

化学療法剤の投与方法に関する実験的解析

9. 大腸菌ならびに肺炎桿菌に対する CS-1170 の効果

宇津井 幸男・西野武志・故中沢昭三
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は治療効果を左右する重要な要因の一つと考えられる。かつて H. EAGLE らは^{1,2,3,4}, β -溶血性連鎖球菌, 肺炎球菌などのグラム陽性菌感染症に対する Penicillin G の投与方法について検討し, その治療効果は①感染病巣部位における薬剤の有効濃度の維持時間に左右される。②薬剤の感染菌に対する直接殺菌作用のみならず宿主側の防禦能も重要な役割を演じていると示唆している。近年開発し実用化された各種化学療法剤の投与方法に関しては真下⁵, 島田⁶らが若干の報告をしており, また私どもの教室でも大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性桿菌感染症を対象に Cephalothin, Sulbencillin, Gentamicin などの各種化学療法剤の投与方法について詳細に検討し報告してきた。そこで今回, 三共株式会社で開発された新しい cephamycin 系の抗生物質 CS-1170 について, マウスにおける大腸菌感染症ならびに肺炎桿菌感染症を対象に投与方法に関する実験的解析を試み, 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 *Escherichia coli* ST-0198 株と *Klebsiella pneumoniae* 株を用いた。薬剤は力価の明らかな CS-1170 と比較薬剤として Cefazolin (CEZ) を用いた。

2. *in vitro* における殺菌作用

Tryptosoy Broth (TSB: Nissan) で 37°C 20 時間前培養した *E. coli* ST-0198 および *Klebsiella pneumoniae* を Heart Infusion Broth (HIB: Nissan) に移植し 37°C で振とう培養を行った。約 2 時間後の対数増殖期に CS-1170 または CEZ を 1/2, 1, 5, 10 MIC となるように添加し, さらに振とう培養を続け 1, 2, 4 時間後の生菌数を測定した。

3. *in vitro* における再増殖実験

TSB で 37°C 20 時間前培養した *E. coli* ST-0198 ならびに *Klebsiella pneumoniae* を HIB で対数増殖期まで培養し, これに CS-1170 または CEZ を 1 MIC および 10 MIC となるように添加した。薬剤添加後さらに振とう培養を続け 1, 2, 4 時間目に遠心洗浄により薬剤を除去し, おのおのを等量の HIB に再浮遊した後さらに振とう

培養を行い経時的に生菌数を測定した。

4. 使用動物

ddY 系の雄マウスで体重 19~21g のものを用いた。感染治療実験には 1 群 10 匹, 体内液濃度および腹腔内菌数の実験には 1 群 3 匹とした。

5. マウス感染治療実験

E. coli ST-0198 は TSB で 20 時間前培養しこれを HIB にて 10^8 希釈後, 6% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) と等量混合しマウスあたり 2.7×10^8 cells を腹腔内に接種した。*Klebsiella pneumoniae* は Nutrient Broth (NB: Nissan) で 24 時間前々培養し, さらに NB で 20 時間前培養後生理食塩水にて 10^4 希釈し, この菌液を 6% gastric mucin と等量混合しマウスあたり 5×10^8 cells を腹腔内に接種した。治療は感染 2 時間後を 1 回目とし, 分割投与の場合には以後 1 時間間隔で皮下に投与した。ED₅₀ 値は 7 日目の生存率から算出した。分割投与の場合には総投与量で表わした。

6. マウス体内液濃度の測定

5. と同様の方法により *Klebsiella pneumoniae* を感染させたマウスに対し, 2 時間後に CS-1170 または CEZ を 0.25mg および 1mg 皮下投与した。薬剤投与後 15, 30, 60, 90, 120 分目に麻酔下に心臓穿刺により血液を採取し, 遠心で血漿を分離した。腹水は直接 paper disc にしみこませた。このようにして調製した検体は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする paper disc 法によりその濃度を測定した。

7. マウス腹腔内生菌数の測定

感染マウスの腹腔内へ菌数測定時に生理食塩水を 2.5 ml 注入し, 腹腔内の菌を均等に浮遊させて回収した後, 各時点における生菌数の測定を行った。

II. 実験結果

1. *in vitro* における殺菌効果

E. coli ST-0198 に対する CS-1170 と CEZ の殺菌効果を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。CS-1170 は 1/2 MIC 以上で薬剤濃度に応じた殺菌作用を示し, CEZ の場合 5 MIC および 10 MIC では CS-1170 と同程度の著明な殺菌作用を示したが 1/2 MIC および 1 MIC では若干劣った殺菌作用が認められた。また *Klebsiella pneumoniae* に対

する殺菌効果は Fig. 3 および Fig. 4 に示すように CS-1170 は 1/2 MIC 以上で濃度に応じた殺菌作用を示した

が、CEZ は 1/2 MIC では静菌的な作用しか示さず 1 MIC 以上で濃度に応じた殺菌作用を示した。

Fig. 1 Effect of CS-1170 on viability of *E. coli* ST-0198

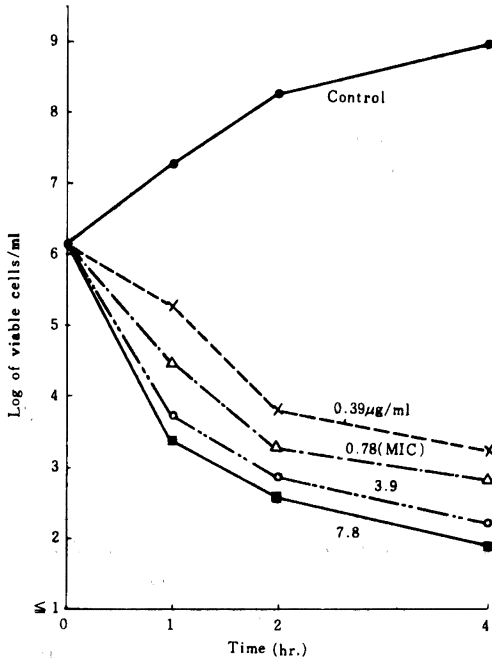


Fig. 2 Effect of CEZ on viability of *E. coli* ST-0198

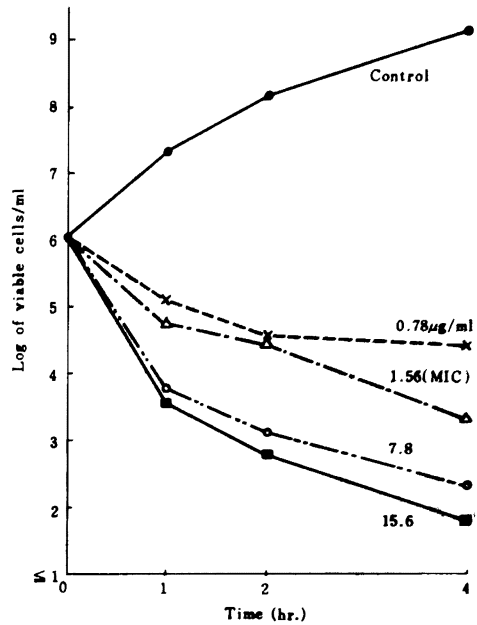


Fig. 3 Effect of CS-1170 on viability of *K. pneumoniae*

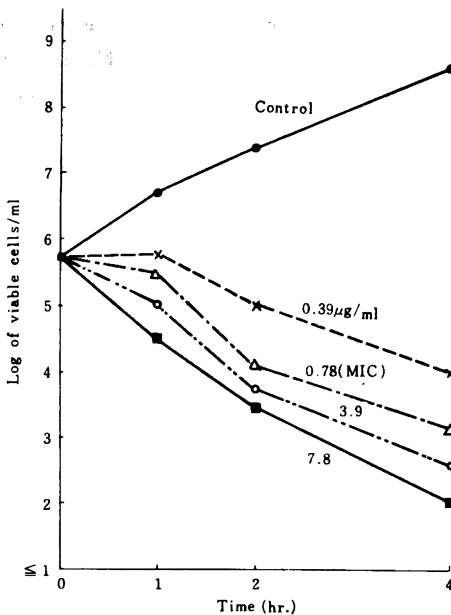
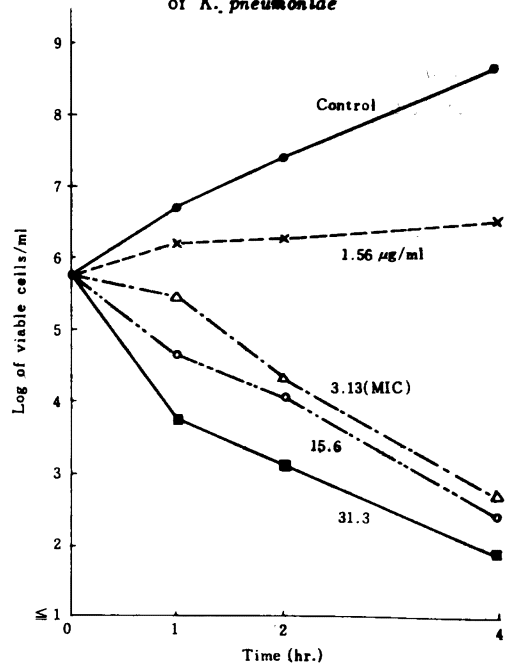


Fig. 4 Effect of CEZ on viability of *K. pneumoniae*



2. *in vitro* における薬剤処理菌の再増殖

E. coli ST-0198にCS-1170またはCEZをおおの1 MICおよび10MIC添加し、一定時間経過後薬剤を除去した場合の再増殖の結果を Fig. 5 および Fig. 6 に示した。1 MIC添加ではCEZに比べCS-1170のほうが1, 2, 4時間後の菌数の減少は大きく、10 MIC添加で

は両薬剤ともにはほぼ同程度の減少となった。しかし薬剤を除去すると、CS-1170の1 MIC処理菌はただちに増殖を開始し、10 MIC処理菌は1時間程度の lag が認められ、以後 control と同じぐらいの速度で増殖した。一方、CEZの1 MIC処理菌は薬剤除去後、おおむね1時間程度の lag が認められ以後の増殖もややゆるやかであっ

Fig. 5 Behavior *in vitro* of *E. coli* ST-0198 previously exposed to CS-1170

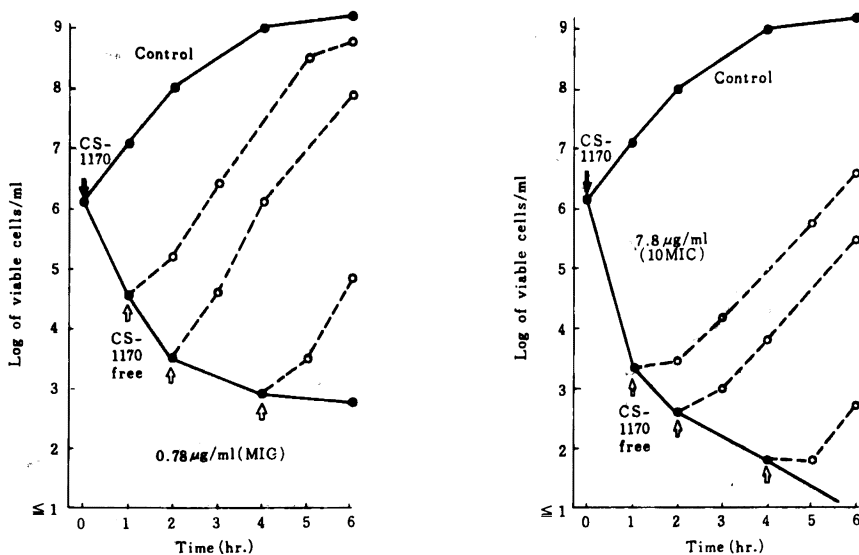
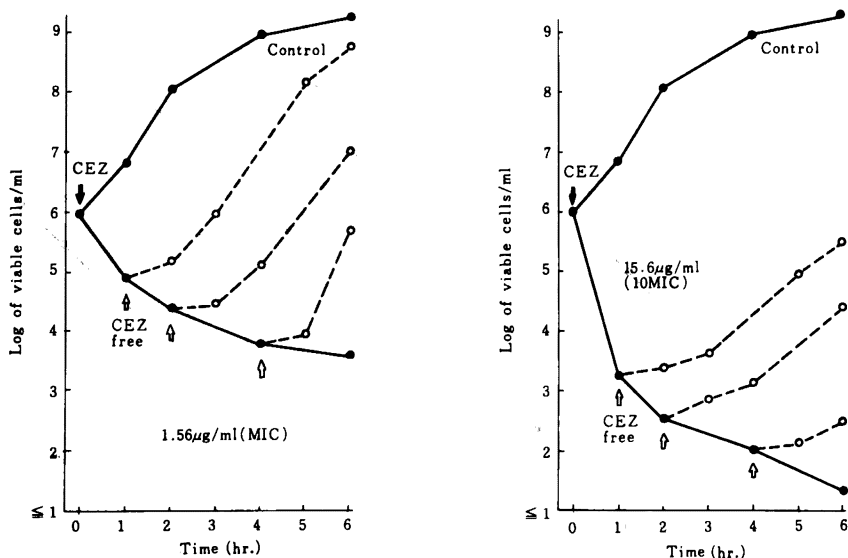


Fig. 6 Behavior *in vitro* of *E. coli* ST-0198 previously exposed to CEZ



た。また *Klebsiella pneumoniae* に対する再増殖の結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示した。1 MIC 添加では CS-1170, CEZ とともに菌数の減少はほぼ同じ程度であるが、10MIC 添加ではことに短時間においては CEZ のほうが減少は大きかった。CS-1170 の 1 MIC および 10 MIC

1 時間処理菌は薬剤除去後ただちに control と同じぐらいの速度で増殖するが、2 時間および 4 時間処理菌は薬剤除去後 1 時間程度はややゆるやかに増殖し以後 control と同じぐらいの速度で増殖した。一方、CEZ の場合には 1 MIC 1 時間処理菌の場合を除き、薬剤除去後おおむね

Fig. 7 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* previously exposed to CS-1170

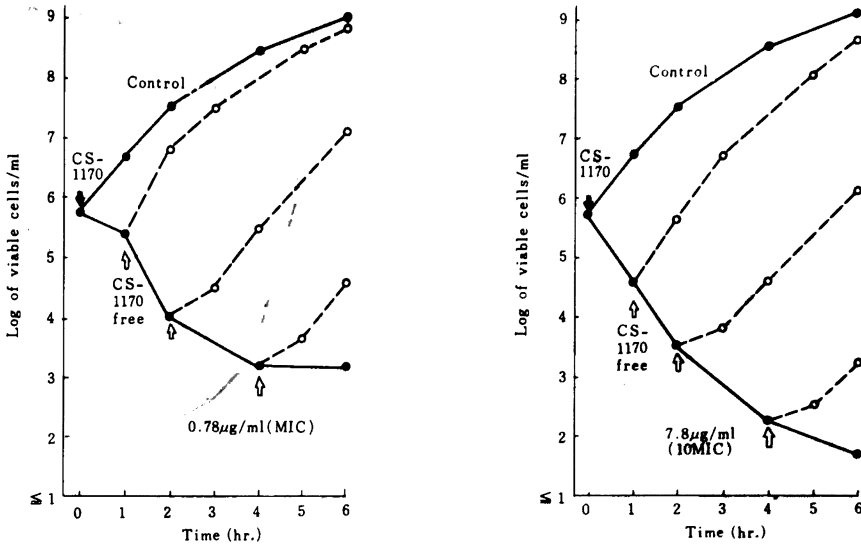
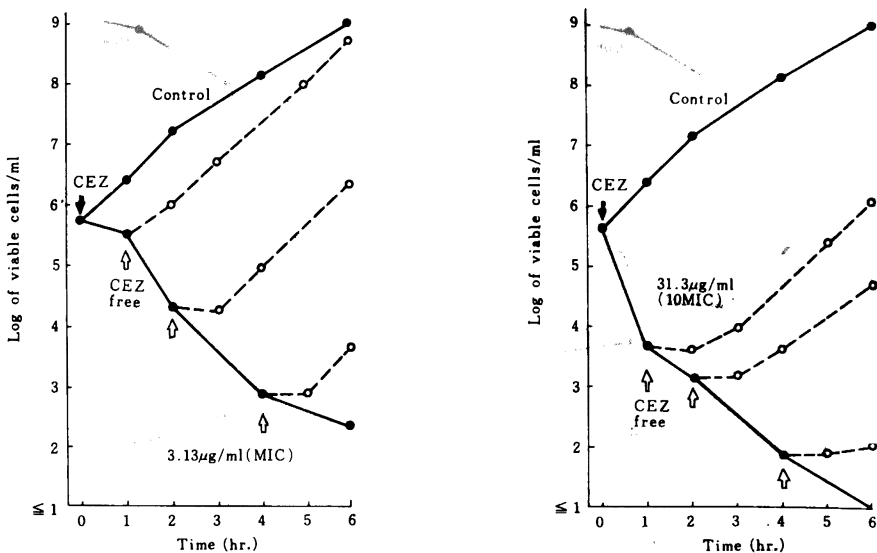


Fig. 8 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* previously exposed to CEZ



1時間程度のlagが認められ、以後はcontrolとほぼ同じぐらいの速度で増殖した。以上のようにCS-1170は処理時間が長いほど薬剤除去後の再増殖はゆるやかであったが、CEZでは処理時間による再増殖の差はほとんど認められなかった。

3. マウス感染実験における治療効果

E. coli ST-0198 感染症に対する治療効果について検討した結果を Table 1 に示した。CS-1170 の 1 回投与ではそのED₅₀値は0.024 mg/mouse であり、2 回分割投与では0.017 mg/mouse、4 回分割投与では0.035 mg/mouse であった。また CEZ も順に0.044 mg/mouse、0.031 mg/mouse、0.069 mg/mouse となり両薬剤とも1 回投与に比べ2 回分割投与では、ED₅₀値が約1.4倍良好となり4 回分割投与では逆に約1.5倍劣った結果が得られた。すなわち投与回数を増やしても必ずしも治療効果は良好とはならなかった。

Table 1 Effect of devided administration

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Total ED ₅₀ (mg/mouse)			Ratio	
		(1)once	(2)twice	(3)4times	(2)/(1)	(3)/(1)
CS-1170	0.78	0.024	0.017	0.035	0.71	1.46
CEZ	1.56	0.044	0.031	0.069	0.70	1.57

(1) 2 hr. *E. coli* ST-0198
 (2) 2, 3 hr. 10 LD₅₀
 (3) 2, 3, 4, 5 hr. 2.7×10^3 cells/mouse
 (mucin: 3%)

一方、*Klebsiella pneumoniae* 感染症の場合には Table 2 に示すようにCS-1170 の ED₅₀値は1 回投与が2.64 mg/mouse に対し、2 回分割投与では1.65 mg/mouse で約1.6倍良好となり4 回分割投与では0.58 mg/mouse で約4.6倍良好となった。CEZは順に2.30mg/mouse、1.69 mg/mouse、1.55 mg/mouse となり2 回および4 回分割投与は1 回投与に比べ約1.4倍 ED₅₀値が良好となった。すなわち両薬剤とも投与回数を増やしたほうが総投与量は減少し治療効果は良好となったが、分割による効果はCS-1170のほうがCEZに比べかなり大きかった。

4. マウス体液内濃度の測定

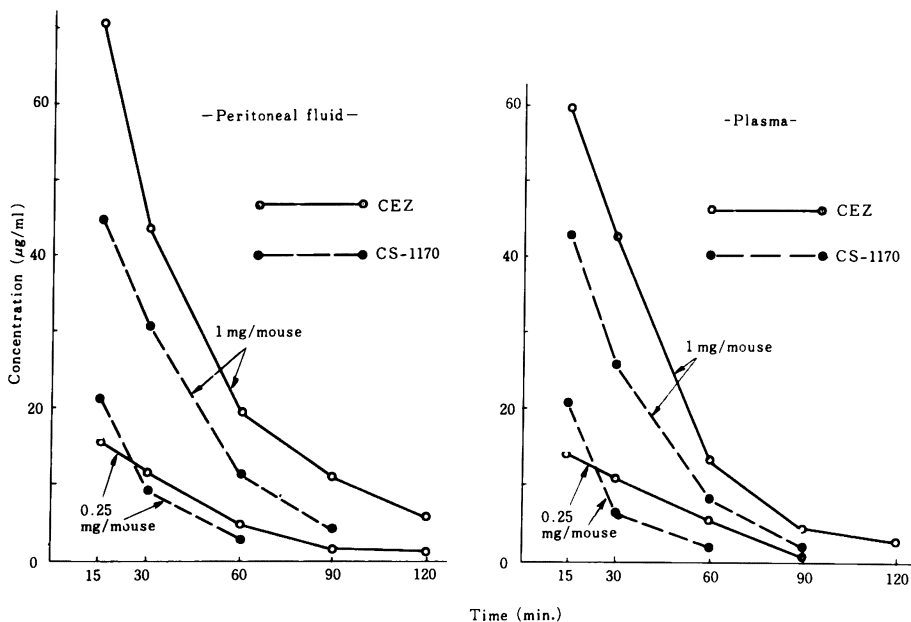
Klebsiella pneumoniae 感染2時間後のマウスにCS-1170とCEZの0.25 mg/mouseならびに1 mg/mouseを1 回皮下投与した場合の血漿中と腹水中の濃度を Fig. 9 に示した。血漿中の濃度は1 mg/mouse 投与の場合そのピーク値はCS-1170が43.0 $\mu\text{g/ml}$ 、CEZは60.5

Table 2 Effect of devided administration

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Total ED ₅₀ (mg/mouse)			Ratio	
		(1)once	(2)twice	(3)4times	(2)/(1)	(3)/(1)
CS-1170	0.78	2.64	1.65	0.58	0.63	0.22
CEZ	3.13	2.30	1.69	1.55	0.73	0.67

(1) 2 hr. *K. pneumoniae*
 (2) 2, 3 hr. 2000 LD₅₀
 (3) 2, 3, 4, 5 hr. 5×10^3 cells/mouse
 (mucin: 3%)

Fig. 9 Concentration of CS-1170 and CEZ after s.c. administration to mice infected with *K. pneumoniae*



Time (min.)

$\mu\text{g/ml}$ となり、 0.25mg/mouse 投与の場合のそれは CS-1170 が $21.5\mu\text{g/ml}$ 、CEZ は $14.3\mu\text{g/ml}$ であった。また腹水中濃度は 1mg/mouse 投与の場合ピーク値は CS-1170 が $45.0\mu\text{g/ml}$ 、CEZ が $72.0\mu\text{g/ml}$ となり、 0.25mg/mouse 投与の場合のそれは CS-1170 が $21.5\mu\text{g/ml}$ 、CEZ は $15.8\mu\text{g/ml}$ であった。両薬剤とも腹水中の濃度推移は血漿中濃度の推移と並行していた。

5. マウス腹腔内生菌数の測定

Fig.10~Fig.13は感染マウスを CS-1170 または CEZ で治療した場合の腹腔内菌数の消長を測定した成績である。またグラフ中のカッコ内の数字は7日後の生存匹数を示す。(生存匹数/使用匹数) Fig.10は *E. coli* ST-0198 感染マウスに CS-1170 を総量として 0.025mg/mouse 投与した場合である。1回投与群および4回分割投与群で

Fig. 10 Bactericidal activity of CS-1170 to mice infected with *E. coli* ST-0198

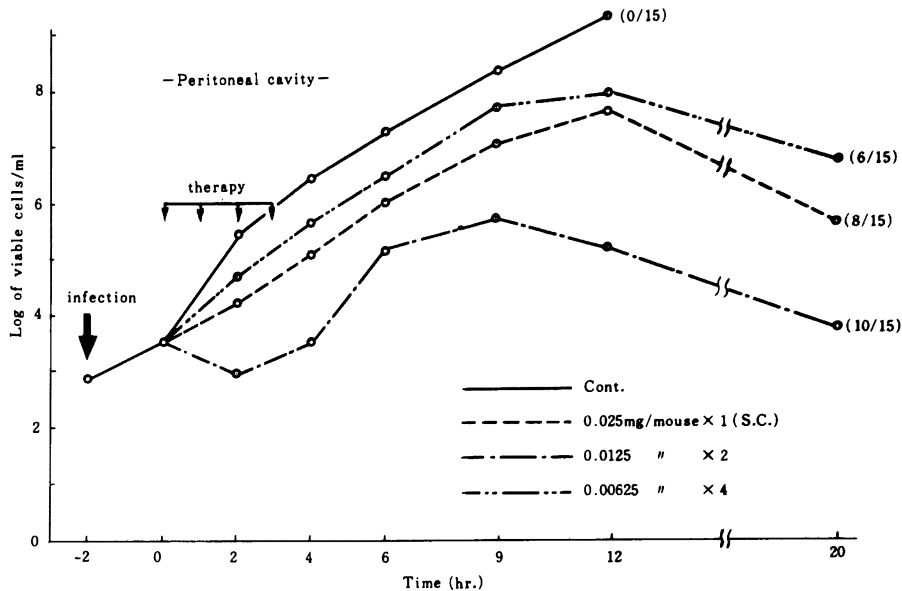
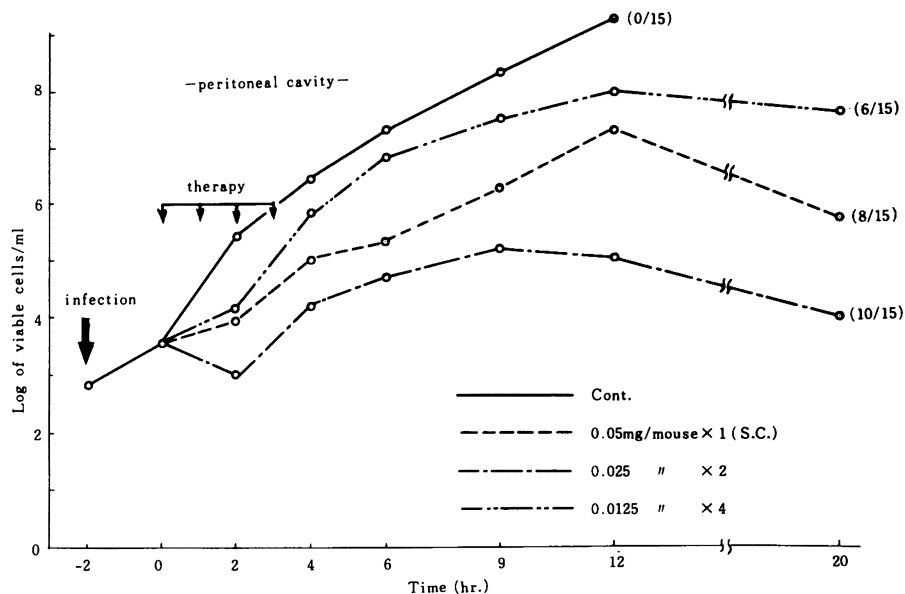


Fig. 11 Bactericidal activity of CEZ to mice infected with *E. coli* ST-0198



は治療後菌の増殖は少し抑えられたが9時間目まで control 群とほぼ同程度の速度で増加した。2回分割投与群は治療開始時に比べ2時間後にいったん菌数の減少がみられたが、その後9時間目まで菌数は漸増した。しかし12時間以後どの投与群も菌数は漸減し、20時間後にはたとえば2回分割投与群の場合、治療開始時とほぼ同程度の菌数となった。Fig.11は総量としてCEZを0.05

mg/mouse 投与した場合であるが、腹腔内菌数の消長は CS-1170 と同様の傾向を示した。また control 群は感染14時間後にはすべて死亡したのに対し CS-1170, CEZ ともに1回投与群は約50%, 2回分割投与群は約60%, 4回分割投与群は約40%の生存率を示した。Fig.12は *Klebsiella pneumoniae* 感染マウスに総量として CS-1170 を1 mg/mouse 投与した場合である。治療開始時に比べ

Fig. 12 Bactericidal activity of CS-1170 to mice infected with *K. pneumoniae*

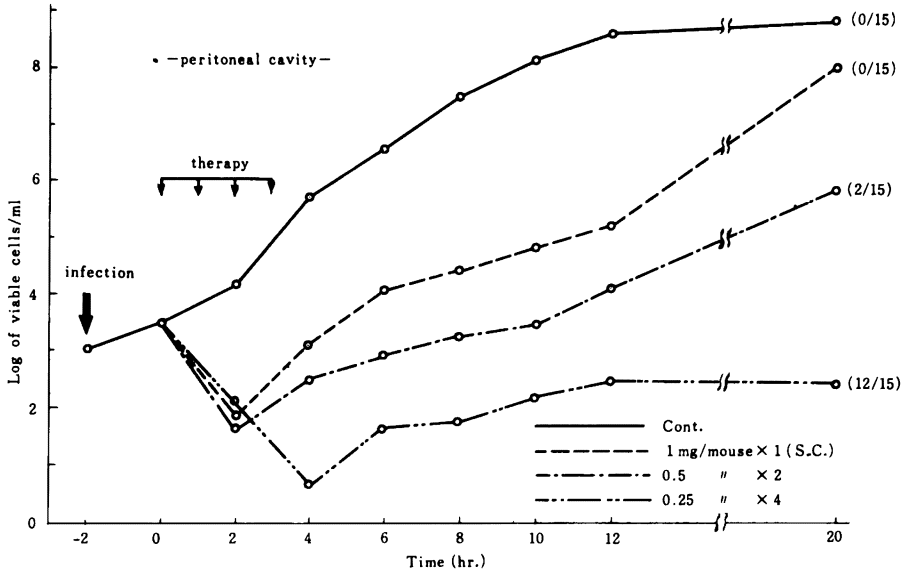
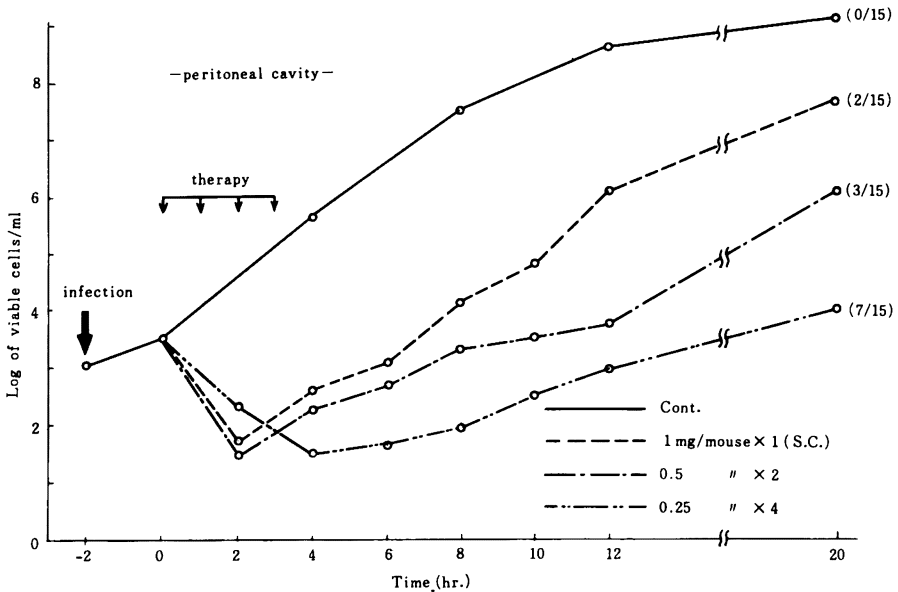


Fig. 13 Bactericidal activity of CEZ to mice infected with *K. pneumoniae*



2時間後にはどの投与群も著明な菌数の減少が認められたが、以後は1回投与群と2回分割投与群は漸時菌数が増加し、1回投与群では20時間後にはcontrol群とほぼ同程度の菌数となった。しかし、4回分割投与群は4時間後まで著明な菌数の減少が認められ、以後もほとんどlagの状態が続き、20時間後には1回投与群とは著しい差が認められた。また1回投与群がすべて死亡したのに対し、4回分割投与群は80%の生存率を示した。Fig.13はCEZを総量として1mg/mouse投与した場合である。CS-1170の場合とほぼ同様の傾向を示したが、4回分割投与群の場合20時間後の菌数はCS-1170投与のそれよりも約100倍大となった。またその生存率は1回投与群が約10%に対し、4回分割投与群は約50%であった。したがって、CS-1170投与の場合ほど分割投与による効果が認められなかった。

III. 総括および考察

E. coli ST-0198ならびに *Klebsiella pneumoniae* 感染症を対象に、新しいcephamycin系抗生物質CS-1170の投与方法に関する実験的解析についてCefazolin (CEZ)を比較薬剤として検討を行った。

1. *in vitro*における殺菌効果としては *E. coli* ST-0198, *Klebsiella pneumoniae* に対しCS-1170, CEZともにおおむね薬剤濃度に応じた殺菌作用が認められた。

2. 薬剤を除去することによりCS-1170で処理した *E. coli* ST-0198は薬剤濃度に応じて再増殖を始めるまでの時間が延長する傾向が認められたが、CEZで処理した場合にはおおむね1時間程度のlagが認められ、以後はすみやかに再増殖した。一方、*Klebsiella pneumoniae*はCS-1170で処理した場合、薬剤濃度にかかわらず処理時間が長いほど再増殖はゆるやかであったが、CEZで処理した場合にはおおむね1時間程度のlagが認められた。これらの結果はH. EAGLEらの述べている「抗菌剤で1時間から1.5時間処理した菌は抗菌剤を含まない培地に移しても2~3時間のlagが認められる」という結果とは必ずしも一致しなかった。この事実は彼らの用いたグラム陽性球菌と本実験に用いたグラム陰性桿菌との相違によるものであろう。

3. マウス実験的感染症に対する治療効果は *E. coli* ST-0198の場合、CS-1170とCEZとのMICの比と1回投与の治療値の比はよく一致していた。またCS-1170, CEZともに1時間間隔で分割投与した場合には2回分割投与の方が4回分割投与よりも優れた治療値が得られ、投与回数を増やすことにより必ずしも治療値は良好とはならなかった。一方、*Klebsiella pneumoniae*の場合にはMICはCS-1170のほうがCEZよりも4倍優れているにもかかわらず、1回投与の治療値はCEZとほぼ同じであ

った。しかし、CS-1170を1時間間隔で4回分割投与すると、1回投与に比べ約5倍優れた治療値が得られた。しかし、CEZは4回分割投与でも1回投与に比べ約1.5倍良好となったにすぎなかった。すなわち、CS-1170は投与回数を増やすことにより、CEZに比べきわめて良好な治療効果が認められた。このように *Klebsiella pneumoniae* 感染症に対しては、CS-1170の場合感染菌種に違いはあるが、EAGLEや中沢^{10,11}らが述べているように「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」という報告とよく一致していた。以上のように頻回投与した場合、薬剤の種類により、また感染菌種によっても治療効果に差が認められた。

4. *Klebsiella pneumoniae* 感染2時間後のマウスにCS-1170またはCEZを皮下投与し体液内濃度を検討したところ、血漿中と腹水中の濃度推移はよく一致した傾向が認められた。

5. CS-1170の最も効果的な投与方法を腹腔内菌数の消長との関連で検討した。*E. coli* ST-0198感染症の場合には、CS-1170, CEZいずれも1回投与群と4回分割投与群は治療後はcontrol群に比べ若干菌数の増殖が抑制された。2回分割投与群では治療2時間後にいったん菌数が減少したが、その後少なくとも治療開始9時間後までは菌数が増加する傾向が認められた。しかし、いずれの投与群も、明らかに薬剤が体内から消失したと考えられる20時間後においては、むしろ菌数は減少していた。この実験系において腹腔内菌数の消長は投与回数による総投与量の減少の結果とよく一致していたと思われる。したがって、*E. coli* ST-0198による感染症にはCS-1170は必ずしも頻回投与により有効濃度を長時間維持する必要はなく、1回に適当量をone shotする方法でも十分な治療効果が期待できると考えられる。

Klebsiella pneumoniae 感染症の場合には、CS-1170は投与回数を増やすほど菌数の減少は大きくなり、特に4回分割投与群では治療20時間後においてもほとんど菌数の増加は認められなかった。しかし1回投与群の場合、20時間後にはcontrol群と同程度の菌数となった。この実験系では治療に要する総投与量(ED₅₀)はCS-1170の場合、投与回数を増やすほど減少し、腹腔内菌数の消長もその結果をよく反映していると思われる。したがって、CS-1170は *Klebsiella pneumoniae* 感染症には、有効濃度を長時間維持する点滴静注のような投与方法が適していると考えられる。

今回の実験により、*E. coli* ST-0198感染症と *Klebsiella pneumoniae* 感染症とは腹腔内菌数の消長が大きく異なった結果が得られた。これは薬剤の消失した後の菌の再増殖ならびにその抑制は、薬剤によって短時間

内に菌の受ける障害の強弱, および宿主側の食食能と大きな関連があるのではないかと考えられる。すなわち菌体外層に夾膜を有する *Klebsiella pneumoniae* は, 抗生剤の攻撃を受けても *E. coli* ST-0198 に比較して食食されにくいのではないかと思われ, したがって有効濃度以上を長時間維持する投与方法によって良好な治療値が得られるのではないかと考えている。

結 論

新しい cephamycin 系抗生物質 CS-1170 の投与方法について, *E. coli* ST-0198 感染症と *Klebsiella pneumoniae* 感染症を対象に実験的解析を行い, 以下の成績を得た。

1) *in vitro* において *E. coli* ST-0198 と *Klebsiella pneumoniae* に対し, CS-1170 は薬剤濃度に応じた殺菌作用を示した。

2) 薬剤除去により CS-1170 の作用を受けた *E. coli* ST-0198 の場合には薬剤濃度に応じて再増殖までの時間が延長する傾向を示したが, *Klebsiella pneumoniae* の場合には薬剤濃度にかかわらず作用時間が長いほど再増殖はゆるやかであった。

3) マウスにおける CS-1170 の治療効果は *E. coli* ST-0198 感染症には 1 回投与と頻回投与では差がみられず, *Klebsiella pneumoniae* 感染症には頻回投与によりすぐれた治療効果が認められた。

4) マウス腹腔内での感染菌の消長を検討した結果 CS-1170 の治療効果を左右する大きな要因は, *E. coli* ST-0198 の場合, 有効濃度の総維持時間より, むしろ有効濃度の高さであり, *Klebsiella pneumoniae* の場合, 有効濃度の総維持時間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 reco-

- very 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 vitro*; 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. 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 Engl. 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) 岩日朋幸, 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 25: 615~616, 1977
- 9) 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。Chemotherapy 25: 616, 1977
- 10) 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
- 11) 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
- 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
- 13) 尾花芳樹, 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(6) 緑膿菌に対する Ticarcillin の効果。Chemotherapy 25: 2422~2427, 1977

EXPERIMENTAL STUDIES ON ADMINISTRATION OF
CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS
9. EFFECT OF CS-1170 AGAINST *ESCHERICHIA COLI*
AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

YUKIO UTSUI, TAKESHI NISHINO and SHOZO NAKAZAWA
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

As an aid for seeking an optimal method for dosing a new cephamycin antibiotic, CS-1170, against *E.coli* ST-0198 and *Klebsiella pneumoniae* infections in mice, both *in vitro* and *in vivo* antibacterial actions of CS-1170 were examined, and the following results were obtained.

1) CS-1170 showed dose-dependent bactericidal action on *E.coli* ST-0198 and *Klebsiella pneumoniae* *in vitro*.

2) Growth inhibition time (lag) of *E.coli* ST-0198 damaged by 10 MIC of CS-1170 was about 1 hour. However *Klebsiella pneumoniae* damaged by CS-1170, when the drug was free, immediately began to regrow *in vitro*.

3) The therapeutic effect of CS-1170 on *E.coli* ST-0198 infection in mice seemed to be superior in single dose in a few large doses than in multiple injections. On the other hand, the therapeutic effect of CS-1170 on *Klebsiella pneumoniae* infection in mice found to be superior in multiple injections than single administration.

4) An important factor to decide the therapeutic efficacy of CS-1170 was the highness of drug concentration rather than the total duration time of the effective concentration in *Klebsiella pneumoniae* infection.