

Klebsiella pneumoniae 気道感染マウスにおける sizofiran (SPG) 投与の効果

手田 尚人¹⁾・鈴木 宗司¹⁾・八木田旭邦²⁾・緒方 幸雄³⁾

¹⁾： 科研製薬株式会社中央研究所*

²⁾： 吉林大学医学部第一外科

³⁾： 吉林大学医学部微生物学教室

(平成2年8月23日受付・平成2年10月17日受理)

抗腫瘍多糖体 sizofiran (SPG) の生体防御能に与える効果を *Klebsiella pneumoniae* によるマウス気道感染モデルを用いて検討した。Cyclophosphamide (CY) 前処置マウス、および非処置マウスの気道感染において SPG 投与群の生存率は上昇した。感染時、および感染3日後の末梢白血球数は SPG 前投与群で有意に増加した。さらに CY 前処理群においても SPG 前投与により末梢白血球数の増加が示された。非感染マウスの羊赤血球に対する脾抗体産生細胞数は、CY 前処理により低下したが、SPG 前投与によりその回復が認められた。感染4日後の脾抗体産生細胞数についても、CY 前処理および非処理、いずれにおいても、SPG 前処理によりその回復および増加が認められた。一方、 2×10^4 cells/lung 感染3日後の血清中 *Klebsiella pneumoniae* 菌体凝集抗体価は、感染対照群のみが高い値を示し、他群は同程度の低値であった。以上、総じて *Klebsiella pneumoniae* 気道感染実験における SPG の生体防御能賦活作用は、白血球数の増加と抗体産生能の増強により、生存率上昇効果が発揮されたものと考えられた。ただし、血清中凝集抗体価については、防御能だけによるのではなく、感染の進展の度合いにも影響されたと考えられた。

Key words : 気道感染, sizofiran, cyclophosphamide

Sizofiran (SPG) は宿主介在性の抗腫瘍作用を示す多糖体であり^{1,2)}、現在、臨床で放射線との併用で優れた効果が認められ、特に婦人科領域で使用されている抗腫瘍剤である。本剤の作用機序については、マクロファージ、好中球機能の活性化、補体の活性化、抗体産生能の増強等³⁻⁶⁾、また LAK 細胞の活性化⁷⁾、NK 細胞の活性化等⁸⁾の様々な生体防御能賦活作用が知られている。一方、抗腫瘍作用のみならず、大腸菌、緑膿菌や結核菌、Candida 等による実験感染症に対しても、防御作用を示すことが知られている⁹⁻¹²⁾。しかしそれらの感染症に対する生体防御能としては好中球、マクロファージによる食作用、あるいは細胞性免疫が主役であるが、現在までに体液性免疫が重きをなす感染症についてはいまだ検討されていない。

荚膜多糖体を有する細菌による感染症に対する防御因子としては、その荚膜多糖体に対する特異抗体の存在が不可欠である¹³⁾。特異抗体がオプソニンとして働くことによって始めて好中球やマクロファージによる食作用が可能となる。このような特性を有すると思われる肺炎桿菌の強毒株、B-54 株を用い、臨床の感染に近似した気道感染モデル¹⁴⁾で

SPG 投与の効果につき検討した。さらに、cyclophosphamide (CY) 前投与の影響、および、SPG の併用による効果について検討した。

1. 実験材料および方法

1. 実験動物

5週齢の Jcl/ICR 雄性マウス(体重 20~24 g)を1群 5~10匹として用いた。

2. 実験気道感染

長崎大学熱帯医学研究所内科松本慶蔵教授より分与を受けた *Klebsiella pneumoniae* B-54 株を用いた。マウスを松本教授が考案した密閉容器¹⁴⁾に入れ、マウス肺あたり 2×10^4 個、および 2×10^3 個の生菌を噴霧感染させ、以後9日間マウスの生存を観察した。

3. 血清中の抗体価の測定

感染菌株 B-54 株を 0.5%ホルマリンで 37℃ 1日処理した菌体を抗原とし、マウスの血清と混和後 37℃、2時間、次に、4℃ 24時間放置し、凝集の認められる最大希釈倍数を抗体価とした。

4. 白血球数の算定

血液中の白血球数を自動血球計算装置（東亜医用電子）にて測定した。

5. 抗体産生能の測定

10%ヒツジ赤血球液 0.1 ml を抗原として、マウス腹腔内に移入し、移入後4日目にカニングム法で脾細胞の溶血斑を数え、IgM 産生 PFC (plaque forming cell) を算定した。

6. 薬剤の投与

Cyclophosphamide (CY, 塩野義製薬) は生理食塩水に溶解し、感染4日前に 200 mg/kg 量を1回腹腔内に投与した。Sizofiran (SPG, 科研製薬) は生理食塩水にて適宜希釈し、感染3日前と1日前、あるいは感染1日後と3日後の各2回、5 mg/kg 量をマウス大腿部筋肉内に投与した。

II. 実験結果

1. *Klebsiella pneumoniae* 気道感染に対する SPG の効果

SPG 感染前2回投与群、および感染後2回投与群について生存率の推移を検討した結果を Fig. 1 に示した。感染前投与群の生存率は明らかに対照群に比し高く推移した。そこで SPG 前投与による防御効果を CY 前投与、および非投与マウスで検討した。2×10⁴ cells/lung の菌数を感染させた場合を Fig. 2 に示した。CY 単独投与群は、対照群と比較して明らかな生存率の低下が認められた。CY を前投与したうえに、SPG を感染前3日および1日前の2回筋肉内投与した群は、CY 単独投与群と比較して生存率が高い傾向が認められた。

感染菌量 2×10³ cells/lung の場合を Fig. 3 に示した。2×10⁴ cells/lung の感染菌量の場合に比較し、SPG 投

与群と非投与群との生存率の差はさらに大きく、CY 前投与群での検討においても、同様の傾向が示された。

2. 気道感染マウス血清中の凝集抗体価

Table 1 に示したごとく感染菌量が、2×10³ cells/lung の場合、血清中の凝集抗体価は4日後においても発現が低く、CY、および SPG 投与による影響はほとんど認められなかった。2×10⁴ cells/lung の菌数を感染後、3日目のマウス血清中の凝集抗体価を Table 2

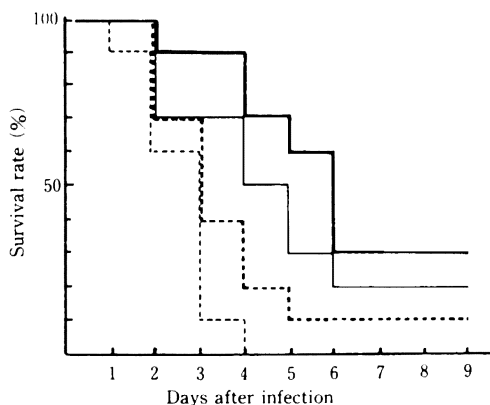


Fig. 2. Effect of cyclophosphamide and sizofiran on survival of mice infected with 2×10⁴ cells/lung
 —: control, - - -: sizofiran,
: cyclophosphamide,
 - · - ·: cyclophosphamide + sizofiran

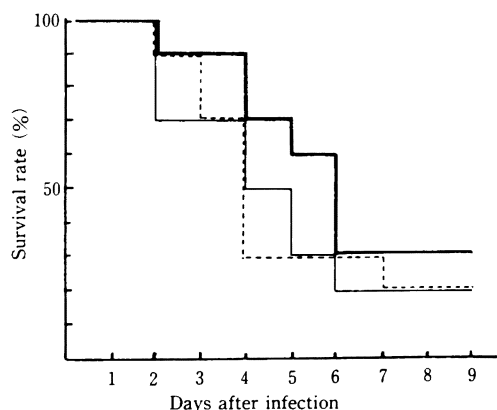


Fig. 1. Effect of sizofiran on survival rate of mice infected with 2×10⁴ cells/lung
 —: control, - - -: sizofiran (pre-treated),: sizofiran (post-treated)

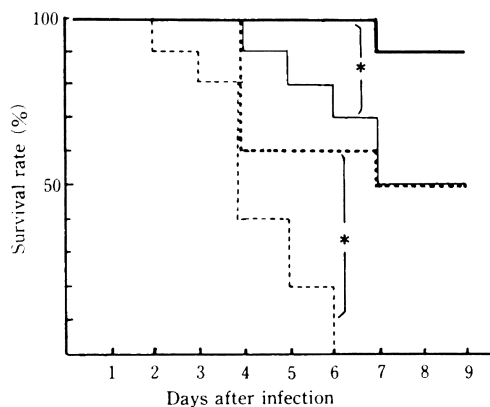


Fig. 3. Effect of cyclophosphamide and sizofiran on survival rate of mice infected with 2×10³ cells/lung
 —: control, - - -: sizofiran,
: cyclophosphamide,
 - · - ·: cyclophosphamide + sizofiran
 * p < 0.05 (generalized Kruskal-Wallis)

Table 1. Agglutination reaction of serum of mice infected with 2×10^3 cells/lung

CY	SPG	Infection	Maximum titer of positive reaction	Survival rate of mice
	-		<2, <2, <2, <2, <2	
	-	+	<2, <2, <2, 2, 16	9/10
	+	+	<2, <2, <2, 8, 16	9/10
+		+	<2, 2, 4, 16, 16	8/10
+	+	+	<2, <2, 2, 8, 16	9/10

4 days after infection.

CY, cyclophosphamide; SPG, sizofiran

Table 2. Agglutination reaction of serum of mice infected with 2×10^4 cells/lung

CY	SPG	Infection	Maximum titer of positive reaction	Survival rate of mice
-		-	<2, <2, <2, <2, <2	
-		+	4, 32, 64, 64, 64	6/14
-	+	+	2, 2, 4, 4, 8	10/14
+	-	+	2, 4, 4, 4, 8	5/14
+	+	+	2, 4, 8, 8, 16	8/14

3 days after infection.

CY, cyclophosphamide; SPG, sizofiran

Table 3. Effect on number of peripheral leukocytes in mice

CY	SPG	Infection	Number of WBC ($\times 10^2$ cells/mm ²)	
			Day 0 ^{a)}	Day 3
-	-	-	58.7 \pm 2.1	45.8 \pm 8.0
-	-	+	58.7 \pm 2.1	28.6 \pm 14.0
-	+	+	74.0 \pm 12.6	78.8 \pm 15.3
+	-	+	8.0 \pm 1.4	32.8 \pm 4.0
+	+	+	7.7 \pm 0.5	56.6 \pm 16.9

Challenge dose: 2×10^4 cells/lung, n=5, ^{a)} Days after infection, * p<0.05, ** p<0.01 t test

CY, cyclophosphamide; SPG, sizofiran

に示した。感染対照群は凝集力価が高く、4から64倍の希釈倍数を示した。他群の凝集力価はそれに比べ低く、2から16倍を示した。しかし3日目の生存マウス数を比較するとCY、SPGおよびCYとSPG併用群の凝集反応の力価は変わらないが、生存率はCY群で36%、SPG群で71%、CYとSPG併用群で57%と異なった生存率を示した。

3. 気道感染マウス血液中の白血球数

Table 3に示したように、感染時の白血球数は、SPG前投与により有意な増加を示した。しかし、SPGには、CY前投与による白血球数減少を抑制しなかった。一方、感染3日目の白血球数では、正常対照群に比べ、感染対照群は減少の傾向が認められ、感染マウスのSPG投与群に、有意な増加が認められた。さらに、CY前投与感染群に比較し、SPG併用感染群の3日目の白血球数は、有意に増加し、CYによる白血球減少の回復

Table 4. Effect of cyclophosphamide and sizofiran on antibody producing ability

Challenge dose (cells/lung)	Drug	Survival rate (survival/total)	PFC ^{a)} /10 ⁶ spleen cells	Inhibition ^{b)} (%)
Without infection	Control	6/6	2,163 ± 365	—
	SPG	6/6	2,714 ± 870	25
	CY	6/6	338 ± 228**	84
	CY + SPG	6/6	655 ± 303**	70
2 × 10 ³	Control	9/10	1,186 ± 194*	45
	SPG	10/10	1,515 ± 249	30
	CY	6/10	457 ± 135**	79
	CY + SPG	9/10	1,083 ± 379*	50
2 × 10 ⁴	Control	0/10	—	—
	SPG	8/10	1,286 ± 857*	41
	CY	0/10	—	—
	CY + SPG	2/10	216 ± 45**	50

^{a)} mean ± SD

^{b)} (PFC of control without infection - PFC) ÷ (PFC of control without infection)

* p<0.05, ** p<0.01 (t-test)

CY, cyclophosphamide; SPG, sizofiran

を SPG 前投与は、促進していることが判明した。

4. 気道感染後の抗体産生能に与える CY および SPG の効果

Table 4 に示したごとく、非感染マウスでは CY 投与により強い脾抗体産生細胞数の抑制効果が認められた。一方、SPG 投与群は 25% の促進効果を示し、CY と SPG の併用群では CY 単独投与群の免疫抑制作用の軽減を示した。

2 × 10³ cells/lung 感染マウスでは、SPG 投与群の抗体産生能は正常マウスの対照群に比較すると 30% の抑制を示しているが、全匹数生存した。CY 前処理群では、生存率 60% で抗体産生能は正常対照群の 79% の抑制であった。一方 CY と SPG の併用群は 50% の抑制率で生存率は 90% まで回復した。

2 × 10⁴ cells/lung 感染マウスでは、SPG 投与群の抗体産生能は正常マウスの対照に比較すると 41% の抑制を示しているが、感染対照群および CY 前処理群はいずれも前例が測定時に死亡していた。一方、CY と SPG の併用群は 2 例生存し、その抗体産生能は、非感染マウス対照群の 10% を維持していた。

III. 考 察

小松らは大腸菌⁹⁾、緑膿菌¹⁰⁾、結核菌¹¹⁾、Candida¹²⁾等の急性、慢性の実験的感染症に対する SPG の感染

防御効果について報告し、肥山らは、SPG の抗ウイルス感染効果¹³⁾について報告した。これらの感染症に対する生体防御能は好中球、マクロファージによる食作用が主役である。今回は、体液性免疫が生体防御能に不可欠である¹³⁾肺炎桿菌の強毒株の感染に対する SPG の防御効果について検討した。一方、癌患者においては、抗癌化学療法剤の投与による宿主防御能の低下から、日和見感染の危険が増大している¹⁴⁾。担癌や放射線照射、化学療法による宿主の免疫能低下に伴う微生物の感染に対しても、SPG の防御効果が期待される。そこで、CY 前投与マウスについても、SPG の防御効果について検討した。

Fig. 1 に示したように SPG の感染前投与により延命効果が観察され、その効果は、CY で生体防御能を抑制したマウスにも認められ、さらに感染菌量 (2 × 10³ cells/lung) を低下させて SPG を感染前に投与した場合、有意 (P<0.01) な延命効果が認められた。

そこで上述のように抗体が SPG の感染防御作用の要因であるのかを調べる目的で、まず凝集抗体価を測定した。低感染菌量 (2 × 10³ cells/lung)、感染 4 日後に測定した結果では、凝集抗体価は低く、CY、および SPG 投与による影響はほとんど認められなかった。この時点での生存匹数はいずれも多く、感染の進展がい

まだに軽度であったためと考えられた。一方、高感染菌量 (2×10^4 cells/lung), 感染3日後に測定した結果では、感染対照群のみに高い凝集価が観察され、他群はすべて低い凝集価を示した。以上のように、凝集抗体価は、感染の進展の度合いと抗体産生能自体の要素の両者が関与した結果の現象であることが推察された。

そこでより明確に解析する目的で、血中白血球数と抗体産生能の2点から検討した。感染時では、SPG前投与の白血球数が正常群より有意に多く、CY前投与群およびCYとSPG併用群では正常群にくらべて有意な低下を示した。一方、感染3日目の白血球数では、正常対照群に比べ、感染対照群は少ない傾向が認められ、感染マウスのSPG投与群に、有意な増加が認められた。さらに、CY前投与感染群と比較し、SPG併用感染群の3日目の白血球数は、有意に多く、CYによる白血球減少の回復をSPG前投与は、促進していることが判明した。このことが生存匹数におけるSPGの効果の一つの理由であることが推察された。

各群の抗体産生能を比較した結果、正常マウスでは、SPG投与により、抗体産生能が増強されること、CY投与による抑制を緩和することが判明した。また、感染自体により抗体産生能が抑制される傾向が認められたが、SPG投与によりその緩和が認められた。また、CY投与による抑制の緩和も認められることから、感染マウスにおいてもSPGには抗体産生能を増強する作用があることが、明らかとなった。さらにこのSPGの抗体産生能増強作用も生存率を上昇させる一つの因子であると考えられた。

これらのことから、凝集抗体価の結果について考察すると、SPG投与群は白血球増加と感染初期の抗体産生能増強により感染がそれほど進展せず、結果的に凝集抗体価が低く、CY投与群は、感染は進展しているが、抗体産生能の抑制により凝集抗体価が低くあり、併用群ではその両者の中間であったと考えられ、正常群のみ、感染の進展と抗体産生能の共存により凝集抗体価が上昇していたものと説明される。

いずれにせよ、抗体が存在することにより白血球による食殺菌がおきるといふ本感染菌における生体防御の特質において、SPGはその両者を増強することにより、感染防御効果を示していると考えられた。また、SPGにはCY投与群においても同様の感染防御効果が認められることから、癌患者におけるような宿主防御機構の破綻による日和見感染の防御においてもSPGの有用性が示唆された。

文 献

- 1) Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Saito G, Sakai S: Host mediated antitumor action of Schizophyllan; A glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Cann* 60: 137~144, 1969
- 2) 有可 正, 鈴木宗司, 百木克夫, 斉藤伍作: スエヒロタケ由来多糖体 (SPG) の抗腫瘍作用に関する研究。臨床と研究 57: 1710~1715, 1980
- 3) 鈴木博之, 南雲 昇, 小松信彦: マウス腹マクロファージの *Candida* 増殖阻止活性におよぼす Schizophyllan の効果。昭和医学会雑誌 45: 217~223, 1985
- 4) 鈴木宗司, 木村賀津子, 小松信彦: 好中球の走化性およびNBT還元能におよぼす Schizophyllan の効果。昭和医学会雑誌 40: 501~506, 1980
- 5) 小松信彦, 吉山賀津子, 木村成成, 宇 村 4, 天野 洋, 田村貞俊, 小池健一: Schizophyllan の感染防御作用と血清の殺菌作用との関係について。昭和医学会雑誌 35: 359~362, 1975
- 6) 鈴木宗司, 小松信彦: 低精度 Schizophyllan の免疫グロブリン産生系に及ぼす影響。日本細菌学雑誌 31: 557~564, 1976
- 7) 土屋吉則, 山本正春, 五十嵐稔, 鈴木隆二, 熊谷勝男: 抗腫瘍多糖体シゾフィランの免疫増強作用の解析—液性因子レベルにおいて—。臨床免疫 18: 575~584, 1986
- 8) 土屋吉則, 多糖体 BRM-SPG の骨髓レベルでのNK活性増強作用。Biotherapy 4: 680~684, 1990
- 9) 小松信彦, 南雲 昇, 大久保幸枝, 小池健一: スエヒロタケ多糖 Schizophyllan の実験的細菌感染症に対する感染防御効果。Jap. J. Antibiotics 26: 277~283, 1973
- 10) 小池健一: 実験的緑膿菌感染症に対する Schizophyllan の感染防御作用。Jap. J. Antibiotics 29: 1098~1105, 1976
- 11) 小松信彦, 南雲 昇, 雨宮功治, 加藤桃代, 嵯峨克昌: 実験的結核症に対する Schizophyllan の効果。Jap. J. Antibiotics 26: 459~469, 1976
- 12) 大久保幸枝: マウスの実験的 *Candida* 症に対する Schizophyllan の効果。昭和医学会雑誌 39: 603~610, 1979
- 13) Fukutome T, Mitsuyama M, Takeya K, Nomoto K: Importance of antiserum and phagocytic cells in the protection of mice against infection by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Gen. Microbiology* 119: 225, 1980
- 14) 松本慶蔵, 他: 噴霧吸入感染によるグラム陰性桿菌性肺炎モデル。日陶疾会誌 16: 581~587, 1978
- 15) 肥山良之, 大森和則, 山本正春: 担子菌由来多糖 Schizophyllan (SPG) の抗ウイルス作用。近畿大学医学雑誌 6: 387~391, 1981
- 16) 田口鐵男, 金子有太郎, 千原呉郎: レンチナン。Biotherapy 2: 509~521, 1988

PROTECTIVE EFFECT OF SIZOFIRAN IN EXPERIMENTAL RESPIRATORY
TRACT INFECTION WITH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN MICE

Hisato Senda and Motoji Suzuki

Central Research Laboratories, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.,
14 Shinomiya Minami Kawara-cho, Yamashina-ku, Kyoto, Japan

Akikuni Yagita

Department of Surgery, School of Medicine, Kyorin University

Sachio Ogata

Department of Microbiology, School of Medicine, Kyorin University

We examined the protective effect of sizofiran in experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* in mice. Pre-injection of sizofiran increased the survival rate of infected mice with and without administration of cyclophosphamide. Sizofiran proved to increase the number of peripheral leukocytes in mice at the time of infection and 3 days afterwards. In uninfected mice, the drug restored the number of spleen cells producing antibody that were decreased by cyclophosphamide. It also increased or restored the number of spleen cells producing antibody 4 days after infection, in mice with or without cyclophosphamide. On the other hand, the titer of agglutination reaction increased only in controls infected with 2×10^4 cells/lung. These results show that the protective effect of sizofiran against the infection was caused by an increase in the leucocyte count and in antibody-producing ability. It would appear that the titer of the agglutination reaction was influenced not only by antibody-producing ability but also by the progress of the infection.