

Cefodizime の実験的感染防御能低下マウスにおける治療効果について

三宅美行・朝長正志・東岡俊之・山田雄次・石田直文
大鵬薬品工業株式会社開発研究所

兵頭昭夫・井上松久*・三橋 進
エビゾーム研究所
群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設*

新しいセファロスポリン系抗生物質である Cefodizime(THR-221)の *in vivo* 抗菌力を調べたところ、正常および実験的感染防御能低下マウスでの感染に対し優れた治療効果を示した。更に THR-221の *in vivo* での優れた効果を解明するために、生体防御因子との関連について検討を行い、以下の知見が得られた。

1. THR-221は感染防御能低下マウス(X線, Adriamycin 処理)においても優れた治療効果を示し、ED₅₀値は正常マウスに近く、Cefotaxime(CTX), Cefoperazone(CPZ)よりもはるかに優れていた。
2. *K. pneumoniae* 感染治療時におけるマウス腹腔内浸出細胞(PEC)の acid phosphatase 活性は、THR-221 500 mg/kg 治療群において上昇し、CTX, コントロール群のそれよりも高かった。
3. THR-221 1/4 MIC 存在下において PEC の *K. pneumoniae* に対する殺菌作用は増強した。その殺菌作用は THR-221単独に比べ40.7倍強く、CTX の7.1倍よりも優れていた。
4. THR-221前処理菌は PEC の Nitro Blue Tetrazolium(NBT)還元能を CTX, 無処理菌のそれよりも有意に上昇させた。
5. THR-221前処理菌はマウス腹腔内において食細胞に食菌されやすくなり、感染後、菌の再増殖は認められなかった。CTX 前処理, 無処理菌は感染後6時間で再増殖し、マウスは全数死亡した。*K. pneumoniae* のマウス感染力は CTX 前処理, 無処理菌に比較して、THR-221前処理において著しく低下した。

PEC のライソゾーム酵素の上昇, PEC との殺菌増強作用, NBT 還元能の上昇等これらの結果より、THR-221の優れた *in vivo* 作用は生体防御因子との協力的な殺菌作用に優れていることが一因と考えられた。

Cefodizime(THR-221)はヘキスト社(西独)とルセル社(仏)で合成、開発された注射用セファロスポリン系抗生物質であり、Fig. 1 に示す構造式を有する。本剤がグラム陽性、陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを示し、*in vivo* において *in vitro* で期待される以上の治療効果を示すことを報告している¹⁾。今回、我々は感染防御能低下時における治療効果とその解析を Cefotaxime, Cefoperazone と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

検討薬剤として THR-221(大鵬薬品工業, ヘキスト社, 重量力価)および対照薬として Cefotaxime(CTX, ヘキスト社), Cefoperazone(CPZ, 富山化学)を使用した。

2. 使用菌株

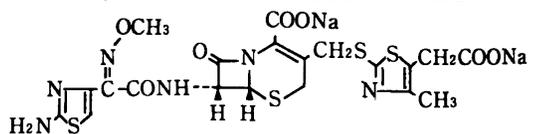
S. marcescens GN 7577, *P. mirabilis* GN 4754 はエビ

ゾーム研究所保存株を使用した。臨床分離株の *K. pneumoniae* 163, *K. pneumoniae* 109, *E. cloacae* 118は大鵬薬品・開発研究所で保存しているものを使用した。

3. 感染菌液の調製

Nutrient agar (Difco) 上で37℃, 18~20時間培養した後、滅菌生食にて集菌洗浄したものを菌液とした。これらの菌液は使用直前にそれぞれの菌株の投与濃度となるように、滅菌生食あるいは5%ムチン(Difco)を用い希釈した。

Fig. 1 Chemical structure of THR-221



4. 使用動物

実験動物はBALB/c マウス(8週齢, 雌)を主として用いた。*S. marcescens*, *E. cloacae*の全身感染に対する治療実験にはddY マウス(4週齢, 雄)を用いた。

5. 感染防御能低下マウスの作成

Adriamycin(ADM, 協和発酵)10 mg/kg を感染3日前に腹腔内に投与した。X線照射はX線発生装置(MBR-1505 R, 日立社)を用い, 250, 450 rad を感染3日前に行った。またこれらの前処理マウスについて, 末梢血液の白血球数を血液自動分析装置(ELT-8, ダイアヤトロン(株))にて測定した。

6. 感染防御能低下マウスに対する感染治療効果

1) マウス全身感染

1群6~10匹のマウスを用い, *K. pneumoniae* 109, 163および*P. mirabilis* GN 4754は菌液の0.2または0.5 mlを腹腔内に接種した。他の菌種は5%ムチンに浮遊したものを腹腔内に接種した。薬剤は滅菌生食に溶解した各濃度液を*S. marcescens* GN 7577および*E. cloacae* 118の場合は菌接種2, 5時間後に2回, 他の菌種は菌接種2時間後に1回皮下投与した。判定は5日間マウスの生死を観察し, 5日目の生存数よりProbit法でED₅₀値を求めた。腹腔内生菌数の測定は5mlの滅菌生食をマウス腹腔内に注入し, よくマッサージした後回収を行い, 得られた回収液について生菌数を測定した。

2) 腹腔内浸出細胞(PEC)のライソゾーム酵素活性

氷冷滅菌生食5mlをマウス腹腔内に注入し, よくマッサージした後回収を行いPECを採取した。遠心分離(1500 rpm, 7分, 4℃)にて上清を除き, Ammonium chloride potassium solution(ACK)処理(1L中, NH₄Cl 8.29g, KHCO₃ 1.0g, EDTA 0.367g, pH 7.4)により混入する赤血球を溶血し, Hanks(ニッスイ)培地にて3回遠心洗浄を行った。得られた細胞を1×10⁷個/mlに調製し, ソニケーターにて完全に細胞を破壊したものを酵素液とした。酵素活性の測定は酸性ホスファターゼ測定用キット(酸性ホスファ B テスト ワコー, 和光純薬工業)を用いた。

3) 体液内濃度測定

BALB/c マウス, 雌, 8週齢, 1群3匹にTHR-221またはCTXの500 mg/kgを皮下投与し, 経時的に腹腔内濃度についてHPLC法²⁾で測定した。腹腔内濃度は薬剤投与後, 腹腔内に1mlの生食を投与し, その回収液について測定を行った。

7. PECのNBT還元能に及ぼす影響について

1) PECの調製

マウス腹腔内に1%オイスターグリーコーゲン3mlを投与し, 4時間後に滅菌生食にて誘導されたPECを採

取した。得られたPECをACK溶液, MEM培地(Flow laboratories)にて洗浄し, MEM培地にて細胞数を2×10⁶個/mlに調製した。尚, ADM処理マウスについてはオイスターグリーコーゲンを投与しないで滅菌生食にてPECを採取した。

2) 薬剤前処理

K. pneumoniae 109, 163株の10⁸ cells/mlの菌液をsub-MICのTHR-221, CTX, CPZを含有した寒天培地上(Nutrient agar, Difco)に塗抹し, 一夜37℃にて培養後, 滅菌生食にて回収し菌液とした。薬剤処理濃度は, *K. pneumoniae* 109株ではTHR-221, CTXおよびCPZはそれぞれ1/8 MICである0.1, 0.05, 12.5 μg/mlとし, *K. pneumoniae* 163株ではTHR-221およびCTXは1/2 MICである0.2, 0.05 μg/mlとした。

3) NBT還元能の測定

小試験管内にてPEC調製液(0.5 ml)と試験菌体(*K. pneumoniae* 109, 163株の正常菌体, 薬剤前処理菌, 2×10⁶~1×10⁷ cells/tube)を37℃, 2.5時間振盪培養を行った後, 食食時のNBT還元能を測定した。NBT還元能の測定は井口らの方法³⁾に準じて行った。すなわち, 培養PEC浮遊液(2.0×10⁶ cells/ml)0.5 mlに0.01 N KCN 0.1 ml, 0.1% NBT 0.5 mlを加え37℃にて30分振盪後, 0.75 N HCl 5 ml加えて反応を停止した。

遠心分離(2000 rpm, 10 min)にてPECを回収し, これに4 mlのピリジンを加え, 100℃, 15分にてフォルマザンを抽出した。OD_{515nm}にて濁度を測定し, NBT還元能をΔOD_{515nm}で示した。正常マウスとADM処理マウスから採取したPECについて, NBT還元能を測定し比較を行った。

8. PECとの協力殺菌作用

滅菌生食にて上記の方法で採取したPECを各々1/4 MICのTHR-221, CTXを含有するRPMI培地(Flow laboratories)に浮遊させ, 約2×10⁷ cells/mlに調製した。Nutrient broth(Difco)にて一夜培養した*K. pneumoniae* 163株を集菌後, 薬剤含有RPMI培地にPECと1:2(*K. pneumoniae* 163: PEC)になるように添加し, 37℃にて振盪下培養を行った。培養後1, 2, 4時間目に生菌数を測定した。

9. 補体との協力殺菌作用

K. pneumoniae 163, *S. marcescens* GN 7577株に対するTHR-221と補体との協力殺菌作用について検討した。測定方法は横田らの方法⁴⁾に準じて行った。

すなわち, 20%非働化ヒト血清加L-broth中にID₅₀(50%発育阻止濃度)のTHR-221と菌の増殖に影響を及ぼさない補体(モルモット補体, 極東製薬)の最大量とを加え, それに試験菌を10⁵ cells/mlになるように接種し,

37℃にて1, 3, 5, 24時間培養後, それぞれの生菌数を測定した。

10. 薬剤前処理による菌の感染力の低下作用

K. pneumoniae 163株を7.2)の方法にて前処理を行った後, 1/2 MICの薬剤を含む滅菌生食に懸濁し, ADM処理マウスに腹腔内投与を行った。生存率の測定は1群7匹を用い5日間観察を行った。また, 腹腔内生菌数は1群4匹を使用し感染後, 2, 6, 24, 48時間目に6.1)の方法に準じて測定を行った。

II. 結 果

1. 感染防御能低下マウスに対する感染治療効果

1) マウス全身感染に対する効果

ADM, X線処理マウスの感染防御能低下は, 感染菌に対する易感染化並びに白血球数の変化にて確認した。すなわち, *K. pneumoniae* 163株感染において, MLD値は正常マウス 2.7×10^4 cells/mouse, ADM処理マウス 1.1×10^2 cells/mouse, X線処理マウス 3×10^3 cells/mouseであり, 易感染化が認められた。また, 白血球数も正常マ

ウスの $4800 \pm 510/\text{mm}^3$ に対し, ADM処理マウスで $2000 \pm 600/\text{mm}^3$, X線処理マウスで $830 \pm 120/\text{mm}^3$ (250 rad), $270 \pm 60/\text{mm}^3$ (450 rad)であり, ADM, X線処理マウスでは有意($p < 0.01$)に低下していた。

これらの感染防御能低下マウスを用いて, グラム陰性桿菌5株について感染治療効果を調べ, ED₅₀値をTable 1に示した。

K. pneumoniae 163株に対する治療効果はCTXと比較して, 正常マウスではTHR-221 2.37 mg/kg, CTX 3.16 mg/kgとほぼ同等であるが, 感染防御能低下マウスにおいては, X線, ADM処理共にTHR-221が55.9, 36.2 mg/kgとCTXの257, 286 mg/kgよりも優れた治療効果を示した。

K. pneumoniae 109, *S. marcescens* GN 7577株においても, THR-221は同等のMIC値を示すCTX, CPZよりも正常・感染防御能低下マウス共に優れた治療効果を示した。

P. mirabilis GN 4754株において, 正常マウスではほぼ同等のED₅₀値を示すCTXよりも, X線照射マウスで

Table 1 Therapeutic efficacy of THR-221 against experimental infection in normal and immunosuppressed mice

Strain Challenge dose (i.p.) (cells/mouse)	5% Mucin	Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/ml}$) (10^6 cells)	ED ₅₀ (mg/kg)			Therapy*
				Normal	X-ray (250 rad)	ADM**	
<i>K. pneumoniae</i> 163 1×10^5 a, b, c)	—	THR-221	0.1	2.37	55.9*	36.2	1
		CTX	0.05	3.16	257*	286	
<i>K. pneumoniae</i> 109 1.5×10^4 a, b, c)	—	THR-221	0.05	1.36	52.3*	40.7	1
		CTX	0.05	87.1	478*	531	
		CPZ	0.10	523	>1000*	>1000	
<i>P. mirabilis</i> GN 4754 6.6×10^7 a) 3.4×10^8 b)	—	THR-221	0.013	2.21	43.7	1	
		CTX	0.013	5.04	>1000		
		CPZ	0.39	>1000	>1000		
<i>E. cloacae</i> 118 5×10^6 a) 2×10^4 b)	+	THR-221	0.39	236	310	2	
		CTX	0.10	71.6	920		
		CPZ	0.78	254	531		
<i>S. marcescens</i> GN 7577 6×10^5 a) 5.5×10^3 b) 4.6×10^5 c)	+	THR-221	0.78	8.27	41.1	62.4	2
		CTX	0.20	164	484	654	
		CPZ	1.56	>1000	>1000	>1000	

a) : Normal mice

b) : X-ray treated mice

c) : ADM treated mice

* : Mice were irradiated (450 rad) 3 days before challenge

** : ADM was given an i.p. dose of 10mg/kg 3 days before challenge

*1 : Drugs were given s.c. 2 h after challenge

2 : Drugs were given s.c. 2 and 5 h after challenge

は THR-221 は 43.7 mg/kg であり、CTX の >1000 mg/kg よりはるかに優れた治療効果を示した。

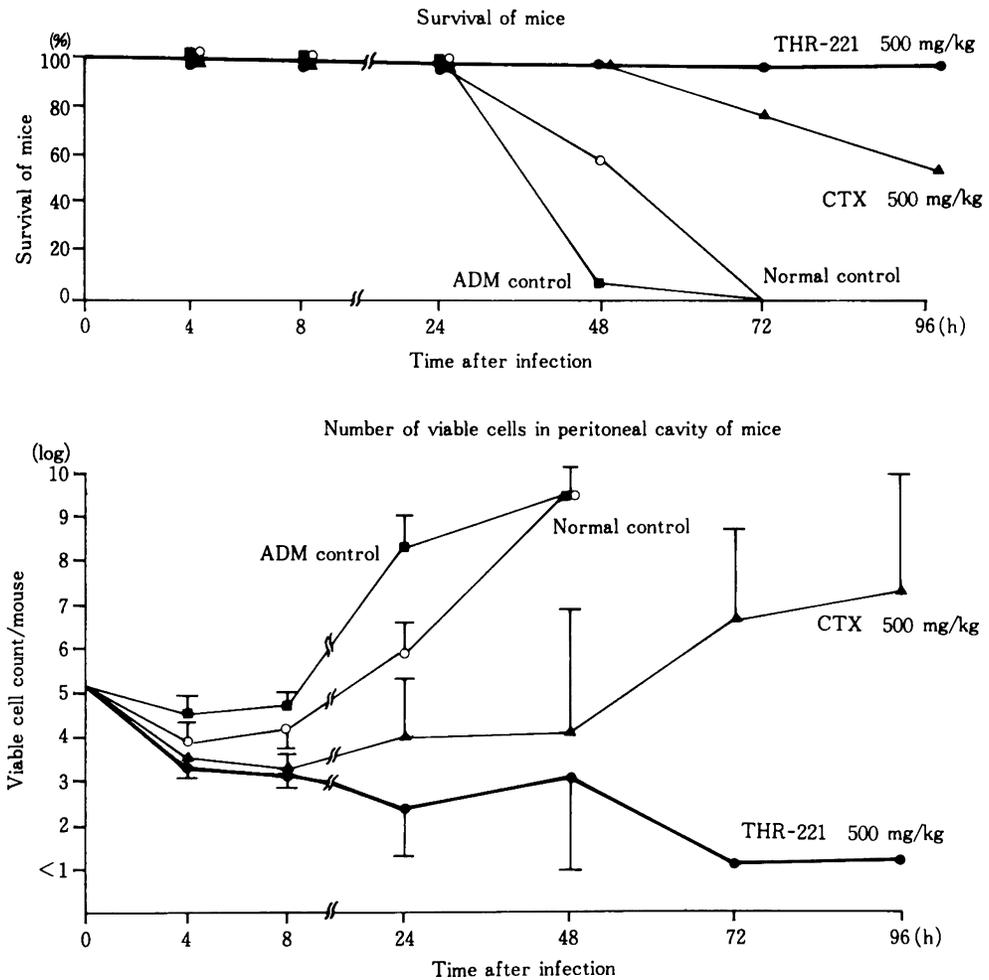
また、*E. cloacae* 118 株において、正常マウスでは THR-221 236 mg/kg、CTX 71.6 mg/kg、CPZ 254 mg/kg であり CTX より劣っているが、X 線照射マウスでは各々 310, 920, 531 mg/kg と THR-221 が優れていた。

感染防御能低下マウスの感染に対し薬剤の効果は低下するが、THR-221 ではいずれの株においても ED₅₀ の上昇の程度は CTX および CPZ よりも軽度であり、正常時の感染治療効果に近い値を示し、CTX、CPZ より優れた治療効果を示した。

2) 感染治療時の腹腔内生菌数の変化とライソゾーム酵素活性に対する効果

ADM 処理マウスにおける *K. pneumoniae* 感染において、THR-221 治療で全数マウスが生存する 500 mg/kg の投与量を設定し、その時の腹腔内生菌数の変化と酸性ホスファターゼ活性を調べた (Fig. 2-4)。THR-221 治療群で、腹腔内の薬剤濃度が検出限界以下になった 24 時間以後も MLD 以上の菌が腹腔内に認められたが、48 時間以後 72 時間までに菌は消失した。この感染後 48 時間をピークとして酸性ホスファターゼの上昇が認められ、以後菌の消失に伴って元のレベルに復した。一方、CTX 治療群で

Fig. 2 Therapeutic efficacy of THR-221 against experimental infection with *K. pneumoniae* 163 in ADM treated mice



Therapy : Drugs were given s.c. 2 h after challenge

Fig. 3 Changes of lysosomal enzyme activity in PEC

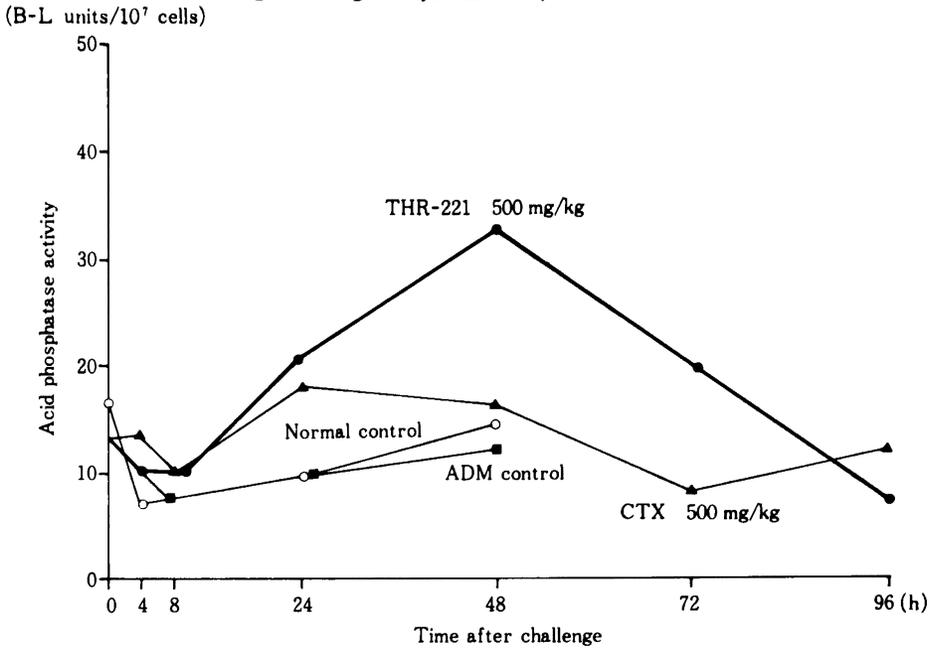
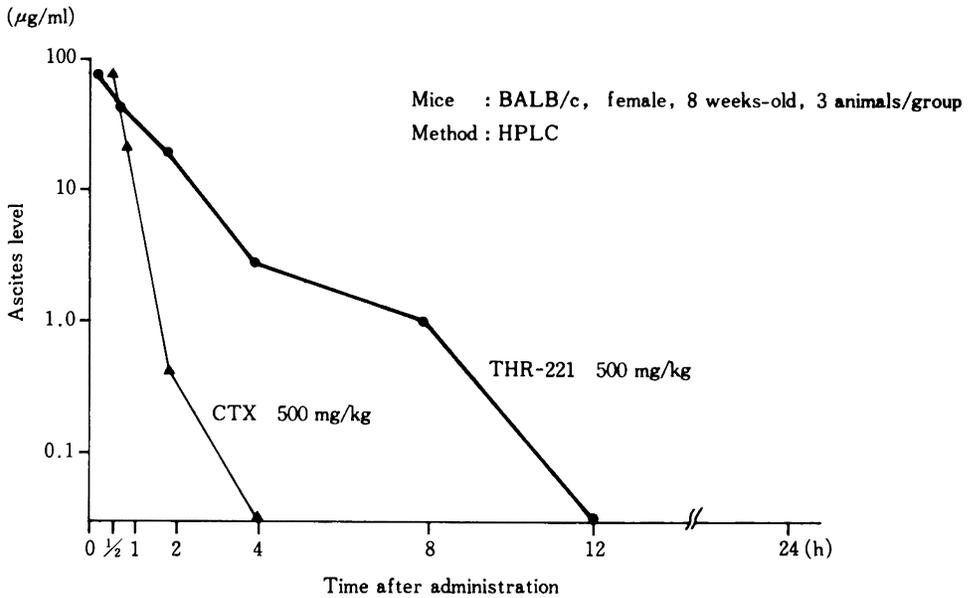


Fig. 4 Ascites level of THR-221 after s.c. administration of 500 mg/kg of the drug to ADM treated mice



Ascites level presents the concentration in 1 ml of recovered solution from peritoneal cavity

は酸性ホスファターゼの著明な上昇は認められず、48時間以後菌の再増殖が認められ、56%の生存率にとどまった。

3) PEC との協力殺菌作用

PEC と sub-MIC の薬剤存在下における *K. pneumoniae* 163株の殺菌率を検討した(Fig. 5, Table 2)。1/4 MIC の THR-221 と正常マウス PEC 存在下での殺菌率は、培養4時間後において1/4 MIC THR-221 単独より40.7倍強く、また CTX の場合の7.1倍より優れていた。ADM 処理マウスより得た PEC においても THR-221 は1/4 MIC で協力殺菌作用を示し、殺菌率は43.7倍と正常マウスと同じであったが、CTX では殺菌率4.4倍と劣っていた。THR-221 は CTX よりも優れた PEC との協力殺菌作用を示した。

4) PEC の NBT 還元能に及ぼす薬剤前処理菌の影響

PEC の NBT 還元能に及ぼす薬剤前処理菌の影響について検討を行った(Fig. 6, 7)。*K. pneumoniae* 163株と正常マウスより採取した PEC との接触において、THR-221 前処理菌の PEC の NBT 還元能 (ΔOD_{515nm}) は 0.083 ± 0.006 であり、CTX 前処理菌 (0.041 ± 0.026) および無処理菌 (0.031 ± 0.013) よりも有意 ($p < 0.01$) に活性の上昇が認められた。また ADM 処理マウスより採取した PEC でも、THR-221 前処理菌において CTX 前処理菌および無処理菌よりも強い活性の上昇が観察された。一方 *K. pneumoniae* 109株との接触においても、正常マウスより採取した PEC の NBT 還元能は THR-221 前処理菌で 0.110 ± 0.006 の値であり、この値は CTX、CPZ 前処理菌の 0.070 ± 0.004 , 0.080 ± 0.003 並びに無処理菌の 0.070 ± 0.002 より高かった。

5) 補体との協力殺菌作用

THR-221 と補体との協力殺菌作用について検討を行った(Fig. 8, 9)。

K. pneumoniae 163株に対する THR-221 の ID_{50} は $0.2 \mu\text{g/ml}$ であり、その抗菌力は 2.5 units/ml の補体存在下において増強され、24時間後においても菌の再増殖は認められなかった。

S. marcescens GN 7577 においても、 ID_{50} $0.78 \mu\text{g/ml}$ の THR-221 と 10 units/ml の補体存在下において殺菌力の増強が認められた。

6) 薬剤処理による菌の感染力の低下

ADM 処理マウスにおいて、薬剤前処理菌のマウス感染力並びに腹腔内殺菌作用について観察を行った(Fig. 10)。

K. pneumoniae 163株の1/2 MIC, 18時間処理菌と無処理菌の感染後のマウス生存率を比較すると、無処理菌あるいは CTX 処理菌が THR-221 処理菌より接種量が低

いにもかかわらず感染3日目まで全数死亡した。またこれらの接種菌量は無処理菌の MLD 値 (1.1×10^2) より高いが、THR-221 処理菌では感染5日目においても71.4%と高い生存率を示し、明らかに感染力の低下が認められた。一方、腹腔内での感染菌の殺菌作用を比較しても THR-221 処理菌の接種菌量 ($4.2 \times 10^3 \text{ cells/mouse}$) が無処理菌 ($1.5 \times 10^3 \text{ cells/mouse}$)、CTX 処理菌 ($3.0 \times 10^3 \text{ cells/mouse}$) より高いにもかかわらず、感染24, 48時間後においても感染菌の増殖は認められなかった。無処理菌、CTX 処理菌においては感染6時間以降菌の増殖が観察され、CTX 処理菌は無処理菌と同じ傾向を示した。尚、無処理菌と1/2 MIC の THR-221 を接種直前に混合してマウス腹腔内に投与しても感染力の低下は認められず、THR-221 処理による感染力の低下は感染菌液中に存在する薬剤濃度の影響によるものではないことを確かめている。

III. 考 察

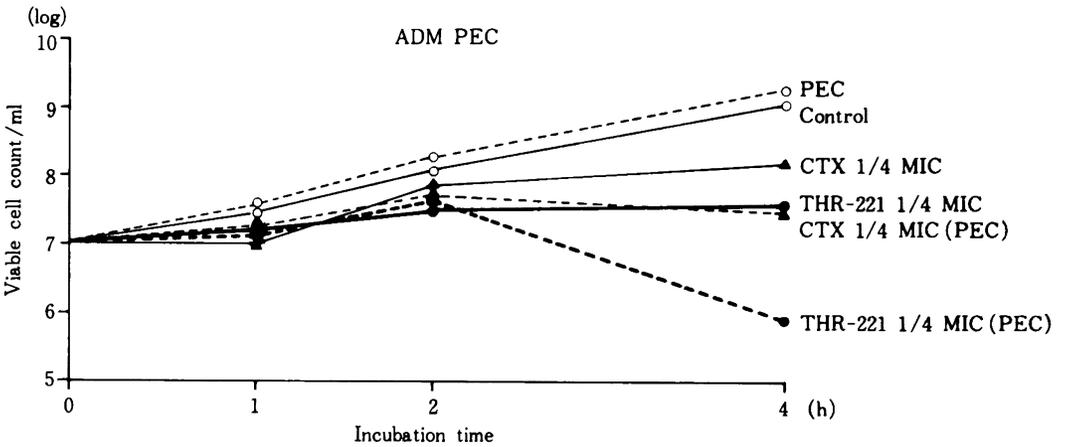
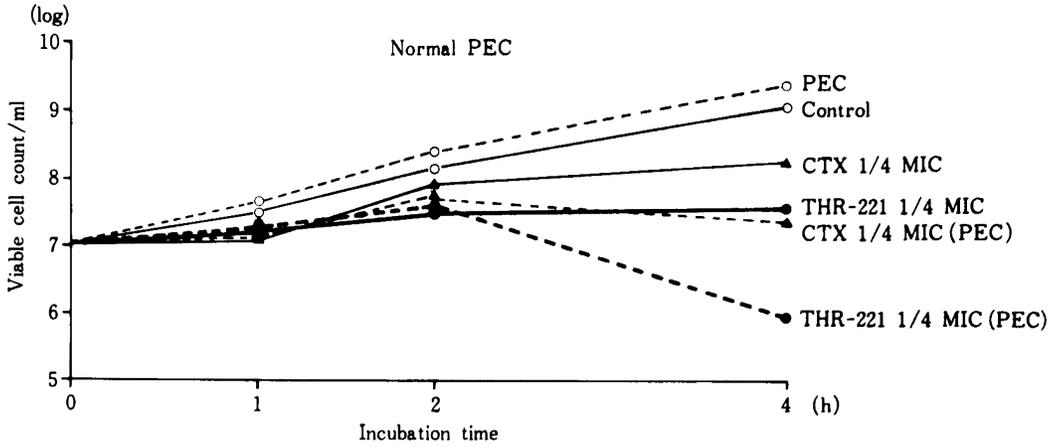
近年、immunocompromised host に対する感染症が増加し、これらの治療に有効な抗生物質の開発が望まれており、いくつかの薬剤において正常動物だけでなく易感染化動物による治療実験がなされている⁹⁾。THR-221 が正常動物において優れた *in vivo* 効果を発揮することはすでに報告している¹⁾。

今回、我々は THR-221 の感染防御能低下マウス (X 線, ADM) に対する治療効果並びに生体防御因子との協力的な殺菌作用について検討を行い、その機作について解析を行った。

グラム陰性桿菌5株について感染防御能低下マウスに対する感染治療実験を行ったところ、いずれの菌においても THR-221 の優れた治療効果が確かめられた。感染防御能低下マウスに対する治療効果は低下するが、THR-221 はいずれの菌においても CTX、CPZ に比べ ED_{50} 値の上昇は軽度であり、正常時に近い値を示した。特に *K. pneumoniae* 163株において、MIC 値並びに正常マウスの感染治療効果は THR-221 2.37 mg/kg 、CTX 3.16 mg/kg と同等であるのに対し、X 線、ADM 処理マウスの ED_{50} 値は各々 THR-221 $55.9, 36.2 \text{ mg/kg}$ 、CTX $257, 286 \text{ mg/kg}$ と上昇しているが、THR-221 は正常マウスに近い値を示し、感染防御能低下マウスにおいても明らかに優れた治療効果があることがわかった。

このように、THR-221 の優れた *in vivo* 効果については LIMBERT⁶⁾ らにより生体防御因子とのかわかりが示唆されている。そこで ADM 処理マウスを用い、*K. pneumoniae* 163株感染治療時の腹腔内生菌数の推移と、その過程で食菌に関与するとされるライソゾーム酵素⁷⁾ につい

Fig. 5 Effects of THR-221 on killing of *K. pneumoniae* 163 in PEC



Ratio : *K. pneumoniae* 163/PEC (1/2)
 MIC : THR-221 0.2 μg/ml, CTX 0.05 μg/ml
 (Medium : RPMI, 10⁶ cells/ml)
 Medium : RPMI

Table 2 Index of killing effect of THR-221 in PEC

PEC	Effect $\left(\frac{\text{Viable cells with drug only}}{\text{Viable cells with drug and phagocytes}} \right)$	
	THR-221	CTX
Normal	40.7	7.1
ADM treated	43.7	4.4

Fig. 6 Effects of THR-221 pretreated *K. pneumoniae* 163 on the NBT reduction activity of PEC in ADM-treated mice

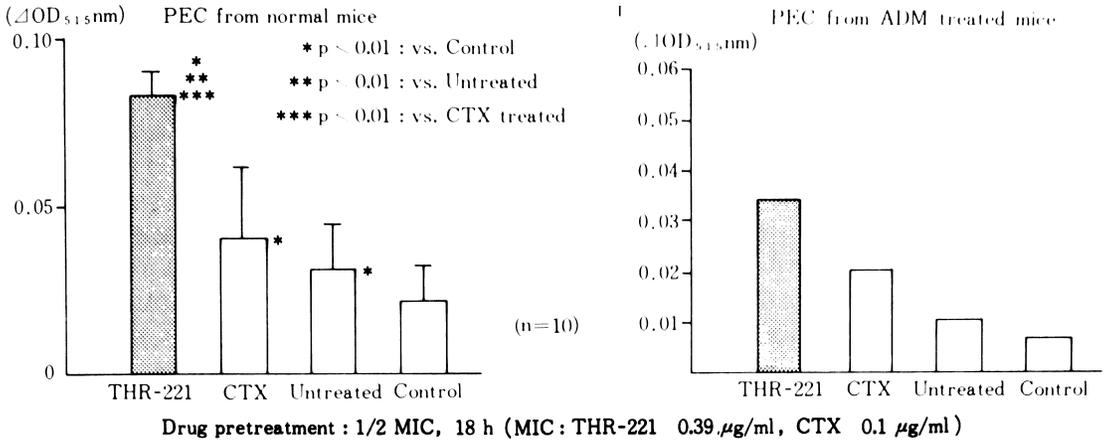


Fig. 7 Effects of THR-221 pretreated *K. pneumoniae* 109 on the NBT reduction activity of PEC in normal mice

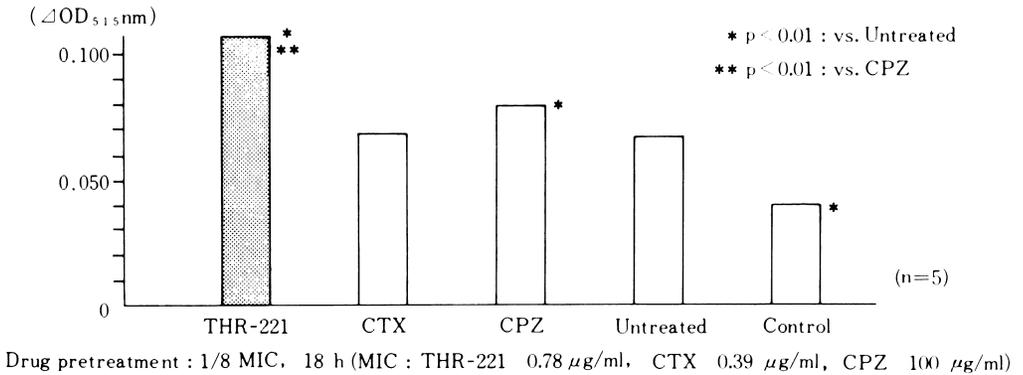
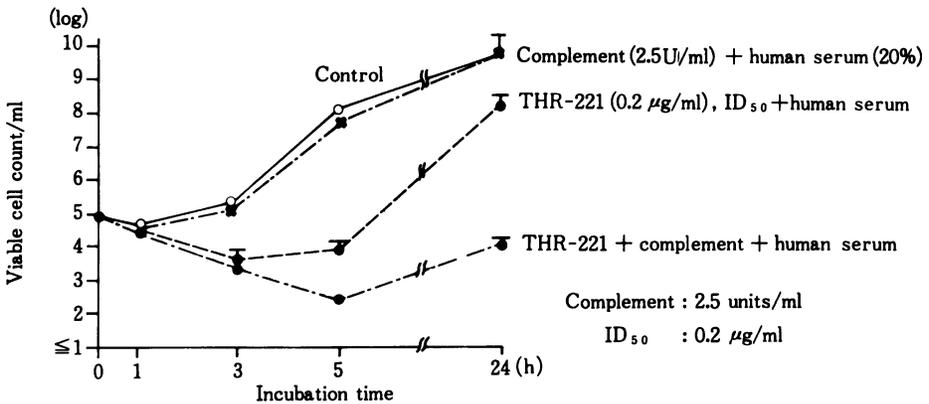


Fig. 8 Change in viable cell count of *K. pneumoniae* 163 in the presence of THR-221 and guinea pig complement



て測定を行った。

その結果、THR-221治療群においてマウス生存率、腹腔内生菌数の消失がCTXよりはるかに優れていた。その原因の一つとして、THR-221が薬剤投与後4時間まで、CTXに比べて高い腹腔内濃度を示すことがあげられる (Fig. 4)。しかし腹腔内のTHR-221の濃度は感染12時間以降ではほとんど検出されなかった。

ところが、この時点で腹腔内にはMLD以上の菌が残存している (Fig. 2) ことから、THR-221投与群で24時間以後の感染菌の消失が薬剤濃度だけでなく、生体防御因子も関与している可能性が示唆された。またTHR-221治療群において、感染菌の消失の過程でライソゾーム酵素の一種、酸性ホスファターゼの活性の上昇が認められた。この原因については不明であるが、THR-221治療群において食細胞の活性が上昇し、その結果よく菌の消失がおこるのではないかと推測された。そのため、次に薬剤とPECと菌の相互作用について調べた。

K. pneumoniae 163株の殺菌におけるPECとの関連を考察する上で、sub-MIC存在下でのPECとの協力殺菌作用を測定したところ、正常マウスより採取したPECにおいて、THR-221ではPEC存在下の方が1/4 MICの薬剤単独よりも40.7倍殺菌力が増強され、CTXの7.1倍よりも優れていた。またADM処理マウスより採取したPECでも、殺菌率はTHR-221 1/4 MIC存在下において薬剤単独よりも43.7倍と、正常マウスと同じく増強傾向が認められた。しかしPECとCTX 1/4 MIC存在下における殺菌率は薬剤単独に対して4.4倍であり、殺菌作用はTHR-221より劣っていた。

このように、sub-MIC存在下でPECの殺菌作用が増

強されることはTHR-221が直接PECを賦活化するのではなく⁸⁾、菌側に影響を与えPECによる食菌が促進されるのではないかと考え、薬剤前処理菌を用いて種々の検討を行った。

PECの殺菌機構として活性酸素が深く関与することは知られ、また菌体を薬剤処理することにより好中球の活性酸素放出能が高まることが報告されている^{9,10)}。

そこで、THR-221 sub-MIC処理菌のPECのNBT還元能について観察を行った。PECのNBT還元能は*K. pneumoniae* 109, 163株共にTHR-221処理菌との接触において、CTX処理菌および無処理菌より有意 ($p < 0.01$) に活性の上昇が認められた。またADM処理マウスのPECにおいてもCTX、無処理菌よりも強いNBT還元能が観察された。一方、THR-221前処理菌による好中球のケミルミネッセンス上昇は斧ら¹¹⁾で認められた。

次に、薬剤前処理菌の感染力を *in vivo* にてマウス生存率並びに腹腔内殺菌作用についてADM処理マウスを用いて観察を行った。THR-221前処理菌はCTX前処理菌、無処理菌と比較し明らかにマウス生存率の上昇が認められると共に、マウス腹腔内の感染菌もよく食菌され菌の消失が認められた。また、正常マウスにおいても同様の現象がNOMURAら¹²⁾によって観察されている。このことは、THR-221前処理菌がCTX前処理菌よりもよくPECを活性化し、容易に殺菌されやすくなり感染力の低下がおこると考えられた。

更にTHR-221の生体防御因子とのかかわりは、LABROら^{13,14)}によりライソゾーム酵素、酸素非依存系酵素の賦活化も示唆されている。また横田ら⁸⁾はTHR-221と補体との殺菌増強効果について報告しており、*K. pneumoniae*

Fig. 9 Change in viable cell count of *S. marcescens* GN7577 in the presence of THR-221 and guinea pig complement

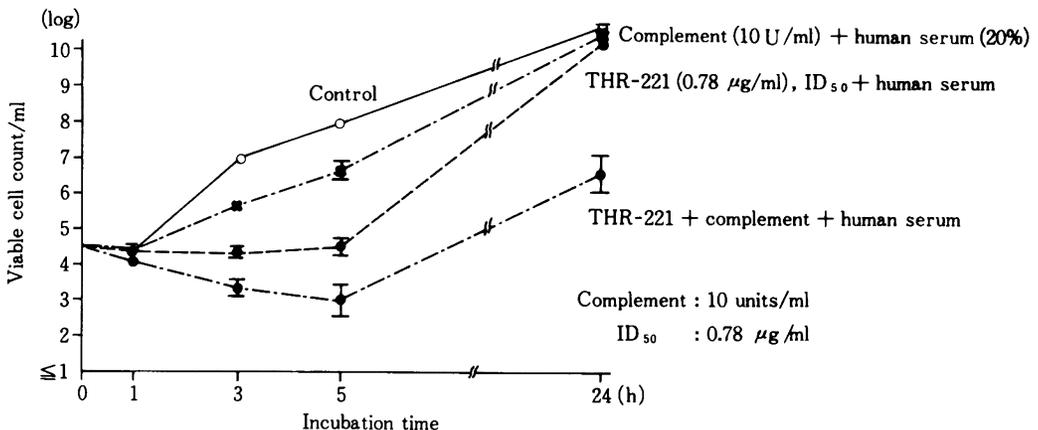
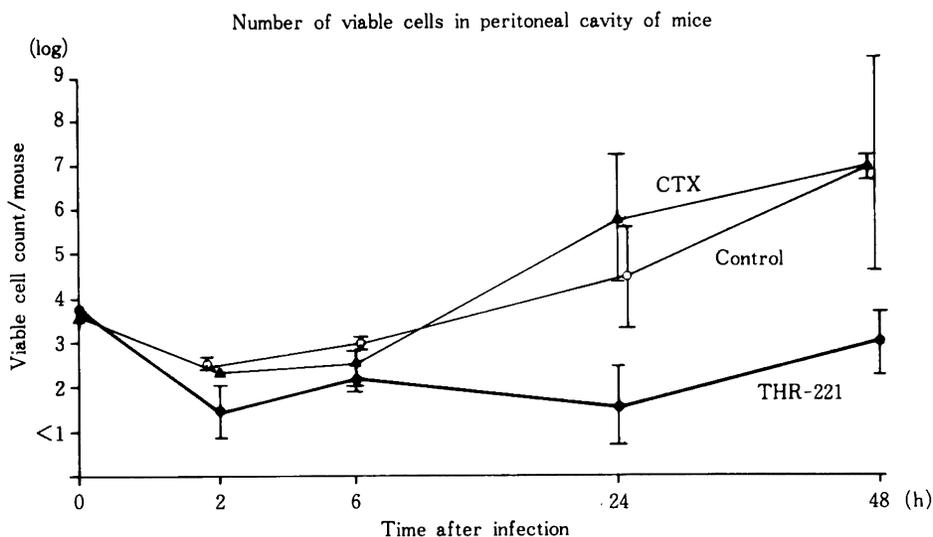
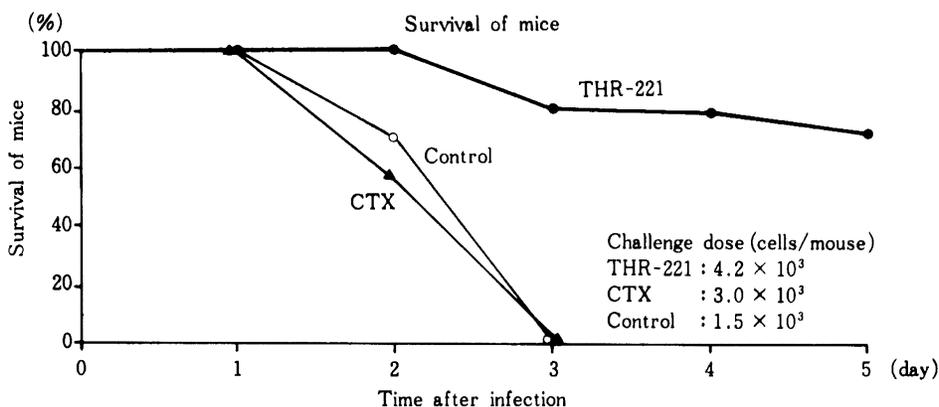


Fig. 10 Decrease in virulence of *K. pneumoniae* 163 pretreated with THR-221



Drug pretreatment : 1/2 MIC, 18 h (MIC : THR-221 0.39 μ g/ml, CTX 0.1 μ g/ml)
 Mice were pretreated with ADM

163株において補体との殺菌増強効果が認められたことから、生体内で THR-221にさらされた感染菌がオプソニン作用等により食細胞で処理されやすくなることが示唆された。

以上のことから、THR-221の優れた *in vivo* 作用は生体防御因子との協力的な殺菌作用に優れていることが一因と考えられた。

文 献

- 1) 兵頭昭夫, 東谷房広, 井上松久, 三橋 進: Cefodizime の細菌学的評価。Chemotherapy 投稿中
- 2) T. MARUNAKA, E. MATSUSHIMA and M. MANIWA :

Determination of cefodizime in biological materials by high performance liquid chromatography. J. Chromatography 420 : 329~339, 1987

- 3) 井口博史, 中沢昭三: 食細胞のNBT還元能に及ぼす2, 3の抗生剤, ハイドロコチゾンならびに Tuftsins の *in-vitro* における影響。Chemotherapy 24 : 1436~1441, 1976
- 4) 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) : 20~27, 1982
- 5) 横田好子, 上村利明, 若井芳美, 俵 修一, 峯靖弘, 五島瑳智子, 西田 実, 桑原章吾: 新しい

- 経口セファロスポリン, Cefixime(CFIX)の各種実験感染モデルにおける治療効果。Chemotherapy 33(S-6) : 134~142, 1985
- 6) MICHAEL LIMBERT, ROBERT R. BARTLETT, GERIARD DICKNEITE, NORBERT KLESEL, HANS ULRICH SCHOLEMMER, GERHARD SEIBERT, IRVIN WINKLER and ELMAR SCRINNER : Cefodizime, an aminothiazolyl cephalosporin, IV. Influence on the immune system. The Journal of Antibiotics 37(12) : 1719, 1984
- 7) 桜井明子, 里美信子, 原中勝征, 国井乙彦: 緑膿菌の食菌, 殺菌機構におよぼすマクロファージの活性化の影響—黄色ブドウ球菌, ラテックス粒子の貪食作用と比較して—。感染症学雑誌 59 : 597~603, 1985
- 8) 横田 健, 野沢龍嗣, 鈴木映子, 新井京子: Cefodizime(THR-221)の試験管内抗菌力, PBP に対する結合親和性および補体, マウス培養マクロファージの協力的殺菌力。Chemotherapy 投稿中
- 9) J. VERHOFF and D. MILATOVIC : Influence of antibiotics on opsonization of staphylococci. Chemotherapy and Immunity. Zbl. Bakt. Suppl. 13, Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · New York, 115, 1985
- 10) CURTIS G. GEMMEL, PHILLIP K. PETERSON, DAVID SCHMELING, YOUNGKI KIM, JOHN MATHEWS, LEWIS WANNAMAKER and PAUL G. QUIE : Potentiation of opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following growth in the presence of clindamycin. J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, Inc. : 67, 1249~1256, 1981
- 11) 斧 康雄, 上田雄一郎, 馬場ますみ, 野末則夫, 芳賀敏明, 村岡 啓, 西谷 肇, 国井乙彦, 宮下英夫: ヒト食細胞機能に及ぼす THR-221の影響。Chemotherapy 投稿中
- 12) S. NOMURA and A. NAGAYAMA : Stimulation of phagocytes functions and enhanced killing of *Klebsiella pneumoniae* in vivo after in vitro incubation with THR-221 (CEFODIZIME), 15 th INTERNATIONAL CONGRESS OF CHEMOTHERAPY, JULY 19~24, ISTANBUL, TURKY
- 13) M. T. LABRO, C. BABIN-CHEVAYE and J. HAKIM : Effects of cefotaxime and Cefodizime on human granulocyte function in vivo. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 18 : 233~237, 1986
- 14) M. T. LABRO, C. BABIN-CHEVAYE and J. HAKIM : Cefodizime(HR-221) potentiation of human neutrophil oxgen-independent bactericidal activity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 19 : 331~341, 1987

THERAPEUTIC EFFICACY OF CEFODIZIME AGAINST EXPERIMENTAL INFECTIONS IN IMMUNOSUPPRESSED MICE

YOSHIYUKI MIYAKE, MASASHI TOMONAGA, TOSHIYUKI TOKOH, YUJI YAMADA, NAOFUMI ISHIDA,
Biological Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

AKIO HYODO, MATSUHISA INOUE* and SUSUMU MITSUHASHI
Episome Institute and Gunma University*, Maebashi

Cefodizime (THR-221), a new parenteral cephem antibiotic, exhibited excellent *in vivo* activity against experimental infections both in normal and immunosuppressed mice. To clarify the prominent *in vivo* effect of THR-221, we carried out studies on the interrelation between the drug and host defence mechanisms. The following results were obtained.

1. In immunosuppressed mice (X-ray or ADM treated), ED₅₀ values of THR-221 were close to those in normal mice with experimental infection and much smaller than those in CTX and CPZ treated mice.

2. The activity of acid phosphatase prepared from peritoneal exudate cells (PEC) of *K. pneumoniae* infected mice increased in mice treated with 500 mg/kg of THR-221. The activity was higher than in the CTX treated and control groups.

3. Synergistic bactericidal activity of THR-221 with PEC against *K. pneumoniae* was noted. At 1/4 MIC of THR-221, the bactericidal activity of PEC was 40.7-fold higher than that of THR-221 alone. On the other hand, the synergistic bactericidal activity of PEC and CTX was only 7.1-fold that of CTX alone.

4. The effect of drug-pretreated *K. pneumoniae* on nitroblue tetrazolium (NBT) reduction activity of PEC was then studied. NBT reduction activity of PEC, prepared from normal and ADM treated mice, was significantly higher in cases of THR-221 pretreated *K. pneumoniae* than in CTX pretreated and untreated bacteria.

5. THR-221 pretreated *K. pneumoniae* (7.4×10^2 cells/mouse) was easily phagocytized in mouse peritoneum, and no regrowth of bacteria was observed 48 h after infection, whereas in the case of CTX pretreated *K. pneumoniae* (3.4×10^2 cells/mouse) and untreated *K. pneumoniae* (4.0×10^2 cells/mouse), bacterial regrowth was observed 24 h after infection. The virulence of *K. pneumoniae* in mice was much more decreased by pretreatment with THR-221 than with CTX.

Based on the following findings—enhancement of lysosomal enzyme activity of PEC, synergistic bactericidal activity of PEC, and increase in NBT reduction activity of PEC—we conclude that the prominent *in vivo* effect of THR-221 is caused by its higher bactericidal activity due to a synergistic interaction with host defence mechanisms.