

PC-904 の体液内濃度測定法

小松敏昭・木崎容子・入江健二・江田靖子・奥田隆夫・野口 浩・井沢昭雄

住友化学工業株式会社医薬事業部研究開発センター

三 木 文 雄

大阪市立大学医学部第1内科学教室

グラム陰性桿菌、とくに緑膿菌に強力な活性を示す広域半合成ペニシリン PC-904 は、血清蛋白結合率は高いが、その結合は強固なものではなく可逆的であり、また本剤は他の多くの β -ラクタム系抗生物質同様生体成分共存下や pH などの条件によっては不活化の起る事実などのため、本剤の体液内濃度測定に当って測定条件の差により測定値に差異を生じることが当然予測される¹⁻³⁾。

以下、PC-904 の bioassay に際しての諸条件の影響を検討し、標準的な本剤の体液内濃度測定法を設定したので、その成績を報告する。

I. 検定菌の選択

(1) 実験材料と方法

Staphylococcus aureus 209 P JC-1, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Streptococcus pyogenes* Cook, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* NIH JC-2, *E. coli* O 111, *Proteus vulgaris* HX 19, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 の 8 菌株について日本化学療法学会標準法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した⁴⁾⁵⁾。なお、*S. pyogenes* Cook の場合は測定用培地として、5% 家兎血加ハートインフュージョン寒天培地 (pH 7.2) を用いた。

(2) 実験結果

PC-904 の最小発育阻止濃度 (MIC) は、Table 1 に示すとおりで、 10^6 /ml 接種の場合、MIC 値の小さいは

Table 1 Antibacterial activities (MIC) of PC-904 tested by various organisms ($\mu\text{g/ml}$)

Test organism	Inoculum size (cells/ml)	
	10^6	10^8
<i>S. aureus</i> 209 P JC-1	0.39	0.78
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.05
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.1	0.1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.2	1.56
<i>E. coli</i> NIH JC-2	0.39	0.39
<i>E. coli</i> O111	0.78	0.78
<i>P. vulgaris</i> HX19	0.006	25
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 10490	0.2	0.39

Medium: HIA (pH 7.2)

うから *P. vulgaris* HX19, *M. luteus* ATCC 9341, *S. pyogenes* Cook, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* NCTC 10490, *S. aureus* 209 P JC-1, *E. coli* NIH JC-2, *E. coli* O 111 の順であった。

以上の結果から、MIC 値が最小の菌株として *P. vulgaris* HX19 を、次いで MIC 値の小さいものとして *M. luteus* ATCC 9341 を、さらに MIC 値は必ずしも最小ではないが、孢子懸濁液として、一般に検定菌に用いられる *B. subtilis* ATCC 6633 を取り上げ、以下の PC-904 測定方法設定のための条件検討に用いた。

II. 測定方法の検討

1 カップ法

(1) 実験材料と方法

i) 検定菌株

前項の実験結果から、*P. vulgaris* HX19, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 の 3 菌株を測定方法設定のための検討用検定菌株とした。

ii) 培養液および孢子懸濁液の調製

P. vulgaris HX19 および *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌として使用する場合は、前培養としてトリプトソーヤブイヨン (ニッスイ) を培地として用い、 37°C 18~24 時間培養し、生菌数が *P. vulgaris* の場合は 5×10^8 /ml, *M. luteus* の場合は 3×10^8 /ml の菌液を得、これを接種用原液として用いた。

B. subtilis ATCC 6633 を検定菌として使用する場合は、日本抗生物質医薬品基準の一般試験法に準じて、孢子懸濁液の調製を行い、得られた 10^8 /ml 濃度の孢子懸濁液を接種用原液として用いた。

iii) 測定用培地

一般市販培地として、ハートインフュージョン寒天 (ニッスイ) (以下 HIA と略す)、トリプトソーヤ寒天 (ニッスイ) (以下 TSA と略す)、普通寒天 (ニッスイ) (以下 NA と略す)、ミューラーヒントン寒天 (ニッスイ) (以下 MHA と略す)、また独自に調製した仮称 ML 培地 (ポリペプトン 0.6%, 酵母エキス 0.3%, 肉エキス 0.15%, ブドウ糖 0.1%, 寒天末 1.5%, pH 6.3) を使用した。

iv) 測定方法

検定菌を含む寒天培地 10ml を直径 90mm のプラスチックシャーレに流し、水平台上で固化させた。接種菌量は寒天培地に添加する接種用液体培地または胞子懸濁液の添加 % で示した。

寒天平板上にカップを置き、37°C で 18~20 時間培養後生じた阻止円の直径を測定し、検査線画いた。

(2) 実験結果

i) 測定用培地の選択

HIA, TSA, NA, MHA および ML 培地にそれぞれ検定菌 *M. luteus* ATCC 9341 の 3×10^8 /ml の菌液を 5% 濃度となるように加え、37°C で 18~20 時間培養し、得られた阻止円を比較することにより測定用培地の検討を行った。

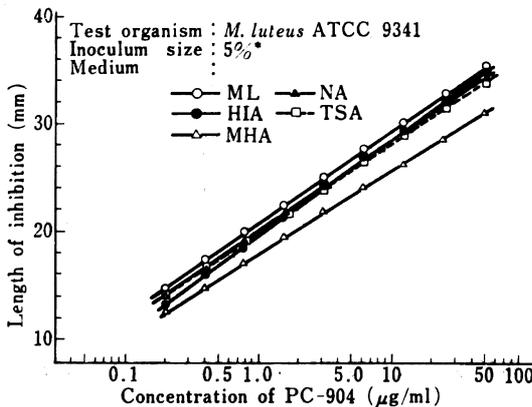
結果は Fig.1 に示すとおりで、ML 培地は最も感度が良好で、次いで HIA, TSA, NA の各培地もほとんど同様の傾向を示し、MHA 培地が感度の点では最も劣っていた。いずれの培地の場合も 0.2~50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で直線性が成立した。

ML 培地は測定用培地として最も高感度であったが、その程度は著明なものではなく、かつ特別に調製する必要があること、MHA 培地は市販されているが、最も感度が悪かったため、この 2 種の培地は以下の検討から除外した。

HIA, TSA, NA の各培地については、いずれも同程度の感度と傾斜を得たが、NA の場合は菌の生育状態が最も不良で、阻止円周囲の明瞭さの点で劣っていた。また、HIA と TSA では、HIA のほうがやや明瞭な阻止円を示した。

従って、入手が容易であり、阻止円が明瞭で、かつ感度の点でも良好な培地として HIA を測定用培地として

Fig.1 Standard curves of PC-904 on various assay media using *M. luteus* ATCC 9341 (cup method)



選択し、以下の検討は HIA 培地を用いて行った。

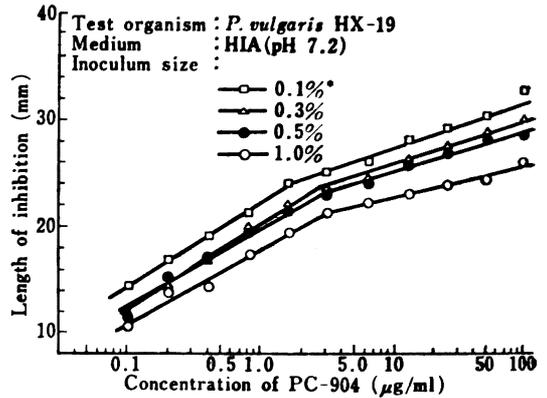
ii) 検定菌ならびに接種菌量の検討

測定用 HIA 培地に、*P. vulgaris* HX19, *M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 の 3 検定菌を、それぞれの接種菌量を変えて加え、37°C 18~20 時間培養し、検査線ならびに阻止円の性状におよぼす菌量の影響を検討した。

結果は Fig.2, Fig.3 および Fig.4 に示すとおりである。

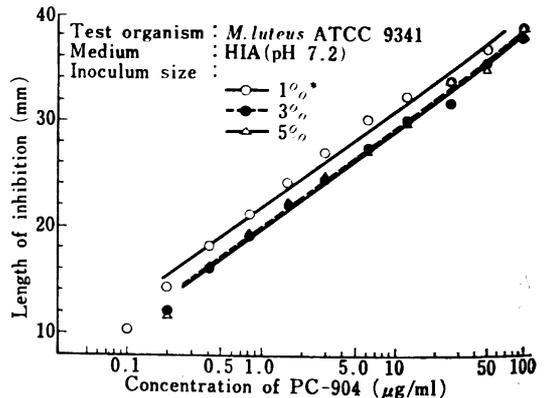
(a) *P. vulgaris* HX19 測定用 HIA 培地に接種菌液 (5×10^8 /ml) を 0.1, 0.3, 0.5 および 1% 濃度となるように加えた場合の検査線は Fig.2 に示すとおりで、0.1% 添加の場合には、生育が不十分で、阻止円の読み取りが困難であった。また 1% 添加の場合には、多重阻止円

Fig.2 Standard curves of PC-904 on various inoculum sizes using *P. vulgaris* HX19 (cup method)



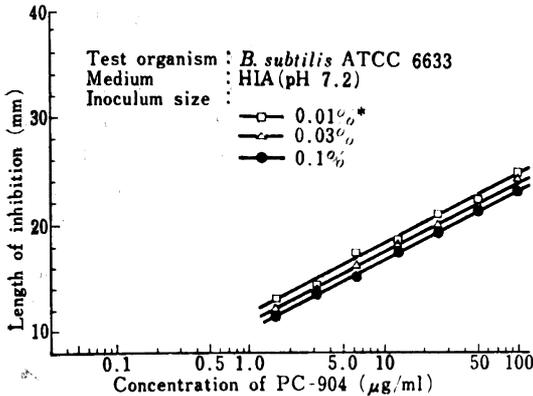
* Subculture (5×10^8 /ml) was added to HIA by 0.1, 0.3, 0.5 and 1%.

Fig.3 Standard curves of PC-904 on various inoculum sizes using *M. luteus* ATCC 9341 (cup method)



* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 1, 3 and 5%.

Fig. 4 Standard curves of PC-904 on various inoculum sizes using *B. subtilis* ATCC 6633 (cup method)



* Spore suspension (10^8 /ml) was added to HIA by 0.01, 0.03 and 0.1%.

が生じ、阻止円直径の読み取りの変動が大であった。0.3% および 0.5% 添加の場合は、多重阻止円が生じることもなく、生育状態が最も一定しており、判定しやすかった。また、それぞれの接種菌量のいずれの場合も検出限界は、 $0.1\mu\text{g/ml}$ と高かったが直線性の点では、 $0.1\mu\text{g/ml}$ から $1.56\sim 3.13\mu\text{g/ml}$ の間、ならびに $1.56\sim 3.13\mu\text{g/ml}$ から $100\mu\text{g/ml}$ までの間で直線性は成立したが、 $1.56\sim 3.13\mu\text{g/ml}$ で検量線の屈曲が認められた。

(b) *M. luteus* ATCC 9341 測定用 HIA 培地に接種菌液 (3×10^8 /ml) を、1, 3 および 5% 濃度となるように加えた場合の検量線は Fig. 3 に示すとおりで、1% 添加の場合は、菌密度が小さく阻止円周囲が不鮮明で、読み取り誤差が大きかった。3% および 5% 添加の場合には、阻止円の大きさはほぼ等しかったが、5% 添加の場合のほうが菌の生育状態が一定し、阻止円周囲が明瞭であった。

また、それぞれの接種菌量のいずれの場合も、検出限界は $0.1\sim 0.2\mu\text{g/ml}$ で、 $0.2\sim 0.39\mu\text{g/ml}$ から $100\mu\text{g/ml}$ まで直線性が成立した。

(c) *B. subtilis* ATCC 6633 測定用 HIA 培地に孢子懸濁液 (10^8 /ml) を、0.01, 0.03 および 0.1% 濃度となるように加えた場合の検量線は、Fig. 4 に示すとおりで 0.01% および 0.03% 添加の場合は菌密度が小さくなり、阻止円周囲が不整、不明瞭となった。0.1% 添加の場合には阻止円周囲が明瞭で読み取りやすかった。

また、それぞれの接種菌量のいずれの場合も検出限界は $1.56\mu\text{g/ml}$ であり、 1.56 から $100\mu\text{g/ml}$ の間で直線性が成立した。

以上のとおり、*P. vulgaris* HX19 は接種菌量と関係

なく、検出感度の点では最も高かったが、検量線の直線性に問題が残った。

M. luteus ATCC 9341 は、接種菌量に関係なく、検出感度も高く、検量線の直線性も保たれていた。また、菌の生育状態の一定すること、阻止円周囲が明瞭に読み取れること等から 5% 添加の場合が最良と考えられた。

B. subtilis ATCC 6633 は、接種菌量に関係なく直線性は保たれていたが、検出感度は低く、0.1% 添加の場合には阻止円周囲の明瞭さの点で優れていた。

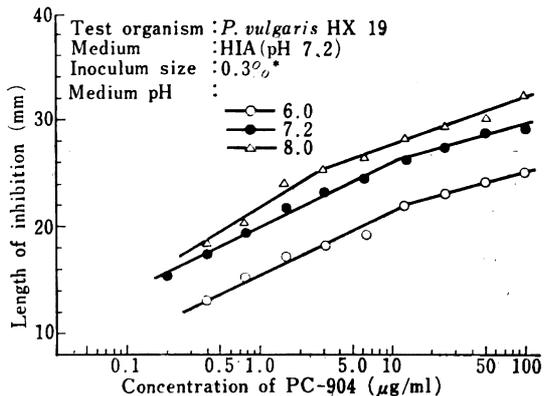
iii) 培地 pH の影響

測定用培地に HIA を用い、検定菌に *P. vulgaris* HX 19 を用いた場合には 5×10^8 /ml の菌液を 0.3% 濃度となるように、*M. luteus* ATCC 9341 の場合には 3×10^8 /ml の菌液を 5% 濃度となるように、また *B. subtilis* ATCC 6633 の場合には 10^8 /ml の菌液を 0.1% 濃度となるように、それぞれ加え、測定用 HIA 培地の pH を 6.0, 7.2 および 8.0 と変えて PC-904 の検量線におよぼす培地 pH の影響を検討した。

結果は Fig. 5, 6 に示すとおりで、*P. vulgaris* HX19 の場合は培地 pH の影響を受けやすく、pH 6.0 の酸性側で感度が劣ることを認めた。*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 の場合は、pH 7.2 と 8.0 では検量線に差はなく、pH 6.0 の酸性側ではむしろ感度がやや上昇する傾向を認めた。

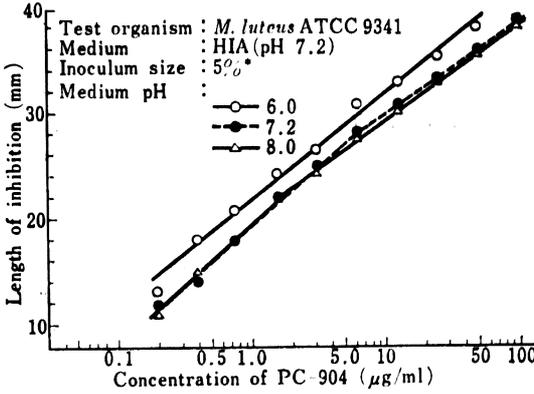
以上の結果から、*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 の場合、pH を酸性側にしたほうが感度は上昇するが、その程度はわずかであるので、とくに市販培地の pH を修正することなく使用し得るものと考えられた。

Fig. 5 Standard curves of PC-904 on various medium pH using *P. vulgaris* HX19 (cup method)



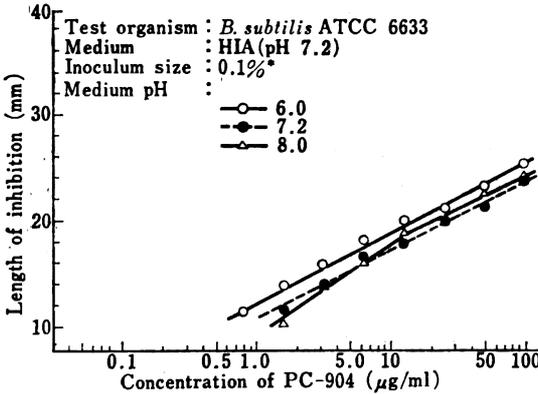
* Subculture (5×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 6 Standard curves of PC-904 on various medium pH using *M. luteus* ATCC 9341 (cup method)



* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 7 Standard curves of PC-904 on various medium pH using *B. subtilis* ATCC 6633 (cup method)



* Spore suspension (10^8 /ml) was added to HIA by 0.1%.

iv) PC-904 希釈液の検討

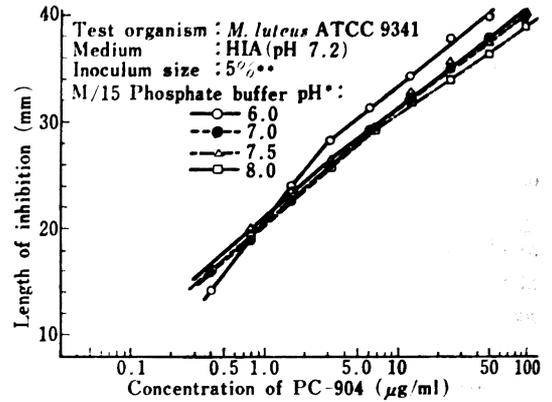
(a) 希釈液の pH 測定用 HIA 培地の pH は 7.2 と一定にし、検定菌 *M. luteus* ATCC 9341 の 3×10^8 /ml の菌液を 5% 濃度に加え、PC-904 を希釈する M/15 リン酸緩衝液の pH を 6.0, 7.0, 7.5 および 8.0 とかえ、検量線におよぼす PC-904 希釈液の pH の影響を検討した。

結果は Fig. 8 に示すとおりで、M/15 リン酸緩衝液の pH が 7.0, 7.5, 8.0 の場合は検量線に差を認めなかったが、pH 6.0 の場合は $2.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で阻止円直径は大となるが、 $0.39 \mu\text{g/ml}$ ではかえって阻止円直径は小さくなり、検量線の屈曲が認められた。

(b) ヒト血清およびリン酸緩衝液 前項と同一条件で、PC-904 の希釈液としてヒト血清（健康成人の新鮮血清）を使用した場合ならびに Moni-Trol I を使用した場合の検量線を、M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した場合の検量線と比較検討した。

結果は Fig. 9 に示すとおりで、新鮮ヒト血清の場合は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) の場合に比し、阻止円が小さく、同一阻止円直径を示す PC-904 の濃度は、M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) の場合に比し、ヒト血清の場合 3~4 倍であった。また、新鮮ヒト血清希釈に比較して

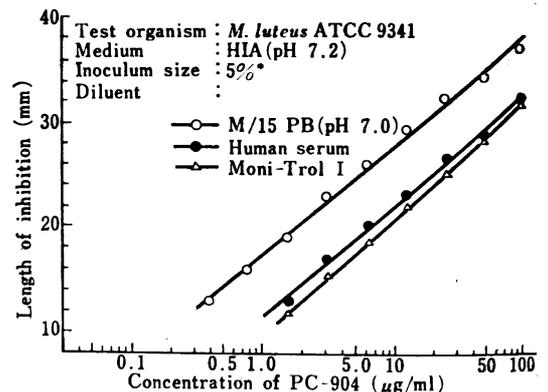
Fig. 8 Standard curves of PC-904 on various pH of M/15 phosphate buffer as diluent of PC-904 (cup method)



* PC-904 was dissolved and diluted in M/15 phosphate buffer at various pH.

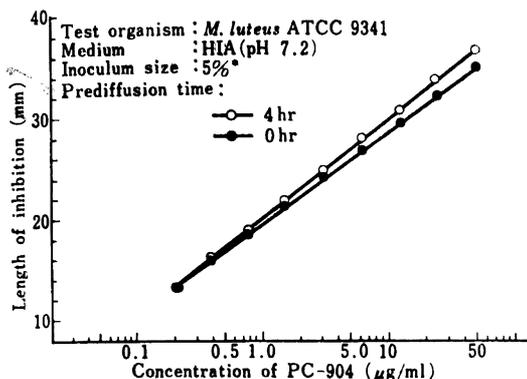
** Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 9 Standard curves of PC-904 using M/15 phosphate buffer, fresh human serum and Moni-Trol I as diluent of PC-904 (cup method)



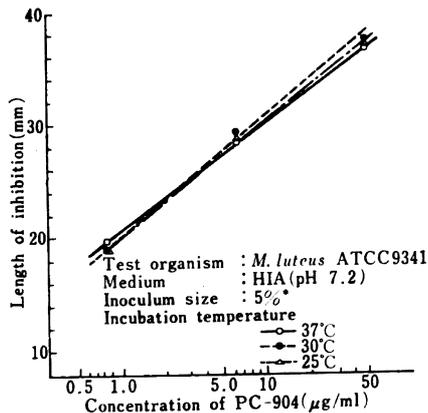
* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 10 Standard curves of PC-904 on prediffusion times at 4°C (cup method)



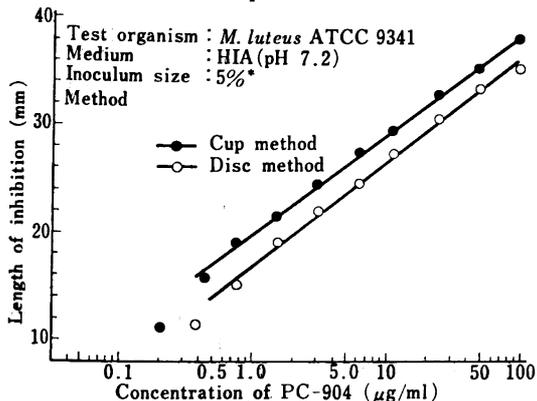
* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 11 Standard curves of PC-904 on various incubation temperatures (cup method)



* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Fig. 12 Comparison of standard curves of PC-904 between cup method and disc method



* Subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

Moni-Trol Iにて希釈した場合は、わずかに阻止円が小さくなる傾向を認めた。

v) 予備拡散、培養温度および培養時間の検討

(a) 予備拡散 測定用 HIA (pH 7.2) 培地に、検定菌 *M. luteus* ATCC 9341 の 3×10^8 /ml の菌液を 5% 濃度となるように加え、カップに PC-904 溶液を注入後予備拡散を行わずに直ちに培養した場合と、4°C で 4 時間予備拡散を行った場合を比較し、予備拡散を行うことによる阻止円の読みやすさ、検出感度について検討した。

結果は Fig. 10 に示すとおりで、4°C で 4 時間予備拡散することにより、PC-904 の濃度が高くなるに従い、阻止円直径が予備拡散なしに比べて増大する傾向を認めたが、0.2 µg/ml の検出限度付近ではその影響はほとんど認めなかった。

したがって予備拡散を行うことにより、阻止円直径を増大させることは可能であるが、検出感度を高めることは不可能であった。

(b) 培養温度 測定用培地に HIA (pH 7.2) を用い、*M. luteus* ATCC 9341 の 3×10^8 /ml の菌液を 5% 濃度となるように加えた条件で、25°C、30°C および 37°C の培養温度で 20 時間培養した阻止円を比較し、検査線に及ぼす培養温度の影響を検討した。

結果は Fig. 11 に示すとおりで、25°C、30°C および 37°C のいずれの温度で培養した場合も、検査線に差は認めなかった。

したがって、一般に使用される 37°C の培養温度で充分測定可能である。

(c) 培養時間 測定用 HIA (pH 7.2) 培地に、検定菌 *M. luteus* ATCC 9341 の 3×10^8 /ml 菌液を 5% 濃度となるように加え、37°C の培養温度で、18、20、24、28 および 40 時間と培養時間を延長し、培養時間の影響を検討した。

結果は、培養時間を 22~40 時間と延長することにより、阻止円直径は小さくなる傾向にあるが、阻止円円周が明瞭になる場合を認めた。従って、接種菌量が少ない場合や菌の生育が不十分で阻止円円周が不明瞭な場合は、培養時間を 18~20 時間から 24~28 時間、または 40 時間と延長することにより、阻止円直径の読み取りを容易にし得た。

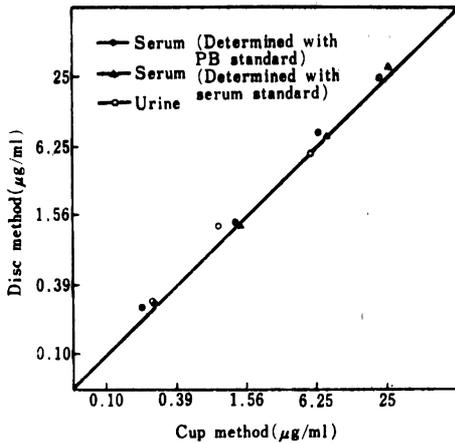
2. ディスク法

(1) 実験材料及方法

前述のカップ法で検討した条件を用い、ディスク法による PC-904 濃度測定の可能性を検討した。

ディスクは東洋濾紙社製の thick、直径 8 mm のものを用い、ディスクを薬剤希釈液、または被検液に浸した

Fig. 13 Relationship of assay values of PC-904 between cup method and disc method



Test organism: *M. luteus* ATCC 9341
 Test medium: HIA (pH 7.2)
 Inoculum size: subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%.

後、乾燥濾紙上で余剰の液を除き、直ちに測定用培地に貼布し、 37°C で18~20時間培養後生じた阻止円直径を測定した。

(2) 実験結果

ディスク法にて得られた検量線は Fig. 12 に示すとおりで、検出感度は $0.2 \sim 0.39 \mu\text{g/ml}$ とカップ法の場合の $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ に比し、約 1/2 に低下したが、 $0.78 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ の濃度の範囲では、直線性が成立した。

また、PC-904 投与後を得られたラット血清およびラット尿の同一検体を用いて、カップ法とディスク法による測定値を比較した結果は Fig. 13 に示すとおりで、両法の測定値は良く一致した。

3. 重層法

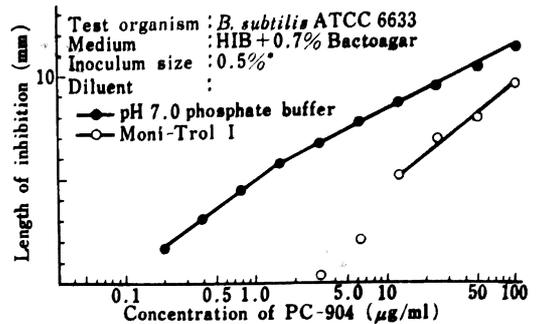
(1) 実験材料と方法

測定用培地として Heart infusion broth (Difco) に 0.7% の Bactoagar (Difco) を添加した培地 (pH 7.2) を用い、検定菌として *B. subtilis* ATCC 6633 の 10^8 /ml 孢子懸濁液を 0.5% に加え、内径 4mm の小試験管に分注、PC-904 のリン酸緩衝液 (pH 7.0) および Moni-Trol I 希釈液を重層し、予備拡散を行うことなく、 37°C 18 時間培養後発育阻止帯長を測定し、標準曲線を作製した。

(2) 実験結果

PC-904 の重層法での標準曲線は Fig. 14 に示すとおりで、リン酸緩衝液希釈の場合、阻止帯を認めた最低濃度は $0.2 \mu\text{g/ml}$ であるが、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ での阻止帯はやや不鮮明で、実用に供し得る測定可能範囲は $0.39 \sim 100 \mu\text{g/ml}$

Fig. 14 Standard curves of PC-904 in superposition method



* Spore suspension (10^8 /ml) was added to medium by 0.5%.

ml と考えられた。Moni-Trol I 希釈 PC-904 の場合は、最低阻止帯出現濃度は $3.13 \mu\text{g/ml}$ であるが、 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下では阻止帯が不鮮明であり、測定可能範囲は $12.5 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ であった。

III. その他の検討

1. 検定菌による測定値の差の検討

SD 系ラットに PC-904, 50mg/kg を筋注して得られた血清中、および尿中の PC-904 濃度を、*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とするディスク法で測定し、検定菌の差により測定値に差を生じないか否かを検討した。

結果は Table 2 に示すとおりで、ラット血清中および

Table 2 Assay values of PC-904 in rat serum and rat urine using *M. luteus* ATCC 9341 and *B. subtilis* ATCC 6633 (disc method)

	Sample No. (dilution)	Test organism	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
			PB standard	Serum standard
Rat serum	1	<i>M. luteus</i>	$15.7 \pm 0.3^*$	38.8 ± 0.6
		<i>B. subtilis</i>	12.8 ± 0.1	31.6 ± 0
	2	<i>M. luteus</i>	15.5 ± 0.1	38.5 ± 0.3
		<i>B. subtilis</i>	16.1 ± 0.2	39.3 ± 0.4
	3	<i>M. luteus</i>	6.4 ± 0.2	18.2 ± 0.5
		<i>B. subtilis</i>	6.1 ± 0	16.0 ± 0
Rat urine	1 ($\times 10$)	<i>M. luteus</i>	155 ± 1	—
		<i>B. subtilis</i>	153 ± 2	—

SD rats (δ), 50mg/kg , i. m., * Mean \pm SE (3 discs)
 Medium : HIA (pH 7.2)

Inoculum size: *M. luteus*; subculture (3×10^8 /ml) was added to HIA by 5%
B. subtilis; spore suspension (10^8 /ml) was added to HIA by 0.1%.

Table 3 Assay values of PC-904 in different research institutes with the same samples

	Sample No.	Sumitomo	Osaka City University	
		Disc method*	Cup method* Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Super-position method**
Rat serum ($\mu\text{g/ml}$)	1	17.9	13.5	17.5
	2	14.1	14.0	13.0
	3	13.6	14.0	12.0
	4	24.9	27.0	30.0
	5	3.7	3.3	3.4
	6	3.5	2.7	2.6
Rat urine ($\mu\text{g/ml}$)	1	184.6	171	125
	2	17.6	11.7	9.6
	3	4.7	4.7	—

Concentration assayed with PB standard ($\mu\text{g/ml}$)

Test organism: * *M. luteus* ATCC 9341

** *B. subtilis* ATCC 6633

Medium : HIA (pH 7.2)

Inoculum size : *M. luteus*; subculture ($3 \times 10^8/\text{ml}$) was added to HIA by 5%.

B. subtilis; spore suspension ($10^8/\text{ml}$) was added to HIA by 0.1%.

尿中濃度において、*M. luteus* を検定菌とした場合と、*B. subtilis* を検定菌とした場合いずれの場合も測定値に大差を認めなかった。

2. 研究施設間の測定値の変動の検討

SD系ラットに PC-904, 50mg/kg を筋注して得られた血清および尿の同一検体を2カ所の研究施設で、それぞれ独自に *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とする薄層カップ法、またはディスク法、および *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする重層法で測定し、前記 PC-904 測定法の普遍性を検討した。

結果は Table 3 に示すとおりで、2施設の間で、また測定方法の間でそれぞれ測定値に大差を認めなかった。

3. PC-904 のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、血清中および尿中での安定性の検討

(1) リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での安定性

PC-904 を 50 $\mu\text{g/ml}$ 濃度含む M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 4°C および -20°C に保存し、7日間にわたって力価の測定を行い、PC-904 の M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での安定性を検討した。PC-904 の力価の測定は、*M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とするカップ法で行った。

結果は Fig. 15 に示すとおりで、4°C および -20°C に保存した場合、いずれも7日間は安定であった。

(2) 血清および尿中での安定性

Fig. 15 Stabilities of PC-904 in M/15 phosphate buffer (pH 7.0)

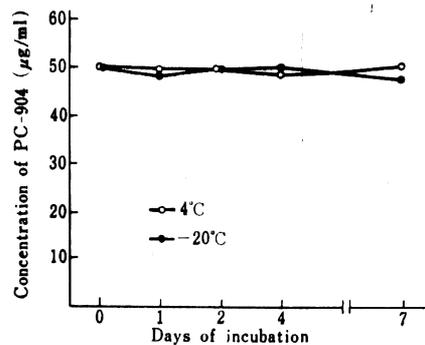


Table 4 Stabilities of PC-904 in the rat serum stocked at -20°C (disc method)

a) Concentration assayed with PB standard ($\mu\text{g/ml}$)

Sample No.	Test organism	Days stocked		
		0	1	3
1	<i>M. luteus</i>	17.2 ± 0.4*	16.8 ± 0.4	15.7 ± 0.3
	<i>B. subtilis</i>	16.6 ± 0.5	17.5 ± 0.6	12.8 ± 0.1
2	<i>M. luteus</i>	16.2 ± 0.4	17.3 ± 0.4	15.5 ± 0.1
	<i>B. subtilis</i>	15.6 ± 0.6	14.7 ± 0.9	16.1 ± 0.2
3	<i>M. luteus</i>	6.2 ± 0.2	6.1 ± 0.1	6.4 ± 0.2
	<i>B. subtilis</i>	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.1 ± 0

b) Concentration assayed with serum standard ($\mu\text{g/ml}$)

Sample No.	Test organism	Days stocked		
		0	1	3
1	<i>M. luteus</i>	40.6 ± 0.7*	41.7 ± 0.6	38.8 ± 0.6
	<i>B. subtilis</i>	41.3 ± 0.8	40.2 ± 1.5	41.6 ± 0
2	<i>M. luteus</i>	34.3 ± 0.8	32.3 ± 0.7	38.5 ± 0.3
	<i>B. subtilis</i>	36.2 ± 0.5	34.7 ± 0.6	39.3 ± 0.4
3	<i>M. luteus</i>	16.7 ± 0.6	13.5 ± 0.4	18.2 ± 0.5
	<i>B. subtilis</i>	17.1 ± 0.5	15.8 ± 0.3	16.0 ± 0

Rat 50mg/kg, i. m., * Mean ± SE (3 discs)

Medium and inoculum size: the same as in Table 2

ラットに 50 mg/kg の PC-904 を筋注し、30分後に採血、直ちに血清を分離し、得た血清について採取直後と、-20°C で1日および3日間保存した条件で PC-904 力価の判定を行い、ラット血清中での PC-904 の安定性を検討した。PC-904 濃度は、*M. luteus* ATCC 9341 および *B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする、ディスク法で測定した。

結果は Table 4 に示すとおりで、PC-904 のラット血

Table 5 Stabilities of PC-904 in the human serum and urine stocked at -20°C (disc method)

	Sample No.	Days stocked		
		0	2	10
Human serum* ($\mu\text{g/ml}$)	1	12.3	12.0	11.7
	2	41.2	43.4	38.7
	3	14.1	13.7	14.7
	4	17.8	17.6	14.3
Human urine** ($\mu\text{g/ml}$)	1	5.4	5.6	5.5
	2	4.9	4.5	4.8
	3	2.8	2.9	2.1
	4	3.4	3.4	3.4

* Concentration assayed with serum standard

** Concentration assayed with PB standard
Test organism: *M. luteus* ATCC 9341

清中濃度は、採取直後測定の場合と -20°C で1日および3日間保存後測定した場合で、いずれも大差を認めなかった。

また、健康成人にPC-904を1g点滴静注し、30分～1時間後に採血、直ちに血清を分離し、また8～24時間後採尿して得たヒト血清およびヒト尿について、採取直後と -20°C で2日および10日間保存した条件で、PC-904の力価測定を行い、ヒト血清中およびヒト尿中のPC-904の安定性を検討した。PC-904濃度は、*M. luteus* ATCC 9341を検定菌とするディスク法で測定した。

結果は、Table 5に示すとおりでPC-904のヒト血清中およびヒト尿中濃度は、採取直後測定の場合と、 -20°C で2日および10日間保存後測定した場合と、いずれの場合も大きな変動は認められなかった。

上記の検討結果に基づき、著者らはPC-904の体液内濃度測定法として以下に記す案を作成した。

PC-904 体液内濃度測定法 (案)

1. 方法

カップ法またはディスク法が本剤の生物学的測定に適している。

B. subtilis ATCC 6633を試験菌とした重層法によっても測定可能であるが、低濃度の測定には不適當である。(注1)

2. 試験菌株

M. luteus ATCC 9341 (= *Sarcina lutea* PCI-1001)
(注2)

3. 測定用培地

ハートインフュージョン寒天培地, pH 7.2 ± 0.1

4. 接種菌液および接種菌量

トリプトソーヤブイヨンにて 37°C 18～24時間培養菌液をディスク法、カップ法とも2～5%になるように測定用培地に接種する。(注3)

5. 測定用培地量

カップ法、ディスク法とも直径90mmのシャーレを使用する場合 sheeded agar 10ml とする。(1層法の場合)

6. 標準液希釈液

- (1) pH 7.0のM/15リン酸緩衝液
- (2) ヒト血清または Moni-Trol I (注4)

7. PC-904標準液の作成、保存

PC-904の標準原液 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を作成し、上記希釈液にて 100 $\mu\text{g/ml}$ より2倍系列希釈を行う。

(注5)

8. 検体の処理

血清はそのまま測定に供し、尿などPC-904濃度の高い試料はM/15リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いて希釈を行い測定する。(注6)

9. 培養温度、時間

37°C , 18～20時間。(注7)

(注1) *B. subtilis* ATCC 6633を検定菌とした重層法では、最低測定可能濃度が、リン酸緩衝液希釈で0.39 $\mu\text{g/ml}$ 、血清希釈で12.5 $\mu\text{g/ml}$ である。

(注2) *P. vulgaris* HX19のほうがPC-904に対する感受性が高いが、直線性に問題があり、測定誤差が大となるので検定菌としては不適當と考えられる。

(注3) *M. luteus* ATCC 9341のトリプトソーヤブイヨン中 37°C 18～24時間培養により通常 $\text{OD}_{630} = 0.3 \sim 0.5$ を示すが、発育の悪い場合にはさらに培養時間を延長する。

日本抗生物質医薬品基準に基づき、 $\text{OD}_{630} = 1.0$ の菌浮遊液を用いる場合は、1.0%接種する。

(注4) リン酸緩衝液のpH 6.0～8.0の間では、阻止円直径に大きな差は認められない。血清を用いてPC-904を希釈した場合、リン酸緩衝液希釈に比して阻止円直径はかなり短縮する。

新鮮ヒト血清および Moni-Trol I を用いた標準曲線の間では、わずかながら差を生じるので、血清中濃度測定に当り標準液の希釈に用いた血清の種類を併記することが望ましい。

(注5) PC-904の標準原液は実験のつど調製することが望ましいが、 -20°C 以下に凍結保存すれば最低7日間は、力価の低下を認めない。ただし保存中は融解、再凍結を行なってはならない。

(注6) 血清、尿などの試料は採取後できるだけ速やかに測定することが望ましいが、 -20°C 以下に凍結保

存すれば最低7日間は、力価の低下をきたさない。

(注7) 菌の発育が不十分で、阻止円が不明瞭な場合は培養時間を延長して判定する。

予備拡散はとくに行う必要はないが、4°Cで2~4時間程度拡散すると阻止円が大きくなる。

文 献

- 1) NOGUCHI, H.; Y. EDA, H. TOBIKI, T. NAKAGOME & T. KOMATSU: PC-904, a novel broad-spectrum semisynthetic penicillin with marked antipseudomonal activity; microbiological evaluation. *Antimicrob. Agents & Chemother.*

9: 262~273, 1976.

- 2) 小松敏昭, 木崎容子, 入江健二, 奥田隆夫, 赤栗信二, 野口 浩, 井沢昭雄, 紺野昌俊: PC-904の血清蛋白, 組織成分との結合について。 *Chemotherapy* 26 S-2: 154~158, 1978
- 3) 入江健二, 奥田隆夫, 野口浩, 赤栗信二, 井沢昭雄, 山森芬, 小松敏昭: PC-904の動物における吸収・分布・排泄。 *Chemotherapy* 26 S-2: 138~147, 1978
- 4) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法の標準化について。 *Chemotherapy* 16: 98~99, 1968
- 5) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974

THE BIOASSAY METHOD OF PC-904 IN BODY FLUIDS

TOSHIAKI KOMATSU, YOKO KISAKI, KENJI IRIE, YASUKO EDA,
TAKAO OKUDA, HIROSHI NOGUCHI and AKIO IZAWA
Research and Development Center, Pharmaceuticals Division,
Sumitomo Chemical Co., Ltd.

FUMIO MIKI

First Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School

Studies on the bioassay method of PC-904 concentration in body fluids were performed and the following results using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as an assay organism in heart infusion agar (pH 7.2) were obtained.

1) Detectable sensitivity limit of this method for PC-904 was 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by thin layer cup method or 0.2~0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by paper disc method.

2) Standard curve of PC-904 using M/15 phosphate buffer (pH 7.0) as diluent of PC-904 as slightly different from that of fresh human serum or Moni-Trol I.