

ヒト及び動物におけるCefpirome sulfateの蛋白結合 及びビリルビンとのアルブミン結合競合性

田端 滋・志村武貞・前田 巧・林 昌亮
ヘキストジャパン株式会社医薬総合研究所*

小林寅詰
三菱油化ビーシーエル化学療法研究室

齊藤 玲
北海道大学技術医療短大部

*In vitro*及び*in vivo*におけるcefpirome sulfate(CPR)とラット、マウスまたはヒト血清(血漿)蛋白との結合率を対照薬物との間で比較検討を行なうと共に、ヒト血清アルブミンとビリルビンの結合に及ぼす影響を検討した。

*In vitro*におけるCPRとラット血清蛋白との結合率は添加濃度(25~100 µg/ml)及びインキュベーション時間(15~60min)の影響を受けなかった。そこで、添加濃度50 µg/mlにおけるラット及びマウス血清蛋白との結合をceftazidime(CAZ),latamoxef(LMOX),cefoperazone(CPZ),cefotaxime(CTX)ならびにcefazolin(CEZ)と比較した結果、CPRの結合率はそれぞれ7.7及び11.3%といずれの対照薬物よりも低かった。

また、ヒトにCPRを1g静脈内投与後における*in vivo*血漿蛋白結合率を測定した場合においても、時点によらず8.2~11.7%と低値を示した。

次に、ヒト血清アルブミンとビリルビンとの結合に対する影響を検討した結果、比較対照としたCPZではアルブミンとの結合の競合に基づくビリルビン遊離作用が顕著かつ濃度依存的に見られたのに対して、CPRの場合にはその蛋白結合性の低さを反映して高濃度(800 µg/ml)のCPR添加時においても有意なビリルビンの遊離は認められなかった。

Key words : Cefpirome sulfate(CPR),セファロsporin系抗生物質, 血清蛋白結合, ビリルビン-アルブミン結合, 競合性

Cefpirome sulfate(CPR)はドイツ連邦共和国のHoechst社とフランスのRoussel Uclaf社で合成、開発されたβ-lactamaseに対する高い安定性ならびに幅広い抗菌スペクトルを有する新しいセファロsporin剤であり¹⁻³⁾, 本薬の組織への良好な移行性^{4,5)}及び*in vivo*における高い抗菌活性が報告されている⁶⁾。

ところで、蛋白結合が薬物の組織内移行や排泄過程等の体内動態ならびに薬理作用に影響する重要な因子の一つである事が良く知られている⁷⁻⁹⁾。そこで、今回CPRの体内動態及び抗菌作用における特長の発現に関与している事が考えられる血清蛋白との結合をceftazidime(CAZ),latamoxef(LMOX),cefoperazone(CPZ),cefotaxime(CTX)及びcefazolin(CEZ)を比較対照として検討した。

また、サリチル酸、サルファ剤等の薬物が血清アルブ

ミンに対してビリルビンと競合的に結合する結果、遊離型ビリルビン濃度の上昇を招来する事が報告されている¹⁰⁾。そこで、CPRの安全性を評価する観点からそのビリルビン-アルブミン結合に及ぼす影響についても他のセファロsporin系抗生物質を対照として比較検討を行なった。

I. 材料と方法

1. 使用薬物

Cefpirome sulfate(CPR)はドイツ連邦共和国Hoechst社より供与を受けた。また、対照薬物としてはceftazidime(CAZ, 新日本実業), latamoxef(LMOX, 塩野義), cefoperazone(CPZ, 富山化学), cefotaxime(CTX, ヘキストジャパン)及びcefazolin(CEZ, 藤沢)を使用した。

2. 蛋白結合率の測定

1) *In vitro*におけるラット及びマウス血清蛋白との

* 〒350 埼玉県川越市南台1-3-2

結合

エーテル麻酔下で6週令の雄性Sprague Dawley系ラット(日本クレア)及び6週令の雄性ICR系マウス(日本チャールスリバー)から、それぞれ心穿刺及び腋下動脈切断により採血し、血清を分離した。血清1ml/tubeを37℃で5minブレインキュベートした後、薬物溶液(0.5~2mg/ml 0.13M phosphate buffer(pH7.4))を50 μ l添加し15,30または60min インキュベートした。インキュベート後の試料は直ちにセントリフローMPS-1(Amicon Corp.)を用いて4℃で遠心限外濾過(2000 \times g,30min)を行ない、濾液を得た。また血清のかわりに0.13M phosphate buffer(pH7.4)1mlに対して血清の場合と全く同様に処理して濾液を得た。

2) *In vivo*におけるヒト血漿蛋白との結合

健康人にCPRを1g静脈内投与後、経時的に採血を行った。これを遠心分離(3000rpm, 10min)して得られた血漿試料(EDTA処理)1mlについてAIRPRESS-30(東ソー)を用いて限外濾過を行ない濾液を得た。

3) 薬物濃度測定

濾液試料中の薬物濃度は、*in vitro*における試験では *Bacillus subtilis* ATCC6633 (CPR,CTX 及び CEZ), *Proteus mirabilis* ATCC21100(CAZ), *Escherichia coli* 7437 (LMOX)または *Micrococcus luteus* ATCC9341 (CPZ)を検定菌とする bioassay法¹¹⁻¹⁶⁾(ディスク法)により、また *in vivo*における試験ではHPLC法¹¹⁾ [条件: カラム, Nucleosil 5C18(センシューパック); 移動相, 0.2%酢酸アンモニウム/メタノール/アセトニトリル(25:4:2); 検出, UV254nm] を用いて測定した。

4) 蛋白結合率の算出

血清(血漿)蛋白と薬物との結合率は次式によって算出した。

$$\text{結合率(\%)} = [(B-A)/B] \times 100$$

A: 血清を限外濾過時の濾液中濃度

B: 血清と同濃度に薬物添加したPBSを限外濾過時の濾液中濃度

3. ビリルビン-アルブミン結合に対する影響

1) インキュベーション及び遊離ビリルビン濃度の測定

CPR及び対照とした抗生物質のビリルビン遊離作用の強さをBrodersonの酵素法¹⁷⁾を用いて測定した。すなわち、終濃度が小児期における血清アルブミン濃度の正常域(31~51mg/ml)¹⁸⁾及び総ビリルビン濃度値(9 μ g/ml)¹⁹⁾となるように、ヒト血清アルブミン(fraction V, Sigma社)の69.6mg/ml水溶液にビリルビン(東京化成)の0.756mg/ml水溶液を、40:1(V/V)の割合で混和した。この混液を1.5mlずつ小試に取り、薬物溶液(0~

1600 μ g/ml 0.13M PBS)1.5mlを加えて37℃, 20min遮光下でインキュベート後、速やかに35mM過酸化水素水5 μ lを滴下しさらに3minインキュベートした。次に、254nmのperoxidase (Type-1, Sigma社)150 μ lを加え攪拌後、直ちに455nmにおける吸光度変化を測定した。

2) 遊離ビリルビン濃度の比の算出

薬物添加時の吸光度変化の初速度及び遊離ビリルビン濃度をそれぞれV及びB, また薬物無添加時の初速度及びビリルビン濃度をそれぞれVo及びBoとすると、 $V/V_0=B/B_0$ が成立する¹⁷⁾。よって、薬物添加時と無添加時の吸光度変化率の比から相対遊離ビリルビン濃度を求めた。

II. 実験成績

1. *In vitro*におけるラット及びマウス血清蛋白との結合

*In vitro*におけるラット血清蛋白とCPRの結合率に及ぼすCPR添加濃度及びインキュベーション時間の影響をそれぞれTable 1及び2に示した。その結果、CPR添加濃度(25~100 μ g/ml)及びインキュベーション時間(15~60min)は共にほとんど影響を及ぼさず、CPRのラット血清蛋白との結合率は7.5~9.7%とはほぼ一定であった。

そこで、次にCPR及び対照薬物とラットならびにマウス血清蛋白との結合率を、添加濃度50 μ g/ml, インキュベーション時間30minの条件下で比較検討した。

Table 1. Effect of drug concentration on the binding of cefpirome sulfate to rat serum protein *in vitro*

Concentration (μ g/ml)	Protein binding (%)
25	9.5 \pm 1.7
50	7.7 \pm 1.0
100	8.3 \pm 0.9

Each value represents the mean \pm SE for 3 samples after 30-min incubation.

Table 2. Effect of incubation time on the binding of cefpirome sulfate to rat serum protein *in vitro*

Incubation time (min)	Protein binding (%)
15	9.7 \pm 0.7
30	8.3 \pm 0.9
60	7.5 \pm 0.8

Each value represents the mean \pm SE for 3 samples at 100 μ g/ml.

Table 3に示した如く、ラット及びマウス血清蛋白との結合率は、共にCEZが最も高く(それぞれ94.8及び82.6%)以下CTX,CPZ(マウスではLMOX), LMOX, CAZ及びCPRの順であった。CPRの血清蛋白結合率はラット及びマウスでそれぞれ7.7及び11.3%の値を示し、比較対照としたいずれの薬物と比べても低かった(マウスでCAZとの間に有意差が認められなかったのを除きいずれの薬物に対しても $P < 0.01$ で有意であった)。

2. *In vivo*におけるヒト血漿蛋白との結合

CPRをヒトに静脈内投与後の血漿中薬物濃度推移及び蛋白結合率をTable. 4に示した。血漿中濃度は投与後速やかに減衰し、4hr後には初期濃度(15minで61.3 $\mu\text{g/ml}$)の1/8となった。この時の血漿蛋白との結合率は時点によらず8.2~11.7%とほぼ一定しており、この値は*in vitro*におけるヒト血清蛋白結合率⁵⁾と良く一致していた。

3. ビリルビン-アルブミン結合に及ぼす影響

種々の濃度のCPR及び比較対照とした抗生物質による遊離ビリルビン濃度の相対変化をFig. 1に示した。今回検討した抗生物質の内ではCPZが最もビリルビン遊離能が高く、またCTXも弱いながらも有意な遊離作用を示した。すなわち、薬剤濃度100 $\mu\text{g/ml}$ での遊離ビリルビン濃度はCPZで薬剤無添加時の1.15倍、CTXで1.12倍と軽微であったが、これらの薬物は共にその添加濃度の増加に比例して遊離ビリルビン濃度を上昇させ、800 $\mu\text{g/ml}$

添加時ではそれぞれ8.10及び1.69倍に増加した。一方、CPR及びCAZの場合には、いずれの添加濃度においても有意なビリルビン遊離作用は認められなかった(薬剤無添加時の0.96~1.07倍)。

III. 考 察

抗生物質の体内動態及び*in vivo*における抗菌活性に影響する重要な要因の一つと考えられる蛋白結合を、新規のセファロsporin剤であるCPRについて種々の対照薬物と比較検討した。その結果CPRはヒト、ラット及びマウスのいずれの動物種においても、また*in vitro*, *in vivo*に関わらず10%前後の値を示し、対照としたCAZ, LMOX, CPZ, CTX及びCEZのいずれと比べても低かった。この事は、CPRの蛋白結合性がセファロsporin系抗生物質の内でも極めて低い部類に属する事を示している。

ところで、セファロsporin剤等の抗生物質では、遊離薬物のみが抗菌作用に関与し、かつ組織の細胞外液スペースへ到達できる事が知られている⁷⁻⁹⁾。実際に、CPRを動物に投与したとき肺、肝等の主要組織内濃度は血清中濃度の20~90%と良好な移行を示し⁴⁾、また*in vivo*における高い抗菌力が認められた事⁶⁾から、CPRの低い蛋白結合率がそれらの特長における要因の一つとなっているものと推察される。さらに、CPRは生体内でほとんど代謝を受けずに大部分が尿中に排泄され、またプロベネシド併用によって消失速度が影響を受けなかった事からその腎排泄機序は主に糸球体濾過による事が示唆

Table 3. Binding of cefpirome sulfate and other antibiotics to rat and mouse serum proteins *in vitro*

Antibiotic (50 $\mu\text{g/ml}$)	Protein binding (%)	
	rat	mouse
cefpirome	7.7 \pm 1.0	11.3 \pm 0.3
ceftazidime	*17.2 \pm 1.8	19.7 \pm 2.4
latamoxef	*45.6 \pm 0.3	*38.1 \pm 0.1
cefoperazone	*78.0 \pm 0.1	*35.5 \pm 0.4
cefotaxime	*83.6 \pm 0.2	*69.9 \pm 0.8
cefazolin	*94.8 \pm 0.0	*82.6 \pm 0.0

Each value represent the mean \pm SE for 3 samples after 30-min incubation.

* Significantly higher than CPR ($p < 0.01$).

Table 4. *In vivo* protein binding and plasma levels in human after intravenous administration of cefpirome sulfate (1 g)

Item	Time after administration (h)			
	0.083	1	2	4
Protein binding (%)	9.7 \pm 1.2	11.7 \pm 1.6	8.2 \pm 1.3	10.9 \pm 1.3
Plasma level ($\mu\text{g/ml}$)	61.3 \pm 2.0	33.6 \pm 0.7	18.6 \pm 0.5	7.7 \pm 0.4

each value represents the mean \pm SE (n=3)

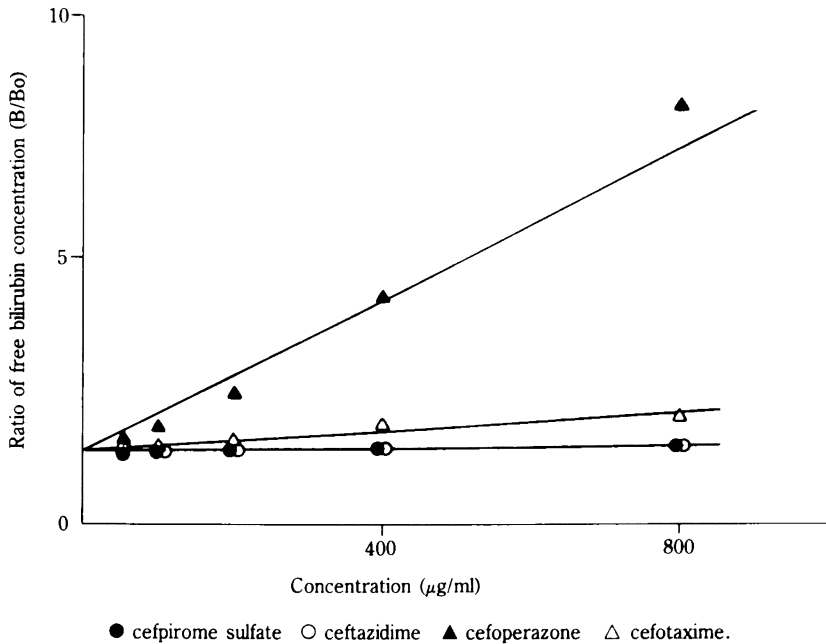


Fig. 1. Displacing effect of antibiotics on bilirubin bound to human serum albumin.

されている^{4,21}). 蛋白結合は糸球体濾過等の薬物排泄過程に対しても重要に関与している事が知られている^{8,9}). が, CPRはその極めて低い蛋白結合率の為に, 年齢, 病態あるいは併用薬物等の様に蛋白結合率の変化を通じて薬物の体内動態を修飾する因子の影響を受けにくい事が考えられよう。

今回, *in vitro*でのヒト血清アルブミンとビリルビンとの結合に及ぼす各種抗生物質の影響を比較検討した結果, CPZで顕著な遊離ビリルビン量の増加が添加濃度依存的に見られたのに対して, CPRではCAZと同様に高濃度添加時においてもほとんど影響が認められなかった。ところで, CPZ, CTX, CAZ及びCPRのヒト血清蛋白との結合率はそれぞれ90,60,22及び7%と報告されており^{5,8,21}, これらの薬物の蛋白結合率とビリルビン遊離作用の強さとの間にはある種の相関性がうかがわれる。吉田ら²²)はセファロsporin系抗生物質の構造とビリルビン遊離作用との関係について考察しており, 特にフェノール性水酸基がアルブミンにおけるビリルビン結合部位との相互作用に重要に関与している事を示唆している。この観点からも, フェノール性水酸基を有しないCPRはビリルビンとの競合性が低く, 遊離アルブミン濃度の上昇に基づく核黄疸の誘因となる可能性が極めて低い事が支持される。

以上の如く, CPRはその蛋白結合率が極めて低く, この事が本薬の良好な組織移行性及び*in vivo*における高い抗菌活性に反映されると共に, ビリルビンとの競合性も低く, これらの観点から臨床使用においても極めて有用かつ安全なセファロsporin剤であると考えられる。

文 献

- 1) JONES R N, THORNSBERRY C, BARRY A L: *In vitro* evaluation of HR810, a new wide-spectrum aminothiazolyl α -methoxyimino cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 25: 710~718, 1984
- 2) KOBAYASHI S, ARAI S, HAYASHI S, FUJIMOTO K: β -lactamase stability of cefpirome (HR810), a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 30: 713~718, 1986
- 3) ARAI S, KOBAYASHI S, HAYASHI S, FUJIMOTO K: *In vitro* antimicrobial activity of cefpirome, a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. *Jap. J. Antibiotics* 40: 969~982, 1987
- 4) KLESEL N, SEEGER K: Pharmacokinetic properties of the new cephalosporin antibiotic HR810 in animals. *Infection* 11: 318~321, 1983
- 5) 松本慶蔵, 小林宏行: 第38回日本化学療法学会

- 総会, 新薬シンポジウムⅡ。HR810, 長崎, 1990
- 6) KIESEL N, LIMBERT M, SCHRINNER E, SEEGER K, SEIBERT G, WINKLER I Chemotherapeutic Properties of the New Cephalosporin Antibiotic HR810 in Laboratory Animals. *Infection* 12 : 286~292, 1984
 - 7) HOUIN G : Drug binding and apparent volume of distribution. IN : Symposia Medica Hoechst 20, Protein Binding and Drug Transport (Tillement J-P and Lindenlaub E), Schattauer Verlag, pp. 213~226, 1985
 - 8) LIMBERT M, SEIBERT G Serum protein binding and pharmacokinetics of cephalosporins. IN : Symposia Medica Hoechst 20, Protein Binding and Drug Transport (Tillement J-P and Lindenlaub E), Schattauer Verlag, pp. 249~252, 1985
 - 9) CRAIG WA, SUH B Protein Binding and the Antimicrobial Effects Methods for the Determination of Protein Binding. IN : Antibiotics in Laboratory Medicine 2nd. ed (Lorian V), WILLIAMS & WILKINS, pp.477~514, 1986
 - 10) VALLNER J J Binding of Drugs by Albumin and Plasma Protein. *J. Pharm. Sci.* 66 : 447~465, 1977
 - 11) 田端 滋, 小池優子, 林 昌亮, 佐藤弓枝, 小林寅苗, 平山正史, 長谷川嘉成 : Cefpirome sulfate の体液及び組織内濃度測定法。Chemotherapy 38(S-3) : 92~99, 1990
 - 12) 真下啓明, 国井乙彦, 深谷一太, 大和邦雄, 里見信子, 笠井一弘, 重柄幹夫 : Cefotaximeに関する基礎的臨床的研究。Chemotherapy 28(S-1) : 194~217, 1980
 - 13) 清水喜八郎, 国井乙彦, 奥村有史 : Cefazolinに関する基礎的, 臨床的検討。Chemotherapy 18 : 559~563, 1970
 - 14) 中村 孝, 橋本伊久雄, 沢田康夫, 三上 三郎, 斎藤美和子, 八反田薫, 戸次英一, 奥村和夫, 武田憲三 : Cefazidime (SN401) の人組織内濃度について。Chemotherapy 31(S-3) : 156~164, 1983
 - 15) 本村靖雄, 吉田 正 : 6059-Sの微生物学的定量法による体液内濃度測定法に関する検討。Chemotherapy 28(S-7) : 178~188, 1980
 - 16) 才川 勇, 久保田隆, 田井賢, 渡辺泰雄, 清水喜八郎 : Cefoperazone (T-1551) の体液内濃度測定法について。Chemotherapy 28(S-6) : 157~162, 1980
 - 17) BRODERSON R : Competitive Binding of Bilirubin and Drugs to Human Serum Albumin Studied by Enzymatic Oxidation. *J. Clin. Invest.* 54 : 1353~1364, 1974
 - 18) 河合 忠 : 総蛋白・蛋白分画。日本臨床 34 : 1812~1820, 1976
 - 19) 岩波文門 : ビリルビン(小児科領域)。日本臨床 34 : 1964~1970, 1976
 - 20) 田端 滋, 小川 隆, 稲津水穂, 林 昌亮, 小林寅苗 : 実験的に惹起した腎及び肝障害ラットにおけるCefpirome sulfateの体内動態-排泄機序との関連-。Chemotherapy 38(S-3) : 100~104, 1990
 - 21) 笠井一弘, 新井 進, 宮本政樹, 坂口 孝 : Cefotaxime の基礎的検討。Chemotherapy 28(S-1) : 89~97, 1980
 - 22) 吉田昌彦, 松下 仁, 黒川恭子, 丸伝 章, 川口安郎 : Cefodizime sodium (THR-221) の蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 36(S-5) : 218~226, 1988

PROTEIN BINDING OF CEFPIROME SULFATE IN MAN AND ANIMALS AND ITS DISPLACING EFFECT ON BILIRUBIN BOUND TO HUMAN SERUM ALBUMIN

SHIGERU TABATA, TAKESADA SHIMURA, TAKUMI MAEDA and SHORYO HAYASHI

Pharma Research Laboratories, Hoechst Japan, Ltd.,

1-3-2 Minamidai Kawagoe, Saitama 350, Japan

INTETSU KOBAYASHI

Laboratory of Chemotherapy, Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratories

AKIRA SAITO

College of Medical Technology, Hokkaido University

We compared the *in vitro* and *in vivo* binding of ceftazidime (CPR) with rat, mouse, or human serum/plasma protein with that of other antibiotics. Its displacing effect on bilirubin bound to human serum albumin was also examined.

The *in vitro* binding of CPR with rat serum protein was not affected by the compound concentration added (25–100 $\mu\text{g/ml}$) or by the incubation time (15–60 min). Therefore, the rat and mouse serum protein binding of the compound added at 50 $\mu\text{g/ml}$ was compared after 30-min incubation, with that of ceftazidime (CAZ), latamoxef (LMOX), cefoperazone sodium (CPZ), cefotaxime sodium (CTX), and cefazolin sodium (CEZ). CPR showed 7.7% and 11.3% binding with rat and mouse serum proteins, which were lower than the values of the reference antibiotics.

When the *in vivo* plasma protein binding of CPR was examined at 15 min to 4 h after administration (1 g. i.v.) to human subjects, only 8.2–11.7% of the compound was bound to the protein at any time.

The displacing effect of CPR on bilirubin bound to human serum albumin was examined *in vitro*. CPZ and CTX, used as the reference substances, displaced bilirubin, and the amount of free bilirubin increased in a concentration-dependent manner. By contrast, even when a high concentration (800 $\mu\text{g/ml}$) of CPR was added, no significant liberation of bilirubin was observed, reflecting the low protein binding of the compound.