

Ampicillin の新しいエステル体：Lenampicillin (KBT-1585) の基礎的評価

山川 洋志・石井 久一・五島 瑛智子

東邦大学医学部微生物学教室

経口ペニシリン剤として開発された Ampicillin のエステル体 Lenampicillin (KBT-1585, LAPC) の *in vivo* および *in vitro* の抗菌力について検討し、以下のような結果を得た。

1. KBT-1585 の *Escherichia coli* NIHJ JC-2 に対する *in vitro* 殺菌効果は、Ampicillin (ABPC) より遅れて発現するが、ヒト血清で処理すると、3 位側鎖が加水分解され ABPC が遊離するため、ABPC と同等の効果が得られた。
2. KBT-1585 をヒト血清、マウス血清およびマウス腸管 homogenate で処理すると、bioautogram 上で、ABPC と同じ位置にのみ抗菌活性のスポットを認め、本剤が生体内では ABPC として作用することが確認された。
3. KBT-1585 の MIC および MBC は、KBT-1585 が *in vitro* で分解する過程で生ずる diacetyl および acetoin の存在下においても変動せず、抗菌力への影響は認められなかった。
4. KBT-1585 を経口投与後のマウス血清中濃度は 15 分でピークに達し、Bacampicillin (BAPC) と同等であり最高濃度は ABPC より約 5 倍高く、BAPC より低かった。
5. 経口投与によるマウス実験的感染症の治療効果は、KBT-1585 と BAPC は、ほぼ同等であり ABPC より良好であった。

Lenampicillin (KBT-1585) は Fig. 1 に示すような構造を有する化合物で、鐘紡株式会社薬品研究所で開発された ABPC の prodrug である。本剤は ABPC をエステル体として腸管吸収を高めるとともに、体内での分解過程で従来の prodrug のように人体に有害なアルデヒド体を形成しないことが特徴である^{1,2)}。

本報告では、KBT-1585 の抗菌力を *in vitro* では殺菌作用、特に血清添加の影響について検討するとともに、*in vivo* でマウス実験的全身感染モデルに対する本剤の治療効果を BAPC、ABPC および Amoxicillin (AMPC) を対照薬とした実験成績から、KBT-1585 の基礎的評価を行なった。

I. 材料および方法

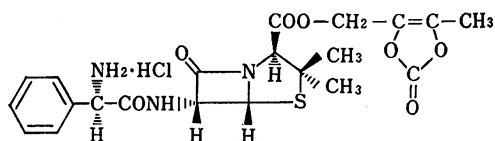
1. 使用薬剤

- KBT-1585 (力価 642.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 鐘紡)
 BAPC (力価 663.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 鐘紡)
 ABPC (力価 847.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 東洋醸造)
 AMPC (力価 839.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ビーチャム)

2. 抗菌力測定法

寒天平板希釈法は、日本化学療法学会による MIC 測定法に準じて行なった³⁾。液体希釈法は、Heart infusion broth (Difco) を用いた。KBT-1585 と BAPC の濃度は、

Fig. 1 Chemical structure of KBT-1585



ABPC の力価に換算して用いた。

3. 殺菌作用

E. coli NIHJ JC-2 を試験菌とし Heart infusion broth (Difco) 中に一夜、37°C で前培養した菌液を同一培地に 10^5 cells/ml となるよう接種し、37°C で 1 時間振盪培養後、各種濃度の薬剤をそれぞれ加え、37°C で振盪培養し、経時的に菌液を採取し、その生菌数を測定した。また、KBT-1585 の 3 位側鎖の血清による加水分解を調べる目的で、新鮮ヒト血清に KBT-1585 の濃度が 10 mg/ml となるように加え、37°C 30 分間反応させた後、薬剤の最終濃度が各々、1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう菌液に加え、37°C で振盪培養し、経時的に菌液を採取し、生菌数を測定した。なお、この際 *E. coli* NIHJ JC-2 については、ヒト新鮮血清は殺菌作用を示すが 56°C 30 分の非動化によりこの殺菌作用は失われることが知られている⁴⁾

ので、56°C 30 分非働化ヒト血清を用い同様の実験を試みた。

4. 血清および腸管 homogenate による KBT-1585 の加水分解

ヒト血清、マウス血清およびマウス腸管を5倍量の 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0) で homogenize した後、3,000 rpm、10 分間遠心分離した上清と KBT-1585 の濃度 10 mg/ml で 37°C 30 分間反応させた後、等量の 0.1 M Phosphate buffer を加え、Centriflo® を用い、3,000 rpm、10 分間遠心分離により限外ろ過を行ない、ろ液の 10 μ l を kieselgel 60 F₂₅₄ にスポットし、展開溶媒として、*n*-buthylacetate: *n*-buthanol: acetic acid: 1 % phosphate buffer = 50:9:25:15 を用いて展開、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を試験菌として、bioautogram を作成した。

5. マウス血清中濃度

ICR 系雄、体重 19 \pm 1 g マウスを用い、KBT-1585、ABPC、BAPC および AMPC を各々 1 mg/0.2 ml/mouse を経口用ゾンデにより、経口投与し、経時的に 1 群 5 匹のマウスから心臓穿刺により、それぞれ 1 ml を採血後、プールし、血清分離し、*B. subtilis* ATCC 6633 を試験菌とした Paper disc 法により、同時に作成した標準曲線により血清中濃度を測定した。なお、実験期間中動物は、自由摂餌、摂水とした。

6. 実験的マウス全身感染症に対する治療効果

ICR 系雄マウス (19 \pm 1 g) に、一夜培養した被検細菌を、生理食塩水に懸濁し、菌数を OD₄₈₀ で調整した後、その 0.5 ml を腹腔内注射により全身感染させた。少量菌感染群は、最終濃度 5 % の gastric mucin を細菌

懸濁液に添加した。感染 1 時間後に各薬剤を経口投与し、以後 1 週間マウスの生死を観察し、生残率から ED₅₀ を Van der Waerden 法により算出した。なお、KBT-1585 および BAPC の ED₅₀ は ABPC の濃度に換算した。

II. 実験成績

1. *In vitro* 殺菌作用における KBT-1585 の特徴 —ヒト血清添加の影響—

E. coli NIHJ JC-2 に対する ABPC、KBT-1585 および血清処理 KBT-1585 の殺菌作用成績を、Fig. 2、Fig. 3、Fig. 4 に示した。

KBT-1585 の *E. coli* NIHJ JC-2 に対する増殖抑制は、1.65、3.13、12.5 μ g/ml 添加のいずれも ABPC に比べて遅れて発現し、殺菌効果が現われるまでに若干の増殖さえ認められている。しかし、KBT-1585 をヒト血清で処理した場合、また、56°C 30 分間非働化ヒト血清で処理した場合においても、薬剤添加直後から菌の増殖は抑制されるようになり、同様に処理した ABPC および非処理 ABPC の場合とほぼ一致した。この様に KBT-1585 の殺菌効果が遅れる現象は、KBT-1585 が血清中の酵素により分解をうけ、ABPC となって抗菌力を発揮することを示唆している。

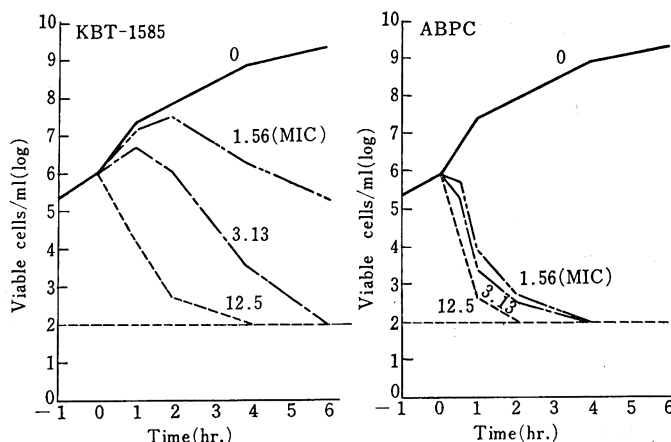
2. 血清および腸管 homogenate 処理

血清および腸管 homogenate で加水分解した後 bioautogram を Fig. 5 に示した。

KBT-1585 はヒト血清、マウス血清およびマウス腸管 homogenate のいずれでも 3 位側鎖が加水分解され、ABPC と同じ位置に活性スポットを生じた。

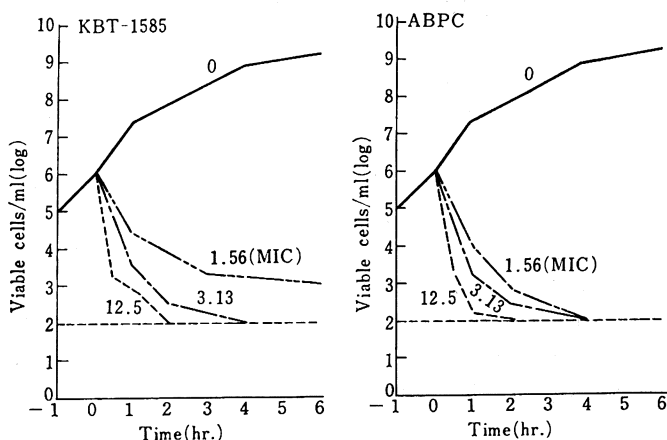
3. KBT-1585 分解産物の抗菌力への影響

Fig. 2 Bactericidal activities of KBT-1585 and ABPC against *E. coli* NIHJ JC-2



Culture medium: Heart infusion broth (Difco)

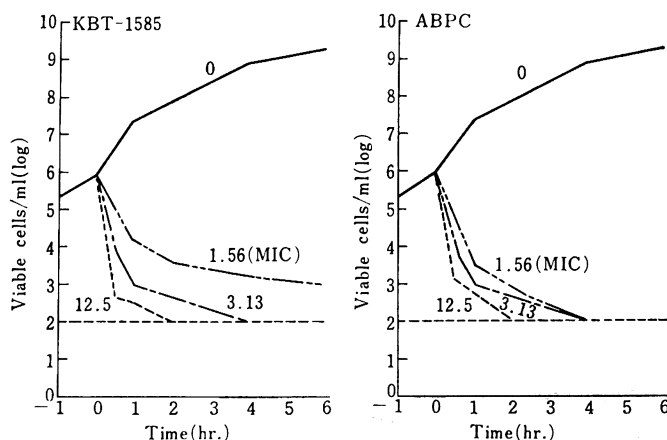
Fig. 3 Bactericidal activities of KBT-1585 and ABPC treated with human serum against *E. coli* NIHJ JC-2



Culture medium : Heart infusion broth(Difco)

KBT-1585 and ABPC were incubated with human serum at 37°C for 30 minutes.

Fig. 4 Bactericidal activities of KBT-1585 and ABPC treated with heat treated human serum against *E. coli* NIHJ JC-2



Human serum was inactivated at 56°C for 30 minutes for inactivation of complement.

KBT-1585 は、3 位側鎖のエステル結合が加水分解することにより、ABPC と diacetyl に分解し、この diacetyl から速やかに acetoin を生ずる。この分解産物が抗菌力にどのような影響を与えるかを調べるため、ABPC と diacetyl または、acetoin をモル比 1:1 の混合物としその MIC および MBC を液体希釈法により測定した。

Table 1 に示したように、KBT-1585、ABPC および ABPC と diacetyl または acetoin の混合物の MIC お

よび MBC は ABPC と同等であり抗菌力に影響を与えないことが認められた。

3. マウスの血清中濃度

KBT-1585 が prodrug としてその本体の ABPC に比べ腸管吸収の点でどの程度改良されているかについて、実験感染に用いる同一条件のマウスに KBT-1585 を経口投与し、経時的に血中濃度を調べた。Fig. 6 に対照薬剤と比較した成績を示した。

KBT-1585 と BAPC はともに投与 15 分後にピーク

Table 1 MIC and MBC of KBT-1585, ABPC, Diacetyl + ABPC and Acetoin + ABPC on *E. coli* NIHJ-JC 2

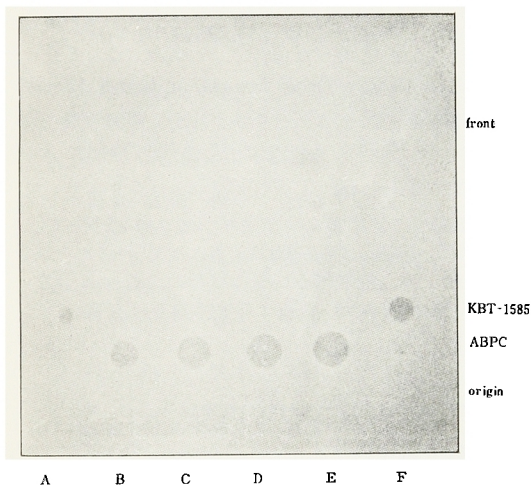
cells/ml	KBT-1585		ABPC		Diacetyl + ABPC		Acetoin + ABPC	
	MIC*	MBC*	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
10 ⁶	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13
10 ⁵	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
10 ⁴	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56

* $\mu\text{g/ml}$

MIC was detected by broth dilution method.

Medium: Heart infusion broth "Difco"

Fig. 5 Bioautogram of KBT-1585 after incubation with human serum, mouse serum and mouse intestine homogenate



A: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0),

B: human serum,

C: mouse serum,

D: mouse intestine homogenate,

E: standard of ABPC,

F: standard of KBT-1585.

Solvent system

n-butylacetate: n-butanol: acetic acid:

0.1% phosphate buffer (pH 6.2) = 50: 9: 25: 15

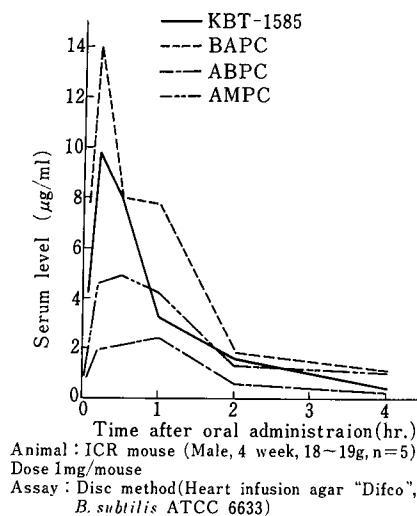
に達し、KBT-1585 の濃度のピークは $9.76 \mu\text{g/ml}$, BAPC のピークは KBT-1585 の 1.4 倍の $13.9 \mu\text{g/ml}$ であった。ABPC ではピークに至る時間が投与 1 時間後であり、ピーク値約 $2.2 \mu\text{g/ml}$ と KBT-1585 の約 5 分の 1 であった。AMPC は投与後 30 分にピーク値 $4.8 \mu\text{g/ml}$ を示した。

4. 実験的全身感染マウスに対する治療効果

マウス実験感染症に対する KBT-1585, BAPC, ABPC および AMPC の治療効果は、Table 2 に示した。

Staphylococcus aureus SMITH に対する KBT-1585

Fig. 6 Serum levels of KBT-1585, BAPC, ABPC and AMPC after oral administration in mice



Time after oral administration (hr.)

Animal: ICR mouse (Male, 4 week, 18~19g, n=5)

Dose 1mg/mouse

Assay: Disc method (Heart infusion agar "Difco",

B. subtilis ATCC 6633)

の ED_{50} 値は、 0.016 mg/mouse であり、ABPC の値より小さく BAPC とほぼ同等であり、AMPC より大きい値が得られた。

E. coli C-11 大量菌感染マウス群 (ムチン無添加) に対する KBT-1585 の ED_{50} は、他の 3 剤より小さい値を示した。また、少量菌感染マウス群 (ムチン添加) では、KBT-1585 の ED_{50} は BAPC と同等であり、AMPC および ABPC の値より小さかった。

E. coli 94 に対する KBT-1585 の ED_{50} 値は BAPC と同等で、ABPC および AMPC の値より小さかった。

E. coli C-11 と、*Streptococcus faecalis* No. 3 によるマウス実験的混合感染に対する各薬剤の治療成績を Table 3 に示した。

Table 3 に示す菌量での混合感染マウスに対する KBT-1585 の ED_{50} は BAPC と同等であり、AMPC

Table 2 Protective effect of KBT-1585, BAPC, ABPC and AMPC against experimental infection in mice

Organism	Drug	Mucin 5 %	Challenge dose (cells/mouse)	MLD (cells/mouse)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		ED ₅₀ * (mg/mouse)
					10 ⁸	10 ⁶	
<i>S. aureus</i> SMITH	KBT-1585	+	1.75×10^6	1.4×10^4	0.2	0.2	0.016 (0.009~0.028)
	BAPC				0.39	0.2	0.013 (0.007~0.023)
	ABPC				0.1	0.1	0.020 (0.011~0.035)
	AMPC				0.2	0.1	0.010 (0.005~0.018)
<i>E. coli</i> C-11	KBT-1585	--	1.9×10^9	3.0×10^8	1.56	0.78	2.22 (1.54~3.21)
	BAPC				6.25	1.56	3.85 (2.51~5.90)
	ABPC				3.13	0.78	3.85 (2.48~5.96)
	AMPC				3.13	1.56	3.20 (1.12~9.18)
<i>E. coli</i> C-11	KBT-1585	+	9.5×10^5	4.8×10^2	1.56	0.78	0.10 (0.08~0.13)
	BAPC				6.25	1.56	0.10 (0.08~0.13)
	ABPC				3.13	0.78	0.21 (0.15~0.28)
	AMPC				3.13	1.56	0.14
<i>E. coli</i> 94	KBT-1585	—	1.2×10^9	4.6×10^6	0.78	0.78	2.67 (1.92~3.70)
	BAPC				6.25	1.56	2.22 (1.99~2.49)
	ABPC				3.13	0.39	6.66 (4.26~10.40)
	AMPC				1.56	1.56	7.99 (7.36~8.69)

* VAN DER WAERDEN

および ABPC より小さい値であった。

III. 考 察

Prodrug の主たる目的は腸管吸収を高め、本体の抗菌活性をより有効に作用させることであるが、今回の各種実験により、KBT-1585 はマウスに経口投与した際、明らかに ABPC として体内に高濃度に吸収され、実験感染においても ABPC をしのぐ防禦効果を呈することが示された。In vivo では KBT-1585 がエステラーゼの作用をうけて水解され ABPC として作用することを確かめるため in vitro においていくつかの実験を試みた。すなわち、in vitro における KBT-1585 の殺菌作用は、ABPC に比べ遅れて発現したが、ヒト血清で処理した KBT-1585 は、ABPC とほぼ同等の殺菌作用曲線

を示した。また、ヒト血清およびマウス血清を用いて処理した KBT-1585 の bioautogram では、ABPC に対応するスポットのみに抗菌活性が認められたことから、KBT-1585 も他の prodrug と同様、本体である ABPC が抗菌作用を発揮していることが確認された。

さらに、マウス腸管 homogenate を用いて処理した KBT-1585 の bioautogram でも同様に、抗菌活性は ABPC に対応するスポットのみに認められた。また、KBT-1585 マウス経口投与後の ABPC 血中濃度は、等量の ABPC 経口投与時に比べて高かったことから、消化管吸収は改良され、かつ血中へは ABPC の形で移行することが推測された。

KBT-1585 の 3 位エステルの加水分解により生じる

Table 3 Protective effect of KBT-1585, BAPC, ABPC and AMPC against experimental polymicrobial infection in mice

Drug	MIC (μg/ml)				ED ₅₀ * (mg/mouse)
	<i>E. coli</i> C-11		<i>S. faecalis</i> No. 3		
	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	
KBT-1585	1.56	0.78	0.78	0.78	1.57 (0.91~2.72)
BAPC	6.25	1.56	1.56	1.56	1.57 (0.92~2.67)
ABPC	0.78	0.78	0.78	0.78	2.49 (1.61~3.87)
AMPC	1.56	1.56	0.39	0.39	1.98 (1.18~3.32)

* VAN DER WAERDEN

Mucin (—)

Challenge dose : *E. coli* C-11: 8×10^8 cells/mouse, *S. faecalis* No. 3: 4.5×10^8 cells/mouseMLD : *E. coli* C-11: 3×10^8 cells/mouse, *S. faecalis* No. 3: 7.5×10^8 cells/mouse

diacetyl または acetoin が *in vitro* 実験において抗菌力に影響を与えないことから、これらの代謝物は生体内でも ABPC の抗菌力に干渉しないと考えられる。

文 献

- 1) 第 31 回日本化学療法学会西日本支部総会, 新薬シンポジウム I, KBT-1585. 佐賀, 1983
- 2) 川崎賢二, 関口金雄, 小川正俊, 辻 明良, 金子康子, 五島瑳智子: 経口 Penicillin 剤 Bacampicillin

の感染防禦効果および血清中濃度。Chemotherapy 27 : S-24, 1979

- 3) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度の測定法再改訂について。Chemotherapy 29 : 76~79, 1981
- 4) 小川正俊, 辻 明良, 川崎賢二, 関口金雄, 金子康子, 五島瑳智子: Opportunistic pathogen と宿主防衛機能の関連について。日本細菌学雑誌 33: 237, 1978

EXPERIMENTAL EVALUATION OF A NEW PENICILLIN, LENAMPICILLIN (KBT-1585)

HIROSHI YAMAKAWA, HISAKAZU ISHII and SACHIKO GOTO

Department of Microbiology, School of Medicine, Toho University

In vitro and *in vivo* antibacterial activities of lenampicillin (KBT-1585), a new oral esterified ampicillin, were examined and the results summarized as follows.

- 1) KBT-1585 was weaker than ampicillin in terms of bactericidal activity against *E. coli* NIHJ JC-2, but after KBT-1585 was treated with human serum, its bactericidal activity was the same as that of ampicillin.
- 2) On bioautogram of KBT-1585 incubated with each human serum, mouse serum and mouse intestine-homogenate, the antibacterially active spot was observed only at the identical position with ampicillin.
- 3) MIC and MBC of KBT-1585 were not affected by diacetyl or acetoin which are degradation products of KBT-1585.
- 4) The maximum serum level of KBT-1585 in mice occurred 15 minutes after oral administration, and it was 5 times as high as that of ampicillin and lower than that of bacampicillin.
- 5) It was shown that the protective effect of KBT-1585 against experimental infection in mice was the same as that of bacampicillin and more effective than that of ampicillin.