

## Cefpirome sulfateの体液及び組織内濃度測定法

田端 滋・小池優子・林 昌亮  
ヘキストジャパン株式会社医薬総合研究所\*

佐藤弓枝・小林寅詰  
三菱油化ビーシーエル化学療法研究室

平山正史・長谷川嘉成  
日本ルセル株式会社研究所

Cefpirome sulfate(CPR)の生体試料中濃度測定法及び試料中での安定性について検討した。

微生物学的定量法(bioassay法)において*Bacillus subtilis* ATCC 6633を検定菌とした時、検定用培地としてクエン酸ナトリウム培地(pH6.4)を用いたペーパーディスク法により血漿または血清、尿、胆汁及び組織内濃度の測定が可能であった。ここで、血漿(血清)試料の測定においてはヒト血漿またはConsera<sup>®</sup>を用い、また尿、胆汁及び組織内濃度測定には0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)を用いて作成した標準曲線によって定量する事ができた(検出限界:血漿の場合0.39 µg/ml、リン酸緩衝液を用いた場合0.20 µg/ml)。また、*Escherichia coli* ATCC 39188も検定菌として利用する事ができ、nutrient agar(Difco)を培地としたディスク法により高感度での測定(検出限界:血漿、リン酸緩衝液共に0.05 µg/ml)が可能であった。血漿(血清)及び尿中のCPRは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いても定量でき、検出限界はそれぞれ0.1及び5.0 µg/mlであった。

Bioassay及びHPLCの両測定法による定量値の間には良好な相関性が認められた。

生体試料中におけるCPRの安定性をbioassay法により検討した結果、-20℃以下で保存する事により血清及び尿中で少なくとも12週間、また組織内では8週間安定であった。

**Key words**: Cefpirome sulfate(CPR), セファロsporin系抗生物質, 定量法, 生体試料中濃度, 安定性

新しい注射用セファロsporin剤, cefpirome sulfate (CPR)はドイツ連邦共和国のHoechst社とフランスのRoussel Uclaf社で合成、開発され、β-lactamaseに対する高い安定性ならびに幅広い抗菌スペクトルを有し、*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*を含めたグラム陽性菌、グラム陰性菌に対して強い抗菌力を示す<sup>1-3)</sup>。その構造式はFig. 1 に示すとおりである。本薬の体内動態を検討するにあたっては、その治療濃度を考慮した体液及び組織内濃度の定量法を確立する必要がある。そこで今回著者らは、その目的にあった微生物学的定量法及び高速液体クロマトグラフィーによる定量法ならびに生体試料中での安定性について検討を行なったので報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 使用薬物

CPRはドイツ連邦共和国Hoechst社より供与を受けたものを使用した。

#### 2. 生体試料

血漿または血清及び尿は、あらかじめ抗菌薬等の投与のない健康人から採取したものをを用いた。また、胆汁試料はラットから採取したものを、組織試料はラット腎あるいはあらかじめCPRの静脈内投与(1g)を行なった産婦人科患者から、外科的処置により得られたものを使用した。

### 3. 微生物学的定量法(bioassay法)

#### 1) 検定菌

*Bacillus subtilis* ATCC 6633は日抗基・力価試験法<sup>4)</sup>に準じて $2.2 \times 10^9$  spores/mlの孢子液を調製した。また

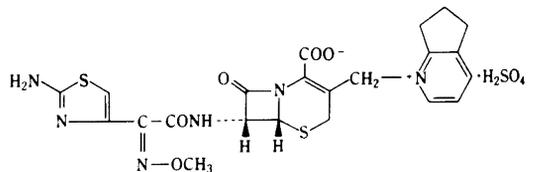


Fig. 1. Chemical structure of cefpirome sulfate.

\* 〒350 埼玉県川越市南台1-3-2

*Escherichia coli* ATCC 39188はTrypticase soy agar (TSA, BBL)で2, 3回継代培養を行ない, Trypticase soy broth (TSB, BBL)で37℃, 20時間培養したものを用いた。その他, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *S. aureus* 209P JC-1及び*E. coli* NIHJ JC-2を用いた。

## 2) 標準溶液

血漿試料測定法標準液としては, CPRを0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し, ヒト血漿またはConsera<sup>®</sup> (ニスイ)を用いて希釈系列を作製した。また, 尿, 胆汁及び組織試料の測定には, 0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解したCPRを同緩衝液にて希釈し標準溶液とした。

## 3) 試料の前処理

血漿(血清)試料については, そのままあるいは必要に応じて新鮮ヒト血漿またはConsera<sup>®</sup>で希釈した。尿試料は0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)を用いて適宜希釈した。また, 組織試料については, 0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)を所定の割合で加え, 氷冷下でホモジナイズした後4℃で12000 rpm, 5 min遠心して上清を得, これらをbioassay用の試料とした。

## 4) 検定法

*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とした場合には, 胞子液を1%クエン酸ナトリウム培地(pH6.4)に0.1% (v/v)接種した。また*E. coli* ATCC 39188を用いた場合には, nutrient agar (Difco)培地に検定菌の培養液を1% (v/v)接種した。これらの培地10あるいは6 mlを直径9 cmのプラスチックシャーレに分注して寒天平板を作成した。これに, 標準溶液または試料液を浸み込ませたペーパーディスク(東洋アドバンテック, 8mm thin)をのせて37℃, 18~20時間培養した後, 阻止円直径を測定した。

## 4. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法

### 1) 試料の前処理

血漿(血清)及び尿試料をpore size 0.20 µmのフィルター(ゲルマン)で濾過, あるいは次の如く処理した後HPLC分析に供した。すなわち, 血漿(血清)試料については, その0.5 mlに対し40 µlの40%トリクロル酢酸を加えて振盪後4℃で12000 rpm, 5 min遠心して上清を得た。また尿試料については, その0.5 mlに0.1 Mリン酸緩衝液(pH5.5)を適宜加えて希釈後4℃で12000 rpm, 5 min遠心して上清試料を得た。

### 2) HPLC分析条件

上記に従って調製した試料を, Uhieleinの方法<sup>5)</sup>を改良した以下の条件で測定した。なお, 検量線作成用の標準液は蒸留水あるいは0.1 Mリン酸緩衝液を用いて作成した。

カラム: Nucleosil C18(5 µm), 4.6 mm i.d.×125

mm(センシユールバック)

カラム温度: 25℃

移動相: 0.2%酢酸アンモニウム/メタノール/アセトニトリル(75:10:5または25:4:2, v/v)

流速: 1.0 ml/min

検出器: UV-254nm

注入量: 10~50 µl

## 5. 生体組織試料中における安定性

CPRを添加したヒト血清及び尿試料を, -20℃及び4℃で保存した時の経時的な濃度変化をbioassay法(*B. subtilis*を検定菌とするペーパーディスク法)にて検討した。また, 組織試料については採取後速やかに同bioassay法にて測定し, 得られた値を初期濃度として-70及び-20℃で保存した時の濃度変化を検討した。

## II. 実験結果及び考察

### 1. Bioassay法の検討

#### 1) 検定菌の選定

CPRに対する種々の菌種のMICの結果<sup>1-3)</sup>を考慮し, 感受性の高い菌株として*B. subtilis* ATCC 6633, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* 209P JC-1, *E. coli* NIHJ JC-2及び*E. coli* ATCC 39188を選び, それらの標準曲線を比較検討した。その結果, Fig. 2に示した如く*B. subtilis* ATCC 6633及び*E. coli* ATCC 39188が感度, 傾き共に良好であり, いずれも測定法として使用可能と考えられた。このうち, *E. coli* ATCC 39188の方が感度が高かったが, *B. subtilis* ATCC 6633における阻止円が鮮明で判定しやすかった事から, 低~高濃度の幅広い濃度域の測定には*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌として用いる事とし, また特に高感度の測定を必要とする場合には*E. coli* ATCC 39188も適用可能と考えられた。

#### 2) 検定菌*B. subtilis* ATCC 6633の検討

測定条件について種々検討した結果, クエン酸ナトリウム培地(pH6.4)を用いてペーパーディスク法, カップ法共に使用可能であったが, 操作の簡便な薄層ディスク(thin)法を採用する事にした。また, 培地pHについてはpH6.4~7.4の範囲で検討したところ, 標準曲線の傾きは変わらなかったが最も感度の良いpH6.4を選定した。

次に, 標準曲線に及ぼす生体試料中成分の影響を調べた結果, Fig. 3に示した様にヒト血漿を用いて作成した標準曲線はConsera<sup>®</sup>のそれとよく一致した。血清を用いた場合も同様であった。また尿については0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)で希釈する事により同緩衝液で作成した標準曲線と一致した。ラットの胆汁及び腎組織ホモジネートの標準曲線についても0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)

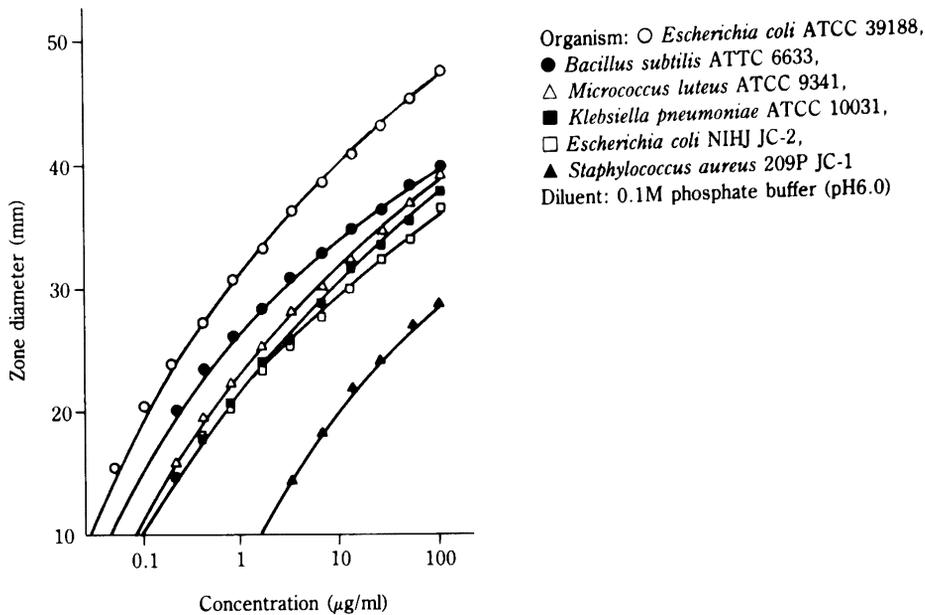


Fig. 2. Standard curves of ceftiofime sulfate by disc-plate method using various test organisms.

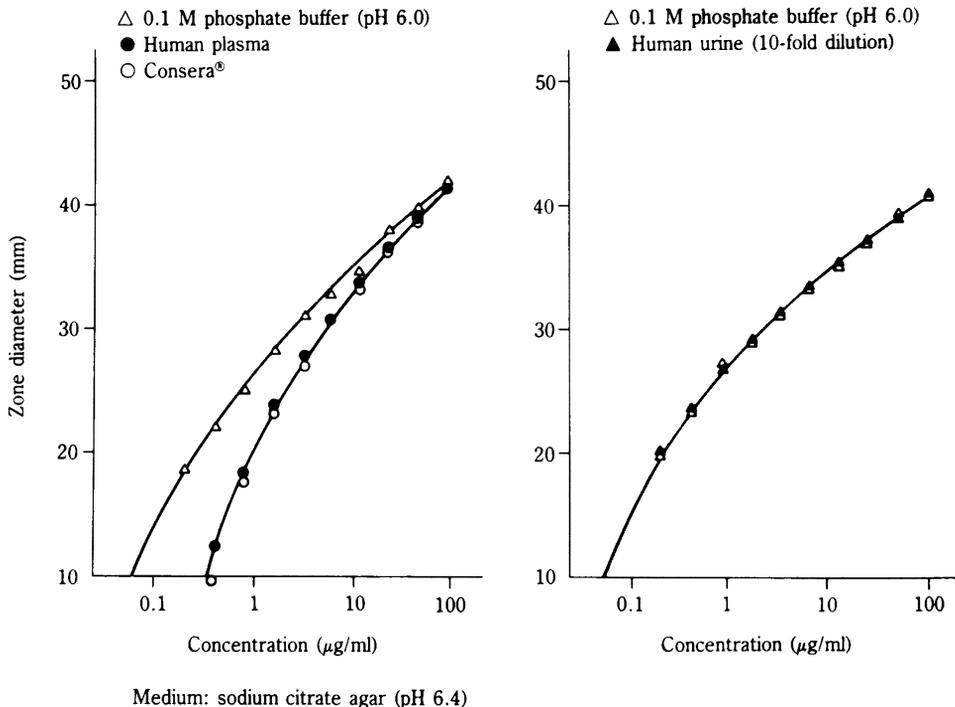


Fig. 3. Influence of human plasma and urine on standard curve of ceftiofime sulfate by disc-plate method using *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

のそれと良く一致した。従って、CPRの血漿(血清)中濃度測定に際してはヒト血漿またはConsera<sup>®</sup>を用い、また尿、胆汁及び組織内濃度測定においては0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)を用いて作成した標準曲線で定量する事が可能であると考えられた。それらの標準曲線はいずれも傾き、感度共に良好であり、血漿の場合0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、リン酸緩衝液を用いた場合には0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで測定が可能であった。

### 3) 検定菌 *E. coli* ATCC 39188の検出

*E. coli* ATCC 39188を検定菌として用いた場合には、nutrient agar (Difco)を培地としたペーパーディスク(thin)法により高感度の測定が可能であった。*B. subtilis* ATCC 6633の場合と同様、ヒト血漿の標準曲線はConsera<sup>®</sup>と、また組織(ラット腎ホモジネート)については0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)とよく一致し、それぞれ標準液としての代用が可能であった(Fig. 4)。検出限界は血漿及びリン酸緩衝液の場合共に0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

### 2. HPLC法の検討

ヒト血漿及び尿中のCPRをHPLC法で定量した時のクロマトチャートをFig. 5に示した。血漿(血清)試料はフィルター(0.20  $\mu\text{m}$ , ゲルマン)濾過後、あるいはトリクロル酢酸による除蛋白後のいずれでも測定可能であり、除蛋白操作によるCPRの回収率は良好であった。CPRの保持時間は6~7分であり、検出限界は血漿及び尿中でそれぞれ0.1及び5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。ヒトにCPRを投与後の血清試料をbioassay法(*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とするペーパーディスク法)及びHPLC法で定量した時の相関をFig. 6に示した。その結果、 $Y=0.985X-0.444$  ( $r=0.992$ )の回帰直線が得られた。さらにCPR第一相試験<sup>6,7)</sup>において、血漿及び尿中濃度を両測定法を用いて測定した場合においても極めて良好な相関が認められている。このようなbioassay法及びHPLC法によるCPR測定値の良好一致は、本薬を投与後の生体試料中に抗菌活性を有する代謝物が認められなかった事実<sup>6,8)</sup>を反映しているものと考えられる。

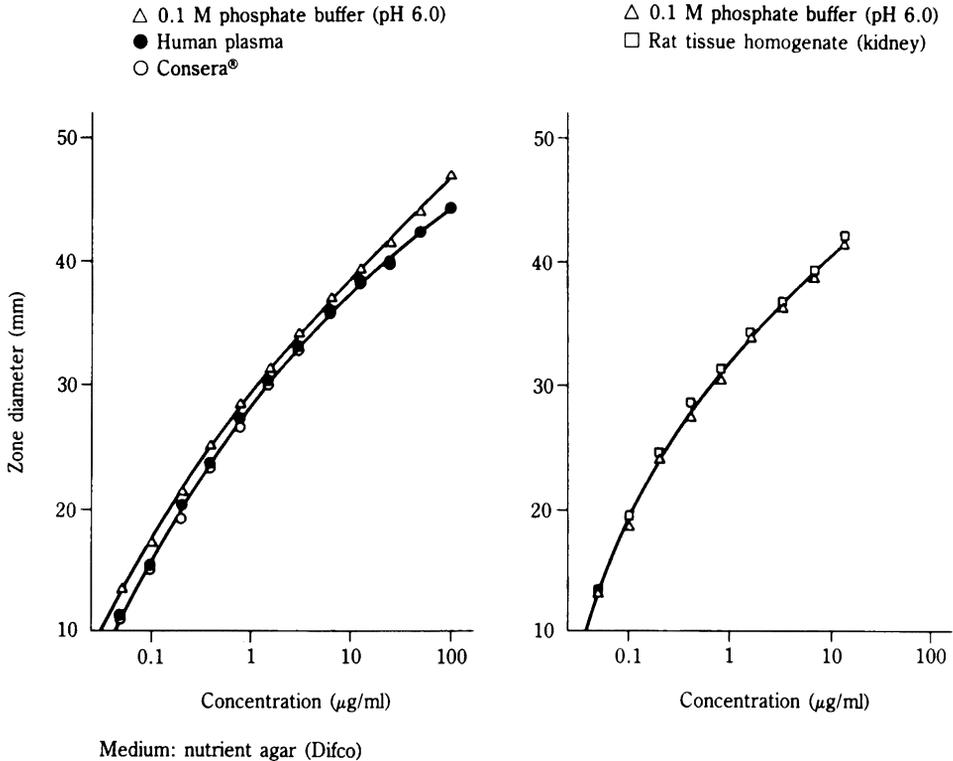


Fig. 4. Influence of human plasma and rat tissue on standard curve of ceftiofime sulfate by disc-plate method using *Escherichia coli* ATCC 39188.

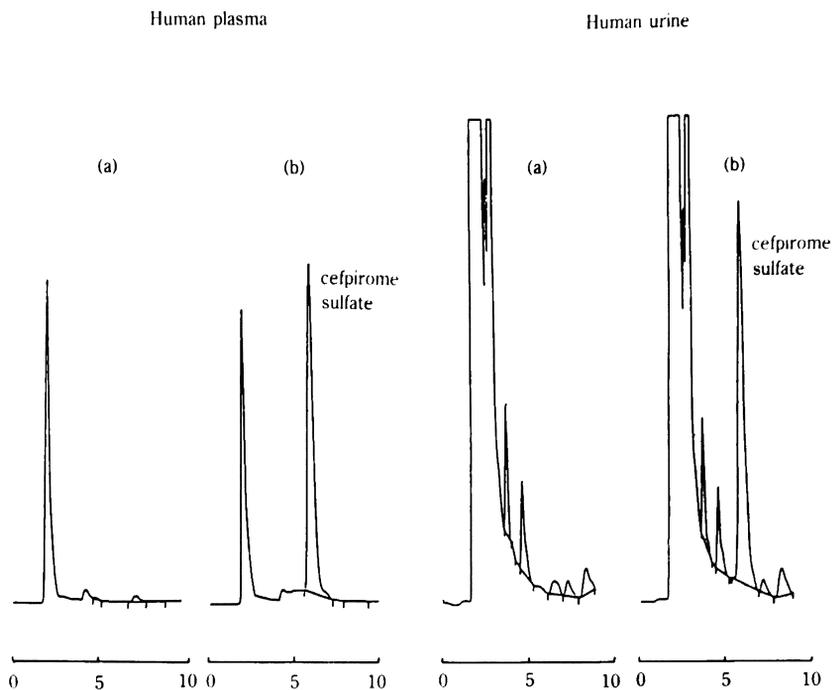


Fig. 5. Typical chromatograms of human plasma and urine before (a) and after (b) administration of cefpirome sulfate.

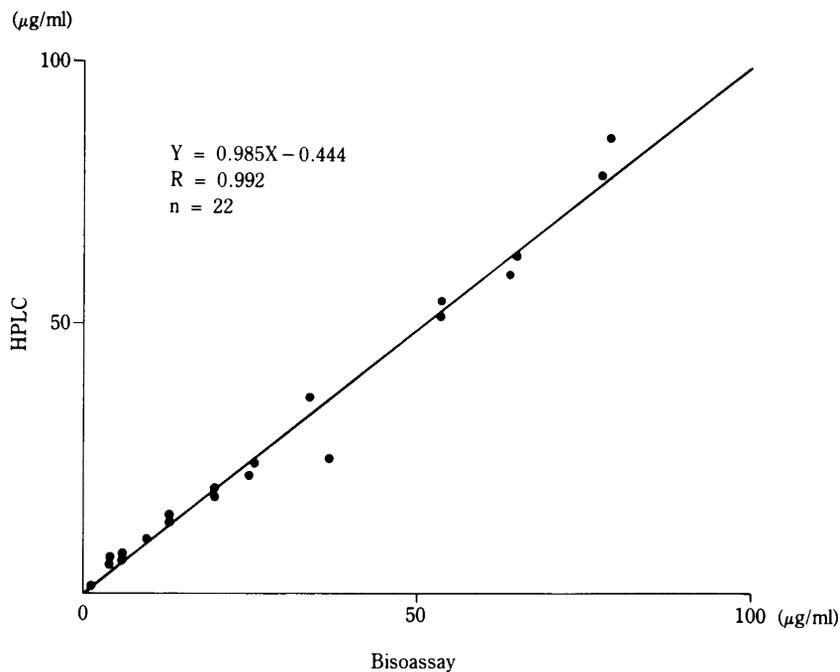


Fig. 6. Correlation between cefpirome sulfate concentrations in human serum determined by bioassay and HPLC.

### 3. 生体試料中での安定性

-20℃及び4℃の保存条件下におけるCPRのヒト血清及び尿中での安定性を*B. subtilis*を検定菌とするbioassay法で検討した結果をFig. 7に示した。血清(20 µg/ml)及び尿中(50 µg/ml)のいずれにおいても、-20℃の保存条件下で少なくとも12週間安定であった。また、4℃では血清及び尿中のいずれにおいても1週間は安定であったが、その後徐々に減少してそれぞれ12及び4週間後には検出限界以下となった。ところで、Uihleinら<sup>9)</sup>はヒト血漿及び血清中におけるCPRの安定性をHPLC法で検討し、-18℃保存下でそれぞれ少なくとも28及び21週間は安定である事を報告しており、今回の我々の結果はこれと矛盾しないものと考えられる。

CPR投与患者より採取した各種組織を-70及び-20℃で保存した時の薬物濃度変化を*B. subtilis*を検定菌とするbioassay法により検討した結果をTable 1に示した。卵巣組織内濃度は採取直後に2.63~32.7 µg/gの値を示し、-70℃保存下では全例(n=5)で少なくとも8

週間安定、-20℃においても2例(8週間で84.1及び91.4%とやや減少傾向)を除いてすべて8週間安定であった。また、子宮筋層、子宮頸部及び子宮腔部についても同様に、一部の試料で若干の減少傾向を示したものの-70及び-20℃保存下でいずれもほぼ8週間安定と考えられた。

### Ⅲ. 結 論

以上の検討の結果より、CPRのbioassay及びHPLCによる生体試料中濃度測定法を次の様に設定した。

#### 1. Bioassay法

##### 1) 検定菌

*B. subtilis* ATCC 6633あるいは*E. coli* ATCC 39188を用いる。

##### 2) 測定用培地

検定菌として*B. subtilis* ATCC 6633を用いる場合には1%クエン酸ナトリウム培地(pH6.4)を、また*E. coli* ATCC 39188を用いる場合にはnutrient agar(Difco)を10あるいは6 mlの薄層にして使用する。

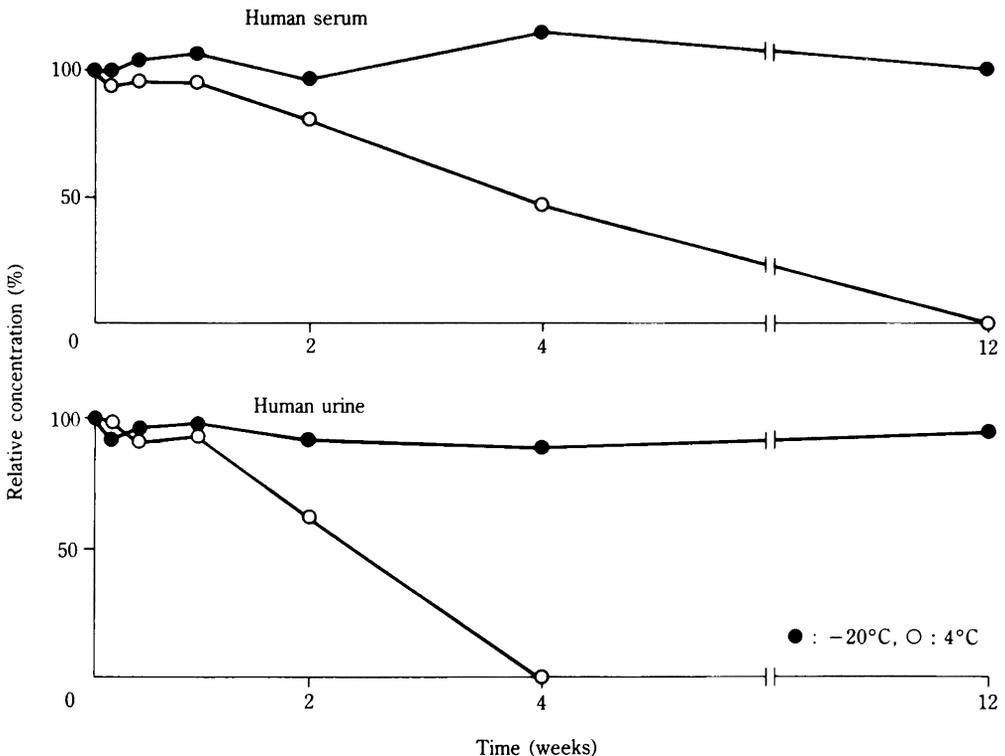


Fig. 7. Stability of cefpirome sulfate in human serum (20 µg/ml) and urine (50 µg/ml).

Table 1. Stability of cefpirome sulfate in human uterine tissues

Period (weeks)	Subject No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		No. 5	
	-20°C	-70°C	-20°C	-70°C	-20°C	-70°C	-20°C	-70°C	-20°C	-70°C
Ovary										
0	100 (17.4)		100 (20.5)		100 (32.7)		100 (6.62)		100 (2.63)	
1	105	112	107	107	95.4	102	101	103	100	101
2	116	114	102	107	100	102	100	98.8	100	102
3	105	109	107	103	96.3	95.4	98.3	98.3	97.3	100
4	103	103	98.5	100	93.6	98.2	96.5	97.0	103	103
8	104	108	100	111	91.4	100	84.1	99.2	96.6	101
Myometrium										
0	100 (24.3)		100 (34.0)		100 (33.2)		100 (4.67)		100 (1.60)	
1	101	103	103	108	101	101	102	102	106	106
2	86.8	101	93.5	104	101	102	104	104	106	106
3	79.8	93.8	96.8	101	103	103	97.9	104	106	106
4	81.5	89.3	94.4	103	105	104	102	104	103	103
8	70.8	96.3	100	101	102	106	97.4	104	106	106
Cervix										
0	100 (20.7)		100 (31.5)		100 (50.3)		100 (4.68)		100 (2.11)	
1	96.6	100	103	103	101	100	98.9	110	101	103
2	92.3	95.7	102	100	98.6	99.0	109	109	98.1	101
3	88.4	100	99.0	98.7	94.0	97.0	108	108	103	103
4	92.8	92.3	103	105	93.6	96.0	104	113	103	103
8	89.8	92.8	87.6	99.0	93.0	101	110	114	103	103
Vagina										
0	100 (21.9)		100 (35.4)		100 (36.8)		100 (5.20)		100 (2.00)	
1	89.5	90.0	105	107	102	103	103	105	107	105
2	90.9	96.8	96.9	102	103	102	102	103	102	100
3	80.8	83.1	91.5	94.6	101	100	104	100	98.0	100
4	78.1	80.8	90.4	95.2	100	103	101	99.2	98.0	98.0
8	77.2	79.9	98.0	101	105	107	109	111	98.0	100

Each value represents the residual %.

The values in parentheses are the initial concentration of cefpirome sulfate ( $\mu\text{g/g}$ ) determined by bioassay method.

### 3) 接種菌液及び菌量

*B. subtilis* ATCC 6633を用いる場合には日抗基力価試験法<sup>4)</sup>に準じて $2.2 \times 10^9$  spores/mlの孢子液を調製し0.1% (v/v)を接種する。また、*E. coli* ATCC 39188の場合はTrypticase soy broth (TSB, BBL)で37°C, 20時間培養した菌液を1% (v/v)接種する。

### 4) 測定方法

ペーパーディスク(thin)法を用いる。

### 5) 標準曲線の作成

CPRを0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)で溶解した後、血漿(血清)試料の場合にはヒト血漿またはConsera<sup>®</sup>(ニッスイ)にて作製した標準希釈系列を、また尿、胆汁及び組織試料の場合には0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.0)にて作製した標準希釈系列を用いて標準曲線を作成する。

### 6) 培養条件

37°Cで18~20時間培養する。

### 2. HPLC法

血漿(血清)及び尿中のCPR濃度はHPLCによっても測定できる。HPLC法とbioassay法による測定値は極めて良好な相関性を示す。

### 3. 生体試料中での安定性

CPR濃度測定用の生体試料は採取後速やかに凍結保存する事が望ましい。-20°C以下で保存すればCPRは血清及び尿中で少なくとも12週間、または組織内では8週間安定である。

## 文 献

- 1) JONES R N, THORNSBERRY C, BARRY A L. *In vitro* evaluation of HR810, a new wide-spectrum amino-

- thiazolyl  $\alpha$ -methoxyimino cephalosporin.  
Antimicrob. Agents Chemoth. 25 : 710 ~ 718, 1984
- 2) KOBAYASHI S, ARAI S, HAYASHI S, FUJIMOTO K :  $\beta$ -lactamase stability of cefpirome (HR810), a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. Antimicrob. Agents Chemoth. 30 : 713 ~ 718, 1986
  - 3) ARAI S, KOBAYASHI S, HAYASHI S, FUJIMOTO K : *In vitro* antimicrobial activity of cefpirome, a new cephalosporin with a broad antimicrobial spectrum. Jap. J. Antibiotics 40 : 969 ~ 982, 1987
  - 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。729 ~ 735, 1990
  - 5) UHLEIN M, BRETZ K, HENNIG J : Bestimmung von Präparat HR810 in Serum und Urin mittels HPLC. Hoechst A.G. unpublished report
  - 6) 松本慶蔵, 小林宏行 : 第38回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウムII。HR810, 長崎, 1990
  - 7) MAAB L, MALLERZYK V, VERHO M : Pharmacokinetics of Cefpirome (HR810), a new Cephalosporin Derivative Administered Intramuscularly and Intravenously to Healthy Volunteers. Infection 15 : 207 ~ 210, 1987
  - 8) KLESEL N, SEIGER K : Pharmacokinetic properties of the new cephalosporin antibiotic HR810 in animals. Infection 11 : 318 ~ 321, 1983
  - 9) UHLEIN M, HENNIG J, WICHA I : Haltbarkeit von HR810 bzw. Ceftazidim enthaltenden Plasma- und Serumproben unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Hoechst A. G. unpublished report

## DETERMINATION METHOD AND STABILITY OF CEFPIROME SULFATE IN BIOLOGICAL SAMPLES

SHIGERU TABATA, YUKO KOIKE and SHORYO HAYASHI  
Pharma Research Laboratories, Hoechst Japan Ltd.,  
1-3-2 Minamidai Kawagoe Saitama 350, Japan

YUMIE SATO and INTETSU KOBAYASHI  
Laboratory of Chemotherapy, Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratories

MASASHI HIRAYAMA and YOSHINARI HASEGAWA  
Laboratory, Shirakawa Site, Nippon Roussel, K.K.

We established microbiological assay (bioassay) and HPLC methods for determination of cefpirome sulfate (CPR) in body fluid and tissue samples.

When the bioassay was carried out by the paper-disc method, using *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as the test organism and sodium citrate agar (pH 6.4) as the test medium, CPR could be determined in plasma (serum), urine, bile and tissues. Human plasma or Consera<sup>®</sup> were used to prepare the standard solutions for determination of the human plasma level, and 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) was used for the assay of urine, bile and tissue levels. The detection limits of CPR in plasma and phosphate buffer were 0.39 and 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. By the disc-plate method, using *Escherichia coli* ATCC 39188 as the test organism and nutrient agar (Difco) as the test medium, the CPR level at lower concentrations (detection limit, 0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) was assayed.

Plasma (serum) and urine levels of CPR were determined by HPLC with detection limits of 0.1 and 5.0  $\mu\text{g/ml}$ . CPR concentrations measured by HPLC were in good agreement with those of the bioassay.

CPR was stable at  $-20^{\circ}\text{C}$  in serum and urine for at least 12 weeks and in tissues for 8 weeks.