

Cefatrizine の体液内濃度測定法に関する研究

清水 喜八郎

筑波大学内科

紺野 昌俊

帝京大学小児科

深谷 一太

東京大学医科学研究所内科

松本文夫

東京慈恵会医科大学上田内科

中山一誠・岩井重富

日本大学第三外科

松崎明紀・亀井敏夫

萬有製薬(株)薬理化学研究所

米国プリストル社において新しく開発された半合成セファロスポリン Cefatrizine(CFT) は生体外では不安定である⁹⁾。このことから本剤の体液内濃度測定について一定の方法を設定し、その方法で、濃度測定を行なう必要性が Cefatrizine 研究会(会長:東京慈恵会医科大学上田泰教授)で指摘された。その検討を行ない若干の知見がえられたので、その検討成績および Cefatrizine 研究会において採択された小委員会の体液内濃度測定方法について報告する。

実験方法および材料

Cefatrizine の体液内濃度測定に関する諸条件、すなわち本剤の安定性、標準液の作成方法、検体の処理などについて検討した。

1) 標準溶液

Cefatrizine 濃度検定用の標準液は CFT を化学天秤で 0.1mg 単位まで正確に秤量し、滅菌した pH 6.0 phosphate buffer に溶解し作製した。

2) 試験菌

試験菌は *Sarcina lutea* ATCC-9341, または *Bacillus subtilis* ATCC-6633 を用いた。

3) 検定用培地

S. lutea の検定用培地として SL-15 培地を, *B. subtilis*

SL-15		BS-1	
Polypeptone	0.3%	Polypeptone	0.5%
Yeast ext.	0.1%	Beef ext.	0.3%
Beef ext.	0.1%	Powder Agar	1.2%
NaCl	1.0%		pH 6.0
Powder Agar	1.2%		
	pH 6.0		

検定用培地として BS-1 培地と HI 培地を使用した。組成は以下のとおりである。*S. lutea* 用の SL-15 培地は、低栄養で食塩を加え、*S. lutea* の発育を適度に抑制した培地がえられるのでこの培地を使用した。

4) 検定用培地への接種

増菌用培地は HI プイオン培地 (pH 7.0) を用い、37°C, 18~24 時間培養を行なった。この菌液をディスク法 0.2%, カップ法 1% になるよう検定用培地に接種した。

5) Cefatrizine の希釈液

pH 6.0, 1/15 M phosphate buffer, または pH 7.0, 1/15 M phosphate buffer を用いた。

6) 検定法

ディスクプレート法またはカッププレート法を用いた。径 90mm シャーレを使用する時は、1層法では Seeded Agar 8~10ml を用い、2層法では Base Agar 10ml, あるいは 20ml, Seeded Agar 5~8ml を用いた。

実験成績

1) Cefatrizine 水溶液および血清中における安定性
Cefatrizine は Fig. 1-1, 2, 3 に示したように、pH 6.0 以下では安定であるが、アルカリ側では不安定であった。人血清中での Cefatrizine の不活性化は pH 7.0 ~7.5 の phosphate buffer 溶解時の失活とほぼ同じであった。

2) 検定条件の検討

S. lutea を検定菌とした Cefatrizine の標準曲線を Fig. 2 に示した。Cefatrizine 標準液の希釈は pH 6.0, pH 7.0 の phosphate buffer, 4倍希釈した人血清、そして人血清で行なった。培養温度は 37°C である。この

Fig. 1-1 Stability of CFT in buffer solution

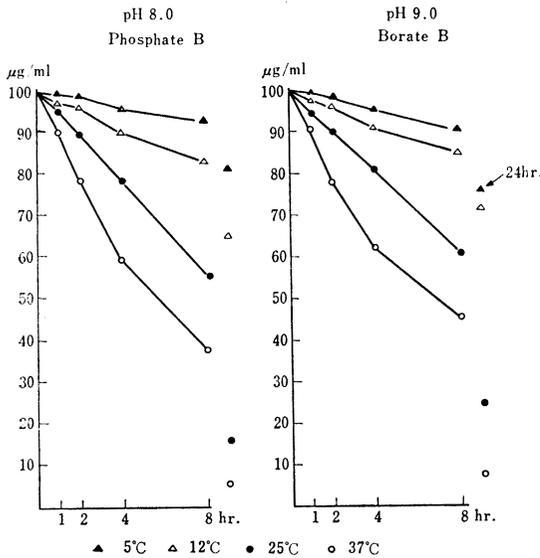
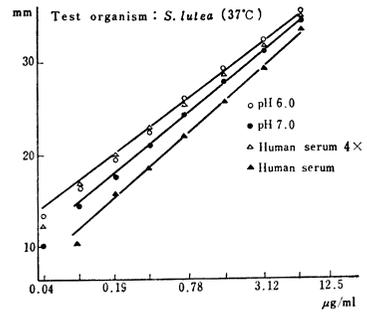


Fig. 2 Standard curve of CFT



標準曲線から、pH 6.0 の phosphate buffer で Cefatrizine 標準液を希釈したほうが pH 7.0 の phosphate buffer で希釈するより、低い濃度まで阻止円が出るのがわかった。Cefatrizine の標準液を人血清で希釈した場合、pH 6.0, pH 7.0 の phosphate buffer で希釈した場合より、阻止円が小さかった。しかし 4 倍希釈した人血清で Cefatrizine 標準液を希釈した場合、標準曲線

Fig. 1-2 Stability of CFT in buffer solution and serum

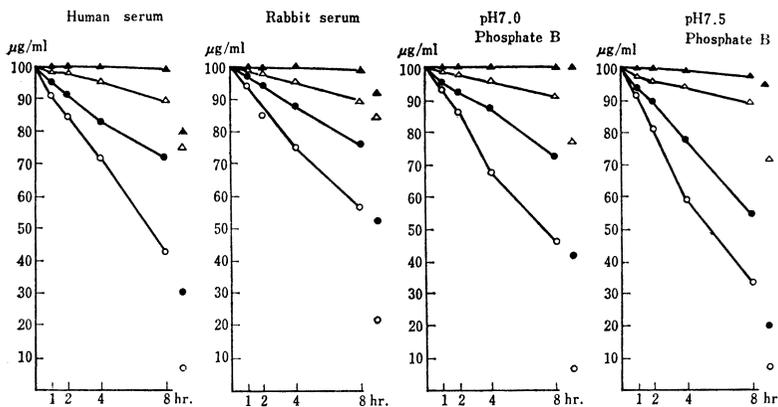
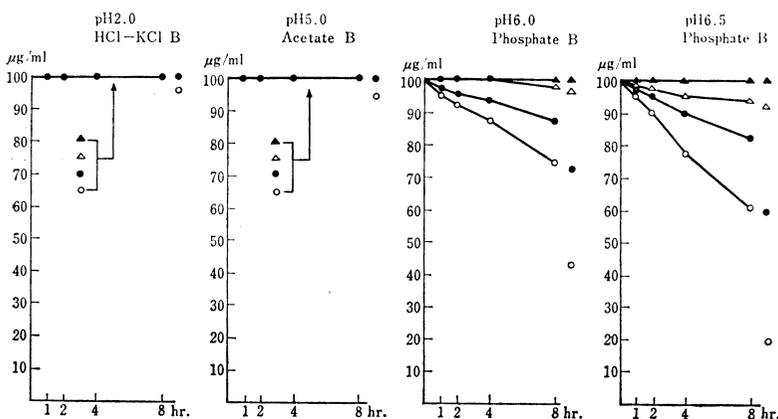


Fig. 1-3 Stability of CFT in buffer solution



は pH 6.0 の phosphate buffer で希釈した場合とほぼ同じであった。*S. lutea*, *B. subtilis* を検定菌とし、Cefatrizine 標準液を pH 6.0 の phosphate buffer で希釈し、5°C で 2 時間拡散を行ない、31°C で 15~17 時間培養した標準曲線を Fig. 3 に示した。検定菌として、*S. lutea* を用いるほうが *B. subtilis* を用いるより、4 倍ほど低濃度まで測定できた。

培地検討は、検定菌を *S. lutea* とする場合は SL-15 培地と Heart Infusion 培地(HI 培地)を用いた。検定菌を *B. subtilis* とする場合には BS-1 培地と HI 培地を用いた。標準曲線は Fig. 4-1, 2, 3, 4 に示した。

S. lutea の場合には SL-15 培地が HI 培地に比べ、標準曲線の感度、直線性とも良好であった。

B. subtilis の場合には BS-1 培地が HI 培地に比べはるかに標準曲線の感度が良好であった。

HI 培地で、培地 pH を 6.0 と 7.0 に変え、標準曲線を引いた場合、pH 6.0 のほうが標準曲線を低濃度まで引くことができた。培養温度を 31°C と 37°C に変え、標準曲線を引いた場合、*B. subtilis* の場合は 31°C のほうが 37°C より低濃度まで引くことができた。*S. lutea* の場合は両者の間にあまり差は認められなかった。

Fig. 3 Standard curve of CFT

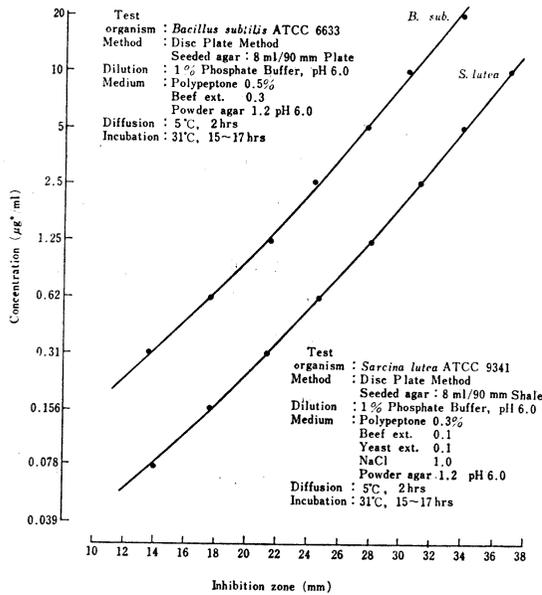
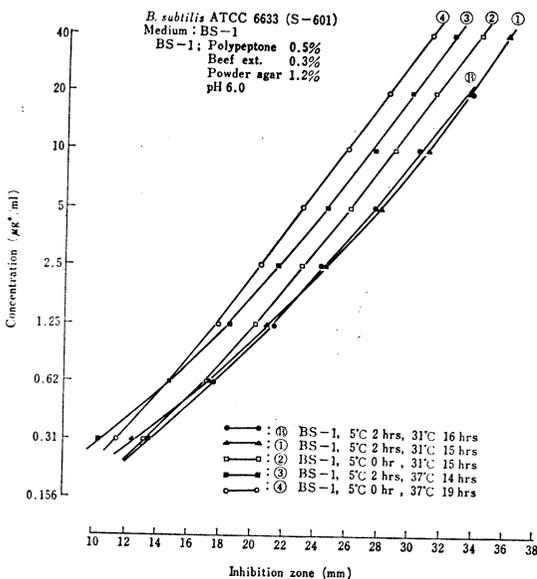


Fig. 4-1 CFT, Standard curve



検定ディスクを培地上においた後 5°C での拡散時間の有無が標準曲線に与える影響を検討した。5°C における 2 時間の拡散は検量線の感度を良好にした。

4) 試料処理方法、測定条件の検討

Table 1~3 に試料の処理方法、標準曲線の作り方を換え、Cefatrizine の量を求めた結果を示した。Table 1 からわかるように Cefatrizine の定量を血清で行なうよりも血漿で行なうほうが高い値がえられた。血清または血漿中 Cefatrizine 濃度は、そのまま定量するよりも

Fig. 4-2 CFT, Standard curve

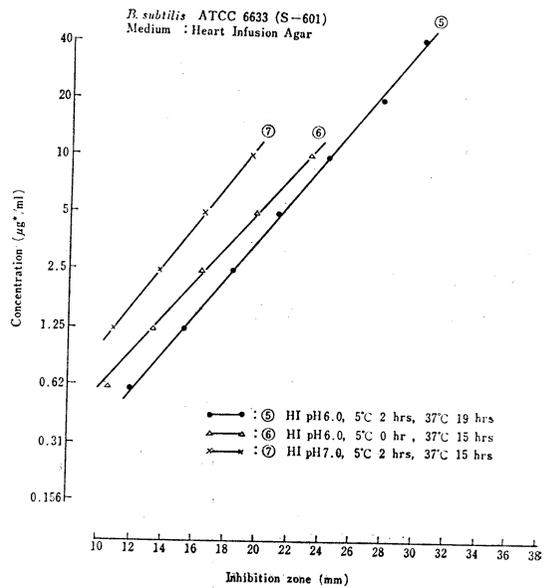


Fig. 4-3 CFT, Standard curve

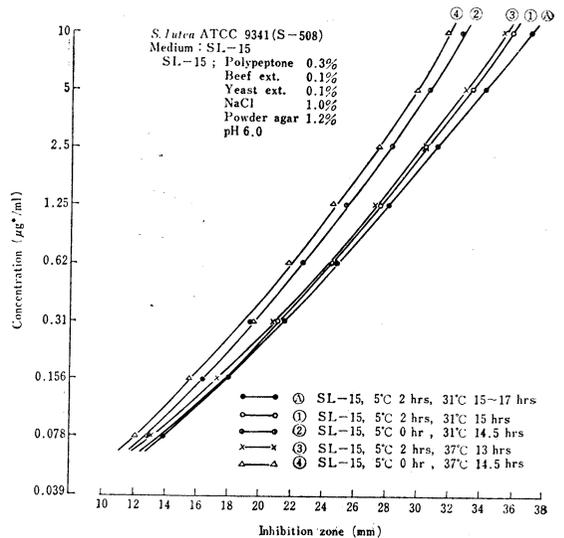
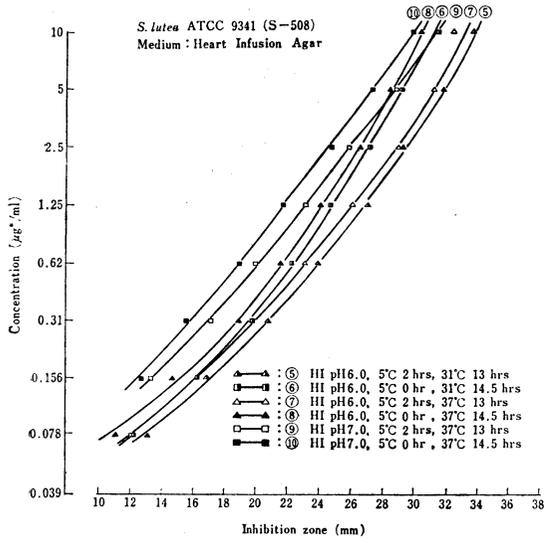


Fig. 4-4 CFT, Standard curve



pH 6.0 の phosphate buffer で 4 倍希釈するほうが高い値が得られた。

各研究機関で、血清 Cefatrizine 濃度を、定量法を変

え求めた結果を Table 4 に示した。検量線を pH 7.0 で血漿そのまま測定した場合と pH 6.0 の検量線を用いて検体を pH 6.0 の buffer にて 4 倍希釈したときの測定値の比較および室温、冷室での測定、培養温度の比較であり、多くはほぼ同じ値がえられたが一部に食い違いのある値がえられた。

考 察

Cefatrizine の体液内濃度測定条件を検討し、定量法を Cefatrizine 濃度測定標準法の項に述べたように定めた。検体処理に際しては、Cefatrizine の安定性から、血漿または血清、尿はいずれも採取後、速やかに氷室に保存し、少なくとも 24 時間以内に測定することが望まれる。また、それ以上の時間保存して後日測定する場合は、凍結し、検定に用いることが望ましいと考えられる。この場合、再凍結は望ましくない。血中 Cefatrizine の測定で血漿濃度が、血清濃度より高く示されることは、血液から血清を分離するさいに Cefatrizine が力価低下を起こすためと考えられた。

したがって血中濃度の測定に際しては血清を用いるよりも、クエン酸ナトリウム加血漿を用いるほうが、より正確に Cefatrizine 血中濃度を表わすことになる。

Table 1. Serum levels after 2hr of 500mg CFT oral administration. Comparison of standard curves and influence of temperature

Samples	(µg/ml)				
	pH 7.0 buffer	pH 6.0 buffer	human serum	monitrol serum	monitrol serum 4×diluted by pH 6.0 buffer
Serum ordinarily taken and treated at room temperature	2.7	1.6	4.2	4.8	2.9
Plasma obtained in ice-box at about 3°C	3.2	1.9	5.0	5.8	3.4

Table 2. Serum levels after 2hr of 500mg CFT oral administration. Comparison of dilution of sample

Samples	(µg/ml)			
	pH 7.0 buffer	pH 6.0 buffer	monitrol serum	monitrol serum 4×diluted by pH 6.0 buffur
Original serum	2.7	1.6	4.8	2.9
diluted 4× by pH 6.0 buffer	4.0	1.4	6.0	4.0
Original plasma	3.2	1.9	5.8	3.4
diluted 4× by pH 6.0 buffer	7.6	4.2	13.2	8.0

Table 3. Serum levels after 2hr of 500mg CFT oral administration. Comparison of bioassay method

Samples	(µg/ml)		
	<i>S. lutea</i> cup plate	<i>B. subtilis</i> cup plate	<i>S. hemolyticus</i> tube
Original serum	2.7	3.1	3.8
diluted 4× by pH 6.0 buffer	4.0	9.4	4.6
Original plasma	3.2	3.4	5.5
diluted 4× by pH 6.0 buffer	7.6	10.0	6.2

Table 4. Comparison between value with pH 7.0 standard (original serum) and those with pH 6.0 standard (serum ×4)

		Teikyo								Tokyo		Ikaken		Jikei
		37°C SL Medium pH 6.0		31°C SL Medium pH 6.0		37°C HI Medium pH 6.0		37°C HI Medium pH 7.0		SL Medium		SL-15		
		M. K.	K. U.	ice	room	room	ice							
1hr.	pH 7	4.0	4.0	4.2	4.2	5.4	8.2	3.8	3.0	3.0		/	3.3	
	pH 6 4	4.0	4.0	5.6	5.6	6.0	6.8	4.4	4.8	2.08	1.28		8.5	
2hr.	pH 7	2.5	3.3	4.2	2.9	4.1	5.4	2.6	6.0	1.5	0.4	2.7	3.2	
	pH 6 4	3.2	5.2	5.6	5.2	4.8	8.4	4.4	4.8	4.4	4.0	1.4	4.2	
4hr.	pH 7	3.0	2.4	1.6	0.9	3.6	2.8	3.8	1.5	/	2.2	/	/	
	pH 6 4	4.0	1.6	4.0	5.6	6.8	4.4	4.8	1.0		2.8			
6hr.	pH 7	0.9	1.8	0.9	0.9	1.5	0.9	1.1	0.6	/	0.7	/	/	
	pH 6 4	1.2	1.3	1.8	0.9	2.8	—	1.6	—		0.96			
1hr. heparin	pH 7	3.0	5.6	3.3	7.0	5.0	5.4	4.4	9.0	/	/	/	/	
	pH 6 4	5.2	5.2	5.6	5.6	10.0	8.4	6.8	7.2					

Cefatrizine 標準液を buffer を用い希釈し、標準曲線を作り、血中 Cefatrizine 濃度を求めた場合、血清または血漿原液で、直接 Cefatrizine 濃度を求めるより、試料を buffer で希釈した後、定量するほうが高い値がえられた。これは血清原液では Cefatrizine が血清蛋白に吸着されているためで希釈することにより Cefatrizine は血清蛋白より離れることが一因であることも考えられる。なお人間の血清には Cefatrizine は 50 μ g/ml で約 56% が吸着される¹⁾。

尿の測定に際しては、尿がアルカリ性の場合には buffer 希釈倍率を大きくして測定したほうが Cefatrizine の安定性より正確な値が求められることが推定される。なお、Cefatrizine を投与した人の血中、尿中には抗菌力を持った代謝物は検出されず²⁾、生物学的定量法により測定された Cefatrizine 値は、すべて未代謝 Cefatrizine によるものと考えられた。

以上の事項を検討し、体内濃度測定小委員会では以下の方法を標準法とした。

Cefatrizine 濃度測定標準法

1) 試験菌

Sarcina lutea ATCC-9341 (比較的高濃度の尿中濃度測定には感受性の劣る *B. subtilis* を使用してもよい。)

2) 増菌用培地および培養温度

HI ブイヨン培地。pH 7.0, 37°C, 18~24 時間

3) 検定法

Disk plate method, Cup plate method のいずれで

もよい。径 90mm のシャーレを使用する時は Seeded agar 8~10ml が適当である (1 層法の場合)。(Base agar 10ml あるいは 20ml, Seeded agar 5~8ml の 2 層法で行なってもよい。)

4) Cefatrizine 標準液および検体の希釈液 希釈液

① pH 6.0, 1/15 M phosphate buffer

② pH 7.0, 1/15 M phosphate buffer

①の希釈液を用いるときは検体の血漿または血清を pH 6.0 buffer にて 4 倍に希釈する。

②の希釈液を用いるときは血漿または血清をそのまま用いる。pH 6.0 の buffer と pH 7.0 の buffer の 2 方法を用いることが望ましい。

5) 標準溶液

Cefatrizine (CFT) 濃度検定用の標準液は、Cefatrizine を化学天秤で 0.1mg 単位まで正確に秤量し、滅菌した pH 6.0 phosphate buffer に溶解し作製する。(標準液は、実験に際し、その都度作成することが望ましいが、1mg/ml の溶液を、1ml ずつ小バイアルに分注し、-20°C 以下で凍結保存しておけば約 6 カ月保存も可能である。ただし、再凍結、溶解は行なわない。)

6) Cefatrizine 標準液の濃度段階

下記の 100 μ g/ml からの 2 倍希釈を使用する。100, 50, 12.5, 6.25, 3.1, 1.56, 0.78, 0.39, 0.18 μ g/ml

7) 検定用培地

SL-15 寒天培地をもっともよい。

Rp.	
Polypeptone	0.3%
Yeast ext.	0.1%
Beef ext.	0.1%
NaCl	1.0%
Powder Agar	1.2%
pH 6.0	

8) 培養温度, 時間

37°C, 15~20 時間

9) 検定用培地への接種菌量

増菌用培地に培養した菌液をディスク法 0.2%, カップ法 1% になるよう接種する。650nm Spectrophotometer T=20% (0, D 0.7) の濁度の菌液を上記 % に接種してもよい。(培地への菌量は 0.2% または 1% としたが検定に際し, 阻止帯が明確で判定に誤差が少なければよい訳で適宜菌量の増減は差支えない。)

10) 判定法

常法どおり。

結 論

小委員会の測定方法が採用され, 本方法を用いることによりかなり正確な成績がえられるが実験条件あるいは検体の取扱いによっては若干の誤差がでることも考えられる。

従ってできる限り正しい値を推察するためには前述したように2つの検量線を用いて測定値をだすことが望ましい。

文 献

- 1) 松崎明紀, 田戸宣江, 平田洋子, 加藤誠, 中村浩一, 荒川まゆみ, 立山治代, 亀井敏夫: Cefatrizine (S-640 P) に関する細菌学的研究。Jap. J. Antibiotics 29 (1): 61~68, 1976
- 2) 松崎明紀, 大多和昌克, 秋山 勇, 山本三千世, 富岡順子, 清原美恵, 馬淵 正: Cefatrizine (S-640 P) の代謝。Jap. J. Antibiotics 29 (1): 90~106, 1976
- 3) 第 22 回日本化学療法学会東日本支部総会, Cefatrizine 研究会報告, 1975 (新潟)

THE STUDIES ON DETERMINATION METHOD OF TISSUE DISTRIBUTION OF CEFATRIZINE

KIHACHIRO SHIMIZU

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tsukuba University

MASATOSHI KONNO

Department of Pediatrics, School of Medicine, Teikyo University

KAZUFUTO FUKAYA

Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo

FUMIO MATSUMOTO

Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, The Jikei University

ISSEI NAKAYAMA and SHIGETOMI IWAI

Third Department of Surgery, School of Medicine, Nihon University

MEIKI MATSUZAKI and TOSHIO KAMEI

Institute of Chemical Pharmacology, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

Since cefatrizine is unstable *in vitro*, a fixed method to determine its tissue distribution was devised. Although considerably accurate result will be obtained by this method, experimental conditions or dealings of the specimens may produce some difference. Therefore, two determination curves will be recommended to be used to obtain the values as accurate as possible. From the characteristic of this agent, authors endeavored to minimize the lowering of antibacterial activity of cefatrizine *in vitro*.