

AT-2266 の腎排泄機序

武山邦彦・湊 久夫・黒部暢之・細木 和・門河敏明

大日本製薬株式会社総合研究所

山本研二郎

大阪市立大学医学部薬理学教室

AT-2266 の腎排泄機序を体重 10kg 前後の雌雄ビーグル犬を用い、腎クリアランス法および stop-flow 法で検討した。

AT-2266 の腎排泄部位と排泄機序は Pipemidic acid と異なり、主に糸球体における濾過であった。尿細管分泌の関与は少ない。

この両者の差は AT-2266 の血中濃度の半減期が Pipemidic acid より長い理由の一つと考えられる。

AT-2266^{1,2)} は新しく合成された化学療法剤でグラム陽性菌、緑膿菌、セラチアを含むグラム陰性菌やマイコプラズマ等に極めて強い抗菌力を示す。経口投与すると消化管から良く吸収されて脳や脊髄を除く臓器や組織に高濃度に分布した後、大部分は代謝されずに尿中に排泄される。

本剤は Pipemidic acid に比し血中濃度半減期の長いことが特長の一つであることから、本報告では麻酔犬を用いて腎クリアランスおよび stop-flow 試験を行って AT-2266 の腎排泄について検討し、先に報告³⁾した Pipemidic acid と比較した。

I. 実験方法

1. 使用動物

体重 10kg 前後の雌雄ビーグル犬を Pentobarbital sodium (30mg/kg i.v.) で麻酔し、気管切開後、腹部正中切開を行い、両側の輸尿管にカニューレを挿入して採尿した。また、左大腿動脈にもカニューレを挿入し圧トランスジューサー (日本光電; MP-4T) を介して血圧を測定した。採血は右大腿動脈から、薬物の投与は左大腿静脈からそれぞれカニューレを介して行った。

2. 使用薬物

1) Priming 液は Para-aminohippuric acid (半井化学, 特級, 以下 PAH と略す) を 2 W/V % および Creatinine (半井化学, 特級) を 6 W/V % の濃度に 0.9 W/V % 生理食塩水を用い調製した。

2) Sustaining A 液 (クリアランス実験用) は PAH を 0.2 W/V % および Creatinine を 0.06 W/V % の濃度になるように 0.9 W/V % 生理食塩水を用い調製した。

3) Sustaining B 液 (stop-flow 実験用) は Mannitol を 10 W/V %, PAH を 0.05 W/V % および Creatinine を 0.17 W/V % の濃度に 0.9 W/V % 生理食塩水を用い調製した。

4) AT-2266 (sesquihydrate, Lot No. T81008) は使用直前に少量の IN NaOH で溶解し、2 N-HCl にて pH 7.5~8.0 に調整した後、Priming 液または Sustaining 液を用いて使用濃度に希釈した。

5) イヌリン (和光純薬, 特級) は 5 W/V % の濃度に Sustaining B 液を用い溶解した。

6) Probenecid (科研化学) は 240~390 mg (30 mg/kg) をとり Sustaining B 液の 20ml と 500mM のリン酸緩衝液 (pH7.4) 5 ml を加え、加温して溶解した。

3. クリアランス実験

AT-2266 の腎クリアランス実験を 6 頭のイヌを用いて行った。まず、AT-2266 投与前の腎機能を測定するために Priming 液 (1 ml/kg) を左大腿静脈内に投与し、つづいて Sustaining A 液を持続注入ポンプを用いて 2.5 ml/min の速度で静脈内に注入した。注入開始約 1 時間後、尿量がほぼ一定になってから採尿採血を開始した。採尿は 15 分間隔で実施し、採血は採尿の中間点においてヘパリン処理した注射筒を用いて行った。次いで Sustaining A 液で溶解した AT-2266 の priming dose (1 mg/ml/kg) を静脈内に投与し、さらに血中濃度を維持するための sustaining dose (100 μg/kg/min) を 2.5 ml/min の速さで約 2 時間持続注入した。AT-2266 の血中濃度をさらに上げるために AT-2266 の高用量, priming dose (2 mg/ml/kg) と sustaining dose (300 μg/kg/min, 2 hours) を投与した。

4. Stop-flow 実験

Priming 液で溶解した AT-2266 (1 または 2 mg/ml/kg) を静脈内に投与した後、Sustaining B 液で溶解した AT-2266 (100~900 μg/kg/min) を 5 ml/min の速度で持続注入した。注入開始約 1 時間後、尿量が 3~4 ml/

min になって安定してから、3分間隔で2回採尿し、同時に血液も採取して free-flow クリアランスを測定した。次いで、輸尿管に挿入したカニューレを止血鉗子で6分間閉塞し尿流を停止させた。開放15秒前にイヌリン(500 mg/10ml/dog)を静脈内に投与した。止血鉗子を開放し、噴出する尿サンプルを0.5ml ずつポリアクリル樹脂製サンプルカップに連続的に30本採取した。再び3分間隔で2回採尿・採血し、free-flow クリアランスを測定した。

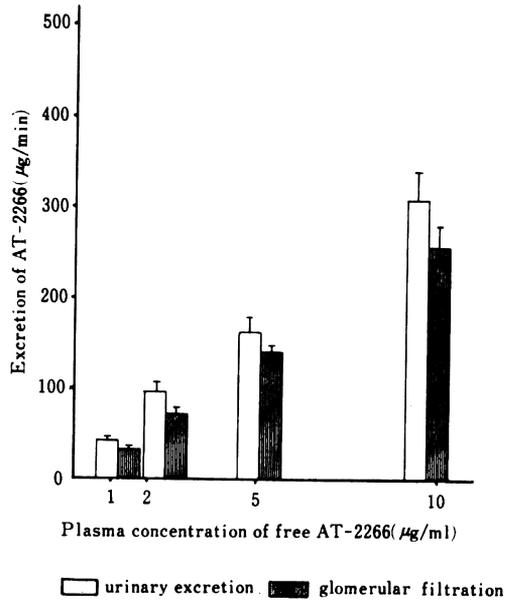
以上の実験終了後 Probenecid (30mg/kg) を静脈内に投与し、20分後に再び free-flow クリアランス測定と stop-flow 実験を繰り返した。

5. AT-2266, PAH, Creatinine, Inulin, Na および K の定量方法

血漿および尿中の AT-2266 濃度は *Escherichia coli* Kp 株を指示菌とする薄層カッパ法¹⁾により測定した。AT-2266 の検量線は 0.067M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて調製した標準液 (0.125~1 µg/ml) で作製し、血漿と尿は同リン酸緩衝液で適宜希釈し定量に供した。なお、本法では血漿中の蛋白結合型 AT-2266 は希釈することにより遊離型と同様に測定されることから、血漿中 AT-2266 は全 AT-2266 として定量される。したがって、血漿中遊離型 AT-2266 濃度は実測した全 AT-2266 濃度と血漿蛋白結合率34%から算出した (Table 1)。

PAH は Smith の方法⁶⁾、Creatinine は Bonsnes and Taussky の方法⁷⁾、Inulin は Schreiner の方法⁸⁾により定量した。

Fig. 1 Urinary excretion of AT-2266 in beagle dogs



Na および K は炎光光度計 (日立 205D 型) により測定した。

6. 腎機能および AT-2266 の腎クリアランス値の計算方法

腎血漿流量 (Renal Plasma Flow : PAH のクリアランス値) や糸球体濾過値 (Glomerular Filtration Rate :

Table 1 Calculation of parameters in renal function and renal excretion of AT-2266

Parameter	Formula
Renal Plasma Flow [RPF : ml/min] (PAH clearance)	$\frac{\text{urinary PAH concentration} \times \text{urinary volume}}{\text{plasma PAH concentration}}$
Glomerular Filtration Rate [GFR : ml/min] (Creatinine clearance)	$\frac{\text{urinary creatinine concentration} \times \text{urinary volume}}{\text{plasma creatinine concentration}}$
AT-2266 clearance [CAT-2266 : ml/min]	$\frac{\text{urinary AT-2266 concentration} \times \text{urinary volume}}{\text{plasma free AT-2266 concentration}}$
AT-2266 Amount of free AT-2266 [µg/ml]	$\text{Total AT-2266 concentration} \times (1 - 0.34)$
Amount of glomerular filtration [µg/min] (GFAT-2266)	$\text{GFR} \times \text{plasma free AT-2266 concentration}$
Amount of urinary excretion [µg/min] (UEAT-2266)	$\text{urinary AT-2266 concentration} \times \text{urinary volume}$
Amount of tubular excretion [µg/min] (TEAT-2266)	$\text{UEAT-2266} - \text{GFAT-2266}$

Table 2 Urinary excretion of AT-2266 in beagle dogs

Plasma concentration of AT-2266 ($\mu\text{g/ml}$)		AT-2266					Renal function		
		GF#	UE#	TE#	TE# UE# $\times 100$	C#	CPAH (RPF)#	CCr. (GFR)#	UV#
Total	Free*	($\mu\text{g/min}$)			(%)	(ml/min)	(ml/min)		
1.87	1.23	31.7	41.8	10.1	21.0	33.6	53.8	25.9	0.08
± 0.07	± 0.05	± 4.0	± 4.2	± 2.4	± 6.7	± 3.3	± 11.3	± 3.4	± 0.01
3.73	2.46	71.2	95.9	24.8	25.4	39.2	67.7	28.9	0.11
± 0.05	± 0.03	± 6.9	± 10.6	± 4.9	± 3.5	± 4.6	± 6.4	± 3.1	± 0.01
7.74	5.11	139.8	161.8	21.9	11.7	32.1	65.5	27.7	0.15
± 0.39	± 0.25	± 9.7	± 15.9	± 8.3	± 4.2	± 4.1	± 8.0	± 2.5	± 0.05
13.70	9.74	255.6	309.6	54.1	16.1	31.6	69.9	26.1	0.20
± 0.95	± 0.36	± 23.6	± 31.9	± 17.2	± 4.0	± 2.7	± 8.2	± 2.1	± 0.04
[mean \pm S. E.]					18.6 ± 3.0	34.1 ± 1.7	64.2 ± 3.6	27.2 ± 0.7	0.13 ± 0.03

AT-2266 was given intravenously (1 and/or 2mg/kg) and was immediately infused at the rate of 100, 200 and 300 $\mu\text{g/kg/min}$ ($n=3\sim 5$). *: The binding rate of AT-2266 was 34% in dog plasma. # Abbreviations: GF=amount of glomerular filtration; UE=amount of urinary excretion; TE=amount of tubular excretion; C=renal clearance rate; RPF=renal plasma flow; GFR=glomerular filtration rate; UV=urinary volume.

Creatinine のクリアランス値)などの腎機能を表わすパラメーターはそれぞれ血漿と尿中のPAHおよびCreatinineの濃度と尿量より算出した。

AT-2266の尿中排泄量(UEAT-2266),糸球体濾過量(GFAT-2266),尿細管排泄量(TEAT-2266)やクリアランス値(CAT-2266)などのAT-2266の腎排泄を表わすパラメーターはそれぞれ血漿や尿中のAT-2266濃度と腎機能を表すパラメーターより算出した(Table 1)。

II. 実験結果

1. AT-2266のイヌにおける腎クリアランス

AT-2266の1または2mg/kgを静脈内に投与した後100, 200および300 $\mu\text{g/kg/min}$ の用量で静脈内に持続注入すると血中の遊離型AT-2266濃度の増加に対応して尿中への排泄量が増加した。

AT-2266の血中遊離型濃度に糸球体濾過値(GFR, クレアチニンクリアランス)を掛けて算出したAT-2266の糸球体濾過量と実測した尿中AT-2266排泄量はほぼ同じ値を示した(Fig. 1)。

すなわち, AT-2266の血漿中遊離型濃度が(1.23~9.74 $\mu\text{g/ml}$)を示す時, AT-2266の腎クリアランス値(CAT-2266: 34.1 ± 1.7 ml/min)は糸球体濾過値(CCr: 27.2 ± 0.7 ml/min)に近く, 腎血漿流量(CPAH: 64.2 ± 3.6 ml/min)よりはるかに小さかった。

尿中排泄量に対する尿細管分泌量の割合(tubular ex-

cretion/urinary excretion $\times 100$)は18.6 $\pm 3.0\%$ と小さかった(Table 2)。

2. Stop-flow 実験

AT-2266の1mg/kgを静脈内投与後100 $\mu\text{g/kg/min}$ の用量を1時間持続注入した時の典型的なstop-flowパターンを示した(Fig. 2)。

尿細管各部位のマーカーとしては, 遠位尿細管部位にはNaを, 近位尿細管部位にはPAHを, 糸球体部位にはイヌリンを測定した。

図の縦軸は各マーカーの尿中/血中濃度比(U/P)を尿濃縮の指標(クレアチニンの尿中/血中濃度比, U/P Cr.)で除した値で表示した。

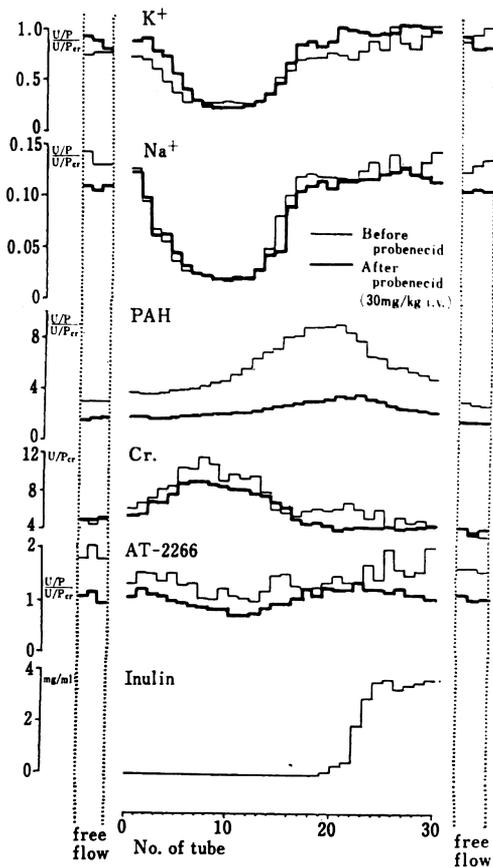
その結果, 近位尿細管部位を示すPAHのピーク部位にも, また, 遠位尿細管部位を示すNaの極少部位にもAT-2266の特定のピークは認められなかった。

また, Probenecid前処理により, PAHのピークは消失したがAT-2266のパターンには特定の変化はなかった。

III. 考察

AT-2266の腎排泄機序を知る目的で麻酔イヌを用いて腎クリアランス実験を行ったところ, AT-2266の腎クリアランス値はGFRにほぼ匹敵することから, AT-2266の腎からの排泄は主に糸球体濾過によるものであり, 尿細管の関与は少ないと推察された。

Fig. 2 Stop-flow pattern of AT-2266 in the dog



しかしながら、AT-2266 は糸球体で濾過された後、尿細管各部位で再吸収と分泌を受け、結果として糸球体濾過量に近い量が尿中に排泄される可能性もあることから、さらに、尿細管の関与を明確にするため stop-flow 実験を行った。その結果、AT-2266 は遠位から近位までの尿細管各部位において特定のピークを示さず、また、このパターンは Probenecid 前処置でも特定の変化を受けなかった。この stop-flow 試験の成績は AT-2266 がイヌでは主として糸球体濾過によって腎から排泄される

ことを示唆しており、クリアランス実験における結果と一致する。

これら AT-2266 の腎排泄機序を先に実施した Pipemidic acid の結果³⁾と比較すると、

1. AT-2266 の腎クリアランス値は Pipemidic acid の値より小さく、GFR にほぼ匹敵する。
2. AT-2266 は近位尿細管部位において Pipemidic acid のような顕著な分泌を受けない。

したがって、AT-2266 の腎排泄部位と機序は Pipemidic acid と異なり、主に糸球体における濾過であり、尿細管の関与は少ないと結論できる。

こうした両者の差は AT-2266 の血中濃度の半減期が Pipemidic acid より長い理由の一つと考えられる。

(実施期間：1981年11月～1982年4月)

文 献

- 1) 中村信一, 片江宏巳, 南 明, 中田勝久, 井上 了, 山岸純一, 高瀬善行, 清水当尚: AT-2266 の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 32(S-3): 70~85, 1984
- 2) 中村信一, 黒部暢之, 粕本茂樹, 大植富夫, 高瀬善行, 清水当尚: AT-2266 の実験動物における吸収, 分布, 排泄および代謝. *Chemotherapy* 32(S-3): 86~94, 1984
- 3) 門河敏明, 中村信一, 清水当尚, 山本研二郎: Pipemidic acid の腎排泄機序. *Chemotherapy* 23(9): 2730~2733, 1975
- 4) YAMAMOTO, K. and J. UEDA: Further studies on renal hemodynamics. *Osaka City Med. J.* 10: 41-56, 1964
- 5) MAL VIN, R. L., W. S. WILDE, and L. P. SULLIVAN: Localization of nephron transport by stop-flow analysis. *Am. J. physiol.* 194: 135-142, 1958
- 6) SMITH, J., N. FINKELSTEIN, L. ALIMINOSA, B. CRAWFORD and M. GRAVER: The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dogs and man. *J. Clin. Invest.* 24: 388-404, 1945
- 7) BONSNES, R. W. and H. H. TAUSSKY: On the colorimetric determination of creatinin by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* 158: 581-591, 1945
- 8) SCHREINER, G. F.: Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 74: 117-120, 1950

RENAL EXCRETION MECHANISM OF AT-2266 IN DOGS

KUNIHICO TAKEYAMA, HISAO MINATO, NOBUUKI KUROBE, KANOO HOSOKI,
and TOSHIAKI KADOKAWA

Research Laboratories, Dainippon Pharmaceuticals Co., Ltd

KENJIRO YAMAMOTO

Department of Pharmacology, Medical School, Osaka City University

Mechanism of renal excretion of AT-2266, a new chemotherapeutic agent, was investigated in anesthetized dogs using renal clearance and stop-flow methods. Results were compared with those of pipemidic acid.

- (1) Renal clearance rate of AT-2266 was lower than that of pipemidic acid.
- (2) AT-2266 differed from pipemidic acid in stop-flow study in which AT-2266 showed a similar pattern with creatinine.

These results suggested that the renal excretion of AT-2266 took place mainly by glomerular filtration. The longer biological half life time of AT-2266 than that of pipemidic acid might derive from the above characteristic in renal excretion.