

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¹⁾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¹⁾ 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¹⁾ 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 μ l を, NA, RFP は 100 mcg/ml 溶液を作成して, 10 μ 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。

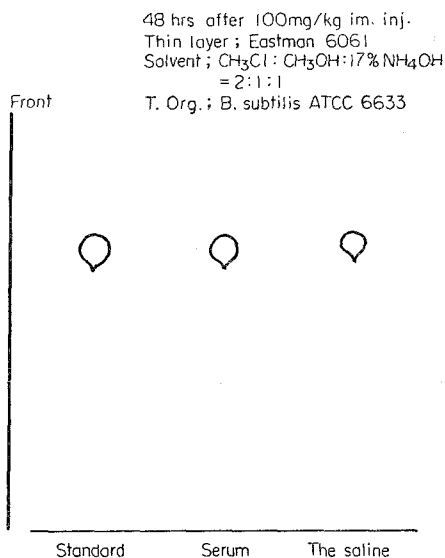


Fig. 1. A bioautogram of KM.

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=

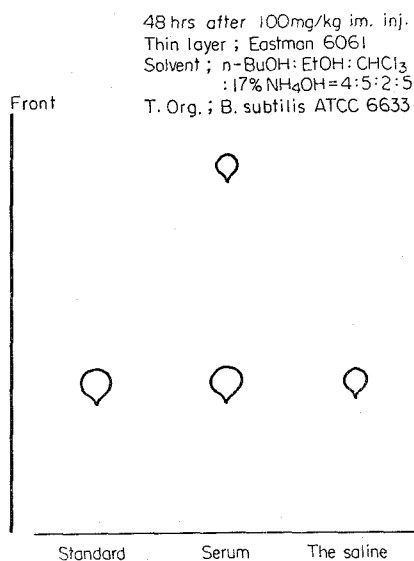


Fig. 2. A bioautogram of DKB.

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

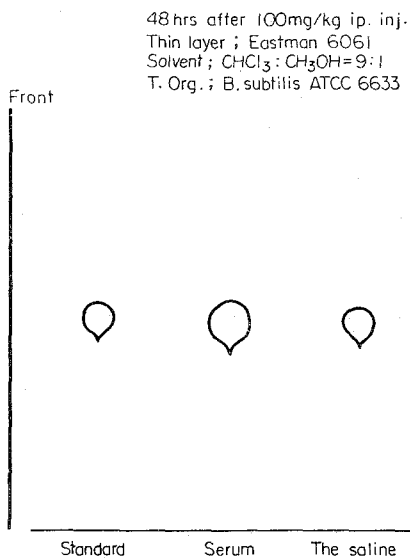


Fig. 3. A bioautogram of GM.

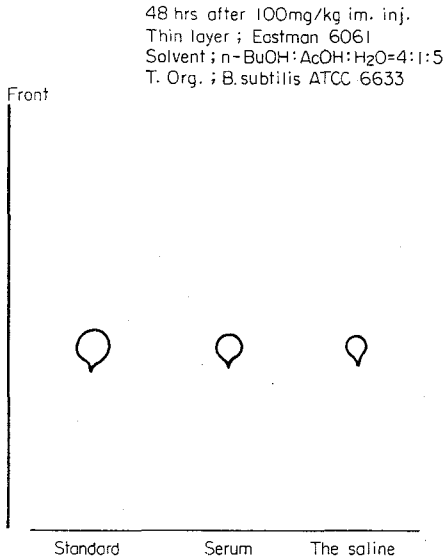


Fig. 4. A bioautogram of CEZ.

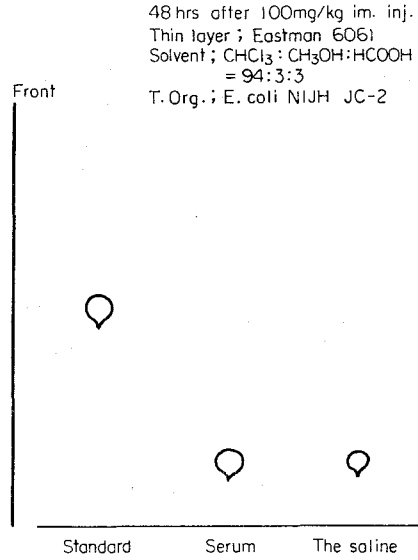


Fig. 6. A bioautogram of NA.

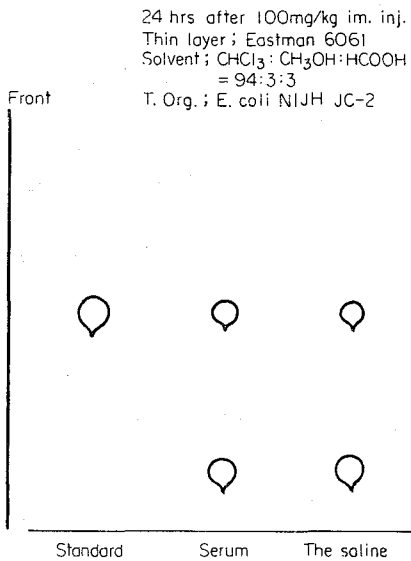


Fig. 5. A bioautogram of NA.

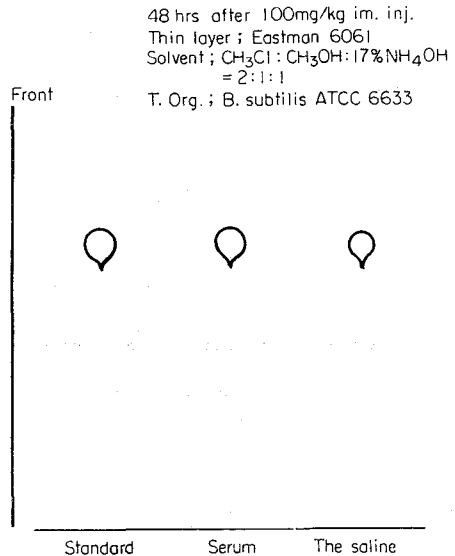


Fig. 7. A bioautogram of RFP.

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、

生体内のアセトアルデヒドと ABPC が反応して生ずるものであり、アセトアルデヒドの増量に伴って transformation product も増加する^{2,3)}。

著者が、全身的に投与された抗菌剤の膀胱腔内への移行性を検討するために作成した実験モデルでは、両腎摘除を施行している。このモデルはもちろん、ヒトの腎障害時においてもとくに腎から排泄される一部の抗菌剤は、体内に滞留し、正常とは異なった動態を示すことも考えられる^{4,5)}。また上記の ABPC にみられるごとく、尿中の uremic substance などの影響も全く無視しえないであろう。投与法の如何を問わず、薬物は体内において一部は、主として肝で代謝をうけ、腎または肝より排泄されることが多い。このような意味で、本研究の実験モデルのごとく両腎を失えば、薬剤の代謝産物が長期にわたって蓄積し、副作用の面からも各臓器や組織に対する影響が大きいと思われる⁵⁻⁸⁾。例えば CP の血清濃度は、腎障害時においても半減期は正常時と変らないが、これは CP が大部分はそのまま、一部は hydrolysis を受けて monoglucuronide conjugate となり、不活性化されて血清濃度で差がみられなくなるわけで、これらは、さらに代謝をうけた aryl compounds や aryl nitro compounds とともに体内に蓄積し、副作用の危険がある⁹⁾。化学療法剤も他の一般薬剤と同じく生体内で変化をうけるが、その主要部位は肝である。化学療法剤の場合、このような変化によって抗菌活性をもたない代謝物に変わるのがふつうであるが、ときとして抗菌活性が増強することがある。こうしたいろいろな見地から、まず本実験モデルにおける活性代謝物の有無を検索するために、TLC-bioautography を施行した。

一般に aminoglycoside 系抗生剤は、きわめて安定な物質であり、KM⁹⁾ および GM¹⁰⁾ もきわめて安定性が高く、本実験においても薄層クロマトグラフィーで活性代謝物を得られなかった。しかし DKB では、血清に DKB とは明らかに異なる Rf=0.87 に小さな阻止帯をもった代謝物が存在するようであった。これは charge 量を多くした時に、ときに出現するもので、DKB のエタノール処理とは無関係であった。DKB は 1971年梅沢ら¹¹⁾の KM の不活性化機構の研究の成果から、3' 位の水酸基のリン酸エステル化が起らないように 3', 4' 位の水酸基を H に置換したものであり、長時間の血清内停滞で、何らかの代謝をうけたとも考えられるが、この阻止帯が常時出現しないので、今後の検討が必要である。

CEZ もきわめて安定な物質で、ヒトでの TLC-bioautography では活性代謝物は存在しない。しかし

ラットで CEZ-Na-7-¹⁴C または CEZ-Na-3-¹⁴C を投与して TLC-autoradiography または inverse isotope dilution analysis を用いて検索すると、尿では微量の、胆汁では数%の2つ以上の代謝物が存在する¹²⁾。CEZ は肝からも排泄されるので、本実験モデルでは48時間後には、血清濃度が低値をとることも相まって活性代謝物を認めていない。

RFP の生体内代謝についてはいくつかの報告¹³⁻¹⁶⁾に接するが、その主要代謝物は desacetyl RFP¹⁴⁾ である。その他ヒトの尿中においては、RFP-quinone と 3-formyl RFP SV が代謝物として存在している¹⁵⁾。一般に RFP は、酸性 media では加水分解して、3-formyl RFP SV を生成しやすく、弱アルカリ性 media では RFP-quinone を生成する。ヒト尿中においては多くは、RFP のままで排泄され、代謝物の大半は desacetyl RFP の形で排泄されている。代謝物の約 10%が 3-formyl RFP として排泄され、RFP-quinone は微量である。血中においても RFP として存在し、desacetyl RFP は 1/10 以下である¹⁵⁾。しかしヒトあるいはモルモット胆汁内ではほとんどすべてが desacetyl RFP として存在し、腸肝循環をおこなっている¹⁴⁾。しかしイヌやウサギでは desacetyl RFP は胆汁内には検出されない¹⁴⁾。またラットでは desmethyl RFP の存在も確かめられている¹⁶⁾。このように薬物代謝能は、種属、動物による差や個体差があり、著者のラットを使用した本研究で血清および膀胱内腔液に代謝物が検出されなかったのは動物による差も考慮に入れなければならない。しかし、実際は上述したとおり、desacetyl RFP が存在したとしても、その量はわずかであり、検定菌として desacetyl RFP に比較的 MIC の高い *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いたが、desacetyl RFP の検出にはむしろ *Sarcina lutea* PCI 1001 を使用すべきであった。

NA は体内で代謝をうけて hydroxy NA となり、最後には dicarboxylic acid になって尿に出るとされている¹⁷⁻¹⁹⁾。これらの NA, hydroxy NA および dicarboxylic acid は、それぞれその一部がグルクロン酸と抱合して体内および尿中で NA glucuronide, hydroxy NA glucuronide および dicarboxylic acid glucuronide としても存在している¹⁷⁻¹⁹⁾。血中では hydroxy NA よりも NA の形で多くが存在するが NA から hydroxy NA への代謝は比較的速やかであり、NA および hydroxy NA とのグルクロン酸抱合も比較的速やかにおこなわれる²⁰⁾。著者の実験で、NA の24時間の試料と48時間の試料で異なった結果が得られた。NA 投与24時間後には TLC-bioautogram に血清およ

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-¹⁴C 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)