

結核化学療法剤に対するリゾチームの共同作用 (第1報) 試験管内併用効果と血清総合抗菌力的にみた併用効果

月居典夫・佐々木貞雄・高橋利通

北大第一内科・国立札幌療養所

福田 晃

国立札幌療養所

受付 昭和40年7月16日

SYNERGIC ACTIVITY OF LYSOZYME IN COMBINATION WITH ANTITUBERCULOUS AGENTS*

Report I. Inhibitory Activity against *M. Tuberculosis* in vitro and
Synergic Effect in Vivo Measured by S. S. A. T. Method

Norio TSUKIORI, Sadao SASAKI, Toshimichi TAKAHASHI and Akira FUKUDA

(Received for publication July 16, 1965)

Experimental studies were made to evaluate the influences of lysozyme, a mucopolysaccharidase, upon *Mycobacterium tuberculosis* as well as to investigate its synergic actions with drugs for tuberculosis.

The results obtained are summarized as follows :

- (1) The minimum inhibitory concentration of lysozyme in vitro for the strains of $H_{37}R_v$, R-INH and R-SM were found to be 400 mcg/ml, 400mcg/ml and 200 mcg/ml, respectively.
- (2) The experiments on synergic actions of lysozyme with streptomycin, PAS or INH revealed that its synergic actions were quite evident both when lysozyme was adjunctively used with streptomycin against $H_{37}R_v$ strain and when it was used with SM or PAS against R-INH strain.
- (3) The addition of lysozyme to the incubated test tubes of *M. tuberculosis* resulted in the significant shrinkage and lysis of bacterial cells. This suggests that lysozyme possesses a potent bacteriolytic capacity.
- (4) In S. S. A. T. (specific serum antimycobacterial activity test) studies using rabbits, the synergic actions of lysozyme with kanamycin, streptomycin or INH against *M. tuberculosis* were observed to some extent.

緒 言

治療医学の領域でようやく脚光を浴びてきた酵素療法は、肺結核治療の分野でも例外でなく、その対症療法の一つとして蛋白分解酵素が採り入れられてきた。

リゾチーム (以下 LZ と略記する) は蛋白分解酵素とは異なり、生体内に広く分布し、粘膜あるいは結合織な

どの生合成、代謝に関与するムコ多糖類分解酵素であるとされており、臨床的にはその抗炎症作用、組織修復作用などの点から、この面での治療剤として使用されている。LZ はまた病原性細菌の一部に対し溶菌作用を有し、抗生物質とくにペニシリンと併用投与すると、ペニシリンの病巣内浸透性を高め、血中濃度を長時間維持することから、抗生物質との共同作用活性を有することが

* From the Hokkaido University, School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan.

Table 1. Growth Inhibitory Activity of Lysozyme in Vitro against Mycobacterium Tuberculosis

Strain	Lysozym (γ/cc)	0	0.5	1	5	10	50	100	200	400	500	1000
H ₃₇ Rv		+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
H ₃₇ Rv-R-INH		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
H ₃₇ Rv-R-SM		+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

Table 2. In Vitro Synergic Activity of Lysozyme in Combination with Streptomycin or INH or PAS (Growth inhibition)

		(H ₃₇ Rv)							(H ₃₇ Rv-R-SM)										
		Lysozym	0	0.5	1	5	10	50	(γ)	Lysozym	0	0.5	1	5	10	50	(γ)	100	
INH	0 (γ)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++		INH	0 (γ)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
	0.05	+++	+++	+++	+++	+++	++	++			0.05	+++	+++	+++	+++	++	+	+	
	0.1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++			0.1	+	+	+	+	+	±	-	
	0.5	-	-	-	-	-	-	-			0.5	-	-	-	-	-	-	-	
SM	0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++		SM	1	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
	0.1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++			5	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
	0.5	+++	+++	++	+	+	+	+		PAS	0	+++	+++	+++	+++	++	++	+	
	1	+++	++	+	+	+	+	+			0.05	++	++	++	++	++	++	+	
	5	-	-	-	-	-	-			1	-	-	-	-	-	-	-		
PAS	0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++		Media : Kirchner's media (10% bovine serum added)									
	0.01	+++	+++	+++	+++	+++	++	++		Amount of inoculum : 10 ⁻³ mg									
	0.05	+	+	+	+	+	±	-		Observation : After 3 weeks' incubation									
	0.1	-	-	-	-	-	-	-		実験方法									
		(H ₃₇ Rv-R-INH)																	
		Lysozym	0	0.5	1	5	10	50	(γ)										
INH	1 (γ)	+++	+++	+++	+++	+++	++	++											
	5	+++	+++	+++	+++	+++	++	++											
SM	0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++											
	0.05	+++	+++	+++	+++	+++	++	++											
	0.1	+++	+++	+++	++	+	+	-											
	0.5	-	-	-	-	-	-	-											
PAS	0	+++	+++	+++	+++	+++	++	++											
	0.01	+++	+++	+++	+++	+++	++	+											
	0.05	+++	+++	+++	++	+	+	-											
	0.1	-	-	-	-	-	-	-											

Media : Kirchner's media (10% bovine serum added)
 Amount of inoculum : 10⁻³ mg
 Observation : After 3 weeks' incubation

実験方法

1. 試験管内実験

10% 牛血清加 Kirchner 液体培地に LZ (結晶性卵白塩化リゾチーム製剤「ノイチーム」: エーザイ製品を使用) 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 500, 1000 mcg per ml になるように混入, それぞれの培地内に H₃₇Rv 株, H₃₇Rv-R-INH 株 (INH 10mcg 耐性菌) および H₃₇Rv-R-SM 株 (SM 10mcg 耐性菌) の蒸溜水菌浮遊液 10⁻³ mg ずつを接種, 37°C で3週間培養後, 菌の最少発育阻止濃度を測定した。

次に Kirchner 培地に SM 0.1~5 mcg/ml, INH 0.05~0.5 mcg/ml, PAS 0.01~0.1 mcg/ml を混入し, さらにこれに LZ 0.5~100 mcg/ml を併用混入し, 上記同様 H₃₇Rv 株, R-SM 株および R-INH 株を接種培養後, SM, INH, PAS との試験管内併用作用を確かめた。

2. 電子顕微鏡による菌体の観察

Dubos Tween-Albumin 培地に H₃₇Rv および R-SM 株 0.1 mg を接種, 37°C 7日間培養後8日目に培地 per ml 1,000 mcg の LZ を混入し, さらに7日間培養後, 蒸溜水で菌を3回洗浄し電子顕微鏡により菌の形態を観察した。

3. 血清総合抗菌力的実験

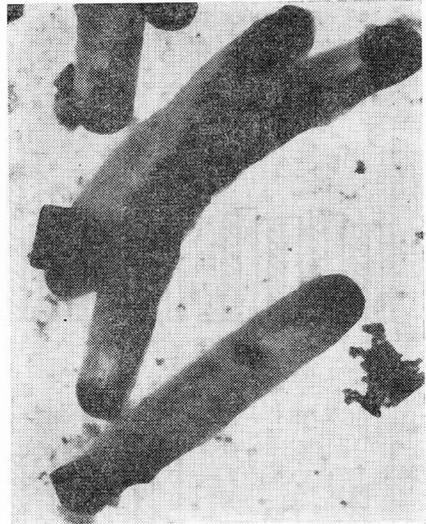
家兎に4日間にわたり SM, INH, KM, LZ を1日ごと単独投与, 第5日目から3日間は SM, INH, KM

報告されている。

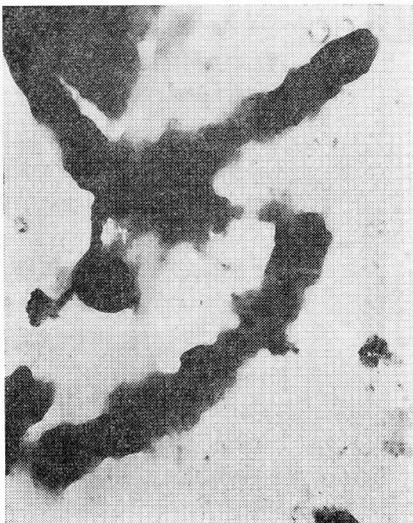
われわれは LZ の上述の諸性状に着目して, これが結核菌に対する影響および抗結核剤との共同作用の有無などを確かめようとして, 試験管内における単独あるいは抗結核剤併用による結核菌発育阻止状態, 電子顕微鏡的にみた結核菌形態に及ぼす影響, さらにわれわれがさきに報告した血清総合抗菌力検査による本酵素と抗結核剤との併用効果などについて一部の実験を行なった。



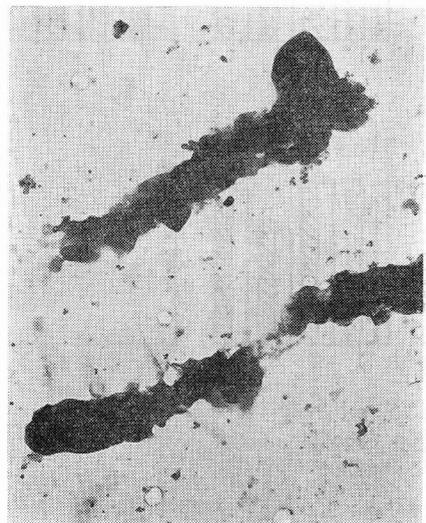
H₃₇Rv (Control)



H₃₇Rv·R-SM (Control)



H₃₇Rv (Lysozym)



H₃₇Rv·R-SM (Lysozym)

Fig. 1. Lytic Effect of Lysozyme on the Structure of Bacterial Cells

に LZ をそれぞれ併用投与、各薬剤投与1時間後に心臓穿刺により採血、その血清 1ml ずつを H₃₇Rv 株、R-INH 株、R-SM 株 10⁻³ mg ずつ接種した 1% 小川直立拡散培地管底に注加、直立したまま 37°C 3 週間培養後、液面よりの菌発育阻止帯を測定した。なお薬剤の投与量および方法は、SM、KM は per kg 150mg、INH は per kg 2mg、LZ は per kg 10mg を、いずれも溶液として筋注した。

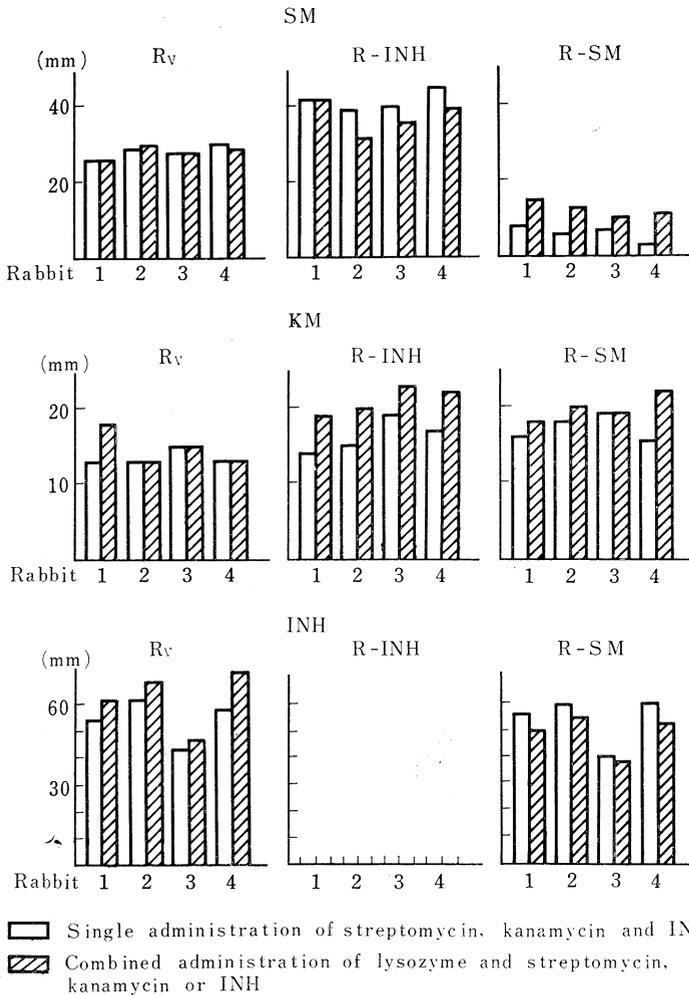
実験成績

1. リゾチームの試験管内結核菌発育阻止力および抗結核剤との併用作用成績は表1に示したが、これによると LZ の試験管内

結核菌最少発育阻止濃度は、H₃₇Rv 株および R-INH 株に対し 400 mcg per ml、R-SM 株には 200 mcg per ml であつた。

次に INH、SM および PAS との併用効果をみると(表2)、まず H₃₇Rv 株に対しては、INH・LZ および PAS・LZ の併用作用はまったく認められず、SM・LZ 併用の場合のみ SM 0.5 mcg と LZ 5 mcg で若干の併用効果が得られた。R-INH 株に対しては、INH との併用作用はみられなかつたが、SM 0.1 mcg と LZ 100 mcg、PAS 0.05 mcg と LZ 100 mcg の併用で完全に菌発育を阻止し併用効果が明瞭に認められた。R-SM 株に対しては、いずれの薬剤との併用によつても併用効果は認められなかつた。

Fig. 2. S. S. A. A. T Studies on Synergic Activity of Lysozyme and the Drugs for Tuberculosis (By vertical diffusion method)



結核 第40巻 第12号
は認めえなかつたが、R-SM株に対しては、SM単独投与の阻止帯長は家兎1で8mm、家兎2で6mm、家兎3で7mm、家兎4で3mmであり、LZ単独投与はいずれの家兎についても阻止帯は0mmであつたが、両者を併用した場合は、家兎1で15mm、家兎2で13mm、家兎3で11mm、家兎4で12mmと、いずれも相乗的に作用している成績が得られた。

KM・LZ併用投与の場合は、R-INH株およびR-SM株に対して両者の相乗効果が認められ、INH・LZ併用投与の場合はRv株のみに併用効果がみられた。

総括ならびに考案

リゾチームの溶菌性および抗生物質との共同作用活性に着目して、結核菌に対する抗菌性さらには抗結核剤との併用による試験管内ならびに生体投与後の成績について検討した結果、試験管内ではきわめて低弱ではあるがLZ単独で結核菌の発育を阻止すること、SM、INH、PASとの試験管内併用効果はSMと併用の場合のみ若干の相乗作用があることを認めた。

試験管内でのこの程度の抗菌力あるいは併用効果からは、ただちにリゾチームの結核臨床への応用を考慮

2. リゾチームによる結核菌形態の変化

図1にLZの作用によるH₃₇Rv株およびR-SM株の菌形態の変化像を示したが、対照菌(Dubos Tween-Albumin培地2週間培養)と比較すると、明らかに菌体の萎縮、菌膜の破壊あるいは原形質の漏出を想像する像が認められた。

なお今回の成績には報告しえなかつたが、Dubos Tween-Albumin培地に最初からper ml 200mcgのLZを混入し、H₃₇RvおよびR-SM株を接種し、2週間培養した実験の電子顕微鏡検査では、菌体の破壊が著しいため形態的にこれを把握しえず写真撮影が不能であつた。

3. 血清総合抗菌力的にみたリゾチームと抗結核剤の生体内併用効果

図2にみられるようにSM・LZの併用投与の場合では、Rv株およびR-INH株に対してはLZの併用効果

することは難しいが、電子顕微鏡による菌形態に及ぼす作用をみると、かなりの溶菌力が推定され、化学療法強化剤として実用に供しうものと思われる。

次に家兎にリゾチームと抗結核剤とを併用投与して、その効果を血清総合抗菌力の面から検討したところ、菌株の種類によつては、どの抗結核剤とも多少の相乗作用を示すことが分かつた。この方法は生体投与後のINHとサルファ剤との併用効果をみるために、さきに山田ら¹⁾が発表したものであるが、生体内における2種以上の薬剤の併用効果を知るための一助にはなるとと思われる。本実験ではリゾチームが量的に少なかつたせいか、著明な相乗作用は得られなかつたが、投与量をさらに増加すれば、より優れた成績が得られるようにも思われる。

リゾチームの結核菌あるいは結核症に対する作用は、すでにBestaら^{2)~18)}により若干報告もされておられ、肺結核治療面への本剤の応用は、抗結核剤の補助強化の意

味で今後希望をもてるものと考え。

結 語

ムコ多糖類分解酵素リゾチームの結核菌に対する影響ならびに抗結核剤との共同作用活性を実験的に検討し次の結論を得た。

1) リゾチームの試験管内結核菌最少発育阻止濃度は、H₃₇Rv 株および R-INH 株に対しては 400 mcg per ml, R-SM 株に対しては 200 mcg per ml であつた。

2) 試験管内における SM, INH, PAS とリゾチームの併用では、H₃₇Rv 株に対しては SM と、R-INH 株に対しては SM および PAS と若干の相乗作用を示した。

3) 試験管内で結核菌にリゾチームを作用させると、菌体はかなり顕著な萎縮破壊像を示し、リゾチームの溶菌性が推定できた。

4) リゾチームと抗結核剤とを家兎に併用投与し、血清総合抗菌力からその効果を検討したところ、KM, SM, INH 各薬剤とリゾチームとは相乗的に結核菌に作用することがうかがわれた。

撰筆にあたり、本研究を命ぜられかつご指導を恭うした、北大医学部第一内科 山田豊治教授に深謝するとともに、本研究に協力下された国立札幌療養所 宮城行雄所長、また「ノイチーム」を提供されたエーザイ株式会社に謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) 山田豊治・月居典夫：結核，40：277，1965.
- 2) Besta, B. : 1st International Symposium on Fleming's Lysozym, p.62, 1959.
- 3) Myrvik, Q.N. : Ibid. p.63, 1959.
- 4) Bracco, M., Collaboratori : Ibid. p.64, 1959.
- 5) Rottini E., Silvestri, G. : Ibid. p.64, 1959.
- 6) Leoncini, G. : Ibid. p.65, 1959.
- 7) Cavallo, G. : Ibid. p.66, 1959.
- 8) Bazzicalupo, C. : Ibid. p.67, 1959.
- 9) Gulotta, G., Storniello, G. : Ibid. p.68~69, 1959.
- 10) Corbia, A. : Ibid. p.70, 1959.
- 11) Moncalvo, F., Paolini, F.A. : Ibid. p.71, 1959.
- 12) Thacore, H., Willett, H.P. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 114 : 43, 1963.