

生体試料中のCefotiam hexetil 関連化合物の微生物学的定量法

畚野剛・前田憲一

武田薬品工業株式会社技術管理本部試験分析センター*

Cefotiam hexetilの活性体である cefotiam (CTM) の生体試料中濃度測定法 (標準法) として, *Proteus mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とし, DST 寒天 (pH 8.0) を測定培地とする Agar well 法を設定した。本法の測定下限濃度は 0.1 Mリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 及びヒト血清中で, 共に CTM として約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

低濃度または微量試料に適した方法 (高感度法) として検討した *Providencia rettgeri* ATCC 9250 及び MacConkey 寒天 (pH 8.0) を用いる Agar well 法 (または Paper disc 法) は測定下限がCTMとして約 0.03 (または約 0.1) $\mu\text{g/ml}$ であった。

活性代謝物検索のため *Providencia rettgeri* ATCC 9250 を用いるバイオオートグラフ法を設定し, cefotiam hexetil を経口投与したヒトの血漿及び尿を分析した結果 CTM 及び微量の活性代謝物 (SCE-1006 及びSCE-1136) を検出した。

Key words : Cefotiam hexetil, 微生物学的定量法, 生体試料, Agar well 法, バイオオートグラフ法

Cefotiam hexetil は cefotiam (CTM) の prodrug であって¹⁾, 経口投与により消化管より吸収されたのち, 活性体である CTM となり血中に移行する²⁾。CTM の微生物学的定量法については, *Proteus mirabilis* ATCC 21100 を試験菌とし DST (pH 8.0) を測定培地とする薄層カップ法の設定経過を既に報告した³⁾。今回はそれを Agar well 法に改変しさらに *Providencia rettgeri* ATCC 9250 を用いる高感度法及びバイオオートグラフ法について検討し cefotiam hexetil の経口投与試験における生体内動態研究に適用することが可能となった。

実験材料と方法

1. 薬剤 : Cefotiam hexetil 及び関連化合物 (Fig. 1) は当社中央研究所で合成したものをを用いた。
2. 試験菌株 : 当研究室で保存中の *Proteus mirabilis* ATCC 21100 (IFO 13300) 及び *Providencia rettgeri* ATCC 9250 (IFO 13501) をを用いた。
3. 微生物学的定量法³⁾ :
 - 1) 測定用培地 : Diagnostic sensitivity test

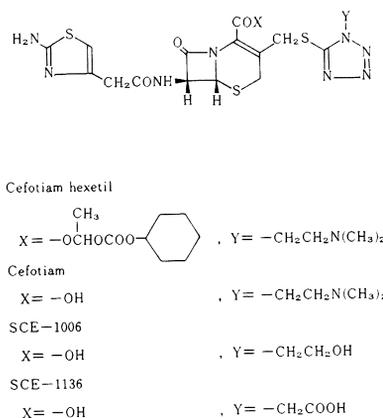


Fig. 1 Chemical structures of cefotiam hexetil and related compounds

(DST) 寒天培地 (Oxoid), Bile violet DST 培地 (DST に胆汁酸塩を 0.15%, クリスタルバイオレットを 0.2 mg% 添加したもの)⁴⁾ 及び MacConkey 寒天培地 (MCA, 栄研) をそれぞれ滅菌前に pH を 8.0 に調整して用いた。

2) 菌液 : 寒天斜面培地上で 37°C, 一夜培養した新鮮な菌叢を滅菌水に懸濁し, 光電比色計 (日立 EPO-B 型) により吸光度が 0.8 になるように調整

* 〒532 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 17-85

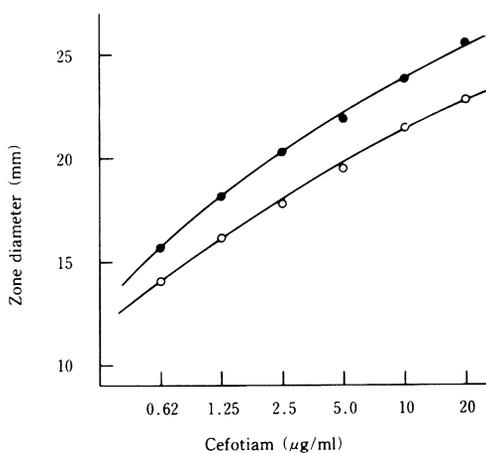


Fig. 2 Standard curves for assay of cefotiam using *Proteus mirabilis* ATCC21100 as the test organism

Medium : DST (pH 8.0)

Vehicle : ●—● Agar well

○—○ Cylinder

した。

3) 標準液 : CTM 標準品を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で溶解して 1,000 μg (力価)/ml としたものを原液とし, さらに同緩衝液または血清(血漿)で希釈して標準希釈系列を調製した。

4) 薄層カップ法 : 含菌寒天平板上にステンレスカップを立て標準希釈液及び検液を注入後 34°C, 一夜培養した。阻止円の直径を測定し, CTM 濃度の対数と平均阻止円直径との関係を 2 次回帰⁵⁾し, この曲線(標準曲線)により検液中の CTM 濃度を算出した。

5) Agar well 法 : 薄層カップ法と同様にして調製した含菌寒天平板に直径 8 mm のノズルを用いて穿孔し, 各孔に標準希釈液および検液を 50 μl ずつ注入した。以下の操作は前項に準じて行った。

6) Paper disc 法 : ステンレスカップを用いるかわりに, 直径 6 mm の Paper disc (Whatmann) に検液各 20 μl をスポットしたものを含菌寒天平板上に貼付した。その他の操作は薄層カップ法と同様に行った。

4. 薄層クロマトグラフィーバイオオートグラフ法³⁾ : 担体に Spotfilm silica gel f (東京化成) を用い, 溶媒系としてアセトン-酢酸-水-アンモニア水 (20 : 8 : 5 : 1) を用いて薄層クロマトグラフィー

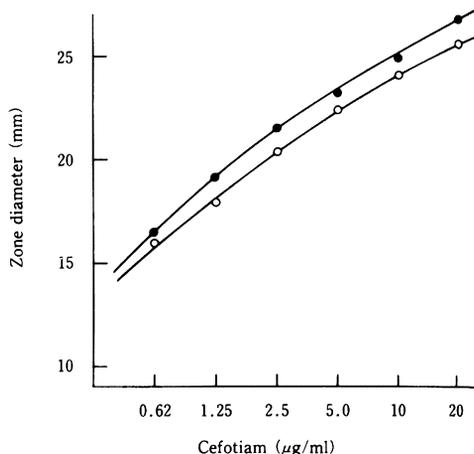


Fig. 3 Effect of diluent on standard curves for assay of cefotiam by agar well method

Test organism : *P. mirabilis* ATCC 21100

Medium : DST (pH 8.0)

Diluent : ●—● 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)

○—○ control serum (Consera, Nissui)

を行った。バイオオートグラフ法の試験菌は *P. rettgeri* ATCC 9250 を用い, 培地は MCA (pH 8.0) を用いた。

実験結果

1. 微生物学的定量法

1) 標準法 : *P. mirabilis* ATCC 21100 株を試験菌とする薄層カップ法と Agar well 法の標準曲線は Fig. 2 のようになり, 各濃度における阻止円直径は Agar well 法の方が 1.5~2.5 mm 大きかった。また阻止円周縁の鮮明度については両者に差はなかった。

Agar well 法において希釈液の影響を検討した結果を Fig. 3 に示す。緩衝液希釈と比較して血清希釈において阻止円の直径は 0.3~1.1 mm 小さくなったが, 両者の測定下限濃度はほぼ同等で CTM として約 0.1 μg/ml であった。また血清希釈と血漿希釈との間で阻止円直径および測定下限濃度に差は認められなかった。

2) 高感度法 : 低濃度または微量の生体試料について測定を行うため, *P. rettgeri* ATCC 9250 株を試験菌とする高感度法⁴⁾を設定した。本菌を用いた Agar well 法と Paper disc 法の標準曲線は Fig. 4 のとおりで, その測定下限濃度はそれぞれ約 0.03

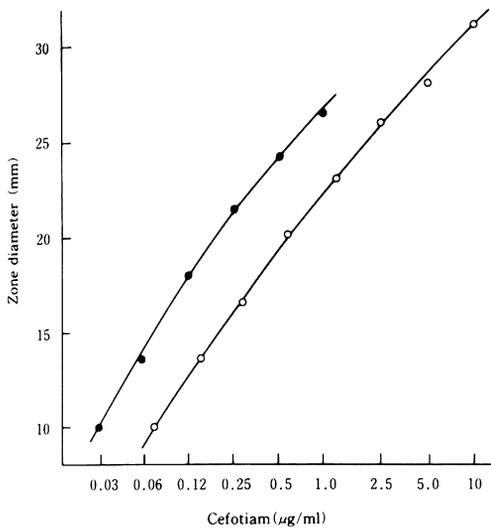


Fig. 4 Standard curves for assay of cefotiam using *Providencia rettgeri* ATCC9250 as the test organism

Medium : MCA (pH 8.0)

Vehicle : ●—● Agar well

○—○ Paper disc

μg/ml, 約 0.1 μg/ml であった。なお測定培地として MCA のかわりに Bile violet DST (pH 8.0) を用いた場合もほぼ同等の成績であった。標準法および高感度法の測定条件を Table 1 にまとめて示した。

2. バイオオートグラフ法：活性代謝物検索のため CTM とその関連化合物の分離検出が可能な条件を検討した。薄層クロマトグラフ法は既報の系³⁾を用い、バイオオートグラフ法の試験菌と培地は前項の高感度法と同じものとした。本系における標品の Rf 値は CTM, SCE-1136, SCE-1106 が、それぞれ 0.38, 0.62, 0.72 であった。また測定下限量は、それぞれ 1.2, 0.6, 0.6 ng であった。生体試料を CTM として 200 ng をスポットした場合 SCE-1136 または SCE-1006 は CTM の約 1/300 存在すれば検出可能と考えられる。

Cefotiam hexetil, 200 mg 力価錠をヒトに経口投与した後、採取した尿についてのバイオオートグラムを Fig. 5 に例示する。CTM による大きい阻止帯の他に、SCE-1136 及び SCE-1006 標品の Rf に相当する位置に、測定下限に近い小さい阻止帯が認められた。同時に採取した血漿についてのバイオオートグラムにおいても、CTM の他にごく微弱な SCE-1136 及び SCE-1006 と思われる阻止帯が検出された。

考 案

二次元拡散法による生体試料中の抗生物質の定量において我が国では宮村ら⁶⁾によって始められた薄層カップ法が汎用されて来た。一方 Agar well 法については Bennet ら⁵⁾の報告が一つの典型と考えら

Table 1 Microbiological assay for cefotiam (a summary of assay conditions)

Method	Ordinary Agar well	Sensitive Agar well (Paper disc)
Test organism	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC21100	<i>Providencia rettgeri</i> ATCC9250
Inoculum	cell suspension (OD=0.8), 0.5%	cell suspension (OD=0.8), 1%
Assay medium	DST agar (OXOID) pH 8.0	DST+0.15% bile salt +0.2mg % crystal violet or MCA (EIKEN), pH 8.0
Diluent	Serum or 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)	
Incubation	16-18 h at 34-37°C	
Minimal detectable concentration	ca. 0.1 μg/ml	ca. 0.03 μg/ml (ca. 0.1 μg/ml)

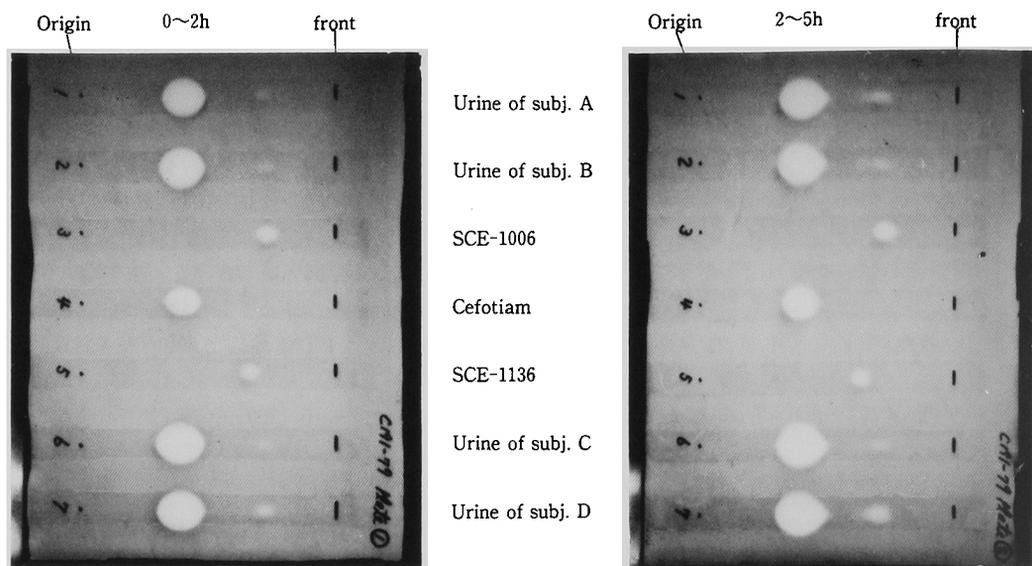


Fig. 5 Bioautograms of human urine after oral administration of cefotiam hexetil (200 mg)

れるが、その後我が国においても報告されるようになった⁷⁾。カップ法が約0.3 mlの検液を必要とするのに対して、Agar well法では50 μ lでよいこと、及び検液注入後のシャーレの取り扱い時にカップの転倒のような失敗のないこと等から、CTMの測定も今回の検討によりAgar well法で実施することとした。CTMの血清蛋白結合率は8%と報告されており⁸⁾、血清(または血漿)試料の測定においては血清(または血漿)希釈による標準曲線の調製が望ましい。今回検討の結果に従い、入手の容易な市販血清(Consera, 日水)を用いることとした。本法によるPhase I試験血漿試料の測定値は、CTMとして0.1~6.0 μ g/mlの範囲において、HPLC法による値と良好な相関($r=0.978$)を示した⁹⁾。したがって上記希釈用血清の選択を含めて、本微生物定量法の設定は妥当であったと考えられる。

経口剤は注射剤と比較して低濃度領域での測定が多くなるため、標準法とは別に高感度法の設定が必要と考えられる。今回設定した高感度法は喀痰、乳汁などの試料の測定に適しており、また微量の組織からの抽出液(3~10倍抽出)を対象としても、十分な測定感度が保証されるようになった。また臨床現場において微量の試料(液)を直接Paper discに採取し、小容器中で凍結保存したものを定量に供する方法¹⁰⁾も、高感度法の裏付けがあつてはじめて可能となった。

Cefotiam hexetilを投与したヒトの血漿及び尿中よりCTM以外に、微量の活性代謝物(SCE-1136及びSCE-1006)がバイオオートグラフ法により検出されたが、これらの代謝物は動物実験においても認められている¹¹⁾。

(研究期間 S 59. 2~62. 6)

文 献

- 1) NISHIMURA T, YOSHIMURA Y, MIYAKE A, YAMAOKA M, TAKANOHASHI K, HAMAGUCHI N, HIRAI S, YASHIKI T, NUMATA M: Orally active 1-(cyclohexyloxycarbonyloxy) alkylester prodrugs of cefotiam. *J. Antibiotics* 40: 81~90, 1987
- 2) 棚山薫晴, 吉田清志, 三谷政義, 塚本剛司, 鳥井洋: 新規経口セファロsporin SCE-2174のラット, マウス, イヌにおける生体内運命—エステル側鎖由来成分を中心にした検討—. *Chemotherapy* 投稿中
- 3) 畚野 剛, 前田憲一: Cefotiam (SCE-963)の体内濃度測定法. *Chemotherapy* 27 (S-3): 106~111, 1979
- 4) 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
- 5) BENNET JN, BRODIE JL, BEMER EJ, KIRBY WM M: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl. Microbiol.* 14: 170~177, 1966
Microbiol. 14: 170~177, 1966
- 6) 宮村定男, 金沢 裕: 薄層カップ法による体液中ペ

- ニシリンおよびストレプトマイシンの濃度測定法。
J. Antibiotics 3: 411~416, 1950
- 7) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体液内 Tobramycin の生物学的定量法に関する検討。
Chemotherapy 23, 886~893, 1975
- 8) 土屋皖司, 近藤正照, 喜多八洲男, 畚野 剛, 野路弓子, 武内真理子, 水田栄治: Cefotiam (SCE-963) のマウス, ラット, ウサギおよびイヌにおける吸収・体内分布および排泄について。Chemotherapy 23: (S-3): 121~132, 1979
- 9) 山下健治, 太田竜一, 青木 勇, 前田憲一, 畚野剛, 矢敷孝司: 生体試料中の Cefotiam hexetil およびその代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる定量法。Chemotherapy 投稿中
- 10) 西代博之, 中西昌美, 葛西洋一, 橋本伊久雄, 沢田康夫, 中村 孝, 畚野 剛, 前田憲一: 抗生剤体液内濃度測定法の臨床的研究, 微量試料にて可能な測定法の検討。Jpn. J. Antibiotics 36: 3412~3421, 1983
- 11) 喜多八洲男, 浜口 直, 平井真一郎, 今田 哲: Cefotiam hexetil のマウス, ラット及びイヌにおける体内動態—セフェム骨格成分を中心にした検討—。Chemotherapy 投稿中。

MICROBIOLOGICAL METHODS FOR ASSAY OF CEFOTIAM HEXETIL RELATED COMPOUNDS IN BIOLOGICAL SPECIMENS

TAKESHI FUGONO and KENICHI MAEDA

Analytical Laboratories, Corporate Technology, Takeda Chemical Industries, Ltd.,

2-17-85 Juso-honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

We developed assay methods for cefotiam (bioactive form of cefotiam hexetil, CTM) and related compounds in biological specimens. For determination of CTM, an agar well method using *Proteus mirabilis* ATCC 21100 as the test organism and DST agar (OXOID, pH 8.0) as the test medium was established. The sensitivity of the method for CTM was about 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ both in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) and in human serum.

A method with higher sensitivity was also elaborated by using *Providencia rettgeri* ATCC 9250 and MacConkey agar (pH 8.0). The sensitivity of this method using agar wells and paper discs as the vehicles was about 0.03 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively/

A bioautographic method using the same *Providencia* strain was devised for detection of antibacterially active metabolites. By this method, CTM and two minor metabolites (SCE-1006 and SCE-1136) were shown in human plasma and urine after oral administration of cefotiam hexetil.