

# Studies on the Susceptibility of Anaerobic Organisms to Lysozyme and Antibiotics: the Lysozyme Alone and the Combination Effect of Lysozyme and Antibiotics

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7796">http://hdl.handle.net/2297/7796</a>

# 嫌気性菌のリゾチームおよび抗生物質に 対する感受性に関する研究 — 単独または併用効果について —

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 玉井健三教授)

和 泉 忍

(昭和60年5月2日受付)

嫌気性菌のリゾチームとリゾチームおよび抗生物質の併用に対する感受性について本研究をおこなった。実験は比濁法または寒天平板法で施行した。比濁法はL型試験管で培養した菌に薬剤を投与した後の増殖曲線を測定することより、寒天平板法は寒天平板で培養した菌にカップ法にて薬剤を投与した際の発育阻止円の有無により検討した。*Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes* は比濁法で実験し、*Veillonella alcalescens*, *Peptostreptococcus magnus* は寒天平板法で実験した。使用した抗生物質はアミノベンジルペニシリン (ABPC), セファロリジン (CER), オキシテトラサイクリン (OTC), エリスロマイシン (EM), リンコマイシン (LCM), ゲンタマイシン (GM) である。*Cl. perfringens* と *B. fragilis* でリゾチーム投与後、増殖曲線は減少しリゾチームに対する嫌気性菌の感受性が認められた。さらに、*Cl. perfringens* ではリゾチームと抗生物質を併用すると一層増殖抑制を受け、中でも ABPC, OTC, LCM と併用した際著しい併用効果を受けた。同様に、*B. fragilis* でも併用により増殖抑制を受け、ABPC, CER, OTC, LCM と併用した時に著しい併用効果を受けた。しかし、*P. acnes* では CER へのみ併用効果を認めた。平板法で施行した *V. alcalescens* では併用効果を認めたが、*P. magnus* では認めなかった。さらに、*B. fragilis* を用いて増殖曲線の減少が菌数の減少と一致するか否かについて検討した。その結果、増殖曲線の減少と菌数の減少はよく一致した。そして、併用実験ではリゾチーム単独投与したものより菌数の減少を認めた。

**Key words** anaerobes, lysozyme, antibiotics, combination effect.

Fleming がペニシリンを発見して以来、多くの抗生物質が研究開発され、それらの抗生物質が臨床において応用されかつ広く普及した。そのために、多剤耐性菌の出現<sup>1)~3)</sup>、日和見感染症<sup>4)5)</sup>、嫌気性菌感染症<sup>6)~8)</sup>など感染症の病態が変化した。これらの感染症に対して治療をおこなう際、抗生物質の単独投与では十分な治療法となり得ず、他の薬剤と併用をおこなってきめ細かな治療をおこなう必要がある。併用をおこなう薬剤の一つに消炎酵素剤としてのリゾチームがある。嫌気性菌感染症の報告<sup>9)~11)</sup>は散見されるが、リゾチームと抗生物質を併用した基礎実験は殆んどみられない。以

上のことから嫌気性菌のリゾチームに対する感受性を検討し、かつ、各種抗生物質との併用効果について実験した。さらに、臨床応用を目的として口腔内より分離・同定した新鮮分離菌に対しても検討した。

## 材料および方法

### I. 使用菌株

使用菌株は、教室保存株である *Clostridium perfringens* PB6K および金沢大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した感染症患者から分離・同定した新鮮分離菌株 *Bacteroides fragilis* KI-1, *Propioni-*

Abbreviations: ABPC, aminobenzylpenicillin; CER, cephaloridine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EM, erythromycin; GM, gentamicin; LCM, lincomycin; OD, optical density; OTC, oxytetracycline; PCG, benzylpenicillin; TF 培地, Tamai & Fukuda 培地; TYG, tripticase yeast extract glucose.

*bacterium acnes* KI-2, *Peptostreptococcus magnus* KI-3, *Veillonella alcalescens* KN-1 の4株を実験に供した。なお、臨床分離菌株は Cowan ら<sup>9)</sup>, Bergey's Manual<sup>10)~13)</sup> および API 20A anaerobic system (La Balme les Frontes, Montalieu, France) に従って同定した。

## II. 使用培地

菌の分離・同定および継代培養には、口腔内嫌気性菌分離用の玉井・福田培地<sup>14)</sup> (TF 培地, 日水, 東京) を使用した。菌の増殖実験には TYG 培地を使用した。その組成はトリプチカーゼ (tripticase, BBL) 2%, イーストエキストラクト (yeast extract, Difco) 0.5%, グルコース (glucose, 和光) 0.5%, 塩化ナトリウム (sodium chloride, 和光) 0.5%, チオグリコール酸ナトリウム (sodium thioglycollate, 和光) 0.1% である。この組成を蒸留水に溶解後, 15 分間高圧滅菌し, 最終 pH が 7.0 となるように調整した。また, 平板法にて実験を施行する際には, GAM 寒天培地 (日水, 東京) をペトリシャーレに 20 ml 分注し使用した。

## III. 嫌気培養法

嫌気培養法は, ガスパック嫌気システム (GAS Pak anaerobic system, BBL, USA) を用いて, 37°C・48 時間培養した。

## IV. 使用薬剤

使用したリゾチームは力価測定済注射用塩化リゾチーム (lysozyme chloride, 日本新薬, 京都) を用いた。抗生物質はアミノベンジルペニシリン (aminobenzyloxy penicillin, ABPC), セファロリジン (cephaloridine, CER), オキシテトラサイクリン (oxytetracycline, OTC), エリスロマイシン (erythromycin, EM), リンコマイシン (lincomycin, LCM), ゲンタマイシン (gentamicin, GM) の注射用製剤の計 6 剤を用いた。

## V. 嫌気性菌の薬剤感受性試験

### 1. 比濁法による試験

#### 1) リゾチームに対する感受性試験

保存菌株を TF 培地 15 ml に 3 回継代後, TYG 培地 20 ml で 37°C で前培養した。*Cl. perfringens* では 6 時間, *B. fragilis* では 12 時間, *P. acnes* では 24 時間前培養をおこなった。その後, 前培養した各菌株を TYG 培地 20 ml の L 型試験管に 1% の割合で移植した。37°C の恒温槽で培養し, 増殖中にリゾチームを添加後, 経時的に菌の発育を optical density (OD) で示した。OD は光電比色計 (ボシュロムスペクトロニック, 島津, 東京) で測定した。なお, 測定の際の波長は 560 nm で施行した。

#### 2) 抗生物質に対する感受性試験

リゾチームの感受性試験の際と同様の方法で菌を移植し, 増殖の各段階において抗生物質を添加し, その後の OD の変化により抗生物質の感受性を検討した。また, 抗生物質の濃度についても検討した。

3) リゾチームと抗生物質の併用による感受性試験  
増殖の各段階においてリゾチームおよび抗生物質の感受性試験から得られた最適濃度でリゾチームと抗生物質を同時に添加した。薬剤の添加後に増殖曲線が減少した時, その減少は薬剤の併用によるものか, あるいはリゾチームまたは抗生物質によるものかについてさらに検討をおこなった。添加の段階は比較を容易にするために, 単独添加の実験では増殖曲線の減少が弱い段階を選択した。増殖の各段階で併用した濃度のリゾチームと抗生物質, さらにその倍量の濃度のリゾチームと抗生物質を単独に添加し, リゾチームおよび抗生物質の併用したものと比較した。

## 2. 平板法による試験

保存菌株を TF 培地 15 ml に 3 回継代後, 37°C・30 分間乾燥した GAM 寒天平板培地上に  $10^7$  cells/ml に調整した菌を接種した。薬剤は, 日本化学療法学会標準法<sup>15)</sup> に準じて生理的食塩水で希釈し, 寒天平板培地上のカップ内に 0.2 ml 滴下し, 37°C・48 時間嫌気培養をおこなった。なお, リゾチームと抗生物質の併用に際しては, リゾチームと抗生物質をそれぞれ 0.1 ml カップ内へ滴下し実験した。

## VI. 併用効果の判定

比濁法における抗生物質とリゾチームの併用効果の判定は (+), (+), (-) の 3 段階とした。(+) は増殖曲線の減少が著しく, リゾチームまたは抗生物質単独で添加したものと OD の差で 0.1 以上の明らかな差の認められたものとした。(++) は増殖曲線が減少し, リゾチームと抗生物質の併用効果が認められたが, リゾチームまたは抗生物質を単独で添加したものと OD の差で 0.1 以内であったものとした。(-) は併用の際に増殖曲線の減少しないものとした。また, 平板法における併用効果の判定は, 寒天平板培地上に生じた発育阻止円によりおこなった。単独で添加したリゾチームと併用したリゾチームの濃度, または, 単独で添加した抗生物質と併用した抗生物質の濃度を比較し, 単独で発育阻止円を認めたりゾチームまたは抗生物質の濃度より低い濃度で, 併用したリゾチームまたは抗生物質により発育阻止円が認められた時に併用効果ありと判定した。

## VII. 菌数測定法

*B. fragilis* の菌数は比濁法で発育中の L 型試験管のものについて測定した。*B. fragilis* の培養開始時, 薬剤添加時, 対数増殖期 (OD 1.0 以上), リゾチーム添

加後、抗生物質添加後、そしてリゾチームと抗生物質の同時添加後の培養液の各々をL型試験管から採取し、GAM寒天平板培地にて平板希釈法により生菌数の測定をおこなった。なお、リゾチーム、抗生物質、両者を併用したものは薬剤の添加後、菌の増殖が最も減少した時点で培養液を採取した。

成 績

I. *Cl. perfringens* のリゾチームによる溶菌現象

*Cl. perfringens* がリゾチームにより溶菌現象を生じるか否かを検討した。リゾチームの活性を検定する際、検定菌として用いられている *Micrococcus lysodeikticus* を対照とした。TF培地 15 ml に3回継代後、TYG培地 200 ml で37°C・24時間培養した。その後、3000 r.p.m.・20分間遠心分離し、得られた菌体にリン酸緩衝液 (pH7.0) を加え、OD 535 nm=1.0と調整し基質とした。基質 3 ml に種々の濃度のリゾチー

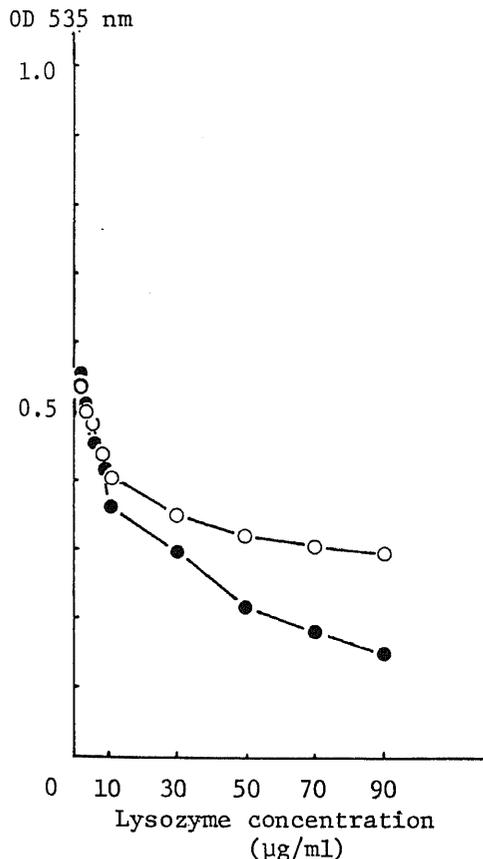


Fig. 1. Lysozyme activity on optical density (wave length at 535 nm) of *Clostridium perfringens* PB6K and *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698. ○—○, *Cl. perfringens*; ●—●, *M. lysodeikticus*.

ムを添加し、37°C・30分間反応させODを測定した。その結果、*Cl. perfringens* には *M. lysodeikticus* と同様にODの減少が認められた (図1)。

II. *Cl. perfringens* のリゾチーム単独と抗生物質単独、およびリゾチームと抗生物質の併用に対する感受性

*Cl. perfringens* はリゾチームに対し感受性のあることが前実験で確認できたので、*Cl. perfringens* を用いて菌の増殖中におけるリゾチーム単独、各種抗生物質の単独、およびリゾチームと各種抗生物質の併用効果について検討した。

1. リゾチームに対する感受性

菌の増殖の各段階、すなわち、OD 560 nm で 0.04、

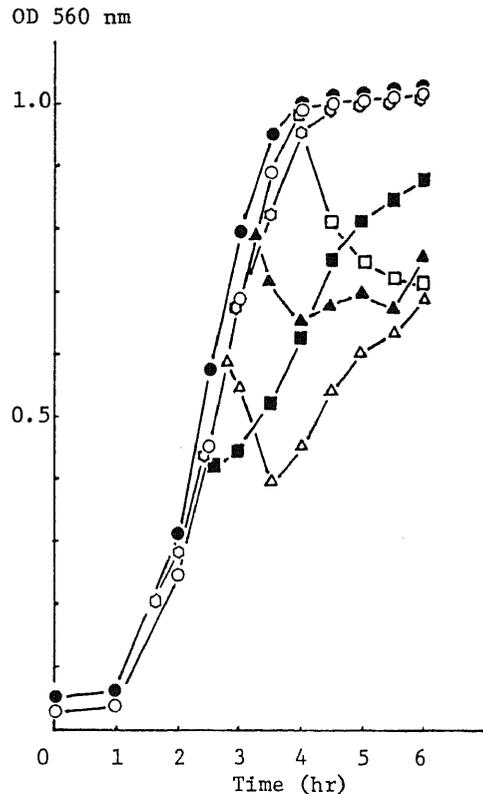


Fig. 2. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of lysozyme. Lysozyme was administered in concentration of 50 µg/ml at various OD. ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration at OD 0.04; □—□, growth curve after administration at OD 0.20; ■—■, growth curve after administration at OD 0.40; △—△, growth curve after administration at OD 0.59; ▲—▲, growth curve after administration at OD 0.80; □—□, growth curve after administration at OD 1.00.

0.20, 0.40, 0.59, 0.80, 1.00の各段階でリゾチームの最終濃度が50  $\mu\text{g/ml}$ になるように調整し添加したところ, OD 0.59, 0.80, 1.00で増殖曲線の減少が認められた(図2). 同時にOD 0.60でリゾチーム10, 30, 50, 70, 90, 120  $\mu\text{g/ml}$ と量を変えて添加した結果, 30  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で増殖曲線の減少が認められた, 50  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度ではリゾチームの添加直後から増殖曲線の減少を認めた(図3). 以上の成績から, 以後の実験ではリゾチームの濃度を50  $\mu\text{g/ml}$ とした.

## 2. 抗生物質に対する感受性

まず, ABPC単独による感受性について検討した. 菌の増殖の各段階でABPC 0.78  $\mu\text{g/ml}$ を添加したところ, OD 0.20で添加したものに著しい増殖曲線の減

少を認めた(図4). そこで, OD 0.20で濃度の検討をしたところ, 0.39  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で著しい増殖曲線の減少が認められた(図5). 以下同様の方法によりCER, OTC, EM, LCM, GMに対して感受性を検討した. CERではOD 0.2付近でかつ5.0  $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で著しい菌の増殖の抑制を示した. しかし, OTC, EM, LCMでは増殖の各段階で薬剤を添加したが, 増殖曲線の減少を認めず増殖を抑制するのみであった. 前2者に従いOD 0.2付近で増殖が抑制される最小濃度を検討した. OTCでは0.39  $\mu\text{g/ml}$ 以上, EMでは6.25  $\mu\text{g/ml}$ 以上, LCMでは同様に6.25  $\mu\text{g/ml}$ 以上であった. 一方, GMでは増殖の各段階で添加したと

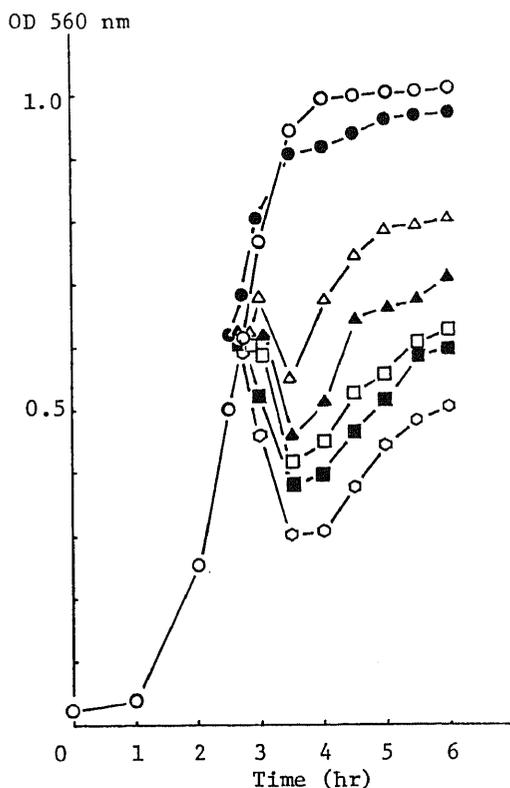


Fig. 3. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of lysozyme at OD 0.60. ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration in concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ ; △—△, growth curve after administration in 30  $\mu\text{g/ml}$ ; ▲—▲, growth curve after administration in 50  $\mu\text{g/ml}$ ; □—□, growth curve after administration in 70  $\mu\text{g/ml}$ ; ■—■, growth curve after administration in 90  $\mu\text{g/ml}$ ; ○—○, growth curve after administration in 120  $\mu\text{g/ml}$ .

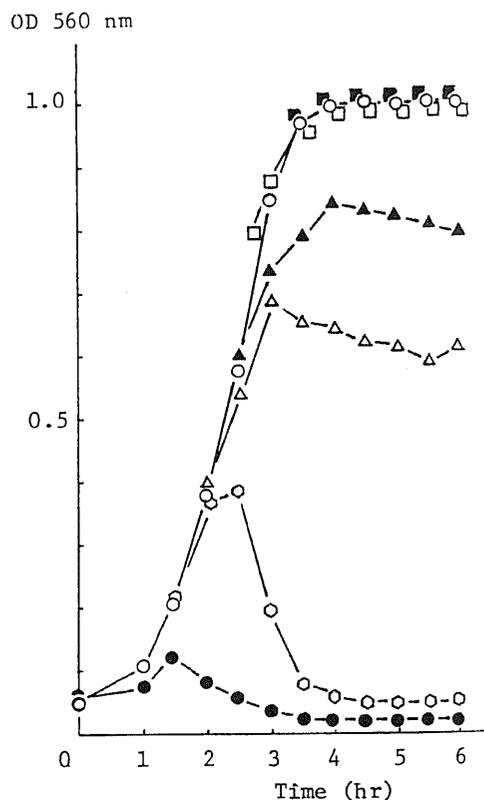


Fig. 4. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of ABPC. ABPC was administered in concentration of 0.78  $\mu\text{g/ml}$ . ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration at OD 0.05; ○—○, growth curve after administration at OD 0.20; △—△, growth curve after administration at OD 0.40; ▲—▲, growth curve after administration at OD 0.61; □—□, growth curve after administration at OD 0.80; ■—■, growth curve after administration at OD 1.00.

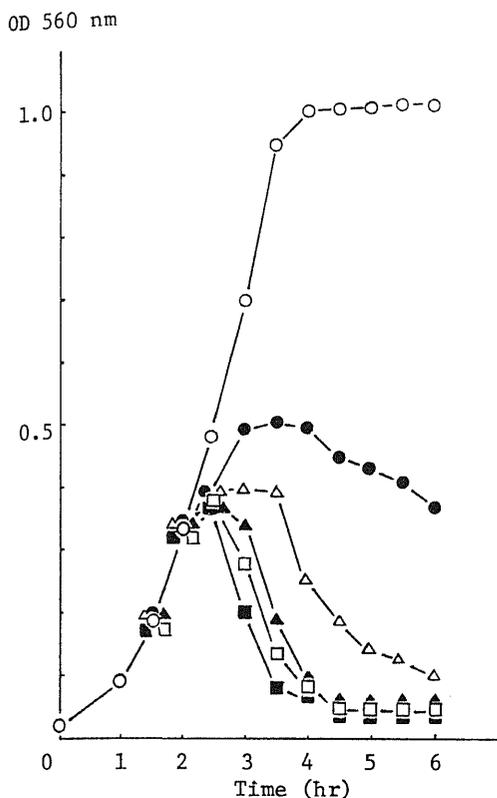


Fig. 5. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of ABPC in various concentration at OD 0.20. ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration in concentration of 0.20 µg/ml; △—△, growth curve after administration in 0.39 µg/ml; ▲—▲, growth curve after administration in 0.78 µg/ml; □—□, growth curve after administration in 1.56 µg/ml; ■—■, growth curve after administration in 3.13 µg/ml.

ころ, OD 0.21 の段階で添加したものは 4 時間で 0.4 のゆるやかな増殖を示し, OD 0.42 で添加したものは 4 時間で 0.8 の増殖を示した. その他の段階で添加したものはコントロールと同様な増殖となった. さらに, OD 0.2 において前述のごとく, ゆるやかな増殖となる最小濃度を検討したところ, 100 µg/ml 以上の濃度で 0.4 の増加とゆるやかな増殖を示した (表 1).

3. リゾチームと各種抗生物質の併用に対する感受性

前述した感受性試験の成績をもとに, リゾチームと抗生物質の併用について検討した. まず, ABPC 0.78 µg/ml とリゾチーム 50 µg/ml を増殖の各段階において添加したところ, いずれの段階でも増殖曲線の減少を認め, 特に OD 0.6 で添加したものに著しい減少を認めた (図 6). そこで, OD 0.62 でリゾチーム 50, 100 µg/ml と ABPC 0.78, 1.56 µg/ml の単独投与群, そしてリゾチーム 50 µg/ml および ABPC 0.78 µg/ml の併用したもの同時添加をおこなった. その結果, 併用したものでは, 単独で倍量添加したものより著しい増殖曲線の減少を認めた. 以上の成績から, リゾチームと ABPC の併用効果を (+) と判定した (図 7). 以下同様の方法により, CER, OTC, EM, LCM, GM に対して併用効果を検討した. その際の抗生物質の濃度は抗生物質の感受性の実験で得られた CER 5.0 µg/ml, OTC 0.39 µg/ml, EM 6.25 µg/ml, LCM 6.25 µg/ml, GM 100 µg/ml を用いた. 増殖の各段階において CER, OTC ではリゾチームと併用した時, どの段階でも増殖曲線の減少を認めたが, EM では OD 0.80, 0.97, LCM では OD 0.20, 0.41 そして GM では OD 0.80, 0.97 で増殖曲線の減少を認め, その他の段階では菌の増殖の抑制を認める成績であった. そこで, 増殖曲線が減少し, かつ単独投与したリゾチームと抗生物質との比較が容易な段階, すなわち, OD が CER で

Table 1. Susceptibility of *Clostridium perfringens* PB6K to antibiotics or lysozyme

Antibiotics	Concentration of antibiotics (µg/ml)	Susceptibility	Concentration of lysozyme (µg/ml)	Susceptibility
Aminobenzylpenicillin	0.78	+	50	+
Cephaloridine	5.0	+	50	+
Oxytetracycline	0.39	±	50	+
Erythromycin	6.25	±	50	+
Lincomycin	6.25	±	50	+
Gentamicin	100	-	50	+

+, OD reduction of growth curve; ±, slight OD reduction of growth curve.

は 0.62, OTC では 0.62, EM では 0.82, LCM では 0.43, GM では 0.82 の段階で併用実験をおこなった。その結果, OTC, LCM では ABPC と同様に著しい増殖曲線の減少を認め, リゾチームまたは抗生物質単独で添加したものと明らかな差を認めた。以上の成績から, 併用効果を (+) と判定した。一方, CER, EM, GM では薬剤の添加後に増殖曲線の減少を認めたが, リゾチームの倍量投与したものと OD の差が 0.1 とわずかな差しか認められなかった。以上の成績から, 併用効果を (+) と判定した (表 2)。

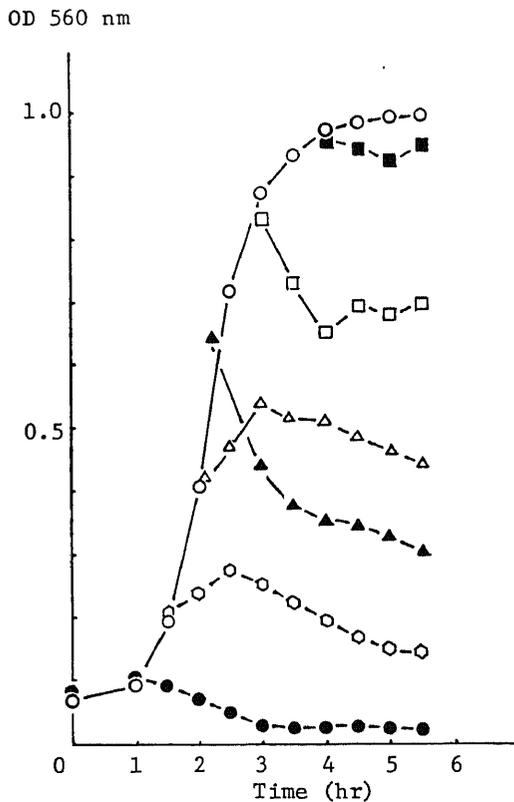


Fig. 6. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of ABPC and lysozyme at various optical density. ABPC was administered in concentration of 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and lysozyme was administered in 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .  $\circ-\circ$ , control curve;  $\bullet-\bullet$ , growth curve after administration at OD 0.05;  $\odot-\odot$ , growth curve after administration at OD 0.20;  $\triangle-\triangle$ , growth curve after administration at OD 0.40;  $\blacktriangle-\blacktriangle$ , growth curve after administration at OD 0.61;  $\square-\square$ , growth curve after administration at OD 0.80;  $\blacksquare-\blacksquare$ , growth curve after administration at OD 1.00.

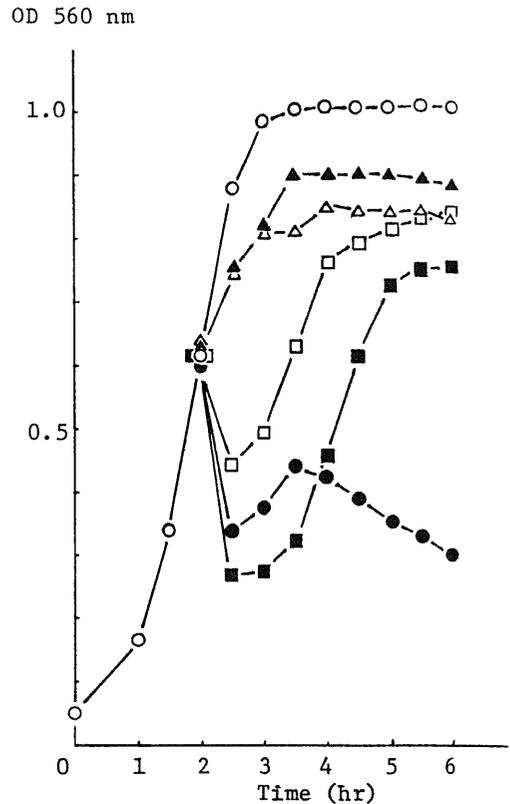


Fig. 7. Growth curve of *Cl. perfringens* after administration of ABPC and/or lysozyme at OD 0.62.  $\circ-\circ$ , control curve;  $\bullet-\bullet$ , growth curve after administration of ABPC in 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and lysozyme in 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\blacktriangle-\blacktriangle$ , growth curve after administration of ABPC in 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\triangle-\triangle$ , growth curve after administration of ABPC in 1.56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\square-\square$ , growth curve after administration of lysozyme in 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $\blacksquare-\blacksquare$ , growth curve after administration of lysozyme in 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Table 2. Combination effect of *Clostridium perfringens* PB6K to antibiotics and lysozyme

Antibiotics	Effect of combination
Aminobenzylpenicillin	#
Cephaloridine	+
Oxytetracycline	#
Erythromycin	+
Lincomycin	#
Gentamicin	+

#, heavy OD reduction of growth curve; +, slight OD reduction of growth curve.

### Ⅲ. 口腔内新鮮分離菌株のリゾチーム単独と抗生物質単独、およびリゾチームと抗生物質の併用に對する感受性

口腔内から分離・同定した *B. fragilis*, *p. acnes*, *V. alcalescens* および *P. magnus* に対し前述の *Cl. perfringens* と同様の方法にて実験を施行した。しかし、*V. alcalescens* および *P. magnus* では比濁法の実験で菌数の増加は認められたが、それにとまなう OD の増大は 0.3~0.4 であった。増殖中に薬剤の添加をおこなっても、薬剤の感受性の検討は困難であるため、薬剤に対する感受性と併用効果の検討は平板法でおこなった。

#### 1. *B. fragilis* に対する検討

##### 1) リゾチームに対する感受性

菌の増殖の各段階でリゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  を添加したところ、OD 0.20, 0.41 の段階で菌の増殖は抑制され、その他の段階ではいずれの増殖曲線も減少した。そして、OD 0.60 の段階で 30, 50, 70, 90, 110  $\mu\text{g/ml}$  の濃度のリゾチームを添加して濃度の検討をした。その結果、いずれの段階でも感受性が認められたが、以後の実験において *Cl. perfringens* と同様に 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度を選択した。

##### 2) 抗生物質に対する感受性

まず、ABPC 単独による感受性を検討した。増殖の各段階で ABPC 1.56  $\mu\text{g/ml}$  を添加した時、OD 0.07, 0.23 の段階で増殖曲線の減少を認めた。また、OD 0.20 で濃度の検討をおこない、1.56  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で感受性が認められた。以下同様の方法により CER, OTC, EM, LCM, GM に対して感受性を検討した。CER による増殖曲線の減少は認められず、OD 0.2 かつ 3.13  $\mu\text{g/ml}$  で菌の増殖は OD 0.5 の増殖を示し、OD 0.20 かつ 6.25  $\mu\text{g/ml}$  で抑制される成績であった。OTC, EM, LCM, GM では増殖の各段階で薬剤を添加したが、増殖曲線の減少は認められず、増殖が抑制される

のみであった。そこで、前 2 者に従い OD 0.2 付近で抑制される最小濃度を検討した。その結果、OTC では 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , EM では 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , LCM では 25  $\mu\text{g/ml}$ , GM では 6.25  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で増殖が抑制されるかまたは OD の差が 0.3 のわずかな増殖となる成績であった (表 3)。

#### 3) リゾチームと各種抗生物質の併用

前述した感受性実験の成績をもとに、リゾチームと抗生物質の併用について検討した。まず、リゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  と ABPC 1.56  $\mu\text{g/ml}$  を増殖の各段階で添加したところ、いずれの段階でも増殖曲線の減少を認め、特に OD 0.80, 1.00 で添加したもので著しい減少を認めた。しかし、単独投与群と比較する際に OD 0.8 または 1.0 の段階で薬剤を添加すると、リゾチームの単独投与したものと比較が困難となる可能性があり、OD 0.62 の段階で薬剤を添加し比較検討することとした。その結果、リゾチームと ABPC を併用したものは、単独で倍量添加したものより著しい増殖曲線の減少を認めた。以上の成績から、リゾチームと ABPC の併用効果を (+) と判定した (図 8)。以下同様の方法により、CER, OTC, EM, LCM, GM に対して併用効果を検討した。その際の抗生物質の濃度は抗生物質の感受性から得られた CER 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , OTC 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , EM 0.78  $\mu\text{g/ml}$ , LCM 25  $\mu\text{g/ml}$  そして GM 6.25  $\mu\text{g/ml}$  を用いた。増殖の各段階でリゾチームと抗生物質を併用すると、すべての抗生物質で増殖のどの段階でも増殖曲線の減少が認められ、OTC では OD 0.78, 1.00, LCM では OD 0.79, 1.00, GM では OD 0.79, 1.00 で著しい OD の減少を認めた。しかし、単独で添加したリゾチームと比較が容易となる段階を選択し、併用効果を検討するため、OD 0.6 付近で抗生物質とリゾチームを添加した。CER, OTC, LCM では ABPC と同様に著しい増殖曲線の減少を認め、リゾチームまたは抗生物質の単独で添加したものと明らかな差異を認

Table 3. Susceptibility of clinically isolated *Bacteroides fragilis* KI-1 to antibiotics or lysozyme

Antibiotics	Concentration of antibiotics ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility	Concentration of lysozyme ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility
Aminobenzylpenicillin	1.56	+	50	+
Cephaloridine	3.13	-	50	+
Oxytetracycline	0.20	±	50	+
Erythromycin	0.78	±	50	+
Lincomycin	25	±	50	+
Gentamicin	6.25	±	50	+

+, OD reduction of growth curve; ±, slight OD reduction of growth curve; -, no effect.

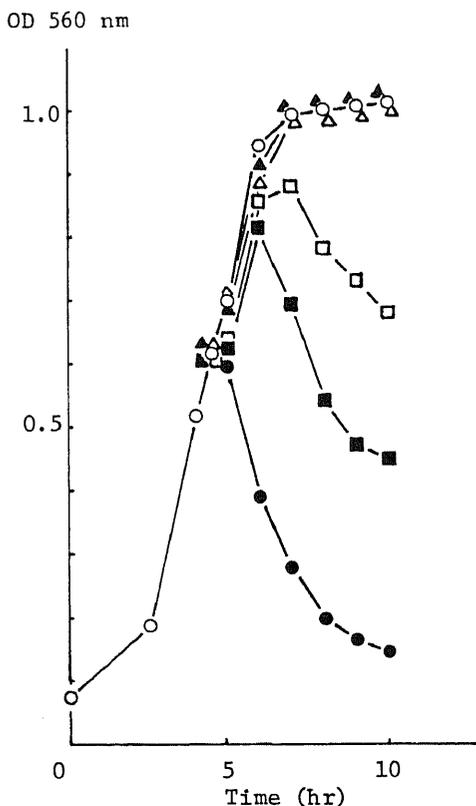


Fig. 8. Growth curve of *Bacteroides fragilis* KI-1 after administration of ABPC and/or lysozyme at OD 0.62. ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration of ABPC in 1.56  $\mu\text{g/ml}$  and lysozyme in 50  $\mu\text{g/ml}$ ; ▲—▲, growth curve after administration of ABPC in 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ; △—△, growth curve after administration of ABPC in 3.13  $\mu\text{g/ml}$ ; □—□, growth curve after administration of lysozyme in 50  $\mu\text{g/ml}$ ; ■—■, growth curve after administration of lysozyme in 100  $\mu\text{g/ml}$ .

めた。以上の成績から、併用効果を(+)と判定した。一方、EM, GM では添加後増殖曲線は減少したが、リゾチームの倍量添加したものと OD において 0.1 以内のわずかな差しか認められなかった。以上の成績から、併用効果を(+)と判定した(表4)。

## 2. *P. acnes* に対する検討

### 1) リゾチームに対する感受性

菌の増殖の各段階でリゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  を添加したが、いずれの段階でも増殖曲線の減少や菌の増殖の抑制はなく、感受性は認められなかった。さらに、リゾチーム 150  $\mu\text{g/ml}$  を添加しても同様に感受性を認めなかった。

### 2) 抗生物質に対する感受性

まず、ABPC 単独による感受性を検討した。増殖の各段階で ABPC 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を添加した時、OD 0.13, 0.20 の段階で増殖曲線は抑制され、その他の段階ではすべて増殖した。また、OD 0.20 で増殖が抑制される最小濃度の検討をおこない、ABPC 0.20  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で増殖曲線の抑制を認めた。以下同様の方法により、CER, OTC, EM, LCM, GM に対して感受性を検討した。しかし、いずれの抗生物質でも増殖曲線の

Table 4. Combination effect of *Bacteroides fragilis* KI-1 to antibiotics and lysozyme

Antibiotics	Effect of combination
Aminobenzylpenicillin	‡
Cephaloridine	‡
Oxytetracycline	‡
Erythromycin	+
Lincomycin	‡
Gentamicin	+

‡, heavy OD reduction of growth curve; +, slight OD reduction of growth curve.

Table 5. Susceptibility of clinically isolated *Propionibacterium acnes* KI-2 to antibiotics or lysozyme

Antibiotics	Concentration of antibiotics ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility	Concentration of lysozyme ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility
Aminobenzylpenicillin	0.39	±	50	—
Cephaloridine	0.39	±	50	—
Oxytetracycline	3.13	±	50	—
Erythromycin	0.20	±	50	—
Lincomycin	0.78	±	50	—
Gentamicin	12.5	±	50	—

+, OD reduction of growth curve; ±, slight OD reduction of growth curve; —, no effect.

減少は認められず、抑制されるのみであった。そのため、OD 0.20 付近で増殖の抑制される最小濃度を検討した。その結果、CER では 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、OTC では同様に 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、EM では 0.20  $\mu\text{g/ml}$ 、LCM では 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 、GM では 12.5  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で菌の増殖が抑制された (表 5)。

3) リゾチームと各種抗生物質の併用

前述した感受性実験の成績をもとに、リゾチームと抗生物質の併用について検討した。なお、リゾチームには感受性を認めなかったため、前述の実験で使用した 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度を使用した。まず、リゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  と ABPC 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を増殖の各段階で添加したが、いずれの段階でも増殖曲線の減少を認めなかった。以上の成績から、リゾチームと ABPC の併用効果を (-) と判定した。つぎに、リゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  と CER 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を菌の増殖の各段階で添加したところ、菌の発育阻害は OD 0.21, 0.42, 0.58, 0.80 の各段階で認められたが、OD 0.58 にて単独で添加した群と比較した。併用したもので著しい増殖曲線の減少が認められ、単独で添加した群より OD で 0.1 以上の明らかな差を認めた (図 9)。以上の成績から、リゾチームと CER の併用効果を (+) と判定した。以下同様の方法で OTC, EM, LCM, GM に対して検討した。OTC 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、EM 0.20  $\mu\text{g/ml}$ 、LCM 0.78  $\mu\text{g/ml}$ 、GM 12.5  $\mu\text{g/ml}$  を菌の増殖の各段階でリゾチーム 50  $\mu\text{g/ml}$  と併用したが、どの段階でも増殖曲線の減少は認められず、LCM とリゾチームの併用の際に OD 0.42 と 0.62 の段階で併用したものに増殖の抑制が認められるのみであった。以上の成績から、OTC, EM, LCM, GM とリゾチームの併用効果を (-) と判定した (表 6)。

3. *V. alcalescens* に対する検討

1) リゾチームに対する感受性

倍数希釈法でリゾチームを 100  $\mu\text{g/ml}$  から 0.10  $\mu\text{g/ml}$  まで希釈し、平板法で感受性を検討したが、感受性は認められなかった。

2) 抗生物質に対する感受性

リゾチームと同様に平板法で最小発育阻止濃度を測定した。その結果、*V. alcalescens* に対する最小発育阻止濃度はそれぞれ ABPC 1.56  $\mu\text{g/ml}$ 、CER 0.20  $\mu\text{g/ml}$ 、OTC 1.56  $\mu\text{g/ml}$ 、EM 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 、LCM 3.13  $\mu\text{g/ml}$ 、GM 25  $\mu\text{g/ml}$  であった。

3) リゾチームと各種抗生物質の併用

まず、ABPC 単独の感受性を示す濃度とリゾチームおよび抗生物質を併用して認められた ABPC の感受性を示す濃度を比較した。その結果、単独で感受性の認められなかった ABPC 0.78  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム

6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  および ABPC 0.39  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  の併用したもので発育阻止円の形成が認められた。以上の成績から、ABPC とリゾチームには併用効果が認められると判定した (表 7)。同様にして CER, OTC, EM,

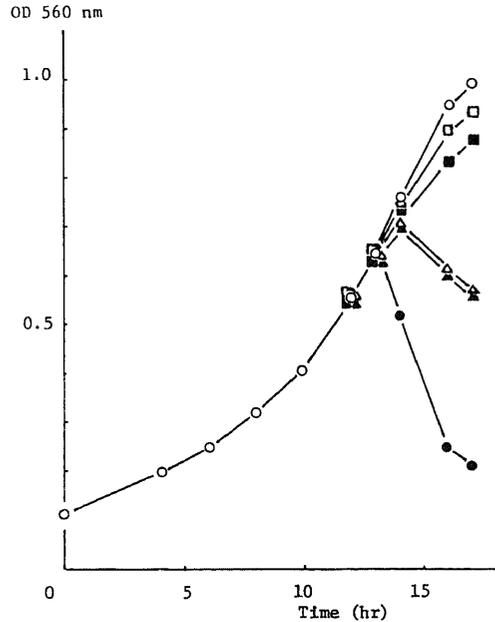


Fig. 9. Growth curve of *Propionibacterium acnes* KI-2 after administration of CER and/or lysozyme at OD 0.58. ○—○, control curve; ●—●, growth curve after administration of CER in 0.39  $\mu\text{g/ml}$  and lysozyme in 50  $\mu\text{g/ml}$ ; ▲—▲, growth curve after administration of CER in 0.39  $\mu\text{g/ml}$ ; △—△, growth curve after administration of CER in 0.78  $\mu\text{g/ml}$ ; □—□, growth curve of lysozyme in 50  $\mu\text{g/ml}$ ; ■—■, growth curve after administration of lysozyme in 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Table 6. Combination effect of *Propionibacterium acnes* KI-2 to antibiotics and lysozyme

Antibiotics	Effect of combination
Aminobenzylpenicillin	—
Cephaloridine	+
Oxytetracycline	—
Erythromycin	—
Lincomycin	—
Gentamicin	—

+, heavy OD reduction of growth curve; —, no effect.

LCM, GM について検討した。CER 0.10  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 25, 100  $\mu\text{g/ml}$ , OTC 0.78  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 6.25, 25, 100  $\mu\text{g/ml}$ , EM 3.13  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 12.5, 50  $\mu\text{g/ml}$ , LCM 1.56  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 0.20, 0.78, 3.13, 12.5, 50  $\mu\text{g/ml}$  および LCM 0.78  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 12.5, 50  $\mu\text{g/ml}$ , GM 12.5  $\mu\text{g/ml}$  とリゾチーム 1.56, 6.25, 25, 100  $\mu\text{g/ml}$  の併用したもので発育阻止円の形成が認められた。以上の成績から, CER, OTC, EM, LCM, GM とリゾチームには併用効果があると判定した (表 8)。

#### 4. *P. magnus* に対する検討

#### 1) リゾチームに対する感受性

*V. alcalescens* と同様な方法でリゾチームの感受性を検討したが, 感受性は認められなかった。

#### 2) 抗生物質に対する感受性

*P. magnus* に対する抗生物質の最小発育阻止濃度はそれぞれ ABPC 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , CER 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , OTC 3.13  $\mu\text{g/ml}$ , EM 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , LCM 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , GM 12.5  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 3) リゾチームと各種抗生物質の併用

単独で使用した抗生物質の感受性を示す濃度とリゾチームおよび抗生物質を併用して認められた抗生物質

Table 7. Combination effect of aminobenzylpenicillin and lysozyme on *Veillonella alcalescens* NK-1

Concentration of lysozyme ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration of ABPC ( $\mu\text{g/ml}$ )						Susceptibility to lysozyme alone
	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	
100	+	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	+	+	-	-
25	+	+	+	+	+	-	-
12.5	+	+	+	+	+	-	-
6.25	+	+	+	+	+	-	-
3.13	+	+	+	-	-	-	-
Susceptibility to ABPC alone	+	+	+	-	-	-	-

Table 8. Susceptibility of clinically isolated *Veillonella alcalescens* NK-1 to antibiotics and lysozyme

Antibiotics	Susceptibility to antibiotics ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility to lysozyme ( $\mu\text{g/ml}$ )	Effect of combination
Aminobenzylpenicillin	1.56	100 <	+
Cephaloridine	0.20	100 <	+
Oxytetracycline	1.56	100 <	+
Erythromycin	6.25	100 <	+
Lincomycin	3.13	100 <	+
Gentamicin	25	100 <	+

+, combined effect of antibiotics and lysozyme.

Table 9. Susceptibility of clinically isolated *Peptostreptococcus magnus* KI-3 to antibiotics and lysozyme

Antibiotics	Susceptibility to antibiotics ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibility to lysozyme ( $\mu\text{g/ml}$ )	Effect of combination
Aminobenzylpenicillin	0.10	100 <	-
Cephaloridine	0.39	100 <	-
Oxytetracycline	3.13	100 <	-
Erythromycin	0.20	100 <	-
Lincomycin	0.05	100 <	-
Gentamicin	12.5	100 <	-

-, no combined effect of antibiotics and lysozyme.

Table 10. Number of viable cells in various stages of *Bacteroides fragilis* KI-1

	Number of cells (cells/ml) of					
	A	B	C	D	E	F
Aminobenzylpenicillin	$1.0 \times 10^7$	$8.1 \times 10^7$	$3.8 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$5.0 \times 10^7$	$4.4 \times 10^6$
Cephaloridine	$8.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$	$6.9 \times 10^6$	$3.7 \times 10^7$	$5.7 \times 10^6$
Oxytetracycline	$1.2 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$9.0 \times 10^5$
Erythromycin	$1.4 \times 10^7$	$1.9 \times 10^8$	$9.0 \times 10^8$	$4.6 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	$1.2 \times 10^6$
Lincomycin	$1.7 \times 10^7$	$9.5 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$2.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$
Gentamicin	$3.4 \times 10^6$	$1.9 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$	$1.3 \times 10^5$

A, start of growth; B, administration of drug; C, maximum of growth; D, after administration of antibiotics; E, after administration of lysozyme; F, after administration of antibiotics and lysozyme.

の感受性を示す濃度を比較したところ、いずれの抗生物質においても感受性を示す濃度は同一であった。以上の成績より、ABPC, CER, OTC, EM, LCM, GM とリゾチームには併用効果が認められないと判定した(表9)。

#### IV. 増殖曲線の減少と生菌数

前述のごとく、各種抗生物質とリゾチームの併用の際に、比濁法で検討すると、著しい増殖曲線の減少が認められた。この現象を確認するために、試験管内の菌数が実際に減少しているか否かについて、*B. fragilis* を用いて検討した。菌の移植直後の生菌数は  $9.6 \times 10^6$  cells/ml であり、薬剤添加直後の平均生菌数は  $1.4 \times 10^6$  cells/ml であり、対数増殖期(OD 1.0 以上)の平均生菌数は  $4.6 \times 10^8$  cells/ml であった。抗生物質およびリゾチーム添加後における生菌数は ABPC を除き薬剤添加時より菌数は減少した。そして、リゾチームと抗生物質を併用したものは、比濁法の実験で OD の差が単独添加時と著明でなかった。EM, GM を含め生菌数において著しい差を認めた。以上の成績から、リゾチームと抗生物質には併用効果のあることが生菌数の実験でも確認できた(表10)。

#### 考 察

*M. lysodeikticus* の細胞壁にリゾチームを作用させると N-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine) と N-アセチルムラミン酸 (N-acetylmuramic acid) が分離されることより、リゾチームには  $\beta(1-4)$  アセチルグルコサミダーゼ ( $\beta(1-4)$  acetylglucosamidase) としての酵素的作用を有している<sup>16)~20)</sup>。しかし、グラム陰性菌においては、細胞壁の基本構造はグラム陽性菌と同様であるが、ペプチドグリカン層の外側にタンパク質・リポ多糖・リン脂質からなる外膜が存在し、ペプチドグリカン層と密着しているため、リゾチームには感受性はないと考えられていた。しかし、

Repaske<sup>21)</sup> は *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* および *Azotobacter vinelandii* に対してリゾチームとエチレンジアミンテトラ酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) を添加すると溶菌がみられることを報告した。Miura ら<sup>22)</sup> および Mizushima ら<sup>23)</sup> は *E. coli* に対してリゾチームと EDTA を併用するとスフェロプラスト (spheroplast) の形成を認め、時間の経過とともに細胞壁が分離されることを報告した。以上のことより、特定の条件下においてはグラム陰性菌にもリゾチームの感受性が存在していることが示唆された。しかし、これらのリゾチームの感受性についての報告や従来からの報告<sup>16)~33)</sup> は好気性菌に対するものであり、嫌気性菌に対する報告はみられない。これは嫌気性菌の培養が困難であったことや嫌気性菌に対する関心の低さから施行されなかったと思われる。近年、嫌気性菌感染症に対し注意が払われ、嫌気培養法が広く普及したことより、嫌気性菌感染症の報告は増加してきた<sup>34)~38)</sup>。臨床において、感染症に対し抗生物質の投与とともに消炎酵素剤の併用が頻繁におこなわれており、嫌気性菌に対するリゾチームの感受性について検討をおこなうことには意義のあることと思われる。

本研究では、リゾチームの活性を検定する菌種として用いられる *M. lysodeikticus* がリゾチームにより溶菌現象のみられることを確認後、*M. lysodeikticus* を使用した溶菌現象の際と同様の方法で *Cl. perfringens* を用いてリゾチームの溶菌性について検討をおこない、明らかな溶菌現象がみられることを確認した。さらに、その後の実験では、臨床に近い状態となるように菌の増殖段階において薬剤の添加をおこない、その感受性を検討した。しかし、*V. alcalescens* および *P. magnus* では増殖曲線の増大は OD 0.3~0.4 であり、薬剤に対する感受性の検討は困難であったため、平板法で施行した。

*Cl. perfringens* および口腔内感染症から分離・同定した *B. fragilis*, *P. acnes* に対し増殖の各段階でリゾチームを添加したところ、OD 0.8, 1.0 付近において *Cl. perfringens* と *B. fragilis* の増殖曲線に明らかな減少が認められた。この増殖曲線の減少が菌数の減少であるか否かについて *B. fragilis* を用いて検討した。すなわち、リゾチーム添加直後の生菌数とリゾチームにより増殖曲線が減少した時の生菌数について比較したところ、リゾチームにより増殖曲線が減少した際、これに対応して生菌数の減少を認めた。このことは、リゾチーム単独で一部のグラム陰性菌に対する溶菌を示唆すると思われる。グラム陰性菌においては、ペプチドグリカン層の外側における細胞外膜のためリゾチームには抵抗性があるとされていた。Repaske<sup>21)</sup> は *E. coli*, *Ps aeruginosa*, *A. vinelandii* に対しリゾチームと EDTA を添加し、これらの菌における溶菌の差異について報告し、グラム陰性菌においてリゾチーム感受性に差のあることが示唆され、本研究でも *B. fragilis* の増殖の抑制が生じたのであろうと考察した。

一方、臨床において抗生物質が感染症の治療や術後感染予防のため常用されている。急性感染症においては、初診時に原因菌の分離・同定そして薬剤感受性についての成績が得られないため、第1次選択剤として広範囲抗生物質を投与することが多い。しかし、多種多様な抗生物質の氾濫と適切な診療指針をとらないことより、起因菌に対する抗生物質の耐性化、嫌気性菌との混合感染などの問題が口腔領域においても認めようになってきた<sup>37)38)</sup>。その結果、単純な感染症が重症型の感染症へと移行する可能性が生じてきた。重症型感染症への移行を防止するため、作用の異なる薬剤を併用することは臨床上有意義である。作用の異なる薬剤の併用の1方法として抗生物質とリゾチームの併用がある<sup>34)~46)</sup>。中沢ら<sup>34)</sup>は *Staphylococcus aureus* を用いて併用効果の検討をおこない、ベンジルペニシリン (benzylpenicillin, PCG), ABPC とリゾチームを併用した際に抗菌力が著明に増強され、クロラムフェニコール (chloramphenicol), EM, CER と併用した際にも併用効果が認められると報告している。大石ら<sup>36)</sup>は PCG とリゾチームに併用効果を認め、斉藤ら<sup>47)</sup>は *S. aureus* において PCG, ABPC とリゾチームの間に明確な併用効果を、EM とテトラサイクリン (tetracycline) とリゾチームの併用に若干の併用効果を認めたと報告している。しかし、これらの抗生物質とリゾチームの併用の報告は、その他の報告を含めてリゾチームの感受性の際と同様、好気性菌についておこなわれており<sup>34)~47)</sup>、嫌気性菌に対する報告はみられない。以上のことから、本研究では嫌気性菌に対する抗

生物質とリゾチームの併用効果について、臨床に近い状態となるように増殖の各段階で薬剤を添加する方法で検討した。*Cl. perfringens* に対して、ABPC, CER, OTC, EM, LCM および GM をリゾチームと併用するといずれの抗生物質においても増殖曲線は減少し、ABPC, OTC および LCM に特に著しい増殖曲線の減少を認めた。さらに、口腔内より分離・同定した菌株について検討したところ、*B. fragilis* ではすべての抗生物質とリゾチームの併用時に単独で添加した時より増殖曲線は減少した。特に、ABPC, CER, OTC, LCM においては著しい減少を認めた。その際に、生菌数を測定したところ、ABPC を除いた抗生物質ではリゾチームとの併用により、その生菌数は L 型試験管に移植した直後の生菌数より著しく減少し、抗生物質とリゾチームの併用には著しい効果のあることが確認できた。抗生物質とリゾチームの併用効果の検討の際に、単独で添加したリゾチームや抗生物質との比較を容易にするため、OD 0.6 にて単独添加群と併用したものとの検討をおこなった。しかし、増殖の各段階で添加した実験成績から、リゾチームと抗生物質を併用した時の増殖曲線の減少は CER を除き OD 0.8, 1.0 の段階で添加した場合に著しい増殖曲線の減少を認めた。生体と試験管内では増殖の状態は異なるが、菌数の増大とともに併用効果が増強されるならば、臨床において抗生物質とリゾチームの併用をおこなう際に、抗生物質の効果を高めることが期待できると思われる。*P. acnes* においては、リゾチームと CER を併用すると著明に増殖曲線が減少し、併用効果が認められた。また、平板法にて実験した *V. alcalescens* では、リゾチームと抗生物質を併用した際に、抗生物質単独での感受性の濃度より低い濃度で感受性が認められ、併用効果が認められた。しかし、*P. magnus* については抗生物質単独で認められた感受性の濃度と併用した際の抗生物質の感受性の濃度に差がなく、併用効果は認められなかった。 $\beta$ -ラクタム系抗生物質はペプチドグリカンの生合成におけるトランスペプチダーゼ (transpeptidase) と D-アラニンカルボキシペプチダーゼ (D-alanine carboxypeptidase) の反応を阻害するとされている<sup>48)</sup>。OTC, EM, LCM, GM などの抗生物質は細菌のリボゾーム (70 s) に作用するが、動物のリボゾーム (80 s) には作用しないことに選択毒性があり、細菌のタンパク質合成を阻害する。*Cl. perfringens*, *B. fragilis* そして *V. alcalescens* において  $\beta$ -ラクタム系抗生物質とリゾチームを併用した際、併用効果がみられたことは  $\beta$ -ラクタム系抗生物質が細胞壁の合成を阻害し、リゾチームは細胞壁自体を溶解するためと考えられる。その結果、単独で用いた量より低い濃度で

感受性を示したものと解される。また、その他の抗生物質においても、リゾチームが細胞壁を溶解するとともに抗生物質がタンパク質の合成を阻害する。そのために、単独で用いた時には完全な細胞破壊は生じないが、作用点の異なる薬剤の併用によって細胞破壊が生じ、*Cl. perfringens*, *B. fragilis* そして *V. alcalescens* において併用効果が生じたのでないかと考える。

生体においては生体自身による感染防禦作用が認められている。口腔粘膜や眼粘膜においては唾液や涙液の中にリゾチームが含有されており、侵入細菌に対し直接作用が期待できる。体内に侵入した細菌に対しては、白血球による食菌作用や血清中の抗体・補体などの免疫機構が細菌に対する防禦効果を果たしている<sup>49)50)</sup>。多核白血球においてはリゾチームが含有されており、重要な働きをなしている。Amanoら<sup>51)</sup>は生菌とアルコール処理をおこなった、*E. coli* に対し抗白血球・補体による溶菌現象において白血球由来のリゾチーム添加によって溶菌が促進したと報告し、天野ら<sup>52)</sup>はリゾチームを添加することで白血球の食菌能が亢進することを報告した。谷川<sup>53)</sup>は免疫溶菌反応においてリゾチーム活性がないとスフェロプラストの形成を生じないことを認め、卵白由来のリゾチームを添加すると溶菌反応が生じると報告した。さらに、感染症患者においては好中球中のリゾチーム量は $\frac{1}{2}$ に低下しており<sup>54)</sup>、病原菌由来のヒアルロン酸 (hyaluronic acid) がリゾチームの活性を低下させている<sup>55)</sup>。これらのことより、重症感染症患者においてリゾチームを投与することには、本実験において認められたリゾチームの細菌に対する直接作用を期待するだけでなく、生体における感染防禦機構の強化をはかることができ、臨床的に意義のあることと考える。

一方、全身に投与された抗生物質は血漿タンパクと結合し、抗菌力や組織内移行を低下させ治療効果を減弱させる<sup>56)</sup>。そして、血管系を介して各臓器に到達した抗生物質は各臓器によりその親和性が異なるため組織内濃度に変化する。そして、同一部位においてもその組織の状態により組織内濃度に変化する<sup>57)</sup>。そのため、従来より組織内濃度を上昇させるための努力がなされている。その一つの方法として、タンパク分解酵素と抗生物質の併用がある。タンパク分解酵素は炎症による代謝産物の除去をはかり、血管壁や細胞膜の抗生物質の透過性を高めるとされている<sup>58)59)</sup>。リゾチームには、抗炎症作用、瘢痕形成・組織修復作用、膿粘液の分解と排出作用、血液凝固時間短縮、抗ヘパリン・抗プラスミン作用、抗腫瘍効果など多数の作用を有している。このことより、臨床的にリゾチームを使用することには、リゾチームの細菌に対する直接作用、抗炎

症作用による抗生物質の組織内濃度の上昇そして生体の感染防禦のためのリゾチーム量の維持などが期待できる。また、細菌が増殖しつつあるという生体内の状態に近い環境で、リゾチームと抗生物質の併用により、細菌に対する抗生物質の感受性濃度を下げることが明らかになったことより、組織移行の悪い部位においても抗生物質の感受性を増す可能性があると考えられた。

## 結 論

比濁法または平板法にてリゾチームとリゾチームおよび各種抗生物質 (ABPC, CER, OTC, EM, LCM および GM) の併用について、嫌気性菌である *Cl. perfringens* および口腔内より分離・同定した新鮮分離菌株 *B. fragilis*, *P. acnes*, *V. alcalescens* および *P. magnus* の感受性について検討し、以下の結論を得た。

1. リゾチーム単独で *Cl. perfringens* の感受性が認められた。菌の増殖中における各種抗生物質とリゾチームの併用について検討したところ、使用したすべての抗生物質で併用効果を認め、特に ABPC, OTC, LCM において著しい効果を認めた。

2. リゾチーム単独で *B. fragilis* の感受性が認められた。菌の増殖中における各種抗生物質とリゾチームの併用については、使用したすべての抗生物質で併用効果を認め、特に ABPC, CER, OTC, LCM で著しい効果を認めた。

3. リゾチーム単独で *P. acnes* の感受性は認められなかった。菌の増殖中における各種抗生物質とリゾチームの併用では、CER にのみ併用効果を認めた。

4. *V. alcalescens* では平板法により各種抗生物質とリゾチームの併用効果を検討し、いずれの抗生物質においても単独で用いた濃度より低い濃度で感受性を認め、併用効果が認められた。

5. *P. magnus* では平板法により各種抗生物質とリゾチームの併用効果について検討したが、併用効果は認められなかった。

6. *B. fragilis* では増減した増殖曲線に対し各発育段階で生菌数を測定し、増殖曲線の低下と菌数の減少が一致すること、さらに、リゾチーム単独の菌数減少とくらべ、併用したものでは著しい菌数の減少があることが明らかとなった。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師玉井健三教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり、終始御助言を賜りました竹松啓一博士に深く感謝いたします。さらに、本研究に種々の御協力いただいた歯科口腔外科学教室の教室員各位に謝意を表します。

本論文の要旨は、日本口腔科学会総会(昭和52, 54年)および日本細菌学会中部支部総会(昭和58年)で報告した。

## 文 献

- 1) **Jacobs, M. R., Koornhof, H. J., Robins-Browne, R. M., Stevenson, C. M., Vermaak, Z. A., Freiman, I., Miller, G. B., Witcomb, M. A., Isaacson, M., Ward, J. I. & Austrian, R.:** Emergence of multiple resistant *Pneumococci*. N. Engl. J. Med., **299**, 735-740 (1978).
- 2) **Denny, A. E., Peterson, L. R., Gerding, D. N. & Hall, W. H.:** Serious staphylococcal infections with strains tolerant to bactericidal antibiotics. Arch. Intern. Med., **139**, 1026-1031 (1979).
- 3) **Bahn, S. L., Ciola, B. & Segal, A. G.:** Penicillin-resistant *Bacteroides melaninogenicus* infection of the mandible. J. Oral Surg., **39**, 221-223 (1981).
- 4) **Markowitz, S. M. & Sibilla, D. J.:** Comparative susceptibilities of clinical isolate of *Serratia marcescens* to newer cephalosporins, alone and in combination with various aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother., **18**, 651-655 (1980).
- 5) **Preheim, L. C., Penn, R. G., Sanders, C. C., Goering, R. V. & Giger, D. K.:** Emergence of resistance to  $\beta$ -lactam and aminoglycoside antibiotics during moxalactam therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Antimicrob. Agents Chemother., **22**, 1037-1041 (1982).
- 6) **Gorbach, S. L. & Bartlett, J. G.:** Anaerobic infections. N. Engl. J. Med., **290**, 1177-1184 (1974).
- 7) **Greenberg, R. N., James, R. B., Marier, R. L., Wood, W. H., Sanders, C. V. & Kent, J. N.:** Microbiologic and antibiotic aspects of infections in the oral and maxillofacial region. J. Oral Surg., **37**, 873-884 (1979).
- 8) **Gross, B. D., Roark, D. T., Meador, R. C. & Cohen, A. M.:** Ludwig's angina due to bacteroides. J. Oral Surg., **34**, 456-460 (1976).
- 9) **Cowan, S. T. & Steel, K. J.:** Manual for the identification of medical bacteria, 1st ed., p44-82, Cambridge Univ. Press, 1970.
- 10) **Holdman, L. V. & Moore, W. E. C.:** Gram-negative anaerobic bacteria, Family I. Bacteroidaceae, Genus I. *Bacteroides*, p385-404. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 11) **Rogosa, M.:** Gram negative anaerobic cocci, Family I. Veillonellaceae, Genus I. *Veillonella*, p445-447. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 12) **Rogosa, M.:** Gram-positive cocci, Family III. Peptococcaceae, Genus II. *Peptostreptococcus*, p517-525. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 13) **Moore, W. E. C. & Holdman, L. V.:** Actinomycetes and related organisms, Family I. Propionibacteriaceae, Genus I. *Propionibacterium*, p633-641. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 14) **玉井健三:** 口腔内嫌気性菌の研究. 口科誌, **27**, 393-415 (1978).
- 15) **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).
- 16) **Salton, M. R. J. & Ghuysen, J. M.:** The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and Streptomyces F<sub>1</sub> enzyme and the  $\beta$  (1-4) N-acetylhexosaminidase activity of these enzymes. Biochim. Biophys. Acta, **36**, 552-554 (1959).
- 17) **Salton, M. R. J. & Ghuysen, J. M.:** Acetylhexosamine compounds enzymically released from *Micrococcus lysodeikticus* cell walls, III. The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and Streptomyces F<sub>1</sub> enzyme. Biochim. Biophys. Acta, **45**, 355-363 (1960).
- 18) **Berger, L. R. & Weiser, R. S.:** The  $\beta$ -glucosaminidase activity of egg-white lysozyme. Biochim. Biophys. Acta, **26**, 517-521 (1957).
- 19) **Perkins, H. R.:** The structure of a disaccharide liberated by lysozyme from the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. Biochem. J., **74**, 182-186 (1960).
- 20) **Brumfitt, W. & Wardlaw, A. C.:** Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodeikticus* and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall. Nature, **181**, 1783-1784 (1958).
- 21) **Repaske, R.:** Lysis of gram-negative bacteria by lysozyme. Biochim. Biophys. Acta, **22**, 189-191 (1956).
- 22) **Miura, T. & Mizushima, S.:** Separation and

- properties of outer and cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, **193**, 268-276 (1969).
- 23) Mizushima, S. & Yamada, H.: Isolation and characterization of two outer membrane preparations from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, **375**, 44-53 (1975).
- 24) Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. Roy. Soc. Bact., **93**, 306-317 (1922).
- 25) Fleming, A.: Lysozyme. Proc. Roy. Soc. Med., **26**, 71-84 (1932).
- 26) Meyer, K. & Hahnel, E.: The estimation of lysozyme by a viscometric method. J. Biol. Chem., **163**, 723-732 (1946).
- 27) Smolelis, A. N. & Hartsell, S. E.: The determination of lysozyme. J. Bact., **58**, 731-736 (1949).
- 28) Salton, M. R. J.: Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. Nature, **170**, 746-747 (1952).
- 29) Webb, M.: The action of lysozyme on heat-killed gram-positive micro-organisms. J. Gen. Microbiol., **2**, 260-275 (1948).
- 30) 山田忠雄・平尾文男・黒田 稔・尾笹桂作: *Staphylococcus* に対する Lysozyme の溶菌作用. 阪大医誌, **11**, 5705-5707 (1959).
- 31) Young, F. E.: Autolytic enzyme associated with cell walls of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., **241**, 3462-3467 (1966).
- 32) Grossgebauer, K., Raettig, H., Langmaack, H. & Küchler, R.: Zur unspezifischen Schutzwirkung von Lysozym und Aristolochiasäure bei bakteriellen und viralen Infektionen. Zbl. Bakt., **213**, 401-415 (1970).
- 33) Suzuki, Y. & Role, L. J.: Effect of lysozyme on resting spores of *Bacillus megaterium*. J. Bact., **98**, 238-245 (1969).
- 34) 中沢昭三・板垣守正・横田芳武・大谷好子・三輪真知子・鬼武順子・中山孝昭・岡岡温子: 細菌溶解酵素 Lysozyme の抗生作用に関する基礎的研究. J. Antibiotics, Ser. B, **19**, 34-47 (1966).
- 35) 中沢昭三・山本郁夫・横田芳武・光武照之・三好英司・山階綾子: 細菌溶解酵素 Lysozyme の抗生作用に関する基礎的研究 第2報 アミノペンシルベニシリンとの併用効果. Jap. J. Antibiotics, **21**, 10-14 (1968).
- 36) 大石正夫・林日出人・周田茂雄・今井正雄: Neuzym (Lysozyme) の眼科的応用. 眼科臨床医報, **60**, 693-699 (1966).
- 37) Ritzerfeld, V. W.: Enzymatische Beeinflussung der Antibiotikawirkung. Ärztl. Forschung, **19**, 674-676 (1965).
- 38) Aldrich, K. M. & Sword, C. P.: Methicillin-induced lysozyme-sensitive forms of *staphylococci*. J. Bact., **87**, 690-695 (1964).
- 39) 山田忠雄・平尾文雄・黒田 稔・尾笹桂作: 抗生物質の抗菌作用に及ぼす Lysozyme の影響. 阪大医誌, **11**, 5701-5704 (1959).
- 40) 松本慶蔵・横山紘一・荒井一男・西岡きよ・中村隆: Flucloxacillin の臓器内濃度を中心とした基礎的研究と, Lysozyme との併用効果について. Chemotherapy, **17**, 1343-1351 (1969).
- 41) 永井 裕・橋本 一: リゾチームと各種抗菌剤との協力作用. Chemotherapy, **17**, 1593-1597 (1969).
- 42) 松本慶蔵・荒井澄夫・横山紘一・西岡きよ・荒井一男・中村 隆・斎藤順次: Cephalixin の基礎的・臨床的研究. Chemotherapy, **18**, 878-883 (1970).
- 43) 大木稔文・増田官太郎・園浦利雄・坂部長正・井口晃一: 慢性副鼻腔炎に対する抗生物質と酵素製剤の併用療法について. 交通医学, **24**, 538-542 (1970).
- 44) 増谷 衛・板倉英子・小川秀興: Penicillin 系薬剤 (Amoxycillin) と溶菌酵素 (Lysozyme) との併用効果について—臨床ならびに基礎的研究—. Chemotherapy, **21**, 1793-1796 (1973).
- 45) 鍵富敏郎: 酵素と抗生剤の協力作用に関する実験的研究. 耳鼻臨床, **66**, 319-331 (1973).
- 46) 板倉英子: Lysozyme と Amoxicillin による溶菌効果. 日皮会誌, **88**, 17-22 (1978).
- 47) 斎藤 昇・前田直之・岩淵武介: 抗生物質と細菌溶解酵素 Lysozyme (レフトーゼ) との併用に関する研究 (第1報 基礎的研究). 歯界展望, **39**, 1133-1137 (1972).
- 48) 田中信男: 新しい化学療法の手引 (小酒井・真下・長谷川・田中・深谷・富岡編), 第1版, 68-77頁, 榮研化学, 東京, 1975.
- 49) Rowley, D. & Wardlaw, A. C.: Lysis of gram-negative bacteria by serum. J. Gen. Microbiol., **18**, 529-533 (1958).
- 50) Asamer, H., Schmalzl, F. & Braunsteiner, H.: Der immunzytologische Lysozymnachweis in menschlichen Blutzellen. Acta Haemat., **41**, 49-54 (1969).
- 51) Amano, T., Morioka, T., Seki, Y., Kashiba,

- S., Fujikawa, K. & Ichikawa, S.: Studies on the immune bacteriolysis, IX. The effect of immune bacteriolytic system and lysozyme on the cell wall preparation. Med. J. Osaka Univ., 6, 1023-1026 (1956).
- 52) 天野正道・田中啓幹: 尿路感染症と白血球機能 (特に腎盂腎炎について) 第4報 化学療法剤存在下の白血球貪食能にあたるリゾチームの影響について. 西日泌尿, 40, 352-359 (1978).
- 53) 谷川 隆: 免疫溶菌現象におけるリゾチームの役割. 阪大医誌, 11, 1999-2005 (1959).
- 54) Hansen, N. E. & Anderson, V.: Lysozyme activity in human neutrophilic granulocytes. Brit. J. Haemat., 24, 613-623 (1973).
- 55) Skarnes, R. C. & Watson, D. W.: The inhibition of lysozyme by acidic polymers from pathogenic bacteria. J. Bact., 70, 110-112 (1965).
- 56) 田中信男・中村昭四郎: 抗生物質大要, 第3版, 337頁, 東大出版会, 東京, 1982.
- 57) 中村正利: 口腔領域における抗生物質の組織移行に関する研究. 十全医会誌, 89, 302-323 (1980)
- 58) 恒川 陽: 蛋白分解酵素がペニシリンの炎症巣内移行に及ぼす影響に関する実験的研究. Chemotherapy, 19, 26-40 (1971).
- 59) 牛久忠彦: ペニシリン及び酵素剤併用による手術創化膿防止に関する実験的研究. Chemotherapy, 14, 229-241 (1966).

**Studies on the Susceptibility of Anaerobic Organisms to Lysozyme and Antibiotics: the Lysozyme Alone and the Combination Effect of Lysozyme and Antibiotics** Shinobu Izumi, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 95, 509-524 (1985)

**Key words:** anaerobes, lysozyme, antibiotics, combination effect

#### Abstract

The present study was pursued to examine the susceptibility of anaerobic organisms to lysozyme and antibiotics. Experiments were done by the turbidimetric method and the agar plate dilution method. In the turbidimetric method, the organisms were cultured in a L form test tube and were measured for growth curve after administration of drugs. In the agar plate dilution method, the organisms were examined for presence or absence of inhibition zone after organisms cultured on agar plates were given drugs by the cup method. *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* and *Propionibacterium acnes* were examined by using the former method and *Veillonella alcalescens* and *Peptostreptococcus magnus* were examined by the latter. Antibiotics used were aminobenzylpenicillin (ABPC), cephaloridine (CER), oxytetracycline (OTC), erythromycin (EM), lincomycin (LCM), and gentamicin (GM). Growth curve of *Cl. perfringens* and *B. fragilis* was decreased after administration of lysozyme. Therefore, the two organisms were evaluated to have susceptibility to lysozyme. Furthermore, the susceptibility of *Cl. perfringens* to lysozyme was potentiated when the drug was combined with antibiotics, especially ABPC, OTC and LCM. *B. fragilis* was also evaluated to be sensitive to the combined effect of lysozyme with drugs, especially with ABPC, CER, OTC and LCM. *P. acnes*, however, was susceptible to the combination effect with only CER. *V. alcalescens*, which was examined by the agar plate dilution method, was evaluated for the combination effect, while, *P. magnus* was not. Further study was continued to examine whether the decreasing of growth curve of *B. fragilis* corresponded to that of organisms or not. Consequently, both were found to decrease together, and the combination of lysozyme with antibiotics was recognized to be more effective than lysozyme alone.