

Tazobactam/Piperacillinの各種動物における代謝

松下 仁・小室昌仁・前田利松・南 慶典・佐川久美子*

大鵬薬品工業株式会社 製薬センター 代謝分析研究所*

(*大鵬薬品工業株式会社 製薬センター 化学療法剤研究所)

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) の代謝物の検索をラジオ-HPLCを用いて、また活性代謝物の検索をTLC-バイオオートグラフィーを用いて検討した。次にtazobactam (TAZ) の代謝物M-1の生成臓器について、血漿、臓器ホモジネートを用いた*in vitro*試験により検討し、次の結果を得た。

1. ラットに ^{14}C -TAZ/PIPCあるいはTAZ/ ^{14}C -PIPCを静脈内投与して、血漿、尿および胆汁中代謝物を検索し、定量した。TAZの代謝物として、 β -ラクタム環が開裂・分解した構造を有するM-1を同定した。Piperacillin (PIPC) は主として未変化体として検出され、主要代謝物は存在しなかった。ラットの尿中にはTAZ未変化体が約70%、TAZの代謝物M-1が約17%、PIPC未変化体が約25%排泄された。胆汁中にはTAZが約2%、M-1が約1%、PIPCが約60%排泄された。

2. ラット、イヌおよびサルにTAZ/PIPC 50mg/kgを投与して、血漿および尿のバイオオートグラムを作製し、活性代謝物を検索した。その結果、TAZ、PIPCともに、標準品と同位置に1スポットのみ検出され、活性代謝物は存在しなかった。

3. マウスの肺、肝、腎、小腸の25%ホモジネートおよび血漿中の安定性について検討した。マウスでは血漿、腎、小腸でM-1が生成した。

Key words : tazobactam/piperacillin, β -lactamase inhibitor, 代謝, 実験動物

Tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) は強く広い阻害スペクトルを有する β -ラクタマーゼ阻害剤tazobactam (TAZ) と長い臨床実績を持つpiperacillin (PIPC) を1:4の力価比で配合した新規抗生剤である。

TAZ/PIPCは、ブドウ球菌から緑膿菌におよぶ幅広い抗菌スペクトルを示し、特に β -ラクタマーゼによる耐性菌に対してはPIPCに比べ強い抗菌力を示す¹⁾。また近年注目を集めている第3世代のセフェム剤をよく分解する β -ラクタマーゼによるセフェム耐性菌に対しても優れた抗菌力を有する²⁻⁴⁾。

今回、著者らは、TAZ/PIPCの代謝物の検索を標識化合物を用いたHPLC法、活性代謝物の検索をTLC-バイオオートグラフィーで検討した。得られたTAZの代謝物M-1の生成について臓器ホモジネート、血漿を用いた*in vitro*試験により検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および実験方法

1. 薬物

1) 標識化合物

^{14}C で標識されたTAZおよびPIPC (^{14}C -TAZおよび ^{14}C -PIPCと略) は、それぞれ小室ら⁵⁾および才川ら⁶⁾の

報告した合成経路にしたがってアマシャム社(英国)で合成した。 ^{14}C -TAZおよび ^{14}C -PIPCの化学構造と標識位置をFig. 1に示した。 ^{14}C -TAZおよび ^{14}C -PIPCの比放射能はそれぞれ350MBq/mmol, 96.0MBq/mmolであり、薄層クロマトグラフィー(TLC)により測定された放射化学的純度は ^{14}C -TAZで98%以上、 ^{14}C -PIPCで95%以上であった(TLC条件; プレート: シリカゲル60F₂₅₄, Merck, 展開溶媒; ^{14}C -TAZ: アセトン/ジエチルエーテル/酢酸/水(10/4/2/3), ^{14}C -PIPC: 酢酸エチル/エタノール/水(3/1/1))。

2) 非標識化合物

TAZおよびSodium PIPCを用いた。

2. 実験動物

マウス(ddy系: 代謝物の同定, 雄, 体重23~30g; ICR系: 臓器ホモジネート・血漿中の安定性, 雄, 体重31~41g), ラット(SD系: 雄, 体重195~285g), イヌ(ビーグル犬: 雄, 体重10.9~12.5kg)およびサル(カニクイザル: 雄, 体重5.6, 6.1kg)を用いた。

3. 投与液の調製

標識化合物を用いた代謝物の検索は、 ^{14}C -TAZを用

いて調製したTAZ/PIPC (^{14}C -TAZ/PIPCと略)および ^{14}C -PIPCを用いて調製したTAZ/PIPC (TAZ/ ^{14}C -PIPCと略)の2投与群で実施した。投与量はTAZ/PIPC 50 mg (TAZ 10mg + PIPC40mg, とともにフリー体換算) / 1.85MBq/2ml/kgとし、生理食塩液を用いて調製した。フリー体である非標識TAZおよびTAZとPIPCの両 ^{14}C 標識体は等モルの炭酸水素ナトリウムを添加しナトリウム塩として溶解した。

活性代謝物の検索に使用した投与液はフリー体であるTAZを等モル量の炭酸水素ナトリウムを含む生理食塩液に溶解した後、PIPCを加え溶解し、TAZ/PIPC 50mg/kgで、ラットでは尾静脈、イヌでは前腕正中皮静脈、サルでは伏在静脈より投与した。投与量はラットでは2ml/kg、イヌおよびサルでは1ml/kgとした。

臓器ホモジネート・血漿中安定性試験に使用した添加液は、フリー体であるTAZを等モル量の炭酸水素ナトリウムを含む生理食塩液に溶解した後、TAZ 20 $\mu\text{g/ml}$, PIPC 80 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となるように臓器ホモジネートおよび血漿に添加した。

4. 代謝物の検索・同定・測定

1) 標識化合物を用いた検索、測定

1群3匹のラットに ^{14}C -TAZ/PIPCあるいはTAZ/ ^{14}C -PIPCを投与した。投与後5, 15, 30分の血漿、自然排泄尿および胆汁を採取した。

(a) 放射能の測定

血漿はそれぞれ50 μl をオキシダイザーコーンにアブライシ乾燥させた後、サンプルオキシダイザー (Tri-Carb C-306, Packard) にて燃焼後、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2000CA, Packard) にて放射能を測定した。尿および胆汁は、リン酸緩衝液 (0.1M, pH6.0) を加えて一定量にメスアップした後、各試料

100 μl に液体シンチレーター (ACS-II, Packard) を加え、血漿と同様に放射能を測定した。

(b) サンプル処理、ラジオ-HPLC

採取した血液はただちに5 $^{\circ}\text{C}$ で10000rpm \times 40秒間遠心分離し (MR-50, TOMY), 得られた血漿に4mlの氷冷した0.5Nギ酸/アセトニトリル (1/99, V/V) を加えながらミキシングし、除タンパク処理した。TAZはラット血漿中で不安定であるため、採血開始から除タンパク処理までを3分以内に行った。除タンパク処理した血漿は5 $^{\circ}\text{C}$ で3000rpm \times 15分間遠心分離し (05PR-22, HITACHI), 得られた上清を N_2 ガス気流下乾固した後、100 μl の蒸留水に溶解し、その30 μl をHPLCに注入した。

尿および胆汁はリン酸緩衝液 (0.1M, pH6.0) を加えて希釈した後、HPLCへの注入放射能が約0.5KBqとなるように各試料の75 \sim 150 μl を注入した。

HPLC分析は、カラムとしてShim-pack CLC-ODS (6.0 ϕ \times 150mm, Shimadzu) を使用し、Shimadzu LC-4A システムにて行った。 ^{14}C -TAZおよびその代謝物の分析は、移動相として15%アセトニトリル/PIC-A low UV (Waters) を用いて、流速1.0ml/minで行い、 ^{14}C -PIPCおよびその代謝物の分析は、移動相にA液として5mMリン酸緩衝液 (pH6.86), B液としてアセトニトリルを用い、移動相B液の濃度が0 \sim 3分で7 \sim 10%, 3 \sim 13分で10 \sim 25%となる直線グラジエント後、13 \sim 15分は25%の定組成となる条件下、流速1.5ml/minで溶出した。試料注入後20分まで一定時間毎に溶出液を分取し、その放射能を測定することによりラジオクロマトグラムを得た。HPLC溶出液中の放射能は、各フラクションの溶出液に液体シンチレーター (ACS-II, Packard) を加え、前項と同様にして放射能を測定し

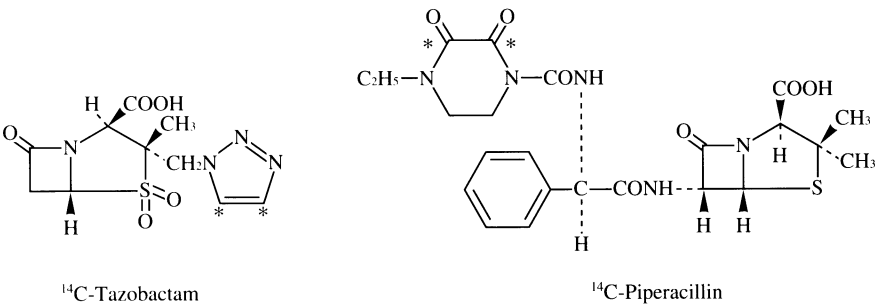


Fig. 1. Chemical structures and labeled positions of tazobactam and piperacillin.

* : ^{14}C labeled position

た。

2) 活性代謝物の検索

ラット、イヌおよびサルにTAZ/PIPCを投与して、一定時間後の血液、0～6時間の尿を採取した。血液、尿の処理は前項に準じた。

薄層クロマトグラフィー(TLC)-バイオオートグラフィーは、薄層としてシリカゲル60W (Kieselgel 60W, layer thickness 0.25mm, Merck)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に浸した後、110℃で30分間乾燥したものを使用し、展開溶媒として酢酸エチル：アセトン

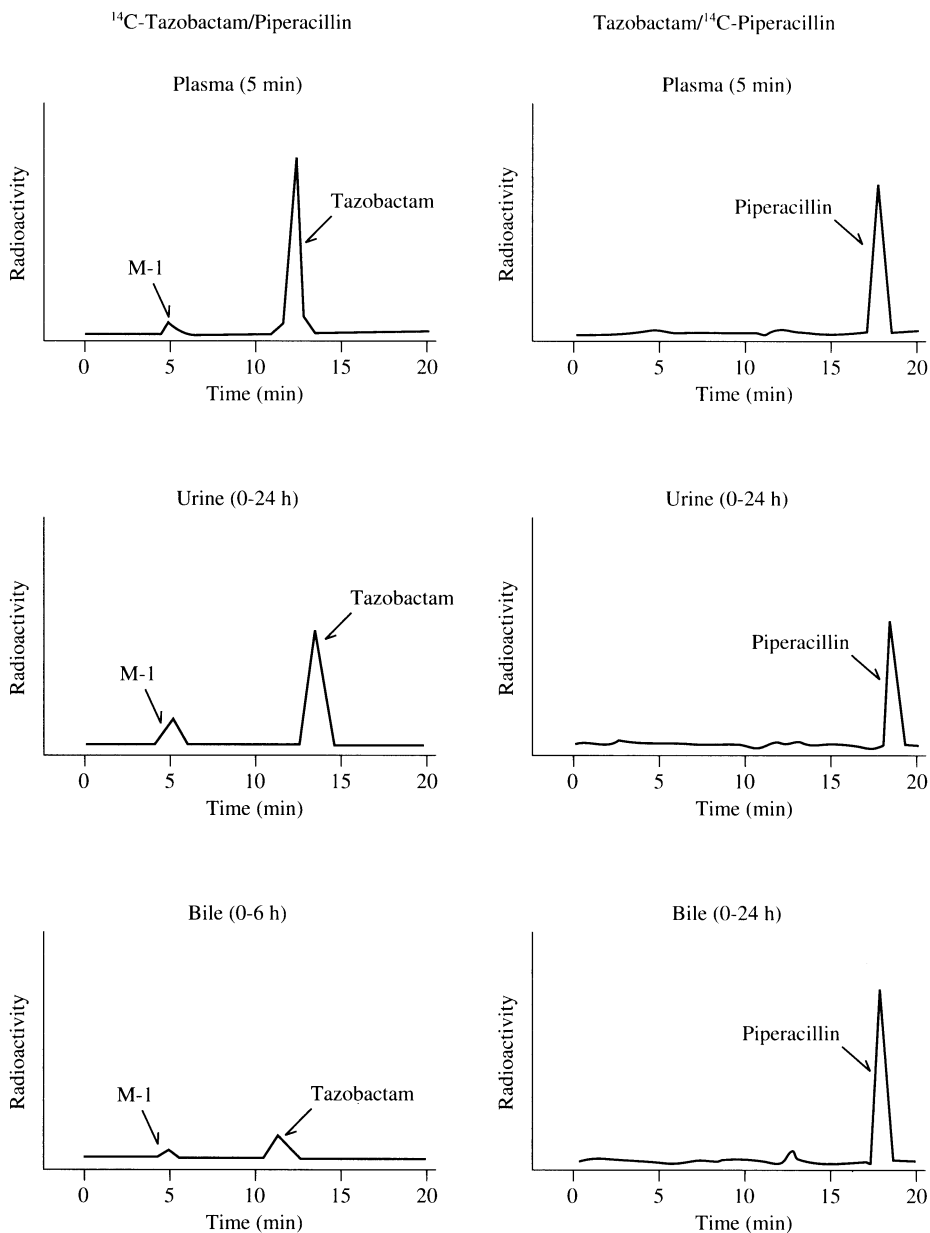


Fig. 2. Typical HPLC chromatograms of radioactivity in rats following intravenous administration of ^{14}C -tazobactam/piperacillin or tazobactam/ ^{14}C -piperacillin (10/40 mg/kg).

: 酢酸: 水 (30:10:6:5) を用いた。

TAZのバイオオートグラフィーは検定菌として *Escherichia coli* 603 を、培地としてセフォペラゾン (CPZ, 富山化学) 150 μ g/ml を含有する Mueller-Hinton agar (pH8, Difco) を用いた。

PIPCのバイオオートグラフィーは検定菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を、培地に Sensitivity test agar (栄研) を用いた。

3) 代謝物の同定

マウスにTAZを投与した後、12時間までに排泄された尿を採取した。尿試料を Sep-pak C₁₈ にアプライしたのち蒸留水で溶出した。溶出液をHPLCに注入して代謝物M-1を分取した。HPLC条件は、カラムとして μ -Bondapak C₁₈ (3.9 ϕ ×300mm, Waters), 移動相として HCl 水溶液 (pH3.0) を使用し、流速 1ml/min とした。M-1の検出は、UV230nm で行った。

分取液は集めて凍結乾燥し、¹H核磁気共鳴 (¹H-NMR, FX-100型核磁気共鳴装置, JEOL) および Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB-MS, DX-303型, JEOL) で同定を行った。

またTAZ 5mgを0.04N NaOH溶液5mlに溶解後30℃

で40分間インキュベートし、0.04N HCl 5mlを加えて反応を停止し、アルカリ分解物を調製した。

5. TAZの臓器ホモジネート・血漿中の安定性

エーテル麻酔下マウスの下大静脈より採血し、遠心分離 (3000rpm, 15min, 4℃) により血漿を得た。

また、無麻酔のマウスを断頭放血し、下大静脈より生理食塩液で灌流を行った後、肺、肝、腎、小腸を採取し、肺、肝、腎はテフロンホモジナイザーで25% ホモジネートを調製した。また、小腸は経口投与用ゾンデを用い、生理食塩液で内容物を除去した後、ポリトロンを用いて25% ホモジネートを調製した。なお、緩衝液として 50mM MOPS [3-(N-morpholino) propane-sulfonic acid, pH7.4] を使用した。反応は、組織ホモジネートまたは血漿にTAZ/PIPCを最終濃度としてそれぞれ20および80 μ g/mlとなるように添加し、37℃で60分間行った。M-1濃度の測定は佐川ら⁷⁾の方法に準じてHPLC法により行った。

II. 実験結果

1. 代謝物の検索・同定・測定

1) ラジオ-HPLC

Fig. 2に¹⁴C-TAZ/PIPCあるいはTAZ/¹⁴C-PIPC投与後

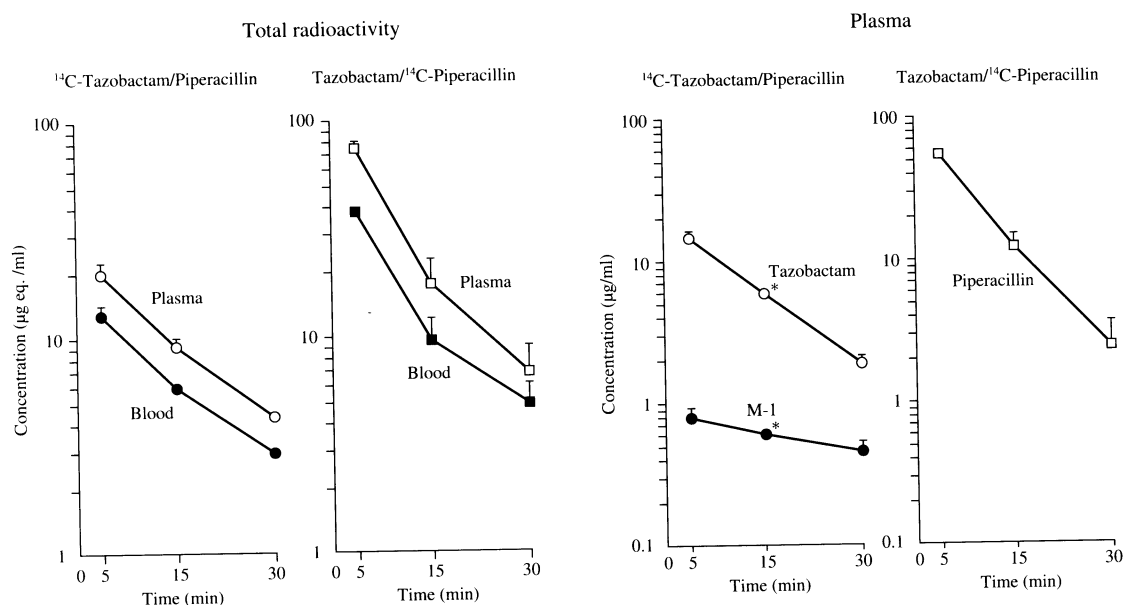


Fig. 3. Plasma and blood concentrations of radioactivity, tazobactam, M-1 and piperacillin in rats following intravenous administration of ¹⁴C-tazobactam/piperacillin or tazobactam/¹⁴C-piperacillin (10/40 mg/kg).

Data represent the mean \pm SD of three animals.

* : Data represent the mean value of two animals.

の血漿(5min値), 尿(0~24hr)および胆汁(^{14}C -TAZ/PIPC: 0~6hr, TAZ/ ^{14}C -PIPC: 0~24hr)の代表的HPLCラジオクロマトグラムを示した。HPLCからの放射能の回収率は86.4~101.7%であった。

^{14}C -TAZ/PIPCを投与した群では, 血漿, 尿, 胆汁いずれにおいても, TAZの代謝物として保持時間約5分の位置にM-1が検出された。TAZ/ ^{14}C -PIPC投与群では, 血漿, 尿, 胆汁のいずれの試料中においても, 主として未変化体として推移した。 ^{14}C -TAZあるいは ^{14}C -PIPC単独投与においても同様の結果が得られた。

2) 血液・血漿中放射能濃度

Fig. 3に ^{14}C -TAZ/PIPCあるいはTAZ/ ^{14}C -PIPC投与後の血液, 血漿中放射能濃度推移を示した。両投与群とも放射能はほとんどが血漿中に存在した。

^{14}C -TAZ/PIPC投与群では, 血漿中のM-1は未変化体に対して5分で5.5%, 15分で11.4%, 30分で26.5%存在した。

3) 尿中, 胆汁中排泄

^{14}C -TAZ/PIPCあるいはTAZ/ ^{14}C -PIPCを投与した後の尿中排泄率をTable 1に, 胆汁中排泄率をTable 2に示した。

尿中には投与後24時間までに, ^{14}C -TAZ/PIPC投与群では, TAZ未変化体として69.2%, 代謝物M-1として16.9%が, TAZ/ ^{14}C -PIPC投与群ではPIPC未変化体として24.5%が排泄された。

また胆汁中には, ^{14}C -TAZ/PIPC投与後6時間までにTAZ未変化体として1.9%, M-1として0.6%が, また

TAZ/ ^{14}C -PIPC投与群では投与後24時間までにPIPC未変化体として57.9%が排泄された。

4) 代謝物の同定

代謝物M-1の ^1H -NMRスペクトルでは δ 1.3 (3H, S), δ 4.5 (1H, S), δ 4.8 (2H, S), δ 7.9 (1H, S), δ 8.1 (1H, S)が観察され, FAB-MSでは249(M+1) $^+$ が検出された。また, TAZのアルカリ分解物の ^1H -NMR, FAB-MSのチャートはM-1のそれと一致した。以上の結果からTAZの代謝物M-1はアルカリ分解物と同一でFig. 4に示した構造を有していることが判明した。

5) 活性代謝物の検索

ラット, イヌおよびサル血漿および尿のバイオオートグラムをFig. 5に示した。いずれの動物の血漿, 尿においてもTAZ, PIPC標品と同位置に1つの阻止円が確認されたのみで, 活性代謝物は検出されなかった。

2. TAZの臓器ホモジネート・血漿中の安定性

TAZ/PIPCを臓器ホモジネートおよび血漿に添加後

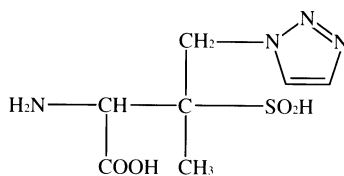


Fig. 4. Chemical structure of M-1

Table 1. Urinary excretion of tazobactam, M-1 and piperacillin in rats following intravenous administration of ^{14}C -tazobactam/piperacillin or tazobactam/ ^{14}C -piperacillin (10/40 mg/kg)

Compound	Urinary excretion (0~24 h, % of dose)
Tazobactam	69.2 \pm 4.7
M-1	16.9 \pm 0.7
Piperacillin	24.5 \pm 3.9

Each value represents the mean \pm SD of three animals.

Table 2. Biliary excretion of tazobactam, M-1 and piperacillin in rats following intravenous administration of ^{14}C -tazobactam/piperacillin or tazobactam/ ^{14}C -piperacillin (10/40 mg/kg)

Compound	Biliary excretion (% of dose)
Tazobactam	1.9 \pm 0.3 ^{a)}
M-1	0.6 \pm 0.1 ^{a)}
Piperacillin	57.9 \pm 5.4 ^{b)}

Each value represents the mean \pm SD of three animals.

a): 0~6 h, b): 0~24 h

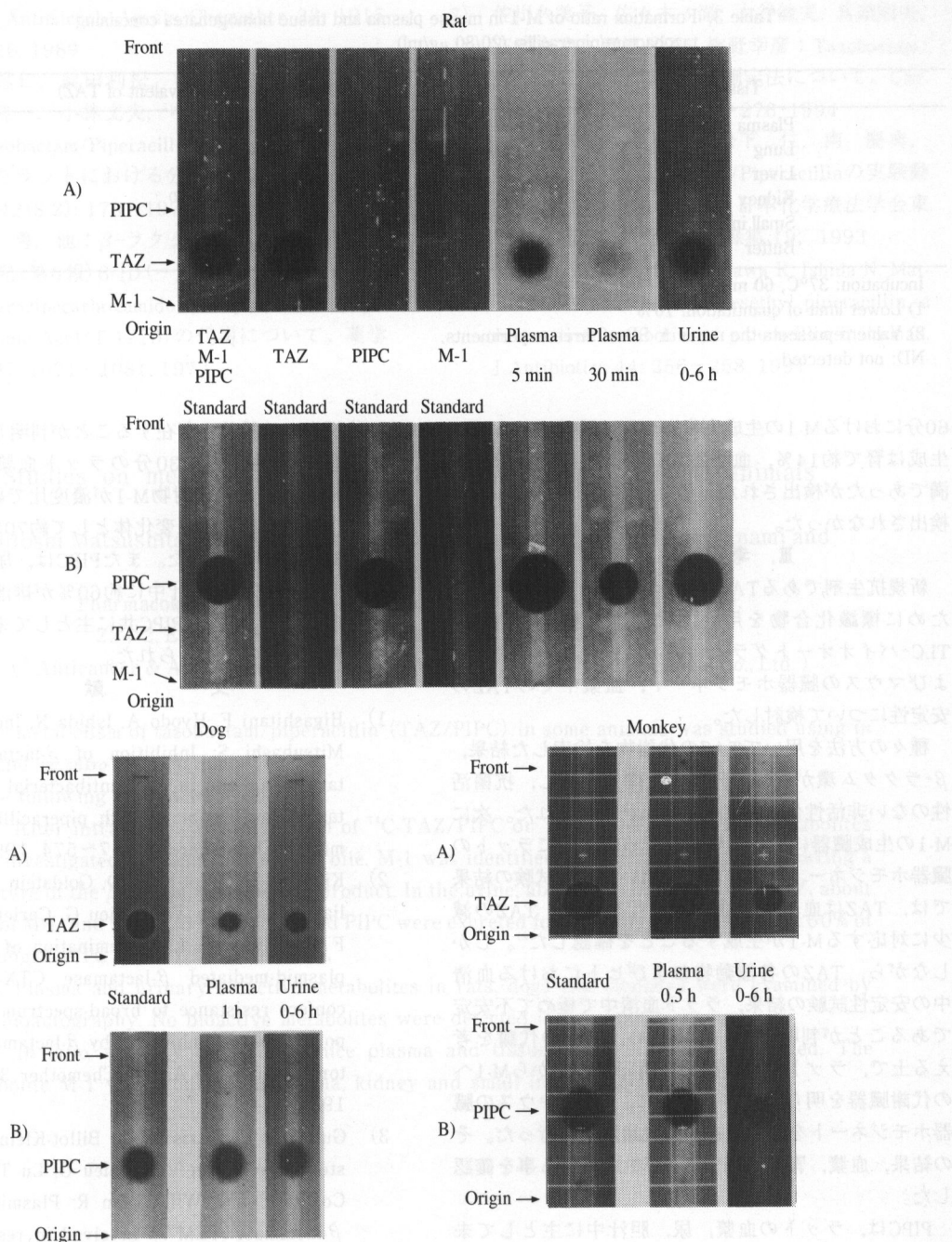


Fig. 5. Bioautograms of plasma and urine in rats, dogs and monkeys following intravenous administration of tazobactam/piperacillin (10/40 mg/kg).

TLC : Kieselgel 60 W [Treated with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), Merck]

Solvent : Ethyl acetate : Acetone : Acetic acid : Water (30 : 10 : 6 : 5)

Organism : a) *Escherichia coli* 603 in Mueller-Hinton agar containing cefoperazone (150 µg/ml, pH 8)

b) *Micrococcus* ATCC 9341 in sensitivity test agar

TAZ : tazobactam, PIPC : piperacillin

Table 3. Formation ratio of M-1 in mouse plasma and tissue homogenates containing tazobactam/piperacillin (20/80 $\mu\text{g/ml}$)

Tissue	M-1 formation (% equivalent of TAZ)
Plasma	<10 ¹⁾
Lung	ND
Liver	ND
Kidney	13.7 \pm 1.3 ²⁾
Small intestine	<10 ¹⁾
Buffer	ND

Incubation: 37°C, 60 min

1) Lower limit of quantitation: 10%

2) Value represents the mean \pm SD of three experiments.

ND: not detected

60分におけるM-1の生成率をTable 3に示した。M-1の生成は腎で約14%, 血漿および小腸では定量限界未満であったが検出された。また肺および肝ではM-1は検出されなかった。

Ⅲ. 考 察

新規抗生剤であるTAZ/PIPCの薬物動態を解明するために標識化合物を用いた代謝物の検索, 測定, TLC-バイオオートグラムによる活性代謝物の検索およびマウスの臓器ホモジネート, 血漿中でのTAZの安定性について検討した。

種々の方法を用いてTAZの代謝物を検索した結果, β -ラクタム環が開裂・分解した構造を有し, 抗菌活性のない非活性代謝物であるM-1が同定された。次にM-1の生成臓器に関する検討を行った。先にラットの臓器ホモジネートおよび血漿を用いた代謝試験の結果では, TAZは血漿中で速やかに代謝され, TAZの減少に対応するM-1が生成することを確認した⁸⁾。しかしながら, TAZの各種動物およびヒトにおける血清中の安定性試験の結果, ラット血清中で極めて不安定であることが判明した。このため, TAZの代謝を考える上で, ラット以外の動物を用いてTAZからM-1への代謝臓器を明らかにするために, 今回, マウスの臓器ホモジネートを用いた*in vitro*代謝試験を行った。その結果, 血漿, 腎, 小腸でM-1が生成される事を確認した。

PIPCは, ラットの血漿, 尿, 胆汁中に主として未変化体として存在していた。またバイオオートグラムを用いたラット, イヌ, サルにおける活性代謝物の検索においてもPIPCに活性代謝物は検出されなかった。以上の動物におけるPIPCの代謝に関する結果はオウラの報告⁶⁾と一致した。しかしながら, ヒトにおいては臨床第I相試験において, PIPCの新規活性代謝物としてDesethyl-PIPCが同定されており⁹⁾, PIPCの脱エ

チル化反応には種差の存在することが判明した。

TAZ/PIPC投与後5~30分のラット血漿中には, TAZ未変化体に対し代謝物M-1が濃度比で約5~27%存在し, 尿中にはTAZ未変化体として約70%, M-1として約17%が排泄された。またPIPCは, 尿中に未変化体として約25%, 胆汁中に約60%が排泄された。これらの結果よりTAZ, PIPC共に主として未変化体として挙動するものと考えられた。

文 献

- 1) Higashitani F, Hyodo A, Ishida N, Inoue M and Mitsuhashi S: Inhibition of β -lactamases by tazobactam and in-vitro antibacterial activity of tazobactam combined with piperacillin. J Antimicrob Chemother 25: 567~574, 1990
- 2) Kitzis M D, Billot-Klein D, Goldstein F W, Williamson R, Tran Van Nhieu G, Carlet J, Acar J F and Gutmann L: Dissemination of the novel plasmid-mediated β -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins, and its inhibition by β -lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 32: 9~14, 1988
- 3) Gutmann L, Kitzis M D, Billot-Klein D, Goldstein F W, Tran Van Nhieu G, Lu T, Carlet J, Collatz E and Williamson R: Plasmid-mediated β -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. Rev Infect Dis 10: 860~866, 1988
- 4) Chanal C M, Sirot D L, Petit A, Labia R, Morand A, Sirot J L and Cluzel R A: Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plas-

- mids. Antimicrob Agents Chemother 33: 1915～1920, 1989
- 5) 小室昌仁, 前田利松, 松下 仁, 野崎 修, 平尾隆一, 小林文夫, 中野大三郎, 西森司雄: Tazobactam/Piperacillinの¹⁴C-標識化合物を用いたラットにおける分布・排泄。Chemotherapy 42(S-2): 178～197, 1994
 - 6) 才川 勇, 他: β -ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第6報) 6. [D(-)- α -(4-Ethyl-2,3-dioxo-1-piperazinecarboxamido) phenylacetamido] penicillanic Acid(T-1220)の代謝について。薬学雑誌97: 1071～1081, 1977
 - 7) 佐川久美子, 佐々木 徹, 大谷敏夫, 兵頭昭夫, 石田直文, 西川昌子, 梅野幸彦: Tazobactam/Piperacillinの生体内濃度測定法について。Chemotherapy 42(S-2): 263～276, 1994
 - 8) 前田利松, 小室昌仁, 松下 仁, 南 慶典, 佐川久美子: Tazobactam/Piperacillinの実験動物における代謝。第40回日本化学療法学会東日本支部総会紙上発表抄録集 19, 1993
 - 9) Minami Y, Komuro M, Sakawa K, Ishida N, Matsumoto K and Oishi K: Desethyl piperacillin, a new active metabolite of piperacillin in human. J Antibiotics 44: 256～258, 1991

Studies on metabolism of tazobactam/piperacillin in some animals

Hitoshi Matsushita, Masahito Komuro, Toshimatsu Maeda, Yoshinori Minami and Kumiko Sakawa[#]

Pharmacokinetics Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

([#] Anticancer & Antimicrobial Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.)

The metabolism of tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) in some animals was studied using *in vivo* and *in vitro* examinations.

The following results were obtained.

1. After intravenous administration of ¹⁴C-TAZ/PIPC or TAZ/¹⁴C-PIPC to rats, metabolites were investigated in plasma, urine and bile. M-1 was identified as a metabolite of TAZ having a structure of the β -lactam ring-opening product. In the urine, about 70% of unchanged TAZ, about 17% of M-1, and about 25% of unchanged PIPC were excreted for 24h, and in the bile about 60% of unchanged PIPC was excreted for 24h.

2. Plasma and urinary bioactive metabolites in rats, dogs and monkeys were examined by TLC-bioautography. No bioactive metabolites were detected in any specimens.

3. *In vitro*, stability of TAZ in mice plasma and tissue homogenate was examined. The metabolite M-1 was produced in plasma, kidney and small intestine homogenates.