

## Cefodizime sodium(THR-221)の蛋白結合に関する研究

吉田昌彦・松下 仁・黒川恭子・丸伝 章・川口安郎

大鵬薬品工業株式会社開発研究所・安全性研究所

Cefodizime sodium(THR-221)の血清蛋白および組織蛋白との結合について詳細な検討を行い、次のような結果を得た。

THR-221の各種動物血清における蛋白結合率は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ヒトでそれぞれ91.8, 97.7, 98.8, 60.8, 94.0, 86.0%と、イヌ以外の動物で高い傾向を示した。

THR-221のヒト血清蛋白結合画分を平衡ゲル濾過法を用いて測定し、アルブミン画分であることを推定した。

THR-221の4%ヒト血清アルブミンでの結合定数、最大結合数を specific and nonspecific model に従い解析した結果、特異的結合 site の結合定数( $K_s$ )と最大結合数( $N_s$ )はそれぞれ $6.30 \times 10^3 M^{-1}$ 、1.42であり、他の抗生物質と比較して弱い親和性を示した。

THR-221のヒト血清蛋白に対するビリルビン競合性は正常時または病態時において、サリチル酸、CPZ, LMOX に比較して弱く、CEZ とほぼ同等の強さであった。

THR-221の25%ラット組織105000 g 上清を用いた組織蛋白結合率は、肺、肝、腎でそれぞれ8.9, 11.7, 13.1%であり、CEZ の2.3倍、1.6倍、21.8倍の結合性を示した。また全ての組織において、THR-221は CTRX と類似しているかわずかに高い結合性を示した。

ペニシリン系やセファロsporin系抗生物質についても血清蛋白や組織蛋白との結合に関する種々の報告<sup>1-3)</sup>がなされており、薬効の持続性、副作用、組織移行性などの面から近年特に注目されるようになった。今回著者らは、ヘキスト社(西独)とルセル社(仏)で合成開発<sup>4)</sup>された新しい注射用第三世代セフェム系抗生物質 Cefodizime sodium(THR-221), disodium(-)-(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[[[5-(carboxylatomethyl)-4-methyl-2-thiazolyl]thio]methyl]-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylate の各種動物の血清蛋白結合率、ヒト血清蛋白結合画分、ヒト血清アルブミンとの結合様式(結合定数、最大結合数の算出)、ビリルビンとの競合性、組織蛋白との結合性について検討を行った。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

抗生物質として THR-221(ヘキスト), Cefotetan(CTT: 山之内), Cefoperazone(CPZ: 富士化学), Cefazolin(CEZ: 藤沢薬品), Latamoxef(LMOX: 塩野義製薬), Cefotaxime(CTX: ヘキスト・ジャパン), Ceftriaxone(CTRX: 日本ロシュ), Cefmetazole(CMZ: 三共)を用いた。

また他にサリチル酸(和光純薬), アセチルサリチル酸(和光純薬), 過酸化水素水(純正化学), ビリルビン(東

京化成), Peroxidase(Type 1 Horseradish M.W. 40000: SIGMA), ヒト血清アルブミン(HSA, Fraction V: SIGMA), ヒト $\gamma$ -グロブリン(HGG, SIGMA), イヌ血清アルブミン(DSA, Fraction V: SIGMA)を用いた。

## 2. 使用血清

使用血清はヒトでは健康成人男子より、また各種動物ではラット(Wistar系, 雄), マウス(ICR系, 雄), ウサギ(日本白色種, 雄), イヌ(ビーグル, 雄), サル(赤毛ザル, 雄)より採血し、分離した血清をそれぞれ混合して用いた。

## 3. 血清蛋白結合率の測定

血清9容に対して、薬剤濃度が最終的に $100 \mu\text{g/ml}$ となるように Phosphate buffered isotonic saline(PBS, 1/15 M リン酸緩衝液(pH 7.4)+50 mM NaCl)を用いて調整した薬液1容を加え、25°Cで1時間 incubate した後、MPS-3(セントリフリー: Amicon)を用いて遠心限外濾過を行い濾液中の薬剤濃度を測定し、この測定値をX、対照としてPBSで同様の処理を行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. ヒト血清蛋白結合画分の推定

高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)により、カラム(TSKgel G 3000 SW: 東洋ソーダ)を予め $100 \mu\text{g/ml}$ のTHR-221を含むPBSで平衡化し、PBSで10倍希釈した

ヒト血清100  $\mu$ l を供与し、流速0.7 ml/min で溶出し、蛋白の吸収がほとんど関与しない310 nm で検出した。装置はLC-3 A(島津)、検出器はSPD-6 AV(島津)を用いた。なお、ヒト血清蛋白標品として5 mg/ml の濃度となるようにPBSで調整したヒト血清アルブミン(HSA)、ヒト $\alpha$ -グロブリン(HGG)溶液を用いた。

#### 5. 蛋白結合定数と最大結合数の測定

各種濃度の薬物を4% HSA 溶液( $5.8 \times 10^{-4}$  M)中にPBSで調製し、25°Cで1時間 incubate した後、遠心限外濾過法を用いて遊離薬剤濃度を測定し、同時にアルブミンに結合した薬剤濃度を算出した。アルブミンの特異的および非特異的結合を考慮し<sup>5)</sup>、下式に基づきTAIRAらの方法<sup>6)</sup>に従って、コンピューター(NEC 9801)を用いて結合定数( $K_s$ ,  $K_{ns}$ )と最大結合数  $N_s$  を解析した。

$$R/F = N_s K_s - K_s R_s + K_{ns}$$

F : 遊離薬剤濃度(M)

R : アルブミン1分子当たり結合する薬剤の結合量(moles/mole)

$K_s$  : specific site の結合定数

$K_{ns}$  : non-specific site の結合定数

$N_s$  : アルブミン1分子当たりの specific site の最大結合数

#### 6. ビリルビンとの競合性

小児期の血清アルブミン濃度の正常値域は3.1~5.1 g/dl であり<sup>7)</sup>、非抱合型ビリルビン濃度は平均0.34 mg/dl とされている。新生児溶血性疾患、新生児黄疸患者における非抱合型ビリルビン濃度は8~10 mg/dl である<sup>8)</sup>。これらの事実に基づき、今回の実験条件として、アルブミンおよびビリルビン濃度を

- 1) 両者正常値域
- 2) 正常アルブミン濃度で高ビリルビン濃度
- 3) 低アルブミン濃度で正常ビリルビン濃度

の三条件を重栖らの方法<sup>9)</sup>に従って設定した。

R. BRODERSEN の酵素法<sup>10)</sup>に従い、HSA 溶液中の遊離ビリルビンを  $H_2O_2$  と Peroxidase によって酸化する方法を用いた。すなわち、HSA 水溶液(6.96 g/dl または 1.74 g/dl)100 ml にビリルビン水溶液(7.59 mg/ml または 0.759 mg/ml)の2.5 ml を混和し、その混液1.5 ml に1/7.5 M リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解した薬剤溶液を同容量加えた後、 $H_2O_2$  (1.75 mM 水溶液)100  $\mu$ l を滴下し、37°Cで3分間 incubate した。次に Peroxidase (381 nM 水溶液)100  $\mu$ l を加えて、直ちに460 nm における1分間当たりの吸光度変化を吸光度計 UV-3200(日立)にて測定した。

また、両者正常濃度時の混液と各抗生物質溶液を同容量混和し、37°Cで1時間 incubate した後、MPS-3を用

いて遠心限外濾過を行い結合率を測定した。

#### 7. 組織蛋白結合率の測定

村川らの方法<sup>11)</sup>を若干変更して行った。すなわち、雄性ラットを断頭瀉血して充分放血した後、直ちに下大静脈から冷却した生食約25 ml を注入して血液を可能な限り排除した。肺、肝、腎を摘出後、肝臓においては、さらに洗瓶を用いて血液を排除した。摘出臓器に2倍量のPBSを加え、テフロン製 homogenizer(岩城硝子)を用いて1/3組織 homogenate を作成した。さらに遠心分離(9000 g  $\times$  30 min ; 日立 20 PR-52)、続いて超遠心分離(105000 g  $\times$  60 min ; 日立 65 P-7)を行い、1/3組織105000 g 上清(S-105 Fraction)を調製した。

組織105000 g 上清3容に対し薬液1容を加え、薬剤濃度が最終的に100  $\mu$ g/ml となるように調整し、0°C、1時間 incubate した後、MPS-3を用いて遠心限外濾過を行い濾液中の薬剤濃度を測定し、3項の方法に従って結合率を求めた。なお、105000 g 上清の蛋白濃度は Lowry 法<sup>12)</sup>に従って測定した。

#### 8. 薬剤濃度測定法

HPLC によって測定した。HPLC 系として、装置および検出器は4項と同様のものを使用した。またオートサンプラーは Waters 710 B型サンプルプロセッサーを使用し、全ての測定は室温にて行った。THR-221, CTX, CEZ, CMZ については、カラムは  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (3.9 ID  $\times$  300 mm, Waters) を用いて、移動相 1/15 M  $NaH_2PO_4$  (pH 3.5)/15%  $CH_3CN$  で流速1.0 ml/min にて検出波長254 nm、検出感度0.01 a.u.f.s. で測定を行った。CPZ については、移動相1/15 M  $NaH_2PO_4$  (pH 3.5)/20%  $CH_3CN$  を使用した以外は同一条件で行った。CTT については、移動相1/15 M  $NaH_2PO_4$  (pH 3.5)/10%  $CH_3CN$  で検出波長280 nm を使用した以外は同一条件で行った。CTR については市原らの報告<sup>13)</sup>に従い測定した。

## II. 結果ならびに考察

### 1. 各種動物の血清蛋白結合率

各種動物の血清蛋白結合率を Table 1 に示す。THR-221 の血清蛋白結合率は、マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒトでそれぞれ91.8, 97.7, 98.8, 94.0, 86.0% と高い傾向を示したが、イヌでは60.8%と比較的低く、岡田らの報告<sup>14)</sup>と一致した。THR-221 の高い結合率は各種動物の長い生物学的半減期( $T_{1/2\beta}$ )<sup>15)</sup>とよく相関しており、血中動態を反映する一要因であると思われる。

### 2. ヒト血清蛋白結合画分の推定

ヒト血清蛋白結合画分を高速ゲル濾過カラムを用いた平衡ゲル濾過法にて測定した結果を Fig. 1 に示す。HS-A および HGG の保持時間はそれぞれ24.7~24.9 および

22.7 min であり、平衡ゲル濾過法により、THR-221のヒト血清蛋白結合画分はアルブミンであることが推定された。

### 3. 蛋白結合定数と最大結合数の測定

各種薬剤の血清蛋白結合率が薬剤濃度によってどのように変化するかを4% HSA および DSA 溶液を用いて検討した。その結果を Fig. 2 に示す。薬剤濃度100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  での蛋白結合率は、HSA では THR-221, CPZ, CTRX, CTT, CEZ が約85~90%と高く、次に CMZ が約70%で、CTX が約25%と低い値を示した。また DSA では薬剤濃

度100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の時、THR-221が約65%と HSA に比べ低い結合率を示した。また薬剤濃度の増加に伴う結合率の低下が認められた。

Specific and non-specific binding model による解析値は、Scatchard model で2種類のサイトが存在すると仮定して解析した値と比較した場合、最大結合数は整数値に近くしかも相関係数も良いことから、以後この model を用いて結合定数( $K_s$ ,  $K_{ns}$ )と最大結合数( $N_s$ )を解析した。その結果を Table 2 に示す。非特異的結合部位の結合定数  $K_{ns}$  はいずれも極めて小さく、結合に関する寄

Table 1 Protein binding rates of THR-221, CTT, CTX, CEZ and CTRX with human and animal sera

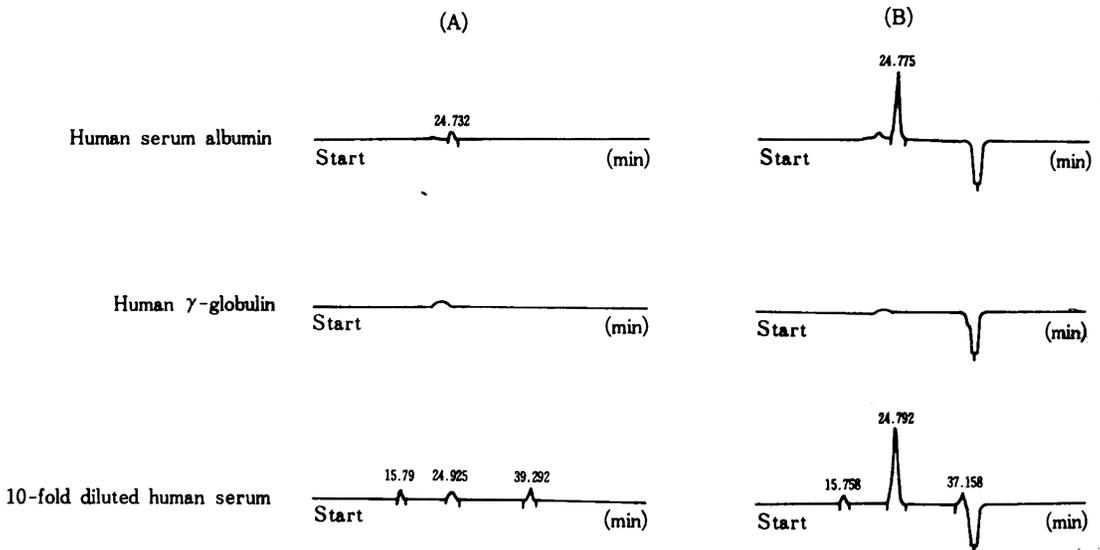
Drug	Binding rate (%)					
	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Monkey	Human
THR-221	91.8	97.7	98.8	60.8	94.0	86.0
CTT	43.1	65.0	45.9	58.8	88.9	93.1
CTX	47.3	63.6	77.4	22.6	54.8	40.1
CEZ	59.2	83.6	83.5	25.9	89.9	87.4
CTRX	68.3	85.2	87.5	15.7	94.0	92.7

Centrifugal ultrafiltration : MPS-3 (Amicon) ; 1000G  $\times$  15min

Incubation : Room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$ ) , 60min

Serum concentration of antibiotic : 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Fig. 1 Gel filtration chromatograms of human serum albumin, human  $\gamma$ -globulin and 10-fold diluted human serum



Column : TSK gel G3000SW (7.5mmID  $\times$  600mm)

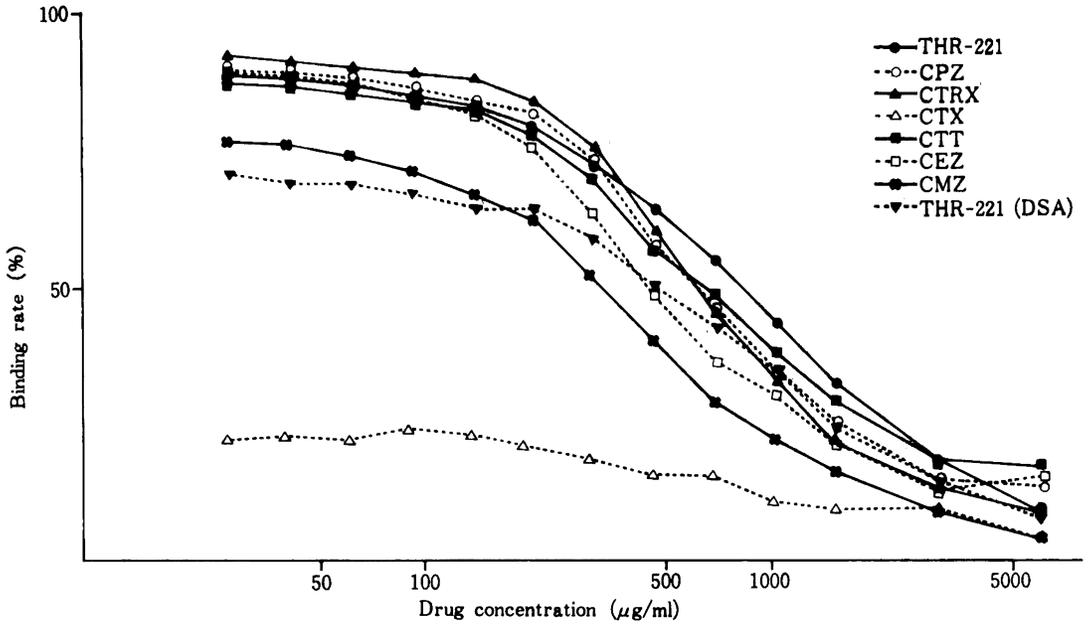
Wave-length : 310 nm

Flow rate : 0.7 ml/min

Mobile phase : (A) 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 50 mM NaCl

(B) 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4) + 50 mM NaCl + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  THR-221

Fig. 2 Effect of drug concentration on protein binding of antibiotics



Human serum albumin (HSA) and dog serum albumin (DSA) concentration : 4 %  
 Method : Centrifugal ultrafiltration

Table 2 Parameters for binding of antibiotics to human serum albumin (HSA) or dog serum albumin (DSA) according to the specific and non-specific binding model

Drugs	Protein	Binding parameter		
		Ns	Ks (M <sup>-1</sup> )	Kns (M <sup>-1</sup> )
THR-221	HSA	1.42	6.30 × 10 <sup>3</sup>	12
THR-221	DSA	1.12	3.75 × 10 <sup>3</sup>	46
CTT	HSA	1.02	1.07 × 10 <sup>4</sup>	166
CEZ	HSA	0.93	1.49 × 10 <sup>4</sup>	126
CTRX	HSA	0.79	2.69 × 10 <sup>4</sup>	83
CPZ	HSA	0.84	1.75 × 10 <sup>4</sup>	92
CMZ	HSA	0.83	7.01 × 10 <sup>3</sup>	9
CTX	HSA	0.50	1.13 × 10 <sup>3</sup>	45

Protein concentration : 4% (5.8 × 10<sup>-4</sup>M)

Incubation : Room temperature (25°C), 60min

Method : Centrifugal ultrafiltration

与はほとんどないように思われた。特異的結合部位の結合定数  $K_s$  は CTRX が最も大きかった。一方、THR-221 は  $6.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  と他の抗生物質と比較すると小さく、アルブミンとの親和性は弱いものと思われた。ところが THR-221 の最大結合数  $N_s$  は 1.42 であり、1-2 個の THR-221 が特異的結合部位に結合するものと思われた。THR-221 の血清蛋白結合率が高いのは、結合数が他の抗生物質よりも多いためと推察した。また、DSA の THR-221 の結合定数  $K_s$  および最大結合数  $N_s$  は HSA に比べ小さく、イヌにおいて血清蛋白結合率が低い結果とよく一致していた。

4. ビリルビンとの競合性

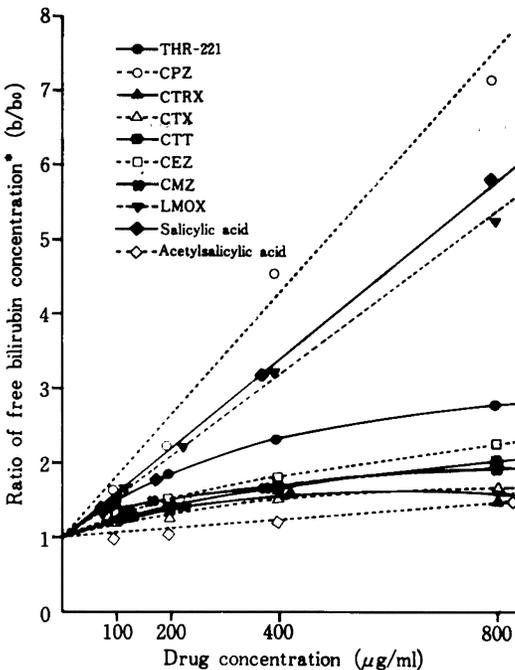
アルブミン・ビリルビン濃度が正常値域の条件、すなわち、アルブミン濃度 3.48 g/dl、ビリルビン濃度 0.922 mg/dl、(アルブミン:ビリルビンのモル比=32:1) の条件で検討した結果を Fig. 3 に示す。薬剤濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  での遊離ビリルビン量比は薬剤無添加時の 0.97~1.69 倍で、ビリルビン遊離作用は軽微であった。薬剤濃度 800

$\mu\text{g/ml}$  での遊離ビリルビン量比は、CPZ で薬剤無添加時の 7.12 倍、サルチル酸で 5.78 倍、LMOX で 5.18 倍と高く、次に THR-221 (2.76 倍)、CEZ (2.22 倍)、CTT (2.03 倍)、CMZ (1.90 倍)、CTX (1.65 倍)、CTRX (1.48 倍)、アセチルサルチル酸 (1.48 倍) の順であった。

高ビリルビン濃度条件、すなわち、アルブミン濃度 3.48 g/dl、ビリルビン濃度 9.22 mg/dl (アルブミン:ビリルビンのモル比=3:1) の条件で検討した結果を Fig. 4 に示す。薬剤濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  での遊離ビリルビン量比は薬剤無添加時の 0.90~1.76 倍と軽微であった。薬剤濃度 800  $\mu\text{g/ml}$  での遊離ビリルビン量比はサルチル酸で薬剤無添加時の 7.88 倍、CPZ で 4.91 倍と高く、次に CEZ (3.79 倍)、LMOX (3.68 倍)、CTRX (3.56 倍)、THR-221 (3.29 倍)、CTT (3.13 倍)、CMZ (1.94 倍)、アセチルサルチル酸 (1.52 倍)、CTX (1.06 倍) の順であった。

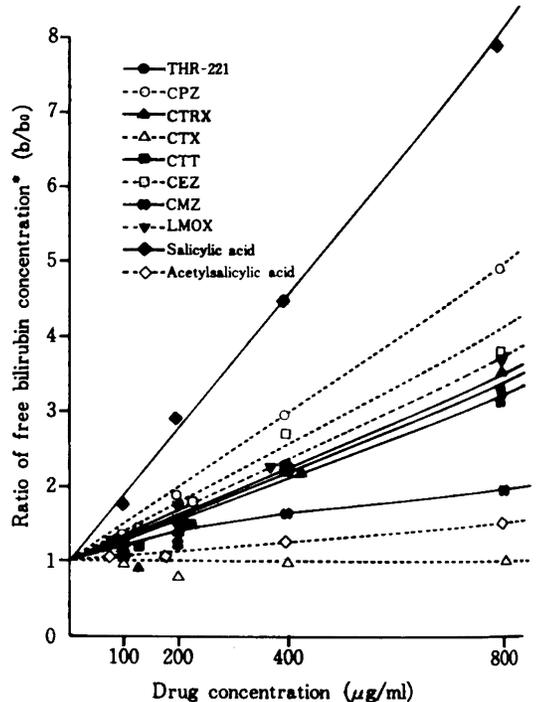
低アルブミン濃度条件、すなわち、アルブミン濃度 0.87 g/dl、ビリルビン濃度 0.922 mg/dl (アルブミン:ビリルビンのモル比=8:1) の条件で検討した結果を Fig.

Fig. 3 Displacing effect of antibiotics on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)



\* : Using enzyme oxidation in the presence of normal human serum albumin (3.48 g/dl, 504  $\mu\text{M}$ ) and normal bilirubin (0.922 mg/dl, 15.8  $\mu\text{M}$ )

Fig. 4 Displacing effect of antibiotics on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)



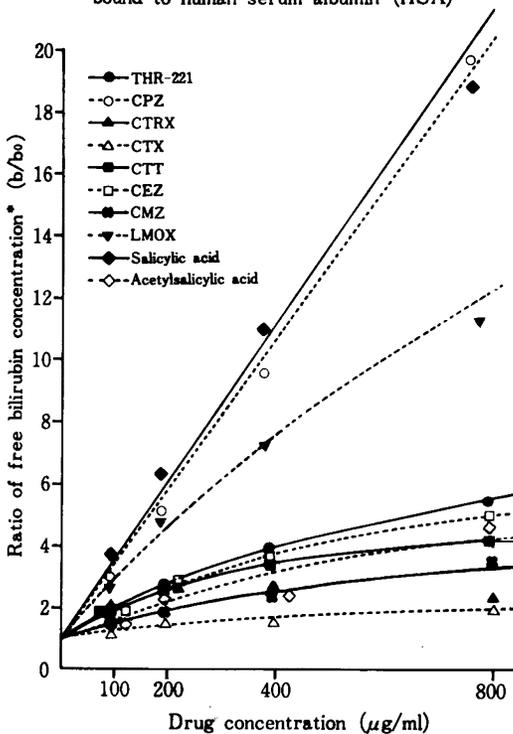
\* : Using enzyme oxidation in the presence of normal human serum albumin (3.48 g/dl, 504  $\mu\text{M}$ ) and high bilirubin (9.22 mg/dl, 157.7  $\mu\text{M}$ )

5に示す。薬剤濃度100  $\mu\text{g/ml}$ での遊離ビリルビン量比はサリチル酸, CPZ, LMOXで薬剤無添加時の約3倍, 他のセフェム系薬剤は2倍以下の値を示した。薬剤濃度800  $\mu\text{g/ml}$ での遊離ビリルビン量比はCPZで薬剤無添加時の19.61倍, サリチル酸で18.73倍, LMOXで11.25倍, THR-221(5.40倍), CEZ(4.98倍), アセチルサリチル酸(4.67倍), CTT(4.15倍), CMZ(3.39倍), CTRX(2.30倍), CTX(1.98倍)の順であった。

従って, THR-221のビリルビンとヒト血清アルブミン結合に対する競合性は三条件下において, サリチル酸, CPZ, LMOXと比較して弱く, CEZとはほぼ同等であった。臨床用量から考えると薬剤濃度100  $\mu\text{g/ml}$ でのビリルビン遊離作用は軽微であり, またCEZについても臨床投与量での核黄疽の危険性は極めて少ないと考えられる<sup>19)</sup>ことから, THR-221を臨床使用上蛋白結合型ビリルビンを遊離させる可能性は少ないものと推察された。

また, 正常値域条件での各抗生物質濃度を100, 800  $\mu\text{g/ml}$ として結合率を求めた結果をTable 3に示す。抗

Fig. 5 Displacing effect of antibiotics on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)



\* : Using enzyme oxidation in the presence of low human serum albumin (0.87 g/dl, 126  $\mu\text{M}$ ) and normal bilirubin (0.922 mg/dl, 15.8  $\mu\text{M}$ )

生物質濃度100  $\mu\text{g/ml}$ の時の結合率は高い順に CTRX (90.3%), CTT (84.1%), CMZ (79.4%), THR-221 (76.4%), CEZ (60.6%), CPZ (42.2%), CTRX (27.9%)であった。抗生物質濃度800  $\mu\text{g/ml}$ の時の結合率は高い順に THR-221 (46.9%), CTT (35.6%), CTRX (32.8%), CPZ (25.4%), CMZ (22.2%), CEZ (20.9%), CTRX (13.9%)であった。ビリルビンの結合定数は  $K=7 \times 10^7$  ( $n=1$ )であり強い結合性を示すが<sup>17)</sup>, 正常アルブミン-正常ビリルビン条件下(アルブミン:ビリルビンのモル比=32:1)での結合率はHSAとの結合率とほぼ一致していたが, CPZについては低い結合率を示した。このことはCPZがビリルビンと同じ結合サイトを有しているため, 結合性の高いビリルビン( $K=7 \times 10^7$ )が, それに比較して弱いCPZ( $K=1.75 \times 10^4$ )の結合を拮抗的に阻害していることが考えられた。

ビリルビンはHSAのLys 240と高い親和性で結合し<sup>18)</sup>, 塩結合の関与が考えられるが, ビリルビン遊離作用の強さはサルチル酸, CPZ, LMOXが特に強く, それらの構造の類似性からみると, 一価のカルボン酸と一価のフェノール性OHを有している点だと考えられた。またフェノール性OHがマスクされたアセチルサリチル酸のビリルビン遊離作用は極めて弱いことから, 特にフェノール性OHがビリルビン結合部位との結合に強く関与していることが示唆された。この結果は, アルブミンとフェノール系誘導体の選択的結合を指摘しているJUDISの報告と一致した<sup>19)</sup>。

ところが, ビリルビンと同じく二価のカルボン酸を有しているLMOX, THR-221, CTTはビリルビン遊離作用に差異が認められ, また3位側鎖にチオメチルテトラゾール基を有しているCPZ, LMOX, CTT, CMZにも差異が認められ, また7位側鎖にsynメトキシミノチアゾール基を有しているTHR-221, CTRX, CTXにも差異が認められ, これらの薬物の側鎖構造と遊離作用との間に共通した相関性は認められなかった。

#### 5. 組織蛋白との結合率

細胞質蛋白画分である25%組織homogenateのS-105 Fractionには, 有機酸結合蛋白であるLigandinが存在し, 肝においてビリルビン等の代謝に関与し, 腎, 小腸などの組織にも存在するといわれている<sup>20)</sup>。またCEZはアルブミンよりも肝Ligandinと強く結合することが報告されており<sup>11)</sup>, S-105 Fractionの結合性をCEZを対照にして比較検討することは, 組織移行性との相関を考えると重要であると思われる。そこで, 25%組織homogenate S-105 Fraction中での各種抗生物質の結合率を比較検討した結果をTable 4に示す。THR-221は肺でCEZの2.3倍, 肝で1.6倍, 腎で21.8倍の結合性を示し,

Table 3 Protein binding rates and displacing effects of antibiotics on bilirubin bound to human serum albumin (HSA)

Drug	Drug concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	100		800	
	Binding rate (%)	b/b <sub>0</sub> *	Binding rate (%)	b/b <sub>0</sub> *
THR-221	76.4	1.48	46.9	2.76
CTRX	90.3	1.24	32.8	1.48
CTX	27.9	1.19	13.9	1.65
CPZ	42.2	1.61	25.4	7.12
CEZ	60.6	1.31	20.9	2.22
CMZ	79.4	1.35	22.2	1.90
CTT	84.1	1.29	35.6	2.03

\* : Using enzyme oxidation in the presence of normal human serum albumin (3.48 g/dl, 504  $\mu\text{M}$ ) and normal bilirubin (0.922 mg/dl, 15.8  $\mu\text{M}$ )

Table 4 Protein binding rates (%) of antibiotics and protein contents (mg/g tissue) in several 25% tissue 105000 g supernatant fractions of rats

Drug	25% tissue 105000 g supernatant fractions		
	Lung	Liver	Kidney
THR-221	8.9	11.7	13.1
CTT	2.5	10.9	10.2
CEZ	3.9	7.2	0.6
CTRX	7.3	11.3	9.0
Cytosol protein contents (mg/g tissue)	37.5	60.8	55.4

Centrifugal ultrafiltration : 1000 g  $\times$  20 min

Incubation : In ice (0°C), 60 min

Concentration of antibiotic : 100  $\mu\text{g/ml}$

また全ての組織で CTRX と類似しているかまたはわずかに高い結合性を示し、KLESEL らの組織移行性の結果<sup>21)</sup>とよく一致していた。また、25%組織 homogenate S-105 Fraction を用いて LOWRY 法により測定した各組織中細胞質蛋白含量は肺、肝、腎でそれぞれ 37.5、60.8、55.4 mg/g tissue であり、THR-221 は肺において蛋白含量が少ないにもかかわらず高い結合率を示した。以上の結果より、THR-221 の組織移行性が良好であるのは組織中蛋白結合率が高いことが一要因であると推察された。Ligandin が塩基性のグルタチオン S-トランスフェラーゼの分子種であり、肺においてグルタチオン S-トランスフェラーゼの分子種が発見されていること<sup>22,23)</sup>、また、THR-221 が二価のカルボン酸を有していて CEZ よりも組織蛋白との親和性が強いことなどから、Ligandin 以

外の有機酸結合蛋白が存在し、組織移行に関与している可能性も示唆された。

### Ⅲ. 謝 辞

稿を終えるに当たり、結合定数・最大結合数の算出について種々の御教示、御助言を賜りました徳島大学薬学部 寺田 弘教授ならびに徳島文理大学薬学部 平良全栄助教授に深甚なる感謝の意を捧げます。

### 文 献

- 1) CRAIG, W. A & WELLING, P. G. : Protein Binding of Antimicrobials Clinical Pharmacokinetic and Therapeutic Implication. Clin Pharmacokin 2 : 252~268, 1977

- 2) CRAIG, W. A. & KUNIN, C. M. : Significance of Serum Protein and Tissue Binding of Antimicrobial Agent. *Annu Rev Med* 27 : 287~300, 1976
- 3) KORNGUTH, M. L. ; MONSON, R. A. & KUNIN, C. M. : Binding of antibiotics to soluble protein from rat liver. *J. Infectious Diseases* 129 ( 5 ) : 552~558, 1974
- 4) JURGEN, B., et al : Cefodizime, an aminothiazolyl-cephalospolin V. synthesis and structure-activity relationships in the cefodizime series. *J. Antibiotics* 40 : 29~42, 1987
- 5) 青木幸一郎, 高木俊夫, 寺田 弘, 他 : 血清アルブミン。講談社サイエンティフィック : 86~89, 1984
- 6) TAIRA Z. & TERADA H. : Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochemical Pharmacology* 34 : 1999~2005, 1985
- 7) 河合 忠 : 総蛋白・蛋白分画。日本臨床 34(秋期増刊号) : 1812~1820, 1976
- 8) 岩波文門 : ビリルビン(小児科領域)。日本臨床 34(秋期増刊号) : 1964~1970, 1976
- 9) 重柄幹夫, 藤本和巳 : ビリルビン-アルブミン結合に対する Cefotaxime の競合について。 *Chemotherapy* 30 : 189~192, 1982
- 10) BRODERSEN, R. : Competitive binding of bilirubin and drugs to human serum albumin studied by enzymatic oxidation. *J. Clin. Invest.* 54 : 1353~1364, 1974
- 11) 村川武雄, 岡田直彦, 坂本 博, 西田 実 :  $\beta$ -lactam 抗生物質の組織結合に関する研究(2)ラット肝組織の cefazolin の結合因子について。 *Chemotherapy* 26 : 819~823, 1978
- 12) LOWRY, O. H. ; BOSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDOL, R. J. : Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275, 1951
- 13) 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) : 165~168, 1984
- 14) 岡田直彦, 坂本 博, 中本昭治, 横田好子, 村川武雄, 西田 実 : Cephalospolin 類の動物組織 Paste との結合について。 *Chemotherapy* 25 : 392~396, 1977
- 15) 松下 仁, 吉田昌彦, 佐川久美子, 丸中照義, 松島英司, 入村兼司, 川口安郎 : Cefodizime sodium (THR-221)の実験動物における体内動態。 *Chemotherapy* 投稿中
- 16) 地蔵本博章, 岩田辰雄, 栗山 馨, 紺野昌俊, 藤井良知, 生方公子, 齊藤洪水 : 各種抗生物質の蛋白結合と新生児高ビリルビン血症との関係(第一報)円2色性測定による基礎的研究。 *Chemotherapy* 25( 4 ) : 639, 1977
- 17) 青木幸一郎, 高木俊夫, 寺田 弘, 他 : 血清アルブミン。講談社サイエンティフィック : 123, 1984
- 18) JACOBSEN, C. : Lysine residue 240 of human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin. *Biochem. J.* 171 : 453~459, 1978
- 19) JUDIS, J. : Binding of selected phenol derivatives to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.* 71 : 1145~1147, 1982
- 20) FLEISCHNER, G. ; MISHKIN, S., REVES, H., ROBBINS, J., LEVI, A. J., GATMAITAN, Z. & ARIAS, I. M. : On the structure and function of Y protein. *J. Clin. Invest.* 50 II : 31 a, 1971
- 21) KLESEL, N. ; LIMBERT, M., SEEGER, K., SEIBERT, G., WINKLER, I. & SCHRINNER, E. : Cefodizime, an aminothiazolylcephalospolin II . comparative studies on the pharmacokinetic behavior in laboratory animals. *J. Antibiotics* 37 : 901~909, 1984
- 22) 高橋健治, 浅岡一雄 : グルタチオン S-トランスフェラーゼとリガンディン。 *代謝* 17 : 2139~2149, 1980
- 23) 杉山雄一 : 肝上清蛋白リガンディン及びグルタチオン S-トランスフェラーゼの薬物解毒過程におけるマルチファンクショナルな役割の解明。 *薬学研究所の進歩研究成果報告集* 2 : 58~79, 1986

## PROTEIN BINDING OF CEFODIZIME(THR-221)

MASAHIKO YOSHIDA, HITOSHI MATSUSHITA, KYOKO KUROKAWA, AKIRA MARUDEN and YASURO KAWAGUCHI  
Research Institute, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

We investigated the binding to serum and tissue proteins of cefodizime(THR-221) with the following results.

Serum protein binding rates of THR-221 were high in man, monkey, rabbit, rat and mouse, but not in dog. Our equilibrated gel filtration results suggest that the THR-221 binding fraction in human serum is albumin.

Using specific and non-specific models, we found that the binding constant( $K_s$ ) and maximum binding number( $N_s$ ) for THR-221 in human serum albumin were  $6.30 \times 10^9 M^{-1}$  and 1.42. The affinity of THR-221 to human serum albumin was relatively lower than that of other antibiotics.

The displacing effect of THR-221 on bilirubin bound to human serum albumin was similar to that of CEZ but weaker than those of salicylic acid, CPZ and LMOX.

The binding rates of THR-221 in  $105000 \times g$  supernatants of 25% lung, liver and kidney homogenates were 8.9, 11.7 and 13.1%, and superior to those of other drugs.