

多形核白血球の貪食殺菌作用に対する β -lactam 系抗生剤の影響

池田 靖・福岡 義和・伊東 優子
室 和 美・保田 隆・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和61年3月13日受付)

多形核白血球の貪食殺菌作用に対する Cefbuperazone の影響について Cefmetazole, あるいは Latamoxef を対照として検討し, 以下の結果を得た。

- 1) Cefbuperazone は被検菌6株に対してウサギ多形核白血球と協力殺菌作用を示し, その程度も Cefmetazole あるいは Latamoxef に比べて高かった。
- 2) この協力作用は, 新鮮血清を添加することによってさらに増強され, またヒト多形核白血球の場合も同様であった。
- 3) Cefbuperazone で前処理した *Escherichia coli* は無処理の菌体に比べて明らかにウサギ多形核白血球の貪食殺菌作用を受け易かった。
- 4) *Escherichia coli* を被貪食物として NBT 還元能を調べた結果, Cefbuperazone 前処理菌体はウサギ多形核白血球の NBT 還元能を著しく上昇させた。

以上の結果より Cefbuperazone は多形核白血球の貪食殺菌作用に協力作用を示す薬剤であることが示唆された。

化学療法を行なうに際して, 抗生剤と, いわゆる生体防禦能との協力作用は重要な因子と考えられる。さきになわれわれは Piperacillin とウサギ多形核白血球との協力作用について検討し, ウサギ多形核白血球の貪食殺菌作用が Piperacillin の MIC 近辺の濃度で増強されることを報告した¹⁾。

今回, *in vivo* における効果が優れているといわれる^{2,3)} Cefbuperazone を用いて, ウサギおよびヒトより採取した多形核白血球, あるいは新鮮血清との協力作用について Cefmetazole および Latamoxef を対照として検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

Cefbuperazone (CBPZ: 富山化学工業), Cefmetazole (CMZ: 三共), および Latamoxef (LMOX: 塩野義製薬) を用いた。

2. 使用菌株

当研究所保存の標準株, あるいは臨床分離株, *Staphylococcus aureus* FDA 209 P, *Escherichia coli* IHJ JC-2, *E. coli* TK-16, *Klebsiella pneumoniae* Y-1, *Proteus vulgaris* T-261 および *Serratia marcescens* IID 620 を用いた。

3. 抗菌力測定法

日本化学療法学会により定められた最小発育阻止濃度測定法⁴⁾に基づき, 寒天平板希釈法により MIC 値を測定した。

4. 多形核白血球 (PMN) の採取

ウサギ PMN はさきに著者らが報告した方法¹⁾により採取した。ヒト PMN は健康成人男子 (25~34 歳) の静脈より 25 ml の血液を採取し, 6% dextran (MW 177,000) により比重分離後, 遠心分離 (800 rpm, 10 min) によって 2 回洗浄した後, Hank's buffer (HBSS pH 7.2) に浮遊させた。

5. 抗生剤と PMN あるいは新鮮血清との協力作用

前報の方法¹⁾により, HBSS 中に 3×10^6 cells/ml の PMN, 1×10^6 cells/ml の菌液, 50% 新鮮血清および 0.1, 1.0, 10 μ g/ml の薬液を調製し, 37°C で 3 時間振盪培養後, 遠心分離 (3,500 rpm, 20 min) により PMN と菌体を回収した。滅菌蒸留水によって PMN を破壊した後, 生理食塩水にて 2 回洗浄後, 生菌数を測定することにより, 協力作用を検討した。

6. 薬剤前処理菌体に対するウサギ PMN の貪食殺菌作用

一夜培養後, 37°C で 2 時間前培養した *E. coli* TK-16 を Heart infusion broth (HIB: 栄研) で 1×10^8 cells/ml に調整し, 薬剤を 10 μ g/ml になるように添加した。

Table 1 Antibacterial activities of CBPZ, CMZ and LMOX

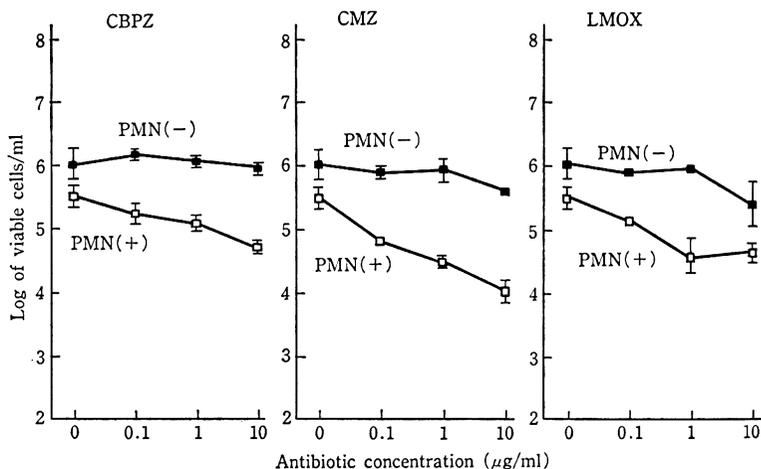
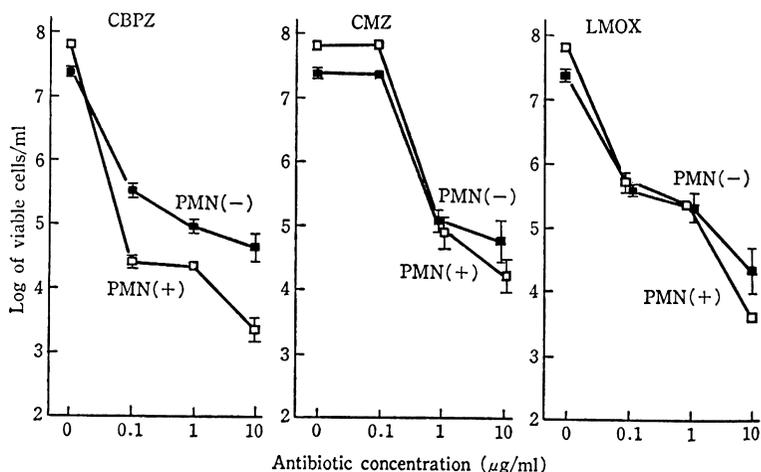
Bacteria	MIC ($\mu\text{g/ml}$)*		
	CBPZ	CMZ	LMOX
<i>S. aureus</i> FDA 209 P	12.5	0.78	6.25
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.78	0.2
<i>E. coli</i> TK-16	0.05	0.39	0.1
<i>K. pneumoniae</i> Y-41	0.1	0.78	0.2
<i>P. vulgaris</i> T-261	0.1	0.78	0.2
<i>S. marcescens</i> IID 620	0.05	1.56	0.2

* 10^6 cells/ml 1 loopful.

これを 37°C で3時間振盪培養後、遠心分離 (3,500 rpm, 20 min) して HBSS で2回洗浄し、約 10^7 cells/ml の菌液になるように調整した。この細菌浮遊液の 0.1 ml と PMN 浮遊液 0.8 ml (約 4×10^8 cells/ml), HBSS 0.1 ml を加え、前項と同様ウサギ PMN 貪食殺菌作用を測定した。

7. 薬剤前処理菌体に対するウサギ PMN の NBT 還元能

一夜培養後、 37°C で2時間前培養した *E. coli* TK-16 を HIB 中にて 1×10^8 cells/ml に調整し、CBPZ あるいは CMZ を 0.1, 1.0 および $10 \mu\text{g/ml}$ になるよ

Fig. 1 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *S. aureus* FDA 209 P by rabbit PMNFig. 2 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *E. coli* TK-16 by rabbit PMN

うに添加した。これを 37°C で 3 時間培養後遠心分離 (3,500 rpm, 20 min) し, HBSS で 2 回洗浄した後, 1×10^8 cells/ml になるように調整し, 薬剤前処理菌体として用いた。

NBT 還元能は BAERNER らの方法⁵⁾ に準じて行なった。すなわち, 0.01 N KCN 0.1 ml, 0.1% NBT 0.4 ml, 1×10^7 cells/ml の PMN 浮遊液 0.4 ml に薬剤前処理菌体 0.1 ml を加え, 37°C にて 20 min 振盪後 0.5 N HCl を 10 ml 加えて反応を停止した。遠心分離 (2,000 rpm, 15 min) にて PMN を回収し, これに 4 ml のピリジンを加え, 100°C, 10 min にてフォルマザ

ンを抽出した。OD 515 nm にて濁度を測定し NBT 還元能を Δ OD 515 nm で示した。

II. 実験結果

1. 抗生剤の使用菌株に対する抗菌力

CBPZ は *S. aureus* に対しては 12.5 μ g/ml と劣るが, グラム陰性菌に対して優れた抗菌力を示し, 次いで LMOX, CMZ の順であった (Table 1)。

2. 抗生剤とウサギ PMN との協力作用

1) *S. aureus*: *S. aureus* FDA 209 P は抗生剤非添加時にはウサギ PMN の食食殺菌作用をほとんど受けなかったが, 抗生剤を添加することによって食食殺菌作用

Fig. 3 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *E. coli* NIHJ JC-2 by rabbit PMN

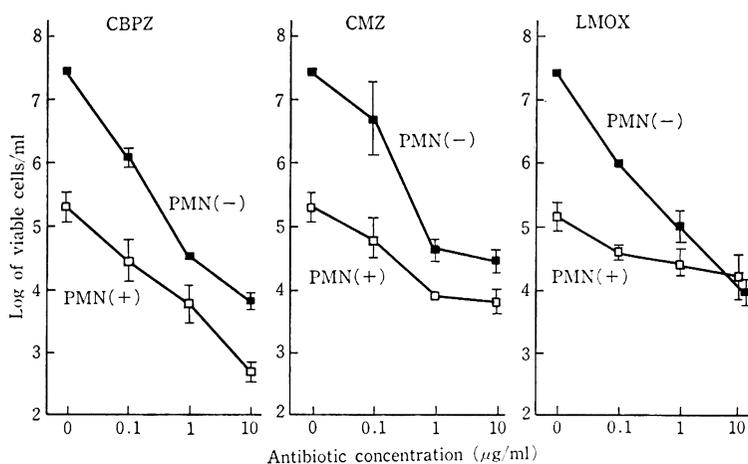


Fig. 4 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *K. pneumoniae* Y-41 by rabbit PMN

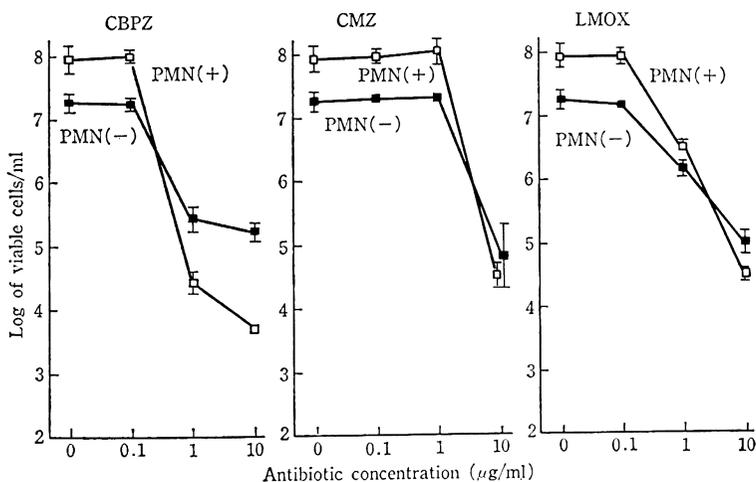


Fig. 5 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *P. vulgaris* T-261 by rabbit PMN

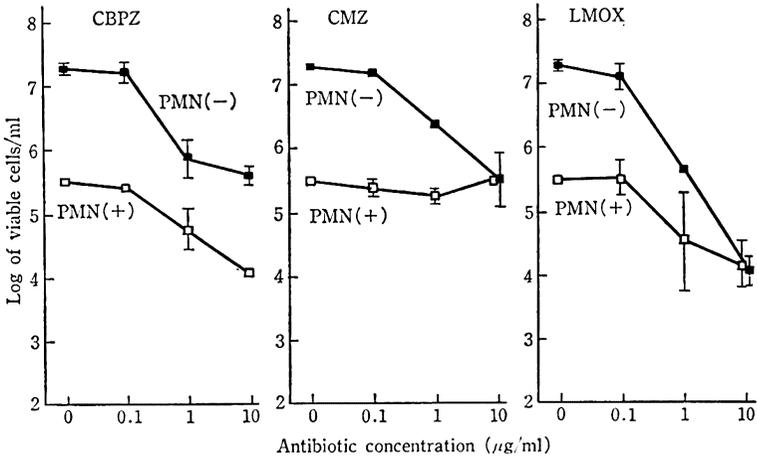
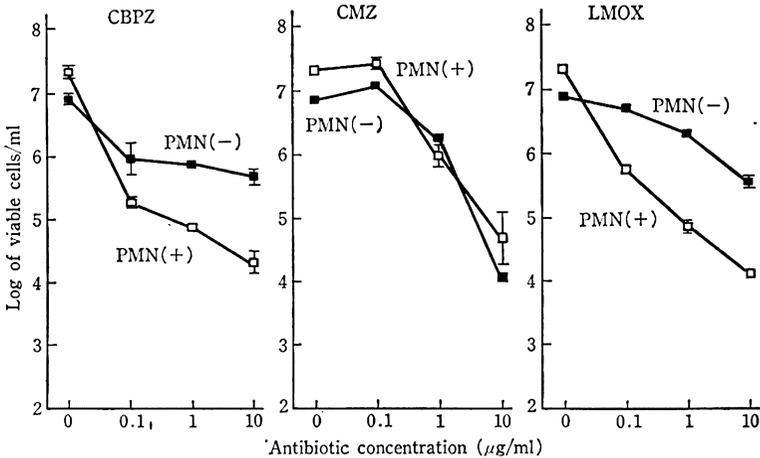


Fig. 6 Effect of CBPZ, CMZ or LMOX on the phagocytosis and killing of *S. marcescens* IID 620 by rabbit PMN



は増強され、薬剤単独群に比べ、いずれの薬剤添加群でも生菌数を約 1/10~1/40 に減少せしめた (Fig.1)。

2) *E. coli* : *E. coli* TK-16 は薬剤非添加時、あるいは CMZ または LMOX 添加時にはほとんどウサギ PMN の食食殺菌作用を受けなかった。しかし、CBPZ を添加することによって食食作用は増強され、薬剤単独群に比べて生菌数は約 1/4~1/30 に減少した (Fig.2)。

E. coli NIHJ JC-2 は薬剤無添加時でもウサギ PMN の食食殺菌作用を受け、生菌数は約 1/100 に減少した。しかし、薬剤添加による PMN の食食殺菌増強効果はみられず、LMOX 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加時には PMN 共存群

と非共存群の生菌数の差はなくなった (Fig.3)。

3) *K. pneumoniae* : *K. pneumoniae* Y-41 は薬剤の低濃度添加時には PMN の食食殺菌作用に強い抵抗性を示し、抗生剤と PMN の協力殺菌作用は認められなかった。しかし、CBPZ を 1.0 および 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加することによって PMN の食食殺菌作用は増強され、薬剤単独群に比べて生菌数は各々約 1/10 および 1/30 に減少した。CMZ および LMOX 添加群では 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加時にウサギ PMN との協力作用がみられたもののその程度は弱かった (Fig.4)。

4) *P. vulgaris* : *P. vulgaris* T-261 に対してウサギ

PMN は薬剤無添加時でも貪食殺菌作用を示し、生菌数を約 1/60 に減少せしめた。しかし薬剤添加によるウサギ PMN の貪食殺菌増強効果はみられず、逆に CMZ あるいは LMOX 添加群では PMN の貪食殺菌作用は減弱した (Fig. 5)。

5) *S. marcescens*: *S. marcescens* IID 620 はウサギ PMN の貪食殺菌作用に抵抗性を示したが CBPZ あるいは LMOX を 0.1, 1.0 および 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加時にウサギ PMN の貪食殺菌作用は増強され、生菌数は約 1/10~1/20 に減少した。CMZ 添加群では CMZ 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加時においてウサギ PMN との協力作用がみられたが

その程度は弱かった (Fig. 6)。

3. 抗生剤とウサギまたはヒト PMN との協力作用に及ぼす新鮮血清の効果

1) ウサギ PMN : *E. coli* TK-16 は薬剤無添加時には PMN あるいは血清単独では殺菌作用を受けなかったが、両者の共存時には殺菌作用を受け生菌数は約 1/3 に減少した。CBPZ は PMN と新鮮血清が共存することによって殺菌力がさらに増強され、CBPZ 単独群に比べて生菌数は 1/40~1/160 に減少した。CMZ 添加群では新鮮血清共存時に殺菌力増強効果がみられたものの、その程度は低く、また PMN との協力作用はほとんどみら

Fig. 7 Effect of CBPZ or CMZ on the phagocytosis and killing of *E. coli* TK-16 by rabbit PMN

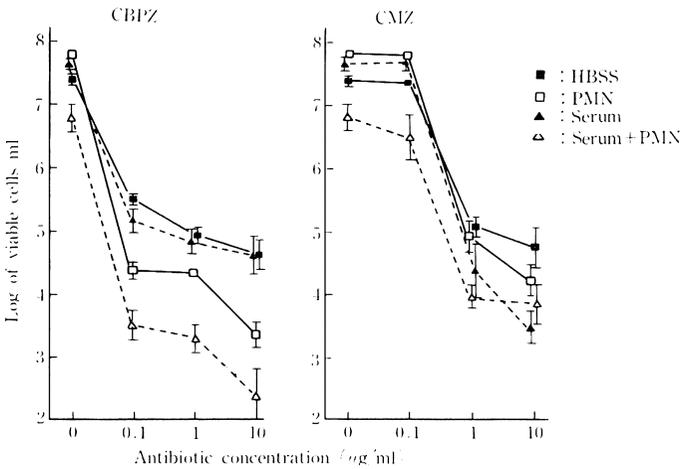


Fig. 8 Effect of CBPZ or CMZ on the phagocytosis and killing of *E. coli* TK-16 by human PMN

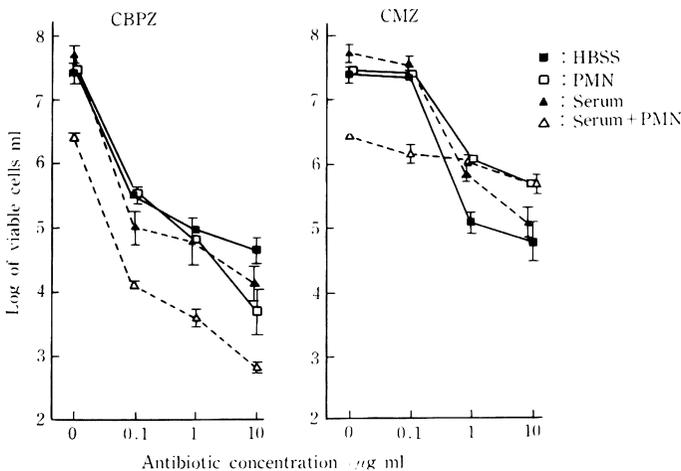
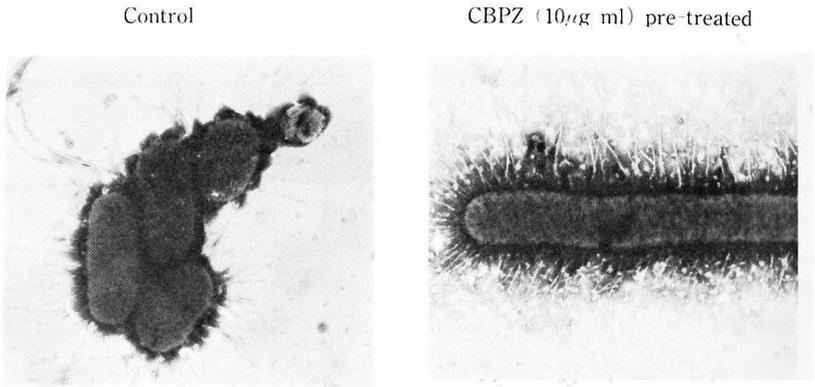


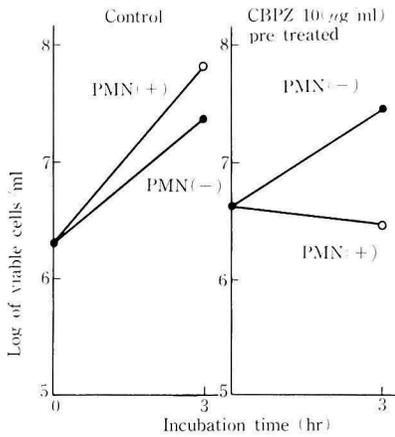
Photo. 1 Morphological effect of CBPZ on *E. coli* TK-16



れなかった (Fig. 7)。

2) ヒト PMN : *E. coli* TK-16 は薬剤無添加時には

Fig. 9 Phagocytosis and killing of CBPZ pre-treated *E. coli* TK-16 by rabbit PMN



PMN と新鮮血清が共存時においてのみ殺菌作用を受け生菌数は約 1/10 に減少した。CBPZ と PMN との協力作用は新鮮血清の添加によって増強され、CBPZ 単独群に比べて生菌数は約 1/30~1/70 に減少した。しかし、CMZ の場合は新鮮血清の添加によりかえって殺菌作用は減弱した (Fig. 8)。

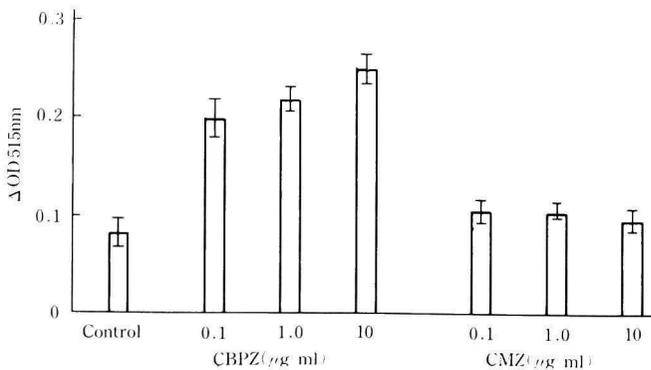
4. 薬剤前処理菌体に対するウサギ PMN の貪食殺菌作用

CBPZ 10 μg/ml で前処理した *E. coli* TK-16 に対するウサギ PMN の貪食殺菌作用を無処理の菌体と比較した (Fig. 9)。CBPZ で前処理した菌体はウサギ PMN の貪食殺菌作用に対して感受性を示し、ウサギ PMN 非共存時の約 1/10 に菌数が減少した。また CBPZ 前処理菌体の電子顕微鏡像は filament form を示していたがペリ毛には特に変化はなかった (Photo. 1)。

5. 薬剤前処理菌体に対するウサギ PMN の NBT 還元能

CBPZ 0.1, 1.0 および 10 μg/ml で前処理した *E. coli* TK-16 に対するウサギ PMN の NBT 還元能は無

Fig. 10 Effects of CBPZ or CMZ pre-treated *E. coli* TK-16 on NBT test



処理あるいは CMZ 前処理菌体に対するそれと比べて明らかに高い値を示し、無処理群に比べて各々約 2.3, 2.5 および 2.9 倍の値を示した (Fig. 10)。

III. 考 察

前報¹⁾および本報の実験から明らかなように、PMN の貪食殺菌作用に及ぼす抗生剤の影響は、菌種菌株あるいは抗生剤の種類によって一様ではない。すでに述べたように、PMN の貪食殺菌作用を受ける菌株は、抗生剤の添加によってもそれ以上貪食殺菌を受け易くなることはなかった。しかし、PMN の貪食殺菌に抵抗性を示した菌株は MIC 濃度近辺の抗生剤添加によって PMN の貪食殺菌を受け易くなった。すでに β -lactam 系抗生剤はほとんど PMN 内に取り込まれないことが知られており⁹⁾、また VAUDAUX⁷⁾は一度 PMN に取り込まれ、*S. aureus* が Gentamicin による殺菌を受けないことを報告している。これらのことから抗生剤と PMN との協力作用は、PMN 内においてよりむしろ PMN 外においてすでに起こっているものと推察された。例えば、抗生剤によって damage を受け filament 状となった菌が何らかの機作によって PMN の貪食殺菌を受け易くなったことが考えられる。この作用機作については不明の点が多いが^{8,9,10)}、今回のわれわれの実験結果で、CBPZ によって前処理した *E. coli* TK-16 がウサギ PMN の NBT 還元能を著しく賦活した。このことは薬で前処理し、形態変化を起こした菌体が単に PMN 貪食殺菌作用に抵抗を失ったためだけではなく、形態変化を起こした菌体に対して PMN が活発な食菌機能発揮することが考えられる。CBPZ はウサギ PMN の協力作用を示し易かったが、この作用はウサギ新鮮清の共存によってより増強された。したがって CBPZ 貪食細胞とのみ協力作用を示すだけでなく、抗体あるいは補体など血清因子とも協力作用を示すことが示唆された。またこれらの協力作用はヒトより採取した PMN あるいは新鮮血清との間にも認められた。PMN あるいは血清などの生体防禦因子と抗生剤の協力作用の検討より臨床に近いモデルとして意義があると考えられ、しかし生体内における抗生剤の効果は血中濃度、組

織移行性あるいは感染菌の不活化酵素などによっても左右される。また実験動物を用いた感染防禦効果については動物種差の問題がある。したがって、抗生剤の生体内効果について論ずる際にはこれらの要因を総合した判定が必要と考えられる。

文 献

- 1) 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及ぼす Piperacillin, Carbenicillin の相互作用。Chemotherapy 31: 639~645, 1983
- 2) 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
- 3) 才川 勇, 保田 隆, 福岡義和, 高畑正裕, 松原信之, 四辻 彰, 岡本直子: T-1982 の細菌学的評価。Chemotherapy 30 (S-3): 112~126, 1982
- 4) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) BAEHNER, R. L. & D. G. NATHAN: Quantitative NBT test in chronic granulomatous disease. New Engl. J. Med. 278: 971~976, 1968
- 6) PROKESCH, C. R. & W. L. HAND: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 373~380, 1982
- 7) VAUDAUX, P. & F. A. WALDVOGEL: Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 743~749, 1979
- 8) 峯 靖弘, 野々山重男, 西田 実: 多形核好中球による *Pseudomonas aeruginosa* の貪食殺菌効果と抗生物質の作用。Chemotherapy 22: 247~251, 1974
- 9) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 遠 彦三: 血清又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
- 10) LORIAN, V.; B. ATKINSON & Y. KIN: Phagocytosis of filaments of *Escherichia coli* produced with mezlocillin. J. Antimicrobial Chemotherapy 4: 71~78, 1983

EFFECT OF β -LACTAMS ON THE PHAGOCYTOSIS AND KILLING OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

YASUSHI IKEDA, YOSHIKAZU FUKUOKA, YUUKO ITO, KAZUMI MURO,
TAKASHI YASUDA and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan

The effect of cefbuperazone on the phagocytosis and killing of polymorphonuclear leukocytes were studied and compared with those of cefmetazole and latamoxef. The following results were obtained.

1) Cefbuperazone showed apparently stimulative effect on the phagocytosis and killing of rabbit polymorphonuclear leukocytes against 6 strains of bacteria, and this effect was superior to those of cefmetazole and latamoxef.

2) The effect of cefbuperazone on polymorphonuclear leukocytes was activated with addition of fresh serum. A similarly phenomenon was noted with human polymorphonuclear leukocytes.

3) When *Escherichia coli* was pre-treated with cefbuperazone, the pre-treated cells were more easily phagocytized and killed by rabbit polymorphonuclear leukocytes than non-treated cells.

4) Nitroblue tetrazolium dye reduction in rabbit polymorphonuclear leukocytes were tested with the cells pre-treated or non-treated with cefbuperazone. The cells pre-treated with cefbuperazone increased the amount of reduced nitroblue tetrazolium in rabbit polymorphonuclear leukocytes much more than non-treated control.

From these result, cefbuperazone should show stimulative effect on the bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes.