

サルモネラ症の化学療法に関する実験的研究

—特に chloramphenicol の生体内における有効性について—

林 敏 明, 岩 永 正 明

長崎大学熱帯医学研究所病原細菌学部門

Studies on the Antimicrobial Treatment of Experimental Salmonellosis: Effectiveness of Chloramphenicol in vivo and Its Mechanism

Toshiaki HAYASHI and Masaaki IWANAGA (Department of Bacteriology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract: In the antimicrobial treatment of salmonellosis, especially typhoid fever, no drug is clinically superior to chloramphenicol, although antibacterial effect of chloramphenicol in vitro is most inferior to other drugs. These facts were confirmed again in the present study using salmonellosis in C₅₇BL mice challenged orally with *Salmonella typhimurium*. To clarify the reason why chloramphenicol is so beneficial in the treatment of salmonellosis, a comparative study on chloramphenicol and amoxicillin was carried out using the experimental animals, in regards to distribution and duration of their activity in vivo, and the influence to bactericidal activity of the normal human serum. No significant difference between two drugs was found as far as the above regards were concerned. However, multiplication of challenged salmonella in the organs was markedly inhibited by the presence of chloramphenicol even in low concentration.

Tropical Medicine, 22(2), 89-94, June, 1980

はじめに

チフス性疾患に対する化学療法の場合、現在確実な効果を期待できる薬剤は chloramphenicol (CP), ampicillin (AB-PC), amoxicillin (AM-PC) 及び sulfamethoxazole-trimethoprim 合剤の4種類だけであると云われている(勝ら, 1973; Calderon, 1974; Scragg and Rubidge, 1975; Gilman *et al.*, 1975). これらのうち CP は他の3剤に比して, in vitro での抗菌力は最も弱いにもかかわらず, 実際の治療に際しては最も優れた成績を示しており, 現在でもチフス性疾患に対する第一選択剤としての地位を保っている(坂崎, 1979). しか

し化学療法に関する多数の研究報告をみても生体内で CP が他より優れた効果を示す原因を明らかにしたものはみられない。

本研究では実験的ネズミチフス症に対して CP と AM-PC またはその併用による治療を実施し, 効果の差を確認するとともに, 生体内における CP の有効性の本態の解明を試みた。

実験方法

供試菌株: 臨床材料から分離され当部門で保存されていた *Salmonella typhimurium* ITM-1 を使用した。

使用薬剤: chloramphenicol 原末 (三共) と

amoxicillin 原末 (藤沢) を用いた。

抗菌力測定方法: 使用菌株に対する各薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は日本化学療法学会標準法 (MIC 測定委員会, 1974) によって測定し, 併用の効果は高橋・小林 (1972) の checker board 法によって検討した。殺菌効果は薬剤を各種濃度を含むハートインフュージョンブイヨン (栄研) に被験菌を約 6×10^6 /ml に接種, 37°C で培養, 経時的に生菌数を測定して行なった。

実験動物: C₅₇BL マウスの 5~10週齢で体重16~18g のものを用いた。飼育にはオリエンタル社製マウス固型飼料と水道水を使用した。

菌投与方法: 普通寒天斜面一夜培養菌を 1~2% に NaHCO₃ を含む 0.45% 食塩水に約 10^8 /ml に浮遊させ, これを吸水瓶に入れ, 予め24時間湯水状態においたマウスに, 3~16時間自由に飲用させた。

抗生剤投与方法: 治療効果判定のため10匹を一群として菌投与後7日目から7日間, 薬剤加飲料水として自由に飲用させた。薬剤は CP, AM-PC 単独ではそれぞれ 1,000mcg/ml, 併用の場合は各薬剤 1,000 mcg/ml として行ない, 対照群は非添加とした。

薬剤が臓器内菌数に及ぼす影響をみる場合には投与期間を 2 日間とした。

薬剤の臓器内分布をみる際は各薬剤の 2,000 mcg/ml 溶液を 0.25ml 宛胃チューブで投与した。この場合, 感染後7日目のマウスと健康マウスに対していずれもエーテルによる軽麻酔下で投与した。

臓器内生菌数測定法: 薬剤投与中止時から経時的に 3 匹ずつのマウスについて測定した。血液は腋窩部から採血し, 各臓器は努めて相互間の汚染を避けるように摘出し, 滅菌生理食塩水 10ml 中でホモジナイズした。それぞれの十進希釈液列を作製, SS 寒天平板に塗布, その集落数から臓器内生菌数を算定した。これと同時に 10^2 /organ 以下の菌を検出するため, 血液及びホモジナイズした検体の一部をセレナイト培地に接種して, 生菌の有無を確認した。

臓器内薬剤濃度測定法: 薬剤投与後一定時間に各臓器を摘出, 秤量後 2~3 倍量の生理食塩水を加え乳鉢で磨細したものをを用いた。血液は腋窩部から採血した血清を血中濃度測定用検体とした。薬剤濃度測定は薄層カップ法で実施し, AM-PC の検定菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (検出限度 0.2

mcg/ml) の芽胞を, CP の場合は *Vibrio parahaemolyticus* 49 (検出限度 0.48 mcg/ml) を使用した。

薬剤の血清殺菌因子に及ぼす影響: 6名の健康成人の新鮮血清を使用, 血清 1ml に 10^7 コの被験菌を接種, 30分と 120分後の生菌数を測定した。薬剤の影響は血清にそれぞれの薬剤を 1 MIC 量に加えたもので比較した。同時にヒト血清殺菌因子に感受性である *E. coli* 1341-3, *E. coli* 1341-34 及び *P. aeruginosa* 7087 を対照として使用した。但し, 一部の実験については血清量の関係から完全な併行実施は出来なかった。

実験成績

供試菌の薬剤感受性: 固型培地で測定した AM-PC 及び CP の MIC はそれぞれ 1.56, 3.13 mcg/ml であった。また checker board 法による両剤の併用効果は FIC index=0.5 であった。液体培地中における薬剤の作用を Fig. 1 に示した。AM-

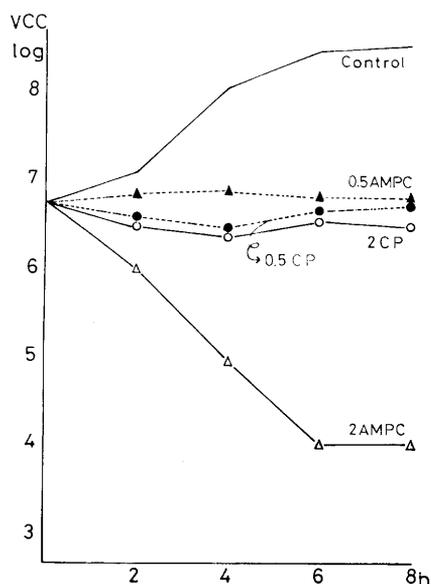


Fig. 1 Effects of antibiotics on the growth of *Salmonella typhimurium*.

Numbers attached to the antibiotics indicate MIC/ml in broth. The antibacterial activity of CP was not so changed by concentration, comparing to that of AM-PC.

PC の場合、2 MIC の濃度で速やかな殺菌効果を示したが、CP では殺菌効果を示さず、菌の増殖を抑制するのみであった。薬剤濃度を 1/2 MIC に下げると AM-PC の殺菌効果は認められず、増殖を抑えるにとどまったが、CP の場合その静菌効果は 2 MIC の場合と同程度であった。

治療成績: Fig.2 に示したように、菌投与後 4 週までに、無治療の対照群では 10 匹中 8 匹が死亡したのに対し、CP 投与群では 1 匹が死亡したのみであった。また AM-PC 投与群では 3 匹、併用群でも 3 匹が死亡した。

臓器内生菌数: 菌投与後無治療の群について、各臓器内生菌数を経時的に測定した結果は Fig. 3 に示した。小腸内では、24 時間目に菌は一旦消失したが、その後再び増加していた。腸管以外の臓器では 48 時間以後に菌が検出され、その後の増殖を示した。薬剤単独投与群の各臓器内生菌数は、菌投与後 9 日目（薬剤投与中止時から 3 時間毎に測定し、その結果を Fig.4 に示した。投与中止時には小腸を除くすべての臓器で CP 投与群の生菌数が少なかった。この傾向は血液、脾、大腸においてはその後 9 時間まではみられ肺、肝、小腸では AM-PC 投与群との差は明らかでなかった。投与中止時には無治療群に比して少なかった臓器内生菌数は中止後増加し、9 時間までに無治療群（10 日

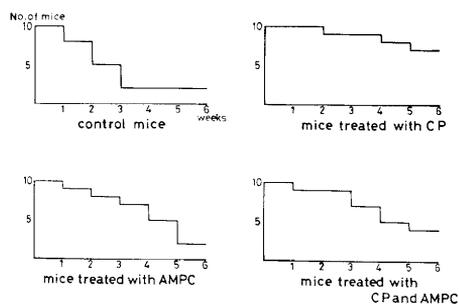


Fig. 2 Survival of $C_{57}BL$ mice orally challenged with *Salmonella typhimurium*.

Inoculum: $10^8/ml$ of the organism suspended in the solution containing 2% $NaHCO_3$ and 0.45% $NaCl$. It was freely given for 16 hours instead of drinking water. Antibiotics were given with the drinking water containing 1,000 mcg/ml of the drugs during the period from the 7th to the 14th day after challenge.

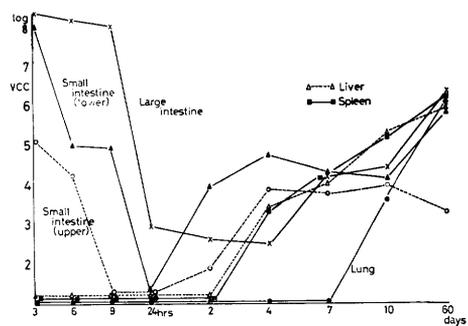


Fig. 3 Numbers of the salmonella in the organs of mice without antibiotic treatment.

The period of challenge was 3 hours in this experiment.

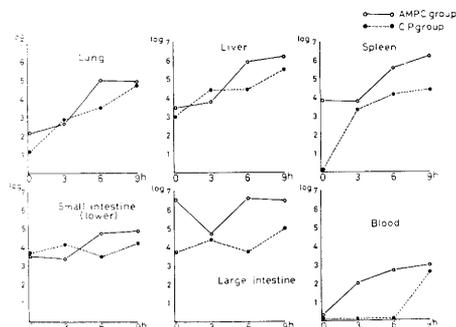


Fig. 4 Numbers of the salmonella in the organs of mice after the antibiotic treatment. Antibiotics were given with the method of Fig. 2 for 2 days from the 7th day after challenge.

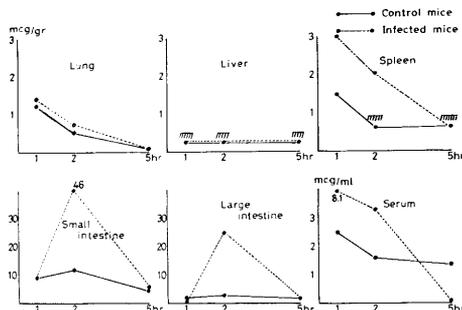


Fig. 5 Concentration of CP in the organs and serum.

500 mcg of antibiotics in 0.25 ml of water was given through stomach tube on the 7th day after challenge.

目)のレベルに達した。

臓器内の薬剤濃度: 各臓器内の薬剤濃度は Figs. 5, 6 にしめたように, 感染マウスのものが健康マウスのものより高い傾向を示した. 特に血液および脾でその差は約2倍であった. 肝では CP が全く検出されず, 他の臓器でも投与後5時間で殆ど検

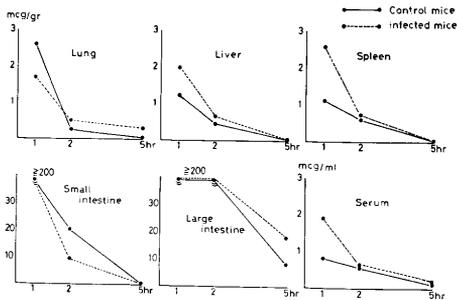


Fig. 6 Concentration AM-PC in the organs and serum. Administration procedure was the same as that of Fig. 5.

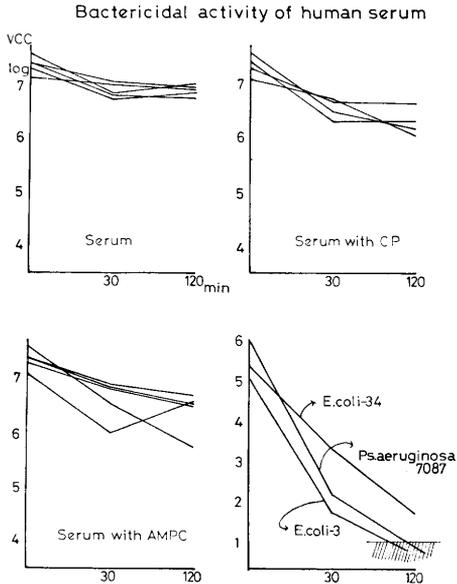


Fig. 7 Bactericidal activities of human serum and the cooperative effects of antibiotics on *Salmonella typhimurium*. Right bottom shows the control experiment using 2 strains of *E. coli* and 1 strain of *Pseudomonas aeruginosa*.

出不能のレベルまで低下していた. 感染マウスにおける薬剤の最高濃度は AM-PC の場合肺, 肝, 脾でそれぞれ 1.8, 2.0, 2.6mcg/g であり, 血中濃度は 1.9mcg/ml であった. 一方 CP の最高濃度は肺, 脾でそれぞれ 1.5, 3.0mcg/g, 血液で 8.1 mcg/ml であった.

血清殺菌因子との関係: Fig.7 に示したように対照として用いた感受性株, *E. coli* 1341-3, *E. coli* 1341-34, および *P. aeruginosa* 7078 を速やかに殺菌した血清は, 投与菌として用いたサルモネラに対しては僅かな殺菌能しかみられなかった. これに 1 MIC 濃度の薬剤を加えても殺菌効果は殆ど増強せず, 両薬剤間にも差はみられなかった.

考 案

Woodward ら (1948) が始めて腸チフスに対して CP の効果を認めて以来, *in vitro* では CP より遙かに優れた抗菌力を有する化学療法剤が数多く開発されてきたが, 実際の治療には現在でも CP が最も 確実な 効果を示している. このことは *in vitro* における薬剤の抗菌力が疾患の治療に直結できないことを意味し, 病原体-薬剤-宿主の三者が複雑に影響し合っているものと考えられる. これらの関係を明確にすることは感染症の治療に当って極めて重要なことである. 本報ではチフス性疾患に対して CP が他剤よりも優れた効果を示す理由はどこにあるのかに焦点をおき, 次のようなことを考えながらその証明を試みようとした.

最初に薬剤の体内分布と滞留時間について考えると, サルモネラ症のように全身の菌散布を特徴とする疾患に対しては, 投与された薬剤が各臓器に高濃度に移行することが必要であろう. 今回の実験系で薬剤の臓器内濃度は菌投与マウスに対して AM-PC 500mcg を経口 1 回投与した場合 (Fig.6), 1 時間目には肺, 肝, 脾で 1.5~2.5 mcg/g, 血液で 1.9mcg/ml とほぼ均等に分布しており, 腸管においては非常に高い濃度を示した. これは主として糞便中の薬剤濃度を反映したものと思われる. 一方, CP 500mcg 投与の場合 (Fig.5), 脾及び血中濃度は, それぞれ 3.0mcg/g, 8.1mcg/ml と AM-PC より高く, 肺及び肝では低濃度であった. 勿論, 皮膚, 筋肉, リンパ節, 更には髄液から脳に至るま

での全臓器ないしは体液について調べない限り結論できないが、今回測定した範囲の臓器では AM-PC に比して CP の方が広範しかも高濃度に分布するとは言えなかった。次に各臓器における薬剤濃度の持続性をみると、菌投与マウスに投与した CP、または AM-PC ではともに、各時間とも殆どの臓器、血中で健康マウスよりも高い濃度を示した。この傾向は菌投与マウスでは薬剤の排泄の、または代謝による薬剤の不活化の遅延が考えられる。特に CP のように肝のアセチル化酵素によってその大部分が不活化される薬剤の場合（真下，1973）、相坂ら（1979）の報告にあるように、ヒトの腸チフス症例で血清中での肝の逸脱酵素の上昇がしばしば観察されていることを考慮すると、菌投与マウスの肝機能低下による CP の不活化遅延の可能性も考えられる。別に行なった実験で、マウス摘出肝と CP を混じて、経時的に残存力価をみると15分で31%、60分で4.7%にまで CP 力価の急速な減少がみられた。しかし、菌投与マウスにおいても2時間以後の薬剤濃度は両薬剤とも大幅な減少を示し、通常の有効濃度以下になったことを考えると、薬剤の排泄及び不活化の遅延は一部に関与があるとしても、本感染系における CP と AM-PC の効力の差を説明できるものではないと思われる。

第2に薬剤と宿主防御能との関係を見ると、薬剤投与により、血中の特異抗体の上昇がより速やかに出現すると報告は勿論みられていないが、非特異的防御能の関与も重要と思われる。その中でヒト血清中に存在する殺菌因子の影響をみた実験成績では、対照として用いた3株に対しては全く正常の殺菌活性を認めたにもかかわらず、供試菌に対しては全く効果がなく、更に薬剤による殺菌増強作用もみられなかった。次に、貪食細胞である好中球及びマクロファージに対する化学療法剤の関与に関しては、朝長ら（1977）は好中球の Random mobility に及ぼす各種薬剤の影響を調べ、AM-PC を含むほとんどの薬剤が抑制的に働くことを認め、CP においては更に強い抑制を示すことを報告している。この成績からは CP が治療の面で有利に働くとの示

唆は得られないが、我々は現在、低濃度の CP に暴露された後の本菌のマクロファージまたは好中球内での運命について検討を進めつつある。

第3にサルモネラのような細胞内寄生性の病原体に対しては、たとえ液性抗体や化学療法剤の作用により、細胞外での殺菌が行なわれたにしても、細胞内に生菌が生存しつづける限り真の治療目的は達せられないと思われる。そこで化学療法剤の細胞内浸透性が問題となる。Lowrie ら（1979）はマウス腹腔マクロファージにネズミチフス菌を感染させペニシリン（PC）を添加した場合、PC は短時間で急速にマクロファージ内に拡散し、その濃度は細胞外濃度の13%に達したと述べている。現在まで著者らが調べた範囲では、CP の細胞内移行率を明らかにした報告はみられないので比較は出来ないが、CP の方が高い浸透性をもつことも予想されるので、この方面での今後の検討が待たれる。

本研究では治療上 CP が AM-PC より優れた効果を示す理由を十分に説明する成績は得られなかった。しかし今回の実験治療においても CP の優位性は再三確認されており、また菌の臓器内での増殖抑制力を試験した場合、CP 投与群では臓器内濃度が最高の時でも、MIC 以下であるにもかかわらず、その時の菌数は AM-PC 投与群よりも少なかったことから、低濃度 CP の体内における役割も重要視する必要があるものと思われる。

ま と め

チフス性疾患の治療に使用される化学療法剤のうち、*in vitro* における抗菌力では最も劣るとされている chloramphenicol が、実際の治療では最も優れた効果を示す理由を明確にする目的で、実験ネズミチフス症を対象に、その要因の解析を薬剤の体内分布、滞留時間及び血清殺菌能に及ぼす影響の面から検討した。その結果、chloramphenicol と amoxicillin の間で特に有意な差は得られなかった。しかし、臓器内では chloramphenicol は MIC 以下の低濃度でも菌の増殖を著明に抑制していることが判明した。

謝 辞

内藤達郎教授の御指導，御校閲に深謝いたしますとともに実験にあたり御援助，御協力を得ました宇都宮助手をはじめとする教職員各位にも謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 相坂忠一，新美正信，藤井 肇，藤井章伸，榎坪慎一 (1980): 腸チフス疾患における肝機能異常について. 感染症誌, 54(7) 掲載予定.
- 2) Calderon, E., (1974): Amoxicillin in the treatment of typhoid fever due to chloramphenicol-resistant *Salmonella typhi*. J. Inf. Dis., 129 (suppl.) S219-S221.
- 3) Gilman, R. H., Terminel, M., Levine, M. M., Hernandez-Mendoza, P., Calderne, E., Vasquez, V., Martinez, E., Snyder, M. J. & Hornick, R. B. (1975): Comparison of trimethoprim-sulfamethoxazole and amoxicillin in therapy of chloramphenicol-resistant and chloramphenicol-sensitive typhoid fever. J. Inf. Dis., 132 (6), 630-635.
- 4) 勝 正孝，秋葉 亨，富沢 功，仁平 誠，平石 浩，鷺飼新一郎，松原義雄，丹治 汪，御簾納孝次郎，今川八束，高橋良二，加藤貞治，藤森一平，伊藤周治，藤井俊宥，鍵和田滋，星野重二，戸谷徹造，酒井庸禎，内藤伝兵衛，小林祥男，杉山茂彦，中島邦夫，赤尾 満，山本琢三，角田冲介，善養寺浩，寺山 武，潮田 弘，斉藤 誠 (1973): Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤の腸管感染症における治療成績および各種腸管病原菌に対する in vitro での抗菌性. Chemotherapy. 21 (2), 351-369.
- 5) Lowrie, D. B., Aber, V. R. & Carrol, M. E. W. (1979): Division and death rates of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol., 110, 409-419.
- 6) 真下啓明 (1973): 抗生物質・化学療法剤. 76-84, 文光堂, 東京.
- 7) 日本化学療法学会 MIC 測定委員会 (1975): 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. Chemotherapy. 23 (8), 1~2.
- 8) 坂崎利一 (1979): サルモネラ症—その細菌学, 病理学および臨床. 近代出版, 東京.
- 9) Scragg, J. N. & Rubidge, C. J. (1975): Amoxicillin in the treatment of typhoid fever in children. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 25 (5), 860-865.
- 10) 高橋公毅，小林章男 (1979): 緑膿菌・クレブシエラ・セラチアに対する 抗生剤の併用効果. Chemotherapy, 27 (6), 848-856.
- 11) 朝長昭光，渡辺繁徳，林 敏明，堀内信宏，中富昌夫，広田正毅，森 信興，那須 勝，斉藤 厚，原耕平 (1978): 各種抗生剤の白血球機能に及ぼす影響，白血球の Random mobility に及ぼす影響. Chemotherapy, 26(5), 723.
- 12) Woodward, T. E., Smadel, J. E., Ley, H. L., Green, R. & Mankakan, D. S. (1948): Preliminary report on the beneficial effect of chloromycetin in the treatment of typhoid fever. Ann. Int. Med., 29, 131-134.