

EXPERIMENTAL STUDY ON BACTERICIDAL EFFECT OF LZ-G SOLUTION

Soichi Nukuzuma, Kiichi Sato * and Michiko Hikishima *

Department of Otolaryngology, Kanazawa Medical University

& *Institute for Tropical Medicine

and

Takaichi Kinoshita & Mayumi Morisaki

Senju Pharmaceutical Research Laboratories

The bactericidal effect of LZ-G was estimated by using *Staphylococcus aureus* and Diphtheroid isolated from clinical sources. The antibacterial activity of LZ-G was investigated for changes of viable organisms after treatment.

The morphological changes of control and LZ-G treated colony were compared by scanning electron microscopy (SEM). The obtained results were as follows :

1. The number of viable Diphtheroid organisms became 0 CFU/ml in 5 minutes. The number of viable *S. aureus* organisms became 0 CFU/ml in 40 minutes. The antibacterial activity of LZ-G against Diphtheroid

is superior to that of LZ-G against *S. aureus*.

2. The morphological changes were observed for about 24 hours and significant differences were observed between control and LZ-G treated colony of both *S. aureus* and Diphtheroid for about 48 hours by SEM.
3. LZ-G has a remarkable bactericidal effect for *S. aureus* and Diphtheroid.

As a conclusion, it was considered to be one of the useful drugs for throat diseases.

LZ-G液の殺菌作用に関する基礎的実験

金沢医科大学耳鼻咽喉科

奴久妻聡一・*佐藤喜一・*疋島道子

千寿製薬伊丹研究所

木下貴一・守先真由美

(* : 熱帯医研併任)

はじめに

LZ-G液は酵素剤である塩化リゾチームと殺菌作用を有する塩化セチルピリジニウムを配合したうがい薬である。今回、LZ-G液を咽喉頭疾患に使用するにあたり、前臨床段階としての基礎的実験を行った。試験菌は耳鼻咽喉科臨床分離株である黄色ブドウ球菌および常在菌を用い、殺菌効果の有無とその程度をin vitroで検討したので報告する。

実験材料および方法

1) 試験菌

金沢医科大学耳鼻咽喉科臨床分離株である *Staphylococcus aureus* および *Diphtheroid* を用い、保存培地として血液カンテン平板（デンカ生研KK）を使用した。

2) 試験薬物

被試験薬物として再蒸留水で10倍希釈した LZ-G液（千寿製薬KK）を用い、コントロールとして滅菌生理食塩液を用いた。

3) 細菌学的検査

試験菌液の調整として、*S. aureus* は heart infusion agar (HIA) 斜面培地 (Difco) で37℃、24時間、*Diphtheroid* はHIA に更に綿羊血液（日本生物材料センター）を5%の割合で添加した。5%血液含HIAで48時間培養後、滅菌した0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、更に滅菌した0.5Mリン酸緩衝液で希釈して、約 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mlの試験菌液とした。

なお、試験菌液中の生菌数はHIAあるいは5%血液含HIAを用いた寒天平板混釈法により Colony Forming Units/mlとして求め、接種時における生菌数とした。経時的に試料中での試験菌の生存菌数を調べるために、無菌的に調整したLZ-G液を滅菌した共栓付試験管(21×200mm)に20mlずつ分注し、試験菌液0.2mlを接種した後、5分間隔で、その1mlをレシチン(和光純薬工業KK)0.1%、Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monooleate(Tween80)(和光純薬KK)1.0%を添加した。

0.5Mリン酸緩衝液9mlに加え、よく混和し、その1mlを滅菌シャーレに加え、更にHIA培地にレシチン0.1%と、Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monooleate(Tween80)1.0%を添加したHIALP培地を20ml注ぎ、平板とした後、37℃で、*S. aureus* は48時間、*Diphtheroid* は72時間培養後、集落数を計測して、生菌数とした。

4) 走査電顕(SEM)的観察

血液カンテン平板に増殖した菌のコロニーを培地ごと直径5mmの円形に切り、96穴の平底マルチプレート(Nunc.)に入れ、試験薬物を各穴に100μlずつ分注した後、37℃で培養した。次に、24時間後、48時間後、試料を取り出し、4℃で2.5%グルタルアルデヒド、2.0%オスミウム酸で二重固定し、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)でよく洗浄した後、正四角形に細切したろ紙にのせ、37℃の乾燥器に1晩保存し、IB-2型イオンコーター(エイコー・エンジニアリング)で白金蒸着し、走査型電子顕微鏡(HITACHI,S-510)で観察した。

実験結果

1) 生菌数の測定

接種時の生菌数は *S. aureus* が 2.7×10^6 CFU/ml、*Diphtheroid* が 6.7×10^5 CFU/mlであったが、LZ-G液で処理5分後には *Diph-*

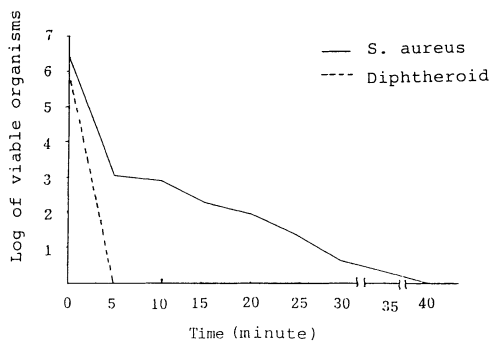


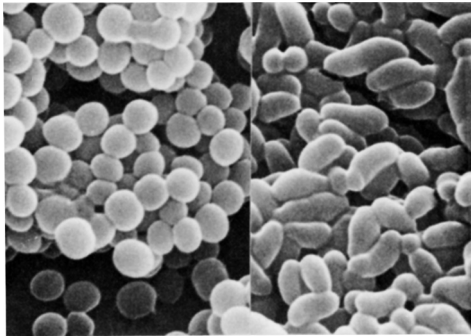
Fig.1. Changes of viable organisms after treatment of LZ-G

heroid の菌が全て死滅し、生菌数が 0 CFU/ml になったのに対し、*S. aureus* では 1.2×10^3 CFU/ml の菌が依然として生存していた。しかしながら、*S. aureus* も時間の経過とともに菌が徐々に死滅し、40分後には生菌数が 0 CFU/ml になった (Fig. 1)。

2) SEM 的観察

S. aureus の生理食塩液で処理した菌体は表面構造がなめらかで、球状の正常像を示した (Fig. 2)。

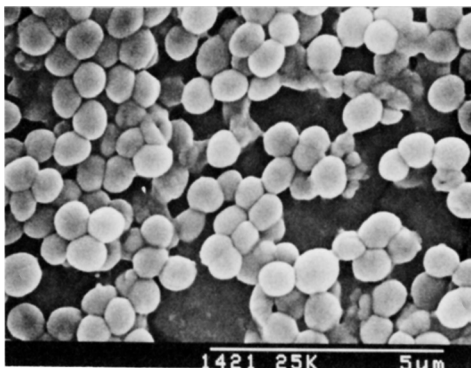
Fig. 2 . SEM image of *S. aureus* and *Diphtheroid* in control (X10,000)



S. aureus *Diphtheroid*

それに対し、LZ-G 液で処理して24時間後では、菌に形態変化がおり、細胞質の内容物が流出し、溶菌したと思われる菌も認められた (Fig. 3)。

Fig. 3 . SEM image of *S. aureus* after LZ-G treatment for 24hr



更に、48時間後では形態変化が顕著になり、

溶菌した菌も増え、コロニーが1つのかたまりになった (Fig. 4)。

Fig. 4 . SEM image of *S. aureus* after LZ-G treatment for 48hr

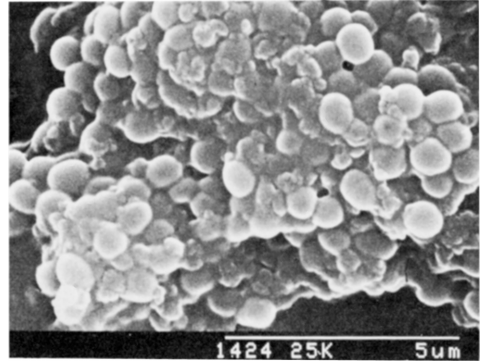


Fig. 5 . SEM image of *Diphtheroid* after LZ-G treatment for 24hr

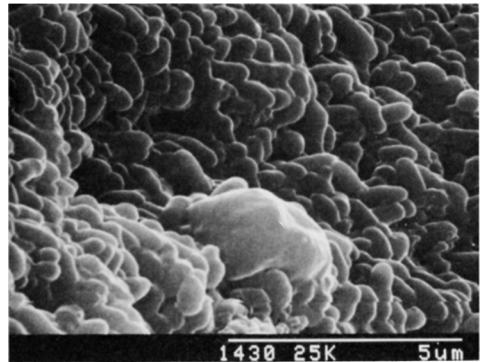
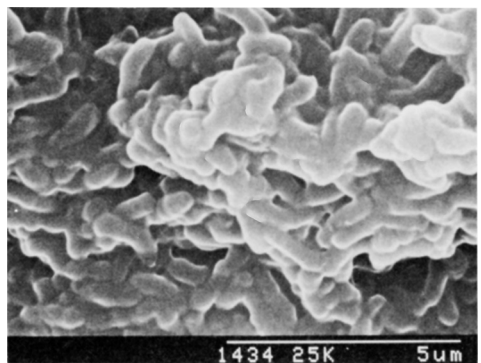


Fig. 6 . SEM image of *Diphtheroid* after LZ-G treatment for 48hr



次に、*Diphtheroid* の生理食塩液で処理し

た菌体は、表面構造がなめらかで、桿状の正常像を示した (Fig. 2)。それに対し、LZ-G液で処理して24時間後では菌に形態変化がおこり、菌体の境界が不明瞭になっていった (Fig. 5)。更に、48時間後になると、形態の変化は *S. aureus* と同様に顕著になり、コロニーが塊状になった (Fig. 6)。

考 按

LZ-G液は酵素剤である塩化リゾチームと殺菌作用を有する塩化セチルピリジニウムを配合したうがい薬である。従来、塩化セチルピリジニウム単独でも殺菌効果は十分期待されている¹⁾。今回、試験に用いたLZ-G液は更に塩化リゾチームを併用したもので、殺菌効果の増強が期待されている。また、塩化リゾチームを抗生物質を併用して、その効果を高める報告も過去になされているが^{2),3)}、その作用機序は塩化リゾチームが菌体の細胞壁を分解する薬理作用を有することから、併用薬剤である塩化セチルピリジニウムの菌体内への透過性が増したために殺菌作用がより強くなったものと考えられる。

今回、LZ-G液のin vitroでの殺菌効果を検討するにあたり、LZ-G10倍希釈液 (臨床使用) を用いて、生菌数の経時変化と走査電顕による形態変化について検討した。生菌数の経時変化は、LZ-G液を加えて5分以内に *Diphtheroid* が40分以内に、*S. aureus* が生菌数0になるという極めて良好な殺菌効果が認められた。それに対して、走査電顕による形態変化では、24時間後には、形態変化が始まり、48時間後に明らかに溶菌したと思われる像が得られたが、これは必ずしも生菌数の経時変化と一致しているとはいえない。

従来、抗菌力の指標の1つとしてMICが重要視されているが、接種菌量に差が生じることから、臨床に直結させるためには、更に他の観察方法が求められてきた。その観察方法の1つとして走査電顕、透過電顕を用いた

菌の形態変化の検討が試みられている。それによると、MICが良いとされている抗生物質の殆どが、菌を溶菌させるためには、MICよりもはるかに高濃度の薬剤を必要とすることがわかっている⁴⁾。今回、LZ-G液のin vitroでの生菌数の経時変化と走査電顕の形態変化の結果が一致しなかった理由も同様なことが十分予想されるが、この点については、更に検討が必要であると思われる。しかしながら、今回の試験において、LZ-G液が *S. aureus* および *Diphtheroid* に対し、顕著な殺菌効果が認められたことから、咽喉頭疾患に使用する薬剤としてはかなり期待のもてる薬剤であると結論づけられる。

結 語

耳鼻咽喉科臨床分離株である *S. aureus* および *Diphtheroid* を試験菌としてLZ-G液の殺菌効果を細菌学的、形態学的に検討した。その結果、次のような成績が得られた。

- ① LZ-G液処理後の生菌数の経時変化については *S. aureus* では40分以内に、*Diphtheroid* では5分以内に生存菌数が0 CFU/mlになり、*Diphtheroid* に対してより強い効果を示した。
- ② 走査電顕 (SEM) 的観察では *S. aureus*、*Diphtheroid* とともに24時間後には形態変化がはじまり、48時間後には顕著な溶菌像が捉えられた。
- ③ LZ-G液は *S. aureus* および *Diphtheroid* に対し、顕著な殺菌効果を示した。

《本研究を行うにあたり、細菌実験に際しては、本学中央臨床検査部細菌室、池端隆氏の御指導と御協力を得た。ここに記して、心から感謝する。》

参 考 文 献

- 1) Clausen. O. G : An Examination of the Bacteriostatic and Bactericidal, Fungistatic and Fungicidal Effects of Cetylpyridinum Chloride and 2-Bromo

- 2 -Nitropropan - 1 , 3 -Diol, separately and in Combinations also Including Benzyl Alcohol, Pharm, Ind. 35;726 -729, 1973
- 2) 中沢昭三, 板垣守正: 細菌溶解酵素Lysozymeの抗生作用に関する基礎的研究, The Journal of Antibiotics, 19;34 -47, 1966
- 3) 永井 裕, 橋本 一: リゾチームと各種抗菌製剤との協力作用, Chemotherapy, 17;1593 -1597, 1969
- 4) 紺野昌俊: 抗菌剤の評価のあり方, 医薬品研究, 9 : 1 -35, 1978