

## 生体試料中の Carumonam の定量法

畚野 剛・前田憲一

武田薬品工業株式会社中央研究所

Carumonam の体内動態研究のための諸測定法を検討設定した。微生物学的定量法では *Escherichia coli* NIHJ を試験菌、抗生物質用培地「ダイゴ」No. 4 を測定培地とするアガーウェル法により carumonam 約 0.1  $\mu\text{g}$  (力価)/ml (下限) まで測定可能であった。また *Providencia rettgeri* ATCC 9250 を試験菌、0.15%胆汁酸塩、0.2 mg%クリスタルバイオレット添加 DST 寒天培地を用いたアガーウェル法により carumonam 約 0.02  $\mu\text{g}$  (力価)/ml まで測定できた。さらに活性代謝物検索のため、同菌を用いるバイオオートグラフ法も設定した。

Carumonam とその  $\beta$ -ラクタム開環体の分離定量のため、Nucleosil 5 C<sub>18</sub> カラムを用い、0.005M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム (pH 3.0) - アセトニトリル (85:15) を移動相とする高速液体クロマトグラフ法を設定した。

## 緒 言

Carumonam (CRMN), disodium (+)-Z-[[[1-(2-amino-4-thiazolyl)-2-[[[(2S, 3S)-2-carbamoyloxymethyl)-4-oxo-1-sulfonato-3-azetidiny] amino]-2-oxoethylidene] amino] oxy] acetate は新規な単環性の N-スルホ  $\beta$ -ラクタム抗生物質<sup>1)</sup> (Fig. 1) で、*in vitro* において *Enterobacteriaceae* の諸菌種、*Pseudomonas aeruginosa* および *Haemophilus influenzae* に強い抗菌

力を持ち、また各種の  $\beta$ -lactamase にも安定な性質を有する<sup>2,3)</sup>。本剤のヒトにおける体内動態の研究のために、血中および尿中濃度の微生物学的定量法、バイオオートグラフ法および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による代謝物の定性・定量法について検討した。

## 実験材料と方法

1. 薬剤：CRMN およびその  $\beta$ -ラクタム開環体である類縁物質 I (Fig. 1) は当社中央研究所で合成したものを用いた。

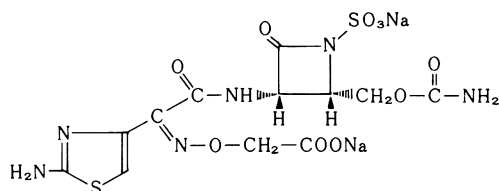
2. 試験菌株：*Escherichia coli* NIHJ (IFO 14249), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (IFO 3512), *Proteus mirabilis* ATCC 21100 (IFO 13300), *Providencia rettgeri* ATCC 9250 (IFO 13501), *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 (IFO 12582) は財団法人発酵研究所から分与された後、本研究室で継代保存中のものを用いた。

3. 微生物学的定量法：

1) 測定用培地：Antibiotic medium 4 (AM4, Difco), 普通寒天培地 (NA, 栄研), ハートインヒュージョン寒天培地 (HIA, 栄研), ミューラーヒントン培地 (MH, 栄研), 抗生物質用培地「ダイゴ」No. 4 (D4, 大五栄養), スルベニシリン定量用培地<sup>4)</sup> (SBM; ポリペプトン 0.6%, 酵母エキス 0.3%, 肉エキス 0.15%, ブドウ糖 0.1%, 寒天末 1.5%; pH

Fig. 1 Chemical structures of carumonam and related compound I

Carumonam



Related Compound I

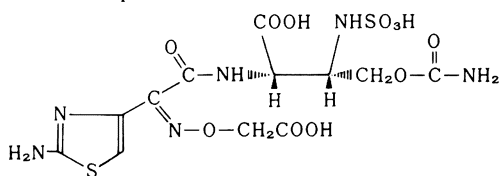
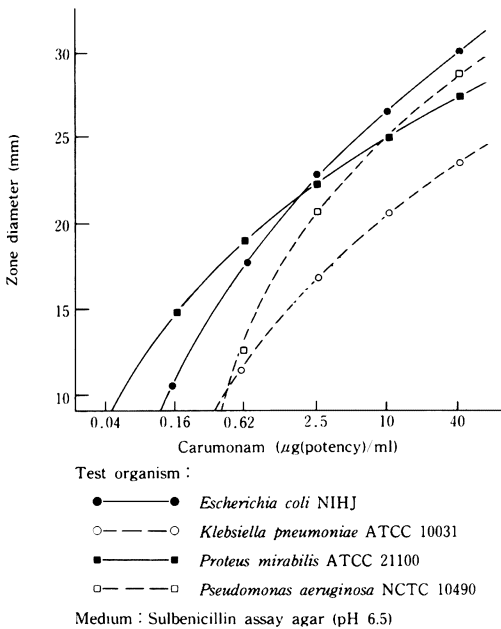


Fig. 2 Comparison of test organisms for assay of carumonam by agar well method



6.5; 自家調製) および DST 寒天培地 (Oxoid) に胆汁酸塩 (Difco) 0.15%, クリスタルバイオレット 0.2 mg% を添加した BVDST 培地<sup>5)</sup> を使用した。

2) 菌液: 斜面寒天培地で 37°C, 1 夜培養した新鮮菌体を滅菌蒸留水に懸濁し, その濁度を光電比色計 (EPO-B 型, 日立製作所) で 660 nm における吸光度が 0.8 になるように調整した。この菌液濃度は約 10<sup>9</sup> CFU/ml であった。菌液 0.5 ml を 47°C に保温した測定用培地 100 ml に接種した。

3) 標準液: CRMN を 0.1M リン酸塩 (pH 6.0 または 7.0) で 1,000 μg (力価)/ml に溶解したものを標準原液とし, さらに同緩衝液で希釈して標準希釈液系列を調製した。

4) 薄層カップ法: 試験菌を接種した測定用培地 10 ml を直径 9 cm のプラスチック・シャーレに流しこみ, 水平台上で固化させた。それぞれの間隔が約 3.5 cm になるように 4 個のステンレス・カップ (内径×外径×高さ=6×8×10 mm) を立て, 標準希釈液および検液をカップ内に注入した後, 37°C, 1 夜培養し, 阻止円の直径を測定した。標準希釈液の CRMN 濃度の対数と阻止円の直径との関係を 2 次曲線<sup>6)</sup> で回帰して, この曲線 (標準曲線) により検液

中の CRMN 濃度を算出した。

5) アガーウェル法: 測定用含菌寒天平板の調製, 阻止円計測, 濃度計算の方法は薄層カップ法と同様である。寒天平板は, 寒天せん孔機 (武田薬品製) を用いて直径 8 mm の孔 4 個を打抜き, 各孔に標準希釈液および検液を 50 μl ずつ注入し, とくにことわらない限り 34°C, 1 夜培養した。

6) ペーパーディスク法: ステンレス・カップを用いるかわりに直径 6 mm のペーパーディスク (Whatman 社) に検液各 20 μl をスポットしたものを寒天平板上に貼付する以外は薄層カップ法に準じた。

4. 薄層 chromatograph/bioautograph 法 (TLC/バイオオート法)<sup>7)</sup>: 薄層クロマトシート (Spotfilm, silica gel f: 東京化成工業) に各検体溶液 (CRMN として 50~100 ng 力価) をマイクロピペットでスポットした後, 約 10 分間通風乾燥し, ただちに (a) アセトニトリル-水-酢酸-25% アンモニア水 (144:24:12:1) または (b) 酢酸エチル-アセトニトリル-水 (8:6:2:3) を展開溶媒として約 15 cm 展開した。1~2 時間通風乾燥したシートを各検体ごとに切断した。

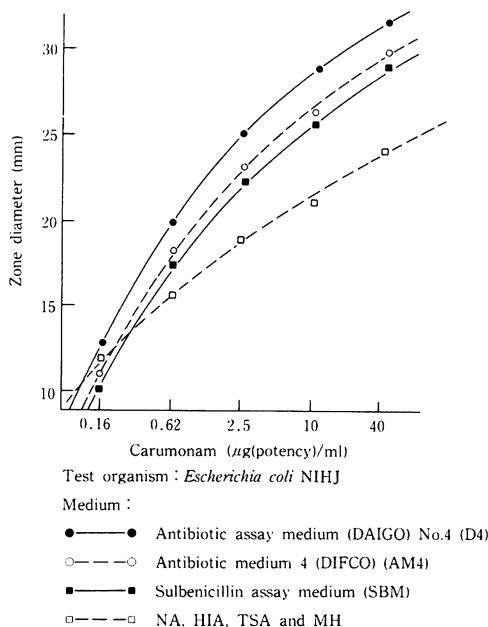
*P. rettgeri* ATCC 9250 の菌液 2 ml を接種したマッコンキー寒天 (pH 8.0, 栄研) 200 ml をバイオオート缶 (24×34 cm) に流し込み, 水平台上で固化させた。寒天平板上に, それぞれの間隔が約 3 cm になるように切断シートをはりつけた。約 20 分間薬剤を寒天層に拡散させた後, 切断シートを取り除き, 寒天平板を 34°C, 1 夜培養し, 阻止帯を検出した。

#### 5. HPLC 法:

1) 検体の前処理: 血清および尿検体は採取後なるべく速やかに 0.1M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で正確に 2 倍希釈した後, -20°C で凍結保存した。測定当日各検体を融解後よく混合し, 血清検体については 2 倍量のメタノールを加え, Voltex 型ミキサーで攪拌混合した。エッペンドルフ卓上遠心器を用いて 15,000 rpm, 1 分間遠心後, 各上清を採取した。上清をミリポアフィルター (メタノール処理検体は Millex-SR, 水性検液は Millex-HA) で濾過した。血清検体はさらに蒸留水で 3 倍希釈, 尿検体は HPLC 移動相で 25 倍希釈した後カラムに注入した。

2) HPLC の装置および条件: 実験結果の項に記述する。

Fig. 3 Comparison of media for assay of carumonam by agar well method



## 実験結果

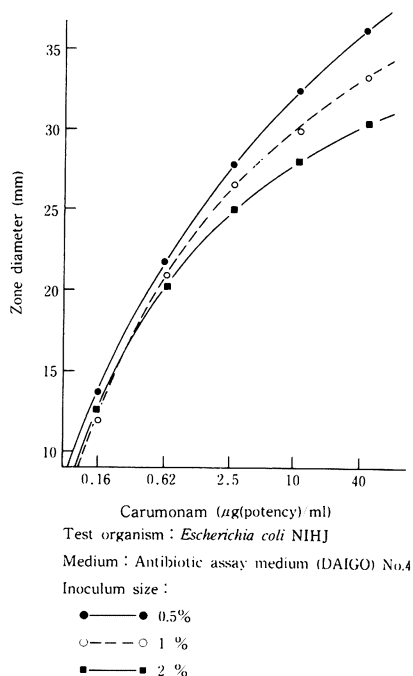
### I. 微生物学的定量法

1. 試験菌株の選択: 試験菌4株について CRMN の標準曲線(アガーウェル法)を作成した結果を Fig. 2 に示す。測定感度は *P. mirabilis* ATCC 21100 > *E. coli* NIHJ > *P. aeruginosa* NCTC 10490 ≒ *K. pneumoniae* ATCC 10031 の順であった。阻止円の鮮明度は *E. coli* NIHJ ≒ *K. pneumoniae* ATCC 10031 > *P. mirabilis* ATCC 21100 > *P. aeruginosa* NCTC 10490 の順であった。これらの結果より、感度が高く阻止円が鮮明な *E. coli* NIHJ を試験菌株として選択し、以下の実験に用いた。

### 2. 濃度測定条件の検討

1) 測定用培地: *E. coli* NIHJ を試験菌とするアガーウェル法により CRMN の 0.16~40 μg (力価)/ml の濃度範囲で、pH 7.0 の7種の培地(D4, AM4, SBM, NA, HIA, TSA および MH) について標準曲線を作成した。Fig. 3 に示すように、阻止円の大きさは D4 で最大となり AM4, SBM がこれにつき、他の4種の培地では最小となった。阻止円の鮮明度は D4 が最もすぐれ、SBM, AM4 がこれにつき、他の培地では不鮮明で計測が著しく困

Fig. 4 Effect of inoculum size on calibration curve for assay of carumonam by agar well method



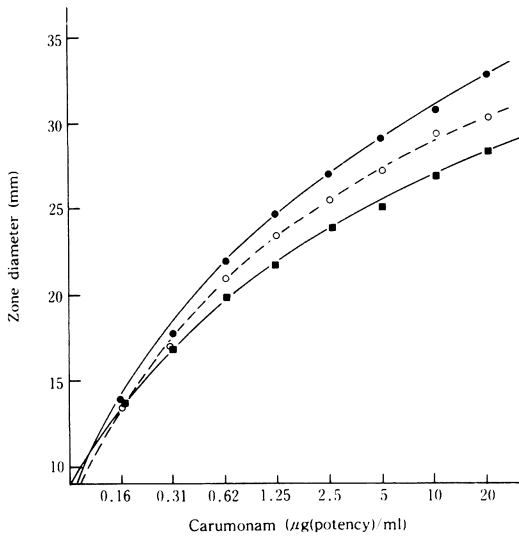
難であった。

D4 培地を用い、pH 6~8 において培地 pH の阻止円に及ぼす影響を検討した。阻止円の鮮明度はいずれの pH においても良好であったが、阻止円径は pH が高いほど小さくなり、また標準曲線の傾斜は高濃度側(10 μg (力価)/ml 以上)において小さくなる傾向を示した。したがって、培地の pH は無調整(pH 6.4~6.5) で使用するのが妥当と考えた。

2) 菌量: 接種菌量 0.5, 1, 2% について比較した結果を Fig. 4 に示す。菌量を増やすと阻止円径が小さくなった。また標準曲線の傾斜が高濃度側で著しく小さくなった。したがって、以下の検討において、菌量は 0.5% とした。

3) 培養温度の影響およびアガーウェル法と薄層カップ法との比較: アガーウェル法の 34°C, 37°C 培養および薄層カップ法の 37°C 培養について比較検討した。Fig. 5 に示すように、アガーウェル法で培養温度を 37°C にすると、高濃度側で阻止円径が減少した。薄層カップ法では、さらに直径が小さくなったが、測定下限はいずれも 0.1 μg (力価)/ml 付近であった。

Fig. 5 Effect of incubation temperature and vehicle on calibration curve for assay of carumonam by agar diffusion method



Test organism : *Escherichia coli* NIHJ

Medium : Antibiotic assay medium (DAIGO) No.4

Vehicle and incubation temperature :

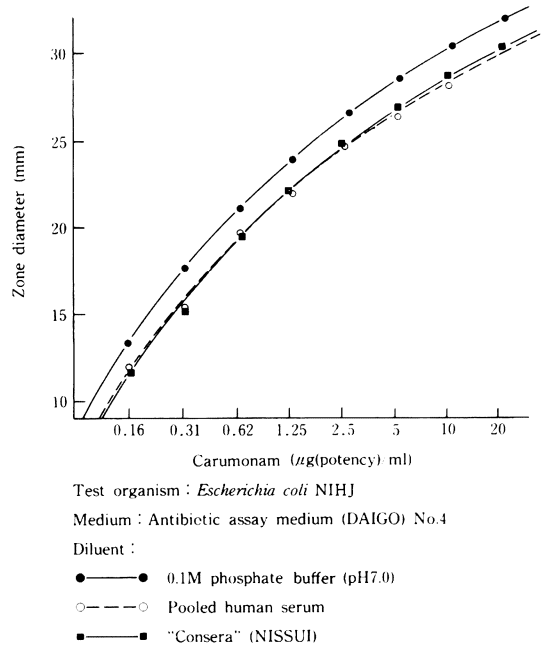
- Agar well, 34°C
- Agar well, 37°C
- Cylinder, 37°C

### 3. ヒト血清および尿の影響

1) 標準曲線：プールしたヒト血清および市販のコントロール血清（コンセーラ；日水）により希釈して作成した標準曲線と、リン酸塩緩衝液（pH 7.0）で希釈して作成した標準曲線とを比較した。阻止円の鮮明度は3者間で差はなかったが、血清で希釈調整すると阻止円径が約2 mm減少した（Fig. 6）。したがって、血清中濃度の測定は血清希釈による標準曲線を調整して計算する必要がある。尿検体では少なくとも10倍希釈すれば、尿成分の阻止円への影響は認められなかった。

2) 凍結保存での安定性：CRMNをヒト血清および尿に加え $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した（Table 1）。それぞれを0.1Mリン酸塩緩衝液（pH 6.0）で2倍希釈すると安定性が改善された。血清および尿検体を1日以上保存する場合には、同緩衝液で2倍希釈後凍結保存することが必要と思われる。したがって、緩衝液添加の血清検体に対応する標準曲線は正常血清-pH 6.0緩衝液（1:1）により希釈作成することが必要である（Fig. 7）。

Fig. 6 Effect of diluent on calibration curve for assay of carumonam by agar well method



Test organism : *Escherichia coli* NIHJ

Medium : Antibiotic assay medium (DAIGO) No.4

Diluent :

- 0.1M phosphate buffer (pH7.0)
- Pooled human serum
- "Consera" (NISSUI)

4. CRMNの体液内濃度測定法（小括）：CRMNの体液内濃度は*E. coli* NIHJを試験菌，抗生物質用培地「ダイゴ」No. 4を試験培地とするアガーウェル法（または薄層カップ法）により測定する。検体は0.1Mリン酸塩緩衝液（pH 6.0）で希釈後凍結保存する。血清検体中のCRMN濃度は血清-pH 6緩衝液（1:1）で希釈作成した標準曲線から求める。尿検体は同緩衝液で10倍以上希釈した後測定し、緩衝液で希釈作成した標準曲線からCRMN濃度を算出する（Table 2）。本法によるCRMNの測定下限濃度は0.1Mリン酸塩緩衝液（pH 6.0）中で約 $0.1\mu\text{g}$ （力価）/mlである。

5. 高感度法：低濃度あるいは微量の検液測定のため、Aminothiazolyl cephalosporinに用いられている定量系<sup>4)</sup>の準用を検討した。*P. rettgeri* ATCC 9250を試験菌とし、BVDST寒天を試験培地とする寒天拡散法の標準曲線はFig. 8のようになり、CRMNの測定下限濃度はアガーウェル法で約 $0.02\mu\text{g}$ （力価）/ml、ペーパーディスク法で約 $0.06\mu\text{g}$ （力価）/mlであった。後者は組織の溶媒抽出液の測定にも用いられる。

6. TLC/バイオオート法：CRMNの定性的検出のためTLC/バイオオート法について検討した。

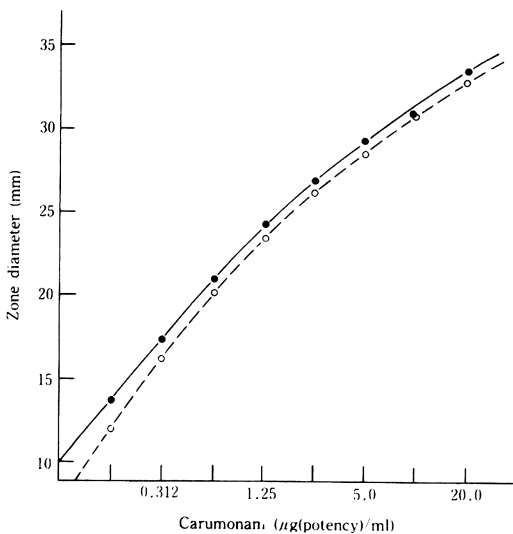
Table 1 Stability of carumonam in serum, plasma and urine at a freezing temperature ( $-20^{\circ}\text{C}$ )

Storing medium (final pH)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Storing period (days)			
		0	3	7	14
Serum (pH 8.3)	100	100 <sup>a)</sup>	94	84	77
	20	100	101	85	66
	4	100	95	86	79
Serum + Buffer <sup>b)</sup> 1 : 1 (pH 6.6)	50	100	95	93	94
	10	100	95	91	88
	2	100	102	99	91
Plasma (pH 7.6)	100	100	93	87	82
	20	100	94	91	71
	4	100	98	88	85
Plasma + Buffer 1 : 1 (pH 6.4)	50	100	96	97	98
	10	100	98	95	94
	2	100	100	99	94
Urine (pH 7.2)	1000	100	92	94	93
	200	100	94	92	85
Urine + Buffer 1 : 1 (pH 6.0)	500	100	92	91	89
	100	100	100	90	94
Buffer (pH 6.0)	1000	100	97	90	92

a) : Residual potency (%), assayed by the agar well method.

b) : 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0)

Fig. 7 Standard curves for assay of carumonam (agar well method)

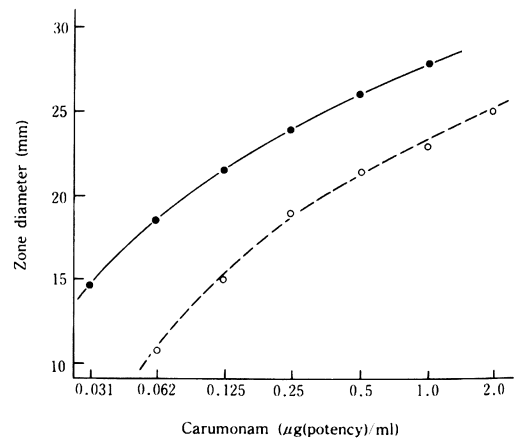


Diluent : ●—● Buffer (pH 6.0)  
○---○ Serum buffer (1 : 1)

Test organism : *Escherichia coli* NIHJ

Medium : Antibiotic assay medium (DAIGO) No. 4

Fig. 8 Standard curves for assay of carumonam (sensitive method)



Test organism : *Providencia rettgeri* ATCC 9250

Medium : BVDST agar

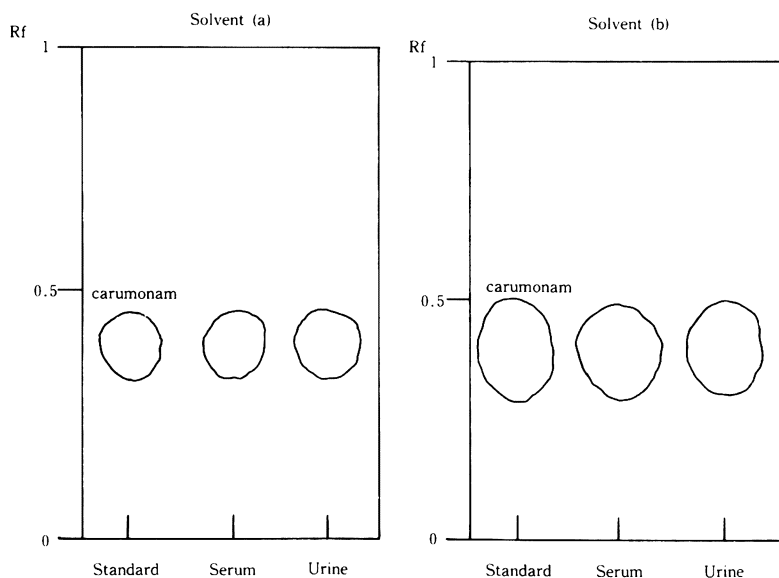
Vehicle :

●—● Agar well  
○---○ Paper disc

Table 2 Microbiological assay of carumonam

	Agar well method
Test organism	<i>Escherichia coli</i> NIHJ
Inoculum size	0.5 ml of cell suspension (OD=0.8, about $10^9$ CFU/ml)/100 ml of assay agar
Medium	Antibiotic medium (DAIGO) No. 4 (peptone 0.6 %, yeast extract 0.3 %, meat extract 0.15%, glucose 0.1 %, agar 1.2 %, pH 6.3)
Initial standard solution	1 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0
Diluent for serum samples	Serum-0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0) (1 : 1)
Diluent for urine samples	0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0)
Final concentration of standard solution	Carumonam ; 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.156 $\mu\text{g}$ (potency)/ml
Incubation	16~20 hours at 34 °C
Minimal detectable concentration	about 0.1 $\mu\text{g}$ (potency)/ml in final solution

Fig. 9 Bioautograms of human serum and urine after intravenous administration of carumonam



Solvent (a) : Acetonitrile-Water-Acetic acid-25%NH<sub>4</sub>OH(144 : 24 : 12 : 1)

Solvent (b) : Ethylacetate-Acetone-Formic acid-Water(8 : 6 : 2 : 3)

Silicagel plate : "Spot film" (Tokyo Chemical Industry Co)

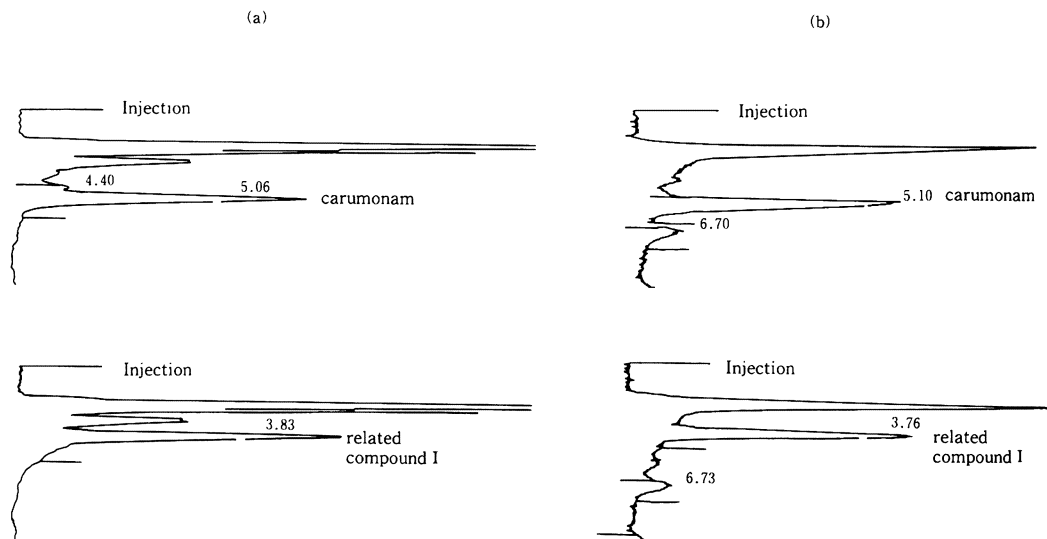
Test organism : *Providencia rettgeri* ATCC 9250

Medium : MacConkey agar (pH 8.0)

Table 3 High-pressure liquid chromatography of carumonam and related compound I

System item	Component or condition used
Instrument	ALC/GPC 204 with an autosampler 710B (Waters Assoc.)
Column	Stainless steel, 15×0.4 cm i. d.
Packing material	Nucleosil 5 C <sub>18</sub> (Macherey Nagel Co.)
Mobile phase	(A) 0.005 M Tetrabutylammonium hydrogen sulfate (pH 3.0) and acetonitrile (85 : 15, v/v) (B) 0.1 % Ammonium sulfate, methanol and glacial acetic acid (97 : 2 : 1, v/v)
Temperature	Ambient room temperature
Flow rate	0.8 ml/min.
Detection	UV, 254 nm for serum samples, 313 nm for urine samples
Injection volume	70 μl
Measurement of peak areas	Data module 730 (Waters Assoc.)

Fig. 10 Typical chromatograms in HPLC analysis of carumonam and related compound I in human serum (a) and urine (b)



Mobile phase : Composition A in Table 3

アセトニトリル系(a)で展開した場合、展開時間 1~1.5 時間、Rf 0.39 付近、検出限界約 2 ng；また酢酸エチル系(b)を用いたときは展開時間 2~2.5 時間、Rf 0.35 付近、検出限界約 1 ng であった。CRMN と Rf が約 0.15 以上離れ、CRMN と同程度の抗菌活性をもつ代謝物があれば、これらの系により検出可

能と考えられる。CRMN を投与したヒトの血清、尿のバイオオートグラムを Fig. 9 に例示した。

## II. HPLC 法

1. 条件設定：高速液体クロマトグラフィーについては既知の報告<sup>9)</sup>を参考として Table 3 に示した条件を設定した。その際とくに次の事項について配

慮した。

1) 測定波長：ヒト尿中の紫外外部吸収性物質の影響をできるだけ少なくするため、UV 検出器のフィルター波長を検討した結果、313 nm で妨害物の影響がより少なかった。血清の場合は妨害が比較的少ないため 254 nm で測定可能であり、かつ、313 nm よりも低濃度まで測定できた。

2) 移動相：組成(A) 0.005M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム (pH 3.0)-アセトニトリル (85:15) および(B) 0.1%硫酸アンモニウム-メタノール-氷酢酸 (97:2:1) について比較した。いずれの系においても CRMN とその  $\beta$ -ラクタム開環体(類縁物質 I) の分離定量が可能であったが、室温で長時間運転しても保持時間のドリフトが少なかった組成(A)がより適していると考えられる。組成(A)における典型的なクロマトグラムを Fig. 10 に示す。

## 2. アガーウェル法と HPLC 法との相関

健康成人男子 3 名に CRMN を投与したときの血清中および尿中の薬剤濃度をアガーウェル法および HPLC 法により定量し、その値の相関性を検討した (Fig. 11, 12)。両測定値の相関は良好であった。

## 考 察

微生物学的定量法の条件設定において、基本的に

重要な因子は試験菌株および測定用培地と考えられる。今回のアガーウェル法の検討において、試験菌株として選定した *E. coli* NIH は「日本抗生物質医薬品基準」<sup>4)</sup>においてクロラムフェニコール、コリスチン、ピブメシリナムなどの力価測定に用いられているものである。本菌に対応する測定用培地として選定した抗生物質用培地「ダイゴ」No. 4 の組成は

Fig. 11 Comparison of carumonam concentrations in serum samples measured by microbiological assay and HPLC

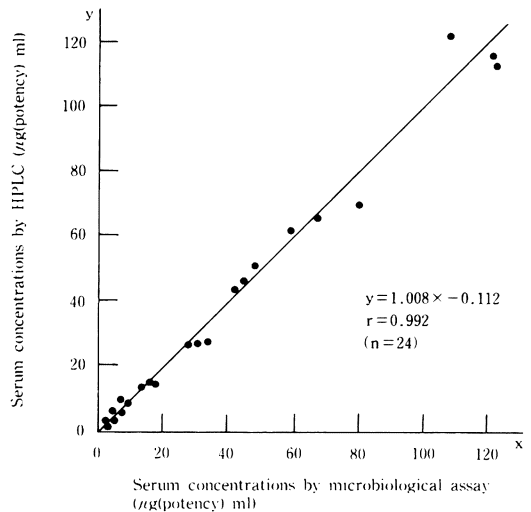
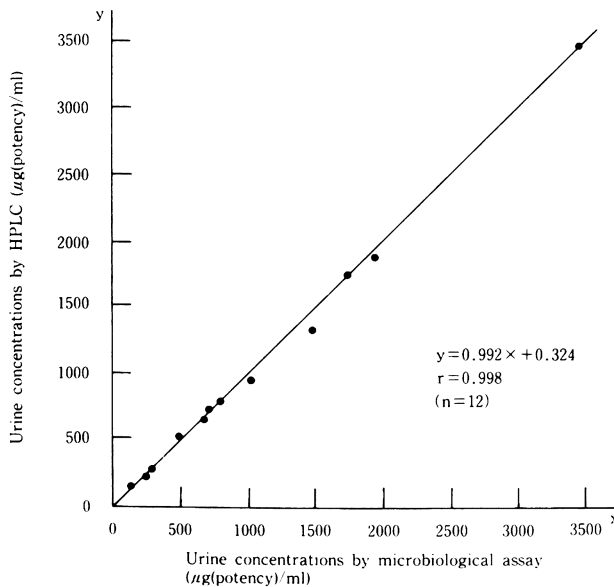


Fig. 12 Comparison of carumonam concentrations in urine samples measured by microbiological assay and HPLC





SBM 培地 (自家調製) と同一であるが、両培地の肉エキスおよび寒天の品質は必ずしも同一ではないと考えられる。また自家調製培地は施設間はもとより、同一施設でも調製時期により一定品質を保持するのは困難である。CRMN の濃度測定において両培地はほとんど同一の性能であったが、一定品質のものが得られ、かつ調製が容易な「ダイゴ」No. 4 培地の方が多施設間における測定値の変動を少なくするのに有用であろう。

薄層クロマトグラフィーにおいて、溶媒系(b)は山中らの報告<sup>9)</sup>を参考にしたが、構成成分の酢酸をギ酸に変更し、乾燥不十分による指示菌の増殖抑制を避けるようにした。溶媒系(a)と(b)との比較においては、スポットの広がり少ない系(a)がより好適と考えられる。

(研究期間: 昭. 57. 6. 11~60. 6. 17)

#### 文 献

- 1) KISHIMOTO, S.; M. SENDAI, S. HASHIGUCHI, M. TOMIMOTO, Y. SATOH, T. MATSUO, M. KONDO & M. OCHIAI: Synthesis of sulfazecin-type 2-azetidinones with a carbon substituent at the 4-position. *J. Antibiotics* 36 : 1421~1424, 1983
- 2) 近藤正熙, 西 武, 中尾雅文, 深沢一郎, 野路弓子,

- 今田 哲: 新規単環性 N-sulfo- $\beta$ -lactam 抗生物質, Carumonam の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用. *Chemotherapy* 35(S-2):104~145, 1987
- 3) 小此木研二, 久野光造: Carumonam の  $\beta$ -lactamase に対する安定性および  $\beta$ -lactamase 産生菌に対する抗菌力. *Chemotherapy* 35(S-2):163~171, 1987
- 4) 薬業時報社編: 日本抗生物質医薬品基準解説 (改訂新版)。171~416頁, 1978
- 5) 畚野 剛, 前田憲一, 逸見昭二: *Proteus rettgeri* ATCC 9250 を試験菌とする aminothiazolyl cephalosporin の高感度測定法. *Chemotherapy* 32 : 109~110, 1984
- 6) BENNET, J.N.; J.L. BRODIE, E.J. BEMER & W.M. M. KIRBY: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl. Microbiol.* 14 : 170~177, 1966
- 7) 畚野 剛, 前田憲一: Cefmenoxime (SCE-1365) の体液内濃度測定法. *Chemotherapy* 29 (S-1): 194~199, 1981
- 8) PILKIEWICZ, F.C.; B.L. REMSBURG, S.M. FISHER & R.B. SYKES: High-performance liquid chromatographic analysis of aztreonam in sera and urine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23 : 852~856, 1983
- 9) 山中康光, 河野静子, 建石英樹, 荒谷春恵: Cephalirin に関する薬理学的研究第 2 報体内分布, 運命, 排泄. *Chemotherapy* 22 : 1208~1217, 1983

## ASSAY METHODS FOR CARUMONAM IN BIOLOGICAL SPECIMENS

TAKESHI FUGONO and KENICHI MAEDA

Central Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka

Assay methods for pharmacokinetic studies of carumonam and its metabolites were developed. For microbiological determination of carumonam, an agar-well method, using *Escherichia coli* NIHJ as the test organism and antibiotic medium No. 4 (DAIGO) as the test medium, was established. The sensitivity of the method for carumonam was about 0.1  $\mu$ g (potency)/ml. A method with higher sensitivity was also elaborated by using *Providencia rettgeri* ATCC 9250 and DST agar supplemented with 0.15% bile salts and 0.2 mg% crystal violet; the sensitivity of this method was about 0.02  $\mu$ g (potency)/ml. A bioautographic method using the same *Providencia* strain, was devised for detection of antibacterially active metabolites.

Carumonam and its open  $\beta$ -lactam ring hydrolysis product, Related Compound I, was quantitatively determined by an HPLC method on a Nucleosil 5C<sub>18</sub> column using 0.005M tetrabutylammonium hydrogen sulfate (pH 3.0)-acetonitrile (85 : 15 v/v) as a mobile phase.