

新規経口ペネム薬 SY5555 の体内濃度測定法

菊地 康博・北崎 知子・斉藤 秀之*・柴沼 忠夫

山之内製薬株式会社第四創薬研究所*

諸住なおみ・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

現 東京医科歯科大学病院薬剤部

新規経口ペネム薬 SY5555 の体内濃度測定法および体液中での安定性について検討した。

微生物学的定量法 (bioassay 法) では、検定菌として *Bacillus subtilis* ATCC6633, 検定培地として日抗基記載の培地(ペプトン0.5%, 肉エキス0.3%, クエン酸ナトリウム1%, カンテン1.5%, pH6.5~6.6)を用いる寒天平板拡散法により測定可能であった。検出感度はカップ法および agar well 法で0.05 μ g/ml, ペーパーディスク法で0.10 μ g/mlであった。血漿中濃度の測定では標準溶液は対照血漿により調整することが必要であり, その時の agar well 法での検出感度は0.10 μ g/mlであった。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法では, 血漿はアセトニトリルで除たん白後, 尿は緩衝液で希釈後, 逆相系カラムにより測定可能であり, 検出感度はそれぞれ0.1 μ g/ml および2.5 μ g/mlであった。臨床第一相試験におけるヒト血漿および尿中の SY5555 濃度を bioassay 法と HPLC 法で測定したところ, 両法による結果はよく相関した。

また, SY5555 を添加したヒト血漿試料および尿試料をそのまま-20 $^{\circ}$ C以下に凍結保存した時, SY5555 はそれら体液中で少なくとも42日間は安定であった。

Key words : Bioassay, HPLC, SY5555, Body fluids

SY5555 は, サントリー株式会社, 山之内製薬株式会社で共同開発中の新規経口ペネム系抗生物質で, 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ラムを有し, とくに腸球菌を含むグラム陽性菌に対し既存の経口セフェム薬に比し優れた抗菌力を示す¹⁾。SY5555 のヒトにおける体内動態を明らかにするため本薬の体内濃度測定法が必要である。本報告では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ならびに体液中での安定性について検討したので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤および試薬

SY5555 (Lot No. 5588613 および 5588814) はサントリー (株) にて合成されたものを使用した。ペプトン, 肉エキスはミクニ化学産業 (株) 製, カンテンは栄研化学 (株) 製を使用した。その他の試薬は市販の特級品または高速液体クロマトグラフ用を使用した。

2. 微生物学的定量法 (bioassay 法)

1) 検定菌

Bacillus subtilis ATCC6633, *Micrococcus luteus*

ATCC9341, *Staphylococcus aureus* 209P および *Escherichia coli* NIHJ を使用した。*B. subtilis* ATCC 6633 および *M. luteus* ATCC9341 は日本抗生物質医薬品基準 (以下日抗基と略す)・一般試験法・力価試験法²⁾に準じて胞子液および菌液を調製した。*S. aureus* 209P, *E. coli* NIHJ は tryptic soy broth (Difco) に一夜培養した菌液を使用した。

2) 検定培地

日抗基・一般試験法・力価試験法に記載されている培地からペプトン0.5%, 肉エキス0.3%, クエン酸ナトリウム1%, カンテン1.5%, pH6.5~6.6 (以下クエン酸含有培地, MRAPJ-A), Nutrient agar (NA, 栄研), Heart infusion agar (HIA, 栄研), Mueller-Hinton agar (MHA, 栄研), Antibiotic medium 1 (AM-1, Difco) を用いた。培地は所定の方法に従って調製し, オートクレーブ滅菌後約50 $^{\circ}$ Cの恒温に保ち平板作製直前に検定菌を接種した。

3) 測定方法

カップ法, agar well 法, ペーパーディスク法により検討した。いずれの方法においても直径90mmのペト

り皿（テルモ製）を用いた。

(1) カップ法：検定菌を接種した培地を10ml分注して水平台上で固化させ、寒天平板を作製する。その寒天平板上に外径8mmのステンレス製カップ（Cylinder）を4個立て、カップ内に検液を280 μ l注入した。

(2) Agar well法：基層用培地19mlを分注して水平台上で固化させた後、検定菌を接種した種層用培地5mlを分注して固化させた。この寒天平板に寒天穿孔機（東洋測器（株）製）を用いて内径6mmまたは8mmの孔を穿孔した。各穿孔内に検液80 μ lまたは100 μ lを注入した。

(3) ペーパーディスク法：検定菌を接種した培地を7ml分注して水平台上で固化させ、寒天平板を作製する。直径8mmのペーパーディスク（東洋製作所（株）製）に検液を40 μ l浸み込ませ、平板に貼付した。

いずれも36~37°Cで16~18時間培養した。Agar well法、ペーパーディスク法では4°Cで2時間の予備拡散を行った。得られた阻止円径はゾーンリーダー（永井商会）により計測した。

4) 希釈用液

希釈用緩衝液として、M/15リン酸塩緩衝液（pH 6.0, pH7.0およびpH8.0）を使用した。また、健康人から採血・分離した血漿をプールして使用した。

5) 体液中安定性

健康人からのプール血漿およびプール尿を用いた。血漿または尿にSY5555を添加し、血漿では1.0 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 尿では10.0 μ g/ml, 50.0 μ g/mlの濃度

Table 1. Examination of HPLC systems for the assay of SY5555 in human plasma and urine

Pump	Vista 5500 (Varian Instrument, USA)
Detector	UV-200 (Varian Instrument, USA)
Autosampler	AS-8000 (Tosoh Co., Ltd., Japan)
Integrator	C-R3A (Shimadzu Seisakusho, Japan)

Table 2. Analytical conditions for the assay of SY5555 in human plasma and urine

Column	Inertsil ODS (ID. 4.6 \times 250mm, 5 μ m, GL sciences Co., Ltd.)
Mobile phase	Solvent A/Solvent B = (68/32, v/v%) Solvent A : 20mM sodium dihydrogen phosphate (adjust at pH 2.0 with phosphoric acid) Solvent B : Acetonitrile
Flow rate	1.0ml/min
Column temperature	Room temperature
Detection wavelength	UV at 318nm
Injection volume	200 μ l
Retention time	ca. 6min

に調製した。それらの試料を-80°C, -20°Cおよび4°Cに保存した時の残存率を bioassay 法で測定した。

3. 高速液体クロマトグラフ（HPLC）法

1) 試料の前処理

血漿0.2mlにアセトニトリル0.2mlを加えてよく攪拌後、遠心分離（12,000rpm, 15分間, 4°C）した。その上清200 μ lをM/100リン酸塩緩衝液800 μ lで希釈し、その200 μ lをHPLCへ注入した。尿試料の場合は、室温でよく攪拌後、M/100リン酸塩緩衝液で250倍に希釈し、その200 μ lをHPLCへ注入した。SY5555濃度は別途調製したSY5555標準液とのピーク面積比により算出した。

2) 測定機器および測定条件

代表的な測定機器をTable 1に、測定条件をTable 2に示した。

II. 実験結果

1. Bioassay法の検討

1) 検定菌の選定

SY5555に高い感受性を示す *B. subtilis* ATCC6633, *M. luteus* ATCC9341, *S. aureus* 209P および *E. coli* NIHJ を選び、agar well法により測定したSY5555の標準曲線をFig. 1に示した。検討した4菌株のうち検出感度および阻止円径の大きさはいずれも *B. subtilis* ATCC6633を用いた時が最も優れていたことから、検定菌として *B. subtilis* ATCC6633を選択した。

2) 測定条件の検討

a) 検定培地の検討

検定菌として *B. subtilis* ATCC6633を用い、検定培地としてクエン酸含有培地, NA, HIA, MHA および AM-1を用い、agar well法により測定したSY5555の標準曲線をFig. 2に示した。阻止円径の大きさは、クエン酸含有培地を用いた時に最も大きく、その他の培地ではクエン酸含有培地よりも小さかった。また、検出感度および阻止円の鮮明度においてもクエン酸含有培地が優れていたことより、検定培地としてクエン

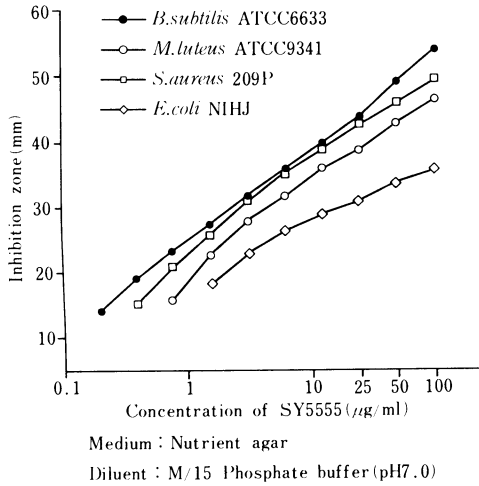


Fig. 1. Comparison of standard curves of SY5555 on various test organisms by agar well method

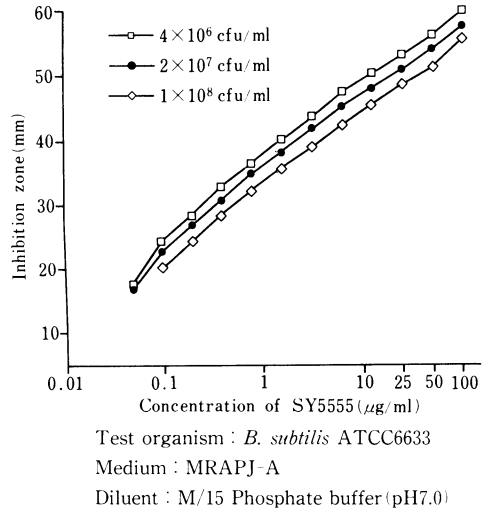


Fig. 3. Effect of inoculum size on standard curves of SY5555 by agar well method

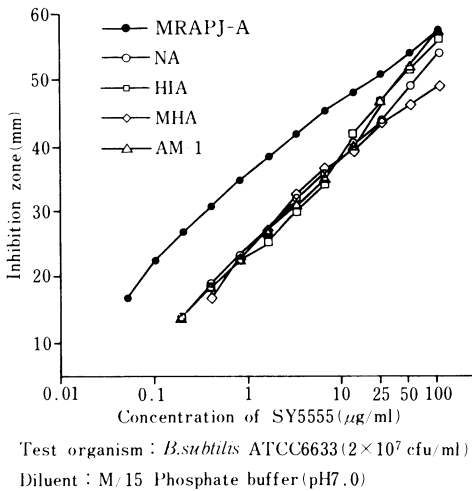


Fig. 2. Comparison of standard curves of SY5555 on various test media by agar well method

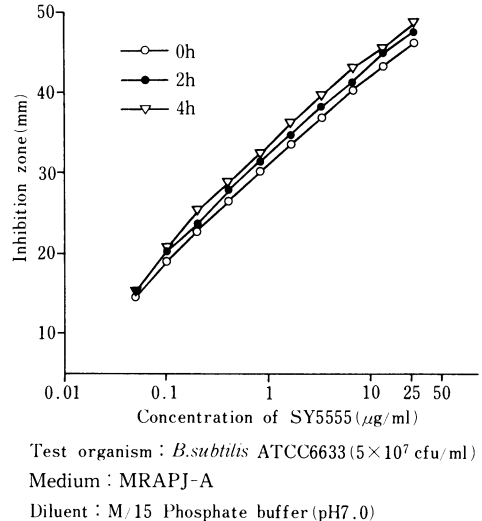


Fig. 4. Comparison of standard curves of SY5555 on different preincubation time at 4°C by agar well method

酸含有培地を選択した。

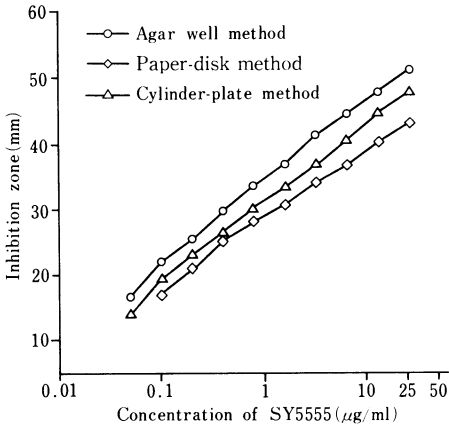
b) 接種菌量の影響

SY5555 の標準曲線に及ぼす *B. subtilis* ATCC6633 の接種菌量の影響を Fig. 3 に示した。標準曲線の阻止円径は、接種菌量を増加すると小さくなることが認められた。また、接種菌量を少なく (4×10^6 cfu/ml) することにより、検出感度は上昇する傾向を示した。しかし、その場合低濃度の SY5555 標準溶液における阻

止円は不明瞭であった。

c) 予備拡散時間の検討

クエン酸含有培地を用い agar well 法により、試料注入後の予備拡散時間の SY5555 標準曲線への影響を Fig. 4 に示した。阻止円径の大きさは予備拡散時間の延長に伴い大きくなる傾向が認められたが、検出感度の上昇は認められなかった。



Test organism : *B.subtilis* ATCC6633 (5×10^7 cfu/ml)
 Medium : MRAPJ-A
 Diluent : M/15 Phosphate buffer (pH7.0)

Fig. 5. Standard curves of SY5555 on different assay method

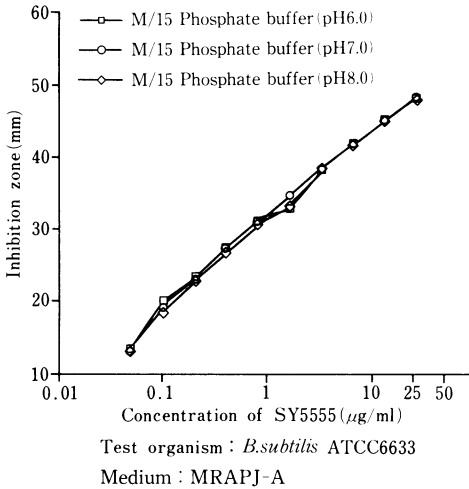
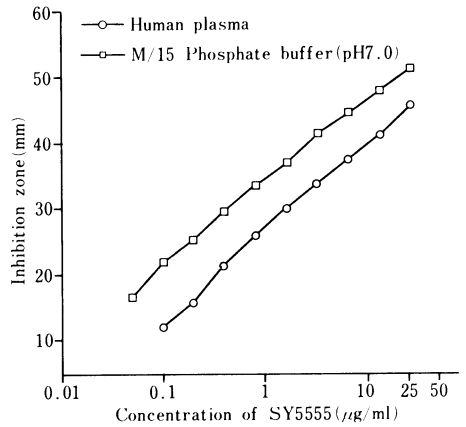


Fig. 6. Effect of diluents on standard curves of SY5555 by agar well method

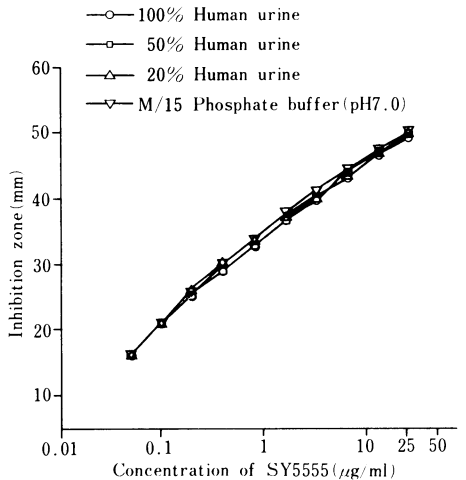
3) 測定方法の検討

検定菌として *B. subtilis* ATCC6633 を、検定培地としてクエン酸含有培地を用い、3種の測定方法により測定した SY5555 の標準曲線を Fig. 5 に示した。阻止円径の大きさは agar well 法が最も大きく、次いでカップ法、ペーパーディスク法の順であった。検出感度はカップ法、agar well 法で $0.05 \mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法で $0.10 \mu\text{g/ml}$ であった。



Test organism : *B.subtilis* ATCC6633 (5×10^7 cfu/ml)
 Medium : MRAPJ-A

Fig. 7. Effect of human plasma on standard curves of SY5555 by agar well method



Test organism : *B.subtilis* ATCC6633 (5×10^7 cfu/ml)
 Medium : MRAPJ-A

Fig. 8. Effect of human urine on standard curves of SY5555 by agar well method

4) 標準試料液の調製希釈液の影響

a) 希釈用緩衝液の pH の影響

SY5555 の標準溶液を種々 pH の M/15 リン酸塩緩衝液により調製した時の標準曲線を Fig. 6 に示した。SY5555 の阻止円径の大きさに希釈用緩衝液の pH による差は認められなかった。検出感度は pH6.0 および 7.0 で $0.05 \mu\text{g/ml}$ であり、pH8.0 では $0.10 \mu\text{g/ml}$ であ

った。そこで、希釈用緩衝液には M/15リン酸塩緩衝液 (pH7.0) を使用することとした。

b) 標準曲線に及ぼす血漿の影響

SY5555の標準溶液をヒトプール血漿により調製した時の標準曲線を Fig.7 に示した。希釈液としてヒト血漿を用いた時の阻止円径は、リン酸塩緩衝液を用いた時よりも小さくなり、SY5555の標準曲線に血漿の

影響が認められた。

c) 標準曲線に及ぼすヒト尿の影響

SY5555の標準溶液をヒトプール尿により調製した時の標準曲線を Fig.8 に示した。原尿および希釈尿で調製した SY5555 標準溶液の阻止円径はリン酸塩緩衝液を用いた時の測定結果と大きな差は認められなかった。

5) 測定精度に関する検討

ヒト血漿およびリン酸塩緩衝液で調製した SY5555 の既知濃度試料を agar well 法およびペーパーディスク法により測定した結果を Table 3 に示した。Agar well 法では、血漿 (0.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) およびリン酸塩緩衝液 (2.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$) 試料の実測値は、平均でそれぞれ設定濃度の100.8~101.2%および101.7~103.4%であった。また、その時の変動係数は5.63%以内であった。ペーパーディスク法では、実測値は平均でそれぞれ設定濃度の99.2~100.5%および99.0~100.6%であり、その変動係数は5.31%以内であった。

2. HPLC 法の検討

ヒト血漿および尿中の SY5555 を HPLC 法で定量した時のクロマトグラムを Fig.9 に示した。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 SY5555 を添加し、本測定法に従い操作してえられた検量線を Fig. 10 に示した。血漿、尿ともに原点を通る良好な直線が得られた。Table 3 に本測定法の精度を示した。ヒト血漿において2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、尿において50.0 $\mu\text{g/ml}$ に設定した

Table 3. Recoveries of SY5555 from human plasma, urine and buffer

1) Assay : Bioassay

Assay method	Sample	Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%)
Agar well	Plasma	0.5	101.2 \pm 4.73	4.67
		2.5	100.8 \pm 4.45	4.41
	M/15 P.B. (pH7.0)	2.0	103.4 \pm 4.91	4.75
		10.0	101.7 \pm 5.73	5.63
Paper disk	Plasma	0.5	99.2 \pm 5.18	5.22
		2.5	100.5 \pm 3.66	3.64
	M/15 P.B. (pH7.0)	2.0	99.0 \pm 5.26	5.31
		10.0	100.6 \pm 3.72	3.70

Mean \pm S.D., n=10

2) Assay : HPLC

Sample	Amount added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	C.V. (%)
Plasma	2.0	103.3 \pm 0.8	0.80
Urine	50.0	101.4 \pm 0.5	0.51

Mean \pm S.D., n=6

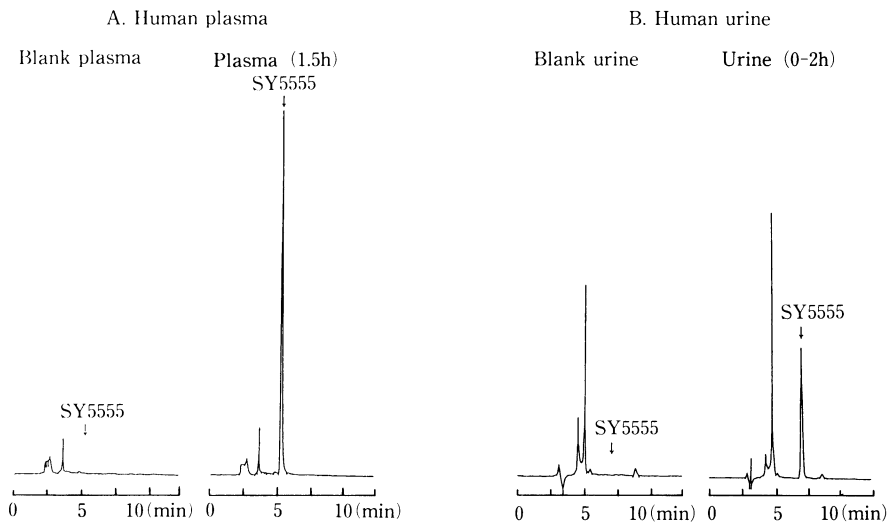


Fig. 9. Chromatograms of human plasma (A) and urine (B) after oral administration on SY5555 (300mg)

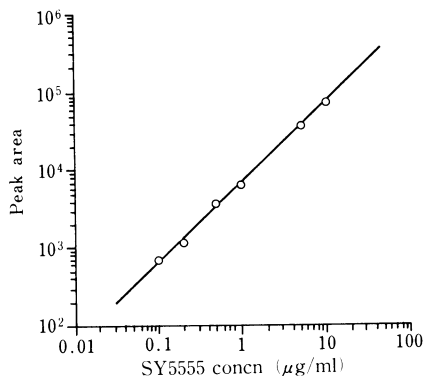


Fig. 10. (A) A typical calibration curve of SY5555 in human plasma

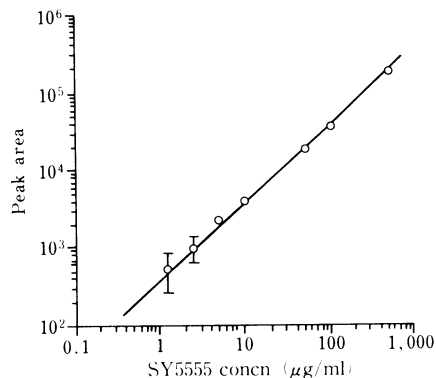


Fig. 10. (B) A typical calibration curve of SY5555 in human urine

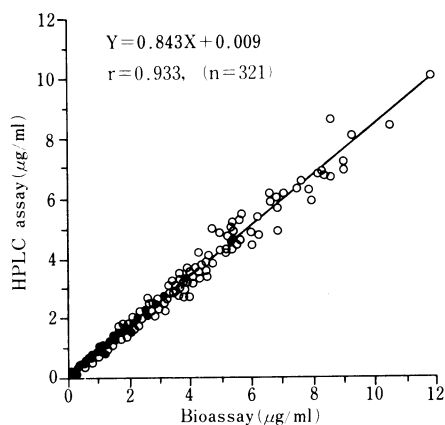


Fig. 11. (A) Correlation between SY5555 concentration in human plasma measured by bioassay and HPLC methods

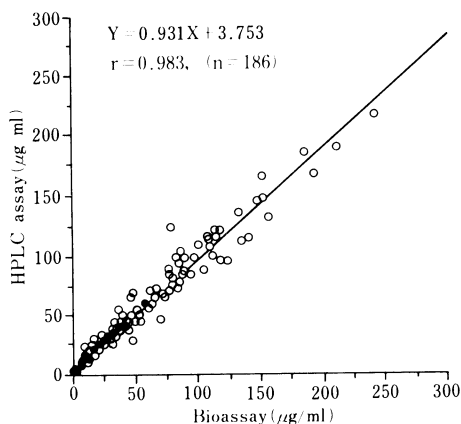


Fig. 11. (B) Correlation between SY5555 concentration in human urine measured by bioassay and HPLC methods

試料を測定した時の実測値はそれぞれ設定値の103.3%および101.4%であった。変動係数は0.80%および0.51%であった。なお、本測定法における血漿試料での測定限界は0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、尿試料での測定限界は2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と設定した。

本HPLC法による臨床第一相試験における血漿および尿中のSY5555濃度測定結果とbioassay法による測定結果を比較したところ、Fig. 11に示すように血漿、尿ともに両測定法の結果はほぼ等しく、良い相関が得られた。

3. SY5555の体液中安定性

SY5555を添加したヒト血漿およびヒト尿試料を保存した時の安定性をTable 4に示した。-20 $^{\circ}\text{C}$ お

び-80 $^{\circ}\text{C}$ の条件で42日間保存した時の残存率は98.6~104.3%であり、SY5555はヒト体液中で少なくとも42日間は安定であった。一方、4 $^{\circ}\text{C}$ で2日間保存した時の残存率は血漿で78.5~83.2%、尿で91.9~96.2%であった。

III. 考 察

SY5555の微生物学的定量法の要約をTable 5に示した。検定菌として*B. subtilis* ATCC6633を用い、検定培地として日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法記載の培地(クエン酸含有培地)を用いた。測定方法としてカップ法、agar well法およびペーパードイスク法において良好な標準曲線が得られ、いずれの測定方法でも体液内SY5555濃度を定量可能であ

Table 4. Stability of SY5555 in human plasma and urine (Assay : Bioassay)

Solution	Concn μg/ml	Temp °C	Remaining activity (%)							
			6 hours	1 day	2 days	7 days	14 days	21 days	28 days	42 days
Plasma	1.0	4	99.1±1.5	81.3±1.0	78.5±1.2	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		20	N.T.	96.8±3.4	N.T.	99.1±3.0	99.1±2.6	106.6±3.6	97.7±0.9	99.8±1.6
		80	N.T.	97.4±2.1	N.T.	98.3±1.0	97.3±2.7	96.3±1.4	100.2±3.5	98.6±1.1
	5.0	4	101.4±6.8	92.8±4.3	83.2±2.7	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		20	N.T.	103.8±5.8	N.T.	99.4±1.2	99.8±3.1	103.5±3.9	101.8±1.8	102.2±3.8
		80	N.T.	101.1±3.8	N.T.	99.9±3.2	99.1±3.1	93.1±1.9	99.1±4.5	103.0±4.1
Urine	10.0	4	99.7±1.7	101.6±8.2	96.2±6.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		20	N.T.	102.8±5.0	N.T.	99.1±3.3	102.8±5.2	102.7±4.1	107.4±4.8	101.0±2.5
		80	N.T.	102.7±6.2	N.T.	98.4±2.7	103.9±3.9	105.2±2.1	102.4±6.6	104.3±3.6
	50.0	4	99.1±3.3	101.0±2.4	91.9±5.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		20	N.T.	101.0±1.3	N.T.	99.7±1.7	105.1±2.3	98.1±3.7	99.4±1.7	98.8±3.3
		80	N.T.	104.3±3.6	N.T.	98.3±1.9	107.4±3.3	97.0±5.2	97.3±3.3	99.5±1.6

N.T. : not tested, Mean ± S.D., n = 5

Table 5. Standardization of microbiological assay method for SY5555

Method	Cylinder-plate	Agar well	Paper-disk
Test organism	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633		
Inoculum size	1~5×10 ⁷ cfu/ml		
Medium	Peptone	0.5%	
	Meat extract	0.3%	
	Sodium citrate	1.0%	
	Agar	1.5%	
	pH 6.5~6.6		
Standard solution	Plasma : Human plasma		
	Buffer : M/15 Phosphate buffer (pH7.0)		
Incubation	36~37°C, 16~18h		4°C, 2h
	36~37°C, 16~18h		

るが、検出感度はカップ法および agar well 法がペーパーディスク法よりも良好であった。

ヒト対照血漿で調製した SY5555 標準溶液の阻止円径にヒト血漿の影響が認められた。これは主に SY5555 の血清蛋白結合率が高いことに起因するものと考えられた³⁾。これより血漿中 SY5555 濃度の測定にはヒト対照血漿により調製した標準溶液を用いる必要性が認められた。一方、ヒト対照尿で調製した SY5555 標準溶液では阻止円径に尿試料の影響が少なかったことから、尿中 SY5555 濃度の測定には尿試料を適宜希釈し、リン酸塩緩衝液により調製した標準溶液を用いることが可能であった。

HPLC 法においては、ヒト血漿試料ではアセトニト

リルで除たん白したものを、ヒト尿試料ではそのまま逆相系 (ODS) HPLC カラムに注入することにより簡便かつ、精度よく測定されることが明らかとなった。さらに、本 HPLC 法での測定結果は bioassay 法による結果とほぼ等しく、両者の間には良い相関が認められた。

一方、SY5555 の保存安定性の検討結果より、ヒト血漿および尿試料中の SY5555 は試料をそのまま -20°C 以下に凍結保存することにより、少なくとも 42 日間は安定なことが認められた。ヒト体液試料中のカルバペネム系抗生物質の保存には保存安定剤添加の必要性が報告されている^{4,5)}が、本薬は保存安定剤の添加は必要ないことが示された。

文 献

- 1) 齋藤 篤, 國井乙彦: 第41回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウム. SY5555, 東京, 1993
- 2) 厚生省薬務局監修: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法, p. 680~685, 1986
- 3) 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
- 4) 今朝洞忠孝, 朝日良成, 橋爪照隆: Imipenem (MK-0787) の微生物学的定量法による体内濃度測定法に関する検討. *Chemotherapy* 33 (S-4): 275~281, 1985
- 5) 富尾貞治, 納田浩司, 上月庸生, 加藤益弘, 奥田隆夫, 深澤万友友: Meropenem のヒト体液および組織内濃度測定法. *Chemotherapy* 40 (S-1): 114~122, 1992

Microbiological assay method for SY5555, a new oral penem,
in biological fluids

Yasuhiro Kikuchi, Tomoko Kitazaki, Hideyuki Saito and Tadao Shibamura

Infectious Disease and Immunology Research Laboratories,

Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

21 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305, Japan

Naomi Morozumi, Yasushi Kanai, Yoshiyuki Yonemoto,

Osamu Sugita and Norio Ohnuma

Suntory Bio · Pharma Tech Center

We examined a microbiological method (bioassay) and an HPLC method for the determination of SY5555 in biological fluids.

SY5555 in biological fluids was assayed by agar-diffusion microbiological assay using *Bacillus subtilis* ATCC6633 as the test organism and a medium described in the potency test of the Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan (MRAPJ-A : 0.5% peptone, 0.3% meat extract, 1% sodium citrate, and 1.5% agar, pH6.5~6.6) as the growth medium. The minimal detectable concentration of SY5555 in M/15 phosphate buffer (pH7.0) using the bioassay method was 0.05 μ g/ml for the cylinder-plate method and the agar well method, and 0.10 μ g/ml for the paper-disk method. For bioassay of the antibiotic in human plasma, a standard solution of SY5555 should be prepared in human control plasma, because the serum protein binding level of the antibiotic was high. In HPLC deproteinized plasma and diluted urine were directly injected into a reversed-phase (C18) column. The lower limits of detection in human plasma and urine were 0.1 μ g/ml and 2.5 μ g/ml, respectively. SY5555 in human plasma and urine was stable for at least 42 days at temperature of -20°C .