

## *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* および *Staphylococcus aureus* に対する補体とセフェム系抗生剤との協力的殺菌作用の検討

清 田 浩

東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室\*

(昭和63年7月5日受付)

50% 発育阻止濃度の各種セフェム系抗生剤と maximum sub-lethal concentration のモルモット補体共存下あるいは非共存下における *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* 18 S, そして *Staphylococcus aureus* 209 P の経時的生菌数を比較することにより各菌に対する補体とセフェム系抗生剤との協力的殺菌作用の有無を検討した。

*E. coli* に対しては cefmenoxime と ceftizoxime の殺菌作用が補体存在下において著しく増強され、これら2剤と補体との間に強い協力的殺菌作用を認めた。また latamoxef と aztreonam は補体存在下において培養開始5時間後に殺菌力の増強を認めたものの、24時間後には菌は再増殖した。cefazolin, cefotiam, cefmetazole, cefoperazone, cefotaxime, cefbuperazone, そして ceftazidime と補体との間には協力的殺菌作用は認めなかった。

*P. aeruginosa* と *S. aureus* に対してはセフェム系抗生剤と補体との協力的殺菌作用を認めなかった。

以上の結果より *E. coli* に対する cefmenoxime と ceftizoxime の優れた生体内効果が示唆された。

**Key words:** 補体, セフェム系抗生剤, 協力的殺菌作用

細菌感染症に対する抗菌化学療法において、抗菌剤は補体、 $\beta$ -リジンなどの体液性因子あるいは好中球、マクロファージなどの細胞性因子からなる非特異的感染防御機構<sup>1)</sup>と協力して起炎菌を殺菌することが推測される。そして、抗菌剤の体内動態と抗菌力以外にこのような抗菌剤と感染防御機構との協力の有無と程度を知ることは抗菌剤の有用性と合理的な投与方法を類推するうえで重要であると考えられる。

補体はオプソニン作用<sup>2-7)</sup>のほかに、抗体の存在下でグラム陰性菌の外膜を傷害し殺菌(溶菌)する免疫殺菌(溶菌)作用を有することが知られている<sup>8,9)</sup>。一方、 $\beta$ -ラクタム系抗生剤は菌の細胞膜にあるムレイン架橋酵素を阻害して細胞壁合成を妨げ殺菌すると考えられている<sup>10,11)</sup>。このように補体と $\beta$ -ラクタム系抗生剤は作用機序こそ異なるものの同じ細胞壁を標的とするため、両者の共存下では両者は協力して菌を殺すことが想像される。

補体と $\beta$ -ラクタム剤との協力的殺菌作用の証明は、従来 *in vitro* でヒトあるいは動物の血清に抗菌剤を加

えてその殺菌力を検討する方法とヒトあるいは動物にあらかじめ抗菌剤を投与し薬剤投与後の血清の殺菌力を検討する方法により試みられてきた。前者の方法では、ampicillin<sup>12)</sup>, piperacillin<sup>13)</sup>, cefbuperazone<sup>14,15)</sup>, cefmenoxime<sup>15,16)</sup>, ceftizoxime<sup>15,17)</sup>, cefmetazole<sup>15)</sup>, そして cefuroxime<sup>18)</sup> の殺菌力がヒトあるいはモルモットの血清により増強されたとの報告があり、後者の方法でも ceftazidime<sup>19)</sup>, cefotaxime<sup>20)</sup>, BRL-35650<sup>21)</sup>, そして imipenem<sup>22)</sup> の殺菌力が血清により増強されたとの報告がある。しかし、これら一連の報告は検討薬剤、被験菌が異なり、また使用された血清の補体価が不確定であるため単純な比較は不可能である。そこで今回我々は、50% 発育阻止濃度 (ID<sub>50</sub>) の抗生剤と maximum sub-lethal concentration (MSC) の補体の共存下と非共存下における *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, そして *Staphylococcus aureus* の経時的生菌数を比較することにより、抗菌剤と補体との協力的殺菌作用の有無を検討することを試みた。

\* 東京都港区西新橋 3-25-8

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

教室所有の標準株である *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* 18 S, そして *S. aureus* 209 P の3菌種を用いた。各菌株は L-broth 中に一夜、37°C で振盪培養したのち、Klett 光電光度計 (Klett 社製) にて濁度 (波長 660 m $\mu$ ) を測定した。そしてあらかじめ定めておいた生菌数-濁度曲線よりそれらの生菌数をもとめ、適宜希釈後実験に使用した。

## 2. 補体

モルモット乾燥補体 (東芝化学) を用いた。補体はグリーン氏液 (東芝化学) に 0°C で溶解後 WASSERMANN 反応縮方法<sup>23,24)</sup> に準じて 2% 感作羊赤血球 0.5 ml を完全溶血させる補体の最少量を 1 単位と規定した。

## 3. 抗生剤

各菌種にそれぞれ抗菌力を有するセフェム系抗生剤について検討した。すなわち *E. coli* については cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), cefoperazone (CPZ), ceftazidime (CAZ), latamoxef (LMOX), cefotaxime (CTX), ceftizoxime (CZX), cefmenoxime (CMX), aztreonam (AZT), そして cefbuperazone (CBPZ) の 11 剤を, *P. aeruginosa* については cefsulodin (CFS), CPZ, CAZ, そして AZT の 4 剤を, *S. aureus* については CEZ, CTM, CMZ, そして CPZ の 4 剤を使用した。

## 4. 補体の maximum sub-lethal concentration (MSC) の決定

10<sup>5</sup> CFU/ml の各菌を 0.1 単位/ml から 10.0 単位/ml まで、種々の濃度の補体を含む 20% 非働化ヒト血清 (Flow 社) 加 L-broth 中に 37°C で振盪培養し、培養開始後 1, 3, 5, 24 時間後の生菌数を colony forming unit より求め、これらを補体と非働化血清を含まない L-broth 中でのそれらと比較した。そして菌の増殖に影響 (抑制) を及ぼさない補体の最大量を MSC とした。

5. 抗生剤の 50% 発育阻止濃度 (ID<sub>50</sub>) の決定

10<sup>5</sup> CFU/ml の各菌を 0.01  $\mu$ g/ml から 12.5  $\mu$ g/ml まで、種々の濃度の各抗生剤を加えた L-broth 中に 37°C で 5 時間振盪培養し、それらの生菌数を colony forming unit より求めた。そして、その結果より生菌数-薬剤濃度曲線を作成し菌が培養開始後 5 時間でも 10<sup>5</sup> CFU/ml となるような薬剤濃度を ID<sub>50</sub> とした。

## 6. 補体と抗生剤との協力的殺菌作用の検討

10<sup>5</sup> CFU/ml の各菌を MSC の補体および 20% 非働化ヒト血清存在下と非存在下に ID<sub>50</sub> の各抗生剤加 L-broth 中で 37°C で振盪培養し、培養開始後 1, 3, 5,

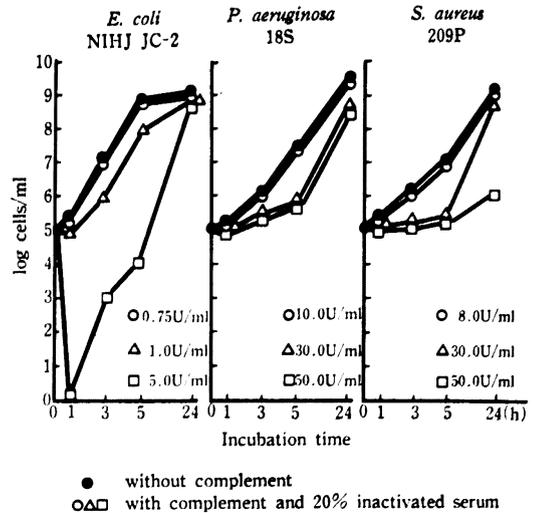


Fig. 1. Bactericidal effect of guinea-pig complement against *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* 18 S and *S. aureus* 209 P

そして 24 時間後の生菌数を colony forming unit より求めた。そして補体非存在下の生菌数に対する補体存在下のそれらの比が 10<sup>-2</sup> 未満のときを補体と抗生剤との協力的殺菌作用ありと、1 未満 10<sup>-2</sup> 以上のときを相加的殺菌作用ありと判定した。

## II. 結果

## 1. 各菌に対する補体の MSC の決定

各菌ともに補体濃度が高くなるに従いその生菌数は、補体非存在下でのそれらに比べ減少する傾向が認められた (Fig. 1)。

*E. coli* は補体に最も高い感受性があり、補体濃度が 0.75 単位/ml 以下では菌の発育に影響を及ぼさなかったが、それ以上では発育が抑制され、5.0 単位では培養開始後 1 時間に生菌数の著明な減少を認めた。これに対し *P. aeruginosa* と *S. aureus* は補体存在下でわずかながら発育の抑制を認めたものの生菌数の減少は認められなかった。以上より補体の MSC を *E. coli* に対しては 0.75 単位/ml, *P. aeruginosa* に対しては 10.0 単位/ml, そして *S. aureus* に対しては 8.0 単位/ml と定めた。

2. 各種セフェム系抗生剤の ID<sub>50</sub>

各菌に対するセフェム系抗生剤の ID<sub>50</sub> を Table 1 に示した。

## 3. 補体とセフェム系抗生剤の協力的殺菌作用

Fig. 2 から 4 に MSC の補体と ID<sub>50</sub> のセフェム系抗生剤共存下および非共存下における *E. coli* の経時的生菌数を示した。これら 11 剤のうち CMX と CZX は

Table 1. ID<sub>50</sub>s of the test antibiotics against each strain of bacterium

Strain	Antibiotic	ID <sub>50</sub> (μg/ml)
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	cefazolin (CEZ)	1.70
	cefotiam (CTM)	0.160
	cefmetazole (CMZ)	1.30
	cefoperazone (CPZ)	0.300
	ceftazidime (CAZ)	0.0760
	latamoxef (LMOX)	0.190
	aztreonam (AZT)	0.0700
	cefotaxime (CTX)	0.0800
	ceftizoxime (CZX)	0.0400
	cefmenoxime (CMX)	0.190
	cefbuperazone (CBPZ)	0.210
<i>P. aeruginosa</i> 18S	cefsulodin (CFS)	3.90
	cefoperazone (CPZ)	8.20
	ceftazidime (CAZ)	1.90
	aztreonam (AZT)	10.5
<i>S. aureus</i> 209P	cefazolin (CEZ)	0.260
	cefotiam (CTM)	0.400
	cefmetazole (CMZ)	1.00
	cefoperazone (CPZ)	0.860

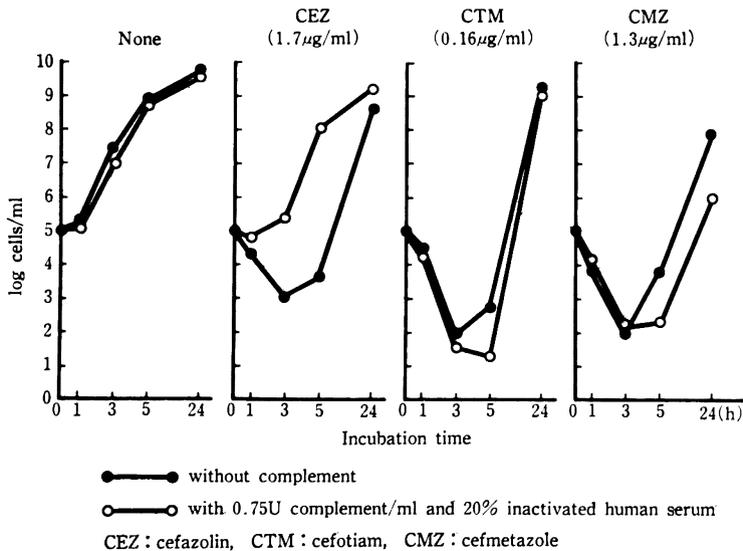


Fig. 2. Synergy of bactericidal effects between complement and first- or second-generation cephem antibiotics against *E. coli*

補体存在下でその殺菌力は増強され、24時間後にはすべての *E. coli* が殺菌されたことから、補体との間に強い協力的殺菌作用があると考えられた (Fig. 4)。また、LMOX と AZT は培養開始 5 時間後に補体共存下での生菌数が非共存下でのそれらに比べ  $10^{-2}$  以下に減少し、この時点で補体との協力的殺菌作用を認めたが、24 時間後には菌は再増殖した。CTM, CMZ, CTX, CAZ, そ

して CBPZ は補体存在下で生菌数の減少はわずかであり (Fig. 2, 3, 4), これらと補体とは相加的殺菌作用を認めた。これに対して CEZ と CPZ は補体を添加することにより生菌数は増加した (Fig. 2, 3)。

*P. aeruginosa* に対しては CAZ と AZT が補体添加により培養開始 5 時間後、および 24 時間後に生菌数の減少を認めたが、それらは補体非存在下のときの生菌数

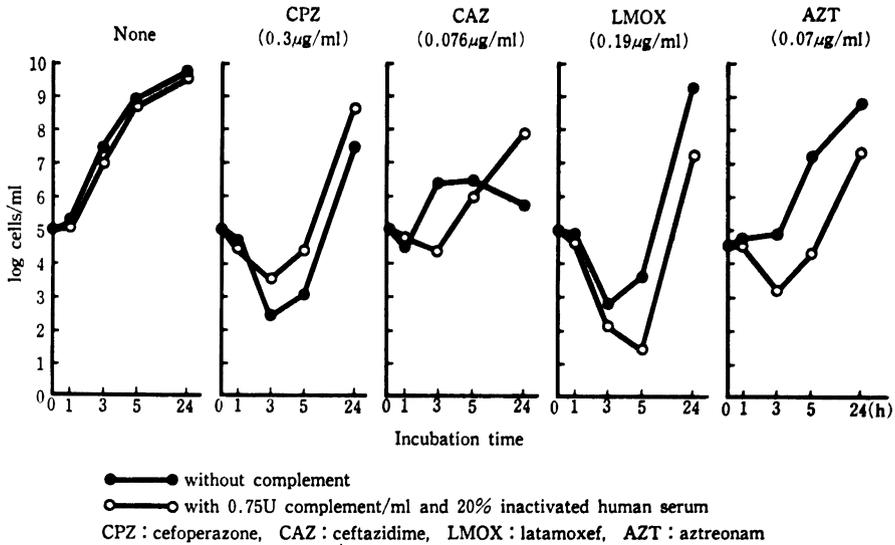


Fig. 3. Synergy of bactericidal effects between complement and third-generation cephem antibiotics against *E. coli* (1)

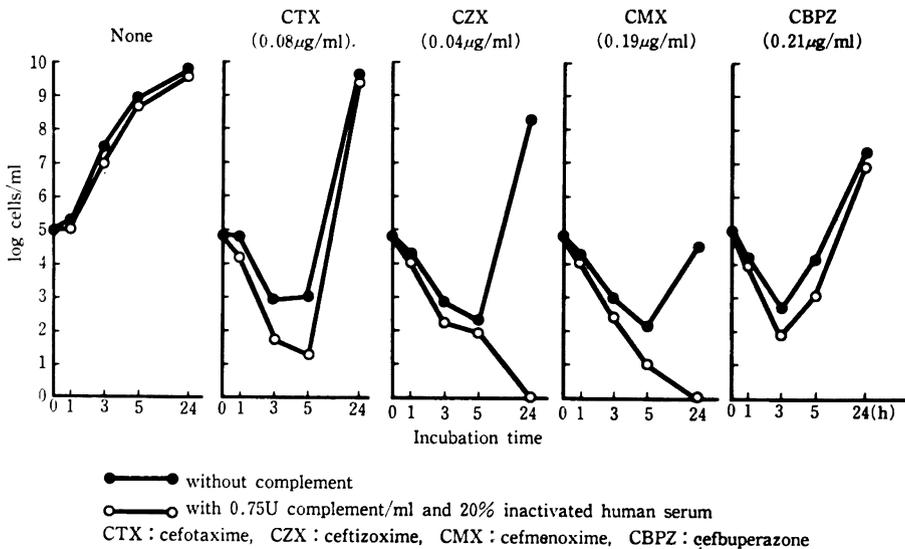


Fig. 4. Synergy of bactericidal effects between complement and third-generation cephem antibiotics against *E. coli* (2)

に比べて  $10^{-1}$  程度であり、これら 2 剤と補体とは相加的な殺菌作用を認めるのみであった (Fig. 5)。しかし CFS と CPZ では補体添加により *P. aeruginosa* の生菌数は減少しなかった (Fig. 5)。

*S. aureus* に対しては、ここでとりあげた 4 剤はいずれも補体との間に協力的あるいは相加的殺菌作用を認めなかった (Fig. 6)。

III. 考 察

補体とセフェム系抗生剤との協力的殺菌作用を検討するため、抗生剤の濃度に菌を生かしても殺しもしない 50% 発育阻止濃度 ( $ID_{50}$ ) を、また補体の濃度に菌の発育に影響を及ぼさない最高の濃度 (maximum sub-lethal concentration : MSC) を設定し、両者の共存下および非共存下における生菌数を比較した。そして補体濃度

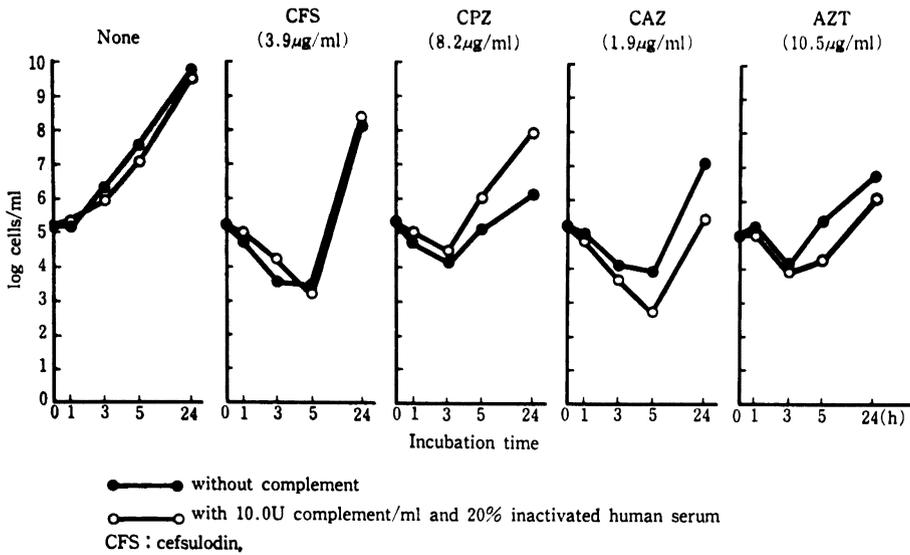


Fig. 5. Synergy of bactericidal effects between complement and antipseudomonal cephem antibiotics against *P. aeruginosa*

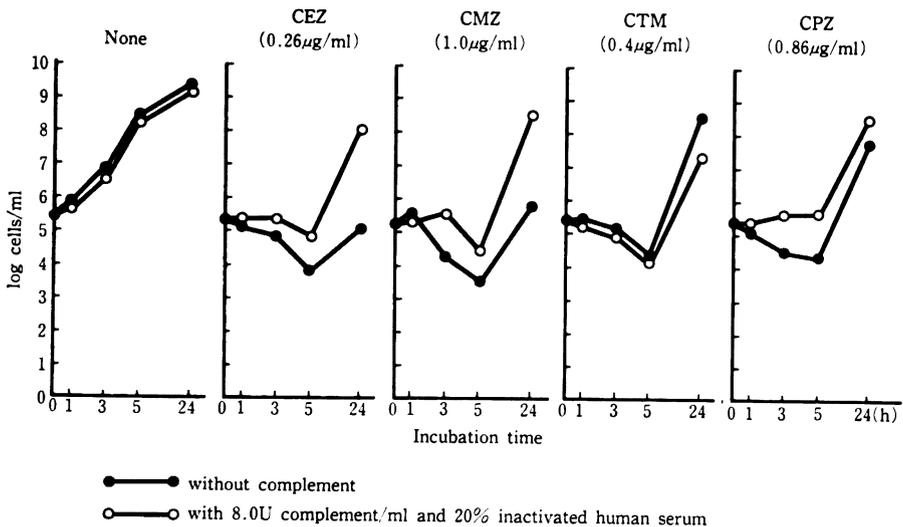


Fig. 6. Synergy of bactericidal effects between complement and cephem antibiotics against *S. aureus*

を一定にするにあたり WASSERMANN 反応緒方法<sup>23,24)</sup>を用いた。これは本法が MAYER 法<sup>25)</sup>とともに広く臨床に用いられており、簡便でしかも再現性に優れているためである。以上の条件下では *E. coli* に対して横田ら<sup>16,17)</sup>の報告と同様に CMX, CZX に強い補体との協力的殺菌作用を認め、LMOX と AZT がこれらに次いだ。しかし CBPZ と CMZ には浅野ら<sup>15)</sup>が報告したような補体との強い協力的殺菌作用は認められなかった。

このような補体と抗生剤との協力的殺菌作用の発現機序として、DUTCHER ら<sup>18)</sup>は補体で前処理した *E. coli* に

SM を加えたときの生菌数の減少が、SM で前処理した *E. coli* の生菌数の減少に比べ速やかであったことから、補体による薬剤の外膜透過性の亢進によるものであるとした。これに対し、浅野ら<sup>15)</sup>は CBPZ で前処理した *E. coli* が補体の消費量を増加させたことから、薬剤前処理菌の補体活性化能の亢進によるものであるとしており、この点に関しては今後検討する余地があると考えられる。また、補体と  $\beta$ -ラクタム剤との協力的殺菌作用の強弱は奥村ら<sup>20)</sup>や横田ら<sup>21,22)</sup>が指摘したような抗生剤の PBP Ib との結合親和性の差異によるものと考えられて

おり、今回の結果もこれにより一応説明できるものと思われた。また、CEZ と CPZ は補体と非働化血清の添加により殺菌力が減弱したが、その理由として、これら2剤と血清蛋白との高い結合率<sup>26,27)</sup>により細菌に作用する薬剤量が減少したためであると考えられた。

一方、補体抵抗性であった *P. aeruginosa*, *S. aureus* に対しては補体と抗生剤との間に協力的殺菌作用を認めなかった。これらのことから補体とセフェム系抗生剤との協力的殺菌作用は菌種と薬剤により異なり、その発現には菌の補体感受性が前提条件となることが示唆され、感染症の際には抗菌力、体内動態以外に考慮すべき要素となると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師町田豊平教授、ならびに順天堂大学医学部細菌学教室横田 健教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに終始温かい御指導、御鞭撻をいただきました順天堂大学細菌学教室吉田玲子博士に心から感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第13回国際化学療法学会議において発表した。

また、本研究の一部は、昭和61年度文部省科学研究費補助金奨励研究A、課題番号61771194によった。

#### 文 献

- 1) 野本亀久雄：生体防御機構の変動と感染症成立のかかわりあい。日本細菌学雑誌 37：479~495, 1982
- 2) GIGLI I, NELSON JR. R A : Complement dependent immune phagocytosis I. Requirements for C'1, C'4, C'2, C'3. Exp Cell Res 51 : 45~67, 1968
- 3) GRIFFIN JR. F M, BIONCO C, SILVERSTEIN S C : Characterization of the macrophage for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc. J Exp Med 141 : 1269~1277, 1975
- 4) MANTOVANI B, RAVINOVICH M, NUSENZEIG V : Phagocytosis of immunocomplex by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). J Exp Med 135 : 780~792, 1972
- 5) REYNOLDS H Y, ATKINSON J P, NEWBALL H H, FRANK M M : Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. J Immunol 114 : 1813~1819, 1975
- 6) SHIN H S, SMITH M R, WOOD JR. R B : Heat labile opsonins to *Pneumococcus*. II Involvement of C3 and C5. J Exp Med 130 : 1229~1241, 1969
- 7) WINKELSTEIN J A, SHIN H S, WOOD JR. W B :

Heat labile opsonins to *Pneumococcus*. III The participation of immunoglobulins and of alternate pathway of C3 activation. J Immunol 108 : 1681~1689, 1972

- 8) INOUE K, TANIGAWA Y, TAKUBO M, SATANI M, AMANO T : Quantitative studies on immune bacteriolysis II. The role of lysozyme in immune bacteriolysis. Biken J 2 : 1~20, 1959
- 9) INOUE K, TAKAMIZAWA A, KURIMURA T, AMANO K : Studies on the immune bacteriolysis. Biken J 11 : 193~201, 1968
- 10) TIPPER D J, STROMINGER J L : Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII Inhibition of crosslinking by penicillins and cephalosporins : Studies in *Staphylococcus aureus in vivo*. J Biol Chem 243 : 3169~3179, 1968
- 11) IZAKI K, MATSUHASHI M, STROMINGER M : Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase : Penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. J Biol Chem 243 : 3180~3192, 1968
- 12) DUTCHER B S, REYNARD A M, BECK M E, CUNNINGHAM R K : Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. Antimicrob Agents Chemother 13 : 820~826, 1978
- 13) 四辻 彰, 田井 賢, 笹倉かの子, 柿澤裕美, 岡本直子, 保田 隆, 才川 勇 :  $\beta$ -lactam 抗生剤の sub-MIC に関する研究 (第1報) ヒトおよび各種動物血清中での殺菌作用。Chemotherapy 31 : 1047~1054, 1983
- 14) 出口雅子, 竹村周平, 小野寺秀紀, 上田正博, 杉野 成, 近藤元治 : Cefbuperazone による補体殺菌能増強作用。Chemotherapy 35 : 542~545, 1987
- 15) 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 34 : 481~487, 1986
- 16) 横田 健, 関口玲子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365) の各種  $\beta$ -lactamase およびペニシリン結合蛋白に対する親和性とその抗菌力との関係。Chemotherapy 29 (S-1) : 32~41, 1981
- 17) 横田 健, 関口玲子 : Ceftizoxim (CZX) の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合蛋白に対する親和性と抗菌力の関係。Chemotherapy 28 (S-5) : 44~49, 1980
- 18) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 達 彦二 : 血清または多形核好中球共存下における cefroxime の殺菌効果について。Chemotherapy 27 (S-6) : 76~83, 1979
- 19) STANDIFORD H C, DRUSANO G L, FITZPATRICK B, TATEM B, SCHIMPF S C : Bactericidal activity of ceftazidime in serum compared with

- that of ticarcillin combined with amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 26 : 339~342, 1984
- 20) BERGERON M G, LeBEL M, CHAREST A, FOCIER J F, MORINE J, VALLEE F : Comparative study of serum bactericidal activity of cefotaxime alone or in combination with tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 379~381, 1986
- 21) PASCUAL-LOPEZ A, VAN DER AUERA P, LIEPPE S, KLASTERSKY J : BRL-36650 : *In vitro* studies and assessment of serum bactericidal activity after single-dose administration in volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 29 : 757~759, 1986
- 22) VAN DER AUERA P, KLASTERSKY J, LAGAST H, HUSSON M : Serum bactericidal activity and killing rate for volunteers receiving imipenem, imipenem plus amikacin, and ceftazidime plus amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 30 : 122~126, 1986
- 23) 緒方富雄, 松橋 直, 原 一郎, 鈴木達男, 木村 一郎, 岡野 敏, 熊沢 博, 大畑英二 : 梅毒補体結合反応緒方法の改良に関する理論的・実際的研究. *日新医学* 47 : 671~689, 1960
- 24) OGATA T : Fundamental principles to highly sensitive serological tests for syphilis. *Jap J Microbiol* 1 : 423~431, 1957
- 25) MAYER M M : Complement and fixation, *Experimental Immunochemistry* (2nd. Ed.) Springfield, IL, C. C. Thomas Publisher, pp. 133~240, 1961
- 26) HOFFSTEDT B, WALDER M R : Influence of serum protein binding and mode of administration on penetration of five cephalosporins into subcutaneous tissue fluid in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 20 : 783~786, 1981
- 27) WATANABE Y, HAYASHI T, TAKEDA R, YASUDA T, SAIKAWA I : Studies on protein binding of antibiotics I. Effect of cefazolin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone. *J Antibio* 33 : 625~635, 1980

## SYNERGY OF BACTERICIDAL EFFECTS BETWEEN COMPLEMENT AND CEPHEM ANTIBIOTICS AGAINST *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

HIROSHI KIYOTA

Department of Urology, The Jikei University, School of Medicine,  
3-25-8 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan

We investigated the influence of the 50% growth inhibitory dose (ID<sub>50</sub>) of cephem antibiotics on the sub-lethal concentration of complement against *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* 18 S and *Staphylococcus aureus* 209 P. The number of *E. coli* survivors decreased more rapidly in the presence of both the complement and the ID<sub>50</sub> of the antibiotic than of either alone, with a few exceptions. Cefmenoxime and ceftizoxime manifested synergy with complement and all cells of *E. coli* were killed 24 hours after the initiation of incubation. In contrast, latamoxef and aztreonam showed synergistic bactericidal effect with complement on *E. coli* 5 hours after the initiation of incubation. Bactericidal effects of cefazolin and cefoperazone were diminished by the addition of complement. Synergy was not observed between the ID<sub>50</sub> of cephem antibiotics and complement against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The possible role of the interaction between cephem antibiotics and complement in the *in vivo* efficacy is described.