

Biapenem のヒト体液内濃度測定法

柳 孝明・砂川正幸・各務勝義・松本正三・北村正孝
日本レダグリー株式会社製薬製剤研究所*

生体試料中 biapenem(BIPM)の微生物学的定量法(Bioassay法)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法での測定法を確立し,生体試料中 BIPMの安定性を検討した。

Bioassay法では,検定菌として *Staphylococcus aureus* Terajima, 培地に Antibiotic medium 3 (Difco) + Agar 1.5%, (pH 7.0)を用いるアガーウェル法およびカップ法,あるいは,検定菌に *S. aureus* IFO 14607, 培地に Nutrient agar (Difco) + N-Acetyl-D-glucosamine 0.1%を用いるペーパーディスク法による測定方法を確立した。各方法での定量限界はアガーウェル法で0.06 $\mu\text{g/ml}$, カップ法で0.04 $\mu\text{g/ml}$ およびペーパーディスク法で0.06 $\mu\text{g/ml}$ であった。

HPLC法としては ODS カラムを用いた逆相系での測定方法を確立した。HPLC法による定量限界は血漿中0.1 $\mu\text{g/ml}$, 尿中1 $\mu\text{g/ml}$ であった。これら Bioassay法および HPLC法による両測定値には良好な相関性が認められ,相関係数は血漿で0.997, 尿で0.999であった。体液に1M MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid]緩衝液(pH 7.0)あるいは50mM MOPS緩衝液(pH 7.0)+5% Ethylene glycol混液(1:1)を等容量混合した液を試料とし,試料液中での BIPMの安定性を検討した。BIPMは血漿試料中-20°Cで4日間, -80°Cで53日間, 尿試料中-20°Cで7日間, -80°Cで224日間, 胆汁試料中-20°Cで14日間, -80°Cで28日間安定であることが確認された。

Key words: Biapenem, Bioassay, HPLC, LJC 10,905, LJC 10,906, 安定性

Biapenem(BIPM)は日本レダグリー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,優れた抗菌力を有する^{1,2)}。本報では BIPMのヒトにおける体内動態を明らかにするために微生物学的定量法並びに高速液体クロマトグラフィー法による定量法を確立し,併せて生体試料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

BIPM, LJC 10,905および LJC 10,906は,日本レダグリー株式会社にて合成されたものを使用した。

2. 微生物学的定量法(Bioassay法)

1) 検定菌

Staphylococcus aureus Terajima, *S. aureus* IFO 14607, *Escherichia coli* IFO 14605, *S. aureus* IFO 14606 および *Bacillus subtilis* ATCC 12432を使用した。

2) 検定用培地

市販培地の Antibiotic medium 3 (AM3, Difco)に Agar (ニッスイ)を1.5%添加したもの(AM3+Agar)と Antibiotic medium 4 (AM4, 大五栄養)および Nutrient agar

(NA, Difco)に N-Acetyl-D-glucosamine (A, 東京化成)を0.1%添加したもの(NA+A)を使用した。

3) 菌液の調製

S. aureus Terajimaを AM3 + Agar の斜面培地で35~37°C, 16~24時間培養した後,滅菌水に懸濁して OD_{660nm} = 約0.22の懸濁液(約10⁸ CFU/ml)を調製し,予め47~48°Cに保温した AM3+Agar 培地に,0.25%の割合で接種した。

S. aureus IFO14607を NA + Aの斜面培地で,35~37°C, 16~24時間培養した後,滅菌水に懸濁して OD_{660nm} = 約0.8の懸濁液(約10⁹ CFU/ml)を調製し,予め48~50°Cに保温した NA + Aに0.1%の割合で接種した。

4) 標準溶液

BIPMの標準品約25mg(力価)を正確に秤量し,50mM MOPS緩衝液(pH 7.0)で溶解し,1000 μg (力価)/mlの標準原液を調製する。血漿試料用標準液としては,この標準原液を50mM MOPS緩衝液(pH7.0),あるいは50mM MOPS緩衝液(pH 7.0)での血漿2倍または3倍希釈液を用いて希釈系列を調製した。また,尿,胆汁および組織試料については50mM MOPS緩衝液(pH 7.0)を用いて希釈系列を調製した。

* 〒353 埼玉県志木市柏町1-6-34

5) 濃度測定法

a) アガーウェル法

検定菌 (*S. aureus* Terajima) を接種した測定用培地の 10ml を内径 90mm のプラスチックシャーレに分注し、水平固化して寒天平板を作製する。この平板上に直径 8mm の 4 個の穿孔をあけ、各穿孔に試料液あるいは標準液 50 μ l を注入し、冷所 (5 $^{\circ}$ C) に 1 時間放置した後、34~37 $^{\circ}$ C で 16~20 時間培養し、発育阻止円の直径を測定した。

b) カップ法

検定菌 (*S. aureus* Terajima) を接種した測定用培地の 5ml を内径 90mm のプラスチックシャーレに分注し、水平固化して寒天平板を作製する。この平板上に外径 8mm、内径 6mm、高さ 10mm のステンレス鋼製円筒 (カップ) をのせ、試料液あるいは標準液を注入し、室温に 1 時間放置した後、34~37 $^{\circ}$ C で 16~20 時間培養し、発育阻止円の直径を測定した。

c) ペーパーディスク法

検定菌 (*S. aureus* IFO 14607) を接種した測定用培地の 10ml を内径 90mm のプラスチックシャーレに分注し、水平固化して寒天平板を作製する。この平板上に試料液または標準液をしみ込ませた直径 8mm のペーパーディスク (アドバンテック東洋, thick) を貼り付け、冷所 (5 $^{\circ}$ C) に 1 時間放置した後、34~37 $^{\circ}$ C で 16~20 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

HPLC法においては、血漿および尿中の BIPM の他に、BIPM の代謝物である LJC 10,905 および LJC 10,906 の測定方法についても検討した。BIPM、LJC 10,905 および LJC 10,906 の構造式を Fig. 1 に示す。

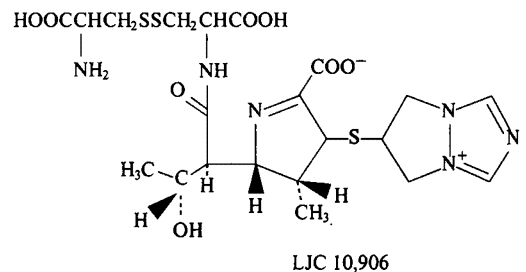
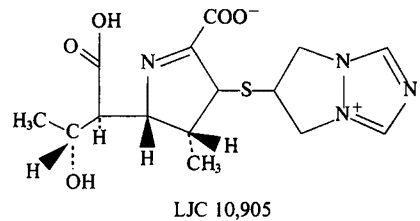
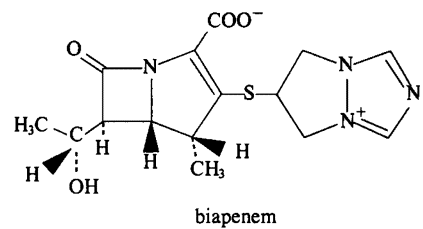


Fig. 1. Chemical structure of biapenem, LJC 10,905 and LJC 10,906

Table 1. HPLC conditions for the assay of biapenem in human plasma and urine

Sample	Plasma	Urine
Column	TSKgel ODS 80TM (4.6mm I.D. \times 250mm, TOSOH)	TSKgel ODS 80TM (4.6mm I.D. \times 250mm, TOSOH)
Mobile phase	0.1M Acetic acid \cdot sodium acetate buffer (pH5.5): CH ₃ CN=197:3	Sodium 1-octanesulfonate(1 \rightarrow 160): CH ₃ CN: CH ₃ OH: CH ₃ COOH= 480: 110: 12: 3
Flow rate	1.2ml/min	1.1ml/min
Column temperature	25 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C
Detection	UV 300nm	UV 310nm

1) BIPM の測定

a) 試料の前処理

体液に安定化剤として 1M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) あるいは 1M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) と 5% Ethylene glycol の 1:1 混液を等容量混合したものを試料とした。

血漿試料では、試料の 0.4ml を量り、内標準物質 5-ヒドロキシインドール-3-酢酸溶液 (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.1ml を加え、さらに氷冷した硫酸アンモニウム溶液 (3 \rightarrow 10) 0.6ml を加え混和した後、遠心分離 (3000rpm, 3min, 4 $^{\circ}\text{C}$) を行い、上清 20 μl を HPLC に注入した。血漿の検量線用標準液は、ヒト blank 血漿と標準希釈系列を用いて調製し、試料と同様に処理した。

尿試料では、試料の 0.4ml に内標準物質 *o*-ニトロアセトアニリド溶液 (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2ml を加え混和した後、その 20 μl を HPLC に注入した。尿の検量線用標準液はヒト blank 尿と標準希釈系列を用いて調製し、試料と同様に処理した。

b) HPLC 測定条件

血漿および尿試料について HPLC 測定条件を Table 1 に示す。

2) 代謝物 LJC 10,905 および LJC 10,906 の測定

a) 試料の前処理

血漿試料では試料 0.4ml にメタノール 0.5ml を加え混和した後、遠心分離 (3000rpm, 3min, 4 $^{\circ}\text{C}$) を行い、得

Table 2. HPLC conditions for the assay of metabolites LJC 10,905 and LJC 10,906 in human plasma and urine

Sample	Plasma	Urine
Column	LiChrosorb NH ₂ (4.6mm I.D. \times 250mm, Merck)	LiChrosorb NH ₂ (4.6mm I.D. \times 250mm, Merck)
Mobile phase	75mM Ammonium hydrogencarbonate buffer (pH 6.8) : CH ₃ CN=40 : 60	50mM* or 75mM** Ammonium hydrogencarbonate buffer (pH 6.8) : CH ₃ CN=40 : 60
Flow rate	1.2ml/min	1.2ml/min
Column temperature	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
Detection	UV 217nm	UV 217nm

* for LJC 10,905

** for LJC 10,906

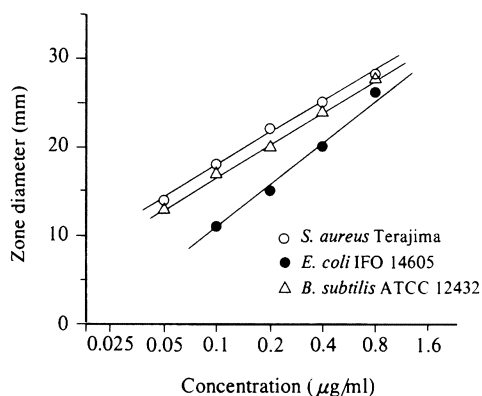


Fig. 2. Comparison of standard curves of biapenem on various test organism by agar well method

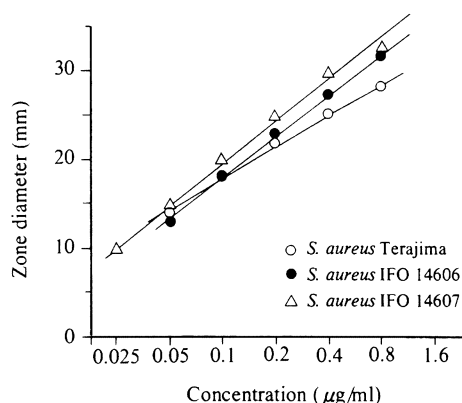


Fig. 3. Comparison of standard curves of biapenem on various test organism by agar well method

られた上清 20 μ l を HPLC に注入した。血漿の検量線用標準液はヒト blank 血漿と標準希釈液を用いて調製し、試料と同様に処理した。

尿試料についても血漿試料と同様に操作した。

b) HPLC 測定条件

血漿および尿試料について HPLC 測定条件を Table 2 に示す。

3) 生体試料中での安定性

BIPM を添加したヒト血漿、尿および胆汁試料を 25 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、氷冷下、-20 $^{\circ}$ C および -80 $^{\circ}$ C に保存した時の経時的な残存率を HPLC 法で測定した。

II. 結 果

1. Bioassay 法の検討

1) 検定菌の選定

BIPM に対する種々の菌種の MIC の結果で感受性の高かった *S. aureus* Terajima, *E. coli* IFO 14605 および *B. subtilis* ATCC 12432 の 3 株を用いて、アガーウェル法での標準曲線の比較を行った (Fig. 2)。その結果、*S. aureus* Terajima を用いると、これら 3 株の中で最も良好な直線性の検量線と、臨床試験に十分対応できる測定感度が得られた。そこで *S. aureus* Terajima を臨床第一相試験³⁾ および前期臨床第二相試験での検定菌として選定した。

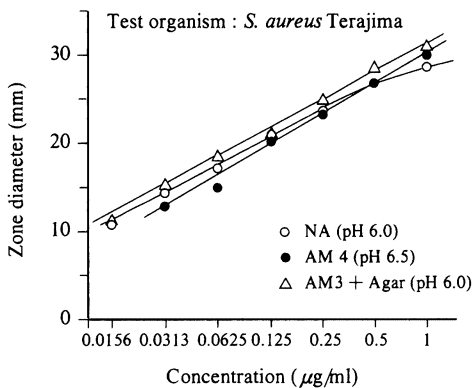


Fig. 4. Comparison of standard curves of biapenem on various test media by agar well method

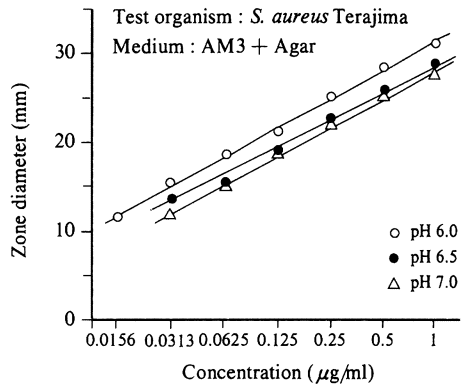


Fig. 5. Effect of medium pH on standard curves of biapenem by agar well method

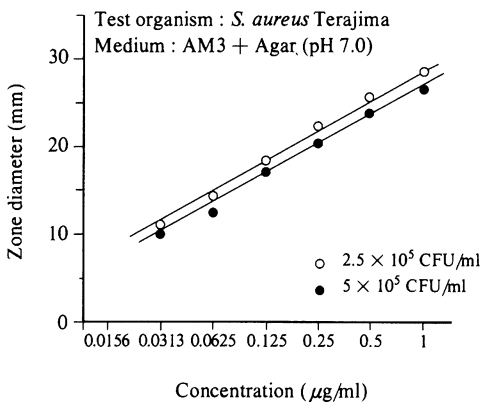


Fig. 6. Effect of inoculum size on standard curves of biapenem by agar well method (*S. aureus* Terajima)

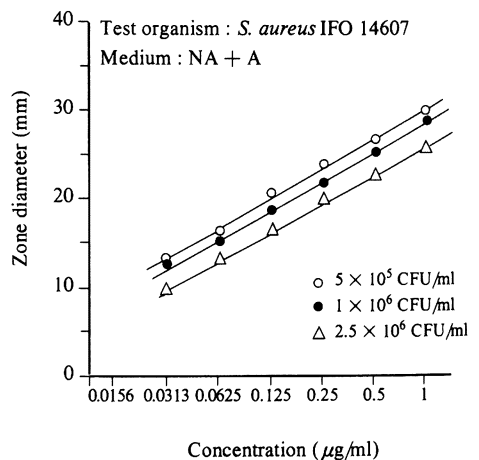


Fig. 7. Effect of inoculum size on standard curves of biapenem by paper disk method (*S. aureus* IFO 14607)

また、後期臨床第二相試験では操作がより簡便であるペーパーディスク法の採用を検討した。ペーパーディスク法はアガーウェル法に比べ検出感度は若干劣るのが一般的である。そこでペーパーディスク法でも十分な検出感度が得られるよう *S. aureus* Terajima より検出感度の高い検定菌の選定を行った (Fig. 3)。*S. aureus* IFO 14607, *S. aureus* IFO 14606 および *S. aureus* Terajima の3株のうちアガーウェル法で最も高い検出感度が得られた *S. aureus* IFO 14607 をペーパーディスク法での検定菌として選定した。

2) 検定培地の検討

S. aureus Terajima を検定菌としたアガーウェル法での

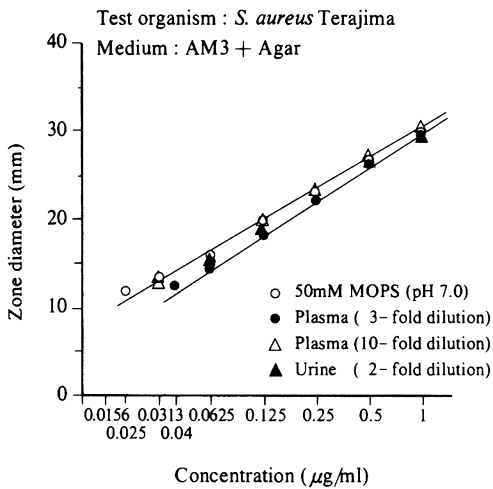


Fig. 8. Effect of plasma and urine on standard curves of biapenem by agar well method

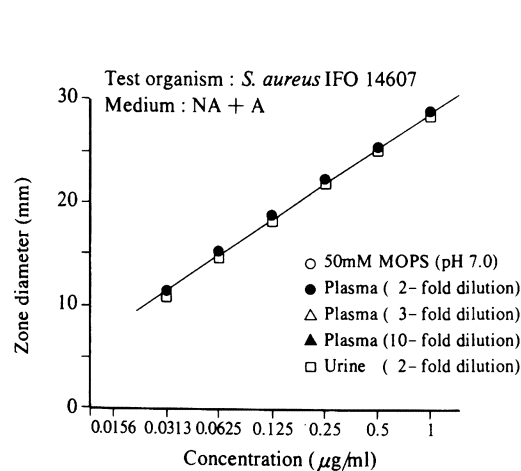


Fig. 9. Effect of plasma and urine on standard curves of biapenem by paper disk method

NA (pH 6.0), AM4 (pH 6.5) および AM3 + Agar (pH 6.0) の3種培地における検量線を比較検討した (Fig. 4)。その結果、どの培地を使用しても検出感度に大差は認められなかったが、AM3 + Agar 培地で、良好な直線性の検量線が得られ、かつ、阻止円も明瞭であった。また、*S. aureus* IFO 14607 を検定菌として用いた場合には NA + A 培地で検出感度が高く、かつ、明瞭な阻止円が観察された。

3) 培地 pH の検討

S. aureus Terajima を検定菌としたアガーウェル法での AM3 + Agar 培地の pH が標準曲線に及ぼす影響を pH 6.0, 6.5 および 7.0 で検討した (Fig. 5)。いずれの pH においても検量線の傾きおよび直線性、さらに、阻止円の鮮明さには大差は認められなかった。そこで、培地の pH としては希釈液および体液の pH を考慮し pH 7.0 が妥当と考えた。

4) 接種菌量の検討

S. aureus Terajima を 2.5×10^5 あるいは 5×10^5 CFU/ml の割合で AM3 + Agar (pH 7.0) 培地に接種し、アガーウェル法で作成した検量線を比較して、接種菌量の影響を検討した (Fig. 6)。その結果から、検出感度、阻止円の明瞭性を考慮し、接種菌量として 2.5×10^5 CFU/ml を選定した。また、*S. aureus* IFO 14607 を検定菌としたペーパーディスク法での接種菌量の阻止円への影響を 5×10^5 , 1×10^6 および 2.5×10^6 CFU/ml で検討した (Fig. 7)。菌量が少いほど阻止円は大きくなるが、阻止円の明瞭性は低下傾向にあった。そこで阻止円の大きさと明瞭性の両方を考慮し、接種菌量を 1×10^6 CFU/ml と選定した。

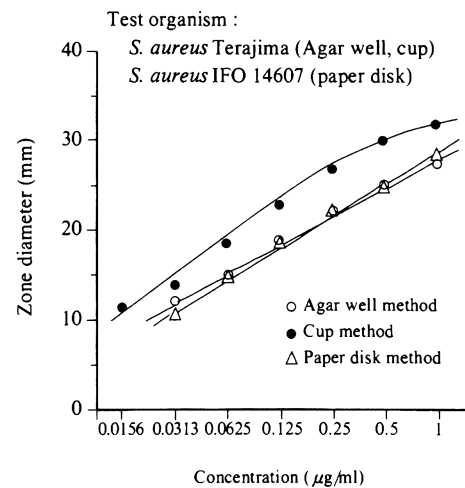


Fig. 10. Comparison of standard curves of biapenem obtained by different methods

5) 希釈液 pH の検討

pH 6.0~7.0 での BIPM の安定性は pH の低い方が若干良好であるが、血漿試料を pH 6.0, 6.5 および 7.0 の 50mM MOPS 緩衝液で 10 倍あるいは 100 倍に希釈すると、pH 6.0 と 6.5 では血漿由来の濁りが生じ、希釈液 pH としては不適當であった。そこで pH 7.0 の 50mM MOPS 緩衝液を希釈液として選定した。なお、50mM および 1M の MOPS 緩衝液を希釈液として使用した場合、阻止円に差は認められなかった。

6) 血漿の影響の検討

S. aureus Terajima を検定菌としたアガーウェル法にお

いて、ヒト血漿・1M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 混液 (1:1, 2 倍希釈液) に 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を加え血漿の 3 倍および 10 倍希釈液を調製し、これら血漿希釈液を用いて作成した検量線を 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いて作成した標準検量線と比較した (Fig. 8)。その結果、血漿の 10 倍希釈液を使用した場合の検量線は標準検量線とほぼ一致した。しかし、血漿の 3 倍希釈液を使用した場合には検量線に血漿の影響が若干認められた。したがって、高濃度の血漿試料では、試料を 10 倍以上に希釈し、標準検量線を用いての測定が可能であるが、低濃度の試料の場合には、血漿希釈液での検量線を用い

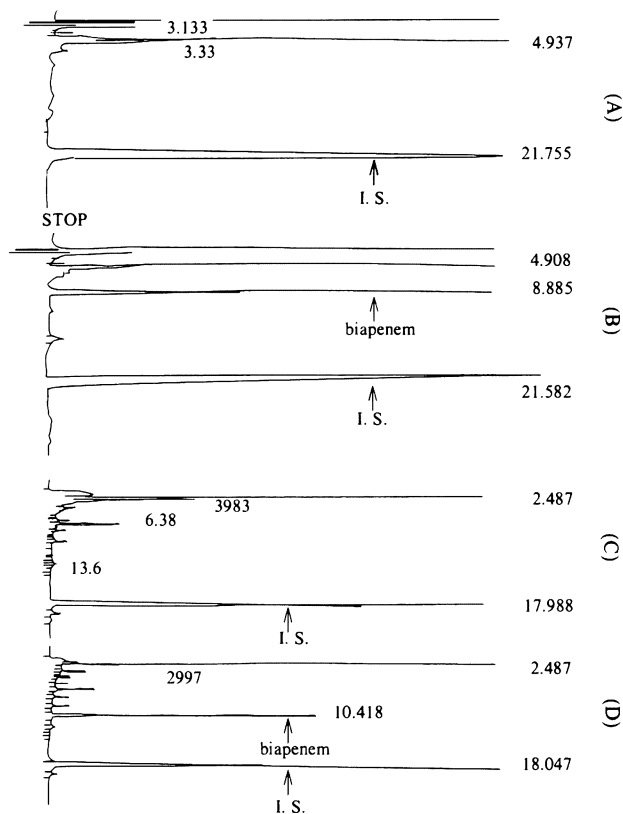


Fig. 11. HPLC chromatogram of biapenem in human plasma and urine.

(A) : blank plasma, (B) : Plasma spiked with biapenem 10 μ g/ml

and I. S., (C) : blank urine, (D) : urine spiked with biapenem 100 μ g/ml and I. S.

での測定が妥当であると考えられた。また、*S. aureus* IFO 14607を用いるペーパーディスク法においては、検量線に血漿の影響は認められなかった (Fig. 9)。

7) 尿の影響の検討

S. aureus Terajimaを検定菌としたアガーウェル法において検量線に及ぼすヒト尿の影響について検討した。ヒト尿・1M MOPS緩衝液 (pH 7.0)混液 (1:1, 2倍希釈液)を

用いて作成した検量線は 50mM MOPS緩衝液 (pH 7.0)を用いて作成した標準検量線と一致した (Fig. 8)。また、*S. aureus* IFO 14607を用いるペーパーディスク法においても、検量線に尿の影響は見られなかった (Fig. 9)。したがって、Bioassay法での尿試料測定には尿試料の希釈倍数に関わらず標準検量線が使用可能であることが明らかとなった。

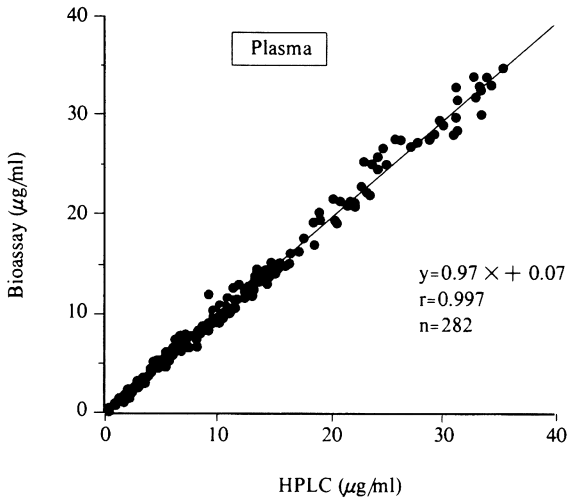


Fig. 12. Correlation between bioassay and HPLC of biapenem in plasma

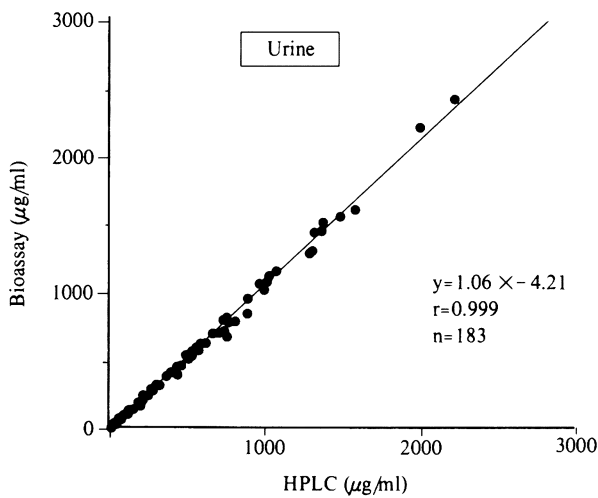


Fig. 13. Correlation between bioassay and HPLC of biapenem in urine

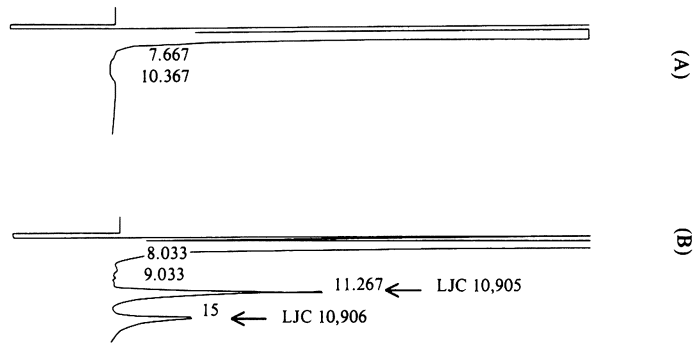


Fig. 14. HPLC chromatogram of LJC 10,905 and LJC 10,906 in human plasma. (A) : blank plasma, (B) : plasma with LJC 10,905 and LJC 10,906 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively

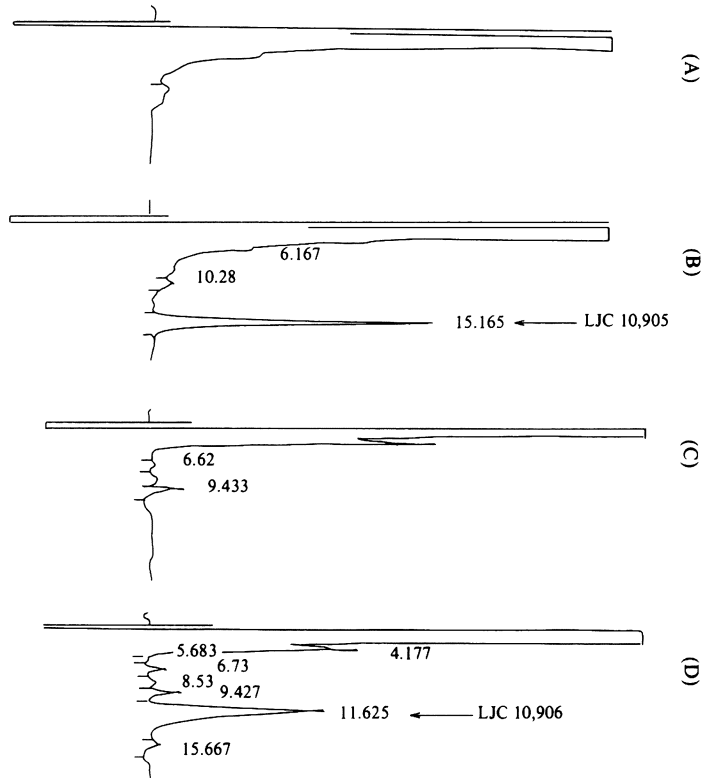


Fig. 15. HPLC chromatogram of LJC 10,905 and LJC 10,906 in human urine. (A) : blank urine, (B) : urine spiked with LJC 10,905 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C) : blank urine, (D) : urine spiked with LJC 10,906 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

8) 測定方法による検量線および検出感度の比較
 検定菌として *S. aureus* Terajima, 検定用培地に AM3 + Agar (pH 7.0) を用いたアガーウェル法, 同検定菌と培地を使用したカップ法および検定菌として *S. aureus* IFO 14607, 検定用培地に NA + A を用いたペーパーディスク法の3方法での検量線と検出感度を比較した (Fig. 10)。カップ法は阻止円が大きく定量限界が $0.04 \mu\text{g/ml}$ と高感度であったが、高濃度域では標準検量線が直線性を示さなかった。一方、アガーウェル法は定量限界が $0.06 \mu\text{g/ml}$ であるが、標準検量線が広範囲で直線であった。また、*S. aureus* IFO 14607 を使用するペーパーディスク

法では定量限界が $0.06 \mu\text{g/ml}$ であり、標準検量線も直線であった。

2. HPLC 法の検討

1) BIPM

ODS カラムを用いる逆相系での HPLC 測定方法を検討した。Table 1 に示す測定条件にすることでヒト血漿試料およびヒト尿試料で生体成分との分離も良く、かつ、良好なピーク形状のクロマトグラム (Fig. 11) を得ることが出来た。BIPM の回収率はほぼ 100% であった。また、定量限界は血漿で $0.1 \mu\text{g/ml}$, 尿で $1 \mu\text{g/ml}$ であった。

BIPM の臨床第一相試験の血漿および尿中濃度を Bioas-

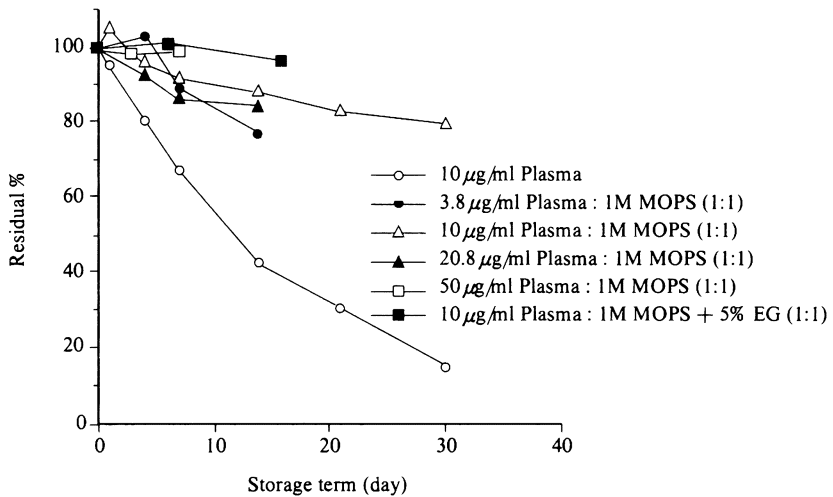


Fig. 16. Stability of biapenem in human plasma at -20°C

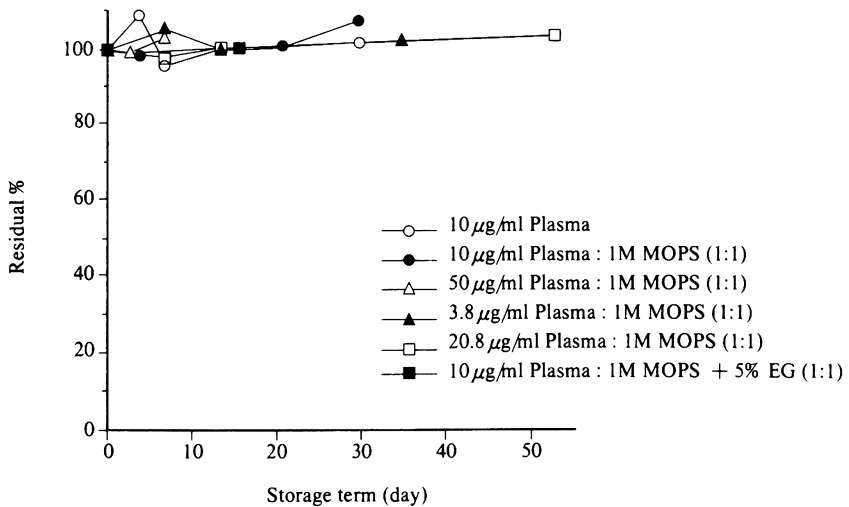


Fig. 17. Stability of biapenem in human plasma at -80°C

say法 (*S. aureus* Terajima を検定菌とするアガーウェル法) および HPLC 法による定量値の相関を検討した (Fig. 12~13)。その結果、相関係数は血漿で 0.997, 尿で 0.999 となり、良好な相関が認められた。

2) 代謝物 LJC 10,905 および LJC 10,906

ヒト血漿およびヒト尿中の LJC 10,905 および LJC 10,906 を HPLC 法で定量した時のクロマトグラムを Fig. 14~15 に示した。血漿および尿成分の妨害ピークは認められず良好な分離を示した。また、LJC 10,905 および LJC 10,906 の回収率もほぼ 100% であった。定量限界は

いずれの代謝物とも血漿で $2\mu\text{g/ml}$, 尿で $10\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 生体試料中での安定性

ヒト血漿, 尿および胆汁中での BIPM の安定性を HPLC 法を用いて検討した。また, 安定化剤として IM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) あるいは IM MOPS 緩衝液 (pH 7.0)・5% Ethylene glycol 混液 (1:1) と検体を 1:1 の割合で混合した際の安定性を検討した。

血漿中の BIPM の安定期間は安定化剤無添加の場合、 -20°C で 1 日間, -80°C では 30 日間であったが, 安定化

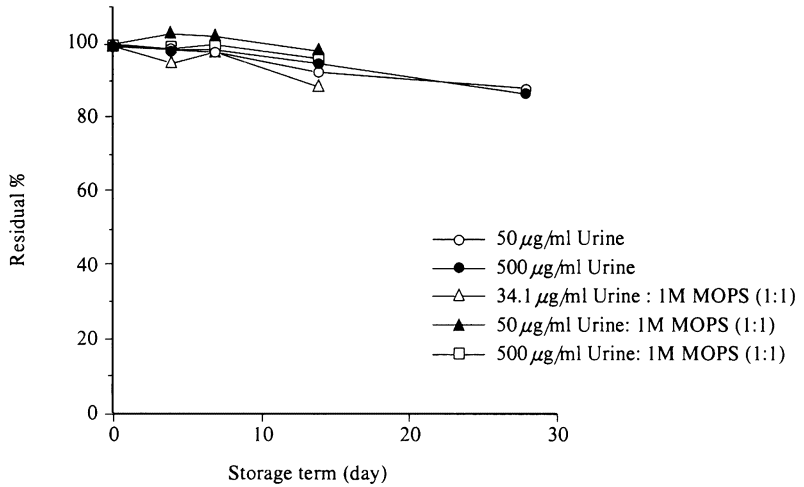


Fig. 18. Stability of biapenem in human urine at -20°C

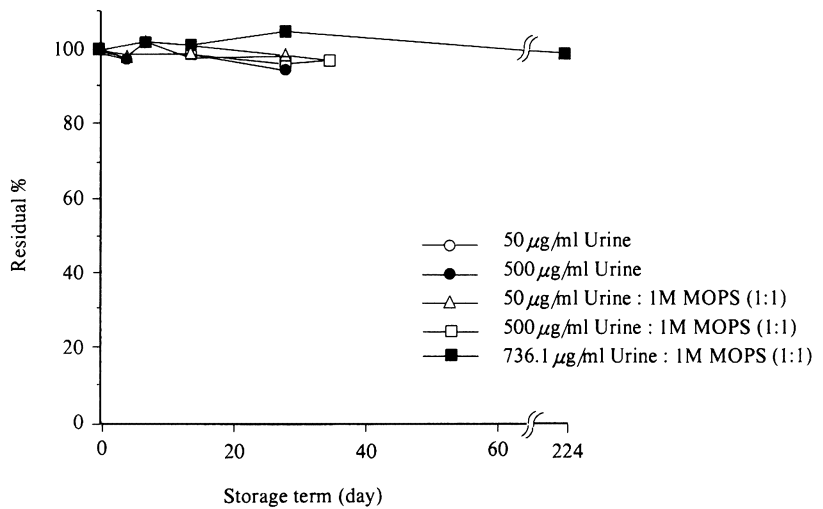


Fig. 19. Stability of biapenem in human urine at -80°C

剤の添加によって -20°C で4日間、 -80°C で53日間に延長した (Fig. 16~17, 20~22)。また、尿中では安定化剤無添加の場合、安定期間は -20°C で4日間、 -80°C では28日間であったが、安定化剤の添加によって -20°C で7日間、 -80°C で224日間に延長した (Fig. 18~22)。また、胆汁中では、安定化剤の添加の条件で、 -20°C で14日間、 -80°C で28日間は安定であった (Fig. 23)。

III. 考 察

BIPMの体内動態を検討するために、Bioassay法およびHPLC法の測定方法を確立した。併せてBIPMの主代

謝物であるLJC 10,905およびLJC 10,906の測定方法としてHPLC法を確立した。

生体試料中のBIPMは、他のカルバペネム系抗生剤と同様にそのままの状態では安定性が十分ではなく分解されやすい。そこで安定化のためにMOPS緩衝液やMES緩衝液等の数種の安定化剤の添加を検討した結果、ImipenemやPanipenemと同様にBIPMの安定化剤としてはMOPS緩衝液が最適であることが判明した。従って、Bioassay法とHPLC法に用いるサンプルについては、いずれもMOPS緩衝液を添加する方法を採用した。

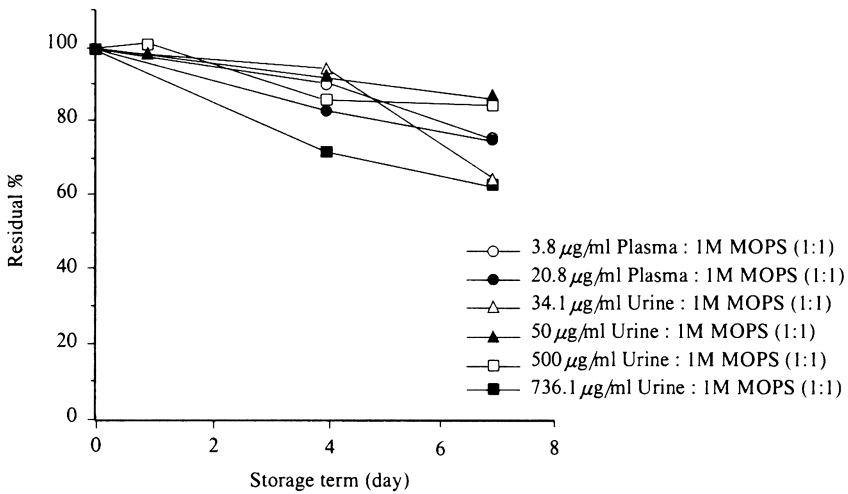


Fig. 20. Stability of biapenem in human plasma and urine at 4°C

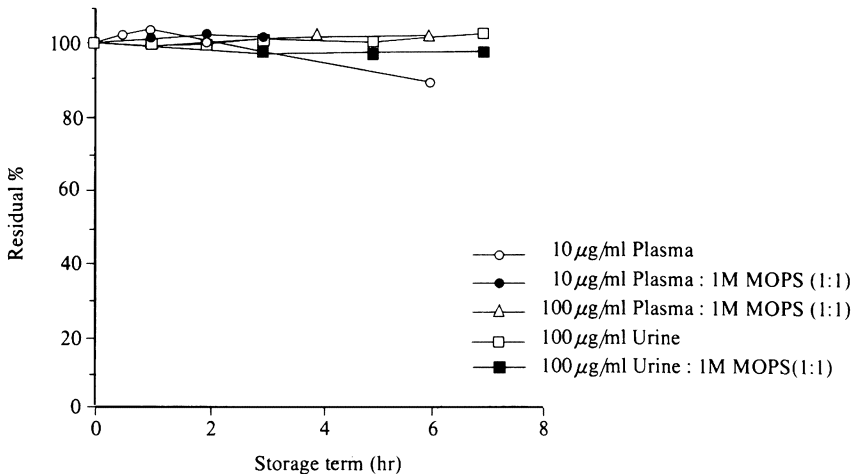


Fig. 21. Stability of biapenem in human plasma and urine under ice water

Bioassay 法における生体試料の前処理としては、MOPS 緩衝液にて希釈する方法のみで試験を行うのに十分な試料溶液が得られた。検出菌として *S. aureus* Terajima, *E. coli* IFO 14605, *B. subtilis* ATCC 12432 等の種々の菌の中から BIPM に高い感受性を示す *S. aureus* Terajima を選定し、アガーウェル法およびカップ法による試験方法を確立した。これらの方法は、いずれも良好な検出感度、直線性、再現性を示した。また、広範囲な臨床試験に簡便に対応出来る試験方法として、BIPM に対し *S. aureus* Terajima より高い感受性を示す *S. aureus* IFO

14607 を用いたペーパーディスク法をも確立した。

HPLC 法では BIPM に広く汎用されている C₁₈ODS カラムを、代謝物 LJC 10,905 および LJC 10,906 に対しては、BIPM より水溶性が高いことから逆相系のアミノカラムを用いた。試料の前処理として、血漿中の BIPM については硫酸アンモニウム溶液を加えて除タンパク処理し HPLC 分析に供した。尿中の BIPM については水を加えて希釈する方法だけで HPLC 分析サンプルとしては十分であった。BIPM の代謝物 LJC 10,905, LJC 10,906 はメタノールを加える除タンパク処理をする方法を採用した。

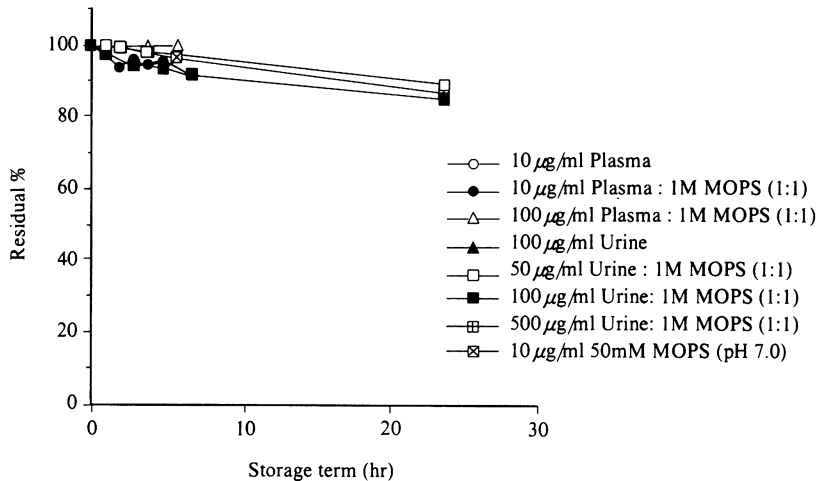


Fig. 22. Stability of biapenem in human plasma and urine at 25 °C

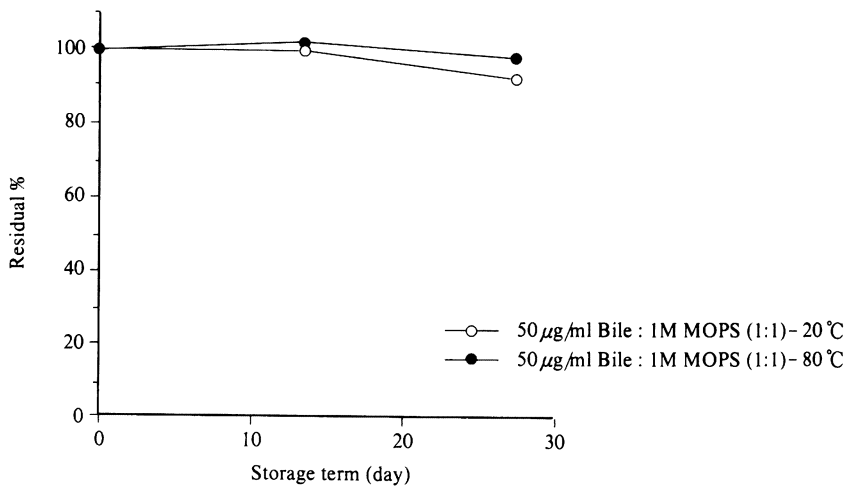


Fig. 23. Stability of biapenem in human bile

いずれの場合も、クロマト上のピーク分離は十分に回収率もほぼ100%を示し、高い定量精度が得られた。

一方、血漿および尿の同一検体での Bioassay 法と HPLC 法における両測定値間には高い相関性が得られた。このことは血漿中および尿中に未変化体以外の抗菌活性を有する代謝物はないことを示唆している。

以上のことより、これらの測定法は、臨床場における薬物モニタリングに十分対応できる有用な方法であると考えられる。

IV. 結 論

以上の検討結果より、BIPM の bioassay 法および HPLC 法による体内濃度測定法を次のように設定した。

1. Bioassay 法

1) 検定菌

S. aureus Terajima あるいは *S. aureus* IFO 14607 を用いる。

2) 検定用培地

検定菌として *S. aureus* Terajima を用いる場合には Antibioc medium 3 (Difco) + Agar (ニ ッ ス イ) 1.5% (pH 7.0) (AM3 + Agar) を、また、*S. aureus* IFO 14607 を用いる場合には Nutrient agar (Difco) + N-Acetyl-D-glucosamine (東京化成) 0.1% (NA + A) を使用する。

3) 接種菌量

S. aureus Terajima を用いる場合には AM3 + Agar で 35~37℃、16~24時間培養した菌液を 0.25% 接種する (最終菌量 2.5×10^5 CFU/ml)。

また、*S. aureus* IFO 14607 を用いる場合には NA + A で 35~37℃、16~24時間培養した菌液を 0.1% 接種する (最終菌量 1×10^6 CFU/ml)。

4) 希釈液

血漿試料には 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) あるいは必要に応じて 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) による血漿 2 倍または 3 倍希釈液を、また尿、胆汁及び組織試料には 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いる。

5) 検定方法

S. aureus Terajima を用いる場合にはアガーウェル法あるいはカップ法を、*S. aureus* IFO 14607 を用いる場合にはペーパーディスク法を用いる。

6) 標準曲線の作成

BIPM を 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で溶解した後、血漿試料の測定においては 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) あるいは必要に応じて 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) による血漿 2 倍または 3 倍希釈液を、また尿、胆汁および組織試料の測定においては 50mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) を用いて調製した標準希釈系列にて標準曲線を作成する。

7) 培養条件

34~37℃ で 16~20 時間培養する。

2. HPLC 法

血漿および尿中の BIPM 濃度は HPLC 法によっても測定できる。HPLC 法と Bioassay 法による測定値は良好な相関性を示す。

3. 生体試料への安定化剤の添加

BIPM 濃度測定用の生体試料は採取後、速やかに 1M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) もしくは 1M MOPS 緩衝液 (pH 7.0) ・ 5% Ethylene glycol 混液 (1:1) の安定化剤を加え、-80℃ に凍結保存することが望ましい。-80℃ で保存すれば少なくとも血漿で 53 日間、尿で 224 日間、胆汁で 28 日間は安定である。

文 献

- Hikida M, Yoshida M, Nishiki K, Furukawa Y, Ubukata K, Konno M and Mitsunashi S: *In vitro* evaluation of LJC 10,627, a new carbapenem antibiotic. Program Abstr 29th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother (Abstr) 221, 1989
- Hikida M, Kawashima K, Nishiki K, Furukawa Y, Nishizawa K, Saito I and Kuwano S: Renal dehydropeptidase-I stability of LJC 10,627, a new carbapenem antibiotic. Antimicrob Agents Chemother 36: 481~483, 1992
- Nakashima M, Uematsu T, Ueno K, Nagashima S, Inaba H, Nakano M, Kosuge K, Kitamura M and Sasaki T: Phase I study of L-627, Biapenem, a new parenteral carbapenem antibiotic. J Clin Pharmacol 31: 70~76, 1993

Assay of biapenem in human body fluids

Koumei Yanagi, Masayuki Sunakawa, Katsuyoshi Kagami,
Shozo Matsumoto and Masataka Kitamura

Chemical & Formulation Research Laboratories, Lederle (Japan), Ltd.
1 - 6 - 34 Kashiwa - cho, Shiki, Saitama 353, Japan

We established microbiological assay (Bioassay) and HPLC methods for biapenem (BIPM) in human body fluids and tissues, and studied on the stability of BIPM in human body fluid samples. The Bioassay methods established for BIPM in human body fluids are agar well and cup plate methods using *Staphylococcus aureus* Terajima as the test organism and Antibiotic medium 3 +1.5 % of Agar (pH 7.0) as the test medium, and paper disk method using *Staphylococcus aureus* IFO 14607 as the test organism and Nutrient agar +0.1% of N - Acetyl - D - glucosamine as the test medium. The quantitation limits of BIPM in agar well, cup and paper disk methods were 0.06, 0.04 and 0.06 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

We also established reverse phase HPLC methods for BIPM in human body fluid samples. The quantitation limits of BIPM by the HPLC methods were 0.1 $\mu\text{g/ml}$ in plasma and 1 $\mu\text{g/ml}$ in urine, respectively. There was a good correlation between the assay values by the Bioassay and the HPLC methods, and the correlation coefficients were 0.997 for plasma samples and 0.999 for urine samples, respectively.

BIPM in the two - fold diluted solutions of human body fluids with 1 M MOPS buffer or 50 mM MOPS buffer +5% ethylene glycol mixture (1:1) were stable for 4 days at - 20 °C and 53 days at - 80 °C in plasma sample, and 7 days at - 20 °C and 224 days at - 80 °C in urine sample, and 14 days at - 20 °C and 28 days at - 80 °C in bile samples, respectively.