

Cefotiam (SCE-963) の体液内濃度測定法

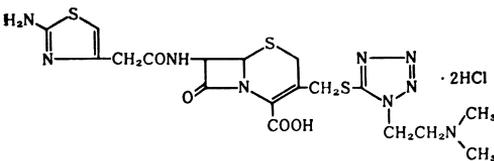
畚野 剛・前田憲一

武田薬品工業株式会社中央研究所

結 言

Cefotiam (CTM, SCE-963) [7 β -[2-(2-aminothiazol-4-yl)acetamido]-3-[[[1-(2-dimethylaminoethyl)-1H-tetrazol-5-yl]thio]methyl]-ceph-3-em-4-carboxylic acid, dihydrochloride) は沼田¹⁾により合成された新セファロsporin誘導体 (Fig. 1) で、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に抗菌力を示し、特に臨床分離の *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* および *Proteus mirabilis* の多くの菌株に対する最小発育阻止濃度は 0.2~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、CEZ, CER の約 10 倍の抗菌活性を示す²⁾³⁾。本報告では本剤の体液内濃度測定法および bioautograph 法による CTM の検出法について検討した成績について述べる。

Fig. 1 Chemical structure of CTM



実験材料と実験方法

1. 使用薬剤

CTM は武田薬品工業株式会社中央研究所で合成された。

2. 菌 株

Staphylococcus aureus ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Proteus mirabilis* ATCC 21100 および *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 は発酵研究所から分与されたのち、本研究室で継代保存中のものを用いた。

3. 感受性試験

ブドウ糖寒天を用いた寒天平板希釈法により⁴⁾、0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で試験した。

4. 濃度測定法

4.1 測定用培地：スルベニシリン定量用寒天⁵⁾ (自家

調合)、普通寒天 (栄研)、ハートインフュージョン寒天 (栄研) および DST 寒天 (Oxoid) を用いた。

4.2 菌液：37°C 一夜培養した新鮮斜面培養から菌体をかきとり、滅菌蒸留水に懸濁し、その濁度を光電比色計 (EPO-B 型, フィルター-660 nm, 日立製作所) で O.D. 約 0.8 に調整した。この菌液 5 ml を 47°C に保温した測定用培地 1,000 ml に接種した。

4.3 標準液：CTM を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 1,000 μg (力価)/ml に溶解したものを標準原液とし、さらに同緩衝液または血清で希釈して標準希釈系列を調整した。

4.4 薄層カップ法：試験菌を接種した測定用培地 10 ml を直径 9 cm のプラスチック・シャーレに流しこみ、水平台上で固化させた。寒天平板上に、それぞれの間隔が約 3.5 cm になるように 4 個のステンレス・カップ (内径×外径×高さ=6×8×10mm) を立てた。標準希釈液および検体をカップ内に注入したのち、34°C 一夜培養し、阻止円の直径を測定した。検体の CTM 濃度は標準曲線法⁵⁾により求めた。

5. 薄層 chromatograph (TLC)/bioautograph 法

5.1 TLC 系 I : Spotfilm (シリカゲル f, 20×20 cm, 東京化成工業株式会社) をシリコン油 (DC-200, Nishio Industry Co.) の 5% エーテル溶液で上昇法により一夜展開したのち通風乾燥した。これに CTM 標準液、化合物 A 液、化合物 B 液および尿検体 (CTM 約 2 μg 相当量) を、マイクロピペットでスポットしたのち、約 10 分間通風乾燥し、ただちに 1% 食塩液を展開溶媒として室温で上昇法により原点から約 15 cm (約 60 分) 展開した。約 1 時間通風乾燥したシートを各検体毎に切断した。

5.2 TLC 系 II : Spotfilm (シリカゲル f, 20×20 cm, 東京化成工業株式会社) に標準液および各検体をマイクロピペットでスポットしたのち、約 10 分間通風乾燥した。乾燥後ただちにアセトン・酢酸・水・アンモニア (20 : 8 : 5 : 1) を用いて室温で上昇法により約 15 cm (約 110 分) 展開した。約 1 時間通風乾燥したのち、シートを切断した。

5.3 Bioautograph 法: *P. mirabilis* ATCC 21100 を接種した DST 寒天 (pH 8.0) 200 ml をバイオオート缶 (24×34 cm) に流しこみ, 水平台上で固化させた。寒天平板上にそれぞれの間隔が約 3.5 cm になるように切断シートを下向けに張り付けた。約20分間薬剤を寒天層に拡散させたのち, 切断シートを去除した。寒天平板は37°C, 一夜培養したのち各阻止帯を検出した。

実験結果と考察

1. 試験菌株の選択

試験菌 6 株の CTM に対する感受性をブドウ糖寒天を用いて測定した (Table 1)。CTM に対しては *P. aeruginosa* NCTC 10490 を除くすべての株が高い感受性を示した。さらにこれらの株について薄層カップ法により CTM 濃度と阻止円径との関係および阻止円周縁の鮮明度について検討した。CTM の 0.625 $\mu\text{g/ml}$ における各菌株の阻止円の大きさは *P. mirabilis* ATCC 21100 が最も大きく, 以下 *S. lutea* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* NIHJ JC-2 の順に小さくなった (Fig. 2)。阻止円の鮮明度は *P. mirabilis* ATCC 21100 および *E. coli* NIHJ JC-2 では鮮明で, 他の菌株ではやや不鮮明であった。以上の結果より, CTM の体液内濃度測定および bioautography には阻止円が鮮明で, 低濃度の CTM を検出できる *P. mirabilis* ATCC 21100 を試験菌として選定した。

2. 濃度測定条件の検討

2.1 測定用培地: *P. mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とする薄層カップ法により, CTM の 0.625~40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で, スルベニシリン定量用寒天, DST 寒

Table 1 Susceptibility of test organisms to CTM

| Test organism | MIC ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------------|--------------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538 P | 0.2 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 | 0.2 |
| <i>S. lutea</i> ATCC 9341 | 0.5 |
| <i>E. coli</i> NIHJ JC-2 | 0.5 |
| <i>P. mirabilis</i> ATCC 21100 | 0.2 |
| <i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490 | >100 |

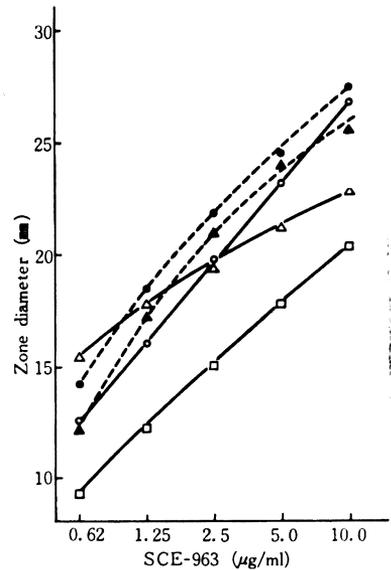
MIC=Minimum inhibitory concentration

Method: agar dilution method

Medium: glucose agar

Incubation: 18 hours at 37°C

Fig. 2 Comparison of zone diameters of CTM on various test organisms by cylinder-plate method



●-----● *S. lutea* ATCC 9341*

▲-----▲ *S. aureus* ATCC 6538P*

○-----○ *B. subtilis* ATCC 6633*

△-----△ *P. mirabilis* ATCC 21100**

□-----□ *E. coli* NIHJ JC-2**

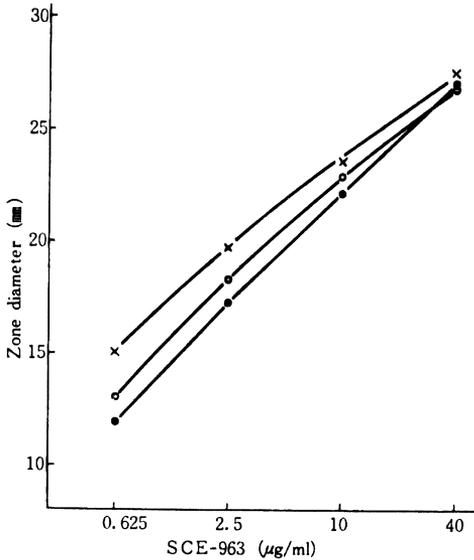
Medium: *Sulbenicillin assay agar (pH 6.5)

**DST agar (pH 7.0)

天, 普通寒天およびハートインフュージョン寒天における阻止円を比較した。スルベニシリン定量用寒天での阻止円径は最も大きかったが, 鮮明度において最も劣った。他の 3 種の培地での阻止円径は大差なかったが, そのうち DST 寒天が最も鮮明な阻止円を示した。ついで DST 寒天における培地 pH の影響を検討した (Fig. 3)。阻止円の大きさは pH 8, 7, 6 の順に小さくなった。また鮮明度は pH 8 および 7 が良好であった。以上の結果から測定用培地として DST 寒天 (pH 8.0) を用いることとした。

2.2 血清, 尿および胆汁の阻止円に対する影響: 標準液の希釈溶媒として 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) (以下緩衝液と略記), 新鮮ヒト血清および精度管理用血清 [Consera (日水製薬株式会社), Moni-trol I (American Hospital Supply Co.)] を用い, 阻止円に対する影響を検討した (Fig. 4)。血清で希釈した標準液では緩衝液で希釈した標準液よりも阻止円が小さくなり, そ

Fig. 3 Effect of medium pH on zone diameters of CTM by cylinder-plate method



Test organism : *P. mirabilis* ATCC 21100

Medium : DST agar

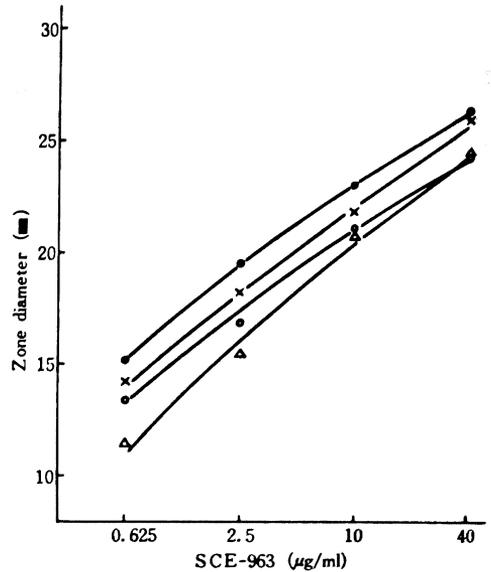
- pH 6.0
- pH 7.0
- ×——× pH 8.0

の程度は血清の種類により異なるが、新鮮ヒト血清と Moni-trol I は比較的近似した値を示した。また Consera で希釈したとき、CTM の 2.5 µg/ml 以下の濃度では、阻止円が著しく不鮮明であった。したがって血清中濃度の測定には、血清で希釈した CTM 溶液によって得られた標準曲線を用いることが望ましい。また緩衝液で 5 倍希釈した尿または胆汁で調製した CTM 溶液の阻止円径は緩衝液で調製したそれと差がなかった。

2.3 体液中での安定性 : CTM をヒト血清に 10 µg/ml、胆汁に 50 µg/ml、尿および緩衝液にそれぞれ 1,000 µg/ml の濃度になるように添加溶解した。これらの溶液を -20°C で保存し、0, 7, 14, 30 日後に CTM 濃度を薄層カップ法で測定し、それぞれ 0 日における力価を 100% として、保存後の残存率を算出した (Table 2)。血清、尿および緩衝液中では 14 日後まで力価はほとんど変化せず、30 日後にはやや減少した。胆汁中では 7 日後に力価の低下が認められた。

2.4 体液内濃度測定法 : CTM の体液内濃度測定には *P. mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とし、DST 寒

Fig. 4 Effect of diluents on zone diameter of CTM by cylinder-plate method



Test organism : *Proteus mirabilis* ATCC 21100

Medium : DST agar (pH 8.0)

Diluent :

- Phosphate buffer (pH 7.0)
- Fresh human sera
- ×——× "Moni-trol I"* (American Hospital Supply Co.)
- △——△ "Consera"* (Nissui Seiyaku Co.)

*Reconstituted from freeze-dried material.

Table 2 Stability of CTM in human body fluids under frozen state

| Body fluid | CTM (µg/ml) | Freezing period (days) | | | |
|------------|-------------|------------------------|-----|-----|----|
| | | 0 | 7 | 14 | 30 |
| Serum | 10 | 100* | 101 | 100 | 87 |
| Urine | 1000 | 100 | 105 | 95 | 90 |
| Bile | 50 | 100 | 84 | NT | NT |
| Buffer** | 1000 | 100 | 105 | 99 | 94 |

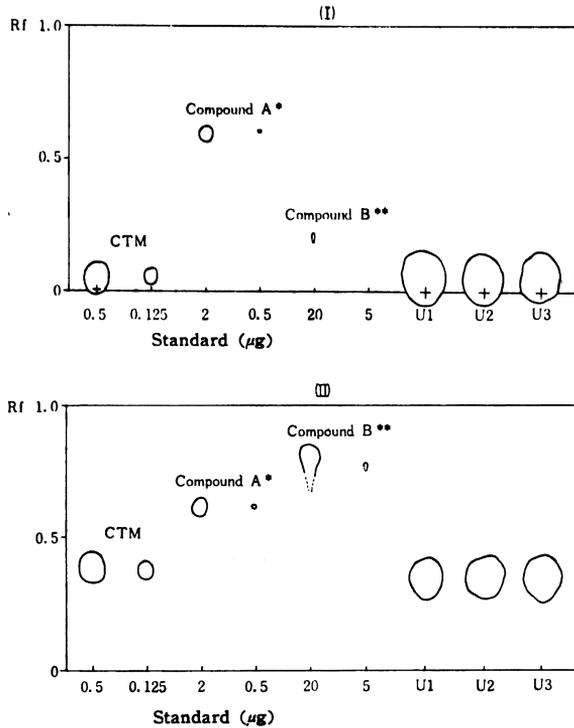
* Residual potency (%)

** 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)

NT : not tested

天 (pH 8.0) を試験培地とする薄層カップ法を用いる。血清検体の CTM 濃度は、血清で希釈調製した CTM 標準曲線から求める。尿および胆汁検体は 0.1M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で 5 倍以上に希釈して測定

Fig. 5 Bioautograms of human urine specimens after single intramuscular administration of 500 mg (potency) of CTM



Thin-layer chromatography (plate/solvent) :

(I) Spotfilm silica gel f (Tokyo Kasei)

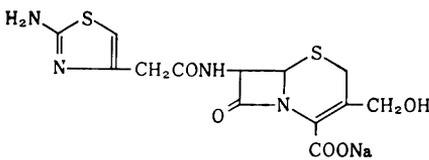
Impregnated with silicon oil DC-200 (Nishio Industry)/1% NaCl

(II) Spotfilm silica gel f/Me₂CO · AcOH · H₂O · NH₃aq (20 : 8 : 5 : 1)

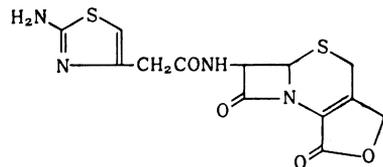
Bioautography (test organism/medium) :

Proteus mirabilis ATCC 21100/DST agar (Oxoid), pH 8.0

U 1, U 2, U 3 : Human urine specimens collected 0~2, 2~4, 4~6 hours after administration, respectively.



* Compound A : Sodium 7β-[2-(2-aminothiazol-4-yl)acetamido]-3-hydroxymethyl-ceph-3-em-4-carboxylate



** Compound B : 7β-[2-(2-aminothiazol-4-yl)acetamido]-3-hydroxymethyl-ceph-3-em-4-carboxylic acid lactone

Table 3 Microbiological assay of CTM

| | |
|--|---|
| Type | cylinder-plate method |
| Test organism | <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 21100 |
| Inoculum size | 0.5ml of cell suspension (O.D.=0.8) per 100 ml of assay agar |
| Medium | Diagnostic sensitivity test agar (Oxoid) adjusted pH to 8.0 before sterilization |
| Initial solution of standard | 1 mg/ml in 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 |
| Diluent for further dilution | 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 or serum (Moni-trol I) |
| Final concentration of standard solution | CTM : 0.625, 2.5, 10.0, 40.0 (μ g/ml) |
| Incubation | 16~20 hours at 34°C |

し、その CTM 濃度は同緩衝液で希釈調製した CTM 標準曲線から算出する。本法による CTM の測定下限濃度は緩衝液中で 0.1 μ g (力価)/ml、ヒト血清中で 0.2 μ g (力価)/ml である (Table 3)。

3. 薄層 chromatograph (TLC)/bioautograph 法 : CTM の分離検出のため、CTM とその関連化合物の分離が可能である TLC 系 I および II を用いて bioautograph 法を検討した。Fig. 5 に示すようにシリコンオイルを浸透した silicagel プレートを用い、1%食塩液を展開溶媒とする TLC 系 I において化合物 A、化合物 B および CTM の順に展開され、Rf 値はそれぞれ 0.60~0.62, 0.20 および 0.05~0.06 であった。また silicagel プレートを用い、アセトン-酢酸-水-アンモニア水 (20 : 8 : 5 : 1) を展開溶媒とする TLC 系 II においては化合物 B、化合物 A および CTM の順に展開され、Rf 値はそれぞれ 0.78~0.83, 0.61~0.62 および 0.36~0.38 であった。これら化合物の bioautograph 法で CTM は系 I、系 II 共に約 0.1 μ g、化合物 A は系 I、系 II 共に約 2 μ g、化合物 B は系 II では約 20 μ g で明らかに検出されたが、化合物 A は系 I、系 II 共に 0.5 μ g、化合物 B は系 I では 20 μ g、系 II では 5 μ g では不明瞭な生育阻止帯を示した。健康成人男子に CTM を 500 mg (力価) 筋肉内投与して得られた尿について試みた結果、尿中には Rf が CTM に相当する spot のみが検出された。

ま と め

Cefotiam (CTM, SCE-963), (7 β -[2-(2-aminothiazol-4-yl)acetamido]-3-[[1-(2-dimethylaminoethyl)-1H

-tetrazol-5-yl] thio] methyl] -ceph-3-em-4-carboxylic acid) の血清、尿および胆汁中濃度は *Proteus mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とし、DST 寒天 (Oxoid), pH 8.0 を試験培地とする薄層カップ法により測定が可能であった。本法による測定下限は緩衝液中で 0.1 μ g (力価)/ml、血清中で 0.2 μ g (力価)/ml であった。また silica gel plate による薄層 chromatograph 法と、*P. mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とし、DST 寒天 (Oxoid), pH 8.0 を試験培地とする bioautograph 法とを組合せることにより、生体試料中の CTM を分離検出できた。

文 献

- 1) NUMATA, M.; I. MINAMIDA, M. YAMAOKA, M. SHIRAIISHI, T. MIYAWAKI & T. NISHIMURA : SCE-963, A New Cephalosporin I. Synthesis and Structure, Abstracts of 17th Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemoth. No. 44, 1977
- 2) TSUCHIYA, K.; M. KIDA, M. KONDO, S. GOTO, M. OGAWA, A. TSUJI & S. KUWAHARA : SCE-963, A New Cephalosporin. II. *In Vitro* and *In Vivo* Antibacterial Activities, *ibid.* No. 45, 1977
- 3) TSUCHIYA, K.; M. KIDA, M. KONDO, H. ONO, M. TAKEUCHI & T. NISHI : SCE-963, A New Broad-spectrum Cephalosporin : *In Vitro* and *In Vivo* Antibacterial Activities, *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 14 (4) : 557~568, 1978
- 4) 畚野 剛, 前田憲一 : Cephacetrile とその代謝物

の分別定量法。Chemotherapy 24: 78~84, 1976

- 5) 薬業時報社：日本抗生物質医薬品基準解説，396
~397, 1974

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD OF CEFOTIAM (SCE-963) IN BIOLOGICAL SPECIMENS

TAKESHI FUGONO and KEN'ICHI MAEDA

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.

A microbiological method for the quantitative determination of Cefotiam (CTM, SCE-963) (7β -[2-(2-aminothiazol-4-yl) acetamido]-3-[[[1-(2-dimethylaminoethyl)-1H-tetrazol-5-yl] thio] methyl]-ceph-3-em-4-carboxylic acid) in biological specimens is described. This method is essentially a cylinder-plate technique using *Proteus mirabilis* ATCC 21100 as the test organism grown in the DST agar medium (Oxoid), pH 8.0. As low as 0.1 μg (potency)/ml of CTM in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), or 0.2 μg (potency)/ml in human serum specimens, can be measured. A method for the qualitative detection of CTM in biological specimens is also presented. The procedure involves a thin-layer chromatography on silica gel plate combined with a bioautography using *P. mirabilis* ATCC 21100 as the test organism grown in the same medium as described above.