

ラットのアルコール代謝系に対する cephem 系 経口抗生物質 7432-S の影響

松原尚志・大坪 龍

塩野義製薬株式会社研究所*

新規経口用セファロsporin系抗生物質 7432-S および対照薬物の latamoxef (LMOX) や disulfiram をラットに投与し、アルコール代謝系に対する影響を検討した。LMOX や disulfiram を単回ないしは3日間連続して投与すると肝ミトコンドリアの low Km aldehyde dehydrogenase (low Km ALDH) 活性の低下がひきおこされ、アルコール負荷後には血中 acetaldehyde レベルの上昇が認められた。他方 7432-S を 1,000 mg/kg の用量で単回ないしは3日間連続して皮下または経口投与しても、肝 low Km ALDH 活性の変動もまたアルコール負荷時の血中 acetaldehyde レベルの上昇もみられなかった。次いで 7432-S および disulfiram 前処置ラットにアルコールを静脈内投与して血中よりの消失を調べた。正常ラットに比して disulfiram 処置ラットでは、アルコールの血中よりの消失速度もまた単位重量肝組織当りの消失速度も著しく低下していたが、7432-S 処置ラットでは単位重量肝組織当りのアルコールの消失速度に変動が認められなかった。これらの結果から、7432-S はアルコール代謝系に対して disulfiram 様作用を示さない抗生物質であると結論できた。

Key words : 7432-S, アルコール代謝, disulfiram 様作用, aldehyde dehydrogenase

近年 cephem 系抗生物質の中にアルコールの代謝に影響を及ぼし、いわゆる disulfiram 様作用を発現するものがあることが臨床的に見出され注目を集めてきている¹⁻³⁾。Disulfiram はアルコール代謝系の重要な酵素である aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性を阻害することによって体内に acetaldehyde を蓄積し、種々の不快症状をひきおこすことが明らかにされている⁴⁾。

Disulfiram 様作用を発現すると報告されている抗生物質をラットに投与すると、肝 ALDH 活性の低下がひきおこされると共にアルコール負荷後に血中 acetaldehyde レベルの著しい上昇がひきおこされることが確認され⁵⁻¹⁰⁾、薬物のアルコール代謝系に及ぼす影響をラットを用いて検討できることが示された。

7432-S は新規の cephem 系経口抗生物質で Fig. 1 に示すような構造を有している¹¹⁾。この 7432-S が disulfiram 様作用を示すかどうかをラットで検討すると共に、アルコールの消失に及ぼす影響についても調べたので、それらの成績について報告する。

I. 材料と方法

1. 実験動物

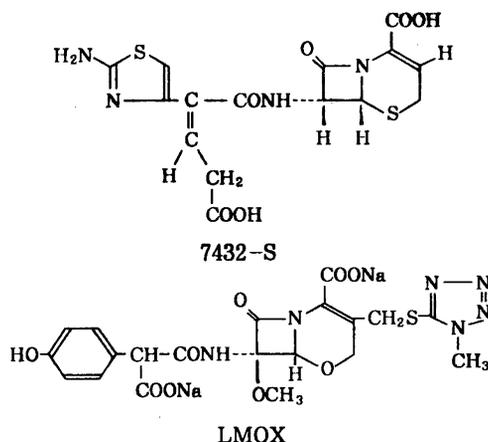


Fig. 1. Chemical structures of 7432-S and latamoxef.

実験には生後8週令のSlc Wistar系雄性ラット(静岡県実験動物農業協同組合産)を使用した。動物は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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

Table 1. Effect of single administration of 7432-S on liver aldehyde dehydrogenase activity and blood acetaldehyde level

Exptl group	Treatment of animal	Dose (mg/kg)	Route of administration	Aldehyde dehydrogenase (nmol/min/mg protein)		Blood acetaldehyde (nmol/ml)
				Low K_m ALDH	High K_m ALDH	
1	None(control)	-	-	20.61±0.30	18.63±1.09	5.0±0.8
2	Disulfiram	1,000	p.o.	2.27±0.27***	19.08±0.47*	299.8±26.4**
3	LMOX	1,000	s.c.	4.54±0.14***	19.48±0.85*	120.0±15.1**
4	7432-S	1,000	s.c.	19.16±0.61	17.58±0.23	0.5±0.5
5	7432-S	1,000	p.o.	18.98±0.62	18.40±0.96	2.0±1.3

The animals pretreated with 7432-S and other test drugs were orally given ethanol 24 hr after the pretreatment. Liver and blood samples were obtained 1 hr after the ethanol administration. The values in the table represent the mean ± S.E. of 4 animals.

•, ••, •••: Statistically significant ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) against the control.

Table 2. Effect of multiple administrations of 7432-S and other drugs on liver aldehyde dehydrogenase activity and blood acetaldehyde level

Exptl group	Treatment of animal	Dose (mg/kg/day)	Route of administration	Aldehyde dehydrogenase (nmol/min/mg protein)		Blood acetaldehyde (nmol/ml)
				Low K_m ALDH	High K_m ALDH	
1	None(control)	-	-	16.97±0.82	17.60±0.79	7.5±0.6
2	Disulfiram	250	p.o.	4.60±0.19***	19.28±0.46	210.9±30.7**
3	LMOX	1,000	s.c.	3.60±0.40***	18.54±0.39	169.4±9.5***
4	7432-S	1,000	s.c.	18.59±1.24	18.45±0.48	8.9±1.3
5	7432-S	1,000	p.o.	18.65±0.95	17.50±0.60	6.4±1.5

The animals were received 7432-S or other drugs once daily for 3 days, and they were fasted after the last administration. Then, the animals were given orally ethanol 24 hr after the last treatment. One hour later, liver and blood samples were obtained for the assay. The values in the table represent the mean ± S.E. of 4 animals.

••, •••: Statistically different ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) from the control.

餌 (CA-1, 日本クレア) と水とは自由に摂取させた。

2. 使用薬物および投与検体の調製

実験に使用した 7432-S は当研究所で合成した Lot No. F002NN (力価 848 $\mu\text{g}/\text{mg}$) および Lot No. 79704 (力価 857 $\mu\text{g}/\text{mg}$) のものである。対照薬物としては latamoxef (LMOX; 塩野義製薬) および disulfiram (和光純薬) を使用した。7432-S は注射用蒸留水を用いて 250 mg 力価 /ml (皮下投与用) または 100 mg 力価 /ml (経口投与用) の濃度の水溶液として調製し投与検体とした。尚、特に記載した一部の実験では 7432-S を 5% (W/V) アラビアゴム水溶液に溶解して使用した。LMOX も 250 mg 力価 /ml の濃度の水溶液として調製して使用した。Disulfiram は 5% (W/V) アラビアゴム水溶液を用いて 100 mg/ml の濃度の検体

液として調製した。

3. 薬物の投与および測定試料の採取

ラットに 7432-S の検体水溶液を 1,000 mg 力価 /kg の用量となるように経口ないしは皮下投与した。LMOX も 1,000 mg 力価 /kg の用量で皮下投与した。一方 disulfiram は単回投与実験時には 1,000 mg/kg の用量で、また連続投与実験時には 250 mg/kg/day の用量で経口投与した。単回および連続投与実験群共に薬物の最終投与後直ちに絶食し、その 24 時間後に 20% (W/V) エタノール溶液を 10 ml/kg、即ち 2,000 mg/kg の用量で経口投与した。エタノール投与 1 時間後の血液と肝を採取して測定試料とした。

アルコールの血中よりの消失速度を求める実験時にはアラビアゴム水溶液を用いて調製した 7432-S および

Table 3. Effects of 7432-S and disulfiram on the rate of ethanol elimination *in vivo*

	Body weight (g)	Liver weight (g)	C_0 (mg/ml)	r (mg/g)	Ethanol elimination rate		
					v (mg/ml/hr)	α (mg/hr/rat)	β (mg/hr/g liver)
Control	234±3	10.1±0.2	1.29±0.05	0.778±0.029	0.40±0.01	73.0±1.8	7.21±0.17
Disulfiram	232±3	10.6±0.3	1.34±0.04	0.748±0.021	0.31±0.01**	54.3±4.0*	5.12±0.31**
7432-S	231±4	8.7±0.3*	1.37±0.02	0.730±0.010	0.36±0.01**	61.0±1.1**	7.02±0.23

Ethanol elimination parameters were calculated from the data shown in Fig.2. Ethanol concentration at zero time (C_0) was obtained by extrapolating the clearance curve to zero time, and the ratio of the distribution volume for ethanol to body mass (r) was calculated as $A_0 / (C_0 \times \text{body weight})$, where A_0 is the amount of ethanol injected. Ethanol elimination rate from blood (v) was obtained from the slope of the data in Fig.2. The elimination rate from whole body (α) and from unit wet weight of liver (β) was calculated as follows:

$$\alpha = v \times r \times (\text{body weight})$$

$$\beta = \alpha / (\text{liver weight})$$

The values in the table represent the mean \pm S.E. of 4 animals.

*, **, statistically significant ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) against the control.

disulfiram の検体を共に 1,000 mg/kg の用量で経口投与し、その 20 時間後にエタノールを 1,000 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。7432-S の投与量は力価換算値で表わした。エタノールの投与液としては生理食塩水を用いて 20% (W/V) エタノールとなるように調製したものをを用いた。エタノール投与 30 分後から 150 分後にかけて経時的に眼窩血管より採血し、血中エタノール濃度測定用の試料とした。

4. 酵素活性の測定

肝組織よりミトコンドリア分画を既報⁹⁾に示した方法で分離し、ミトコンドリア分画での ALDH 活性を Hasumura らの方法¹²⁾をいくらか改変した方法^{9, 10)}に従って測定した。またミトコンドリアの蛋白含量は血清アルブミンを標準として Lowry らの方法¹³⁾に従って測定した。

5. 血中 acetaldehyde 及びエタノールの定量

ラット血中の acetaldehyde 及びエタノール濃度は head space gas chromatography 法で測定した。血液の処理および分析は既報^{9, 10, 14)}に示した通りに行った。

II. 成績

1. 7432-S および対照薬物単回投与によるラットのアルコール代謝系への影響

ラットに 7432-S や対照薬物の LMOX または disulfiram を経口ないしは皮下投与し、acetaldehyde の代謝に関与する ALDH 活性およびアルコール負荷時の血中 acetaldehyde レベルを指標としてアルコール代謝系への影響を検討した。ラットにアルコールのみを投

与しても肝 ALDH 活性への影響は認められなかったので、「実験方法」に記載したように薬物処置ラットにアルコールを投与した後に肝と血液を採取し、同一動物での ALDH 活性と血中 acetaldehyde レベルを測定した。また、vehicle (アラビアゴム水溶液)のみを投与しても酵素活性や acetaldehyde に対する影響は認められなかった。今回の実験では特に記載しない限り対照群としては無処置動物を使用した。Disulfiram や LMOX を投与したラットでは、肝ミトコンドリアの high Km ALDH 活性には殆ど影響が認められなかったが low Km ALDH 活性の著しい低下が認められた。更にアルコール負荷後に血中 acetaldehyde レベルの著しい上昇も観察された (Table 1)。他方 7432-S を皮下ないしは経口投与しても、肝ミトコンドリアの low Km ALDH 活性の低下やアルコール負荷後の血中 acetaldehyde レベルの上昇は認められなかった (Table 1)。

2. 7432-S および対照薬物連続投与によるラットのアルコール代謝系への影響

ラットに 7432-S を単回投与してもアルコール代謝系への影響が現われなかった。3 日間連続投与した際に影響が現れるかどうか検討した。対照薬物の LMOX や disulfiram を連続投与したラットでは、単回投与時と同様に肝ミトコンドリアの low Km ALDH 活性が低下しアルコール負荷時に血中 acetaldehyde レベルが著しく増加した (Table 2)。7432-S を連続投与したラットでは、肝酵素活性や血中 acetaldehyde レベルへの影響が認められなかった (Table 2)。ラットに 7432-S を単回ないしは連続投与しても肝 low Km ALDH 活性やアルコール負荷時の血中 acetaldehyde

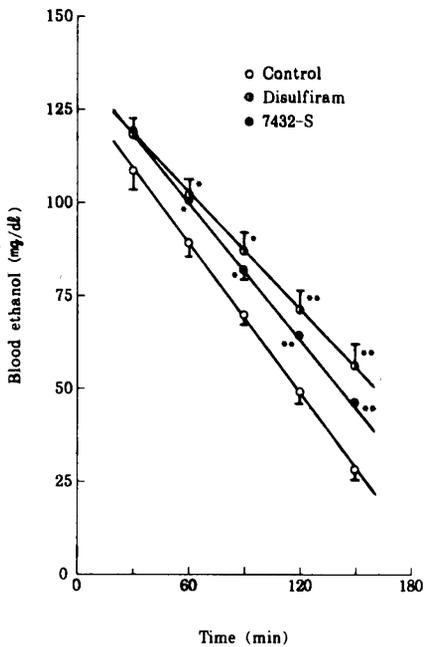


Fig. 2. Mean blood concentration of ethanol after intravenous administration to normal and 7432-S- or disulfiram-pretreated rats. Animals were given 7432-S or disulfiram orally at 1,000 mg/kg followed by ethanol (1,000 mg/kg) intravenously 20 hr later. Control animals were given 5% arabic gum orally then ethanol intravenously. Blood samples were obtained periodically 30-150 min after the ethanol administration. Each value in the figure represents the mean and standard error of 4 rats. *, ** ; statistically different ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) from the control.

レベルに全く影響を及ぼさなかったことは、7432-S が disulfiram 様作用を示さない抗生物質であることを示唆するものであった。

3. アルコールの血中消失速度に及ぼす 7432-S の影響
7432-S および disulfiram 投与によりアルコールの血中からの消失が影響をうけるかどうかを、アルコールの血中濃度変化を経時的に測定することにより調べた。正常ラットにアルコールを静脈内投与すると、投与 30 分後の血中アルコール濃度は高値を示していたが、時間の経過と共に急速に低下していった。Disulfiram 前処置ラットでは血中からのアルコールの消失が著しく遅延し、正常ラットの場合に比べて有意に高いアルコール濃

度を示していた。一方 7432-S 前処置ラットでも正常ラットに比べて血中アルコール濃度は高値を示し、disulfiram 処置ラットよりは軽度ではあるがアルコール消失の遅延がひきおこされていた (Fig. 2)。

Fig. 2 に示したアルコール濃度の経時変化の成績を Lumeng ら¹⁶⁾ の報告した方法で解析し、薬動学的パラメーターを求めた。ラット血中 (v) および全身 (α) からのアルコールの消失速度は disulfiram や 7432-S 前処置ラットでは著しく低下し、特にその傾向は disulfiram 処置ラットで顕著であった (Table 3)。7432-S 投与ラットでは一過性の肝重量低下がひきおこされたために血中や全身からのアルコール消失速度に影響が現れたものと考えられた。この考えは単位重量肝組織当りのアルコールの消失速度 (β) が disulfiram 処置ラットでは低下しても 7432-S 処置ラットでは正常値を示していたこと (Table 3) からも支持された。

III. 考 察

アルコール代謝系の阻害剤として知られている disulfiram をラットに投与すると肝ミトコンドリアおよび可溶性画分に局在し、acetaldehyde に対して高い親和性を示す low Km ALDH 活性の低下をひきおこすことが明らかにされている^{1, 16)}。臨床的に disulfiram 様作用の発現が見出されている抗生物質をラットに投与した際にも肝 low Km ALDH 活性の低下がひきおこされ、アルコール負荷時に血中 acetaldehyde の上昇がみられることから disulfiram と同様の機作でアルコール代謝系に影響を及ぼすと考えられている⁹⁻¹⁰⁾。これらの抗生物質はセフェム核 3 位側鎖に N-methyl-tetrazaolethiol (NMTT) を共通して持っていることから NMTT が作用発現の原因物質と推察されていたが、LMOX をモデルとしてその体内動態とアルコール代謝系への影響発現との関連性を検討した結果からも NMTT の重要性が示された¹⁷⁾。一方 flomoxef は 3 位側鎖置換基として N-hydroxyethyltetrazaolethiol を有する抗生物質で disulfiram 様作用を示さないが、その側鎖部分のみを NMTT に置換すると disulfiram 様作用を発現することが確認されている¹⁴⁾。これらの結果はセフェム核 3 位側鎖の構造が disulfiram 様作用発現と密接に関連していることを示唆するものである。7432-S は Fig. 1 に示すように 3 位側鎖に異項環チオール基を有さない抗生物質であるので disulfiram 様作用を示さないと考えられていたが、今回の実験で disulfiram 様作用を示さないことを確認することができた。尚、7432-S 単回投与ラットにアルコールを負荷

した際に血中 acetaldehyde レベルが対照群よりも低値を示し、7432-S は disulfiram とは異なる作用、即ちアルコール代謝系を活性化したと考えられるような結果が得られた (Table 1) けれども 7432-S 連続投与時にはこのような傾向は認められず (Table 2), またアルコールの消失速度も 7432-S 処置により活性化はされなかった (Fig. 2)。これらの結果より 7432-S は disulfiram 様作用を示さないし、またアルコール代謝系の活性化をもひき起さないと結論した。

生体内でアルコールは alcohol dehydrogenase およびミクロゾームのアルコール酸化酵素系で代謝されて acetaldehyde を生成し、それが更に low Km ALDH によって代謝されることが明らかにされている^{16, 17)}。アルコール代謝に関与する数種の酵素の中のいずれかゝ抗生物質投与の影響をうけているときには low Km ALDH 活性変動のみを指標としては検出不能である。一方生体からのアルコール消失の速度を指標として薬物の影響を検討する系では、low Km ALDH に対する影響のみでなく他の酵素や機能に対する影響をも含めて検出できることが確認されている¹⁹⁾。そこで 7432-S 投与によるアルコール消失速度への影響を検索したが、処置ラットでは消失速度が遅延しアルコールの血中濃度が未処置正常ラットにくらべて高値を示すことがわかった (Fig. 2)。一般に大量の抗生物質を投与すると一過性の肝重量低下がひきおこされて代謝能の低下が認められる¹⁹⁾。今回の実験でも 7432-S を 1.0 g/kg の用量で投与したために肝重量低下が一過性にひきおこされ、二次的に血中や生体からのアルコール消失の遅延がもたらされたものと推察された。従って単位重量肝組織当りのアルコールの消失速度 (β) を求めると、酵素阻害をひきおこす disulfiram 投与動物の場合とは異り 7432-S 投与動物では影響が認められなかった (Table 3)。これらの結果は disulfiram 様作用を示さない抗生物質を投与した際に共通して認められる現象である¹⁹⁾。このような結果からも 7432-S はアルコール代謝系に対して影響を与えない抗生物質であると結論できた。

(実験期間: 1984年12月~1987年11月)

文 献

- 1) 石神襲次: 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) PROTIER, H.: J. M. CHALOPIN, M. FREYEZ & Y. TANTER: Interaction between cephalosporins and alcohol. *Lancet* I: 263, 1980
- 3) McMAHON, F. E.: Disulfiram-like reaction to cephalosporin. *J. Am. Med. Assoc.* 243: 2397, 1980
- 4) 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
- 5) BUENING, M. K. & J. S. WOLD: Ethanol moxalactam interactions *in vivo*. *Rev. Infect. Dis.* 4 (Suppl.): S555~S563, 1982
- 6) 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
- 7) YAMANAKA, Y.: T. YAMAMOTO & T. EGASHIRA: Effects of cephem antibiotics on rat liver aldehyde dehydrogenases. *Japan. J. Pharmacol.* 33: 717~723, 1983
- 8) YANAGIHARA, M.: K. OKADA, M. NOZAKI, K. TSURUMI & H. FUJIMURA: Cephem antibiotics and alcohol metabolism. *Jpn. J. Antibiotics* 38: 634~642, 1985
- 9) MATSUBARA, T.: S. OTSUBO, A. OGAWA, J. OKAMOTO, T. YOSHIZAKI, Y. NISHIBE, Y. TOCHINO & E. HIRAI: A comparative study on the effects of disulfiram and β -lactam antibiotics on the acetaldehyde metabolizing system in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 42: 333~343, 1986
- 10) MATSUBARA, T.: S. OTSUBO, A. OGAWA, K. KAWAMOTO, J. OKAMOTO, K. SUGENO, Y. TOCHINO, T. YOSHIDA & E. HIRAI: Effects of beta-lactam antibiotics and N-methylterazoethiol on the alcohol-metabolizing system in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 45: 303~315, 1987
- 11) HAMASHIMA, Y.: T. KUBOTA, K. MINAMI, K. ISHIKURA, T. KONOIKE, M. YOSHIOKA, T. YOSHIDA, H. NAKASHIMIZU & K. MOTOKAWA: Synthesis and biological properties of 7 β -[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-4-carboxy-2-butenoylamino]-3-cephem-4-carboxylic acid (7432-S), a new oral cephem antibiotic. *J. Antibiotics* 40:

- 1468~1470, 1987
- 12) HASUMURA, Y. : R. TESCHKE & C. S. LIEBER : Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver. *J. Biol. Chem.* 251 : 4908~4913, 1976
- 13) LOWRY, O. H. : N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 266~276, 1951
- 14) 松原尚志, 大坪 龍, 小川文子 : 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。 *Chemotherapy* 35 (S-1) : 460~469, 1987
- 15) LUMENG, L. : W. F. BOSRON & T.-K. LI : Quantitative correlation of ethanol elimination rates *in vivo* with liver alcohol dehydrogenase activities in fed, fasted and food-restricted rats. *Biochem. Pharmacol.* 28 : 1547~1551, 1979
- 16) LI, T. L. : Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymol.* 45 : 427~483, 1977
- 17) MATSUBARA, T. : S. OTSUBO, A. OGAWA & T. OKA : Pharmacokinetics of latamoxef and N-methyltetrahydrothiol in rats associated with the development of disulfiram-like effects. *Japan. J. Pharmacol.* 45 : 223~232, 1987
- 18) 蓮村 靖, R. TESCHKE, C. S. LIEBER : 肝臓のアセトアルデヒド代謝系—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
- 19) SHIMADA, J.:T. MIYAHARA, S. OTSUBO, N. YOSHIMATSU, T. OGUMA & T. MATSUBARA : Effects of alcohol-metabolizing enzyme inhibitors and beta-lactam antibiotics on ethanol elimination in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 45 : 533~544, 1987

EFFECT OF A NEWLY SYNTHESIZED ANTIBIOTIC 7432-S ON ALCOHOL-METABOLIZING SYSTEM IN RATS

TAKASHI MATSUBARA and SHIGEMI OTSUBO
Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co. Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

Disulfiram-like effects of 7432-S were studied using rats. Single and multiple administrations of disulfiram caused a decrease in liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity and produced a marked increase in the blood acetaldehyde level when ethanol was administered 24 h later. Similar changes in ALDH activity and blood acetaldehyde level were observed when animals were given latamoxef subcutaneously. On the other hand, oral and subcutaneous administrations of a high dose (1,000 mg/kg) of 7432-S caused no alteration in both ALDH activity and blood acetaldehyde level. Effects of 7432-S and disulfiram on ethanol elimination were then studied by checking the blood ethanol level after the intravenous injection of ethanol. Pretreatment of animals with disulfiram caused marked decreases in ethanol elimination from blood and whole body, and the elimination rate showed lower values even when expressed as the rate per g liver. Pretreatment of rats with 7432-S caused a decrease in the ethanol elimination from blood associated with a decrease in the liver weight. However, no alteration was detected in 7432-S-pretreated rats when the rate was expressed as the rate per g liver. These results indicate the lack of disulfiram-like effects in 7432-S.