

高度耐性 *Serratia marcescens* に対する新セフェム系抗生物質 と新鮮血清との協力的殺菌効果について

代居 敬子¹⁾・熊谷 幸雄¹⁾・岡田 薫¹⁾・澤江 義郎²⁾

¹⁾:九州大学医学部第一内科*

²⁾:九州大学医療技術短期大学部

(平成元年6月27日受付・平成元年9月27日受理)

臨床分離株の *Serratia marcescens* に対するいわゆる第3世代セフェム系薬と新鮮血清の協力的殺菌効果を検討した。

新鮮血清を培養液中に10%~30%の濃度に添加すると血清量に比例して菌の増殖が抑制された。また、非働化血清あるいは特異的抗菌抗体の添加により、その増菌抑制効果は消失した。

10%と20%血清存在下における各薬剤1/2 MICでの協力的殺菌効果は cefbuperazone (CBPZ) ≥ latamoxef (LMOX) ≥ ceftizoxime (CZX) ≥ cefotaxime (CTX) ≥ cefotetan (CTT) ≥ であった。CBPZ, LMOX は血清10%の添加において、CZX, CTX は血清20%の添加時に24時間後の再増殖を認めなかった。CTT は血清20%添加で4時間後には検出感度以下に減少するが8時間後には再増殖が認められた。培養液の補体価の変動をみると、補体価の明らかな経時的な低下が認められた。また、1/2 MICの抗生物質のみと、さらに新鮮血清5%を添加して培養したとき、再増殖後の菌のMICはいずれの場合でも上昇するが、血清添加群で約2~3倍に上昇した。

Key words : *Serratia marcescens*, 新鮮血清の殺菌効果, いわゆる第3世代セフェム系薬, 補体価

新鮮血清に殺菌効果のあることは以前から知られていたが、最近、補体の殺菌作用に及ぼす影響について多数の報告がなされている。抗生物質の殺菌効果は試験管内と生体内とは大きく異なるが、その原因として血清中に存在する補体や lysozyme などの殺菌物質や食細胞の関与が考えられる。一方、*Serratia marcescens* は日和見感染症の起炎菌として重要なものであるが、本菌に抗菌力のあるいわゆる第3世代セフェム系薬剤の広範な普及により、その分離頻度は減少しつつある。しかし、最近分離された *S. marcescens* をみると、いわゆる第3世代セフェムやニューキノロン系抗菌薬に対する耐性株の分離率が比較的高いことから、今後再びその重要性の増加する可能性が考えられる。

そこで、我々は臨床分離株の高度耐性 *S. marcescens* を用いて、いわゆる第3世代セフェム系薬と新鮮血清の協力的殺菌作用を検討したので報告する。

I. 材料および方法

1) 使用菌株

実験に使用した *S. marcescens* 株は癌転移により

尿路障害をきたし、尿路感染症から菌血症を併発した症例から分離された血清型0-3の臨床分離菌である。トリプトソイブイオン(栄研)で一夜培養した菌液を、リン酸塩緩衝液で3回洗浄し、生理食塩液に再浮遊後、1 ml ずつ分注して-80°Cに保存し、実験ごとに室温で溶解して使用した。

2) 使用薬剤

Cefbuperazone (CBPZ; 味の素), cefotetan (CTT; 山之内製薬), latamoxef (LMOX; 塩野義製薬), cefotaxime (CTX; 日本ルセル), ceftizoxime (CZX; 藤沢薬品工業)をそれぞれの会社から分与を受け使用した。

3) 使用血清

新鮮ウサギ血清は健康な雄ウサギ(約3 kg)から、新鮮ヒト血清は抗生物質を使用していない健康人より採取した。抗 *Serratia* 血清は家兎を免疫して作成した。すなわち家兎の免疫は、0.5%ホルマリンで処理した *S. marcescens* 死菌 1×10^8 CfU を3日間隔で2回静注し、2回目の投与7日後の血清を採取した。血

清は小チューブに分注し、 -80°C に保存して室温で融解後非働化して使用した。抗体価は試験管内細菌凝集反応により測定した。

4) *S. marcescens* の増殖曲線

トリプトソイオン 30 ml に *S. marcescens* を接種し、 37°C の恒温槽中で振盪培養し、その生菌数を経時的に測定した。培養液の量は血清や抗生物質を含め全量を 30 ml とした。血清添加は培地量の 10%、20%、30% になるように加え、薬物は主として 1/2 MIC を添加したときについて検討した。

5) 補体価の測定

培養液の補体価測定は、経時的に培養液を 4 ml ずつ採取しミリポアフィルターで濾過後、MAYER 変法¹¹⁾により CH 50 価を測定した。すなわち至適濃度の抗体で感作されたヒツジ赤血球 5×10^8 個の 50% を 7.5 ml の反応液の中で 37°C 90 分間に溶血させるに要する補体の量を 50% 溶血単位 (CH 50) とした。補体価測定のための緩衝液は、ゲラチン、ペロナール緩衝液 (GVB) を使用した。

6) Sub-MIC 抗生物質に新鮮血清を添加した場合の MIC 変化

1/2 MIC 抗生物質を含有したトリプトソイオンに新鮮血清 5% を添加した場合と、添加しなかった場合の *S. marcescens* の培養により、再増殖が認められた 10 時間後と 24 時間後に、培養液 0.1 ml 採取し、普通寒天平板に塗抹培養後、10 コロニーを個別に釣菌し、ただちにそれぞれの MIC を測定した。

7) MIC 測定

各種抗生物質の *S. marcescens* 菌株に対する MIC は日本化学療法学会標準法¹²⁾に準じて寒天平板希釈法により測定した。

II. 成 績

1) 使用した臨床分離 *S. marcescens* 株の MIC 値

実験に使用した *S. marcescens* の MIC 値は、CZX と LMOX が $25 \mu\text{g/ml}$ 、CTX と CBPZ が $50 \mu\text{g/ml}$ 、CTT が $100 \mu\text{g/ml}$ であり、いずれも高い MIC 値を示した。

2) 新鮮血清の増菌抑制効果

新鮮ウサギ血清の増菌抑制効果を Fig. 1 に示した。添加した血清量に比例して増菌抑制効果がみられ、培養 12 時間後の菌数をコントロールと比較すると添加血清 20% では約 $1/10^3$ 、30% では約 $1/10^5$ の菌数に発育が抑制された。しかし、14 時間以降では増殖抑制効果は減弱し、22 時間後にはコントロールとほぼ同数まで増殖した。

3) 非働化新鮮血清と抗体血清の影響

添加する 30% 新鮮ウサギ血清を非働化して加える

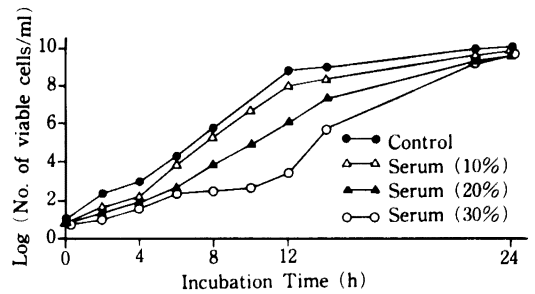


Fig. 1. Growth curves of *Serratia marcescens* in the broth with fresh serum

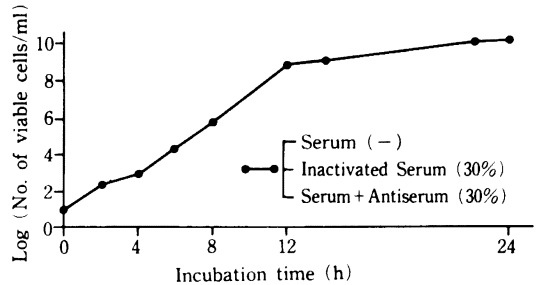


Fig. 2. Growth curves of *Serratia marcescens* in the broth with inactivated serum or fresh serum with antiserum

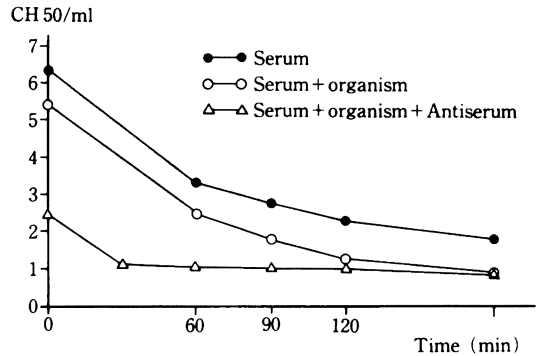


Fig. 3. CH 50 of broth with fresh serum after the inoculation of *Serratia marcescens*, or *Serratia marcescens* and antiserum

と Fig. 2 に示すように、増菌抑制効果は認められなかった。また 30% 血清添加と同時に抗 *Serratia* 血清を加えた系でもその増菌抑制効果が失われた。

4) 培養液中の補体価の経時的変動

培養液に血清のみ、血清と *S. marcescens*、さらに血清と *S. marcescens* と非働化抗血清を添加した時の CH 50 値の経時的変化を見たのが Fig. 3 である。コントロールは熱と振動による影響をみるため、菌を接種せず血清のみ添加したものについて測定した。菌の存在下ではコントロールに比べ明らかに補体価は低

Table 1. Agglutination titers of antiserum, the broth with antiserum, and the broth with antiserum inoculated with *Serratia marcescens*

Time (min)	Agglutination titer								
	×40	×80	×160	×320	×640	×1,280	×2,560	×5,120	×10,240
Before Dilution	##	##	##	#	#	#	#	-	-
After Dilution	##	##	#	+	-	-	-	-	-
0	##	##	±	-	-	-	-	-	-
60	#	#	±	-	-	-	-	-	-
90	#	#	±	-	-	-	-	-	-
120	#	#	±	-	-	-	-	-	-
180	#	#	±	-	-	-	-	-	-

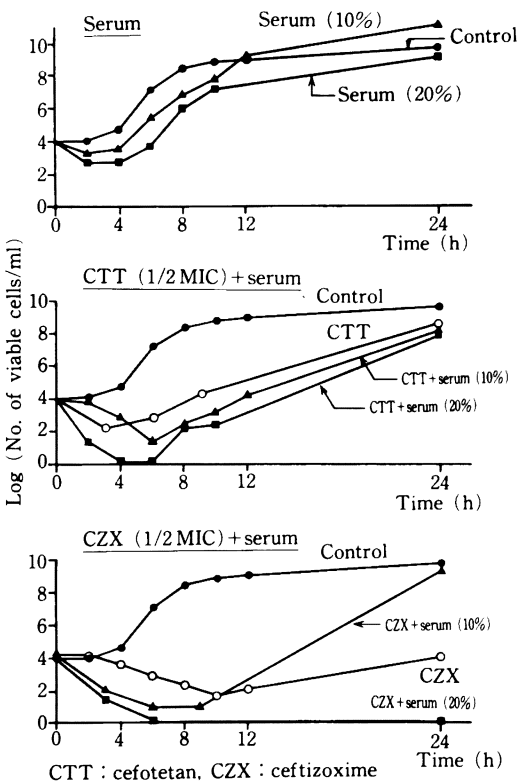


Fig. 4-1. Effect of antibiotics with serum on the growth of *Serratia marcescens*

下しており、時間の経過と共に低下がやや促進されていた。また抗 *Serratia* 血清を添加した場合は、添加直後より急速に、しかも著明に補体価が減少し、以後の変化は認められず、最低値を示した。

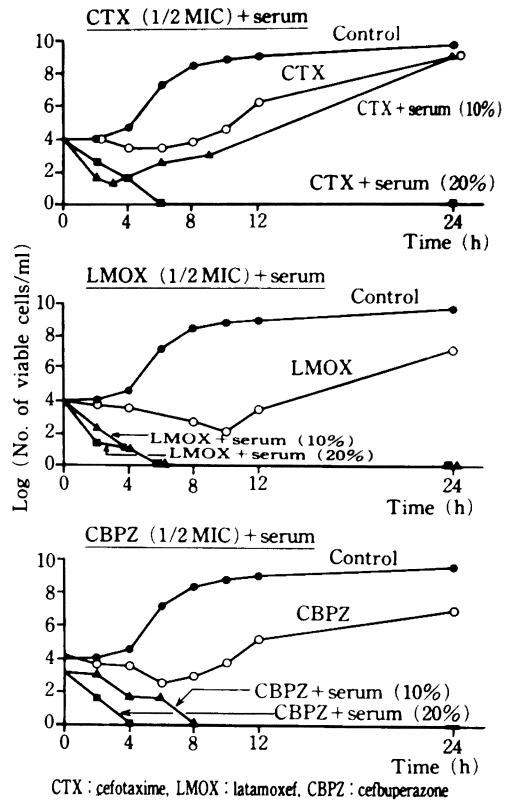


Fig. 4-2. Effect of antibiotics with serum on the growth of *Serratia marcescens*

5) 培養液中の抗体凝集価の経時的変動
 使用した抗 *Serratia* 血清の凝集価 Table 1 に示したように 2,560 倍であった。この血清を培養液に添加

したところ凝集価は 320 倍であったが、菌接種により直ちに 80 倍に減少していた。しかも、経時的変動が認められないことから、抗体の反応は菌接種とともにただちに終了していると考えられた。

6) ヒト新鮮血清と sub-MIC の抗生物質との協力的殺菌効果

Sub-MIC, すなわち 1/2 MIC の抗生物質存在下で、新鮮ヒト血清の添加効果を調べ、その結果を Figs. 4-1, 4-2 に示した。1/2MIC での各薬剤と血清との協力的増菌抑制効果は、CBPZ > LMOX > CZX > CTX の順に強かった。すなわち、血清 10% 添加の場合 CTT, CZX, CTX では 24 時間後に菌の再増殖を認めたが、LMOX, CBPZ は 24 時間後も菌の再増殖

は抑制された。血清 20% の添加の場合 CZX, CTX, LMOX, CBPZ いずれも 24 時間後の再増殖は認められなかった。

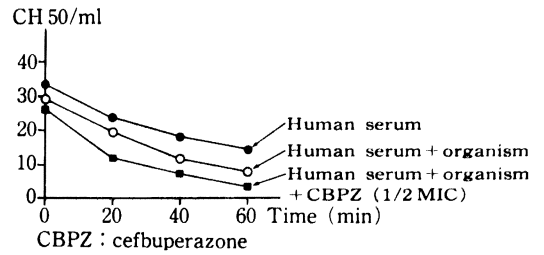


Fig. 5. CH 50 of broth with fresh serum and antibiotic

Table 2. Course of MICs of *Serratia marcescens* in the broth with 1/2 MIC antibiotic with or without fresh serum

Drug medium	Culture	10h MIC (μg/ml)	(%)	24h MIC (μg/ml)	(%)
CTT	CTT (100)	100	40	100	20
		200	60	200	80
	CTT+S	100	0	100	0
		200	100	200	100
CZX	CZX (25)	25	70	25	10
		50	30	50	60
		100	0	100	30
	CZX+S	25	0	25	0
		50	80	50	40
		100	20	100	60
CTX	CTX (50)	50	100	50	20
		100	0	100	80
	CTX+S	50	50	50	0
		100	50	100	100
LMOX	LMOX (25)	25	20	25	0
		50	80	50	100
	LMOX+S	25	0	25	0
		50	100	50	100
CBPZ	CBPZ (50)	50	100	50	100
		50	100	50	100
	CBPZ+S	50	100	50	100

a) () : MIC of the original strain

b) S : 5% fresh serum

CTT : cefotetan, CZX : ceftizoxime, CTX : cefotaxime, LMOX : latamoxef, CBPZ : cefbuperazone

7) Sub-MIC の抗生物質と新鮮血清添加に於ける CH 50 の経時的変化

最も強い協力的殺菌効果の認められた CBPZ 1/2 MIC と新鮮血清 20% 添加培養液の補体価の変動を Fig. 5 に示した。補体消費は菌を加えることにより増加し CBPZ の添加によりさらに増大した。

8) Sub-MIC の抗生物質と新鮮血清による MIC の変化 (Table 2)

1/2 MIC の抗生物質およびさらに 5% 血清を添加したものに菌を接種して 37°C で培養し、10 時間後と 24 時間後の培養液から分離された、それぞれ 10 コロニーの MIC を測定した。Table 2 に 10 コロニー中に占める各 MIC 値の割合を百分率で示した。CTT, CZX, CTX において血清添加群では血清非添加群の 2~4 倍の MIC 値の上昇が認められた。CBPZ ではこの MIC の変化は認められなかった。また、MIC の経時的変動をみると、培養 24 時間後の方が、より強い耐性傾向にあるのが認められた。

III. 考 察

臨床分離株の高度多剤耐性 *S. marcescens* に対する新鮮血清の殺菌効果と、第 3 世代セフェム系薬の 5 剤との協力的殺菌効果を調べた。

培養液に新鮮血清を添加すると、添加した血清の量に比例して増菌抑制効果が認められた。この増菌抑制効果は、以下の点より補体が関与していると推測された。すなわち、①添加する新鮮血清を非働化するとその効果が失なわれること、②抗 *Serratia* 血清を添加すると、培養液中の補体価は瞬時に低下し、増菌抑制効果が同時に失なわれること。③菌の増殖がより抑制された群において培養液中の補体の消費がより著明であったことの 3 点である。血清の菌体に及ぼす影響について、井上¹⁾は溶菌反応での補体と lysozyme の関与を指摘している。また加えられた補体量に比例して菌の表面に障害が加わることも指摘している。

いわゆる第 3 世代セフェム系抗生物質の 1/2 MIC と新鮮血清添加時の *S. marcescens* の増殖曲線を見たところ明らかに殺菌効果の増加が認められた。しかし、一部の薬剤では時間の経過とともに再増殖が認められた。

血清補体と抗生物質との協力的・相乗的殺菌効果のメカニズムに関しては、いまだ十分に解明されていないが、大きく 2 つに分けて考えることができる。1 つは、抗生物質 (特に β -lactam 系) が、たとえ MIC 以下であっても菌体の表面構造を変化させ、補体の殺菌作用を受け易くする²⁻⁴⁾。また、抗生物質が murein 架橋酵素 PBP_s と結合すると、菌の filament 化がおこ

り、菌の表面構造において C3 を不活化させていた外膜の LPS や zymosan が変化し、C3 が膜表面でただちに活性化され、引き続き補体系そのものの活性化が引き起こされるといふ報告がある^{7,8)}。一方、逆に Dutcher⁹⁾は補体によって生じた菌体外層の障害の修復が薬剤の細胞壁合成阻害によって妨げられ、薬剤の外膜透過が亢進することによって相乗効果をもたらすのではないかと報告している。浅野¹⁰⁾の最近の実験では、血清で菌を前処理した後、第 3 世代セフェムを作用させた群において、コントロール群と比べ著しい生菌数の減少が観察され、また抗生物質の菌への取込み率が著明に増加したことを報告している。我々の実験は、血清と抗生物質を同時に加えた培養系であるが、最も菌の増殖を阻止した群において、上記の 2 つのメカニズムが相互に関与して相乗効果をもたらしたのではないかと考えられる。

Serratia は従来 chromosomal な β -lactamase を有する菌であり、その耐性菌の増加は薬剤の使用による選択によると考えられる。その結果 β -lactamase の量的に増加した菌が生き残り、セフェム剤高度耐性を示すと考えられる。我々が使用した株は、ある病棟の流行菌型であり、第 3 世代セフェム剤に対しても 25~100 μ g/ml の高い MIC を示す β -lactam 系薬の高度耐性菌である。この菌はまた 20~30% の血清添加によりいったんは増殖の抑制傾向がみられるものの、24 時間後には血清非添加のコントロールと同じレベルまで増殖した。一方、1/2 MIC の抗生物質と新鮮血清の添加により明らかに増殖抑制の増強がみられ、薬によっては強力な殺菌作用がみられた。この際、抗生物質単独添加群と抗生物質・血清添加群での培養後に得られたコロニーの MIC を比較したところ、培養 12 時間後、血清添加群の MIC が非添加群と比べ 2~4 倍高い値を示したことが興味ある事実である。

この機構については現在不明であり、さらに検討する必要がある (本論文の要旨は第 33 回日本化学療法学会、西日本支部総会にて発表した)。

文 献

- 1) 井上公蔵: 免疫殺菌反応の研究。日本細菌学雑誌 39 (16): 833~847, 1984
- 2) 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): 76~83, 1979
- 3) 横田 健, 関口玲子: Ceftizoxime (CZX) の大腸菌およびコレラ菌 penicillin 結合蛋白質に対する親和性と殺菌力の関係。Chemotherapy 28 (S-5): 44~49, 1980

- 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
- 5) 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効果. *Chemotherapy* 30 (S-3): 20~27, 1982
- 6) 四辻 彰, 田井 賢, 笹倉かの子, 柿澤裕美, 岡本直子, 保田 隆, 才川 勇: β -lactam系抗生剤の sub-MIC に関する研究 (第一報) ヒト及び各種動物血清中での殺菌作用. *Chemotherapy* 31 (11): 1047~1054, 1983
- 7) 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 (7): 542~545, 1987
- 8) GEWURY H, SHIN H S, MERGENHAGEN S E: J. *Exp. Med.* 128: 1049~1057, 1968
- 9) DUTCHER B S, REYNARD A M, BECK M E, CUNNINGHAM R K: Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 820~826, 1978
- 10) 浅野泰司, 横田 健: 各種セフェム系抗生物質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
- 11) MAYER M M: *Experimental immunochmistry*. 2nded, Thomas, pp. 133~240, 1961
- 12) 最小発育阻止濃度 (MIC), 測定法再改定について. *Chemotherapy* 21: 76~79, 1981

SYNERGISTIC INTERACTION OF NEW CEPHEM ANTIBIOTICS AND FRESH SERUM ON A HIGHLY RESISTANT STRAIN OF *SERRATIA MARCESCENS*

TAKAKO YOSUE, YUKIO KUMAGAI, KAORU OKADA and YOSHIRO SAWAE

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, and School of Health Sciences,
Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku, Fukuoka 812, Japan

We studied the synergistic interaction of some new cephem antibiotics and fresh serum against a clinical isolate of *Serratia marcescens*.

Bacterial growth was dose-dependently inhibited by the addition of 20%~30% fresh serum to the broth.

Its activity was lost by the inactivation of the fresh serum and the addition of specific antibody for the strain, while the complement activity (CH50) of the broth was consumed.

Bacterial growth was strongly inhibited by simultaneous incubation with fresh serum and some new cepheims. The most potent synergistic bactericidal effect was observed with cefbuperazone, followed by latamoxef, ceftizoxime, cefotaxime and cefotetan. No regrowth of the strain after 24h was observed in a broth of 1/2 MIC of cefbuperazone or latamoxef with 10% serum, or in a broth of 1/2 MIC of ceftizoxime or cefotaxime with 20% serum.

Interestingly, after 10 and 24 hours incubation, the MIC levels of the cepheims in the broth with sub-MIC antibiotic and fresh serum increased 2-4 times more than those in the broth with sub-MIC antibiotic only. This suggests that the drug resistance of this organism might have been induced during the simultaneous incubation with cephem antibiotics and fresh serum.