

リゾチームと各種抗菌製剤との協力作用

永井 裕・橋本 一

群馬大学医学部微生物学教室

(昭和 43 年 9 月 20 日受付)

緒 言

酵素リゾチームの作用点は、多くの細菌に共通の細胞構成物質 (murein) であるが¹⁾、同じ murein の他の場所を開裂する他の酵素、例えば LE No. 2²⁾などと併用すると殺菌効果が著明に上昇することは知られている。

現在種々の感染症に使用されている抗菌抗生物質の中には、ペニシリン類を始めとして、コリスチン等のように、細菌の膜構造の直接障害、或いは合成阻害剤として知られているものがあり³⁾、これらがリゾチームと併用された場合に、抗菌力が相加作用以上に増大する可能性が考えられる。本稿では、こういう目的でリゾチームと他の薬剤との協力作用を調べた結果を報告する。

実験材料並びに方法

使用菌株：本教室保存のグラム陰性桿菌 25 株、および病原由来ブドウ球菌 5 株を用いた。いずれもクックドミート培地に保存のものを 1 度純粋培養した後使用した。

使用薬剤：酵素リゾチームはエーザイ株式会社のノイチームを用いた。抗生物質はいずれも予研梅沢浜夫博士より分与され、力価の明らかなもののみを用いた。使用薬剤とその略号は次のとおりである。Colistin methan sulfonate (CLM), aminobenzyl-penicillin (AB-PC), novobiocin (NB), demethoxy-phenyl-penicillin (DMP), kanamycin (KM)。

耐性検査：耐性検査は希釈平板法、または tube dilution method を用いた。2 倍づつの濃度の薬剤を含む Heart infusion (HI) broth または HI 平板に試験菌を接種し、37°C 18 時間で成育をみた最高発育許容濃度 (MAC) を以て耐性値とした。試験菌の前培養としてはペプトン水中で 1 夜培養した。

実験結果

平板上における耐性値：始めに平板上で 6 種 21 株の菌について、AB-PC、NB、CL と lysozyme との協力作用をみた。6 種の濃度の抗生剤と、6 種の濃度の Lysozyme とを組合せた種々の薬剤平板上に、被検菌のペプトン水中 1 夜培養液を 100 倍に希釈したものから 1 白金耳づつ接種した。その結果を第 1 図 a, b, c に示す。

NB と Lysozyme との組合せでは 21 株の菌に対し、いずれの場合でも相加作用はなかつた。NB はグラム陰性桿菌に無効であり、Lysozyme の協力作用でも有効と

なり得ない。

AB-PC と Lysozyme との組合せでは Arizona の 1 株、ブドウ球菌の 1 株にわずかに抗菌力が增加するのみみられたのであつた。

CL では上記 2 剤と異なり、赤痢菌およびブドウ球菌のほとんど全株において Lysozyme の協力作用がみられた。しかし抗菌力の増加は著明ではない。

液体培地中の耐性値：リゾチームは強い塩基性の蛋白質であり、寒天中では硫酸根の如き酸性基と結合して酵素活性が不活化する傾向が強いので、リゾチームの活性が阻害されない液体培地中での他薬剤との協力作用をみた。

第 1 表にみるとおり、25 種のグラム陰性桿菌、2 種のブドウ球菌を用いて、3 種の薬剤に対するリゾチームの協力作用をみると、NB ではリゾチームの有無に拘わらず抗菌力が変わらず、AB-PC では Arizona の 1 例に僅かな差のみみられたのであつたが、平板上にみられたように、リゾチームと CLM との併用では、27 株中 11 株において抗菌力に差がみられた。平板上では協力作用が認められなかつた菌でも抗菌作用が増加したものに大腸菌、フロイソ菌、変形菌、ビブリオなどがある。抗菌作用の増加が特に明らかなのはブドウ球菌であり、4 倍から 16 倍までの抗菌力の増加があつた。

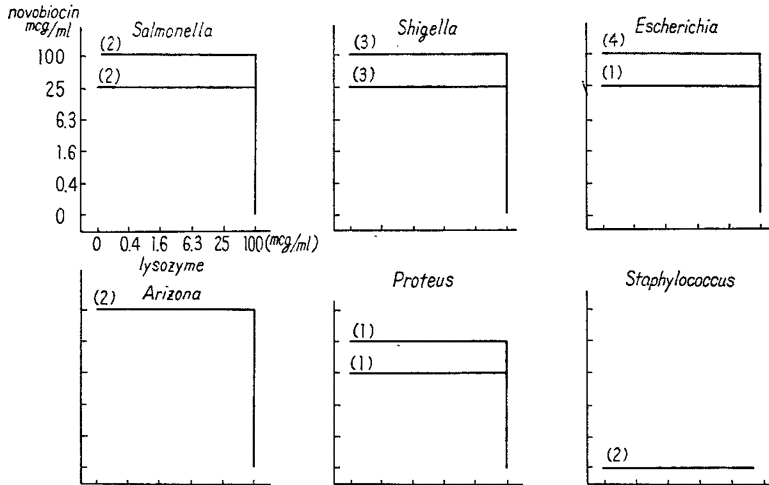
リゾチームとの協力作用が常に明らかなのは CLM との併用である。それを明らかにするために赤痢菌とブドウ球菌を用い、接種菌量を 10^8 コの少量にし、培養時間を 8 時間にして各種濃度における菌増殖の有無をみた。

第 2 表に示すとおり、リゾチームの添加で赤痢菌では 2 倍から 4 倍、ブドウ球菌では 30 倍以上の抗菌作用がいずれの株でもみられた。

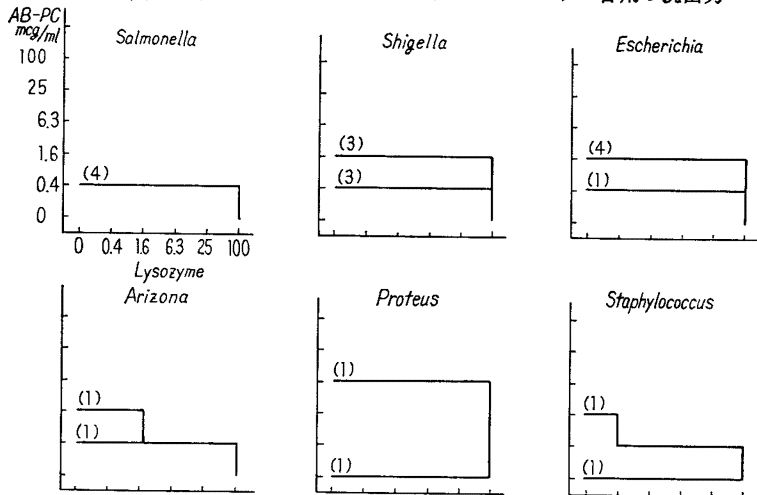
ブドウ球菌におけるリゾチームと他薬剤との併用効果：以上の検査により、接種菌量が少ない場合、他薬剤との併用効果が著明に出ることがわかつたので、再びリゾチームと諸種抗生剤の種々の濃度の組合せでブドウ球菌の増殖阻止効果をみた。ブドウ球菌はほとんどが 10 mg/ml のリゾチーム濃度でも増殖可能であるが、その中の 1 株、MS 353 は 5 mg/ml で増殖できず、また 5 mcg/ml 以上で増殖がやや抑えられる。従がつて最も感受性の高い MS 353 を用いてリゾチームと他薬剤との

第1図a リゾチームとノビオシンの合剤の抗菌力

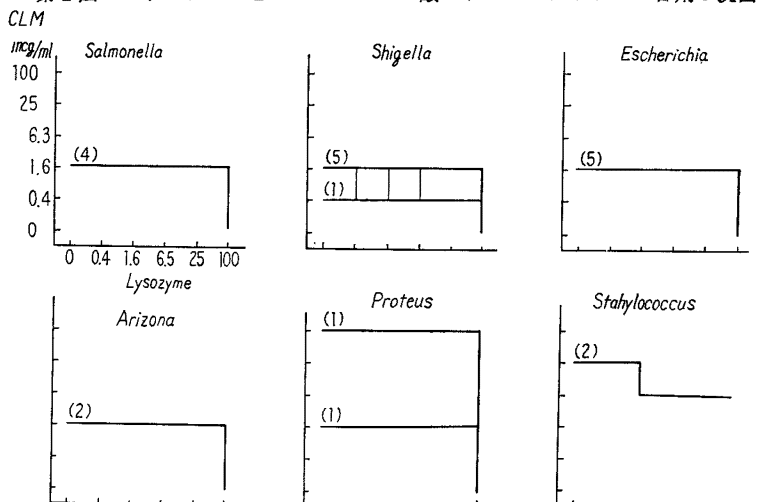
() 内数字は検査株数を表わす。接種菌量はペプトン水中18時間培養液を100倍に希釈しそれより1白金耳ずつ接種した



第1図b リゾチームとアミノベンジルペニシリン合剤の抗菌力



第1図c リゾチームとメタンサルホン酸コリスチンナトリウム合剤の抗菌力



第1表 リゾチームとノボビオシン, メタンサルホン酸コリスチンナトリウムおよびアミノペンジールペニシリンの相乗作用

Strain	Novobiocin		Colistin-M		AB-PC	
	L ⁺	L ⁻	L ⁺	L ⁻	L ⁺	L ⁻
1 <i>S. paratyphi</i> A	100<	100<	1.6	1.6	0.4	0.4
2 <i>S. paratyphi</i> B	100<	100<	0.4	0.4	0.4	0.4
3 <i>S. typhi</i>	100<	100<	0.4	0.4	0.4	0.4
4 <i>S. enteritidis</i>	100<	100<	1.6	1.6	1.6	1.6
5 <i>Sh. flex.</i> 2a R4	100<	100<	0.4	0.4	1.6	1.6
6 <i>Sh. flex.</i> 2a	100<	100<	0.4>	0.4	1.6	1.6
7 <i>Sh. flex.</i> 3a R4	100<	100<	0.4	0.4	1.6	1.6
8 <i>Sh. flex.</i> 3a	100<	100<	0.4>	0.4	0.4	0.4
9 <i>Sh. sonnei</i> R4	100<	100<	0.4>	0.4>	0.4	0.4
10 <i>Sh. sonnei</i>	25	25	0.4	0.4	1.6	1.6
11 <i>E. coli</i> O-26	100<	100<	0.4>	0.4	1.6	1.6
12 <i>E. coli</i> O-11	100<	100<	0.4>	0.4	0.4	0.4
13 <i>E. coli</i> K-12	100<	100<	1.6	1.6	1.6	1.6
14 <i>E. freundii</i>	25	25	0.4>	0.4	1.6	1.6
15 <i>E. freundii</i>	25	25	0.4>	0.4	1.6	1.6
16 <i>Arizona</i>	6.25	6.25	1.6	1.6	0.4>	0.4
17 <i>Arizona</i>	1.4	1.4	1.6	1.6	0.4>	0.4>
18 <i>Proteus(mirabilis)</i>	25	25	25	100<	0.4>	0.4>
19 <i>Proteus</i>	100<	100<	1.6	1.6	100<	100<
20 <i>Ps. pyogenes</i>	100<	100<	1.6	1.6	100<	100<
21 <i>Ps. pyogenes</i>	25	25	1.6	1.6	100<	100<
22 <i>Klebsiella</i>	0.4>	0.4>	25	25	25	25
23 <i>Klebsiella</i>	0.4>	0.4>	6.25	6.25	0.4>	0.4>
24 <i>Staphylococcus</i> MS 27	0.4>	0.4>	1.6	25	0.4>	0.4>
25 <i>Staphylococcus</i> 353	1.6	1.6	1.6	6.25	0.4	0.4
26 <i>Vibrio parahemolyticus</i>	1.6	1.6	0.4>	0.4	6.25	6.25
27 <i>Vibrio parahemolyticus</i>	0.4>	0.4>	0.4>	0.4	6.25	6.25

数値は最大発育許容濃度 (mcg/ml) を表わす

L⁻ リゾチームなし, L⁺ リゾチーム 100 mcg/ml を加えた場合

協力作用 10⁶/ml の接種菌量の 20 時間の菌増殖でみることにした。その結果は第3表に示す。

表にみられるとおり, 共存するリゾチームの量を 0.1 mcg/ml から 1 mg/ml まで増加させると, カナマイシンの場合には抗菌力は差はみられないが, NB の場合はリゾチーム 100 mcg/ml の濃度で 0.1 mcg/ml の NB に増殖が抑えられるようになり, DMP の場合は, リゾチーム 10 μg/ml の濃度で DMP 0.1 mcg/ml での増殖が抑えられるようになる。CLM の場合はこの協力作用は最も明らかで, 1 mcg/ml の添加で CLM 12.5 mcg/ml に増殖を抑えられるようになる。

NB や DMP のリゾチームによる抗菌作用の増加は, 少量の接種菌量の場合で, さらに培養時間が短いとより著明にあらわれる。すなわち, 第4表にみられるとお

り, 10⁵/ml の接種菌量で5時間後の菌数増加をみると, MS 353 では, NB, DMP 共に 0.1 mcg/ml の濃度では, リゾチームがないといずれも 10⁶/ml までの菌数増加があるが, リゾチームが 10 mcg/ml 加わると5時間の間, 10 倍, 或いは全然菌数が増加しない。しかし, こういう作用は MS 353 の特徴でもあり, 他のブドウ球菌では, こういう著明な変化はみられなかつた。

考 察

酵素リゾチームの作用点は, 多くの細菌に共通の細胞壁構成物質, murein における, N-acetyl murein 酸と N-acetyl glucosamine 間のグルコシド結合の開裂である¹⁾。細菌細胞壁はこの2種のアミノ糖と, 数種のアミノ酸とが縦横に連結した構造をもつが, そのいずれの開裂によつても機械的な構造は失なわれる。LE No.2 酵素等もリゾチームと異なる作用点ながら murein を開裂する酵素であり, 共に生菌死菌を問わず, 細菌から細胞壁を除いて菌体内物質をとり出す方法として汎用されている。しかもこれら作用点の異なる酵素を同時に作用させるとそれら単独の場合よりも遙かに効率よく殺菌作用を示すことが知られている。

抗生物質の抗菌作用は未だ充分に

明らかでないものが多いが, ペニシリン類は細胞壁の合成阻害剤であり, コリスチンは細胞質膜の直接障害と考えられている²⁾。ノボビオシンも以前は細胞壁合成阻害と考えられていたが spheroplast にも抗菌力があるので膜障害は明らかでない³⁾。KM はリボゾームでの蛋白合成阻害と考えられている。

これらの薬剤の中, CLM と DMP にリゾチームとの相乗作用が認められたのは, 細菌の膜構造に対する協力作用として理解されうる。これらの場合, リゾチームが 10 mcg/ml 以下の少量でも効果があつたことは, リゾチームが, それ自身抗菌力はなくともかなりの障害を細菌に与えていることを示す。接種菌量が少なければ少ないほどリゾチームと他薬剤との相乗作用が大であつたが, 実際の感染症の始まりには菌量は少ないことが考えられ

るので、感染初期には薬剤とリゾチームとの協力作用は効果的である。リゾチームはまた生体内に広く分布しているから、薬剤を単独で投与した場合でも、*in vivo* ではおのづからリゾチームとの協力作用は行なわれていることが考えられる。

リゾチームは生体内にすでに存在する酵素であり、またその投与により生体の種々の代謝を促進する作用もあるので、リゾチームと他薬剤との合剤の病原菌に対する作用が、*in vitro* と *in vivo* とでは異なる成績をもたらすであろうが、*in vitro* に於いて既に認められる協力作用は、*in vivo* でも少なからぬ役割を果すのではないかと考えられる。

結 論

1) リゾチームと Colistin-M, Novobiocin, Aminobenzyl penicillin, Dimethoxyphenyl penicillin, Kanamycin との相乗作用を、種々のグラム陰性、陽性菌につき、平板上と、液体培地におけるのと両法によつて検査した。

2) 平板上でも、液体培地でも、リゾチームと Colistin-M との相乗作用は最も顕著であり、本来両薬剤い

第2表 赤痢菌およびブドウ球菌に対するリゾチームとメタンサルホン酸コリスチンナトリウムの相乗作用

菌 株	メタンサルホン酸コリスチンナトリウムに対する最大発育許容濃度 (mcg/ml)		
	リゾチームなし	リゾチーム 100 mcg/ml	リゾチーム 1000 mcg/ml
<i>Sh. flex.</i> 2 a R 4	0.8	0.2	0.2
2 a	0.4	0.2	0.2
3 a R 4	0.2	0.1	0.1
3 a	0.4	0.2	0.1
<i>Sh. sonnei</i> R 4	0.4	0.2	0.2
<i>Sh. sonnei</i>	0.4	0.2	0.2
<i>Staphylococcus</i> 353	12.5	0.4	0.4
MS 27	25.0	0.8	0.8
209 P	25.0	0.8	0.8
S-103	50.0	1.6	0.4

(mcg/ml)

接種菌量 10⁸/ml 培養時間 8 hr. 37°C

第3表 ブドウ球菌に対するリゾチームとノボピオシン、ジメトキシフェニールペニシリン、カナマイシンまたはメタンサルホン酸コリスチンナトリウムの相乗作用

Lysozyme	DMP			NB			KM			CLM			Control
	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1	3.1	12.5	50	
1000	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
100	+	-	-	+	±	-	+	+	-	+	-	-	+
10	+	±	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
1	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
0.1	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
0	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+

使用菌株 MS 353, 接種菌量 10⁸/ml, 培地, 普通ブロス: 培養時間 37°C 20 hr. 表中数値は薬剤の量 (mcg/ml) を表わす

+ : 10⁸/ml 以上にまで増殖したもの, ± : 10⁷/ml まで増殖, - : 菌増殖のみられないもの

れも単独では抗菌力のないブドウ球菌に対してもよく抗菌作用がみられた。

3) リゾチームと他薬剤との相乗作用は、比較的リゾチームに感受性のある菌を指示菌として用い、接種菌量を少くし、培養時間を短くした場合、最も顕著に観察される。こういう系においては、Demethoxyphenyl penicillin でも、リゾチームとの相乗効果が認められた。

文 献

- 1) SALTON, M. R. J. *et al.* : Biochem. et Biophys. Acta 45 : 355, 1960
- 2) 小谷尚三 : 細菌細胞壁の構造と機能 (1), (2), (3) 表面 5 : 257~266, 5 : 285~297, 5 : 394~403, 1967
- 3) GOTTLIEB, D. & P. D. SHAW (ed.) : Antibiotics, vol. I. Mechanism of Action. Springer-Verlag, Berlin, 1967

第4表 ブドウ球菌に対するリゾチームとノボピオシンまたはジメトキシフェニールペニシリンの相乗作用

リゾチーム量 (mcg/ml)	MS 353			S 2608		
	抗生剤なし	NB	DMP	抗生剤なし	NB	DMP
1000	7	4	5	8	7	6
100	8	5	4	8	7	7
10	8	6	5	8	7	8
0	8	8	8	8	7	8

10⁸表中の数字は10⁸/mlの菌数を各薬剤を含む培地中で5時間振盪培養後の菌数を示し、対数の指数で表わした

NB, DMP の濃度 : 0.1 mcg/ml

COMBINED ANTIMICROBIAL EFFECT OF LYSOZYME
WITH SOME ANTIBIOTICS

YUTAKA NAGAI and HAJIME HASHIMOTO

Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Japan

Combined antimicrobial effect of lysozyme with some antibiotics on various gram-positive and gram-negative bacteria was tested. Lysozyme, when combined with colistin-M, inhibited bacterial growth most effectively. *Staphylococcus aureus*, which is resistant to both lysozyme and colistin, was found sensitive to the mixture of the two drugs.

Combined effect of lysozyme with other drugs could be also found when the indicator strain was rather sensitive to lysozyme, inoculum size was small and incubation time was short.