

Doxycycline の体液中濃度測定法、感受性ディスク法ならびに臨床経験

金沢 裕・倉又 利夫

新潟 鉄道 病院

Tetracycline の新誘導体 Doxycycline についての、臨床検査としての体液中濃度測定法、ディスクによる感受性測定法について検討し、臨床的治療効果についても多少の経験を重ねたので報告する。

体液中濃度測定法

私どもがすでに各種の化学療法剤の体液中濃度測定法として、たびたび報告した薄層カップ法(宮村)¹⁾を適用した。

実験方法

検定菌: *B. subtilis* PCI 219 芽胞液, 約 10^8 /ml に芽胞を含有するように調製使用した。

培地: 感受性ディスク用培地, pH 6.5 に調製。

検定平板作製: 溶解して 50°C 前後に保つた上記寒天培地に, 検定菌浮游液を 1% に加えて混和し, 水平におかれた底の平らな規格型ペトリ皿に 5 ml ずつ分注する。

標準ならびに被検体の調製: 血清は pH 6.5 の M/15 磷酸 Buffer で 3 倍に希釈, 尿も 40 倍程度に同様 Buffer で希釈した。血清の標準サンプルは化学療法剤の投与をうけていない人の血清(血漿)で, 検体と同様にして調製し, 8, 2, 0.5, 0.125, 0.031 mcg/ml の 4 倍希釈系列をつくつた。

培養: 寒天平板上にカップを立て, 標準ならびに被検体を充たし, 冷所に 4 時間放置したのち 37°C に培養する。

濃度測定: 現われた阻止円直径を直角 2 方向から 0.5 mm まで測定し, その平均値を求める。半対数方眼紙上に標準サンプルの測定値の座標をとり, 標準曲線を描き, その上に被検体の阻止円の大きさに相当する濃度を求めて被検体濃度とする。

実験成績

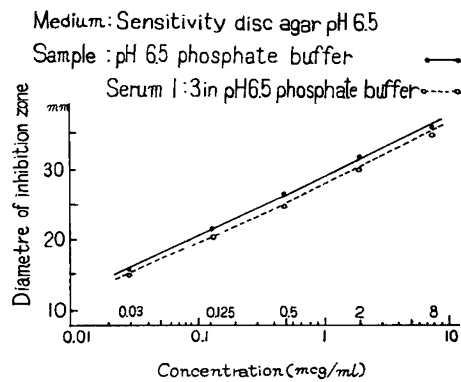
薬剤濃度と阻止円の関係: 血清に標準力価の Doxycycline を含有させて本法を行なつた。Fig. 1 に示すように 8.0~0.031 mcg/ml の間にはほぼ直線関係が成立し, 0.031 mcg/ml 以上が十分測定しうることがみとめられた。したがって通常のカップ法の方式によつて未知

濃度を推定することができるわけである。

薬剤投与時の体液中濃度測定成績: 100 mg 服用後の血清中濃度。3 名について測定した成績は, Fig. 2 のように, そのピークは 4 時間程度 1.5~2.4 mcg/ml で, 24 時間以上にわたり 1.1 mcg/ml 以上の濃度が証明された。また 100 mg 宛 8 時間毎連続服用中の血中濃度は, 5.0~7.4 mcg/ml 程度の蓄積による高値を示し, また喀痰中にも十分有効濃度が証明された (Fig. 3)。

尿中排泄は Fig. 4 のように 100 mg 服用後の濃度は 10 mcg/ml 以下で, 24 時間の回収率は 20% 程度であつた。

Fig. 1 Relation between concentration of doxycycline and diameter of inhibition zone by the thin agar cylinder plate method



Concentration mcg/ml	Diameter of inhibition zone* in mm	
	In pH 6.5 phosphate buffer	Serum 1:3 in pH 6.5 phosphate buffer
8	37.75 ± 0.58	35.00 ± 0.62
2	31.12 ± 0.48	30.25 ± 0.41
0.5	26.25 ± 0.37	25.50 ± 0.45
0.125	20.75 ± 0.45	20.25 ± 0.36
0.0312	15.37 ± 0.38	15.25 ± 0.25

* mean value and confidential limit ($\alpha = 0.05$)
by 8 plates

Fig. 2 Serum concentration (mcg/ml) after single oral dosage of 100 mg doxycycline in 3 adults

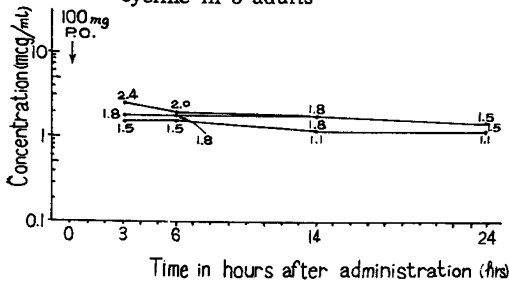


Fig. 3 Concentration in serum, urine and sputum after continuous administration of 100 mg doxycycline 8 hourly in a case of lung abscess

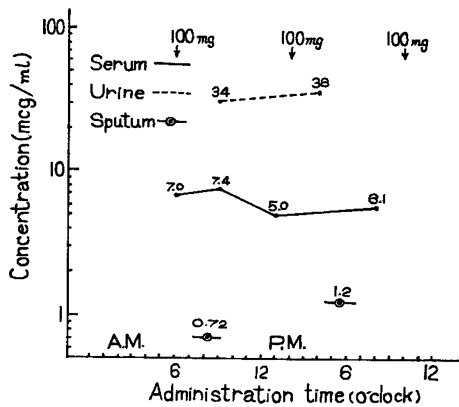
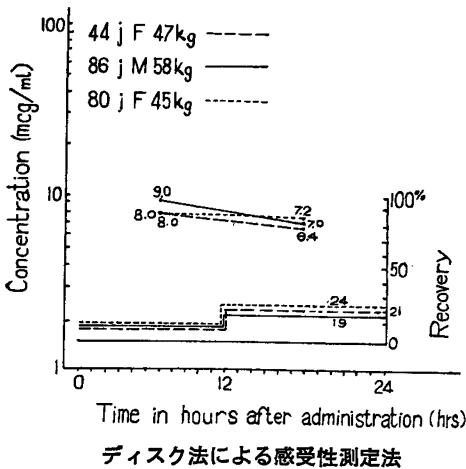


Fig. 4 Urinary concentration and urinary recovery after single dosage of 100 mg doxycycline



ディスク法による感受性測定法

つぎに臨床検査としての感受性ディスク法に検討を加えた。Doxycycline などのように新しく出現した薬剤の

臨床的感性、耐性に相当する最小発育阻止濃度 (MIC) の基準は全く不明で、多くの起因菌についての MIC と薬剤投与による臨床効果の集計の上に、将来定めらるべきものであり、必ずしも根拠の明らかでない薬剤量を含有するディスクにより +、- などの成績のみが検査室から天降り式に臨床家におしつけられるべきものではなく、適当に規定された実験条件での MIC を推定することが臨床的感受性検査の目的と考えられる。私ども²⁾³⁾⁴⁾ は単一ディスク (single disc) を用いる定量測定をふくめて、化学療法剤の感受性測定法についてたびたび報告してきた。今回は Doxycycline についても本法が適用されるかについて検討した。

実験材料

培地: つぎのような組成の粉末寒天培地 (感受性ディスク用培地: MUELLER-HINTON 変法)³⁾⁴⁾⁵⁾ を用いた。

Heart infusion	300 ml
Casamino acid	16.5 g
Starch	1.5 g
Glucose	2 g
L-Tryptophane	0.05 g
L-Cystine	0.05 g
Biotine	0.000005 g
Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml
pH 7.3~7.4	NaCl 濃度: 0.8%

5% 血液添加または非添加

供試菌株: Fig. 5 に示すように、臨床検査の対象になることが多いと考えられる 19 種 109 株を用いた。

実験方法ならびに実験成績

稀釈法による MIC 値測定: Doxycycline の 2 倍稀釈系列 (400, 200, 100, 50, mcg/ml) 濃度含有の寒天平板培地上に発育がよく、コロニー形成の比較的早い菌は、寒天平板 cm² 当り 10⁸~10⁴ 程度、コロニー形成のややおそい菌は、cm² 当り 10⁴~10⁸ 程度に接種した。37°C に 16~24 時間培養し、肉眼的に発育阻止濃度を測定し、約 6 回繰返して得た値の幾何平均の $\frac{1}{\sqrt{2}}$ を最も信頼すべき最小発育阻止濃度 (MIC) 値とした。

血液添加の影響: Table 1 に示すような菌株を用いて、脱フィブリンメン羊血液を 5% 添加、非添加の際の MIC 値の変動を検し、5% 血液添加で、平均 1.43 程度 MIC 値に変動がみられた。

ディスク法の実施: 内径 85~90 mm の規格型ペトリ皿に培地を 20 ml ずつ分注し、水平に固めた。供試菌

Fig. 5 Microorganisms employed for constructing regression lines and their sensitivities against doxycycline expressed in terms of MIC*

Organisms employed	No. of Strains	$\log \text{MIC} - \log 400/2^{**}$													
		14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	24					•••				••	••	••	••	••	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12					•••				••	••	••	••	••	
† <i>Diplococcus pneumoniae</i>	7										••	••	••	••	
† β -hemolytic streptococci (Group A)	9										••	••	••	••	
† α -hemolytic streptococci	4										••	••	••	••	
† <i>Enterococci</i>	5										•••••				
† <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	5										••	••	••	••	
†† <i>Hemophilus influenzae</i>	3							••							
† <i>Bordetella pertussis</i>	1											••			
† <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2												••		
† <i>Neisseria meningitidis</i>	1													••	
<i>Escherichia coli</i>	5										••	••	••	••	
<i>Klebsiella</i>	5								••	••	••	••	••	••	
<i>Enterobacter</i>	4								••	••	••	••	••	••	
<i>Citrobacter</i>	1										••				
<i>Salmonella</i>	3										••	••	••	••	
<i>Shigella</i>	3										••	••	••	••	
<i>Serratia</i>	1														••
<i>Proteus-Providencia</i>	3										••	••	••	••	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11					••	••	••	••	••	••	••	••	••	••
Total	109	282	142	70.9	35.4	17.7	8.85	4.42	2.21	1.10	0.552	0.676	0.137	0.0689	0.0344

Confidential MIC value ($\frac{\text{geometrical mean}}{\sqrt{2}}$ of so-called MIC obtained by the 2-fold agar dilution method): mcg/ml

* MIC was obtained by the 2-fold agar dilution method after 16-24 hours incubation
 ** Agar medium used: Modified MUELLER-HINTON agar pH 7.4
 † " " " with 5% sheep blood
 †† Chocolate agar
 Inoculum size: approximately $10^3 - 10^4 / \text{cm}^2$
 ††† " $10^4 - 10^5 / \text{cm}^2$

Table 1 Influence of adding sheep blood on the MICs of doxycycline obtained by the 2-fold agar dilution method

Strains employed:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
<i>Enterococci</i>	6
α -hemolytic streptococci	2
<i>Escherichia coli</i>	6
Total	50
Ratio of MIC	Number of data obtained
($\frac{\text{with blood}}{\text{without blood}}$)	
4	2
2	23
1	24
1/2	1
1/4	0

Geometrical mean ≈ 1.43

コロニーの 1~2 白金耳程度を 1 ml の滅菌水または broth に懸濁し、ブドウ球菌、腸内細菌の場合はその 1 白金耳を、淋菌、ヘモフィルス、レンサ球菌、肺炎球菌などはその 10 白金耳程度を 0.5 ml に懸濁し、その 1 白金耳を 1 枚の寒天平板上におとし、20 個程度の小ガラス玉をゆりうごかして均等に拡げる。この際の接種菌量は前者では cm^2 当り $10^3 \sim 10^4$ 程度、後者では $10^4 \sim 10^5$ 程度のことがたしかめられている。

ディスクをおいて直ちに培養し、16 時間後に阻止円直径を計測する (簡易法)。

寒天平板 cm^2 当り $10^6 \sim 10^7$ 程度に濃厚に菌を接種して、3~4 時間で阻止円の出現した場合、5~6 時間で阻止円の出現した場合に分けて判定する (迅速法)。

簡易法の 1/10 程度に菌を接種し、28°C 程度で培養して、16 時間で阻止円が出現せず、24 時間以内で阻止円の出現した菌株についてのみ阻止円を計測する (遅延判定)。

ディスク薬剤含有量: Doxycycline の臨床的耐性下限として、普通量投与時の尿中濃度の下限である 50

Table 2 Regression equation representing the relationship between MICs and diameters of inhibition zones and range of deviation of MICs by disc method from MICs by the agar dilution method

Method (Incubation time in hours)	No. of data employed	Regression equation	Range of deviation by disc method expressed in terms of rejection limit*, ** ($\alpha=0.05$)					
			Range of diameter of inhibition zone in mm					
			8	20	30	40	50	60
Conventional (approx. 16 hrs)	654	25.4-9.5 log MIC	2.8~ 0.36	2.8~ 0.36	2.8~ 0.36	2.8~ 0.36		
delayed determination (approx. 24 hrs)	216	30.5-11.7 log MIC	2.9~ 0.34	2.8~ 0.36	2.8~ 0.36	2.8~ 0.36	2.9~ 0.39	
Rapid method (6 hrs)	216	21.8-8.1 log MIC	3.1~ 0.32	3.0~ 0.33	3.0~ 0.33	3.1~ 0.32		
(4 hrs)	216	18.2-6.5 log MIC	3.3~ 0.30	3.2~ 0.31	3.2~ 0.31			

* Rejection limit was obtained by following formula

$$\pm t_{0.05} \sqrt{S^2 y \times \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S^2 x} \right)}$$

Where, x : diameter of inhibition zone

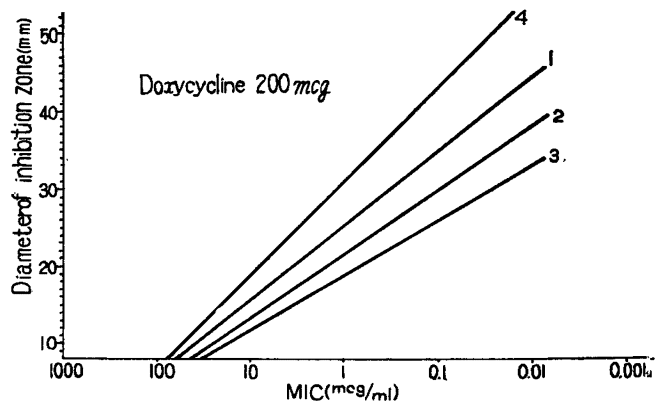
$$y: \frac{\log \text{MIC} - \log 400/2^{14}}{\log 2}$$

t : t-distribution coefficient of student

S^2 : variance from regression line

** Where MIC obtained by the agar dilution method is taken as 1.0; $\alpha=0.05$

Fig. 6 Standard curves representing the relationship between the size of inhibition zones and MICs



mcg/ml 程度の MIC の菌に対して阻止円を生ずるのが適当と考えられる。予備実験で 200 mcg 含有ディスクがこの目的にかなうという成績がえられたので、以下200 mcg 含有ディスクを用いることにした。

阻止円の計測：上述のそれぞれの方法によつて現われた阻止円直径を直角2方向から計測し、平均値を求めた。また迅速法では、4時間以内に肉眼的に十分な阻止円の現われた場合と、6時間以内の場合の2つのグループに分けて阻止円直径を計測した。

標準曲線の調製：普通法は6回、迅速法、遅延法は2回に分けて実施し、それぞれの菌種の阻止円直径の平均値を求めた。ついで半対数方眼紙上に阻止円直径

Disc: 8 mm in diameter; water absorption; 0.027 ± 0.004

Conventional method

usual determination (about 16 hours incubation)(1)

delayed determination (about 24 hours incubation).....(4)

Rapid method

3~4 hours incubations with heavy inoculum.....(3)

5~6 hours incubations with heavy inoculum.....(2)

Table 3 Range of MIC values obtained by the 2-fold agar dilution method expressed in terms of rejection limit

No. of organisms employed (n/6)	No. of data employed (n)	Rejection limit* ($\alpha=0.05$)
109 strains of bacteria	654	2.2~0.45

* Where sample mean is taken as 1.0

$$\text{Rejection limit: } M \pm St_{0.05} \sqrt{\frac{n+1}{n}}$$

S: sample standard deviation obtained from the formula

$$\left(\sqrt{\frac{\sum R^2}{n}} \right)$$

R: sample standard deviation of MIC values for each organism obtained by the multiplicative test repeated 6 times

$$\left(\sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{5}} \right)$$

M: sample mean

t: distribution coefficient of student

を整数目盛に、希釈法による MIC 値を対数目盛にとり、各々の実験条件の下で MIC と阻止円直径の関係を示す 1 次回帰式を求めた (Table 2, Fig. 6)。

感受性測定法：普通法において、16 時間培養で測定に十分な阻止円が出現した場合は簡易法、16 時間で十分な阻止円が出現せず、24 時間で出現した場合は遅延判定の曲線を用いて、MIC を推定できるわけである。

迅速に感受性を知るために 0.1 ml の滅菌水に 10 白金耳程度に菌を濃厚に浮遊し、濃厚菌液をつくり、その 1 白金耳を寒天平板上にガラス玉法で接種して、37°C で培養し、4 時間以内に阻止円の出現した場合には迅速 3~4 時間の曲線で、5~6 時間で阻止円の出現した場合には迅速 5~6 時間の曲線で、感受性をスクリーニングすることができるわけである。

また、被検体 (膿、尿など) を直接接種した寒天平板にディスクを置いて感受性試験をおこなう Primary culture sensitivity disc 法のさいは、接種菌量を規定することが時に困難なことがあるので、測定に十分な阻止円の出現した時間に応じて、すなわち、迅速 3~4 時間法、迅速 5~6 時間法、簡易法 (16 時間培養)、遅延法 (24 時間培養) のいずれかを適用して感受性を推定することが可能であろう。

実験誤差について：本ディスク法の実験誤差を検討するために、求められたすべての成績の標準曲線からのへだたりの存在範囲を棄却限界の式 ($\alpha=0.05$) を適用し

て計算し、Table 3 の値がえられた。一方、参考としての寒天平板の 2 倍希釈法の実験誤差を検討する意味で、すべての寒天平板 2 倍希釈法による MIC 値を同一菌株について 6 回宛行ない、その各菌株ごとの成績を総合して、MIC 値の存在範囲の棄却限界の幅を求め、Table 3 の成績がえられた。

両者は実験条件がすべて同一ではなく、またディスク法評価の基準となる MIC 値が、寒天平板 2 倍希釈法の実験誤差を必然的に含んでいるので、厳密な比較はやや困難と思われるが、測定値の存在範囲の幅から推定すると、本ディスク法の精度は、寒天平板 2 倍希釈法のそれにある程度近く、臨床的感受性測定法としては十分用いられると推定された。

臨床使用経験

つぎに Doxycycline を少数例ではあるが、臨床的に使用したのでその概要を Table 4 に示す。Table 4 に示すように、第 1 例を除けば Doxycycline 使用の適応が必ずしも十分とは考えられない例が大部分であるので、その効果も不十分であつた。これは上述の理由により本剤の真価を示しているとは必ずしも思われないので、将来十分適応のある症例を選んで検討の要があると思われる。

副作用について：第 1、第 2 例の女性の例では、100 mg 2 回、1 日量の投与で胃部重圧感、嘔気、嘔吐などの副作用があり投与を中止せざるをえなかつた。しかし 1 日 100 mg × 3、100 mg × 4 投与の男性例では特別の消化器症状はみられなかつた。

また 1 日 400 mg 10 日間投与前後の尿、血液諸検査では Table 5 のように、投与前後に大差はなく、肝、腎、造血機能障害を思わせる所見はみられなかつた。

結 語

新抗生剤 Doxycycline について細菌学的、臨床的検討を行なつた。その結果を要約すると、つぎのようであつた。

1) 19 種 109 株の Doxycycline に対する感受性を寒天平板希釈法で測定したが、TC 同様緑膿菌、TC 耐性ブドウ球菌、 α -レンサ球菌をのぞき、グラム陽性、陰性菌を含め広範囲の抗菌力を示すことがたしかめられた。

2) 単一ディスク法の臨床応用のための感受性測定法に適用するために、MIC と阻止円直径の関係を示す図表を i) 1 夜 16 時間培養の普通法 ii) 24 時間後判定の遅延判定法 iii) 濃厚接種による 3~4 時間培養後の 4 時間迅速法 iv) 同様に 5~6 時間培養後判定を

Table 4 Clinical effect of doxycycline

Case	Sex	Age	Diagnosis	Isolated microorganisms and their drug-sensitivity*
1	F	39	Cystitis	<i>Staph. epidermidis</i> $4 \times 10^5/\text{ml} \rightarrow$ + (<i>Enterococcus</i>) $< 10^3/\text{ml}$
				PF >20 (-) EM 1.4 (+) SM 2.3 (##) SP 10 (+) KM 1.3 (##) Nft 12 (+) TC 8.3 (+) Sulfi 37 (+) CP 17 (+) NA 8 (+) CER 4.5 (+) DOTC 3.8
2	F	59	Chronic bronchitis	<i>α-hemolytic streptococcus</i> <i>Neisseria catarrhalis</i>
3	M	45	Lung abscess	<i>Klebsiella</i>
				SM 3.0 (##) CL 63 (+) KM 4.0 (##) Sulfi 63 (+) TC 6.5 (+) NA 6.6 (+) CP 4.4 (+) CER 2.9 (+) DOTC 3.0
4	M	73	Lung Consolidation after FRIEDLÄNDER pneumoniae	<i>Neisseria catarrhalis</i>

(Table 4 つづき)

Symptoms		Dose	Duration of dose	Clinical results	Side effect	Comment
Before treatment	After treatment					
subfever	→ (-)	100 mg × 2/day × 1 100 mg/day . × 1		good	epigastric distress, nausea	Discontinuance of dose due to side effect
urinary frequency	→ (-)					
cloudy urine	→ (-)					
sputum	→ (+)	100 mg × 2/day × 2		poor	epigastric distress, vomiting	Discontinuance of dose due to side effect
cough	→ (+)					
sputum (+)	→ (+)	100 mg × 3/day × 8		poor	none	
dense shadow in the right upper lobe	→ stationary					
dense shadow in the right upper lobe, no sputum	→ stationary	100 mg × 4/day × 10		not determined	none	

Sulfi: Sulfisoxazole

Nft: Nitrofurantoin

* by single-disc method

Table 5 Laboratory findings before and after doxycycline administration (400 mg/day × 10) 73 years-old male : Lung consolidation after FRIEDLÄNDER pneumoniae

Laboratory exam.		Before DOTC treatment	After DOTC treatment
Hematological exam.	Hb g/dl	11.3	10.8
	RBC mill	3.62	3.43
	WBC	9,000	7,700
	Hematocrit	35	32
Serum	Total protein g/dl	7.1	7.6
	BUN mg/dl	12.5	21
	Na mEq/ml	139	137
	K "	4.2	3.5
	Cl	105	110
	Total cholesterol mg/dl	166	113
	Icteric index	8	10
	Total bilirubin mg/dl	0.2	0.5
	ZTT	14	16
	CCF	++	++
	GOT	22	6.5
	GPT	9	4
Urine	Albumin	—	—
	Sugar	—	—
	Sediment RBC	—	—
	WBC	4/F	5/F
	Cast	—	—

行なう6時間迅速法の各々について調製した。また本ディスク法における実験誤差をも希釈法のそれと比較しつつ検討した。

3) Doxycycline の体液中濃度は、*B. subtilis* PCI 219 株を用いる薄層平板カップ法で最低 0.03 mcg/ml まで測定可能であつた。100 mg 服用後の血中濃度は、内服後 24 時間以上にわたり有効濃度を持続した。また本剤は尿中、喀痰中にも有効濃度で移行することがみられた。

4) 臨床的には本剤の適応症である1例の尿路感染にも効果がみられたが、適応の十分でない他の3例には効果は不十分であつた。

副作用として4例中2例に消化器症状をみとめたが、400 mg 1日量、10日間投与の1例についての検査では、肝、腎、造血機能障害と思われるものはみられなかつた。

文 献

- 1) 宮村定男, 金沢 裕: カップ法による体液中抗生物質濃度測定法について。臨床 4 (7): 678~689, July 1951
- 2) 金沢 裕, 宮村定男, 倉又利夫: カップ法による体液中 Kanamycin 濃度測定法。J. Antibiotics, Ser. B 12(5): 295~296, Oct. 1960
- 3) 金沢 裕: 細菌の化学療法剤感受性測定法としての感受性ディスク法。Chemotherapy 9(1): 50~67, Jan. 1961
- 4) KANAZAWA, Y. Clinical use of the disc sensitivity test. Antimicrob. Agents & Chemother. 1961: 926~942, 1961
- 5) KANAZAWA, Y.: Single disc method for MIC determination. J. Antibiotics, Ser. A 19(4): 175~189, July 1966

LABORATORY AND CLINICAL EVALUATION ON DOXYCYCLINE

YUTAKA KANAZAWA & TOSHIO KURAMATA

Niigata Railway Hospital

A new derivative of tetracycline, doxycycline was studied bacteriologically and clinically, and the results may be summarized as follows:

1) In a study by the agar dilution method on a total of 109 strains of 19 bacterial species, *staphylococci*, *pneumococci*, β -hemolytic *streptococci* and *Corynebacterium diphtheriae* were found to be very sensitive to the agent with the MICs of 1.56 mcg/ml or less. And *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* and *Shigella* were fairly sensitive with the MICs of 6.25 mcg/ml or less. While *Pseudomonas*,

tetracycline-resistant *staphylococci* and *α-hemolytic streptococci* were slightly resistant to the agent showing their MICs ranging from 6.25 to 50 mcg/ml.

2) In order to apply the single-disc method to the sensitivity test in clinical laboratory, graphic analysis of the dose-response data concerning the interrelationship between MIC values and diameters of inhibition zones were conducted on each of i) conventional (over-night: about 16 hours) assay, ii) delayed (about 24 hours) assay for slowly growing bacteria, iii) 4-hours rapid assay with heavy inocula and iv) 6-hours rapid assay with heavy inocula.

3) By the thin-layer cylinder-plate technique using *B. subtilis* PCI 219 as a test organism, the concentration of the agent was assayable to the lower limit of 0.03 mcg/ml.

Following a single oral administration of 100 mg doxycycline, serum peak levels were obtained at 4 hour, with a persistence of serum levels at least 0.5 mcg/ml over ensuing 24 hours. After the oral administration, effective levels were found to be obtained in sputum and in urine.

4) Treatment with doxycycline was effective in a case of acute cystitis.

5) Side effects on the digestive tract such as epigastric distress or nausea were observed in 2 cases. There was no apparent evidence of hepatic, renal or hematopoietic functional-impairment in a case treated in a dose of 300 mg for 10 days.