

## BRL25000 (Clavulanic acid-Amoxicillin) の微生物学的定量法による体内濃度測定法に関する検討

横田 栄作・佐藤 光行・建林 和夫・服部 信之

ビーチャム薬品株式会社試験研究所

BRL25000 の経口投与時における体内濃度の微生物学的定量法について検討した。

BRL25000 は Amoxicillin (AMPC) と Clavulanic acid (CVA) の配合剤のため、その成分を各々定量しなければならない。

Amoxicillin の定量には *Micrococcus luteus* ATCC 9341 が *Bacillus subtilis* ATCC 6633 より Clavulanic acid の影響を受けず適していた。このとき Amoxicillin の測定限界濃度は、0.03  $\mu\text{g/ml}$  であった。

Clavulanic acid については、それ自身の持つ抗菌活性が弱いため従来の生物学的定量はできず、Penicillin G を用いて  $\beta$ -lactamase 産生の *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 を検定菌とする方法によった。*Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 は、Amoxicillin が 250  $\mu\text{g/ml}$  の濃度まで混入しても影響を受けず測定限界濃度は 0.06  $\mu\text{g/ml}$  であった。

ヒトの血清中濃度測定には新鮮ヒト血清が、尿中濃度測定には 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) による希釈が適していた。各種体液試料は、 $-55^{\circ}\text{C}$  以下(ドライアイス)で保存する方法で Amoxicillin および Clavulanic acid は少なくとも 2 週間安定に保たれた。

BRL25000 は英国ビーチャム社で開発された  $\beta$ -lactam 系抗生物質である Amoxicillin (AMPC) と Clavulanic acid (CVA) が 2:1 の割合で含有される配合剤で、各々の構造式を Fig. 1 に示す。

近年 penicillin 類の耐性菌が問題になっておりその主な原因が細菌により産生される  $\beta$ -lactamase によることが判明している。CVA は抗菌力が弱いので単独では使用されにくい、 $\beta$ -lactamase と不可逆的に結合してその活性を阻害するために、AMPC と配合することによって  $\beta$ -lactamase 産生の細菌を含む広範囲な細菌に阻害作用を発揮する。

著者らは BRL25000 の中の AMPC および CVA のそれぞれの体内における濃度について微生物学的定量法によって検討するとともに、体内における安定性および尿中活性代謝物検索のための薄層クロマトグラフ/バイオオートグラフ法による AMPC, CVA の検出法について検討したので報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用薬剤

AMPC は三水和物、Penicillin G (PCG) は Na 塩、CVA は K 塩のそれぞれ力価の明白なものを用いた。

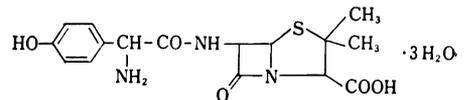
#### 2. Bioassay 法

##### 1) 菌株

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*) および

*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus*) は国立予防衛生研究所より分与を受け、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 (*K. pneumoniae*) は英国ビーチャム社か

Fig. 1 Structural formula of AMPC and CVA

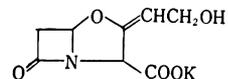


Amoxicillin trihydrate

Molecular formula:  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Molecular weight: 419.45

Chemical name: (2S, 5R, 6R)-6-[2-amino-2-(p-hydroxyphenyl) acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylate trihydrate



Potassium clavulanate

Molecular formula:  $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_5\text{K}$

Molecular weight: 237.25

Chemical name: potassium (Z)-(2R, 5R)-3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carboxylate

ら分与されたものを用いた。

## 2) 測定用培地

*B. subtilis* 用培地には、PM agar (ポリペプトン 5 g, 肉エキス 3g, 寒天 15g, 蒸留水 1l, pH 6.5) を用いた。*M. luteus* 用培地には、市販培地の AM-2 agar (Antibiotic medium No. 2: Difco), HI agar (Heart infusion agar: Difco), BHI agar (Brain heart infusion agar: Difco), TS agar (Tryptone soya agar: Oxoid) および PMY agar (ポリペプトン 6g, 肉エキス 1.5g, 酵母エキス 3g, ブドウ糖 1g, 寒天 15g, 蒸留水 1l, pH 6.5) を用いた。

*K. pneumoniae* 用培地には、AM-2 agar, HI agar, BHI agar, TS agar および NA agar (Nutrient agar: Oxoid) を用いた。

## 3) 菌液の調製

*B. subtilis* は、斜面とした増菌用培地 (ポリペプトン 10g, 肉エキス 5g, NaCl 2.5g, 寒天 15g, 蒸留水 1l, pH 6.5) で、37°C, 1週間培養し、菌体を 10 ml の滅菌水に懸濁し、65°C, 30 分間加熱し、菌液とした。

*M. luteus* は、斜面とした増菌用培地を用い、30°C, 約 48 時間培養し、菌体を 10 ml の生理食塩水に懸濁し、菌液とした。

*K. pneumoniae* は、TSB (Tryptone soya broth: Oxoid) に接種し、37°C, 約 18 時間培養して菌液とした。

## 4) 濃度測定条件の検討

平板 Cup 法<sup>1,2)</sup>: 直径 9 cm のペトリ皿を用い、AMPC の測定には基層用培地 20 ml に種層用培地 4 ml を層積した二層 Cup 法を、また CVA には種層用培地に最終濃度 PCG 60 µg/ml になるように添加した 15 ml を分注し薄層 Cup 法を用いて測定した。それぞれ 37°C, 約 18 時間培養し実験に供した。

## 5) 希釈液

0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), 0.1 M citrate buffer (pH 6.5), 健康ヒト血清, 市販 Moni-Trol I (ミドリ十字), Consera (日水製薬), Norusera (北医研), Seronorm (第一化学薬品), Hyland control serum I (日本トラバノール), Seraclear-N (化血研) および水で希釈した場合の影響を検討した。

## 3. 薄層クロマトグラフ/バイオオートグラフ法

TLC 用シリカゲルプレート (20 cm × 20 cm, 厚さ 0.25 mm, E. Merck 社製 Art. 5715) を用い、下端から 2 cm の位置に検液を spot し、メチルイソブチルケトン・氷酢酸・水 (49:22:4 v/v) の混液で上昇法により、原点から約 12 cm まで展開した。

抗菌活性物質の検出には、*M. luteus* を、CVA および penicillinase inhibitor の検出には、*K. pneumoniae*

および PCG を最終濃度 60 µg/ml になるようにそれぞれ添加し、37°C, 約 18 時間培養し実験に供した。

## II. 実験成績

### 1. 測定条件に関する検討

#### 1) 試験菌の選択

AMPC 濃度測定法においては、*B. subtilis* と *M. luteus* につき、二層 Cup 法により、AMPC の標準曲線に与える CVA の影響について検討した。CVA を AMPC の 0.5, 5, 10 倍濃度になるように混合した 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) を用いて標準曲線を作成すると、*B. subtilis* では CVA が 0.6 µg/ml 混入しても影響がみられた。混入量が多くなると影響がさらに大きくなった (Fig. 2)。しかし *M. luteus* の場合には CVA が AMPC の 10 倍量の 10 µg/ml 混入していても影響が認められなかった (Fig. 3)。したがって試験菌として *M. luteus* を選定した。

また、CVA の濃度測定においては、*K. pneumoniae* による薄層 Cup 法で AMPC が CVA の 100 倍量の 250 µg/ml 混入しても測定に全く影響を与えなかった (Fig. 4)。

#### 2) 測定用培地の種類の検討

*M. luteus* を用いる AMPC 測定用培地および *K. pneumoniae* を用いる CVA 測定用培地として各々 5 種類の寒天培地を用い、AMPC は二層 Cup 法、CVA は薄層 Cup 法で標準曲線を作成した。AMPC 測定の場合は、PMY agar および AM-2 agar において、直線性が良好で鮮明な阻止円が得られた (Fig. 5)。

*K. pneumoniae* を用いる CVA 測定用培地としては、Fig. 6 に示すようにいずれの培地においても直線性は良

Fig. 2 Standard curves of AMPC by two agar layers cylinder plate method

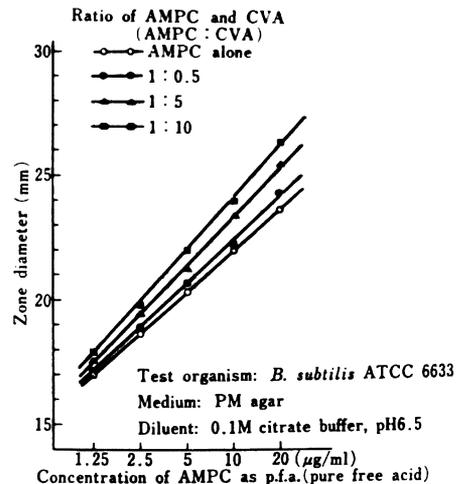


Fig. 3 Standard curves of AMPC by two agar layers cylinder plate method

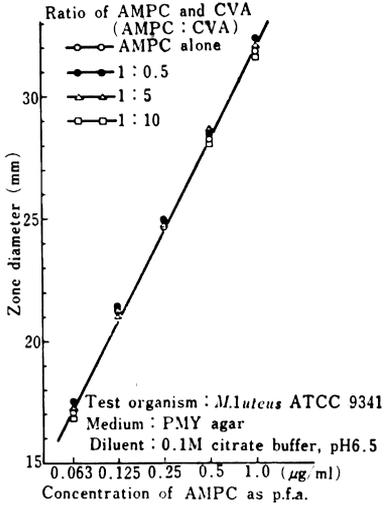


Fig. 4 Standard curves of CVA by thin layer cylinder plate method

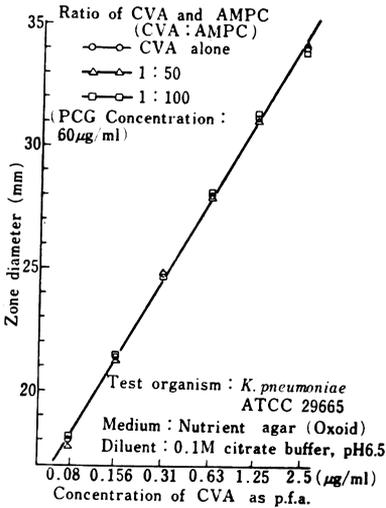


Fig. 5 Standard curves of AMPC in different media

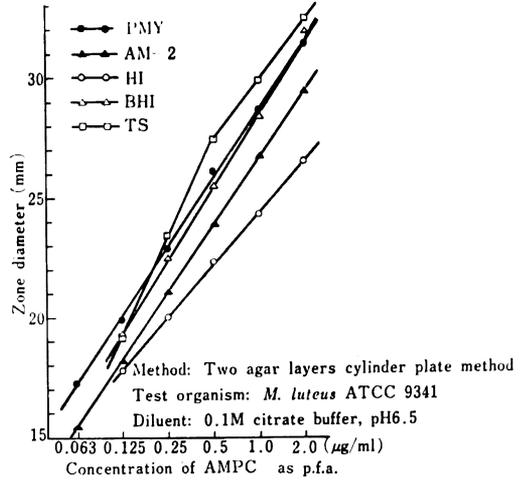
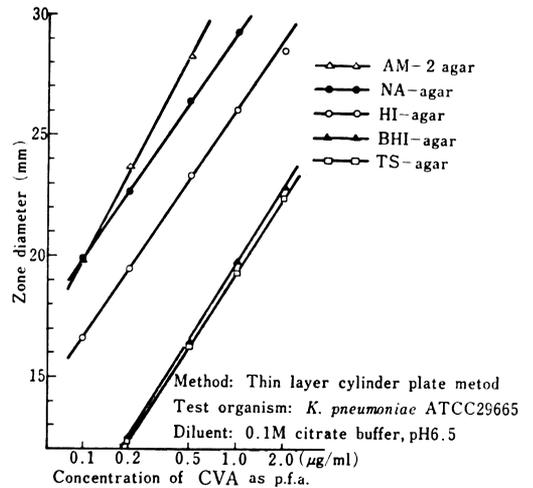


Fig. 6 Standard curves of CVA in different media



好であるが、NA agar による阻止円が最も鮮明であり、他の培地は不鮮明であった (Fig. 6)。

3) 菌液添加量の影響

*M. luteus* の菌液を PMY agar に 1, 2, 3% 接種して二層 Cup 法により標準曲線を作成した結果、Fig. 7 に示すように殆んど差異は認められなかったが、測定限界および定量性からは 2% 添加したものが最も適していた。

*K. pneumoniae* の場合は、NA agar に対して、菌液を 2, 3, 4% 接種して薄層 Cup 法により標準曲線を作

成した結果、Fig. 7 に示すように、2% の場合は直線性は比較的良好であったが、阻止円径が大きく不鮮明であった。4% 接種した場合は、測定感度が低下する傾向にあり、3% の場合は、直線性は最も良好で、阻止円も鮮明であった (Fig. 7)。

4) CVA 測定用培地中の PCG 濃度の影響

*K. pneumoniae* の菌液接種量を 3% として、NA agar 中の PCG 濃度を 6 μg/ml から 120 μg/ml まで変動させ、CVA の標準曲線を作成すると、Fig. 8 に示すように、PCG 濃度が大きくなるに従い阻止円径は大

Fig.7 Influence of inoculum size

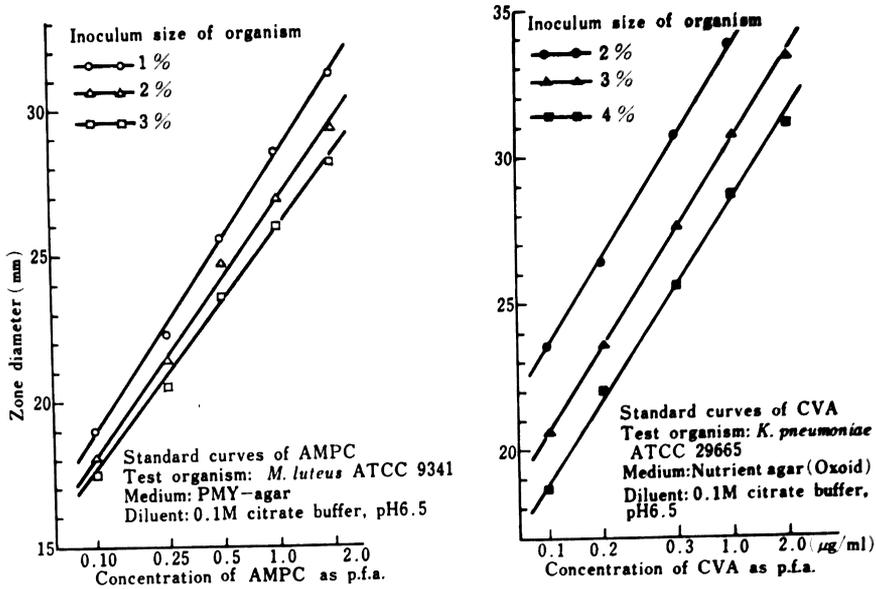
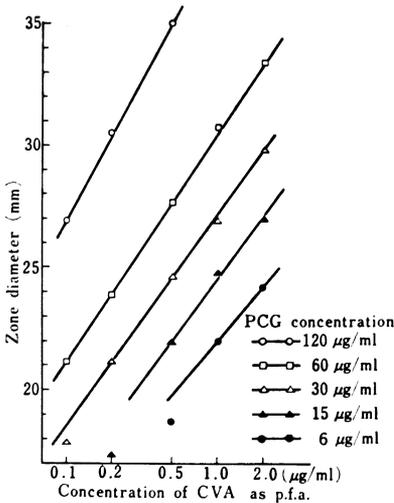


Fig. 8 Standard curves of CVA in different final concentration of PCG



きくなるが、直線性の範囲が広い 60 µg/ml が最適であるという結果が得られた (Fig. 8)。

5) 緩衝液中の CVA の安定性

CVA の蒸留水, 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) および 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) の溶液中の安定性について, HPLC 法 (High Performance Liquid Chromatography) により測定した。緩衝液の種類により安定性に著しい相違が認められ, 0.1

Table 1 Stability of CVA in buffer solution

Storage condition : 25°C  
 Concentration of CVA : 1 mg/ml

Solvents	Storage periods(day)		
	Initial	1	2
Distilled water	100	95	89
0.1M citrate buffer (pH6.5)	100	95	86
0.1M phosphate buffer (pH6.5)	100	80	45

Residual %

Analytical method : HPLC

Column : µ-Bondapak C18

Detector : 254nm

Solvent : 0.1M HCOONH<sub>4</sub> (pH6.0)/CH<sub>3</sub>OH (99/1)

Range : 0.02AUFS

Flow rate : 2 ml/min.

M citrate buffer (pH 6.5) が 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) より安定であった (Table 1)。

2. 体液内濃度測定に及ぼす血清の影響

AMPC は *M. luteus* による二層 Cup 法, CVA は *K. pneumoniae* による薄層 Cup 法を用い, ヒト血清, Moni-Trol I, Consera, Norusera, Seronorm, Hyland control serum I, Seraclear-N および 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) で調製した標準曲線を作成し, 比較検討した。Fig. 9 に示すように, AMPC の標準曲線につ

Fig. 9 Influence of diluents on standard curves of AMPC by two agar layers cylinder plate method

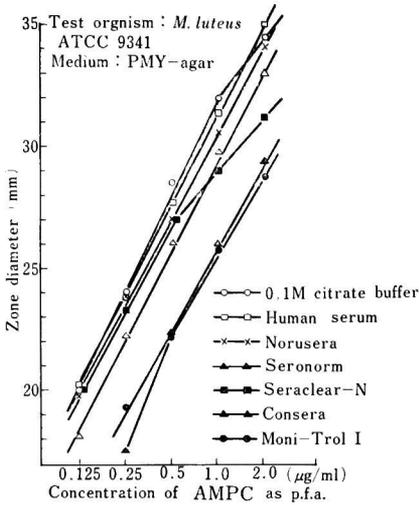


Fig. 10 Influence of diluents on standard curves of CVA by thin layer cylinder plate method

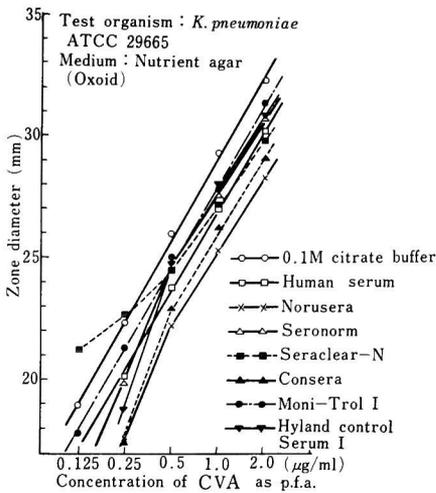
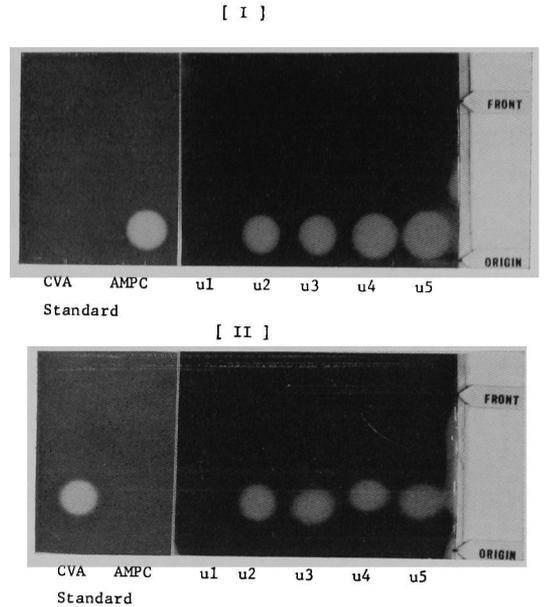


Fig. 11 Bioautograms of human urine specimens after administration of 375mg (potency) of BRL25000



Thin layer chromatography

Plate: Silica gel 60 F<sub>254</sub> (E. Merck)  
Solvent system: MIBK·AcOH·H<sub>2</sub>O (49:22:4)

Bioautography

Test organism: [ I ] *M. luteus* ATCC 9341  
[ II ] *K. pneumoniae* ATCC 29665  
u 1, u 2, u 3, u 4, u 5: Human urine specimens collected 0, 0~2, 2~4, 4~6, 6~8 hours after administration, respectively

よく一致した (Fig. 9, Fig. 10)。

3. 尿中活性代謝物の検索

健康成人男子に BRL25000 錠を 375 mg 投与して得られた尿について 薄層クロマトグラフ/バイオオートグラフ法を試みた結果、尿中には AMPC または CVA 以外の活性代謝物は認められなかった (Fig. 11)。

4. AMPC および CVA の体液中における安定性

新鮮ヒト血清に AMPC1 と 10  $\mu\text{g/ml}$  および CVA 0.5 と 5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように、それぞれ混合した試料を作成した。尿および 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) には AMPC20 と 1,000  $\mu\text{g/ml}$ , CVA10 と 500  $\mu\text{g/ml}$ , また尿を 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) で 10 倍に希釈したものについては AMPC2 と 100  $\mu\text{g/ml}$ , CVA1 と 50  $\mu\text{g/ml}$  の混合試料を調製した。これらの溶液の凍結、融解を繰り返すことによる力価低下をさけるため小分けして、5, -20 および -55°C 以下 (ドライアイス) で保存し、Initial および 1, 2, 3, 7, 14 日後の AMPC および CVA 濃度を測定し、力価残存率を求めた。

いては、希釈液としてヒト血清を用いた場合に 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) より阻止円が小さくなり、Moni-Trol I および Consera は、ヒト血清希釈より測定感度が悪く、Hyland control serum I は阻止円が検出不可能であった。一方、CVA の 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) を希釈液とした標準曲線と比較すると、ヒト血清での阻止円は小さく、Moni-Trol I, Consera, Norusera および Seronorm はヒト血清の場合と比較的

Table 2 Stability of AMPC and CVA in serum, urine and citrate buffer solution

Solution	Initial concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Storage condition* ( $^{\circ}\text{C}$ )	Residual concentration (%)													
			AMPC							CVA						
			1	2	3	7	14(day)	1	2	3	7	14(day)				
Human serum	BRL25000 1.5	+5	104	100	79	78	ND**	66	43	38	9	ND				
		-20	102	93	85	95	ND	70	39	34	9	ND				
		<-55	100	106	98	101	95	97	98	103	98	98				
Human urine	BRL25000 1.500	+5	103	95	81	78	ND	66	48	37	ND	ND				
		-20	98	94	82	89	ND	59	48	35	ND	ND				
		<-55	96	101	101	101	95	98	99	106	102	96				
Human urine (10 fold)	BRL25000 30	+5	97	101	86	82	81	95	97	89	72	62				
		-20	95	94	95	94	79	95	100	94	87	72				
		<-55	105	99	101	96	96	101	105	105	105	105				
Human urine (10 fold)	BRL25000 150	+5	96	95	91	90	82	95	93	96	69	57				
		-20	95	92	84	89	88	95	98	99	87	75				
		<-55	102	96	97	97	96	97	104	103	98	97				
Human urine (10 fold)	BRL25000 3	+5	98	105	95	91	86	95	99	98	73	73				
		-20	96	104	101	98	87	94	98	100	79	74				
		<-55	94	105	101	98	98	105	107	105	100	105				
0.1M citrate buffer(pH6.5)	BRL25000 1.500	+5	98	105	93	89	87	99	96	87	76	77				
		-20	98	105	101	94	88	95	96	96	103	79				
		<-55	98	104	101	99	99	95	96	100	97	96				
0.1M citrate buffer(pH6.5)	BRL25000 30	+5	95	105	99	99	80	95	93	87	77	67				
		-20	95	104	98	90	76	96	96	94	73	64				
		<-55	100	105	104	100	101	105	95	96	95	95				
0.1M citrate buffer(pH6.5)	BRL25000 30	+5	95	106	102	104	88	92	103	99	90	62				
		-20	95	104	104	99	85	97	103	100	92	82				
		<-55	97	105	105	97	95	97	99	104	97	95				

\* <-55 $^{\circ}\text{C}$ : in dry ice

\*\* ND: Not Done

血清中においては、5、-20°C 保存で CVA の力価の低下が認められたが、-55°C 以下に保存した場合は、7 日後においては両剤とも殆んど力価の低下をみず、14 日後でも 95% 以上の残存率を示した。なお、希釈された尿中ではより良好な安定性を保った (Table 2)。

### III. 考 察

BRL25000 は、AMPC と CVA の合剤であるためその各々を定量する必要がある。

AMPC の測定には、従来検定菌として使用されている *B. subtilis* ATCC 6633 は、AMPC 測定時に CVA が存在すると影響を受けやすく検定菌としては不適当である。*M. luteus* ATCC 9341 は、CVA が 10 µg/ml 存在しても、何ら AMPC 濃度測定に影響を受けないことが確認され、BRL25000 中の AMPC 濃度測定の検定菌に適しており、そのときの測定培地として PMY agar または AM-2 agar が最適である。

CVA はそれ自体抗菌力が弱いため、AMPC と同一方法では測定できないので AMPC 耐性で、penicillinase 産生の *K. pneumoniae* ATCC 29665 を検定菌とする方法を用いたが、検定菌以外に PCG をあらかじめ培地中に最終濃度 60 µg/ml になるように添加し定量する。す

なわち CVA が *K. pneumoniae* ATCC 29665 の産生する penicillinase を CVA が阻害して PCG が分解されずに阻止円を形成することを利用したものである。

測定培地は、AMPC と同一の PMY agar または NA agar を用いると良好な結果が得られる。

標準溶液の調製と被検液の希釈は、AMPC および CVA 両剤の測定とも、血清の場合は新鮮ヒト血清、尿は 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) が適当と考えられる。

検体試料の測定は、採取後ただちに測定に供するのが最も望ましいが、ヒト血清の場合はそのまま、尿は 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) で 10 倍希釈して -55°C 以下に凍結保存し、2 週間以内に測定を行なえば力価の低下は押えられると考えられる。

### 文 献

- 1) 厚生省薬務局：力価試験法，日本抗生物質医薬品基準解説 一般試験法。594～604 頁，薬業時報社，1978
- 2) 宮村定男，金澤 裕：薄層カップ法による体液中ペニシリンおよびストレプトマイシンの濃度測定法。J. Antibiot. 3: 411～416, 1950

## MICROBIOLOGICAL ASSAY OF AMOXICILLIN AND CLAVULANIC ACID IN SPECIMENS OF BODY FLUIDS AFTER BRL25000 (CLAVULANIC ACID-AMOXICILLIN) ADMINISTRATION

EISAKU YOKOTA, MITSUYUKI SATO, KAZUO TATEBAYASHI and NOBUYUKI HATTORI  
Laboratory, Beecham Yakuhin K. K.

BRL25000 is a 2 to 1 formulation of  $\beta$ -lactam compounds, namely the broad spectrum penicillin amoxicillin (AMPC), and the  $\beta$ -lactamase inhibitor clavulanic acid (CVA) respectively. Microbiological assay methods suitable for the measurement of amoxicillin and clavulanic acid in clinical specimens of serum and urine are described.

AMPC concentrations were measured by standard agar-diffusion microbiological assay using *Micrococcus luteus* ATCC9341 as assay organism. The CVA concentrations in body fluids were assayed using a  $\beta$ -lactamase producing strain of *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 in the presence of subinhibitory concentrations of penicillin G.

Fresh human serum and 0.1 M citrate buffer were used as body fluid diluents and studies showed that the AMPC and CVA content in serum and urine were stable for 2 weeks at temperatures below -55°C.