

Ritipenem acoxil の bioassay 法による体液内濃度測定法

武田勝男・矢野 茂・平野直光・松下忠弘

大橋元明・山口東太郎

田辺製薬株式会社薬理研究所*

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) の活性体である ritipenem (RIPM) の体液内濃度測定法および体液中での安定性について検討し、以下の結果を得た。

1) *Bacillus subtilis* ATCC12432 を被験菌とし、0.5%クエン酸三ナトリウム・2水和物添加普通寒天培地を用いた RIPM の高感度測定法を設定した。

2) 本法では生体試料に等量の安定化剤 [1M Morpholino-propane sulfonate (pH5.0)/Ethylene glycol (1:1, v/v)] を加える。また、本法のペーパーディスク法による測定下限は血漿、血清、尿試料で 0.04 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3) 安定化剤を加えた試料 (血漿、血清、尿) は -80°C で保存すれば、少なくとも 28 日間は安定であった。

Key words : ritipenem acoxil, ritipenem, bioassay, plasma, serum, urine stability

Ritipenem acoxil (RIPM-AC) はファルミタリア・カルロエルバ社 (現ファルマシア社) で合成された広域抗菌スペクトルをもつエステル型経口ペネム剤である¹⁾²⁾。本剤は生体内で速やかに活性体の ritipenem (RIPM) に変換される。我々は本邦で実施された第一相試験³⁻⁵⁾に関連し、bioassay 法による RIPM の体液内濃度測定法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

RIPM (Lot. Batch : 003/7 ; 870 μg (力価)/mg) はファルミタリア・カルロエルバ社にて合成したものを用いた。

2. 検定菌

Micrococcus luteus ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* ATCC 12432, *Staphylococcus aureus* 209P は本研究所にて継代保存のものを用いた。*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 は日本医学臨床検査研究所 (株) からの分与株を用いた。

3. 検定用培地

市販培地の Antibiotic medium 1 (Difco), nutrient agar (NA, 栄研化学) およびクエン酸三ナトリウム・2水和物 (関東化学) を添加した NA を用いた。なお、クエン酸三ナトリウムは所定量を滅菌前に培地に加えオートクレーブで同時滅菌した。

4. 接種菌の調製

M. luteus ATCC 9341 は、日本抗生物質医薬品基準解説 (日抗基) の調製法に準じて調製し、 10^9 cfu/ml の

菌液を検定用培地に 0.02% (v/v) 接種した。また、*B. subtilis* ATCC 6633 および *B. subtilis* ATCC 12432 は、日抗基記載の *B. subtilis* ATCC 6633 の調製法に準じて 10^9 spores/ml の孢子液を調製し、検定用培地に 0.1% (v/v) 接種した。*S. aureus* ATCC 25923 および *S. aureus* 209P の場合は、NA 培地で 37°C 、一夜斜面培養した菌に滅菌生理食塩水 (10 ml) を加え懸濁し、 10^9 cfu/ml の菌液に調製後、検定用培地 (AM-1) に 0.1% (v/v) 接種した。

5. 標準溶液の調製

RIPM を正確に秤量し、純水を加えて 1000 μg (力価)/ml の標準原液を作製した。

6. 安定化剤

1M 3-(N-Morpholino)propane sulfonate (MOPS, ナカライテスク)/ethylene glycol (関東化学) を 1:1 に混合した。MOPS の pH は 2N NaOH で調製し、安定化剤は -20°C で保存した。

7. 標準希釈液

標準希釈液は、特に断わらない限り、1/2x 安定化剤 (安定化剤に等量の滅菌蒸留水を加えたもの) を用いた。

8. 微生物学的定量法

1) ペーパーディスク法 : 検定菌を接種した培地 7 ml を分注し、水平台で固化させて検定平板 (径 90 mm シャーレ) を作製する。 4°C に約 1 時間放置後、検液 50 μl を浸み込ませたペーパーディスク (Thick, 径 8 mm, 東洋濾紙) を平板上に貼り付け、 37°C 、18~20 時間培養した。

* 埼玉県戸田市川岸 2-2-50

Table 1. Stability of ritipenem in body fluid without a stabilizer

Body fluid	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity (%)			
			0 day	3 day	7 day	14 day
Human plasma	1.0	25	100	0	0	
		4	100	31.3	0	
		-20	100	84.0	68.9	70.6
		-80	100	88.2	75.6	88.2

Paper disk method with blank plasma as the standard solution.

Table 2. Stability of ritipenem in body fluids with a stabilizer³

Body fluid	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity (%)				
			1 day	3 day	7 day	14 day	28 day
Human plasma + stabilizer (1 : 1)	1.0	25	88.2	84.4			
		4	96.8	104			
		-20	104	108	103	103	92.1
		-80					100
Human serum + stabilizer (1 : 1)	1.0	25	107	90.1			
		4	97.9	113			
		-20	115	113	116	106	108
		-80					100
Human urine + stabilizer (1 : 1)	10	25	98.7	87.6			
		4	90.6	93.8			
		-20	95.3	100	97.8	97.8	89.1
		-80					100

Paper disk method with 1/2x stabilizer (MOPS pH 5.0) as the standard solution.

2) Agar well 法：検定平板（培地はシャーレ当り 12 ml）に寒天穿孔機（Zone puncher ZP-SM；システムサイエンス）を用い、内径 8 mm の孔を穿孔した。各穿孔内に検液 50 μl を注入した。

阻止円直径の測定は、自動阻止円測定装置（Zone Analyzer System ZA-FII, システムサイエンス社）を用いた。

9. 保存中の安定性

健康成人の新鮮血を採取、ヘパリン処理にて得た血漿、および、ヘパリン非処理の血清を用いた。尿も同様に健康成人から採取したものを用いた。本文中の Table 1 は試料を一括調製し、所定の日数に残存活性を測定した。残存活性は調製時の測定値を 100% とした時の比較値として示した。また、Table 2 は試料を一括調製し、各温度で所定の日数放置後、 -80°C に保存し、調製時から 28 日目に一括測定した。残存活性は 28 日間、 -80°C の保存試料を 100 とした時の比較値として示した。 -80°C で 28 日間保存した試料の実測値は血漿が $1.04 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ （平均値 \pm SD, $n = 6$ ）、血清が $1.02 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ 、また、尿が $11.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ であった（Table 2）。

II. 結 果

1. 検定菌の選択

Fig. 1 に 5 株の検定菌の検量線を示した。

M. luteus ATCC9341 は、検量線の傾きが大きく、阻止円も鮮明であったが検出感度の点で劣った。一方、*S. aureus* ATCC25923 は傾きおよび検出感度（ $0.08 \mu\text{g/ml}$ ）で優れたが、阻止円の境界が不鮮明であった。また、*B. subtilis* ATCC6633 と *S. aureus* 209P は、検量線の傾き、検出感度とも *B. subtilis* ATCC12432 より劣った。

一方、*B. subtilis* ATCC12432 は検出感度、阻止円の鮮明さの点で最も優れたことから、この株を RIPM の検定菌に選定した。

2. 培地の選択

Fig. 2 に NA 培地にクエン酸三ナトリウムを添加した時の阻止円に及ぼす影響を示した。阻止円はクエン酸三ナトリウムの添加量に伴い大きくなり、検出感度も高まった。なお、クエン酸三ナトリウム濃度を 1.0% とした時、菌の生育に影響が見られた。これより、検定用培地には 0.5% クエン酸三ナトリウム添加 NA 培地を用いることとした。

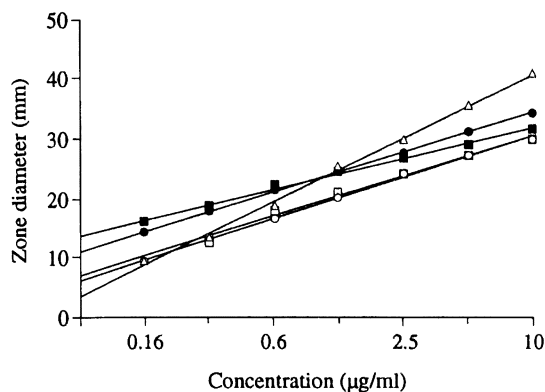
3. 安定化剤の pH

安定化剤の組成である MOPS の pH を変動させた時の阻止円に及ぼす影響を Fig. 3 に示した。低濃度域（ $0.04 \mu\text{g/ml}$ ）で比較した時、MOPS の pH 5.0 が最も大きな阻止円を示した。これより以後の実験では、安定化剤の pH を 5.0 とした。

4. 培地の pH

これまでの実験は pH 6.6 (滅菌前) の検定培地で検討した。Fig. 4 に pH を調整しない検定培地 (pH7.0

付近) の阻止円と調製したそれとを比較して示した。両者の検量線はほぼ一致したことから、以後、検定培地は pH 無調整とした。



- *B. subtilis* ATCC 12432 (NA, pH6)
- *B. subtilis* ATCC 6633 (NA, pH6)
- *S. aureus* ATCC 25923 (AM-1, pH5)
- *S. aureus* 209P (AM-1, pH5)
- △ *M. luteus* ATCC 9341 (AM-1, pH7)

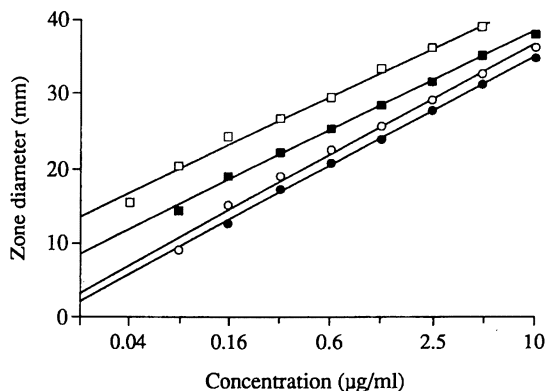
Fig. 1. Standard curves of ritipenem on various test organisms

Diluent : Distilled water

Medium : NA, Nutrient agar(Eiken)

AM-1, Antibiotic medium 1 (Difco)

Paper disk method



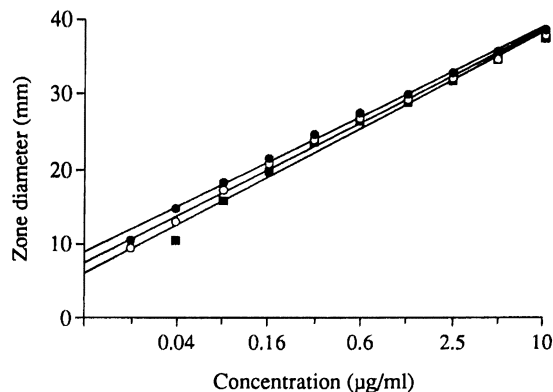
- Nutrient agar (pH6.6)
- +0.1%TCD (pH6.6)
- +0.3%TCD (pH6.6)
- +0.5%TCD (pH6.6)

Fig. 2. Effect of medium supplemented with trisodium citrate dihydrate (TCD) on standard curves of ritipenem

Test organism : *B. subtilis* ATCC 12432

Diluent : 1/2x Stabilizer(pH 6.8)

Paper disk method



pH of Stabilizer

- MOPS (pH5)
- MOPS (pH6)
- MOPS (pH7)

Fig. 3. Effect of pH of stabilizer as a diluent on standard curves of ritipenem

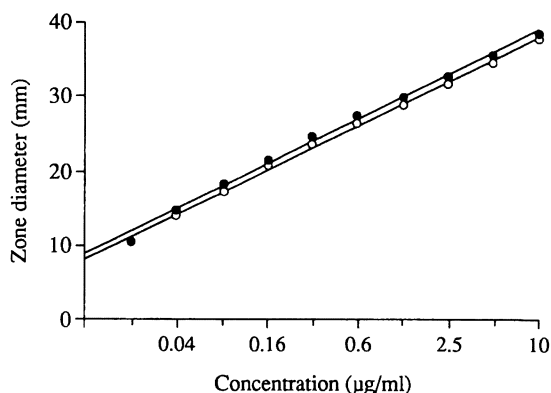
Test organism : *B. subtilis* ATCC 12432

Medium : Nutrient Agar+0.5% Trisodium citrate dihydrate(pH 6.6)

Stabilizer : 1M MOPS: Ethylene glycol(1:1)

Diluent : 1/2x Stabilizer

Method : Paper disk method



- Medium (pH6.6)
- not adjusted (ca. pH7.0)

Fig. 4. Effect of pH in assay medium on standard curves of ritipenem

Test organism : *B. subtilis* ATCC 12432

Medium : Nutrient Agar+0.5% Trisodium citrate dihydrate

Diluent : 1/2x Stabilizer(pH 5)

Method : Paper disk method

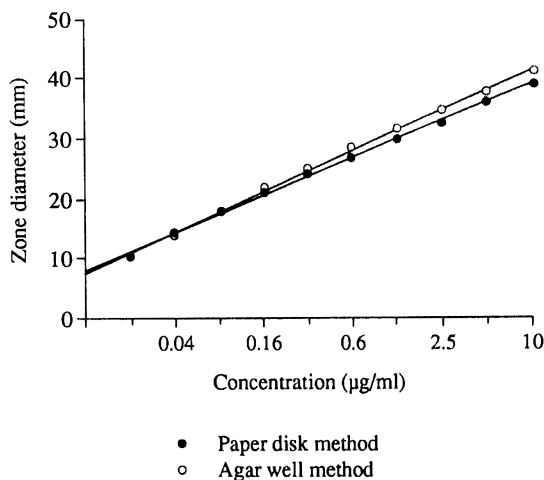


Fig. 5. Standard curves of ritipenem with different methods

Test organism : *B. subtilis* ATCC 12432
 Medium : Nutrient Agar + 0.5% Trisodium citrate dihydrate (pH not adjusted)
 Diluent : 1/2x Stabilizer (pH 5)

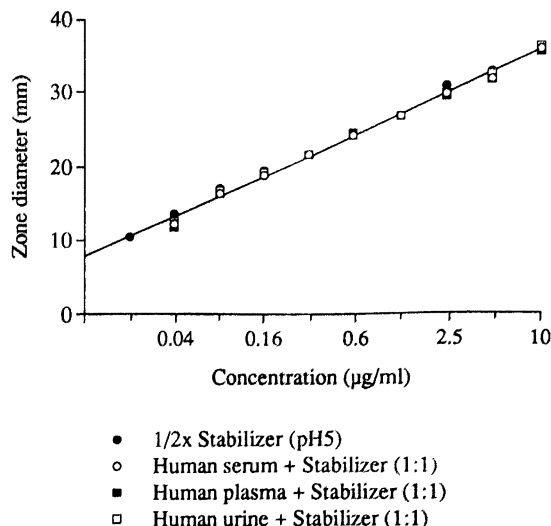


Fig. 6. Effect of human body fluids on standard curves of ritipenem

Test organism : *B. subtilis* ATCC 12432
 Medium : Nutrient Agar + 0.5% Trisodium citrate dihydrate (pH not adjusted)
 Method : Paper disk method

5. 測定法の比較

Fig. 5 にペーパーディスクおよび agarwell 法での検量線を比較して示した。いずれの方法でも測定感度 ($0.04 \mu\text{g/ml}$) に差はなかった。

6. 血漿・尿の影響

Fig. 6 に ヒト血漿、血清および尿の検量線に及ぼす影響を示した。等量の安定化剤を加えた時の検量線は 1/2x 安定化剤で作成した検量線とほぼ一致した。

7. 保存中の安定性

RIPM をヒト体液中で保存した時の安定性について検討した。安定化剤を添加しない場合、RIPM は血漿存在下で失活した (Table 1)。これに対し、安定化剤を添加した時、RIPM の保存中の安定性は向上した (Table 2)。28 日間保存した時、ヒト血漿、血清、尿中の RIPM は -80°C で安定であった (Table 2)。

Ⅲ. 考 察

生体試料中の薬剤濃度を測定する場合、試料中での薬剤の安定性について配慮する必要がある。カルバペネムの imipenem⁸⁾, meropenem⁷⁾, panipenem⁹⁾ の場合、血漿、尿試料中に安定化剤を加え、薬剤の分解を防ぐ工夫がなされている。RIPM の場合も、試料への安定化剤の添加が必要である。

本剤の第一相試験^{3) 4)} において、血漿、尿試料は採取後、直ちに安定化剤を添加し、測定時まで低温 (-80

$^\circ\text{C}$) で保存した。本剤の活性体 RIPM の bioassay 法については、既に、*M. luteus* を検定菌とした測定法がある³⁾。我々は第一相試験の過程でさらに測定法の検討を行い、Table 3 に示した高感度測定法を設定した。本報告はこれをまとめたものである。

Table 3 に示した測定法は初期の方法に比べ 8 倍測定感度が優れる。両者の主たる違いは検定菌、検定培地、安定化剤である。本法での検定菌は測定感度のよい *B. subtilis* ATCC12432 を選定し (Fig. 1), 検定培地はクエン酸三ナトリウムを添加することでさらに測定感度を高めた (Fig. 2)。クエン酸三ナトリウムの添加濃度は 0.5% が適切で 1.0% では検定菌の生育に影響を及ぼす。

安定化剤は、初期の安定化剤 [1M MOPS (pH6.8) : ethylene glycol / 1 : 1] の MOPS の pH を 5.0 に変更した。この理由は、bioassay での測定感度が高まることによる (Fig. 3)。また、本法では、できるだけ簡便に行えるよう培地の pH は無調製で問題ないことを確認した (Fig. 4)。

臨床検体の中には、試料に安定化剤を添加できない場合もある。Table 1 に示す如く血漿中で RIPM は不安定であった。一方、試料に等量の安定化剤を加え -80°C で保存した時、少なくとも 28 日間は安定であった (Table 2)。

Table 3. Standardization of bioassay for ritipenem in body fluids

Method	Paper-disk	Agar well
Test organism	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 12432	
Inoculum size	1×10^6 spores/ml	
Medium	Nutrient agar (Eiken) +0.5% Trisodium citrate dihydrate (pH not adjusted)	
Assay range	0.019~10 μ g/ml	
Stabilizer	1 M MOPS (pH 5.0)/Ethylene glycol (1 : 1, v/v)	
Standard solution	plasma or serum : plasma/stabilizer (1 : 1) serum/stabilizer (1 : 1) or 1/2x stabilizer other body fluids : 1/2x stabilizer	
Incubation	37°C, 18~24 hours	

1/2x Stabilizer : stabilizer/distilled water (1 : 1, v/v)

以上, Table 3 に示した RIPM の高感度測定法を設定した。第一相試験における本法と HPLC 法の測定値はよく相関した⁹⁾。

文 献

- Franceschi G, Foglio M, Alpegiani M, Battistini C, Bedeschi A, Perrone E., Zarini F and Arcamone F : Synthesis and biological properties of sodium (5R, 6S, 8R)-6 α -hydroxyethyl-2-carbamoyloxymethyl-2-penem-3-carboxylate (FCE 22101) and its orally absorbed esters FCE 22553 and FCE 22891. J. Antibiot. 36 : 938~941, 1983
- Mitsunashi S and Takagi S : *In vitro* antibacterial activity of FCE22101 and its stability to β -lactamases. Penem Antibiotics, ed. by S. Mitsunashi and G. Franceschi, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, pp. 13~39, 1991
- 熊澤浄一, 浦江明憲, 天本敏明, 入江伸 : 新ペネム系抗生物質, Ritipenem acoxil の臨床第 I 相試験 (第 1 報)。(日本化学療法学会雑誌 投稿予定)
- 柴 孝也, 坂本光男, 中沢 靖, 前沢浩美, 吉川晃司, 吉田正樹, 酒井 紀, 斎藤 篤 : Ritipenem acoxil に関する臨床的検討。日本化学療法学会雑誌 43 (S-3) : 134~139, 1995
- 小野憲昭, 藤田竜二, 渡辺豊彦, 竹中 皇, 門田晃一, 宇埜 智, 櫻本耕司, 林 俊秀, 畠 和宏, 那須良次, 津川昌也, 公文裕巳, 大森弘之, 入江伸, 金重哲三 : Ritipenem acoxil の体内動態の検討 - Cefotiam hexetil との比較 -。日本化学療法学会雑誌 43 (S-3) : 286~291, 1995
- 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液内濃度測定法による体液内濃度測定法に関する検討。Chemo-therapy 33 (S-4) : 275~289, 1985
- 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 : Meropenem のヒト体液および組織内濃度測定法。Chemotherapy 40 (S-1) : 114~122, 1992
- 久岡正史, 市川正人, 寺尾俊雄 : Panipenem の bioassay 法による体液内濃度測定法に関する検討。Chemotherapy 39 (S-3) : 190~196, 1991
- 松岡正之, 細身律子, 真木照雄, 伴野清, 佐藤忠司 : 高速液体クロマトグラフィーによる ritipenem のヒト血漿および尿中濃度測定法。日本化学療法学会雑誌 43 (S-3) : 91~96, 1995

Microbiological assay method for ritipenem, an active form of a new oral penem, ritipenem acoxil, in human body fluids

Katsuo Takeda, Shigeru Yano, Naomitsu Hirano,
Tadahiro Matsushita, Motoaki Ohashi and Totaro Yamaguchi
Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd.
Toda, Saitama 335, Japan

A microbiological assay procedure has been developed for the determination of ritipenem, an active form of ritipenem acoxil, in human plasma and urine.

1) Drug concentrations were determined by *Bacillus subtilis* ATCC 12432 as the test strain and nutrient agar supplemented with 5 % trisodium citrate dihydrate as the test medium.

2) For the quantitative determination of ritipenem, an equal volume of a stabilizer, 1 M MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid](pH 5)/ethylene glycol (1 : 1), was added to plasma, serum and urine samples. The lowest detectable concentration of ritipenem was 0.04 μ g/ml, when measured by a paper disk method.

3) The activity of ritipenem in human body fluids mixed with an equal volume of the stabilizer was unchanged during 28 days' storage at -80°C .