

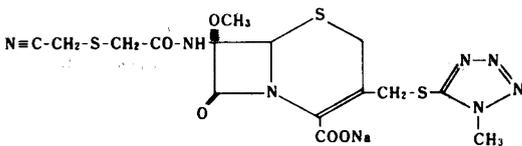
## CS-1170の体液内濃度測定法に関する研究

佐橋佳郎・小島敏昌・市川正人・笹原邦宏  
三共株式会社生産技術研究所

## はじめに

CS-1170はグラム陰性菌や $\beta$ -lactamase産生菌に優れた抗菌作用を示す<sup>1)</sup>注射用の合成セファマイシン系抗生物質で以下の構造を有する。

Chemical structure of CS-1170



体液内濃度測定にあたり、最適な方法を検討するとともに体液内での安定性についても検討したので報告する。

## I. 実験方法および材料

## 1. CS-1170の標品

標準曲線作成には、吸湿性が小さい白色結晶で力価検定の標準品として適したCS-1170・DCHA (Dicyclohexylamine) 塩〔1 mgは0.722 mg (力価)に対応する〕を用い、体液中での安定性の検討にはCS-1170の製剤を用いた。

## 2. 試験菌

CS-1170にもっとも感受性の高い*Micrococcus luteus* ATCC 9341<sup>2)</sup>を用いたが定量法の比較のため世上汎用さ

れている*Bacillus subtilis* ATCC 6633も併せて用いた。

## 3. 検定用培地

*Micrococcus luteus*の検定用培地としてTable 1の諸培地を検討したが、*Bacillus subtilis*の検定用培地としてはNutrient agarを用いた。

## 4. 検定用培地への接種

*Micrococcus luteus*および*Bacillus subtilis*の菌液を日抗基・一般試験法・力価試験法<sup>3)</sup>に準じて調製し、 $10^6$ /ml培地となるように検定用培地に接種した。

## 5. 検定法

薄層カップ法または薄層ディスク法を用いた。径90 mmのペトリ皿の場合、一層法(薄層法)では種層寒天培地5~8 mlを用い、二層法では基層寒天培地20 ml, 種層寒天培地4 mlを用いた。

## 6. 希釈液

## 6.1. Buffer

pH6.0 phosphate buffer(1% = M/15), pH7.0 phosphate buffer (M/10), pH8.0 phosphate buffer (M/10)の3種のbufferを用いて、標準曲線に及ぼすbufferの影響を検討した。

## 6.2. 血清

健康成人プール血清を用いたが比較のため、Moni-Trol I (ミドリ十字), Consera (日水製薬)も用いた。

Table 1 Assay media (Composition per 1,000ml)

Reagents	Heart infusion agar (HIA)	Nutrient agar (NA)	AM 5	MA	NYA
Peptone	10g	5g	6g	6g	10g
Beef extract	—	3	1.5	1.5	—
Yeast extract	—	—	3	3	10
Glucose	—	—	—	1	10
NaCl	5	—	—	—	0.01
Beef heart (Infusion form)	500	—	—	—	—
Agar	15	15	15	15	15
pH after sterilization	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5

## 7. 血中濃度測定法

東京大学・医学研究所で行われたCS-1170第1相試験あるいはCS-1170, CEZ 交叉投与試験<sup>9)</sup>での血清試料の一部につき、以下の検討を行った。

7.1. 測定値に対する buffer 希釈あるいは血清希釈の影響

*Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法を用いて、血清試料を a) 希釈せずに測定、b) 健康成人プール血清で希釈して測定、c) pH6.0 phosphate buffer で希釈して測定し、三者の相関性を検討した。a) と b) の標準液系列の作成には血清、c) の標準液系列の作成には試料と同じ倍率に buffer 希釈した血清を用いた。

7.2. 測定値に対する試験菌の影響

*Micrococcus luteus* および *Bacillus subtilis* を試験菌とする薄層カップ法により血清試料を測定した。標準液系列の作成には血清を用いた。

7.3. 薄層カップ法と薄層ディスク法

*Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法および薄層ディスク法により血清試料を測定した。標準液系列の作成には血清を用いた。

## 8. 尿中濃度測定

東京大学・医学研究所で行われたCS-1170第1相試験あるいはCS-1170, CEZ 交叉投与試験<sup>9)</sup>での尿試料の一部を buffer で適当な濃度 (~5 µg(力価)/ml) に希釈し、薄層カップ法あるいは薄層ディスク法で測定した。標準液系列の作成には buffer を用いた。

## 9. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法

血清試料、尿試料の一部を HPLC 法で測定し、bioassay による測定値と比較した。HPLC 測定条件は Table 2 のとおりである。

## 10. CS-1170の安定性

## 10.1. Buffer 溶液中での安定性

CS-1170標準品 (DCHA塩) あるいはCS-1170製剤 (Na塩) を1% phosphate buffer (pH6.0) に溶かして1 mg(力価)/mlの溶液を調製し、5℃(冷蔵庫)と-20℃(凍結)で保存した。-20℃保存の場合は検液の一部を小分け(A)し、一部を小分けせず(B)に保存した。小分け(A)は測定時ごとに融解使用し、残液は廃棄した。非小分け(B)は測定時に融解使用後、残液を次回測定のため再度-20℃で凍結保存した。これら検液は測定時 buffer 希釈して50 µg(力価)/ml, 25 µg(力価)/mlの試料液とし *Bacillus subtilis* を試験菌とする円筒平板法(日抗基・一般試験法・力価試験法)<sup>4)</sup>により力価を測定した。

## 10.2. ヒト血清中での安定性

健康成人プール血清9 mlにCS-1170水溶液(1000 µg

Table 2 HPLC Condition

	Serum	Urine
Column	µ-Bondapak C18	
Eluent	Buffer* + MeOH (21 : 4)	Buffer** + CH <sub>3</sub> CN (97 : 3)
Flow rate	0.8 ml/min	1.8 ml/min
Detector	254 nm	272 nm
Sensitivity	0.08 AUFS	0.16 AUFS
Injection	10 µl	10 µl
Retention time	6 min	8 min
Int. standard	Chloramphenicol alginate	

\* M/100 Phosphate buffer (pH 7.0)

\*\* M/100 Phosphate buffer (pH 6.8)

(力価)/ml) 1 mlを加えて100 µg(力価)/mlの溶液を調製した。この一部をさらに血清で希釈して20 µg(力価)/mlの溶液とし、両者を小分けして5℃と-20℃で保存した。測定時に100 µg/ml, 20 µg/mlの溶液を buffer でそれぞれ20倍, 10倍希釈し、*Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法で力価を測定した。このときの標準液系列の作成には buffer を用いた。

## 10.3. ヒト尿中での安定性

健康成人の尿にCS-1170を溶かして1000 µg(力価)/mlと100 µg(力価)/mlの溶液を調製し、小分けして5℃と-20℃で保存した。測定時にそれぞれ buffer で200倍および20倍に希釈し、*Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法で力価を測定した。標準液系列の作成には buffer を用いた。

## 10.4. ヒト胆汁中での安定性

ヒト胆汁 (pH8.8) 9 mlにCS-1170のpH6.0 phosphate buffer 溶液 (200 µg(力価)/ml) 1 mlを加えて20 µg(力価)/mlの溶液を調製した(90%胆汁溶液, pH8.5)。また同じ胆汁5 mlにCS-1170のpH6.0 phosphate buffer 溶液 (40 µg(力価)/ml) 5 mlを加えて20 µg(力価)/mlの溶液を調製した(50%胆汁溶液, pH6.4)。両者を小分けして5℃と-20℃で保存した。測定時両者を buffer で4倍希釈し、*Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法により力価を測定した。標準液系列の作成には buffer を用いた。

## II. 実験成績

## 1. 検定条件の検討

## 1.1. 検定培地の選定

CS-1170の体液中濃度測定用の試験菌としてはCS-1170にもっとも感受性の高い *Micrococcus luteus* を用いた<sup>9)</sup>。この菌を用いたときの検定用培地として5種の培地について検討したのが Fig. 1 である。NYA 培地を用

Fig. 1 Standard curves of CS-1170 with several media

Test organism; *M. luteus* ATCC 9341  
 Dilution; 1% Phosphate buffer (pH 6.0)  
 Medium; 5 ml/petri dish (90mm)(single layer)  
 Incubation; 37°, 18~20hrs.

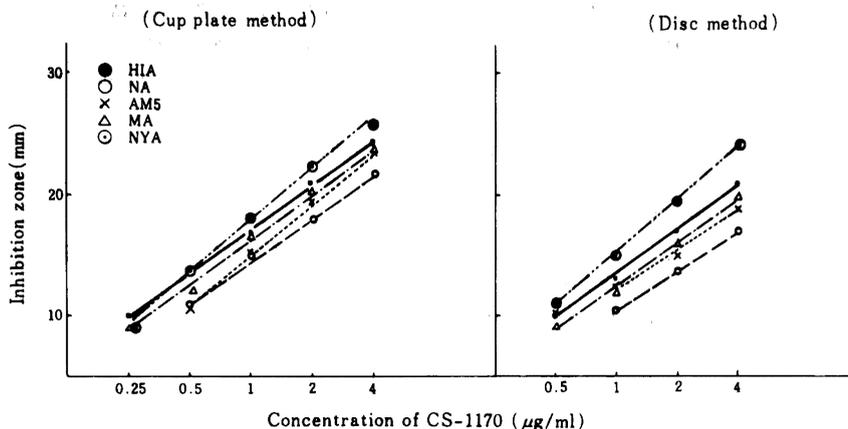
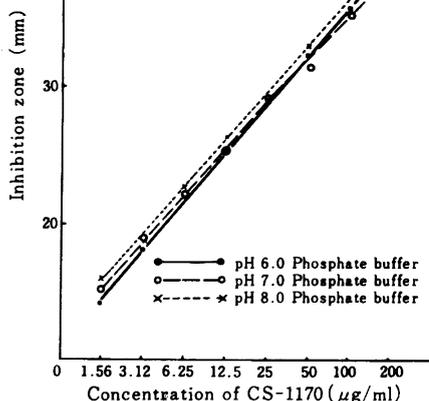


Fig. 2 Effect of buffer pH on standard curve of CS-1170

Test organism ; *M. luteus* ATCC 9341  
 Method ; Cup plate method  
 Medium ; Heart infusion agar  
 Seeded agar ; 8 ml/petri dish (φ 90mm)  
 (single layer)  
 Incubation ; 37°, 18~20hrs.



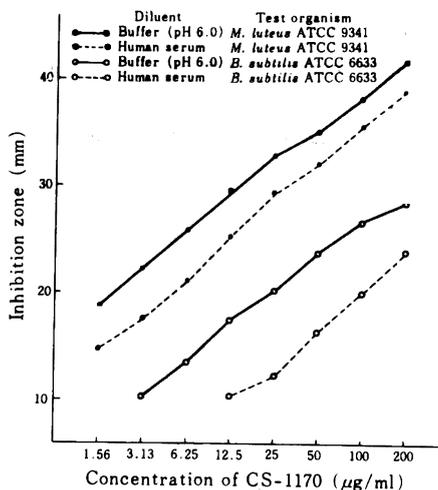
いたときの生成阻止円がもっとも大きく、次いで Heart Infusion Agar, MA, AM 5, Nutrient agar 培地の順になった。しかし NYA 培地の場合、阻止円周辺がやや不明瞭になるという欠点があるため、適当とは思わず、感度や阻止円生成の状態からみて Heart Infusion Agar 培地が検定用培地として適当と考え、採用した。

1.2. 標準曲線に対する buffer pH の影響

pH 6, 7, 8 の phosphate buffer を用いたときの CS-1170 の標準曲線を Fig. 2 に示した。この3者間には大きな差はなかったののでいずれの buffer を用いても測定上問題は無いと考えられるが、CS-1170は pH 4 ~ 6 で

Fig. 3 Effect of human serum on standard curve of CS-1170 with two test organisms

Method ; Cup plate method  
 Medium ; Heart infusion agar (*M. luteus* ATCC 9341)  
 Nutrient agar (*B. subtilis* ATCC 6633)  
 Seeded agar ; 8 ml/petri dish (φ 90mm)(single layer)  
 Incubation ; 37°, 18~20hrs.



もっとも安定であるので、試料希釈液には pH 6.0 phosphate buffer を用いることにした。

1.3. 標準曲線に対する血清の影響

Fig. 3 に *Micrococcus luteus* ATCC 9341 と *Bacillus subtilis* ATCC 6633 の標準曲線を示した。*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いれば 1.56 µg/ml 以下の血中濃度まで測定できるが、*Bacillus subtilis* を用いると、10

$\mu\text{g/ml}$ 以下の血中濃度測定は精度上無理である。いずれの試験菌を用いても血清標準曲線とbuffer標準曲線の間には開きがあり、この開きは *Bacillus subtilis*の方が大きい。*Micrococcus luteus*の場合、buffer標準液から算出した血中濃度値は血清標準液から算出した血中濃度値の50%であり、*Bacillus subtilis*では24%程度にすぎない。血清標準液から算出した血中濃度値は血中のCS-1170の全量(タンパク結合型+遊離型)を表わすと考えられる。bufferを標準液として求めた血中濃度値は *Micrococcus luteus*と *Bacillus subtilis*とはかなり差があるので、この値を血中の遊離型CS-1170量の目安とすることには問題がある。

GROVE, RANDALLも抗生物質の血中濃度測定には血清タンパク結合の影響を考慮し、血清試料と同条件の標準溶液すなわち血清あるいは血清と同等のタンパク結合力を持つウシアルブミン溶液などを用いる必要性のあることを述べている。また試料の阻止円径を補正するため径100mmのペトリ皿に6カップを置き、試料液とともに常に標準液を用いることを強調している。そのため、高濃度域では隣接阻止円の癒着が起こり、測定不能となるので、血清あるいは同等のタンパク結合力を有するウシアルブミン溶液による希釈を行わなければならない<sup>9)</sup>。

CS-1170血中濃度測定法としてGROVE, RANDALLらの方法を用いると希釈用のヒト血清が大量に必要となるが入手が一般には容易でないため、ヒト血清の代わりにpH 6.0 phosphate bufferでの希釈を検討した。buffer希釈

血清溶液での標準曲線はFig.4のごとくbufferによる希釈倍率が高く(すなわち血清濃度が低く)なるほどbuffer溶液の標準曲線に近づいてくる。

しかし20倍希釈してもその標準曲線はbuffer溶液の標準曲線と一致せずタンパク結合の影響が残っている<sup>7)</sup>。それゆえCS-1170血清試料をbuffer希釈して測定する場合、試料液と同じ倍率にbuffer希釈した血清溶液で標準液系列を調製しなければならない。ところで標準液系列の作成の場合、新鮮ヒト血清の代りにMoni-Trol IやConseraなどの市販凍結乾燥血清が使用できれば都合がよい。そこで *Micrococcus luteus* および *Bacillus subtilis* を試験菌とする薄層カップ法でこれら血清の標準曲線を求めFig.5に示した。

*Micrococcus luteus* を試験菌とするとMoni-Trol IとConseraの標準曲線はbuffer、血清標準曲線の間に位置しており、これら代用血清の標準曲線から求めたCS-1170濃度は血清標準曲線から算出されるCS-1170濃度の60~70%にすぎなかった。

試験菌に *Bacillus subtilis*、標準液にConseraを用いると $25\mu\text{g}$ (力価)/ml以下では濃度に無関係に一定の阻止円の生成がみられた。

## 2. 血中濃度測定に対する測定法の影響

### 2.1. Buffer希釈の影響、血清希釈の影響

健康成人にCS-1170投与後採取された血清試料の一部につき検討した。血清試料を希釈せずに測定した場合とbufferで10倍希釈して測定した場合の測定値の相関

Fig. 4 Effect of concentration of human serum on standard curve of CS-1170

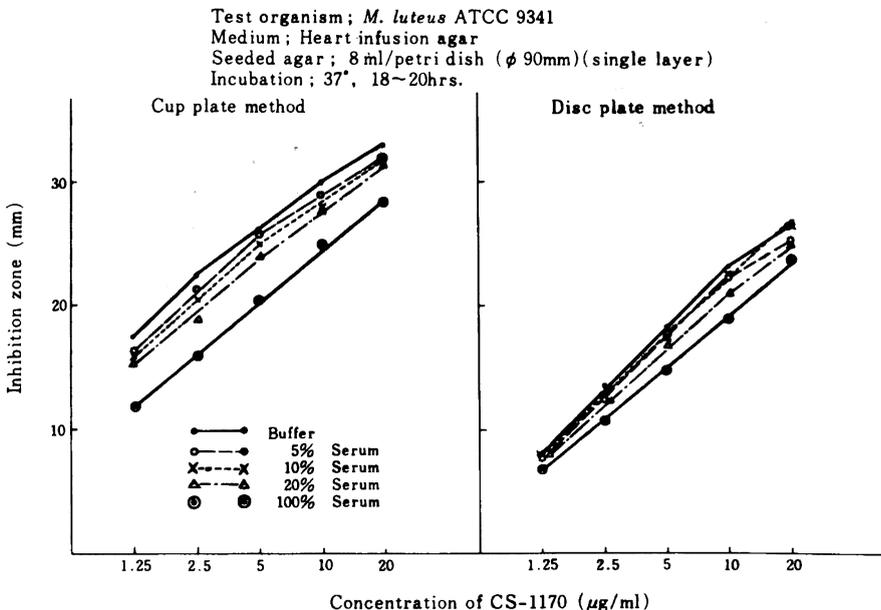


Fig. 5 Effect of human serum, Moni-Trol I and Consera on standard curve of CS-1170

Method; Cup plate method  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.

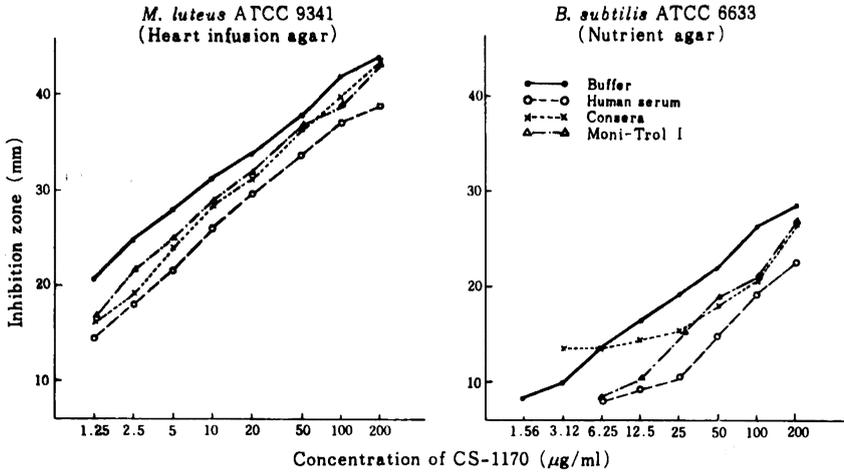
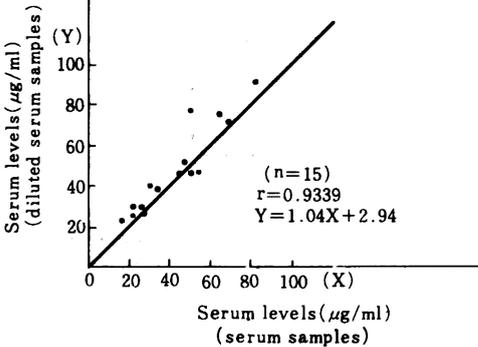


Fig. 6 Correlation between the serum levels obtained from serum and diluted serum samples

Test organism; *M. luteus* ATCC 9341  
Method; Cup plate method  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.



Samples (Y): Serum diluted 10-fold with buffer (pH 6.0)  
Standard diluent: Buffer (pH 6.0) containing 10% human serum  
Samples (X): Serum  
Standard diluent: Human serum

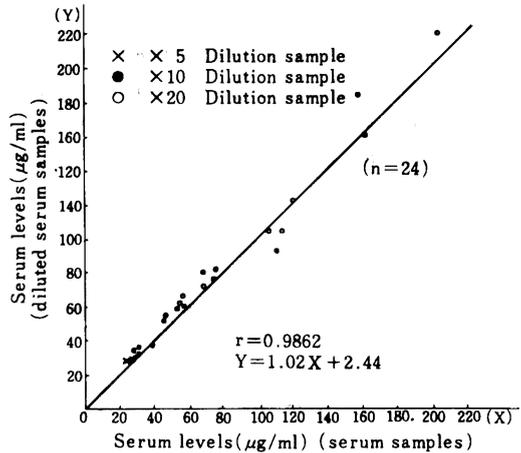
を Fig. 6 に示した。

この場合の標準液にはそれぞれ血清および buffer で 10倍希釈した血清を用いた。両測定値の相関性は良好であり、血清試料を buffer 希釈して測定しても問題ないことがわかった。またこのような buffer 希釈血清試料の測定値が GROVE, RANDALL らの血清希釈法による測定値とどの程度相関しているかを Fig. 7 に示した。

同一血清試料の一部を血清、一部を buffer でそれぞれ

Fig. 7 Correlation between the serum levels obtained from buffer or serum-diluted serum samples

Test organism; *M. luteus* ATCC 9341  
Method; Cup plate method  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.



Samples (Y): Serum diluted 5- or 20-fold with buffer (pH 6.0)  
Standard diluent: Buffer (pH 6.0) containing 20% or human serum  
Samples (X): Serum diluted with human serum  
Standard diluent: Human serum

同じ倍率に希釈し、標準液として血清、buffer 希釈血清を用いて測定したが両者も良好な相関性を示した。以上のことから CS-1170 の血中濃度測定法として、1) 血清試料を希釈せずに測定し、標準液系列は血清で作成する方法、2) 血清試料を血清で希釈して測定し、標準液系

列は血清で作成する方法, 3) 血清試料を buffer で希釈して測定し, 標準液系列は試料液と同じ倍率に buffer で希釈した血清溶液で作成する方法のいずれを用いても測定値に差が生じないことがわかった。

## 2.2. 試験菌の影響

同一血清試料を *Micrococcus luteus* および *Bacillus subtilis* を試験菌とする薄層カップ法で測定し, その相関を Fig. 8 に示した。標準液系列の作成には血清を用いた。両者の相関は良好で試験菌により測定値に差が生じないことがわかった。

## 2.3. 薄層カップ法と薄層ディスク法

血清試料を薄層カップ法と薄層ディスク法で測定し, 両者の相関を Fig. 9 に示した。両測定値の相関は良好であるが, ディスク法はカップ法よりデータのバラツキがやや大きく, 検出限界濃度もカップ法より一段階程度劣るものであった。

## 2.4. 薄層カップ法と HPLC 法

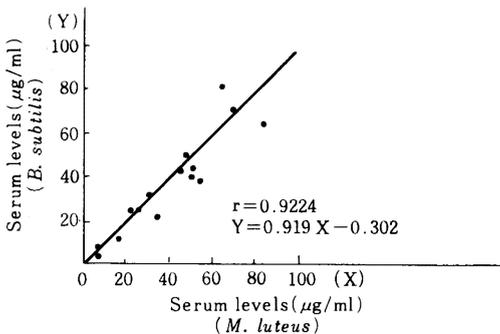
両者による測定値の相関を Fig. 10 に示した。

両測定値の相関性が良好であることから, 血中 CS-1170 測定法として用いている bioassay 法の妥当性が確認された。

## 3. 尿中濃度測定に対する測定法の影響

CS-1170 第 1 相試験での尿試料の一部について, *Micrococcus luteus* を試験菌とする薄層カップ法, 薄層ディスク法および HPLC 法での測定を行い, カップ法とディスク法, カップ法と HPLC 法との相関を Fig. 11 に示した。各測定法間の相関性は良好であり, いずれの方法によっても測定値に大きな差はなく, 特に高濃度の抗生剤を含む尿で常に問題となる希釈誤差が全くみられない。

Fig. 8 Correlation between the serum levels obtained from cup plate method with *M. luteus* ATCC 9341 and *B. subtilis* ATCC 6633  
Method; Cup plate method  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.



## 4. CS-1170の安定性

CS-1170の1% phosphate buffer (pH6.0) 中での安定性を Fig. 12 に示した。5°C (冷蔵庫中) で保存した場合の CS-1170 の力価は 1 週間程度ではほとんど変化しなかった。-20° (凍結) で保存した場合は 6 カ月程度安定であり, 凍結, 融解を繰り返さない小分け保存法と, 凍結, 融解を繰り返す非小分け保存法の間にもほとんど差はなかった。それゆえ CS-1170 の標準液は凍結保存により長期間使用できるものと判定された。CS-1170 の血清中での安定性は Fig. 13 のとおりである。

5°C 保存の場合, 10 日前後は安定であり, -20°C 保存なら 60 日後でも力価の低下はみられなかった。CS-1170 の

Fig. 9 Correlation between the serum levels obtained from cup or disc plate method

Method; Cup plate method, Disc plate method  
Test organism; *M. luteus* ATCC 9341  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.

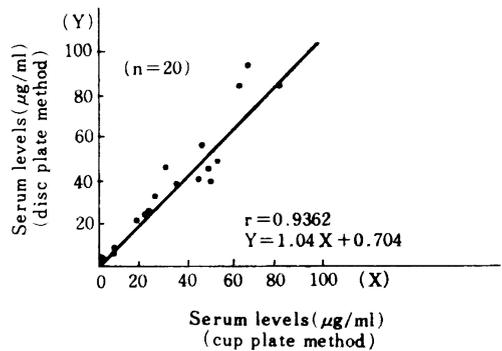


Fig. 10 Correlation between the serum levels obtained from cup plate method and HPLC method

Method; Cup plate method, HPLC method  
Test organism; *M. luteus* ATCC 9341  
Seeded agar; 8 ml/petri dish (single layer)  
Incubation; 37°, 18~20hrs.

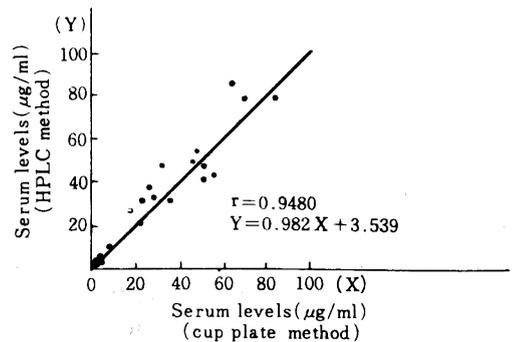


Fig. 11 Correlation between the urinary levels obtained from cup plate method and disc plate method or HPLC method

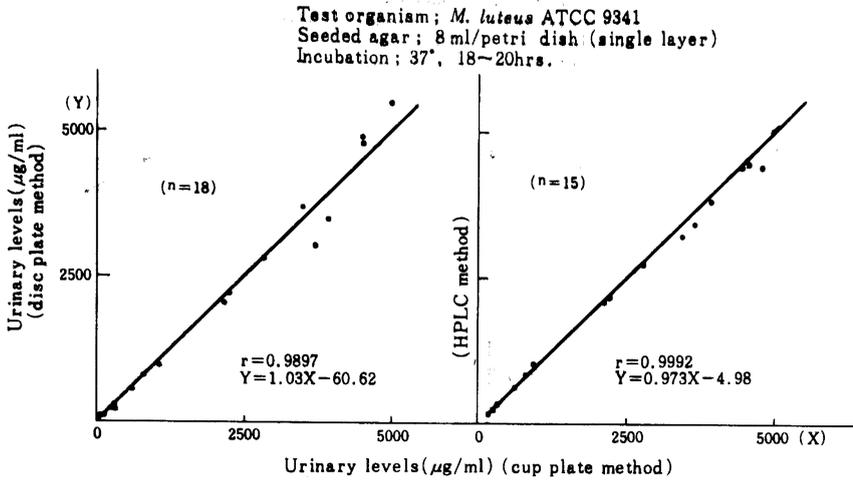


Fig. 12 Stability of CS-1170 in phosphate buffer solution

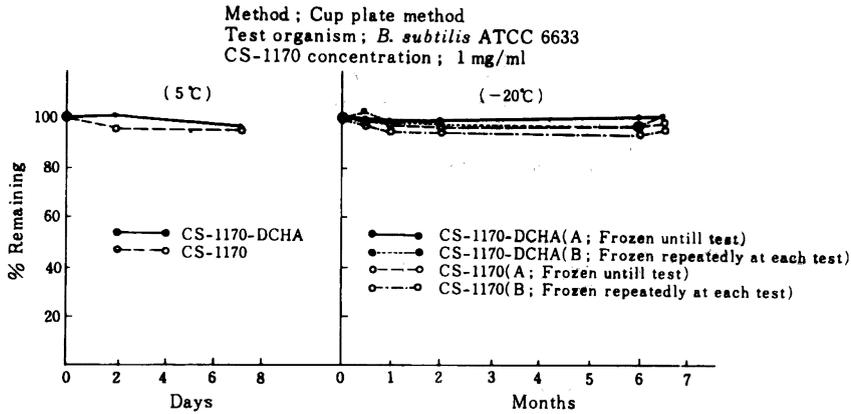


Fig. 13 Stability of CS-1170 in human serum

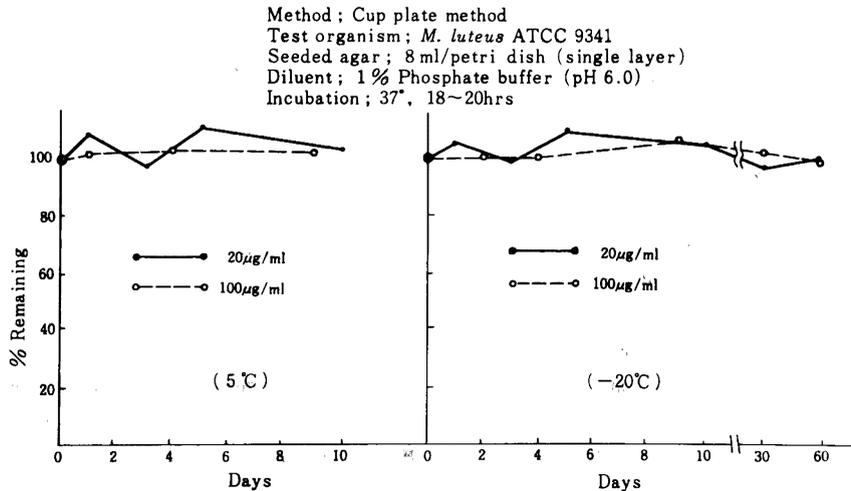


Fig. 14 Stability of CS-1170 in human urine

Method ; Cup plate method  
 Test organism ; *M. luteus* ATCC 9341  
 Seeded agar ; 8 ml/petri dish (single layer)  
 Diluent ; 1% Phosphate buffer (pH 6.0)  
 Incubation ; 37°, 18~20hrs.

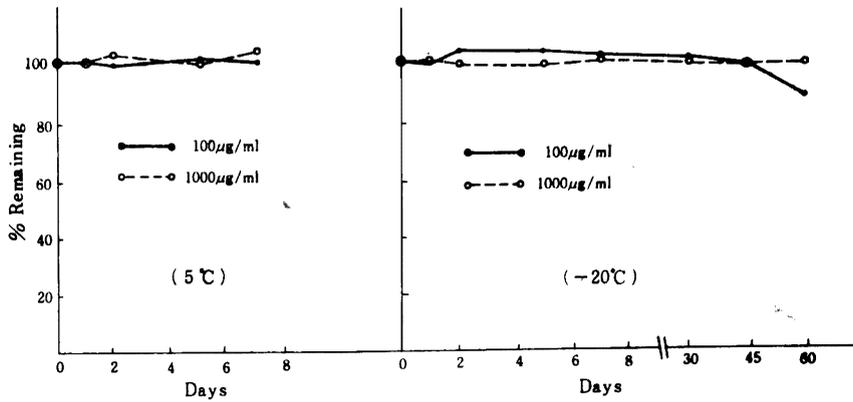
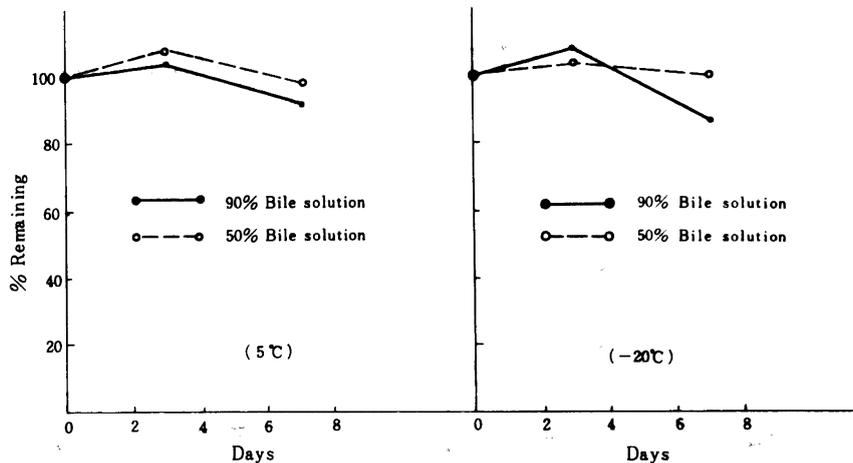


Fig. 15 Stability of CS-1170 in human bile

Method ; Cup plate method  
 Test organism ; *M. luteus* ATCC 9341  
 Seeded agar ; 8 ml/petri dish (single layer)  
 Diluent ; 1% Phosphate buffer (pH 6.0)  
 Incubation ; 37°, 18~20hrs.  
 CS-1170 Concentration ; 20µg/ml Bile solution



尿中での安定性を Fig.14に示した。

5°C 保存では1週間前後、-20°C 保存では1カ月前後安定であった。

また CS-1170の胆汁中移行という点から胆汁中での安定性を検討したのが Fig.15である。90%胆汁溶液中では5°C 保存でも-20°C 保存でも1週間後には力価の低下がみられた。この胆汁原液は pH8.8であるため、90%胆汁溶液中では CS-1170 はやや不安定と考えられる。

一方、buffer (pH6.0)で2倍希釈した50%胆汁中では5°C 保存でも-20°C 保存でも1週間後に CS-1170の力価低下はみられなかった。その理由は2倍希釈胆汁溶液の pHが6.4であるためと考えられる。

それゆえ CS-1170の胆汁試料の保存には pH 6の phosphate bufferで2倍以上に希釈して凍結しておくのが適当と思われる。

### III. 考 察

CS-1170体液濃度測定用の試験菌はCS-1170にもっとも感受性の高い *Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*) ATCC 9341が適当と考え採用した。検定用培地としては定量感度がよく、阻止円周辺も比較的明瞭な Heart Infusion Agar 培地を選んだ。

この試験菌と培地を用いて、希釈液の pH の影響を検討した。pH 6, 7, 8 の phosphate buffer の標準曲線間にはほとんど差がないこと、CS-1170は pH 4~6 でもっとも安定なこと、セファロsporin 剤の力価検定<sup>4)</sup>では主に pH6.0 phosphate buffer (1%≒1/15M) が用いられていることなどから、CS-1170の希釈液として pH6.0 phosphate buffer (1%≒1/15M) を用いた。以上の条件で薄層カップ・プレート法を用いれば 0.6 $\mu$ g/ml 血清の濃度まで測定可能であるが、試験菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いた場合は定量感度は悪く、10  $\mu$ g/ml 血清以上の濃度でないと測定できない。CS-1170 血中濃度測定で、標準液に血清を用いたか buffer を用いたかで測定値に大きな差がでてくるのは主に CS-1170 の血清タンパク結合率 (~85%)<sup>7)</sup> が高いためである。

血清を buffer で高倍率に希釈するほどその標準曲線は buffer の標準曲線に接近してくるが、20倍希釈でも血清タンパクの影響は消失しない。血中濃度測定用の標準液として新鮮なヒト血清の代りに市販の代用血清 (Consera, Moni-Trol I) もよく使用されているので、これらについても検討した。Consera と Moni-Trol I の標準曲線はほとんど一致し、buffer とヒト血清との中間に位置する。*Micrococcus luteus* ATCC 9341 を試験菌としたとき、代用血清標準液から求めた血清中濃度はヒト血清標準液から求めた値より 30~40%低い。

*Bacillus subtilis* の場合、Consera を標準液とすると 25 $\mu$ g/ml 以下で、CS-1170の濃度と無関係に一定の阻止円生成がみられ、なんらかの未知要因の存在が推定された。血中濃度測定法としては一般に血清あるいは buffer を標準液として血清をそのまま測定する方法が行われているが、GROVE と RANDALL の方法<sup>8)</sup>では径100mm のペトリ皿に 6 カップを置き、試料溶液とともに補正用として標準溶液を用いるため、高濃度血清試料の場合は血清希釈する必要がある。この方法では希釈用の血清が多量に必要であり、供給の面で困難がある。そこで血清希釈の代りに buffer 希釈も検討した。試料の buffer 希釈の場合には、その希釈倍率によって標準曲線が異なるので、血清試料の希釈に応じた希釈血清で標準液系列を作成する必要がある。こうして a) 血清試料を希釈せずに測定した場合、b) 血清試料を血清希釈して測定した場合、c) 血清試料を buffer 希釈して測定した場合の測定値を比

較したが、これらの値はよく一致し、希釈によって測定値に差が生じることはなかった。

薄層ディスク法は薄層カップ法より測定値のバラツキがやや多いが、両者の値はよく一致した。また試験菌として *Micrococcus luteus* を用いても *Bacillus subtilis* を用いても測定値には差がなかった。このような bioassay による血清中濃度値は高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法による測定値ともよく一致しており、bioassay 法の妥当性が確認された。

CS-1170尿中濃度についても薄層カップ法、薄層ディスク法、HPLC 法による測定値はよく一致した。CS-1170 溶液中での安定性を 5 $^{\circ}$ C と -20 $^{\circ}$ C で検討した。1% phosphate buffer (pH6.0) 中では 5 $^{\circ}$ C で 1 週間程度は安定で、-20 $^{\circ}$ C で保存すれば 6 カ月間使用できる。ヒト血清中では 5 $^{\circ}$ C で 10 日前後、-20 $^{\circ}$ C で 2 カ月程度は保存できる。ヒト尿中では 5 $^{\circ}$ C で 1 週間、-20 $^{\circ}$ C では 1.5 カ月程度保存しても力価の低下はみられなかった。ヒト胆汁 (90%胆汁) 中では -20 $^{\circ}$ C 保存でも 1 週間後に 10% 程度の力価低下がみられたが、buffer で 2 倍希釈した胆汁 (50%) 中では 5 $^{\circ}$ C 保存でも -20 $^{\circ}$ C 保存でも 1 週間後の力価低下はみられなかった。

以上のことから CS-1170 体液内濃度測定法として以下の方法が適当である。

#### 1) 試験菌

*Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*) ATCC 9341

#### 2) 検定用培地

Heart Infusion Agar 培地

#### 3) 検定法

薄層カップ法、薄層ディスク法のいずれでもよい。径 90mm のペトリ皿を用いるときは試験菌接種寒天 (Seeded agar) を 5~8 ml 分注する。

#### 4) 検体の希釈液

血清試料を希釈する場合は血清または 1% phosphate buffer (pH6.0)。尿、胆汁試料を希釈する場合は 1% phosphate buffer (pH6.0)。

#### 5) 標準液系列

血清試料あるいは血清で希釈した血清試料の測定には、血清 (入手しにくいときは Moni-Trol I あるいは Consera) と 1% phosphate buffer (pH6.0) で標準液系列を作成する。buffer で希釈した血清試料の測定には、試料液と同じ倍率に buffer で希釈した血清で標準液系列を作成する。尿、胆汁などの測定には 1% phosphate buffer (pH6.0) で標準液系列を作成する。

#### 6) 標準曲線による測定範囲

薄層カップ法 0.6~200 $\mu$ g (力価)/ml

薄層ディスク法 1~200 $\mu$ g (力価)/ml

## 7) 検定用培地への接種菌量

$10^8$ ~ $10^9$ /mlの菌液を培地に1%になるように接種し、培地1ml当りの菌数が $10^8$ ~ $10^7$ になるようにする。

## 8) 培養条件

37°C, 15~20時間

## ま と め

新合成セファマイシン系抗生物質、CS-1170の体内濃度測定法を第1相試験の血清、尿を用いて検討した。試験菌として *Micrococcus luteus* を用いる薄層カップ法がCS-1170の体内濃度を測定する最適な方法であることがわかった。この方法によるヒト血清中CS-1170検出感度は $0.6\mu\text{g/ml}$ であった。簡便な薄層ディスク法は薄層カップ法に比べいくぶんバラツキが大きい、薄層カップ法とほとんど結果に差がなかった。薄層ディスク法による血清中CS-1170検出感度は $1\mu\text{g/ml}$ であった。このbioassay法で求めた体内濃度はHPLC法から求めた値とよく一致した。薄層カップ法でCS-1170血清中濃度を求めた場合、標準溶液調製用の希釈液としてヒト血清の代りにMoni-Trol IかConseraを用いると30~40%低い値が得られた。また測定試料溶液と同一組成の希釈液で標準液系列を調製すれば、CS-1170血清中濃度は血清希釈してもbuffer希釈しても影響を受けないことが確かめられた。さらにCS-1170血清中濃度は試験菌として *Micrococcus luteus* を用いても *Bacillus subtilis* を用いても影響ないことが確認された。*Bacillus subtilis* を試験菌とする薄層カップ法を用いたときの血清中CS-1170検出感度は $10\mu\text{g/ml}$ であった。CS-1170は

buffer溶液、ヒト血清、ヒト尿中でも凍結保存で安定であった。胆汁中ではやや不安定であるがpH6.0 phosphate buffer溶液で2倍希釈して凍結した場合、力価の低下はみられなかった。

## 文 献

- 1) FUJI-KURIYAMA, Y.; M. YAMAMOTO & S. SUGAWARA: Purification and Properties of Beta-Lactamase from *Proteus morgani*. J. Bacteriol., 131; 726~734, 1977
- 2) JOSEPH V. U.; P. ACTOR, J. R. GUARINI, L. PHILLIPS, D. PITKIN, R. M. DEMARINIS & J. A. WEISBACH: Biological and Chemotherapeutic Studies of Semisynthetic Cephamycins. J. Antibiotics 31 (1): 82~91, 1978
- 3) 菅原真一, 田島政三, 五十嵐勇, 宇津井幸男, 大屋哲, 中原正城: 新セファマイシン系抗生物質CS-1170の抗菌活性. Chemotherapy 26 (S-5): 81~98, 1978
- 4) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法 1974
- 5) 真下啓明, 国井乙彦, 深谷一太, 谷莊吉, 原中勝征, 渡部迪男, 小松喬, 里見信子: CS-1170に関する基礎的・臨床的研究 Chemotherapy 26 (S-5): 193~202, 1978
- 6) D. C. GROVE & W. A. RANDALL: Assay Methods of Antibiotics P. 2~5, Medical Encyclopedia, Inc., 1955
- 7) 進藤英世, 河合賢司, 前田敏彦, 五十嵐勇, 田島政三, 菅原真一: 新セファマイシン系抗生物質, CS-1170の各種動物における吸収, 分布, 代謝ならびに排泄. Chemotherapy 26 (S-5): 99~114, 1978

## THE STUDIES ON DETERMINATION METHOD OF BODY FLUID LEVEL OF CS-1170

YOSHIO SAHASHI, TOSHIMASA KOJIMA,  
MASATO ICHIKAWA and KUNIHIRO SASAHARA  
Product Development Laboratories, Sankyo Co. Ltd.,

Determination method of tissue distribution of CS-1170, a new semisynthetic cephamycin group antibiotic, was studied with use of serum and urine of the phase one study. Thin layer cup-plate method in which *Micrococcus luteus* ATCC 9341 was used as test organism was proved to be the best way to determine the low level of CS-1170 in body fluid. The sensitivity of this method for CS-1170 in human serum was 0.6  $\mu\text{g/ml}$ . Convenient thin layer disc-plate method was not different from thin layer cup-plate method, though the former showed somewhat larger deviation as compared with the latter. The sensitivity of thin layer disc-plate method for CS-1170 in human serum was 1  $\mu\text{g/ml}$ . The body fluid level of CS-1170 obtained by these bioassay methods was in good agreement with that obtained by HPLC method. Serum level of CS-1170 was 30-40% lower, if Moni-Trol I or Consera was used in place of human serum as the diluent for preparing standard solution in the thin layer cup-plate method. It was confirmed that serum level of CS-1170 was not affected if serum samples were diluted with serum or buffer solution when the standard solution of serial dilution was prepared with the diluent of the same composition as that of test sample solutions. Furthermore measured serum value of CS-1170 was not affected when *Micrococcus luteus* ATCC 9341 or *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was used as test organism. The sensitivity of the thin layer cup-plate method for CS-1170 in human serum was 10  $\mu\text{g/ml}$  when *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was used as test organism.

CS-1170 was stable in buffer solution, human serum and human urine when it was kept in frozen state. Although CS-1170 was somewhat unstable in human bile, it showed no decrease of the potency when it was kept frozen with addition of the equal volume of pH 6.0 phosphate buffer solution.