

## 新規セフェム系抗生物質 cefozopran のラット、ウサギおよびサルにおける腎排泄機序

喜多八洲男・木村 義昭・小此木研二・山崎 俊幸・今田 哲

武田薬品工業株式会社 創薬研究本部\*

Cefozopran のラット、ウサギおよびサルにおける腎排泄機序について、cefazopran の血中濃度推移に及ぼすプロベネシド併用投与の影響に関する実験と、ウサギにおける腎クリアランスおよび stop-flow 実験により検討した。

1) ラット、ウサギおよびサルにおけるプロベネシド併用投与群の cefozopran の血中濃度曲線下面積、血中半減期および全身クリアランスは、対照群 (cefazopran 単独投与) のそれらと近似していた。

2) ウサギにおける腎クリアランス実験において、クレアチニン クリアランスに対する cefozopran クリアランスの比率は 0.72~0.77 と低値を示した。

3) ウサギにおける stop-flow 実験において、近位尿細管部位に cefozopran の再吸収を示す負のピークが認められた。

以上の実験結果から、cefazopran はラット、ウサギおよびサルにおいて、主として糸球体濾過により尿中に排泄されるが、ウサギにおいては一部分 (約 20%)、近位尿細管部位で再吸収されることが示唆された。

**Key words:** cefazopran, 腎排泄機序, ラット, ウサギ, サル

Cefazopran はグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対して幅広く、かつ強力な抗菌力を示す新規注射用セフェム剤である<sup>1)</sup>。Cefazopran を実験動物に静脈内投与すると、主として未変化体として尿中に排泄される<sup>2,3)</sup>。

本報ではラット、ウサギおよびサルにおける cefazopran の血中濃度推移に及ぼすプロベネシド併用投与の影響を調べる実験と、ウサギにおける cefazopran の腎クリアランスおよび stop-flow 法による実験によって、cefazopran の腎排泄機序を検討した成績を述べる。

#### 実験材料および実験方法

##### 1. 使用薬剤

Cefazopran は武田薬品工業株式会社に合成されたものを、その他の試薬は市販品を用いた。

##### 2. 実験動物

ラットは Jcl:SD, 雄, 7 週齢, 体重 190~230 g, ウサギは New Zealand White 種, 雄, 2~3 カ月齢, 体重 2.0~2.5 kg, サルは cynomolgus, 雌, 体重 2.0~3.0 kg のものを用いた。いずれも薬剤投与前 16~18 時間の絶食を行った。

##### 3. プロベネシド併用投与時の血中濃度の測定

ラット、ウサギおよびサルにプロベネシド (ラット: 500 mg/kg, ウサギ, サル: 100 mg/kg) を cefazopran 20 mg/kg 静脈内投与の 30 分前に経口投与し、所定時

間後の cefazopran 血中濃度を測定した。プロベネシドを投与しない対照群 (cefazopran 単独投与) の血中濃度も同時に測定した。なお、ウサギおよびサルでは対照群の投与実験一週間後に同じ動物を用いてプロベネシド併用投与と実験を行い、ラットではプロベネシド併用実験と対照実験は別個の動物を用いて同時に行った。

##### 4. 腎クリアランスおよび stop-flow 実験

###### 4-1) 被験薬物溶液の調製

Priming 投与用薬液:  $\rho$ -アミノ馬尿酸 (PAH, Sigma Chemical Co.) は 200 mg/ml 濃度, クレアチニン (Cr, 和光純薬) は 100 mg/ml 濃度, イヌリン (和光純薬) は 50 mg/ml 濃度, cefazopran は 100 mg (力価)/ml 濃度にそれぞれ滅菌蒸留水を加えて溶解した。

Sustaining 投与用薬液: 薬液 I として, D-マンニトール (和光純薬) 10% (w/v), クレアチニン 0.25%, PAH 0.1%, 塩化ナトリウム (和光純薬) 0.9% を含む水溶液を用いた。薬液 II としては上記の薬液 I に cefazopran 167  $\mu$ g/ml を添加したもの, 薬液 III としては薬液 I に cefazopran 333  $\mu$ g/ml を添加したものをそれぞれ用いた。

プロベネシド溶液: プロベネシド (Sigma Chemical Co.) は当量の 1 N NaOH および滅菌水を加え、加温

により溶解した (60 mg/ml, pH 7~8)。

#### 4-2) 手術処置

動物 (ウサギ) は sodium pentobarbital (Nembutal, Abbott Labs.) 30 mg/kg を静脈内投与して麻酔し, 気管切開カニューレ挿入後, 腹部を正中切開して左輸尿管に採尿用のポリエチレンチューブを挿入した。被験薬物の priming および sustaining 投与のために, 左頸静脈にカニューレを挿入した。また, 採血用のカニューレは右頸動脈に挿入した。

#### 4-3) 腎クリアランス実験

上記の手術処置をしたウサギに, クレアチニン 100 mg/kg を左頸静脈に挿入したカニューレより priming 投与した。次に, sustaining 用薬液 I を 0.3 ml/min/kg の流速で infusion pump を用いて注入した。排泄尿量が安定化 (2~3 ml/min) した後, 尿を 10 分間隔で 3 回採尿した。薬液 I の注入開始約 1 時間後に, cefozopran 10 mg/0.1 ml/kg あるいは 20 mg/0.1 ml/kg を priming 投与し, 引き続き sustaining 用薬液 II あるいは薬液 III をそれぞれ持続注入した。その後各々 10 分間隔で 3 回採尿し, 採尿の中間点で血液も 3 回採取した。

#### 4-4) Stop-flow 実験

Stop-flow 実験は基本的には Malvin らの方法<sup>4)</sup>に準じて行った。上記の手術処置をしたウサギに, 先ず PAH (20 mg/kg) およびクレアチニン (100 mg/kg) を左頸静脈に挿入したカニューレよりそれぞれ priming 投与した。次に, 薬液 I を 0.5 ml/min/kg の流速で注入した。排泄尿量がほぼ安定化する薬液 I 注入開始約 30 分後に, cefozopran 10 mg/kg (10 mg/0.1 ml/kg) を priming 投与し, 引き続き薬液 II を 0.5 ml/min/kg の流速で sustaining 投与した。その後 10 分間隔で 3 回採尿し, 採尿の中間点で血液も 3 回採取して, free flow クリアランス測定用試料とした。次いで, 輸尿管カニューレを止血鉗子ではさんで尿流を 6 分間停止させた。尿流停止 5 分後にイヌリン 50 mg/kg を静注し, その 1 分後に鉗子を開放した。噴出する尿を約

0.2 ml ずつ連続的に 30 本分画採取した。その後約 10 分間放置し, 尿流を安定させた後, 再び free flow クリアランス測定用試料とする尿および血液を上記のように 3 回採取した。引き続き, プロベネシド併用投与の影響をみるために, プロベネシド 30 mg/kg (30 mg/0.5 ml/kg) を静注し, 20 分後に上記の方法により stop-flow 尿を連続的に 30 本分画採取した。

#### 5. 分析方法

採取した血液は冷却下で遠心分離 (2000 xg, 10 min) して血漿を分離した。尿量は重量を秤量し測定した。これらの血漿および尿検体は当日, または -80°C に凍結保存して一週間以内に分析した。

##### 5-1) Cefozopran 濃度の測定

血漿および尿検体中の cefozopran 濃度は *Escherichia coli* NIHJ または *Providencia rettgeri* ATCC 9250 を試験菌とする agar well 法により測定した<sup>2,3)</sup>。

##### 5-2) p-アミノ馬尿酸の定量

血漿および尿検体中の p-アミノ馬尿酸濃度は Waugh & Beall の方法<sup>5)</sup>に準じて比色定量した。

##### 5-3) イヌリンの定量

尿検体中のイヌリン濃度は Schreiner の方法<sup>6)</sup>に準じて比色定量した。

##### 5-4) クレアチニンの定量

血漿および尿検体中のクレアチニン濃度は Folin & Wu の方法<sup>7)</sup>に基づいて, クレアチニン測定用キット (Creatinine-Test Wako, 和光純薬) を用いて比色定量した。

##### 5-5) Na<sup>+</sup>および K<sup>+</sup>の定量

血漿および尿検体中の Na<sup>+</sup>および K<sup>+</sup>濃度は炎光光度分析法 (CORNING 社 455 型炎光光度計使用) により測定した。

#### 6. 薬動力学的解析

Cefozopran 投与後の血中濃度推移を one-compartment open model (ラット) または two-compartment open model (ウサギ, サル) にあてはめ, 山岡

Table 1. Influence of probenecid on plasma concentrations of cefozopran in rats, rabbits and monkeys

| Animal (n) | Without probenecid |                      |                 | With probenecid |                      |                 |
|------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------------|-----------------|
|            | AUC (μg · h/ml)    | T <sub>1/2</sub> (h) | CLp (ml/min/kg) | AUC (μg · h/ml) | T <sub>1/2</sub> (h) | CLp (ml/min/kg) |
| Rat (5)    | 30.2               | 0.26                 | 11.0            | 30.0            | 0.21                 | 11.1            |
| Rabbit (3) | 79.1               | 0.88                 | 4.2             | 79.4            | 0.73                 | 4.2             |
| Monkey (4) | 108                | 1.02                 | 3.1             | 138             | 1.12                 | 2.4             |

Cefozopran was intravenously administered at a dose of 20 mg/kg.

Probenecid (rat : 500 mg/kg, rabbit and monkey : 100 mg/kg) was orally administered at 30 min before cefozopran was administered.

Table 2. Renal excretion of cefozopran in rabbits

| Infusion rate of cefozopran (mg/kg/h) | Plasma concentration of cefozopran (μg/ml) |                      | Cefozopran urinary excretion (μg/min) | Cefozopran glomerular filtration (μg/min) | CL <sub>CEF</sub> <sup>b</sup> (ml/min) | CL <sub>CR</sub> <sup>c</sup> (ml/min) | CL ratio (CL <sub>CEF</sub> /CL <sub>CR</sub> ) |
|---------------------------------------|--|----------------------|---------------------------------------|---|---|--|---|
|                                       | Total                                      | Unbound <sup>a</sup> |                                       |   |   |  |   |
| 3.0                                   | 14.4 ± 2.5                                 | 13.9 ± 2.5           | 70.0 ± 17.0                           | 94.6 ± 17.7                               | 5.07 ± 0.29                             | 7.08 ± 0.04                            | 0.72 ± 0.04                                     |
| 6.0                                   | 41.7 ± 10.5                                | 36.4 ± 8.6           | 111.2 ± 26.8                          | 127.6 ± 25.2                              | 3.07 ± 0.23                             | 3.99 ± 0.31                            | 0.77 ± 0.06                                     |

Values represent means ± SE (n=3).

<sup>a</sup> Each protein binding of cefozopran was determined by centrifugal ultrafiltration method.

<sup>b</sup> Cefozopran clearance.

<sup>c</sup> Creatinine clearance.

ら<sup>9)</sup>の非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用いて解析した。

7. 統計学的解析

実験結果の有意差検定は Student の t-test により行った。

実験成績および考察

1. プロベネシド使用投与時の血中濃度推移

ラット, ウサギ及びサルにおける cefozopran 静脈内投与後の血中濃度に及ぼすプロベネシド (尿細管分泌阻害剤) 投与の影響について検討した (Table 1)。

プロベネシド併用投与群の各動物における cefozopran の血中濃度曲線下面積 (AUC), 血中半減期 (T<sub>1/2</sub>), 全身クリアランス (CLp) 値は, cefozopran 単独投与群のそれらとほぼ同程度であった。サルにおける cefozopran 単独投与群およびプロベネシド併用投与群の平均 AUC (±SD) がそれぞれ 108 (±28.6) および 138 (±26.6) であったが, 統計学的に有意差は認められなかった。これらの動物における cefozopran の尿中排泄には, 尿細管分泌の関与はなく, 主として糸球体濾過により尿中排泄されることが示唆された。

2. ウサギにおける cefozopran の腎クリアランス

Cefozopran の腎排泄機序について, ウサギを用いて腎クリアランス実験により検討した (Table 2)。Cefozopran の尿中排泄量は糸球体濾過量に比して小さく, クレアチンクリアランスに対する cefozopran 腎クリアランスの比率は 0.72~0.77 と低値を示した。

ウサギにおいて cefozopran は糸球体濾過された後, 一部分が尿細管部位で再吸収されることが示唆された。

3. ウサギにおける cefozopran の stop-flow パターン

ウサギにおける cefozopran の腎排泄機序について, さらに cefozopran の尿細管部位における分泌あるいは再吸収の有無を確認するために, stop-flow 法により検討した。

尿細管各部位の指標として, 近位尿細管分泌 (または再吸収) には PAH 濃度を, 遠位尿細管再吸収には

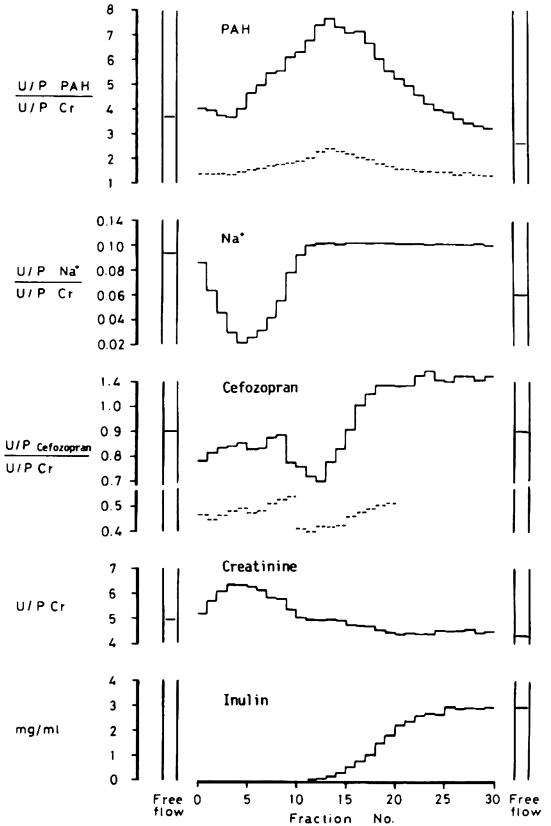


Fig. 1. Stop-flow pattern of cefozopran in rabbits

Cefozopran was administered at a priming dose of 10 mg/kg, followed by a sustaining dose of 5.0 mg/kg per hr.

——, Before probenecid was administered;

-----, after probenecid was administered.

U/P, Concentration in urine /concentration in plasma.

Na<sup>+</sup>および K<sup>+</sup>の濃度を測定した。糸球体濾過原尿の指標として, 尿流開放直前に静脈内投与したイヌリンの濃度を測定した。さらに, 尿中および血中のクレアチン濃度を測定し, 尿中および血中のクレアチニン濃

度比 (U/P Cr) を尿濃縮の指標とした。

ウサギにおける cefozopran の典型的な stop-flow パターンを Fig. 1 に示す。このパターンの縦軸は、各種測定物質の尿中および血中濃度比 (U/P) を U/P Cr で除した値で表示している。ウサギにおいては、近位尿細管部位を示す PAH の正のピーク出現部位に、cef-zopran の負のピークが認められた。遠位尿細管部位を示す Na<sup>+</sup>濃度の負のピーク出現部位には cefozopran のピークは認められなかった。また、近位尿細管部位における負のピークはプロベネシド前投与によってもほとんど影響をうけなかった。

したがって、ウサギにおいては cefozopran は糸球体濾過により排泄された後、一部分は近位尿細管部位で再吸収されることが示唆された。さらに、腎クリアランス実験の結果から、近位尿細管部位での再吸収は糸球体濾過量の約 20 % であることが明らかにされた。

Cefozopran の血清蛋白結合率はいずれの動物種においても極めて低いことから<sup>2,3)</sup>、本薬は主として糸球体濾過により尿中に排泄されるものと考えられるが、ウサギの中動物においては一部が近位尿細管部位で再吸収され、血中濃度の持続に関与していることが示唆された。

#### 謝 辞

本研究に御協力いただいた当創薬研究本部の川畑知行、吉岡由里子(実験補助)及び薬剤安全性研究所の毒性試験グループ(サル投与実験援助)の諸氏に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Iwahi T, Okonogi K, Yamazaki T, Shiki S, Kondo M, Miyake A, Imada A: *In vitro* and *in vivo* activities of SCE-2787, a new parenteral cephalosporin with a broad spectrum. *Antimicrob Agent Chemother* 36: 1358-1366, 1992
- 2) Kita Y, Yamazaki T, Imada A: Comparative pharmacokinetics of SCE-2787 and related antibiotics in experimental animals. *Antimicrob Agent Chemother* 36: 2481-2486, 1992.
- 3) 喜多八洲男, 木村義昭, 山崎俊幸, 今田哲: 新規セフェム系抗生物質, Cefozopran の実験動物における体内動態. *Chemotherapy* 41(S-4): 121~130, 1993
- 4) Malvin RL, Wilde WS, Sullivan LP: Location of nephron transport by stop flow analysis. *Am. J. Physiol.* 194: 135-142, 1958
- 5) Waugh WH, Beall PT: Simplified measurement of *p*-amino-hippurate and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.* 5: 429-436, 1974
- 6) Schreiner GE: Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 117-120, 1950
- 7) Folin O, Wu H.: A system of blood analysis. *J. Biol. Chem.* 38: 81-110, 1919
- 8) Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* 4: 879-885, 1981

## Mechanism of renal excretion of cefozopran in rats, rabbits and monkeys

Yasuo Kita, Yoshiaki Kimura, Kenji Okonogi, Toshiyuki Yamazaki and Akira Imada

Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

17-85, Juso-Honmachi, 2-Chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

The mechanism of the renal excretion of cefozopran was investigated in rats, rabbits and monkeys.

Prior administration of probenecid did not affect the area under the plasma concentration-time curve, the elimination half-life or the plasma clearance of cefozopran in rats, rabbits and monkeys.

The renal clearance of cefozopran was 0.72~0.77 times lower than creatinine clearance in rabbits. In the stop-flow pattern of cefozopran, a specific trough was observed corresponding to the peak of *p*-aminohippuric acid.

These results suggest that cefozopran is mainly excreted in the urine through glomerular filtration in rats, rabbits and monkeys, and is reabsorbed in part from renal proximal tubules in rabbits.