

## 新規エステル型経口セフェム剤, CS-807のBioassay法による 体内濃度測定法に関する検討

久岡正史・市川正人・小島敏昌

三共株式会社・第一生産技術研究所

新規エステル型経口セフェム剤, CS-807のBioassay法による体内濃度測定法について検討を行った。

CS-807は, 経口投与された後抗菌活性を示す脱エステル体R-3763として生体内に存在することから, 本剤の体内濃度はR-3763として測定する。

R-3763の血清, 尿および胆汁中濃度は, 通常 *M. morgani* IFO 3848を検定菌とし自家調製培地(ペプトン5g, 肉エキス3g, 酵母エキス2g, カンテン15g, 蒸留水1l, pH6.8)を用いた寒天平板拡散法で測定でき, 測定感度はカップ法, ディスク法ともに約0.078 $\mu$ g/mlであった。さらに低濃度のR-3763測定には, 検定菌 *P. rettgeri* IFO 3850, 自家調製培地を用いることにより約0.019 $\mu$ g/mlまでの測定が可能であった。また, 検定菌として *E. coli* NIHJ, Nutrient agar培地を用いるBioassay法では鮮明度の高い阻止円が得られ, 0.156 $\mu$ g/ml以上の比較的高濃度の生体試料測定に適している。

これら3種のBioassay法で測定した値は, それぞれ良く相関するものであり, HPLC法で測定した値とも良く一致した。

R-3763は, 血清および尿中で安定であり, -20°Cの凍結保存では少なくとも28日間は活性が安定保持された。

CS-807は, 三共㈱で開発されたエステル型経口セフェム剤で, グラム陽性菌およびグラム陰性菌に幅広い抗菌作用を有する薬剤である<sup>1)</sup>。本剤は, 経口投与された後, 消化管から循環血へと吸収される過程において酵素的に加水分解され, 抗菌活性を有する脱エステル体R-3763に変換して体内に移行する<sup>2)</sup>(Fig. 1)。

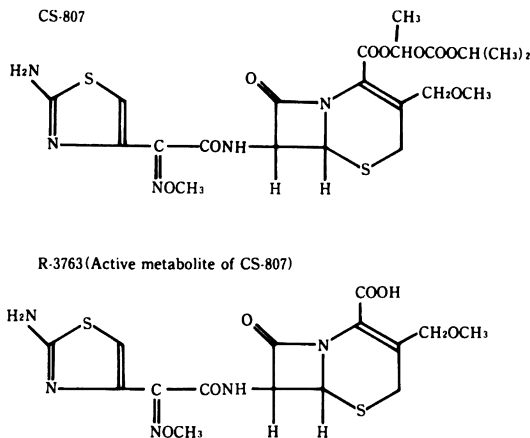
R-3763の体内濃度は, HPLC法でも測定可能で, その定量感度は約0.1 $\mu$ g/mlである<sup>3)</sup>。今回, 著者らは, Bioassay法による活性体の体内濃度測定法を検討し, 高感度の測定法を確立するとともにR-3763の体液中の安定性についても検討を加えたので, その成績を報告する。

### I. 実験材料および方法

#### 1. 使用薬剤

R-3763 (# POA-39-3 ②, 1000 $\mu$ g(力価)/mg) およびR-3746 (R-3763のNa塩, # 9, 952 $\mu$ g(力価)/

Fig. 1 Chemical structure



mg) は、当社研究所で合成された分析用標準品を使用した。

## 2. 検定菌

当研究所で保存中の *Morganella morganii* IFO 3848, *Providencia rettgeri* IFO 3850, *Escherichia coli* NIHJ, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 および *Proteus vulgaris* 1420 を使用した。 *M. morganii* IFO 3848 および *P. rettgeri* IFO 3850 は自家調製培地で、 *E. coli* NIHJ は Nutrient agar (Difco) で、 *M. luteus* ATCC 9341 は Heart infusion agar (栄研) で、 *P. vulgaris* 1420 は Trypticase soy agar (BBL) で 37°C、一夜斜面培養し、その菌を蒸留水 10 ml に懸濁して約  $10^8$  cells/ml の検定菌液を調製した。 *B. subtilis* ATCC 6633 は、日抗基・一般試験法・力価試験法<sup>4)</sup> に準じて孢子液を得、約  $10^7$  cells/ml の検定菌液を調製した。

## 3. 測定用培地

市販培地である Nutrient agar (NA, Difco), Heart infusion agar (HIA, 栄研), Mueller Hinton agar (MHA, BBL) Trypticase soy agar (TSA, BBL), Antibiotic medium 1 (AM-1, Difco), および自家調製培地 (HPM と略す、ペプトン 5 g, 肉エキス 3 g, 酵母エキス 2 g, カンテン 15 g, 蒸留水 1 l, pH 6.8) を使用した。

## 4. 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。ディスク法では、直径 90 mm のプラスチックシャーレに検定菌を接種した測定用培地 4 ml または 8 ml を分注し、水平固化させて薄層寒天平板を作製した。この平板上に、試料液または標準液を浸み込ませた直径 6 mm のペーパーディスク (東洋製作所) を貼り付け、37°C、18~24 時間培養を行った。二層カップ法では、基層として菌無添加の培地 8 ml または 20 ml をプラスチックシャーレに分注水平固化させたのち、この上に菌添加の種層培地 4 ml を分注し水平固化して二層平板を作製した。この平板上に外径 8 mm、内径 6 mm、高さ 10 mm のステンレス円筒 4 個をのせ、相対する円筒にそれぞれ試料液および標準液を満たして 37°C、18~24 時間培養を行った。

## 5. 標準溶液の調製

R-3763 またはその Na 塩である R-3746 の 20 mg・力価を正確に秤量し、R-3763 の場合には 3% NaHCO<sub>3</sub> 1 ml で溶解後直ちに 1% リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) を加えて 20 ml にメスアップし、R-3746 の場合には同緩衝液に直接溶解、メスアップして 1 mg (力価) / ml の標準溶液を調製した。血清および胆汁中の R-3763 濃度測定には、

薬剤を含有していない control 血清および胆汁を用いて標準液系列を調製し、標準曲線法により定量を行った。また、尿およびその他の体液中濃度測定には 1% リン酸塩緩衝液で調製した標準液系列を用い、同様の方法で定量を行った。

## 6. 各測定法による測定値の相関性

CS-807 200 mg・力価を健康成人に投与して得られた血清および尿試料を任意に選出し、同一検体について *M. morganii* IFO 3848 および *P. rettgeri* IFO 3850 を検定菌とする Bioassay 法で定量を行い、それぞれの測定値間の相関性を最小二乗法を用いた直線回帰により検討した。また、同様にして *M. morganii* IFO 3848 による測定値と *E. coli* NIHJ による値および HPLC 法<sup>5)</sup> による値についてもそれぞれの相関性を検討した。

## 7. R-3763 の血清および尿中での安定性

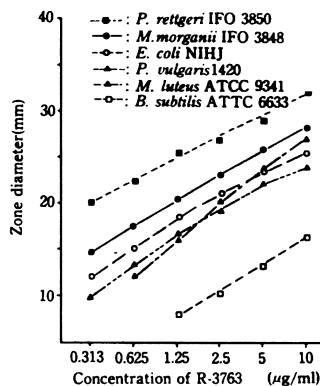
健康人の新鮮 control 血清および尿に R-3763 を添加し、その濃度が血清では 4 μg/ml、尿では 100 μg/ml となるように調製した。この溶液を 25°C、5°C および -20°C の温度下で保存し、R-3763 の残存活性を 28 日間経時的に測定した。

## II. 結 果

### 1. 検定菌の選定

R-3763 に比較的感受性の高い 5 菌株と Bioassay に汎用される *B. subtilis* ATCC 6633 について、阻止円の鮮明度および測定感度を調べるため NA を測定培地とした二層カップ法 (基層 20 ml, 種層 4 ml) により標準

Fig. 2 Standard curves of R-3763 on various tests organisms by cylinder-plate method



曲線作成の検討を行った (Fig. 2)。

阻止円の鮮明度は *E. coli* NIHJ が最も良く、*B. subtilis* ATCC 6633, *M. morganii* IFO 3848, *P. vulgaris* 1420 等も良好であったが、*P. rettgeri* IFO 3850 および *M. luteus* ATCC 9341 の本条件下における

阻止円は不鮮明であった。測定感度の点では、*P. rettgeri* IFO 3850が最も良く、次いで *M. morgani* IFO 3848, *E. coli* NIHJ, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* 1420の順であった。体液内濃度測定では、Bioassayの阻止円の鮮明さと共に高感度であることが要求されることから、これらの点を考慮した上で検定菌として *M. morgani* IFO 3848, *P. rettgeri* IFO 3850および *E. coli* NIHJの3菌株を選定して以後の検討を進めた。

## 2. 測定条件の検討

### 1) 測定培地の選択

市販培地を中心に、自家調製培地 HPM も含めて6種類の寒天培地を用い、前記選定3菌株の阻止円形成の状態および標準曲線の検討を二層カップ法(基層20ml, 種層4ml)で行った(Fig. 3)。

*M. morgani* IFO 3848(Fig.3-a)では、HPM, NA, AM-1の培地で鮮明な阻止円が得られ、特に HPM 使用時には阻止円形成の良好さと共に測定感度、標準曲線についても良好な結果が得られた。

*P. rettgeri* IFO 3850(Fig.3-b)では、いずれの市販培地を用いても阻止円は鮮明でなかったが、HPMを使用した場合には測定に十分な鮮明さをもつ阻止円の形成が見られた。本検定菌により高感度 Bioassay 法が開発できるものと考えられた。

*E. coli* NIHJ(Fig. 3-c)では、NA, HIA, MHAの培地で鮮明な阻止円が得られた。しかし、NA使用時の標準曲線の傾斜が最も大きく、定量精度の点で優れ

ていることが認められ、本培地を用いることとした。

### 2) 培地量の検討

寒天平板拡散法では、平板の厚さによっては二重阻止円や鮮明さに欠ける阻止円が形成されることもある。そこで、直径90mmのシャーレに分注する培地量を変えて標準曲線を作成し、平板の厚さが阻止円形成に及ぼす影響について検討した。*E. coli* NIHJを検定菌とした検討結果を Fig. 4 に示した。二層カップ法では基層20ml, 種層4mlに対し、基層8ml, 種層4mlの場合の比較を行い、薄層ディスク法では8mlと4mlでの比較を行った。いずれの培地量でも二重阻止円の形成はなく鮮明な阻止円が得られた。また、培地量が少ない程、すなわち平板が薄くなる程阻止円径は大きく測定感度の上昇することが認められた。同様の傾向は *M. morgani* IFO 3848および *P. rettgeri* IFO 3850の場合にも認められている。

### 3) 接種菌量の影響

測定用培地に添加する検定菌量が阻止円形成に及ぼす影響について、3種の検定菌を用いて二層カップ法(基層20ml, 種層4ml)で検討を行った(Fig. 5)。

いずれの検定菌でも接種量が少なくなるにしたがって阻止円径は大きくなり、定量感度も増大した。しかし、最終菌量が $10^8$  cells/ml以下では菌の生育が平板上まばらとなり、阻止円は測定しにくくなった。すなわち、種層の菌量が約 $10^8$  cells/mlとなるように調整すれば鮮明度が高く、しかも径の大きな阻止円の得られることが確認された。

Fig. 3 Standard curves of R-3763 with various media by cylinder-plate method

Medium —●—: NA, —○—: HIA, —▲—: MHA, —△—: TSA, —■—: AM-1, —□—: HPM

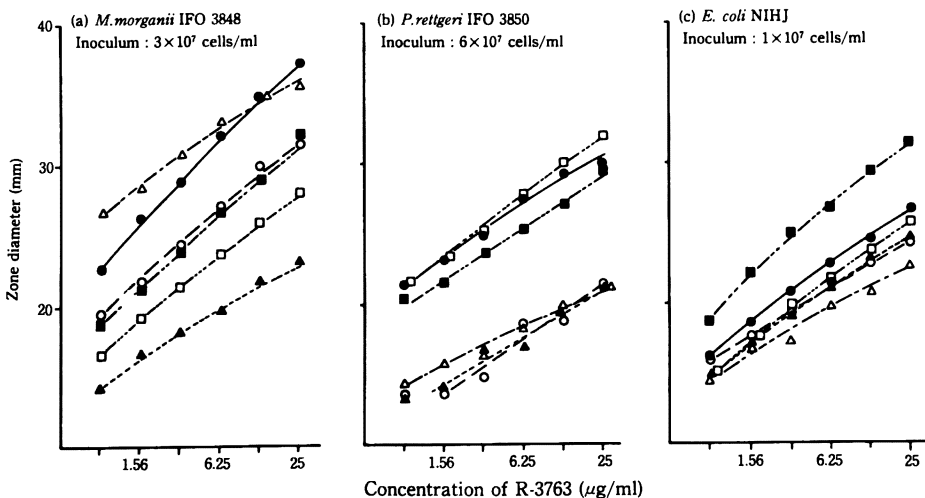


Fig. 4 Influence of amount of medium on standard curves of R-3763

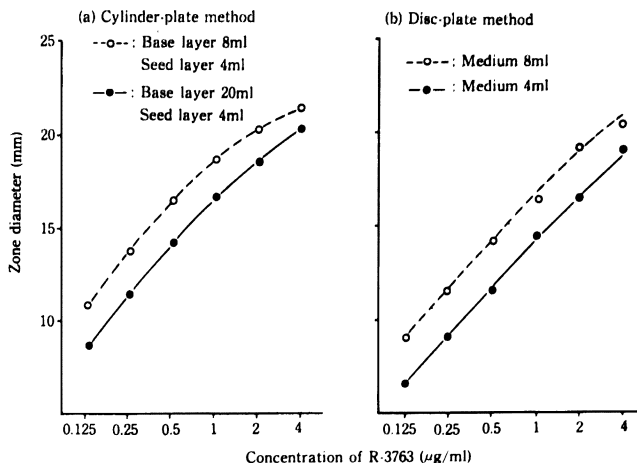
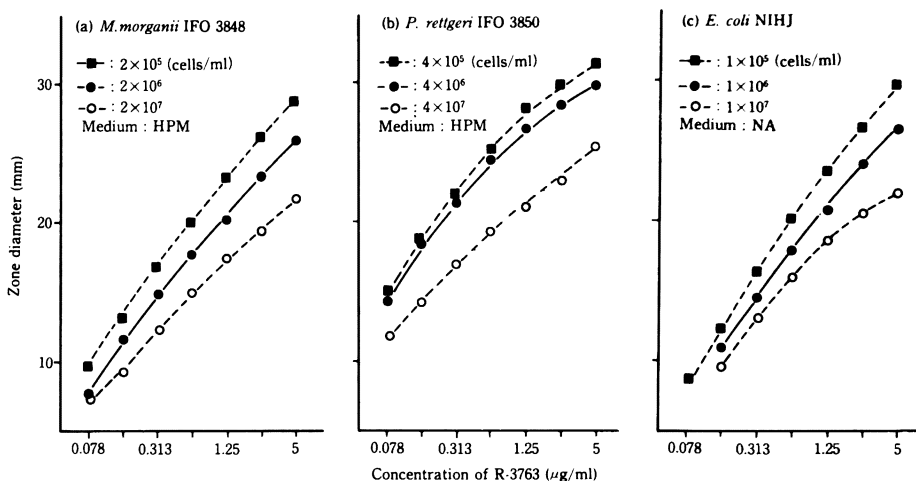
Test organism : *E. coli* NIHJ, Medium : NA, Inoculum :  $1 \times 10^7$  cells/ml

Fig. 5 Influence of inoculum size on standard curves of R-3763 by cylinder-plate method



#### 4) 試料希釈液の pH の影響

検定菌として *M. morgani* IFO 3848 および *E. coli* NIHJ を用い、pH 5~8 の 0.1M リン酸塩緩衝液で希釈した R-3763 溶液による標準曲線を Fig. 6 に示した。なお、検討は二層カップ法 (基層 20ml, 種層 4ml) で行った。いずれの検定菌でも、pH の違いによる阻止円径の大きさに変化はなく、標準曲線に及ぼす試料液 pH の影響はほとんどないものと考えられる。

#### 3. 血清の影響

抗生物質の血清蛋白結合性が阻止円径に及ぼす影響も考えられることから、新鮮ヒト血清および精度管理用血清

(Consera, Moni-Trol I, Versatol) が R-3763 の標準曲線に及ぼす影響について検討を行った。検定菌には *M. morgani* IFO 3848 を用い二層カップ法 (基層 20ml, 種層 4ml) により検討した。

Fig. 7 に、新鮮ヒト血清の影響を示したが、R-3763 が高濃度になる程血清と緩衝液の標準曲線は離れる傾向にあり、阻止円は血清の影響を受けて小さくなるのが認められた。すなわち、R-3763 の血清中濃度測定にはヒト血清で調製した標準液が望ましいと考えられるが、精度管理用血清を代用できれば便宜であることよりその標準曲線に及ぼす影響について検討した (Fig. 8)。

Fig. 6 Influence of buffer pH on standard curves of R-3763 by cylinder-plate method

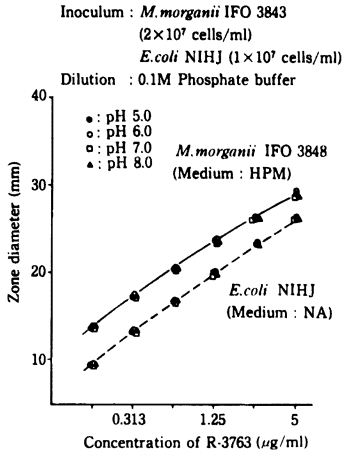


Fig. 7 Influence of human serum on standard curves of R-3763 by cylinder-plate method

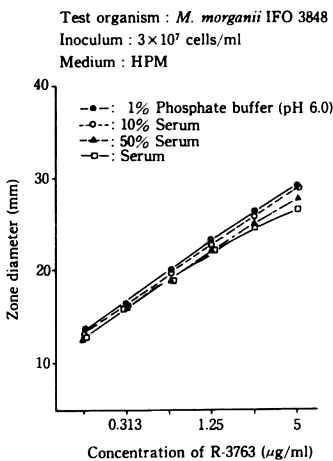


Fig. 8 Influence of human serum on standard curves of R-3763 by cylinder-plate method

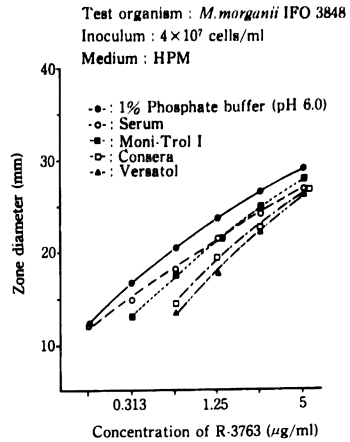
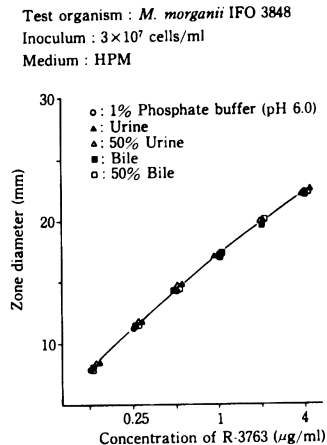


Fig. 9 Influence of human urine and bile on standard curves of R-3763 by disc-plate method



Moni-Trol Iでは新鮮血清よりも阻止円径が大きくなり、ConseraまたはVersatolでは逆に小さくなった。すなわち、検討で用いたいずれの代用血清も適切でなく、血清中R-3763濃度測定にはヒト血清で調製した標準液を用いて測定することとした。

4. 尿および胆汁の影響

ヒト尿および胆汁の原液または5倍希釈液が標準曲線に及ぼす影響について、検討結果をFig.9に示した。検討は*M.morganii* IFO 3848による薄層ディスク法(培地8ml)で行ったものである。尿、胆汁の原液および5倍希釈液で作成した標準曲線は緩衝液の標準曲線と

一致し、これら体液成分が阻止円径に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。また、実際の尿検体は希釈倍率が50倍以上と高いことから、緩衝液で調製した標準液を用いて尿中R-3763の定量を行う。本結果では阻止円に及ぼす胆汁の影響も認められないが胆汁検体は希釈率も低い(原液または2倍希釈液)ことから、原則的にはcontrol胆汁で調製した標準液を用いて定量を行うこととする。

5. 各測定法による測定値の相関性

ヒトにCS-807 200mg・力価を経口投与したときの血清および尿検体について、それぞれの検定菌による二層

カップ法 (基層20ml, 種層4ml)での測定を行い, 測定値間の相関性を検討した (Fig.10)。

いずれの検討結果でも, 最小二乗法で求めた回帰直線の勾配は0.911~1.018を示しており, 相関係数  $r = 0.983 \sim 0.997$  ( $P < 0.01$ )と良好な相関性が得られた。

Bioassay法とHPLC法との相関性を検討するために, *M. morganii* IFO 3848でのBioassayの測定値に対してHPLC法の測定値を比較すると, 血清検体 ( $n = 45$ )では回帰直線式  $Y = 0.982X - 0.026$ が得られ, その時の相関係数は  $r = 0.996$  ( $P < 0.01$ )であった。また, 尿検体 ( $n = 35$ )についても回帰直線式は  $Y = 1.054X + 0.172$ で  $r = 0.996$  ( $P < 0.01$ )となり, 血清, 尿いずれの検体でもBioassay法とHPLC法には良好な相関が認められた。

#### 6. R-3763の体液中での安定性

R-3763を新鮮ヒト血清およびpH6.0に調整した尿に溶解し,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ および $25^{\circ}\text{C}$ の保存温度における安定性を経時的に測定した (Table 1)。 $25^{\circ}\text{C}$ の保存

では, いずれの体液中でもR-3763の安定性は悪く, 特に血清中では不安定で7日後の残存活性はほとんど認められなかった。尿中R-3763は, 7日後の残存活性が92%に減少し, 1%リン酸塩緩衝液中の場合とほぼ類似した動態を示した。保存温度が $5^{\circ}\text{C}$ および $-20^{\circ}\text{C}$ と低くなる程R-3763の安定性は増大し,  $5^{\circ}\text{C}$ 保存血清中のR-3763の残存活性は28日後でも95%と比較的安定であることが認められた。尿中R-3763は, 28日後でもほとんど分解されてない。 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した場合, 血清, 尿および緩衝液中R-3763は安定であり, 28日間の保存期間中でほとんど分解されないことが認められた。

以上の結果より, 生体試料は $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し, なるべく速やかに測定することとした。

### III. 考 察

R-3763のBioassay法の条件を要約してTable 2に示した。また, 本条件を用いて血清および緩衝液の標準液系列を処理し, 得られた標準曲線をFig.11に示した。

Fig. 10 Correlation between R-3763 concentrations obtained from various bioassays by cylinder-plate method

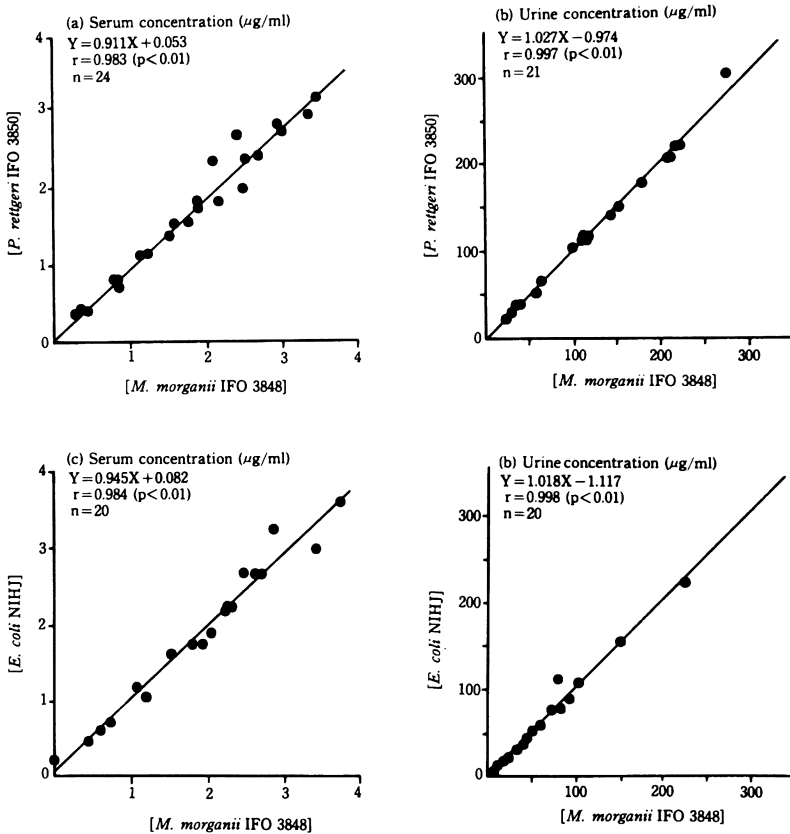


Table 1 Stability of R-3763 in human serum and urine

Solution	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Remaining activity (%)						
			0	1	3	7	14	21	28days
Phosphate buffer (pH 6.0)	1000	25	100	101	98	95	—	—	—
		5	100	99	98	99	99	97	98
		-20	100	98	100	100	99	100	98
Serum (pH 7.2)	4	25	100	88	71	N.D.	—	—	—
		5	100	93	91	93	93	90	82
		-20	100	98	99	100	101	100	101
Urine (pH 6.0)	100	25	100	101	97	92	—	—	—
		5	100	99	99	100	101	101	100
		-20	100	99	100	101	99	100	100

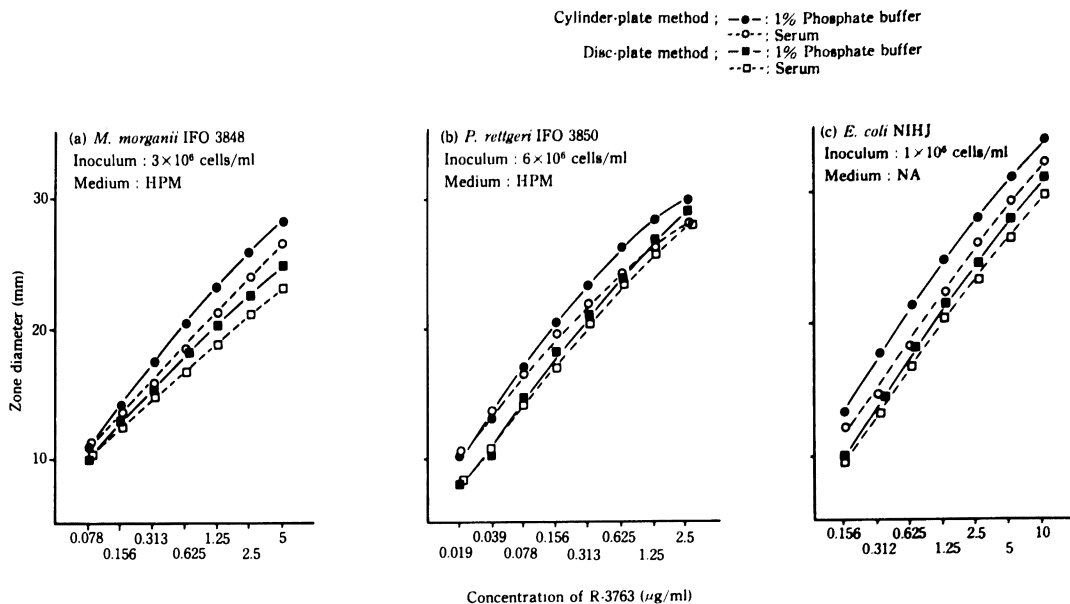
N.D. : not detected

Table 2 Standardization of bioassay for R-3763 in biological fluids

Test organism	<i>M. organii</i> IFO 3848	<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	<i>E. coli</i> NIHJ
Inoculum size	$3 \times 10^6$ cells/ml	$6 \times 10^6$ cells/ml	$1 \times 10^7$ cells/ml
Assay range	0.078 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$	0.019 ~ 2.5 $\mu\text{g/ml}$	0.156 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$
Medium	Prepared medium* (pH 6.8)	Prepared medium* (pH 6.8)	Nutrient agar (pH 6.8)
Method	Cylinder-plate method Base layer : 8 ml Seed layer : 4 ml Disc-plate method Seed layer : 4 ml		
Standard solution	Serum : Serum Bile : Bile Other fluids : 1 % Phosphate buffer		
Incubation	37 $^{\circ}\text{C}$ , 18 ~ 24 hours		
Minimum detectable concentration	0.078 $\mu\text{g/ml}$	0.019 $\mu\text{g/ml}$	0.156 $\mu\text{g/ml}$

\* Pepton 5 g, Yeast extract 2 g, Beef extract 3 g, Agar 15 g, added adequate H<sub>2</sub>O up to total volume 1000 ml.

Fig. 11 Standard curves of R-3763 under standardized assay conditions



いずれの Bioassay 法でも良好な標準曲線が得られているが、定量感度が異なることを考慮して検体に応じた適切な測定方法を選択することとした。すなわち、CS-807 100~200mg (力価) をヒトに経口投与した場合の血清、尿および胆汁中濃度測定には、 $0.1\mu\text{g/ml}$  の定量感度があれば充分と考えられるため *M. morgani* IFO 3848 を検定菌として用いる。さらに低濃度の R-3763 を含有する生体試料については、より感受性の高い *P. rettgeri* IFO 3850 を検定菌として用いることとした。この方法では、R-3763  $0.019\mu\text{g/ml}$  濃度までの定量が可能となるが、阻止円の鮮明度は *M. morgani* IFO 3848 に比較して多少劣る。また、R-3763 濃度が  $0.156\mu\text{g/ml}$  以上の比較的高濃度の試料については、*E. coli* NIHJ を検定菌としてより広い濃度範囲の測定を行うこととした。なお、この条件で得られる阻止円は、鮮明度の優れたものである。

血清試料の希釈液として Moni-Trol I, Consera または Versatol などの管理用血清が代用できれば便宜なことから検討を行ったが (Fig. 8), いずれの代用血清を用いた場合でも標準曲線は血清と異なったため使用できなかった。また、これら代用血清のうち標準曲線が最も血清に近かった Moni-Trol I でも、製造ロットによって得られた標準曲線は異なることから、Bioassay 用の希釈液として使用する際には十分な注意が必要である。

今回確立した Bioassay 法と HPLC 法の相関をみる

ために、血清および尿検体の同一試料をそれぞれの方法で測定したところ、両測定値が良く一致することを認めている。したがって、CS-807 を投与したヒトの生体試料中には、Bioassay の障害となるような生体成分または代謝産物等はほとんど存在しないものと考えられる。

以上、体液内 R-3763 濃度測定法として *M. morgani* IFO 3848 を検定菌とした Bioassay 法を確立し、さらに低濃度、高濃度の検体測定には、*P. rettgeri* IFO 3850 または *E. coli* NIHJ を検定菌として、良好な測定感度および精度を示す方法を確立した。

#### 文 献

- 1) SUGAWARA, S.: M. IWATA, M. TAJIMA, T. MAGARIBUCHI, H. YANAGISAWA, H. NAKAO, J. KUMAZAWA & S. KUWAHARA. CS-807, a New Orally Active Cephalosporin. I. *In vitro* and *in vivo* Antibacterial Activities. 26th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1986.
- 2) 第35回日本化学療法学会総会 新薬シンポジウム。CS-807, 盛岡, 1987
- 3) 関根 実, 笹原邦宏, 市川正人: 高速液体クロマトグラフィーによる CS-807 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 36(S-1): 194~199, 1988
- 4) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法。p. 680~691, 1986



## MICROBIOLOGICAL ASSAY FOR DETERMINING THE CS-807 CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

MASAFUMI HISAOKA, MASATO ICHIKAWA and TOSHIMASA KOJIMA

Product Development Laboratories, Sankyo Co. Ltd., Tokyo

Microbiological assay methods were investigated for quantitative determination of CS-807 in body fluids. CS-807 is almost completely metabolized to the active metabolite R-3763 during absorption through the gastrointestinal wall after p.o. administration. CS-807 concentration was determined as the concentration of R-3763.

R-3763 in body fluids was assayed by agar-diffusion microbiological assay using *M. morgani* IFO 3848, *P. rettgeri* IFO 3850 and *E. coli* NIHJ as test organisms. Minimal detectable concentrations for these bioassays were 0.078 $\mu$ g/ml, 0.019 $\mu$ g/ml and 0.156 $\mu$ g/ml, respectively. The inhibition zones of *M. morgani* IFO 3848 and *E. coli* NIHJ were more defined than those of *P. rettgeri* IFO 3850. The assay sensitivity was, however, very high in the case of *P. rettgeri* IFO 3850.

Standard solutions prepared with human serum, bile and 1% phosphate buffer (pH6.0) were used for the assay of serum, bile and urine samples. R-3763 in serum and urine was sufficiently stable and no reduction in activity was observed after 4 weeks' storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .