

Cefbuperazone による補体殺菌能増強作用

出口 雅子・竹村 周平・小野寺秀記

上田 正博・杉野 成・近藤 元治

京都府立医科大学第一内科学教室

(昭和 62 年 3 月 16 日 受付)

Cefbuperazone (CBPZ, トミボラン[®]) の細菌に対する血清・補体との協力的殺菌作用について、補体の面から検討を加えた。

1/4 の最小発育阻止濃度 (MIC) の CBPZ と 5% 正常ヒト血清 (NHS) を共存させると、グラム陰性菌である *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* ならびに *Serratia marcescens* に対しては協力的殺菌作用が認められたが、グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* に対しては作用は認めなかった。血清・補体に感受性である *E. coli* は、先天的に C9 を完全に欠如している C9 欠損血清 (C9 D) によっても殺菌作用が認められたが、その力価は NHS に比べ約 1/4 程度であった。さらに 1/4 MIC の CBPZ は C9 欠損血清の *E. coli* に対する殺菌作用に対しても相乗的に働き、CBPZ の血清・補体との協力的殺菌作用は C9 の活性化以前の段階で生じているものと考えられた。CBPZ は正常人のみならず、C9 欠損者においても宿主の防御機能を高めることが期待され、臨床的価値が高いものと考えられた。

細胞壁合成阻害剤である β -lactam 剤は、血清・補体による殺菌を増強させることが報告されている^{1,2)}。新しく開発された cephem 系抗生物質である Cefbuperazone (CBPZ, トミボラン[®]) は、その試験管内抗菌力から類推されるよりも生体内効果が高い特徴を有するといわれ、実際に従来の cephem 系薬剤より強い血清・補体との協力的殺菌作用を有すると報告されている³⁾。

そこで、各種菌に対する CBPZ の血清・補体との協力的作用、ならびにグラム陰性菌の代表である *E. coli* に対する CBPZ と血清・補体との協力的殺菌作用を補体の面から若干の検討を行なった。

I. 材料および方法

1) 使用菌株および培地

Staphylococcus aureus FDA 209 P (*S. aureus*), *Escherichia coli* NIHJ J-2 (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 (*P. aeruginosa*) および *Serratia marcescens* IID 620 (*S. marcescens*) は、富山化学工業株式会社より供給を受けた。菌の前培養には Trypto-Soya Broth (日本製薬) を、実験系には Heart Infusion Broth (日本製薬) を、colony forming units (CFU) の測定には Heart Infusion 寒天培地 (日本製薬) を使用した。

2) 血清ならびに抗生物質

健常人より静脈採血にて血清を得た。C9 欠損血清 (C9 D) は稲井真弥教授 (大阪医科大学病態検査学教

室) より供給を受けた。CBPZ は富山化学工業より供給を受け、各種被験菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は寒天平板希釈法により測定し、その値は *S. aureus* 12.5 μ g/ml, *E. coli* 0.39 μ g/ml, *P. aeruginosa* 25 μ g/ml, *S. marcescens* 0.05 μ g/ml であった。

3) 各種菌に対する血清・補体と CBPZ との協力的殺菌作用

各被験菌は、Trypto-Soya Broth にて 37°C 20 時間培養後、さらに Heart Infusion Broth 中で 37°C 3 時間培養したものを使用した。1/4 MIC 濃度の CBPZ のみ、5% 濃度の健常人血清 (NHS) のみ、ならびに両者を添加した Heart Infusion Broth 2.0 ml を作り、各菌を 1.0×10^4 /ml 接種した。コントロールとしては、培養液のみに菌を接種した。37°C で振とう培養を続け、0, 2, 4 および 24 時間目にその一部をとり、適当に対数希釈した後、Heart Infusion 寒天培地に散布し、37°C 24 時間培養後、集落数を数え、生菌数 (CFU) を計算した。

4) *E. coli* に対する血清・補体の作用

2.5%, 5% および 10% 濃度の正常人血清あるいは C9 欠損血清を添加した 2.0 ml の Heart Infusion Broth に 1.0×10^4 /ml の *E. coli* を接種し、37°C 振とう培養を続けながら、0, 2, 5 および 9 時間目にその一部をとり、生菌数を測定した。

5) *E. coli* に対する C9 欠損血清と CBPZ の協力的殺菌作用

1/4 MIC 濃度の CBPZ を含む Heart Infusion Broth に, C9D を 2.5%, 5% ならびに 10% の濃度となるよう添加し, 1.0×10^4 /ml の *E. coli* を接種した。37°C 揺とう培養を続け 0, 2, 4 および 9 時間目にその一部をとり, 生菌数を測定した。

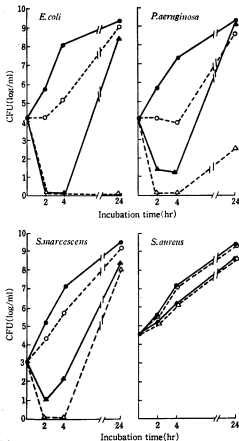
II. 結 果

1. 各種菌に対する CBPZ, 血清・補体ならびに両者の協力的殺菌作用

Heart Infusion Broth に 5% NHS 単独, 1/4 MIC 濃度の CBPZ 単独, ならびに両者を共存させた時の各種被験菌に対する殺菌曲線を Fig. 1 に示した。グラム陰性桿菌である *E. coli*, *P. aeruginosa* ならびに *S. marcescens* においては, CBPZ 単独にて若干の菌種の間での差は認めるものの 37°C 2時間培養後, 生菌数の増加は

Fig. 1 Influence of CBPZ at the concentration of 1/4 MIC on bactericidal activity of normal human serum (NHS) against various kinds of bacteria.

Symbols: ●, Broth alone; ○, CBPZ; ▲, NHS; △, CBPZ+NHS.



抑制されるが, その後再増殖がみられる。さらに, NHS 単独でもグラム陰性菌では, 37°C 2時間培養後生菌数は低下するが, その後再増殖がみられた。それに対し CBPZ, NHS が共存すると, 殺菌作用は増強され *E. coli* では完全に殺菌が認められ 24 時間後においても再増殖はみられなかった。しかし *P. aeruginosa* および *S. marcescens* では, 4 時間目までは完全に殺菌されるが, それ以後は再増殖が認められた。

これに対し, グラム陽性球菌である *S. aureus* においては, CBPZ, NHS 単独および共存のいずれにおいても全く殺菌効果が認められなかった。

2. 正常人血清ならびに C9 欠損血清の *E. coli* 殺菌作用への影響

NHS ならびに C9D の 2.5%, 5% および 10% 濃度における *E. coli* の殺菌曲線を Fig. 2 に示した。2.5% NHS では, 37°C 5 時間目まで生菌数の減少がみられるが, 以後再増殖が認められた。5% および 10% NHS では培養 2 時間目以後で完全に殺菌された。これに対し, C9D では, 2.5% では生菌数の減少はみられず, 5% および 10% においても, 培養 5 時間までは若干の生菌数減少が認められるもの, 以後再増殖を認めた。2.5% NHS の殺菌曲線と 10% C9D のそれとは, ほぼ同様で, C9 の存在下では非存在下に比べ血清・補体の殺菌作用は約 4 倍の力価があると思われる。

3. C9 欠損血清と CBPZ の *E. coli* に対する協力的殺菌作用

2.5%, 5% ならびに 10% C9D のいずれの濃度においても, 1/4 MIC 濃度の CBPZ 共存下では殺菌作用の増強が認められ, 10% 濃度の C9D に CBPZ が加わると *E. coli* は完全に殺菌された (Fig. 3)。

III. 考 案

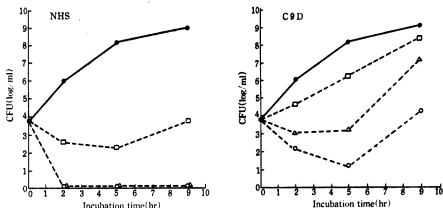
各種菌に対する血清・補体の殺菌作用において, CBPZ は菌種間での感受性の差はあるものの, グラム陰性菌に対して協力的殺菌作用を認めた。しかし, グラム陽性菌には作用は認めなかった。一般に, グラム陽性菌は細胞壁の構造上の相違から血清・補体に抵抗性であるため, CBPZ との協力的作用も受けにくいものと思われる。

血清・補体の *E. coli* に対する殺菌作用の検討より, C9D においても NHS より弱い, 殺菌作用が認められ, 10% C9D の殺菌曲線は 2.5% の NHS のそれとほぼ同様であった。この結果は単離精製された補体蛋白を用いた実験において *E. coli* の殺菌には C9 が必要であるといわれている事実⁽⁴⁾に反している。

しかし, 他方で C9D による *E. coli* の発育阻止の報告⁽⁵⁾もみられ, その違いが, *E. coli* の strain の違いによ

Fig. 2 Killing of *E. coli* in normal human serum (NHS) and congenitally deficient C9 serum (C9D).

Symbols: ●, Broth alone; □, 2.5% serum; △, 5% serum; ○, 10% serum.



るものなのか、あるいは血清中の C9 以外の成分、例えばリゾチームのようなものが C8 まで作用した *E. coli* を殺菌に導いているのかは不明である。

しかしながら、C9 欠損血清においても、CBPZ は *E. coli* に対して協力的殺菌作用を示した。その機序として、①赤血球のみならず有核細胞においても補体膜侵襲複合体 C5b-8 は細胞膜に穴をあけること^{7,8,9,10}、また、細胞の溶解には C9 非存在下では C9 存在下に比べて C5b-8 の数は多く必要とされる事実^{8,10} より、1/4 MIC という低濃度の CBPZ が細菌壁を変性させ、補体を活

性化し易くした結果、細菌膜上の C5b-8 の数を増加したことによるものか、あるいは、②有核細胞においては、細胞壁の修復機構を有するため、C5b-8 は膜面上で不安定であるといわれており^{11,12,13}、CBPZ が細胞壁の合成を阻害することにより、C5b-8 が細胞膜上で安定化し、殺菌作用が増強されることによるものかは不明である。いずれにせよ、CBPZ の血清・補体による *E. coli* に対する殺菌への協力作用が、C9 の活性化以前の段階で生じているということが出来る。

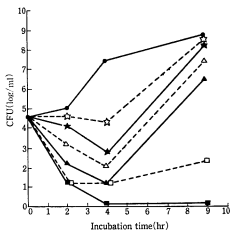
以上により、CBPZ は正常人のみならず、C9 欠損患者においても、宿主の防御機構を増強させることが期待され、臨床的価値が高いものと考えられる。

文 献

- MILLER, C. P. & A. Z. FOSTER: Studies of the action of penicillin. III. Bactericidal action of penicillin on Meningococcus *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56: 205-208, 1944
- WATANABE, K.; R. KIN, M. MURAKAMI & M. KONDO: Influence of human serum on bactericidal activity of ceftizoxime sodium. Chemotherapy 32: 113-117, 1986
- 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
- SCHREIBER, R. D.; D. C. MORRISON, E. P. PODACK & H. J. MÜLLER-EBERHARD: Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. J. Exp. Med. 149: 870-882, 1979
- JOINER, K. A.; M. A. SCHMETZ, M. E. SANDERS, T. G. MURRAY, C. H. HAMMER, R. DOURMASHKIN & M. M. FRANK: Multimeric complement

Fig. 3 Influence of CBPZ at the concentration of 1/4 MIC on killing of *E. coli* in congenitally deficient C9 serum (C9D).

Symbols: ●, Broth alone; ☆, 2.5% C9D; ★, 2.5% C9D+CBPZ; △, 5% C9D; ▲, 5% C9D+CBPZ; □, 10% C9D; ■, 10% C9D+CBPZ.



- component C9 is necessary for killing of *Escherichia coli* J5 by terminal attack complex C5b-9. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 4808~4812, 1985
- 6) LINT, T. F.; H. J. ZEITZ & H. GEWURZ: Inherited deficiency of the ninth component of complement in man. J. Immunol. 125: 2252~2257, 1980
- 7) STOLFI, R. L.: Immune lytic transformation: A state of irreversible damage generated as a result of reaction of the eighth component in guinea pig complement system. J. Immunol. 100: 46~54, 1968
- 8) TAMURA, N.; A. SHIMADA & S. CHANG: Further evidence for immune cytolysis by antibody and the first eight components of complement in the absence of C9. Immunology 22: 131~140, 1972
- 9) HARRIMAN, G. R.; A. F. ESSER, E. R. PODACK, A. C. WUNDERLICH, A. J. BRAUDE, T. F. LINT & J. G. CURD: The role of C9 in complement-mediated killing of *Neisseria*. J. Immunol. 127: 2386~2390, 1981
- 10) MORGAN, B. P.; D. K. IMAGAWA, J. R. DANKERT & L. E. RAMM: Complement lysis of U 937, a nucleated mammalian cell line in the absence of C9: Effect of C9 on C5b-8 mediated cell lysis. J. Immunol. 136: 3402~3406, 1986
- 11) RAMM, L. E.; M. B. WHITLOW, C. L. KOSKI, M. L. SHIN & M. M. MAYER: Elimination of complement channels from the plasma membranes of U 937, a nucleated mammalian cell line: Temperature dependence of the elimination rate. J. Immunol. 131: 1411~1415, 1983
- 12) MORGAN, B. P.; A. K. CAMPBELL, J. P. LUZIO & M. B. HALLETT: Recovery of polymorphonuclear leucocytes from complement attack. Biochem. Soc. Trans. 12: 779, 1984
- 13) CARNEY, D. F.; C. L. KOSKI & M. L. SHIN: Elimination of terminal complement intermediates from the plasma membrane of nucleated cells: The rate of disappearance differs for cells carrying C5b-7 or C5b-8 or a mixture of C5b-8 with a limited number of C5b-9. J. Immunol. 134: 1804~1809, 1985

SYNERGETIC BACTERICIDAL EFFECT WITH SERUM COMPLEMENT BY CBPZ

MASAKO DEGUCHI, SHUHEI TAKEMURA, HIDEKI ONODERA,
MASAHIRO UEDA, SHIGERU SUGINO and MOTOHARU KONDO

First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

The influence of cefbuperozone (CBPZ) on the synergetic bactericidal effect with serum complement was investigated. One-fourth of minimal inhibitory concentration (MIC) of CBPZ increased the killing activity of gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*, but no synergetic bactericidal effect of CBPZ with serum complement was observed on gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*.

E. coli was also killed by congenitally deficient C9 serum (C9D). The killing activity of C9D was weaker than that of NHS; the killing activity of 10% C9D was equivalent to that of 2.5% NHS.

CBPZ increased the killing activity of *E. coli* by C9D, and when 10% C9D was used with 1/4 MIC of CBPZ, 10⁴ *E. coli* was completely killed within 4 hours after incubation.

It is concluded that CBPZ has the synergetic effect on *E. coli* with serum complement before C9 activation.