化学療法剤の投与法に関する実験的解析
14. 大腸菌ならびに肺炎桿菌に対する Cefaclor の効果

三和秀明・西野武志・谷野輝雄
京都薬科大学微生物学教室

新しい経口セファロスポリン系抗生物質 Cefaclor (CCL) の投与法に関して，大腸菌及び肺炎桿菌マウス腹腔内感染症を対象に，Cephalexin (CEX) を対照薬として実験的解析を行ない，以下の成績を得た。

In vitro における殺菌作用に関しては，使用した菌株 *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 において，CCL は CEX より強い殺菌作用を示し，また再増殖実験で高濃度を作用させた場合，CCL は CEX に比べ長い菌数増加抑制時間が認められた。

E. coli KC-14, *K. pneumoniae* KC-1 に対して，CCL は CEX より優れた治療効果を示した。

接種菌量の影響として，*E. coli* KC-14 では CCL は CEX に比べ菌量の増加に伴って治療効果の低下は小さかったが，*K. pneumoniae* KC-1 では CEX と同様に治療効果が低下した。

頻回投与の効果について検討したところ，*E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1 両菌種に対して，CCL 及び CEX は共に 1 回投与と頻回投与で治療効果に差が認められなかった。

CCL, CEX の治療効果を左右する因子は，有効濃度以上の薬物濃度の高さでなく，有効濃度の維持時間であると考えられた。

I. 序文

細菌感染症に対する化学療法において，使用薬の投与法は，治療効果を左右する重要な因子である。H.EAGLE[1-5] らは 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，薬の有効濃度の維持時間によって大きく左右される事や，感染症に対する薬の直接作用だけでなく，宿主側の感染防禦機能も関与している事をあげている。当教室の中沢[6-17] らは，これらの研究をもとに，実験的マウス腹腔内緑膿菌及び大腸菌感染症に対する各種抗生物質の投与法について，詳細に検討を行ない，報告してきた。

今回，Eli Lilly & Company で開発された新しい経口セファロスポリン系抗生物質 Cefaclor について，大腸菌及び肺炎桿菌感染症を対象に，投与法に関する基礎的検討を試み，2, 3 の知見を得たので報告する。

II. 実験材料及び実験方法

1. 使用菌株及び使用薬

臨床分離株 *Escherichia coli* KC-14, *Klebsiella pneumoniae* KC-1 を用い，薬として Cefaclor (CCL 960.6 μg力価/mg Eli Lilly & Company), Caphalexin (CEX 938 μg力価/mg 塩野義製薬 K.K) を用いた。

2. *in vitro* における殺菌作用及び薬除去後の再増殖実験

Tryptosoya broth (TSB : Nissui) で前培養した菌を，Heart infusion broth (HIB : Nissui) で 37°C 振盪培養を行ない対数増殖期にする。この菌液に 1/2, 1, 5 および 10 MIC の薬を加え，以後経時的に生菌数を測定した。なお，MIC は tube dilution method で求めた。また再増殖実験では，*E. coli* KC-14 では 1 および 5 MIC の薬添加，また *K. pneumoniae* KC-1 では 1 および 10 MIC の薬添加 1, 2, 4 時間後に遠心で薬を除去し，薬を含まない新しい HIB に再懸濁させ，経時的に生菌数を測定した。

3. 使用動物

SLC-ddY 系雄性マウス，体重 16～18 g, 4 週令を用いた。感染治療実験には，1 群 10 匹腹腔内生菌数及び体液内濃度の測定には 1 群 3 匹を用いた。

4. マウス感染治療実験

Heart infusion agar (HIA: Nissui) 斜面培地に一昼夜培養した菌を 10% calf serum (非働化済) 加 HIB に懸濁し，−80°C に凍結保存した。この菌液を用時融解させ，Nutrient broth (NB: Nissui) で所定の菌液に希釈した。これに 6% gastric mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) を等量混合し，その 0.5 ml をマウス腹腔内に接種した。薬は 0.5% CMC に懸濁し，菌接種 2 時間後を第 1 回目とし，経口投与を行なった。頻回投与の間隔は 1 時間とした。ED_{50} は 7 日目の生存数を Probit 法により算出した。なお，頻回投与の ED_{50} は総投与量で表わした。

5. マウス体液内濃度の測定

薬を *E. coli* KC-14 感染マウスに経口投与した後，経時的に血液，腹腔内液を採取した。血液はエーテル麻酔下で上膊動脈を切断して採血し，遠心で血漿を分離した。腹腔内液は，1/10 M Phosphate Buffer (PBS. pH 6.5) 2.5 ml を腹腔内に注入し，充分腹腔内を洗滌後，その洗滌液を採取した。両薬共に *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする paper disc 法で測定した。血漿濃度は血漿標準線，腹腔内液は PBS 標準線より算出した。なお，腹腔内液濃度は洗滌液 1 ml 当りで表示した。

6．マウス腹腔内生菌数の測定

腹腔内における生菌数の測定は，滅菌生理食塩水 2.5 ml を腹腔内に注入し，腹腔内を充分洗滌後採取した洗滌液の生菌数を測定した。なお，腹腔内生菌数は洗滌液 1 ml 当りで表示した。

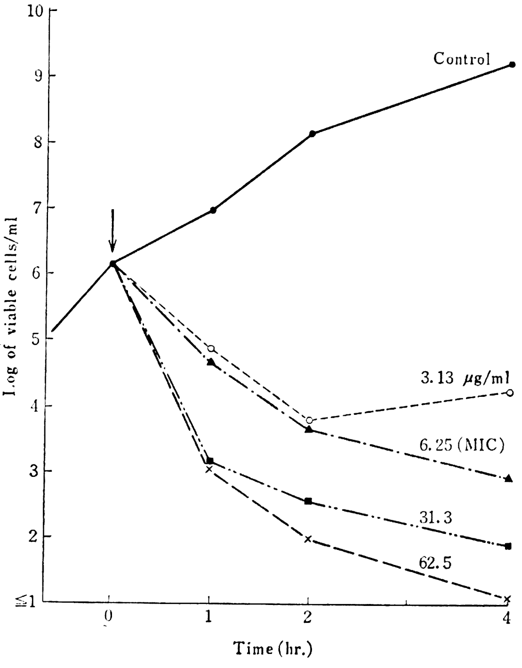
Ⅲ. 実験成績

1．*in vitro* における殺菌作用及び薬除去後の再増殖実験

E. coli KC-14 に対する CCL, CEX の殺菌作用の成績を Fig. 1, 2 に示した。

CCL は CEX より強い殺菌作用を有し，特に高濃度でその差が著明であった。

Fig. 1 Effect of CCL on viability of *E. coli* KC-14



K. pneumoniae KC-1 に対する成績を Fig.3，4 に示した。*E. coli* KC-14 同様，CCL は CEX に比べ強い殺菌作用を有していた。

Fig. 2 Effect of CEX on viability of *E. coli* KC-14

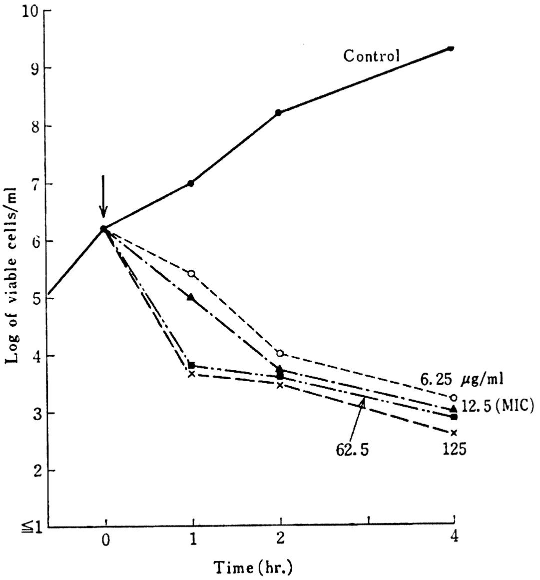


Fig. 3 Effect of CCL on viability of *K. pneumoniae* KC-1

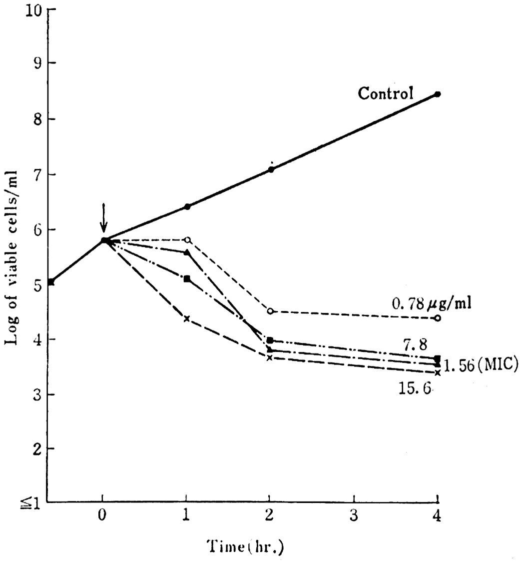


Fig. 4 Effect of CEX on viability of *K. pneumoniae* KC-1

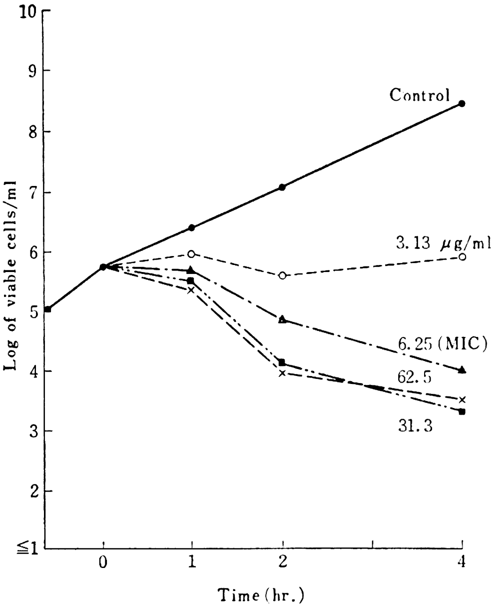


Fig. 5 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CCL

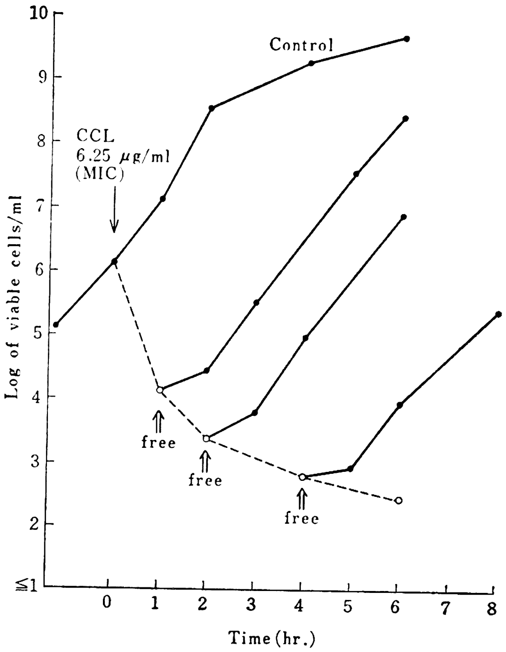


Fig. 5, 6, 7, 8 は *E. coli* KC-14 に対する再増殖の成績であり, Fig. 5, 6 は 1 MIC, Fig. 7, 8 は 5 MIC の成績である。CCL, CEX 共に 1 MIC 作用では薬除去後, 速やかに再増殖するが, 5 MIC 作用では, CCL は CEX に比べ明らかに菌数増加抑制時間が認められた。

K. pneumoniae KC-1 に対する成績は Fig.9 , 10, 11 及び 12 に示した。*E. coli* KC-14 同様, 両薬共に 1 MIC 作用で速やかに再増殖するが, 10 MIC 作用では, CCL は明らかに菌数増加抑制時間が認められた。

2. マウス感染治療実験

1 回投与における *E. coli* KC-14 に対する ED_{50} は Table 1 に示す様に菌量が 2.3×10^4 cells/mouse の場合 CCL は, 0.03 mg/mouse, CEX は 0.21 mg/mouse であり, *K. pneumoniae* KC-1 に対しての ED_{50} は Table 2 に示す様に菌量が 5.0×10^3 cells/mouse の場合 CCL は 0.087 mg/mouse, CEX は 1.1 mg/mouse であり, CCL は CEX より優れた治療効果を示した。

1) 接種菌量の影響

E. coli KC-14 の成績を Table 1, *K. pneumoniae* KC-1 の成績を Table 2 に示した。両菌種に対し, いずれの菌量においても CCL は CEX よりも優れた治療効果を示したが, Table 1 に示す如く, *E. coli* KC-14 では接種菌量を 2.3×10^4 cells/mouse から 2.3×10^6

Fig. 6 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CEX

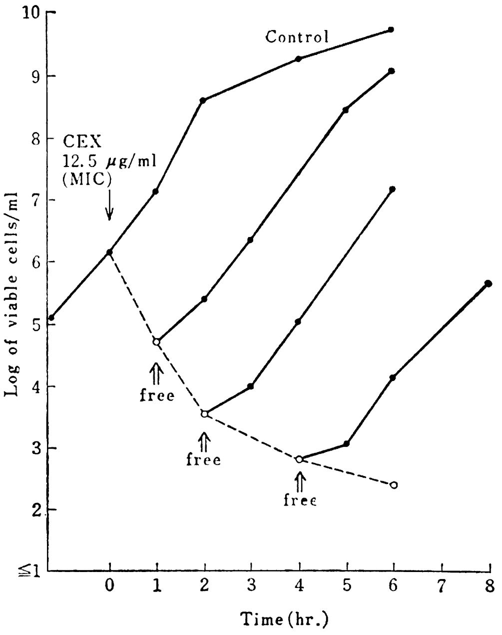


Fig. 7 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CCL

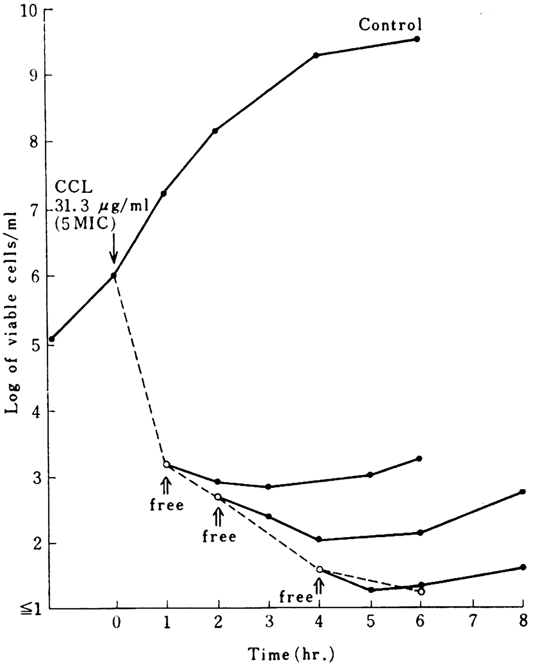


Fig. 8 Behavior *in vitro* of *E. coli* KC-14 previously exposed to CEX

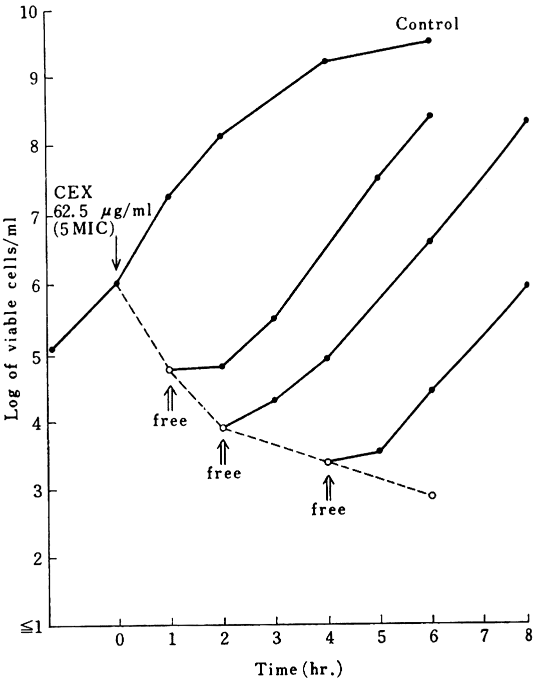


Fig. 9 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* KC-1 previously exposed to CCL

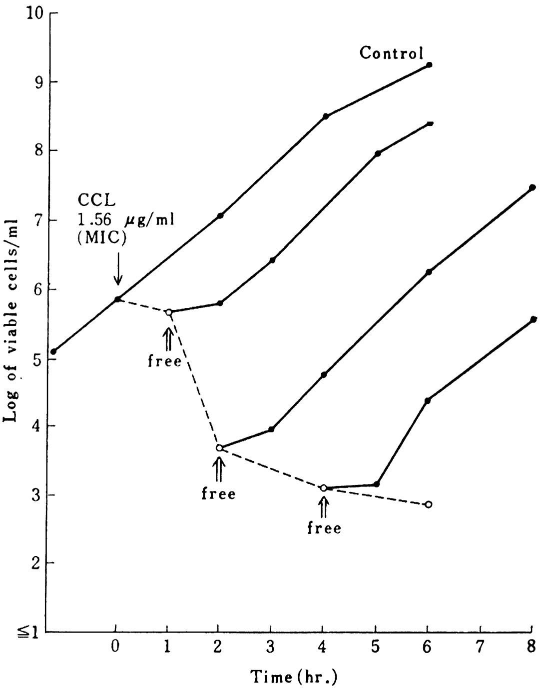


Fig. 10 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* KC-1 previously exposed to CEX

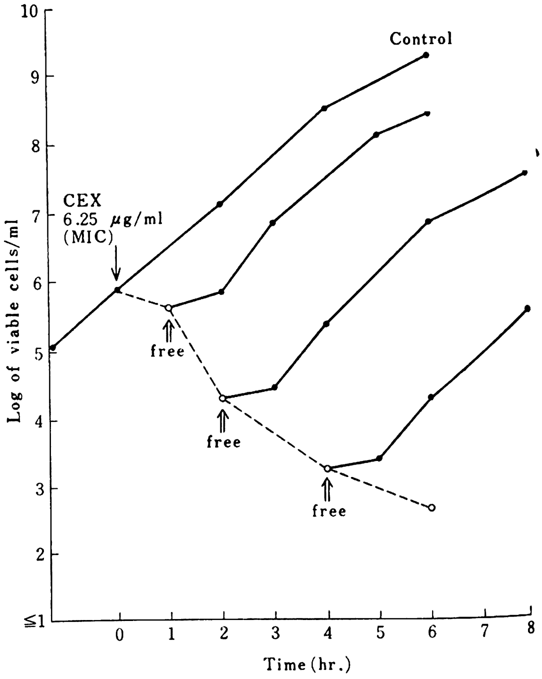


Fig. 11 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* KC-1 previously exposed to CCL

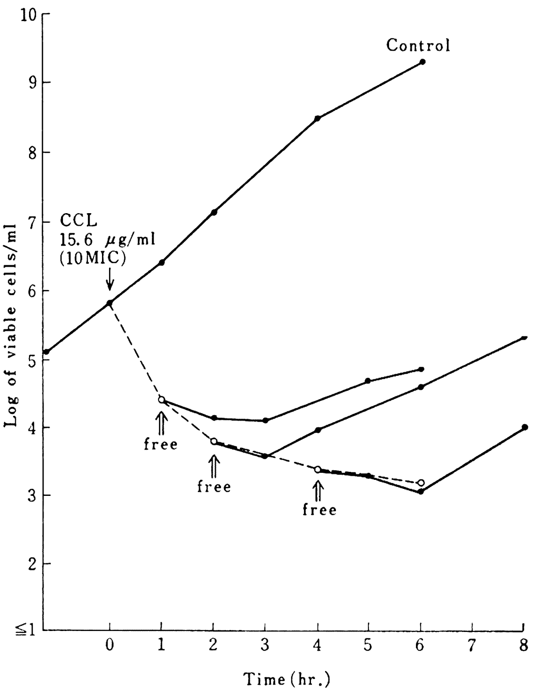


Fig. 12 Behavior *in vitro* of *K. pneumoniae* KC-1 previously exposed to CEX

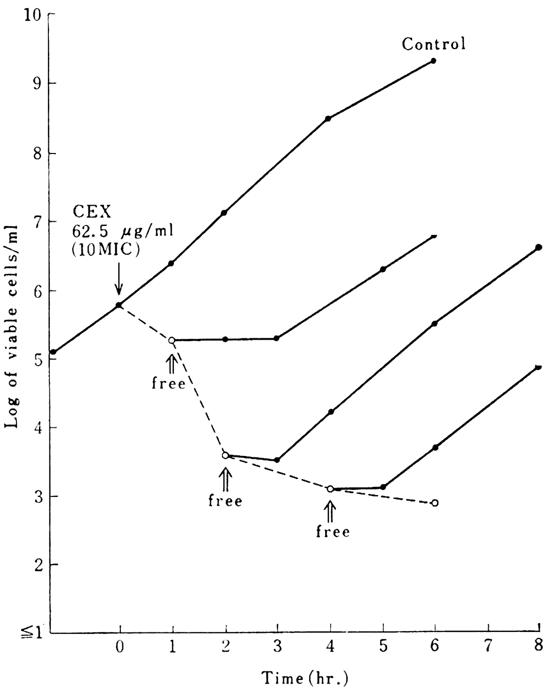


Table 1 Influence of challenge dose on ED_{50} of CCL and CEX in experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Inoculum size (cells/mouse)	Challenge LD_{50}	ED_{50} (mg/mouse) CCL	ED_{50} (mg/mouse) CEX	Ratio (CEX/CCL)
2.3×10^4	2×10^2	0.030 (0.024 ~ 0.037)	0.21 (0.12 ~ 0.30)	7.0
2.3×10^6	2×10^4	0.085 (0.020 ~ 0.16)	0.55 (0.32 ~ 0.88)	6.5
2.3×10^7	2×10^5	1.5 (0.86 ~ 2.7)	≧30	≧20

cells/mouse に増すと両薬共に同程度治療効果の低下を認めた。しかし 2.3×10^7 cells/mouse では CCL の ED_{50} は 1.5 mg/mouse, CEX の ED_{50} は ≧ 30 mg/mouse となり，2.3×10^4 cells/mouse 接種に比べ，CCL は CEX より影響を受けにくい成績が得られた。*K. pneumoniae* KC-1 では Table 2 に示す如く接種菌量を増大するに伴なって治療効果の低下を認め，両薬共に同程度の影響を受けた。

2) 頻回投与の効果

E. coli KC-14 の成績を Table 3, 4, *K. pneumoniae* KC-1 の成績を Table 5, 6 に示した。Table 3, 5 は低菌量接種の成績であり，*E. coli* KC-14 に対して CCL の 1 回投与の ED_{50} は，0.030 mg/mouse, 6 回投与では，0.055 mg/mouse, CEX のそれは各々 0.21 mg/mouse, 0.23 mg/mouse であった。又 *K. pneumoniae* KC-1 に対して，CCL の 1 回投与の ED_{50} は 0.13 mg/mouse, 6 回投与では 0.10 mg/mouse, CEX のそれは各々 0.55 mg/mouse, 0.89 mg/mouse であった。Table 4, 6 は高菌量接種の成績であるが両薬共に低菌量接種時と同様の傾向を示し，頻回投与の効果は認

Table 2 Influence of challenge dose on ED_{50} of CCL and CEX in experimental *K. pneumoniae* KC-1 infection in mice

Inoculum size (cells/mouse)	Challenge LD_{50}	ED_{50} (mg/mouse)		Ratio (CEX/CCL)
		CCL	CEX	
5.0×10^3	1×10^4	0.087 (0.061 ~ 0.17)	1.1 (0.67 ~ 2.2)	12.6
5.0×10^4	1×10^5	0.15 (0.087 ~ 0.25)	2.4 (1.2 ~ 3.6)	16.0
5.0×10^5	1×10^6	0.83 (0.36 ~ 1.5)	11 (6.7 ~ 22)	13.3

Table 3 Protective effect of CCL and CEX against experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Administration times	ED_{50} (mg/mouse)	
	CCL	CEX
X 1	0.030 (0.017 ~ 0.058)	0.21 (0.12 ~ 0.30)
X 2	0.024 (0.013 ~ 0.035)	0.17 (0.086 ~ 0.35)
X 4	0.024 (0.013 ~ 0.035)	0.24 (0.12 ~ 0.36)
X 6	0.055 (0.025 ~ 0.12)	0.23 (0.12 ~ 0.63)

Inoculum size: 2.4×10^4 cells/mouse with 3% mucin

Table 4 Protective effect of CCL and CEX against experimental *E. coli* KC-14 infection in mice

Administration times	ED_{50} (mg/mouse)	
	CCL	CEX
X 1	1.5 (0.87 ~ 2.5)	≧30
X 2	0.99 (0.41 ~ 1.7)	22 (13 ~ 44)
X 4	2.1 (1.2 ~ 3.0)	>30
X 6	1.7 (1.1 ~ 2.7)	>30

Inoculum size: 2.3×10^7 cells/mouse with 3% mucin

Table 5 Protective effect of CCL and CEX against experimental *K. pneumoniae* KC-1 infection in mice

Administration times	ED_{50} (mg/mouse)	
	CCL	CEX
X 1	0.13 (0.095 ~ 0.22)	0.55 (0.30 ~ 0.99)
X 2	0.13 (0.095 ~ 0.22)	0.55 (0.30 ~ 0.99)
X 4	0.089 (0.051 ~ 0.14)	0.55 (0.30 ~ 0.99)
X 6	0.10 (0.052 ~ 0.16)	0.89 (0.51 ~ 1.4)

Inoculum size: 6.3×10^3 cells/mouse with 3% mucin

Table 6 Protective effect of CCL and CEX against experimental *K. pneumoniae* KC-1 infection in mice

Administration times	ED_{50} (mg/mouse)	
	CCL	CEX
X 1	1.3 (0.68 ~ 2.2)	≧30
X 2	1.5 (0.68 ~ 2.9)	26 (15 ~ 57)
X 4	1.7 (0.86 ~ 3.5)	>30
X 6	1.7 (0.86 ~ 3.5)	20 (12 ~ 34)

Inoculum size: 5.0×10^5 cells/mouse with 3% mucin

Fig. 13 Plasma levels of CCL and CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14

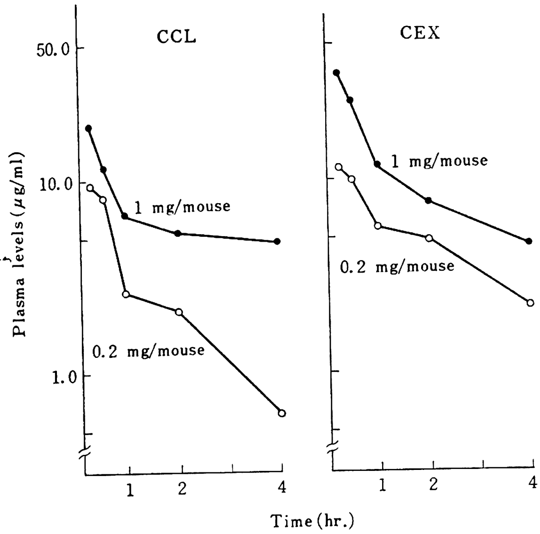


Fig. 14 Peritoneal fluid levels of CCL and CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14

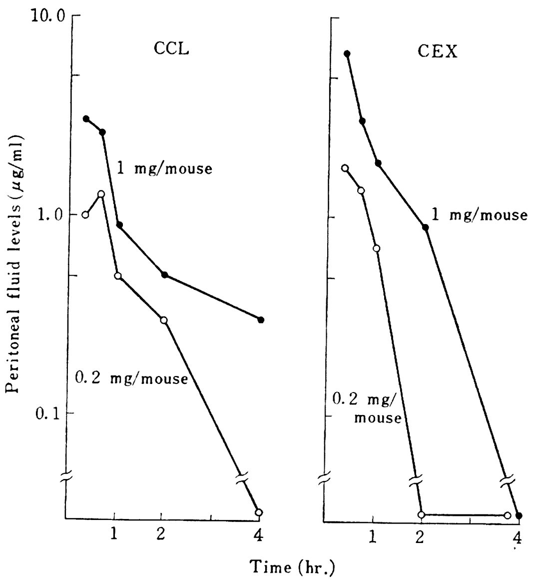
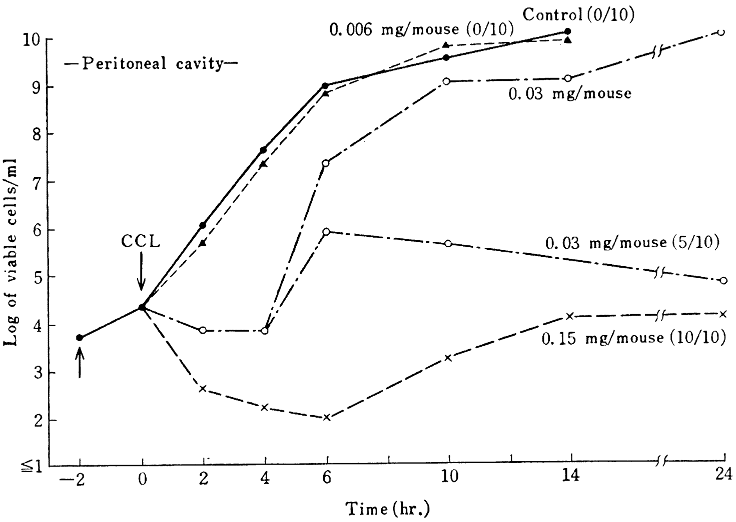


Fig. 15 Bactericidal activity of CCL after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14



められなかった。

3. マウス体液内濃度

各薬 1, 0.2 mg/mouse を経口投与した時の血漿，腹腔内液濃度の成績を Fig. 13, 14 に示した。CCL は CEX に比べ，血漿，腹腔内濃度共に peak は低く，持続時間もやや短かった。

4. マウス腹腔内生菌数の測定

E. coli KC-14 に対する CCL, CEX 1 回投与時の成績を Fig. 15, 16, *K. pneumoniae* KC-1 の成績を Fig. 17, 18 に示した。なお，図中の（　）内は 7 日後の生存率（生存匹数/使用匹数）を表わしている。

E. coli KC-14 では両薬共に 1/5 ED_{50} 量すなわち

Fig. 16 Bactericidal activity of CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14

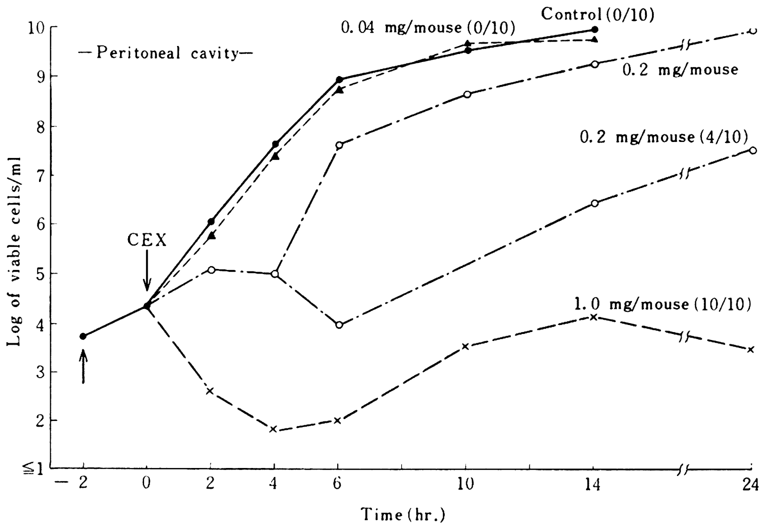
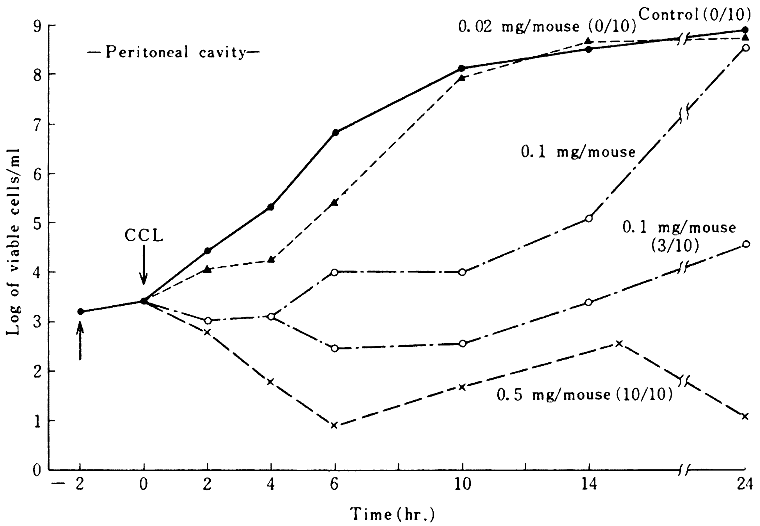


Fig. 17 Bactericidal activity of CCL after oral administration to mice infected with *K. pneumoniae* KC-1



CCL の場合 0.006 mg/mouse, CEX の場合 0.04 mg/mouse 投与では菌数の減少は認められず，無処置群と同様速やかに増殖し，全例死亡した。ED_{50} 量すなわち CCL の場合 0.03 mg/mouse, CEX の場合 0.2 mg/mouse 投与では薬投与後約 4 時間菌数増加が認められず，その後マウスの生死が分かれる菌数の変化を示した。5 倍 ED_{50} 量すなわち CCL では 0.15 mg/mouse, CEX では 1.0 mg/mouse 投与では CCL で 6 時間，CEX で 4 時間の菌数の減少を示し，その後緩やかに増加するが，全例生存した。

K. pneumoniae KC-1 の場合，*E. coli* KC-14 とほぼ同様の変化を示した。しかし *E. coli* KC-14 に比べ ED_{50} 量すなわち CCL では 0.1 mg/mouse, CEX では 1.5 mg/mouse 投与において生死の分かれる菌数の変化が現われるのに要する時間が *K. pneumoniae* KC-1の場合長く，特に CEX では著明であった。この事は両菌

Fig. 18 Bactericidal activity of CEX after oral administration to mice infected with *K. pneumoniae* KC-1

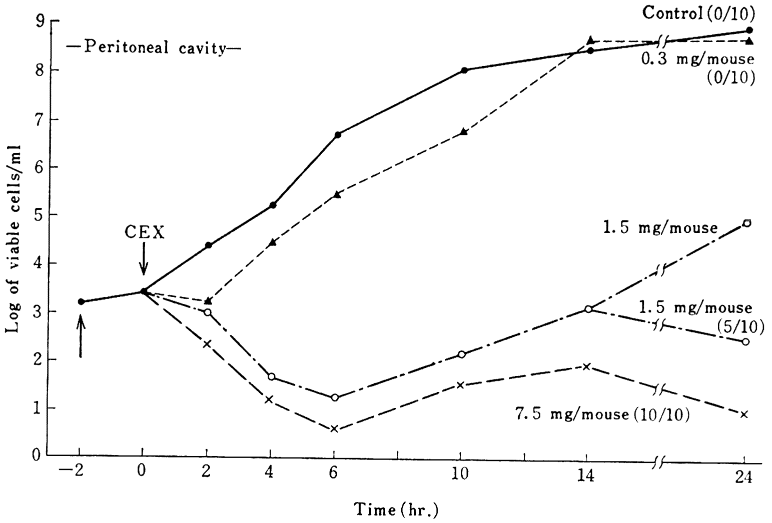
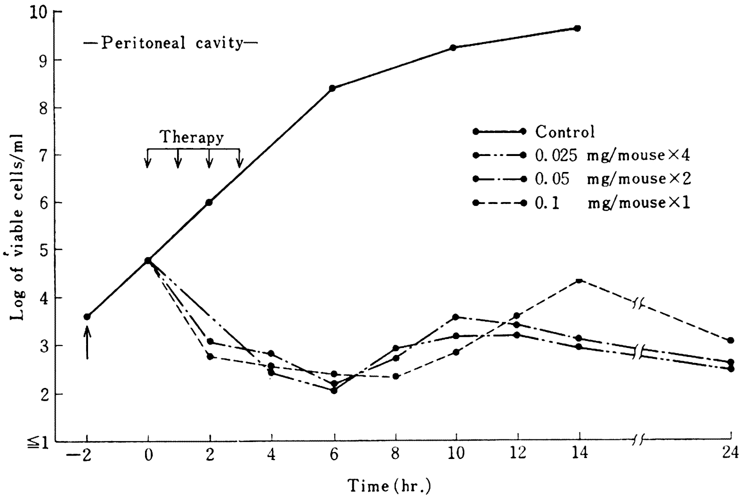


Fig. 19 Bactericidal activity of CCL after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14



種における増殖の速さ，virulence の違いによると考えられる。Fig. 19, 20 は *E. coli* KC-14, Fig. 21, 22 は *K. pneumoniae* KC-1 の頻回投与時の成績である。両菌種，両薬共に，総投与量を一定にして，2, 4 回頻回投与を行なっても，1 回投与時の菌数の減少，菌数増加抑制時間と異ならず，治療実験の成績を反映していた。

IV. 総括及び考察

E. coli KC-14 並びに *K. pneumoniae* KC-1 マウス腹腔内感染症に対する新しい経口セファロスポリン系抗生物質 CCL の投与法に関して CEX を対照薬として検討を行なった。

1. *in vitro* における殺菌効果に関して CCL は *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1 に対して CEX に比べ，強い殺菌作用を有し特に *K. pneumoniae* KC-1 では短時間においてその差が著明であった。

2. *in vitro* における再増殖に関する実験では両菌種共に CCL, CEX 1 MIC 作用させた場合，薬除去後

Fig. 20 Bactericidal activity of CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* KC-14

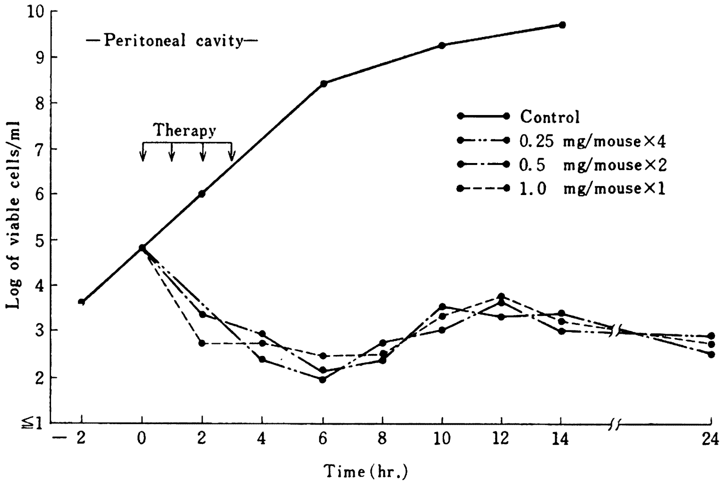
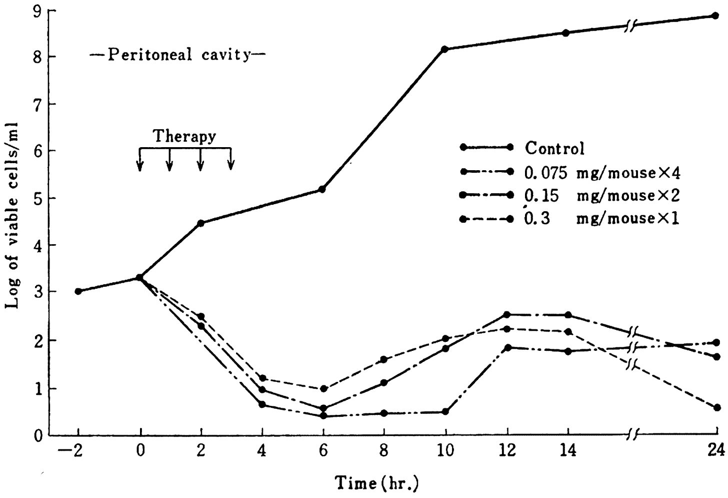


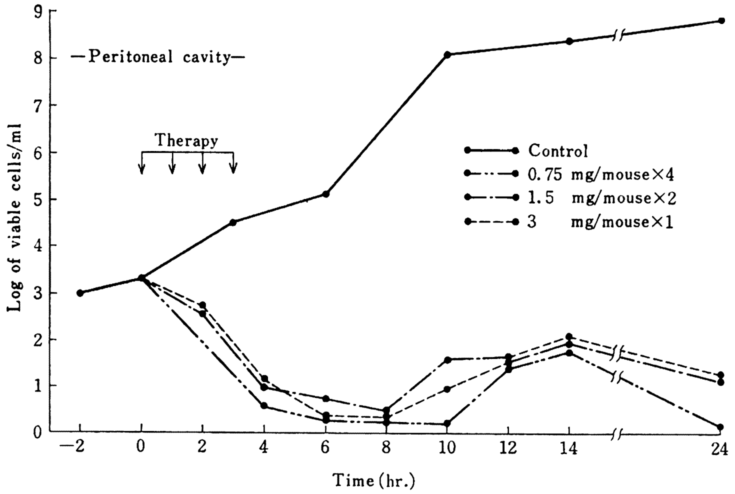
Fig. 21 Bactericidal activity of CCL after oral administration to mice infected with *K. pneumoniae* KC-1



control と同様な速度で再増殖を始めた。しかし，*E. coli* KC-14 に対して 5 MIC, *K. pneumoniae* KC-1 に対して 10 MIC を作用させた場合 CCL の方が明らかに CEX に比べ菌数増加抑制時間が認められた。CCL 高濃度作用においてより強い菌数増加抑制時間が認められた事は興味ある問題であるが，CCL の殺菌作用と何らかの関連性があると考えられる。

3．マウス腹腔内感染症に対する治療効果では *E. coli* KC-14, *K. pneumoniae* KC-1 に対して 1 回投与では CCL は CEX より優れた治療効果を示した。CCL は CEX より血漿中，腹腔内濃度が共に低い傾向が認められたにもかかわらず，また CCL, CEX との MIC 比以上に優れた治療効果が得られた要因は CCL が CEX より強い殺菌作用を有しているためと考えられる。また CCL の強い殺菌作用は菌量の影響に関する実験で，*E. coli* KC-14 に対して CCL は CEX に比べ，菌量の増加に伴なう治療効果の低下が小さかった要因とも関連していると考えられる。しかし，*K. pneumoniae* KC-1 で

Fig. 22 Bactericidal activity of CEX after oral administration to mice infected with *K. pneumoniae* KC-1



は両薬共に菌量の増加に伴なって治療効果の低下が同程度認められた。この事は治療実験に用いた *K. pneumoniae* KC-1 の challenge LD_{50} が非常に高いためと考えられ低い接種菌量での検討が必要と考えられる。1 時間間隔で頻回投与した場合，両菌種共に高，低接種菌量にかかわらず CCL, CEX 共に 1 回投与に比べ治療効果は良くならなかった。しかし，頻回投与の治療に要する総投与量は 1 回投与の総投与量と変らないため，1 回当りの投与量は減少しており，また頻回投与における腹腔内生菌数変化と併せて考えれば，両薬共に治療効果を発現させるには有効濃度以上の高さでなく，有効濃度の維持時間が必要と考えられる。

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. Bact. 58 : 475～490, 1949

3) EAGLE, H. & 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 penillin 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 the rapeutic efficacy. New Engl. J. Med. 248 : 481～488, 1953

6) 岩日朋幸，中沢昭三：化学療法剤の投与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) 佐藤 清，中沢昭三：化学療法剤の投与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

8) 三和秀明，大槻雅子，平井芳美，中沢昭三：化学療法剤の投与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

9) 渡辺泰雄，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与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

10) 皆川治重，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与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

11) 尾花芳樹，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与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) 戸辺健介，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与法に関する実験的解析 7. 大腸菌に対する Cefoxitin の効果。Chemotherapy 26(S-1): 100～119, 1978

13) 尾花芳樹，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与法に関する実験的解析 8. 緑膿菌に対する AB-206 の効果。Chemotherapy 26(S-4) : 41～47, 1978

14) 宇津井幸男，西野武志，中沢昭三：化学療法剤の投与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。Chemotherapy 26(S-5): 57～66, 1978

15) 岩日朋幸，西野武志：化学療法剤の投与法に関する実験的解析 10．緑膿菌に対するCefsulodin (SCE-129) の効果。Chemotherapy 27(S-2): 87～100, 1979

16) 平井芳美，西野武志：化学療法剤の投与法に関する実験的解析 11．大腸菌ならびに肺炎桿菌に対するCefamandoleの効果。Chemotherapy 27(S-5): 59～69, 1979

16) 大槻雅子，西野武志：化学療法剤の投与法に関する実験的解析 12．大腸菌ならびに肺炎桿菌に対するCefuroximeの効果。Chemotherapy 27(S-6): 83～90, 1979

EXPERIMENTAL STUDIES ON ADMISTRATION METHOD OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENT

14. EFFECT OF CEFACLOR AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

HIDEAKI MIWA, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

As an aid for seeking an optimal method for dosing cefaclor (CCL), a new oral cephalosporin antibiotic, against *E. coli* KC-14 and *K. pneumoniae* KC-1 infections in mice, both *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of CCL were studied using cephalexin (CEX) as control drug, and the following results were obtained.

1. Bactericidal action of CCL on *E. coli* KC-14 and *K. pneumoniae* KC-1 was superior to that of CEX *in vitro.*

2. *E. coli* KC-14 and *K. pneumoniae* KC-1 damaged by 1 MIC of both drugs, when free from the drugs immediately began to regrow; however, unlike CEX, higher concentration (5 or 10 MIC) of CCL caused a lag time until regrowth of these bacteria *in vitro.*

3. The therapeutic effect of CCL on *E. coli* KC-14 and *K. pneumoniae* KC-1 infections in mice was superior to that of CEX. On the other hand, the thereutic effect in multiple administrations of both drugs on these infections was as effective as their single administrations.

4 The factor of influencing the therapeutic effect of both drugs was found to be total duration of both of the effective concentration.