Ceftriaxone (Ro 13-9904) の生体内濃度測定法

大島 純子・瀧井 裕子・鬼塚光子 有沢幹雄・丸山博巳 日本ロシュ研究所微生物学化学療法部

要 旨

Ceftriaxone(CTRX, Ro 13-9904),(Z)-(6R, 7R)-7-[2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxyimino)acetamido) -3-{〔2.5-dihydro-6-hydroxy-2-methyl-5-oxo-as-triazin-3-yl)thio〕methyl} -8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-[4, 2, 0) oct-2-ene-2-carboxylic acid disodium saltの血漿,尿および胆汁中濃度は, $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2$ を検定菌とし,Antibiotic medium(Difco)を測定用培地とする薄層カップ法またはディスク法で行うとき鮮明な阻止帯を与えるので,本法で微生物学的定量が可能であった。測定範囲は $0.1\ \mu g/ml$ から $100\mu g/ml$ であった。また,ヒト血清,Consera,Moni-trol 1で希釈した検量線はリン酸緩衝液で希釈して得た検量線より小さい阻止帯直径を示した。ヒト血清およびConseraで希釈した場合には両検量線はよく一致した。生体サンフル中のCTRX濃度については,0.067Mリン酸緩衝液で11倍以上に希釈すれば,リン酸緩衝液で希釈した検量線を用いた定量が可能であった。他方,薄層シリカクロマトグラフィーを行った後で, $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2$ を検定菌とするバイオオートグラフィーにより尿中のCTRXを分離検出できた。

緒 言

Ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904) は広域抗菌スペクトラムを有し、 β -ラクタマーゼに安定な、いわゆる第3世代セファロスポリンで、蛋白結合率が高くヒトにおける血中半減期が7~8時間と長いことが特徴となっている 10 。我々は、検定菌を $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2$ に定めて、微生物学的定量法による体液内濃度測定のための各種測定条件を検討し、至適条件を設定した。さらに体液中での活性代謝物検索のためのバイオオートグラフィーによるCTRXの分離、検出法についても検討したので併せて報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

CTRX (Ro 13-9904; Lot. 907001) は F. Hoffmann-La Roche (スイス、バーゼル) で合成したものを用いた。

2. 検定菌

検定菌の検討には*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* K12, W3110, U5, ATCC 25922, NIHJ JC-2, および*K. pneumoniae* ATCC 27736を用いた。これらはいずれも当研究所で12.5%グリセロール存在下−70℃にて保存しているものを用いた。

3. 検定用培地

基層用寒天培地としてAntibiotic medium No. 2 (AM2, Difco),種層用寒天培地としてAntibiotic medium No. 1 (AM1, Difco)を用いた。また、培地検討の目的で、Heart infusion agar (HIA, 栄研)、Tryptosoy agar (TSA, 栄研) および、日本抗生物質医薬品基準²⁾(日抗基) mediumを用いた。前3者は処方どおり調製使用した。日抗基agarには0.5%polypeptone, 0.3%beef extractおよび1.5%agarを基層用培地として、また1%polypeptone, 0.5%beef extract, 0.25%NaClおよび0.7%agarを種層用寒天培地として用いた。

4. 菌液調製

B. subtilis以外の菌株については、Trypto-soy broth (2ml)に-70°C保存菌液を一白金耳接種して、37°Cにて $18\sim20$ 時間培養し、10倍希釈液がA650=0.4となるように調製後、検定培地に 1%になるように接種した。また、B. subtilis ATCC 6633は日本抗生物質医薬品基準の一般試験法に準して調製した胞子液を、あらかじめ最も明確な阻片帯を示す胞子液濃度を予備試験により求めて、検定培地に接種した。

5. 検定方法

日抗基・一般試験法の力価試験法に準じて調製した種 層用寒天培地(AM1)4mlを,16mlの基層寒天平板(AM2) 上に分注し,水平に固化し4℃にて最短1時間冷却した

Table 1 Susceptibility of tester strains to CTRX

Strains		Diameter of inhibition zone (mm) at CTRX of:	
		l μg/ml	10 μg/ml
B. subtilis	ATCC 6633	9.7	18.0
S. aureus	ATCC 6538P	8.6	16.0
E. coli	ATCC 25922	9.0	16.9
E. coli	NIHJ JC-2	20.3	27.0
E. coli	K 12	13.3	19.0
E. coli	U 5	18.5	22.4
E. coli	W 3110	14.8	20.8
K. pneumoniae	ATCC 27736	9.5	16.3

後で使用した。直径 9 cmの栄研HS-シャーレに 4 個の内 径6mm高さ10mmのステンレスカップをたてて、標準希 釈溶液または検定液を0.25ml加えて、37℃にて16~18時 間培養し、阻止帯の直径を測定した。

ペーパーディスクを用いる場合には、上述した方法で作成した寒天平板に、直径8mmのWhatmanディスク (thick)に 50μ lの標準希釈溶液または検定液をしみ込ませた後、1シャーレにつき 4 枚張りつけて培養した。

検定培地の検討は、E. coli NIHJ JC-2を検定菌とし、 前述の5種類の検定培地を用いて薄層カップ法とペー パーディスク法を併用、比較した。

6. 標準溶液および希釈液

CTRXを0.067Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同じ緩衝液にて標準希釈系列を作成して用いた。また、血漿検体測定用標準希釈液としては、CTRXをConseraに溶解した希釈系列を作り、これをさらに0.067Mリン酸緩衝液で11倍に希釈して血漿検体測定用標準希釈溶液とした。

7. 薄層クロマトグラフィー/バイオオートグラフィー

適宜0.067Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した検体にスポットし、ethanol/ethylacetate/ $H_2O=50/27/23$ (v/v/v) を展開溶媒として展開後風乾し、 $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2$ を検定菌としたバイオオートグラフィーを行った。この時 CTRX の Rf 値は 0.38 ± 0.05 であった。

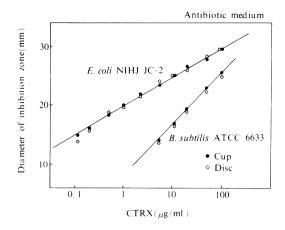
8. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法

血漿検体には内部標準としてセファロチンを加えて acetonitorile/ $H_2O=2.0/0.8$ (v/v) で抽出し、2,500 rpm×5分間の遠心分離後の上清を用いた。

HPLCは以下の条件で測定した。

ポンフ Waters Model 6000A pump 注入器 Waters U6K injector

Fig. 1 Comparison of standard curves of CTRX on *E. coli* and *B. subtilis* by cylinder plate method and disc plate method



検出器	Shimadzu SPD 2A
データー処理器	Shimadzu C-RIA
カラム	Lichrosorb RP-18, 5μm,
	4.0×250 mm
移動層	アセトニトリル600ml, セチルトリ
	メチルアンモニウムブロシド4g,
	1Mリン酸緩衝液(pH7.0)50ml,
	H ₂ O 350ml
流速	1.5ml/分
検出波長	274nm
保持時間	4.4分
検出限界	$1\mu g/ml$

II. 実験結果ならびに考察

1. 検定菌種の選択

B. subtilis ATCC 6633, S. aureus ATCC 6538P, E. coli K12, W3110, U5, ATCC 25922, NIHJ JC-2および K. pneumoniae ATCC 27736のCTRX感受性を薄層カップ法で調べて、 $1\mu g/\text{ml}$ および $10\mu g/\text{ml}$ のCTRXに対する 阻止帯の直径(mm)として測定し、Table 1に示した。これら 8 株のなかではE. coli NIHJ JC-2が最もCTRX に対する感受性が高かった。

次に、 $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2およ<math>UB.\ subtilis\ ATCC\ 6633$ について薄層カッフ法ならUにディスク法を用いて、0.067Mリン酸緩衝液($pH\ 7.0$)で調製した標準希釈溶液($0.1\sim100\mu g/ml$)の検量線を作0 Fig. 1に示した。阻止帯直径は $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2の方が<math>B.\ subtilis\ ATCC\ 6633$ に比較してかなり大きく、測定範囲も $B.\ subtilis\ ATCC\ 6633$ が $5\sim100\mu g/ml$ であるのと比較して、 $E.\ coli\ NIHJ\ DC-200$

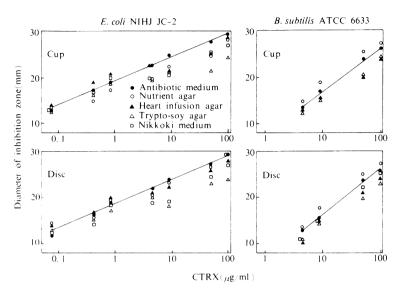


Fig. 2 Comparison of standard curves of CTRX on various test medium by cylinder plate method and disc plate method

NIHJ JC-2では $0.1 \sim 100 \mu g/ml$ と低濃度範囲まで測定可能であった。また、薄層カッフ法とディスク法の差は測定を行った全濃度範囲ではごく小さかった。

以上の結果から、CTRXの体液内濃度測定における検定菌は測定感度の高いE. coli NIHJ JC-2が適当と考え、これを用いることにした。また測定法としては、薄層カップ法とティスク法の両者で差がごく小さいことが判明したので、適宜両方法を使いわけることとした。

2. 検定培地の検討

 $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2を検定菌として、CTRXの濃度範囲<math>0.1\sim100\mu g/ml$ で5種類の検定培地を用いて検量線を作成し比較した。測定法としては薄層カップ法とディスク法を併用した、結果を $Fig.\ 2$ に示す。

概して、 $E.\ coli$ NIHJ JC-2に対しては、高濃度域ではNA、TSA、および日抗基培地で阻止帯が小さく現われた。他方 $B.\ subtilis$ ATCC 6633を用いた場合には全濃度域にわたって、NAで最も大きい阻止帯を示し、HIA、TSAでは小さかった。AMを用いた場合には両検定菌、特に $E.\ coli$ NIHJ JC-2に対して、検量線の傾きが大きく、かつ阻止帯も鮮明であったので検定培地には、基層用寒天培地としてAM1を用いることに定めた。

3. pHの影響

CTRXは中性域では安定であり、また各検定菌株のMIC値も培地のpH (pH 6.0, 7.0, 8.0) および培地への馬 脱繊維血清添加の有無によって変化しなかった。

他方、CTRXをpH 6.0, 7.0および8.0の3種類のリン酸緩衝液で希釈して標準希釈溶液を作りそれぞれに対する検量線を求めてFig. 3に示した。pH 6.0~8.0では、いずれのpHでも鮮明な阻止帯が得られ、検量線もよく一致することから、希釈液のpHが標準希釈溶液の活性に影響を与えていないことがわかった。したがってCTRXの希釈には培地のpHに近いpH 7.0のリン酸緩衝液を選んだ。

4. 血清の影響

ヒトのプール血清, Moni-trol 1, Conseraおよび0.067 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した 4 種類の標準希釈 溶液を用いて、E. coli NIHI IC-2の薄層カップ法によ る検量線を求めてFig. 4に示した。前3者から得られる 阻止帯は、リン酸緩衝液による標準希釈溶液の場合に比 して小さく、同一阻止帯を得るには6~8倍高い濃度が 必要であった。これはcefotetan³と同様にCTRXの蛋白結 合率が高いためであると考えられる。この実験では、ヒ ト血清とConseraの検量線はほぼ一致しているが、Monitrol 1の検量線は両者より若干低くなった。ただしこの差 は、後述するヒト血清を用いた標準希釈溶液の検量線の 個人差によるバラツキと同程度であった。ヒトのプール 血清、およびConseraに溶解したCTRX標準希釈溶液を さらに 3 倍、 6 倍、11倍に0.067Mリン酸緩衝液(pH 7.0) で希釈後検量線を作成して、Fig. 5,6に示した。いずれ の場合にも希釈溶液中の血清蛋白含量の減少に伴って CTRXのみかけの抗菌力の増加が認められた。

次にConseraのlotによる差、ヒト血清の個体差が体液

Fig. 3 Effect of diluents on standard curves of CTRX(1) — pH—

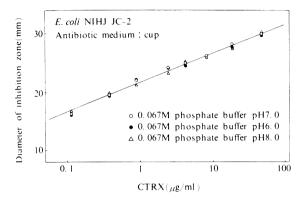


Fig. 6 Effect of diluents on standard curves of CTRX(4)

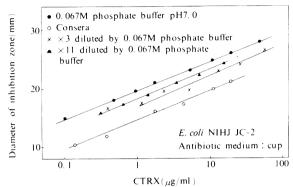


Fig. 4 Effect of diluents on standard curves of CTRX(2)

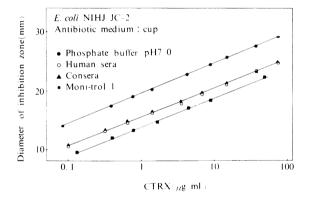


Fig. 7 Effect of diluents on standard curves of CTRX(5)

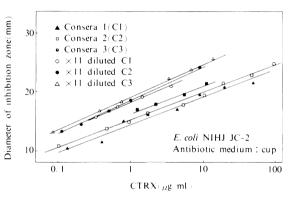


Fig. 5 Effect of diluents on standard curves of CTRX(3)

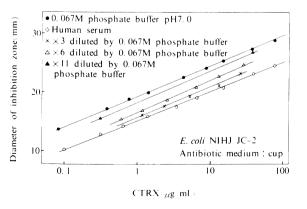


Fig. 8 Effect of diluents on standard curves of CTRX(6)

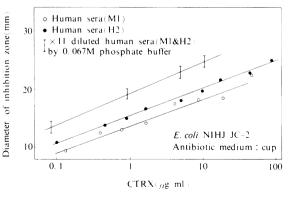


Table 2 Effect of urine on the activity of CTRX

Actual conc.	CTRX diluted with		
of CTRX (µg/ml)	Undiluted urine	11-fold diluted urine	
85	72 (84)	85 (100)	
50	36 (72)	50 (100)	
11	8.5 (77)	10.5 (95)	
1.65	1.4 (85)	1.55 (94)	

(): % recovery

内濃度測定に及ぼす影響を調べた。即ち、Consera 1、2、3を用いた標準希釈溶液に対する検量線と、それぞれを0.067Mリン酸緩衝液で11倍に希釈後の検量線をFig.7に示した。Conseraやヒト血清の個体差による検量線の差は、最大約5倍とかなり大きいことがわかった。これはCTRXが95%と非常に高い蛋白結合率を有するために、実際に測定しているfreeのCTRX量の個体差がみかけ上大きく現われるためであると考えられる。ところがFig. 7、8で示されだように、リン酸緩衝液で11倍に希釈した後で測定すればその差は1.5倍以内と小さくなることがわかった。

我々は、個体差の影響を小さくするために、血清検体を0.067Mリン酸緩衝液で11倍に希釈し、同じく0.067Mリン酸緩衝液で11倍に希釈したConseraを用いて作った標準希釈溶液に対して作成した検量線を使って濃度測定を行うこととした。

5. 尿、および胆汁の影響

ヒトの尿を用いて調製した検体、およびそれを0.067Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で11倍に希釈した検体中のCTRXの濃度を $E.\ coli\ NIHJ\ JC-2$ 薄層カッフ法で求めてTable 2に示した。括弧内に示したそれぞれの回収率からも明らかであるように、尿検体ではリン酸緩衝液に溶解した場合に比して $15\sim30\%$ 低い測定値が得られる。他方、尿検体をリン酸緩衝液で11倍に希釈後測定すれば尿の影響は無視しうる。なお、測定はリン酸緩衝液に溶解した標準希釈溶液に対する検量線を用いて行った。

胆汁についても尿と同様の実験を行い、胆汁中では、添加CTRXの60~70%の測定値を示すが、リン酸緩衝液で 5 倍希积後測定すれば胆汁の影響は無視しうる結果を得てTable 3に示した。

これらより、ヒトの尿および胆汁中のCTRXの測定に際しては、原液検体をそれぞれ11倍または5倍にリン酸緩衝液を用いて希似した後で、リン酸緩衝液を用いて作

Table 3 Effect of bile on the activity of CTRX

Actual conc.	CTRX diluted with		
of CTRX (µg/ml)	Undiluted bile	5-fold diluted bile	
109.1	70.0 (64.2)	108.9 (99.8)	
54.5	38.1 (69.9)	54.5 (100.0)	
9.92	6.85 (69.1)	9.60 (96.8)	
1.04	0.754 (72.5)	0.98 (94.2)	

(): % recovery

成した標準希釈溶液の検量線を使って測定すればよいことがわかった。

6. 薄層クロマトグラフ/バイオオートグラフ

健常人にCTRXを投与して得た尿検体について薄層 クロマトグラフィー (ethanol/ethylacetate/ $H_2O=50/27/23(v/v/v)$)を行った後、*E. coli* NIHJ JC-2 を検定菌 としてバイオオートグラフィーを行った。抗菌活性を示したスポットは1つで、投与量、投与経路、採取時間に無関係であった。活性スポットはRf値と一致した(Fig. 9)。

7. HPLC法と微生物学的定量法の一致度

CTRXをヒトに静脈投与し、経時的に採取した血液検体中のCTRXの濃度を本報告で検討した薄層カップ法およびHPLC法で測定し、それぞれの結果を合せてFig. 10に示した。両測定法の結果はH.F. およびT.N. の二人の検体でかなりよく一致していた。

Ⅲ. 結 論

以上の検討の結果から微生物学的定量法による CTRXの体液内濃度測定法としては、次の方法が適して いる。

1. 検定菌

E. coli NIHJ JC-2が最適であるが高濃度の検体を測定する場合にはB. subtilis ATCC 6633も使用可能である。

2. 検定用培地

基層用寒天培地としてAntibiotic medium 2 (16ml), 種層用寒天培地としてAntibiotic medium 1 (4ml) を用いる。

3. 接種菌液および接種菌量

日抗基・一般試験法力価試験法に準じて調製し, E. coli NIHJ JC-2は一夜培養菌液をOD unit = 4 に希供して final 1 %濃度となるように、またB. subtilis ATCC 6633 は600nmにおける透過率60%の胞子液を 1 %濃度となる

Fig. 9 Bioautograms of urine after intravenous injection of CTRX in healthy volunteers

TLC: Merck silica gel 60 F-254

Solvent : Ethanol/ethylacetate/ $H_2O = 50/27/23 (v/v/v)$

Organism: E. coli NIHJ JC-2

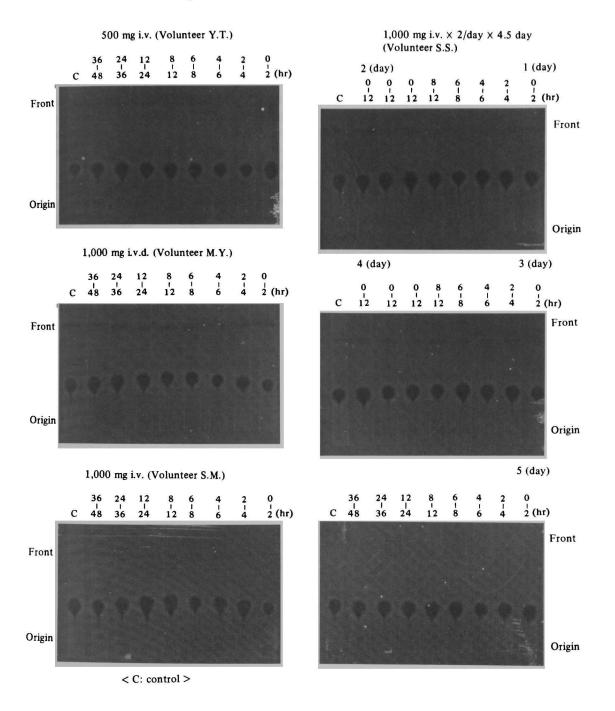
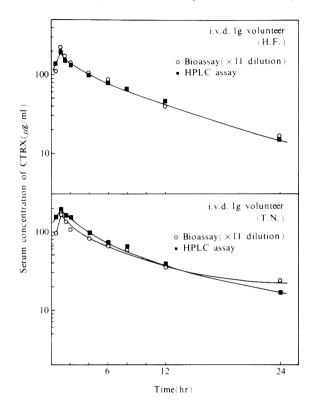


Fig. 10 Comparison of bioassay with HPLC assay



ように接種する。

4. 測定法

薄層カップ法,ディスク法のいすれでも測定可能であ

る。

5. 検体の希釈

検体は0.067Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で、血液検体、 尿検体では11倍以上にまた、胆汁検体では5倍以上に希 釈後測定する。

6. 検量線の作成

血液中濃度測定用の検量線は、CTRXをConseraに溶解後さらに0.067Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で11倍に希釈して調製した標準希釈溶液を用いて作る。また、尿中および胆汁中濃度測定用の検量線は、CTRXを0.067Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で希釈調製した標準希釈溶液を使って作る。

7. 培養条件

37℃で18~20時間とする。

8. その他

本微生物学的測定法はHPLC法とかなりよく一致した 結果が得られた。

文 献

- 1) STOECKEL, K. Pharmacokinetics of Rocephin®, a highly active new cephalosporin with an exceptionally long biological half-life. Chemotherapy (Basel) 27(S-1): 42~46, 1981
- 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
- 小宮正行,菊地康博,立花章男,矢野邦一郎:Cefotetan (YM09330)の微生物学的定量法による体液内濃度測定法。Chemotherapy 30 (S-1):98~105, 1982

BIOASSAY METHOD FOR CEFTRIAXONE (Ro 13-9904) CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

JUNKO OSHIMA, YUKO TAKII, MITSUKO ONIZUKA,
MIKIO ARISAWA and HIROMI B. MARUYAMA
Department of Microbiology & Chemotherapy
Nippon Roche Research Center

The concentration of ceftriaxone (CTRX, Ro 13-9904), (Z)-(6R,7R)-7[2-(2-amino-4-thiazolyl)-2-(methoxyimino) acetamido]-3- $\{[2.5-dihydro-6-hydroxy-2-methyl-5-oxo-as-triazin-3-yl)thio]$ methyl $\}$ -8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-[4,2,0] oct-2-ene-2-carboxylic acid disodium salt, in the plasma, urine and bile was microbiologically determined by a thin layer cup method or a disc method, using $E.\ coli$ NIHJ JC-2, as a test organism, and antibiotic medium (Difco), which induced a clear inhibition zone. The detection sensitivity ranged from $0.1\ \mu g/ml$ to $100\ \mu g/ml$. The standard curves obtained using human serum, Consera and Monitrol 1 as the diluent showed a smaller diameter of inhibition zone than that obtained with phosphate buffer solution. The standard curves with human serum and Consera were highly similar to each other. The CTRX level in biological specimens was able to be determined when diluted with 0.067M phosphate buffer to 11-fold or more, according to the standard curves using phosphate buffer solution.

A bioautography using E. coli NIHJ JC-2 as a test organism, following the treatment of the specimens by a silica thin layer chromatography, detected CTRX in urine.