

気道障害マウスを用いた実験的肺炎桿菌性肺炎の治療に関する研究

田 野 吉 彦

川崎医科大学呼吸器内科

(指導: 副島林造教授)

(昭和 55 年 9 月 29 日受付)

難治性呼吸器感染症の治療実験モデルとして、1%ホルマリンによる気道障害マウスを用い肺炎桿菌噴霧感染による実験的肺炎を作製し、気道障害時の化学療法の効果について検討した。

抗生物質1回投与後の肺内生菌数減少と再増殖開始までの時間を検討した結果、Cefotaxime (CTX) と Gentamicin (GM) を併用した場合、単独投与に比し、肺内生菌数の減少率が大きく、且つ再増殖開始時間の延長を認めた。

また、一定時間毎に抗生物質反復投与した場合の肺内生菌数の変化を経時的に検討した結果、肺内生菌数が10以下に減少しても治療を中止すれば再燃増殖し、治癒するには、さらに健常マウス群では24時間以上、気道障害マウス群では、48時間以上の継続が必要であった。治療開始時から12時間内の肺内生菌数の減少率が大きければ、再増殖開始時間が延長し、とくにCTXとGMの併用において顕著であった。

抗生物質投与後の生存期間について検討した結果、健常群は、CTX単独でもほぼ治癒させることが可能であったが、CTXとGMの併用により治療期間を短縮することができた。しかし、気道障害群の場合、CTX単独では、治癒困難で、肺内生菌数の減少率が大きいCTXとGMの併用により治癒可能となり、初期における強力な化学療法を必要とした。また健常群より2倍以上長期の治療が必要であった。

以上、肺組織障害を伴う気道障害群の場合、初期強化化学療法的重要性が示唆され、こういう例における有効な強化化学療法について、今後さらに検討をすすめる必要があると考えられた。

I. 緒 言

近年、抗生物質の開発と普及により細菌性感染症、とくに細菌による伝染性疾患は著しく減少して来た。しかし、相次ぐ新抗生物質の開発¹⁾にも拘わらず、むしろ化学療法に抵抗する難治性感染症の増加²⁾が目立っている。

抗生物質の登場以来、細菌性感染症の問題点として、先づ第1に原因菌の変貌が挙げられる。抗生物質登場前の細菌性肺炎の原因菌は、肺炎双球菌³⁾が主であり原因菌決定も比較的容易であったが、ペニシリンの普及と共にペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が院内感染の原因菌として注目されるようになった⁴⁾。その後次々と新しい抗生物質が登場して来たにも拘わらず、最近ではこれらの薬剤に比較的感受性の低い、セラチア、エンテロバクター、クレブシエラ、あるいは緑膿菌を主とするブドウ糖非酵溶性グラム陰性桿菌など、従来弱毒菌と考えられていた菌群が、難治感染症の原因菌として重要視されるようになって来ている^{5,6)}。

第2の問題点は宿主側の要因である。最近では、医学

の進歩と相まって老令人口の増加、さらに白血病や悪性腫瘍患者など重症患者を取り扱う機会も多く、加えてステロイド剤や抗腫瘍剤など免疫抑制剤などの多用により、宿主側の感染防御能の低下による、いわゆるOpportunistic infection⁷⁾が注目されている。とくに肺は、そのtarget organとして重要である。このようなCompromised hostだけでなく、呼吸器感染症難治化の要因として肺の局所障害についても考慮する必要がある。例えば気管支拡張症や慢性気管支炎のように慢性的気道障害が存在する場合や、肺気腫のように肺胞壁の破壊を伴うような場合には、しばしば化学療法に抵抗し難治性となる^{8,9)}。

難治性感染症に対する対策としては、先ず宿主側要因の除去が重要であるが、現実には困難なことが多い。近年開発されている新しい抗生物質は、*in vitro*では優れた抗菌力を示すものが多いが、臨床的效果は必ずしも抗菌力の増強と平行しない場合があり、*in vitro*と*in vivo*効果に解離が見られる。このような解離の原因を明らかにして、化学療法による臨床効果をより一層高め

るためには、*in vivo* での実験的解析が必要である。

化学療法の動物実験的解析は、EAGLE ら^{10,11)}の一連の研究があるが、呼吸器感染症をモデルとした実験は、古くは BLAKE ら¹²⁾が猿を用いての肺炎双球菌性肺炎の成績がある。さらに GREEN & KASS¹³⁾, PENNINGTON¹⁴⁾など多くの研究者が、呼吸器感染に対する肺の防御機構の解明を目的として噴霧感染実験をおこなっている。しかし、呼吸器感染症に対する化学療法の効果を系統的に検討した実験は比較的少なく、WOOD ら^{15,16,17)}および SCHMIDT ら¹⁸⁾、本邦では西村¹⁹⁾および松本ら^{20,21)}のマウスを用いた実験等があるだけであり、とくに気道障害動物を用いての感染治療実験は極めて少ない。

そこで、すでに MATSUSHIMA ら²²⁾が報告している気道障害マウスと健常マウスを用いて、噴霧感染による肺炎桿菌性肺炎を作製し、気道障害時の化学療法の効果について検討をおこない、若干の知見を得たので報告する。

II. 実験方法

1. 気道障害マウスおよび肺炎桿菌性肺炎の作製

1) 材料

(1) 使用マウス：ICR マウス，雄，体重 22～24 g (4～6週令)

(2) 使用細菌：*Klebsiella pneumoniae* B-54 株（長崎大学熱研内科 松本慶蔵教授から分与された臨床分離株）を Heart Infusion Broth に 48 時間培養後、さらに継代して 24 時間培養した菌液（ $1\sim 2 \times 10^8$ /ml）を用いた。

(3) 噴霧感染装置（Fig. 1）：円筒型の透明プラスチック装置で、上方に取り付けたジェット式ネブライザーにより菌液を噴霧し、底部から吸引しながら滅菌排除する方式を用いた。

2) 方法

(1) 気道障害の作製：マウスをエーテル麻酔下で、1% ホルマリンを経鼻的に 5 滴滴下吸入させ気道障害を惹起させ、経時的に肺について組織学的検討をおこなった。

(2) 噴霧感染：上記の噴霧感染装置を用いて、1～2

$\times 10^8$ /ml の菌液、6～7 ml を 25 分間かけて噴霧感染した。感染後、経時的にマウスを屠殺し、肺内生菌数（CFU/lung）ならびに HE 染色による組織学的検討をおこなった。

(3) 肺内生菌数測定法：屠殺したマウスを、ヒビタン液に漬け、ホモジナイザーに滅菌生理食塩水 2 ml 加え、ホモジナイズした。さらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈系列を作製し 0.1 ml ずつ普通寒天培地に接種し、24 時間培養後集落数を測定し、マウス肺当りの菌数を算定した。1 回に 1 群 10 匹とし、それらの値の幾何平均値を求めて各時点の肺内生菌数とした。

2. 治療別肺内生菌数の検討

材料および方法

原則として感染 18 時間後から治療開始し、その後の肺内生菌数を経時的に測定した。各群の肺内生菌数は、1 群 3 匹を用いたので 3 つの値の幾何平均値を求め、その数値を各時点の肺内生菌数とし、さらに治療開始時の肺内生菌数に対する各時点の肺内生菌数の割合を対数で求めて減少率とした。

1) 治療薬剤

a) Cefotaxime (CTX), 40 mg/kg, 80 mg/kg 単独使用群

b) Gentamicin (GM), 1 mg/kg, 2 mg/kg 単独使用群

c) CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg 併用群を用いてマウス的大腿部に筋注した。

ii) 投与方法

a) 1 回投与群

b) 分割投与群：CTX 20 mg/kg を 30 分毎 4 回（総量 80 mg/kg）分割投与した。

c) 反復投与群：CTX 40 mg/kg, 80 mg/kg 単独使用群, GM 2 mg/kg 単独使用群および CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg 併用群について、6 時間毎 3 回投与した場合、さらに 12 時間後に同様の治療をくり返した場合について肺内生菌数の推移を検討した。なお、これらの治療群については、1 群 5 匹として同時に死亡率についても検討した。

3. 治療期間の検討

治療法は、CTX 40 mg/kg, 80 mg/kg 単独使用群, GM 2 mg/kg 単独使用群, CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg 併用群を 1 日 3 回投与し、治療期間は、3 日間、5 日間、7 日間および 10 日間継続に分け、治療開始 14 日までの累積死亡率を求めた。各治療群は、各々 10 匹のマウスを使用した。

4. 細菌の増殖曲線に及ぼす薬剤効果についての検討
Heart Infusion Broth に 48 時間培養後さらに継代し

Fig. 1 Aerosol exposure apparatus

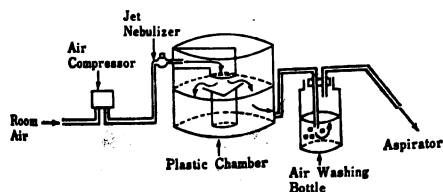


Fig. 2 Effect of antibiotics on the growth curve of bacteria

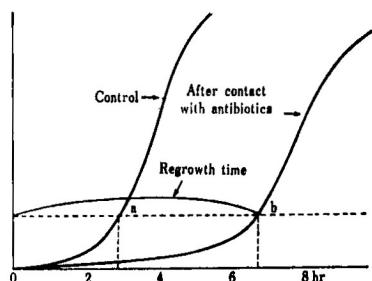


Fig. 3 Scanning electron micrograph of the bronchus 5 days after the transnasal application of 5 drops of 1% formaldehyde ($\times 2000$)



24 時間培養した *Klebsiella* B-54 株を用い、CTX 0.4～3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独、GM 0.78～1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単独および CTX と GM を併用添加し、37℃ で 1～4 時間接触させた。その後直ちに生食水で 2 回洗滌し薬剤の影響を除去した後、L 型試験管に分注し、Biophotometer を用いて振盪培養しながら菌の増殖状況を経時的に観察した。

各薬剤添加群の再増殖開始時間は、Fig. 2 に示すとおり、薬剤を加えない菌の増殖曲線の変曲点 a を求め、その水平線上で交わる b 点をそれぞれの再増殖開始時間とした。

III. 実験結果

実験 1. 気道障害マウスおよび肺炎桿菌性肺炎作製

1) 1% ホルマリン処置によるマウス肺組織の変化

1% ホルマリン処置後経時的に気管支肺胞系の変化をみた結果、直後では著明な浮腫状の変化と共に線毛の短縮、脱落、肺胞中隔の細胞浸潤が認められた。5 日後には浮腫性変化はかなり軽減しても、Fig. 3 に走査電頭像で示すとおり、著明な線毛の脱落が認められ、肺胞中隔の肥厚 (Fig. 4) も認められている。こういう変化は 7～10 日間にわたり持続しているが、その後、線毛の再生像

Fig. 4 Scanning electron micrograph of the lung 5 days after the transnasal application of 5 drops of 1% formaldehyde ($\times 900$)

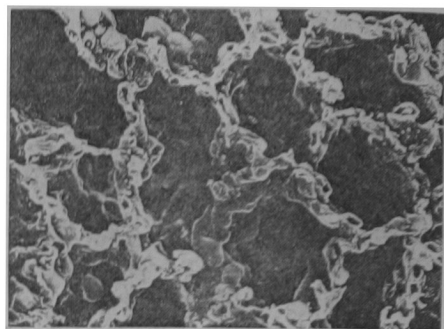
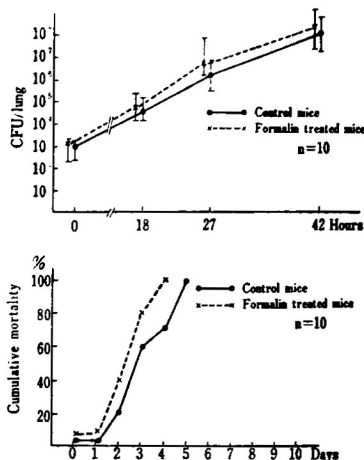


Fig. 5 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice challenged with *Klebsiella*

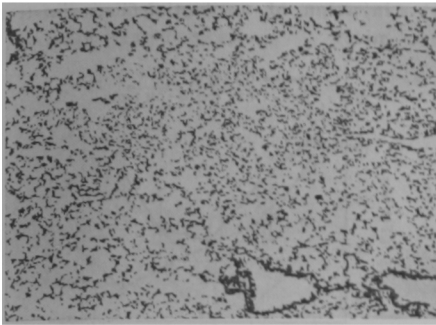


が認められるようになった。

2) 肺炎桿菌噴霧感染後の肺内生菌数ならびに死亡率の検討

健常マウス群 (C 群) と気道障害マウス群 (F 群) について、肺炎桿菌噴霧感染後の経時的肺内生菌数と、その死亡状況をそれぞれ Fig. 5 の上、下段に示した。噴霧菌量 $1\sim 2\times 10^8$ の場合、感染直後の肺内生菌数は、C 群 1.3×10^3 、F 群 1.6×10^3 で 18 時間後は、C 群 5.6×10^4 、F 群 6.5×10^4 であり、両群間に殆んど差は認められなかった。27 時間後は、C 群 2.4×10^6 、F 群 7.7×10^6 、42 時間後は、C 群 1.2×10^8 、F 群 3.2×10^8 であり、F 群は C 群に比し 27 時間後では $P<0.2$ 、42 時間後では $P<0.1$ で有意に増加している傾向が認められ

Fig. 6 Lung of a mouse 18 hours after challenging with *Klebsiella* B-54 (HE stain $\times 100$)



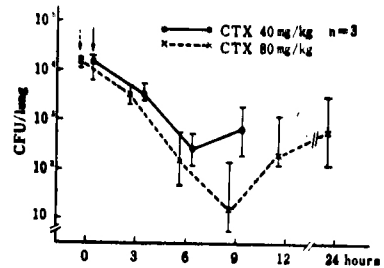
た。死亡率については、F群でやや早期に死亡する傾向が認められたが感染4～5日後までにC群、F群ともに100%死亡した。

3) 肺炎桿菌噴霧感染後の組織学的検討

感染18時間後の組織は、一部健常部位も認められるが、ほぼびまん性に肺胞腔内に軽度の浸出液が認められ、肺胞中隔は浮腫状で好中球を含む浸潤細胞が見られた。Fig. 6にC群の組織所見を示したが、F群もほぼ同様の所見で、ともに肺膿瘍の形成は見られなかった。しかし、感染42時間後の組織所見では、C群 (Fig. 7-A)、F群 (Fig. 7-B) とともに肺膿瘍を形成し、F群はC群に比べて著明であった。

以上の結果から、*Klebsiella* B-54 株の噴霧感染により、18時間後には軽度ながら組織学的に明らかな肺炎形成が認められ、しかもそのまま放置すれば5日以内に全例死亡することが確認された。このような実験系のもとに治療実験を行ない、気道障害マウスと健常マウスにおける治療効果の検討を行なった。

Fig. 8 Viable counts and decreasing rate of bacteria in murine lung treated with single injection of antibiotics (Control mice)



Hours	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr
CTX 40mg/kg	-0.538	-1.677	-1.329		
CTX 80mg/kg	-0.447	-1.899	-2.970	-1.655	-1.232
Significance	N.S.	N.S.	P<0.2		

実験 2, 治療実験

1) 治療法別肺内生菌数の検討

a) 1回投与群

① 健常マウス群: CTX 40 mg/kg, 80 mg/kg を投与した場合の成績を Fig. 8 に示した。40 mg/kg では6時間まで減少傾向を示し、6時間後の肺内生菌数は 4.0×10^5 であったが、9時間後には増殖傾向が認められた。80 mg/kg ではさらに9時間後まで減少しつづけ、その時の肺内生菌数は 1.5×10^4 であった。減少率でみても80 mg/kg 投与群が優れていた。Fig. 9 には、GM 単独および CTX と GM 併用の場合の肺内生菌数の成績を示した。GM 1 mg/kg では、9時間まで減少 (5.4×10^4) し、12時間後には再増殖がみられたが、GM 2 mg/kg では、12時間まで減少 ($<10^4$) 傾向を示した。CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg の併用では、12時間まで肺内生

Fig. 7 Lung of a mouse 42 hours after challenging with *Klebsiella* B-54

(A) Control mouse (B) Formalin treated mouse (HE stain $\times 40$)

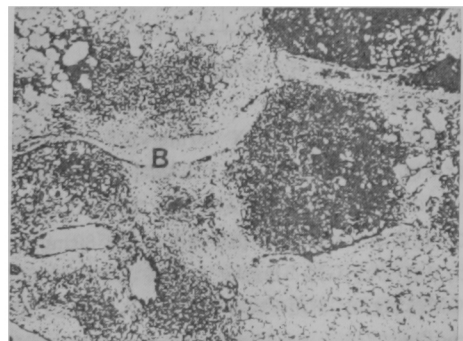
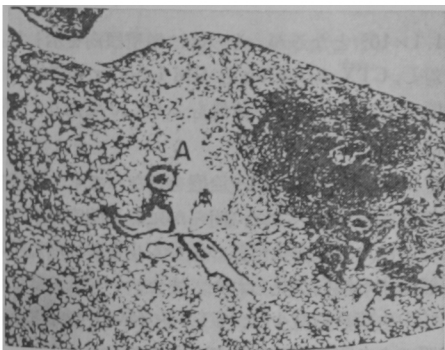
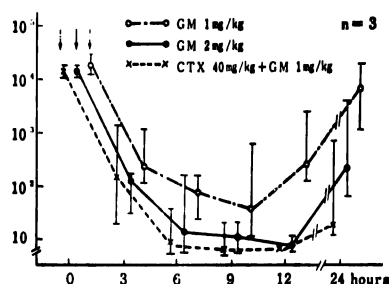
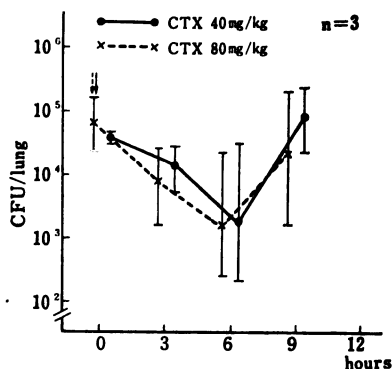


Fig. 9 Viable counts and decreasing rates of bacteria in murine lung treated with single injection of antibiotics (Control mice)



D.R.	Hours					
	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr	
CTX 40mg/kg + GM 1mg/kg	-1.888	-3.327	-3.327	-4.230	-2.686	
GM 2mg/kg	-1.882	-2.694	-2.960	-3.924	-1.356	
Significance	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P<0.2	

Fig. 10 Viable counts and decreasing rate of bacteria in murine lung treated with single injection of antibiotics (Formalin treated mice)

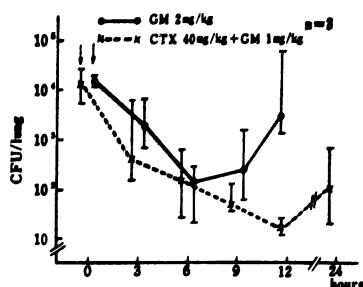


D.R.	Hours		
	3hr	6hr	9hr
CTX 40mg/kg	-0.192	-1.067	-0.535
CTX 80mg/kg	-0.967	-1.745	-0.358
Significance	N.S.	N.S.	N.S.

菌数が減少 (<10) し、その後増殖傾向を示すが、GM 単独に比し軽度であった。

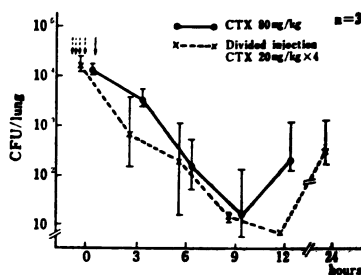
② 気道障害 マウス群: CTX 40mg/kg, 80mg/kg の成績を Fig. 10 に示した。ともに6時間まで減少傾向を示し、その時の肺内生菌数はそれぞれ 2.4×10^3 , 1.6×10^3 で有意差はなかったが、減少率をみると 80mg/kg がやや大であった。GM 2mg/kg および CTX 40mg/kg と GM 1mg/kg 併用の成績を Fig. 11 に示した。GM 2mg/kg では、6時間まで減少し、肺内生菌数

Fig. 11 Viable counts and decreasing rate of bacteria in murine lung treated with single injection of antibiotics (Formalin treated mice)



D.R.	Hours				
	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr
CTX 40mg/kg + GM 1mg/kg	-1.490	-1.982	-2.355	-2.929	-2.230
GM 2mg/kg	-0.7447	-2.135	-1.574	-0.428	
Significance	N.S.	N.S.	N.S.	P<0.1	

Fig. 12 Viable counts and decreasing rate of bacteria in murine lung treated with single and divided injection of antibiotics (Control mice)



D.R.	Hours				
	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr
CTX 90mg/kg	-0.447	-1.891	-2.970	-1.655	
CTX 20mg/kg x 4	-1.451	-1.918	-3.204	-4.038	-1.617
Significance	N.S.	N.S.	N.S.	P<0.05	

1.1×10^2 となるが、その後は増殖傾向を示した。それに対し、CTX 40mg/kg と GM 1mg/kg の併用では、12時間まで減少し肺内生菌数も 2.0×10^2 であり、併用効果が認められた。

以上のとおり、同一治療を行なっても、健常マウスと気道障害マウスでは、明らかに気道障害マウスが健常マウスに比し肺内生菌数の減少も少なく、増殖開始時間も短縮する傾向が見られた。また、いずれの群においても肺内生菌数の減少は、CTX と GM を併用した場合に著明であり再増殖時間も延長した。

Fig.13 Viable counts and decreasing rate of bacteria in murine lung treated with single and divided injection of antibiotics (Formalin treated mice)

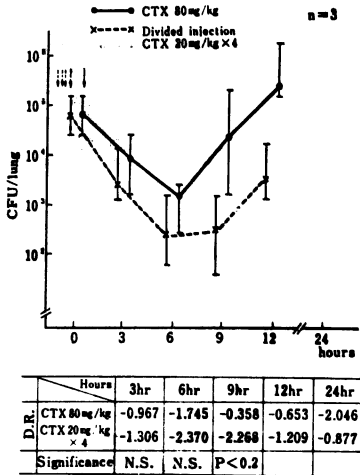
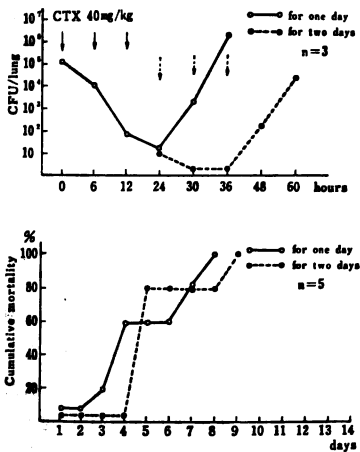


Fig.14 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Control mice)



b) 分割投与群

① 健常マウス群: CTX 20mg/kg を 30 分毎に 4 回分割投与 (総量 80mg/kg) した場合の成績を Fig.12 に示した。肺内生菌数は、12 時間まで減少し、 10^1 以下となった。投与量としては分割投与の場合と同量の 80mg/kg 1 回の場合の成績を比較すると、分割投与のほうが 12 時間後の減少率が有意に優れていた。

Fig.15 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Control mice)

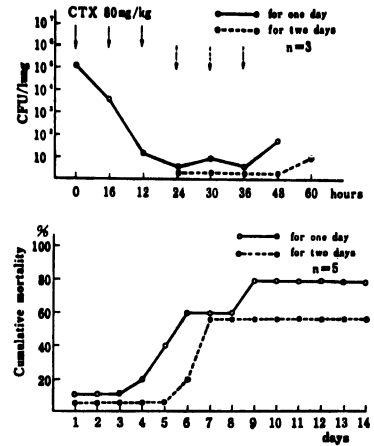
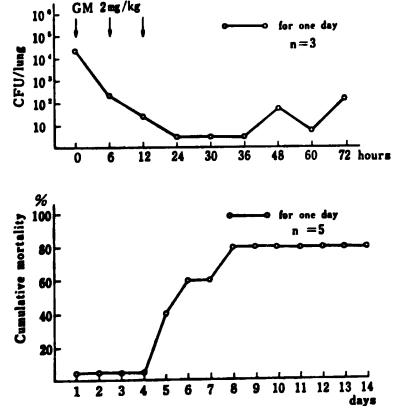


Fig.16 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Control mice)



② 気道障害マウス群: Fig.13 に示すとおり、6 時間まで減少し、9 時間後も持続がみられており、80mg/kg 1 回投与の場合より優れていた。

c) 反復投与群

① 健常マウス群: CTX 40mg/kg を 6 時間毎 3 回投与 (以下 1 日投与) の場合と、さらに 12 時間後 6 時間毎 3 回投与 (以下、2 日投与) の場合について検討した成績を Fig.14 に示した。1 日投与の場合、治療開始から 24 時間後の肺内生菌数は 4×10^1 となるが、その後速やかに増殖する。2 日投与では、30 時間後に肺内生菌数 10^1 以下となり、36 時間後も 10^1 以下に保たれているが、その後の再増殖傾向は、1 日投与の場合と全く同様

Fig. 17 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Control mice)

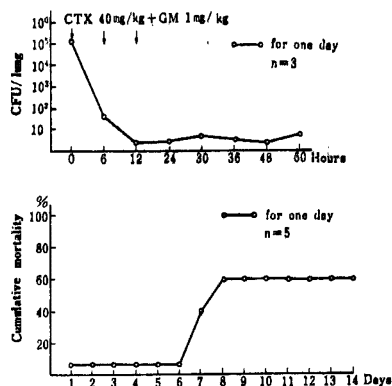
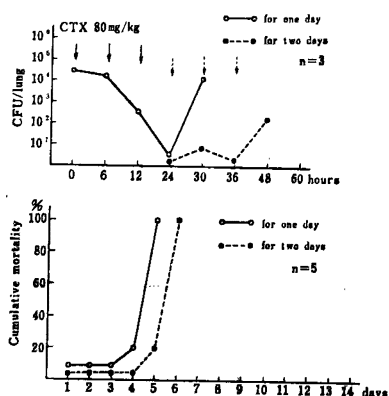


Fig. 18 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Formalin treated mice)



であり全例死亡した。しかし、CTX 80 mg/kg 投与した場合の成績は、Fig. 15 に示すとおり、1日投与でも24時間後肺内生菌数 10 以下となり36時間まで継続し、死亡率も80%であった。さらに、2日投与では、48~60時間まで肺内生菌数は10以下であり、死亡率も60%と減少した。GM 2 mg/kg 1日投与ではFig. 16 に示すとおり、24時間後に肺内生菌数 10 以下となり、ほぼ60時間まで継続し、死亡率80%であった。次にCTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg の併用、1日投与では、Fig. 17 に示すとおり、肺内生菌数の減少も速やかで、12時間後に10以下となり、60時間まで継続し、死亡率は60%であった。

② 気道障害マウス群：Fig. 18 に示すとおり、CTX

Fig. 19 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Formalin treated mice)

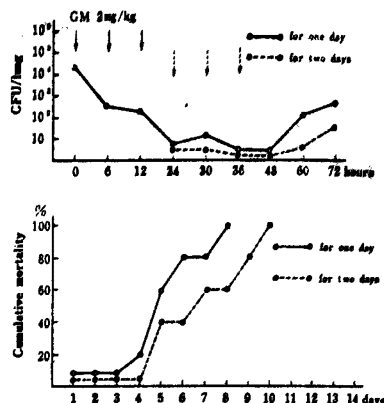
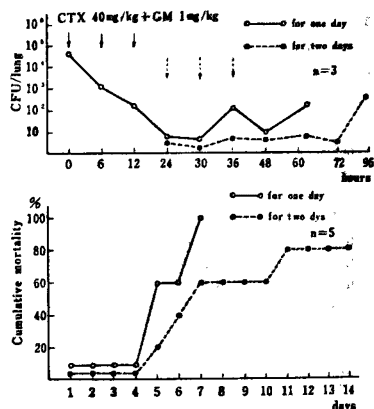


Fig. 20 Viable counts of bacteria in murine lung and cumulative mortality of mice treated with repeated injection of antibiotics (Formalin treated mice)



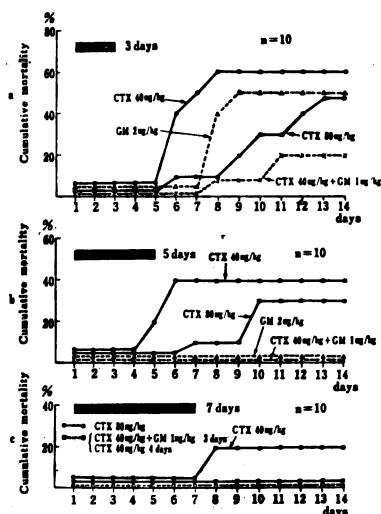
80 mg/kg の1日投与では、24時間後肺内生菌数 10 以下となるが、その後は速やかに増殖した。2日投与でも肺内生菌数 10 以下の状態が36時間まで継続するが、やはり全例死亡した。Fig. 19 に GM 2 mg/kg の成績を示した。24時間後に肺内生菌数 10 以下となり、1日投与で48時間まで、2日投与で60時間まで継続するが、ともに全例死亡した。CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg 併用の成績をFig. 20 に示した。1日投与で24時間後肺内生菌数 10 以下となり、30時間まで継続するが全例死亡した。しかし、2日投与では、肺内生菌数 10 以下が72時間まで継続し20%は生存し得た。

以上のとおり、肺内生菌数 10 以下になっても再増殖し、さらに健常マウス群では24時間以上、気道障害

Table 1 Decreasing rate of bacteria in murine lung treated with repeated injection of various antibiotics

Antibiotics		Decreasing rate		Hours CFU/lung <10
		6 hr	12 hr	
Control	CTX 40mg/kg	-0.942	-3.202	6
	CTX 80mg/kg	-1.530	-3.854	12
	GM 2mg/kg	-1.935	-2.960	36
	CTX 40mg/kg + GM 1mg/kg	-3.354	-4.578	>36
	GM 1mg/kg			
Formalin	CTX 80mg/kg	-0.621	-1.877	>6
	GM 2mg/kg	-1.743	-1.960	24
	CTX 40mg/kg + GM 1mg/kg	-1.860	-2.597	24
	GM 1mg/kg			

Fig. 21 Cumulative mortality of mice challenged with *Klebsiella* and treated with antibiotics (Control mice)

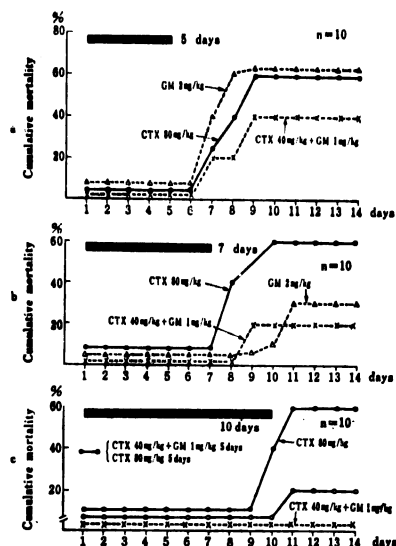


マウス群では 48 時間以上継続することにより生存例が認められた。

また Table 1 に、6 時間毎 3 回投与した時の、治療開始後 6 時間および 12 時間における肺内生菌数の減少率と、肺内生菌数 10 以下の継続時間を示した。気道障害群が健常時に比べて、同一治療でも明らかに減少率が小さく、且つ継続時間も短かった。減少率と継続時間の関係についてみると、両群ともに治療開始後 12 時間までの減少率が大きいほど、継続時間が延長する傾向が認められた。

2) 治療期間の検討

Fig. 22 Cumulative mortality of mice challenged with *Klebsiella* and treated with antibiotics (Formalin treated mice)



① 健常マウス群

Fig. 21-a, b, c にそれぞれ 3 日間、5 日間、および 7 日間投与後の死亡率を示した。3 日間投与の場合、CTX 40 mg/kg で 60%，CTX 80 mg/kg および GM 2 mg/kg がともに 50% と高い死亡率を示したが、CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg の併用では 20% と低率であった。

5 日間投与の場合、CTX 40 mg/kg で 40% の死亡率であった。GM 2 mg/kg 単独および CTX 40 mg/kg と GM 2 mg/kg の併用はともに全例生存した。

7 日間治療した場合は、CTX 40 mg/kg でも死亡率は 20% に減少し、CTX 80 mg/kg では全例生存した。また初期 3 日間だけ併用療法をおこない、その後 4 日間 CTX 単独療法を行った群も全例生存した。

② 気道障害マウス群

3 日間投与での死亡率は、CTX 80 mg/kg および GM 2 mg/kg ではともに 100%，CTX 40 mg/kg と GM 1 mg/kg の併用でも 80% と高率であった。Fig. 22-a, b, c に 5 日間、7 日間、10 日間治療後の死亡率を示した。5 日間投与の場合でも、死亡率は、CTX 80 mg/kg, GM 2 mg/kg がともに 60% を示し、併用療法でも 40% であった。

7 日間投与では、CTX 80 mg/kg 単独では 60%，GM 2 mg/kg 単独では 30%，CTX と GM の併用で 20% の死亡率であった。さらに治療を延長し、10 日投与すると、併用療法では全例生存し得た。また併用を 5 日間そ

Table 2 Effect of CTX on the growth curve of *Klebsiella* B-54

Contact time Concent.	1 hr	2 hr	4 hr
4 MIC	4.6	5.4	7.1
8 MIC	4.8	5.5	7.6
16 MIC	4.6	6.4	8.7
32 MIC	4.9	7.3	
Control		4.6	

1 MIC : <0.1 μ g/ml

の後 CTX 単独 5 日間の投与にしても死亡率は 20% であった。しかし、CTX 80 mg/kg 単独では、治療中の死亡例は認められなかったが、治療中止後、再燃悪化し 7 日間投与の場合と同じく 60% の高い死亡率であった。

なお、死亡例については、剖検し全例肺炎死であることを確認した。また、一部について、肝臓、腎臓の組織を検討したが副作用と思われる著明な臓器障害は認めなかった。ただし、GM 2 mg/kg を 5 日間投与した場合の一部の腎組織に尿細管上皮の軽度と混濁の腫脹が見られた。

実験 3. 細菌の増殖曲線に及ぼす薬剤効果についての検討

日本化学療法学会標準法に基づき測定した *Klebsiella* B-54 株に対する CTX と GM の MIC は、それぞれ 0.1 μ g/ml 以下、0.39 μ g/ml であった。

薬剤濃度と接触時間の関係について検討する目的で、CTX 4 MIC, 8 MIC, 16 MIC, 32 MIC をそれぞれ、1 時間、2 時間、4 時間菌と接触させた場合の、再増殖開始までの時間を Table 2 に示した。接触時間が 2 時間以上であれば、添加濃度に比例してわずかではあるが再増殖開始時間の延長が見られた。さらに同一濃度であっても接触時間を長くすることにより、明らかな再増殖開始時間の延長が認められた。すなわち、4 MIC 2 時間接触させた場合、32 MIC, 1 時間接触させるよりも再増殖開始時間は延長し、32 MIC 2 時間接触と 4 MIC 4 時間接触とはほぼ同等の効果であった。

次に、接触時間を 3 時間と一定にし、CTX と GM の併用効果を検討した成績を Table 3 に示した。GM 2 MIC, 4 MIC 添加時の再増殖開始時間は、それぞれ 14.5, 15.0 時間であり、添加濃度を 2 倍にしても再増殖開始時間には、ほとんど影響が見られていないが、GM 2 MIC に CTX 8 MIC を加えることにより 18.1 時間と延長が認められた。

IV. 考 察

ホルマリン処置による気道障害マウスは、形態的に線

Table 3 Combined action of CTX and GM on the growth curve of *Klebsiella* B-54

Contact time Concent.	3 hr
CTX 8 MIC+GM 2 MIC	18.1
CTX 8 MIC	4.9
CTX 16 MIC	6.4
GM 2 MIC	14.5
GM 4 MIC	15.0
Control	3.9

1 MIC

CTX : <0.1 μ g/mlGM : 0.39 μ g/ml

毛の脱落、肺胞壁の肥厚等が認められており、肺炎桿菌による噴霧感染を行うと、感染 27 時間後では、気道障害群と健常群の間に肺内生菌数に有意の差が認められた。さらに 42 時間後の膿瘍形成の程度は気道障害群がより著明であった。実験的肺炎に対する同一治療でも、肺内生菌数、死亡率、組織の面において、いずれも明らかに健常群より劣っていた。

このような両群の差異の原因として、第 1 に肺の感染防御能に関する問題が挙げられる。GREEN & KASS¹⁰⁾ は、肺の感染防御機構として、(1) 異物を物理的に排除しようとする Mechanical Clearance (2) 肺胞マクロファージ、白血球等が主役を演じる Phagocytic Mechanism をとり挙げ、感染初期においては、とくに肺胞マクロファージの重要性を強調した。今回私が用いた気道障害マウスでは、線毛の脱落が著明で Mechanical Clearance の低下は容易に想像されるのであるが、³²P でラベルした *Staphylococcus aureus* を用いて Mechanical Clearance を検討した成績では 22% 以下であり、健常マウス (16%) との間に有意差はなく無視し得るものと考えられた。Phagocytic mechanism についてはさらに詳細な検討は行っていないが、肺洗浄により得られた肺胞マクロファージを主とする総細胞数やその貪食能のコントロールと殆んど差がなく intracellular Killing だけの低下を認めた。さらに気管支線由来と考えられている分泌型免疫グロブリンが肺胞マクロファージの活性化に関与しているといわれており²¹⁾、気管支線障害による肺胞マクロファージの活性化の低下なども考えられる。また、SMITH & WOOD¹⁷⁾ は感染薬の治療過程において、抗生物質の他に多核白血球の貪食能を重要視しているが、気道障害マウスの感染の場合、肺胞マクロファージと白血球のいずれがより多く関与しているかは今後の課題である。

第 2 に、抗生物質の肺への臓器移行性の問題が挙げら

れる。肺への菌移行を左右する因子として、深谷²⁴⁾は、炎症病巣の stage に関係し、肺炎の程度が強い部位ほど毛細血管は拡張し充血しているので健常部位より抗生物質の移行は良好であるとしている。また松本²⁵⁾は、抗生物質の種類が関係するとした。しかし、気道障害マウスの場合、毛細血管等の障害により肺への抗生物質の移行は悪いであろうことが予想される。

第3に、治療開始時に両群の肺炎の程度に差が見られないかの問題があるが、治療を開始した感染 18 時間後の肺内生菌数、肺組織所見は健常マウスと有意な差は見られなかった。

以上、気道障害マウスの難治化の原因は必ずしも明確でなく今後の問題であるが、いずれにせよ気道障害マウスを用いての実験的肺炎の作製は、難治性肺感染症の治療実験モデルとして化学療法解析の研究に今後大いに役立つものと考えられる。

抗生物質 1 回投与後の肺内生菌数減少と再増殖開始までの時間を検討した結果、CTX と GM の併用において、肺内生菌数の減少が単独投与に比較して、より急峻に下降し、且つ再増殖開始までの時間延長を認めた。また、Biophotometer による *in vitro* の実験でも同様の結果を得ており、肺炎桿菌感染に対する CTX と GM の併用は有効であると考えられた。肺炎桿菌に対するセファロスポリン系抗生物質とアミノ糖系抗生物質の併用効果は *in vitro* で認められているが²⁶⁾、今回私が行ったマウスを用いての実験的肺炎の治療においても明らかに有効であった。中沢²⁷⁾は、*Pseudomonas aeruginosa* に対して、合成ペニシリン (CBPC, SBPC) とアミノ糖系抗生物質 (GM, DKB) の併用効果を認め、形態的な面からその理由を説明している。すなわち、GM による細胞表面の切断と Penicillin による Peptidoglycan 層攻撃という 2 面からの攻撃と Penicillin を併用することにより、GM がより速く細胞質内の蛋白合成の場であるリボゾムの第 1 次作用点に到達し易くなるためであろうとしている。セファロスポリン系抗生物質も合成ペニシリンと同様に細菌の Cell Wall を attach するため GM がより速く細胞質内に入り易くなるためと考えられる。

CTX 20mg/kg 30 分毎 4 回分割投与と CTX 80mg/kg 1 回投与では、明らかに分割投与が肺内生菌数の減少が急峻で、増殖開始時間の延長も見られた。分割投与の場合は、1 回投与より最高血中濃度は低いのであるが、血中濃度の持続時間が長くなるため菌と抗生物質の接触時間が長くなると考えられる。とくに CTX の場合、血中濃度の低下が速やかであるので 1 回投与と分割投与の間でより顕著な差が見られたのかも知れない。菌と薬剤接触濃度および時間に関する報告は EAGLE

ら^{10,11)}を始めとして尾崎²⁸⁾、STILLE²⁹⁾の多くの報告があるが、肺炎桿菌に対する CTX の効果は、むしろ最高血中濃度を高めるより、菌に有効な薬剤濃度を出来るだけ長く接触させるほうがより効果的であるといえる。この *in vivo* の実験結果は Biophotometer を用いての *in vitro* の実験でも同様の結果が得られており、また他のセファロスポリン系抗生物質についても同様であった³⁰⁾。このような考えから、肺炎桿菌性肺炎マウスを用いて、各種セファロスポリン系抗生物質について 1 日 1 ~ 2 回投与と 3 回分割投与について治療効果を検討した成績でも、1 日投与量が同じであれば 3 回分割投与が有効であった成績を得ている^{31,32)}。EAGLE¹⁰⁾は、溶連菌、肺炎双球菌に対する PCG の効果を投与法の面から実験的考察を加え、間歇大量投与より頻回分割投与のほうが、一定時間に治療する量が少なくすむとしている。西野³³⁾は、感染菌種、使用薬剤が異なれば、薬剤の至適投与法も異なることが予想されるとし、大腸菌、緑膿菌等のグラム陰性桿菌を対象に SBPC, Cephalothin (CET), GM 等を用いて、*in vitro* と *in vivo* の実験を行った結果、緑膿菌に対する SBPC, T-1220 は、薬剤濃度より最少有効濃度以上維持される時間がより重要な役割を演じるとし、GM 等のアミノ糖系抗生物質は、有効濃度の高さが関係するとした。また、セファロスポリン系抗生物質は、CET, CEZ を用いて大腸菌に対する効果を検討し、1 回投与より頻回投与がより優れており有効濃度の持続時間が重要としている。

一定時間毎の抗生物質投与による肺炎桿菌性肺炎マウスに対する治療過程について検討した結果、肺内生菌数が 10 以下に減少してもそこで治療を中止すれば再燃増殖し、治療するためには、健常マウス群では、さらに 24 時間以上、気道障害マウス群では 48 時間以上の継続が必要である。EAGLE¹⁰⁾の実験によると液体培地に PCG を β -溶連菌に一定時間接触させると急速に菌は死滅するが、その後ペニシナーゼで PCG を分解してもすぐに再増殖せず、増殖するまでの lag time が存在し、これは *in vivo* において、より長くなることを報告している。本実験における肺内生菌数 10 以下の継続時間は、この lag time に相当すると考えられ、この間の治療中止が再燃増殖の原因となっていると思われる。lag time の機序は、今日も不明であるが、島田³⁴⁾は、生存菌の細胞壁に何らかの形で抗生物質分子が付着して細胞壁を損傷する可能性を推定している。さらに治療開始時から 12 時間内の肺内生菌数の減少率が大きければ、肺内生菌数 10 以下の継続時間が延長し、とくに CTX と GM の併用において顕著であった。健常マウス群は、CTX 単独でもほぼ治療させ得たが、CTX と GM の併

用により治療期間の短縮が可能であった。しかし、気道障害マウス群の場合は、CTX 単独では、大量使用でも治癒させ得ず、肺内生菌数の減少率が大きであった CTX と GM の併用の場合にだけ治癒可能であった。初期強化化学療法的重要性が示唆される所見であると考えている。しかし治療期間は、健常マウス群より2倍以上延長する必要があった。このように気道障害群では、より長期に治癒しなければ治癒させ得なかった理由は、24 時間内に肺内生菌数 10 以下になっても組織学的には肺炎像は正常に修復しておらず、肺組織障害における宿主側の細菌に対する反応態度が重要であり、とくに肺胞マクロファージの殺菌能の低下が原因であろう。こういう例におけるより有効な強化化学療法については今後さらに検討をすすめる必要があると考えている。

なお、本研究の一部は、第 27 回日本化学療法学会総会および西日本支部総会において報告した。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました恩師副島林造教授に感謝するとともに、本研究に御助言を頂いた松島敏春助教授および協力頂いた本学大学院生 二木芳人先生、研究補助員 佐々文子氏に感謝します。

文 献

- 1) 真下啓明：抗生物質の動向と将来。最新医学 34: 1454~1457, 1979
- 2) 原 耕平：シンポジウム、細菌感染症の化学療法 内科系感染症の化学療法の問題点、(i) 呼吸器感染症。日内会誌 66: 1373~1377, 1977
- 3) 真下啓明編：内科シリーズ No. 22 肺炎のすべて、肺炎球菌性肺炎（塩田憲三）、150~162 頁、南江堂、1976
- 4) MITCHELL, A. A. B.; R. I. S. DUNN & T. W. LEES: Staphylococcal pulmonary infection. Lancet II: 669~672, 1961
- 5) PIERCE, A. K. & J. P. SANFORD: Aerobic gram-negative bacillary pneumonias. Am. Rev. Respir. Dis. 110: 647~658, 1974
- 6) YU, V. L.: *Serratia marcescens*: Historical perspective and clinical review. New Engl. J. Med. 300: 887~893, 1979
- 7) KLAINER, A. S. & W. R. BEISEL: Opportunistic infection. A review. Amer. J. Med. Sci. 258: 431~456, 1969
- 8) 塩田憲三：呼吸器感染症最近の動向。日胸疾会誌 15: 445~454, 1977
- 9) 田野吉彦、二木芳人、繁治健一、加藤 収、小林武彦、松島敏春、副島林造：過去5年間当院における呼吸器感染症入院患者の臨床的検討一特に難治化の要因と化学療法効果について一。第 19 回日本胸部疾患学会総会発表、1979
- 10) 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
- 11) 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
- 12) BLAKE, F. G. & R. CECIL: Studies on experimental pneumonia. I. Production of pneumococcus lobar pneumonia in monkeys. J. Exp. Med. 31: 403~443, 1920
- 13) GREEN, G. M. & E. H. KASS: The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung. J. Exp. Med. 119: 167~177, 1964
- 14) PENNINGTON, J. E.: Bronchoalveolar cell response to bacterial challenge in the immunosuppressed lung. Amer. Rev. Respir. Dis. 116: 885~893, 1977
- 15) SALE, L. Jr. & W. B. WOOD, Jr.: Studies on the mechanism of recovery in pneumonia due to FRIEDLÄNDER's bacillus. I. The pathogenesis of experimental FRIEDLÄNDER's bacillus pneumonia. J. Exp. Med. 86: 239~247, 1947
- 16) SALE, L. Jr.; M. R. SMITH & W. R. WOOD, Jr.: Studies on the mechanism of recovery in pneumonia due to FRIEDLÄNDER's bacillus. II. The effect of sulfonamide chemotherapy upon the pulmonary lesion of experimental FRIEDLÄNDER's bacillus pneumonia. J. Exp. Med. 86: 249~255, 1947
- 17) SMITH, M. R. & W. B. WOOD, Jr.: An experimental analysis of the curative action of penicillin in acute bacterial infections. III. The effect of suppuration upon the antibacterial action of the drug. J. Exp. Med. 103: 509~521, 1956
- 18) SCHMIDT, L. H. & A. WALLEY: The influence of the dosage regimen on the therapeutic effectiveness of penicillin G in experimental lobar pneumonia. J. Pharmacol. & Exper. Therap. 103: 479~488, 1951
- 19) 西武、土屋院司：K. pneumoniae による実験的マウス気道感染症 Cephalosporin の効果。Chemotherapy 27: 141, 1979
- 20) 松本慶蔵、宇塚良夫、永武 毅、矢戸春美、鈴木寛、野口行雄、玉置公俊、井手政利、渡辺貴和雄：肺炎桿菌性マウス実験肺炎を場とする Cefazolin による化学療法の解析。Chemotherapy 27: 109~115, 1979
- 21) 松本慶蔵、宇塚良夫、永武 毅、矢戸春美、渡辺貴和雄：実験肺炎治療過程における3相性肺内生菌数減少パターン。Chemotherapy 27: 801~

- 806, 1979
- 22) MATSUSHIMA, T.; D. MIZOGUCHI & R. SOEJIMA : Experimental mouse pneumonia following lung injury with one percent formaldehyde. Kawasaki Medical Journal 4 : 35~46, 1978
 - 23) 安藤正幸, 志摩 清, 徳巨晴比古 : 肺胞マクロファージその機能と役割について一。日本胸部臨床 36 : 635~645, 1977
 - 24) 深谷一太 : 抗生物質の体内濃度測定の問題点とその意義—とくに臓器内濃度について—1 肺。最新医学 28 : 390~395, 1973
 - 25) 松本慶蔵, 西岡きよ, 荒井澄夫, 宇塚良夫, 磯山正文 : 抗生物質の体内濃度測定の問題点とその意義—とくに臓器内濃度について—1 肺。追加発言。最新医学 28 : 395~400, 1973
 - 26) 増田剛太, 富岡 一 : *Klebsiella* 感染症の化学療法に関する基礎的研究 : Cephalosporin 系抗生剤単独と Gentamicin との併用について。Chemotherapy 24 : 451~455, 1976
 - 27) 中沢昭三, 大槻雅子, 西野武志, 中尾雅文 : 緑膿菌に対する合成ペニシリンとアミノ配糖体抗生物質との併用に関する細菌学的研究。Chemotherapy 23 : 3201~3209, 1975
 - 28) 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 系抗生剤の殺菌効果について。第1報。In vitro における Cephalosporin 系抗生剤の *Escherichia coli* に対する殺菌効果。Chemotherapy 23 : 3179~3191, 1975
 - 29) STILLE, W. & P. SHAH : Kinetik der Bakterizidie von Ampicillin, Penicillin G, Carbenicillin, Cephalothin, Kanamycin, Gentamycin Polymyxin B und Sulfamethoxazol/Trimethoprim gegenüber *E. coli*. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 23 : 58~60, 1973
 - 30) 田野吉彦, 二木芳人, 松島敏春, 副島林造 : 細菌増殖に及ぼす薬剤濃度と接触時間についての検討。第 26 回日本化学療法学会西日本支部総会発表, 1978
 - 31) 田野吉彦, 二木芳人, 松島敏春, 副島林造 : 肺炎桿菌肺炎マウスの治療実験—主としてセファロスポリン系抗生剤の効果について—第 26 回日本化学療法学会総会発表, 1978
 - 32) 副島林造, 松島敏春, 田野吉彦, 溝口大輔, 二木芳人, 繁治健一 : Cefotiam (SCE-963) に関する研究。Chemotherapy 27 (S-3) : 334~340, 1979
 - 33) 西野武志 : 化学療法剤の投与に関する基礎的研究。最新医学 32 : 1491~1496, 1977
 - 34) 島田 馨, 稻松孝思 : 敗血症における抗生物質の投与理論とその臨床的検討—とくに Cephalosporin 系抗生物質について—。最新医学 32 : 1497~1504, 1977

STUDIES ON CHEMOTHERAPY OF EXPERIMENTAL *KLEBSIELLA* PNEUMONIA IN MICE WITH LUNG INJURY

YOSHIHIKO TANO

Division of Respiratory Disease,
Department of Internal Medicine,
Kawasaki Medical School, Kurashiki

(Director : Professor RINZO SOEJIMA)

Studies on the efficacy of chemotherapy of experimental *Klebsiella* pneumonia were made on mice with lung injury (the mice transnasally instilled with one percent formaldehyde) as an experimental model of intractable respiratory infections.

In the investigation that pneumonia was treated with a single injection of Cefotaxime (CTX) or/and Gentamicin (GM), the following result was obtained. Viable counts of bacteria in murine lung decreased more rapidly and regrowth time was prolonged much more when treated with a combination of CTX and GM than when treated with CTX or GM alone.

As for pneumonia treated with a repeated injection of CTX or/and GM, it was not cured even when viable counts of bacteria in murine lung had decreased less than 10 CFU/lung. It was necessary to continue the treatment for more than 24 hours to cure pneumonia in controlled mice, and for more than 48 hours in mice with lung injury. When viable counts of bacteria in murine lung decreased more rapidly within 12 hours, duration of less than 10 CFU/lung persisted longer, especially treated with a combination of CTX and GM.

For the survival of mice with pneumonia treated with CTX or/and GM, the following results were obtained. Pneumonia in controlled mice was cured with a treatment of CTX or GM alone. But pneumonia in mice with lung injury was not cured with the treatment of either CTX or GM. It was necessary for these mice to be treated with a combination of CTX and GM, which decreased viable counts of bacteria in murine lung more rapidly, necessitating yet longer duration of therapy.

These results suggested that initial intensive chemotherapy was more important for the treatment of pneumonia in mice with lung injury and long duration of therapy was necessary. Experimental studies should be continued on more intensive chemotherapy for pneumonia in animals with decreased lung defense.