

ビリルビン-アルブミン結合に対する Cefotaxime の競合について

重 栖 幹 夫・藤 本 和 巳

ヘキストジャパン 総合開発研究所

(昭和 56 年 8 月 13 日受付)

Cefotaxime のビリルビン-アルブミン結合に及ぼす影響を他の Cephalosporin 系抗生物質と比較しながら *in vitro* で検討した。

ヒトアルブミン濃度が正常値域の条件では、用いたいずれの薬剤 (Cefotaxime, desacetyl-Cefotaxime, Cefazolin, Cefmetazole) においてもビリルビン-アルブミン結合体からのビリルビン遊離作用は認められなかった。アルブミン濃度を、正常値域の約 1/5 の濃度にした条件下では、Cefazolin, Cefmetazole によるビリルビンの遊離がみられ、その遊離作用の強弱と抗生物質の蛋白結合性の大小に正の相関がみられた。この条件においても、Cefotaxime およびその代謝産物である desacetyl-Cefotaxime には他の抗生物質に比べて極めて弱いビリルビン遊離作用がみられたにすぎなかった。

新生児の溶血性黄疸発現期には、サリチル酸、サルファ剤などの薬剤が血清アルブミンにビリルビンと競合的に結合する結果、非結合型ビリルビン濃度の上昇を来し、核黄疸の誘因となることが報告されている¹⁾。抗生物質も薬剤によりその程度は異なるが血清蛋白と結合するので、それぞれの薬剤について結合型ビリルビンの遊離作用を検討することは、その薬剤の安全性を評価する上で重要である。

今回われわれは、Hoechst 社と Roussel Uclauf 社により共同開発された新 Cephalosporin 誘導体、Cefotaxime (以下 CTX と略)^{2,3)} のビリルビン遊離作用を、2, 3 の抗生物質を対照として、R. BRODERSSEN の酵素法⁴⁾により検討した。

I. 実験材料ならびに方法

1. 使用薬物および試薬

Cefotaxime (CTX) および desacetyl-Cefotaxime (以下 desacetyl-CTX と略) は、Hoechst A. G. で合成されたものを使用した。対照薬として Cefazolin (以下 CEZ と略) と、Cefmetazole (以下 CMZ と略) を用いた (Fig. 1)。これらの抗生物質を、133 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4 で溶解し、それぞれ 1, 280, 640, 320, 160, 80, 40 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を調整した。

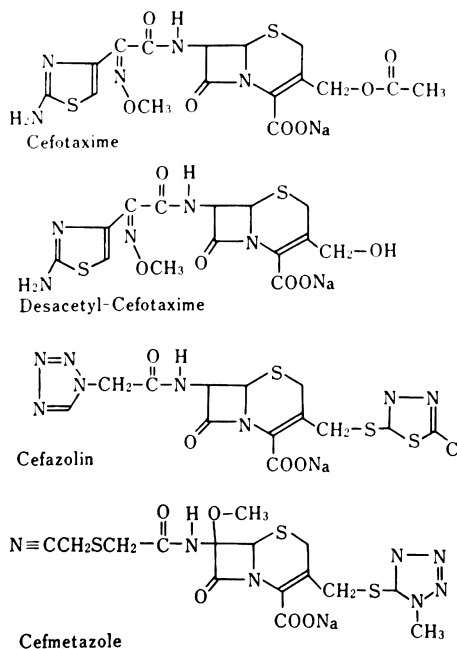
ヒトアルブミン (Calbiochem-Behring Corp. Fraction V), ビリルビン (東京化成), Peroxidase-Type I (Sigma Chemical Co. Inc. Horseradish. M. W. 40,000), 過酸化水素水 (純正化学) をそれぞれ使用した。

2. 実験条件

小児期の血清アルブミン濃度の正常値域は 3.1~5.1 g/dl であり⁵⁾、非抱合型ビリルビン濃度は、平均 0.34 mg/dl とされている。新生児溶血性疾患、新生児黄疸患者における非抱合型ビリルビン濃度は、8~10 mg/dl である⁶⁾。

これらの事実に基づき、今回の実験条件として、アル

Fig. 1 Chemical structures of cefotaxime and related antibiotics



ブミンおよびビリルビン濃度を①両者正常値域, ②正常アルブミン濃度で高ビリルビン濃度, ③低アルブミン濃度で高ビリルビン濃度の3条件を設定した。

3. 遊離型ビリルビンの測定

R. BRODERSEN の酵素法⁴⁾に従い, Human serum albumin (以下 HSA と略) 溶液中の遊離ビリルビンを, H₂O₂ と Peroxidase によって酸化する方法を用いた。すなわち, HSA 水溶液 (6.96 g/dl または 1.74 g/dl) 50 ml にビリルビン水溶液 (7.59 mg/ml または 0.756 mg/ml) の 1.25 ml を混和し, その混液 1.5 ml に同容量の薬剤溶液を加えたのち, H₂O₂ (35 mM 水溶液) 5 μl を滴下し, 37°C で3分間インキュベートした。次に Peroxidase (254 nM) 150 μl を加えて, 直ちに 460 nm における吸光度の変化を測定した。

4. HSA に対する薬剤の結合率の測定

上記実験で使用した HSA 水溶液と各薬剤溶液を混和し, 37°C で1時間インキュベートしたのち, この液をセントリフロー®CF 25 (Aminco Corp.) に入れ遠心限外濾過 (1,000 G, 30 分間) し, 濾過液中の各薬剤濃度を Bioassay 法にて測定した。CTX, desacetyl-CTX, CMZ の測定には, Heart infusion agar 培地 (pH 7.4), *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とし, CEZ の測定には, クエン酸培地, *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした薄層ペーパーディスク法で行なった。

II. 結 果

1. アルブミン・ビリルビン濃度が正常値域の条件

アルブミン濃度 3.48 g/dl, ビリルビン濃度 0.922 mg/dl (アルブミン: ビリルビンモル比=32:1) のとき, Table 1 に示したように, 抗生物質濃度 320 μg/ml 以上において, 遊離ビリルビン量は, CTX および desacetyl-CTX で薬剤無添加時の 1.1 倍, CMZ で 1.3 倍,

Table 1 Displacing effect of cefotaxime(CTX) on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)

(HSA : 3.48 g/dl (504 μM)
(Bilirubin : 0.922 mg/dl (15.8 μM))

Compound	Ratio of free bilirubin concentration (b/b ₀)					
	Compound concentration (μg/ml)					
	20	40	80	160	320	640
CTX	1.06	1.09	1.09	1.12	1.11	1.14
Desacetyl-CTX	1.04	1.04	1.05	1.05	1.10	1.11
CEZ	1.03	1.09	1.11	1.11	1.34	1.41
CMZ	1.04	1.15	1.09	1.14	1.26	1.26

b₀ : Free bilirubin concentration without a compound (3.75 μg/dl)

b : Free bilirubin concentration with a compound

Table 2 Displacing effect of cefotaxime (CTX) on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)

(HSA : 3.48 g/dl (504 μM)
(Bilirubin : 9.26 mg/dl (158.3 μM))

Compound	Ratio of free bilirubin concentration (b/b ₀)					
	Compound concentration (μg/ml)					
	20	40	80	160	320	640
CTX	1.07	1.07	1.12	1.26	1.31	1.31
Desacetyl-CTX	0.97	0.97	1.02	1.02	1.17	1.17
CEZ	1.02	1.02	1.07	1.31	1.41	1.49
CMZ	0.97	0.97	1.02	1.12	1.31	1.31

b₀ : Free bilirubin concentration without a compound (11.0 μg/dl)

b : Free bilirubin concentration with a compound

Table 3 Displacing effect of cefotaxime (CTX) on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)

(HSA : 0.87 g/dl (126 μM)
(Bilirubin : 0.922 mg/dl (15.8 μM))

Compound	Ratio of free bilirubin concentration (b/b ₀)					
	Compound concentration (μg/ml)					
	20	40	80	160	120	640
CTX	1.04	1.06	1.14	1.19	1.21	1.31
Desacetyl-CTX	1.06	1.08	1.19	1.21	1.28	1.32
CEZ	1.08	1.14	1.28	1.67	1.89	2.67
CMZ	1.06	1.11	1.19	1.44	1.58	1.76

b₀ : Free bilirubin concentration without a compound (3.75 μg/dl)

b : Free bilirubin concentration with a compound

CEZ では 1.3~1.4 倍にそれぞれ増加した。

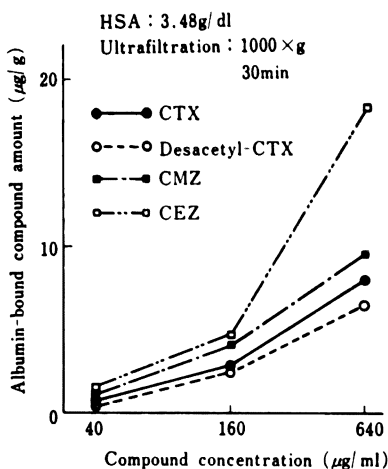
2. 高ビリルビン濃度の場合

ビリルビン濃度を 10 mg/dl とし, 正常アルブミン濃度 (3.48 g/dl) の条件で検討した結果を, Table 2 に示した。この条件 (アルブミン: ビリルビンモル比=3:1) でも, 薬剤濃度 640 μg/ml のとき, ビリルビン遊離量は desacetyl-CTX で最も少なく, 無添加時の 1.2 倍, ついで CTX, CMZ でともに 1.3 倍, CEZ では 1.5 倍にそれぞれ増加したにすぎなかった。

3. 低アルブミン濃度の場合

低アルブミン濃度条件, すなわちアルブミン濃度 0.87 g/dl, ビリルビン濃度 0.922 mg/dl (アルブミン: ビリルビンモル比=8:1) の条件で検討した (Table 3)。この条件でビリルビンの遊離は, CEZ で最も強くみられ, CEZ 濃度 640 μg/ml の時, 遊離ビリルビン量は, 薬剤

Fig. 2 Bindings of compounds to human serum albumin (HSA)



無添加時の2.7倍に増加した。同濃度のCMZでは1.8倍に、CTXおよびdesacetyl-CTXでは1.3倍に増加した。

4. HSA に対する結合率

今回のビリルビン遊離能の検討に使用したアルブミン濃度3.48g/dlにおける各薬剤のアルブミンとの結合量を、Fig. 2に示した。

desacetyl-CTXのアルブミンへの結合量が最も少なく、いずれの薬物濃度においてもCEZの約1/2の量であった。HSA濃度3.48g/mlにおける各薬剤のアルブミンへの結合の程度は、CEZ, CMZ, CTX, desacetyl-CTXの順に大きかった。

III. 考 察

β -lactam系抗生物質によるビリルビン-血清アルブミン結合体からのビリルビン遊離作用を、R. BRODERSENらの方法に準じて検討した。BRODERSENは、この方法によって、ビリルビンのヒト血清アルブミン結合部位に対する各種薬剤の結合常数を求め、ビリルビンと薬剤との競合により、ビリルビンの遊離が生ずることを確認している⁴⁾。

藤井らの報告では、新生児の黄疸血清に、種々の抗生物質を添加した場合、ビリルビンのアルブミンからの遊離が生ずることを報告している^{7,9)}。ビリルビンが代謝されるためには、血清アルブミンとの結合が必須であるので、抗生物質による、このビリルビンの遊離作用は、ビリルビン代謝に影響を及ぼすことが推察される。今回の*in vitro*でのヒト血清アルブミンとビリルビンの結合に及ぼす各種抗生物質の影響を検討した結果では、血清アルブミン濃度が正常値域の場合には、極めて高濃度の薬

剤添加時においても、薬剤を通じてビリルビンの遊離作用は軽微に認められたにすぎなかった。一方、血清アルブミン濃度を正常値の約1/5の濃度に低下させた条件下では、抗生物質による明らかなビリルビン遊離作用がみられ、その作用はCEZで最も強く、ついでCMZが強く、CTXとdesacetyl-CTXは軽微であった。このように、ヒトアルブミンが正常値域にある場合には、ビリルビン濃度(10mg/dlまで)に依存せず、抗生物質による顕著なビリルビン遊離作用は認められなかったが、アルブミン濃度が低いとき、抗生物質のビリルビン遊離作用が明確に発現したことは、アルブミン濃度が、抗生物質のビリルビン遊離作用の大小に重要なfactorとなっていることを示している。このことは、抗生物質のアルブミンへの結合能(Fig. 2)の強弱と遊離作用の強弱の順位がよく一致した結果からもうかがえ、最近の旋光分散法を用いた研究結果から、抗生物質の血清蛋白結合率とビリルビン遊離作用との間に相関性を認めている知見を支持するものである^{9,10)}。今回使用された薬剤のうち、CTX, desacetyl-CTXは、アルブミン遊離作用を検討したいずれの実験(Table 1, 2, 3)においても、その遊離作用はCEZ, CMZに比べ弱かった。

文 献

- 1) VALLNER, J. J.: Binding of drugs by albumin and plasma protein. J. pharm. Sci. 66: 447~465, 1977
- 2) 益吉真次, 新井 進, 三橋 進: 新しいセファロsporin Cefotaximeの抗菌作用および β -lactamaseに対する態度。Chemotherapy 28(S-1): 1~11, 1980
- 3) 笠井一弘, 新井 進, 宮本政樹, 坂口 孝: Cefotaximeの基礎的検討。Chemotherapy 28(S-1): 89~97, 1980
- 4) BRODERSEN, R.: Competitive binding of bilirubin and drugs to human serum albumin studied by enzymatic oxidation. J. Clin. Invest. 54: 1353~1364, 1974
- 5) 河合 忠: 総蛋白・蛋白分画。日本臨床 34(秋季増刊号): 1812~1820, 1976
- 6) 岩波文門: ビリルビン(小児科領域)。日本臨床 34(秋季増刊号): 1964~1970, 1976
- 7) 藤井良知, 紺野昌俊, 岡田一穂: 新生児期の高ビリルビン血症におよぼすPC系抗生物質の影響について。Chemotherapy 20(2): 374, 1972
- 8) 斎藤洪太, 生方公子, 紺野昌俊, 藤井良知: 新生児高ビリルビン血症と抗生物質との関係について第1報: ペニシリン系, セファロsporin系薬剤とビリルビンの解離。Chemotherapy 23(8): 2612, 1975
- 9) 地蔵本博章, 岩田辰夫, 栗山 馨, 紺野昌俊, 藤井良知, 生方公子, 斎藤洪太: 各種抗生物質の蛋白結合と新生児高ビリルビン血症との関係, 第1報

- 円2色性測定による基礎的研究。Chemotherapy 25(4): 639, 1977
- 10) 紺野昌俊, 藤井良知, 生方公子, 齋藤沢太, 地藏本博章, 岩田辰夫, 栗本 馨: 各種抗生物質の蛋

白結合と新生児ビリルビン血症との関係, 第2報
 円2色性測定の臨床への応用。Chemotherapy 25(4): 640, 1977

IN VITRO DISPLACING EFFECTS OF CEFOTAXIME AND DESACETYL-CEFOTAXIME ON BILIRUBIN BOUND TO HUMAN SERUM ALBUMIN

MIKIO OMOsu and KAZUMI FUJIMOTO

Research and Development Laboratories, Hoechst Japan Limited

In vitro displacing effects of cefotaxime (CTX) and desacetyl-CTX on bilirubin bound to human serum albumin were compared with those of other cephalosporins, cefazolin (CEZ) and cefmetazole (CMZ).

Any of the four compounds at 20~640 $\mu\text{g/ml}$ exerted no bilirubin-displacing effect at the normal level of human serum albumin.

At the albumin level approximately 1/5 times lower than the normal, CEZ and CMZ exhibited bilirubin-displacing effects, which were directly proportional to albumin binding affinities of the antibiotics. On the other hand, CTX and desacetyl-CTX displaced bilirubin from albumin to a much lesser extent than CEZ and CMZ.