

PC-904 の血清蛋白および組織成分との結合について

小松敏昭・木崎容子・入江健二・奥田隆夫・赤栗信二・野口浩・井沢昭雄

住友化学工業株式会社医薬事業部研究開発センター

紺野昌俊

帝京大学医学部小児科

PC-904 は住友化学工業株式会社において合成された ampicillin 誘導体で、その特徴は下記のとおりである。

1) 緑膿菌を始めグラム陰性桿菌に強力な抗菌活性を示す。2) 広域スペクトラムを有する。3) 注射後肝-胆道を主排泄経路として排泄される¹⁻³⁾。

本剤の生体試料測定にあたり標準曲線を描くと血清希釈とリン酸緩衝液希釈の間に差が認められるがその差は血清蛋白結合率から予測されるよりもかなり小さい事実が存在し、本剤の血清蛋白または組織成分との結合性を解明することは、その生体内での活性発現や代謝など本剤の生体内における態度を理解する上で重要な研究課題と考えられる。

著者らは PC-904 の血清蛋白、組織成分との結合率、結合力、結合の可逆性などの結合性につき検討を行なったので報告する。

I. 実験材料と方法

1. 薬剤

PC-904: 住友化学工業株式会社で合成されたものを使用した。

cefazolin: 藤沢薬品工業株式会社のもの。以下 CEZ と略す。

dicloxacillin (Methyldichlorophenylisoxazolylpenicillin): 万有製薬株式会社のもの。以下 MDIPC と略す。

2. 血清蛋白および臓器ホモジネート

動物血清: マウスの場合は ICR 系(♂), ラットは SD 系(♂)から採取したものを使用し、仔牛血清は市販品(和光純薬)を、イヌの場合はビーグル犬(♂)の血清を使用した。

ヒト血清: 健康成人男子血清を用いた。また Moni-Trol I(Dade 社), Consera(ニッスイ)は指定どおり蒸留水に溶解して使用した。ヒト血清アルブミン fraction IV(INC 社)は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて 4% または 0.4% に溶解して使用した。

臓器ホモジネート: SD 系(♂)ラットから摘出した臓器を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 20%, 50% および 80% になるようにテフロンホモジナイザーにて氷冷下ホモジナイズした。

3. 結合率の測定

薬剤を血清中に 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し 37°C, 1 hr. インキュベート後 Centriflo membrane ultrafilter CF-50(Amicon) を用いて $1 \times 10^5 \text{G}$, 10 min. 遠心限外濾過を行ない外液の活性を *B. subtilis* ATCC 6633 を用いたディスク法により測定した。超遠心法の場合は 4°C で $2 \times 10^5 \text{G}$, 18 hr. 遠心して得られた上清の濃度を上記方法でバイオアッセイした。外液または上清液の濃度を $x \mu\text{g/ml}$ とすると蛋白結合率は下式で求められる。

$$\text{蛋白結合率} = \left(1 - \frac{x}{50}\right) \times 100\%$$

平衡透析法の場合はセロファンチューブ (Visking 社 15.9 mm ϕ 20/32) を用いて薬物の 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液を外液 (14 ml) とし、内液は Moni-Trol I 溶液 (7 ml) とした。4°C で 48 hr. 透析後外液の薬剤濃度を測定し、また対照として内液を緩衝液とした場合の透析後の外液濃度を測定し平衡濃度と表現した。蛋白結合率の計算は下式によった。

$$\text{蛋白結合率} = \frac{C_b}{C_b + C_f} \times 100\%$$

C_b : 結合濃度 = (平衡濃度 - 外液濃度) \times (全液量/内液量)

C_f : 遊離濃度 = 外液濃度

4. 希釈効果の検討

血清希釈および M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて標準曲線を作成し、一方、血清中での薬剤最高濃度溶液を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて倍数希釈し *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌としたディスク法により阻止帯を測定した。

また ROLINSON ら⁴⁾の方法によっても可逆性の検討を行なった。Moni-Trol I 溶液中に 100 $\mu\text{g/ml}$ になるように薬剤を溶解し 37°C, 1 hr. インキュベート後、原液ならびに 10 倍, 40 倍に溶液を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈しそれぞれの蛋白結合率を測定した。一方これらと同等の混合割合になるように薬剤, 蛋白共に予め希釈して混合後 37°C, 1 hr インキュベートしそれぞれの結合率を測定した。結合率の測定は遠心限外濾過法によった。

Table 1 Protein binding rates of PC-904, CEZ and MDIPC with human and animal sera
—centrifugal ultrafiltration method—

Drug	Serum	Binding rate (%)								
		Human	Moni Trol I		Consera	Human serum albumin (4%)	Mouse	Rat	Dog	Bovine
			*	**						
PC-904		98	98	96	98	90	82	96	95	98
CEZ		90	84	84	89	88	66	95	40	51
MDIPC		98	96	96	96	98	87	92	97	88

* dissolved in distilled water

** dissolved in M/15 PBS(pH 7.0)

Ultrafiltration : centriflo membrane ultrafilter, CF-50(Amicon) ; $1 \times 10^6 G$ 10 min.

Drug conc. : 50 $\mu g/ml$

Incubation : 37°C, 1 hr.

Bioassay : *B. subtilis* ATCC 6633

Table 2 Comparison of protein binding rates by some determination methods

Drug	Method	Binding rate(%)		
		Ultrafiltration*	Ultracentrifugation**	Equilibrium dialysis
PC-904		98	98	81
CEZ		84	88	85
MDIPC		96	95	86

* $1 \times 10^6 G$ 10 min. ** $2 \times 10^6 G$, 18 hr.

Drug conc. : 50 $\mu g/ml$, Serum : Moni-Trol I

Incubation : 37°C, 1 hr.

Bioassay : *B. subtilis* ATCC 6633

5. 結合定数の測定

ヒト血清蛋白としてヒト血清アルブミン fraction IV (INC 社) の 4% または 0.4% の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液を用いた。各薬剤濃度に溶解した液中での遊離型薬剤濃度 (C) を超遠心法により分離測定した。PC-904 の場合は ^{14}C -PC-904 を使用したラジオアッセイにより、CEZ および MDIPC の場合は *B. subtilis* ATCC 6633 を用いたバイオアッセイにより測定した。蛋白 1 mol に結合した薬剤の mol 数 (r) を算出し、横軸 $1/C$ と縦軸 $1/r$ の Klotz plot⁵⁾ により N (蛋白 1 分子が薬剤と結合し得る結合部位数) および K (薬剤と蛋白の結合定数) を下式により算出した。

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{N \cdot K} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{N}$$

C : 遊離型薬剤濃度 mol 数

r : 蛋白 1 mol 当りに結合した薬剤 mol 数

N : 蛋白 1 分子当りの薬剤結合部位数

K : 結合定数

なお、ヒト血清アルブミンの分子量は 65,000 として計算した。

II 結果と考察

1. 蛋白結合率

PC-904 の各種動物およびヒト血清蛋白との結合率は Table 1 に示されるように遠心限外濾過法にて、マウスの場合の 82% を除いて 95~98% と高率であった。

測定方法による測定値の変動については、超遠心法にても限外濾過法と同様の値が得られたが平衡透析法では 81% と比較的低い値が得られた (Table 2)。

この原因は平衡透析時には平衡が外液の遊離型に移行したためと考えられ、本剤の蛋白結合が強固なものでなく可逆的なことを示唆している。

2. 蛋白結合の希釈による可逆性

PC-904 の血清標準曲線は Fig. 1 および Fig. 2 に示されるように M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 8~16 倍に希釈することにより緩衝液標準曲線と合致した。従って本剤の蛋白結合は血清中の蛋白濃度が 8~16 倍に希釈されると大部分が遊離型に移行し、本剤の蛋白結合の可逆性が示唆された。

ROLINSON ら⁴⁾の方法に基づき PC-904 を先に血清中に溶解し、次いで M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した場合と、まず薬剤および血清蛋白を希釈して先と同様の濃度になるように混合した場合の結合率の差は殆んど認められなかった (Fig. 3)。

前者の結合率のほうが高い場合、その差は非可逆的結合とみなされているので、本法によっても本剤の蛋白結合の可逆性が証明された。

3. 結合定数

ヒト血清アルブミンを用いて PC-904 と血清蛋白との結合定数を算出した。対照薬剤として蛋白結合率の比較的高い CEZ および MDIPC を用いた。

4% または 0.4% アルブミンの場合の結合定数 K お

Fig. 1 Reversibility of the protein binding of PC-904 by dilution

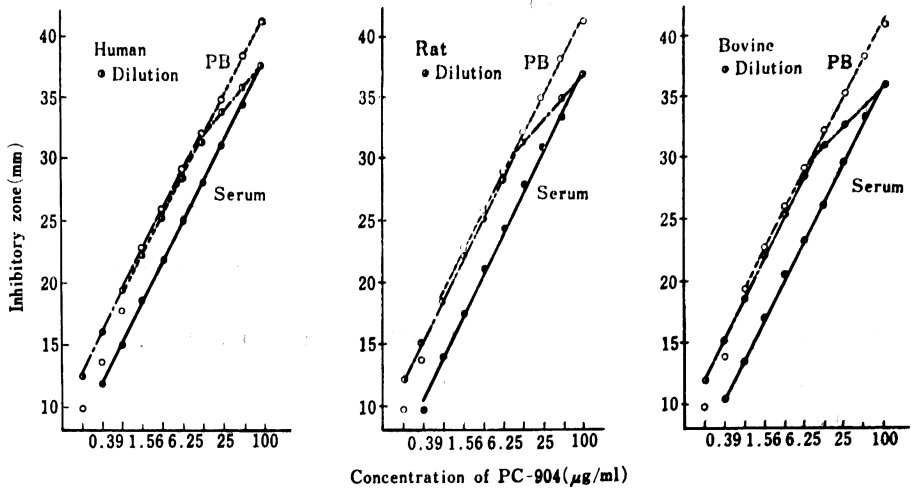
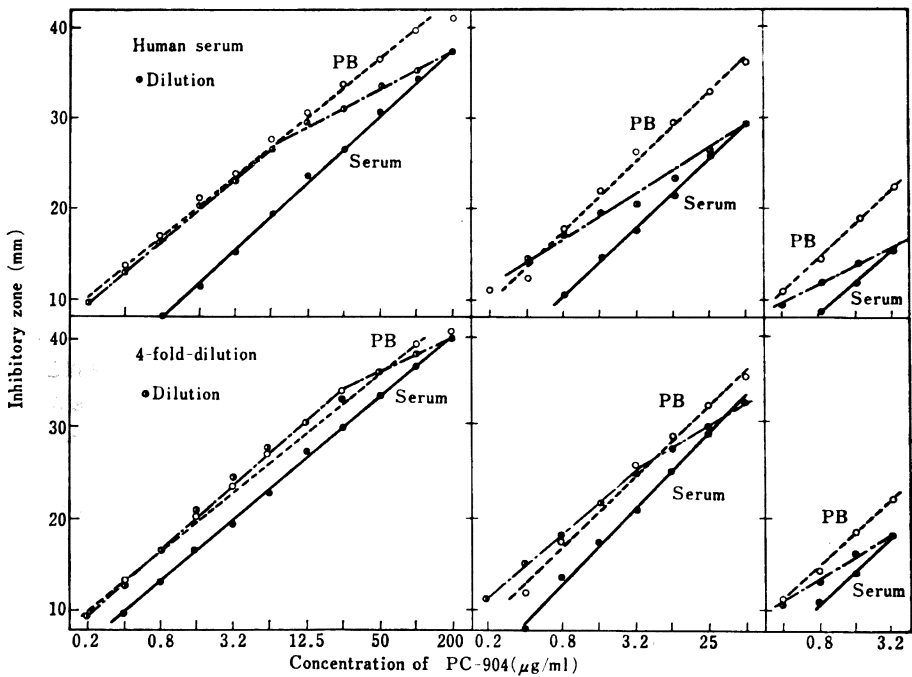


Fig. 2 Reversibility of the binding of PC-904 with human serum by dilution (Bioassay : *M. luteus* ATCC 9341)



よび蛋白 1 分子当りの薬剤の結合部位数 N の値を Fig. 4 示される Klotz plot から算出すると, Table 3 のとおりであった。

4% アルブミンの場合の PC-904 の値 ($K=1.03 \times 10^4 M^{-1}$, $N=1.13$) は CEZ の値 ($K=1.18 \times 10^4 M^{-1}$, $N=1.00$) と近似し, MDIPC の値 ($K=3.95 \times 10^4 M^{-1}$, $N=$

1.92) に比し低値であった。なお上記 CEZ の数値は和泉ら⁹⁾の値 ($K=1.93 \times 10^4 M^{-1}$, $N=0.98$) に極めて近い値であった。

CEZ は蛋白結合率は高いが優れた生体内効果を発揮することは公知の事実である。PC-904 も蛋白結合率は高率であるが, 結合力は CEZ 並みであるという点で少

Fig.3 Reversibility of the protein binding of PC-904 by the dilution technique

System A

Drug conc. : 100 $\mu\text{g/ml}$ in Moni-Trol I
 Incubation : at 37°C for 1 hr prior. to dilution
 Dilution : 10-fold and 40-fold in M/15 PBS(pH 7.0)
 Binding rate : ultrafiltration method

System B

Moni-Trol I : diluted 10-fold and 40-fold in M/15 PBS(pH 7.0)

Drug : added to 100, 10 and 2.5% Moni-Trol I solution in final conc. of 100, 10 and 2.5 $\mu\text{g/ml}$

Incubation : at 37°C for 1 hr. after drug addition
 Binding rate : ultrafiltration method

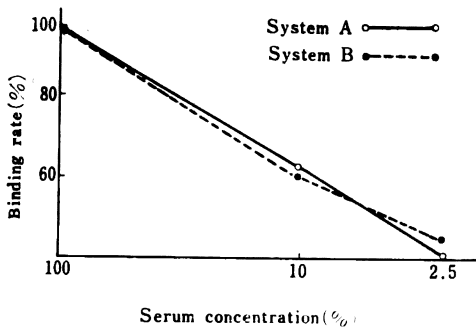


Fig.4 Binding of PC-904, CEZ and MDIPC with 4% human serum albumin (Klotz plot)

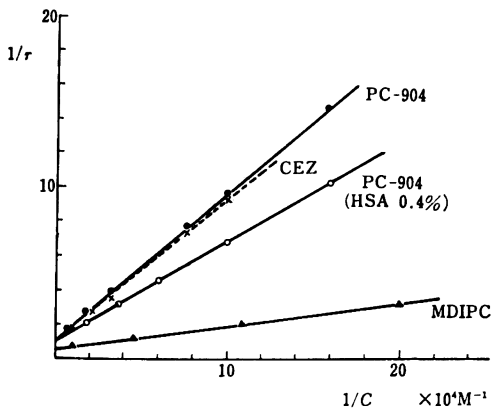
$$\frac{1}{r} = \frac{1}{NK} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{N}$$

C : conc. of free drug

r : moles of drug bound per mole of protein

N : number of binding site/protein molecule

K : binding constant



なくとも血清蛋白結合の観点からは CEZ に類似した態度を生体内でとることが予想される。

4. 臓器ホモジネートとの結合

ラット肝および腎ホモジネートと PC-904 の結合率

Table 3 Binding constants of PC-904, CEZ and MDIPC with human serum albumin

	HSA (%)	N	K ($\times 10^4 \text{M}^{-1}$)
PC-904	4	1.13	1.03
	0.4	0.85	1.85
CEZ	4	1.00	1.18
MDIPC	4	1.92	3.95

HSA : human serum albumin

N : number of binding site/protein

K : binding constant

Table 4 Affinity of PC-904 to tissue homogenates from male Wistar rats

Tissue	Drug	Binding rate (%) in binding exp.	Free rate (%) in recovery exp.
Liver	PC-904	76	92(71, 15, 6)*
	CEZ	90	96(76, 14, 6)*
	MDIPC	≥ 92	$\leq 14(\leq 14)$
Kidney	PC-904	80	106
Serum	PC-904	99	not tested
	CEZ	≥ 96	not tested
	MDIPC	≥ 93	not tested

Incubation : drug soln. (1 mg/ml M/15 PBS, pH 7.0) + 90% homogenate(1 : 9), at 0°C for 2 hr.
 Binding exp. : ultracentrifuged at 4°C for 20 hr. ($26 \times 10^4 \text{G}$)

Recovery exp. : after washing the mixtures with 2 vol. (1 st) and 1 vol. (2 nd & 3 rd) of M/15 PBS pH 7.0, centrifuged at $1.2 \times 10^4 \text{G}$

Bioassay : the supernatants were bioassayed with *M. luteus*(PC-904) or *B. subtilis*(CEZ & MDIPC).

* () : 1 st, 2 nd and 3 rd recovery

は Table 4 に示されるように 76~80% であり血清蛋白の場合より低率であった。肝ホモジネートと PC-904 の結合物を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈洗浄すると 1 回目 71%, 2 回目 15%, 3 回目 6%, 計 92% が回収され, 本結合は可逆的であった。

以上のとおり PC-904 の血清蛋白または組織成分との結合は比較的高率であるがその結合は強固なものではなく比較的ルーズで可逆的である。KUNIN⁷⁾ は抗生剤の蛋白結合につき抗菌活性への影響, 腎排泄率, 生体内分布, 間質組織, 炎症巣への移行などの観点から論じている。また蛋白結合率の高い CEZ は低率の CER よりも間質液中への移行が良好であるとの知見⁸⁾もある。

蛋白結合率は高率であるがその結合が比較的ルーズで可逆的な本剤の場合, 生体内で如何なる動態をとるか興味ある問題であるが, 臨床上的意義は今後の臨床評価と関連して論じられるべきであろう。

III. ま と め

1. PC-904 の血清蛋白結合率はマウスの 82% を除きヒトおよび動物 (ラット, イヌ, ウシ) 血清で 95~98% と高率であった。

2. PC-904 とヒト血清アルブミンとの結合定数は $K = 1.03 \times 10^4 M^{-1}$ ($N=1.13$) で, その結合力は cefazolin の場合と同程度であった。また PC-904 蛋白結合物は緩衝液希釈により容易に遊離型に移行しその結合は可逆的であった。

3. PC-904 のラット肝または腎ホモジネートとの結合率は約 80% 程度で血清蛋白の場合より低く, その結合は可逆的であった。

本研究に当り実験にご協力頂いた東仲真理子氏に感謝します。

(本実験は昭和 51 年 2 月から昭和 51 年 12 月に亘り実施されたものである。)

文 献

- 1) NOGUCHI, H.; Y. EDA, H. TOBIKI, T. NAKAGOME & T. KOMATSU: PC-904, a novel broad-spectrum semisynthetic penicillin with marked antipseudomonal activity; microbiological evaluation: Antimicrob. Agents & Chemoth. 9 : 262~273, 1976

- 2) 小松敏昭, 井沢昭雄, 入江健二, 木崎容子, 奥田隆夫, 江田靖子, 赤栗信二; 野口 浩: 新合成ペニシリン PC-904 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. Chemotherapy 26 S-2 : 94~110, 1978
- 3) 入江健二, 奥田隆夫, 野口浩, 赤栗信二, 井沢昭雄, 山森 芥, 小松敏昭: PC-904 の動物における吸収・分布・排泄. Chemotherapy 26 S-2 : 138~147, 1978
- 4) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND: The binding of antibiotics to serum proteins. Brit. J. Pharmacol. 25 : 638~650, 1965
- 5) KLOTZ, I. M.; F. M. WALKER & R. B. PIVAN: The binding of organic ions by proteins. J. Am. Chem. Soc. 68 : 1486~1490, 1946
- 6) 和泉太郎, 栗山 馨, 三宅幸雄, 江幡光雄, 吉田正: Cephalothin, cephaloridine および cefazolin のヒト血清タンパク質に対する結合. Chemotherapy 24 : 1305~1306, 1976
- 7) KUNIN, C. M.; W. A. CRAIG, M. KORNGUTH & R. MONSON: Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics. Ann. N. Y. Acad. Sci. 226 : 214~224, 1973
- 8) CARBON, C.; A. CONTREPOIS, N. BRION & S. LAMOTTE-BARRILLON: Penetration of cefazolin, cephaloridine and cefamandole into interstitial fluid in rabbits. Antimicrob. Agents & Chemoth. 11 : 594~598, 1977

ON THE BINDING OF PC-904 WITH SERUM PROTEIN OR TISSUE HOMOGENATE

TOSHIKI KOMATSU, YOKO KISAKI, KENJI IRIE,

TAKAO OKUDA, NOBUTSUGU AKAKURI, HIROSHI NOGUCHI and AKIO IZAWA

Research and Development Center, Pharmaceuticals Division,

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, School of Medicine,

Teikyo University

1. Binding rates of PC-904 with serum protein of rat, dog, bovine and human determined by the centrifugal ultrafiltration method were generally high (95~98%), except for 82% in mouse serum.

2. Those results were confirmed by the ultracentrifugation method, but the binding rate obtained by the equilibrium dialysis method was relatively low (81%).

3. The serum protein binding of PC-904 was not so firm, but comparatively loose. It was confirmed by the determination of the binding constant.

Binding data obtained using 4% human serum albumin were as follows:

PC-904 : $K = 1.03 \times 10^4 M^{-1}$, $N = 1.13$

cefazolin : $K = 1.18 \times 10^4 M^{-1}$, $N = 1.00$

dicloxacillin : $K = 3.95 \times 10^4 M^{-1}$, $N = 1.95$

The binding constant of PC-904 was very similar to that of cefazolin and lower than dicloxacillin.

4. It was further confirmed by the dilution technique that its binding was reversible.

5. The binding rates (about 80%) of PC-904 with rat liver or kidney homogenates were lower than that with serum protein. Its binding was reversible.