

## 抗菌剤の膀胱腔内への移行にかんする研究

## II. TLC-bioautography による抗菌活性代謝産物の検索について

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

上 領 頼 啓

STUDIES ON THE TRANSFER OF ANTIBACTERIAL  
AGENTS INTO THE INTRAVESICAL SPACEII. INVESTIGATION OF THE ACTIVE METABOLITES BY MEANS  
OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC BIOAUTOGRAPHY

Yoriaki KAMIRYO

*From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine**(Chairman : Prof. J. Sakatoku)*

Male rats, weighing 300 to 350 grams, were nephrectomized bilaterally and their penis was ligated. The bladder was instilled with 0.7 ml of normal saline. This was designated as the intravesical fluid.

Antibacterial agents such as kanamycin, DKB, gentamicin, cefamezin, rifampicin and nalidixic acid were administered to these rats 100 mg per 1 kg body weight. Forty-eight hours later, serum and intravesical fluid were submitted for thin-layer chromatographic bioautography. This procedure was made also at 24 hours after administration in the nalidixic acid group.

No active metabolite was detected in kanamycin, gentamicin, cefamezin and rifampicin. In DKB, serum sample occasionally showed the small inhibitory zone of a different Rf value from the original DKB, but an exact proof of being an active metabolite could not be obtained. In nalidixic acid, 24 hours samples, both serum and intravesical fluid, showed nalidixic acid as well as hydroxy-nalidixic acid. In 48 hours samples, both serum and the intravesical fluid, nalidixic acid could not be detected and only hydroxy-nalidixic acid was identified.

## 緒 言

上部尿路で (supravesical) 尿路変更術のみを施行して、あとに残された (left behind) 膀胱 (dysfunctionalized bladder) の感染の予防や治療についての基礎的データを得る目的で、抗菌剤の膀胱壁移行にかんする研究をおこない、その成績を前報<sup>1)</sup>で発表した。すなわち、両腎を摘除し、膀胱内に生理的食塩水を注入したラットに、全身的に投与した抗菌剤が膀胱内の生理的食塩水 (膀胱内腔液と略す) に移行してくるか否かを調べた。その結果、KM などの aminoglycoside 系抗生剤は血清および膀胱内腔液の両者に長期間活性が認められ、RFP, NA および CEZ でもこのような傾向にあった。

一部の抗菌剤、とくにその主要排泄経路が腎であるような抗菌剤は、腎そのもの、あるいはその機能が全く喪失すると、長期間にわたって体内に滞留するおそれがある。この間に何らかの代謝をうけ、このものが体内に存在し、膀胱内腔液へ移行してくることも予想される。このようなことが事実であるか否かを知る目的で、投与した抗菌剤以外の抗菌活性代謝産物の有無を TLC-bioautography で検索した成績を報告する。

## 実 験 材 料

## A-1. 実験動物

体重 350 g 前後の Wistar 系雄性 ラットを使用した。

## A-2. 使用薬剤

抗菌剤として、つぎのものを使用した。

Kanamycin sulfate (KM: 力価 700 mcg/mg, 明治製菓株式会社)

3', 4'-dideoxykanamycin B sulfate (DKB: 力価 700 mcg/mg, 明治製菓株式会社)

Gentamicin sulfate (GM: 力価 616 mcg/mg, 日本シエーリング株式会社)

Cephazolin-Na (CEZ: 力価 944.5 mcg/mg, 藤沢薬品工業株式会社)

Nalidixic acid (NA: 力価 1,000 mcg/mg, 第一製薬株式会社)

Rifampicin (RFP: 力価 1,000 mcg/mg, 第一製薬株式会社)

#### A-3. 検定菌株および使用培地

KM, DKB, GM, CEZ の検出には, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を使用し, 培地として下記組成のものを用いた。

ポリペプトン 5g, 肉エキス 3g, クエン酸ナトリウム 10g, 寒天 (栄研) 10g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2

RFP の検出には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とし, 培地として普通寒天培地 (栄研 pH 7.0) を使用した。

NA は *E. coli* NIJH, JC-2 を検定菌として, Müller-Hinton 培地 (栄研, pH 6.0) を用いて検出した。

#### A-4. 薄層クロマトグラフィ (TLC) の展開溶媒系

KM および GM にはクロロホルム:メタノール:17%アンモニア水=2:1:1の混合溶媒,

DKB には n-ブタノール:エタノール:クロロホルム:17%アンモニア水=4:5:2:5の混合溶媒,

CEZ には n-ブタノール:酢酸:水=4:1:5の混合溶媒,

NA にはクロロホルム:メタノール:ぎ酸=94:3:3の混合溶媒,

RFP にはクロロホルム:メタノール=9:1の混合溶媒,

を使用した。

#### A-5. TLC シート

Eastman chromatogram sheet No. 6061 を使用した。

## 実験方法

#### B-1. 実験モデルの作成

A-1 のラットをエーテル麻酔下に両腎を摘除し, 陰莖を結紮する。膀胱内腔に生理的食塩水を 0.7 cc 注入する。この実験モデル作成は, 前報<sup>1)</sup> に記してあるので, 詳細はそれに譲る。

#### B-2. 薬剤の投与

KM, DKB, GM は 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.8) で溶解し, KM, DKB は 100 mg/kg of body weight を, GM は 40 mg/kg of body weight を, CEZ は 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶解したのち 100 mg/kg of body weight を大腿筋肉内に投与した。

NA は生理的食塩水に 0.1 N NaOH を加えた溶液で溶解し, さらに 0.1 N HCl で pH 7.8 に調整したのち 100 mg/kg of body weight を投与した。

RFP は 0.5% carboxymethylcellulose-Na 水溶液に懸濁し 100 mg/kg of body weight を投与した。

#### B-3. 試料の採取

B-1 のごとくにして作成した実験モデルラット 3 匹をもって 1 群とし, 抗菌剤を投与した。岡崎産業社製のラットケージで飼育し, 水および MF 固型飼料 (オリエンタル酵母 KK) を自由摂取とした。48 時間後にエーテル麻酔下に開腹し, 血液および膀胱内腔液を採取した。NA 投与群は 2 群を作成し, 24 時間後および 48 時間後に試料の採取をおこなった。血液の採取および膀胱内腔液の採取は, 前報<sup>1)</sup> に述べたとおりである。

#### B-4. 試料の調整

一匹のラットより採取しうる膀胱内腔液が少ないため, 各抗菌剤ごとに血清および膀胱内腔液を等量ずつ 3 匹分を一緒にしてこれを実験に供した。血清および膀胱内腔液を 3,000 回転, 10 分で遠沈し, この上清を適量とって, これに 2 倍量のエタノールを加え, 再び 3,000 回転, 10 分で遠沈し除蛋白をおこなった。これらの上清を濃縮用試験管にとり, Concentrater TC-8 122 (Taiyo KK) にて 37°C で 5 分間濃縮した。最終的には試料が初期の 2 倍の濃度, すなわち初期量の 1/2 になるように, 各試料にリン酸緩衝液-RFP にはエタノールを加え bioautography の試料とした。

#### B-5. Bioautography

各試料とそれぞれの抗菌剤の標準液は Microcaps (Drummond USA) を用いて, 上述の薄層クロマトグラフィ用シートに charge した。各抗菌剤の標準液は, B-2 の方法で溶解し (RFP はエタノールで溶解し, 0.15 M, リン酸緩衝液で調整), KM, DKB, GM, CEZ は 10 mcg/ml 溶液を作成して, 5  $\mu$ l を, NA, RFP は 100 mcg/ml 溶液を作成して, 10  $\mu$ l を charge した。いずれも展開槽で, A-4 のそれぞれの溶媒系にてフロントより 10 cm の高さまで展開したのち, じゅうぶん乾燥せしめた。

角シャーレ (栄研 KK, 227×77×13 mm) に A-3 に記載した検定菌の入った培地を 20 ml 注入し, この培地上に上記の標準液および試料を展開してあるシ

ートを張り付けた。約30分間室温に放置した後、シートをはがし 37°C 20時間ふ卵器で培養し、各 spot の Rf 値を判定した。試料の採取から bioautogram の作成まで無菌的操作に心掛けた。とくに各溶媒系による展開以後の操作にはそのよう心掛けた。

### 実験結果

#### 1. KM

Fig. 1 に示すごとく、血清、膀胱内腔液（図中 the saline と略記、以下同じ）中には、ともに抗菌活性を示す新しい代謝物質はなく、標準物質と同じ位置に Rf=0.67 の spot を示した。

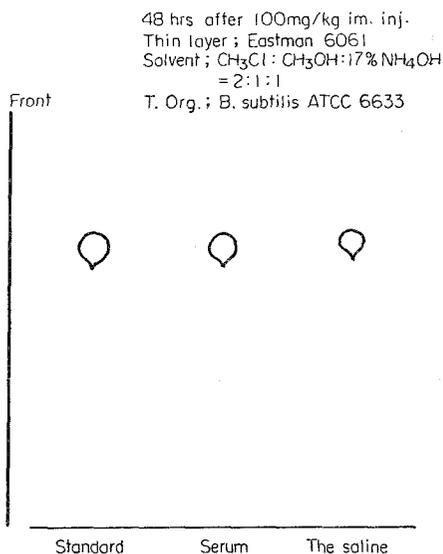


Fig. 1. A bioautogram of KM.

#### 2. DKB

膀胱内腔液中には新しい代謝物質はみられなかった (Fig. 2)。血清には標準物質と同じ Rf=0.36 の spot のほかに、あらたな抗菌活性を示す Rf=0.87 の spot がみられることがある。そこで charge 量をいろいろ変えて同様の検索をおこなったが charge 量が多い場合 (30 μl 以上) にときに出現することがあり、10 μl 以下の少ない場合には出現しなかった。また除蛋白の際に使用したエタノールによる影響を調べるため、除蛋白なしでおこなったところ、やはり同じ結果を得た。この活性物質の阻止円の大きさは、標準物質の阻止円の大ききの 1/4 強であった。

#### 3. GM

Fig. 3 に示すように KM と同様、抗菌活性のあるあらたな代謝産物はなく、標準物質と同じ位置に Rf=

48 hrs after 100mg/kg im. inj.  
Thin layer; Eastman 6061  
Solvent; n-BuOH:EtOH:CHCl<sub>3</sub>  
:17% NH<sub>4</sub>OH=4:5:2:5  
T. Org.; B. subtilis ATCC 6633

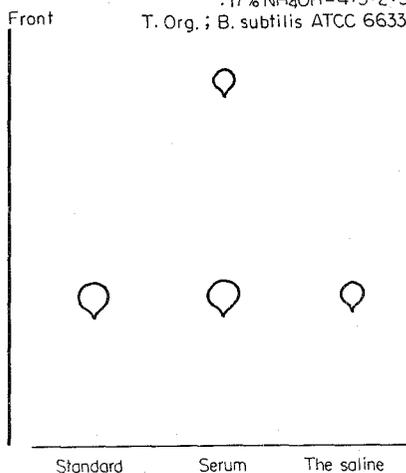


Fig. 2. A bioautogram of DKB.

0.67 の spot を得た。

#### 4. CEZ

CEZ にも活性代謝産物はなく標準物質と同じ Rf=0.43 の spot を得た (Fig. 4)。

#### 5. NA

Fig. 5 は投与24時間後の bioautogram であるが、血清および膀胱内腔液のいずれにも標準物質と同じく Rf=0.52 の spot を示す物質と、これとは別に Rf=0.15 の spot を示す新しい抗菌活性代謝産物が存在

48 hrs after 100mg/kg ip. inj.  
Thin layer; Eastman 6061  
Solvent; CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH=9:1  
T. Org.; B. subtilis ATCC 6633

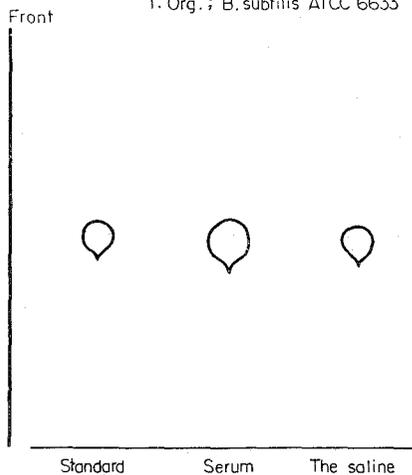


Fig. 3. A bioautogram of GM.

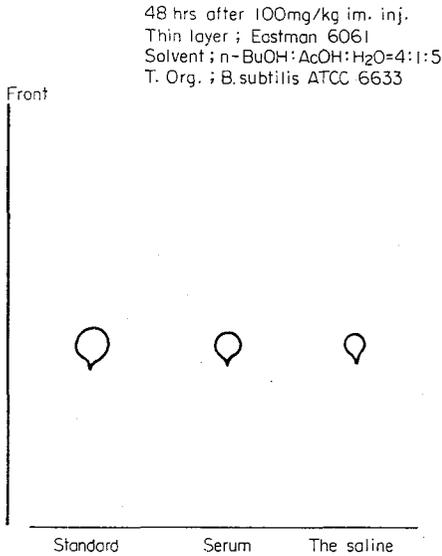


Fig. 4. A bioautogram of CEZ.

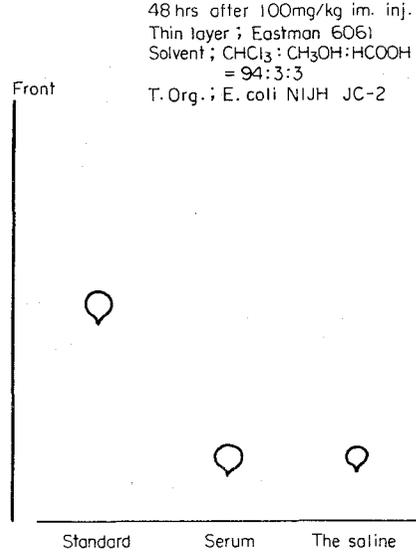


Fig. 6. A bioautogram of NA.

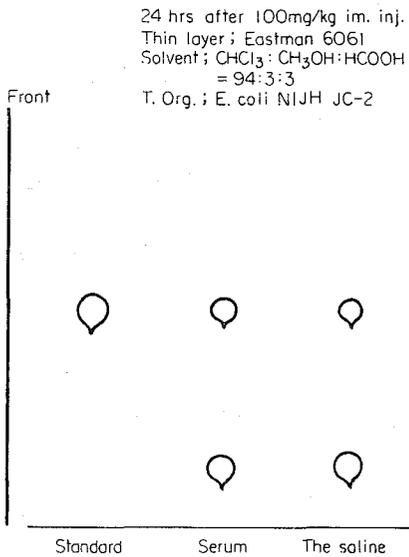


Fig. 5. A bioautogram of NA.

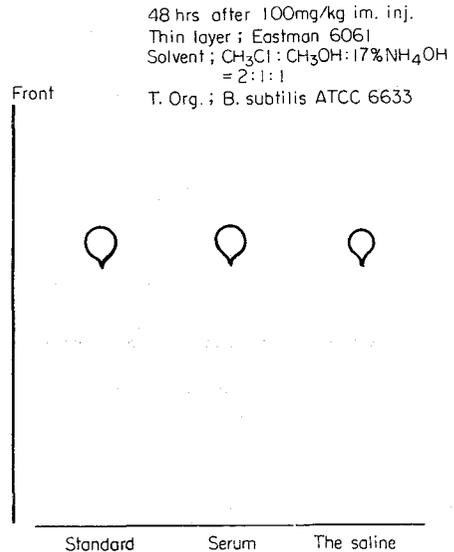


Fig. 7. A bioautogram of RFP.

している。しかし48時間後の bioautogram では、Fig. 6 に示すように血清および膀胱内腔液のいずれからも、標準物質と同じ位置にあった  $R_f=0.52$  の spot が消失し、新しい活性代謝産物と思われる  $R_f=0.15$  の spot のみが残っている。

#### 6. RFP

これも KM, GM, CEZ と同じく活性代謝産物はなく、 $R_f=0.50$  の標準物質と同じ位置に spot が得られた。

#### 考 察

近年、放射性同位原素の医学への導入により、薬物の生体内における吸収、分布、代謝、排泄などの運命についての研究の進歩は著しいものがある。それにもかかわらず、化学療法剤を含め、多くの薬剤の体内動態にかんする知見は、正常個体内におけるものでさえ、まだ不充分である。ましてや、われわれが対象とする疾病個体内におけるものは、さらにその感が強い。生体内で生ずる ABPC の transformation product は、



び膀胱内腔液の試料から2つずつの阻止帯が出現した。この1つはNAであり、他の1つはhydroxy NAと考えられる。これが48時間後の試料では、血清および膀胱内腔液の阻止帯は、hydroxy NAと思われるもの1つになっている。これは膀胱内腔液に移行してきたNAが、NAの血清濃度の低下とともに再び血中に戻り、肝で代謝されてhydroxy NAとなったものと推定される。

以上無腎ラットで血清および膀胱内腔液中の抗菌活性を示す代謝物の検討をTLC-bioautographyでおこなってきたが、今後はさらに抗菌性を示さない代謝物の検索をおこない、それが生体に如何なる影響を及ぼしているかを知る必要がある。通常なら腎から速やかに排泄される代謝物が、腎がないため肝から排泄するよう、さらに何回かの代謝の過程を必要として肝に与える負担を大きくするとか、腎から速やかに排泄される物質が、腎がないため肝に蓄積し、従来肝毒性がないとされていたにもかかわらず肝毒性を現わしてくるというようなことも想像される。ただ、両腎を摘除したラットはせいぜい72時間位しか生存しないため、本研究の目的からすればさらに長時間の薬剤の滞留が望ましく、そのためには新しい実験モデルの開発も必要と考えられる。

## 結 語

体重300~350gの雄ラットの両腎を摘除し、膀胱腔内に生理的食塩水0.7ccを注入(膀胱内腔液)し、陰茎を結紮した。このラットに、体重kg当り100mgのKM, DKB, GM, CEZ, RFPおよびNAを投与し、48時間後(NAでは24時間後にも)に血清および膀胱内腔液のTLC-bioautographyを施行した。その結果、KM, GM, CEZおよびRFPでは活性代謝物は検出されなかった。DKBでは血清中にときとしてDKBとは別のRfをもつ小さな阻止帯が作られることがあったが、確実に活性代謝物とはなしえなかった。NAでは24時間後に血清および膀胱内腔液中にNAおよびhydroxy NAと思われる活性代謝物が存しているが、48時間後になると血清および膀胱内腔液の双方からNAは消失し、hydroxy NAのみとなった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わった酒徳治三郎教授、本研究の遂行に多大の御協力を頂いた桐山管夫助教授、広中弘講師、永田一夫先生に感謝いたします。また各抗菌剤の標準品の御提供ならびに研究手技について御教示を頂いた製薬会社諸氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 上領頼啓：抗菌剤の膀胱腔内への移行にかんする研究。I. 両腎摘除ラットにおける各種抗菌剤の血清ならびに膀胱内腔液の食塩水中濃度について。泌尿紀要, **24**: 1978.
- 2) 西田 実・ほか：Ampicillinの代謝について (1) 新しいMetaboliteの生成条件とその活性について。Chemotherapy, **19**: 170~173 1971.
- 3) 村川武雄・ほか：Ampicillinの代謝について(2) 未知物質の生成機作について。Chemotherapy, **20**: 621~626, 1972.
- 4) Kunin, C. M. et al.: Excretion of cephaloridine and cephalothin in patients with renal impairment. *New Eng. J. Med.*, **274**: 654~656, 1966.
- 5) Giromin, M. et al.: Influence de l'anurie et des hemodialyses sur le comportement des antibiotiques. *Praxis*, **58**: 1,181~1,187, 1969.
- 6) Bennett, W. M. et al.: A practical guide to drug usage in adult patients with impaired renal function. *JAMA*, **214**: 1,468~1,475, 1970.
- 7) Kunin, C. M. et al.: A guide to use of antibiotics in patients with renal disease. A table of recommended doses and factors governing serum levels. *Ann. Int. Med.*, **67**: 151~158, 1967.
- 8) Kunin, C. M. et al.: Persistence of antibiotics in blood of patients with acute renal failure. II. Chloramphenicol and its metabolic products in the blood of patients with severe renal disease or hepatic cirrhosis. *J. Clin. Invest.*, **38**: 1,498~1,508, 1959.
- 9) Granatek, A. P. et al.: Pharmaceutical properties and stability of kanamycin. *Antib. and Chemoth.*, **10**: 148~156, 1960.
- 10) Cox, C.: Gentamicin. *Med. Clin. N. Am.*, **54**: 1,305~1,315, 1970.
- 11) Umezawa, H. et al.: 3', 4'-dideoxy-kanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiotics*, **24**: 485, 1971.
- 12) Kozatani, J. et al.: Cefazolin. A new semi-synthetic cephalosporin antibiotic. VI. Excretion and metabolism of cefazolin-<sup>14</sup>C in rats

- after intramuscular administration. *J. Antibiotics*, **25**: 86~93, 1972.
- 13) Maggi, N. et al.: Rifampicin: A new orally active rifamycin. *Chemotherapy*, **11**: 285~292, 1966.
- 14) Maggi, N. et al.: Rifampicin desacetylation in the human organism. *Arzneimittel Forsch.*, **19**: 651~654, 1969.
- 15) 清水喜八郎・ほか：Rifampicin (Rifadin) の生体内代謝. 診療, **23**: 969~973, 1970.
- 16) 佐野光司・ほか：Rifadin の尿中代謝産物. *Jap. J. Antibiotics*, **13**: 416~420, 1970.
- 17) 秋元 健・ほか：Rifadin のラットにおける吸収, 分布, 代謝および排泄について. *Jap. J. Antibiotics*, **13**: 250~256, 1970.
- 18) McChesney, E. W. et al.: Absorption, excretion and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **6**: 292~309, 1964.
- 19) Harrison, et al.: Bacteriologic and pharmacodynamic aspects of nalidixic acid. *J. Urol.*, **104**: 908~913, 1970.
- 20) Moore, W. E. et al.: Biopharmaceutical investigation of nalidixic acid in man. *J. Pharm. Sci.*, **54**: 36~41, 1965.
- 21) Portmann, et al.: Pharmacokinetic model for nalidixic acid in man. II. Parameters for absorption, metabolism, and elimination. *J. Pharm. Sci.*, **55**: 72~78, 1966.

(1978年7月1日受付)