

原 著

シゾフィランのマウス実験的結核症に対する抗結核効果

松 宮 恒 夫

埼玉県立小原療養所

齊 藤 健 利

東京大学医科学研究所

受付 昭和 51 年 11 月 8 日

ANTITUBERCULOUS EFFECT OF SCHIZOPHYLLAN (SPG)
ON THE EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS IN MICE

Tsuneo MATSUMIYA* and Taketoshi SAITO

(Received for publication November 8, 1976)

Schizophyllan (SPG) is a polysaccharide obtained from the culture fluid of *Schizophyllum commune*, and its fundamental structure is β -1, 3 linked glucan as shown in Figure 1. Its molecular weight is estimated to be about 50,000.

This substance does not exhibit any anti-microbial effect *in vitro*, however, it has been already indicated by Komatsu et al., that its intraperitoneal application elongate the life span of mice experimentally infected with coli bacilli, pseudomonas, fungus, tubercle bacilli and so on.

Such phenomena are explained as follows, that is, SPG would probably stimulate the reticuloendothelial system of the hosts and enhance their antimicrobial activity.

As we have proved the antituberculous effect of SPG *in vivo* as previously reported, our objects of these animal experiments are to clarify that such antituberculous effect of SPG is due to its special character, differently from the substances as Glycogen, Drakeol or Zymosan, and to find the most favorable administration conditions of SPG to show its antituberculous effect.

Experimental methods are presented in the following figures.

The results of our experiments are as follows:

Experiment 1. Comparison of survival effects of intraperitoneal administration of SPG, Glycogen and Drakeol in the mice experimentally infected with tubercle bacilli (Fig. 2). Intraperitoneal administration of SPG, Glycogen or Drakeol enhance the activity of intraperitoneal macrophage (i.e. phagocytic activity and hydrolysis enzyme activity). If the antimicrobial action of SPG is due to this phenomenon, Glycogen and Drakeol are also expected to show similar antituberculous effect. However, neither Glycogen nor Drakeol revealed *in vivo* any antituberculous effect in the same dosage as that of SPG.

Experiment 2-1. Comparison of antituberculous effect of SPG with Zymosan (Fig. 3).

Since SPG is a high molecular polysaccharide, we compared the antituberculous effect of SPG and other high-molecular polysaccharides, Zymosan, which increases the lysosomal enzymes of macrophages. However as to Zymosan, no antituberculous effect could be proved at all either

* From the Ohara Sanatorium, Osato-gun, Saitama Prefecture 360-01 Japan.

in the intraperitoneal or intramuscular application.

Experiment 2-2 (Fig. 3) and Experiment 3 (Fig. 4). The relationship between antituberculous effect of SPG and its dosage. In these experiments we attempted to clarify whether the antituberculous effect of SPG increases in proportion to its dosage. The effect of SPG was indeed strengthened with the increase of dosage, but its degree was not so high.

Experiment 4. The relationship between inoculated dose of tubercle bacilli and survival effect of SPG in experimental mice tuberculosis (Fig. 5 and 6).

If the dose of inoculated tubercle bacilli is too high, no significant effect is seen both in treated and untreated groups. This is probably due to the rather weak antituberculous effect of SPG.

If the inoculation dose is within certain range, however, surviving bacilli in the groups treated with SPG are apparently smaller in number than those in untreated groups.

And in the groups inoculated with too small dose of bacilli, the difference in survival time of hosts between treated and untreated groups becomes insignificant again, suggesting that the defense mechanism of the hosts is strong enough to suppress the bacilli without SPG. In the group administered SPG prior to inoculation of tubercle bacilli, there was seen some prolongation effect of survival time of mice due to the enhancement of the host's defensive ability, but this effect did not last so long, but transient after administration.

まえがき

シズフィラン [Schizophyllan 略号 SPG] は藤本ら¹⁾により 1964 年担子菌の 1 種 *Schizophyllum commune* Fries—スエヒロタケ—の培養液中の粘液質として発見された。この物質は白色無味・無臭のタンパク質を含まない多糖類である。水には溶けやすく粘稠な溶液となる。その推定構造は菊本ら²⁾によると図 1 のごとくである。すなわち構成糖としてグルコースのみからなる重合体で、その基本構造は β -1,3 グルコシッド結合をなす直鎖のグルコース残基 3 個に対して、1 個の割合で 1 分子のグルコースが β -1,6 グルコシッド結合を介して分岐しているものと考えられ、また分子量は約 5 万位と推定されている。

この物質は最初小松ら³⁾⁴⁾によりマウスのエールリッヒ癌に対して投与が試みられ、ある程度の制癌作用が認められたが、自然発生癌に対しては効果が少なかった。しかし間もなく、この物質が生体の細菌などの感染に対する防御力を増強することが認められ、大腸菌、緑膿菌

および真菌など⁴⁾とならんで結核菌感染マウスに対しても腹腔内投与を行なつて、延命効果のあることが認められた⁵⁾。

われわれは先に、小松らの成績を参考にして、既報のごとき成績⁶⁾を収めたが、今回は斯様な現象が SPG に特有のものか、またいかなる投与条件下で最も効果を表しうるかなどの点について、以下の実験を試みたので、その成績について報告する。

実験方法

結核菌：人型結核菌 Schacht [INH および SM 高度耐性菌] 1% 小川培地で培養し、3~4 週後、湿重量 2 mg/ml の割合に生理的食塩水中に浮遊。

マウス：生後 4 週の d-d YS 系雌マウスを用いた。感染は上記結核菌浮遊液を 0.1 ml/4 g マウス体重 [0.1 mg/20 g マウス] の割合に尾静脈より静注した。

SPG：0.05% 水溶液、または 0.25% 水溶液を使用した。

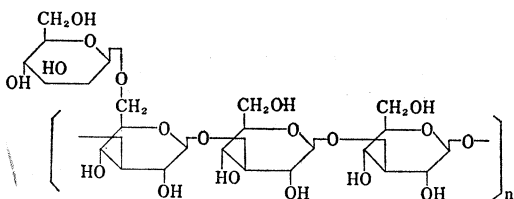
実験 1：SPG, glycogen および Drakeol の腹腔内投与によるマウス実験的結核症に対する延命効果の比較

Glycogen および Drakeol の調製：それぞれの薬剤 0.05 g を 100 ml の生理的食塩水で溶かし (0.05% 液)、120°C、15 分間加熱したものを使用。

薬剤投与方法：SPG (0.05% 液) を含め、各薬剤とも毎日 1 日 1 回 0.2 ml (5 mg/kg) 宛腹腔内に投与した。投与期間は感染後 3 日目より 14 日間とした。

実験 2：SPG と zyosan の抗結核効果の比較および SPG の投与量に関する実験

Fig. 1. Structural formula of SPG



molecular weight : about 50,000

Zymosan の調製: Zymosan は 0.05 g を 100 ml の生理的食塩水に溶かし、ザイツの濾過器を用いて滅菌した。

薬剤の投与方法によりマウスを次の6群に分けた。

実験群: 1. 無治療対照群 感染のみ, 2. SPG 5mg/kg/日毎日筋注, 3. SPG 5mg/kg/日毎日腹腔内投与, 4. Zymosan 5mg/kg/日毎日筋注, 5. Zymosan 5mg/kg/日毎日腹腔内投与, 6. SPG* 25mg/kg/日週1回筋注。

治療期間 感染当日より3週間

*SPG: 0.25% 液使用

実験3: SPG の投与量による結核マウスの延命効果の比較

マウスを次の実験群に分けた。

1. 無治療対照群 感染のみ, 2. SPG 5mg/kg 群 SPG 0.05%液 0.2ml, 1日1回筋注, 週5日, 3. SPG 25mg/kg 週2日群 SPG 0.25%液 0.2ml, 1日1回筋注, 週2日, 4. SPG 25mg/kg 週1日群 SPG 0.25%液 0.2ml, 1日1回筋注, 週1日。

SPG の投与は図4のごとき間隔で行なつた。治療は感染当日より始め、3週間にわたり投与した。

実験4: 結核菌接種量別マウス実験的結核症に対するSPG の抗結核効果の比較, および SPG を結核菌接種前に投与した場合の抗結核効果

結核菌浮遊液 (1)Schacht 株を他の実験と同じく, 2mg/ml の割に生理的食塩水中に浮遊させたもの, (2) Schacht 株を生理的食塩水中に 0.6mg/ml の割に浮遊させたもの, (3)Schacht 株を生理的食塩水中に 0.2mg/ml の割に浮遊させたものの3種類の菌液を用意し, マウスに 0.1ml/4g 体重の割にそれぞれの菌液を静注感染させた。

SPG: 他の実験成績から最も抗結核効果を表した量, すなわち 12.5mg/kg (0.25%液 0.1ml) を週2回筋注, 治療期間は感染当日より3週間とした。また SPG をあらかじめ投与する群には菌接種の7日前と4日前の2回, 1回 12.5mg/kg の割で筋注した。マウスは1群15匹とし, 以下の群に分類した。

1. 菌液(1)1mg/20g マウス菌接種のみ, 2. 菌液(1) 1mg/20g マウス SPG 投与, 3. 菌液(2) 0.3mg/20g マウス菌接種のみ, 4. 菌液(2)0.3mg/20g マウス SPG 投与, 5. 菌液(3)0.1mg/20g マウス菌接種のみ, 6. 菌液(3) 0.1mg/20g マウス SPG 投与, 7. あらかじめ SPG を上記のごとく投与した後, 菌液(1)を 1mg/20g マウス接種。

実験成績

実験1: SPG, glycogen および Drakeol の腹腔内投与によるマウス実験的結核症に対する延命効果の比較(図2)

これらの薬剤は腹腔内に投与して, いずれも腹腔内へのマクロファージの遊出を促進するという共通の作用を有している。このため, これら3剤の薬剤を同量, 結核マウスの腹腔内に投与したのであつたが, 実験成績は図2のごとく, SPG のみが延命効果を示し, 他の2剤は延命効果を示さなかつた。

実験2: SPG と zymosan の抗結核効果の比較および SPG の投与量に関する実験(図3)

SPG は前述のごとく大分子多糖類であるので, 他の大分子多糖類から zymosan を選び, SPG と同量の投与を行ない, 結核マウスに対する延命効果を比較した。成績は図3のごとく, SPG 投与の場合は筋注および腹

Fig. 2. Comparison of Survival Effects of Intraperitoneal Administration of SPG, Glycogen and Drakeol in the Mice Experimentally Infected with Tubercle Bacilli

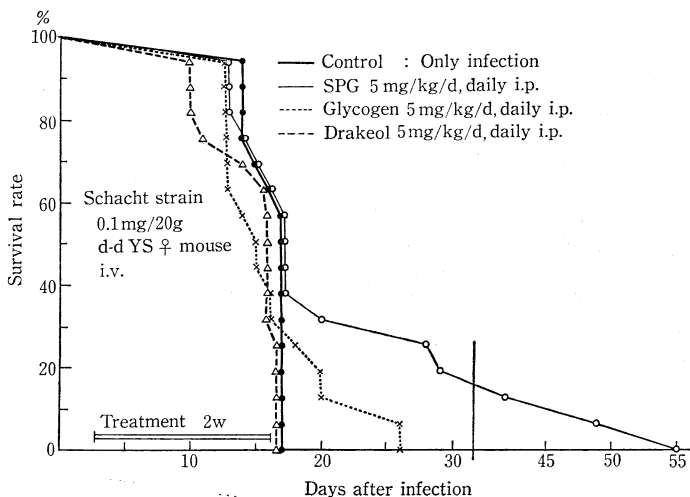


Fig. 3. Comparison of Antituberculous Effect of SPG with Zymosan

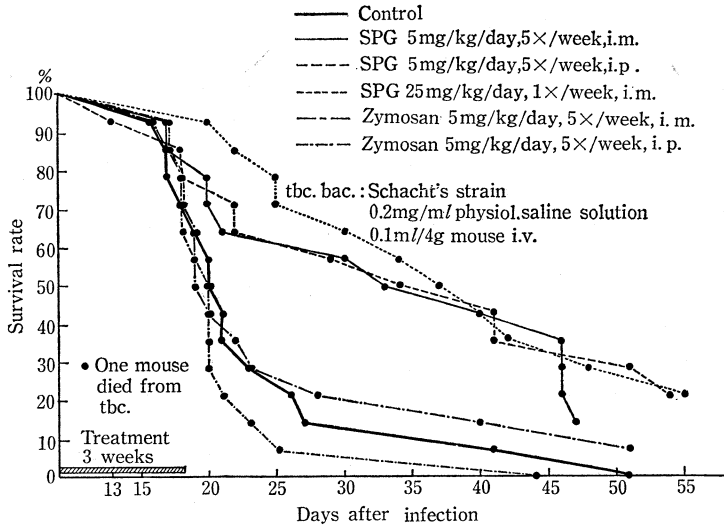
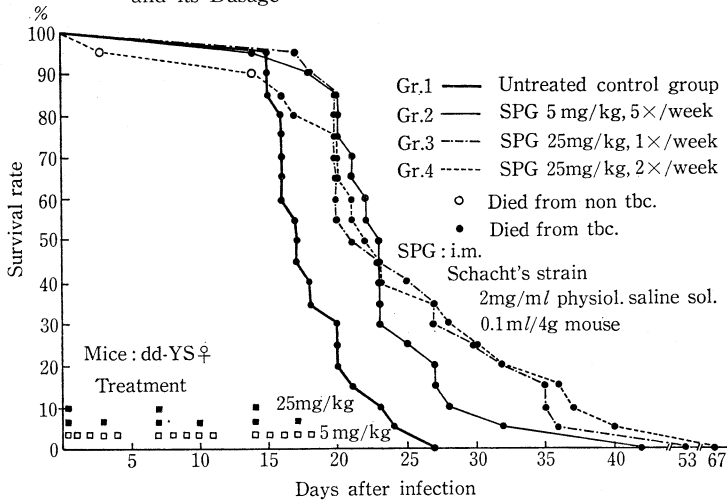


Fig. 4. The Relationship between Antituberculous Effect of SPG and its Dosage



腔内投与いずれも、無処置対照群に比べて延命効果が認められたが、zymosan の場合はいずれも延命効果は認められなかつた。

また同時に行なつた実験で、SPG をこれまで (5 mg/kg) よりも大量 (25 mg/kg) で、間欠的 (週1回) に投与した成績は、後者の方の延命効果がわずかにまさるかのごとく成績であつた。

実験3: SPG の投与量による実験的結核マウスの延命効果の比較 (図4)

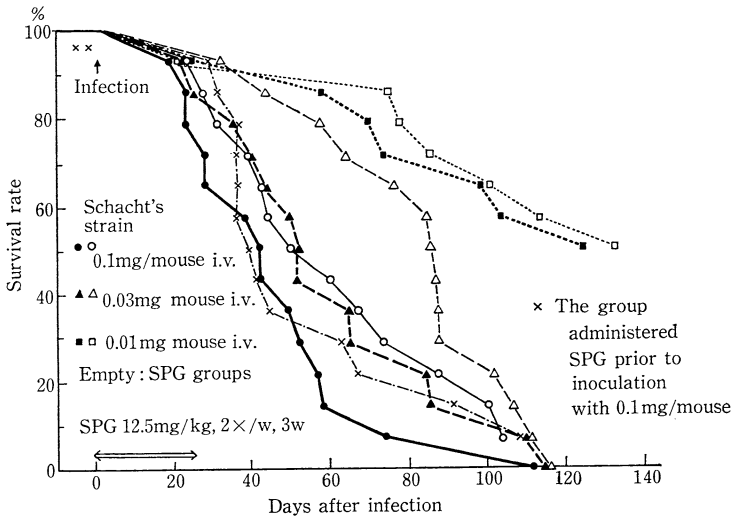
図4のごとく、SPG 各群いずれも延命効果は認められたが、投与中3群間に成績の差はほとんどなかつた。しかし投与中止後は SPG 5 mg/kg 群の成績がわずかに劣つた。ただし SPG を 25 mg/kg 週2回投与した群は、SPG が極めて粘稠で、注射器へ薬液吸入の際混入した空気をぬき難く、誤つて空気とともに SPG を筋注した直後、痙攣を起こして2匹が死亡した。

この実験の成績から、SPG の投与量はある程度以上の量になると、それ以上増加させても延命効果はあまり上昇させることができないであろうと判断させられた。

実験4: 結核菌接種量別マウス実験的結核症に対する SPG の抗結核効果の比較、および SPG を結核菌接種前に投与した場合の抗結核効果 (図5および図6)

この実験は次のような推論の下に行なつた。すなわち菌の接種量が多くても少なくとも、宿主の菌に対する防御力はほぼ一定と考えられ、SPG によつてその能力が増加したとしても、もしそれがあまり大きくなければ、菌の接種量が非常に多い場合、SPG の投与の有無にかかわらず、生残る菌数はあまり相違せず、したがつて両者の結核マウス生残曲線の間に大きな差は生じないであろう。逆に接種菌量があまりに少なければ、宿主本来の防御力のみで十分で、SPG の効果は示されない。もし丁度その中間であれば、SPG 投与を行なわない群では菌

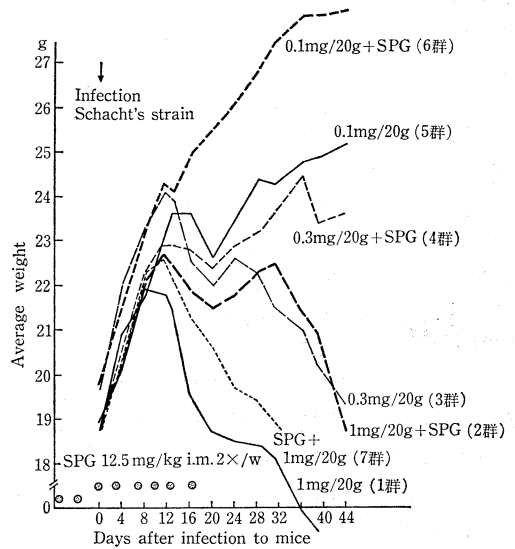
Fig. 5. The Relationship between Inoculated Dose of Tubercle Bacilli and Survival Effect of SPG in Experimental Mice Tuberculosis



の増殖力が宿主の防御力を凌駕するのに対し、SPG投与群では宿主の防御力が上回り、両群の生残曲線には相当の差が生じるものと推測される。またSPGが宿主の防御能力を高めるのであれば、あらかじめ投与していても、結核マウスの延命効果は認められるはずである。かかる観点から本実験を行なった。

成績は図5のごとくである。すなわち、あらかじめSPGを投与した群(第7群)の延命効果はあまり大きくはなかつたが、無治療、同量菌接種の第1群の成績を上回つた。また菌接種量別のSPGの効果は、菌接種量0.3mg/20gマウスの群に最も明確に示された。すなわち先の推測のごとく、菌接種量が1mg/20gマウスではSPGの効果を見るにはやや多すぎ、また0.1mg/20gマウスでは少なすぎたということになる。したがつてこの成績から、SPGの投与により宿主であるマウスの結核菌に対する防御力がそう強くないが増加したと考えられる。また体重曲線(図6)で各接種量群ともSPGの効果は示されているが、第1群より第5群までは菌接種後いつたん体重が増加した後、減少し、2週後半に体重の谷が存在する。しかし第6群(0.1mg/20gマウス菌接種、SPG投与)にはこの谷が認められなかつた。これは菌接種量が少なかつたとはいえ、無治療対照群ではいつたん菌が増殖し、体重の減少を招いたが、その後宿主側の防御力が出現し、菌の増殖を抑制し、回復したと考えられるのに対し、SPG投与群では防御力が早期かつ十分に出現したため、体重の減少がみられなかつたと推測される。

Fig. 6. The Relationship between Inoculated Dose of Tubercle Bacilli and Survival Effect of SPG in Experimental Mice Tuberculosis



考 案

Schizophyllan (SPG) は *in vitro* では全くといってよいほど、結核菌に対して無効であることは、小松らおよび科研化学研究陣の行なつた実験成績に示されており、また著者らの直立拡散法を用いた実験(0.05%液 1ml)でも同様に抗結核作用は認められなかつた。したがつてSPGの実験的マウス結核症に対する効果はもつばらSPGによる宿主側の防御力の増強のためと解釈されている。小松らおよび科研化学研究陣の報告によると、SPGにはマクロファージの貪食能を増加させる作用が

認められ、またTリンパ球およびBリンパ球による免疫力の増加も来すごとき成績が得られている。これらのうち、どの因子がどの程度結核防御にあずかっているかについては現在なお不明である。

小松らは SPG の防御力増殖作用を主としてマクロファージの食力強化と遊出促進に求め、これを腹腔内に投与して結核マウスに延命効果のあることを認めた。実験1は SPG と同様腹腔内に投与してマクロファージの腹腔内遊出促進を起こす glycogen と Drakeol の2薬剤を SPG と同量用いて、これらも SPG 同様抗結核作用を有するか否かについてみた実験であったが、延命効果は認められなかつた。また SPG は前述のごとき大分子多糖類であるので、他の多糖類ではどうかという疑問に対し、マクロファージの lysosomal enzymes を増量させるといわれる zymosan を選び、SPG と比較したが、実験2のごとく zymosan には抗結核効果は示されなかつた。したがって、これまでの実験では SPG のみが有効性を示し、glycogen, Drakeol および zymosan には有効性は示されなかつた。また SPG と比較した実験ではないので実験成績は示さなかつたが、ピシバニールについて行なつた別の実験でも *in vivo* にて抗結核作用は示されなかつた。したがって腹腔内マクロファージ遊出促進やマクロファージの lysosomal enzymes の増量などに単純に SPG の効果の理由を求めることは困難である。 β -1,3 結合の多糖類の特殊な能力か否かについては、今後検討する必要がある。

著者らは既報のごとく、SPG を腹腔内投与と、静脈内、筋肉内および経口投与とでその効力を比較したが、経口投与を除きいずれも有効で、3者はほぼ同様の成績を示し、臨床的応用が可能となつたが、この点からも、SPG の効果をマクロファージの遊出促進、特に腹腔内遊出促進に求めるのは難しい。

次に SPG の投与量および投与間隔の問題である。実験2では通常の投与量 5 mg/kg の5倍、すなわち 25 mg/kg を週1回筋注し、前者の週5回法と比較したものであるが、ほぼ同様か、若干上回る成績となつた。菌接種直後に5倍量の投与が行なわれたことに若干の意味があつたのかもしれない。実験3は SPG 25 mg/kg の大量筋注を週1回法と2回法とで行なつた実験であるが、SPG の溶液があまりに粘稠であり、実験開始当初空気を混入を起こし、週2回群中の2匹は注射直後死亡した。薬液の粘稠性を除去する何らかの工夫が必要と思われた。成績から、大量投与により若干効果が上昇する傾向はうかがえたが大差なく、投与量の増加による宿主の防御力亢進には限界のあることが推測された。

実験4は結核菌の接種量と SPG の効果との関係を見たものである。実験目的および考案の一部は成績の項で述べたので省略するが、Schacht 株 1 mg/20 g マウス

のような大量菌接種では RFP のような強力な抗結核薬と異なり、生残率曲線による成績判定では常にわずかな有効性しか認められない。また逆に 1/10 量の 0.1 mg/20 g マウスの少量接種では、体重曲線による成績で SPG の効果は示されたが、生残率曲線による成績では両者はほぼ同様であつた。これは SPG の投与中止後は宿主の防御力亢進が消失し、対照群と同様後期に菌が宿主内で増殖したことを示し、完全な殺菌には至らなかつたことを示している。したがってその中間量である 0.3 mg/20 g マウスの菌接種で、対照群は 1 mg/20 g マウス接種群と同様に、菌接種後間もなく菌の増殖が起り早期に死亡したのに対し、SPG 投与群は菌の増殖抑制が起り、明らかな死亡曲線の延長が起つたものと解釈された。したがって SPG 自身による抗結核効果は本実験によって確かに証明されたが、その効力はあまり強いものとはいえない。

結 論

Schizophyllan (SPG) は *in vitro* にて全く抗結核効果がないにもかかわらず、実験的マウス結核症に対し、既報のごとく体重曲線および生残率曲線による成績から抗結核効果が証明された。今回の実験からも SPG の抗結核効果が裏付けされたが、同じ腹腔内マクロファージ遊出促進作用のある glycogen や Drakeol, また大分子多糖類で lysosomal enzymes を増加させるといわれる zymosan には、著者らの行なつた実験条件では抗結核作用が認められなかつた。また SPG の抗結核効果はあまり大きくないので、菌接種量をわれわれが用いる実験の1/3程度にした方が明確に示された。また SPG の投与量を増加 (25 mg/kg 週2回) させても、通常投与量 (5 mg/kg 週5回) と大差なかつた。SPG は水溶液が粘稠性をおびており、特に濃厚液は使用に不便で、臨床的応用のためには、この粘稠性を消失させる何らかの工夫が必要であると感ぜられた。

文 献

- 1) 藤本ら: 台糖研究報告, 22 : 77, 1964.
- 2) 菊本ら: 昭和45年度日本農芸化学大会.
- 3) 小松ら: Gann, 60 : 137, 1969.
- 4) 小松ら: Japan. J. Antibiotics, 26 : 277, 1973.
- 5) 小松ら: Japan. J. Antibiotics, 26 : 459, 1973.
- 6) 松宮: Japan. J. Tbc. & Chest Dis., 20 : 19, 1976.
- 7) R. C. Williams et al.: Phagocytic Mechanisms in Health and Diseases, Intercontinental Medical Book Co., 1971.

本論文の研究に対しご助言をいただいた東大医科研福原講師に深謝いたします。この論文の大半は第48回および第49回結核病学会総会で発表した。また SPG は科研化学(株)より提供をうけた。