内服卵白リゾチームの血液・副鼻腔組織への 移行とリゾチーム濃度について

市立吹田市民病院耳鼻咽喉科

石 田 稔

大阪大学医学部耳鼻咽喉科学教室

松 永 亨

PARTITIONING AND CONCENTRATION OF EGG LYSOZYME BETWEEN THE SERUM AND PARANASAL TISSUE AFTER ADMINISTRATION OF EGG LYSOZYME

MINORU ISHIDA, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Suita Municipal Hospital, Osaka

TORU MATSUNAGA, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Osaka University Medical School, Osaka

Partitioning of egg-white lysozyme between the serum and paranasal tissue was investigated using the ELISA method.

- 1) Egg-white lysozyme was detected in the paranasal tissues of 7 of 8 subjects given exogenous lysozyme reached a peak concentration in the serum in 60 minutes, whereas, 90 minutes was required to reach peak concentrations in the paranasal tissues.
- 2) Antibodies against egg-white lysozyme were detected in the serum of 4 of 5 subjects given exogenous lysozyme.
- 3) Differences in serum concentrations of lysozyme between subjects given exogenous lysozyme and subjects non-receiving lysozyme were not significant.

However, lysozyme concentrations in the paranasal tissues of all subjects receiving exogenous lysozyme were higher than in subjects not receiving an exogenous source of the enzyme.

Key words: 卵白リゾチーム, 血液, 副鼻腔組織

A87—1678—33041

I. 緒 言

リゾチームの溶菌作用における基質は細胞壁の多糖類: N-アセチルグルコサミン (2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose; 略称 NAG) の重合体 (キチンの場合; ポリサッカライド β -1, 4 結合) あるいは NAG と N-アセチルムラミン酸 (2-acetamido-3-o-(1-carboxy ethyl) 2-deoxy-D-glucopyranose; 略称 NAM) で構成される重合体 (M. luteus の場合) であり¹⁾, いずれもリゾチームで加水分解される事実からリゾチームは β グリコシ

ダーゼに属する酵素である。

リゾチームは1922年に、ペニシリンの発見でノーベル賞を受けた著名な細菌学者: A. Fleming²⁾ により鼻汁中に存在する細菌 (Micrococcus lysodeikticus) を溶解する酵素として発見され、溶菌 (lysed) する酵素 (enzyme) という意味で Lysozyme と命名された。

リゾチームは広く生物界に分布するが、ヒトでは涙液、鼻汁、鼻腔粘膜、唾液、扁桃、喀痰、肝、腎、脾、消化管、軟骨、結合組織などで検出されている。

しかしながら、卵白リゾチーム製剤を内服したヒトでの同時点における血液および副鼻腔粘膜組織へ移行した卵白リゾチーム濃度を測定して、血清・副鼻腔粘膜組織ヒトリゾチーム濃度への影響について考察した報告はなされていない。そこで今回、卵白リゾチーム製剤を一定期間内服したヒトの血清と副鼻腔粘膜組織における卵白リゾチーム濃度およびヒトリゾチーム濃度を免疫化学的定量法：ELISAにより分別測定した結果、興味ある知見を得たので報告する。

Ⅱ. 測定方法

内服卵白リゾチーム製剤はノイチーム 90mg錠（エーザイ株式会社製）を使用した。慢性副鼻腔炎患者に1週間以上連続投与して、手術直前に1錠（90mg）投与した。服用量は3錠（270mg）/日を3回に分与した。手術時の採血と副鼻腔粘膜組織摘出プログラムは最終内服後30分、60分、90分を実施した。血液は遠心加速度：1000gで遠心分離して血清サンプルとし、摘出組織は凍結保存（ -20°C 以下）、測定時に抽出して組織液サンプルとした。

(1) 総リゾチーム（卵白リゾチームおよびヒトリゾチーム）の溶菌活性測定法⁹⁾

標準品として卵白リゾチームを用いた。基質として紫外線照射乾燥菌株：Micrococcus lysodeikticus（Worthington Biochemical Co. Ltd.）を0.1Mりん酸緩衝液PH 6.2に懸濁して0.2mg/ml浮遊液として用いた。基質液3mlにサンプル0.1mlを混和して、 25°C で1時間反応後、濁度の減少を波長：570nmで測定した。（測定濃度範囲：0.25～25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

(2) 卵白リゾチームの酵素免疫測定法（ELISA）⁹⁾

標準品として卵白リゾチームを用いた。マイクロタイタープレートに吸着した固相化・抗卵白リゾチーム抗体に常法に準拠してサンプルを反応後、第2抗体としてペルオキシダーゼ標識抗卵白リゾチーム抗体を添加してサンドイッチにし、抗原と結合した標識抗体のペルオキシダーゼ活性を波長：490nmで測定した。（測定濃度範囲：1～50ng/ml）。

(3) ヒトリゾチームの酵素免疫測定法（ELISA）⁹⁾

標準品としてヒト初乳リゾチームを用いた。測定原理は卵白リゾチームの酵素免疫測定法と同様である（測定濃度範囲：1～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

(4) 抗卵白リゾチーム抗体の酵素免疫測定法（ELISA）⁹⁾

マイクロタイタープレート吸着した固相化・卵白リゾ

チーム抗原にサンプル（未知量の抗卵白リゾチーム抗体）と既知量のペルオキシダーゼ標識抗卵白リゾチーム抗体を競合させ、抗原と結合した標識抗体のペルオキシダーゼ活性を波長：490nmで測定した。（測定濃度範囲：0.05～2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

Ⅲ. 成績

ノイチーム 90mg錠を1週間以上内服した患者8例について血清および副鼻腔粘膜組織の総リゾチーム（卵白リゾチームおよびヒトリゾチーム）の溶菌活性、卵白リゾチーム濃度およびヒトリゾチーム濃度を測定し、更に血清の抗卵白リゾチーム抗体価を測定した。

血清および副鼻腔粘膜組織サンプルは同時に得たもので、手術直前にノイチーム 90mg錠服用後、30分、60分、90分に採取したものである。なお、卵白リゾチーム製剤を内服していない手術施行患者血清および副鼻腔組織抽出液を対照サンプルとして同時に測定した。

(1) 血清サンプル（表1参照）

1-1) 総リゾチーム（卵白リゾチームおよびヒトリゾチーム）の溶菌活性

4.05～23.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と個体差はあるが、手術経過時の測定値はノイチーム 90mg錠最終服用後、30分、60分、90分および対照サンプルで差異を認めなかった。ただし、症例8における右側副鼻腔手術経過時のノイチーム 90mg錠最終服用後90分値が314U/mlと極度に上昇しているが、それはヒトリゾチーム濃度161 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の反映したものである。

1-2) 卵白リゾチーム濃度

8例中6例で認められ、症例1では、ノイチーム 90mg錠最終服用後60分値がピークを示した。60分値は、とくに4例で著明であった。症例8において右側副鼻腔手術経過時のノイチーム 90mg錠最終服用後90分のヒトリゾチーム濃度が161 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と極度に上昇している時点では検出されず、更に15分経過した時点で12.9ng/mlの測定値を得た。

1-3) 抗卵白リゾチーム抗体濃度

抗体濃度測定にあたって、同種抗体（抗卵白リゾチーム）とヒトリゾチームは、cross reactionしないことを確かめた。また健康成人（男）およびノイチーム非投与症例で検討したところcross reactionを認めなかった。抗卵白リゾチーム抗体は測定した5例中4例で認められ、ノイチーム 90mg錠最終服用後105分までの経過中に抗体濃度はほとんど変化せずに一定している。

表 1 血清サンプルのリゾチーム測定値

サンプル	最終服用後の時間 (分)	総リゾチーム 溶菌活性 ($\mu\text{g/ml}$)	ヒトリゾチ ーム濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	卵白リゾチ ーム濃度 (ng/ml)	抗卵白リゾチ ーム抗体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
健常成人(男)		5.25	0.90	0.00	0.00
ノイチーム(1)		n.d.	2.42	0.00	0.00
非投与症例(2)		12.38	3.26	0.00	n.d.
症例 1 M. U.	30	6.75	1.39	8.40	n.d.
40歳(男)	60	6.15	1.23	12.00	n.d.
	90	5.85	1.28	7.20	n.d.
	120	4.05	0.83	0.20	n.d.
症例 2 I. F.	30	n.d.	7.72	4.96	0.00
70歳(女)	60	n.d.	7.80	46.47	0.03
症例 3 F. W.	30	n.d.	4.37	7.52	0.38
35歳(男)	60	n.d.	5.29	20.52	0.31
症例 4 N. S.	60	10.90	3.18	0.00	n.d.
17歳(男)	90	13.97	4.07	1.12	n.d.
症例 5 Y. K.	30	9.65	2.57	0.00	n.d.
43歳(女)	60	10.17	2.60	0.00	n.d.
症例 6 I. I.					
17歳(男)	60	n.d.	3.86	97.55	0.00
症例 7 R. Y.	30	n.d.	5.17	0.00	0.05
31歳(女)					
症例 8 K. M.	右60	n.d.	2.29	0.00	1.80
18歳(男)	105	n.d.	4.03	12.86	2.05
	左60	23.55	5.38	0.77	n.d.
	90	23.78	3.65	0.00	n.d.

備考: n.d. (not detect); 未測定 左: 左側副鼻腔組織 右: 右側副鼻腔組織

(2) 副鼻腔組織サンプル(表2参照)

血清サンプルの総リゾチーム溶菌活性および卵白リゾチーム濃度と比較して100倍程度高値であった。

(3) 症例検討(表1および表2を対比参照)

3-1) 症例1 M. U. 40歳 男性

慢性副鼻腔炎のため抗生物質と酵素製剤を投与して治療を試みたが治癒し得ず、副鼻腔根治手術を施行した症例である。酵素製剤はノイチーム 90mg錠、3錠(270mg)/日を3回に分与して2カ月間内服していた。血清の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度は対照サンプル(ノイチーム 90mg錠 非投与例)と比較して有意な差異はなく一定していたが、卵白リゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後60分でピークに達し

120分ではほぼ元のレベルまで低下した。一方、右副鼻腔組織の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後80分の時点ですでに高値は達しているが卵白リゾチーム濃度は検出されなかった。他方、左副鼻腔組織の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後80分の時点でほとんど検出されず、更に10分経過した時点とともに飛躍的に急上昇したが、卵白リゾチーム濃度はすでに80分の時点でピークに達している。

3-2) 症例2 I. F. 70歳 女性

慢性副鼻腔炎のためノイチーム 90mg錠、3錠(270mg)/日を3回に分与して連日内服していたが手術時にまだ副鼻腔内にポリープ様粘膜が充満していた。血清の

表 2 副鼻腔組織サンプルのリゾチーム測定値

サンプル	最終服用後 時間 (分)	総リゾチーム 溶菌活性($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ヒトリゾチーム 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	卵白リゾチーム 濃度 (ng/ml)
ノイチーム(1)		n.d.	0.04	0.00
非投与症例(2)		n.d.	0.11	0.00
症例 1 M. U. 40歳(男)	右: 80 左: 80 90	<1.20 376.20 448.80	<0.10 89.90 103.30	35.40 0.00 19.80
症例 2 I. F. 70歳(女)	30 60	177.09 261.56	91.68 121.96	0.00 83.69
症例 3 F. W. 35歳(男)	30 60	322.06 262.39	171.07 142.97	2.80 3.12
症例 4 N. S. 17歳(男)	30 60 90	396.00 192.59 1055.58	109.90 82.15 527.53	3.20 8.30 57.53
症例 5 Y. K. 43歳(女)	60	510.59	257.20	4.96
症例 6 I. I. 17歳(男)	60	2490.59	741.76	0.00
症例 7 R. Y. 31歳(女)	60	610.46	317.16	41.28
症例 8 K. M. 18歳(男)	90 90	314.34 306.72	161.25 172.39	0.00 11.27

備考: n.d. (=not detect); 未測定 左: 左側副鼻腔組織 右: 右側副鼻腔組織

ヒトリゾチーム濃度は健常成人および対照サンプル(ノイチーム 90mg錠 非投与例)と比較して有意な高値で一定しており, 卵白リゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 30分の時点で認められなかったが更に 30分経過した時点で高値を示した。副鼻腔組織の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 30分の時点で血清の100倍レベルの高値を示しており更に30分経過した時点で有意に上昇し, 卵白リゾチーム濃度も高値を示した。

3-3) 症例 3 F.W. 35歳 男性

血清のヒトリゾチーム濃度は健常成人および対照サンプル(ノイチーム 90mg錠 非投与例)と比較して幾分上昇傾向にあるが顕著ではなく, 卵白リゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 30分の時点で認められ, 更に 30分経過した時点で上昇した。血清中に認められた抗卵白リゾチーム抗体価は高値で一定しており, 30分と60分の時点で変動しなかった。

副鼻腔組織の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 30分の時点ですでにピークに達し, 卵白リゾチーム濃度も低値ながら認められた。

3-4) 症例 4 N. S. 17歳 男性

血清の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度は対照サンプル(ノイチーム 90mg錠 非投与例)と比較して有意な差異はなく一定していたが, 卵白リゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 90分で認めたが, ごく低値であった。副鼻腔組織の総リゾチーム溶菌活性およびヒトリゾチーム濃度はノイチーム 90mg錠 投与後 30分の時点ですでに高値に達し 60分の時点でやや低下したが, 再び90分の時点で飛躍的に急上昇した。卵白リゾチーム濃度は 30分の時点で検出され, その後上昇して 90分の時点では飛躍的に上昇していた。

Ⅳ 考 按

ヒトリゾチームは多糖体を加水分解する β グリコシダーゼ作用を有し、分子量 14,307 等電点 11.1~11.35 で溶菌活性の最適 pH は 5.0 である。分泌型 IgA や補体成分とともに働いて殺菌作用を発揮する⁵⁾。内服卵白リゾチーム製剤の薬効・薬理作用として、1) 抗菌作用、2) 抗生物質との相乗効果、3) 抗ウイルス作用、4) 抗炎症作用、5) 止血作用、6) 組織修復作用、7) 膿、粘液分解作用、8) 放射線障害予防効果、9) 癌性疼痛緩解作用、10) 抗腫瘍作用などが検討され、特異的作用のほか、非特異的感染防御因子としての関与に興味をもたれている⁶⁾⁷⁾。内服卵白リゾチーム製剤の耳鼻咽喉科領域における臨床応用は、かなり早い時期から試みられ多くの治験報告がなされ、鍵富⁸⁾により詳述されている。足川⁹⁾は蛍光抗体法により内服卵白リゾチームの副鼻腔組織への移行を示唆し、奈良林¹⁰⁾は蛍光法により、枉¹¹⁾はラジオイムノアッセイによりそれぞれ動物実験で血液および副鼻腔粘膜への移行を証明しており、更に奈良林は卵白リゾチーム製剤を一定期間内服したヒトの手術時に摘出した粘膜に、卵白リゾチームが移行することを蛍光抗体法により証明している。今回の実験から明らかなように、内服塩化卵白リゾチーム製剤の連用により、血清ヒトリゾチーム濃度に影響を及ぼすことなく特異的に副鼻腔組織ヒトリゾチーム濃度を著明に上昇させることができる。すなわち、卵白リゾチームはそのままの型で副鼻腔組織へ移行する比率は少なく、大部分は卵白リゾチーム代謝産物として異種蛋白抗原性が弱められて移行するものと考えられ、その結果、副鼻腔組織ヒトリゾチーム濃度が飛躍的に上昇するものと推定する。なお、血清中に抗卵白リゾチーム抗体が4例で確認されたが、卵白アレルギー様の臨床所見は観察されるに至っていない。

Ⅴ 結 語

内服卵白リゾチーム製剤 ノイチーム 90mg 錠(エーザイ株式会社製)の血液・副鼻腔組織への移行とリゾチーム濃度について検討した。

(1) 製剤の有効成分の卵白リゾチームのヒト体内(血清もしくは副鼻腔組織)への移行はノイチーム 90mg 錠、3錠(270mg)/日を3回に分与にて1週間以上連続投与して、手術直前に1錠(90mg)投与した慢性副鼻腔炎患者8症例の全例で確認できた。すなわち、血清サンプルで検出されない2例(症例5および症例7)は副鼻腔組織で認められ、副鼻腔組織サンプルで検出されなかった

1例(症例6)は血清で高濃度に認められた。

(2) ノイチーム 90mg 錠を最終服用後 30分、60分、90分の測定値を比較すると、卵白リゾチームの血清への移行は60分でピークに達し、副鼻腔組織への移行は90分でピークに達するパターンが一般的であると推定される。

(3) ノイチーム 90mg 錠を1週間以上連続服用による血清ヒトリゾチーム濃度への影響は認められず恒常性は維持されており、他方、副鼻腔組織ヒトリゾチーム濃度は全例で著明に上昇している。

(4) ノイチーム 90mg 錠を1週間以上連続服用した患者5例中4例で血清に抗卵白リゾチーム抗体が確認され、ノイチーム 90mg 錠最終服用後105分までの経過中に抗体濃度はほとんど変化せずに一定している。

参 考 文 献

- 1) Salton MRJ and Chuysen JM: The structure of di-and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and streptomycin F₁ enzyme and the β (1-4) N-acetylhexoamidase activity of the these enzymes. *Biochim Biophys Acta* 36: 552-555, 1959.
- 2) Fleming A: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, *Proc Roy Soc B* 93: 306-317, 1922.
- 3) Yuzuriha T et al: Sensitive immunoassays for the Measurement of Human Lysozyme. *Chem Pharm Bull* 27(11): 2802-2806, 1979.
- 4) 石川栄治 他: 酵素免疫測定法 医学書院 4-20, 1978.
- 5) 寺野由剛: 血清蛋白質の比較生物学 代謝 14: 345 (241)-373(269), 1977.
- 6) Broun OH: Fackle Lysozym-ausscheidung bei Sauglingen und Darmflora. *Ernährungsforschung*. 10: 130-142, 1965.
- 7) Haenel H et al: Ernährung und faekale Lysozym-aktivitat beim Saugling. *Ernährungsforschung*. 8: 282-289, 1963.
- 8) 鍵富敏郎: 炎症と消炎酵素 金原出版 145, 1968.
- 9) 足川力雄: 卵白塩化リゾチームについての基礎的検索 耳展 11(6): 485-490, 1968.
- 10) 奈良林 繁: 塩化リゾチームの耳鼻咽喉科領域組織への移行について 日耳鼻 73(4): 473-484, 1970.

- 11) Yuzuriha T: Studies on Biotransformation of Lysozyme. IV. Radioimmunoassay of Lysozyme and Its Evaluation. Chem Pharm Bull 21(3): 908-914, 1978.

阪市立大学医学部・兵庫医科大学の兼任講師寺野由剛博士に深甚なる謝意を表わします。

本論文の要旨は第204回日耳鼻大阪地方連合会において発表した。

稿を終わるに臨み、本研究に際し終始御指導、御協力を頂いたエーザイ研究所、杠輝昭博士、ならびに、本論文の作成に当たり御助力賜りました東京医科大学・大

(原稿受付 昭和 59. 5. 7日)

別刷請求先 〒564 吹田市片山町 2-13-20

市立吹田市民病院耳鼻咽喉科 石田 稔