

新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の体液内濃度測定法

才川 勇・保田 隆・渡辺泰雄・南 新三郎

林 敏雄・熊野克彦・高橋礼子

富山化学工業株式会社総合研究所

新経口用セフェム剤 T-2588 の体液内濃度測定法について検討した。

本剤の体液内濃度は親化合物である T-2525 として測定し, 検定菌として *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, 測定用培地として独自に調製した培地 (ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, ブドウ糖 1.5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 L, pH 6.5~6.6) を用いるのが好ましく, ペーパーディスク法およびカップ法のいずれでも測定可能であった。

ヒト血清中濃度測定にはプールヒト血清またはコンセーラで, 尿中および胆汁中濃度の測定には 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0 または 7.0) で作製した標準液を用いるのが望ましい。

Bioassay 法で求めた血清中濃度は HPLC 法の結果と良く一致した。また, 各種の体液試料は -20°C に凍結保存すれば少なくとも 30 日間は安定であった。

T-2588 は富山化学工業 (株) 総合研究所で開発されたエステル型経口用セフェム剤で, 従来の経口剤に比べ幅広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力を有している¹⁾。T-2588 は経口投与により腸管から吸収され, 酵素的に加水分解を受けて抗菌活性を示す親化合物 T-2525 となり, 体内に移行する²⁾。今回著者らは T-2525 の bioassay 法による体液内濃度測定法について検討を加え, 標準的な測定法を設定するとともに, 体液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。

I. 実験材料および方法

1) 使用薬剤

T-2525 ならびに T-2525 A は富山化学工業 (株) 総合研究所で合成されたものを使用した。これら化合物ならびに T-2588 の構造式を Fig. 1 に示す。

2) 試験菌

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031, *Escherichia coli* NIHJ, *Proteus mirabilis* ATCC 21100 および *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いた。

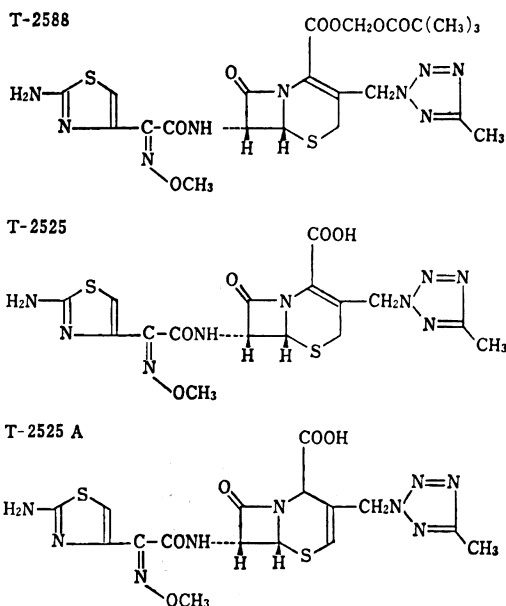
3) 測定用培地

市販培地の heart infusion agar (HIA, 栄研), brain heart infusion agar (BHIA, 栄研), tryptosoy agar (TSA, 栄研), nutrient agar (NA, 栄研) ならびに独自に調製した *Klebsiella* 用培地 (KA 培地: ポリペプトン (大五栄養) 10 g, 肉エキス (Difco) 5 g, ブドウ糖 (和光) 1.5 g, 寒天 (栄研) 15 g, 蒸留水 1 L, pH 6.5~6.6), *Proteus* 用培地 (ポリペプトン 5 g, 肉エキス 1.5 g, 酵母エキス (Difco) 1.5 g, NaCl (和光) 3.5 g, ブドウ糖 1 g, K₂HPO₄ (和光) 3.68 g, KH₂PO₄ (和光)

1.32 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 L, pH 7.0~7.1), および *Micrococcus* 用培地 (ポリペプトン 6 g, 酵母エキス 3 g, 肉エキス 1.5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 L, pH 6.5~6.6) を用いた。

4) 試験菌液の調整法および測定培地への接種
K. pneumoniae, *E. coli*, *P. mirabilis* の場合, heart infusion broth (HIB, 栄研) で 37°C 18 時間 培養し

Fig. 1 Chemical structure of T-2588, T-2525 and T-2525 A



たものを各測定用培地に1%になるように接種した。*M. luteus* の場合、cefoperazone 濃度測定法に準拠した⁹⁾。

5) 濃度測定法

薄層ペーパーディスク法および二層カップ法を用いた。薄層法の場合、試験菌を接種した測定用培地7mlを径90mmのシャーレに流し込み、水平固化させ、37°C、18~24時間培養した。二層法の場合は、基層に10ml、種層に4mlを流し込み、水平固化させたものを使用した。なお、ペーパーディスク法においてはペーパーディスクをはり付けた後5°C、1時間の予備拡散を行なった。

6) T-2525 および体液の希釈法

1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0, 7.0, 8.0), ウサギ血清, プールヒト血清およびコンセーラ (日水製薬) を用いた。

7) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

島津 LC-3 A 型高速液体クロマトグラフで行なった。即ち、固定相として Nucleosil 10 C₁₈ (Nagel, 4 mmφ × 300 mm), 移動相として CH₃CN : 1 M CH₃COOH : 1 M CH₃COONa : H₂O (120 : 2 : 20 : 858) を用い、室温下 254 nm の検出波長で測定した。なお、血清は等量の CH₃OH を加え遠心 (1,200 g × 10 min) にて除蛋白し、その上清を注入サンプルとした。

8) 各種体液中の T-2525 の安定性

T-2525 を 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0 および 7.0), ヒト尿 (pH 5.9), ウサギ胆汁 (胆汁濃度は 100% (pH 8.7) および 10% (pH 6.4)) および プールヒト血清 (pH 7.2) に溶解した後、-20°C, 5°C, 25°C の条件下で保存し、その残存活性を経時的に bioassay 法で測定した。濃度は プールヒト血清では 12.5 μg/ml その他は 125 μg/ml に調整した。なお、ウサギ胆汁の 10% 溶液はウサギ胆汁を 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で希釈した。

9) 薬剤感受性試験法

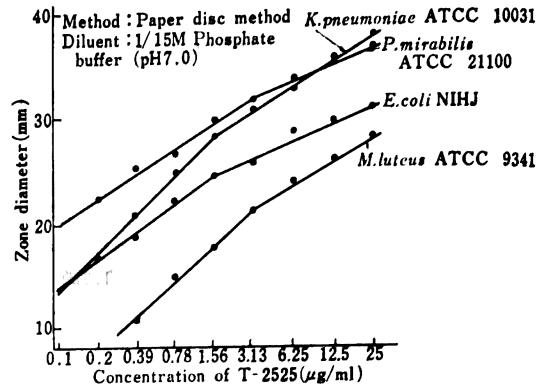
日本化学療法学会 MIC 測定標準法に従って行なった⁹⁾。

II. 結果および考察

1) 検定菌の選定

K. pneumoniae ATCC 10031, *E. coli* NIHJ, *P. mirabilis* ATCC 21100 および *M. luteus* ATCC 9341 を用い、T-2525 濃度と阻止円径の関係について検討した。その結果を Fig. 2 に示す。*K. pneumoniae* ATCC 10031 および *M. luteus* ATCC 9341 では、検量線の傾きは大きく、かつ阻止円も鮮明であった。一方、*E. coli* NIHJ および *P. mirabilis* ATCC 21100 では前2株にくらべて検量線の傾きは小さく、阻止円も不鮮明であった。検出感度は

Fig. 2 Comparison of standard curves of T-2525 using various test organisms



M. luteus ATCC 9341 が最も劣り、次いで *K. pneumoniae* ATCC 10031, *E. coli* NIHJ で、*P. mirabilis* ATCC 21100 が最も良好であった。データは示さないが *P. mirabilis* ATCC 21100 では薄層ペーパーディスク法で 0.02 μg/ml まで検出可能であった。

検量線の傾き、検出感度ならびに阻止円の鮮明さから、検定菌として *K. pneumoniae* ATCC 10031 が望ましいように思われる。

2) 培地の選定

K. pneumoniae ATCC 10031 を検定菌とする薄層ペーパーディスク法で独自に調製した *Klebsiella* 用培地 (KA 培地) および市販培地の HIA, TSA, BHIA, NA を

Fig. 3 Standard curves of T-2525 on various assay media using *K. pneumoniae* ATCC 10031

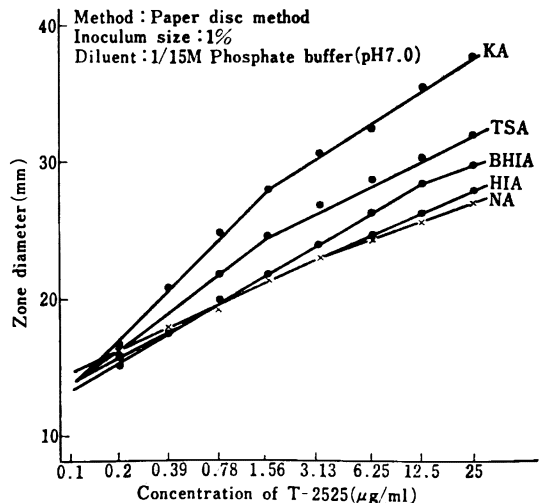
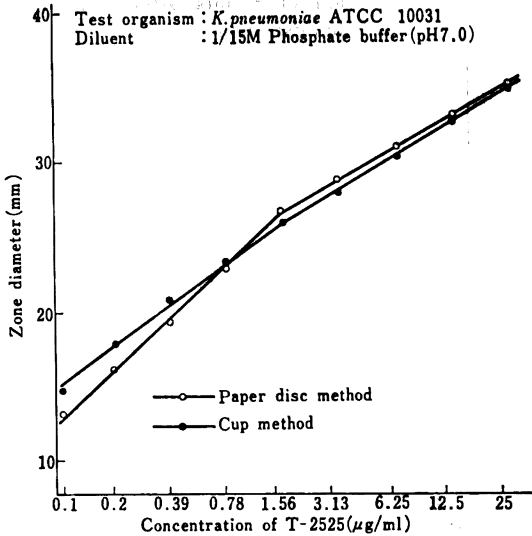


Fig. 4 Standard curves of T-2525 in different methods



測定用培地として用い、T-2525 濃度と阻止円径の関係について検討した (Fig. 3)。KA 培地では検量線の傾きが大きく、阻止円も鮮明であったが、市販培地ではいずれも検量線の傾きは KA 培地に比べて小さく、阻止円の鮮明さも劣っていた。

3) 測定法の比較

検定菌として *K. pneumoniae* ATCC 10031 を用い、ペーパーディスク法とカップ法の比較を行なった (Fig. 4)。薄層ペーパーディスク法および二層カップ法の結果を比較すると、検量線の傾き、阻止円径の大きさおよび阻止円の鮮明さに大きな差は認められなかった。

以上、検定菌、測定用培地および測定法の検討結果から、以後の検討は検定菌として *K. pneumoniae* ATCC 10031 を、測定用培地として独自に調製した KA 培地を用いる薄層ペーパーディスク法で行なった。

4) 希釈液の検討

希釈液 pH の影響 : pH 6.0, 7.0 および 8.0 の 1/15 M リン酸塩緩衝液で標準液を作製し、希釈液 pH の影響を検討した。Fig. 5 に示すように希釈液 pH の影響はほとんど認められなかった。T-2525 は pH 3.0~7.0 で安定⁵⁾であることから標準液は pH 6.0 あるいは pH 7.0 の 1/15 M リン酸塩緩衝液で作製することが望ましい。

血清の影響 : プールヒト血清および代用血清としてコンセーラを用いて検量線を作成し、1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で作成した検量線と比較した (Fig. 6)。ヒト血清の阻止円径は、同一濃度の 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) の阻止円径より小さく、同一阻止円径を

Fig. 5 Standard curves of T-2525 on various pH of 1/15 M phosphate buffer as diluent

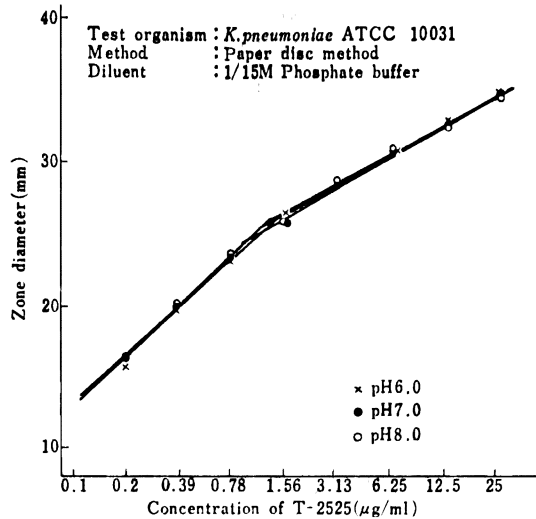
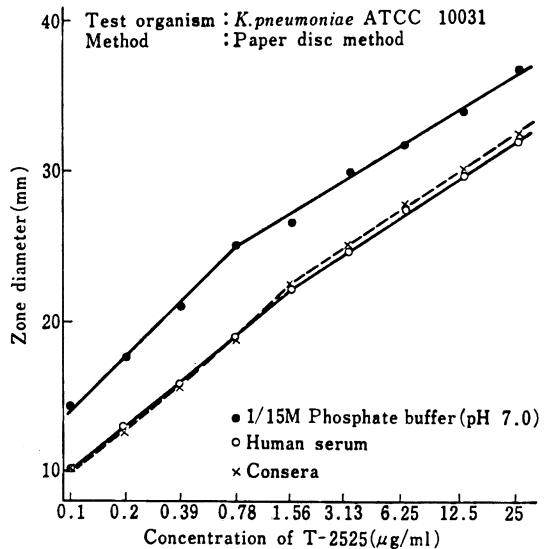


Fig. 6 Standard curves of T-2525 using 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0), human serum, and consera as diluent



得るには約 4 倍の濃度を必要とした。これは T-2525 のヒト血清蛋白結合率 (74.6%)⁶⁾ に基づくものと考えられる。

代用血清としてコンセーラを用いた場合、ヒト血清で作成した検量線にはほぼ一致した。しかしながら、図には示さないが Moni-Trol I で作成した検量線は Lot によって 1/15 M リン酸塩緩衝液に近接することがあるので T-2525 濃度測定には不適と思われる。

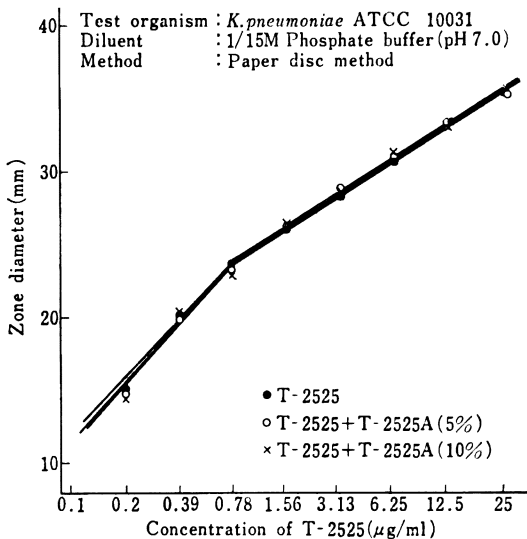
5) T-2525 の検量線に及ぼす T-2525 A の影響

Table 1 Susceptibility of the test organisms to T-2525 and T-2525A

Organism	MICs ($\mu\text{g/ml}$) at inoculum of 1 loopful of 10^6 cells/ml	
	T-2525	T-2525A
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.025	50
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	0.00625	12.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.0125	25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 21100	0.0016	6.25

MICs were determined by agar dilution method

Fig. 7 Effect of T-2525 A on standard curve of T-2525

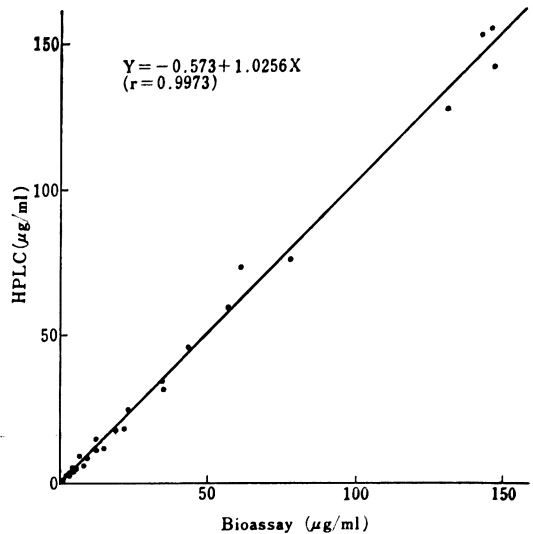


T-2588 を経口投与した動物の尿にわずかではあるが代謝物である T-2525 A が認められている⁷⁾。T-2525 A は Table 1 に示すように微弱であるが抗菌活性を示すことから、T-2525 の体液中濃度測定を bioassay 法で行なう場合なんらかの影響を及ぼすことが予想された。そこで T-2525 検量線作成のための標準液に T-2525 A を 5% および 10% になるように添加し、検量線への影響を検討した。Fig. 7 に示すように T-2525 A を 10% 添加しても *K. pneumoniae* ATCC 10031 を検定菌とする検量線にはほとんど影響がみられなかった。

6) Bioassay と HPLC による測定値の比較

ウサギに T-2525 の 50 mg/kg 静脈内投与した時の血中濃度を bioassay 法と HPLC 法で測定した。その結果、両法で測定した値は良く一致していた (Fig. 8)。

Fig. 8 Comparison of individual bioassay and HPLC values for T-2525 concentration in serum of rabbits after 50 mg/kg i. v. administration



7) T-2525 の各種体液中での安定性

Table 2 に示すようにウサギ 100% 胆汁を除くいずれの体液およびリン酸塩緩衝液中においても 5°C、-20°C では比較的高い安定性を示し、特に -20°C 保存下では少なくとも 30 日間は安定であった。100% 胆汁中での安定性は各条件下ともに他の体液中に比べ劣っていたが、リン酸塩緩衝液で 10 倍以上に希釈した場合リン酸塩緩衝液中と類似した安定性を有していた。

III. ま と め

以上の検討結果から bioassay 法による標準的な測定法を以下のように設定した。

T-2588 体液中濃度測定法

1) 方法

ペーパーディスク法またはカップ法のいずれも測定可能である。

2) 試験菌株

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 を用いる。ただし低濃度の場合、*P. mirabilis* ATCC 21100 を用いてもかまわない。

3) 測定用培地

独自に調製した *Klebsiella* 用培地 (ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, ブドウ糖 1.5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1 L, pH 6.5~6.6) を用いる。

4) 接種菌液および接種菌量

Heart infusion broth で 37°C, 18 時間培養した菌液

Table 2 Stability of T-2525 in body fluids under various conditions

Solution	pH of solution	Temperature	Residual activity (%)					
			1	2	4	7	14	30 days
1/15M Phosphate buffer	6.0	-20°C	99	100	101	98	98	99
1/15M Phosphate buffer	7.0		99	100	101	99	98	98
Human serum*	7.2		98	100	100	98	98	97
Human urine	5.9		98	100	101	99	98	99
100% Rabbit bile	8.7		99	98	98	95	92	92
10% Rabbit bile	6.4		100	99	99	99	97	99
1/15M Phosphate buffer	6.0	5°C	99	101	99	99	97	94
1/15M Phosphate buffer	7.0		99	100	100	100	98	96
Human serum*	7.2		98	101	97	94	95	95
Human urine	5.9		100	100	97	95	94	93
100% Rabbit bile	8.7		99	99	96	95	89	53
10% Rabbit bile	6.4		100	99	98	98	96	96
1/15M Phosphate buffer	6.0	25°C	98	95	91	85	76	63
1/15M Phosphate buffer	7.0		98	93	89	85	70	53
Human serum*	7.2		98	96	94	85	79	53
Human urine	5.9		95	94	93	88	77	67
100% Rabbit bile	8.7		87	75	52	<25	<25	<25
10% Rabbit bile	6.4		98	97	93	87	78	61

Concentration of T-2525 : 125 µg/ml *12.5 µg/ml

を測定用培地に1%加える。

5) 検体の希釈液

血清試料の希釈には血清あるいはコンセーラを用い、尿・胆汁試料の希釈には1/15Mリン酸塩緩衝液(pH 6.0あるいは7.0)を用いる。

6) 検量線の作成

標準液はT-2525を用いて作製し、血清試料の測定にはブール血清またはコンセーラで、尿および胆汁中濃度の測定には1/15Mリン酸塩緩衝液(pH 6.0あるいは7.0)で検量線を作成する。

7) 培養条件

37°C, 18~20時間。

文 献

- 1) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 福岡義和, 四辻 彰, 南新三郎, 山城芳子, 荒木春美, 大懸直子: 新しいエステル型経口用セフェム剤 T-2588 の抗菌作用について。Chemotherapy 34(S-2): 66~84, 1986
- 2) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 高橋 礼子, 貞木 浩: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の実験動物における体内動態について。Chemotherapy 34(S-2): 122~133, 1986
- 3) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 渡辺泰雄, 清水

喜八郎: Cefoperazone (T-1551) の体液内濃度測定法について。Chemotherapy 28 (S-6): 157~162, 1980

- 4) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 5) 才川 勇, 田井 賢, 酒井広志, 山本至臣, 杉本由美子, 出町久美子, 金井久美, 中野麟二, 貞木浩: β-ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第20報) Pivaloyloxymethyl[6R, 7R]-7-[(Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl) methyl]-3-cephem-4-carboxylate (T-2588) の水溶液中での安定性及び分解パターン。薬学雑誌投稿中
- 6) 才川 勇, 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 熊野克彦, 北山理恵子, 浅井妙子: 新しいエステル型経口用セフェム剤, T-2588 の血清蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 34(S-2): 115~121, 1986
- 7) 才川 勇, 田井 賢, 杉本由美子, 今泉弘之, 竹田憲治, 貞木 浩: β-ラクタム系抗生物質の薬学的研究(第21報) Pivaloyloxymethyl[6R, 7R]-7-[(Z)-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(5-methyl-2H-tetrazol-2-yl)methyl]-3-cephem-4-carboxylate (T-2588) の代謝について I。薬学雑誌投稿中

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR T-2588 CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

ISAMU SAIKAWA, TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, SHINZABUROU MINAMI,
TOSHIO HAYASHI, KATSUHIKO KUMANO and REIKO TAKAHASHI
Research Laboratory of Toyama Chemical Co., Ltd.

A microbiological assay method for quantitative determination of T-2588 in body fluids was investigated.

T-2588 concentration in the body fluids was determined as the concentration of T-2525, a parent compound of T-2588. The suitable condition for assay was paper disc method or cylinder method using *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 as the test organism in the originally prepared medium which consisted of 10 g of polypeptone, 5 g of beef extract, 1.5 g of glucose, 15 g of agar, and 1,000 ml of distilled water and whose pH was adjusted to 6.5 to 6.6.

For the quantitative determination of T-2525 concentration in human serum, pooled human serum and consera were suitable for the use as the diluent of the standard solution of T-2525. For the quantitative determination of T-2525 in urine and bile, 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0 or 7.0) was suitable.

The concentrations of T-2525 in the serum obtained by the bioassay method were well in agreement with those obtained by the high pressure liquid chromatography.

T-2525 in body fluids was stable at -20°C for at least 30 days.