

新経口セフェム剤 ME 1207 の体液内濃度測定法

I. 微生物学的定量法

石渡 信由・大石 繁喜・中山 悦子・新開 祥彦

明治製菓株式会社薬品総合研究所*

新規エステル型経口用セフェム剤 ME 1207 は、内服後エステラーゼにより加水分解され、抗菌活性を示す ME 1206 として生体内に移行する。そこで ME 1206 の微生物学的定量法 (Bioassay 法) による体液内濃度測定法について検討を行った。

測定方法は試験菌に、*Escherichia coli* NIHJ, 測定用培地として日抗基記載の培地 (ペプトン 10 g, 食塩 2.5 g, 肉エキス 5 g, カンテン 15 g に蒸留水を加えて 1,000 ml とする。pH 6.5~6.6), 希釈用緩衝液は同じく日抗基記載の 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いる方法が最適であった。カップ法, アガーウェル法及びペーパーディスク法のいずれでも測定可能であった。また、ヒト血清中濃度測定には、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) のほかプールヒト血清を、尿中濃度の測定には 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で作製した標準液を用いなければならない。なお、本法における検出感度はカップ法で緩衝液 0.005 $\mu\text{g/ml}$, ヒト血清 0.025 $\mu\text{g/ml}$, アガーウェル法で緩衝液 0.02 $\mu\text{g/ml}$, ヒト血清 0.03 $\mu\text{g/ml}$, 及びペーパーディスク法で緩衝液 0.08 $\mu\text{g/ml}$, ヒト血清 0.09 $\mu\text{g/ml}$ であった。ME 1206 の安定性は、 -20°C 凍結保存において血清中及び尿中で少なくとも 60 日間安定であった。

Key words : ME 1207, ME 1206, Bioassay

ME 1207 は、明治製菓株式会社で開発されたエステル型経口用セフェム剤で、グラム陽性菌及びグラム陰性菌に幅広い抗菌作用を有する薬剤である¹⁾。本剤は経口投与された後腸管から吸収され、腸管壁のエステラーゼによって加水分解され、抗菌活性を有する ME 1206 となり体内に移行する²⁾。

今回著者らは、ME 1206 の微生物学的定量法 (Bioassay 法) による体液内濃度測定法について検討を行い、測定方法を確立するとともに ME 1206 の体液中での安定性についても試験を行ったので、その成績を報告する。

I. 実験材料及び方法

1. 使用薬剤

ME 1206 (Lot No. 6 S-03, 878 μg (力価)/mg) は、当社研究所で合成されたナトリウム塩を使用した。

2. 試験菌

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Escherichia coli* NIHJ, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Comamonas terrigena* ATCC 8461 及び

Pseudomonas aeruginosa NCTC 10490 を使用した。これら試験菌は日本抗生物質医薬品基準 (以下日抗基と略す) ・一般試験法・力価試験法³⁾ に準じて菌液及び孢子液を調製した。

3. 測定用培地

日抗基・一般試験法・力価試験法³⁾ に記載された培地から (1) ペプトン 10 g, 食塩 2.5 g, 肉エキス 5 g, カンテン 15 g, 以上に水を加えて溶かし 1,000 ml とする。pH 6.5~6.6 (MRAPJ ①), (2) ペプトン 5 g, 肉エキス 3 g, カンテン 15 g, 以上に水を加えて溶かし 1,000 ml とする。pH 8.0 (MRAPJ ②), Heart infusion agar (HIA, 栄研), Mueller Hinton agar (MHA, 栄研), 及び Nutrient agar (NA, Difco) を使用した。

4. 希釈用液

1) 希釈用緩衝液

日抗基・付表 II⁴⁾ に記載された 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 4.5), 1% リン酸塩緩衝液 (pH 6.0), 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0), 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0), 及び 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。

*〒222 横浜市港北区師岡町 760

2) 血清

血清にはブールヒト血清, モニトロール I (ミドリ十字) 及びコンセーラ (日水製薬) を使用した。

3) 尿

尿にはヒト尿を使用した。

5. 種層寒天培地の調製

菌液あるいは孢子液を用時, 生理食塩液で 20 倍に希釈し, 測定用培地 100 ml に対し 1 ml の割合で加え, 種層寒天培地を調製した。

6. 濃度測定法

カップ法, アガーウェル法及びペーパーディスク法を用いた。

1) カップ法: アルミ製大型平板 353 mm (W) × 255 mm (D) × 180 mm (H) を用いる場合には種層のみ 140 ml を, 内径 90 mm のプラスチックシャーレを用いる場合には種層のみ 10 ml を分注し, 水平固化して寒天平板を作製する。この板上に外径 8 mm, 内径 6 mm, 高さ 10 mm のステンレス鋼製円筒(カップ)をのせ, 試料液及び標準液を注入し, その後 32~37°C で 16~18 時間培養を行った。

2) アガーウェル法: アルミ製大型平板を用いる場合には基層 125 ml, 種層 125 ml を分注し, シャーレを用いる場合には基層 6 ml, 種層 5 ml を分注し, 水平固化して寒天平板を作製する。次に, 大型平板及びシャーレとも寒天面に内径 8 mm の穴をあけ, 各穿孔に

試料液及び標準液を注入し, その後 32~37°C で 16~18 時間培養を行った。

3) ペーパーディスク法: カップ法と同一条件で寒天平板を作製した。

この寒天平板上に試料液及び標準液を一定量 (20 μ l) しみこませた内径 8 mm のペーパーディスクをカップ法と同様に並べ, その後 32~37°C で 16~18 時間培養を行った。

7. ME 1206 の血清中及び尿中での安定性

ブールヒト血清及び尿に ME 1206 を添加し, その濃度が血清では 0.8 μ g/ml, 4 μ g/ml, 尿では 5 μ g/ml, 50 μ g/ml となるよう調製し, この溶液を 25°, 5° 及び -20°C で保存し, ME 1206 の残存力価を最長 60 日間経時的に測定した。

II. 結 果

1. 試験菌の選択

試験に用いた 8 種類の試験菌から ME 1206 に高い感受性を示した *Escherichia coli* NIHJ, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 の 3 種を選び, カップ法によりこれらの試験菌で標準曲線を作製して試験を行い, 阻止円の鮮明さ, 検出感度及び直線性を指標として試験菌の選択を行った。その結果, *Escherichia coli* NIHJ が阻止円の鮮明さ, 検出感度及び直線性ですぐれていると判断し, これを試験菌として選択した (Fig. 1)。

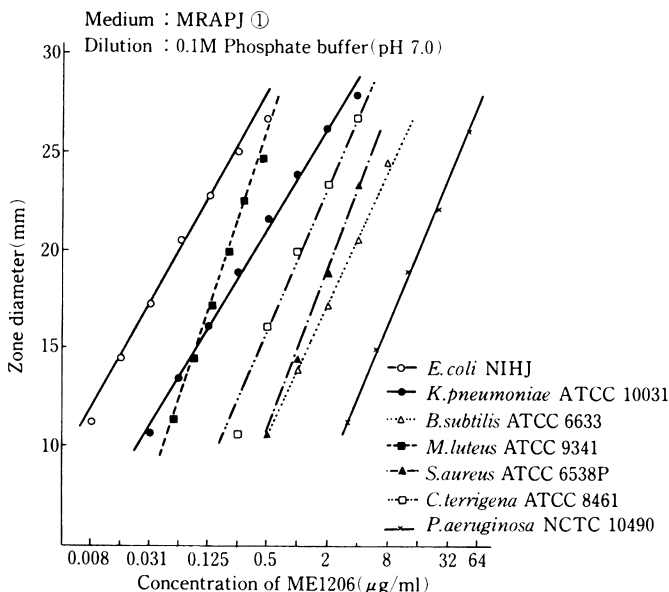


Fig. 1. Standard curves of ME1206 on various test organisms by cylinder-plate method.

2. 測定培地の選択

試験菌に *Escherichia coli* NIHJ を用い、測定用培地として HIA, MHA, MRAPJ ①, 及び MRAPJ ② を用い、標準曲線を作製して阻止円の鮮明さ、直線性及び検出感度を指標にカップ法で検討した。その結果、MRAPJ ① 及び MRAPJ ② とも阻止円の鮮明さ、検出感度とも優劣がつけにくかったが直線性において MRAPJ ① がわずかにすぐれていたのをこれを選択した (Fig. 2)。

3. 希釈用緩衝液の選択

試験菌に *Escherichia coli* NIHJ, 測定用培地に MRAPJ ① と希釈用緩衝液の 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 4.5, pH 7.0, pH 8.0), 1% リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) 及び 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) をそれぞれ組み合わせ、カップ法を用い標準曲線を作製して試験を行い、阻止円の鮮明さ、検出感度及び直線性を指標に希釈用緩衝液の選択を行なった。その結果、リン酸塩系緩衝液ではほぼ同じ位置に標準曲線が得られ、pH の影響はほとんどみられなかった。なお、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) では阻止円形成がみられなかった。これらの結果より、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を選択した (Fig. 3)。

4. 標準曲線におよぼす血清の影響

血清が測定値に与える影響を調べるためプールヒト

血清及び精度管理用血清 (モニター I, コンセーラ) を用いて、ME 1206 の標準曲線を作製して、血清の影響をカップ法で検討した。その結果、ヒト血清の阻止円径は同一 ME 1206 濃度の 0.1 M リン酸塩緩衝

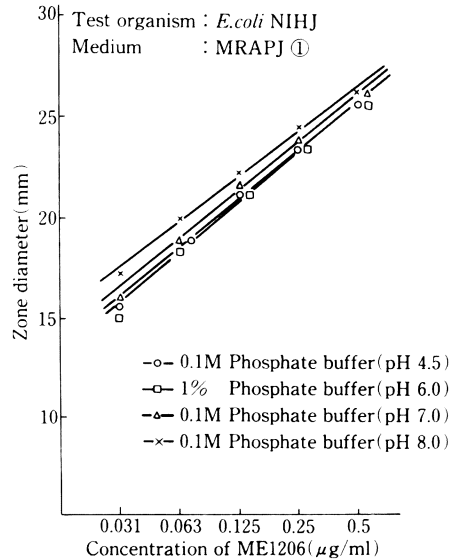


Fig. 3. Standard curves of ME1206 with various buffer solutions by cylinder-plate method.

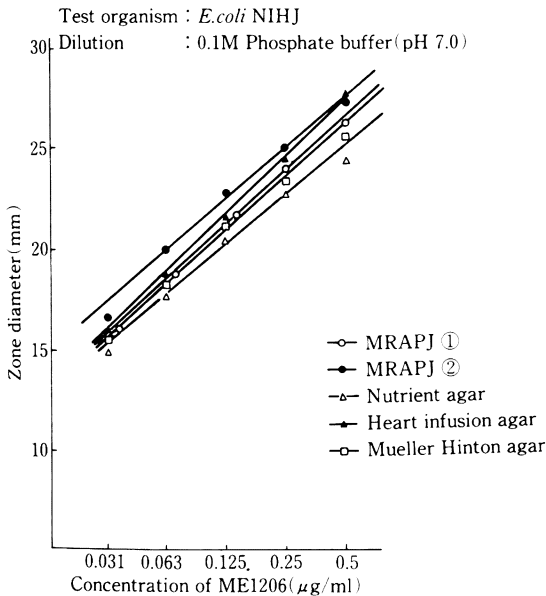


Fig. 2. Standard curves of ME1206 with various media by cylinder-plate method.

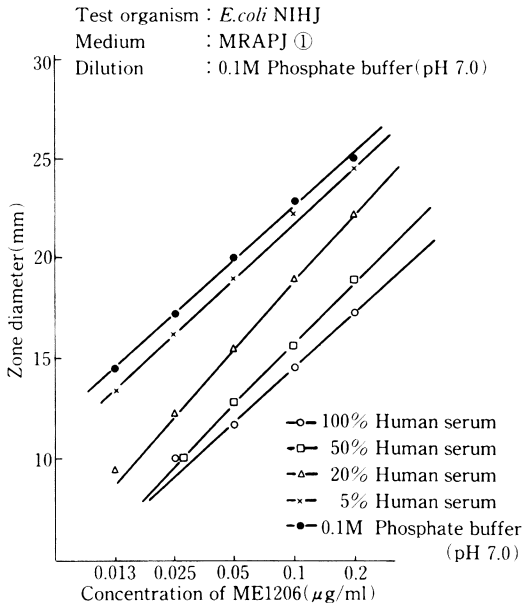


Fig. 4. Influence of human serum on standard curve by cylinder-plate method.

液(pH 7.0)の阻止円径より小さくなり、血清の影響が認められた。また精度管理用血清(以下、代用血清と略す)についても標準曲線を作製し、ヒト血清標準曲線と比較したところ、いずれの代用血清もヒト血清と

かけはなれ、代用血清は不向きであった。従って、ME 1206 血清試料の希釈はプールヒト血清を用いて希釈しなければならないことを確認した (Fig. 4, 5)。

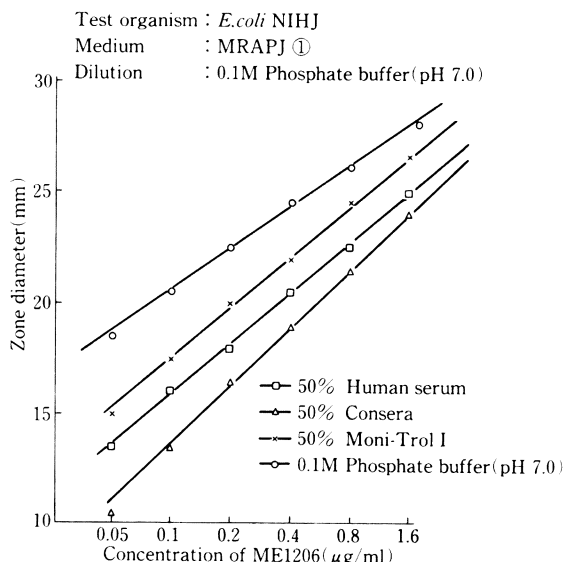


Fig. 5. Influence of quality control serum on standard curve by cylinder-plate method.

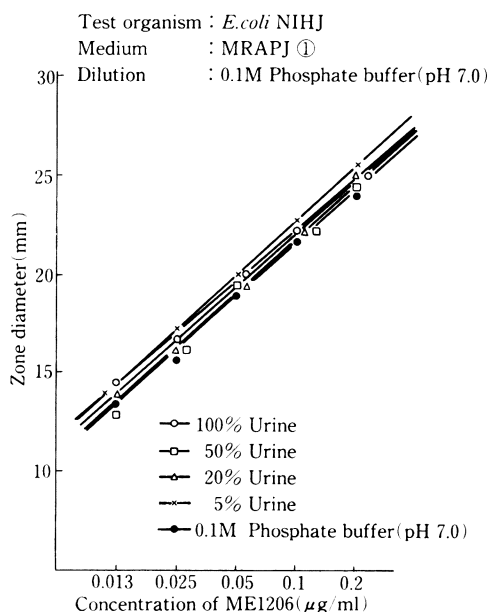


Fig. 6. Influence of human urine on standard curve by cylinder-plate method.

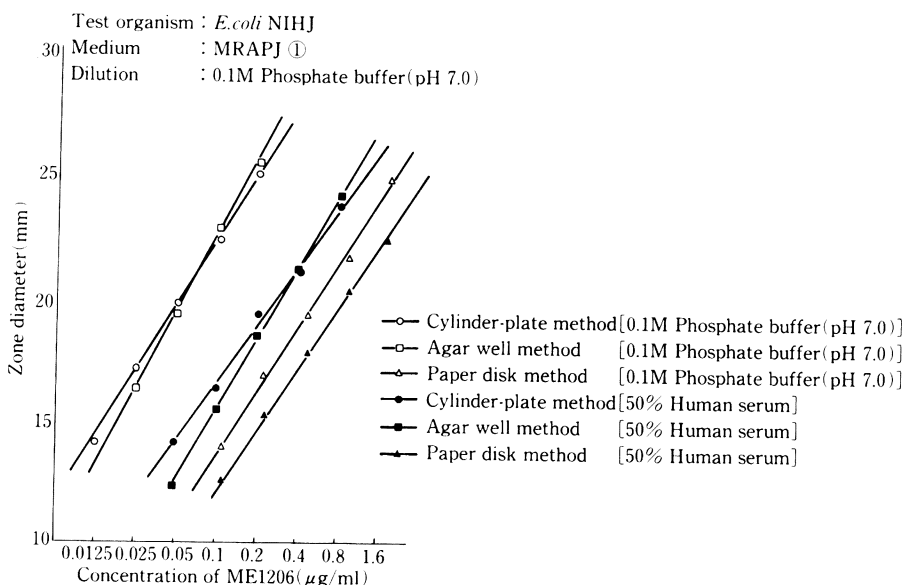


Fig. 7. Standard curves of ME1206 by cylinder-plate method, agar well method and paper disk method.

5. 標準曲線におよぼす尿の影響

健常人の尿を用い、尿濃度をかえて ME 1206 の標準曲線を作製し、尿の影響をカップ法で検討した。その結果、各標準曲線ともそれぞれきわめて近い位置にあり、このことから尿の標準曲線に与える影響はないと考えられた。従って尿試料の希釈には緩衝液のみで可能と判断した (Fig.6)。

6. 測定方法の検討

試験菌として *Escherichia coli* NIHJ, 測定用培地に MRAPJ ①を用いて、カップ法のほかアガーウェル法、ペーパーディスク法についても検討した。検討はカップ法に準じて行い、プールヒト血清及び 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いて標準曲線を作製した (Fig.7)。その結果、検出感度及び阻止円径においてはカップ法とアガーウェル法にそれほど大きな差は認められなかったが、ペーパーディスク法はかなり大きな差が認められた。また、標準曲線の傾きは、カップ法、アガーウェル法及びペーパーディスク法ともほぼ同等であった。更に、作成して得られた標準曲線において直線性のある最小濃度付近を細かく設定して、三方法の検出感度を求めた。検出感度は、カップ法の緩衝液で 0.005 µg/ml, ヒト血清で 0.025 µg/ml, アガーウェル法の緩衝液で 0.02 µg/ml, ヒト血清で 0.03 µg/ml, ペーパーディスク法の緩衝液で 0.08 µg/ml, ヒト血清で 0.09 µg/ml であった。

7. ME 1206 の体液中での安定性

ヒト血清, ヒト尿及び 0.1 M リン酸塩緩衝液

(pH 7.0) の ME 1206 力価残存率を 25°, 5° 及び -20°C の保存条件で経時的に測定した。25°C の保存ではいずれの体液中でも安定性は悪く、血清中では 3 日目以降、尿中では 7 日目以降の残存率が低かった。5°C 保存においては血清中で 28 日間まで力価低下を認めず、尿中では少なくとも 60 日間安定であった。-20°C 保存においては、いずれの体液中でも少なくとも 60 日間力価低下を認めず安定であった。以上の結果より、生体試料は -20°C で凍結保存し、血清及び尿とも 60 日以内に測定することとした (Table 1)。

III. 考 察

これまで検討してきた ME 1206 の微生物学的測定条件を要約して Table 2 に示した。

体液内濃度測定法の条件確立については、岩本、石山⁵⁾ がのべている基本手技上の要点に①阻止円が鮮明なこと、②標準偏差が小さいこと、③標準曲線の勾配が大きいこと、④鋭敏に低濃度まで測定できること、があり、我々もこの点に留意して試験を行ってきた。

測定条件は初めにカップ法で確立し、ここで得られたデータをもとにアガーウェル法とペーパーディスク法についても検討を行い、それぞれの測定条件を確立した。

一般に微生物学的測定法は抗生物質の種類によっては精度に問題があるといわれ、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) など、他の手法によって測定する場合が多い。特にアミノ配糖体系抗生物質では測定値のバラツキが大きく⁶⁻⁸⁾、微生物学的測定法の信頼性が問題となっている。

Table 1. Stability of ME1206 in human serum, urine and buffer Remaining activity (%)

Solution	Concentration of ME1206 (µg/ml)	Temperature (°C)	Remaining activity (%)									
			0	1	3	7	14	21	28	35	45	60days
Human serum (pH 7.2)	0.8	25	100	107	95	69	39	—	—	—	—	—
		5	100	108	104	101	97	104	101	85	77	78
		-20	100	107	107	109	108	108	107	100	101	97
	4	25	100	101	89	84	37	—	—	—	—	—
		5	100	107	98	108	102	104	96	82	76	78
		-20	100	107	100	105	103	103	103	102	99	95
Human urine (pH 6.6)	5	25	100	96	98	88	58	—	—	—	—	—
		5	100	98	100	100	99	100	105	96	96	101
		-20	100	98	104	102	101	107	103	98	96	104
	50	25	100	97	101	97	88	—	—	—	—	—
		5	100	102	107	104	106	104	105	97	99	103
		-20	100	100	106	102	103	105	106	96	100	105
0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)	100	25	100	98	90	82	66	—	—	—	—	—
		5	100	104	95	99	96	96	89	86	—	—
		-20	100	95	101	94	95	102	97	99	—	—

Table 2. Standardization of microbiological assay method for ME1206 in biological fluids

Method	Cylinder-plate	Agar well	Paper disk
Test organism	<i>Escherichia coli</i> NIHJ		
Inoculum size	Cell suspension : 5×10^8 CFU/ml 0.1% of cell suspension		
Medium (per 1,000ml of dist. water)	Peptone 1.00% Sodium chloride 0.25% Beef extract 0.15% Agar 1.50% (pH6.5~6.6)		
standard curve (μ g/ml)	Human serum : 0.05-0.8 Buffer 0.013-0.2	Human serum : 0.05-0.8 Buffer 0.025-0.2	Human serum : 0.125-2.0 Buffer 0.125-2.0
Standard solution	Serum : Human serum Buffer : 0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)		
Minimum detectable concentration	Human serum : 0.025 μ g/ml Buffer : 0.005 μ g/ml	Human serum : 0.03 μ g/ml Buffer : 0.02 μ g/ml	Human serum : 0.09 μ g/ml Buffer : 0.08 μ g/ml
Incubation	32-37°C, 16-18h		

Table 3. Reproducibility of ME1206 spiked samples determination by cylinder-plate method in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) and human serum

Solution	0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)			Human serum		
	Concentration (μ g/ml)			Concentration (μ g/ml)		
Number	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
1	0.45	0.86	1.63	0.48	0.84	1.76
2	0.47	0.95	1.76	0.44	0.98	1.80
3	0.48	0.95	1.49	0.48	0.97	1.74
4	0.48	0.89	1.66	0.47	0.94	1.74
5	0.52	0.95	1.68	0.49	0.84	1.50
6	0.46	0.93	1.72	0.44	0.98	1.72
7	0.47	0.84	1.85	0.49	0.93	1.80
8	0.46	0.95	1.79	0.54	0.95	1.88
9	0.51	0.95	1.79	0.39	0.97	1.77
\bar{X}	0.48	0.92	1.71	0.47	0.93	1.75
Max	0.52	0.95	1.85	0.54	0.98	1.88
Min	0.45	0.84	1.49	0.39	0.84	1.50
SD	0.02	0.04	0.11	0.04	0.06	0.10
CV (%)	4.17	4.35	6.43	8.51	6.45	5.71

ここに報告する ME 1207 はアミノ配糖体系抗生物質ではないものの、どの程度の測定精度をもっているのか調べておくことが大切であると考え、緩衝液及びプールヒト血清に ME 1206 を添加したスパイクサンプルを調製して、カップ法、アガーウェル法及びペーパーディスク法による測定値の再現性を調べた (Tables 3~5)。測定精度は変動係数 (CV %) を指標として求めたところ、カップ法では緩衝液で 4~6 %、ヒト血清で 6~9 %、アガーウェル法では緩衝液で 4~7 %、ヒト血清で 4~8 %、ペーパーディスク法では緩

衝液で 4~7 %、ヒト血清で 7~10 % であった。以上のことから、方法間に大きな差は認められなかったが検体間に差が認められ、緩衝液スパイクサンプルよりヒト血清スパイクサンプルの方がバラツキが大きかった。一方、検出感度ではカップ法が最も優れ、次いでアガーウェル法、ペーパーディスク法の順であった。しかし、実用上は検出感度だけにとらわれることなく、検体の種類や検体の含有する薬剤濃度あるいは検体の液量などを考慮し、目的に合った方法を選択すべきであると考えられる。

Table 4 Reproducibility of ME1206 spiked samples determination by agar well method in 0.1M phosphate buffer (pH7.0) and human serum

Solution	0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)			Human serum		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
Number	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
1	0.55	0.89	1.89	0.48	0.98	2.00
2	0.48	0.97	1.82	0.51	1.01	2.00
3	0.54	0.96	1.71	0.51	1.04	2.04
4	0.49	0.96	1.57	0.51	0.93	2.08
5	0.47	0.93	1.59	0.52	0.98	1.83
6	0.49	0.91	1.53	0.48	0.96	2.19
7	0.50	0.95	1.60	0.48	0.90	1.80
8	0.49	1.04	1.70	0.53	0.93	1.78
9	0.51	0.91	1.72	0.54	1.00	1.70
\bar{X}	0.50	0.95	1.68	0.51	0.97	1.94
Max	0.55	1.04	1.89	0.54	1.04	2.19
Min	0.47	0.89	1.53	0.48	0.90	1.70
SD	0.03	0.04	0.12	0.02	0.04	0.16
CV (%)	6.00	4.21	7.14	3.92	4.12	8.25

Table 5. Reproducibility of ME1206 spiked samples determination by paper disk method in 0.1M phosphate buffer (pH7.0) and human serum

Solution	0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)			Human serum		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
Number	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
1	0.45	0.89	1.93	0.48	0.90	1.80
2	0.46	0.89	1.82	0.48	1.01	1.93
3	0.45	0.94	1.92	0.49	0.97	1.98
4	0.46	0.96	1.60	0.38	0.91	1.69
5	0.45	0.87	1.72	0.45	0.95	1.77
6	0.47	0.94	1.75	0.52	0.69	1.70
7	0.49	0.90	1.52	0.48	0.98	1.73
8	0.49	0.90	1.76	0.45	0.92	1.90
9	0.46	0.84	1.79	0.45	0.93	2.00
\bar{X}	0.46	0.90	1.76	0.46	0.92	1.83
Max	0.49	0.96	1.93	0.52	1.01	2.00
Min	0.45	0.84	1.52	0.38	0.69	1.69
SD	0.02	0.04	0.13	0.04	0.09	0.12
CV (%)	4.35	4.44	7.39	8.70	9.78	6.56

文 献

- 1) Tamura A, Okamoto R, Yoshida T, Yamamoto H, Kondo S, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of ME 1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 32(9): 1421~1426, 1988
- 2) 松元 隆, 岡本淳一, 齊藤光一, 相沢一雅, 小宮 泉: 新経口セフェム剤, ME 1207 の実験動物における体内動態. *Chemotherapy* 40(S-2): 120~130, 1992
- 3) 厚生省薬務局監修: 日本抗生物質医薬品基準解説・一般試験法・力価試験法 729~733, 1990
- 4) 厚生省薬務局監修: 日本抗生物質医薬品基準解説・付表II 708~711, 1986
- 5) 岩本英夫, 石山俊次: カップ法による検討法. *最新医学* 27(2): 287~292, 1972
- 6) 西園寺克, 飯塚 建, 坂野幸江: Tobramycin 血中濃度測定法の検討. *Chemotherapy* 30: 509~513, 1982
- 7) 田中美雄, 篠崎公一, 増原慶壯, 荒井 栄, 高橋 悟, 佐野隆志, 染谷一彦, 佐々木康人: 血中トブラマイシン測定法 5 種の比較検討. *Chemotherapy* 31: 324~330, 1983
- 8) 山作房之輔: Micronomicin の定速度静脈内持続注入時の薬動力学的研究. *J J Antibiot* 36: 359~366 1983

ASSAY METHOD OF ME1207, A NOVEL ORAL CEPHEM ANTIBIOTIC,
IN BIOLOGICAL BODY FLUIDS

I. MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD

Nobuyoshi Ishiwatari, Shigeki Oishi, Etsuko Nakayama,
Sachihiko Shinkai

Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.
760 Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama 222, Japan

Microbiological assay methods were examined for the quantitative determination of ME1206, the active metabolite of ME1207, in human serum or urine.

ME1207 is almost completely metabolized to ME1206, the ultimate active compound, during its absorption through gastrointestinal tract after oral administration. Thus, all the quantitative assays were studied with ME1206.

The most suitable condition for a bioassay was obtained when combining the test organism *Escherichia coli* NIHJ with the growth medium Minimum Regulation for Antibiotic Products of Japan (MRAPJ① : 1% peptone, 0.25% sodium chloride, 0.5% beef extract and 1.5% agar, pH6.5~6.6). This condition was suitable for the cylinder-plate method and the agar well and paper disk methods. As diluents for the standard solutions, normal serum was suitable for dilution of ME1206 in serum and 0.1M phosphate buffer(pH7.0) for ME1206 in urine.

The minimal detectable concentrations of ME1206 in 0.1M phosphate buffer (pH7.0) using these methods, were 0.01 μ g/ml for the cylinder-plate method, 0.04 μ g/ml for the agar well method and 0.16 μ g/ml for the paper disk method.

In human serum, however, they were 0.05 μ g/ml for the cylinder-plate method, 0.06 μ g/ml for the agar well method and 0.18 μ g/ml for the paper disk method.

ME1206 was stable for at least 60 days in human serum and/or human urine at the temperature of -20°C.