

糖尿病マウスにおける実験的化学療法

—治療効果に及ぼす insulin の影響—

尾花 芳樹・国安 朋子・長尾 晃裕

和田 勝夫・西野 武志・谷野 輝雄

京都薬科大学微生物学教室

(昭和60年1月28日受付)

実験的 alloxan 糖尿病マウスを用いて、*Klebsiella pneumoniae* 性肺炎に対する化学療法を行ない、治療効果に及ぼす insulin 投与の影響について検討を行なった。

Insulin 投与による糖尿病態の改善を検討したところ、1 I. U./b. i. d. 3日間投与により病態の改善が認められた。

K. pneumoniae 性肺炎に対する cefmenoxime および ceftazidime の効果を検討したところ、正常マウスの治療成績に比べ糖尿病マウスでは効果の低いことが認められた。また insulin 投与マウスでは正常マウスより劣るものの明らかに治療効果の上昇が認められ、insulin 無投与糖尿病マウスより優れていた。

Insulin 投与糖尿病マウス(血糖コントロール群)の好中球および macrophage の chemotaxis 能は亢進しており、明らかに insulin 無投与マウスより改善されていた。

糖尿病患者に感染症が合併しやすく、また化学療法も効を奏しにくいということはよく知られている。この易感染化機序については古くから興味を持たれ、細胞性免疫、体液性免疫、白血球機能などの面から研究が行なわれ、特に白血球の機能異常について検討した報告¹⁻⁶⁾が多い。

一方、糖尿病患者には、血糖コントロールのため、insulin が投与されていることが多く、insulin 治療により白血球機能の改善も報告されている^{1,7)}。

さらに、すでに我々は実験的糖尿病マウスを用いて、抗生物質の効果を検討したところ、非常に治療効果が正常マウスより劣ることを報告してきた⁸⁾。

そこで今回、実験的糖尿病マウスを用いて、*Klebsiella pneumoniae* 性肺炎に対する化学療法を行ない、治療効果に及ぼす insulin 投与の影響について検討を行なったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株

Klebsiella pneumoniae B-54 株(長崎大学熱帯医学研究所 松本慶蔵教授分与)を使用した。

2. 使用薬物

Cefmenoxime (CMX: 武田薬品工業, 力価 941 µg/mg) および ceftazidime (CAZ: 新日本実業, 力価 845 µg/mg) の標準品を用いた。

3. 使用動物

Std-ddY 系雄マウス(4週齢, 17~18g)を使用した。

4. 実験的糖尿病の作製

一夜絶食させたマウス腹腔内に用時滅菌生理食塩水で溶解した alloxan (半井化学) 300 mg/kg を1回接種し、さらに4時間絶食を続けた。各実験には alloxan 投与4日後のマウス(血糖値 185±40 mg/dl)を用いた。また alloxan 投与2日後より3日間朝夕の2回 insulin (Sigma 社)を腹腔内投与し、血糖値のコントロールを行なった。なお血糖値は GOD-POD 法⁹⁾で測定した。

5. *In vitro* 抗菌力測定

薬物感受性は日本化学療法学会感受性測定法¹⁰⁾に準じて測定した。また増殖に及ぼす影響は heart infusion broth (ニッスイ)で培養した菌液に、所定の濃度になるように薬物を添加し、以後経時的に生菌数を測定した。

6. 実験的呼吸器感染症に対する治療効果

K. pneumoniae を nutrient agar (ニッスイ)で 37°C 18時間表面培養後、nutrient broth (ニッスイ)に懸濁させ、nebulizer を用い噴霧感染させた¹¹⁾。噴霧終了15時間後に薬物を皮下投与し、以後肺を無菌的に摘出し、homogenize 後、生菌数測定を行なった。さらに薬物投与後、肺内移行について *Proteus mirabilis*

ATCC 21100 株を検定菌とする薄層 paper disc 法により測定を行なった。なお菌数および薬物濃度測定には1群5匹のマウスを用いて検討した。

7. 好中球および macrophage の chemotaxis 能について

各マウス群の腹腔内に1% glycogen 1ml を接種し、腹腔内遊出好中球数について Türk 染色後血球計算盤を用いて測定した。なお1群5匹のマウスを用いた。また上記の方法で腹腔内遊出の好中球および macrophage を採取し、Eagles MEM 培地(ニッスイ)を用いて、これらの chemotaxis 能について modified Boyden chamber 法¹⁰⁾で測定した。なお stimulator として *K. pneumoniae* B-54 株の培養無菌ろ液を用いた。

II. 実験結果

1. Insulin 投与による糖尿病態の改善

血糖値および体重変化に及ぼす insulin 投与の影響について検討した結果を Fig. 1 および 2 に示す。Insulin (1 I. U.) 投与により糖尿病マウスの血糖値は一過性の低下が認められ、2時間後の血糖値は 75~95 mg/dl を示したが、その後漸次増加しもとの血糖値レベルに達した。Insulin 投与を繰り返すことにより、同様な血糖値の変動は認められたが糖尿病状態の根本的な改善は血糖値レベルからは判断できなかった。また体重変化について検討したところ、糖尿病マウスの場合 alloxan 投与により若干体重が減少し、その後6日までほとんど体重の増加は認められなかった。一方、insulin 投与糖尿病マウスでは、初回投与より体重増加が認められ、insulin 投与4日後では平均 2.5g の体重増加があった。また体重の増加に伴って毛並み、吸水量および排尿量などの点からも糖尿病態の改善がみられた。

2. *In vitro* 抗菌力測定

CMX および CAZ の生菌数に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 3 に示す。両薬物の接種菌量 10^6 cells/ml 時の最小発育阻止濃度 (MIC) はそれぞれ 0.05 および 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であり、また dose dependent な殺菌作用を示すことが認められ、それぞれ 0.04 および 0.08 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で殺菌的作用を示した。

3. 実験的呼吸器感染症に対する治療効果

K. pneumoniae 性肺感染症に対する CMX および CAZ の治療効果について検討した結果を Fig. 4~6 に示す。薬物無投与マウスの肺内菌数について検討したところ、若干のパラツキが認められるが、24時間後には同レベルの菌数を示し、いずれのマウス群においても一様の感染が起っていることが確認できた (Fig. 4)。

CMX および CAZ 投与マウスの肺内菌数の消長について検討したところ、いずれの投与群においても dose

Fig. 1 Changes in serum glucose levels after injection of insulin

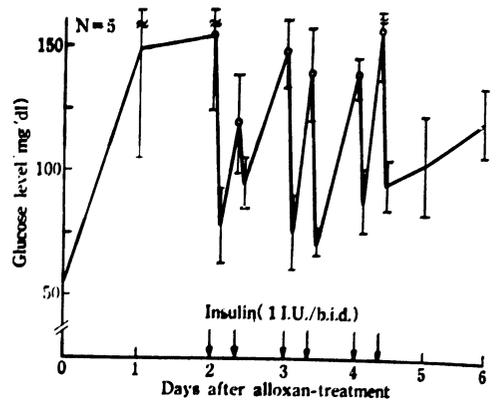
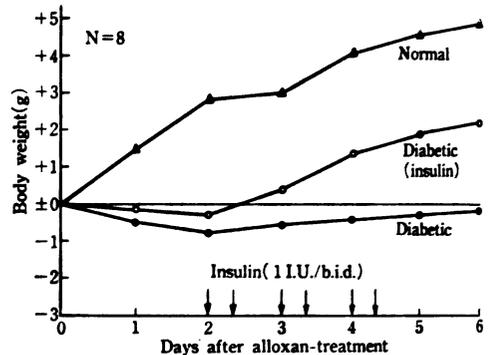


Fig. 2 Changes in body weight of mice after injection of insulin



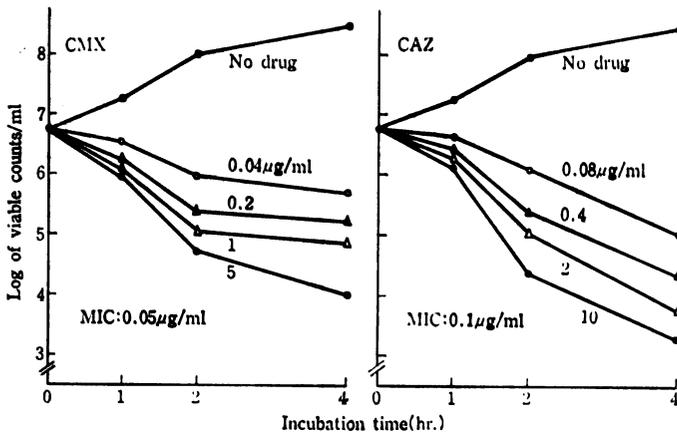
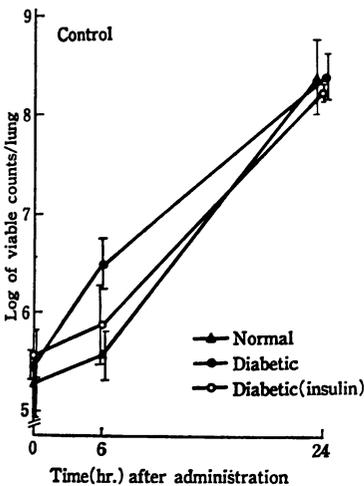
dependent な除菌効果が認められ、5 mg/mouse 投与における投薬3時間後の除菌率は各マウス群のいずれも約 95% であり、ほとんど差を認めることができなかった。しかしながら、投与3時間以後の除菌効果および再増殖抑制効果は、正常マウスの場合が最も顕著にみられ、ついで insulin 投与糖尿病マウスであった (Fig. 5, 6)。これらの結果より、各マウス群の治療効果の差は再増殖抑制に及ぼす生体防禦機構の関与が考えられた。

4. 肺内薬物濃度

感染病巣への薬物移行について、bioassay 法で検討した結果を Fig. 7 に示す。いずれのマウス群においても吸収のピークは投与 15 分後にあり、12.8~13.6 $\mu\text{g/lung}$ を示し、その後漸減し、糖尿病マウス群で排泄が若干他のマウス群よりも速いと思われたが、いずれのマウス群もほぼ同様の吸排パターンを示した。

5. 好中球および macrophage 機能について

Glycogen 接種後の腹腔内遊出好中球数について検討した結果を Fig. 8 に示す。Glycogen 接種後、腹腔内

Fig. 3 Effect of CMX and CAZ on the viability of *K. pneumoniae* B-54Fig. 4 Growth of *K. pneumoniae* B-54 in the lung of normal and diabetic mice

への遊出が認められるが糖尿病マウスにおける遊出細胞数は明らかに正常マウスおよび insulin 投与糖尿病マウスよりも低値を示した。Insulin 投与糖尿病マウスでは、glycogen 接種直後の細胞数は正常マウスよりも低値を示すが、その後の遊出数はほぼ正常マウスと同レベルであった。In vitro における好中球および macrophage の chemotaxis 能について検討した結果を Fig. 9 に示す。正常マウスの stimulation index を 1.0 とした時、糖尿病マウスは 0.4~0.55, insulin 投与糖尿病マウスでは 0.86~0.9 であり、好中球および macrophage とともに糖尿病マウスでは正常マウスの貪食細胞より chemotaxis 能が低下しており、また insulin 投与糖尿病マウスでは

正常マウスとほぼ同じレベルまで機能回復が認められた。

III. 考 察

糖尿病に細菌感染症が合併した場合、殺菌作用の優れている β -lactam 系抗生物質やアミノ配糖体系抗生物質が大量使用されるが、化学療法は奏効しにくいといわれている。すでに我々は、alloxan 糖尿病マウスを用い、実験的呼吸器感染症に対する cephem 系およびアミノ配糖体系抗生物質の治療効果について検討を行ない、糖尿病マウスは正常マウスに比べ cephem 系抗生物質の治療効果が低いと報告してきた。一方、血糖降下作用を有する insulin は糖尿病治療薬として頻用されており、感染時には抗生物質と併用されているものと考えられる。そこで今回、呼吸器感染モデルを用いて cefmenoxime (CMX) および ceftazidime (CAZ) の治療効果に及ぼす insulin 投与の影響について検討を行なった。Alloxan 糖尿病マウスに insulin を投与することにより一過性的に血糖値を下げることができ、この処理を繰り返すことにより検査上および外見的に病態の改善が認められた。この insulin 投与糖尿病マウス群に肺感染を惹起させたところ、感染様相は細菌学的検査上、正常マウスおよび糖尿病マウス群とはほぼ同様な感染病態を示した。しかしながら薬物効果について検討したところ、薬物投与後、短時間内(投与3時間後)での肺内菌数の減少は、正常マウス、insulin 投与糖尿病マウス、および糖尿病マウスでほとんど差が認められなかった。この現象は、肺への薬物移行がいずれのマウス群においても同様の吸排パターンを示すことから、薬物の直接的な作用はいずれのマウス群においても同程度発揮されているものと考えられた。しかし、その後の除菌効果および再増殖抑制効

Fig. 5 Therapeutic efficacy of CMX on number of bacteria in the lung of normal and diabetic mice infected with *K. pneumoniae* B-54

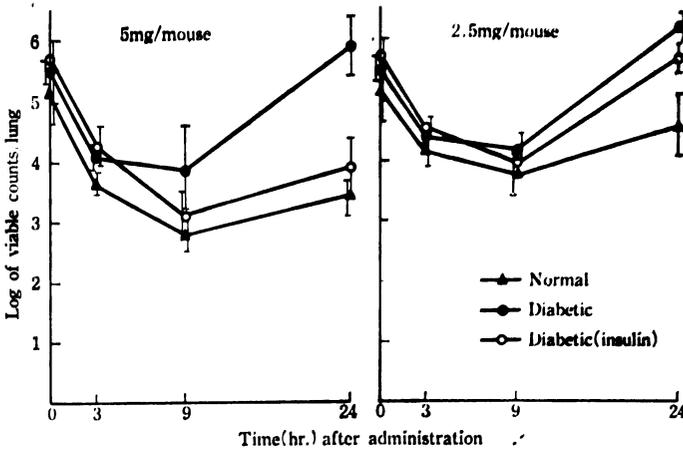
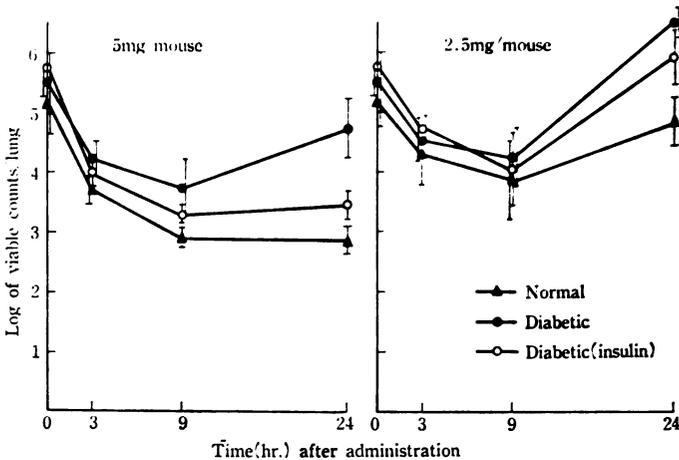


Fig. 6 Therapeutic efficacy of CAZ on number of bacteria in the lung of normal and diabetic mice infected with *K. pneumoniae* B-54



果には明らかに差が認められ、糖尿病マウスでは再増殖が非常に早く認められるのに対して、正常マウスおよび insulin 投与糖尿病マウスではさらに除菌効果が認められ、再増殖抑制も非常に強いことが分かった。このような効果は薬物の直接的な作用以外に生体防禦反応との相互作用を示唆するものと考えられた。すでに糖尿病態の生体防禦機能異常については基礎的および臨床的に検討され、好中球、macrophage 機能などの低下が報告されている¹⁻⁶⁾¹³⁾。また、すでに我々も同様な結果を糖尿病マウスで認め報告している¹⁴⁾。今回は急性感染症において重要な役割を担う好中球および macrophage 機能、特に

糖尿病マウスにおいて機能低下の顕著であった両食細胞の chemotaxis 能について検討し、これらの機能に対する insulin 投与（血糖コントロール）の影響について調べた。糖尿病マウスにおける好中球および macrophage の chemotaxis 能が正常マウスより劣っていることが、*in vitro* および *in vivo* で確認されたが、insulin 投与糖尿病マウスでは好中球および macrophage の chemotaxis 能の改善が認められ、正常マウスより劣るが糖尿病マウスより優れていた。また今回データを示さなかったが好中球の食菌殺菌能を検討したところ、正常マウスと糖尿病マウスで機能の差はほとんど認められず、

Fig. 7 Lung levels of CMX after s. c. injection to normal and diabetic mice infected with *K. pneumoniae* B-54

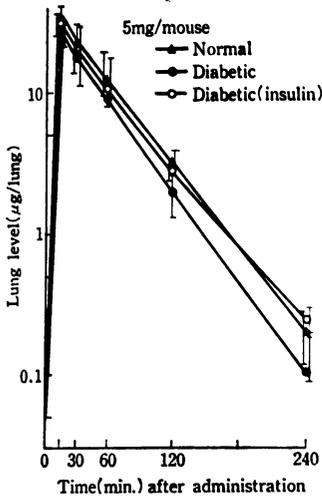
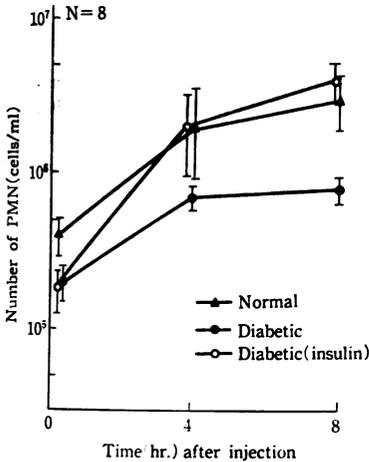
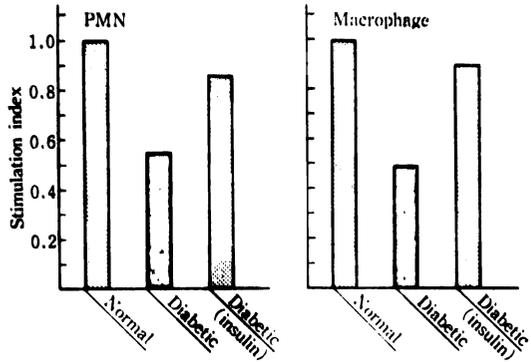


Fig. 8 Changes in number of PMN in mouse peritoneal cavity after injection of glyco-gen



insulin 投与による影響もほとんどなかった。さらに macrophage の食食殺菌能では、糖尿病マウスは正常マウスより若干低いことが分かり、また insulin により若干機能回復の傾向が認められたが著明なものではなかった。COIL¹⁵⁾は糖尿病マウスに insulin を投与することにより白血球機能の亢進を認めたと報告しており、また熊坂ら⁷⁾は臨床的に白血球機能(殺菌能)の改善を報告している。このように insulin 投与により血糖コントロールを行なうと、白血球機能の低下が回復することが示

Fig. 9 Chemotaxis of PMN and macrophage in normal and diabetic mice



唆されたが、これは白血球に対して insulin が直接的に作用したのか、血糖コントロールの結果、二次的に生じたものかは不明でありさらに追求しなければならないと考えている。以上のように糖尿病マウスに対する化学療法を施行する場合、insulin 投与による血糖コントロールは治療効果を増大させることが分かった。

文 献

- BADGDADE, J. D.; R. K. ROOT, & R. J. BUGTER: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 23: 9~15, 1974
- BYBEE, J. D. & D. E. ROGERS: The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 1~13, 1964
- ROBERTSON, H. & H. C. POLK, JR.: The mechanism of infection in patients with diabetes mellitus. A review of leukocyte malfunction. *Surgery* 75: 123~128, 1974
- MOWAT, A. G. & J. BAUM: Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 284: 621~627, 1971
- PERILLIE, P. E.; J. P. NOLAN & S. C. FINCH: Studies of the resistance to infection in diabetes mellitus: local exudative response. *J. Lab. Clin. Med.* 59: 1008~1015, 1962
- 佐野 清: 糖尿病における白血球機能に関する研究。第1編, 好中球スーパーオキシド産生能。岡山医学会雑誌 91: 713~722, 1979
- 熊坂義裕, 中畑 久, 平井裕一, 小沼富男, 工藤幹彦, 今村憲市, 武部和夫: 糖尿病患者多核白血球の食食, 殺菌能。感染症学雑誌 57(6): 487~494, 1984
- 尾花芳樹, 鈴木由紀子, 西野武志, 谷野輝雄: 糖尿病マウスにおける実験的的化学療法。*Chemotherapy* 32: 60, 1984

- 9) 奥田 潤, 小原 晃, 渡辺富久子編: 血液, 8, 糖質 (Carbohydrate), 112~114 頁, 廣川書店, 1981
- 10) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 11) 尾花芳樹, 石黒啓司, 星合真紀子, 平田收正, 山村宣弘, 西野武志, 谷野輝雄: マウス実験的局所感染症に対する Ceftazidime (SN 401) の効果。Chemotherapy 31: 102~110, 1983
- 12) 水上茂樹, 柿沼カツ子編: 白血球実験法, 2, 生物学的測定, 201~203 頁, 講談社サイエンティフィック, 1979
- 13) SAIKI, O.; S. NEGORO, I. TSUYUGUCHI & Y. YAMAMURA: Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. Infect. Immun. 28(1): 127~131, 1980
- 14) 芝田和夫, 尾花芳樹, 鈴木由起子, 西野武志, 谷野輝雄: 実験的糖尿病マウスに対する各種グラム陰性桿菌の感染性について。Chemotherapy 32: 59~60, 1984
- 15) COIL, J. A. & J. H. DAVIS: Altered host response to experimental pyelonephritis in alloxan diabetic rats. J. Surg. Res. 7(1): 28~34, 1967

EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY IN DIABETIC MICE

EFFECT OF INSULIN ON THE THERAPEUTIC EFFICACY OF B-LACTAM ANTIBIOTICS

YOSHIKI OBANA, TOMOKO KUNIASU, AKIHIRO NAGAO, KATSUO WADA,
TAKESHI NISHINO, and TERUO TANINO

Department of Microbiology, Kyoto Pharmaceutical University

The effect of insulin on the therapeutic efficacy of β -lactam antibiotics was studied in alloxan-induced diabetic mice with experimentally induced *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. The symptoms in diabetic mice was corrected by injection of insulin (1 I. U./b. i. d.) for 3 days. In experimentally induced *K. pneumoniae* pneumonia in diabetic mice, the efficacy of cefmenoxime and ceftazidime was inferior to that in normal mice. In the diabetic mice treated with insulin, the therapeutic efficacy of cefmenoxime and ceftazidime was superior to that in non-treated diabetic mice, but inferior to that in normal mice. Neutrophils and peritoneal macrophages from diabetic mice treated with insulin showed elevated chemotactic activity compared to that of non-treated diabetic mice.