

## ウサギ緑膿菌性眼内炎に対する抗緑膿菌 免疫グロブリンの硝子体内注入 (図11, 表1)

秦野 寛・田中 直彦・河野 宗浩 (横浜市立大学医学部眼科学教室)  
松本 健二・磯部 裕・井上 克洋

### Intravitreal Injection of Human Anti-Pseudomonas Globulin in Pseudomonas Endophthalmitis in Rabbits

Hiroshi Hatano, Naohiko Tanaka, Munehiro Kawano  
Kenji Matsumoto, Yutaka Isobe and Katsuhiko Inoue

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

#### 要 約

ウサギ緑膿菌性眼内炎に対する抗緑膿菌免疫グロブリンの硝子体内注入の影響について検討した。アルブミンを対照として注入し、眼内炎の臨床経過、硝子体培養、組織像、網膜電図、眼内生菌数などについて比較した。実験1：ウサギ6匹の右眼硝子体に緑膿菌(5cfu)・グロブリン(10mg)混合液を注入し、左眼には菌(5cfu)・アルブミン(10mg)混合液を注入した。右眼は6眼中1眼に眼内炎が発症(16.6%)し、左眼は6眼中6眼に発症(100%)した。実験2：ウサギ6匹の両眼硝子体に先ず緑膿菌(5cfu)を注入し、1時間後に右眼硝子体にグロブリン(10mg)を、左眼にアルブミン(10mg)を注入した。左右眼の全例で眼内炎が発症したが、右眼は左に比べ、眼内炎が著明に抑制された。以上臨床経過の他、実施した検索全てにおいても、抗緑膿菌免疫グロブリン単独の硝子体内注入は、緑膿菌性眼内炎を抑制した。(日眼 92:2120—2128, 1988)

キーワード：眼内炎、緑膿菌、免疫グロブリン、硝子体内注入、ウサギ

#### Abstract

The effect of the intravitreal injection of anti-pseudomonas globulin in pseudomonas endophthalmitis was investigated using albino rabbits. In the first experiment we injected a mixture of five viable cells of pseudomonas aeruginosa and 10mg of human anti-pseudomonas globulin into the vitreous cavities of the right eyes of six rabbits. The left eyes were injected with pseudomonas and human albumin as the control. They were clinically followed for five days and then enucleated for vitreous culture and histology. The right eyes showed no clinical findings except one eye, whereas all left eyes progressed to endophthalmitis. Pseudomonas were recovered from one right eye and all left eyes. The left eyes showed typical histopathological findings of panophthalmitis with marked intraocular inflammation and destruction, which were not seen in the right eyes, except for one eye. In the second experiment the vitreous cavities of six rabbits were injected with five cells of pseudomonas, and one hour later the right and left vitreous cavities were injected with 10mg of globulin and albumin respectively. They were clinically followed for six days and ERGs were recorded. The viable cell numbers of pseudomonas in the vitreous cavities were also counted at given times using another nine rabbits injected in the same way as above. All the eyes developed endophthalmitis, but the right eyes

別刷請求先：232 横浜市区南浦舟町3-46 横浜市立大学医学部眼科学教室 秦野 寛

(昭和63年8月23日受付, 昭和63年9月29日改訂受理)

Reprint request to: Hiroshi Hatano, M.D. Dept. of Ophthalmol., Yokohama City Univ. School of Med.  
3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Received August 23, 1988 and accepted in revised form September 29, 1988)

showed milder inflammation than the left eyes. ERGs of all left eyes became extinguished at 48 hours but those of the right eyes did not. The viable cell numbers of the right eyes were much smaller than those of left eyes at all given times. The above indicates that the intravitreal injection of anti-pseudomonas globulin significantly suppressed pseudomonas endophthalmitis in rabbits. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92 : 2120—2128, 1988)

Key words: Endophthalmitis, Pseudomonas aeruginosa, Immune-Globulin, Intravitreal Injection, Rabbits

I 緒 言

今日一般に細菌感染の薬物療法には、全身、局所の抗生物質療法と、グロブリン製剤による全身免疫補助療法の2つが考えられる。特に全身重症感染症に対しては、抗生物質に加えて、グロブリン製剤の全身投与の併用が行なわれる。しかし細菌性眼内炎をはじめとする重篤な眼感染症に対しては、従来抗生物質の投与のみがなされ、免疫グロブリン製剤の投与はあまり検討されていない。

現在、緑膿菌感染症は化学療法の発達にもかかわらず、全般にまだ難治であり、我々はその治療には常に苦慮している。緑膿菌は角膜潰瘍の最も重要な起炎菌であり<sup>1)</sup>、また眼内炎においては進行が迅速で眼内組織破壊力が強く<sup>2)3)</sup>、視力予後の極めて不良な点から、眼科領域でも最も問題の多い菌の一つである。

過去、緑膿菌眼感染症に対して、全身免疫による予防や治療に関する動物実験が報告されている。田中ら<sup>4)</sup>は緑膿菌の共通抗原である Original endotoxin protein(OEP)、および菌体外酵素の Protease, Elastase のトキシノイドを用いてウサギを免疫し、緑膿菌性角膜潰瘍の発症予防効果を報告している。Kawahara-

jo ら<sup>5)</sup>はマウスに対して OEP, Protease, Elastase に対する抗体を有する免疫グロブリンと DKB を筋注し、緑膿菌性角膜潰瘍の発症予防に相乗効果をみとめている。また大石ら<sup>6)</sup>はモルモットの緑膿菌性眼内炎に対し、抗緑膿菌免疫グロブリンと DKB を筋注し、やはり両者の相乗効果を報告している。

今回我々は、局所免疫としてウサギ緑膿菌性眼内炎に対して、抗緑膿菌免疫グロブリン単独を硝子体内注入し、抗体が硝子体内で細菌感染防御に果たす役割について検討した。

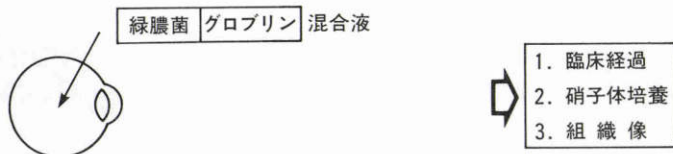
本実験は緑膿菌感染病理上興味深いだけでなく、細菌性眼内炎に対する臨床応用として考え得るグロブリン製剤の硝子体内注入の検討に資するものと期待される。

II 方 法

1. 材料

- 1) 動物；成熟白色ウサギ（2.0～2.5kg 体重）21匹
- 2) 菌株；緑膿菌75株(Protease, Elastase, Exotoxin A 産生株)を10<sup>3</sup> colony-forming-units/ml saline に調整した。
- 3) 抗体；ヒト抗緑膿菌免疫グロブリンである

実験1.



実験2.

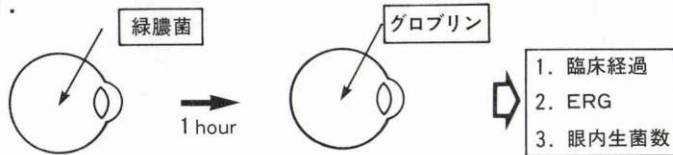


図1 実験法の説明



Pyocyanbulin I® (ミドリ十字, 大阪) を200mg/ml saline に溶解した, 本剤の PHA (間接赤血球凝集反応) 抗体価は抗緑膿菌共通抗原 (抗 OEP) 80倍, 抗 Protease 8 倍, 抗 Elastase 8 倍, 抗 Exotoxin 32倍である。

4) 対照; 抗体に対するコントロールとしてはヒトアルブミンを200mg/ml saline に溶解して用いた。

## 2. 方法 (図1)

実験1: 緑膿菌と抗緑膿菌免疫グロブリンが硝子体の同一部位に同時に注入された時, なにか起るかをみるため, 菌液とグロブリン溶解液の等量混合液を硝子体に注入する実験を先ず行なった。

ウサギ6匹を pentobarbital sodium (25mg/kg) で全身麻酔の上, 各眼から前房水を30gauge 針を用いて0.1ml 抜去して眼圧を下げ, 右眼には菌液とグロブリン溶解液の等量混合液0.1ml を硝子体中心部に30gauge 針付注射筒で注入した。他方左眼は対照として菌液とアルブミン溶解液の等量混合液を同様に注入した。

接種後5日間毎日, 手持ち細隙燈顕微鏡 (コーワ) を用いて眼内炎の臨床像を観察した。臨床像の程度判定は前述<sup>2)</sup>の方法で0~6点までの採点を行なった。さらに5日間の観察後, 19gauge 針付注射筒で各眼の硝子体を0.1ml 程吸引し, 緑膿菌選択培地であるNAC 寒天培地にて培養した。ついで, 眼摘してホルマリンに固定後, 眼球を眼軸にそって2分割し, パラフィン包埋の上, 断面に平行な切片の HE 染色標本の眼内組織所見を鏡検した。

実験2: 緑膿菌を先ずウサギ硝子体に接種し, 1時間後改めて硝子体に抗緑膿菌免疫グロブリンを注入した場合にはどうなるかをみた。ここでは臨床経過, 網膜電図 (ERG), 眼内生菌数の動態について調べた。

ウサギ15匹を麻酔後, 前房水を抜去し, 両眼の硝子体内に緑膿菌液0.05ml を接種した。1時間後, 右眼硝子体には抗緑膿菌免疫グロブリン溶解液0.05ml を注入し, 対照の左眼にはアルブミン溶解液0.05ml を注入した。

うち6匹は眼内炎の臨床経過ならびに ERG 記録用に用いた。臨床像は6日間毎日実験1と同様に観察した。ERG は菌接種前, 接種後24時間, 48時間の計3回, ERG 記録装置 (半田屋) ER502を用いて記録した。ウサギは暗順応せずに未散瞳で一定照明下 (50~100/x) にて, 点眼麻酔の上, 角膜にコンタクト電極, 頭皮に不関電極, 耳介に接地電極をおき, 50joules の光刺激を

眼前約5cm はなして行ない, 時定数30msec で記録した。

残9匹のウサギは眼内生菌数の動態をみるために用いた。菌接種後6時間, 24時間, 48時間の3時点で, 3匹6眼ずつ摘出し, 硝子体全てを眼球毎に採取し, 前述の平板培養法<sup>2)</sup>にて眼内生菌数を算定した。

なお全実験を通じ, ウサギ眼の各処置に際しては, 薬物の影響を考慮して抗生物質点眼を含む滅菌操作は行なわなかった。

## III 結 果

### 実験1

#### 1. 臨床経過 (図2)

1) 菌・アルブミン混合液注入群: 左眼6眼全例に眼内炎が発症した。6眼中5眼は1日後すでに臨床像スコアが3.5から5.5までに分布し, 2日後には5眼とも

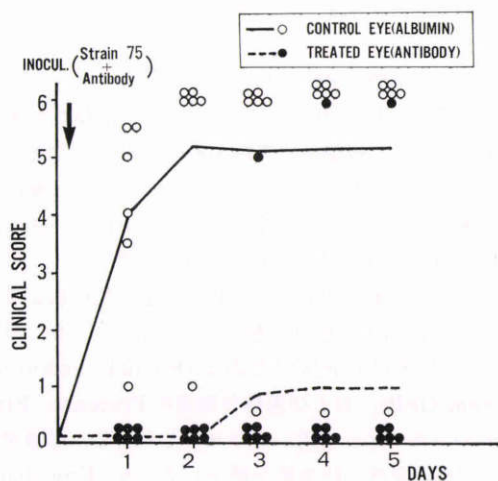


図2 眼内炎の臨床経過, 線は平均値 (実験1)

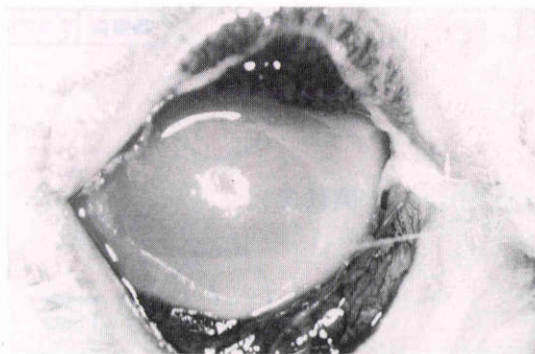


図3 接種後4日の対照眼 (実験1)

最高値の6.0に達して5日後まで同スコアで持続した(図3). 残りの1眼は1日後, 2日後にスコアは1.0であったが, 3日後から5日後までは0.5であった.

なおこの群での5日間の平均スコアの動きは4.1, 5.2, 5.1, 5.1, 5.1であった.

2) 菌・グロブリン混合液注入群: 右眼6眼中5眼は5日後まで眼内炎の発症を全くみとめず, スコアは0であった(図4). 残りの1眼は2日後まではスコア0であったが, 3日後で発症しスコア5.0となり, さらに4日後, 5日後には6.0となった. なおこの群での5日間の平均スコアは0, 0, 0.8, 1.0, 1.0であり, 全時点でアルブミン群よりはるかに低値であった.

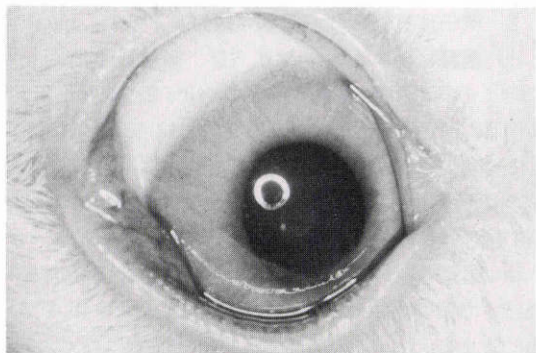


図4 接種後4日の抗体注入眼(実験1)

表1 硝子体培養結果(実験1)

| Rabbits No<br>Eye |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|
|                   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| R (Globulin)      | — | — | — | — | + | — |
| L (Albumin)       | + | + | + | + | + | + |

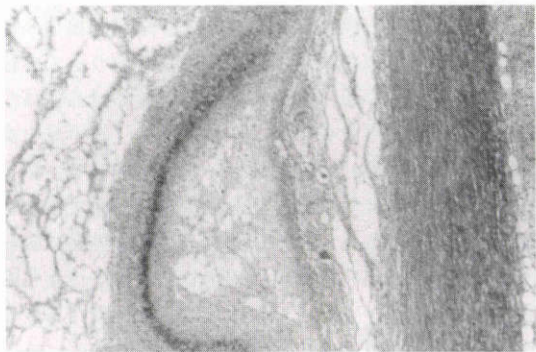


図5 接種後5日の対照眼のHE染色標本, (×40)  
(実験1)

2. 硝子体培養(表1)

1) 菌・アルブミン混合液注入群: 左眼6眼全例の硝子体より緑膿菌が分離された.

2) 菌・グロブリン混合液注入群: 右眼6眼の1眼から緑膿菌が分離されたが, 他の5眼からは菌は分離されなかった.

3. 組織像(図5, 6)

1) 菌・アルブミン混合液注入群: 左眼6眼全て強膜は穿孔しており, 前房と硝子体は炎症細胞で充満していた. 網膜, 脈絡膜構造の破壊をみとめた(図5).

2) 菌・グロブリン混合液注入群: 右眼6眼のうちの1眼はアルブミン群と同様の所見がみられたが, 他の5眼は病的所見をみとめなかった(図6).

実験2

1. 臨床経過(図7)

1) 菌接種後アルブミン注入群: 左眼6眼は接種当日から眼内炎の発症をみとめ, 6日後まで全て重症の眼内炎の病像を示した. 以下経時的に個別スコアをみてる. 接種後10時間の観察では, スコアは3眼が0.5, 他は1.0, 3.0, 4.0であり, すでに平均スコアで1.6となった. 24時間後になるとスコアは1眼が4.0, 3眼5.0, 2眼5.5であり, 平均で5.0を記録した(図8下). 2日後には1眼が5.0, 1眼5.5, 4眼6.0となり平均5.8となった. 4日後では1眼が5.5, 5眼6.0で平均5.9, 6日後では1眼が4.5, 2眼5.0, 3眼6.0で平均5.4であった.

2) 菌接種後グロブリン注入群: 右眼6眼の平均スコアは全時点で, アルブミン群左眼6眼のそれよりも低値で経過し, より軽度の眼内炎症状を示した. つまり10時間後でのスコアは6眼全て0であった. 24時間後になると1眼に眼内炎症状が出現してスコア3.0と

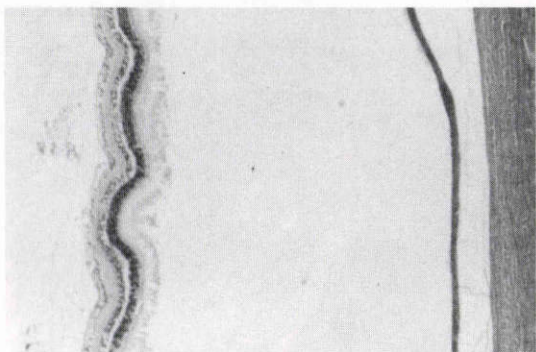


図6 接種後5日の抗体注入眼のHE染色標本, (×40), 網膜剥離はartefact(実験1)



なったが、残りの5眼はいぜん0のままであり、スコア平均は0.5であった(図8上)。2日後には2眼が0、1眼4.0、2眼4.5、1眼5.0となり平均スコアは3.0となった。4日後にはじめて全例が眼内炎症状を呈する

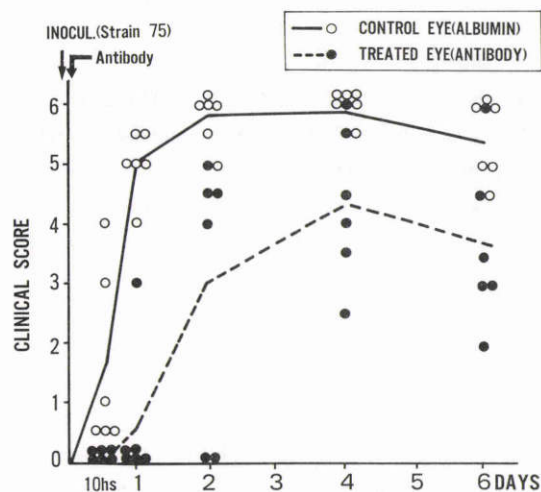


図7 眼内炎の臨床経過、線は平均値(実験2)

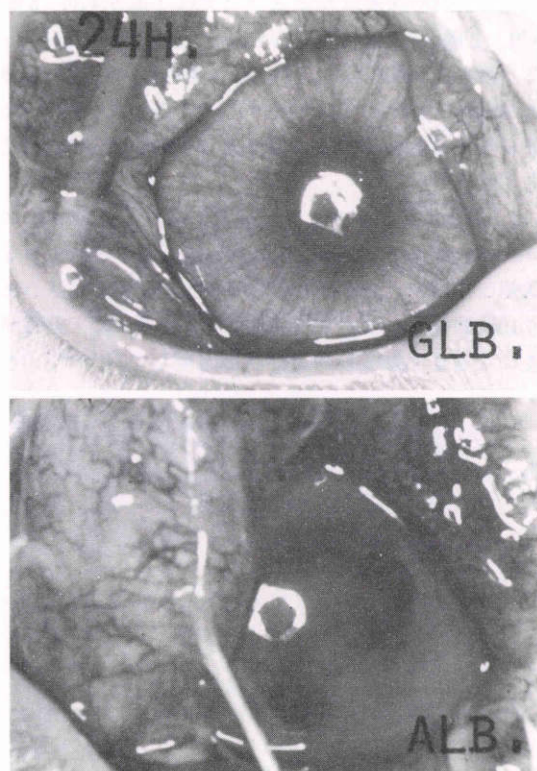


図8 接種後1日の対照眼(下)と抗体注入眼(上)(実験2)

に至り、6眼の各々スコアは2.5、3.5、4.0、4.5、5.5、6.0とばらつきをみせ平均で4.3となった。その後6日後では6眼各々は2.0、3.0、3.0、3.5、4.5、6.0となり平均スコア3.7となった。

## 2. ERG (図9, 10)

1) 菌接種後アルブミン注入群：左眼6眼についてみると、24時間後ですでに全例で、a波b波とも大幅に減衰し、48時間後には全例波形は平坦となった(図9)。

2) 菌接種後グロブリン注入群：右眼6眼についてみると、24時間後ではERG波形は1眼たりとも平坦とならず、48時間後になり、はじめて4眼の波形がほぼ平坦となったが、他の2眼はまだ波形が残存した(図10)。

## 3. 硝子体内生菌数の動態(図11)

1) 菌接種後アルブミン注入群：接種後6時間をみると、3眼の菌数/眼は各々 $1.7 \times 10^4$ 、 $2.2 \times 10^4$ 、 $3.5 \times 10^4$ /眼であった。24時間後の3眼では各々 $9.6 \times 10^7$ 、 $9.8 \times 10^7$ 、 $1.9 \times 10^8$ /眼となった。48時間後の3眼は各々 $3.5 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^5$ 、 $6.3 \times 10^5$ /眼に減少し、硝子体内生菌数は24時間値が最高値であった。

2) 菌接種後グロブリン注入群：接種後6時間をみると、3眼の菌数/眼は各々、 $2.5 \times 10$ 、 $5.0 \times 10$ 、 $7.5 \times 10$ /眼であった。24時間後でも大幅な増殖はなく、3眼各々は $2.5 \times 10$ 、 $7.5 \times 10$ 、 $4.3 \times 10^2$ /眼であった。48時間後では、3眼各々の菌量は $2.5 \times 10$ 、 $1.6 \times 10^4$ 、 $3.6 \times 10^6$ /眼となって、2眼で明瞭な増殖を示した。

## IV 考 按

今回の実験から、硝子体において緑膿菌は抗体の存在下で、明らかにその増殖を抑制されることが判明した。以下この事実をもとに、硝子体での化膿菌の液性免疫について考察してみたい。

化膿菌に対する感染防御の主役は好中球・抗体・補体である。化膿菌の大半は好中球が菌を取り込んで殺菌し処理されている。化膿菌処理過程における抗体の作用は大別して3つある<sup>7)</sup>。第1の作用は好中球の食作用を助ける働き、つまりオプソニン化である。第2の作用は菌と結合して補体系を活性化し、菌を溶かす免疫溶菌現象である。この現象はグラム陰性菌に限られる。第3の作用は補体を活性化して、好中球走化因子を産生する働きである。以上、化膿菌に対する生体各組織の防御メカニズムが正常に働くためには、その場に好中球、抗体、補体の全てが必要となる。この点、硝子体という環境はどうであろうか。

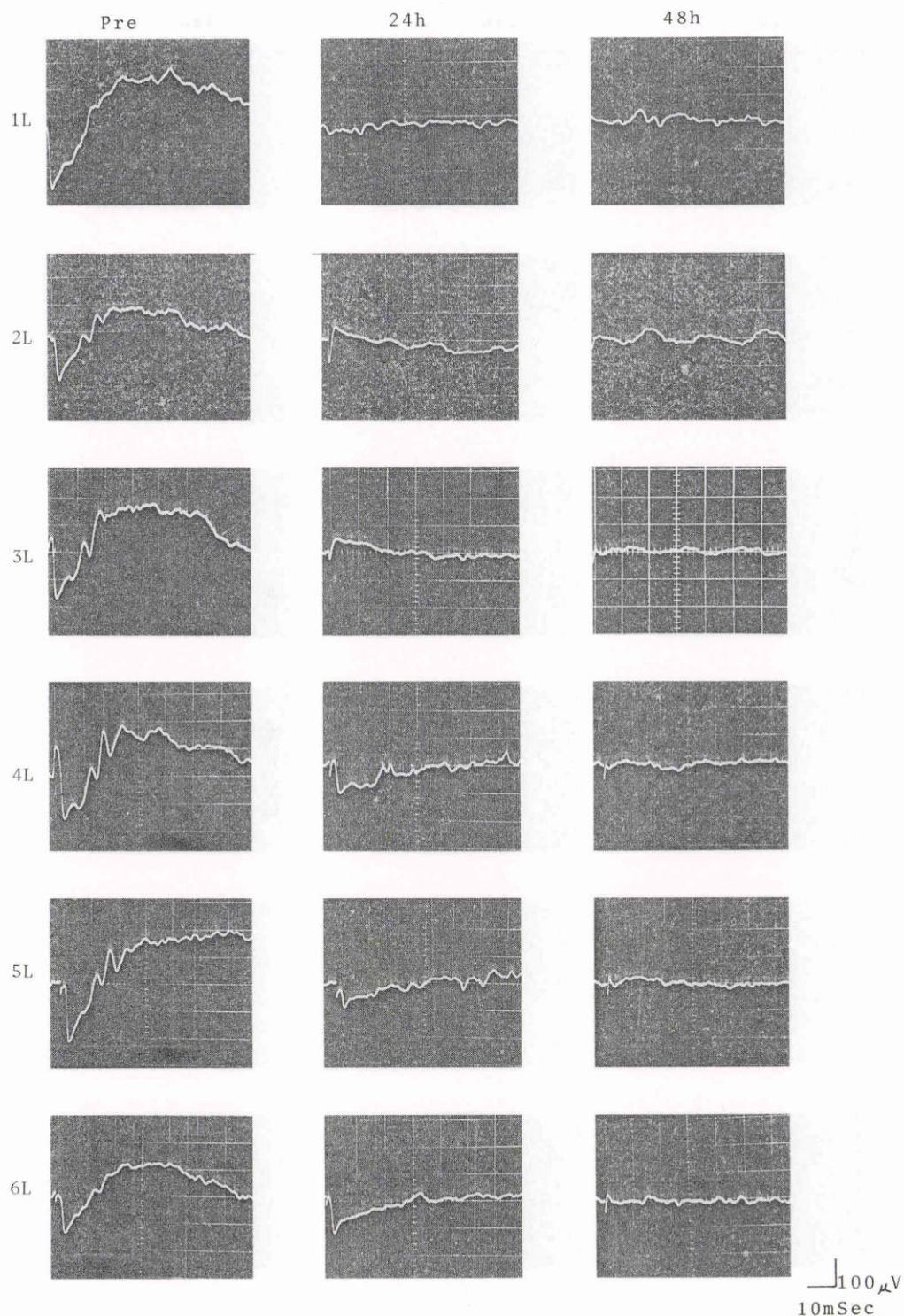


図9 対照眼の ERG (実験2)



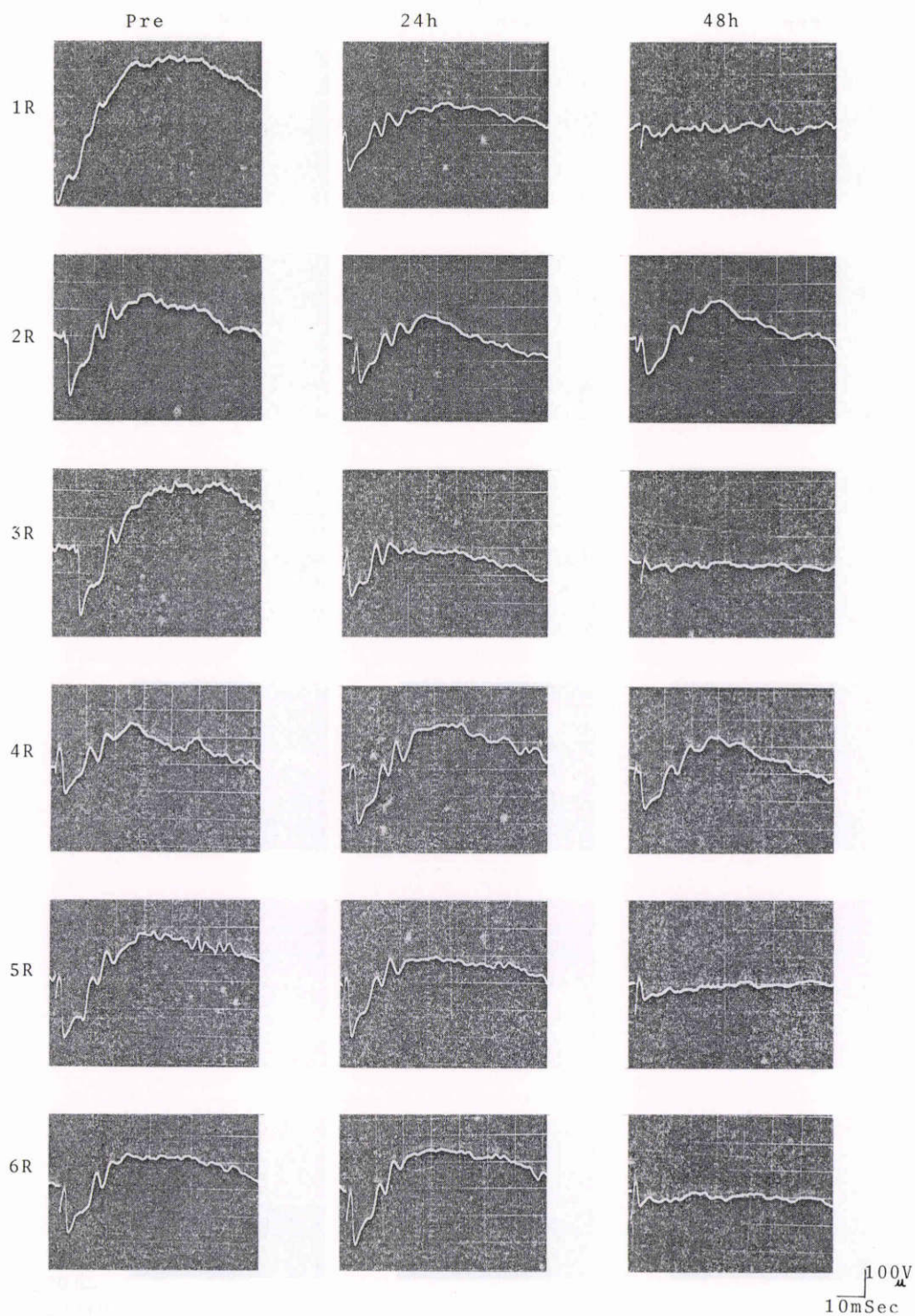


図10 抗体注入眼の ERG (実験 2)

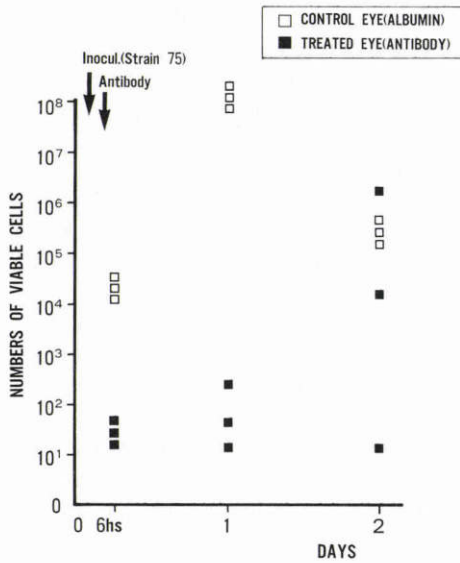


図11 眼内生菌数の動態 (実験2)

硝子体中の可溶性蛋白は主として、網膜血管由来の血清蛋白と推測されているが、その量は血清レベルよりはるかに低値である<sup>8)</sup>、従って補体についてみると、正常硝子体中には存在しないか、極めて微量と考えられる。つまり硝子体は、好中球、抗体、補体が通常は存在せず、一般化膿菌に対して極めて無防備な環境と言える。事実我々が報告したウサギ眼内炎<sup>9)</sup>では、緑膿菌5個を硝子体内接種しただけで、硝子体では細菌用培地内と同様の菌増殖がみられ、48時間以内に全硝子体は膿瘍と化し、ERGは全例平坦化した。

この辺で、今回得られた実験結果をふり返って考えてみたい。今回、抗体を硝子体内注入した所、前述<sup>9)</sup>した自然状態の硝子体内におけるのとは異なり、硝子体培養や眼内生菌数の動態からも明らかなように、硝子体中での緑膿菌の増殖は著明に抑制された。この事実を説明するためには、少なくとも菌と抗体が硝子体内注入された後、周囲組織の血管透過性が亢進し、硝子体内に好中球と補体が出現したと考えるべきであろう。

実験1は、抗体が眼内炎の発症自体を予防し得ることを示した。ただ抗体注入眼の1眼で2日目までスコア0であったものが3日目で急に発症したのは、この眼だけは菌と抗体の量的関係で殺菌が不完全で、2日目まで抗体がぎりぎりの所で菌増殖を抑制していた可能性があると思われる。この場合、別の推測として他眼から菌が血行転移した可能性はうすい。また混合感

染については本研究全体を通じて完全に否定はできないが、硝子体から緑膿菌を検出していることから、その可能性は少ないと思われる。

さらに実験1と実験2の結果を比較すると、臨床経過、硝子体内菌増殖などで抗体投与眼がアルブミン投与眼に比べ、明らかに抑制されたことは両実験で共通した傾向であった。ただし眼内炎の発症予防が実験2で成立しなかった理由については、実験1と比べ、菌接種と抗体注入の時間差、および菌と抗体の別々注入による硝子体内での両者の拡散動態のくいちがいなどが考えられよう。この点については、薬剤の硝子体内動態の一つとしても、今後検討を要すると思われる。

ここで話をかえ、抗体の殺菌以外の役割についても考えておきたい。抗体は毒素や酵素活性を中和する働きを持っている。ジフテリア菌のように毒素が病変形成に主に関与している場合には、抗体の意義は極めて大きい。緑膿菌は外酵素 Protease, Elastase<sup>9)</sup>や外毒素 Exotoxin A<sup>10)</sup>などを産生し、これらは角膜潰瘍の場合には主要な病原因子であることが実証されている。これらの毒素・酵素が硝子体や網脈絡膜などにも障害を与えうるとすれば、抗体はその毒性や活性を中和し、眼内組織障害を軽くする可能性が充分期待できる。当然これらの役割は抗生物質や抗菌剤には全く期待できないものである。

今後の課題として、抗体の硝子体内での作用や意義をより明らかにするために、1) 硝子体内での食菌をとらえ、抗体眼と対照眼で比較する。2) 硝子体内注入による抗体・抗生物質の相乗効果をみる。3) 緑膿菌の代謝産物の網膜毒性とそれに対する抗体の抑制効果をみる。以上が必要であろう。

細菌性眼内炎は眼疾患の中でも、最も緊急性が強く予後重篤であり、常に迅速な細菌学的診断と最大限の内容を盛り込んだ治療が要求される。従来の治療に加える新しい予防法、治療法の一つとして、免疫グロブリンの硝子体内注入は、一般に硝子体への薬物移行の不良な全身投与に比べ、投与量も少量で済む能率的な局所免疫療法と考えられ、抗生物質との併用で臨床的に検討されてよいと思われる。さらに桐沢型ブドウ膜炎などのウイルス性眼内炎に対しても抗体によるウイルスの中和などを期待して試みるべき価値のある治療法と考えられる。

本稿は第17, 18回緑膿菌研究会と第24回日本眼感染症学会で口演された。

稿を終えるにあたり、動物実験用抗緑膿ヒト免疫グロブ



リンを提供して下さったミドリ十字株式会社に感謝します。

# 文 献

- 1) 田中直彦, 土屋雅彦, 藤田 靖: 角膜潰瘍と起炎菌. 眼科 14: 269—274, 1972.
- 2) 秦野 寛: 緑膿菌性眼内炎の実験的研究—前房内接種における菌株と病原性について—, 日眼会誌 86: 839—845, 1982.
- 3) 秦野 寛, 佐々木隆敏, 田中直彦: 緑膿菌性眼内炎の実験的研究—硝子体内接種による病像, 眼内生菌数, ERG—, 日眼会誌 92: 1758—1764, 1988.
- 4) 田中直彦, 大関尚志, 田中一郎他: 緑膿菌性角膜潰瘍の免疫療法に関する実験的研究. OEP, プロテアーゼ, エラスターゼ免疫ウサギにおける緑膿菌接種実験. 日眼会誌 81: 1252—1259, 1977.
- 5) Kawaharajo K, Homma JY: Synergistic effect of immune  $\gamma$ -globulin-fraction on protection by antibiotic against corneal ulcers in experimental mice infected with pseudomonas aeruginosa. Jap J Exp Med 46: 155—165, 1976.
- 6) 大石正夫, 西塚憲次, 山本まり子他: 実験的緑膿菌性眼内炎に対する抗緑膿菌グロブリン Pyocyanbulin と DKB との併用効果. 眼紀 29: 1813—1816, 1978.
- 7) 矢田純一: 免疫学問答. 東京, 中外医学社, 98—102, 1981.
- 8) 早坂征次: 硝子体の生化学. 高久 功, 松井瑞夫編: 眼科 Mook 21, 硝子体, 東京, 金原出版, 17—23, 1984.
- 9) Kawaharajo K, Abe C, Homma JY, et al: Corneal ulcers caused by protease and elastase from *P. aeruginosa*. Jap J Exp Med 44: 435—442, 1974.
- 10) Iglewski BH, Burns RP, Gipson IK: Pathogenesis of corneal damage from *Pseudomonas* exotoxin A. Invest Ophthal Vis Sci 16: 73—76, 1977.