

組織液内抗生物質濃度の簡易測定法

ラット granuloma pouch モデルの応用

松原秀三, 遠藤久男, 岡崎博司, 小川春樹

中外製薬株式会社・総合研究所

(昭和54年8月13日受付)

実験小動物において組織液中の抗生物質濃度を測定することは、組織液を採取する適当な手段に乏しい現状では容易でない。そこでラット背部に granuloma pouch を作成し、そこに貯留する浸出液が代替組織液として応用しうるかどうかを、血清蛋白結合率が異なる β -lactam 抗生物質を用いて検討した。その結果、抗生物質の浸出液内への移行様式は、生理的組織液を用いて実験された既知の成績とほとんど一致した。また、抗生物質の浸出液中レベルは起炎後一定期間内で実験する限り、炎症反応の進行に影響されなかった。浸出液中の総蛋白含量は組織液のそれに等しかった。これらの結果は、組織液内抗生物質濃度を測定する手段として granuloma pouch に貯留する炎症浸出液が組織液の代替体液として応用しうることを示唆する。

序 文

抗生物質の体内分布が血清蛋白によって調節されることはよく知られる事実である¹⁻⁴⁾。それ故、この作用によって *in vitro* では同様の抗菌力を示す類縁抗生物質が、*in vivo* において治療効果を比較すると大きな差を生じることがしばしば経験される。これは細菌感染の主な場である組織液中の抗生物質濃度に影響される場合が多い。そこで、より確実に *in vivo* における治療効果を推定するために、抗生物質の血中濃度や臓器内濃度のほか組織液内濃度を測定する努力が試みられているが⁵⁻¹⁵⁾、実際に組織液を採取することは容易でない。

我々は以前からラットの granuloma pouch モデルを用い、その炎症浸出液中への抗生物質の移行様式を比較検討しているが¹⁶⁾、それは血中の分布パターンと明らかに異なり、むしろ従来脊髄液^{7,8)}、リンパ液⁵⁾あるいは関節腔液^{9,9)}などで知られる生理的組織液中への抗生物質の分布様式と類似することが経験された。granuloma pouch は比較的容易に形成することができ¹⁷⁾、また浸出液を連続的に採取することも容易であるので、このモデルを用いて得られる結果が、生理的狀態での抗生物質の組織液内濃度を反映するのであれば、これは有用な実験モデルとして応用しうると考えられる。そこで、今回我々は血清蛋白結合率が異なる β -lactam 抗生物質を選び、血清蛋白結合率と血中および浸出液内濃度に関し基礎的な検討を行った。

実験材料と方法

1. 抗生物質

Ampicillin (ABPC), Carbenicillin (CBPC), Cloxa-

cillin (MCIPC), Cefazolin (CEZ) および Cephaloridine (CER) を実験に用いた。これらの β -lactam 抗生物質は Table 1 に示すとおり、それぞれ異なる血清蛋白結合率を有する。また、これらは生体内で代謝分解されず投与量のほとんどが尿中または胆汁中に排泄されるとされている⁴⁾。抗生物質は実験直前に燐酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.2) に溶解し、その 0.2 ml をラット尾靜脈または大腿部筋肉内に投与した。

2. Granuloma pouch の作成

本研究所で飼養された体重約 150 g の Wistar-Imamichi 雄ラットを用いた。Granuloma pouch は SELYE らの方法¹⁸⁾に準じ、ラットの背部皮下に空気 25 ml を注入して、くるみ大の空嚢を形成したのち、さらに起炎剤を含むオリーブ油 1 ml を注入して急性浸出性炎症を惹起した。起炎剤には croton oil (東京化成工業) および結核死菌体 (青山 B 株) を用い、それぞれ 1%, 1.5 mg/ml をオリーブ油に混じた。2日後に嚢内の空気を除去した。抗生物質の浸出液内移行濃度を測定する実験

Table 1 Binding rate of PC and CE against rat serum

| Antibiotics | Binding rate (%)* |
|-------------|-------------------|
| ABPC | 27 |
| CBPC | 54 |
| MCIPC | 86 |
| CER | 29 |
| CEZ | 89 |

* Determined by equilibrium dialysis method.

は主に起炎後6日から9日の間に行った。

3. 抗生物質の定量

浸出液は26ゲージの皮下針を用い、同一ラットから経時的に0.4mlづつ採取した。また血液は各ラットから断頭放血法によって採取し、血清を分離した。両体液中の抗生物質濃度は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするディスク拡散法によって定量した。標準検量線は血清および浸出液を用いて作成した。

4. Pouch 内感染と生菌数の測定

Escherichia coli C-11 株(東邦大・五島嗟智子教授から分与)を感染に用いた。本菌株に対するPC誘導体の最少発育阻止濃度(MIC)はABPC 0.78 $\mu\text{g/ml}$, CB-PC 1.56 $\mu\text{g/ml}$ ならびにMCIPC 3.12 $\mu\text{g/ml}$ であった。この菌株を Heart infusion 寒天平板上で1夜培養後、 $1 \times 10^7/\text{ml}$ の菌浮遊液を作り、その0.5mlを炎症惹起8日目の pouch 内に感染した。浸出液中の生菌数を測定するために、感染3時間後および6時間後に浸出液0.5mlづつを採取し、直ちに滅菌PBSで10倍段階希釈した。この各希釈液0.5mlをMacConkey寒天培地に混釈し、48時間培養後集落数を計測した。なお、本菌株はMacConkey培地によって増殖阻害を受けない。

4. 総蛋白含量の定量

浸出液および血清中の総蛋白含量はRaBAシステム(中外製薬)用ユニキットを用いて定量した。

実験成績

1. PCの浸出液内移行濃度

croton oilで炎症惹起後6日目にラットの尾静脈から20mg/kgのPCを投与し、経時的に浸出液内移行濃度を測定した(Fig. 1)。ABPC, CBPCおよびMCIPCの3剤はいずれも投与1時間後に最も高く移行した。そのピーク値はABPCで平均3.6 $\mu\text{g/ml}$, CBPCで1.9 $\mu\text{g/ml}$, MCIPCで0.9 $\mu\text{g/ml}$ であった。これはラット血清に対する結合率が低いほど高いことを示す。一方、

Fig. 1 Exudate levels of PC after intravenous injection

Rats received 20 mg/kg of PC 6 days after induction of granuloma pouch by 1% croton oil.

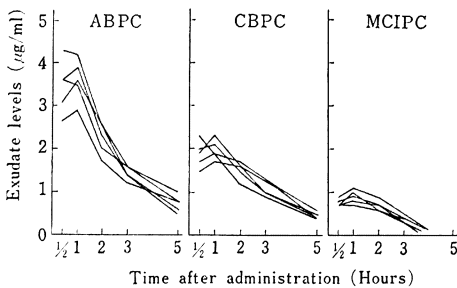
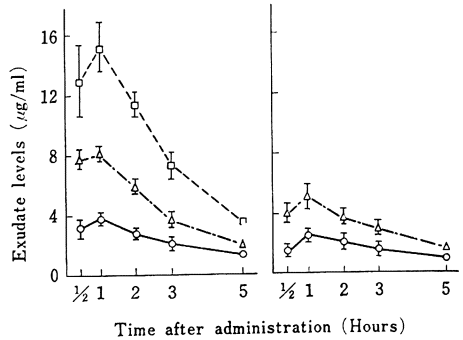


Fig. 2 Dose and administration route effects of ABPC penetrating into 7 day-pouches

Rats received a single intravenous (left) or intramuscular (right) injection of 20 (○), 40 (△) and 80 mg/kg (□). Values represent the mean \pm S.D. for four rats.



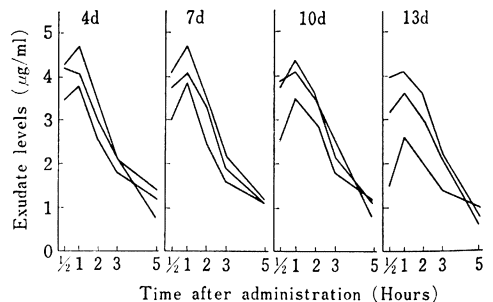
図に示すとおり、同一群における抗生物質濃度のラット間差は少なかった。

次に、ABPCを用い浸出液内移行におよぼす投与量と投与ルートの影響を検討した(Fig. 2)。20, 40および80 mg/kgのABPCを静注または筋注投与すると、浸出液内濃度は投与量に応じて等しく増加し、また同一投与量では筋注より静注投与のほうが高く移行した。この結果は同一抗生物質を投与した場合、浸出液内濃度は血中濃度に比例することを示す。

さらに、このような薬物移行が炎症反応によって影響されるかどうかを検査するために、炎症惹起後4, 7, 10および13日のラットにABPC 20 mg/kgを静注し、浸出液内移行濃度を比較した(Fig. 3)。その濃度レベルは起炎後4, 7および10日のラットでほとんど差がなかった。13日後ではやや減少する傾向がみられた。同様の成績はCEZを用いて得られた。これらのラットの pouch 内液量は4日後で平均4.3ml(2.5~6.5ml), 7

Fig. 3 Influence of inflammation on penetration of ABPC into exudate

Rats possessing 4, 7, 10 or 13 day-pouch were injected intravenously with 20 mg/kg of ABPC.



日後で 15.6 ml (9~18 ml), 10 日後で 16.5 ml (8~20 ml), 13 日後で 12.4 ml (5~15 ml) であった。起炎後 4~5 日まで明らかな pouch 内液量の増加がみられ, 10 日を過ぎると徐々に減少した。すなわち, 炎症初期 (5~6 日まで) には激しい体液の浸出が生じるにもかかわらず, 抗生物質の移行はほとんど影響されなかった。また各時期に得られた浸出液中の総蛋白含量はいずれも 3.5~4.5 g/dl であった。血清は 6.5~8.0 g/dl であった。

2. pouch 内感染菌に対する PC の殺菌効果

前述のとおり, 浸出液内濃度が ABPC > CBPC > MCI-PC の順に高くなることを確認するために, これら 3 剤を用いて pouch 内感染 *E. coli* に対する殺菌効果を比較した。(Fig. 4)。

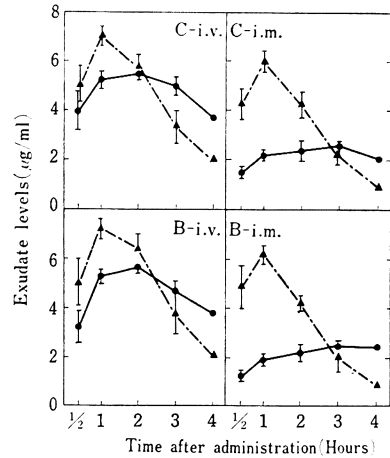
5×10^8 コの *E. coli* を感染し, 1 時間後に 40 mg/kg の PC を静注した。ABPC 投与 3 時間後の生菌数は投与前の約 1/100 に減少し, 6 時間後ほとんどその菌数レベルを維持した。CBPC 投与群では 3 時間後に投与前の約 1/10 に減少したが, 6 時間後には再び増加した。しかしながら, MCIPC の殺菌効果はほとんど認められなかった。この殺菌効果は各誘導体の浸出液内移行濃度に比例した。

3. CE の浸出液内移行濃度

炎症惹起後 6 日目のラットに 20 mg/kg の CEZ あるいは CER を静注または筋注投与し, 浸出液内濃度を比較した (Fig. 5)。PC と同様に浸出液内濃度は筋注より静注で高かった。CER は CEZ より高いピーク値を示し

Fig. 5 Exudate levels of CE after intravenous or intramuscular injection

Granuloma pouches were induced by 1% croton oil (C) and 1.5 mg of *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B (B). Six days after the induction, rats received a single intravenous (i. v.) or intramuscular (i. m.) injection of 20 mg/kg of CEZ (●) and CER (▲). Values represent the mean \pm S. D. for six rats.



たが, 比較的速やかに減少した。このような傾向は起炎剤に結核死菌体浮遊油液を用いて granuloma pouch を作成しても croton oil 誘発 pouch と同様に認められた。croton oil は明らかに出血を伴い, 浸出液は暗赤褐色を呈するが, 後者は透明な血清色の浸出液を生ずる。従って, 両者は異なる炎症反応を惹起すると推測される

Fig. 4 Bactericidal effect of PC against *Escherichia coli* infected in 8 day-pouches

A 20 mg/kg dose of ABPC (○), CBPC (△), or MCIPC (□) was injected intravenously 1 hr after infection of 5×10^8 *E. coli*. Control group (×) was given PBS. Values represent the mean \pm S. D. for four rats.

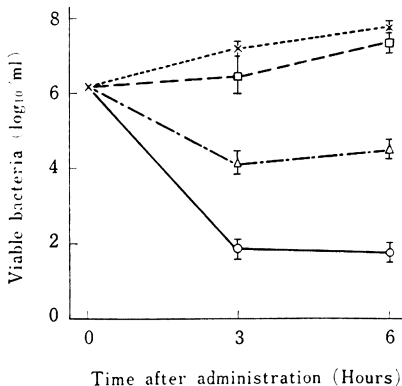
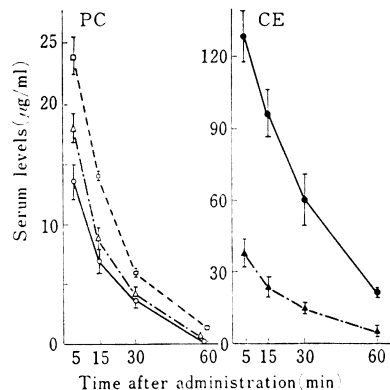


Fig. 6 Serum levels of PC and CE after intravenous injection of 20 mg/kg

Rats received a single injection of ABPC (○), CBPC (△), MCIPC (□), CEZ (●) and CER (▲), respectively. Values represent the mean \pm S. D. for three rats.



が、抗生物質の浸出液内移行には影響しなかった。

4. 血中濃度の比較

PC および CE 20 mg/kg 静注後の血中濃度を比較した (Fig. 6)。PC 剤では MCIPC > CBPC > ABPC の順に高い血中レベルを示した。また、CE 剤では CEZ のほうが顕著に高い血中濃度を示した。この結果は浸出液内の濃度順位とは逆に、血清蛋白結合率が高い誘導体ほど血中濃度は高くなった。また、血中濃度は投与後速やかに減少し 90 分後に完全に消失したが、この分布パターンは 60 分後にピークとなり、以後数時間持続する浸出液内濃度レベルと明らかに異なった。

考 案

この実験に用いた β -lactam 抗生物質は Table 1 に示すとおり、ラット血清に対してそれぞれ異なる結合率を有する。いずれも生体内で分解を受けないので^{4,16)}、その体内分布と血清蛋白結合率との関係を解析するには都合がよい。これらの抗生物質をラット尾静脈から投与し、炎症浸出液中への移行濃度を比較すると、血清蛋白結合率が低い誘導体ほど高い濃度が測定された。すなわち、PC 剤では ABPC > CBPC > MCIPC の順に高く、また CE 剤では CEZ より CER のピーク値のほうが高かった。一方、これらの誘導体静注後の血中濃度を比較すると、浸出液内濃度順位とは逆に PC 剤では MCIPC > CBPC > ABPC、CE 剤では CEZ > CER の順で高かった。これは両体液中の抗生物質を総量で比較する限り反比例することを示すが、実際には浸出液内濃度は血中の遊離濃度に比例することが推測される。また、今回の実験で、各抗生物質の浸出液内における分布様式が血中と明瞭に異なることが確認された。すなわち、血中の抗生物質濃度は静注後速やかに減少し、90分以内に検出限界以下になるのに対し、浸出液中では 30~60 分後にピークとなり、以後数時間持続した。このような血中と異なる分布様式は脊髄液^{7,8)}、リンパ液⁹⁾、あるいは関節腔液^{8,9)}などで測定された結果と近似する。これらの体液は生理的組織液あるいはそれに近い compartment に属する体液として評価されているが、さらに多孔質の管腔を皮下に移植して、その管内貯留液中に移行する抗生物質濃度を測定したり^{10~15)}、フィブリン球を腹腔内に移入して、そのフィブリン中に浸潤する抗生物質限度を測定しても⁹⁾、上記とほとんど同様の分布パターンをとることが報告されている。従って granuloma pouch モデルを用いて従来の報告と同様の現象を確認しえたことは、換言すれば、granuloma pouch が blood compartment と異なり、むしろ生体内で interstitial fluid compartment に近い画分に属することが推測される。

もちろん、pouch 内貯留液は炎症性に誘導される体液

であり、抗生物質の移行におよぼす炎症の影響は無視できない。前述のとおり、浸出液は炎症惹起後 4~5 日まで増加し、5~6 日後に plateau に達して、10 日後から徐々に減少する。一般に、炎症局所では正常時より薬物濃度が高くなるということが知られている^{3,4,7,8)}。それは血清蛋白に結合した薬物が、炎症部位に漏出する蛋白と共に移行するからと考えられており、そのためこの現象は血清蛋白結合率が低い薬物よりも高い薬物で顕著であることが知られている。我々はこの可能性を検討するために、起炎後 4, 7, 10 および 13 日のラットを用い ABPC 静注後の浸出液内レベルを比較したが、それぞれに有意な差を認めなかった。同様の結果は血清蛋白結合率が高い CEZ を用いても確認された。それ故、起炎後 4~10 日の期間に限って言えば、血清蛋白結合率の違いによらず炎症経過の影響はほとんど認められなかったと結論できる。なお、起炎後 4, 7, 10, 13 日の浸出液中の総蛋白含量はいずれも 3.5~4.5 g/dl であった。この含量は血中 (6.5~8.0 g/dl) の約半量にあたる。GARDNER ら¹¹⁾はラット腹壁に diffusion chamber を移植し、その腔内に貯留する組織液中の総蛋白含量を測定するとやはり 3.5~4.5 g/dl であることを報告している。

さらに我々は granuloma pouch が croton oil だけでなく結核死菌体浮遊油液を用いても作成しうることを示した。croton oil は出血を伴うが、後者は注射のさい血管を破綻しないよう注意すれば黄麦色の透明な液を得ることができる。従って両者の炎症反応において異なる機序の介在が示唆されるが、この場合も抗生物質の移行濃度に関して差はなかった。この事実もさらに、抗生物質の浸出液内移行が炎症反応によって影響されないことを支持する。従って以上の実験結果から、granuloma pouch モデルはラットの組織液内の抗生物質濃度を把握するために応用しうると思われる。また、このモデルを使って抗生物質の体内分布とその血清蛋白との関与について解析することも可能であると思われる。

Granuloma pouch は比較的容易に作成でき、また浸出液を容易に採取することができる。今日まで、ラットの組織液としてはリンパ液や生理食塩水洗浄腹水などが利用されてきたが、リンパ液の採取は技術的に難しく、それを原因とする個体差が発現するし、生理食塩水洗浄腹水は薬物が希釈されたり、食塩水そのものが速やかに吸収されてしまう欠点がある。従って、ラットにおける適当な組織液採取の手段がない現状では、granuloma pouch モデルは抗生物質の組織内濃度を推定するための有用な実験モデルとして推奨できる。

文 献

- 1) KOCH-WESER, J. & E. M. SELLERS: Binding

- of drugs to serum albumin. *New Engl. J. Med.* 294 : 311~316, 1976
- 2) KUNIN, C. M.: Clinical significance of protein binding of the penicillins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 145 : 282~289, 1967
 - 3) 真下啓明: 抗生物質の血清蛋白結合性。代謝 7 : 255~259, 1970
 - 4) 岡見吉郎: クリロピッツ抗生物質論, 学会出版センター (東京), 1978
 - 5) VERWEY, W. F. & H. R. WILLIAMS, Jr.: Relationships between the concentrations of various penicillins in plasma and peripheral lymph. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* -1961 : 476~483, 1962
 - 6) BARZA, M. & L. WEINSTEIN: Penetration of antibiotics into fibrin loci *in vivo*. I. Comparison of penetration of ampicillin into fibrin clots, abscesses, and "interstitial fluid". II. Comparison of nine antibiotics: Effect of dose and degree of protein binding. *J. Infect. Dis.* 129 : 59~65, 66~72, 1974
 - 7) OPPENHEIMER, S.; H. N. BEATY & R. G. PETERSDORF: Pathogenesis of meningitis. VIII. Cerebrospinal fluid and blood concentrations of methicillin, cephalothin, and cephaloridine in experimental pneumococcal meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 73 : 535~543, 1969
 - 8) RELLER, L. B.; W. W. KARNEY, H. N. BEATY, K. K. HOLMES & M. TURCK: Evaluation of cefazolin, a new cephalosporin antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 3 : 488~497, 1973
 - 9) HOWELL, A.; R. SUTHERLAND & G. N. ROILNSON: Effect of protein binding on levels of ampicillin and cloxacillin in synovial fluid. *Clin. Pharm. Therap.* 13 : 724~732, 1972
 - 10) CHISHOLM, G. D.; P. M. WATERWORTH, J. S. CALNAN & L. P. GARROD: Concentration of antibacterial agents in interstitial tissue fluid. *Brit. Med. J.* 10 : 569~573, 1973
 - 11) GARDNER, W. G.; R. B. PRIOR & R. L. PERKINS: Fluid and pharmacological dynamics in a subcutaneous chamber implanted in rats. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 4 : 196~197, 1973
 - 12) TIGHT, R. R.; R. B. PRIOR, R. L. PERKINS & C. A. ROTILIE: Fluid and penicillin G dynamics in polyethylene chambers implanted subcutaneously in rabbits. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 8 : 495~497, 1975
 - 13) GERDING, D. N.; W. H. HALL, E. A. SCHERL & R. E. MANION: Cephalosporin and aminoglycoside concentrations in peritoneal capsular fluid in rabbits. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 10 : 902~911, 1976
 - 14) WATRMAN, N. G. & L. B. KASTAN: Interstitial fluid and serum antibiotic concentrations. *Arch. Surgery* 105 : 192~196, 1972
 - 15) TAN, J. S.; A. TROTT, J. P. PHAIR & C. WATERNAKUNAKORN: A method for measurement of antibiotics in human interstitial fluid. *J. Infect. Dis.* 126 : 492~497, 1972
 - 16) 小山憲次朗, 小川春樹, 野藤隆夫, 根橋敏行, 原田祐輔, 松原秀三, 遠藤久男, 斎藤元男, 柿本守夫, 鈴木清吉, 金子康子, 五島差智子: Ceftezole の抗菌作用ならびに吸収, 分布, 代謝および排泄。 *Chemotherapy* 24 : 619~634, 1976
 - 17) 松原秀三, 遠藤久男, 小川春樹: 炎症浸出液の性状と Penicillin の移行濃度。第 23 回日本化学療法学会西日本支部総会講演要旨, p. 41~42, 1975
 - 18) SELYE, H.: On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissue to injury. An experimental study with the granuloma pouch technique. *JAMA* 152 : 1207~1213, 1953

APPLICATION OF GRANULOMA POUCH MODEL FOR MEASUREMENT OF THE INTERSTITIAL ANTIBIOTIC LEVELS OF RAT

SHUZO MATSUBARA, HISAO ENDO and HIROSHI OKAZAKI
Research Laboratories of Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

To study the penetration of antibiotics into interstitial fluid, granuloma pouch model induced by either 1% croton oil or 1.5mg of *Mycobacterium tuberculosis* Aoyama B in the back of rat was applied. Pouches were filled with inflammatory exudate (4 days, 3~7 ml; 6~13 days, 8~20 ml) having a protein concentration range of 3.5~4.5g/100ml. Exudate antibiotic levels after intravenous injection depended upon the doses and the serum binding rates but not the inflammatory process. Furthermore, an intravenous injection of antibiotics developed greater exudate level than an intramuscular injection. These results indicate that antibiotic concentration in exudate was reflected by the protein-free concentration in serum. Therefore, this granuloma pouch model appears to be useful for measurement of interstitial antibiotic levels in rats.