

## ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルにおける aspoxicillin の化学構造と髄液中移行

奥野 哲・春日 修・谷 佳都・芝田 和夫

石井 信男・佐久間由光・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所\*

(平成元年1月31日受付)

Aspoxicillin (ASPC) の構造と髄液中移行との関係を明らかにするため、ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルを用いて、ASPC の構造上の特徴であるフェニル基に導入された水酸基およびアミノ酸側鎖である  $N^4$ -メチル-D-アスパラギン基に着目して、ASPC, dehydroxyaspoxicillin (AB-ASPC), amoxicillin (AMPC), ampicillin (ABPC), mezlocillin (MZPC) および piperacillin (PIPC) の6剤の髄液中移行を検討した。

感染24時間後に各ペニシリン剤を静脈内投与した結果、 $N^4$ -メチル-D-アスパラギン側鎖を有するASPCとAB-ASPCが最も高い髄液中濃度および大きい髄液中濃度曲線下面積(AUC)を示し、曲線下面積(AUC)髄液血清比百分率も他剤よりも優れていた。

ASPC の感染髄液への移行が他剤よりも優れている理由として、 $N^4$ -メチル-D-アスパラギン基が移行を増大させ、さらに、フェニル基に導入された水酸基が髄液中の薬剤濃度を持続させていると考えられた。

**Key words:** ラット肺炎球菌性髄膜炎モデル, aspoxicillin,  $N^4$ -メチル-D-アスパラギン基, 水酸基, AUC 髄液血清比百分率

ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルを作製し、ASPC の治療効果、髄液中殺菌作用および髄液移行について検討を行ない、ASPC は感染髄液への移行に優れ、強い殺菌作用を発揮し、良好な治療効果を示したことを前報<sup>1,2)</sup>で報告した。

今回、ASPC の感染髄液への移行が他剤よりも優れている理由の一端を解明するためASPC の構造上の置換基に着目して、髄液への移行性について検討を加えたので報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用菌株

*Streptococcus pneumoniae* type III (京都薬科大学微生物学教室より分与)を用いた。

#### 2. 接種菌液調整

前報<sup>1)</sup>に準じ、上記菌株を10%非働化馬血清加ハートインフュージョン寒天培地で37°C、18時間培養後、トリプトソイブイオン培地に浮遊し、 $1 \times 10^7$  CFU/ml になるように調整した。

#### 3. 使用動物

7週齢のCrj-SD系雄性ラット(体重:190~210g)

を使用した。

#### 4. 使用薬剤

aspoxicillin (ASPC: 田辺製薬)

dehydroxyaspoxicillin (AB-ASPC: 田辺製薬有機化学研究所合成品)

amoxicillin (AMPC: アンチビオティコス社)

ampicillin (ABPC: 明治製薬)

mezlocillin (MZPC: バイエル薬品)

piperacillin (PIPC: 富山化学工業)

#### 5. 感染動物の作製<sup>1)</sup>

感染ラットは大槽内に菌液10 $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  CFU/ラット)を接種して作製した。

#### 6. 薬剤の投与

薬剤を滅菌蒸留水に溶解し、大槽内に本菌接種24時間後の感染ラットを用い、尾静脈に100mg/kgを単回投与した。

#### 7. 髄液および血液の採取

髄液および血液は薬剤投与後、一定時間(7.5分、15分、30分、1時間および2時間)に採取した。髄液は髄液採取針を用いて大槽内から10~50 $\mu$ l、血液はラット

\* 戸田市川岸 2-2-50

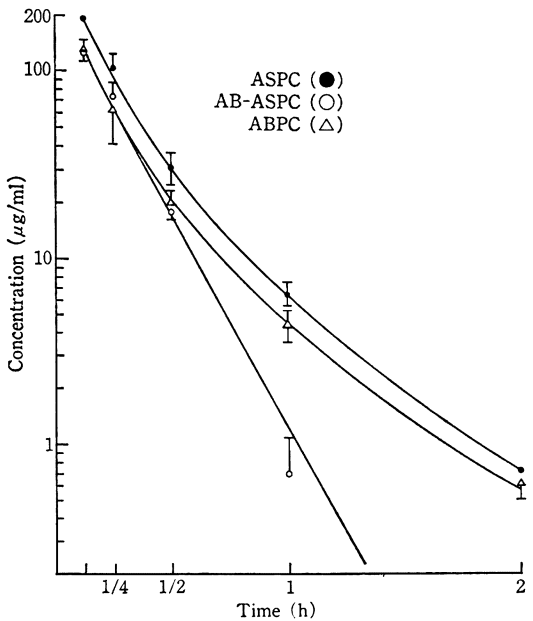


Fig. 1. Serum concentrations of ASPC, AB-ASPC and ABPC after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

大腿動, 静脈切断により約 5 ml 採取した。採取した血液は室温に 1~2 時間放置後, 4°C, 3,000 rpm, 15 分間遠心分離後得られた血清を測定に供した。

#### 8. 薬剤濃度の測定

髄液は上記のように検体が少量しか採取できないため高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法, 血清はバイオアッセイ法にて測定した。

AMPC: HPLC 法における移動相は 5% メタノール-0.025 M PBS (pH 6.0) を用い, バイオアッセイ法の検定菌は *B. subtilis* ATCC 6643 を使用した。

AB-ASPC: HPLC における移動相は 35% メタノール-0.025 M PBS (pH 6.0) を用い, バイオアッセイ法の検定菌は *E. coli* ATCC 27166 を使用した。

その他の条件は前報<sup>2)</sup>に準じた。髄液中薬剤濃度測定に際し, 採取時血液の混入した髄液は濃度測定から除外し, 測定時まで水冷下に保存した。各薬剤の標準液は, 感染ラット血清, 髄液中濃度測定の際には感染ラット血清, 髄液をそれぞれ用いて, 作製した。なお, 薬動学的パラメーターは非線型最小二乗法により算出した。

## II. 成績

ASPC, ABPC, MZPC および PIPC のデータは前報<sup>2)</sup>に報告した値を使用した。

### 1. 肺炎球菌性髄膜炎ラットにおける ASPC および

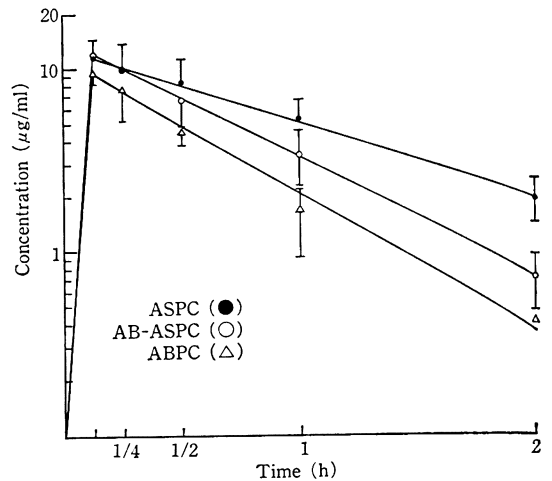


Fig. 2. CSF concentrations of ASPC, AB-ASPC and ABPC after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

各種ペニシリン剤の血清中濃度推移および髄液中濃度推移

まず最初に水酸基と  $N^4$ -メチル-D-アスパラギンの両方を有す ASPC と  $N^4$ -メチル-D-アスパラギン基のみ有す AB-ASPC およびいずれも持たない ABPC との比較を行なった。

ASPC, AB-ASPC および ABPC をそれぞれ 100 mg/kg 尾静脈内投与し, 経時的に採取した時の血清中濃度推移を Fig. 1, Table 1 に示した。ASPC の血清中濃度は AB-ASPC, ABPC よりもいずれの時間においても高く推移した。ASPC と ABPC の血清での消失パターンは類似していたが, AB-ASPC の  $t_{1/2}$  は 7.9 分で 3 剤の中では一番消失の速いペニシリン剤であった。

ASPC, AB-ASPC および ABPC を感染ラットの尾静脈にそれぞれ 100 mg/kg 投与し, 経時的に採取した時の髄液中濃度推移を Fig. 2, Table 1 に示した。ASPC の髄液中濃度は 15 分までは AB-ASPC とほぼ同等であったが 30 分以降は ASPC の方が AB-ASPC を上回った。ASPC と AB-ASPC の髄液中濃度は ABPC よりもいずれの時間においても高い値を示した。

次いで, ASPC と AMPC を感染ラットの尾静脈にそれぞれ 100 mg/kg 投与し, 経時的に採取した時の血清および髄液中濃度推移を Figs. 3, 4, Table 1 にそれぞれ示した。ASPC と AMPC の血清および髄液中濃度を比較すると, ASPC の血清中濃度は 1 時間までは AMPC よりも高く推移した。ASPC の髄液中濃度は AB-ASPC

Table 1. Serum and CSF concentrations of ASPC, AB-ASPC, AMPC and ABPC after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

Specimen	Drug	Mean concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ standard deviation				
		7.5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Serum	ASPC	195.3 $\pm$ 1.04 <sup>a)</sup>	101.5 $\pm$ 20.88	30.7 $\pm$ 5.80	6.7 $\pm$ 1.00	0.7 $\pm$ 0
	AB-ASPC	129.5 $\pm$ 16.30	73.4 $\pm$ 14.19	18.2 $\pm$ 1.86	0.7 $\pm$ 0.49	ND <sup>b)</sup>
	AMPC	140.8 $\pm$ 13.88	66.6 $\pm$ 19.97	22.4 $\pm$ 3.92	6.0 $\pm$ 1.05	1.4 $\pm$ 0.21
	ABPC	135.2 $\pm$ 14.00	61.3 $\pm$ 20.12	20.5 $\pm$ 3.12	4.5 $\pm$ 0.93	0.6 $\pm$ 0.10
CSF	ASPC	11.3 $\pm$ 4.75	9.7 $\pm$ 4.18	8.3 $\pm$ 2.94	5.2 $\pm$ 1.38	1.9 $\pm$ 0.48
	AB-ASPC	11.7 $\pm$ 2.36	9.7 $\pm$ 2.98	6.8 $\pm$ 2.05	3.4 $\pm$ 1.10	0.7 $\pm$ 0.23
	AMPC	7.8 $\pm$ 1.35	6.1 $\pm$ 1.35	3.8 $\pm$ 1.18	2.1 $\pm$ 1.21	0.8 $\pm$ 0.17
	ABPC	9.6 $\pm$ 1.27	7.9 $\pm$ 2.72	4.5 $\pm$ 0.61	1.6 $\pm$ 0.67	0.4 $\pm$ 0

a) Each value represents the mean of 3 to 7 animals  $\pm$  standard deviation

b) ND: not detected

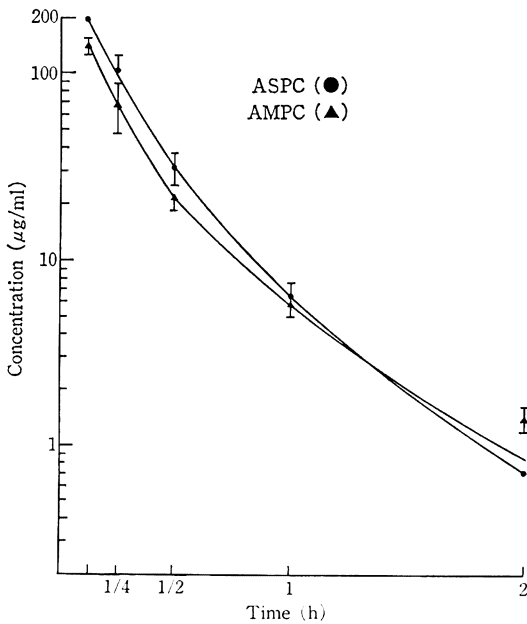


Fig. 3. Serum concentrations of ASPC and AMPC after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

と ABPC の関係と同様に AMPC よりもいずれの時間においても高く推移した。

## 2. ASPC および各種ペニシリン剤の薬動学的パラメーター

感染ラットにおける血清中濃度および髄液中濃度から算出した各種ペニシリン剤の薬動学的パラメーターを

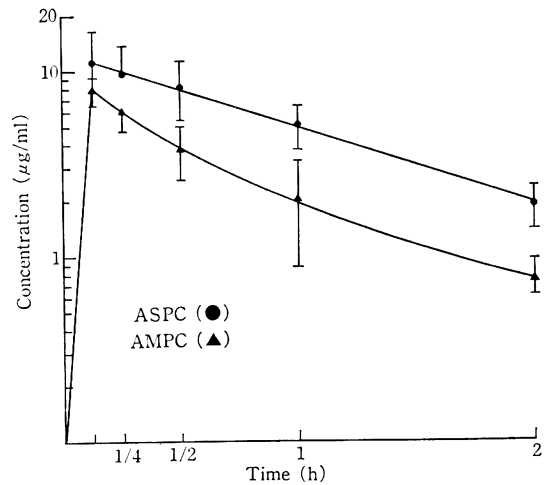


Fig. 4. CSF concentrations of ASPC and AMPC after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

Table 2 に示した。

感染髄液中濃度曲線下面積 ( $\text{AUC}_{0-\infty}$ ) は ASPC が最も大きく 12.8  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  で AB-ASPC (8.7  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ) の約 1.5 倍, ABPC, AMPC および MZPC の約 2 倍, PIPC の約 4 倍の値を示した。また, 薬剤の血液から髄液への移行率を示す  $\text{AUC}_{\text{髄液}}/\text{AUC}_{\text{血清}}$  百分率は ASPC: 16.2%, AB-ASPC: 17.6%, AMPC: 13.7%, ABPC: 11.1%, MZPC: 9.3% および PIPC: 5.2% であった。感染髄液中半減期 ( $t_{1/2}$ ) は ASPC: 44.2 min, AB-

Table 2. Pharmacokinetic parameters of ASPC and other penicillins after an intravenous bolus injection of 100 mg/kg in rats with experimental meningitis due to *S. pneumoniae* type III

Drug	AUC <sub>0-∞</sub>			t <sub>1/2</sub>		
	CSF (μg·h/ml)	Serum (μg·h/ml)	CSF/Serum (%)	CSF (min)	Serum (min)	CSF/Serum
ASPC	12.8	78.8	16.2	44.2	19.1	2.3
AB-ASPC	8.7	48.2	17.6	27.8	7.9	3.5
AMPC	6.1	58.7	13.7	46.0	21.0	2.2
ABPC	5.8	52.1	11.1	24.3	20.2	1.2
MZPC	6.0	64.2	9.3	25.5	12.3	2.1
PIPC	3.0	57.3	5.2	14.1	11.7	1.2

ASPC : 27.8 min, AMPC : 46.0 min, ABPC : 24.3 min, MZPC : 25.5 min および PIPC : 14.1 min であり、半減期髄液血清比は ASPC : 2.3, AB-ASPC : 3.5, AMPC : 2.2, ABPC : 1.2, MZPC : 2.1 および PIPC : 1.2 であった。

### III. 考 察

化膿性髄膜炎は一步治療を誤れば死亡や重大な後遺症を残す恐れがあり、抗菌剤の開発の進んだ今日でも難治な疾患のひとつである。本症の治療が困難な理由として、髄液中での感染防御能が乏しいことと抗菌剤の髄液中移行が血液髄液関門により制限されていることの2点が大きな理由として考えられる<sup>3-5)</sup>。髄液中での感染防御能が乏しいため本症の治療においては髄液中での抗菌剤による殺菌が治療を成功させる大きな要因となる。以上のことから抗菌剤の髄液中移行の研究は化膿性髄膜炎の治療に対して有益な示唆を与えるものと考えられる。

抗菌剤の髄液中移行の研究は家兎を用いてすでに数多くの報告<sup>6-9)</sup>がなされているが、我々は先に報告したラットを用いて ASPC およびその他のペニシリン剤の髄液中移行について、特にペニシリン剤の構造上の置換基と髄液中移行との関連に着目して検討した。

ASPC は ABPC の遊離のアミノ基に N<sup>4</sup>-メチル-D-アスパラギン基が、さらにフェニル基に水酸基が導入された化学構造を有する新しいタイプのペニシリン<sup>10)</sup>である。そこでアミノ酸側鎖および水酸基の有無が髄液中移行にどのように影響を及ぼしているか検討した。

AB-ASPC の髄液中濃度は ABPC のそれよりもいずれの時間においても高く推移し、血清中濃度推移の結果とは一致せず、髄液中へのペニシリン剤の移行は必ずしも血清中濃度とは比例していないものと考えられる。以上の結果は髄液のような特殊な感染部位でのペニシリン

剤の移行は、血清中濃度からは類推することが困難であることを示唆していると思われる。

ASPC と AMPC も同様に比較すると、ASPC の髄液中濃度は AMPC よりもいずれの時間においても高く推移した。さらに、AUC 髄液血清比百分率を比較すると、N<sup>4</sup>-メチル-D-アスパラギン基を有する ASPC, AB-ASPC はそれぞれ 16.9%, 17.6% であるのに対して、AMPC, ABPC はそれぞれ 13.7%, 11.1% であった。以上の結果から、ASPC および AB-ASPC の N<sup>4</sup>-メチル-D-アスパラギン基は髄液移行に関与している側鎖であることが示唆された。

次いで髄液中半減期について各種ペニシリン剤を比較すると、フェニル基に水酸基を有する ASPC, AMPC の半減期はそれぞれ 44.2 min, 46.0 min で AB-ASPC の 27.8 min および ABPC の 24.3 min よりも約2倍長くフェニル基に導入された水酸基は髄液中のペニシリン剤の持続性に関与していることが示唆された。

家兎を用いた ASPC の髄液中移行の研究においても、ASPC は髄液中半減期が長く、その髄液血清比とともに、今までに検討したペニシリン剤中では最大であったと報告<sup>11)</sup>されている。

これまでの髄液移行に関する研究により、ASPC の感染髄液への移行が他剤よりも優れているのは、N<sup>4</sup>-メチル-D-アスパラギン基が移行性を、フェニル基に導入された水酸基が持続性を共に増大させていることによるものと考えられる。

### 謝 辞

本研究に際し、貴重な御助言をいただいた田辺製薬株式会社 前澤 功 博士に深謝致します。

### 文 献

- 1) 春日 修, 谷 佳都, 芝田和夫, 石井信男, 奥野 哲, 佐久間由光, 前澤 功, 岩崎 仁, 山口東太

- 郎：ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルの作製。  
Chemotherapy 36 : 97~102, 1988
- 2) 春日 修, 谷 佳都, 芝田和夫, 石井信男, 奥野哲, 佐久間由光, 前澤 功, 山口東太郎：ラット肺炎球菌性髄膜炎モデルにおける aspoxicillin の治療効果および髄液中移行。Chemotherapy 36 : 103~108, 1988
  - 3) 小林 裕, 春田恒和：抗生物質 髄膜炎を中心に。脳神経外科 9 : 771~783, 1981
  - 4) 春田恒和：髄液。化学療法の領域 3 : 820~824, 1987
  - 5) 春田恒和, 大倉完悦, 小林 裕：髄液。化学療法の領域 4 : 109~115, 1988
  - 6) 森川嘉郎, 春田恒和, 藤原 徹, 小林 裕：家兔黄色ブドウ球菌性髄膜炎における抗生剤の髄液中移行に関する研究 I. 半合成 Penicillin について。Jap. J. Antibiot. 31 : 260~268, 1978
  - 7) MORIKAWA Y : Comparative pharmacokinetics of ampicillin and carbenicillin in the cerebrospinal fluid of rabbits with staphylococcal meningitis with reference to half-lives and areas under the curve. Jap. J. Antibiot. 34 : 211~218, 1981
  - 8) KHURANA C M, DEDDISH P A : Effectiveness of treatment with mezlocillin, ampicillin and latamoxef (moxalactam) of experimental group B  $\beta$ -haemolytic streptococcal meningitis in rabbits. J. Antimicrob. Chemother. 11 : 125~133, 1983
  - 9) HARUTA T, YAMAMOTO H, OKURA K, KUROKI K, KOBAYASHI Y : Penetration of cefuzonam into the cerebrospinal fluid of rabbits. Antimicrob. Agents Chemother. 30 : 157~160, 1986
  - 10) 松本慶蔵：[最近の抗菌薬 XXII] Aspoxicillin. Jap. J. Antibiot. 40 : 1221~1242, 1987
  - 11) 小林 裕, 春田恒和, 大倉完悦, 黒木茂一：TA-058 に関する基礎的研究。Chemotherapy 32 (S-2) : 73~76, 1984

## RELATIONSHIP BETWEEN THE CHEMICAL STRUCTURE OF ASPOXICILLIN AND ITS PENETRATION INTO CEREBROSPINAL FLUID IN RATS WITH PNEUMOCOCCAL MENINGITIS

SATOSHI OKUNO, OSAMU KASUGA, KATO TANI,  
KAZUO SHIBATA, NOBUO ISHII, YOSHIMITSU SAKUMA  
and TOUTARO YAMAGUCHI

Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,  
2-2-50 Kawagishi, Toda, Saitama 335, Japan

To gain a better understanding of how the hydroxyl and  $N^4$ -methyl-D-asparaginyl groups in aspoxicillin (ASPC) effectively contribute to its penetration into infected lesion, the concentration of ASPC in cerebrospinal fluid (CSF) in rats with pneumococcal meningitis was compared with that of dehydroxyaspoxicillin (AB-ASPC), amoxicillin (AMPC), ampicillin (ABPC), mezlocillin (MZPC) and piperacillin (PIPC).

By an intravenous bolus injection of each penicillin 24 hours after infection, ASPC and AB-ASPC, with a side chain of  $N^4$ -methyl-D-asparagine, gave the highest maximum concentrations and AUC values in CSF among the penicillins tested. The AUC values in CSF/AUC values in serum ratios of ASPC and AB-ASPC were also superior to those of AMPC, ABPC, MZPC and PIPC. From the above results, we hypothesize that the side chain of  $N^4$ -methyl-D-asparagine of ASPC plays an important role in the penetration of the penicillins into CSF and that the hydroxyl group introduced in to the phenyl group of ASPC is also helpful in maintaining the CSF levels.