

試験管内膀胱モデルについて

河田 幸道・説田 修・西浦 常雄

岐阜大学泌尿器科学教室

主任：西浦常雄教授

(昭和 56 年 3 月 5 日受付)

尿路感染症の治療効果に影響する因子としては、血中濃度よりも尿中濃度が重要であることが指摘されているが、尿中の薬剤濃度は、試験管内抗菌力測定の際のように濃度が一定に保たれることはなく、時間とともに常に変化している。

一方、膀胱内の細菌は腎尿による希釈と排尿の影響により、その菌数は常に変動している。したがって膀胱内では、濃度変化をともなった薬剤と、菌数変動をともなった細菌とが接触していることになり、この状態は通常の薬剤感受性試験における試験管内での細菌と薬剤の接触とはかなり異なった条件にあるといえる。

膀胱におけるこのような試験管内と生体内との条件の相違を小さくし、少しでも生体に近い状態の試験管内実験を行う目的で開発された O'GRADY らの膀胱モデルに、若干の改良を加えたモデルを試作したので、その概要を紹介するとともに、膀胱モデルを用いた予備的実験の成績について報告した。

今後このモデルを用いて検討を行うことにより、膀胱炎に対する適正な化学療法を行ううえで有用な指標が得られると思われる。

薬剤感受性と臨床効果との間に一定の相関関係が認められることは事実であるが、両者は常に一致するとは限らない¹⁾。

その理由としては、感染巣に十分な濃度の薬剤が到達しえない場合など、生体内における薬剤の吸収、分布に関連した因子がまず挙げられるが、通常用いられる薬剤感受性試験が、生体の炎症巣における薬剤と細菌との関係を、忠実に再現しえないことも大きな原因と考えられる。

たとえば尿路感染症において、薬効に影響する因子として血中濃度よりも尿中濃度が重要であることが指摘されているが²⁾、尿中の薬剤濃度は時間とともに常に変化しており、試験管内におけるように濃度が一定に保たれていることは決してない。

一方、膀胱内の細菌は、抗生物質が投与されない状態でも、尿による希釈や排尿の影響により、その菌数は常に変化している。したがって濃度変化をともなった薬剤と、菌数変動をともなった細菌とが膀胱内で接触することになり、この状態は通常の薬剤感受性試験における試験管内での薬剤と細菌の接触とは、かなり異なった状態にあると思われ、これが薬剤感受性試験と臨床効果とが一致しない原因のひとつと考えられる。

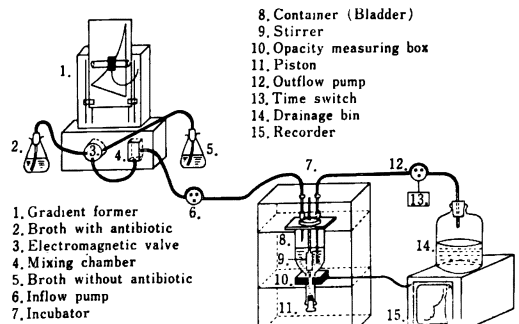
膀胱におけるこのような試験管内実験と生体内との相違

を小さくし、少しでも生体に近い条件での試験管内実験を行う目的で、O'GRADY らは試験管内膀胱モデルを開発し、各種の実験を行っているが⁸⁻¹¹⁾、筆者らは今回 O'GRADY らのモデルに若干の改良を加えた試験管内膀胱モデルを作製し、その機能に関して予備的実験を行ったので、本モデルを紹介するとともに、その実験成績について報告する。

I. 膀胱モデルの構成

膀胱モデルは Fig. 1 に示したようにに、生体ではいわば腎および尿管に相当する部分 (1~6) と、膀胱に相当する部分 (7~11) とから成り立っている。

Fig. 1 Bladder model



1. Gradient former
2. Broth with antibiotic
3. Electromagnetic valve
4. Mixing chamber
5. Broth without antibiotic
6. Inflow pump
7. Incubator
8. Container (Bladder)
9. Stirrer
10. Opacity measuring box
11. Piston
12. Outflow pump
13. Time switch
14. Drainage bin
15. Recorder

まず濃度勾配自動発生装置(1)としては、Mixograd (Gilson) を用いているが、グラフ用紙を切って作った希望の濃度勾配をこの部分で読みとることにより、電磁バルブ(3)の三方弁の開閉時間が調節される。電磁バルブは最短6秒単位で開閉時間の調節を行い、抗生物質含有液体培地(2)と非含有液体培地(5)を一定の比率で吸引し、これを mixing chamber (4) に送り、ここで両液を混和することにより所定の濃度を作製する。所定の濃度に調整された培地(腎尿に相当する)は inflow pump(6)により、incubator (7)内に設置された膀胱に相当するガラス容器(8)に送られるが、inflow pump としては微量調節が可能な minipulse pump (Gilson) を用いている。

膀胱に相当するガラス容器は、最大容量が 600 ml であるが、その下方は円筒状に突出しており、この部分を取り囲むようにして濁度計(10)が設置され、モデル内菌数を濁度により測定する。円筒部の下端には注射器の内筒(11)を挿入し、これをピストン運動させることにより、円筒部内壁に付着した気泡を除去したり、容器内の濁度を一定にすることができるが、後者の目的には、stirrer (9)も設置されている。なお濁度計には日本光電製の濁度感知器を改造して用いているが、測定された濁度は東亜電波 EPR-100 A 型濁度記録装置(15)に連続的に記録される。

容器(膀胱)内に貯留した培地(尿)は、生体におけると同様に、outflow pump (12)とタイマー(13)により、一定時間ごとに排出されるが、この場合排液用長針の長さを調節することにより残尿を発生させ、かつその量を調節することができる。なお outflow pump としては吐出量が約 150 ml/min のチューブポンプ(東京理化 RP-10 型)を用いているため、1回の排液に要する時間は通常1~2分程度の短時間である。

II. 実験的検討

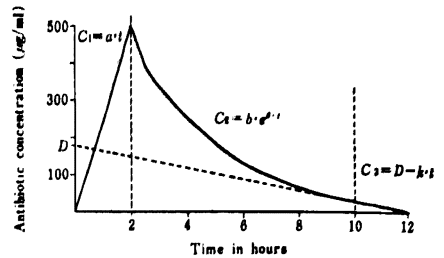
1. washout effect の検討

(i) 膀胱内細菌に対する効果

生体の膀胱のもつ washout effect が、膀胱モデルでも認められるかどうかを検討する目的で、培地の流入量(尿量)と排液間隔(排尿間隔)が膀胱モデル内の細菌数に及ぼす影響について検討した。

供試菌には尿由来の *E. coli* ECSA1 を用い、排液時に膀胱モデル内に残す残液量(残尿量)は 20 ml とした。培地の流入速度(尿量)が 1 ml/min で排尿間隔が 1 時間の場合を標準状態とし、利尿と頻回排尿のモデルとして尿量が 2 ml/min で排尿間隔が 30 分の場合、尿量減少と尿回数減少のモデルとして尿量が 0.5 ml/min で排尿間隔が 2 時間の場合について、膀胱モデル内菌数

Fig. 2 Standard excretion profile of the drug



の推移を検討した。

(ii) 抗生物質濃度に対する効果

抗生物質が膀胱から wash out される状況について数学的に検討した。この場合尿量が 1 ml/min の標準状態において膀胱内に流入する培地(腎尿)中の抗生物質濃度変化の1例として、Fig. 2 に示すように、2時間までは直線的に濃度が上昇して2時間後にピーク値の 500 µg/ml に達し、その後 10 時間までは2時間の半減期で指数関数的に低下、10 時間以後は再び直線的に低下して 12 時間後に 0 となる濃度推移を仮定した。したがって2時間目までの腎尿中抗生物質濃度 C_1 は、 $C_1 = a \cdot t$ 、2時間より 10 時間目までの濃度 C_2 は $C_2 = b \cdot e^{\beta t}$ 、10 時間より 12 時間目までの濃度 C_3 は、 $C_3 = D - K \cdot t$ で表わされるものと考えた。標準状態における各係数は $a = 4.1667$ 、 $b = 1,000$ 、 $\beta = -0.0058$ 、 $D = 187.5$ 、 $K = 0.2604$ となる。

なお膀胱モデル内に流入する抗生物質の総量は尿量にかかわらず一定と考えたため、尿量が 2 ml/min の場合のピーク値は 250 µg/ml、0.5 ml/min の場合は 1,000 µg/ml とした。

2. 膀胱モデル内抗生物質濃度の実測

膀胱モデル内に貯留した培地中の抗生物質濃度(膀胱尿中濃度)は、腎尿中抗生物質濃度、尿量、排尿間隔、残尿量などによって変化するが、前述のように計算によって求めることができる。

そこで ampicillin (ABPC) を用い、計算どおりの膀胱尿中濃度が得られるかどうかを bioassay により実際に測定した。この場合腎尿中の ABPC 濃度は、1 時間後に 500 µg/ml でピークに達し、以後 5 時間目まで 1 時間の半減期で低下、その後直線的に低下して 6 時間目に 0 になるものとした。また尿量は 1 ml/min、排尿間隔は 1 時間、残尿量は 20 ml とした。膀胱尿中濃度の測定は 8 時間目まで 1 時間ごとに行い、*E. coli* ECSA1 を用いた well diffusion method によった。

3. 膀胱モデル内細菌に対する抗生物質の効果

膀胱モデル内の細菌に抗生物質を作用させた時にみら

れる増殖抑制効果を, ABPC を用いて観察し, 抗生物質の効果を表現するに適切な指標とその再現性について検討した。

供試菌としては *E. coli* ECSA 1, *S. epidermidis* A, *S. epidermidis* B の 3 株を用いた。これらの株はいずれも尿路由来株で, tube dilution method により測定した ABPC の MIC は, それぞれ 4 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で, *S. epidermidis* A は β -lactamase 産生株, *S. epidermidis* B は非産生株である。膀胱モデルの条件は, 尿量 1 ml/min, 排尿間隔 1 時間, 残尿量 20 ml とし, ① *E. coli* ECSA 1 単独培養, ② *E. coli* ECSA 1 と *S. epidermidis* A の混合培養, ③ *E. coli* ECSA 1 と *S. epidermidis* B の混合培養に対する ABPC の効果を検討した。

まず単独培養例では *E. coli* の over-night broth culture 20 ml, また混合培養例では *E. coli* と *S. epidermidis* それぞれの over-night broth culture 各 10 ml を膀胱内に注入し, 抗生物質を含まない trypticase soy broth (BBL) の流入を開始, 4 時間後に ABPC 10 mg を直接膀胱モデル内に注入した。

ABPC 注入時よりいったん下降した濁度が再上昇して 50% に達するまでの時間 (time to 50% opacity level: T_{50}), および ABPC 注入時の濁度まで回復するに要する時間 (time to original opacity level: T_{OL}) を求め, これを ABPC による増殖抑制時間とした。なお T_{50} , T_{OL} の再現性を検討する目的で, 単独培養例については 5 回, 混合培養例については各 4 回実験を繰返した。

III. 実験成績

1. 膀胱モデルの washout effect

(i) 膀胱内細菌に対する効果

膀胱内細菌数は腎尿による希釈と排尿の効果により, Fig.3 のようにはじめは減少するが, その後細菌の増殖が希釈効果を上まわるため再び増加し, 波動を示しつつ

Fig.3 Influence of urine volume and micturition interval on bacterial counts in the bladder urine

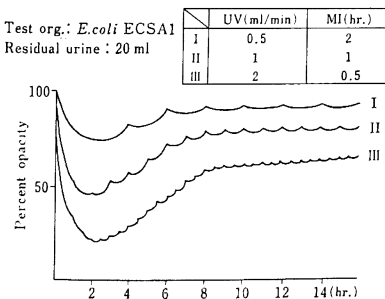


Fig.4 Influence of urine volume and micturition interval on antibiotic levels achieved in the bladder model

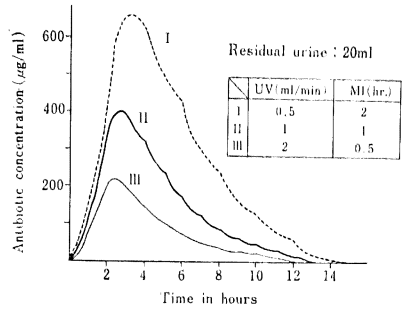


Fig.5 Comparison of antibiotic levels achieved in the bladder model

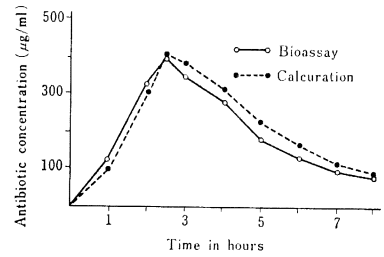


Fig.6 Antibiotic concentration achieved in the bladder model

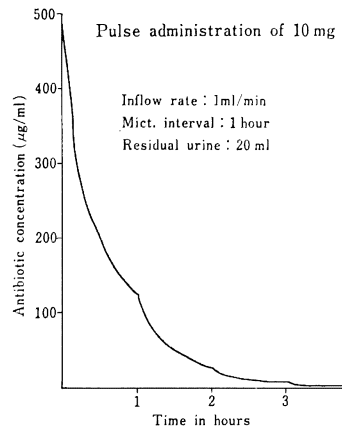


Fig.7 A typical opacity record obtained with the bladder model

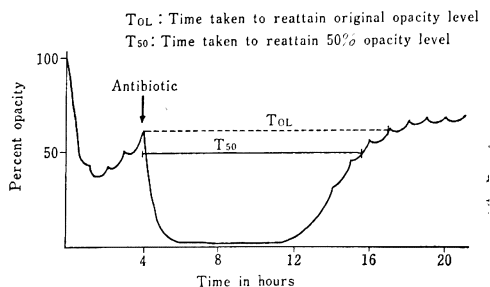


Table 1 Time to recovery

Cultures	$T_{50}^{a)}$		$T_{OL}^{b)}$	
	Mean \pm SD (hrs)	CV ^{c)} (%)	Mean \pm SD (hrs)	CV ^{c)} (%)
<i>E. coli</i> ECSA 1 (n=5)	10.4 \pm 0.2	1.5	12.2 \pm 2.9	24.0
<i>E. coli</i> ECSA 1 + <i>S. epiderm.</i> A (n=4)	8.8 \pm 0.3	3.8	9.8 \pm 2.4	24.2
<i>E. coli</i> ECSA 1 + <i>S. epiderm.</i> B (n=4)	10.4 \pm 0.6	5.7	11.1 \pm 1.1	9.5

a) Time taken for opacity to reattain 50% level

b) Time taken for opacity to reattain original level

c) Coefficient of variation

もほぼ一定の菌数に維持される。この場合尿量が多く、かつ排尿間隔が短い場合には菌数は低く、生体の膀胱もつ voiding defense mechanism と同様の washout effect が認められた。

(ii) 膀胱尿中抗生物質濃度に対する効果

計算により得られた膀胱尿中抗生物質濃度は Fig. 4 のように、尿量が少なくかつ排尿間隔が長い場合にはピークは高くかつ遷延し、逆に多尿と頻回排尿の条件下ではピークは低くかつ膀胱よりの消失も速かった。

2. 膀胱モデル内抗生物質濃度

計算により求められた膀胱尿中の ABPC 濃度は、Fig. 5 のように bioassay により実測した値ときわめてよく一致した。

3. 膀胱モデル内の *E. coli* に対する ABPC の効果
ABPC 10 mg を膀胱モデル内に直接注入した場合の濃度は、Fig. 6 のように急速に低下し、*E. coli* ECSA 1 に対する MIC を上まわる時間は3時間15分と計算された。

膀胱モデル内の細菌は Fig. 7 のように、ABPC 注入直後より急速にその菌数を減少させるが、その後再増殖し、一定の菌数に達すると波動を呈しつつも安定する。

ABPC 添加後にいったん低下した濁度が再び増加して50%まで回復するに要する時間(T_{50})は、Table 1 のように、*E. coli* の単独培養例と *E. coli* と *S. epidermidis* B の混合培養例とは全く同じであり、*E. coli* と *S. epidermidis* A との混合培養例においてのみ若干短くなっている。一方、濁度が ABPC 添加時の濁度にまで回復するに要する時間(T_{OL})でも、ほぼ同様の傾向が認められるが、それぞれの変動係数(CV)をみると、 T_{50} では1.5~5.7%ときわめて小さいのに対し、 T_{OL} では9.5~24.2%とかなり大きい値を示し、再現性の点から T_{50} のほうが指標としてすぐれていると考えられた。

IV. 考 按

抗生物質の抗菌効果を検討する場合、通常の試験管内実験では薬剤濃度が常に一定に保たれているため、濃度が時間とともに変化する生体の炎症巣における細菌と薬剤の関係とはかなり異なった条件にあると考えられる。

このため、主に血中濃度に simulate した濃度変化をとともなり薬剤中での細菌の増殖抑制が検討されており¹²⁻¹⁷⁾、臨床効果を推測するうえでより有用な情報の得られることが期待されている。

一方、薬剤感受性試験において、接種菌量とその成績に大きく影響することはよく知られた事実であるが、膀胱内の細菌は膀胱のもつ washout effect と腎尿による希釈効果により常にその菌数を変動させており、この点でも *in vitro* の条件は *in vivo* のそれとは相違している。

膀胱炎の治療においては尿中濃度が主体をなすことから、膀胱炎に対する化学療法の指標とする目的での抗菌力の測定は、尿中濃度に simulate した濃度変化の中で行われることがより実際的であるが、O'GRADY らの考案した膀胱モデルはこの目的にかなうばかりでなく、今回の実験でも示されたように腎尿による希釈と排尿による washout effect をも有していることから、生体にきわめて近い状態で膀胱内の細菌に対する抗生物質の効果を観察することが可能と考えられる。

この場合、抗生物質の効果は、再現性の点から T_{50} を指標として判断することが適当と考えられ、これにより薬剤間の比較、同一薬剤における投与量、投与方法の比較などが可能であるが、実際の臨床効果との関係は今後の検討にまたねばならない。

今回の実験では *E. coli* の単独培養と混合培養に対する ABPC の効果を比較し、*E. coli* と *S. epidermidis* A の混合培養に対しては、*E. coli* の単独培養または *S. epidermidis* B との混合培養に対するより効果が低

いと成績を得たが、混合感染例に対するペニシリン系薬剤の効果が単独感染例に対するより低いことは臨床的に認められるところであり¹⁸⁾、今回の実験はこれを *in vitro* で証明したことになる。なおその理由は *S. epidermidis* A の産生する β -lactamase により ABPC が不活化されるためと考えられる¹⁹⁾。

膀胱の washout effect についてみると、膀胱モデルにおいても細菌、抗生物質ともに wash out されることが認められた。通常、膀胱炎患者の治療に際しては、充分量の水分摂取と頻回排尿とが指導されるが、利尿と頻回排尿により確かに膀胱内の細菌数は減少するものの、同時に投与薬剤の膀胱尿中濃度も低下することになり、薬剤濃度の観点のみから見れば、治療上むしろ不利になると考えられる。したがって抗生物質濃度の低下が不利にならない範囲での利尿と頻回排尿とが理想的であり、これには薬剤の投与量や投与間隔も関係すると思われるが、今後膀胱モデルを用いた検討により、この点についても明確にすることが可能と考えている。

なお抗生物質の膀胱尿中濃度に影響する因子としては、尿量、排尿間隔のほかは薬剤の腎からの排泄態度や残尿量などがあるが、これらの影響についてはすでに報告した²⁰⁾。

このように膀胱モデルを用いた実験を行うことにより、膀胱炎に対する化学療法を行ううえで重要な各種の指標が明確にされると思われるが、一方、今回の膀胱モデルの問題点としては、voiding 以外の defense mechanism, いわゆる膀胱の intrinsic factor が加味されていないこと、尿の代用として用いる trypticase soy broth の浸透圧が約 280 mOsm/l と、尿より低く、また broth 中における細菌の増殖が尿中におけるより若干良好なこと、濁度の検出下限が生菌数にして 10^5 個/ml 程度と比較的高いこと、細菌の種類によっては濁度が均一にならない場合があること、抗生物質の種類によっては生菌数の減少と濁度の低下とが一致しない場合も予想されること、細菌を再増殖させ、これに要する時間により抗生物質の効果を判定するため、再増殖に必要な一定量の残尿の存在が必要なことなどが挙げられる。

したがって膀胱モデルを用いて行った実験成績の解析に際しては、これらの諸点を勘案する必要があるが、今後これらの問題点についても検討し、より生体に近い条件下で実験が行えるよう改良を重ねる予定である。

稿を終るにあたり、本モデルの試作に多大なご協力を賜った三共中央研究所主任研究員、斎藤友紀雄博士に感謝します。なお本研究は文部省試験研究費(2)No. 587000 により行った。

文 献

- 1) 河田幸道, 土井達朗, 西浦常雄: 尿路感染症における薬剤感受性と臨床効果について。日泌尿会誌 70: 327~336, 1979
- 2) STAMEY, T. A.; D. E. GOVAN & J. M. PALMER: The localization and treatment of urinary tract infections: The role of urine levels as opposed to serum levels. *Medicine*, 44: 1~36, 1965
- 3) O'GRADY, F.; I. P. MACKINTOSH; D. GREENWOOD & B. W. WATSON: Treatment of "bacterial cystitis" in fully automatic mechanical models simulating conditions of bacterial growth in the urinary bladder. *Br. J. exp. Path.*, 54: 283~290, 1973
- 4) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: The comparative performance of beta-lactam antibiotics against ampicillin sensitive *Escherichia coli* in conditions simulating those of the infected urinary bladder. *Br. J. exp. Path.*, 55: 245~250, 1974
- 5) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Response of ampicillin resistant *Escherichia coli* to cephalosporins in an *in vitro* model simulating conditions of bacterial growth in the urinary bladder. *Br. J. exp. Path.*, 56: 167~171, 1975
- 6) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Is your dosage really necessary? Antibiotic dosage in urinary infection. *Brit. Med. J.*, 2: 665~667, 1977
- 7) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: Factors governing the emergence of resistance to nalidixic acid in treatment of urinary tract infection. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 12: 678~681, 1977
- 8) GREENWOOD, D.: The activity of pipemidic acid and piromidic acid against *Escherichia coli* in static culture and in conditions simulating the treatment of bacterial cystitis. *J. Appl. Bacteriol.*, 44: 191~197, 1978
- 9) GREENWOOD, D. & F. O'GRADY: An *in vitro* model of the urinary bladder. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4: 113~120, 1978
- 10) GREENWOOD, D.; Y. KAWADA & F. O'GRADY: Treatment of acute bacterial cystitis: Economy versus efficacy. *Lancet*, 1: 197, 1980
- 11) GREENWOOD, D.; Y. KAWADA & F. O'GRADY: An *in vitro* model for assessing optimum antibiotic dosage in urinary tract infection. *Infection*, 8: S 35~S 38, 1980
- 12) SANFILIPPO, A. & E. MORVILLO: An experimental model for the study of the activity of the sulfonamides. *Chemotherapy*, 13: 54~60, 1968
- 13) GRASSO, S.; G. MEINARDI; I. DE CARNERI & V. TAMASSIA: New *in vitro* model to study the

- effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 13 : 570~576, 1978
- 14) NISHIDA, M.; T. MURAKAMI; T. KAMIMURA & N. OKADA : Bactericidal activity of cephalosporins in an *in vitro* model simulating serum levels. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 14 : 6~12, 1978
- 15) MURAKAWA, T.; H. SAKAMOTO; T. HIROSE & M. NISHIDA : New *in vitro* kinetic model for evaluating bactericidal efficacy of antibiotics. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 18 : 377~381, 1980
- 16) 坂本 博, 広瀬俊治, 村川武雄, 西田 実 : 抗生物質の生体内濃度に simulate した *in vitro* model system について。 *Chemotherapy*, 28 : 842~847, 1980
- 17) AL-ASADI, M. J. S.; D. GREENWOOD & I. O'GRADY : *In vitro* model simulating the form of exposure of bacteria to antimicrobial drugs encountered in infection. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 16 : 77~80, 1979
- 18) 河田幸道, 西浦常雄 : 複雑性尿路感染症における病態と薬効との関係について。 *日泌尿会誌*, 70 : 523~533, 1979
- 19) KAWADA, Y.; D. GREENWOOD & F. O'GRADY : Response of *Escherichia coli* to beta-lactam antibiotics : Effect of concomitant presence of *Staphylococci* exhibiting inducible beta-lactamase activity. *Infection*, 8 : 81~85, 1980
- 20) KAWADA, Y.; D. GREENWOOD & F. O'GRADY : Factors affecting antibiotic concentrations in bladder urine. *Invest. Urol.*, 17 : 484~488, 1980

AN *IN VITRO* MODEL OF THE URINARY BLADDER

YUKIMICHI KAWADA,

OSAMU SETSUDA

and

TSUNEO NISHIURA

Department of Urology,

Gifu University School of Medicine

(Chief : Prof. T. Nishiura, M.D.)

In most *in vitro* tests, antibiotic concentrations remain static whereas in the body drug concentrations rise and fall in a way which varies from drug to drug and with method of administration. Thus the conditions in which antibacterial drugs are tested by conventional *in vitro* tests are different from those in which urinary bacteria are exposed to drugs in the treatment of cystitis.

In an attempt to minimize these differences between *in vitro* and *in vivo* conditions, O'GRADY and his coworkers have introduced an *in vitro* model of the urinary bladder in which the conditions of exposure of bacteria to antibacterial drugs which exist in the treatment of cystitis are simulated. We have constructed a similar model of the urinary bladder with some modification.

An outline of our bladder model was introduced and the results of preliminary experiments obtained by use of the model were reported. The bladder model must give the useful informations which are necessary in the treatment of cystitis.