

Cefepime (CFPM) の体液内濃度測定法

中名生宏・城殿正博・清水孝容・高橋紀光

ブリストル・マイヤーズ研究所株式会社前臨床研究所*

新注射用セフェム剤 cefepime (CFPM) の体液内濃度測定法について検討した。本剤の体液内濃度は、*Morganella morganii* IFO 3848 を検定菌とする微生物学的定量法により、低濃度まで感度良く定量することができた。血清中の CFPM はカップ法および Agar well 法で 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 、ディスク法で 0.16 $\mu\text{g/ml}$ まで測定可能であった。血清中濃度の測定にはブール血清を標準液に用いることが望ましかった。CFPM は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によっても定量でき、ヒトに CFPM を静脈内投与したときの血清および尿試料を bioassay と HPLC 法によって同時に測定した結果は、高い相関性を示した。ヒトに CFPM を静脈内投与したときの尿試料を TLC-Bioautography で検討した結果、CFPM 以外の抗菌活性をもつスポットは検出されなかった。CFPM は弱酸性の溶液中で安定であり、血清中では尿中よりやや不安定であったが、 -20°C 以下に保存すれば 30 日間安定であった。

Key words : Cefepime, Bioassay, HPLC, Body fluid

Cefepime (CFPM) は 7 位側鎖に α -methoxyimino-aminothiazole 基、3 位側鎖に N-methylpyrrolidinium 基を導入した新しい注射用セフェム剤で、ブドウ球菌、連鎖球菌等のグラム陽性菌から、*Pseudomonas aeruginosa* を含めた各種グラム陰性菌まで広範囲の菌に対して優れた抗菌力を示す¹⁾。

本報では体内動態を明らかにするための微生物学的定量法、高速液体クロマトグラフィーによる定量法を検討し、体液中での安定性および尿中抗菌活性代謝物の検索を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 薬 剤

CFPM は Bristol-Myers (USA) Pharmaceutical Research & Development Division より供給を受けた。

2. 試験菌

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* FDA 209 P, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 および *Morganella morganii* IFO 3848 を用いた。

3. 測定培地

Nutrient agar (NA, Difco), Muller-Hinton agar (MHA, 日水), Antibiotic Medium 2 (AB-2, BBL) および日本抗生物質医薬品基準収載の培地 (Modified AB-2)²⁾ を用いた。Modified AB-2 の組成はポリペプトン 0.6 %, 肉エキス 0.15 %, 酵母エキス 0.3 %, ブドウ糖 0.1 %, 寒天 1.3 %, pH 6.5 である。

ウ糖 0.1 %, 寒天 1.3 %, pH 6.5 である。

4. 試験菌液の調製法

測定培地で 2 回以上継代した新鮮菌を滅菌水に懸濁し、透光率 50 % (530 nm) の菌液を調製し、接種菌液とした。

5. 標準希釈液の調製

1 % リン酸塩緩衝液 pH 6.0, 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 4.5, pH 7.0), ヒトブール血清, モニトロール I[®] (Dade), およびコンセーラ[®] (日水) を用いた。

6. 微生物学的濃度測定法 (Bioassay)

ペーパーディスク法、カップ法および Agar well 法を用いた。ペーパーディスクは、直径 8 mm (ADVA-NTEC, Thin), カップは外径 8 mm, 内径 6 mm, 高さ 10 mm のステンレスシリンダーを用いた。Agar well は小型自動穿孔装置 (東洋測器) を用いて直径 8 mm の孔を穿孔した。ディスク法では 30 μl , カップ法では 270 μl , Agar well 法では 100 μl をフィンピペット (Labsystems) を用いてスポットまたは分注した。寒天平板はディスク法およびカップ法では試験菌を接種した測定培地を直径 90 mm のシャーレに 8 ml 分注し、薄層平板を調製した。Agar well 法では、基層 10 ml に種層 5 ml を重層して用いた。

7. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法

血清試料 0.5 ml に 1 N 塩酸 50 μl を加え、アミコンセントリフリー MPS-3 (グレースジャパン) を用いて

*〒444-01 愛知県額田郡幸田町大字坂崎字双子山 1

遠心限外濾過 (1,000 G, 15 min) し、濾液の 25 μ l を HPLC 分析に供した。尿試料はメンブランフィルター (ミリポア, 0.45 μ m) で濾過し、濾液を 0.02 M のリン酸二水素カリウム溶液で 10 倍希釈しその 10 μ l を HPLC 分析に供した。検量線用の標準溶液は 0.02 M リン酸二水素カリウム溶液を用いて用時調製し以下の条件で測定した。

装 置 LC-800 シリーズ (日本分光)
 カ ラ ム Inertsil ODS-5 4.6 mm ID $\times$ 150 mm
 (ガスクロ工業)
 カラム温度 35 $^{\circ}$ C
 移 動 相 0.01 M ドデシル硫酸ナトリウム・リン酸 (2%, w/v) 溶液 : アセトニトリル = 3 : 2
 流 速 1 ml/min
 検 出 UV 254 nm

8. 尿中抗菌活性代謝物の検索

CFPM をヒトに静脈内投与して得られた尿を試料とし、TLC-Bioautography により抗菌活性代謝物の検索を行なった。TLC は silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK), 展開溶媒は、アセトニトリル・水・酢酸 (150 : 75 : 1) を用いた。検定菌は *M. morganii* IFO 3848 を、培地は Modified AB-2 を使用した。

9. 各種溶液中での安定性

CFPM を各種 pH の水溶液に溶解し、23 $^{\circ}$ C で、また、ヒトプール血清、ヒトプール尿に溶解し、-20 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C, および 23 $^{\circ}$ C で保存し、それぞれの残存活性を経時的に bioassay 法で測定した。濃度は、緩衝液では 250 μ g/ml, 血清では 5 μ g/ml, 尿では 500 μ g/ml とした。

II. 実験結果

1. 検定菌の選定

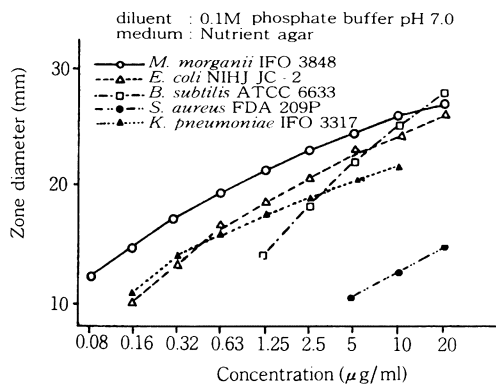


Fig. 1. Standard curves of cefepime on various test organisms using disc-plate method

全菌種とも測定培地に NA を用い、CFPM 濃度と阻止円の関係を検討した (Fig. 1)。検出限界は、*M. morganii* IFO 3848 が 0.08 μ g/ml と最も良く、ついで、*K. pneumoniae* IFO 3317, *E. coli* NIHJ JC-2 の 0.16 μ g/ml で、グラム陽性菌の *B. subtilis* ATCC 6633 は 1.25 μ g/ml, *S. aureus* FDA 209 P は 5 μ g/ml と感度が低かった。

阻止円の形状に関しては、*K. pneumoniae* IFO 3317 が最も鮮明で、ついで *M. morganii* IFO 3848 が比較的鮮明、*E. coli* NIHJ JC-2, *B. subtilis* ATCC 6633 および *S. aureus* FDA 209P は不鮮明であった。以上の結果より、検出感度が最もすぐれ、阻止円形状も比較的鮮明な *M. morganii* IFO 3848 を検定菌として選定した。

2. 培地の選定

検定菌として *M. morganii* IFO 3848 を用い、各種培地において CFPM 濃度と阻止円の関係について検討した (Fig. 2)。

NA, MHA, AB-2 の検出限界はともに 0.16 μ g/ml であったが、Modified AB-2 は 0.04 μ g/ml であった。阻止円の形状に関しては、Modified AB-2 が最も鮮明で、他はいずれもやや不鮮明であった。以上の結果より、Modified AB-2 を検定培地として選定した。

3. 希釈液の検討

希釈液 pH の影響 : 1% リン酸塩緩衝液 pH 6.0 および 0.1 M リン酸塩緩衝液 pH 4.5, pH 7.0 を用いて検量線を作成し、pH の検量線に与える影響を検討したところ、各検量線はほとんど一致し、pH 4.5~7.0 の範囲では pH の影響は小さいものと考えられた。

血清の影響 : ヒトプール血清の検量線と、代用血清のモニターールおよびコンセーラの検量線を作成し、比較した (Fig. 3)。

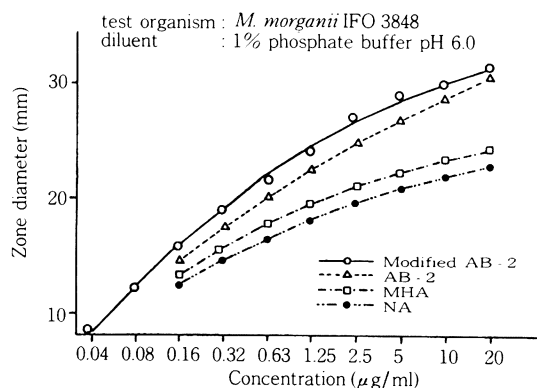


Fig. 2. Standard curves of cefepime on various media using disc-plate method

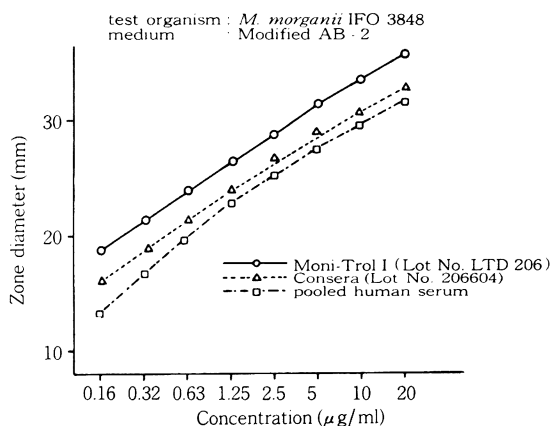


Fig. 3. Influence of human serum on standard curves of cefepime using disc-plate method

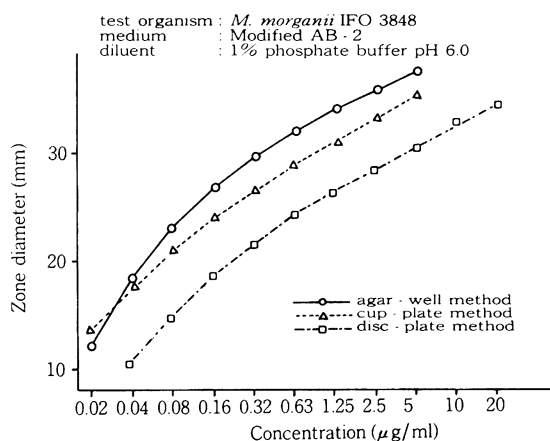


Fig. 4-1. Standard curves of cefepime for urine samples

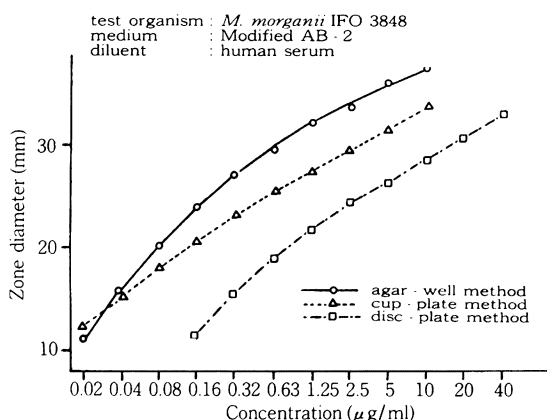


Fig. 4-2. Standard curves of cefepime for human serum

モニターおよびコンセーラの検量線は、ヒトプール血清の検量線と大きく異なるため、これら代用血清を用いることは不適当であると考えられた。

4. 測定法の比較

1%リン酸塩緩衝液 pH 6.0 およびヒトプール血清を用いて薄層ディスク法、薄層カップ法および Agar well 法の測定法の比較を行なった (Fig. 4-1, 4-2)。

1%リン酸塩緩衝液 pH 6.0 において、薄層ディスク法の検出限界は $0.04 \mu\text{g/ml}$ 、薄層カップ法および Agar well 法はともに $0.02 \mu\text{g/ml}$ であった。ヒトプール血清において、薄層ディスク法の検出限界は $0.16 \mu\text{g/ml}$ 、薄層カップ法および Agar well 法はともに 1%リン酸塩緩衝液 pH 6.0 と同様 $0.02 \mu\text{g/ml}$ であった。

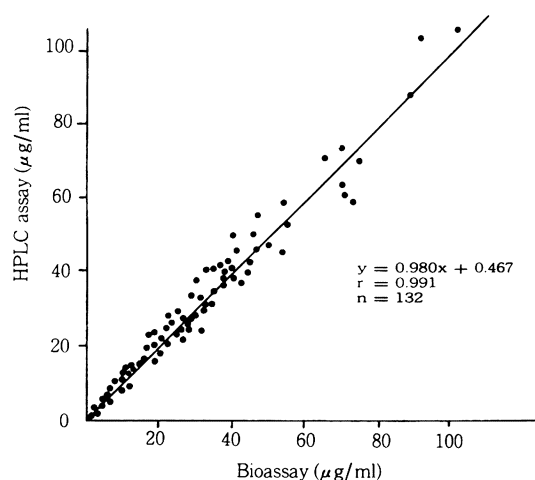


Fig. 5-1. Correlation between cefepime concentrations in serum determined by HPLC and bioassay

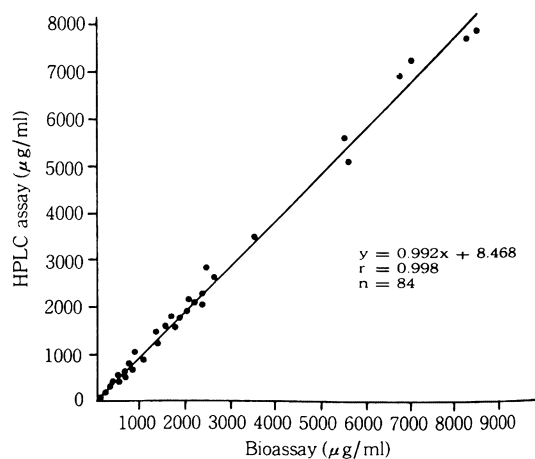


Fig. 5-2. Correlation between cefepime concentrations in urine determined by HPLC and bioassay

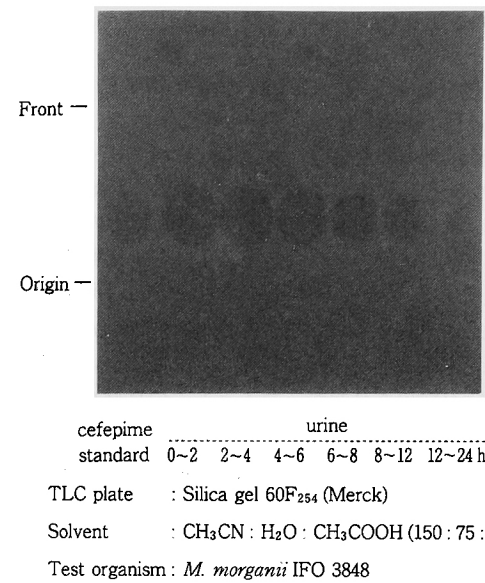


Fig. 6. TLC-Bioautogram of human urine after intravenous administration of cefepime (2g/body)

5. Bioassay 法と HPLC 法による測定値の比較
CFPM 0.5 g および 1 g 投与時の血清および尿を bioassay 法と HPLC 法で比較した。その相関図を Fig. 5-1, 5-2 に示す。

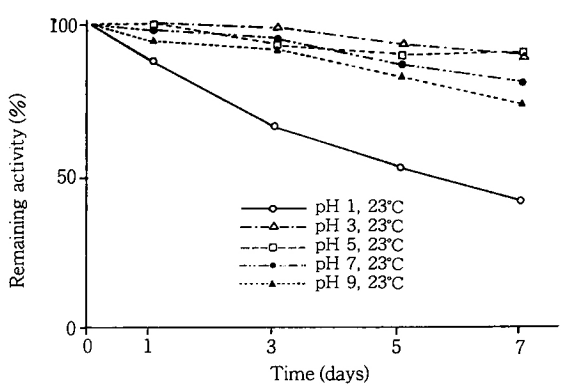


Fig. 7-1. Stability of cefepime solutions of various pH

血清 132 検体, 尿 84 検体について HPLC assay を縦軸に, bioassay を横軸にプロットしたときの回帰直線は, それぞれ, $Y = 0.980X + 0.467$ ($r = 0.991$), $Y = 0.992X + 8.468$ ($r = 0.998$) を示し, 両測定法とも良好な一致性が認められた。

6. 尿中抗菌活性代謝物の検索

CFPM を静脈内点滴投与した時のヒト尿中の抗菌活性代謝物を TLC-Bioautography により検索した結果を Fig. 6 に示す。いずれの試料においても CFPM 以外の抗菌活性代謝物は検出されなかった。

7. CFPM の溶液中安定性

Table 1. Microbiological assay of cefepime

Specimen	Serum	Urine
Type	disc-plate, cup-plate, and agar-well method	
Test organism	<i>M. morganii</i> IFO 3848	
Inoculum	1ml of cell suspension (T=50% at 530nm) /100ml of assay agar	
Medium	Modified AB-2	
	polypepton	6.0g
	glucose	1.0g
	yeast extract	3.0g
	beef extract	1.5g
	agar	13.0g
	distilled water	1000ml pH 6.5
Standard solution	pooled human serum*	1% phosphate buffer pH 6.0
Incubation	16h at 37°C	
Minimal detectable concentration		
Disc-plate method	0.16 μg/ml	0.04 μg/ml
Cup-plate method	0.02 μg/ml	0.02 μg/ml
Agar-well method	0.02 μg/ml	0.02 μg/ml
Sample storage	-20°C	

*Can not substitute Moni-Trol I® or Consera® for pooled human serum.

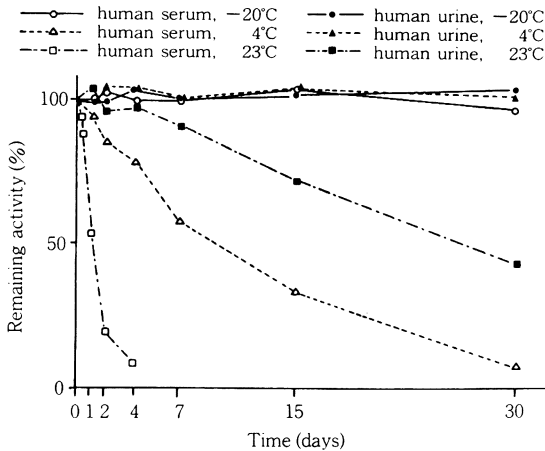


Fig. 7-2. Stability of cefepime in human serum and urine

CFPM を各種 pH 水溶液中に室温下で保存したときの安定性を Fig. 7-1, ヒトプール血清およびヒトプール尿に -20°C , 4°C , 23°C で保存した時の安定性を Fig. 7-2 に示す。

CFPM は水溶液中では、弱酸性で最も安定であった。また、血清中では尿や水溶液より不安定であったが、凍結保存すれば 30 日間は失活を認めなかった。尿中では、凍結あるいは 4°C に保存すれば 30 日間は失活

を認めなかった。

III. 考 察

以上の結果より、CFPM の微生物学的定量法を Table 1 に要約した。

血清試料の濃度測定において、モニトロール、コンセーラなどの代用血清の使用が可能であれば便利であるが、これら代用血清とヒトプール血清との検量線では大きな差が認められたので、これらの使用は避けるべきであると考ええる。ヒト血清と尿を Bioassay と HPLC で測定した結果は、測定値の相関性が高く、良く一致することが確認された。ヒト尿について活性代謝産物が検出されなかったこともこの良好な相関性を裏づけていると考えられる。CFPM は弱酸性の溶液で安定であり、血清中では尿や水溶液中よりやや不安定であったが、 -20°C 以下に凍結保存すれば少なくとも 30 日間は安定であると考えられる。

文 献

- 1) Kessler R E, Bies M, Buck R E, Chisholm D R, Pursiano T A, Tsai Y H, Misiek M, Price K E, Leitner F : Comparison of a new cephalosporin, BMY 28142, with other broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 27 : 207~216, 1985
- 2) 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. 730, 1990

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR CEFEPIME CONCENTRATION IN BIOLOGICAL FLUIDS

Hiroshi Nakanomyo, Masahiro Kidono, Takayoshi Shimizu,
Norimitsu Takahashi

Preclinical Research Laboratories, Bristol-Myers Research Institute Ltd.,
1 Futagoyama, Sakazaki, Kota-cho, Nukata-Gun, Aichi 444-01, Japan

A microbiological assay (bioassay) and HPLC methods for quantitative determination of cefepime (CFPM) in body fluids were investigated. The drug was studied by agar-diffusion microbiological assay using *Morganella morganii* IFO 3848 as the test organism and Modified Antibiotic Medium 2 as the test medium. The minimum detectable concentrations of CFPM in human serum were $0.02\text{ }\mu\text{g/ml}$ for the cup-plate and agar-well methods and $0.16\text{ }\mu\text{g/ml}$ for the disc-plate method. The lowest detectable concentrations of CFPM in the buffer were $0.02\text{ }\mu\text{g/ml}$ for the cup-plate and agar-well methods and $0.04\text{ }\mu\text{g/ml}$ for the disc-plate method. Standard solutions prepared with human serum and 1% phosphate buffer (pH 6.0) should be used for the assay of serum and urine samples. The concentrations of CFPM in serum and urine determined by bioassay correlated well with those determined by HPLC. No bioactive metabolites of CFPM were observed in human urine samples. CFPM in human plasma and urine was stable at -20°C for at least 30 days.