

生体内濃度に simulate した *in vitro* model での Piperacillin の殺菌作用

山城芳子・福岡義和・保田 隆・才川 勇

富山化学工業株式会社総合研究所

(昭和 57 年 5 月 10 日受付)

ヒト血中濃度に simulate した *in vitro* model を用いて *Escherichia coli* と *Pseudomonas aeruginosa* に対する Piperacillin (PIPC) の殺菌効果を検討した。使用した model は 1g の筋注, one shot 静注, 1 時間点滴静注および 2g one shot 静注に対応した one compartment model あるいは two compartment model である。

1g 投与の *in vitro* model で比較すると, *P. aeruginosa* IFO 3445 に対して one shot 静注より筋注時の方が殺菌効果が優れていた。しかし *E. coli* NIHJ JC-2 に対して投与方法の差は顕著でなく, 点滴静注, 筋注時の方が one shot 静注よりわずかに優れている程度にとどまった。

one shot 静注の *in vitro* model において, 両菌株に対し 1g より 2g 投与時の方が強い殺菌効果を示し, dose response が認められた。しかし penicillinase 産生株の *E. coli* TK-3 に対しいずれの投与方法でも殺菌効果は示さなかった。

また, PIPC と同様に antipseudomonas  $\beta$ -lactam 系抗生物質の CBPC について 1g 筋注時の殺菌効果を *P. aeruginosa* IFO 3445 に対して検討した結果, ほとんど菌の生育を抑制せず, PIPC に比べて殺菌効果は弱かった。

生体内に投与された抗生物質は, 投与条件に対応した生体内濃度を与え, かつ gradient な濃度変化を示す。一般に抗生物質の *in vitro* 抗菌力は, 生体内での動態を考慮せず一定濃度を維持した静的な条件下で評価されている。そこで GRASSO ら<sup>1)</sup>や, 村川ら<sup>2)</sup>は, ヒトにセファロsporin 剤を投与して得られた pharmacokinetics の one compartment または two compartment 理論を応用して *in vitro* model を考案し, この model を用いて抗生物質の投与量や投与方法が及ぼす殺菌作用について検討している。

今回, われわれは Piperacillin について生体内濃度変化を加味した *in vitro* model を作製し, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌作用を投与量, 投与方法との関連において検討した。なお, *P. aeruginosa* については Carbenicillin と比較したので併せて報告する。

## I. 実験材料および実験方法

## 1. 使用薬剤

Piperacillin (PIPC, 富山化学工業株式会社), Carbenicillin (CBPC, 藤沢薬品工業株式会社) を用いた。

## 2. 被験菌

標準菌株の *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3445, 臨床分離菌の *E. coli* TK-3 を用いた。

## 3. 抗菌力測定

Nutrient broth (NB, 栄研) で 37°C, 1 夜培養した菌液を, 薬剤の倍数希釈濃度を含む NB 中に約  $10^4 \sim 10^6$  cells/ml となるように接種し, 37°C, 18 時間培養した後肉眼的に菌の増殖が認められなかった最小濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。MIC 測定後, 各培養液の 1 白金耳を薬剤を含まない Heart infusion agar (栄研) 平板上に塗布し, 37°C, 20 時間培養後コロニーを全く認めない濃度を最小殺菌濃度 (MBC) とした。

4. *In vitro* model での殺菌力測定

筋注時に得られた血中濃度に simulate した model として GRASSO ら<sup>1)</sup>が報告した model を用いた。PIPC および CBPC の 1g を健康成人男子に筋注したときの pharmacokinetic parameter<sup>3)</sup> および kinetic model 作製のための流速・流量は Table 1 に示した。

one shot 静注および点滴静注に対応した model として, 村川ら<sup>2)</sup>が報告した model を用いた。PIPC の 1g および 2g の one shot 静注したときの pharmacokinetic parameter<sup>3)</sup> および kinetic model 作製のための流速・流量は Table 2 に示した。なお PIPC の 1g 1 時間点滴静注の条件は 1g one shot 静注時の pharmacokinetic parameter を用いた。

両 model では NB を培地として用い, 装置の始動後経時的にサンプリングを行なった。被検液は 3,500rpm

Table 1 Pharmacokinetic parameter of PIPC and CBPC, and value of flow rate and volume for apparatus adjusted to simulate serum concentration after i. m. injection of 1g to healthy human

| Parameter*<br>Drug | $K_a$ (hr <sup>-1</sup> ) | $K_e$ (hr <sup>-1</sup> ) | $V$ (L) | $V_A$ (ml) | $V_B$ (ml) | $F$ (ml/min) |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------|------------|------------|--------------|
| PIPC               | 4.07                      | 0.94                      | 18.27   | 204        | 47         | 3.2          |
| CBPC               | 1.15                      | 0.65                      | 25.4    | 166.2      | 94         | 1.8          |

\* The abbreviations were written according to the reference

Table 2 Pharmacokinetic parameter of PIPC, and value of flow rate and volume for apparatus adjusted to simulate serum concentration after i. v. injection to healthy human

| Parameter*<br>PIPC dose | $C_0$ (μg/ml) | $K_e$ (hr <sup>-1</sup> ) | $K_{12}$ (hr <sup>-1</sup> ) | $K_{21}$ (hr <sup>-1</sup> ) | $\alpha$ (hr <sup>-1</sup> ) | $\beta$ (hr <sup>-1</sup> ) | $a$ (ml) | $b$ (ml) | $F_1$ (ml/min) | $F_2$ (ml/min) |
|-------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------|----------|----------------|----------------|
| 1g                      | 91.7          | 1.57                      | 1.06                         | 3.27                         | 4.84                         | 1.06                        | 200      | 64       | 5.23           | 3.53           |
| 2g                      | 174.1         | 1.26                      | 0.63                         | 3.72                         | 4.59                         | 1.02                        | 300      | 51       | 6.3            | 3.15           |

\* The abbreviations were written according to the reference

Table 3 Correlation between MIC and MBC

| Organism                         | Inoculum size (cells/ml) | PIPC (μg/ml) |        | CBPC (μg/ml) |       |
|----------------------------------|--------------------------|--------------|--------|--------------|-------|
|                                  |                          | MIC          | MBC    | MIC          | MBC   |
| <i>E. coli</i> NIHJ JC-2         | $2.95 \times 10^4$       | 6.25         | 6.25   | NT           | NT    |
|                                  | $2.95 \times 10^5$       | 6.25         | 6.25   | NT           | NT    |
|                                  | $2.95 \times 10^6$       | 6.25         | 200    | NT           | NT    |
| <i>E. coli</i> TK-3              | $2.47 \times 10^4$       | 800          | >3,200 | NT           | NT    |
|                                  | $2.47 \times 10^5$       | 3,200        | >3,200 | NT           | NT    |
|                                  | $2.47 \times 10^6$       | >3,200       | >3,200 | NT           | NT    |
| <i>P. aeruginosa</i><br>IFO 3445 | $4.48 \times 10^4$       | 3.13         | 6.25   | 50           | 100   |
|                                  | $4.48 \times 10^5$       | 6.25         | 800    | 50           | 100   |
|                                  | $4.48 \times 10^6$       | 6.25         | 800    | 100          | 1,600 |

NT: Not tested

10 分間の遠心，生理食塩水による 1 回洗浄により薬剤を完全に除去し，生理食塩水で菌体を懸濁した後，常法に従って生菌数を測定した。なお，この条件下で， $10^3$  cells/ml 以上の菌数は約 90% 以上の回収率を示した。

## II. 結 果

### 1. 抗菌力

PIPC の MIC は，*E. coli* NIHJ JC-2，*P. aeruginosa* IFO 3445 に対し接種菌量の影響をあまり受けず  $10^5$  cells/ml 接種時ともに 6.25 μg/ml であったが，MBC は接種菌量の影響を受け高菌量では高値を示した。また penicillinase 産生菌である *E. coli* TK-3 に対して PIPC は抗菌活性を示さなかった。

CBPC の MIC は *P. aeruginosa* IFO 3445 に対し  $10^5$  cells/ml 接種時 50 μg/ml で PIPC に比べて劣っていた。

### 2. PIPC の各投与法による血中濃度と殺菌効果

#### 1) 投与法による血中濃度

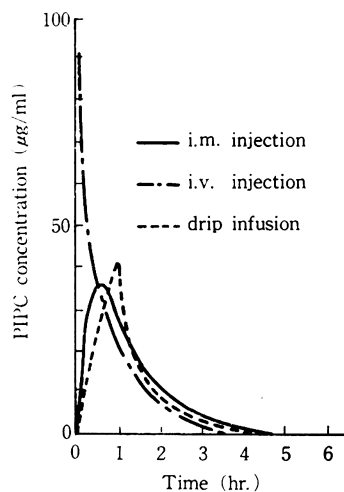
PIPC 1g 筋注時，1g one shot 静注時，1g 点滴静注時のヒト血中濃度を Fig. 1 に示した<sup>3)</sup>。最高血中濃度はそれぞれ 35.4 μg/ml，91.7 μg/ml，40.8 μg/ml であり，筋注と点滴静注ではほぼ同様の推移を示した。この成績により，*E. coli* NIHJ JC-2，*P. aeruginosa* IFO 3445 に対する MIC 値 (6.25 μg/ml) 以上の PIPC 濃度持続時間は，one shot 静注で約 2 時間，筋注で約 2.5 時間，点滴静注では約 2.3 時間となるが，*E. coli* TK-3 に対しては MIC 値以上の PIPC 濃度は得られなかった。

#### 2) 血中濃度に simulate したときの PIPC の殺菌効果

上記の成績に対応する *in vitro* model を用いた PIPC の殺菌効果を Fig. 2 に示す。

*E. coli* NIHJ JC-2 に対して筋注および点滴静注時と

Fig. 1 Serum concentration of PIPC after i. m. injection, i. v. injection and drip infusion of 1g to healthy human

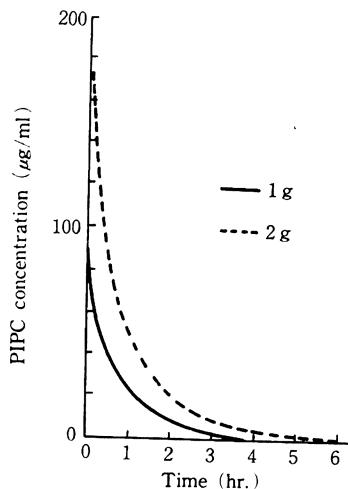


もに3時間で生菌数が約  $10^3$  cells/ml と最も抑制していた。一方, one shot 静注時3時間後では約  $10^4$  cells/ml であり, 他の投与方法に比べてわずかに劣っていた。しかし, 4時間目以後の菌数は3投与方法ともに差がなく, 投与方法による差異は認められなかった。

*E. coli* TK-3 に対して one shot 静注, 筋注時ともに殺菌効果は認められなかった。

*P. aeruginosa* IFO 3445 に対しては筋注および one

Fig. 3 Serum concentration of PIPC after i. v. injection of 1g or 2g to healthy human



shot 静注時ともに4時間で菌の生育を最も抑制し, 以後再増殖が認められた。しかし, 殺菌効果は one shot 静注より筋注時の方が優れており, 投与方法による差異が認められた。

3. one shot 静注時の投与量による血清中濃度と殺菌効果

1) 投与量による血清中濃度

PIPC の 1g および 2g one shot 静注時のヒト血中濃度を Fig. 3 に示した<sup>3)</sup>。最高血中濃度は 1g で 91.7

Fig. 2 Bactericidal activity of PIPC in *in vitro* model simulating serum concentration after i. m. injection, i. v. injection and drip infusion of 1g to healthy human

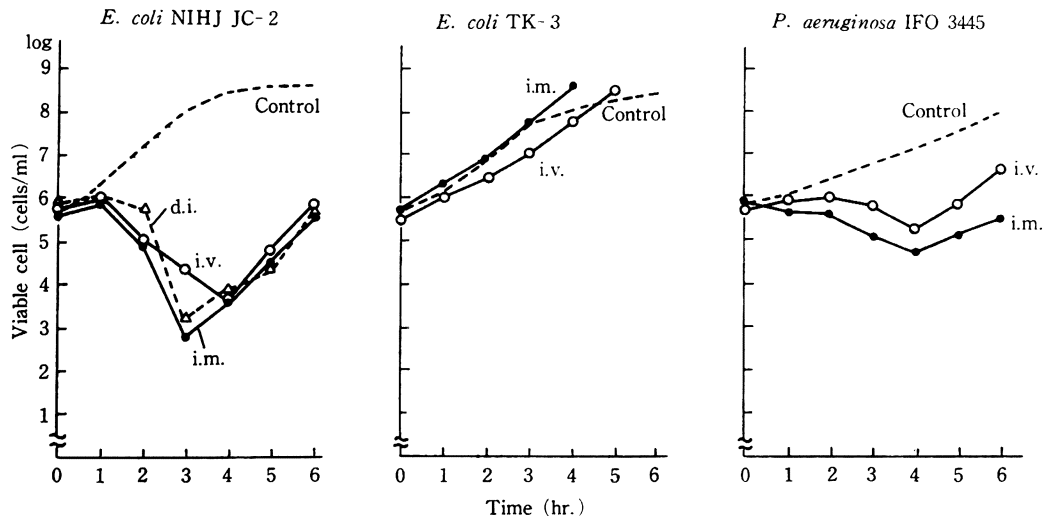
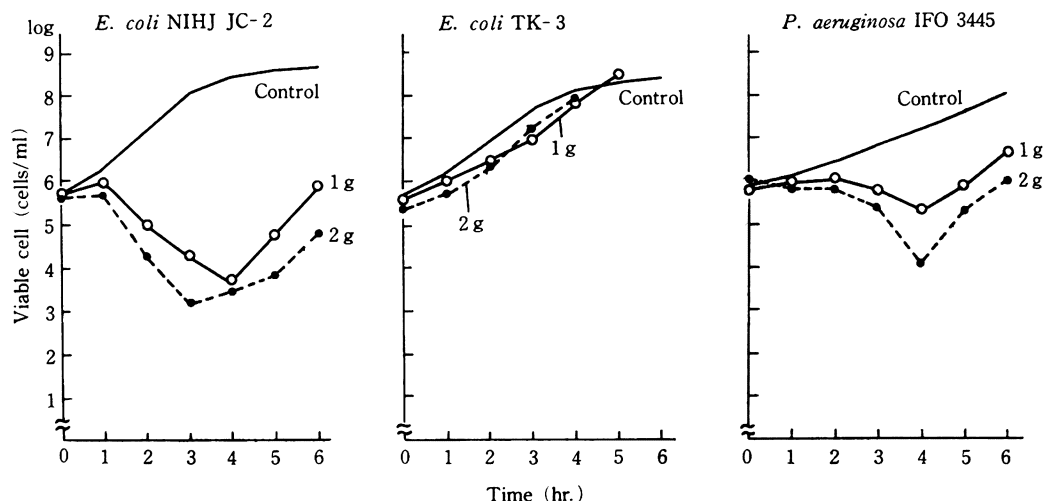


Fig. 4 Bactericidal activity of PIPC in *in vitro* model simulating serum concentration after i. v. injection 1g or 2g to healthy human



$\mu\text{g/ml}$ , 2g で  $174.1 \mu\text{g/ml}$  であり, dose response がみられた。 *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 に対する MIC 値以上の PIPC 濃度持続時間は 1g で約 2 時間, 2g で約 3 時間であり, *E. coli* TK-3 に対してはともに MIC 値以上の濃度は得られなかった。

## 2) 血清中濃度に simulate したときの PIPC の殺菌効果

上記の成績に対応する *in vitro* model を用いた PIPC の殺菌効果を Fig. 4 に示した。

*E. coli* NIHJ JC-2 に対しては投与量が反映して, 1g 投与時よりも 2g 投与時の方が殺菌効果は増大し, 菌と接触後 2 時間から 6 時間まで約  $1/10$  の菌量差で推移していた。

しかし, PIPC 耐性の *E. coli* TK-3 に対しては投与

量が 1g または 2g でも増殖を抑制せず殺菌効果は認められなかった。

*P. aeruginosa* IFO 3445 に対しては, *E. coli* NIHJ JC-2 と同様であり, 2g は 1g 投与時より殺菌効果が優れていた。

## 4. PIPC, CBPC 筋注時の血清中濃度と殺菌効果

### 1) 1g 筋注時の血清中濃度

PIPC および CBPC の 1g 筋注時のヒト血中濃度を Fig. 5 に示す<sup>3)</sup>。 PIPC は 30 分後に  $35.4 \mu\text{g/ml}$  の最

Fig. 6 Bactericidal activity of PIPC and CBPC against *P. aeruginosa* IFO 3445 in *in vitro* model simulating serum concentration after i. m. injection of 1g to healthy human

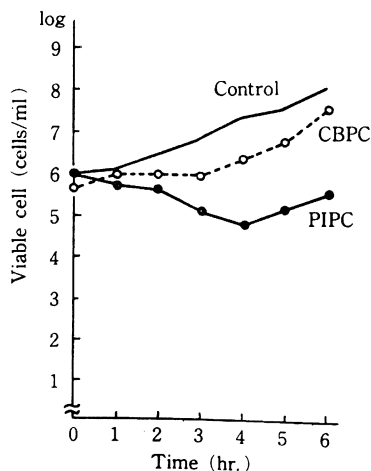
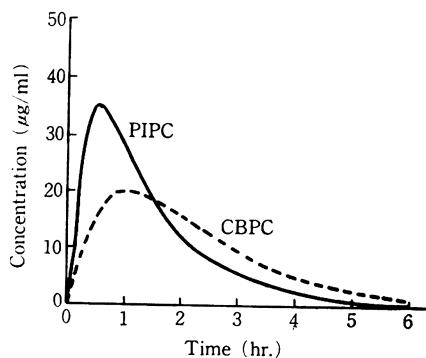


Fig. 5 Serum concentration of PIPC and CBPC after i. m. injection of 1g to healthy human



高血中濃度を示し、その後速やかに消失するが、CBPC は1時間後に 20  $\mu\text{g/ml}$  の最高血中濃度を示し、その後 PIPC に比べゆるやかに消失した。*P. aeruginosa* IFO 3445 に対する MIC 値以上の PIPC 濃度持続時間は約 2.5 時間であるのに対し、CBPC は MIC 値以上の濃度は得られなかった。

2) 血清中濃度に simulate したときの PIPC, CBPC の殺菌効果

上記の成績に対応した *in vitro* model を用いた殺菌効果を Fig. 6 に示す。PIPC は投与4時間後まで菌の増殖を抑制し、その後の再増殖もゆるやかで、6時間後で約  $10^5$  cells/ml であった。これに対し CBPC は菌の増殖をほとんど抑制せず6時間後約  $10^7$  cells/ml の生菌数となり、殺菌効果はほとんど認められなかった。

### III. 考 察

生体内に投与された抗生物質は投与条件に対応した生体内濃度を与え、かつ gradient な濃度変化を示す。一般に抗生物質の *in vitro* 抗菌力は、生体内での薬剤の動態を考慮せず静的な薬剤濃度条件下で評価されている。

そこでわれわれは、PIPC をヒトに投与した際に得られた血中濃度に simulate した *in vitro* model を作製し、この model を用いて PIPC の殺菌効果を検討した。使用した model は GRASSO ら、村川らの報告した one compartment model や two compartment model である。

各々の菌株について各投与方法での PIPC 濃度が MIC 値以上に持続される時間を比較した。PIPC の MIC が 6.25  $\mu\text{g/ml}$  である *E. coli* NIHJ JC-2, *P. aeruginosa* IFO 3445 に対して 1g の one shot 静注で約2時間、筋注では約 2.5 時間、1時間点滴で約 2.3 時間、2g one shot 静注で約3時間であった。また *E. coli* TK-3 に対しては PIPC の MIC が 3,200  $\mu\text{g/ml}$  であり、いずれの投与方法でも MIC 値以上の PIPC 濃度は得られ

なかった。

この model を用いて PIPC の殺菌効果を検討した結果、MIC 値以上の PIPC 濃度持続時間が殺菌効果に反映しており、持続時間が長いほど殺菌効果が強かった。すなわち、1g one shot 静注よりも筋注や点滴 静注の方が効果的であり、1g より 2g one shot 静注の方が優れた殺菌効果を示した。

次に antipseudomonas 作用を有する CBPC の *P. aeruginosa* IFO 3445 に対する 1g 筋注時の殺菌効果を PIPC と比較した。筋注時に得られる CBPC の最高血中濃度は 20  $\mu\text{g/ml}$  で、MIC 濃度 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) には達しない。それゆえ、CBPC の殺菌効果は MIC 値以上の濃度持続時間が約 2.5 時間の PIPC より劣っていた。

*In vivo* 効果は抗生物質の血中濃度推移のほか宿主条件が関与しているので *in vitro* 効果のみからは厳密には論じられないが、今回検討した *in vitro* model を用いることにより、抗生物質の投与量または投与方法の差異によって生じる薬剤濃度およびその持続時間が、種々の菌に対する殺菌効果に大きな影響を及ぼすことが判明した。

### 文 献

- 1) GRASSO, S.; G. MEINADRI, I. D. CARNERI & V. TAMASSIA: New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob. Agents & Chemoth. 13: 570~576, 1978
- 2) 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)。Chemotherapy 28: 26~30, 1980
- 3) 中島良文, 保田 隆, 渡辺泰雄, 酒井広志, 清水悦郎, 松原信之, 才川 勇: T-1220 の薬動力学的研究。Jap. J. Antibiotics 25: 582~586, 1977
- 4) 植尾健次, 田井 賢, 林 敏雄, 福岡義和, 三橋進: T-1220 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について。Chemotherapy 25: 700~709, 1977

## BACTERICIDAL ACTIVITY OF PIPERACILLIN IN IN VITRO MODEL SIMULATING HUMAN SERUM LEVEL

YOSHIKO YAMASHIRO, YOSHIKAZU FUKUOKA, TAKASHI YASUDA and ISAMU SAIKAWA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

Bactericidal activity of piperacillin (PIPC) against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated using the *in vitro* model simulating serum concentration after i.m. injection (1 g), i.v. injection (1 g and 2 g) and drip infusion (1 g/ 1 hr.) to healthy human.

When bactericidal activity of PIPC in *in vitro* model simulating serum concentration after administration at dose of 1 g was studied, it was found that i.m. injection was superior to i.v. injection on *P. aeruginosa* IFO 3445 (MIC : 6.25  $\mu$ g/ml), while the difference among i.m. injection, i.v. injection and drip infusion was hardly recognized on *E. coli* NIHJ JC-2 (MIC : 6.25  $\mu$ g/ml). Bactericidal activity of PIPC against the above organisms was dose dependent in 1 g and 2 g of i.v. injection.

On the other hand, against penicillinase producing *E. coli* TK-3 (MIC : >3,200  $\mu$ g/ml), any administered route of PIPC showed no bactericidal activity.

The i.m. injection of carbenicillin showed less bactericidal activity against *P. aeruginosa* IFO 3445 (MIC : 50  $\mu$ g/ml) in comparison to that of PIPC.