

免疫グロブリン製剤の胆汁中移行に関する検討

品川 長夫・真下 啓二・水野 章・由良 二郎
名古屋市立大学医学部第一外科学教室*

(平成元年5月1日受付)

ペプシン処理ヒト免疫グロブリン製剤 5g を総胆管 T-チューブドレナージ施行患者 4 名に 60 分で点滴静注し、胆汁中移行について検討した。また本剤の *in vitro* における細菌との結合についても検討し以下の結果を得た。(1) 胆汁中濃度、血清中濃度とも症例によって変動はあるものの、いずれも点滴静注終了直後より 4 時間後までに最高値となり、ピーク値は胆汁中濃度では 3.6~23 $\mu\text{g/ml}$ 、血清中濃度では 406~2,586 $\mu\text{g/ml}$ を示した。(2) *In vitro* における免疫グロブリン製剤と細菌の反応の蛍光顕微鏡像では、免疫グロブリン製剤が細菌によく結合しているのが観察された。その濃度は免疫グロブリン製剤 0.01 $\mu\text{g/ml}$ まで確認できた。以上のことから、胆道感染症における本剤の有用性が示唆された。

Key words: ペプシン処理ヒト免疫グロブリン製剤、胆汁中濃度、抗タタムストキソイド抗体価、
蛍光顕微鏡像

重症感染症に対する抗生剤と免疫グロブリン製剤との併用効果については、基礎、臨床面とも種々の報告^{1~5)}がある。我々は、外科領域での感染症、特に、胆道感染症での免疫グロブリン製剤の有用性を検討する一環として、ペプシン処理ヒト免疫グロブリン製剤 ($F_{(ab)2}$) の胆汁中への移行を抗タタムストキソイド抗体価を指標にして測定し、さらに *in vitro* における本剤と細菌との結合についても検討したので報告する。

I. 対象と方法

1. 胆汁中移行について

胆石症術後の総胆管 T-チューブドレナージ施行症例 4 例を対象とし、胆汁中への移行を検討した。使用した静注用ヒト免疫グロブリン製剤は、ペプシン処理によって Fc 部位を部分的に分離した $F_{(ab)2}$ フラグメントを主成分とする市販のペプシン処理ヒト免疫グロブリン製剤 (ガンマ・ベニン® lot No. 318 B 005, 以下 GV と略) を用いた。

GV 5g を総胆管 T-チューブドレナージ施行患者 4 名に 60 分で点滴静注し、投与前、投与終了時、投与後 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 時間に血清および胆汁を採取し、測定時まで -20°C で凍結保存した。

GV 濃度の測定は以下のごとく施行した。タタムストキソイド抗原をコーティングしたプレートにサンプル (血清、胆汁、スタンダード) を添加して反応させた。これに、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン G 抗

体および基質 (orthophenylenediamine) を加えて反応させた。これを ELISA reader にて OD 492 nm を測定して抗タタムストキソイド抗体価を求め、その後、GV 量に換算して算出した。

2. *In vitro* における GV と細菌との結合について

GV と細菌の結合については以下のごとく施行し、判定した。教室保存の臨床分離菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) を pH 7.5 の Soybean Casein Digest 平板培地 (ポリペプトン 15g (日本製薬(株)), ポリペプトン S 5g (日本製薬(株)), NaCl 5g (和光純薬工業(株)), Agar 15g (栄研化学(株))) で 24 時間培養後スライドガラス上に塗布、風乾後、火炎中で固定し、そこに GV 希釈液を滴下した。室温で 30 分間インキュベーション (湿潤) したのち、FITC 標識抗ヒト免疫グロブリン G ($F_{(ab)2}$ フラグメント) を滴下し、室温で 30 分間インキュベーション (湿潤、遮光) した。洗浄、風乾後蛍光顕微鏡でスライドガラス上を観察 (400 倍, 1,000 倍油浸) した。GV と細菌との結合の有無は、GV が何倍希釈された時まで、蛍光が見られるかを観察し、強蛍光を (++)、弱蛍光を (+)、微蛍光を (±)、蛍光なしを (-) と判定した。

II. 結果

1. 胆汁中移行

胆石症術後の総胆管 T-チューブドレナージ施行症例 4 例において GV の胆汁中移行を抗タタムストキソイ

* 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

Table 1. Profile of four patients

ID	0195812	1754378	1459961	1612611
Age · Sex	70, female	38, female	67, female	61, male
Underlying disease	choledocholithiasis	choledocholithiasis	choledocholithiasis	intrahepatic stone
Bile culture	negative	negative	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CNS
RBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	402	404	376	324
Hb (g/dl)	12.4	12.3	11.6	9.9
TP (g/dl)	6.4	6.4	6.5	7.8
TB (mg/dl)	0.5	0.9	0.2	0.6
GOT (U/l)	68	136	129	44
GPT (U/l)	48	241	204	58
Al-P (U/l)	288	448	548	615
CHE (U/l)	140	263	254	149
BUN (mg/dl)	9	9	16	17
S-Cr (mg/dl)	0.7	0.8	0.7	1.4

CNS : coagulase-negative *Staphylococcus*

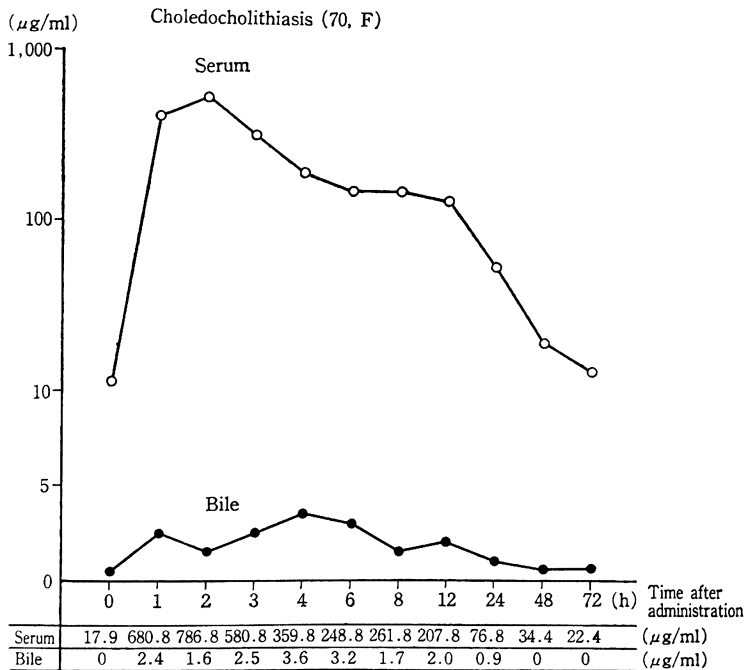


Fig. 1. Concentration of pepsin-treated human immunoglobulin preparation in bile and serum

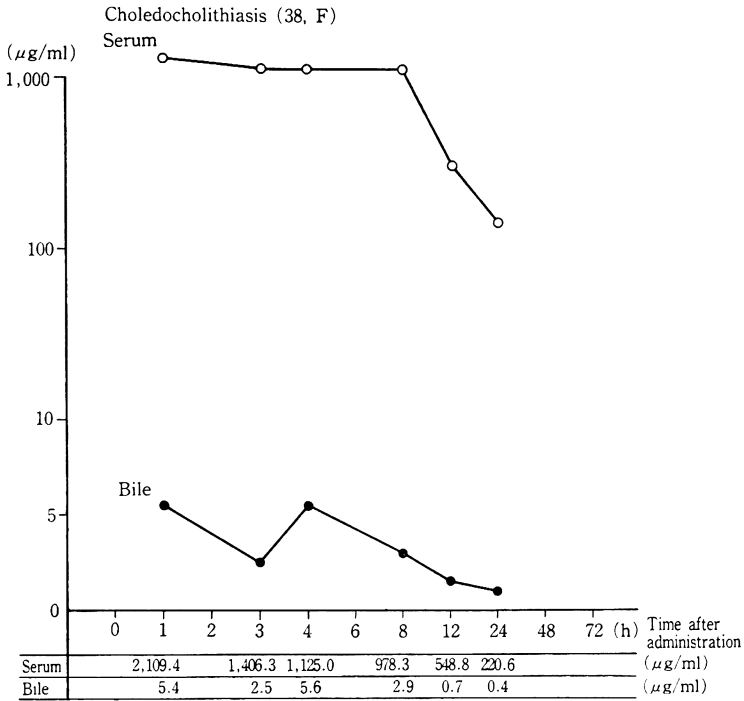


Fig. 2. Concentration of pepsin-treated human immunoglobulin preparation in bile and serum

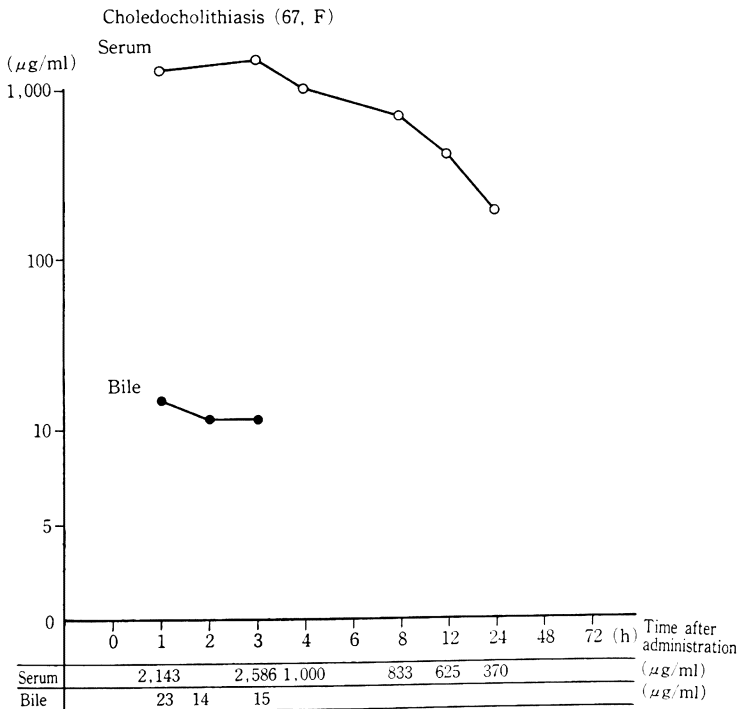


Fig. 3. Concentration of pepsin-treated human immunoglobulin preparation in bile and serum

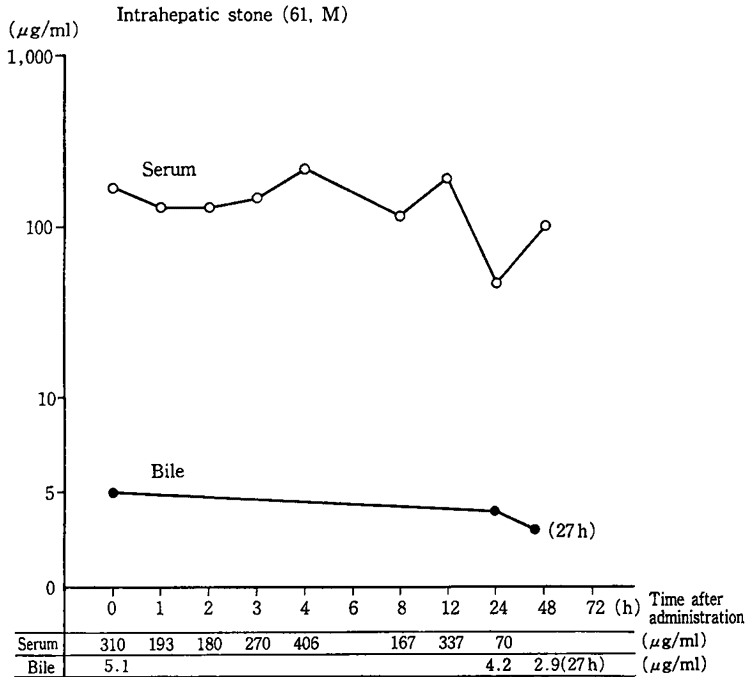


Fig. 4. Concentration of pepsin-treated human immunoglobulin preparation in bile and serum

Table 2. Relations between the concentrations of pepsin-treated human immunoglobulin preparation and the strength of fluorescence

dilution ratio	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	fluorescence	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
× 5	10,000	±	±
× 50	1,000	±	±
× 500	100	±	±
× 5,000	10	±	±
× 50,000	1	+	+
× 500,000	0.1	+	+
× 5,000,000	0.01	±	±

抗体価を指標にして測定した。Table 1 は症例の背景因子および検討時の血液生化学検査結果である。総胆管結石症の3例と肝内結石症の1例であり、女性3例、男性1例である。年齢は38歳から70歳である。胆汁中細菌は2例に陽性であり、*Klebsiella pneumoniae* と coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) がそれぞれ分離されている。4例とも腎機能障害はないが、軽度の肝障害が認められている。

それぞれの症例について結果を示す。まず、症例1 (Fig. 1) は、70歳、女性、総胆管結石症術後の症例である。血清中濃度では投与後2時間で786 $\mu\text{g/ml}$ のピーク

を示し、12時間後でも207 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度を示した。胆汁中濃度は4時間後でピークを示し、3.6 $\mu\text{g/ml}$ であった。胆汁への移行は軽度であったが、12時間後でも2.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を示した。

症例2 (Fig. 2) は、38歳、女性、総胆管結石症術後の症例である。血清中濃度は、投与後1時間で2,109 $\mu\text{g/ml}$ のピークを示し、8時間後でも978 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度を示した。胆汁中濃度は、4時間後でピークを示し、5.6 $\mu\text{g/ml}$ であった。胆汁への移行は軽度であったが、8時間後でも2.9 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を示した。

症例3 (Fig. 3) は、67歳、女性、総胆管結石症術後

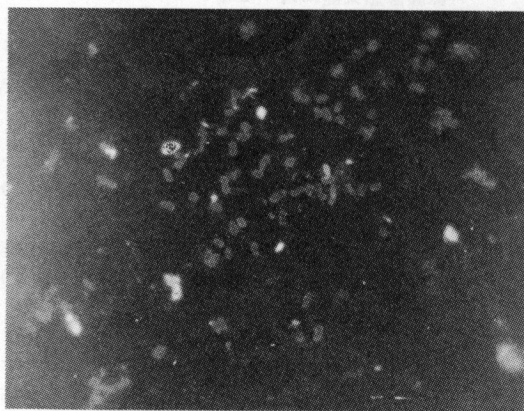


Fig. 5. Fluorescent micrograph of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* and pepsin-treated human immunoglobulin (100 µg/ml)



Fig. 6. Fluorescent micrograph of the binding of *Escherichia coli* and pepsin-treated human immunoglobulin (100 µg/ml)

の症例である。血清中濃度は、投与後3時間で2,586 µg/mlのピークを示し、8時間後でも833 µg/mlの高濃度を示した。胆汁中濃度は、1時間後で23 µg/mlであり、2時間後で14 µg/ml、3時間後で15 µg/mlであった。

症例4 (Fig. 4) は、61歳、男性、肝内結石症術後の症例である。血清中濃度は、投与後12時間まで300から400 µg/mlの濃度を示した。24時間後でも70 µg/mlの濃度を示した。胆汁中濃度は投与直後で5.1 µg/ml、24時間後で4.2、27時間後で2.9 µg/mlの濃度を示した。

2. *In vitro* におけるGVと細菌との結合

In vitro における各濃度のGVと*P. aeruginosa*および*E. coli*との結合の程度をTable 2に示した。2菌種いずれも同様の結果でGV濃度10,000 µg/ml~0.01 µg/mlまで蛍光を発する細菌が観察できた。しかし、その蛍光の程度はGV濃度に比例して明らかに弱くなった。Fig. 5にはGV (100 µg/ml)と*P. aeruginosa*、Fig. 6にはGV (100 µg/ml)と*E. coli*との反応の蛍光顕微鏡像を示した。いずれも細菌の周囲が蛍光を発し、GVが細菌によく附着しているのが観察された。

III. 考 察

外科領域において静注用免疫グロブリン製剤が投与されるのは、ほとんどが重症感染症の治療においてであり、抗生剤との併用で使用されている。細菌感染症に対する免疫グロブリン製剤の主な作用⁶⁻⁸⁾としては、細菌に直接結合して、食細胞の食作用を促進させるオプソニン作用、補体活性化による溶菌作用、細菌が産生する毒素に対する中和作用がある。いずれにしても抗生剤との併用効果をあげるためには、感染部位や組織へ移行する

ことが必要である。従来より、抗生剤の組織移行に関する報告は数多くみられるが、免疫グロブリン製剤の移行に関する報告は、肺胞洗浄液⁹⁾や喀液¹⁰⁾などの一部を除き少ない。そこで、今回、外科領域の感染症、特に胆道感染症での免疫グロブリン製剤の有用性を検討する一環として、ペプシン処理ヒト免疫グロブリン製剤(F_{(ab)2})の胆汁中への移行、さらには*in vitro*における本剤と細菌との結合について検討した。胆汁中への移行パターンは、血清中へのパターンとほぼ同様であり、症例によって変動はあるものの点滴投与直後から4時間後に最高値となり、以後漸減した。しかし、投与24時間後でも、胆汁採取ができなかった1症例を除き胆汁中にGVは検出され、4.2~0.4 µg/mlの濃度を示した。

In vitro におけるGVと細菌との結合についても検討したが、GVは細菌によく結合しているのが観察された。その濃度はGVが0.01 µg/mlの低濃度まで確認できた。したがって、上記で得られた胆汁中濃度は少なくとも*in vitro*におけるGVと細菌との結合に十分な値であり、生体内での胆汁中細菌とGVとの結合の可能性を示唆するものと思われた。今後、さらに胆汁中での細菌とGVとの結合の確認、あるいは抱合されているのかどうかなどの検討も必要と考える。胆汁中移行に関する検討は症例の病態、すなわち栄養状態、肝機能障害の有無、黄疸の期間などにより測定値は異なってくる。また、術後の症例でT-チューブ挿入状態での値であり、生理的な状態での胆汁中移行を反映しているとは言い難いが、本結果においてGVの良好な胆汁中移行が認められたことは、胆道感染症に対する本剤の有用性を示唆するものと思われると同時に、抗生剤と免疫グロブリン製剤との併用効果の基礎的根拠の一つとなるものと思われる。

た。

文 献

- 1) 原 耕平, 斎藤 厚, 山口恵三, 他: 内科領域における重症細菌感染症にたいする静注用免疫グロブリン (SW-4300) と抗生剤との併用効果。感染症学雑誌 58: 982~1002, 1984
- 2) 松本慶蔵, 正岡 徹, 中村 徹, 他: 重症感染症に対する pH 4 処理ヒト免疫グロブリン製剤 IG-100 と抗生剤との併用効果。感染症学雑誌 58: 1001~1024, 1984
- 3) 由良二郎, 品川長夫, 石川 周, 他: 外科領域における重症感染症に対する新しい免疫グロブリン製剤 (SW-4300) の使用経験。Jap. J. Antibiotics 38: 2622~2629, 1985
- 4) 鶴見信男, 紀 孝, 桜井道雄, 他: 実験的マウス肺炎球菌感染症に対するペプシン処理免疫グロブリン製剤 (ガンマベニン) の効果。現代の診療 22: 403~415, 1980
- 5) 重野芳輝, 猿渡勝彦, 渡辺講一, 他: 実験的マウス緑膿菌感染症に対するガンマ・グロブリン製剤の効果。感染症学雑誌 57: 531~536, 1983
- 6) 黒岩 中, 矢野貴彦, 岡田則子, 他: Fc および Cs レセプターを介するヒト抹消血食細胞活性化機構の研究。臨床免疫 18: 1005~1011, 1986
- 7) 赤垣洋二, 稲井真弥: ヒト IgG 抗体の F_{(ab)₂} を含む抗原抗体複合体による補体 alternative pathway の活性化について。医学のあゆみ 124: 19~20, 1983
- 8) 鈴木達夫, 藤村響男, 竹内 聡: 市販静注用免疫グロブリン製剤の緑膿菌内毒素蛋白部分 (OEP) protease, blastase に対する羊赤血球凝集素価。新薬と臨床 36: 1087~1090, 1987
- 9) 河村一太, 早田義博: 静注用ヒト免疫グロブリン製剤の臓器移行性の検討。日本臨床免疫学会誌 5: 215~219, 1982
- 10) 重野芳輝: 難治性慢性気道感染症に対するガンマグロブリン補助療法。感染症学雑誌 57: 662~675, 1983

STUDY ON AN IMMUNOGLOBULIN PREPARATION'S
PENETRATION INTO BILE

NAGAO SHINAGAWA, KEIJI MASHITA, AKIRA MIZUNO
and JIRO YURA

First Department of Surgery, Nagoya City University Medical School,
Kawasumi 1, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

Five grams of a pepsin-treated human immunoglobulin preparation was administered by i. v. drip infusion over 60 min to 4 patients undergoing T-tube drainage of the common bile duct, and the preparation's passage into bile was studied. Its binding to clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was also examined *in vitro*. The results were as follows: (1) The biliary and serum levels of the preparation both reached the maximum 4 h after administration, with peak levels ranging from 3.6 to 23 $\mu\text{g/ml}$ and from 406 to 2,586 $\mu\text{g/ml}$, respectively. (2) Fluorescent microscopy showed that the preparation was able to bind to the bacteria *in vitro* at concentrations of down to 0.01 $\mu\text{g/ml}$. The above results suggest the usefulness of the immunoglobulin preparation in biliary tract infection.