

化学療法剤の投与法に関する実験的解析

マウス実験的感染症に対する Dibekacin (DKB) 坐剤の治療効果

折笠 義則・宮内慶之輔・岡本 了一・数野 勇造

明治製菓中央研究所

鬼 海 庄 一 郎

明治製菓薬品開発研究所

尾 花 芳 樹・西 野 武 志

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 57 年 11 月 26 日受付)

マウス実験的感染症に対する Dibekacin (DKB) 坐剤の治療効果を筋肉内投与の成績と比較検討し、以下の成績を得た。

マウス実験的感染症に対する DKB 坐剤の治療効果について検討を行なったところ、筋肉内投与の場合と同様に dose response が認められ、ED₅₀ 値は筋肉内投与における ED₅₀ 値の 2.1~2.8 倍であった。

DKB 坐剤の治療効果の発現には、筋肉内投与の場合とは異なり、有効血清中濃度の維持時間が関与していた。

グラム陰性桿菌症の増加に伴い、アミノ配糖体系抗生物質の使用頻度が上昇する傾向にあるが、その投薬方法は、筋肉内投与が一般的である。しかし、強度の出血傾向を示す場合や羸瘦が著しい全身状態の悪化した症例、あるいは筋拘縮症などに対しては筋肉内投与以外の投薬方法が求められている。われわれは、すでに Dibekacin の静脈内投与に関する研究結果を報告¹⁾したが、今回はさらに投薬の簡便さをも併せ考慮し、経直腸投与による Dibekacin 坐剤の治療効果をマウス実験的感染症を用いて筋肉内投与の成績と比較検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

力価の明瞭な注射用 Dibekacin (DKB) および DKB 坐剤 (基剤: Witopsol-W-35, 直径: 3 mm) を使用した。DKB 坐剤の 2.1 mg/mouse 以上の投与量では、DKB 100 mg/g を含む坐剤を、1.02 mg/mouse 以下の投与量では DKB を 25 mg/g を含む坐剤を用いて、所要投与量を含有するように剃刀で細切して使用した。(Fig. 1-1)

2. 使用菌株

臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* E-2, *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007, *Escherichia coli* No. 29, *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 を用いた。

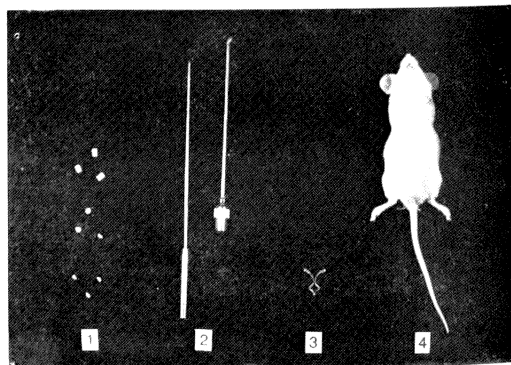
3. 抗菌力

使用菌株に対する試験管内抗菌力を、日本化学療法学会標準法²⁾に準じて測定した。

4. 増殖曲線に及ぼす影響

Pseudomonas aeruginosa E-2 を 2/3 濃度の Trypto Soya Broth (TSB; Nissui) で 37°C, 20 時間培養後、さらに同培地に 10% の割合で接種し、37°C, 1.5 時間振盪培養して対数増殖期に達した菌液を Heart Infusion Broth (Difco) で希釈し、約 1×10^8 cells/ml に調整後、薬剤を添加し、経時的に生菌数を測定した。

Fig. 1 Material required for use of suppository



5. マウス実験的感染症に対する治療効果

各種感染マウスは、下記菌液をいずれも Jcl : ICR 系マウス (4週令, ♂, 21±1g) に 0.5 ml 各々腹腔内に接種することにより作製した。薬剤の投与は、菌液接種直後に坐剤挿入器 (Fig. 1-2) による坐剤の直腸内挿入 (P. R.) または筋肉内 (I. M.) 投与により行ない、坐剤挿入マウスには坐剤の排出を防止するために肛門部に坐剤排出防止器 (Fig. 1-3) を 1 時間装着 (Fig. 1-4) した。その後、7 日目の生存数から LITCHFIELD-WILCOXON 法⁹⁾によって ED₅₀ 値を算出し、治療効果を検討した。なお、坐剤挿入器および坐剤排出防止器は著者の考案したものをを用いた。

i) *Pseudomonas aeruginosa* E-2 の場合

Pseudomonas aeruginosa E-2 を 2/3 濃度の TSB で 37°C, 20 時間培養後、同培地に 10% の割合で接種し、37°C, 1.5 時間振盪培養後、2×10⁴ 倍に希釈し、これに 6% Mucin (Orthana-Kemisk-Fabrik-A/S) 溶液を等量混合し、これを接種菌液とした。

ii) *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007, *Escherichia coli* No. 29 および *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 の場合

Pseudomonas aeruginosa IAM 1007, *Escherichia coli* No. 29 および *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 を Heart Infusion Agar (Difco) 平板に画線塗抹し、37°C, 20 時間培養後、生理食塩水に浮遊させ、O. D.=0.5 (赤色フィルター 66, 平沼産業 EPO-B 型光電光度計) に調整したものを原液とした。この菌液を生理食塩水で、*Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007 の場合は 2 倍に、*Escherichia coli* No. 29 の場合は 5,000 倍に、*Klebsiella pneumoniae* PCI 602 の場合は 50,000 倍に希釈し、*Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007 および *Escherichia coli* No. 29 の場合は 5% Mucin (Difco) 溶液と、*Klebsiella pneumoniae* PCI 602 の場合は 2.5 %Mucin (Difco) 溶液と等量混合し接種菌液とした。

6. マウス腹腔内生菌数

上記 (5-i) と同様の方法により *Pseudomonas aeruginosa* E-2 を感染させた Jcl : ICR 系マウスに、各薬剤の ED₅₀ 相当量とその 3 倍量および 1/3 量を菌接種直後に P. R. または I. M. 投与にて 1 回治療を行ない、その後経時的に 1 群 3 匹のマウスの腹腔内に 2.5 ml の生理食塩液を注入し、2~3 回マッサージした後、その液を採取し、その生菌数を測定した。なお、腹腔内生菌数は洗浄液 1 ml 当りの菌数として示した。

7. マウス血清中薬剤濃度

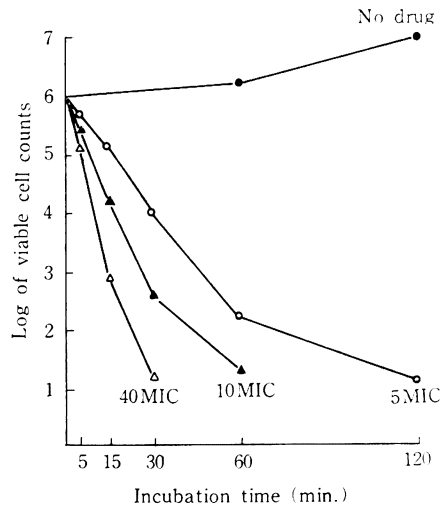
上記 (5-i) と同様の方法により *Pseudomonas aeruginosa* E-2 を感染させた Jcl : ICR 系マウスに、各薬

Table 1 Test strain and MIC of DKB

Organism	MIC (μg/ml)
<i>P. aeruginosa</i> E-2	3.13
<i>P. aeruginosa</i> IAM 1007	1.56
<i>E. coli</i> No. 29	1.56
<i>K. pneumoniae</i> 602	1.56

Inoculum size:10⁸ cells/ml

Fig. 2 Bactericidal effect of DKB on *P. aeruginosa* E-2



剤の ED₅₀ 相当量を菌接種直後に 1 回投与した後、5, 15, 30, 60, 120, 180 および 240 分に、1 群 5 匹のマウスの腋下動脈から採血を行ない、血清を分離し、薄層カップ法で薬剤濃度を測定した。検定菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いた。

II. 実験結果

1. 抗菌力

使用菌株に対する DKB の試験管内抗菌力を測定した結果を Table 1 に示した。DKB の抗菌力は、10⁸ cells/ml 接種において、*Pseudomonas aeruginosa* E-2 に対しては 3.13 μg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007, *Escherichia coli* No. 29 および *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 に対しては 1.56 μg/ml を示した。

2. 増殖曲線に及ぼす影響

Pseudomonas aeruginosa E-2 の増殖曲線に及ぼす DKB の効果を Fig. 2 に示した。DKB の殺菌速度は薬剤濃度に依存していたが、低濃度の作用でも作用時間が長くなると高濃度の場合と同程度に生菌数の減少が認められた。

3. マウス実験的感染症に対する治療効果

Table 2 Protecting effect of DKB against experimental mice infections

Challenge strain	Challenge dose (cells/mouse)	ED ₅₀ (mg/mouse)		$\frac{\text{P. R.} \cdot \text{ED}_{50}}{\text{I. M.} \cdot \text{ED}_{50}}$
		P. R.	I. M.	
<i>P. aeruginosa</i> E-2	2×10 ³ , 35.5 LD ₅₀	0.28 (0.20~0.39)	0.1 (0.056~0.18)	2.8
<i>P. aeruginosa</i> IAM 1007	1×10 ⁸ , 9.8 LD ₅₀	0.25 (0.18~0.34)	0.09 (0.06~0.13)	2.7
<i>E. coli</i> No. 29	1×10 ⁵ , 40.5 LD ₅₀	0.165 (0.11~0.25)	0.08 (0.05~0.13)	2.1
<i>K. pneumoniae</i> PCI-602	1.5×10 ⁴ , 16.0 LD ₅₀	0.14 (0.095~0.21)	0.066 (0.049~0.088)	2.1

() : 95% confidence limits

Fig. 3 Viable cell numbers after P. R. administration of DKB in the peritoneal cavity of mice inoculated with *P. aeruginosa* E-2

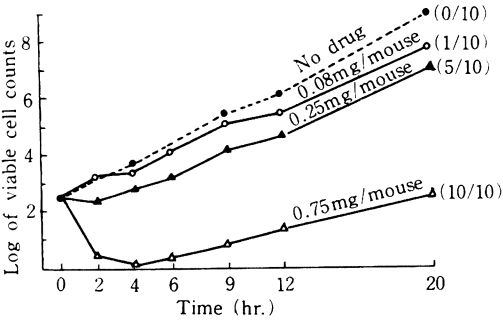


Fig. 4 Viable cell numbers after I. M. administration of DKB in the peritoneal cavity of mice inoculated with *P. aeruginosa* E-2

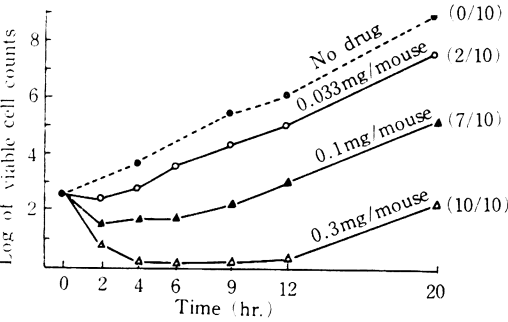
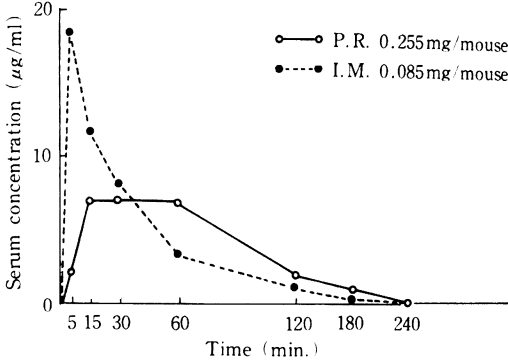


Fig. 5 Serum levels of DKB after P. R. and I. M. administration to mice infected *P. aeruginosa* E-2



I. M. 投与で 0.1 mg/mouse, *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007 に対しては, P. R. 投与で 0.25 mg/mouse, I. M. 投与で 0.09 mg/mouse, *Escherichia coli* No. 29 に対しては P. R. 投与で 0.165 mg/mouse, I. M. 投与で 0.08 mg/mouse を示し, また *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 に対しては, P. R. 投与で 0.14 mg/mouse, I. M. 投与では 0.066 mg/mouse を示した。すなわち, これらの菌株に対する P. R. 投与における ED₅₀ 値は, I. M. 投与における ED₅₀ 値の 2.1~2.8 倍であった。

4. マウス腹腔内生菌数

Pseudomonas aeruginosa E-2 を感染させたマウスに各薬剤を P. R. または I. M. 投与した場合の腹腔内生菌数の消長を Fig. 3 および 4 に示した。なお, 図中の () 内には, 感染後 7 日目の生存数 (生存数/実験匹数) を示した。投与量は ED₅₀ 相当量とその 3 倍量および 1/3 量で行なったが, I. M. 投与の場合, P. R. 投与

DKB 坐剤の P. R. 投与と注射用 DKB の I. M. 投与による治療効果をマウス実験の感染症を用いて検討したところ, それぞれに dose response が認められ, Table 2 に示す結果が得られた。*Pseudomonas aeruginosa* E-2 に対する ED₅₀ 値は, P. R. 投与で 0.28 mg/mouse,

の場合よりも菌の増殖抑制がやや強く認められたが、両者の菌数消長のパターンは類似していた。

5. マウス血清中薬剤濃度

Pseudomonas aeruginosa E-2 を感染させたマウスに、各薬剤の ED₅₀ 相当量を P. R. または I. M. 投与した場合の血清中薬剤濃度の経時的推移を Fig. 5 に示した。P. R. 投与の場合の血清中薬剤濃度は、投与後 30 分にみられるピークを中心に、ピーク値に近い量が持続しており投与後 15 分で 7.04 µg/ml、投与後 30 分で 7.06 µg/ml、投与後 60 分で 6.83 µg/ml を示し、投与後 120 分で 1.92 µg/ml となった。一方、I. M. 投与の場合のピークは投与後 5 分にみられ、P. R. 投与の場合より高い 18.50 µg/ml を示したが、その後、急速に減少し投与後 60 分で 3.5 µg/ml、120 分で 1.27 µg/ml となった。

III. 総括および考察

アミノ配糖体系抗生物質の新しい投薬方法が求められているなかで、今回、われわれは、DKB 坐剤の P. R. 投与における治療効果を、抗生物質の *in vivo* 評価として一般に利用されている腹腔内感染によるマウス実験的感染症を用いて、I. M. 投与における成績と比較検討した。

いずれの感染菌の場合にも、P. R. 投与の治療効果においては、I. M. 投与の場合と同様に dose response が認められ、また、その ED₅₀ 値は I. M. 投与における ED₅₀ 値の 2.1~2.8 倍であった。これら両投与方法における治療過程を検討するために、腹腔内生菌数の消長を *Pseudomonas aeruginosa* E-2 感染マウスを用い、投与量を ED₅₀ 相当量とその 3 倍量および 1/3 量として観察したところ、P. R. 投与と I. M. 投与における腹腔内生菌数の消長のパターンは類似しており、それぞれの治療過程に大差を認めなかった。なお、本実験におけるサンプリング時間は、薬剤投与直後の次が 2 時間後となっているために薬剤投与後初期の腹腔内生菌数の変化は不明であるが、両投与方法における薬剤の血清中濃度のパターンからみて、両投与方法に多少の相違も考えられた。次に両投与方法における薬剤の血清中濃度と治療効果との関係を検討するために、*Pseudomonas aeruginosa* E-2 感染マウスを用いて、それぞれの ED₅₀ 相当量を投与して検討したところ、いずれの投与方法においても MIC を超える血清中濃度を認めたが、両者間の吸収パターンには相違が認められ、P. R. 投与の場合には低いなどかなな形を、I. M. 投与の場合は高く尖鋭な部分をもつ形を示した。しかし、両投与方法の AUC はほぼ同じであり、総吸収量は同一と考えられ、治療効果の発現に関し、I. M. 投与では血清中濃度の高さが、P. R. 投与では有効

血清中濃度の維持時間が関与していると思われる。すなわち、*in vitro* における各薬剤濃度での生菌数の変化を経時的にみると、Fig. 2 に示したように、5 MIC でも時間の経過とともに 10 MIC や 40 MIC と同等の菌数減少をもたらすことがわかり、有効血清中濃度が低い状態でも、その維持時間が長ければ、高濃度短時間の場合と近似する治療効果を示すものと考えられた。

本論文の要旨は第 27 回日本化学療法学会総会 (1979, 福岡) において発表した。

文 献

- 1) 折笠義則, 宮内慶之輔, 吉田 隆, 数野勇造, 鬼海庄一郎, 尾花芳樹, 西野武志: 化学療法剤の投与方法に関する実験的解析 13, マウス実験的緑膿菌感染症に対する Dibekacin (DKB) の投薬方法と治療効果について。Chemotherapy 28 : 905~912, 1980
- 2) MIC 測定改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
- 3) LITCHFIELD, J. T. & F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99~113, 1949
- 4) 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 concentration against certain organisms. J. Exp. Med. 88 : 99~131, 1948
- 5) EAGLE, H. & A. D. MUSSELMAN: The slow recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. J. Bact. 58 : 475~490, 1949
- 6) EAGLE, H.; R. FLEISCHMAN & A. D. MUSSELMAN: The bactericidal action of penicillin *in vivo*. The participation of the host and the slow recovery of surviving organisms. Ann. Intern. Med. 33 : 544~571, 1950
- 7) EAGLE, H.; R. FLEISCHMAN & A. D. MUSSELMAN: Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. Ann. J. Med. 9 : 280~299, 1950
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 島田 馨: Cephalothin 大量療法の適応と限界。最新医学 29 : 867~887, 1974
- 11) 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 26 : 337~344, 1978
- 12) 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
- 13) 三和秀明, 平井芳美, 大槻雅子, 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 Cephalotin の効果。Chemotherapy 25 : 616~617, 1977
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 戸辺建介, 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 三和秀明, 西野武志, 谷野輝雄 : 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。Chemotherapy 27 (S-7) : 59~70, 1979
- 24) 中野一行, 西野武志, 谷野輝雄 : 化学療法剤の投与法に関する実験的解析 15, 大腸菌ならびに肺炎桿菌に対する Cefadroxil の効果。Chemotherapy 28 (S-2) : 22~23, 1980
- 25) 尾花芳樹, 大槻雅子, 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 16, 緑膿菌に対する Polymyxin B の効果。THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS 33, 5 : 636~640, 1980
- 26) 堀賢司, 西野武志, 谷野輝雄 : 化学療法剤の投与法に関する実験的解析 17, 大腸菌に対する 6059-S の効果。Chemotherapy 28 (S-7) : 76~85, 1980
- 27) 西野武志 : 化学療法剤の投与法に関する基礎的研究。最新医学 32 (8) : 1491~1496, 1977
- 28) 新井俊彦, 小松洋子, 小松貞男, 安田耕太郎 : Cephalexin の直腸投与法に関する基礎的研究, I. 直腸吸収について。Chemotherapy 26 : 757~761, 1978
- 29) 新井俊彦, 小松洋子, 小松貞男, 安田耕太郎 : Cephalexin の直腸投与法に関する基礎的研究, II. 配合剤の選択法。Chemotherapy 27 : 890~893, 1979