

BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の体内濃度測定法

中沢 久・名倉好巳・中平和男

ビーチャム薬品株式会社試験研究所

R. HORTON

Beecham Pharmaceuticals Research Division

BRL 28500 の体内濃度測定法ならびに血清および尿中での安定性を検討した。

BRL 28500 は clavulanic acid (CVA) と ticarcillin (TIPC) の配合剤であるため、その測定にあたり、各成分を配合薬の影響のない条件で定量した。尿中の TIPC の測定には *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10701 を検定菌とし、測定用培地として Antibiotic medium No. 2 (Difco) を用いた薄層 cup 法により測定を行った。なお測定限界値は $0.78 \mu\text{g/ml}$ であった。また血清中の TIPC の定量には測定用培地に CaCl_2 を 10 mM 添加することにより $0.78 \mu\text{g/ml}$ の濃度まで測定が可能であった。

CVA は単独では抗菌活性が弱いためこの定量には penicillin G (PCG) を $60 \mu\text{g/ml}$ の濃度に添加した Nutrient agar (Oxoid) を用い、 β -lactamase 産生の *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 を検定菌とする薄層 cup 法により測定を行った。このときの測定限界値は $0.078 \mu\text{g/ml}$ であった。

血清および尿中での BRL 28500 の安定性は TIPC, CVA 共に -70°C 以下の保存条件で少なくとも 3 週間は安定であった。

BRL 28500 は英国ビーチャム社で開発された β -lactamase 阻害効果を有する clavulanic acid (CVA) と広域スペクトルを有する ticarcillin (TIPC) を 1:15 の比率で配合した注射用抗生剤である。それぞれの構造式を Fig. 1 に示す。

CVA は単独ではほとんど抗菌力を示さないが、 β -lactamase (特にペニシラーゼおよびオキシミノセファロスポリナーゼ) と不可逆的に結合してその活性を永久的に阻害することが知られている^{1,2)}。一方、TIPC はグラム陽性および陰性菌に対し広い抗菌スペクトルを有するが、ペニシラーゼ型の β -lactamase による加水分解を受ける³⁾。したがって、CVA と TIPC を配合した BRL 28500 は β -lactamase を産生する TIPC 耐性菌に対しても抗菌作用を発揮する⁴⁾。

BRL 28500 の吸収・排泄ならびに体内分布を検討するにあたり、TIPC と CVA の体内濃度測定法および血清中・尿中での安定性について検討したので、その結果を報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

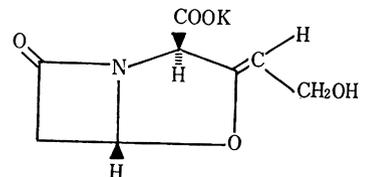
TIPC, CVA および penicillin G (PCG) は英国ビーチャム社より入手し、それぞれ力価の明らかなものを用いた。

2. Bio assay 法

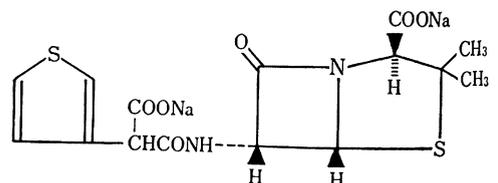
1) 菌株

Pseudomonas aeruginosa NCTC 10701 および *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 は英国ビーチャム社より分与を受け、*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 および *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 は国立予防

Fig. 1 Chemical structures of CVA and TIPC



Potassium clavulanate



Sodium ticarcillin

衛生研究所より分与されたものを用いた。

2) 測定用培地

測定用培地として市販の Antibiotic medium No.2 (AM-2, Difco), Heart infusion agar (HIA, Difco), Brain heart infusion agar (BHIA, Oxoid), Tryptone soya agar (TSA, Oxoid) および Nutrient agar (NA, Oxoid) を用いた。

3) 菌液の調整

P. aeruginosa は Nutrient broth (NB, Oxoid), *K. pneumoniae* は Tryptone soya broth (TSB, Oxoid) にそれぞれ接種し, 37°C で一夜培養して菌液とした。

4) 測定方法

A. TIPC 濃度測定: 試験菌を接種した測定用培地 10 ml を直径 90 mm のシャーレに分注し, 薄層 cup 法⁵⁾を行った。ただし, 血清中濃度測定の場合, 測定限界値を下げるために塩化カルシウム溶液を測定用培地に添加した。

B. CVA 濃度測定: 試験菌を接種した測定用培地に PCG を添加し, その 15 ml をシャーレに分注し薄層 cup 法を行った。

5) 希釈液

0.1 M citrate buffer (pH 6.5), 健康ヒト血清および市販の Moni-trol I (ミドリ十字), Consera (日水製薬) を用いた。

3. 血清および尿中での安定性

BRL 28500 (CVA : TIPC=1 : 15) を健康ヒト血清, 尿および 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) で希釈した。健康ヒト血清では BRL 28500 濃度が 480 および 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, また尿と 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) では 9,600 および 192 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料液を作成した。尿試料液については, 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) にてさらに 10 倍に希釈した溶液も同様に試料液とした。

これらの試料液を 5, -20 および -70°C 以下で保存し, initial および 1, 2, 3, 7, 14, 21 日後の TIPC と CVA の濃度を測定し残存率を求めた。

II. 実験成績

1. 測定条件に関する検討

1) 試験菌の選択

A. TIPC 濃度測定: *P. aeruginosa* NCTC 10701 および *P. aeruginosa* NCTC 10490 を試験菌として TIPC の標準曲線に与える CVA の影響について検討した。いずれの菌においても, CVA が TIPC と同量含まれていても標準曲線への影響はみられなかった (Fig. 2, Fig. 3)。しかし, *P. aeruginosa* NCTC 10490 では低濃度 (0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で阻止円がやや不鮮明であった。したがって, *P. aeruginosa* NCTC 10701 を検定菌として採用し,

Fig. 2 Effect of CVA on TIPC standard curves

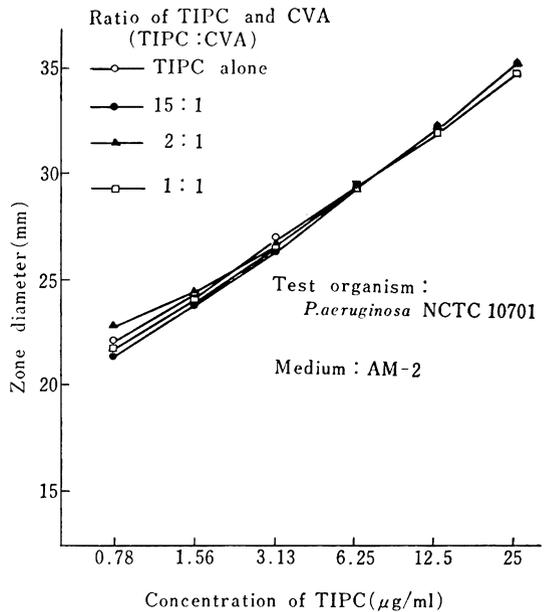
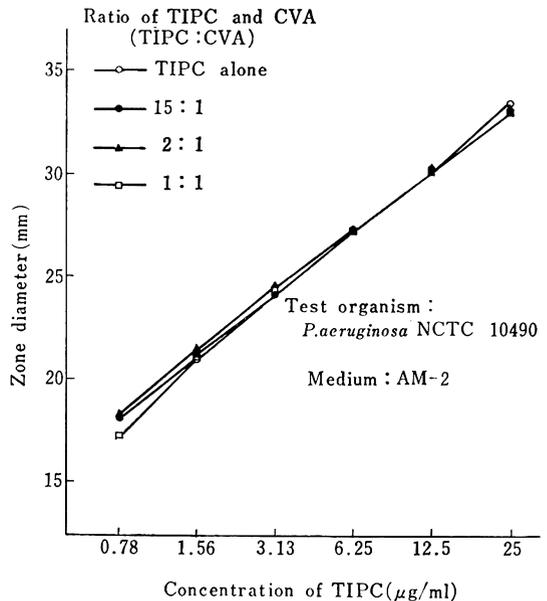


Fig. 3 Effect of CVA on TIPC standard curves



以後の実験に使用した。

B. CVA 濃度測定: *K. pneumoniae* ATCC 29665 および *K. pneumoniae* ATCC 10031 を試験菌として CVA の標準曲線に与える TIPC の影響について検討した。いずれの菌においても TIPC が CVA の 60 倍量含まれていても影響はみられなかった (Fig. 4, Fig. 5)。

また, 両者の阻止円は測定した全濃度において鮮明で

Fig. 4 Effect of TIPC on CVA standard curves

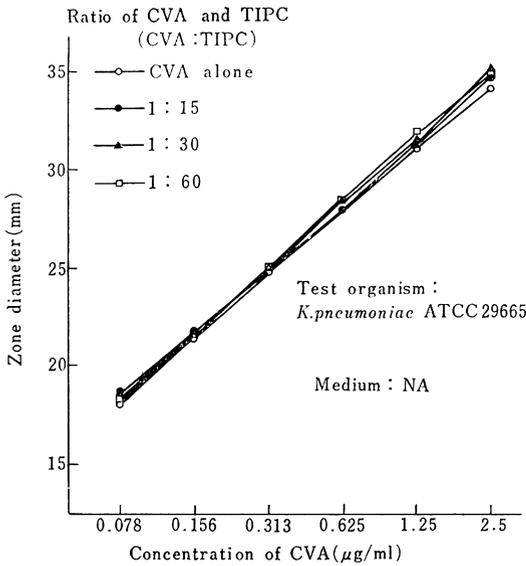
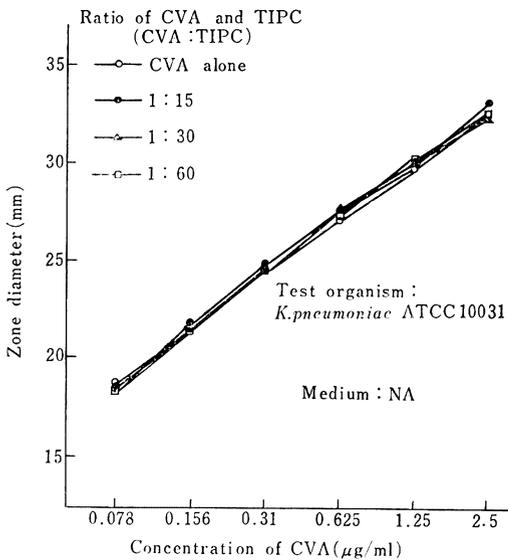


Fig. 5 Effect of TIPC on CVA standard curves



あった。*K.pneumoniae* ATCC 29665 は BRL 25000 (clavulanic acid-amoxicillin) の CVA 体内濃度測定法⁹⁾に使用されているのでこの菌を 検定菌として用い、以後の実験に使用した。

2) 測定用培地の種類の検討

A. TIPC:NA, AM-2, HIA, BHIA および TSA を測定用培地として用いて検討を行った (Fig. 6)。AM-2, BHIA および TSA では直線性が良好であった。これら 3 種の培地のうちで AM-2 の阻止円が最も鮮明であったので、AM-2 を測定用培地として採用し、以後の実

Fig. 6 Effect of media on TIPC standard curve

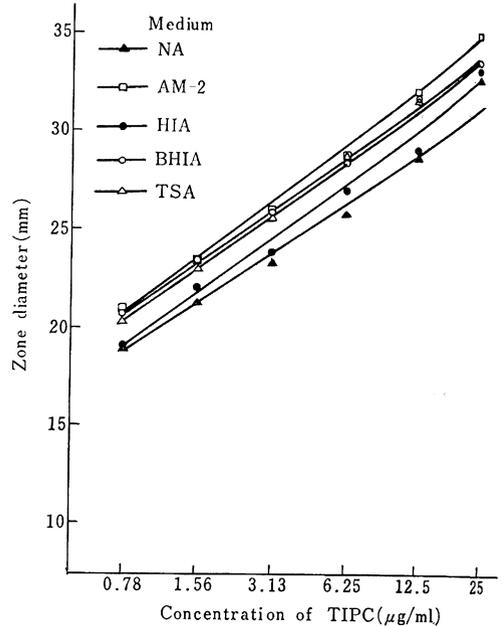
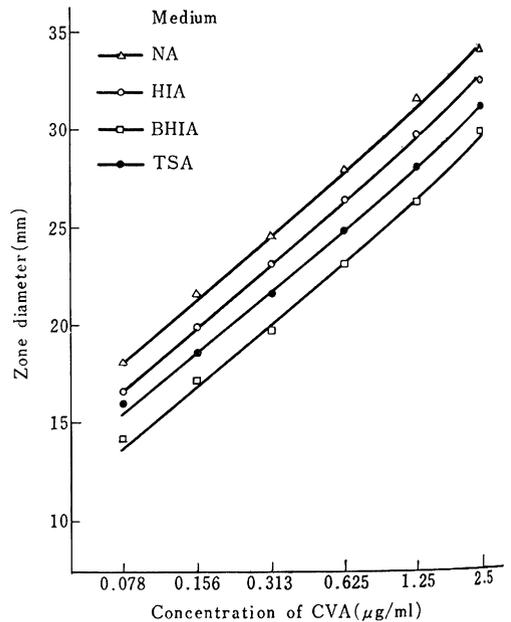


Fig. 7 Effect of media on CVA standard curves



験に使用した。

B. CVA:NA, AM-2, HIA, BHIA および TSA を測定用培地として用いて検討を行った。

AM-2 においては、菌の生育が悪く阻止円径の測定は不可能であった。他の培地ではいずれも直線性は良好であった (Fig. 7) が、NA 使用時の阻止円が最も鮮明であ

ったため NA を測定用培地として採用し、以後の実験に使用した。

3) 菌液添加量の影響

A. TIPC: 菌液濃度が 0.05, 0.1 および 0.2% となるように AM-2 に *P. aeruginosa* NCTC 10701 の菌液を接種し、標準曲線を作成した結果、Fig. 8 に示すようにいずれの菌液濃度においても直線性は良好であった。しかし、0.05% では菌量が不足し阻止円が不鮮明であった。

菌液濃度が 0.1~0.2% の範囲で直線性・阻止円の鮮

明度共に良好であったので、菌液濃度は 0.15% とした。

B. CVA: 菌液濃度が 1.25, 2.5 および 5% となるように NA に *K. pneumoniae* ATCC 29665 の菌液を接種し、標準曲線を作成した結果を Fig. 9 に示す。

いずれの濃度においても直線性は良好であったが、1.25% では阻止円の鮮明度がやや低く、かつ、CVA 濃度 2.5 $\mu\text{g/ml}$ のときの阻止円は大きすぎた。

菌液濃度が 2.5~5% の範囲で直線性・阻止円の鮮明度共に良好であったので菌液濃度は 3% とした。

Fig. 8 Effect of inoculum size on TIPC standard curves

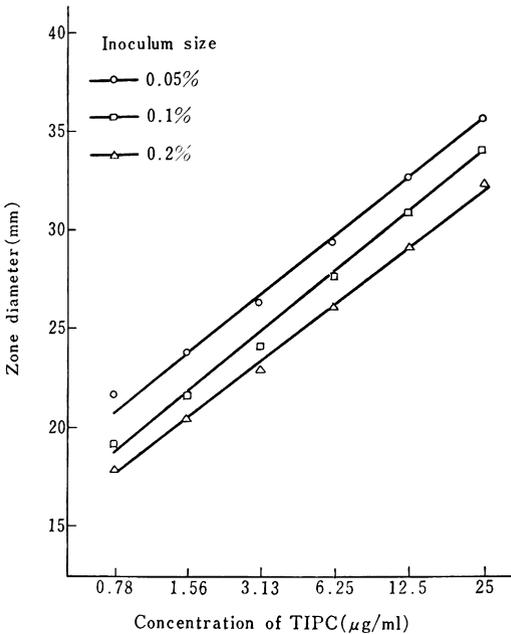


Fig. 9 Effect of inoculum size on CVA standard curves

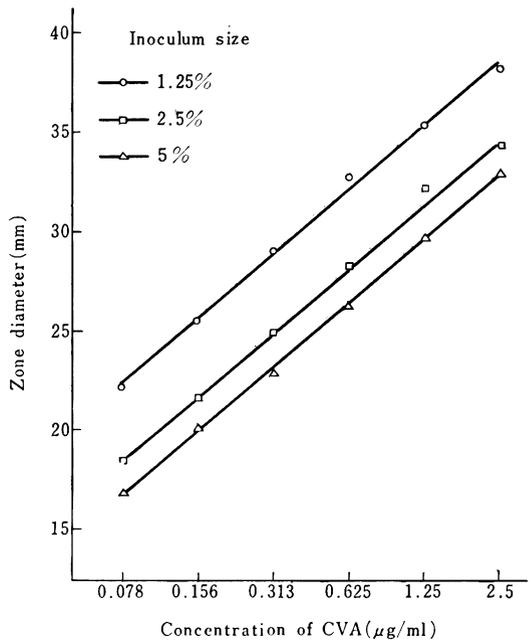
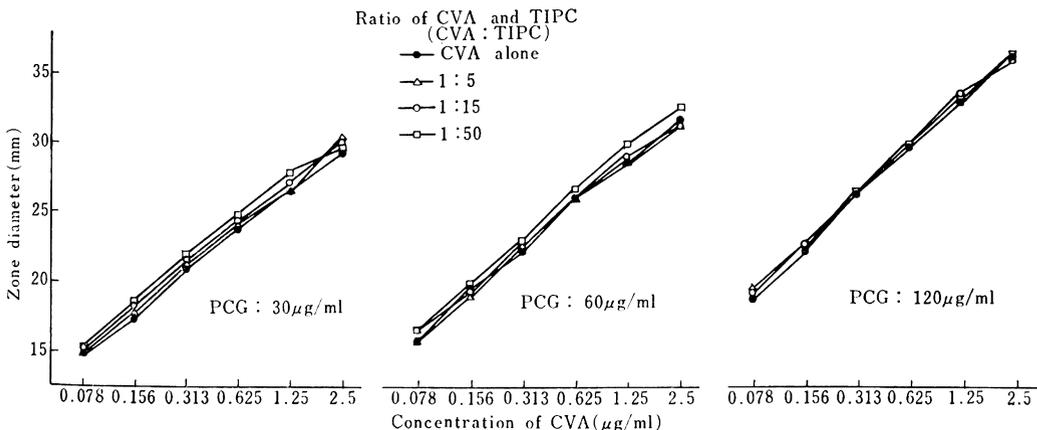


Fig. 10 Effect of PCG on CVA standard curves



4) PCG 添加量の影響

CVA の検量線に対する培地中の PCG 濃度の影響について検討を行った。NA 中の PCG 濃度を 30, 60 および 120 $\mu\text{g/ml}$ とし、さらに TIPC が各種の比率で含まれる CVA 希釈液を用いて標準曲線を作成した (Fig. 10)。

いずれの標準曲線も直線性は良好で、かつ、TIPC の影響は認められなかった。しかし、PCG 濃度 30 $\mu\text{g/ml}$ では、CVA 濃度が 0.078 $\mu\text{g/ml}$ の阻止円がやや不鮮明であった。また、PCG 濃度 120 $\mu\text{g/ml}$ では、CVA 2.5 $\mu\text{g/ml}$ における阻止円が大きすぎ、径の計測が困難であった。したがって、測定した全濃度において最も計測しやすい PCG 濃度 60 $\mu\text{g/ml}$ を採用した。

5) 培地 pH の影響

A. TIPC : AM-2 の pH を 6.0, 6.6 および 7.5 に 1 N HCl あるいは 1 N NaOH で調整し、標準曲線を作成した (Fig. 11)。

いずれの pH でも直線性は良好であり、阻止円の鮮明度にも違いは認められなかった。したがって、培地 pH は AM-2 の表示通り 6.6 とした。

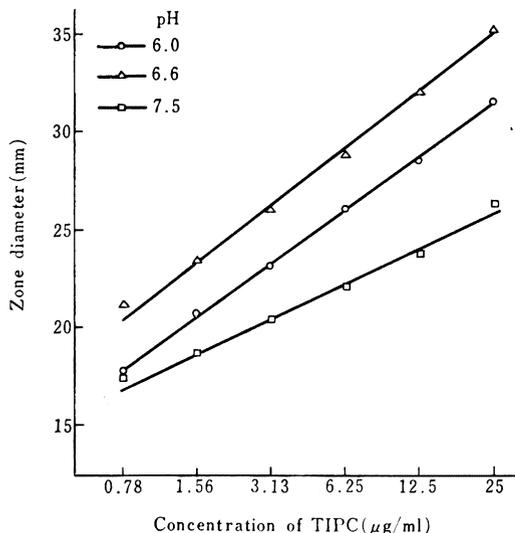
B. CVA : NA の pH を 6.0, 6.5, 7.5 および 8.5 に調整し、標準曲線を作成した (Fig. 12)。

いずれの pH でも直線性は良好であった。阻止円の鮮明度は pH 6.0 および pH 8.5 でやや低かった。したがって、培地 pH は NA の表示通り 7.5 とした。

6) 血清中 TIPC における CaCl_2 の影響

CaCl_2 添加により測定限界値が下がるので、その添加量について検討した。

Fig. 11 Effect of pH on TIPC standard curves



5, 10 および 20 mM の CaCl_2 を含む AM-2 寒天平板培地を作成し、ヒト血清で希釈した TIPC の標準曲線を比較した (Fig. 13)。

CaCl_2 無添加および 5 mM 添加では測定限界値はそれぞれ 3.13 および 1.56 $\mu\text{g/ml}$ であったが、10 mM と 20 mM では、測定した全濃度において直線性が認められ、かつその測定限界はそれぞれ 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。し

Fig. 12 Effect of pH on CVA standard curves

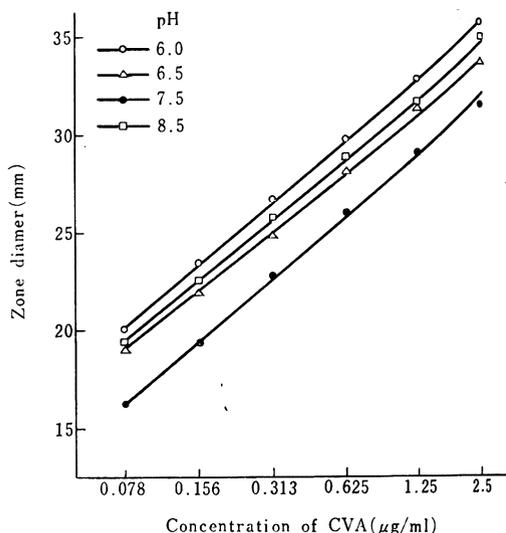
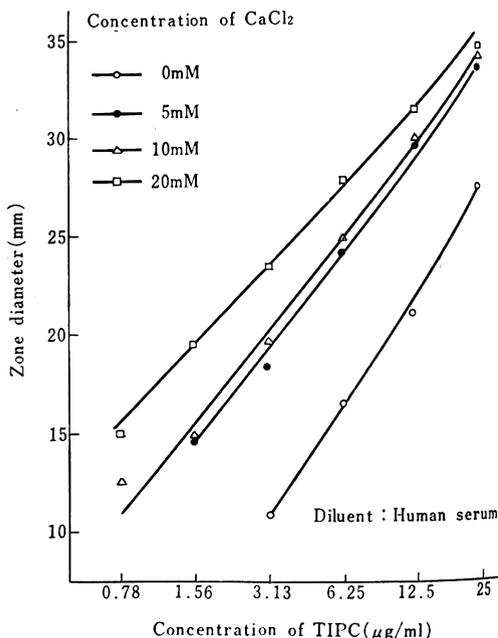
Fig. 13 Effect of CaCl_2 on TIPC standard curves

Fig. 14 Effect of serum on TIPC standard curves

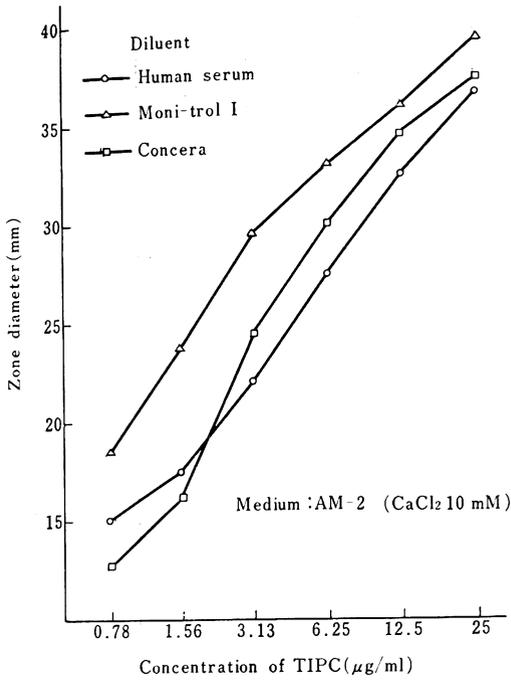
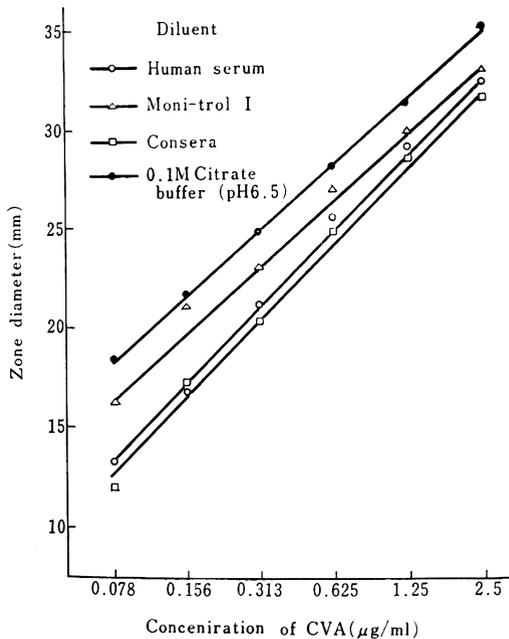


Fig. 15 Effect of diluents on CVA standard curves



かし、20 mM では阻止円が著しく不鮮明であったので CaCl_2 濃度は 10 mM とした。

7) 血清の影響

A. TIPC : 10 mM の CaCl_2 を含む AM-2 寒天平板培地を用い、0.1 M citrate buffer (pH 6.5)、健康ヒト血清、Moni-trol I および Consera を用い調整した希釈液で標準曲線を作成し比較検討した (Fig. 14)。

0.1 M citrate buffer (pH 6.5) では CaCl_2 の影響で阻止円が大きすぎ、径の測定は不可能であった。また、Moni-trol I および Consera では直線性は不良であった。

B. CVA : NA 培地を用い、0.1 M citrate buffer (pH 6.5)、健康ヒト血清、Mori-trol I および Consera を用い調製した希釈液で標準曲線を作製し、比較検討した (Fig. 15)。

阻止円の鮮明度はいずれも良好であった。また、直線性に関しては 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) と健康ヒト血清のものが Moni-trol I および Consera より優れていた。

2. 血清および尿中での安定性

BRL 28500 の健康ヒト血清、尿および 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) 中での安定性を Table 1 に示した。

血清中における CVA および TIPC の安定性は 5°C および -20°C 保存においては両剤とも力価の低下が見られた。 -70°C 以下では CVA、TIPC とともに 21 日後の残存率は、95% 以上を維持し安定であった。

尿中においては、TIPC は -20°C および -70°C 以下では、21 日後の残存率は 96% 以上で安定であった。一方、CVA は -20°C 保存では原尿、10 倍尿とも 7 日間、 -70°C 以下の条件では 21 日間安定であった。

III. ま と め

BRL 28500 は TIPC と CVA 配合剤であるため、体液内濃度測定には各々の物質を配合物質の影響のない条件で測定しなければならない。

今回の検討結果から、BRL 28500 の体液内濃度測定法を以下のように設定した。

1) 方法

薄層 cup 法

2) 検定菌および接種菌量

TIPC 濃度の測定には、*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10701 を Nutrient broth (Oxoid) にて 37°C 、16~18 時間培養した菌液を 0.15% 接種する。CVA 濃度の測定には、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 を Trypton soya broth (Oxoid) にて 37°C 、16~18 時間培養した菌液を 3% 接種する。

3) 測定用培地

TIPC 濃度の測定には Antibiotic medium No. 2 (Difco)、ただし血清中の濃度測定には、 CaCl_2 を 10 mM 含むように調製した Antibiotic medium No. 2 を用い

Table 1 Stability of TIPC and CVA in serum, urine and citrate buffer solution

Solution	Initial concentration (mg/ml)	Storage condition (°C)	Residual potency (%)													
			TIPC							CVA						
			1	2	3	7	14	21(day)	14	21(day)	1	2	3	7	14	21(day)
Human serum	BRL28500 480	+ 5	94	105	84	55	31	20	70	46	27	2	ND*	ND		
		-20	100	105	105	78	85	73	82	58	41	10	ND	ND		
		< -70	95	103	101	98	94	98	99	99	101	101	100	95		
Human serum	BRL28500 48	+ 5	87	70	70	46	18	12	75	45	30	ND	ND	ND		
		-20	92	87	87	78	78	59	81	63	51	15	ND	ND		
		< -70	94	99	99	99	94	105	102	98	99	93	100	97		
Human urine	BRL28500 9,600	+ 5	90	94	96	100	89	91	98	102	103	97	86	81		
		-20	93	96	104	106	97	97	103	104	99	101	100	90		
		< -70	95	95	97	94	96	97	104	104	97	103	101	97		
Human urine	BRL28500 192	+ 5	105	97	106	100	92	96	97	90	88	86	63	57		
		-20	103	95	106	104	104	96	94	95	91	91	81	73		
		< -70	104	95	104	101	100	100	106	107	98	99	102	94		
Human urine (10-fold)	BRL28500 960	+ 5	99	101	90	94	82	84	101	95	98	97	93	71		
		-20	102	99	106	101	96	96	99	104	95	99	87	79		
		< -70	100	101	100	98	97	98	99	103	98	102	99	92		
Human urine (10-fold)	BRL28500 19.2	+ 5	100	104	104	103	93	95	95	99	91	86	80	66		
		-20	104	96	93	93	92	98	99	101	89	93	92	79		
		< -70	104	101	98	96	98	98	102	101	98	106	102	95		
0.1M citrate buffer (pH 6.5)	BRL28500 9,600	+ 5	95	92	97	103	89	89	98	102	103	97	86	81		
		-20	96	101	105	103	100	98	103	104	99	101	100	90		
		< -70	96	101	101	100	97	99	104	104	97	103	101	97		
0.1M citrate buffer (pH 6.5)	BRL28500 960	+ 5	90	94	96	100	89	91	100	100	107	107	90	80		
		-20	93	96	105	106	97	97	99	102	105	102	97	83		
		< -70	95	95	97	94	96	97	105	98	108	102	98	94		

*ND : Not done

る。CVA 濃度の測定には PCG を 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むように調製した Nutrient agar (Oxoid) を用いる。

4) 検体の希釈液

血清中試料の希釈には健康ヒト血清, 尿試料の希釈には 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) を用いる。

5) 標準曲線の作成

血清試料の測定には健康ヒト血清, 尿試料の測定には 0.1 M citrate buffer (pH 6.5) を用いて調製する。

6) 培養条件

37°C, 約 16 時間。

文 献

- 1) MITSUHASHI, S. & M. INOUE: In β -lactam antibiotics, mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics (ed. by S. MITSUHASHI), p. 41~56, Japan Sci. Soc. Press, 1981
- 2) MATSUURA, M.; H. NAKAZAWA, T. HASHIMOTO

& S. MITSUHASHI: Combined antibacterial activity of amoxicillin with clavulanic acid against ampicillin-resistant strains. Antimicrob. Agents Chemother. 17(6): 908~911, 1980

- 3) 西野武志, 尾花芳樹, 杉原芳樹, 中沢昭三: 合成ペニシリン Ticarcillin にかんする細菌学的評価。Chemotherapy 25: 2404~2421, 1977
- 4) 中沢 久, 井上松久, 三橋 進: BRL 28500 (Clavulanic acid-Ticarcillin) の抗菌作用およびクラブロン酸の生菌中 β -lactamase に対する阻害効果について。Chemotherapy (投稿中)
- 5) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準, 一般試験法, 力価試験法。1982
- 6) 横田栄作, 佐藤光行, 建林和夫, 服部信之: BRL 25000 (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。Chemotherapy 30 (S-2): 111~117, 1982

ASSAY METHOD FOR BRL 28500 (CLAVULANIC ACID-TICARCILLIN) IN HUMAN BODY FLUIDS

HISASHI NAKAZAWA, YOSHIMI NAGURA and KAZUO NAKAHIRA

Development Laboratory, Beecham Yakuhin K. K.

R. HORTON

Beecham Pharmaceuticals Research Division

BRL 28500 is a formulation of the β -lactam antibiotic ticarcillin (TIPC) with the β -lactamase inhibitor clavulanic acid (CVA). A microbiological assay method has been developed which allows determination of each component without interference from the other. The thin layer plate-cup method was used and the assay conditions were as follows:

1) Test organisms and inocula

A 0.15% dilution of an overnight culture of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10701 was used for the TIPC assay. A 3% dilution of an overnight culture of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 was used for the CVA assay.

2) Media

Antibiotic medium No. 2 agar (Difco) was employed for the routine TIPC assay which was supplemented with 10 mM CaCl_2 for serum level determination. Nutrient agar (Oxoid) containing 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of penicillin G was employed for the CVA assay.

3) Diluents

Urine samples were diluted with 0.1 M citrate buffer solution (pH 6.5) and serum samples were diluted with pooled human serum.

4) Standard solutions

Standard solutions of TIPC and CVA were prepared in 0.1 M citrate buffer solution (pH 6.5) except for the assay of serum samples. For these pooled human serum was used as diluent. The concentration ranges of TIPC and CVA standard solutions were from 0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and from 0.078 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

BRL 28500 (CVA and TIPC) was stable in human body fluids when stored at temperatures below -70°C for provides up to 3 weeks.