

微量全血を用いる濾紙法による抗生剤濃度測定法に関する検討

新潟鉄道病院 内科 金 沢 裕
 " 薬剤科 倉 又 利 夫

(昭和 45 年 10 月 21 日受付)

われわれ¹⁻¹¹⁾は 1950 年来、低濃度測定可能な薄層平板による体液中濃度測定法として、おもにカップ法、一部には変法としての濾紙法¹⁰⁾をも加えてたびたび報告して来た。濾紙法の長所は新井ら¹²⁾、三方ら¹³⁾、藤井ら¹⁴⁾、OKADA¹⁹⁾らの報告にもみられるように、微量で充分施行しうるのが特徴であるとされている。しかしわれわれ¹⁰⁾の検討ではカップ法でも 0.03 ml 程度の微量サンプルで、濾紙法とはほぼ同様な鋭敏度で測定しうることをたしかめた。したがって濾紙法の特徴の 1 つはベッドサイドで微量血液を吸着して、被検サンプルを簡易に調製することにあると考えられる。しかし本法は施行上の簡易さはあるが、標準サンプルの調製などになお未解決の点があると考えられるので、これらの点を含めて、本法の実験条件に検討を加えた。

実験材料ならびに実験方法

検定菌：おもに *B. subtilis* PCI 219 の 10^8 /ml 程度に芽胞を有する菌液を用いた。

培地：MUELLER-HINTON 変法培地 (感性ディスク用培地, pH 7.4: ニッサン) を用いた。ただし Tetracycline (TC), Penicillin (PC) 類は pH を 6.5 に、Erythromycin (EM), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Kanendomycin (KDM) では pH 7.8 に調製した。

円形濾紙：東洋濾紙 No. 26, 直径 8 mm の円形濾紙 (paper disc) を用いた。

検定平板作製：検定菌を溶解培地に 1% に加えて混和し、5 ml ずつ規格型ペトリー皿に分注し、水平に固めた。

培養：ついで標準および被検ディスクにおいて冷所 (2~10°C) に放置 (6 時間) し、37°C で 12~16 時間培養した。

濃度測定：出現した阻止円直径を直角 2 方向から測定し、その平均値を求めた。半対数方眼紙上に標準ディスクの測定値の座標をとり、標準曲線を描き、その上に被検ディスク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

抗血液凝固剤としてのヘパリンの検定菌発育に及ぼす影響：標準サンプルとして全血使用の際に用いる抗血液

凝固剤としてのヘパリンが、検定菌に発育阻止作用を呈しては不都合と考えられるので、この点の検討を加えた。抗生剤の検定菌として代表的な *Staph. aureus* ATCC 6538 P, *E. coli* NIHJ, *B. subtilis* ATCC 6633 について、その接種平板上に、2 倍希釈段階濃度のヘパリン溶液に浸したディスクにおいて、その発育阻止円の出現の有無を検した。その結果は Table 1 に示すように、抗凝固剤として使用される 20 u/ml 以下の濃度では、いずれの検定菌にも発育阻止作用を呈せず、したがって充分使用しえられることがたしかめられた。

サンプル液量の阻止円直径に及ぼす影響：Paper disc に添加させるサンプル液量の阻止円直径に及ぼす影響を EM について検討した。Fig. 1 に示すように、サンプル液量の多いほど阻止円の増大する傾向が明らかであった。したがって被検サンプル量は一定にする必要があると考えられた。

Table 1. Inhibitory effect of heparin on the growth of three test organisms

Test organism	Concentration of heparin (u/ml)		
	20	10	5
<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538 P (FDA 209 P)	—	—	—
<i>E. coli</i> NIHJ	—	—	—
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (PCI 219)	—	—	—

Fig. 1 Effect of amount saturated in paper disc on the diameters of inhibition zones

Paper disc: 8 mm in diameter
 Amount saturated: 0.02 ml —●—●—
 0.03 ml —×—×—
 0.04 ml —○—○—

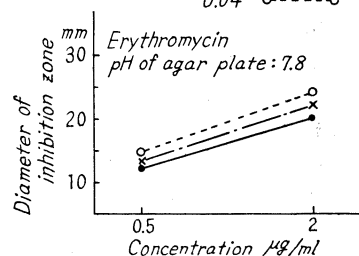
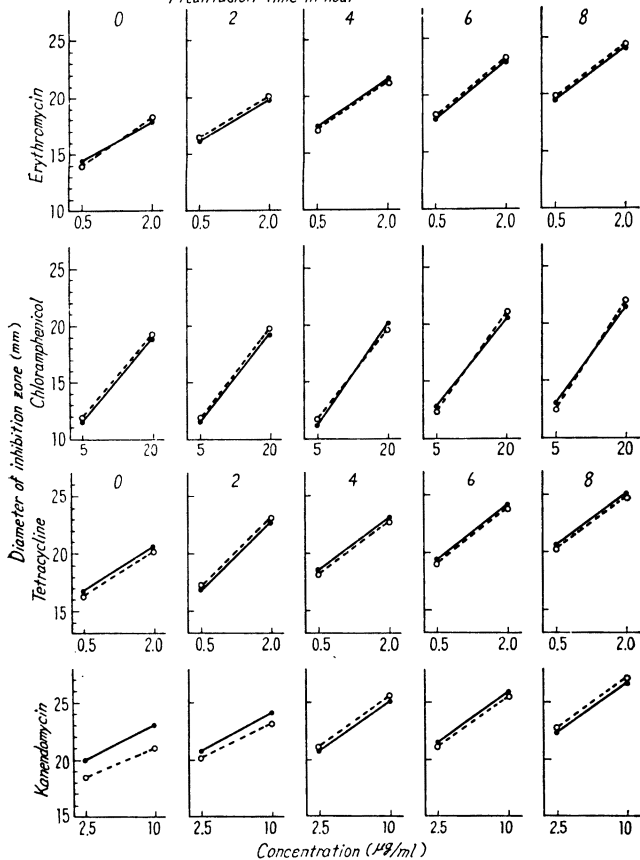


Table 2. Fluctuation of weight of paper discs saturated with whole blood under the regulated procedure
Paper disc used : 8 mm in diameter

Subject examined		Mean (n=20)	Standard deviation	Range of rejection limit	
				$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
Weight (mg)		16.95	0.89	± 1.94	± 2.73
Amount of water absorbed (ml)		0.0272	0.0019	± 0.00416	± 0.00583
Weight of paper disc saturated with whole blood (mg)	just after saturated	37.65	2.34	± 5.12	± 7.18
	after drying*	24.10	1.91	± 4.36	± 5.86

* dried for 1 hr. in ventilation after saturation

Fig.4 Effect of drying paper disc and prediffusion on the diameters of inhibition zones in the thin-agar paper disc method
 —●— Moist disc : just after saturation
 - - - ○ - - - Dried disc : dried for 1 hr for 30min. in ventilation after saturation .
 Prediffusion time in hour



がみられた。したがって標準曲線の直線性が失なわれ測定精度の劣る傾向が想像された。したがって培養前放置時間は 6~12 時間程度が適当と考えられた。

本法の測定精度についての検討：つぎに本法の測定精度について検討した。Table 3 に示すような薬剤について梅沢ら¹⁵⁾が cup 法について行なつた方式にならつて、

2 倍希釈，4 段階濃度で行なつた阻止円直径から，高，低濃度を標準，中濃度を被検体として求めた被検体濃度の変動の幅を算出した。その成績は Table 3 に示すように 3 枚の平均では，最大 146~74% から最小 118~86% 程度であつた。

薬剤濃度と阻止円直径の関係：Fig. 6 に示すように EM, CP, KDM, TC ではいずれも 6~12 時間前放置後培養の実験条件下では，全血含有薬剤濃度と阻止円直径の間にはほぼ直線関係が成立することがたしかめられた。

抗生剤服用後の測定成績：実際に抗生剤として CP(CP パルミテート散) を内服した場合の血中濃度を，上述の全血法と血漿について同時に測定した(ただし本実験には検定菌として *Sh. flex.* 3a 5184 を用いた)。Table 4 に示すように，同一検体についての全血 disc 法と，血漿カップ法との測定値は極めて接近した成績を示した。

考 察

微量の検体でしかも血清分離などの操作を必要とせず，ベッドサイドで被検サンプルの調製できる濃度測定法として，微量全血を用いる沓紙法に検討を加えた。すでに沓紙法では被検液量が阻止円直径に影響することは，三方¹³⁾，藤井ら¹⁴⁾により報告されているが，われわれも全血使用時にも同一の傾向があることを知つた。したがつて

paper disc 吸収のサンプルは標準，検体ともになるべく同一量にする注意が重要と考えられた。したがつてマイクロピペットを用いて(たとえば直径 8 mm の paper disc に 0.03 ml を吸収させるなど)吸収全量を正確に調製するか，または手技を統一して(たとえば paper disc の一端を全血にふれ，血液が全 disc にしみわたる

Table 3. Fluctuation of concentration values assayed by the whole blood paper disc method

Agents and concentrations tested

Agents	Concentration			
	H	M ₁	M ₂	L
Tetracycline $\mu\text{g/ml}$	8	4	2	1
Benzyl penicillin u/ml	2	1	0.5	0.25
Kanandomycin $\mu\text{g/ml}$	20	10	5	2.5

+ A : Concentration assayed, M₁ as the test and H, M₂ as the standard++ B : " " M₂ " M₁, L "

Agents No. of plates used	Penicillin		Tetracycline		Kanandomycin	
	A	B	A	B	A	B
1	138~75	146~72	169~66	133~78	153~67	193~60
2	125~82	131~79	141~75	122~84	135~77	159~69
3	121~85	125~83	133~77	118~86	128~81	146~74
4	118~87	121~85	128~81	115~88	124~83	139~77
5	116~88	119~86	126~83	114~89	121~84	134~79

Probable maximum range of deviation (σ) was obtained from the formula

$$\frac{\sigma^2}{S^2} F = (0.01)$$

$n_1 = \infty$
 $n_2 = 9$

Maximum range of fluctuation (Sample mean is taken as 100%)

$$< \text{sample mean} + \frac{\sigma / \sqrt{N}}{\text{fiducial lower limit of mean}}$$

$$> \text{sample mean} - \frac{\sigma / \sqrt{N}}{\text{fiducial upper limit of mean}}$$

where, S: sample standard deviation N: number of plate used F: variance ratio

Table 4. Comparison between measured values of microbiologically active levels ($\mu\text{g/ml}$) obtained by the whole-blood disc-plate method and those by the plasma cylinder-plate method after chloramphenicol palmitate powder administration

Case	Sample measured	Hour after 500 mg administration						Mean
		1	2	3	4	6	12	
No. 1	whole-blood (a)	0.40	1.1	1.3	1.7	2.0	1.8	-0.11
	plasma (b)	0.45	1.5	1.4	1.6	1.9	2.1	
	difference (a)-(b)	-0.05	-0.4	-0.1	+0.1	+0.1	-0.3	
No. 2	whole-blood (a)	0.42	9.0	2.9	6.2	5.0	1.7	+0.01
	plasma (b)	0.42	8.8	3.3	7.0	4.1	1.5	
	difference (a)-(b)	0	+0.2	-0.4	-0.8	+0.9	+0.2	
No. 3	whole-blood (a)	0.40	0.8	1.1	1.2	1.4	1.7	-0.03
	plasma (b)	0.32	0.75	0.8	1.1	1.5	2.2	
	difference (a)-(b)	+0.08	+0.05	+0.3	+0.1	-0.1	-0.5	

のを見とどけて、直ちに吸水紙に軽くふれて余分の血液をとり去るなど)のいずれかで行なうのが合理的であろう。とくに後者の方法は実際上便利と考えられるが、その際の血液吸着 disc 重量の変動を求めたところ上記の

ように $37.65 \pm 2.34 \text{ mg}$ (調製直後), $24.10 \pm 1.91 \text{ mg}$ (乾燥時)であつた。いずれも変動係数が10%以下であるので、幾何学的数値の変動から求める血中濃度の測定には充分使用しうると考えられた。

Fig. 5 Effect of prediffusion time on the dose-response curve in the thin agar paper disc method. Prediffusion time at 4h

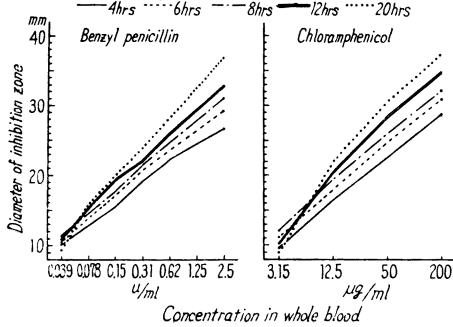
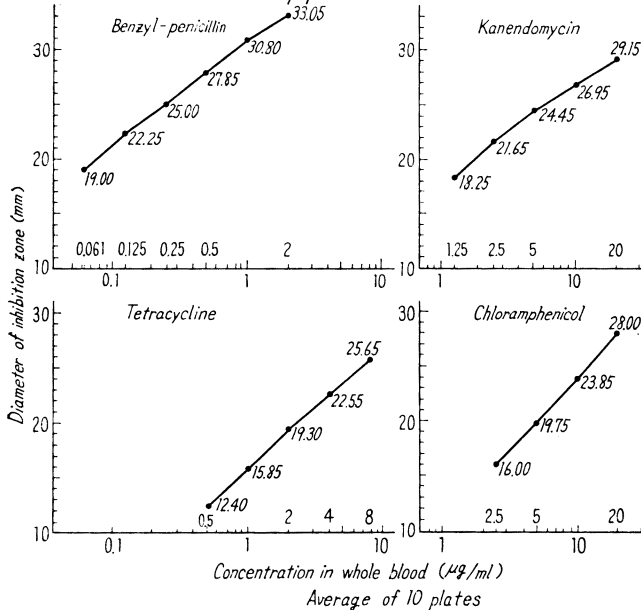


Fig. 6 Relation between drug concentrations in whole blood and diameters of inhibition zones in the paper disc method



カップ法では被検サンプルの pH または buffer、血清などの差により阻止円直径に差のみられることが知られているが、今回の実験でも paper disc 法でも同様の傾向がみられた。したがって全血と同一条件に近いものとしてヘパリン加全血をとりあげて標準液として使用するかについて検討した。異なる個体（健康者）からの採血および異なる保存法（2 日以内）によるヘパリン非添加血液の間には EM, TC, PC, SM などについては差異がみられなかった。したがってヘパリン加全血を標準サンプルとして用いるのが適当と考えられた。保存により血液の pH の変動があると考えられるが、全血であるので、その変動が血清のみの場合よりすくなく、また微量であるので、その各々の pH のわずかの差は培地の pH 緩衝作用でほとんど差を生じなくなるものと推定された。

また本法の問題点の 1 つと考えられるサンプルの保存乾燥による影響は培養前 6 時間以上放置すると、調製直後サンプルとの間に差がみられなくなることがたしかめられた。これは前放置の間に paper disc が培地から水分を吸収し、調製直後とほぼ同一条件に復元するためと推定された。しかし、いつばう培養前放置時間を 12~20 時間と長くすると、CP, PC など拡散のよい抗生剤では低濃度のほうでの阻止円の縮小がみられ、むしろ測定感度の低下がみられた。これは disc 法では cup 法と異なりサンプルの量がすくないので、薬剤濃度の低い場合は長時間では拡散による disc 内薬剤濃度の低下が生ずるためと考えられた。したがってとくに拡散の悪い薬剤以外では培養前放置時間は 6~12 時間程度が適当であろう。

さらに測定精度について検討したが、1 枚の平板では 193~60%（最大）から 122~74%（最小）、3 枚の平板では 146~74%（最大）から 118~86%（最小）であり、体液中濃度測定における cup 法の本全血 disc 法の測定精度にある程度近いと考えられ、実用性が充分うかがわれた。また全血中薬剤濃度と阻止円の関係については CP, KDM, PC, TC など、今回検した範囲では直線関係にあり、したがって普通カップ法などの寒天拡散法の検定方式で濃度の測定が可能と考えられた。実際に 1 例として本法で CP 内服後の血中濃度を測定したが、血漿中濃度とほぼ一致する値を示した。しかし薬剤の種類によりそれぞれ特異な傾向を示す可能性があると考えられ、今後この点に検討を加える予定である。

結 語

微量の検体でしかもベッドサイドで測定サンプルを調製しうる抗生剤血中濃度測定法としての全血を用いる濾紙平板薄層平板法 (Filter paper disc thinlayer method) に検討を加えた。

- 1) 濾紙に吸着させる全血量は阻止円直径に影響するので一定にする必要があつた。
- 2) 被検体として各種の pH の phosphate buffer、全血、血清を用いると EM, SM, TC では phosphate buffer の、SM では血清、全血のそれぞれの差による影響が明らかにみとめられた。したがって被検標準ともなるべく同一条件に調製する必要があつた。
- 3) 各種保存条件のヘパリン加全血および採血直後の全血（ヘパリン非添加）の本法測定値に及ぼす影響を観察した。EM, TC, PC, SM ではこれら検体の差による影響はほとんどみられなかった。したがってヘパリン加全

血を標準サンプルとして用いられると考えられた。

4) ディスク吸収全血量をなるべく同一にするために、disc の一端を全血にふれ血液が全 disc にしみわたるのをまつて、吸水紙に軽くふれて余分の血液をとり去るというよう調製法を統一した。この際の paper disc (直径 8 mm) の重量は 37.65 ± 2.34 mg (吸血直後)、 24.10 ± 1.91 mg (乾燥後) で、いずれも変動係数 10% 以下であった。

5) 培養前放置時間を 6 時間以上とすると、調製直後の disc と乾燥 disc の間に阻止円の差はみられなくなった。しかし培養前放置時間を 12 時間以上にすると、CP, PC などでは低濃度 disc ではむしろ阻止円縮小がみられた。したがってとくに拡散の低い薬剤以外では 6~12 時間の前放置が適当と考えられた。

6) 本法の測定精度としての実験誤差を TC, PC, KDM について検討して、1 枚の平板使用では 193~60% の範囲から 133~78% 以内の範囲、3 枚の平板では 146~74% 以内から 118~86% 以内との成績がえられた。

7) *B. subtilis* PCI 219 を用いる薄層平板法を用いて上述の方法を行ない、KM, TC, PC-G, CP で cup 法と同様に全血中薬剤の対数濃度と阻止円直径の間に直線関係が成立することがたしかめられた。

8) 実際に CP 内服後の血中濃度を本法で充分測定することができた。

本研究に種々助言を頂いた昭和医大婦人科 張博士に厚く感謝の意を表す。

本論文の要旨は第 17 回日本化学療法学会総会 (昭和 44 年 4 月於大阪) ならびに第 16 回日本化学療法学会東日本支部総会 (昭和 44 年 11 月於東京) で報告した。

文 献

- 1) 宮村定男, 金沢 裕: 薄層カップ法による体液中ペニシリンおよびストレプトマイシン濃度測定法。J. Antibiotics 3: 411~416, 1950
- 2) 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について。臨床 4: 678~689, 1951
- 3) 金沢 裕, 倉又利夫: サルファ剤の生物学的活性濃度測定法ならびに 2, 3 サルファ剤についての測定成績。Chemotherapy 8: 478~485, 1960
- 4) 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 8: 295~296, 1960
- 5) KANAZAWA, Y. & T. KURAMATA: Assay method for biologically active isoniazid in body fluid by agar diffusion method using sapro-

phytic mycobacterium as test organism, Chemotherapy 11: 176~179, 1963

- 6) 金沢 裕, 倉又利夫, 七里義雄, 堀 祐久, 富樫和夫, 田沢和内, 大倉憲吾: Phenoxypyropylpenicillin および Aminobenzyl-penicillin の体液中濃度測定法ならびに臨床経験。J. Antibiotics, Ser. B 16: 50~57, 1963
- 7) 金沢 裕, 倉又利夫, 丸山 勇, 河路 清, 田沢和内: 合成 Cephalosporin C 製剤 (Cephaloridine, Cephalothin) の基礎的 (*in vitro*) 抗菌力, 併用効果, 体液中濃度, 不活化酵素) 検討ならびに臨床経験。J. Antibiotics, Ser. B 19: 122~130, 1966
- 8) 金沢 裕, 倉又利夫: 体液中 Capreomycin 濃度測定法。J. Antibiotics, Ser. B 17: 190~192, 1964
- 9) 金沢 裕, 倉又利夫, 七里義雄: Lincomycin 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。J. Antibiotics, Ser. B 18: 64~69, 1965
- 10) 金沢 裕, 倉又利夫: 寒天平板拡散法による Nitrofurantoin 系薬剤の体液中微生物学的活性濃度測定法。Chemotherapy 14: 319~322, 1966
- 11) KANAZAWA, Y. & T. KURAMATA: Agar-plate diffusion method for the assay of microbiologically active concentration of synthetic chemotherapeutic agents in body fluids. 5th international congress of chemotherapy. Suppl. Vol. 449~454, 1967
- 12) 新井義夫, 木村義民: 体液中及び尿中抗菌性物質の微量生物学的活性濃度測定法。Chemotherapy 10: 198~199, 1962
- 13) 三方一沢, 長谷川弥人, 富岡 一, 吉村幸高, 鳥飼勝隆, 山田淑児: 濾紙平板法による抗生剤の体液中濃度に関する研究。日伝会誌 40: 242~243, 1966
- 14) 藤井良知, 市橋治雄, 紺野昌俊, 岡田一雄: 抗生物質微量測定法における 2, 3 の検討。Chemotherapy 17: 1009~1010, 1969
- 15) 梅沢浜夫, 鈴木幸朗, 竹内富雄: ペニシリン検定法の研究。ペニシリン 1: 197~204
- 16) 藤井良知, 紺野昌俊: FUJIII-GROSSMAN 抗生物質微量定量法の検討。Chemotherapy 12: 22~30, 1964
- 17) 金沢 裕, 倉又利夫: 微量血液を用いる濾紙法による抗生物質濃度測定法に関する検討。Chemotherapy 18: 214~215, 1970
- 18) 日高正昭 (17) に対する追加発言 *Ibid.*
- 19) OKADA, K., M. KONNO & R. FUJIII: The merits or demerits of two microbioassay methods for determination of antibiotic levels in the body fluids of infants. Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy (1): 782~788, 1970

MICROASSAY METHOD FOR ANTIBIOTIC CONCENTRATIONS IN WHOLE BLOOD BY THE USE OF PAPER DISCS

YUTAKA KANAZAWA & TOSHIO KURAMATA*

Department of Internal Medicine and Department of Pharmacy*,

Niigata Railway Hospital

A paper disc thin-layer plate microassay method for determination of antibiotic concentrations in the body fluid, using minute amounts of test sample preparable for the assay at bedside, was evaluated as to its usefulness and reproducibility of the results thereof.

1) It was found essential to allow blood samples be absorbed in constantly the same quantities by assay discs, since the diameters of inhibition zones produced were affected by the amount of a blood sample with which the filter paper discs were impregnated.

2) When phosphate buffers at various pH, a serum and a whole blood were used in the reference assay series, it was found that the results of assay for erythromycin and streptomycin were influenced by the pH of phosphate buffer, and the results of assay for streptomycin by the serum and whole blood. It followed that it was important to use the same ones as the reference samples as much as practicable.

3) Effect of various preserving conditions on the results of assay with heparinized whole blood samples and with (non-heparinized) whole blood samples obtained immediately prior to assay was studied. We observed practically no influence due to the sample difference upon the assay results for erythromycin, tetracycline, benzyl-penicillin and streptomycin. The findings indicated practicability of the use of heparinized whole blood as the standard sample.

4) With a view to equalization of the amounts of whole blood samples with which filter paper discs saturated, the technique for preparation of saturated assay discs was standardized as follows: Allow one end of a disc to touch the whole blood sample and wait until the whole blood soak into entire disc; then remove excess blood from the disc with a blotting paper pressed lightly on it; and use it in the assay. The amount of whole blood absorbed by the disc (8 mm in diam.) was 37.65 ± 2.34 mg on the average immediately after the saturation and was 24.10 ± 1.19 mg after drying. In either case the coefficient of variation was not more than 10%.

5) The difference in whole blood content between the moist disc (immediately after saturation) and dried disc did affect the diameters of inhibition zones but it was found to be abolished when the discs were allowed for prediffusion for not less than six hours before incubation. However, when allowed for prediffusion for more than twelve hours, discs impregnated with low concentrations of chloramphenicol or benzyl-penicillin showed some reduction in the diameter of inhibition zones. Consequently, it was considered advisable to perform prediffusion for six to twelve hours, unless the chemotherapeutics to be assayed for were particularly poorly diffusible.

6) To assess the assay method as to its accuracy, ranges of experimental errors in tetracycline, benzyl-penicillin, and kanamycin assays were determined. As a result, it was found that the range of experimental error was 78~133% (minimum) to 60~193% (maximum) when single assay plates were employed, and 86~118% (min.) to 75~146% (max.) when assays were carried out in triplicate, respectively.

7) The subject paper disc technique was applied to the thin-layer plate method using spores of *B. subtilis* PCI 219 as test organism. As a result, a linear relationship was confirmed to exist between the logarithmic value of drug concentration in whole blood sample and the diameter of inhibition zones in cases of assay with kanamycin, tetracycline, erythromycin, and chloramphenicol.

8) In practice, levels of the active concentration of chloramphenicol in whole blood were determined by the said assay method with reasonable accuracy in individuals receiving the agent by oral route.