

実験的腹腔内混合感染マウスにおける抗菌剤の投与時期および投与経路の治療効果におよぼす影響

石川 信男・谷 佳都・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所*

東 芳典・谷村 弘・大河内則仁・青木 洋三

和歌山県立医科大学消化器外科

(平成4年1月17日受付・平成4年4月22日受理)

Escherichia coli KC-14 および *Bacteroides fragilis* No.36 による実験的腹腔内混合感染マウスを作成し、抗菌剤の治療効果を投与時期および投与経路の面から比較検討した。Aspoxicillin (ASPC), piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT) および cefminox (CMNX) は感染1時間後投与で良好な治療効果を示したが、投与時期を2または4時間後にすると PIPC および AZT の治療効果は著しく低下した。一方、*E. coli* に対して強い殺菌力を示す ASPC と CMNX はその低下の程度が少なかった。投与経路は各薬剤で静脈内よりも腹腔内投与の方が優れ、急性感染症では感染部位への直接投与が有効であることを示唆した。これらの治療効果はオートバクテリオグラフィーによっても確認された。さらに、本混合感染マウスでは *B. fragilis* よりも *E. coli* の菌数増加が急速であることから、死亡原因は *E. coli* の増加によると考えられ、その治療には *E. coli* に殺菌力の強い薬剤が有効であることが示唆された。

Key words: 実験的腹腔内感染マウス, 混合感染, 治療効果, 全身オートバクテリオグラフィー

急性化膿性腹膜炎の起炎菌は穿孔部位により異なり、特に下部消化管穿孔では *Escherichia coli* および *Bacteroides fragilis* の分離頻度が高く、これらが混合で分離されることが多い^{1,2)}。一方、急性腹膜炎の治療では、治療の開始時期と適切な抗菌剤の選択がその予後を左右する。そこで、*E. coli* と *B. fragilis* の混合菌液を腹腔内に接種することにより実験的腹腔内混合感染マウスを作成し、抗菌剤として *E. coli* に抗菌力を示す aspoxicillin (ASPC), piperacillin (PIPC), aztreonam (AZT) と *E. coli* および *B. fragilis* の両方に抗菌力を示す cefminox (CMNX) を用いて、本混合感染マウスの治療効果におよぼす薬剤の投与時期および投与経路の影響を検討した。さらに、各薬剤の治療効果をマウス全身オートバクテリオグラフィーによって検討した。

I. 材料および方法

1. 使用菌株

臨床分離株の *Escherichia coli* KC-14 および *Bacteroides fragilis* No.36 を用いてマウス実験的腹腔内混合感染モデルを作成した。本混合感染マウスの全身オートバクテリオグラム (ABGM) 作成にはマウス切

片中の腸内細菌および操作中の汚染菌を抑えて感染菌のみを選択的に培養するために両菌株からリファンピシン耐性株 (RFP^r) を誘導して用いた³⁾。耐性株の RFP に対する MIC 値は *E. coli* KC-14 RFP^r が 200 μg/ml および *B. fragilis* No.36 RFP^r が 800 μg/ml であった。また、両耐性株は生化学的性状、マウス致死力および試験薬剤に対する感受性が各親株と変わらないことを確認した。

2. 使用動物

Slc-ICR 系マウス、雄性、4週齢、体重 22±1g を用いた。

3. 使用薬剤

Aspoxicillin (ASPC, 田辺製薬), piperacillin (PIPC, 富山化学工業), aztreonam (AZT, エーザイ) および cefminox (CMNX, 明治製薬) を滅菌水に溶解して用いた。

4. 腹腔内感染および薬剤治療効果

GAM ブイヨン (ニッスイ) で *E. coli* KC-14 は好氣的に、*B. fragilis* No.36 は嫌氣的に 37°C、16時間培養後同培地で希釈し、*E. coli* KC-14 5×10⁶ CFU/

* 埼玉県戸田市川岸 2-2-50

mouse および *B. fragilis* No.36 7.5×10^8 CFU/mouse の混合菌液 (0.5 ml) をマウス腹腔内に接種することにより感染した。なお、感染菌量は下部消化管穿孔による急性化膿性腹膜炎を想定して *E. coli*:*B. fragilis* 比を約 1:100 とし、全マウスを死亡させる量 ($79 \times LD_{50}$) とした⁴⁾。薬剤は感染後 1, 2 および 4 時間に、静脈内 (0.2 ml) または腹腔内 (0.5 ml) に 1 回投与した。治療効果の測定には一群 10 匹の感染マウスを用い、薬剤投与 5 日後のマウス生存率からプロビット法によって ED_{50} 値を算出した。

5. マウス全身 ABGM の作成

感染マウス一群 5 匹を用いて、感染 2 時間後に各薬剤を静脈内は 25 mg/kg、腹腔内は 6.25 mg/kg を 1 回投与し、薬剤投与 24 時間後のマウス全身 ABGM を佐久間ら⁵⁾ に準じた改良法⁴⁾ により作成した。マウス切片の *E. coli* KC-14 RFP^r はハートインフュージョン寒天 (HIA, 栄研) を基礎培地として、リファンピシン (RFP, 第一製薬) 50 μ g/ml およびトリフェニールテトラゾリウムクロリド (TTC, ナカライテスク) 50 μ g/ml を添加し、24 時間好気培養した。*B. fragilis* No.36 RFP^r は GAM 寒天 (ニッスイ) を基礎培地として、RFP 50 μ g/ml, TTC 25 μ g/ml および混在する *E. coli* の発育抑制のためにアンピシリン (ABPC, 明治製薬) 12.5 μ g/ml を添加し、48 時間

嫌気培養した。なお、ABPC に対する両株の MIC 値は *E. coli* KC-14 RFP^r が 1.56 μ g/ml および *B. fragilis* No.36 RFP^r が 100 μ g/ml であった。寒天平板上に生育した菌集落は写真撮影により記録した。

6. 混合感染マウスの腹水および血中生菌数測定

一群 5 匹を用い、腹水はマウス腹腔内に 1 ml の GAM ブイオンを注入後回収し、血液は心臓より採血した。各試料を GAM ブイオンで希釈後、*E. coli* KC-14 は HIA を用いて好氣的に、*B. fragilis* No.36 は ABPC 12.5 μ g/ml 添加 GAM 寒天を用いて嫌氣的に培養して生菌数を測定した。

7. 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) および *in vitro* 殺菌作用

両菌株に対する各薬剤の MIC は日本化学療法学会標準法に準じて寒天平板希釈法により測定した⁶⁾。各薬剤の *in vitro* 殺菌作用は各菌株を GAM ブイオンで 37°C、一夜培養後、*E. coli* KC-14 は新鮮な同培地に 1% 接種して約 2 時間振盪培養した 10^8 CFU/ml の対数増殖期に、*B. fragilis* No.36 は同培地で希釈した 10^8 CFU/ml に各薬剤を添加して培養後、経時的に試料中の生菌数を測定することにより検討した。

II. 実験結果

1. 各薬剤の治療効果におよぼす投与時期および投与経路の影響

Table 1. Therapeutic efficacy of aspoxicillin, piperacillin, aztreonam and cefminox in the treatment of intraperitoneal mixed infection caused by *Escherichia coli* KC-14 and *Bacteroides fragilis* No. 36 in mice

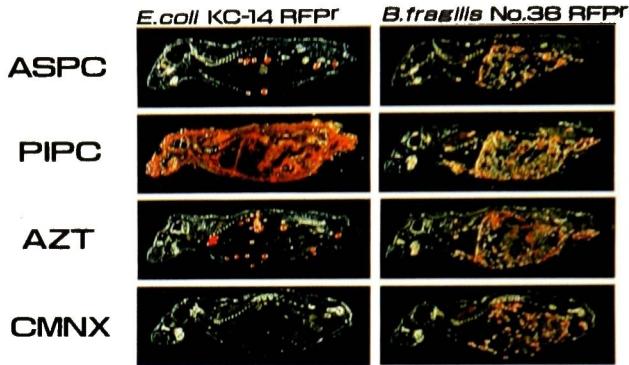
Drug	Administration* (h)	ED_{50} (mg/kg)	
		i. v.	i. p.
ASPC	1	2.03	1.01
	2	26.02	5.74
	4	161.07	65.90
PIPC	1	11.79	4.10
	2	323.76	194.22
	4	1,890.30	1,670.26
AZT	1	0.48	0.06
	2	23.74	9.79
	4	1,690.90	1,154.43
CMNX	1	0.94	0.31
	2	2.60	0.59
	4	27.28	5.38

* Time after infection

ASPC, aspoxicillin; PIPC, piperacillin; AZT, aztreonam; CMNX, cefminox.

実験的腹腔内混合感染マウスに対する各薬剤の治療効果を薬剤の投与時期は感染後1, 2および4時間, 投与経路は静脈内 (i.v.) および腹腔内 (i.p.) として検討し, そのED₅₀ 値を Table 1 に示した。薬剤を感染1時間後に投与した場合, 両投与経路とも AZT

が最も優れた治療効果を示した。投与時期を感染2時間後にすると PIPC および AZT の ED₅₀ 値は両経路とも1時間後投与の27倍以上および50倍以上となり治療効果は低下した。さらに4時間後投与で両投与経路とも1,000 mg/kg 以上となり著しい治療効果の低

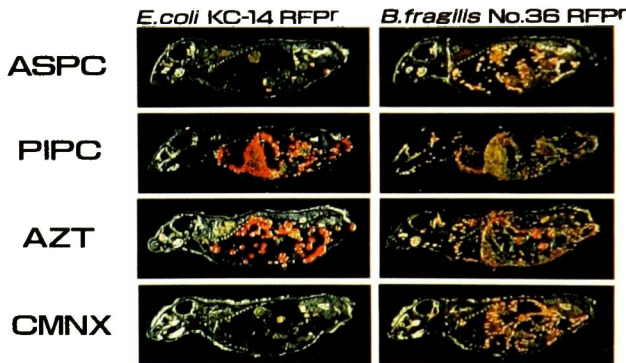


Time of Administration: 2 hours after infection

Autobacteriography: Mouse autobacteriograms were prepared 24 hours after administration.

ASPC, aspoxicillin; PIPC, piperacillin; AZT, aztreonam; CMNX, cefminox.

Fig. 1. Comparison of the antibacterial effect of aspoxicillin, piperacillin, aztreonam and cefminox by whole body autobacteriography in mice with intraperitoneal mixed infection caused by *Escherichia coli* KC-14 RFP^r and *Bacteroides fragilis* No. 36 RFP^r (25 mg/kg, i.v.).



Time of Administration: 2 hours after infection

Autobacteriography: Mouse autobacteriograms were prepared 24 hours after administration.

ASPC, aspoxicillin; PIPC, piperacillin; AZT, aztreonam; CMNX, cefminox.

Fig. 2. Comparison of antibacterial effect of ASPC, PIPC, AZT and CMNX by whole body autobacteriography in mice with intraperitoneal mixed infection caused by *Escherichia coli* KC-14 RFP^r and *Bacteroides fragilis* No. 36 RFP^r (6.25 mg/kg, i.p.).

下 (PIPC: >100 倍, AZT: >1,000 倍) が認められた。しかし, ASPC と CMNX は 4 時間後投与においても両経路の ED₅₀ 値は 1 時間後投与に比較して ASPC: 80 倍以下および CMNX: 29 倍以下であり, PIPC および AZT にくらべ低下の程度は少なかった。また, 投与経路で比較すると, いずれの薬剤, またいずれの投与時期においても i.p. 投与の ED₅₀ 値の方が i.v. 投与に比べて小さく優れた治療効果を示した。

2. マウス全身 ABGM による治療効果の観察

感染 2 時間後に i.v. 投与は各薬剤の 25 mg/kg (ASPC の ED₅₀ 値: 26.02 mg/kg 付近), i.p. 投与は 6.25 mg/kg (ASPC の ED₅₀ 値: 5.74 mg/kg 付近) を投与し, 薬剤投与 24 時間後のマウス全身 ABGM を各薬剤 5 匹作成し, そのうち平均的な菌分布を示した各群 1 匹のマウス ABGM を Fig. 1 (i.v. 投与) および Fig. 2 (i.p. 投与) に示した。各薬剤の i.v. 投与 (Fig. 1) における ABGM では, *E. coli* は投与量がほぼ ED₅₀ 値付近である ASPC および AZT で腹腔および肝にまばらに菌集落が観察され, ED₅₀ 値の約 1/13 投与量である PIPC で全身に多数の菌集落が観察された。ED₅₀ 値の約 10 倍投与量である CMNX では菌集落がほとんど観察されなかった。一方, *B. fragilis* はいずれの薬剤も腹腔, 肝および脾に菌集落が観察された。しかし, ASPC 投与マウスの菌分布密度は PIPC および AZT に比べてまばらであり, CMNX と同程度であった。各薬剤の i.p. 投与 (Fig. 2) における ABGM では, *E. coli* は ASPC で腹腔にまばらに, ED₅₀ 値の約 1/30 投与量の PIPC で腹腔, 肝, 脾および肺に密に観察された。AZT は投与量がほぼ ED₅₀ 値付近であるにもかかわらず, 腹腔, 肝, 脾および肺に観察された。また, ED₅₀ 値の約 10 倍投与量である CMNX では菌集落はほとんど観察されなかった。*B. fragilis* の分布密度は i.v. 投与と同様であり, ASPC と CMNX では明らかに PIPC および AZT よりもまばらに観察された。

3. 混合感染マウスの腹水および血中生菌数推移

E. coli KC-14 5×10^6 CFU/mouse および *B. fragilis* No. 36 7.5×10^8 CFU/mouse の腹腔内接種により作成した混合感染マウスの腹水および血中生菌数推移を Fig. 3 に示した。腹水中の *E. coli* は感染 1 時間後に約 1/2 (2×10^6 CFU/ml) に減少したが, 3 時間後には 4×10^7 CFU/ml に増加し, 以後速やかに増加した。血中の *E. coli* は腹水中生菌数の増加に伴って推移し, 感染 9 時間後には腹腔内で 10^8 CFU/ml, 血液中で 10^8 CFU/ml に増加した。一方, *B. fragilis* は

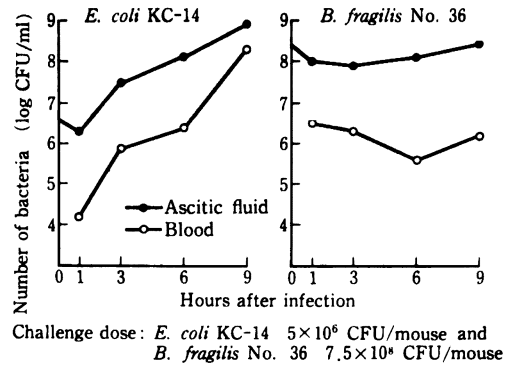


Fig. 3. Profile of changes in ascitic fluid and blood bacteria counts of mice with intraperitoneal mixed infection caused by *Escherichia coli* KC-14 and *Bacteroides fragilis* No. 36.

腹水中で感染 1 時間後に約 1/3 (1×10^8 CFU/ml) に減少したが, その後 9 時間まで著しい菌数の変化は認められなかった。血中生菌数は 1 時間後から 9 時間後まで $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ CFU/ml を推移した。また, 本感染マウスは感染約 12 時間後に全例死亡した。

4. 各薬剤の MIC と in vitro 殺菌作用

E. coli KC-14 および *B. fragilis* No. 36 に対する各薬剤の MIC 値および菌量 10^8 CFU/ml における殺菌作用を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。*E. coli* KC-14 に対する殺菌作用 (Fig. 4) の検討では ASPC は 50, 10, 2 μ g/ml で薬剤濃度に依存した菌数の減少が認められ殺菌的に作用した。PIPC および AZT は 50 μ g/ml でも菌数は減少せず静菌的な作用であった。CMNX は 2 μ g/ml においても強い殺菌作用を示した。*B. fragilis* No. 36 に対しては (Fig. 5), ASPC は 200 μ g/ml (2 MIC) で 2 時間後に 10^6 CFU/ml と菌数を減少させたが, 8 時間後には再増殖が認められた。PIPC は 200 μ g/ml (4 MIC) で 8 時間後まで殺菌的に作用し, 50 μ g/ml (MIC) では静菌的に作用した。AZT は 200 μ g/ml で対照と同様に菌数が増加し, 殺菌作用も静菌作用も示さなかった。また, CMNX は 2 μ g/ml では作用を示さなかったが, 10 および 50 μ g/ml で 8 時間後まで殺菌的に作用した。

III. 考 察

実験的腹腔内混合感染マウスに対する各薬剤の治療効果を感染 1, 2, 4 時間後投与で検討し, i.v. および i.p. 投与ともに 1 時間後投与で良好な治療効果が認められた。特に *B. fragilis* には抗菌力を示さないが *E. coli* には優れた抗菌力を示す AZT (MIC 値: 0.1

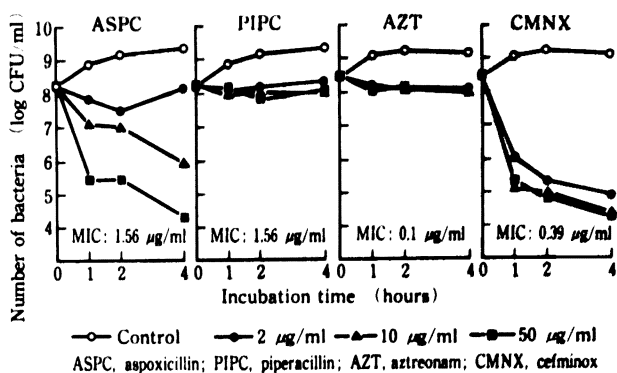


Fig. 4. Bactericidal activity of aspoxicillin, piperacillin, aztreonam and cefminox against *Escherichia coli* KC-14.

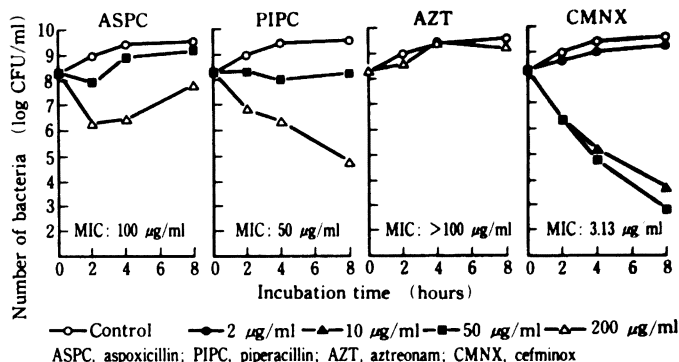


Fig. 5. Bactericidal activity of aspoxicillin, piperacillin, aztreonam and cefminox against *Bacteroides fragilis* No. 36.

µg/ml) の治療効果が最も優れ、他剤も *E. coli* の抗菌力を反映した治療効果であった。しかしながら、薬剤投与を 2 時間後および 4 時間後とした場合、PIPC および AZT の治療効果は著しく低下した。本感染マウスは *E. coli* KC-14 5×10^6 CFU/mouse と *B. fragilis* No. 36 7.5×10^8 CFU/mouse の高菌量接種によって感染が惹起されており、特に *E. coli* のマウス体内での菌数増加は速やかで、感染 2 時間後には腹水中で約 10^7 CFU/ml、4 時間後には 5×10^7 CFU/ml に増加した。そこで、*E. coli* 高菌量における各薬剤の *in vitro* 殺菌作用を検討したところ、強い殺菌力を示した ASPC と CMNX は 4 時間後投与でも治療効果の低下が少なく、静菌作用しか示さない PIPC と AZT は 2 時間以降投与で治療効果が著しく低下することが明かになった。一方、*B. fragilis* の腹水および血中生

菌数は感染 9 時間後まで著しい変化が見られず、また *in vitro* 殺菌作用において PIPC が ASPC よりも強い殺菌力を示したにもかかわらず治療効果にその強さは反映されていない。また、宮崎⁷⁾ は複数菌感染において、一方の菌種が薬剤を不活化する酵素産生菌である場合には他方の菌種が薬剤に感受性であっても治療効果が低下すると報告している。我々は *B. fragilis* No. 36 の各薬剤に対する不活化活性を検討し、ASPC、PIPC および AZT でわずかながら不活化が認められたものの、治療効果に影響を与えるほどの活性でないことを確かめている。したがって、PIPC および AZT の 2 時間以降投与における治療効果の低下の原因が *B. fragilis* No. 36 の薬剤不活化によるとは考えにくい。さらに、本感染マウスの死亡原因としてマウス体内における *E. coli* の増加が主なものと考え

られることから、その治療には *E. coli* に殺菌力の強い薬剤が有効であると考えられた。

全身 ABGM による治療効果の観察では、*E. coli* の分布密度は ED_{50} 値を良く反映した結果であった。しかし、*B. fragilis* の分布密度は PIPC および AZT で全身に密に、ASPC と CMNX は同程度で腹腔内にまばらに観察された。そこで、本感染マウスに ASPC および CMNX の ABG 用量を投与し、24 時間後の *B. fragilis* の腹水中生菌数を測定した結果、両投与経路で両剤とも約 10^5 CFU/ml の菌数を示した。この結果は両剤で *B. fragilis* の分布密度が同程度を示す ABGM の結果と一致した。しかし、ASPC と CMNX は *B. fragilis* に対して *in vitro* 抗菌力 (MIC 値、ASPC: $100 \mu\text{g/ml}$, CMNX: $3.13 \mu\text{g/ml}$) および殺菌作用で差があるにも関わらず、マウス体内では同程度の抗菌作用を示したことになり、ASPC の *B. fragilis* に対する作用は興味あるところである。ヒト症例において、ASPC は腹水中へ高濃度に移行し、投与 6 時間後でも高い濃度を維持することが報告されている⁹⁾。本混合感染モデルにおいても、ASPC の腹水中への高濃度移行が良好な治療効果と関連しているものと推測される。

本腹腔内感染モデルは *E. coli* と *B. fragilis* の混合感染により、臨床的には急性虫垂炎を想定した急性化膿性腹膜炎モデルとして作成された。本モデルは細菌の各臓器への広がりから急性に進行する腹膜炎であり、細菌接種 6 時間後には病理組織学的にも腹壁腹膜に多核白血球の浸潤を伴う急性腹膜炎の所見を認めている⁹⁾。本感染マウスを用いて抗菌剤の治療効果を検

討した結果、急性感染症では薬剤を早期に投与することが重要であり、また感染部位への直接投与も有効な手段であることが示唆された。さらに、急性化膿性腹膜炎の治療には起炎菌に対する薬剤の殺菌力の強さも重要であることが示唆された。

文 献

- 1) 谷村 弘, 日笠頼則: 腹膜炎の化学療法。外科治療 48: 29~36, 1983
- 2) 谷村 弘, 吉田圭介, 斎藤 徹, 小澤 恵: 嫌気性菌感染症。消化器外科セミナー 24: 259~276, 1986
- 3) 谷 佳都, 遠藤幸夫, 山口東太郎, 藤居美智子, 高橋忠男: 全身オートバクテリオグラフィ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。Chemotherapy 32 (S-2): 158~165, 1984
- 4) 東 芳典: 化膿性腹膜炎における腹腔内洗浄の効果に関する実験的研究。和歌山医学 42: 315~332, 1991
- 5) 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 bacteriography。薬学雑誌 89: 1740~1742, 1969
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 7) 宮崎修一, 向山和代, 金子康子, 五島嵯智子: 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。Chemotherapy 33: 133~136, 1985
- 8) 谷村 弘, 他 (11 施設): 腹膜炎の化学療法 (IV) TA-058 の腹水中移行とその臨床効果について。Chemotherapy 32 (S-2): 514~524, 1984

Effect of timing and route of administration of antibiotics in the treatment
of experimental intraperitoneal infections in mice

Nobuo Ishikawa, Kato Tani and Toutaro Yamaguchi

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

Yoshinori Azuma, Hiroshi Tanimura, Norihito Oukouchi and Youzou Aoki

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College

An experimental intraperitoneal infections were produced in mice by inoculating them with *Escherichia coli* KC-14 and *Bacteroides fragilis* No.36. The therapeutic efficacy of antibiotics in these mice was compared when different dosage schedules and routes of administration were employed. When administered one hour after infection, aspoxicillin (ASPC), piperacillin (PIPC), azthreonam (AZT) and cefminox (CMNX) had good efficacies. When administered 2 or 4 hours after infection, the efficacy of PIPC and AZT was significantly reduced, but the reductions in the case of ASPC and CMNX, which display potent bactericidal activity against *E. coli* KC-14, were smaller than in the case of PIPC and AZT. Intraperitoneal injection of these antibiotics yielded greater efficacy than intravenous injection. These findings suggest that the direct administration at the site of infection may be available on the therapy of acute infectious diseases. Therapeutic efficacy was demonstrated by whole body autobacteriography. Since the death of the infected mice depended more on the rapid growth of *E. coli* KC-14 than that of *B. fragilis* No.36, the antibiotics which had potent bactericidal activity against *E. coli* may exhibited greater efficacy.