

Cephalosporin 類の動物組織 Paste との結合について

岡田直彦・坂本 博・中本昭治

横田好子・村川武雄・西田 実

藤沢薬品工業株式会社・中央研究所

(昭和51年6月18日受付)

Penicillin 類および Cephalosporin 類と各種の動物の血清タン白との結合については、現在までに多くの報告がみられる。これらの抗生物質が血清タン白のアルブミンと、特異的または可逆的に結合することが明らかにされている¹⁻³⁾。また血清タン白の抗生物質結合能は、動物種⁴⁾、Penicillin 類および Cephalosporin 類の側鎖構造によって異なることも周知のとおりである⁵⁾。

いっぽう、抗生物質と動物組織との結合については KUNIN らの広範な研究⁶⁻⁹⁾があり、大久保¹⁰⁾、橋本¹¹⁾らも検討を加えている。われわれは cephalosporin 類の血清タン白結合と組織との結合の関連性を明らかにするため、血清の抗生物質結合能が異なるラットおよびイヌの肝、および腎組織と3種類の Cephalosporin 類 (CEZ, CER, および CEX) の結合を比較した。β-ラクタム系抗生物質と生体成分との結合は、buffer その他による希釈によって影響をうけるので、本報における実験には水分を加えないで組織 paste を調製して実験に供した。

実験方法

1. 抗生物質

Cefazolin (CEZ, 藤沢薬品), Cephaloridine (CER, Glaxo Laboratories), Cephalexin (CEX, Eli Lilly & Company) および Cloxacillin (MCIPC, Beecham Research Laboratories)

2. 実験動物

ラット; SD 系, 180~250g, 雄

イヌ; Beagle, 10.5~12.5kg, 雄

3. 組織 paste の調製

動物を断頭瀉血し、充分放血した後、肝および腎を摘出し、水を加えないで Polytron PT-10 ST ホモジナイザーにて 100% 組織 paste を調製し、実験に供した。なお組織 paste の pH は、肝 6.6~6.8, 腎 6.5~6.7 で両 paste とも、そうとうな緩衝作用がある。

4. 血清タン白および組織結合の測定法

(1) 血清タン白: ラットまたはイヌの新鮮血清9容に、各抗生物質の 500 μg/ml 溶液1容をそれぞれに加え、0°C で1時間放置後、遠心限外濾過法 (0~5°C) により結合率を求めた。

(2) 組織: 組織結合は通常 10~30% ホモジネート

中で測定されるが、本実験では血清タン白結合率の測定に用いる血清濃度と等しい濃度、すなわち 90% paste 中で測定した。(25% ホモジネート中では MCIPC (50 μg/ml) の結合率は 3~6% であったが、90% paste 中ではその結合率は 40~50% である。)

(a) 総結合率 (可逆的結合と非可逆的結合の和): 100% 組織 paste 9g に各抗生物質の 500 μg/ml 溶液 1ml をそれぞれ加えて充分攪拌し、不活化酵素の作用しない 0°C に1時間放置後、遠心限外濾過法により結合率を求め、これを総結合率とした。

(b) 非可逆的結合率: 100% 組織 paste 9g に各抗生物質の 1,000 μg/ml 溶液 1ml を加え、充分攪拌し、不活化酵素の作用しない 0°C に1時間放置後、M/15 Phosphate buffer (pH 7.0) 20ml を加えて遊離型の抗生物質を抽出し、10,000×G の遠心分離を行なう。さらに沈澱に 10ml の buffer を添加してこの処理を2回くり返す。添加した総抗生物質量から、3回の遠心上清中に回収された総抗生物質量を差し引き結合率を求め、これを非可逆的結合率とした。このさい、薬剤濃度を 100 μg/ml としたが、これは第2, 第3回の抽出時の測定感度を高めるため、薬剤濃度が 50 μg/ml および 100 μg/ml の場合の抽出回収率には大差を認めなかった。

5. 抗生物質の定量

M/15 Phosphate buffer (pH 7.0) で作成した標準液を用いて、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするディスク法で測定した。

結 果

1. 血清タン白結合と肝および腎組織との結合の比較

Cephalosporin 類の血清タン白との結合率は動物種によって差異がある。ラット血清はヒト血清と同様、結合能が大でイヌ血清は比較的結合能が小さい。そこで血清タン白の結合能に著明な差があるラットおよびイヌの肝および腎組織の CEZ, CER および CEX 結合能を血清の場合と比較した。

1) ラット肝および腎組織による結合

Table 1 に明らかたのとおり、ラットの血清タン白と CEZ の結合率は 91%、以下 CER 65% および CEX 30% の順となり、CEZ は対照とした MCIPC の 93%

Table 1 Binding of cephalosporins and cloxacillin to 90% tissue pastes and serum

Antibiotic	Tissue, Serum	Bound (%)	
		Rat	Dog
Cefazolin	Liver	10	14
	Kidney	4	16
	Serum	91	55
Cephaloridine	Liver	12	8
	Kidney	7	18
	Serum	65	21
Cephalexin	Liver	4	2
	Kidney	2	4
	Serum	30	8
Cloxacillin	Liver	46	28
	Kidney	61	65
	Serum	93	80

Centrifugal ultrafiltration

と同程度の高い結合率を示した。しかしラットの肝組織との総結合率は CEZ 10%, CER 12% および CEX 4% となり、血清タン白との結合率よりも低率で、また両者間に相関性はなかった。ただ血清タン白との結合率が、CEZ と同程度に高率であった MCIPC の肝組織との総結合率は 46% となり、CEZ の 10% より高率であった。いっぽう、腎組織との総結合率は CEZ 4%, CER 7%, および CEX 2% と極めて低率で、3者間に大差はみられなかった。しかし MCIPC の総結合率は 61% と、Cephalosporin 類よりかなり高率であった。

2) イヌの肝および腎組織による結合

これらの Cephalosporin 類とイヌの血清タン白との結合率は、CEZ 55%, CER 21% および CEX 8% とラットの場合より全般に低率である。しかし MCIPC では 80% となり、上記の Cephalosporin 類ほど種差がなかった。

イヌの肝組織との総結合率は CEZ 14%, CER 8%, CEX 2% で、ラットの肝組織との結合率と大差はなかった。しかし対照とした MCIPC のそれは 28% で、同等の血清タン白結合率を示す CEZ よりも高い結合率を示した。腎組織との総結合率は CEZ 16%, CER 18% と CEX の 4% よりも高率であった。しかし対照とした MCIPC は腎組織との総結合率は 65% とさらに高率であった。

以上、イヌの肝および腎組織と CEZ, CER および CEX との総結合率も血清タン白のそれと全く相関性を示さなかった。

Fig. 1 Comparison between binding extent of cephalosporins and cloxacillin to 90% rat liver paste by different methods

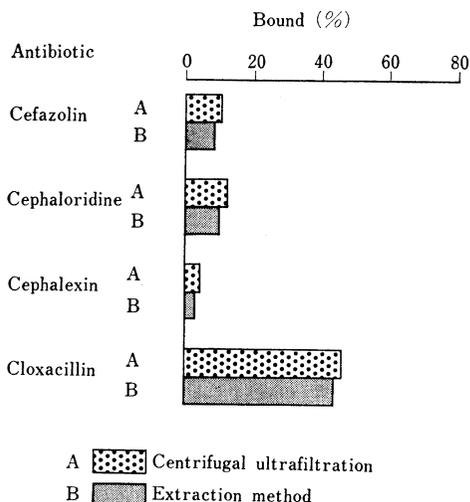
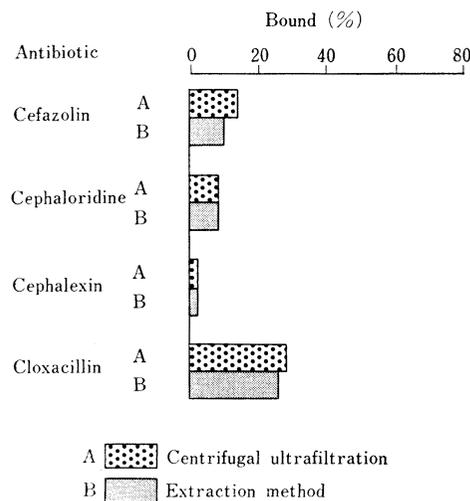


Fig. 2 Comparison between binding extent of cephalosporins and cloxacillin to 90% dog liver paste by different methods



2. 総結合と非可逆的結合

1) 肝組織との結合

実験の項に記載した2種類の方法(遠心限外濾過法と抽出法)を用い、CEZ, CER, CEX および MCIPC の肝組織との総結合率および非可逆的結合率を比較した。

Fig. 1 に明らかとなおり、ラット肝組織と CEZ および CER との総結合率はそれぞれ 10% および 12% で、非可逆的結合率もほぼこれに近い値を示した。CEX では総結合率は 4%、非可逆的結合率は 3% と、CEZ および CER よりもさらに低率であった。対照とした MCIPC の総結合率は 46% と上述の Cephalosporin 類

Fig. 3 Comparison between binding extent of cephalosporins and cloxacillin to 90% rat kidney paste by different methods

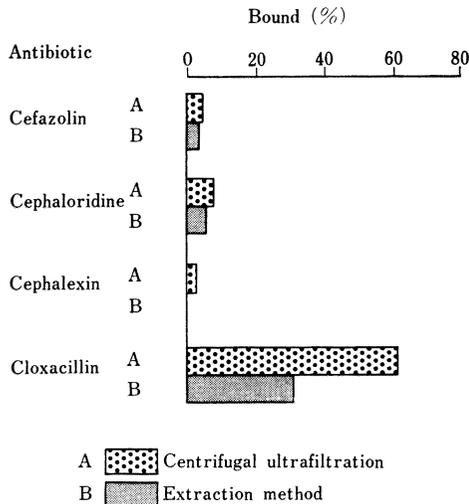
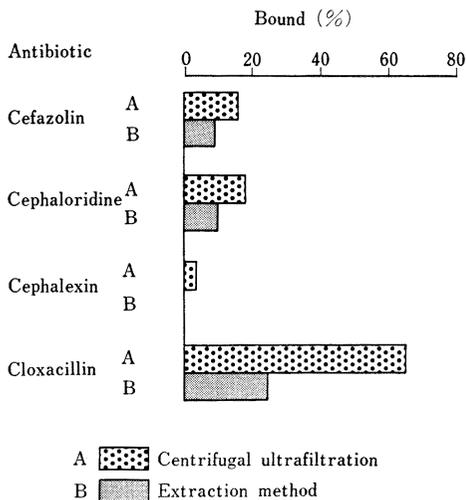


Fig. 4 Comparison between binding extent of cephalosporins and cloxacillin to 90% dog kidney paste by different methods



よりもそうとうに高率で、その大部分は非可逆的結合(44%)であった。

イヌ肝組織との結合は Fig. 2 のとおりである。CEZ, CER および CEX の総結合率および非可逆的結合率はラットの場合とひじょうに類似し、CEZ と CER はともに約 10% の総結合率を示し、その大部分は非可逆結合であった。CEX の結合率はさらに低く、MCIPC は 28% (総結合率) および 26% (非可逆的結合率) であった。

以上の結果から 3 種の Cephalosporin 類のラットおよびイヌ肝組織との総結合率は極めて低率で、またこれらの結合の大部分は用いた条件下で非可逆的なものであ

った。

2) 腎組織との結合

上記の Cephalosporin 類とラット腎組織との結合率は Fig. 3 のとおりである。肝の場合と同様、これら 3 種の Cephalosporin 類の総結合率はひじょうに低く、CEZ 4%, CER 7% および CEX は 2% にすぎなかった。また非可逆的結合も総結合率に対応して低率であった。しかし MCIPC では総結合率は 61%, その約 50% は非可逆的結合で肝の場合と異なり、両結合率の間にさうとうな差が認められた。

イヌの腎組織との結合率は Fig. 4 のとおりである。総結合率は CEZ 16%, CER 18% に対して CEX は 4% と前 2 者と比較すると低率であった。非可逆的結合率はそれぞれ CEZ 9%, CER 10%, CEX は測定限界以下の低率であった。対照とした MCIPC の総結合率は 65%, 非可逆的結合率は 25% であった。

考 察

Polymyxin B および Colistin sulfate とウサギ、イヌおよびサルなどの各種の組織 homogenates との結合については、KUNIN らによって研究が行なわれている⁷⁾。Polymyxin B は *in vitro* で動物組織の cell membranes の phospholipids と特異的に結合し、不活性化される⁸⁾。また実験動物に連続投与すると肝、腎その他の組織と結合して、比較的長期にわたり生体内に貯留されることが立証されている⁸⁾。その他 Aminoglycosides と動物組織との結合を比較した成績⁷⁾によれば、Neomycin が最も強く、Streptomycin が最も弱いことが知られている。また KUNIN らの最近の研究⁹⁾によれば、Cephalothin, Cephalixin, Tetracycline, Penicillin G, Chloramphenicol および Nitrofurantoin は、ラット肝 homogenate の 100,000×G 上清の specific component に *in vitro* で結合することが知られている。この component は 45,000 の分子量をもつタン白として精製分離された。このタン白に Polymyxin B および Erythromycin は全く結合しないけれど、Cephalothin が最もよく結合し、ついで Cephalixin, Tetracycline, Penicillin G の順となった。

われわれが本報で用いた Penicillin および Cephalosporin 類などの β -lactam 系抗生物質の血清タン白との結合は可逆的で、血液の中では活性型と非活性型が動的平衡を保ちながら共存している³⁾。この平衡は薬物およびアルブミンの濃度に対応して変化する⁵⁾。一般に抗生物質の血清タン白との結合は、90% の血清中濃度によって、組織との結合は 10~30% の homogenate を用いてそれぞれ検討されてきた。このような異なった条件において得られた結果を比較して論じることには問題があ

る。われわれは水を加えないで調製した組織 paste を、低温で抗生物質と混じて結合率を検討した。しかしこのような条件で得られた組織成分と抗生物質の結合は、たんに組織 paste による抗生物質の吸着をあらわすにすぎないという批判をとまなうかも知れない。さきにわれわれは Penicillin および Cephalosporin 類の血清タン白との結合率は、それらの抗生物質の Sephadex-G 10 および G 25 との aromatic sorption の強さと相関性をもつことを明らかにした⁷⁾。すなわちアルブミンおよび Sephadex gel と抗生物質との相互作用は類似した現象であって、ether 結合により高度に cross-linked した gel の特異的な構造は、gel に疎水的な特性を与え、この特性が抗生物質の affinity の主因と考えられる。この観点からすれば濃度 90% の動物組織 paste と抗生物質の結合を検討することは、低濃度の組織 homogenate を用いた場合より、より実際の評価結果が得られたことになるかも知れない。とくに β -lactam 抗生物質のように、可逆的な結合性をもつ物質では希釈した生体成分を用いることには問題がある。

すでに述べたとおり Cephalosporin 類の組織成分との結合率は低率ではあるが、大部分は非可逆的で、血清タン白との結合が比較的高率で可逆的である事実とは対称的である。これは組織中に存在するこれらの抗生物質の結合に関与する成分が、血清中に存在する成分、アルブミンとは異なるものであることを示唆する。

要 約

ラットの血清タン白と CEZ の結合率は 90% 以上と CER (65%) および CEX (30%) よりも高率である。しかしこの動物の肝および腎組織 paste と CEZ, CER および CEX の結合率はともに低率で、3者間に大差は認められなかった。また β -ラクタム系抗生物質の血清タン白との結合能の小さいイヌの肝および腎組織 paste と、上記の3種の Cephalosporin 類との結合も、ラットの場合と同様の傾向が認められた。

これらの Cephalosporin 類のラット肝組織 paste との結合の大部分は、用いられた条件下で非可逆的であった。しかし CEZ および CER の腎組織 paste との結合の約 50% は非可逆的であった。

以上の結果から、Cephalosporin 類の肝および腎組織 paste との結合率は、それらの血清タン白との結合率とは無関係であることが明らかになった。

文 献

- 1) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND : The binding of antibiotics to serum proteins. *Brit. J. Pharmacol.* 25(3) : 638~650, 1965
- 2) MEYER, M. C. & D. E. GUTTMAN : Review article - The binding of drugs by plasma proteins. *J. Pharmaceut. Sci.* 57(6) : 895~918, 1968
- 3) JOOS, R. W. & W. H. HALL : Determination of binding constants of serum albumin for penicillin. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 166(1) : 113~118, 1969
- 4) SHIMIZU, T. : Studies of protein binding of cefazolin and other antibiotics. *Jap. J. Antibiotics* 27(3) : 296~301, 1974
- 5) MURAKAWA, T.; Y. WAKAI, Y. DOI & M. NISHIDA : Studies on binding of penicillins to serum protein. *Jap. J. Antibiotics* 22 : 387~393, 1969
- 6) KORNGUTH, M. L.; R. A. MONSON & C. M. KUNIN : Binding of antibiotics to soluble protein from rat liver. *J. Infectious Diseases* 129(5) : 552~558, 1974
- 7) KUNIN, C. M. : Binding of antibiotics to tissue homogenates. *J. Infectious Diseases* 121(1) : 55~64, 1970
- 8) KUNIN, C. M. & A. BUGG : Binding of polymyxin antibiotics to tissues : The major determinant of distribution and persistence in the body. *J. Infectious Diseases* 124(4) : 394~400, 1971
- 9) KUNIN, C. M. & A. BUGG : Recovery of tissue bound polymyxin B and colistimethate. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 137 : 786~790, 1971
- 10) 呉 京修・岡本緩子・大久保 滉 : 各種抗生物質の組織ホモジネート (とくに肝) における不活化 (2)。第 20 回日本化学療法学会総会抄録集 : 49, 1972
- 11) 橋本孝夫 : 抗生物質の生体内動態に関する基礎研究, 第 2 編, 肝 microsome との結合について。 *Chemotherapy* 21(1) : 45~53, 1973

STUDY ON BINDING OF CEPHALOSPORINS TO TISSUE PASTES

NAOHIKO OKADA, HIROSHI SAKAMOTO, SHOJI NAKAMOTO,
YOSHIKO YOKOTA, TAKEO MURAKAWA and MINORU NISHIDA
Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

Binding of cefazolin to the serum protein of rats was as high as 90%, *i. e.*, higher than that of cephaloridine (65%) and cephalexin (30%). However, binding of cefazolin, cephaloridine and cephalexin to the hepatic and renal tissue pastes was low in rats, and no great differences in binding were noted among these three antibiotics. Binding of the cephalosporins to the hepatic and renal tissue pastes of dogs, in which the binding of β -lactam antibiotics to the serum protein is low, tended to show nearly the same results as in the case of rats.

Most of the binding of cephalosporins to the hepatic and renal tissue pastes of rats was irreversible under the present conditions. However, about a half of the total binding of cefazolin and cephaloridine to the renal tissue paste was irreversible.

From the results, it is clear that there is no relationship between the binding of cephalosporins to the hepatic and renal tissue pastes and to the serum proteins.