

各種抗菌薬のマウス脾抗体産生細胞への影響

(2) 側鎖の影響

小川正俊・五島瑛智子

東邦大学医学部微生物学教室

石川文雄・木村一郎

東邦大学医学部免疫学研究室

(昭和61年9月8日受付)

各種抗菌薬の免疫系への影響を調べる目的で、ヒツジ赤血球で免疫したマウス脾臓の抗体産生細胞数の増減を指標として検討した。 β -lactam系抗菌薬のうちでペニシリン系に属する Ticarcillin は投与量によってマウス抗体産生能を増強する作用が認められ、その原因は側鎖の thiophen の構造に由来することが明らかとなった。しかし Ticarcillin には直接 B cell を分化させる作用はなく、T cell を介した間接的な作用であることが示唆された。

一方、抗体産生細胞数の抑制が明確に認められるセフェム系の Cefsulodin では、3位と7位の側鎖の構造に由来する現象であることが確認された。

前報¹⁾において抗菌薬の免疫系に対する影響を調べるため、ヒツジ赤血球で免疫したマウス脾臓の抗体産生細胞に対する阻害作用をカニンガム法を用いて検討した。

β -lactam系抗菌薬(20 mg/mouse)のうちで、ペニシリン系薬剤は一般にマウスの抗体産生細胞を阻害する作用は弱かった。

ペニシリン系の母核である 6-aminopenicillanic acid, セフェム系の基本骨格である 7-aminocephalosporanic acid の阻害作用はともに弱かったが、セフェム系抗菌薬は概してペニシリン系抗菌薬より阻害作用が強く、特に Cefsulodin, Cefmenoxime, Cefotiam および Ceftazidime など顕著であった。

このことから、 β -lactam 系の阻害的影響は側鎖の構造に起因すると考え、今回は、先の報告にひきつづき他の抗菌薬について検討を行なうとともに、 β -lactam 系の側鎖の影響について検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

Cefminox (CMNX, 744 μ g/mg, 明治製薬)
 Aztreonam (AZT, 947 μ g/mg, 日本スライプ)
 Imipenem (IPM, 990 μ g/mg, 日本メルク 萬有)
 Micronomicin (MCR, 571 μ g/mg, 協和醗酵)
 Habekacin (HBK, 700 μ g/mg, 明治製薬)
 HAPA-B (710 μ g/mg, 東洋醸造)
 Cinoxacin (CINX, 1,000 μ g/mg, 塩野義製薬)

Enoxacin (ENX, 1,000 μ g/mg, 大日本製薬)
 Ofloxacin (OFLX, 1,000 μ g/mg, 第一製薬)
 Clindamycin (CLDM, 915.5 μ g/mg, UP John)
 Metronidazole (MNZ, 1,000 μ g/mg,
 日本ローディア)

Fosfomycin (FOM, 741 μ g/mg, 明治製薬)
 Chloramphenicol (CP, 1,000 μ g/mg, 三共)
 Colistin (CL, 12,500 unit/mg, 萬有製薬)
 Polymyxin (PL, 7,800 unit/mg, 台糖ファイザー)
 Vancomycin (VCM, 931 μ g/mg, 塩野義製薬)
 Rifampicin (RFP, 1,000 μ g/mg, 第一製薬)

2. 抗体産生能の測定法

1群3匹の ICR 系、雄マウスをヒツジ赤血球で免疫し、脾臓内に出現する抗体産生細胞数をカニンガムの方法²⁾(直接法)で測定した。すなわち 1×10^8 cells/mouse のヒツジ赤血球をマウス腹腔内に接種し、同時に薬剤を投与した。4日後に摘出した脾臓から得た細胞浮遊液 0.4 ml に MEM 液 0.4 ml, 10%ヒツジ赤血球浮遊液 0.1 ml およびモルモット補体 0.1 ml を加え、攪拌後、カニンガムチューブに入れ、両端をパラフィンで封入した。溶血斑の数を 37°C, 1.5 時間放置後測定し、抗体産生細胞数とした。

3. 胸腺細胞数および脾臓内リンパ球数の測定

マウス胸腺および脾臓を採取後、MEM 培養液にて洗浄後、シャーレ上 (MEM 培養液 5 ml 添加) にて細胞

後、ピンセットではぐし、胸腺細胞、脾臓細胞をそれぞれ採取した。脾臓細胞は赤血球除去用のトリス緩衝液で赤血球を除いて浮遊液とした。この細胞浮遊液中の細胞数を血球計算盤にて測定した。

4. *In vitro* 抗体産生細胞数の測定

マウス脾臓から、脾臓細胞を採取、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む MEM 培養液にて、細胞数を 1×10^6 cells/ml に調整した。これに LPS (*E. coli* 0127: B8, Difco) および Ticarcillin を添加、168 時間、5% CO₂, 37°C の条件下にて培養した。遠心後、上清を除去、細胞を蛍光スライドグラス上に直接塗抹した。

4°C のアセトンで 10 分間固定した後緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、抗マウスイムノグロブリン FITC 結合抗体 (カベル社) にて 1 時間染色し、PBS で 1 回洗浄後、蛍光顕微鏡で抗体産生細胞数を測定した⁹⁾。

5. 側鎖の抗体産生細胞数に対する影響

Benzyl sulfanic acid, aminothiazole および pyridine を 0.85% 生理食塩水に溶解し、マウスの皮下に投与した。Thiophen は dimethyl sulfoxide に溶解し、マウスの皮下に投与した。

薬剤は、 1×10^8 cells/ml のヒツジ赤血球をマウス腹腔内に接種した直後、皮下に投与した。4 日後にマウス脾臓の抗体産生細胞数を測定した。

II. 成 績

1. 各種抗菌剤の抗体産生細胞数に対する影響

ヒツジ赤血球 (1×10^8 cells/mouse) と薬剤を同時に投与した後、マウス脾臓におけるヒツジ赤血球に対する抗体産生細胞数の変化を測定した。各種薬剤 17 剤を投与した結果を Table 1 に示した。

前報において報告した成績と同様に、 β -lactam 系の Cefminox, Aztreonam, Imipenem では control に比べ、抗体産生細胞数は減少し、アミノ配糖体では、Habekacin および HAPA-B に抗体産生細胞数の減少がみられた。

ピリドンカルボン酸系抗菌薬では、Enoxacin, Cinoxacin に抗体産生細胞数の減少がみられたが、Ofloxacin では影響が認められなかった。

また Fosfomycin, Colistin, Polymyxin, Vancomycin, Rifampicin も control に比べ抗体産生細胞数は減少した。

2. マウス脾臓の抗体産生細胞と脾臓内リンパ球数に対する Ticarcillin の影響

前報において Ticarcillin は試験薬剤中、抗体産生細胞数が対照群に比べて増加した唯一の薬剤であった。そこで Ticarcillin の量的検討を試み、40 mg/mouse, 20 mg/mouse, 5 mg/mouse 投与時における抗体産生細胞

Table 1 The effect of antibiotics on the antibody producing cells in spleen of immunized mice

| Drugs | Administration | | Antibody producing cells ($\times 10^5$ PFC/spleen) \pm S.D. |
|-----------------|--------------------|-------|---|
| | Dose (mg/mouse) | Route | |
| Control | | | 9.10 \pm 0.66 |
| Cefminox | 20.0 | S.C. | 4.68 \pm 0.98 |
| Aztreonam | 20.0 | S.C. | 4.30 \pm 0.84 |
| Imipenem | 20.0 | S.C. | 5.48 \pm 1.70 |
| Micronomicin | 1.0 | S.C. | 7.18 \pm 2.27 |
| Habekacin | 1.0 | S.C. | 4.39 \pm 1.53 |
| HAPA-B | 1.0 | S.C. | 4.55 \pm 1.17 |
| Cinoxacin | 5.0 | P.O. | 6.64 \pm 1.44 |
| Enoxacin | 5.0 | P.O. | 1.60 \pm 0.28 |
| Ofloxacin | 5.0 | P.O. | 9.08 \pm 2.43 |
| Clindamycin | 5.0 | P.O. | 7.04 \pm 1.63 |
| Metronidazole | 5.0 | P.O. | 7.63 \pm 1.75 |
| Fosfomycin | 20.0 | P.O. | 6.02 \pm 2.32 |
| Chloramphenicol | 5.0 | P.O. | 7.55 \pm 2.65 |
| Colistin | 1.0 | S.C. | 3.85 \pm 1.32 |
| Polymyxin | 1.0 | S.C. | 5.41 \pm 1.95 |
| Vancomycin | 5.0 | P.O. | 6.92 \pm 1.45 |
| Rifampicin | 5.0 | P.O. | 3.78 \pm 1.89 |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19 \pm 1g, 3 animals/group

Drugs and sheep blood red cells are simultaneously administered to mice.

Table 2 Comparison between the antibody producing cells and lymphocytes in spleen of mice after administration of ticarcillin

| Drug | Dose (mg/mouse) | Antibody producing cells ($\times 10^5$ PFC/spleen) \pm S.D. | Lymphocytes/spleen ($\times 10^6$ cells) \pm S.D. |
|-------------|-----------------|---|--|
| Control | | 9.1 \pm 0.67 | 2.67 \pm 0.74 |
| Ticarcillin | 40 | 3.31 \pm 1.41 | 1.67 \pm 0.28 |
| | 20 | 11.52 \pm 3.12 | 2.14 \pm 0.15 |
| | 5.0 | 8.35 \pm 2.33 | 2.05 \pm 0.18 |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19 \pm 1 g, 3 animals/group

数およびリンパ球数を測定し Table 2 に示した。

Ticarcillin 40 mg/mouse 投与では、抗体産生細胞数が減少したが、20 mg/mouse 投与では増加、5 mg/mouse では影響がみられなかった。抗体産生細胞数の変化に対しては、Ticarcillin の投与量の影響が確認された。

マウス脾臓のリンパ球数は Ticarcillin 40 mg/mouse 投与では control に比べ、明らかに減少していたが、20 mg/mouse および 5 mg/mouse 投与では大きな変化はみられなかった。

3. *In vitro* における抗体産生細胞数

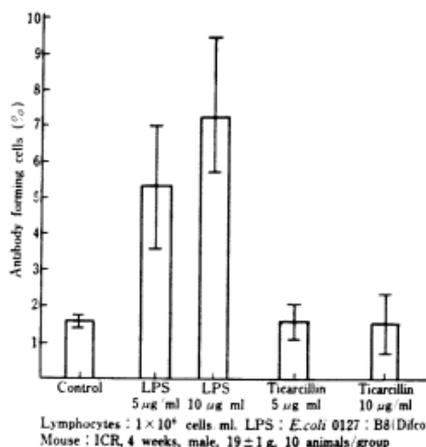
B cell に対し直接作用し、これを活性化する LPS の抗体産生細胞に対する影響を Ticarcillin と比較した成績を Fig. 1 に示した。

LPS は直接 B cell に作用するために、5 μ g/ml, 10 μ g/ml を作用させた場合に、dose response が認められ、control に比べて抗体産生細胞数が増加した。しかし Ticarcillin では control と同値であり、B cell への直接作用は認められなかった。

4. *In vivo* における LPS の抗体産生細胞に対する影響

マウス脾臓における抗体産生細胞に対する LPS の影響を検討した成績を Table 3 に示した。

LPS を 10-40 μ g/mouse 投与することにより、control に比べ各投与量とも抗体産生細胞数は減少した。

Fig. 1 Effect of ticarcillin and LPS on the antibody forming cells in the mouse spleen lymphocytes *in vitro*

5. 胸腺細胞に対する影響

20 mg/mouse 投与で抗体産生細胞数が増加する Ticarcillin と減少する Cefsulodin を用いて、胸腺に対する影響を検討した成績を Table 4 に示した。

Control に比べ、Ticarcillin は胸腺細胞が増加し、胸

Table 3 Effect of LPS on the antibody producing cells of the mouse spleen

| Substance | Antibody producing cells ($\times 10^5$ PFC/spleen) \pm S.D. |
|-----------------------------|---|
| Control | 9.1 \pm 0.67 |
| LPS <i>E. coli</i> 0127: B8 | |
| 40 μ g/mouse | 0.36 \pm 0.3 |
| 20 μ g/mouse | 1.15 \pm 0.63 |
| 10 μ g/mouse | 2.08 \pm 1.20 |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19 \pm 1 g, 3 animals/group

Table 4 Comparison between weight of thymus and number of thymus cells after administration of ticarcillin and cefsulodin

| Drugs | Weight of thymus (mg±S.D.) | Number of thymus cells ($\times 10^6$ cells) ±S.D. |
|----------------------------|----------------------------|---|
| Control | 71.5±14.2 | 151.5±31.4 |
| Ticarcillin 20 mg/mouse | 79.3±18.4 | 188.0±70.0 |
| Cefsulodin 20 mg/mouse | 64.0± 5.0 | 138.7±39.9 |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19±1g, 3 animals/group

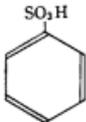
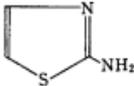
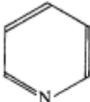
腺の重量も増加した。一方 Cefsulodin は胸腺の重量、細胞数とも減少した。

6. β -lactam 剤の側鎖の影響

β -lactam 剤の化学的修飾に用いられている3種の側鎖について、抗体産生細胞数に対する影響を Table 5, 6 に示した。

Benzyl sulfonic acid や aminothiazole, pyridine を側鎖にもつ抗菌剤の Cefsulodin, Cefmenoxime, Cefotiam, Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftizoxime などの投与により、マウス脾臓の抗体産生細胞数の減少が認められたが、それらの側鎖部分の化合物の投与によって抗体産生細胞数の著明な減少傾向が認められ

Table 5 Influence of various side chain of β -lactam antibiotics on the antibody producing cells of the mouse spleen

| Side chains | Route | Antibody producing cells ($\times 10^5$ PFC/spleen) | Drugs |
|---|-------|--|--|
| Control 0.85% saline | S.C. | 9.1 ± 0.67 | |
| Benzyl sulfonic acid 6.35 mg/mouse  | S.C. | 1.4 ± 1.19 | Sulbenicillin Cefsulodin |
| Aminothiazole 3.6 mg/mouse  | S.C. | 5.7 ± 0.42 | Cefmenoxime Cefotaxime Cefotiam Ceftriaxone Ceftazidime Ceftizoxime |
| Pyridine 3.0 mg/mouse  | S.C. | 4.47 ± 0.74 | Cefsulodin Ceftazidime Cephaloridine |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19±1g, 3 animals/group

Table 6 Effect of side chain on the antibody producing cells of the mouse spleen

| Side chains | Route | Antibody producing cells ($\times 10^6$ PFC/spleen) | Drugs |
|---|-------|---|-------|
| Control (Dimethyl sulfoxide) | S.C. | 6.27 \pm 2.38 | / |
| Thiophen 4mg/mouse  | S.C. | 6.99 \pm 1.01 | |

Mouse: ICR, 4 weeks, male, 19 \pm 1g, 3 animals/group

た (Table 5)。

一方 Ticarcillin の 6 位の側鎖, thiophen は control よりも抗体産生細胞数が程度ではあるが増加した (Table 6)。

III. 考 察

前報¹⁾において Ticarcillin は 20 mg/mouse 投与時に抗体産生細胞数が増加することが認められていたが、今回の実験で 40 mg/mouse では減少, 5 mg/mouse では全く影響がみられなかったことから Ticarcillin の抗体産生細胞の増加作用には、投与量が影響することが確認され、他剤においても投与量の影響を無視し得ないことが示唆された。しかし脾臓内リンパ球数については、変化が認められなかった。そこで *in vitro* で Ticarcillin を B cell に作用させ、抗体産生細胞にどのような影響を与えるかを検討したところ、対照とした LPS には報告²⁾のとおり、direct に抗体産生細胞の増加作用が認められたが、Ticarcillin にはこのような作用が認められなかった (Fig. 1)。

In vivo においては、LPS の作用は *in vitro* とは異なり、マウス脾臓の抗体産生細胞数が減少し、この点についても Ticarcillin の場合と異なる挙動を示した (Table 3)。

ペニシリン系抗菌薬のなかで、20 mg/mouse 投与で抗体産生能の増強を示す Ticarcillin には脾臓内リンパ球数に対しては影響が認められなかったが (Table 2)、胸腺細胞数については増加傾向が認められた (Table 4)。

Ticarcillin の増強作用には、T cell の分化、成熟過程に Ticarcillin の適量がなんらかの影響を及ぼすためと考えられる。

Ticarcillin の 6 位の側鎖の thiophen はそのもの自体に抗体産生細胞を増加させる作用を有しているため、これが Ticarcillin の抗体産生細胞数を増加させることに関与している可能性も考えられる。

Benzyl sulfonyl と aminothiazole, pyridine などを側鎖にもつ β -lactam 剤は、抗体産生細胞数が減少する傾向が認められ、一方、セフェム剤では 7 位に benzyl sulfonyl 基、3 位に pyridine をもつ Cefsulodin が最も影響が大きく、側鎖構造との関連性が明らかであった。

以上の結果により、 β -lactam 剤の抗体産生能に対する影響には化学的修飾による側鎖の重要性が示唆された。

抗菌物質の免疫学への関与は、まだ十分に解析されていないが、以上の成績から長期投与や宿主の基礎疾患によっては、薬剤の選択に重要な問題となり得ることが考えられる。

文 献

- 1) 小川正俊, 辻 明良, 石川文雄, 金子晴生: 各種抗菌薬のマウス脾抗体産生細胞への影響。東邦医学会誌 32(3): 450~454, 1985
- 2) CUNNINGHAM, A. J. & A. SZENBERG: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology* 14: 599~600, 1968
- 3) 矢田純一, 藤原道夫: リンパ球機能検査法, 348~353, 中外医学社, 1983
- 4) SJOBERG, O.; J. ANDERSSON, et al.: Lipopolysaccharide can substitute for helper cells in the antibody response *in vitro*. *J. Immunology* 2: 326, 1972

EFFECT OF VARIOUS ANTIBIOTICS ON ANTIBODY PRODUCING CELLS OF MOUSE SPLEEN

(II) INFLUENCE OF SIDE CHAINS

MASATOSHI OGAWA¹⁾, SACHIKO GOTO¹⁾, FUMIO ISHIKAWA²⁾
and ICHIROU KIMURA²⁾

Department of Microbiology¹⁾ and Laboratory of Immunology²⁾,
Toho University, School of Medicine

The influence of antibiotics on antibody production in the spleen was evaluated in mice immunized with sheep red blood cells.

In penicillins, enhancing effect on antibody production was observed, when 20 mg/mouse of ticarcillin was given in the immunized mice and considered due to the activity of thiophen radical of the antibiotic.

Ticarcillin did not act to B cells directly. As a marked decrease in antibody producing cells was observed when cefsulodin was injected, effect of side structure of cephem antibiotic including cefsulodin on the antibody production of mouse spleen was investigated. It was suggested that the side structure of those antibiotics played an important role for the antibody production.