化学療法剤とガンマー・グロブリンとの併用効果に関する研究 第1報

マウスの肺炎双球菌感染に対するサルファダイアジンとヒト・ガンマー グロブリンとの併用効果について

大山昭夫・栗村 徹・堀田 進
神戸医科大学微生物学教室

(昭和 34 年 3 月 6 日受付)

(本論文の要旨は昭和33年11月15日第6回日本化学療法学会近畿支部総会(京都)において発表せられた。)

化学療法は着々と目覚ましい発展を遂げて来たが，感染に対する治癒という点から考えてみると，投与される化学療法剤それ自体の検討もさることながら，生体の側の条件，例えば，特異的な或いは非特異的な免疫療法乃至は刺激療法なども同時に考慮すべきものと思われる。特に，現行の化学療法剤の生体内濃度が多くの場合殺菌的な域に達することなく静菌的な濃度に止まることを思えば，一層その感を深くする。既に，化学療法剤と抗血清の併用がマウスのブドウ球菌感染に対し優秀な治療効果を収めることが知られている (DE & BASU[2], 1938)。近来，ヒト血清に由来するガンマー・グロブリン (γG) がある種の細菌性感染に対し治療効果を示すことが知られてきたが (HARRIS & SCHICK[5], 1954; ROSENTHAL, *et al*[10]., 1957; BARANDUN, *et al*[1]., 1957)，さらに最近に至つて γG と抗生物質との併用治療が試みられ，実験的並びに臨床的に興味ある知見が得られている (FISHER[3], 1957; WAISBREN[11], 1957; MANNING, *et al*[8]., 1958; FISHER & MANNING[4], 1958)。

吾々も上述の観点からまず化学療法剤サルファダイアジン (SD) を用いて，これに γG を併用せしめ，マウスの肺炎双球菌感染に対する治療効果を検討した。

実験材料並びに実験方法

供試菌 実験に供した肺炎双球菌Ⅰ型(神戸市衛研株*)及びⅢ型(伝研5A株**)は何れも15% 緬羊血清ブイヨンに 37°C, 48 時間培養したものであつて，均等に溷濁した培養液をそのまま菌浮游液として用いた。実験に先立ち，型の如くマウス通過を数代くりかえして，高度なしかも安定した毒力を獲得せしめた。上記菌浮游液を 15% 緬羊血清ブイヨンにて 10 倍階段稀釈を行い，適宜稀釈度の液を以て接種材料とした。接種菌量並びに毒力などの条件を可及的明らかにする目的をもつて，各実験毎に接種材料の 0.1 ml を直ちに緬羊血液寒天 10 ml に混合平板培養して，37°C, 24～48 時間後の集落数を数えて生菌数を測定した。

供試動物: 用いた動物は体重 10～13 g の雑系白色マウスである。純系動物を用いなかつたが，後の実験成績の部に記載する通り，対照群動物の全例が規則正しく感染死するような条件を採用して観察を進めた故，この点の疑問はほとんど除外されたと考えられる。上記菌材料 0.1 ml の腹腔内注射によつて感染を成立せしめた。菌接種後，通常 24 時間毎に1回，場合によつては6時間毎に1回点検して立毛・活気喪失などの病的症状の有無並びに生死を観察した。観察期間は6日間とした。屢屢死亡マウスの心血の塗抹標本についてグラム染色並びに莢膜染色を行ない，供試肺炎菌の感染が成立していることを確認した。

γG: 市販品*** 並びに市販品に含まれるグリココール及びマーゾニンを除いた同一規格の供試品を用いた。各製品による活性の差をなるべく少くするため，各実験毎に通常 2～3 瓶の内容を混合したものが用いられた。何れも用に臨み，原液或いは適宜濃度の生理的食塩水稀釈液の 0.1 ml を上記マウスの大腿筋肉内に注射した。

SD**: 略同量の馬鈴薯澱粉に混じて懸濁液を作り，その 0.05～0.1 ml をゾンデを以てマウスに経口投与した。

なお，何れの場合も γG 及び SD の投与は菌接種後1時間以内に完了するよう実験を進めた。

実験成績

供試菌の LD_{50}:

供試Ⅰ型菌の LD_{50} は $10^{6.5}$ 前後であり，$1\times LD_{50}$ 中に含まれる生菌数は大約1個であつた。同じくⅢ型菌にあつては DD_{50} は 10^3 前後，$1\times LD_{50}$ 中の生菌数は大約 300 個であつた。これらの成績の代表的な例は第1表及び第2表に示す通りである。

γG の毒性

γG の原液 0.1 ml を筋肉内注射せられたマウスは視診

* 神戸市衛生研究所 堀道紀博士より恵与せられた。
** 東京大学伝染病研究所 工藤正四郎博士より恵与せられた。
*** 日本ブラッドバンク製。同社 内藤良一博士及び森末新一博士より恵与せられた。
**** 第一製薬製テラジアジン。

第1表　供試肺炎双球菌（I型）の LD_{50}

菌液稀釈倍数	菌数 (Per 0.1ml)*	マウスの死亡率	死亡したマウスの平均生存日数
10^{-2}	∞	5/5	1.0
10^{-3}	2,597	5/5	1.0
10^{-4}	304	5/5	1.4
10^{-5}	55	5/5	1.6
10^{-6}	3	5/5	1.8
10^{-7}	0	0/5	—
10^{-8}	0	0/5	—
10^{-9}	0	0/5	—

$LD_{50}=10^{6.5}$；　$1\times LD_{50}$ 中の生菌数＝1

*　血液寒天混合平板培養による菌集落数。

第2表　供試肺炎双球菌（III型）の LD_{50}

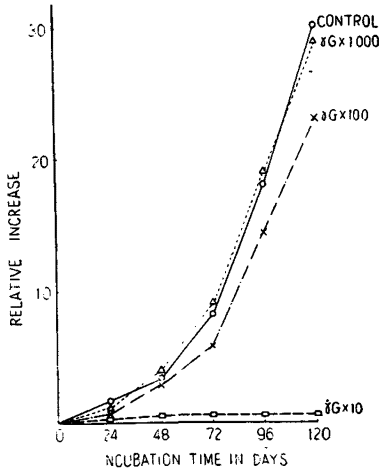
菌液稀釈倍数	菌数 (Per 0.1ml)	マウスの死亡率	死亡したマウスの平均生存日数
10^{-1}	∞	5/5	1.2
10^{-2}	∞	5/5	1.6
10^{-3}	339	3/5	2.0
10^{-4}	80	0/5	—
10^{-5}	12	0/5	—
10^{-6}	0	0/5	—
10^{-7}	0	0/5	—
10^{-8}	0	0/5	—

$LD_{50}=10^{3.0}$；　$1\times LD_{50}$ 中の生菌数＝300

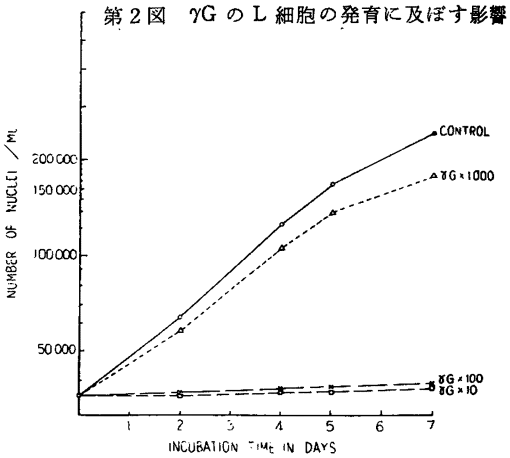
上局部的並びに全身的に何らの変化をも示さなかつた。

更に組織培養法により，γG の体外培養細胞の発育に及ぼす影響を検討した。培養細胞としては Carrel 瓶法によるニワトリ胎児心組織及びL細胞を用い，細胞発育度の測定は前者にあつては面積測定法，後者にあつては核数計算法によつた（木村[7]，1955；勝田[6]，1955）。得たる成績は第1図並びに第2図に示す通りである。ニワトリ胎児心組織は γG を 10 倍稀釈の割合に含むメジウム内において著明にその発育を障害せられ，培養各細胞に高度の空胞変性が認められた。しかしながら γG の上記稀釈度が 100 倍或いは 1,000 倍になるようなメジウムにおいては対照とほとんど変らない組織の発育を認めた。これに対し，L 細胞は γG の 100 倍稀釈液によつてもある程度の障害を蒙つた。このような差が細胞固有の性状の差異によるのか，あるいは培養方法の相違に基ずくものかは明かでない。しかしながらいずれにせよ γG の原液もしくは 10 倍稀釈液の 0.1 ml を体重 10g のマウスに筋肉内注射しても，そのこと自体がマウスにさして著しい障害を与えるものではなかろうと推定せられた。

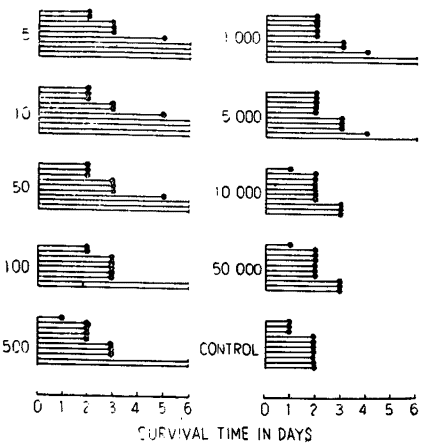
第1図　γG のニワトリ胎児心組織の発育に及ぼす影響



第2図　γG の L 細胞の発育に及ぼす影響



第3図　γG 単独投与のマウス肺炎双球菌（I型）感染に対する治効



I型菌の 10^{-5} 稀釈菌液 0.1 ml（生菌数＝24）腹腔内注射の後に γG 稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
5～50,000 の数字は γG 稀釈倍数を示す。
図中各線は被接種マウス各1匹を示し，黒丸はその時期に該当マウスの死亡したことを意味する。

第3表 SD のマウスに対する毒性

SD の経口投与量 (mg)	マウスの死亡率	死亡したマウスの平均生存日数
32	0/5	—
64	2/5	3.5
128	5/5	2.8
256	5/5	2.2

LD_{50}=74 mg

第4表 SD 経口投与の肺炎双球菌（I型）に対する治効

SD 投与量 (mg)	マウス死亡率*	死亡マウスの平均生存日数
10	1/10	3.0
5	7/10	2.5
1	9/10	2.8
0.5	10/10	2.6
0.1	10/10	1.8
対照無処置	10/10	1.6

CD_{50} (50% 治効量)：大約 10 mg

* 10^{-5} 稀釈菌液 0.1 ml（生菌数=56）腹腔内注射

第5表 SD 経口投与の肺炎双球菌（III型）に対する治効

SD 投与量 (mg)	マウス死亡率*	死亡マウスの平均生存日数
10	6/10	3.1
8	7/10	2.6
4	8/10	2.4
2	10/10	2.5
1	10/10	2.1
0.5	10/10	1.9
0.25	10/10	1.4
対照無処置	10/10	1.3

CD_{50} (50% 治効量)：大約 13 mg

* 10^{-1} 稀釈菌液 0.1 ml（10^{-4} 稀釈液の生菌数=84/0.1 ml）腹腔内注射

SD の毒性：

経口投与による供試 SD のマウスに対する LD_{50} は大約 70 mg であつた（第3表参照）。

SD 或いは γG の単独投与による治療実験：

SD の単独経口投与の有効量を検討した成績は第4表及び第5表の通りである。すなわち，I型菌については大約 30～50×LD_{50} の菌の感染に対する CD_{50}（50% 治効量）は約 10 mg，III型菌については大約 100×LD_{50} の菌の感染に対する CD_{50} は約 13 mg の前後と認められた。

γG 単独の筋肉内注射によつてもある程度マウスの肺炎双球菌感染を阻止することを認めた（第3図参照）。

γG と SD の併用投与による治療実験

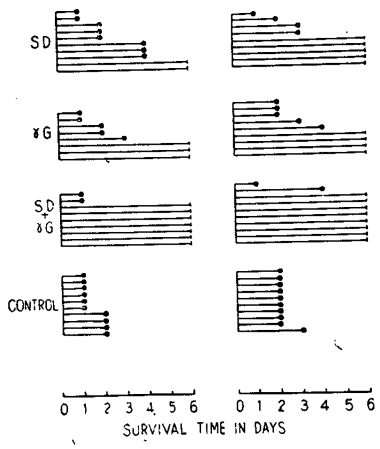
上述の成績はいわば予備的実験のそれであつて，この論文の主題である本項目については下記のごとく種々の方向から検討を加えた。

（1） I型菌の 10^{-4} 或いは 10^{-6} 稀釈液を感染せしめた実験群について γG 原液 0.1 ml，及び SD 10 mg を夫々単独に或いは併用して投与した結果，第4図に示す如く，対照無処置群に較べて投与群の死亡率は低く，而も γG·SD 併用群の死亡率が，夫々の単独使用群の死亡率よりも更に低いことを認めた。

なお，観察期間（1週間）終了後，生残りマウスの心血，肝，腎，脾より夫々肺炎双球菌の検索を行なつたが，

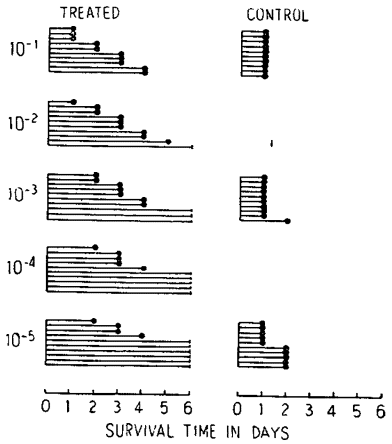
第4図 マウスの肺炎双球菌（I型）感染に対する γG と SD の併用治療効果（実験1）

10^{-6} 稀釈菌液（生菌数=311）0.1 ml　10^{-6} 稀釈菌液（生菌数=3）0.1 ml



上段の数字は接種菌量を示す。
その他の説明は第3図と同様。
SD：10 mg 経口投与。
γG：10 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。

第5図 マウスの肺炎双球菌（I型）感染に対する γG と SD の併用治療効果（実験2）



左欄の数字は菌液稀釈度。
生菌数/0.1 ml：10^{-4}=319；　10^{-5}=57.
SD：10 mg 経口投与。
γG：10 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
その他の説明は第3図と同様。

染色並びに培養上全例において菌陰性であつた。すなわち生残りマウスに保菌状態の成立する可能性はほとんどないものと認められた。

（2） 次に接種菌量による影響を検討するため，I型菌の 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} 及び 10^{-5} 稀釈液の夫々 0.1 ml をマウスに感染せしめ，SD 10 mg，及び γG 10 倍稀釈液 0.1 ml を用いて併用投与実験を行なつた。第5図に示す如く，併用治療群は，対照無処置群に比し 300～1,000 倍程度高濃度の菌の攻撃に耐え得ることを認めた。

（3） 供試 γG 製品は，ヒト血清に由来し，かつ消毒剤たるマーゾニンを含有する故，果してこれらが上記のような併用効果を有するや否やを検討した。用いたヒト血清は，健康人の正中静脈より無菌的に採取した血液から法の如く分離されたものである。非働化することなく 4°C に保存し，採取後1週間以内に実験に使用せられた。本血清原液そのまま，又はこれに 0.01% の割にマーゾニンを加えたもの，或いはマーゾニンの 0.01% 生理的食塩水溶液の夫々 0.1 ml について単独に又は SD 10 mg を併用して前項同様の実験を行なつた。しかるにこの場合は γG にみられたような効果は全く認められなかつた（第6表参照）。

第6表 正常ヒト血清並びにマーゾニンのマウス肺炎双球菌感染に対する効果

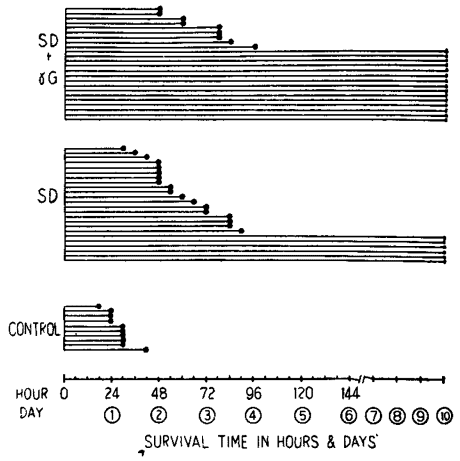
接種菌量（腹腔内注射）／マウス投与	10^{-4} 稀釈液 0.1 ml（生菌数＝52）		10^{-6} 稀釈液 0.1 ml	
	マウス死亡率	死亡マウスの平均生存日数	マウス死亡率	死亡マウスの平均生存日数
SD 10 mg ヒト血清原液 0.1 ml			8/10	2.6
ヒト血清原液 0.1 ml			10/10	1.9
0.01% マーゾニン加ヒト血清原液 0.1 ml	15/15	1.9		
0.01% マーゾニン生理的食塩水溶液	15/15	1.7		
対照無処置	15/15	1.5	10/10	1.8

SD は経口投与； 其の他はすべて筋肉内注射

（4） 先に行なつた併用実験を統計学的に考察するため，より多数のマウスを用いて同様の実験を試みた。得たる成績によると（第6図参照），γG 10 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射と SD 10 mg 経口投与の併用群は，SD 10 mg 単独投与群並びに対照無処置群に比較して遙かに低い死亡率を示し，而もこれらの死亡率間の差は 99% の信頼水準（Yates 修正 chi 自乗法による）で有意であることが知られた。

（5） 上述の諸実験を通じ，γG 及び SD の併用が夫夫の単独使用よりも優秀な治療効果を発揮することを認めたが，本効果が薬理学的に相加的であるかあるいは相乗的であるかを検討するため次の実験を行なつた。すなわち，γG·SD 併用群に対応して，γG 或いは SD の夫夫単独2倍量投与の群を設けて比較検討した。実際に行なつた実験区分並びにその各々に対する投与量は第7表の通りであり，その成績は第7図，第8図及び第9図に示されてある。いずれの場合も併用群（第7表中 a 群）の死亡率は単独2倍量投与群（第7表中 b 及び c 群）のそれよりも低いことが認められた。従つて γG と SD との併用効果は“相加的”であるよりもむしろ“相乗的”であると考えられた。

第6図 マウスの肺炎双球菌（I型）感染に対する γG と SD の併用治療効果（実験4）



10^{-5} 稀釈菌液 0.1 ml（生菌数＝58）腹腔内注射。
SD：10 mg 経口投与。
γG：10 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
その他の説明は第3図と同様。

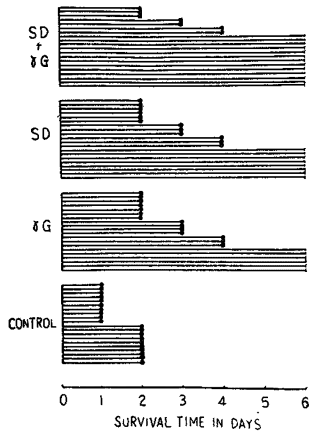
第7表 γG·SD 併用の相乗的効果を検討する実験区分

実験	マウス群	γG（筋肉内注射）	SD（経口投与）
A	a	10 倍稀釈液 0.1 ml	10 mg
	b	5 倍稀釈液 0.1 ml	——
	c	——	20 mg
	対照	——	——
B	a	1,000 倍稀釈液 0.1 ml	1 mg
	b	500 倍稀釈液 0.1 ml	——
	c	——	2 mg
	対照	——	——

考察

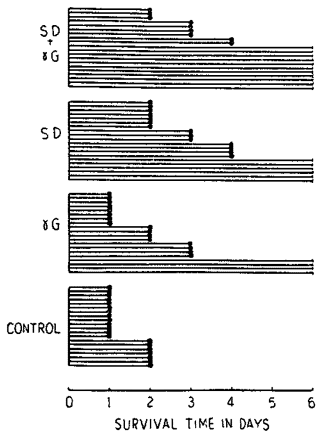
ヒト γG が動物の細菌性感染をある程度阻止することが既に知られているが（ROSENTHAL, *et al*[10], 1957),

第7図 マウスの肺炎双球菌(I型)感染に対するγGとSDの併用治療効果(実験 5-A)



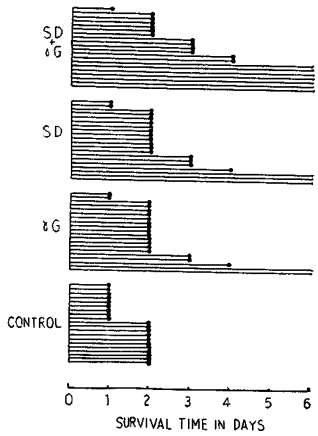
10^{-5} 稀釈菌液 0.1 ml
(生菌数=59) 腹腔内注射。
SD : 10 mg 又は 20 mg 経口投与。
γG : 10 倍又は 5 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
其の他の説明は第3図と同様。

第8図 マウスの肺炎双球菌(III型)感染に対するγGとSDの併用治療効果(実験 5-A)



10^{-1} 稀釈菌液 0.1 ml (生菌数 : 10^{-4}=75/0.1 ml) 腹腔内注射。
SD : 10 mg 又は 20 mg 経口投与。
γG : 10 倍又は 5 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
其の他の説明は第3図と同様。

第9図 マウスの肺炎双球菌(I型)感染に対するγGとSDの併用治療効果(実験 5-B)



10^{-5} 稀釈菌液 0.1 ml
(生菌数=82) 腹腔内注射。
SD : 1 mg 又は 2 mg 経口投与。
γG : 1,000 倍又は 500 倍稀釈液 0.1 ml 筋肉内注射。
其の他の説明は第3図と同様。

吾々の供試したγG製品もマウスの肺炎双球菌感染に対して若干の治効を有することが認められた。

しかしより興味あることはγGとSDとの併用が甚だすぐれた治療効果を発揮するという事実である。このことは，最近報告せられたγGとクロロマイセチンとの併用に関する動物実験の成績(FISHER[3], 1957; MANNING, *et al*[8], 1958 ; FISHER & MANNING[4], 1958) と軌を一にするものである。しかもかような併用効果は相加的であるよりも相乗的であることが示された。従来細菌性感染に対する薬剤の併用治療を論ずる場合，主として化学療法剤相互間の併用のみが考慮せられる傾向にあつたが，本論文の前がきにも述べた如く，化学療法剤と生物学的製剤との間の併用効果もまたゆるがせに出来ない問題と思われる。

次にしからばかような併用効果は如何なる機序によるのかという疑問が起る。細菌学的に先ず考えられることはγG中に含まれる抗体の関与する可能性であろう。事実，細菌体を以てγGの"吸収試験"を行なつてみると上述の効果が失われたという結果が報告されている(FISHER & MANNING[4], 1958)。しかしながらかような成績のみを以て直ちに抗体の関与を説明することはいささか困難ではなかろうかと思われる。たとえ抗体の関与することが確実であるとしても，それのみが本併用効果の機序のすべてであるか否かについてはなお考究の余地があろう。かりにここで主役を演ずるものが抗体であるとしても，抗体と化学療法剤とがどのように働き合うかということはきわめて困難な問題である。これを明らかにするためにはあらゆる可能性についての検討がなされねばならないであろう。観点は少しく異るけれども，ペニシリンが生体内で菌喰燼作用を促進するほかに血中抗体量を増大せしめるという成績 (武藤[9], 1954) もこの場合参考とすべきものかも知れない。

臨床上γGが単独に (HARRIS & SCHICK[5], 1954 ; BARANDUN, *et al*[1]., 1957) あるいは化学療法剤と併用的に (WAISBREN[11], 1957) 用いられて有効であつたという例も報告されている。この点については今後更に広汎な症例の集積を期待したい。ただ，これらの臨床例の大部分は比較的慢性の経過をたどつたものであつて，その点本論文にとり扱われたような動物の実験的感染とはややその形式を異にする。周知の如く，マウスの肺炎双球菌感染は特殊な急性敗血症である。しかしさような相異はあるにしても，細菌性感染に対してある種の生物学的製剤と化学療法剤とが相乗的に作用し合うという事実そのものはいささか注目に価することと思われる。

総　括

マウスの肺炎双球菌感染にたいするヒト ガンマー・グロブリンとサルファダイアジンとの治療効果が検討せられた。

供試ガンマー・グロブリンは単独でマウスの肺炎双球菌感染をある程度阻止した。しかしガンマー・グロブリ

ンとサルファダイアジンとを併用することによつて極めてすぐれた治療効果が発揮せられた。かような併用効果は相加的であるよりも相乗的であることが認められた。

健康ヒト血清あるいはマーゾニンは単独でもしくはサルファダイアジンと併用して用いられても上記のような効果を全く示さなかつた。これらの成績にもとずいて若干の細菌学的考察を加えた。

(ガンマー・グロブリンを恵与せられた内藤良一博士及び森末新一博士，菌株を恵与せられた堀道紀博士及び工藤正四郎博士，組織培養実験に協力せられた本教室 野村美恵氏，並びに薬理学的考察について助言を与えられた本学薬理学教室 松本博教授に対し深謝の意を表する。)

参 考 文 献

1) BARANDUN, S., KIPFER, R., RIVA, G. & NICOLET, A. (1957) Über die therapeutische Vervendung von Gamma Globulin bei bakteriellen Infectionen. Schweiz. med. Whschr., 87 : 155～159.

2) DE, S. P. & BASU, U. P. (1938) Synergy in experimental chemotherapy of staphylococcal infections. Brit. Med. J., ii, 564～565.

3) FISHER, M. W. (1957) Synergism between human gamma globulin and chloramphenicol in the treatment of experimental bacterial infections. Antibiot. & Chemoth., 7 : 315～321.

4) FISHER, M. W. & MANNING, M. C. (1958) The specific antibody nature of the therapeutic action of gamma globulin in experimental bacterial infections in mice. Antibiotics Annual 1957/1958, 572～576.

5) HARRIS, J. R. & SCHICK, B. (1954) The use of gamma globulin in infection refractory to antibiotics. J. Mt. Sinai Hosp. N. Y., 21 : 148～161.

6) 勝田甫 (1955) 組織培養法，東京，納谷書店.

7) 木村廉 (1955) 組織培養 (改訂版)，東京，共立出版.

8) MANNING, M. C., GAGLIARDI, L. A. & FISHER, M. W. (1958) The therapeutic activity of gamma globulin chloramphenicol combinations in mouse infections due to *Salmonella*, *Pneumococci*, *Escherichia coli*, or *Pasteurella*. Antibiotics Annual 1957/1958, 566～571.

9) 武藤勇哉 (1949) ペニシリンの血中抗体に及ぼす影響。抗菌物質研究，2 : 251～299.

10) ROSENTHAL, S. M., MILLICAN, R. C. & RUST, J. (1957) A factor in human gamma globulin preparations active against *Pseudomonas aeruginosa* infections. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94 : 214～217.

11) WAISBREN, B. A. (1957) The treatment of bacterial infections with the combinations of antibiotics and gamma globulin. Antibiot. & Chemoth., 1 : 322～333.