

## L-105 のイヌにおける腎排泄機序

松本文夫

神奈川県衛生看護専門学校附属病院内科

井之川芳之・赤井伸子・武井啓司

日本レダリー株式会社薬理研究部

比留間秀雄

日本レダリー株式会社品質管理部

L-105 のイヌにおける腎排泄について、定速注入による stop-flow 法により検討した。Stop-flow 分析では、近位尿細管部に L-105 のピークは認められなかった。また L-105 の stop-flow パターンに対してプロベネシドの影響はほとんどみられなかった。これらの成績は、L-105 がイヌでは主として糸球体濾過によって排泄されることを示唆している。

L-105 は、新しく合成された注射用の cephalosporin 系抗生物質で、グラム陽性菌およびグラム陰性菌にきわめて強い抗菌力を示す。また、ヒトおよび実験動物で比較検討された抗生物質中では、その血中半減期が cefmenoxime とほぼ同等で、腎毒性は低いことが示されている<sup>2)</sup>。そこで、血中半減期および腎毒性との関連において、腎臓からの排泄機序を解明するため、ビーグル犬を用いて定速注入による stop-flow 分析を実施し、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. 実験動物

体重 12.0~16.0 kg の雄性ビーグル犬(株式会社シー・エス・ケー実験動物研究所)および体重 10.5~12.5 kg の雌雄雑犬、合計 6 頭を用いた。動物は予備飼育期間中、室温  $24 \pm 5^\circ\text{C}$ 、湿度 50~70%、照明 1 日 12 時間(午前 6 時~午後 6 時)に調節した動物室で飼育した。飼料(固型飼料, CD-5 日本クレア)は午前 11 時から午後 4 時までに 1 頭あたり 300 g を与え、水は自由に摂取させた。

## 2. 手術処置

ビーグル犬および雑犬はペントバルビタールナトリウム(日本ローディア) 30 mg/kg を前肢静脈内に注射麻酔した。気管切開後、左側腹を切開して後腹腔の左尿管を分離し、導尿採取した。また、右大腿動脈にカニューレを挿入し、圧トランスジューサー(三栄測器 1257)を介して、血圧を測定した。採血は右腕頭動脈より行った。薬物の投与は右腕頭静脈より行った。

## 3. 使用薬物および調製法

1) L-105 (Batch No. 306 M) は、使用直前に生理食塩液に溶解し、20 W/V% 濃度にした。

2) イヌリン(特級, 和光純薬)は、生理食塩液に溶解し、5 W/V% 濃度にした。

3) マンニトール(特級, 和光純薬)は、生理食塩液に溶解し、15 W/V% 濃度にした。

4) クレアチニン(特級, 和光純薬)は、生理食塩液に溶解し、10 W/V% 濃度にした。

5) p-アミノ馬尿酸(PAH)は、p-アミノ馬尿酸ナトリウム 20 W/V% 注射液(第一製薬)を用いた。

6) プロベネシド(GR, Sigma)は、その 900 mg に 1N NaOH 水溶液 2.5 ml および脱イオン水を加え、加温により大部分を溶解した後、1N NaOH 水溶液数滴を加えて完全に溶解し、次いで脱イオン水を加え全量を 15 ml とした(6 W/V%, 60 mg/ml, pH 7~8)。

7) パン酵母はオリエンタル酵母工業の新鮮な生酵母を洗浄後、使用した。生酵母約 10 g を 10 倍量の生理食塩液に懸濁し、遠心分離操作を繰り返すことにより 5 回洗浄した。沈渣のうち、着色上層は除去し、下層の部分を生理食塩液に懸濁して用いた。

## 4. 分析方法

1) L-105 の微生物学的測定法

試料はすべて 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 にて希釈し、*E. coli* NHUJ による円筒寒天平板法にて検定を行った。

2) イヌリンの定量

血漿 0.5 ml に 50% パン酵母懸濁液 0.05 ml を加え、

38°C で30分間インキュベートした後、室温で3,000 rpm, 10分間遠心分離した。その上清 0.3 ml をとり、10%トリクロル酢酸溶液(特級, 和光純薬) 2.1 ml を加えて10分間放置後、3,000 rpm で10分間遠心分離した。その上清 1.0 ml をとり、ジフェニルアミン試薬 2.0 ml を加えて攪拌し、煮沸浴中に30分間放置、次いで室温に10分間放置後、620 nm で吸光度を測定した。ブランクにはイヌの血漿を用いた。ジフェニルアミン試薬はジフェニルアミン(特級, 和光純薬) 18 g を水酢酸(特級, 和光純薬) 600 ml に溶解し、濃塩酸(特級, 和光純薬) 360 ml を加えて調製し、冷暗所に保存して1ヵ月以内に使用した。

尿試料は希釈尿(15倍) 0.5 ml に10%トリクロル酢酸溶液 3.5 ml を加えて遠心分離し、その上清 1.0 ml をとりジフェニルアミン試薬 2.0 ml を加え以下血漿の場

合同様に発色、比色した。標準には標準溶液 0.5 ml (200, 100, 50, 25  $\mu$ g イヌリン/ml), ブランクには水 0.5 ml をとり、以下同様にトリクロル酢酸処理、発色および比色を行った。

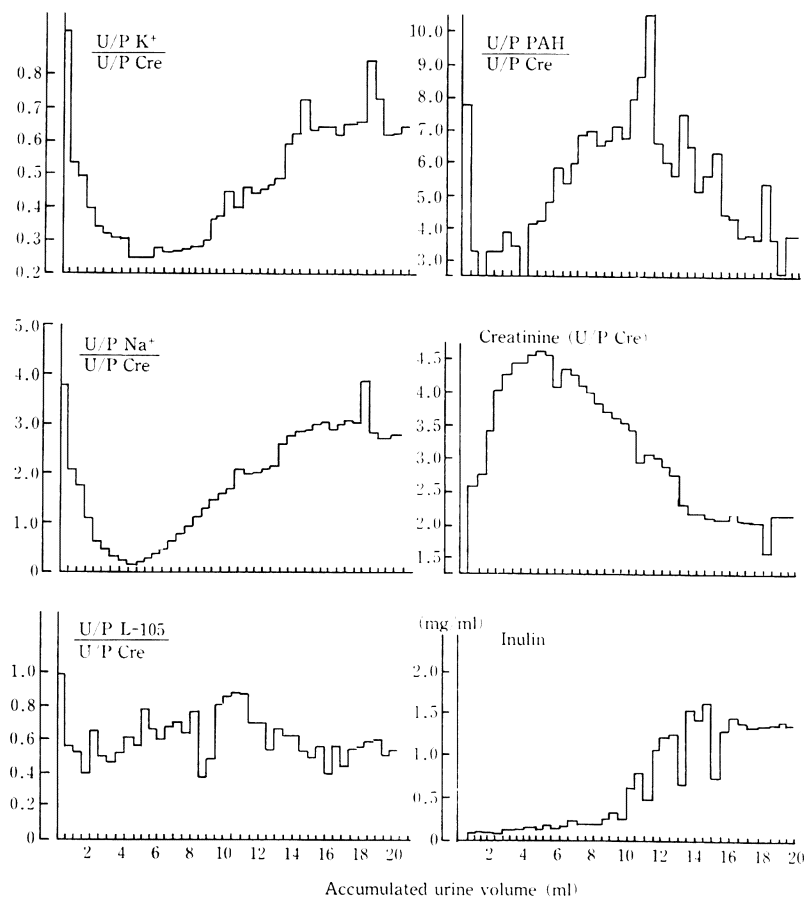
### 3) p-アミノ馬尿酸の定量

BRATTON-MARSHALL 法により行った。

血漿 0.2 ml をとり、10%トリクロル酢酸 3.0 ml を加え、さらに蒸留水 6.8 ml を加えた後、10分間放置し、室温で3,000 rpm, 10分間遠心分離した。上清 0.2 ml をとり、0.1% 亜硝酸ナトリウム溶液 0.2 ml を加えた。亜硝酸ナトリウム溶液を加えた上清は、攪拌して室温で15分間放置後、0.5% スルファミン酸アンモニウム溶液(スルファミン酸アンモニウム, 特級, 和光純薬) 0.2 ml を加えて2~5分間室温放置、さらに0.1% 津田試薬(特級, 和光純薬) 0.2 ml を加えて10分間室温に放置

Fig. 1 Renal excretion of L-105, a new cephalosporin antibiotic in dogs —stop-flow pattern in the dog—

L-105 was given at a priming dose of 10 mg/kg of body weight followed by a sustaining dose of 170 mg/kg of body weight per hour



後, 555 nm で吸光度を測定した。

尿は希釈液 (15倍) を 0.2 ml とり, 10% トリクロル酢酸 0.6 ml, 蒸留水 1.2 ml の順に加えて室温に10分間放置後, 0.1% 亜硝酸ナトリウム溶液 0.2 ml, 0.5% スルファミン酸アンモニウム溶液 0.2 ml, 0.1% 津田試薬 0.2 ml の順に加えて, 555 nm で比色定量した。標準には, PAH 標準保存溶液 (1.0 mg/ml) を使用直前に蒸留水を用いて, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml に希釈したものを用いた。ブランクには, 蒸留水 1.4 ml に10%トリクロル酢酸 0.6 ml を加え以下同様の操作を行い測定した。

#### 4) クレアチニンの定量

ピクリン酸発色による JAFFE 反応を用いた。中村ら

の方法<sup>3)</sup>に準じ, 生化学自動分析装置 (Abbott VP) により, 血漿は5倍希釈液を, 尿は15倍希釈液を比色定量した。

#### 5) $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ の定量

原子吸光法 (Corning 455) により測定した。

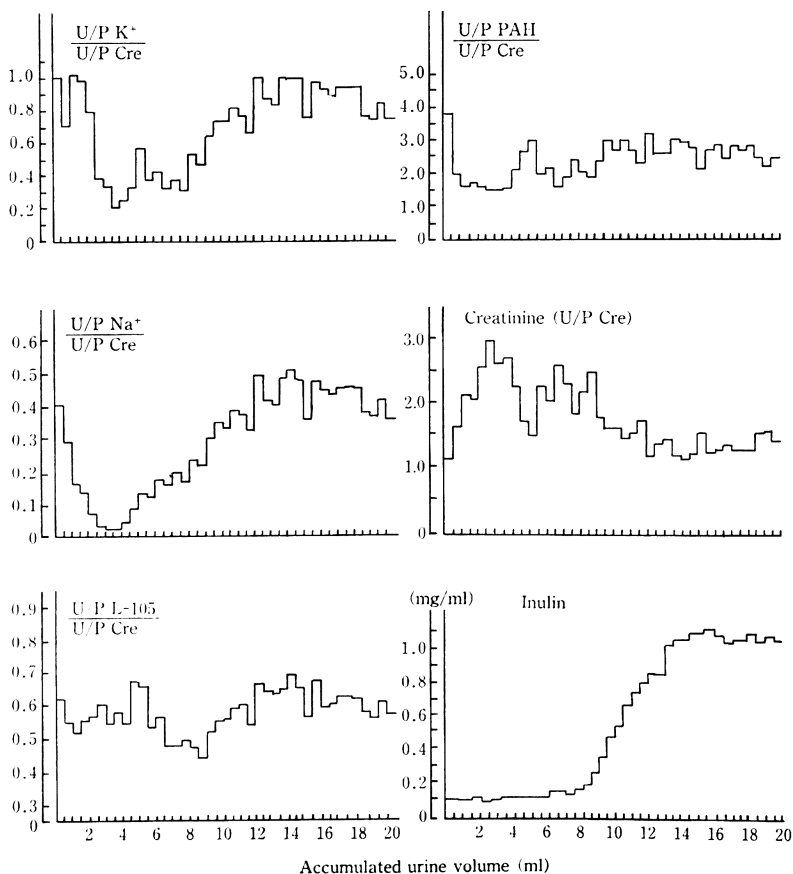
#### 5. Stop-flow 試験

腕頭静脈より priming dose として p-アミノ馬尿酸ナトリウム 20 mg/kg (20% 溶液 0.1 ml/kg) およびクレアチニン 100 mg/kg を投与し, sustaining 溶液には, 15 W/V% マンニトール—0.9% NaCl—0.25%, クレアチニン—0.1% p-アミノ馬尿酸を用い, 17 ml/min/body の速度で注入した。L-105 の priming dose は 10 mg/kg (20 W/V% 溶液 0.05 ml/kg), sustaining は

Fig. 2 Renal excretion of L-105, a new cephalosporin antibiotic in dogs —stop-flow pattern in the dog—

L-105 was given at a priming dose of 10 mg/kg of body weight followed by a sustaining dose of 170 mg/kg of body weight per hour

Probenecid was given at a dose of 30 mg/kg of body weight before the start of stop-flow experiment



170 mg/body/hr (20 W/V% 溶液 0.833 ml/1,000 ml) で行った。注入開始後、尿量が 7~8 ml/min になり、ほぼ安定したら 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。次いで尿管を止血鉗子ではさみ、尿流を停止させた。止血鉗子は 6 分間で開放し、噴出する尿サンプルを 0.5 ml ずつアクリル樹脂製のサンプラーに連続的に 40 本採取した。開放の 1 分前にインスリン 50 mg/kg (5 W/V% 溶液 1 ml/kg) を静注した。

近位尿細管からの排泄の有無について、プロベネシドを用いて検討した。プロベネシド 30 mg/kg (6 W/V% 溶液 0.5 ml/kg) は尿管を止血鉗子ではさみ、尿流を停止させる約 10 分前に腕頭静脈より投与し、以下同様の操作を行った。

## II. 結 果

尿細管関与の有無を検討する目的で stop-flow 分析を行った。尿細管各部位のマーカーとしては、近位尿細管分泌には p-アミノ馬尿酸 (PAH)、遠位尿細管再吸収には  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  を測定した。インスリンは尿管開放直前に投与し、糸球体原尿のマーカーに用いた。クレアチニンを測定し、 $\text{U/Pcr}$  (クレアチニンの尿中: 血漿中濃度比) を求め、尿濃縮の指標とした。Stop-flow パターンの縦軸は濃度の  $\text{U/P}$  (尿中: 血漿中濃度比) を  $\text{U/Pcr}$  で除した値 ( $\text{U/P} \div \text{U/Pcr}$ ) で表示した (Fig. 1 および 2)。

Fig. 1 に代表的な stop-flow パターンを示したが、これらの成績からみる限り、L-105 には特定の極大ピークまたは極小ピークは認められなかった。すなわち、近位尿細管部位を示す PAH のピーク部位にも L-105 の特定ピークはなく、また遠位を示す  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  の極小域にも L-105 の特定ピークはなかった。Fig. 2 にプロベネシド前投与試験の結果を示した。近位尿細管排泄のマーカーである PAH の極大ピークは、プロベネシドの作用により、消失した。また  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , クレアチニンおよびインスリンの排泄パターンはプロベネシド未処置犬での結果と同様であった。さらに L-105 の排泄パターンについてもプロベネシド前投与による変化は認められなかった。

## III. 考 察

L-105 はイヌにおける stop-flow 分析の結果、近位および遠位尿細管部位にピークがなく、またプロベネシド前処置の影響も認められていない。したがって、イヌに関しては、L-105 は主として糸球体濾過により排泄され

ているものと考えられる。またヒトにおいてクレアチニンクリアランスを指標とし、腎障害時の L-105 の血中動態を検討したところ、クレアチニンクリアランスの低下に伴って血中からの L-105 の消失が遅延すること<sup>4)</sup>、さらにプロベネシドの前投与によっても血中からの L-105 の消失に大きな影響を及ぼさないことなどから、ヒトでも L-105 は主として糸球体から排泄されるものと考えられ、イヌはヒトと同様であると推測される。

また 6059-S (latamoxef)<sup>3)</sup> および ceftriaxone<sup>6)</sup> についても、stop-flow 分析によるイヌにおける腎排泄機序の検討結果が報告されているが、これらのセフェム剤も尿細管からの排泄は認められず、主として糸球体濾過によることが示されている。一方、cefazolin については、糸球体濾過の他にわずかながら近位および遠位尿細管部でも分泌されることがすでに確かめられている<sup>7)</sup>。いずれにしても、L-105 のイヌで実施した本試験の結果からは、尿細管からの分泌は少ないものと推察される。

## 文 献

- 1) HIKIDA, M.; M. INOUE & S. MITSUHASHI: 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., 1984
- 2) NAKASHIMA, M.; M. MIZUMURA, H. HIRUMA & M. KITAMURA: Pharmacokinetics and safety of L-105 in healthy volunteers and experimental animals. 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., 1984
- 3) 中村益久, 川畑友二, 安部陽一: 6059-S のイヌにおける腎排泄機序。Chemotherapy 28(S-7): 236~243, 1980
- 4) 柴 孝也, 斉藤 篤, 嶋田甚五郎, 山路武久, 北條敏夫, 加地正伸, 宮原 正: L-105 に関する臨床的研究。第33回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, L-105, 1985
- 5) 水野全裕, 岸 幹雄, 宮田和豊, 公文裕巳, 大森弘之, 近藤 淳, 近藤捷喜, 難波克一, 赤枝輝明: 泌尿器科領域における L-105 の基礎的, 臨床的検討。第33回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム, L-105, 1985
- 6) 市原成泰, 露木由美子, 中山幸子, 清水宏俊: Ceftriaxone (Ro 13-9904) のイヌおよびウサギにおける腎排泄機序。Chemotherapy 32(S-7): 165~169, 1984
- 7) 上田 泰, 松本文夫, 中村 昇, 斉藤 篤, 野田一雄, 小林千鶴子, 大森雅久: Cefazolin に関する研究。Chemotherapy 18: 564~570, 1970

## RENAL EXCRETION OF L-105, A NEW CEPHALOSPORIN ANTIBIOTIC IN DOGS

FUMIO MATSUMOTO

Department of Internal Medicine

Kanagawa Prefecture Midwives and Nurses Training School Hospital

YOSHIYUKI INOKAWA, NOBUKO AKAI and HIROSHI TAKEI

Toxicology Laboratory, Lederle (Japan), Ltd.

HIDEO HIRUMA

Quality Control Laboratory, Lederle (Japan), Ltd.

Mechanism of renal excretion of L-105, a new beta-lactam antibiotic, was investigated in dogs using stop-flow analysis. In the stop-flow studies, dogs were cannulated into the ureter for collection of urine, into the vein for constant infusion of L-105, mannitol, creatinine and p-aminohippuric acid, and into the artery for blood sampling.

The pelvic urine was collected in fractions and the phases of distal tubular excretion (and reabsorption), proximal tubular excretion and glomerular filtration were ascertained by monitoring concentration of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ions p-aminohippuric acid and inulin in each fraction. The concentration of creatinine was monitored as a parameter of urine concentration.

No specific peak of L-105 was recognized in the phase of p-aminohippuric acid excretion nor in the entire phase of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  reabsorption in dogs. After pretreatment of probenecid (30 mg/kg), the peak of p-aminohippuric acid disappeared while the stop-flow pattern of L-105 remained virtually unchanged. These findings suggested that the renal excretion of L-105 took place mainly through glomerular filtration in dogs.