

Panipenemのbioassay法による体液内濃度測定法に関する検討

久岡正史・市川正人・寺尾俊雄
三共株式会社・第一生産技術研究所*

新規carbapenem系抗生剤panipenem(PAPM)の体液および組織内濃度測定のため、微生物学的定量法の検討を行った。

検定菌として*Bacillus subtilis* SANK 76959, 測定培地としてheart infusion agarを用いることにより、カップ法およびペーパーディスク法のいずれの方法でもPAPMの測定が可能であったが、通常はサンプル量が少なく済むペーパーディスク法(接種菌量 1.7×10^5 CFU/ml)を用いることにした。その測定限界は、血漿、尿などの体液試料で約 $0.02 \mu\text{g}$ (力価)/ml, 組織試料で約 $0.08 \mu\text{g}$ (力価)/gであった。

PAPMの標準曲線に及ぼす影響は血漿で軽度認められ、尿、胆汁および乳汁では認められなかった。したがって、血漿試料測定用の標準液系列は1 M MOPS液(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, pH 7.0)とcontrol血漿を1:1に混合した液で調整し、その他の体液試料測定用の標準液系列は0.5M MOPS液で調整した。

血漿および尿を1M MOPS液と1:1の割合で混合した試料液中のPAPMは、 -80°C で凍結保存で2週間以上安定であることが認められた。

Key words : Panipenem, Bioassay, Body fluids, Tissues

Panipenem/betamipron(PAPM/BP)は、carbapenem系抗生剤panipenem(PAPM)と腎でのアニオン輸送系の阻害剤betamipron(BP)¹⁾との1:1の合剤である。PAPMは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抗菌活性体²⁾であるのに対し、BPはアミノ酸誘導体で抗菌活性を示さない化合物である。したがって、PAPMの体内動態を知ることがPAPM/BPの臨床評価上重要であり、PAPMの定量法の確立が必要である。

本報告では、PAPMの微生物学的測定法の測定条件を検討し、定量法を確立すると共に生体試料中での安定性について検討したので報告する。なお、PAPMおよびBPの分離定量法である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法については別報³⁾に記載する。

1. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

PAPM(チオ尿素付加体, Lot. CPS-11, $807 \mu\text{g}$ (力価)/mg)は三共株式会社にて合成されたものを用いた。

2. 検定菌

Micrococcus luteus ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

Bacillus subtilis SANK 76659, *Bacillus subtilis* SANK 76859, *Bacillus subtilis* SANK 76959および*Bacillus subtilis* SANK 77059のすべての使用菌種は、当研究所で継代・保存中のものを用いた。*M. luteus* ATCC 9341はheart infusion agarで、*S. aureus* ATCC 6538Pはantibiotic medium 1で 37°C , 12~18時間斜面培養し、その菌を蒸留水10mlに懸濁して約 10^8 CFU/mlの菌液を調整した。*B. subtilis*の各菌については、日抗基・一般試験法・力価試験法⁴⁾記載の*B. subtilis* ATCC 6633の孢子液の調整法に準じて約 10^8 CFU/mlの菌液を調製した。

3. 測定用培地

市販培地のheart infusion agar(HIA, 栄研化学), Mueller-Hinton agar(MHA, BBL), brain heart infusion agar(BHIA, Difco), trypticase-soy agar(TSA, BBL), nutrient agar(NA, Difco)およびantibiotic medium 1(AM-1, Difco)を用いた。

4. 濃度測定法

薄層ペーパーディスク法および2層カップ法を用いた。薄層ペーパーディスク法では、直径90mmのプラスチックシャーレに検定菌を接種した測定用培地4mlま

たは8mlを分注し、水平固化させて薄層寒天平板を製作した。この平板上に試料液または標準液をしみ込ませた直径6mmのペーパーディスク(東洋製作所)を貼り付け、37°C、18~24時間培養を行った。2層カップ法では、同径プラスチックシャーレに菌無添加の培地20mlを分注、水平固化させたのち、その上に菌添加の種層培地4mlを分注し水平固化させ2層平板を製作した。この平板上に外径8mm、内径6mm、高さ10mmのステンレス円筒4個をのせ、相対する円筒に試料液または標準液を満たして37°C、18~24時間培養を行った。得られた阻止円は、自動阻止円測定装置(Zone Analyzer®, 東洋測器)により径を測定した。

5. 標準溶液の調製

PAPMのチオ尿素付加体20mg(力価)を正確に秤量し、種々検討の結果PAPMの安定化剤として選択した3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS)緩衝液(0.5M, pH 7.0)で20mlにメスアップして1mg(力価)/mlの標準原液を調製した。この原液を0.5M MOPS液、組織中PAPMの抽出液に安定化剤として用いる5mM $K_3Fe(CN)_6$ を含む0.5M MOPS液、または血漿と1M MOPS液との1:1の混合液を用いて希釈し、標準液系列を調製して実験に供した。なお、本論文中のPAPM量は、特別の記載のない限りすべて力価表示とした。

6. PAPMの血漿および尿試料液中での安定性

健康人の新鮮control血漿および尿をPAPM含有1M MOPS液と1:1に混合して、血漿試料液中PAPM濃度が0.25 μ g/mlおよび25 μ g/mlとなるように調製し、また尿試料液中PAPM濃度は500 μ g/mlとなるように調製した。これら試料溶液を-40°Cおよび-80°Cで凍結保存して、PAPMの残存活性を14日間測定した。

II. 結果

1. 検定菌の選定

PAPMに比較的感受性の高い3菌種を用い、NAを測定培地とした薄層ディスク法により標準曲線を作成し、阻止円の鮮明度および測定感度の検討を行った(Fig. 1)。

阻止円の鮮明度は*B. subtilis* ATCC 6633が最も良く、*S. aureus* ATCC 6538Pは比較的鮮明ではあったが二重阻止円が認められた。また、*M. luteus* ATCC 9341は不鮮明であった。測定感度の点では*M. luteus* ATCC 9341が最も良く、*B. subtilis* ATCC 6633と*S. aureus* ATCC 6538Pはほぼ同等の感度を示した。以上の検討結果より体液内濃度測定用の検定菌としては*B. subtilis* ATCC 6633が適当と考えられたが、さらに定量感度上昇を目的として*B. subtilis*菌種の異なった菌株を用いて

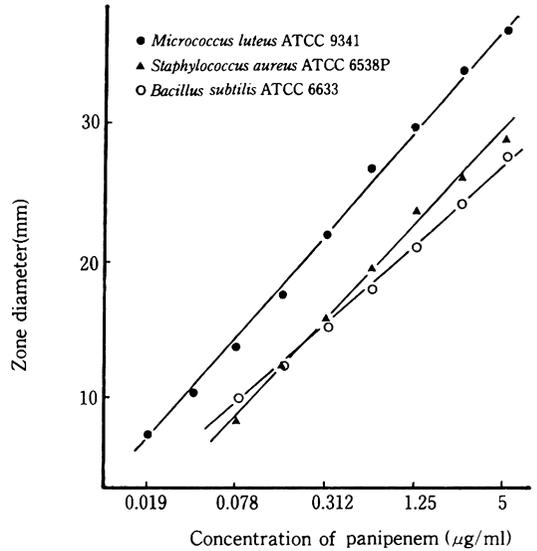


Fig. 1. Standard curves of panipenem on various test organisms by paper disk method
Medium: NA, Diluent: 0.5M MOPS

標準曲線を作成した(Fig. 2)。なお、この検討では、いずれの菌株の接種菌量も $10^5 \sim 10^6$ CFU/mlとなるように調整して試験を行った。

阻止円の鮮明度はいずれの菌株においても良好であ

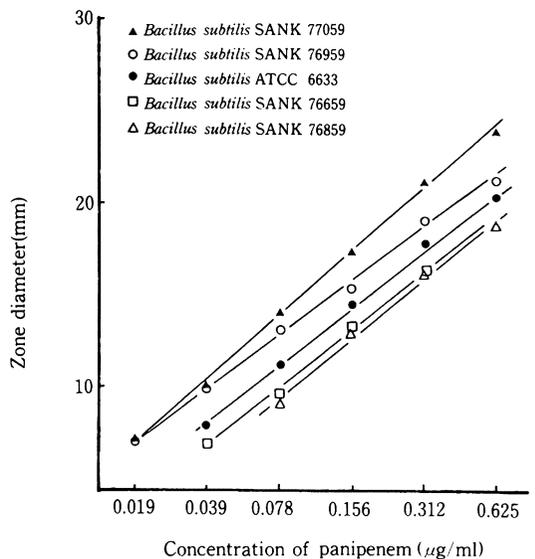


Fig. 2. Standard curves of panipenem on various strains of *Bacillus subtilis* by paper disk method
Medium: HIA, Diluent: 0.5M MOPS

ったが、特に *B. subtilis* SANK 76959 と 77059 では鮮明な阻止円が得られた。測定感度の点でもこれらの菌株が優れており、*B. subtilis* ATCC 6633 より高感度の測定が可能であった。両菌株について胞子液調製時の菌の取り扱い易さを考慮した上で、検定菌として *B. subtilis* SANK 76959 を選定した。

2. 測定条件の検討

1) 測定培地の選択

市販培地を主体に 6 種の寒天培地を選び、前記選定の検定菌 *B. subtilis* SANK 76959 使用時の阻止円形成の状態および標準曲線の検討を薄層ディスク法で行った (Fig. 3)。なお、本検討では接種菌量を 1.2×10^8 CFU/ml とし、培地量は 4 ml/シャーレとした。

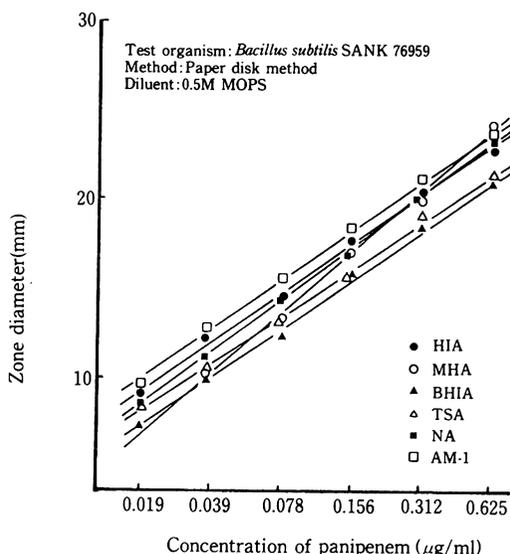


Fig. 3. Standard curves of panipenem on various test media by paper disk method

阻止円形成はいずれの培地を用いた場合も良好であったが、特に HIA 培地では鮮明であったことから測定培地として選定した。また、直径 90mm のシャーレに分注する培地量は薄層ディスク法の場合 8 ml または 4 ml とした。いずれの条件でも良好な阻止円および標準曲線が得られるが 4 ml の方はより高感度で、8 ml の方はより高精度であることから、適宜条件を選定することとした。

2) 接種菌量の影響

測定培地に添加する検定菌量の阻止円形成に及ぼす影響について、薄層ディスク法 (培地量 4 ml) を用いて検討を行った (Fig. 4)。

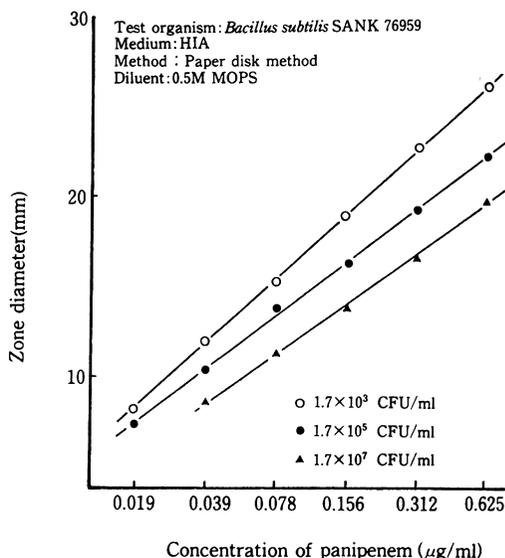


Fig. 4. Effect of inoculum size on standard curves of panipenem by paper disk method

検定菌の接種量が少なくなるに従い阻止円径は大きくなって定量感度は増大した。しかし、菌量が 1.7×10^9 CFU/ml の場合には菌の生育が不十分となり、阻止円の鮮明度は減少した。以上の結果より、検定菌量を約 10^8 CFU/ml に調製すれば、鮮明度が高くしかも径の大きな阻止円の得られることが確認された。

3) 試料希釈液の pH の影響

PAPM の安定化のために 0.5M MOPS 液を希釈液として使用するの、その pH を 5.0~9.0 に調整した時の標準曲線について検討を行った (Fig. 5)。

希釈液の pH が 5.0~7.0 の場合ほぼ同等の阻止円径が得られ、pH 8.0 および 9.0 では阻止円径は小さくなる傾向が見られたことから、希釈液の pH は 7.0 を選定した。

3. 血漿、尿、胆汁および乳汁の影響

抗生物質の蛋白結合性が阻止円径に影響する例もあることから⁹⁾、血漿、尿、胆汁および乳汁が PAPM の標準曲線に及ぼす影響について検討を行った (Fig. 6, 7)。

いずれの体液も 1M MOPS 液と 1:1 に混合して標準液系列を調製したもので、0.5M MOPS 液の標準液系列の場合ほぼ同等の標準曲線が得られた。しかし、血漿添加希釈液の標準曲線は程度は小さいものの低位に推移する傾向が見られた。以上の結果から、血漿試料中 PAPM の測定には血漿と 1M MOPS 液の 1:1 の混合液で作製した標準液系列を用い、その他の体液試料測定には 0.5M MOPS 液で調製した標準液系列を用

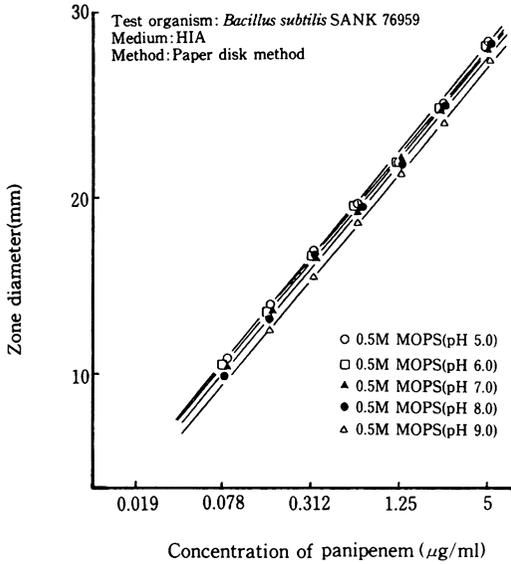


Fig. 5. Effect of diluent pH on standard curves of panipenem by paper disk method.

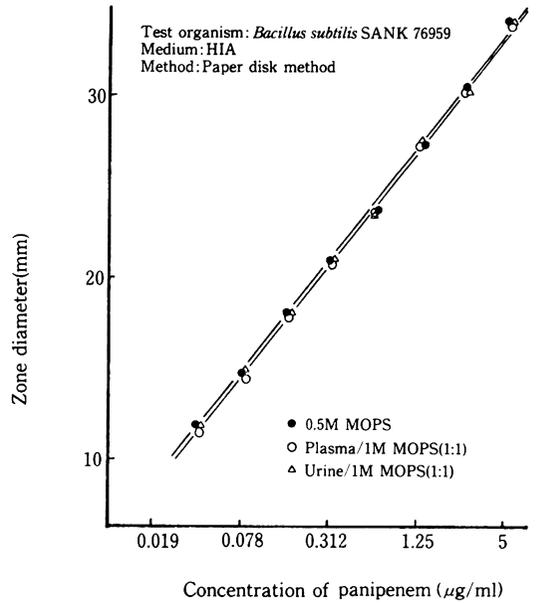


Fig. 6. Effects of plasma and urine on standard curves of panipenem by paper disk method

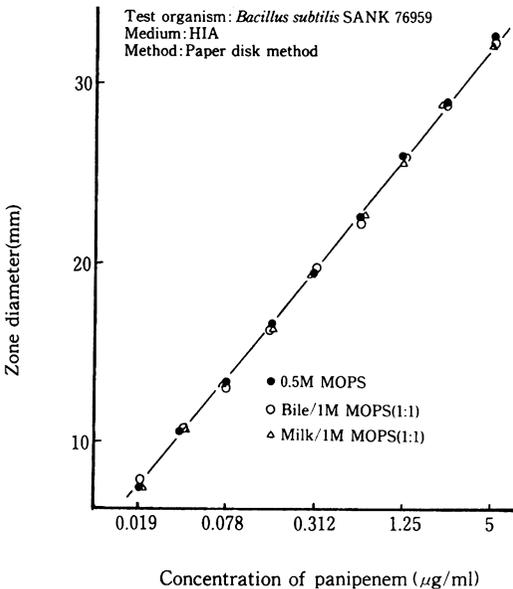


Fig. 7. Effects of bile and milk on standard curves of panipenem by paper disk method

いることとした。

4. 各種希釈液の影響

PAPMの固型組織からの抽出操作時に、分解防止のため5mM K₃Fe(CN)₆と0.14M DBL(α, ε-dibenzoyl-

DL-lysine)を含む0.5M MOPS液を使用することから、これら抽出液が標準曲線に及ぼす影響について検討した(Fig. 8)。

いずれの希釈液を用いても同一の標準曲線が得られたことから、組織内濃度測定には5mM K₃Fe(CN)₆含有の0.5M MOPS液で調製した標準液系列を用いることとした。

5. 測定方法の比較

ペーパーディスク法(培地量 4 ml)と2層カップ法による標準曲線の比較を行った(Fig. 9)。

いずれの方法においても0.019~5μg/mlの濃度範囲で直線性が認められ、阻止円も鮮明であった。したがって、生体試料の採取量等に応じて測定方法を選定すれば良いが、通常は薄層ディスク法を用いることとする。

6. PAPMの生体試料中での安定性

ヒト血漿および尿をPAPM含有の1M MOPS液と1:1に混合し、-40℃および-80℃で凍結保存した時の残存率を経時的に測定した(Table 1)。

いずれの保存温度においても、血漿および尿試料液中のPAPMは少なくとも2週間は安定であることが認められた。また、PAPMの分解酵素dehydropeptidase-Iが多く存在するウサギ腎臓に、PAPMを含む3倍重量の組織抽出液を加えてホモジナイズし、-80℃で凍結保存して経時安定性を検討した(Fig. 10)。

ウサギ腎臓ホモジネート液中のPAPMは、この保存

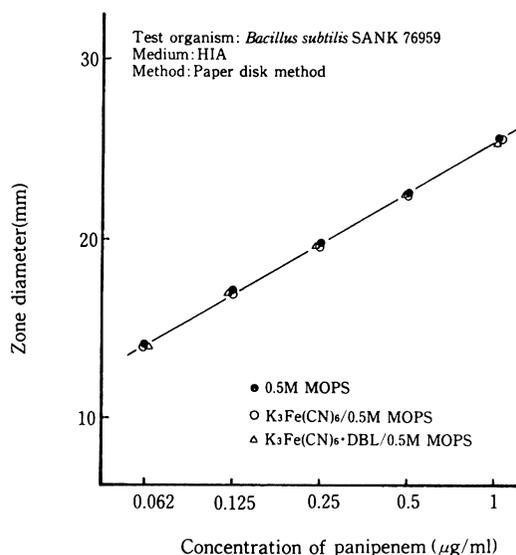


Fig. 8. Effect of diluents on standard curves of panipenem by paper disk method

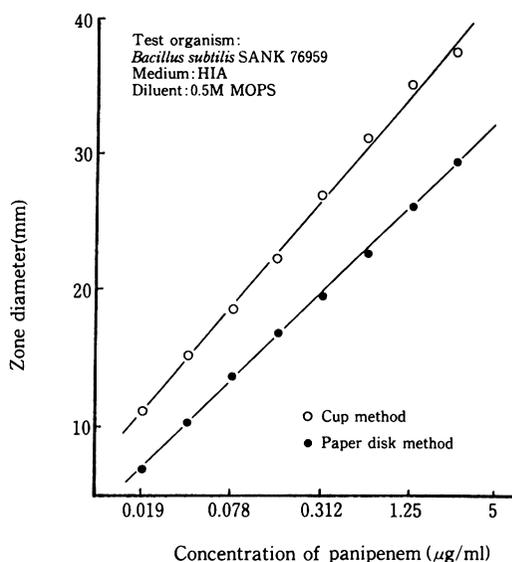


Fig. 9. Standard curves of panipenem in different methods

Table 1. Stabilities of panipenem in samples of human plasma and urine after storage at -40°C and -80°C

Mean \pm S.D. (% , n=3)

Sample	Panipenem ($\mu\text{g/ml}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Days					
			0	1	2	3	7	14
Plasma + 1M MOPS (1:1)	0.25	-40	100	99.9 ± 0.5	101.4 ± 1.1	99.2 ± 1.1	101.2 ± 0.9	97.7 ± 1.3
		-80	100	98.7 ± 1.7	100.4 ± 1.7	100.3 ± 2.1	101.0 ± 1.3	101.1 ± 0.3
	25	-40	100	101.7 ± 2.7	99.2 ± 1.1	100.8 ± 1.4	101.1 ± 1.2	97.2 ± 0.8
		-80	100	102.7 ± 1.7	99.7 ± 4.0	99.4 ± 3.1	104.2 ± 2.2	100.0 ± 0.4
Urine + 1M MOPS (1:1)	500	-40	100	100.1 ± 0.7	103.1 ± 2.0	100.4 ± 1.0	101.1 ± 1.8	102.3 ± 1.0
		-80	100	97.9 ± 2.5	103.8 ± 1.3	100.9 ± 0.9	100.3 ± 1.0	101.9 ± 1.3
0.05M MOPS (pH7.0)	1000	-40	100	101.6 ± 0.6	99.8 ± 0.9	99.2 ± 1.7	100.9 ± 3.8	99.9 ± 2.4
		-80	100	101.6 ± 0.6	100.3 ± 1.2	99.2 ± 0.9	101.3 ± 1.9	99.1 ± 0.7

条件において、少なくとも3日間は安定であることが確認された。腎臓に比較して他臓器中の dehydropeptidase-I活性は低い⁶⁾ことから、それら試料中でのPAPMの安定性は腎臓中よりも良好なものと推察される。

以上の検討結果より、採取した生体試料は直ちに安定化緩衝液MOPSで処理し、 -80°C で凍結保存して出来

るだけ速やかに測定に供することとした。

III. 総括および考察

PAPMのbioassay法の条件を要約してTable 2に示した。

Bioassayによる測定法のうちで操作が簡便で精度の高い方法として、薄層ペーパーディスク法と2層カップ法を選択した。両測定法共に良好な標準曲線が得ら

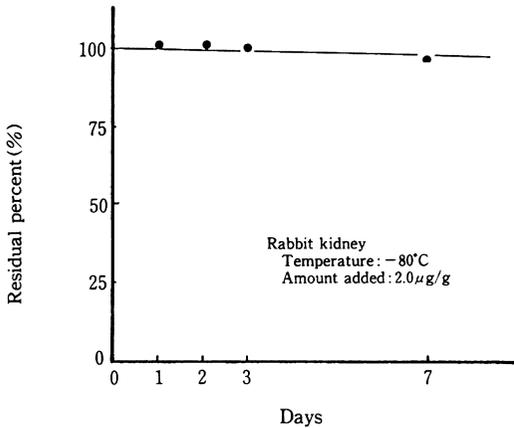


Fig. 10. Stability of panipenem in rabbit kidney after storage at -80°C

Table 2. Standardization of microbiological assay of panipenem in biological samples.

Method	Paper disk method
Test organism	<i>Bacillus subtilis</i> SANK 76959
Inoculum	1.7×10^5 CFU/ml in medium
Medium	Heart infusion agar (Eiken)
Assay range	0.019 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$
Standard solution	Plasma; Plasma/1M MOPS (1:1) Other body fluids; 0.5M MOPS Tissues; 5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/0.5\text{M}$ MOPS
Incubation	37°C , 18 ~ 24 hours

れることから、試料用量、定量精度および定量感度を考慮した上でいずれかの測定方法を選定するが、通常の臨床試験検体の測定には、薄層ペーパーディスク法を用いる。検定菌については、MICの値から判断して選択した菌の中でも阻止円が鮮明で最も感度が高い*B. subtilis* SANK 76959を選定した。

以上の定量条件により、PAPMの濃度範囲が0.019~5 $\mu\text{g/ml}$ において良好な標準曲線が得られ、血漿、尿などの体液試料については約0.02 $\mu\text{g/ml}$ まで、また、固形組織試料については約0.08 $\mu\text{g/ml}$ までの測定が可能であった。PAPM/BPの用法、用量およびその時のPAPM濃

度を考慮した場合、この測定感度は、体内動態の情報を得るために十分であると考えられる。

我々は本測定法開発の前に、検定菌に*B. subtilis* ATCC 6633を用いる以外は本測定条件と同じbioassay法で定量を行ってきた。測定感度は使用菌量または培地量によって変動するが、*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とすると本定量法に比較して約4倍低かった。しかし、同等の定量精度を有することからPAPM/BPの第I相試験⁷⁾で得た血液検体を任意に選出し、*B. subtilis* SANK 76959および*B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とした両測定法により同一検体を測定して、相関性を検討した (Fig. 11)。

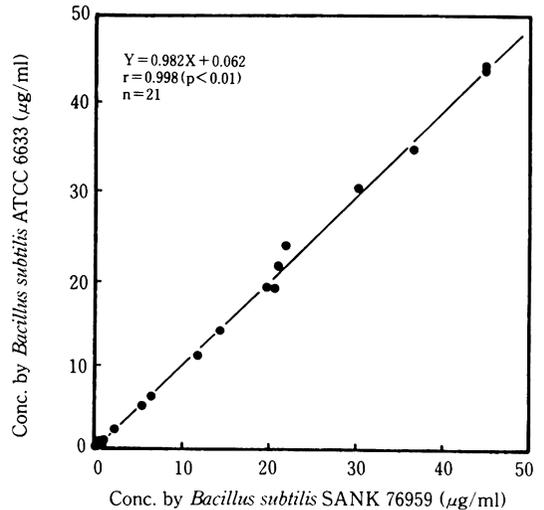


Fig. 11. Correlation between plasma concentrations of panipenem obtained by microbiological assays using two strains of *Bacillus subtilis*

この結果、最小二乗法で求めた回帰直線の勾配は0.982を示し、相関係数 $r = 0.998$ ($p < 0.01$) と良好な相関性が認められ両測定値はほぼ等しいことが確認された。

PAPMの血漿、尿試料中での安定性は、 -40°C 以下の温度での保存であれば少なくとも2週間は安定であることが確認された。なお、HPLC法による検討から、 -80°C ではより長期保存の可能なことが明らかとなっている³⁾。したがって、生体試料は採取後直ちに凍結して -80°C で保存し、出来るだけ速やかに定量を実施することとした。

文 献

- 1) 長沼英夫, 広内康邦, 川原幸則, 乾賢一, 谷川原祐介, 安原真人, 堀了平, 桑原章吾: Betamipronの腎毒性軽減作用とその作用機序(2) — 腎排泄挙動との関連一。Chemotherapy 39(S-3): 178~189, 1991
- 2) 宇津井幸男, 他: Panipenem/betamipronに関する細菌学的評価(第1報) *In vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 39(S-3): 83~101, 1991
- 3) 久岡正史, 長沼英夫, 山崎泰志, 高萩英邦, 川原幸則: Panipenem/betamipronの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による体液内濃度測定法に関する検討。Chemotherapy 39(S-3): 197~205, 1991
- 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, 1990
- 5) 久岡正史, 市川正人, 小島敏昌: 新規エステル型経口セフェム剤, CS-807のbioassay法による体液内濃度測定法に関する検討。Chemotherapy 36(S): 185~193, 1988
- 6) 高萩英邦, 広田孝司, 松下洋子, 松村重樹, 田中実, 松尾英一: デヒドロペプチダーゼ-I(DHP-I)の組織内分布の種差とpanipenemの代謝に及ぼす影響。Chemotherapy 39(S-3): 236~241, 1991
- 7) 中島光好, 植松俊彦, 金丸光隆, 田島政三, 長沼英夫, 久岡正史, 川原幸則, 高萩英邦: Panipenem/betamipronの臨床第I相試験 — 第1報 単回投与試験一。Chemotherapy 39(S-3): 242~264, 1991

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR THE DETERMINATION OF PANIPENEM CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

Masafumi Hisaoka, Masato Ichikawa, and Toshio Terao

Product Development Laboratories, Sankyo Co. Ltd.

2-58 Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 140, Japan

Microbiological assay method was developed for the quantitative determination of a new carbapenem, panipenem (PAPM) in body fluids and tissues.

Bioassay was performed by agar-diffusion method using *Bacillus subtilis* SANK 76959 as the test organism and heart infusion agar as the media. Assay methods of cup-plate methods and paper-disk method were available with these conditions. However, the paper-disk method will be used in usual because of simple treatments. Minimum detectable concentrations of this method were about 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for plasma, urine and other body fluids, and about 0.08 $\mu\text{g}/\text{g}$ for tissue samples.

Standard solution prepared with the mixture of plasma and 1M MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid) solution was used for the assay of plasma, and that of 0.5M MOPS for other body fluids. And the standard solution of 0.5M MOPS containing 5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ was used for the assay of tissue samples.

PAPM in assay samples of plasma and urine was stable in biological activity for two weeks under the storage at -80°C .