

Sub-MIC における各種 β -ラクタム剤の抗菌効果

松本文夫・今井健郎

神奈川県衛生看護専門学校付属病院内科*

高橋孝行・田浦勇二・国分勝弥・桜井磐

同 検査科

加藤伸郎・村田定三

味の素(株)中央研究所

(平成元年4月24日受付)

β -ラクタム剤の sub-MIC 濃度における臨床的意義を知るために、1/4 MIC の β -ラクタム剤で前処理した大腸菌に対するヒト好中球の食菌能、殺菌能、および尿路上皮細胞への付着能について検討した。Cefmetazole, cefpimizole にて処理した菌では無処理菌に比べ、好中球による食菌能の亢進が認められ、ampicillin, mecillinam, cefoperazone で処理した菌では、その低下が認められた。ケミルミネッセンスを指標とした殺菌能の検討結果では、食菌能と同様に、cefmetazole で亢進が、ampicillin, mecillinam, cefoperazone で低下が認められた。上皮細胞に対する付着能では、使用したすべての抗菌剤処理で付着能の抑制が認められ、特に cefmetazole, cefpimizole で著明であり、抑制率は 42~56% であった。また付着能の抑制はマンノース感受性株だけでなく、マンノース耐性株に対しても認められた。以上の結果より cefmetazole, cefpimizole は MIC 以下の濃度においても、細菌の生体内での colonization を減弱する一方、好中球による食殺菌を促進する可能性が示唆された。

Key words : sub-MIC, β -ラクタム剤, 好中球, 付着能, ケミルミネッセンス

細菌感染症に対する抗菌剤療法では、原因菌の薬剤感受性、使用する薬剤の吸収、体内分布、代謝、排泄などを勘案し、必要充分量の薬剤が感染病巣に到達することを目的に、使用設計がたてられている。しかしながら実際は、感染病巣における薬剤濃度は最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 以下で推移する 경우가多いと推定される。したがって使用薬剤の総合的有効性を論ずるにあたっては MIC のみならず MIC 以下の濃度、すなわち sub-MIC における薬剤の作用を検討することが重要と考えられる¹⁾。Sub-MIC 濃度の抗菌剤が細菌の形態、分裂、病原性 (付着能) に及ぼす影響に関して多くの報告があるが、いまだその臨床的意義は明確ではない^{2~4)}。

一方、抗菌剤療法の有効性を決定する重要な因子として上述の諸因子のほかに、好中球や血清など生体の感染防御機構と薬剤との相互作用も注目されつつあり、近年これら感染防御機構に対して活性化作用、または相互作用を有する種々の β -ラクタム剤が報告されている^{5~7)}。

Sub-MIC 濃度の薬剤とこれら感染防御因子の相互作用に関しては、好中球の走化性、食菌能⁵⁾、血清の殺菌作用に対する影響⁶⁾等の報告があるが、我々は今回、sub-MIC 濃度における抗菌剤の臨床的意義を明らかにする目的で、sub-MIC 濃度の種々 β -ラクタム剤にて処理した細菌 (大腸菌) の好中球による食菌能、殺菌能および尿路上皮細胞に対する付着能に関し検討を行なった。

I. 材料と方法

(1) 使用薬剤

Ampicillin (ABPC: 明治製菓(株)), mecillinam (MPC: 武田薬品工業(株)), cefoperazone (CPZ: 富山化学工業(株)), cefmetazole (CMZ: 三共(株)), cefpimizole (CPIZ: 味の素(株))を用いた。

(2) 使用菌株

当病院尿路感染症患者から分離した *Escherichia coli* のうち、ヒト血清中で死滅することなく増殖する No. 1 株および No. 116 株を選び、食菌能および殺菌能の検討

* 神奈川県横浜市磯子区汐見台 1-6-5

に用いた。また腎盂腎炎患者の尿から分離した *E. coli* 11 株を赤血球凝集活性および上皮細胞への付着能の検討に用いた。

(3) 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

薬剤の被検菌に対する MIC は液体希釈法によって測定した。培地として nutrient Broth (NB) を用いた。各種抗菌剤を 1,000 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度として 2 倍希釈系列で培地に添加し、これに最終濃度が 10^8 cells/ml または 10^6 cells/ml となるよう菌を接種して、 37°C 18 時間培養後、肉眼判定により菌による混濁が認められない最小薬剤濃度を MIC とした。

(4) ヒト好中球の調製

ヒト好中球 (PMN) の調製は Ficoll-Conray 重層法よった。すなわち健康成人よりヘパリン採血した血液 8 ml を 2% デキストラン生理食塩水溶液 2 ml と混和し、1 時間室温にて放置後、leukocyte-rich plasma をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に等量加え Ficoll-Conray 3 ml に重層し、1,500 rpm にて 45 min 遠心した。沈澱物に 0.87% NH_4Cl を 4 ml 加え 10 分間ゆっくりと混和した後、遠心して、沈澱した好中球を PBS にて洗浄した。洗浄した好中球を最終濃度が 1×10^7 cells/ml となるようゼラチン加ハックス緩衝液 (HGS) に懸濁し使用した。

(5) 尿路上皮細胞の調製

健康成人女子 5 名の中間尿を 100~150 ml 採取し、1,000 rpm 10 min 遠心分離により尿路上皮細胞を得た。ついで 1/15 M PBS (pH 7.3) にて 3 回洗浄し実験に供した。

(6) Sub-MIC 抗菌剤による被検菌の処理

Heart infusion broth (HIB, 日水製薬(株)) または heart infusion agar (HIA, 日水製薬(株)) で 37°C 18 時間培養した菌液を洗浄後 HIB に懸濁し、分光光度計 (日立 101 型) にて菌濃度を調製した後 (10^8 cells/ml), 最終濃度が 1/4 MIC となるよう抗菌剤を添加し 37°C 2

時間培養した。培養後、菌を HGS にて 3 回洗浄し 5% ヒト新鮮血清を添加し 37°C にて 30 分間オプソナイズし、HGS にて 2 回洗浄後、分光光度計にて菌濃度を調整し実験に使用した。ヒト新鮮血清は、健康成人男子より採取した血液を、室温にて 1 時間放置後、3,000 rpm 10 min 遠心分離し調製した。

(7) 食菌能の検討

0.8 ml の HGS に、1/4 MIC 濃度の抗菌剤で処理した菌懸濁液 (10^7 cells/ml) を 0.1 ml 加え、次いで好中球浮遊液 (10^5 cells/ml) を 0.1 ml 加え (菌:好中球=100:1), 37°C 5 分間振とう培養後直ちに氷冷し反応を停止させた。HGS にて 2 回洗浄後牛血清アルブミンを 0.5% 含む HGS に再浮遊し、オートスミア (サクラ精機) にて塗沫標本を作製し、メタノール固定後ギムザ染色を行なった。光学顕微鏡下で 100 個の好中球を観察し、食菌された菌数を測定し 1 個あたりの好中球に食菌された菌数を算出した。対照として抗菌剤未処理の菌を用い同様の操作を行ない、以下の式に従い phagocytic index (PI) を算出した。

$$\text{phagocytic index} = \frac{\text{抗菌剤処理菌の食菌数}}{\text{抗菌剤未処理菌の食菌数}}$$

(8) 殺菌能

殺菌能の測定は楊井らの方法⁹⁾に準じた chemiluminescence (CL) 法により行なった (Table 1)。反応セルに 0.2 mg/ml のルミノール 50 μl , 抗生剤処理または未処理菌 (10^9 cells/ml) を 200 μl 添加後、好中球浮遊液 (10^7 cells/ml) を 100 μl 添加し 10 秒間攪拌した後、Chem-Glow-Photometer (Aminco, 米国) にて CL を測定した。反応開始後の CL ピーク値を測定し以下の式に従い CL index を算出した。

$$\text{CL index} = \frac{\text{抗菌剤処理菌の CL ピーク値}}{\text{抗菌剤未処理菌の CL ピーク値}}$$

(9) 赤血球凝集活性

被検菌を HIB, または HIA にて 37°C 18 時間培養し

Table 1. Effect of sub-MIC treatment of bacteria on the phagocytic activity of human PMN

Antibiotic	Phagocytic index		MIC ($\mu\text{g/ml}$) 10^8 cells/ml	
	<i>E. coli</i> No.1	<i>E. coli</i> No.116	<i>E. coli</i> No.1	<i>E. coli</i> No.116
Control	1.0	1.0		
ampicillin	0.86	0.82	25	200
mecillinam	0.70	0.60	200	400
cefoperazone	0.80	0.70	25	100
cefmetazole	1.43	1.30	6.25	50
cefpimizole	1.23	1.16	25	200

E. coli: *Escherichia coli*

Table 2. Effect of sub-MIC treatment of bacteria on the chemiluminescence of human PMN

Antibiotic	Chemiluminescence index	
	<i>E. coli</i> No.1	<i>E. coli</i> No.116
Control	1.0	1.0
ampicillin	0.91	0.88
mecillinam	0.74	0.66
cefoperazone	0.90	0.76
cefmetazole	1.50	1.45
cefipimizole	1.16	0.89

E. coli: *Escherichia coli*

た後、PBS に懸濁し (5×10^8 cells/ml) 25 μ l を 1.5% ヒト P1 またはモルモット赤血球浮遊液 50 μ l に加え 37 °C 2 時間インキュベートした後、凝集の有無を判定した。またマンノース感受性の検討は反応液中に α -methyl-D-mannose (MM) を最終濃度が 10% となるよう添加し行なった。

(10) 付着能

健康成人女子の尿より採取した尿路上皮細胞の PBS 懸濁液 (2×10^5 cells/ml) 0.5 ml に抗生剤処理菌または未処理菌 (2×10^8 cells/ml) 0.5 ml を添加し室温にて 30 min 反応させた。氷冷により反応を停止後、PBS にて洗浄し塗抹標本を作製しメタノール固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡下に 20 個の上皮細胞に付着した菌数を測定した。

II. 成 績

(1) β -ラクタム 剤前処理の食菌能に対する影響
1/4 MIC の ABPC, MPC, CPZ, CMZ および CPIZ にて処理した菌の好中球の食菌能に対する検討結果を Table 1 に示した。

E. coli No.1 株の phagocytic index は CMZ が 1.43, CPIZ が 1.23 であり、食菌能の亢進傾向が認められた。一方、ABPC, CPZ, MPC は phagocytic index が各々 0.86, 0.80, 0.70 であり、抑制傾向が認められた。*E. coli* No.116 株においても No.1 株と同様に、CMZ, CPIZ は各々 1.30, 1.16 の phagocytic index を示したのに比べ、ABPC, CPZ, MPC のそれはいずれも低値であった。

(2) β -ラクタム 剤前処理の殺菌能に対する影響

各種 β -ラクタム 剤にて前処理した菌の好中球による殺菌能を CL により検討した (Table 2)。*E. coli* No.1 株および No.116 株の殺菌能 (CL index) は各々 CMZ が 1.50, 1.45, CPIZ が 1.16, 0.89, ABPC が 0.91,

0.88, CPZ が 0.90, 0.76, MPC が 0.74, 0.66 であり、CMZ 前処理により殺菌を受け易くなっていることが示唆された。

(3) Mannose sensitive 株 (MS), Mannose resistant 株 (MR) の選定および各種 β -ラクタム 剤に対する MIC

腎盂腎炎患者由来 *E. coli* 11 株を用い、赤血球凝集活性とマンノース感受性および各種 β -ラクタム 剤に対する MIC を検討した (Table 3)。

Broth 法にて培養した場合には 11 株中 5 株がモルモット赤血球に対し凝集活性を示し、そのうちいずれもがマンノース感受性 (MS) であった。一方、agar 法で培養した場合には 11 株中 4 株がヒト赤血球に対し凝集活性を示し、いずれもマンノース耐性 (MR) であった。以上の結果より MS 株として No.1 株を broth 法にて培養したものを、MR 株として No.4 株を agar 法にて培養したものを、また凝集活性のない株として No.6 株を agar 法にて培養したものを各々選定し、以下の実験に使用した。

各種 β -ラクタム 剤に対する MIC は、No.8 株が ABPC, MPC, CPZ, CPIZ に対し 100 μ g/ml 以上であり、耐性を示したが、CMZ 対しては 6.25 μ g/ml であり感受性を示した。一方、その他の株では各薬剤に対する MIC は 0.1~6.25 μ g/ml であり感受性を示した。

(4) 赤血球凝集活性と上皮細胞に対する付着能の関連

赤血球凝集活性と尿路上皮細胞付着能の関連を Fig. 1 に示した。

赤血球凝集活性と上皮細胞付着能はマンノース感受性で相関傾向が認められた。すなわち、MS 株はマンノース無添加時、上皮細胞 1 個当たり 72 個付着したのに対して、マンノース添加時では 31 個に減少し、赤血球凝集

Table 3. Hemagglutination activity of *Escherichia coli*/MICs of antibiotics

Strain No.	Hemagglutination		MIC (μg/ml)				
	red cell		ABPC	MPC	CPZ	CMZ	CPIZ
	guinea pig	human					
	-MM/+MM	-MM/+MM					
PN 1	+/-	+/+	3.13	0.2	0.78	0.78	3.13
PN 2	-	-	3.13	0.1	0.2	0.39	3.13
PN 3	+/-	+/+	3.13	0.1	0.39	0.39	3.13
PN 4	+/-	+/+	3.13	0.1	0.2	0.39	3.13
PN 5	-	-	6.25	0.1	1.56	0.39	3.13
PN 6	-	-	6.25	0.1	1.56	1.56	6.25
PN 7	-	-	6.25	0.1	1.56	1.56	6.25
PN 8	-	-	>100	>100	>100	6.25	>100
PN 9	+/-	-	6.25	0.1	0.78	0.39	1.56
PN 10	+/-	+/+	1.56	0.1	0.39	0.39	1.56
PN 11	-	-	3.13	0.1	0.2	0.39	1.56

-MM : without α-methyl-mannose +MM : with α-methyl-mannose

ABPC : ampicillin, MPC : mecillinam, CPZ : cefoperazone, CMZ : cefmetazole, CPIZ : cefpimizole

Strain No.	Hemagglutination	Adhesion to uroepithelial cells	
		α-MM	attached bacteria/cells
PN6	-	-	28±9
PN1	MS	-	72±27
		+	31±16
PN4	MR	-	90±20
		+	84±20

MS : mannose-sensitive MR : mannose-resistant

Fig. 1. Relationship between hemagglutination activity and adhesion to uroepithelial cells of *Escherichia coli*

活性のない株と同等 (28 個) であった。一方, MR 株はマンノース添加の有無にかかわらず高い付着能を示した。

(5) β-ラクタム剤前処理の上皮細胞付着能に対する影響

MS 株および MR 株を 1/4 MIC 濃度の各種 β-ラクタム剤で前処理した際の尿路上皮細胞付着能を Tables 4, 5 に示した。

MS 株, MR 株は共に, いずれの抗菌剤前処理にても付着能の抑制が認められたが, その程度は抗菌剤間で著明な差が認められた。MS 株では CPIZ, CMZ が強力な抑制作用を示し, 抑制率は各々 55.6%, 48.1% であった。ABPC, CPZ は中等度の抑制であり, MPC は 14.8% と低い抑制率であった。MR 株でも MS 株同様

に CPIZ, CMZ が強力な抑制作用を示し, 各々 42.1%, 50.9% の抑制率であった。ABPC は 10.5% と MS 株に比べ低い抑制率であった。

III. 考察

Sub-MIC 濃度における抗菌剤の臨床的意義を解明する一助として, sub-MIC 濃度の各種 β-ラクタム剤によって前処置した菌の好中球による食菌能, 殺菌能, および尿路上皮細胞に対する付着能に関し検討した。

尿路感染症患者より分離した *E. coli* を 1/4 MIC の各種 β-ラクタム剤で処理した場合, 無処理菌に比べ, ABPC, MPC, CPZ では好中球による食菌性の低下傾向が認められ, 逆に, CMZ, CPIZ では亢進する傾向が認められた。また好中球の殺菌能の指標として CL を測定した結果, ABPC, MPC, CPZ では低下傾向が, CMZ では亢進傾向が認められ, CPIZ では No. 1 株では亢進, No. 116 株では低下傾向が各々認められた。好中球は感染症に対する宿主側の防御因子として重要な役割を担っていることが知られているが⁹⁾, 今回の検討では, parasite (細菌) を sub-MIC の抗生剤で処理することにより host 側の防御因子 (好中球) 活性が相対的に亢進または低下したことは, host-parasite-drug interaction における sub-MIC の意義を解明していく上で興味深い結果と考えられる。また種々の β-ラクタム剤が host-parasite interaction に対して異なる影響を及ぼすことが示唆された点は, 臨床において抗生剤を選択する上でも重要な知見と考えられる。今回は宿主側因子として好

Table 4. Effect of antibiotic treatment on the adhesion of mannose-sensitive *Escherichia coli* to uroepithelial cells

Antibiotic	Adhesion to uroepithelial cells (attached bacteria/cells)	Inhibition of adhesion (%)
Control	27±6	0%
ampicillin	20±5	25.9
mecillinam	23±4	14.8
cefoperazone	19±5	29.6
cefmetazole	14±3	48.1
cefipimizole	12±2	55.6

Table 5. Effect of antibiotic treatment on the adhesion of mannose-resistant *Escherichia coli* to uroepithelial cells

Antibiotic	Adhesion to uroepithelial cells (attached bacteria/cells)	Inhibition of adhesion (%)
Control	57±18	0%
ampicillin	51±24	10.5
mecillinam	52±17	8.8
cefoperazone	41±15	28.1
cefmetazole	28±9	50.9
cefipimizole	33±15	42.1

中球に着目して検討を加えたが、この他血清と sub-MIC 抗菌剤の協合作用に関して、CPIZ をはじめ⁵⁾ cefuroxime⁶⁾, cefbuperazone¹⁰⁾ 等報告されており、宿主状態を勘案した抗菌剤の選択も留意せねばならない問題と思われる。

腎盂腎炎患者由来 *E. coli* の尿路上皮細胞に対する付着能を検討した成績では、いずれの抗菌剤処理にも付着能の抑制が認められ、CMZ, CPIZ で著明であった。広瀬ら⁴⁾SVANBERG-EDEN ら¹¹⁾は sub-MIC 濃度の ABPC 処理または共存下にて *E. coli* の上皮細胞への付着能が著明に減少したことを報告しており今回の結果と一致するものである。また今回の成績では CMZ, CPIZ が ABPC に比べ 2~5 倍強力な抑制作用を示しており、今後さらに対象薬剤を広げ検討を加えることが必要と考えられる。

多くの *E. coli* では、付着にマンノースレセプターが関与している報告がある¹²⁾。今回、sub-MIC 濃度の抗菌剤処理による付着能の減少が MS 株だけでなく MR 株に対しても認められたことは、これら β -ラクタム剤の作用点がマンノースレセプターの結合に関与する部位以外の要素もあることを示唆するものと考えられる。

以上、今回は host 側因子として好中球機能に、para-

site 側の因子として付着能に各々着目し、sub-MICs の意義を解明すべく検討を行なったが、この他 compromised host の問題、菌の virulence の問題、他の β -ラクタム剤を始めアミノ配糖体、ピリドンカルボン酸系抗菌剤の効果等、今後、臨床の有効性も加味した総合的な検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) 松本文夫：sub-MICs をとりまく臨床上の諸問題。臨床と微生物。12(1)：6~12, 1985
- 2) 浅野英夫, 村川武雄, 西田 実：Ceftizoxime の sub-inhibitory concentration による *E. coli* の形態変化について。Chemotherapy 28 (S-5)：104~110, 1980
- 3) LORIAN V：Some effects of subinhibitory concentration of penicillin on the structure and division of *Staphylococci*. Antimicrob. Agents Chemother. 7：864~870, 1975
- 4) 広瀬崇興, 岡山 悟, 西尾 彰, 熊本悦明：*E. coli* の尿路上皮細胞への付着能に対する抗生物質の影響。Chemotherapy：30(1)：1~6, 1982
- 5) OHNISHI H, KOSUZUME H, INABA H, OKURA M, MOCHIZUKI H, SUZUKU Y, FUJII R：Effects of AC-1370, a new semisynthetic cephalosporin, on phagocytic functions. Antimicrob. Agents Chemother. 23 (6)：874~880, 1983

- 6) 奥村和夫, 横田 健, 加藤日出子, 遠 彦二: 血清または多形核好中球共存下における Cefuroxime の殺菌効果について: *Chemotherapy* 27 (S-6): 76~82, 1979
- 7) ANDREANA A, PERNA P, UTILI R, DILLO M, RUGGIERO G: Increased phagocytosis and killing of *Escherichia coli* treated with subinhibitory concentrations of cefamandole and Gentamicin in isolated rat livers *Antimicrob. Agents Chemother.* 25 (2): 182~186, 1984
- 8) 楊井正紀, 森 剛一, 福田友子, 辻 芳郎: ヒト多核白血球のルミノール添加による chemiluminescence 測定の検討。医学のあゆみ 112(10) 594~596, 1980
- 9) METCHNIKOFF O, (1921): *Life of Elle Metini-*
- 10) 横田 健, 関口玲子: T-1982 (Cefbuperazone) と血清・補体および白血球の協力的殺菌作用。 *Chemotherapy* 30: 20~28, 1982
- 11) SVANBERG-EDEN C, STANBERG T, STENOVIST K, AHLSTEDT S: Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells *in vitro* by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection* 6 (Suppl.1): 121~124, 1978
- 12) OFEK I, MIRELMAN D, SHARON N: Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265: 623~625, 1977

INFLUENCE OF β -LACTAM ANTIBIOTICS AT
SUB-MIC CONCENTRATIONS ON THE
ADHERENCE OF *ESCHERICHIA COLI*
AND PHAGOCYTOSIS AND KILLING
BY HUMAN PMN

FUMIO MATSUMOTO¹⁾, TAKEO IMAI¹⁾, TAKAYUKI TAKAHASHI²⁾,
YUHJI TAURA²⁾, KATSUYA KOKUBU²⁾, IWAO SAKURAI²⁾,
NOBUO KATO³⁾ and TEIZO MURATA³⁾

¹⁾ Department of Internal Medicine and ²⁾ Clinical Laboratories, Kanagawa
Prefectural Midwives and Nurses Training School Hospital,
1-6-5 Shiomidai, Isogo-ku, Yokohama 235, Japan

³⁾ Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.

The therapeutic significance of β -lactam antibiotics at sub-MIC concentrations was studied. Phagocytosis by human PMN and adherence to human uroepithelial cells were examined on *Escherichia coli*, pre-treated with cefmetazole, cefpimizole, ampicillin, mecillinam, and cefoperazone at 1/4 MIC. The phagocytosis of cefmetazole- and cefpimizole-treated bacteria was increased compared with untreated bacteria, whereas the phagocytosis of ampicillin-, mecillinam- or cefoperazone-treated bacteria was decreased. The bactericidal activity of PMN, measured by chemiluminescence, was also increased when bacteria were treated with cefmetazole and decreased when treated with ampicillin, mecillinam or cefoperazone. Cefmetazole and cefpimizole treatment inhibited bacterial adherence to uroepithelial cells at an inhibition rate of 42-56%, and such inhibition was observed in both mannose-sensitive and mannose-resistant strains. Thus, cefmetazole and cefpimizole at sub-MIC concentrations may cooperate with the host defense mechanisms against bacterial infections and inhibit the pathogenicity of bacterial adherence.