

Imipenem (MK-0787) の微生物学的定量法による体液内濃度測定法に関する検討

今朝洞忠孝・朝日良成・橋爪照隆

日本メルク萬有株式会社 研究所

新規 carbapenem 系抗生剤 imipenem(MK-0787), (5R, 6S)-3-[[2-(formimidoylamino)ethyl]thio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3, 2, 0]hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate の体液内濃度測定法について検討した。

検定菌として *Bacillus subtilis* ATCC 12432, 測定用培地として brain heart infusion agar を用いると, 薄層カップ法, 寒天孔拡散法およびペーパーディスク法のいずれの方法においても測定が可能であった。ペーパーディスク法 (接種菌量 2.1×10^8 CFU/ml) における MK-0787 の測定下限濃度は約 $0.1 \mu\text{g}$ (力価)/ml であった。MK-0787 の検量線の作成の際, 希釈液として血清, 尿および胆汁を用いてもその阻止円の径は 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を希釈液として用いた場合と殆ど差は見られなかった。

血清および胆汁に MES 安定化剤 [1M Morpholino-ethane sulfonate 緩衝液 (pH 6.0)/Ethylene-glycol(1:1, v/v)] を, 尿に MOPS 安定化剤 [1M Morpholino-propane sulfonate 緩衝液 (pH 7.0)/Ethylene glycol(1:1, v/v)] を 1:1(v/v) の割合にて添加し, -80°C にて凍結保存すると, 少なくとも 28 日間は安定であった。

Imipenem (MK-0787) (Fig. 1) は *Enterococcus faecalis* や *Pseudomonas aeruginosa* を含む各種のグラム陽性菌および陰性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを有する新規 carbapenem 系抗生剤である¹⁻³⁾。MK-0787 の吸収・排泄ならびに体内分布を検討するに際し, 本剤の体液内濃度測定法を十分に検討する必要がある。本報告では, MK-0787 の微生物学的定量法に関する諸条件を検討し, 標準的な体液内濃度測定法を設定するとともに, 各種条件下における体液中での安定性について検討したのでその結果について報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

MK-0787 (Lot. L-638, 596-01 D 362, $945 \mu\text{g}$ (力価)/mg) は米国 Merck 社にて合成したものをを用いた。

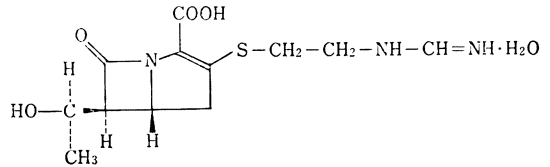
2. 検定菌

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 および *Bacillus subtilis* ATCC 6633 は財団法人発酵研究所から, *Bacillus subtilis* ATCC 12432 は米国 Merck 社研究所から分与をうけ本研究室にて継代保存中のものをを用いた。

3. 測定用培地

市販培地の heart infusion agar (HIA, 栄研化学), brain heart infusion agar (BHIA, 栄研化学), nutrient agar (NA, 栄研化学), Müller-Hinton agar (MHA, BBL), trypto-soy agar (TPSA, 栄研化学) および日本抗生物質医薬品基準培地 (polypeptone 1.0%, glucose

Fig. 1 Chemical structure
Imipenem (MK-0787)



(5R, 6S)-3-[[[2-(formimidoylamino (ethyl)thio)-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3, 2, 0] hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate

0.1%, yeast extract 0.3%, meat extract 0.15%) をを用いた⁴⁾。

4. 試験菌液の調整

S. aureus ATCC 6538 P, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 は日本抗生物質医薬品基準一般試験法, 力価試験法に準じて試験菌液を調整した。*B. subtilis* ATCC 12432 はルー瓶に入れた試験菌移植寒天培地 (peptone 1%, meat extract 0.5%, NaCl 0.25%, agar 1.5%) 上にて, 37°C で1週間培養し, 胞子を 50 ml の滅菌蒸留水に浮遊させ 65°C で 30 分間加熱後, 8,000 rpm にて 15 分間遠心し, 胞子を集めた。この胞子は 50 ml の滅菌蒸留水にて 3 回洗浄した後, 20 ml の滅菌蒸留水に懸濁し, 再び 65°C で 30 分間加熱した。そしてその胞子懸濁液 1 ml 中に含まれる菌数を求め, 最終的に 2.1×10^8 CFU/ml の胞子懸濁液を調整した。

5. 濃度測定法

Fig. 2 Comparison of standard curves of MK-0787 on various test organisms by paper disc method

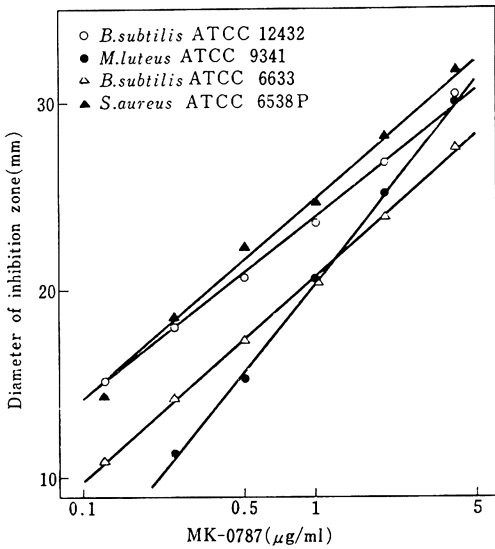


Fig. 3 Comparison of standard curves of MK-0787 on various test media

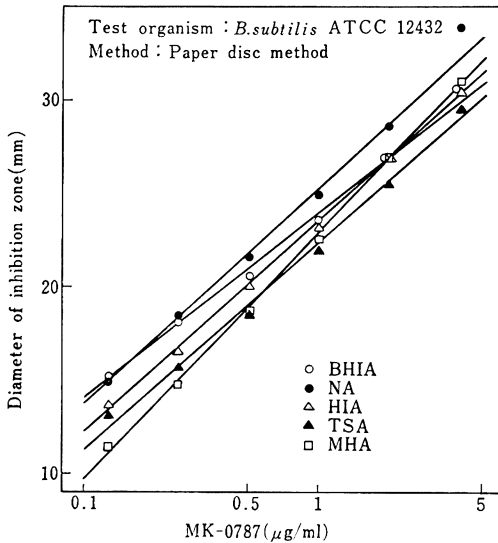


Fig. 4 Effect of medium pH on standard curves of MK-0787

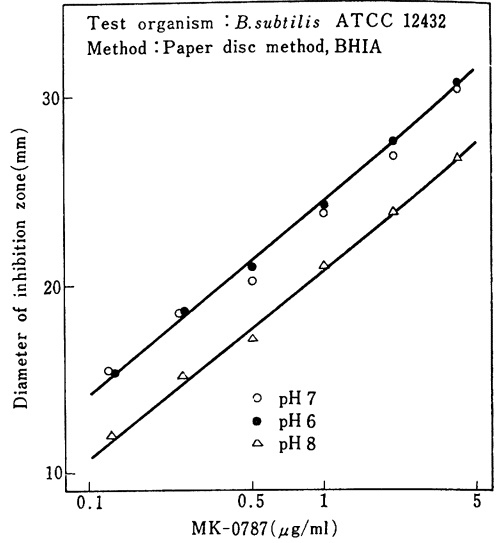
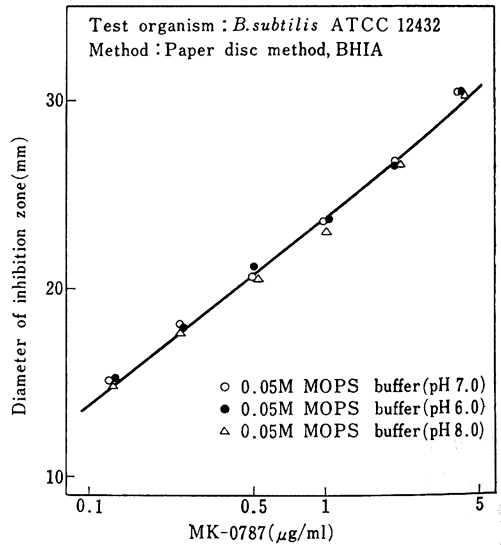


Fig. 5 Effect of diluents on standard curves of MK-0787 (1) pH



以下の方法を用いて検定した。培養温度は 37°C、培養時間は 18~20 時間とした。

a) 薄層カップ法

検定菌を接種した測定用培地の 8 ml を直径 9 cm のプラスチックシャーレに分注し、水平に保ってかたまら

せる。Cup は、内径 6 mm、外径 8 mm の stainless 製を用いた。標準溶液は 0.3 ml を分注した。

b) 寒天孔拡散法

薄層カップ法に述べた方法で作成した寒天平板に、直径 6 mm の孔を作る。すなわち、先端に外径 6 mm の薄刃をつけたステンレス製円筒シリンダーで平板上に孔を

切り、切り取った寒天片を吸引除去する。寒天孔に標準溶液の 40 μ l を定容ピペットにて分注した。

c) ペーパーディスク法

薄層カップ法に述べた方法で作成した寒天平板に、標準溶液および検液を浸潤させたペーパーディスク (8 mm, 東洋沓紙薄型) をのせた。

6. 検体の希釈液

0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0), 0.05 M MOPS (Morpholino-propane sulfonate) 緩衝液 (pH 6.0, 7.0, 8.0), 0.05 M MES (Morpholino-ethane sulfonate) 緩衝液 (pH 7.0), 人血清, 人血漿, monitrol-I (ミドリ十字), consera (日本製薬), 人尿および人胆汁を用いた。

II. 実験結果

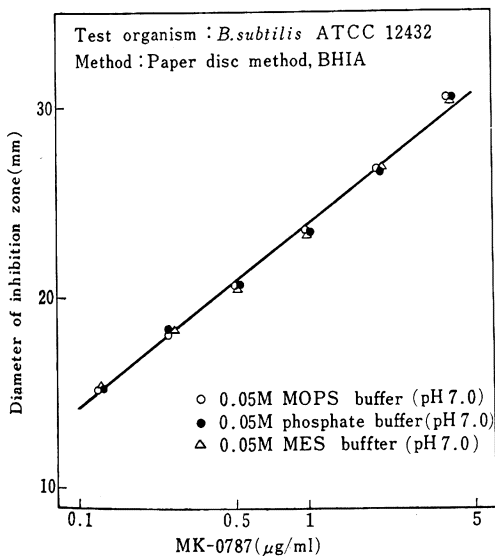
1. 検定条件の検討

1) 試験菌株の選択

ペーパーディスク法を用い, *S. aureus* ATCC 6538 P, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633 および *B. subtilis* ATCC 12432 の 0.125~4.0 μ g/ml の濃度範囲における阻止円を比較検討した (Fig. 2)。

阻止円の大きさは *S. aureus* ATCC 6538 P, *B. subtilis* ATCC 12432, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633 の順で小さくなった。一方, *B. subtilis* ATCC 12432 および *B. subtilis* ATCC 6633 は鮮明な阻止円を形成したが, *S. aureus* ATCC 6538 P および *M. luteus* ATCC 9341 の阻止円は不鮮明であった。

Fig. 6 Effect of diluents on standard curves of MK-0787 (2) Buffer



2) 測定用培地の検討

B. subtilis ATCC 12432 を試験菌とし, ペーパーディスク法にて MK-0787 の NA, HIA, BHIA, TSA および MHA における阻止円を比較検討し, Fig. 3 に示した。1 μ g/ml の濃度での阻止円の大きさを検討すると, NA, BHIA, HIA, MHA, TSA の順であったが, 阻止円の鮮明度は, BHIA=MHA, HIA, TSA, NA の順であった。

3) 培地 pH の検討

BHIA の pH を 121°C, 15 分間の蒸気滅菌の後 6.0, 7.0 および 8.0 に調整し, 培地 pH の検量線に及ぼす影響をペーパーディスク法を用いて検討した。そしてその結果を Fig. 4 に示した。

pH 8.0 にて明らかに阻止円が小さくなったが, 試験した濃度範囲では直線性は失われなかった。一方, pH 6.0 および pH 7.0 では阻止円の大きさに差が見られなかった。

4) 希釈液の検討

i) 希釈液 pH の影響

pH 6.0, 7.0 および 8.0 の 0.05 M MOPS 緩衝液で希釈した検量線をペーパーディスク法にて作成し, 希釈液 pH の影響を検討した。Fig. 5 にその結果を示したごとく, 阻止円の大きさおよび直線性において殆ど希釈液 pH の影響は見られなかった。

ii) 希釈緩衝液の検討

0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0), 0.05 M MES 緩衝

Fig. 7 Effect of diluents on standard curves of MK-0787 (3) Body fluids

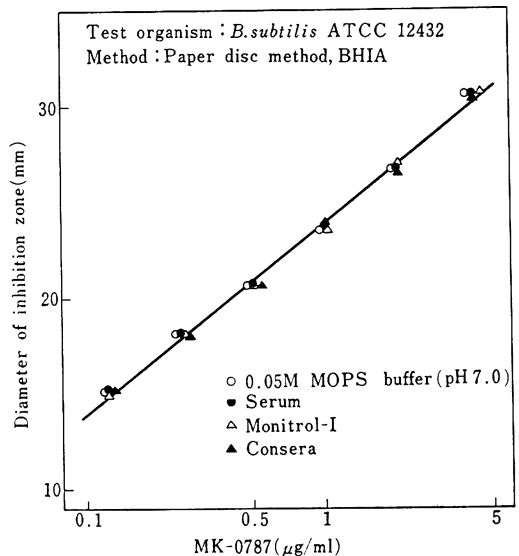


Fig. 8 Effect of diluents on standard curves of MK-0787 (4) Body fluids

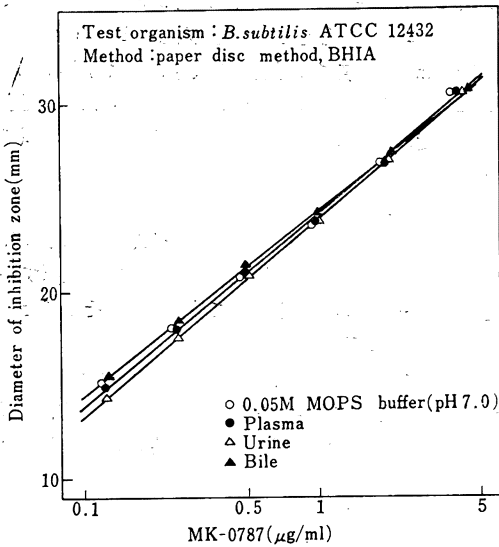
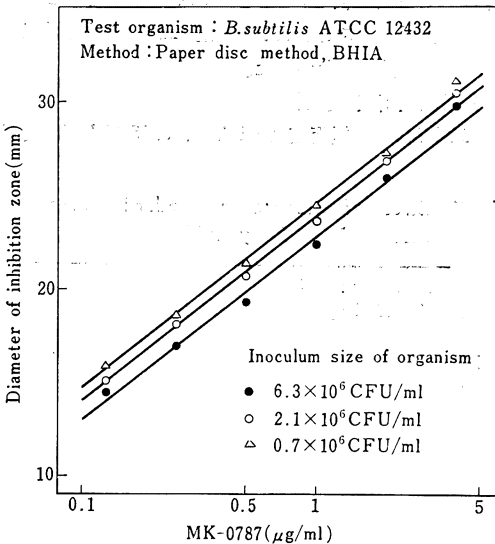


Fig. 9 Effect of inoculum size on standard curves of MK-0787

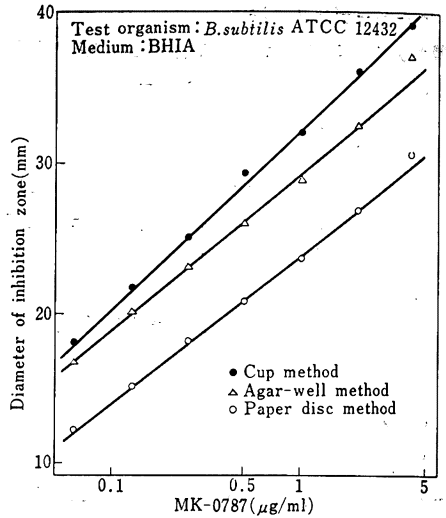


液 (pH 7.0) および 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で希釈した検量線をペーパーディスク法にて作成し、各種希釈液の阻止円に及ぼす影響を検討した。Fig. 6 にその結果を示したごとく、試験した緩衝液間ではまったく阻止円の大きさに差は認められなかった。

iii) 血清の影響の検討

血清、monitrol-I および consera で希釈作成した検量線を 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で希釈作成し

Fig. 10 Comparison of standard curves of MK-0787 in different methods



た検量線と比較検討した。結果を Fig. 7 に示したごとく、血清、monitrol-I および consera を用いて作成した検量線は 0.05 M MOPS 緩衝液を用いて作成した検量線とまったく差は認められなかった。

iv) 血漿、尿および胆汁の影響の検討

ペーパーディスク法にて、血漿、尿および胆汁で希釈作成した検量線を 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で希釈作成した検量線と比較検討した。Fig. 8 に示したごとく、血漿および胆汁にて作成した検量線は、0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いて作成した検量線とまったく差は認められなかったが、尿を用いて作成した検量線は低濃度域において、僅かに 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いて作成した阻止円より小さかった。

5) 接種菌量の検討

B. subtilis ATCC 12432 の孢子懸濁液を 6.3, 2.1 および 0.7×10^6 CFU/ml の割合で BHIA に接種し、ペーパーディスク法にて接種菌量の影響を検討した。Fig. 9 にその結果を示したごとく、接種菌量を少なくするほど阻止円は大きくなる傾向を示した。阻止円は 2.1×10^6 CFU/ml 接種の際に最も明瞭であった。一方、検量線の直線性は接種菌量を変えても影響を受けなかった。

6) 検定方法の比較

薄層カップ法、寒天孔拡散法およびペーパーディスク法にて検量線を作成し、各々を比較した。Fig. 10 に示したごとく、いずれの方法にてても 0.063~4.0 μ g/ml の範囲にて直線性が認められた。一方、阻止円も検定方法による差は認められず、いずれの方法にてても明瞭な阻止円が観察された。

Table 1 Stability of MK-0787 in human plasma and human serum under various temperatures

Body fluid	MK-0787 ($\mu\text{g/ml}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (days)										
			0	1/12	1/6	1/4	1/3	1	2	3	7	14	28
Human plasma	50	25	100*	98.5	83.4	67.0	63.9	7.0	0	0			
		4	100					72.2		50.6	10.4		
		-20	100					92.0		85.2	72.8	58.0	43.4
		-80	100					101.0		96.2	96.4	92.2	92.4
Human plasma + MES stabilizer	50	25	100	98.5	87.5	86.1	85.1	56.9	44.4	29.7			
		4	100					91.4		84.8	73.8		
		-20	100					99.6		96.6	94.6	90.8	95.0
		-80	100					98.8		95.0	99.0	95.8	100.6
Human serum	50	25	100	80.7	73.7	65.7	54.0	6.6	0	0			
		4	100					76.2		48.4	14.4		
		-20	100					93.4		80.4	68.6	53.2	39.2
		-80	100					97.8		103.2	98.6	96.4	101.0
Human serum + MES stabilizer	50	25	100	95.5	88.9	72.3	68.3	54.0	50.9	25.1			
		4	100					94.2		85.2	64.0		
		-20	100					100.4		99.1	93.6	90.8	83.2
		-80	100					99.2		98.4	99.4	97.2	100.0
0.05M MOPS buffer	50	25	100	97.6	97.6	96.9	96.9	75.0	58.7	57.8			

* Residual potency (%)

Table 2 Stability of MK-0787 in human urine and human bile under various temperatures

Body fluid	MK-0787 ($\mu\text{g/ml}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (days)										
			0	1/12	1/6	1/4	1/3	1	2	3	7	14	28
Human urine	500	25	100*	95.7	83.6	76.5	68.4	28.1	3.8	0			
		4	100					92.7		76.8	54.8		
		-20	100					93.9		85.1	75.2	62.3	32.1
		-80	100					102.1		99.0	95.3	91.5	94.7
Human urine + MOPS stabilizer	500	25	100	97.8	89.1	85.4	79.8	69.6	36.0	22.9			
		4	100					83.5		69.6	47.1		
		-20	100					96.7		97.3	94.4	92.4	88.4
		-80	100					100.3		101.4	99.4	98.6	100.4
Human bile	50	25	100	75.3	67.5	57.7	51.5	10.7	0.8	0.1			
		4	100					86.6		64.6	30.0		
		-20	100					94.4		78.2	62.0	36.2	19.8
		-80	100					102.4		98.2	95.4	98.0	98.6
Human bile + MES stabilizer	50	25	100	100	97.6	87.4	86.4	67.0	51.7	38.6			
		4	100					97.2		84.6	80.8		
		-20	100					100.4		98.8	101.4	92.8	90.4
		-80	100					99.6		97.6	99.6	100.2	100.4

* Residual potency (%)

2. 体液中の安定性

ヒト血清、血漿および胆汁で MK-0787 の 50 $\mu\text{g/ml}$ 、尿で 500 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を調製し、 -80°C 、 -20°C 、 4°C (氷水中) および 25°C での安定性について *B. subtilis* ATCC 12432 を試験菌とするペーパーディスク法にて検討した。同時に MOPS 安定化剤 (1 M Morpholino-pro-

pane sulfonate 緩衝液 (pH 7.0)/Ethylene glycol (1:1, v/v)] もしくは MES 安定化剤 [1 M Morpholino-ethane sulfonate 緩衝液 (pH 6.0)/Ethylene glycol (1:1, v/v)] を検体に 1:1(v/v) の割合にて添加した際の安定性を検討した。

Table 1 および 2 に示したように、血清、血漿、胆汁

および尿のいずれにおいても MK-0787 は 25°C には不安定で、2 日目で殆ど活性が認められなかった。一方、安定化剤を添加すると、0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中にての安定性よりやや劣るものの概ね 35~50% の残存活性が認められた。4°C では安定化剤を加えると少なくとも 1 日間は比較的安定で、5~15% 程度の失活であった。-20°C では安定化剤を加えても 28 日間で 10~20% 程度の力価の低下が観察されたが、安定化剤を加え -80°C にて保存すると、少なくとも 28 日間では、まったく力価の低下は観察されなかった。

III. 総括および考察

S. aureus ATCC 6538 P, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633 および *B. subtilis* ATCC 12432 を試験菌として、MK-0787 の体液内濃度測定法を検討した。

試験菌としては鮮明な阻止円が得られ、かつ低濃度までの測定が可能である *B. subtilis* ATCC 12432 が最も適していた。測定用培地としては、鮮明な阻止円が得られる BHIA が最も適していたが、MHA でも特に遜色はなかった。

本試験菌を用い、希釈液 pH、培地 pH および緩衝液の種類などの影響を検討した結果、緩衝液の種類による差は認められなかったが、希釈液および培地の pH を 8.0 にした際、その阻止円は pH 7.0 および pH 6.0 の阻止円より小さかった。さらに MK-0787 が pH 7.0 付近で最も安定であることおよび非極性緩衝液が望ましいこと⁵⁾から、希釈液として 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を選定した。

さらに、ヒト血清、血漿、胆汁および尿で希釈作成した検量線を 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で希釈作成した検量線と比較した結果、いずれも殆ど差は認められなかった。また、日常使用されている代用血清である monitrol-I および consera についても検討したが、同様に 0.05 M MOPS 緩衝液の検量線と差は認められなかった。

以上の結果より MK-0787 の体液内濃度測定法として次の方法が適していると考えられる。

1. 試験菌

B. subtilis ATCC 12432 が最適である。

2. 測定用培地

BHIA が最適であるが、MHA を用いてもよい。

3. 培地 pH

滅菌後の pH は 6.0~7.0 が最適である。

4. 接種菌量

2.1×10^8 CFU/ml 前後が適当である。

5. 濃度測定法

薄層カップ法、寒天孔拡散法およびペーパーディスク法のいずれにても測定可能である。直径 9 cm のシャーレを用いる場合は測定用培地 8 ml を分注する。

6. 検体の希釈

血清、血漿、胆汁および尿試料とも 0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で希釈してもよい。各々の体液にて希釈が可能であればより望ましい。

7. 検量線の作成

血清、血漿、胆汁および尿試料を測定する場合、0.05 M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で希釈して検量線を作成してもよい。各々の体液にて希釈作成が可能であればより望ましい。

検体試料の測定は、採取後ただちに測定するのが最も望ましいが、試料に MOPS もしくは MES 安定化剤を加え、-80°C にて凍結保存すれば、少なくとも 28 日以内は力価の低下が押えられると考えられる。

文 献

- 1) KROPP, H.; J. G. SUNDELDF, J. S. KAHAN, F. M. KAHAN & J. BIRNBAUM: MK 0787 (*N*-formimidoyl thienamycin): Evaluation of *in vitro* and *in vivo* activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 993~1000, 1980
- 2) TALLY, F. P.; N. V. JACOBUS & S. L. GORBACH: *In vitro* activity of *N*-formimidoyl thienamycin (MK 0787). *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 642~644, 1980
- 3) NEU, H. & P. LABTHAVIKUL: Comparative *in vitro* activity of *N*-formimidoyl thienamycin against gram-positive and gram-negative aerobic and anaerobic species and its β -lactamase stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 180~187, 1982
- 4) 厚生省, 日本抗生物質医薬品基準, 一般試験法, 力価試験法。1974
- 5) SMITH, G. B. & E. F. SCHOENEWALDT: Stability of *N*-formimidoyl thienamycin in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* 70: 272~276, 1981

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD OF IMIPENEM IN BIOLOGICAL SPECIMENS

TADATAKA KESADO, YOSHINARI ASAHI and TERUTAKA HASHIZUME

Research Laboratories, Nippon Merck Banyu Co., Ltd.

The concentration of imipenem (MK-0787), (5R, 6S)-3-[[2-(formimidoylamino)ethyl]thio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3, 2, 0]hept-2-ene-2-carboxylic acid monohydrate, in plasma, serum, urine and bile was microbiologically determined by a thin layer cup, an agar well or a paper disk method, using *B. subtilis* ATCC 12432, as a test organism, and brain heart infusion agar (BHIA, Eiken), which included a clear inhibition zone. Approximately 0.1 μg (potency)/ml of MK-0787 in biological specimens can be measured by a paper disk method. For the quantitative determination of MK-0787 in plasma, serum, urine and bile, 0.05 M MOPS buffer (pH 7.0) was suitable for the use as the diluent of the standard solution of MK-0787.

The activity of MK-0787 in human body fluids mixed with a MOPS or a MES stabilizer unchanged during 28 days storage at -80°C .