

## 第 32 回日本化学療法学会総会

会 期：昭和 59 年 6 月 4 日～6 日

会 場：北海道厚生年金会館，札幌市教育文化会館

会 長：熊 本 悦 明（札幌医科大学教授）

## シンポジウム（I）

癌治療における Biological Response  
Modifiers(BRM)の意義

## はじめに—BRMの現況—

塚 越 茂

癌研癌化学療法センター

これまで癌にかかった患者において癌に対し固有の抵抗力のあることが報告されており，これは多くの場合に癌に対する免疫力という形で表現されてきた。これまでわが国をはじめ諸外国で研究されてきた免疫療法も，いずれも癌に対する生体側の免疫機構を回復または賦活化して効果を発揮すると考えられており，その有用性も一応認められている。

これら以外にも癌に対する生体側のいろいろな抵抗性を介してはたらくと考えられる，サイトカイン類その他の研究も次第に進んできた。米国の国立癌研究所においては，このような生体の癌に対する抵抗性を介し，または利用して癌に対する治療を考える試みや物質を総称してBRMとよび，一括して基礎的臨床的検討を加えることが行なわれている。このBRMの考え方はわが国にも紹介されており，以上のような領域に属する研究も総合して発表し討論することは有意義であろうと考えられている。BRMはしたがって癌の新しい治療の方向を示すものであり，BRMの効果的利用法が将来開発されればこれまである程度のゆきづまりをみせている癌の治療法による成果をさらに向上させていくことが可能とも思われる。

本シンポジウムにおいては，広義に解釈したBRMについて，その最近注目をあびている研究について代表的な研究者から御発表をお願いすることにした。今後の新しい癌治療がこの中から生まれ得ることも大いに期待されよう。

## 1. プロスタグランディン E1/D2

今 宿 晋 作・東道伸二郎

京都府立医科大学小児科

癌細胞のなかには，自ら活発なPG産生を行ない増殖するもの（乳癌など）やPGにより増殖が抑制されるもの（神経芽腫など）が存在するため，制癌を目的として前者にはPG合成阻害剤，後者にはPGそのものの効果が検討されてきた。これらの作用効果については *in vitro*, *in vivo* の系で数多くのデータが集積されているが，特に生体内ではPGの作用が複雑にからみ合っているため抗腫瘍効果のみを最大限に引き出すことが容易でなく，いずれの治療法も未だ一定の評価を得るに至っていない。従来これらの研究はE型PGを主体に行なわれてきたが，最近ではPGD<sub>2</sub>の制癌作用の機序解明から生理的なPGとは異なったPG系制癌剤の開発も進められている。

ここではPGの制癌作用という面からPGE<sub>1</sub>とPGD<sub>2</sub>をとり上げ，主に神経芽腫に対する作用を中心に述べる。これらのPGには細胞増殖抑制，分化誘導，血小板凝集抑制作用など，癌細胞の性状をコントロールするいくつかの作用が期待できる。しかしながら，培養系で抗腫瘍性の証明されたこれらPGを臨床応用してゆくためにはまだまだ解決すべき問題が多く残されている。

(1) PGE<sub>1</sub>: dbcAMP, papaverine, PGE<sub>1</sub> など細胞内cAMPを高める薬剤は神経芽腫培養細胞の増殖を抑え分化を促す。C1300神経芽腫の皮下移植腫瘍に対するこれら薬剤の *in vivo* 投与はChangら(1976), Wajsmanら(1978), 土田ら(1979), 角岡ら(1981), 中島ら(1981)により検討され，腫瘍体積増加率の減少はみるが，分化誘導に関しては顕著な変化をみなかった。中島ら(1982)はこれらの薬剤はpulse投与でなく，持続投与すべきだとした。臨床的にもこれらの薬剤を抗腫瘍剤に併用する試みが始まり，papaverine (Helson 1975, Nitschke 1979, 多和ら 1980), PGE<sub>1</sub> と papaverine (東道ら 1978, 中條ら 1981, 今宿ら 1982) などの報告がある。我々の動脈内留置カテーテルからのPGE<sub>1</sub>持続動注法では流域腫瘍の縮小化，分化促進に抗

腫瘍作用の効果増強が認められる。しかしながら、未だまとまった治療成績に乏しく、長期投与に伴う  $\text{PGE}_1$  の免疫抑制や骨融解作用も考慮したさらに optimal な投与条件の検討が待たれる。

(2)  $\text{PGD}_2$ :  $\text{PGD}_2$  は脳をはじめとする各種臓器で種々の生理機能を発現する PG であるが、現在その抗腫瘍性に注目が集まっている。福島ら (1982)、腰原ら (1982)、東田ら (1983)、Simmet ら (1983) によりマウスの L1210, mastocytoma, 神経芽腫, melanoma などの培養細胞で増殖抑制効果が見出され、酒井ら (1983) はヒト神経芽腫細胞の増殖抑制をみた。in vitro の系でのヒト腎・膀胱癌に対する効果についても岡田ら (1983) の報告がある。しかし  $\text{PGD}_2$  のマウス皮下移植腫瘍に対する腹腔内投与効果については東田ら (1983)、岡田ら (1983) によると著効なく、福島ら (1984) は腹水癌には腹腔内投与の効果があつたとしている。 $\text{PGD}_2$  は現時点では未だ臨床応用の段階に至っていない。 $\text{PGD}_2$  の抗腫瘍作用は生理的な cAMP を介する pathway とは別と考えられ、成宮・福島ら (1984) は  $\text{PGD}_2$  の誘導体にその主作用を求めている。従って将来的にはこれら誘導体の臨床応用の可能性も考えられる。

以上の諸点に加えて、現在我々は数種のヒト神経芽腫培養細胞を用いて、個々の細胞の産生する内因性 PG (特に  $\text{TXB}_2$ , 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , および  $\text{PGD}_2$ ) が癌細胞としての性状をどのように修飾しているか、また外因性  $\text{PGE}_1$  や  $\text{PGD}_2$  に対する反応が個々の細胞でどのように異なるか、といった点を検討中であるので、これらの基礎的データについても報告する。

## 2. $\gamma$ 型 Interferon

高久史磨  
東京大学第三内科

Biogen 社製の recombinant  $\text{IFN-}\gamma$  の抗腫瘍効果に関する基礎的な実験ならびに Phase I, II study の結果について報告する。

Recombinant  $\gamma$ - $\text{IFN}$  は分子量 16,000~18,000, その純度は 99% で native のヒト  $\text{IFN-}\gamma$  に対する抗体によって中和される性質を有していた。この  $\text{IFN-}\gamma$  の腫瘍細胞に対する in vitro の殺腫瘍細胞効果を株化腫瘍細胞を用いて検索したところ、黒色腫・膀胱癌・脾臓癌由来の株化細胞に対しては  $\text{IFN-}\gamma$  のみが有効で recombinant  $\text{IFN-}\alpha$  は無効であるという結果を得た。一般的にいて in vitro の培養細胞に対する抗腫瘍効果では、 $\text{IFN-}\gamma$  は扁平上皮癌・膀胱癌・黒色腫細胞に対して障害的に働き造血管の腫瘍細胞にはあまり有効でないとい

う結果を得た。しかしこれは腫瘍細胞系に直接  $\text{IFN-}\gamma$  を添加して殺細胞効果をみたため、例えばヒトの末梢血から単球を分離しそれに  $\text{IFN-}\gamma$  を加えて 1~4 日間培養したあとに培養単球系に K 562 細胞を加えて単球の K 562 細胞に対する細胞障害性をみみると、4 日間  $\text{IFN-}\gamma$  で処理した単球は未処置の単球に比べてより強い細胞障害性を有するという結果が得られた。なおこの単球の細胞障害作用の  $\text{IFN-}\gamma$  による活性化の程度は添加  $\text{IFN-}\gamma$  の量と比例していた。その結果生体内では、 $\text{IFN-}\gamma$  は癌細胞に対する直接の障害併用以外に障害細胞の活性化という機序によって腫瘍細胞を障害している可能性が充分考えられ、また文献的にもそのことを示す結果が報告されている。次に我々はヌードマウスに移植したヒト腫瘍に対する  $\text{IFN}$  の縮小効果を  $\text{IFN } \alpha$  と  $\gamma$  の両方で比較する実験を行なった。現在までに肺の扁平上皮癌 3 例、乳癌、口腔扁平上皮癌, choriocarcinoma 各 1 例の腫瘍を移植されたヌードマウスに  $\text{IFN } \alpha$  と  $\gamma$  を  $10^8$  単位 1 マウス毎日腹腔注射したところ、肺の扁平上皮癌の一例に対してのみ有効でその例では移植腫瘍の明らかな縮小を認めた。この際  $\text{IFN-}\alpha, \gamma$  各々単独および  $\alpha, \gamma$  の併用のいずれの注射によっても移植腫瘍の著明な減少を認めた。この肺癌細胞は PTH 様物質を産出しているため患者自身ならびに移植されたヌードマウスで共に血清 Ca 値が高くなっていったが、 $\alpha$  および  $\gamma$   $\text{IFN}$  の投与による腫瘍の縮小と平行して血清 Ca 値の低下を認めた。

次に recombinant  $\text{IFN-}\gamma$  の Phase I, Phase II study に関する研究グループ (13 の施設) の共同研究の結果を報告する。Phase I study として 34 例の各種癌患者について 5 日間静注の形で Phase I study を行なった。その内、評価可能な症例は 30 例であったが 200 万  $\text{m}^2$ /日 から始めて最高 6,400 万  $\text{m}^2$ /日 にまで達している。副作用として発熱は殆ど全例にみられ、その程度と投与量とは相関がみられなかった。悪感、倦怠感、食欲不振も半数がそれ以上に認められ、また 3,200 万, 6,400 万単位各々 1 例で傾眠がみられた。今までのところこの傾眠傾向が dose limiting になる可能性が考えられた。血液学的な副作用としては白血球および血小板の減少が認められ、白血球数が 1,000 以下になったのは 6,400 万単位投与の 1 例であった。次に行なった Phase II study では原則として 600 万  $\text{u/m}^2$  を連日静脈内に 4 週間投与した。未だ症例が少ないが全身的投与を行なったのは 18 例で投与総量は 8,800 万から 9 億 9,000 万単位。その内腎癌、慢性リンパ性白血病、Mycosis fungoides の 3 例に部分寛解を認めている。局所的な投与は膀胱癌 4 例、皮膚悪性リンパ腫 2 例に対して行なわれ

膀胱癌で完全寛解2例、部分寛解2例、皮膚の悪性リンパ腫で部分寛解1例という結果を得た。なお局所投与の際の症例は4,000万～4億2,610万単位であった。なお副作用はIFN- $\gamma$ の方がIFN- $\alpha$ よりも軽度であるという結果が得られた。しかし規準となる単位の問題を考える必要がある。今後の検索として症例を増やすと共に現在までに検索した腫瘍特に *in vitro* の殺細胞効果やヌードマウスの実験から効果がある程度期待できる扁平上皮癌の検索の症例をもう少し増やす予定である。その他、その他のIFNおよび化学療法剤やinterleukin-2などとの併用の臨床効果を見ることを計画している。

### 3. カルシウム拮抗剤(基礎)

—カルシウム拮抗薬による抗癌剤耐性の克服—

鶴尾隆

癌研癌化学療法センター

現在の癌化学療法が必ずしも治療につながらない理由の一つに、治療中に認められる耐性癌細胞の出現がある。臨床の場でみられる耐性化現象のうち、患者側の因子によるものは、その解析、治療上の対応はむずかしい。しかし、癌細胞そのものが抗癌剤に対して耐性化したcellular resistanceは、近年その臨床における重要性が指摘され、その多くに実験癌でみられる耐性化現象と共通性があることが認められつつある。本シンポジウムでは、実験癌のcellular resistanceのうちでも、最近特に注目されてきたpleiotropic drug resistanceの問題について、最近の知見と、われわれが試みているカルシウム拮抗薬による耐性克服のアプローチについて述べる。

1970年代に入って、アクトノマイシンDやダウノマイシンに耐性になった癌細胞は、ビンカルカロイドに対し耐性であること、また逆も起きる、いわゆる交叉耐性の現象が見出された。この現象は多くの癌細胞において認められ、pleiotropic drug resistance(PDR)という言葉で表現されている。PDRにおいて認められる興味深い性質は、1) PDRは構造的にも、作用機作の上でもまったく類似性のない薬剤において認められる、2)一つの薬剤によって誘導することができる、3) PDRを示す多くの抗癌剤が、天然物であることなどである。現在PDRのメカニズムとして考えられているものは、PDRを示す多くの抗癌剤は、一部共通のメカニズムで膜輸送されており、PDRを示す耐性細胞ではその抗癌剤の膜輸送機能が変化し、抗癌剤の細胞内濃度が低く保たれるというものである。これらの知見はもしわれわれが抗癌剤の膜輸送機構をコントロールすることができれば、抗癌剤の耐性を克服できる可能性を示している。

われわれはカルシウムの細胞機能の研究においてカルシウム拮抗薬やカルモジュリン阻害剤が、抗癌剤の排出機能を阻害することを見出した。その結果カルシウム拮抗薬は癌細胞、特に耐性化したマウスやヒトの癌細胞においてビンクリスチン(VCR)やアドリアマイシン(ADM)の細胞内濃度を高めることを見出した。このカルシウム修飾物質を用いた治療法は上に述べたPDRの性質からみて以下の利点をもっている。(1)ビンカルカロイド系やアンストラサイクリン系の抗癌剤に対する獲得耐性の克服ができる。(2)このアプローチは先天的に耐性な低感受性癌細胞に対しても有効である。その結果、異なる癌の間のあるいは同一癌に存在する細胞間の抗癌剤感受性のheterogeneityが克服され、治療が達成できる。(3)カルシウム修飾物質を用いたアプローチは、同様な機構で細胞外に排出される多くの抗癌剤について、その細胞内蓄積を高め、結果を増強する。すなわちVCR, ADMなどと交叉耐性を示す多くの抗癌剤に対して有効である。

このアプローチのメカニズムについて現在研究中である。カルシウム修飾物質が、抗癌剤の細胞外排出を阻害することは明らかであり、その結果特に耐性細胞において著明な抗癌剤の蓄積がみられる。カルシウム拮抗物質が有効なことよりこのメカニズムには細胞のカルシウムとカルモジュリンの機能が関与しており、その機能は膜構造、膜機能と密接に関係していると思われる。

臨床評価は現在、日本において主に血液系腫瘍に対し、ジルチアゼムとニカルジピンを用いて進行中であり、その一部は次演者によって紹介される。また米国NCIにおいて卵巣癌に対しベラパミールを用いて行なわれており、臨床効果については、近々結果が得られると思われる。

### 4. カルシウム拮抗剤(臨床)

三比和美

埼玉県立がんセンター血液科

最近、鶴尾らは<sup>1-2)</sup>カルシウム(Ca)拮抗剤を併用することにより数種類の抗腫瘍剤に対する耐性が克服できることを*in vitro*で、また動物実験で証明し報告した。今回われわれはこの報告に基づき、Ca拮抗薬であるnicardipineとvinca alkaloidまたはanthracycline系薬剤を併用し、標準的併用化学療法に抵抗性となった造血器悪性腫瘍および一部の固型腫瘍に対して治療を試みてみたので、preliminaryではあるがその結果について報告する。

#### 1. Nicardipineの投与方法

耐性を克服させる Ca 拮抗剤は幾種類か報告されてきたが<sup>1-3)</sup>、今回はその中の一つである nifedipine を取りあげた。in vitro で nifedipine による耐性克服のための最低濃度は 500 ng/ml といわれており、臨床的にこの濃度に到達できるかどうか種々の投与方法の検討を行なった。

#### A. Nifedipine の経口投与方法

a) 最初は経口で投与することから開始した。すなわち nifedipine の常用量は 1 日 60 mg であるが、1 日 80 mg より開始し分 4 として連日投与した。しかし、その後投与量を 1 日 120 mg まで増量し連日内服投与してみた。

b) その後 1 回 30 mg または 40 mg の nifedipine を 2 時間ごとに 5 回内服させる方法を考えた。

B) Nifedipine の静脈内投与方法：経口投与では充分な血中濃度が得られそうもないため、nifedipine 静注法を検討した。投与量は 10 mg/hr~10 mg/m<sup>2</sup>/hr で 8 時間以上かけて投与した。

#### 2. 結果

1 日 80 mg から 120 mg の連日投与の患者で 4 例に血中濃度を測定してみたところ、500 ng/ml 以上に上昇していたのはわずか 1 例であった。一方、2 時間ごとに内服させる方法では 2 例中 2 例とも 500 ng/ml を超えた。静注法では 4 例に血中濃度の測定が行なわれ、そのうち 3 例が 500 ng/ml を超えていた。

表 1 は現在まで nifedipine と併用して治療した全症例を網羅したものである。慢性骨髄性白血病の 1 例の cytoreduction 効果を含めた有効率は 45.5% であった。しかし残念ながらこのような寛解率にも拘らず全身状態の改善、しいては生命の延長をきたしたと印象づけられた症例はなく今後さらに good risk および併用抗癌剤療法等での症例の蓄積が必要かと思われた。

表 2 は血中濃度の最高値が 500 ng/ml 以上に上昇したものと上昇しないものとで効果に差がないかどうかをみたものであるが、やはり効果がみられたのは血中濃度が 500 ng/ml 以上に上昇している者に多い傾向にあった。

Nifedipine の副作用としては血圧低下および頻脈などがみられた。

#### 3. 考案

Ca 拮抗剤による抗癌剤の耐性克服にはまず Ca 拮抗剤の血中濃度を充分上昇させることが必要と考えられわれは種々の検討を加えてきた。その結果、表 3 に示すような投与方法および投与量が妥当ではないかと現在考えている。

Nifedipine の a dose limiting factor は血圧下降であり、われわれは一応 80 mmHg までの下降を目安とし

Table 1 Response to nifedipine-combined therapy

| Diagnosis          | No. of patients | No. of response |
|--------------------|-----------------|-----------------|
| Malignant lymphoma | 4               | 2               |
| Acute leukemia     | 4               | 2               |
| ALL                | 1               | 1 <sup>§</sup>  |
| ANLL               | 1               | 0               |
| CML/BC             | 2               | 1 <sup>*</sup>  |
| Solid tumors       | 3               | 1 <sup>*</sup>  |
| Total              | 11              | 5 (45.5%)       |

ALL=Acute Lymphocytic Leukemia,  
ANLL=Acute Non-lymphocytic Leukemia,  
CML/BC=Blastic Crisis of Chronic Myelogenous leukemia.  
§=CR, ★=PR, \* =Cytoreductive effect.

Table 2 Relationship of plasma concentration to response

| Peak concentration | No. of patients | CR+PR+MR |
|--------------------|-----------------|----------|
| ≥ 500 ng/ml        | 6 (3)           | 3        |
| < 500 ng/ml        | 4 (1)           | 1        |

Number in parentheses means the number of i.v. route.

Table 3 Recommended dose for nifedipine

#### 1. Oral route

a) Poor risk : 30mg every 2 hr×5

b) Good risk : 40mg every 2 hr×5

Two hrs after initiation of nifedipine anti-cancer drugs are given.

#### 2. I.V. route

a) Poor risk : 10mg or less/hr×8

b) Good risk : 10mg/m<sup>2</sup>/hr×8

One hr after initiation of nifedipine anti-cancer drugs are given in i.v. push or continuously.

たが、これでは乏尿の出る場合も考えられるため今後は投与前血圧より 20 mmHg の下降を限度とした方がよいのではないかと考えている。

今回の nifedipine と制癌剤の併用では、制癌剤が単剤であるとの制約にも拘らず期待した以上の効果はあったように思われる。しかしながら、今回の造器器悪性腫瘍患者はいずれも終末増悪期にあった PS 3-4 の患者であったため、反応がみられても生存期間の延長まで寄与しているとは思われなかった。

今後は制癌剤の併用療法による耐性の克服、さらに初回例より nifedipine を併用し生存期間の延長がみられるかどうか randomized controlled study などを行ない慎重に nifedipine の有効性を検討していかねばならないものと思われる。

なお、nifedipine 血中濃度の測定は山之内製薬にお願ひ測定した。

## 【文 献】

- 1) TSURUO, T.; H. IIDA, S. TSUKAGOSHI, et al.: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41: 1967~1972, 1981
- 2) TSURUO, T.; H. IIDA, M. NOJIRI, et al.: Circumvention of VCR and ADR resistance *in vitro* and *in vivo* by calcium influx blockers. *Cancer Res.* 43: 2901~2905, 1983

## 5. Tumor Necrosis Factor (TNF)

新津洋司郎・渡辺直樹  
札幌医科大学第四内科

Tumor necrosis factor (TNF, 腫瘍壊死因子) は、1975年 Oldらにより見出された抗腫瘍因子で、動物種を超えて腫瘍細胞へ細胞傷害ないし増殖阻止作用を示すことから、いわゆる生物学的抗癌物質として注目されている。しかし、その産生の機構、物質の性状、target cell specificity, さらには作用機序などに関していまだに不明な点が少なくない。

そこで本研究では以下の点について検討した。

## 1) TNF の産生

a) TNF の作製: TNF の誘導には priming, eliciting 両 agent の投与が必要であり、priming agent として BCG, *P. acnes*, zymosan や plasmodium, eliciting agent には endotoxin, mixed bacterial vaccine や *Pseudomonas* が報告されている。われわれは、*P. acnes* 1.5 mg, OK-432 10~40 KE を priming agent としてマウス腹腔内に投与、10日後に LPS 10 µg 同部位より投与し、その 1.5~2 時間後に全採血し、tumor necrosis serum (TNS) を分離することができた。さらに、同時に採血した peritoneal fluid 中にも細胞傷害活性が認められ、特に OK-432 を priming agent とした場合、血清中と同程度の TNF 活性が得られた。

b) TNF 産生細胞: TNF の産生細胞については従来 macrophage と推測されてきたが、最近、ヒト B 細胞由来培養株のある種のものにも TNF 産生能が報告され、その不均一性が問題となっている。そこでわれわれは、*P. acnes* 投与マウス脾臓から macrophage, B. T 細胞分画を分離し、*in vitro* で LPS を投与することにより TNF 産生能を検討したところ、細胞傷害活性を認められたのは macrophage 分画であり、B. T 細胞分画には細胞傷害活性はみられなかった。なお、*P. acnes* 非投与群の macrophage には活性は全く認められなかった。ただし、ヌードマウスでは *in vivo* での TNF 産性能が低

く、胸腺移植ヌードマウスで TNF 産性能が回復したことから、T 細胞は間接的に macrophage の増生を促し、TNF 産生に促進的に作用しているものと考えられた。

## 2) Target cell specificity

これまで TNF の target cell spectrum については、議論が多く、すべての癌細胞に有効とする報告とそうでないとする報告がみられる。TNF の各種培養細胞株に対する細胞傷害活性の有無を、前述の TNS を用い *in vitro* の morphological microassay で比較検討した。TNF は L929 cell, B-16 mouse melanoma cell, Lewis lung carcinoma cell, K562 human chronic myelocytic leukemia cell など、ヒト、マウス両者の established malignant cell line に対し、細胞傷害作用を示した。さらに直接癌患者から腫瘍細胞(急性骨髄性白血病細胞、胃癌転移による腹水癌細胞など)を分離し、TNF に対する感受性を調べたところ、高い細胞傷害作用を示した。しかし、HMV human melanoma cell, HeLa cell では影響はみられず、腫瘍細胞でも TNF に対する感受性は細胞株により異なるものと考えられた。また、*in vivo* において TNF の肺転移抑制効果を検討したところ、B-16 melanoma cell を用いた artificial metastasis の系ではほぼ完全に、Lewis lung carcinoma cell を用いた spontaneous metastasis の系でも約 60% の転移抑制効果と原発巣の縮小効果が認められたのに対し、肝細胞など正常細胞には組織学的変化はみられなかった。すなわち TNF は腫瘍細胞に対する特異性が正常細胞に比べてきわめて高いと考えられる。

## 3) TNF の作用機序

特異性がどのような機序に基づくのか、あるいは TNF が腫瘍細胞にどのような sequential event が起って死滅にいたるのかは極めて興味深い問題である。また、*in vivo* での抗腫瘍効果についても単なる細胞傷害作用を反映したものなのか、あるいは他に Schwarzman などの血管をまき込んだ反応も介在しているのか議論が多い。そこで、われわれは吸収実験および microinjection によりそれらの機序について検討を加えた。TNF に対する感受性の異なる L929 cell, B-16 melanoma cell, HeLa cell を用い、TNS を 4°C および 37°C で 2 時間、この 3 種類の細胞で吸収後、L929 cell を target cell として細胞傷害活性を測定したところ、TNF に感受性のない HeLa cell で吸収した群で 40.2% の cytotoxicity を示したのに対し、高感受性の L929 cell で吸収した群では 2% と低値を示し、B-16 melanoma cell では 16.6% と中間の値であった。さらに target cell を trypsin および cckhicine で処理したところ、TNF に対する感受性が低下した。また L929 cell, HeLa cell の細胞

胞質内に TNF を injection したところの細胞傷害作用は全く認められなかった。このことは TNF の細胞傷害作用が細胞表面の TNF receptor を介して発揮され、細胞膜に associate した sequential event が必要であることを示唆していた。

## 6. インターロイキン

矢原 一郎

都臨床研細胞生物学

免疫応答を、それに関与する細胞集団の量的および質的な変動(いわゆる免疫調節というのは、すべてこのレベルで行なわれている)という観点からみると、増殖因子あるいは分化促進因子としてのインターロイキン(IL)は一義的に重要である。IL には、IL 1, IL 2 および IL 3 が知られており、それぞれ対応するレセプターをもつ標的細胞の増殖や分化成熟を促進する作用を有する。本シンポジウムでは、IL 2 および IL 3 に関する演者らの最近の研究の一部を紹介し、併せて現在のインターロイキン研究における幾つかの問題点を論じたい。

1) インターロイキンの分子的性状と活性の発現: IL 2 と IL 3 の活性は共に SDS 処理に対比較的に安定なので、その最低分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で容易に求めることができる。マウス IL 2 と IL 3 の最低分子量は共に約 23 K, ラットの IL 2 と IL 3 は 15 K である。しかし、溶液中におけるこれらのインターロイキンの分子サイズは非常に不均一である。しかも、その分子的性状の不均一さは活性の発現と関連するようみえる。Lewis ラット脾細胞由来の IL 2 とマウス YAC-1 細胞が生産する IL 2 について得た結果を例として示す。

2) IL 2 レセプターの出現と消失: 静止期(G 0 期)のリンパ球は IL 2 やインスリンのような増殖因子のレセプターをもたない。抗原やマイトゲンの刺激により、これらのレセプターが細胞表面に出現する。一方、分裂後のリンパ球を IL 2 非存在下で培養すると、IL 2 レセプターもインスリンレセプターも消失する。興味あることに、インスリンは G 1 期のリンパ球に対し mitogenic ではないが、IL 2 レセプターの消失を妨げる作用を示す。ある増殖因子がそのレセプターばかりでなく、他のレセプターの出現消失の調節に対しても効果を及ぼすことは、リンパ球の応答性の維持という問題に関して、新しい見方を促す。

3) リンパ球活性化の素過程とインターロイキン 2: Con A による T 細胞活性化反応は、(a) IL 2 の生産、(b) IL 2 レセプターの出現、(c) IL 2 レセプター保持

細胞に IL 2 が作用し DNA 合成を誘導する反応、の 3 つの素過程に分けることができる。このうち、(a) の反応にとってのみ細胞間相互作用が必須である。このことを、細胞希釈効果を決定することによって示した結果を紹介する。また、リンパ球のコミットメントが上記(c)の反応の中において起こることを示し、リンパ球活性化における細胞間相互作用について論ずる。

4) Tリンパ球クローンが生産するリンホカイン: IL 2 や IL 3 のようなリンホカインの作用によって免疫系全体がどのような変動を受けるかということ解析する一つの方法は、クローン細胞を用いて、リンホカインの生産細胞と応答細胞を厳密に決定することであろう。演者らは、誘導的に IL 3 と IFN- $\gamma$  を生産するマウスサブレッサー T 細胞クローン(3D10)および IL 3 依存性 P 細胞クローン(1C2)を用いてこの問題にアプローチした。とりわけ増殖因子および分化促進因子の働き方に、どのような細胞社会学的特徴があるかを考察した。

## むすび—BRMの展望—

漆崎 一郎

札幌医科大学内科

このシンポジウムのむすびとして BRM の展望につき述べてみたい。

今日、担癌宿主は癌に対し固有の抵抗性を有することが、主として免疫学の分野において明らかにされた。腫瘍抗原に対する特異的免疫応答が specific cytotoxicity として癌細胞の排除に本質的役割を演じ、killer T 細胞、ADCC の関与する K 細胞として示された。しかし NK 細胞や活性化マクロファージの存在は、非特異的生体防御機構の役割が癌細胞の排除に重要な意義をもっている。本来免疫という言葉は抗原特異的認識を出発点とする現象に限定して用いられるべきであるが、癌に対する生体防御のしくみ、癌発生とその進展に伴う生体防御の変動を詳細に把握し、担癌個体の機能維持をはかり、治療効果をあげ、延命へと結びつけてゆくためには生体防御のしくみを活用しなければならぬであろう。癌の免疫療法は、低下した担癌個体の免疫能を賦活することを意図したものであったが、今日癌と宿主の相互関係を修飾することで癌の治療に結びつけようとする BRM なる概念が生じた。このなかにはいわゆる免疫賦活剤が含まれることはいうまでもないが、その意味するところは広範囲であり、癌と宿主の相互関係に立脚した生物学である。しかしこのような概念はかなり抽象的であり、その具体面が問題となる。monoclonal antibody, liposome immunotherapy, thymosine, active specific intralym-

phatic immunotherapy, chemically defined immunomodular などが第一にとりあげられそれぞれの進展をみた。現在は大きく3つの方法論の進歩がみられている。

第1は hybridoma technology であり、第2は genetic engineering であり、第3は computer technology の開発である。これらの方法論の展開によって、分子生物学的レベルにたった微量生体活性物質の精製、量産が可能になり、癌治療における新しい抗腫瘍性活性物質の開発がみられるようになったのである。その一部はこのシンポジウムで発表されている。interferon および interferon inducer の知見はさらに cytokine, いわゆる monokine, lymphokine のなかから抗腫瘍性の活性物質の開発を可能にした。thymic factor, さらに抗腫瘍性の monoclonal antibody の進展が望まれるし、腫瘍増殖と分化に関係する antigrowth factor ならびに maturation and differentiation factor の研究は新しい展開をもたらすであろう。

## シンポジウム (II)

### Chlamydia 感染症の基礎と臨床

#### はじめに

石 神 襄 次  
神戸大学泌尿器科

中 尾 亨  
札幌医科大学小児科

クラミジア感染症のうち、オウム病は古くから知られた疾患であり、その名のように、オウムから感染した人間は、肺炎を主症状とした疾患を起すことが判明している。最近、オウム類のみならずその他の鳥類においてもオウム病の病原である *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) の感染があり、これらの鳥類を取り扱うものに感染し、疾患を起すことが証明されている。ペットとして小鳥を飼育するものが増加するにつれて本症の意義は大きくなってきている。

オウム病のわが国における疫学は、これまで不明のことが多かったが、本シンポジウムにおいて明らかにされ、ヒトの関係がどのようになっているかということの解明に期待したい。

一方、トラコーマの病原と知られている *C. trachomatis* については、文明国においてはトラコーマの病原としての意義は失われている反面、sexually transmitted disease の病原としての意義はますます大きくなっている。母親の産道において感染した児は封入体結膜炎あるいは/および肺炎を起すことが明らかになり、小児に対

する影響も軽視できぬ問題である。

さらに、非淋菌性尿道炎の起炎菌として本菌の占める割合は近年急激に増加し、淋菌性尿道炎における混合感染を含めて欧米では深刻な社会問題とさえなっている。特に本症が淋菌性感染に比べ、学生をはじめ知的社会層に多いことも指摘されている。わが国においては、従来本菌が生きた細胞内でしか培養、繁殖しないという特殊性から、その増加が警告されながらも臨床症状よりの推測の域をでないのが大半であった。しかし、最近モノクローナル抗体の開発により、比較的容易にクラミジア粒子の検出が可能となり、また培養方法にも一段の進歩が認められ、漸く臨床診断にも応用が可能となりつつあるのが現状といえる。

今回は、この時期をとらえて、基礎、臨床両面より各科領域の研究者から本邦におけるクラミジア感染に対する基礎的研究と疫学の実態が報告される。これらの報告を起点として今後本邦においても本菌感染の重要性が指摘されると共に適切な対策が確立されることを期待したい。

#### 1. オウム病の疫学

平 井 克 哉  
岐阜大学農学部

1931~1963年の間に世界の28か国で5,390名のオウム病症例と89名の死亡が記録されている。最近約10年間にヒトの本病は世界各国で増加している(表1)。WHOの報告にはアジア、中央、南アメリカ、アフリカ諸国からの統計がない。わが国のヒトのオウム病の実態は不明である。1957年ヒトの初発症が報告された。当時の調査では原発性異型肺炎患者160名中20%に抗体が検出されている。1981年までに余らは45症例の患者を診断し、6名の死亡例を記録している。ここ数年間に予研・衛生研究所を中心に疫学調査がなされてきた。健康人の抗体保有率は北海道13.1%、山形19.3%、秋田1.2%、愛知1.7%、岐阜2.5%、山口13.8%である。東京の民間検査機関で1981年に全国から集めた13,275例中2.7%に抗体が検出されている。

オウム病の鳥からヒトへの感染源は重要な順にオウム・インコ類、ハト、七面鳥、アヒル、フィンチ類、野鳥、その他である。アメリカ1975~1978年の間患者の59%、イギリス1975~1980年の間患者の70%がオウム・インコ類からの感染である。欧米では感染源が明らかにされない症例が12~15%記録されている。

近年諸外国からの輸入鳥は年間150~200万羽、そのうちオウム・インコ類10~12万羽、フィンチ類130~

表1 世界のヒトのオウム病

| 年    | US <sup>(1)</sup> | UK <sup>(2)</sup> | 西ドイツ <sup>(3)</sup> | スウェーデン <sup>(3)</sup> | デンマーク <sup>(3)</sup> |
|------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 1974 | 46                | 190               | 145                 | 57                    | 56                   |
| 1975 | 58                | 250               | 172                 | 60                    | 115                  |
| 1976 | 60                | 230               | 167                 | 66                    | 168                  |
| 1977 | 98                | 190               |                     | 108                   | 194                  |
| 1978 | 142               | 160               |                     |                       |                      |
| 1979 | 140               | 245               |                     |                       |                      |
| 1980 | 120               | 480               |                     |                       |                      |

(1) CDC, (3) WHO  
(2) CDS・CDSC

表2 オウム・インコ類からのオウム病クラミジアの分離

| 由 来           | 供試羽数 | 分離数 | 分離率(%) |
|---------------|------|-----|--------|
| 卸売業者(輸入愛玩鳥)   | 636  | 420 | 66     |
| 卸売業者(セキセイインコ) | 203  | 108 | 53.2   |
| 小鳥店           | 30   | 3   | 10     |
| 動物園           | 60   | 19  | 31.7   |
| 一般家庭          | 33   | 9   | 27.3   |

150万羽, その他数万羽である。国内産の愛玩鳥は年間約400万羽, セキセイインコ約100万羽とカナリヤ・文鳥・十姉妹など約300万羽である。表2は1980~1983年の4か年間に卸売業者, 動物園, 小鳥店および一般家庭で斃死または衰弱したオウム・インコ類からのクラミジア分離成績を示している。東南アジアからの輸入鳥のうち, ワカケホンセイ, コセイ, ダルマ, ビセイインコの順に分離率が高い。卸売業者で斃死するセキセイインコの約半数から, 動物園および一般家庭からも高率に分離され, 公衆衛生上問題がある。

欧米諸国の疫学統計からヒトのオウム病感染源の第2はハトといわれている。1968年Meyerは世界各地からのハト16,539羽中27%に抗体を検出し, 20%からクラミジアを分離している。1973~1983年までにわが国の6研究機関で集積された成績では全国1,394羽中, 地区により15~53% 平均32%に抗体が検出され, 分離率は0.8~13.4%である。注目しなければならない。

家畜や愛玩・野生動物はクラミジアに感染すると, 流産, 脳脊髄炎, 肺炎, 結膜炎, 関節炎, 腸炎などを起す。動物からヒトの流産, 結膜炎, 肺炎, 髄膜炎などの症例が集積され, 最近欧米の研究者は鳥類以外に動物も加えたZoonosisを主張している。1980~1983年に収集したわが国の家畜および愛玩動物の疫学調査では牛31.1%, 馬2.2%, 豚0.7%, 犬9.5%および猫2%に抗体が検出され, ヒトへの感染源として憂慮される。

以上欧米と対比しながらわが国のオウム病の現況を要約したが, 本病の疫学的研究は医学・獣医学両領域の綿密な協力が必要である。また本病に対する関係諸機関の対応も重要である(共同研究者: 島倉省吾, 福士秀人,

山下照夫, 伊藤公和, 小川晴子, 小川幸哉)。

## 2. 小児における *Chlamydia trachomatis* 感染症

沼 崎 啓

札幌医科大学小児科学教室

1. 目的: *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) は最近本邦においても sexually transmitted disease (STD) としての病原的役割が注目されている。小児における *C. trachomatis* 感染では母児感染による新生児の封入体結膜炎および乳児肺炎が注目を集めている。演者らは組織培養を用いて新生児の封入体結膜炎および乳児肺炎患児より *C. trachomatis* の分離を試みた結果, 本邦においてもこれらの疾患で *C. trachomatis* が重要な病原的役割を担っている成績を得, 報告してきた。肺炎患児よりの *C. trachomatis* の分離には鼻咽腔スワブを用い, 結膜炎患児よりの分離は結膜スワブを用いた。乳児の *C. trachomatis* 肺炎の血清学的診断には蛍光抗体間接法による特異的IgM抗体の測定を用いた。*C. trachomatis* の血清学的検索には *C. trachomatis* L<sub>2</sub> 株の Reticulate body (RB) を単一抗原とした microimmunofluorescence (micro-IF) 法を用い, 本邦の小児および成人における抗体保育率の検討を行なった。

2. 材料と方法: *C. trachomatis* の分離には cycloheximide 処理 McCoy 細胞および DEAE-Dextran 処理 HeLa 229 細胞を使用した。すなわち, 分離用材料接種前に薬品処理を加えた McCoy 細胞および HeLa 229 細胞に材料を接種し, 遠心を加えた後 48 時間培養し, メ

タノール固定後ヨード染色を施した。分離の判定には細胞質内の特異的封入体の出現を基準とした。さらに、封入体の特異性の確認のため材料の一部は電子顕微鏡による形態学的同定も行なった。臨床材料の採取は肺炎患児は鼻咽腔スワブ、結膜炎患児は結膜スワブによった。*C. trachomatis* の血清学的診断には蛍光抗体間接法による特異的 IgM 抗体の測定を用いた。すなわち、*C. trachomatis* L<sub>2</sub> 株を感染させた HeLa 229 細胞を使用し細胞質内封入体の特異的蛍光の出現を判定の基準とした。また血清疫学的診断への応用として HeLa 229 細胞中で増殖させた *C. trachomatis* L<sub>2</sub> 株の RB を分離・精製し micro-IF 法の単一抗原として用いた。これによって本邦の小児および成人の *C. trachomatis* 特異的 IgG 抗体の保有率を検索した。臨床における迅速診断への応用の目的で FITC 標識単クローン抗体の評価も行なった。

3. 成績：昭和 56 年 12 月から昭和 59 年 2 月までに当科および関連病院に入院した生後 4 日目より 2 歳までの乳幼児肺炎患児 116 例について検索を行なった。その結果、28 例 (24.1%) より *C. trachomatis* が分離されその大半は 6 か月未満の乳児だった。*C. trachomatis* 特異的 IgM 抗体は 116 例中 33 例 (28.4%) に陽性だった。これらの症例の中には肺炎軽快後に RS ウイルスによる細気管支炎を発症したのもあった。また母児感染が疑われ、遷延性の経過をたどり肺炎を再発した症例もあった。演者らの成績では *C. trachomatis* 肺炎と確認された症例は他のウイルス性および細菌性肺炎と同様に冬季に多く発症する傾向が認められた。これらの症例は好酸球増多、無熱性の経過を多く認め Beem らの報告と一致した。しかし、結膜炎、中耳炎の合併は少なかった。新生児結膜炎患児 85 例からは 16 例 (18.8%) に *C. trachomatis* が分離された。新生児結膜炎よりの *C. trachomatis* 同定に FITC 標識単クローン抗体を用いた結果、組織培養法による分離成績と比較しても高い一致率が得られた。本邦の小児および成人 1,005 名より RB を単一抗原とした micro-IF 法で、*C. trachomatis* 特異的 IgG 抗体の保有率の検討を行なった結果、成人では 20~25% の抗体保有率で小児では年齢の上昇に伴う抗体保有率の増加が認められた (抗体価  $\geq 1:10$ )。RB を単一抗原とした micro-IF 法は RB の *C. trachomatis* 全 strain に対する共通抗原性を利用したもので手技的にも elementary body (EB) を抗原とした従来の micro-IF 法より容易であった。

5. 考按と結語：*C. trachomatis* 感染症は最近本邦でも非淋菌性尿道炎をはじめとする STD における病原性が注目されている。本邦の小児における *C. trachomatis* 感染の実態は不明なままであったが、演者らの成績によ

り本邦においても *C. trachomatis* は乳児の肺炎および新生児の封入体結膜炎などの疾患において重要な病原的役割を果たしていることが示唆された。小児における *C. trachomatis* 感染には母児感染が重要な役割をもつとされる。今後は周産期における本症の実態の解明が必要と思われる。*C. trachomatis* の診断に関しても単クローン抗体の導入で多くの施設で可能になるものと思われる。また血清学的診断法にも現在では ELISA 法が導入され、検索が進められている。

今後とも本邦の基礎および臨床の多方面の分野で *C. trachomatis* 感染症の研究が進められることが望まれる。

### 3. 成人女子の抗体保有率と頸管からの *C. trachomatis* の分離率について

橋爪 壮・吉沢 花子  
千葉大学看護学部病態学

成人女子の泌尿生殖器系感染症として、尿道炎、子宮頸管炎をはじめ、子宮内膜炎、卵管炎、骨髄炎、肝臓周囲炎を伴う Curtis-Fitz-Fugh 症候群など多彩で、不妊の原因としても注目されている。

わが国の成人女子の *C. trachomatis* の調査はこれまで殆どなく、この汚染がどの程度かは未だに不明である。今回この汚染の実態調査の一環として性病科外来を受診した女子、一般婦人科受診の妊婦および頸管炎患者、ならびに女子学生 (大学生) の抗体調査、および性病科受診者および妊婦、頸管炎患者からのクラミジアの分離を行なったのでこれらの成績について報告する。

抗体価測定法：ELISA による抗体価の測定は、L<sub>2</sub> 株を抗原とし、ヒト IgG ウサギ血清を用いた Whittaker 社 (旭メジカル社提供) 製のキットを用いた。また一部の血清についてはやはり L<sub>2</sub> 株の網様体を抗原とした間接蛍光抗体法により、抗体価を測定し、ELISA 法との相関をみた。

クラミジアの分離法：HeLa 229 細胞を用い、Wang らの方法に準じ DEAE-dextran 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有 Hanks 液で処理した細胞に検体を接種し、室温にて 430 g で 1 時間遠心吸着後、37°C に 1 時間おいた後、被検液を除去し、cycloheximide 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む Eagle 培地 (ブドウ糖 0.594 mg/ml, l-グルタミン 2 mM 添加) を添加し、72 時間培養した後、ヨード染色および *C. trachomatis* のモノクローナル抗体 (Microtrak) にて分離を確認した。

抗体保有率：女子学生の抗体保有率は 24.2% (15/62)、妊娠 10 か月の妊婦では 41.7% (10/24) で、性病科を受診した女性の保有率は 88.2% (45/51) で、このう

ち特殊浴場の女性は93%(40/43)で、他の群に比較して極めて高い。

また抗体保有率が高だけでなく、その抗体価も中等度ないし強陽性者が多く、間接蛍光抗体法で強陽性例10例につき抗体価を調べてみると、4例は512倍で、他の6例はいずれも1,024倍あるいはそれ以上で、このような高い抗体価の保有者はこの群以外には認められず、この群は質的にも他群とは明らかに異なっていることがうかがわれる。

分離率と抗体価の関係：男性の非淋菌性尿道炎患者からの分離率は40~50%であるが、性病科を受診する女性の分離率は男性に比べ低く、15~25%にとどまる。この群の女性で抗体検査と、分離を同時に行なった28例中5例(17.9%)にクラミジアが検出された5例中4例は抗体中等度陽性者、1例は陰性者からであった。この群の検査例は少ないので、同様の検査がされた男性の非淋菌性尿道炎患者47例につきみてみると、全体の分離率は42.6%(20/47)で、このうち陰性者からの分離率は14.9%(7/47)、弱陽性者から23.4%(11/47)、中等度陽性者からは4.3%(2/47)となっており、分離例数中陰性者および弱陽性者から分離される例が90%(18/20)に達している。しかし、抗体保有状況別にみた分離率では陰性者群36.8%(7/19)、弱陽性者群52.2%(11/23)、中等度陽性者群40%(2/5)とあまり差がみられない。男性例では強陽性者がいないため、弱陽性者からも中等度あるいは弱陽性群と同じく分離が可能であるか否かは不明である。性病科を受診する女性の80%は特殊環境の女性が占めており、高い抗体保有者が多いために分離率が低くなるのではないかという考えは、血中抗体からみる限りむしろ否定的で、今後分泌抗体あるいはそれ以外の非特異的インヒビターなどについても調べる必要がある。

しかし、男性例からもみられるように、IgG抗体でみる限り、陰性者の40%近くからクラミジアが分離される点は、尿路系の感染症では抗体上昇は比較的遅く、この感染症の診断には抗体検査よりも分離、あるいはモノクローナル抗体による抗原検出が重要であることを示唆している。

妊婦および子宮頸管炎患者からの分離：妊娠10か月の妊婦35例中3例(8.6%)からクラミジアが分離された。これは諸外国の報告例と比較し、まず妥当な値と考えられた。

一方、頸管炎患者33名中1例(3.1%)の分離率であったが、臨床的に重症例21例からは分離できず、むしろ軽症例12例中1例(8.3%)からクラミジアが検出された。

このような成績から、例数は少ないが妊婦からの分離率などからみる限り、わが国の一般女性の罹患率は欧米の報告とそれほど変わらないと考えられるが、特殊環境の女性は、その高い抗体保有率、異常に高い抗体保有者の多いこと、分離率もかなり高い点からみて、これらの女性の間ではかなり広範な汚染と、頻回の繰り返しの感染があると推定され、感染源対策上重視する必要があると考えられる。

#### 4. 尿路生殖器感染症からの *Chlamydia trachomatis* の分離

加藤直樹  
岐阜大学泌尿器科

はじめに：最近の sexually transmitted diseases (STD) に対する関心の高まりとともに、*Chlamydia trachomatis* 感染も注目を集めるようになってきた。当教室においては約1年半前より非淋菌性尿道炎(NGU)を中心に尿路生殖器感染症からの *C. trachomatis* の分離を行なってきたので、これらの分離状況とともに、治療成績についても報告する。

材料と方法：男性症例における検体は、尿道炎では尿道 swab、急性副睾丸炎では尿道 swab もしくは中間尿、慢性前立腺炎では原則として VB<sub>2</sub>(中間尿)、前立腺液、VB<sub>3</sub>(前立腺マッサージ後の5~10 mlの初期排尿)とした。女性症例では、尿道、膣、子宮頸管の swab とした。検討した総症例数は827例、1,075検体で、男性は655例、897検体、女性は172例、182検体であった。

採取された検体は transport medium(2SP+10% FCS, pH 7.0) に入れ、培養まで凍結した。*C. trachomatis* の培養法は Taylor-Robinson の教室で行なっている方法に準じた。すなわち、細胞は McCoy cell を用い、遠心は 4,500 rpm (2,850 g) で行なった。培養時間は48時間で、封入体の検出は Giemsa 染色で行なった。

結果：男性症例からの *Chlamydia* の分離率は NGU で 73/159(45.9%)、分泌物中の PMN 数が4個未満の NGU 疑い症例で 18/109(16.5%)、淋菌性尿道炎(GU)で 46/196(23.5%)であった。前立腺液もしくは VB<sub>2</sub> 中の白血球数が  $\geq 5$  個( $\times 400$ )で前立腺炎症状を呈する症例を慢性前立腺炎とした場合の分離率は 2/23(9%)であった。急性副睾丸炎では 2/5(40%)であり、陽性の2例は30歳以下の若年者で、1例は副睾丸炎症状を呈する1日前に尿道炎症状で来院した患者であった。その他では 17/129(13.2%)、healthy control では 1/34(3%)であった。healthy control と各感染症との間の推計学的

な差の検討では、NGU、GU および急性副睾丸炎が healthy 群より有意に高い分離率であった。女性症例からの分離率は、pelvic inflammatory disease(PID)で 2/23 (9%)、子宮頸管炎で 1/32 (3%)、膣炎で 1/7 (14%)、urethral syndrome で 1/30 (3%)、その他で 0/50、尿道炎男性の partner で 3/13 (23%) および healthy の 0/2 であった。partner のうち、*Chlamydia* 陽性男性 4 例の partner では 3 例 (75%) が陽性で、陰性男性 9 例の partner は全例陰性であった。

尿道炎症例において検出された *Chlamydia* の封入体数を比較すると、NGU では 1,000 個台が 40% と最も多く、100 個以上の症例は 74% を占めていた。NGU 疑の症例では NGU とほぼ同様の分布をしていた。GU では 10 個台が 30% と最も多く、約半数が 100 個未満という成績であった。NGU と NGU 疑の症例において、分泌物中の PMN 数と封入体数との間には特に相関は認められなかった。

minocycline と doxycycline の 1 日 100 mg、2 回の投与による NGU の治療では、7 日目判定の 15 例中 *Chlamydia* が再分離されたのは 1 例で、症状が正常化しなかった例は 6 例、すべて消失した例が 8 例であった。14 日目判定では *Chlamydia* はすべて陰性化し、症状は 1 例で正常化しなかった例があったが、残りの 4 例はすべて正常化した。ST 合剤では 7 日目判定で *Chlamydia* はすべて消失したが、6 例中 3 例で症状の正常化がみられなかった。また、*Chlamydia* 陽性の 15 例に ABPC もしくは AMPC の 1 日 1.5 g と *Chlamydia* には抗菌力のない spectinomycin 2 g 1 回を投与した際、全例で *Chlamydia* の消失をみた。

Micro Trak™ を用いた直接塗抹標本からの *C. trachomatis* の elementary body (EB) の検出では、培養との陽性一致率は 22/31, 71%、陰性一致率は 67/69, 97% であった。

考按：今までの当教室での尿路性器からの *C. trachomatis* の分離実験では、欧米と同様に我が国においてもかなりの率で *Chlamydia* 感染がみられ、NGU では約半数が感染を受けていることが判明した。その治療にはやはりテトラサイクリン系抗生剤が有効であったが、投与期間は 2 週間以上の方が良い成績であった。また ST 合剤も有効性が認められた。GU では 1/4~1/5 の症例で *C. trachomatis* 感染を同時に受けていることが分かった。治療では ABPC や AMPC の投与により *Chlamydia* の消失をみているが、その抗菌作用からみて、潜伏感染への移行が懸念された。慢性前立腺炎や急性副睾丸炎における *C. trachomatis* の病原性に関しては議論の多いところではあるが、まだ少数例ながら、*C. tra-*

*chomatis* のこれらとの関連を示唆する結果が得られた。しかし、今後この方面での詳細な検討が切望された。女性症例では、PID などからの *C. trachomatis* の分離率は予期したほど高くはなかったが、*Chlamydia* 陽性男性の partner からは高率に分離されており partner における *Chlamydia* の検索とその治療の必要性が強調された。また、臨床検査法として、Micro Trak™ 法による直接塗抹法は迅速、簡便で極めて有用な方法であると考えられた。

## 5. 男子尿道炎と *Chlamydia*

松本 修・藤井 明・守殿貞夫  
神戸大学医学部泌尿器科

*C. trachomatis* は non-gonococcal urethritis (NGU) の主要な病原体であり、また gonococcal urethritis (GU) にしばしば合併感染して post-gonococcal urethritis の原因となることが欧米の報告にみられる。本邦でも NGU が増加しており *C. trachomatis* の関与が予測される。そこで *C. trachomatis* 感染の実態を知るため尿道炎患者からの分離培養およびモノクローナル抗体による尿道スミア診を試み、さらに治療について検討した。

培養用およびスミア診用検体の採取は Medical Wire & Equipment 社製 *Chlamydia* Transwab を 2 本使用し、尿道内に 2~4 cm 挿入して 2~3 回回転させることにより行なった。培養用検体は SPG transport medium 内に移し 4°C に保存、24 時間以内に -70°C に凍結保存した。swab の 1 本は無蛍光スライドグラスあるいは MicroTrak single well glass slide に検体を塗抹し、7 セトン固定後スミア検査に供した。*Chlamydia* 分離培養は S. P. Wang の方法に準じ HeLa 229 細胞の cover slip culture により行なった。Eagle MEM で培養し monolayer となった HeLa 229 細胞を DEAE-dextran 30 µg/ml を含む Hanks'BSS にて 30 分前処理し、検体を 20°C、2,000 g にて 60 分間遠沈接種した。cycloheximide 1 µg/ml 存在下に 48, 72 時間培養し、May-Grünwald Giemsa 染色および MicroTrak culture confirmation method により *Chlamydia* 封入体が 1 個でも認められた場合に培養陽性とした。後者は FITC-labeled anti-*C. trachomatis* monoclonal antibody による染色で、赤色に対比染色された細胞質内にグリーンの蛍光を発する *Chlamydia* 封入体が観察される。Giemsa 染色では封入体形成の少ない場合には判定に時間がかかり、慣れも必要であるが蛍光染色では比較的短時間にかつ簡単に封入体を判定できる利点が認められた。両者

による培養陽性判定は完全に一致していた。男子尿道炎における *C. trachomatis* 培養陽性率は NGU では 38.9% (36 例中 14 例), GU では 21.1% (38 例中 8 例) であった。欧米では NGU で 30~59%, GU で 4~32% に *C. trachomatis* 感染が認められているが、本邦でも同様にかなり高率に *Chlamydia* 感染が存在することが明らかとなった。

尿道スミア検体の蛍光染色による診断は Ortho 社製の抗 *Chlamydia* モノクローナル抗体を一次抗体, FITC-標識抗マウス  $\gamma$ -グロブリンを二次抗体とする間接蛍光抗体法, または FITC-labeled 抗 *C. trachomatis* モノクローナル抗体による直接蛍光抗体法である MicroTrak direct specimen test により行なった。前者は *C. psittaci* との共通抗原に対するモノクローナル抗体である。蛍光抗体間接法または直接法による尿道スミア診の結果 NGU では 35.3%, GU では 19.0% に *Chlamydia* の EB または RB と考えられる粒子が検出され陽性と判定された。これは培養の陽性率よりやや低頻度であった。MicroTrak 法には対比染色がなされており尿道上皮細胞が赤く染色されるためグリーンの *Chlamydia* 粒子は判定が容易で検査時間も短かった。MicroTrak direct specimen test の施行された 37 例についてみると NGU 20 例中 9 例 (45.0%), GU 17 例中 4 例 (23.5%) が陽性であった。これを培養の結果と比較すると表のように培養陽性の 15 例中 MicroTrak 法でも陽性であったのは 11 例で MicroTrak 法の陽性一致率は 73.3%, また培養陰性の 22 例中 2 例は MicroTrak 法で陽性で陰性一致率は 90.9% であった。sensitivity は培養に比べやや不良であるが、検体の採取, スミア作製に習熟すればさらに診断率は向上するものと期待される。特に single well glass slide を使用し集中的に検体を塗抹すると診断率が改善すると考えられた。いずれにしても本法は短時間に診断が確立すること, および蛍光顕微鏡さえあれば特殊な技術が不要であることから尿道炎における *Chlamydia* 感染の臨床的診断には非常に有用で、今後急速に普及すると考えられる。

次に尿道炎に対する治療について検討した。Sultamicillin 1, 125 mg 7 日間投与では投与終了時の主治医判定で GU では 14 例中 9 例 (64.3%) 有効と概ね良好な成績であったのに対し, NGU 5 例では全例無効であった。また GU のうち *C. trachomatis* 陽性例の中には治療終了後に症状の再燃がみられたものが存在し, post-gonococcal urethritis と *C. trachomatis* の関連を思わせた。Spectinomycin 2 g-一発療法と DOXY の併用療法では GU, NGU とも良好な成績で 7 日目の主治医判定では尿道炎全体の 80% に有効であった。また KM 1 g 筋

Results of MicroTrak direct specimen test compared to the tissue culture method

MicroTrak direct specimen test

|                | +  | -  | total |
|----------------|----|----|-------|
| tissue culture |    |    |       |
| +              | 11 | 4  | 15    |
| -              | 2  | 20 | 22    |
| total          | 13 | 24 | 37    |

sensitivity: 73.3% (11/15)

specificity: 90.9% (20/22)

注 3 日投与と DOXY の併用でも同様に良好な成績であった。GU, NGU の症状などについて比較すると、潜伏期間が 10 日以上の場合には NGU であることがある程度推測可能と考えられた。NGU では症状が軽微で尿道分泌物の量が少なく漿液性であるとされているが、このような典型的な症例は案外少なく、症状面から両者を鑑別するのは困難と考えられた。本邦では尿道炎がペニシリン系薬剤によって治療される傾向にあるが、GU でも *Chlamydia* の感染を伴うことが多いことを考えると、淋菌に対し有効な Spectinomycin などの薬剤と *C. trachomatis* に有効な DOXY または MINO との併用療法で尿道炎を包括的に治療することも臨床的に有用であると考えられた。

### 追加発言 1: オウム病クラミジア感染症の疫学調査ならびに分離株の 2, 3 の性状

松本 明

川崎医科大学微生物学教室

〔目的〕: 川崎医大附属病院入院患者を対象にオウム病クラミジアに対する抗体保有者の疫学調査を行ない、その侵淫度を明らかにする。同時にオウム病患者が飼育したセキセイインコから分離したクラミジアの生物学的性状を検索し、この分離株に対する単クローン抗体を作製し、細胞診に応用できる態勢を確立する。

〔疫学調査の結果および考察〕: 健康人として当院ドックの入院患者 162 名, および当呼吸器内科の入院患者 84 名を対象に SRCF プレート (デンカ生研) を使用して調査し, 表 1, 2 に示す結果を得た。非特異反応や *C. trachomatis* との共通抗原性を考慮して 32 倍以上を陽性とみなすと, 健康成人 (表 1) で 4.9%, 呼吸器疾患患者 (表 2) で 11.9% が陽性であった。呼吸器疾患患者中の抗体価 1,024 倍 1 例と 128 倍陽性者 1 例は共にオウム病の臨床像を呈したが, 他の 8 例では特に呼吸

表1 Frequencies of positive anti-C.psittacosis titers in healthy adults

| Titer | No. of sample |        |         |
|-------|---------------|--------|---------|
|       | Male          | Female | Total   |
| 1,024 |               |        |         |
| 512   |               |        |         |
| 256   |               |        |         |
| 128   |               | 1      | 1       |
| 64    |               |        |         |
| 32    | 5             | 2      | 7(4.9%) |
| 16    | 20            |        | 20      |
| 8     | 12            | 4      | 16      |
| 4     | 4             | 8      | 12      |
| <4    | 73            | 33     | 106     |
| Total | 114           | 48     | 162     |

表2 Frequencies of positive anti-C.psittacosis titers in patients with respiratory diseases

| Titer | No. of patients |        |          |
|-------|-----------------|--------|----------|
|       | Male            | Female | Total    |
| 1,024 |                 | 1      | 1        |
| 512   |                 |        |          |
| 256   |                 |        |          |
| 128   | 2               | 2      | 4        |
| 64    | 1               | 1      | 2        |
| 32    | 2               | 1      | 3(11.9%) |
| 16    | 8               | 3      | 11       |
| 8     | 5               | 2      | 7        |
| 4     | 6               | 9      | 15       |
| <4    | 23              | 18     | 41       |
| Total | 47              | 37     | 84       |

器疾患と抗体価上昇との間に関連性を見出せなかった。これらの結果は岡山地方におけるオウム病クラミジアの侵淫状態が無視できない状況にあることを示している。特に呼吸器疾患患者における高い陽性率については不顕性感染や感染発症しても必ずしも定型的症状を呈さない場合、あるいは他の病因による症状が先行し、これに対する加療によってオウム病発症には至らない場合、さらに気道障害の存在がオウム病感染を容易にする可能性などさまざまなケースが推測され、この原因についてはさらに感度が高い抗体測定法を用いて検討する必要がある。

[分離クラミジアの性状]: オウム病で死亡した患者(表2, 1,024倍陽性例)が飼育したセキセイインコ3羽中2羽からL細胞および発育鶏卵によってクラミジアを分離した。分離株のL細胞における増殖は*C. psittaci* Cal10株のそれよりやや遅く、細胞変性効果は約1日遅れて発現するが、サルファジアジン耐性で、光顕、電顕

による封入体、基本小体(EB)、網様体(RB)の形態はCal10株と大差なく、僅かにEB表面突起数に相異が認められた(分離株で22本、Cal10株で18本)。封入体はモード染色陰性であった。患者血清および抗Cal10株EB家兎血清による蛍光抗体法で分離株封入体は強い特異反応を示した。以上の結果から分離株が*C. psittaci*であることが判明した。分離株は浮遊L細胞でもよく増殖し、そのため大量のEB精製が可能となった。分離株EBは蔗糖密度勾配遠心(20~50%, w/v, 7,000×g)で比重1.19g/mlを示し、Cal10株EB(比重1.21g/ml)より軽い。リピド含量の相異によるものと推測される。RBはCal10株RBと異なり超音波(20kc, 30秒)で破壊されず、蔗糖密度勾配遠心によってEBより重い位置にバンドを形成する。このため分離株EBの高度の精製には密度勾配遠心によるリバンディングを要する。

分離株精製EBを抗原として単クローン抗体作製を試み、蛍光抗体法によって封入体、精製EBに対して強い特異反応を示す2株の単クローン抗体産生細胞株を得た。両細胞株ともに蛍光抗体法には培養上清を直接使用でき、Cal10株とも強く反応した。免疫電顕法によってこれら単クローン抗体はEB、RB共通の内部抗原に対する抗体であることが判明したが、両抗体の反応パターンの相異から、これらは相互に異なる内部抗原に対する抗体であると考えられる。これら単クローン抗体はすでに診断に使用可能な状態にある。

本研究は当教室別所敏子および当呼吸器内科副島林造、日野二郎との共同研究である。

## 追加発言2: クラミジアの病原性をめぐる問題点

徐慶一郎

デンカ生研生物物理化学研究所

ヒトのクラミジア感染症には、*C. psittaci*によるものと、*C. trachomatis*によるものがある。従来トリ、時には哺乳類からヒトへ感染する疾患をオウム病とよんできた。また一方、*C. trachomatis*は、ヒトに固有のもので、Biovarとして、トラコーマ、LGVおよびマウス肺炎が認められている。

クラミジアの宿主域が非常に広いこと、またクラミジアにより起される疾患の多様性には、驚くべきものがある。

我々は、気道感染症の中で、トリとヒトの共通の病気であるオウム病を中心に研究を進めてきた。この間ヒトの肺炎の原因として*C. psittaci*以外に、*C. trachomatis*のあることを念頭においていなかった。しかし、近年

*C. trachomatis* による新生児の肺炎が高頻度に存在することが明らかになり、その重要性を痛感している。

兩種クラミジアの起病性を肺炎について比較すると *trachomatis* に弱く *psittaci* に強いといえよう。

オウム病の場合、軽症では上気道感染症で普通かぜないし無自覚に終ることも多いが、基本的には全身感染症で、肺以外に、肝、脾、腎、心、腹神経系などの各臓器に病変を起こし、重症例では、DIC 症状を示し、短期間に急性死を来すこともある。

クラミジア感染症の宿主域について Storz(1971)らの総説によれば、哺乳類、鳥類のあらゆる種類に分布しており、その惹起する疾患も極めて多様である。ヒトについては、古くから知られたトラコーマ、また封入体結膜炎と多くの性器感染症、oculo-genital infection、そけいりんば肉芽腫症、ライター症候群などが、ヒトからヒトへ感染する homogeneous infection chain として知られている。また、他方 heterologous infection chain として、肺炎、全身感染症、無症状感染症が、トリからヒト、ヒトからヒトへ感染するクラミジア感染症として認識されてきた。この他、流産、結膜炎が、このグループの疾患として報告されてきた。

ヒト以外の哺乳類では、フェレット（もしくはヒト）の髄膜肺炎。マウスおよびハムスターの肺炎や不顕性感染。モルモットの封入体結膜炎と、幼弱モルモットの全身感染症。野兎の全身感染症。家兎の流産と肺炎。ジャコウネズミの全身感染症（大量死亡）。イヌの脳炎、肺炎、腸炎、結膜炎。ネコの肺炎と結膜炎。ブタの腸管感染、漿膜炎、心外膜炎、肺炎、結膜炎、流産。ヤギの腸管感染と肺炎。ヒツジの流産、腸管感染、肺炎、流産、多発性関節炎、結膜炎。ウシの腸管感染、肺炎、脳脊髄膜炎、流産、睾丸炎、精囊炎、症候群、多発性関節炎、結膜炎、乳腺炎（実験的）。ウマの肺炎、肝脳疾患。アザランの潜伏感染。コモリネズミの脳炎、肺炎。

鳥類については、MEYER(1967)が40年間にわたる研究の結果、異な12目に属するトリの130種にクラミジアの寄生を証明している。愛玩用のトリは、この中の異な71種に該当している。その代表的なものとして、フルマカモメ、シラサギ、ガチョウ、アヒル、ニワトリ、キジ、クロガレラ、カモメ、七面鳥、シギ、イエバト、ドバト、オウム、インコなどである。

宿主特異性と異種動物のクラミジア感染の関連性：長い間 *C. trachomatis* は、非常に宿主特異性の高いもので、ヒトもしくはヒトに近いサル類にのみ感染するものと考えられていた。また、偶発自然感染もヒトにのみ起るものと考えられていた。しかし、卵黄嚢内接種あるいは細胞培養分離株は、マウスに毒性を示し、マウス適応

株では、マウスに肺炎を起こしうることも知られている。またマウス適応株は、兎に眼病巣を起こし得ることも知られている。

トラコーマクラミジアの高度特異性とは対照的に、トリまたは哺乳類由来のクラミジア株は宿主や組織特異性を示さない。クラミジアの不顕性感染はいずれの動物種にも知られている。宿主対寄生体の調和された関連性は、クラミジア感染性に共通の現象である。しかし、前述の動物種では、重症な感染症が経験されている。臨床症状の極めて異なるクラミジア疾患が、ヒトや反芻類では認められている、宿主特異性の問題について十分な答えは得られていない。

病原クラミジアは、宿主の細網内皮系の細胞、結膜の上皮細胞、消化管、胎盤の細胞で増殖する。この経過で一ないし多数の器管系に病巣が惹起されるがそれは病原体の侵襲性と毒力に基づいている。クラミジアの病原性に関して中でも毒力は他の因子よりも重要である。しかしその実態は理解されていない。

ここで、クラミジア病原体の最初の宿主が何であるかを推論してみよう。鳥類は伝統的にクラミジア感染症の宿主であると推定するのは尚早のようである。実際にトラコーマは明確な臨床的存在として証明されたヒトの最初の疾患である。MOULDER(1960)は、トラコーマクラミジアが、クラミジア進化における早期型に最も近いものであるらしいことを理屈づけている。GORDON & QUARIS(1965)の亜群 *C. trachomatis* の自然宿主は、ヒトもしくはマウスである。ヒトにおいてこの病原体は同種のチェーンで永続してきた。したがって、トラコーマクラミジアが他の宿主から由来したとは考えられない。一方、亜群 *B. psittaci* は幅広い宿主をもっており、哺乳類と鳥類を含む異種チェーンにより伝搬されてきた。理論的に、これは将来の進化を表わすもので、ある生合成機能の消失に伴い宿主域の拡大と毒力の増殖が同時に起こると考えられる。すべてのクラミジアの病原体がおそらく共通の性質を有しているものと思われる。

#### 〔文 献〕

- 1) Storz, J.: *Chlamydia and Chlamydia induced diseases*, C. C. Thomas, Springfield Illinois (1971).
- 2) Mardh, P. A., et al.: *Chlamydial infections*. Elsevier Biomedical (1982).

### 追加発言3：内科疾患における抗 *Chlamydia trachomatis* 抗体

小花光夫・藤森一平  
川崎市立川崎病院内科

〔目的〕：近年諸外国では免疫不全状態にある成人で *Chlamydia trachomatis* (以下 *C. trachomatis*) が肺炎を惹起したとの報告が散見され、新たに *C. trachomatis* の成人呼吸器感染症の病原体としての意義が注目されつつある。そこで我々は、従来報告がない内科領域疾患における抗 *C. trachomatis* 抗体保有率を疫学的に検討した。

〔対象および方法〕：対象は当院で加療中の糖尿病患者 76 例、血液学的悪性腫瘍患者 28 例(内訳は悪性リンパ腫 18 例、急性白血病および慢性白血病 10 例)とし、各例より原則的に 1 血清ずつ採取した。コントロール対照は医療従事者を主とした健康人 51 例とした。

糖尿病患者においてはコントロール状況をヘモグロビン A<sub>1</sub> 値により 3 群に層別化した。

血清抗 *C. trachomatis* 抗体の測定は、WANG らの方法に準じて Micro-immunofluorescence test を行なった。

〔結果〕：IgG クラス抗 *C. trachomatis* 抗体陽性例は糖尿病患者 76 例では 25 例 (32.9%)、血液学的悪性腫瘍患者 28 例では 6 例 (21.4%) であり、一方、コントロール対照 51 例における陽性例は 6 例 (11.8%) であった。IgG クラス抗体においては糖尿病ではコントロール対照に比べて有意に高い陽性率 ( $P < 0.05$ ) であったが、血液学的悪性腫瘍ではその陽性率はコントロール対照と有意差はなかった。しかし、悪性リンパ腫患者に限ると 18 例中 5 例 (27.8%) と高い傾向があった。

疾患別に IgG クラス抗体陽性例における *C. trachomatis* の Immunotype の頻度をみたところ糖尿病、悪性リンパ腫では B-complex に属する B/E/D が過半数を占めていたが、コントロール対照での Immunotype の頻度と明らかな差は認められなかった。

糖尿病患者でさらにそのコントロール状況と IgG クラス抗 *C. trachomatis* 抗体との関連をみたところ、ヘモグロビン A<sub>1</sub> 値で分類した Good control 群では 32 例中 8 例 (25.0%)、Fair control 群では 23 例中 8 例 (34.8%)、Poor control 群では 21 例中 9 例 (42.9%) に IgG クラス抗体が陽性であった。Good control 群では対照に比べ有意差がなかったが、Fair control 群では有意に高い陽性率 ( $P < 0.05$ ) で、Poor control 群ではさらに高い陽性率 ( $P < 0.01$ ) でありコントロールの良否と抗体陽性率に関連を認めた。

また、治療別に陽性率をみたところ、経口剤治療群およびインスリン治療群で対照に比べ有意に高い陽性率であった。

次に最近の感染を意味する IgM クラス抗 *C. trachomatis* 抗体をみたところ糖尿病患者、血液学的悪性腫瘍患者では各 1 例陽性で、一方、コントロール対照においては陽性例はみられなかった。IgM クラス抗体においては糖尿病、血液学的悪性腫瘍ともその陽性率はコントロール対照と有意差はなかった。

IgM クラス抗 *C. trachomatis* 抗体が証明された一例を提示する。症例は 73 歳、女性。悪性リンパ腫で悪性腫瘍治療中に咳嗽が強くなり、セファゾリン、ゲンタミシンなどの抗生剤無効の発熱が 1 か月続き、胸部レ線では索状影を認めた。本例ではベアー血清で IgM クラス抗体価が 1:128 より 1:16 に減少し、IgG クラス抗体価が 1:32 より 1:64 に増加した。Immunotype は G/F であった。

〔結論〕：本邦においても *C. trachomatis* 感染症が存在し、いわゆる易感染性疾患では健康人より高率に *C. trachomatis* 感染が証明された。特に糖尿病患者では抗 *C. trachomatis* 抗体陽性率が糖尿病コントロール状況と並行していた。さらに、悪性リンパ腫の 1 例で認められたように、*C. trachomatis* が成人でも呼吸器感染を起こす可能性が示唆された。

### 追加発言4：STD における *Chlamydia* 感染

酒井 茂・恒川琢司  
札幌医科大学泌尿器科

1. 目的：sexually transmitted disease (STD) における *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) の占める比重は、近年著しく増加しているとされているが、本邦における正確な報告は、未だ乏しいのが現状である。そこで、最近、我々札幌 STD 研究会において、*C. trachomatis* 感染に関する臨床的検討を行なっているので、その結果につき報告する。

2. 対象および方法：対象は、STD として発症した男子尿道炎、女子子宮頸管炎症例で、札幌 STD 研究会に所属する医療機関を受診した症例、および感染源に対する検討としてトルコ風呂接客婦の血清の *C. trachomatis* に対する抗体価を測定した。直接鏡検法では、蛍光標識モノクローナル抗体 (ダイシバ社製) を用いて、尿道および子宮頸管の上皮擦過塗抹標本にて基本小体を観察した。*C. trachomatis* の分離培養は McCoy 細胞を用いて行なった。血清学的検討は、男子尿道炎、女子子宮頸管炎症例の初診時血清およびトルコ風呂接客婦の血

清を、ワシントン大学三教授に依頼し、micro-IF test により、*C. trachomatis* に対する抗体価を測定した。また、これらの血清については、*C. psittaci* との共通抗原の存在を考え、*C. psittaci* を抗原とする CF test による検索も行なった。

3. 結果および考案：(1) 蛍光標識モルクロナル抗体 (Micro-trak) を用いた直接鏡検法では、非淋菌性尿道炎 (NGU) の 40.0%、淋菌性尿道炎 (GU) の 21.3% に陽性所見を認め、また女子例では、非淋菌性子官頸管炎 (NGC) の 22.7%、淋菌性子官頸管炎 (GC) の 25.0% で陽性所見を認めた。また McCoy 細胞を用いた分離培養では、NGU の 38.1%、GU の 21.8% で *C. trachomatis* を分離し得た。

(2) Micro-IF test による *C. trachomatis* に対する抗体価は、NGU 91 例、GU 105 例、NGC 9 例、GC 14 例で測定したが、8 倍以上の抗体価を示したものは、NGU 18.7%、GU 20.0%、NGC 44.4%、GC 43.8% であった。また Ig クラスでは、9 例 (4.1%) に感染初期であることを示す IgM を検出し、その他は IgG のみであった。同時に、札幌市内トルコ風呂接客婦 76 例の血清について、micro-IF test にて抗体価を測定したところ、75% が 8 倍以上の高い抗体価を示し、最高値は 512 倍であった。また 3 例 (3.9%) で IgM を検出し、トルコ風呂接客婦は、*C. trachomatis* 感染の感染源として重要であると考えられた。

Micro-IF test による *C. trachomatis* の血清型は、64.8% が B-complex に分布し、B、E/D が主なものである。また 22.7% は C-complex に分布し、C/J、I、K が主なものである。血清型の分布は、F/G が欧米の報告より少ないこと以外は、他の報告とはほぼ同様な分布である。

(3) *C. psittaci* を抗原とした CF test では、抗原の種類により抗体価の分布が異なり、また micro-IF test による抗体価との相関性も少ないため、*C. trachomatis* 感染の診断に用いるのは難しいと考えられた。

## パネルディスカッション (I)

### 抗菌物質存在下における Sub-MIC の意義

司会にあたって

紺野昌俊  
帝京大学臨床病理学

Sub-MICs の意義が 4 人の演者ならびに場内からの多数の発言により論ぜられた。これらの論点の中から、ほぼ全体の意見の一致したところをまとめると下記のよ

うになる。

第 1. MIC とは、抗菌物質を評価する上においては極めて重要な指標ではあるけれども、MIC そのものも、薬物の作用機序、菌の受ける障害の量的あるいは質的な相違、あるいは菌側から産生される薬物を阻害する酵素等の総合的な作用に基づく、しかも培養 18 乃至 24 時間後も菌の発育を抑制するという時間的な要因も含んだある薬剤濃度であって、菌に薬剤が取り込まれて何らかの作用がみられる薬剤濃度から MIC に至るまでの濃度には、かなりの濃度幅があり、いくつかのポイントがある。また、MIC から更に高濃度の、菌が完全に溶菌死滅する薬剤濃度までの間にも薬剤濃度幅がある。そして、このような薬物によって菌が何らかの作用を受け始める時点から MIC に至る連続的な濃度を Sub-MICs というべきであろう。

第 2. この Sub-MICs の濃度幅の広い抗菌物質、例えば、今日最も注目されている、いわゆる第 3 世代のセフェム系薬剤などにおいては、この Sub-MICs の薬剤濃度においても臨床効果はあり得るという可能性もあるし、またそのような臨床報告も既に存在する。

第 3. しかしながら、動物を用いた感染防御実験によると、確かに MIC 以下の濃度でもある程度の効果を発揮する薬剤もみられるが、それは接種菌量や薬剤投与方法などによって左右され、それよりも MIC 以下の濃度でも効果が期待できる動物というのは、白血球やその他の動物自体の保持している感染防御能が正常であるという大前提に立たなければならぬということである。

第 4. このような観点から臨床を眺めてみると、これらの Sub-MICs でも効果が期待できるというのは、やはりヒトの感染防御能が正常であるという症例に限るべきで、無批判に受け入れるべきものではないであろうという意見であった。

第 5. ところで、MIC そのものも変動する値であり、臨床における Sub-MICs に対する批判は成り立つとしても、一体、臨床における抗菌物質の常用量とは何を指すのであろうか。ましてや、MIC と常用量の関係となってくると、Sub-MICs の濃度幅の広い薬剤程その関係は複雑となってくる。

第 6. そのような観点から考えると、ヒトに対する常用量は本来どのようにして決められるべきものであろうか。少なくとも、本来の臨床治験の在り方については、phase II の段階における常用量に対するもっと真剣な比較試験の取り組み方が必要だと思われるし、加えて今日の日本化学療法学会で定めた MIC そのものの測定法はそのままにしておくとしても、より一層臨床に即した抗菌物質の指標も考える必要があろう。そして何よりも

大切なことは、化学療法の原点に戻って、もう一度、抗菌力の評価と化学療法の在り方について考えようという気運が感ぜられたことである。

## 1. Sub-MIC をとりまく諸問題

松本文夫

神奈川県衛生看護専門学校付属病院内科

抗菌物質存在下における Sub-MIC の意義と題するパネルディスカッションに際して、演者に与えられたテーマは“Sub-MIC をとりまく諸問題”であるが、演者は Sub-MIC に関する文献的考察を前段として、その臨床上の問題を後段として述べることにする。

Sub-MIC に関連する研究の歴史は決して新しいものではなく、penicillin 発見後間もなくの 1940 年にさかのぼることができる。penicillin の低濃度存在下における *C. perfringens*, Gram 陰性桿菌, *S. aureus* など諸菌種の形態変化がその起源であり、Gardner によって報告されている。その後、欧米では Lorian を中心に多くの研究者によって抗菌薬低濃度下における細菌の形態変化、細菌の増殖、特に log phase に対する抑制、PBP に対する結合などが主な研究課題として検討がつづけられた。一方、本邦においては清水の L-form, 藤井, 西野の filament 形成が 1960 年後半から 1970 年初頭にかけて相次いで報告された。また諸家による新抗菌薬の細菌に対する増殖曲線に及ぼす影響の検討も Sub-MIC の研究の範疇に属するものといえる。

このような研究経過の中で Sub-MIC に関する研究がにわかに活発化したのは 1970 年代すなわち今から約 15 年前のことであって、現在までに 4 回の国際シンポジウムが開催され、さらに広範かつ詳細な研究業績が発表討議されていることは周知のとおりである(表 1)。

Sub-MIC の定義にはいくつかの変遷がみられるが、国際シンポジウムの資料から考察すると、“Sub-MIC とは抗菌薬が細菌に対してなんらかの影響を及ぼす MIC 以下の濃度範囲、すなわち minimum antibiotic concentration(MAC) を起点とする MIC までの範囲”と定義するのが妥当と考えられる。ただし、Sub-MIC 検討のための種々の実験系によって得られる成績、いかにすれば Sub-MIC 値は Sub-MIC の範囲内に、連続的に配列する可能性があるので、Sub-MICs として複数で表現するのが正しい。一方、動物を用いた感染防御実験において感染菌の MIC を超えない血中濃度あるいは組織(病巣)内濃度の投与量で有効の結果が得られた場合にはその成績は *in vivo* における Sub-MIC と理解することができる。

表 1 Progress of studies on sub-MICs

|      |  |
|------|--|
| 1940 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• morphological change</li> <li>• reduction in the rate of log growth</li> </ul>  |
| 1950 |  |
| 1960 |  |
|      | ↓  |
|      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of chemotaxis of neutrophils</li> </ul>  |
| 1970 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• enhancement of bactericidal activity of serum</li> <li>• enhancement of susceptibility of the bacteria to phagocytosis</li> </ul>                               |
| 1980 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• interference in bacterial adherence to epithelial cells</li> <li>• effects of subMIC concentration <i>in vivo</i> in experimental animals and humans</li> </ul> |

Sub-MIC 濃度でみられる細菌の諸性状はいうまでもなく、細菌の種類、抗菌薬の種類によって異なるものの、文献上から得られる総合的な細菌の諸性状には、①細菌の形態変化(電顕像、光顕像)、②分裂・増殖能の減退、③表層構造の変化に伴う諸性状の変化、④病原性の減弱、⑤上皮細胞への接着能の減退、⑥多核白血球による易貪食性の亢進、⑦血清の殺菌能亢進などがあげられる。前三者は細菌と抗菌薬との関係すなわち parasite-drug-interaction における現象であるが、抗菌薬の臨床成果は host-parasite-drug-interaction によって規定されるので、臨床上問題となるのは後四者である。

1970 年以降、特に host-parasite-drug-interaction を基盤とした研究が活発化した事実についてはわれわれ臨床家は抗菌薬療法本来の姿に立ちかえる必要のあることを改めて示唆するものとして注目しなければならない。

本パネルディスカッションの本题である Sub-MICs の臨床上の問題を明確にすることは必ずしも現状では容易ではないが、少なくとも三つの問題点をあげることができる。

第一の MIC 以下でも臨床効果の得られる抗菌薬があるか否かについてはその事実を臨床例で捕捉することは必ずしも容易ではないが、MIC と臨床効果との discrepancy がしばしばみられる抗菌薬がこれに該当する。そ

の原因には MIC の測定方法あるいは抗菌薬の病巣内移行性などが考慮される。併用療法では *in vitro* での相乗効果が明確な場合には併用両薬剤の抗菌力は Sub-MIC の範囲内にセットされ、また併用療法での併用薬剤の病巣内濃度はいずれか一方、あるいは両薬剤とも Sub-MIC 濃度にとどまる可能性が考えられるので、併用効果がみられる薬剤もこの範疇に属するものと思われる。さらにタンパク結合率の高い抗菌薬もこれに該当するであろう。

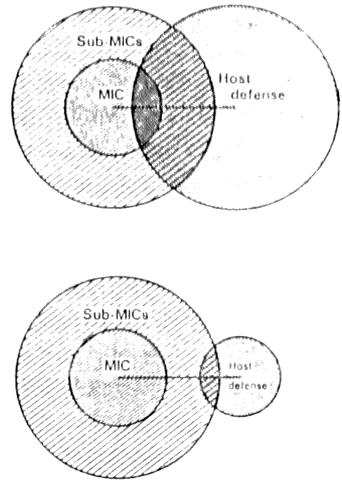
第二の抗菌薬の少量、微量使用で有効な成績が得られる感染症があるか否かについてはすでに桂のツツガ虫病に対する tetracycline の少量使用あるいは大越、名出、鈴木、熊本らの尿路感染症（急性単純性膀胱炎）における少量使用の有効性の報告がある。最も重要な問題点は第三の抗菌薬の適正使用の設定における Sub-MIC の導入如何である。確実な臨床成績を得るためには使用抗菌薬の病巣内濃度を MIC 以上に維持する必要があるが、実際には病巣内濃度は時間とともに変動し、動的なものであって、使用抗菌薬が MIC 測定条件と同様、感染菌に対して長時間一定濃度で接触しうるとは考えられないので、臨床成果に関連する Sub-MIC の検討成績を考慮した使用量、使用方法の決定は極めて有意義なものといえる。

Sub-MIC の臨床的意義については Sub-MIC を指標として検討された抗菌薬の臨床成績がほとんど見当たらないために明確にしないのが現状であるが、Sub-MIC の臨床的意義を Sub-MIC の merit および demerit と理解するならば、merit は抗菌薬の適正使用による無計画な使用量、使用方法の抑制であって、それにより副作用、副現象の防止、経済性を得ることが可能であろう。特に経済性は私共臨床家の姿勢にも関連した重要事項である。一方、demerit には細菌の耐性獲得機序によってすでに明らかにされている耐性誘導がある。

Sub-MIC をとりまく諸問題をさらに明確にするためには Sub-MIC の臨床上の条件を考慮する必要がある。この点に関して演者らは抗菌薬処理大腸菌（尿路感染症由来）に対するヒト多核白血球の食食性について健康成人、高齢者および新生児の多核白血球を材料として検討したところ、薬剤によって食食性が異なることと、新生児においてはほとんど食食性の亢進が認められないことを観察した。このことは新生児においては Sub-MIC を基準とした抗菌薬の使用量、使用方法の設定には無理のあることを示唆するものであって、Sub-MIC は host defense の低下がみられない症例においてのみ適用されることを指摘している。

抗菌薬、感染症の種類によって Sub-MIC 幅は伸縮

図 1 Interrelation between sub-MICs and host defense in anti-infective therapy



し、host の条件も多彩であることから、Sub-MIC の臨床上の条件を明確に表現することは極めて困難であるが、図は臨床成績に関連する抗菌薬の基礎的検討については MIC のみならず、Sub-MIC を含めた総合的なものであるべきこと、また Sub-MIC のみを抗菌薬の選択使用基準の条件とすることには慎重を要することを示したものであり、演者のむすびとしたい。

以上、Sub-MIC について文献的考察と臨床上の問題点を提示したが、Sub-MIC の研究はわれわれ臨床家の終局の目的ともいうべき、適正な抗菌薬療法はいかにあるべきという命題に答を与えるものと考えられるので、今後の検討が期待される。

## 2. Sub-MICs において菌側に見られるいくつかの問題について

生方 公子

帝京大学医学部臨床病理

本邦において、私達が Sub-MICs に関連している現象を問題にしたのは、約 15 年前のことで、それは慢性腎盂腎炎の患児の尿中にフィラメント化した *E. coli* や *P. aeruginosa* を見出したことから始まっている。当時これらの現象から、私達はペニシリンやセフェム系の薬剤について、*in vitro* における薬剤作用時の菌の形態変化や生菌数の変化などについて検討を行なったが、その結果、MIC よりも低濃度から菌のフィラメント化がみられ、MIC 以上の濃度になると溶菌がみられるという基本的なパターンのあることを見出した。そして、その形態変化の生じ方には薬剤によって種々の特徴があり、

幅広くフィラメント形成のみられる薬剤や、逆にその幅が非常に狭く溶菌像の多くみられる薬剤も存在すること、さらには菌種によっても形態変化は異なることを報告してきた。

その後開発されたペニシリンあるいはセフェム系薬剤においても、2, 3の例外を除いて薬剤作用後の菌の形態変化は上述した現象と基本的には一致している。しかしながら、改めてこのような形態変化を生ぜしめる MIC 以下の薬剤濃度を云々すると、必ずしも一致した見解があるわけではない。ことに、近年開発されたペニシリンやセフェム系薬剤は、抗菌力が極めて優れているといわれているが、その中には MIC 以下の濃度においても異常に長いフィラメントを形成したり、また接種菌量によって MIC が大きく変動する薬剤も見受けられる。

そのようなことから、私達の行なってきた一連の研究の中から、腸内細菌属の *E. coli*, *E. cloacae*, *M. morgani* および *S. marcescens* にセフェム系薬剤を作用させた際の生菌数や菌の形態変化あるいは PBP への薬剤の親和性などについての成績をとり上げ、MIC の意義を改めて考えてみることにした。前述したように、MIC は接種菌量によって大きく変動するから、接種菌量によってもあまり変動せず、しかも短時間で判定できる index はないかと探っていくと、セフェム系薬剤の場合、いくつかの現象が比較的再現性の良いことが判明した。

その第1は、薬剤添加後菌が形態変化、すなわち、フィラメント化し始める薬剤の最低作用濃度である。この濃度を minimum effective concentration (MEC) とすると、この濃度は接種菌量の影響を受けずに常にほぼ一定であり、増殖の遅い菌をも含めて判定しようとする、時間的には少なくとも4時間は必要であるという成績であった。第2には、薬剤添加4時間後に培地中の生菌数が接種時の菌数よりも減少し始める薬剤の最低濃度である。この濃度を、minimum growing inhibitory concentration (MGIC) と呼称したが、この MGIC も菌種によってもまた接種菌量によっても変動が少なく、再現性は良いものであった。そしてこの MGIC は、菌の形態観察の上からは、溶菌が出現し始める薬剤の最低濃度とほぼ近似した値でもある。溶菌の出現し始める薬剤の最低濃度は、minimum lytic concentration (MLC) と表現したが、顕微鏡下で観察するという多分に主観的な要素も入るが、この MLC も短時間では接種菌量の影響をほとんど受けない index であった。

さらに、顕微鏡下の観察においては、視野中の菌が4時間以内にほぼ完全に溶菌に至る濃度がある。この濃度

は、液体培地中では生菌数が菌接種時のレベルから 1/100 程度に減少している濃度とほぼ等しい。この濃度を minimum decreasing concentration of viable cells to 1% (MDC) と呼称したが、この index は菌種によっては接種菌量の影響を受けたり、溶菌像が少なかったり、例えば *S. marcescens* や *M. morgani* などでは必ずしも再現性の良いものではなかった。その理由としては、これらの菌が産生する  $\beta$ -lactamase に対して薬剤が安定であるか否か、あるいは薬剤の膜透過性、または、菌の浸透圧に対する抵抗性などに由来する部分が大いと思われる。そして、この MDC の再現性の悪い菌において、より Sub-MIC の問題が生じると考えられた。

これらの index と PBP との関連についてであるが、PBP に対する薬剤の結合の kinetics は cell free の状態で行なう実験であり、薬剤の膜透過に関して何かよい index があれば、本来はその良否を考慮におこななければならない。菌の形態変化は、PBP 3 に対して薬剤が結合し始める濃度付近から生じ始め、PBP 3 への薬剤の結合開始濃度が MEC と極めて近似していることが判明した。そして、溶菌の出現し始める MLC は、PBP 3 に対する薬剤の結合のみでは不十分で、1Bs に対してもある程度の薬剤の結合がみられる濃度であった。したがって、PBP 3 と 1Bs に対する薬剤の kinetics がほぼ同じ薬剤では、MEC と MLC との間の薬剤濃度幅が狭くなり、菌のフィラメント形成も弱く、容易に溶菌像がみられ、それらの薬剤では Sub-MICs が特に問題となるようなことは少ないように考えられた。大部分の菌が溶菌する濃度、すなわち MDC の位置を PBP に対する薬剤の kinetics の上から求めると、ほとんどの例で PBP 3 に対しては 80% 以上の結合と 1Bs に対しても 50% 以上の結合を示す例の多いことが判った。

上述した種々の index を、菌の形態変化と共にまとめ、寒天平板法による MIC との位置的關係をみると、 $10^6$ /ml の菌接種時における MIC でも MEC, MGIC あるいは MLC よりもやや高い濃度に位置し、 $10^8$ /ml の菌接種時の MIC が MDC とほぼ近似するかあるいは MDC よりもやや高い濃度であるという結果であった。そして、この MEC と両 MIC との間における薬剤濃度域が Sub-MICs に相当するといえよう。このような Sub-MICs の定義のもとで、最近開発されたセフェム系薬剤を眺めると、それらに共通している特徴は、菌体内への薬剤の取り込みが極めて良好なこと、そして PBP 3 に対する親和性が極めて高いということにある。つまり、MEC から MIC までの薬剤濃度幅が著しく広いということであり、この薬剤濃度幅における形態変化の主体は、フィラメント化であるということになる。

スィラメント化した菌の感染防禦上の意義については、既に種々の報告もあるが、忘れてならないのは薬剤消失後におけるこれらの菌からの再分裂・再増殖の問題である。Sub-MICsの薬剤存在下においても臨床上有効な薬剤とそうでない薬剤があるとするならば、これもひとつの要因として今後検討すべきことであると考えられた。

### 3. 生体防御能と Sub-MIC

小川正俊

東邦大学医学部微生物

有効濃度以下の薬剤が感染菌および生体防御作用にどのように影響するかは薬剤の種類と Sub-MIC での各種濃度、感染菌の種類、宿主の状態や感染部位などによって異なると考えられ、これらの現象を *in vivo* で解析することは容易ではない。しかし動物の感染モデルを用いた実験と *in vitro* の実験成績を照合することにより、この問題にアプローチできるのではないかと考え、マウス全身感染に各種薬剤を有効濃度以下の血清中濃度しか得られないように投与し、その治療効果を調べ、一方 *in vitro* で感染菌および生体防御能に対し、Sub-MIC の薬剤がこれから、どのように作用するかを検討し、その成績から生体内における Sub-MIC の薬剤が、生体防御能にどのように協力するかを推論した。

#### 1. Sub-MIC 以下の血清中濃度での治療効果

マウス実験全身感染における治療効果において血清中濃度のピークが MIC 以下 (Sub-MIC) における投与量での生残率を調べてみると *E. coli* C 11 株感染において MZPC (1/2 MIC, 1/4 MIC の血清中濃度の投与量), CPZ (1/2 MIC, 1/4 MIC), CTX (1/2 MIC), CMX (1/2 MIC, 1/4 MIC), CAZ (1/2 MIC), LMOX (1/2 MIC), GM (1/2 MIC) に生残マウスが認められた。しかし PIPC, CEZ, OFLX では 1/2 MIC 以下では生残するマウスは認められなかった。

*E. coli* 94 株感染では MZPC (1/2 MIC), PIPC (1/2 MIC), CEZ (1/2 MIC), CTX (1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC), CMX (1/2 MIC, 1/4 MIC), CAZ (1/2 MIC, 1/4 MIC), LMOX (1/2 MIC, 1/4 MIC), GM (1/2 MIC, 1/4 MIC), OFLX (1/2 MIC) に生残マウスが認められた。

*K. pneumoniae* TMS 2 株, 3 K 25 株感染には、MZPC, PIPC, CPZ, CTX, CMX, CAZ, LMOX, GM, OFLX を投与したが 1/2 MIC の血清中濃度における投与量での生残率は 0% であった。

*S. marcescens* No. 2 株感染では、CFX (1/2 MIC) で救

命できるマウスが認められたが、他剤はすべて MIC 以下の投与では無効であった。

*S. marcescens* TMS 8 株感染において、CFX (1/2 MIC, 1/4 MIC), CAZ (1/2 MIC, 1/4 MIC), OFLX (1/2 MIC) 投与で生残するマウスが認められた。しかし他剤はすべて MIC 以下の投与量では効果が認められなかった。

*P. aeruginosa* P 167 株, E 7 株を感染菌としたマウスには MZPC, PIPC, CPZ, CTX, CMX, CAZ, LMOX, CFS, GM, OFLX を投与したが MIC 以下の投与量では、全薬剤ともマウスは生残しなかった。

以上の実験により、*E. coli* 感染のみが、MIC 以下の投与量で治療効果が認められ、他の菌種については、この実験系では効果はないと判断された。

#### 2. マウス好中球の食殺菌に対する Sub-MIC の薬剤の影響

MIC 以下の投与量における治療が菌種によって異なることから、使用した感染菌と生体防御能との関係をマウスの血清および好中球の殺菌作用と virulence との関連性から比較した結果、マウス血清は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* の 4 菌種各 5 株に対し殺菌作用は示さなかった。しかしマウス好中球はそれぞれの菌株に対し殺菌作用を示し、マウス好中球に殺菌される菌株は LD<sub>50</sub> 値が大きく、殺菌されにくい菌株は LD<sub>50</sub> 値が小さく、virulence と相関していた。

マウス好中球が感染の成立に大きく関与していることから、好中球の食菌作用に MIC 以下の薬剤がどのように関与するかを *in vitro* で検討した。

薬剤を CTX とし、マウス好中球に CTX を MIC 以下の濃度に添加して、各菌種に対する殺菌作用を比較した結果、CTX 添加においてマウス好中球の殺菌作用が増強される場合には *in vivo* の実験においてもマウスの生残率が高いことが認められた。

以上の結果から重症な感染である敗血症の系においては、一般に MIC 濃度以下の薬剤の作用は低いと考えられる。しかしその程度は薬剤および菌種によって異なり、*E. coli* による軽度な感染には薬剤によって効果のある場合も認められた。

*in vivo* 効果の認められた菌株では、*in vitro* での好中球の殺菌作用への Sub-MIC の薬剤の協力が認められた。マウスと異なりヒトの血清には補体の殺菌作用があり、これらの成績は必ずしもヒトに適用されるものではなく、また免疫系への影響については全く不明である。

### 4. 尿路感染症における MIC について

坂 義 人

岐阜大学泌尿器科学教室

我々は以前より抗菌剤の投与方法について検討してきたが、今回は Sub-MIC に関する *in vitro* の検討と最小投与量に関する dose finding study の成績を報告した。

*in vitro* の検討では *E. coli* (菌数  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml) に ampicillin (ABPC), sulbenicillin, cephalothin, および kanamycin (KM) などの各種濃度 (最低 1/32 MIC, 最高 64 MIC) を 24~3 時間作用させて細菌増殖抑制効果を biophotometer で観察した。上記薬剤の Sub-MIC 濃度 3 時間作用でも増殖抑制効果が認められ、その効果の認められる最低濃度は penicillin 系, cephem 系では 1/8~1/4 MIC, KM では 1/2 MIC であった。細菌の形態変化についても検討したが、penicillin 系, cephem 系薬剤の 1/16~1/8 MIC 濃度でもフィラメント形成が認められた。このように Sub-MIC 濃度でもかなりの抗菌効果が認められ、生体においては、さらに感染防御能が加わって臨床効果が発揮されるものと思われる。

臨床的検討では、UTI 薬効評価基準に合致した急性単純性膀胱炎症例に ABPC を 1 日 2g, 1g, 0.5g, 0.2g および 0.1g を 4 回に分けて 3 日間投与して細菌の消失率と MIC の関係を検討した。対象はすべて単独感染症とし、MIC は  $10^6$  CFU/ml 接種を採用した。検討症例数と細菌消失率は、2g 投与群が各々 63 例: 97%, 1g 群が 85 例: 80%, 0.5g 群が 52 例: 83%, 0.2g 群が 56 例: 68% および 0.1g 群が 20 例: 60% で、全体として投与量の低下に伴って細菌消失率も低下したが、その程度はそれ程大きいものではなかった。しかし分離菌に対する MIC が 200  $\mu$ g/ml 以上の耐性群と 100  $\mu$ g/ml 以下の感性群に分けてみると、感性群の消失率は投

与量による差を全く認めなかったが (98~89%), 耐性群では 2g→0.1g 投与量にわたる消失率が各々 80%, 47%, 20%, 6% および 0% と著明な低下が認められた。このことは一般に、細菌消失率は MIC 値の高い菌群の消失率に左右され、薬剤濃度が cover できる範囲の細菌から消失してゆくことを意味している。このような観点から、分離菌の MIC 累積分布曲線を描いた場合、細菌の消失率に一致する累積%となる MIC 値以下の菌が、薬剤の抗菌作用と生体防御能の総合力で消失すると考えることができる。この有効濃度は仮想のもので、これを clinical effective level (CEL) と名付けると、投与量と CEL の間には一定の相関性が示唆された (図 2)。仮に、この相関関係が求められれば、未知の投与量における細菌消失率を予測することができ、最小投与量の決定あるいは抗菌薬の薬効評価の上で有用である。そこで今回の成績について両者の関係を種々の曲線にあてはめて検討したところ、比較的直線性が認められた。投与量の極めて低い部分では指数関数的になることが予想

図 2 Doses and CELs

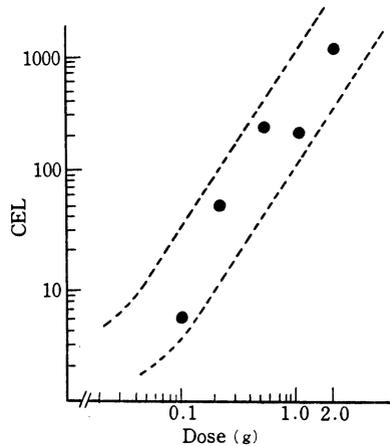
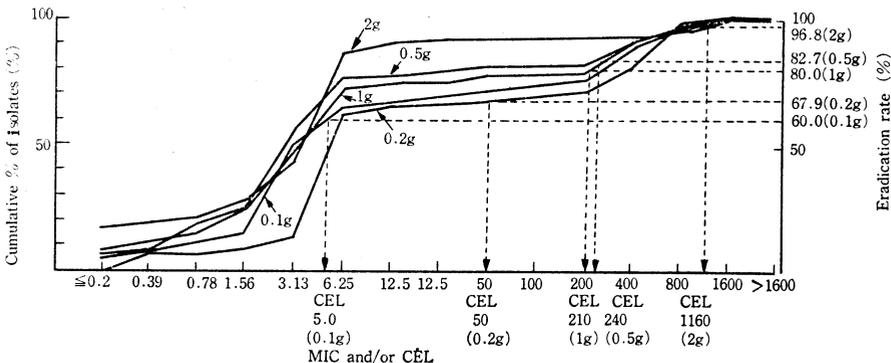


図 1 Eradication rate and CEL in various therapeutic doses of ampicillin



されるが、この部分に関する臨床的検討は極めて困難で現時点では定かではない。この低域での臨床的検討に代って、ヒトの膀胱機能に類似させた bladder model を応用することも考えられ、この予備的検討の結果も示した。

現在はまだ投与量と CEL の関係を充分明らかにするには至っていないが、CEL の概念を導入することにより、未知の投与量における細菌消失率を予測する方法およびその可能性について報告した。

## パネルディスカッション (II)

### 腫瘍に選択的に作用する制癌剤の基礎と臨床

はじめに

太田 和雄  
愛知県がんセンター

大沢 伸昭  
東京大学内科

現在、使用されている制癌剤の大部分は、その制癌作用のみをとりあげると極めて強力であり、癌そのものを抑制するためには十分な能力をそなえている。しかし、患者に投与される場合には、重篤な副作用が併発するために、癌細胞を絶滅せしめるだけの充分な量を用いることができず、これが制癌剤の臨床における最も大きな問題点となっている。

これを解決するために、制癌剤を腫瘍にのみ作用せしめる方法の開発が注目されている。腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体、あるいはそれに制癌物質を結合せしめた複合体は腫瘍への targeting の代表的なものである。

このパネルは、以上のような点を中心に企画された、モノクローナル抗体を用いる研究については、特別講演にて紹介があるので、ここではそれ以外の targeting の方法をとりあげた。このような目的で開発されつつある制癌剤には多くのものがあるが、ここでは、ホルモンを担体とする製剤、および腫瘍における特異的な代謝を介する製剤について、すでにある程度の臨床経験が得られているものを選択した。

ホルモンを担体とする制癌剤のうち、Estracyt は、Estradiol と Nitrogen mustard の複合体であり、エストロゲンに関連のある腫瘍、特に前立腺癌の治療剤として開発されたが、最近、前立腺に特異的な Estracyt 結合蛋白の存在が発見され、全く新しい観点から targeting が見直されつつある。

Bestrabucil は、Estradiol と Chlorambucil の複合体

の安息香酸エステルであるが、最近エストロゲンレセプターの有無と関係なく、腫瘍に特異的に取り込まれることが見出されたものである。

一方、腫瘍における特異的な代謝を応用する制癌剤の開発の企ては数多くみられるが、ここでは次の二つの研究が紹介される。

シスチニールフェノール・ジフェノールおよびその関連化合物はメラニン中間体の化学的修飾されたものであるが、悪性黒色腫にみられる異常に高いチロナーゼ活性とメラニン形成能を利用し、腫瘍に選択的に取り込ませ、腫瘍細胞を選択的に破壊しようとするものである。

5'-Deoxy-5-fluorouridine(5'-DFUR) は 5-FU の誘導体 (Masked compound) の一種で、腫瘍に取り込まれたのち、正常組織よりも高い酵素活性を有する腫瘍組織中にて活性化、すなわち 5-FU の生成がなされることにより腫瘍選択性を高めたものである。活性化する酵素は、実験癌とヒト悪性腫瘍とで異なることも見出されている。

以上のような話題提供を中心に、この領域の経験、あるいは興味をもたれる方々の活発な討論を得て、このパネルをのみりあるものとしたと考える。

### 1. ホルモンを担体とした制癌剤

#### [1] Estracyt (Estradiol-Nitrogen mustard 複合体) :

#### Estramustine 結合蛋白と作用特異性

山中英寿・今井強一・鈴木孝憲  
湯浅久子・高橋悦子  
群馬大学泌尿器科

前立腺癌はアンドロゲン依存性を有し、エストロゲン剤投与を中心とする所謂“抗男性ホルモン療法”が広く行なわれている。当初より低分化像を呈するものや治療経過においてホルモン抵抗性となったものに対しては化学療法が試みられている。Estracyt は estradiol と nitrogen mustard との複合体であり、エストロゲンに関連のある腫瘍、特に前立腺癌の治療薬剤として開発され、臨床的に使用されているが、最近、前立腺に特異的な結合蛋白、estramustine 結合蛋白 (EMBP) の存在が見出され、新しい観点から薬剤腫瘍集積性が見直されつつある制癌剤である。

まずラットを用いた基礎的検討の結果についてみると、全身的に投与された estracyt は血中にて速やかに脱リン酸化されて、estramustine となり、さらに肝において estramustine → estromustine → nitrogen mustard + estrone という代謝がみられる。in vivo 実験にて前

立腺組織（特に前立腺腫瘍）のサイトソール分画中に estramustine および estromustine の集積が認められた。3.5S 蛋白と結合した状態でサイトソール内に長時間にわたって貯留していることも確認された。この蛋白 (estramustine binding protein, EMBP) は沈降常数 3.5S, 分子量 45,000~50,000 の糖蛋白であり, 容易に分子量 25,000 の sub component になる。この蛋白の estramustine および estromustine の oxidative metabolite である estromustine に対する結合親和性は高く, estracyt, estradiol, DHT に対する結合親和性は低い。FRITJOFSSON ら (1983) は Estracyt 投与前立腺癌患者における血漿 および 前立腺組織中の代謝産物を検討し, estramustine が血漿濃度の 5~10 倍であることを報告している。このことはヒト前立腺癌組織中にも EMBP が存在することを示唆している。我々はヒト前立腺癌  $^3\text{H}$ -estramustine ラベルしたサイトソールを用いて glycerol density gradient analysis を行ない, 沈降常数 3~4S の EMBP が存在することを明らかにした。さらに HPLC analysis にて, ヒト前立腺癌組織には, 主に 2 つの binding components があり, 1 つは分子量 45 K, 他の 1 つは 25 K の蛋白であった。estramustine および estromustine に対して高い結合特異性をもつこの 2 つの components の相互作用はこれから解明される必要がある。また, ヒト前立腺癌組織内での estramustine および estromustine の直接作用を EMBP との関連において解決されなければならない。

わが国において 1977 年 4 月より 1979 年 2 月にわたり, 全国 24 施設が参画し, 統一的方法により estracyt の前立腺癌に対する治療効果が検討された。治療効果判定は 7 段階評価法にて投与 3 か月時点にて行なわれた。未治療群においては著効 50%, 有効 29%, やや有効 13%, 無効 8% であった。一方, 従来のホルモン療法または他の治療では制御できなくなった前立腺癌を対象とした再燃群にあっては著効 15%, 有効 12%, やや有効 19%, 無効 54% であった。副作用についてみると, 3 か月間の観察では消化器障害が 36%, 浮腫 15%, 肝障害 7%, 血管系障害 3%, 白血球減少 1% であった。従来のホルモン療法において無効であった再燃症例において著効 15% の成果が得られたことは特筆すべき所見である。未治療症例では低分化生検像を示すものや, 病期 D 症例および再燃症例が本剤の適応となるであろう。今後, 集学的治療の一つとしての本剤の位置づけを見出すことが課題となると思われる。

## [2] Bestrabucil (Estradiol-Chlorambucil 複合体):

### 腫瘍親和性と作用特異性

大 沢 伸 昭

東京大学内科

山 崎 善 也

東京大学外科

我 妻 堯

国立病院医療センター産婦人科

岩 動 孝 一 郎

東京大学泌尿器科

Bestrabucil は, 女性ホルモンである estradiol-17 $\beta$  と, 制癌剤である chlorambucil との複合体の安息香酸エステルである。

本剤はもともと chlorambucil をエストロゲンを担体として, エストロゲン・レセプター陽性の腫瘍, 特に乳癌に高濃度に取り込ませることにより, その全身性副作用を減少せしめることを目的として検討されてきた cytotoxic estrogen の一種であるが, その後の検討の結果, この安息香酸エステル剤はエストロゲン・レセプターの有無にかかわらず, 腫瘍に高濃度に取り込まれることが明らかにされてきた。

基礎的検討として, *in vitro* 実験系では, マウス 3T3 細胞および 3T3-SV 40 transformed 細胞を用いて, bestrabucil と chlorambucil について比較検討した結果, bestrabucil は 3T3-SV 40 細胞にのみよく取り込まれ, 増殖抑制効果も 3T3-SV 40 細胞にのみ認められた。一方, chlorambucil は 3T3, 3T3-SV 40 細胞のいずれにも取り込まれ, いずれにも増殖抑制効果を示した。

*in vivo* 動物実験系では, Walker 256 腫瘍を移植された Wistar 系メスラットを用い, bestrabucil を経口投与後, その血中, 腫瘍中, 対照正常組織中の濃度を測定した結果, 投与 3 時間後以降, 腫瘍中の濃度が著明に増加することが認められた。抗腫瘍効果と副作用を bestrabucil と chlorambucil とで比較した結果, 腫瘍抑制率 100% を来たす投与量における副作用, 特に骨髄抑制は, bestrabucil では認められず, chlorambucil に比べ明らかに全身的副作用の減少するのが認められた。

bestrabucil の制癌作用の機序には, 少なくとも 2 種類があり, 第 1 は腫瘍内での chlorambucil の遊離, 第 2 は本剤自身の効果が考えられる。これは, chlorambucil 耐性 Walker 256 腫瘍に対し十分な制癌効果を示すこ

とからも示唆される。

臨床的には、乳癌、前立腺癌、卵巣癌のほか、消化器癌(胃癌、腸癌)などについて予備的検討がなされているが、手術時に得られた組織内の bestrabucil の濃度は、いずれの場合にも血中、あるいは周辺部組織に比べ、腫瘍において著明に高く、臨床的にも本剤の腫瘍親和性が認められた。制癌効果に関しては、進行性乳癌 10 例中 8 例、進行性前立腺癌 15 例中 12 例に何らかの改善効果が認められ、また慢性リンパ性白血病 5 例について、その有用性を示唆する成績が得られている。本剤に特異なことは、腫瘍中への高濃度の取り込みが証明されても制癌効果を示さない場合があることである。副作用としては、bestrabucil から遊離される chlorambucil および estradiol の効果が予期されるが、いずれも臨床用量では著明なものは認められていない。

以上、bestrabucil は *in vitro* 系、*in vivo* 系、あるいは臨床知見においても、正常組織よりも腫瘍組織への取り込みが多いことが認められ、腫瘍に選択的に作用する制癌剤となりうることが示唆された。

Bestrabucil のもつ腫瘍親和性の機構は未だ明らかでなく、今後の検討が必要と思われる。

## 2. 腫瘍特異性代謝機構を応用した制癌剤

### [1] Melanin 中間体の化学的修飾による 黒色腫の治療法(基礎と臨床)

神保孝一

札幌医科大学皮膚科

悪性黒色腫の化学療法剤として現在最も広く使用されているのは DTIC である。しかし、その作用は非特異的で、治療効果も高々 25% 内外である。

メラニン形成は、メラノサイト・悪性黒色腫に特異である。これは、酸化・還元酵素チロシナーゼの存在下で以下の反応を起こすことによる(図1)。

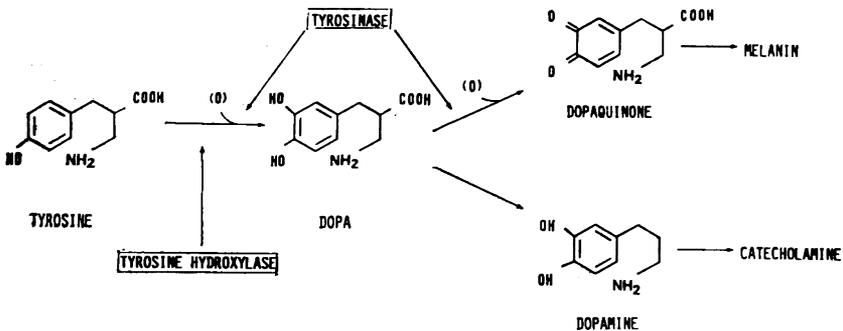
癌化と共に異常に高まるチロシナーゼ活性とメラニン形成能を利用し、1) チロシナーゼの基質となりうるメラニン前駆体を化学的に修飾し、2) 黒色腫に選択的に取り込ませ、3) 黒色腫内のチロシナーゼおよび他の酵素と反応させ、4) 細胞内で一種のラジカル反応を起こさせ、5) その結果、黒色腫を選択的に破壊しようとの試みが近年実験的に行なわれている。

その一つは、キノン誘導体・カテコールを用いメラノサイト・黒色腫細胞を選択的に破壊しようという試みである。我々は、ハイドロキノン・4-イソプロピルカテコールを用いた実験にてその作用機構が、1) チロシナーゼ依存性の反応であること、2) メラニン形成細胞に対し特異な反応であること、3) メラニン形成異常のみならず蛋白合成をも障害することを確認した。しかし、これら薬剤は、一般に細胞毒性が強く抗腫瘍剤として用いることはできない。臨床的には、ハイドロキノンおよびモノベンジルエーテル・ハイドロキノンが外用剤として種々の色素異常症の治療に用いられているにすぎない。

その2は、より細胞毒性が低く、しかもメラニン形成の基質であるドーパ、ドーパミン、システィニールドーパおよびこれらの誘導体が黒色腫細胞に試みられている。培養実験系にてこれら薬剤は、1) 黒色腫細胞に比較的選択的に取り込まれ、2) チミジンの取り込み、DNA ポリメラーゼなどの活性を阻害することにより細胞の増殖を阻害することが確認されている。また、最近一部の転移性黒色腫患者にレボドーパを投与し、転移性黒色腫細胞の増殖を選択的に抑制したという臨床例が報告されている。

我々は、近年フェノール・カテコールにシスチン、シスタミンを結合させ、システィニールフェノール・ジフェノールおよび関連化合物を合成し黒色腫細胞の選択的増殖抑制、破壊を実験的に試みている。その理論的背景としてこれら合成薬剤は、1) 黒色腫細胞にドーパと同

図1 Metabolic pathway for synthesis of melanin and catecholamine





## [2] 5'-Deoxy-5-fluorouridine(5'-DFuR): 腫瘍組織における活性化を利用した masked compound

原 泰 寛・河 野 彬

国立病院九州がんセンター

目的: 今日, 5-fluorouracil(5-Fu) は各種の悪性腫瘍に対し治療効果が認められ, 広く臨床に用いられている薬剤である。しかし本剤が, 水溶性であるため, 組織親和性に乏しく, 投与後, 比較的速やかに体外に排泄されることや, 経口的投与による腸管からの吸収に問題があることから, これらの欠点を補うため, 多くの 5-Fu 誘導体が作られてきた。

そのいくつかはすでに臨床に用いられている。5'-DFuR も 5-Fu 誘導体の一つであり, 実験癌において pyrimidine nucleoside phosphorylase のうち, uridine phosphorylase によって 5-Fu に活性化され, しかも本酵素の活性は正常組織に比べ腫瘍組織で著しく高いことが報告されている。

われわれは, ヒト悪性腫瘍における 5'-DFuR の活性化が実験癌と異なった酵素によって活性化される機構や, 臨床応用の可能性につき検討を加えてきた。

方法: 胃癌, 大腸癌, 肺癌, 子宮癌, 卵巣癌の手術材料を用い, 5'-DFuR から 5-Fu への分解に関与する pyrimidine nucleoside phosphorylase の酵素学的検討を行なった。まず実験癌と上記の各種ヒト悪性腫瘍組織における uridine, thymidine, 5'-DFuR から uracil, thymine, 5-Fu への分解の相違や, uridine phosphorylase の specific inhibitor である 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl) thymine, (GPT) を用いた際のヒト悪性腫瘍と実験癌における 5'-DFuR から 5-Fu への分解の相違などにつき検討した。

次に, ヒト悪性腫瘍における手術材料を用い, 5'-DFuR から 5-Fu への分解に関与する酵素の精製を試みた。また, この部分精製された酵素を用い,  $K_m$  値を求めた。

以上の基礎的検討をふまえ, 次の臨床的検討を行なった。

まず, 癌患者に 5'-DFuR 500 mg を静注し, 注射前, 注射後経時的に採血し, 5'-DFuR, 5-Fu の血中濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

次に 800 mg の 5'-DFuR の経口投与を行ない, 同様に投与前, 投与後経時的に採血して, 5'-DFuR, 5-Fu の濃度を測定した。

さらに, 子宮癌, 卵巣癌, 肝癌, 膀胱癌などの患者の術

中に 5'-DFuR 500 mg の静脈投与を行ない, 手術摘出組織中の 5'-DFuR, 5-Fu 濃度とほぼ同時に採血した血中濃度を測定した。

子宮癌患者に 600 mg の 5'-DFuR を術前に経口投与し, 手術摘出組織中の 5'-DFuR, 5-Fu 濃度と, ほぼ同時に採血した血中濃度を測定した。

胃癌患者については 400 mg の 5'-DFuR を術前経口投与し, 手術摘出組織につき, 腫瘍組織とそれに隣接する正常組織中の 5'-DFuR, 5-Fu 濃度を測定し比較検討した。

また, 5'-DFuR の Blood brain barrier の問題を検討するため, 脳腫瘍患者に術中 5'-DFuR 500 mg の静脈内注射を行ない, 経時的に腫瘍組織と血中 5'-DFuR, 5-Fu 濃度を測定した。

最後に, 以上の結果をふまえ, Phase I, II, study における臨床有効例を供覧し, 検討を行なった。

結果: 胃癌, 大腸癌, 肺癌, 子宮癌, 卵巣癌の手術材料を用いた, 5'-DFuR から 5-Fu への分解に関与する pyrimidine nucleoside phosphorylase の酵素学的検討では, 腫瘍組織とそれに隣接する正常組織を比較すると, 腫瘍組織において, 5-Fu 生成が正常組織に比べ著しく高く, この分解に関与する酵素の活性は腫瘍組織に著しく高いことが判明した。

次に実験癌とヒト悪性腫瘍における 5'-DFuR から 5-Fu 分解の相違については, 実験癌では, uridine から uracil への分解が高く, ヒト悪性腫瘍では thymidine から thymine への分解が高いことが判明した。

次に 5'-DFuR から 5-Fu への分解では, 実験癌では uridine phosphorylase の specific inhibitor である GPT で著しく抑制されるのに反し, ヒト腫瘍では殆ど GPT の抑制効果は認められなかった。以上の結果から, 5'-DFuR から 5-Fu への分解は動物における実験癌では uridine phosphorylase が主に関与し, ヒト悪性腫瘍では, thymidine phosphorylase が主に関与することが判明した。このことをさらに確認するため, 手術により摘出したヒト悪性腫瘍組織からの thymidine phosphorylase の精製では, かなりの純度まで精製できた。この部分精製した thymidine phosphorylase を用い, thymidine, 5'-DFuR を基質として Michaelis 曲線を作製し, これより  $K_m$  値を算出したが, その結果, 5'-DFuR の本酵素に対する親和性は, thymidine に対するその約 1/10 と考えられた。

癌患者に 5'-DFuR 500 mg 静注後の 5'-DFuR, 5-Fu の血中濃度の変化では, 両者とも注射後速やかに濃度の低下を認め, 本剤が尿中より, 比較的早く排泄されることが示唆された。

800 mg の経口投与における血中濃度の変化では、5'-DFuR は投与1時間まで次第に上昇し、以後2時間まで peak を維持し、以後次第に低下を示した。5-Fu についても静注に比べ、かなり長時間血中濃度が維持されていた。このことから、5'-DFuR は経口投与でかなり消化管からの吸収があることが認められた。

次に 5'-DFuR を術中静脈内投与した後、手術摘出組織中と同時に採血した血中における 5'-DFuR と 5-Fu 濃度の比較では、5'-DFuR は常に組織内が血中より低い値を示したが、5-Fu は常に組織内が高い値を示した。

同様に 5'-DFuR の術前経口投与の例における腫瘍組織内と血中濃度の検討でも、5'-DFuR は腫瘍組織より血中濃度が高い値を示したが、5-Fu は腫瘍組織が血中濃度より高い値を示した。

胃癌症例における 5'-DFuR の術前経口投与の症例における腫瘍組織と、それに隣接する正常組織における 5'-DFuR と 5-Fu 濃度の検討では 5'-DFuR は両者の間に殆ど差を認めないが、5-Fu では腫瘍組織が正常組織に比べ明らかに高い値を示した。

以上の結果から、先の基礎的検討における 5'-DFuR から 5-Fu への分解に関与する thymidine phosphorylase 活性が、腫瘍内で正常に比べ、著しく高いこととはほぼ一致する臨床的結果が得られた。

さらに、脳腫瘍における検討では、脳腫瘍組織においても thymidine phosphorylase 活性は極めて高いにも拘らず、5'-DFuR は血中より極めて低く、その結果、5-Fu 濃度も血中より低い値を示した。このことから脳組織では、5'-DFuR そのものの移行に barrier の存在があることが示唆された。最後に、本剤を用いたヒト癌患者に対する抗腫瘍効果については、現在進行中であるが、そのうち特に腫瘍縮小効果がみられた胃癌、乳癌、胆道癌などにつき供覧した。

結語：5'-DFuR は、5-Fu の誘導体であり、ヒト腫瘍組織では正常組織より活性の高い thymidine phosphorylase によって 5-Fu に活性化される。したがって、これを癌患者に投与した場合、選択的に腫瘍組織内で高い 5-Fu 濃度が得られた。この結果、副作用が少なく、より高い抗腫瘍効果が期待される。

今後、臨床例で例数を増して、詳細な検討が望まれる。

## 新薬シンポジウム

### Sultamicillin

はじめに

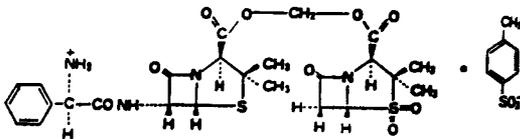
西浦常雄

岐阜大学医学部泌尿器科

横田健

順天堂大学医学部細菌

Sultamicillin は、ampicillin (ABPC) と sulbactam (SBT) をエステル結合で1分子化したものの tosyl 塩である。375 mg の sultamicillin (ABPC として 220 mg) を含む錠剤を経口投与すると、吸収されるとき腸管粘膜細胞の esterase で加水分解され、当量の ABPC と SBT となり血中に入る。それぞれ単独で経口投与したときより両者とも高い血中濃度が得られ、"mutual prodrug" としての価値をもつうえ、SBT が  $\beta$ -lactamase inhibitor として働くので、ABPC 耐性菌にも抗菌力が及ぶようになる。



Sultamicillin tosylate の安全性が確認され、前臨床試験、臨床第1相試験、および小規模第2相試験を行ない、その有用性が示唆されたので、1983年2月から全国規模の研究会が組織され、1984年6月現在まで基礎的ならびに臨床的研究が続けられつつあり、各種感染症の治療における有用性を示す成績が蓄積されるとともに、その副作用も既に実用化されている内服  $\beta$ -lactam 抗生物質に比べ特に多くないことが明らかにされたので、sultamicillin tosylate について各方面から検討を加えるため、シンポジウムが開催された。

#### 研究施設

[基礎]: 群馬大学、順天堂大学、順天堂大学附病、東邦大学、岐阜大学、鎌倉市、京都薬科大学 [内科、呼吸器科]: 北海道大学第二、岩見沢労災病院、東北大学抗酸菌病研究所、いわき市立総合磐城共立病院、竹田総合病院、新潟大学第二、新津医療センター、水原郷病院、信楽園病院、国立霞ヶ浦病院、東京慈恵会医科大学第二、順天堂大学、東京女子医科大学、杏林大学第一、東京都養育院付属病院、東京厚生年金病院、虎の門病院、東京共済病院、川崎市立川崎病院、横浜通信