AC-1370の人白血球貪食能および殺菌能に対する効果について

天野正道・山本省一・斎藤典章・鈴木　学・田中啓幹
川崎医科大学泌尿器科
(主任：田中啓幹教授)

要　旨

新cephalosporin系抗生物質AC-1370の人白血球貪食能と殺菌能への影響を *in vitro* で正常人と腎盂腎炎症例白血球について0.01～100 mcg/mlの濃度で検討した。貪食能は臨床分離 *St. aureus* を^{3}H-lysineで標識し，30分間反応させliquid scintillation counterで求めた。殺菌能は同一菌株を標識せず使用し，3時間反応後の残存生菌数を求め峯の方式で判定した。

1）貪食能は正常人と腎盂腎炎白血球共，濃度に比例して亢進し，両者は類似した成績であった。各々のpeak値はcontrol値（濃度0）に比し正常では約3倍，腎盂腎炎症例では約2倍の値を示した。

2）殺菌能も，正常人，腎盂腎炎症例白血球共に濃度に比例して亢進し，peak値は正常人で0.457，腎盂腎炎症例で0.560であった。

3）AC-1370に関する今回の成績と8種の抗生物質と4種の抗菌剤のそれとを比較すると，貪食能に関しては正常人における亢進作用は一番優れ，腎盂腎炎症例では中等度であった。殺菌能については正常人と腎盂腎炎症例共に亢進し，他剤の中にあって3～4位に相当する成績がみられた。

はじめに

抗生物質が感染症の治療に果す役割は大きく高く評価されているが，抗生物質を化学物質と考えれば生体の感染防御反応に影響を与え，防御能を低下させる可能性があり，前もって検討しておくことは臨床上有意義な点と考える。

新しく開発されたcephalosporin系抗生物質AC-1370は開発段階で生体の感染防御能を亢進させる作用があることが発見された[1]。感染防御能に関して他の研究者による追試がなされているが，著者らも既に報告している方法に準じてAC-1370の白血球機能への影響を *in vitro* で正常人と腎盂腎炎症例白血球を用いて実験を行ったので，その成績と他の抗生物質の結果と比較検討し，若干の文献的考察を加えて報告する。

I．実験方法

1．AC-1370の人白血球貪食能への影響

1）^{3}H-Lysineによる細菌の標識

臨床分離株 *St. aureus*（AC-1370に対するMICは800 mcg/ml以上）と^{3}H-lysine 1 mCiをbrain heart infusion 250 mlに加え，37℃，21時間振盪温置した。培養中アミノ酸であるlysineは菌内に取り込まれ細菌が標識された。

2）標識細菌浮遊液作製

上記培養液を2,000 gで15分間遠心し，上澄液を除去した。生理的食塩水で2回洗浄し，標識に関与しなかった^{3}H-lysineを除去した。最終的に生食30mlに浮遊させ，4℃に保管した。菌数5×10^{8}/ml，放射能1.08×10^{6}dpm/ml。

3）白血球浮遊液作製

正常人と複雑性腎盂腎炎患者の肘静脈より20ml採血し，6％dextran 5mlを注射器内に吸引，混合，静置した。分離血漿の倍量の0.87％ NH_4Cl溶液を注入した遠心管に血漿を移し，200 gで5分間遠心し，上澄を除去し，沈降した白血球塊にpH7.2のHank's balance salt solution（以下HBSSと略す）を加え2回洗浄し，チュルク液にて好中球数をcountし，0.5％トリパンブルー液にて生存率を測定した。最終的に生存成熟好中球を2.3×10^{6}/ml含むようにHBSSで濃度調節し実験に供した。

4）分注

細菌浮遊液	0.02ml
白血球浮遊液	0.5ml
25％opsonin加HBSS	0.4ml
HBSS with AC-1370	0.1ml

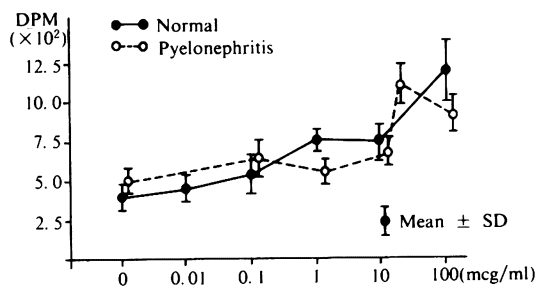
分注後の試験管内AC-1370濃度を検定濃度とし，0.01

Table 1 Effect of AC-1370 on phagocytosis in normal and pyelonephritis

Dilution (mcg/ml)	0	0.01	0.1	1	10	25	100
Normal	406 ± 83 (1.00)	450 ± 74 (1.11)	539 ± 104 (1.33)	752 ± 56 (1.85)	743 ± 134 (1.83)	–	1,189 ± 193 (2.93)
Pyelonephritis	499 ± 45 (1.00)	–	579 ± 78 (1.16)	474 ± 75 (0.95)	605 ± 78 (1.21)	1,033 ± 113 (2.07)	882 ± 110 (1.76)

Mean ± SD
( ) : Each dilution/Control (dilution 0 mcg/ml)

Fig. 1 Effect of AC-1370 on phagocytosis in normal and pyelonephritis



～100mcg/mlについて検べた。試験管は内面をシリコンでcoatingしたものを使用した。

5）反応・算出

分注後の各試験管を37℃，30分間振盪温置後，冷HBSSを加え反応を停止した。HBSSにて2回洗浄し，HBSS 0.5mlに再浮遊させ，0.1mlにAquasol 8mlを加えliquid scintillation counterで算出した。

2．AC-1370の人白血球殺菌能への影響

1）細菌浮遊液作製

臨床分離*St. aureus*（1.の貪食能で使用したものと同一の菌株）を普通寒天培地で24時間増菌培養し，リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浮遊し，菌数5×10^8/mlに調節した。

2）白血球浮遊液作製・分注

上記貪食能の項で記述したと同様な方法で白血球浮遊液を作製し，分注した。

3）反応

分注後の各試験管を37℃で3時間振盪温置し，反応後の液0.1mlを蒸留水9.9mlに加え白血球を破壊し，白血球内に取り込まれながら殺菌されていない菌を遊離し，各試験管内の残存生菌数を菌数計算した。

4）判定

下記の峯[2]の方法で行った。

$$K=\log\left(\frac{a\cdot p}{b\cdot c}\right)$$

p：好中球＋細菌
a：AC-1370＋細菌
b：好中球＋AC-1370＋細菌
c：細菌

判定はK値が正の値の時亢進，負の値の時抑制とし，数値が大きい時その程度が強いものとした。

II. 実 験 成 績

1．AC-1370の人白血球貪食能への影響

正常人白血球では濃度に比例して貪食能は亢進し，最大値は100 mcg/mlの1,189±193DPMで，control（濃度0）値406±83DPMの約3倍であった。腎盂腎炎患者白血球でも濃度と貪食能は比例し，peak値は25mcg/mlで1,033±113DPMの値で，control値499±45DPMに対して約2倍であった(Table 1，Fig. 1)。

2．AC-1370の人白血球殺菌能への影響

正常人白血球では検討した各濃度共正の値で，AC-1370によって殺菌能は亢進した。また，濃度の上昇と共にK値は増加し，100 mcg/mlでは0.457であった。腎盂腎炎患者白血球でも各濃度の値は正の値でAC-1370によって殺菌能は亢進し，50mcg/mlでは0.560，100mcg/mlでは0.550と顕著な亢進を認めた(Table 2, Fig. 2)。

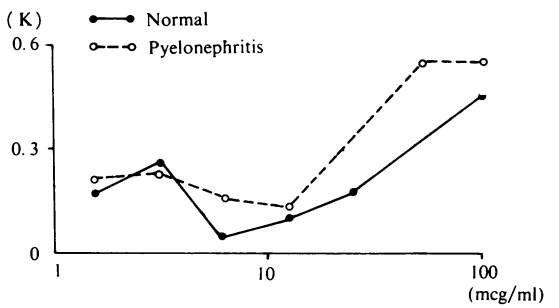
III. 考 按

抗生物質の白血球機能に対する影響をみた研究は，1950年Munoz[3]らはaureomycinについて検討を加え，濃度の上昇と共に貪食率が低下した成績を報告した。1952年土屋[4]は追試し同様な成績を報告すると共に，臨床上aureomycinによって白血球貪食能が低下する可能性を指摘した。1945年Hager[5]はPcG，TC，SMをとりあげ，PcGは貪食能への影響は小さく，TCとSMで貪食

Table 2 Effect of AC-1370 on bactericidal activity in normal and pyelonephritis

Dilution (mcg/ml)	1.57	3.13	6.25	12.5	25	50	100
Normal	0.178	0.262	0.054	0.104	0.176	–	0.457
Pyelonephritis	0.193	0.258	0.153	0.118	–	0.560	0.550

Fig. 2 Effects of AC-1370 on bactericidal activity in normal and pyelonephritis



能亢進作用を認めている。1966年 Seneca[6]は12種の抗生物質と3種の抗菌剤の貪食能への影響を検討し，多くの薬剤で貪食能の低下を認め，高濃度で低下が顕著であったと述べている。1974年峯[2]は CBPC, GM および PL-B の殺菌能への影響を検討し，CBPC では 1/4MIC の濃度で殺菌能は亢進し，GM は殺菌能に影響を与えず，PL-B では 1 MIC の濃度で亢進をみている。1972年堀[7]は NBT テストで CP の殺菌能への影響を検べ，動物実験で白血球機能不全状態が惹起され，抗生物質の白血球機能への影響が大きいことを警告した。1972年大田黒[8]は NBT テストを小児正常人群と長期化学療法実施群で実施し，後者が前者に比し有意に低く，臨床上抗生物質が白血球機能を低下さすことを示した。以上の報告にみられるように，抗生物質が白血球機能を低下さすことを示唆する論文は散見されたか，検討された薬剤，濃度も限定されたものてあり，実施された白血球機能検査法も異なり，抗生物質の白血球機能への影響を薬剤間で比較することはできなかった。

1974年より著者らは抗生物質の白血球機能への影響をみた研究結果から，CBPC, CER, ABPC, TC, GM, KM, PRM, CP, NA, PA, PPA および SMZ の12薬剤，各々6濃度 (0.02～2,000mcg/ml) について *in vitro* で正常人と腎盂腎炎症例白血球について貪食能と殺菌能を検討し，その成績は既に報告している[9~12]。成績の詳細は，AC-1370 との比較の項で述べるが，多数の薬剤か白血球機能を抑制し，少数の薬剤が亢進させた。正常人と腎盂腎炎症例で異なる成績もあり，この研究は実際に抗生物質が投与される感染症患者白血球を用いて検べる意義を認めた。

抗生物質の白血球機能への影響を検べた文献や著者の成績より，抗生物質の開発に際し感染防御能への影響を考慮し，防御能を高める薬剤が望ましいと考えた。AC-1370 は著者らの希望を適えてくれた抗生物質で，他の研究者[1]によっても好中球，マクロファージの機能を亢進させる作用が実証され，実験的感染症での検討においても認められている。臨床治験において AC-1370 は他の第三世代の cephem 剤に比して抗菌力が弱いにもかかわらず，同等あるいはそれ以上の臨床的効果が得られたのも AC-1370 の生体感染防御能を高める作用が寄与しているためと理解されている。

AC-1370に関する今回の成績を著者らが過去に検討した薬剤のそれと比較検討した。AC-1370以外の薬剤における検査法の詳細は原著[9,10]に譲るが，異なる点を簡単に記述すると，貪食能に関しては *St. aureus* 209P株を被貪食物として使用，貪食能の判定は白血球1個あたりに取り込まれた細菌数を鏡検で求めた。殺菌能では被貪食物として *Ps. aeruginosa* NCTC10490 株を使用した以外は同じ実験法である。

貪食能に関する比較は下記基準で各値を模式化することで行った。濃度 0 の control の値を100%とし，各濃度の値を%で置き換え下記の方式で，矢印上向きを亢進，下向きを低下として表示した。

→ : 0%～± 9%
↑, ↓ : ±10%～±29%
↑↑, ↓↓ : ±30%～±49%
↑↑↑, ↓↓↓ : ±50%～

正常人白血球貪食能については AC-1370 の亢進は顕著で，他の12薬剤に比し最も優れていた。他剤では PPA と PA で軽度の亢進が認められ，CBPC と CP で中等度の低下がみられた (Table 3)。腎盂腎炎症例白血球貪食能では AC-1370 の亢進作用は他剤と比し中等度で，他剤では NA と SMZ で中等度の亢進を示し，CBPC, CER, GM および CP で中等度の低下を認めた (Table 4)。

Table 3 Schematic representation of effect of chemotherapeutic agents on phagocytosis in normal

Chemotherapeutic agents	Dilution (mcg/ml)									
	0.01	0.02	0.1	0.2	1	2	10	20	100	200
AC-1370	↑		↑↑		↑↑↑		↑↑↑		↑↑↑	
CBPC		↓		↓		↓↓		↓↓		↓↓↓
CER		→		→		→		↓		↓↓
ABPC				↓		↓↓		→		↓
TC		→		→		→		→		↓↓
GM						↑		↑↑		↓
KM				↓		↓		↑↑		↑
PRM		↑↑↑		↑↑		→		→		→
CP		→		↓		↓		↓↓		↓↓
NA		↑		↓		→		→		↓
PPA		↑		↑		↑		↑		↑
PA		↑		↑		↑		↑		↑
SMZ				→		↓		↓↓		↑

Table 4 Schematic representation of effect of chemotherapeutic agents on phagocytosis in pyelonephritis

Chemotherapeutic agents	Dilution (mcg/ml)							
	0.1	0.2	1	2	12.5	20	100	200
AC-1370	↑		→		↑		↑↑↑	
CBPC		↓		→		↓		↓↓
CER		↓		↓		↓		↓↓↓
ABPC		→		→		↓		↑
TC		↓		↓		↓		↓
GM		→		↓↓		↓↓		↓
KM		↓		↓		→		
PRM		↓		↑↑		→		↓↓↓
CP		↓		↓		↓↓		↓↓
NA		↑		→		→		↑
SMZ		→		→		↑↑		↑

殺菌能についてはK値を下記の基準で模式化し薬剤間の影響を比較した。矢印上向きを亢進，下向きを低下とした。

→ : 0～±0.09
↑，↓ : ±0.10～±0.24
↑↑，↓↓ : ±0.25～±0.49
↑↑↑，↓↓↓ : ±0.50～

正常人白血球殺菌能に対する抗生物質の影響で，AC-1370の亢進作用は中等度で，CER, PRM, KMに続く成績であった。他剤ではABPCとNAで中等度の低下を認めた（Table 5）。腎盂腎炎症例白血球殺菌能についてAC-1370の亢進は中等度で，CP, ABPCに続くものであった。他剤ではTC, PRMとSMZで軽度の亢進を認め，NAで顕著な低下がみられた(Table 6)。

AC-1370は白血球機能を亢進させる作用があり，抗菌力と共に働いて臨床的効果の向上が期待される。特に白

Table 5 Schematic representation of effect of chemotherapeutic agents on bactericidal activity in normal

Chemotherapeutic agents	Dilution (mcg/ml)					
	0.2	1.57	2	3.13	20	100
AC-1370		↑		↑↑		↑↑
CBPC	↑		↓		↑	
CER	↑↑		↑↑↑		↑↑↑	
ABPC	↓		→		↓↓↓	
TC	→		→		↓	
GM	↓		↓↓			
KM	↑↑		↑		↑↑	
PRM	↑↑↑		↑↑		↑↑	
CP	↓↓↓		↓↓		↓	
NA	↓		↓↓		↓↓	
PPA	→		↓↓			
PA	↓↓↓		↓		↑	
SMZ	→		↓		↑↑	

Table 6 Schematic representation of effect of chemotherapeutic agents on bactericidal activity in pyelonephritis

Chemotherapeutic agents	Dilution (mcg/ml)					
	0.2	1.57	2	3.13	20	100
AC-1370		↑		↑↑		↑↑↑
CBPC	↑		→			
CER	↓↓		↑↑		→	
ABPC	↑↑		↑↑		↑↑↑	
TC	↑		↑↑		↑	
GM	↑↑↑		→			
KM	→		↑		↓	
PRM	↑↑		↑		↑	
CP	↑↑↑		↑↑↑		↑↑↑	
NA	↓↓↓		↓↓↓		↓↓↓	
SMZ	↑↑		↑		→	

血球機能を低下させる抗癌剤，ステロイド剤や一部の抗生物質の使用時，糖尿病，担癌患者，カテーテル留置患者および腎不全症例などの時には，AC-1370は第一に使用を考慮すべき薬剤と考える。

（本論文の要旨は第31回日本化学療法学会総会で口演した）

文　献

1）第31回日本化学療法学会総会：新薬シンポジウムII。AC-1370，大阪，1983
2）峯　端弘：多形核好中球における *Pseudomonas aeruginosa* の貪食殺菌効果と抗生物質の作用。Chemotherapy 22：247～251，1974
3）MUNOZ, J. & R. GEISTEN : Inhibition of phagocytosis by aureomycin. Proc. Soc. Exp. Bio. and Med. 75 : 367～370, 1950
4）土屋英一：Aureomycinの血液白血球の貪食能に及ぼす影響について。J. Antibiot. 8：460，1952
5）HAGER, H. & H. STICKL : Antibiotica und Phagocitose. Zeitschrft. J. Kinderheik. 79 : 21, 1957
6）SENECA, H. : Effect of antibacterials, antibiotics, enzyme and steroid on phagocytosis. J. Amer. Geriatris. Society 14 : 187～199, 1966
7）堀　　誠：抗生物質が免疫に及ぼす影響。第89回成医会総会，1972
8）大田黒和生，鈴江美都，近藤　賢：小児尿路感染症と白血球機能，殊にNBTテストについて。臨泌：特71～特75，1972
9）天野正道：尿路感染症における白血球機能（特に腎盂腎炎について）第2報　人白血球貪食能に及ぼす化学療法剤の影響について。西日泌尿 38：319～335，1976
10）天野正道：尿路感染症における白血球機能（特に腎盂腎炎について）第3報　人白血球殺菌能に及ぼす化学療法剤の影響について。西日泌尿 39：213～228，1977
11）天野正道，田中啓幹：尿路感染症と白血球機能（特に腎盂腎炎について）第4報　化学療法剤存在下の人白血球貪食能にあたえるLysozymeの影響について。西日泌尿 40：352～359，1978
12）天野正道：尿路感染症と白血球機能。西日泌尿 45：15～24，1983

EFFECT OF AC-1370 ON PHAGOCYTOSIS AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF HUMAN LEUCOCYTES IN NORMAL SUBJECTS AND CASES WITH PYELONEPHRITIS

MASAMICHI AMANO, SHOICHI YAMAMOTO, NORIAKI SAITO,
MANABU SUZUKI and HIROYOSHI TANAKA
Department of Urology, Kawasaki Medical School
(Director: Prof. H. TANAKA)

A series of experiments on neutrophilic phagocytosis and bactericidal activity of bacteria was performed on normal subjects and patients with secondary pyelonephritis for the purpose of studing effects of AC-1370, a new cephalosporin, on human leucocyte functions. Organisms used in this study were *Staphylococcus aureus* labeled with ^{3}H-lysine. Concentrations of AC-1370 were ranged from 100 mcg/ml to 0.01 mcg/ml.

The results obtained could be summarized as below.

1. Phagocytosis of normal subjects and pyelonephritis patients was markedly enhanced in proportion to the concentration of AC-1370, of which maximum effect was observed in normal subjects about three times in comparison with that of controls ungiven AC-1370 and also observed in the patients with pyelonephritis about two times.

2. Bactericidal activity was moderately accelerated by the same proportion, of which maximum activity by Mine's criterion was obtained 0.457 in normal subjects and 0.560 in the patients with pyelonephritis.

3. Attributing to our data reported in the series of 12 kinds of antibiotics on phagocytosis and bactericidal activity of human leucocytes, most of antibiotics suppressed them, a few of them enhanced. In the antibiotics studied, AC-1370 made the phagocytosis enhanced markedly in the normal subjects and moderately in the phagocytosis in pyelonephritis patients, it made the bactericidal activity accelerated modelately in both the normal and pyelonephritic subjects.

4. Studies of AC-1370 on the antimicrobial activity and natural defense mechanism of the host against infections may contribute to our choice of antibiotic therapy.