

## グラム陰性菌からのエンドトキシン遊離におよぼす抗菌剤の影響

—イミペネムと他剤の比較—

松田 耕二<sup>1)</sup>・柴田 兼良<sup>1)</sup>・真田 実<sup>1)</sup>中川 晋<sup>1)</sup>・川上 正也<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 萬有製薬株式会社つくば研究所, 創薬研究所<sup>2)</sup> 北里大学医学部分子生物学教室

(平成4年10月19日受付・平成4年12月7日受理)

大腸菌 ML 4707 もしくは緑膿菌 MB 5177 を非働化した馬血清中で培養し, 各種の  $\beta$ -ラクタム剤の endotoxin 遊離におよぼす影響を検討した。遊離 endotoxin 量は Endospacy® を用いて定量した。薬剤を含まない対照群では, 大腸菌で培養開始後 8 時間目に平均 91.5 ng/ml の endotoxin の遊離が観察された。Imipenem (IPM) もしくは mecillinam (MPC) 添加群では, その添加薬剤濃度にかかわらず対照群より endotoxin の遊離量が少なく, 最高でも対照群の 1/2 から 1/3 の endotoxin の遊離しか観察されなかった。一方, ceftazidime (CAZ) や latamoxef (LMOX) で処理した菌からの endotoxin の遊離量は, その濃度により異なり静菌濃度でもっとも多く, CAZ では対照群の約 4 倍, LMOX では約 3 倍の endotoxin の遊離が観察された。緑膿菌では, 大腸菌に比べ, endotoxin の遊離が緩徐で対照群では, 12 時間目に 62.3 ng/ml の endotoxin の遊離が観察された。大腸菌の場合と同様, IPM では, 試験したすべての濃度範囲で endotoxin の遊離量は対照群に比べ著しく少ない量 (平均 0.7 ng/ml) であった。Cefoperazone (CPZ), aztreonam (AZT), CAZ は, その静菌濃度では対照群の約 2 倍量の endotoxin の遊離が見られた。このように,  $\beta$ -ラクタム剤による endotoxin 遊離は  $\beta$ -ラクタム剤の種類とその濃度に影響されることがわかった。IPM は  $\beta$ -ラクタム剤の中でも, エンドトキシン遊離が少ない薬剤である。

**Key words:** endotoxin, imipenem, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

グラム陰性菌の細胞壁成分の 1 つであるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) は菌体内毒素 (endotoxin) として, 生体に対して様々な作用をおよぼすことが知られている<sup>1)</sup>。特に臨床上問題なのは, 細菌感染時に起こる血中遊離エンドトキシンによる発熱, DIC, エンドトキシンショックである。エンドトキシンショックに対する治療は, 一般のショックに対する緊急対応療法の外に, いくつかの新しい試みがなされている<sup>2)</sup>。抗菌剤は, 敗血症の治療には必要不可欠であるが, 逆に菌の急速な溶菌からエンドトキシンの大量誘発を招く恐れがある。抗菌剤によるエンドトキシン遊離についてはいくつかの報告がある<sup>3-6)</sup>。しかし,  $\beta$ -ラクタム剤について検討したものは少ない。今回, 我々は,  $\beta$ -ラクタム剤のエンドトキシンの遊離におよぼす影響について検討したので報告する。この研究の一部は第 40 回日本化学療法学会総会で発表した。

## I. 材料と方法

## 1. 材料

## (1) 使用菌株

マウス感染菌である *Escherichia coli* ML 4707 と *Pseudomonas aeruginosa* MB 5177 を用いた。

## (2) 使用薬剤は以下のものを使用した。

Imipenem (IPM), mecillinam (MPC), ceftazidime (CAZ), latamoxef (LMOX), aztreonam (AZT), cefoperazone (CPZ)。

## (3) 使用培地

増菌培養には Mueller-Hinton broth (Difco) を用いた。エンドトキシン遊離測定用培地は, 生体に近い条件にするため, 非働化 (56°C, 30 分) した馬血清 (IRVINE SCIENTIFIC, CA, USA) を用いた。

2. 血清中の菌の生育と遊離エンドトキシンの定量  
Mueller-Hinton broth (Difco) で 16 時間 37°C で

\* 茨城県つくば市大久保 3 番つくばテクノパーク大穂

振盪培養した菌液を、非働化した馬血清で10,000倍に希釈し、初発菌濃度を $5.0 \times 10^8$  CFU/mlに合わせた。L字管に10 mlずつ分注し、37°Cで毎分30振盪の条件で振盪培養 (TAIYO MONOSIN-II A, 大洋科学工業株式会社) した。培養開始後、2時間目に所定の濃度の薬剤を添加し、引続き6時間から10時間まで培養した。その間、2時間毎に一定量の培養液をサンプリングし、適宜希釈した後、普通寒天培地に塗抹し、生菌数を求めた。エンドトキシンの定量<sup>7)</sup>は、サンプリングした菌液をミリポアフィルター (マイルックス GS 0.22  $\mu$ m, 日本ミリポア工業株式会社) で除菌した後、過塩素酸 (PCA-1 set, 生化学工業)<sup>8)</sup> で処理し、エンドスペシー<sup>9)</sup> (生化学工業) で定量した。

### 3. 静菌濃度における各種薬剤のエンドトキシン遊離におよぼす影響

各種薬剤の静菌濃度 (IPM 0.78  $\mu$ g/ml, MPC 1.56  $\mu$ g/ml, CAZ 0.05  $\mu$ g/ml, LMOX 0.78  $\mu$ g/ml for *E. coli* ML 4707; IPM 0.78  $\mu$ g/ml, CPZ 0.2  $\mu$ g/ml, AZT 0.39  $\mu$ g/ml, CAZ 0.2  $\mu$ g/ml for *P. aeruginosa* MB 5177) で大腸菌の場合は6時間、緑膿菌の場合は10時間培養し、遊離エンドトキシンの量を測定した。各5回行い、平均値を求めた。対照群との比較はWelch法による二標本t検定より有意差検定を行った。

## II. 結 果

### 1. 菌の生育とエンドトキシン遊離におよぼす $\beta$ -ラクタム抗菌剤の影響

Fig. 1からFig. 4は、 $5 \times 10^8$  CFU/mlの*E. coli* ML 4707を馬血清中で37°Cで培養し、培養開始2時間目にIPM, MPC, CAZ, LMOXの1/4 MICから16 MICの濃度の薬剤を加え、薬剤添加後6時間まで培養した時の生育曲線とエンドトキシンの遊離量を示した。いずれの薬剤も薬剤添加後2時間目では、特に薬剤によるエンドトキシン遊離の効果は見られず対照群と同程度のエンドトキシンしか遊離していなかった。4時間目では、CAZとLMOXは、試験した全濃度範囲で対照群よりやや多くのエンドトキシンの遊離が見られ、さらに6時間目では、最大で対照の3から6倍のエンドトキシンの遊離が観察された。最大のエンドトキシン遊離を引き起こす薬剤濃度はCAZで1/4 MIC (0.05  $\mu$ g/ml) であり、LMOXでは2 MIC (0.78  $\mu$ g/ml) の濃度であった。なお、ここで用いたMIC値はMueller-Hinton agarで測定した時の値である。この最大エンドトキシン遊離を引き起こす薬剤濃度では、菌の生育は静菌的であった。一方、IPM

とMPCでは試験したいずれの時間でも、またどの濃度でも対照より低い量のエンドトキシンの遊離しか観察されなかった。MPCは薬剤濃度を上げてても殺菌的には作用せず、3.13  $\mu$ g/ml以上の濃度では静菌的であったにもかかわらず、エンドトキシンの遊離量は対照より少なかった。IPMでも同様な傾向が見られたが、生育曲線が対照に近づくにつれ、そのエンドトキシンの遊離量も対照群に近い値となった。個々のデータは示さないが、緑膿菌についても、IPM, CPZ, AZT, CAZの各薬剤の濃度とエンドトキシンの遊離量について検討した。対照群では、大腸菌に比べ、一般にエンドトキシンの遊離が遅い傾向にあり、8時間までは、その量は対照群の約1/10以下であった。10時間目になって大腸菌なみのエンドトキシンの遊離が観察された。大腸菌と同様にIPMほどの濃度でもエンドトキシンの産生量は対照群より少なく、また大腸菌の場合に比べ、その量は著しく少なかった。他の薬剤では、その静菌濃度では対照より多くのエンドトキシンの遊離が観察された。

### 2. 静菌濃度におけるエンドトキシンの遊離

前項の実験結果から、大腸菌、緑膿菌のいずれも静菌濃度において、もっとも多くのエンドトキシンを遊離していることが分かった。そこで、各薬剤の静菌濃

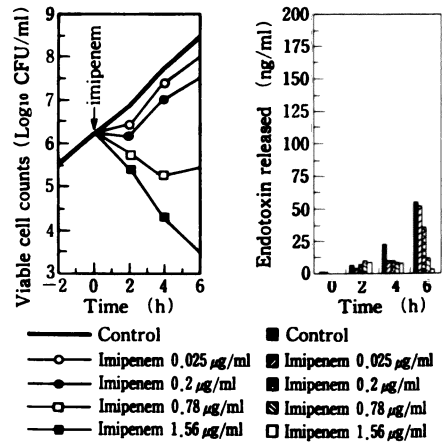


Fig. 1. Effect of imipenem on the growth of *Escherichia coli* ML 4707 and the release of endotoxin.

Left figure indicates the effect of imipenem on the growth of *E. coli* ML 4707. Imipenem was added after 2 h incubation (indicated by arrow). Right figure indicates endotoxin release from *E. coli* with the addition of imipenem.

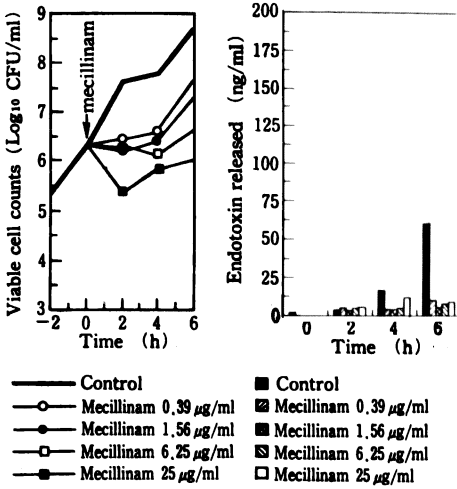


Fig. 2. Effect of mecillinam on the growth of *Escherichia coli* ML 4707 and the release of endotoxin.

Left figure shows the effect of imipenem on the growth of *E. coli* ML 4707. Mecillinam was added after 2 h incubation (indicated by arrow). Right figure shows endotoxin release from *E. coli* with the addition of mecillinam.

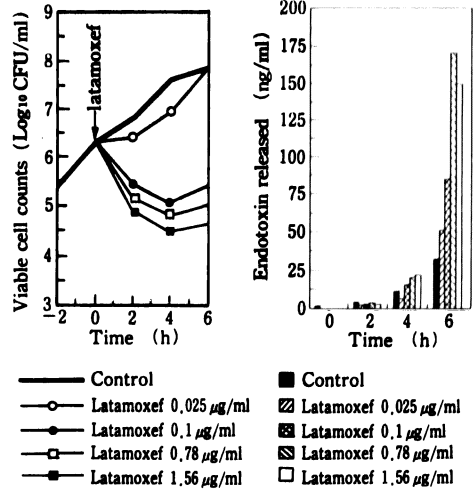


Fig. 4. Effect of latamoxef on the growth of *Escherichia coli* ML 4707 and the release of endotoxin.

Left figure depicts the effect of latamoxef on the growth of *E. coli* ML 4707. Latamoxef was added after 2 h incubation (indicated by arrow). Right figure depicts endotoxin release from *E. coli* with the addition of latamoxef.

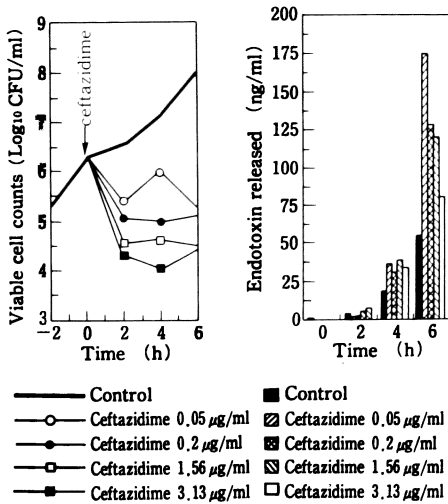


Fig. 3. Effect of ceftazidime on the growth of *Escherichia coli* ML 4707 and the release of endotoxin.

Left figure illustrates the effect of ceftazidime on the growth of *E. coli* ML 4707. Ceftazidime was added after 2 h incubation (indicated by arrow). Right figure illustrates endotoxin release from *E. coli* with the addition of ceftazidime.

度におけるエンドトキシンの遊離量を比較した (Figs. 5, 6). 静菌濃度の薬剤で大腸菌の場合は6時間、緑膿菌の場合は10時間菌を処理した場合のエンドトキシンの遊離量を各5回ずつ実験し比較検討した (各薬剤の静菌濃度は材料と方法の項を参照)。大腸菌では、対照群の遊離エンドトキシン量は平均91 ng/mlで、LMOXとCAZで処理した菌からは、それぞれ平均275 ng/mlと398 ng/mlと明らかに対照群より有意に高いエンドトキシンの遊離が観察された ( $P < 0.01$ )。一方、IPMでは36.1 ng/ml、MPCでは44.6 ng/mlのエンドトキシンが遊離し、IPMでは、対照群に比べて有意にエンドトキシンの遊離が少なく ( $P < 0.05$ )、MPCによるエンドトキシン遊離量は対照群に比べ少ないものの有意差は見いだせなかった (Fig. 5)。

緑膿菌では、対照群の遊離エンドトキシン量は平均62 ng/mlであり、IPMでは0.7 ng/mlと大腸菌に比べて極端に少ない量のエンドトキシンしか遊離しなかった ( $P < 0.01$ )。一方CPZ, AZT, CAZではそれぞれ108 ng/ml, 119 ng/ml, 119 ng/mlで、AZTとCAZは対照より有意に高いエンドトキシンを遊離していた (AZT,  $P < 0.05$ ; CAZ,  $< 0.01$ )。CPZは対照

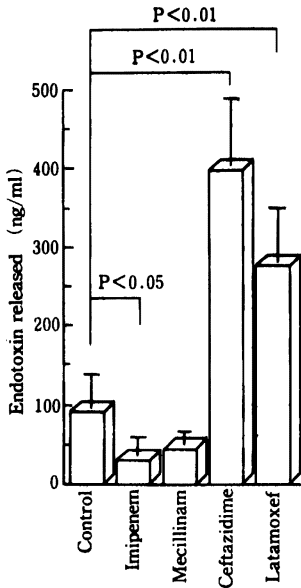


Fig. 5. Release of endotoxin from *Escherichia coli* ML 4707 at the bacteriostatic concentration of each antibiotic.

Amounts of endotoxin released from *E. coli* exposed to each antibiotic for six hours are represented as mean  $\pm$ SD of five experiments.

と有意差がなかった (Fig. 6)。顕微鏡観察から、IPMとMPCは、スフェロプラストを経て溶菌していくのが観察され、大腸菌で多量のエンドトキシンを遊離したCAZとLMOXははなはだしい菌の伸長が観察された。緑膿菌では、CPZ、AZT、CAZは対照群の菌に比べてやや伸長している像が観察されたが大腸菌ほどではなかった。

### III. 考 察

敗血症の治療として抗生物質の投与は必須である。しかし、抗菌作用の結果、エンドトキシンが遊離されることが *in vitro*, *in vivo* で示されている<sup>3-6)</sup>。今回、我々は馬血清中で生育している大腸菌もしくは緑膿菌に各種の $\beta$ -ラクタム剤を添加し、経時的に生菌数と遊離エンドトキシン量を測定した。その結果、大腸菌では、IPMとMPCは殺菌力が違うにもかかわらず、エンドトキシンの遊離量が対照に比べ少ないことがわかった。一方、CAZやLMOXでは、その静菌濃度で対照より有意に高いエンドトキシンを遊離した。同様に、緑膿菌では、IPMは試験したすべての濃度で明らかに対照より低いエンドトキシンしか遊離しなかつた。

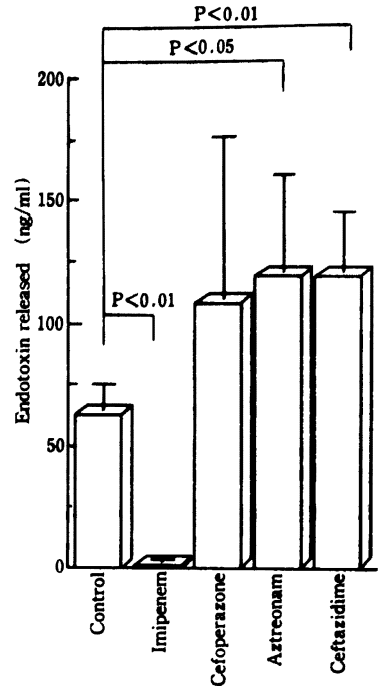


Fig. 6. Release of endotoxin from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5177 at the bacteriostatic concentration of each antibiotic.

Amounts of endotoxin released from *P. aeruginosa* exposed to antibiotic for 10 hours are represented as mean  $\pm$ SD of five experiments.

Jerryらはchloramphenicol (CP), gentamicin (GM), LMOXについて *in vivo* のエンドトキシン遊離量を測定し、CPにはエンドトキシン遊離作用はなく、GMとLMOXではエンドトキシン遊離量が多く、殺菌力がおなじでも、LMOXの方が、GMの20倍も多いと報告している<sup>9)</sup>。彼らはその理由として、GMがエンドトキシンを吸着するためとしている。このように使用する抗生物質により、エンドトキシンの遊離量に差がある。しかし、 $\beta$ -ラクタム剤の中でエンドトキシンの遊離量を検討したものは少ない。我々は、大腸菌に対してはIPMとMPCはエンドトキシンを遊離しにくく、CAZとLMOXにはエンドトキシン遊離量が多いことを見出した。また、緑膿菌では、IPMによるエンドトキシン遊離量がきわめて少ないのに対して、CPZ、CAZ、AZTでは対照より多いエンドトキシンの遊離が見られたが、大腸菌の場合のほどではなかった。このように $\beta$ -ラクタム剤の中でもその種類によってエンドトキシンの遊離に差があ

ることがわかった。池邨らは、ある種の抗生物質はリムルステストの測定に干渉すると報告している<sup>10)</sup>。予備実験から、我々が使用した抗生物質の濃度範囲では、薬剤がエンドトキシンの測定に何等支障がないことを確認した。したがってこのエンドトキシンの遊離に差があるのは、測定法に対する抗生物質の影響に起因するものではない。顕微鏡観察の結果から、菌の形態変化とエンドトキシンの遊離に密接な関係があることが示唆された。すなわち、 $\beta$ -ラクタム剤による菌の伸長が見られない IPM や MPC ではエンドトキシンの遊離が対照より少なく、大腸菌に著しい菌の伸長を引き起こす CAZ や LMOX では対照の何倍ものエンドトキシンの遊離がみられること、また、同じ薬剤でも菌の伸長がそれほどでもない緑膿菌に対しては対照の2倍程度のエンドトキシン遊離に終わっていること、さらに、菌の形態変化を引き起こさない程度の十分量の薬剤ではいずれの薬剤でもエンドトキシンの遊離が少ないことなどから、菌の伸長に伴う表面積の増大がエンドトキシンの遊離に関係しているものと推察される。いずれにしろ、薬剤の濃度に関係なくエンドトキシンの遊離が少ない IPM はエンドトキシンショックの危険が少ないと期待される薬剤といえる。

#### 文 献

- 1) 本間 遜監修, 岩永貞昭ほか編集, “内毒素” 医歯薬出版, 東京 (1983)
- 2) Kodama M: New therapeutic method against septic shock. International Symposium of endotoxin, Jichi Medical School, May 13, 1988, Program and Abstracts SV-5
- 3) Cohen J, McConnell J S: Release of endotoxin from bacteria exposed to ciprofloxacin and its prevention with polymyxin B. Eur. J. Clin. Microbiol. 5: 13~17, 1986
- 4) Goto H, Nakamura S: Liberation of endotoxin from *Escherichia coli* by addition of antibiotics. Jpn. J. Exp. Med. 50: 35~43, 1980
- 5) Rokke O, Revhaug A, Osterud B, Giercksky K E: Increased plasma levels of endotoxin and corresponding changes in circulatory performance in a porcine sepsis model: the effect of antibiotic administration. Prog. Clin. Biol. Res. 272: 247~262, 1988
- 6) Shenep J L, Barton R P, Mogan K A: Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for experimental gram-negative bacteria sepsis. J. Infect. Dis. 151: 1012~1018, 1985
- 7) Kakinuma A, Asano T, Torii H, Sugino Y: Gelation of *Limulus* amoebocyte lysate by an atitumor (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 434~439, 1981
- 8) Tamura H, et. al.: Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using synthetic chromogenic substrate for horse-shoe crab clotting enzyme. Thromb. Res. 27: 51~57, 1982
- 9) Hurley J C, Louis W J, Tosolini F A, Carlin J B: Antibiotic-induced release of endotoxin in chronically bacteriuric Patients. Antimicrob. Agents and Chemother. 35: 2388~2394, 1991
- 10) 池邨勝美, 田中 裕, 吉岡敏治, 杉本 侃: 血液製剤, 抗生物質やサルファ剤による合成基質法リムルステストおよびエンドトキシン特異的テストへの干渉. 臨床病理 38: 87~92, 1990

Comparative effect of imipenem and other  $\beta$ -lactam antibiotics on the release of endotoxin from gram-negative bacteria

Kouji Matsuda, Kaneyoshi Shibata, Minoru Sanada  
and Susumu Nakagawa

New Drug Discovery Research Laboratories, Tsukuba Research Institute Tsukuba  
Techno-Park Oho, Okubo 3, Tsukuba, 300-33, Japan

Masaya Kawakami

Molecular Biology Department Kitazato University, School of Medicine

We investigated the effects of  $\beta$ -lactam antibiotics on the release of endotoxin from *Escherichia coli* ML 4707 and *Pseudomonas aeruginosa* MB 5177 cultured in inactivated horse serum. Endospacy®, a specific reagent for endotoxin, was used for estimation of released endotoxin. *E. coli* without exposure to  $\beta$ -lactam antibiotics (control) released 91.5 ng/ml of endotoxin after six hours of cultivation. *E. coli* with exposure to imipenem or mecillinam released less endotoxin than did controls at all concentration ranges tested. In contrast, *E. coli* with exposure to ceftazidime or latamoxef at bacteriostatic concentrations released three or four times more endotoxin than did controls. *P. aeruginosa* without exposure to antibiotics (control) released 62.3 ng/ml after 10 hours of cultivation. Imipenem-exposed *P. aeruginosa* released less endotoxin than did controls. *P. aeruginosa* exposed to cefoperazone, aztreonam or ceftazidime released about twice as much endotoxin as controls. These results demonstrate that release of endotoxin caused by  $\beta$ -lactam antibiotics depends on the type of  $\beta$ -lactam antibiotic used, the concentration and associated morphological changes, rather than antibacterial activity. Imipenem-exposed organisms released less endotoxin than did those exposed to other  $\beta$ -lactam antibiotics, because gram-negative bacteria are lysed by imipenem via their spheroplast forms, but not via elongation.