

癌患者の術後好中球機能に対する cefpimizole, latamoxef 投与の影響について

八木田旭邦・織田 俊・立川 勲

杏林大学医学部第1外科学教室

桂 卓也・緒方幸雄

同 微生物学教室

村田定三・奥西昌彦

味の素株式会社中央研究所*

(平成元年3月2日受付)

CPIZ 投与時の好中球機能に及ぼす影響を健常人および手術施行癌患者を対象として検討した。

健常人における検討では cefpimizole (CPIZ) 投与前, および 1g 静脈内投与 2, 7 時間目に採血し好中球の大腸菌に対する殺菌能を測定したところ, その亢進が認められ, この傾向は若年齢群 (20~30 歳) に比べ高年齢群 (50~60 歳) で著明であった。また, 高年齢群において薬剤投与前, および 1g 静脈内投与 2 時間目の好中球のケミルミネッセンス (CL), および NBT 還元能を測定したところ, これらの亢進が認められた。

手術施行癌患者における検討では, CPIZ または latamoxef (LMOX) を 1 回 1~2g, 1 日 2 回, 術中より術後 6~10 日目まで投与し, 投与前, 投与期間中および投与後に採血し好中球機能を測定した。CPIZ 投与期間中, CL および大腸菌に対する殺菌能の亢進が認められた。一方, 対照薬として使用した LMOX では, 投与期間中 CL および殺菌能の減少が認められた。また, CL と大腸菌に対する殺菌能には高い相関性 ($r=0.78$) が認められた。遊走能および大腸菌に対する貪食能は LMOX 投与症例で一過性の亢進があった他は, 大きな変動は認められなかった。

以上の結果より, CPIZ の好中球機能活性化は臨床投与例において発現し, 特に殺菌能に対し強い影響を及ぼすことが示唆された。

Key words: 好中球, ケミルミネッセンス, Cefpimizole, 殺菌能, 貪食能

Cefpimizole (CPIZ) は抗生物質としての抗菌力以外に, 生体の感染防御因子, 特に好中球機能 (遊走能, 貪食能, 殺菌能) を亢進する作用を有するセフェム系抗生剤である¹⁻⁴⁾。CPIZ の有するこれら 2 つの作用は, 感染症の治療において, host 側を増強し, parasite 側を減弱せしめるものであり, compromised host の感染症を考える上でも興味深い薬剤と思われる。しかしながら, 本剤の好中球機能活性化作用に関する検討は, これまで *in vitro* を中心に行なわれており, また 50~100 $\mu\text{g/ml}$ という比較的高濃度を使用したものであった。

今回, 我々は CPIZ の好中球機能活性化が臨床においても発現するか否かを検討する目的で, 健常人および手術施行患者に CPIZ を投与し, 好中球機能に及ぼす影響を詳細に検討したので報告する。

I. 材料および方法

1. 対象

健常人における検討には 20~30 歳の男子 3 名 (若年齢群) および 50~60 歳の男子 3 名 (高年齢群) を対象とした。手術施行患者における検討には, 胃癌, 結腸癌等による手術施行患者を対象とし, CPIZ 投与群および latamoxef (LMOX) 投与群に無作為に振り分けた (各群 3 例)。また重複癌を有する症例, 感染症その他重篤な合併症を有する症例は除外した。

2. スケジュール

健常人における検討では CPIZ を 1g 午前 10 時に静脈内投与した。採血は午前 8 時 (薬剤投与 2 時間前), および正午 (薬剤投与 2 時間後) に行ない, 大腸菌に対する殺菌能, 遊走能の検討では, さらに午後 5 時 (薬剤

* 神奈川県横浜市戸塚区前田町 214

投与7時間後)にも採血を行なった。また、好中球の機能測定は採血後5時間以内に終了するように行なった。

手術施行患者における検討では、CPIZ または LMOX を手術中 1~2g, 術後1日目より 1~2g を1日2回(午前10時および午後4時), 6日間または10日間投与した。採血は6日間投与患者では手術2日前, 術後1, 5, 8日目に行ない, 10日間投与患者ではさらに術後12日目にも採血を行なった。条件を一定にするために採血は正午に行ない, 好中球機能測定は健康人の場合と同様に, 採血後5時間以内に終了するように行なった。

3. 好中球の分離

健康成人または手術施行患者より末梢静脈血を採取し, ケミルミネッセンス (CL) 測定用, および NBT 還元能測定用として, 各々 5ml 使用し, 食食, 殺菌および遊走能測定用として 10ml 使用した。CL 測定用血液は抗凝固剤としてクエン酸を添加した後, モノ・ポリ分離溶液(大日本製薬プロダクツ)に重層し, 2,200 rpm にて30分間遠心し, 好中球を分離した。NBT 還元能, 食食, 殺菌および遊走能測定用血液は抗凝固剤としてヘパリンを添加した後, BOYUM⁹⁾の方法に従い, デキストランを用い好中球を分離した。

4. 食食および殺菌能の測定

好中球をゼラチン加ハンクス緩衝液にて洗浄し, *Escherichia coli* 312 株を菌:好中球の比率が 2:1 および 7:1 となるよう添加し, 30 および 60 分培養した。500 rpm にて5分間遠心し好中球を除いた後, 上清をとり生菌数を測定した。対照として *E. coli* 312 株のみを含む試料にて同様の操作を行なった。両試料の生菌数の差より好中球により食食された菌数を求め, 対照とした試料の総菌数に対する比率を食食率(%)とした。

また, 好中球と菌を同様に培養し, 蒸留水を加え好中球を破壊した後生菌数を測定した。同様の操作を菌のみを含む試料にて行ない, 両試料の生菌数の差を殺菌された菌数とし, 食食率が 20% を越えた条件にて得られた菌数をもとに, 以下の式より殺菌率を算出した。

$$\text{殺菌率 (\%)} = \frac{\text{殺菌された菌数}}{\text{食食された菌数}} \times 100$$

5. ケミルミネッセンス (CL) の測定

分離した好中球を Buffer II (5 mM KCl, 145 mM NaCl, 5.5 mM グルコース, 10 mM HEPES, pH 7.4) にて洗浄し, Buffer I (1 mM CaCl₂ を含む Buffer II) にて好中球数が 1 × 10⁶/ml となるよう調製した。調製した液 100 μl に 200 μM ルミノール液 100 μl, および 3 × 10⁻⁷ M fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) 100 μl を各々添加しただけに Lumiphotometer (LABO サイエン

製)にて CL を測定した。測定は fMLP 添加後 10 分間行ない, ピーク値を CL 値(単位:rlu, 1 rlu=約 10⁵ cpm)として表示した。

6. NBT 還元能の測定

NBT 還元能の測定は辻の方法⁶⁾を用いて行なった。試験管にハンクス緩衝液 0.20 ml, 0.01 MKCN 0.1 ml, 0.1% NBT 試薬を含む 0.85% NaCl を 0.4 ml, 0.81 μm ラテックス粒子懸濁液 0.05 ml を各々加え, 37°C 10 分間インキュベート後, 好中球浮遊液 (10⁷ cells/ml) を 0.25 ml 加えた。37°C 15 分間インキュベート後, 0.5 N HCl を 10 ml 加え反応を停止させ, 2,000 rpm 10 分間遠心し, 沈渣にピリジン 2 ml を加え, 100°C 10 分間インキュベートした。さらに 2,000 rpm 10 分間遠心後, 上清の吸光度を 515 nm にて測定し, ピリジンとの吸光度の差を NBT 還元能とした。

7. 遊走能の測定

前田ら⁴⁾によるアガロースプレート法により測定した。組織培養用シャーレにヒト非動化血清を含む 1.2% アガロースを加え固化させた後, 直径 3 mm の3つのウェルを 3 mm の間隔で直線上にあげた。真中のウェルに好中球液 (1~5 × 10⁷ cells/ml) 10 μl をいれ, 外側のウェルの一方にザイモザン処理血清を, 他方に緩衝液 (Eagle MEM) を各々 10 μl 入れた。アガロースプレートを 5% CO₂ 下に 37°C 2 時間培養した後, ホルマリン固定, ギムザ染色を施し顕微鏡下に好中球の遊走距離を測定した。好中球を含むウェルからザイモザン処理血清を含むウェルまでの遊走距離を chemotaxis, 緩衝液を含むウェルまでの距離を spontaneous migration とした。

8. フィーバーインデックス (FI) の算出

酒井ら⁷⁾の方法に従い, 術後の各病日における発熱曲線と 37°C 線が囲んだ面積を FI として算出した。

II. 結 果

1. 健康人における検討

健康成人の好中球殺菌能, 遊走能に及ぼす CPIZ 投与の影響を, 若年齢群および高年齢群に分けて検討した。また高年齢群においては, CL および NBT 還元能についても検討を加えた。

1) 殺菌能 (Fig.1)

CPIZ 投与前の殺菌能は若年齢群が全例において高年齢群より高値を示した。CPIZ 投与後, 殺菌能の亢進が認められ, この傾向は特に高年齢群において強く, また時間の経過とともに増大した。

2) CL (Fig.2)

CPIZ 投与後の CL 値は大腸菌に対する殺菌能と同様に, 全例において著明な亢進が認められた。

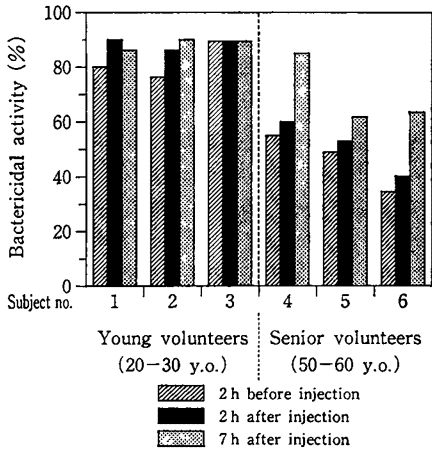


Fig. 1. Influence of cefpimizole injection on bactericidal activity of neutrophils

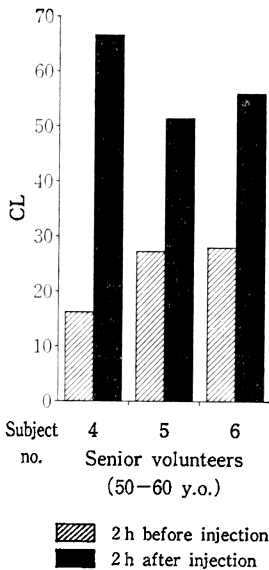


Fig. 2. Influence of cefpimizole injection on CL of neutrophils

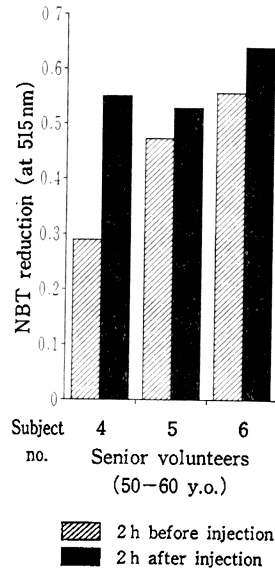


Fig. 3. Influence of cefpimizole injection on NBT reduction by neutrophils

3) NBT 還元能 (Fig. 3)

殺菌能および CL と同様に, CPIZ 投与により NBT 還元能の亢進が認められた。

4) 遊走能

CPIZ 投与前における遊走能には若年齢群, 高年齢群で違いが認められなかった。CPIZ 投与後の遊走能の変動は各人によって異なり, 一定の傾向は認められなかった。

2. 手術施行患者における検討

1) 背景因子およびフィーバーインデックス (FI)

対象とした患者の背景因子および FI を Table 1 に示した。CPIZ 投与群は結腸癌 2 例, 胃癌 1 例, LMOX 投与群では胃癌, 結腸癌, 直腸癌各 1 例であった。平均年齢 (±SD) は CPIZ 投与群で 57.7±19.7 歳, LMOX 投与群で 59.0±18.2 歳であり両群間で差は認められなかった。体重および手術時間も 両群間で差は認められなかった。FI は CPIZ 投与群で 1 例が高値を示し, LMOX 投与群では 2 例が高値を示した。しかし, 高値を示した例にあっても 6 日以降 37°C は越えなかった。

2) CL

CPIZ および LMOX 投与患者の CL 値の経時変化を Figs. 4, 5 に示した。また各薬剤の投与期間を図中に表示した。CPIZ 投与群では患者毎に CL 値が異なるものの, 投与 1 日目でいずれの患者においても著明な CL 値の上昇が認められた。2 例においては CPIZ 投与終了後に投与前値に復帰またはそれより低下したが, 1 例では投与終了後も高値を維持した。

一方, LMOX 投与群ではいずれの患者においても投与 1 日目で CL 値の低下が認められた。投与終了後 2 例においては投与前値に回復またはそれ以上に上昇し, 1 例では低値を維持した。

3) 食食および殺菌能

CPIZ および LMOX 投与患者の食食率および殺菌率の経時変化を Figs. 6, 7 に示した。CPIZ 投与患者では CL 値と同様, 投与 1 日目で殺菌能の亢進が認められたが, CL 値に比べややばらついた結果であった。食食能

Table 1. Background data of patients and their fever indexes

| Patient no. | Antibiotic used | Sex | Age (y.o.) | Body weight (kg) | Diagnosis | Operation duration | FI* (°C-h) |
|-------------|-----------------|-----|------------|------------------|-------------------------|--------------------|------------|
| 1 | CPIZ | M | 68 | 55 | Sigmoid colon cancer | 3 h | 39.0 |
| 2 | CPIZ | M | 70 | 54 | Stomach cancer | 1 h 43 min | 5.9 |
| 3 | CPIZ | F | 35 | 46 | Descending colon cancer | 2 h 55 min | 9.4 |
| 4 | LMOX | F | 47 | 56 | Transverse colon cancer | 3 h 6 min | 6.4 |
| 5 | LMOX | M | 50 | 60 | Rectum cancer | 4 h 25 min | 34.2 |
| 6 | LMOX | M | 80 | 64 | Stomach cancer | 3 h | 58.6 |

* FI: Fever index

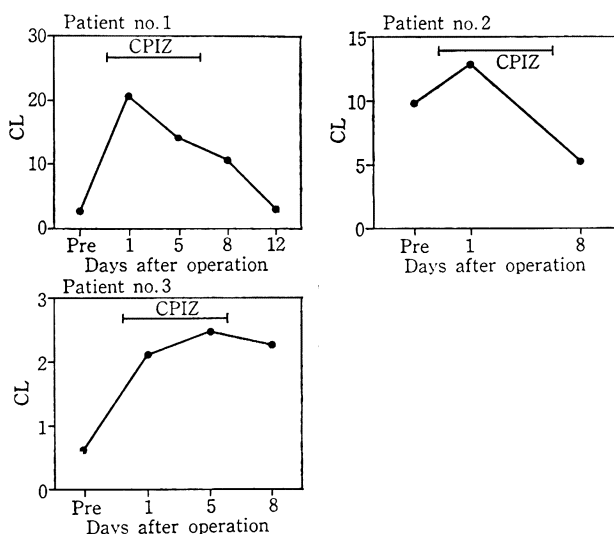


Fig. 4. Influence of cefpimizole-treatment on CL of neutrophils

は2例でやや低下する傾向が、1例では一過性の上昇が認められたが、殺菌能に比べその変動は小さかった。LMOX 投与患者では、投与期間中2例で殺菌能の低下が認められた。食食能はいずれの患者においても一過性の亢進が認められた。

4) 遊走能

CPIZ および LMOX 投与患者の chemotaxis および spontaneous migration の経時変化を Figs. 8, 9 に示した。CPIZ 投与群における遊走能の変動は患者毎に異なっており、一定の傾向は認められなかった。LMOX 投与群では投与1日目に一過性の亢進が認められ、以降低下した。

5) CL と殺菌率の相関

各測定時における CL と殺菌率の相関を Fig. 10 に示した。CL と殺菌率の相関係数は 0.78 と高いものであ

り、fMLP 刺激時の CL 値と *E. coli* 312 株に対する殺菌活性は強い関連性をもって変動することが認められた。

III. 考 察

CPIZ は基礎的検討において、好中球の遊走能、食食能および殺菌能を亢進することが報告されているが⁴⁾、これらの報告は主として *in vitro*、あるいは実験動物を用いたものである。落合らは⁹⁾ CPIZ を投与した手術施行患者では、大腸菌に対する好中球殺菌能の低下は認められないが、LMOX 投与症例では低下が認められたことを報告している。今回、我々は CPIZ 投与の好中球機能に対する影響に関しより詳細な検討を行なった。LMOX は CPIZ とほぼ同等な抗菌力を示す第3世代セフェム系抗生剤であり、ヒトにおける体内動態も類似している^{9,10)}。また LMOX はこれまで好中球機能に

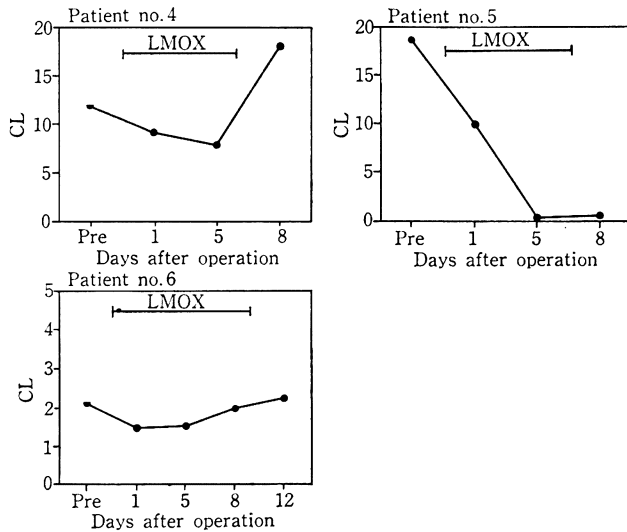


Fig. 5. Influence of latamoxef-treatment on CL of neutrophils

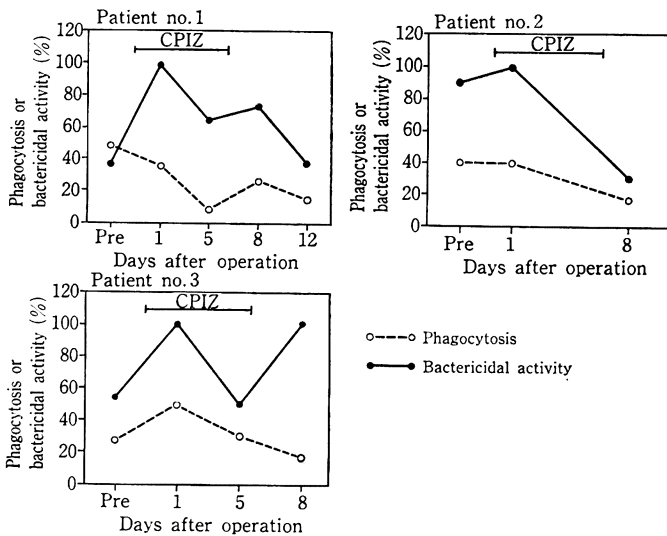


Fig. 6. Influence of cefpimizole treatment on phagocytosis and bactericidal activity of neutrophils

対して影響を及ぼすとの報告はないことより、本研究に使用する対照薬として妥当と考えられた。

健常人における検討では、若年齢群に比べ高年齢群の方が大腸菌に対する殺菌能が低下しており、CPIZの好中球に対する殺菌能亢進作用はベースが低下している高年齢群においてより著明に発現した。また、このような高年齢群において、殺菌能の指標とされるCLおよびNBT還元能もCPIZ投与により亢進することが認めら

れた。一方、癌患者の手術施行例を対象とし検討した結果、CPIZ投与により同様に好中球機能(CL, 殺菌能)の亢進が認められた。

以上の結果は、本剤のcompromized hostに対する有用性を示唆するものと考えられた。

好中球の殺菌能を測定する方法として、CL¹¹⁾、NBT還元能¹²⁾、細菌を用いる方法¹³⁾等が報告されている。今回、健常人の高年齢群にCPIZを投与した際の好中球

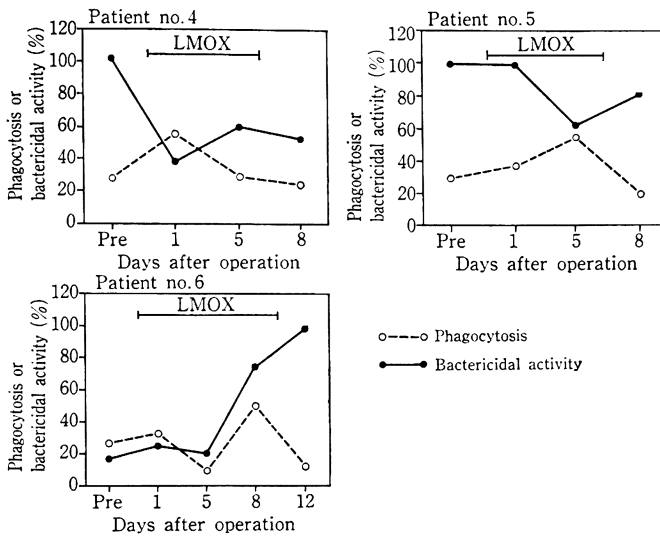


Fig. 7. Influence of latamoxef-treatment on phagocytosis and bactericidal activity of neutrophils

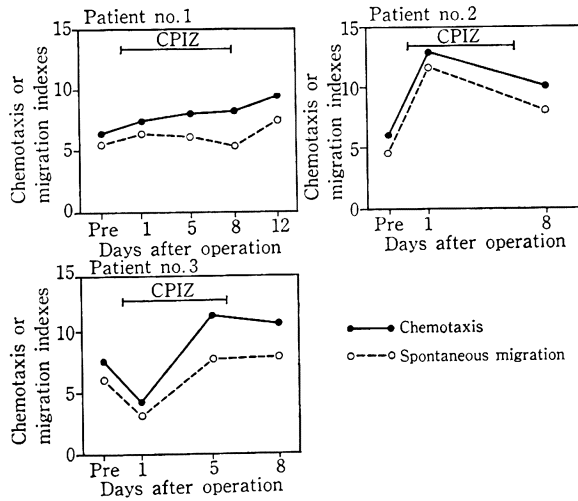


Fig. 8. Influence of cefpimizole-treatment on chemotaxis and spontaneous migration of neutrophils

機能の変動を、これら3つの方法を用い比較検討した結果、いずれの方法にても好中球機能の亢進が認められ、特にCL法にて著明であった。そこで、手術施行患者においては、細菌を用いる方法、およびより簡便なCL法を殺菌能測定の指標として検討した。その結果、CL法はfMLP刺激であり、細菌法は*E. coli*刺激ではあるが、両者は高い相関性を示した($r=0.78$)。CLは操作も簡便であり、今後同様の検討を行なう上で有用な指標

これまでの *in vitro* における報告^{1~4)}では、好中球機能活性化作用の測定に用いた CPIZ 濃度は 50~100 $\mu\text{g/ml}$ と比較的高いものであった。CPIZ に関する薬動学的データでは、1g 静脈内投与時の2時間後の血中濃度は 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下と報告されており¹⁰⁾、また今回の検討では、CPIZ 投与2時間後に採血し、好中球分離後、充分な洗浄を行なっていることから、反応液に CPIZ の残存はなく、したがって、CPIZ が直接菌に作用した可能性はないものと考えられる。この様な条件下において

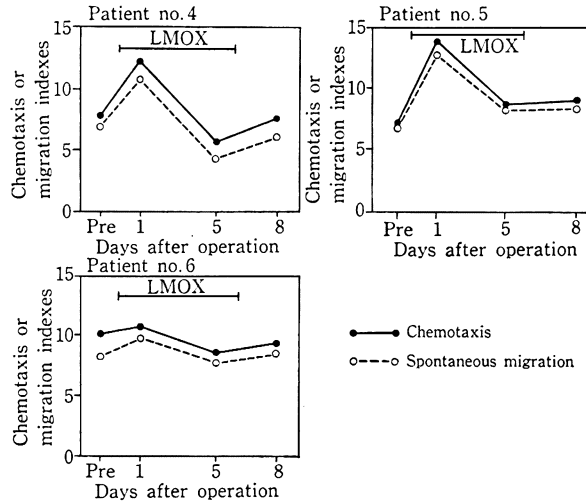


Fig. 9. Influence of latamoxef-treatment on chemotaxis and spontaneous migration of neutrophils

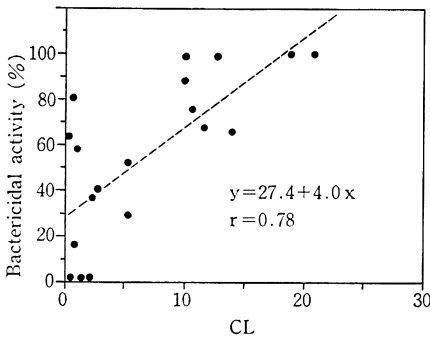


Fig. 10. Relationship between bactericidal activity and CL

も CPIZ の作用が発現したことは、本剤が生体側に作用して好中球機能を活性化したものと推察され、臨床使用するにあたって興味深い結果と思われた。

前田らは、*in vitro* で 100 µg/ml の CPIZ にて好中球を処理することにより、遊走能が亢進すると報告している⁴⁾。今回の結果では LMOX 投与により一過性の亢進が認められたが、CPIZ では著明な変化は認められなかった。*In vivo* と *in vitro* の条件の違い、あるいは薬剤濃度の違いが関与しているものと思われた。

酒井らは、FI が術後感染のマーカーとして有用であることを報告している⁷⁾。比較するには少数例ではあるが、CPIZ 投与群では LMOX 投与群に比べ、FI が低い傾向を示した。CPIZ による好中球機能活性化が、FI に反映している可能性が考えられた。

以上、*in vitro* にて好中球機能活性化作用を有すると

される CPIZ を臨床的に使用し、LMOX と比較検討した結果、CPIZ が好中球機能、特に殺菌能を亢進することが示唆された。まだ症例数が少なく、今後さらに検討を加える必要があると考えられるが、今回用いた手法は抗生剤のみならず、免疫賦活作用を有するとされる薬剤の評価にも有用と考えられた。

文 献

- 1) OHNISHI H, KOSUZUME H, INABA H, OKURA M, MOCHIZUKI H, SUZUKI Y, FUJII R: Effects of AC-1370, a new semisynthetic cephalosporin, on phagocytic functions. *Antimicrob. agents Chemother.* 23 (6): 874~880, 1983
- 2) 大西治夫, 小雀浩司, 稲葉 均, 望月英典, 長尾祐二, 藤井良知: AC-1370 の宿主感染防御能に対する作用の解析: 第1報。 *Chemotherapy* 32 (S-9): 120~126, 1984
- 3) 大西治夫, 稲葉 均, 望月英典, 日下部知志, 小雀浩司, 大西治夫: AC-1370 の宿主感染防御能に対する作用の解析: 第2報。 *Chemotherapy* 32 (S-9): 127~130, 1984
- 4) 前田真一, 小林克寿, 斎藤昭弘, 秋野裕信, 出口隆, 西浦常雄: 白血球機能に及ぼす抗生剤の影響。 *感染症学雑誌* 57 (10): 890~896, 1983
- 5) BOYUM A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl. 97): 77~89, 1968
- 6) 辻 芳郎: NBT 還元能検査。白血球と食作用。水上茂樹, 柿沼カツ子編。pp. 210~211 講談社, 東京, 1979

- 7) 酒井克治, 他 (7 施設及び関連施設): 抗生剤術後感染防止効果の評価方法に関する研究。Chemotherapy 33 (12): 1086~1094, 1985
- 8) 落合武徳, 佐藤 博, 浅野武秀, 榎本和夫, 永田松夫: 免疫能と白血球食菌能に及ぼす AC-1370 投与の影響。Chemotherapy 32 (S-9): 98~102, 1984
- 9) 山田秀雄, 吉田 正, 尾熊隆嘉, 木村靖雄, 羽野義博, 栗原二郎, 松本慶蔵, 宇塚良夫, 穴戸春美, 永武 毅: 6059-S の健常人における吸収, 排泄。Chemotherapy 28 (S-7): 251~262, 1980
- 10) 斎藤 玲, 他 (4 施設及び関連施設): AC-1370 の基礎的臨床的検討。Chemotherapy 32 (S-9): 163~173, 1984
- 11) ALLEN R C, LOOSE L D: Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69: 245~252, 1976
- 12) BAEHNER R L, NATHAN D G: Quantitative nitroblue tetrazolium dye test in chronic granulomatous disease. New Engl. J. Med. 278: 971~980, 1968
- 13) QUIE P G, WHITE J G, HOLMES B, GOOD R A: *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes, diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J. Clin. Invest. 46: 668~678, 1967

THE INFLUENCE OF CEFPIMIZOLE OR LATAMOXEF TREATMENT ON HUMAN NEUTROPHIL FUNCTIONS IN CANCER PATIENTS

AKIKUNI YAGITA, TAKASHI ODA and ISAO TATEKAWA

First Department of Surgery, School of Medicine, Kyorin University

TAKUYA KATSURA and SACHIO OGATA

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyorin University

TEIZO MURATA and MASAHICO OKUNISHI

Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., 214 Maeda-cho,
Totsuka-ku, Yokohama 244, Japan

We studied the influence of cefpimizole (CPIZ) or latamoxef (LMOX) treatment on human neutrophil functions in healthy volunteers and cancer patients.

In healthy volunteers, the bactericidal activity of neutrophils against *Escherichia coli* was enhanced at 2 h and 7 h after CPIZ injection. This tendency was more marked in the senior group (50-60 years old) than the younger group 20-30 years old). Chemiluminescence (CL) and NBT reduction of neutrophils were also examined at 2 h after CPIZ injection in the senior group, and enhancement of both was observed.

In cancer patients, CPIZ or LMOX was given during and after operation for 6-10 days. Enhancement of CL and of bactericidal activity was observed during CPIZ-treatment, whereas these decreased during LMOX-treatment. Chemiluminescence correlated highly with bactericidal activity, with a coefficient of 0.78. No marked changes were observed in the phagocytic and chemotactic activities of neutrophils during CPIZ or LMOX treatment, except for transient elevation in LMOX-treated patients.

We conclude that CPIZ enhances neutrophil functions, especially killing activity, during treatment.