

Sparfloxacin の体液内濃度測定法

黒部暢之・大植富夫・山口俊和・中村信一

大日本製薬株式会社総合研究所*

Sparfloxacin (SPFX) の bioassay 法による体液内濃度測定法と体液中での安定性を検討し、以下の成績を得た。

SPFX の濃度測定は *Escherichia coli* Kp を検定菌とするアガーウェル (AW) 法が感度・精度ともに良好であった。標準液は 1/15 M リン酸緩衝液 pH 7.0 (尿中濃度の測定など) またはヒト血清 (血中濃度の測定など) で調製した。但し、血清 (漿) 試料を 3 倍以上希釈して測定する場合には、リン酸緩衝液の標準曲線を用いることが可能であった。AW 法による SPFX の定量限界は約 0.01 $\mu\text{g/ml}$ であり、測定値の日内および日間変動係数 (CV%) は 16% 以下であった。標準原液およびヒト血清や尿に添加した SPFX は、 -20°C で凍結保存すれば少なくとも 2 週間は安定であった。

Key words : Sparfloxacin, SPFX, Bioassay, Agar well, HPLC

Sparfloxacin (SPFX) はグラム陽性菌、グラム陰性菌およびブドウ糖非発酵菌に加え、クラミジア、マイコプラズマ、抗酸菌にも強い抗菌作用を有する広域スペクトルの新キノロン剤で¹⁾、体内動態的には組織移行性と持続性の良好な薬剤である²⁾。

キノロン (QL) 剤の bioassay 法による体液内濃度測定法は本邦で多く検討され、既に薄層カップ (TC) 法³⁻⁶⁾、ペーパーディスク (PD) 法^{5, 9)} およびアガーウェル (AW) 法⁹⁻¹¹⁾ が用いられており、これら測定法の多くは QL 剤に高感受性の *Escherichia coli* Kp 株を検定菌としている。そこで SPFX の bioassay 法の設定においては、検定菌に感度の良い *E. coli* Kp を用いることとし、測定感度と精度の面から種々の検討を行った。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬物

SPFX は大日本製薬(株)総合研究所で合成されたものの¹²⁾を用いた。

2. 検定菌

当研究所で分離同定した *E. coli* Kp は、現在 QL 剤の bioassay 検定菌として広く使われており、SPFX にも高い感受性を示す (日本化学療法学会標準法の寒天希釈法による MIC は 0.0031 $\mu\text{g/ml}$)¹⁾。そこで *E. coli* Kp 株を SPFX の bioassay 検定菌に用いることにした。

3. 定量用培地

AW 法に用いた定量用培地は、特記しない限り水 11 当たり heart infusion broth (HIB, Difco) 12.5 g と寒天 15.7 g を溶解して調製した。Bioassay 法の検討で用いた TC 法⁹⁾ や PD 法⁹⁾ の定量用培地には Mueller-Hinton agar (Difco) を用いた。

4. 検定菌の培養と定量用培地への接種

E. coli Kp は、普通ブイヨン (栄研) で 37°C 1 夜培養し ($\text{OD}_{625} =$ 約 0.22)、予め 44~45°C に保温した定量用培地に、特記しない限り 1% の割合で接種した。

5. 標準液の調製

SPFX を精秤後、当モル量もしくは少し過剰の 0.1 N NaOH で溶解し、水を加えて 1 mg/ml の標準原液を調製した。次いで、標準原液を 1/15 M リン酸緩衝液 pH 7.0 (PB)、ヒト血清 (大日本製薬) または 33% ヒト血清添加 PB で希釈し、0.0125~0.8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲に調整したものを標準液とした。これら標準液は用時調製した。

6. 定量操作

AW 法の定量操作は以下の如く実施した。菌を接種した定量用培地をシャーレ (90×15 mm, テルモ) に 12 ml ずつ分注して水平に固化させ、5°C に約 2 h 放置後、小型自動穿孔装置 AHP-104 (東京 M・I 商会) で 8 mm 径のウェルを 4 ケ所ずつ空けたものを定量用平板とした。標準液および試料液はウェル当たり 60 μl ずつ充填した。通常、標準曲線の作製には 5 枚の平板を用

*〒564 大阪府吹田市江の木町 33-94

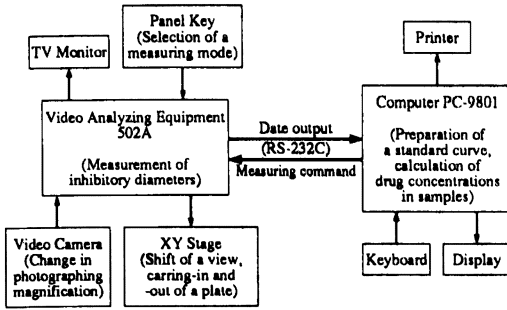


Fig. 1. Automatic measuring system of inhibitory diameters (AMS)

い、標準液 1 濃度当たり 5 ウェル使用した。また、定量には試料液当たり 3 枚の平板を用い、平板当たり 1 ウェル、合計 3 ウェル使用した。阻止円は 37°C で 18~20 h 培養後に計測した。なお、TC 法⁹⁾や PD 法⁹⁾はそれぞれ文献に従い実施した。

7. 阻止円直径の計測

画像解析装置 502 A (ダックエンジニアリング) を用いて阻止円直径を計測し、逐次、計測値をコンピュータ PC-9801 vm (NEC) に転送して処理した。Fig. 1 にその阻止円自動計測システム (AMS) の構成と各部機能の概略を示す。AMS は画面の指示に従って操作すれば、標準曲線の作成と試料中濃度の算出が行えるようになっており、測定結果はプリンタから出力される。なお、阻止円計測法の検討においては、従来の竹尺による計測も併用した。

8. SPFX の安定性

標準原液 (pH 9.0)、血清および尿中における SPFX の安定性を、AW 法により残存濃度を測定して検討した。血清と尿の試料はそれぞれヒト血清 (pH 7.2) と濾過滅菌したヒト新鮮尿 (pH 6.5) で標準原液を希釈し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したものをを用いた。試料液は polystyrene 製滅菌管 (直径 16.5 mm) に入れ密栓し、室温、4°C および -20°C に保存した (室温保存のみ非遮光)。測定は試料を PB で適宜希釈して行った。

9. HPLC 法

1) 血漿中 SPFX の測定法

血漿 1 ml に内部標準液 (IS) 1 ml と CH_2Cl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ (8:2) 混液 5 ml を加え、10 分間振盪した。遠心分離後、有機層 4 ml をとり減圧下濃縮乾固し、残渣を移動層 100 μl に溶解し、その 20 μl を HPLC に注入した。カラムは YMC Pack A-312

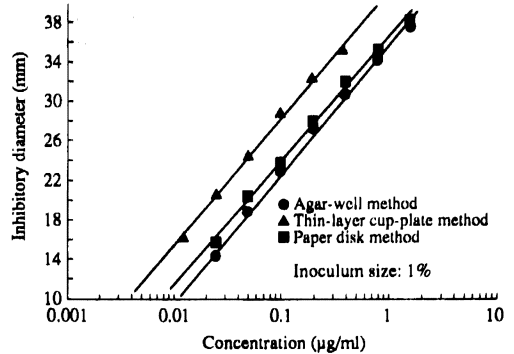


Fig. 2. Standard curves of sparfloxacin by different methods

(ODS, 5 μm , 150 \times 6 mm, 山村化学) を 40°C で使用し、移動相は 5% CH_3COOH - CH_3CN - CH_3OH (70:15:15) を流速 1.5 ml/min で流した。検出は 364 nm の吸収で行った。なお IS には、5-amino-7-(3-amino-3-ethyl-1-pyrrolidiny)-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid (AT-4117) を pH 7.4 の PB で 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整したものをを用いた。

2) 尿中 SPFX の測定法

尿 20 μl を直接 HPLC に注入した。カラム、カラム温度、検出波長および流速は前項の条件に従った。移動相には 5% CH_3COOH (A) および CH_3CN - CH_3OH (1:1) (B) を用い、以下の直線グラジエントを行った: 0~1 分; A-B (90:10), 1~10 分; A-B (90:10) から A-B (60:40), 10~13 分; A-B (60:40) から A-B (30:70), 13~16 分; A-B (30:70) から A-B (90:10)。

10. 統計処理

2 群間の有意差検定に用いた Student および Cochran-Cox の検定の計算には、統計ライブラリー I (Yukms) のプログラムを利用した。

II. 結果および考察

1. Bioassay 法の比較

SPFX の AW 法、TC 法、PD 法における標準曲線を作成し、測定感度や阻止円直径のパラッキを比較した。測定感度は TC 法が約 0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と最も良かったが、他の方法でも 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であり実用上充分高かった (Fig. 2)。一方、平均直径の変動係数 (CV%) は、AW 法が平均 1.01% であり、TC 法や

Table 1. Coefficients of variance (CV%) for inhibitory diameters measured by three bioassay methods

Sparfloxacin ($\mu\text{g/ml}$)	Agar-well method		Thin-layer cup- plate method		Paper disk method	
	Mean \pm SD*	CV%	Mean \pm SD*	CV%	Mean \pm SD*	CV%
1.6	37.00 \pm 0.55	1.5			37.80 \pm 0.68	1.8
0.8	33.70 \pm 0.24	0.7			34.70 \pm 0.40	1.2
0.4	30.30 \pm 0.40	1.3	34.75 \pm 0.45	1.3	31.60 \pm 0.49	1.6
0.2	27.10 \pm 0.34	1.3	31.90 \pm 0.20	0.6	27.70 \pm 0.40	1.4
0.1	22.75 \pm 0.27	1.2	28.50 \pm 0.32	1.1	23.50 \pm 0.45	1.9
0.05	18.71 \pm 0.11	0.6	24.65 \pm 0.60	2.4	20.15 \pm 0.30	1.5
0.025	14.25 \pm 0.22	1.5	20.48 \pm 0.54	2.6	15.59 \pm 0.45	2.9
0.0125	10.00 \pm 0.00	0.0	15.96 \pm 0.33	2.1		
For CV%:						
n		8		6		7
Mean		1.01*		1.68		1.76
SD		0.53		0.80		0.56

*Mean \pm SD of five inhibitory diameters.

*Significantly different from the thin-layer cup-plate method ($p < 0.1$) and from the paper disk method ($p < 0.02$) by Cochran-Cox's t test.

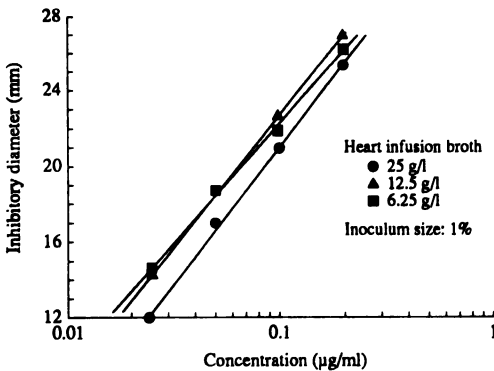


Fig. 3. Effect of medium concentrations on the standard curves of sparfloxacin by the agar-well method

PD法に比し有意に小さく、バラツキの最も少ない方法であった (Table 1)。またAW法は、AMSによる阻止円計測が容易で、他の二法に比べ阻止円計測の自動化を図る上で有利な方法であった。従って、SPFXのbioassay法には *E. coli* Kpを検定菌とするAW法を用いることにした。

2. 定量用培地の検討

AW法の寒天平板は、ウェル作製のため穿孔装置で穿孔するが、その際、培地の寒天濃度やシャーレ当たりの培地分量がどのように影響するかを予め調べた。その結果、寒天濃度が1.57%の定量用培地をシャーレ当

たり12 mlずつ分注した場合に、ウェルの作製が最も確実であった。次に定量用培地のHIBを11当たり25 g (メーカ指示量)、12.5 g (1/2量)および6.25 g (1/4量)溶解し、SPFXの標準曲線における培地濃度の影響を検討した。Fig. 3の如く、標準曲線は1/2~1/4量の培地濃度で良好な感度を示したが、阻止円の境界は1/4量より1/2量の方が比較的明瞭であった。そこで定量用培地は、水11当たりHIB 12.5 gと寒天15.7 gを溶解して調整することとした。

3. 接種菌量の検討

普通ブイヨンで1夜培養した *E. coli* Kpを定量用培地に0.5、1および2%の割合に接種して、標準曲線に及ぼす菌量効果を検討した。その結果、これら接種菌量の範囲内では測定感度に大差は無かったが、標準曲線の勾配は2%の接種菌量でやや緩やかであった (Fig. 4)。測定の精度は勾配が急であるほど向上すると思われるので、接種菌量は1%とした。

4. 阻止円の計測法

阻止円計測に要する時間は、AMSでは平板1枚当たり約30秒で、竹尺による計測は50~120秒程度であった。計測精度は1枚の平板を5回計測して検討したが、竹尺による計測では複数の平板を用いて、測定者に対象の平板が分からないようにした。計測値の平均CV%は竹尺が0.59~0.83%であるのに対しAMSが0.33%と有意に小さく、精度はAMSの方が良好であった (Table 2)。また、AMSの計測直径の平均値と竹尺の

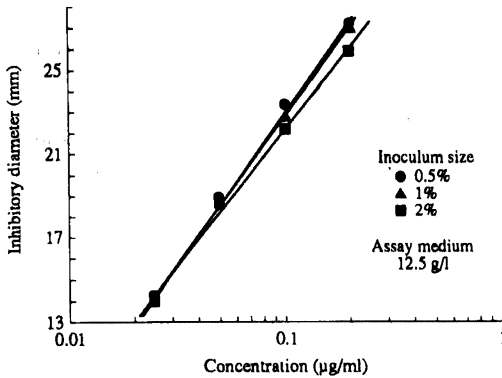


Fig. 4. Effect of inoculum sizes on the standard curves of sparfloxacin by the agar-well method

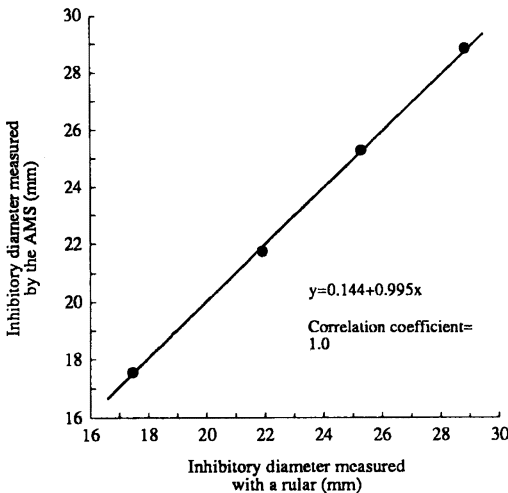


Fig. 5. Correlation between mean inhibitory diameters ($n=5$) measured by the AMS and with a ruler

それとは良く一致していた ($y=0.144+0.995x$, $r=1.0$) (Fig. 5)。このように AMS による計測は、従来の竹尺より迅速であり精度も高いことから、阻止円計測法としては優れた方法と思われる。

5. 標準曲線に及ぼす血清の影響

PB, ヒト血清および 33% ヒト血清含有の PB で標準液を調製し、標準曲線を作成した (Fig. 6)。ヒト血清の標準曲線は阻止円直径が少し小さく右方にずれていた。従って、血清試料を希釈せずに測定する場合には血清の標準曲線を、また 3 倍以上希釈する場合には、PB の標準曲線を用いることにした。

6. AW 法と HPLC 法の比較

SPFX の Phase I 試験で得られた血漿と尿を AW 法

Table 2. Coefficients of variance for inhibitory diameters measured with an automatic measuring system (AMS) and a ruler

Sparfloxacin ($\mu\text{g/ml}$)	Coefficient of variance (%), $n=5$		
	With AMS	With a ruler by:	
		Person A	Person B
0.2	0.32	0.30	0.50
0.1	0.28	0.40	0.48
0.05	0.00	0.47	0.92
0.025	0.72	1.18	1.43
Mean	0.33*	0.59	0.83
SD	0.30	0.40	0.45

* Significantly different from the measurement with a ruler (person B, $p<0.1$) by Cochran-Cox's t test.

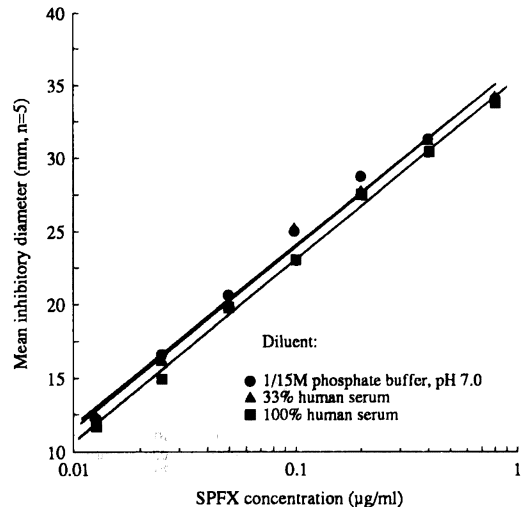


Fig. 6. Effect of serum on the standard curves of sparfloxacin by the agar-well method

と HPLC 法で測定し、SPFX 濃度を比較した。血漿中濃度と尿中濃度の測定値はいずれも両測定法で良く一致した (Fig. 7)。SPFX の代謝物にはグルクロン酸抱合体が知られているが、体内の抗菌活性物質は未変化の SPFX のみであることから¹³⁾、両測定法で高い相関性が得られたものと思われる。

7. SPFX の安定性

SPFX の血清、尿および標準原液中における安定性を室温、 4°C および -20°C に保存して検討した (Fig. 8)。ヒト血清を室温に保存した場合、SPFX の残存濃度は 1 週間後にやや低下し、2 週間後で 44% に減少した。血清や尿を 4°C または -20°C で保存した場合、2 週間後も濃度の低下は見られなかった。次いで、SPFX

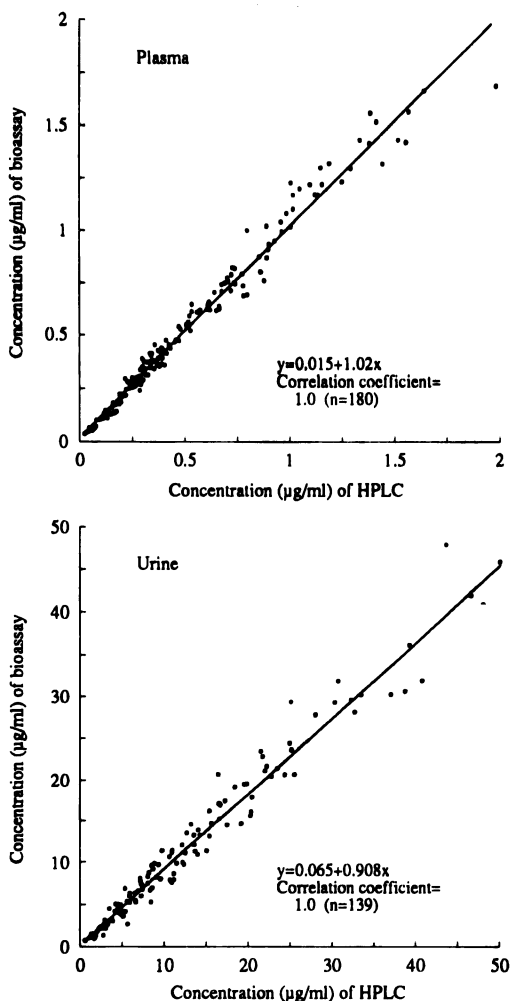


Fig. 7. Correlation between concentrations of sparfloxacin measured by the HPLC and the agar-well methods

の臨床治験で採取した血漿、尿および胆汁の一部試料を用いて、 -20°C 凍結保存時の安定性を検討した。血漿と尿のSPFX濃度は凍結保存の前後で同様の値を示したが、胆汁中濃度は凍結保存後に高くなった (Table 3)。また、胆汁中濃度はAW法の測定値がHPLC法より少し高くなる傾向にあった (データ省略)。これは胆汁中に多いSPFXのグルクロン酸抱合体が凍結保存、凍結融解またはbioassay中にその1部が加水分解されてSPFXに戻るためではないかと考えられる。従って、胆汁は採取後、速やかにHPLC法にて測定す

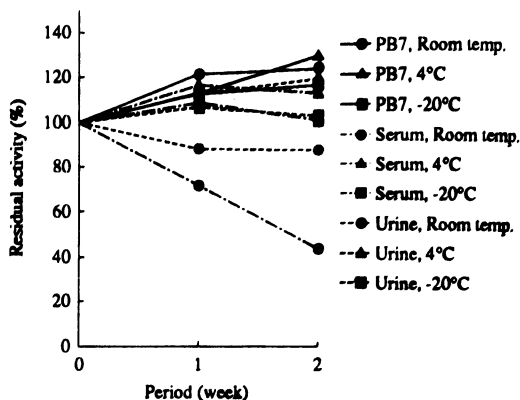


Fig. 8. Stability of sparfloxacin in biological fluids at -20°C , 4°C and room temperature

Table 3. Stability of sparfloxacin in plasma, urine, and bile of patients given 200- or 300-mg sparfloxacin orally

Statistics	Plasma (4)	Urine (17)	Bile (12)
Concentration ($\mu\text{g/ml}$):			
Mean \pm SD of			
1st assay	0.95 ± 0.82	15.4 ± 8.4	2.22 ± 1.20
2nd assay	0.97 ± 0.83	16.2 ± 12.8	3.90 ± 2.40
Paired t test:			
Mean \pm SD of			
difference	± 0.155	± 6.505	± 1.602
t cal	0.193	0.981	3.627*

The values in parentheses indicate the number of samples.

The samples were stored in a freezer (-20°C) after the 1st assay and re-determined after intervals of 22 days for plasma, 12 days for urine, and 41 days for bile.

*Significantly different between the 1st and 2nd assays ($p < 0.01$).

るなどの配慮が必要と思われる。

8. 日内および日間変動

SPFXの 0.12 と $0.04 \mu\text{g/ml}$ の標準液を試料液としてAW法による測定値の日内および日間変動を検討した。なお、日間変動の検討に際しては、試料液は 4°C の冷蔵庫に1日保存して試験に供した。日内および日間の測定値のCV%は、 $0.12 \mu\text{g/ml}$ が約5%であり、 $0.04 \mu\text{g/ml}$ が約16%であった (Table 4)。CV%は濃度の低い所で大きくなったが、SDはほぼ一定していた。また、日内と日間の測定値の平均値間に有意差は認められなかった。従って、AW法によるSPFXの測定は再現性が高いと思われる。

Table 4. Variation of assay values of sparfloxacin by agar-well method

No.	Intra-day		Inter-day	
	0.12 ^a	0.04	0.12	0.04
1	0.11 ^b	0.04	0.10	0.03
2	0.12	0.03	0.10	0.04
3	0.11	0.03	0.11	0.03
4	0.11	0.03	0.11	0.03
5	0.11	0.04	0.11	0.04
Mean	0.112	0.034	0.106	0.034
SD	0.004	0.005	0.005	0.005
CV% ^c	4.0	16.1	5.2	16.1

^a Prepared concentration ($\mu\text{g/ml}$),

^b Assayed concentration ($\mu\text{g/ml}$),

^c Coefficient of variation (%).

Not significant between intra- and inter-assays.

Ⅲ. ま と め

以上の結果に基づき、SPFX の体液中濃度測定法として下記のアガーウェル法を設定した。本法は穿孔装置や阻止円自動計測システムの利用により操作の省力化が可能であり、感度・精度とともに良好であった。

Sparfloxacin (SPFX) の体液中濃度測定法

1. Bioassay 法

アガーウェル法を用いる（薄層カップ法⁸⁾でも可能）。

2. 検定菌

Escherichia coli Kp 株を用いる。

3. 定量用培地

水 1 l 当たり heart infusion broth 12.5 g と寒天 15.7 g を溶解する。

4. 菌接種

普通ブイヨンで 37°C 1 夜培養した菌液 ($\text{OD}_{625} = \text{約} 0.22$) を 44~45°C の定量用培地に 1% の割合で接種する。

5. 標準液

1/15 M リン酸緩衝液 pH 7.0 (PB) またはヒト血清で 0.025~0.2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製する。

6. 定量用試料

血清や尿は -20°C で凍結保存すれば少なくとも 2 週間は安定である。測定に際しては適宜 PB で希釈する。胆汁は SPFX のグルクロン酸抱合体が多いため、採取後、速やかに HPLC 法にて測定することが望ましい。

7. 標準曲線

血清試料を希釈せずに測定する場合は血清の標準曲線

を用い、血清や尿を 3 倍以上希釈した場合には PB の標準曲線を用いる。

8. 阻止円の計測

37°C で 18~20 h 培養後、阻止円自動計測システムにより計測する（マニュアルで計測してもよい）。

9. 定量感度

約 0.01 $\mu\text{g/ml}$ である。

10. 日内および日間変動

測定値の日内および日間変動係数 (CV%) は 16% 以下である。

(実施期間: 1987 年 10 月~1990 年 6 月)

文 献

- 1) Nakamura S, et al. : *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of AT-4140, a new broad spectrum quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 33 : 1167~1173, 1989
- 2) Nakamura S, et al. : Pharmacokinetics of a novel quinolone, AT-4140, in animals. *Antimicrob Agents Chemother* 34 : 89~93, 1990
- 3) 清水喜八郎, 紺野昌俊, 深谷一太, 松本文夫, 中山一誠, 岩井重信, 清水当尚, 中村信一 : Pipemidic acid の体液中濃度測定に関する検討。 *Chemotherapy* 23 : 2707~2716, 1975
- 4) 大森康男, 村山哲, 阿部泰夫, 入倉 勉 : Bioassay 法による AM-715 の体液中濃度測定法に関する研究。 *Chemotherapy* 29 (S-4) : 91~97, 1981
- 5) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一, 寺崎哲也, 辻 彰 : NY-198 の体内動態 I - Bioassay 法による各種動物における吸収, 分布および排泄。 *Chemotherapy* 36 (S-2) : 132~137, 1988
- 6) 保田隆, 渡辺泰雄, 南新三郎, 熊野克彦, 恒田礼子, 金山淳子 : 新ピリドンカルボン酸系抗菌剤 T-3262 の体液中濃度測定法。 *Chemotherapy* 36 (S-9) : 137~142, 1988
- 7) Shimizu M, Nakamura S, Takase Y and Kurobe N : Pipemidic acid : absorption, distribution, and excretion. *Antimicrob Agents Chemother* 7 : 441~446, 1975
- 8) Nakamura S, Kurobe N, Kashimoto S, Ohue T, Takase Y and Shimizu M : Pharmacokinetics of AT - 2266 administered

- orally to mice, rats, dogs, and monkeys.
Antimicrob Agents Chemother 24 : 54~60, 1983
- 9) 津村光義, 佐藤敬喜, 采 猛, 立沢晴男: DL-8280 の体内動態第一報 Biossay 法と HPLC 法によるイヌとサルにおける吸収, 排泄の比較。Chemotherapy 32 (S-1): 1179~1184, 1984
- 10) 神木照雄, 山田秀雄: Cinoxacin の臨床第一相試験。Chemotherapy 28 (S-4): 104~123, 1980
- 11) 芦原義久, 湯木士朗, 小林紀彦, 浅田裕啓: Bioassay 法による BAYo 9867 (Ciprofloxacin) の体液内濃度測定法に関する研究。Chemotherapy 33 (S-7): 76~80, 1985
- 12) Miyamoto T, et al. : Synthesis and structure-activity relationships of 5-substituted 6,8-difluoroquinolones, including sparfloxacin, a new quinolone antibacterial agent with improved potency. J Med Chem 33 : 1645~1656, 1990
- 13) Sekine Y, et al. : Absorption, distribution, metabolism and excretion of AT-4140 in animals. 28th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr no 1489, 1988

BIOASSAY METHOD FOR SPARFLOXACIN IN BODY FLUIDS

Nobuyuki Kurobe, Tomio Ohue,
Toshikazu Yamaguchi and Shinichi Nakamura
Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.
33-94 Enoki-cho, Suita, Osaka 564, Japan

As a microbiological assay method used for determining concentrations of sparfloxacin (SPFX) in body fluids, an agar-well method using *Escherichia coli* Kp as a test organism was found to be sensitive and accurate. Standard solutions of SPFX were made in 1/15 M phosphate buffer, pH 7.0 for urine samples etc. and in human serum for serum or plasma samples. The assay limit of SPFX by the method was ca. 0.01 $\mu\text{g/ml}$. SPFX in human serum or urine were stable for at least 2 weeks at -20°C in a freezer.