

嫌気性菌に対する metronidazole の *in vivo* 抗菌作用—*E. coli* と *B. fragilis* の実験的混合感染における metronidazole と他剤の併用—

宮崎修一・向山和代・金子康子・五島瑩智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 59 年 5 月 4 日受付)

Escherichia coli と *Bacteroides fragilis* の混合感染マウスに対し metronidazole は cefazolin, cefoperazone または latamoxef との併用投与で、著明な相乗効果が認められた。この併用効果は、*E. coli* と clindamycin 耐性の *B. fragilis* による混合感染系においても認められた。

B. fragilis と *E. coli* の実験的混合感染マウスに対する metronidazole と cefazolin の併用効果は、2 剤の同時投与が最も有効であった。感染 1 時間後に metronidazole を投与し、cefazolin の投与を遅らせるほど治療効果は著しく低下した。また cefazolin を投与後、metronidazole の投与までの間隔をあげると、同様に治療効果が顕著に低下した。これらの混合感染における血中細菌の検索から、マウスの死亡は *E. coli* の増殖によることが判明した。

嫌気性菌の混合感染例で最も多く検出されるのは、*Bacteroides fragilis* と *Escherichia coli* である¹⁻⁴⁾。多くの *B. fragilis* は β -lactamase (主として Cephalosporinase) を産生し、各種 Cephalosporin 系抗生物質を不活化する⁵⁻⁷⁾。

著者らは、既に metronidazole が *B. fragilis*, *Clostridium difficile* など各種嫌気性菌に対し *in vitro* において強い抗菌力を示すことを報告した⁸⁾。

本報では *B. fragilis* と *E. coli* による実験的混合感染マウスに対し、*B. fragilis* に抗菌力があるが *E. coli* には抗菌作用のない metronidazole と、反対に *E. coli* には抗菌力を示すが *B. fragilis* には抗菌作用の弱いセフェム系薬剤および gentamicin とを併用し、その治療効果を検討したのでその成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

E. coli C-11 株, *B. fragilis* GM 7004 株と clindamycin 耐性の臨床分離 TMS 151 株を用いた。

2. 使用薬剤

Metronidazole (1,000 μ g/mg, 日本ローディア)

Cefazolin (964 μ g/mg, 藤沢薬品)

Cefoperazone (933 μ g/mg, 台糖ファイザー)

Cefmetazole (953 μ g/mg, 三共)

Latamoxef (912 μ g/mg, 塩野義製薬)

Gentamicin (565 μ g/mg, 塩野義製薬)

Clindamycin (864 μ g/mg, 日本アップジョン)

以上 7 薬剤を用いた。

3. マウス血清中の薬剤濃度

Metronidazole を 0.5 mg/mouse 経口投与し、30 分、1, 2, 4, 8 時間後 1 群 8 匹のマウスの心臓からそれぞれ 0.5 ml の血液を採り、群ごとのプール血清を得た。cefazolin, cefmetazole, cefoperazone, latamoxef および gentamicin をそれぞれ皮下投与し、5 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間後 metronidazole の場合と同じ方法で血清を得た。血清中の各薬剤濃度は、ディスク法で測定した。metronidazole の濃度測定用培地として GAM 寒天 (日本), 検定菌として *Clostridium sporogenes* を用いた。cefazolin と cefmetazole の場合は、Heart infusion broth (栄研); 2.5%, 寒天 (Difco); 1.2% から成る培地と *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用い、cefoperazone の場合は、ポリペプトン (大五栄養); 0.6%, 肉エキス (極東); 0.15%, 酵母エキス (Difco); 0.3%, ブドウ糖 (和光純薬); 0.1%, 寒天; 1.2% から成る培地と *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用い、latamoxef にはトリプトソイブイオン (栄研); 3.0%, 寒天; 1.2% から成る培地と *E. coli* 7437 を用い、gentamicin ではペプトン (Difco); 0.6%, 酵母エキス; 0.3%, 肉エキス; 0.15%, ブドウ糖; 0.1%, 寒天; 1.5% から成る培地に *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 を用いた。

4 項で記述する *E. coli* と *B. fragilis* 混合感染マウスに cefazolin 単剤および metronidazole との併用投与後の血清中 cefazolin 濃度を前述のとおり測定した。また単剤または併用投与群の薬剤投与後 2 時間目の血清

を、それぞれ 37°C に放置し、血清中の cefazolin の安定性を経時的に測定した。

4. *E. coli* と *B. fragilis* 混合感染マウスに対する metronidazole と他剤の併用療法

E. coli C-11 約 2 MLD (MLD ; 3×10^8 CFU/mouse, LD₅₀ ; 3.8×10^7 CFU/mouse) と *B. fragilis* GM 7004 約 10 分の 1 MLD (MLD ; 5×10^9 , LD₅₀ ; 3×10^9) を同時にマウス腹腔内感染させ、1 群は 1 時間後に cefazolin を投与し、metronidazole はさらに 1, 2, 4 および 6 時間遅れて投与する。一方は逆に metronidazole を先に投与し、cefazolin を遅らせて投与した。両群の治療効果とマウス血中菌数の推移を観察した。また metronidazole または clindamycin と他剤の投与比は 1 : 2 とし、同時投与における ED₅₀ は Van der Waerden 法により算出した。観察期間は 5 日間とした。

5. 複数菌感染マウスの血中菌数の測定

複数菌感染マウスの心血中の生菌数は、心血 0.2 ml を GAM ブイヨンで順次 10 倍希釈し、*E. coli* にはドリガルスキー改良培地平板、*B. fragilis* には *E. coli* の増殖を阻止するため cefazolin 25 μ g/ml を加えた GAM 寒天平板を用いた。

II. 実験成績

1. Metronidazole 投与後のマウス血清中濃度推移

Metronidazole および他の 5 薬剤を 0.5 mg/mouse 投与後、マウス血清中の各薬剤の濃度推移を Fig. 1 に示した。

Metronidazole 経口投与後の血清中ピーク値は投与 30 分後の 41 μ g/ml であり、この値は cefazolin, latamoxef のピーク値の 3 分の 2、cefmetazole, gentamicin とほぼ同等、cefoperazone の約 2 倍であった。metronidazole は他の 5 剤に比べ血清中での持続性が長く、薬剤

投与 8 時間後でも 2.3 μ g/ml の血清中濃度が検出された。

2. Metronidazole と他剤の併用効果

E. coli C-11 と *B. fragilis* GM 7004 (clindamycin 感受性) の混合感染マウスに metronidazole を経口投与し、同時に他剤を皮下投与した場合の治療効果を Table 1 に示した。

Metronidazole は *E. coli* に対し抗菌作用がなく、cefazolin, cefoperazone, gentamicin は *B. fragilis* に対し抗菌作用がないので、これら単剤による治療効果はほとんど認められなかった。しかし、metronidazole と cefazolin, cefoperazone との併用による治療効果 (ED₅₀) は、それぞれ 94 mg/kg, 82 mg/kg となり、単剤治療時の ED₅₀ 値の約 10 分の 1 あるいはそれ以下に低下している。*B. fragilis* に対して弱いながら抗菌作用のある latamoxef との併用による ED₅₀ 値は単剤治療時の 4 分の 1 であり、*B. fragilis* に対し強い抗菌力のある cefmetazole との併用時の ED₅₀ 値は、単剤治療時とほぼ同じであった。

次に clindamycin 耐性 *B. fragilis* TMS 151 と *E. coli* C-11 との混合感染に対する併用効果を同様に比較検討した (Table 2)。

Clindamycin 耐性 *B. fragilis* の関与する混合感染に対しても metronidazole と cefazolin, cefoperazone, latamoxef, gentamicin との併用により ED₅₀ 値はそれぞれ 94, 71, 41, 50 mg/kg で、単剤よりも優れた治療効果を示した。

一方、clindamycin と cefazolin, cefoperazone, latamoxef との併用治療ではそれぞれ単剤治療時より小さい ED₅₀ 値を示すが、metronidazole と各剤との併用時に比べ約 3~5 倍大きい値となった。*B. fragilis* に全く抗菌

Fig. 1 Serum levels in mice

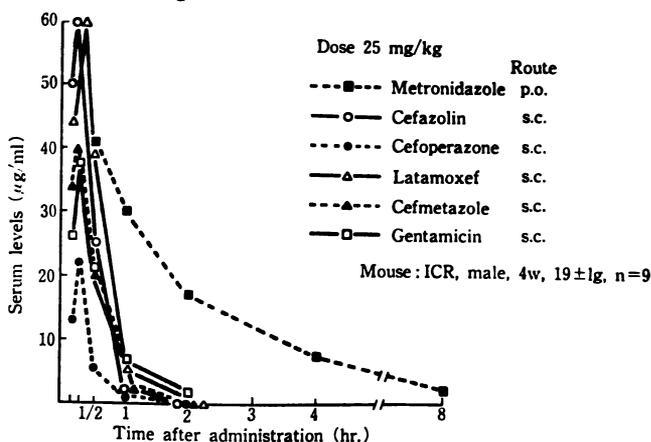


Fig. 2 Relation between therapeutic effect and the initiating time of administration of metronidazole and cefazolin in mice of mixed infection with *E. coli* and *B. fragilis*

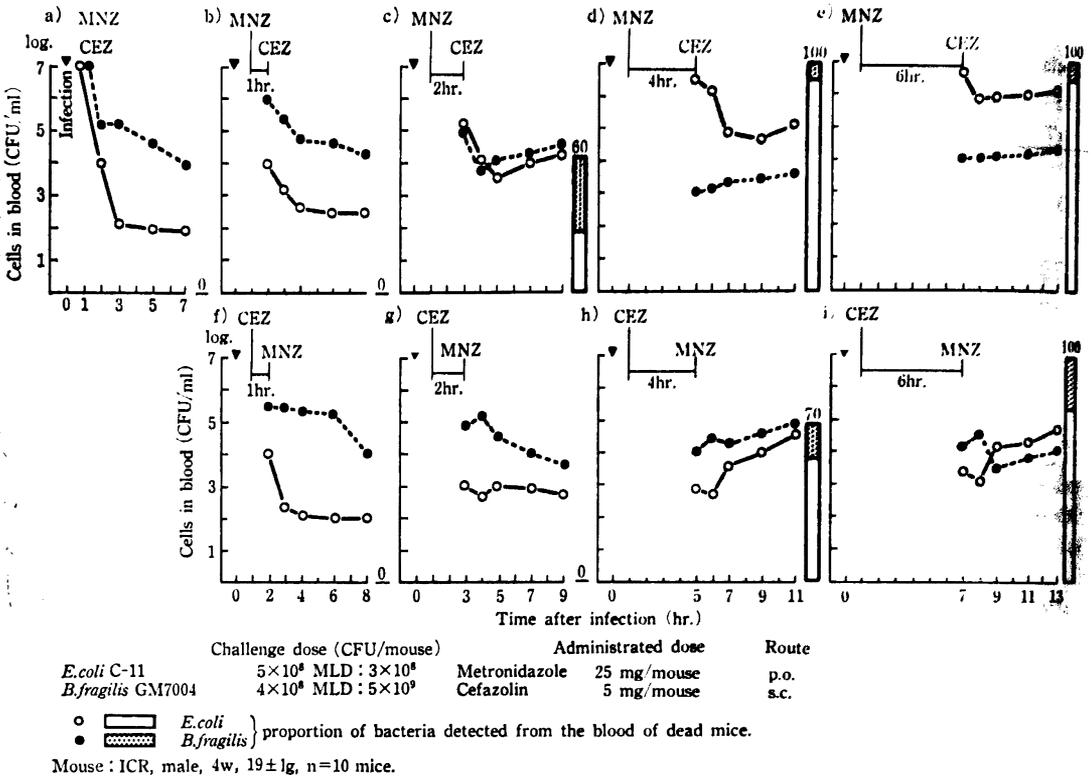
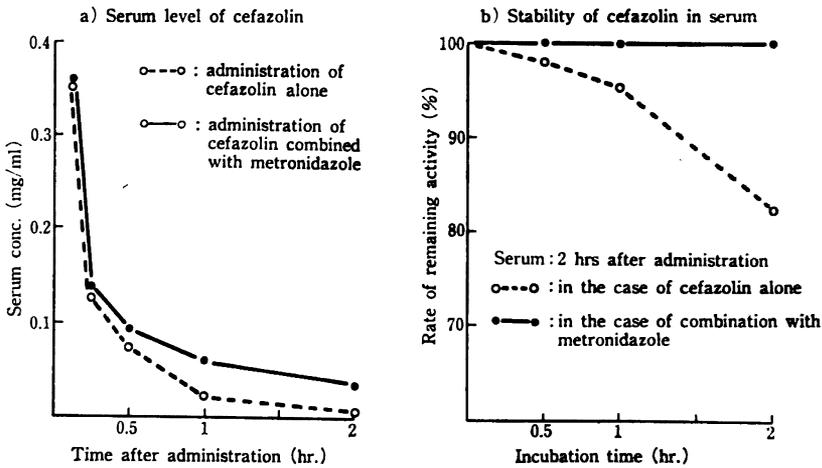


Fig. 3 Serum level of cefazolin in mice mixed infection with *E. coli* and *B. fragilis* and stability of cefazolin in serum



と cefazolin を同時投与すると、マウス血中の *E. coli*, *B. fragilis* は経時的に減少し、死亡率 0% であった (Fig. 2-a)。また混合感染後 1 時間目に metronidazole を投与し、さらに 1 時間後に cefazolin を投与した群で

も、2 薬剤同時投与群のように死亡率 0% となった (Fig. 2-b)。しかし、metronidazole 投与 2 時間後に cefazolin を投与した群では死亡率 60% となり (Fig. 2-c)、血中の *E. coli*, *B. fragilis* の菌数は cefazolin 投与 2

時間後から再増殖がみられた。4時間後 (Fig 2-d) および6時間後の投与では (Fig 2-e), すべてのマウスを救命できず死亡率 100% となった。

一方 cefazolin を先に投与し, 1時間または2時間後に metronidazole を投与した群では (Fig 2-f, g), 死亡率 0% であったが, cefazolin 投与4時間後に metronidazole 投与した群では死亡率 70% (Fig 2-h), 6時間後投与では 100% となった (Fig 2-i)。

5. *E. coli* と *B. fragilis* の混合感染マウスにおける血清中 cefazolin 濃度

E. coli C-11, *B. fragilis* GM 7004 混合感染マウスに cefazolin 単剤および metronidazole との併用投与後の cefazolin の経時的血清中濃度を Fig. 3 に示した。

Metronidazole との併用投与1時間, 2時間後の血清中 cefazolin 濃度は, それぞれ 60, 38 $\mu\text{g/ml}$ であったが, cefazolin 単剤投与群では 21 $\mu\text{g/ml}$ と 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度であった (Fig 3-a)。

また薬剤投与2時間後の血清を 37°C に放置すると, cefazolin 単剤投与群の血清中 cefazolin 活性は経時的に減少したが, metronidazole との併用投与群では cefazolin 活性が減少しなかった (Fig 3-b)。

III. 考 察

Metronidazole はマウスに経口投与後, 迅速に吸収され, 血中半減期も長かった。この傾向は, HOUGHTON¹¹⁾ らの健康人での血清中濃度の推移と類似している。*in vitro* における metronidazole の *B. fragilis* に対する 80% 発育阻止濃度は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であることから⁹⁾, マウス血清中の metronidazole は *B. fragilis* の増殖を十分に阻止する有効濃度が維持されるものと考えられる。

Clindamycin 感受性 *B. fragilis* GM 7004 と *E. coli* C-11 との混合感染マウスに対する metronidazole と cefazolin, cefoperazone あるいは latamoxef との併用治療効果は, それぞれ単剤治療効果に比べ約 6~10 倍以上優れた成績を得た。この *in vivo* での metronidazole と他剤との相乗効果は, 前報⁹⁾ の *in vitro* 併用結果とよく対応している。

さらに近年, 臨床において検出頻度が増加している clindamycin 耐性 *B. fragilis* TMS 151 を用いた混合感染系においても, 良好な併用効果が得られたことから, metronidazole 経口投与での臨床的有用性が示唆された。

しかし, *B. fragilis* GM 7004 と *E. coli* C-11 との混合感染マウスに metronidazole と cefazolin の併用投与を行なうと, 両薬剤の投与条件によってマウスの治療効果は著しく変動した。この場合, 死亡マウスの血中から多数の *E. coli* が検出されたことから, cefazolin の投与時

間が遅れると *E. coli* の増殖阻止が不十分となり, 二次的に *B. fragilis* の増殖も助長されることが効果を減弱させるものと考えられた。またもう一つの理由としては *B. fragilis* の急速な増殖によって, この菌の産生する β -lactamase が cefazolin を分解, 不活化し *E. coli* の増殖を抑制し得なくなることである。このことは cefazolin 単剤より metronidazole との併用時のマウス血清中濃度が高く, しかも cefazolin 単剤投与時の血清中の cefazolin 活性が *in vitro* で経時的に減少したことから裏付けられる。

B. fragilis は, 広い基質特異性をもつ2種類の β -lactamase を産生することが知られている¹²⁾。したがってこの種の菌の混合感染における metronidazole と他剤の併用治療は両薬剤の両細菌に対する抗菌力とともに, 薬剤の投与条件 (投与時間, 投与量) などについても十分な配慮が必要である。

文 献

- 1) 五島登智子, 辻 明良, 小川正俊, 宮崎修一: Polymicrobial infection—基礎—。臨床と細菌 8: 113~121, 1981
- 2) GORBACH, S. L. & J. G. BARTLETT: Anaerobic infection. N. Engl. J. Med. 290: 1177~1184, 1237~1245, 1289~1294, 1974
- 3) TULLY, F. P. & S. L. GORBACH: Clinical aspects of anaerobic infection. J. of Infect, S-1: 25~37, 1979
- 4) THADEPALLI, H.; S. L. GORBACH & L. KEITH: Anaerobic infections of the female genital tract: Bacteriologic and therapeutic aspects. Amer. J. Obstet. Gynecol. 117: 1034~1040, 1973
- 5) LEUNG, T. & J. D. WILLIAMS: β -lactamase of subspecies of *Bacteroides fragilis*. J. Antimicrob. Chemother. 4: 47~54, 1978
- 6) TALLY, F. P.; J. P. O'KEEFE, N. M. SULLIVAN & S. L. GORBACH: Inactivation of cephalosporins by *Bacteroides*. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 565~571, 1979
- 7) PECHERE, J. C.; R. GUAY, J. DUBOIS & R. LE-TARTE: Hydrolysis of Cefotaxime by a β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 17: 1001~1003, 1980
- 8) 投稿中。
- 9) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 10) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 27: 559~560, 1979
- 11) HOUGHTON, G. W.; P. S. THORNE, J. SMITH, R. TEMPLETON, P. J. COOK & I. M. JAMES: Plasma

metronidazole concentration after suppository administration. "Metronidazole" [ed] PHILLIPS, I. & J. COLLIER, The royal society of Medicine, 1979

- 12) YOTSUJI, A.; S. MINAMI, M. INOUE & S. MITSUHASHI: Properties of novel β -lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob. Agents. Chemother. 24 : 925~929, 1983

IN VIVO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF METRONIDAZOLE AGAINST ANAEROBIC BACTERIA

THERAPEUTIC EFFECT OF METRONIDAZOLE IN COMBINATION WITH
OTHER ANTIBIOTICS IN MICE MIXED INFECTION WITH
B. FRAGILIS AND *E. COLI*

SHUICHI MIYAZAKI, KAZUYO MUKAIYAMA,
YASUKO KANEKO and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine Toho University

Each combinations of metronidazole and cefazolin, cefoperazone or latamoxef was synergistic effect in mice of experimental mixed infection with *E. coli* and *B. fragilis*. Also these combined effects were obtained in mice of experimental mixed infection with *E. coli* and clindamycin-resistant *B. fragilis*.

When metronidazole was administered within 2 hrs after administration of cefazolin, the results were the same as with simultaneous administration of the 2 antibiotics. The number of viable cells in the blood of the 2 bacterial strains gradually decreased with time, and 0% mortality was achieved. When cefazolin was administered within 2 hrs after administration of metronidazole, however, the number of viable cells gradually increased and the mortality rate became 60%. An interval of over 4 hrs between the administration of the 2 antibiotics resulted in a mortality rate of 70~100%, regardless of the order of administration.