

## セフェム剤のラット肺内移行性におよぼす血清蛋白結合の影響

俵 修一・松本 哲・松本 佳巳・上村 利明

藤沢薬品工業新薬研究所\*

五島 瑛智子

東邦大学医学部微生物学教室

(平成3年10月26日受付・平成4年1月29日受理)

セフェム剤のラット肺内移行性におよぼす血清蛋白結合の影響について、(1)投与法の影響、(2)感染病巣への移行性、(3)血清中遊離体濃度と移行率との関係の3つの観点から検討し、以下の成績を得た。

(1) 正常ラットにおいて、血清蛋白結合率の高いcefazolin (CEZ), ceftriaxone (CTRX), cefuzonam (CZON) の肺内移行率は結合率の低いceftizoxime (CZX), ceftazidime (CAZ) に比べ、bolus 静注ではやや低い傾向にあったが大差は認められなかった。一方、点滴静注により血清中濃度を一定濃度に保ち肺内濃度と平衡あるいはそれに近似する状態では移行率が約1/2~1/3に低下した。

(2) *Klebsiella pneumoniae*による肺炎ラットに各薬剤を点滴静注した場合、血清蛋白結合率の高い薬剤は低い薬剤に比べその肺内移行率は絶じて低い傾向にあった。しかし、重症肺炎ラットにおいては、正常ラットに比べその肺内移行率は約1.5~2倍に上昇した。一方、蛋白結合率の低い薬剤は、いずれの動物においてもその移行率の変動は小さかった。

(3) 正常ラットにbolus で静注した場合には血清中遊離体濃度と肺内濃度の間には相関性は認められなかったが、点滴静注により血清中濃度が一定に達した状態ではある程度の相関性が認められた。

以上の成績より、血清蛋白結合は組織移行性を左右する重要な因子ではあるが、血清中濃度半減期や肺内濃度との平衡関係の有無、感染の程度によってもその影響は異なり、遊離体濃度に加えこれらの因子についても十分考慮した上で移行性を論じる必要があることが示唆された。

**Key words:** セフェム剤、肺内移行、蛋白結合、遊離体濃度

抗菌薬の感染治療効果におよぼす血清蛋白結合の影響については種々の動物モデルで検討されてきたが<sup>1~7)</sup>、一定の結論が得られていない。我々はさきに動物感染モデルの種類によってその影響が異なることを報告した<sup>8)</sup>。抗菌薬の血清蛋白結合は、その抗菌活性および体内動態に影響をおよぼすことが知られており、その両面から感染治療効果に影響をおよぼすものと考えられる。抗菌活性への影響については一致した見解が得られており、遊離体のみが活性を示すとされている<sup>9,10)</sup>。一方、薬剤の組織および炎症巣への移行性におよぼす影響については種々のヒトおよび動物モデルで検討されているが、影響するという報告<sup>11~17)</sup>と影響しないという報告<sup>18~22)</sup>とがあり見解が分かれてい

る。このような不一致の理由として、(1) 使用した動物種および実験モデルの違い、(2) 感染および炎症の度合いの違い、(3) 投与法の違い(単回投与、連続投与など)、(4) 使用薬剤の違い(ペニシリソ、セフェム、アミノグリコシドなど)が考えられる。

以上のことを考慮し、ラットにおけるセフェム剤の組織移行性におよぼす血清蛋白結合の影響について、(1) 薬剤が移行しにくく、特に感染局所の薬剤濃度がその治療効果にとって重要である、(2) 薬剤の排泄器官ではないので、血中濃度対比での移行性が検討できる、という2つの理由から組織として肺を選び、(1) 投与法の影響、(2) 感染病巣への移行性、(3) 血清中遊離体濃度と移行率と

\* 大阪市淀川区加島 2-1-6

の関係、の3つの観点から検討したので報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 使用薬剤

Cefazolin(CEZ, 藤沢薬品), ceftriaxone(CTX, 日本ロッシュ), cefuzonam (CZON, (日本レガリ-) ceftizoxime (CZX, 藤沢薬品) および ceftazidime (CAZ, 日本グラクソ) を用いた。

### 2. 使用動物

SD系ラット、雄、6週齢を用いた。

### 3. 使用菌株

臨床分離の *Klebsiella pneumoniae* B-54 を用いた。

### 4. 実験的肺炎ラットの作成

#### (1) 菌液の調製

*K. pneumoniae* B-54 を Trypticase Soy agar (BBL) 斜面培地で 37°C, 20時間培養した後生理食塩水に  $1 \times 10^9$  CFU/ml となるように浮遊させた。

#### (2) 感染方法

重症肺炎モデル A は、Bakker-Woundenberg ら<sup>7</sup>の方法にほぼ準じ以下のごとく作成した。ペントバルビタールで麻酔したラットの頸部皮膚を正中切開して気管を露出した後、気管内にポリエチレンチューブを挿入して試験菌液 0.1 ml,  $1 \times 10^8$  CFU を注入し、48 時間後に使用した。また、軽症肺炎モデル B は、麻酔下のラットにモデル A と同量の菌液を経鼻的に注入し、20 時間後に使用した。この両条件における感染の成立を組織標本の観察により確認した。

#### (3) 肺内菌数の測定

経時に、放血致死させた一群3匹のラットの肺を無菌的に採取し、生食 10 ml を加えてポリトロンホモジナイザーで均質にした後、生食で連続 10 倍希釈し、その 1 ml を取り Trypticase Soy agar で混ぜた。37°Cで一夜培養後形成されたコロニーをカウントし、肺当たりの生菌数を求めた。

### 5. 薬剤の投与方法

#### (1) Bolus 静注

各薬剤を生理食塩水に溶解後、尾静脈より 20 mg/5 ml/kg の投与量にて約 5 秒間で静注した。

#### (2) 点滴静注

ラットの大軸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、インフュージョンポンプを用いて 1.5 ml/h の速度で 3 時間点滴静注した。血清中濃度が一定レベルに達した時の各薬剤の濃度が等しくなるように、以下のごとく投与量を調整した。CEZ; 20 mg/kg/h, CTRX; 10 mg/kg/h, CZON; 35 mg/kg/h, ZX; 75 mg/kg/h, CAZ; 35 mg/kg/h。

### 6. Bioassay による濃度測定

各薬剤の濃度は以下の検定菌および培地を使用し、Disc (TOYO, Thin 8 M/M DIA) 法により測定した。すなわち、CEZ, CZON は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とし、クエン酸培地 (ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.3%, クエン酸ナトリウム 0.8%, 寒天 1.0%) で、CTX, ZX, CAZ は *Escherichia coli* ATCC 39188, Nutrient agar (Difco) を用いてそれぞれ測定した。

### 7. 肺内移行率の測定

#### (1) 血清中濃度および肺内濃度の測定

大腿動脈を切断して血液を採取し、放血致死させた後に肺を採取した。Bolus 静注の場合は、CEZ, CZON, ZX および CAZ について薬剤投与後 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 時間目に、CTX については薬剤投与後 0.25, 1.0, 2.0, 3.0 時間目にそれぞれ血液および肺を採取した。点滴静注の場合は、薬剤投与開始後血清中濃度が一定となった 1 時間目と投与を終了した 3 時間目に血液および肺を採取した。血清中濃度は、 $3,000 \times g$  で 10 分遠心して得られた血清を測定試料とし、血清で作成した標準曲線により bioassay 法で測定した。肺内濃度は、肺 1 g 当たり 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 2 ml 加えてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした後  $10,000 \times g$  で 10 分遠心して得られた上清を測定試料とし、肺ホモジネート上清で作成した標準曲線により bioassay 法で測定した。正常ラットおよび軽症肺炎モデル B については肺全体の濃度を求めた。重症肺炎モデル A では肉眼観察で病巣と思われる部分は、暗赤色を呈し固く膨らんでいるのに対し、正常と思われる部分は桃色で弾力があり、明瞭に区別できたので、肺全体と病巣部分とについて濃度を求めた。

肺内濃度の測定においては、摘出した肺を洗浄しても肺内に含まれる血液を完全に除去することはできず、この混入血液の影響を無視することはできない。そこで、シアノメトヘモグロビン法<sup>23)</sup>により、アキュグロビン (Ortho Diagnostic Systems) を標品として肺ホモジネート上清および血液中のヘモグロビン量を測定し、肺ホモジネート上清 1 ml 中に含まれる血液量を求めた。一群 5 匹のラットについて測定した結果、個体ごとのばらつきが小さかったので、以下に示す平均値を用い、次式により肺内濃度を補正した。

$$C_L = (C_{LH} - V_B \times C_B) \times 3$$

$C_L$ : 肺内濃度

$C_{LH}$ : 肺ホモジネート上清中薬剤濃度

$V_B$ : 肺ホモジネート上清中血液量

$C_B$ : 血液中薬剤濃度

$V_B$  (平均値±標準偏差):

正常ラット;  $0.044 \pm 0.004$  ml

感染モデル A (肺全体);  $0.031 \pm 0.003$  ml

感染モデル A (病巣);  $0.016 \pm 0.002$  ml

感染モデル B;  $0.041 \pm 0.004$  ml

## (2) 肺内移行率

肺内濃度と血清中濃度の AUC (area under the concentration-time curve) 比を求め移行率とした。Bolus 静注後の血清中濃度 AUC は two-compartment model により、肺内濃度 AUC は吸収過程を含む one-compartment model により解析し、NON-LIN プログラムより求めた。点滴静注の場合は、血清中濃度が一定となった 1 時間目から投与を終了した 3 時間目までの AUC を台形法により求めた。

8. 血清蛋白結合率および血清中遊離体濃度の測定  
遠心限外濾過法により測定した。1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で各薬剤の  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を調製し、薬剤溶液 1 容とラット血清 9 容を混合し  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。この反応液を visking チューブ (8/32, 三光純薬) に入れ、 $1,000 \times g$  で 30 分遠心した後濾液中濃度を bioassay 法で測定した。濾液中濃度を X、対照として血清の代わりにリン酸緩衝液を用いて同様の操作をして得られた値を Y として、次式により結合率を算出した。

$$\text{結合率} (\%) = \frac{Y - X}{Y} \times 100$$

血清中遊離体濃度は、各時点で得られた血清サンプルにつき、同様の方法で測定した。

## 9. 病理組織学的検討

正常、感染モデル A (感染 48 時間後)、感染モデル B (感染 20 時間後) の各ラットを放血致死させて肺を摘出し、10% 中性ホルマリンで固定後常法に従いパラフィンで包埋し、ミクロトームで組織切片を作成した。ヘマトキシン・エオジン染色後顕微鏡観察を行った。

## II. 結 果

### 1. 血清蛋白結合率

Table 1 に本実験で使用したセフェム剤のラット血清に対する結合率を示す。CEZ, CTRX, CZON はいずれも 90% 以上の高い結合率を示したのに対し、CZX, CAZ は 30% 以下の低い結合率であり、すでに報告されている成績とほぼ一致した結果が得られた。

### 2. 投与法の影響

セフェム剤の単回投与と連続投与<sup>24,25)</sup>、ペニシリソルあるいはアミノ配糖体の筋注での連続投与と点滴静

Table 1. Serum protein binding rates of cephalosporin antibiotics in rats

| Drug        | % bound        |
|-------------|----------------|
| Cefazolin   | $91.9 \pm 3.0$ |
| Ceftriaxone | $90.7 \pm 3.0$ |
| Cefuzonam   | $92.3 \pm 0.1$ |
| Ceftizoxime | $25.8 \pm 8.8$ |
| Ceftazidime | $21.3 \pm 2.7$ |

The percentage of binding to rat serum at a concentration of  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  was determined by the ultrafiltration method. Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of 2 determinations.

注<sup>26)</sup>とでは炎症巣への薬剤移行における血清蛋白結合の影響が異なることが報告されており、投与法によりセフェム剤の肺内移行性における血清蛋白結合の影響も異なることが考えられた。そこで、ラットに各薬剤の  $20 \text{ mg}/\text{kg}$  を bolus で静注した後の非感染肺組織への移行率と、点滴静注により血清中濃度を一定レベルに保った状態での移行率とを比較した。

Table 2 に示すように bolus 静注後の CZX, CAZ の移行率が 24~27% であったのに対し、CEZ, CTRX, CZON の移行率は 16~20% であり、やや低い傾向にあったものの大差は認められなかった。一方、点滴静注により各薬剤の血清中濃度をほぼ同等のレベルに維持させた状態では、CEZ, CTRX, CZON の移行率は 8~11% となり、bolus の静注時の約 1/2 に減少した。しかし、CZX, CAZ の移行率は 25~27% と両条件下で変動がみられなかった。以上のように、蛋白結合率の高いセフェム剤 CEZ, CTRX および CZON の非感染肺組織への移行率は、投与方法によって顕著に影響されたが、他方、結合率の低い CZX および CAZ ではほとんど影響を受けなかった。

### 3. 感染病巣移行性における血清蛋白結合の影響

以上のように、CEZ, CTRX および CZON では点滴静注した場合に血清蛋白結合が影響して非感染肺組織への移行率が低下したので、次に、点滴静注後の各薬剤の感染病巣移行性における血清蛋白結合の影響を正常動物の場合と比較した。

Fig. 1 にラットの肺炎モデルの作成方法および感染後の肺内生菌数の推移を示す。ラットの気管内にポリエチレンチューブを挿入し、 $1 \times 10^8 \text{ CFU}$  の *K. pneumoniae* B-54 を感染させて作成した重症肺炎モデル A では、感染 1 日後より肺当たり約  $1 \times 10^8 \text{ CFU}$

Table 2. Effect of serum protein binding on the penetration of cephal antibiotics into the lungs of uninfected rats after intravenous bolus injection or drip infusion

| Drug        | iv bolus <sup>1)</sup>               |                          |                         |  |   |                  | drip infusion <sup>2)</sup>                                 |             |   |  |             |  |
|-------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--|---|------------------|---|-------------|---|--|-------------|--|
|             | serum <sup>3)</sup>                  |                          |                         | lung <sup>4)</sup>   |   |                  | penetration <sup>5)</sup>                                   | serum       | lung  | penetration <sup>6)</sup>                              |             |  |
|             | $C_0$<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | $t_{1/2}(\alpha)$<br>(h) | $t_{1/2}(\beta)$<br>(h) | $AUC_{0-\infty}$<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) | $C_{\text{max}}$<br>( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | $t_{1/2}$<br>(h) | $AUC_{0-\infty}$<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ ) | rate<br>(%) | $AUC_{1-3}$<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) | $AUC_{1-3}$<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ ) | rate<br>(%) |  |
| Cefazolin   | 118.2                                | 0.15                     | 0.42                    | 59.3   | 17.7  | 0.43             | 11.8  | 19.9        | 145.3   | 14.3   | 9.8         |  |
| Ceftriaxone | 116.2                                | 0.31                     | 0.72                    | 108.4  | 13.5  | 0.86             | 17.4  | 16.1        | 112.2   | 9.4  | 8.4         |  |
| Cefuzonam   | 82.0                                 | 0.36                     | 0.39                    | 45.5   | 15.5  | 0.33             | 8.1   | 17.8        | 115.5   | 13.2   | 11.4        |  |
| Ceftizoxime | 60.4                                 | 0.18                     | 0.21                    | 17.9   | 13.1  | 0.20             | 4.3   | 24.0        | 129.9   | 32.4   | 24.9        |  |
| Ceftazidime | 87.0                                 | 0.26                     | 0.27                    | 33.4   | 15.8  | 0.37             | 9.1   | 27.2        | 116.3   | 31.3   | 26.9        |  |

<sup>1)</sup> Drugs were given at a dose of 20 mg/kg.

<sup>2)</sup> Drugs were given at a dose of 20 mg/kg/h for cefazolin, 10 mg/kg/h for ceftriaxone, 35 mg/kg/h for cefuzonam, 75 mg/kg/h for ceftizoxime, and 35 mg/kg/h for ceftazidime.

<sup>3)</sup> The serum concentration-time data were fitted to a two-compartment model.

<sup>4)</sup> The lung level-time data were fitted to a single-compartment model.

<sup>5)</sup> Penetration rate (%) = (AUC of lung level/AUC of serum level) × 100

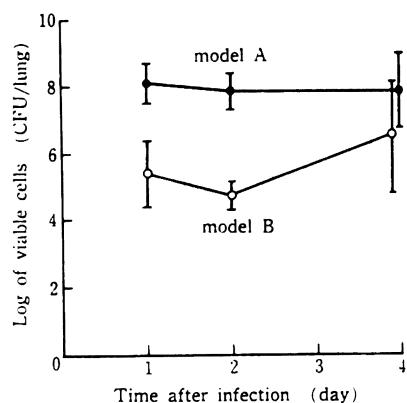


Fig. 1. Viable cell counts in the lungs of rats with pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* B-54. Model A: The trachea was intubated and the lung was inoculated with 0.1 ml of a saline suspension of *K. pneumoniae* B-54 containing  $1 \times 10^8$  CFU. Model B: Rats were inoculated intranasally with 0.1 ml of a saline suspension of *K. pneumoniae* B-54 containing  $1 \times 10^8$  CFU. Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of 3 rats.

の菌が検出され、4日後においてもほぼ同等の菌数が検出された。一方、モデル A とほぼ同量の菌を経鼻感染させて作成した軽症肺炎モデル B では、感染1日後から4日後にかけて肺当たり約  $1 \times 10^5$  CFU から  $1 \times 10^7$  CFU の菌が検出され、モデル A に比べ肺内生

菌数は 1/100 から 1/1,000 であった。肺病変の肉眼観察においてもモデル A の方が感染の程度は重篤であると思われたので、次にこのことを病理組織学的に確認した。正常ラット、肺炎モデル A および B の肺病理組織像を Fig. 2 に示す。モデル A では高度な好中球の浸潤、膿瘍形成、気管上皮および肺包上皮の部分的壊死、線維素の析出が認められ、広範な肺炎像を呈していた。一方、モデル B では部分的に正常な構造が残っており、好中球の浸潤を主とする巢状の肺炎像が認められた。

以上のように感染の程度の異なる 2 つのモデルを利用して、各薬剤の肺内移行性を検討した。その結果を Table 3 に示す。重症肺炎モデル A、軽症肺炎モデル B のいずれにおいても、血清蛋白結合率の高い CEZ、 CTRX、 CZON の肺内移行率は、正常ラットの場合と同様に蛋白結合率の低い CZX、 CAZ よりも低い傾向にあった。しかし、モデル A において CZX、 CAZ の肺内移行率が正常ラットの場合とほぼ同等であったのに対し、CEZ、 CTRX、 CZON の移行率はそれぞれ 1.7 倍、 1.5 倍、 1.6 倍に上昇した。一方、モデル B においては、いずれの薬剤についてもモデル A で見られたような明らかな移行率の上昇は認められなかつた。

重症肺炎モデル A において、血清蛋白結合率の高い薬剤の肺内移行率が、正常ラットおよび感染モデル B より高い傾向が認められたので、病巣部分のみについて移行率を算出した。その結果を Table 4 に示す。CZX、 CAZ の移行率は正常ラットに比べそれぞれ 1.2

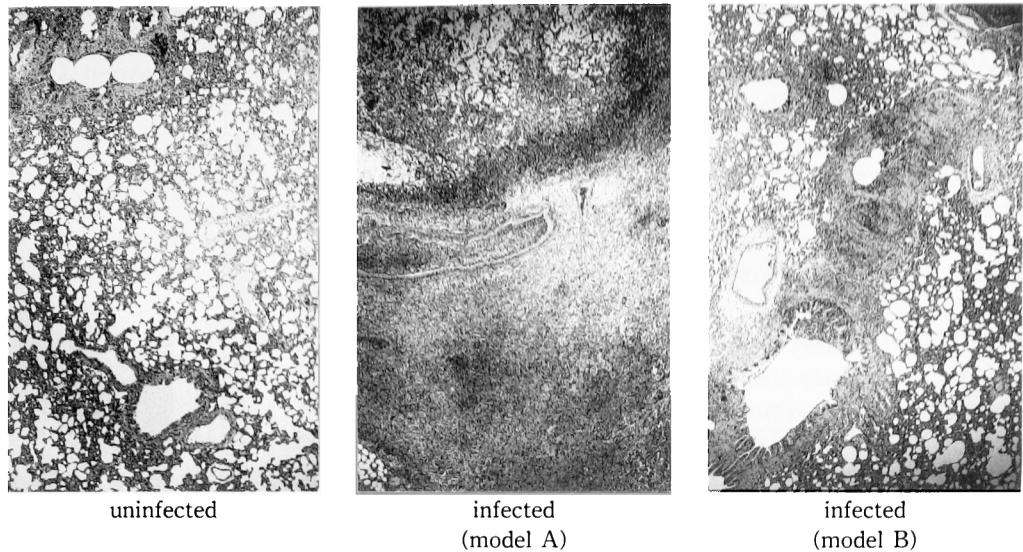


Fig. 2. Micrographs of lungs of rats with pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* B-54. Left, uninfected rats; Middle, infected rats (model A); Right, infected rats (model B) (HE stain,  $\times 40$ )

Table 3. Effect of serum protein binding on the penetration of cephalosporin antibiotics into the lungs of rats with pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* after drip infusion

| Drug <sup>1)</sup> | Infected rats (model A) <sup>2)</sup>                            |   |             | Infected rats (model B) <sup>3)</sup>                            |   |             | Uninfected rats |
|--------------------|--|---|-------------|--|---|-------------|-----------------|
|                    | Serum  | lung  | penetration | Serum  | lung  | penetration | penetration     |
|                    | AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ ) | AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{g}$ ) | rate<br>(%) | AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ ) | AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{g}$ ) | rate<br>(%) | rate<br>(%)     |
| Cefazolin          | 97.9   | 16.7  | 17.1        | 96.5   | 10.1  | 10.5        | 9.8             |
| Ceftriaxone        | 110.3  | 13.6  | 12.3        | 137.7  | 9.1   | 6.6         | 8.4             |
| Cefuzonam          | 122.2  | 22.5  | 18.4        | 121.6  | 16.9  | 13.9        | 11.4            |
| Ceftizoxime        | 107.7  | 26.0  | 24.1        | 115.5  | 30.6  | 26.5        | 24.9            |
| Ceftazidime        | 83.8   | 26.3  | 31.4        | 104.6  | 25.4  | 24.3        | 26.9            |

<sup>1)</sup> The dose of each drug was the same as in Table 1.

<sup>2)</sup> Drugs were given 48 h after inoculation of  $1 \times 10^8$  CFU of *K. pneumoniae* B-54 into the lung via a tube inserted into the trachea.

<sup>3)</sup> Drugs were given 20 h after intranasal inoculation of  $1 \times 10^8$  CFU of *K. pneumoniae* B-54.

倍, 1.3倍の上昇であったのに対し, 病巣部へのCEZ, CTRX, CZONの移行率はそれぞれ2.1倍, 2.2倍, 2.1倍に上昇し, 肺全体として求めたTable 3の結果がより明瞭となった。モデルAの感染病巣への移行率, モデルAの肺全体への移行率, モデルBの肺全体への移行率を正常ラットの場合を100として相対値で表わすとFig. 3のようになる。CZX, CAZに比べ, CEZ, CTRX, CZONは重症肺炎ラッ

トにおいて移行率が高まることが明らかとなった。

以上の結果より, 抗菌薬の肺内移行性におよぼす血清蛋白結合率の影響は, 感染の程度によっても異なることが示唆された。

#### 4. 血清中遊離体濃度と肺内移行率との関係

血清中遊離体濃度により炎症単移行性が左右されることが報告されているので<sup>14,17</sup>, 血清中遊離体濃度のAUC値と肺内濃度のAUC値の関係を調べた。正常

ラットに各薬剤 20 mg/kg を bolus で静注した場合の結果を Fig. 4 に示す。血清中 total 濃度と肺内濃度との間に原点に近い点を通る直線関係が成立し、両者の間に相関性が認められたのに対し、遊離体濃度と肺内濃度との間には 5 薬剤全部についてみると相関性は認められなかった。しかし、蛋白結合率の高い CZON, CEZ および CTRX の血清中遊離体濃度と肺内濃度との間には相関性が認められた。同様の関係が、蛋白結合率の低い CZX および CAZ の場合にも認められた。正常ラットに、各薬剤の血清中 total 濃度がほぼ同等となるように投与量を調整して点滴静注した場合の結果を Fig. 5 に示す。Bolus で静注した場合とは異なり、血清中 total 濃度と肺内濃度との間には相関性は

Table 4. Effect of serum protein binding on the penetration of cephal antibiotics into the infection foci of the lungs of rats with pneumonia (model A) induced by *Klebsiella pneumoniae* after drip infusion

| Drug        | serum<br>AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) | lung<br>AUC <sub>1-3</sub><br>( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$ ) | penetration<br>rate<br>(%) |
|-------------|---|---|----------------------------|
| Cefazolin   | 97.9  | 20.3  | 20.7                       |
| Ceftriaxone | 110.3   | 19.8  | 18.0                       |
| Cefuzonam   | 122.2   | 29.5  | 24.1                       |
| Ceftizoxime | 107.7   | 32.7  | 30.4                       |
| Ceftazidime | 83.8  | 29.8  | 35.5                       |

The experimental conditions were the same as described in Table 3.

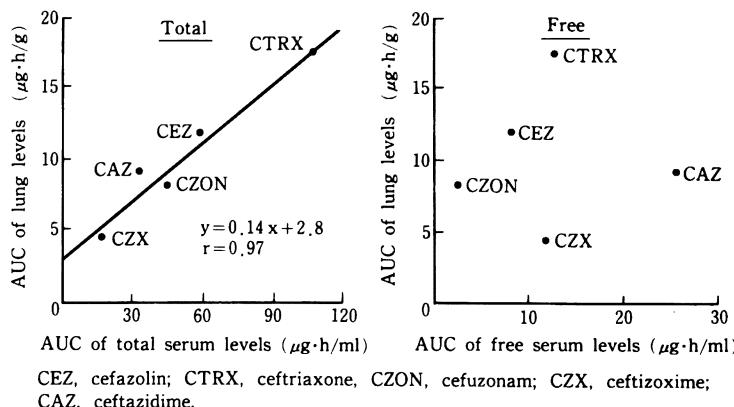


Fig. 4. Relationship between total or free serum levels and lung levels of the cephal antibiotics in uninfected rats after a single intravenous dose of 20 mg/kg.

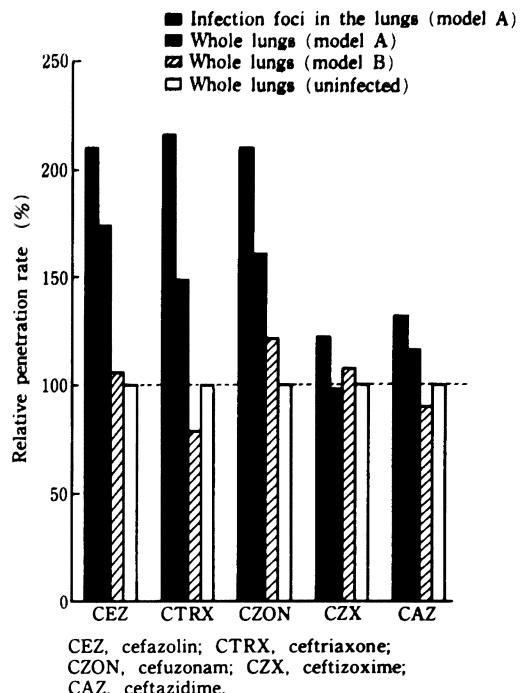


Fig. 3. Effect of serum protein binding on penetration of cephal antibiotics into the lungs of rats with pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* B-54 or uninfected rats after drip infusion. Relative penetration rate (%) = (penetration rate in rats with pneumonia/penetration rate in uninfected rats) × 100

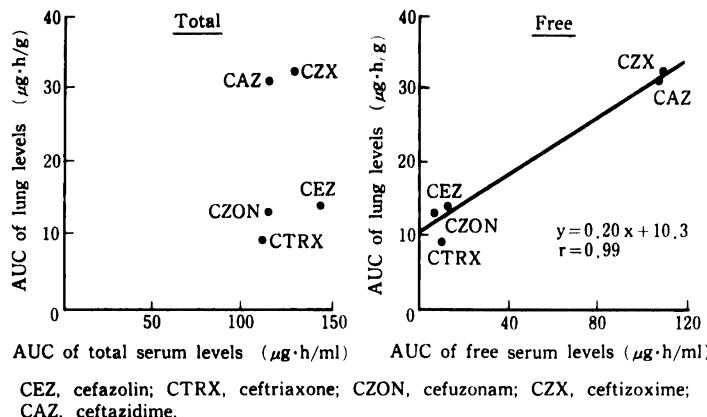


Fig. 5. Relationship between total or free serum levels and lung levels of the cephalosporin antibiotics in uninfected rats after drip infusion. Drugs were given at a dose of 20 mg/kg/h for cefazolin, 10 mg/kg/h for ceftriaxone, 35 mg/kg/h for cefuzonam, 75 mg/kg/h for ceftizoxime and 35 mg/kg/h for ceftazidime.

認められなかった。一方、血清中遊離体濃度と肺内濃度との関係をみると、血清中遊離体濃度の上昇に伴って肺内濃度も上昇する傾向が認められ、ある程度の相関性がみられた。しかし、原点付近を通る直線となることからも分かるように、CZX, CAZ の血清中遊離体濃度 AUC 値は CEZ, CTRX, CZON よりも約 10 倍高いにも拘らず、肺内濃度 AUC 値は約 3 倍にとどまり、両者の間に比例関係は認められなかった。

これらの結果より、肺内移行性は必ずしも血清中遊離体濃度のみで決定されるものではないことが示唆された。

### III. 考 察

抗菌薬の感染症に対する治療効果は種々の要因によって左右されるが、その中でも起炎菌に対する抗菌力と感染病巣内への移行性が最も重要な因子であると考えられる。血清蛋白結合は抗菌力および体内動態の両方に影響をおよぼすことが知られており、抗菌薬の感染治療効果にとって重要な因子である。一般に遊離型薬剤のみが抗菌活性を示し<sup>9,10)</sup>、炎症巣および組織移行性も血中の遊離型薬剤濃度によって規定されると考えられている<sup>14,17)</sup>。したがって、蛋白結合率の高い薬剤は低い薬剤に比べ治療効果が劣ると予想されるが、種々の動物モデルで検討された結果必ずしも劣っていないこと<sup>1,3,4,8)</sup>、また臨床においても Wise<sup>27)</sup> が指摘しているようにそのような知見はなく、一定の結論に達していない。これは、炎症巣および組織移行性におよぼす血清蛋白結合の影響について、序論で述べたよう

な種々の実験条件の違いによって結果が異なることと関係があると思われる。したがって、炎症巣および組織移行性におよぼす血清蛋白結合の影響が、実験条件によってどのように左右されるかを明らかにすることが重要であると考えられる。

そこで、今回我々はセフェム剤 (CEZ, CTRX, CZON, CZX, CAZ) のラット肺内移行性におよぼす血清蛋白結合の影響について、(1)投与法との関係、(2)感染の重篤度との関係、(3)血清中遊離体濃度との関係の 3 つの観点から検討した。

まず投与法の影響について検討した。通常最もよく用いられる条件である 20 mg/kg の bolus 静注では、明らかな蛋白結合の影響は認められなかった。そこで次に点滴静注による検討を行った。各薬剤の投与量を同一とした場合、血清中濃度が一定レベルに達した時の各薬剤の濃度に差が生じるが、この濃度の違いが移行率に影響する可能性を考慮し、なるべく各薬剤の真的移行性の差異を比較する目的で、投与量を調整してほぼ同等の血清中濃度となるようにした。血清中濃度が一定レベルに保たれている時間帯での移行率を測定した結果、明らかな蛋白結合の影響が認められた。投与法の影響に関しては、単回投与時と連投時とでは炎症巣移行性におよぼす蛋白結合の影響が異なり、投与を重ねるにしたがい結合率の高い薬剤の移行率が低い薬剤の移行率に近づくことが報告されている<sup>24,25)</sup>。これは、結合率の高い薬剤は血管外液への移行は遅いが、いったん移行すれば出にくいという性質によるも

のと考えられている。また点滴静注による検討では結合率の高い薬剤は炎症巣移行性が低いことが報告されており<sup>17)</sup>、我々の成績と一致した。以上の成績より、血清中濃度が一定の速度で減少しつつある状態と、血清中濃度が一定濃度に保たれ肺内濃度と平衡あるいはそれに近い関係にある状態とでは、肺内移行性によれば血清蛋白結合の影響が異なることが示唆された。このような投与法による影響が認められた要因として、Rolinson<sup>28)</sup>が指摘しているように、移行率は血清中濃度の半減期と血管から組織への移行に要する時間との関係に依存するのではないかという可能性が考えられる。すなわち bolus で静注した場合には一定の半減期で血中濃度が減少していくため血管から組織への拡散の時間が限られるが、点滴静注により血中濃度が一定に保たれている場合にはほぼ平衡に近い状態にまで達するものと考えられる。

以上のように点滴静注した場合に蛋白結合の影響が認められたので、同様の投与条件で *K. pneumoniae* による肺炎モデルを用いて感染病巣移行性におよぼす蛋白結合の影響について検討した。その結果、肺炎モデルにおいても結合率の高い薬剤の移行性は低い傾向にあり正常ラットの場合と同様であった。しかし、CEZ、CTRX、CZON の移行率は軽症モデルにおいては大きな変化はなかったものの、重症モデルにおいては高い傾向が認められた。これは感染によって惹起された炎症により血管透過性が亢進し、血管外への蛋白の漏出が起こったことが一つの要因ではないかと考えられる。これらの成績は、蛋白結合率の高い薬剤については正常動物を用いて求めた組織移行率から感染病巣移行率を一概には推測できないことを示している。炎症の程度と移行性の関係については、ラット無菌炎症ポーチ内への移行性はポーチ作成後の日数とは関係なかったという報告もあるが<sup>12)</sup>、Peterson ら<sup>29,30)</sup>は浸出液中の蛋白濃度が移行性に大きく影響したと報告しており、結合率の高い薬剤については炎症の程度が移行率に影響することを示唆している。今回我々が用いた肺炎モデルのうち、重症モデル A では肉眼的に病巣とその他の部分とが区別でき病巣のみの濃度が測定できたが、軽症モデル B では Fig. 2 に示したように巣状の肺炎像を呈したため病巣のみを取り出すことができなかった。したがって、両モデルでの移行率の比較は肺全体で行ったが、両モデルでの移行率の違いが単に病巣部分の肺全体に占める割合の違いによる可能性もあり今後さらに検討する必要があると思われる。

血中からの炎症巣浸出液および組織への移行性は血

清中遊離体濃度によって規定されていると言われているので<sup>14,17)</sup>、今回我々が用いた系においても同様のことが認められるか否かについて検討した。Fig. 4 に示したように bolus 静注では血清中 total 濃度 AUC と肺内濃度 AUC との間に高い相関性が認められたのに対し、遊離型濃度 AUC との間には 5 薬剤全部についてみると相関性は認められなかった。一方、正常ラットに点滴静注した場合には、Fig. 5 に示したように遊離型濃度の上昇に伴って肺内濃度も上昇し、両者間にある程度の相関性が認められた。このことは、遊離型濃度が肺内移行性を左右する重要な因子であることを示唆しているが、両者間に比例関係が認められなかったことから、遊離型濃度以外にも肺内移行性に影響をおよぼす因子が存在する可能性が考えられた。ラット無菌炎症ポーチを用いた久岡ら<sup>5)</sup>の報告によれば、血清中遊離体濃度は CMZ > CEZ であるのにポーチ内の total 濃度は CEZ > CMZ となり相関性が認められていない。また、清水ら<sup>17)</sup>はウサギ tissue cage 内浸出液中への各種  $\beta$ -ラクタム剤の点滴静注時の移行性は遊離体濃度によって説明できるが、CZX の移行性を tissue cage モデルと胸膜炎モデルで比較した結果必ずしも遊離体濃度だけでは説明できないことから、炎症の程度および炎症部位の面積などによっても移行性が異なると報告している。加藤<sup>22)</sup>は緑膿菌を噴霧感染させたラットに BAL を施行して各種薬剤の肺胞腔内移行性を検討した結果、移行性は親水性と相関し分子量、蛋白結合とは相関しなかったと報告している。今回は、正常ラットにおける肺内濃度と血清中 total 濃度および遊離体濃度との関係について検討したが、今後、感染病巣または感染全組織における薬剤濃度と血清中濃度との関係についても検討する必要があると思われる。

以上より、蛋白結合はセフェム剤の組織移行性を規定する重要な因子には違いないが、薬剤の投与法、炎症の種類、程度によってもその移行性におよぼす影響は異なり、遊離体濃度以外にも移行性を左右する因子が存在する可能性も考えられることから、蛋白結合の高い薬剤についてはこれらのことと十分に考慮した上で移行性を論じる必要があると思われる。

#### 謝 辞

肺の病理組織学的検討について御指導いただきました藤沢薬品工業、安全性研究所、主任研究員、藤平司郎氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Mattie H, Goslings W R O, Noach E L: Cloxacillin and nafcillin: serum binding and its relation-

- ship to antibacterial effect in mice. *J. Infect. Dis.* 128: 170~177, 1973
- 2) Mückter H, Sous H, Poszich G, Arend P: Comparative studies of the activity of ciclacillin and dicloxacillin. *Chemotherapy (Switzerland)* 22: 183~189, 1976
- 3) Nishida M, Murakawa T: Exudate levels and bactericidal activity of cefazolin in a new local infection system using rat granuloma pouches. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 1042~1048, 1977
- 4) Sande M A, Sherertz R J, Zak O, Strausbaugh L J: Cephalosporin antibiotics in therapy of experimental *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* meningitis in rabbits. *J. Infect. Dis.* 137: s 161~s 168, 1978
- 5) 久岡正史, 小島敏昌: 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。*Chemotherapy* 29: 738~743, 1981
- 6) Merrikin D J, Briant J, Rolinson G N: Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 11: 233~238, 1983
- 7) Bakker-Woudenberg I A J M, Van Den Berg J C, Vree T B, Baars A M, Michel M F: Relevance of serum protein binding of cefoxitin and cefazolin to their activities against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 654~659, 1985
- 8) 俵修一, 松本哲, 松本佳巳, 広瀬俊治, 中本昭治, 上村利明: セフェム剤の血清蛋白結合率と感染防御効果との関係について。第36回日本化学療法学会総会, 1988
- 9) Tompsett R, Schultz S, McDermott W: Relation of protein binding to the pharmacology and antibacterial activity of penicillins X, G, dihydro-F, and K. *J. Bacteriol.* 53: 581~595, 1947
- 10) Quinn E L, Colville J M, Ballard L, Jones D, Debman F: Ampicillin antimicrobial activity and pharmacological behavior with reference to certain gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 339~349, 1962
- 11) Kunin C M: Effect of serum binding on the distribution of penicillins in the rabbit. *J. Lab. Clin. Med.* 65: 406~415, 1965
- 12) 松原秀三, 遠藤久男, 岡崎博司, 小川春樹: 組織液内抗生物質濃度の簡易測定法。*Chemotherapy* 28: 589~593, 1980
- 13) Hoffstedt B, Walder M: Influence of serum protein binding and mode of administration on penetration of five cephalosporins into subcutaneous tissue fluid in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 783~786, 1981
- 14) 渡辺泰雄:  $\beta$ -lactam 系抗生素の血清蛋白結合に関する研究。*Chemotherapy* 31: 448~455, 1983
- 15) Bergan T, Engeset A, Olszewski W: Does serum protein binding inhibit tissue penetration of antibiotics? *Rev. Infect. Dis.* 9: 713~718, 1987
- 16) Shyu W C, Quintiliani R, Nightingale C H, Dudley M N: Effect of protein binding on drug penetration into blister fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 128~130, 1988
- 17) 清水喜八郎, 熊田徹平, 戸塚恭一, 片平潤一, 深田智子, 長谷川裕美, 菊池賢, 春木宏介, 熊野克彦, 林敏雄, 渡辺泰雄: 炎症巣への  $\beta$ -lactam 剤の移行。*Chemotherapy* 36: 632~639, 1988
- 18) 村川武雄, 岡野圭介, 岩井芳美, 西田実: Cefazolin の無菌炎症浸出液およびリンパ液内移行について。*Jap. J. Antibiotics* 25: 99~103, 1972
- 19) Waterman N G, Raff M J, Scharfenberger L, Barnwell P A: Protein binding and concentrations of cephaloridine and cefazolin in serum and interstitial fluid of dogs. *J. Infect. Dis.* 133: 642~647, 1976
- 20) Carbon C, Contrepois A, Brion N, Lamotte-Barrion S: Penetration of cefazolin, cephaloridine, and cefamandole into interstitial fluid in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 594~598, 1977
- 21) Gerdung D N, Peterson L R, Legler D C, Hall W H, Schierl E A: Ascitic fluid cephalosporin concentrations: Influence of protein binding and serum pharmacokinetics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14: 234~239, 1978
- 22) 加藤政仁: 化学療法剤の病巣移行性と薬効: 肺炎。第36回日本化学療法学会西日本支部総会, 1988
- 23) Matsubara T, Okuzono H: A new reagent for the HiCN method. *Abstr.*, p.368. 16th International Congress of Hematology, 1976
- 24) LeBel M, Grégoire S, Caron M, Bergeron M G: Difference in blister fluid penetration after single and multiple doses of ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 123~127, 1985
- 25) Gerdung D N, Van Etta L L, Peterson L R: Role of serum protein binding and multiple antibiotic doses in the extravascular distribution of ceftizoxime and cefotaxime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 844~847, 1982
- 26) Van Etta L L, Kravitz G R, Russ T E, Fasching C E, Gerdung D N, Peterson L R: Effect of method of administration on extravascular penetration of four antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 873~880, 1982
- 27) Wise R: Protein binding of  $\beta$ -lactams: the effects on activity and pharmacology, particularly tissue penetration II. *J. Antimicrob. Chemother.* 12: 105~118, 1983
- 28) Rolinson G N: The significance of protein binding of antibiotics in antibacterial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 311~317, 1980

- 29) Peterson L R, Gerding D N: Prediction of cefazolin penetration into high- and low-protein containing extravascular fluid: new method for performing simultaneous studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 14: 533~538, 1978
- 30) Peterson L R, Van Etta L L, Fasching C E, Gerding D N: Effect of protein binding on simulated intravascular and extravascular kinetics of cefotaxime in an in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother.* 25: 58~61, 1984

## EFFECT OF SERUM PROTEIN BINDING OF CEPHEM ANTIBIOTICS ON THEIR PENETRATION INTO THE LUNGS OF RATS

Shuichi Tawara, Satoru Matsumoto, Yoshimi Matsumoto  
and Toshiaki Kamimura

New Drug Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6 Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Sachiko Goto

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

The effect of serum protein binding of cephem antibiotics on their penetration into the lungs of rats was investigated from the following aspects: (1) Effect of administration method, (2) Penetration into the lungs of rats with pneumonia, (3) Relationship between lung tissue levels and free serum levels.

(1) The penetration rates of cefazolin, ceftriaxon and cefuzonam, which had high protein binding after a bolus intravenous injection into normal rats, were slightly lower than those of ceftizoxime and ceftazidime. But there were no marked differences. On the other hand, the penetration rates of the antibiotics with high protein binding after a continuous drip infusion were 1/2 to 1/3 of those of the antibiotics with low protein binding.

(2) In the rats with pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae*, the penetration rates of the antibiotics with high protein binding were also lower after a continuous drip infusion, but their penetration rates were 1.5 to 2 times higher in the rats with severe pneumonia than in the normal rats. The penetration rates of the antibiotics with low protein binding in the infected rats, however, were not significantly different from those in the normal rats.

(3) The antibiotic concentrations in the lung tissue after a bolus intravenous injection in the normal rats did not correlate with the free serum levels, but some correlation was seen after a continuous drip infusion.

These results show that protein binding is an important factor for penetration of cephem antibiotics into the lung but the effect depends on some experimental conditions such as serum half life, equilibrium between serum levels and lung levels, or severity of infection, and suggest that these factors should be taken into consideration in addition to free serum levels in evaluation of penetrability of cephem antibiotics into the lung.