

## AC-1370 の宿主感染防御能に対する作用の解析 (第2報)

稲場 均・望月 英典・日下部知志・小雀 浩司・大西 治夫  
持田製薬株式会社富士中央研究所

### 要 旨

AC-1370 の宿主感染防御能賦活作用の感染症治療における意義について検討した。AC-1370 はカンジダに対して増殖抑制作用を示さなかったが、マウスのカンジダ感染に対して防御作用を示した。一方、cyclophosphamide はマウスをカンジダに対して易感染化したが、AC-1370 は cyclophosphamide 処理マウスのカンジダ感染に対しても防御作用を示した。さらに、cyclophosphamide は *in vitro* において好中球機能を抑制し、AC-1370 は cyclophosphamide 処理により低下した好中球機能を未処理好中球のそれと同程度まで回復させた。以上の結果から、AC-1370 の宿主感染防御能賦活作用は感染症の治療に寄与し得るものと推察された。

### 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<sup>1,2)</sup>。本剤はまた、食細胞機能賦活作用を有する<sup>3)</sup>ことから、宿主の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が感染症治療に寄与しているか否かを、AC-1370 が抗菌作用を示さないカンジダの感染モデルを用いて解析した。

### 1. 材料および方法

#### 1. 薬物

AC-1370 (味の素) および cyclophosphamide (CY, 塩野義製薬) を、静注する場合は生理食塩液に溶解して、用いた。

#### 2. 菌株

*Candida albicans* IFO 1060 (発酵研究所) を、Sabouraud dextrose broth (Difco Labs.) を用いて培養し、動物に接種する場合は生理食塩液に浮遊させて、用いた。

#### 3. 動物

4～5週齢の雄 ICR マウス (静岡実験動物農業協同組合) を用いた。

#### 4. 最小発育阻止濃度(MIC)

日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法<sup>4)</sup>に準じ、AC-1370 を含む Sabouraud agar 培地(Difco Labs.) に *C. albicans* 10<sup>6</sup>もしくは10<sup>8</sup>個/ml 浮遊液1白金耳を接種した後、37℃、48時間培養して MIC を測定した。

#### 5. マウスのカンジダ感染におよぼす影響

##### 1) 正常マウス

マウスを1群10匹とし、AC-1370, 10もしくは100mg/kg/day を1日1回2日間静注した。最終投与1時間後、*C. albicans* 5×10<sup>8</sup>個を腹腔内接種し、1週間生死を観察して生存率を求めた。

##### 2) 免疫抑制マウス

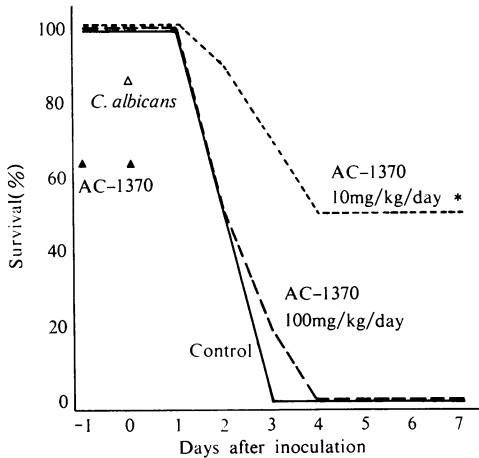
川崎らの方法<sup>5)</sup>に準じ、マウスを1群10匹としてCY 200 mg/kg を腹注し、4日後 *C. albicans* 1×10<sup>8</sup>もしくは3×10<sup>8</sup>個を腹腔内接種した。接種1時間後、AC-1370, 10もしくは100 mg/kg を静注し、1週間生死を観察して生存率を求めた。

また、*C. albicans* 4.5×10<sup>8</sup>個を腹腔内接種したマウスについても、同様にして生存率を求めた。

#### 6. CY 処理好中球の貪食能におよぼす影響

Burgaleta らの方法<sup>6)</sup>に従って健常男子成人の末梢血から分離した白血球5×10<sup>6</sup>個にCY 300 μg/ml を含むヒト血清1mlを加え、37℃、1時間培養した後、培地をAC-1370, 10もしくは100 μg/ml を含む5%ヒト血清添加

Fig. 1 Effect of AC-1370 on *Candida albicans* infection in mice



\*:  $p < 0.05$  Significant difference from control ( $\chi^2$ -test)

Hanks 緩衝液(HBSS) 1ml に交換し、この液を 0.2ml ずつ Lab-Tek chamber (Miles Labs.) に分注した。37°C で 1 時間培養した後、30 分間煮沸処理した baker's yeast (和光純薬)  $5 \times 10^7$  個/ml を含む 5% ヒト血清添加 HBSS 20 $\mu$ l を加え、さらに 37°C で 30 分間培養した。Methanol 固定、Giemsa 染色した後、顕微鏡下で好中球 300 個以上を観察し、yeast 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。

## II. 成績

### 1. MIC

AC-1370 は 100  $\mu$ g/ml においても *C. albicans* の増殖を抑制せず、MIC は 100  $\mu$ g/ml 以上であった。

### 2. マウスのカンジダ感染におよぼす影響

#### 1) 正常マウス

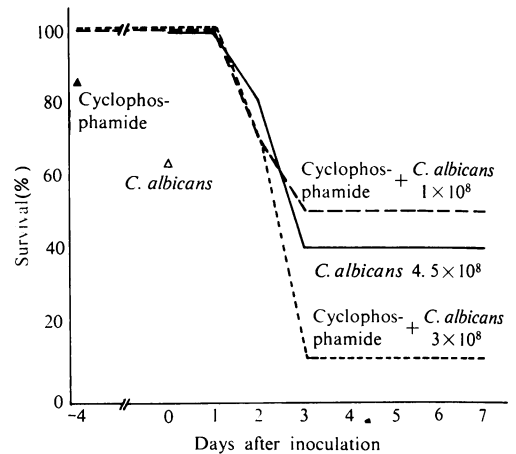
Fig. 1 に示すように、*C. albicans* 接種マウスは接種 3 日後までに全例が死亡したが、AC-1370, 10mg/kg/day 投与群では 50% のマウスが接種 7 日後も生存し、AC-1370 投与により、生存率が有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。

#### 2) 免疫抑制マウス

Fig. 2 に示すように、*C. albicans*  $4.5 \times 10^8$  個接種群の接種 7 日後の生存率は 40% であった。一方、CY 投与後 *C. albicans*  $3 \times 10^8$  および  $1 \times 10^8$  個接種群の接種 7 日後の生存率はそれぞれ 10 および 50% であった。

また、Fig. 3-a に示すように、CY 投与後 *C. albicans*  $3 \times 10^8$  個接種マウスに AC-1370, 10 および 100 mg/kg を投与した時の接種 7 日後の生存率はいずれも 40%

Fig. 2 Effect of cyclophosphamide on *Candida albicans* infection in mice



であり、対照群のそれより高い傾向を示した。

さらに、Fig. 3-b に示すように、CY 投与後 *C. albicans*  $1 \times 10^8$  個接種マウスに AC-1370, 10 および 100 mg/kg を投与した時の接種 7 日後の生存率はそれぞれ 100 および 70% であり、対照群の 50% に比べて 10 mg/kg 投与群のそれは有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

### 3. CY 処理好中球の貪食能におよぼす影響

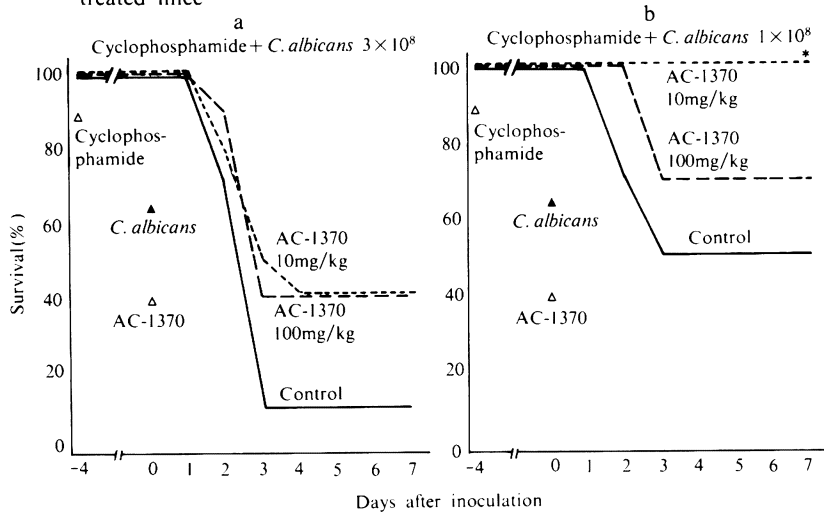
Fig. 4 に示すように、CY 処理好中球の貪食率は  $47.5 \pm 2.1\%$  であり、CY 非処理好中球の  $68.4 \pm 3.3\%$  に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ )。一方、AC-1370, 10 および 100  $\mu$ g/ml 添加培養時の CY 処理好中球の貪食率はそれぞれ  $59.7 \pm 2.9\%$  および  $70.3 \pm 0.6\%$  であり、CY 処理好中球のそれに比べて有意に高く ( $p < 0.05$  および  $p < 0.01$ )、特に 100  $\mu$ g/ml 添加培養時の貪食率は CY 未処理好中球のそれと同程度であった。

## III. 考察

AC-1370 は細菌に対する直接的な抗菌作用と共に、宿主感染防御能賦活作用を併せ持つ新しいタイプのセファロsporin 剤である<sup>1,2)</sup>。AC-1370 による宿主感染防御能賦活作用はマクロファージおよび好中球の機能を多面的に賦活するものであることから、AC-1370 は細菌以外の微生物に起因する感染症に対しても治療効果を発現し得るものと推察される。

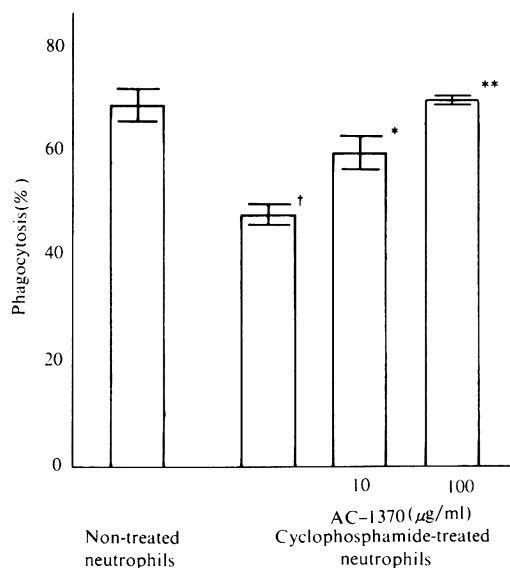
一方、宿主感染防御能の低下した宿主はカンジダ感染にかかり易く<sup>8,9)</sup>、カンジダ感染に対する宿主側の防御因子としてマクロファージや好中球などの食細胞が主要な役割を果しているものと考えられている<sup>10-13)</sup>。したがって、カ

Fig. 3 Effect of AC-1370 on *Candida albicans* infection in cyclophosphamide-treated mice



\*:  $p < 0.05$  Significant difference from control ( $\chi^2$ -test)

Fig. 4 Effect of AC-1370 on cyclophosphamide-treated neutrophil function



†:  $p < 0.05$  Significant difference from non-treated neutrophils (Student's  $t$ -test)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  Significant difference from cyclophosphamide-treated neutrophils (Student's  $t$ -test)

防御能に対する作用と、薬物の感染症治療におけるその作用の関与を評価するうえで有用と思われる。このような観点から、本研究では、AC-1370の持つ食細胞機能賦活作用が感染症の治療に寄与しているか否かを、マウスのカンジダ感染モデルを用いて検討した。

AC-1370は *C. albicans* に対して増殖抑制作用を示さず、直接的な抗菌力を殆んど持たないものと思われたが、予めマウスに AC-1370 を投与しておく、カンジダ感染に対して抵抗性を獲得した。この結果から、AC-1370 は直接的な抗菌力をおよぼさない微生物の感染に対しても宿主の機能を介して感染防御作用を示すものと考えられた。

一方、CY 投与マウスは CY 非投与マウスに比べて少量の *C. albicans* 接種によって感染症を発症し、CY 投与による易感染化が認められた。AC-1370 はこの易感染化マウスのカンジダ感染に対しても感染治療作用を示した。CY は強い免疫抑制作用を有する<sup>14)</sup>ことが知られていることから、CY による易感染化と AC-1370 による感染防御効果は宿主感染防御能を介したものとされた。

そこで、宿主感染防御に重要な役割を果している好中球の機能に対する CY および AC-1370 の作用を測定した。CY は好中球の貪食能を抑制し、CY が免疫能ばかりでなく食細胞機能をも抑制することが確認された。一方、CY 処理好中球の貪食能は AC-1370 と共に培養することにより亢進され、CY 未処理好中球のそれと同程度まで回復した。このことは、AC-1370 は正常食細胞の機能

ンジダに対して抗菌力を示さない薬物のカンジダ感染症に対する有効性を検討することは、そのものの宿主感染

を賦活するだけでなく、低下した食細胞機能を回復させる作用をも有することを示しており、前述のAC-1370によるカンジダ感染防御効果もこの作用を介したものと思われた。したがって、AC-1370による宿主感染防御能賦活作用は感染症の治療に寄与し得るものと考えられる。

### 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) 日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22: 1126~1128, 1974
- 5) 川崎賢二, 関口金雄, 小川正俊, 辻 明良, 五島瑛智子: Opportunistic pathogen と宿主防衛機能の関連について, 実験的白血球減少症マウスにおける各菌種の易感染化と抗菌薬の治療効果について。Chemotherapy 28: 14~21, 1980
- 6) BURGALETA, C.; J. MARTINEZ-BELTRAN & E. BOUZA: Comparative effects of moxalactam and gentamicin on human polymorphonuclear leukocyte functions. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 718~720, 1982
- 7) 木谷信行: 好中球の貪食能。臨床免疫13(S-3): 375~378, 1981
- 8) CHILGREN, R. A.; H. J. MEUWISSEN, P. G. QUIE, R. A. GOOD & R. HONG: The cellular immune defect in chronic mucocutaneous candidiasis. Lancet i: 1286, 1969
- 9) LEHNER, T.; J. M. A. WILTON & L. IVANYL: Immuno-deficiencies in chronic mucocutaneous candidiasis. Immunology 22: 775~787, 1972
- 10) SASADA, M. & R. B. JOHNSTON, Jr.: Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. J. Exp. Med. 152: 99~112, 1980
- 11) LEHRER, R. I.; L. G. FERRARI, J. PATTERSON-DELAFFIELD & T. SORRELL: Fungicidal activity of rabbit alveolar and peritoneal macrophages against *Candida albicans*. Infect. Immun. 28: 1001~1008, 1980
- 12) LEHRER, R. I.: Measurement of candidacidal activity of specific leukocyte types in mixed cell populations I. Normal, myeloperoxidase-deficient, and chronic granulomatous disease neutrophils. Infect. Immun. 2: 42~47, 1970
- 13) 野口義圀: *Candida albicans* と白血球, 特に opsonization について。真菌誌 17: 75~79, 1976
- 14) TURK, J. L. & D. PARKER: Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. Immunol. Rev. 65: 99~113, 1982

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

HITOSHI INABA, HIDENORI MOCHIZUKI, SATOSHI KUSAKABE,  
HIROSHI KOSUZUME and HARUO OHNISHI  
Fuji Central Research Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.

Significance of potentiation of host defense by AC-1370 was investigated in relation to the treatment of infectious diseases. AC-1370 defended mice from *Candida albicans* infections, though the compound did not show direct antifungal effects on *C. albicans*. Treatment of mice with cyclophosphamide made the animals susceptible to *C. albicans* infection, and AC-1370 defended cyclophosphamide-treated mice from *C. albicans* infection. Furthermore, AC-1370 restored the functions of neutrophils, which had been suppressed by cyclophosphamide treatment *in vitro*, to the level same as those of intact neutrophils. These results suggest that the potentiating action of AC-1370 on host defense may contribute to the treatment of infections.