

イヌおよびラットにおける MT-141 の腎排泄機構に関する研究

小宮 泉¹⁾・米山彰二²⁾・仲由武實²⁾新開祥彦²⁾・藤田正敬²⁾・西尾元宏¹⁾明治製菓株式会社薬理安全性研究所¹⁾明治製菓株式会社薬品開発研究所²⁾

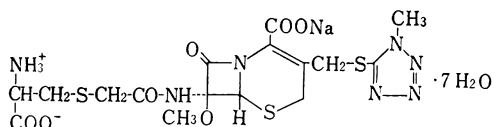
新規セファマイシン系抗生物質である MT-141 のイヌおよびラットにおける腎排泄機構について検討した。MT-141 または CBPC の血清中濃度および累積尿中排泄率について Probenecid 併用時と単独投与時を比較したところ、MT-141 に関しては Probenecid 併用の効果が認められなかった。一方、腎尿細管で分泌される CBPC の場合には Probenecid 併用により、血清中濃度の持続、尿中排泄の阻害が認められた。またラットにおけるクリアランス実験の結果では、能動分泌阻害剤である Iodopyracet を併用しても MT-141 の排泄比 (ER) の変化は認められなかった。

これらの結果により、MT-141 はイヌおよびラットにおいて尿細管で能動分泌されず、主として糸球体濾過により血漿中非結合型薬物が排泄されると考えられる。

MT-141 は Fig. 1 に示す構造を有するセファマイシン系の抗生物質であり、嫌気性菌である *Bacteroides fragilis* を含む広範囲のグラム陽性菌および陰性菌に強い抗菌力を示す¹⁾。

MT-141 の、イヌ、ウサギにおける吸収・排泄についてはすでに報告したが²⁾、今回、MT-141 の腎排泄機構を明らかにする目的でラットを用いた定型クリアランス実験、およびビーグル犬を用いた能動分泌阻害剤併用時の MT-141 体内動態の測定を行なったので報告する。

Fig. 1 Chemical structure of MT-141



I. 実験材料および実験方法

1. 実験動物

体重 9~12 kg の雌性ビーグル犬、および体重 270~350 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した。

2. 使用薬物

MT-141 は当社で合成されたロットおよび力価の明らかなもの、Probenecid は萬有製薬の 250 mg 錠、Carbenicillin (CBPC) として注射用バイオベン® (Beecham 薬品) を、また Inulin, Iodopyracet はそれぞれ Merck 社および岩井化学のものを使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. ビーグル犬における実験

ビーグル犬に Probenecid 2 錠 (500 mg) を水 20 ml とともに経口投与し、投与 30 分後に MT-141 の場合に

は 20 mg/kg または 40 mg/kg を、CBPC の場合には 10 mg/kg を前腕静脈に急速投与した。投与後経時的に血液は反側前腕静脈より、尿は導尿カテーテルを用いて採取し、血液から血清を分離した。対照として MT-141 または CBPC のみを投与した実験をクロスオーバーにて行なった。

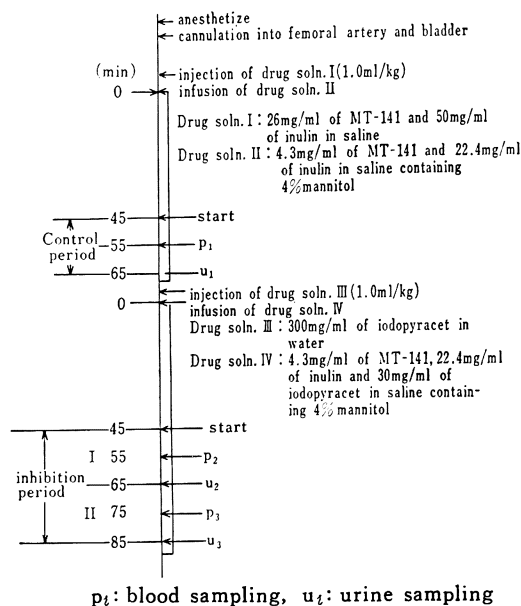
4. ラットにおけるクリアランス実験

ペントバルビタール (40 mg/kg, ip) 麻酔下ラットの左大腿動脈および膀胱にカニューレーションし、血液および尿のサンプリングを行なった。右大腿静脈に注射針を留置し、三方コックを介して薬液の急速静注および定速ポンプ (古江サイエンス社) を用いての定速点滴静注 (流速: 約 3.6 ml/hr/rat) を行なった。能動分泌阻害剤としては、尿 pH に影響を与えない Iodopyracet を用いた。Fig. 2 に示すタイムスケジュールに従って下記薬物溶液を投与した後、対照期 (MT-141 のみ投与) および阻害期 (Iodopyracet 併用) のクリアランス実験を実施した。それぞれの薬物の投与量を以下に示した。

| | | |
|-------|------|-------------------------------|
| 〔対照期〕 | 急速静注 | MT-141 : 26 mg/kg |
| | | Inulin : 50 mg/kg |
| | 点滴静注 | MT-141 : 0.26 mg/min/rat |
| | | Inulin : 1.34 mg/min/rat |
| 〔阻害期〕 | 急速静注 | Iodopyracet : 300 mg/kg |
| | 点滴静注 | MT-141 : 0.26 mg/min/rat |
| | | Inulin : 1.34 mg/min/rat |
| | | Iodopyracet : 1.80 mg/min/rat |

蛋白結合は無投与ラットより血清を採取し Centriflo® CF 50 A (Amicon 社) を用いた限外濾過法により測定し

Fig. 2 Protocol for the renal clearance in rats



た。

5. 薬物の定量

ビーグル犬を用いた実験においては Bioassay 法により薬物の定量を行なった。すなわち MT-141 は *Vibrio percolans* ATCC 8461, CBPC は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌としたカップ法により定量した。

一方、ラットのクリアランス実験においては MT-141 および Iodopyracet を HPLC 法により定量した。すなわち血漿 0.2 ml に内部標準としてアセトリゾン酸水溶液 (300 μ g/ml) 0.1ml を加え、さらにメタノール 0.4 ml を加え充分攪拌した後、4 $^{\circ}$ C で 6,000rpm, 15 分間遠心して除蛋白した。また尿は 51 倍に希釈し、その 0.5 ml にアセトリゾン酸水溶液 (60 μ g/ml) を 0.5 ml 加えた。除蛋白後の上澄および内部標準を含む尿サンプルをミリポアフィルター (FG. 0.2 μ , Millipore 社) で濾過した後 10 μ l を HPLC にインジェクションした。

HPLC の条件は以下に示す通りであった。

カラム: TSK-gel ODS-120A (東洋曹達工業), 4 mm ϕ × 250 mm

プレカラム: TSK-gel ODS-120A (東洋曹達工業), 4 mm ϕ × 50 mm

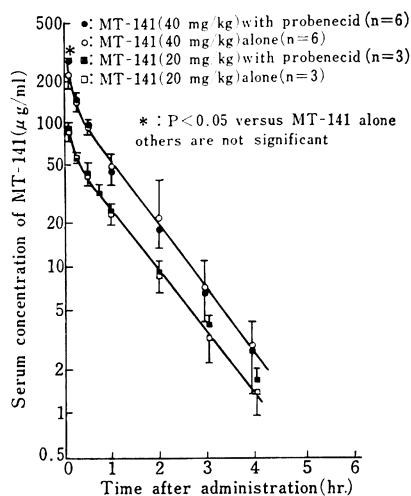
溶離液: CH₃OH : H₂O : 0.5 M-Tetrabutylammonium phosphate (クロマトリサーチ社) = 35 : 64 : 1, pH 4 に調整

流速: 1ml/min

検出: 260 nm

また Inulin は DISCHE & BORENFREUND の方法³⁾に

Fig. 3 Effect of probenecid on the serum concentration of MT-141 in dogs.



Probenecid (500 mg/dog) was orally administered 0.5 hr. before the bolus intravenous administration of MT-141.

Each value represents the mean \pm standard deviation.

よって比色法により定量した。

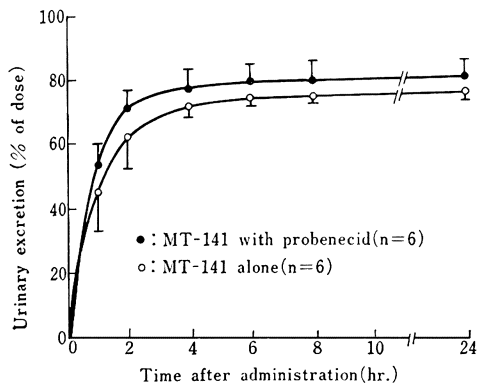
6. 薬動学的解析

ダンピング付き GAUSS-NEWTON 法を用いた繰り返し最小二乗法により薬動学的パラメータを算出した。なおデータのウェイト付けは行なわなかった。

II. 結果

ビーグル犬に MT-141 20 mg/kg および 40 mg/kg 急速静注後の血清中 MT-141 の濃度推移を Probenecid 併用群と無処置群について比較した。Fig. 3 に示したように、Probenecid 併用群と無処置群の血清中濃度を比較すると、20 mg/kg 投与の場合にはいずれの時点においても有意差が認められなかった。また 40 mg/kg 投与の場合にも、投与 5 分後の血清中濃度に統計上有意差が認められた ($P < 0.05$) のもの、他の時点においては有意差が認められなかった。累積尿中排泄率を Fig. 4 (投与量 20 mg/kg) および Fig. 5 (40 mg/kg) に示したが、いずれの投与量においても Probenecid 併用の効果は認められなかった。一方、腎尿細管において能動分泌があると報告されている CBPC⁴⁾ 10 mg/kg を急速静注した後の血清中濃度推移を Fig. 6 に、また累積尿中排泄率の変化を Fig. 7 に示した。血清中濃度はいずれの時点においても Probenecid 併用群が有意に高く ($P < 0.01$)、累積尿中排泄率は Probenecid 併用群が有意に低く ($P < 0.01 \sim P < 0.05$)、Probenecid 併用の効果は顕著であった。Table 1 にこれら血清中濃度を two-compartment

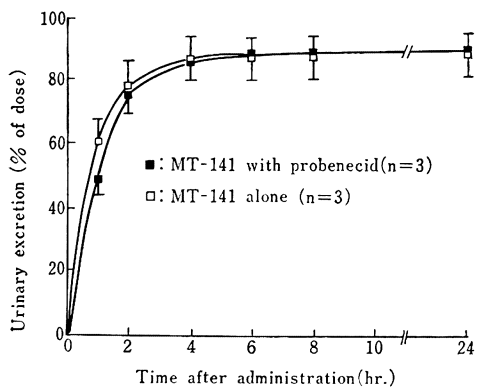
Fig. 4 Effect of probenecid on the urinary excretion of MT-141 in dogs



Probenecid (500 mg/dog) was orally administered 0.5 hr. before the bolus intravenous administration of MT-141 of 40 mg/kg.

Each value represents the mean \pm standard deviation.

Fig. 5 Effect of probenecid on the urinary excretion of MT-141 in dogs

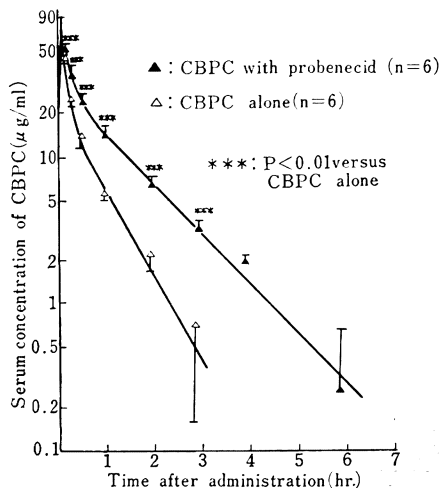


Probenecid (500 mg/dog) was orally administered 0.5 hr. before the bolus intravenous administration of MT-141 of 20 mg/kg.

Each value represents the mean \pm standard deviation.

open model に従い解析して得られた薬動学的パラメータを示した。MT-141 の場合には 40 mg/kg 投与の際の central compartment の分布容積 (V_c) に統計上有意味差が認められたが ($P < 0.05$), 他の薬動学的パラメータおよび 20 mg/kg 投与の際のすべての薬動学的パラメータに関しては, Probenecid 併用の効果は認められなかった。一方 CBPC の場合には定常状態における分布容積 (V_{ss}) には差を認められなかったが, total body

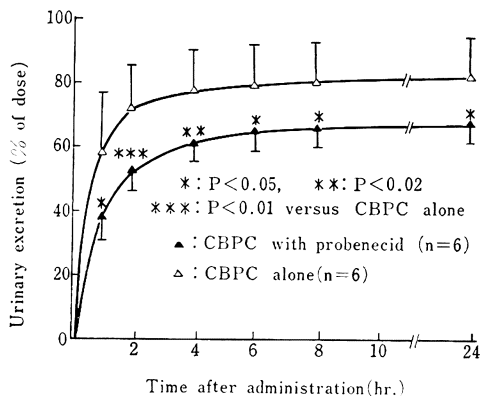
Fig. 6 Effect of probenecid on the serum concentration of CBPC in dogs.



Probenecid (500 mg/dog) was orally administered 0.5 hr. before the bolus intravenous administration of CBPC of 10 mg/kg.

Each value represents the mean \pm standard deviation.

Fig. 7 Effect of probenecid on the urinary excretion of CBPC in dogs.



Probenecid (500 mg/dog) was orally administered 0.5 hr. before the bolus intravenous administration of CBPC of 10 mg/kg.

Each value represents the mean \pm standard deviation.

clearance (Cl_{tot}) には差 ($P < 0.01$) を認めた。その結果, 半減期 ($t_{1/2\beta}$) は Probenecid 併用群で 1.08 hr, 無処理群で 0.674 hr となり, Probenecid 併用の効果が著明に観測された ($P < 0.01$)。

MT-141 (100 μ g/ml) のラット血清蛋白結合に及ぼす

Table 1 Pharmacokinetic parameters of MT-141 and CBPC with and without probenecid

(Mean \pm S. D.)

| Parameter Drug | k_{12} (hr ⁻¹) | k_{21} (hr ⁻¹) | k_{10} (hr ⁻¹) | α (hr ⁻¹) | β (hr ⁻¹) | V_c (ml/kg) | V_p (ml/kg) | V_{ss} (ml/kg) | Cl_{tot} (ml/min/kg) | $t_{1/2 \beta}$ (hr.) |
|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| MT-141 (20mg/kg) (n=3) | 17.0 ± 13.2 | 6.21 ± 0.62 | 4.71 ± 2.74 | 26.9 ± 15.7 | 1.10 ± 0.10 | 91.5 ± 96.8 | 116.5 ± 43.6 | 208.0 ± 53.5 | 4.27 ± 1.07 | 0.636 ± 0.058 |
| MT-141+Probenecid (20mg/kg) (n=3) | 12.0 ± 7.4 | 6.89 ± 1.30 | 3.01 ± 1.21 | 20.8 ± 9.4 | 1.01 ± 0.05 | 95.7 ± 57.0 | 123.8 ± 25.5 | 219.4 ± 31.8 | 4.09 ± 0.66 | 0.684 ± 0.035 |
| MT-141 (40mg/kg) (n=6) | 2.84 ± 3.39 | 3.52 ± 2.26 | 2.10 ± 1.41 | 7.48 ± 6.34 | 0.979 ± 0.400 | 137.5 ± 49.8 | 72.6 ± 16.9 | 210.0 ± 45.3 | 3.95 ± 0.75 | 0.812 ± 0.320 |
| MT-141+Probenecid (40mg/kg) (n=6) | 5.89 ± 5.65 | 3.81 ± 1.59 | 3.10 ± 1.32 | 11.7 ± 8.2 | 1.07 ± 0.14 | 83.8* ± 30.4 | 87.8 ± 20.5 | 171.6 ± 18.0 | 3.79 ± 0.36 | 0.655 ± 0.083 |
| CBPC (10mg/kg) (n=6) | 2.29 ± 1.00 | 2.60 ± 1.13 | 2.84 ± 0.64 | 6.62 ± 2.39 | 1.10 ± 0.32 | 143.2 ± 24.1 | 125.5 ± 23.8 | 268.7 ± 43.3 | 6.60 ± 0.74 | 0.674 ± 0.197 |
| CBPC+Probenecid (10mg/kg) (n=6) | 4.16 ± 5.08 | 2.62 ± 1.52 | 1.81* ± 0.79 | 7.92 ± 7.24 | 0.663*** ± 0.114 | 125.1 ± 38.1 | 126.8 ± 37.8 | 252.0 ± 30.5 | 3.36*** ± 0.39 | 1.08*** ± 0.22 |

 V_c : Volume of distribution in central compartment. V_p : Volume of distribution in peripheral compartment. V_{ss} : Volume of distribution at steady state. Cl_{tot} : total body clearance. $t_{1/2 \beta}$: half-life at β -phase.* : $P < 0.05$, *** : $P < 0.01$ versus without probenecid.

Iodopyracet (500 $\mu\text{g/ml}$) の効果を *in vitro* で測定し、Table 2 に示した。両者の間には有意差は認められなかったものの、Iodopyracet 共存下では MT-141 の蛋白結合が若干減少する傾向が見られた。

ラットにおける定型クリアランスの結果を Table 3 に示した。能動分泌阻害剤である Iodopyracet の血漿中濃

Table 2 Effect of iodopyracet on the serum protein binding of MT-141 *in vitro* (Mean \pm S. D.)

| | without iodopyracet | with iodopyracet |
|------------------|------------------------------|------------------------------|
| Fraction unbound | 0.755 \pm 0.064 (n = 7) | 0.825 \pm 0.086 (n = 7) |

Ultracentrifugation method using Centriflo[®] CF 50A.
Concentration,
MT-141 : 100 $\mu\text{g/ml}$.
Iodopyracet : 500 $\mu\text{g/ml}$.

度は平均 563 $\mu\text{g/ml}$ であり、この濃度で尿細管分泌される Sulfamethizole の能動分泌は完全に阻害されることを確認している。排泄比 (ER) は、血漿蛋白結合を補正した薬物の腎クリアランスと Inulin の腎クリアランスより求めた糸球体濾過速度 (GFR) との比で定義され、(1) 式により計算される。

$$ER = \frac{UV}{P \cdot f \cdot GFR} \quad (1)$$

ここで、 U : 尿中薬物濃度 V : 尿流速 P : 血漿中薬物濃度 f : 蛋白非結合率 (Table 2 の値を使用)

MT-141 の排泄比は対照期で 0.742, 阻害期で 0.815 となり、両者の間に有意な差は認められず、また排泄比はいずれの場合も 1 を下回ったものであった。

Table 3 Effect of iodopyracet on the excretion ratio (ER) of MT-141 in rats

(Mean \pm S. D.)

| | Control period (n=10) | Inhibition period with iodopyracet (n=17) |
|---|--------------------------|--|
| Plasma concn. of MT-141 ($\mu\text{g/ml}$) | 86.5 \pm 14.4 | 83.1 \pm 18.0 |
| Plasma concn. of iodopyracet ($\mu\text{g/ml}$) | 0 | 563 \pm 148 |
| GFR (ml/min/rat) | 2.46 \pm 0.29 | 2.16 \pm 0.38* |
| Excretion ratio (ER) | 0.742 \pm 0.113 | 0.815 \pm 0.094 |

* : $P < 0.05$ versus control period.

III. 考 察

β -lactam 抗生物質のうち、Ampicillin⁵⁾, Cephalexin⁵⁾, Cefamandole⁶⁾などのいくつかのものは Probenecid, Iodopyracet などと共通の有機酸輸送系に従い、腎臓で能動分泌されることが報告されている。能動分泌の有無は当該薬剤の血中半減期を支配する大きな要因となり、したがって安全性、有効性に強い影響を及ぼす。

MT-141 はウサギ²⁾, イヌ²⁾ およびヒト⁷⁾ で投与量のほとんどが未変化体のまま尿中に排泄される腎排泄型薬剤である。イヌにおける Probenecid 併用実験の結果、20 mg/kg および 40 mg/kg 投与の場合に血清中 MT-141 濃度、累積尿中排泄率に Probenecid 併用の効果は認められなかった。一方能動分泌のある CBPC の場合には、同一実験条件下で血清中濃度の持続、排泄抑制が著明に観測された。これらのことより、MT-141 はイヌにおいて能動分泌されないことが明らかになった。

またラットのクリアランス実験 (Iodopyracet 併用) の結果においても、Sulfamethizole の能動分泌を完全に阻害する実験条件下において、排泄比は対照期と阻害期との間に有意差がなかった。このことはイヌ同様ラットにおいても尿細管における能動分泌がないことを示す。また対照期、阻害期いずれも排泄比が 1 を下回っており、このことから糸球体濾過された薬物のうち約 20~25% が再吸収等の過程を経ることが考えられた。なお、糸球体濾過速度 (GFR) に対照期、阻害期間に有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、これは阻害期の実験を対照期にひきつづき行なったためラットの生理的機能が一部減弱したものと推察された。

以上の結果より、ラット、イヌいずれの場合にも腎尿細管における MT-141 の能動分泌 (有機酸輸送系によ

る) の寄与はなく、主として糸球体濾過により血漿中非結合型薬物が排泄されると推察された。

文 献

- 1) IWAMATSU, K.; S. INOUE, T. TSURUOKA, K. MIZUTANI, S. OMOTO, H. OGINO, K. MIYAUCHI, T. WATANABE & T. NIIDA. Synthesis and biological activity of 7 β -(2-amino-2-carboxy)-ethylthioacetamido-7 α -methoxycephalosporin derivatives. *J. Antibiotics* 36 : 229~241, 1983
- 2) 友野法子, 千葉文子, 桜井孝, 仲由武實, 新開祥彦, 藤田正敬, 小宮泉: MT-141 の吸収・分布・代謝および排泄 (第一報) 血清中濃度および尿中排泄。 *Chemotherapy* 32 (S-5) : 67~75, 1984.
- 3) DISCHE, Z. & E. BORENFREUND: A new spectrophotometric method for detection and determination of keto sugars and trios. *J. Biol. Chem.* 192 : 583~587, 1951.
- 4) 上田 泰, 松本文夫, 中村 昇, 斎藤篤, 野田一雄, 大森雅久, 古屋千鶴子, 中村喜典, 宇都宮光明: Carbenicillin にかんする研究。 *Chemotherapy* 17 : 1140~1146, 1969
- 5) KAMIYA, A.; K. OKUMURA & R. HORI Quantitative investigation on renal handling of drugs in rabbits, dogs, and humans. *J. Pharm. Sci.* 72 : 440~443, 1983
- 6) GRIFFITH, R. S.; H. R. BLACK, G. L. BRIER & J. D. WOLNY: Effect of probenecid on the blood levels and urinary excretion of cephmandole. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 11 : 809~812, 1977.
- 7) 中山一誠, 秋枝洋三, 川村弘志, 川口広, 山地恵美子, 石山俊次: 新セファマイシン系抗生物質, MT-141 の抗菌力, 吸収, 排泄, 代謝, 臓器移行性および外科臨床応用について。 *Chemotherapy* 32 (S-5) : 319~337, 1984.

RENAL EXCRETION MECHANISM OF MT-141 IN DOGS AND RATS

IZUMI KOMIYA¹⁾, SHOJI YONEYAMA²⁾, TAKEMI NAKAYOSHI²⁾SACHIIHIKO SHINKAI²⁾, MASATAKA FUJITA²⁾and MOTOHIRO NISHIO¹⁾¹⁾ Pharmacology & Toxicology Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.²⁾ Pharmaceutical & Development Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

Renal excretion mechanism of MT-141, a novel cephamycin antibiotic, was studied in dogs and rats. The serum level and the cumulative urinary excretion of MT-141 and CBPC administered with probenecid were compared with those of MT-141 and CBPC administered without probenecid. There was no effect of probenecid on the serum level and urinary excretion of MT-141. On the other hand, in the case of CBPC, an antibiotic actively secreted in the renal tubules, the serum level of CBPC administered with probenecid was higher throughout the experiment than that of CBPC administered alone. Moreover, the renal excretion of CBPC was remarkably inhibited by the coadministration of probenecid in dogs. From the results of the clearance experiments in rats, iodopyracet, a potent active secretion inhibitor, failed to diminish the excretion ratio (ER) of MT-141.

Accordingly, MT-141 is not actively secreted in the renal tubules, and mainly excreted by the glomerular filtration of unbound drug in plasma in dogs and rats.