

Meropenemのヒト体液および組織内濃度測定法

富尾貞治・納田浩司・上月庸生
加藤益弘・奥田隆夫・深澤万左友
住友製薬株式会社研究所*

Meropenem (MEPM) の生体試料中濃度測定法および試料中での安定性について検討した。微生物学的定量法 (bioassay 法) において、検定菌 *Escherichia coli* NIHJ, 培地 nutrient agar (Difco) でペーパーディスク法を用いて血漿, 尿, 胆汁および組織内濃度の測定が可能であった。標準液, 希釈液とも 50mM 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH7.0) を用いて測定を行った (検出限界 0.06 $\mu\text{g/ml}$)。血漿および尿試料については, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いても測定可能であった (検出限界; 血漿 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 尿 1 $\mu\text{g/ml}$)。Bioassay および HPLC の両測定値には, 良好な相関性が認められ, 相関係数は血漿 0.9963, 尿 0.9965 であった。

生体試料中における MEPM の安定性を検討した結果, 血液試料は, -20°C で 3 日間, -80°C で 2 ヶ月間, 尿試料は, -20°C で 14 日間, -80°C で 2 ヶ月間は安定であった。胆汁試料は, 1M MOPS 緩衝液 (pH7.0) と 1:1 に混合した液を測定試料とし, -20°C で 1 ヶ月間, -80°C で 2 ヶ月間安定であった。

Key words: Meropenem, bioassay, HPLC, 安定性

Meropenem (MEPM) は, 住友製薬株式会社で開発された新規な注射用カルバペネム系 β -ラクタム剤で, グラム陽性菌, グラム陰性菌および嫌気性菌に対して幅広い抗菌スペクトルときわめて強い抗菌活性を示す^{1,2)}。

MEPM の吸収, 排泄並びに体内分布を検討するに際し, 本剤の体液および組織内濃度測定法を確立する必要がある。本報告では, MEPM の微生物学的定量法および高速液体クロマトグラフィーによる定量法並びに生体試料中の安定性について検討を行ったので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

MEPM は, 住友製薬株式会社にて合成された物を用いた。

2. 微生物学的定量法 (bioassay 法)

1) 試験菌

Escherichia coli NIHJ, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を用いた。

2) 測定用培地

Sensitivity test agar (ニッスイ), nutrient agar (ニッ

スイ, Difco), brain heart infusion agar (ニッスイ), trypto soy agar (ニッスイ), Mueller-Hinton agar (BBL), および日本抗生物質医薬品基準「力価試験法」³⁾ に準じた pepton agar (pepton 1%, meat extract 0.5%, NaCl 0.25%, agar 1.5%) を用いた。

3) 標準溶液

MEPM 標準品を 50mM 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH7.0) に溶解し, 1mg (力価)/ml 溶液を調製した。標準希釈系列は, 同希釈液を用いて 2 倍希釈をして調製した。尚, 諸検討には 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いた。

4) 試験菌液の検討

E. coli NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *P. aeruginosa* NCTC 10490, *S. aureus* FDA 209P, *M. luteus* ATCC 9341 は, trypto soy broth (ニッスイ), 37°C で一夜培養したものをを用いた。*B. subtilis* ATCC 6633 は, 日抗基に準じて作製した孢子液を生理食塩水で 100 倍希釈したものをを用いた。

5) 検定方法

菌液は, 検定培地 (pepton agar) に *E. coli* NIHJ と *M. luteus* ATCC 9341 は, 1.5%, *S. aureus* FDA 209P と *B. subtilis* ATCC 6633 は 1%, *P. aeruginosa* NCTC 10490 と *K. pneumoniae* ATCC 10031 は 10 倍希釈した

ものを1%接種した。平板(30×40cm)に基層200ml, 種層200mlを分注しペーパーディスク法(ディスク直径8cm(東洋濾紙薄型))にて検討した。標準希釈液および検液を室温で30分間予備拡散させた後, 37℃18時間培養し, 発育阻止円の直径を測定した。

3. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法

1) 血液試料中濃度測定法

a) 試料の調整

血漿を遠心分離(3000rpm, 5℃, 10min)し, 上澄をHPLC用メンブレンフィルター(0.45 μ m, エキクロディスク13, ゲルマンサイエンスジャパン(株))に通し, その濾液を試料とした。

b) 検量線の作成

MEPMの標準品約10mg(力価)を正確に秤量し, 蒸留水にて1000 μ g(力価)/mlの標準原液を作成する。さらに蒸留水で希釈して500, 100および5.0 μ g(力価)/mlの標準液を調整した。これらの標準液100 μ lに市販のヒトブール血漿((株)日本生物材料センター)900 μ lを加えて検量線を作成した。

c) HPLCの条件

当方法は前処理カラムを必要とする。

前処理条件

- ・前処理カラム：L-カラム(10 μ m, 3cm×4.6mm ϕ (内径)(財)化学品検査協会)
- ・移動相 A：10mMリン酸緩衝液(pH6.8)(前処理用)
- ・移動相 B：100mM過塩素酸ナトリウム/10mMリン酸緩衝液(pH2.6)：メタノール=1：1

分析条件

- ・分析カラム：Hypersil C₁₈ 3 μ m ODS カラム 10cm×4.6mm ϕ (内径)(充填剤：SHANDON社(英))
- ・移動相：メタノール：PIC試薬A溶液* = 15：85
- ・注入量：100 μ l
- ・流速：1.0ml/min
- ・検出：UV300nm

* ベアードイオンクロマト試薬(日本ミリポアリミテッド)1バイアルを蒸留水と混合し, 1000mlとする Tetraethyl ammonium dihydrogen phosphate 0.005M 溶液。

試料100 μ lを移動相A(流速2ml/min)にて前処理カラムに導き, MEPMを吸着させる。3分後に流路を切り替え, 分析カラムと前処理カラムを直結し, 分析用

移動相で前処理用カラムより遊離したMEPMを分析カラムで分離定量した。前処理カラムはその3.5分後に分析カラムより切り離し, 移動相B(流速1ml/min)で5分間洗浄する。その後は次の分析開始に備え移動相A(流速1ml/min)で置換しておく。

2) 尿試料中濃度測定法

a) 試料の調整

尿試料をHPLC用メンブレンフィルター(0.45 μ m, エキクロディスク13, ゲルマンサイエンスジャパン(株))に通し, その濾液を試料とした。

b) 検量線の作成

MEPMの標準品約10mg(力価)を正確に秤量し, 蒸留水にて2000 μ g(力価)/mlの標準原液を作成する。さらに蒸留水で希釈して1000, 10 μ g(力価)/mlの標準液を調整する。これらの標準液100 μ lに蒸留水900 μ lを加えて検量線を作成した。試料中のMEPMが本濃度範囲を越えると予想される場合は, 試料を蒸留水で適当に希釈した。

c) HPLCの条件

- ・分析カラム：Hypersil C₁₈ 3 μ m ODS カラム 5cm×4.6mm ϕ (内径)
- ・移動相：アセトニトリル：リン酸緩衝液(10mM, pH7.4)=6：100
- ・注入量：100 μ l
- ・流速：1.0ml/min
- ・検出：UV300nm

4. 生体試料中における安定性

MEPMを添加したヒト血漿, 血清, 尿および胆汁を20, 4, -20, -80℃(胆汁中37℃)で保存した時の経時的な濃度変化を検討した。血漿, 血清および尿中濃度は, 前述のHPLC法で行った。胆汁濃度は, 以下の方法でHPLC法により行った。

- ・前処理：100 μ lのサンプルに氷冷メタノール100 μ l, 氷冷脱イオン水800 μ lを加える。
- ・分析カラム：Nucleosil 5C18 4.6mm ϕ ×15cm
- ・移動相：0.1% SDSを含むpH2.8 citrate-Na₂HPO₄緩衝液(citrate 8.84g/l, Na₂HPO₄ 2.25g/l)：アセトニトリル=75：25
- ・注入量：50 μ l
- ・流速：1.0ml/min
- ・検出：UV300nm

II. 実験結果および考察

1. Bioassay法の検討

1) 検定菌の選定

MEPMに対する種々の菌種のMIC測定の結果を考慮し, 感受性の高い*E. coli* NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC

10031, *P. aeruginosa* NCTC 10490, *S. aureus* FDA 209P, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341の6株を選び、0.1–100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲における阻止円を、ペーパーディスク法を用い pepton agar 培地で比較検討した(Fig. 1)。

E. coli NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC 10031が、測定感度が良く、直線性も良好であったため以後の検討は、*E. coli* NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC 10031の2菌種を用いることにした。

2) 測定用培地の検討

E. coli NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC 10031を試験菌とし、ペーパーディスク法にてMEPMの sensitivity test agar, nutrient agar(ニッスイ), brain heart infusion agar, trypto soy agar, Mueller-Hinton agar および pepton agarにおける阻止円を比較検討した(Fig. 2, 3)。*E. coli* NIHJ, *K. pneumoniae* ATCC 10031共に pepton agarが最も大きな阻止円を形成し、測定限界は、pepton agarと nutrient agar(ニッスイ)が低かった。pepton agarと nutrient agar(ニッスイ)は、NaCl濃度(pepton agar 2.5g/l, nutrient agar 5g/l)以外、同じ成分であるにもかかわらず*E. coli* NIHJでの阻止円の鮮明さは、pepton agarの方が優れており直線の傾きも大きかった。そこで pepton agar成分中のNaCl濃度を変化させて検討を行った(Fig. 4)。NaCl濃度を変化させることにより*E. coli* NIHJでの阻止円の大きさ、直線の傾きが顕著に異なり、NaCl無添加の場合のみ鮮明な阻止円を示し2重阻止円にならなかった。*K. pneumoniae* ATCC 10031では、NaCl濃度による変化はみられず、いずれの濃度においても2重阻止円を形成した。従って、MEPMに対する*E. coli* NIHJの感受性は、NaCl濃度に影響を受け、NaClのない条件が適していると考えられた。Difco社の nutrient agarにはNaClが含まれておらず調製が容易であり、*E. coli* NIHJでの測定培地に適していると考えられたので以後の検討は、*E. coli* NIHJに絞り、培地はDifco社の nutrient agarを用いることにした。

3) 培地pHの検討

Difco社の nutrient agarのpHを5.8, 6.7, 7.5に調整し、培地pHの検量線におよぼす影響をペーパーディスク法を用いて検討した(Fig. 5)。いずれのpHにおいても鮮明な阻止円が得られ、測定感度も良好であった。この結果から培地は、Difco社の nutrient agarを処方どおり(表示pH6.8 \pm 0.1)を用いることにした。

4) 接種菌量の影響

E. coli NIHJの接種菌量の影響をペーパーディスク法で検討した。菌量 2.4×10^6 CFU/mlに調整した菌液を

種層培地100mlに対して5, 1.5, 0.3%の割合で接種した(Fig. 6)。

阻止円はすべてクリアーで大きさは菌量が少ないほど大きくなる傾向を示した。一方、直線性は菌量が多いほど良くなる傾向を示した。この結果より接種菌量を1.5%にした。

5) 予備拡散時間の影響

ペーパーディスク法にて標準試料をスポット後、室温で0, 30, 60分予備拡散させ、37℃で約18時間培養し検量線を検討した。予備拡散時間が長い程、阻止円の大きさは若干大きくなる傾向を示したが、30分、60分では殆ど差はなかった。そこで予備拡散時間は30分で行うことにした。

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、各々を比較検討した(Fig. 7)。その結果、寒天孔拡散法が最も検出感度は高かったが、ペーパーディスク法でも検出限界は、0.06 $\mu\text{g/ml}$ と良好な感度を示したため、操作の容易さ等を考慮しペーパーディスク法で行うことにした。

7) 血漿、血清および尿の影響の検討

ペーパーディスク法にて、ヒト由来の血漿、血清、尿を用いて希釈作製した検量線と、50mM MOPS緩衝液(pH7.0)を用いて希釈作製した検量線を比較検討した。又、同時に安定化剤として1M MOPS緩衝液(pH7.0)を血漿又は血清に1:1で添加した希釈液により作製した検量線についても比較検討した(Fig. 8)。その結果、各々の検量線は一致し、希釈液の差は認められなかった。

8) 胆汁の影響の検討

ペーパーディスク法にて、ヒト由来の胆汁、ヒト胆汁+1M MOPS緩衝液(pH7.0)混合液および50mM MOPS緩衝液(pH7.0)で希釈作製した検量線と比較検討した(Fig. 9)。その結果、3つの検量線は一致し希釈液の差は認められなかった。

2. HPLC法の検討

ヒト血漿および尿中のMEPMをHPLC法で定量したときのクロマトチャートをFig. 10に示した。血漿試料はカラムスイッチング法を用いることにより、保持時間約24分、定量限界0.05 $\mu\text{g/ml}$ で測定可能であった。尿試料は保持時間約7分、定量限界1 $\mu\text{g/ml}$ で測定可能であった。又、血漿、尿由来の生体成分の各ピークへの妨害は認められなかった。ヒトにMEPMを投与後の血漿および尿試料をbioassay法(*E. coli* NIHJを検定菌とするペーパーディスク法)およびHPLC法で定量したときの相関を検討した(Fig. 11, 12)。その結果、相関

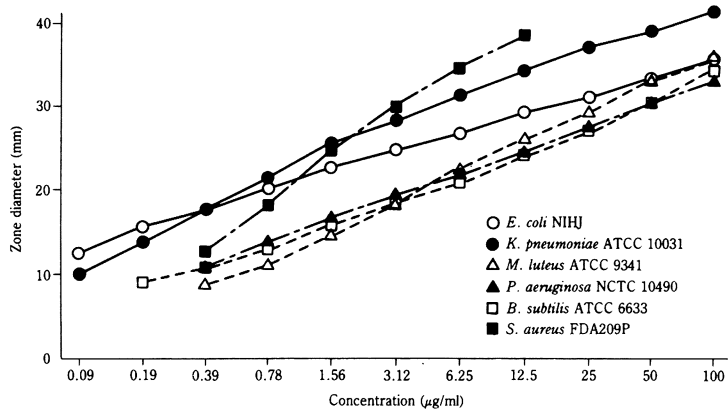


Fig. 1. Comparison of standard curves of meropenem on various test organisms by paper disc method.

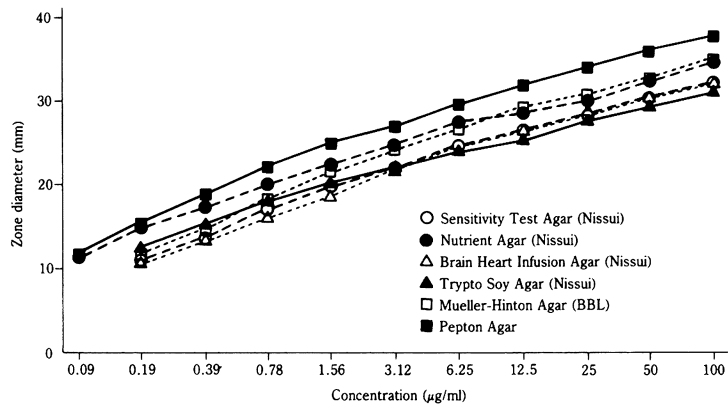


Fig. 2. Comparison of standard curves of meropenem on various test media by paper disc method (*Escherichia coli* NIHJ).

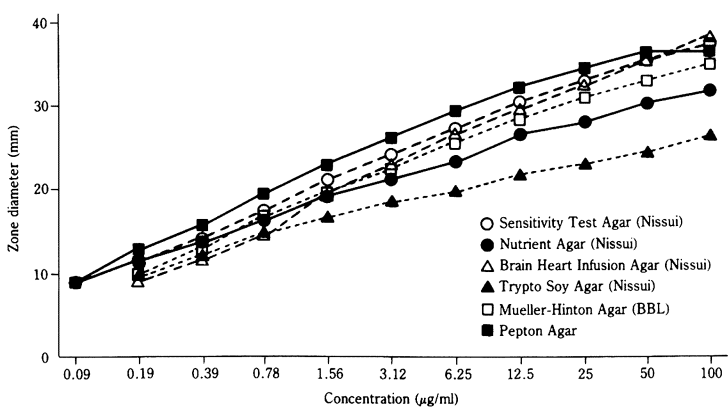


Fig. 3. Comparison of standard curves of meropenem in various test media by paper disc method (*Klebsiella pneumoniae* ATCC10031).

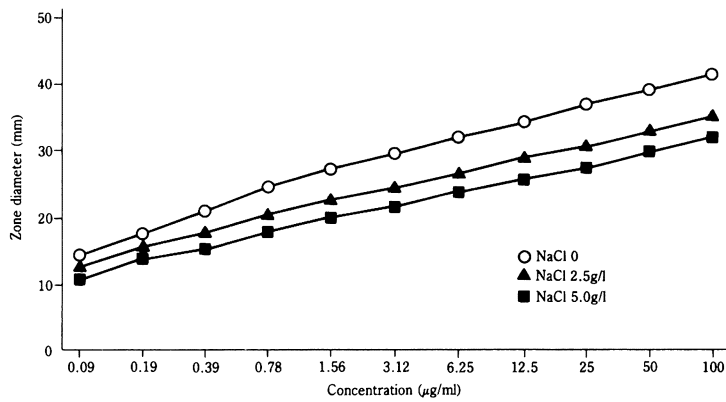


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on standard curves of meropenem. (*Escherichia coli* NIHJ)

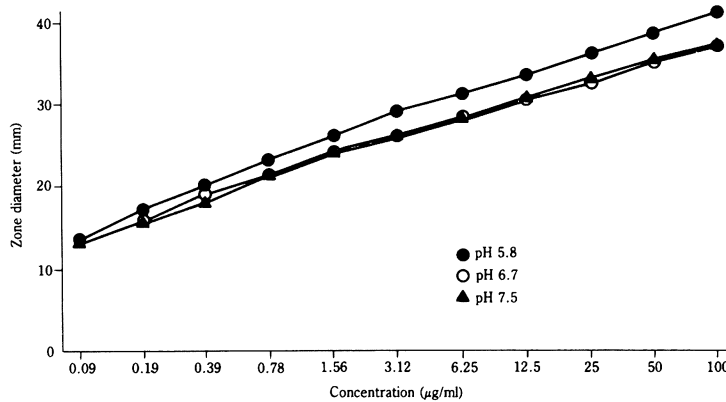


Fig. 5. Effect of medium pH on standard curves of meropenem (*Escherichia coli* NIHJ).

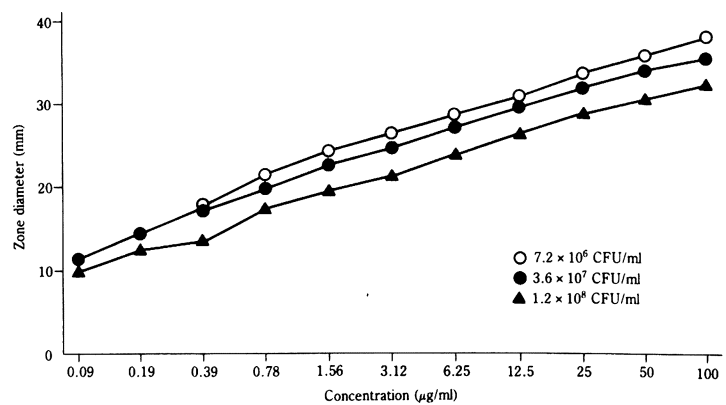


Fig. 6. Effect of inoculum size on standard curves of meropenem (*Escherichia coli* NIHJ).

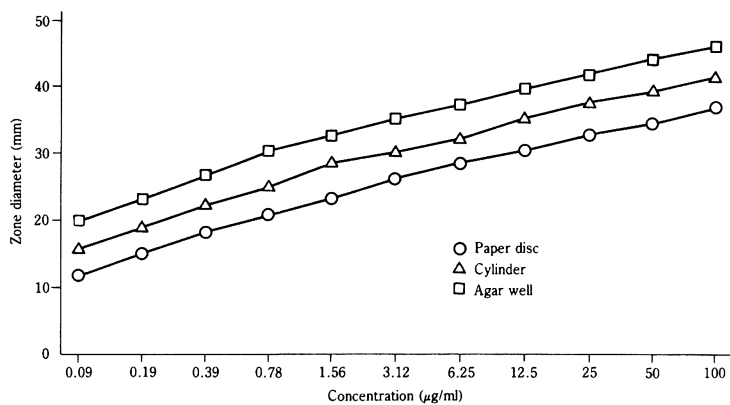


Fig. 7. Comparison of standard curves of meropenem obtained by different methods.

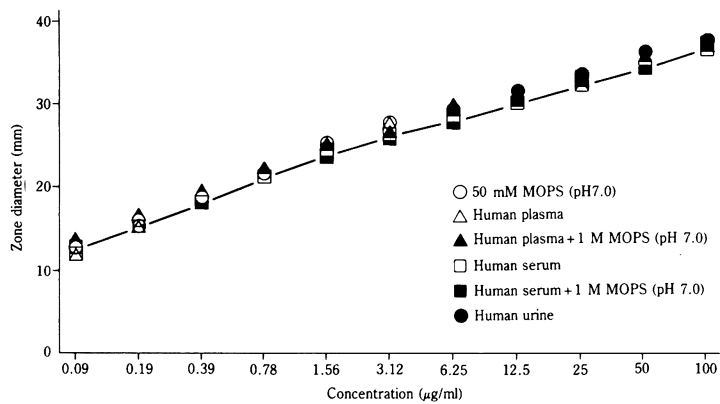


Fig. 8. Effect of diluents on stadard curves of meropenem (plasma, serum and urine).

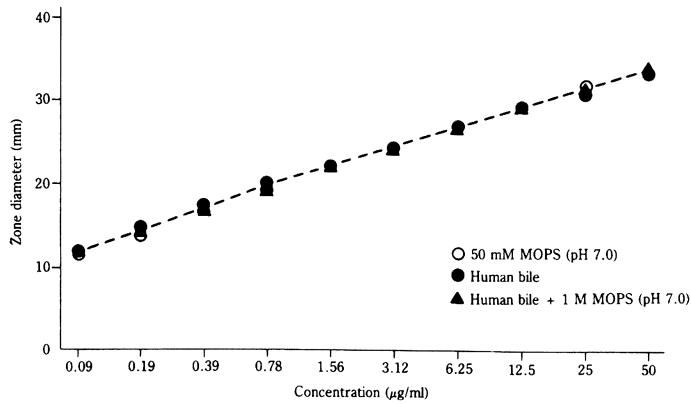


Fig. 9. Effect of diluents on standard curves of meropenem (bile).

係数は血漿試料で0.9963, 尿試料0.9965となり極めて良好な相関が認められた。

3. 生体試料中での安定性

ヒト血漿, 血清および胆汁でMEPM 50 $\mu\text{g/ml}$, 尿で1000 $\mu\text{g/ml}$ の溶液を調整し各温度での安定性についてHPLC法にて検討した。同時に安定化剤として1M MOPS緩衝液(pH7.0)を検体に1:1(v/v)の割合で添

加した際の安定性を検討した。

1) 血漿および血清試料(Table 1)

安定化剤無添加の場合, -20°C で3日間, -80°C で2ヶ月間は安定であった。安定化剤を添加すると -20°C , -80°C とも2ヶ月間安定になった。

2) 尿試料(Table 2)

安定化剤有無にかかわらず, -80°C では2ヶ月間安

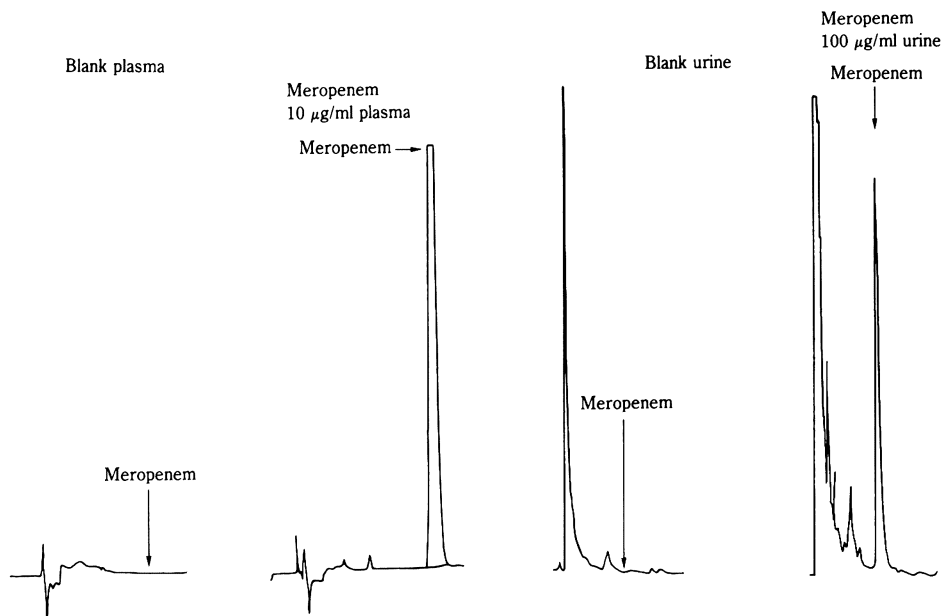


Fig. 10. Typical chromatogram of human plasma and urine before and after administration of meropenem.

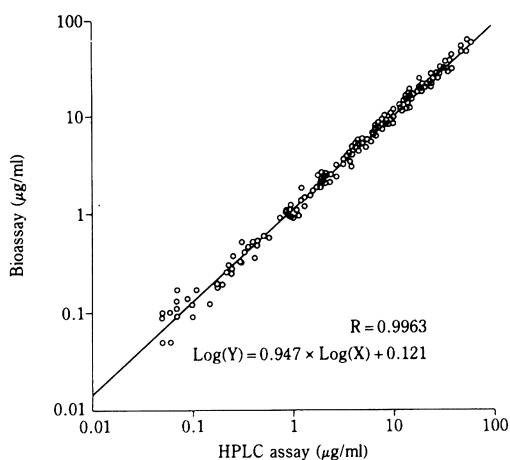


Fig. 11. Correlation between bioassay and HPLC assay of meropenem in plasma.

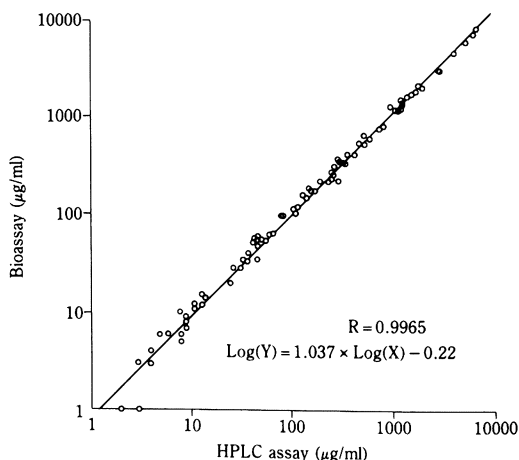


Fig. 12. Correlation between bioassay and HPLC assay of meropenem in urine.

Table 1. Stability of meropenem in human serum and human plasma under various temperatures

Body fluid	Meropenem (μg/ml)	Temperatures (°C)	Residual potency (%)										
			0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	1 day	3 day	1 week	2 week	4 week	8 week
Human plasma	50	20	100	99.2	83.7	80.5	76.2	66.7					
		4	100	97.2	101	96.2	95.5	82.4	71.3				
		-20	100					100	93.1	85.2	80.1		
		-80	100					93.3	91.2	93.4	95.4	100	96.9
Human plasma + 1 M MOPS buffer	50	20	100			97.8		93.8	89.5	64.9			
		4	100			96.1		105	96.1	88.5	85.3	78.3	
		-20	100							98.5	95.2	99.9	96.4
		-80	100							105	103	102	103
Human serum	50	20	100	108	98.2	96.2	74.3	62.8					
		4	100	96.6	106	95.5	91.9	88.6	69.5				
		-20	100					96.9	91.5	85.8	78.4		
		-80	100					95.3	102	95.6	96.5	101	94.8
Human serum + 1 M MOPS buffer	50	20	100			102		92.1	85.4	62.1			
		4	100			98.4		99.8	95.8	86.6	83.0	74.9	
		-20	100							95.8	97.8	99.1	92.1
		-80	100							102	95.7	99.3	99.4
50 mM MOPS buffer (pH 7.0)	50	20	100			102		95.7	89.2	67.5	57.8		
		4	100			101		97.7	91.0	90.4	85.5	78.2	
		-20	100							97.0	103	101	98.7
		-80	100							97.2	105	101	99.3

Table 2. Stability of meropenem in human urine and human bile under various temperatures

Body fluid	Meropenem (μg/ml)	Temperatures (°C)	Residual potency (%)										
			0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	1 day	3 day	1 week	2 week	4 week	8 week
Human urine	50	20	100	98.3	94.0	93.3	91.3	78.3					
		4	100	99.1	98.9	98.4	98.1	98.3	87.9	81.7	72.7		
		-20	100					101	90.5	95.0	95.7	86.6	78.8
		-80	100					103	96.2	97.4	96.7	97.2	96.7
Human urine + 1 M MOPS buffer	50	20	100			102		82.1	63.2				
		4	100			95.8		90.9	90.7				
		-20	100							82.2	74.8		
		-80	100							94.9	94.7	95.3	83.7
Human bile	50	37	100	81.1	66.8	51.6	41.4						
		20	100	90.8	80.7	73.7	64.0						
		4	100		97.9		92.5	87.1	64.8				
		-20	100					84.2	63.8	44.3	29.0		
Human bile + 1 M MOPS buffer	50	-80	100					101	96.9	94.4	100	99.0	103
		4	100		101		106	96.7	99.3	95.6	92.9	88.0	79.7
		-20	100					104	97.2	99.1	96.3	95.2	87.0
		-80	100					101	96.9	99.2	102	101	103

定であった。又、14日目までは -20°C でも安定であった。安定化剤を添加すると -20°C で1ヶ月間安定になった。

3) 胆汁試料(Table 2)

安定化剤無添加の場合、 37°C 、 20°C いずれも分解が速く、 4°C 、 -20°C でも1日目で10%以上分解し、不安定であった。 -80°C では2ヶ月間安定であった。安定化剤を添加すると、 4°C で10日間、 -20°C でも20日間安定と、MOPS添加により顕著に安定性が増した。

Ⅲ. 結 論

1. MEPMの微生物学的定量法

1) 検定菌

E. coli NIHJを用いる。

2) 測定用培地

Nutrient Agar(Difco社)を処方どおり調製する。

3) 接種菌量

Tryptoy soy broth(ニッスイ)で 37°C 、一夜培養した菌液を1.5%接種する(final 10^7CFU/ml)。

4) 標準液および希釈液

50mM MOPS緩衝液(pH7.0)を用いる。

5) 検定方法

薄層カップ法、寒天孔拡散法およびペーパードISK法のいずれにおいても測定可能である。

6) 予備拡散および培養温度

室温にて30分の予備拡散を行い、 37°C で一夜培養する。

2. MEPMの高速液体クロマトグラフィーによる定量法

実験材料および実験方法の部を参照

文 献

- 1) Edwards J R, Turner P J, Mannop C, Withnell E S, Grindey A J, Nairn K: *In vitro* antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 215~222, 1989
- 2) Sumita Y, Inoue M, Mitsuhashi S: *In vitro* antibacterial activity and β -lactamase stability of the new carbapenem SM-7338, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 908~916, 1989
- 3) 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法, 1990

ASSAY OF MEROPENEM IN BODY FLUIDS AND TISSUES

Teiji Tomio, Hiroshi Nouda, Tsuneo Kohzuki, Masuhiro Kato, Takao Okuda and Masatomo Fukasawa

Research Laboratories, Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd.

1-98 Kasugade-naka, 3-chome, Konohana-ku, Osaka 554, Japan

We performed a microbiological assay (bioassay) and HPLC methods for quantitative determination of meropenem (MEPM) in body fluid and tissue samples.

When the bioassay was carried out by paper disc with *Escherichia coli* NIHJ as the test organism and nutrient agar (Difco) as the test medium, MEPM could be determined in plasma, urine, bile and tissues. We used 50 mM 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) buffer (pH7.0) to prepare the standard solutions. The detection limit by this method was $0.06\text{ }\mu\text{g/ml}$. Concentrations of MEPM in plasma and urine could be determined by HPLC with detection limits of 0.05 and $1.0\text{ }\mu\text{g/ml}$, respectively. There was a good correlation between the bioassay and HPLC (correlation coefficient; plasma 0.9963, urine 0.9965).

The activity of MEPM in plasma was stable at -20°C for 3 days and -80°C for 2 months; in urine it was stable at -20°C for 14 days and -80°C for 2 months. In bile mixed with the same volume of 1 M MOPS stabilizer (pH7.0), it was stable at -20°C for month and -80°C for 2 months.