

抗生物質の生体内濃度に simulate した *in vitro* model system について (3)

Cefazolin の透析 cell compartment への移行

坂本 博・広瀬俊治・村川武雄・西田 実
藤沢薬品工業株式会社中央研究所

(昭和 55 年 2 月 9 日受付)

抗生物質の血清中濃度を simulate する既報の *in vitro* kinetic model に特殊な透析 cell unit を接続し、薬剤の浸出液または組織濃度に対応する新しい model を考案した。

この model を用い、0.5~2g の cefazolin をそれぞれ 1 回静注したときの殺菌効果を比較し、tissue compartment に対応する dialysis cell 内で、cefazolin の殺菌効果が dose-response することを認めた。またこの model で、cefazolin の MIC が 3.13~50 $\mu\text{g/ml}$ の *E. coli* 5 株に対する cefazolin の殺菌効果を検討した。この実験において、dialysis cell 内の cefazolin 濃度とそれらの試験菌に対する殺菌効果との間には、一定の相関が認められた。

序 文

前報¹⁾で報告した抗生物質の血清中濃度に simulate する *in vitro* kinetic model に特殊な透析 flow cell unit を接続し、薬剤の血液から浸出液または組織への単純拡散による移行に対応する新しい model を考案した。この model における抗生物質の殺菌作用を投与量および試験菌の MIC との関連において検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

cefazolin (CEZ, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Japan)

cefuroxime (CXM, Glaxo Research Laboratories, England)

2. 透析 cell model

前報に記載した、血清中の薬剤濃度を gradient に simulate する *in vitro* kinetic model に、flow cell を備えた透析 unit を連結した。この装置の概要は Fig. 1 のとおりである。透析 unit として flow-type dialysis cell model 283 (Technilab. Institute Inc., Pequannock, New Jersey, U. S. A.) を用いた。この透析 unit の flow cell に既報の kinetic model の outlet から流出する液を通液し、dialysis cell には適当な medium (培地または buffer) で満たした。本実験においては flow cell は 5 ml 容、dialysis cell は 2.5 ml, 5 ml および 10 ml 容のものを実験に応じて使用した。この unit に使用した膜は、dialysis membrane model 299 (Technilab Institute Inc.), diafilter type A-50 T (Bio Engineering Co., Ltd., Tokyo) および Millipore filter

type HA, 0.45 μm (Millipore Corp., U. S. A.) を用いた。Kinetic model の medium として Heart infusion broth (Difco Lab., U. S. A.) または M/15 リン酸 buffer pH 7.0 を用いた。CEZ をヒトに 1g 静注した際に得られた血清中濃度²⁾を two compartment model によって回帰し、各種の parameters を求めた。この parameters に対する Kinetic model を作製した。装置の始動後、一定時間における薬剤濃度を経時的に測定した。model における液量、流速等の条件は Table 1 に示した。

3. 膜透過定数

透析 unit の flow cell から 100 $\mu\text{g/ml}$ の薬液を循環させ、dialysis cell から経時的に sampling を行ない濃度を測定した。(1)式に従い薬剤の透過定数を求めた。

$$K' = \frac{V}{t} \ln \frac{C_1}{C_1 - C_2} \quad (1)$$

K' : 膜透過定数

C_1 : flow cell 中の薬剤濃度

Fig. 1 Diagram of the apparatus

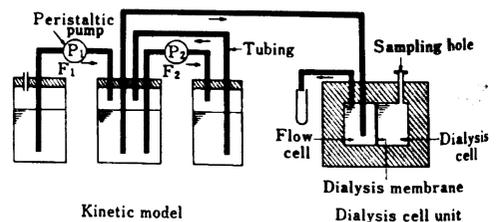


Table 1 Experimental condition for kinetic model and dialysis unit

		Kinetic model						Dialysis unit	
		Type	C ₀ (μg/ml)	a (ml)	b (ml)	F ₁ (ml/min)	F ₂ (ml/min)	Flow cell (ml)	Dialysis cell (ml)
Rat	CEZ, i. v. 20 mg/kg	One compartment	95.0	36.8	—	0.91	—	5	5
	CXM, i. v. 20 mg/kg		40.0	26.0	—	0.90	—		
Human	CEZ, i. v. 0.25 g	Two compartment	58.0	90.0	69.3	1.20	2.73	5	5
	0.5 g		116.0						
	1.0 g		232.0						
	2.0 g		464.0						

C₂: dialysis cell 中の薬剤濃度

V: dialysis cell の容量

t: 測定時間

4. 殺菌効果

試験菌として *E. coli* を使い, kinetic model 内で simulate された CEZ の血清中濃度および dialysis cell 内濃度と殺菌性の関係を検討した。なお生菌数の測定は前報⁹⁾のとおりにおこなった。

5. ラット無菌炎症浸出液への CEZ の移行

無菌炎症 pouch 作成後 6 日目のラット 1 群 6 例に CEZ を 20 mg/kg 静注した際の血清中濃度とその浸出液中濃度の既報⁹⁾の方法に従って測定した。

6. 薬剤濃度の測定

dialysis cell 内の薬剤濃度は, 液体クロマトグラフィ (HPLC) により測定した。ALC/GPC 204 型液体ク

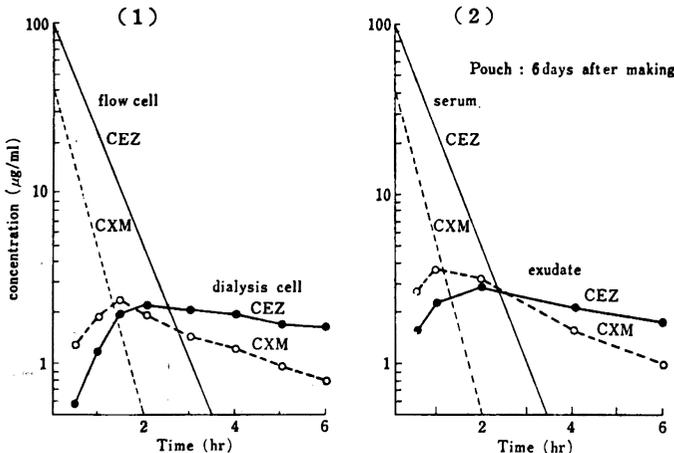
ロマトグラフ (Waters Associates, U. S. A.) を使い, Column として μ Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm), 移動相として Acetonitrile-0.3% KH₂PO₄ (20:80) を使用した。

実験結果

1. dialysis cell 内への薬剤移行

Kinetic model に接続した dialysis cell 内の薬剤濃度の推移と *in vivo* における浸出液移行の相関性を検討するため, ラットに CEZ または CXM を 20 mg/kg 静注した際の無菌炎症 pouch 内の浸出液中濃度を測定した。その結果を Fig. 2 に示した。Fig. 2(1) は, 両薬剤を上記のとおりラットに投与し, 得られた血清中濃度に対応する dialysis cell 内の CEZ および CXM の濃度の推移を示した。Fig. 2(2) は, ラット無菌炎症浸出液中濃度の実測値を示した。この際, 透析 unit の条件と

Fig. 2 (1) Levels of CEZ and CXM in dialysis cells of the model simulating serum levels in rats after i. v. injection (20 mg/kg), (2) Serum and exudate levels of CEZ and CXM in rats after i. v. injection (20 mg/kg)

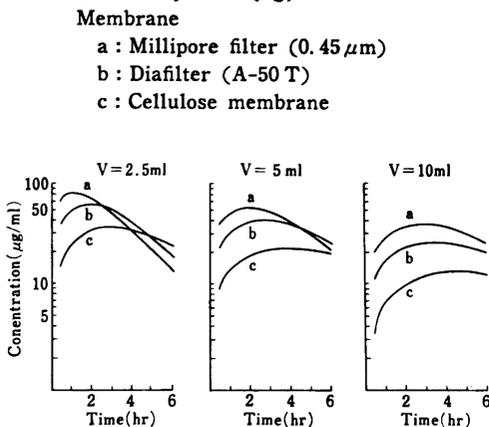


しては flow cell 容量 5 ml, dialysis cell 容量 5 ml, そして透析膜としては cellulose 膜 (Technilab.) を用いた。dialysis cell 内の CEZ または CXM の濃度はラットの無菌炎症浸出液中の両薬剤の濃度の実測値にほぼ一致した。抗生物質を含む各種の薬剤の浸出液への移行は、炎症の stage その他の要因によって相違する^{4,5,9}。また浸出液または組織の種類により異なるので、本報の model における dialysis cell 内で浸出液または組織濃度を simulate するため、適当な透析膜の種類、または cell 容量を決定することが必要である。Table 2 は薬剤の dialysis cell 内の濃度を薬剤の膜に対する透過定数、cell 容量および静注、筋注 (経口) 投与時の血清中濃度式から数式化したものである。CEZ の各種膜に対する透過定数は cellulose 膜 0.622, diafilter 1.56, および millipore filter 2.80 となった。このような異なる透過定数を使用して、CEZ 1g を静注した場合の血清中濃度に対応する dialysis cell 内濃度をそれぞれ算出した。その結果を Fig. 3 に示した。これらの計算値は、実際にこの model を用いて得られた CEZ の dialysis cell 内濃度値とよく一致した。Fig. 3 に示したように millipore filter (a) は他の 2 種の膜に比較して cell 内 CEZ 濃度は最も高いが消失も速い。他方、cellulose 膜 (c) では cell 内 CEZ 濃度は最も低いが持続的であった。この結果に明らかたとおり、薬剤の透過定数の異なる膜を用い、さらに dialysis cell 容量を変えることにより、生体の特定の浸出液または組織への薬剤の移行を *in vitro* で simulate することが可能である。

2. *in vitro* model による CEZ の殺菌作用

この model を用いて、CEZ の殺菌作用の評価を試みた。実験条件として、CEZ をヒトに 0.25, 0.5, 1 およ

Fig. 3 Calculated CEZ levels in dialysis cell of the model simulating human serum levels after i. v. injection (1g)



び 2g を静注した時の血清中濃度を、flow cell に流入する循環液中でそれぞれ再現した。透析 unit の条件としては、cellulose 膜と dialysis cell 容量 5 ml (Fig. 2 の実験と同一条件) を用いた。Fig. 4 はこの条件における flow cell および dialysis cell 中の CEZ の濃度を示した。Fig. 4 のとおり、CEZ の 0.25g 静注により flow cell における CEZ の初期濃度 (C_0) は 58.0 μ g/ml, half-life は 1.6 時間であった。これに対し、dialysis cell 中の CEZ の peak 値は 5.5 μ g/ml (3.8 時間) で、8 時間で 4.2 μ g/ml が維持された。1g の静注によってより高い濃度が得られ、dose-response が認められた。血清中濃度に対応する flow cell 中および浸出液中濃度に対応する dialysis cell 中の CEZ の *E. coli* に対する殺菌効果を検討した。

(a) CEZ の投与量と殺菌効果

0.25, 0.5, 1 および 2g の各投与量で、1 回静注した条件における CEZ の殺菌効果を *E. coli* strain 74 を試験菌として検討した。Fig. 5 の実線および点線はそれぞれ dialysis cell および flow cell における生菌数

Fig. 4 Levels of CEZ in dialysis and flow cells of the model simulating human serum levels after i. v. injection

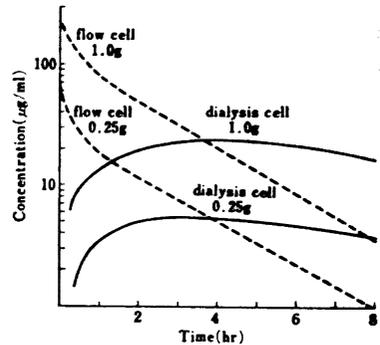


Fig. 5 Bactericidal activity of CEZ in the model against *E. coli* No. 74

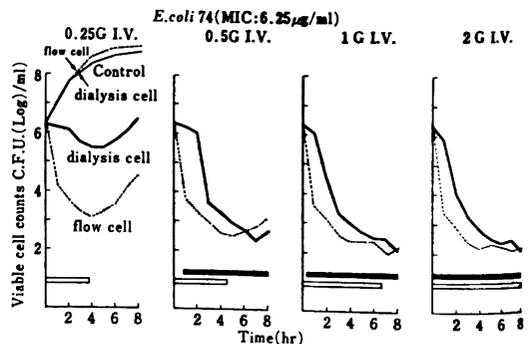


Table 2 Pharmacokinetic formula for simulating antibiotics levels in the model

Route	Levels in flow cell	Levels in dialysis cell
I. M. or P. O.	$C = \frac{K_a \cdot X_0}{K_a - K_e} (e^{-K_e t} - e^{-K_a t})$ $X_0 = \frac{f \cdot \text{Dose}}{V_c}$ <p>f: Bioavailability</p>	$C = \frac{K_a \cdot X_0 \cdot h}{K_a - K_e} \left\{ \frac{e^{-K_e t}}{h - K_e} - \frac{e^{-K_a t}}{h - K_a} - \left(\frac{1}{h - K_e} - \frac{1}{h - K_a} \right) e^{-ht} \right\}$
I. V.	$C = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$	$C = h \left\{ \frac{A e^{-\alpha t}}{h - \alpha} + \frac{B e^{-\beta t}}{h - \beta} - \left(\frac{A}{h - \alpha} + \frac{B}{h - \beta} \right) e^{-ht} \right\}$
Drip Infusion	$F(t) = \frac{R}{V_c} \left\{ \frac{K_{21}}{\alpha\beta} - \frac{\alpha - K_{21}}{\alpha(\alpha - \beta)} e^{-\alpha t} - \frac{K_{21} - \beta}{\beta(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \right\}$ <p>During infusion ($t \leq \theta$): $C = F(t)$ After infusion ($t > \theta$): $C = F(t) - F(t - \theta)$ θ: Infusion time R: Infusion rate</p>	$C = \frac{hR}{V_c} \left\{ \frac{K_{21}}{\alpha\beta h} (1 - e^{-ht}) - \frac{\alpha - K_{21}}{(\alpha - \beta)(h - \alpha)\alpha} (e^{-\alpha t} - e^{-ht}) - \frac{K_{21} - \beta}{(\alpha - \beta)(h - \beta)\beta} (e^{-\beta t} - e^{-ht}) \right\}$ <p>During infusion ($t \leq \theta$): $C = F(t)$ After infusion ($t > \theta$): $C = F(t) - F(t - \theta)$</p>

$h = k/V$; k : Permeability constant, V : Volume of dialysis cell
 K_a : Absorption rate constant
 $A, \alpha, B, \beta, K_{21}, K_e, V_c$: Parameters expressed in the reference¹⁾

の経時的变化を示す。Fig. 5 の下部の白線および黒線は flow cell および dialysis cell における薬剤濃度がそれぞれ MIC を越える時間を示す。CEZ 0.25g の静注では cell 内の薬剤濃度は MIC に達しなかった。dialysis cell 中では CEZ の著明な殺菌効果はみられなかった。0.5g の静注では、flow cell 内で約 4 時間 MIC を越える濃度が続き、この部位における生菌数は約 5 時間まで減少し、その後再増殖した。dialysis cell 中の生菌数は約 2 時間の lag time の後、7 時間まで減少し、その後再増殖を開始した。1g および 2g の静注では、flow cell 内の薬剤濃度は MIC 以上にそれぞれ約 7 時間および 8 時間持続した。この条件下で CEZ は cell 内の生菌数を 8 時間まで減少し続けた。これらの条件でも flow cell と比較して、dialysis cell 内における CEZ の殺菌効果は約 2 時間おくれて発現した。

(b) CEZ の MIC と殺菌効果

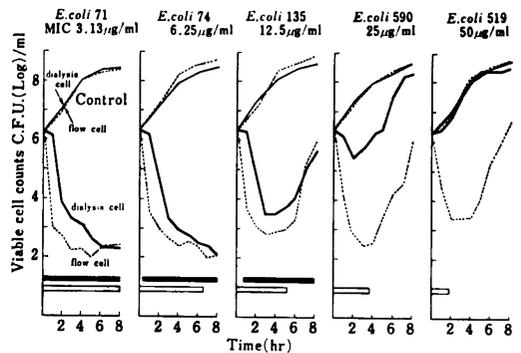
CEZ に対する感受性の異なる 5 株の *E. coli* に対する殺菌効果を CEZ 1g 1 回静注の条件について検討した。Fig. 6 に明らかとなり、CEZ の MIC がそれぞれ 3.13 $\mu\text{g/ml}$ および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の *E. coli* strains 71 および 74 に対して、flow cell および dialysis cell 内で CEZ は強い殺菌効果を示し、8 時間の観察時間内で試験菌は全く再増殖しなかった。しかし、MIC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の *E. coli* strain 135 に対して、CEZ は両 cells において 3 時間まで殺菌的に作用したが、4 時間以降、試験菌は再増殖を開始した。MIC 25 $\mu\text{g/ml}$ の *E. coli*

strain 590 に対しては、flow cell 内で CEZ は 3 時間まで殺菌的に作用したが dialysis cell において、CEZ は 2 時間までごく弱い殺菌効果を示したにすぎない。また MIC 50 $\mu\text{g/ml}$ の *E. coli* strain 519 に対して、dialysis cell において CEZ は全く殺菌的に作用しなかった。1g 1 回静注時の条件において、dialysis cell 内の CEZ が殺菌的に作用し得るのは、試験菌の MIC が 6.25 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以下であることが必要で、この濃度が dialysis cell におけるこの薬剤の有効性の分岐点である。

考 察

われわれは抗生物質を各種の方法によって投与した際に得られる血清中濃度を simulate する *in vitro* kinetic

Fig. 6 Bactericidal activity of CEZ in the model against *E. coli* strains with different susceptibility of CEZ



model を考案し¹⁾、この model を用いて薬剤の殺菌効果を検討した。しかし、感染症の治療においては感染部位、すなわち浸出液および組織中における薬剤濃度がより重要な意義をもつと考えられる。そこでわれわれは、血清中だけでなく浸出液および組織内の薬剤濃度を同時に simulate する model の確立と、それを利用して抗生物質の有効性を評価することを計画した。薬剤の組織および浸出液中濃度を数式化し予測するために、pharmacokinetics の研究分野において physiological perfusion model 理論による解析が試みられている²⁾。この理論では、薬物の血流中から組織への移行はそれぞれ所定の血流量と移行定数を用いて解析され、これによりうまく実測値を数式化できることが認められている。薬物の血中から特定の部位への移行が単純拡散によると考えられる場合、われわれの考案したこの model は組織または浸出液内濃度の simulation ための最も簡単な方法と考えられる。そして、抗生物質の或る投与条件における血清中濃度および組織内濃度の実測値から、この model の dialysis cell 内で組織内濃度を simulate するために必要な実験条件の計算式を決定した。dialysis cell 内の薬剤濃度が各種の条件で投与された薬剤の組織内濃度を良く反映するかということは、明らかにされるべき最も重要な問題である。この点に関しては、抗生物質の血清中濃度と組織または浸出液中濃度の実測値が dialysis cell 内濃度の計算式に K' と V を特性値として回帰できればよいことになる。われわれは CEZ および ceftizoxime のヒトの組織内濃度が、このような方法によって回帰できることを確認した(未発表データ)。血中濃度を simulate した *in vitro* model における抗生物質の殺菌効果については、われわれを含めすでに 2, 3 の研究者によって論議されてきた^{8,9,10)}。本報でわれわれは新しく、dialysis cell を用いて組織または浸出液中における CEZ の濃度を simulate し、血清中濃度を simulate する系と同時に、その殺菌効果を検討した。CEZ の 0.25 から 2g までの 1 回静注の投与条件のもとで *E. coli* strains 74 (MIC : 6.25 $\mu\text{g/ml}$) に対する CEZ の殺菌効果には比較的明瞭な dose-response が認められた。とくに殺菌的に有効であった投与量 0.5~2g 静注の条件で、dialysis cell 中の CEZ の peak 値は flow cell における peak 値と比較して、かなり低値であったにもかかわらず dialysis cell において初期の lag time が認められた以外は両 cells における CEZ の殺菌効果には本質的な相違はなかった。またこの model を用いて、CEZ の *E. coli* に対する MIC と殺菌効果との関係を検討した。CEZ 1g, 1 回静注の条件では、MIC が 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の試験菌に対しては、flow cell および

dialysis cell における CEZ の殺菌効果は一致しなかった。とくに dialysis cell 中で MIC が 25 $\mu\text{g/ml}$ の試験株に対して、CEZ の殺菌効果は弱く、また MIC 50 $\mu\text{g/ml}$ の試験株に対しては殆んど効果を示さなかった。一方、flow cell 中で CEZ はこれらの菌株に対して初期に一過性ではあるが明瞭な殺菌効果を示した。以上のとおり、両 cells における数株の *E. coli* に対する CEZ の殺菌効果の相違は、それらの部位における薬剤濃度と比較的良く対応した。

文 献

- 1) 村川武雄, 広瀬俊治, 西田 実: 生体内濃度に simulate した *in vitro* model における抗生物質の殺菌作用 (2)。Two compartment 理論による新しい gradient 濃度変化 model について。Chemotherapy 8(1): 26~30, 1980
- 2) GOLD, J. A.; J. J. MCKEE & D. S. ZIV: Experience with cefazolin: An overall summary of pharmacologic and clinical trials in man. J. Infect. Dis. 128 (Suppl): S 415~S 421, 1973
- 3) NISHIDA, M. & T. MURAKAWA: Exudate levels and bactericidal activity of cefazolin in a new local infection system using rat granuloma pouches. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11: 1042~1048, 1977
- 4) GERDING, D. N. & H. H. WENDELL: The penetration of antibiotics into peritoneal fluid. Bull. N. Y. Acad. Med. 51: 1016~1019, 1975
- 5) PETERSON, L. R. & D. N. GERDING: Prediction of cefazolin penetration into high- and low-protein-containing extravascular fluid: New method for performing simultaneous studies. Antimicrob. Agents & Chemoth. 14: 533~538, 1978
- 6) GILLET, A. P. & R. WISE: Penetration of four cephalosporins into tissue fluid in man. Lancet 1: 962~964, 1978
- 7) GREENE, D. S.; R. QUINTILIANI & C. H. NIGHTINGALE: Physiological perfusion model for cephalosporin antibiotics. I: Model selection based on blood drug concentrations. J. Pharmacol. Sci. 67(2): 191~196, 1978
- 8) NISHIDA, M.; T. MURAKAWA, T. KAMIMURA & N. OKADA: Bactericidal activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. Antimicrob. Agents & Chemoth. 14: 6~12, 1978
- 9) GRASSO, S.; G. MEINARDI, I. D. CARNERI & V. TAMASSIA: Mew *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob. Agents & Chemoth. 13: 570~576, 1978
- 10) JACQUELINE, A. R.; E. B. ROBERT & E. P. KENNETH: Comparative bactericidal effect of

ceforanide (BL-S786) and five other cephalosporins in an *in vitro* pharmacokinetic model.

J. Antibiotics 32 : 727~733, 1979

BACTERICIDAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS IN *IN VITRO* MODEL SIMULATING ANTIBIOTIC LEVELS IN BODY (3)

Incorporation of Cefazolin into the Dialysis Cell

HIROSHI SAKAMOTO, TOSHIHARU HIROSE, TAKEO MURAKAWA
and MINORU NISHIDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

A dialysis cell unit was used in conjunction with our previously described kinetic model for simulating antibiotic concentrations in exudates and tissues.

The bactericidal efficacy of cefazolin in the dialysis cell was investigated in the model simulating the serum levels in the flow cell after i. v. dosing with 0.25 to 2g. In this experiment, the activity of cefazolin was dose-dependent in the range of the drug concentrations used. When 5 strains of *E. coli* (MIC : 3.13~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used as the test organism, the bactericidal efficacy of cefazolin correlated well with the drug concentrations in the dialysis cell.