

## ラットのアルコール代謝系に対する Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) の影響

松原尚志・大坪 龍・小川文子  
塩野義製薬株式会社研究所

ラット肝細胞内で、アルコールの代謝に関与する alcohol dehydrogenase (ADH) は cytosol (細胞質ゾル) に、また aldehyde dehydrogenase (ALDH) は主としてミトコンドリアとミクロゾームの両分画に局在していた。Pyrazole 投与ラットでは ADH 活性のみが、また disulfiram (Antabuse) 投与ラットではミトコンドリアの low Km ALDH (enzyme I) 活性のみが低下した。ヒトで disulfiram 様作用の報告されている抗生物質 (Cefamandole や Latamoxef) を投与すると、投与数時間後より肝の low Km ALDH 活性の低下が認められた。さらに、これらの抗生物質や disulfiram を投与し、その 18~24 時間後にアルコールを负荷したラットでは、血中 acetaldehyde 濃度が著しく上昇した。一方、大量 (1,000 mg/kg) の 6315-S (Flomoxef) を単回ないしは 3 日間連続して投与したラットにアルコールを负荷しても、肝ミトコンドリアの low Km ALDH 活性や血中 acetaldehyde レベルに変動は認められなかった。

ラット静脈内にアルコールを投与し、血中アルコール濃度を経時的に測定した。pyrazole や disulfiram 投与ラットではアルコールの血中よりの消失が著しく遅延したが、6315-S を大量に単回ないしは 3 日間連続投与したラットでは、アルコールの消失速度は正常動物の場合とほぼ同一であった。これらの結果から、6315-S は生体でのアルコール代謝系に全く影響を及ぼさないと結論することができた。

最近一部の抗生物質の投与をうけたヒトがアルコール飲料を摂取すると、disulfiram (Antabuse) 様作用が発現し、顔面紅潮、発汗、心悸亢進、呼吸困難、頻脈、悪心あるいは嘔吐などの種々の不快症状があらわれると報告されている<sup>1)</sup>。アルコール代謝に対する disulfiram の影響についてはこれまで種々の検討が行なわれてきており、それらの結果から disulfiram は aldehyde dehydrogenase (ALDH) を阻害することによって体内に acetaldehyde を蓄積し、それが生体に種々の影響を及ぼして不快症状をひきおこすことが明らかにされてきている<sup>2)</sup>。Disulfiram 様作用を発現したと報告されている抗生物質をラットに投与し、その後でアルコールを负荷すると血中 acetaldehyde レベルの上昇することが確認され<sup>3, 4)</sup>、これらの抗生物質は disulfiram と同様の機作でヒトやラットのアルコール代謝系に影響を及ぼしているものと推察された。

6315-S (Flomoxef: FMOX) は塩野義製薬研究所で新たに合成された oxacephem 系抗生物質で、Fig. 1 に示すような構造を有している<sup>5)</sup>。この 6315-S がアルコール代謝系に対して影響を及ぼすかどうかをラットを用いて検討すると共に、他剤との比較を行なったので、

それらの実験成績について報告する。

### 1. 実験材料と方法

#### 1. 実験動物

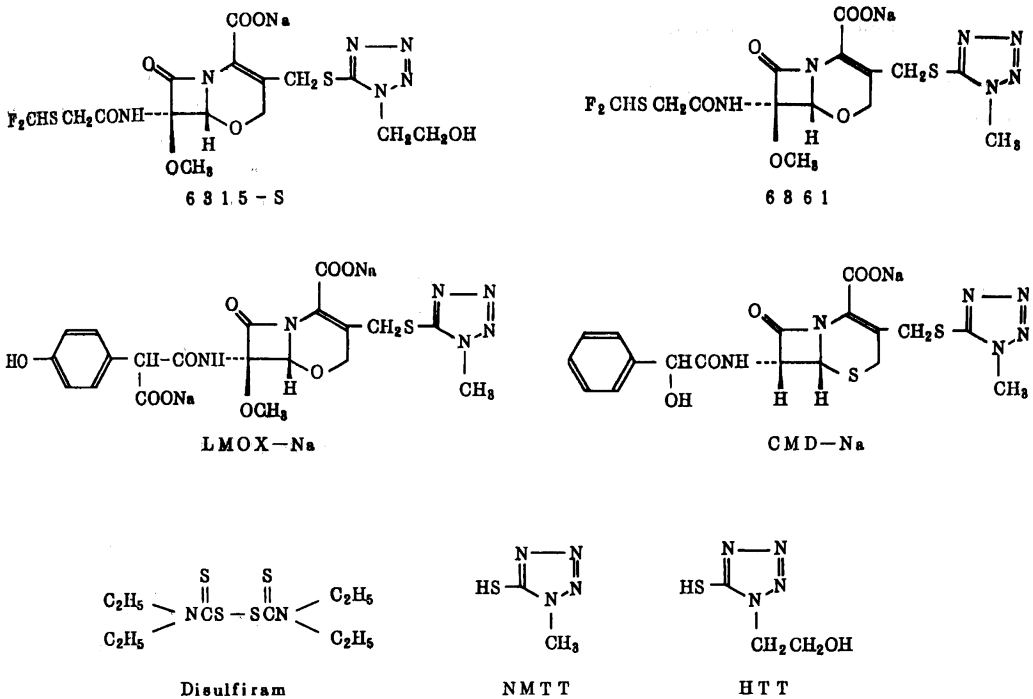
実験には特に記載しない限り生後 8~9 週齢の Slc-Wistar 系雄性ラット (静岡実験動物農業共同組合産) を使用した。実験動物は室温 24±1℃、湿度 50~60% および定時照明 (8:00~20:00) の飼育条件下で 1 週間飼育し、実験環境に順応させた後に使用した。特に記載しない限り、実験期間中に餌 (CA-1; 日本クレア) と水とは自由に摂取させた。

#### 2. 使用薬物

実験に使用した抗生物質は 6315-S, Latamoxef sodium (LMOX), Cefamandole sodium (CMD) (以上 塩野義製薬) で、それらの化学構造は Fig. 1 に示す。

その他実験に使用した 1-methyl-1H-tetrazole-5-thiol (NMTT, Na 塩として使用)、1-(2-hydroxyethyl)-1H-tetrazole-5-thiol (HTT, Na 塩として使用) および化合物 6361 (6315-S の 3' 位側鎖にある HTT を NMTT に変えた化合物) はすべて塩野義製薬

Fig. 1 Chemical structures of 6315-S and related compounds



研究所で調製または合成したものである。また disulfiram や pyrazole は和光純薬の特級試薬を使用した。Acetaldehyde は Merck 社の Art. 5 (99.5%) を用いた。他の試薬は全て市販のもので精製せずにそのまま使用した。

### 3. 投与薬物の調製および投与

実験に使用した抗生物質は、特に記載しない限り 250 mg/ml の濃度の水溶液として調製し、ラット皮下に 1,000 mg/kg の量で投与した。なお、一部の実験では、投与量や投与径路を変えて行なった。対照薬として用いた disulfiram は 5% アラビアゴム水溶液の懸濁液として調製し、10 ml/kg の一定容量で経口投与した。それゆえ、投与液の disulfiram 濃度は実験毎に変えるようにした。Pyrazole は 34 mg/ml の濃度の水溶液として調製し、ラット腹腔内に 68 mg/kg の量で投与した。NMTT および HTT は 5% アラビアゴム水溶液を用いて 100 mg/ml の濃度の検体液として調製し、検体液の pH が中性付近になるように調製した後に 500 mg/kg の量で皮下投与した。

4. 血中 acetaldehyde およびアルコール濃度の測定  
アルコール (ethyl alcohol) を水で希釈して 20% (%) 溶液とし、2.0 g/kg の量でラットに経口投与し

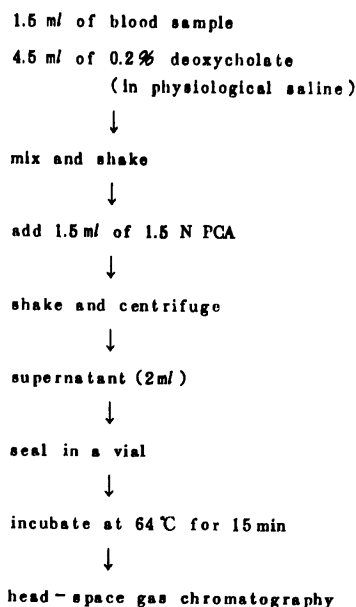
た。なお、アルコールを投与する際には、一晩絶食させたラットを使用した。アルコール投与一定時間後に断頭屠殺して血液を採取し、Fig. 2 に示すような処理を行なった後に、血中 acetaldehyde およびアルコール濃度を head-space gas chromatography 法で測定した<sup>9)</sup>。すなわち、ヘパリン添加血液 1.5 ml と 4.5 ml の 0.2% deoxycholate を混和した後に、1.5 N の perchloric acid を加えて除蛋白した。その上清 2 ml をバイアル瓶に入れて密封し、測定試料とした。ついで測定試料を 64°C で 15 分間 incubate し、その平衡気相 1.0 ml を gas chromatography (GLC) で分析した。GLC の分析条件は以下のようなものである。装置：島津 GC-4CM-PF, column: Chromosorb 101 (60/80 mesh, 3 mm i. d. × 100 cm), column 温度: 125°C, 気化室および検出器温度: 150°C, キャリアガス: ヘリウム, 流速: 33 ml/min, 検出器: FID。

### 5. アルコール血中濃度の経時的推移

ラットにアルコールを 1.0 g/kg の量で尾静脈より投与し、投与 30 分後より 180 分後まで 30 分間隔で眼底血管より 0.2 ml ずつ採血した。その血液を基本的には Fig. 2 に示す操作方法で処理し、血中アルコール濃度を head-space GLC 法で測定した。

Fig. 2 Experimental procedure for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in blood

Treatment of blood samples for the determination of acetaldehyde and ethanol



#### 6. 酵素試料の調製

検体投与ラットを断頭屠殺して肝を採取し、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を含む 0.25 M sucrose 溶液中で homogenate を調製した。その homogenate より分別遠心分画法でミトコンドリア、ミクロソームおよび cytosol の分画を調製し、酵素活性測定用の試料として実験に用いた。

#### 7. 酵素活性の測定

肝 ALDH 活性は HASUMURA らの方法<sup>7)</sup>をいくらか修正した方法で測定した。すなわち、10  $\mu$ M rotenone, 0.1 mM pyrazole, 0.5 mM NAD, 0.5 mg deoxycholic acid を含む 50 mM pyrophosphate buffer (pH 8.5) の反応液 (3.0 ml) に酵素試料と基質 (acetaldehyde) を添加し、NADH の生成速度を 340 nm の吸光度変化を経時的に追跡することにより活性を求めた。反応液中の基質濃度は 180  $\mu$ M および 5 mM とし、低濃度の基質存在下で low Km ALDH (enzyme I) の活性を求め、また高濃度の基質添加により全 ALDH 活性を測定し、両者の差より high Km ALDH (enzyme II) 活性を求めた。

ALDH 活性測定は 25°C で行なった。また NADH の分子吸光係数を  $6.22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  として<sup>8)</sup> 活性値を計算した。

肝 alcohol dehydrogenase (ADH) 活性はほぼ BUTTNER の方法<sup>9)</sup>に従って測定した。すなわち、0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) に 47  $\mu$ M NADH と酵素試料とを加えた全量 3.1~3.2 ml の反応液に 4.7 mM acetaldehyde を添加して、NADH から NAD への酸化反応の速度を 25°C で 340 nm の吸光度変化を経時的に追跡することにより求めた。実験に用いた酵素試料の蛋白含量は、牛血清アルブミンを標準試料として LOWRY らの方法<sup>10)</sup>で求めた。

## II. 実験結果

### 1. Disulfiram および抗生物質投与による肝アルコール代謝酵素系に及ぼす影響

ラット肝細胞内での ADH と ALDH の局在性についての研究から、ADH は cytosol に、また ALDH はミトコンドリアとミクロソームの両分画に主として局在していることが明らかにされている。また ALDH には acetaldehyde に対して異なる親和性を示す isozyme (low Km ALDH と high Km ALDH) が存在し、low Km ALDH はミトコンドリアのみに主として局在すると報告されている<sup>11~14)</sup>。さらに *in vitro* 系で、ADH は pyrazole によって、また low Km ALDH は disulfiram によってそれぞれ特異的に阻害されることが見出されている<sup>13,14)</sup>。阻害剤の作用が *in vivo* 系でも発現するかどうかを調べるために、pyrazole または disulfiram を投与したラット肝より細胞内分画を調製し、酵素活性の変動を検討した。Disulfiram 投与ラットではミトコンドリアの low Km ALDH 活性のみが有意に低下したが、ミトコンドリアおよびミクロソーム分画の high Km ALDH 活性には変動がみられなかった。一方、pyrazole 投与ラットでは、cytosol の ADH 活性は低下したが、ALDH 活性は影響をうけなかった (Table 1)。この結果は disulfiram や pyrazole による酵素阻害作用が *in vivo* でも特異的に発現することを示すものである。Disulfiram 様作用を発現すると云われる LMOX や CMD を投与したラット肝でも同様の酵素活性の変動が認められた (未発表) ので、肝ミトコンドリア局在の ALDH 活性の変動を指標として、抗生物質の disulfiram 様作用の検定ができると結論された。なお、cytosol でも微弱ではあるが ALDH 活性が検出され、ミトコンドリア酵素と類似の変化を示したが、活性が低く disulfiram 様作用検討のためには適さないと考えられ

Table 1 Effects of disulfiram- and pyrazole-administrations on hepatic alcohol-metabolizing enzyme activity in rats

	Experiment 1		Experiment 2	
	Normal rat	Disulfiram-treated rat	Normal rat	Pyrazole-treated rat
Low Km ALDH activity				
Mitochondria	16.01 ± 0.72	8.76 ± 0.48**	16.86 ± 1.75	14.08 ± 0.60
Cytosol	2.98 ± 0.88	1.04 ± 0.12	2.47 ± 0.22	2.08 ± 0.26
High Km ALDH activity				
Mitochondria	23.95 ± 0.72	28.26 ± 0.42	28.89 ± 0.50	20.98 ± 0.86*
Microsome	66.58 ± 1.80	59.89 ± 2.41	58.13 ± 0.11	54.80 ± 1.50
Cytosol	1.81 ± 0.80	2.81 ± 0.52	2.25 ± 0.25	3.10 ± 0.46
ADH activity				
Cytosol	102.8 ± 7.4	117.6 ± 4.5	118.9 ± 1.8	66.3 ± 5.9*

Animals were given disulfiram (500mg/kg, p.o.) or pyrazole (68mg/kg, i.p.), and the liver samples were obtained 18 or 2 hr later, respectively. The activities in the table are expressed as "nmoles/min/mg protein," and the values in the table represent the mean ± S.E. of 3 animals.

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ) against control group (normal rats).

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) against control group.

た (Table 1)。

ラットに CMD を 500 mg/kg の量で静脈内ないしは皮下投与し、投与 5 時間または 18 時間後の肝 ALDH 活性を検討した (Table 2)。両投与群で low Km ALDH 活性の低下が認められ、投与 5 時間後より 18 時間後により顕著な活性低下がひきおこされた。また low Km ALDH 活性の低下は、皮下投与群でより明瞭に認められた。この結果から、抗生物質を皮下投与したラットで disulfiram 様作用の検討を行なうようにした。

## 2. 6315-S および関連化合物投与ラットでのアルコール代謝系の変動

6315-S が disulfiram 様作用を示すかどうかを検討するために、ラットに 6315-S ないしは対照薬物の disulfiram を投与し、その 18 時間後にさらにアルコールを投与した。アルコール投与 1 時間後の血液と肝を採取し、血中 acetaldehyde レベルと肝ミトコンドリアの ALDH 活性を測定した (Table 3, 実験群 1~3)。無処置ラットにアルコールのみを投与した control 群の動物では、血中に高濃度のアルコールは検出されたが acetaldehyde 濃度は非常に低かった。一方、disulfiram 投与後にアルコールを投与すると、血中アルコール濃度にはあまり変動がみられなかったが acetaldehyde レベルは著しい上昇を示した。Disulfiram 投与ラットでは肝ミトコンドリアの low Km ALDH 活性低下も認められた。

LMOX や 6315-S の類縁化合物である 6361 投与ラットでも、disulfiram 投与時と同様の現象が観察された。それに対して、6315-S 投与ラットでは、血中 acetaldehyde レベルや肝 low Km ALDH 活性に全く影響が認められなかった。

6315-S および対照薬物を 3 日間ラットに投与し、最終投与の 18 時間後にアルコール負荷を行なった場合でも、disulfiram や LMOX 投与群ではアルコール代謝系への影響がみられたが、6315-S 投与による影響は認められなかった (Table 3, 実験群 4)。

## 3. Cephem 核の 3 位置換基のアルコール代謝系に対する作用

Disulfiram 様作用を発現する抗生物質は Cephem 核の 3 位置換基として NMTT を共通構造として有している<sup>3,4)</sup>と云われているので、LMOX や CMD の 3 位置換基である NMTT と、6315-S の置換基である HTT との作用を比較した。NMTT ないしは HTT を投与したラット肝ミトコンドリアの ALDH 活性を比較すると、NMTT によっては low Km ALDH 活性が低下したが、HTT 投与による影響は認められなかった (Table 4)。この結果は、NMTT は disulfiram 様作用を示すが HTT にはそのような作用のないことを示唆するものである。

## 4. アルコールの血中よりの消失速度に対する 6315-S の影響

これまで述べてきたように、LMOX や CMD は disul-

Table 2 Alteration of liver mitochondrial low Km ALDH activity following i. v. and s. c. administrations of cefamandole

Treatment of animals	Route	Time after administration	Activity (nmol/min/mg protein)	
			Low Km ALDH	High Km ALDH
Control	—	—	15.17 ± 0.76	28.14 ± 1.01
Cefamandole	i. v.	5 hr	12.15 ± 0.67*	24.50 ± 1.09
		18 hr	9.42 ± 0.90**	28.80 ± 0.24
Cefamandole	s. c.	5 hr	10.78 ± 0.89**	24.87 ± 0.77
		18 hr	7.87 ± 0.28**	24.05 ± 0.85

The animals were given intravenous (i. v.) or subcutaneous (s. c.) administration of cefamandole at the dose of 500 mg/kg. The values in the table represent the mean ± S. E. of 4 animals.

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ) against control group.

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) against control group.

Table 3 Effects of single and successive administrations of 6315-S and related compounds on liver mitochondrial ALDH activity and blood acetaldehyde level

Exptl group	Treatment of animals	Dose (mg/kg/day)	Days of treatment	No. of rat	ALDH Activity (nmol/min/mg protein)		Blood acetaldehyde level (nmol/ml)
					Low Km ALDH	High Km ALDH	
1	Control	—	—	4	16.16 ± 0.88	21.35 ± 1.15	5.4 ± 0.6
	6315-S	1,000	1	4	13.81 ± 1.20	25.26 ± 0.72*	6.9 ± 0.9
	Disulfiram	500	1	4	3.73 ± 0.11**	22.39 ± 0.52	197.4 ± 30.9*
2	Control	—	—	5	12.92 ± 0.44	20.53 ± 1.57	27.1 ± 1.4
	LMOX	1,000	1	5	5.66 ± 0.17**	21.89 ± 0.77	136.1 ± 3.8**
	Disulfiram	500	1	5	3.53 ± 0.22**	21.83 ± 0.67	213.4 ± 25.6**
3	Control	—	—	3	19.96 ± 0.93	17.79 ± 0.86	4.4 ± 0.8
	6361	1,000	1	3	4.40 ± 0.25**	20.00 ± 0.87	177.7 ± 15.2**
	Disulfiram	1,000	1	3	5.06 ± 0.44**	18.97 ± 0.33	161.8 ± 43.0
4	Control	—	—	4	24.62 ± 1.21	21.88 ± 1.25	5.1 ± 0.6
	6315-S	1,000	3	4	23.70 ± 0.97	19.98 ± 0.39	3.3 ± 0.2*
	LMOX	1,000	3	4	4.82 ± 0.29**	21.32 ± 0.66	175.5 ± 26.5**
	Disulfiram	250	3	4	8.13 ± 0.62**	20.12 ± 0.92	103.7 ± 18.1*

S1c—Wistar strain male rats, aged 6 weeks old, were used in Exptl group 2, and other experiments were performed by using 8.5–9 weeks old rats. In Exptl groups 1–3, animals were given single administration of 6315-S or related drugs, while the animals in Exptl group 4 were received the test compounds once daily for 3 days. Ethanol was given 18 hr after the last administration of the compounds, and then blood and liver samples were obtained 1 hr later. The values in the table represent the mean ± S. E.

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ) against control group.

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) against control group.

firmと同様に肝ミトコンドリア局在の low Km ALDH 活性を抑制することによってアルコール代謝系に影響を及ぼし、アルコール負荷時に血中 acetaldehyde レベルを上

昇させることを確認することができた (Table 1, 3)。6315-S には ALDH 活性を抑制する作用はみられなかったが (Table 3), アルコール代謝に関与する ALDH 以

Table 4 Effect of NMTT- and HTT-administration on mitochondrial ALDH activity in rats

Treatment of animals	Dose (mg/kg)	No of rat	ALDH Activity (nmol/min/mg protein)	
			Low Km ALDH	High Km ALDH
Control	—	4	8.42±0.15	22.10±1.08
NMTT	500	4	8.86±0.80**	21.94±1.60
HTT	500	4	9.70±0.79	20.11±1.25
Disulfiram	1,000	4	5.51±0.89**	22.68±1.27

Sic-Wistar strain male rats, aged 6 weeks old, were used for the experiments. NMTT and HTT were administered subcutaneously, and disulfiram orally. Liver samples were obtained 5 hr after the administration. The values in the table represent the mean ± S. E.

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) against control group.

外の酵素に対しても影響を及ぼしていないとは断言できない。そこで6315-S投与ラットで血中よりのアルコールの消失を調べ、disulfiramやpyrazole投与ラットとの比較を行なった。ラットに6315-S (1,000 mg/kg, s. c.) またはdisulfiram (1,000 mg/kg, p. o.) を投与し、その24時間後にアルコールを静注 (1,000 mg/kg) して血中濃度を経時的に調べた。また対照薬としてのpyrazoleを投与する際には、アルコール投与15分後にpyrazole (68 mg/kg, i. p.) を投与し、アルコールの血中よりの消失速度を調べた。正常ラットにアルコールを投与した際に、血中のアルコール濃度は急速に低下してゆき、用いた投与条件下では投与3時間後に血中でアルコールを検出することはできなかった (Fig. 3)。6315-S投与ラットにアルコールを投与した際にも正常動物の場合と類似の結果が得られた。アルコール代謝系の阻害剤であるpyrazoleやdisulfiramを投与したラットにアルコールを投与すると、血中よりのアルコールの消失が著しく遅延し、この傾向はpyrazole投与時により顕著に認められた (Fig. 3)。6315-Sを3日間連続投与 (1,000 mg/kg/day, s. c.) したラットにアルコールを投与し、血中アルコール濃度の経時的推移を調べてみたが、正常動物との間に差異は認められなかった (Fig. 4)。6315-Sおよび対照薬物を投与したラット肝よりミトコンドリアとcytosolを調製し、low Km ALDH活性とADH活性とを測定した。Low Km ALDH活性はdisulfiram投与によって、またADH活性はpyrazole投与によって阻害されたが、両酵素とも6315-S投与による影響は認められなかった (Table 5)。

Fig. 3 Blood ethanol clearance in 6315-S, disulfiram- and pyrazole-treated rats. Experimental animals were pretreated with 6315-S or disulfiram and then received ethanol intravenously 24 hr later. In the case of pyrazole treatment, rats were given ethanol followed by intraperitoneal administration of pyrazole 15 min later. Each value in the figure represents the mean and standard error of 5 animals.

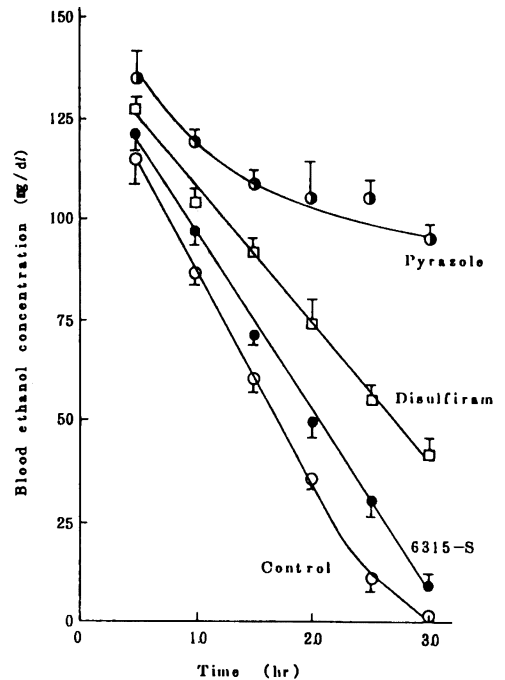
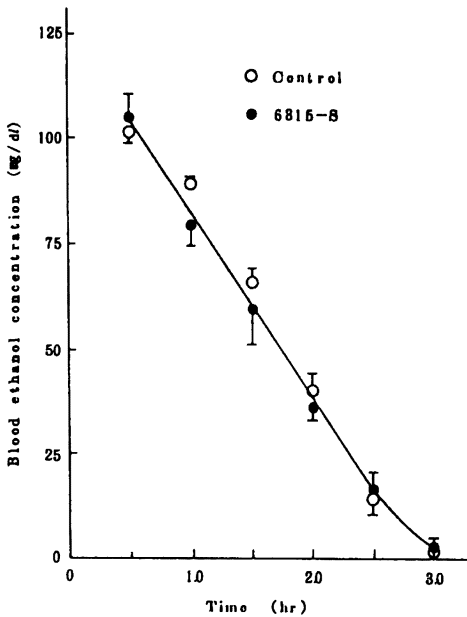


Fig. 4 Effect of repeated administrations of 6315-S on blood clearance of ethanol. The animals received subcutaneous

administration of 6315-S (1,000 mg/kg/day), once daily for 3 days. Ethanol (1,000 mg/kg, i. v.) was given 24 hr after the last administration of 6315-S. Each value in the figure represents the mean and standard error of 5 (control group) and 4 (6315-S-treated group) animals.



これらの結果は、6315-Sを単回ないしは連続して投与してもアルコールの代謝には影響を及ぼさないことを示唆するものである。

### Ⅲ. 考 察

生体内でアルコールを代謝する主要な臓器は肝臓であり、その代謝にはADHの関与する系とミクロゾームのアルコール酸化酵素系(microsomal ethanol oxidizing system; MEOS)の関与する系とが存在することが知られている<sup>13)</sup>。これらの両系での代謝産物として生成してくるacetaldehydeは、さらに、ALDHによって酢酸にまで代謝されることが明らかにされている<sup>14-16)</sup>。ALDHにはacetaldehydeに対して高い親和性を示すlow Km ALDH (enzyme I)と親和性の低いhigh Km ALDH (enzyme II)との二種のisozymeが存在するが、disulfiramによってはlow Km ALDH活性のみが影響をうけて低下する(Table 1)。

ALDHの細胞内局在性には動物種差がみられ、正常ラットではミトコンドリアとミクロゾームに主として活性が検出され、cytosolではわずかな活性が検出されるのみ(Table 1)であるが<sup>11, 12)</sup>、ヒト、ウマ、ヒツジ、ウサギなどではcytosolにdisulfiramに感受性の高いALDHが局在すると報告されている<sup>17-20)</sup>。ラットの場合にも、薬物による誘導時にはcytosolに新たなisozymeの生成することが見出されている<sup>13, 21, 22)</sup>。このようにALDHにはいくつかのisozymeが存在し、しかも細胞内局在性が異なるので、薬物のdisulfiram様作用を調べる際には指標とする酵素を

Table 5 Effect of 6315-S administration on liver mitochondrial ALDH and cytosol ADH activities in rats

Treatment of animals	Dose (mg/kg)	Activity (nmol/min/mg protein)	
		Low Km ALDH	ADH
Control	—	7.87 ± 0.56	77.5 ± 6.5
Disulfiram	1,000	1.87 ± 0.22**	85.8 ± 4.9
Pyrazole	68	9.28 ± 0.34	37.2 ± 1.0**
6315-S	1,000	8.85 ± 0.20	85.7 ± 4.3

The animals were given disulfiram (p.o.) or 6315-S (s.c.) and liver samples were obtained 24 hr later. Pyrazole was administered intraperitoneally 15 min prior to the decapitation. Low  $K_m$  ALDH and ADH activities were determined using liver mitochondrial and cytosol fractions, respectively. The values in the table represent the mean ± S. E. of 5 animals.

\*\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) against the control.

明確にしておく必要がある。Disulfiram および LMOX はラット肝ミトコンドリアの low Km ALDH に特異的に影響を及ぼし high Km ALDH に対して作用を示さない (Table 1, 3) ことから、肝ミトコンドリアの low Km ALDH 活性変動を指標として disulfiram 様作用の検定を行なった今回の実験系に問題は無いと考えられた。

6315-S を単回ないしは 3 日間連続して投与しても、肝の low Km ALDH 活性の低下は観察されずまたアルコール負荷時に血中 acetaldehyde レベルの上昇の認められないこと (Table 3) は、6315-S が disulfiram 様作用を有さないことを示すものである。臨床的に disulfiram 様作用発現の報告されている抗生物質には CMD<sup>23, 24)</sup>, LMOX<sup>25 ~ 27)</sup>, cefoperazone<sup>28, 29)</sup>, cefotetan<sup>30)</sup> などがあるが、これらの抗生物質は cephem 核 3 位置換基として NMTT を含んでおり、その構造が disulfiram 様作用発現と関連していると考えられている<sup>4)</sup>。NMTT のみを投与したラットで肝 low Km ALDH 活性低下の認められること (Table 4)、および NMTT 投与ラットにアルコールを負荷すると血中 acetaldehyde レベル上昇のみられること<sup>4)</sup> は、NMTT が disulfiram 様作用の本体であることを支持するものである。6315-S の 3 位置換基を HTT から NMTT に変えた化合物 (6361) では明瞭な disulfiram 様作用発現の認められたこと (Table 3) も 3 位側鎖置換基の重要性を示すものである。HTT には肝 ALDH に対する作用が認められない (Table 4) ことから、HTT を含む 6315-S には disulfiram 様作用がないと結論できた。

血中よりのアルコールの消失速度が pyrazole や disulfiram 投与によって大きな影響をうけるにもかかわらず、6315-S 投与による影響は認められなかった (Fig. 3, 4)。また、ADH 活性も 6315-S 投与によって変動を示さなかった (Table 5)。これらの結果は、6315-S が acetaldehyde 酸化酵素系 (ALDH) のみでなく、アルコールから acetaldehyde を生成する酵素系に対しても全く影響を及ぼしていないことを推察させるものである。したがって、ラットのアルコール代謝系に対して 6315-S は全く影響を及ぼさないと結論することができた。

(実験期間: 1983 年 11 月 ~ 1984 年 12 月)

#### 文 献

- 1) 石神裏次: セフェム系薬剤のアンタビウス作用。臨床と細菌 8 : 464~467, 1981
- 2) RITCHIE, J. M. : The aliphatic alcohols. The

pharmacological basis of therapeutics, 5th Ed., (GOODMAN, L. S. & A. GILMAN), pp. 137~151, MacMillan Pub. Co., Inc., New York, 1975

- 3) BUENING, M. K. ; J. S. WOLD, K. S. ISRAEL & R. B. KAMMER : Disulfiram-like reaction to  $\beta$ -lactams. J. Am. Med. Assoc. 245 : 2027~2028, 1981
- 4) 柳原雅良, 岡田謙司, 野崎正勝, 鶴見介登, 藤村一: Cephem 系抗生物質のアルコール代謝系におよぼす影響 (第一報) Cephem 系抗生物質静注時における disulfiram-like reaction. 日薬理誌 79 : 551~560, 1982
- 5) TSUJI, T. ; H. SATOH, M. NARISADA, Y. HAMASHIMA & T. YOSHIDA : Synthesis and antibacterial activity of 6315-S, a new member of the oxacephem antibiotics. J. Antibiot. 38 (4) : 466~476, 1985
- 6) OKAMOTO, J. ; K. FUJIMOTO, K. HIRAUCHI & E. HIRAI : Determination of blood acetaldehyde and ethanol levels by head-space gas chromatography. submitted
- 7) HASUMURA, Y. ; R. TESCHKE & C. S. LIEBER : Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 251 : 4908~4913, 1976
- 8) HORECKER, B. L. & A. KORNBERG : The extinction coefficient of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem. 175 : 385~390, 1948
- 9) BUTTNER, H. : Aldehyd- und Alcohol dehydrogenase Aktivität in Leber und Niere der Ratte. Biochem. Z. 341 : 300~314, 1965
- 10) LOWRY, O. H. ; N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. T. RANDALL : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
- 11) MARJANEN, L. : Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. Biochem. J. 127 : 633~639, 1972
- 12) KOIVULA, T. & M. KOIVUSOLO : Different forms of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. Biochim. Biophys. Acta 397 : 9~23, 1975
- 13) LINDAHL, R. : Differentiation of normal



- and inducible rat liver aldehyde dehydrogenases by disulfiram inhibition in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 29 : 3028~3029, 1980
- 14) LI, T. K. : Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. in Enzymol.* (Meister, A. ed.), Vol. 45, pp. 427~483, 1977
- 15) 蓮村 靖, R. TESCHKE, C. S. LIEBER : 肝臓のアセトアルデヒド代謝酵素—その性質および酵素活性に及ぼす慢性アルコール投与の影響。蛋白質核酸酵素 21 : 711~719, 1976
- 16) HAWKINS, R. D. & H. KALANT : The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol. Rev.* 24 : 67~157, 1972
- 17) CROW, K. E. ; T. M. KITOSON, A. K. H. MACGIBSON & R. D. BATT : Intracellular localization and properties of aldehyde dehydrogenases from sheep liver. *Biochim. Biophys. Acta* 350 : 121~128, 1974
- 18) ECKFELDT, J. H. & T. YONETANI : Subcellular localization of the F1 and F2 isozymes of horse liver aldehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 175 : 717~722, 1976
- 19) GREENFIELD, N. J. & R. PIETRUSZKO : The aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* 483 : 35~45, 1977
- 20) LINDAHL, R. : Subcellular distribution and properties of rabbit liver aldehyde dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* 30 : 441~446, 1981
- 21) LINDAHL, R. & S. EVCES : Rat liver aldehyde dehydrogenase. I. Isolation and characterization of four high Km normal liver isozymes. *J. Biol. Chem.* 259 : 11986~11990, 1984
- 22) LINDAHL, R. & S. EVCES : Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes. *J. Biol. Chem.* 259 : 11991~11996, 1984
- 23) PORTIER, H. ; J. M. CHALOPIN, M. FREYEZ & Y. TANNER : Interaction between cephalosporins and alcohol. *Lancet* 1 : 263, 1980
- 24) DRUMMER, S. ; W. E. HAUSER & J. S. REMINGTON : Antabuse-like effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *N. Eng. J. Med.* 303 : 1417~1418, 1980
- 25) NEU, H. C. & A. S. PRINCE : Interaction between moxalactam and alcohol. *Lancet* 1 : 1422, 1980
- 26) ELENBAAS, R. M ; J. L. RYAN, W. A. ROBINSON, M. J. SINGSANK, H. J. HARVEY & C. D. KLASSEN : On the disulfiram-like activity of moxalactam. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32 : 347~356, 1982
- 27) FOSTER, T. S. ; C. L. RAEHLI & H. D. WILSON : Disulfiram-like reactions associated with a parenteral cephalosporin. *Am. J. Hosp. Pharm.* 37 : 858~859, 1980
- 28) MCMAHON, F. E. : Disulfiram-like reaction to cephalosporin. *J. Am. Med. Assoc.* 243 : 2397, 1980
- 29) REEVES, D. S. & A. J. DAVIES : Antabuse effect with cephalosporins. *Lancet* 11 : 540, 1980
- 30) 平賀洋明, 菊地弘毅, 中橋 勝 : 呼吸器感染症に対する cefotetan (YM 09330) の臨床的研究。 *Chemotherapy* 30 (S-1) : 323~331, 1982

## EFFECT OF 6315-S (FLOMOXEF) ON THE ALCOHOL-METABOLIZING SYSTEM IN RATS

TAKASHI MATSUBARA, SHIGEMI OTSUBO and AYAKO OGAWA  
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

Subcellular localization of several enzymes participating in alcohol metabolism was studied using rat liver. Alcohol dehydrogenase (ADH) activity was detected in cytosol, while aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity was detected mainly in both mitochondrial and microsomal fractions. Decreased ADH activity was observed in pyrazole-pretreated rats. On the other hand, administration of disulfiram (Antabuse) resulted in decrease of mitochondrial low-Km ALDH activity. Administration of some antibiotics, reported to have a disulfiram-like action clinically, also caused a depression of mitochondrial low-Km ALDH activity. When the animals received alcohol orally 18~24 h. after the administration of these antibiotics or disulfiram, blood acetaldehyde level increased remarkably. However, mitochondrial low-Km ALDH activity and blood acetaldehyde level were not changed by single and repeated administrations of 6315-S.

Elimination of ethanol from blood was also determined by measuring the blood level in rats following i. v. administration of ethanol. Disappearance rate of ethanol was prolonged remarkably in the animals treated with either pyrazole or disulfiram, while single and repeated administrations of 6315-S had no effect on the disappearance rate. We conclude from these results that 6315-S does not affect the alcohol metabolizing system in rats.