

生体試料中の cefozopran の微生物学的定量法

竹田 益雄・前田 憲一

株式会社 武田分析研究所*

Cefozopran (CZOP) の生体試料中濃度測定法 (標準法) として, *Escherichia coli* NIHJ を試験菌とし, Antibiotic medium 4 を測定培地とするアガーウェル法を設定した。本法における CZOP の定量限界は 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) およびヒト血清中で, 共に 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

低濃度または微量検体に適した方法 (高感度法) として検討した *Providencia rettgeri* ATCC 9250 および MacConkey 寒天培地 (pH 8.0) を用いるアガーウェル法またはペーパーディスク法の定量限界は, それぞれ 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

微生物学的定量法と高速液体クロマトグラフ法の両測定値には高い相関性が認められた。

活性代謝物検索のため *Providencia rettgeri* ATCC 9250 を用いるバイオオートグラフ法を設定し, CZOP を静脈内投与したときのヒト血清および尿試料を分析した結果, CZOP 以外の抗菌活性をもつスポットは検出されなかった。

CZOP の安定性は, -20°C 保存において血清中および尿中で少なくとも 6 週間は安定であった。

Key words: cefozopran, 生体試料, 微生物学的定量法

Cefozopran (CZOP), (-)-1-[[[6 R, 7 R]-7-[(Z)-2-(5-amino-1,2,4-thiadiazol-3-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-2-carboxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-en-3-yl] methyl] imidazo [1,2-b]pyridazinium hydroxide, inner salt monohydrochloride は三宅ら¹⁾により合成された新しいセフェム系抗生物質で, グラム陽性菌から緑膿菌を含むグラム陰性菌に対して幅広く強い抗菌力²⁾を示し, また各種の β -lactamase にも安定な性質を有する³⁾。

本報告では本剤のヒトにおける生体内動態の研究のため, 血中および尿中濃度の微生物学的定量法ならびにバイオオートグラフ法による CZOP の検出法につき検討した。

I. 実験材料と方法

1. 薬剤

CZOP は武田薬品工業株式会社製薬研究所で合成された。

2. 菌株

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 および *Providencia rettgeri* ATCC 9250 は財団法人発酵研究所から分与された後, 当研究室で継代保存中のものを用いた。

3. 微生物学的定量法

1) 測定用培地: Nutrient agar (NA, Difco), 抗生物質用培地「ダイゴ」No. 4 (D 4, 日本製薬), Antibiotic medium 4 (AM 4, Difco) および Diagnostic sensitivity test 寒天培地 (DST, Oxoid) ならびに培地滅菌前に pH 8.0 に調整した MacConkey 寒天培地 (MCA, 栄研) を用いた。

2) 菌液: 斜面寒天培地で 37°C , 18~20 時間培養した新鮮菌体を滅菌精製水に懸濁し, その濁度を光電比色計 (EPO-B 型, 日立製作所) で 660 nm により吸光度が 0.8 になるように調整した。この菌液濃度は約 $10^9\text{CFU}/\text{ml}$ であった。

菌液 0.5 ml を 47°C に保温した測定用培地 100 ml に接種した。

3) 標準液: CZOP 標準品を 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で溶解して 1000 μg (力価)/ml としたものを標準原液とし, さらに同緩衝液または血清で希釈して標準希釈系列を調製した。

4) 薄層カップ法: 試験菌を接種した測定用培地 10 ml を直径 9 cm のプラスチック・シャーレに流しこみ, 水平台上で固化させた。それぞれの間隔が約 3.5 cm になるように 4 個のステンレス・カップ (内径×外径×高さ = 6 × 8 × 10 mm) を立て, 標準希釈液およ

*〒532 大阪市淀川区十三本町 2-17-85

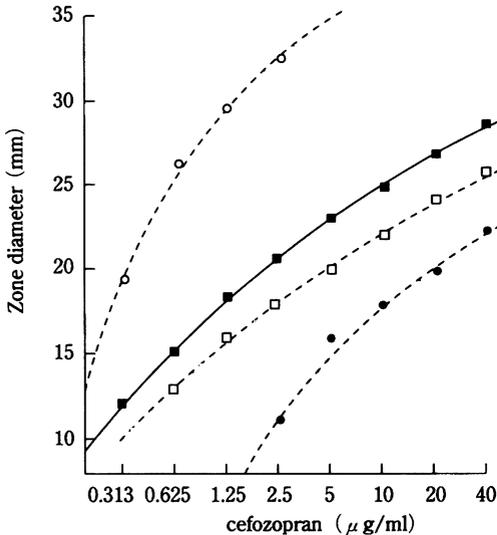


Fig. 1. Comparison of standard curves of ceftazidime on various test organisms by agar well method

Medium: Antibiotic assay medium (DAIGO) No. 4

Test organism:

●—● *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P

○---○ *Micrococcus luteus* ATCC 9341

■—■ *Escherichia coli* NIHJ

□---□ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

び試料液をカップ内に注入した後、37°C、18~20時間培養し、阻止円の直径を測定した。標準希釈液のCZOP濃度の対数と阻止円の直径との関係を2次曲線で回帰して、この標準曲線により試料液中のCZOP濃度を算出した。

5) アガーウェル法: 測定用含菌寒天板の調製、阻止円の計測及び濃度計算の方法は薄層カップ法と同様である。寒天平板は、寒天穿孔器(武田薬品製)を用いて直径8mmの孔4個を打ち抜き、各孔に標準希釈液および試料液を50μlずつ注入し、37°C、18~20時間培養した。

6) ペーパーディスク法: ステンレス・カップを用いるかわりに直径6mmのペーパーディスク(Whatman社)に試料液各20μlをスポットしたものを寒天平板上に貼りつける以外は薄層カップ法に準じた。

4. 薄層 chromatograph/bioautograph 法 (TLC/バイオオートグラフ法)

薄層クロマトシート (Spotfilm, silica gel f: 東京化成工業) に各試料液 (CZOPとして25~50ng力価) をマイクロピペットでスポットした後、約10分間通風乾燥し、アセトン・氷酢酸・水・強アンモニア水混液(15:8:4:1)を展開溶媒とした上昇法により約

15cm展開した。約1.5時間通風乾燥したシートを各試料ごとに切断した。

P. rettgeri ATCC 9250の菌液1.0mlを接種したMacConkey寒天培地(pH8.0)200mlをバイオオート缶(24×34cm)に流し込み、水平台上で固化させた。寒天平板上にそれぞれの間隔が約3cmになるように切断したシートを下向けに貼りつけた。約20分間薬剤を寒天層に拡散させた後、切断シートを除いた。寒天培地は37°C、18~20時間培養し、各阻止帯を検出した。

II. 実験結果

1. 試験菌株の選択

試験菌株4株についてCZOPの標準曲線(アガーウェル法)を作成した結果をFig.1に示す。測定感度は*M. luteus* ATCC 9341>*E. coli* NIHJ>*K. pneumoniae* ATCC 10031>*S. aureus* ATCC 6538 Pの順であった。阻止円の鮮明度は*E. coli* NIHJ≒*K. pneumoniae* ATCC 10031>*M. luteus* ATCC 9341>*S. aureus* ATCC 6538 Pの順であった。

これらの結果より感度が高く、阻止円が鮮明な*E. coli* NIHJを試験菌株として選択し、以下の実験に用いた。

2. 濃度測定条件の検討

1) 標準法

①測定用培地: *E. coli* NIHJを試験菌とするアガーウェル法によりCZOPの0.313~40μg(力価)/mlの濃度範囲で、4種の培地(NA, D4, AM4およびDST)について標準曲線を作成した。Fig.2に示すように、阻止円の大きさはD4及びAM4が最も大きく、NAおよびDSTはそれよりも小さかった。阻止円はいずれも鮮明であった。D4を用い、pH6.0~8.0において培地pHの阻止円におよぼす影響を検討した。阻止円の鮮明度はいずれのpHにおいても良好であったが、阻止円径はpHが高い程、小さくなる傾向を示した。したがって、培地のpHは無調整(pH6.4~6.5)で実施するのが妥当と考えた。

②菌量: 接種菌量0.25, 0.5および1.0%について比較した。菌量を増やすと阻止円径が小さくなった。また、標準曲線の勾配は高い濃度側で小さくなる傾向を示した。したがって、以下の検討は菌量0.5%とした。

③培養温度: 34°Cおよび37°C培養について比較検討したが、阻止円径および鮮明度においては両温度間に差は認められなかった。

④ヒト血清および尿の影響: プールしたヒト血清および市販のコントロール血清[Moni-trol I (Dade

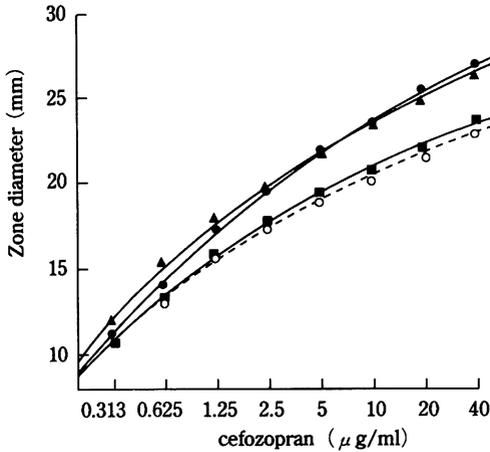


Fig. 2. Comparison of standard curves of ceftazidime on various test media determined by agar well method

Test organism: *Escherichia coli* NIHJ
 Medium:
 ●—● Antibiotic assay medium (DAIGO) No. 4
 ▲—▲ Antibiotic medium 4 (DIFCO)
 ○—○ Diagnostic sensitivity test agar (OXOID)
 ■—■ Nutrient agar (DIFCO)

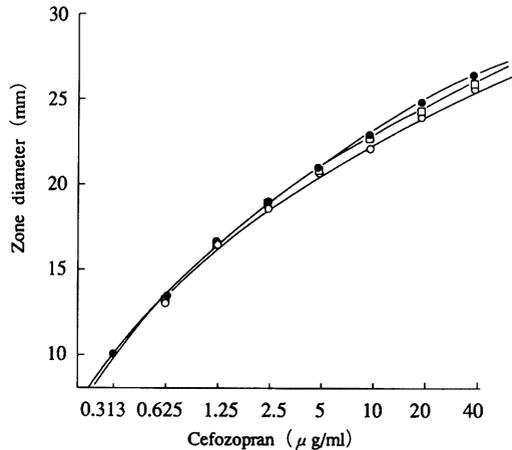


Fig. 3. Effect of diluents on standard curves of ceftazidime determined by agar well method

Test organism: *Escherichia coli* NIHJ
 Medium: Antibiotic medium 4 (DIFCO)
 diluents:
 ●—● 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)
 ○—○ Human serum
 △—△ Control serum I (WAKO)
 □—□ Moni-trol I (DADE)

社), Control Serum I (和光純薬)] で希釈して作成した標準曲線と, 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で希

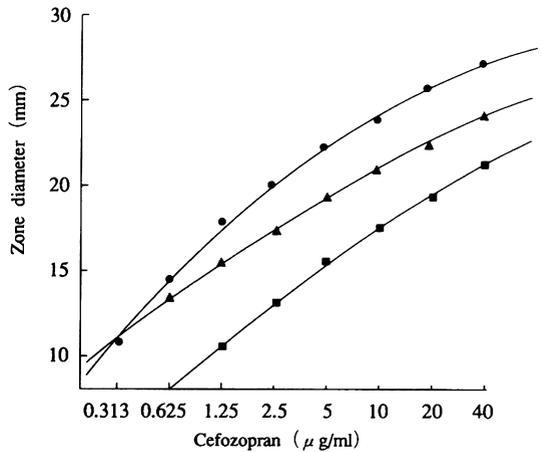


Fig. 4. Comparison of standard curves of ceftazidime determined by different methods

Test organism: *Escherichia coli* NIHJ
 Medium: Antibiotic medium 4 (DIFCO)
 Methods: ●—● Agar well
 ▲—▲ Cylinder plate
 ■—■ Paper disc

釈して作成した標準曲線とを比較した。阻止円の鮮明度は3種の血清間で差はなかったが, 血清で希釈調整すると阻止円径が若干減少した (Fig. 3)。したがって, 血清中濃度の測定は血清希釈による標準曲線を作成して計算する必要がある。

尿試料を用いて作成した標準曲線は, 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で作成した標準曲線とよく一致し, 尿成分の阻止円径への影響は認められなかった。

⑤方法間の比較: 薄層カップ法, アガーウェル法およびペーパーディスク法で求めた標準曲線の比較を Fig. 4 に示す。アガーウェル法は他の2方法に比較して標準曲線の勾配が大きく測定精度の向上につながる事, また, 操作が簡便であることから本法を標準法として設定した。アガーウェル法の定量限界は0.3 μg/ml であった。

3) 高感度法

低濃度または微量の生体試料について測定を行うため *P. rettgeri* ATCC 9250 を試験菌とし, MacConkey 寒天培地 (pH 8.0) を測定用培地とする高感度法⁹⁾ を設定した。本菌を用いたアガーウェル法およびペーパーディスク法の標準曲線は Fig. 5 のとおりで, CZOP の定量限界はアガーウェル法で0.03 μg/ml, ペーパーディスク法で0.16 μg/ml であった。

3. 体液中での安定性

ヒト血清, ヒト血漿, 尿および0.1 M リン酸塩緩衝

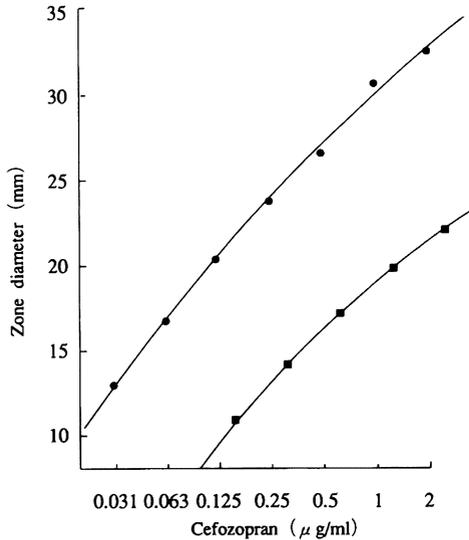


Fig. 5. Comparison of standard curves of ceftazidime determined by different methods

Test organism: *Providencia rettgeri* ATTC 9250
 Medium: MacConkey agar (EIKEN)
 Methods: ●—● Agar well
 ■—■ Paper disc

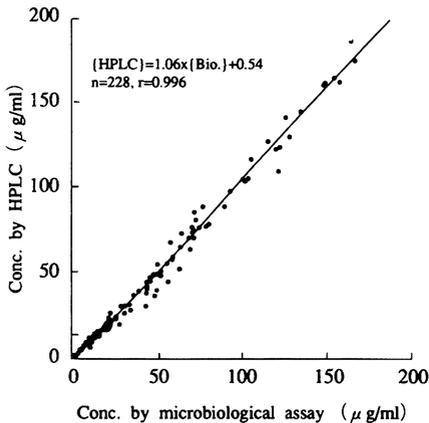


Fig. 6. Relationship between ceftazidime concentrations in serum determined by HPLC and microbiological assay

液 (pH 7.0) で CZOP の 10 $\mu\text{g/ml}$ および 100 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を調製し、 -20°C に保存した際の安定性について、*E. coli* NIHJ を試験菌とするアガーウェル法で検討した。その結果を Table 1 に示す。ヒト血清、ヒト血漿、尿および 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中で、 -20°C 保存であれば、6 週間は安定であった。

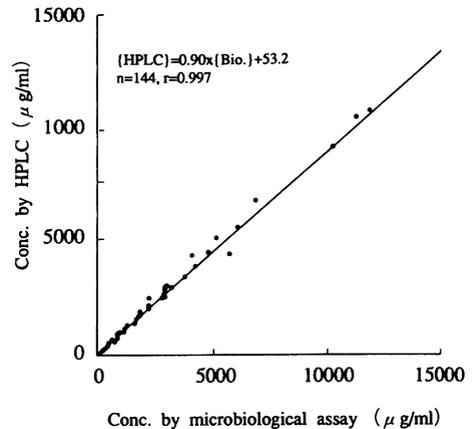


Fig. 7. Relationship between ceftazidime concentrations in urine determined by HPLC and microbiological assay

4. HPLC 法による測定値との相関性

CZOP は微生物学的定量法 (Bioassay 法) の他に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法⁹⁾で測定することが出来る。そこで臨床第一相試験で測定された Bioassay 値と HPLC 値の相関性を調べた。Fig. 6 および Fig. 7 に示すように両測定値間には良好な相関性が認められた。

5. TLC/バイオオートグラフ法

CZOP の活性代謝物検索のためのバイオオートグラフ法について検討した。薄層クロマトグラフ法の展開溶媒としてはアセトン・氷酢酸・水・強アンモニア水混液 (15 : 8 : 4 : 1) を用い、バイオオートグラフ法の試験菌と培地は上記の高感度法と同じものとした。CZOP 標準品の Rf 値は 0.45 付近で検出限界は 1 ng であった。CZOP と同じレベルの抗菌活性をもち、Rf 値が約 0.1 以上差のある活性代謝物は、この系によって検出可能と考えられる。

臨床第一相試験検体の血清試料および尿試料のバイオオートグラムを Fig. 8 に例示した。CZOP を静脈内投与したときのヒト血清および尿試料を分析した結果、CZOP 以外の抗菌活性をもつスポットは検出されなかった。

III. 考 察

CZOP の寒天平板法による微生物学的定量法を Table 2 に要約した。

試験菌として *E. coli* NIHJ, 測定培地として Antibi-otic medium 4 を用い、アガーウェル法、薄層カップ法およびペーパーディスク法につき検討した結果、ア

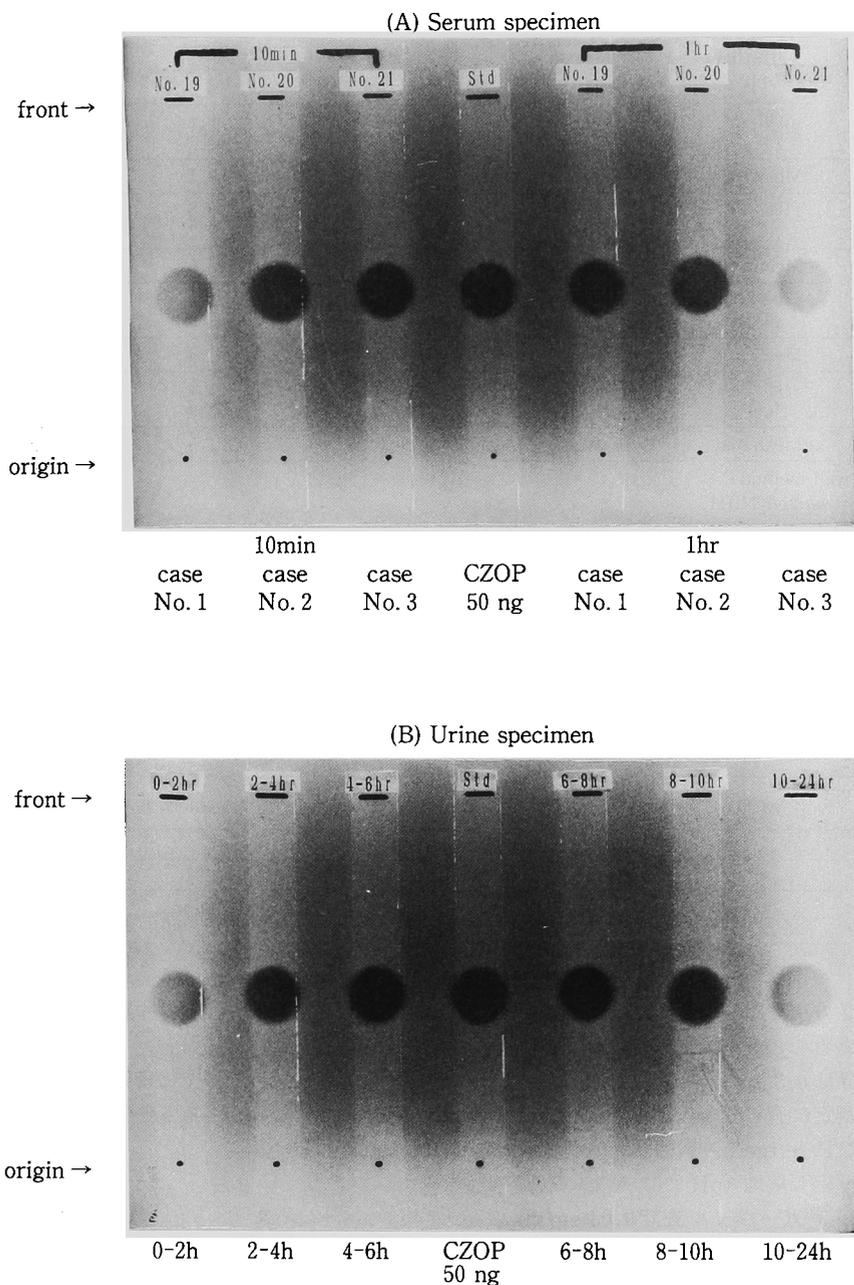


Fig. 8. TLC-bioautograms of human serum and urine specimens after single intravenous administration of cefozopran (2000 mg)

TLC plate : Spotfilm silica gel f (Tokyo Kasei)

Solvent : Acetone·Acetic acid·Water·Strong ammonia water (15 : 8 : 4 : 1)

Bioautography :

Test organism : *P. rettgeri* ATCC 9250

Medium : MacConkey agar (pH8.0)

Table 1. Stability of ceftazidime in serum, plasma, urine and 0.1M phosphate buffer (pH7.0) at a freezing temperature (-20°C)

Storage medium	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Storage period (weeks)			
		0	1	4	6
Serum	100	100 ^{a)}	100.6	99.9	99.0
	10	100	102.6	98.3	100.3
	Mean	100	101.6	99.1	99.7
Plasma	100	100	98.5	99.8	99.5
	10	100	98.2	96.2	96.7
	Mean	100	98.4	98.0	98.1
Urine	100	100	94.6	96.8	93.6
	10	100	98.0	98.0	95.0
	Mean	100	96.3	97.4	94.3
0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)	100	100	102.0	104.1	100.8
	10	100	95.7	98.8	95.1
	Mean	100	98.9	101.5	98.0

Assay : Agar well method

Test organism : *Escherichia coli* NIHJ

a) : Residual potency(%)

Table 2. Microbiological assay for ceftazidime (a summary of assay conditions)

Method	Ordinary, Agar well	Sensitive, Agar well (Paper disc)
Test organism	<i>Escherichia coli</i> NIHJ	<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 9250
Inoculum	cell suspension (OD=0.8), 0.5 %	cell suspension (OD=0.8), 1 %
Assay medium	Antibiotic medium 4 (DIFCO), pH 6.5	MacConkey agar (EIKEN), pH 8.0
Diluent	Serum or 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)	
Incubation	16-20 h at 34-37 °C	
Limit of quantitation	0.3 $\mu\text{g/ml}$	0.03 $\mu\text{g/ml}$ (0.16 $\mu\text{g/ml}$)

ガーウェル法は他の2方法に比較して測定感度が高く、また、操作が簡便であることから、標準法として設定した。本法の定量限界は0.3 $\mu\text{g/ml}$ であり、血清、尿など比較的高濃度の測定に適していると考えられた。

一方、試験菌として *P. rettgeri* ATCC 9250、測定培地として MacConkey 寒天培地 (pH 8.0) を用いる高感度法の定量限界は、アガーウェル法で0.03 $\mu\text{g/ml}$ である。乳汁などの低濃度試料、また、微量の組織からの抽出液 (3~20 倍抽出) 等に、より適した方法であると考えられる。

血清試料の濃度測定において Moni-troll, Control Serum I 等の代用血清の使用が可能であれば便利である。これらの代用血清とプールヒト血清での標準曲線は一致したため、代用血清の使用が可能であった。

ヒト血清と尿を Bioassay 法と HPLC で測定した結果、両側定値の相関性は高く、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。

CZOP のヒト血清及び尿での安定性は -20°C 以下の凍結保存であれば少なくとも 6 週間は安定であることが認められている。

文 献

- 1) Miyake A, Yoshimura Y, Yamaoka M, Nishimura T, Hashimoto N, Imada A: Studies on condensed-heterocyclic azolium cephalosporins IV. Synthesis and antibacterial activity of 7 β -[2-(5-amino-1, 2, 4-thiadiazol-3-yl)-2(Z)-alkoxyiminoacetamido]-3-(condensed-heterocyclic azolium)methyl cephalosporins including SCE-2787. *J Antibiot* 45: 709~720, 1992
- 2) Iwahi T, Okonogi K, Yamazaki T, Shiki S, Kondo M, Miyake A, Imada A: *In vitro* and *in vivo* activities of SCE-2787, a new parenteral cephalosporin with a broad antibacterial spec-

- trum. Antimicrob Agent Chemother 36: 1358
~1366, 1992
- 3) 小此木研二, 岩日朋幸, 山崎俊幸, 今田 哲: 新セ
フェム系抗生物質 cefozopran の β -lactamase に
対する安定性, 親和性および β -lactamase 産生菌に
対する抗菌力。Chemotherapy 41(S-4): 105~111,
1993
- 4) 畚野 剛, 前田憲一, 逸見昭二: *Proteus rettgeri*
ATCC 9250 を試験菌とする aminothiazolyl ce-
phalosporin の高感度測定。Chemotherapy 32:
109~110, 1984
- 5) 山下健治, 本橋道生, 前田憲一, 竹田益雄, 矢敷孝
司: Cefozopran の高速液体クロマトグラフィーに
よる定量法。Chemotherapy 41(S-4): 142~146,
1993

Microbiological assay method for cefozopran in biological specimens

Masuo Takeda and Kenichi Maeda

Takeda Analytical Research Laboratories, Ltd.,
2-17-85, Jusohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

We investigated several methods for the determination of cefozopran (CZOP) in biological specimens and developed an agar well method using *Escherichia coli* NIHJ as the test organism and antibiotic medium 4 (Difco) as the test medium. The quantitation limit of the method was 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ both in 0.1 M phosphate buffer (pH7.0) and in human serum.

A method with higher sensitivity was also elaborated by using *Providencia rettgeri* ATCC 9250 and MacConkey agar (pH8.0). The quantitation limits of the methods using agar wells and paper discs as the vehicles were 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

The concentrations of CZOP in serum and urine determined by bioassay correlated well with those determined by HPLC.

A bioautographic method using the same *Providencia* strain was developed for the detection of antibacterially active metabolites. No bioactive metabolites of CZOP were observed in human serum and urine samples.

CZOP in human serum and urine was stable at -20°C for at least 6 weeks.