

## Cefmetazole (CS-1170) のラット炎症 Pouch 内浸出液中への移行と実験的局所感染に対する効果

久岡正史・小島徹昌

三共株式会社生産技術研究所

(昭和55年11月11日受付)

Cefmetazole のラット炎症 Pouch 内浸出液中への移行性と Pouch 内実験的感染に対する治療効果を検討し、Cefazolin についても同様の検討を行なった。その結果、総薬物濃度では血清中および浸出液中ともに Cefazolin の方が Cefmetazole よりも高い濃度推移を示したのに対し、非結合型薬物濃度では Cefmetazole の方が Cefazolin よりも高い濃度推移を示した。また、ラット Pouch 内に接種した大腸菌に対する増殖抑制効果は、Cefmetazole、Cefazolin ともに投与量の増加に伴って強く発現したが、両薬剤の効果を比較すると Cefmetazole の方が Cefazolin よりも強く、しかも持続性を示した。

抗生物質の *in vivo* での治療効果は、主としてマウス感染実験における ED<sub>50</sub> 値により評価されてきた。しかし、このような感染実験系では、感染部位への薬剤の移行性および感染菌の経時的変動は把握しがたい。そういった点で、最近良く用いられているラット炎症 Pouch 内実験的感染系は、投与薬剤の局所への移行性や感染菌に対する効果を定量的に評価できるモデルとして興味深い。村川ら<sup>1,2)</sup>は Cefazolin (CEZ), Cephaloridine (CER) および Cephalothin (CET) のラット Pouch 内浸出液中への移行性を検討し CEZ が優れていること、また、黄色ブドウ球菌および大腸菌を Pouch 内に接種して作成した局所感染に対する効果は CEZ, CER が CET より優れていることを報告している。松原ら<sup>3)</sup>は、ラット Pouch 内接種菌に対する Ceftezole (CTZ) の菌増殖抑制効果は CEZ と同等で移行性は劣ることを報告し、また、渡辺ら<sup>4)</sup>は同じような実験系を用いて Piperacillin (PIPC), Carbenicillin (CBPC), Ampicillin (ABPC) の抗菌活性を比較検討している。これらの検討では、移行性は総薬物濃度で論じられ、非結合型薬物濃度についての考慮はなされていない。しかし、C. M. KUNIN<sup>5)</sup>は、非結合型薬物濃度が抗菌活性と相関すると述べていることから、われわれは、Pouch 内浸出液中の Cefmetazole (CMZ) および CEZ については、総薬物濃度だけでなく非結合型薬物濃度をも測定した。また、CMZ および CEZ の MIC が等しい臨床分離大腸菌をラット Pouch 内に接種後薬剤を投与して、それぞれの薬剤の菌増殖抑制効果を検討した。

### 1. 実験材料および方法

#### 1. 使用薬剤

CMZ: セフメタゾン (三共) を使用。

CEZ: セファメジン (藤沢薬品) を使用。

#### 2. 使用動物

Wister-Imamichi 系雌性ラット、体重 143~162 g  
(局所感染作成時体重 176~205 g)

#### 3. 炎症 Pouch の作成

H. SELYE<sup>6)</sup>の方法に準じた。すなわち、ラット背部皮下に 20 ml の空気を注入して Pouch を作成し、これに 1% クロトン油を含有するオリーブ油 1 ml を注入して無菌的浸出性炎症を惹起した。炎症惹起 2 日後に空気を抜き、7 日後に実験に供した。

#### 4. 血清中および浸出液中薬物濃度の測定

薬剤投与後、測定時点毎にラットを屠殺して血清および浸出液を採取し、濃度測定用検体とした。CMZ の定量は佐橋ら<sup>7)</sup>の方法に準じ、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする薄層平板ディスク法により行なった。また、CEZ の定量は常法に従い *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする薄層平板ディスク法により行なった。定量限界はいずれの薬剤でも約 0.5 μg/ml であった。総薬物 (Total 体) 濃度定量では、血清検体、浸出液検体を 1% phosphate buffer 溶液 (pH 6.0) で適当に希釈して用いた。標準液系列は、薬剤を投与していないラットの血清、浸出液を buffer 溶液で検体と同じ倍率に希釈した液で調製した。また、非結合型薬物 (Free 体) 濃度定量には、検体をセントリフロー®膜 (アミコン, CF-25) で 130 g × 15 分遠心濾過して得た濾液を用いた。標準液系列は buffer 溶液で調製した。

#### 5. Pouch 内に接種した大腸菌の菌数測定

臨床分離菌株 *E. coli* 640<sup>8)</sup> (MIC: CMZ, CEZ ともに

Table 1 Analytical values of exudates in granuloma pouches

	Exudate	Blood	Serum
Erythrocytes( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	136 $\pm$ 15	638 $\pm$ 45	
Leukocytes( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	25 $\pm$ 3	37 $\pm$ 2	
Total protein (g/dl)	4.2 $\pm$ 0.1		8.1 $\pm$ 0.2
Albumin(g/dl)	2.6 $\pm$ 0.1		5.0 $\pm$ 0.0
pH	7.5 $\pm$ 0.1		7.3 $\pm$ 0.0

Each value indicated the mean  $\pm$  S.E. of 5 samples. Exudates were analyzed on day 7 after forming.

3.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を Heart Infusion Broth 培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ , 24 時間培養後, その菌液 0.2 ml を Pouch 内に接種した。接種 1 時間後に各薬剤をラット後肢大腿筋内に投与した。投与後 0, 3, 6, 9 および 24 時間に浸出液を注射器 (注射針: 皮下注 1/4) で 0.2 ml 採取し, 生理食塩液で希釈後, その 0.1 ml を Mac Conkey Agar 培地に塗抹した。次いで, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 18 時間培養し, 出現した集落数を計測して生存菌数を求めた。

## II. 実験結果

### 1. 浸出液の特性

ラット 5 匹の血液および浸出液の特性を Table 1 に示した。

浸出液の赤血球数, 白血球数, 総タンパク含量およびアルブミン含量は血液より低く, pH は血液とはほぼ同じであった。なお, これらの値は M. NISHIDA ら<sup>2)</sup>の実験結果とほぼ等しかった。

### 2. 血清中および浸出液中の Total 体濃度と Free 体濃度

CMZ または CEZ を 20 mg/kg, 40 mg/kg および 80 mg/kg 筋注後, 各薬剤の Total 体と Free 体の血清中および浸出液中濃度を測定し, その結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。また, これら濃度推移の特性値である最高濃度値と濃度曲線下面積値 (AUC) を Table 2 に示した。なお, AUC はラット 3 匹の平均値から成る濃度曲線より求めた。

CMZ 80 mg/kg 投与時の Total 体の血清中濃度は, 投与後 30 分で最高値 33.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し, 2 時間で 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4 時間では定量限界 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 以下となった。また, Total 体の浸出液中濃度は, 投与後 1 時間で最高値 8.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し, 以後血清中濃度よりも遅い消失パターンを示し, 8 時間で 1.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となった。一方, CEZ 80 mg/kg 投与時の Total 体の血清中濃度は, 投与後 30 分で最高値 162.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し, 2 時間で 9.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4 時間では定量限界 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 以下となった。また, Total 体の浸出液中濃度は, 投与後 2 時間で最高

Fig. 1 Concentrations of total CMZ and CEZ in serum and exudate after intramuscular administration in rats

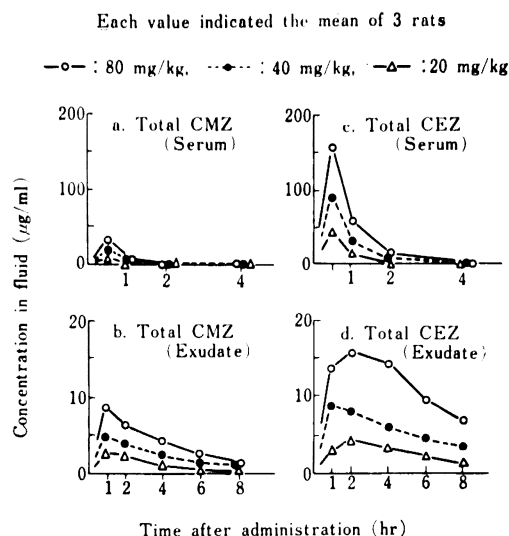
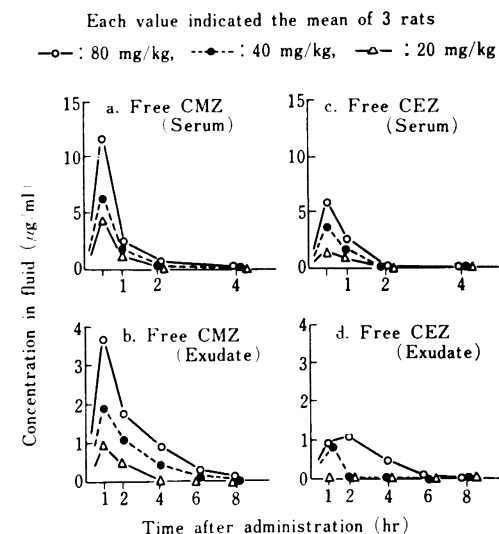


Fig. 2 Concentrations of free (unbound) CMZ and CEZ in serum and exudate after intramuscular administration in rats



値 15.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し, 8 時間でも 7.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示した。このように, CMZ 80 mg/kg 筋注後の Total 体の血清中および浸出液中濃度は, CEZ より低いことが認められた。Total 体に対し, CMZ 80 mg/kg 投与時の Free 体の血清中濃度は, 投与後 30 分で最高値 11.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し, 1 時間で 2.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2 時間では 0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となった。また, Free 体の浸出液中濃度は, 投与

Table 2 Peak concentration and AUC

Drug	Dose <sup>3)</sup>	Peak concentration <sup>1)</sup>				AUC <sup>2)</sup>			
		Total		Free		Total		Free	
		Serum	Exudate	Serum	Exudate	Serum	Exudate	Serum	Exudate
CMZ	20	12.9±1.4	2.9±0.5	4.4±0.4	1.0±0.2	10.4	10.7	3.2	1.8
	40	18.8±0.9	4.5±0.5	6.3±0.5	1.9±0.2	14.0	20.0	4.3	4.6
	80	33.5±1.6	8.8±0.1	11.8±0.6	3.7±0.2	24.1	33.1	8.8	9.3
CEZ	20	47.0±3.4	4.3±0.2	1.4±0.0	0.0±0.0	40.0	22.9	1.5	0.0
	40	90.1±9.1	9.0±0.4	3.7±0.6	0.9±0.0	79.3	44.4	3.1	0.9
	80	162.6±7.4	15.7±0.5	6.0±1.9	1.1±0.0	139.4	93.5	4.9	3.4

1) Each value indicated the mean±S.E. of 3 rats. ( $\mu\text{g/ml}$ )

2) Calculated from the mean value of 3 rats. ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ )

3) mg/kg i.m.

後1時間で最高値  $3.7\mu\text{g/ml}$  に達し、2時間で  $1.7\mu\text{g/ml}$ 、4時間で  $0.9\mu\text{g/ml}$  となった。一方、CEZ 80mg/kg 投与時の Free 体の血清中濃度は、投与後30分で最高値  $6.0\mu\text{g/ml}$  に達し、1時間では  $2.5\mu\text{g/ml}$ 、2時間では定量限界以下となった。また、Free 体の浸出液中濃度は、投与後2時間で最高値  $1.1\mu\text{g/ml}$  に達し、4時間では  $0.5\mu\text{g/ml}$  となった。このように、CMZ の Free 体の血清中および浸出液中濃度は、Total 体の場合とは逆に CEZ より高いことが認められた。この濃度推移の傾向は、両薬剤の投与量が  $40\text{mg/kg}$  および  $20\text{mg/kg}$  の場合にも同じように認められた。すなわち、Table 2 のように、CMZ Total 体の血清中濃度の最高値および AUC は CEZ の  $1/4\sim 1/5$  にすぎないのに対し、CMZ Free 体の濃度は逆に最高濃度値で CEZ の 2

～3 倍、AUC で CEZ の 3～4 倍大きい値を示した。以上の結果からも、CMZ の血清中および浸出液中濃度は CEZ よりも Total 体では低い推移を示すが、Free 体では高い推移を示すことが明らかとなった。

また、Table 2 の最高濃度値および AUC を投与量に対しプロットしてみると、Fig. 3 および Fig. 4 に示したように、いずれの値についてもほぼ直線性の用量-反応関係が認められた。

3. Pouch 内実験的感染系における菌増殖抑制効果  
*E. coli* 640 の培養液  $0.2\text{ml}$  を Pouch 内に接種し、1時間後に両薬剤を筋注して生存菌数の経時的測定を行

Fig. 3 Peak concentrations

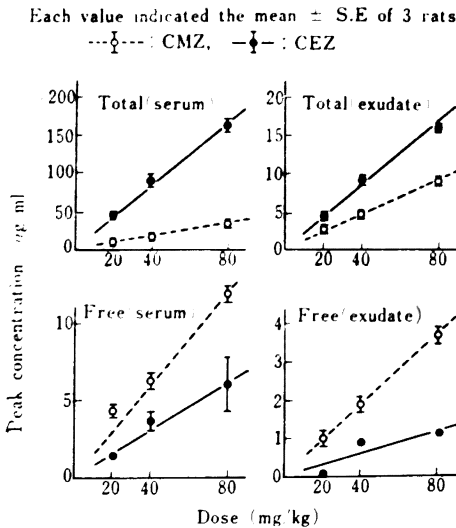


Fig. 4 Area under the concentration-time curves (AUC)

Each value was calculated from the mean value of 3 rats.

---○---: CMZ, —●—: CEZ

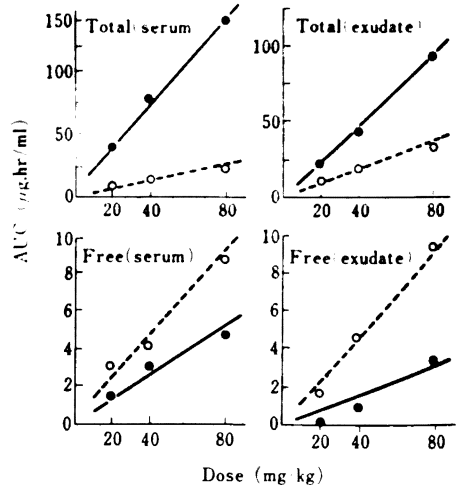
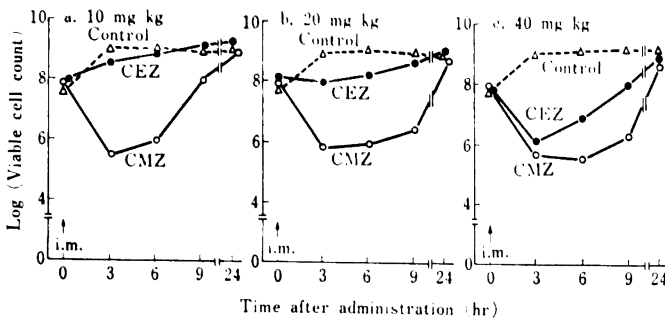


Fig. 5 Bactericidal effects of CMZ and CEZ against *E. coli* 640 in glanuloma pouches in rats after intramuscular administration. Antibiotics were administered at one hour after inoculation of *E. coli* 640 ( $1 \times 10^8$  cells). Each value indicated the mean of 3 rats



なった。結果を Fig. 5 に示した。

浸出液中の生存菌数は、菌接種1時間後で  $5.0 \times 10^7$ /ml となり、薬剤を投与しなければ3時間で  $10^9$ /ml に達し、以後24時間までこの菌数を持続した。

これに対し、菌接種1時間後に CMZ 10 mg/kg を投与した群では、投与3時間後の生存菌数は薬剤を投与していない control 群の値に比べて  $1/1,000$  と有意 ( $P < 0.05$ ) に減少し、この抑制効果は6時間まで持続した。しかし、9時間後には CMZ 投与時の菌数まで回復し、24時間後では control 群との差は見られなくなった。一方、CEZ 10 mg/kg 投与群では、投与3時間後に生存菌数の減少する傾向が認められたが、control 群の値と有意な差はなく菌増殖抑制効果はほとんど認められなかった。

CMZ 20 mg/kg 投与群では、投与3時間までの菌数の減少傾向は 10 mg/kg 投与群と差がなかったが、菌増殖抑制効果は9時間まで持続した。一方、CEZ 20 mg/kg 投与群では、投与3時間後の生存菌数は control 群の値の  $1/10$  と有意に減少したが、以後漸増して9時間以降では control 群と差が見られなくなった。

CMZ 40 mg/kg 投与群の場合も、20 mg/kg 投与群と同様の菌増殖抑制効果を示した。この投与量では、CEZ 投与群でも3時間後の生存菌数は control 群の値の  $1/1,000$  と有意に減少したが、以後漸増して24時間後では control 群と差が見られなくなった。

以上のように、CMZ の場合は、10 mg/kg の投与量でも優れた菌増殖抑制効果が認められ、投与量を 20 mg/kg, 40 mg/kg と増量することにより抑制効果の持続性が認められた。一方、CEZ の場合は、20 mg/kg の投与量でも菌増殖抑制効果は極めて弱く、40 mg/kg の投与量で CMZ 10 mg/kg 投与時とほぼ同等の菌増殖抑制効

果が認められた。

### III. 考 察

C. M. KUNIN<sup>9)</sup> は、ペニシリン系薬物の血清中での MIC が buffer 溶液中での MIC より高いこと、また、血清中でのペニシリン系薬物は一部タンパク結合して存在することなどから、薬物の抗菌活性が Free 体薬物濃度に依存して発現することを報告している。われわれも CMZ の血清中および浸出液中での存在形態をラットで検討したところ、Free 体濃度の割合はいずれの体液中においても約 40% (結合率 60%) であった。一方、CEZ の場合、Free 体濃度の割合は血清中で約 5% (結合率 95%)、浸出液中で約 10% (結合率 90%) であった。したがって、CMZ の血清中および浸出液中成分への結合率は CEZ に比較して少ない。村川ら<sup>11)</sup>は、CEZ をラットに筋注したとき、血清中および炎症 Pouch 内浸出液中への移行が良いことを報告しているが、本検討でも同様の結果が得られた。しかし、その存在形態は結合型が多く、薬効発現に寄与する Free 体の存在では CMZ より少ないことが明らかとなった。このことは、*E. coli* 640 に対する CMZ の *in vivo* での菌増殖抑制効果が CEZ より優れているとのわれわれの結果を良く説明し得る。しかし、*in vivo* での抗菌活性は宿主の生体防禦能、菌の感染状況などにも影響されるものであり、Free 体濃度も、*in vivo* での抗菌活性に影響を及ぼす重要な因子の一つと考えるべきであろう。

感染症の治療薬剤は、感染部組織への移行が良好であることが望まれる。薬物の組織移行には血清中または組織中のタンパクとの結合性が影響を及ぼす<sup>9,10)</sup>。

W. F. VERWEY ら<sup>11)</sup>は、ペニシリン系薬剤のリンパ液中への移行が Free 体薬物によるものであることを報告している。同しく、E. G. McQUEEN<sup>12)</sup>は、sulphormethoxine

の組織液中への移行が血中 Free 体によるものであることを報告している。いずれも、血清タンパクへの結合率が低い薬剤ほど、血中から組織液中への移行率は高いことを述べたものである。CMZ と CEZ についてのわれわれの検討でも、このことが示唆された。すなわち、Fig. 1 に示した濃度推移のデータから血中濃度に対する浸出液中濃度の比を求めてみると、タンパク結合率の低い CMZ の方が CEZ より大きい値を示した。

#### 文 献

- 1) 村川武雄, 岡野圭介, 岩井芳美, 西田 亨: Cefazolin の無菌炎症浸出液およびリンパ液内移行について. Japanese Journal of Antibiotics 25: 99~103, 1972
- 2) NISHIDA, M. & T. MURAKAWA: Exudate levels and bactericidal activity of Cefazolin in a new local infection system using rat granuloma pouches. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 1042~1048, 1977
- 3) 松原秀三, 遠藤久男, 小川春樹, 小山憲次朗: Ceftezole のラット炎症 pouch 内実験的感染に対する効果. Chemotherapy 24: 748~752, 1976
- 4) 渡辺泰雄, 西田亨子, 山本恵美子, 林 敏雄, 西田 隆, 才川 勇: ラット Pouch 内実験的感染における薬剤の効果. Chemotherapy 27: 865~869, 1979
- 5) KUNIN, C. M.: Therapeutic implications of serum protein binding of the new semisynthetic penicillins. Antimicrob. Agents Chemother.-1965 1025~1034
- 6) SELYE, H.: Use of "granuloma pouch" technique in the study of antiphlogistic corticoid. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 82: 328~333, 1953
- 7) 佐橋作郎, 小島敏昌, 市川正人, 笹原邦宏: CS 1170 (CMZ) の体液内濃度測定法に関する研究. Chemotherapy 26 S-5: 127~137, 1978
- 8) 菅原真一, 田島政三, 五十嵐勇, 宇津井幸男, 大塚 哲, 中原正城: 新セファマイシン系抗生物質 CS 1170 の抗菌活性. Chemotherapy 26 S-5: 81~98, 1978
- 9) CRAIG, W. A. & C. M. KUNIN: Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. Ann. Rev. Med. 27: 287~300, 1976
- 10) CRAIG, W. A. & P. G. WELLING: Protein binding of antimicrobials: Clinical pharmacokinetics and therapeutic implications. Clinical Pharmacokinetics 2: 252~268, 1977
- 11) VERWEY, W. E. & H. R. WILLIAMS: Binding of various penicillins by plasma and peripheral lymph obtained from dogs. Antimicrob. Agents Chemother.-1962, 484~491
- 12) McQUEEN, M. G.: Comparison of tissue fluid and plasma concentrations of a protein-bound drug sulphormethoxine by *in vivo* dialysis in rats. Brit. J. Pharmac. Chemother. 33: 312~318, 1968

## EXUDATE LEVELS AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF CEFMETAZOLE IN A LOCAL INFECTION SYSTEM USING RAT GRANULOMA POUCHES

MASAFUMI HISAOKA and TOSHIMASA KOZIMA

Product Development Laboratories, Sankyo Company, Ltd.

Penetration of cefmetazole into exudate and its bactericidal activity were studied in a local infection system using rat granuloma pouches comparing with cefazolin. The result showed that serum and exudate levels of total (bound and unbound) cefmetazole were found to be lower than those of cefazolin, but unbound levels of cefmetazole were higher than those of cefazolin. The inhibitory effect of cefmetazole on the growth of *E. coli* inoculated into the pouches was observed at the dose of 10 mg/kg being almost equal to that of cefazolin at the dose of 40 mg/kg. And the effect of cefmetazole was enhanced with increase of the dose.