

化学療法剤の投与方法に関する実験的解析 5 緑膿菌に対する KW-1062 の効果

皆川 治重・西野 武志・中沢 昭三

京都薬科大学微生物学教室

感染症に対する化学療法において、使用薬剤の投与方法に関する問題は治療効果を左右する重要な要因の一つである。

H. EAGLE^ら¹⁻⁵⁾ は β -溶血連鎖球菌、肺炎球菌などのグラム陽性菌感染症に対する Penicillin G (以下 PCG と略す) の治療効果を投与方法の面から検討し、PCG の治療効果は感染巣部位における有効薬剤濃度の総維持時間に左右されること、また薬剤の直接効果のみならず宿主側の要因にも影響を受けることなどを示唆した。

KW-1062 はグラム陽性菌、グラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有するアミノ配糖体抗生物質であるが、今回は近年細菌感染症の分野で問題視されているグラム陰性桿菌感染症とくに緑膿菌感染症に対する治療効果を投与方法の面から検討し H. EAGLE 説との比較を行った。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株：臨床分離緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* E-2 株を用いた。KW-1062 に対する感受性は $3.12\mu\text{g/ml}$ (MIC) であった。

2. 使用薬剤：KW-1062 sulfate ($598\mu\text{g}$ (力価)/mg, 協和醸酵) を用いた。

3. 使用動物：生後 4 週齢の ddY 系雄性マウス、16~18g を 1 群 5 匹として用いた。

4. *In vitro* における抗菌作用および薬剤除去後の再増殖：Heart infusion broth (HIB: ニュスイ) に 37°C 、一夜培養菌液を新鮮同培地に 1:10 の割合で加え、 37°C で 2 時間振盪培養した。この対数増殖期菌液に KW-1062 の各濃度を添加し、以後経時的に寒天平板法により生菌数を測定した。

KW-1062 処理菌の再増殖実験における薬剤除去は、菌体を洗浄希釈し、残存薬剤の影響がないことを確認のうえ行なった。

5. 感染治療実験

(1) 感染方法：HIB, 37°C 、一夜培養菌液を新鮮同培地に 1:10 の割合で加え、 37°C 2 時間振盪培養した。この対数増殖期菌液 (約 2×10^8 cells/ml) を滅菌生理食塩水で 10^{-5} 希釈し、4% Gastric mucin (NBC) と等量混合し、0.5 ml/mouse 腹腔内接種した。

(2) 薬剤投与方法：滅菌蒸留水で目的に応じた濃度の

KW-1062 溶液を調製した。1 回の注射容量はすべて 0.2 ml/mouse とし、皮下注射で行なった。なお薬剤の投与は感染 2 時間後より開始した。

(3) 治療効果の判定：感染治療 7 日間経過後のマウスの生存率を求め VAN DER WAERDEN 法により ED_{50} (mg/mouse) を算出した。

6. 血中薬剤濃度の測定：薬剤投与 1/4, 1/2, 1, 2, 4 時間後に 1 群 3 匹のマウス腋動脈より血液を採取し、血漿を調製した。

検体中薬剤濃度測定は、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 の spore を用いる paper disc 法によった。標準曲線は対照マウスの血漿を用いて作成した。

7. 腹腔および血中生菌数の測定：感染治療実験と同一実験条件下におけるマウスより経時的に腹水洗浄液および血液を採取し、10 倍希釈系列による混釈培養法で生菌数を測定した。

腹腔内における生菌数の測定は、滅菌生理食塩水 2.5 ml を腹腔に注入し、腹部をマッサージ後、開腹して採取した腹水洗浄液を検体として測定した。

II. 実験結果

1. *In vitro* における抗菌作用

本実験に使用した臨床分離株 *Ps. aeruginosa* E-2 に

Fig.1 Bactericidal activity of KW-1062 against *Ps. aeruginosa* E-2

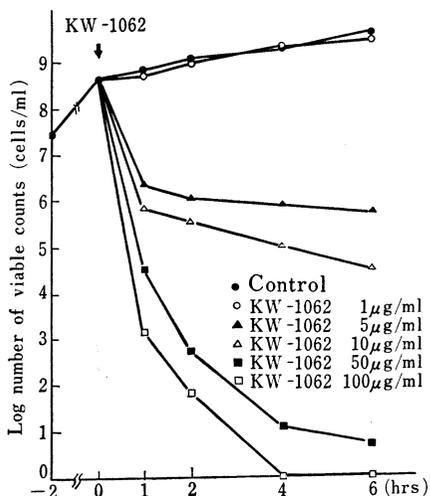


Fig.2 Regrowth curve of *Ps. aeruginosa* E-2 treated with KW-1062

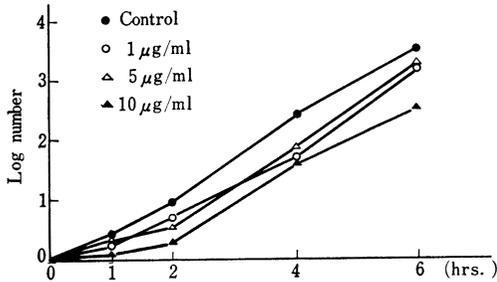
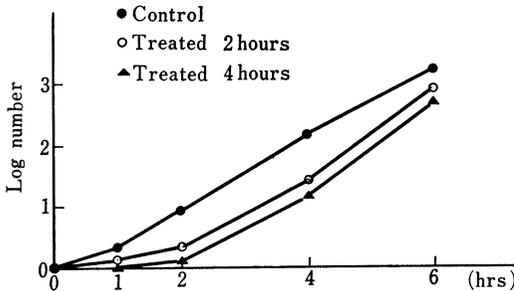


Fig.3 Regrowth curve of *Ps. aeruginosa* E-2 treated with KW-1062



に対する KW-1062 の抗菌作用を Fig.1 に示した。

MIC (3.12 µg/ml) 以上の濃度を作用させた場合生菌数の急激な減少が見られ、その殺菌作用は薬剤濃度に依存していることがわかった。

2. *In vitro* における薬剤処理菌の再増殖

薬剤濃度 1, 5, 10 µg/ml で 2 時間処理した菌の薬剤除去後の再増殖を Fig.2, 薬剤濃度 10 µg/ml で 2 時間および 4 時間処理した菌の再増殖を Fig.3 に示した。

いずれの場合も薬剤除去後 start の生菌数を約 10^8 cells/ml にそろえ、0 時間の生菌数を基数 (1) とする対数表示で示した。

薬剤濃度、薬剤処理時間に応じて再増殖開始時間の遅れが見られるが、薬剤除去後約 2 時間経過後より処理菌は正常菌とはほぼ変らない速度で再増殖することが認められた。

3. 実験的緑膿菌感染症に対する治療効果

実験的緑膿菌感染症に対する KW-1062 の治療効果を投与回数、投与間隔を種々組み合わせて検討し、各条件下における治療効果 (薬剤総投与量に対する ED_{50}) を Table 1 に示した。

治療時間を 12 時間以内とした場合、薬剤総投与量が一定なら投与間隔が短い程、また投与回数が少ない程治療効果は高かった。

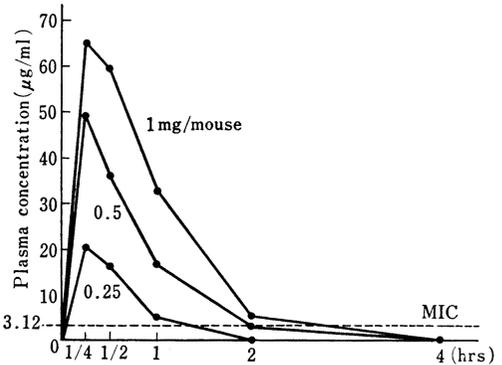
すなわち、同一薬剤量で治療した場合、分割投与より

Table 1 Effect of the schedule of administration on the therapeutic efficiency of KW-1062 in an infection with *Ps. aeruginosa* E-2 in mice

Interval	ED_{50} (mg/mouse) S.C.		
	×1	×2	×4
0 hr	0.35		
1		0.41	0.54
3		0.62	1.24
6		0.62	0.93

Infective inoculum : 4.25×10^2 /mouse i. p.
2% Mucin

Fig.4 Plasma concentration of KW-1062 in mice, administered S.C.



単投与で最も高い治療効果が得られた。

4. 血中薬剤濃度

薬剤を 0.25, 0.5, 1 mg/mouse 皮下投与した時の血漿中濃度の時間的推移を Fig.4 に示した。

単投与治療の場合、0.25 mg/mouse 以下で、マウスは全例死亡し、0.5 mg/mouse 以上で全例生存した。

薬剤を 0.25, 0.5, 1 mg/mouse 投与した場合の血漿中有効濃度維持時間は、それぞれ約 1.5, 2, 3 時間であった。

5. 腹腔および血中感染菌の消長

In vivo における治療効果をより詳細に理解するため、上記感染治療実験時の腹腔および血中感染菌の消長を検討した。

(1) 単投与 : 薬剤を 0.25, 1, 2 mg/mouse 皮下投与した場合の腹腔内感染菌の推移を Fig.5-a に、血中感染菌の推移を Fig.5-b に示した。

腹腔内生菌数は、control では感染 15 時間後まで増殖を続け約 10^8 オーダーに達し全例死亡した。0.25 mg/mouse 投与群では一端減少の後、ほぼ control と同じ速さで再増殖し全例死亡した。1, 2 mg/mouse 投与群では一端減少の後、ゆるやかに再増殖するが、やがて消失

Fig. 5-a Viable cell numbers in the peritoneal cavity of mice inoculated with *Ps. aeruginosa* E-2 after administration of KW-1062

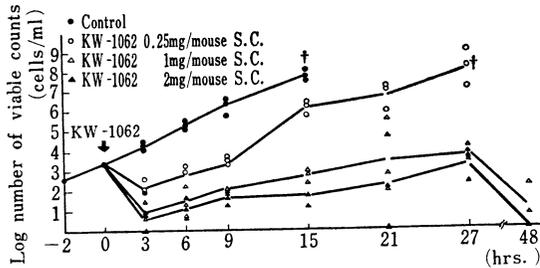
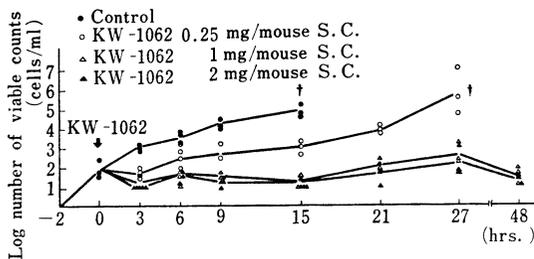


Fig. 5-b Viable cell numbers in blood of mice inoculated with *Ps. aeruginosa* E-2 after administration of KW-1062



の方向に向い、全例生存した。

血中内生菌数は、腹腔に比べ全体に $10^1 \sim 10^2$ cells/ml 低い値であるが、腹腔内とほぼ同じ消長パターンを示した。

(2) 分割投与との比較：薬剤を 0.125mg/mouse 3 時間間隔 4 回投与、総投与量でこれと同量になる 0.5 mg/mouse 1 回投与および 0.125mg/mouse 1 回投与した場合の腹腔内感染菌の推移を Fig. 6-a に、血中感染菌の推移を Fig. 6-b に示した。

腹腔内生菌数は、0.125 mg/mouse 1 回および 4 回投与群とも control に比べややゆるやかではあるが増殖を続け、全例死亡した。0.5 mg/mouse 投与群では一端減少の後、ゆるやかに再増殖するが、やがて消失の方向に向い全例生存した。

血中内生菌数もほぼ腹腔と同じ消長パターンを示した。

III. 考 察

化学療法における投与方法の問題について、1940 年代に H. EAGLE¹⁻⁵⁾ により PCG の有効な投与方法が証明されて以来、近年、五島⁶⁾、西浦⁷⁾、真下⁸⁾ らによってもその重要性が示唆されている。

筆者らは新しいアミノグリコシッド系抗生物質 KW-1062 につき、緑膿菌感染症に対する投与方法について若干の検討を行なった。

Fig. 6-a Viable cell numbers in the peritoneal cavity of mice with one or frequent administration of KW-1062

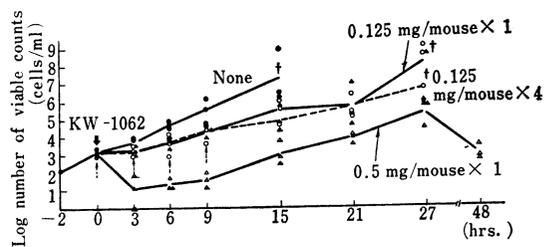
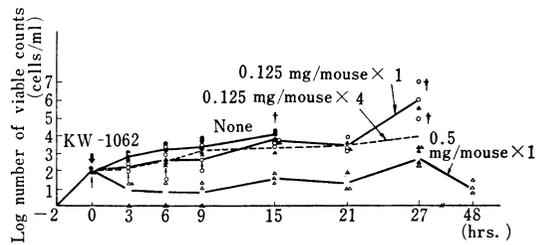


Fig. 6-b Viable cell numbers in blood of mice with one or frequent administration of KW-1062



KW-1062 の緑膿菌に対する *in vitro* の抗菌作用型式は、殺菌作用の発現時間、殺菌率とも濃度依存性が強く、また薬剤を作用させた菌を新しい培地に移した場合、薬剤濃度が高く、接触時間が長いほど、正常菌とほぼ同様の速度で再分裂増殖するまでに回復期間を要した。

蜂須賀⁹⁾、中沢¹⁰⁾ らは、緑膿菌に Sulbenicillin を作用させた場合、新しい培地に移せば速やかに再増殖することを認め、これらの薬剤が抗菌作用を示すには菌と接触しつづけることが必須条件であることを示唆しているが、KW-1062 では薬剤除去後も一定時間菌の再増殖を抑制することがわかった。これは、 β -lactam 系抗生物質と Aminoglycoside 系抗生物質の菌に対する作用機序の差異によるものと考えられた。

これらの結果から、KW-1062 の抗菌作用は、有効濃度以上であれば薬剤濃度を高くすればする程効果的であり、薬剤除去後も菌に対する効果は持続するものと推察された。

in vivo における治療効果は、治療時間を 12 時間以内とした場合、投与回数を減らす程、また投与間隔を短かくする程高い効果が得られた。

投与総量を同一にした場合、KW-1062 の血中薬剤濃度パターンから単投与より分割投与で有効濃度の総維持時間が長く保たれることは明白であり、単投与で治療効果が最も高い要因として血中薬剤濃度のピークの高さが考えられた。

これらの結果は、治療効果を左右する最大の要因は有効薬剤濃度の総維持時間であるとする H. EAGLE, 尾崎¹¹⁾, Y. BAN¹²⁾ らの β -lactam 系薬剤についての報告と相反するものであった。

in vivo における治療効果をさらに詳細に理解するため腹腔および血中における感染菌の消長を検討した結果、生存例では薬剤投与後一端減少した菌は、薬剤が血中より消失したと思われる時間以後も control に比べはるかに遅い再増殖過程をたどり、やがて減少の方向へ向かった。

in vitro の再増殖実験では、一定時間後 control とほぼ同じ速度で再増殖することから H. EAGLE ら³⁾ が指摘しているように抗菌剤の治療効果の発現には薬剤の直接作用のみでなく、それ以外の宿主側の何らかの要因もまた重要な役割を演じていることが考えられた。

以上述べてきたように、KW-1062 の緑膿菌感染症に対する治療効果を左右する主要因は、 β -lactam 系抗生物質でいわれているように体液中における有効薬剤濃度の総維持時間ではなく、薬剤濃度のピークの高さと考えられ、従って、分割投与よりも一過性の高い体液内濃度を得る単投与で最も良好な治療効果が期待できるものと考えられた。

IV. 結 論

緑膿菌感染症に対する KW-1062 の適切な投与方法について検討した。

1) KW-1062 の *in vitro* における抗菌作用型式は、殺菌作用の発現時間、殺菌率とも濃度依存性が強く、薬剤処理菌は一定の回復期間を要した後、control とほぼ同じ速さで再増殖した。

2) KW-1062 の *in vivo* における治療効果は、分割投与より、一過性の高い体液内濃度を得る単投与で最も優れていた。

3) 生体内感染菌の消長を検討した結果、治療効果の発現には宿主側の何らかの要因の関与が考えられた。

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 concentration against certain organisms. *J. Exp. Med.* 88: 99~131, 1948
- 2) EAGLE, H. & A. D. MUSSELMAN: The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J. Bacteriol.* 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 of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. *Ann. 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 Engl. J. Med.* 248: 481~488, 1953
- 6) 五島達智子: 抗菌薬の *in vivo* 評価。Chemotherapy 23(10): 3277~3285, 1975
- 7) 坂義人, 河田幸道, 西浦常雄: 化学療法剤の投与形式に関する考察。Chemotherapy 24(5): 1366~1367, 1976
- 8) 真下啓明: 抗生物質の大量投与の適応と限界。ファルマシア 10: 271~273, 1974
- 9) 蜂須賀養悦, 斎藤四郎, 鶴見鼎, 田中義, 中野健一郎, 川瀬泰弘, 柄久保邦夫: 映画撮影による緑膿菌のフィラメント型細胞に関する研究。日本細菌学雑誌 28: 339~342, 1973
- 10) 中沢昭三: 抗菌化学療法的作用機序。第19回日本医学会総会, 京都, 1975
- 11) 尾崎守, 西村欣也, 小林功二, 青葉誠二, 木村美司, 中村光男, 小林譲二, 板倉隆志, 加藤博: 注射用 Cephalosporin C 系抗生剤の殺菌効果について。第1報。Chemotherapy 23(10): 3179~3191, 1975
- 12) BAN, Y.; Y. SHIMIZU, Y. KAWADA & T. NISHIURA: Dosage schedule of antimicrobial agents. *Chemotherapy Vol. 5* (edited by J. D. Williams & A. M. Geddes, Plenum Press, New York & London) 271~276, 1976

EXPERIMENTAL STUDIES ON ADMINISTRATION OF
CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS 5
EFFECT OF KW-1062 AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

HARUSHIGE MINAGAWA, TAKESHI NISHINO and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

For the purpose to seek an optimal method for dosing KW-1062, a new aminoglycoside antibiotic, in the infection due to *Pseudomonas aeruginosa*, gram-negative rod bacteria, both *in vitro* and *in vivo* antibacterial actions of KW-1062 were examined, and the following items were clarified.

- 1) The time of onset of the bactericidal action and the bactericidal potency of KW-1062 depended on its concentration.
- 2) *Ps. aeruginosa* was damaged by KW-1062, however, it began to regrow, when the drug was free, as fast as intact cells after a lag time.
- 3) The maximal therapeutic efficacy of KW-1062 was obtained following its single administration.