ヒト胎盤リゾチームの破傷風菌に対する影響について

小黒義五郎・石川英之：三宅正治郎
ミドリ十字中央研究所

（昭和 48 年 9 月 7 日受付）

緒　　言

リゾチームは卵白をはじめ生体の各臓器，体液，さらには微生物などにも広く分布存在する比較的に分子量の小さい塩基性蛋白で，ある種のムコ多糖類を加水分解する酵素として FLEMING[1] によつて同定され古くから細菌溶解酵素として知られていたが，その後の研究により本酵素は単に溶解作用だけでなくその他きわめて多岐に渉る作用を持つことが次第に明らかとなつた。すなわち，天野ら[2,3]は免疫溶菌反応において，抗体，補体の系にリゾチームを添加するときは溶菌反応が促進されると述べ，MUSHEL ら[4,5,6]は *Salmonella* などを用いた抗原抗体反応でリゾチームの存在が反応を亢進させるとし，三橋ら[7]も *Salmonella* を用いて免疫し得た細胞性抗体は補体とともに作用させても菌の発育を抑制することはできないがリゾチームを添加すると発育が抑制されると報告している。

また，細菌感染症の実験的治療に際し抗生物質とリゾチームの併用によつて治療効果を高めるとの報告がある[8,9,10]。われわれも先に[11]マウスを用いての実験的感染症の治療効果として，破傷風菌に対する抗菌活性を検討したところ *in vitro* では抗菌作用を示さないが，*in vivo* の治療実験でリゾチームに救命効果のあることがみとめられ，さらに Penicillin との併用で協力治療効果のあることを報告した。

たほう，菌体外毒素の産生におよぼす作用として，STONE ら[12,13]は破傷風菌毒素の産生について培地にリゾチームを添加すると，培養初期での毒素産生が高まるとし，これはリゾチームによつて細胞壁が溶解し毒素が遊離するものであると述べている。

ここでは，われわれは抗菌血清および補体の存在下でのリゾチームの菌発育増殖に対する作用，ならびに培養菌体からの毒素遊離作用，さらにはマウスを用い毒素による実験的発症に対する抗毒素治療に際してのリゾチームのおよぼす影響などについて検討し，興味ある知見を得たのでここに述べる。

実験材料と方法

本実験に使用したヒト胎盤リゾチームは，井坂ら[14]の方法により作製した株式会社ミドリ十字製の凍結乾燥試製品 (Lot No. 042) で 1.0 mg 中の力価は *Micrococcus lysodeikticus* を基盤とした寒天内拡散法による溶菌活性測定法で国立衛研リゾチーム標準品（卵白）の 1.0 mg 力価と同等の活性をもつものである。

実験 I　抗菌血清および補体存在下での菌発育抑制作用

1. 使用菌株：*Cl. tetani* Harvard 株を用い肝ブイヨンに 35℃ 24 時間培養し滅菌食塩水で 3 回洗滌後，pH 7.0 の滅菌緩衝食塩水に浮遊させ，予じめ生菌数を 1.0 ml 当り約 10^8 個になるよう希釈し，これを原菌液とし 10^4 倍，および 10^5 倍希釈菌液を用いた。

2. 抗菌血清：前項の洗滌原菌液にフォルマリンを添加し 37℃ 2 日間放置，殺菌したのち滅菌食塩水で洗滌したものを，体重 2.5 kg 内外の家兎（雄）に静脈注射し抗菌血清を得た。本抗菌血清はスライドガラス法で凝集価を測定するとき 800 倍の力価を有し，実験に際しては滅菌緩衝食塩水で 10 倍に希釈したものを用いた。

3. 補体：数匹のモルモット新鮮混合血清を 10 倍希釈したものを用いた。

4. 生菌数測定用培地：TGC 培地に寒天を追加し半流動培地としたものを用いた。

5. 実験方法：各希釈菌液に抗菌血清，補体，リゾチームを順次添加して，37℃ 水溶加温したのちそれぞれの試料中の含有生菌数を測定したが，混合ならびに加温の条件は次のような順でおこなつた。

第 1 段階

各希釈菌液 1.0 ml に 10 倍希釈の抗菌血清 1.0 ml，または 10 倍希釈正常家兎血清 1.0 ml を混合し振盪加温 30 分。

第 2 段階

10 倍希釈補体 1.0 ml，または非働化した 10 倍希釈補体 1.0 ml を混合し振盪加温 30 分。

第 3 段階

5,000 mcg/ml のリゾチーム 1.0 ml，または緩衝食塩水を加えて全重 5.0 ml とし振盪加温 30 分。

以上の各段階反応処理後，その 1.0 ml を予じめ保温溶解した 45℃ 前後の TGC 培地に混釈し，高層凝固させ 35℃ 2 日間培養し発育集落数を観察した。

実験 II 試験管内培養時における菌発育増殖抑制と菌体からの毒素遊離作用

1. 使用菌株 (*Cl. tetani* Harvard 株)：実験 I と同様に肝ブイヨンの 1 日，3 日，5 日，および 8 日間 35°C 培養を滅菌緩衝食塩水で洗滌し，これを 10 倍希釈し供試菌液とした。

2. アルブミン液：株式会社ミドリ十字製ヒトアルブミンを滅菌緩衝食塩水で 1,000 mcg/ml に希釈したものを用いた。

3. 生菌数測定用培地：実験 I に同じ。

4. 毒素の力価測定用動物：市販 dd 系のマウス(雄)，体重 15 g 内外のものを 1 群各 6 匹を用いた。

5. 実験方法：各培養日数毎の洗滌菌液の 10 倍希釈浮遊液にリゾチームの各濃度およびアルブミン液をそれぞれ等量に混合し 37°C 水浴，振盪加温 60 分間後に遠沈し，沈澱菌体は滅菌緩衝食塩水で原量に戻し，TGC 培地を用い混釈し 35°C 2 日間培養後，発育集落数を観察した。

上清はブイヨンを用い段階希釈し，マウス大腿皮下に注射し毒素の最少致死量を測定した。

実験 III 抗毒素とリゾチームの併用による治療効果

1. 攻撃用毒素：久保田ら[15]の培地を用い 35°C 6 日間培養液を除菌し毒素液とした。

2. 抗毒素血清：北里研究所製の馬免疫抗毒素血清を用い所要の力価に希釈した。

3. 実験方法：攻撃用毒素はその所定毒素量をマウス大腿皮下に，抗毒素は反対側筋肉内に注射し，またリゾチームは腹腔内に投与した。観察は 6 日間としその生死により治療効果を判定した。

実 験 成 績

実験 I 抗菌血清および補体存在下における発育抑制作用

Table 1 に示すように正常血清添加の各試料は 10^5 倍希釈菌液混合では 19～58 個/ml の発育集落数であるが，抗菌血清添加のものはいずれも 10 個/ml 以下，10^4 倍希釈菌液混合でも発育集落数は少なく，抗菌血清添加による菌の発育増殖阻止作用がみとめられた。そして抗菌血清存在下で，補体，ならびにリゾチーム添加による発育阻止能を大きいものからあげれば(抗菌血清＋補体)＞(抗菌血清＋非働化補体)＞(抗菌血清＋補体＋リゾチーム)＞(抗菌血清＋非働化補体＋リゾチーム) の順となり，この傾向は正常血清を用いての各試料も同様な結果を示した。すなわち，いずれの場合も補体の添加により僅かながら菌発育阻止能がみられるが，リゾチーム添加の場合は抗菌血清または正常血清の存在下では非添加に比し発育集落数はむしろ増加の傾向がみられ，リゾチームによる発育増殖抑作用はみとめられなかつた。

実験 II 培養日数による生菌数の消長と菌体からの毒素遊離能について

1. 培養日数による発育増殖菌数の消長は Table 2 のとおりで，培養日数の経過にともなう菌の増殖はいずれも培養第 5 日をピークとし，以後は漸次減少した。リゾチーム添加による影響は 1,000 mcg/ml 添加で対照のアルブミン液および食塩水に比し僅かに減少をみたが，明らかにリゾチーム添加による有意の差と推察はし難く，この濃度範囲では菌増殖に対し，とくに作用はみとめられなかつた。

2. 菌体からの遊離毒素量については Fig. 1 に示すように，対照のアルブミン液および食塩水は培養日数の経過にしたがつて遊離毒素量は増加するが，リゾチーム

Table 1 Antibacterial action of placental lysozyme on antiserum and complement *(in vitro)*

Sample \ No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Viable organisms *	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Anti-serum *	1.0	1.0	—	—	1.0	1.0	—	—	1.0	—	—
Normal-serum *	—	—	1.0	1.0	—	—	1.0	1.0	—	1.0	—
Complement *	1.0	—	1.0	—	1.0	—	1.0	—	—	—	—
Inactivated complement *	—	1.0	—	1.0	—	1.0	—	1.0	—	—	—
Lysozyme *	—	—	—	—	1.0	1.0	1.0	1.0	—	—	—
PBS *	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0	4.0
Viable-colony-counts (cell/ml) $10^4\times$	18.3	19.3	＞100	＞100	68.3	59.3	＞100	＞100	63.7	＞100	＞100
Viable-colony-counts (cell/ml) $10^5\times$	1.0	1.3	19	26	6	6.7	32	58	4.7	27.3	13

PBS : Phosphate Buffer Saline

* : (ml)

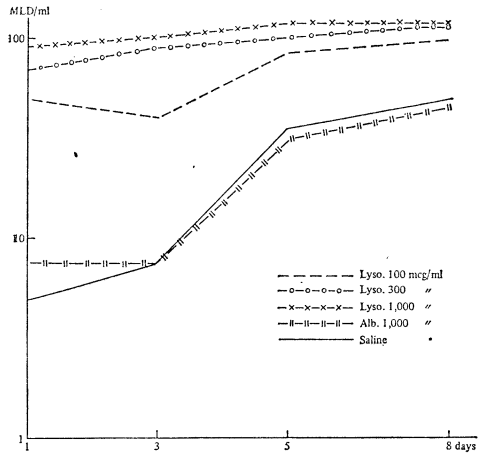
Table 2 Effect of lysozyme against time course of viable colony counts

Sample		Incubation period (days) 1	3	5	8
Lysozyme (mcg/ml)	100	1.8×10^3	2.3×10^3	1.7×10^5	7×10^3
	300	1×10^3	2.2×10^3	1.4×10^5	8×10^3
	1,000	0.4×10^3	1×10^3	5.4×10^5	8.7×10^3
Control	Albumin (1,000 mcg/ml)	1.8×10^3	2×10^3	1.3×10^5	7×10^3
	Saline I	0.7×10^3	1.7×10^3	1×10^5	6.3×10^3
	Saline II	1.3×10^3	2.4×10^3	1.5×10^5	7×10^3

(cell/ml)

Saline I : after shaking and heating
Saline II : before shaking and heating

Fig. 1 Time course of free-toxin from cells

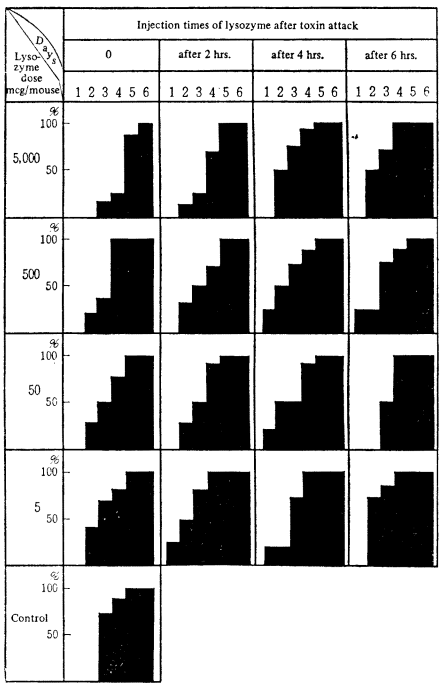


液では培養初期から毒素の遊離は極めて大きく，かつリゾチームの濃度に比例し遊離毒素量は増加した。各培養日数におけるアルブミン液ならびに食塩水での毒素遊離量との差は顕著で1日培養菌体からの毒素量は，両者の18～20倍，3日培養菌体からは12～13倍，5日培養菌体では2.5～3.5倍，8日培養菌体で約2倍に近い遊離量がみられ，とくに幼若菌体における差は極めて大であつた。ことに5日培養菌体ではその毒素遊離量は食塩水，アルブミン液では30～35 MLD，8日培養菌体では両者とも約50 MLDで培養日数の経過とともに徐々に上昇するにもかかわらず，リゾチーム液では菌体に含有される毒素は5日培養菌体以降はほとんど増加せず8日培養菌体の遊離量と大差はなく，菌体含有の毒素は大部分遊離溶出したものと推察された。

実験 III 破傷風毒素による発症に対するリゾチーム単独，ならびに抗毒素との併用による治療効果について

1. リゾチーム単独投与による治療効果は毒素1

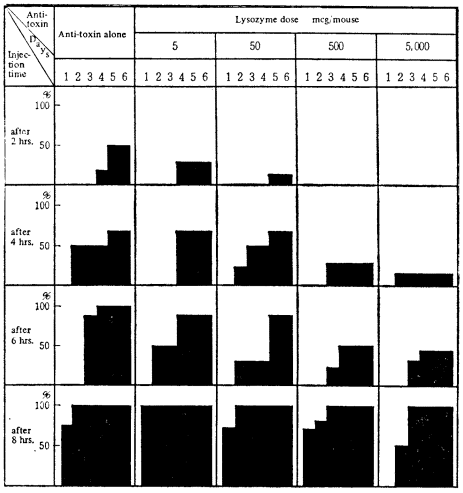
Fig. 2 Protective effect of lysozyme alone after tetanus toxin attack 1 MLD/mouse
(mortality)



MLDでマウスを攻撃し，その直後，2時間後，4時間後，および6時間後に種々な量を腹腔投与し，マウスの生死を観察したが，結果はFig. 2のとおりで，リゾチーム投与群，非投与群とも発症を防御し得ず，すべて死の転帰をとつたが，リゾチーム5,000 mcg投与群で毒素攻撃直後の治療時で他の投与群ならびに対照群に比し僅かに延命効果の傾向を示した。しかしながらこの程度の差では有意とみとめることは困難であつた。

2. 一定量抗毒素をもつての治療に際し併用による効果について，毒素10 MLDでマウスを攻撃し直後，2

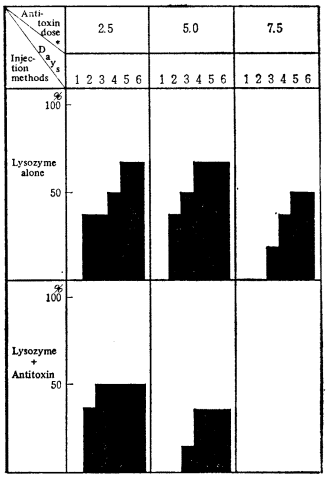
Fig. 3 Protective effect of anti-toxin 10 ut/mouse and lysozyme after tetanus toxin attack 10 MLD/mouse (mortality)



時間後，4時間後，6時間後，および8時間後に抗毒素10単位とリゾチームの種々な量を同時に投与した結果は直後治療群は抗毒素単独，または併用のいずれもすべてマウスは生存し完全治療効果をみた。しかし，2時間後，およびそれ以降の治療群における効果は Fig. 3 にみられるとおり，2時間後治療群で抗毒素単独では死亡率50% であつたが併用治療の各群は，5 mcg 併用で 33.3%，50 mcg 併用で 16.7% の死亡率となり，さらには 500 mcg，5,000 mcg の両併用群ではすべてのマウスは生存し完全治療効果を示した。4時間後の治療群も 5 mcg，50 mcg 併用群は単独治療群と同様な死亡率であつたが，500 mcg，5,000 mcg の両併用群においては明らかに単独治療群に比し死亡率は低く併用治療による効果の増大がみとめられた。さらに，6時間後における治療効果も4時間後治療時と同様に 500 mcg，5,000 mcg 併用の両群は単独治療群より死亡率は低く併用効果がみとめられた。しかしながら，毒素攻撃後8時間を経て治療するときは抗毒素単独または併用投与の各治療群のいずれも発症は防御できずすべて死に至り治療効果はみられなかつた。

3. 毒素攻撃。一定時間後に抗毒素の種々な量にリゾチーム 500 mcg との併用群の効果について，毒素 5 MLD でマウスを攻撃し，4時間後抗毒素 2.5 単位，5.0 単位，7.5 単位を投与した結果は，Fig. 4 のとおりである。すなわち，抗毒素単独投与群では 2.5 単位，5.0 単位の両投与群は死亡率 66.7%，7.5 単位では 50% の死亡率であつた。併用投与群では 2.5 単位は死亡率 50%，5.0 単位では 33.3% といずれも単独投与群に比し低い死亡率を示し，ことに 5.0 単位との併用治療は

Fig. 4 Protective effect of lysozyme 500 mcg/mouse and anti-toxin after tetanus toxin attack 5 MLD/mouse (mortality)



*: ut/mouse

著明で完全に発症を防御し，すべて生存する効果を示した。

考　　察

ヒト胎盤リゾチームの破傷風菌に対する抗菌作用は，すでにわれわれが先の報告で述べたとおり，*in vitro* では菌の発育増殖を阻止し得ないが *in vivo* では明らかに感染発症を抑制できることを見出した。ここでは，抗菌血清および補体との協同作用下でリゾチームの効果を検討したところ，抗菌血清の存在下，さらに補体の添加によつて発育抑制作用はみとめられるが，リゾチームの添加による作用の増強はとくにみられなかつた。

菌体からの毒素遊離作用は MUSCHEL の述べたとおり極めて大きく，とくに培養初期においては著明で 24 時間培養菌体では対照としての食塩水，ならびにアルブミン液での遊離毒素の 20 倍におよぶ毒素量を遊離させることができる。そしてリゾチームの毒素遊離能5日間培養菌体からの毒素量と8日培養菌体での差は，アルブミン液，および食塩水におけるそれと遊離比が小さいこと，また培養日数による発育生菌数から推察し，菌の生存および増殖にはなんらの活性は示さないが，細胞壁に対する作用として古くからリゾチームのもつ作用によつて細胞壁が部分的に溶解した結果として菌体内から毒素が溶出してくるものと考えられる。

毒素に対する抗毒素性の作用は先の報告でも *in vitro* または *in vivo* ともに活性はなかつたが，この実験でも *in vivo* での抗毒素性の作用はみとめられなかつた。しかしながら *in vivo* における実験的治療に際し，抗毒素と併用するときは生体内における抗毒素の中和能は著し

く増強された。すなわち毒素 10 MLD でマウスを攻撃し2時間後に 10 単位の抗毒素で治療するときは生存率は 50% であるにもかかわらず，リゾチーム 500 mcg 以上を同時に併用すると中和能は高まりマウスはすべて毒素攻撃に耐え 100% の生存率を示した。また毒素 5 MLD で攻撃し種々な抗毒素量で治療するとき，7.5 単位投与でも 50% の治療効果をみないが，リゾチーム 500 mcg を併用した結果は 100% の生存率をみた。

これらの成績から抗毒素単独における治療効果と併用による治療効果との相関関係を示せば，次のとおりである。

10 MLD 攻撃後抗毒素 10 単位で治療をおこなつた場合。

○単独治療 2 時間後≒併用治療 6 時間後

5 MLD 攻撃，4 時間後に治療をおこなつた場合。

○単独治療 7.5 単位≒併用治療 2.5 単位

に等しい治療効果を挙げ得る。

そもそも毒素による発症に対する治療手段としては，現在のところ抗毒素の早期投与が認められているだけで，もし治療時期を逸すればいかに大量の抗毒素を投与してもその治療は極めて困難であることは衆知のことである。このことから抗毒素の投与に際し，組織への浸透促進，ひいては血中への早期移行を助長する目的から小黒ら[16]は組織内のヒアロン酸を分解するヒアルロニダーゼを用い抗毒素の血中への早期移行によつて治療効果が高まることを報告した。この作用は，たんに組織内に存在するヒアロン酸の分解による，いわゆる拡散現象の結果にすぎず，リゾチームの併用による効果の増強とは異なる機序であることはいうまでもない。

感染症に対するリゾチームの生体内における作用としては感染菌の細胞壁溶解の結果，菌の死滅，あるいは併用される抗生物質の細胞壁溶解による細胞内の取り込み容易，さらには生体の Phagocytosis の亢進などが推測されるが，毒素による発症に際し，抗毒素との併用が中和能を高めるとの機序は，感染菌体に直接，作用するものとは異なる機序であると推測される。

結　論

ヒト胎盤リゾチームを用い，破傷風菌に対する *in vitro* における抗菌作用，ならびに毒素による実験的発症に対する作用と，抗毒素との併用による治療効果について検討した。

1. *In vitro* での破傷風菌の発育増殖に際して抗菌血清および補体の存在下でリゾチームを添加しても抗菌血清および補体の活性を強めることはない。

2. *In vitro* での菌体からの毒素遊離能についてリゾチームは極めて顕著な作用を示し，菌体細胞壁を溶解し，菌を死滅させないで菌体内の毒素をほとんど溶出させることがみとめられた。

3. *In vivo* において破傷風毒素を抗毒素の中和に際して，リゾチームは抗毒素の中和能を著しく増強する作用がみとめられた。

参考文献

1) FLEMING, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretion. Proc. Roy. Soc. (London). Ser. B 93(653) : 306～307, 1922

2) AMANO, T.; T. MORIOKA, Y. SEKI, S. KASHIBA, K. FUJIKAWA & S. ICHIKAWA: Studies on the immune bacteriolysis. IX. The effect of immune bacteriolytic system and lysozyme on the cell wall preparation. Med. J. Osaka Univ. 6(4) : 1023～1026, 1956

3) INOUE, K.; Y. TANIGAWA, M. TAKUBO, M. SATARI & T. AMANO: Quantitative studies on immune bacteriolysis. II. The role of lysozyme in immune bacteriolysis. Biken's. J. 2. 1. 1～20, 1959

4) MUSCHEL, L. H.; W. F. CAREY & L. S. BARON: Formation of bacterial protoplasts by serum components. J. Immun. 82(1) : 38～42, 1959

5) MUSCHEL, L. H. & J. E. JACKSON: Activity of the antibody-complement system and lysozyme against rough gram negative organisms. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 113(4) : 881～884, 1963

6) L. B. CROMBIE & L. H. MUSCHEL: Quantitative studies on spheroplast formation by the complement system and lysozyme on gram negative bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 124. 1029～1033, 1963

7) KURASHIGE, S.; N. OSAWA, M. KAWAKAMI & S. MITSUHASHI: Experimental salmonellosis. X. Cellular immunity and its antibody in mouse mononuclear phagocytes. J. Bact. 94 (4) : 902～906, 1967

8) 永井　裕，橋本　一：リゾチームと各種抗菌製剤との協同作用. Chemotherapy 17(8) : 1593～1597, 1969

9) 中沢昭三，板垣守正，横田芳武，犬谷好子，三輪真知子，鬼武順子，中山孝昭，房岡温子：細菌溶解酵素 Lysozyme の抗生作用に関する基礎研究。J. Antibiotics, Ser. B 19(1) : 34～47, 1966

10) 中沢昭三，山本郁夫，横田芳武，光武照之，三好英司，山階綏子：細菌溶解酵素 Lysozyme の抗生作用に関する基礎的研究，第2報，アミノベンジルペニシリンとの併用効果。Jap. J. Antibiotics 21(1) : 10～14, 1968

11) 須山忠和，小黒義五郎，土居卓治，井坂健一：胎盤 Lysozyme のマウス実験的感染症におよぼす効果。*Cl. tetani*, *Staph. aureus* および *Diplo. pneumoniae* による実験。Jap. J. Antibiotics 22 (4) : 287～298, 1969

12) STONE, J.L.: The effect of Lysozyme on the production of tetanus toxin. I. Studies with flocculation. J. Bact. 64, 299, 1952
13) STONE, J.L.: The effect of Lysozyme on the production of tetanus toxin. II. Mouse M.L.D. Yale. B. Biol. & Med. 25, 239～244, 1953
14) IZAKA, K.; H. SHIRAKAWA, M. YAMADA & T. SUYAMA: Method for isolation of human placental lysozyme. Analytical Biochemistry 42, 299～309, 1971
15) 久保田憲太郎，山本昭夫：破傷風毒素産生について。日本細菌学雑誌 21(11)：651～660, 1966
16) 小黒義五郎，黒川正治，沼田岳二：血清を標示薬としての Hyaluronidase の拡散性について。北里研究所研究会抄録，北里実験医学，Vol. 25, No. 2, 1952

EFFECT OF HUMAN PLACENTAL LYSOZYME AGAINST *CLOSTRIDIUM TETANI*

YOSHIGORO OGURO, HIDEYUKI ISHIKAWA and SHOJIRO MIYAKE
Research Laboratory, Midori Juji Ltd., Osaka

Antibacterial action of human placental lysozyme against *Clostridium tetani in vitro* was studied as well as protective effect of the lysozyme alone in combination with anti-toxin on experimental toxinosis in mice induced by tetanus toxin.

(1) Lysozyme added to anti-toxin and complement *in vitro*, no enforcing effect was observed on the activity of anti-toxin and complement against *Clostridium tetani*.

(2) The lysozyme revealed a remarkable action of toxin release from cells without killing the microbes.

(3) A remarkable reinforcing effect of lysozyme was noted on neutralization of toxin with anti-toxin.