

全身オートバクテリオグラフィーによる実験的腹腔感染マウスにおける感染菌の消長および TA-058 の *in vivo* 抗菌作用の観察

谷 佳 都・遠藤 幸夫・山口東太郎

田辺製薬株式会社微生物研究所

藤居美智子・高橋 忠男

田辺製薬株式会社薬理研究所

E. coli KC-14 RFP^r を腹腔内に接種したマウスの全身オートバクテリオグラムにおいて、感染菌は接種後腹腔内で急激に増加し、血液中でもそれに伴って増加し、14 時間以降にはマウス全身に分布した。一方、*P. aeruginosa* No. 12 腹腔内に接種したマウスの場合は、腹腔内における感染菌の増加に長い lag time があって、8 時間後から徐々に増加したものの、死亡直前のマウスでも感染菌は全身に分布することなく、血液中の生菌数は 10^4 cells/ml 以下にとどまった。

E. coli 1346 RFP^r, *E. coli* KC-14 RFP^r および *P. aeruginosa* No. 12 をそれぞれ感染させたマウスに TA-058 および各種の薬剤を菌接種 1 時間後に投与し、20~24 時間後に全身オートバクテリオグラムを作成し *in vivo* 抗菌効果を比較した。その結果、各薬剤の投与量に対応したマウス体内の菌分布密度が観察され、それぞれの薬剤の ED₅₀ 値をよく反映し、TA-058 が *in vivo* ですぐれた抗菌作用を示すことが裏づけられた。

緒 言

細菌を感染させた動物体内における感染菌の分布およびその消長を簡便に知る方法の一つに全身オートバクテリオグラフィー (whole body autobacteriography)^{1),2)} があり、抗菌剤の *in vivo* 効果判定に利用されてきた^{3),4),5)}。本報では大腸菌 および 緑膿菌をそれぞれ腹腔内接種したマウスにおける感染菌の体内消長ならびに、これらの感染系に対する TA-058 の *in vivo* 抗菌作用について報告する。

新合成ペニシリンである TA-058, (2S, 5R, 6R)-6-[2 R-2-(2R-2-amino-3-N-methyl carbamoylpropionamido)-2-(4-hydroxyphenyl) acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylic acid trihydrate は *in vitro* の抗菌活性から予想される以上に *in vivo* の効果がすぐれていることを特徴とする^{6),7),8)}。

I 実験材料と方法

1. 使用動物

Slc: ddY マウス, 4 週齢, 雄, 体重 19~21 g を用いた。

2. 使用薬剤

TA-058 (Lot. No. 803420), Ampicillin (ABPC,

明治製薬), Carbenicillin (CBPC, 台糖ファイザー), Sulbencillin (SBPC, 武田薬品工業) および Piperacillin (PIPC, 富山化学) を滅菌蒸留水に溶解して用いた。経口剤 Carindacillin (CIPC, 台糖ファイザー) は水に懸濁して投与した。

3. 使用菌株

E. coli 1346 および京都薬大・西野博士より分与をうけた *E. coli* KC-14 ならびに *P. aeruginosa* No. 12 を使用した。大腸菌についてはマウス全身オートバクテリオグラム (ABGM) 作成に当って、マウス切片中の腸内細菌を抑えて感染菌のみを選択的に培養する目的でリファンピシン耐性株、すなわち *E. coli* 1346 RFP^r および *E. coli* KC-14 RFP^r を分離して用いた。実験には生物学的性状が親株と変わらず、かつ TA-058 および各種抗生物質に対する薬剤感受性、マウスに対する致死活性およびリファンピシン 50 μg/ml を含む寒天平板での菌生育性が親株と変らなかった株を選んだ。親株および耐性株に対するリファンピシンの最小発育阻止濃度 (MIC) は *E. coli* 1346 がそれぞれ、6.25 μg/ml および 200 μg/ml, *E. coli* KC-14 がそれぞれ、12.5 μg/ml および 200 μg/ml であった。

4. 感染および薬剤投与

被検菌の一夜培養菌液をそれぞれのマウス致死菌量に依じて適宜生理食塩液で希釈し、5%ムチン液に懸濁し

Fig. 1 Symbols of mouse autobacteriograms

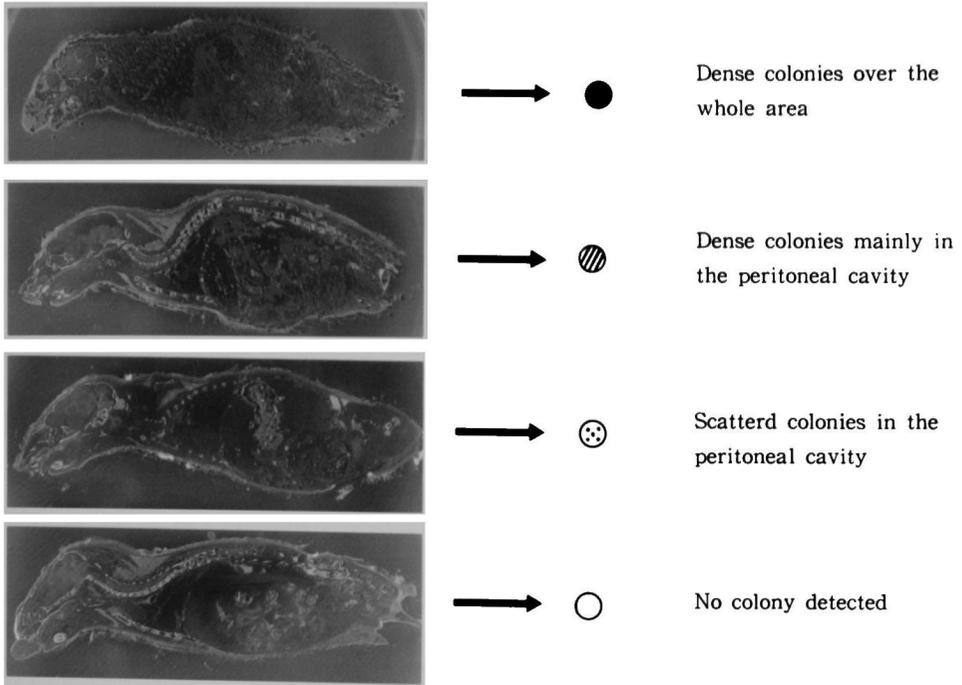
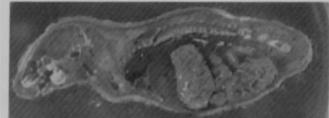
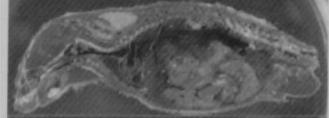
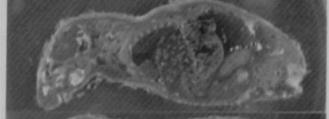
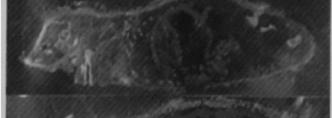
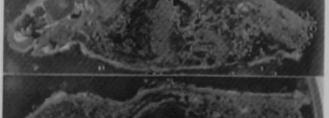
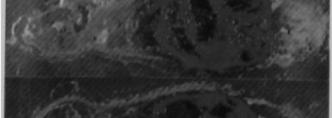
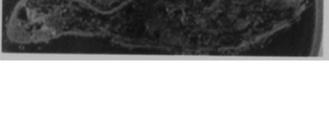


Fig. 2 Time course of bacterial distribution in mice after infection

Hrs. after infection	Infectious organism	
	<i>E. coli</i> KC-14	<i>P. aeruginosa</i> No. 12
0		
6		
8		
10		
14		
18		

てその 0.5 ml ずつをマウス腹腔内に接種した。薬剤は菌接種 1 時間後に、投与量が液量 0.2 ml/マウスになるように調製して、筋肉内、静脈内または経口的に 1 回投与した。薬剤の治療効果は 50% 有効量 (ED₅₀) で表わし、各投与量における 7 日間のマウス生存率からプロビット法によって算出した。

5. マウス全身オートバクテリオグラフィー

感染マウスの全身 ABGM は佐久間らの方法²⁾に準じて作成した。薬剤の *in vivo* 効果を比較した実験では菌接種後 20~24 時間に、その他の実験においては適宜、

頸椎牽引でマウスを殺し、直ちに -40 °C に温度を調節したドライアイス-アセトン中で凍結した。凍結マウスを -15 °C クリオスタット内でガーゼを支持体として、マイクロームにより厚さ 40 μm の全身縦切片とし、感染菌に応じてそれぞれ Table 1 に示した選択培地寒天平板上にのせて培養した。寒天平板上に生育してくる細菌集落はマウス体内での感染菌の分布および密度の程度に応じて Fig. 1 の写真の例に示すような状態で観察されるので、細菌集落が全身に密に分布しているもの；主として腹腔内に密に検出されるもの；腹腔内にまばら

Table 1 Selective agar medium for infectious organism in mouse slices

Infectious organisms	Medium
<i>E. coli</i> 1346 RFP ^r	Heart infusion agar (Eiken) containing:
<i>E. coli</i> KC-14 RFP ^r	Rifampicin 50 μg/ml
	Triphenyltetrazolium chloride 1mg/ml
<i>P. aeruginosa</i> No. 12	NAC agar (Eiken) containing:
	Triphenyltetrazolium chloride 1mg/ml

Fig. 3 Time course of bacterial numbers in peritoneal washing and blood of mice after infection

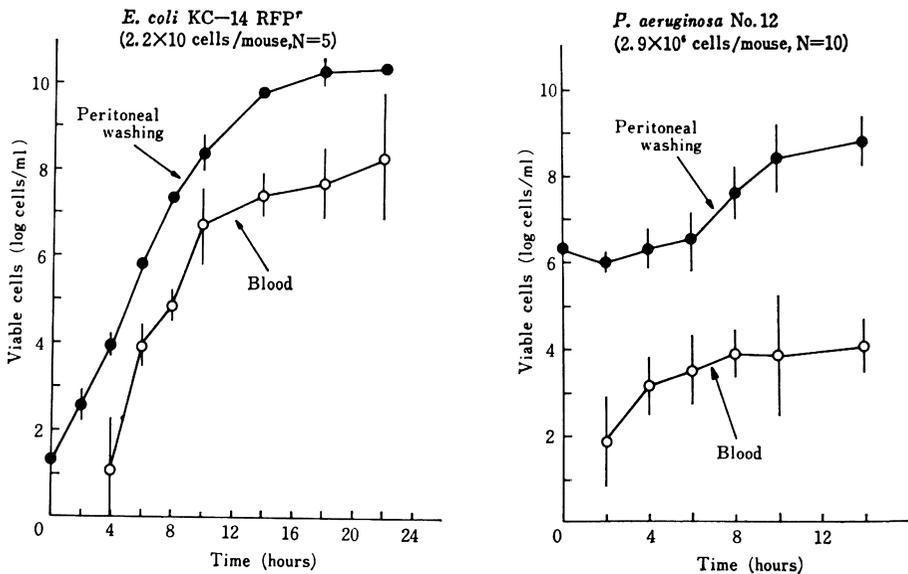


Table 3 Comparison of the antibacterial effects of TA-058 and PIPC by whole body autobacteriography in mice infected with *E. coli* 1346 RFP^r

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)	Dose (mg/kg)	Distribution density of bacteria in mice
TA-058	0.1	0.37 (0.24-0.57)	5	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			1.25	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			0.31	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
PIPC	0.2	4.78 (2.81-7.87)	5	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			1.25	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			0	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●

Infection: Each mouse was infected intraperitoneally with 2.5×10^7 cells ($84 \times \text{LD}_{50}$) suspended in 5% mucin

Drug treatment: TA-058 or PIPC in water solution was administered intravenously 1 hour after infection

Autobacteriography: Mouse autobacteriogram was prepared 20 hours after infection

Table 4 Comparison of the antibacterial effects of TA-058 and PIPC by whole body autobacteriography in mice infected with *E. coli* KC-14 RFP^r

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED ₅₀ (mg/kg) (95% confidence limit)	Dose (mg/kg)	Distribution density of bacteria in mice
TA-058	1.56	11.06 (7.76-15.67)	50	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			25	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			12.5	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
PIPC	1.56	66.43 (44.76-137.27)	50	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			25	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
			12.5	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Infected controls			0	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●

Infection: Each mouse was infected intraperitoneally with 2.2×10^7 cells ($20 \times \text{LD}_{50}$) suspended in 5% mucin

Drug treatment: TA-058 or PIPC in water solution was administered intravenously 1 hour after infection

Autobacteriography: Mouse autobacteriogram was prepared 20 hours after infection

についても ED₅₀ 付近の投与量群, 例えば Table 3 に示した PIPC, 5 mg/kg 投与群および Table 4 に示した PIPC, 50 mg/kg 投与群には様々な菌分布状態のマウスが観察され, 全身に感染菌の分布したマウスはその後死亡し, 腹腔内に感染菌の留まっているマウスは生死の境にあると推測された。また, 全身 ABGM における感染菌の分布と密度が ED₅₀ 値をよく反映しており, 薬剤の効果を直接目で見える方法として全身 ABGM の意義が再確認された。

TA-58 の筋肉内および静脈内投与における *in vivo* 抗菌作用を示す ED₅₀ 値を *in vitro* の抗菌活性を示す MIC 値との関連で見ると, TA-058 の *in vivo* での効果が対照薬剤のそれらと比較してすぐれていることが *E. coli* ならびに *P. aeruginosa* いずれの感染系でも認められ, 全身 ABGM からも裏づけることが出来た。TA-058 は対照薬剤の CBPC および PIPC よりもマウス血濃度の AUC 値が大きく, 半減期の長いことが認められており^{9),10)}, また *E. coli* KC-14 に対する殺菌作用がこれらの対照薬剤よりも強い^{6),7)}。TA-058 のこれらの性質が *in vivo* 効果のすぐれている理由の一部に考えられる。

TA-058 は経口投与によっても *in vivo* 抗菌作用を示し, 全身 ABGM からもその作用が裏づけられた。しかしながら筋肉内投与と比較してその ED₅₀ 値は *E. coli* 1346 RFP^r 感染系で約 13 倍, *P. aeruginosa* No. 12 感染系で約 9 倍と高く, TA-058 は注射用抗生物質と用いることがより適当と考えられる。

謝 辞

本研究に御協力いただいた遠藤いづみ氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 佐久間真理, 佐藤善重: 体内における細菌の分布と治療効果判定に用いる新技法: Whole body bacterioautography. 薬学雑誌 89: 1740~1742, 1969
- 2) 佐久間真理, 栗田口重美, 佐藤善重: Whole body bacterioautography によるブドウ球菌のマウス生体内分布に関する研究. 薬学雑誌 90: 1100~1106, 1970
- 3) 佐久間真理, 大塚峯三, 佐藤善重: 全身オートラ

ジオグラフィによる放射性化合物の生体内分布に関する研究 (第26報) ブドウ球菌感染マウスにおける ³H-tetracycline の分布, とくに全身オートバクテリオグラムとの関連について. Radioisotopes 20: 83~89, 1971

- 4) 佐久間真理, 栗田口重美, 佐藤善重: Sulfamethoxazole と trimethoprim の研究, ¹⁴C-trimethoprim の生体内分布に関する全身オートラジオグラフィの研究. Chemotherapy 21: 232~240, 1973
- 5) 遠藤俊夫, 佐久間真理, 田中 久, 萩島健次, 原 武史, 大島 慧, 佐藤善重: Oxolic acid の魚類感染症治療剤としての応用に関する研究 II, 全身オートバクテリオグラフィによる治療効果の検討. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 39: 173~177, 1973
- 6) NISHINO, T.; N. ISHII, T. TANINO, S. OHSHIMA & T. YAMAGUCHI: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of TA-058, a new broad-spectrum semisynthetic penicillin. Current Chemotherapy and Infectious Disease (Proceedings of the 11th ICC and the 19th ICAAC) Vol. I: 362~363, 1980
- 7) 西野武志, 石井信男, 谷野輝雄: 半合成ペニシリン系抗生物質 TA-058 に関する細菌学的評価. Chemotherapy 32 (S-2): 47~66, 1984
- 8) 谷 佳都, 早坂治男, 石井信男, 春日 修, 山口東太郎, 大島 慧: TA-058 の *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 32 (S-2): 90~98, 1984
- 9) YAMAGUCHI, T.; I. MAEZAWA, Y. SAKUMA, K. TANI, H. YOSHIDA & S. OHSHIMA: Pharmacokinetic studies of TA-058 in laboratory animals. Current Chemotherapy and Immunotherapy (Proceeding of the 12th ICC Vol. I: 331~333, 1981
- 10) 山口東太郎, 前澤 功, 吉田弘嗣, 谷 佳都, 佐久間由光, 恩田時男, 石井信男, 大島 慧, 仁田修治, 村田一夫, 溝辺雅一: 実験動物における TA-058 の体内動態. Chemotherapy 32 (S-2): 119~132, 1984

STUDY OF BACTERIAL PROPAGATION IN THE MOUSE
BODY AND *IN VIVO* ANTIBACTERIAL EFFECT OF
TA-058 BY WHOLE BODY AUTOBACTERIOGRAPHY

KATO TANI, YUKIO ENDO and TOUTARO YAMAGUCHI
Microbiological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

MICHIKO FUJII and TADAO TAKAHASHI
Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

The autobacteriograms of mice infected intraperitoneally with *E. coli* KC-14 RFP^r showed that the bacterial cells rapidly increased first in the peritoneal cavity and then in the blood. Fourteen hrs. after infection the cells were distributed in the whole body. On the contrary, in the mice infected intraperitoneally with *P. aeruginosa* No. 12 a lag time of 8 hrs. elapsed before the bacterial cells started to increase in the peritoneal cavity. The cells were not distributed in the whole body even immediately before death. The bacterial number in the blood remained less than 10⁴ cells/ml throughout.

The *in vivo* antibacterial effects of TA-058 and some reference drugs were compared in terms of bacterial growth on the autobacteriograms of mice infected with bacteria and treated with drug 1 hr. after infection. All the animals were sacrificed for autobacteriography 20~24 hrs. after infection shortly before the death of non-medicated, infected controls. The bacterial distribution and density in these mice were dependent on the administered dose of the antibiotics and their efficacy well reflected their ED₅₀. The excellent *in vivo* antibacterial effect of TA-058 was well substantiated in this autobacteriographical study.