

として内液に 1/15 M P.B. (pH 7.0) を用いて同様に処理し、外液中の薬剤濃度を測定し、これを Y として下式に従って結合率を求めた。

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

6) 蛋白結合定数と最大結合量の算出

各種濃度の薬剤を含む 4% HSA 溶液または血清を 37°C, 1 時間インキュベートした後、遠心限外ろ過法を用いて蛋白結合率を測定した。得られた結果を SCATCHARD の方法³⁾ に従い、ACOS 350 コンピューター (NEC) を用いて、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。また結合サイト数の決定は渡辺⁴⁾ の方法に従った。なお、HSA の分子量は 69,000 とした。

7) *In vivo* における血清蛋白結合率の測定

ラットおよびウサギに 0.5% CMC 溶液に懸濁した T-2588 を、T-2525 に換算してそれぞれ 50 mg/kg, 100 mg/kg 経口投与し、経時的に採血した後、血清を分離した。またヒトでは 200 mg (力価) 錠を投与された血清を用いた。この一部に同量のメタノールを加え、激しく振り混ぜた後、遠心上清中濃度を測定し、この測定値の 2 倍を total 濃度とした。別に、血清を Micropartition system MPS-1 (Amicon company) を用いて遠心限外ろ過したろ液中濃度を測定し、これを free 体濃度とした。結合率は下式に従って算出した。

$$\text{結合率 (\%)} = \frac{\text{total 濃度} - \text{free 体濃度}}{\text{total 濃度}} \times 100$$

8) ビリルビンとの競合⁵⁾

0.04% HSA 溶液 (5.8×10^{-6} M) およびビリルビン溶液 (From Bovine Gall Stones: Sigma) 溶液 (1.16×10^{-5} M) を 37°C, 20 分間インキュベートした後、種々の濃度の薬剤を加え、さらに 20 分間インキュベートした。この反応液の 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度合を %A.O.D. で表示した。

$$\% \text{ A.O.D.} = \frac{(\text{薬剤添加時の O.D.}) - (\text{薬剤無添加時の O.D.})}{\text{薬剤無添加時の O.D.}} \times 100$$

9) 薬剤濃度測定法

T-2525 の濃度測定は前報⁶⁾ に従って bioassay および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行なった。CE X および CCL の濃度測定は、島津 LC-3A 型を用いて、固定相として LiChrosorb RP-18 (10 μm, 4 mm i.d. × 300 mm; Merck), 移動相として CH₃CN : 1 M CH₃COOH : 1 M CH₃COOH · N(C₂H₅)₃ : H₂O (100 : 14 : 27 : 859) を用い、室温下、1 ml/min の流速で溶出し、254 nm で検出した。ただし、可逆性の検討の項の CEX

の濃度測定は、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とするペーパーディスク法で行なった。

10) 蛋白定量

LOWRY 法⁷⁾ により求めた。

II. 結果ならびに考察

1) アルブミン濃度の影響

T-2525 および CEX の血清蛋白結合におよ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-2525 の 25 μg/ml では、0.25% の HSA 溶液で 25% 程度の結合率を示したが、HSA 濃度の増加に伴って結合率は上昇し、HSA 濃度 4% では 82%、8% では 91% であった。また T-2525 6.25 μg/ml における結合率は 25 μg/ml の結合率と近似した値を示した。CEX に

Fig. 2 Effect of human serum albumin concentration on protein binding of T-2525 and CEX

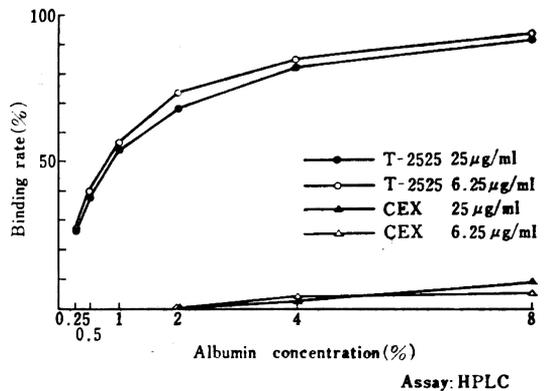


Table 1 Effect of volume of outside solution on protein binding of T-2525 and CEX in equilibrium dialysis

Ratio of volume outside sol. inside sol.	T-2525		CEX	
	Binding (%)	Binding ratio	Binding (%)	Binding ratio
2	66.9	1.00	9.8	1.00
4	61.1	0.91	9.0	0.92
8	47.2	0.71	8.4	0.86
16	32.5	0.49	8.0	0.82
32	21.4	0.32	4.5	0.46

Drug concentration : 50 μg/ml

Inside solution : 4% human serum albumin

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

Assay : Bioassay

においても、結合率は低いながら HSA 濃度の増加に伴い結合率は上昇した。

2) 可逆性の検討

T-2525 および CEX と HSA との結合の可逆性を検討す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, 8, 16 および 32 とした時の蛋白結合率を測定した。その結果を Table 1 に示す。

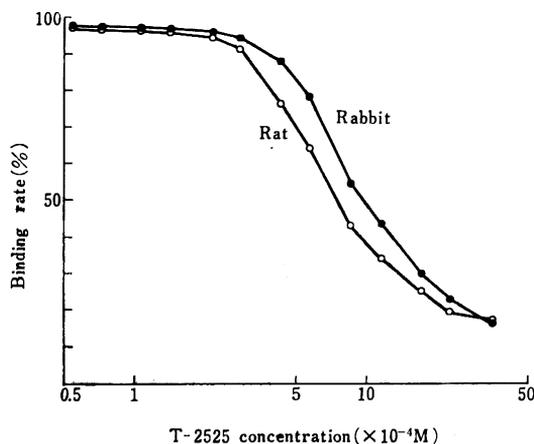
液量比が 2 の時の結合率を 1 とすると、液量比が大きくなるにつれて結合率が小さくなり、液量比が 32 の時、0.32 であった。従って T-2525 の HSA との結合は可逆的と考えられる。一方、CEX の結合率は T-2525 に比べ高値を示した。この理由として CEX の血清蛋白結合率は低く、内液の CEX はほとんど free 体として存在しているため影響が現われにくかったものと考えられた。

3) 薬剤濃度の影響

T-2525 のラットおよびウサギ血清蛋白との結合におよぼす薬剤濃度の影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示す。

ラット血清では、 2.90×10^{-4} M (139.1 μ g/ml) までは 95~90% の高い結合率を示したが、それ以上の濃度では、薬剤濃度の増加に伴って結合率は低下し、 34.8×10^{-4} M (1,669 μ g/ml) では 16% であった。ウサギ血清では、 $0.544 \sim 2.90 \times 10^{-4}$ M (26.1~139.1 μ g/ml) における結合率は約 95% を示したが、それ以上の濃度では徐々に結合率は低下し、 34.8×10^{-4} M では 16% であった。

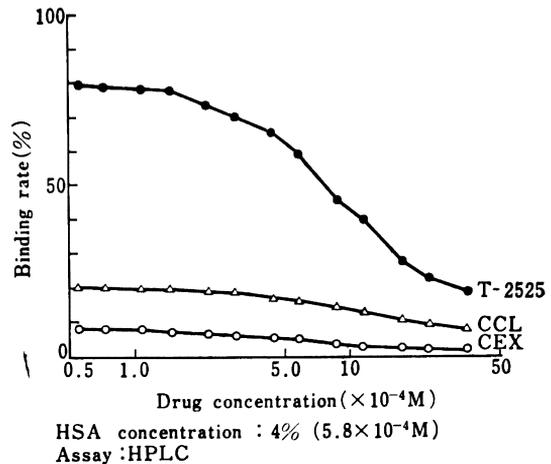
Fig. 3 Effect of T-2525 concentration on protein binding of T-2525 to rabbit and rat serum protein



Rabbit serum protein : 67.91mg/ml

Rat serum protein : 87.53mg/ml Assay : HPLC

Fig. 4 Effect of drug concentration on protein binding of T-2525, CEX and CCL to human serum albumin



HSA concentration : 4% (5.8×10^{-4} M)
Assay : HPLC

Table 2 Effect of T-2525 concentration on protein binding of T-2525 to human serum

T-2525 concentration (μ g/ml)	0.313	1.25	5
Binding rate (%)	76.3	72.1	74.2

Assay : Bioassay

次に HSA を用いて T-2525, CEX および CCL の血清蛋白結合におよぼす薬剤濃度の影響を検討した。その結果を Fig. 4 に示す。

T-2525 は $0.544 \sim 1.45 \times 10^{-4}$ M (26.1~69.5 μ g/ml) では 79~77% 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って徐々に低下し、 34.8×10^{-4} M (1,669 μ g/ml) では 19% であった。また CEX および CCL の結合率は T-2525 と若干異なり、ゆるやかに低下した。薬剤濃度の増加に伴う結合率の低下は、血清蛋白の結合サイトが薬剤で飽和されたためと考えられる。

T-2588 をヒトに 100 mg または 200 mg 経口投与した時の最高血清中濃度は、それぞれ 1.2 μ g/ml, 1.97 μ g/ml であることが報告されている⁹⁾。そこで T-2525 5 μ g/ml 以下の濃度におけるヒト血清蛋白結合率を検討した。その結果を Table 2 に示す。

T-2525 の結合率は 0.313, 1.25 および 5 μ g/ml でそれぞれ 76.3, 72.1 および 74.2% を示し、すでに報告¹⁾した 25 μ g/ml の結合率とほぼ一致した。

4) 蛋白結合定数 (K) および最大結合量 (n)

Fig. 3 から求めた T-2525 のラットおよびウサギ血清に対する SCATCHARD plot を Fig. 5 に、また Fig. 4 から求めた T-2525, CEX および CCL の HSA に対する

Fig. 5 SCATCHARD plots for T-2525

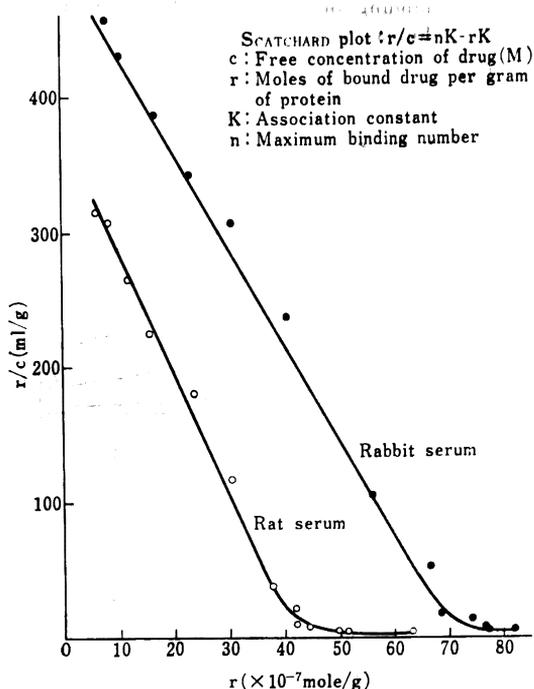


Fig. 6 SCATCHARD plots for T-2525, CEX and CCL —Human serum albumin—

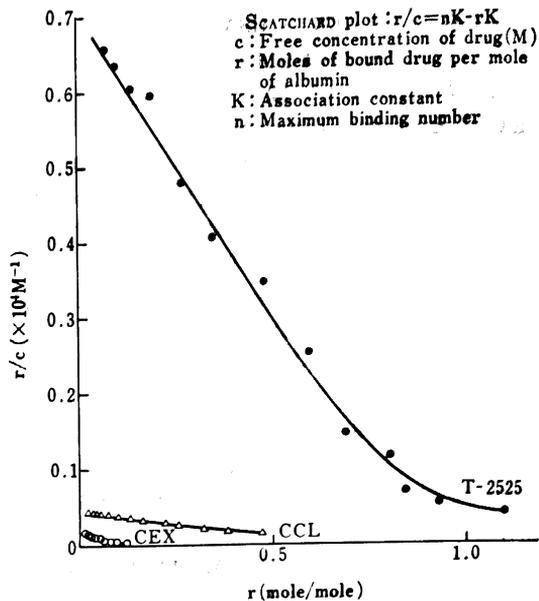


Table 3 Association constant and maximum binding number for T-2525, CEX and CCL

Protein	Drug	Association constant		Maximum binding number*	
		K_1	K_2	n_1	n_2
Rat serum	T-2525	9.30×10^4	2.32×10	4.12×10^{-6}	3.05×10^{-5}
Rabbit serum	T-2525	7.00×10^4	5.94×10	7.18×10^{-6}	6.76×10^{-6}
Human serum albumin	T-2525	8.84×10^3	3.09×10	0.813	3.6
	CEX	2.86×10^2	1.76	0.054	1.1
	CCL	1.01×10^3	1.54×10	0.424	3.0

* mole/g (rat and rabbit serum) or mole/mole (human serum albumin)

HSA concentration: 4% (5.8×10^{-4} M)

SCATCHARD plot を Fig. 6 に示す。

いずれも曲線を示したことから、結合サイトは2種以上あることが予測されたので、結合サイト数を1~3としてデータを解析した結果、結合サイトは2種であることが適当と考えられた。Table 3 に各結合サイトにおける結合パラメーターを示す。なお第1次結合サイトは薬剤濃度が低い時、主に結合する蛋白部位、第2次結合サイトは薬剤濃度が高くなると結合する部位とした。

HSA に対する T-2525 の結合パラメーターは K_1 : 8.84×10^3 , K_2 : 3.09×10 , n_1 : 0.813, n_2 : 3.6 であつ

た。第1次結合定数である K_1 値は CEX および CCL より大きな値を示し、結合力が強いことが推定された。しかし、この強さは CMZ (K_1 : 1.26×10^4) と CBPZ (K_1 : 3.60×10^3)⁹⁾ の中間に位置するものであった。また、ラットおよびウサギ血清では、それぞれの K_1 値は 9.3×10^4 および 7.0×10^4 を示し、HSA より強い結合であった。

5) *In vivo* での血清蛋白結合率

T-2588 経口投与後のラット、ウサギおよびヒト血清中の T-2525 total 濃度ならびに free 体濃度を Fig.

7, 8 および 9 に示す。またその成績より *in vivo* 血清蛋白結合率を求めた結果を Table 4 に示す。

ラットの場合, total 濃度は投与後 15 分で $8.77 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$ を示し, 以後ゆるやかに上昇し, 60 分で $26.9 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$, 120 分にピーク値 $29.4 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ を示した後, 漸次低下し, 360 分では $8.35 \pm 2.26 \mu\text{g/ml}$ であった。一方 free 体濃度は投与後 15, 60, 120 および 360 でそれぞれ 0.22 ± 0.02 , 0.79 ± 0.18 , 1.04 ± 0.34 および $0.21 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ であり, total 濃度と free 体濃度は平行して推移した。各測定値から求めた結合率は $96.6 \sim 97.6\%$ であった (Table 4)。またウサギおよびヒトにおいてもラットと同様, total 濃度と free 体濃度は平行して推移し, 結合率はそれぞれ $95.3 \sim 97.2$, $72.1 \sim 82.3\%$ を示した。*in vitro* の血清蛋白結合率はラットでは 96.1% , ウサギでは 97.5% , ヒトでは 74.6% と報告されており, 今回得られた *in vivo* 結合率は *in vitro* の成績とほぼ一致していた。

6) ビリルビンとの競合

結合力の強い薬剤, たとえばサリチル酸, サルファ剤, NB^(10,11)等は, 血清アルブミンとの結合においてビリルビンと競合し, ビリルビンが遊離するため, 特に新生

Fig. 7 Serum levels of T-2525 after oral administration of T-2588 in rats

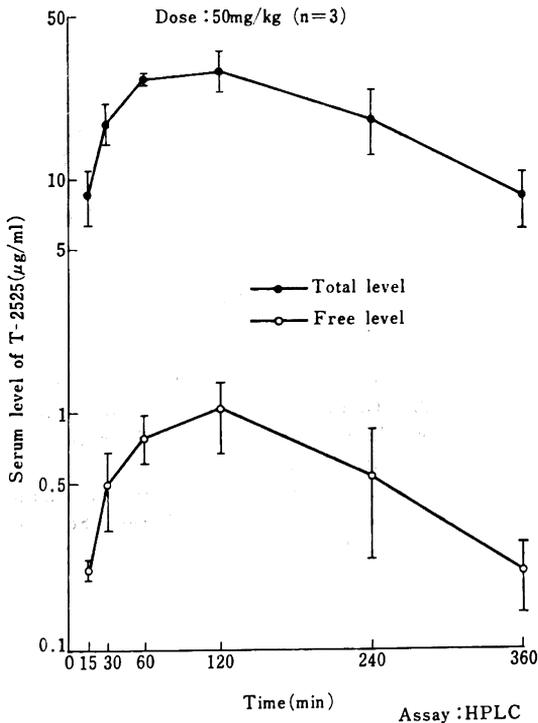


Fig. 8 Serum levels of T-2525 after oral administration of T-2588 in rabbits

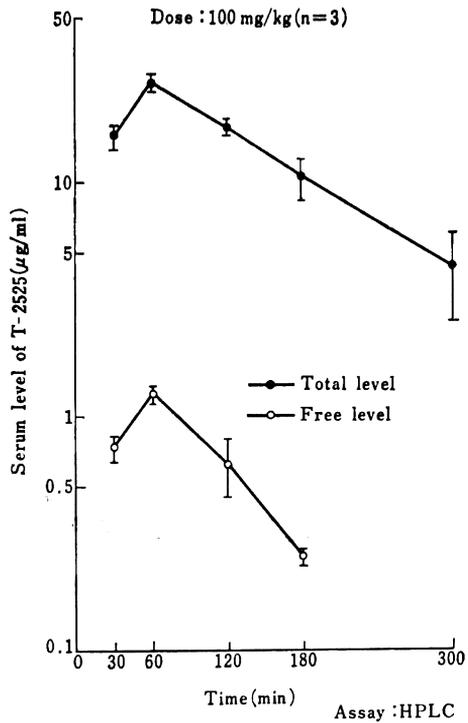


Fig. 9 Serum levels of T-2525 after oral administration of T-2588 in humans

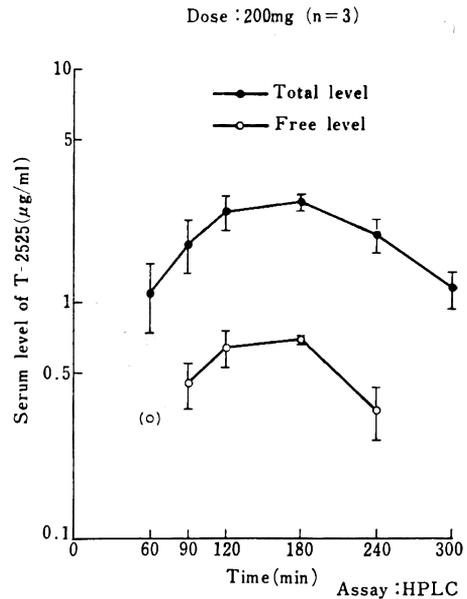


Table 4 *In vivo* binding rates of T-2525 to various serum

Time (min)	Binding rate*1 (%)								
	15	30	60	90	120	180	240	300	360
Rat	97.1±1.0	97.3±0.6	97.1±0.5	N.T.	96.6±0.5	N.T.	97.5±0.7	N.T.	97.6±1.2
Rabbit	N.T.	96.3±0.2	95.4±0.0	N.T.	96.3±1.0	97.2±0.7	N.T.	N.D.	N.T.
Human	N.T.	N.T.	78.4*2	74.3±2.4	73.9±1.7	74.4±2.0	82.3±2.6	72.1*2	N.T.

*1: Mean±S.E.(n=3)

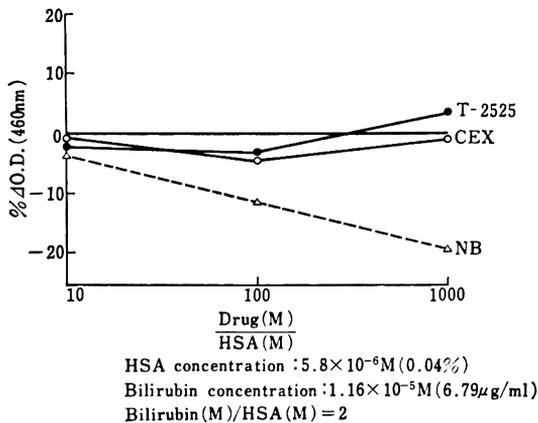
*2: Mean (n=2)

N.T.: Not tested

N.D.: Not determined

Assay: HPLC

Fig. 10 Effect of drug on binding of bilirubin to human serum albumin



児において核黄疸が誘発されると指摘されている。そこで HSA との結合におけるビリルビンとの競合を検討した。

その結果、Fig. 10 に示すように T-2525 および CEX では吸光度はほとんど減少せず、ビリルビンの遊離は認められなかった。一方、NB では薬剤と HSA とのモル濃度比が 100 および 1,000 の場合、吸光度はそれぞれ約 10%、約 20% 減少し、ビリルビンの遊離が認められた。

以上、T-2525 の血清蛋白結合について検討した結果、その結合は可逆的であり、HSA に対する T-2525 の結合は CEX ならびに CCL より強いが、ビリルビンと HSA との結合に対しては、T-2525 は影響をおよぼさなかった。また *in vivo* における血清蛋白結合率は *in vitro* の結果と良く一致していた。

文 献

- 1) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 高橋礼子, 貞木 浩: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 34 (S-2): 122~133, 1986
- 2) 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
- 3) SCATCHARD, G. F.: The attractions of protein for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660~692, 1949
- 4) 渡辺泰雄: β -lactam 系抗生剤の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 31: 448~455, 1983
- 5) ODELL, G. B.: Influence of binding on toxicity of bilirubin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 226: 225~237, 1973
- 6) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 林敏雄, 熊野克彦, 高橋礼子: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 34 (S-2): 109~114, 1986
- 7) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. T. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951
- 8) 第 33 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, T-2588, 東京, 1985
- 9) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 北山理恵子: T-1982 の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 30 (S-3): 190~197, 1982
- 10) ODELL, G. B.: The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. J. Pediat. 55: 268~279, 1959
- 11) VALLNAR, J. J.: Binding of drugs by albumin and plasma protein. J. Pharm. Sci. 66: 447~465, 1977

STUDIES ON THE SERUM PROTEIN BINDING OF T-2525,
THE PARENT COMPOUND OF T-2588

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

The extent of the binding of T-2525 to serum protein, which is the parent compound of T-2588 (a new oral cephem antibiotic), was studied by the equilibrium dialysis and the centrifugal ultrafiltration method.

The following results were obtained.

- (1) T-2525 was bound reversibly to human serum albumin (HSA).
- (2) The binding rates of T-2525 as well as cefaclor (CCL) and cephalexin (CEX) were influenced by the concentration of the drug and HSA. That is to say, the binding rate of T-2525 became higher as the concentration of HSA became higher, and became lower as the concentration of T-2525 became higher.
- (3) From the results of SCATCHARD plot, rat and rabbit serum proteins, and HSA seemed to have 2 binding sites for T-2525.
- (4) *In vivo* binding rates of T-2525 after oral administration of T-2588 in rats, rabbits and humans were similar to those obtained *in vitro*, respectively.
- (5) T-2525 showed no influence on the binding of bilirubin to HSA.