

化学療法剤の投与方法に関する実験的解析

(8) 緑膿菌に対する AB-206 の効果

尾花芳樹・西野武志・故中沢昭三

京都薬科大学微生物学教室

感染症の化学療法において、薬剤の治療効果を最大限に発揮するためには、それら薬剤の適切な投与方法が問題となってくる。

H. EAGLE¹⁻⁵⁾はβ溶血性連鎖球菌、肺炎球菌などのグラム陽性球菌を用いて、Penicillin-G の治療効果を投与方法の面から検討し、Penicillin-G の治療効果は感染病巣部位における薬剤の有効濃度の総維持時間に左右され、さらに感染菌に対する薬剤の直接作用のみならず宿主側の感染防禦機構が大きく関与していることなどを示唆した。しかし、これらの研究は EAGLE 自身が指摘しているように、あくまで Penicillin-G をグラム陽性球菌感染症に対して使用する際の実験的考察を行なったものであり、感染菌種、使用薬剤が異なれば、当然個々の薬剤の至適投与方法も相当様相を異にしたものになると予想される。そこで、すでにわれわれ⁶⁻¹⁰⁾は、グラム陰性桿菌の緑膿菌や大腸菌を用いて、Sulbenicillin, T-1220 Gentamicin, Cephalothin などの代表的な化学療法剤の治療効果を投与方法の面から検討し、緑膿菌感染症では、Sulbenicillin, T-1220 の治療効果を左右する大きな要因は有効濃度の維持時間であり、Gentamicin のそれは有効濃度の高さであることを報告した。また、大腸菌感染症では、Sulbenicillin や Gentamicin の治療効果を左右する大きな要因は有効濃度の高さであり、Cephalothin のそれは有効濃度の持続時間であることを示した。

今回、われわれは住友化学工業株式会社で合成された新しい化学療法剤 AB-206 の投与方法について、比較薬剤として Pipemidic acid を用い、緑膿菌感染症を対象に実験的解析を試み、2, 3 の知見を得たので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 使用菌株および薬剤

菌株は臨床分離の緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* E-2 株を用い、薬剤は AB-206 および比較薬剤として Pipemidic acid (PPA) のいずれも力価の明らかなものを用いた。

2. *In vitro* における抗菌作用

Tryptosoya broth (TSB: ニッスイ) で前培養した菌を Heart infusion broth (HIB: ニッスイ) に移し、振とう培養を行なった。対数増殖期中期に達した菌液を

HIB で希釈し、おおよそ 10^7 cells/ml および 10^5 cells/ml に調製後、所定の濃度になるように薬剤を添加し、経時的に生菌数を測定した。

3. *In vitro* における再増殖に関する実験

上記のように対数増殖期まで培養した菌液を HIB で希釈し、おおよそ 10^7 cells/ml に調製後、薬剤を添加した。薬剤添加後 1, 2, 4 時間目に菌液をサンプリングし、M/15-リン酸緩衝液で遠心洗浄を2回繰り返した。このようにして薬剤を除去した菌を新鮮 HIB に再懸濁させ、培養を続け、以後経時的に生菌数測定を行なった。

4. マウス実験の緑膿菌感染症に対する治療効果

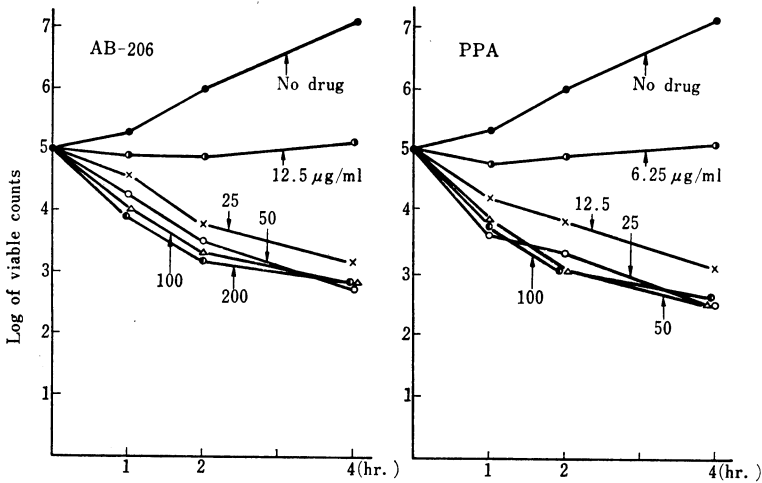
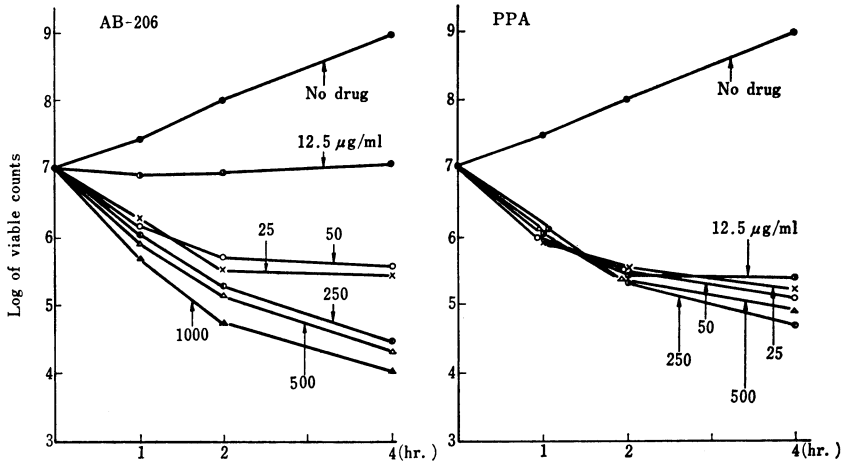
2/3 濃度の TSB で前培養した菌を同培地に 10% の割合で加え、1.5 時間振とう培養し、同培地で 10^{-5} 希釈後、6% Gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) と等量混合した。この菌の 55 LD₅₀ を 1 群 10 匹の ddY 系マウス (17~18g) の腹腔内に接種して、感染 2 時間後に 1 回、0.5% CMC に懸濁させた薬剤を経口投与した。また頻回投与の場合は、感染 2 時間後の投与を第 1 回として、以後 2 時間間隔で投与を行なった。その後 7 日間生死の観察を行ない、生残率を求め、LITCHFIELD-WILCOXON 法によって、ED₅₀ 値を算出した。なお、頻回投与の場合の ED₅₀ は投与総量で表わした。

5. マウス体液内濃度の測定

上記と同様の方法により緑膿菌で感染させたマウスに薬剤を経口投与し、投与 15~240 分経過後、1 群 3 匹のマウスから血漿および腹水を採取した。血漿は腋動脈より採取した血液を遠心操作することによって分離した。また、腹水は血液採取後開腹し、直接 paper disc を浸すことによって調製した。これらの方法によって採取した検体中の薬剤濃度を、検定菌として *Escherichia coli* Kp 株を用いた薄層 paper disc 法によって測定した。

6. マウス腹腔内生菌数の測定

緑膿菌感染マウスに薬剤を経口投与して、経時的に 1 群 3 匹のマウスの腹腔内に生理食塩水 (2.5ml) を注入し、腹腔内の菌を浮遊させ、この浮遊菌液を回収し、生菌数測定を行なった。

Fig.1 Effect of AB-206 and PPA on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2Fig.2 Effect of AB-206 and PPA on the viability of *Ps. aeruginosa* E-2

II. 実験結果

1. *In vitro* における抗菌作用

AB-206 および PPA の *in vitro* 抗菌作用の結果は Fig.1, 2 に示すとおりである。すなわち Fig.1 は薬剤作用時の菌量が 10^5 cells/ml の場合であり, Fig.2 は 10^7 cells/ml の場合である。いずれの場合も最小発育阻止濃度 (MIC) の 1/2 量以上で殺菌作用が認められたが, あまり dose response があるとはいえないようである。なお, それぞれの薬剤の MIC は AB-206 が 50 µg/ml, PPA が 25 µg/ml であった。

2. *In vitro* における再増殖に関する実験

薬剤除去後の菌の再増殖に関する実験結果は Fig.3, 4 に示すとおりである。すなわち, AB-206 および PPA を作用させ, 1, 2, 4 時間目に薬剤を遠心除去し, 菌を新鮮培地に再懸濁させ, 経時的に生菌数の変動を調べた。その結果, 両薬剤ともに2時間以上の処理を受けて

いた生残菌は再増殖するまでに 1~2 時間の lag が認められたが, 1 時間しか処理を受けていない生残菌は無処理菌とほとんど変わらない速さで分裂再増殖することが認められた。

3. マウス実験の緑膿菌感染症に対する治療効果

実験の緑膿菌感染症に対する治療効果を, 単投与と頻回投与について検討した結果を Table 1 に示す。なお, 頻回投与の ED_{50} 値は投与総量で示してある。AB-206 の治療効果 (ED_{50}) は単投与が 1.77 mg/mouse, 2 回投与が 2.08 mg/mouse, 3 回投与が 1.58 mg/mouse であり, 一方, PPA の治療効果は単投与が 2.89 mg/mouse, 2 回投与が 2.50 mg/mouse, 3 回投与が 3.20 mg/mouse であった。両薬剤とも投与回数によって治療効果はさほど影響されなかった。また, AB-206 は *in vitro* 抗菌力では PPA よりも劣るが, *in vivo* 抗菌力は PPA よりもすぐれていた。

Fig.3 Behavior *in vitro* of *Ps.aeruginosa* E-2 previously exposed to AB-206

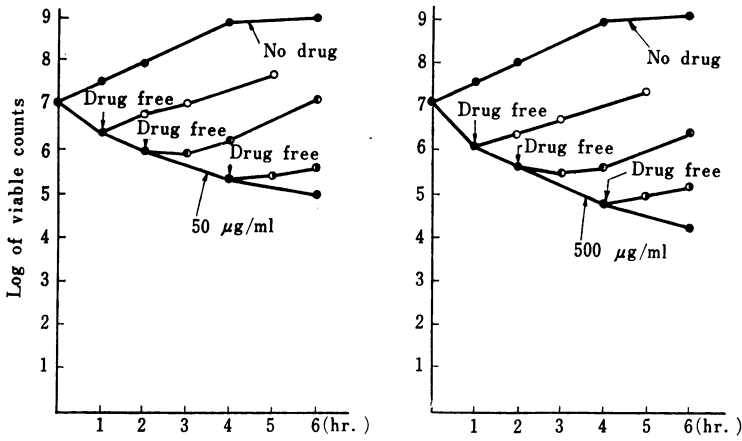


Fig.4 Behavior *in vitro* of *Ps.aeruginosa* E-2 previously exposed to PPA

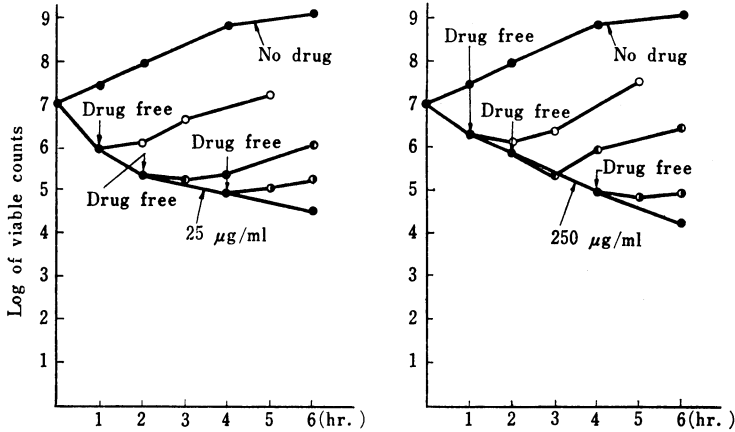


Table 1 Protective effect with AB-206 and PPA for experimental *Ps.aeruginosa* E-2 infection in mice

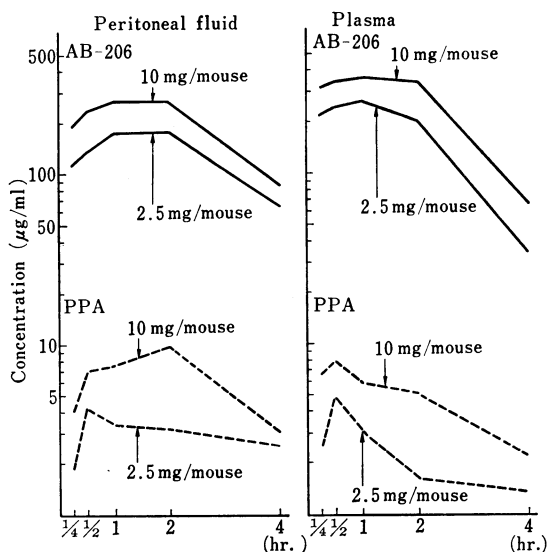
Drug	Challenge dose		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Administration		ED ₅₀ * (mg/mouse)
	cells/mouse	LD ₅₀		Times	Time (After infections)	
AB-206	5.0 × 10 ²	55	50	1	2 (hr.)	1.77 (1.75~1.80)
				2	2, 4 (hr.)	2.08 (1.33~3.24)
				3	2, 4, 6 (hr.)	1.58 (0.96~2.59)
PPA	5.0 × 10 ²	55	25	1	2 (hr.)	2.89 (1.85~4.51)
				2	2, 4 (hr.)	2.50 (1.40~4.48)
				3	2, 4, 6 (hr.)	3.20 (2.24~4.58)

* LITCHFIELD-WILCOXON method

4. マウス体液内濃度の測定

各薬剤 2.5 mg/mouse および 10 mg/mouse を経口投与した時の血漿中および腹水中濃度を測定した結果を Fig.5 に示す。血漿中濃度では、AB-206 の場合、10 mg 投与群では 15 分後に約 320 $\mu\text{g/ml}$ 、60 分後に 360 $\mu\text{g/ml}$ のピークに達し、120 分まで同レベルを維持し、240 分後でも 65 $\mu\text{g/ml}$ を示した。2.5 mg 投与群では 15 分後に 215 $\mu\text{g/ml}$ 、60 分後に 260 $\mu\text{g/ml}$ のピークに達し、120 分後に 200 $\mu\text{g/ml}$ 、240 分後に 34 $\mu\text{g/ml}$ を示した。PPA の場合、10 mg 投与群では 30 分後に 7.8 $\mu\text{g/ml}$ のピークに達し、120 分後に 5.3 $\mu\text{g/ml}$ を示したが、240 分後にはほとんど検出できなかった。また、2.5 mg 投与群では 30 分後に 4.8 $\mu\text{g/ml}$ を示したが、120 分後ではほとんど測定することができなかった。このように AB-206 の血漿中濃度は PPA のそれに比べて約 50 倍高い値を示し、さらに持続的であった。腹水中濃度では、AB-206 の場合、10 mg 投与群では 15~120 分後まで 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高値を示し、ピークは 60 分後の 270 $\mu\text{g/ml}$ であり、240 分後でも 87 $\mu\text{g/ml}$ を示した。2.5 mg 投与群では、60~120 分後に 180 $\mu\text{g/ml}$ のピークに達し、240 分後でも 65 $\mu\text{g/ml}$ を示した。PPA の場合、10 mg 投与群では、120 分後に 9.8 $\mu\text{g/ml}$ のピーク値を示し、2.5 mg 投与群では 30 分後に 4.2 $\mu\text{g/ml}$ のピーク値を示した。このように AB-206 の腹水中濃度は PPA のそれに比べて約 30~40 倍高い値を示した。そしてこれらの吸収排泄パターンは血漿

Fig.5 Concentration of AB-206 and PPA in peritoneal fluid and plasma after oral administration in mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2 (— : AB-206, ---- : PPA)



中濃度パターンとよく一致していた。

5. マウス腹腔内生菌数の測定

緑膿菌感染マウスに薬剤を経口投与し、以後の腹腔内菌数の消長を測定した結果を、Fig.6~9 に示してある。また図中の () 内は 7 日後の生残率 (生残匹数/実験匹数) を表わしている。Fig.6 は AB-206 の 0.625, 2.5, 10 mg/mouse をそれぞれ単投与したときの結果である。0.625 mg 投与群では無処置群とほぼ同じ増殖が認められた。2.5, 10 mg 投与群では、投与後菌数の減少が認められ、9 時間の lag を経て、緩やかな速さで増殖を開始したが、90% 以上が生残した。Fig.7 は AB-206 の投与総量 (2.5 mg/mouse) を一定にして、1 時間間隔で分割投与したときの結果である。1 回投与と 2 回、4 回、6 回に分割した頻回投与の間に差がほとんど認められなかった。すなわち、いずれの場合も投与後菌数の減少が見られ、9 時間の lag があり、それ以後は徐々に菌数の増加が見られたが 70% 以上のマウスが生残した。Fig.8 は PPA の 0.625, 2.5, 10 mg/mouse をそれぞれ単投与したときの結果である。0.625 mg 投与群では無処置群とほぼ同じ増殖が認められ、20 時間後には全例死亡した。2.5, 10 mg 投与群では投与後菌数の減少が認められたが、2.5 mg で 4 時間後に、10 mg では 9~12 時間後に再増殖を開始し、2.5 mg では半数のマウスが死亡した。Fig.9 は PPA の投与総量 (2.5 mg/mouse) を一定にして、1 時間間隔で分割投与したときの結果である。1 回、2 回分割では投与後、わずかな菌数の減少を認めたが、4 回、6 回分割では横這状態が続き、4~6 時間の lag を経て、いずれも再増殖を開始し、40~50% が生残したのに過ぎなかった。このように AB-206 の場合と同様、PPA でも 1 回投与と頻回投与でその治療効果および殺菌性に差が認められなかった。以上の結果より単投与において同一投与量で比較すると、AB-206 は PPA よりも *in vivo* 抗菌力が強く、殺菌性および再増殖抑制にすぐれていることが解った。また、両薬剤とも単投与と頻回投与で、その腹腔内生菌数の減少率 (殺菌性) および再増殖抑制時間にほとんど差が認められなかった。そして単投与と頻回投与で、その治療効果に大きな差が見られないのは、このことが影響しているものと考えられる。

III. 総括および考察

緑膿菌感染症を対象に新合成化学療法剤 AB-206 の投与方法に関する実験的解析について Pipemidic acid (PPA) を比較薬剤として検討を加えた。まず、*in vitro* における抗菌作用では、薬剤作用時の菌量が小さい場合、大きい場合ともに、両薬剤は殺菌的に作用したが、あまり dose response はなかった。次に *in vitro* における再

Fig. 6 Bactericidal activity of AB-206 after oral administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

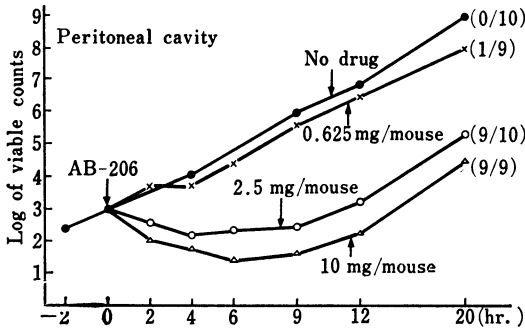


Fig. 7 Bactericidal activity of AB-206 after oral administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

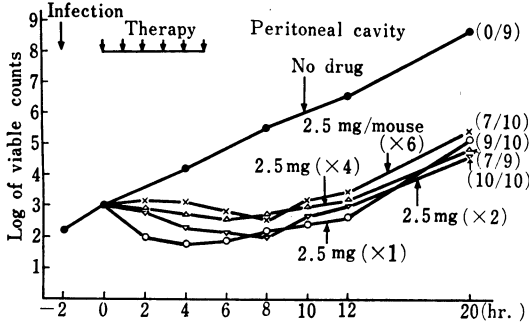


Fig. 8 Bactericidal activity of PPA after oral administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2

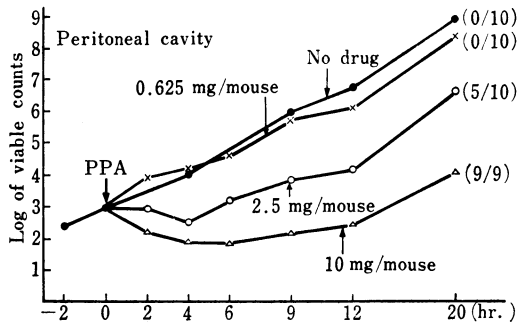
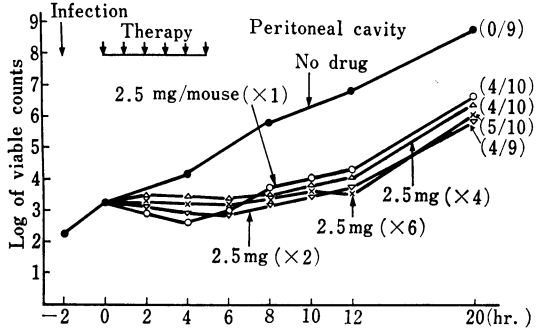


Fig. 9 Bactericidal activity of PPA after oral administration to mice infected with *Ps. aeruginosa* E-2



増殖に関する実験では両薬剤ともに1時間の処理を受けていた生残菌は薬剤除去によって無処理菌とほとんど変わらない速さで分裂再増殖した。また、2時間以上の処理を受けていた生残菌は再増殖までに1~2時間のlagが認められた。これらの結果は、すでにわれわれ^(9),7),10),11)が報告している緑膿菌に対するペニシリン系抗生物質 (Sulbenicillin, Carbenicillin, T-1220, Ticarcillin) の場合と若干異っている。すなわち、ペニシリン系抗生物質の処理を受けた緑膿菌は薬剤除去後、ただちに分裂再増殖した。このような差異はそれぞれの薬剤の作用機作の違いによって生ずるものと考えている。マウス実験的緑膿菌感染症に対する治療効果では、単投与の場合、最小発育阻止濃度 (MIC) が1管悪いにもかかわらず、AB-206 の治療効果は PPA よりもすぐれていた。また2時間間隔の頻回投与では、両薬剤ともに投与回数を増しても治療効果にほとんど影響が認められなかった。これらの結果は、すでにわれわれ^(9),10),12)が報告した緑膿菌に対するアミノ配糖体抗生物質 (Gentamicin, KW-1062) の場合と類似している。すなわち、アミノ配糖体抗生物質のように殺菌性の強い薬剤の治療効果は頻回投与より

も、むしろ単投与の方が良いという報告である。マウス体内濃度の測定を血漿および腹水液について検討した結果、血漿中および腹水液中濃度ともに AB-206 の方が PPA よりも数十倍高い値を示し、さらに両薬剤ともに持続的であった。このように AB-206 の方が PPA よりも体内への移行が良好なために、よい治療効果が得られるものと考えている。また、EAGLE らは“治療効果を上げるためには有効濃度の総維持時間が重要である”と述べているが、両薬剤ともに持続的であるために、治療効果に対する頻回投与の影響が小さいものと考えられる。さらにこれら感染治療実験時のマウス腹腔内生菌数を測定した結果、AB-206, PPA の 0.625, 2.5, 10 mg/mouse をそれぞれ単投与した場合、2.5 mg 以上の投与量において菌数の減少と再増殖までに lag が認められ、また薬剤が体内から消失したと思われる時期になっても増殖は抑制されていた。このことは *in vitro* における再増殖実験で認められた、薬剤による damage の強さや、宿主側の防禦機構が総合的に働いて発現されるものと思われる。さらに、腹腔内菌数の消長が、薬剤濃度の高さに依存するのか、薬剤の作用時間に依存するのかを検討

するために、AB-206, PPA の投与総量(2.5 mg/mouse)を一定にし、1時間間隔で2回、4回、6回に分割投与したときの生菌数の変動を調べた。その結果、両薬剤とも菌数の減少率や lag の長さは投与回数の影響をあまり受けないことが認められた。これらのことより、AB-206 PPA などの薬剤の治療効果を左右する大きな要因は、有効濃度の総維持時間(頻回投与)よりも有効濃度の高さであると思われる。

以上の結果より、AB-206 の治療効果を最大限に発揮するためには、本物質の体内濃度をより高くするような投与量および投与方法が重要であると考えられる。そのため、臨床においては、毒性を十分考慮した上で、本物質の大量を one shot するような投与方法が効果的であると思われる。

IV. 結 論

緑膿菌感染症に対する新合成化学療法剤 AB-206 の投与方法について、比較薬剤として Pipemidic acid (PPA) を用いて実験的解析を試みた。

1. AB-206, PPA の作用を受けた緑膿菌はその作用時間に応じた再増殖抑制が認められた。
2. AB-206, PPA ともに頻回投与により治療効果(ED_{50} 値)は良くなり、単投与とほとんど差が認められなかった。
3. AB-206, PPA の治療効果を左右する大きな要因は有効濃度の総維持時間よりも有効濃度の高さであることがわかった。

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. 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. FLEISHMAN & 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. FLEISHMAN & A. D. MUSSELMAN : Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. Importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. Ann. J. Med., 9 : 280~299, 1950
- 5) EAGLE, H. ; R. FLEISHMAN & M. LEVY : Continuous "vs Discontinuous" therapy with penicillin the effect of the interval between injection on therapeutic efficacy. New Engle. J. Med., 248 : 481~488, 1953
- 6) 岩日明幸, 中沢昭三 : 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析, (1) 緑膿菌に対する Sulbenicillin の効果。Chemotherapy 26 : 337~344, 1978
- 7) 渡辺泰雄, 西野武志, 中沢昭三 : 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。Chemotherapy 25 : 747~754, 1977
- 8) 佐藤 清, 中沢昭三 : 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析, (2) 緑膿菌に対する Gentamicin の効果。Chomotherapy 25 : 616, 1977
- 9) 三和秀明, 平井芳美, 大槻雅子, 中沢昭三 : 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析, (3) 大腸菌に対する Cephalothin の効果。Chemotherapy 25 : 616~617, 1977
- 10) 西野武志 : 化学療法剤の投与方法に関する基礎的研究。最新医学 32 : 1491~1496, 1977
- 11) 尾花芳樹, 西野武志, 故中沢昭三 : 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析, (6) 緑膿菌に対する Ticarcillin の効果。Chemotherapy 25 : 2422~2427, 1977
- 12) 皆川治重, 西野武志, 中沢昭三 : 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。Chemotherapy 25 : 1839~1843, 1977

EXPERIMENTAL STUDIES ON ADMINISTRATION OF
CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

8. EFFECT OF AB-206 AGAINST
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

YOSHIKI OBANA, TAKESHI NISHINO and SHOZO NAKAZAWA
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The most effective administration of a new chemotherapeutic agents, AB-206, has been studied in the experimental mice infection with *Pseudomonas aeruginosa*.

1) *Pseudomonas aeruginosa* damaged by AB-206 or pipemidic acid (PPA), when the drug was free, began regrowth after a lag time *in vitro*.

2) The therapeutic efficacy of AB-206 or PPA on multiple administration was as effective as its single administration.

3) An important factor to decide the therapeutic efficacy of AB-206 and PPA was the high drug concentration in plasma and peritoneal fluid.