

BRL25000 (Clavulanic acid-Amoxicillin) の実験的マウス皮下混合感染症 に対する治療効果およびマウス盲腸内細菌叢への影響

渡辺 邦友・青木 誠・磯野美登利
小林とよ子・川島 健・上野 一恵
岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

BRL25000 の *in vivo* における抗菌力および盲腸内細菌叢への影響をマウスを用いて検討し、次の結果を得た。

1. β -lactamase 産生で Amoxicillin, Cefazolin に耐性の *B. fragilis* と β -lactamase 非産生で Amoxicillin, Cefazolin に感受性の *E. coli* による皮下混合感染系において、BRL25000 は Amoxicillin 単独, Cefazolin 単独より著明に優れた治療効果を示した。

2. Amoxicillin 2 mg/mouse 1日1回, 7日間経口投与されたマウスの中止直後の盲腸内には、5匹中5匹(100%)とも *C. difficile* が多数(10^5 個以上/g)存在したが、BRL25000 を 2 mg/mouse 経口投与されたマウスの盲腸内には5匹中1匹(20%)に少数の *C. difficile* が存在したのみであった。

BRL25000 は、 β -lactamase 阻害剤である Clavulanic acid と Amoxicillin (以下 AMPC) を 1:2 の割合に配合した合剤で、 β -lactamase 産生菌による単独あるいは混合感染症への治療効果が期待されている。

著者らはすでに BRL25000 の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用について検討し、本剤が *B. fragilis* をはじめとする β -lactamase 産生菌に対し AMPC 単独ではみられなかった強力な抗菌作用を示すことを報告した¹⁾。本報では *E. coli* と *B. fragilis* による実験的マウス皮下混合感染症に対する治療成績と BRL25000 投与マウスの盲腸内細菌叢の変化、特に *C. difficile* の異常増殖の有無について述べる。

I. 実験方法

1. BRL25000 の実験的マウス皮下混合感染症に対する治療効果

dd-Y 系 雄(体重 20~25g)のマウスを用い、1群 10匹として以下の実験に供した。感染菌として β -lactamase 非産生の *Escherichia coli* (No. 1) と β -lactamase 産生の *Bacteroides fragilis* (GAI-0544) を用いた。これらの菌株の β -lactamase 産生の有無は、Penicillin G を基質とした β -lactam 錠 (Marion 社) により検査された。

E. coli の GAM ブイオンでの 24 時間嫌気培養菌の 10^5 個をマウス側腹皮下に接種、24 時間後に同部に *B. fragilis* の GAM ブイオンでの 24 時間嫌気培養菌の 10^6 個を再度接種して、*E. coli* と *B. fragilis* の混合感染巣を作製した。

B. fragilis 接種当日より、BRL25000 1.6 mg/mouse, BRL25000 0.3 mg/mouse, AMPC 1.0 mg/mouse および Cefazolin (CEZ) 4 mg/mouse を朝夕 2 回に分割 8 日間投与した。投与方法は、CEZ の皮下注射を除き、すべて経口投与とした。

経日的に生残マウス数を記録し、死亡マウスおよび治療終了マウスは、その直後屠殺・剖検し、各臓器および皮下感染部位の細菌学的検索も行なった。

なお、使用薬剤の感染菌に対する MIC は、 10^6 個接種で、*E. coli* では、AMPC 3.13 μ g/ml, CEZ 3.13 μ g/ml, BRL25000 6.25 μ g/ml であり、*B. fragilis* では、AMPC 50 μ g/ml, CEZ 100 μ g/ml, BRL25000 0.8 μ g/ml であった。

2. BRL25000 のマウス盲腸内細菌叢への影響

dd-Y 系 雄マウス(体重 20~25g)を 1 群 5 匹として以下の実験に供した。

BRL25000 2 mg/mouse, AMPC 2 mg/mouse を 1 日 1 回 7 日間経口投与し、マウス盲腸内の *C. difficile* の菌数を非投与群(対照)と比較して測定した。

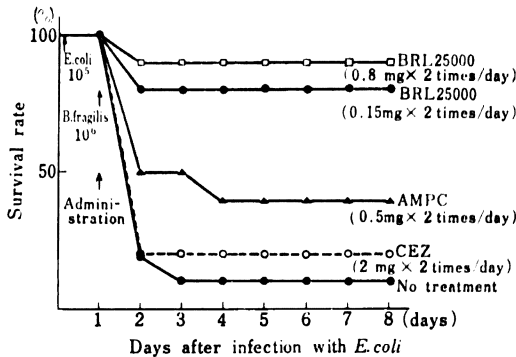
7 日目に投薬して、24 時間経過後に屠殺、解剖し、盲腸内容物を採取、直ちに嫌気性グローブボックス (Forma 社) 中に搬入、定量培養した。

盲腸内容物の希釈には、嫌気性希釈液を²⁾、*C. difficile* の分離には、使用前 24~48 時間嫌氣的に保存し充分還元された変法 CCFA 培地³⁾を用いた。

II. 成績

1. BRL25000 の実験的マウス皮下混合感染症に対

Fig. 1 Chemotherapeutic effect of BRL25000, AMPC and CEZ on experimental mixed infection with *E. coli* (β -lactamase negative) and *B. fragilis* (β -lactamase positive) in mice (n=10)



する治療効果

E. coli と *B. fragilis* を重感染させたマウスへの BRL25000 の治療効果を、AMPC、CEZ それぞれ単独の治療効果と比較した。

成績は Fig. 1 に示した。この実験条件で、非治療群では 10 匹中 9 匹 (90%) が *B. fragilis* 接種後 2 日までに死亡し、7 日目での最終判定で生存率は 10% であった。死亡したマウスからは、菌接種局所はもちろんのこと心臓、肺、肝、脾、腎など全身から *E. coli* と *B. fragilis* が検出された。しかし *B. fragilis* は *E. coli* に比べ、極めて少数しか分離されなかった。

一方 8 日目まで生存したマウスでは、菌接種部位から少数の *E. coli* と多数の *B. fragilis* が分離され、諸臓器の培養では、肝から *B. fragilis* が分離されたのみであった。

一方治療群では、BRL25000 1.6 mg 投与群、BRL25000 0.3 mg 投与群で 7 日目での生存率が、それぞれ 90%、80% と高率で、AMPC 1 mg 投与群 40%、CEZ 4 mg 投与群 20% よりそれぞれ著明に優れた。生存マウスの細菌学的検索では、菌接種部位および各臓器から *B. fragilis* は検出されなかった。

2. BRL25000 のマウス盲腸内細菌叢への影響——特に *C. difficile* の出現との関係——

AMPC および BRL25000 の 2 mg/mouse を 1 日 1 回、7 日間経口投与し、8 日目の盲腸内細菌叢、特に *C. difficile* の菌数を比較した。成績は Fig. 2 に示した。AMPC 投与マウスは、5 匹中 5 匹とも盲腸内容物 1 g 当り 10^5 個以上の *C. difficile* を認めたが、BRL25000 投与マウスは、5 匹中 1 匹に内容物 1 g 当り 1~5 個の *C. difficile* を認めたのみで、他の 4 匹には全く認められなかった。

Fig. 2 Appearance of *C. difficile* in mice cecum after BRL25000 and AMPC administration

Drug	Mouse No.	Isolation of <i>C. difficile</i>				
		1	2	3	4	5
AMPC		+++	+++	+++	+++	+++
BRL25000		+	-	-	-	-
No administration		-	-	-	-	-

Bacterial counts +++ : $>10^5$ cfu/g
 ++ : $6 \sim <10^5$ cfu/g
 + : $1 \sim 5$ cfu/g
 - : 0
 Daily dose : 2 mg/mouse for 7 days

III. 考察とまとめ

著者らは、AMPC と Clavulanic acid 2 : 1 (力価) の合剤である BRL25000 が β -lactamase 産生の *B. fragilis* をはじめとする多くの嫌気性菌に対し *in vitro* で優れた抗菌力を示すことを前報で報告した¹⁾。

β -lactamase を産生し AMPC、CEZ に耐性の *B. fragilis* と β -lactamase を産生しない AMPC、CEZ 菌に感受性の *E. coli* を用いてマウス皮下に作製した混合感染系を用いて、BRL25000 の *in vivo* での抗菌力を、AMPC、CEZ それぞれ単独と比較した。BRL25000 は、CEZ 単独による治療では全く無効であり、AMPC 単独でもわずかに 40% の生残率を示しただけであったこの感染系に対し、著明な治療効果を示した。このことは、既に著者らが指摘しているように、AMPC、CEZ に感受性の *E. coli* (β -lactamase 非産生) であっても、それが β -lactamase を産生する *B. fragilis* のような他菌種と共存しているような感染系においては、AMPC、CEZ の単独投与では治癒せしめることができないことを示しており、治療上、充分注意しなければいけないだろう²⁾。

また、近年、化学療法剤投与と関連して生じる *C. difficile* 腸炎が治療上の問題となってきている³⁻⁵⁾。

教室の青木らは、マウスに各種化学療法剤の 2 mg/mouse を 1 日 1 回 4~7 日間投与し、投与終了翌日の盲腸内 *C. difficile* 菌数を測定報告している⁷⁾。これによると上記条件で、100% *C. difficile* が盲腸内 1 g 当り 10^5 個以上に出現してくる Cefotaxime (CTX) のような薬剤 (以下 CTX 型という) と 100% *C. difficile* がみられない Cefotetan (CTT) のような薬剤 (以下 CTT 型という) およびそれらの中間型を示す薬剤があることがわかる。

今回の成績では、AMPC 単独投与では、CTX 型を示しながら、AMPC と Clavulanic acid の合剤である

BRL25000 投与では、CTT 型を示すという現象がみられた。

AMPC と Clavulanic acid の合剤は、糞便中に存在する多くの嫌気性菌に対し AMPC 単独よりも著しい抗菌力の増強が認められていること、また抗菌スペクトラムの拡大がみられることがこの現象を説明できる一つの因子であろう。即ち BRL25000 の *C. difficile* に対する MIC は 0.01 $\mu\text{g/ml}$ と AMPC のそれより 32 倍小さくなっており、また、腸管内優位菌種である *B. fragilis* group に対する MIC も AMPC の 16 倍以上小さい⁸⁾。

また、BRL25000 中の AMPC は、Clavulanic acid の存在で、腸管内でもより安定であることが容易に推測され、このこともこの現象を説明する重要な因子であろう。

文 献

- 1) 上野一恵, 渡辺邦友, 磯野美登利, 小林とよ子, 丸井利軌: 嫌気性菌に対する β -lactam 系抗生物質の抗菌作用に及ぼす Clavulanic acid の *in vitro* 併用効果。Chemotherapy 30 (S-2): 30~38, 1982
- 2) 鈴木祥一郎, 上野一恵監修: 臨床嫌気性菌マニユ

アル。ニッスイライブラリー No. 6, 日水製薬 K. K., 1979

- 3) 小林とよ子, 磯野美登利, 青木 誠, 梅村厚志, 丸井利軌, 渡辺邦友, 上野一恵: Cefmenoxime (SCE-1365) の実験的嫌気性菌マウス感染症に対する治療効果について。Chemotherapy 29(S-1): 53~56, 1981
- 4) 上野一恵, 渡辺邦友, 小林とよ子: 偽膜性腸炎と *Clostridium difficile*。モダンメディア 25(12): 798~810, 1979
- 5) 小林とよ子, 磯野美登利, 渡辺邦友, 上野一恵, 桜井恒久, 蜂須賀喜多男: 抗生剤投与中にみられた偽膜性腸炎と *Clostridium difficile*。臨床検査 24(5): 553~557, 1980
- 6) 加藤直樹, 小林とよ子, 渡辺邦友, 上野一恵: *Clostridium difficile* による Antibiotic-Associated Colitis の 2 例。感染症学雑誌 54(11): 699~707, 1980
- 7) 青木 誠, 小林とよ子, 渡辺邦友, 上野一恵: マウスにおける各種化学療法剤投与と腸管内 *Clostridium difficile* の変動について。第 11 回嫌気性菌感染症研究会講演記録: 85~90 頁, エーザイ, 1981
- 8) 第 29 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, BRL25000, 1981

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BRL25000 (CLAVULANIC ACID-AMOXICILLIN) AGAINST AN ANAEROBIC AND AEROBIC MIXED INFECTION IN MICE AND THE INFLUENCE ON CECAL MICROFLORA

KUNITOMO WATANABE, MAKOTO AOKI, MIDORI ISONO

TOYOKO KOBAYASHI, TAKESHI KAWASHIMA and KAZUE UENO,

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

The *in vivo* antibacterial activity of BRL25000 was investigated against mouse experimental mixed infection caused by β -lactamase producing strain of *B. fragilis* and β -lactamase none producing strain of *E. coli*.

The influence of treatment on mouse cecal microflora was studied following treatment with either 2 mg/kg of BRL25000 or amoxicillin for 7 days.

The following results were obtained.

1. BRL25000 produced a more potent therapeutic effect than amoxicillin and cefazolin in the mouse experimental infection study.
2. Following the administration of amoxicillin, strains of *C. difficile* were detected in numbers in excess of 10^5 cfu/g of mouse cecal contents, whereas very small number were isolated following prophylactic treatment with BRL25000.