

各種セフェム系抗生物質のマウス白血球との協力的殺菌作用

浅野泰司
 科研製薬株式会社東京研究所
 横田健
 順天堂大学医学部細菌学教室

(昭和61年3月8日受付)

マウス腹腔内好中球 (PMNs) およびマクロファージ (Mφ) による、大腸菌に対する貪食殺菌作用に抗生物質がどのような影響を与えるか検討した。PMNs では、1.25% 正常マウス血清添加時 CBPZ を 1/8 MIC 以上加えると明らかな PMNs との協力的殺菌作用が認められた。しかし、無血清、非働化血清添加時あるいは Mg-EGTA 存在下では、CBPZ と PMNs の協力的貪食、殺菌作用は認められないか、認められても軽度であった。また、CBPZ 前処理菌は無処理の菌体に比べて PMNs の貪食殺菌作用を受け易かった。血清存在下で6種類のセフェム系抗生物質と PMNs との協力的殺菌作用を比較した結果、CBPZ は 1/8 MIC、CZX、LMOX、CTX および CTT は 1/4 MIC まで、また CMZ は 1 MIC まで明らかな協力作用を示すことが確かめられた。一方、Mφ を用いた場合には、血清無添加あるいは非働化血清添加でも CBPZ との協力的殺菌作用が認められ、PMNs とは異なった態度を示した。また、抗血清添加においても抗血清のみでは Mφ の *E. coli* に対する貪食殺菌作用は弱く、sub-MIC の CBPZ を加えてはじめて殺菌作用が強くなるのを認めた。

感染症の成立には生体防御機構が複雑に関与することが知られている。特に、食細胞は細菌を貪食殺菌するので生体の感染防御機構のなかで重要な役割をもっている¹⁻⁴⁾。

抗生物質による細菌感染症の治療において、体内に MIC 以上の有効濃度が保持されるのは数時間以内と考えられるので、残存する菌は低濃度の薬剤存在下で体液性および細胞性防御機構の作用を受けるものと考えられる。抗生物質と多形核白血球 (PMNs) の相互作用については、WELCH ら⁵⁾、天野ら⁶⁾ は、rifampicin (RIF) や高濃度の chloramphenicol (CP) がヒトの PMNs 機能を抑制することを報告し、奥村ら⁷⁾ および池田ら⁸⁾ は、sub-MIC の β -lactam 系抗生物質が *E. coli* の菌体表面を変化させ、それを弱体化して貪食殺菌され易くすると報告している。我々は、生体内効果が良好といわれている CBPZ を中心に、各種 cephem 系抗生物質の *E. coli* に対するマウス PMNs およびマクロファージ (Mφ) の貪食殺菌作用に及ぼす影響について検討した。

I. 材料および方法

1) 使用菌株および培地
Escherichia coli NIHJ JC-2 を被験菌として使用した。菌の前培養には Mueller-Hinton Broth (日水製薬) を、固型培地としては普通寒天培地 (日水製薬) を使用

した。また、PMNs および Mφ の保存培地としては、0.1% gelatin 含有 Hank's balanced salt solution G-HBSS (日水製薬) を使用した。

2) 抗生物質

cefbuterazone (CBPZ : 科研製薬), cefotetan (CTT : 山之内製薬), latamoxef (LMOX : 塩野義製薬), cefotaxime (CTX : ヘキストジャパン), ceftizoxime (CZX : 藤沢薬品工業) および cefmetazol (CMZ : 三共) の力価の明らかな標品を使用した。

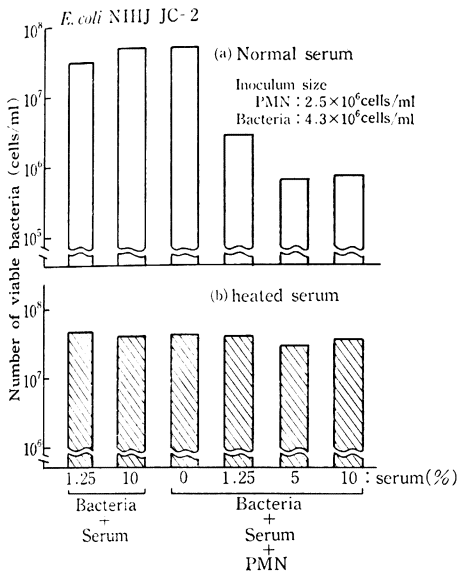
3) 抗菌力測定法

各抗生物質の被験菌に対する MIC は液体培地希釈法で測定した。培地には白血球の保存に使用した G-HBSS を使用した。抗生物質の濃度は各薬剤とも 100 μ g/ml を基点として倍々希釈で添加し、これに終末濃度が 10^5 cells/ml になるように菌を接種して 37°C、24 時間培養後、明らかに菌の発育を阻止している薬剤濃度を MIC 値とした。

4) マウス PMNs および Mφ の調整

PMNs は ICR 系マウス (♂, 9~13 週齢) に 2 ml の 0.2% カゼイン含有生理食塩液を腹腔内に注射し 18 時間後に、また、Mφ は、2 ml の 0.1% グリコーゲン含有生理食塩液をマウス腹腔内に注射し 72 時間後に、エチルエーテル深麻酔下に 10 ml の HBSS (10 U/

Fig. 2 Bactericidal activity of mouse PMN in the presence of normal or heated serum



(a) Fresh normal serum was used.
 (b) The serum was inactivated at 56°C for 30 min, and used.
 Leukocyte bacteria suspensions were incubated at 37°C for 120 min. in the presence of normal or heated serum at various concentrations.

認めなかった。

次に、PMNs の貪食と細胞内殺菌を含めた全体としての殺菌能を検討した。その結果、Fig. 2 に示すように、培養 2 時間後の残存生菌数は、先の実験と同様、添加される正常血清の濃度に依存して減少し、貪食された菌は、PMNs 内で殺菌されていると結論された。しかし、非働化血清では PMNs の貪食殺菌作用は全く認められなかった。

3) 抗生物質存在下における PMNs の貪食殺菌作用
 Fig. 1 および 2 に示したように、正常血清 1.25% 添加時には、菌増殖と PMNs による貪食殺菌は平衡状態であった。そこで、この条件下で抗生物質を添加し、貪食殺菌に及ぼす影響を検討した。Fig. 3 に示すように、または 1/2 MIC 濃度の CBPZ を加えると培養 1 時間後から細胞外細菌数の減少を認めた。しかし、PMNs、血清および CBPZ の三者だけでは生残菌数の減少は認められなかった。次に、添加する正常血清および非働化血清の添加濃度の影響をみた。Fig. 4 に示すように、正常血清 1% 添加時には、CBPZ は 1/8 MIC まで白血球による殺菌効果の増強を示した。しかし、非働化血清 (1% または 10%) 存在下では、CBPZ 2 MIC を添加しても PMNs による殺菌作用は増強されなかった。

4) Mg-EGTA 存在下における PMNs の貪食殺菌作用

Fig. 3 Synergy of bactericidal effect between mouse PMN and CBPZ

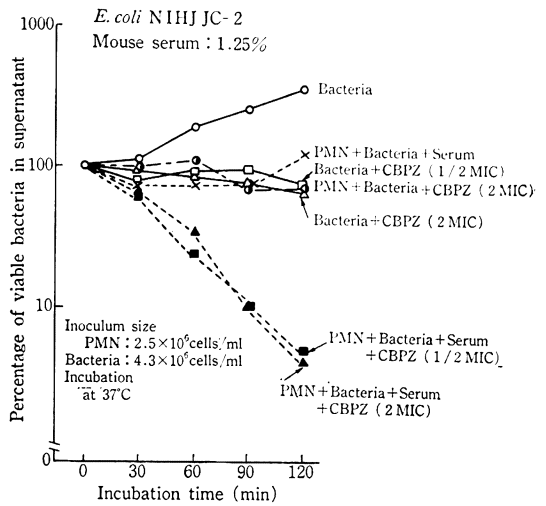
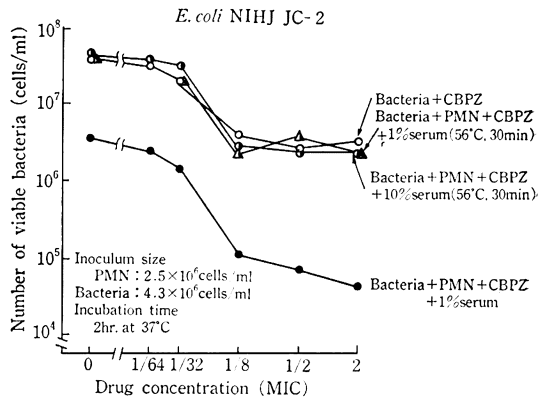


Fig. 4 Effect of CBPZ on the bactericidal activity of mouse PMNs in the presence of normal or heated serum



0.01 M Mg-EGTA 存在下における PMNs の貪食殺菌作用を Fig. 5(a) に示した。正常血清 1.25% 添加時、PMNs の貪食殺菌作用が减弱するが、血清 2.5% 添加時には、Mg-EGTA 存在下でも PMNs の貪食殺菌反応が認められた。さらに、この条件下で CBPZ 1/8 MIC を添加すると、Fig. 5(b) に示すように、正常血清 1.25% 添加時に認められた PMNs と CBPZ の協力的殺菌作用が Mg-EGTA で阻害されるのを認めたが、血清 2.5% 添加時には、PMNs と CBPZ の協力的殺菌作用に対する Mg-EGTA の阻害は軽度であった。

5) CBPZ 前処理菌に対する PMNs の貪食殺菌作用
 2, 1/2 および 1/8 MIC の CBPZ で 37°C, 1 時間 *E. coli* の菌体を前処理すると、Fig. 6 に示すように、

Fig. 5 Effect of CBPZ on bactericidal activity of mouse PMN in the presence of fresh serum with/without Mg-EGTA

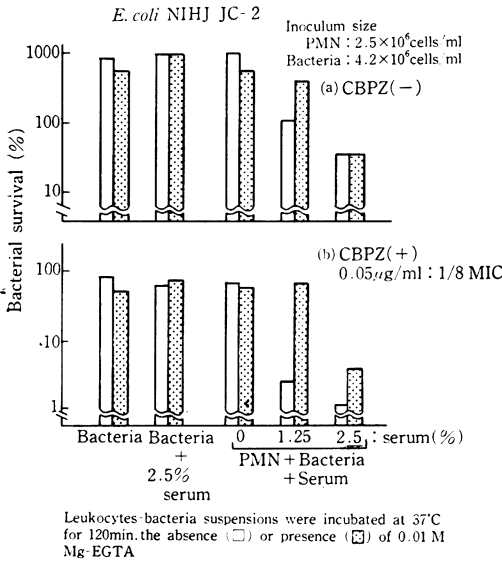
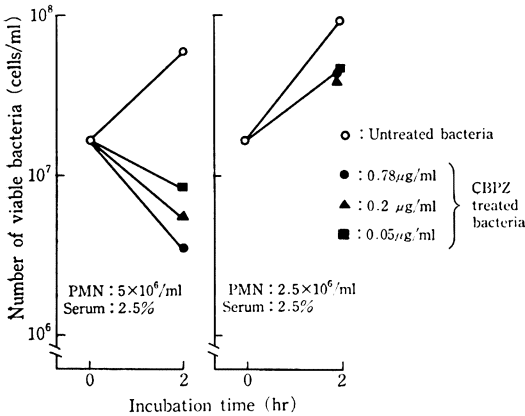


Fig. 6 Killing of CBPZ-pretreated *E. coli* NIHJ JC-2 by mouse PMNs



2.5×10^6 cells/ml の PMNs では無処理菌に比べ若干生残菌数が減少し、 5×10^6 cells/ml の PMNs を用いると、処理菌の方が明らかに早く殺菌された。また、この現象は CBPZ の前処理濃度に依存しているのが判った。

6) 薬物存在下における Mφ の 貪食殺菌作用

正常血清存在下における Mφ による貪食殺菌と CBPZ との相乗的殺菌作用の結果を Fig. 7 に示した。Mφ によっては PMNs と異なり正常血清 10% 添加時でも残存生菌数はあまり減少せず、4 時間後には菌の増殖を認めた。しかし、CBPZ を添加すると、残存生菌数

Fig. 7 Effect of CBPZ on bactericidal activity of mouse peritoneal macrophages in the presence of normal fresh serum

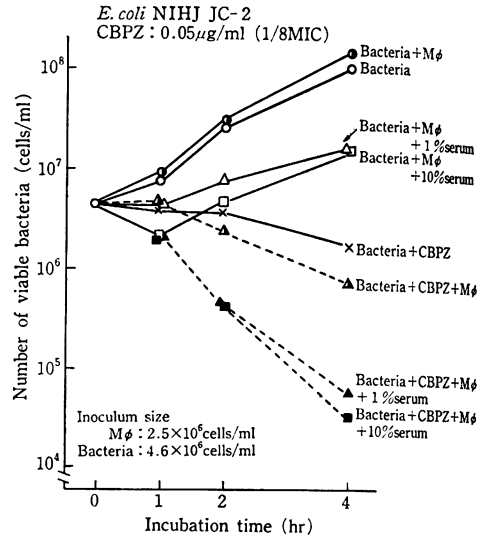
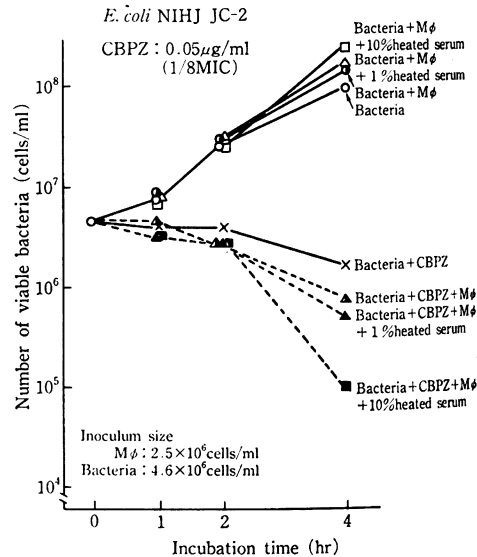


Fig. 8 Effect of CBPZ on bactericidal activity of mouse peritoneal macrophages in the presence of heated serum



の明らかな減少を認め、それに血清 1% を添加すると生残菌数の減少はさらに顕著となった。また、血清無添加時にも CBPZ と Mφ の協力的殺菌作用が認められた。

非働化血清存在下の Mφ の貪食殺菌作用と、CBPZ との相乗的殺菌反応の結果を Fig. 8 に示した。非働化血清だけでは、Mφ は全く貪食殺菌作用を発現しなかつ

Fig. 9 Effect of CBPZ on bactericidal activity of mouse peritoneal macrophages in the presence of heated serum of the antiserum at various concentration

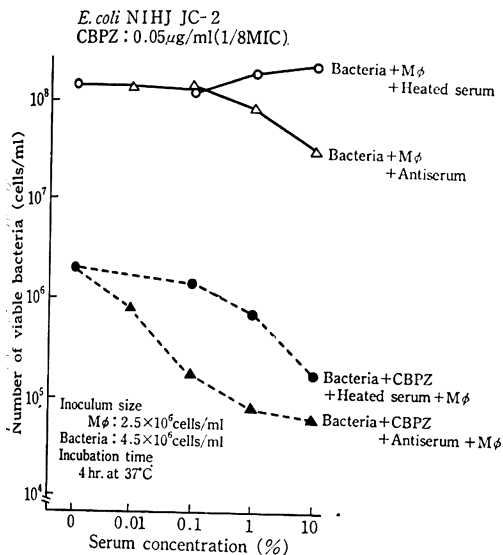


Fig. 10 Effect of CBPZ, LMOX, CTX and CMZ on the bactericidal activity of mouse PMN

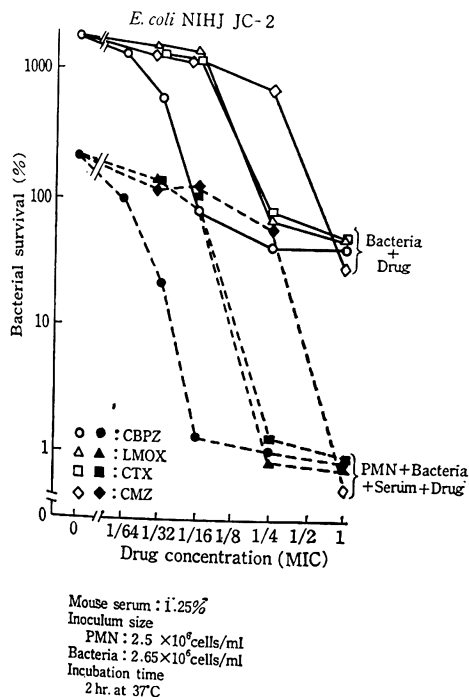
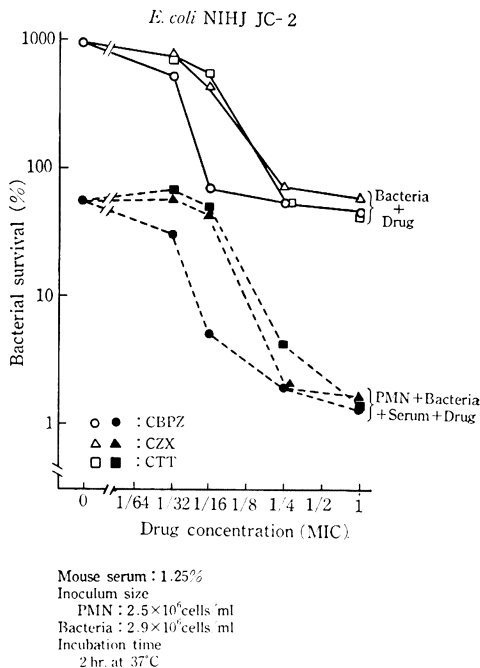


Fig. 11 Effect of CBPZ, CZX and CTT on the bactericidal activity of mouse PMN



た。しかし、さらに CBPZ を添加することにより、反応開始後 2 時間目から生残菌数の減少を認め、非働化血清 10% 添加でその程度は著明となった。

PMNs と異なり、Mφ では非働化血清添加でも CBPZ との間で相乗的殺菌作用を示すことから、血清に存在する自然抗体がオプソニン作用を示すためと考えられた。そこで、被験菌に対する抗血清を用いて非働化血清と比較した。その結果を Fig. 9 に示した。抗血清の凝集素価は、試験管内凝集反応の結果では 4096 倍であった。一方、非働化正常血清の凝集素価は、4 倍以下であった。Fig. 9 に示すように、抗血清単独添加では Mφ による食食殺菌作用は認められないが、さらに CBPZ (1/8 MIC) を添加すると生残菌数の減少が認められ、0.01% の抗血清添加でも Mφ と CBPZ の協力的殺菌作用を認めた。

7) CBPZ と他のセフェム系抗生物質の比較

CBPZ, CTT, CTX, CZX, LMOX および CMZ を用いて、各薬剤の PMNs との協力的食食殺菌作用を比較した。薬剤濃度は 1, 1/4, 1/16, 1/32, 1/64 MIC とした。Fig. 10 および Fig. 11 に示すように、6 薬剤とも PMNs と協力的殺菌作用を示した。CBPZ は 1/16 MIC まで、CTX, CTT, LMOX, CZX は 1/4 MIC まで、また、CMZ は 1 MIC において PMNs との協力的殺菌作用を認めた。

III. 考 察

近年、広域スペクトルと強い抗菌活性を有し、 β -lactamase に対し高い安定性を示すセフェム系抗生物質が開発されている。一方、生体防御機構のなかでも重要な役割を果たしている食細胞に対し、抗生物質が種々の影響を及ぼすことが報告^{5-8,10,11}されている。我々は、生体内効果が良好とされる CBPZ を用い、PMNs および $M\phi$ の食食殺菌作用に及ぼす影響を検討するとともに、他の 5 種類のセフェム系薬剤と、その強弱を比較検討した。

PMNs が細菌を食食殺菌するためには、菌体への補体または抗体の結合が必要とされている^{1,2}。オプソニンとしては耐熱性の IgG、IgM と易熱性の C3b、C5 が知られているが、対象となる菌種や菌株によっても相違があり、また食細胞の種類によっても異なることが報告¹²⁻¹⁵されている。今回使用した *E. coli* NIHJ JC-2 に対しては、PMNs による食食殺菌作用が非働化血清では発現しないことから、補体成分が主要なものと考えられた。補体成分によるオプソニン活性の発現は、Classical pathway による場合と Alternative pathway による場合とが考えられる。Mg-EGTA を用いると Alternative pathway のみが活性化されること^{16,17}はよく知られているが、正常血清で認められる PMNs の殺菌作用が、Mg-EGTA を添加することにより減弱したことから Classical pathway による補体活性化が示唆された。しかしこの場合も、血清量を増加することにより再びオプソニン活性が出現したことから、PMNs では被験菌に対する抗体が無くても、Alternative pathway でオプソニン活性が得られるものと考えられた。食細胞として $M\phi$ を用いた場合は、正常血清で培養初期には若干の食食殺菌が認められたが、時間の経過とともに被験菌は再増殖し、非働化血清では食食殺菌作用は全く認められなかった。これらのことから、グラム陰性菌排除における生体内での PMNs の重要性が確認された。

一方、これらの食食系に薬剤を添加した実験を行なうと、PMNs では、無血清または非働化血清に CBPZ を加えても食食殺菌作用はみられず、さらに、正常血清に Mg-EGTA を添加すると CBPZ との協力的殺菌作用が減弱するのを認めた。これらのことから、sub-MIC の CBPZ との協力的殺菌作用の発現には、補体成分のオプソニンが必要と考えられた。奥村ら⁷、HORNE ら¹¹)は、抗生物質添加による PMNs の食食殺菌作用の増強にはオプソニンが必要であるとし、我々の結果と一致するものであった。しかし、池田ら⁸)は、ウサギ PMNs を用いた実験でオプソニン非存在下で抗生物質との協力作用を検討し、MIC 近辺の piperacillin および carbenicillin 添加は PMNs による殺菌を著明にすると報告してお

り、sub-MIC の薬剤と PMNs との協力的殺菌作用発現に対するオプソニン必要性に関しては、更に検討する必要がある。

CBPZ は、sub-MIC で補体を活性化しないこと(未発表)、CBPZ 前処理菌は無処理の菌体に比べて食食され易くなったこと、さらには sub-MIC の CBPZ で処理した菌体 (*E. coli* KC-14) は無処理の菌体に比べて補体活性化能が亢進していたこと¹⁸) を考えあわせると、sub-MIC の CBPZ による PMNs の食食殺菌作用増強は、薬剤によって生じた菌体の変化が補体を大量に消費し、その結果生じるオプソニン (C3b、C5) の増量によるものではないかと推察された。

抗生物質とペニシリン結合蛋白質 (PBPs) 親和性に関しては、種々の報告^{19,20})がなされている。横田ら²¹、奥村ら⁷)は、PBPs への薬剤親和性と生体防御機構との関連性について考察し、PBP 3 に強い親和性を有する薬剤は、菌体がフィラメント化しても $M\phi$ による食菌作用を妨げるものではなく、また、PBP 1b を強く抑える β -lactam 剤は sub-MIC で補体による殺菌を受け易くなるように菌体を変化させると報告している。CBPZ が PBP 3 および PBP 1b に対し強い親和性を有することは、熊野ら²²、西野ら²³)によって報告されており、また、我々の実験においても、横田ら²⁴)の報告と同様に、無血清でも CBPZ 添加によって $M\phi$ の食食殺菌の増強が認められたことから、PBPs への親和性と $M\phi$ による殺菌のされ易さとの関連性がうかがわれた。興味ある点は、薬剤無添加では、 $M\phi$ では正常血清、非働化血清あるいは抗血清を加えても、培養開始 4 時間後には明らかな被験菌の増殖が認められたのに対し、sub-MIC の CBPZ を添加することによりいずれの血清を用いた場合でも $M\phi$ による食食殺菌が進み、4 時間後には残存菌数が接種時の 1/10~1/100 になったことである。これらの結果から、 $M\phi$ は PMNs と異なり、sub-MIC の薬剤存在下では自然抗体あるいは特異抗体のみでも被験菌に対するオプソニン活性が発現するものと考えられた。さらに、非働化血清では正常血清と異なり、培養開始 2 時間目以降に協力作用が出現することから、抗体によるオプソニン活性の発現には、sub-MIC の CBPZ による菌体の damage がある程度進行する必要があるものとも考えられた。

CBPZ は、感染治療実験において MIC から予想されるよりも良好な治療効果を示すことが報告^{22,25,26})されている。PMNs との協力的殺菌作用も、比較した 6 薬剤のなかでは優れていた。すなわち、CBPZ は 1/8 MIC まで、LMOX、CTX、CTT、CZC では 1/4 MIC まで、CMZ は 1 MIC で PMNs との協力的殺菌作用を示し

。熊坂ら²⁷⁾は、人の PMNs を用いて CBPZ と CMZ と比較し、CBPZ が優れた協力的殺菌作用を示したと報告しており、我々の結果と一致した。CBPZ の PMNs の優れた協力的殺菌作用、血清との協力的殺菌作用^{18,24)}さらには Mφ の貪食殺菌作用に対する亢進作用¹⁸⁾生体内効果を反映しているとも考えられる。また、BPZ は抗菌活性を有さないカンジダに対しても感染防御作用を有すること²⁰⁾から、今後さらに生体防御機構との関連性について検討する必要があるであろう。

文 献

- 1) 野本亀久雄：生体防御機構。炎症 4：93～99, 1984
- 2) 辻 芳郎, 楊井正紀, 柳 忠道：感染と好中球機能。免疫と疾患 3：469～473, 1982
- 3) SASADA, M.; H. NISUYAMA, H. SAWADA, T. NAKAMURA & H. UCHINO：Phagocytic and bactericidal capacities in neutrophils from patients with acute and chronic myelocytic leukemia. Acta Haematol. Jpn. 41：709～718, 1978
- 4) YAMAMOTO, K.; M. SASADA, H. NISHIYAMA, M. UCHIDA, H. SAWADA, T. NAKAMURA & H. UCHINO：Ingestion and killing of bacteria by neutrophils from patients with leukemia—a new method for evaluating phagocytic function at short incubation periods—. Acta Haematol. Jpn. 45：56～65, 1982
- 5) WELCH, D. W.; D. DAVIS & L. D. THRUPP：Effect of antimicrobial agents on human polymorphonuclear leukocyte function. Antimicrob. Agents Chemother. 20：15～20, 1981
- 6) 天野正道：尿路感染症における白血球機能。西日本泌尿器科 38：319～335, 1976
- 7) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 遠 彦二：血清または多形核好中球共存下における Cefuroxime の殺菌効果について。Chemotherapy 27：76～82, 1979
- 8) 池田 靖, 福岡義和, 永田優子, 保田 隆, 才川 勇：ウサギ多形核好中球の貪食殺菌作用におよぼす piperacillin, carbenicillin の相互作用。Chemotherapy 31：639～644, 1983
- 9) 医科学研究所学会編：細菌学実習提要, 第 14 章, 凝集反応, 223～235 頁, 丸善株式会社, 1958
- 10) LORIAN, N.; B. ATKINSON & Y. KIM：Phagocytosis of filaments of *Escherichia coli* produced with mezlocillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 11：71～78, 1983
- 11) HORNE, D. & A. TOMASZ：Hypersusceptibility of penicillin-treated group B streptococci to bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 19：745～753, 1981
- 12) HORWITZ, M. A. & S. C. SILVERSTEIN：Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 65：82～94, 1980
- 13) SCHILLER, N. L.; G. L. FRIEDMAN & R. B. ROBERTS：The role of natural IgG and complement in the phagocytosis of type 4 *Neisseria gonorrhoeae* by human polymorphonuclear leukocytes. The Journal of Infectious Diseases 140：698～707, 1979
- 14) BJORNSON, A. B. & G. MICHAEL：Factors in normal serum that promote bacterial phagocytosis. The Journal of Infectious diseases 128：182～186, 1973
- 15) TATSUKAWA, K.; M. MITSUYAMA, K. TAKEYA & K. NOMOTO：Differing contribution of polymorphonuclear cells and macrophages and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Microbiology 115：161～166, 1979
- 16) DOUGLAS, P. F.; S. R. MARNEY, JR., D. G. COLLEY, J. S. SERGENT & R. M. D. PREZ：C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. The Journal of Immunology 109：807～809, 1972
- 17) DOUGLAS, P. F.：Comparison of ethyleneglycol-tetraacetic acid and its magnesium salt as reagents for studying alternative complement pathway function. Infection and Immunity 16：124～128, 1977
- 18) 浅野泰司, 横田 健：各種セフェム系抗生物質のモルモット新鮮血清との協力的殺菌作用。Chemotherapy 印刷中
- 19) 松橋通生, 野口 浩, 玉城成夫：ペニシリン結合蛋白質—理論と実際—。Chemotherapy 27：827～840, 1979
- 20) TAMAKI, S.; S. NAKAJIMA & M. MATSUHASHI：Thermosensitive in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillinbinding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74：5472～5476, 1977
- 21) 横田 健, 関口玲子, 東 映子：Cefmenoxime (SCE-1365) の各種 β -lactamase およびペニシリン結合蛋白質に対する親和性とその抗菌力との関係。Chemotherapy 29 (S-1)：32～41, 1981
- 22) 熊野克彦, 三上秀忠, 井上松久, 三橋 進：T-1982 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 30 (S-3)：1～19, 1982
- 23) 西野武志, 大槻雅子, 千田尚人, 内藤睦子, 南場 勲, 谷野輝雄：新しく開発されたセフマイン系抗生物質 T-1982 に関する細菌学的評価。Chemotherapy 30 (S-3)：80～95, 1982
- 24) 横田 健, 関口玲子：T-1982 と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用。Chemotherapy 30 (S-3)：20～28, 1982
- 25) 才川 勇, 保田 隆, 四辻 彰, 福岡義和, 高畑 正裕, 西田享子, 笹倉かの子：T-1982 の実験的感

- 染症に対する有効性。Chemotherapy 30 (S-3) : 131~138, 1982
- 26) SUZUKI, I.; H. SENDA & T. YOKOTA : *In vivo* activity of cefbuperazone (T-1982) against various experimental infections in mice. The

- Journal of Antibiotics 38 : 249~258, 1985
- 27) 熊坂義和, 平井裕一, 今村憲市, 武部和夫, 工藤肇 : 菌消失率からみた人多形核白血球と抗生剤濃度との関係 (第2報)—CMZ・CBPZの比較—。第33回日本化学療法学会総会, 1985

SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECTS OF MOUSE LEUKOCYTES WITH SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS OF CEPHEM ANTIBIOTICS

TAIJI ASANO

Tokyo Research Laboratories, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.

TAKESHI YOKOTA

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

A series of experiments was performed to investigate the synergy of bactericidal effect between mouse leukocytes and cephem antibiotics.

Cefbuperazone (CBPZ) enhanced phagocytosis of *E. coli* by polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in the presence of 1.25% fresh normal mouse serum, this synergy, however, was diminished in the absence of the fresh serum, or in the presence of heat inactivated or Mg-EGTA treated mouse serum. The cells of *E. coli* preincubated with sub-MIC of CBPZ were more susceptible to phagocytosis by PMNs.

The synergy of bactericidal effect between PMNs and 6 cephem antibiotics was also compared. The synergy of bactericidal effect was confirmed with PMNs and up to 1/8 MIC of CBPZ, 1/4 MIC of ceftizoxime, latamoxef, cefotaxime and cefotetan, and 1 MIC of cefmetazole.

When macrophages were employed for phagocytosis, cells of *E. coli* were engulfed and digested well even in the absence of the fresh serum and in the presence of the heat inactivated mouse serum. The subinhibitory concentrations of CBPZ helped phagocytic and bactericidal effects of macrophages against *E. coli*. However more clear phagocytosis was observed in the presence of anti *E. coli* mouse serum than with the heat inactivated mouse serum.