

## 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体内濃度測定法

保田 隆・渡辺泰雄・南新三郎

熊野克彦・恒田礼子・金山淳子

富山化学工業株式会社総合研究所\*

新規ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体内濃度測定法について検討した。

本剤はパラトルエンスルホン酸塩であるので T-3262 base として測定した。

検定菌としては *Escherichia coli* Kp, 測定用培地としては heart infusion agar 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いずれも測定可能であった。

血清中濃度測定には試料血清の pH に調整した各種血清で標準液を作製し、また、尿中および胆汁中濃度測定には 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で作製した標準液を用いるのが望ましい。

各種の体液試料は凍結保存すれば少なくとも 30 日間は安定であった。

**Key words:** T-3262, Bioassay 法

T-3262 は富山化学工業(株)総合研究所で開発された新ピリドンカルボン酸系抗菌剤である。T-3262 は幅広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を示し、特に従来の新キノロン剤に比べ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* などのグラム陽性菌、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、*Peptostreptococcus*, *Bacteroides fragilis* に対して強い抗菌力を有する<sup>1)</sup>。今回 T-3262 の bioassay 法による体内濃度測定法を設定したので報告する。

## I. 実験材料および方法

## 1. 使用薬剤

T-3262 (Lot AP 001, AP 002, AP 005), T-3262 base (Lot 14) および代謝物である T-3262 A (Lot 60128), T-3262 B (Lot 610620) を用いた。以上 4 化

合物の構造式を Fig. 1 に示す。

## 2. 試験菌

*Escherichia coli* (*E. coli*) Kp, *E. coli* NIHJ, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) FDA 209 P および *Micrococcus luteus* (*M. 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), nutrient agar (NA, 栄研), mueller hinton agar (MHA, 栄研), 日本抗生物質医薬品基準<sup>2)</sup>記載の一般試験菌培地 (ポリペプトン (大五栄養) 6g, 酵母エキス (Difco) 3g, 肉エキス (Difco) 1.5g, ブドウ糖 1.0g, 寒天 (栄研) 15g, 蒸留水 1L, pH 6.5~6.6), *Staphylococcus* 用培地 (ポリペプトン 6g, 酵母エキス 3g, 肉エキス 1.5g, ブドウ糖 1g, NaCl 2.5g, 寒天 15g, 蒸留水 1L, pH 6.5~6.6), *Bacillus* 用培地 (ポリペプトン 5g, 肉エキス 3g, クエン酸ナトリウム 10g, 寒天 15g, 蒸留水 1L, pH 6.5~6.6) および独自に調製した *Klebsiella* 用培地 (ポリペプトン 5g, 肉エキス 3g, ブドウ糖 1g, NaCl 2.5g, 寒天 15g, 蒸留水 1L, pH 6.5~6.6) を用いた。

## 4. 試験菌液の調製法および測定培地への接種

*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* の場合, HIA で 37°C 18~24 時間培養した菌を heart infusion broth (HIB, 栄研) に懸濁し, OD<sub>650</sub>=0.4 になる様に調整し

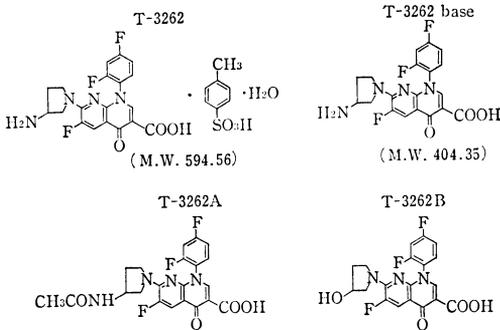


Fig. 1. Chemical structure of T-3262, T-3262 base, T-3262 A and T-3262 B.

たものを、*Bacillus* の場合  $4 \times 10^8$  cells/ml の孢子液を各測定用培地にそれぞれ 1% になるよう接種した。*M. luteus* の場合 cefoperazone 濃度測定法<sup>3)</sup>に準拠した。

#### 5. 濃度測定法

薄層ペーパーディスク法および薄層カップ法を用いた。ペーパーディスク法の場合、試験菌を接種した測定用培地 7 ml を径 90 mm のシャーレに流し込み、水平固化させた後、37°C、18~24 時間培養した。カップ法の場合は 10 ml 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(直径 8 mm, 厚手, 東洋製作所)をはりつけた後、4°C、1 時間の予備拡散を行った。

#### 6. T-3262 および体液の希釈液

1/15 M リン酸塩緩衝液 (P. B.: pH 6.0, 7.0, 8.0), プールヒト血清, コンセーラ(日水製薬)およびモントロール I (ミドリ十字)を用いた。

#### 7. 標準液の調製

T-3262 を 1,470  $\mu\text{g/ml}$ , 即ち T-3262 base として 1,000  $\mu\text{g/ml}$  となるように 0.1 N-NaOH に溶解し標準原液を作製した。pH 8.0 の標準液は標準原液を 1/15 M P. B. (pH 8.0) で 100 倍希釈した後、2 倍希釈系列を作成した。pH 6.0 および pH 7.0 の標準液は標準原液を水で 10 倍希釈後、各 pH の 1/15 M P. B. でさらに 10 倍希釈し、以後同 P. B. で 2 倍希釈系列を作成した。

血清中濃度の場合、ヒトあるいは動物のプール血清を検体血清の pH に調整し、上記 1,000  $\mu\text{g/ml}$  の溶液を 1/15 M P. B. (pH 8.0) で 10 倍希釈した後同血清でさらに 10 倍希釈後、10  $\mu\text{g/ml}$  からの 2 倍希釈系列を作製し標準液とした。

#### 8. 各種体液中での T-3262 の安定性

T-3262 を 1/15 M P. B. (pH 8.0), プールヒト血清 (pH 8.0), ヒト尿 (pH 6.0) およびウサギ胆汁 (pH 8.8) に溶解させた後、-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 T-3262 base として、プールヒト血清では 2  $\mu\text{g/ml}$ , その他は 100  $\mu\text{g/ml}$  に調整した。なお、尿は冷蔵庫保存あるいは室温放置により本剤の析出が認められることがあったので、ヒト尿についてはクエン酸を 1% 添加したのもも作製し同時に検討した。

#### 9. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定法

島津 LC-6 A 型高速液体クロマトグラフィーで行った。血清中 T-3262 測定の場合、前処理カラムとして牛血清アルブミンを吸着させた Nucleosil 10 C<sub>18</sub> (4 mm $\phi$   $\times$  50 mm) を用い、移動相として A 液 [CH<sub>3</sub>CN-0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-10% (v/v) CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H $\cdot$ NEt<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (250 : 175 : 50 : 525)] ならびに B 液 [0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-10% (v/v) CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H $\cdot$ NEt<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (180 : 50 : 770)] を用いた。分離方法は前処理カラムを B 液で平衡化し、血清 100  $\mu\text{l}$  を注入し、B 液を 3.0 ml/min で 2 分間流した。なお、この間は溶出液を前処理カラムと分析カラム (Nucleosil 10 C<sub>18</sub>, 4 mm $\phi$   $\times$  250 mm) の間に設けた切換バルブから排液させた。次に A 液を 1.0 ml/min で流し、溶出液を分析カラムに導き室温下 UV 345 nm で分析した。尿中の T-3262 測定の場合、分析カラムとして Nucleosil 10 C<sub>18</sub> (Nagel 4 mm $\phi$   $\times$  300 mm), 移動相として CH<sub>3</sub>CN-0.2 M クエン酸 2 Na-10% (v/v) CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H $\cdot$ NEt<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (200 : 310 : 100 : 390) を用い、尿 20  $\mu\text{l}$  を注入後、室温下流速 1.5 ml/min, UV 345 nm で分析した。なお、血清および尿前処理として血清はフィルター

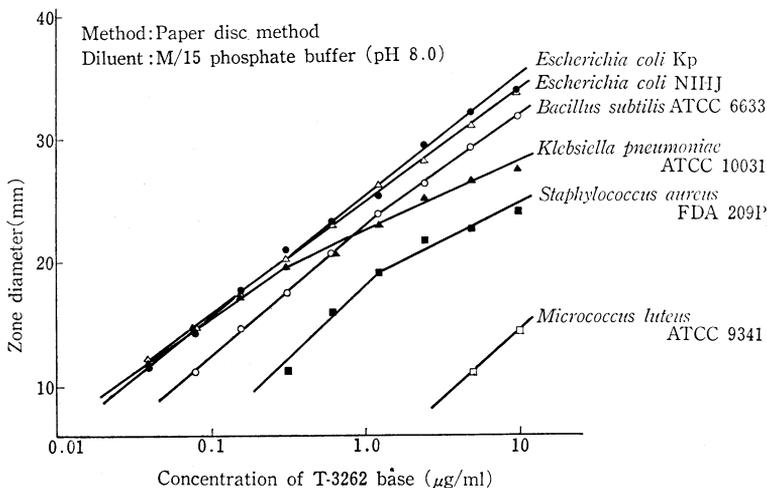


Fig. 2. Comparison of standard curves of T-3262 using various test organism.

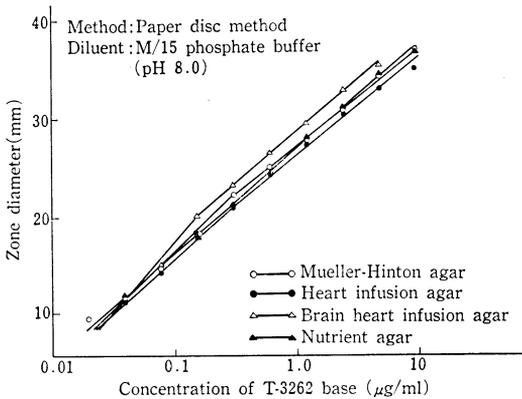


Fig. 3. Standard curves of T-3262 using various assay media.

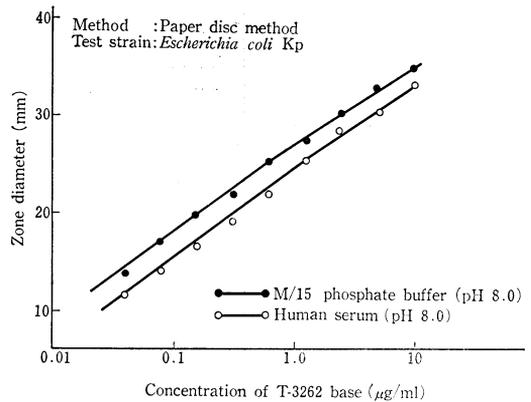


Fig. 6. Standard curves of T-3262 using M/15 phosphate buffer and human serum.

(0.7  $\mu\text{m}$ ) 濾過し、尿は等量の  $\text{CH}_3\text{CN}$ -0.2 M クエン酸 2 Na-10%  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}\cdot\text{NEt}_3$  (2:3:1) を加えて希釈した。

## II. 結果および考察

### 1. 検定菌の選定

*E. coli* Kp, *E. coli* NIHJ (HIA), *B. subtilis* ATCC 6633 (*Bacillus* 用培地), *K. pneumoniae* ATCC 10031 (*Klebsiella* 用培地), *S. aureus* FDA 209 P (*Staphylococcus* 用培地) および *M. luteus* ATCC 9341 (一般試験菌培地) を用い、T-3262 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。

*E. coli* Kp および *E. coli* NIHJ では検量線の傾きも大きく、かつ検出感度にも差が認められないが *E. coli* Kp の方が阻止円が鮮明であり、判読しやすかった。一方、*B. subtilis* ATCC 6633 および *K. pneumoniae* ATCC 10031 では *E. coli* に比べて阻止円の鮮明さは同等であったが、検出感度や直線性は劣っていた。*S. aureus* FDA 209 P および *M. luteus* ATCC 9341 は検出感度も悪く阻止円も不鮮明であった。

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 *E. coli* Kp を選択した。

### 2. 培地の選定

HIA, BHIA, NA および MHA を測定用培地として *E. coli* Kp を検定菌とする薄層ペーパーディスク法で T-3262 濃度と阻止円径の関係について検討した (Fig. 3) 直線の傾きや検出感度には大きな差はみられなかったが HIA が他の培地より鮮明であった。

### 3. 測定法の比較

検定菌として *E. coli* Kp を用いペーパーディスク法とカップ法の比較を行った (Fig. 4)。その結果、ディスク法では 0.039  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , カップ法では 0.02

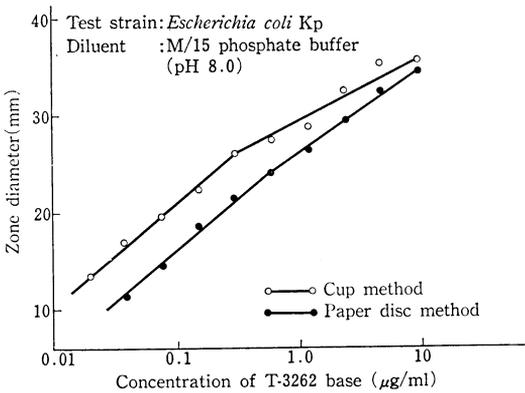


Fig. 4. Standard curves of T-3262 by different methods.

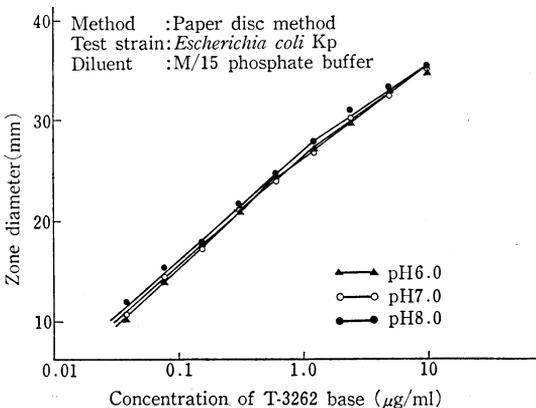


Fig. 5. Standard curves of T-3262 on various pH of M/15 phosphate buffer as diluent.

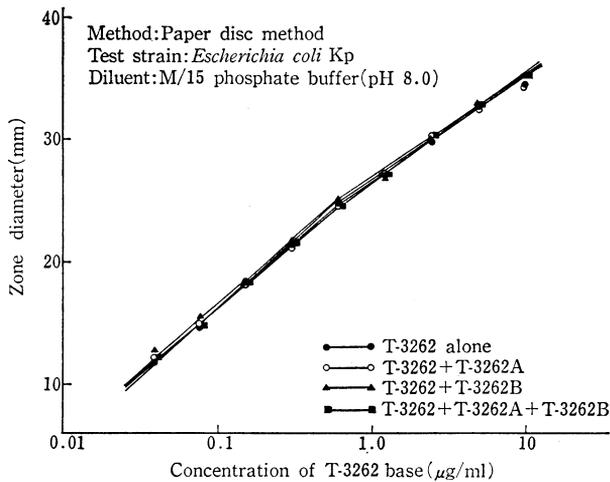


Fig. 7. Effect of T-3262 A and T-3262 B on standard curve of T-3262.

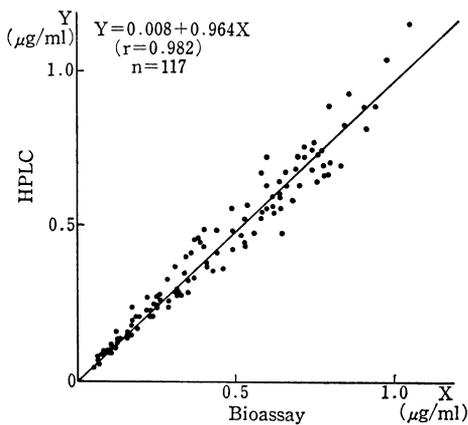


Fig. 8. Comparison of individual bioassay and HPLC values for T-3262 concentration in human serum.

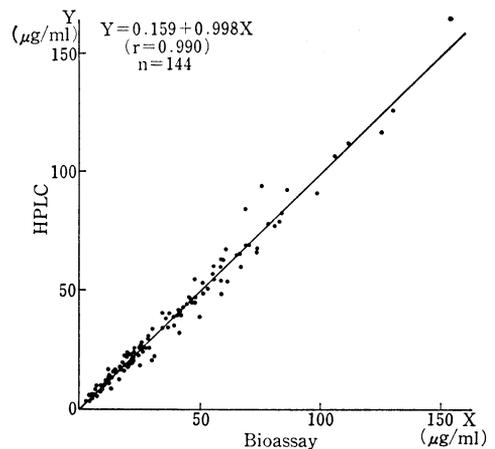


Fig. 9. Comparison of individual bioassay and HPLC values for T-3262 concentration in human urine.

～10 μg/ml の範囲で測定可能であった。

以上の結果から以後の検討は、検定菌として *E. coli* Kp を、測定用培地として HIA を用いる薄層ペーパーディスク法で行った。

#### 4. 希釈液の検討

希釈液の pH の影響：pH 6.0, 7.0 および 8.0 の 1/15 M P. B. を用い、T-3262 の検量線に及ぼす影響について検討した。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。なお、pH 6.0 あるいは pH 7.0 の 1/15 M P. B. では原液を水で 10 倍希釈後各 pH の 1/15 M P. B. で希釈すれば結晶が析出しませんが、原液を直接 1/15 M P. B. (pH 6.0 あるいは pH 7.0) で希釈した 100 μg/ml の溶液では結晶が析出する。従っ

て操作上以後の標準液は pH 8.0 の 1/15 M P. B. で作成した。

血清の影響：プールヒト血清 (pH 8.0) と 1/15 M P. B. (pH 8.0) で作成した検量線を比較した (Fig. 6)。血清の方が buffer に比べ阻止円が小さかったが 0.039～10 μg/ml の範囲で測定可能であった。この阻止円が小さくなった理由は蛋白結合のためと考えられる。本剤は pH によりその蛋白結合率が異なる<sup>4)</sup> ため手技上の点から血清標準液の pH を測定試料の pH に調整するのが望ましい。図には示さなかったがコンセーラで作成した検量線はヒト血清とはほぼ一致したが、Lot により *E. coli* Kp に対して抗菌活性を示すものがあり使用にあたり抗

Table 1. Stability of T-3262 in body fluids under various conditions

Temperature	Solution	Citric acid	pH	Residual activity (%)				
				0	1	7	14	30 days
-20°C	1/15 M Phosphate buffer	-	8.0	100	104	101	97	98
	Human serum*	-	8.0		100	101	104	96
	Human urine	-	6.0		99	106	95	98
	Rabbit bile	+	2.8		102	106	107	103
		-	8.8		105	101	102	92
5°C	1/15 M Phosphate buffer	-	8.0	100	98	95	98	102
	Human serum*	-	8.0		94	98	103	96
	Human urine	-	6.0		96	97	105	104
	Rabbit bile	+	2.8		99	103	97	103
		-	8.8		102	92	86	74
25°C	1/15 M Phosphate buffer	-	8.0	100	95	110	105	97
	Human serum*	-	8.0		97	106	101	95
	Human urine	-	6.0		103	95	102	94
	Rabbit bile	+	2.8		102	98	103	99
		-	8.8		98	92	85	72

Concentration of T-3262 : 100 µg/ml or \*2 µg/ml

菌活性の有無をチェックする必要がある。モニター I では検討したすべての Lot でヒト血清に比べ大きな阻止円を示したので血清中濃度測定には不適と思われる。

#### 5. T-3262 の検量線に及ぼす T-3262 A および T-3262 B の影響

T-3262 を経口投与した尿中にわずかではあるが代謝物であり抗菌活性を示す T-3262 A あるいは T-3262 B が認められている<sup>9)</sup>。E. coli Kp に対する最小発育阻止濃度 (MIC, 10<sup>8</sup> cells/ml) は T-3262 A で 1.56 µg/ml, T-3262 B で 0.2 µg/ml であるので T-3262 の bioassay に及ぼす T-3262 A および T-3262 B の影響について検討した。T-3262 の標準液に T-3262 A あるいは T-3262 B を 20%, また T-3262 A と T-3262 B をそれぞれ 20% 添加した結果, Fig. 7 に示すように T-3262 A および T-3262 B は T-3262 の検量線にほとんど影響を及ぼさなかった。

#### 6. Bioassay 法と HPLC 法による測定値の比較

T-3262 phase I 時の血清および尿を bioassay 法と HPLC 法で比較した。血清中濃度では両測定法間の回帰直線式は  $Y=0.008+0.964 X$  (Y: HPLC 測定値, X: bioassay 測定値), 相関係数  $r=0.982$  で良好な相関が得られた (Fig. 8)。また, 尿中濃度についても回帰直線式は  $Y=0.159+0.998 X$ , 相関係数  $r=0.990$  で同様に良好な相関性を示した (Fig. 9)。

#### 7. T-3262 の各種体液中での安定性

Table 1 に示すように血清, ヒト尿 および 1/15 M

P. B. (pH 8.0) では, -20°C, 5°C, 25°C いずれも高い安定性を有していたが, ウサギ胆汁では -20°C では安定であったものの 5°C, 25°C においては若干活性の低下が認められた。なお, 尿については本剤の結晶析出を防止するためクエン酸を 1% 添加したがいずれの濃度においても安定であった。

以上の結果から血清, 尿および胆汁はいずれも凍結保存により少なくとも 1 カ月は安定であることが示唆された。

### 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-3262 体液内濃度測定法

##### 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

*Escherichia coli* Kp を用いる。

##### 3. 測定用培地

市販培地の heart infusion agar を用いる。

##### 4. 接種菌液および接種菌量

Heart infusion agar で 37°C 18~24 時間培養した菌を, heart infusion broth に OD<sub>650</sub>=0.4 になるように懸濁し測定用培地に 1% 加える。

##### 5. 検体の希釈および保存

血清試料の希釈には試料 pH に調整した各種血清を用

い、尿、胆汁および組織の希釈には 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を用いる。なお尿は冷蔵庫保存あるいは室温放置により本剤の析出が認められることがあるので、析出防止のためクエン酸を約 1% になる様添加することが望ましい。

#### 6. 検量線の作成

標準液は T-3262 base として作成し血清試料の測定には試料 pH に調整した各種血清 (または抗菌活性の有無をチェックしたコンセーラ) で、尿および胆汁中濃度の測定には 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で検量線を作成する。

#### 7. 培養条件および判定

37°C, 18~24 時間培養後、通常の検量線法によって濃度を求める。

#### 文 献

- 1) 保田 隆, 渡辺泰雄, 四辻 彰, 林 敏雄, 南新 三郎, 岡本世紀, 山城芳子, 荒木春美, 伊東優子,

本村桂子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の細菌学的評価。Chemotherapy 36 (S-9): 95~109, 1988

- 2) 薬業事報社: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法。P 628~639, 1982
- 3) 才川 勇, 保田 隆, 田井 賢, 渡辺泰雄, 清水喜八郎: Cefoperazone (T-1551) の体液中濃度測定法について。Chemotherapy 28 (S-6): 157~162, 1980
- 4) 保田 隆, 渡辺泰雄, 林 敏雄, 北山理恵子: 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の蛋白結合に関する研究。Chemotherapy 36 (S-9): 143~148, 1988
- 5) 田井 賢, 小西義憲, 杉本由美子, 出町久美子, 前田豊男: ピリドンカルボン酸系抗菌剤の代謝研究, (第 1 報) (±)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1-(2,4-difluoro-phenyl)-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid *p*-toluenesulfonate hydrate (T-3262) の尿中代謝物の単離及び同定。Jpn J Antibiot 投稿中

## MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR T-3262 CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

TAKASHI YASUDA, YASUO WATANABE, SHINZABUROU MINAMI,  
KATSUHIKO KUMANO, REIKO TSUNEDA and JUNKO KANAYAMA

Research Laboratory, Toyama Chemical Co., Ltd.  
2-4-1 Shimookui, Toyama-shi, 930, Japan

A microbiological assay method for measurement of T-3262 in body fluids was investigated. The concentrations of T-3262 in body fluids were determined as T-3262 base, this being *p*-toluenesulfonic acid salt.

The paper disc or cup methods proved suitable for this assay using *Escherichia coli* Kp as test organism and commercially available heart infusion agar as a test medium.

For the measurement of T-3262 concentration in serum, a solution adjusted to the mean pH of the samples was suitable as diluent of the standard solution of T-3262. For measurement of T-3262 in urine and bile, 1/15 M phosphate buffer (pH 8.0) was found suitable.

T-3262 in various body fluids was stable under freezing for at least 30 days.