

Cefpiramide の胆汁内移行におよぼす各種薬剤の影響

宮 司 厚 子

帝京大学医学部第2内科*

(平成4年6月15日受付・平成4年7月21日受理)

肝排泄型抗生剤である cefpiramide (CPM) の肝内輸送経路を明らかにする目的で、rat を用い、1) CPM の胆汁内移行におよぼす他剤の影響、2) sulfobromophthalein (BSP) の肝 cytosol への結合におよぼす CPM の影響、3) 肝 glutathione S-transferase (GST) 活性におよぼす CPM をはじめとする薬剤の影響、4) 肝内 vesicle 輸送の関与、について検討した。CPM (20 mg/kg) 投与2分前に、indocyanine green (ICG) 25 mg/kg, BSP 35 mg/kg, bilirubin 7.5 mg/kg を前投与すると、CPM 単独投与時に比べ、120分までの CPM の胆汁内回収率はそれぞれ 44.1%, 39.4%, 64.8% に減少した。同じく肝排泄型の薬剤で肝薬物代謝酵素系と関連する propranolol, metoprolol の前投与では、いずれの場合も CPM の胆汁内排泄に有意な抑制は認められなかった。次に、BSP (0.02 mM) を肝 cytosol (1.5 ml) に添加して行った Sephadex G-75 superfine によるカラムクロマトグラフィーでは、CPM (45.0 mM) 添加により、GST 分画へ結合した BSP の 73.8% が抑制された。また、肝 cytosol の GST 活性に対する各薬物の影響については、ICG (阻害定数 $K_i=0.12 \mu\text{M}$), BSP ($K_i=3 \mu\text{M}$), bilirubin ($K_i=0.039 \text{mM}$), CPM ($K_i=0.74 \text{mM}$) の順に強い酵素阻害を示した。propranolol, metoprolol は阻害を示さなかった。さらに、肝内 vesicle により輸送される分泌型 IgA や vesicle 輸送を阻害する colchicine を前投与した場合、CPM の胆汁内移行に有意な変化は認められなかった。diethyl maleate により肝内 GSH 量を減少させた場合にも、CPM の胆汁内排泄量は変化しなかった。以上の結果より、CPM は vesicle 系や肝薬物代謝酵素系とは異なり、主に GST を carrier protein とする ICG, BSP, bilirubin などの organic anion と共通の経路で肝内輸送され、胆汁中に排泄されると考えられ、CPM の肝内輸送蛋白としての GST の役割が示唆された。

Key words: cefpiramide (CPM), organic anion, 胆汁内移行, carrier protein, 肝 glutathione S-transferase (GST)

抗生物質は、その体内動態の違いにより、肝排泄型と腎排泄型に分けることができる。 β -lactam 剤の多くは腎排泄型であるが、肝排泄型のものとしては cefpiramide (CPM), cefoperazone (CPZ), ceftriaxone (CTRX) などが知られている。これらの β -lactam 剤は、濃度勾配にさからって血清から胆汁内へ輸送されるが、その肝内輸送機構の全容はいまだ明らかではない。

現在までに知られている薬物の肝内輸送経路には以下のようなものが考えられている。①肝薬物代謝酵素系(主としてチトクローム P-450)を経て胆汁内に排泄される経路、②carrier protein と結合して肝内輸送される経路、③ pinocytosis により取り込まれ、vesicle により輸送され、胆汁内に排泄される経路、等である。

一般には、肝細胞膜での輸送が β -lactam 剤の胆汁中への移行に重要な役割を持っていると考えられている^{1,2)}。

一方、西谷ら^{3,4)}は、胆汁排泄型抗生物質の肝内輸送機構について検討し、肝 glutathione S-transferase (GST) がこれらの抗生剤の肝内輸送に重要な役割を果たしている可能性を指摘している。

そこで今回、主として肝排泄型のいくつかの薬剤と CPM を併用し、CPM の胆汁内排泄機構と GST との関連について検討した。

I. 材料と方法

材 料

実験動物: 9~11 週齢の Sprague - Dawley (SD) rat 雄 (BW 304~425 g; 船橋農場) を使用した。

* 東京都板橋区加賀 2-11-1

薬剤: 以下のものを使用した。

Cefpiramide (CPM): 住友製薬, indocyanine green (ICG), sulfobromophthalein (BSP): 第一製薬, bilirubin, diethyl maleate: 和光純薬工業, colchicine, dl-propranolol, reduced glutathione (GSH): Sigma chemical co., St. Louis, U.S.A., metoprolol: 藤沢製薬, 分泌型 IgA: コスモ・バイオ, 実験方法

1. CPM の rat 胆汁内移行におよぼす各種薬剤の影響

SD rat (各群 5~7 匹) を, pentobarbital sodium (25~50 mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔し, 開腹した。総胆管にポリエチレン静脈チューブ (3 Fr., 八光商事) をカニューレーションし, 約 10 分間, 胆汁流出が良好なことを確認した。その後, その大部分が胆汁内に移行することが知られている ICG, BSP, bilirubin を用いて, CPM の胆汁内移行におよぼす影響を検討した。

ICG は 25 mg/ml 液を作製し, 25 mg/kg (rat BW 当たり) を約 1 分間で頸静脈より注入した (以下, 注入時間, 静注部位は同様にして行った)。BSP は, 原液を生食で希釈し, 35 mg/ml とし, 35 mg/kg を静注した。bilirubin は 1 N の NaOH で溶解し, phosphate buffer (PB) を加え, 7.5 mg/ml とし, pH = 7.4 に調整した。CPM は ICG, BSP, bilirubin 投与の 2 分後, 20 mg/ml (0.1 M PB で溶解) を 20 mg/kg 静注し, その 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 分後に胆汁を採取した (control 群は CPM のみ同量を 1 分間かけて静注した)。次に, チトクローム P-450 を主とする肝薬物代謝酵素系を経て胆汁中へ移行することが知られている肝排泄型 β -blocker である propranolol と metoprolol の輸送経路と, CPM の輸送経路との関係を調べる目的で, propranolol 20 mg/ml (蒸留水に溶解) を 5 mg/kg で静注, metoprolol 15 mg/ml (蒸留水に溶解) を 15 mg/kg でそれぞれ静注し, 2 分後, CPM (20 mg/kg) を静注して, 同様に, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 分後に胆汁を採取した。さらに, 肝排泄のもう 1 つの経路である pinocyte から vesicle による輸送と, CPM の輸送経路との関連を調べる目的で, vesicle により輸送されることが知られている, 分泌型 IgA (1.25 mg/rat) の静注 2 分後に CPM (20 mg/kg) を静注し, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 分後に胆汁を採取した。

次に, vesicle 輸送に重要な役割を果たす microtubules を破壊する作用のある colchicine 3 mg/kg (生食に溶解) を腹腔内投与し, 3 h 後に CPM (20 mg/

kg) を静注し, その 15, 30, 45, 60, 90, 120 分後に胆汁を採取した。

最後に, 肝内 GSH 量が, CPM の肝内輸送に関係するかどうかを調べる目的で, 肝内 GSH 量を減少させることが知られている diethyl maleate (450 mg/kg) を腹腔内投与し, その 1 h 後に CPM (20 mg/kg) を静注し, その 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 分後に胆汁を採取した。胆汁中の CPM 濃度の測定は, 採取した胆汁をそれぞれ 20 倍希釈し, HPLC 法 (HPLC: Waters, column: Bondapak C, mobile phase: 1/15 M PB pH 7.0: acetonitrile = 86.5:13.5, flow rate: 1.5 ml/min, 吸光度: 235 nm) または bioassay 法 (円筒寒天平板法, 検定菌: *Bacillus subtilis* ATCC 6633) にて測定した。

胆汁量は, 胆汁重量を化学秤量にて測定し, 胆汁の比重を 1.0 g/ml として算出した。

2. 肝 glutathion S-transferase (GST) 活性におよぼす各種薬剤の影響

GST 活性の測定は, 基質として, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (和光純薬工業), 緩衝液として, 0.1 M PB pH 6.5 1 mM GSH を用いて, Habig らの方法¹⁰⁾により, 吸光度 340 nm にて室温で測定した。各種薬剤の影響は, BSP, ICG, bilirubin, propranolol, metoprolol, CPM を肝 cytosol に添加し, 検討した。阻害形式と阻害定数 (K_i) は, s/v - s plot より求めた。

3. 肝 cytosol と BSP の結合におよぼす CPM の影響

肝 cytosol は, SD rat (9 週令) の肝 11 W G 上清を用いた⁹⁾。肝 cytosol と BSP の結合は, 肝 cytosol 1.5 ml に BSP 0.025 mg を添加し, 4°C で 30 分静置後, Sephadex G-75 superfine (Pharmacia LKB biotechnology AB, Uppsala, Sweden) による column chromatography (C 16/100 Pharmacia, fine chemicals, Uppsala, Sweden) により, 20 mM PB pH 7.4 で溶出し, 行った (Bed volume 166.8 ml, 2 ml/15 min/fraction)。

CPM の肝 cytosol と BSP の結合におよぼす影響は, CPM (50 mg/ml) 2 ml を肝 cytosol 1.5 ml に添加し, 10 分後 BSP 0.025 mg を添加したものを 4°C, 30 分静置後, 上記と同じ条件で column chromatography を行った。

肝 cytosol の蛋白濃度は, 分光光度計 (日立 A 220) を用いて, 280 nm の波長で測定した。BSP は, column chromatography で得られた各 fraction の 0.3 ml に 0.1 N の NaOH 2.4 ml を添加し, 蒸留水

を対照に、上記分光光度計の波長 580, 560, 600 nm でそれぞれの吸光度 A, B, C を求め、補正吸光度 $[A - (B+C)/2]$ を算出、BSP 標準液のそれと比較し、求めた。

有意差検定は、Non-paired student's t-test により行い、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

II. 結 果

1. CPM の rat 胆汁内移行におよぼす各種薬剤の影響

① BSP 併用投与時における CPM の胆汁内排泄量の変化を Fig. 1 に、CPM の回収率の変化を Fig. 2

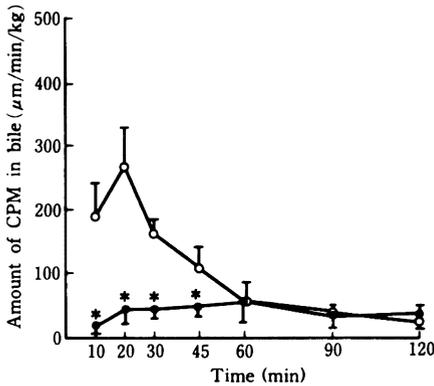


Fig. 1. Effects of BSP on biliary excretion of cefpiramide.

BSP: sulfobromophthalein, CPM: cefpiramide, ○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM+BSP (CPM: 20 mg/kg, BSP: 35 mg/kg, n=5), * $p < 0.01$

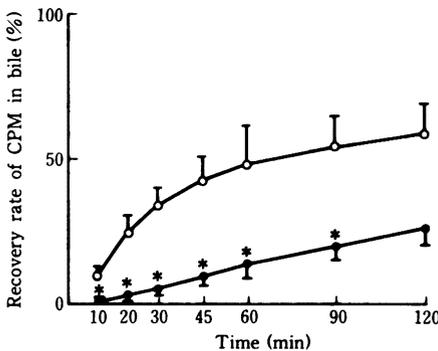


Fig. 2. Effects of BSP on biliary recovery rate of cefpiramide.

○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM+BSP (CPM: 20 mg/kg, BSP: 35 mg/kg, n=5), * $p < 0.01$

に示す。BSP 投与群では、control 群に比較し、CPM の胆汁内移行は有意に抑制された。CPM の時間体重当たりの胆汁内排泄量 ($\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) は、30 分までが有意に抑制されており、10 分での胆汁内排泄量は control 群が $200.8 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ に対し、BSP 投与群では $17.2 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ であり、抑制率は 91.4% であった。また、CPM の回収率は 60 分までが有意に抑制されており、120 分における回収率は control 57.1% に対し、BSP 投与群では 25.2% であり、抑制率は 55.9% であった。

② ICG 併用投与時における CPM の胆汁排泄量の変化を Fig. 3 に、CPM の回収率の変化を Fig. 4 に示

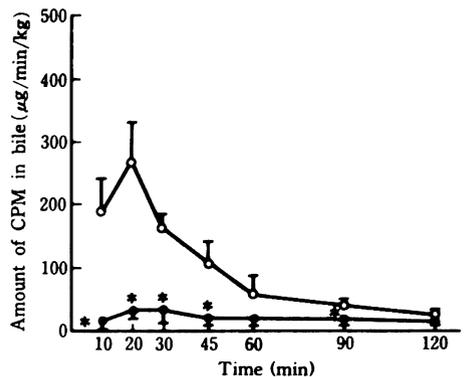


Fig. 3. Effects of ICG on biliary excretion of cefpiramide.

ICG: indocyanine green, ○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM+ICG (CPM: 20 mg/kg, ICG: 25 mg/kg, n=5), * $p < 0.01$

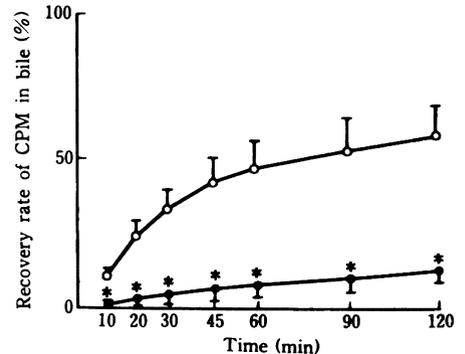


Fig. 4. Effects of ICG on biliary recovery rate of cefpiramide.

○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM+ICG (CPM: 20 mg/kg, ICG: 25 mg/kg, n=5), * $p < 0.01$

す。ICG 投与群では、CPM の胆汁内排泄量と回収率にさらに著明な抑制が見られ、胆汁内排泄量の 90 分値までと回収率の 120 分値までが有意に抑制されていた。10 分での胆汁内排泄量は、control 群 200.8 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ に対し、ICG 投与群では 16.9 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ であり、control に比べ、その 91.6% が抑制された。また、ICG 投与群の 120 分における回収率は control 57.1% に対し、22.5% であり、抑制率は 60.6% であった。

③ Bilirubin 併用投与時における CPM の胆汁排泄量の変化を Fig. 5 に、CPM の回収率の変化を Fig.

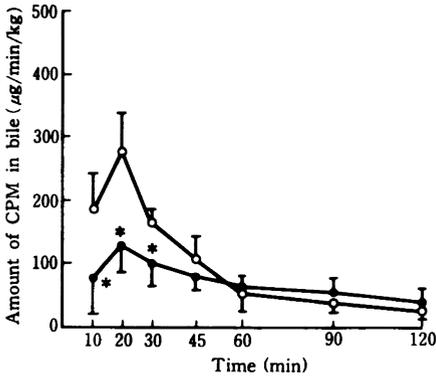


Fig. 5. Effects of bilirubin on biliary excretion of cefpiramide.

○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM + bilirubin (CPM: 20 mg/kg, bilirubin: 7.5 mg/kg, n=5), *p<0.01

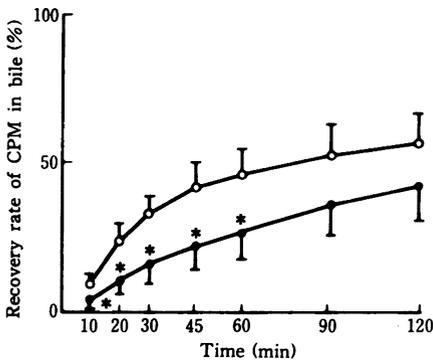


Fig. 6. Effects of bilirubin on biliary recovery rate of cefpiramide.

○—○: CPM (20 mg/kg, n=7), ●—●: CPM + bilirubin (CPM: 20 mg/kg, bilirubin: 7.5 mg/kg, n=5), *p<0.01

6 に示す。Bilirubin 投与群では、CPM の胆汁内排泄量の 30 分値までと、回収率の 60 分値までが有意に抑制されており、10 分での胆汁内排泄量は、control 群 200.8 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ に対し、bilirubin 投与群では 78.4 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ とその約 61% が抑制された。また、120 分における回収率は、control 群 57.1% に対し、bilirubin 投与群では 37.0% であり、抑制率は 35.2% であった。

④ Propranolol 投与群では、回収率の 20 分から 60 分にかけて有意差が認められたが胆汁内排泄量には有意差は認められなかった。

⑤ Colchicine, diethyl maleate, metoprolol, IgA 投与群では、control 群と比較して、CPM の胆汁内排泄量、回収率ともに有意差は認められなかった。各薬剤投与時の経時的な胆汁量を Table 1 に示す。ICG, propranolol 併用群では、control 群に比べ胆汁量が少ない傾向がみられ、一部で有意に抑制されていた。

2. 肝 GST 活性におよぼす各種薬剤の影響

CPM の肝内輸送に GST が関与しているとするれば、各薬物が GST に結合し、GST 活性を阻害することが考えられる。

各薬剤の K_i と阻害形式を Table 2 に示す。肝 GST 活性に対して強い阻害を示した薬剤を順に並べると、ICG, BSP, bilirubin, CPM となった。ICG の K_i は、0.12 μM と肝 GST 活性に対して最も強い阻害を示し、阻害形式は非拮抗型であった。BSP は非拮抗型阻害を示し、 K_i は 3 μM であった。CPM も肝 GST 活性に対して非拮抗型阻害を示し、(Fig. 7) K_i は 0.74 mM であった。

3. 肝 cytosol と BSP の結合におよぼす各種薬剤の影響

酵素阻害で見られた BSP と CPM の関係が実際に肝 GST との結合でも見られるかどうかを rat 肝 cytosol に BSP を添加して行った column chromatography にて検討した。その結果、GST の peak fraction における吸光度 280 nm 当たりの結合 BSP 量は、BSP 単独群の 5.03 nM に対し、CPM 併用投与群では、1.32 nM と BSP の GST 分画への結合の低下が認められ、BSP 単独群に比べ、73.8% の結合が阻害された (Fig. 8 ①, ②)。

III. 考 案

β -lactam 剤の肝内輸送経路には数種類のものがあるが、その全容はいまだ明らかではない。薬物の主要肝内輸送経路として、現在までのところ以下のものが考えられている。①肝薬物代謝酵素系 (主

Table 1. Amounts of bile excreted ($\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{kg}$, mean \pm SD)

time (min) \ drug	10	20	30	45	60	90	120
CPM	60.9 \pm 15.8	53.6 \pm 10.1	58.5 \pm 18.8	58.2 \pm 13.9	52.1 \pm 25.3	48.6 \pm 13.9	42.4 \pm 11.1
CPM+propranolol	53.1 \pm 9.5	44.9 \pm 11.4	40.2 \pm 11.7	33.9 \pm 4.7*	32.2 \pm 3.4	30.8 \pm 7.8	28.9 \pm 7.7
CPM+metoprolol	57.2 \pm 15.2	54.9 \pm 12.8	51.1 \pm 12.1	52.8 \pm 14.9	53.8 \pm 14.5	39.1 \pm 11.8	46.3 \pm 10.3
CPM+IgA	46.6 \pm 18.4	51.8 \pm 12.8	52.3 \pm 20.3	50.9 \pm 8.2	47.8 \pm 14.2	50.5 \pm 14.7	42.9 \pm 17.6
CPM+diethyl maleate	64.6 \pm 12.1	59.1 \pm 15.0	65.3 \pm 23.2	44.5 \pm 17.6	45.0 \pm 12.2	40.0 \pm 8.7	36.9 \pm 8.5
CPM+BSP	42.7 \pm 7.6	55.4 \pm 14.0	59.2 \pm 11.7	56.9 \pm 13.0	69.3 \pm 41.4	40.9 \pm 12.5	36.7 \pm 17.8
CPM+ICG	38.1 \pm 6.6	29.6 \pm 3.8*	26.4 \pm 0.8*	18.2 \pm 2.5*	21.7 \pm 4.0	23.4 \pm 9.0*	24.5 \pm 5.9*
CPM+bilirubin	55.7 \pm 11.4	55.1 \pm 8.3	55.3 \pm 11.9	51.0 \pm 17.9	46.5 \pm 14.2	48.0 \pm 19.9	43.6 \pm 15.3
CPM+colchicine	(15')	57.8 \pm 8.7	44.7 \pm 13.7	40.7 \pm 12.6	22.5 \pm 5.4*	36.1 \pm 7.6	34.0 \pm 8.4

* $p < 0.01$

CPM: cefpiramide.

Table 2. Inhibition constants (K_i) of various agents for GST

Inhibitor	K_i (mM)	Inhibitory effect
CPM	0.74	noncompetitive
ICG	0.00012	noncompetitive
Bilirubin	0.039	competitive
BSP	0.003	noncompetitive
Propranolol	nd	(-)
Metoprolol	nd	(-)

nd: not determined

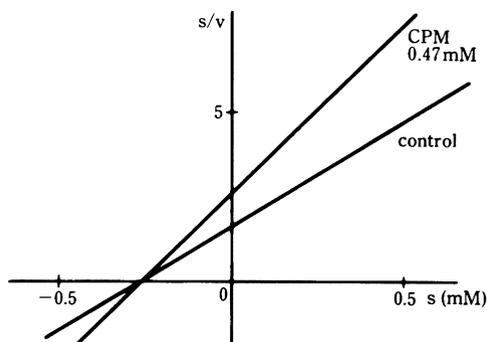


Fig. 7. Noncompetitive effect of cefpiramide on GST.

GST: glutathione S-transferase, s: concentrations of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, v: initial velocity of GST, $K_i = 0.74$ mM

としてチトクローム P-450) を経て胆汁内へ排泄される経路, ②carrier protein と結合して肝内輸送される経路, ③pinocytosis により取り込まれ, vesicle により輸送され胆汁内へ排泄される経路, 等である。

今回, 代表的な胆汁排泄型抗生物質である CPM にいくつかの薬物を併用し, それらの薬物が CPM の胆汁内移行におよぼす影響を検討した。

まず, 肝薬物代謝酵素系を介する薬物として propranolol⁴⁾, metoprolol⁴⁾ をそれぞれ CPM と併用投与し, CPM の胆汁内移行におよぼす肝薬物代謝酵素系の影響について検討した。

Control 群に比較し, metoprolol 併用群には CPM の胆汁内排泄量, 回収率ともに有意差は認められなかった。一方, propranolol 併用群では, CPM の胆汁内排泄量には有意差は認められなかったが, 回収率は, 20, 30, 45, 60 分で有意差が認められ, 上記4点を平均すると, control 群に比べ約 30.9% の回収率の低下が認められた。この回収率の低下の原因については, 胆汁量 (Table 1) が, CPM 単独投与群に比べ, propranolol 併用群では少ない傾向が見られ, 20, 30, 45, 60 分における平均値と比較すると, control 群に比べ約 32% の胆汁量の減少が認められることから, propranolol 併用群における CPM の回収率の低下は, 胆汁量の減少が影響した可能性が強いと考えられた。

この実験結果は, CPM は propranolol や metoprolol の肝薬物代謝酵素系を介する経路とは異なった肝

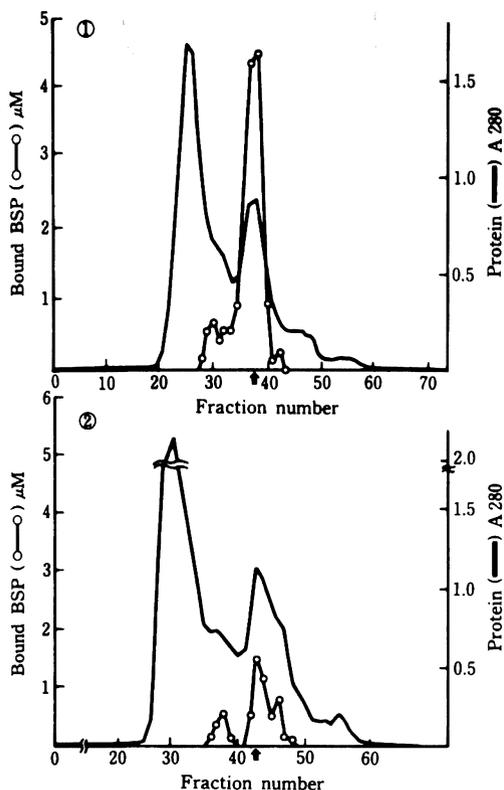


Fig. 8. ① Binding patterns of BSP to liver cytosol.

↑: GST peak fraction

② Binding patterns of BSP to liver cytosol in the presence of cefpiramide.

↑: GST peak fraction

内輸送経路を通ることを示唆している。

次に、CPMの胆汁内移行におよぼすorganic anionの影響を調べるため、CPMとICG, BSP, bilirubinをそれぞれ併用投与して検討したところ、ICG, BSP, bilirubinなどのorganic anion併用群では、control群に比べ、CPM胆汁内排泄量、回収率とも著明な抑制が見られ、もっとも差のある投与後10分で比較すると、胆汁内排泄量は、organic anion群ではcontrol群の1/12~2/5に減少し、回収率はorganic anion群はcontrol群の1/2~2/3であった(Figs. 1~6)。

これらの結果からは、CPMとICG, BSP, bilirubinなどのorganic anionは共通の肝内輸送経路を通る可能性が示唆される。なお、organic anionの中ではICG併用群でCPMの胆汁内排泄、回収率の最

も著明な減少を認めたが、これには胆汁量自体の減少も関与していると考えられる (Table 1)。

CPMの胆汁内排泄と胆汁酸の排泄機構との関連については、内田⁹⁾がratで検討し、CPMはorganic anionおよび胆汁酸グルクロナイド、胆汁酸サルフェートに共通で、通常の胆汁酸とは異なる排泄経路により胆汁内排泄されていると報告している。

一方、森ら¹⁰⁾は、ratにcolchicineを前投与し、microtubulesを破壊し、ICGを投与したところ、colchicine投与群では、control群に比べ、ICGの血漿消失時間の遅延、胆汁内排泄量の有意な減少が認められたことから、ICGには、vesicleを通り肝内輸送される系も存在することを示唆した。

今回の実験で、CPMとICGは共通の肝内輸送経路を通ることが示唆されたが、CPMもまた、vesicle系とも関係しているかどうかを調べるため、colchicineを前投与し、microtubulesを破壊し、vesicleの動きを止めた群でのCPM投与実験と、さらにvesicleで肝内輸送される分泌型IgAとの併用実験を行った。その結果、いずれもcontrol群とは有意差を認めなかった。このことは、CPMの肝内輸送にvesicle routeは関係していないことを示唆している。

さて、薬物の肝内輸送経路にかかわる肝内carrier proteinには数種類のもの知られている⁷⁾が、今回の実験では、glutathione (GSH) 抱合に際し、基質とGSHを結びつける作用をもつglutathione S-transferase (GST)のcarrier proteinとしての役割に注目した。

まず、カラムクロマトグラフィーによる肝cytosol分画と、BSPとの結合実験では、BSPは、GST活性のピークに一致して結合が見られ、(Fig. 8) CPMをあらかじめ添加して行った同様の実験では、BSPのGST分画への結合の抑制が認められた。このことは、BSPとCPMの両者がGSTに結合することを示唆している。

今回の実験では、実際に結合したCPM量の測定は行っていないが、西谷ら⁸⁾は、mouseのcytosol分画と¹⁴C-CPMとの結合実験で、¹⁴C-CPMがGST分画に結合していることを示し、さらに、ICG添加により、¹⁴C-CPMのGST分画への結合量は低下することを示した。

このことは、今回のBSPのGST分画への結合の抑制が、CPMのGST分画への結合によるものであるという今回の推論を裏づけていると考えられる。

ところで、GSTが各種薬剤と結合するとすれば、その酵素活性も阻害されると考えられる。肝cytosol

分画に ICG, BSP, bilirubin, CPM, propranolol, metoprolol を添加して, GST 活性の阻害実験を行ったところ, rat において CPM の胆汁内移行に影響を与えなかった propranolol, metoprolol は GST 活性を阻害しないが, CPM の胆汁内移行を著明に抑制した ICG, BSP, bilirubin は程度に差はあるが GST 活性を著明に阻害した。

これらの結果は, CPM は propranolol, metoprolol とは異なり, ICG, BSP, bilirubin とは GST を介した共通の経路で肝内輸送されている可能性を裏付ける結果であった。

また, 各薬物の阻害定数 (Table 2) を見ると, CPM は最大であり, GST への結合力は 4 者 (ICG, BSP, bilirubin, CPM) の中でもっとも弱いと考えられた。また, カラムクロマトグラフィーの実験において, BSP の GST 分画への結合を抑制するのに, CPM (45.0 mM) は BSP (0.02 mM) の約 2,250 倍を用いたが, 阻害係数を見ると, CPM (0.74 mM) は BSP (3 μ M) の約 2,000 倍であり, 阻害定数の比率と結合実験の比率とはほぼ相関していた。このことは肝 CPM と肝 GST の結合力は比較的弱いことを示しているが, ICG, BSP, bilirubin の選択的胆汁排泄と CPM の胆汁内排泄の程度の差を考えると当然の結果と考えられる。

さらに, 肝内 GSH 量と CPM の胆汁移行の関連についても検討を加えた。Davis⁹⁾ は rat を用い, 今回の実験と同量の diethyl maleate を前投与した群では, control 群に比べ, 肝内 GSH レベルは投与前の 16% まで減少したと報告している。また, BSP の GSH 抱合量の低下に伴い, BSP の GST 分画への結合量が増加したことをも示した。今回, GST の基質である肝内 GSH 量を減少させて, CPM の胆汁内排泄量がどう変化するかを control 群と比較したところ有意差は認められず, 肝内 GSH 量の減少は, CPM の肝内輸送に影響をおよぼさないと考えられた。

抗生剤の胆汁移行について考える場合, 血管側の肝細胞膜や細胆管側の細胞膜の働きは重要であると考えられている。

肝細胞膜輸送に関しては, 寺崎¹⁾ は benzylpenicillin (PCG) は, Na イオンとは無関係の, carrier mediated transport system によって肝細胞に取り込まれると結論づけており, CPM もまた, Na イオンとは無関係であったと報告している。そしてほとんどすべての β -lactam 剤が PCG と同様の経路で輸送されるものと推定している。また, PCG と CPM の肝細胞への取込みには carrier mediated uptake

system が関与していると考えられると述べている²⁾。今回得られた結果は, 辻らの肝細胞 uptake を検討した実験結果と相関するものと考えられる。

著者は, 今回, 代表的な肝排泄型 β -lactam 剤の 1 つである CPM を用いてその肝内輸送経路について検討したが, 上に述べた成績から, CPM は, vesicle 系や, 肝薬物代謝酵素系との関連は薄い³⁾が, organic anion である ICG, BSP, bilirubin とは GST を carrier protein とする共通の経路により胆汁内に排泄される可能性が考えられ, CPM の肝内輸送蛋白としての GST の役割が示唆された。

謝辞: 稿を終えるにあたり, 御指導, 御助言, 御校閲を頂きました帝京大学第 2 内科国井乙彦教授, 直接御指導頂きました同内科西谷 肇講師及び実験にあたり多大な協力をいただいた石沢希久子氏に深謝いたします。

最後に, 御校閲頂きました帝京大学第 2 内科宮下英夫主任教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Terasaki T, Tamai I, Takanosu K, Nakasima E, Tsuji A: Kinetic evidence for a common transport route of benzylpenicillin and probenecid by freshly prepared hepatocytes in rats. Influence of sodium ion, organic anions, amino acids and peptides on benzylpenicillin uptake. *J Pharmacobio-Dyn* 9: 18~28, 1986
- 2) Tsuji A, Terasaki T, Takanosu K, Tamai I, Nakasima E: Uptake of benzylpenicillin, cefpiramide and cefazolin by freshly prepared rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 35: 151~158, 1986
- 3) Nishiya H, Komatsu T, Kunii O: Binding of antibiotics to human liver glutathione s-transferase. *Jap J Exp Med* 51: 355~362, 1981
- 4) Scriabrine A, Taylor D G: Antihypertensive drugs. In *Cardiovascular Pharmacology* 2nd. ed. (Antonaccio M J ed.) p.257~294, Ravan Press New York 1984
- 5) 内田芳信: Cefpiramide の胆汁排泄機構に関する検討—胆汁酸及び有機陰イオン排泄経路との関連について。帝京医学雑誌 14: 389~398, 1991
- 6) Mori M, Oyamada M, Sakauchi F, Ogawa K: Effects of colchicine on the hepatocellular transport of indocyanine green in the rat. *Virchows Arch B* 53: 37~43, 1987
- 7) Levi A J, Gatmaitan Z, Arias I M: Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J Clin Invest* 48: 2156~2167, 1969
- 8) Nishiya H, Haga T, Nozue N, Komatsu T,

- Baba M, Ueda Y, Ono Y, Kunii O: Effects of 2 (3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole pretreatment on cefpiramide binding to mouse glutathione S-transferases. *Pharmacology* 39: 213~223, 1989
- 9) Davis D R, Yeary R A: Interaction of bilirubin and indocyanine green with the binding and conjugation of sulfobromophthalein by rat liver cytosol proteins. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 27: 373~388, 1980
- 10) Habig H W, Pabst M J, Jakoby W B: Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 249: 7130~7139, 1974

Effects of various agents on biliary excretion of cefpiramide

Atsko Guji

Second Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, 2-11-1,
Kaga, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

The effects of various agents on biliary excretion of cefpiramide (CPM) were investigated to clarify the transport mechanism of CPM in the rat liver. Indocyanine green (ICG) (25 mg/kg), bromosulfophthalein (BSP) (35 mg/kg) or bilirubin (7.5 mg/kg) administered 2 min before intravenous administration of CPM (20 mg/kg) reduced the biliary excretion of CPM to the extent of 44.1, 39.4, and 64.8% respectively of the amount of CPM excreted for 120 min without these agents. Propranolol and metoprolol, mainly excreted in bile and metabolized by mixed function oxidases, had no effect on biliary excretion of CPM. In the presence of CPM (45 mM), the amount of BSP (0.02 mM) bound to the glutathione S-transferase (GST) fraction on chromatography of the liver cytosol was reduced to 26.2% of the value obtained in the absence of CPM. The inhibition constant (K_i) of ICG, BSP, bilirubin and CPM to GST was, 0.12 μ M, 3 μ M, 39 μ M and 740 μ M respectively. Propranolol and metoprolol had no inhibitory effect on GST activity. Neither secretory IgA, which is transported via vesicles, nor colchicine, which inhibits movement of vesicles in the liver, had any effect on biliary excretion of CPM. Diethyl maleate, which reduces the amount of GSH in the liver had no influence on CPM excretion. The study showed that CPM shared a common hepatic transport system with ICG, BSP and bilirubin, and inhibited BSP binding to GST, suggesting an important role of GST in CPM excretion into bile.