

AC-1370の宿主感染防御能に対する作用の解析 (第1報)

大西治夫・小雀浩司・稲場 均・望月英典・長尾祐二

持田製薬株式会社富士中央研究所

藤井良知

帝京大学医学部小児科

要 旨

新規半合成セファロsporin AC-1370の宿主感染防御能に対する作用とその機序について検討した。AC-1370は溶血斑形成細胞数および遅延型過敏症反応に影響を与えなかったが、マクロファージおよび好中球貪食能を *in vivo*, *in vitro* いずれにおいても増強した。一方、他のβ-ラクタム剤はこれらの宿主感染防御能に影響を与えないかあるいは逆に抑制した。AC-1370の標的細胞を解析すると、そのほとんどがマクロファージであり、好中球への親和性は見られなかった。マクロファージ培養上清は好中球貪食能賦活作用を示し、AC-1370刺激マクロファージの培養上清はさらに強い作用を示した。これらの培養上清による作用はいずれも培養上清を56°C、30分処理しても残存したが、トリプシン処理により消失した。以上の結果から、AC-1370は体液性および細胞性免疫能には影響を与えることなく食細胞機能を賦活し、その作用はAC-1370のマクロファージに対する直接作用と、マクロファージの産生する蛋白質因子を介した好中球に対する間接的な作用とから成るものと思われた。

序 文

1-[(6R, 7R)-2-carboxy-7-[(R)-(2-(5-carboxy-1H-imidazole-4-carboxamido)-2-phenyl)acetamido]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo(4.2.0)oct-2-en-3-yl)methyl-4-(2-sulfoethyl)pyridinium hydroxide, inner salt, monosodium salt (AC-1370)はグラム陽性菌および緑膿菌を含むグラム陰性菌に幅広い抗菌作用を示し、実験的感染症に対してもすぐれた治療作用を有する新規半合成セフェム系抗生物質であり、*in vitro* より *in vivo* において強い作用を示すといわれている^{1,2)}。本剤はまた、食細胞機能賦活作用を有する³⁾ことから、宿主感染防御能を介しても治療効果を示すことが期待されている。そこで、本剤の宿主感染防御能賦活作用のメカニズムを解明する目的で、AC-1370の標的細胞の解析を行った。

I. 材料および方法

1. 薬物

AC-1370 (味の素), carbenicillin (CBPC, 藤沢薬品工業), cefazolin (CEZ, 藤沢薬品工業), cefuroxime (CXM, 新日本実業), cefsulodin (CFS, 武田薬品工業),

cefoperazone (CPZ, 富山化学工業), cefotaxime (CTX, ヘキストジャパン), ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品工業) および latamoxef (LMOX, 塩野義製薬) を、動物に静注する場合は生理食塩液に溶解して用いた。

2. 動物

6週齢の雄 ddY および ICR マウス (静岡実験動物農業協同組合) を用いた。

3. Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 AC-1370 抗体

近藤らの方法⁴⁾に従い、AC-1370-ヒト血清アルブミン結合物およびAC-1370-ウシガンマグロブリン結合物を調製した。AC-1370-ヒト血清アルブミン結合物を等量のプロイント完全アジュバントと共に乳化させ、毎週1回の割合で6週間家兔に筋注し抗血清を得た。Ovaryの方法⁵⁾に従い、この抗血清の受身皮膚アナフィラキシータイター (PCA titer) を、AC-1370-ウシガンマグロブリン結合物を抗原として用いて測定したところ、512であった。なお、この抗血清とウシガンマグロブリンの交叉性は認められなかった。抗血清をさらに Zan-Barらの方法⁶⁾に従い精製し、IgGフラクションとして得た。こうして得られたIgGフラクションとFITCをCebra

and Goldsteinの方法⁷⁾に従い反応させて、FITC 標識抗 AC-1370 抗体を得た。

4. 感染防御能におよぼす影響

1) 溶血斑形成細胞数 (PFC)

ddY マウスにヒツジ赤血球(SRBC) 10^8 個を静注し、1 時間後薬物 1, 10もしくは 100 mg/kg を静注した。4 日後脾細胞を採取し、Cunningham and Szenbergの方法⁸⁾に従って、SRBC およびモルモット補体と共にカニングラムチャンバー中でインキュベイトした後、PFC を計数した。

2) 遅延型過敏症反応 (DTH)

ddY マウスの腹部を剃毛した後、7%塩化ピクリルエタノール溶液 0.5ml を塗布し、1 時間後薬物 1, 10もしくは 100mg/kg を静注した。7 日後耳厚を計測した後、1%塩化ピクリルオリブ油溶液 0.1ml を耳朶に再塗布した。再塗布 2 日後再び耳厚を計測し、再塗布による耳厚の増加量を算出した⁹⁾。

3) マクロファージ貪食能

ICR マウスに薬物 1, 10もしくは 100 mg/kg を静注し、24時間後腹腔細胞を採取した¹⁰⁾。腹腔細胞 10^6 個をイーグル最小基本培地 (MEM, 日本製薬) 5ml に浮遊させた後、60mmφ プラスチックシャーレ上で、37°C, 30分間培養した。ついでシャーレを同培地で洗浄して非付着細胞を除去し、付着細胞をマクロファージとした。マクロファージに10%ウシ胎仔血清(FCS)添加 MEM 5ml を加え、20時間培養した後、培地を SRBC 10^7 個/ml を含む 10%FCS 添加 MEM に替え、さらに 2 時間培養した。メタノール固定、ギムザ染色した後、顕微鏡下でマクロファージ 500 個以上を観察し、SRBC を貪食しているマクロファージ数の全マクロファージ数に対する割合を貪食率として算出した。

また、薬物を投与していない ICR マウスから同様に分離したマクロファージに薬物 10もしくは 100 μ g/ml を含む 10%FCS 添加 MEM を加えて 20 時間培養し、ついで培地を SRBC 10^7 個/ml を含む 10%FCS 添加 MEM に替えてさらに 2 時間培養した後、同様に貪食率を求めた。

4) 好中球貪食能

ICR マウスに薬物 1, 10もしくは 100 mg/kg を静注し、24時間後ヘパリン存在下に末梢血を採取した。血液 1ml に 6%デキストラン添加生理食塩液 0.5ml を加え、室温、1 時間静置して赤血球を沈降させた後、上層を分取し、遠心分離して細胞を集めた。この細胞に 0.75%塩化アンモニウム添加 0.17M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、室温に 3 分間放置して残存赤血球を融解させ、白血球を得た。この白血球を 5×10^6 個/ml となるようにハ

ンクス緩衝液 (HBSS) 0.1ml に浮遊させ、30分間煮沸処理後 20 倍希釈マウス血清中で 37°C, 30 分間インキュベイトしたパン酵母 (和光純薬) $10^7 \times 5 \times 10^7$ 個/ml を含む HBSS 0.1ml を加え、37°C, 30 分間培養した。ついで顕微鏡下で好中球 300 個以上を観察し、酵母を貪食している好中球数の全好中球数に対する割合を貪食率として算出した。

また、健常男子成人の末梢血から同様に分離した白血球を 5×10^6 個/ml となるように、薬物 10もしくは 100 μ g/ml を含む HBSS 0.1ml に浮遊させた。この浮遊液を 37°C で 1 時間培養後、培地を HBSS 0.1ml に替え、30 分間煮沸処理したパン酵母 $10^7 \times 5 \times 10^7$ 個/ml を浮遊させた HBSS 0.1ml と共に、さらに 37°C で 15 分間培養した後、同様に貪食率を求めた。

5. AC-1370 標的細胞の解析

ICR マウスより採取した腹腔細胞 10^7 個を、AC-1370, 1,000 μ g/ml を含む 10%FCS 添加 MEM 1ml に浮遊させ、37°C, 6 時間培養した。ついでその細胞を、0.01M リン酸緩衝食塩液 (pH 7.0, PBS) にて 10 倍に希釈した FITC 標識ウサギ抗 AC-1370 抗体 50 μ l に浮遊させ、4°C, 30 分間インキュベイトして染色した後、fluorescence-activated cell sorter (FACS IV, Becton Dickinson) を用い、染色細胞を AC-1370 標的細胞、非染色細胞を AC-1370 非標的細胞として分取した¹²⁾。各分画細胞および培養前の腹腔細胞の塗抹標本を作成し、顕微鏡下にマクロファージおよび好中球を計数し、各々の細胞の割合を算出した。

6. マクロファージ培養上清の好中球貪食能におよぼす影響

ICR マウス腹腔細胞から前述と同様に分離したマクロファージに AC-1370, 100 μ g/ml を含む 10%FCS 添加 MEM 5ml を加えて 20 時間培養した後、その上清を回収し、Sephadex G-25 カラム (2.6 \times 84cm) にてゲル濾過して AC-1370 を含まない分子量 3,000 以上の画分を集めた。この画分を限外濾過膜 (PM-10, Amicon) を用いて 10 倍に濃縮し、AC-1370 を添加せずにマクロファージを培養した上清より同様に分子量 3,000 以上の画分の 10 倍濃縮液を調製し、対照上清として、さらに、10%FCS 添加 MEM を 37°C, 20 時間インキュベイトした後同様に分子量 3,000 以上の画分の 10 倍濃縮液を調製し、対照培地として用いた。

ICR マウス末梢血より前述と同様に分離した白血球を 5×10^6 個/ml となるよう、各々 AC-1370 刺激上清、対照上清もしくは対照培地を 20% 含む HBSS 1ml に浮遊させ、37°C, 1 時間培養した後、培地を同量の HBSS に交替し、その 0.1ml を採取した。これに煮沸およびマウス血清処理したパン酵母 5×10^7 個/ml を浮遊させた HBSS 0.1ml を加え、37°C で 15 分間培養した後、前述と同

Table 1 Effects of antibiotics on host defense mechanism

Drug	Dose (mg/kg)	Humoral immunity ^{a)}	Cellular immunity ^{b)}	Macrophage function ^{c)}	Neutrophil function ^{c)}
Control		403 ± 29	2.9 ± 0.2	14.6 ± 2.0	36.6 ± 1.5
AC-1370	1	419 ± 27	3.1 ± 0.2	15.4 ± 2.0	36.9 ± 1.0
	10	441 ± 28	3.2 ± 0.3	21.7 ± 1.4*	42.6 ± 1.2*
	100	397 ± 28	3.0 ± 0.3	19.6 ± 2.2*	39.7 ± 0.8*
CPZ	1	412 ± 27	2.8 ± 0.3	15.0 ± 3.4	36.7 ± 1.6
	10	381 ± 27	2.6 ± 0.3	15.4 ± 2.5	37.2 ± 2.5
	100	308 ± 23*	2.3 ± 0.2*	8.0 ± 2.0*	29.9 ± 1.9
CBPC	1	400 ± 10	3.1 ± 0.3	14.4 ± 1.1	37.1 ± 1.9
	10	402 ± 23	3.1 ± 0.3	14.1 ± 1.2	38.5 ± 3.7
	100	389 ± 18	3.0 ± 0.2	14.9 ± 0.8	35.3 ± 2.4
CFS	100	361 ± 27	2.9 ± 0.3	14.4 ± 1.0	35.8 ± 1.8

Results are given as means ± s.e. of 5 or 6 mice

a) : PFC/ 10^6 spleen cells, b) : ear swellings in 10^{-3} cm, c) : % phagocytosis

* : $p < 0.05$

様にして好中球の貪食率を求めた。

また、AC-1370 刺激上清、対照上清および対照培地を 56°C 、30分間インキュベイトした後、HBSSを加えてそれぞれの濃度が20%となるように調製した液を用いて、前述の白血球を同様に処理し、好中球の貪食率を求めた。

さらに、0.5N 水酸化ナトリウムを用いて pH8.0 に調整した AC-1370 刺激上清、対照上清もしくは対照培地 1ml に、トリプシン (フナコシ薬品) $500\mu\text{g}$ を含む PBS $25\mu\text{l}$ を加えて 37°C 、2時間、さらにトリプシン溶液 $25\mu\text{l}$ を追加して2時間インキュベイトした後、HBSSを加えてそれぞれの濃度が20%となるように調製した液を用いて、前述の白血球を同様に処理し、好中球の貪食率を求めた。

II. 成績

1. 感染防御能におよぼす影響

1) 溶血斑形成細胞数 (PFC)

Table 1 に示すように、AC-1370, 1, 10 および 100 mg/kg 投与群の PFC は、各々 419 ± 27 , 441 ± 28 および 397 ± 28 個/ 10^6 脾細胞であり、対照群の 403 ± 29 個/ 10^6 脾細胞と同程度であった。また、CBPC および CFS 投与群においても PFC の変動は認められなかった。一方、CPZ 100mg/kg 投与群の PFC は 308 ± 23 個/ 10^6 脾細胞であり、対照群のそれに比し、有意に低下した ($p < 0.05$)。

2) 遅延型過敏症反応 (DTH)

Table 1 に示すように、AC-1370, 1, 10 および 100

mg/kg 投与群の耳厚増加量は、各々 3.1 ± 0.2 , 3.2 ± 0.3 および $3.0 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ cm であり、対照群の $2.9 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ cm と同程度であった。また、CBPC および CFS 投与群においても耳厚増加量の変動は認められなかった。一方、CPZ 100 mg/kg 投与群の耳厚増加量は $2.3 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ cm であり、対照群のそれに比し、有意に低下した ($p < 0.05$)。

3) マクロファージ貪食能

Table 1 に示すように、AC-1370, 1, 10 および 100 mg/kg 投与群の貪食率は、各々 15.4 ± 2.0 , 21.7 ± 1.4 および $19.6 \pm 2.2\%$ であり、対照群の貪食率 $14.6 \pm 2.0\%$ に比べ、AC-1370, 10 および 100 mg/kg 投与群のそれは有意に高かった (いずれも $p < 0.05$)。一方、CBPC および CFS 投与群においては貪食率の変動は認められず、CPZ 100 mg/kg 投与群においては $8.0 \pm 2.0\%$ と、有意に低下した ($p < 0.05$)。

また、Table 2 に示すように、AC-1370, 10 および 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加培養後の貪食率は、各々 16.0 ± 1.2 および $17.6 \pm 1.1\%$ であり、対照の貪食率 $13.9 \pm 1.1\%$ に比べ、AC-1370, 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加時のそれは有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、CBPC および CFS 添加においては貪食率の変動は認められず、CPZ 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加では $9.0 \pm 0.6\%$ と、貪食率は有意に低下した ($p < 0.01$)。

4) 好中球貪食能

Table 1 に示すように、AC-1370, 1, 10 および 100 mg/kg 投与群の貪食率は、各々 36.9 ± 1.0 , 42.6 ± 1.2 お

よび39.7±0.8%であり、対照群の食食率36.6±1.5%に比べ、AC-1370, 10および100 mg/kg 投与群のそれは有意に高かった($p < 0.05$)。一方、CBPCおよびCFS投与群においては食食率の変動は認められず、CPZ100 mg/kg 投与群では29.9±1.9%と、食食率が低下する傾向を

示した。

また、Table 2に示すように、AC-1370, 10および100 $\mu\text{g/ml}$ 添加培養後の食食率は各々20.9±2.0および27.5±1.6%であり、対照の食食率20.7±1.6%に比べ、AC-1370, 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加時のそれは有意に高かった($p < 0.05$)。一方、CPZ, CBPC およびCFS 添加では食食率の変動は認められなかった。

2. AC-1370 標的細胞の解析

Table 3に示すように、分画前のマウス腹腔細胞中のマクロファージおよび好中球の割合は32.4±0.6および3.6±0.6%であった。AC-1370 標的細胞画分中のマクロファージおよび好中球の割合は92.9±3.4および4.7±2.3%であり、分画前のそれに比べ、マクロファージの割合が増加していた。一方、AC-1370 非標的細胞画分中のマクロファージおよび好中球の割合は24.8±2.8および

Table 2 Effects of antibiotics on phagocytic functions *in vitro*

Drug	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Macrophage function ^{a)}	Neutrophil function ^{a)}
Control		13.9 ± 1.1	20.7 ± 1.6
AC-1370	10	16.0 ± 1.2	20.9 ± 2.0
	100	17.6 ± 1.1*	27.5 ± 1.6*
CPZ	10	13.5 ± 1.4	18.9 ± 1.5
	100	9.0 ± 0.6**	18.7 ± 1.8
CBPC	10	14.5 ± 1.5	19.5 ± 0.9
	100	11.6 ± 0.6	18.6 ± 1.5
CFS	100	—	20.3 ± 0.8
CXM	100	—	21.8 ± 1.6
CEZ	100	—	18.5 ± 1.1
CTX	100	—	19.6 ± 1.4
CZX	100	—	19.6 ± 0.9
LMOX	100	—	18.6 ± 0.6

Results are given as means ± s.e. of 5 or 6 tests

a) : % phagocytosis

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

Table 3 Macrophages and neutrophils binding AC-1370 in mouse peritoneal cells

	Macrophages	Neutrophils
Mouse peritoneal cells	32.4 ± 0.6	3.6 ± 0.6
Cells binding AC-1370	92.9 ± 3.4	4.7 ± 2.3
Cells not binding AC-1370	24.8 ± 2.8	3.7 ± 0.6

Results are given as means ± s.e. (%) of 3 tests

Table 4 Effects of conditioned medium of AC-1370-stimulated macrophages on mouse neutrophil function

	Neutrophil function ^{a)}		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
Control medium	48.2 ± 1.6	48.5 ± 1.5	47.9 ± 3.0
Control supernatant	53.2 ± 1.0*	53.9 ± 1.2*	52.6 ± 1.7
AC-1370-stimulated supernatant	57.9 ± 1.1**††	57.3 ± 1.5**	58.5 ± 1.7*
Heat-treated control medium	—	45.5 ± 2.5	—
Heat-treated control supernatant	—	54.7 ± 1.5 [#]	—
Heat-treated AC-1370-stimulated supernatant	—	57.3 ± 1.2 ^{##}	—
Trypsin-treated control medium	—	—	49.6 ± 1.6
Trypsin-treated control supernatant	—	—	50.0 ± 3.5
Trypsin-treated AC-1370-stimulated supernatant	—	—	50.5 ± 2.2

Results are given as means ± s.e. of 5 tests a) : % phagocytosis

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, compared with control medium

†† : $p < 0.01$, compared with control supernatant

[#] : $p < 0.05$, ^{##} : $p < 0.01$, compared with heat-treated control medium

3.7±0.6%であり、分画前のそれに比べ、マクロファージの割合が減少していた。

3. マクロファージ培養上清の好中球貪食能におよぼす影響

Table 4(Experiment 1)に示すように、対照上清添加好中球の貪食率は53.2±1.0%であり、対照培地添加培養時の48.2±1.6%に比べ、有意に高かった($p < 0.05$)。一方、AC-1370刺激上清添加培養時の貪食率は57.9±1.1%であり、対照上清添加培養時のそれに比べ、有意に高かった($p < 0.01$)。

また、Table 4 (Experiment 2)に示すように、加熱処理対照上清添加好中球の貪食率は54.7±1.5%であり、加熱処理対照培地添加培養時の45.5±2.5%に比べ、有意に高く($p < 0.05$)、この値は未処理対照上清添加培養時の貪食率と同程度であった。一方、加熱処理 AC-1370 刺激上清添加培養時の貪食率は57.3±1.2%であり、加熱処理対照上清添加培養時のそれと比べても高く、この値は未処理 AC-1370 刺激上清添加培養時の貪食率と同程度であった。

さらに、Table 4 (Experiment 3)に示すように、トリプシン処理対照上清添加培養好中球の貪食率は50.0±3.5%であり、トリプシン処理対照培地添加培養時の49.6±1.6%と同程度であった。なお、この値は未処理対照上清添加培養時の52.6±1.7%に比べ、低かった。一方、トリプシン処理 AC-1370 刺激上清添加培養好中球の貪食率は50.5±2.2%であり、トリプシン処理対照培地あるいはトリプシン処理対照上清添加培養時のそれと同程度であった。なお、この値は未処理対照上清あるいは未処理 AC-1370 刺激上清添加培養時の52.6±1.7および58.5±1.7%に比べ、低かった。

III. 考 察

生体内への微生物の侵入に対し、宿主は食細胞による食菌、殺菌あるいは抗体によるオプソニン化などの感染防御能によって微生物を排除¹³⁻²⁰⁾、容易に感染症にかかることはない。生体における宿主感染防御能の重要性はセラチアや緑膿菌などによる日和見感染が免疫能の低下した宿主にしばしば見られる^{13,21-24)}ことから推察される。このような観点から、感染症の治療に、従来の化学療法に加えて、食細胞機能や免疫能などの宿主感染防御能を賦活する方法の適用が考えられている。一方、AC-1370は幅広い抗菌スペクトルを有し^{1,2)}、かつ食細胞機能賦活作用をも併せ持つ³⁾ことから、直接的な抗菌力だけでなく、宿主感染防御能を介しても感染治療効果を示すことが期待されている。しかしながら、AC-1370の免疫系に対する作用に関しては報告がなく、また食細胞機能

賦活作用のメカニズムも明らかにされていない。そこで今回、AC-1370の抗体産生を指標にして体液性免疫能、遅延型過敏症反応を指標にして細胞性免疫能および貪食能を指標にして食細胞機能に対する作用を検索し、併せて食細胞機能賦活作用のメカニズムの解析を試みた。

AC-1370はPFCおよび遅延型過敏反応にほとんど影響を与えなかったが、マクロファージおよび好中球の貪食能を亢進させた。この食細胞貪食能の亢進は薬物を*in vitro*において作用させた場合にも認められた。一方、CBPCおよびCFSはこれらの宿主感染防御能に対して影響を与えず、CPZはこれらの諸機能を抑制した。以上の結果から、AC-1370は免疫系、特にリンパ球系には作用せず、食細胞に選択的に作用し、その貪食能を賦活するものと考えられた。また、その作用はβ-ラクタム剤に普遍的なものではなく、特定の化学構造を必要とするものと思われた。

次に、この食細胞貪食能賦活作用が、AC-1370がマクロファージおよび好中球に直接作用した結果であるか否かを検討するため、AC-1370の標的細胞を解析した。AC-1370を加えて培養したマウス腹腔細胞をFITC標識抗AC-1370抗体で蛍光染色し、AC-1370標的細胞と非標的細胞とに分画すると、AC-1370標的細胞の組成は、そのほとんどがマクロファージであり、AC-1370非標的細胞中のマクロファージの割合は未分画腹腔細胞中のそれより減少していた。このことは、AC-1370が標的とする細胞は主としてマクロファージであり、AC-1370によるマクロファージ貪食能賦活作用はAC-1370がマクロファージに直接作用した結果であると思われた。一方、AC-1370標的細胞中の好中球の割合は未分画腹腔細胞およびAC-1370非標的細胞中のそれと差がなかった。したがって、AC-1370による好中球貪食能賦活作用はAC-1370が好中球に直接作用したことによるものではないように思われた。

一方、マクロファージをはじめ単球系の細胞は各種の液性因子を放出し、それらの因子には好中球機能を増強するものもあることが知られている²⁵⁻²⁷⁾。そこで、AC-1370の好中球に対する作用が単球系細胞を介した作用であろうとの観点から、マクロファージの好中球賦活因子産生に対するAC-1370の作用を検討した。マクロファージ培養上清(対照上清)は好中球貪食能を亢進させた。一方、マクロファージにAC-1370を添加して培養した後の上清(AC-1370刺激上清)は好中球貪食能をさらに亢進させた。これらの培養上清の作用は、培養上清を加熱処理しても消失しなかったが、トリプシン処理すると、いずれの活性も消失した。以上の結果から、マクロファージは耐熱性の好中球機能賦活蛋白因子を産生し、AC

-1370はこの因子の産生を促進する作用を有するものと考えられた。また、AC-1370による好中球貪食能の亢進はこの因子を介したものであると思われた。

以上の結果を併せ考えると、AC-1370は体液性および細胞性免疫能に影響を与えることなく食細胞機能を選択的に賦活し、その作用はマクロファージに対する直接作用と、マクロファージの産生する液性因子を介した好中球に対する間接的な作用とから成るものと思われた。

文 献

- 1) ZURENKO, G. E.; G. P. LI, R. J. YANCEY, M. L. KINNEY, K. F. STERN & C. W. FORD: Antibacterial evaluation of U-63, 196E (AC-1370), a new cephalosporin analog. Program Abstr. 22nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 102, 1982
- 2) KATO, N.; Y. SASAKI, Y. YUGARI, H. KOSUZUME, H. INABA, H. OHNISHI, T. MURATA, M. INOUE & S. MITSUHASHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AC-1370, a new third generation cephalosporin. Program Abstr. 22nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 102, 1982
- 3) OHNISHI, H.; H. KOSUZUME, H. INABA, M. OKURA, H. MOCHIZUKI, Y. SUZUKI & R. FUJII: Effects of AC-1370, a new semisynthetic cephalosporin, on phagocyte functions. Antimicrob. Agents Chemother. 23: 874~880, 1983
- 4) KONDOH, M.; O. SHIHO, T. OISHI & K. TSUCHIYA: Immunological specificity of cephacetrile. Chemotherapy 24: 86~93, 1976
- 5) OVARY, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Progr. Allergy 5: 459~508, 1958
- 6) ZAN-BAR, I.; S. STROBER & E. S. VITETTA: The relationship between surface immunoglobulin isotype and immune function of murine B lymphocytes. I. Surface immunoglobulin isotypes on primed B cells in the spleen. J. Exp. Med. 45: 1188~1205, 1977
- 7) CEBRA, J. J. & G. GOLDSTEIN: Chromatographic purification of tetramethylrhodamine-immune globulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit γ -globulin polypeptide chains. J. Immunol. 95: 230~245, 1965
- 8) CUNNINGHAM, A. J. & A. SZENBERG: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology 14: 599~600, 1968
- 9) 夏梅俊之助, 右田俊介: 塩化ピクリルによるマウスの遅延型皮膚反応。免疫実験操作法1972年増補版(日本免疫学会方法小委員会)日本免疫学会, pp. 525~531, 1974
- 10) STUART, A. E.; J. A. HABESHAW & A. E. DAVIDSON: Phagocytosis *in vitro*. Handbook of experimental immunology, 3rd Ed. (WEIR, D. M.), pp. 31. 1~31. 30, Blackwell Scientific Publications (Oxford), 1978
- 11) 木谷信行: 好中球の貪食能。臨床免疫 13 (Suppl. 3): 375~378, 1981
- 12) JONES, P. P.; J. J. CEBRA & L. A. HERZENBERG: Immunoglobulin (Ig) allotype markers on rabbit lymphocytes: separation of cells bearing different allotypes and demonstration of the binding of Ig to lymphoid cell membranes. J. Immunol. 111: 1334~1348, 1973
- 13) NAUTA, E. H.: Infection in the compromised host. Immunological aspects of infectious diseases (DICK, G.), MTP Press (Lancaster), pp. 343~389, 1979
- 14) QUIE, P. G.; J. G. WHITE, B. HOLMES & R. A. GOOD: *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes; diminished activity in chronic glomerulomatous disease of childhood. J. Clin. Invest. 46: 668~678, 1967
- 15) BJORNSON, A. B. & J. G. MICHAEL: Contribution of humoral and cellular factors to the resistance to experimental infection by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. I. Interaction between immunoglobulins, heat-labile serum factors, and phagocyte cells in the killing of bacteria. Infect. Immun. 4: 462~467, 1971
- 16) YOUNG, L. S.: The host humoral and cellular factors. J. Infect. Dis. 130 (Suppl.): S111~S118, 1974
- 17) KETCHEL, S. J. & V. RODRIGUEZ: Acute infections in cancer patients. Semin. Oncol. 5: 167~179, 1978
- 18) SAKAMOTO, M.; S. ISHII, K. NISHIOKA & K. SHIMADA: Complement response after experimental bacterial infection in various nutritional states. Immunology 38: 421~427, 1979
- 19) FUKUTOME, T.; M. MITSUYAMA, K. TAKEYA & K. NOMOTO: The importance of antiserum and phagocytic cells in the protection of mice against infection by *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 119: 225~229, 1980
- 20) KURRLE, E.; S. BHADURI, D. KRIEGER, W. GAUS, H. HEIMPEL, H. PFLIELGER, R. ARNOLD & E. VANEK: Risk factors for infections of the oropharynx and the respiratory tract in patients with acute leukemia. J. Infect. Dis. 144: 128~136, 1981
- 21) KLAINER, A. S. & W. R. BEISEL: Opportunistic infection: a review. Am. J. Med. Sci. 258: 431~456, 1969
- 22) SMITH, H.: Opportunistic infection. Br. Med. J. 2: 107~110, 1973
- 23) SINGER, C.; M. H. KAPLAN & D. ARMSTRONG: Bacteremia and fungemia complicating neoplastic disease. A study of 364 cases. Am. J. Med. 62: 731~742, 1977
- 24) WIERNIK, P. H.: The management of infection in the cancer patient. J. Am. Med. Assoc. 244: 185~187, 1980
- 25) ALITALO, K.; T. HOVI & A. VAHERI: Fibronectin is produced by human macrophages. J. Exp. Med. 151: 602~613, 1980
- 26) TSUKAMOTO, Y.; W. E. HELSEL & S. M. WAHL:

Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts. *J. Immunol.* 127 : 673~678, 1981

27) JARSTRAND, C.; T. AHLGREN & L. BERGHEM: Fibronec-

tin increases the motility, phagocytosis and NBT (nitroblue tetrazolium)-reduction of granulocytes. *J. Clin. Lab. Immunol.* 8 : 59~63, 1982

EFFECTS OF AC-1370 ON HOST DEFENSE AGAINST INFECTIONS AND ITS MECHANISM OF ACTION (Paper 1)

HARUO OHNISHI, HIROSHI KOSUZUME, HITOSHI INABA,
HIDENORI MOCHIZUKI and YUJI NAGAO

Fuji Central Research Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

RYOCHI FUJII

Department of Pediatrics, School of Medicine, Teikyo University

Effects of AC-1370, a novel semisynthetic cephalosporin, on host defense against infections and its target cells were investigated. AC-1370 exerted no effect on plaque forming cells and delayed type hypersensitivity but augmented phagocytosis by macrophages and neutrophils by *in vitro* application and also *in vivo*. In contrast, other β -lactam antibiotics either did not affect or rather suppressed these functions. Flow cytometry revealed that most of the cells binding AC-1370 were macrophages and that few neutrophils bound AC-1370. Culture supernatants of macrophages potentiated phagocytosis by neutrophils, and the culture supernatants of AC-1370-stimulated macrophages potentiated phagocytosis by neutrophils more potently than the culture supernatant of unstimulated macrophages did. The activities of these culture supernatants were resistant to heat treatment at 56°C for 30 minutes but labile to the treatment with trypsin. These results suggest that AC-1370 potentiates phagocyte functions without affecting humoral and cellular immune responses and that the potentiating action of AC-1370 may be mediated by direct binding of the compound to macrophages and by indirect action on neutrophils through facilitating production of protein factor(s) by macrophages.