

## セフェム系抗生剤 cefbuperazone (CBPZ) の好中球リゾチーム活性に与える影響

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内科

緒 方 幸 雄

杏林大学医学部微生物学教室

(平成元年6月27日受付・平成元年10月5日受理)

大腸菌 *Escherichia coli* (KC-14) を用いた感染実験でセフブペラゾン (cefbuperazone, CBPZ) の治療実験を行ってきた。今回は本剤による好中球の殺菌作用の亢進の有無を好中球より放出されるリゾチーム濃度の変動を中心とし、CBPZの好中球に与える影響を検討した。すなわちモルモット血清加好中球とCBPZの協同作用による殺菌作用の亢進効果について検討した結果、CBPZ (0.1 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$ ) の殺菌作用の機序にリゾチームおよび補体の関与が示唆された。血清を加えた好中球浮遊液でCBPZは殺菌作用をさらに亢進した。

また培養液中のリゾチーム値を測定すると、CBPZ濃度が1.0  $\mu\text{g/ml}$  で最大値を示し、10  $\mu\text{g/ml}$  では、その増強程度は低下した。またベントナイト処理によりリゾチームを吸収したモルモット血清加好中球群では1.0および10  $\mu\text{g/ml}$  で有意に高い活性値を示した。

一方、非動化血清加好中球群はCBPZの濃度変化に伴うリゾチーム活性の亢進作用はほとんど見られなかった。ベントナイト処理血清に市販リゾチームを添加すると無添加群と比べ添加 (0.8  $\mu\text{g/ml}$ ) 群では殺菌活性が増強された。この場合の培養液上清を集めリゾチーム活性を測定した処市販リゾチーム無添加群ではCBPZ用量依存性を示す活性増加傾向を示した。一方、添加群ではCBPZの1.0  $\mu\text{g/ml}$  濃度で有意に好中球からリゾチームの遊離が認められた。さらに、CBPZとcefmetazole (CMZ) で殺菌活性を比較するとCMZではモルモット血清加好中球群でも殺菌作用 (貪食作用) の亢進は見られなかった。またCBPZ (1  $\mu\text{g/ml}$ ) で4時間前処理した *E. coli* (KC-14) は好中球の貪食作用を受け易い形態を呈した。また脾臓単核細胞を分離し、モルモット血清加単核細胞とCBPZの協同作用による殺菌活性を調べた結果、CBPZとモルモット血清加単核細胞群で最も強い殺菌活性を示し、その遠心分離上清液も同様にモルモット血清加好中球群が最も強い殺菌活性を示したが、この遠心分離液中のリゾチーム活性を測定したがCBPZ用量依存的に活性は増大せず、CBPZによる影響はほとんど見られなかった。

**Key words** : Cefbuperazone (CBPZ), リゾチーム, 好中球, 補体, 脾細胞

宿主が生来備えている非特異的防御機構の中に好中球の働きが挙げられる。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<sup>1)</sup>。

前者に属する殺菌活性に myeloperoxidase や活性酸素 (superoxide 等) が関与する。

後者には非特異的防御機構に携わる液性因子としてリゾチームの殺菌作用は感染初期に重要な役割を果たす因子である。リゾチームは分子量 15,000 の塩基性蛋白質で、涙液粘液、血清などに含まれている。リゾチーム (endo-N-acetyl-muramidase) 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<sup>2-5)</sup>。

\*東京都文京区駒込2-28-8

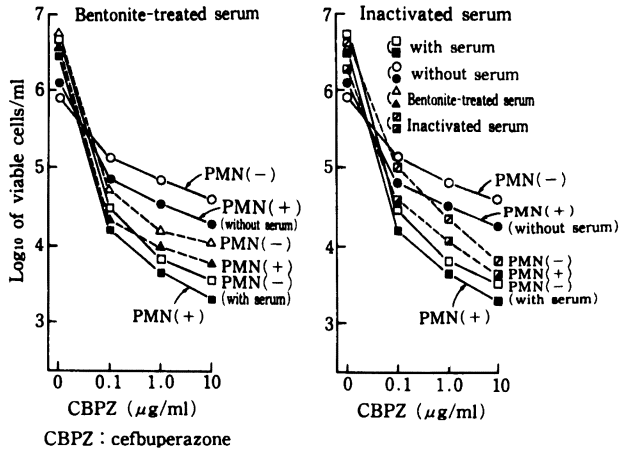


Fig. 1. Cooperative role of PMN and serum in antibacterial activity against a strain (KC-14) *in vitro* of *Escherichia coli*

Cefbuperazone (CBPZ) は緑膿菌を除くグラム陰性菌に対して強い殺菌力を示すセファム系抗生剤である<sup>9)</sup>。鈴木等<sup>7)</sup>はCBPZが *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* 感染実験で、*in vitro* 活性で示した他のセファム系抗生剤よりも、*in vivo* でより有効な結果を得た。 $\beta$ -lactum 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け易い。横田ら<sup>8)</sup>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による修飾によって補体ならびに好中球の食菌作用を促進することを示した。また前報では、CBPZが間葉系細胞(食細胞、リンパ球等)から遊離される殺菌蛋白リゾチームの活性、好中球のNBT還元能および抗体産生能に与える影響について、*in vivo* および *in vitro* で検討し、CBPZが各試験で活性化することを示した<sup>10)</sup>。今回はCBPZが好中球を刺激しリゾチームを遊離させる機序、ならびに殺菌活性へのリゾチームの関与について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6週齢を使用した。

菌数の算出：*E. coli* (KC-14)を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。

好中球(Granulocyte)の採取：0.2%カゼイン溶液をICR/jclマウスの腹腔内に2ml注射し、15時間後にHank's buffer (HBSS)で腹腔内を洗浄、好中球を採取し、2回HBSSで洗浄後、同液に $3 \times 10^6$ /mlの濃度に調整浮遊した。また、好中球を多形核白血球(PMN)とも表示した。

リゾチーム活性値の測定<sup>11)</sup>：結晶卵白リゾチーム(Sigma社, IF-8055)を1/15M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1/15Mリン酸緩衝液(pH=6.2)を用いて *Micrococcus lysodeikticus* cell (Difco社, 107C-006)の50 mg/100 ml浮遊液を調整した。リゾチーム活性値は0.75 ml *Micrococcus lysodeikticus* cell浮遊液、0.25 ml 0.3N NaCl液を0.5 ml標準リゾチーム溶液または被検液40  $\mu$ lと1/15Mリン酸緩衝液の460  $\mu$ lの割合に混合し、5時間室温を保ち、540  $\mu$ mの波長で%Tを測定し求められた。

好中球またはモルモット血清加CBPZの殺菌活性の測定：HBSS中に $2.5 \times 10^6$  cells/mlの好中球、 $1 \times 10^6$  cells/mlの *E. coli* (KC-14)、20%モルモット血清およびCBPZを0.1、1.0および10  $\mu$ g/mlの濃度の各液を調整し、37°Cで4時間振盪培養後、遠心分離(3,200 r.p.m, 20 min)し、菌体と好中球を回収した。その好中球を蒸留水で破壊し、ただちに生理食塩水で2回洗浄し、培養後、コロニーをカウントし生菌数とした。

モルモット血清のベントナイトおよび熱処理：10 mgのベントナイト(和光純薬株式会社 Lot No. CDF 2843)を1 mlの血清に加え5°Cで10分間放置後、遠心分離(3,000 r.p.m, 10 min)しベントナイト処理血清とした。また補体活性を除くために57°C、30分間加温した。

脾細胞浮遊液の調整<sup>12)</sup>：ICR/jclマウス(♂)より脾臓を摘出し、150 meshのステンレスメッシュを通過させ、ガーゼでろ過した細胞浮遊液をFicell液(比重1,090, IML社製)の上に重層し、遠心分離

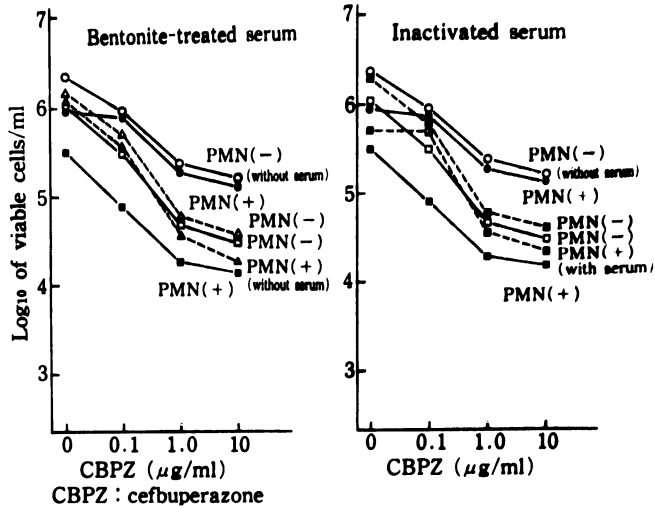


Fig. 2. Comparison of antibacterial activity between Bentonite-treated serum and inactivated serum after culture with a strain of *Escherichia coli* KC-14

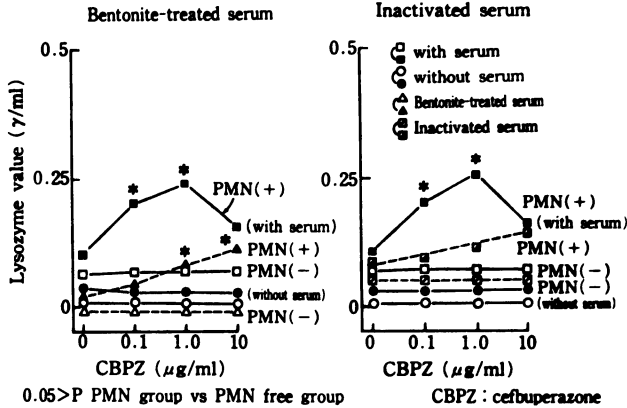


Fig. 3. Comparison of lysozyme induction between Bentonite-treated serum and inactivated serum

(2,100 r.p.m, 30分)後、プラスチックシャーレ (Falcon 社製) に撒き、CO<sub>2</sub>培養器で1時間培養し、付着細胞を除き、また同様の操作を残り2回繰り返えし、付着細胞を除き、Hank's buffer (HBSS) に浮遊させ脾細胞浮遊液 (2.5×10<sup>6</sup> cells/ml) とした。

II. 結 果

マウス好中球またはモルモット血清による *E. coli* (KC-14) の殺菌および食作用における CBPZ の影響: Fig. 1 の左欄にベントナイト処理をしてリゾチーム吸収した血清, 右欄には 57°C, 30 分間熱処理した血清をそれぞれ 20% 添加した。対照として血清無添加培地と無処置血清培地をおいた。好中球添加群は無添加群に較べ CBPZ の各濃度 (0.1, 1.0 および 10

µg/ml) で添加群の方が強い殺菌活性を示した。また好中球添加群に血清添加した群はさらに強い殺菌活性を示した。また血清添加群は好中球添加群よりも強い抗菌活性を示した。さらにベントナイト処理血清および非動化血清では CBPZ の各濃度で殺菌活性の低下を示し、殺菌作用にリゾチームおよび補体の関与が示唆された。また CBPZ は血清および好中球の存在でその殺菌活性を増強されることも判明した (Fig. 1)。

培養 (4 時間) 滲液の抗菌活性: Fig. 1 に示した実験で得られた培養液を遠心分離し、この上清について殺菌活性を測定した。その結果、血清無添加群では好中球添加群および無添加群共にほぼ同程度の殺菌活性を示した。これは好中球の直接作用を示唆した。一

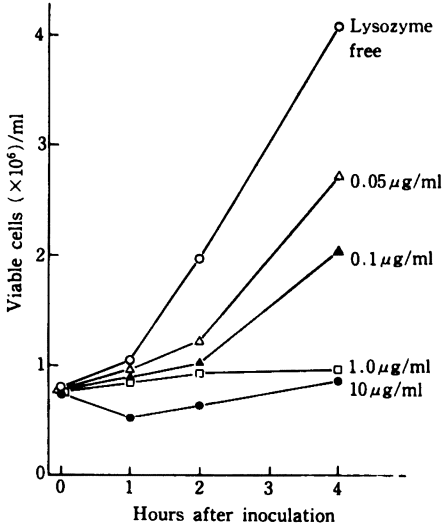


Fig. 4. Antibacterial activity of lysozyme *in vitro*

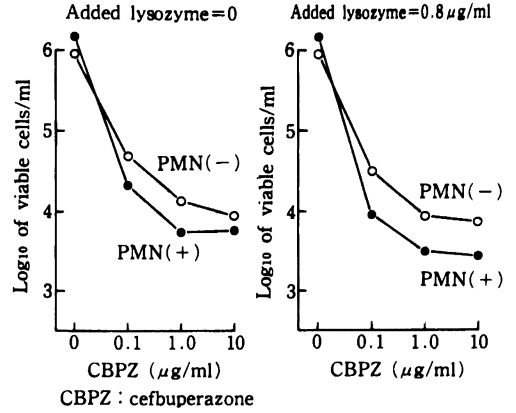


Fig. 5. Cooperative role of PMN and lysozyme on antibacterial activity in Bentonite-treated serum *in vitro*

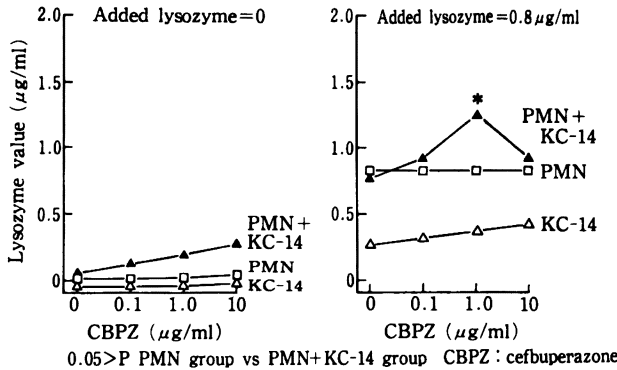


Fig. 6. Lysozyme induction by cefubuperazone in Bentonite-treated serum

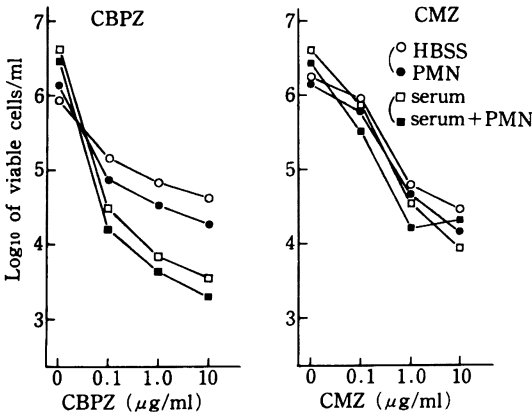


Fig. 7. Effect of guinea pig serum on antibacterial activity of cefubuperazone or cefmetazole against *Escherichia coli* (KC-14)

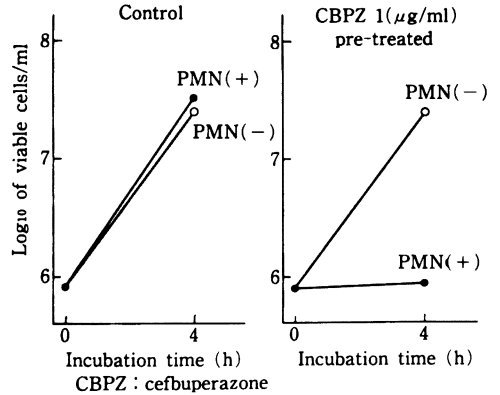


Fig. 8. Effect of pre-treatment of *Escherichia coli* (KC-14) with cefubuperazone on antibacterial activity of PMN in the presence of guinea pig serum

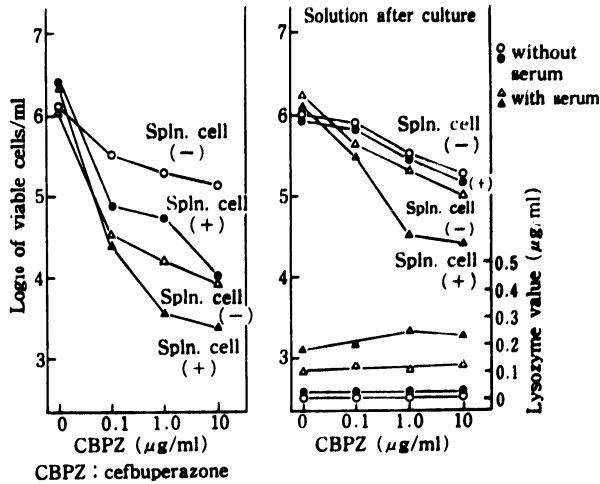


Fig. 9. Cooperative role of spleen cells in antibacterial activity of cefbuperazone *in vitro*

方血清添加群のうち好中球添加群は無添加群に較べ強い殺菌活性を示している、これは血清と好中球およびCBPZが相互に作用して殺菌因子を遊離していることを示した。ベントナイト処理および非動化血清でも同様に好中球添加群と無添加群では添加群の方が強い抗菌作用を示したが、無処置血清添加よりも抗菌活性は低かった。このことはFig. 1と同様にリゾチームおよび補体の関与を示した (Fig. 2)。

ベントナイト処理血清および非動化血清とCBPZの相互作用による好中球より遊離するリゾチーム活性の測定：無処置血清群の好中球添加群はCBPZ濃度の0.1および1.0 µg/mlでリゾチーム活性は有意に上昇した。またベントナイト処理した好中球添加群では1.0および10 µg/mlで有意にリゾチーム活性は上昇した。また非動化血清では用量依存的にリゾチーム活性が上昇した。また血清無添加群および好中球無添加群ではリゾチーム活性の促進作用は示されなかった (Fig. 3)。

市販リゾチームの *E. coli* (KC-14) に対する抗菌活性：Fig. 4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 (Fig. 4)。

ベントナイト処理血清添加培養液に市販リゾチームを加えた場合の殺菌活性：Fig. 5に示したごとく、市販リゾチーム無添加の場合にはCBPZの各濃度で好中球の殺菌活性が促進されることはなかった。一方、市販リゾチーム (0.8 µg/ml) 添加群では抗菌活性は亢進された。Fig. 6では、上記の培養液を遠心分離し、上清中のリゾチーム活性を測定した結果、市販リゾチーム無添加群ではCBPZの用量依存的にリ

ゾチーム活性が上昇する傾向がみられたが、市販リゾチーム (0.8 µg/ml) 添加群のCBPZ濃度1.0 µg/mlで有意なリゾチーム活性亢進効果を示した。*E. coli* (KC-14) 単独群でリゾチーム値が低いのは抗菌作用でリゾチームが消費されて低い値になったものと考えられた (Figs. 5, 6)。

CBPZとcefmetazole (CMZ)の好中球および血清存在下の殺菌活性の比較：Fig. 7に示したごとく、血清存在下でCBPZは好中球を活性化し殺菌力を亢進したが、CMZではCBPZのような活性化は観察されなかった (Fig. 7)。

CBPZによる前処理による好中球の抗菌活性：CBPZ (1 µg/ml)により *E. coli* (KC-14)を4時間前処理し好中球の貪食殺菌作用を観察した。その結果、Fig. 8に示したごとく、CBPZで前処理した菌体は好中球の貪食殺菌作用に感受性を示した (Fig. 8)。

モルモット血清加脾細胞とCBPZの貪食殺菌作用に与える影響：Fig. 9に示したごとく、脾細胞添加群は血清無添加でも抗菌活性を亢進した。血清添加群も同様に脾細胞添加群の方が抗菌活性を亢進した。一方上記の培養液を遠心分離し、殺菌活性を調べた結果、血清無添加群では脾細胞の有無にかかわらず同程度の殺菌活性しか示さなかった。一方血清添加群では脾細胞が存在した場合より強い殺菌活性を示した。

さらに、本培養液中のリゾチーム活性を測定したところ、血清添加群でCBPZの各濃度でリゾチーム活性の亢進作用は極めて弱いものであった。一方血清無添加群はリゾチーム活性亢進作用は観察されなかった (Fig. 9)。

### III. 考 察

CBPZの生体内効果の証明実験については、横田ら<sup>8,9,13)</sup>によって補体および好中球との協同作用について、*in vitro*で検討が行なわれた。その結果、*in vitro*実験より生体内効果が期待できた。すなわち、CBPZは50%発育阻止濃度(ID<sub>50</sub>)存在下において、*E. coli*を血清、補体による殺菌効果を受けやすくするように変化させることが判明した。一般にβ-lactam薬剤などの細胞壁合成阻害剤は、菌の表面構造を変化させるため、sub MICでも生体内では補体と協力的殺菌効果を示すことが多いが、これはβ-lactamの誘導体ごとにある程度の差のあることがすでに確認されている。CBPZは、その効果が著しいので、このことが生体内効果が良好である理由と考えられた。また鈴木ら<sup>7)</sup>はCBPZが*E. coli*および*K. Y. pneumoniae*感染実験で、*in vitro*活性で示した他のセファム系抗生剤よりも、より有効な結果を得た。さらに前報において、正常および感染マウスにおいて血清中のリゾチーム量、血液中のNBT還元能および抗体産生能に与える影響についても検討した。その結果、CBPZは好中球等を活性化し血液中にリゾチームを放出し、NBT還元能を亢進した。さらに、異物抗原(羊赤血球, SRBC)に対し抗体産生能を促進した<sup>10)</sup>。

今回の実験では、*in vitro*での好中球に与えるCBPZの影響について検討した。Figs. 1, 2で示したごとく、ペントナイト処理によりリゾチームを除いた血清と好中球(PMN), また57°C, 30分間加熱処理した血清のいずれの場合においてもCBPZの抗菌活性は好中球および血清の存在でさらに亢進されることが判明した。

実際に20%血清添加Hank's buffer (HBSS)中でCBPZと好中球が存在した場合のCBPZ濃度差によるリゾチーム量の変化を測定すると、好中球からのリゾチーム放出はCBPZ濃度が1.0 μg/mlで最高値を示した。さらに高濃度(10 μg/ml)になると低下した(Fig. 2)。一方、*in vitro*でのNBT還元能亢進効果は10 μg/mlでも亢進作用は低下しない、この事実はCBPZのNBT還元能活性化とリゾチーム放出能活性化作用の至適量が異なることを示している。また20%ペントナイト処理血清の場合はCBPZ濃度の増加に伴ってリゾチーム量も漸次増加し、濃度が1.0 μg/mlおよび10 μg/mlで有意に上昇した。さらに非動化血清も同様な傾向を示したが有意差を示さなかった。このことはFigs. 1, 2で示した殺菌活性へのリゾチームおよび補体の関与を示している。さらにFig. 3の示す事実はリゾチーム放出に補体が関与し

ていることを示すと同時に、CBPZは補体を活性化していることを示唆している。一方、リゾチームの抗菌作用(静菌作用)はFig. 4に示したごとく、市販リゾチーム濃度が0.05 μg/mlから1.0 μg/mlの各濃度で用量依存的であるが10 μg/mlでは1.0 μg/mlと同程度の殺菌作用しか示さなかった。このことは10 μg/mlの殺菌活性はリゾチームの抗菌活性というよりは、CBPZの直接の殺菌作用と考えられる。これらの事実にもとづき、ペントナイト処理血清に市販リゾチームを添加した場合抗菌作用およびリゾチーム活性に与える影響について検討した結果、Fig. 5で示したごとく市販リゾチーム加CBPZの各濃度において市販リゾチームの存在によって殺菌作用の増強を示した。またFig. 6では市販リゾチーム(0.8 μg/ml)を加えた場合にCBPZ濃度が0.1 μg/ml, 好中球および*E. coli* (KC-14)を添加した場合のリゾチーム活性が最大値を示した。この結果はFig. 3で示したCBPZ濃度1.0 μg/mlでリゾチーム活性が最大値を示したことと同じ傾向を示した。この事実はCBPZ濃度が1.0 μg/mlまではCBPZとリゾチームおよび血清による静菌作用およびCBPZの殺菌作用が相乗的に作用を示すが、CBPZ濃度が10 μg/mlになるとリゾチーム活性が低下するが抗菌作用は低下しなかった。すなわちCBPZのリゾチーム誘導には至適量があることを示している。

また一方、Fig. 8に示したごとくCBPZ(1 μg/ml)で*E. coli* (KC-14)を4時間前処理するとPMN添加群では強い貪食殺菌能を示した。このことはCBPZが*E. coli*の膜を修飾しPMNの貪食を亢進していることを示している。他方CBPZとCMZの抗菌活性を血清およびPMN添加培地で比較するとCMZには血清およびPMNを加えたことによる抗菌活性の亢進が見られなかった(Fig. 7)。

さらに興味深いことはFig. 9に示したごとくCBPZは付着細胞を除いた脾細胞と反応し、抗菌作用を亢進する結果を得た。この作用はリゾチームの抗菌作用だけではなく、その他の脾細胞産生因子が血清成分がCBPZで活性化され殺菌作用を亢進していることを示唆した。

### 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) 井上公蔵: 免疫殺菌反応の研究. 日本殺菌学雑誌 39 (6): 833 ~ 848, 1984
- 3) 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

- 4) INOUE K, TANIGAWA Y, TAKUBO M, SATANI M, AMANO T: Quantitative studies on immune-bacteriolysis, *Biken's Journal* 2: 1~20, 1959
- 5) WICKEN A J, KNOX K W: Bacterial cell surface amphiles. *Biochemica et Biophysica Acta* 604: 1~26, 1980
- 6) 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* の抗菌作用について. *Chemotherapy* 30 (S-3): 1~20, 1982
- 7) SUZUKI I, SENDA H, YOKOTA T: *In vivo* activity of cefbuperazone (T-1982) against various experimental infections in mice 38 (2): 249~258, 1985
- 8) 横田 健, 関口玲子, 東 映子: Cefmenoxine (SCE-1365)の各種 $\beta$ -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
- 9) 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: 481~487, 1986
- 10) 鈴木宗司, 八木田旭邦, 緒方幸雄: セファム系抗生剤セフペラゾンの免疫殺菌能に与える影響. *Chemotherapy* 37(4): 433~439, 1989
- 11) GORION S, TODD J, COHN Z A: *In vitro* synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear Phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* 139: 1228~1248, 1974
- 12) 原口惣一, 吉田孝人: *In vitro* 抗体産生の測定. 臨床免疫 13 (S-3): 314~320, 1981
- 13) 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

## EFFECT OF CEFBUPERAZONE (CBPZ) ON LYSOZYME ACTIVITY OF MUPINE NEUTROPHILES

MOTOJI SUZUKI

Kaken Pharmaceutical Co. Ltd., 2-28-8 Komagome, Bunkyo-ku, 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 effect of cefbuperazone (CBPZ) on the antibacterial activity of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and found that it enhances the phagocytosis of *Escherichia coli* in the presence of complement. Synergy, however, was diminished in the absence of complement or in presence of heat-inactivated or Bentonite-treated serum. *In vitro*, CBPZ increased the lysozyme activity of PMNs in the presence of complement, and showed maximum activity at an optimal dose of 1.0  $\mu\text{g/ml}$ .

Furthermore, it significantly induced lysozyme activity of PMNs in the presence of Bentonite-treated serum containing CBPZ (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ), but not with heat-inactivated serum containing CBPZ (0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ ). Also, commercial lysozymes (0.8  $\mu\text{g/ml}$ ) significantly induced lysozyme activity in PMNs and Bentonite-treated serum containing CBPZ (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ).

*E. coli* (KC-14) pre-incubated with CBPZ (1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) was more susceptible to phagocytosis by PMNs. CBPZ was compared with CMZ against infection *in vitro*. It enhanced the phagocytosis by PMNs in each dose (0.1-1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) of cefmetazole.

CBPZ enhanced phagocytosis of *E. coli* (KC-14) by spleen cells in the presence of complement. This synergy, however, was diminished in the absence of complement, but was not shown to increase lysozyme activity in the medium.