

Cefuzonam とヒト多核白血球の協力的殺菌作用

平井 裕一・中 畑 久・青木留美子

辻野 守泰・熊坂 義裕・武部 和夫

弘前大学医学部第三内科*

(平成3年1月29日受付・平成3年2月19日受理)

新 cephem 系抗生剤 cefuzonam (CZON) のヒト多核白血球 (PMN) との協力的作用を、血清に殺菌されない特徴を有する *Escherichia coli* No. 59 株を用いての殺菌能への影響で検討し、cefbuperazone (CBPZ), cefmetazole (CMZ) と比較した。*E. coli* No. 59 株を sub-MIC (1/32, 1/8, 1/2) の CZON で一夜培養すると健康人多核白血球の殺菌作用を容易に受けることが観察された。この多核白血球との協力的作用は CZON と CBPZ で同程度に認め、CMZ より著明であった。また、CZON と CBPZ が作用した菌は血清にも殺菌を受けやすくなった。菌体内の活性酸素消去酵素である SOD とカタラーゼを測定したところ、sub-MIC の薬剤が作用した場合、両酵素とも活性が抑制されていた。CZON は SOD、CBPZ はカタラーゼ活性の抑制が大きい傾向であった。これらの結果から、CZON は多核白血球の酸素依存系殺菌機構に対する細菌の抵抗性を減弱させ、殺菌作用を受けやすくさせることが考えられた。

Key words : cefuzonam (CZON), 多核白血球 (PMN), superoxide dismutase (SOD), catalase

いわゆる compromised host の増加にともない、各種抗菌薬と宿主の生体防御能の相互作用が注目されている。近年 *in vitro* の抗菌作用から予想される以上に *in vivo* 効果が優れる抗菌薬が数種報告されてきているがその理由はいまだ充分解明されていない。今回、新しい oxime 型 cephem 剤である cefuzonam (CZON) につき非特異的防御機構として重要な多核白血球との協力的殺菌作用を検討し、細菌の活性酵素消去系酵素活性におよぼす抗菌薬の影響の点から考察を加えた。

I. 材料・方法

1. 被検菌は藤沢薬品中央研究所から分与を受けた臨床分離株、*Escherichia coli* No. 59 株を用いた。本株はヒトおよびマウスの血清に殺菌されがたい特徴を有しており、Hanks balanced salt solution (HBSS) 単独と健康人 AB 型血清 10 人分を混和し 10% に HBSS に添加した場合で増殖曲線に差を生じなかった (Fig. 1)。

2. 使用薬剤

CZON (日本レダリー), cefbuperazone (CBPZ, 富山化学), cefmetazole (CMZ, 三共) を使用した。

3. 抗菌力測定

日本化学療法学会標準法に基づき¹⁾、寒天平板希釈

法 (10^6 CFU/ml 接種) で MIC を測定した。

4. 多核白血球の調製

健康男子 1 名肘静脈よりヘパリン加採血し、Dextran, Ficoll-Paque により多核白血球 (polymor-

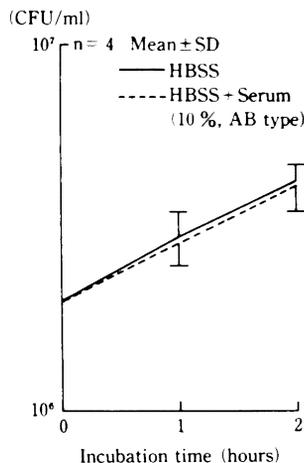


Fig. 1. Effect of human serum on viability of *Escherichia coli* No. 59

*弘前市在府町 5

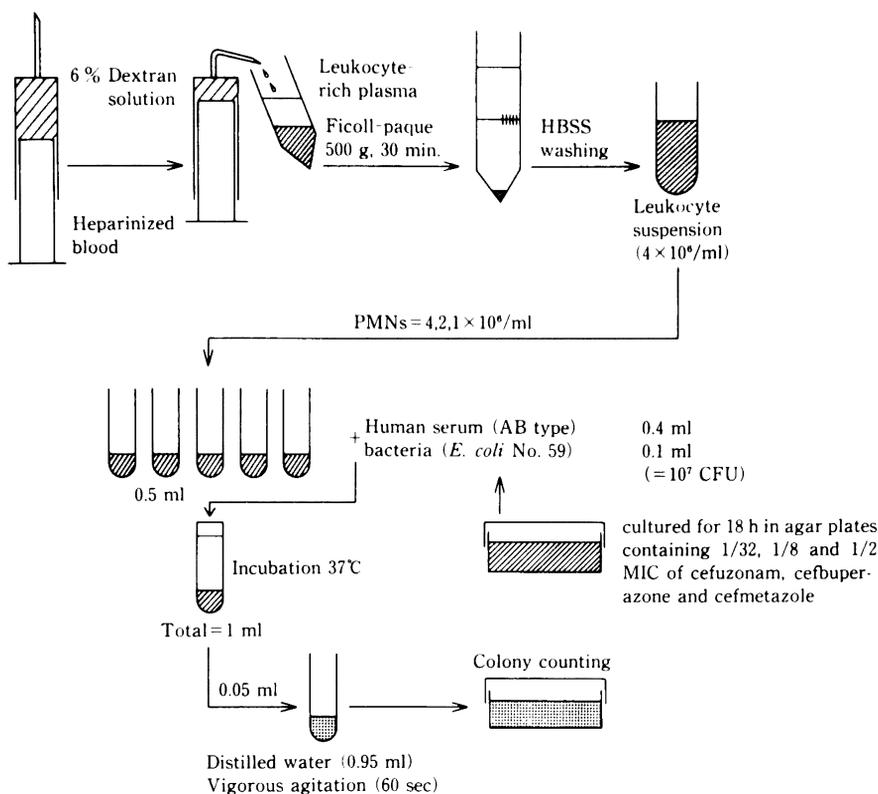


Fig. 2. Experimental method for evaluating effect of antibiotics on bactericidal activity of human PMNs

phonuclear leukocytes; PMN) を $4.2,1 \times 10^6/\text{ml}$ の 3 段階に HBSS で調製した。

5. 殺菌能の測定

MIC の 1/32, 1/8, 1/2 相当量となるよう CZON, CBPZ, CMZ を含んだ感受性ディスク培地を作成した。*E. coli* No. 59 株を HI broth で 37°C 一夜培養し、上記抗菌薬含有感受性ディスク培地に白金耳で塗布した。37°C で 18 時間培養後、集菌し、1/15 M リン酸緩衝液に懸濁した。分光光度計を用いて菌数を 10^8 CFU/ml に調製した。PMN 液 0.5 ml, 菌液 0.1 ml, オゾンとして健康人 AB 型血清 (5 人分混和) を 25% 含んだ HBSS 0.4 ml を混和し計 1.0 ml とした。すなわち PMN に対する菌数の比は約 1:5, 1:10, 1:20 とした。対照として PMN と血清を含まぬ系を作成した。上記混合液を 37°C で回転培養し、1, 2 時間後に PMN を浸透圧破壊し生菌数を算定した (Fig. 2)。

6. 菌体内活性酸素消去酵素活性の測定

上記と同様に、核抗菌薬を含有する感受性ディスクで一夜培養した菌を白金耳で集め、1/15 M リン酸緩衝

液 (pH 7.0) で洗浄し、10,000 G で集菌後 0.5 ml の 1/15 M リン酸緩衝液に懸濁した。超音波処理 (75 W, 15 秒) にて菌体を破壊し粗酵素液とした。

1) カタラーゼ活性の測定

石英セルに 3.0 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) と 50 μl の試料を入れ、37°C にて 1 M の過酸化水素 (H_2O_2) を 30 μl 添加した (最終濃度 10 mM)。転倒混和後 240 nm の吸光度変化を記録し、チャートに接線を書いて反応初速度を求めた。 H_2O_2 の 240 nm のミリモル吸光係数は 0.0394 であるので、次の式から H_2O_2 消費量を求めた²⁾。

$$\Delta A/\text{min} \times 3 \div 0.0394 = \text{タンパク量} = \text{H}_2\text{O}_2 \text{消費量} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg})$$

2) superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

大柳らの亜硝酸法に従って測定した^{3,4)}。この方法は、ヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼが作用して産生されたスーパーオキシド (O_2^-) が、ヒドロキシアミン-O-スルホン酸と波長 550 nm に吸光を有するアゾ色素を産生する反応を、SOD が阻害する率で

活性を求めるものである。SOD 活性は 50% 阻害に要する検体量を 1 亜硝酸単位 (nitrite unit; NU) とし、蛋白量当りの活性を求めた。

なおカタラーゼ、SOD 活性とも duplicate で測定した。タンパクの測定は Lowry 法によった。

II. 結 果

1. 多核白血球殺菌能

各薬剤の *E. coli* No. 59 株に対する MIC は CZON 0.025 ($\mu\text{g/ml}$, 以下同様) CBPZ 0.05, CMZ 0.39 であった。

これらの薬剤の 3 段階の濃度を含む培地で一夜培養した *E. coli* No. 59 株の殺菌曲線を Figs. 3~5 に示した。PMN が 2×10^6 個, すなわち PMN 1 個に対して菌

数約 5 個の場合, CZON および CBPZ の 1/2 MIC 下で培養した菌では 1 時間後に菌が消失していた。しかし CMZ では 2 時間後まで菌消失は認めなかった。PMN が 1×10^6 個の場合では CZON, CBPZ の 1/2 MIC が作用した菌では生菌数減少が CMZ 処理菌より明らかであった。PMN が 0.5×10^6 個, つまり PMN 1 個に対し菌数を 20 個まで増やした場合, PMN 単独では菌数減少が認められず殺菌作用が発揮されていなかったが, CZON と CBPZ 存在下で培養した菌ではその濃度に応じて生菌数の減少が認められた。これに対し CMZ では菌数減少はわずかであった。

さらに血清との協力作用の有無を検討したところ,

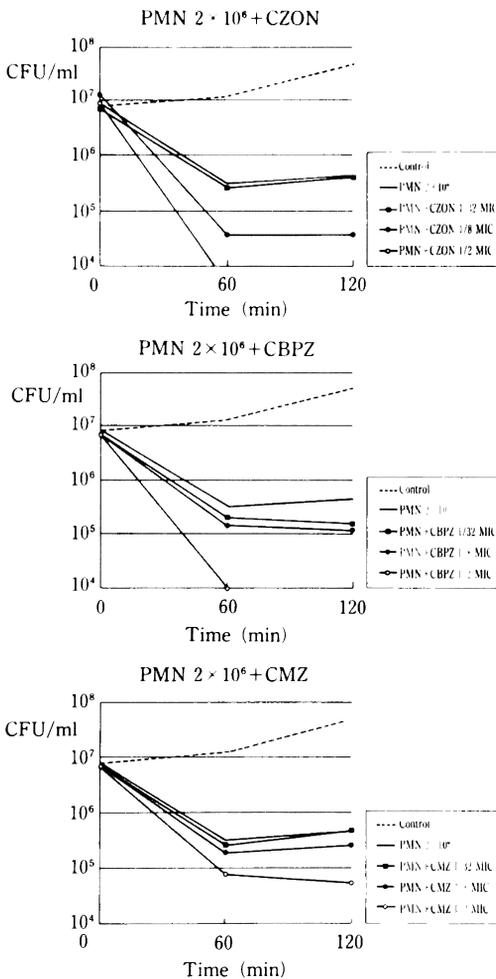


Fig. 3. Effect of cufuzonam, cefbuperazone and cefmetazole on killing of *Escherichia coli* No. 59 by human PMNs ($2 \times 10^6/\text{ml}$)

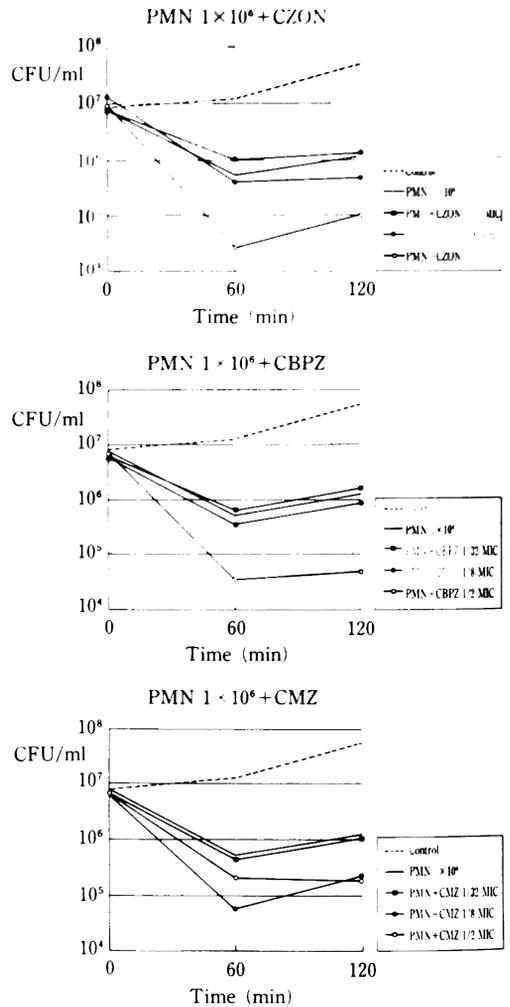


Fig. 4. Effect of cufuzonam, cefbuperazone and cefmetazole on killing of *Escherichia coli* No. 59 by human PMNs ($1 \times 10^6/\text{ml}$)

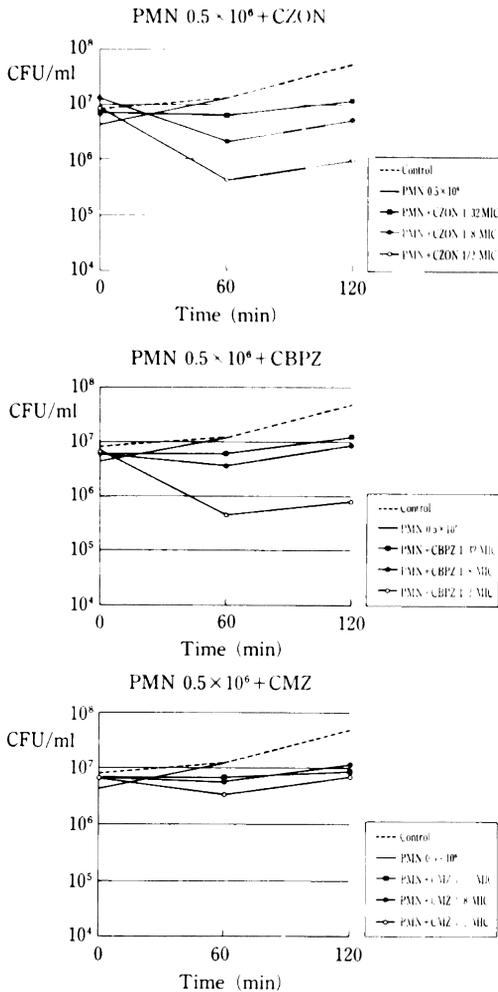


Fig. 5. Effect of cefuzonam, cefbuperazone and cefmetazole on killing of *Escherichia coli* No. 59 by human PMNs (0.5×10^6 /ml)

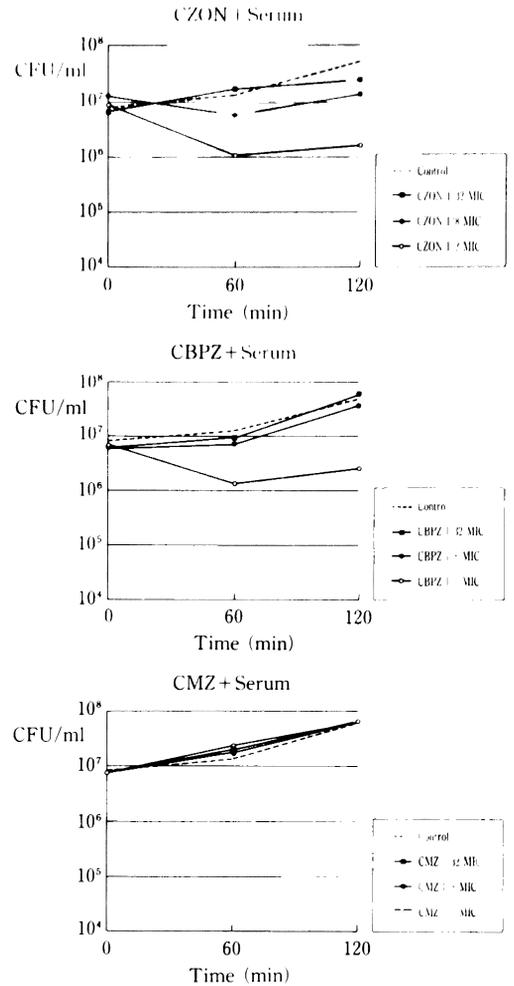


Fig. 6. Synergy of cefuzonam, cefbuperazone and cefmetazole for bactericidal effect of *Escherichia coli* No. 59 with human serum

CZON, CBPZ では 1/2 MIC で菌数減少が認められたが CMZ ではほとんど観察されなかった (Fig. 6)。

2. 菌体内カタラーゼ, SOD 活性の変化

カタラーゼ, SOD とも薬剤濃度に平行して活性が抑制される傾向であった。CZON は SOD, CBPZ はカタラーゼ活性の抑制が強い傾向だった (Fig. 7)。

III. 考 察

社会環境の変化にともない, なんらかの基礎疾患を有する症例やあるいは高齢者など生体防御能に障害をきたしていると思われる症例の感染症が増加している。これらの症例は一般に compromised host と称されるが, その定義ははっきりしていない。しかし, 一般に

末梢血中の白血球の数および機能の低下が有力な指標になることが知られる。

細菌感染症に対する host の生体防御能において多核白血球を中心とする食細胞系の役割は非特異的防御機構の中心として重要である。多核白血球の殺菌過程は詳細に解明されてきているが, スーパーオキシド (O_2^-) にはじまる活性酸素産生による酸素依存の系が主たる役割を担っているとされる。

このことは多核白血球の活性酸素産生能が先天的に欠落した慢性肉芽腫症患者が細菌感染を繰り返すことからうかがわれる。同症では特にカタラーゼ活性の高い菌の感染を反復することが知られている。これは同症患者多核白血球の過酸化水素 (H_2O_2) 産生能が著減

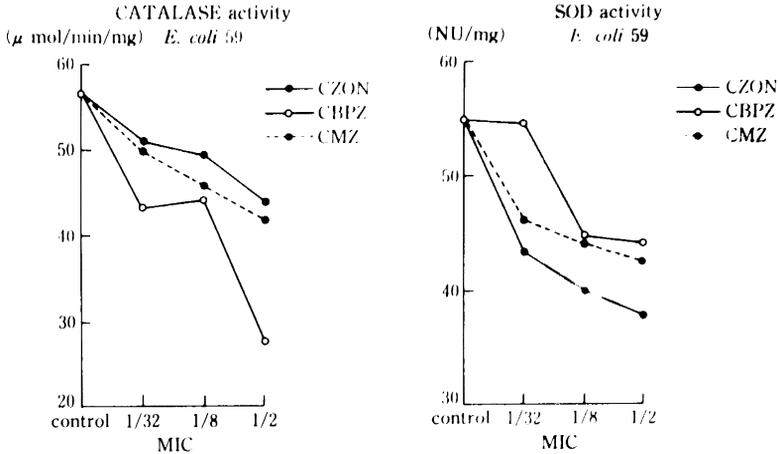


Fig. 7. Effect of cefuzonam, cefbuperazone and cefmetazole on catalase and SOD activity of *Escherichia coli* No. 59

しておりカタラーゼ活性の高い菌を殺菌できないためであろうと考えられる。

逆にみれば細菌側では host の多核白血球の産生する O_2^- や H_2O_2 の消去酵素である SOD やカタラーゼを有することにより多核白血球の殺菌作用に対抗していることになる。したがってその活性の強弱は菌力を規定する一要因と考えられる。

宮崎らはマウスの実験感染における成績で、グラム陰性桿菌 10 菌種で SOD およびカタラーゼ活性の高い菌種ほど菌力が強いこと、マウス多核白血球の貪食・殺菌に抵抗を示すことなどを報告している⁵⁾。その他にも細菌のカタラーゼ、SOD 活性については様々な報告がある。SOD の測定方法は報告者によって異なるが、結核菌やらい菌で SOD 活性が高く細胞内寄生菌として抵抗性が強いことの一因であろうとするもの⁶⁾、*Staphylococcus aureus* を用い、新生児マウスに接種したところカタラーゼと SOD 活性の高い菌ほどその後の体重増加が障害され、菌力が強いとするもの⁷⁾などがある。

細菌感染症の治療において、感染部位では多核白血球と細菌に加え抗菌薬を初めとする各種薬剤が関与してくる。したがって抗菌薬が host の生体防御能にどのように作用するかが問題になる。特に compromised host の細菌感染症治療にあたっては、生体防御能となんらかの協力作用を有する薬剤を選択することが望ましいといえる。

最近、*in vitro* の抗菌作用から想像される以上に *in vivo* 効果の優れる薬剤が報告されており、今回取り上げた CZON、CBPZ の他に cefpimizole (CPIZ)、

cefodizime (CDZM) などが知られる。その機序としてははまだ全容が明らかにされていないが、宿主の防御能、細菌、薬剤間でなんらかの相互作用が生ずるものと考えられる。これまで、抗菌薬と多核白血球の間では薬剤が、1) 直接多核白血球の殺菌能を賦活する、2) 菌体が多核白血球の貪食・殺菌作用を受けやすいようなんらかの変化が生じさせる、3) 多核白血球内に浸透して貪食された菌に対し抗菌力を発揮する、などの機序が想定されている。CBPZ、CZON についてもマウスを用いての実験で 2) の機序を支持する成績が報告されている^{8,9)}。また著者らは今回と同じ *E. coli* No. 59 株を用いたマウスの実験感染で CBPZ が MIC に比し検討薬剤中で最も優れた ED_{50} 値を示したことおよび、最も差のあった CMZ との間でヒト多核白血球との協力作用を検討したところ優れた協力的殺菌作用をあらわしたことを認めている¹⁰⁾。そこで今回 CBPZ、CMZ を対照として CZON のヒト多核白血球との協力作用を 2) の機序の面から検討した。

実際の生体内では、低濃度の抗菌薬が菌に作用する時間が長い。そこで今回は sub-MIC の薬剤が菌体におよぼす影響をみる目的でまず抗菌薬を sub-MIC 濃度を含む寒天平板で一晩培養したのち多核白血球に貪食させるという方法をとった。

これまでの薬剤と多核白血球の協力作用の評価は報告者によって一定しないことが多い。これは菌数、薬剤濃度、多核白血球数の設定が施設によって異なることが一因と思われる。そこで著者らは薬剤濃度と多核白血球数を変えて様々な組合せを作成することで客観的な評価ができるのではないかと考えている。

結果として多核白血球数が $2 \times 10^6/\text{ml}$ と多い場合のみならず 0.5×10^6 と少なく設定し、多核白血球単独では殺菌作用が認められなかった場合でもCZONのsub-MICで培養した菌はCBPZ同様殺菌を受けやすくなっていた。またこの両薬剤はその濃度に応じて*E. coli* No. 59株のカタラーゼおよびSOD活性を抑制した。ただし多核白血球との協力作用がこの2剤に比べわずかであったCMZでも、これらの酵素活性抑制はほぼ同程度であった。よってこれらの酵素活性抑制だけでは協力作用の強弱の説明はできないことになる。しかし、さきに述べたように今回用いた*E. coli* No. 59株はヒト血清にきわめて殺菌されがたい特徴を有するにもかかわらず、CZONおよびCBPZを作用させた場合、CMZに比して血清の殺菌作用を受けやすくなっていた。これはよりopsonizationを受けやすくなったことを反映すると考えられる。したがって、これら両薬剤の作用を受けた菌は容易に多核白血球に貪食され、その後の活性酵素による殺菌作用を受けるにあたってカタラーゼやSOD活性が低下しているため、 O_2^- や H_2O_2 を処理できずより容易に殺菌されCMZに比し生菌数の減少が著しかったのではないかと考えられる。また、今回は検討していないが菌体の形態変化の違いも薬剤間の協力作用の差に関与しているものと想像される。

カタラーゼやSOD活性が抗菌薬により変化した機序は不明である。第一に、CZONなど β -lactam剤は細胞壁を傷害するので、これらの酵素が菌体外に漏出したことが考えられる。しかし著者らは β -lactam剤以外の抗菌薬でもこれらの活性に影響をおよぼし、抑制するのみならず時にはむしろ誘導的に働くことを数種の菌で観察している¹¹⁾。したがって、酵素合成の段階にも抗菌薬が作用する可能性があると思われる。*E. coli*については、GardnerらがSOD合成の調節につき、thiolが抑制的に働くことなどを報告している¹²⁾。しかし抗菌薬との関係については従来報告がなく、他にレジオネラでcefmenoximeを用い検討した報告¹³⁾があるくらいであり、今後の検討課題と思われる。

今回は健常人多核白血球を用いての実験であったが、compromised hostと称される状態においては、多核白血球の活性酸素産生能がさまざまな程度に低下しているのが通常である。著者らは血糖コントロールの不良な糖尿病患者、特に1型糖尿病患者で、HbA_{1c}値に反比例して多核白血球のスーパーオキシド産生能が低下を示すことを認めている^{14,15)}。この活性酸素産生能低下は糖尿病患者が易感染性を示すことの一因と考えられる。

このような患者が細菌感染症に罹患した場合、使用した抗菌薬が細菌のカタラーゼやSOD活性に対し抑制的に働くことは多核白血球との協力的殺菌作用を強く発揮することにつながる可能性がある。また今回の成績で、多核白血球数が少ない場合でもCZONとCBPZは良好な協力作用を示していた。これらの結果から、CZONはCBPZ同様の良好なヒト多核白血球との協力作用を有し、実際の臨床多核白血球の機能低下あるいは数的減少の両方の場合において有用な薬剤である可能性があると思われる。

文 献

- 1) 日本化学療法学会：最小発育濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 2) Beers R F Jr., Sizer I W: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195, 133~140, 1952
- 3) 大柳善彦：SODの測定法問題点と病態時の活性変化。炎症 3: 261~267, 1983
- 4) 大柳善彦：SOD活性測定亜硝酸法とそのキット化。炎症 4: 63~73, 1984
- 5) 宮崎修一，他：実験的敗血症における各種グラム陰性桿菌の菌力の解析—各菌種のsuperoxide dismutaseおよびcatalase活性と好中球の貪食殺菌との相関—。日本細菌学雑誌 41: 535~539, 1986
- 6) 楠瀬正道：抗酸菌のスーパーオキシド・ジスムターゼ。結核 57: 707~710, 1982
- 7) Kanahani H, Martin S: Catalase and Superoxide Dismutase Activities in Virulent and Nonvirulent *Staphylococcus aureus* Isolates. J. Clin. Microb. 21: 607~610, 1985
- 8) 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 (Suppl. 3): S 20~28, 1982
- 9) 横田 健，吉田玲子，他：L-105の抗菌力、 β -lactamase安定性、penicillin結合蛋白への親和性および補体・白血球との協力的殺菌作用。Chemotherapy 34 (Suppl. 3): S17~34, 1986
- 10) 熊坂義裕，中畑 久，平井裕一，他：Cefbuperazoneの*in vivo*効果に関する検討。The Japanese Journal of Antibiotics, 39: 154~158, 1986
- 11) 平井裕一，中畑 久，武部和夫，他：各種抗生物質の細菌SOD，Catalase活性におよぼす影響について。第36回日本化学療法学会総会，p 108, June, 9~11, 1988 (神戸)
- 12) Gardner P R, Fridvich I: Controls on the biosynthesis of the Manganese-containing Superoxide Dismutase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262: 1791~1795, 1987
- 13) 山口恵三，朝野和典，賀来満夫，他：最近話題の感染症レジオネラ—本菌群によって産生される β -lactamaseおよびSuperoxide dismutase活性を中心の一。臨床病理 33: 892~897, 1985

- 14) 熊坂義裕, 中畑 久, 平井裕一, 他: 糖尿病患者多核白血球のスーパーオキシド産生能. 感染症学雑誌 57: 504~511, 1983
- 15) 中畑 久, 平井裕一, 辻野守泰, 他: インスリン依存性糖尿病 (IDDM) 患者多核白血球 Superoxide 産生能の検討. 感染症学雑誌, 投稿中

SYNERGETIC BACTERICIDAL EFFECT OF CEFUZONAM WITH HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Yuichi Hirai, Hisashi Nakahata, Rumiko Aoki,

Moriyasu Tsujino, Yoshihiro Kumasaka and Kazuo Takebe

Third Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine,

5 Zaifu-cho, Hirosaki 036, Japan

We evaluated the synergetic bactericidal effect of cefuzonam (CZON), a new cephem antibiotic, and human polymorphonuclear leukocytes (PMNs), using *Escherichia coli* No. 59, which is known to be resistant against human serum as a model. The effect was also compared with those of cefbuparazone (CBPZ) and cefmetazole (CMZ). *E. coli* No. 59 became more susceptible to the bactericidal action of PMNs after overnight incubation with sub-MICs (1/32, 1/8, 1/2) of CZON. This enhancement of bactericidal action of PMNs was greater with CZON than CMZ and was almost the same for CZON and CBPZ. The activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase in the bacterium, known scavengers of active oxygens, were suppressed significantly by overnight exposure to sub-MICs of either CZON or CBPZ. Nevertheless, there was a trend toward observations that CZON suppressed SOD more profoundly than CBPZ, which in turn suppressed CBPZ catalase more than CZON. Our results suggest that CZON enhances the bactericidal property of PMNs by decreasing the resistance of bacteria against the PMNs' oxygen-dependent bactericidal system.