

T-1982 の血清蛋白結合に関する研究

才川 勇・保田 隆・渡辺泰雄

林 敏雄・北山理恵子

富山化学工業株式会社総合研究所

T-1982 の血清蛋白結合について検討を行ない次の結果を得た。

T-1982 の血清蛋白との結合は可逆的であった。

T-1982 の血清蛋白結合率は血清蛋白濃度や薬剤濃度によって影響を受け、血清蛋白濃度の増加に伴って高くなり、薬剤濃度の増加に伴って低下した。

本剤の結合サイトは1種で、結合定数と最大結合量はそれぞれ 3.60×10^8 , 0.58 であり Latamoxef や Cefmetazole とは若干異なる結果であった。

ビリルビンと血清蛋白との結合に対して T-1982 は影響を及ぼさず、T-1982 によるビリルビン遊離はほとんど認められなかった。

T-1982 の炎症部位への移行性は良好であり、ラットとウサギにおいて蛋白結合率は異なるが、移行性には差は認められなかった。

ペニシリン系やセファロスポリン系抗生剤の血清蛋白結合については種々の報告¹⁻⁵⁾があり、薬効の持続性、病巣内移行性また体内分布、排泄等に大きな影響を及ぼすことが知られている。著者ら⁶⁻⁸⁾も、Cefoperazone (CPZ)を用い血清蛋白結合率は排泄に影響を与える factor であることを報告している。従って薬剤の体内動態を知るうえで、蛋白結合の様式、結合の強さなどを知ることが必要であると思われる。今回当社総合研究所において新しく開発されたセフエマイシン系抗生剤 T-1982 (Fig. 1)の蛋白結合について検討し若干の知見を得たので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1) 使用薬剤

T-1982 (富山化学), Latamoxef (LMOX: 塩野義製薬), Cefmetazole (CMZ: 三共), Cefazolin (CEZ: 藤沢薬品), Novobiocin (NB: 日本アップジョン) および Salicylic acid (SA) を用時 1/15 M リン酸塩緩衝液 (P. B. S.: pH 7.0) に溶解して用いた。

2) 血清蛋白の調製

ヒト血清アルブミン (HSA, fraction V: SIGMA) を、用時 P. B. S. に溶解して用いた。

3) 血清蛋白結合率の測定法

遠心限外ろ過法⁹⁾を用いて測定した。薬液 1 容を 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. S. 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。

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

4) 可逆性の検討

a) 平衡透析法で透析外液量を種々変化させた場合 (外液量/内液量 = 2~32) の結合率を測定し、可逆性を検討した。セルロース・チューブ (Visking company: サイズ 20/32) に内液として各薬剤 50 μg/ml 含有の 4% HSA 溶液 4 ml を入れ、外液に P. B. S. を用いて 4°C で 48 時間平衡透析を行ない、外液中の薬剤濃度を測定しこれを X とした。対照として内液に HSA 溶液の代わりに P. B. S. を用い同様に処理し、外液中の薬剤濃度を Y とした。下式に従って結合率を求めた。

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

b) 希釈法

ROLINSON¹⁾らの方法に従った。4% HSA 溶液中に 100 μg/ml になるように薬剤を溶解し 37°C, 1 時間 incubate した後に 10 倍および 40 倍に希釈して原液ならび

Fig. 1 Chemical structure of T-1982

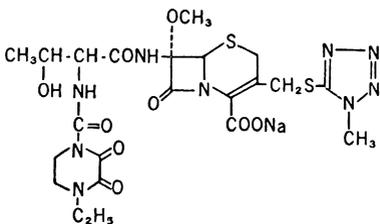


Fig. 2 Effect of albumin concentration on protein binding of T-1982, LMOX and CMZ

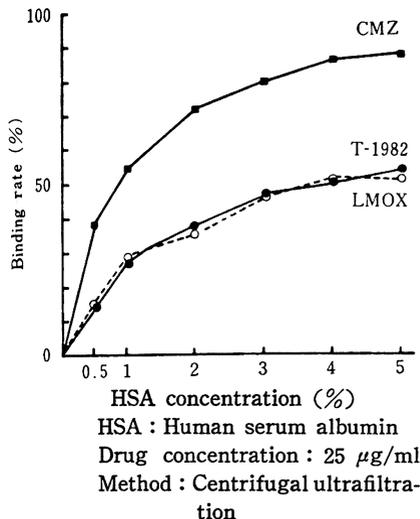
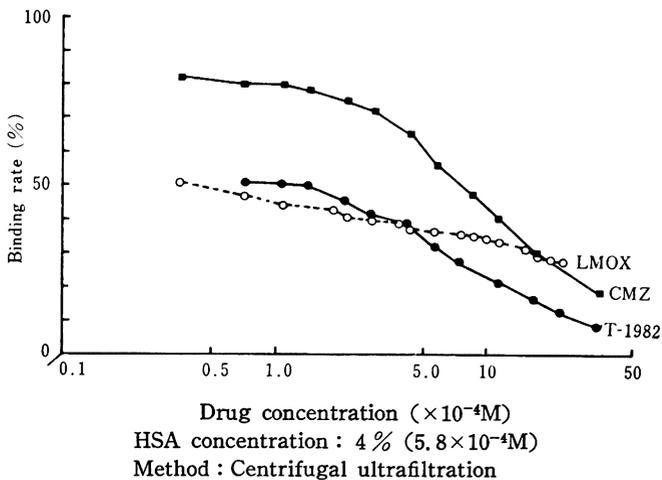


Fig. 3 Effect of drug concentration on protein binding of T-1982, LMOX and CMZ



にこの希釈液の結合率を測定し、これを system A とした。一方、これらと同等の濃度になるように薬剤および HSA 溶液をあらかじめ希釈して混合した後、37°C、1 時間 incubate してそれぞれの結合率を測定し、これを system B とした。結合率の測定は遠心限外ろ過法を用いた。

5) 蛋白結合定数と最大結合量の測定¹⁰⁾

各種濃度の薬剤を含む 4% HSA 溶液を 37°C、1 時間 incubate した後、遠心限外ろ過法を用いて結合率を測定した。得られた結果を scatchard plot で図示し結合サイト数を予測した。次いでコンピューターを用い、各結合サイトにおける結合定数 (k) と最大結合量 (n) を求めた。

6) ビリルビンとの競合¹¹⁾

0.04% HSA 溶液 ($5.8 \times 10^{-6}\text{M}$) およびビリルビン溶液 (From Bovine Gall Stones : SIGMA) ($1.16 \times 10^{-5}\text{M}$) を 37°C、20 分間 incubate した後、種々の濃度の薬剤を加え、さらに 37°C、20 分間 incubate した。この混液の 460 nm (アルブミンと結合したビリルビンの極大吸収波長) における吸光度を測定し、ビリルビンの遊離の割合を % 40. D. で表示した。

$$\% 40. D. = \frac{\text{薬剤添加時}_{\text{の O. D.}} - \text{薬剤無添加時}_{\text{の O. D.}}}{\text{薬剤無添加時}_{\text{の O. D.}}}$$

7) 無菌炎症ポーチの作製および血中、浸出液中濃度の測定¹²⁾

ラット (6 週齢, 雄) およびウサギ (6 週齢, 雄) の

背部皮下に 25 ml の空気を注入した後、1% のクロトン油を含むオリーブ油 1 ml を空気のように注入し、無菌炎症ポーチを作製した。ポーチ作製後 8 日目に薬剤を 100 mg/kg 静脈内投与し、経時的に血中および浸出液中濃度を測定した。標準曲線は、血中濃度ではラットまたはウサギ血清、浸出液中濃度では浸出液を用いて作成した。

8) 薬剤濃度測定法

Bioassay 法または高速液体クロマトグラフィ (HPLC) によって測定した。

a) Bioassay 法 : 次の菌株を検定菌とする薄層ペーパーディスク法を用いた。

T-1982 : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

LMOX : *Escherichia coli* NIHJ

CMZ : *Micrococcus luteus* ATCC 9341

CEZ : *Bacillus subtilis* ATCC 6633

b) HPLC 法

装置 : 島津 LC-2 型および LC-3A 型

固定相 : LiChrosorb RP-18 (4 mm ϕ \times 25cm)

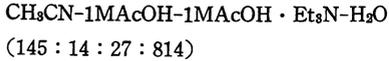
移動相 : T-1982

$\text{CH}_3\text{CN}-1\text{MAcOH}-1\text{MAcOH} \cdot \text{Et}_3\text{N}-\text{H}_2\text{O}$
(125 : 14 : 27 : 834)

LMOX

$\text{CH}_3\text{CN}-1\text{MAcOH}-1\text{MAcOH} \cdot \text{Et}_3\text{N}-\text{H}_2\text{O}$
(63 : 14 : 27 : 896)

CMZ



カラム温度：室温

検出波長：254 nm

流速：1 ml/min.

II. 結 果

1) ヒト血清アルブミン濃度の影響

T-1982, LMOX および CMZ の血清蛋白結合率に及ぼすアルブミン濃度の影響を HSA を用いて検討した。その結果を Fig. 2 に示す。T-1982 の結合率はアルブミン濃度 0.5% では約 15% を示していたが、アルブミン濃度の増加に伴い上昇し、4~5% では約 50~55% の結合率を示し平衡に達した。この傾向は LMOX と類似していた。CMZ は T-1982, LMOX よりも高い結合率を示したが、T-1982, LMOX と同様にアルブミン濃度 4~5% で平衡に達した。

2) 薬剤濃度の影響

T-1982, LMOX および CMZ の血清蛋白結合率に及ぼす薬剤濃度の影響を 4% HSA 溶液を用いて検討した。その結果を Fig. 3 に示す。T-1982 の結合率は薬剤濃度 $0.7 \sim 1.4 \times 10^{-4}$ M (45~90 $\mu\text{g/ml}$) までは約 50% を示し、それ以上の濃度では薬剤濃度の増加に伴い徐々に低下し、 $17 \sim 34 \times 10^{-4}$ M (1,000~2,000 $\mu\text{g/ml}$) の高濃度では 20% 以下の結合率を示した。LMOX の低濃度での結合率は約 50% で T-1982 と同等であったが、薬剤濃度の増加に伴う結合率の低下はゆるやかで、T-1982 とは若干異なり、 23×10^{-4} M (1,300 $\mu\text{g/ml}$) の高濃度においても約 30% の結合率を保っていた。また CMZ では、 $0.4 \sim 3.0 \times 10^{-4}$ M (20~150 $\mu\text{g/ml}$) において約 80~70% の結合率を示したが、それ以上の濃度では薬剤濃度の増加に伴う結合率の低下が認められ 35×10^{-4} M (1,700 $\mu\text{g/ml}$) の高濃度では 20% 以下の結合率であった。

3) 血清蛋白結合の可逆性

平衡透析法および希釈法によって T-1982, LMOX および CMZ の血清蛋白結合の可逆性を検討した。平衡透析法において、内液に対する外液の液量比を 2, 4, 8, 10, 20 および 32 とした時の結合率を測定し、その結果を Table 1 に示す。

T-1982, LMOX の液量比 4 の時の結合率はともに約 50% であり、遠心限外ろ過法で求めた結合率とはほぼ一致した。また両剤ともに液量比の増加に伴って結合率は低下し、ほぼ同様の傾向を示した。さらに液量比が 4 の時の結合率を 1 とした時のそれぞれの結合比率を求めたが、T-1982 と LMOX は類似した値を示した。CMZ で

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

Ratio of volume (outside sol. inside sol.)	T-1982		LMOX		CMZ	
	Bind- ing (%)	Bind- ing ratio	Bind- ing (%)	Bind- ing ratio	Bind- ing (%)	Bind- ing ratio
2	—	—	—	—	70.0	1.05
4	49.6	1.0	47.8	1.0	66.4	1.0
8	34.4	0.69	32.7	0.68	47.8	0.72
10	28.5	0.57	26.8	0.56	47.5	0.72
20	16.4	0.33	11.5	0.24	31.2	0.47
32	10.7	0.22	7.1	0.15	26.6	0.40

Drug concentration : 50 $\mu\text{g/ml}$ — : Not tested
 Inside solution : 4% HSA
 Outside solution : 1/15M phosphate buffer (pH 7.0)

は液量比 2, 4 の結合率は約 70% であり、遠心限外ろ過法で求めた結合率よりもわずかに低かった。また、T-1982, LMOX と同様に液量比の増加に伴って結合率は低下したが、結合比率は T-1982, LMOX よりもわずかに高かった。以上の結果より T-1982, LMOX および CMZ の HSA との結合はいずれも可逆的であると考えられるが T-1982, LMOX の結合の強さは CMZ よりも弱いと推定される。次に ROLINSON らの希釈法に従って system A および system B の結合率をそれぞれ求め、その結果を Fig. 4 に示す。

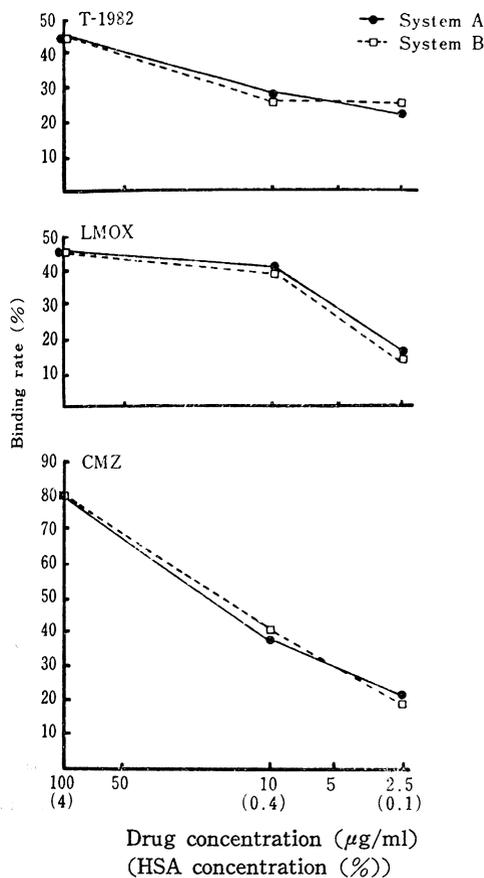
T-1982, LMOX および CMZ とともに system A と system B による結合率の差はほとんど認められなかった。すなわち system A の結合率が高ければ両者の結合率の差が非可逆的結合とみなされるので、平衡透析法の結果と同様にこれら 3 剤の結合は可逆的であると推定される。

4) 蛋白結合定数および最大結合量の測定

T-1982, LMOX および CMZ の HSA に対する結合定数 (k) および最大結合量 (n) を求めた。Scatchard plot を Fig. 5 に示したが、T-1982 はほぼ直線を示し結合サイトは 1 種であったが、LMOX および CMZ は曲線を示し、結合サイトは 2 種以上であることがうかがわれた。次に結合定数 (k) および最大結合量 (n) をコンピューターで算出し、その結果を Table 2 に示す。

T-1982 では結合サイトは 1 種で、 $k_1 = 3.60 \times 10^8$, $n_1 = 0.58$ を示した。LMOX, CMZ の結合サイトが 2 種か 3 種かの検定を行なったが、いずれも 2 種の方が適していた。LMOX では $k_1 = 9.49 \times 10^8$, $n_1 = 0.043$, $k_2 = 4.50 \times 10^8$, $n_2 = 2.50$ で、第 1 次結合サイトでの親和性は T-

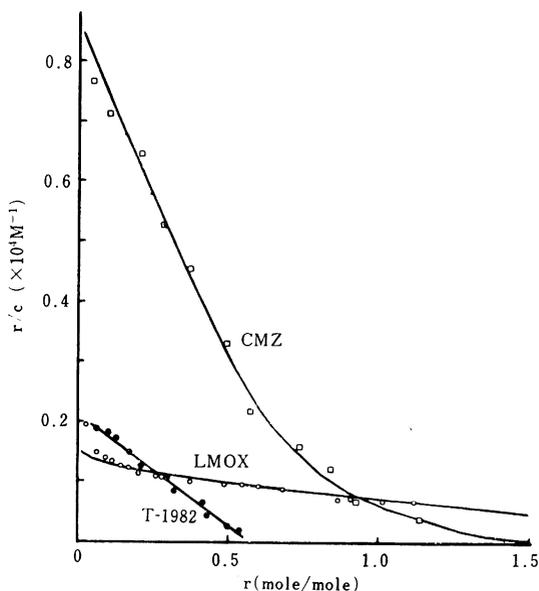
Fig. 4 Reversibility of the protein binding of T-1982, LMOX and CMZ by the dilution technique



System A
 Drug conc. : 100 µg/ml in 4% HSA sol.
 Incubation : 37°C for 1 hr.
 Dilution : 10- and 40-fold with 1/15 M P. B. S. (pH7.0) after incubation

System B
 Drug conc. : 100, 10 and 2.5 µg/ml in 4, 0.4 and 1% HSA sol. respectively
 Incubation : 37°C for 1 hr.
 Binding rate : by centrifugal ultrafiltration method

Fig. 5 Scatchard plots for T-1982, LMOX and CMZ



Scatchard plot : $r/c = nk - rk$
 c : Free concentration of drug(M)
 r : Moles of drug bound per moles of albumin
 k : Association constant
 n : Maximum binding number

Table 2 Binding constant and maximum binding number for T-1982, LMOX and CMZ

Drug	Association constant		Maximum binding number	
	k ₁	k ₂	n ₁	n ₂
T-1982	3.60 × 10 ³	/	0.58	/
LMOX	9.49 × 10 ³	4.50 × 10 ³	0.043	2.50
CMZ	1.26 × 10 ⁴	5.20 × 10 ³	0.66	0.828

HSA concentration : 4% (5.8 × 10⁻⁴M)
 Method : Centrifugal ultrafiltration

を検討した。生体内ではアルブミン1分子に対してビリルビン2分子が結合している¹³⁾ので、アルブミンのモル濃度：ビリルビンのモル濃度が1：2となるように結合させ、薬剤添加によってビリルビンが遊離するか否かを吸光度の減少度によって測定した。なおビリルビンと競合すると報告¹⁴⁾されているSAおよびNBについても同様に測定して比較検討し、その結果をFig. 6に示す。NBでは薬剤とアルブミンのモル濃度比が100の時、SAではモル濃度比が1,000の時、吸光度が約10%減少

1982よりも強い様であった。またCMZではk₁=1.26 × 10⁴, n₁=0.66, k₂=5.20 × 10³, n₂=0.828で、第1次結合サイトでの親和性はT-1982, LMOXよりも強かった。

5) ビリルビンとの競合
 T-1982, LMOX および CMZ とビリルビンとの競合

Fig. 6 Effect of addition of drug on the binding of bilirubin to protein

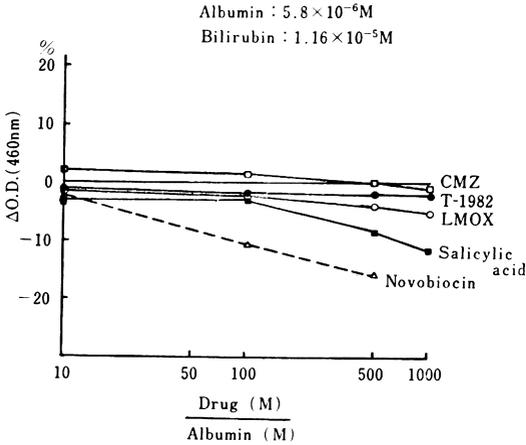


Fig. 7 Serum and exudate levels of T-1982 and CEZ after intravenous administration of 100 mg/kg to rat with granuloma pouch

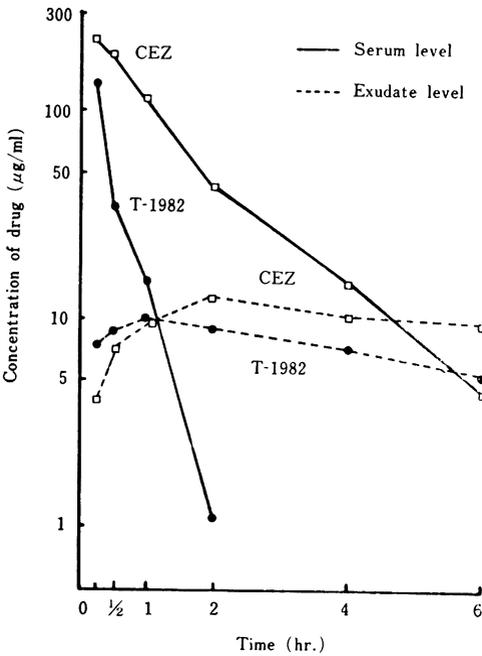
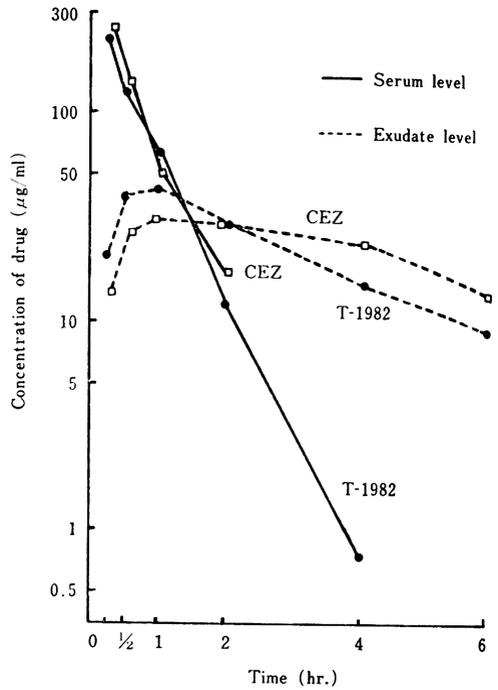


Fig. 8 Serum and exudate levels of T-1982 and CEZ after intravenous administration of 100 mg/kg to rabbit with granuloma pouch



行性に差が認められるか否かを血清蛋白結合率の高いCEZを対照薬として検討した。ラットおよびウサギに無菌炎症ポーチを作製し、T-1982, CEZの血中および浸出液中濃度を測定した。その結果をFig. 7および8に示す。ラットではT-1982の血中濃度はCEZよりも低く推移した。また、本剤の浸出液中濃度はピークに達する時間が早く、両剤ともに比較的ゆるやかに減少した。ウサギでは、T-1982の血中濃度はCEZと類似していたが、浸出液の最高濃度はCEZよりも高く、また、やや早く減少し、若干CEZと異なった動態を示した。以上の結果を血中濃度に対する浸出液中濃度の比率(血清比)で比較した(Fig. 9)。CEZの血清比はラットの方が低く推移したが、T-1982ではラットとウサギでそれほど差は認められずCEZより高い比率で推移した。

III. 考 察

T-1982の血清蛋白結合の可逆性、強さ、ビリルビンとの競合、動物の炎症部位への移行性などについて検討した。

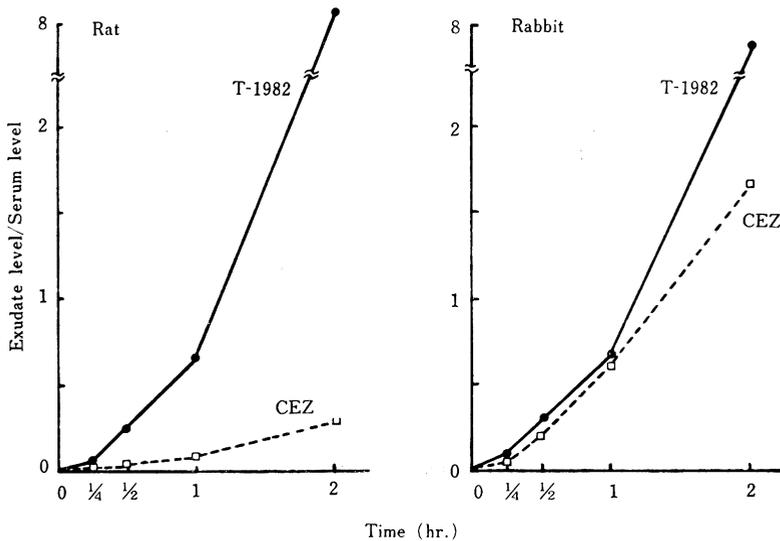
血清蛋白結合の可逆性について2種の方法で検討した結果、T-1982, LMOX および CMZ のいずれも従来のセファロスポリン系抗生剤と同様に可逆的であり、T-

しているが、T-1982, LMOX および CMZ では吸光度はほとんど変化せず、ビリルビンの遊離は認められなかった。

(6) 各種動物の炎症組織への移行性

T-1982の血清蛋白結合率¹⁵⁾には動物種差が認められるが、T-1982を動物に投与した時、T-1982の組織移

Fig. 9 Transfer of T-1982 and CEZ into granuloma pouch after intravenous administration of 100 mg/kg



1982 の結合は CMZ より弱いことがわかった。

T-1982 の血清蛋白結合率は LMOX, CMZ と同様にアルブミン濃度に依存し 4~5% ではほぼ平衡に達した。また、結合率に及ぼす薬剤濃度の影響を検討したところ T-1982, LMOX および CMZ の結合率は、薬剤濃度の増加に伴って減少した。しかし T-1982 と LMOX の結合率は、薬剤濃度が低濃度の時はほぼ一致していたが、高濃度の場合 T-1982 と LMOX の結合率の減少度が幾分異なり LMOX の方が結合率が高かった。これは、結合サイトが T-1982 より多く存在していることを示唆している。

次いで結合サイト数、結合定数、最大結合量をコンピューターを用いて求めたところ、結合サイトは T-1982 では 1 種、LMOX, CMZ では 2 種であった。第 1 次結合サイトでの親和性 (k_1) は $CMZ > LMOX > T-1982$ で、最大結合量 (n_1) は $CMZ > T-1982 > LMOX$ であった。また、 k , n の値から、T-1982 と LMOX の蛋白結合率は同じであっても、その結合様式は異なっていると推定した。

T-1982 の蛋白結合の強さは、それほど強固な結合ではないと考えられるが、他の薬剤やビリルビンのような内因性物質との競合によって、毒性を惹起する恐れもある。そこで血清アルブミンとの結合におけるビリルビンとの競合を検討した。アルブミンとビリルビン濃度はビリルビンの比色測定可能な濃度 (アルブミン: 5.8×10^{-6} M, ビリルビン: 1.16×10^{-6} M) を設定して測定した。その結果、T-1982, LMOX, CMZ いずれもビリルビン

の遊離は認められなかった。

T-1982 の各種動物における血清蛋白結合率はすでに著者ら¹⁵⁾が報告したように、ヒトで約 50% であり、サルで最も高く 70%、イヌで最も低く 9% と、従来のセファロsporin 系抗生剤にもみられるように動物種差がみられた。そこで、T-1982 を各種動物に投与した時、組織への移行性にも差が認められるか否かを無菌炎症ポーチラットおよびウサギで検討した。T-1982 の血清蛋白結合率はラットで 29%、ウサギで 49% であったが、組織移行性には差は認められず、ともに良好な結果を示した。以上 T-1982 の血清蛋白結合について若干の成績を述べたが、第 1 次結合サイトでの結合定数と最大結合量が体内動態にどのような影響を与えているかについては今後の課題である。

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, 五島瑛智子: 新しい Cephalosporin 誘導体, Cefazolin の評価。 *Chemotherapy* 18 (5): 481~491, 1970
- 4) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 山本恵美子: T-

- 1220 の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 25 (5) : 810~815, 1977
- 5) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 高田理恵子 : Cefoperazone (T-1551) の蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 28 (S-6) : 173 ~ 178, 1980
 - 6) WATANABE, Y. ; T. HAYASHI, R. TAKADA, T. YASUDA, I. SAIKAWA & K. SHIMIZU : Studies on protein binding of antibiotics. I. Effect of cefazolin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone. J. Antibiotics 33 (6) : 625~635, 1980
 - 7) WATANABE, Y. ; T. HAYASHI, R. KITAYAMA, T. YASUDA, I. SAIKAWA & K. SHIMIZU : Studies on protein binding of antibiotics. II. Effect of apalcillin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone and cefazolin. J. Antibiotics 34 (6) : 753~757, 1981
 - 8) WATANABE, Y. ; T. HAYASHI, R. KITAYAMA, T. YASUDA, I. SAIKAWA & K. SHIMIZU : Studies on protein binding of antibiotics. III. Effect of novobiocin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone and cefazolin. J. Antibiotics 34 (6) : 758~762, 1981
 - 9) REBERG, P. B. : A centrifugation method of ultrafiltration using cellophane tubes. Acta Physiol. Scand. 5 : 305~310, 1943
 - 10) SCATCHARD, G. F. : The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 : 660~692, 1949
 - 11) ODELL, G. B. : Influence of binding on the toxicity of bilirubin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 226 : 225~237, 1973
 - 12) 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
 - 13) 安部井徹 : 黄疸の成因と病態生理。薬局 28 (5) : 535~539, 1977
 - 14) ODELL, G. B. : The dissociation of bilirubin from albumin and it's clinical implications. J. Pediat. 55 : 268, 1959
 - 15) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 南新三郎, 熊野克彦, 荒木春美, 松永清美 : T-1982 の吸収, 分布, 代謝および排泄について。Chemotherapy 30 (S-3) : 145~157, 1982

STUDIES ON THE SERUM PROTEIN BINDING OF T-1982

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, TOSHIO HAYASHI and RIEKO KITAYAMA
Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.

The extent of the binding of T-1982 to human serum albumin was examined with the equilibrium dialysis and the centrifugal ultrafiltration method.

T-1982 bound reversibly to human serum albumin.

The binding rate of T-1982 as well as latamoxef (LMOX) and cefmetazole (CMZ) was influenced by the concentration of the drug and human serum albumin. That is, the binding rate of T-1982 became higher as the concentration of human serum albumin became higher. Further that of T-1982 became lower as the concentration of T-1982 became higher.

From the result of scatchard plot, it became clear that T-1982 had 1 binding site on albumin, and LMOX and CMZ had 2 sites. The maximum binding number and the association constant of T-1982 to human serum albumin were 0.58 and 3.60×10^3 respectively. Addition of T-1982 didn't influence on the binding of bilirubin to human serum albumin.

T-1982 showed the good transference activity to exudate fluid of experimental animals with granuloma pouch.

Although there was the specific difference of the serum protein binding ratio between rats and rabbits, no appreciable difference was observed in the transference of T-1982.