

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

西田 実・峯 靖弘・村川 武雄
 深田志計実・河野 洋子・末田百合子
 藤沢薬品工業株式会社・中央研究所

(昭和 45 年 10 月 5 日受付)

Ampicillin はその優れた抗菌作用と高い忍容性のために、現在広く臨床的に応用されている。現在まで Ampicillin に関して多くの報告があるが¹⁻⁷⁾、その生体内代謝については殆んど報告に接しない。われわれは、さきに Thin layer chromatography を用いる Penicillin 類の分離定量法を考案した⁸⁾、この方法を応用して、Ampicillin を投与した動物の血清および尿中に、抗菌活性をもつ未知の metabolite と考えられる物質が存在することを証明したので報告する。

実験方法

1. Ampicillin

Ampicillin(AB-PC) は Beecham 研究所で製造された Penbritin(Trade name, 力価 832 mcg/mg) を使用した。

2. 実験動物および投与量

健康成人(男子, 60 kg) に Ampicillin を 500 mg 1 回筋注した。また実験動物として、ラット(Wistar 系)、白色ウサギおよびイヌに Ampicillin を 50 mg/kg それぞれ筋注した。

3. Thin layer chromatography による定量

Ampicillin と他の物質との分離定量法は、さきに、われわれが報告した方法によつておこなった。

実験結果

1. 健康成人および正常動物に Ampicillin を筋注した際の尿中活性物質

上述のとおり、Ampicillin をラット、ウサギおよびイヌに各々 50 mg/kg、健康人には 500 mg 1 回筋注し、投与後 3 時間までに排泄された尿中の活性物質を検索した。

図 1 に明らかなとおり、この展開条件では標品の Ampicillin は原点附近に止り、移動性は小さい。また Benzylpenicillin はこの条件で非常に良く移動する。いつぼう Ampicillin を投与した尿

をこの条件で展開すると、各動物の尿中に Ampicillin に対応するスポットと、Benzylpenicillin より Rf のやや小さい活性物質の存在を示すスポットが認められた。この物質は尿中のみでなく、血清中からも認められた。ただヒトの場合、この実験における投与量 500 mg 筋注) ではこのような活性スポットが検出されないことがある。以上の実験結果から、この未知物質は Ampicillin が生体内で変化して生成した 1 つの metabolite であると考えられる。

2. In vivo におけるラットの生体成分による metabolite の生成

Ampicillin を筋注した各実験動物の尿に図 1 のように新しい metabolite が検出されたので、この物質の生成条件を in vitro で検討した。

すなわち Ampicillin 2 mg/ml 溶液の 1 ml と正常ラットの血清、尿および 30% 組織ホモジネートのそれぞれ 1 ml を、37°C で 2 時間 incubate した。この反応液を常法どおり TLC で展開し、Bioautography で Rf を求めた。図 2 に示したとおり、Ampicillin は血清、尿および組織(肝および腎)ホモジネートとの接触によつて、対照として用いた Benzylpenicillin より Rf

図 1 Bioautogram of Urine after Intramuscular Administration of Ampicillin
 0-3hr. Urine (50 mg/kg)

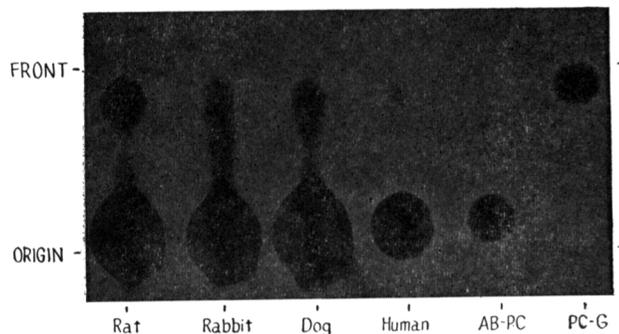


図2 ラット・生体成分による未知活性物質の生成 (in vitro)

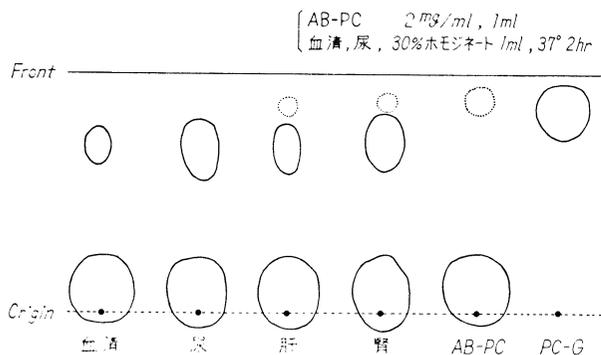


図3 ラット・腎ホモジネートの (NH₄)₂SO₄ 分画 および 限外濾過と 活性分布

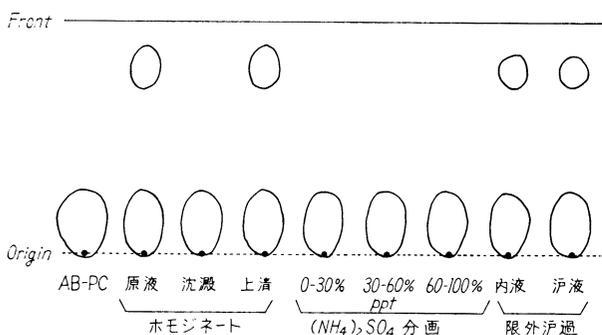
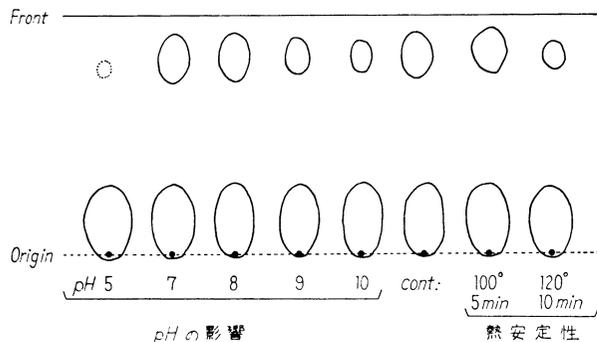


図4 ラット・腎ホモジネートの 活性と 至適 pH および 熱安定性



のやや小さい未知の metabolite 活性スポットが認められた。またこの条件で、各生体成分によつて生成された metabolite は、それらの R_f からいずれも同一のものであると考えられる。なおこの場合、反応時間を延長すると活性スポットは縮小する傾向があつた。この結果は生成物が不安定であることを示唆するものと考えられる。

(3) ラット腎ホモジネート分画による生成

ラット腎ホモジネートによつて in vitro で Ampicil-

表 1 AB-PC および Metabolite の 抗菌活性の比較

Organism	阻止帯 (mm)		B/A
	(A) AB-PC	(B) Metabolite	
<i>Staph. aureus</i> 209-P	36.0	19.3	0.54
<i>St. hemolyticus</i> A-S-8	22.0	9.3	0.42
<i>B. subtilis</i> ATCC-6633	28.5	19.0	0.66
<i>E. coli</i> NIHJ	11.0	0	—
<i>Sal. enteritidis</i>	26.0	0	—
<i>Pro. vulgaris</i> IAM-1025	20.2	0	—

ラット・腎ホモジネート 30% 1ml] 37°C,
AB-PC 500 mcg/ml 1ml] 1hr.
TLC で展開 (Gram (+) 5 μl, Gram (-) 20 μl) し、6種の試験菌を用いて Bioautography を行なつた

表 2 AB-PC を正常ラットに筋注した時の 未知活性物質の時間的消長 血清 (mcg/ml)

時 間	AB-PC	未知物質
15 min.	80.0	1.65
30 min.	82.0	1.60
1 hr.	76.0	1.20
2 hr.	12.0	—

尿 (mcg/ml)

時 間	AB-PC	未知物質
0~ 3 hr.	19,000	81.0
3~ 6 hr.	6,000	54.0
6~24 hr.	550	25.0

投与量: 100 mg/kg

未知物質の活性は AB-PC を標準にして求めた

lin の新しい metabolite の生成が認められたので、ホモジネートの各分画の代謝活性を検討した。結果は図3のとおりである。すなわち 30% 腎ホモジネートの原液は前述のとおり metabolite を生成するが、その遠心沈澱部 (15,000×g, 20分) には活性がなく、その上清には原液と同程度の活性が存在する。つぎに図示のごとく、ホモジネート上清の各硫酸分画の沈澱部 (0~30%, 30~60%, 60~100% 飽和) には活性がない。ホモジネートの上清を限外濾過し、内液および濾液の活性を比較したが、両者とも同様の活性を示した。

以上の結果から、Ampicillin と in vitro で反応して metabolite を生成する因子は、可溶性で、硫酸飽和によつて沈澱せず、透析膜を通過し得る低分子のものであ

ると考えられる。

(4) ラット腎ホモジネートによる metabolite の生成にたいする pH および加熱の影響

腎ホモジネートの上清による未知物質の生成にたいする、pH および加熱の影響を検討した結果は、図4のとおりである。Ampicillin の 2 mg/ml 溶液とホモジネート上清との反応において、未知物質の生成量をスポットの大きさで比較すると、pH 7 および 8 が至適条件であった。pH 5 では痕跡の生成物が認められるのみで、pH 9 ではスポットは小さく、生成量の低下が認められた。つぎにホモジネートの上清中に含まれる Ampicillin と反応する物質は比較的耐熱性で、100°C 5分では全く影響をうけない。しかし 120°C 10分の加熱では生成量が減少することが認められた。

(5) 抗菌活性

この Ampicillin の metabolite の抗菌活性を知るためには、この物質を結晶またはほぼこれに近い純度で得なければならない。現在のところ、まだこの物質をこのような型で分離していない。そこで Ampicillin の 500 mcg/ml の 1 ml と 30% 腎ホジネートの 1 ml を反応させ、この反応液を 5 μ l (グラム陽性菌を試験菌とした場合) または 20 μ l (グラム陰性菌の場合) を TLC シートにスポットし、常法どおり展開した。展開後、上記のとおり 5種類の試験菌を用いて Bioautography をおこなった。

結果は表1のとおりである。*B. subtilis* ATCC-6633 を試験菌とした場合、Ampicillin の阻止帯の直径は 28.5 mm であるが、metabolite のそれは 19.0 mm で、前者にたいする後者の比を求めると 0.66 となる。*Staph. aureus* 209 P JC-1 ではこの比が 0.54、*Streptococcus hemolyticus* A-S-8 では 0.42 となり、これらのグラム陽性菌には metabolite もかなりの抗菌作用をもつようである。ただグラム陰性菌 *Sal. enteritidis*, *Pro. vulgaris* IAM-1025 および *E. coli* NIHJ では、グラム陽性菌と全く同じ条件であるにもかかわらず、metabolite は全く阻止帯を示さなかつた。したがってこの metabolite はグラム陰性菌にたいして、Ampicillin と異なつた抗菌作用をもつていると考えられる。

(6) Ampicillin 筋注時の metabolite の血清および尿中濃度

つぎに未知物質の同定に先立つて、その血清および尿中濃度を予備的に測定した。

すなわち 1 群 5 匹のラットに Ampicillin を 100 mg/kg 筋注し、血清および尿を経時的に採取した。これらの試料を TLC 常法どおり分離し、Bioautography で阻止帯を求めた。Ampicillin 標品を standard として、

各試料中の未知物質濃度を概算した。結果は表2のとおりである。血清および尿中の未知物質濃度が測定されたが、その濃度は Ampicillin と比較して低濃度であった。ただ未知物質の分離精製法が現在のところ確立されていないので、ここに得られた値は正確にその濃度をあらわしていない。

考 察

さきにわれわれが考案した TLC による Penicillin 類の分離定量法を利用して Ampicillin の新しい metabolite の証明をおこなつた。生体に投与された Ampicillin は、健康人、正常動物に広く分布、蓄積する代謝産物、または食飼性の微量成分と反応して、或る程度の抗菌性をもつた metabolite に変化することがわかつた。しかし本報における実験成績から明らかなように、投与された Ampicillin のごく一部が、この metabolite に変化するにすぎない。したがって metabolite が Ampicillin とは異なつた抗菌活性をもつていたとしても、従来報告されている生体内濃度の値を大きく修正する必要はない。ただ抗生物質の代謝に関する研究において、metabolite への変化率および metabolite の生成機構などが問題となるので、さらにこれらの点について今後、検討を加える予定である。

結 論

Ampicillin を健康成人および実験動物に筋注すると、それらの尿中に Ampicillin 以外の抗菌活性をもつた未知物質が排泄された。この物質は *in vitro* で Ampicillin とラット尿、血清および組織ホモジネートなどを incubate することによつても生成する。ホモジネート中に存在する反応性物質は低分子で、熱に安定である。つぎにこの metabolite の 2, 3 のグラム陰性菌にたいする抗菌活性は、Ampicillin よりも弱い。健康成人に Ampicillin を筋注して得られる metabolite の血清または尿中濃度は、Ampicillin のそれに比較すると非常に低濃度であつた。

稿を終るにあたり、本実験に御援助をいただいた藤沢薬品・中央研究所 中野所長、熊田部長に感謝します。

文 献

- 1) G. N. ROLINSON & S. STEVENS: Microbiological studies on a new broad-spectrum penicillin, "Penbritin". Brit. Med. Jour. 2, 191~196, 1961
- 2) ALEXANDER M. RUTENBURG, HAROLD L. GREENBERG, FRITZ B. SCHWEINBURG & MAXINE A. PERREAULT: Studies on α -amino benzyl penicillin. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1961: 748~756, 1962
- 3) P. A. BUNN: Some miscellany about d-alpha-

- aminobenzyl penicillin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1961 : 739~747, 1962
- 4) E. L. QUINN, J. M. COLVILLE, L. BALLARD, D. JONES & F. DEBNAM : Ampicillin : antimicrobial activity and pharmacological behavior with reference to certain gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1962 : 339~349, 1963
- 5) JACK A. BARNETT, JAY P. SANFORD, RICHARD A. FERGUSON & NANCY E. PERRY : *In vitro* evaluation of α -aminobenzyl penicillin (ampicillin). *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1962 : 350~353, 1963
- 6) R. A. BEARGIE & H. D. RILEY, Jr. : Ampicillin: clinical and laboratory evaluation in children. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1963 : 331~334, 1964
- 7) K. N. ANDERSON, R. P. KENNEDY, J. J. FLORDE, J. A. SHULMAN & R. G. PETERSDORF : Evaluation of ampicillin in gram-negative infections. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 1963 : 325~330, 1964
- 8) T. MURAKAWA, Y. WAKAI, M. NISHIDA, R. FUJII, M. KONNO, K. OKADA, S. KUWAHARA & S. GOTO : Chromatographic assay of mixed penicillins, ampicillin and cloxacillin in body fluids. *J. Antibiotics* 23(5) : 250~252, 1970

STUDIES ON METABOLISM OF AMPICILLIN (1)

Formation and Activity of a New Metabolite

MINORU NISHIDA, YASUHIRO MINE, TAKEO MURAKAWA,

SHIGEMI FUKADA, YOKO KŌNO and YURIKO SUEDA

Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

When ampicillin was injected to healthy human adults and experimental animals, an unknown substance with antimicrobial activity, besides ampicillin, was excreted in urine. The substance was also formed by incubation of ampicillin with urine, serum or tissue homogenate of rats. Materials which were present in the homogenates and reacted with ampicillin were small molecules and heat-stable. The antimicrobial activity of the metabolite against some gram-negative bacteria were weaker than that of ampicillin. The metabolite concentration in serum and urine of healthy adult receiving ampicillin intramuscularly was very lower than ampicillin concentration.