

## Cefoperazone (T-1551) の蛋白結合に関する研究

才川 勇・保田 隆・渡辺泰雄

林 敏雄・高田理恵子

富山化学工業株式会社総合研究所

著者らは cefoperazone (CPZ, T-1551) と血清蛋白および組織蛋白との結合について詳細な検討を行ない、次のような結果を得た。

CPZ とヒト血清蛋白との結合様式を検討したところ、本剤とヒト血清蛋白との結合は CEZ と同様に可逆的であった。またヒト血清アルブミンに対する蛋白結合定数 (K) と最大結合量 (n) は、それぞれ  $2.63 \times 10^4$ , 0.79 であり、CEZ (K =  $2.56 \times 10^4$ , n = 0.73) と類似した値を示した。

CPZ とヒト血清アルブミンとの結合は、薬剤濃度およびアルブミン濃度によって影響をうけるが、pH や温度による影響は少なかった。

CPZ とラット組織 paste との親和性をリン酸緩衝液による抽出法で検討した結果、4 回の抽出によってほとんど回収された。また各組織による特異性は認められず、肝および腎組織との親和性を CEZ と比較したが有意差は認められなかった。

薬剤と血清蛋白や組織蛋白との結合は、薬効の持続性や副作用、また体内分布、排泄や代謝などの関係から近年特に注目されるようになった。ペニシリン系やセファロsporin 系抗生剤についても血清蛋白との結合に関する種々の報告<sup>1-4)</sup>がある。今回著者らは、才川ら<sup>5)</sup>により新しく開発された半合成セファロsporin 系抗生剤、cefoperazone (CPZ, T-1551) (Fig. 1) の蛋白結合について cefazolin (CEZ) を対照薬として検討し、若干の知見を得たので報告する。

## 1. 実験材料および実験方法

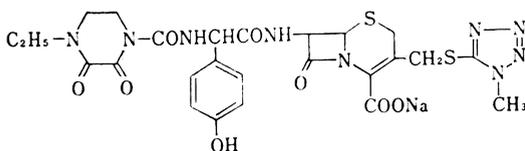
## 1. 使用薬剤

Cefoperazone (CPZ 930  $\mu\text{g}$  力価/mg : 富山化学) および cefazolin (CEZ : 藤沢薬品) を用時 1/15M リン酸緩衝液 pH 7.0 (P. B.) に溶解して用いた。

## 2. 血清蛋白の調製

ヒト血清はブール血清を 10% リン酸で pH 7.2 に調整して用いた。ヒト血清アルブミン (HSA, fraction V : SIGMA 社) は P. B. に溶解し、1% または 4% 溶液に調製した。

Fig. 1 Chemical structure of CPZ



## 3. 蛋白結合率の測定法

a) 遠心限外ろ過法<sup>6)</sup> : 薬液 1 容を血清または HSA 溶液 9 容に加え、37°C、1 時間 incubate した後、セルロース・チューブ (Visking company : サイズ 8/32) に入れ、1,000×G、30 分間遠心分離した。ろ液中の薬剤濃度を測定し、この測定値を X、対照として、P. B. 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。

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

b) 平衡透析法 : 五味ら<sup>7)</sup> の方法に従って、内液として各薬剤 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含有のヒト血清 4 ml をセルロース・チューブ (Visking company : サイズ 20/32) に入れ、外液に P. B. を用いて、4°C で 48 時間平衡透析を行ない、内液および外液の薬剤濃度を測定し、下式により結合率を求めた。なお内液濃度は血清で、外液濃度は P. B. 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

## 4. 希釈効果の検討

薬剤を P. B. またはヒト血清に溶解して 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の溶液を調製した。これらをそれぞれ P. B. またはヒト血

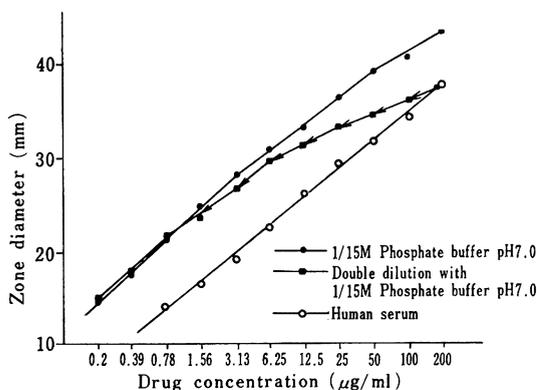
Table 1 Effect of volume of outside solution on protein binding in equilibrium dialysis

Ratio of volume (outside sol./ inside sol.)	CPZ		CEZ	
	Binding (%)	Binding ratio	Binding (%)	Binding ratio
2	77.2	1.0	72.6	1.0
4	77.1	1.0	72.8	1.0
10	68.3	0.89	61.6	0.85
15	67.7	0.88	60.4	0.83
20	65.6	0.85	57.5	0.79

Drug concentration: 50  $\mu\text{g/ml}$

Outside solution: 1/15M Phosphate buffer (pH 7.0)

Fig.2 Reversibility of serum protein binding of CPZ



清で倍数希釈して標準液を作製し、薄層カップ法により阻止帯を測定した。一方、200  $\mu\text{g/ml}$ の血清溶液をP. B. で倍数希釈して同様に阻止帯を測定した。

#### 5. 蛋白結合定数と最大結合量の測定

4% HSA 溶液と各種濃度の薬液を37°C, 1時間 incubate した後、遠心限外ろ過法を用いて遊離薬液濃度を測定し、同時にアルブミンに結合した薬液量を算出した。下式に従って Klotz plot<sup>8)</sup> を作製し、結合定数 (K) と最大結合量 (n) を求めた。なおアルブミンの分子量は69,000とした。

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

c : 遊離薬液濃度 (M)

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. ラット組織 paste の調製

岡田ら<sup>9)</sup>の方法に従って、Wistar系ラットを断頭瀉血した後、肝、腎、肺および小腸を摘出し、水を加えないでホモジネートし、100%組織 pasteを調製した。

Table 2 Binding constant and maximum binding number for CPZ and CEZ

Drug	Binding constant (K)	Maximum binding number (n)
CPZ	$2.63 \times 10^4$	0.79
CEZ	$2.56 \times 10^4$	0.73

Human serum albumin concentration: 4% ( $5.80 \times 10^{-4}\text{M}$ )

Method: Centrifugal ultrafiltration

#### 7. ラット組織 paste との親和性

各組織 paste 4.5g に2,000  $\mu\text{g/ml}$ の薬液0.5mlを加えて十分攪拌し、4°C, 1時間放置した。その後 P. B. 15ml を加え十分に攪拌して遊離型の薬剤を抽出し、10,000 × G, 30分間遠心分離を行なった。沈澱に再び P. B. 15ml を加え同様に遠心し、この処理をさらに2回繰り返した。各上清中の薬剤濃度を測定して回収率を求めた。

#### 8. 薬剤濃度測定法

CPZ は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を、CEZ 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。

## II. 結果

#### 1. 結合の可逆性

CPZ および CEZ とヒト血清蛋白との可逆性を知るために、平衡透析法を用い、内液に対する外液の液量比を2, 4, 10, 15 および 20 とした時の蛋白結合率を測定し、その結果を Table 1 に示した。CPZ の結合率は、液量比が2と4ではほとんど変わらず、10で急激に低下し、それ以上ではほぼ一定であった。またCEZも同様の傾向を示した。さらに液量比が2の時の結合率を1として、それぞれの結合比率を求めたが、CPZ および CEZ の結合比率はいずれも類似した値を示した。

また CPZ の可逆性については、P. B. による希釈効果

Fig. 3 Effect of concentration of drug on protein binding

Human serum albumin: 4% ( $5.80 \times 10^{-4} M$ )  
 Method: Centrifugal ultrafiltration  
 (CPZ:  $400 \mu g/ml = 5.99 \times 10^{-4} M$ )  
 (CEZ:  $400 \mu g/ml = 8.39 \times 10^{-4} M$ )

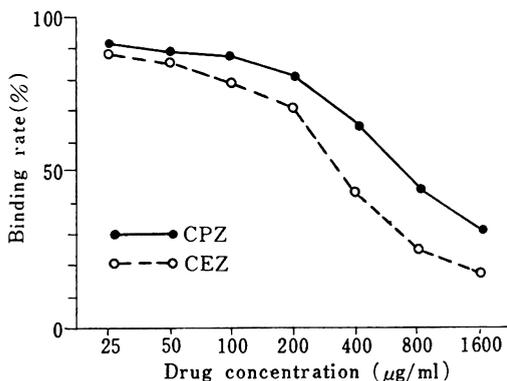
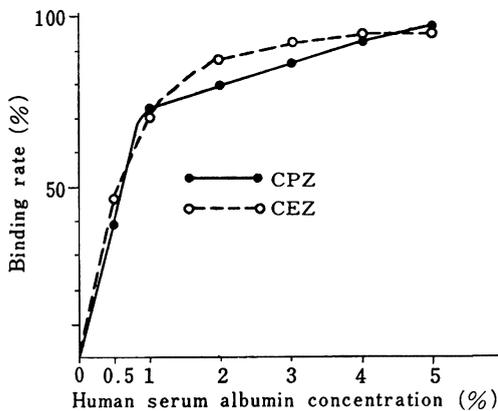


Fig. 4 Effect of albumin concentration on protein binding

Drug concentration:  $25 \mu g/ml$   
 Method: Centrifugal ultrafiltration



もあわせて検討し、その結果を Fig. 2 に示した。200  $\mu g/ml$  の血清溶液は P. B. で 64~128 倍に希釈すると、P. B. の標準曲線とはほぼ合致した。従って血清を P. B. で約 100 倍に希釈することにより、血清蛋白と結合した CPZ は大部分が遊離体になると推定した。

2. 蛋白結合定数および最大結合量の測定

CPZ および CEZ のヒト血清アルブミンに対する蛋白結合定数 (K) および最大結合量 (n) を求め、これを Table 2 に示した。CPZ では  $K = 2.63 \times 10^4$ ,  $n = 0.79$ , CEZ では  $K = 2.56 \times 10^4$ ,  $n = 0.73$  であり、CPZ および CEZ の結合の強さおよびアルブミン 1 分子当りの最大結合量は類似した値を示した。

3. 蛋白結合率に及ぼす薬剤濃度の影響

Fig. 5 Effect of pH on protein binding of CPZ  
 Human serum albumin concentration: 1%  
 Method: Centrifugal ultrafiltration

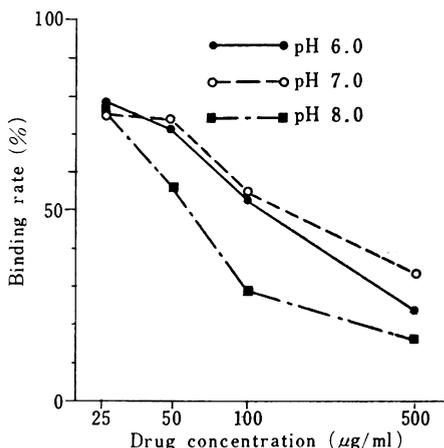


Fig. 6 Effect of pH on protein binding of CEZ  
 Human serum albumin concentration: 1%  
 Method: Centrifugal ultrafiltration

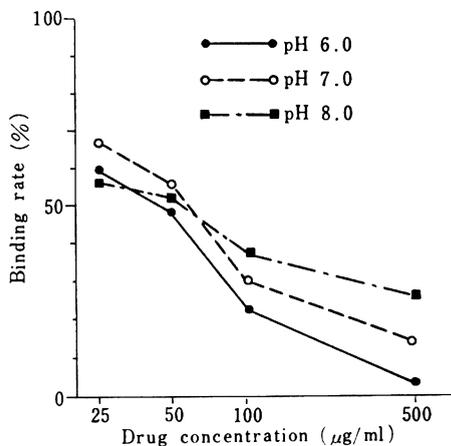
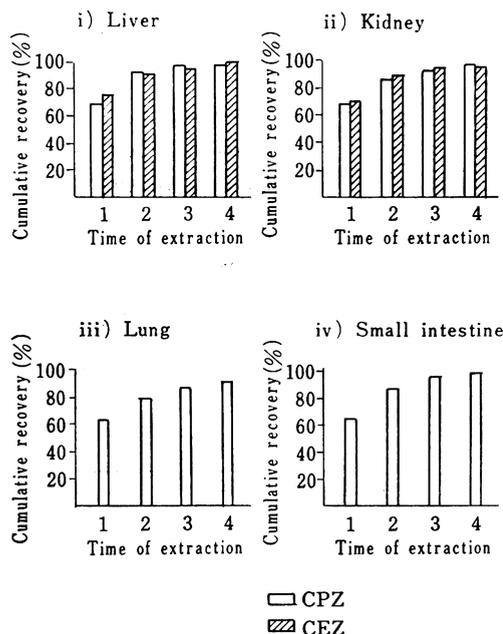


Table 3 Effect of temperature on protein binding

Temperature	5°C	20°C	37°C
Drug			
CPZ	64.1%	66.4%	68.1%
CEZ	55.4%	61.0%	59.1%

Human serum albumin concentration: 1%  
 Drug concentration:  $25 \mu g/ml$   
 Method: Centrifugal ultrafiltration

Fig. 7 Affinity of CPZ and CEZ to rat tissue pastes



4% HSA 溶液に対する CPZ および CEZ の蛋白結合率に及ぼす薬剤濃度の影響を、遠心限外ろ過法を用い 25~1,600  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で測定し、その結果を Fig. 3 に示した。CPZ では 25~200  $\mu\text{g/ml}$  まで 80% 以上の結合率を示したが、薬剤濃度の増加に伴い結合率は急激に低下し 1,600  $\mu\text{g/ml}$  では約 30% の結合率であった。CEZ では CPZ より結合率は全体的に 5~10% 低かったが、薬剤濃度の増加に伴う結合率の低下は CPZ と同様の傾向を示し、200  $\mu\text{g/ml}$  以後結合率は急激に低下した。

#### 4. 蛋白結合率に及ぼすアルブミン濃度の影響

CPZ および CEZ の蛋白結合率に及ぼすアルブミン濃度の影響を、0.5~5% HSA 溶液を用い遠心限外ろ過法で測定し、その結果を Fig. 4 に示した。なお薬剤濃度はいずれも 25  $\mu\text{g/ml}$  とした。CPZ の蛋白結合率は、アルブミン濃度 0.5~1% までは濃度の増加に伴い急激に高くなり、それ以上の濃度では平衡状態に達し、90~95% を示した。また CEZ では、アルブミン濃度 0.5~2% までは結合率は急激に高くなり、それ以上の濃度では CPZ と同様に 90~95% を示した。

#### 5. 蛋白結合率に及ぼす pH および温度の影響

CPZ および CEZ の蛋白結合率に及ぼす pH および温度の影響を 1% HSA 溶液を用い遠心限外ろ過法で求めた。pH の影響は pH 6.0, 7.0 および 8.0 の 1/15M リン酸緩衝液を用い、薬剤濃度 25~500  $\mu\text{g/ml}$  における結合率を測

定し、その結果を Fig. 5, 6 に示した。CPZ では pH 6.0 および 7.0 の結合率にほとんど差がみられないが、pH 8.0 では 50~500  $\mu\text{g/ml}$  の高濃度において pH 6.0 および 7.0 より若干低い結合率を示した。また CEZ では pH 6.0 よりも pH 7.0 および 8.0 の結合率の方が全体的にやや高い値を示した。しかし 25  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度においては、両薬剤ともに pH による差はほとんど認められなかった。また温度の影響は 25  $\mu\text{g/ml}$  の薬液を用いて、5°C, 20°C および 37°C で結合率を測定し、その結果を Table 3 に示した。両薬剤ともに、温度による差は認められなかった。

#### 6. ラット組織 paste との親和性

CPZ と肝、腎、肺および小腸との親和性を、また CEZ については肝および腎との親和性を Fig. 7 に示した。肝 paste の場合、P.B. を加えることによって 1 回で CPZ は 69%、CEZ は 76% 回収され、2 回で両薬剤ともに約 90% に達し、4 回の抽出によってほぼ 100% 回収された。腎 paste の場合、1 回で CPZ および CEZ はそれぞれ 69%、70% 回収され、2 回で 87%、89%、3 回で 90% 以上になり、この場合も 4 回の抽出でほぼ 100% 回収された。肺 および小腸 paste の場合、CPZ は 2~3 回の抽出で約 90% 回収され、肝および腎 paste の場合と同様の傾向を示した。従って CPZ とこれら 4 つの組織との結合は可逆的であり、4 回の抽出によってほとんど回収された。またこの実験方法でみる限り、CPZ は組織による特異性は認められず、CEZ との間にも、有意な差は認められなかった。

### III. 考 察

CPZ の各種動物血清との結合率についてはすでに著者ら<sup>10)</sup>により動物種差が認められ、かつヒト血清蛋白との結合率は 86.8% であって CEZ と同様に高い値を示すことが報告されている。しかし、薬剤の体内分布、排泄および代謝と蛋白結合との関連性を考えた場合、血清蛋白結合率だけでなく、その結合の強さもあわせて考える必要がある。そこで著者らは CPZ とヒト血清蛋白との結合についてさらに詳しい検討を行なった。

CPZ とヒト血清蛋白との結合の可逆性について、平衡透析法および希釈効果により検討した結果、CEZ と同様に可逆的であり、かつその結合の強さもほぼ同等であった。またヒト血清アルブミンとの蛋白結合定数 (K) および最大結合量 (n) を求めると、CPZ および CEZ は類似した値を示した。これらの K 値 (CPZ:  $2.63 \times 10^4$ , CEZ:  $2.56 \times 10^4$ ) を結合力が強いといわれている phenylbutazone<sup>11)</sup> や warfarin<sup>12)</sup> などの文献値と比較すると 1/5~1/7 程度の低い値を示すことから、CPZ および CEZ の血

清蛋白との結合はさほど強固なものではないと考えられる。

一般に血清蛋白結合率を表わす場合、遠心限外ろ過法では薬剤濃度 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で、37°C、1 時間 incubate して結合率を測定している。しかし薬剤濃度やアルブミン濃度、あるいは pH や温度による結合率の変化が考えられるため、これら諸条件の検討を行なった。HSA 濃度を 4% とし薬剤濃度を変化させた場合、CPZ および CEZ の結合率は 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で約 90%、200~1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で急激な低下が認められた。従ってこれらの薬剤を *in vivo* において投与した場合、血中濃度が 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の高濃度であればかなりの量が遊離体として存在すると考えられる。また薬剤濃度 200~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の間で結合率が急激に低下し始めることは、先に述べたアルブミン 1 分子当りの最大結合量、言い換えればアルブミン 1 分子が薬剤と結合する capacity が約 0.7~0.8 であるという結果と一致していた。また薬剤濃度を 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とし HSA 濃度を変化させた場合、CPZ で 1%、CEZ で 2% までは結合率の急激な増加が認められ、それ以上の濃度では平衡状態に達した。次に pH および温度の影響についても検討したが、さほど影響を受けず、生体内の条件に近い pH 7.0、37°C の条件で従来通り結合率を測定することが適当であると思われた。

一方、動物組織と抗生剤との結合については KUNIN らの研究<sup>13-16)</sup> がありこの結合様式が抗生剤の体外排泄機序に関与する可能性も推定されている。CPZ は CEZ に比較して、血清蛋白との結合力の強さは有意差が認められないにもかかわらず本剤のヒトでの排泄パターンは CEZ とことなり胆汁排泄型であることが推定された事実<sup>10)</sup> に着目して、著者らは本剤の胆汁排泄を決定づける要因として肝組織との特異的な親和性の関与を想定した。ヒトと排泄パターンが類似するラットを用いて各臓器組織との親和性を検討したところ、CPZ と各臓器組織との結合は P. B. により容易に遊離し、今回の実験方法でみる限りは組織による特異性は認められなかった。また肝および腎組織との親和性を CEZ と比較したが有意差は認められなかった。

ところで KUNIN ら<sup>13)</sup> によるラット肝 homogenate の可溶性分画には cephalothin や cephalixin などが特異的に結合する ligand と呼ばれる蛋白が存在するといわれている。また村川ら<sup>17)</sup> により CEZ もこの ligand に結合することが明らかになった。そこで、本剤の胆汁排泄機序についてはさらに、肝および腎組織の可溶性分画や不溶性分画に関する研究を進めていくことが必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) ROLINSON, G. N. & R. SUTHERLAND: The binding of antibiotics to serum proteins. *Brit. J. Pharmacol.* 25: 638~650, 1965
- 2) 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
- 3) 西田 実, 松原忠雄, 村川武雄, 峯 靖弘, 横田好子, 五島達智子: 新しい Cephalosporin 誘導体, Cefazolin の評価。 *Chemotherapy* 18(5): 481~491, 1970
- 4) MIYAKE, Y. & M. EBATA: Binding of cephalothin, cephaloridine and cefazolin to human serum proteins. *J. Antibiotics* 29: 667, 1976
- 5) 才川 勇, 高野俊太郎, 桃井海秀, 高倉 勇, 工谷千栞, 落合裕一, 吉田長作, 保田 隆, 滝 秀雄:  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第 8 報) 7-[D(-)- $\alpha$ -(4-alkyl-2, 3-dioxo-1-piperazine-cardoxamido) phenylacetamido] cephalosporanic acid 類の合成ならびに構造-抗菌活性。 *薬学雑誌* 99(9): 929~935, 1979
- 6) REHBERG, P. B.: A centrifugation method of ultrafiltration using cellophane tubes. *Acta Physiol. Scand.* 5: 305~310, 1943
- 7) 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
- 8) KLOTZ, I. M.: The protein "part B, Academic Press, New York: 727, 1953
- 9) 岡田直彦, 坂本 博, 中本昭治, 横田好子, 村川武雄, 西田 実: Cephalosporin 類の動物組織 paste との結合について。 *Chemotherapy* 25: 392~395, 1977
- 10) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 滝 秀雄, 松原信之, 林 敏雄, 松永清美, 高田理恵子: Cefoperazone(T-1551)の吸収・分布および排泄について。 *Chemotherapy* 28(S-6): 163~172, 1980
- 11) CHIGNELL, C. F.: Optical studies of drug-protein complexes. II. Interaction of phenylbutazone and its analog with human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 5(3): 244~252, 1969
- 12) SELLERS, E. M. & J. KOCH-WESER: Displacement of warfarin from human albumin by diazoxide and ethacrynic, mefenamic and nalidixic acids. *Clin. Pharmacol. Ther.* 11(4): 524~529, 1970
- 13) 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
- 14) KUNIN, C. M.: Binding of antibiotics to tissue homogenates. *J. Infectious Diseases* 121(1):

- 55~64, 1970
- 15) 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
- 16) KUNIN, C. M. & A. BUGG : Recovery of tissue bound polymyxin B and colistimethate. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 137 : 786~790, 1971
- 17) 村川武雄, 岡田直彦, 坂本 博, 西田 実 :  $\beta$ -Lactam 抗生物質の組織結合に関する研究(2) ラット肝組織の Cefazolin 結合因子について。 *Chemotherapy* 26 : 819~823, 1978

## STUDIES ON THE PROTEIN BINDING OF CEFOPERAZONE (T-1551)

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE,  
TOSHIO HAYASHI and RIEKO TAKATA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The serum protein binding rate of cefoperazone (CPZ, T-1551) was as high as that of cefazolin (CEZ) in human. Therefore, CPZ was investigated on the binding to serum and tissue proteins in detail, and the result was as follows.

The binding of CPZ to human serum protein was reversible similarly to CEZ. Moreover, it was found that the binding constant (K) and maximum binding number(n) for CPZ to human serum albumin were  $2.63 \times 10^4$  and 0.79, which were very similar to that for CEZ ( $K=2.56 \times 10^4$ ,  $n=0.73$ ).

The binding rate of CPZ to human serum albumin was influenced by the drug and albumin concentrations, but it was little influenced by the pH or temperature.

The affinity of CPZ to rat tissue pastes was determined by extraction of its free form by phosphate buffer. The result showed that most of CPZ was recovered by four extractions. The specificity of affinity of CPZ to each tissue was not found. The affinity of CPZ to liver and kidney pastes was little different from that of CEZ.