

## 実験的化膿性中耳炎モルモットにおける aspoxicillin の薬効評価

奥野 哲・佐久間由光・岩崎 仁・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所\*

(平成元年1月31日受付)

小児の中耳炎より分離した肺炎球菌を用いて、モルモット化膿性中耳炎モデルを作製し、aspoxicillin (ASPC), mezlocillin (MZPC) および sulbenicillin (SBPC) の薬効評価を行なうため、各薬剤を筋肉内投与し、中耳貯留液中の菌数の変化および各薬剤の濃度を経時的に検討した。さらに、ASPC を 40 mg/kg 筋肉内投与し、その治療効果を病理組織学的に検討した。病理組織学的検討において、ASPC 投与群は時間の経過とともに明らかな治療効果が観察された。各薬剤の Time above MIC (TAM) 値を中耳貯留液中濃度推移から求めたところ、ASPC 40 mg/kg 筋肉内投与時の TAM 値は 6.2 時間、MZPC は 2.8 時間であった。治療実験において、ASPC 4 mg/kg 投与群が MZPC 40 mg/kg 投与群と同程度の治療効果を示した一因として、感染菌に対する TAM 値が重要な因子であることが推察され、抗菌剤の治療効果を評価、推測する際に TAM 値が重要なパラメーターになることが示唆された。

**Key words:** 実験的化膿性中耳炎, aspoxicillin, 中耳貯留液中菌数, 中耳貯留液中薬剤濃度, time above MIC

前報<sup>1)</sup>にてモルモット肺炎球菌性中耳炎モデルを用いて、ASPC の構造と感染部位への移行性ととの関係を明らかにし、ASPC は他剤と比較して感染部位において良好な移行性および持続性を示すことを報告した。

今回、以上報告した ASPC の優れた体内動態が治療効果にどのように寄与しているかを明らかにする目的で、上記のモルモット肺炎球菌性中耳炎モデルを作製し、ASPC 筋肉内投与後の中耳貯留液中の菌数の変化および ASPC の治療効果を病理組織学的に検討したので報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 病理組織学的検討

6 週齢のハートレイ系モルモット、雄 32 匹を実験に供した。モルモットを 3 群に分け、第 1 群 (4 匹) は無処置対照群、第 2 群 (16 匹) は菌接種非治療群で、 $6 \times 10^6$  CFU/ml の菌液 0.1 ml を両側の中耳腔内に接種した。第 3 群 (12 匹) は ASPC 治療群で、菌接種後 24 時間に ASPC を滅菌蒸留水に溶解し、40 mg/kg 筋肉内投与した。第 2 群のモルモットは菌接種後 24 時間、2、4 および 8 日に、また、第 3 群のモルモットは菌接種後 2、4 および 8 日にそれぞれ 4 匹宛殺処分した。ただし、第 2 群では途中死亡例が 1 匹あったため、菌接種 4

日後の殺処分例数は 3 匹であった。動物は殺処分に際し、エーテル麻酔下で開胸し、左心室より 10% 中性緩衝ホルマリン液を注入 (110 cm H<sub>2</sub>O の圧力で 5 分間) し、聴器の固定を実施した。固定後、断頭し頭部皮膚を剝離した後、頭蓋骨ごと同固定液に浸漬固定した。固定完了後、聴器は蟻酸脱灰し、パラフィン切片を作製、HE 染色を施し鏡検した。

## 2. 中耳貯留液中の菌数変化および薬剤濃度測定

## 1) 感染動物の作製

前報<sup>1)</sup>に準じ、体重 250~330 g のハートレイ系モルモットを使用した。モルモットを固定して、顎下部を切開し、中耳骨包中に小児中耳炎より分離した *Streptococcus pneumoniae* を約  $10^6$  CFU/ml に調整後、0.1 ml 注入した。

## 2) 使用薬剤

aspoxicillin (ASPC: 田辺製薬)

mezlocillin (MZPC: バイエル薬品)

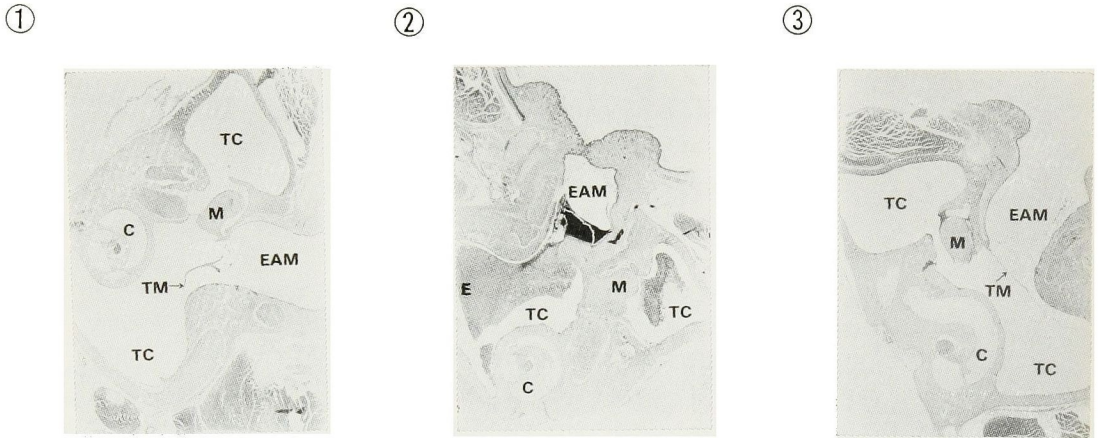
sulbenicillin (SBPC: 武田薬品工業)

## 3) 薬剤の投与

各薬剤は滅菌蒸留水に溶解し、菌接種 1 日後に 4 および 40 mg/kg を大腿筋肉内に投与した。

## 4) 血液および中耳貯留液の採取

\* 戸田市川岸 2-2-50



Abbreviations EAM : External acoustic meatus TM : Tympanic membrane M : Malleus  
TC : Tympanic cavity C : Cochlea E : Effusion

1. Middle ear of a normal control guinea pig.
2. Middle ear of an untreated guinea pig 8 days after inoculation, showing large amount of pus in tympanic cavity and thickening of submucosal tissue.
3. Middle ear of an ASPC-treated guinea pig 8 days after inoculation, showing normal appearance. Guinea pigs were treated with 40 mg/kg of ASPC (intramuscular injection) 24 hours after inoculation.

Fig. 1. Histopathological examination

血液はモルモット心臓より 0.5 ml 採取した。中耳貯留液は放血致死させたモルモットの中耳骨包を摘出して、マイクロピペットを用いて採取した。

#### 5) 血液および中耳貯留液中の菌数の測定

菌接種後の血液および中耳貯留液中菌数変化は 1 群 3 匹のモルモットを用いて検討した。菌接種後、3, 6, 24, 48, 72, 120 および 168 時間に採取した血液および中耳貯留液をトリプトソイブイオン(栄研化学)で適宣希釈後、10% 馬血液加ハートインフュージョン寒天培地(栄研化学)と混合し、37°C、一夜培養後、形成したコロニー数から菌数を測定した。薬剤投与後の中耳貯留液中の菌数の測定は、上記と同様の方法で行ない、3, 6, 24 時間に中耳貯留液を採取して菌数の経時的变化を検討した。

#### 6) 中耳貯留液中濃度の測定

各薬剤を 40 mg/kg 筋肉内投与し、薬剤投与後 15 分、30 分、1 時間および 2 時間に中耳貯留液を採取し、薬剤濃度を測定した。

前報<sup>1)</sup>に準じ、ASPC は *Escherichia coli* ATCC 27166 および *Micrococcus luteus* ATCC 9341, MZPC は *Escherichia coli* ATCC 27166 を被検菌とするペーバーディスク法で濃度を測定した。SBPC は既報<sup>2)</sup>に報告の値を用いた。

#### 7) 薬剤感受性測定

本菌に対する ASPC, MZPC および SBPC の最小発

育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法<sup>3)</sup>に準じ、10% 馬血液加感受性ディスク用培地 N-ニッスイ(日本製薬)を使用し、接種菌量は  $10^6$  CFU/ml として測定した。

## II. 実験結果

### 1. 病理組織学的検討所見

Fig. 1 に無処置対照群、菌接種非治療群および ASPC 治療群の病理組織学的所見の代表例を示した。

#### 1) 無処置対照群

4 匹、8 耳とも正常像を示した。

#### 2) 菌接種非治療群

a. 菌接種 24 時間後：中耳粘膜および粘膜下織には好中球主体の炎症細胞浸潤、水腫が見られ、中耳腔内には多量の膿汁貯留が見られた。また、鼓膜の炎症も高度な例が多く、外耳道へ炎症が波及している例も認められた。

b. 菌接種 2 日後：菌接種 24 時間後とほぼ同様の所見であった。

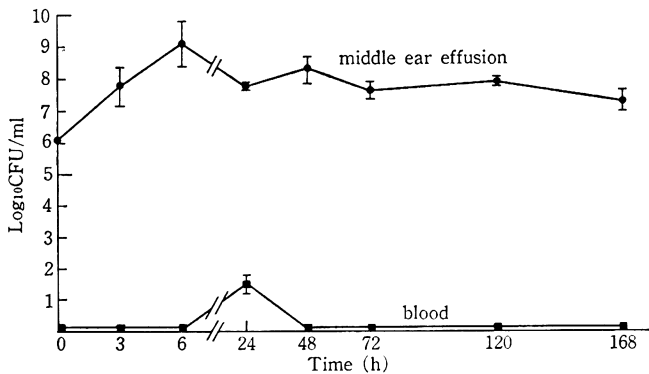
c. 菌接種 4 日後：炎症の程度は相変わらず高度であったが、浸潤細胞の比率はリンパ球が増え、好中球は減少した。粘膜下織には線維芽細胞の増生や特に鼓室階底部の粘膜下では骨組織の増生が観察されるようになった。

d. 菌接種 8 日後：リンパ球主体の炎症細胞浸潤による粘膜下織の増幅が著明で、鼓室階底部粘膜下では線

Table 1. Therapeutic effect of ASPC after a single intramuscular injection of 40 mg/kg on pneumococcal otitis media in guinea pigs

Days after inoculation	Untreated guinea pigs			ASPC-treated guinea pigs		
	+	⦿	⦿	-	+	⦿
1	2 <sup>a)</sup>	4	2			
2	4		4		6	2
4	1	3	2	1	6	1
8	2	3	3	2	6	

a) Each number represents the ear number.



Viability of *S. pneumoniae* in the middle ear effusion and blood was determined by the pour-plate method in a heart infusion agar containing 10% horse blood. Each data point represents the mean of three observations; each vertical bar delimits the standard deviation of the mean.

Fig. 2. Time course changes of bacterial counts in middle ear effusion and blood

維や骨組織の増生がさらに顕著になった。

### 3) ASPC 治療群

a. 菌接種2日後：中耳粘膜および粘膜下織の好中球を主体とする炎症細胞浸潤はいずれの例においても軽度で、中耳腔内の膿汁貯留も軽度な例が多かった。鼓膜の炎症像は全例に観察されたが、比較的軽度であり、外耳道への炎症波及例も少なかった。

b. 菌接種4日後：全般的には菌接種2日後の例と大差ない所見であったが、中耳粘膜や鼓膜にまったく炎症像の見られない耳が少数あった。

c. 菌接種8日後：中耳粘膜、粘膜下織の炎症細胞浸潤はわずかとなり、中耳腔内の膿汁もほとんど認められなかった。鼓膜の炎症像も比較的軽度なものが少数例に観察されただけで、中耳炎の完治した例もあった。

中耳粘膜、粘膜下織の炎症細胞浸潤の程度および中耳腔内の膿汁量を炎症度を表す指標として、非治療群と ASPC 群とを比較した結果を Table 1 に示した。非治

療群では菌接種1日後から8日後まで、かなり高度の炎症が持続しているのに対し、ASPC 群では時間の経過とともに炎症度が軽減していることが明らかとなった。

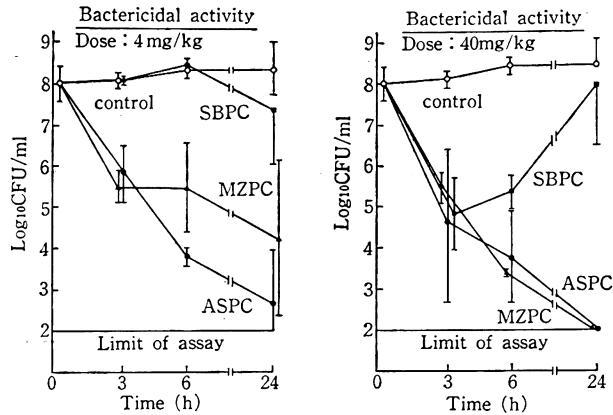
### 2. 菌接種後の中耳貯留液中および血液中の菌数の経時的変化

Fig. 2 に示すように菌接種後の中耳貯留液中菌数は接種直後 6.15、3時間で7.78、6時間で9.1、24時間で7.81 log<sub>10</sub> CFU/ml となった。さらに1週間後まで菌数の変化を検討したが、ほぼ一定の菌数(約 10<sup>8</sup> CFU/ml)を示した。

血液中の菌数は菌接種後、24時間に1.5 log<sub>10</sub> CFU/ml の菌が認められた以外、いずれの時間においても検出できなかった。

### 3. モルモット化膿性中耳炎モデルにおける各種ペニシリン剤投与後の中耳貯留液中の菌数変化

Fig. 3 に各種ペニシリン剤 4 mg/kg および 40 mg/kg 筋肉内投与後の中耳貯留液中の菌数変化を示した。



Each data point represents the mean of three observations; each vertical bar delimits the standard deviation of the mean.

Fig. 3. Bactericidal activity of ASPC, MZPC and SBPC in middle ear effusion after an intramuscular injection in guinea pigs with pneumococcal otitis media

薬剤を投与しない群は投与前で 8.0, 3時間で 8.07, 6時間で 8.37, 24時間では 8.35  $\log_{10}$  CFU/mlの結果となりほぼ一定の菌数を示した。

それに対して, ASPC 4 mg/kg 投与群は投与後3時間で 5.8, 6時間で 3.8, 24時間では 2.7  $\log_{10}$  CFU/mlとなり最も優れた殺菌作用を示した。

MZPC 4 mg/kg 投与群は投与後3時間では 5.5  $\log_{10}$  CFU/mlで ASPCと同等の殺菌作用を示したが, 6時間で 5.5, 24時間で 3.5  $\log_{10}$  CFU/mlで ASPCよりも劣る結果であった。

SBPC 4 mg/kg 投与群はいずれの時間においても薬剤を投与しない群とほぼ同等の結果であった。

ASPC 40 mg/kg 投与群は投与後3時間で 4.6, 6時間で 3.8  $\log_{10}$  CFU/ml, 24時間では  $10^2$  CFU/ml以下となった。

MZPC 40 mg/kg 投与群も ASPC 投与群と同様に投与後3時間で 5.5, 6時間で 3.4  $\log_{10}$  CFU/ml, 24時間で  $10^2$  CFU/ml以下となった。

それに対して, SBPC 40 mg/kg 投与群は投与後3時間では 4.8  $\log_{10}$  CFU/mlと ASPC, MZPCと同様に中耳貯留液中の菌数を減少させたが, 6時間では 5.3, 24時間では 7.8  $\log_{10}$  CFU/mlと再増殖が認められた。

4. 各種ペニシリン剤の中耳貯留液中における time above MIC (TAM) 値

各種ペニシリン剤の中耳貯留液中濃度推移と MIC 値から求めた TAM 値を Fig. 4 に示した。

モルモット化膿性中耳炎モデルの感染菌である小児

より分離された肺炎球菌に対する各薬剤の MIC 値は ASPC : 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , MZPC : 0.025  $\mu\text{g/ml}$ , SBPC : 0.39  $\mu\text{g/ml}$ であった。得られた MIC 値と中耳貯留液中濃度推移より求めた各薬剤の TAM 値は ASPC 40 mg/kg 筋肉内投与では 6.2時間, 4 mg/kg 筋肉内投与では 3.4時間であった。

また, MZPC 40 mg/kg 筋肉内投与では 2.8時間, SBPC 40 mg/kg 投与では 1.5時間となった。

### III. 考 察

実験的化膿性中耳炎モルモットを用いて, ASPC, MZPC および SBPC の薬効評価を行なうため各薬剤を筋肉内投与し, 中耳貯留液中の菌数変化について検討した。また, ASPC を 40 mg/kg 筋肉内投与し, その治療効果を病理組織学的に検討した。

最初に本感染モデルが薬効評価を行なうのに適したモデルかどうかを確認するために菌接種後の中耳貯留液および血液中の菌数の経時的变化を調べた。その結果, 中耳貯留液中の菌数が菌接種後 24 時間から 1 週間まではほぼ一定の菌数 (約  $10^8$  CFU/ml) を示したことから, 本モデルは中耳炎治療実験に適したモデルと考えられた。さらに菌数の測定に際し, 肺炎球菌は培養後形成したコロニー数を判定することが他の菌<sup>4)</sup>と比べて容易であるという利点を有している。

はじめに病理組織学的検討について考察を行なった。非治療群に見られた中耳炎の時間経過をおとしてみると, 菌接種後 24 時間ですでにかなり高度の化膿性炎症像が観察され, 本病変の程度は 1 週間の観察期間中ほとんど

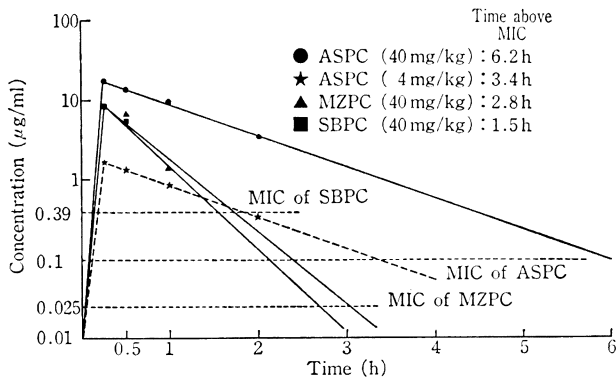


Fig. 4. Time course changes of concentrations of ASPC, MZPC and SBPC in middle ear effusion after 40 mg/kg intramuscular injection in guinea pigs with pneumococcal otitis media

変わらなかった。すなわち、今回の実験条件下では自然治癒傾向が認められず、本菌の起炎性がかかなり強いことを示唆しており、藤巻ら<sup>5)</sup>の菌接種4日後までの所見と一致する成績であった。

炎症の程度については不変であったが、炎症像の内容は時間の経過とともに少しずつ変わっていった。すなわち、初期(菌接種2日後まで)は浸潤細胞の主体は好中球であり、中耳粘膜、粘膜下織の浮腫を特徴としていたが、4日後以降は、リンパ球浸潤が明瞭になるとともに粘膜下織の線維増生、骨化が進行し、炎症の慢性化傾向が明らかであった。

このように今回の実験条件で惹起された中耳炎はその病態からみて、かなり重篤な膿性中耳炎のモデルと考えられる。非治療群の1例が実験途中で死亡したことから、このことは十分にうなずけるだろう。

次いで ASPC 投与群の所見であるが、40 mg/kg 筋肉内単回投与1日後で、中耳炎の程度はかなり軽減し、1週間後では完治例も見られた。病変が見られた例においても、炎症像は極く軽度で、中耳粘膜は軽度の線維性肥厚があり、中耳腔内に膿汁が少量残存していたに過ぎない。非治療群に見られたような粘膜下織における線維増生や骨化はもちろんまったく観察されなかった。このように ASPC は単回投与で顕著な治療効果を示した。このことは ASPC が中耳粘膜の炎症部に速やかに到達し、中耳腔内の炎性浸出液中に容易に移行し、殺菌効果を発揮することを示唆している。連投すれば、さらにその効果ははっきりと現われると考えられる。

次いで、各薬剤投与後の中耳貯留液中の菌数変化について検討した結果、ASPC 4 mg/kg 投与群と MZPC 40 mg/kg 投与群はほぼ同程度の殺菌作用を示した。こ

の理由を明らかにするために ASPC、MZPC および SBPC をそれぞれ 40 mg/kg 筋肉内に投与し、中耳貯留液中の各薬剤の濃度推移から TAM 値を求め治療効果との関係を検討した。

TAM 値<sup>9)</sup>は血液や組織などの薬剤濃度がその薬剤の感染菌に対する MIC 値を上回って維持している時間と定義される<sup>7)</sup>。

ASPC は種々の動物で投与量と血清、組織中濃度が良く相関することが報告されている<sup>8)</sup>。そこで ASPC 4 mg/kg 投与後の中耳貯留液中濃度推移は ASPC 40 mg/kg 筋肉内投与後の中耳貯留液中濃度の 1/10 の値として計算し使用した。その結果、ASPC 4 mg/kg 筋肉内投与後の TAM 値は 3.4 時間、MZPC 40 mg/kg 筋肉内投与後の TAM 値は 2.8 時間であった。

細菌感染症の化学療法を行なう際に、薬剤投与後の感染部位における薬剤の濃度は感染菌の MIC 値を上回り、かつ長時間持続することが必要と考えられる。

治療実験において ASPC 4 mg/kg 投与群が MZPC 40 mg/kg 投与群とほぼ同程度の殺菌作用を示した一因として、本感染菌に対する両群の TAM 値が類似していることによると推察され、抗菌剤の治療効果を評価、推測する際に TAM 値が重要なパラメーターになることが示唆された。

#### 謝 辞

本研究に際し、貴重な御助言をいただいた田辺製薬株式会社 前澤 功 博士に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 奥野 哲, 佐久間由光, 山口東太郎: 実験的化膿性中耳炎モルモットにおける aspicillin の中耳粘膜および中耳貯留液中への移行。Chemothe-

- rapy 37: 882~888, 1989
- 2) 杉田麟也, 河村正三, 藤巻 豊, 渡辺 勲, 出口浩一, 前澤 功, 遠藤幸夫, 佐久間由光, 奥野哲, 山口東太郎: 実験的化膿性中耳炎モルモットにおける aspoxicillin(TA-058) の中耳骨粘膜炎および中耳貯留液中への移行に関する研究。耳鼻と臨床 31: 135~143, 1985
  - 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
  - 4) SHITOH K, KAWAHARAJO K, NAKAZAWA T, YAMAMOTO H: Experimental model of *Staphylococcus aureus* infection in the middle ear of guinea pig. Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha 26: 29~34, 1987
  - 5) 藤巻 豊, 河村正三, 市川銀一郎, 杉田麟也, 堀川治久, 出口浩一: モルモットによる実験的急性化膿性中耳炎の病理学的所見 (第1報)。日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 1: 53~56, 1983
  - 6) VOGELMAN B, GUDMUNDSSON S, TURNIDGE J, LEGGETT J, CRAIG W A: *In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. J Infect Dis 157: 287~298, 1988
  - 7) FRIMODT-MØLLER N, BENTZON M W, THOMSEN V F: Experimental infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice: Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetic parameters with *in vivo* effect for 14 cephalosporins. J Infect Dis 154: 511~517, 1986
  - 8) 山口東太郎, 他: 実験動物における TA-058 の体内動態。Chemotherapy 32 (S-2): 119~132, 1984

## THERAPEUTIC EFFICACY OF ASPOXICILLIN IN GUINEA PIGS WITH EXPERIMENTAL SUPPURATIVE OTITIS MEDIA

SATOSHI OKUNO, YOSHIMITSU SAKUMA, HITOSHI IWASAKI  
and TOUTARO YAMAGUCHI

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,  
2-2-50 Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan

To prepare an experimental otitis media animal model, guinea pigs were inoculated with a strain of *Streptococcus pneumoniae* isolated from an infant with otitis media.

To evaluate the therapeutic efficacy of aspoxicillin (ASPC), mezlocillin (MZPC) and sulbenicillin (SBPC) in this model, each penicillin was administered by intramuscular injection and time course changes in the number of bacterial cells and concentrations of each penicillin in middle ear effusion were studied. The therapeutic effect of ASPC after intramuscular injection at a dose of 40 mg/kg was also histopathologically examined, indicating that ASPC exhibits a clear therapeutic effect with time. Furthermore, the time above MIC (TAM) value of each penicillin was determined based on the time course changes of penicillin concentrations in middle ear effusion. The TAM values of ASPC and MZPC after 40 mg/kg of each drug by intramuscular injection were found to be 6.2 and 2.8 hours.

Since the therapeutic efficacy of ASPC at a dose of 4 mg/kg was comparable to that of 40 mg/kg of MZPC, it was considered that the TAM value against a pathogen plays an important role in treating bacterial infections with antibiotics. Hence the TAM value is a useful parameter when predicting the therapeutic efficacy of antibiotics.