

Amphotericin B 体液中濃度測定法に関する研究 第1報

改良法の提案とそれによる経口投与時ウサギ血清および
臓器内濃度測定成績

岩田和夫・長井辰男

東京大学医学部細菌学教室

(昭和44年6月23日受付)

Amphotericin B(以下、Am B と略す)は GOLD *et al.*¹⁾ によつて *Streptomyces* sp. M 4575 の培養から分離されたポリエン系抗生物質で、諸種の深在性真菌症に著効を奏し、ことにその重症の場合に最も期待しうる治療薬として広く用いられており、基礎的にも臨床的にも多くの研究報告があるにもかかわらず、その体液中もしくは臓器内濃度については、意外に詳細な研究に乏しいうらみがある。これには種々の理由が考えられるが、まず Am B の現行の定量法、すなわち FDA 法²⁾およびこれに準拠したわが国の現行基準³⁾ならびにその改正案⁴⁾は、種々不合理な点を含んでおり、ことに比較的低濃度の体液の場合に、これを正確鋭敏に測定しがたいということであろう。体液中の Am B の濃度測定については、若干の報告^{5,6)}があるが、必ずしも確立されたものとはいえないようである。つぎに、本剤の適応法が問題である。その対象とする疾患と個々の症例に依りて、静脈内、髄腔内、筋肉内、経口的および局所的適応法がおこなわれており、本剤の最も重要な適応の対象である深在性真菌症にはふつう静脈内注射、ことに点滴静注がとられる。しかし、この方法は、薬剤自体の副作用のみでなく、溶剤(デソキソコール酸ソーダなど)による影響も否定できないであろう。とくにその慢性化した場合は、むしろ経口投与が望ましいと考えられる。ただし、経口投与では腸管からの吸収が悪く、有効血中濃度に達しがたいものと一般的にみなされておられ、真菌の2次感染もしくは菌交代症の予防目的に使用されるという他面をもつている。上述の測定方法とも関連して経口投与の場合の血中濃度をはたしてどこまで正確に把握しえた上での結論であろうか。Am B の経口投与によつて諸種の深在性真菌症に充分奏効したとの報告も少なくないのである⁷⁻¹¹⁾。かかる場合、血中濃度は最小発育阻止濃度もしくはそれに近い不完全発育阻止濃度に達しているがゆえに化学療法が成功したのかもしれない。そこで著者らは Am B の定量法、とくに体液中濃度測定の方法を改良し、それに基づいて経口投与による血中濃度をなるべく正確に測定することを企図した。

著者ら¹²⁾はすでに前報において従来の方法を改変した Am B 測定法(比濁法)を呈示し、ウサギに経口投与したときの血清濃度を測定した結果、最小発育阻止濃度には達しなかつたが、ほぼそれに近い不完全阻止濃度を長時間維持することを認め、Am B の経口投与による治療の可能性を指摘した。

本論文においては、前報の測定法に改良を加えることにより体液中 Am B 濃度をより鋭敏に測定する方法を見出し、本法によりウサギに Am B を経口投与したときの血清濃度が最小発育阻止濃度を十分に上廻り、臓器内濃度はさらにそれ以上に上昇することを認めたので報告する。

実験材料

1. 使用 Am B 標品

Squibb Institute for Medical Research 製の微細粉末標品(micropulverized preparation)で、直径 20 μ 以下の粒子 96%、20~40 μ の粒子 4% の割合よりなつている lot No. 7 D 809、力価 840 mcg/mg のものを使用した。

2. 使用動物

白色ウサギの雌性、体重 2.4~2.5 kg(船橋農場)を金屬製ケージにおさめ、固形飼料(同農場)と水を与え飼育した。

3. 使用菌株

前報¹²⁾と同一の *Candida albicans* C-a-13 株(カンジダ性髄膜炎患者の髄液から分離した教室保存株を検定菌として選んだ。その Am B に対する感受性は、後述のとおり、最小発育阻止濃度 0.08 mcg/ml、最小殺菌濃度 0.3 mcg/ml である(図 1)。

4. 使用培地

Am B 測定用培地としては、表 1 に示すような 3 種の半合成培地、すなわち検定菌継代用培地(カンテン斜面として)、検定菌接種用培地および検定用培地を用いた。後 2 者は全く同一の組成で、前者からカンテンを除いた液状培地である。

表 1 Amphotericin B 測定用培地

a. 検定菌継代用培地の組成	
リン酸二水素ナトリウム	2.16 g
リン酸一水素カリウム	1.2
硫酸マグネシウム	0.1
塩化ナトリウム	2.0
ブドウ糖	40.0
カザミノ酸	1.0
カンテン	15.0
蒸留水	1,000 ml
	pH 6.5±
b. 検定菌接種用培地の組成	
検定菌継代用培地からカンテンを除く	
c. 検定用培地の組成	
検定菌継代用培地からカンテンを除く	

表 2 標準曲線の作成法

Am B 一定量 + DMSO	→ 1,000 mcg/ml
+ 50% DMSO	→ 500 "
+ 0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.5	→ 100 "
+ "	→ 50 "
+ "	→ 所要の濃度まで希釈

Am B 希釈液 0.5 ml + 検定菌液 0.5 ml + 検定用培地 9.0 ml

↓ 37°C 15 時間振とう培養

光電光度計 (波長 510 mμ) で透過率測定
(註) DMSO : Dimethyl sulfoxide

実験方法

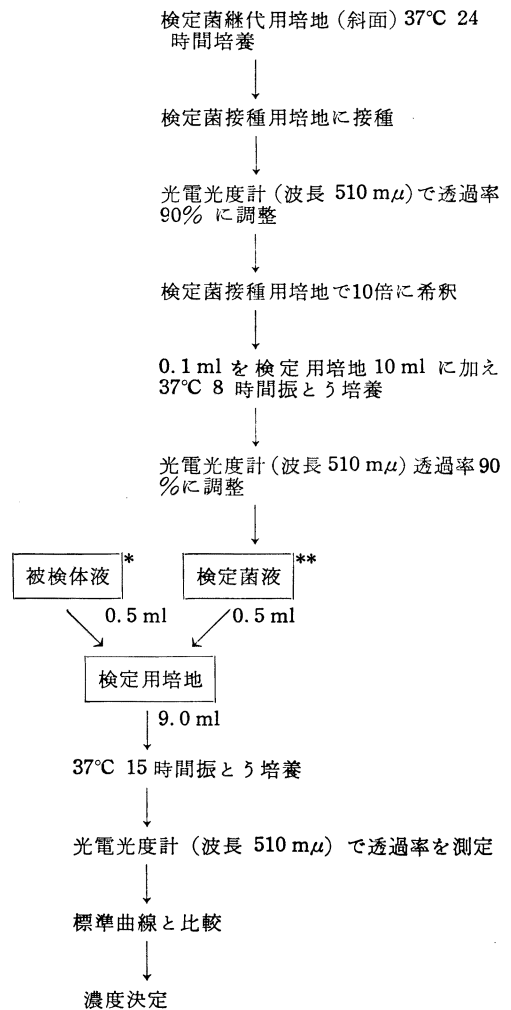
1. 標準発育阻止曲線の作成法

In vitro における Am B 濃度と菌発育阻止との間の量的関係について標準発育阻止曲線 (以下、標準曲線と略す) を作成しておき、その比較から被検溶液の濃度を測定する方法をとった。標準曲線作成の要領は表 2 および 3 による。

1) Am B の希釈系列の作り方: 表 2 に示すように、Am B の一定量に dimethyl sulfoxide (DMSO) を加えて振り、1,000 mcg/ml の溶液をえ、以下 50% DMSO 希釈液 (0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5 を等量加える)、続いて 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5 の順序に加えて行き、所要の Am B 2 倍希釈系列をつくる。

2) 標準曲線作成のための実験: 表 2 に示すように、検定用培地各 9 ml に上記希釈系列 0.5 ml ずつを加え、これに検定菌の菌液 (その作り方は表 3 を参照のこと) 各 0.5 ml を接種し、37°C 15 時間振とう培養する (モノ型振とう培養器で振幅 5 cm, 110 往復/分)。各試験管について光電光度計 (日立製 Perkin-Elmer 型を使用) にて波長 510 mμ で透過率 (%) を測定した。片対

表 3 体液中 Amphotericin B 濃度の測定法



* Am B 0.06~2.2 mcg/ml 相当の濃度の 2 倍希釈系列

** 標準曲線作成の場合にも、これと同一条件の菌液を使用

数方眼紙の横軸 (対数目盛り) に Am B の濃度 (mcg/ml) を、縦軸に透過率 (%) をとり、各濃度における透過率の実測値をプロットして標準曲線をえ (図 2)。なお、試験管は体液中濃度の測定の場合も含めて直径 17 mm, 高さ 18 cm の中試験管を用いた。

2. 体液中 Am B 濃度の測定法

その方法は表 3 に示すが、標準曲線作成のための実験要領と基本的には同様である。すなわち、検定用培地各 9 ml に被検溶液の 2 倍希釈系列各 0.5 ml を加え、これに菌液 0.5 ml ずつを接種して 37°C 15 時間振とう培養した後、光電光度計 (波長 510 mμ) で透過率を測

り、その値を上記標準曲線と比較することによつて体液中 Am B 濃度を決定する。振とう培養の条件なども全く同様である。

接種菌液の調整は、標準曲線作成実験における菌液のそれも同一におこなわれ、表3の上の部分に示すとおりであつて、透過率90%に調整したときの菌液は、菌数計算によれば 2×10^6 /ml であり、したがつてその0.5 ml を培地9 ml および Am B 希釈液0.5 ml に加えるとときの最終の菌数は 1×10^5 /ml となる。

被検体液は今回の実験では分離血清と臓器乳剤の遠心上清を対象とするが、上述の標準曲線の測定限界からみて Am B 含量が0.003~1.1 mcg/ml 相当の濃度範囲にはいるよう適当に希釈するか、または希釈しない。それは投与量、投与経路または方法および被検体の種類に係する。

3. Am B 濃度測定実験における検定菌の培養時間の決定とその Am B 感受性の測定法

表3における各過程に用いられる検定菌の培養時間については、増殖の度合(菌量)の恒常性、菌の発育形態(酵母形であることを原則とする)、ルチンにおける時間的配分などの点の考慮により、予備実験の結果、決定したものである。とくに重要な点是对数増殖期中期の菌を用いたことで、これは検定用培地で 37°C 8 時間振とう培養によつてえられるが、Am B 感受性が最も強く、したがつて Am B 検定の感度がそれだけ増す結果になつた(図2)。

これに関連して検定菌の Am B 感受性試験の方法にふれておく。最小発育阻止濃度の測定方法は、表3に示すような標準曲線作成または体液中濃度測定の実験と全く同様であるが、この場合は、菌液として透過率90%のものを10倍に希釈し、その0.5 ml(最終菌液濃度 1×10^4 /ml に相当)を接種して同様に培養した。別に作った同じ透過率の対照と比較して、それ以下に透過率が低下しない最小濃度をもつて最小発育阻止濃度とし、最小殺菌濃度は、前者の試験管を中心にして前後3本ずつの培養から0.2 ml ずつをとり、継代用培地を平板に注ぎ、塗布して 37°C 48 時間培養後、集落数0を示したもとの試験管の最小濃度をもつてした。

4. 薬剤投与方法

Am B を0.5% carboxymethylcellulose(生理食塩水にて乳剤とする)に20 mg/ml の割合に均等に浮遊させ、体重1 kg あたり50 mg または100 mg の割合にカテーテルで直接ウサギ胃内へ導入した。実験群は2つに分け、1群は1回の投与量50 mg/kg または100 mg/kg ずつをともに3羽のウサギに投与し、6時間おきに4回連続した。他の1群は1回量50 mg/kg を5羽の

ウサギに6時間おきに8回、2日間投与した。

いずれのウサギも投与開始12時間前から給餌給水を断ち、第1回投与2時間後より給餌給水を再開した。

5. 採血

採血は耳翼静脈よりおこなつた。すべてのウサギについて薬剤投与開始2時間前に採血して対照とした。投与後は、前報の成績にてらして(4時間前後に最高血中濃度に達することを認めているので)、4回連続投与群では各回4時間後ごとに、最終回投与後はさらに10時間および22時間に計6回、8回投与群では、第4回投与4時間後、最終回投与後4時間、10時間および14時間、計4回、それぞれ採血した。投薬と採血の時間的關係は、別に図3、4にも示した。

6. 臓器内濃度測定のための試料調整法

最終採血の終了した各ウサギは、4回投与群ではすべて24時間後に、8回投与群では#7、#8は4時間後、#9、#10は12時間後に、それぞれ頸動脈より瀉血した後、肝、脾、腎(両側)の3臓器を摘出した。表4に示すように、0.05 M リン酸緩衝液、pH 6.5 で表面を洗浄した後、濾紙で水分を吸いとり、適当に一部を切除して2 g 秤量し(腎は各側より1 g ずつ)、50% DMSO 溶液(上述と同様、0.05 M リン酸緩衝液、pH 6.5 で希釈)5 ml とともに組織用ホモジナイザーで約5分間ホモジナイズし、3,000 r. p. m. 5分間遠心沈澱し、その上清を測定に供した。なお、雑菌による汚染をさけるために、検定用培地にあらかじめ streptomycin 100 mcg/ml, penicillin G 100 u/ml を添加した。

実験成績

1. 検定菌の Am B 感受性

上述のような方法で Am B 微細粉末標品に対する検

表4 Amphotericin B 臓器内濃度測定のための試料調整法

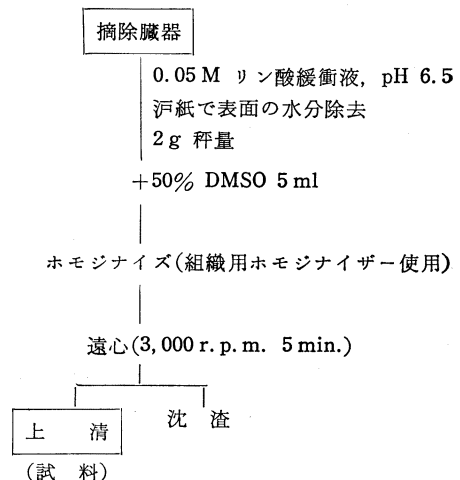
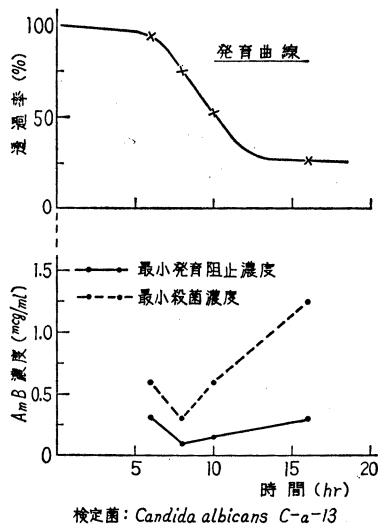


図1. 検定菌の発育曲線とAmphotericin B に対する感受性



検定菌: *Candida albicans* C-a-13

定菌 *C. albicans* C-a-13 株の感受性をしらべた結果は、図1に示したとおりである。37°C 8時間振とう培養の対数増殖期中頃の菌が感受性最も強く、最小発育阻止濃度 0.08 mcg/ml、最小殺菌濃度 0.3 mcg/ml であり、誘導期および定常期に相当する時期の菌は感受性が鈍いことがわかった。かくて、既述のとおり、この対数期の菌を標準曲線の作成および体液中濃度の測定実験に用いることにしたわけである。なお、Am B の最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度とが比較的接近していることが注目される。

2. Am B の標準発育阻止曲線と測定限界

C. albicans C-a-13 株対 Am B の標準曲線は、図2にみるように、Am B の 0.003~0.11 mcg/ml の濃度範囲でほとんど完全に直線関係にあり、こうしてかなり低い体液中 Am B の濃度をも鋭敏に把握することの可能性が示されたわけである。

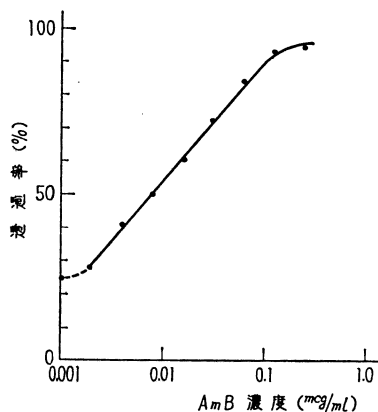
3. Am B 連続投与ウサギの血清濃度

a. 50 mg/kg または 100 mg/kg 4回投与の場合

1回量として 50 mg/kg の Am B を 6時間間隔で 4回 (1日量 200 mg/kg) 経口投与をうけたウサギ(#1, #2, #3) の血清濃度は、図3に示した。初回投与 4時間後早くも最小発育阻止濃度を上廻り (0.25~0.4 mcg/ml)、さらに #1, #2 は上昇して最終回投与 4時間後に最高値 (0.56~0.63 mcg/ml) に達し、以下漸減したが、22時間も初回投与 4時間後の濃度と同等の血清濃度を維持した。#3 はとくに上昇をみず、しかし、24時間後もほぼ同様の濃度を持続した。

100 mg/kg の投与ウサギ (#4, #5, #6) は初回投与

図2. Amphotericin B標準発育阻止曲線



検定菌: *Candida albicans* C-a-13

4時間後は前の群とほぼ同様であるが、最終回投与 4時間後は最高値 0.68~0.94 mcg/ml を示し、以後漸減し、24時間後には前の群と同等にまで低下した。

b. 50 mg/kg 8回投与の場合

つぎに 1回量 50 mg/kg 6時間おきに 8回 (1日量 200 mg/kg 2日間) 投与されたウサギ(#7, #8, #9, #10) は、4回投与 4時間後に 0.34~0.54 mcg/ml を示し、8回終了後 4時間では、#7, #9, #10 は 0.99~1.2 mcg/ml の最高値を示したが、#8 はとくに増加する傾向がみえなかつた。#7, #8 はここで臓器内濃度測定のために血清濃度の測定を打ち切つたが、他の 2羽 (#9, #10) は、12時間後にはかなり著明な低下をみた。このように 4~8回の連続投与によつて血清濃度が最小発育阻止濃度を十分に上廻り、最小殺菌濃度をも越したことは、注目に値する。

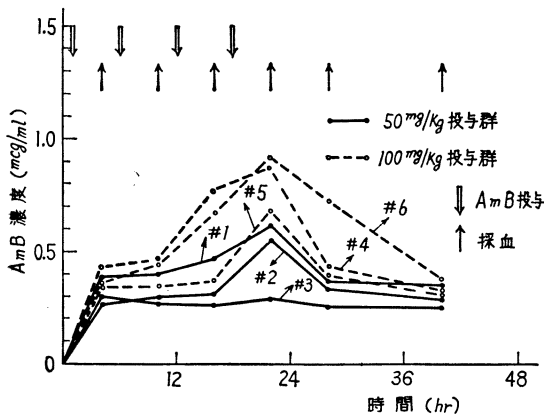
なお、これらの実験を通じて投薬開始 2時間前に採取した対照の血液については、当然のことながら、血清濃度は全例が測定可能限界 0.003 mcg/ml 以下であつた。

4. Am B 連続投与ウサギの臓器内濃度

上述の血清濃度の測定を終了したウサギについては、4回投与群は最終投与後 24時間、8回投与群は最終投与後 4時間および 16時間に屠殺して、肝、脾、腎各 2g あたりの浸出液について Am B 濃度を測定した結果、図5, 6に示すような成績がえられた。

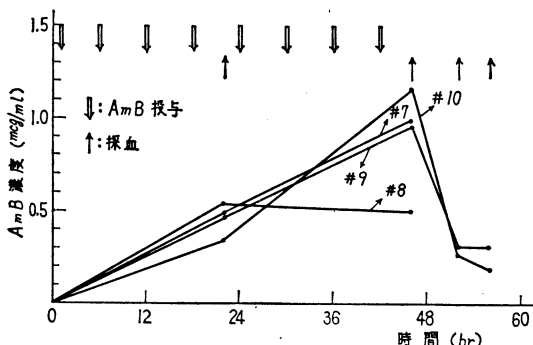
4回投与の場合、50 mg/kg 投与群と 100 mg/kg 投与群との間に全般的には著差がなく、若干の個体差ともみるべき差違があつた。臓器別に 1g あたりの含量で表現すると、脾において最も高く、0.8~1.0 mcg/g、ついで腎で 0.2~0.85 mcg/g、肝はさらにいくぶん低く 0.2~0.45 mcg/g で、最小発育阻止濃度を十分に超え、最小殺菌濃度をも上廻っていたことは注目すべきであろう。

図3. Amphotericin B 連続経口投与によるウサギの血中濃度



Am B 投与量: 1回量 50 mg/kg または 100 mg/kg 6時間間隔 4回 (1日)
ウサギ番号: #1~#6

図4. Amphotericin B 連続経口投与によるウサギの血中濃度



Am B 投与量: 1回量 50 mg/kg 6時間間隔 8回 (2日間)
ウサギ番号: #7~#10

いつぼう, 8回投与群では, 最終投与4時間後の比較的早い時期に採取した臓器については (#7, #8), 肝 0.7~2.2 mcg/g, 腎 0.8~2.0 mcg/g, 脾では実に 3.5~5.6 mcg/g の高値を示し, 血清濃度より数倍ないしそれ以上の濃度に達していた。16 時間後にしらべた #9, #10 では肝 0.7~0.9 mcg/g, 腎 0.8~2.0 mcg/g, 脾で 2.2~3.0 mcg/g で依然として高値を維持していることが明らかとなった。

考 察

Am B の定量法に関しては, 既述のとおり, わが国では FDA 方式⁹⁾(比濁法ならびに円筒平板法)に準じて作成された昭和 36 年 12 月 19 日改正の厚生省編抗菌性物質製剤基準⁹⁾(以下「基準」と略す)に記載されている方法(比濁法)が現行基準としておこなわれており, その後改正案(抗菌性物質製剤基準案⁴⁾, 以下「基準案」と略)も呈示され, 比濁法のほかに同筒平板法も加えられたが, 抜本的な改良化はなされていない。FDA 法自体がその方法論において著しく多くの不合理な点を含ん

図5. Amphotericin B 連続経口投与によるウサギの臓器内濃度(その1)

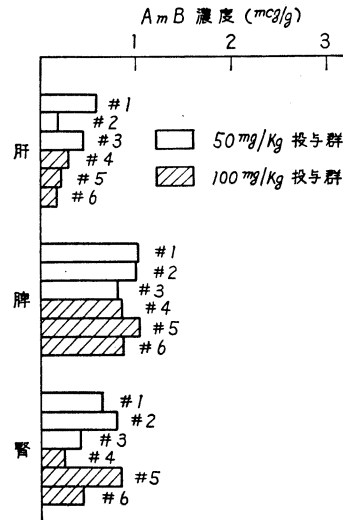


図3に示した実験群(ウサギ番号: #1~#6)

図6. Amphotericin B 連続経口投与によるウサギの臓器内濃度(その2)

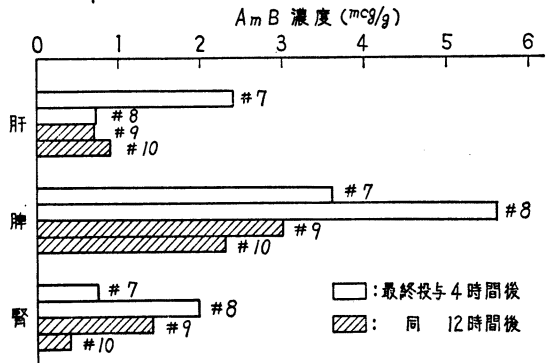


図4に示した実験群(ウサギ番号 #7~#10)

でいるから, 現在われわれは信頼に値する Am B の定量法をもち合わせていないといつても過言ではない。

円筒平板法は Am B に関する限り, それ自体カンテン中への拡散が悪く, 方法上の不合理性のために, その成績は大きく動揺し, しかも相当高濃度の範囲でなければ, 濃度と阻止円直径との間には直線関係が成立しえないから, 体液中濃度を測定することはほとんど不可能であり, きわめて不正確なものとなる危険性があることを著者らは追試の結果, 確認した。そこでわれわれは前報¹²⁾で述べたとおり, 従来の比濁法の不合理な点を改変して, ある程度精度の高い Am B 測定法を呈出したが, 体液中濃度の測定に堪える方法として今回さらに改良化を試みたわけである。

現行の上記諸方法では, *Candida tropicalis*, ATCC

13803, *Saccharomyces mellis*, DA No. M 59 が検定菌として用いられているが、呈示されている培養温度 30°C または 37°C は必ずしもそれらの菌株に至適でなく、培養時間についても同様である。著者らの検定菌 *C. albicans* C-a-13 は 37°C でよく発育し、Am B に対する感受性も強く、最小発育阻止濃度が低いから鋭敏に低濃度の体液を測定することが可能である。ちなみに GORD *et al.*¹⁾ は Am B の *Saccharomyces cerevisiae*, Squibb No. 1600 に対する最小発育阻止濃度は 0.5~1.5 mcg/ml と報告している。

培地組成についていえば、著者らは天然培地をさけて半合成培地によつた。これは、1) 抗菌作用に関して阻害物質をほとんど全く含まない、2) 色調が淡いために透過率の測定に適する、3) 培養条件を一定にすれば恒常的な発育曲線 (図 2) がえられる、4) 継代用にも菌接種用にもまた検定用にも同一組成の培地でよい、などの利点があげられる。

検定のための透過率の測定にも若干の考案を加え、光電光度計は波長 510 m μ を用いた。これは血液などの試料の場合に現行法の 530 m μ ではヘモグロビンそのものを測定することになり鋭敏性を落さないためである。また菌液の調整にあつて、対数増殖期中期の感受性の最も強い時期の培養を検定の際に接種したが、この点については MCNALL *et al.*⁵⁾ もすでに指摘している。

さて、Am B の定量にあつて、注意すべき重要な要因の 1 つは、物質自体の安定性についてのチェックである。本剤は諸種の物理化学的影響に対して比較的不安定であるから、その保存には注意を要する。窒素置換、乾燥剤添加、-15~20°C (少なくとも氷室内での保存等) の処置が必要で、基準となるべき標品についても表示力価と製造月日をチェックして、あらかじめ力価検定をおこなつてから、実験にとりかかるべきであろう。なお、現在の市販標品には Am A が混在するが、きわめて微量であり、抗菌作用も Am B よりずっと弱いから、本測定法への影響は無視しうる。

さて、このような経口投与による場合の血中・臓器内濃度は、*in vitro* の最小発育阻止濃度には達しえないと従来みなされてきた⁶⁾。著者ら¹²⁾も前報においてウサギに 50 mg/kg 1 回のみ経口投与したとき、前回の方法によつてやはり最小阻止濃度には達しえなかつたが、不完全阻止濃度には達し、かつそれが長時間持続するところから連続投与により、より高い血清濃度がえられ、経口投与による有効な化学療法の可能性を示唆したことは、すでに本文でもくり返し述べた。今回の改良された測定法によれば、1 回のみ投与によつても最小阻止濃度を十分に上廻る有効血清濃度の上昇をうることを明らか

にしたので、Am B の経口投与の有効性に 1 つの希望を与えたものと考えられる。

上述の動物実験の成績から、Am B の投与量を増大した場合により高い血清濃度がえられたが、比較的少量でも回数のある程度重ねれば、同等ないしそれ以上の血清濃度がえられるし、吸収が比較的悪い反面、排泄もおそいので、有効濃度は比較的長く保持されるから、副作用も考慮に入れて、いたづらに大量を使用するのは当をえないであろう。

臓器内濃度が血清濃度と同等もしくはそれ以上、臓器によつては上昇したこと、ことに 4 回投与群の大量投与よりも 8 回投与群の少量投与において、とりわけ脾でより高濃度に達したことは、血清濃度との関係と相照らして、経口投与による治療効果の可能性をさらに強く支持するものであろう。

なお、8 回投与群のなかで、#7、#8 については最終投与 4 時間後に胆汁および尿中の Am B 濃度をしらべたが、それぞれ 3~5.5 mcg/ml と 1~1.5 mcg/ml であつた。

各臓器に含まれる Am B の抽出にあつて溶媒として 50% DMSO 希釈液 (0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5 同量混合) を用いて上述のような成績をえたが、対照として正常ウサギ臓器 2g に 5mg の Am B を加え、ホモジナイズした後、同様に 50% DMSO で抽出した結果では、この溶媒による抽出での回収率は 95~98% の高率であることを知つた。これに対して、0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5 による場合は 50~60%、蒸留水を用いたときは、わずかに約 10% であつた。

総 括

Am B の現行の定量法はそれ自体種々の不合理な点を含んでいるが、ことに体液中のような比較的低い濃度を測定するには、きわめて不正確であることに着目し、*C. albicans* C-a-13 株を用いる新しい比濁法による体液内濃度を測定する方法を記載した。この方法により Am B の検定菌に対する標準発育阻止曲線を作成し、0.003~1.1 mcg/ml の範囲で測定可能である。

この新測定法により、Am B をウサギに連続経口投与したとき、血清濃度は初回投与約 4 時間後早くも最小発育阻止濃度あるいはそれ以上に達し、回を重ねるとともに上昇し、投薬中止後も比較的長時間有効濃度を維持すること、さらにそれらの諸臓器、ことに脾臓においては、血清濃度の数倍の濃度に達することを認めた。

こうして新しい測定法を導入することによつて Am B の経口投与による深在性真菌症の化学療法の可能性を示唆する成績がえられた。

Amphotericin B の標品を分与された日本スクイブ株

式会社医学部の御厚意に謝意を表する。

本論文の要旨は第12回日本医真菌学会総会(昭和43年10月10日, 金沢市)および第15回日本化学療法学会関東支部総会(同年11月16日, 東京都)において発表した。

文 献

- 1) GOLD, W., STOUT, H. A., PAGANO, J. F. & DONOVICK, R.: Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. I. *In vitro* studies. *Antibiotics Annual* 579~586, 1955/1956
- 2) FDA Regulation Part 148 Antibiotic drugs, 148 b Amphotericin, Amendment published in Federal Register: December 9, 1965: 30 F. R. 15211
- 3) 厚生省編抗菌性物質製剤基準, 497~503, 1962
- 4) 厚生省編抗菌性物質製剤基準案
- 5) MCNALL, E. G., HALDE, C., NEWCOMER, V. D. & STERNBERG, T. H.: A biological assay for the determination of amphotericin A and B in biological fluids. *Antibiotics Annual* 1957/1958, 131~135
- 6) TAYLOR, R. L., LYNCH, H. P., TAYLOR, R. R. & WEISER, O. L.: The determination of serum concentrations of amphotericin B in men. *Amer. Rev. Resp. Dis. Tuberc.* 77: 1023~1025, 1958
- 7) LYNCH, H. J. Jr., FURCOLOW, M. L., YATES, J. L., TOSH, F. E. & LARSH, H. W.: Toxicity and absorption studies in humans of newer antifungal agents. in *Antimicrobial Agents Annual* 1960, Plenum Press, New York, 1961, p. 551
- 8) NEWCOMER, V. D., STERNBERG, T. H., WRIGHT, E. T. & REISNER, R. M.: Current status of amphotericin B in the treatment of the systemic fungus infections. *J. Chronic Dis.* 9: 354, 1959
- 9) LOHAN, P. H., FURCOLOW, M. L., BRASHER, C. A. & LARSH, H. W.: Therapeutic trials with the newer antifungal agents. in *Antibiotics Annual* 1956/1959, Medical Encyclopedia, Inc., New York, 1957, p. 467
- 10) HALDE, C., WRIGHT, E. T., POLLARD, W. H., II, NEWCOMER, V. D. & STERNBERG T. H.: The effect of amphotericin B upon the yeast flora of the gastrointestinal tract of man. in *Antibiotics Annual* 1956/1957 Medical Encyclopedia, Inc., New York 1957, p. 123
- 11) 池本秀雄: 真菌症, 内科, 19: 1040~1042, 1967 及び私信
- 12) 岩田和夫, 長井辰男: Amphotericin B の血中および臓器内濃度の実験的検討. *Chemotherapy* 16: 877~881, 1968

A METHOD OF DETERMINATION OF AMPHOTERICIN B CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

1. A Tentative Bioassay Method for Amphotericin B and the Results of Determination of Its Concentrations in Rabbit Serum and Viscera after Oral Administration

KAZUO IWATA and TATSUO NAGAI

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

In order to improve the current determination methods of amphotericin B which appear to be inadequate, particularly in determining the lower concentrations in body fluids, the authors have developed a modification of the FDA turbidimetric bioassay method.

The major differences to note in the proposed method are as follows: 1) *Candida albicans* C-a-13 strain was used as a test organism and the test medium employed was a semi-synthetic one supplemented with 1% casamino acids. 2) The organism was most sensitive to amphotericin B at the middle stage of its logarithmic growth phase (the MIC was 0.08 mcg/ml). 3) Determination of the antibiotic concentrations was performed by having serial dilutions of body fluids inoculated with the organism in its correct growth stage and then further incubating, with shaking, at 37°C for 15 hours. Measurements were taken with an electrophotometer of the Perkin-Elmer type using a wave length of 510 mμ. Recording the level of growth inhibition in terms of transmittance, the concentrations were calculated based on a standard growth inhibition curve. This curve had been previously established to provide a concentration range of between 0.003 to 0.11 mcg/ml of the antibiotic.

Employing this method, we determined the serum and intravisceral amphotericin B concentrations from rabbits which had received consecutive oral administrations of 50 or 100 mg per kg body weight,

every six hours for one day followed by 50 mg/kg every 6 hours for the next two days. In all cases the serum concentrations reached or exceeded the MIC four hours after the first dosage, then went up gradually after repeated application. After stopping, effective concentrations remained for a relatively long period of time. Compared with the serum concentrations in each group at four hours after the final administration, four times of the 100 mg/kg gave higher concentrations than four times of 50 mg/kg. Eight times of 50 mg/kg also attained a little higher than the four times of 100 mg/kg.

The drug concentrations in the organs tested were found to be as much as several times higher than the serum concentrations, especially in the spleen.

These results seem to suggest that oral administration of amphotericin B may be effective in the treatment of deep-seated mycoses.