吸収排泄におよぼす医薬品の併用効果 (第 7 報¹⁾) *In Vitro* における
サルファ剤の抗菌活性におよぼすタンパク結合の影響²⁾今村順茂, 重盛啓子, 一番ヶ瀬尚
熊本大学薬学部³⁾

Effect of Simultaneous Administration of Drugs on Absorption and Excretion.

VII.¹⁾ Effect of Protein Binding on Antibacterial
Activities of Sulfonamides *in Vitro*²⁾YORISHIGE IMAMURA, KEIKO SHIGEMORI and HISASHI ICHIBAGASE
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University³⁾

(Received September 30, 1976)

The effect of bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA), and bovine serum globulins on the antibacterial activities of sulfonamides was studied by a diffusion method. The antibacterial activities of sulfonamides decreased by the addition of BSA or HSA. A significant correlation was observed between the antibacterial activities of sulfonamides in the presence of BSA and the binding of sulfonamides to BSA. The antibacterial activities of sulfonamides in the presence of HSA were approximately similar to those of BSA. It was also found that the decreasing effect of bovine serum globulins on the antibacterial activity of sulfadimethoxine is much smaller than that of BSA. This finding suggests that the protein most mainly involved in the drug-protein interaction is albumin. In addition, it was found that the displacement of sulfadimethoxine by other drugs from the protein binding sites affects the antibacterial activity of sulfadimethoxine in the presence of BSA.

Keywords—protein binding; sulfonamides; antibacterial activity; equilibrium dialysis method; bovine serum albumin; human serum albumin; bovine serum globulins displacement

サルファ剤が血漿タンパクと結合すると、その抗菌活性を消失する事実はよく知られている。⁴⁾ 著者らも、代表的な持続性サルファ剤であるスルファジメトキシンの抗菌活性が、牛血清アルブミンを添加することによって著るしく低下することを明らかにし、すでにその結果を報告した。⁵⁾

今回は、さらに種々のサルファ剤の抗菌活性におよぼす牛血清アルブミン、ヒト血清アルブミンおよび牛血清グロブリンの影響について詳細な検討を実施した。また牛血清アルブミン添加時におけるスルファジメトキシンの抗菌活性におよぼす併用薬物の影響についても併せて検討を試みた。

実 験 の 部

実験材料 サルファ剤; スルファジメトキシン (第一製薬), スルフィソキサゾール (山之内製薬), スルファフェナゾール (大日本製薬), スルフィソメゾール (塩野義製薬), スルファメトキシピリダジン (日本レダリー), スルフィソミジン (第一製薬), スルファジアジン (日本新薬), スルファニルアミド (片山化学工業). 併用薬物; フェニルブタゾン (藤沢薬品工業), サリチル酸 (局方品), ブコローム (武田薬品工業), インドメサジン (メルク万有), メフェナム酸 (三共), ペンジダミン (第一製薬), トルブタマイド (日本ヘキスト), クロルブ

1) Part VI: H. Ichibagase, Y. Imamura, H. Nakagami, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 24, 204 (1976).

2) 日本薬学会第 95 年会, 西宮, 1975 年 4 月, 一部発表.

3) Location: 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto, 862, Japan.

4) B.D. Davis, *Science*, 95, 78 (1942); R. Tompsett, S. Shultz, W. McDermott, *J. Bacteriol.*, 53, 581 (1947).

5) 今村順茂, 一番ヶ瀬尚, 薬誌, 93, 1206 (1973).

ロパマイド (小野薬品工業), プロベネシド (メルク万有), フェナセチン (局方品), アンチピリン (局方品), アミノピリン (局方品). 血漿タンパク; 牛血清アルブミン (Armor 社製, Fraction V, 分子量は 69000 とみなした), ヒト血清アルブミン (Nutritional Biochemicals 社製, Fraction V), 牛血清 β -グロブリン (Nutritional Biochemicals 社製, Fraction III), 牛血清 γ -グロブリン (Armor 社製, Fraction II).

抗菌活性測定法 著者らによって開発された拡散法 (標準曲線法)⁶⁾ に従って行なった. 4% (w/v) の牛血清アルブミン添加時において, 併用薬物 (薬物濃度; 200 μ g/ml) が何ら抗菌活性を示さないことは, あらかじめ確認した.

平衡透析法 前報^{1,7)} と同様な方法で行なった.

サルファ剤の定量 Bratton-Marshall 法⁸⁾ により行なった. 併用薬物がサルファ剤の定量に影響を与えないことは, あらかじめ確認した.

結果および考察

サルファ剤の抗菌活性におよぼす牛血清アルブミンの影響

8 種類のサルファ剤の抗菌活性におよぼす牛血清アルブミンの影響について検討を試みた. その結果を Fig. 1 に示す. いずれのサルファ剤においても, 牛血清アルブミンの添加により抗菌活性の低下を認めたが, 中でも持続性サルファ剤であるスルファジメトキシシンやスルファフェナゾールにおいては, それらの抗菌活性が 4% (w/v) の牛血清アルブミンの添加により, 約 1/10 に低下することを確認した.

Fig. 1. Effect of Bovine Serum Albumin on Antibacterial Activities of Sulfonamides

initial concentration of sulfonamides; 50 μ g/ml

●: sulfanilamide   ×: sulfisomidine
■: sulfadiazine   □: sulfisomezole
△: sulfamethoxypyridazine   ▲: sulfaphenazole
⊙: sulfisoxazole   ○: sulfadimethoxine

多くの研究報告⁴⁾ によって, 血漿タンパクと結合したサルファ剤は抗菌活性を消失する事実が認められている. それ故, 牛血清アルブミン添加時におけるサルファ剤の抗菌活性の低下は, 牛血清アルブミンとの結合によるものと考えられる. そこでサルファ剤の抗菌活性とタンパク結合との関係をさらに明らかにするために, 牛血清アルブミン添加時におけるサルファ剤の抗菌活性が, 非結合型サルファ剤の濃度を示すものと仮定し, その抗菌活性の値から求めたタンパク結合率と, 平衡透析法によって求めた結果との相関性を調べた.

まず平衡透析法によりサルファ剤の牛血清アルブミンに対する結合部位数 n と結合定数 K を求めた. データの解析は Klotz の式⁹⁾ に従って行なった. その結果を Table I にまとめた. この表から, サルファ剤の牛血清アルブミンに対する結合部位数は 1.7—2.0 であり, 結合定数の値はスルファジメトキシシンが最も大きく, スルファニルアミドが最も小さいことがわかる. 森口ら¹⁰⁾ 中垣ら¹¹⁾ および Hsu ら¹²⁾ もほぼ同様な結果を報告している.

Fig. 2 は結合部位数 n と結合定数 K の積の対数を縦軸に, 抗菌活性の値から求めたタンパク結合率 β を横軸に取り, 8 種類のサルファ剤の結果をプロットしたものである. タンパク結合率 β はサルファ剤の抗菌活性の値から次式に従って算出した. ここで A は 4% (w/v) の牛血清

$$\beta = \frac{50 - A}{50} \times 100 \quad (1)$$

アルブミンを添加した時の抗菌活性の値を示している. この図から明らかなように, $\log nK$ ¹³⁾ とタンパク結合率

6) 柴田元雄, 重盛啓子, 今村順茂, *Chemotherapy*, **22**, 1424 (1974).

7) H. Ichibagase, Y. Imamura, A. Kinoshita, S. Kojima, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **20**, 947 (1972).

8) A.C. Bratton, E.K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1939).

9) I.M. Klotz, "蛋白質化学 4 巻," 水島三一郎編, 共立出版, 東京, 1956, pp. 15—63

10) I. Moriguchi, S. Wada, T. Nishizawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **16**, 601 (1968).

11) 中垣正幸, 古賀直文, 寺田 弘, *薬誌*, **84**, 516 (1964).

12) P.L. Hsu, J.K. H. Ma, H.W. Jun, L.A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 27 (1974).

13) 金尾義治, 吉柳郁夫, 井口定男, 日本薬学会第 96 年会講演要旨集, 第 IV 分冊, 1976, p. 220.

TABLE I. Binding Data for Sulfonamides to Bovine Serum Albumin

Sulfonamides	<i>n</i>	<i>K</i> (M ⁻¹)
Sulfadimethoxine	1.7	8.14×10^4
Sulfisoxazole	2.0	5.64×10^4
Sulfaphenazole	1.8	2.65×10^4
Sulfisomezole	1.7	1.45×10^4
Sulfamethoxypyridazine	1.7	1.38×10^4
Sulfisomidine	1.9	4.09×10^3
Sulfadiazine	1.8	2.03×10^3
Sulfanilamide	2.0	1.97×10^2

n: number of binding sites   *K*: binding constant

Fig. 2. Relationship between log *nK* and % Bound (β) of Sulfonamides

- 1: sulfadimethoxine   2: sulfisoxazole
 3: sulfaphenazole   4: sulfamethoxypyridazine
 5: sulfisomezole   6: sulfisomidine
 7: sulfadiazine   8: sulfanilamide

Fig. 3. Effect of Human Serum Albumin on Antibacterial Activities of Sulfonamides

- initial concentration of sulfonamides; 50 $\mu\text{g/ml}$
 ●: sulfanilamide   ×: sulfisomidine
 ■: sulfadiazine   □: sulfisomezole
 △: sulfamethoxypyridazine   ▲: sulfaphenazole
 ○: sulfisoxazole   ○: sulfadimethoxine

の間には、極めて良好な相関関係が認められた。この結果は、牛血清アルブミン添加時におけるサルファ剤の抗菌活性の低下が、牛血清アルブミンとの結合によることを示している。

サルファ剤の抗菌活性とタンパク結合との関係については、すでに Anton¹⁴⁾ や森口ら¹⁰⁾ による報告がある。彼らは抗菌活性の測定にいずれも希釈法を用いた。一方、著者らは抗菌活性の測定に拡散法を用いたが、本法は血漿は希釈する必要がない点が特長であり、タンパク結合率を求める場合に都合がよいので本法を用いて比較を行った。

サルファ剤の抗菌活性におよぼすヒト血清アルブミンの影響

サルファ剤の抗菌活性におよぼすヒト血清アルブミンの影響についても、牛血清アルブミンと同様な検討を試みた。Fig. 3 にその結果を示す。ヒト血清アルブミンも牛血清アルブミンとはほぼ同程度の抗菌活性低下作用を有することが明らかである。しかし、スルファジメトキシンとスルファフェナゾールにおいては、ヒト血清アルブミンの方がより強い抗菌活性低下作用を有し、一方、スルフィソキサゾールにおいては、牛血清アルブミンの方がより強い抗菌活性低下作用を有することがわかった。これらの結果は、タンパク結合の種差とも関連して興味ある事実である。Scholtan¹⁵⁾ は、スルファジメトキシンの血清に対する結合の大きさが、ヒト、ウサギ、ウシ、

14) A.H. Anton, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **129**, 282 (1960).

15) W. Scholtan, *Arzneim-Forsch.*, **11**, 707 (1961).

Fig. 4. Effect of Albumin, β -Globulin and γ -Globulin on Antibacterial Activity of Sulfadimethoxine

initial concentration of sulfadimethoxine; 50 μ g/ml

- : bovine serum γ -globulin
- : bovine serum β -globulin
- : bovine serum albumin

Fig. 5. Relationship between % Displaced (D) and % Recovered (R) of Sulfadimethoxine by Other Drugs

initial concentration of sulfadimethoxine; 50 μ g/ml
initial concentration of other drugs; 200 μ g/ml

- 1: phenylbutazone
- 2: salicylic acid
- 3: tolbutamide
- 4: bucolome
- 5: chlorpropamide
- 6: probenecid
- 7: indomethacin
- 8: salicylamide
- 9: phenacetin
- 10: antipyrine
- 11: aminopyrine
- 12: benzydamine

イヌ, ラット, マウスの順であることを報告している。

サルファ剤の抗菌活性におよぼす牛血清グロブリンの影響

血漿タンパクの中で薬物との結合にあずかる分画は主としてアルブミンであることが認められている。¹⁶⁾ サルファ剤と血漿タンパク分画との結合についても, DiCarlo ら¹⁷⁾ により詳細な検討がなされている. 彼らはサルファ剤と結合する血漿タンパクがアルブミンであることを, 電気泳動法によって明らかにした. しかし血漿タンパクには, アルブミンの他に各グロブリンやフィブリノーゲンも含まれており, 脂溶性ビタミン¹⁸⁾ や甲状腺ホルモン¹⁹⁾ などはグロブリンと結合するといわれている. そこで今回, スルファジメトキシシンと β -グロブリンまたは γ -グロブリンとの結合について, 抗菌活性測定法により検討を試みた. なおスルファジメトキシシンと α -グロブリンとの結合については, このグロブリンが溶媒として使用したリン酸緩衝液 (1/15M, pH 7.4) に溶けないために検討できなかった。

Fig. 4 はスルファジメトキシシンの抗菌活性におよぼす牛血清 β -グロブリン, γ -グロブリンおよびアルブミンの影響を比較したものである. β -グロブリンと γ -グロブリンの間では, β -グロブリンの方が強い抗菌活性低下作用を有するが, いずれのグロブリンによる抗菌活性低下作用も, アルブミンのそれと比較して極めて弱いことが明らかである. さらに血漿中の β -グロブリンと γ -グロブリンの含量は, それぞれ 0.82 g/dl, 0.90 g/dl であるのに対し, アルブミンの含量は, 4.42 g/dl であることが指摘されている²⁰⁾ (Fig. 4 に矢印で示した). 従ってこれらの結果からも, サルファ剤は血中で主としてアルブミンと結合していると考えられる。

牛血清アルブミン添加時におけるスルファジメトキシシンの抗菌活性におよぼす併用薬物の影響

すでに著者らは, 牛血清アルブミンとの結合により低下したスルファジメトキシシンの抗菌活性が, 非ステロイド性炎症剤, 特にサリチル酸やフェニルブタゾンを添加することにより著明に回復することを, タンパク結合置換の観点から明らかにした.⁵⁾ 今回は, 牛血清アルブミンの添加時におけるスルファジメトキシシンの抗菌活性におよぼす併用薬物の影響をさらに明らかにするために, 平衡透析法による結果との比較検討を試みた。

16) E.J. Ariëns, "Drug Design, Vol. I" ed. by E.J. Ariëns, Academic Press, New York and London, 1971, pp. 9—17.

17) F.J. DiCarlo, S.G. Malament, L.J. Haynes, G.E. Phillips, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **5**, 61 (1963).

18) 森本博久, ビタミン, **20**, 400 (1960).

19) L.E. Braverman, S. H. Ingbar, *Endocrinology*, **76**, 574 (1965).

20) "生物化学ハンドブック," 児玉桂三ら編, 技報堂, 東京, 1967, p. 507.

Fig. 5 は、平衡透析法により求めた置換率 D を縦軸に、抗菌活性測定法により求めた回復率 R を横軸に取り、12 種類の併用薬物の添加により得られた結果をプロットしたものである。平衡透析法および抗菌活性測定法のいずれの場合においても、スルファジメトキシンの初濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ に、併用薬物の初濃度は $200 \mu\text{g/ml}$ に統一した。さらに抗菌活性測定法においては、併用薬物自体が何ら抗菌活性を示さないことを確認した。なお置換率 D と回復率 R はそれぞれ次式に従って算出した。ここで A_1 と B_1 はそれぞれ併用薬物を添加しない

$$D = \frac{A_1 - B_1}{A_1} \times 100 \quad (2)$$

$$R = \frac{A_2 - B_2}{A_2} \times 100 \quad (3)$$

場合、および併用薬物を添加した場合において、平衡透析法により求めたスルファジメトキシンのタンパク結合率を示し、 A_2 と B_2 はそれぞれ併用薬物を添加しない場合、および併用薬物を添加した場合において、抗菌活性測定法により求めたスルファジメトキシンのタンパク結合率を示す。Fig. 5 から明らかなように、置換率と回復率の間には有意な相関関係が認められた。この結果から、牛血清アルブミンとの結合により低下したスルファジメトキシンの抗菌活性が、サリチル酸やフェニルブタゾンなどの薬物の添加により回復する原因は、これらの薬物のタンパク結合置換作用にあることが確認された。

ところで、置換率と回復率の間には相関関係が認められるが、それらの値に大きな差異があることがわかった。たとえばフェニルブタゾンを添加した場合においては、置換率が 80.9% であるのに比べて、回復率が 31.1% であり、他の併用薬物を添加した場合においても、回復率は置換率の $1/2$ — $1/3$ であった。この原因としては色々な可能性が考えられるが、さらに詳細な追究が必要であり、現在検討中である。