

SY5555 の組織内濃度測定法

諸住なおみ・宮田 幸代・金井 靖・米本 儀之

杉田 修・大沼 規男

サントリー株式会社医薬センター*

菊 地 康 博

山之内製薬株式会社第四創薬研究所

小林 寅 詰・佐藤 弓 枝

三菱油化ビーシーエル株式会社化学療法研究室

松 田 静 治

江東病院産婦人科

馬 場 駿 吉

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

荒 田 次 郎

岡山大学医学部皮膚科学教室

SY5555 の組織内濃度測定法を確立するとともに、測定に及ぼす試料中蛋白の影響を検討した。

抗生物質の組織内濃度測定法として、組織ホモゲネート上清を直接微生物学的測定法(bioassay)に供し、薬剤添加した緩衝液による検量線から組織内濃度を求めることが一般的である(以後、直接法と略す)。直接法をSY5555の組織内濃度測定に適用したところ組織ホモゲネート上清中蛋白の影響を受けて組織内濃度は実際よりも低値に測定された。そこでヒト血漿、ラット腎臓および皮膚ホモゲネート上清試料よりSY5555を固相抽出し、アセトニトリルにて抽出後蒸留水に再溶解してbioassayに供する方法(以後、抽出法と略す)を検討した。その結果、阻止円径は緩衝液のそれと一致し、抽出法により試料中蛋白の影響を回避できた。さらに抽出法を産婦人科、耳鼻咽喉科および皮膚科領域の組織内濃度測定に適用したところ、直接法に供して得られた成績の1.1~1.9倍の濃度が測定された。両測定値の間には良好な相関が観察され、抽出法の有用性が示唆された。

Key words : SY5555, bioassay, 組織内濃度

SY5555はサントリー株式会社および山之内製薬株式会社で共同開発された新規経口ペネム系抗生物質である。本薬は、広域抗菌スペクトラムを有し、好気性ならびに嫌気性菌に対して優れた抗菌力を示す。特に、腸球菌に対しては、既存の経口抗菌薬と比較し、優れた抗菌活性を示す。

抗生物質の組織内濃度測定にあたっては、微生物学的測定法(bioassay)を採用し、組織ホモゲネート上清を直接bioassayに供し、緩衝液による検量線を用いて組織内濃度を求めることが一般的である(以後、直接法と略す)。しかしながら、前報¹⁾で報告したようにSY5555の高い蛋白結合率(約90%)²⁾のために、血漿の阻止円径は同一SY5555濃度の緩衝液と比較して小さ

くなることが明らかとなり、組織内濃度測定においても組織ホモゲネート上清に含まれる蛋白の影響をうけて組織内濃度が低値に測定される可能性が考えられた。

そこで、我々は組織ホモゲネート上清中のSY5555を固相抽出することにより上清に含まれる蛋白の影響を回避できる方法(以後、抽出法と略す)を開発した。本報告では、組織内濃度測定に及ぼす試料中蛋白の影響と抽出法のヒト臨床検体への適用の妥当性について報告する。

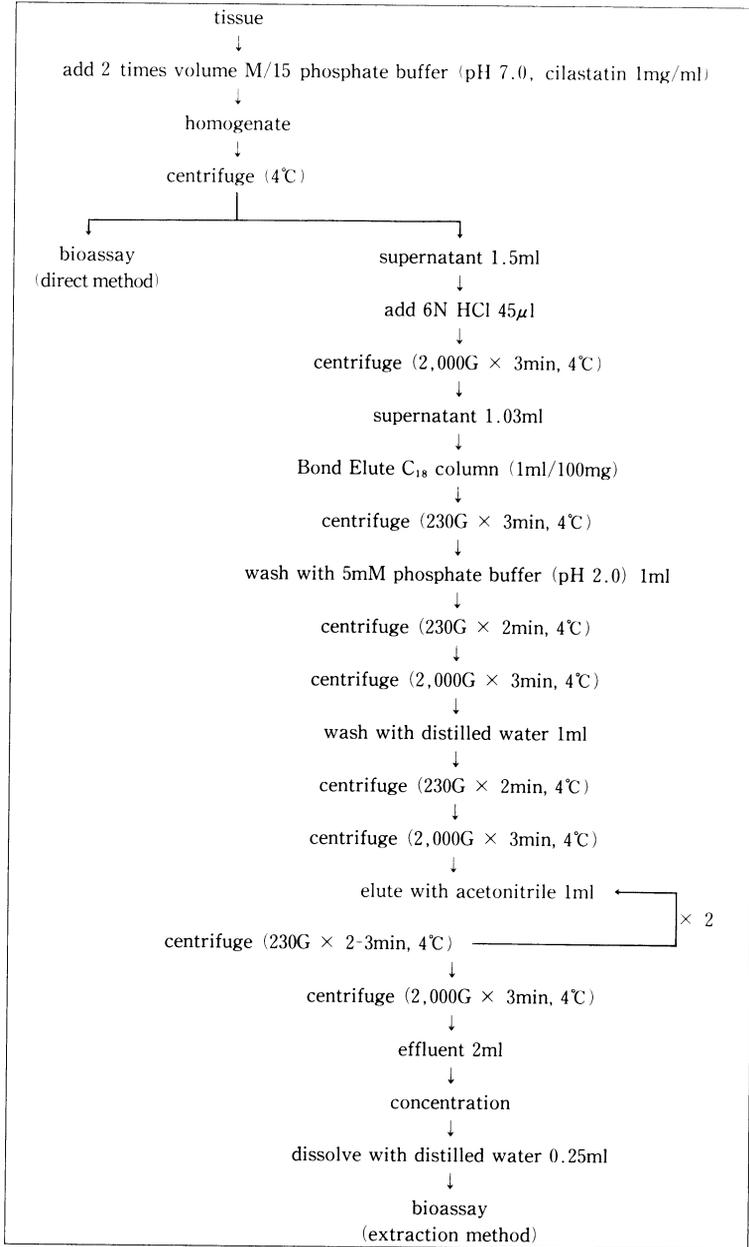
I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤および試薬

SY5555はサントリー株式会社にて合成されたものを使用した。ヒト血清アルブミン(HSA, Fr. V)は

* 〒370-05 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ2716-1

Procedure



Bioassay

test organism	: <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
medium	: sodium citrate agar
method	: agar well or cylinder cup
standard sol.	: M/15 phosphate buffer (pH 7.0, cilastatin 1mg/ml)
preincubation	: 4°C, 2h
incubation	: 37°C, 18h

Fig. 1. Standard assay procedure for direct method and extraction method

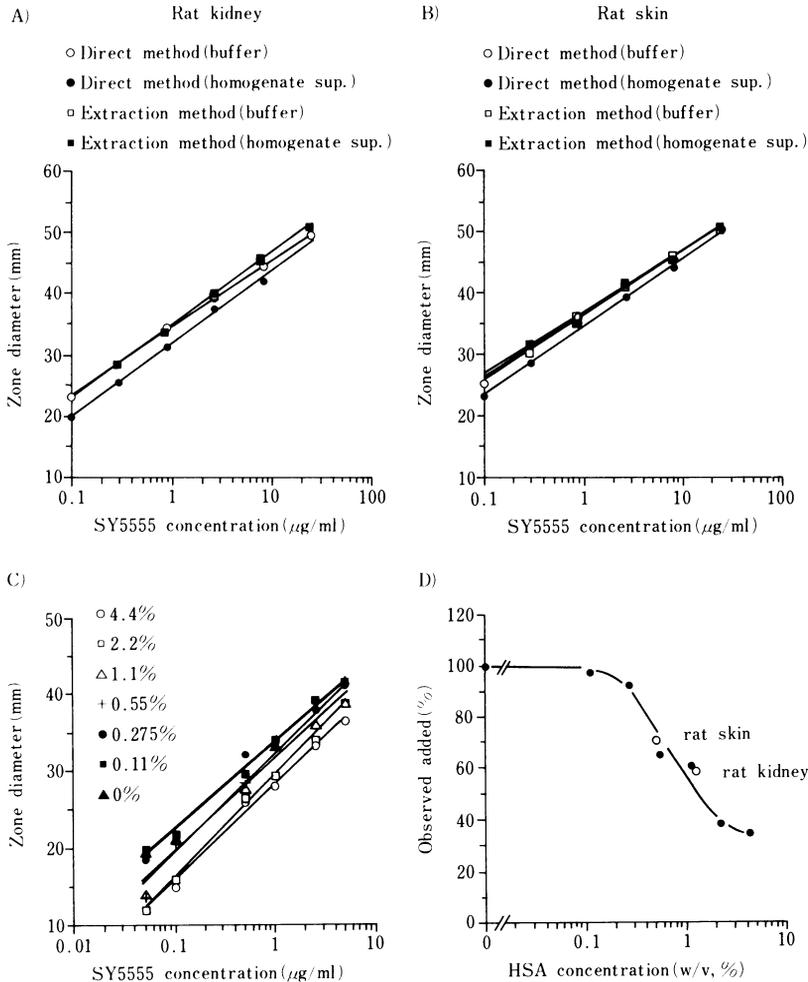


Fig.2-A),B) : Influence of tissue protein on standard curves for SY5555 (A : rat kidney, B : rat skin)

Direct method : Samples ($200\mu\text{l}$) were placed into the cup directly

Extraction method : Samples were acidified with 6N HCl and the supernatant (1 ml) was applied to a C_{18} column. After washing the column, SY5555 was eluted with acetonitrile and the effluent was concentrated, dissolved with water (0.35 ml). The samples ($200\mu\text{l}$) was placed into the cup directly

C) : Influence of HSA on standard curves for SY5555 by direct method (cylinder cup method)

D) : Relationship between HSA concentrations and observed/added SY5555 concentration ratios by direct method (SY5555 : $5\mu\text{g/ml}$, cylinder cup method)

Sigma 社より購入し、cilastatin (CS) はチエナム[®]製剤 (萬有製薬株式会社) から当社にて抽出・精製して使用した。Bioassay の培地成分としてペプトン、肉エキスはミクニ化学産業株式会社、寒天は栄研化学工業株式会社製のものを使用した。その他の試薬は市販の

特級品を用いた。

2. 実験方法

1) 組織ホモゲネート上清の調整

SD 系雄性ラットは日本チャールスリバー株式会社より購入し、6 週令で実験に使用した。ラットは腹部

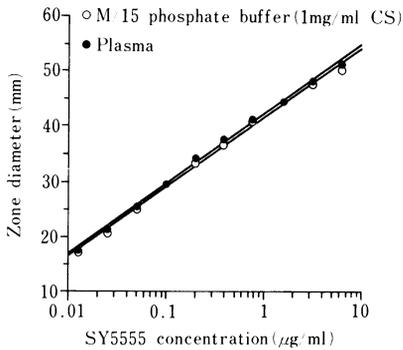


Fig. 3. Typical standard curves for SY5555 measured by extraction method (agar well method)

大動脈より放血致死させ、腎臓、皮膚を摘出した。CS (1 mg/ml) を含む M/15 リン酸緩衝液を組織重量の 2 倍量加え、ポリトロン[®]にてホモゲナイズ後遠心分離 (1,200G×10分, 4℃) して、上清を得た。

2) 濃度測定に及ぼす試料中蛋白の影響

HSA (0~4.4%, w/v) を含む M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) およびラット組織ホモゲネート上清に SY5555 溶液を 5% (v/v) 添加し、種々の SY5555 濃度の試料を調整した。本試料を直接 bioassay に供するとともに、以下に示す抽出法により試料中の SY5555 を抽出し、蒸留水に再溶解して bioassay に供した。

3) 抽出法

固相抽出

標準的な操作手順を Fig. 1 に示した。即ち、ホモゲネート上清 1.5ml に 6N 塩酸を上清の 3% (45μl) 添加し、攪拌遠心分離後、上清 1.03ml を Bond Elute C₁₈ カラム (1 ml/100mg, Analytichem International) にかけた。5 mM リン酸緩衝液 (pH2.0) 1 ml および蒸留水 1 ml にてカラムを洗浄後、アセトニトリル計 2 ml にてカラムから SY5555 を溶出し、減圧乾固後蒸留水 0.25ml にて再溶解し bioassay に供した。ヒト血漿を用いて本法の測定精度を検討した実験では、上記試料量を 1.5ml から 0.6ml に、再溶解液量を 0.25ml から 0.15ml に変更した他は上記方法と同様に操作し、本法の測定濃度/添加濃度比および変動係数を求めた。

微生物学的測定法 (bioassay)

試料中の SY5555 濃度は、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする agar well 法または cylinder cup 法により測定した。検定培地にはクエン酸ナトリウム培地を用いた。測定法の詳細は前報¹⁾に記載した。

4) ヒト臨床検体

産婦人科、耳鼻科および皮膚科領域における臨床試

Table 1. Precision of SY5555 determination by extraction method in human plasma

SY5555 (μg/ml)		added/observed (%)	CV (%)
added	observed		
0.1	0.10 ± 0.01	96.7 ± 5.8	6.0
0.5	0.51 ± 0.01	103 ± 1.2	1.2
1.0	1.06 ± 0.00	106 ± 0.0	0.0
5.0	4.99 ± 0.05	99.9 ± 1.0	1.0

Mean ± SD (N = 3), CV : coefficient of variation

験において採取された組織を -80℃ にて凍結後、ドライアイス存在下に輸送し、濃度測定まで -80℃ で凍結保存した。測定に際し、これらの組織に CS (1 mg/ml) を含む M/15 リン酸緩衝液を加え、ホモゲネート後その遠心上清を測定試料とした。試料は直接法に供するとともに、Fig. 1 に示した抽出法を用いて組織内濃度を測定した。

II. 結 果

1. 阻止円径に及ぼす試料中蛋白の影響

緩衝液、ラット腎臓および皮膚ホモゲネート上清に SY5555 を添加し、直接 bioassay に供して SY5555 濃度と阻止円径の関係を調べた。緩衝液および組織ホモゲネート上清とも添加濃度の対数と阻止円径には良好な直線関係が認められたものの、組織ホモゲネート上清での阻止円径は、同じ SY5555 濃度の緩衝液と比較して小さくなった (Fig. 2-A, B)。

SY5555 はアルブミンと高い結合率を示すことが知られているので²⁾、種々の濃度のアルブミン (0~4.4w/v%) を含む緩衝液に SY5555 を添加した試料を調製し、直接 bioassay に供して SY5555 濃度と阻止円径の関係を調べた。SY5555 添加濃度 (対数) と阻止円径には良好な直接関係が観察されたが、アルブミン濃度の増加とともに阻止円径は小さくなった (Fig. 2-C)。さらに SY5555 濃度を 5 μg/ml に固定し、アルブミン濃度の影響を詳細に検討したところ、緩衝液検量線より算出される SY5555 濃度 (測定濃度) は、アルブミン濃度の上昇に伴い低下し、測定濃度/添加濃度比はアルブミン濃度が 0.1% を越えると急激に低下した (Fig. 2-D)。

他方、Fig. 1 に示した抽出法によりラット腎および皮膚ホモゲネート上清より SY5555 を抽出し bioassay に供したところ、組織ホモゲネート上清試料の阻止円径は緩衝液のそれと差がなかった。また、組織ホモゲネート上清および緩衝液ともに添加 SY5555 濃度の対数と阻止円径には良好な直線関係が認められた (Fig. 2-A, B)。

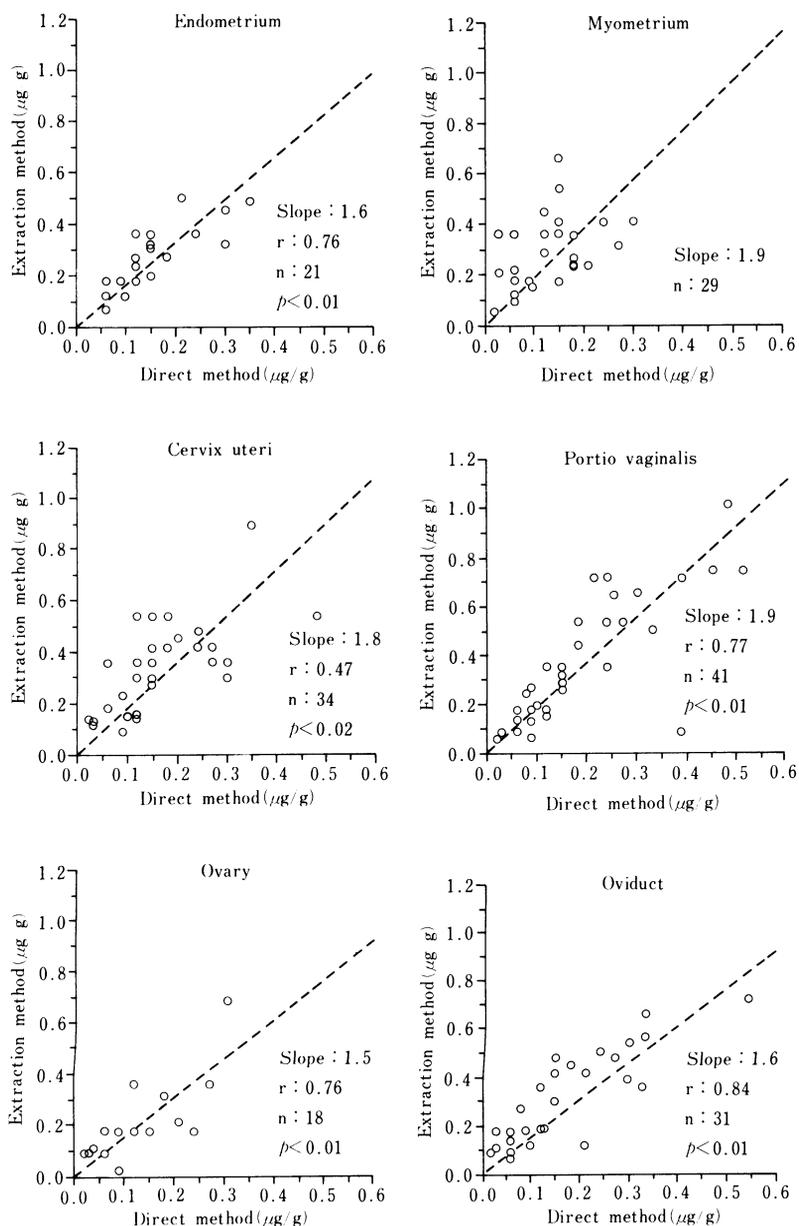


Fig. 4. Correlation between SY5555 concentrations in genital organs measured by direct method and extraction method

2. 抽出法の測定精度

ヒト血漿および緩衝液に種々の濃度のSY5555を添加し、固相抽出後に得られた試料を bioassay に供し検量線を作製した。ヒト血漿と緩衝液の検量線は0.0125~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示し、血漿の阻止円径は緩衝液と一致した (Fig. 3)。またSY5555濃度0.1~

5.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で添加濃度の96.7~106%が測定され、測定の変動係数は0~6.0%であった (Table 1)。

3. 産婦人科、耳鼻咽喉科および皮膚科領域組織内濃度

産婦人科、耳鼻咽喉科および皮膚科において採取された検体を抽出法により測定し、直接法にて測定した

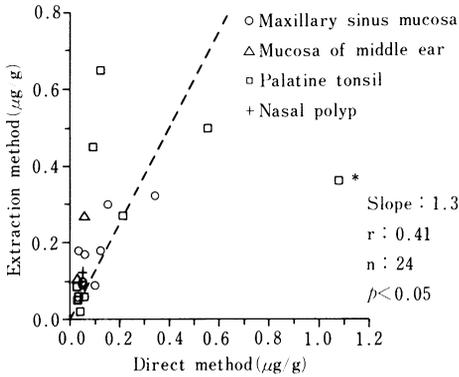


Fig. 5. Correlation between SY555 concentrations measured by direct and extraction assay method in tissues from otorhinolaryngology (* : exclusive case from the evaluation of correlation analysis, direct method : $1.08\mu\text{g/g}$, extraction method : $0.36\mu\text{g/g}$)

成績と比較した (Fig. 4~6)。産婦人科領域の組織 (子宮内膜, 子宮頸部, 子宮筋層, 子宮腔部, 卵巣, 卵管) では, 抽出法による測定値は直接法の1.5~1.9倍を示し, いずれの組織においても両測定値の間には良い相関 (相関係数0.47~0.84) が観察された。耳鼻咽喉科組織 (上顎洞粘膜, 鼻茸, 扁桃, 中耳粘膜) では, 全組織をまとめて解析したが抽出法の成績は直接法で測定した値の1.3倍であった。皮膚組織においては抽出法による測定値は直接法の1.1倍になり両測定値はほぼ等しく, 相関係数は0.77であった。

III. 考 察

抗生物質の組織内濃度測定にあたっては, 組織ホモゲネート上清を直接 bioassay に供し, 緩衝液を用いて作製した検量線により組織内濃度を求めることが一般的である (直接法)。しかしながら, 直接法を SY555 の組織内濃度測定に適用したところ, SY555 の高い蛋白結合率 (約90%)²⁾ のために, 実際の濃度より低値に測定されることが明らかとなった。

蛋白結合率が高い薬物ほど組織移行性が低いと言われており, β ラクタム系抗生物質では組織移行性は蛋白結合率に影響されることが知られている⁴⁾。依ら⁵⁾は血清蛋白結合率の異なる種々のセフェム薬をラットに点滴静注し肺内移行性におよぼす血清蛋白結合の影響を検討し, 高い蛋白結合率を示す cefazolin (蛋白結合率: 91.9%), ceftriaxone (90.7%), cefuzonam (92.3%) では移行率が9.8~11.4%であるのに対して, 蛋白結合率の低い ceftizoxime (25.8%), ceftazidime (21.3%) では24.9~26.9%であることを報告している。

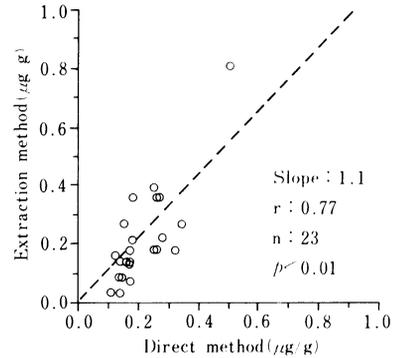


Fig. 6. Correlation between SY555 concentrations measured by direct and extraction assay method in human skin

しかしながら, 本報告で示したように蛋白結合率の高い薬物では測定法によっては組織内濃度が実際よりも低値に測定されることがあり, 蛋白結合率が高くかつ低い組織移行性が示された薬物においては組織内濃度が過小評価されたために組織移行性が低く見積もられた可能性も考えられる。

我々は組織ホモゲネート上清中の蛋白を除くために, 固相抽出により組織ホモゲネート上清中より SY555 を抽出した。SY555 は酸性薬物 (pKa : 3.5) であるので, 組織ホモゲネート上清を塩酸性にすることにより SY555 を非イオン型とし, C_{18} カラムに保持させアセトニトリルで溶出させた。この条件下では, 上清中の蛋白は C_{18} カラムを素通りするかあるいはカラム内に残留するためにアセトニトリル溶出画分には蛋白は含まれず, SY555 と蛋白の分離が可能となった。また本論文で示した抽出法に従えば組織ホモゲネート上清は最終的に約4倍に濃縮され, 測定感度の上昇がもたらされた。

産婦人科, 耳鼻咽喉科および皮膚科領域の組織内濃度を抽出法にて測定したところ, SY555 の組織内濃度は直接法で測定した時の1.1~1.9倍に測定されたが, その比は組織によってわずかながら異なるものであった。SY555 は血清中のアルブミンと結合すること²⁾, アルブミンは血液のみならず組織間質液中にも存在し, また組織中の血液容積, 間質液容積および間質液中アルブミン濃度も組織によって異なることから³⁾, 上述の差は組織ホモゲネート上清中のアルブミン濃度の差による可能性がある。ちなみに本試験で用いたラット腎および皮膚ホモゲネート上清中のアルブミン濃度は腎では1.4%, 皮膚では0.5%と推定され, 両組織での

測定濃度/添加濃度比(腎:57.3%, 皮膚:70.2%)をSY5555濃度測定に及ぼすHSA濃度の影響を検討した結果得られた曲線上にプロットすると、このアルブミン単独時の曲線とよく一致した。また、ヒト皮膚ホモゲネート上清中のアルブミン濃度は約0.3%³⁾と推定されるが、HSA濃度0.3%の時の測定濃度/添加濃度比をこの曲線上から求めると約90%となり、直接法では実際の組織内濃度の約90%の測定値が得られ、抽出法との比は1.1倍(100/90)になるものと予想された。実際、皮膚組織内濃度測定において抽出法による測定値は直接法の1.1倍を示し、予想値と一致した。従って、各ヒト組織で認められた測定濃度比率の差は、組織ホモゲネート上清中のアルブミン濃度が各組織によって異なるためと推察された。産婦人科および耳鼻咽喉科領域の組織の血液容積、間質液容積および間質液中アルブミン濃度は文献的にも不明であるため組織ホモゲネート上清中のアルブミン濃度を推定することは不可能であるが、抽出法の成績は直接法の1.3~1.9倍となり皮膚よりも大きかったことから、これら組織ホモゲネート上清中のアルブミン濃度は皮膚よりも高いことの他に、組織ホモゲネート上清中でSY5555がアルブミン以外の蛋白と結合する可能性も考えられた。

蛋白結合率の高い薬物においてはホモゲネート上清を直接bioassayに供する場合には検量線を測定対照

組織を用いて作製することが望まれるが、臨床試料の分析に際しては多量の対照組織を入手することは極めて困難である場合が多い。従って、このような場合には本報告で示したように固相抽出等により試料中の蛋白を除いて活性成分を抽出し、bioassay法あるいはHPLC法等により測定する方法がより適切であろう。

文 献

- 1) 菊地康博, 北崎知子, 斉藤秀之, 柴沼忠夫, 諸住なおみ, 金井 靖, 米本儀之, 杉田 修, 大沼規男: 新規経口ペネム薬 SY5555 の体液内濃度測定法. *Chemotherapy* 42 (S-1): 227~234, 1994
- 2) 金井 靖, 諸住なおみ, 米本儀之, 杉田 修, 大沼規男, 菊地康博: SY5555 の実験動物における体内動態. *Chemotherapy* 42 (S-1): 243~253, 1994
- 3) Tsuji A, Sato H, Tamai I, Adachi H, Nishihara T, Ishiguro M, Ohnuma N, Noguchi T: Physiological based pharmacokinetics of a new penem, SUN5555, for evaluation of in vivo efficacy. *Drug Metabolism and disposition* 18: 245~252, 1990
- 4) 寺崎哲也: 薬物の組織分布に関する機構論的研究. *薬学雑誌* 112: 887~905, 1992
- 5) 依 修一, 松本 哲, 松本佳巳, 上村利明, 五島瑳智子: セフェム剤のラット肺内移行性におよぼす血清蛋白結合の影響. *Chemotherapy* 40: 459~468, 1992

Microbiological assay method for SY5555,
a novel oral penem antibiotics, in tissues

Naomi Morozumi, Yukiyo Miyata, Yasushi Kanai, Yoshiyuki Yonemoto,
Osamu Sugita and Norio Ohnuma

Suntory Bio · Pharma Tech Center

2716-1 Kurakake, Akaiwa, Chiyoda-machi, Ohra-gun, Gunma 370 05, Japan

Yasuhiro Kikuchi

Infectious Disease and Immunology Research Laboratories,

Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

Intetsu Kobayashi, Yumie Satou

Chemotherapy Division, Mitsubishi Yuka Bio-Clinical Laboratories

Seiji Matsuda

Department of Obstetrics and Gynecology, Koto Hospital

Shunkichi Baba

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University, Medical School

Jiro Arata

Department of Dermatology, Okayama University Medical School

Microbiological assay methods were established for quantitative determination of SY5555 in tissues, and the influence of tissue protein on the assay method was examined.

Measurement of the antibiotic concentration in the tissue was usually conducted by microbiological assay. There, the supernatants of tissue homogenates were placed directly into agar wells, cylinder cups or paper disks, and the calibration curve was prepared by a buffer solution spiked with the antibiotic. However, it was found that the SY5555 concentration in tissue was underestimated by this direct method due to the high protein binding of the substance.

We established a new method (extraction method), by which SY5555 could be extracted from human plasma, as well as supernatant of rat kidney and skin homogenates by using a C_{18} column. In brief, SY5555 was eluted from the column with acetonitrile, followed by a drying down in vacuo, then dissolving with water. The samples were placed into agar wells or cylinder cups.

The diameter of the inhibition zone in these samples was in good agreement with that obtained from the buffer solution prepared in the same way. When the extraction method was employed to measure SY5555 concentrations in human tissue samples from gynecology, otorhinolaryngology and dermatology, SY5555 concentrations were estimated to be 1.1-to 1.9-fold higher than those measured by the direct method. A good correlation was demonstrated between the direct method and extraction method, indicating that the extraction method was valid for the measurement of SY5555 in tissues.