

緑膿菌実験感染における Fosfomycin の治療効果と 血清中濃度との関連について

五島 瑳智子・滝田 聖親・堂ヶ崎 勲
小川 正俊・金子 康子・桑原 章吾

東邦大学医学部微生物学教室

Fosfomycin (以下 FOM と略) の *in vivo* 抗菌作用については、前報¹⁾において *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* の実験感染における感染防禦効果を検討し、攻撃菌量の差による治療効果のパターンが、*P. aeruginosa* では菌株によって異なること、皮下投与においては 1 回投与より 2 回分割投与のほうが効果が確実であることなどを報告した。

今回は *P. aeruginosa* に対する抗菌作用をさらに詳細に検討するため、FOM-Na 塩の皮下投与、FOM-Ca 塩の経口投与によるマウス緑膿菌感染の治療実験を試み、あわせて FOM の血清中濃度の経時変化についてしらべ、有効性との関連を検討した。

実験材料および実験方法

FOM-Na 塩、FOM-Ca 塩 (各 710 mg/g 力価)。

実験動物は ddN 系マウス、5 週齢、雄、体重 20 g 前後。

1. 血清中濃度測定 (ディスク法)

FOM 検定用菌株として *Proteus* sp. (MB-838) 株を普通ブイヨン (栄研) に 1 夜培養したものを Difco の nutrient agar に 1% 加え、シャーレに 10 ml ずつ分注。

FOM 標準液 (マウス血清で調製)、および検体をディスク (直径 6mm) に浸し、上記の寒天培地にのせ、37℃、24 時間培養後、その阻止帯を測定した。

FOM 経口投与には 0.5% メチルセルローズで調製した FOM-Ca 塩を、マウス (1 群 4 匹) に 5 mg/mouse と 2.5 mg/mouse を投与し、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、7 時間後にマウスを断頭採血し、血清を分離し上記の方法でそれぞれの FOM 濃度を測定した。

皮下投与は FOM-Na 塩を用い、同様 5 mg/mouse と 2.5 mg/mouse を投与、15 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、5 時間に断頭採血し、同様の方法で測定した。

2. ED₅₀ の測定

P. aeruginosa GNB-2-29 株 (FOM の MIC は 10⁸/ml の菌量接種で 100 μg/ml 以上、10⁶/ml の菌量接種では 3.12 μg/ml である) を用い、生理食塩液に懸濁した 2×10⁸/0.2 ml/mouse、および 5% ムチン液に懸濁した 2×10⁸/0.2 ml/mouse の菌量をマウス腹腔内に接種した。

FOM 皮下、経口投与とも感染後 1 時間後 1 回投与群、

5 時間後 1 回投与群、1.5 時間後 2 回投与群 (1/2 量を 2 回分割) の 3 群とした。マウス 1 群 8 匹に FOM-Ca 塩は経口投与、FOM-Na 塩は皮下投与し、5 日目に各群のマウス生残数により ED₅₀ を算出した。

実験成績

1. 血清中濃度

1) 皮下投与時の血清中濃度

FOM-Na 塩の 5 mg、および 2.5 mg/mouse を皮下投与したばあいの血清中濃度は Table 1 に示す。5 mg/mouse 投与群では投与後 15 分で平均 375 μg/ml の濃度を示し、以後速やかに減少して 5 時間後には 1.6 μg/ml となる。2.5 mg/mouse 群では 15 分後の値は 200 μg/ml で、その後減少のカーブは 5 mg 投与群とほぼ平行し、5 時間後には 1.2 μg/ml となっている。

2) 経口投与時の血清中濃度

FOM-Ca 塩経口投与群の血清中濃度は、投与後 1 時間にピークがあり、5 mg 投与では 50 μg/ml、2.5 mg 投与では 29.5 μg/ml の値を示した。皮下投与に比べるとピークに達する時間は遅く、最高濃度も約 1/7 となるが、明らかな dose response が認められた。減少のカーブは皮下投与よりゆるく、投与後 7 時間目でも 5 mg 投与で 12.8 μg/ml、2.5 mg 投与で 9.0 μg/ml を示した。この濃度は皮下投与時の 2~3 時間後の血清中濃度に匹敵する。

2. 感染防禦効果

1) 皮下投与

P. aeruginosa GNB-2-29 を用い攻撃菌量を 2×10⁸/mouse (5% mucin 加)、および 2×10⁸/mouse の 2 種とし、感染 1 時間後、5 時間後の 1 回投与および 1 時間、5 時間後の 2 回に分割投与したばあいの ED₅₀ 値を比較すると、大量菌攻撃のばあいは 1 回投与群では感染後 1 時間、5 時間のいずれも 6 mg/mouse 以上の ED₅₀ を示し無効と判定されたが、同じ量を 1.5 時間の 2 回に分割投与したものは、ED₅₀ は 1.19 mg/mouse であって、治療効果が認められた。

少量菌攻撃ではやはり 2 回分割投与群が最も有効であったが、1 時間後 1 回投与でも 1.89 mg/mouse の ED₅₀ 値を示し、治療効果は明らかであった。しかし 5 時間後 1 回投与群では無効であった。

Table 1 Serum levels of fosfomycin in mice

FOM	Dose (mg/mouse)	Time after administration (hrs.)						
		0.25	0.5	1	2	3	5	7
FOM-Na	5	375	270	89.0	34.0	9.0	1.6	
	2.5	200	145	44.0	15.4	6.8	1.2	
FOM-Ca	5		35.0	50.0	36.0	32.0	17.0	12.8
	2.5		25.9	29.5	23.0	15.3	10.0	9.0

Mouse: male albino mice ddN strain, body weight 19~20 g (μg/ml)

Method: Bioassay Paper disk method

Organism *Proteus* sp. (MB-838)

Medium Nutrient agar (Difco)

Standard Mouse serum

Table 2 Fluctuation of protecting effect in various administration of fosfomycin

Antibiotic	Challenge dose (cells/mouse)	Administration			ED ₅₀ (mg/mouse)	MIC (μg/ml)
		Route	Number	After the infection (hr)		
FOM-Na	2 × 10 ⁸ (-)	s.c.	1 1 2	1 5 1, 5	6 < 6 < 1.19	100 <
	2 × 10 ⁶ (+)	s.c.	1 1 2	1 5 1, 5	1.89 ≤ 6 < 1.19	3.12
FOM-Ca	2 × 10 ⁸ (-)	p.o.	1 1 2	1 5 1, 5	1.89 ≤ 6 < 6 <	100 <
	2 × 10 ⁶ (+)	p.o.	1 1 2	1 5 1, 5	1.26 6 ≤ 0.59	3.12

Mouse: ddN, ♂, 5w, 19~20 g, Strain: *P. aeruginosa* GNB-2-29, (+): 5% mucin

2) 経口投与

FOM-Ca 塩を同一菌株による感染マウスに経口投与した結果は、大量菌攻撃では1時間後1回投与だけ ED₅₀ 1.89 mg/mouse で有効であり、5時間後1回投与、および1, 5時間の2回分割投与のいずれも無効であった。

少量菌攻撃では分割投与の ED₅₀ 値が 0.59 mg/mouse で最も小さく、有効であることが認められたが、1時間後1回投与でも 1.26 mg/mouse の ED₅₀ が得られた。しかし5時間後1回投与群は無効であった。

以上の成績を攻撃菌量からながめてみると、少量菌攻撃のばあいには経口、皮下投与のどちらも1時間1回投与群、1, 5時間分割投与群において治療効果が認められているが、5時間後1回投与群は無効であって、皮下、経口のどちらもほぼ同じような成績が得られた。

それにひきかえ大量菌攻撃では皮下、経口とも5時間後1回投与群が無効である点は少量菌攻撃と同様であるが、1時間後1回投与のばあい、皮下投与では無効となり経口投与では効果がみられる。また、1, 5時間の2回分

割投与では効果がなく皮下投与において治療効果が認められている。

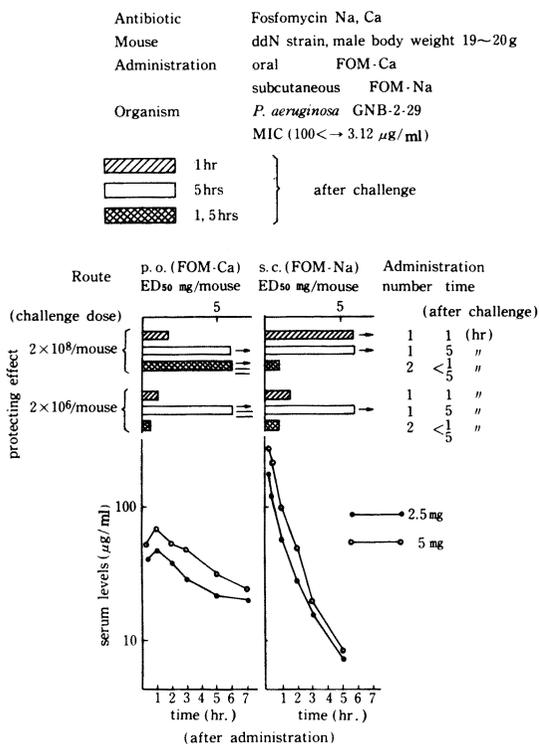
本実験の ED₅₀ 値からみた FOM の治療効果の変動と血清中濃度との関連を Fig. 1 に収めてみた。

考察と結論

少量菌攻撃では感染後1時間で治療したばあい、1回投与でも2回の分割投与でも効果があり、5時間後の投与では皮下、経口とも無効であるのは、感染5時間後には腹腔接種した菌が増殖してしまい、生体の防衛能力をこえた状態になることが考えられる。このことは感染後1時間に投与したばあいはいずれも有効性が明らかであることから推察されるが、大腸菌での実験で大量菌を接種したばあいと、少量菌接種でも効果の認められなかったばあいには、マウスの臓器内菌量がいずれも大きく 10⁷/g (臓器)以上となるが、治療に反応して治癒する(正しくは感染発症が防げたばあい)は、臓器内菌数は 10⁵/g 以下となることからもうかがわれる。

大量菌攻撃のばあい、皮下と経口投与の間に大きな差が

Fig. 1 Correlation between serum levels and protecting effects of fosfomycin in mice



みられるが、これは試験菌株である *P. aeruginosa* GNB-2-29 株の FOM 感受性と、皮下、経口投与時のそれぞれの血清中濃度のパターンの差によるものと解釈される。

感染後 1 時間投与で、経口では有効であるが皮下では無効であることは、血清中濃度のパターンの違いによるもので、前者では有効血清中濃度が長時間持続し、投与

後 7 時間経っても 10 μg/ml 以上を保持しているのに、皮下投与では投与後 3 時間で 10 μg/ml 以下に減少してしまうためと考えられる。

攻撃菌の MIC は 10⁸/ml 菌液接種で 100 μg/ml 以上、10⁶/ml 菌液接種で 3.12 μg/ml を示すが、10⁸/mouse の菌量を感染させたばい有効血清中濃度の持続時間が短く、速やかに消失してしまう皮下投与では、FOM の抗菌作用と生体防衛機構の作用がうまくみ合わないうちに FOM が排泄されてしまうものと思われる。

いっぽう、1, 5 時間の 2 回分割投与では皮下投与が有効で、経口が無効であるのは、分割投与することにより、1 回の投与量が 1/2 となり、経口投与では有効血清中濃度レベルに達しないためと考えられる。逆に皮下投与で有効なのは、1/2 量の分割投与でも血清中濃度は高くなり、5 時間後には速やかに減少して有効濃度を割ることとなるが、そこで再投与されるので有効濃度が持続するためと考えられる。もちろん MIC が小さいより感受性の高い菌株を試験菌としたならば、また異なる成績が得られるであろう。

いずれにしても本実験で感染防禦効果が菌株の MIC、攻撃菌量により影響をうけ、薬剤の投与ルート、投与量、投与時期、投与回数による ED₅₀ の変動は、FOM のマウス血清中濃度パターンにより明確に説明された。

以上の成績は薬剤の感染防禦効果測定に際し実験条件の設定に参考となり、また治療効果の成績の判定に役立つ資料となるであろう。

文 献

1. 五島瑳智子, 他: Fosfomycin の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 23: 1653~1661, 1975

RELATION BETWEEN PROTECTING EFFECT AND SERUM CONCENTRATION
OF FOSFOMYCIN IN EXPERIMENTAL INFECTION
WITH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

SACHIKO GOTO, TOSHICHIKA TAKITA, ISAO DOGASAKI,
MASATOSHI OGAWA, YASUKO KANEKO and SHOGO KUWAHARA
Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University, Tokyo

Protecting effect of fosfomycin on pyocyanosis of mice varies with the challenge dose and route, time and number of administration of the fosfomycin. This is experimentally corroborated by observing the serum concentration pattern of the fosfomycin.

Thus after the oral administration of the fosfomycin, its serum concentration is lower and attains a peak later than after the subcutaneous injection, but the excretion is delayed, and the activity is more persistent in the former. Consequently, after the massive challenge, a single oral administration of fosfomycin at 1 hour after the infection, or two divided subcutaneous injections at 1 and 5 hours were effective, whereas a single oral administration at 5 hours, and a single subcutaneous injection at 5 hours and two divided oral administration at 1 and 5 hours were all ineffective.

In case of a small challenge dose, the therapeutic effect of fosfomycin was relatively stable. However, both oral and subcutaneous administrations were ineffective when given once at 5 hours after the challenge.

These results are considered useful in assaying the protecting effect of antibiotics.