

## 遠心限外濾過法による Sulfisomezole と 血漿蛋白質の結合に関する研究

金沢大学医学部第一生理学教室(主任: 斎藤幸一郎教授)

蓮 村 成 子

中 村 恵 子

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室(主任: 松田竜一教授)

楽 満 一 夫

前 坂 明 男

(昭和37年3月2日受付)

薬物の血漿蛋白結合について、その薬理学的並びに生理学的な意義を明らかにせんとし、従来より、多くの薬物が、研究対象として取り上げられている。

特に抗菌性薬物においては、蛋白の存在下に発現せられる抗菌力は、多分に薬物の蛋白非結合部分の働きに負っている<sup>1)</sup>と考えられている。従つてその薬物がどの程度に蛋白と結合するかということは、薬物適用上、大きな問題となるであろう。近来広く用いられるようになった長時間持続性サルファ剤 (Long action sulfas) についても、同様の問題が考えられ、この薬剤の血漿蛋白質との結合に関するより正確な知見が要求せられる。

薬物と蛋白の結合を研究する方法には、サルファ剤の場合には、従来一般に透析法又は限外濾過法が用いられている。何れの方法を用うる場合でも、in vitro の実験成績より、生体内における薬物のあり方を推測しようとするには、実験を生理的条件下で実施することが不可欠の条件であるが、従来の研究方法は、この点で必ずしも満足すべきものではない。我々が数年来行つている遠心限外濾過法<sup>2)</sup>は、被検試料の濃度、温度、 $pCO_2$ 、 $pH$ 等を生理的状态に維持しつつ、短時間内に濾液を分離しうる点では、このような研究により適当していると考えられる。

本研究は、我々の遠心限外濾過法を用い、我が国で発見された長時間持続性サルファ剤の一つ、Sulfisomezole (塩野義製薬製、シノミン、以下 SI と略記) の血漿中における蛋白質との結合状態を明らかにする

目的で実施された。

### 実験方法

健康なヒト及びウシの血漿を試料として、これに SI-Na 塩水溶液を加えて、最終血漿中濃度が、約 5~40mg/dl となるようにした。血漿容積に対する SI-Na 水溶液の添加割合は、ウシ血漿では、約 20:1、ヒトでは 10:1 であり、最終総蛋白濃度は、それぞれ 5.84~6.92g/dl、4.35~5.49g/dl であつた。

次いで、以下の操作をすべて 37°C の恒温室内で行つた。即ち、ウシ血漿の場合には、5%  $CO_2$  加空気を約 1 時間通じて、試料の  $pH$ 、 $pCO_2$  を生理的な範囲に調整した。又ヒト血漿の場合には、採血、遠心分離、SI 添加はすべて気密条件下で行なわれたので、 $pH$ 、 $pCO_2$  調整の操作は省略し、1 時間 37°C に放置することにより SI と血漿蛋白質の結合における温度の平衡を完了せしめた。

平衡完了後、既述の術式により、試料 5ml を遠心限外濾過管にとり、流動パラフィンを重畳し、37°C、3000 r.p.m. 10 分間遠心し、0.3~0.4ml の濾液を得た。この際限外濾膜としては、和紙コロジオン膜<sup>3)</sup>が用いられた。

SI 添加血漿及び限外濾液中の SI 濃度は、Bratton-Marshall の法<sup>4)</sup>を適当に微量化した方法にて比色測定された。(測定誤差 1~2%)。

SI 添加血漿の  $pH$  (37°C) は、硝子電極法<sup>5)</sup>にて、又、総蛋白質及び Albumin 濃度は、Biuret 法<sup>6)</sup>にて

Studies on the Bindings of Sulfisomezole and Plasma protein by Centrifugal Ultrafiltration. Nariko Hasumura, Keiko Nakamura, Department of Physiology (I) (Director: Prof. K. Saito), Kazuo Rakuman, Akio Maesaka, Department of Oto-Rhino-Laryngology (Director: Prof. R. Matsuda), School of Medicine, University of Kanazawa.

測定した。

### 実験成績

本実験で用いられた和紙コロジオン膜が、SI の透過に、影響を及ぼすか否かにつき予め、次のように調べられた。

1) pH 7.4 の磷酸緩衝液中に SI-Na を 5~40mg

/dl の範囲で溶かした溶液について、遠心限外濾過を行い、限外濾液中の SI 濃度と原液のそれとを比較して、SI の膜透過率を求めた。図 1 に示すような成績より明らかな如く、SI は、pH7.4 の Medium では、その濃度に関係なく、膜透過率はほぼ 100% である。即ち、膜よりの干渉を受けたり、SI 分子相互の集合 (Aggregation) を起すことなく、自由に和紙コロジオ

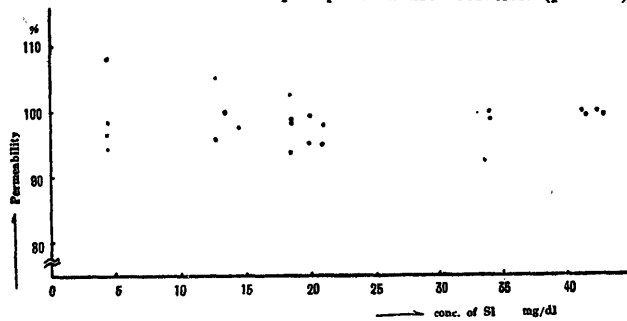
Table 1. An example of experimental data obtained from bovine and human plasma

plasma	$[\text{SI}]_t$ mg/dl	$[\text{SI}]_f$ mg/dl	$[\text{SI}]_b$ mg/dl	$[\text{SI}]_b/[\text{SI}]_t$ %	Total Protein g/dl	Albumin g/dl	Plasma pH (at 37°C)
Bovine	5.34	2.14	3.20	59.9	6.03	3.04	7.44
	8.73	4.21	4.52	51.8			
	14.06	6.69	7.37	52.4			
	19.38	9.51	9.87	50.9			
	25.70	13.37	12.33	48.0			
	29.82	16.45	13.37	44.8			
	35.37	20.07	15.30	43.3			
	38.80	23.55	15.25	39.3			
Human	3.63	2.05	1.58	43.5	4.58	3.14	7.38
	6.04	2.57	3.47	57.4			
	8.18	3.47	4.71	57.6			
	11.23	4.76	6.47	57.6			
	14.40	6.29	8.11	56.3			
	22.46	9.96	12.50	55.7			
	29.54	13.78	15.76	53.4			

Table 2. Comparison of the percentage values of bound SI in the plasma observed by various authors

Total SI in plasma mg/dl	% of Bound SI %	Experimental Condition	Authors
10	25	Dialysis in buffer solution (pH 7.4), 0°C 48 hrs. human plasma	Aoki et al. (9)
10	45	Dialysis, human plasma	Mashimo et al. (10)
	64	Ultrafiltration, human plasma	
	52	Agar-diffusion method	
15	40	Dialysis, human plasma	Kanazawa et al. (11)
10	40	Bioassay, human plasma	
10	58	Ultrafiltration, 0~5°C, 15~20 hrs, human plasma	Sakai et al. (12)
20	38	Ultrafiltration, canine plasma	Yamamoto et al. (13)
10	53	Centrifugal ultrafiltration, 37°C, pH 7.4, bovine plasma	Present authors
10	60	Centrifugal ultrafiltration, 37°C, pH 7.4, human plasma	

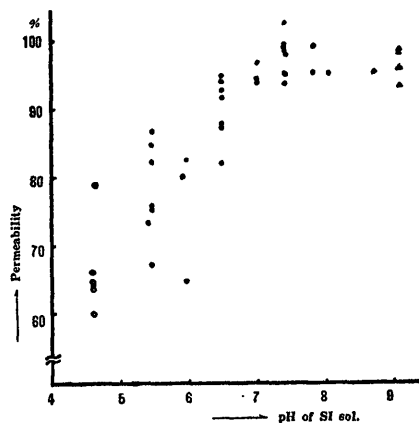
Fig. 1. Permeability of the ultrafiltration membrane to SI at various concentrations in phosphate buffer solution (pH 7.4)



Ordinate: Percentage ratio of filtered SI to SI in the mother liquid.

Abscissa: Concentration of SI in the mother liquid.

Fig. 2. Percentage permeation of SI through the ultrafiltration membrane in various pH medium



- : SI aqueous sol. (10mg/dl)
- : SI buffer sol. (Ca. 20mg/dl)
- ▲: SI NaHCO<sub>3</sub> sol. (Ca. 20mg/dl)

ン膜を透過しうるものと考えられる。

2) 一方, Medium の pH をいろいろに変えた場合の SI (濃度一定) の膜透過率については, 図 2 に示されるが, pH 7 以下の酸性域で限外濾過が行なわれる場合には, 膜透過について, 充分の考慮が払われなければならない。本実験では, 血漿の pH は, 7.40 ± 0.07 の範囲に調整されたので, この点についての補正はされなかつた。

SI を添加したウシ及びヒト血漿試料それぞれ 6 例についての限外濾過実験から, 各血漿 1 例ずつの実験成績を表 1 に示す。

試料の pH は先述の如く, 7.40 ± 0.07 (37°C) に調整され, 総蛋白質濃度は, ウシでは 5.84~6.92g/

dl, ヒトでは 4.35~5.49g/dl, 又 Albumin 濃度は, それぞれ 2.94~3.77g/dl, 3.05~3.40g/dl であつた。

表 1 中, 各記号は, それぞれ次のことを表わす。

(SI)<sub>t</sub>: 血漿に添加された総 SI 濃度. mg/dl

(SI)<sub>r</sub>: 血漿中で拡散性又は遊離の形にて存在している SI 濃度. mg/dl  
限外濾液中の SI 濃度の血漿水分補正<sup>7)</sup>によつて得られる。この際, 血漿中の水分含有量 (g/dl) は Svedberg & Sjögren<sup>8)</sup> の式 ( $W = 99.0 - 0.75P$ , W: 水分含有量, P: 蛋白質濃度) より算出し, 又, 限外濾液中の水分含有量は, 上式の  $P=0$  とおき, 99.0g/dl とした。

(SI)<sub>b</sub>: 血漿中で非拡散性又は血漿蛋白と結合した状態で存在している SI 濃度. [(SI)<sub>t</sub> - (SI)<sub>r</sub>, mg/dl]

蛋白結合率: (SI)<sub>b</sub> / (SI)<sub>t</sub> × 100, %

#### 考 按

1) 血漿中の総 SI 濃度と蛋白結合率  
ウシ及びヒト血漿試料全例について, (SI)<sub>t</sub> と蛋白結合率の関係を図示すると, 図 3 及び図 4 の如くである。各折線で連ねられた諸点は, 同一血漿試料の成績

Fig. 3. Percentage of bound SI to total SI at various SI concentrations in bovine plasma

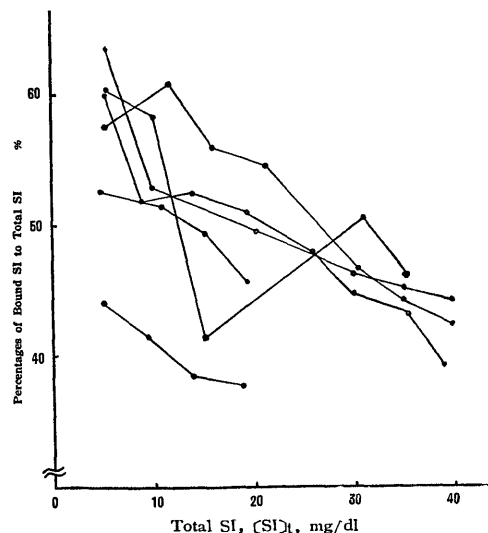
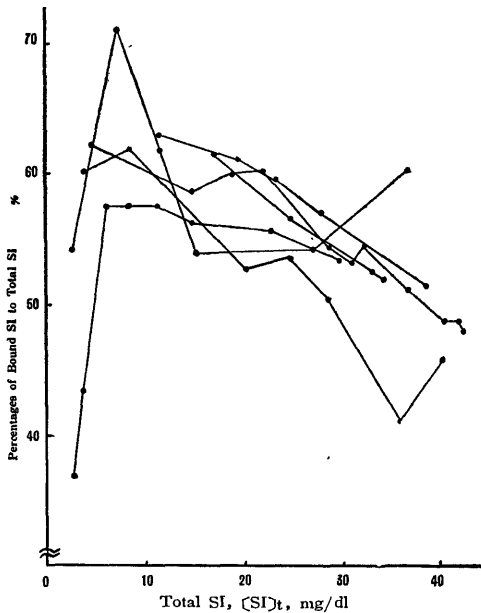


Fig. 4. Percentage of bound SI to total SI at various SI concentrations in human plasma



である。両図より、SI の蛋白結合率は、 $[SI]_t$  の増加に対し、直線的にやや低下することが明らかである。即ち、 $[SI]_t$  が 40mg/dl における蛋白結合率は、5 mg/dl の場合より、約15%低く、この程度は、ウシ及びヒト血漿共にほぼ等しい。

薬物濃度の増加に伴って、結合率が低下することについては、Anton<sup>2)</sup> が Sulfamethoxypridazine など 4 種のサルファ剤と Albumin の結合についての実験から、類似の結果を報告している。しかしながら、酒井ら<sup>12)</sup>は、我々と同様の SI の実験において、蛋白濃度が一定であれば、結合率は、薬物濃度に関係なく一定であると結論している。

又両図において明らかな如く、各試料間の結合率は、比較的差異が大きい。後に述べるような、単位 Albumin に結合する SI 量と  $[SI]_t$  の関係を図示した場合には、各試料間の分散が著しく小さくなることから、蛋白結合率は、血漿 Albumin 量により、多分に影響を受けるものと推測される。

SI を薬用量経口投与した際の血漿中濃度は 5~10 mg/dl である<sup>14)</sup>といわれているが、血漿中濃度が 10 mg/dl である場合の蛋白結合率を、諸家の実験結果と比較すると、表 2 に示される如くである。透析法によつて得られた値は<sup>9)10)11)</sup>、酒井ら<sup>12)</sup>、真下ら<sup>10)</sup>及び我々が限外濾過法によつて得た値に比して小さい。恐らくこれは、血漿総蛋白濃度の差異、その他の実験条件

が生理的条件とかけ離れているためであろう。

蛋白結合率をウシとヒトの間で比較すると、それぞれの蛋白濃度が多少異つてはいるが、全体として、ヒト血漿中の蛋白結合率の方が約 7% 高い。サルファ剤の蛋白結合性が動物の種類によつて異なることについては、他にも報告されている<sup>12)15)</sup>。

## 2) 血漿 Albumin に結合される SI 量

サルファ剤が血漿蛋白特に Albumin と結合しやすいことについては、一般に認められていることである<sup>1)</sup>。

今、本実験で求められた  $[SI]_b$  が、すべて血漿中の Albumin と結合するものと仮定し、1g の Albumin に結合する SI の mg 数を算出した。図 5 及び 6 は、ウシ及びヒトの血漿中において、かようにして算出された値を  $[SI]_t$  に対して plot したものである。

図 5、6 上の諸点は一見直線上に配列するようにみえるが、子細に観察するとゆるやかに彎曲する曲線を描いて分布している。そして諸点の分散が極めて少ないことは、結合性の SI が主として Albumin と結合して存在することを示唆するものといえよう。図 5、6 両者の成績より  $[SI]_b$  が増加するにつれて、単位量の Albumin と結合する SI の量は増すが、しかしながら、 $[SI]_t$  に比例して増加するというものではなく、 $[SI]_t$  の増加と共に SI の Albumin 結合率は漸減することが明らかに認められる。

## 3) 血漿 Albumin と SI の結合に対し、質量作用

Fig. 5. Amount of-SI bound by 1g albumin at various total concentrations of SI in bovine plasma

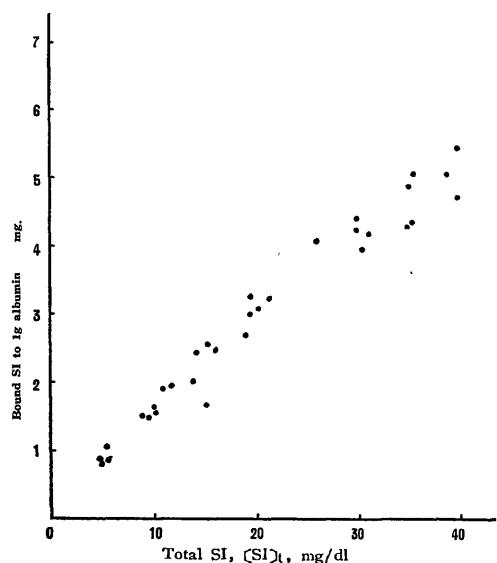
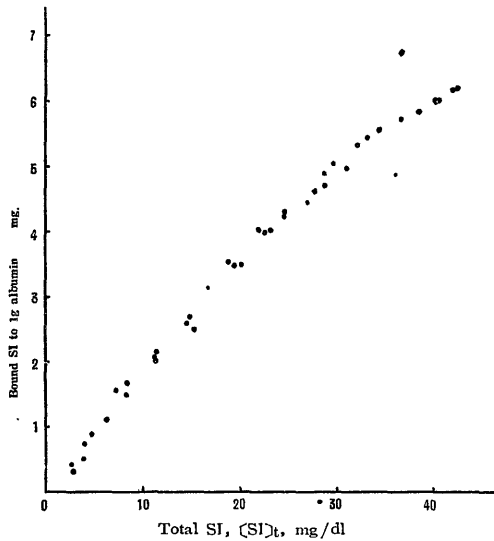


Fig. 6. Amount of SI bound by Ig albumin at various total concentrations of SI in human plasma



の法則の適用

Goldstein<sup>1)</sup> の Review に詳述されているように、平衡状態にある薬物と蛋白の結合関係に、質量作用の法則を導入し、その関係をより定量的に把握しようとする試みがなされている。血漿 Albumin と SI の結合に対しても、同様の試みをなするか否かを、Klotz<sup>16)</sup> らの考えにならって検討した。

次に示される (1) 式は、Klotz らによつて、蛋白と有機陰イオンの結合に対して、質量作用の法則より導き出された最も簡単な関係式である。

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{K}{n} \cdot \frac{1}{(A)} + \frac{1}{n} \quad (1)$$

ここで、(A): 蛋白と結合されない、遊離の有機陰イオン, A, のモル濃度

K: 蛋白分子と A の結合において、両者の特質によつて決定される平衡定数

r:  $\frac{\text{結合された A 分子のモル濃度}}{\text{全蛋白質のモル濃度}}$

n: 蛋白 1 分子当りに結合されうる A 分子の最大結合数

(1)式は、蛋白分子といくつかの A が結合するに際して、第一番目の A の結合が、第二の A の結合に何ら影響を及ぼさないような状態にあると仮定して導き出されている。1/(A) と 1/γ は、(1)式より明らかな如く直線関係にある。故に、1/(A) と 1/γ をパラメーターとして、最小自乗法によつて、K 及び n を求めることができる。

本実験で得られた値より、1/(A) 及び 1/γ を算出

Fig. 7. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{(SI)_r}$  in bovine plasma

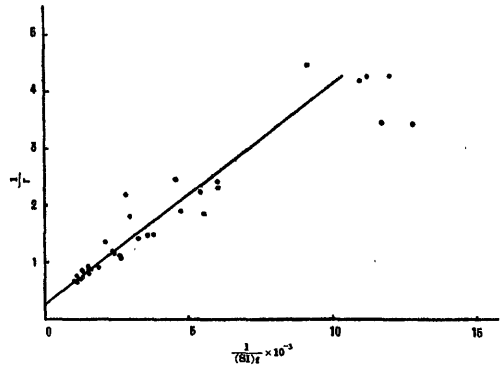
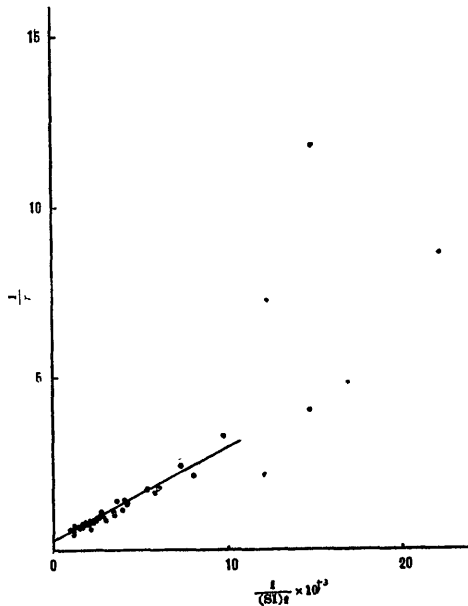


Fig. 8. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{(SI)_r}$  in human plasma



し、図7及び8の如くに、両者の関係を plot した。但し

$$\gamma = \frac{\text{結合性 SI のモル濃度}}{\text{Albumin のモル濃度}}$$

(A) = 遊離の SI のモル濃度, (SI)<sub>r</sub> と略記 Albumin の分子量 = 70,000

SI の分子量 = 253.28 とする。

遊離の SI が 2.5mg/dl の低濃度領域即ち 1/(SI)<sub>r</sub> × 10<sup>-3</sup> が 10 以上の領域では、測定誤差に基く成績の分散が大きいので、これを除外して、1/(SI)<sub>r</sub> × 10<sup>-3</sup> が 10 以下における 1/γ との関係から、相関係数を求

めた。図7では0.943, 又, 図8では0.974となり, 両者共,  $1/(SI)_r$  と  $1/\gamma$  の間に, 相関の高い直線性が確認された。故に, ウシ及びヒトの血漿 Albumin と SI の結合は, pH 7.4 附近にて, 37°C の条件下では, Klotz らによつて示された関係式を満足させるような, 結合様式の1例であることが明らかとされた。

図7, 8の回帰直線から, K及びnを求め, (1)式に代入すると, ウシ血漿 Albumin と SI の結合の場合には,

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{1.56 \times 10^{-3}}{4.0} \cdot \frac{1}{(SI)_r} + \frac{1}{4.0}$$

ヒト血漿 Albumin と SI の結合では,

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{1.20 \times 10^{-3}}{4.4} \cdot \frac{1}{(SI)_r} + \frac{1}{4.4}$$

となり, よつて血漿 Albumin と SI の結合関係を Klotz らの式で表わされる質量作用の法則を適用しうるものと考えられる。

### 要 約

温度, pH, pCO<sub>2</sub>などを可及的生理的条件となした場合の Sulfisomezole (SI) と血漿蛋白質との結合についての研究が, 遠心限外濾過法を用いて行なわれ, 次のような結果を得た。

1) ウシ及びヒトの血漿に添加された SI,  $[SI]_t$ , が 5~40mg/dl の範囲では, 蛋白結合率- $[SI]_t$  に対する非限外濾過性即ち蛋白結合性 SI,  $[SI]_b$ , の比率は,  $[SI]_t$  の増加に従い逆に直線的に低下する傾向にあり, その程度は, 両血漿試料共に約15%であった。

2)  $[SI]_t$  が 10mg/dl の時の蛋白結合率は, ウシ血漿中では53%, ヒト血漿中では60%であり, 両者には明らかな差が認められた。

3)  $[SI]_b$  のすべてが, 血漿中の Albumin に結合されるものであると仮定して, SI と Albumin の結合関係に, Klotz らが質量作用の法則より導き出した

低分子イオンと蛋白の結合に関する関係式を, 適用しうることが明らかにされた。

稿をおえるにあたり, 終始ご指導, ご校閲をたまわつた斎藤幸一郎教授に衷心より謝意を表します。併せて, シノミン並びにそれに関する論文を提供された塩野義製薬 K. K. に深謝致します。

### 文 献

- 1) Goldstein, A. : Pharmacol. Rev., 1, 102 (1949).
- 2) Anton, A. H. : J. Pharm. & Exp. Therap., 129, 282 (1960).
- 3) 斎藤幸一郎・蓮村成子 : 日新医学, 46, 698 (1959).
- 4) 斎藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 第5版, 253頁, 南山堂, 1954.
- 5) 斎藤幸一郎・本田良行 : 日新医学, 42, 167 (1955).
- 6) 斎藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 第5版, 130頁, 南山堂, 1954.
- 7) 蓮村成子 : 日新医学, 48, 261 (1961).
- 8) Svedberg, T. & Sjögren, B. : J. Am. Chem. Soc., 50, 331 (1928).
- 9) 青木隆一・西啓三・林 昭・中川 淳・牧野光太郎・伊藤文雄・高橋久雄 : 総合医学, 16, 1127 (1959).
- 10) 真下啓明 : 診断と治療, 48, 849 (1960).
- 11) 金沢 裕・倉又利夫 : Chemotherapy, 8, 478 (1960).
- 12) 酒井克治・棚野義博・岸和田康二・楠本博一 : 最新医学, 14, 3139 (1959).
- 13) 山本研二郎・黒沢 淳・岸上方子・吉嶋敏夫・北風 猛・堂崎 猛 : 最新医学, 14, 3147 (1959).
- 14) 三矢英輔・三島 力・島居 肇 : 臨皮泌, 13, 927 (1959).
- 15) Beyer, K. H., Russo, H. F., Patch, F. A., Peters, L. & Sprague, K. L. : J. Lab. & Clin. Med., 31, 65 (1946).
- 16) Klotz, I. M., Walker, F. M. & Pivan, R. B. : J. Am. Chem. Soc., 68, 1486 (1946).

### Abstract

The combination of sulfisomezole (Sinomin, SI.) with bovine and human plasma proteins was investigated by using the centrifugal ultrafiltration method under physiological conditions of temperature, pCO<sub>2</sub> and pH. The results obtained were as follows:

1) In the concentration range of 5 to 40 mg SI per dl of plasma, the ratio of bound SI to total SI decreased linearly as the total concentration of SI increased. (Figs. 3 and 4). The percentage of bound SI to total SI at 5mg per dl was higher by about 15% than that at 40 mg per dl, and was 60% in human plasma and 53% in bovine plasma at the concentration of 10 mg per dl of plasma which is routine concentration in clinical practice.

2) The relation between the amount of bound SI per 1 gm albumin and total SI concentration was, as seen in Figs. 5 and 6, precisely shown by a curve nearly straight.

3) On the assumption that SI bound only with albumin in plasma, the binding of SI was found to be described quantitatively by Klotz's equation which was derived from the mass action law on some adequate assumptions.