

コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム (CL-M) の代謝に関する研究

——とくに静注投与後の家兎尿中および胆汁中の代謝産物について——

安部 勝・清水菊子・大内 勝・松本朋徳

科薬抗生物質(株)研究所

(昭和 51 年 4 月 8 日受付)

緒 言

コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム (CL-M) は、コリスチン (CL) の遊離の γ -アミノ基をメタンスルホン酸化 ($-\text{NH}-\text{CH}_2\cdot\text{SO}_3^-$) したコリスチン誘導体で、CL に比較して毒性が低く、また、胆汁、血清などで不活化されにくいことがすでに知られている^{1,2)}。

山田ら³⁾は、この CL-M の吸収、排泄、臓器内分布を明らかにするために犬、ラットおよびヒトに筋注、静注投与して経時的な変化を検討して報告している。また、本物質の代謝に関しては、先に著者ら⁴⁾は、家兎に CL-M を静注投与した際の尿中代謝産物について検討し、その一部分がコリスチン-N-グルクロナイド (CL-NG) になることを確認した。

さらに今回は、投与された CL-M の回収率および生体内で代謝される量的な関係についての実験を家兎を用い、その尿中および胆汁中に存在する CL-M およびその代謝産物の検索および定量を行なった結果を報告する。

実 験

1. 実験動物

体重 2~3 kg の白色家兎雄性を 1 週間予備飼育後に実験に供した。その間、室温 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ で飼育し、固型飼料および水道水を自由に摂取させた。

2. 使用薬物

科薬抗生物質研究所製のコリスチンメタンスルホン酸ナトリウム (CL-M)、力価 12,500 u/mg を使用した。

本実験においては、全て CL-M 100 mg/kg を生理食塩水 4 ml に溶解したものを家兎の耳静脈に静注投与した。

3. 試料の採集

(1) 尿 採 集

家兎に CL-M を静注し、直ちに代謝ゲージに入れ飼料および水を自由に摂取できるような状態で飼育し、薬物投与後の 24 時間尿を採集し試料とした。

(2) 胆 汁 採 集

家兎を開腹し、胆管にビニールチューブを入れて自由に胆汁を流出させた状態で CL-M を静注し、24 時間胆

汁を採集し試料とした。

4. CL-M の定量法

重層用寒天培地に試験菌液 (*E. coli* NIHJ) を 0.3% 添加し、充分混和したのち、重層用試験管 (内径 4 mm、高さ 85 mm) に約 40 mm の高さになるように分注した後、それぞれの試験管に標準 CL-M 稀釈液および試料を 0.2 ml ずつ重層し、冷蔵庫 (約 4°C) に 4 時間放置したのち 37°C で 18~20 時間培養し、各阻止帯の長さを測定した。得られた値を標準曲線に照合して、これら試料中の CL-M 濃度を算出した。

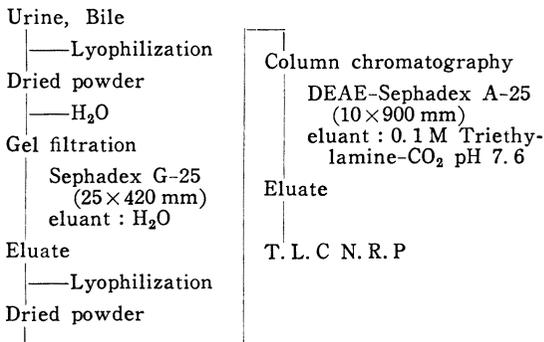
5. 代謝物の精製および確認

CL-M を静注し、それぞれ採集した 24 時間尿および胆汁を試料として CL-M の代謝物の精製を行ない、薄層クロマトグラフィー (TLC) およびナフトレゾルシンピクラー法 (NRP)⁵⁾ によってその確認を行なった。

(1) 代謝物の精製

採集した尿および胆汁中からの代謝物の精製は、Fig. 1 に示すような方法で行なった。セファデックス G-25 (カラム: 25×420 mm, One Tube 4 ml) によるゲル濾過においては水で溶出し、各フラクションの 230 nm の吸光度を測定した。その溶出曲線では 2 つのピークが得られ、その溶出順序に従ってピーク-I、ピーク-II とすると、TLC によりピーク-I の画分に代謝物および CL-M が含まれていることが確認された。そこで、さらに DEAE-セファデックス A-25 (カラム: 10×900 mm) で

Fig. 1 Solution of urinary and biliary metabolite



カラムクロマトグラフィーを行ない、CL-M と CL-NG の分離を行なった。溶出液には 0.1-M トリエチルアミン-CO₂ 緩衝液 pH 7.6 を用いた。溶出した各フラクションについて 230 nm の吸光度を測定した。

(2) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

DEAE-セファデックス A-25 のカラムクロマトグラフィーで 230 nm のピーク部分を試料として TLC を行なった。

薄層のプレートは、シリカゲル H を用いて作製した。

展開溶媒は、(A) *n*-ブタノール：ピリジン：水 (1:1:1), (B) *n*-ブタノール：*n*-プロパノール：水 (2:1:1) の 2 種類を用いた。発色は、ブromフェノールブルーエタノール溶液および硫酸噴霧処理によった。

(3) ナフトレゾルシンピクラー法 (NRP)

TLC の場合と同様に 230 nm のピーク部分を試料として、石館ら⁵⁾の方法に従って行なった。

6. 代謝物の検量線

代謝物の定量を行なうためにコリスチン-N-グルコナイド (CL-NG) の標品を調製し、さらにその検量線を設定した。

(1) 標品の CL-NG の調製

コリスチン硫酸塩 1 モルに対してグルクロノラクトン 5.2 モルの割合で水に溶解させ、0.1N 苛性ソーダで pH をたえず 7.6 になるように調整した。反応温度を 37°C に保つと 3 日間で抗菌活性はほとんどなくなり、5 日間で全く認められなくなった。この時点を実験の終点とした。反応終了後濾過し、濾液を凍結乾燥して CL-NG の標品とした。

(2) 検量線の設定

CL-NG の標品をセファデックス G-25 (カラム：25 × 420 mm One Tube 4 ml) でゲル濾過し、230 nm で各フラクションの吸光度を測定した。溶出液には水を用いた。このゲル濾過では標品の CL-NG 調製時における過剰のグルクロン酸が除去される。溶出された CL-NG 画分を集め凍結乾燥し、この乾燥粉末の各 10, 20, 30, 40, 50 mg の試料についてそれぞれ DEAE-セファデックス A-25 (カラム 10 × 900 mm) でカラムクロマトグラフィーを行なった。溶出液には、0.1M トリエチルアミン-CO₂ 緩衝液 pH 7.6 を用いた。各試料のフラクションについて 230 nm の吸光度を測定し、溶出曲線を求め、その溶出部分の面積から検量線を設定した。

7. 尿中および胆汁中の代謝物の定量

CL-M を静注し、採集した尿および胆汁を用いて行なった。尿および胆汁は、前記のように Fig.1 に示した方法で精製した。すなわち、5(1) で述べたようにピーク I の画分を凍結乾燥し、その一定量を用いて DEAE-セ

ファデックス A-25 (カラム 10 × 900 mm) のカラムで、溶出液 0.1-M トリエチルアミン-CO₂ 緩衝液 pH 7.6 を用いてクロマトグラフィーを行ない溶出曲線を求めた。

実験結果

1. 尿中の CL-M の回収量

CL-M を静注し、採集した 24 時間尿を重層法で測定した結果を、Table 1 に示した。

24 時間での総回収率は、平均 75% で、その後の排泄はほとんどみられなかった。

2. 胆汁中の CL-M の回収量

CL-M を静注投与後 24 時間で 50~80 ml の胆汁を採集することができた。胆汁中の CL-M の回収量の結果は、Table 2 に示すようであった。

3 例の 24 時間後の総回収量は、平均 0.12% であった。

3. 代謝物の確認

Fig.1 のようにして精製した尿および胆汁の TLC で確認した単一のスポットは、Fig.2 に示すように前もって調製した標品の CL-NG と同時に TLC で展開すると全く同じ R_f 値を示した。また、この未知のスポット部分にくるものは、NRP によって紫色の強い発色を示し、グルクロン酸の存在を示した。

このようにして尿中および胆汁中の代謝物が CL-NG であることが確認された。

4. 検量線および代謝物の定量

標品の CL-NG のカラムクロマトグラフィーの溶出曲線から求めた検量線は Fig.3 に示すようであった。グラフの縦軸に面積 (cm²)、横軸に重量 (mg) をとった。

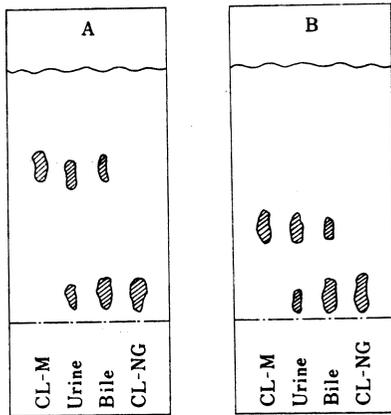
Table 1 Determination of urinary CL-M in rabbit (during 24 hrs)

	Dose (mg/kg)	mg/Rabbit	CL-M	
			mg	%
I	100	190.0	135.4	71.3
II		300.0	230.4	76.8
III		230.0	168.1	73.1

Table 2 Determination of biliary CL-M in rabbit (during 24 hrs)

	Dose (mg/kg)	mg/Rabbit	CL-M	
			μg	%
I	100	300.0	420.0	0.14
II		280.0	336.0	0.12
III		280.0	308.0	0.11

Fig.2 Thin layer chromatograms of urine and bile of rabbit administered CL-M



Solv. Sys.

(A) n-BuOH : Pyridine : H₂O (1 : 1 : 1)

(B) n-BuOH : n-ProOH : H₂O : (1 : 1 : 1)

Fig.3 Colistin N glucuronide standard curve

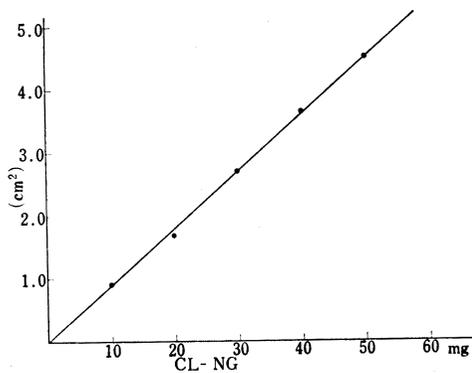


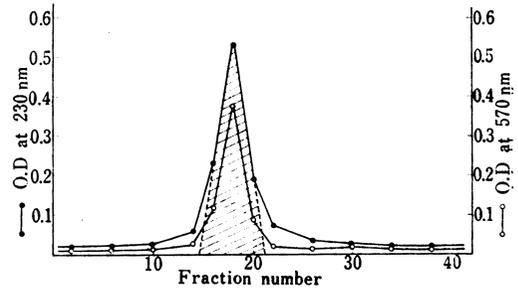
Table 3 Determination of urinary CL-NG in rabbit (during 24 hrs)

	Dried urine (mg)	CL-NG	
		mg	%
I	100.0	1.86	1.86
	600.0	10.85	1.81
II	200.0	3.82	1.90
	600.0	8.50	1.42
III	200.0	3.06	1.53
	600.0	10.18	1.70

尿および胆汁の DEAE-セファデックス A-25 でのクロマトグラフィーの溶出曲線は、Fig. 4, 5 に示すようである。この斜線部分の面積を算出し検量線 (Fig.3) から CL-NG の量を求めることができた。

その結果を Table 3, 4 に示した。尿中の CL-NG 含

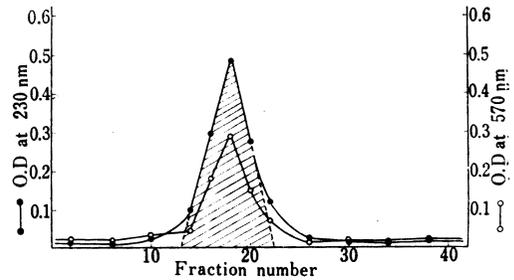
Fig.4 DEAE-Sephadex column chromatography of urine after gel filtration



Column : 10×900 mm

Eluant : 0.1 M TMA-CO₂ pH 7.6

Fig.5 DEAE-Sephadex column chromatography of bile after gel filtration



Column : 10×900 mm

Eluant : 0.1 M TEA-CO₂ pH 7.6

Table 4 Determination of biliary CL-NG in rabbit (during 24 hrs)

Dried bile (mg)	CL-NG	
	mg	%
100.0	6.50	6.50
200.0	12.64	6.32
300.0	21.30	7.10

量は、家兎 3 群中の平均で投与量に対して 1.7% であった。いっぽう、胆汁中の CL-NG 含量は、家兎 3 群の平均で 6.7% であった。

考 按

コリスチンメタンスルホン酸ナトリウムを家兎に静注し、その 24 時間尿および胆汁について CL-M の回収率ならびに代謝物の検索、代謝物の定量を行なった。

静注投与した CL-M の大部分が 24 時間以内に尿中に CL-M として回収され、また、CL-M の他に抗菌活性を持たない未知の物質が存在することが確認されたが、このものは別途に合成したコリスチン標品と TLC で比較したところ、その R_f 値から CL-NG であるこ

とが判明した。このことはすでに著者ら⁴⁾は薬学会で報告したが、この CL-NG が CL-M の生体内代謝物であることを明らかにするために今回は、家兎尿に CL-M を添加して 24 時間にわたって経時的にその活性の変化を調べてみたが、活性の変化はみられなかった。このことは明らかに CL-NG が生体内代謝物であることを示している。

胆汁についても尿と同様な方法で CL-M の回収を試みたが、胆汁中からはほとんど CL-M は回収されなかった。いっぽう、代謝物である CL-NG は、尿中よりはるかに多く存在していた。CL は、胆汁中で胆汁酸と結合して不溶性の沈殿物をつくることが知られている。これに対して CL-M は、比較的胆汁中では不活化されにくいといわれているが、牛胆汁末 4% 以上では不活化がおこるとい報告⁶⁾もある。そこで家兎胆汁末の 1.75%、5%、10% 水溶液に CL-M を添加し、24 時間にわたって経時的に活性を調べてみたが、胆汁濃度 1.75%、5% の場合は CL-M の残存活性は 95~100% を保ち、また、その活性値にも変化はみられなかった。しかし、胆汁濃度 10% では CL-M 添加後直ちに沈殿をつくり残存活性も 30~50% に低下したが、その後経時的には活性値の変化はみられなかった。いっぽう、今回実験に使用した家兎胆汁は、24 時間採集した全胆汁を凍結乾燥し、その濃度を測定したところ、本実験の場合 1.8~2.5% の濃度であった。したがって本実験に用いた家兎胆汁組織の胆汁酸による CL-M の活性値への影響はなかったものと思われる。

代謝物の定量にあたってカラムクロマトグラフィーを行なったが、ゲル透過で得られたピーク-I の画分には CL-M および CL-NG が含まれている。また、ピーク-II の画分は尿および胆汁の成分で分子量の比較的小さなものが溶出されているものと思われる。DEAE-セファデックスによるクロマトグラフィーにおいて、CL-M はカラム内に吸着され目的とする CL-NG だけが溶出されてくる。このものについては、TLC および NRP 法によって CL-NG であることを確認し、また、TLC にお

いては他のスポットは見られず単一のものと考えられる。

CL-NG の定量に使用した標品の CL-NG の検量線は、その重量とカラムクロマトグラフィーでの溶出面積から得られたものであるが、各スポットガー直線となり充分に検量線として使用できるものと思われる。

結 論

家兎に CL-M を静注した場合、

- (1) CL-M として投与 24 時間以内に尿中に約 75% 排泄され、胆汁中の排泄は微量であった。また、両者とも 24 時間以後の排泄はほとんどみられなかった。
- (2) 尿および胆汁中には代謝物として、CL-NG が存在することが確認された。その量は、尿中に平均 1.7%、胆汁中に平均 6.7% 排泄された。

文 献

- 1) 小山康夫, 黒沢秋雄: Colistin メタンズルホン酸誘導体の生体内に於ける抗菌性について。東京医事新誌 77(6): 355~356, 1960
- 2) SCHWARTZ, B. S.; M. R. WARREN, F. A. BARKLEY & L. LANDIS: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistin methanesulfonate. *Antibiotics Annual 1959/1960*: 41~60, 1960
- 3) 山田重男, 馬屋原敬民, 三橋矩昭, 若林一夫, 平塚幸蔵, 定岡啓三, 中沢 進, 渡辺 修, 佐藤肇, 松本朋徳, 野田伊津子: 静注用メタンズルホン酸コリスチンナトリウムに関する研究。*Jap. J. Antibiotics* 27(1): 8~14, 1974
- 4) 佐藤弘幸, 郷右近菊子, 大内 勝, 鈴木正義, 野田伊津子, 松本朋徳: コリスチンの代謝研究。日本薬学会, 第 93 年会, 1973
- 5) ISHIDATE, MORIZO & TOSHIO NAMBARA: Naphthoresorcinol picrate for the determination of glucuronic acid in physiological materials. *Pharm. Bull.* 5: 515~518, 1957
- 6) 真下啓明, 清水喜八郎, 原田敏雄, 国井乙彦, 畠山正己, 陣立恒雄, 山田栄八郎, 畠山 馨: 2, 3 の抗生剤の胆汁内排泄について。*Chemotherapy* 17(3): 147~148, 1963

STUDIES ON SODIUM COLISTIN METHANE SULFONATE (CL-M)
ON METABOLISM IN THE URINE AND BILE OF RABBITS

MASARU ABE, KIKUKO SHIMIZU, MASARU OUCHI and

TOMONORI MATSUMOTO

Kayaku Antibiotics Research Co., Ltd., Saitama

Following intravenous injection of sodium colistin methane sulfonate (CL-M) in male rabbits, the 24 hours urinary and biliary recovery of CL-M was examined by bioassay.

Further 24 hours urinary and biliary metabolite of CL-M and that recovery was examined by TLC, NRP, and column chromatography.

The results obtained were as follows.

- 1) CL-M was excreted about 75% in the urine and slightly in the bile within 24 hours after administration.
- 2) As metabolite, colistin-N-glucuronide was found on the average of 1.7% in the urine and 6.7% in the bile, respectively, within 24 hours after administration.