

T-1220 の血清蛋白結合に関する研究

才川 勇・保田 隆・渡辺泰雄・山本恵美子

富山化学工業株式会社総合研究所

ペニシリン類の血清蛋白結合については、多くの研究報告がある^{1)~3)}。しかしながら蛋白結合様式やその臨床的意義についてはいまだ充分解明されていない現状である。

今回著者らは、新規に開発された半合成ペニシリン、T-1220 (Fig. 1) の蛋白結合態度を知る目的でヒト、イヌ、ウサギおよびラット血清との結合性、結合様式を各種測定方法で検討した。また炎症などの病巣部への移行は臨床に重要な意義を持つと考え、炎症巣への移行と蛋白結合との関連性をも検討し、若干の知見を得たのであわせて報告する。

I. 実験材料および方法

1) 使用薬剤

T-1220 (916 μ g/力価/mg: 富山化学), Ampicillin (ABPC, 870 μ g/力価/mg: 富山化学), Carbenicillin は市販品 Gripenin (CBPC: 藤沢薬品), Oxacillin は市販品 Staphcillin-V (MPIPC: 万有製薬), 他にウシ血清アルブミン (BSA: NBC) を用いた。

2) 使用動物

Wistar 系ラット, 6, 150~200 g を用いた。

3) 血清の調製

ヒト血清は、ブール血清をリン酸で pH 7.2 に調整した。またラット, ウサギおよびイヌ血清は使用当日採血し、冷蔵庫に30分放置後遠心分離を行ない血清を分離した。

4) 蛋白結合率測定法

a) 超遠心法⁴⁾

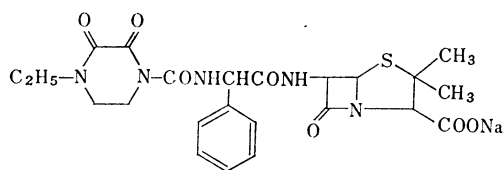
血清 9 容に対し、薬液 1 容を加え、1 時間 incubate した後、4°C, 200,000 $\times$ g, 12 時間遠心処理を行なった。上清部の薬液濃度を 1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で作製した標準液, 原血清濃度を血清 (pH 7.2) で作製した標準液を用いて測定し、下式により結合率を求めた。

$$\text{結合率}(\%) = \frac{\text{原血清中濃度} - \text{上清中濃度}}{\text{原血清中濃度}} \times 100$$

b) 遠心限外濾過法⁵⁾

血清 9 容に対し、薬液 1 容を加え、37°C, 1 時間 incubate した。この反応液をセルロースチューブ (Visking Company, サイズ 8/32) に入れ、1,000 $\times$ g, 30 分遠心分離したのち、濾液中の薬剤の濃度を測定した。この測定

Fig. 1 Chemical structure of T-1220



値を X, 対照として 1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で同様の処理を行なって得られた測定値を Y として、下式により結合率を求めた。

$$\text{結合率}(\%) = \frac{Y - X}{Y} \times 100$$

c) 平衡透析法

五味ら⁶⁾の方法に従った。内液として、薬剤を含む 90% 血清 4.0 ml をセルロースチューブ (Visking Company: サイズ 20/32) に、外液として 1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 16 ml を入れ、4°C で 48 時間平衡透析を行ない、下式により結合率を求めた。内液濃度は血清 (pH 7.2) で作製した標準液, 外液濃度は 1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で作製した標準液を用いて測定した。

$$\text{結合率}(\%) = \frac{(a - b) \times u}{a \times u + b \times v} \times 100$$

a : 内液中薬剤濃度

b : 外液中薬剤濃度

u : 内液量

v : 外液量

5) 蛋白結合定数と最大結合量の測定

Klotz ら⁷⁾は、蛋白質が低分子またはイオンと結合する場合、結合量と濃度の関係は下式に示す LANGMUIR 型の等温吸着式に従うと述べている。

そこで本研究では、前述したセルロースチューブに 1% アルブミン溶液 4 ml, 外液に所定の濃度の薬液 9 ml を入れ、4°C, 48 時間平衡透析を行ない、外液中の薬剤濃度を測定した。平衡状態では内液および外液中の遊離薬剤濃度は等しいものとし、これよりアルブミンに結合した薬剤量を算出し、下式に従って結合定数 K, 最大結合量 n を求めた。なおアルブミンの分子量は 70,000 とした。

Table 1 Extent of binding to human serum protein by different methods

Penicillins	Binding (%)		
	Ultra centrifugation	Centrifugal ultrafiltration	Equilibrium dialysis
T-1220	26.2	21.2	12.2
CBPC	49.0	52.3	28.9
MPIPC	94.9	93.5	84.0

Penicillin concentration : 25 µg/ml

Table 2 Extent of binding to serum protein from different species of animals

Penicillins	Binding (%)			
	Human	Dog	Rabbit	Rat
T-1220	21.2	24.0	27.5	24.8
CBPC	52.3	53.9	56.1	44.0
ABPC	22.9	N. D.	N. D.	27.2
MPIPC	93.5	73.0	72.1	78.9

Method : Centrifugal ultrafiltration

Penicillin concentration : 25 µg/ml

N. D. : Not determined

Fig. 2 Effect of concentration of albumin on protein binding

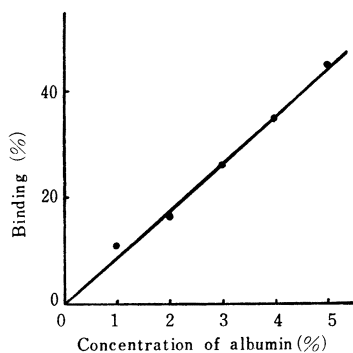
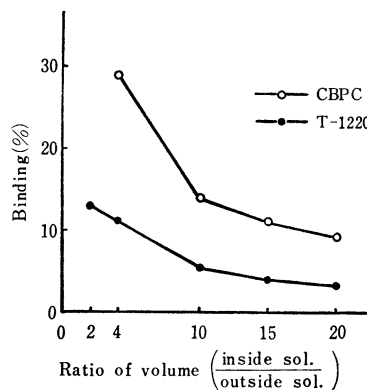


Table 3 Effect of buffer-dilution on serum protein binding of penicillins

Penicillins	Dilution and recovered activity (%)		
	Initial	×10	×100
T-1220	80	95	100
CBPC	64	97	100
MPIPC	22	59	87

Penicillin concentration: T-1220 200 µg/ml, CBPC 200 µg/ml, MPIPC 50 µg/ml

Fig. 3 Effect of volume of outside solution on protein binding in equilibrium dialysis]



$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n \cdot K} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{n}$$

c : 遊離薬剤濃度 (M/L)

r : アルブミン 1 分子当りに結合する薬剤の結合量 (mole/mole)

K : 結合定数

n : アルブミン 1 分子当りの最大結合量

6) ラット無菌炎症の作製⁷⁾

ラット (150~200 g) の背部皮内に空気 25 ml を注射したのち、1% のクロトン油を含むオリーブ油 1 ml を空

気嚢に投与して無菌炎症を作製した。作製後 5~8 日目に各薬剤を筋肉内投与して、経時的に血液、滲出液を採取した。血清中濃度はラット血清で作製した標準液、滲出液中濃度は滲出液で作製した標準液で測定した。

7) 薬剤濃度測定法

T-1220 および MPIPC は *Micrococcus luteus* ATCC 9341, CBPC および ABPC は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする薄層カップ法またはペーパー・ディスク法で測定した。

Table 4 Effect of volume of outside solution on protein binding in equilibrium dialysis

Ratio of volume (outside sol./inside sol.)	T-1220		CBPC	
	Binding (%)	Binding ratio	Binding (%)	Binding ratio
2	13.0	1.2	N. D.	N. D.
4	11.3	1.0	28.9	1.0
10	5.4	0.48	14.1	0.49
15	4.0	0.35	11.1	0.38
20	3.3	0.29	9.3	0.32

N. D.: Not determined

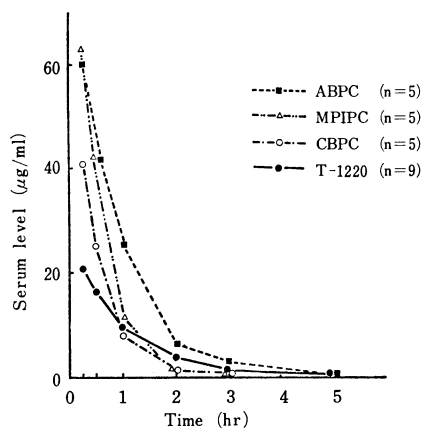
Table 5 Binding constant and maximum binding number for T-1220 and MPIPC

Penicillins	Binding constant (K)	Maximum binding number (n)
T-1220	1.61×10^3	2.17
MPIPC	1.04×10^3	9.26

BSA concentration : 1.43×10^{-4} M

Method : Equilibrium dialysis

Fig. 4 Serum level after intramuscular administration (50 mg/kg) of penicillin derivatives in rats



II. 実験結果

1) 各種方法による蛋白結合率の測定

T-1220の蛋白結合率をヒト血清を用い超遠心、遠心限外濾過および平衡透析の3種の方法で検討した。その結果をTable 1に示す。超遠心、遠心限外濾過および平衡透析法により求めたT-1220の結合率はそれぞれ26.2%, 21.2%および12.2%であり、平衡透析法では前2法に比べ低い値を示した。この傾向はCBPC, MPIPCにおいても認められた。

Fig. 5 Drug levels in exudation after intramuscular administration (50 mg/kg) of penicillin derivatives in rats

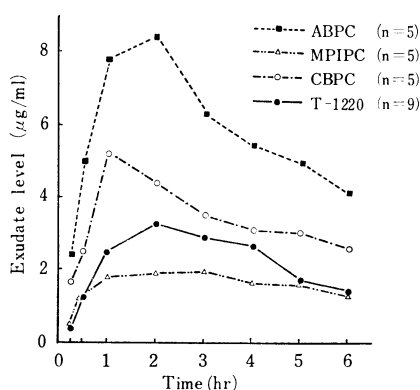


Table 6 Extent of binding to rat exudate protein

Penicillins	T-1220	MPIPC	CBPC	ABPC
Binding (%)	11.7	70.0	N. D.	N. D.

Method: Centrifugal ultrafiltration

Penicillin concentration: 25 μg/ml

N. D.: Not determined

2) 各種動物血清との結合性

各種動物血清に対するT-1220の結合率を遠心限外濾過法で測定した。その結果をTable 2に示す。ヒト、イス、ウサギおよびラット血清に対するT-1220の結合率は、ABPCと同様に低く、それぞれ21.2%, 24.0%, 27.5%および24.8%で、動物血清種による差異は認められなかった。いっぽう、CBPCでは44.0~56.1%, MPIPCでは72.1~93.5%でいずれもT-1220より高い結合率を示した。

3) アルブミン濃度の影響

T-1220の結合率におよぼすアルブミン濃度の影響を

遠心限外濾過法で検討した。その結果を Fig. 2 に示す。T-1220 の結合率は、アルブミン濃度が 1～5% の範囲では濃度とともに比例的に増加した。

4) 希釈処理の影響

血清 9 容に対し、薬液 1 容を加え、37°C, 1 時間 incubate した後、1/15 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) で 10 倍および 100 倍に希釈したときの遊離活性を測定し、1/15 M リン酸緩衝溶液中での抗菌活性を 100 としたときの相対比率で表わした。その結果を Table 3 に示す。血清に結合した T-1220 および CBPC は、10 倍希釈でいずれも 100% 近く遊離体となった。また MPIPC では、10 倍希釈で 59%, 100 倍希釈で 87% が遊離体であった。

5) 透析内液に対する外液比の影響

五味ら⁴⁾の方法に従って、平衡透析法で内液に対する外液の比を 2, 4, 10, 15, 20 としたときの結合率の変化を Fig. 3 に示す。T-1220 は内液に対する外液の比が 10 まで直線的に減少したが、以後はほぼ一定であった。CBPC においても同様の結果が得られた。さらに五味ら⁴⁾と同様に、内液に対する外液の比が 4 のときの結合率を 1 とし、それぞれの結合比率を求めた。その結果を Table 4 に示す。T-1220 および CBPC の結合比率はいずれの場合においても極めて類似した値を示した。

6) 蛋白結合定数および最大結合量の測定

T-1220, MPIPC の蛋白結合定数および最大結合量を求めた。その結果を Table 5 に示す。結合定数および最大結合量は、T-1220 の場合 1.61×10^3 , 2.17, MPIPC の場合 1.04×10^3 , 9.26 であった。

7) 炎症巣への移行に及ぼす蛋白結合の影響

ラットの背部皮下に無菌炎症を作製し、薬剤 50 mg/kg を筋肉内投与したときの血中濃度および滲出液中濃度を測定した。その結果を Fig. 4, Fig. 5 に示す。T-1220, CBPC, ABPC および MPIPC は投与 15 分後にそれぞれ 20.9 $\mu\text{g/ml}$, 41.2 $\mu\text{g/ml}$, 60.2 $\mu\text{g/ml}$ および 63.2 $\mu\text{g/ml}$ の最高血中濃度が得られ、以後すみやかに減少し、3 時間後には 3 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。いっぽう T-1220, CBPC, ABPC および MPIPC の滲出液中濃度は、投与 60～120 分後に最高値を示し、それぞれ 3.4 $\mu\text{g/ml}$, 5.2 $\mu\text{g/ml}$, 8.4 $\mu\text{g/ml}$ および 1.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。また 6 時間後においてもそれぞれ 1.4 $\mu\text{g/ml}$, 2.6 $\mu\text{g/ml}$, 4.1 $\mu\text{g/ml}$ および 1.3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を示し比較的持続的な推移を示した。次に炎症巣において、滲出液中蛋白との結合が炎症巣の活性濃度に影響を及ぼすと考え、滲出液中蛋白との結合率を測定した。その結果を Table 6 に示す。T-1220 は血清蛋白との結合率より低く 11.7%, MPIPC は 70.0 % を示した。

III. 考 察

今回著者らは T-1220 の各種動物血清に対する蛋白結合率を測定した。その結果は 21.2～27.5% であり、他のペニシリンと比較して低い値を示し、動物種差による結合率に大きな差はみられなかった。またアルブミン量との関係では、結合率は蛋白濃度依存性が認められた。

蛋白と結合した T-1220 および CBPC は、希釈することにより容易に遊離体となること、さらに平衡透析法において、内液に対する外液の比を大きくしたときの結合率が類似した減少傾向を示すことより、両剤は可逆的な結合をし、その結合の強さはほぼ同等と考えられる。

ところで平衡透析法で求めた結合率は、超遠心法および遠心限外濾過法にくらべ低い傾向が認められた。すなわちこれは前述したごとく、薬剤と蛋白の結合は可逆的であり、平衡透析法では外液によって薬剤が一部遊離体となるため結合率が低下するものと考えられる。

ペニシリンと血清蛋白との結合能は、その側鎖構造により種々異なることが知られている^{1)～3)}。そこでこの結合能の差異を KLOTZ ら⁶⁾に従って検討した結果、アルブミン 1 分子に対する最大結合量が T-1220 と MPIPC で明らかに差が認められ、これが結合率に反映しているものと思われる。

ROLINSON ら⁸⁾は、結合した薬剤は血管壁をほとんど透過せず組織内への移行が妨げられることから、その結合率および結合の強さが臨床効果に大きく影響を及ぼすと述べている。そこで実験炎症のモデルを用いて、炎症巣への移行性と蛋白結合との関係を検討した結果、MPIPC のような結合率の高いものは炎症巣への移行が悪く、T-1220 のような結合率の低いものは移行性が良い傾向がみられた。すなわち、結合した薬剤は非拡散性となり血管内に残存する傾向にあり、遊離型の薬剤はすばやく血管外へ拡散することを意味するものである⁹⁾。また T-1220 および ABPC のような蛋白結合率の低い薬剤の炎症巣濃度は、血中濃度に大きく左右されるようである。

さらに ROLINSON ら⁸⁾は、血清蛋白と高率に結合した薬剤の MIC 値が大きくなることより、結合した薬剤は抗菌活性を失うと述べている。今回著者らの行った滲出液中蛋白との結合率は、MPIPC の 70.0% に対し、T-1220 は 11.7% と低い結合率を示すことから、病巣内においても有効な抗菌作用を示すものと推定される。

要 約

T-1220 の血清蛋白結合率を超遠心、遠心限外濾過および平衡透析法を用いて測定した。T-1220 は動物種差による結合能に大きな差はなく、ヒト、イヌ、ウサギ

およびラットでそれぞれ21.2%, 24.0%, 27.5%および24.8%であった。またその結合は、可逆的であり強固なものではなかった。さらに実験炎症モデルを用いて、炎症巣への移行性を他の薬剤と比較した結果、蛋白結合率の低いT-1220は、結合率の高いMPIPCより炎症巣への移行性は良好であった。

本研究にあたり終始ご指導とご助言を賜りました東京慈恵会医科大学、上田 泰教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) ZIV, G. & F.G. SULMAN: Binding of antibiotics to bovine and ovine serum. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 2: 206~213, 1972
- 2) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND: The binding of antibiotics to serum proteins. *Brit. J. Pharmacol.* 25: 638~650, 1965
- 3) KUNIN, C. M.: Clinical pharmacology of the new penicillins. I. Importance of serum protein binding in determining antibacterial activity and concentration in serum. *Clin. Pharmacol. Ther.* 7: 166~179, 1966
- 4) 五味二郎, 青柳昭雄, 小穴正治, 満野嘉造, 河合健, 山田淑几, 山田幸寛: Flucloxacillin の血清蛋白との結合についての研究。 *Chemotherapy* 17: 1363~1366, 1969
- 5) REHBERG, P.B.: A centrifugation method of ultrafiltration using cellophane tubes. *Acta Physiol. Scand.* 5: 305~310, 1943
- 6) KLOTZ, I. M.: "The proteins" part B, Academic Press, New York, 727, 1953
- 7) SELYE, H.: Use of "granuloma pouch" technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 82: 328~333, 1953
- 8) ROLINSON, G. N.: The significance of protein binding of antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Recent Advances in Medical Microbiology*, 254~283, Little Brown and Co., Boston, 1967
- 9) 村川武雄, 岡野圭介, 若井芳美, 西田 実: Cefazolin の無菌炎症滲出液およびリンパ液内移行について。 *Jap. J. Antibiotics* 25: 99~103, 1972

STUDIES ON THE SERUM PROTEIN BINDING OF T-1220

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA,
YASUO WATANABE and EMIKO YAMAMOTO
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The serum protein binding extent of T-1220 was determined by ultracentrifugation, centrifugal ultrafiltration and equilibrium dialysis techniques. Not a remarkable difference was observed in the binding extent among species. They were 21.2% in human, 24.0% in dog, 27.5% in rabbit and 24.8% in rat, respectively. The binding of T-1220 was reversible and not so fixative. The transitional activity to the focus of inframammic was studied on the experimental model and the activity of T-1220 was compared to that of the other drugs. The result shows that the transitional activity to the focus of T-1220, having low protein binding extent, is higher than that of MPIPC having higher protein binding extent.