

In vitro と in vivo における *Klebsiella pneumoniae* の増殖に およぼす抗菌薬と白血球の協力作用

宇治 達哉・古川 哲心・清水 千絵

兵頭 昭夫・石田 直文

大鵬薬品工業株式会社製薬センター化学療法剤研究所*

戸塚 恭一・清水 喜八郎

東京女子医科大学内科

(平成5年6月24日受付・平成5年11月17日受理)

Klebsiella pneumoniae に対する gentamicin, cefodizime および ceftazidime の再増殖抑制作用におよぼす白血球の影響を *in vitro* および *in vivo* で検討した。各薬剤の 4 MIC で前処理した菌の増殖は白血球存在下で薬剤非処理菌に比べ抑制された。一方、マウスの敗血症モデルにおいて、菌の増殖は各薬剤投与により X 線照射マウスに比べて正常および G-CSF 投与マウスで有意に抑制された。これらのことより、gentamicin とともに cefodizime, ceftazidime においても生体防御因子との協力作用により、再増殖抑制効果の増強が認められることが明らかとなった。

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, *in vivo* PAE, 白血球, gentamicin, cefodizime

抗菌薬の投与方法については従来より抗菌力と体内動態を中心として論じられてきたが、近年、postantibiotic effect (PAE) が注目され、薬剤投与の重要な指標の1つと考えられている^{1,2)}。PAE は一般に carbapenem 系を除く β -lactam 剤ではグラム陽性菌についてのみに、また、アミノグリコシド、キノロンなどではグラム陽性菌、陰性菌の広範な菌種におよんでみとめられる。PAE の測定は、*in vitro* では一定濃度の薬剤で処理した菌の再増殖速度を、*in vivo* では生体内の薬剤濃度が MIC 以下にいたった時点からの再増殖速度を観察する方法が主たるものである。しかし、臨床の抗菌薬投与を考える場合、宿主の感染防御能や sub-MIC の影響などを含めた観点から検討することが必要と考えられる。

PAEに加えて postantibiotic leukocyte enhancement (PALE)³⁾ や最近 postantibiotic sub-MIC effect⁴⁾ などが検討され、抗菌薬の投与方法に関して新たな考え方が導入されようとしている。

今回、*Klebsiella pneumoniae* を用いて gentamicin (GM), cefodizime (CDZM) および ceftazidime (CAZ) のヒト多形核白血球 (PMN) 存在下における再増殖抑制作用を観察し、さらに生体内における作用を検討するためにマウス敗血症モデルにおける白血球の影響を検討した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Gentamicin (GM, Sigma), cefodizime (CDZM, 大鵬薬品工業), ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ) を使用した。

2. 使用菌株

スキムミルク保存の *K. pneumoniae* BK 株を使用した。培養には heart infusion broth (Difco) を用い、37°C, 18時間培養した後、同 broth にて10倍に希釈しさらに2時間振盪培養した。なお液体希釈法による MIC は GM 0.78, CDZM 0.20, CAZ 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

3. 使用動物

ddY 系、雄、4週齢のマウス (SLC) を使用した。なお、マウスは感染前4日間 G-CSF (キリン) 2 μg または 8 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ を皮下投与したもの、感染3日前に X 線 65 Gy を照射したものおよび非処理マウスを使用した。X 線は実験小動物 X 線照射装置 (MBR-1505 R, 日立) を用いた。また、これらマウスについて感染当日に末梢血液中の白血球分画を測定した。

4. 薬剤処理菌に対する PMN の食食殺菌作用

* 徳島市川内町平石夷野 224-2

Heart infusion broth で培養した *K. pneumoniae* BK 株を各薬剤の 4 MIC を含有する同 broth で最終 10^8 cfu/ml に調製し、1 時間ゆるやかに振盪培養した。この菌液を 10 倍に希釈し、その 0.1 ml をヒト PMN をヒト血清 15% 添加した minimum essential medium (極東) に加え、全量を 1 ml とした (PMN: 10^6 cells/ml)。これを 37°C で振盪し、経時的に生菌数を測定した。また、PMN を添加しない場合についても同様に測定した。ヒト PMN は、健康人より採取した血液を 4.5% dextran 溶液と混合後 5°C で静置し、その上清を Ficoll-paque 比重液に重層、400 G で 30 分間遠心して分離した。In vitro の PAE は、薬剤処理後の菌数が $1 \log_{10}$ 増加するのに要する時間より薬剤非処理菌の菌数が $1 \log_{10}$ 増加するのに要する時間を引いた時間 (h) とした。PMN を添加した場合は薬剤処理菌が PMN 添加時の菌数に戻る時間より非処理菌が PMN 添加時の菌数に戻る時間を引いた時間 (h) を各々の PAE とした。

5. マウス敗血症モデルにおける薬剤の増殖抑制作用

Heart infusion broth で培養した菌液を 10 倍に希釈し、0.1 ml (3×10^6 cfu/mouse) をマウス尾静脈内に接種して敗血症モデルを作成した。薬剤は 5 mg/kg を菌接種 2 時間後に皮下投与し、経時的にマウスを放血致死させ血中生菌数を測定した。1 群マウス数は 3~6 匹とし、採血は腋下より行った。In vivo PAE は、薬剤投与とマウスの血中濃度が MIC 以下になる時点の血中菌数が $1 \log_{10}$ 増加するのに要する時間より非投与マウスの菌数が薬剤投与時から $1 \log_{10}$ 増加するのに要する時間を引いた時間 (h) であらわした。なお、感染マウスにおける血中濃度測定は、GM では *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を、CDZM, CAZ では *Escherichia coli* JCM 6225 を検定菌とするバイオアッセイ法により行った。算出した time above MIC は GM 2.2, CDZM 8.7, CAZ 2.1 時間であった。なお、5 mg/kg 投与時の各薬剤の C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$), $T_{1/2}$ (h), $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$) は GM 7.29, 0.39, 7.61, CDZM 9.26, 2.99, 51.56, CAZ 22.66, 0.26, 18.59 であった。

II. 結 果

1. 薬剤処理菌に対する PMN の再増殖抑制作用

各薬剤 4 MIC で 1 時間処理した菌の PMN 非存在下および存在下で培養したときの生菌数変化を Figs. 1, 2 に示した。

PMN 非存在下においては GM 処理菌で長時間にわたり再増殖抑制が認められた。それに対して

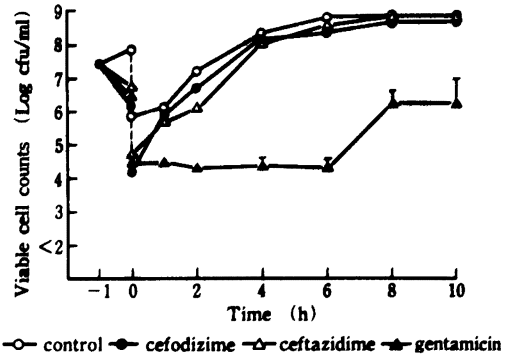


Fig. 1. Growth of *Klebsiella pneumoniae* BK pretreated with antibiotics in the absence of polymorphonuclear leukocytes.

Bacteria were incubated with 4 MICs of the antibiotic for 1 h.

Viable cell counts are shown as logarithmic means \pm SD of 3 samples.

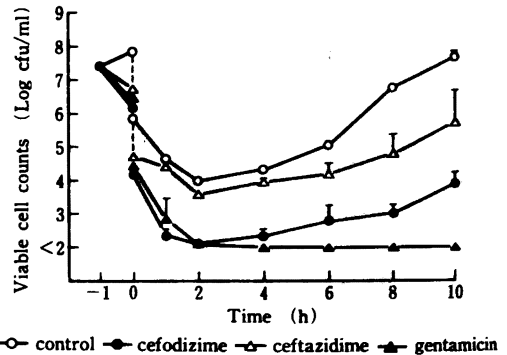


Fig. 2. Growth of *Klebsiella pneumoniae* BK pretreated with antibiotics in the presence of polymorphonuclear leukocytes.

Bacteria were incubated with 4 MICs of the antibiotic for 1 h.

Viable cell counts are shown as logarithmic means \pm SD of 3 samples.

CDZM, CAZ では薬剤除去後に急激な再増殖がみられた。

一方、PMN 存在下では薬剤非処理菌において培養 2 時間後まで生菌数の減少がみられたが、その後再増殖が起こり 10 時間後には 10^7 cfu/ml に達した。薬剤処理時の生菌数減少は 3 剤でほぼ同じであったが、培養開始 2 時間後の菌数減少は GM, CDZM 処理菌で大きかった。GM ではその後の再増殖が認められな

ったが、CDZM、CAZ では非処理菌に比しゆるやかに増殖した。これを PAE であらわすと、Table 1 のごとく GM、CDZM で 3 時間以上、CAZ では 0.8 時間であった。

2. マウス敗血症モデルにおける薬剤の再増殖抑制作用

感染当日における以下の 3 群のマウスの末梢血中白血球分画を Table 2 に示した。正常マウスの総白血球数は 3,717 cells/ μ l であったが、X 線照射マウスでは 100 cells/ μ l 以下に減少した。また、G-CSF 2 μ g 投与では 12,908、8 μ g 投与では 26,167 cells/ μ l に増加した。分画をみると好中球数が G-CSF 2 μ g 投与で正常マウスの約 7 倍に、8 μ g 投与で約 23 倍に増加した。このようなマウスに対して *K. pneumoniae* BK 株を尾静脈内に接種し、薬剤 5 mg/kg を投与したときの血中生菌数変化を Figs. 3~5 に示した。

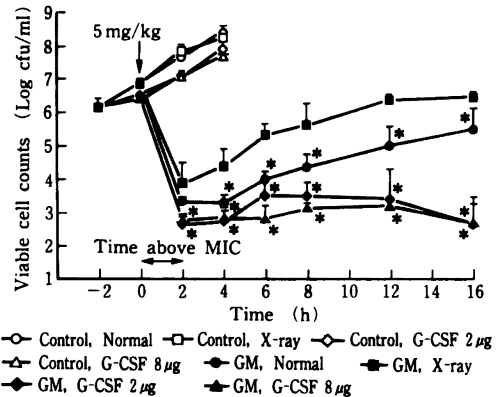
GM 投与マウスにおいてはいずれの処理マウスにおいても time above MIC が持続する 2 時間まで急激な菌数減少がみられ、その後 4 時間まで静菌的に推移した後再増殖が認められた。再増殖は X 線照射マウスにおいて顕著であり次いで正常マウス、G-CSF (2, 8 μ g) 投与マウスであった。G-CSF 2, 8 μ g 投与マウスではいずれにおいても 12 時間以後菌数が減少す

る傾向にあった。

CDZM 投与マウスにおいては、time above MIC の時間内で G-CSF 投与、正常、X 線照射マウスの順に菌数の減少が大きく、その後 X 線照射マウスにおいて急激な増殖がみられたのに対し、正常、G-CSF 投与マウスではほぼ一定の菌数を維持した。

CAZ 投与マウスでは time above MIC 以後の再増殖が GM、CDZM に比べて速かったが、その速さは GM、CDZM の場合と同様に X 線照射 > 正常 > G-CSF 投与マウスの順であった。

また、これらの再増殖抑制作用を *in vivo* PAE として Table 3 に示した。GM では G-CSF 投与マウスで 11 時間以上の PAE を示し、次いで正常マウスの 3.5 時間、X 線照射マウスの 1.1 時間であった。CDZM 投与マウスでは G-CSF 投与、正常マウスで 4



*P < 0.05 vs X-ray GM: gentamicin
Fig. 3. Growth of *Klebsiella pneumoniae* BK in the blood of mice treated with gentamicin. Each value is shown as the logarithmic mean \pm SD of 3 to 6 animals.

Table 1. *In vitro* postantibiotic effect (PAE) of antibiotic-pretreated *Klebsiella pneumoniae* BK in the presence or absence of polymorphonuclear leukocytes (PMN)

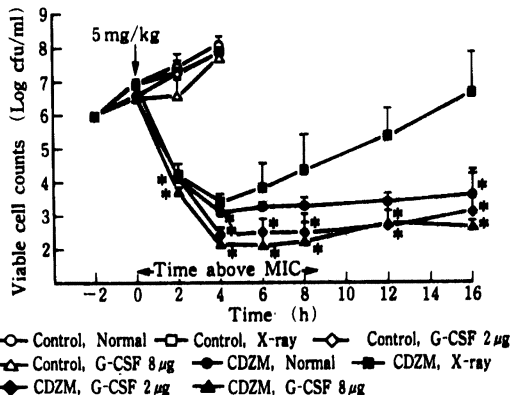
Antibiotics	PAE (h)	
	without PMN	with PMN
Gentamicin	5.6	>3.1
Cefodizime	-0.7	>3.1
Ceftazidime	-0.1	0.8

Table 2. Differential leukocyte counts in the blood of normal, X-ray irradiated and G-CSF treated mice

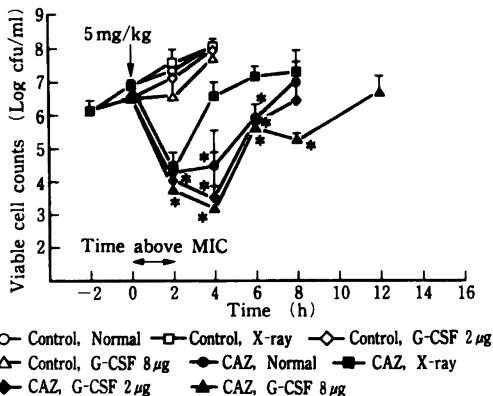
Mice	Leukocyte counts (cells/ μ l)					
	total counts	lymphocytes	neutrophils	monocytes	eosinophils	basophils
Normal	3,717 \pm 603	2,938 \pm 204	638 \pm 402	120 \pm 123	<59 \pm 32	<37
X-ray	<100	-	-	-	-	-
G-CSF (2 μ g/mouse)	12,908 \pm 3,881	7,708 \pm 2,878	4,708 \pm 2,059	571 \pm 271	<129 \pm 39	<129
G-CSF (8 μ g/mouse)	26,167 \pm 5,811	11,700 \pm 2,078	14,546 \pm 3,842	334 \pm 98	<262	<262

Mice were irradiated with 65 Gy from a cobalt-60 source 3 days before infection.

G-CSF was inoculated subcutaneously 4 consecutive days before the day of infection.



*P < 0.05 vs X-ray CDZM: cefodizime
 Fig. 4. Growth of *Klebsiella pneumoniae* BK in the blood of mice treated with cefodizime. Each value is shown as the logarithmic mean \pm SD of 3 to 6 animals.



*P < 0.05 vs X-ray CAZ: ceftazidime
 Fig. 5. Growth of *Klebsiella pneumoniae* BK in the blood of mice treated with ceftazidime. Each value is shown as the logarithmic mean \pm SD of 3 to 6 animals.

時間以上の PAE を示し、X 線照射マウスにおいては PAE は認められなかった。CAZ では G-CSF 投与マウスにおいても PAE は認められなかったが、正常、X 線照射マウスの順で再増殖速度が速くなる傾向が認められた。

III. 考 察

抗菌薬の投与方法については、抗菌薬の抗菌力と体内動態を中心にこれまで多くの検討がなされ、薬剤の系統によりその効果の発現が異なることが明らかになっている。Eagle ら⁶⁾によって最初にとらえられた PAE は、その後多くの研究者によってより深く研究され、一般に *in vitro* においてはグラム陽性菌に対してほとんどの抗菌剤が PAE を有するが、グラム陰性菌に対しては β -lactam 剤 (carbapenem 系を除く) は PAE を有さないことが通説となっている。近年、PAE の概念に対して生体内における様々な因子を加味した考え方が導入され、*in vivo* PAE に関する要因が検討されている。McDonald ら⁷⁾は、一定時間薬剤で処理した菌を白血球存在下で培養すると菌の増殖が白血球を添加しない場合と比べて遅延する現象を認め、これを PAE とした。さらに清水ら⁸⁾、Fantin ら⁷⁾は neutropenic と正常の動物を用いて *in vivo* PAE を検討し、正常状態の場合は neutropenic の場合に比べて PAE の延長がみられることを確認している。

今回の我々の検討において、*K. pneumoniae* を 4 MIC の GM で処理することにより *in vitro* PAE が認められたが、白血球存在下ではより強い再増殖抑制作用を示した。CDZM, CAZ は白血球非存在下では PAE はみられなかったが、白血球存在下では薬剤非処理菌に比べて長時間の再増殖抑制作用を認めた。また、G-CSF 投与により白血球数の増加したマウス、正常マウスおよび X 線照射により作成した白血球減少マウスを用いた敗血症モデルの検討では、いずれの薬剤投与によっても血中生菌数の減少は白血球数が多いほど大きく認められ、また再増殖も抑制された。特に PAE を有する GM 投与マウスではその傾向が顕著

Table 3. *In vivo* postantibiotic effect of antibiotics in G-CSF treated, normal and X-ray irradiated mice

Antibiotics	G-CSF (8 μ g)	G-CSF (2 μ g)	Normal	X-ray
Gentamicin	>11.0	>11.0	3.5	1.1
Cefodizime	>4.0	>4.0	>4.0	-0.3
Ceftazidime	-0.1	0.1	-0.4	-2.2

Postantibiotic effect is expressed in hours.

であり、いわゆる PALE がこのモデルにおいても発現されたものと考えられる。

一方、CDZM, CAZ においても GM と同様の作用が認められたことは、*in vitro* PAE を有さない以上、その他の要因が関与していると考えねばならない。特に CDZM は *in vivo* PAE として算出した場合、4 時間以上の値が得られた。この値は GM よりも大きな値である。

McDonald ら³⁾は ampicillin, cefoxitin で処理した *E. coli* の増殖が白血球存在下で抑制されることを報告し、Zhanell ら⁸⁾はヒト髄液と液体培地中での PAE を比較し、GM, ciprofloxacin のみならず cefotaxime においても髄液中での PAE を認めている。また、PAE に対して補体⁹⁾や抗体⁹⁾などの液性因子が増強効果を有することが示唆されている。本実験においても、CDZM, CAZ と接触した菌が PMN の食食殺菌作用を受けやすくなっていることが明らかとなり、このことが白血球がより多いマウスにおいて強い増殖抑制作用を示した理由のひとつと考えられる。CDZM と白血球の協力殺菌作用のメカニズムについては野村ら¹⁰⁾, Muratsugu ら¹¹⁾により詳細に検討されている。野村らは、*K. pneumoniae* は莢膜を産生することにより白血球の食食作用に抵抗性を示すが、CDZM で処理された菌では菌体表層（莢膜）構造の変化に伴い疎水性、補体親和性の亢進が観察され、これらのことにより食細胞と菌体が容易に接触し、次いで食食作用を受け殺菌されることを推察している。Muratsugu らは、CDZM で処理することにより *Staphylococcus aureus* の菌体表層電位が変化し、白血球の食食作用を受けやすくなることを示唆している。

近年、抗菌薬の *in vivo* PAE を論じるとき sub-MIC 期における作用が注目されてきている。アミノ配糖体系抗菌薬においては Torqvist ら⁴⁾が *Pseudomonas aeruginosa* に対して PAE 期に sub-MIC の amikacin を添加すると再増殖が抑制されることを報告した。また、Roosendaal ら¹²⁾は、ラットにおける *K. pneumoniae* 肺炎モデルにおいて CAZ の血中濃度が sub-MIC レベルであっても効力を発揮し、これが生体防御因子との協力作用によることを推察している。清水ら¹³⁾も半減期が長く sub-MIC が持続する薬剤は、半減期の短い薬剤に比べ postantibiotic sub-MIC effect を有した場合により有効に作用することを示唆している。sub-MIC の CDZM と各種生体防御因子との協力作用についても詳細に検討され、薬剤共存下で食食細胞¹⁴⁻¹⁶⁾, 補体¹⁷⁻¹⁹⁾との協力殺菌作用を有することが明らかにされている。マウス敗血症モデ

ルにおいて CDZM, CAZ の血中濃度が MIC 以下に低下したときにみられた再増殖速度が X 線照射 > 正常 > G-CSF 投与マウスの順であったことは、MIC 以上の薬剤濃度と接触した菌が白血球に対して感受性が高まったことに加え、sub-MIC の薬剤濃度と各種生体防御因子の協力殺菌作用があらわれたものと推察される。

なお、今回の実験で G-CSF 投与マウスの全血ケミルミネッセンス活性を zymosan を刺激物として測定したところ、好中球数の増加に比例したケミルミネッセンス活性の上昇が認められた。計算上の好中球 1 個当たりの活性（全血ケミルミネッセンス活性/好中球数）は正常マウスの好中球と同じレベルであったが、条件によっては好中球機能の上昇がみられる可能性もあり、今後の検討が必要と考えられる。

また、CDZM はマウスにおいても血中半減期が約 2.5 時間であり、ヒトの場合と同等の長い半減期を有するので、CDZM の生体内での作用を推測しえるデータになり得ることも考えられるかもしれない。

文 献

- 1) 戸塚恭一, 清水喜八郎: 抗菌薬の PAE と投与方法. 総合臨床 37: 2187~2190, 1988
- 2) Daikos G K: Continuous versus discontinuous antibiotic therapy: the role of the post antibiotic effect and other factors. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 27: 157~160, 1991
- 3) McDonald P J, Wetherall B L, Pruell H: Postantibiotic leukocyte enhancement: Increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. Reviews of Infectious Diseases 3: 38~44, 1981
- 4) Tornqvist I O, Lowdin E, Cars O: Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36: 1852~1858, 1992
- 5) Eagle H, Fleischman R, Levy M: Continuous vs. discontinuous therapy with penicillin. the effects of the interval between injections on therapeutic efficacy. New England Journal of Medicine 248: 481~488, 1953
- 6) 清水喜八郎, 戸塚恭一: 抗生物質の PAE と pharmacokinetic parameters. Medical Technology 17: 326~330, 1989
- 7) Fantin B, Ebert S, Leggett J, Vogelmann B, Craig W A: Factors affecting duration of *in-vivo* postantibiotic effect for aminoglycosides against Gram-negative bacilli. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 27: 829~836, 1990
- 8) Zhanell G G, Karlowsky L A, Davidson R J, Hoban D J: Effect of pooled human cerebrospinal fluid on the postantibiotic effects of cefotaxime,

- ciprofloxacin and gentamicin against *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 1136~1139, 1992
- 9) Sande M A, Korzeniowski O M, Allegro G M, Brennan R O, Zak O, Scheld W M: Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: Preliminary observations on the postantibiotic effect *in vivo*. *Reviews of Infectious Diseases* 3: 98~109, 1981
- 10) 野村秀一, 永山在明: β -ラクタム系抗生物質と食細胞の殺菌作用について. *Therapeutic Research* 12: 4023~4027, 1991
- 11) Muratsugu M, Tomonaga M, Miyake Y, Terayama K, Ishida N: Electrophoretic mobility of cefodizime treated *Staphylococcus aureus* and chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 28: 887~896, 1991
- 12) Roosendaal R, Bakker-Woudenberg I A J M, van der Berg J C, Michel M F: Therapeutic efficacy of continuous versus intermittent administration of ceftazidime in an experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *The Journal of Infectious Diseases* 152: 373~378, 1985
- 13) 菊池 賢, 清水喜八郎: PAE と臨床的意義. *日本臨床* 50: 1165~1172, 1992
- 14) 野村秀一, 永山在明: *In vitro* と *in vivo* での cefodizime による食細胞の殺菌相乗作用. *化学療法の領域* 8: 112~119, 1992
- 15) 宇治達哉, 野村秀一, 古川哲心, 三宅美行, 兵頭昭夫, 石田直文: 抗癌剤投与担癌マウスにおける cefodizime の感染治療効果. *化学療法の領域* 7: 110~116, 1991
- 16) 斧 康雄, 上田雄一郎, 馬場ますみ, 野末則夫, 芳賀敏昭, 村岡 啓, 西谷 肇, 国井乙彦, 宮下英夫: ヒト食細胞機能に及ぼす Cefodizime (THR-221) の影響. *Chemotherapy* 36 (S-5): 140~148, 1988
- 17) 横田 健, 野沢龍綱, 鈴木映子, 新井京子: Cefodizime (THR-221) の試験管内抗菌力, PBP に対する結合親和性および捕体, マウス培養マクロファージの協力殺菌作用. *Chemotherapy* 36 (S-5): 60~76, 1988
- 18) 三宅美行, 朝長正志, 東岡俊之, 山田雄次, 石田直文, 兵頭昭夫, 井上松久, 三橋 進: Cefodizime の実験的感染防御能低下マウスにおける治療効果について. *Chemotherapy* 36 (S-5): 128~139, 1988
- 19) Ono Y, Ueda Y, Baba M, Nishitani H, Kunii O: Influence of a subinhibitory concentration of antibiotics on opsono-phagocytic functions of *Klebsiella pneumoniae* by human phagocytes. *Chemotherapy* 37: 1487~1491, 1989

In vitro and *in vivo* cooperative suppression of the growth of *Klebsiella pneumoniae* by antibiotics and leukocytes

Tatsuya Uji, Tetsuo Furukawa, Chie Shimizu,
Akio Hyodo and Naobumi Ishida

Anticancer & Antimicrobial Research Lab. Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.,
224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

Kyoichi Totsuka and Kihachiro Shimizu

Department of Internal Medicine, Tokyo Women's Medical College

In vitro and *in vivo* effects of leukocytes on suppression of the growth of *Klebsiella pneumoniae* treated with gentamicin, cefodizime and ceftazidime were investigated. When bacteria pretreated with 4 MICs of each antibiotic were incubated with leukocytes, growth of the bacteria was suppressed more than in the absence of pretreatment. Bacterial growth in a mouse sepsis model was more suppressed in normal and G-CSF treated mice than in X-ray irradiated mice administered of each of the antibiotics. These results confirm that not only gentamicin but cefodizime and ceftazidime have suppressive effects on bacterial growth as a result of cooperative activity with host defense mechanisms.