

セフェム系抗生剤セフブペラゾン (CBPZ) の好中球 NBT 還元率, リゾチーム活性および抗体産生能に与える影響

鈴木 宗 司

科研製薬株式会社*

八木田 旭 邦

杏林大学医学部第一外科学

緒 方 幸 雄

杏林大学医学部微生物学教室

(昭和 63 年 8 月 19 日受付)

セフブペラゾン cefbuperazone (CBPZ) の大腸菌 *E. coli* (KC-14) 感染治療実験で今回は本剤による好中球の殺菌活性の変動を NBT 還元能を指標として, また血清中のリゾチーム濃度の変動などを中心に CBPZ のそれらに与える影響を検討し, 以下の結果を得た。

マウスに KC-14 を感染させ, 1 時間後に最小治癒量 (0.1 mg/mouse) またはそれ以上の用量の CBPZ を皮下に投与した場合, 用量に応じて 4 時間から 8 時間後の期間内に NBT 還元能およびリゾチーム濃度が最高に増大し, その後漸次低下, 24 時間後には元の正常域に戻った。この増大現象は正常マウスに CBPZ を投与した場合にも同様の結果が得られた。さらに *in vitro* においても CBPZ 1.0~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において NBT 還元能の増大が認められたことより CBPZ には好中球の NBT 還元能および血清リゾチーム濃度の増大を促進する活性作用のあることが判明した。

また CBPZ 投与群のマウス血清の抗菌作用を調べた結果, 投与 15 時間後に至ってもその作用 (0.1 mg/mouse) は残存していた。

他方, 羊赤血球を抗原として CBPZ の抗体産生能に及ぼす影響について CUNNINGHAM 法を用いて検討した結果, CBPZ の 0.1 mg/mouse 濃度においても抗体産生促進作用が認められた。

Key words: セフブペラゾン (CBPZ), 免疫殺菌能, NBT 還元能, リゾチーム, 抗体産生促進作用

宿主が生来備えている感染非特異的防御機構の中に好中球の働きが上げられる。好中球は感染初期に感染菌を捕捉貪食し, 感染菌を殺菌消化する宿主防御にとって重要な因子である。この好中球の殺菌機構には酸素依存系殺菌作用と酸素非依存系殺菌作用がある¹⁾。前者に属する殺菌活性に myeloperoxidase や活性酸素 (Superoxide 等) が関与する。これらの活性をみる方法に nitroblue tetrazolium reduction test (NBT 還元試験) があり, NBT 色素が好中球に取り込まれた後 O_2^- による還元作用を受け青色のホルマザン (formazan) に変化する反応を利用したもので, 好中球機能活性を間接的に評価する方法で今回は本法を用いて好中球機能を見た^{2,3)}。後者にはリゾチームその他種々の活性酵素が殺菌作用に関与する¹⁾。

また非特異的防御機構に携わる液性因子の中でリゾチームは感染初期に重要な役割を果す因子である。リゾチームは分子量 15,000 の塩基性蛋白質で, 涙, 粘液, 血清などに含まれている。リゾチーム (endo-N-acetylmuramidase) はグラム陽性菌に対し溶解作用があり, グラム陰性菌に対してもペプチドグリカン層の上層が抗体と補体で破壊された場合に溶菌作用を示す^{4,5)}。

セフブペラゾン (CBPZ) は緑膿菌を除くグラム陰性菌に対して強い抗菌力を示すセフェム系抗生剤である⁶⁾。鈴木ら⁹⁾は CBPZ が *E. coli* および *Klebsiella pneumoniae* 感染実験で, *in vitro* 活性で示した他のセフェム系抗生剤よりも, *in vivo* でより有効な結果を得た。 β -lactam 抗生剤は作用点が細胞壁合成酵素阻害にあり, 菌体表面構造の変化を引き起すため食菌作用を受

* 東京都文京区駒込 2 丁目 28-8

け易い¹⁰⁾。横田ら^{11,12)}はその証明として *in vitro* で補体と CBPZ との協力的殺菌作用および好中球との協力的殺菌作用について検討し、それぞれ CBPZ による調節によって補体並びに好中球の貪食作用を促進することを示した。

今回、我々は CBPZ が関与系細胞（食細胞、リンパ球等）から遊離される抗菌蛋白のリゾチーム活性、好中球の NBT 還元能および抗体産生能等に与える影響について、*in vivo* および *in vitro* で検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

実験動物：SPF の ICR/jcl (♂) マウスの 4 週齢および 7 週齢を使用した。

菌数の算出：*E. coli* (KC-14) を 5×10^8 マウス腹腔内に感染させ、4、8 および 15 時間後に 2 ml の生理食塩液で腹腔内を洗浄し、その洗浄液の 1 ml を腹腔から取り出し、普通寒天培地と混ぜ、37°C で培養後、コロニーをカウントし菌数とした。

リゾチーム値の測定¹³⁾：結晶卵白リゾチーム (Sigma 社, IF-8055) を 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.2) に溶かし標準リゾチーム溶液とした。また *Micrococcus lysodeikticus* cells (Difco 社, 107 C-0061) を 50 mg% (50 mg/100 ml) となる様に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH=6.2) に浮遊した。以上の溶液を 0.75 ml *Micrococcus lysodeikticus* 浮遊液、0.25 ml 0.3 N NaCl 液と 0.5 ml 標準リゾチーム溶液または被検血清 40 μ l と 1/15 M リン酸緩衝液の 460 μ l の割合を混合し、5 時間室温で保ち、540 m μ の波長域で %T を測定し、リゾチーム値とした。

多形核白血球 (PMN) の採取：0.2% カゼイン溶液を ICR/jcl マウスの腹腔内に 2 ml 注射し、15 時間後に

HANK's buffer (HBSS) で腹腔内を洗浄、PMN を採取し、2 回 HBSS で洗浄後、同液に 3×10^6 /ml の濃度に調整浮遊した。

抗生剤前処置 PMN の調整：KC-14 を一夜 heart Infusion broth (HIB) で培養後、さらに 37°C で 2 時間 HIB (栄研) で前培養した KC-14 を HIB で 1×10^8 cells/ml に調整し、その菌液に CBPZ あるいは cefmetazole (CMZ) を添加し 0.1、1.0、および 10 μ g/ml の各濃度含有の菌液を作製した。この溶液を 37°C で 4 時間振盪培養後、遠心分離 (3,200 r. p. m, 20 分) し、HBSS で 2 回洗浄し、再び 1×10^8 cells/ml に再調整し、実験に供した。

HBT 還元能試験の実施：Park 法^{2,3)} に準じて NBT 還元能試験を行なった。NBT (nitroblue tetrazolium: Sigma 社, Lot No. N-6876) を 0.2% 溶液になるように pH=7.2、0.15 M リン酸緩衝液で調製し、等量の生理食塩液を加えて NBT 溶液とした。心臓から採血したヘパリン血および *In vitro* 培養液をシリコンオイル (東芝シリコン社, Lot No. 7 F 97) で処理した時計皿にヘパリン血または培養液と NBT 溶液を 1:1 になる様に滴下し、静かに混和したのち 37°C で 15 分間保温した。次にこれを混和し、室温で 15 分間放置した。染色は Wright-Giemsa 染色で行ない、1,000 倍で鏡検し、formazan 顆粒形成陽性細胞と陰性細胞の割合を百分率で表した。

総蛋白量および A/G 比の測定：血清総蛋白量はビュレット法¹⁴⁾で測定した。A/G 比は血清をセルロースアセテート膜で電気泳動し、画分の % より算出した¹⁵⁾。

抗体産生能の測定：抗原 (羊赤血球, SRBC) の投与前日に CBPZ (0.025~5 mg/mouse) を皮下注射し、抗原投与 (腹腔内, 10% SRBC/0.1 ml) 後、4 日目に CUN-

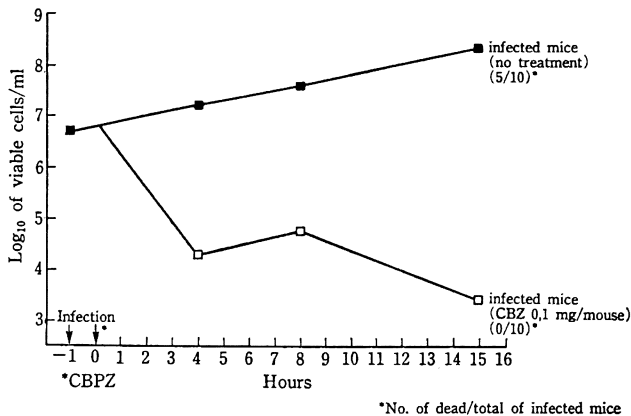


Fig. 1. Time-course effect of CBPZ on *E. coli* (KC-14) growth

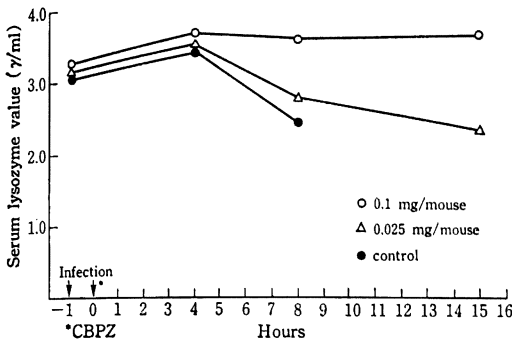


Fig. 2. Time-course effect of CBPZ on lysozyme induction in infected mice

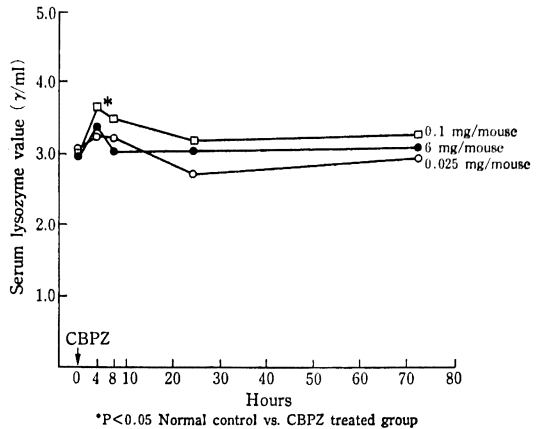


Fig. 3. Time-course effect of CBPZ on lysozyme in normal mice

NINGHAM 法¹⁶⁾で脾細胞の溶血斑を算定し, 抗体産生細胞数とした。

マウスの CBPZ 投与計画: 正常マウスに CBPZ (0.025, 0.1 および 6 mg/mouse) を皮下投与し, 4, 8, 24 および 72 時間後のリゾチーム活性および NBT 還元能を測定した。感染マウスにおいては CBPZ (0.025 および 0.1 mg/mouse) 皮下注射 1 時間前に KC-14 を治療実験菌量 (5×10^6 cells) を腹腔感染させ, CBPZ 投与 4, 8 および 15 時間後のヘパリン含有血液を検体として NB T 還元能および血清リゾチーム値を測定した。対照薬剤としては CMZ (cefmetazole, 三共製薬 KK) を使用した。

II. 結 果

E. coli (KC-14) 腹腔内感染後の菌数に与える CBPZ の作用: KC-14 感染 1 時間後のマウスに CBPZ の最小治癒量 (0.1 mg/mouse) を皮下に投与し, 4, 8 および 15 時間後に菌数の変化を経時的に調べた。その結果, 0.1 mg/mouse で菌数は 4 時間後まで減少し, それ以降 8 時間後まではほぼ同じレベルの菌数を維持し, 8 時間後を経過すると, 再び減少した。感染対照群では経時的に対数的増加した (Fig. 1)。

E. coli (KC-14) 腹腔内感染後のリゾチーム活性に与える CBPZ の影響: CBPZ の 0.1 mg/mouse の投与感染群において 4, 8 および 15 時間後の測定結果によれば共に正常対照群より高い活性を示す傾向がみられ, その活性レベルが 15 時間維持されていたが, ED₅₀ 量 (0.025 mg/mouse) では 4 時間後まで上昇し, その後, 漸次減少した。感染対照群は 4 時間後より急激に減少し, 15 時間後はバラツキが大きく平均値は求められなかった (Fig. 2)。

正常マウスの血清リゾチーム活性に与える CBPZ の影響: CBPZ の最小治癒量 (0.1 mg/mouse) 投与後経時

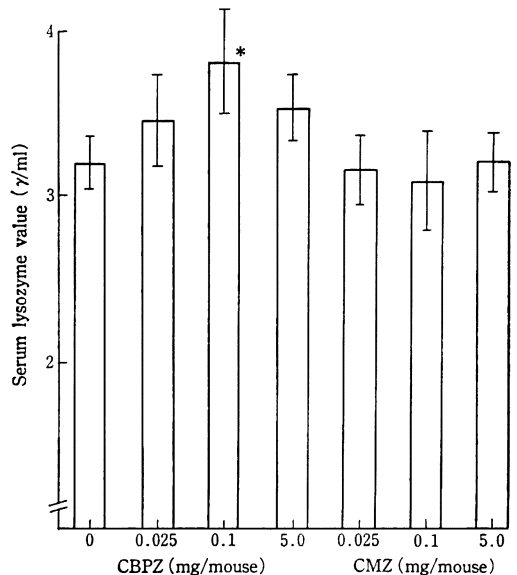


Fig. 4. Effect of CBPZ or CMZ on lysozyme induction in vivo

的に採血, その血清について活性を測定した結果, 4 時間後のみが対照群と比較し有意に促進したが, 他の用量 (0.025, 6 mg/mouse) では経時的に有意に CBPZ がリゾチーム活性を促進する傾向はみられなかった (Fig. 3)。

投薬 4 時間後の CBPZ と CMZ の血清リゾチーム活性の比較: 正常マウスに CBPZ および CMZ をそれぞれ 0.025, 0.1 および 5 mg/mouse 皮下に注射し, 4 時間後に採血し, リゾチーム活性を測定した。その結果,

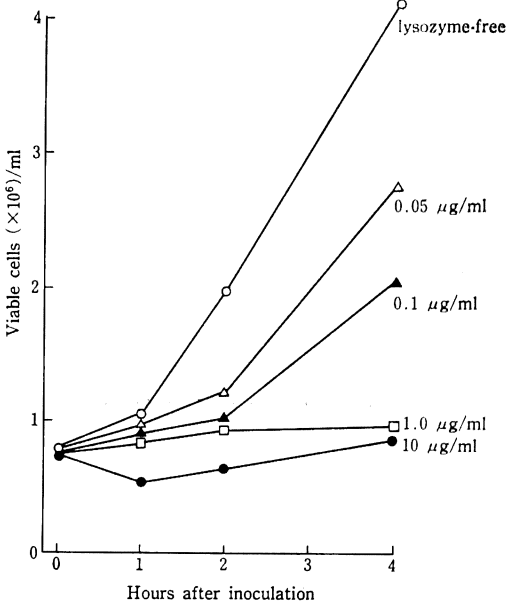


Fig. 5. Antibacterial activity (KC-14) of lysozyme *in vitro*

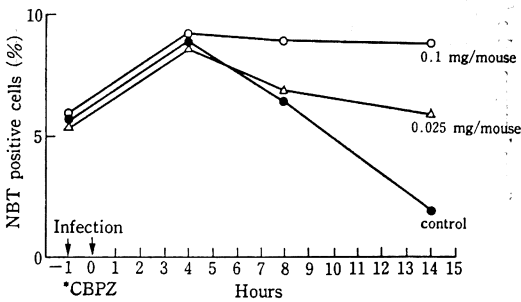
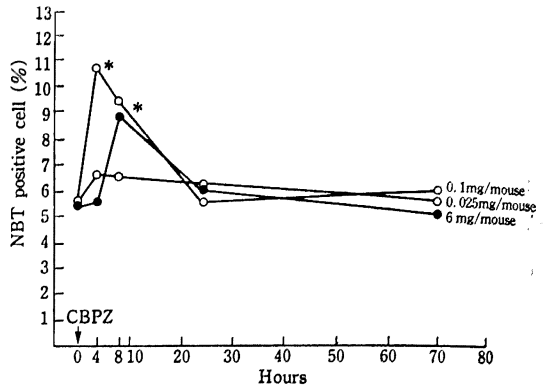


Fig. 6. Time-course effect of CBPZ on NBT reduction in infected mice

CBPZ の 0.1 mg/mouse に強い促進作用を示した。一方、CMZ では各用量で対照群と比較して変化は無かった (Fig. 4)。

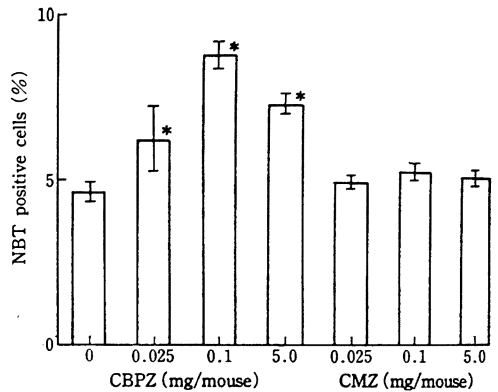
市販リゾチームの *E. coli* (KC-14) に対する抗菌活性: Fig. 5 に示したごとく、リゾチーム濃度が 0.05 µg/ml で抗菌作用を有し、1.0 µg/ml では 4 時間培養で菌の増殖をほぼ抑制した。

感染マウスにおける CBPZ の NBT 還元能に与える影響: *E. coli* (KC-14) 感染後 1 時間後に CBPZ を ED₅₀ 量 (0.025 mg/mouse) と最小治療量 (0.1 mg/mouse) でマウスに皮下注射し、4、8 および 15 時間後の好中球の NBT 還元能を測定した。その結果、最小治



* P<0.05 Normal control vs. CBPZ treated group

Fig. 7. Time-course effect of CBPZ on NBT reduction in normal mice



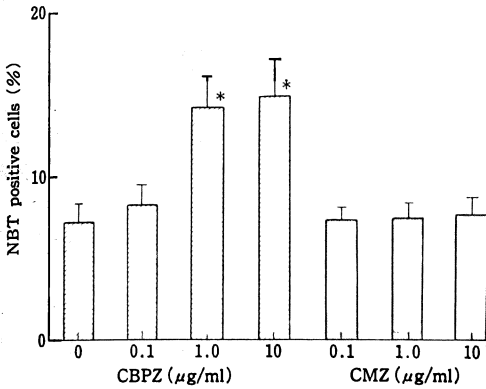
* P<0.05 Normal control vs. CBPZ treated groups

Fig. 8. Effect of CBPZ or CMZ on NBT reduction *in vivo*

療量では 4 時間後まで NBT 還元能が増加し、その後、同レベルで 15 時間持続した。しかし、ED₅₀ 量並びに感染対照群では 4 時間後までは増加するが、それ以降、漸次減少した (Fig. 6)。

正常マウスにおける CBPZ の NBT 還元能に与える影響: CBPZ を最小治療量 (0.1 mg/mouse) および 6 mg/mouse 皮下注射し、NBT 還元能を測定した。そのいずれの用量でも促進効果を示したが、ED₅₀ 量では弱い促進作用しか示さなかった。0.1 mg/mouse では 4 時間後に最大の促進作用を示し、24 時間後には正常域に戻った。6 mg/mouse 量では 0.1 mg/mouse と同様に 24 時間後には正常域に戻り、72 時間目にはいずれの投与量共に正常値を示した (Fig. 7)。

投与後 4 時間後の CBPZ と CMZ の NBT 還元能の比較: 正常マウスに CBPZ および CMZ をそれぞれ



*P<0.05 Nontreated control vs. CBPZ treated groups

Fig. 9. Effects of CBPZ or CMZ on NBT reduction *in vitro*

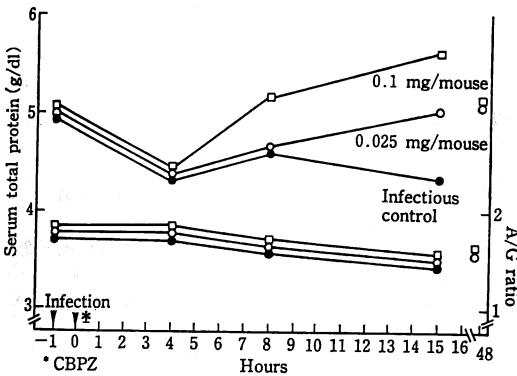


Fig. 10. Time-course effect of CBPZ on total serum protein restoration in infected mice

0.025, 0.1 および 5.0 mg/mouse 量を皮下注射し、4 時間後に採血し、NBT 還元能を測定した。その結果、CBPZ の 0.025 および 0.1 mg/mouse で促進作用を示したが、CMZ ではいずれの用量でも対照群と同程度であった (Fig. 8)。

In vitro における CBPZ と CMZ の NBT 還元能の比較: CBPZ および CMZ を 0.1, 1.0 および 10 µg/ml の各用量について NBT 還元能を調べた。その結果、CBPZ は各用量で促進作用を示したが、CMZ はまったく促進作用を示さなかった (Fig. 9)。

E. coli (KC-14) 腹腔内感染後の血清総蛋白量および A/G 比に与える CBPZ の影響: 感染後、各時点で血清総蛋白量および A/G 比を求めたところ、各群 (感染対照群, ED₅₀ 群, 最小治療量群) 共に 4 時間後までは、血清総蛋白量は減少し、その後投与群は回復したが、感染

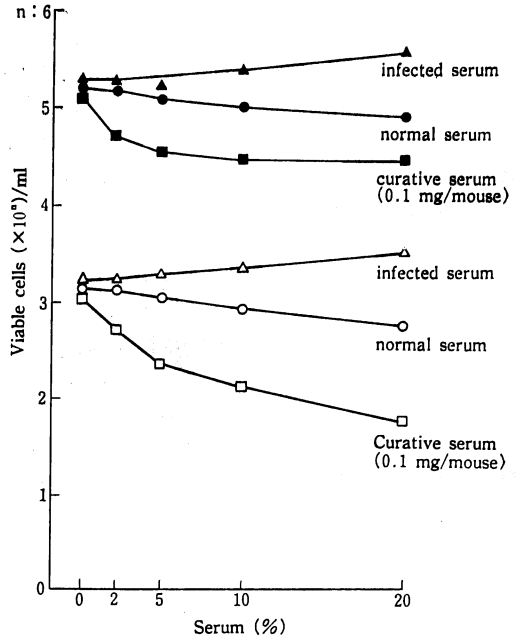


Fig. 11. Antibacterial activity (KC-14) of serum at 15 h after infections

Compound	Dose (mg/mouse)	Number of mice	PFC/10 ⁶ spleen cells	Rate (%)
Control	—	5	1755 ± 301	100
	0.025	5	2048 ± 494	116
	0.1	5	2384 ± 174*	135
CBPZ	0.025	5	1987 ± 254	113
	0.1	5	1932 ± 325	111
	0.1	5	2032 ± 207	116
CMZ	0.1	5	2032 ± 207	116
	5.0	5	1849 ± 253	105

*P<0.05 control vs. treated group

Fig. 12. Effect of CBPZ on antibody production

対照群は経時的に減少する傾向が観察された。また A/G 比を正常対照群 (0 時点) と比較すると 15 時間値が有意に下がっていた (Fig. 10)。

感染後 15 時間後の血清の抗菌作用: 正常血清, 感染未処置血清および最小治療処置血清をそれぞれ 2, 5, 10 および 20% の割合に普通寒天培地に混和し, *E. coli* (KC-14) を 2×10^3 および 2×10^5 それぞれの培地に添加し, 37°C で培養後, コロニーをカウントした。その結果, 添加菌量が 2×10^3 , 2×10^5 のいずれでも感染未処置対照血清では抗菌作用は無く, 血清含量が多くなるほど菌数が多くなった。しかし最小治療処置血清では添加用量に順じて抗菌作用が増強された。正常血清にも弱い抗菌作用が観察された。(Fig. 11)

抗体産生能に与える CBPZ および CMZ の比較:

CUNNINGHAM 法により羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能に与える CBPZ および CMZ の作用について 0.025, 0.1, および 5.0 mg/mouse の各用量で投与マウス脾細胞について測定した。抗体産生抑制作用は各投与量で観察されなかった。CBPZ の 0.1 mg/mouse 量で有意な促進作用を示した。しかし CMZ は抑制および促進作用も示さなかった (Fig. 12)。

III. 考 察

CBPZ の生体内効果についてすでに *in vivo* で鈴木ら⁹⁾が検討し、*in vitro* では横田ら^{11,12,17)}によって補体および好中球との協同作用について検討された。その結果、生体にとって有利な作用を示すことが明らかとなった。

今回我々は好中球の殺菌作用の活性度を間接的に評価する NBT 還元能や血清殺菌性物質のリゾチームについて、さらに抗体産生能に及ぼす CBPZ の影響について検討した。

Fig. 1 より CBPZ の最小治療量 (0.1 mg/mouse) で KC-14 の菌数は感染 4 時間後まで減少した。他方、正常マウスに CBPZ を投与すると 4 時間後にリゾチームならびに NBT 還元能の陽性率が最大を示した。また感染実験においても 4 時間後までリゾチーム活性ならびに NBT 還元能の陽性率は上昇し、それ以降そのレベルが経時的に維持されていた。この事実は CBPZ が 4 時間後まで経時的に NBT 還元陽性率を増強していることを示すものである。

CBPZ は皮下投与してから血液および尿中の濃度測定結果から 2~4 時間で排出されることはすでに報告されている。したがって CBPZ は投与後 4 時間後までは直接的な抗菌作用を発揮し、さらに初期感染に関与する生体防御能をも併せて活性化していることを示唆している。しかし 4 時間後を過ぎると、菌数は 8 時間後まではやや増加傾向を示し、8 時間後を過ぎると、また菌数は減少し、マウスは完全治癒に向かった。この事実は 4 時間後までの補体や好中球の活性化だけでは殺菌は充分行なわれず次の抗菌活性因子^{18~21)}の増強があるものと思われる。その一つとして 4 時間後まで減少していた血清総蛋白量が回復し始め 8 時間後に正常域に達し、15 時間後に正常値よりも増加傾向を示し、48 時間後に正常値に戻った。また 15 時間後では A/G 比の減少からグロブリン分画の増加が示唆された。

このことはグロブリン分画の非特異的抗菌活性と示唆されたので、*In vitro* で感染後 15 時間の処置血清の抗菌活性を検討してみた。その結果、最小治療量 (0.1 mg/mouse) の血清に強い抗菌活性を観察した。この事実の一つとして A/G 比、血清総蛋白量の回復と併せて

考えるとグロブリン分画の非特異的抗菌活性と推察される。

さらに外来抗原 (羊赤血球: SRBC) 投与 4 日後の抗体産生能に与える CBPZ の影響についても検討した結果、0.1 mg/mouse で有意な促進作用がみられた。このことは非特異的グロブリン分画の増強に続いて特異抗原に対する抗体産生の促進効果もあることが判明した。

また CBPZ の生体防御増強作用が他のセファム系抗生剤にも共通した活性なのか否かを CMZ と比較してみた。しかし CMZ には生体防御作用の促進を確認することは出来なかった。このことは β -lactum 系抗生剤共通の活性ではなく、ピペラジン環の付いた D-スレオニン導体の特異的な作用であることが示唆されるが、我々も D-アミノ酸免疫調節作用があることを確認している²²⁾。

以上、*in vivo* および *in vitro* で宿主側の生体防御能を与える CBPZ の促進作用について検討を行なったが、さらに生体防御能の各段階での詳細な確証を得るためにさらに実験が必要であり、そのために宿主側からのみの生体防御能の検索だけでなく、菌そのものの経時的生理活性変化等についての検索も重要な課題と思われる。

文 献

- 1) 飯島宗一, 原 一夫, 浅井淳平: 炎症と好中球, 臨床免疫 11(8): 555~565, 1979
- 2) 松田重三, 河合 忠: 好中球の NBT 還元能試験, モダンメディア 20(4): 43~50, 1974
- 3) 岡田 淳: NBT テスト, ファルマシア 10(12): 903~906, 1974
- 4) 井上公蔵: 免疫殺菌反応の研究, 日本細菌学雑誌 39(6): 833~848, 1984
- 5) 富岡茂雄, 高瀬一郎, 松橋通生: 細菌感染に対する非特異的液性防御因子, 生体防御 2(2): 25~33, 1985
- 6) INOUE K, TANIZAWA Y, TAKUBO M, SATANI M, AMANO T: Quantitative Studies on Immune Bacteriolysis. BIKEN's Journal 2: 1~20, 1959
- 7) WICHEN A J, KNOX K W: Bacterial cell Surface amphiphiles. Biochemica et Biophysica Acta 604: 1~26, 1980
- 8) 熊野克彦, 三上秀忠, 井上松久, 三橋 進: T-1982 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について, Chemotherapy 30(S-3): 1~20, 1982
- 9) SUZUKI I, SERDA H, YOKOTA T: *In vivo* activity of cefbuperazone (T-1982) against various experimental infections in mice 38(2): 249~258, 1985
- 10) 横田 健, 関口玲子, 東 映子: Cefmenoxime (SCE-1365) の各種 β -lactamase およびペニシリン結合蛋白質に対する親和性とその抗菌力との関係 Chemotherapy 29(S-1): 32~41, 1981
- 11) 横田 健, 浅野泰司: 各種セファム系抗生剤のモ

- ルモット新鮮血清との協力的殺菌作用, *Chemotherapy* 34(6) : 481~487, 1986
- 12) 横田 健, 浅野泰司: 各種セファム系抗生剤のマウス白血球との協力的殺菌作用。 *Chemotherapy* 34(10) : 965~971, 1986
- 13) SAIMON GORDON, JEAN JODD, COHN Z A : *In vitro* synthesis and Secretion of lysozymes by Mononuclear Phagocytes, *The Journal of Experimental Medicine* 139 : 1228~1248, 1974
- 14) 副島正美, 菅原 潔: ビューレット法, 生物実験法 3 : 65~86 (1969)
- 15) 小川恕人: 標準セルロースアセテート電気泳動法, 臨床病理 11(5) : 46~47, 1970
- 16) CUNNINGHAM A J and SZENBERG A : Further antibody techniques and their applications. *Immunology* 14 (4) : 599~601, 1968
- 17) 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) : 20~29, 1982
- 18) SIROTAK L, INOUE K, OKADA M, AMANO T : Immune bactericidal reactions by guinea pig γ 1 and γ 2 antibodies. *Immunology* 31 : 435~444, 1976
- 19) JOINER K A, BROWN E J, FRANK M M : Complement and Bacteria. *Ann. Rev. Immunol.* 2 : 461~491 1984
- 20) INOUE K, TAKAMIZAWA A, KURIMURA T, YOMEMASU K : Studies on Immune Bacteriolysis, *Biken Journal* 11 : 193~201, 1968
- 21) 野口 亮: 増殖阻害ペプチドと癌抑制遺伝子, *実験医学* 6(5) : 43~50, 1988
- 22) INOUE Y, ZAMA Y, SUZUKI M : "D-Amino Acids" as Immunosuppressive Agents 51 (6) : 1981

EFFECT OF CEFBUPERAZONE (CBPZ) ON IMMUNE BACTERICIDAL ACTION IN MOUSE

MOTOJI SUZUKI

Kaken Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo 113, Japan

AKIKUNI YAGITA

Department of Surgery, School of Medicine, Kyorin University

SACHIO OGATA

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyorin University

We examined the NBT reduction activity of neutrophil and lysozyme concentrations in serum of mice treated with cefbuperazone (CBPZ) after infection with *E. coli* (K-14). NBT reduction activity and lysozyme concentration increased from 4-8 h, and then both decreased to normal by 24 h after subcutaneous injection with 0.1 mg or more of CBPZ/mouse. The doses in infected mice proved to be the same as in normal mice. Also, CBPZ induced the same results at concentrations from 1.0-10 μ g/ml *in vitro*, and sera showed bactericidal action for as long as 15 h later although antibiotic activity had already disappeared.

The plaque technique of CUNNINGHAM was used to demonstrate the enhancement effect of CBPZ on antibody formation. When mice were pretreated with CBPZ and inoculated with SRBC, the number of plaque-forming cells against SRBC in the spleen increased.

From these results alone it seems that CBPZ contributes to immune bactericidal action *in vivo* as well as *in vitro*.