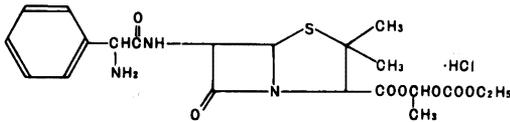


Bacampicillin hydrochloride の生体内変化について

加藤安之・高松陸男・秋山洋一・飯盛勝義
本庄勝彦・栗山経渡
吉富製薬株式会社化学研究所

摘 論

Bacampicillin hydrochloride (BAPC) は Ampicillin (ABPC) のエステル誘導体で、その化学構造は次に示した通りである。



BAPC は経口投与後、消化管から吸収される間に、エステラーゼによって ABPC に加水分解されることが知られている¹⁾。また BAPC の血清中エステラーゼによる加水分解速度には、動物種差があることが報告されている¹⁾。

しかしこれらの実験は、微生物学的定量法によっている為、ABPC のみが測定されており、生体内における未変化体 (BAPC) の残存量についての情報は全く得られていない。

著者らは、化学的定量法による未変化の BAPC および加水分解生成物 ABPC [およびその代謝物 α -aminobenzylpenicilloic acid (ABPA)] の分別定量法を確立し、ヒトおよび各種動物の血漿中における BAPC の加水分解速度を測定した。また、BAPC を経口投与したヒトおよびイヌの血液について上記の分別定量ならびに、バイオオートグラフィーを行ない、未変化 BAPC の存在しない事を確認した。

実験材料および実験方法

1. 使用薬剤

BAPC は ABPC 力価として $661\mu\text{g}/\text{mg}$ のものを、ABPC は $891\mu\text{g}$ (力価)/ mg の Na 塩を使用した。

2. 被験動物および被験者

雄性 Wistar ラット(体重; 約 200g)、雄性白色ウサギ(体重; 約 3 kg) および雄性ビーグル犬(体重; 約 10kg) を使用した。

ヒト試験は、本人の自由意志に基づいて志願した健康な成人男子(年齢; 35~43才, 体重; 52~79kg) 3名につ

いて実施した。

3. 定量法

MIYAZAKI^{ら2,3)} の Pivampicillin, ABPC および ABPA の分別定量法を一部改変し、けい光法により血液および血漿中の BAPC と ABPC・ABPA の分別定量を行った。本定量法では ABPC を ABPA に導いて定量しているのので、両者の合計量を ABPC 量に換算して示した。

操作手順の概要は Scheme 1 に示した通りである。

(1) BAPC と ABPC・ABPA の分離

pH 7.0-リン酸緩衝液 (0.2N- Na_2HPO_4 6 ml + 0.2N- KH_2PO_4 4 ml) 2 ml およびトルエン 5 ml を入れた共栓試験管内に血液または血漿試料 1 ml を入れ、直ちに室温で振とう抽出した。遠心後トルエン層 4 ml を分取して BAPC の定量に供した。

水層はさらに、上記抽出操作を 2 回くり返して BAPC を完全に除去したのち、その 1 ml を分取して ABPC・ABPA の定量に供した。

(2) BAPC の定量

トルエン層 4 ml に 0.33N- NaOH 1.5 ml を加え 15 分間振とうして BAPC を ABPA に分解して、水層へ移行させた。遠心後水層 1.2 ml に、0.63N- HCl 0.8 ml と pH 2.5-クエン酸緩衝液 (0.1M-第二クエン酸ナトリウム 3.3 ml + 0.1N- HCl 6.7 ml) で調製した 0.01% HgCl_2 1 ml を加え、5 分間室温放置ののち pH 6.0-リン酸緩衝液 (0.2N- Na_2HPO_4 1.5 ml + 0.2N- KH_2PO_4 9 ml) 5 ml および 2N- NaOH 0.2 ml を加えて、40℃ の水浴中に 35 分間放置した。水冷後 10N- NaOH 0.2 ml を加えたのち、励起波長 345 nm, けい光波長 420 nm でけい光強度を測定した。

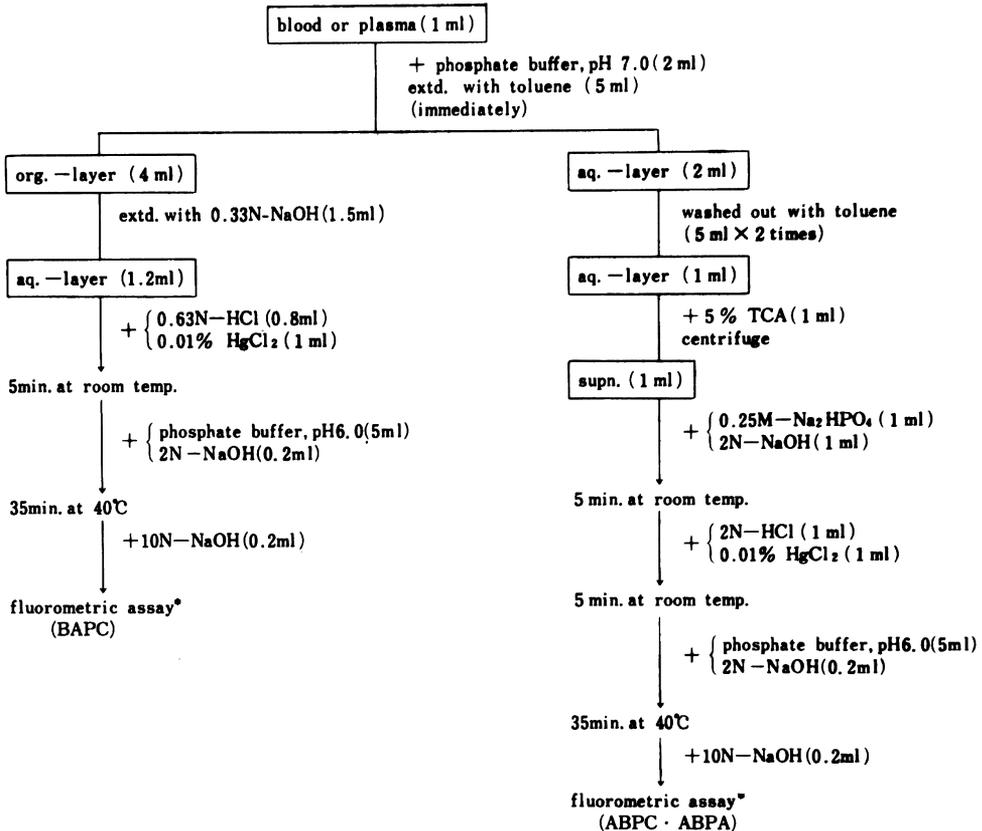
けい光標準溶液には quinine sulfate の 0.1N- H_2SO_4 溶液を用い、測定機器は日立 204 型けい光光度計を使用した。

(3) ABPC・ABPA の定量

前記水層 1 ml に 5% トリクロル酢酸 1 ml を加えて除たん白した。遠心後上清 1 ml をとり、0.25M- Na_2HPO_4 1 ml, ついで 2N- NaOH 1 ml を加えて 5 分間室温に放

Scheme 1 Procedure of separatory determination of BAPC and ABPC · ABPA in the blood or plasma

Detailed procedure was described in the text
* Fluorescence intensity was measured at 345nm excitation wavelength and 420nm emission wavelength



置して、ABPCをABPAに加水分解したのち2N-HCl 1mlとpH 2.5-クエン酸緩衝液で調製した0.01% HgCl₂ 1mlを加えた。以下(2)の方法と同様の操作を行い、けい光度を測定した。

4. バイオオートグラフィー

Eastman chromatogram No. 6061 silicagel plate を用いて薄層クロマトグラフィーを行った。

展開溶媒は酢酸ブチル・n-ブタノール・氷酢酸・1% リン酸緩衝液、pH 6.0 (50 : 9 : 25 : 15, v/v) の上層部 および酢酸エチル・氷酢酸・水 (8 : 1 : 1, v/v) の各溶媒系を用いた。スポット量は以下の通りである。

ABPC標準試料：1 μg/ml イヌ血漿 5 μl (5 ng)

BAPC標準試料：ABPC 力価として 3.3 μg/ml イヌ血漿 5 μl (16.5 ng)

ABPC-アセトアルデヒド結合体標準試料：ABPC 5mg をアセトアルデヒド水溶液 (40 μg/ml) 10ml に溶解。30分間室温放置後その一部をイヌ血漿で250倍試釈、5 μl をスポット。

血漿試料：ヒトの場合は 5 ~ 10 μl。

イヌの場合は薬物無処置血漿で5倍希釈、その5 μl をスポット。

いずれの試料もスポットまでの操作は、氷冷下にて迅速に行なった。

バイオオートグラフィーには、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を試験菌として用いた。

検定用培地には heart infusion agar (栄研) を用い、日抗基(1974年)に準じて調製した菌液を 1.7 × 10⁷ cells/ml の割合で接種した。

本法による ABPC の検出限界は、0.6ng/スポットであった。

5. 加水分解速度の測定

薬物無処置のラット、ウサギ、イヌおよびヒトの新鮮血漿中に BAPC を 66 μ g (力価)/ml の濃度で添加して 37 $^{\circ}$ C または 22 $^{\circ}$ C で加温振とうした。一定時間ごとに試料の一部を採取し、直ちに試料中の BAPC 残存量を測定した。

6. 血液中 BAPC および ABPC・ABPA 濃度

イヌの場合には BAPC を 0.5% メチルセルロース懸濁液 (ABPC 力価として 331mg/5ml) として 5ml/匹の割合で経口投与し、さらに飲料水 20ml を追加投与した。投与 20 時間前から採血終了時まで絶食させ、水のみを自由に与えた。

ヒトの場合には朝食後約 2 時間目に BAPC のフィルム・コート錠 (1 錠中に ABPC 力価として 250mg 含有) 各 2 錠を約 50ml の飲料水を用いて経口投与した。

血液は投与直前、投与後 20 分、40 分および 60 分目に各 2.5ml をヘパリン処理を施した注射筒を用いて採取した。血液中薬物濃度の測定は採血後直ちに行い、バイオオートグラム作成の場合は血液を氷冷下で遠心分離して血漿を得、各時間ごとにヒト、イヌとも各 3 例分をプールの、実験に供するまで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

実験成績および考察

1. BAPC の血漿中における加水分解速度

ヒトおよび各種動物の血漿に BAPC を 66 μ g (力価)/

ml の濃度に添加し、37 $^{\circ}$ C または 22 $^{\circ}$ C に保存し、残存 BAPC を測定した結果を Fig. 1 に示した。血漿中での BAPC の加水分解速度には動物種差がみられ、ラットが最も速く、ついでウサギ、ヒト、イヌの順であった。

特にラットの場合には、BAPC の加水分解活性が著しく高く、定量操作中にも加水分解をうけるため正確な分解速度は算出できなかった。本実験の成績は Boudin¹¹⁾ の報告ともほぼ一致している。

イヌの血漿の場合、反応温度を 37 $^{\circ}$ C から 22 $^{\circ}$ C へ低下させると分解速度は著しく遅延し、半減期 (T1/2) で比較

Table 1 Blood concentrations of BAPC and ABPC・ABPA in healthy volunteers after oral administration of BAPC (500mg ABPC titer/man)

| Volunteer (Body wt.) | Time after administration (min.) | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 20 | | 40 | | 60 | |
| | BAPC | ABPC* | BAPC | ABPC* | BAPC | ABPC* |
| T. M. (79kg) | U. D.** | <0.10 | U. D. | 0.48 | U. D. | 0.90 |
| Y. K. (62kg) | U. D. | 0.86 | U. D. | 4.71 | U. D. | 5.13 |
| R. T. (52kg) | U. D. | 0.18 | U. D. | 1.85 | U. D. | 5.36 |
| mean | U. D. | 0.38 | U. D. | 2.35 | U. D. | 3.80 |

(μ g/ml)

* including ABPA

** undetectable (less than 0.05 μ g/ml)

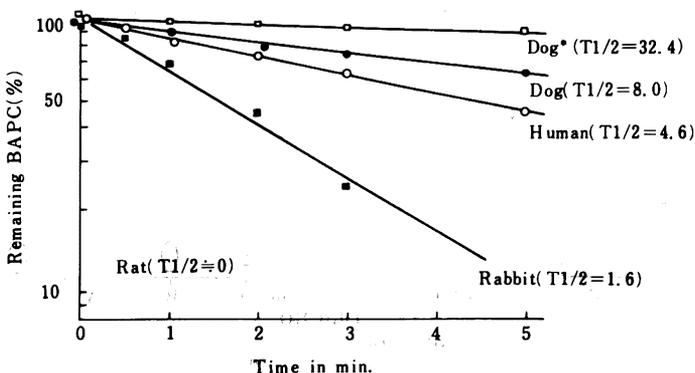
Fig.1 Hydrolysis of BAPC in the plasma

Each point represents the average of 3 experiments
Regression lines were obtained by the method of least squares

Incubation temp.: 37 $^{\circ}$ C (*22 $^{\circ}$ C)

Initial conc. of BAPC: 66 μ g ABPC titer/ml

T1/2; half-life (min.)



すると約 4 倍に延長した。

以上の結果から、BAPC はヒトおよび各種動物の血漿により加水分解されるが、その速度は動物種によって異なることおよび温度条件によっても加水分解速度が変化することが確認された。

2. 血液中の BAPC および ABPC・ABPA 濃度

血漿中での BAPC の加水分解速度が比較的遅かったイヌおよびヒトについて、BAPC 経口投与後の末梢血液中 BAPC および ABPC・ABPA 濃度を測定した (Table 1, 2)。

ヒトおよびイヌの血液中 ABPC・ABPA 濃度は、かなりの値 (測定範囲内での最高濃度はヒトおよびイヌで、それぞれ 5.36 μ g/ml, 23.65 μ g/ml) を示した

Table 2 Blood concentrations of BAPC and ABPC·ABPA in male dogs after oral administration of BAPC (331mg ABPC titer/dog)

| Dog No. (Body wt.) | Time after administration (min.) | | | | | |
|-----------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 20 | | 40 | | 60 | |
| | BAPC | ABPC* | BAPC | ABPC* | BAPC | ABPC* |
| 1 (10.1kg) | U. D.** | 7.50 | U. D. | 17.46 | U. D. | 17.28 |
| 2 (10.5kg) | U. D. | 18.11 | U. D. | 21.42 | U. D. | 19.14 |
| 3 (10.2kg) | U. D. | 9.56 | U. D. | 23.65 | U. D. | 22.63 |
| mean | U. D. | 11.72 | U. D. | 20.84 | U. D. | 19.68 |

(μg/ml)

* including ABPA

** undetectable (less than 0.05 μg/ml)

が、いずれの場合にも BAPC は検出されなかった。これらの事実は、前述の血漿中における BAPC の加水分解速度の成績と考え合せると、経口投与された BAPC の大部分が体循環血液中へ移行する以前に ABPC に加水分解されている事を示唆している。

3. バイオオートグラム

BAPC をヒトに 500mg(力価)/man あるいは、イヌに 331mg(力価)/匹 経口投与後20分および60分目に採取し

た血漿のバイオオートグラムを Fig. 2, 3 に示した。いずれも ABPC と Rf 値の等しいスポットのみが検出され、BAPC は認められなかった。

未変化の BAPC が検出されなかった知見は、前述の分別定量の結果とも一致している。一方、MURAKAWA⁴⁾ は ABPC を経口投与したヒトおよび各種動物の血液中や尿中に、ABPC のほか抗菌活性を有する ABPC-アセトアルデヒド結合体も少量ではあるが存在する事を報告している。しかし本実験においては、ヒトおよびイヌの血漿中に ABPC-アセトアルデヒド結合体が検出されなかった。

これらの知見は BAPC が、生体内で ABPC として抗菌活性を示すとする従来¹⁾の成績¹⁾を強く支持するものである。

要 約

1. 血液または血漿中の Bacampicillin (BAPC) および Ampicillin (ABPC)· α -aminobenzylpenicilloic acid (ABPA) のけい光法による分別定量法を確立した。
2. ヒトおよび動物の血漿中エステラーゼによる BAPC の加水分解速度には動物種差がみられ、ラットが最も速く以下ウサギ、ヒト、イヌの順であった。
3. BAPC を経口投与したヒトおよびイヌの末梢血液中には高濃度の ABPC·ABPA を認めたが、未変化の BA

Fig.2 Bioautograms of the plasma of human and dogs after oral administration of BAPC

A; plasma sample at 20 min. after administration
B; plasma sample at 60 min. after administration
Doses of BAPC are expressed as ABPC titer
Solvent; butyl acetate, butanol, acetic acid
1% phosphate buffer (50:9:25:15, V/V)
TLC; Eastman chromatogram sheet No.6061(silica gel)
Organism; *M. luteus* ATCC 9341

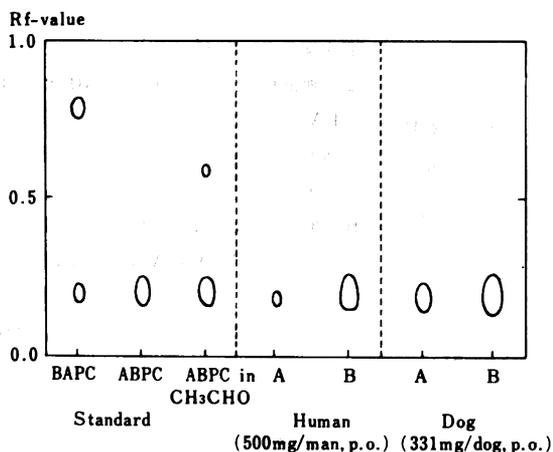
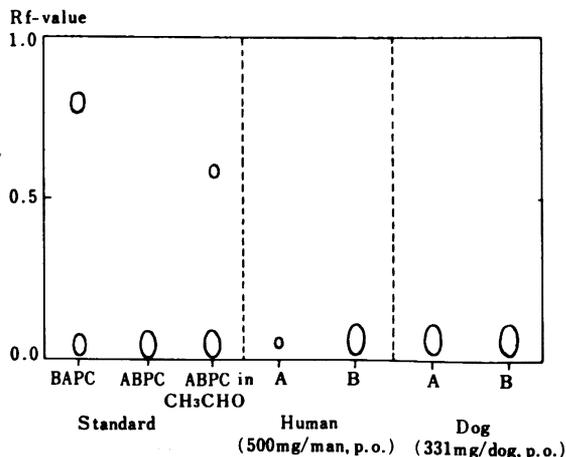


Fig.3 Bioautograms of plasma of human and dogs after oral administration of BAPC

A; plasma sample at 20 min. after administration
B; plasma sample at 60 min. after administration
Doses of BAPC are expressed as ABPC titer.
Solvent; ethyl acetate, water, acetic acid (8:1:1, V/V)
TLC; Eastman chromatogram sheet No.6061(silica gel)
Organism; *M. luteus* ATCC 9341



PCは全く見出されなかった。

4. バイオオートグラフィーにより、BAPCを経口投与したヒトおよびイヌの血漿中抗菌活性物質は、ABPCのみであることが確認された。

(本研究は吉富製薬株式会社、台糖ファイザー株式会社共同企画に基づいて実施されたものである。)

文 献

- 1) BOUDIN, N.O.; B. EKSTRÖM, U. FÖRSGREN, L. P. JALAR, L. MAGNI, C.H. RAMSAY & B. SJÖBERG: Bacampicillin, a new orally well-absorbed derivative of ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8 : 518~525, 1975
- 2) MIYAZAKI, K.; O. OGINO & T. ARITA: Fluorometric determination of ampicillin. *Chem. Pharm. Bull.* 22 : 1910~1916, 1974
- 3) MIYAZAKI, K.; O. OGINO, M. NAKANO & T. ARITA: Fluorometric determination of ampicillin and aminobenzylpenicilloic acid in presence of pivampicillin in body fluids. *Chem. Pharm. Bull.* 23 : 178~183, 1975
- 4) MURAKAWA, T.; Y. KONO & M. NISHIDA: Studies on the formation and activity of the transformation product of ampicillin. II. *J. Antibiotics* 25 : 421~426, 1972

BIOTRANSFORMATION OF BACAMPICILLIN HYDROCHLORIDE

YASUYUKI KATO, RIKUO TAKAMATSU, YOH-ICHI AKIYAMA,
KATSUYOSHI ISAGAI, KATSUHIKO HONJO and TSUNETO KURIYAMA

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.

1. The analytical method was established to separately determine bacampicillin hydrochloride (BAPC), and the total quantity of ampicillin (ABPC) and α -aminobenzylpenicilloic acid (ABPA) in the blood or plasma.
2. Species difference was observed in the hydrolysis rates of BAPC in the plasma of human and animals. The rate was decreased in the order of rats, rabbits, human, and dogs.
3. In the peripheral blood of human and dogs after oral administration of BAPC, unchanged drug was not detectable, though ABPC was found.
4. ABPC was, bioautographically, found to be the only bioactive substance in the plasma after oral administration of BAPC to human or dogs.