

## Biapenemのイヌにおける腎排泄機序

増田達樹・山下憲昭・河島浩輔・原田 寧・成毛 駿  
日本レダリー株式会社生物研究所\*

Biapenem(BIPM)のイヌにおける腎排泄機序についてストップ・フロー法により検討した。ストップ・フローパターンにBIPMの極大ピークは認められず、尿細管からの分泌はなかった。また、ストップ・フローパターンはプロベネシド投与により影響されなかった。これらの試験成績はBIPMがイヌでは主に糸球体濾過により、排泄されることを示唆するものであった。

**Key words:** Biapenem, イヌ, ストップフロー

Biapenem(BIPM)は日本レダリー株式会社で新規に合成されたカルバペネム系抗生物質であり、強い抗菌力と広域な抗菌スペクトルを有している。BIPMのイヌでの静脈内投与における生体内動態は投与量の60% (未変化体)および95% (ラベル体)が投与8時間までに尿中から回収されることから、腎排泄型と考えられた<sup>1,2)</sup>。そこで、本試験においてストップ・フロー試験を用いてイヌにおけるBIPMの腎排泄機序を検討した。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 試験動物および飼育条件

雄のビーグル犬(約10ヵ月齢, 米国ヘーゼルトン・LRE由来)4匹を本試験に使用した。実験時の体重は9.42~10.56 kgであった。動物は予備飼育期間中、室温23±2℃, 湿度50±10%, 換気回数約20回以上/時, 照明1日12時間(7時点灯19時消灯)に設定された動物室で飼育した。飼料(放射線滅菌済みイヌ用固型飼料CD-5, 日本クレア株式会社)を1日当たり約250 g与え、水は自由摂取させた。

#### 2. 被験物質および試薬溶液

BIPMは日本レダリー株式会社で合成されたもの(Lot No. 021M, 純度96.7%)を使用した。

生理食塩液: 日本薬局方注射用生理食塩液(小林製薬, Lot No. A7A8B)

20% w/vパラアミノ馬尿酸溶液: パラアミノ馬尿酸ナトリウム20w/v% 注射液(第一製薬株式会社, Lot No. EL29)を用いた。

10% w/vクレアチニン溶液: クレアチニン(和光純薬, 特級, Lot No. KPN1829)を生理食塩液に溶解した。

15% w/vマンニトール溶液: マンニトール(和光純薬, 特級, Lot No. KPM3670)を生理食塩液に溶解した。

5% w/vイヌリン溶液: イヌリン(和光純薬, 特級, Lot

No. CTN9480)を生理食塩液に溶解した。

6% w/vプロベネシド溶液: プロベネシド(Sigma, Lot No. 78F-0553)900 mgに1N NaOH水溶液2.5 mlおよび精製水を加え、加温により大部分を溶解した後、1N NaOHを数滴加えて溶解した、ついで精製水を加えて全量を15 mlとした。

Priming液: BIPMを10 mg/mlの濃度になるように生理食塩液に溶解した。2%パラアミノ馬尿酸および10%クレアチニンを生理食塩液に溶解した。

Sustaining液: 0.036%のBIPM, 15%のマンニトール, 0.1%のパラアミノ馬尿酸および0.25%のクレアチニンを生理食塩液に溶解した。

上記溶液は全て用時調製とし、濾過滅菌した。

#### 3. 手術処置および投与等

ペントバルビタール・ナトリウム30 mg/kgを静脈内投与して麻酔し、腹部正中切開を行い、左側の尿管にカニューレを挿入して採尿した。また、左大腿動脈と右大腿静脈にも同様にカニューレを挿入し、それぞれ採血および投与に用いた。

Priming液として、クレアチニン, 100 mg/kg, パラアミノ馬尿酸, 20 mg/kg, BIPM, 10 mg/kgをそれぞれ静脈内投与し、その直後から0.5 ml/min/kgの速度でsustaining液を静脈内に持続注入した。priming液投与約60分後、尿量が0.5 ml/min/kgになって安定してから、フリー・クリアランス測定用に3分間隔で2回採尿し、同時に採血した。ついで、尿管に挿入したカニューレを止血鉗子を用いて6分間閉塞し、尿流を停止させた。カニューレ開放1分前にイヌリン50 mg/kgを静脈内投与した。止血鉗子を外して停止させた尿流を開放し、噴出する尿を0.5 mlずつ連続的に30本採取した。その後、再びフリー・クリアランス測定用に3分間隔で2回採尿

\* 〒353 埼玉県志木市柏町1丁目6番34号

し、同時に採血した。以上の試験終了後、プロベネシド 30 mg/kg を静脈内に投与し、20分後に再び上記と同様にフリー・クリアランス試験とストップ・フロー試験を実施した。

4. 測定項目と測定方法

1) 測定項目

血液はヘパリン処理したシリンジで採血した後、3000 rpm で10分間遠心して得た血漿中の BIPM、クレアチニン、ナトリウム、カリウムおよびパラアミノ馬尿酸濃度を測定した。尿試料については血液と同項目を測定し、加えてイヌリンを測定した。

2) 測定方法

BIPM: 血漿中および尿中の BIPM 濃度は以下に示す条件で、HPLC により測定した。

血漿には適量のアセトニトリルおよびクロロホルムを加え除蛋白後の上清を、尿はエキクロディスク 13(0.45 μm, GL. Sciece)により濾過し、濾液をそれぞれ HPLC 用試料とした。測定機器は LC-GA(島津製作所)、分析カラムには Inertsil ODS-2(4.6×150nm, GL. Science)を用いた。移動相は血漿中 BIPM の場合は、0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.5)/アセトニトリル/0.2M 1-オクタンスルホン酸ナトリウム = 100/4/2(v/v/v) を、尿中 BIPM の場合には 0.05M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.5)/メタノール/0.1M 1-オクタンスルホン酸ナトリウム = 80/10/10 (v/v/v) を用いた。流速は 0.9ml/分とし、検出は血漿

中 BIPM の場合は 295nm で、尿中 BIPM の場合は 300nm でそれぞれ行った。

クレアチニン: アルカリ性ピクリン酸比色法により測定した。

ナトリウムおよびカリウム: 炎光光度法 (コーニング 455 型, コーニング社) により測定した。

イヌリン: Brn の方法<sup>3)</sup> に従い、測定した。即ち、尿試料 (25倍希釈尿) 1.0 ml を取り、これに 0.5% インドール-3-酢酸液 0.2 ml および濃塩酸 8.0 ml を加えて混和し、室温に一昼夜放置した後、530 nm で比色定量した。なお、0.5% インドール-3-酢酸液はインドール-3-酢酸 (和光純薬, 特級, Lot No. CTM145) 500 mg を 95% エタノール 100 ml に溶解したものをを用いた。

パラアミノ馬尿酸: Heyrovsky の方法<sup>4)</sup> に従い、測定した。即ち、血漿 0.2 ml を取り、10% トリクロロ酢酸 (和光純薬, Lot No. CTL8950) 1.8 ml, 精製水 0.5 ml を加えて混和した後、10分間放置し、3000 rpm で15分間遠心した。遠心後、上清 2.0 ml を分取し、Ehrlich 試薬 2.0 ml を加えて混和した後、465 nm で比色定量した。尿試料は 25倍希釈尿 0.5 ml を取り、精製水 2.5 ml, Ehrlich 試薬 3.0 ml を加え混和した後、465 nm で比色定量した。なお、Ehrlich 試薬は p-ジメチルアミノベンゼンアルデヒド (和光純薬, 特級 Lot No. CTK0295) 5.0 g を 95% エタノール 300 ml に溶解し、1N 塩酸 40 ml を加え、さらに蒸留水を加えて全量を 500 ml としたものをを用いた。

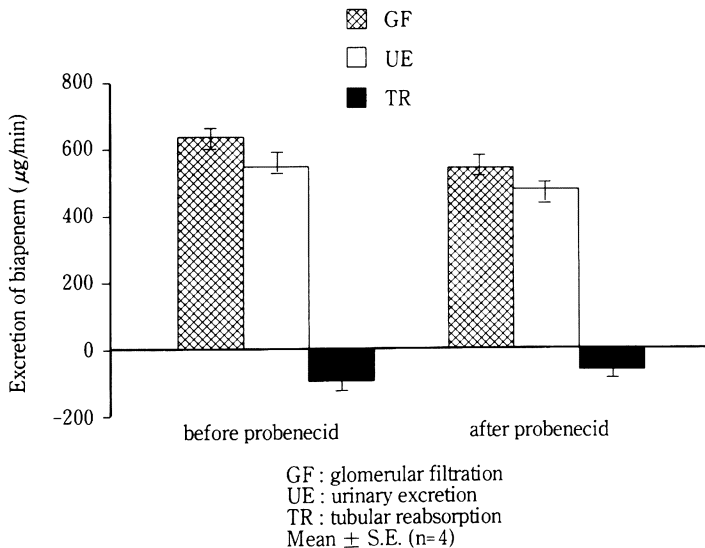


Fig. 1. Urinary excretion of biapenem in dogs

## 5. データ処理方法

## 1) フリーフロー・クリアランス試験

ストップ・フロー試験の前後に実施した採尿および採血から、BIPM、クレアチニンおよびパラアミノ馬尿酸のクリアランスを算出した。また、BIPMの血漿中濃度に糸球体濾過率(クレアチニン・クリアランス)を乗じ

てBIPMの糸球体濾過値を求め、BIPMの尿中排泄量との差を求め、BIPMの排泄におよぼす尿細管の関与について検討した。

## 2) ストップ・フロー試験

血漿中と尿中のBIPM、クレアチニン、ナトリウム、カリウムおよびパラアミノ馬尿酸の各濃度について尿

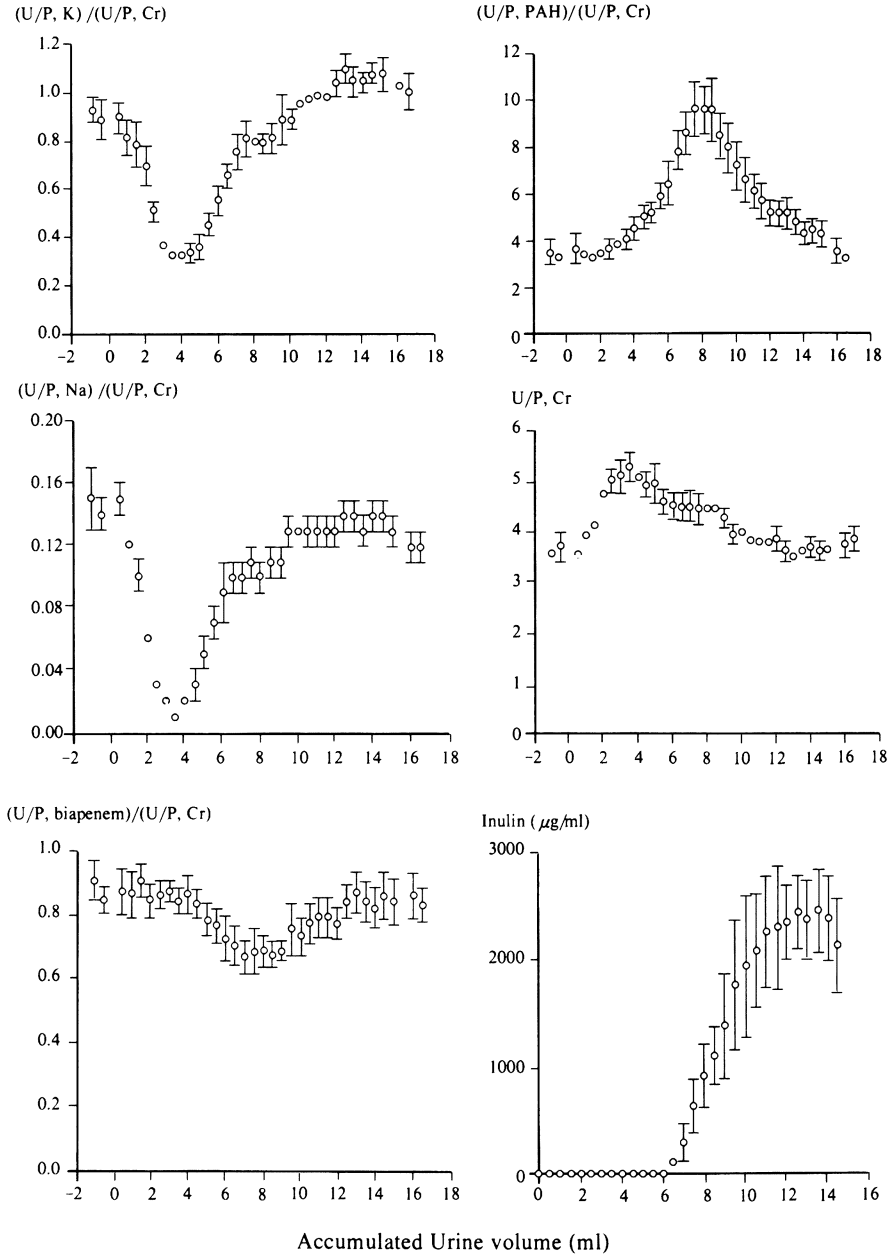


Fig. 2. Stop-flow pattern in dogs [Before probenecid]

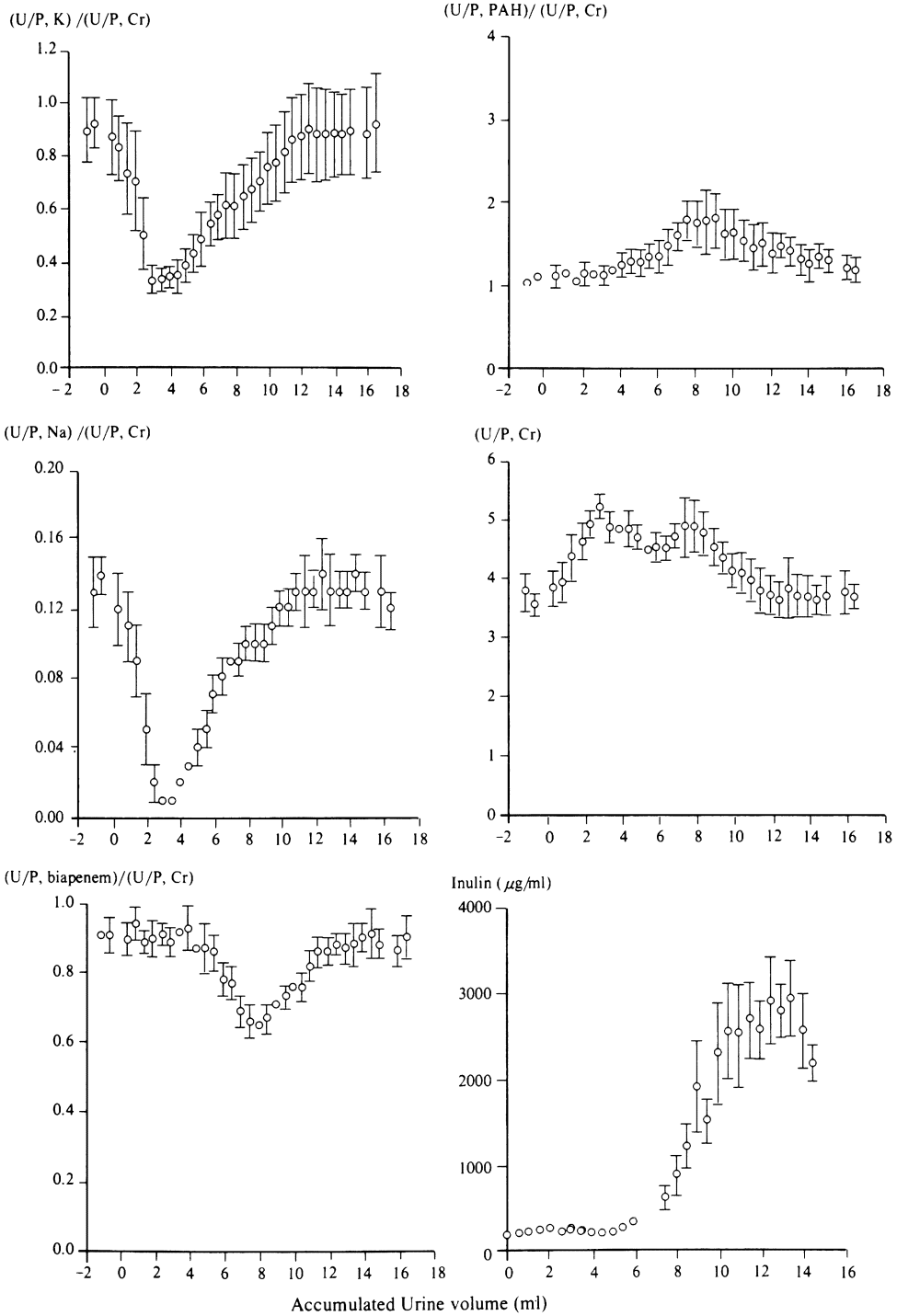


Fig. 3. Stop-flow pattern in dogs [After probenecid]

中濃度 (U) 対血漿中濃度 (P) 比 (U/P) を求めた。BIPM, ナトリウム, カリウムおよびパラアミノ馬尿酸は各々の濃度比をさらに尿の濃縮比を指標としたクレアチニンの濃度比で除した値  $(U/P, X)/(U/P, Cr)$  を求め, これを縦軸とし, 横軸には 0.5 ml ずつ採取した尿の累積容積を表示して, ストップ・フローパターンを作図した。また, イヌリンについては尿中のイヌリン濃度を縦軸にし, 横軸に採取した尿の累積容積を表示してストップ・フローパターンを作図した。

#### 6. 統計処理方法

フリーフロー・クリアランス試験時に求めた数値データについて, プロベネシド投与による影響を Student の t 検定で比較した。

### II. 試験成績

#### 1) フリーフロー・クリアランス試験

(Fig. 1)

BIPM の腎クリアランスはクレアチニン・クリアランスにはほぼ同等であった。また, BIPM の血漿中濃度に糸球体濾過量を乗じて算出した BIPM の糸球体濾過値の平均は  $641 \mu\text{g}/\text{min}$  であり, 実測した BIPM の尿中排泄量 (平均  $553 \mu\text{g}/\text{min}$ ) よりも多く, BIPM は尿細管において再吸収されることが示された。尿細管に再吸収される BIPM は BIPM の糸球体濾過値の約 10% であった。また, プロベネシド投与によりパラアミノ馬尿酸クリアランスはクレアチニン・クリアランスとほぼ同程度まで減少したが, 尿量, BIPM クリアランス, BIPM の尿細管再吸収量および糸球体濾過量等は変化しなかった。

2) ストップ・フロー試験 (Fig. 2 および 3) 尿細管各部位のマーカースとして遠位尿細管部位にはナトリウムおよびカリウムを, 近位尿細管部位にはパラアミノ馬尿酸を, 糸球体部位にはイヌリンを用いた。BIPM のストップ・フローパターンはパラアミノ馬尿酸の極大ピークと同部位で極小ピークを示したが, BIPM の極大ピークは認められなかった。また, ストップ・フローパターンはプロベネシド投与による影響はなかった。

### III. 考察

イヌにおける BIPM の体内動態試験において, 未変化体で約 60% およびラベル体で約 95% が静脈内投与後 8 時間までに尿中に排泄されたことから, BIPM は腎排泄型であることが示されている。そこで, 本試験でイヌを用いてクリアランス試験およびストップ・フロー試験を実施した。

クリアランス試験での BIPM の腎クリアランス値は, 糸球体濾過量にほぼ匹敵することから, BIPM の腎からの排泄には尿細管の関与は少なく, 主に糸球体濾過によるものであることが明らかになった。また, 尿細管

での再吸収が僅かに認められた。

しかしながら, BIPM が糸球体で濾過された後, 尿細管各部で再吸収と分泌を受け, その結果として糸球体濾過量に近似した可能性も考えられたため, さらに尿細管の関与を明確にするためストップ・フロー試験を実施した。パラアミノ馬尿酸の極大ピークと同部位で BIPM の極小ピークが認められ, 近位尿細管での再吸収が示された。これはフローフリー・クリアランス試験での結果とも一致していた。また, ストップ・フローパターンに BIPM の極大ピークは認められず, 尿細管からの分泌はないことが確認され, これらのストップ・フローパターンはプロベネシド投与により影響されなかった。

以上のことから BIPM の腎排泄に際して尿細管からの分泌は認められず, 糸球体濾過により排泄されること, また, 近位尿細管において僅かに再吸収が認められることが確認された。

Cefazolin<sup>5)</sup> および flomoxef<sup>6)</sup> についても, ストップ・フロー試験を用いたイヌにおける腎排泄機序の検討結果が報告されているが, これらの抗生物質ではそれぞれ近位尿細管における分泌と再吸収および遠位尿細管における再吸収が認められている。

いずれにしても, イヌにおいては, BIPM は糸球体濾過により腎から排泄され, 近位尿細管において約 10% 程度の僅かな再吸収が認められるものの, 尿細管からの分泌はないものと推察された。

### 文 献

- 1) 山下憲昭, 河島浩輔, 野村和外, 武内博幸, 正田宗生, 成毛 駿: Biapenem の各種実験動物における体内動態. *Chemotherapy* 42(S-4): 243~250, 1994
- 2) 山下憲昭, 河島浩輔, 野村和外, 黒田豊志, 武内博幸, 中沢 俊, 成毛 駿: Biapenem のイヌ及びサルにおける体内動態. *Chemotherapy* 42(S-4): 268~276, 1994
- 3) Brun C: A rapid method for the determination of para-aminohippuric acid in kidney function tests. *J. Lab. and Clin. Med.* 37: 955~958, 1951
- 4) Heyrovsky A: A new method for the determination of inulin in plasma and urine. *Clin. Chim. Acta.* 1: 470~474, 1956
- 5) 上田 泰, 松本文夫, 中村 昇, 斎藤 篤, 野田一雄, 小林千鶴子, 大森雅久: Cefazolin に関する研究. *Chemotherapy* 18: 564~570, 1970
- 6) 中村益久, 川畑友二: Oxacephem 系抗生物質 6315-S (Flomoxef) のイヌおよびウサギでの腎排泄機序. *Chemotherapy* 35(S-1): 199~206, 1987

## Mechanism of renal excretion of biapenem in dogs

Tatsuki Masuda, Noriaki Yamashita, Kosuke Kawashima,  
Yasushi Harada and Takeshi Naruke

Biological Research Laboratories, Lederle (Japan), Ltd.

1-6-34, Kashiwa-cho, Shiki, Saitama 353, Japan

Mechanism of renal excretion of biapenem(BIPM), a new carbapenem antibiotic, was investigated in dogs using stop-flow analysis. In the stop-flow studies, dogs were cannulated into the ureter for collection of urine, into the vein for constant infusion of BIPM, mannitol, creatinine and p-aminohippuric acid, and into the artery for blood sampling.

No specific peak of BIPM was recognized in the phase of p-aminohippuric acid excretion nor in the entire phase of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  reabsorption in dogs. After pretreatment of probenecid, the peak of p-aminohippuric acid disappeared while the stop-flow pattern of BIPM remained virtually unchanged. These findings suggested that the renal excretion of BIPM took place mainly through glomerular filtration in dogs.