

新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の血清蛋白結合に関する研究

保田 隆・渡辺泰雄・林 敏雄・北山理恵子

富山化学工業株式会社総合研究所*

T-3262 の血清蛋白結合に関する検討を行い、以下の結果を得た。

T-3262 のヒト血清蛋白結合率は 1~10 $\mu\text{g/ml}$ では 35.8~39.9% であり、その結合は可逆的であった。

pH 7.0, 7.4 および 8.0 における T-3262 (2 $\mu\text{g/ml}$) のヒト血清との結合率は、それぞれ 15.5, 37.4 および 71.5% であり、pH の上昇に伴って上昇した。また本剤の結合率は血清蛋白濃度の増加に伴っても上昇した。

ラット、ウサギおよびヒトに T-3262 を経口投与した時の *in vivo* 結合率は、それぞれ 56.1, 45.7 および 40.5% であり *in vitro* 結合率と近似していた。

Key words : T-3262, 血清蛋白結合

T-3262 は富山化学工業(株)総合研究所で新しく開発されたピリドンカルボン酸系の抗菌剤で Fig. 1 に示すような化学構造を有する。本剤はグラム陽性、グラム陰性菌ならびに嫌気性菌に対し広範囲なスペクトルと強い抗菌活性を有し、その抗菌作用は殺菌的である¹⁾。T-3262 の各種動物血清に対する結合率はすでに報告²⁾されているが、今回 T-3262 の血清蛋白結合の可逆性、pH の影響、*in vivo* での結合率、代謝物の結合等について検討したので、その成績を報告する。

を、また norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), enoxacin (ENX) および nalidixic acid (NA) は市販品を抽出したものを、用時 1/10 N 水酸化ナトリウム溶液に溶解し、蒸留水で希釈して用いた。ただし T-3262 濃度は T-3262 base の濃度で表示した。

2. 使用動物

ラット：Wistar 系，雄，体重 204~237 g

ウサギ：日本白色在来種，雄，体重 3.10~3.35 kg

3. 使用血清

ヒト血清はプール血清を用い、用時、炭酸ガスで pH 7.0, 7.4 または 8.0 に調整して用いた。

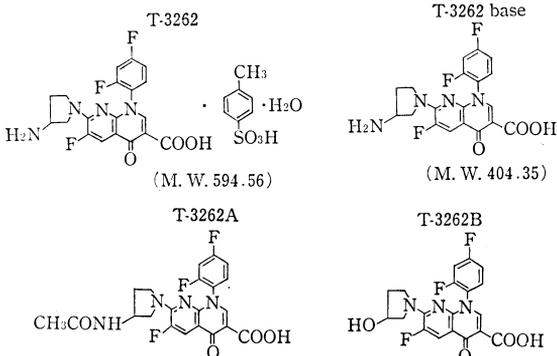
4. 血清蛋白結合率の測定法

遠心限外ろ過法³⁾を用いて測定した。薬液 1 容を血清 9 容に加え、37°C, 1 時間インキュベートした後、セルロースチューブ (Visking Company : サイズ 8/32) に入れ、1,000×g, 30 分間遠心した。ろ液中の薬剤濃度を測定し、この値を X, 対照として 1/15 M リン酸緩衝液 (P.B. : pH 7.0, 7.4 または 8.0) 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。

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

5. 可逆性の検討

血清蛋白結合の可逆性の検討には平衡透析法⁴⁾を用いた。セルロースチューブ (Visking Company : サイズ 20/32) に内液として薬剤 5 $\mu\text{g/ml}$ 含有のヒト血清 (pH 7.0, 7.4 または 8.0) を入れ、外液の 1/15 M P. B. (pH 7.0, 7.4 または 8.0) 量を種々変化させ (外液



量/内液量=2ⁿ, n=1~5), 4°C, 48時間平衡透析を行い, 外液および内液の薬剤濃度を bioassay で測定した。なお T-3262 の外液中濃度測定には 1/15 M P. B. で, 内液中濃度測定にはヒト血清で作製した標準曲線を用いた。結合率は下式に従って算出した。

$$\text{結合率(\%)} = \frac{(a-b) \times u}{a \times u + b \times v} \times 100$$

a: 内液中の薬剤濃度

b: 外液中の薬剤濃度

u: 内液量

v: 外液量

6. *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, 絶食後, 0.5% メチルセルロース溶液に懸濁した T-3262 を 200 mg/kg 経口投与し経時的に採血した後, 血清を分離した。またヒト血清は, 臨床第1相試験で 150 mg 錠あるいは 300 mg 錠を空腹時経口投与された時のものを用いた。これらの血清は凍結保存し, 用時解凍後炭酸ガスで pH 約 7.4 に調整した。total 濃度は牛血清アルブミンを吸着させたカラム (Develosil ODS-10, Nomura Chemical) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法⁵⁾ で測定した。また血清の一部を Micropartition system MPS-1 (Amicon Corporation) を用いて遠心限外ろ過したろ液中濃度を HPLC で測定し, これを free 体濃度とした。結合率は下式に従って算出した。

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

7. 薬剤濃度測定法

T-3262 の濃度測定は前報⁵⁾に従って Bioassay および HPLC で行なった。

a) Bioassay: T-3262 は *Escherichia coli* Kp 株を検定菌とするペーパーディスク法で測定した。

b) HPLC: 島津 LC-6A ならびに SPD-6A 型を用いた。固定相として Nucleosil 10 C₁₈ (10 μm, 4 mm i. d. × 300 mm, Nagel), 移動相として CH₃CN, 1 M Na₂HC₃H₅O₇ · 1 1/2 H₂O, 10%(v/v) CH₃SO₃H · N(C₂H₅)₃ および H₂O を, T-3262 では, 250:60:100:590, NFLX および OFLX では 200:60:100:640, NA, T-3262 A および T-3262 B では 400:60:100:440, ENX では 160:60:100:680 に混合したのものを用いた。ただし T-3262 の *in vivo* の結合率の検討では 220:60:100:620 に調製したものを用いた。サンプル (20~50 μl) を室温下, 2 ml/min の流速で溶出し 345 nm (ただし NA は 320 nm) で検出した。

8. 蛋白定量

LOWRY⁶⁾ 法により求めた。

II. 結 果

1. 薬剤濃度の影響

T-3262 の血清蛋白結合率に及ぼす薬剤濃度の影響をヒト血清 (pH 7.4) を用いて検討した。ただし T-3262 は *p*-toluenesulfonic acid (PTS) 塩であるので, PTS の影響を検討したところ, その影響は認められなかった。そこで以下の実験はすべて PTS 塩を用いて行った。

Table 1 に示すように T-3262 は 1~10 μg/ml で, 35.8~39.9% の結合率を示し, ほぼ一定であった。T-3262 300 mg をヒトに経口投与した場合, その最高血中濃度は 0.68~1.15 μg/ml⁷⁾ であるので, 以下の蛋白結合の実験は可逆性の検討を除いて T-3262 濃度を 2 μg/ml とした。

2. pH の影響

T-3262, NFLX, OFLX, ENX, NA ならびに T-3262 A および T-3262 B⁸⁾ の血清蛋白結合におよぼす pH の影響を, pH 7.0, 7.4, および 8.0 に調整したヒト血清を用いて検討した。その結果を Table 2 に示す。

Table 1. Effect of T-3262 concentration on serum protein binding

Concentration (μg/ml)	Protein binding rate (%)
10	35.8
5	39.2
2	37.4
1	39.9

Protein: Human serum protein (90%)

pH: 7.4

Assay: HPLC

Table 2. Effect of pH on serum protein binding of T-3262

Drug	Protein binding rate (%)		
	7.0	7.4	8.0
T-3262	15.5	37.4	71.5
Norfloxacin	1.0	10.1	33.1
Ofloxacin	6.0	9.8	27.9
Enoxacin	4.9	8.0	32.7
Nalidixic acid	93.9	95.8	96.3
T-3262A	61.7	63.9	64.5
T-3262B	89.0	94.0	95.7

Protein: Human serum protein

Method: Centrifugal ultrafiltration

Drug concentration: 2 μg/ml

Assay: HPLC

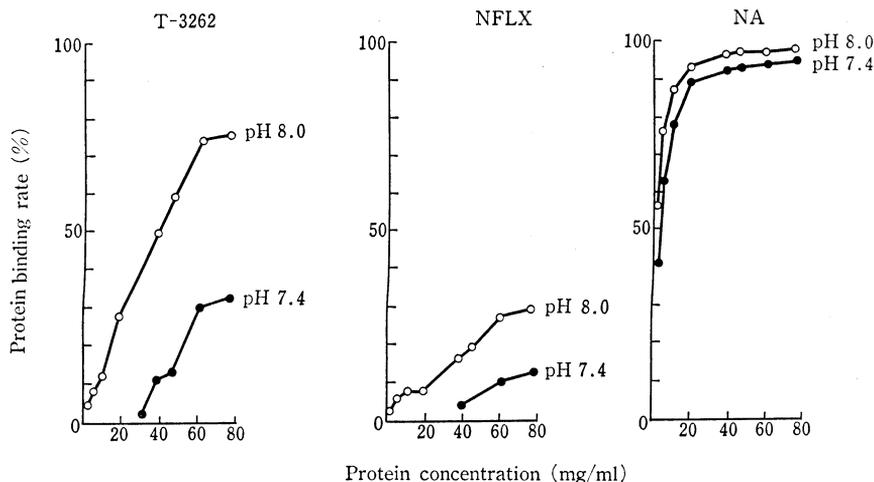


Fig. 2. Effect of human serum protein concentration on protein binding of T-3262, norfloxacin, and nalidixic acid.

T-3262 は pH 7.0, 7.4 および 8.0 でそれぞれ 15.5, 37.4 および 71.5% の結合率を示し, pH が高くなるに従って結合率が上昇した。また NFLX, OFLX および ENX は T-3262 より低い結合率を示したが, T-3262 と同様に pH が高くなるに従って, 結合率が上昇した。一方, NA, T-3262 A および T-3262 B は pH による影響をほとんどうけず, NA では 93.9~96.3%, T-3262 A では 61.7~64.5, T-3262 B では 89.0~95.7% の高い結合率を示した。

3. 蛋白濃度の影響

T-3262, NFLX および NA の蛋白結合に及ぼす蛋白濃度の影響を Fig. 2 に示す。

T-3262 の結合率は pH 7.4, 8.0 とともに蛋白濃度 2~60 mg/ml まで, 蛋白濃度の上昇に伴って徐々に上昇し (pH 7.4 : 1.6~29.4%, pH 8.0 : 3.7~73.7%), 60 mg/ml 以上で平衡に達した。NA の結合率は pH 7.4, 8.0 とともに蛋白濃度 2~19 mg/ml まで, 蛋白濃度上昇

に伴って徐々に上昇し (pH 7.4 : 40.6~88.5, pH 8.0 : 55.7~92.8%), 19 mg/ml 以上で平衡に達した。

4. 可逆性の検討

T-3262 の血清蛋白結合の可逆性について検討した結果を Table 3 に示す。

それぞれの液量比 (外液量/内液量) における結合率を液量比 2 の時の結合率に対する比 (結合比) で表わすと, 液量比 8~32 では液量比が大きくなるに従って結合比は小さくなり, pH に関係なく T-3262 の血清蛋白に対する結合は可逆的であると考えられた。

5. *In vivo* での血清蛋白結合率

T-3262 経口投与後のラット, ウサギおよびヒト血清中の T-3262 total 濃度ならびに free 体濃度を Fig. 3~6 に, 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 0.5 時間で $1.30 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ を示し, 以後ゆるやかに上昇し, 2 時間

Table 3. Effect of volume of outside solution on protein binding of T-3262 in equilibrium dialysis

Ratio of volume ($\frac{\text{outside}}{\text{inside}}$)	pH 7.0		pH 7.4		pH 8.0	
	Binding rate (%)	Binding ratio	Binding rate (%)	Binding ratio	Binding rate (%)	Binding ratio
2	12.1	1.00	30.9	1.00	57.8	1.00
4	11.8	0.98	31.9	1.03	52.5	0.91
8	7.7	0.64	15.8	0.51	29.6	0.51
16	5.7	0.47	14.5	0.47	24.6	0.43
32	2.3	0.19	2.9	0.09	13.1	0.23

Drug concentration : 5 $\mu\text{g/ml}$

Outside solution : 1/15 M phosphate buffer

Inside solution : Human serum

Assay : Bioassay

にピーク値 $2.96 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ を示した後、漸次低下し、6時間では $1.50 \pm 0.19 \mu\text{g/ml}$ を示した。一方 free 体濃度は投与後、0.5、2 および 6 時間でそれぞれ 0.56 ± 0.08 , 1.31 ± 0.09 および $0.73 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ 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 51.6~57.7% であった (Table 4)。ウサギとヒトの場合も、total 濃度と free 体濃度は平行して推移し、結合率はそれぞれ 44.4~49.0% および 35.9~44.6% であった。In vitro の血清蛋白結合率はラットで 51.8%, ウサギで 34.9%, またヒトで 37.4% と報告されており²⁾、今回得られた in vivo の結合率は in vitro 結合率と近似した値を示した。

III. 考 察

血清蛋白結合は体内動態に影響を及ぼす重要な因子であり、従来より血清蛋白結合と体内動態との関係について多くの研究^{9)~12)}がなされてきた。今回、新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の血清蛋白結合について検討した結果、T-3262 の血清蛋白に対する結合は可逆的であり、低濃度では薬剤濃度の影響を受けず、蛋白濃度の上昇に伴って上昇した。また in vivo の血清蛋白結合率は in vitro の結果とほぼ一致しており、これらの成績は我々が以前報告した β -lactam 系抗生剤の知見^{13)~15)}と一致していた。しかしながら、T-3262 ならびに NFLX, OFLX および ENX の血清に対する結合率が血清 pH の上昇に伴って上昇することは、 β -lactam 系抗生剤と異なっており、pH によって影響をうけた理由は 7 位側鎖に塩基性点を有していることが一因として考え

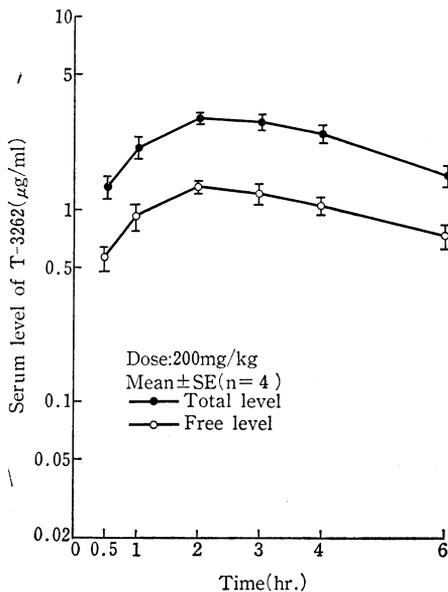


Fig. 3. Serum levels of T-3262 after oral administration of T-3262 in rats.

Table 4. In vivo binding rates of various serums

Serum	Dose	Binding rate (%)*											
		0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	6	8	12	24	
Rat	200 mg/kg	57.0±1.3	57.0±1.5	N.T.	55.9±0.4	N.T.	57.6±2.3	57.7±1.6	51.6±1.7	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Rabbit	200 mg/kg	N.T.	44.8±2.3	N.T.	49.0±4.5	N.T.	45.5±3.3	44.8±3.5	44.4±3.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Human	150 mg	39.1±5.1**	39.0±4.2	37.5±3.0	41.5±2.9	41.5±3.8	39.7±2.2	42.1±2.1	39.9±2.8	40.4±2.2	37.3±3.5	N.D.	N.D.
	300 mg	44.6±0.7***	41.5±1.0	43.2±3.1	43.4±2.1	42.1±3.9	42.4±4.0	43.4±2.8	36.9±1.8	39.5±1.4	35.9±2.4	N.D.	N.D.

* : Mean ± SE (Rat, n = 4 ; Rabbit, n = 3 ; Human, n = 6)
 ** : n = 4
 *** : n = 3
 N.T. : not tested
 N.D. : not determined

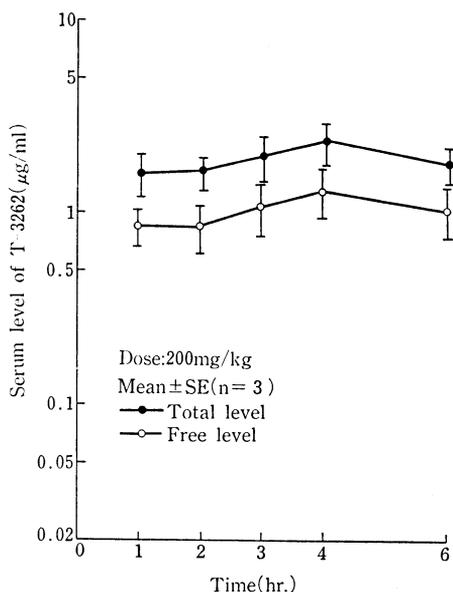


Fig. 4. Serum levels of T-3262 after oral administration of T-3262 in rabbits.

られるが、詳細については今後の課題である。この pH の変動による結合率の変化は T-3262 のみならず、これらピリドンカルボン酸系抗菌剤の Bioassay による血清中濃度の測定に影響を与えると思われるので、血清検体の pH には十分留意する必要がある。

文 献

- 1) 保田 隆, 渡辺泰雄, 四辻 彰, 林 敏雄, 南新三郎, 岡本世紀, 山城芳子, 荒木春美, 伊東優子, 本村桂子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の細菌学的評価。Chemotherapy 36 (S-9): 95~109, 1988
- 2) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 熊野克彦, 高木伸一, 恒田礼子, 金山淳子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の各種動物における吸収・分布・代謝および排泄。Chemotherapy 36(S-9): 149~156, 1988
- 3) REHBERG P B: A centrifugation method of ultrafiltration using cellophan tubes. Acta Physiol Scand 5: 305~310, 1943
- 4) 五味二郎, 青柳昭雄, 小穴正治, 満野嘉造, 河合健, 山田淑江, 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, 1969
- 5) 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 熊野克彦, 恒田礼子, 金山淳子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 36 (S-9): 137~142, 1988
- 6) LOWRY OH, ROSEBROUGHT NJ, FARR AL, RANDALL RT: Protein measurement with the

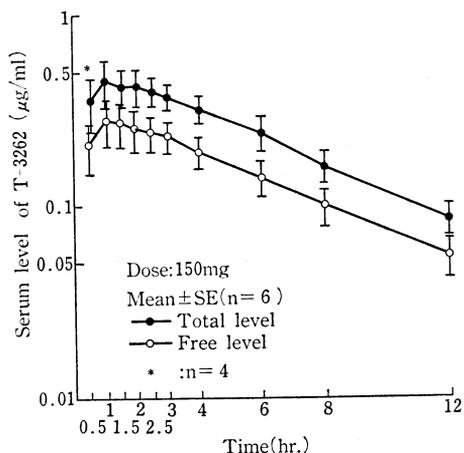


Fig. 5. Serum levels of T-3262 after oral administration of T-3262 in human.

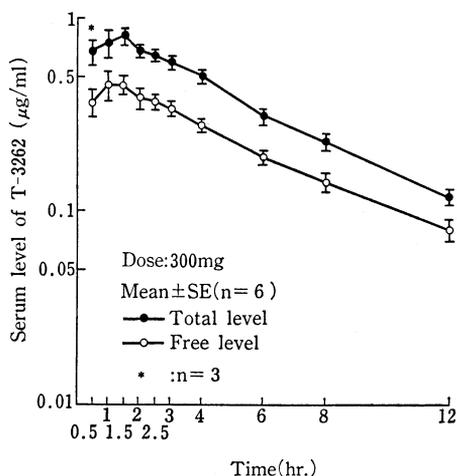


Fig. 6. Serum levels of T-3262 after oral administration of T-3262 in human.

folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265~275, 1951

- 7) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 保田 隆, 渡辺泰雄, 田井 賢: T-3262 の臨床第 I 相試験。Chemotherapy 36(S-9): 158~180, 1988
- 8) 田井 賢, 小西義憲, 杉本由美子, 出町久美子, 前田豊男: ピリドンカルボン酸系抗菌剤の代謝研究 (第 1 報) (±)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1-(2,4-difluorophenyl)-1-4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthylidine-3-carboxylic acid *o*-toluenesulfonate hydrate (T-3262) の尿中代謝物の単離及び同定。Jpn. J Antibiot 投稿中
- 9) WATANABE Y, HAYASHI T, TAKADA R, YASUDA T, SAIKAWA I, SHIMIZU K: Studies on protein binding of antibiotics I. Effect of cefazolin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone. J Antibiot 33 (6)

- 625~635, 1980
- 10) WISE R : Protein binding of beta-lactams : the effect on activity and pharmacology, particularly tissue penetration. I. J Anti-microb Chemother 12 : 1~18, 1983
- 11) CRAIG W A, VOGELMAN B : Changing concept and new applications of antibiotic pharmacokinetics. Am J Med 77 (1 B) 24~28, 1984
- 12) 熊野克彦, 林 敏雄, 北山理恵子, 堀井妙子, 渡辺泰雄, 保田 隆, 才川 勇, 上田 泰 : Cephem系抗生剤の家兎胸水中移行性について。Chemotherapy 35 (2), 99~106, 1987
- 13) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 高田理恵子 : Cefoperazone (T-1551) の蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 28(S-6) : 173~178, 1980
- 14) 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) : 190~196, 1982
- 15) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 熊野克彦, 北山理恵子, 浅井妙子 : 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 34 (S-2) : 115~121, 1986

SERUM PROTEIN BINDING OF T-3262

TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, TOSHIO HAYASHI and RIEKO KITAYAMA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.
2-4-1 Shimookui, Toyama-shi 930, Japan

We studied the extent of the binding of T-3262, a new pyridone-carboxylic acid derivative, to serum protein and obtained the following results.

1. T-3262 bound reversibly to human serum protein, and its binding rates were 35.8-39.9% at concentrations of 1-10 $\mu\text{g/ml}$.
2. T-3262 binding rates to human serum were 15.5% at pH 7.0, 37.4% at pH 7.4 and 71.5% at pH 8.0, showing that the binding rates increased in relation to elevation of the pH. The binding rate of T-3262 also rose with the increase in protein concentration.
3. *In vivo* binding rates of T-3262 after oral administration in rats, rabbits and humans, were 56.1, 45.7 and 40.5%, respectively, which were similar to those obtained *in vitro*.