

## 実験感染における実験条件と感染防御効果に関する研究

### (2) マウスの系統による抗菌薬の血中濃度と治療効果の変動

小川 正俊・川崎 賢二・五島瑳智子

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和61年 1月18日受付)

感染治療実験に用いる ICR, ddN マウスの系統による薬剤の治療効果を検討した。

マウス腹腔内感染における MLD は, *E. coli* C11 株感染において ICR マウスが ddN マウスより小さく, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* においても同様の傾向がみられた。

*E. coli* C11 感染マウスに対する ampicillin, carbenicillin, sulbenicillin, cefazolin, gentamicin, dibekacin の治療効果の比較では, ICR マウスの ED<sub>50</sub> が ddN マウスに比べて小さく治療効率のよいことが示された。この現象は *E. coli* C11 株感染時の血清中薬剤濃度が正常時と異なり, ddN マウスより ICR マウスの方で高くなることが主因と考えられた。

以上の成績から感染治療実験で効果を比較する場合には, 同一条件の動物を用いて, 同時に行なうことが必要であり, 治療効果の評価には, 感染動物における薬剤の体内動態を知ることの重要性が示唆された。

前報<sup>1)</sup>において, 実験感染における抗菌薬の治療効果は, マウス系統差, 週齢差などにより感染菌に対する感受性が異なり, また抗菌薬投与においては血中薬剤濃度に差があることを明らかにした。

すなわち ICR, dd, ddN, ddy の4系統の雄マウスを用い, *E. coli* を感染菌とし, 菌に対するマウスの感受性を比較したところ, ICR が最も少量の菌で感染死した。血中の carbon clearance 能は ICR が最も低く, このことが感染成立に大きく影響していると考えられた。また同一系統であっても, 週齢によって感染菌への感受性に差がみられた。これらの事実から実験動物の条件によって, 治療効果にも差のあることが推察されたので本報では感染マウスでの抗菌薬の治療効果を ICR, ddN の2系統について検討した成績を報告する。

#### I. 実験材料および方法

##### 1. 使用菌株

*Escherichia coli* C11

*Serratia marcescens* No. 8

*Pseudomonas aeruginosa* NC-5

##### 2. 使用薬剤

Ampicillin (ABPC, 904 μg/mg, 藤沢薬品)

Carbenicillin (CBPC, 800 μg/mg, 台糖フェイザー)

Sulbenicillin (SBPC, 871 μg/mg, 武田薬品)

Cefazolin (CEZ, 933 μg/mg, 藤沢薬品)

Gentamicin (GM, 584 μg/mg, 塩野義製薬)

Dibekacin (DKB, 704 μg/mg, 明治製菓)

##### 3. 菌力の測定および感染方法

普通寒天斜面培地に1夜培養した菌を滅菌生理食塩液に浮遊させ, さらにこの浮遊液を滅菌生理食塩液で種々の濃度に希釈し, その0.5 ml をマウス腹腔内に接種し, 5日後の生死により菌力(MLD)を測定した。

同時にこれらの菌液に等量の10% mucin (Wilson gastric mucin) 溶液を加えて(mucinの最終濃度は5%)同様の実験を検討し, mucin 添加時の菌力についても測定した。

##### 4. マウス実験感染における防御効果

ICR 系, ddN 系雄マウス, 19±1 g, 1群6匹を使用し, *E. coli* C11 株を mucin 無添加の場合 1×10<sup>6</sup> CFU/mouse, 5% mucin 添加の場合 2×10<sup>6</sup> CFU/mouse となるように調整し, マウス腹腔内に接種した。感染1時間後に各薬剤をそれぞれ皮下投与した。7日後までのマウスの生死を観察し, Van der Waerden method により ED<sub>50</sub> 値を算出した。

##### 5. マウス好中球の殺菌作用

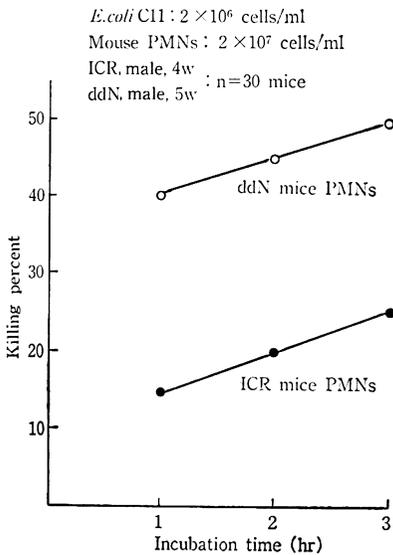
実験感染に用いたのと同じマウスに0.5% glycogen 液0.5 ml を腹腔内に投与し, 4時間後に Hanks 液にて腹腔内を洗浄, 好中球を採取した。好中球浮遊液(2×10<sup>7</sup> cells/ml) 0.2 ml, 菌液(2×10<sup>6</sup> cells/ml) 0.1 ml, マウス新鮮血清0.2 ml, Hanks 液1.5 ml, 総量2.0 ml として振盪培養(37°C)を行ない, 経時的に生菌数を測定

Table 1 Comparison between the virulence of various organisms against male albino mice ICR and ddN strains

Infected strains	MLD CFU/mouse (5% mucin)	
	ICR mouse, male, 4 weeks	ddN mouse, male, 5 weeks
<i>E. coli</i> C 11	$4 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
<i>S. marcescens</i> No. 8	$7 \times 10^4$	$1 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i> NC-5	$3 \times 10^3$	$8 \times 10^4$

1 group : 10 mice.

(Chemotherapy Vol. 30, No. 1, 67-74, 1982)

Fig. 1 Comparison between the bactericidal effect against *E. coli* C 11 with PMN cells of ICR and ddN strains

し、感染実験と同条件の菌量を腹腔内に接種した。感染1時間後に薬剤を投与し30分、1、2、3時間後に断頭により1匹当たり0.4 mlの血液を採取、8匹分をプールし、直ちに血清を分離、0.45 μm ミリポアフィルターで除菌後、前述と同じ方法で血清中濃度を測定した。

## II. 実験成績

### 1. 感染菌に対する感受性

グラム陰性菌3株をICRおよびddNの腹腔内に接種し、5日間生死を観察後、MLD(最小致死量)で表示した(Table 1)。体重をそろえる意味から、ICRは4週齢、ddNは5週齢を用いた。体重は両系とも $19 \pm 1$  gとした。

*E. coli* C 11, *P. aeruginosa* NC-5, *S. marcescens* No. 8の各菌株を腹腔内に感染させた結果、ICRの方がddNよりMLDが小さく、感染菌に対する感受性が高いことが認められた。

### 2. マウス好中球の殺菌作用

ICR, ddNの感染菌に対する感受性の差が好中球の殺菌能の差に起因する可能性を考え2系統のマウス好中球を採取し*E. coli* C 11株を試験菌として貪食殺菌効果を比べた成績がFig. 1である。

ddNがICRより*E. coli* C 11株に対する殺菌作用が若干強いことが認められた。

### 3. 治療効果の変動

*E. coli* C 11の感染菌量は、感受性の低いddNのMLDで行ない、感染1時間後に薬剤を投与した。感染菌量を $1 \times 10^9$  CFU/mouseとした場合にはgentamicin, dibekacin投与におけるICRのED<sub>50</sub>は、ddNより小さい値を示した。感染時にmucinを添加して $2 \times 10^5$  CFU/mouseの菌量で感染させた群では6剤ともICRのED<sub>50</sub>がddNより小さい値を示した(Table 2)。

### 4. 薬剤の血清中濃度

#### 1) 正常マウスの血清中濃度

Ampicillinは経口投与、carbenicillin, sulbenicillin, cefazolin, gentamicin, dibekacinは皮下投与を行な

た。

#### 6. マウス血清中濃度測定

実験感染と同条件のマウス、1群8匹に

ampicillin (1 mg/mouse, 経口投与)

carbenicillin (1 mg/mouse, 皮下投与)

sulbenicillin (1 mg/mouse, 皮下投与)

cefazolin (0.5 mg/mouse, 皮下投与)

gentamicin (0.5 mg/mouse, 皮下投与)

dibekacin (0.5 mg/mouse, 皮下投与)

投与した。投与30分、1、2時間後にマウスから断頭し、血液を1匹当たり0.4 mlずつ採取、プールし血清を分離した。薬剤濃度は、*Bacillus subtilis* ATCC 333株を検定菌とした、薄層ディスク法により測定した。

#### 7. *E. coli* 感染マウスにおける血清中薬剤濃度測定

正常マウス血清中濃度測定と同条件のマウスを使用

Table 2 Comparison between the protecting effect of various antibiotics against experimental ICR and ddN strains infection with *E. coli* C11

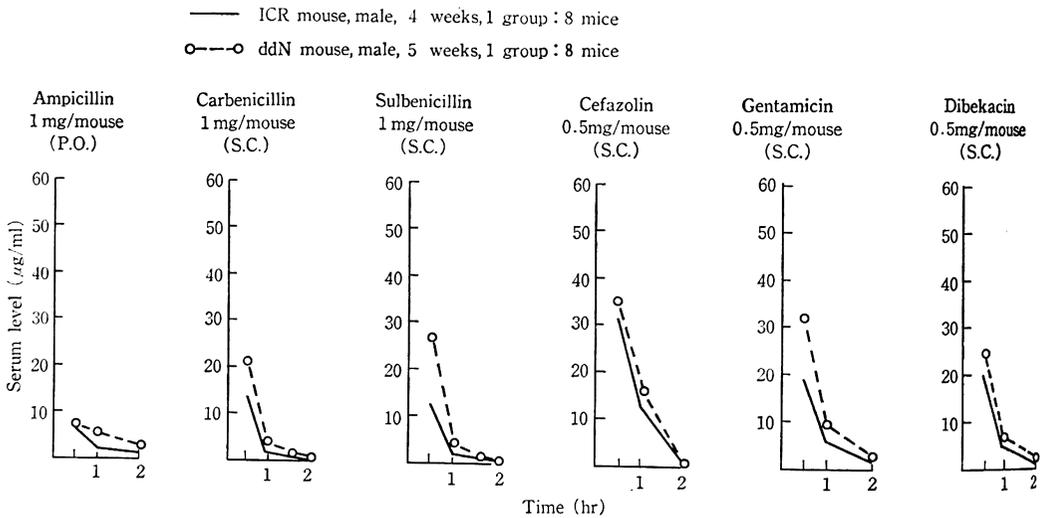
Antibiotics	ED <sub>50</sub> mg/mouse			
	ICR mouse, male, 4 weeks		ddN mouse, male, 5 weeks	
	5% mucin (-) <sup>1)</sup>	(+) <sup>2)</sup>	5% mucin (-) <sup>1)</sup>	(+) <sup>2)</sup>
Ampicillin	>10	0.37 (0.24-0.57)	>10	0.75 (0.5-1.14)
Carbenicillin	>10	0.47 (0.32-0.70)	>10	0.60 (0.41-0.87)
Sulbenicillin	>10	0.60 (0.41-0.87)	>10	0.75 (0.50-1.14)
Cefazolin	>10	0.14 (0.1-0.21)	>10	0.29 (0.19-0.46)
Gentamicin	0.19(0.13-0.28)	0.012(0.007-0.019)	0.39(0.27-0.58)	0.019(0.013-0.027)
Dibekacin	0.25(0.18-0.34)	0.039(0.029-0.052)	0.5 (0.36-0.68)	0.049(0.039-0.062)

Infected strain: *E. coli* C11. 1 group: 6 animals

Challenge dose (CFU/mouse)	MLD (CFU/mouse)	
	ICR mouse	ddN mouse
1) 1 × 10 <sup>9</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>	1 × 10 <sup>9</sup>
2) 2 × 10 <sup>5</sup> *	4 × 10 <sup>4</sup> *	2 × 10 <sup>5</sup> *

\*: 5% mucin

Fig. 2 Serum levels of various antibiotics in normal mice



い、ICR, ddN をそれぞれ 1 群 8 匹の血清中濃度を測定し、その成績を Fig. 2 に示した。

ddN は、ampicillin, carbenicillin, sulbenicillin, cefazolin, gentamicin, dibekacin のすべてに ICR より高い血清中濃度を示した。

2) *E. coli* 感染時の血清中濃度

Fig. 3 は、*E. coli* C11 株を感染させたマウスに各薬剤を投与し、血清中濃度を ddN, ICR でそれぞれ測定した成績である。

6 剤とも ICR の方が ddN より高濃度となり正常マウスでの血清中濃度と逆転する現象が認められた。

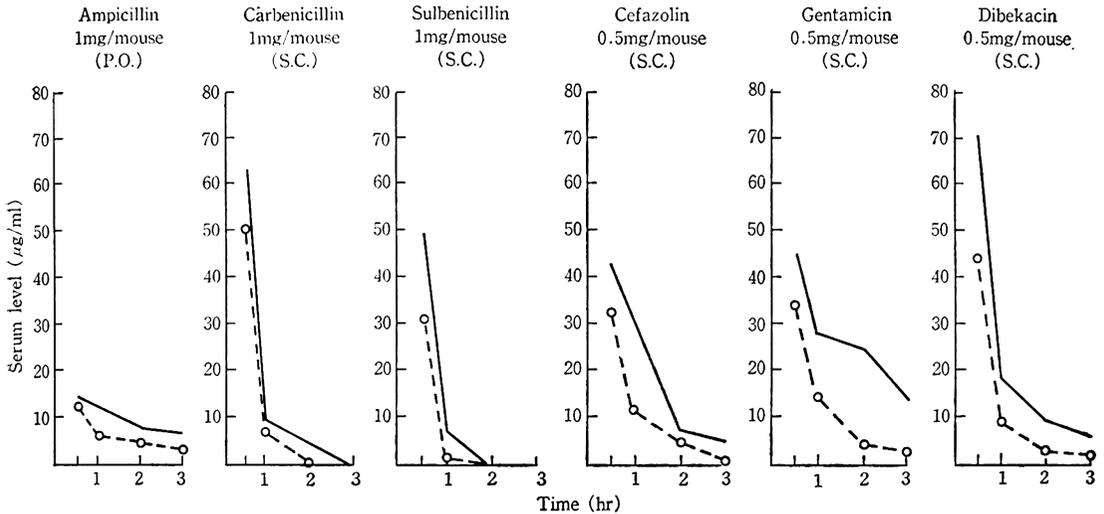
III. 考 察

これまでにマウス実験的全身感染における抗菌薬の治療効果をいかにして正確に評価するかを検討するため菌種の要因について、実験的解析を試みてきた<sup>2-11)</sup>。

前報<sup>1)</sup>において、抗菌作用の *in vivo* 評価は、同一実験系で同時に行なった場合のみ、ED<sub>50</sub> の比較が可能であり、また治療効果を判定する資料としての吸収、排

Fig. 3 Serum levels of various antibiotics in experimental mice infection with *E. coli* C11

Infection with *E. coli* C11 { — ICR mouse, male, 4 weeks, 1 group : 8 mice  
 ○--○ ddN mouse, male, 5 weeks, 1 group : 8 mice  
 Challenge dose :  $2 \times 10^5$  CFU/mouse (5% mucin) MLD : ICR mouse  $4 \times 10^4$  CFU/mouse  
 ddN mouse  $2 \times 10^5$  CFU/mouse  
 Administration : S.C. or P.O. at 1 hr. after infection



の成績は、感染実験に用いた同一条件の動物を用いるべきであることを提唱した。

今回 ICR と ddN の 2 系統のマウスについて抗菌薬の治療効果を比較するため、*E. coli* C11 株を感染菌とし ampicillin, carbenicillin, sulbenicillin, cefazolin, gentamicin, dibekacin による治療効果を比較した。

使用した感染菌に対する感受性は ICR の方が高く、ddN より少量の菌でマウスを致死させることができる。治療には、攻撃菌量に感受性の低い ddN の MLD を用い、ICR には MLD 以上の高い感染菌量として行なったにもかかわらず、ICR の方が、ddN より小さい ED<sub>50</sub> となり、少ない投与量で治療効果が発現された。この結果の原因としてはまず抗菌薬の体内動態の関与が考えられる。しかし正常マウスでは ICR が ddN よりすべての薬剤の血中濃度は低い結果が得られているので、これだけでは治療効果の矛盾を説明することはできなかった。

そこで *E. coli* C11 株を感染させたマウスでの血中濃度を調べたところ、各薬剤とも ICR が ddN より高くなる成績が得られた。

感染マウスの血中濃度は 2 系統とも、正常マウスより高く、感染による排泄障害や血管壁の透過性の亢進などに基づくものと推察された。しかも菌感受性の高い

ICR の方が感染の影響が大きく、薬剤の血中濃度は著しく高まり、ddN を上回った。この理由としては、前報<sup>1)</sup>において報告した尿中排泄率の成績から、正常マウスにおいては ddN が ICR より排泄率が高いことから、感染時においても ddN の方が排泄率が高いことが考えられ、ICR に投与された薬剤が ddN より生体に長時間残存すると考えられる。

この結果が、ICR の治療効果が ddN より高くなる直接の原因と考えられた。

このようにマウスの系統によって治療効果に差があることは、菌に対する感受性、薬剤の体内動態がマウスの系統によって異なることがその要因となることのほかに、感染時と正常時の薬剤の体内動態が異なりそこにも系統差がみとめられ、治療効果の大きな変動因子となることが明らかとなった。

今回マウスは薬剤の治療効果を比較する目的から、体重をそろえるために、ICR は 4 週齢、ddN は 5 週齢を使用した。週齢の異なるマウスを比較することについては前報<sup>1)</sup>で報告したように、週齢の若い方が感染菌に対する抵抗力が強くなる傾向を認めている。しかし ICR は ddN に比べ、週齢が若いにもかかわらず、ddN より感染菌に対する抵抗力が強く、感受性であるため、ddN と同量の菌量で感染させれば、ICR の方が感染が重くな

り治療効果は低くなるはずである。しかし実際には ddN の MLD に近い菌量を感染させた多くの例で ICR の ED<sub>50</sub>の方が小さかった。このことから異なる週齢のマウスを用いたことは問題ないと判断された。

以上の成績により、実験感染における治療効果の解析には、実験動物における薬剤の体内動態成績が役立つことが実証された。

#### 文 献

- 1) 小川正俊, 上村利明, 川崎賢二, 宮崎修一, 五島 瑳智子: 実験感染における実験条件と感染防御効果に関する研究, (1) マウスの条件による感染菌の菌力, 抗菌薬投与後の血中濃度, 尿中排泄の比較。Chemotherapy 30: 67~74, 1982
- 2) 五島 瑳智子, 堂ヶ崎 勲, 一色義人, 野藤隆夫, 桑原章吾: 抗菌薬の試験管内抗菌力と感染防御効果の関連性について。感染・炎症・免疫 1(1): 11~22, 1971
- 3) GOTO, S.; Y. ISSHIKI & T. KAMATA: *In vivo* laboratory evaluation of cephalixin and cephaloglycin. Proceedings of a symposium on the clinical evaluation of cephalixin. 10~13, 1969
- 4) 五島 瑳智子, 上村利明, 堂ヶ崎 勲, 桑原章吾, 西田 実: 実験感染におけるマウスの系統, 週齢差による菌感受性の変動。日本実験動物研究会第7回研究会, 1972
- 5) 五島 瑳智子, 堂ヶ崎 勲, 金子康子, 滝田聖新, 小川正俊, 桑原章吾: 緑膿菌マウス感染における治療効果に関連する要因について。第16回日本化学療法学会東日本支部総会, 1972
- 6) 野藤隆夫: sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防御効果の相関 I. 感受性測定の見直し—特に接種菌量の問題について。Chemotherapy 20: 638~645, 1972
- 7) 野藤隆夫: sulfa 剤の試験管内抗菌力と感染防御効果の相関 II. マウス実験感染における防御効果と MIC との関連性について。Chemotherapy 20: 646~652, 1972
- 8) 一色義人: 試験管内抗菌作用と感染防御効果との相関について, (1) Ampicillin, cyclacillin, cephalixin の感受性測定法の検討。Chemotherapy 23: 3781~3789, 1975
- 9) 一色義人: 試験管内抗菌作用と感染防御効果との相関について, (2) Ampicillin, cephalixin, cyclacillin における MIC とマウス実験的感染に対する防御効果との関連性, 特に攻撃菌量と投与方法の影響について。Chemotherapy 23: 3790~3797, 1975
- 10) 堂ヶ崎 勲, 一色義人, 五島 瑳智子, 桑原章吾: 試験管内感受性と感染防御効果との相関について, (2) Ampicillin, cephalixin, cyclacillin を投与したマウス実験感染症の臓器内菌数と治療効果の関連について。第19回日本化学療法学会総会, 1971
- 11) 上村利明, 五島 瑳智子, 桑原章吾: マウス実験感染における各種要目の検討, マウス系統および週齢による実験化学療法成績の動揺—*E. coli* C11株と CEZ, ABPC, KM の組合せについて。第20回日本化学療法学会総会, 1972

STUDIES ON EXPERIMENTAL CONDITIONS  
AND THERAPEUTIC EFFECTS  
IN EXPERIMENTAL INFECTIONS

(2) COMPARATIVE ANALYTICAL STUDIES OF THERAPEUTIC EFFECTS OF  
ANTIBIOTICS ADMINISTERED IN MICE OF DIFFERENT STRAINS

MASATOSHI OGAWA, KENJI KAWASAKI and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

Comparative studies were made on mice of ddN and ICR strains on the therapeutic effect of antibiotics administered.

MLD of *Escherichia coli* C 11 inoculated intraperitoneally was smaller in ICR strains, representing higher susceptibility and the same results were observed in experimental infection with strains of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa*.

ED<sub>50</sub> values of ampicillin, carbenicillin, sulbenicillin, cefazolin, gentamicin and dibekacin obtained in ICR strains were generally smaller than those in ddN strains against the same infectious dose of *E. coli* C 11.

Pharmacological examination revealed that, in contrast with normal mice, a higher serum level of antibiotic was attained in infected mice of ICR strain.

The above results indicate that, in assessing the *in vivo* antibacterial effect accurately, pharmacological properties of antibiotics in infected mice should be investigated with the same strain as was used for efficacy tests.