

マウス実験的大腸菌感染症に対する Cefaclor の効果

尾花芳樹・西野武志・谷野輝雄

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 57 年 8 月 26 日受付)

マウス実験的大腸菌性腹腔内感染症および尿路感染症に対する Cefaclor(CCL) の効果について、Cephalexin(CEX) と比較検討を行なった。

腹腔内感染症において、CCL の効果は正常および Cyclophosphamide 処理による白血球減少マウスにおいて、CEX に比べ非常に優れていることが認められた。

尿路感染症においても、CCL は腎内濃度の高さや持続性が CEX より劣っているにもかかわらず、その治療効果は非常に優れており、これらは、CCL が CEX に比べ、薬物投与後短時間に、腎内菌数の減少を認めたことと一致した。また白血球減少マウスにおける本感染症モデルにおいて、CCL の効果は CEX よりも優れていた。また治療効果に及ぼす接種菌量の影響では、いずれの薬物も若干影響を受けることがわかった。さらに頻回投与の効果について検討したところ、1回投与と頻回投与との効果の差はほとんど認められず、これらの薬物の効果発現は、有効濃度以上の腎内濃度の高さではなく、有効濃度の維持時間が重要であると考えられた。

Cefaclor(CCL) は米国 Eli Lilly 社研究所において開発された経口用半合成セファロスポリン系抗生物質であり、本物質は Cephalexin(CEX) の3位の methyl 基を chlor 基で置換した化学構造を有する。本物質の *in vitro* 抗菌力は、CEX よりも 2~8 倍優れており、また殺菌・溶菌作用の点でも強いといわれている。さらに実験的腹腔内感染症における *in vivo* 効果では、CEX に比べ本物質は 4~10 倍優れていると報告されている¹⁾。

そこで今回、CCL の *in vivo* 抗菌力について、CEX を比較薬物として、実験的大腸菌性腹腔内感染症および尿路感染症に対する効果を検討したので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1) 使用動物

動物は JCL-ICR 系雌性マウス(体重 18~20g)を用いた。

2) 使用菌株

臨床材料由来の *Escherichia coli* No. 29 株を用いた。

3) 使用薬物

薬物は Cefaclor(CCL:塩野義製薬)、Cephalexin(CEX:塩野義製薬)のいずれも力価の明らかな標準品を用い、また *in vivo* 実験には 0.5% Sodium carboxymethyl cellulose(CMC)に溶解懸濁して使用した。

4) *In vitro* 抗菌力測定

最小発育阻止濃度(MIC)測定は、日本化学療法学会感受性測定法²⁾に準じて行なった。また殺菌作用の検討では、対数増殖期の菌液を用い、接種菌量を 10^5 および 10^7 cells/ml とし、各薬物添加後の生菌数を混釈法により測定した。

5) 腹腔内感染症に対する効果

菌液の調製は、Nutrient agar(NA:Nissui)で37°C 18時間斜面培養した菌を Nutrient broth(NB:Nissui)に懸濁し、同培地で希釈後、6% gastric mucin(Orthana Kemisk Fabrik A/S)と等量混合した。この菌液の 0.5 ml をマウス腹腔内に接種し、接種2時間後、薬物を経口投与し、その後7日間観察を行い、治療効果を判定した。また白血球減少マウスを用い、腹腔内感染症に対する治療効果についても検討を行なった。すなわち菌接種3日前に、Cyclophosphamide(Endoxan:塩野義製薬)250 mg/kg を腹腔内に投与し、白血球減少マウスを作製した³⁾。このマウスを用いて、約 100LD₅₀ に相当する菌液を接種し、接種2時間後、薬物を経口投与し、投与後の腹腔内菌数の消長および生死を観察した。

6) 上行性尿路感染症に対する効果

上行性尿路感染症の作製は既報⁴⁾のように行なった。すなわち菌接種前15時間給水制限をしたマウスを強制的に排尿させ、麻酔後、先端を切断し、まるめた注射針装着注射筒を用いて、0.1 ml の菌液を経尿道的に膀胱内に注入し、4時間小型クリップを用いて、外尿道口を

閉鎖, 止尿し, 上行性感染症を惹起させた。

薬物投与は, 菌接種4時間後に経口投与し, 投与後マウス両腎を摘出, ホモジナイズし, 腎内生菌数を測定した。また薬物投与時期, 分割投与, 接種菌量の影響についても検討を行なった。さらに白血球減少マウスを用いた尿路感染症に対する効果についても検討を行なった。

7) 腎内薬物濃度の測定

上行性尿路感染マウスを用い, 薬物経口投与後の腎内濃度を測定した。すなわち薬物投与後, 経時的(0.5, 1, 2, 3, 4, 6時間後)に両腎を摘出, ホモジナイズし, 遠心上清中の薬物濃度を *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を検定菌とする薄層カップ法で測定した。

II. 実験結果

1) *In vitro* 抗菌力測定

CCL および CEX の殺菌作用を *E. coli* No. 29 について検討した結果を Fig. 1, 2 に示した。接種菌量が 10^5 cells/ml の場合, 両薬物とも, MIC すなわち CCL

Fig. 1 Bactericidal effects of CCL and CEX on *E. coli* No. 29

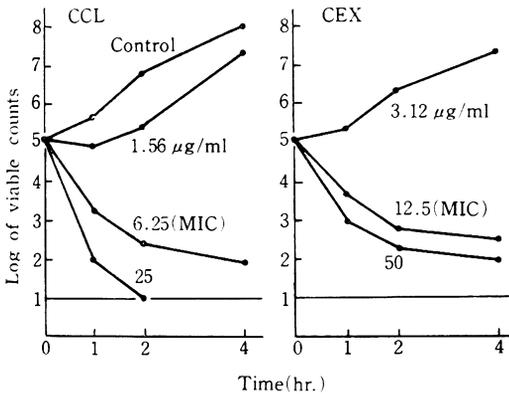
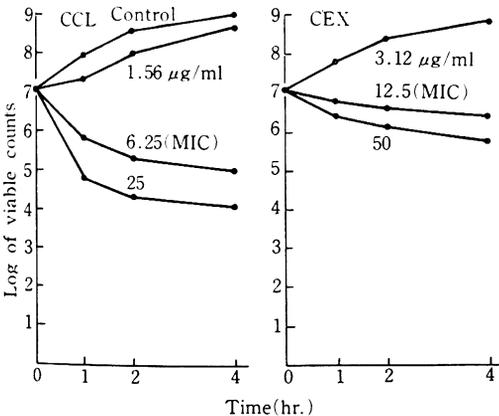


Fig. 2 Bactericidal effects of CCL and CEX on *E. coli* No. 29



6.25 µg/ml, CEX 12.5 µg/ml よりも高い濃度において, dose dependency のある殺菌作用が認められたが, CCL では短時間内に強い殺菌性を示すことが認められた。 10^7 cells/ml の場合, 両薬物とも接種菌量の影響を受け, 殺菌効果は低下した。

2) 腹腔内感染症に対する効果

正常あるいは白血球減少マウスを用い, 腹腔内感染症に対する治療効果を検討した結果を Table 1 および Fig. 3~6 に示した。腹腔内感染症に対する効果(ED₅₀)は, 正常マウスを用いた場合, CCL 0.08 mg/mouse, CEX 0.55 mg/mouse であり, CCL の治療効果は, *in vitro* 抗菌力と同様優れていることが認められた。また白血球減少マウスを用いた場合, CCL 0.17 mg/mouse, CEX 5.6 mg/mouse で, 正常マウスの結果と同様の傾向であったが, 正常マウスと白血球減少マウスの ED₅₀ の比をそれぞれ算出してみると, CCL 2.13, CEX 10.18 であり, 白血球減少状態が CEX の効果に大きな影響を及ぼすのに対して, CCL ではあまり影響を及ぼさないことが認められた。さらにこれらの現象を裏付けるために, 腹腔内での感染菌の消長について検討したところ, CCL では Fig. 3, 4 に示すように正常マウスあるいは白血球減少マウスにおいても, 薬物投与後, dose dependency

Table 1 Protective effect of CCL and CEX against experimental *E. coli* No. 29 infection in neutropenic mice

Drug	Chal- lenge* LD ₅₀	ED ₅₀ (mg/mouse)		Ratio (b/a)
		normal ^a	neutropenic ^b	
CCL	100	0.08	0.17	2.13
CEX		0.55	5.6	10.18

* with 3% mucin

Fig. 3 Bactericidal activity of CCL after oral administration to normal mice infected with *E. coli* No. 29

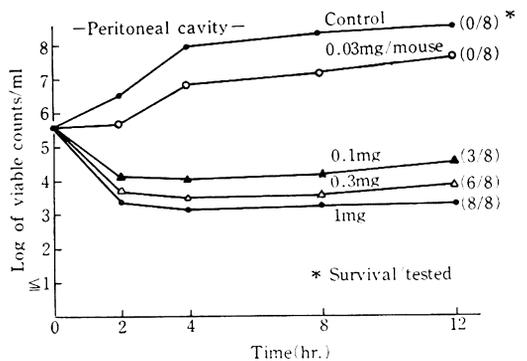


Fig. 4 Bactericidal activity of CCL after oral administration to neutropenic mice infected with *E. coli* No. 29

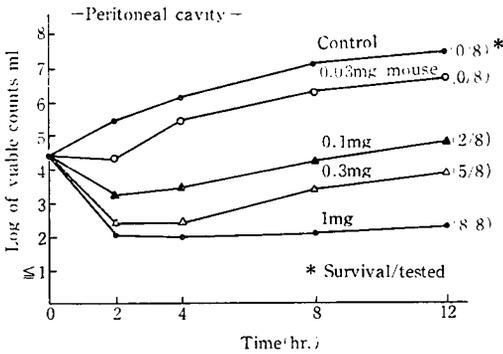


Fig. 5 Bactericidal activity of CEX after oral administration to normal mice infected with *E. coli* No. 29

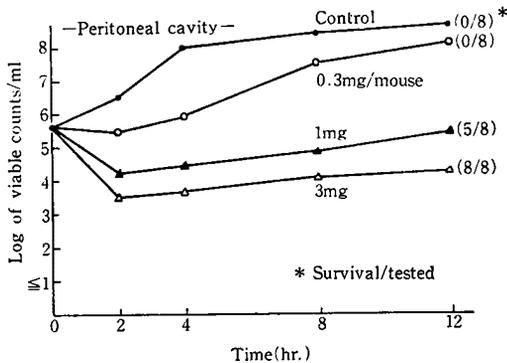
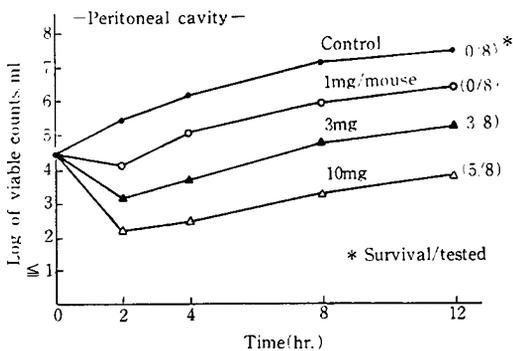


Fig. 6 Bactericidal activity of CEX after oral administration to neutropenic mice infected with *E. coli* No. 29



一方、CEX では、Fig. 5, 6 に示すように薬物投与後 dose dependency のある殺菌作用は認められるが、正常マウスでは、1 mg あるいは 3 mg 投与群で、約 8~12 時間の lag が認められるのに対して、白血球減少マウスでは、ほとんど lag が認められず、3 mg あるいは 10 mg 投与群でも、再増殖が認められ、死亡例も認められた。

3) 上行性尿路感染症に対する効果

a) 尿路感染症に対する効果 感染 72 時間後の腎内生菌数測定により尿路感染症に対する治療効果を検討した結果を、Fig. 7 に示した。CCL では、dose dependency のある効果が認められ、1 mg/mouse 以上の投与量で良好な結果が得られ、CEX に比べ非常に優れていた。またこの結果より腎内生菌数が 1×10^4 あるいは 1×10^5 cells/kidney 以下を有効とした場合の有効率を求めた結果を Table 2 に示した。有効基準を 1×10^4 あるいは 1×10^5 cells/kidney 以下としたいずれの場合も CCL は CEX に比べ約 10 倍優れていることが認められた。さらにこの条件下で経時的に腎内生菌数の消長を検討した結果を Fig. 8, 9 に示した。両薬物とも投与後、dose

Fig. 7 Protective effect on experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice

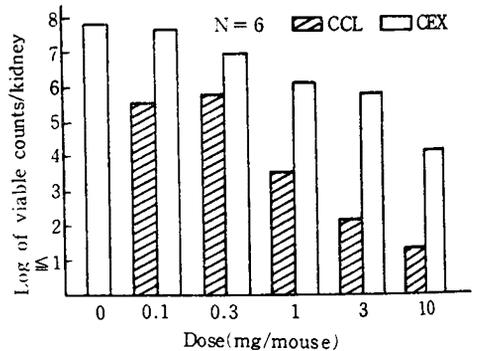


Table 2 Protective effect of CCL and CEX on experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice

Dose (mg/mouse)	1×10^4 cells/kidney		1×10^5 cells/kidney	
	CCL	CEX	CCL	CEX
10	6/6	3/6	6/6	5/6
3	5/6	0/6	6/6	1/6
1	3/6	0/6	6/6	2/6
0.3	0/6	0/6	1/6	0/6
0.1	1/6	0/6	2/6	0/6
0	0/6	0/6	0/6	0/6

* Effective/Tested

のある殺菌効果が認められ、1 mg 投与群においては、いずれの状態のマウスを用いた場合でも、薬物投与後 12 時間ほぼ同様のパターンの再増殖抑制が認められた。

Fig. 8 Bactericidal activity of CCL after oral administration to mice infected with *E. coli* No. 29

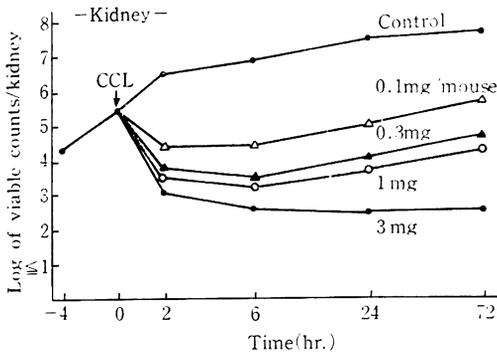
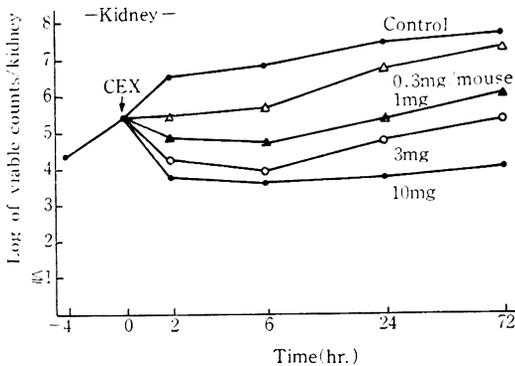


Fig. 9 Bactericidal activity of CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* No. 29



dependency のある殺菌作用が認められ、約6時間の lag を経て、投与量の低い群では、漸次再増殖が認められた。また投与初期の菌数の減少は CCL の方がより強いことが認められた。

b) 薬物投与時期の検討 感染 2, 6 あるいは 24 時間後に薬物を 1 回投与し、治療効果における薬物投与時期の影響について検討した結果を Fig. 10~13 に示した。なお、腎内菌数は感染 72 時間の結果である。感染 2 時間後 (1.5×10^5 cells/kidney) に薬物投与を行なった場合、両薬物ともに dose dependency のある効果が認められ、CCL 0.1 mg, CEX 1 mg 以上の投与量で良好な治療効果が認められた。感染 6 時間後 (2.5×10^6 cells/kidney) では、両薬物ともに治療効果は非常に悪くなり、感染 24 時間後 (3.7×10^7 cells/kidney) では、ほとんど効果は認められず、感染の経過とともに、それぞれの治療効果は非常に影響を受けることが認められた。なおこれらの腎内生菌数の測定は、いずれも感染 72 時

Fig. 10 Influence of therapeutic time on protective effect against experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice

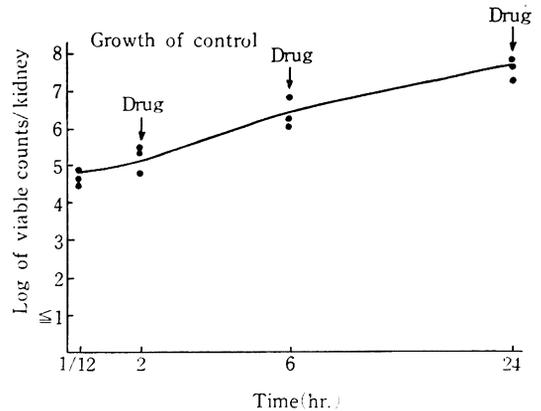
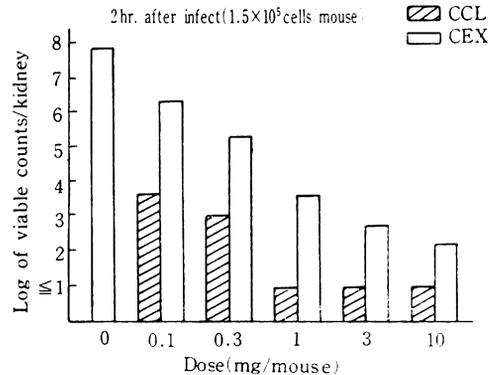


Fig. 11 Influence of therapeutic time on protective effect against experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice



間後に行なった。また感染 2 時間あるいは 6 時間後に両薬物を投与し、初期の殺菌作用を検討し、Fig. 14 に示したが、0.3 mg 投与群では、CCL は 2 時間あるいは 6 時間後投与においても強い殺菌性が認められるのに対して、CEX では 2 時間後投与では強い殺菌性が認められるが、6 時間後では、菌数の影響を受け、若干その殺菌作用が減弱する傾向が認められた。

c) 分割投与の検討 治療効果における分割投与の影響について検討した結果を Fig. 15 に示した。両薬物とも感染 4 時間後より投与を行ない、2 時間間隔でそれぞれ分割投与を行ない、72 時間後の腎内生菌数を測定したところ、いずれの薬物も分割投与の効果はほとんど認められなかった。

d) 接種菌量の検討 治療効果における接種菌量の影響について検討した結果を Fig. 16, 17 に示した。感染 72 時間後の腎内菌数を測定したところいずれの薬物も接種菌量の影響を受け、接種菌量が多いほど治療効果

Fig. 12 Influence of therapeutic time on protective effect against experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice

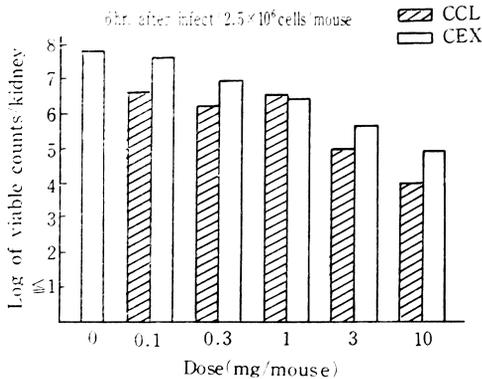


Fig. 13 Influence of therapeutic time on protective effect against experimental urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice

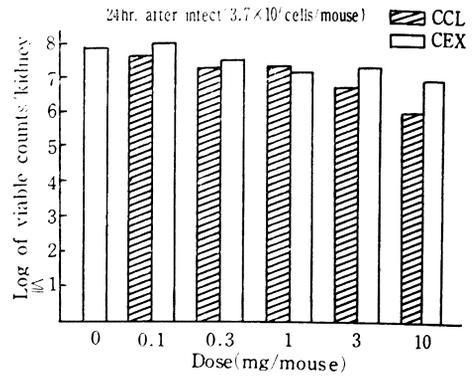


Fig. 14 Bactericidal activity of CCL and CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* No. 29

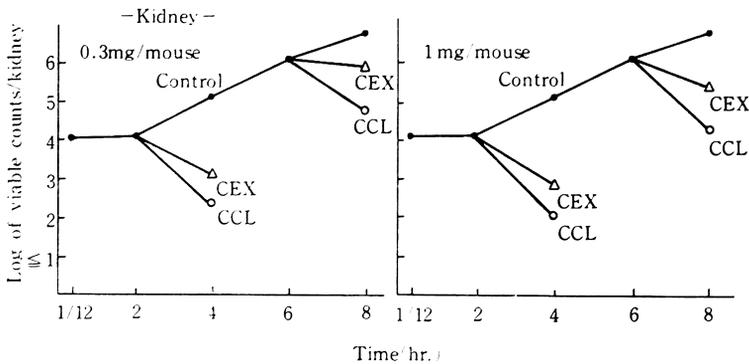
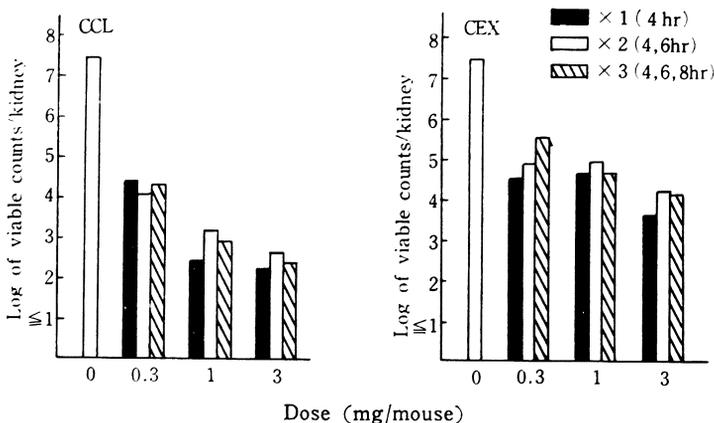


Fig. 15 Effect of administration schedule on therapeutic efficacy of CCL and CEX against experiment urinary tract infection with *E. coli* No. 29 in mice



は低下したが 0.1, 0.3, 1, 3 mg/mouse の投与で CCL の腎内菌数はすべて CEX より少なかった。

e) 白血球減少マウスを用いた場合 白血球減少マ

ウスを用い、尿路感染症に対する治療効果について検討した結果を Fig. 18, 19 に示した。感染 72 時間後の腎内菌数を測定したところいずれの薬物も白血球減少状態

Fig.16 Influence of challenge dose on effect of CCL against experiment urinary tract infection with *E. coli* No.29 in mice

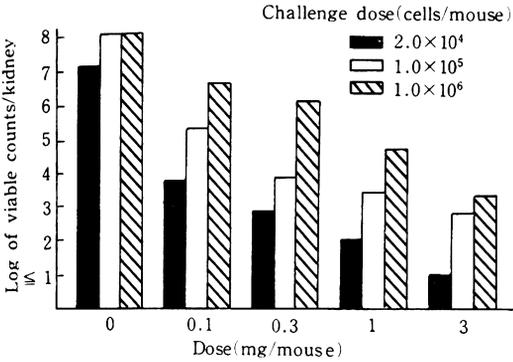


Fig.19 Protective effect on experimental urinary tract infection with *E. coli* No.29 in neutropenic mice

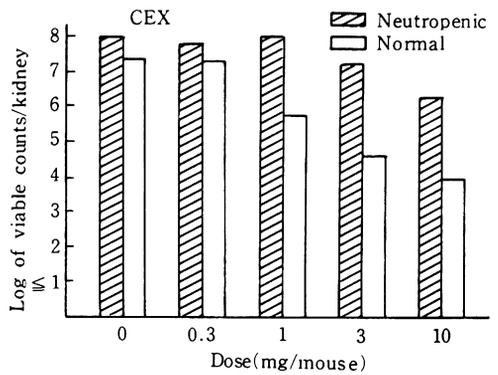


Fig.17 Influence of challenge dose on effect of CEX against experimental urinary tract infection with *E. coli* No.29 in mice

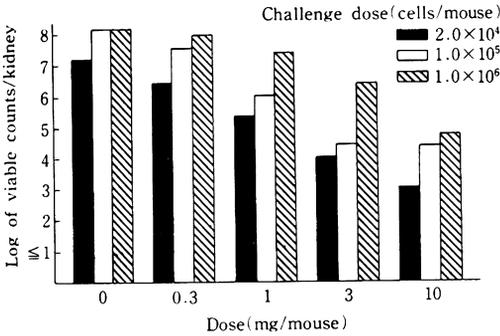


Fig.20 Kidney levels of CCL and CEX after oral administration to mice infected with *E. coli* No.29

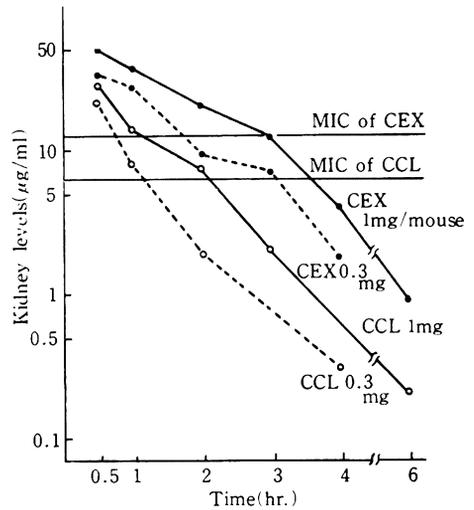
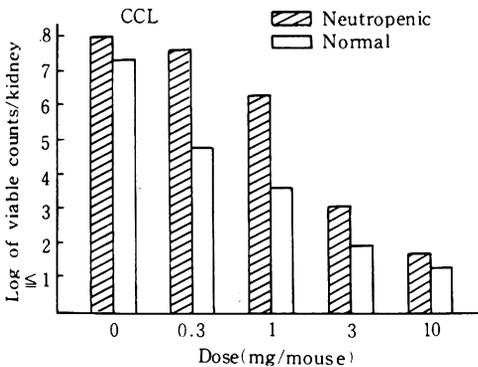


Fig.18 Protective effect on experimental urinary tract infection with *E. coli* No.29 in neutropenic mice



尿路感染マウスに各薬物を経口投与したときの腎内濃度の測定を行なった結果を Fig. 20 に示した。0.3 mg および 1 mg 投与では、両薬物ともに腎に良く移行し、MIC を超える時間を調べてみると CCL(MIC : 6.25 µg/ml) では 75~130 分、CEX(MIC : 12.5 µg/ml) では、105~180 分あり、CEX の方が CCL よりも持続的に作用していることが認められた。

III. 総括および考察

マウス実験の大腸菌性腹腔内感染症および尿路感染症に対する経口用セファロsporin系抗生物質 Cefaclor (CCL) の効果について、Cephalexin(CEX) を比較薬物として検討を行なった。

腹腔内感染症において、CCL の効果は、正常あるいは

の影響により、治療効果が低下したが、CCL では CEX ほど顕著な影響を受けず、CCL 10 mg 投与では、正常マウスと白血球減少マウスの治療効果の差はほとんど認められなかった。

4) 腎内薬物濃度の測定

は白血球減少マウスのいずれを用いた場合も CEX に比べ非常に優れており、*in vitro* 抗菌力（例えば MIC 値など）の結果から推測される効果よりも *in vivo* 抗菌力の方が強く現われることが認められた。さらに正常マウスあるいは白血球減少マウスを用いた検討結果より、両薬物の効果 (ED₅₀) の比を算出してみると、CCL は 2.13, CEX は 10.18 であり、CEX の効果は、白血球減少状態の影響を受け易いのに対して、CCL ではさほど影響を受けないことが認められた。これは、*in vitro* 抗菌力の結果より、CCL の短時間における殺菌、溶菌作用が CEX に比べ非常に強いため、このような現象が発現するものと考えられる。またこれらの *in vitro* 抗菌作用メカニズムについては、ペニシリン結合蛋白質 (PBPs) への親和性の面から詳細に検討されており、CEX は PBP 3 に非常に親和性が高く、伸長化するのに対し、CCL は PBP 1Bs にも親和性が高く溶菌および殺菌が速やかに起こるといわれている^{5,6)}ことから裏付けられる。さらに CCL はマウス腹腔内においても、短時間内殺菌作用が優れていることが、腹腔内生菌数の消長パターン、特に白血球減少マウスの結果からもよくわかった。また CCL 投与時の血中濃度パターンは、ピークの高さや持続性の面で CEX よりも劣っている⁷⁾にもかかわらず、腹腔内感染での効果が優れていることは非常に興味深いことであると思われる。

尿路感染症において、CCL の効果は腹腔内感染症の結果と同様、CEX よりも優れており、約 10 倍良好な結果が得られた。また腎内生菌数の消長パターンの結果からも、優れた抗菌作用を示すことが認められた。しかしながら CCL の腎内濃度の高さや持続性が血中濃度の場合と同様、CEX よりも劣っているのに対して、腎内での殺菌性が優れているのは、やはり殺菌、溶菌作用が CEX より非常に優れていることによるものと考えられ、白血球減少マウスを用いた尿路感染症の治療結果からも、このような傾向を推測することができる。さらに両薬物の治療効果に及ぼす感染の経過について検討するため、感染後、それぞれの時期に薬物を投与し、腎内菌数の消長について検討を行ったところ、感染初期には、両薬物ともに非常に良好な成績であるが、感染の進行とともに薬物効果は悪くなることが認められた。これは感染の進行により、薬物投与時の菌量が多く、菌量の影響により効果が期待できない場合と、膿瘍形成、各種滲出物

のため、薬物移行が悪いことに起因するなどの理由が考えられるが、高菌量を感染させた初期には、十分に効果が期待できるため、薬物移行の悪さや生体防禦反応の低下などにより、薬物効果が低下するものと考えられる。また頻回投与の影響を検討したところ、いずれの薬物も投与総量を同量にした場合は、ほとんど差は認められなかったが、投与量を分割することにより、1 回当たりの投与量は少なくなるにもかかわらず、1 回投与と同様な効果が得られることにより、尿路感染症におけるこれらの薬物の効果発現は、有効濃度以上の腎内濃度の高さではなく、有効濃度の維持時間に規程されるものと考えられる。これらの現象は、すでに三和ら⁷⁾により、腹腔内感染症においても確認されており、腹腔内感染症あるいは尿路感染症における CCL および CEX の効果発現は生体内での有効濃度の維持時間が重要であると思われる。

以上のようなことより、CCL の *in vitro* 抗菌力は CEX よりも強いが、血中および腎内濃度では CEX より劣るにもかかわらず、*in vivo* 抗菌力に非常に優れており、興味もたれる物質であり、さらに *in vitro* および *in vivo* の多方面より検討を加えたいと考えている。

文 献

- 1) Cefaclor (CCL) 論文特集号: Chemotherapy 27 (S-7): 1~880, 1979
- 2) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. Chemotherapy 23: 1~2, 1975
- 3) 川崎賢二, 関口金雄, 小川正俊, 辻 明良, 五島 瑤智子: Opportunistic pathogen と宿主防禦機能の関連について—実験的白血球減少症マウスにおける各菌種の易感染化と抗菌薬の治療効果について. Chemotherapy 28(1): 14~21, 1980
- 4) 尾花芳樹, 折笠義則, 西野武志, 谷野輝雄: *Acinetobacter calcoaceticus* に関する研究, マウス実験的尿路感染症について. Chemotherapy 30 (9): 996~1003, 1982
- 5) 西野武志, 久保田満寿代: 新しい経口用セファロsporin系抗生物質 Cefaclor に関する細菌学的評価. Chemotherapy 27(S-7): 38~58, 1979
- 6) 西野武志: β -ラクタム抗生物質の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について. 長井記念シンポジウム講演要旨集: 47~53, 1980
- 7) 三和秀明, 西野武志: 化学療法剤の投与方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. Chemotherapy 27(S-7): 59~70, 1979

THE EFFECTS OF CEFACLOR AGAINST EXPERIMENTAL *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS IN MICE

YOSHIKI OBANA, TAKESHI NISHINO and TERUO TANINO
Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

Comparative studies were carried out on the effects of cefaclor (CCL) against experimental *E. coli* intraperitoneal and urinary tract infections in mice with cephalixin (CEX) as the control drug.

The effects of CCL in intraperitoneal infections using either normal or cyclophosphamide-induced neutropenic mice were superior to a greater extent than those of CEX, and, furthermore, the therapeutic effects of CCL were independent of the neutrophils.

Similarly in urinary tract infections, the effects of CCL were far excellent despite the fact that CCL is inferior to CEX with regard to renal concentration height and continuity, and such excellent effects were recognized to be due to the reduction in the number of bacteria in the kidneys in short time after drug administration. Also the therapeutic effects of CCL for these infections were independent of the neutrophils. The administration timing which influences the therapeutic effects was investigated, and it was found that the later the administration timing was, the poorer the effects became for either drug. As for the influence of inoculum sizes against infections, it was found that both drugs receive some influence.

Also, the effects of multiple administration were studied, but there was no practical difference between the single and multiple administration of either drug, and it was considered that the important factor for manifestation of efficacy in these drugs is not the renal concentration heights which are in excess of the effective concentrations, but the sustaining time of the effective concentrations.