

## Tobramycin の *in vivo* 抗菌作用

松浦真三・田中融・亀田康雄

塩野義製薬株式会社研究所

本報では、マウスを用いた各種実験的細菌感染症に対する Tobramycin (TOB) の治療効果に関し、Gentamicin (GM) および Dideoxykanamycin B (DKB) を対照薬剤として、比較検討した成績について報告する。

### 実験材料と方法

使用マウス：ICR 系の雌、5週令、体重  $20 \pm 2$  g を1群10匹として使用した。

使用菌株：Table 1, 2 に掲げられたグラム陽性、陰性合わせて8菌種14菌株を使用した。寒天斜面で18時間培養した菌を、Heart infusion broth (栄研) に  $10^8 \sim 9$  /ml となるよう菌懸濁液を調製し、少量ずつ分注して、 $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザー中に凍結保存する。この際、保護剤として *Pseudomonas* の場合はスキム・ミルクを終末濃度 2% に、それ以外の菌株の場合は非動化牛血清を 10% の割合に添加する。この方法で、各菌株は少なくとも 6 カ月間は菌数および毒力を変動を与えることなしに保存し得る。

感染方法：上記  $-80^{\circ}\text{C}$  保存の菌液を  $37^{\circ}\text{C}$  の温浴中で速やかに融解し、それぞれの毒力に応じて Heart infusion broth で適宜希釈した後、*Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae* および *Klebsiella pneumoniae* については、その 0.1 ml を腹腔内に接種した。上記の菌株を除く各菌株については、Gastric mucin Type W-1701 (和光純薬) を 5% になるように加え、その 0.2 ml を腹腔内に接種した。

供試薬剤：GM および DKB については、そのまま蒸留水に溶解し、TOB の場合は、蒸留水に溶解後 1 N 硫酸液で pH 6.0 に調整して、実験に供した。薬剤の投与は、とくにことわらない限り、菌接種 1 時間後および 5 時間後の計 2 回皮下注射によって行なった。

効果の判定：10倍希釈系列による予備試験の成績から、およその有効量を推定し、それに基づきそれぞれの 2 倍希釈系列数段階を投与量とした。1群 10 匹のマウスを使用し、7 日後の生存率から、プロビット法によって ED<sub>50</sub> とその信頼限界 (95%) を算出し、1 回の投与量で表現した。

### 実験成績

#### 1. 各種細菌感染症に対する治療効果

種々の実験的細菌感染症に対する 3 種薬剤の治療効果 (ED<sub>50</sub>) は、前報<sup>1)</sup> の試験管内感受性 (MIC) の成績とともに一括して Table 1 に示す。まず、TOB の効果をみると、グラム陽性菌では、ブドウ球菌感染症に対して強い抗感染効果を認めたほかは、溶連菌ならびに肺炎球菌に対する効果は著明でない。いっぽう、グラム陰性菌群では、肺炎桿菌に対してブドウ球菌に対すると同様の強い効果を示し、その他大腸菌、变形菌、ならびに緑膿菌に対しても、1 mg/kg 前後の ED<sub>50</sub> が得られた。なお、多剤耐性大腸菌 80750 株に対しても、感受性株と同程度の活性が認められた。以上の成績を GM あるいは DKB と比較すると、これら 3 種薬剤は、*in vivo* 抗菌スペクトラムの面から極めて類似した傾向を示しているといえる。強いてその差を論じるならば、Table 1 に示された ED<sub>50</sub> 値より、それらの活性の強さは、グラム陽性菌に対しては GM > TOB > DKB、グラム陰性菌に対しては GM = TOB > DKB、とくに、緑膿菌に対しては TOB > DKB > GM の順となる。

#### 2. *Pseudomonas* 感染症に対する効果

今回用いられた 3 種薬剤は、いずれも緑膿菌に有効なことで注目されており、しかも、前述の成績より 3 者間の活性に若干差のある傾向が示唆されたので、さらにこの点を明らかにする目的から、耐性株を含む 6 種の *Pseudomonas* について *in vivo* 抗感染試験を行なった。少なくとも 2 回以上の繰返し実験によって得られた 3 種薬剤の ED<sub>50</sub> および信頼限界は、MIC とともに一括して Table 2 に示した。すなわち、GM に感受性の株 (PS-24-S, Ps-17, Ps-25 および X-239) は、TOB, DKB とともに感受性であるが、TOB の *in vivo* 効果は、GM, DKB のそれと比較し、統計的有意差をもって優れている。GM には耐性でありながら TOB には感受性である PI-67 に対しては、*in vivo* でも同様の結果が再現された。この株に対しては、DKB もまた有効であった。いっぽう、*in vitro* で TOB, GM の両剤に耐性

Table 1 Effect of three antibiotics against experimental bacterial infections in mice

Test organism	Inoculum size	Challenge LD <sub>50</sub>	Mucin	TOB		GM		DKB	
				ED <sub>50</sub> *	(MIC)**	ED <sub>50</sub>	(MIC)	ED <sub>50</sub>	(MIC)
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	4.0 × 10 <sup>5</sup>	80	+	[ 0.16 ~ 0.21 ]	*** ( 3.13 )	[ 0.11 ~ 0.15 ]	( 1.56 )	[ 0.24 ~ 0.31 ]	( 3.13 )
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	6.7 × 10 <sup>3</sup>	700	-	[ 32.5 ~ 44.3 ]	( 25 )	[ 18.2 ~ 24.6 ]	( 12.5 )	[ 37.3 ~ 50.0 ]	( 50 )
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type-I	4.8 × 10 <sup>3</sup>	1,400	-	[ 89 ~ 116 ]	( 50 )	[ 30.4 ~ 39.6 ]	( 25 )	>200	( 100 )
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.9 × 10 <sup>4</sup>	50	-	[ 0.14 ~ 0.18 ]	( 0.78 )	[ 0.18 ~ 0.25 ]	( 0.39 )	[ 0.35 ~ 0.61 ]	( 0.78 )
<i>Escherichia coli</i> EC-14****	8.6 × 10 <sup>4</sup>	100	+	[ 0.40 ~ 0.62 ]	( 6.25 )	[ 0.30 ~ 0.40 ]	( 6.25 )	[ 0.90 ~ 1.30 ]	( 6.25 )
<i>Escherichia coli</i> 80750	5.2 × 10 <sup>4</sup>	70	+	[ 0.64 ~ 0.90 ]	( 6.25 )	[ 0.56 ~ 0.75 ]	( 6.25 )	[ 0.83 ~ 1.09 ]	( 12.5 )
<i>Proteus mirabilis</i> PR-4	1.5 × 10 <sup>6</sup>	50	+	[ 1.23 ~ 1.47 ]	( 25 )	[ 0.87 ~ 1.14 ]	( 12.5 )	2.83	( 25 )
<i>Proteus vulgaris</i> CN-329	1.2 × 10 <sup>5</sup>	170	+	[ 0.55 ~ 0.86 ]	( 25 )	[ 0.79 ~ 0.94 ]	( 12.5 )	1.17	( 25 )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS-24-S	8.6 × 10 <sup>4</sup>	400~800	+	[ 1.05 ~ 1.24 ]	( 1.56 )	[ 3.15 ~ 4.26 ]	( 1.56 )	3.10	( 2.55 ~ 3.82 )
						[ 3.15 ~ 5.17 ]	( 1.56 )		( 0.78 )

\* ED<sub>50</sub> is the twice-administered dose (1 and 5 hour post infection) : (mg/kg × 2)

\*\* Agar dilution method: (μg/ml)

\*\*\* Confidence limit: (mg/kg × 2)

\*\*\*\* Multiple-drug resistant strain

Table 2 Effect of three antibiotics against experimental *Pseudomonas* infections in mice

<i>Pseudomonas</i> strain	Inoculum size	Challenge LD <sub>50</sub>	TOB		GM		DKB	
			ED <sub>50</sub>	(MIC)	ED <sub>50</sub>	(MIC)	ED <sub>50</sub>	(MIC)
PS-24-S	8.6 × 10 <sup>4</sup>	400 ~ 800	1.24 [1.05 ~ 1.45]*	(1.56)	4.26 [3.15 ~ 5.17]	(1.56)	3.10 [2.55 ~ 3.82]	(0.78)
Ps-17	3.8 × 10 <sup>6</sup>	10 ~ 80	6.84 [6.13 ~ 7.75]	(1.56)	16.79 [13.94 ~ 20.63]	(6.25)	12.13 [10.16 ~ 14.28]	(1.56)
Ps-25	2.9 × 10 <sup>7</sup>	10 ~ 40	3.32 [2.90 ~ 3.77]	(0.39)	8.94 [8.02 ~ 10.27]	(1.56)	6.06 [5.08 ~ 7.14]	(0.78)
X-239	3.2 × 10 <sup>7</sup>	10 ~ 20	3.36 [2.95 ~ 3.82]	(1.56)	10.20 [9.01 ~ 11.55]	(1.56)	6.06 [4.63 ~ 7.57]	(1.56)
PI-21**	6.8 × 10 <sup>6</sup>	50	>188	(>100)	>120	(100)	>200	(>100)
PI-67***	7.5 × 10 <sup>6</sup>	10	8.90 [6.76 ~ 11.60]	(3.13)	≥120	(>100)	15.32 [10.50 ~ 21.30]	(6.25)

\* Confidence limit: (mg/kg × 2)

\*\* TOB- and GM-resistant strain

\*\*\* TOB-sensitive, but GM-resistant strain

を示した PI-21 に対しては 3 薬剤とともに効果を示さなかった。以上、数株の *Pseudomonas* を用いて行なった実験的感染症に対して、TOB は明らかに優れた効果を示し、ついで、DKB, GM の順となる。

### 3. 治療効果におよぼす諸因子の影響

マウスを用いた *Pseudomonas* 感染症に対して、TOB の優れた効果が明らかとなったので、本剤の *in vivo* における作用態度をさらに検討するため、*Pseudomonas aeruginosa* PS-24-S 株を被検菌とし、以下の実験を行なった。なお、対照薬剤としては GM を選んだ。

#### a) 接種菌量による影響

まず、接種菌量の相違と治療効果との関係を、皮下 2 回投与によって検討した。結果を Table 3 に示した。すなわち、ムチン添加群においては、TOB の場合、10<sup>4</sup> 個接種の ED<sub>50</sub> 値を 1 とすると、接種量が 100 倍、1000 倍と增量されるにしたがって、その ED<sub>50</sub> は、それぞれ 2 倍、8 倍の値となった。また、GM の場合は、10<sup>6</sup> 個接種では約 2 倍、10<sup>7</sup> 個接種では約 5 倍の値を示した。つまり、両薬剤とも接種菌量の増加にともなって ED<sub>50</sub> 値は増大する傾向があるが、GM に比して、TOB のほう

がややその影響を受け易い。いっぽう、ムチン非添加群においては、同じく 10<sup>7</sup> 個接種でありながらムチン添加群に比べてそれらの ED<sub>50</sub> 値は低く、ムチン添加 10<sup>6</sup> 個接種と同等、もしくは 2 倍程度にすぎなかつた。このことより、本感染系に関する限り、両薬剤の治療効果は、接種菌数の絶対値よりは、むしろ Challenge LD<sub>50</sub>、つまり、LD<sub>50</sub> の何倍量を接種したかに影響されるものと解釈される。なお、10<sup>8</sup> 個以上の接種は、それが感染症としての意義に疑問があるので、実施することを避けた。

#### b) 薬剤投与時間による影響

接種菌量を一定 (10<sup>4</sup> 個) とし、菌接種前後の種々の時間に、それぞれ皮下に 1 回投与する群を設け、ED<sub>50</sub> におよぼす薬剤投与時間の影響について検討した。成績は Table 4 に示した。すなわち、TOB の場合は、菌接種 1 時間後および 5 時間後が最も効果的な投与時期で、その前後に当たる同時および 8 時間後では約 2 倍の ED<sub>50</sub> 値が得られた。これに対して、GM の場合は、同時投与から 8 時間後投与を通じて、ED<sub>50</sub> 値に有意の変動は認められなかった。いっぽう、菌接種前 1 時間の投与は、

Table 3 Effect of inoculum size on antibacterial activity of TOB and GM against experimental *Pseudomonas* (PS-24-S) infections in mice

Inoculum size	Challenge LD <sub>50</sub>	Mucin	TOB		GM	
			ED <sub>50</sub>	(Ratio)	ED <sub>50</sub>	(Ratio)
8.6 × 10 <sup>4</sup>	400	+	1.2	(1.0)	4.3	(1.0)
2.4 × 10 <sup>6</sup>	10,000	+	2.6	(2.2)	8.9	(2.0)
2.4 × 10 <sup>7</sup>	100,000	+	10.1	(8.4)	19.4	(4.5)
2.4 × 10 <sup>7</sup>	6	-	2.7	(2.3)	4.9	(1.1)

Table 4 Effect of administration-time on antibacterial activity of TOB and GM against experimental *Pseudomonas* (PS-24-S) infections in mice.

Administration time	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	
	TOB	GM
-1 hour	23.6	35.2
0 hour	2.9	4.4
+1 hour	1.7	6.6
+5 hours	1.4	4.4
+8 hours	2.9	4.0

同時または接種後の投与に比べて、その効果が著しく劣り、ED<sub>50</sub>は両剤ともに同時投与の約8倍の値を示した。この事実は、両薬剤の排泄がかなり迅速であることを示唆するものであろう。

### 考 素

TOB が、*in vitro* で、とくに *Pseudomonas* に対して、GM を含む他のアミノグルコシド抗生物質よりも優れた抗菌活性を有することは、既に多くの研究者によって報告されている。今回、著者等は、マウスの実験的 *Pseudomonas* 感染症に対して、TOB が対照薬剤である GM ならびに DKB に比し、統計的有意差をもって優れた治療効果を示すことを明らかにした。また、グラム陰性桿菌およびブドウ球菌感染症には優れた効果を示すが、肺炎球菌ならびに溶連菌に対する効果は著明ではないことが、3種薬剤共通の特徴として認められた。TOB に関する以上の成績は WICK ら<sup>3</sup>、PRESTON ら<sup>3</sup>、および WAITZ ら<sup>4</sup>のマウスを用いた *in vivo* の実験結果とほぼ一致する。さらに、GM に対して耐性を示す PI-67 株に対して、TOB、DKB の両薬剤が有効であったことは、アミノグルコシド抗生物質間の交叉耐性を論ずる際に興味がある。

薬剤の *in vivo* 効果に影響をおよぼす因子についての解析は、その薬剤の生体内での作用態度を特徴づけるための重要な手掛りとなる。とくに、投与時間による影響は、薬剤の吸収、排泄と密接に関係することが予想される。今回の実験において、その影響の一般的傾向は TOB、GM 共通であるが、反応の度合は GM に比して TOB がやや大きいようである。WAITZ ら<sup>4</sup>は、アミノグルコシド抗生物質間の *in vitro* 感受性の差が、かならずしも *in vivo* 効果に結びつかないことを報告し、その理由として、薬剤間の吸収、排泄のちがいを示唆している。また、CHISHOLM ら<sup>5</sup>は、イスを用いた実験で、血中濃度は TOB と GM とで差がないが、組織液

内濃度は TOB が低いと述べている。これらの薬剤の生体内動態に関するさらに詳細な検討が必要と思われる。

最後に、今回の *in vivo* 実験を通じて、効果の再現性が極めて良好であることが注目された。使用した薬剤の性質にもよるが、接種材料として、-80°C に凍結保存した菌液を用いたことが、その一因と考えられる。とくに、緑膿菌のように集落解離が問題となるような場合などには、実験条件の均一化の意味から、上述の菌株保存法は推奨されよう。

### 結 論

種々の病原細菌感染マウスに対する TOB の治療効果に關し、GM および DKB を対照薬剤として、検討した。

これら 3 薬剤はいずれもブドウ球菌、肺炎桿菌、大腸菌、および变形菌感染症に有効であるが、溶連菌ならびに肺炎球菌感染症に対する効果は劣る。

数種の *Pseudomonas* 感染症に対して、TOB は、DKB および GM よりも優れた治療効果を示した。また、TOB は、DKB とともに GM 耐性の 1 株にも有効であった。

実験的緑膿菌感染症に対する TOB の治療効果は、接種菌量ならびに薬剤の投与時間によって影響され、とくに、接種前の投与では、薬剤効果に著しい低下が認められた。

### 文 献

- 1) 真山三賀雄、永田 弘、金沢喜代治: Tobramycin の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 23 (3) : 859 ~880, 1975
- 2) WICK, W.E. & J.S. WELLES: Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. IV. *In vitro* and *in vivo* laboratory evaluation. Antimicr. Agents & Chemoth. 341~348, 1967
- 3) PRESTON, D.A. & W.E. WICK: Preclinical assessment of the antibacterial activity of nebramycin factor 6. *ibid.* 322~327, 1970
- 4) WAITZ, J.A.; E.L. MOSS, Jr., C.G. DRUBE & M.J. WEINSTEIN: Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin, and tobramycin. *ibid.* 2(6): 431~437, 1972
- 5) CHISHOLM, G.D.; P.M. WATERWORTH, J.S. CALNAN & L.P. GARROD: Concentration of antibacterial agents in interstitial tissue fluid. Brit. Med. J. 1: 569~573, 1973

**IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TOBRAMYCIN**

SHINZO MATSUURA, YU TANAKA and YASUO KAMEDA

Shionogi Research Laboratory, Shionogi &amp; Co., Ltd.

The therapeutic activities of tobramycin (TOB) in comparison with gentamicin (GM) or dideoxy-kanamycin B (DKB) were studied in mice infected with various bacterial strains.

These three antibiotics were equally effective against *Staphylococci*, *Klebsiella*, *Escherichia* and *Proteus* infections, whereas less active against *Streptococci* or *Diplococci* infection.

With several *Pseudomonas* infections, however, TOB was significantly more active than DKB and GM. TOB and DKB were effective against one of the GM-resistant *Pseudomonas* strain.

Effect of TOB against experimental *Pseudomonas* infection was affected by the number of infected cells and the administration time of the drug, and especially the administration before infection lost its activity strikingly.