

Cephalexin の直腸投与法に関する基礎的研究 II

配合剤の選択法

新井俊彦・小松洋子・小松貞男

慶応義塾大学医学部微生物学教室

安田 耕 太 郎

メディセル研究所

(昭和 54 年 5 月 17 日受付)

経口セファロスポリン剤：Cephalexin (CEX) の坐剤設計に必要な配合剤の検討をおこなった。その結果、 β -lactamase の競合阻害剤では、酵素との結合活性が CEX より高く、なおかつ加水分解を受けないものでなければならぬことがわかった。これは現実的に困難であるので、 β -lactamase 活性、あるいは、その産生を阻害する非特異的物質で抗菌活性をもたないものをスクリーニングする、*in vitro* の系を開発し、これによって有効物質のスクリーニングを試みた。その結果、不満足なものであるが、sodium desoxycholate にその効果があることを見出した。これによって、スクリーニング系が有効に働くことが確認されたので、今後この系によって、さらに優れた配合剤を選択できるであろう。

序 文

われわれは経口投与の困難な乳幼児への投与や経口投与による腸管内細菌叢への影響を少なくするために汎用経口抗生剤 Cephalexin (CEX) の坐剤製剤設計のための基礎的研究をおこなっている。そして、前報¹⁾では CEX の血中への移行が、経口投与による小腸吸収にくらべて直腸における吸収でもそんなに遜色のないものであることを証明した。しかし、前報¹⁾でも指摘したように、グラム陽性菌が細菌叢の主体をなしている小腸とは異なり、 β -lactamase を産生するものが多いグラム陰性菌を多く含む大腸では、投与された CEX は吸収される前に加水分解されてしまう。そこで、これを防ぐために何んらかの薬剤を配合してこれらの作用を抑えなければならない。今報では、この目的で試みたいいくつかの配合剤の効果と今後よりすぐれた配合剤をスクリーニングする方法を報告する。

材料と方法

使用薬剤：軟カプセル坐剤用基剤に入れる CEX は 100メッシュに粒子サイズをそろえたものを用いた。この粉末および標準力価測定用 CEX 純末は日本抗生物質医薬品基準にしたがって製造されたものである。薬剤を直腸に投与するための坐剤用基剤 (B-4) は前報¹⁾に示したのを用いた。試験配合剤としては、 β -lactamase の競合阻害剤では Cephamycin C および Cefoxitin (いずれも MSD)、また非特異阻害剤として働く可能性があると

考えたものでは monolaurin (東京化成)、monostearin, cholesterol (いずれも関東化学) および sodium desoxycholate (SDC) (半井化学) を用いた。

実験動物および動物実験法：日本在来白色種家兔 (Coccidium-free) の 4~6 月令のものを用いた。動物管理法および投薬実験法は前報¹⁾と同じである。

CEX の力価測定法：前報¹⁾のように日本抗生物質医薬品基準にしたがって *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を指示菌として bioassay によって測定した。なお *in vitro* の実験で抗菌活性をもつ可能性のある物質が CEX と共に assay 系にもち込まれる場合は、力価標準曲線作成用の assay 標準液にそれら配合剤をそれぞれの濃度を含むものを加えて標準曲線および力価の測定値への配合剤の影響を除いた。

非特異的 β -lactamase 阻害物質検索法：CEX 耐性大腸菌を Bactopenassay broth (Difco) で振盪培養し、対数増殖期の培養に非特異的阻害効果の有無をしらべる薬剤を適当な濃度に加え、直ちに CEX を最終濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ に入れて培養を続ける。その後、経時的にサンプルをとり、生菌数を計算し、Millipore filter (HA) 濾液の CEX 活性を測定した。なお使用した CEX 耐性大腸菌 UU 68 株は臨床分離大腸菌株であり、その Bactopenassay agar 上での最小発育阻止濃度 (MIC) は 200 $\mu\text{g/ml}$ であった。

成 績

家兎での Cefoxitin および Cephamycin C 配合時の
CEX 活性の血中への回収

基剤に CEX を 250 mg/ml に加え、それに Cefoxitin あるいは Cephamycin C を CEX に対して 1, 2 および 3 倍に配合して CEX 50 mg/kg 体重の割合で家兎の直腸に投与し、血中 CEX 活性濃度の経時変化を求めた。いずれの薬剤を配合した場合でも血中に CEX 活性が投与後 30 分までは検出されたが、60 分後にはまったく検出されなかった。30 分後の血中 CEX 活性は Cefoxitin の 1, 2 および 3 倍の配合でそれぞれ 1 μ g/ml, 1.2 μ g/ml, および 4.1 μ g/ml であった。Cephamycin C 配合での CEX 活性は配合量が 3 倍の場合にだけ残っており、その値は 1.5 μ g/ml であった。

In vitro での monolaurin, monostearin, cholesterol
および SDC β -lactamase の活性阻害効果

大腸菌 UU 68 株の対数増殖期培養に monolaurin, monostearin および cholesterol は最終濃度 1%, SDC は最終濃度 0.3% に加え、それに CEX を最終濃度 200 μ g/ml に入れて経時的に生菌数および滲液中の残存 CEX 活性を測定した。培養液中の生菌数を Fig. 1 に、CEX 活性の経時変化を Fig. 2 に示した。反応液中の生菌数は CEX だけを入れ配合剤を加えなかったものを含めて、いずれも最初の 60 分間に 4 分の 1 程度に減少しており、配合剤による殺菌効果はこの濃度では著明ではない。一方、反応液中の CEX 活性は SDC 配合のものを除いて 60 分間でまったくなくなることがわかった。すなわち、CEX だけで配合剤無添加のものおよび cholesterol を懸濁させた液ではすでに 30 分間で CEX 活性が検出されず、monolaurin および monostearin を 1% に懸濁させた液でも 30 分後の CEX 活性は非常に低かった。それに対して 0.3% に SDC を配合した液では 60 分後でもまだ 10% に近い CEX 活性が残存していた。なお、monolaurin, monostearin および cholesterol は水によく溶けず、1% では懸濁状態であり、大腸菌に対して殺菌効果がないと同時に bioassay の指示菌である *B. subtilis* にもまったく抗菌活性を示さなかったが、SDC は水によく溶け、腸内細菌である大腸菌には殺菌効果は強くなかったが *B. subtilis* には抗菌活性を示した。この場合 CEX と SDC の配合による *B. subtilis* への抗菌活性は相乗、相加関係がほとんどなく、それぞれ独立に働くことがわかった。その結果 CEX 活性の標準曲線そのものは、SDC の配合によって大きな影響を受けないが、SDC による *B. subtilis* の発育阻止円に入る点以下の CEX 活性が測定できなくなる。すなわち、SDC 無添加では CEX 活性の検出限界は 0.7~1 μ g/ml

Fig. 1 Survival curves of Cephalosporin resistant *E. coli* cultures in Bactopenassay broth containing 200 μ g/ml of Cephalaxin and various chemical substances

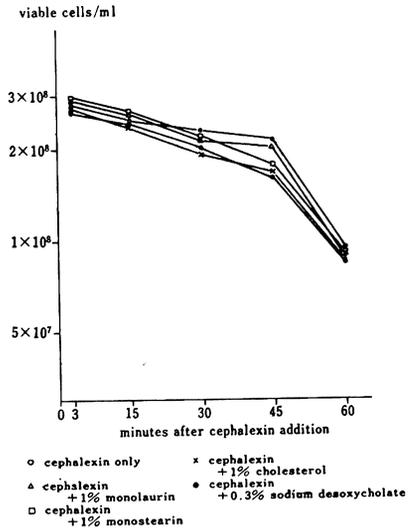


Fig. 2 Residual cephalaxin activities in cephalosporin resistant *E. coli* cultures in Bactopenassay broth containing 200 μ g/ml of Cephalaxin and various chemical substance

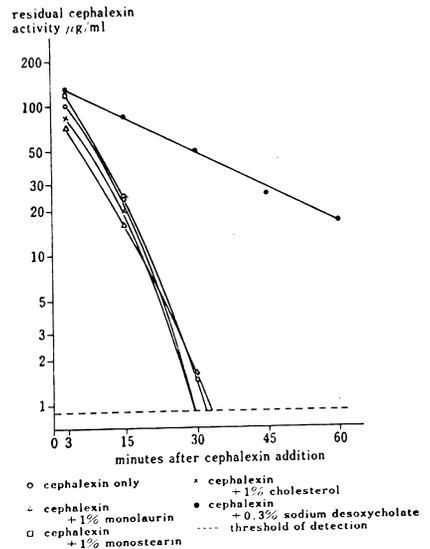
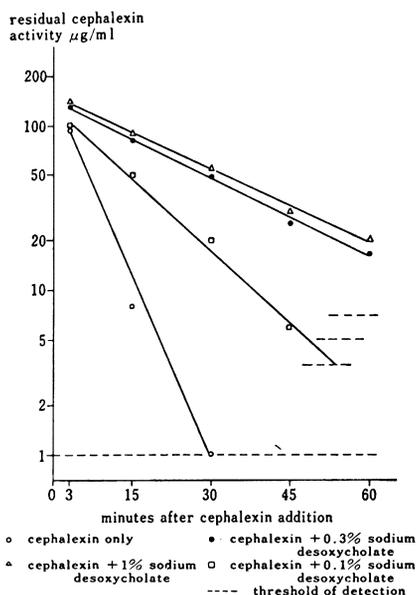


Fig. 3 Residual cephalaxin activities in Cephalosporin resistant *E. coli* cultures in Bactopenassay broth containing 200 $\mu\text{g/ml}$ of Cephalaxin and various concentrations of sodium desoxycholate



であるが SDC の 0.1, 0.3 および 1% の添加では検出限界はそれぞれ, 3.5, 5.0 および 7 $\mu\text{g/ml}$ となる。

In vitro での SDC 配合量と残存 CEX 活性との関係

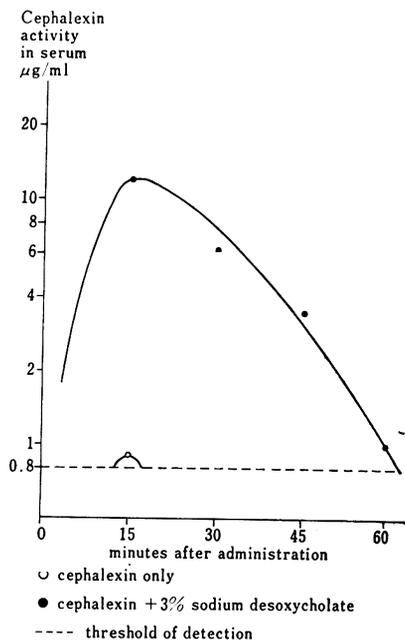
SDC の配合量を最終濃度で 1, 0.3, 0.1 および 0% として大腸菌 UU 68 株による CEX の不活化をしらべた (Fig. 3)。 $2\sim 3 \times 10^8/\text{ml}$ の菌量では SDC の CEX 不活化阻害効果は 0.3% までまったく変わらず最大で、それ以下になると配合量の低下に従って CEX の不活化がはやくなることがわかった。しかし、SDC は 1% 添加では大腸菌に対してやや抗菌活性を示すようになることもわかった。

家兎での SDC 配合による CEX 活性の血中への回収基剤に CEX を 250 mg/ml に加え、さらに SDC を最終濃度で 3% に配合して CEX 100 mg/kg 体重の割合で家兎の直腸に投与し、血中 CEX 活性の経時変化を求めた (Fig. 4)。その結果 SDC 無添加群では 15 分後にほとんど検出限界に近い抗菌活性のみみられるだけであるのに対して、SDC 配合群では投与 60 分後まで血中に CEX 活性が検出された。

考 察

われわれは前報¹⁾で CEX の直腸吸収が経口投与による小腸吸収にくらべてそれほど遜色のないこと、しかし

Fig. 4 Cephalaxin activities in blood serum of rabbit after rectal administration of cephalaxin (100 mg/kg body weight) base containing 3% sodium desoxycholate



直腸内の細菌叢には CEX を加水分解する β -lactamase を生産する細菌が多いので CEX は吸収される前にこれによって不活化されることを示した。したがって CEX の坐剤を作るにはこれらの細菌を抑えるか、または β -lactamase 活性を中和しなければならない。事実、前報¹⁾でも直腸内細菌を殺す kanamycin (KM) の配合がこの目的を達することを示した。しかし、直腸内であるといえども腸管内でそれなりの機能をもつ腸管内の細菌を殺すことは生理学的に問題であるし、同時に KM のような比較的耐性菌²⁾の多い薬剤の配合では、反復投与によって直腸内に KM 耐性の細菌を増やす結果となって、その KM 耐性菌の産生する β -lactamase による CEX 不活化によって KM の配合効果が失われる可能性が高い。したがって、 β -lactamase だけを中和あるいは不活化して、細菌叢には影響を与えない薬剤や、反復投与によってその配合剤に耐性の細菌を選択しない薬剤が配合剤として求められる。

そこで、まず β -lactamase の競合阻害剤であり、腸管で吸収されず、抗菌活性のほとんどない Cepharmycin C と、同様だが抗菌活性のある Cefoxitin の配合を試みた。これらは β -lactamase に対して CEX 以上に結合活性が高いから競合阻害剤として優れたものであると期待された。しかし、結果はこれらの薬剤を非常に多量に

配合したにもかかわらず、直腸内の β -lactamase量に比して少なかったために、かなり急速にこれ自身が加水分解されて効果を失うことがわかった。すなわち、坐剤設計上配合できる最大量の使用によっても実用上の効果はほとんど期待できないことがわかった。酵素との結合活性が高く、なおかつ加水分解を受けないものでなければ、の目的には役立つたないのである。しかし、現実にはこのようなものを合成することは困難である。

そこで、殺菌効果がなく、 β -lactamase活性、あるいは細菌細胞の活性 β -lactamase産生を抑制する非特異的物質を求めることにした。まず、中鎖脂肪酸モノグリセリドにCEXの直腸吸収を助ける作用があるという報告³⁾がすでにあつたので、それに属するmonolaurinとmonostearinを、また細胞膜成分に近い構造をもつものとしてcholesterolを、さらに胆汁に含まれていて腸管にも存在する界面活性剤SDCについてこのような効果があるかどうかを*in vitro*で検討した。その結果、SDCにだけこの効果のあることがわかった。すなわち、濃度を上げるとやや抗菌活性が出現するが、抗菌活性のほとんどない濃度でも β -lactamase活性を抑制することが明らかになった。そこで、これらの配合効果を家兎

で確かめた。その結果、直腸粘膜にまったく障害を与えない濃度の配合でも*in vivo*で、この効果を確かめることができた。しかし、その効果は、前報¹⁾で用いたKMの配合効果にくらべて、まだ不十分なものであつた。また、SDCは濃度を上げると抗菌活性があり、自然な物質であることは優れているが、高濃度では腸管粘膜に障害を与える可能性もあるから、望ましい配合剤とはいえない。

いずれにしても、さらに優れた効果のある配合剤の開発が必要であるが、そのスクリーニング手段として、われわれが開発した*in vitro*の系が役立つものと思う。目下さらに新しい配合剤をスクリーニング中である。

文 献

- 1) 新井俊彦, 小松洋子, 小松貞男, 安田耕太郎: Cephalixinの直腸投与法に関する器礎的研究, I, 直腸吸収について。Chemotherapy 26: 757~761, 1978
- 2) 中谷林太郎: 薬剤耐性。講談社, 東京, 1976
- 3) 日本国特許庁: ペニシリン類およびセファロスポリン類の直腸投与製剤の製造法。公開特許公報, 昭 52-83924, 1977

STUDIES FOR THE RECTAL ADMINISTRATION OF CEPHALEXIN. II

A Method for Screening Effective Additives

TOSHIHIKO ARAI, YOKO KOMATSU, SADA O KOMATSU

Department of Microbiology, Keio University School of Medicine

and KOTARO YASUDA

Medisel Institute, Ltd.

For the effective rectal administration of cephalixin, rectal capsule should contain not only cephalixin, but also the drug which neutralizes cephalosporinase activity or inhibits the production of this enzyme by intestinal bacteria. We examined some competitive inhibitors of cephalosporinase whether they were effective as these additives or not, and found that it was difficult to find out the actually effective additives from this type of inhibitors. So, we developed the *in vitro* system for screening non-specific inhibitors for cephalosporinase or cephalosporinase-producing bacteria, and proved that this system worked well for some additives such as sodium desoxycholate. Further screening of improved additives is in progress.