

THE EFFECT OF A β -LACTAM ANTIBIOTICS IN SUB-MICS

Masaki Sakai¹, Toshikazu Tokuda¹, Atsushi Kishimoto¹, Hiroataka Okamoto¹,
Jun Takeuchi¹, Tatsuya Sawada¹, Tadao Nishimura¹, Hidechika Okada²

¹Department of Otorhynolaryngology, Fujita Health University 2nd Hospital

²Department of Molecular Biology, Nagoya City University

It was known that some β -lactam antibiotics have better activity against some bacterias in vivo than in vitro. We examined the effect of sub-MICs of CDZM on the killing of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* by human serum.

With $1/8 \sim 1/2$ MICs of CDZM, human serum killed *E. coli* and *Ps. aeruginosa* more efficiently than without CDZM. This

result suggested that sub-MICs of CDZM reinforced the activity of complements against *E. coli* and *Ps. aeruginosa*.

It was said that the activity of complements is not declined so in immunocompromised host.

We therefore expect CDZM to have good clinical utility also immunocompromised host.

β -ラクタム系抗生剤の最小発育阻止濃度以下での作用について（補体との協力作用）

酒井 正喜¹ 徳田 寿一¹ 岸本 厚¹ 岡本 啓孝¹
竹内 淳¹ 沢田 達哉¹ 西村 忠郎¹ 岡田 秀親²

¹藤田保健衛生大学第2教育病院耳鼻咽喉科

²名古屋市立大学医学部生体高分子学

様々な抗生物質が開発され臨床にその効果を発揮している今日、抗生物質の細菌に対する作用については様々な方面から研究がされており、ある種の β -ラクタム系抗生剤は、食細胞やマクロファージと協力的に働き in vivo において、in vitro より低濃度で効果を発揮することが知られている。^{1)~5)}

また、日和見感染などが問題となる免疫力の低下した患者でも血清補体価は比較的保たれている事が多いと言われている。^{6)~7)}

今回我々は、これらの抗生物質の中の cefodizime が、最小発育阻止濃度以下の濃度において細菌に与える影響について、補体に対する感受性の変化を指標にして研究し、若干の知見を得たので報告する。

目 的

最小発育阻止濃度（以後 MIC と略す）以下の濃度における cefodizime（以後 CDZM と略す）の細菌に対する作用について、細菌の血清（補体）感受性を指標にして検討する。

実験方法

i) 細菌の調整

細菌としては基本菌種として *Escherichia coli* を使用した。また日和見感染菌として、耳鼻咽喉科領域とりわけ慢性中耳炎や、悪性外耳道炎に検出されることの多いとされる^{8)~10)} *Pseudomonas aeruginosa* について検討することとした。*E. coli* は V6311/65株を、また *Ps. aeruginosa* は NCTC10490株を大鵬薬品工業株式会社開発研究所より分与していただき使用した。細菌は、Mueller-Hinton broth に混和し、36°Cにて約24時間振盪培養し、その数がほぼ 10^7 cfu/mlとなるように調整した。

ii) MIC系列の調整

まず CDZM (大鵬薬品工業株式会社製) を $100 \mu\text{g/ml}$ となるように生理食塩水に溶解し、Mueller-Hinton broth にて倍々希釈し MIC 系列を作成し培養に用いた。まず、あらかじめそれぞれの細菌に対する CDZM の MIC を Mueller-Hinton broth を用いて測定した。その結果では CDZM の MIC は、*E. coli* V6311/65株が $0.39 \mu\text{g/ml}$ で、*Ps. aeruginosa* NC TC10490株は $1.56 \mu\text{g/ml}$ であった。これらの結果をもとに $1/2 \sim 1/8$ MIC 濃度の broth を作成した。

iii) 血清の調整

血清は、健康な成人から採血した血液を、速やかに3000回転、15分間遠心分離し、得られた上清を回収、室温に約30分間放置したのち 1 m^3 づつに分取したうえで -80°C に冷凍し凍結保存した。この血清を用時融解して使用した。また血清の希釈には、同様の血清を、 56°C にて1時間非働化した非働化血清を用い、その補体活性が $1/2 \sim 1/32$ となるように調整した。

iv) 培養

あらかじめ CDZM の濃度が $1 \sim 1/4$ MIC となるように調整した broth にそれぞれ同量

の血清をその補体活性が $1/4 \sim 1/32$ となるように加えた、これにより CDZM の濃度は $1/2 \sim 1/8$ MIC となり、これにスタート時の菌量が 10^6 cfu/ml となるように全量の約 $1/10$ の菌液を混和し、インキュベーターにて 35°C 、約4時間振盪培養した。

v) 菌量のカウント

培養後、培養液を 0.2 ml とり、あらかじめ蒸留水を 1.8 ml づつ分注しておいた滅菌スピッツに 0.2 ml の定量ピペットマンを用いてつぎつぎに混和、希釈し10倍希釈系列とした。それぞれから速やかに内径 1 mm の定量白金耳にて希釈液を採取、BHL 寒天培地にひろげ、 35°C にて約48時間培養し、コロニーをカウントした。

結果

i) *E. coli* (Fig. 1)

E. coli は CDZM が全く存在しない状況下において培養したものは、血清の $1/16$ の補体価の存在下では、非働化血清のみで補体価なしの場合とほぼ同様の増殖を示し、 $1/8$ の補体価から増殖の抑制が認められた。これに対し CDZM を MIC の $1/8$ の濃度存在させて培養したものでは、血清の $1/16$ の補体価で細菌増殖の抑制が認められ、CDZM の濃度が高くなるにつれてより低い補体価で細菌増殖が抑制されることが確認された。

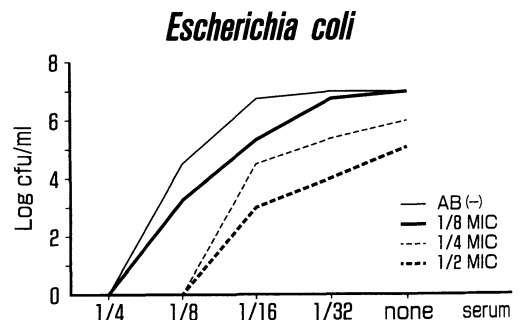


Fig. 1

ii) *Ps. aeruginosa* (Fig. 2)

Ps. aeruginosa においても同様に, CDZM が全く存在しない状況下において培養したものは, 血清の 1/32 の補体価の存在下では補体価なしの場合とほぼ同様の増殖を示したのに対し, CDZM を MIC の 1/8 濃度存在させて培養したものでは, 血清の 1/32 の補体価で細菌増殖の抑制が認められ, CDZM の濃度が高くなるにつれてより強く細菌増殖が抑制されることが確認された。

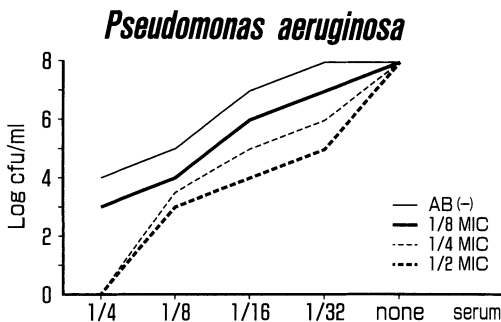


Fig. 2

考 察

i) sub-MICs での CDZM の作用

MIC 以下の濃度における抗生物質の作用についてはすでに様々な報告がなされており, 細菌のフィラメント化が起こる事^{11)~13)}や, 最小発育阻止濃度以下の濃度の抗生物質の存在下で, 好中球や, マクロファージによる細菌の被貪食能が高められること^{11)~13)}などが知られている。今回の我々の結果では, 細菌に対して直接静菌を示す濃度以下でも, 血清に対して感受性が高められた。これは, 補体に対する感受性を高めたことを意味していると考えられた。また, これまでのさまざまな報告から考えると, これまで言われて来たのと同じように CDZM のような細胞壁合成阻害作用のある薬剤は sub-MIC においても細菌の細胞壁に変化を与え, このことによって補体に対する感受性を変化させていると考え

られた。今後はこれらの薬剤が, 細菌の細胞壁に与える変化の本態についてさらに詳細な検討を行って行きたい。

ii) 日和見感染症への有用性

免疫不全状態の患者では, *Ps. aeruginosa* などのような弱毒菌に感染することが多く, 日和見感染症として問題となっている。また, 難治性の慢性中耳炎や, 悪性外耳道炎では *Ps. aeruginosa* が検出されその治療に難渋することも少なくない。^{8)~10)} そのうえ最近では, 我々耳鼻咽喉科領域においても高齢者や, 悪性腫瘍患者などの免疫力の低下した患者を取り扱う機会も多くなって来ている。品川らは Compromised host においても補体は正常に保たれていることがある¹⁴⁾と報告しており, このことも考え合わせると, このように補体感受性を高める薬剤は日和見感染症の患者にも有用な薬剤のひとつであると考えられる。

ま と め

1. MIC 以下の濃度における CDZM の作用について補体感受性を指標にして検討した。
2. 1/2~1/8MIC の CDZM は, *E. coli* 及び, *Ps. aeruginosa* の血清補体に対する感受性を高めた。
3. 補体感受性を高める薬剤は日和見感染症の患者にも有用であると考えられる。

文 献

- 1) Limbert M., Bartlett R. R., Dicknette G., et al. : Cefodizime an aminothiazolyl cephalosporin. IV influence on the immune systems, Jap. J. Antibiotics, 37(12) : 1719~1725, 1984.
- 2) Kasai K., Tsuji A., Miyazaki S., and Goto S. : In vivo antibacterial activity of cfodizime, a new cephalosporin antibiotic, Jap. J. Antibiotics, 37 (7) : 1306~1312, 1984.
- 3) Leyhausen G., Seibert G., Maidhof A. & üller W. E. G. : Differential Stimtla-

- tion of Lymphocyte Cell Growth In vivo by Cephalosporins, Antimicro. Agents Chemother, 26 : 752~756, 1984.
- 4) 野村秀一, 田縁晴子, 永山在明: セフェム系抗生剤 Cefodizime (THR-221) の in vitro 作用と生体防御系との協力作用, Chemotherapy, 36(S-5) : 117~127, 1988.
- 5) 辻 明良: in vitro 抗菌力と in vivo 抗菌力の相関についての解析, 第1回ワークショップ「感染防御能と化学療法」ライフサイエンス出版: 1~6, 1990.
- 6) 四辻 彰, 伊藤優子ら: β -Lactam 系抗生剤の sub-MIC に関する研究. 高齢者血清中での抗菌作用, Chemotherapy, 36 : 294~303, 1988.
- 7) 四辻 彰, 高畑正裕ら: β -Lactam 系抗生剤の sub-MIC に関する研究. Compromised host 血清中での抗菌作用, 感染症学雑誌64-12 : 1499~1506, 1990.
- 8) 猪熊哲彦, 関谷 透ら: 慢性中耳炎の細菌学的検討, 日耳鼻感染誌, 9 : 54~57, 1991.
- 9) 藤田博之, 渡部一雄ら: 当科における慢性中耳炎検出菌と薬剤感受性について, 日耳鼻感染誌, 9 : 50~53, 1991.
- 10) 佐藤 勇, 大谷 巖ら: 悪性外耳道炎の2症例, 耳鼻臨床補32 : 112~119, 1989.
- 11) Lorian V. : Some effects of subinhibitory concentration of penicillin on the structure and division of Staphylococci, Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 864~870, 1975.
- 12) 松本文夫: sub-MICs をとりまく臨床上の諸問題, 臨床と微生物, 12-1 : 6~12, 1985.
- 13) 生方公子: 菌側からみた sub-MICs の問題点について, 臨床と微生物, 12-1 : 13~23, 1985.
- 14) 品川長夫, 中村明茂ら: Compromised host における感染対策, 臨外, 39-3 : 313~318, 1984.

質 疑 応 答

質問 西村忠郎 (保衛大2)

今回 CDZM を選んだ理由は何ですか.

質問 新川 敦 (東海大)

- ① MIC 濃度以下で薬剤効果がある理由としてすべて補体の関与で説明してよいものか.
- ② 補体感受性を高める薬剤とは具体的にどういうものか.

応答 酒井正喜 (保衛大2)

in vivo で in vitro よりも効果が強いとのことで, その作用に注目し今回はこの薬剤を使用した. 今後さらに検討してゆきたい.

応答 酒井正喜 (保衛大2)

- ① 血清補体以外にも MIC 以下の濃度の抗生剤と協力作用を示すものとして貪食細胞などがある.
- ② CDZM の他には第3世代セフェムなどで同様に補体に協力作用を示すものがある.