

## 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析

## 4. 緑膿菌に対する T-1220 の効果

渡辺泰雄・西野武志・中沢昭三

京都薬科大学微生物学教室

H. EAGLE<sup>1)~5)</sup>らは細菌感染症に対する薬剤の投与方法に関して1940~1950年代にかけて一連の報告を行なっている。すなわちβ-溶血性連鎖球菌、肺炎球菌などのグラム陽性球菌感染症に対する Penicillin G の治療効果は、薬剤の有効濃度の総維持時間によって大きく左右されることや薬剤だけでなく宿主側の要因も無視できないことをあげている。わが国においても真下<sup>6)</sup>、島田<sup>7)</sup>らが、若干の考察を行なっているように薬剤の投与方法に関する問題は、今後重要な検討課題になりつつある。

ところで私共は前報<sup>8)</sup>において T-1220 はマウス実験的感染症に対して1回投与よりも頻回分割投与した方がその治療効果は良好であると報告した。

そこで今回 T-1220 の投与方法についてさらに詳細に検討するために近年問題となっている緑膿菌感染症を対象に Carbenicillin (CBPC) を比較薬剤として2, 3の基礎的検討を行なったので報告する。

## I. 実験材料および実験方法

## 1. 使用菌株および薬剤

菌株として臨床分離株 *Pseudomonas aeruginosa* E-2 を用いた。薬剤としては力価の明らかな T-1220 および Carbenicillin (CBPC) を用いて検討を行なった。

2. *in vitro* における殺菌作用

Tryptosoya Broth (TSB: 日水) に前培養した *Ps. aeruginosa* E-2 を Heart Infusion Broth (HIB: 日水) に移植し、対数増殖期に達するまで37°Cで振とう培養を行なった。この菌液に所定濃度になる様に薬剤を添加し以後経時的に生菌数測定を行なった。

3. *in vitro* における再増殖実験

*Ps. aeruginosa* E-2 を HIB で対数増殖期まで培養し、T-1220 (50μg/ml⇐8 MIC) および CBPC (50μg/ml⇐1 MIC) を添加した。1時間および3時間後に遠心で薬剤を除去し、新しい HIB に再懸濁させ経時的に生菌数測定を行なった。

## 4. 使用動物

ddY 系雄性マウス、体重16~18gのものを用いた。感染治療実験には1群10匹、腹腔内感染菌数の測定および体内濃度の測定には1群3匹とした。

## 5. マウス感染治療実験

2/3濃度の TSB に前培養した *Ps. aeruginosa* E-2 を同 TSB で10<sup>-1</sup>に希釈し、37°Cで2時間振とう培養を行なった。この菌液を生理食塩水で10<sup>-5</sup>に希釈後、4% Gastric mucin (Wilson) と等量混合し、その0.5mlをマウス腹腔内に接種した。薬剤による治療は感染2時間後を第1回とし、マウス背部皮下に投与した。ED<sub>50</sub>は5日目のマウス生存数から VAN DER WAERDEN 法により算出した。なお頻回投与の場合の ED<sub>50</sub> は総投与量で表わした。

## 6. マウス体液内濃度の測定

T-1220, CBPC 各1.25mg および2.5mgを感染マウスに背部皮下投与した。以後経時的にエーテル麻酔下で鎖骨下静脈より採血し、遠心により血漿を分離した。またその際1/15M PBS (pH 7.0) 25mlをマウス腹腔内に注入し、十分洗滌後その洗滌液を採取した。

T-1220 は *Micrococcus luteus* ATCC 9341, CBPC は、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするペーパーディスク法で測定した。なお腹水中濃度は洗滌液1ml当たりで表示した。

## 7. マウス腹腔内菌数の測定

感染マウス腹腔内に1/15M PBS 2.5mlを注入し、十分洗滌後その洗滌液の生菌数を測定した。なお、腹腔内菌数は洗滌液1ml当たりで表示した。

## II. 実験結果

1. *in vitro* における殺菌効果

T-1220, CBPC の抗菌作用を Fig. 1 および Fig. 2 に示す。

菌量が10<sup>4</sup> cells/mlの時 T-1220, CBPC は6.25μg/ml および50μg/ml以上で殺菌的に作用した。

2. *in vitro* における薬剤処理菌の再増殖性

T-1220, CBPC で処理された菌の薬剤除去後の増殖態度を Fig. 3 および Fig. 4 に示す。

T-1220 および CBPC で処理された菌は、いずれも薬剤除去後正常菌とほとんど変わらない速度で分裂再増殖を開始することがわかった。

3. *in vivo* における薬剤処理菌の再増殖性

Fig. 1 Effect of T-1220 on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2

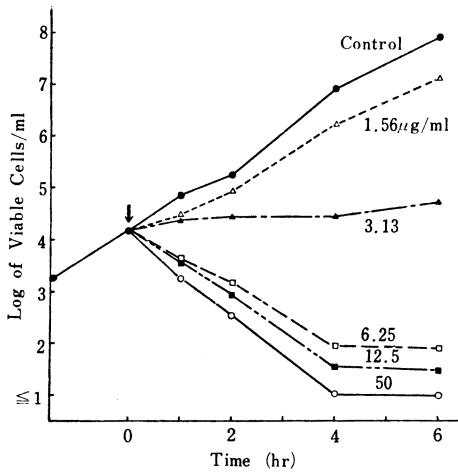


Fig. 3 Behavior *in vitro* of *Ps. aeruginosa* E-2 previously exposed to T-1220

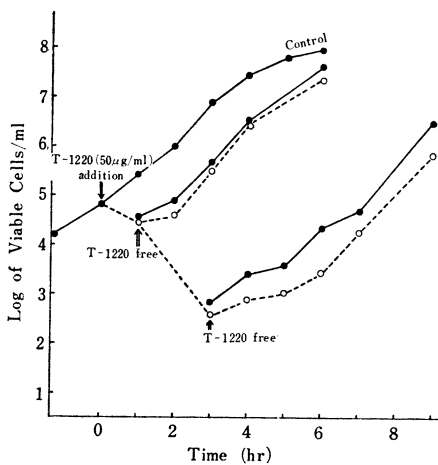


Fig. 5 Behavior in peritoneal cavity of *Ps. aeruginosa* E-2 previously exposed to T-1220 and CBPC *in vitro*

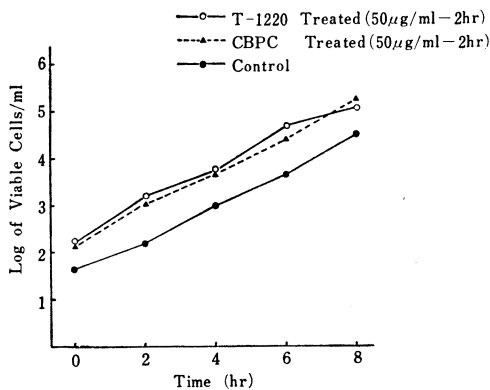


Fig. 2 Effect of CBPC on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2

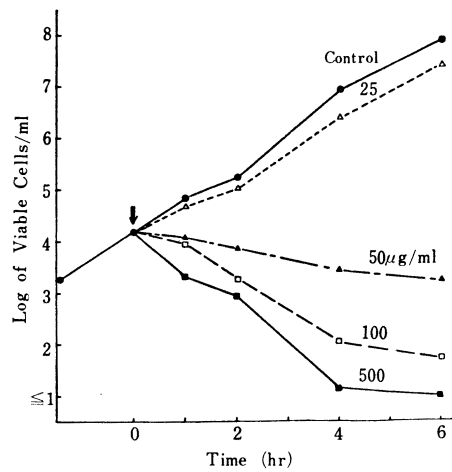
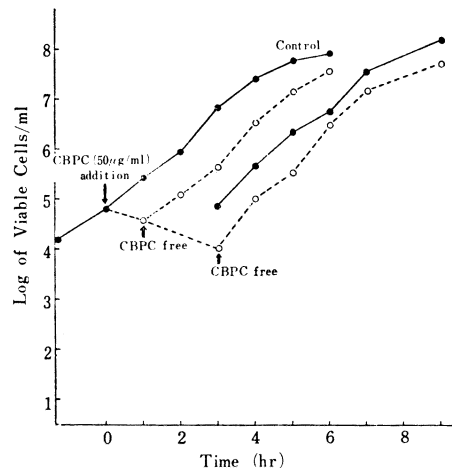


Fig. 4 Behavior *in vitro* of *Ps. aeruginosa* E-2 previously exposed to CBPC



あらかじめ *in vitro* において、T-1220 および CBPC (各  $50\mu\text{g/ml}$ ) で 2 時間処理された菌をマウス腹腔内に接種し、経時的に生菌数を測定した。その結果を Fig. 5 に示す。

*in vitro* の場合と同様 T-1220 および CBPC で処理された菌は正常菌と変わらない増殖態度を示した。

#### 4. マウス感染治療成績

T-1220, CBPC の治療成績を、投与間隔と投与回数を組合せて比較検討した。その結果を Table 1 および Table 2 に示す。

T-1220 の  $\text{ED}_{50}$  は①の場合、1回投与で  $4.35\text{mg/mouse}$ 、1時間間隔 2 回投与で  $0.72\text{mg/mouse}$ 、1時間間隔 4 回投与で  $0.31\text{mg/mouse}$ 、さらに 1 時間間隔 6 回投与で  $0.21$

Table 1 Effect of frequency of administration on the therapeutic efficacy of T-1220 in an infection with *Ps. aeruginosa* E-2 in mice

Interval between injection (hr)	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)					
	1 inject.	2 inject.	3 inject.	4 inject.	5 inject.	6 inject.
	① 4.35 ② 11.5 ③ 14.2	—	—	—	—	—
1	—	① 0.72	② 1.02	① 0.31		① 0.21
2	—	③ 7.07	① 0.82 ② 1.58 ③ 4.73	② 1.50		
3	—	① 0.82	② 4.46			

Inoculum size ①  $2.8 \times 10^2$  cells/mouse (45LD<sub>50</sub>)  
 ②  $1.0 \times 10^3$  cells/mouse (160LD<sub>50</sub>)  
 ③  $1.2 \times 10^3$  cells/mouse (360LD<sub>50</sub>)

Table 2 Effect of frequency of administration on the therapeutic efficacy of CBPC in an infection with *Ps. aeruginosa* E-2 in mice

Interval between injection (hr)	ED <sub>50</sub> (mg/mouse)					
	1 inject.	2 inject.	3 inject.	4 inject.	5 inject.	6 inject.
	① 7.58 ② 6.60 ③ 13.2	—	—	—	—	—
1	—	① 5.00		① 4.35		① 2.16
2	—	② 5.74 ③ 12.3	① 3.26 ② 4.35 ③ 10.3	② 4.50		
3	—	① 6.42	② 5.25			

Inoculum size ①  $2.8 \times 10^2$  cells/mouse (45LD<sub>50</sub>)  
 ②  $1.0 \times 10^3$  cells/mouse (160LD<sub>50</sub>)  
 ③  $1.2 \times 10^3$  cells/mouse (360LD<sub>50</sub>)

mg/mouse であった。すなわち、投与回数をふやした方が総投与量は減少し、治療効果は良くなる傾向が認められた。この傾向は他の組合せにおいても同様であった。

いっぽう CBPC では①の場合のように、1回投与で7.58 mg/mouse 1時間間隔2回投与で5.00mg/mouse、1時間間隔4回投与で4.35mg/mouse、さらに1時間間隔6回

Fig. 6 Concentration of T-1220 and CBPC in blood and peritoneal fluid after subcutaneous injection in mice

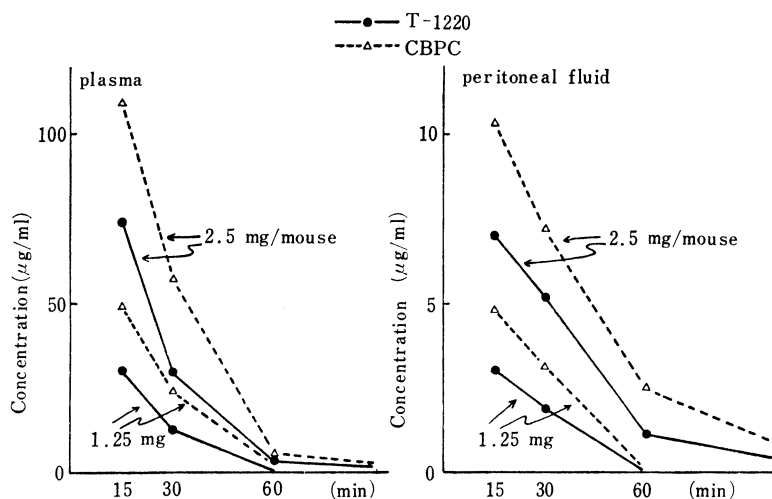
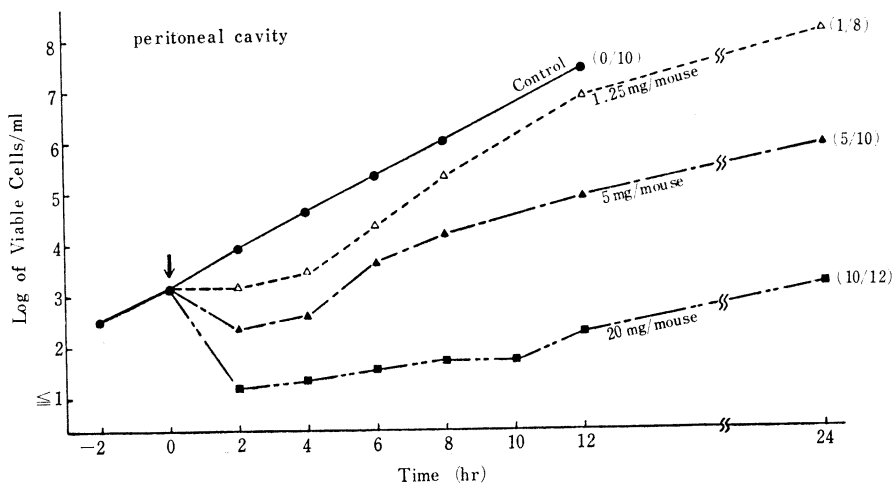


Fig. 7 Bactericidal activity of T-1220 after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2



投与で 2.16mg/mouse となり投与回数をふやしても T-1220 にくらべ総投与量はさほど減少しなかった。また投与間隔は両剤とも 1 時間から 3 時間の範囲では ED<sub>50</sub> に大きな影響を与えなかった。

##### 5. マウス体液内濃度

T-1220, CBPC を感染マウスに背部皮下投与した際の血中および腹水中濃度を Fig. 6 に示す。

T-1220 は CBPC にくらべ血中、腹水中ともに最高濃度は低く、持続時間も短いことがわかった。

##### 6. マウス腹腔内感染菌数の変化

T-1220, CBPC を感染マウスに背部皮下投与した際の

腹腔内菌数の変化を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。カッコ内は 5 日後の生存数 (生存匹数/使用匹数) を表わす。

T-1220 の場合、1.25mg 投与群では投与 4 時間後まで菌の増殖は抑制された。5 mg, 20mg 投与群ではそれぞれいったん減少した後、2 時間および 10 時間程度の lag が認められた。この時 control は 12 時間後 10<sup>7</sup> cells/ml に達し全例死亡した。いっぽう CBPC の場合 1.25mg 投与群では control と同様な速度で増殖した。しかし、5mg 投与群では 2 時間、20mg 投与群では T-1220 より短い 4 時間程度の lag が認められた。この lag は両剤とも投与量に比例しているようであった。また、Fig 7, 8 の

Fig. 8 Bactericidal activity of CBPC after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

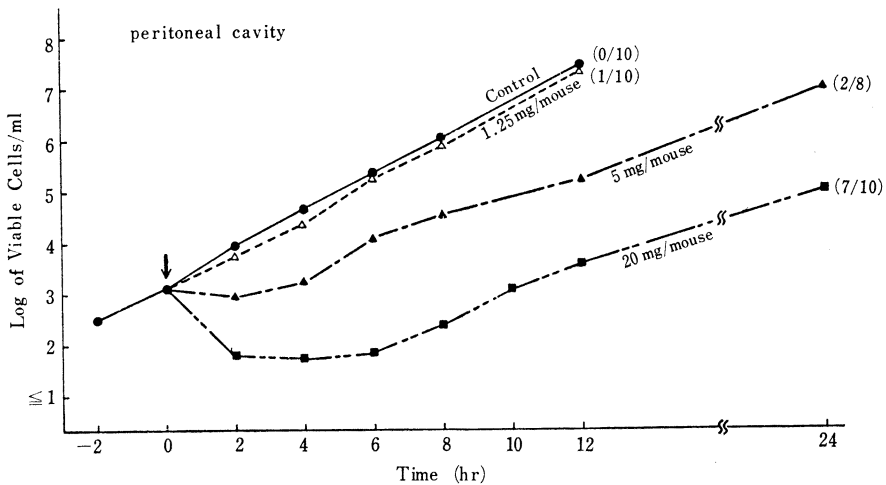
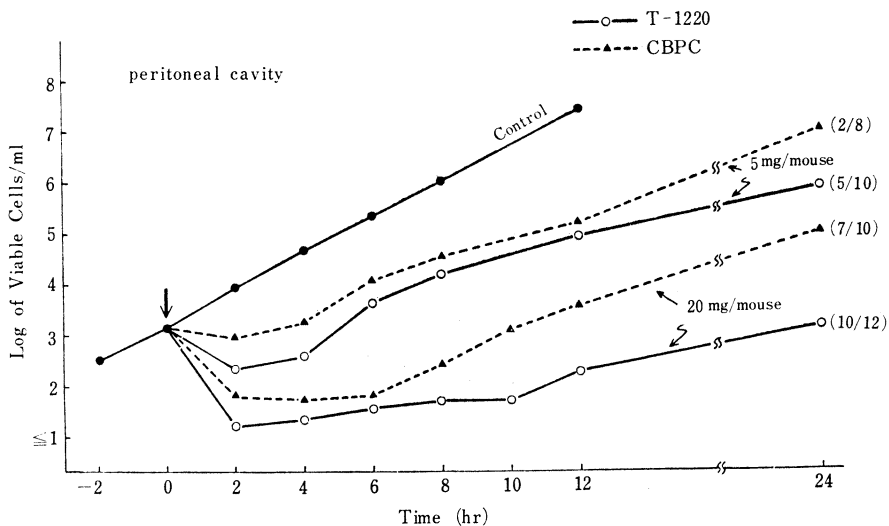


Fig. 9 Bactericidal activity of T-1220 and CBPC after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2



結果をまとめた Fig. 9 から明らかなように T-1220 投与群ではその血中濃度は低く、持続時間も短いにもかかわらず、CBPC より菌の減少率は大きく、その lag も長かった。

次に、T-1220 あるいは CBPC 1.25mg を 1 回、1 時間間隔で 3 回および 6 回、対照として 7.5mg を 1 回投与した際の腹腔内菌数の変化を Fig. 10, 11 に示す。

T-1220 投与群では 1.25mg の投与回数をふやした方が菌の減少率は大きく、lag も長くなる傾向がみられた。また 1.25mg 6 回投与群と 7.5mg 1 回投与群では明らか

に 6 回投与群の方が菌の増殖は抑制されていた。いっぽう CBPC においても T-1220 と同様の傾向がみられた。また Fig. 10, 11 をまとめた Fig. 12 では 1 回投与と同様 T-1220 投与群の方が CBPC よりも菌の減少率は大きく、lag も長いことがわかった。なおこれらの実験より、マウスは 12 時間位までに腹腔内菌数が  $10^5 \sim 10^6$  cells/ml 以下であれば生存する可能性が大であるように思われた。

### III. 総括ならびに考察

T-1220 の投与方法について、CBPC を対照として 2,

Fig. 10 Bactericidal activity of T-1220 after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

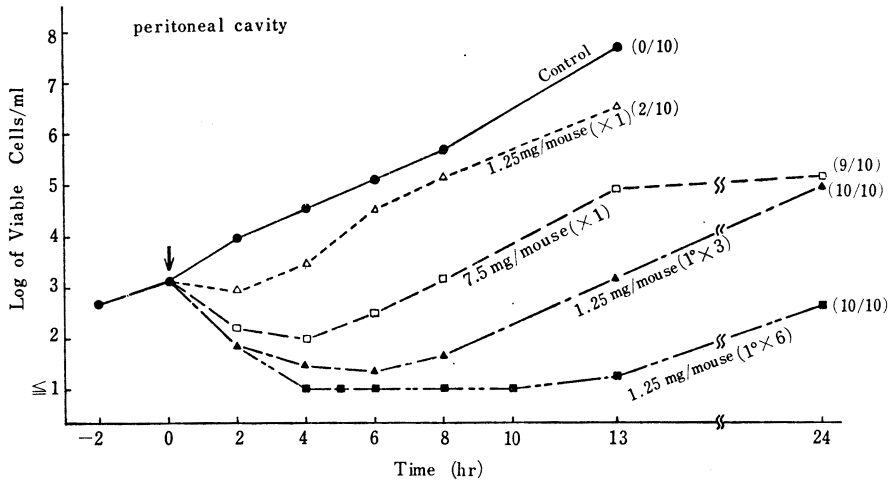
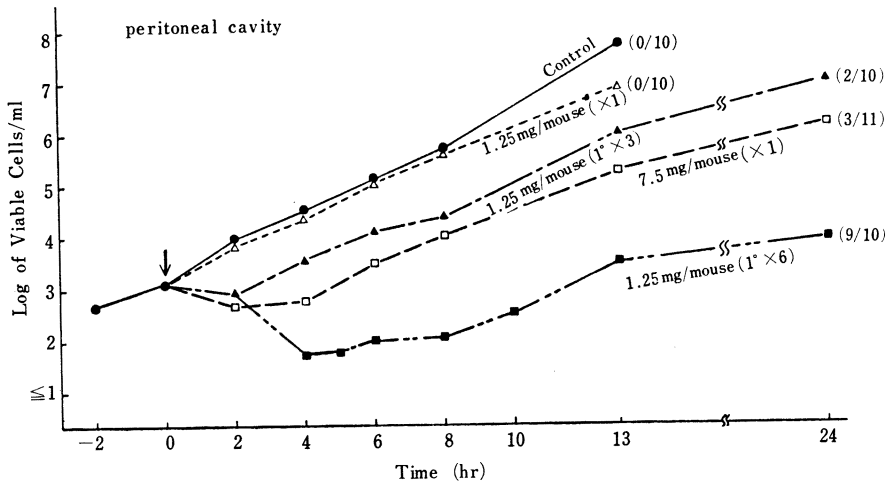


Fig. 11 Bactericidal activity of CBPC after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

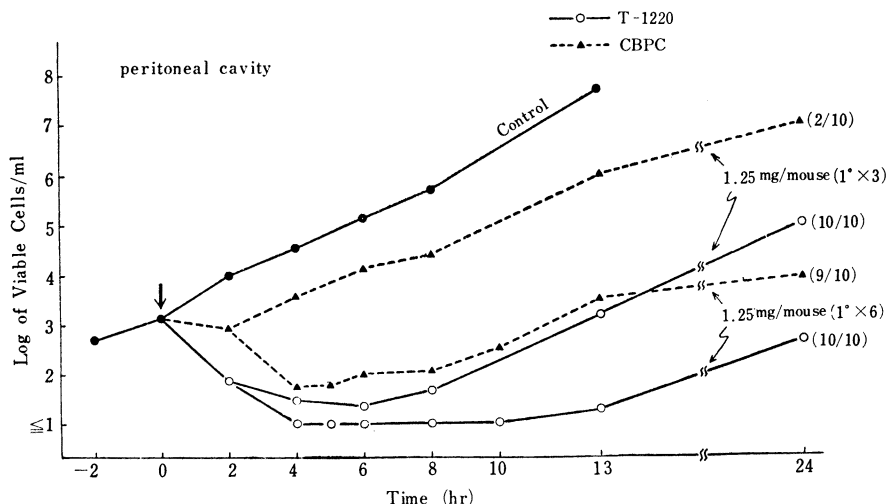


3の基礎的検討を加えた。本剤の *in vitro* における抗菌作用は  $10^4$  cells/ml の菌量の時 CBPC と同様殺菌的であった。また薬剤処理された菌は薬剤除去後直ちに正常菌と同様の速度で再増殖を始め、*in vivo* においても同様な結果が得られた。これは H. EAGLE<sup>3)</sup> が述べた「抗菌剤に1時間から1.5時間さらされた障害菌は抗菌剤のない培地に移されても3時間ほど増殖しない。また正常動物に接種されても6時間はさらに減少傾向をたどる」という結果と一致しなかった。これは H. EAGLE が用いたグラム陽性球菌と私共の用いた緑膿菌との菌種の違いが

原因と考えられる。

投与回数と投与間隔の関係を調べてみると本剤は1回投与よりも頻回投与した方が薬剤の総投与量は減少する傾向が認められた。しかし分割すればするほど良くなるわけではなく、1時間間隔4回および6回投与した場合それぞれの  $ED_{50}$  は 0.31mg/mouse, 0.21mg/mouse であること、また2時間間隔3回および4回投与した場合それぞれ 1.58mg/mouse, 1.50mg/mouse であることから、その治療効果に頭打ちの傾向が認められた。いっぽう CBPC においても頻回投与した方が若干治療効果が良

Fig. 12 Bactericidal activity of T-1220 and CBPC after subcutaneous administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2



くなくなったがその傾向は T-1220 のように顕著ではなかった。また両剤とも 1 時間から 3 時間の投与間隔ではその ED<sub>50</sub> に大きく影響を与えなかったが、治療期間を一定とした場合、1 時間間隔の方が 3 時間間隔より治療効果は若干良好であった。すなわち T-1220 の場合、1 時間間隔 4 回投与で 0.31mg/mouse, 3 時間間隔 2 回投与で 0.82 mg/mouse であった。また CBPC の場合、1 時間間隔 4 回投与で 4.35mg/mouse, 3 時間間隔 2 回投与で 6.42mg/mouse であった。これは H. EAGLE<sup>5)</sup> が述べた「治療期間を一定とした場合、投与回数をふやすほど治療に要する総投与量は減少する」と一致するように思われる。

次に *in vivo* での T-1220, CBPC の作用をより明確にするためマウス体液内濃度および腹腔内感染菌数の変化を検討した。T-1220, CBPC を 1.25mg, 5mg および 20mg 投与した際の腹腔内菌数の変化は短時間では極めて *in vitro* の殺菌曲線に類似していたが薬剤が体内から消失したと思われる時間になっても再増殖せず投与量に比例した lag が認められた。この lag が何に起因するのか今回のデータでははっきりしないが、*in vivo* においては *in vitro* で考えられるより強い殺菌効果が表われるようで興味深い。

このような投与量による腹腔内菌数変化は薬剤濃度に依存するのがあるいは薬剤の作用時間に依存するのかを検討するため本剤 1.25mg を 1 回、1 時間間隔 3 回および 6 回投与、また対照として 7.5mg を 1 回投与した時の菌数の動きについて調べた。その結果 1.25mg 3 回および 6 回投与する方が 7.5mg 1 回投与するより菌数の

減少率は大きく lag も長かった。また CBPC においても同様の傾向がみられた。これは明らかに薬剤濃度よりも最小有効濃度が維持された時間がより重要な役割を演じていることを意味し、両剤ともその傾向は本質的に同じものと考えられる。しかし、本剤は CBPC にくらべ血中、腹水中とも最高濃度は低く持続時間も短いにもかかわらず、いずれの投与量においても菌数の減少率および lag の長さは大であった。このようなことから考えて最小有効濃度は、あくまでも *in vitro* の抗菌力が生体内において大きく反映するものと思われる。従って、本剤は CBPC より *in vitro* の抗菌力がすぐれているので分割投与によって容易に最小有効濃度以上の持続時間をかせぐことが可能である。いっぽう CBPC は分割すれば最高濃度のピークは低下しその分だけ最小有効濃度以上の持続時間が短くなり、頻回分割投与の効果は出にくくなるものと思われる。

以上述べたごとく、本剤の治療効果を大きく左右するのは最小有効濃度の総維持時間であり本剤の薬効を実際の臨床の場合において最大限に発揮させるためには、1 回に大量投与するよりも頻回あるいは点滴静注のような有効濃度を持続させる投与方法が望ましいものと思われる。

#### 結 論

緑膿菌感染症を対象に T-1220 を使用する際の適切な投与方法について、対照薬剤として CBPC を用いて検討を行なった。

1) T-1220 および CBPC によって障害を受けた緑膿菌は薬剤を除去すると *in vitro* および *in vivo* において

直ちに分裂再増殖した。

2) T-1220は1回投与よりも頻回投与の方がCBPCよりも薬剤の総投与量は減少する傾向が認められた。

3) *in vivo* における両剤の最小有効濃度は *in vitro* のそれと本質的にはほぼ同じであると思われた。

4) 両剤の治療効果を左右する要因は、有効濃度の総維持時間であることがわかった。

5) 治療期間を一定とした場合、投与回数をふやす程治療に要する総投与量は減少した。

#### 文 献

- 1) EAGLE, H., & A. D. MUSSELMAN: The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J. Exper. Med.* 88: 99~131, 1948
- 2) EAGLE, H. & A. D. MUSSELMAN: The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bact.* 58: 475~490, 1949
- 3) EAGLE, H.; R. FLEISCHMAN & A. D. MUSSELMAN:

The bactericidal action of penicillin *in vivo*; the participation of the host and the slow recovery of the surviving organisms. *Ann. Intern. Med.* 33: 544~571, 1950

- 4) EAGLE H., R. FLEISCHMAN & A. D. MUSSELMAN: Effect of schedule administration on the therapeutic efficacy of penicillin. Importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *Am. J. Med.* 9: 280~299, 1950
- 5) EAGLE H., R. FLEISCHMAN & M. LEVY: Continuous "vs Discontinuous" therapy with penicillin the effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *New Eng. J. Med.* 248:481~488, 1953
- 6) 真下啓明: 抗生剤大量投与の適応と限界。ファルマシア10: 271~273, 1974
- 7) 島田 馨: Cephalothin 大量療法の適応と限界。最新医学29: 867~887, 1974
- 8) 西野武志, 大槻雅子, 渡辺泰雄, 戸田正人, 中沢昭三: T-1220 に関する細菌学的研究。Chemo-therapy 25(5): 731~746, 1977

## EXPERIMENTAL STUDIES ON ADMINISTRATION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

### 4. EFFECT OF T-1220 AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

YASUO WATANABE, TAKESHI NISHINO and SHOZO NAKAZAWA  
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy, Kyoto

Studies on the appropriate administration method of T-1220 against infectious diseases by *Pseudomonas* as the object, were carried out employing CBPC as the control drug.

1) *Pseudomonas* injured by T-1220 and CBPC disintegrated and reproduced *in vitro* and *in vivo* immediately, if the drug were removed.

2) It was demonstrated that total amount of administration of T-1220 was smaller than that of CBPC when T-1220 were administered by the method of multiple injection than by single administration.

3) The minimal effective concentrations of both drugs *in vivo* seemed to be almost essentially same to that *in vitro*.

4) The factors influencing the effect of treatment of both drugs were found to be total maintaining hours of the effective concentration *in vivo*.

5) When the duration of treatment were set to certain days, the more the times of administration increase the total administration dose required to the treatment decreased.