

Ceftazidime と血清・補体との協力的殺菌作用

柳田 国雄・竹村 周平・小野寺秀記・笠松 美宏
岡本 雅之・福田 亙・出口 雅子・上田 正博
杉野 成・近藤 元治

京都府立医科大学第一内科学教室*

(平成元年6月29日受付・平成元年8月21日受理)

Ceftazidime (CAZ) の細菌に対する血清・補体との協力的殺菌作用について、補体の面から検討を加えた。

最小発育阻止濃度 (MIC) の1/4濃度のCAZと5%正常ヒト血清 (NHS) を共存させるとグラム陰性菌である *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* に対しては、菌種間で程度に差はあるものの協力的殺菌作用が認められたが、グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* に対しては認められなかった。先天的にC9を完全に欠如しているC9欠損血清 (C9D) により、*E. coli* では弱いながらも殺菌作用が認められたが、*P. aeruginosa* に対してはまったく認められなかった。しかし1/4MICのCAZはC9欠損血清の *P. aeruginosa* に対する殺菌作用を増強した。

CAZの血清・補体との協力的殺菌作用は、sub-MICのCAZが殺菌の壁に何らかの影響を与え、その結果、補体膜侵襲複合体C5b-8に対する感受性を高めることにより生じていると考えられ、CAZは血清・補体と協力的に働くことによりその試験管内抗菌力から類推されるよりも高い生体内効果をあらわすと考えられた。

Key words : Ceftazidime (CAZ), 補体, C9欠損血清, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

細胞壁合成阻害剤である β -lactam剤は、血清・補体による殺菌を増強させることが報告されている¹⁻⁶⁾。合成セファロsporin C系抗生物質であるceftazidime (CAZ) は β -lactam剤の中でも強い抗緑膿菌作用をもち、その試験管内抗菌力に優れるばかりでなく、より高い生体内効果をもつと言われ、血清・補体や白血球との協力的殺菌作用を有すると報告されている⁵⁾。

そこで、各種細菌に対するCAZと血清・補体との協力的作用について若干の検討を行なった。

I. 材料および方法

1) 使用菌種および培地

Escherichia coli NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Serratia marcescens* II D 620 および *Staphylococcus aureus* FDA 209P は田辺製薬株式会社より供給を受けた。菌の前培養には trypto-soya Broth (日水製薬) を、実験系には heart infusion Broth (日水製薬) を、colony forming

units (CFU) の測定には heart infusion 寒天培地 (日水製薬) を使用した。

2) 血清ならびに抗生物質

健常人20名より静脈採血にて得たプール血清を正常ヒト血清 (NHS) として用いた。C9欠損ヒト血清 (C9D) は稲井真弥教授 (大阪医科大学病態検査学教室) より供与を受けた。NHS C9Dの補体価はそれぞれ30CH₅₀/ml, 15CH₅₀/mlであった。CAZは田辺製薬株式会社より供与を受け、各種被験菌に対する最小発育濃度 (MIC) は寒天平板希釈法により測定し⁷⁾、その値は *E. coli* NIHJ JC-2 0.4 μ g/ml, *P. aeruginosa* NCTC 10490 0.8 μ g/ml, *S. marcescens* II D 620 0.025 μ g/ml, *S. aureus* FDA 209P 12.5 μ g/mlであった。

3) 各種細菌に対する血清・補体とCAZとの協力的殺菌作用

各種被験菌は、trypto-soya Brothにて37°C20時

*京都市上京区河原町広小路上ル梶井町465

間培養後、さらに heart infusion Broth 中で 37°C 3 時間培養したものを使用した。1/4 MIC 濃度の CAZ のみ、5%濃度の NHS のみ、ならびに両者を添加した heart infusion Broth に各菌を接種し、総量を 2.0ml とした。コントロールとしては、培養液のみに菌を接種し 2.0ml とした。37°C で振とう培養を続け、0、2、4、および 24 時間目にその一部 (0.1 ml) をとり、適当に対数希釈した後、heart infusion 寒天培地に散布し 37°C 24 時間培養し、生菌数 (CFU/ml) を計算した。

4) *E. coli*, *P. aeruginosa* に対する血清・補体の作用

2.5%, 5% および 10% 濃度の NHS あるいは C 9 D を添加した heart infusion Broth に *E. coli* NIHJ JC-2 および *P. aeruginosa* NCTC 10490 を接種し、37°C 振とう培養を続けながら、経時的にその一部 (0.1 ml) をとり生菌数を測定した。

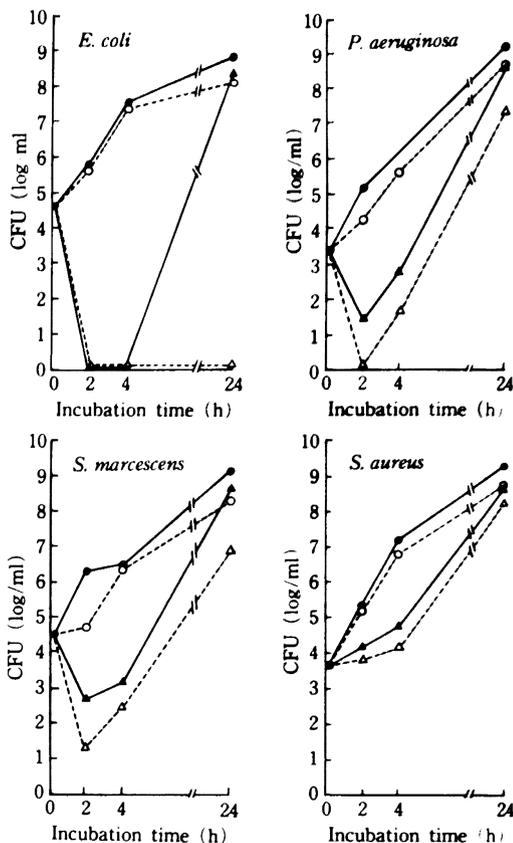
5) *P. aeruginosa* に対する C 9 欠損血清と CAZ の協力的殺菌作用

1/2 MIC 濃度の CAZ を含む heart infusion Broth に C 9 D を 10% 濃度となるように添加し、 1.0×10^4 ml となるよう *P. aeruginosa* NCTC 10490 を接種した。37°C で振とう培養を続け、経時的にその一部 (0.1 ml) をとり、生菌数を測定した。

II. 結果

1. 各種細菌に対する CAZ, 血清・補体ならびに両者の協力的殺菌作用

heart infusion Broth に①培養液のみ、②1/4MIC 濃度の CAZ 単独、③5% NHS 単独、ならびに④両者を共存させた時の、各種被験菌に対する殺菌曲線を Fig. 1 に示した。グラム陰性菌である *E. coli*, *P. aeruginosa* ならびに *S. marcescens* においては CAZ 単独では、生菌数の減少はほとんど認められなかつ



E. coli : *Escherichia coli*,
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*,
S. marcescens : *Serratia marcescens*,
S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Fig. 1. Influence of CAZ at a concentration of 1/4 MIC on bactericidal activity of normal human serum (NHS) against various kinds of bacteria.

Symbols : ●, Broth alone ; ○, CAZ ; ▲, NHS ; △, CAZ+NHS

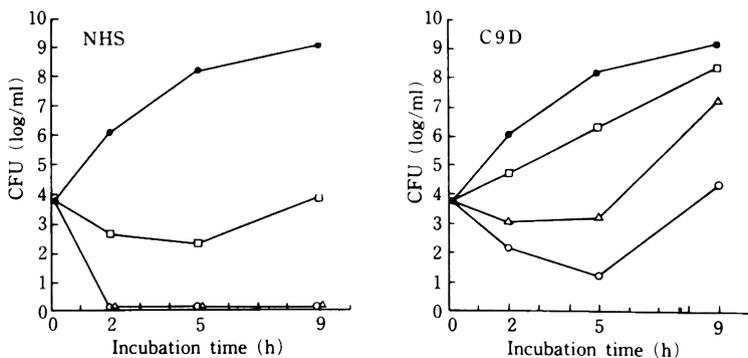


Fig. 2. Killing of *Escherichia coli* NIHJ JC-2 in normal human serum (NHS) and congenitally deficient C 9 serum (C 9 D)

Symbols : ●, Broth alone ; □, 2.5% serum ; △, 5% serum ; ○, 10% serum

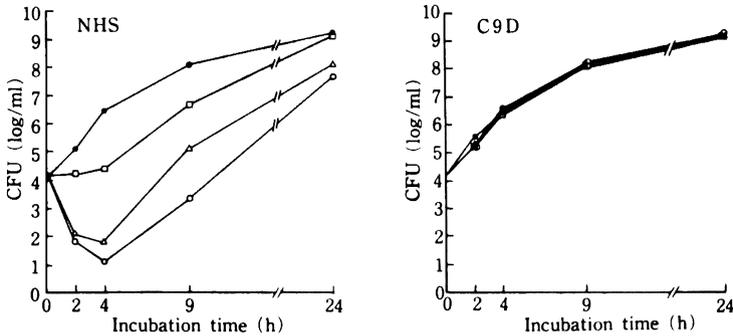


Fig. 3. Killing of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 in normal human serum (NHS) and congenitally deficient C9 serum (C9D)

Symbols: ●, Broth alone; □, 2.5% serum; △, 5% serum; ○, 10% serum

た。また NHS 単独では菌種の間での差は認めるものの 37°C 2 時間培養後、生菌数の増加は抑制されるが、その後再増殖がみられた。それに対し CAZ, NHS が共存すると、殺菌作用は増強され、*E. coli* では完全に殺菌が認められ 24 時間後も再増殖はみられなかった。*P. aeruginosa* および *S. marcescens* では、2 時間目までは殺菌作用は増強されたが、それ以後は再増殖が認められた。

これに対し、グラム陽性球菌である *S. aureus* においては、CAZ, NHS 単独および共存のいずれにおいてもまったく殺菌効果が認められなかった。

2. 正常人血清ならびに C9 欠損人血清の *E. coli*, *P. aeruginosa* 殺菌作用への影響

NHS ならびに C9 D の 2.5%, 5% および 10% 濃度における *E. coli* と *P. aeruginosa* の殺菌曲線を Figs. 2, 3 に示した。

E. coli では、2.5% NHS の条件で 5 時間目まで生菌数の減少がみられるが、以後再増殖が認められた。5% および 10% NHS では培養 2 時間目以後で完全に殺菌された。これに対し、C9 D では 2.5% では弱いながらも増殖抑制作用がみられるが、生菌数の減少はみられなかった。5% および 10% においても、培養 5 時間目までは若干の生菌数の減少が認められるものの、以後再増殖を認めた。

これに対して *P. aeruginosa* では、血清・補体の殺菌作用は *E. coli* に対するよりも弱く、2.5% NHS 条件で生菌数の減少はみられず、5% および 10% NHS においても培養 4 時間目までは生菌数が若干減少するが、9 時間目以後再増殖を認めた。これに対し、C9 D では 10% 濃度にては殺菌曲線はコントロールと同様であり、増殖抑制効果はまったく認められなかった。

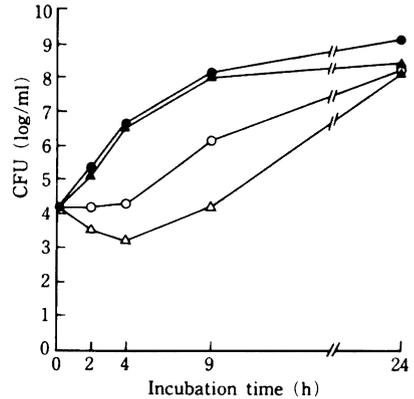


Fig. 4. Influence of ceftazidime at a concentration of 1/2 MIC on killing of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 in congenitally deficient C9 serum (C9D)

Symbols: ●, Broth alone; ○, CAZ; ▲, C9 D (10%); △, CAZ + C9 D (10%)

3. C9 欠損血清と CAZ の *P. aeruginosa* に対する協力的殺菌作用

1/2MIC 濃度の CAZ 単独、10% 濃度の C9 D 単独、に比し、両者の共存下では殺菌作用の増強が認められた (Fig. 4)。

III. 考 案

各種細菌に対する血清・補体の殺菌作用において、CAZ は菌種間での感受性の差はあるものの、グラム陰性菌である *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* に対して協力的殺菌作用を認めた。しかし、グラム陽性菌である *S. aureus* に対しては認めなかった。一般

に、グラム陽性菌はグラム陰性菌に比べ、補体系の活性化を引き起こすある種の lipopolysaccharide を含んでいない⁹⁾など、細胞壁の構成成分や構造上の相違から血清・補体に抵抗性であると考えられている。そのため、細胞壁の合成を阻害する作用を持つ CAZ との協力的作用も受けにくいものと思われた。

血清・補体の *E. coli* および *P. aeruginosa* に対する殺菌作用の検討より、*E. coli* においては NHS よりは弱い⁹⁾が、C9Dでも殺菌作用が認められた。これに対し、*P. aeruginosa* においては、C9Dではまったく殺菌作用が認められなかった。これより血清による殺菌においては、*E. coli* の殺菌に対しては、必ずしもC9が必要でなく、*P. aeruginosa* の殺菌に対しては、C9が必要であると考えられた。*E. coli* の殺菌に対するC9の必要性については様々な報告があるが⁹⁻¹¹⁾、出口ら⁹⁾は *E. coli* の strain の違い、あるいはリゾチームのような血清中のC9以外の成分の作用の可能性について推測している。*E. coli* と *P. aeruginosa* のこの血清・補体に対する感受性の違いは、両菌の膜構造の違い、特に外膜の透過性の問題などに起因すると考えられるが、その詳細については不明である。しかし、C9欠損血清においても、sub-MICのCAZは *P. aeruginosa* に対して協力的殺菌作用を示した。赤血球のみならず有核細胞においても補体膜侵襲複合体C5b-8は細胞膜に孔をあけるといわれていること¹²⁻¹⁵⁾より、その機序として、sub-MICのCAZが細菌壁を変性させ、補体を活性化し易くした結果、細菌膜上の補体膜侵襲複合体C5b-8の数を増加したことによるもの、あるいはCAZが細菌壁の合成を阻害することにより、C5b-8が細胞膜上で安定化したことによるものなどが考えられる。いずれにしてもCAZの血清・補体による *P. aeruginosa* に対する殺菌への協力作用がC9の活性化以前の段階で生じていると考えられる。

緑膿菌は院内感染の代表的な起因菌であり、免疫不全患者、糖尿病患者、ステロイド、制癌剤、免疫抑制剤などの長期使用者などで日和見感染として感染することが多く、治療にも難渋することが多い。CAZはβ-lactam 抗生物質の中でも強い抗緑膿菌作用を持つとされている。これは、良好な外膜透過性、作用点に対する強い親和力¹⁶⁾、β-lactamase に対する高い安定性、白血球¹⁷⁾や血清・補体との協力的殺菌作用などの総合的な効果であると考えられる。補体の面からもその生体内効果は高く、正常人のみならず、C9欠損患者においても、宿主の防御機構を増強させることが

期待され、臨床的価値が高いものと考えられた。

なお、本論文の要旨は第36回日本化学療法学会総会にて発表した。

文 献

- 1) MILLER C P, FOSTER A Z: Studies on the action of penicillin. III. Bacterial action of penicillin on *Meningococcus in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56: 205 ~ 208, 1944
- 2) WATANABE K, KIN R, MURAKAMI M, KONDO M: Influence of human serum on bactericidal activity of ceftizoxime sodium. Chemotherapy 32: 113 ~ 117, 1986
- 3) 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 ~ 28, 1982
- 4) 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タンパク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
- 5) 奥村和夫, 加藤日出子, 横田 健, 関口玲子: Ceftazidime (SN401)の抗菌力とその生体内効果に対する基礎的研究. Chemotherapy 31 (S-3): 22 ~ 30, 1983
- 6) 出口雅子, 竹村周平, 小野寺秀記, 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
- 7) 日本化学療法学会, 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. Chemotherapy 29: 76 ~ 79, 1981
- 8) FEINGOLD D S, GOLDMAN J N, KURITZ H M: Locus of the Lethal Event in the Serum Bactericidal Reaction. J. Bacteriology 96: 2127 ~ 2131, 1968
- 9) SCHREIBER R D, MORRISON D C, PODACK E P, MÜLLER-EBERHARD H J: Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins. J. Exp. Med. 149: 870 ~ 882, 1979
- 10) JOINER K A, SCHMETZ M A, SANDERS M E, MURRAY T G, HAMMER C H, DOURMASHKIN R, FRANK M M: Multimeric complement component C9 is necessary for killing of *Escherichia coli* J5 by terminal attack complex C5b-9. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 4808 ~ 4812, 1985
- 11) LINT T F, ZEITZ H J, GEWURZ H: Inherited deficiency of the ninth component of complement in man. J. Immunol. 125: 2252 ~ 2257, 1980
- 12) STOLFI R L: Immune lytic transformation: a state of irreversible damage generated as a result of reaction of the eighth component in

- guinea pig complement system. J. Immunol. 100 : 46 ~ 54, 1986
- 13) TAMURA N, SHIMADA A, CHANG S : Further evidence for immune cytolysis by antibody and the first eight components of complement in the absence of C 9. Immunology 22 : 131 ~ 140, 1972
- 14) HARRIMAN G R, ESSER A F, PODACK E R, WUNDERLICH A C, BRAUDE A J, LINT T F, CURD J G : The role of C 9 in complement-mediated killing of *Neisseria*. J. Immunol. 127 : 2386 ~ 2390, 1981
- 15) MORGAN B P, IMAGAWA D K, DANKERT J R, RAMM L E : Complement lysis of U937, a nucleated mammalian cell line in the absence of C 9 : effect of C 9 on C 5 b-8 mediated cell lysis. J. Immunol. 136 : 3402 ~ 3406, 1986
- 16) 横田 健, 関口玲子 : Ceftazidime (SN401) のグラム陰性菌外膜通過性とペニシリン結合タンパク質に対する親和性。Chemotherapy 31 (S-3) : 17 ~ 21, 1983
- 17) 池田 靖, 福岡義和, 伊東優子, 室 和美, 保田隆, 才川 勇 : 多形核白血球の貪食殺菌作用に対する β -lactam 系抗生剤の影響。Chemotherapy 34 : 875 ~ 882, 1986

SYNERGETIC BACTERICIDAL EFFECT OF SERUM COMPLEMENT AND CEFTAZIDIME

KUNIO YANAGIDA, SHUHEI TAKEMURA, HIDEKI, ONODERA, YOSHIHIRO KASAMATSU,
MASAYUKI OKAMOTO, WATARU FUKUDA, MASAKO DEGUCHI, MASAHIRO UEDA,
SHIGERU SUGINO and MOTOHARU KONDO

First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji,
Kamikyo-ku, Kyoto 602, Japan

The influence of ceftazidime (CAZ) on the synergetic bactericidal effect with serum complement was investigated. One-fourth of the minimal inhibitory concentration (MIC) of CAZ increased the killing activity of gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*, but no synergetic bactericidal effect of CAZ with serum complement was observed on gram-positive *Staphylococcus aureus*.

E. coli was killed by congenitally deficient C 9 serum (C 9 D). The killing activity of C 9 D was weaker than that of normal human serum (NHS). But *P. aeruginosa* was not entirely killed by C 9 D.

A sub-MIC of CAZ increased the killing activity of *P. aeruginosa* by C 9 D. We suspect that a sub-MIC of CAZ increases the susceptibility of the bacterial cell wall against membrane attack complex (C 5 b-8).

We conclude that CAZ has a synergetic effect with serum complement on *P. aeruginosa* before C 9 activation.