

## NM441 の体液内濃度測定法

松田 真人・奥山 義男・森野 昭・尾崎 正邦

日本新薬株式会社創薬研究本部\*

NM441 の活性本体である NM394 の体液内濃度測定法を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法および微生物学的定量 (bioassay) 法で検討した。

HPLC 法では、溶媒抽出法および固相抽出法を用いることにより測定可能であった。Bioassay 法では、*Escherichia coli* Kp を検定菌とし、定量用培地として感受性ディスク培地を用いるアガーウェル法、カップ法およびペーパーディスク法の 3 方法いずれにおいても測定可能であった。

ヒト血漿および尿において、HPLC 法と bioassay 法による測定値はよく相関した。

-20°C の保存条件では、NM394 はヒト血漿中、ヒト尿中で少なくとも 4 週間は安定であった。

**Key words:** NM394, キノロン系合成抗菌薬, HPLC 法, Bioassay 法

NM441 はプロドラッグ型の新規キノロン薬で<sup>1)</sup>、動物に投与後、グラム陽性菌、陰性菌に対して強い抗菌作用を示す活性本体である NM394 に速やかに変換されることが確かめられており<sup>2)</sup>、動物に対する実験的全身感染、局所感染に対して強い感染防御作用を有することが明らかとなっている<sup>3)</sup>。

キノロン薬の体液内濃度は一般的に、HPLC 法<sup>4-11)</sup> またはアガーウェル法<sup>12,13)</sup>、カップ法<sup>9)</sup>、ペーパーディスク法<sup>5)</sup> 等の bioassay 法によって測定されている。

そこで、NM441 の活性本体である NM394 の測定法について、HPLC 法と bioassay 法の検討および両者の比較を行った。

さらに -20°C 凍結保存時の血漿および尿中の NM394 の安定性を bioassay 法により検討した。

## I. 材料と方法

## 1. 試薬および試料

NM394, 高速液体クロマトグラフの内部標準物質である NAD-358 および NAD-245 は日本新薬株式会社で合成したものを使用した (Fig. 1)。アセトニトリルおよびジクロロメタンは高速液体クロマトグラフ用を、クロロ炭酸エチルは市販の一級品を、その他の試薬は特に記載

のない限り市販の特級品を用いた。

血漿および尿は健康成人男子から採取し、直ちに、または -20°C で凍結保存したものを用いた。

## 2. HPLC 法

## 1) 前処理

## (1) 溶媒抽出法

血漿では 0.5ml に、尿では 0.1ml (高濃度域 5~500  $\mu\text{g/ml}$ ) または 0.5ml (低濃度域 0.5~40  $\mu\text{g/ml}$ ) に、内部標準物質 NAD-358 (血漿: 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 尿: 10  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5ml および 1% クロロ炭酸エチル (尿高濃度域の場合 3%) を含むジクロロメタン 3.5ml を加えて 10 分間振盪した。3000rpm で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン層約 3ml を分取し、減圧下溶媒を留去した。残渣にメタノール (血漿の場合 50  $\mu\text{l}$ , 尿の場合 250  $\mu\text{l}$ ) を加えて溶解させ、その 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入した。

## (2) 固相抽出法

血漿 0.2ml に 0.425% リン酸水溶液 1ml および内部標準物質である NAD-245 を含む 0.425% リン酸水溶液

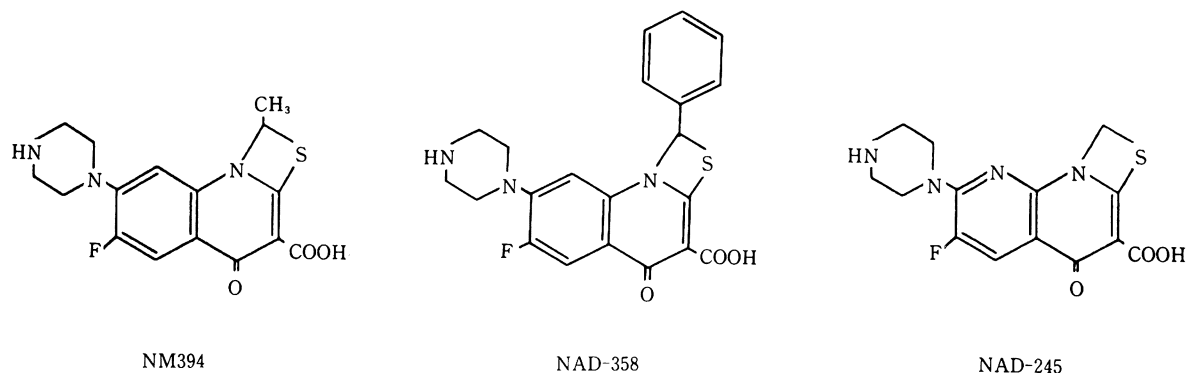


Fig. 1. Structures of NM394, NAD-358 and NAD-245

(1 $\mu$ g/ml) 50 $\mu$ l を加えて混合した後、この溶液をメタノールおよび 0.425% リン酸水溶液各々 3ml を順に加えてコンディショニングした固相抽出用カートリッジカラム SEP-PAK Vac/3cc PS-1 (Waters) に添加した。次いで、0.425% リン酸水溶液 3ml, 5% アセトニトリルを含有する 0.425% リン酸水溶液 3ml を順次カラムに加えた後、40% アセトニトリルを含有する 0.0425% リン酸水溶液 2ml で溶出した。溶出液に 2.5% アンモニア水溶液 20 $\mu$ l を加えて室温で減圧下留去後、0.425% リン酸水溶液 0.25ml に再溶解し、フィルター SPIN-X (Costa, 0.45 $\mu$ m) で濾過を行い、その濾液 40 $\mu$ l を HPLC に注入した。

## 2) 濃度の算定

NM394 濃度(X)は、内部標準物質とのピーク高さ比(NM394/内部標準物質)(Y)による内部標準検量線法によって求めた。検量線は最小二乗法で一次回帰(Y = aX + b)した。

## 3) 測定機器および測定条件

測定機器および HPLC の諸条件を以下に示した。

### (1) 測定機器

ポンプ: 45J 型 (Waters)

カラム恒温槽: 860-CO 型カラムオープン (日本分光)

試料導入部: 712 全自動サンプルプロセッサ (Waters)

検出器: 溶媒抽出法 484 チューナブル UV/VIS 検出器 (Waters), 固相抽出法 821-FP S 型蛍光検出器 (日本分光)

記録装置: クロマトパック C-R5A (島津製作所)

### (2) 測定条件

ガードカラム: ガードパック プリカラムモジュール (Waters), プリカラムインサートには Nova-PaK C<sub>18</sub> を使用

カラム: Capcell Pak C<sub>18</sub> SG120 4.6mm $\phi$  × 250mm (資生堂)

移動相: 溶媒抽出法 0.05M リン酸緩衝液 (pH 2.0)/アセトニトリル/メタノール (血漿の場合 10:5:6, 尿 0.1ml の場合 10:7:7, 尿 0.5ml の場合 10:6:6), 固相抽出法 0.05M リン酸緩衝液 (pH 2.0)/アセトニトリル (10:1)

流速: 1.0ml/min

検出: 溶媒抽出法 UV 275nm, 固相抽出法 蛍光励起波長 275nm, 蛍光波長 425nm

カラム温度: 40°C

## 3. Bioassay 法

### 1) 検定菌

*Escherichia coli* Kp, *E. coli* NIHJ および *E. coli* NIHJ JC-1 で検討した結果、感度の点で *E. coli* Kp が最も優れていた。また、*E. coli* Kp は現在キノロン薬の bioassay 検定菌として広く使用されていることから、*E.*

*coli* Kp を NM394 の bioassay 検定菌として用いた。

### 2) 定量用培地

Heart infusion agar (ニッスイ), Nutrient agar (ニッスイ), 感受性ディスク培地 (栄研), 感性ディスク培地 (ニッスイ), Mueller-Hinton 培地 (Difco) について比較検討した結果、感受性ディスク培地および感性ディスク培地は阻止円形成、検出感度の点で優れていた。今回の試験では感受性ディスク培地を用いた。

### 3) 定量用寒天平板の作製

*E. coli* Kp をトリプトソーヤブイヨン (ニッスイ) で 37°C 一夜培養後、分光光度計 (日立スペクトロフォトメーター 100-60) を用いて OD<sub>660nm</sub> 約 0.5 になるように同培地で調製し、予め約 48°C に保温しておいた定量用培地に 2% 接種した。

菌を接種した寒天培地を直径 9cm のプラスチックシャーレ (テルモ) に 10ml ずつ分注し水平台上で固化させた。

アガーウエル法の場合、寒天穿孔器 (東洋測器 AHP-104) で固化させた平板の寒天に直径 8mm のウエルを 4 個あけた。

カップ法の場合、カップドロッパー (ナガイ商会 MCD-400) を用いてカップ平板を作製した。

### 4) 標準液の調製

NM394 を 1mg あたり 0.1ml の 0.1N NaOH で溶解し、蒸留水で希釈して 1,000 $\mu$ g/ml 溶液を調製後、0.067M リン酸緩衝液 (pH 8.0) もしくはヒトの血漿を用いて 2 倍標準希釈系列を作製した。

### 5) 定量操作

アガーウエル法の場合、4) で作製した NM394 の 2 倍標準希釈系列溶液または測定検体を、3) で作製したアガーウエル平板の相対する 2 ウエルにマイクロピペットで 40 $\mu$ l ずつ注入した。また、シャーレ間の差を補正するためのリファレンスとして、0.067M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で調製した NM394 溶液 40 $\mu$ l を残りのウエルに注入した。この平板を 1 濃度につき 2 枚作製した。

カップ法の場合もアガーウエル法の場合と同様に 2 倍標準希釈系列溶液または測定検体をパスツールピペットでカップに注入した。

ペーパーディスク法の場合には、ペーパーディスク (東洋濾紙 直径 8mm Thin) にマイクロピペットでディスクあたり 30 $\mu$ l ずつしみ込ませ、アガーウエル法と同様に配置した。

作製した各平板は約 1.5~2 時間室温で予備拡散した後、37°C で約 18 時間培養した。

### 6) 阻止円の計測ならびに NM394 濃度の算出

阻止円の直径をゾーンアナライザー (東洋測器 ZA-FM III) を用いて自動測定した。そのデータをコンピュータ (NEC PC-9801) に転送後、ゾーンアナライザープログラム (東洋測器) を用いて標準液の濃度の対数と阻止

円直径の平均値との関係を二次回帰した。得られた検量線より NM394 濃度を算出した。

#### 7) NM394 の安定性

臨床第一相試験<sup>14)</sup> で 400mg 投与群の投与 1.5 時間後の血漿および 2～4 時間に採取した尿それぞれ 6 例を用いた。血漿試料はヒトブランク血漿で、尿試料は 0.067M リン酸緩衝液 (pH 8.0) でそれぞれ希釈して、アガール法によって NM394 濃度を測定した。

残りの上記試料をプラスチック製サンプルチューブに入れて密栓して -20°C で保存し、4 週間後に同様の方法で測定した。

## II. 結 果

### 1. HPLC 法

#### 1) 溶媒抽出法の検討

ヒト血漿または尿に NM394 および内部標準物質を添加したときの HPLC クロマトグラムを Fig. 2, 3 に示

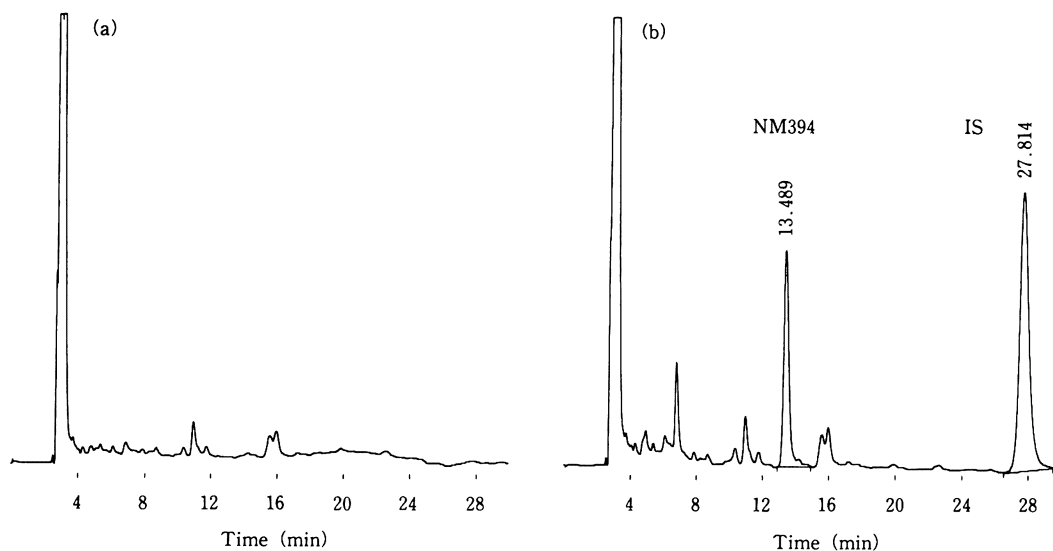


Fig. 2. Typical HPLC chromatograms of NM394 in human plasma by organic solvent extraction method  
(a): Blank plasma  
(b): Plasma spiked with NM394 and internal standard (IS)

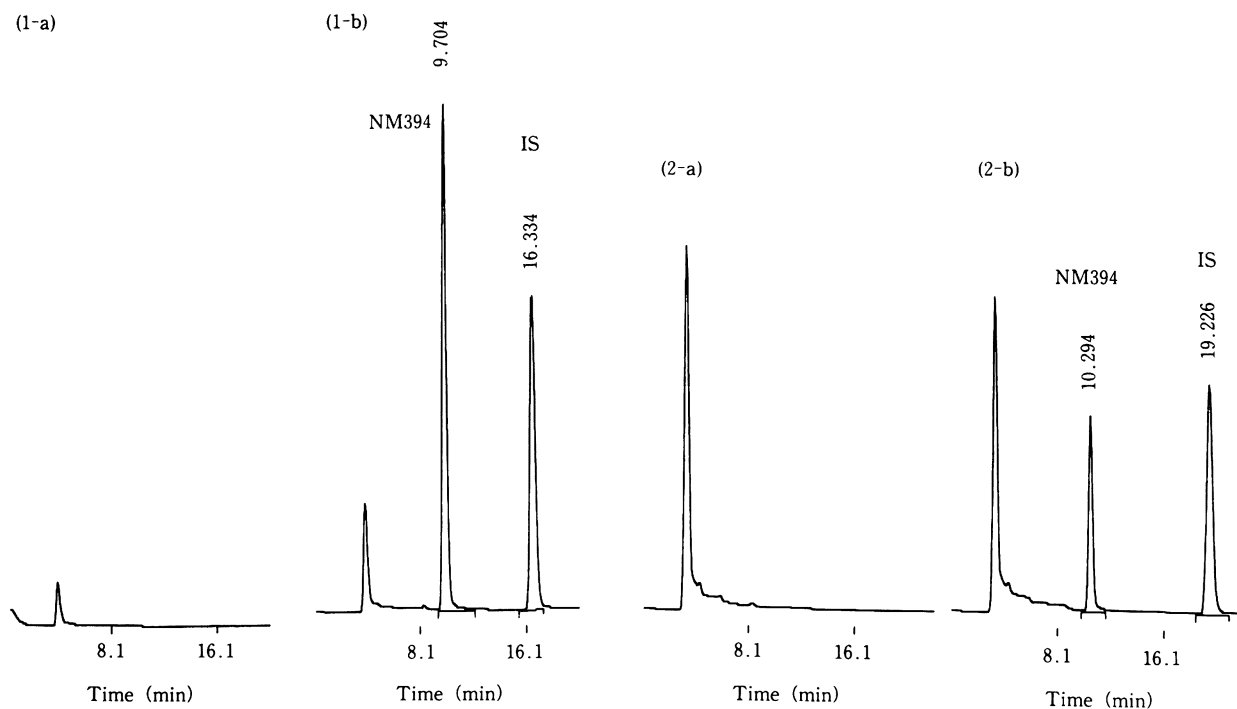


Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of NM394 in human urine by organic solvent extraction method  
(1-a): Blank urine (0.1ml), range 5~500 $\mu$ g/ml (1-b): Urine (0.1ml) spiked with NM394 and IS, range 5~500 $\mu$ g/ml  
(2-a): Blank urine (0.5ml), range 0.5~40 $\mu$ g/ml (2-b): Urine (0.5ml) spiked with NM394 and IS, range 0.5~40 $\mu$ g/ml

した。いずれの場合も生体成分由来のピークとは良好な分離を示した。

ヒト血漿または尿に既知濃度の NM394 を添加し、本定量法に従って得た検量線を Fig. 4 に示した。血漿では 0.05~5 $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で、尿では高濃度域 5~500 $\mu\text{g/ml}$ 、低濃度域 0.5~40 $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で、いずれの検量線も良好な直線性を示した。また、Table 1 に本定量法の精密度および正確度を示した。ヒト血漿、尿とも精密度および正確度は良好であった。

## 2) 固相抽出法の検討

ヒト血漿に NM394 および内部標準物質を添加したときの HPLC クロマトグラムを Fig. 5 に示した。NM394 および内部標準物質とも生体成分由来のピークとは良好な分離を示した。ヒト血漿に既知濃度の NM394 を添加し、本定量法に従って得た検量線は 0.005~0.1 $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で良好な直線性を示した (Fig. 6)。また、本定量法の精密度および正確度は良好であった (Table. 2)。

NM394 の血漿からの回収率は 83% (n=3) であった。

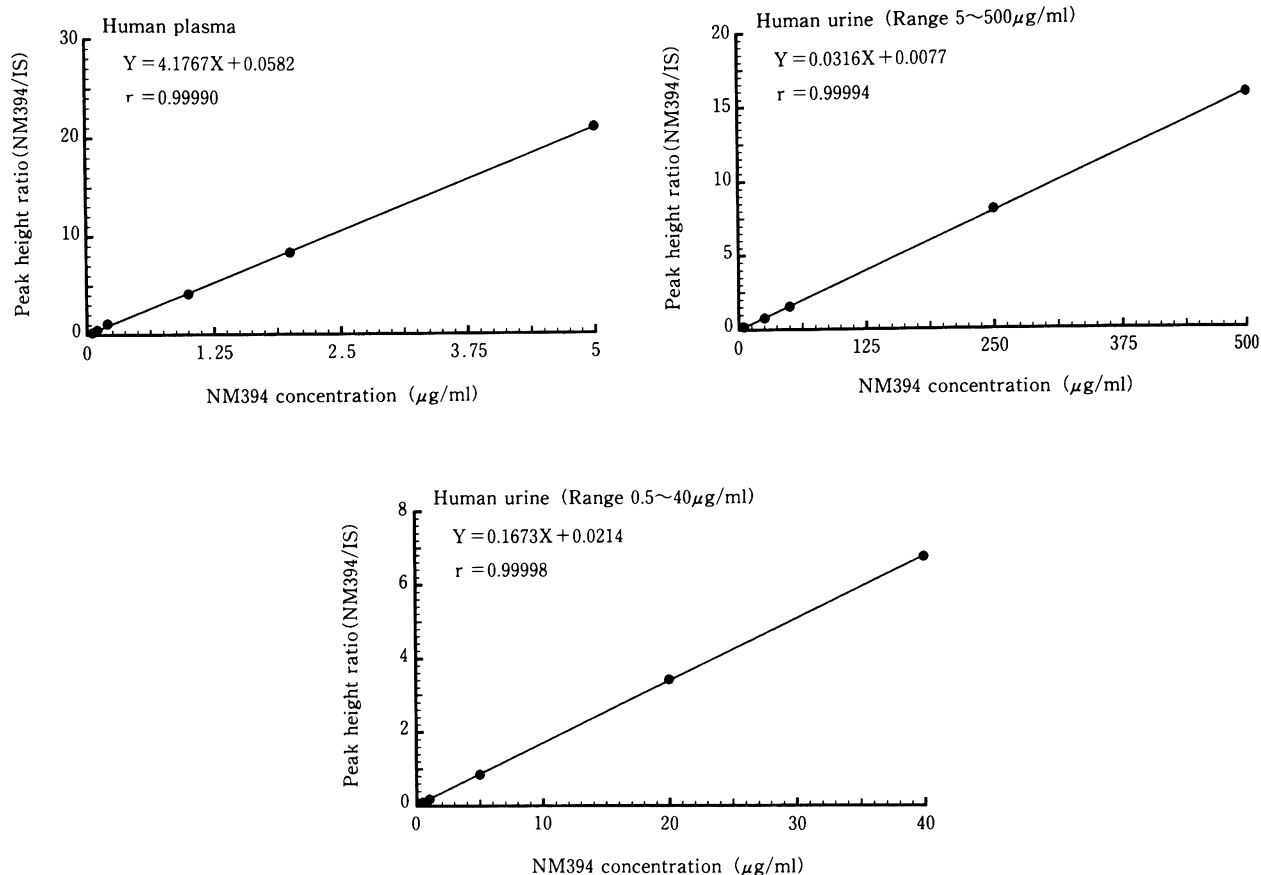


Fig. 4. Standard curves of NM394 in human plasma and urine by organic solvent extraction method

Table 1. Precision and accuracy of NM394 determination by HPLC in human plasma and urine by organic solvent extraction method

| Specimen | Added ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Detected <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Precision <sup>2)</sup> (CV%) | Accuracy <sup>3)</sup> (%) |
|----------|----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Plasma   | 0.05                       | 0.055 $\pm$ 0.005                           | 9.1                           | 10.0                       |
|          | 1.00                       | 1.007 $\pm$ 0.043                           | 4.3                           | 0.7                        |
|          | 5.00                       | 4.934 $\pm$ 0.199                           | 4.0                           | 1.3                        |
| Urine    | 5                          | 5.03 $\pm$ 0.03                             | 0.6                           | 0.6                        |
|          | 50                         | 51.57 $\pm$ 1.04                            | 2.0                           | 3.1                        |
|          | 500                        | 508.12 $\pm$ 12.41                          | 2.4                           | 1.6                        |
|          | 0.5                        | 0.421 $\pm$ 0.013                           | 3.1                           | 15.8                       |
|          | 5.0                        | 5.118 $\pm$ 0.192                           | 3.8                           | 2.4                        |
|          | 40.0                       | 42.030 $\pm$ 0.206                          | 0.5                           | 5.1                        |

1) Each value is the mean  $\pm$  SD (n=5).

2) SD/mean  $\times$  100

3) |detected - added| / added  $\times$  100

## 2. Bioassay 法

### 1) Bioassay 法の比較

0.067M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で調製した NM394 のアガーウエル法, カップ法およびペーパーディスク法による 0.05~3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の検量線を作成した。

その結果, 検量線はアガーウエル法は傾きが大きく, カップ法は低濃度の測定感度の点で優れていた。ペーパーディスク法ではやや測定感度が劣っていた (Fig. 7)。

これらの検量線を用いて別に調製した NM394 の 0.125~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 2 倍希釈系列溶液 5 検体 (n=3) を測定したところ, 上記の 3 種の方法による測定値はよく相関した (Fig. 8)。

また, アガーウエル法を用い, ヒト血漿, 0.067M リン酸緩衝液 (pH 8.0) およびヒト尿の同緩衝液による希釈液を用いて, NM394 の検量線を作成し, Fig. 9 に示

した。

ヒト血漿およびヒト尿中における NM394 の定量限界は 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

### 2) HPLC 法と bioassay 法の比較

臨床第一相試験<sup>14)</sup>で単回投与時に採取した血漿および尿試料を用い, HPLC 法 (溶媒抽出法), bioassay 法 (アガーウエル法) により NM394 濃度を測定し, その値を相互に比較した。

測定値は血漿, 尿試料ともによく相関した (Fig. 10)。

### 3) NM394 の -20°C での安定性

臨床第一相試験<sup>14)</sup>で採取した血漿および尿の試料を -20°C で保存したときの安定性をアガーウエル法により検討した。4 週間後における血漿および尿中の NM394 濃度は低下せず, 本条件で少なくとも 4 週間は安定であった (Table 3)。

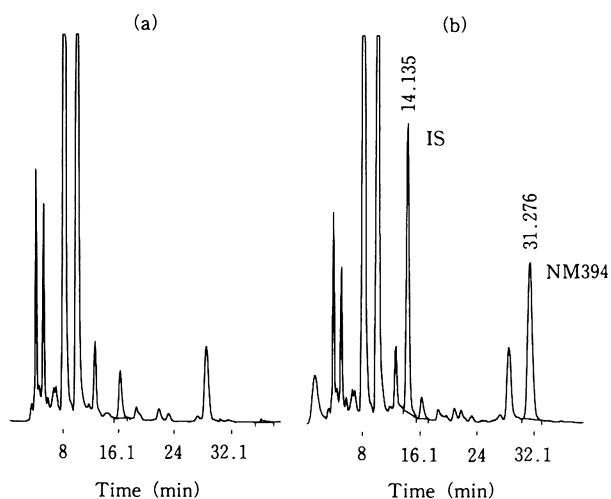


Fig. 5. Typical HPLC chromatograms of NM394 in human plasma by solid-phase extraction method  
(a): Blank plasma  
(b): Plasma spiked with NM394 and IS

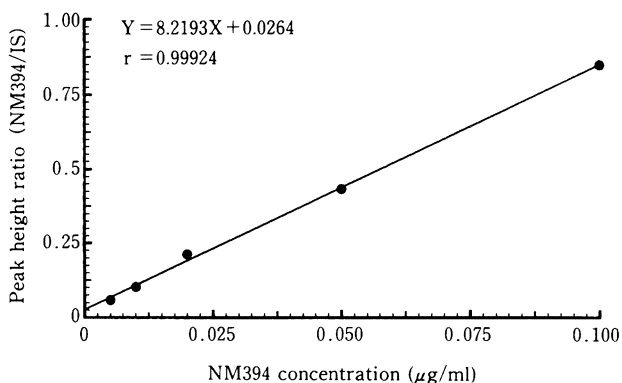


Fig. 6. Standard curve of NM394 in human plasma by solid-phase extraction method

Table 2. Precision and accuracy of NM394 determination by HPLC in human plasma by solid-phase extraction method

| Added ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Detected <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Precision <sup>2)</sup> (CV%) | Accuracy <sup>3)</sup> (%) |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 0.005                             | 0.0048 $\pm$ 0.0009                                | 18.8                          | 4.0                        |
| 0.020                             | 0.0211 $\pm$ 0.0009                                | 4.3                           | 5.5                        |
| 0.100                             | 0.1027 $\pm$ 0.0042                                | 4.1                           | 2.7                        |

1) Each value is the mean  $\pm$  SD (n=5).

2) SD/mean  $\times$  100

3) |detected - added| / added  $\times$  100

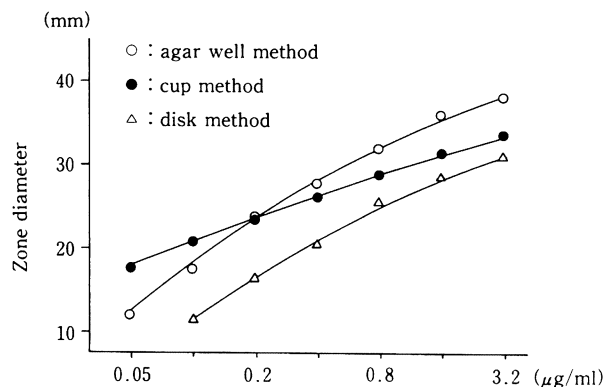


Fig. 7. Standard curves of NM394 by different methods

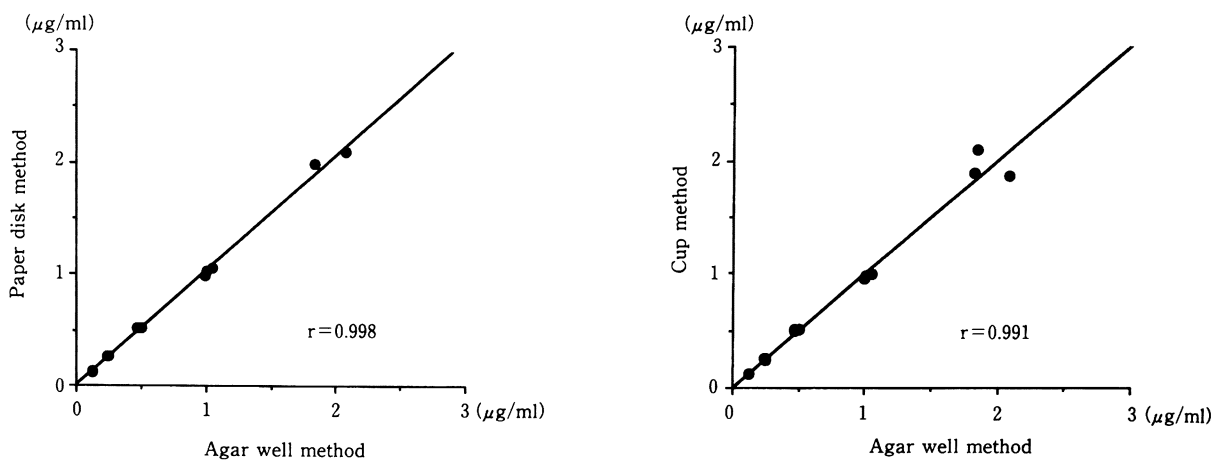


Fig. 8. Correlation between concentrations of NM394 measured by agar well method, cup method and paper disk method

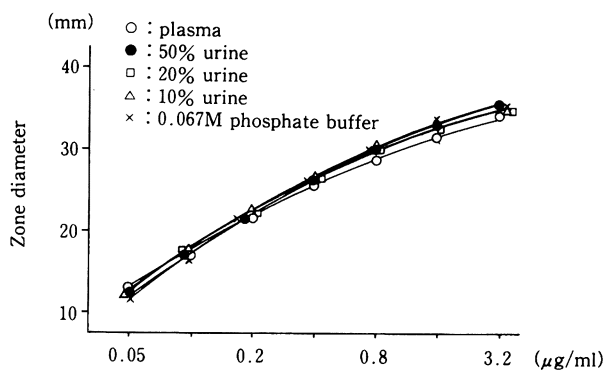


Fig. 9. Standard curves of NM394 in various solvents (agar well method)

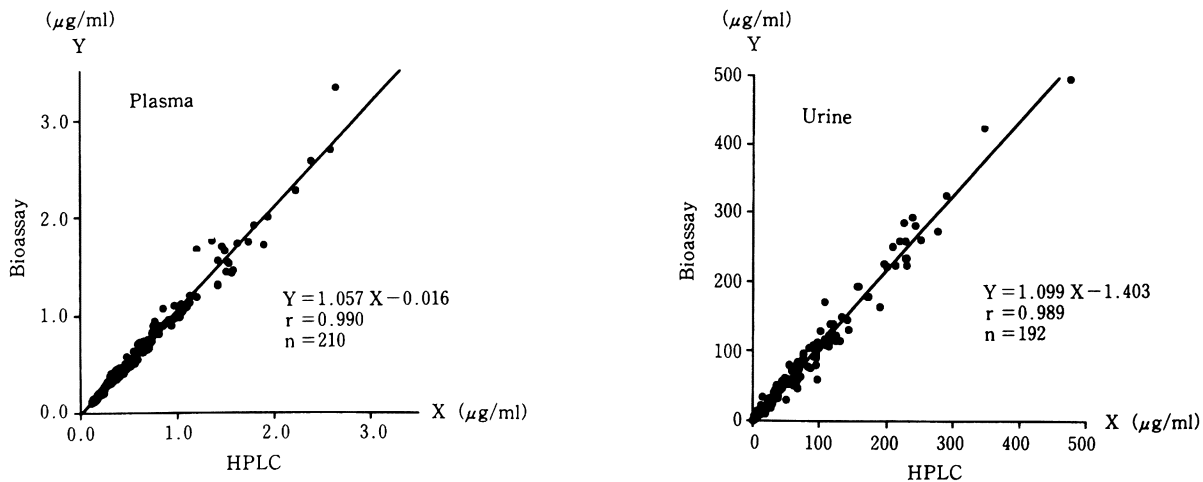


Fig. 10. Correlation between concentrations of NM394 measured by HPLC (organic solvent method) and bioassay (agar well method)

Table 3. Stability of NM394 in plasma and urine of healthy volunteers given 400mg NM441 orally

|                                          |        | Plasma (n=6)       | Urine (n=6)         |
|------------------------------------------|--------|--------------------|---------------------|
| concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )       |        |                    |                     |
| mean $\pm$ SD                            | day 0  | 1.49 $\pm$ 0.73    | 125.0 $\pm$ 72.1    |
|                                          | day 29 | 1.47 $\pm$ 0.70    | 122.3 $\pm$ 81.8    |
| paired t test difference (mean $\pm$ SD) |        | -0.019 $\pm$ 0.068 | -2.747 $\pm$ 13.244 |
| t val                                    |        | 0.663 (N.S.)       | 0.508 (N.S.)        |

N.S.: not significant

### III. 考 察

HPLC 法の場合、NM394 は有機溶媒に抽出され難いので、enoxacin (ENX) の場合と同様にクロロ炭酸エチルと反応させることによりカルバメートとして有機溶媒に抽出させる溶媒抽出法を採用した<sup>4,15)</sup>。この方法により、ENX ではほぼ 100%カルバメートとして抽出できると報告されている<sup>15)</sup>。構造が類似している NM394 の場合も抽出後の水層には NM394 は認められず、NM394 の 100%近くがカルバメートとして有機層に抽出されるものと考えられる。また、本法はかなり迅速性に優れ、精密度および正確度においても満足し得るものであった。

しかし、臨床試験では溶媒抽出法で測定した場合、血漿中濃度が定量限界以下となることもあるために、より感度の高い手法をさらに検討した。NM 394 自身は蛍光物質であり強い蛍光を持っているが、そのカルバメートは蛍光が弱かった。そこで、NM394 をそのまま抽出できる固相抽出法を採用し、NM394 として蛍光検出器で測定したところ、0.2ml の血漿の容量で 0.005 $\mu\text{g/ml}$  までの定量感度が得られた。また、精密度および正確度においても溶媒抽出法と比して劣らなかった。

Bioassay 法においては、ペーパーディスク法はやや感度が劣るものの、アガーウエル法、カップ法およびペーパーディスク法いずれの方法によっても測定可能であり、また測定値は相互によく相関した。

また、HPLC 法と bioassay 法の測定値も血漿、尿試料ともよく相関した。

以上の結果より、NM441 の活性本体である NM394 の濃度は HPLC 法、bioassay 法いずれの方法によっても測定が可能であり、また血漿および尿中 NM394 は -20°C で凍結保存する限り少なくとも 4 週間は安定であった。

### 文 献

- 1) Ozaki M, et al: *In vitro* antibacterial activity of a new quinolone, NM394. Antimicrob Agents Chemother 35: 2490~2495, 1991
- 2) 奥山義男, 桃田一夫, 森野 昭: NM441 の各種動物における吸収。日化療会誌 44(S-1): 155~159, 1996

- 3) Ozaki M, et al: *In vivo* evaluation of NM441, a new thiazeto-quinoline derivative. Antimicrob Agents Chemother 35: 2496~2499, 1991
- 4) 山口俊和, 鈴木玲子, 関根 豊: AT- 2266 の体内動態 III, ヒトにおける AT- 2266 と代謝物の血漿中濃度および尿中排泄。Chemotherapy 32(S-3): 109~116, 1984
- 5) 一原規方, 立澤春男, 津村光義, 采 猛, 佐藤敬喜: DL-8280 の第一相臨床試験。Chemotherapy 32(S-1): 118~149, 1984
- 6) 門脇久治, 友松こずえ, 太田真一, 植村家顯, 小林紀彦, 浅田裕啓: BAYo 9867 (Ciprofloxacin) の体液内濃度測定法に関する研究—高速液体クロマトグラフィー—。Chemotherapy 33(S-7): 81~87, 1985
- 7) 中島光好, 植松俊彦, 滝口祥令, 水野淳宏, 久保信治, 高原義男, 桶崎英一, 永田 治: NY-198 の第 I 相臨床試験。Chemotherapy 36(S-2): 201~239, 1988
- 8) 田井 賢, 杉本由美子, 片山祐子, 前田豊男: T-3262 の臨床第 I 相試験における血中, 尿中および糞中代謝物について。Chemotherapy 36(S-9): 208~215, 1988
- 9) 中島光好, 他: Fleroxacin の第 I 相臨床試験 I。Chemotherapy 38(S-2): 280~311, 1990
- 10) 坂下素子, 横川真紀子, 山口俊和, 関根 豊: Sparfloxacin のヒトにおける体内動態。薬物動態 6: 43~51, 1991
- 11) 武田勝男, 矢野 茂, 佐久間由光, 山口東太郎: Temafloxacin の HPLC 法による体液内濃度測定法。Chemotherapy 41(S-5): 122~127, 1993
- 12) 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
- 13) 黒部暢之, 大植富夫, 山口俊和, 中村信一: Sparfloxacin の体液内濃度測定法。Chemotherapy 39(S-4): 116~122, 1991
- 14) Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, Okuyama Y, Morino A, Ozaki M, Takebe Y: Pharmacokinetics and safety of NM441, a new quinolone, in healthy male volunteers. J Clin Pharmacol 34: 930~937, 1994
- 15) Nakamura R, Yamaguchi T, Sekine Y, Hashimoto M: Determination of a new antibacterial agent (AT-2266) and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 278: 321~328, 1983

## Assay methods for NM441 in body fluids

Masato Matsuda, Yoshio Okuyama, Akira Morino and Masakuni Ozaki

Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.  
Nishioji Hachijo, Minami-ku, Kyoto 601, Japan

The assay methods for determining the concentrations of NM394, the active compound of NM441, in body fluids were examined.

In high-performance liquid-chromatography (HPLC), the organic solvent extraction method and the solid-phase extraction method were found to be available for determining the concentration of NM394.

In bioassay methods, agar well method, cup method and paper disk method were found to be available when *Escherichia coli* Kp and sensitivity test agar were used.

NM394 concentrations determined by HPLC and bioassay method in human plasma and urine were well correlated.

In human plasma and urine, NM394 was stable for at least 4 weeks when stored in  $-20^{\circ}\text{C}$ .