

Bioassay 法による BAY o 9867 (Ciprofloxacin) の体内濃度測定法に関する研究

芦原義久・湯木士朗

株式会社三菱油化メディカルサイエンス第二検査部

小林紀彦・浅田裕啓

バイエル薬品株式会社 開発本部開発部

新キノリンカルボン酸系合成抗菌剤, BAY o 9867 の Bioassay 法による体内濃度測定法ならびに各種生体試料中での安定性について検討し, 以下の成績を得た。

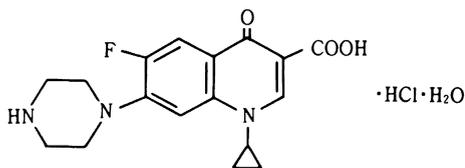
BAY o 9867 の体内濃度は, 検定菌として *E. coli* Kp を, 測定用培地に Heart infusion agar を用いる Agar well 法で感度よく測定できた。今回設定した方法では, BAY o 9867 の測定限界は 0.02 $\mu\text{g/ml}$ であった。

BAY o 9867 の安定性試験では, 室温下 (25°C) でもリン酸緩衝液, Mueller Hinton broth, Monitrol I, ヒト血清および尿中において少なくとも 2 日間は安定であった。また -20°C の凍結保存下では, BAY o 9867 はヒト血清, 尿, 胆汁, 喀痰および 10% 糞便希釈液中で少なくとも 15 日間は安定であった。

BAY o 9867 (Ciprofloxacin) は西ドイツ・バイエル社で開発されたキノリンカルボン酸系の新合成経口抗菌剤であり, Fig. 1 に示すように 1 位に Cyclopropyl 基を有することが化学構造的特徴である。また BAY o 9867 は好気性, 嫌気性を問わず, グラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌スペクトラムを有し, その抗菌力は同系統の新薬である Norfloxacin, Ofloxacin, Enoxacin, Pefloxacin より 4 倍ほど強いことが報告されている^{2,3)}。

BAY o 9867 のヒト体内濃度測定法については, HPLC 法の他に, 諸外国において *E. coli* No. 14 株等を検定菌とする Bioassay 法が開発され, 本剤の吸収, 排泄および体内分布が検討されている^{4,5)}。今回, Foerster⁴⁾が開発した Bioassay 法を参考に改良を加え, 標準的な体内濃度測定法を設定するとともに, 各種生体試料中での安定性についても検討したので, その成績を報告する。

Fig. 1 Chemical structure of BAY o 9867



Generic name: Ciprofloxacin (Prop. INN)

M. W.: 385.82 (Base 331.35)

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

BAY o 9867 は西ドイツ・バイエル社にて合成された分析用標準品 (Lot No. AS 8009, 力価 853 $\mu\text{g/mg}$) および力価既知の原末を用いた。以後, BAY o 9867 濃度はすべて μg (力価) / ml で表示した。

2. 検定菌

BAY o 9867 は腸内細菌群に非常に強い抗菌活性を有することから, 検定菌として *E. coli* Kp, *E. coli* NIHJ を検討したが, 測定感度の点で前者を採用した。日本化学療法学会標準法⁶⁾に従って測定した *E. coli* Kp に対する BAY o 9867 の最小発育阻止濃度は < 0.025 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 測定用培地

市販培地の Heart infusion agar (HIA, Difco) 40g を蒸留水 1 L に溶解し調製した。オートクレーブ滅菌後の培地 pH は 7.4 \pm 0.2 であった。

4. 検定菌液の調製および測定用培地への接種

HIA 斜面にて継代した *E. coli* Kp の一白金耳量を Heart infusion broth (Difco) 10 ml に接種し, 37°C, 18 ~ 20 時間培養したものを検定菌液とした。この菌液 (10^8 ~ 10^9 cells/ml) を 1% の濃度で測定用培地に接種した。

5. 濃度測定法

濃度測定は以下の Agar well 法により行った。検定菌を接種した測定用培地 10 ml を直径 90mm のプラスチックシャーレに分注し, 水平台上で固化させた後, 寒天平

板の中心から約20mmの位置に直径8 mmの孔を4つ穿孔して用いた。定量試料の液量は50 μ l/孔とし、室温で1.5時間予備拡散の後、37°Cで18時間培養した。生じた阻止円の直径をノギスで0.1 mmまで測定し、標準溶液の阻止円径から得られた検量線より各試料中の濃度を求めた。なお1試料についてシャーレ2枚を用いた4個の阻止円径の平均値から濃度を算出した。

6. 標準溶液および希釈液

精秤した標準品を蒸留水にて溶解し、1600 μ g/mlの標準原液を調製した。血漿、血清試料の測定にはMoni-trol I (DADE)にて、尿、胆汁、喀痰、糞便および組織試料の測定には1/15 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)にて原液を希釈して、それぞれ1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025および0.0125 μ g/mlの標準希釈系列を作り、4個の阻止円直径の平均から検量線を作成した。

7. 生体試料中での安定性

a. 室温 (25°C) および低温 (4°C) 保存下での安定性

所定のpHに調整した1/15 Mリン酸緩衝液、Mueller Hinton broth (MHB, Difco), Moni-trol I (DADE), 健康人から採取したプール血清および尿に、それぞれBAY o 9867を50 μ g/mlになるように添加し、室温(25°C)および冷蔵庫(4°C)で48時間にわたり保存した。一定時間保存後、前述したAgar well法によりBAY o 9867濃度を測定し、リン酸緩衝液、MHBおよびヒト体液中での安定性について検討した。

b. 凍結保存下 (-20°C) での安定性

健康人より採取したプール血清および尿、10%糞便希釈液ならびに患者から採取した胆汁および喀痰試料に、BAY o 9867をそれぞれ所定の濃度に添加し、15日間にわたり冷蔵庫(-20°C)で保存した。一定期間保存後、同様にAgar well法によりBAY o 9867濃度を測定し、ヒト生体試料中での安定性について検討した。

II. 実験結果

1. 濃度測定条件の検討

Foersterら⁴⁾が開発したBioassay法を参考に検定菌、測定用培地等について改良を加え、標準的な体液内濃度測定法を設定した。

検定菌としては、BAY o 9867が腸内細菌群に極めて強い抗菌活性を有することから、従来、キノリンカルボン酸系抗菌剤の検定菌として用いられてきた*E. coli* Kp, *E. coli* NIHJの2株について検討した。その結果、測定感度の点で*E. coli* Kpの方がまさっていたため、本菌株を検定菌に選んだ。

BioassayはDisk法およびCup法でも同様に可能であったが、Disk法では薬剤のdiskへの吸着の為か阻止

円が小さく、またCup法では必要な検体量が多いためAgar well法を用いた。測定用培地としてはHIAおよび感受性ディスク培地(日水)を検討したが、HIAの阻止円が鮮明であり、低濃度まで測定でき、感度もよいと思われた。また接種菌量の検討では、検定菌液($10^8 \sim 10^9$ cells/ml)を1%の割合で測定用培地に加えた場合が、阻止円の判読のしやすさ、感度の点で最適であった。

標準溶液作成の希釈液としては、市販のMoni-trol I (DADE), コンセーラ(日水)およびヒト血清(IRVINE), プール血清, 1/15 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を検討した。いずれの場合でも、同様の良好な直線性を示す検量線が得られた。今回は血漿、血清試料の測定にはMoni-trol Iを、それ以外の試料については1/15 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を選択した。

2. 体液内濃度測定法

濃度測定条件の検討により設定した標準的な体液内濃度測定法をFig.2に、その際の検量線をFig.3に示した。BAY o 9867の希釈液としてMoni-trol I, 1/15 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた場合の検量線は、0.025~1.6 μ g/mlの範囲でいずれも良好な直線性を示し($r > 0.99$), 両者にはほとんど差は認められなかった。また本法によるBAY o 9867の測定限界は0.02 μ g/mlであった。

Fig. 2 Bioassay method of BAY o 9867 concentrations in body fluids

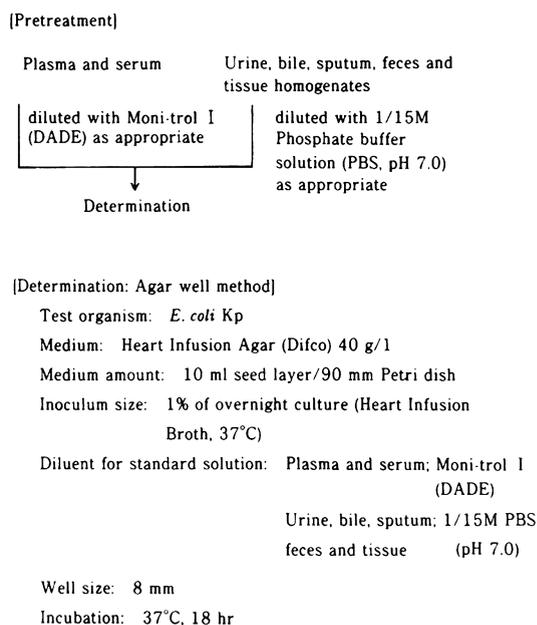
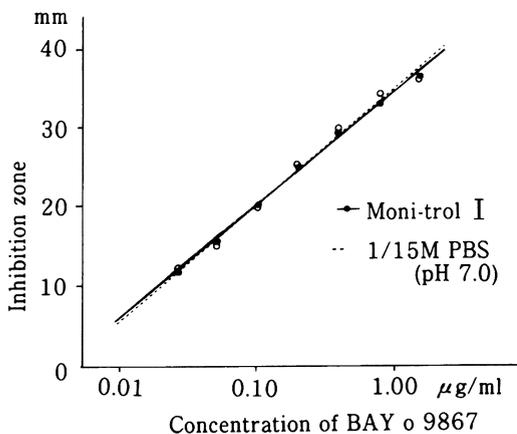


Fig. 3 Standard curves of BAY o 9867 by agar well method



3. 生体試料中での安定性

pH 6.0 ~ 9.0 に調整した 1/15M リン酸緩衝液, MHB, Moni-trol I, ヒト血清および尿に, BAY o 9867 をそれぞれ 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように加え, 室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) および冷蔵庫 (4 $^{\circ}\text{C}$) に保存した際の安定性について検討した。その結果は Table 1 に示すように, 試験したすべての試料中において 25 $^{\circ}\text{C}$ および 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存で BAY o 9867 の分解はみられず, BAY o 9867 はリン酸緩衝液, MHB およびヒト体液中において室温下でも少なくとも 48 時間は安定であった。

また健康人または患者から採取した生体試料に, BAY o 9867 をそれぞれ所定の濃度に添加し, -20 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した際の安定性についても検討した。血清および喀痰についてはそれぞれ 0.2, 1 $\mu\text{g/ml}$ に, 尿では 5, 50 $\mu\text{g/ml}$, 胆汁では 1, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10% 糞便希釈液では 0.2, 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した。Table 2 に示すよ

Table 1 Stability of BAY o 9867 in phosphate buffer solutions (PBS), Mueller Hinton broth (MHB), Moni-trol I, human serum and urine at 25 $^{\circ}\text{C}$ and 4 $^{\circ}\text{C}$

(25 $^{\circ}\text{C}$)

Biological fluid	Concentration of BAY o 9867 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0 hr	6 hr	24 hr	48 hr
1/15M PBS				
pH 6.0	50.2*	50.2	53.9	47.4
pH 7.0	52.6	50.0	50.0	50.8
pH 8.0	49.6	50.4	50.8	48.4
pH 9.0	50.2	51.8	47.8	50.2
M H B	51.0	48.4	50.0	46.6
Moni-trol I	50.2	48.6	50.0	46.6
Human serum	52.4	53.9	52.2	47.2
Human urine	49.0	49.6	52.5	46.8

(4 $^{\circ}\text{C}$)

Biological fluid	Concentration of BAY o 9867 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0 hr	6 hr	24 hr	48 hr
1/15M PBS				
pH 6.0	50.2	49.0	49.4	51.7
pH 7.0	52.6	52.6	51.9	50.8
pH 8.0	49.6	50.0	48.6	49.6
pH 9.0	50.2	52.4	49.4	48.6
M H B	51.0	49.6	50.9	50.1
Moni-trol I	50.2	50.0	52.4	49.6
Human serum	52.4	51.9	48.1	48.1
Human urine	49.0	52.9	50.1	47.4

* Each value is a mean of 3 samples.

Initial preparation concentration : 50 $\mu\text{g/ml}$

Table 2 Stability of BAY o 9867 in human serum, urine, sputum, bile and 10% fecal dilution at -20°C

Biological fluid	Temperature (°C)	Concentration of BAY o 9867 (μg/ml)	Days		
			0	7	15
Human serum	-20	0.2	0.19*	0.23	0.24
		1.0	0.92	1.05	0.97
Human urine	-20	5.0	5.02	5.70	5.18
		50	51.8	53.0	46.8
Human bile	-20	1.0	0.95	0.92	1.00
		5.0	4.88	4.46	4.86
Human sputum	-20	0.2	0.19	0.16	0.18
		1.0	1.12	1.14	1.30
10% fecal dilution	-20	0.2	0.16	0.23	0.17
		5.0	4.42	6.01	4.45

* Found concentration Each value is a mean of 3 samples.

うに、いずれの生体試料中においても-20°Cの凍結保存下でBAY o 9867濃度の低下は認められず、BAY o 9867は各種生体試料中において-20°Cの凍結保存で少なくとも15日間は安定であった。

Ⅲ. 考 察

Foerster⁹⁾が開発し、諸外国において既に用いられているBAY o 9867のBioassay法を参考にし、国内における標準的な体液内濃度測定法を設定した。前述した濃度測定条件の検討により、検定菌として*E. coli* Kp, 測定用培地にHeart infusion agarを、標準溶液作成の希釈液としてMoni-trol I, 1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いるAgar well法を設定した。本Agar well法の測定限界はいずれの希釈液を用いた場合でも0.02 μg/mlであり、高感度であった。今回選択した*E. coli* Kpは、国内において多くのキノリンカルボン酸系抗菌剤の検定菌として既に用いられており、他剤との薬物動態の比較の上でも好都合であろう。BioassayはAgar well法の他に、Cup法でも同様に可能であり、また血漿、血清測定用の標準溶液希釈液としては、Moni-trol Iの他にコンセーラ等も使用可能であった。さらに標準溶液希釈液としてMoni-trol Iおよび1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いて作成した検量線はほとんど一致していた。ヒトでの血清蛋白結合率は*in vitro*で20~28%と比較的低いと報告されており⁷⁾このことがMoni-trol Iとリン酸緩衝液での検量線に差がみられなかった原因の1つかもしれない。

設定したAgar well法を用い、各種pHに調整したリン酸緩衝液、MHB, Moni-trol I, ヒト血清および尿中でのBAY o 9867の安定性について室温および冷蔵庫保存で検討した。その結果、BAY o 9867は室温でも試験

したすべての試料中で少なくとも2日間は安定であると考えられた。また-20°Cの凍結保存下では、ヒト血清、尿、胆汁、喀痰および10%糞便希釈液のいずれの生体試料中においても、BAY o 9867は少なくとも15日間は安定であると考えられた。

以上、今回設定したBAY o 9867のBioassay法は測定感度および精度とも良好であり、ヒト体液内濃度測定法として適していると考えられる。

文 献

- 1) BURNIE, J. & R. BURNIE: Ciprofloxacin. *Drugs Future* 9: 179~182, 1984
- 2) VAN CAEKENBERGHE, D. L. & S. R. PATTYN: *In vitro* activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperaziny-substituted quinoline derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 518~521, 1984
- 3) SHRIRE, L.; J. SAUNDERS, R. TRAYNOR & H. J. KOORNHOF: A laboratory assessment of ciprofloxacin and comparable antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 328~332, 1984
- 4) WINGENDER, W.; K.-H. GRAEFE, W. GAU, D. FOERSTER, D. BEERMANN & P. SCHACHT: Pharmacokinetics of ciprofloxacin after oral and intravenous administration in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 355~359, 1984
- 5) DALHOFF, A. & W. WEIDNER: Diffusion of ciprofloxacin into prostatic fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 360~362, 1984
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76~79,

- 1981
- 7) CHIN. N.-X. & H. C. NEU : Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25 : 319~326, 1984
- 8) REEVES, D.S.; M. J. BYWATER, H. A. HOLT & L. O. WHITE : *In vitro* studies with ciprofloxacin, a new 4-quinolone compound. *J. Antimicrob. Chemother.* 13 : 333~346, 1984

STUDIES ON BIOASSAY METHOD OF BAY o 9867 (CIPROFLOXACIN) CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

Y. ASHIHARA and S. YUKI

Clinical Testing Department B, Mitsubishi Yuka Laboratory of Medical Science Co., Ltd.

N. KOBAYASHI and Y. ASADA

Preclinical Research Department, Development Headquarters

Bayer Yakuhin, Ltd.

Bioassay method of BAY o 9867 concentrations in body fluids and its stability in various types of biological specimens were studied and the results obtained were as follows.

Concentrations of BAY o 9867 in body fluids were determined with high sensitivity by the agar well method using *E.coli* Kp as a test organism and heart infusion agar as a test medium. The lowest detectable concentration of BAY o 9867 by the above-mentioned method was 0.02 $\mu\text{g/ml}$.

BAY o 9867 was stable for at least two days in phosphate buffer solutions, Mueller Hinton broth, Moni-trol I, human serum and urine even at room temperature (25 °C); and for at least 15 days in human serum, urine, bile, sputum and 10% fecal dilution at - 20 °C .