

## Carbenicillin の体液内濃度測定に関する研究

清水喜八郎

東大中央検査部

新抗生物質 Carbenicillin の体液内濃度測定にさいして、本剤はその合成過程にて、PC-G が生成され、本剤中に約1.8%前後に PC-G がふくまれることから、本剤の体液内測定濃度にあつては、PC-G に耐性で、Carbenicillin 感受性の菌株、*Pseudomonas* NCTC 10490 を検定菌として用いる必要があるという KNUDSEN らの報告がみられている。

本剤の体液内濃度測定時の、とくに検定菌について若干の検討を行なつた。

## 1) 検定菌について

表1にしめせるごとき検定菌がひろく一般に用いられている。

表1 Carbenicillin 体液内濃度測定のための検定菌

- |   |
|---|
| 1) <i>B. subtilis</i> PCI 219: 重層法, カップ法          |
| 2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490: カップ法 |
| 3) <i>Streptococcus hemolyticus</i> S 8 重層法       |
| 4) <i>E. coli</i> NIHJ                            |
| 5) <i>Staph. aureus</i> 209 P                     |

上述の報告からして 1), 2) の検定菌について検討してみると、*B. subtilis* PCI 219 を用いた場合、H. I. 寒天 (pH 7.0) を用い重層法、カップ法についてしらべてみると、いずれも pH 7.0 の 1/15 M Phosphate buffer にて Carbenicillin の標準液を作成し、接種菌量 1% 18時間培養にて、0.4 mcg/ml まで測定可能であり、充分使用できることがわかつた。

松本らによると、*Streptococcus hemolyticus* S8 を用い、pH 7.0, H. I. 寒天試料調製液 1/15 M Phosphate buffer 接種菌量 0.01% で 0.1 mcg/ml まで測定可能である。

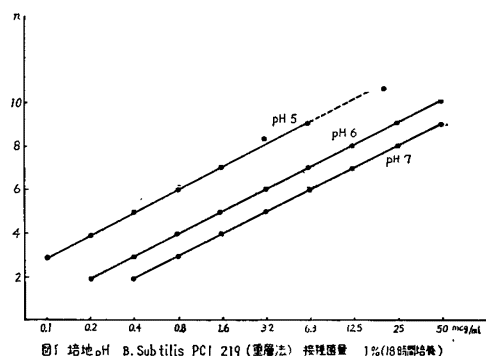
*E. coli* NIHJ を同条件でおこなつた場合、感度がわるく (1.6 mcg/ml まで測定可能)、*Staphylococcus* 209 P 株を用いた場合は、標準曲線が直線 (とくに高濃度) になりにくいいため、あまり好ましくないとの紺野らの報告がある。

*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 を用いたカップ法で H. I. 寒天 (pH 7.0) 試料調製 1/15 M Phosphate buffer を用い、接種菌量 1% は、1.6 mcg/ml ま

で測定可能であり、使用できることがわかつた。ただし本菌を用い、同条件にて重層法をおこなつた場合、阻止帯の判定がむづかしく、重層法は不適であつた。したがつて、検定菌として使用が好ましいのは、*B. subtilis* PCI 219, *Streptococcus hemolyticus* Cook, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 である。

2) *B. subtilis* PCI 219 についての検討

前述のごとき条件にて本菌を用いて測定法、とくに重層法は Carbenicillin の測定の可能であることがわかつたが、培地の pH を、pH 5, pH 6, pH 7 について検討してみると、pH 5 のほうが、pH 7 よりも感度がよく 0.1 mcg/ml まで測定可能であつた。しかし pH 7 の培地を用いても 0.4 mcg/ml まで測定可能であるので、一般測定には、pH 7.0 の培地を使用しておこなつてよいと思われる(図1)。

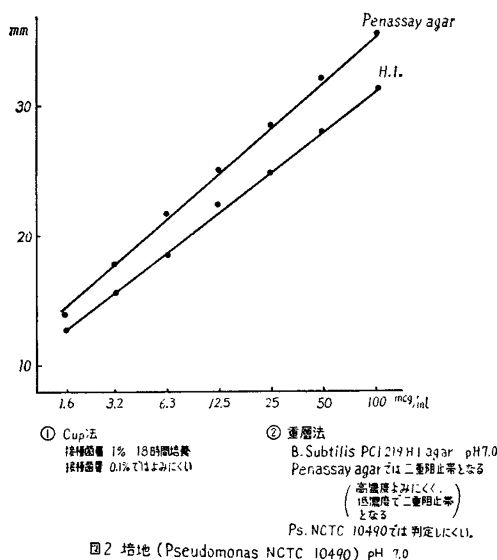
3) *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 についての検討

本菌を検定菌に用いた場合は重層法では測定しにくいので、カップ法が好ましい。

この場合の使用培地について検討した。

Penassay agar と H. I. 寒天 (両培地とも pH 7.0) を比較検討した結果、図2にしめすがごとく、Penassay agar を用いたほうが感度がよく、阻止円もやや鋭敏であるが、H. I. 寒天を用いて充分測定できた。

したがつて、一般には H. I. 寒天を用いて差支えない。接種菌量は 1% がよく、接種菌量を 0.1% とへらすと、阻止円がよみにくかつた。



#### 4) *B. subtilis* PCI 219 による重層法と、*Pseudomonas* NCTC 10490 によるカップ法の測定値の比較

*B. subtilis* PCI 219 を検定菌とし、H.I. 寒天 (pH 7.0)、接種菌量 1%、18時間培養による重層法と、*Pseudomonas* NCTC 10490 を検定菌とし、H.I. 寒天 (pH 7.0)、接種菌量 1%、18時間培養によるカップ法との両法によつて、ヒトの同一検体 (血液、尿)、について測定をおこなつた (標準液は pH 7.0、1/15M Phosphate buffer を使用)。この成績が表 2 であり、その測定値はいずれの方法を用いてもほぼ同じ値がえられた。

*L. subtilis* PCI 219、*Streptococcus hemolyticus* S8 (pH 7.0 接種菌量 0.1%) を用いて重層法で比較した松本らの成績もあわせしめた。

いずれの方法を用いて行なつても、ほとんど同じ測定値がえられた。

以上の成績からして本剤の体内液内濃度の測定は、*B. subtilis* PCI 219、*Pseudomonas* NCTC 10490、*Streptococcus hemolyticus* S8 のいずれの検定菌を用いても測定値には大きな差は認められなかつた。

#### Carbenicillin 投与後尿の薄層クロマトグラフィによる検討

上述の成績をうらがきするために、健康人に Carbenicillin 1g 筋注後、1時間尿を採取し、その尿を薄層クロマトグラフィにて展開した。

n-ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 2 を展開溶媒に用いた。発色には、KMnO<sub>4</sub> を用いた。

成績は図 3 のごとくであり、ヒト尿中には、多量の

表 2 *B. subtilis* PCI 219 (重層法)  
*Pseudomonas aeruginosa* NCTC  
10490 (カップ法) および *Streptococcus hemolyticus* S8 (重層法) を用いての血中および尿中濃度測定値

a) ヒト血中濃度 (1g 筋注後)

| 検体                     | 症例 1         |      | 症例 2 |      | 症例 3 |      |
|------------------------|--------------|------|------|------|------|------|
|                        | 1hr.         | 4hr. | 1hr. | 4hr. | 1hr. | 4hr. |
| <i>B. sub.</i> PCI 219 | mcg/ml<br>22 | 11   | 18   | 8    | 10   | 7.5  |
| <i>Ps.</i> NCTC 10490  | 19           | 11.5 | 16.8 | 6.8  | 8.7  | 7.5  |

| 検体                         | 症例 1           |      | 症例 2 |      | 症例 3 |      |
|----------------------------|----------------|------|------|------|------|------|
|                            | 1hr.           | 4hr. | 1hr. | 4hr. | 1hr. | 4hr. |
| <i>B. sub.</i> PCI 219     | mcg/ml<br>11.3 | 1.4  | 19.3 | 3.2  | 16.3 | 3.2  |
| <i>Str. hemolyticus</i> S8 | 12.5           | 2.1  | 20.6 | 2.7  | 17.5 | 1.2  |

b) ヒト尿中濃度 (1g 筋注後)

| 検体                     | 症例 1            |      | 症例 2  |       |
|------------------------|-----------------|------|-------|-------|
|                        | 1hr.            | 6hr. | 1hr.  | 6hr.  |
| <i>B. sub.</i> PCI 219 | mcg/ml<br>4,100 | 370  | 3,600 | 2,350 |
| <i>Ps.</i> NCTC 10490  | 3,820           | 420  | 3,150 | 2,200 |

a) と b) の成績から *B. subtilis* PCI 219、*Pseudomonas* NCTC 10490、*Streptococcus hemolyticus* S8 のいずれを検定菌に用いても測定値には大きな差は認められない。

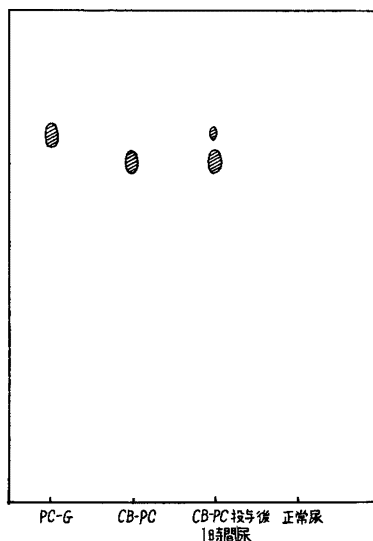


図 3 ヒト尿の薄層クロマトグラフィ  
展開溶媒 n-ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 2  
検出試薬 KMnO<sub>4</sub>

Carbenicillin に相当する Spot がえられ PC-G の Spot がきわめて小さい。このことは、Carbenicillin は生体内で未変化のまま尿中に排泄され、PC-G への代謝は、あまりおこっていないことがわかった。

#### Carbenicillin の検討材料中での安定性

Carbenicillin を 1g 健康人に筋注し、血清および尿を採取し、血清はそのまま、尿は pH 7.0 の 1/15 M Phosphate buffer にて10倍に稀釈せるものを経日的に 3 日まで測定した。

放置条件は 5°C および -20°C であった。その成績は、

表 3 検査材料中における Carbenicillin の安定性

#### i) 血清

|     | フリーザー |      | 氷 室 |      |
|-----|-------|------|-----|------|
|     |       |      |     |      |
| 初   | 19    | 12.5 | 19  | 12.5 |
| 1 日 | 20    | 〃    | 19  | 〃    |
| 2 日 | 21    | 〃    | 19  | 〃    |
| 3 日 | 19    | 13.0 | 19  | 11.8 |

#### ii) 尿

|     | フリーザー |      | 氷 室  |    | 室 温  |    | 孵 卵 器 |    |
|-----|-------|------|------|----|------|----|-------|----|
|     |       |      |      |    |      |    |       |    |
| 初   | 20.5  | 85   | 20.5 | 85 | 20.5 | 85 | 20.5  | 85 |
| 1 日 | 21    | 84   | 21   | 85 | 14   | 50 | 14    | 52 |
| 2 日 | 20    | 84.5 | 20   | 84 | 13   | —  | —     | —  |
| 3 日 | 20    | 84   | 20   | 82 | —    | —  | —     | —  |

表 3 のごとく、血清は 3 日までしか測定していないが、血清、尿とも -20°C, 5°C に保存しておけば少なくとも 3 日間は安定であることがわかった。

#### 総 括

Carbenicillin の体液内濃度に際して、PC-G が若干含有されているために、いかなる検定菌を用うべきかということが問題となる。

われわれのデーターおよび松本らの成績をみてみると、*B. subtilis* PCI 219, *Streptococcus hemolyticus* S8, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 のいずれの検定菌を用いて測定しても差のないことがわかり、したがって、上述 3 つの検定菌のうち、いずれを用いても差支えないと考える。

さらにその成績を裏付ける薄層クロマトグラフィの成績、および西田らの Bioautograph の成績から、Carbenicillin は体内で代謝されることなく、未変化のまま、排泄されることがわかった。つまり、Carbenicillin 中にふくまれる少量の PC-G、および体内で代謝された産物による影響は、検定菌に対してはないものと考えられる。

また本剤の検査材料中における安定性は、5°C, -20°C に保存せる場合は少なくとも 3 日間は安定であった。

本論文の要旨は、第16回日本化学療法学会総会シンポジウムにおいてのべた。

また、慈恵医大 松本博士のデーターを借用致したことについては感謝致します。

## STUDIES ON DETERMINING HUMORAL LEVELS OF CARBENICILLIN

KIHACHIRO SHIMIZU

Central Clinical Laboratory, School of Medicine, University of Tokyo

Indicator organisms and assay procedures were studied for determining carbenicillin levels in human body fluids such as serum and urine, since generation of penicillin-G (approx. 1.8%) is inevitable in the manufacturing process of carbenicillin.

The following organisms and assays proved to be available.

| Indicator organism                       | Assay   |
|--|---|
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI219          | Both cup plate and superposition assay method |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490 | Cup plate method                              |
| <i>Streptococcus hemolyticus</i> S8      | Superposition assay method                    |

Supplemental techniques, such as thin-layer chromatography and bioautography, also demonstrated that both the generating penicillin-G and metabolites of carbenicillin in urine of man and animals did not influence the mentioned organisms.

The body fluid samples collected were stable for 3 days when kept at 5°C or -20°C.