

AB-206 の微生物学的定量法

井沢昭雄・木崎容子・小松敏昭

住友化学工業株式会社医薬事業部研究開発センター

原 寛・杉田和彦・大村貞文

大正製薬株式会社総合研究所

AB-206 はグラム陰性菌に対して、広いスペクトラムを有する化学療法剤であり¹⁾、本薬剤の基礎および臨床評価において、経口投与後の血清その他の生体材料中の抗菌活性の正確な測定が重要な意義をもつものと考えられる。そこで測定段階での誤差を小さくするため、AB-206 の検出感度を上げ、かつ最も精度の高い測定法を見出すことを目的に以下の検討を行なった。

I. 実験材料

1. 検定菌

住友化学工業株式会社および大正製薬株式会社において保存されている標準株より *E. coli* を中心に使用した。

2. 培地

Heart infusion agar および broth, Tryptosoya agar, 普通寒天, 感性ディスク用培地 (変法 Mueller-Hinton agar) はいずれも日本製薬製を用いた。

3. 薬剤

AB-206 は中性および酸性の水には難溶のため炭酸ソ

ーダ溶液にて 5 mg/ml の原液を作製し、これを適宜希釈して使用した。また用時調製とした。

4. 標準液用緩衝液と血清

AB-206 標準液を作製のため、M/15 Sørensen リン酸緩衝液およびヒト血清 Moni-Trol I (DADE) を用いた。

II. 方法および結果

1. 検定菌の選定

標準菌に対する AB-206 の抗菌活性を日本化学療法学会標準法²⁾によって測定した結果を Table 1 に示す。AB-206 は検討した菌のうち *E. coli* NIHJ JC-2, *E. coli* Kp, *E. coli* B の 3 株に対し最も小さな MIC 値を示したので、これらの株を用いて以下の試験を行なった。

2. 培地の検討

上記 3 株を Heart infusion agar, 普通寒天, Tryptosoya agar および感性ディスク用培地を用いて薄層カップ法で検量線を作成した。接種菌量は Heart infus-

Table 1 Antibacterial activity of AB-206 and its metabolites (M-1, M-2 and M-3) *in vitro*

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	AB-206		M-1		M-2		M-3	
	10^8 *	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6	10^8	10^6
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	0.20	0.10	12.5	6.25	>200	>200	>200	>200
<i>E. coli</i> O 111	0.39	0.39	12.5	12.5	>200	>200	>200	>200
<i>E. coli</i> Kp	0.10	0.10	6.25	3.13	>200	>200	>200	>200
<i>E. coli</i> B	0.10	0.10	6.25	3.13	>200	>200	>200	>200
<i>Proteus mirabilis</i> GN 2425	0.78	0.39	25	25	>200	>200	>200	>200
<i>P. vulgaris</i> HX 19	0.20	0.20	6.25	6.25	>200	>200	>200	>200
<i>P. morganii</i> Kono	0.39	0.20	25	12.5	>200	>200	>200	>200
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.39	0.20	100	25	>200	>200	>200	>200
<i>K. pneumoniae</i> GN 45	0.20	0.20	12.5	12.5	>200	>200	>200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	12.5	3.13	100	25	>200	>200	>200	>200
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P JC-1	12.5	12.5	>200	>200	>200	>200	>200	>200
<i>S. aureus</i> Smith	6.25	6.25	>200	>200	>200	>200	>200	>200
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.39	0.39	50	25	>200	>200	>200	>200
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 9634	3.13	1.56	>200	50	>200	>200	>200	>200

* Inoculum size: 10^8 or 10^6 cells/ml

Fig.1 Standard calibration lines for AB-206 by *E. coli* Kp (○··), *E. coli* B (▲··) or *E. coli* NIHJ JC-2 (●··) in modified Mueller-Hinton agar

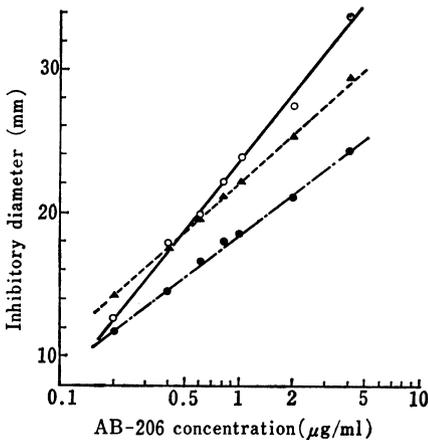
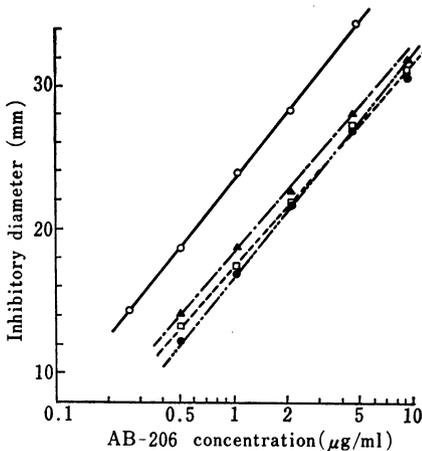


Fig.2 Standard calibration lines for AB-206 by *E. coli* Kp in modified Mueller-Hinton agar (○—), nutrient agar (●··), heart infusion agar (▲··) or Tryptosoya agar (□··)



ion broth 中 37°C, 18時間培養した菌液 0.5% とした。結果は Fig.1 と Fig.2 に示すように感性ディスク用培地を用いた場合に最も大きな阻止円を形成し、かつ *E. coli* NIHJ を用いた場合、最も劣る定量感度であった。この場合、阻止円直径の判読のしやすさはこれら3株間に差を認めなかったが、検量線の勾配は *E. coli* Kp において最も大きかった。

3. 培地 pH

感性ディスク用培地の pH を 6.0, 7.2 および 8.0 に調製し、*E. coli* Kp を指示菌とする薄層カップ法で検量線を比較したところ、Fig.3 に示すように pH 6.0 で阻止円がやや大きくなるが判定のしやすさなどでは大差なく、市販培地そのまま (pH 7.2) で実用上充分使用できると思われた。

Fig.3 Standard calibration lines for AB-206 by *E. coli* Kp in modified Mueller-Hinton agar adjusted pH to 6.0 (●··), 7.2 (○—) or 8.0 (▲··)

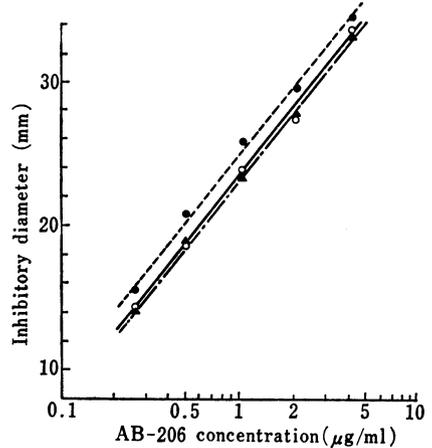
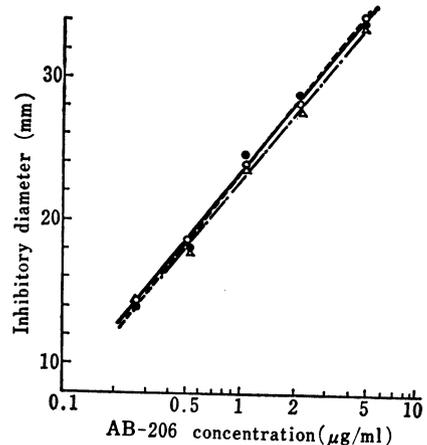


Fig.4 Standard calibration lines for AB-206 diluted in M/15 phosphate buffer of pH 6.0 (●··), pH 7.4 (○—) or pH 8.0 (▲··)



4. 標準液 pH

AB-206 の標準液を M/15 リン酸緩衝液 pH 6.0, 7.4, 8.0 によって作製し、感性ディスク用培地中 *E. coli* Kp を指示菌として検量線を比較したところ、これらの pH による検量線はほぼ一致し、差は認められなかった (Fig. 4)。

5. 接種菌量

Heart infusion broth 中で培養した *E. coli* Kp の菌液を感性ディスク用培地に 0.1, 0.5 および 2.0% 接種し検量線を比較したところ、Fig.5 に示すように接種量 0.1% の場合に最も阻止円は大きい、菌量が少なすぎるためか直線性に問題があり、0.5% が最も良好な結果を示した。

6. 重層カップ法と薄層カップ法

感性ディスク用培地を用い、20 ml の寒天培地の基層

Fig.5 Standard calibration lines for AB-206 by *E. coli* Kp inoculated 0.1% (●···), 0.5% (○—) or 2.0% (▲···) into modified Mueller-Hinton agar

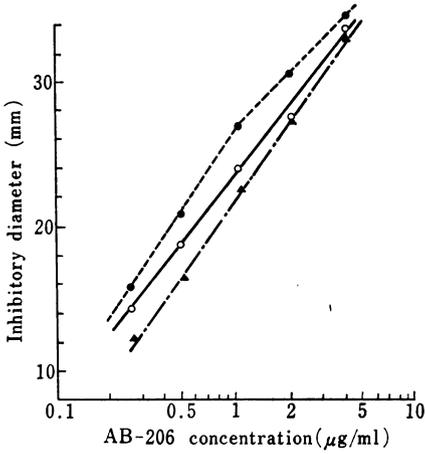


Fig.6 Standard calibration lines for AB-206 by *E. coli* Kp in single (○—) or double (●···) layer of modified Mueller-Hinton agar

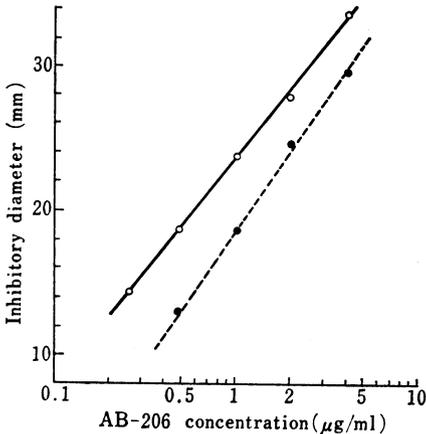
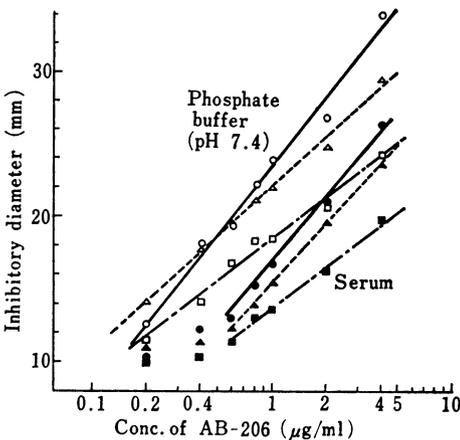


Fig.7 Standard calibration lines for AB-206 diluted with phosphate buffer or serum by *E. coli* Kp (○●), *E. coli* B (△▲) or *E. coli* NIHJ (□■)



上に 4 ml の種層を重層した平板と、10 ml の種層のみの薄層平板での検量線を比較すると、Fig.6 に示すように薄層平板の方が大きな阻止円直径を示した。

7. リン酸緩衝液と血清希釈による検量線

AB-206 を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) またはヒト血清 (Moni-Trol I) で希釈し、薄層カップ法を用いて検量線を作製すると、Fig.7 に示すようにヒト血清希釈 AB-206 の阻止円直径はリン酸緩衝液によるそれらより小さくなった。また両検量線間の隔りは用いた *E. coli* 3 株いずれにおいても同じ傾向であった。

8. AB-206 代謝物の影響

AB-206 は動物体内において代謝され、代謝物として M-1~M-3 および AB-206 を含むこれらのグルクロナイドが見い出されている⁹⁾。代謝物 M-1~M-3 の構造を Fig. 8 に、また *in vitro* 抗菌活性を Table 1 に示す。代謝物 M-1 にのみ抗菌力が認められたが、AB-206 に比べると数 10 分の 1 の強さでしかなく、また M-2、M-3

Fig.8 Chemical structures of AB-206 and its metabolites (M-1, M-2 and M-3)

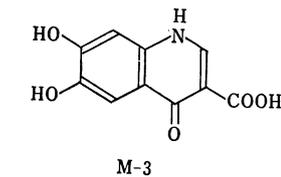
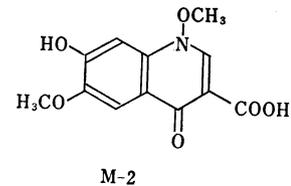
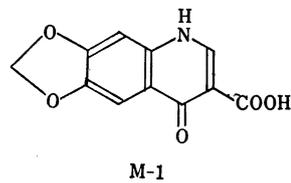
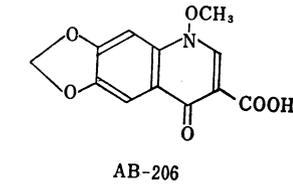


Fig.9 Combined effect of AB-206 and M-1 on the antibacterial activity

<i>E. coli</i> Kp		M-1(μg/ml)						
		25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
AB-206 (μg/ml)	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	0.02	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+

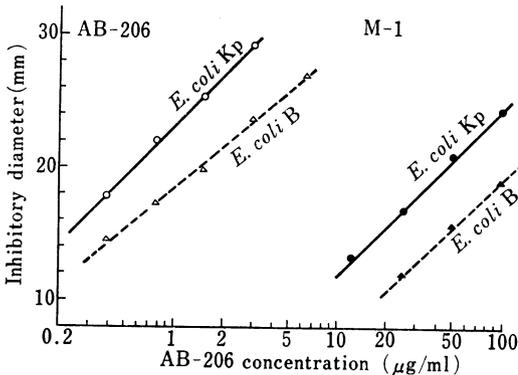
Fig.10 Combined effect of AB-206 and M-1 on the antibacterial activity

<i>E. coli</i> B		M-1(μg/ml)						
		25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
AB-206 (μg/ml)	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	0.02	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+

Fig.11 Combined effect of AB-206 and M-1 on the antibacterial activity

<i>E. coli</i> NIHJ		M-1(μg/ml)						
		25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
AB-206 (μg/ml)	0.78	-	-	-	-	-	-	-
	0.39	-	-	-	-	-	-	-
	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	-	-	-	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-	-	-	-
	0.02	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+

Fig.12 Standard calibration lines for AB-206 and its metabolite M-1 by *E. coli* Kp and *E. coli* B in modified Mueller-Hinton agar



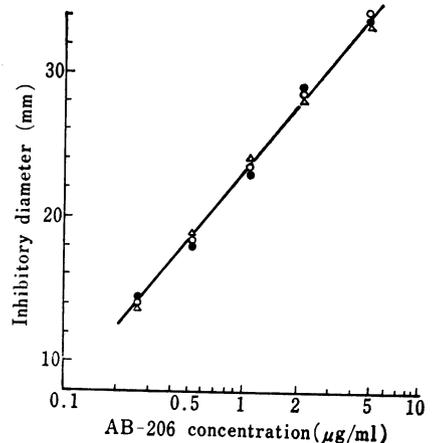
にはまったく抗菌力が認められなかった。次に AB-206 と M-1 が共存したとき、両者間の相乗または相加作用の有無を Box 法を用いて検討した。結果は Fig.9~11 に示すように AB-206 の 0.05 μg/ml, M-1 の 1.56 または 3.13 μg/ml においてのみ協力関係を認めたが、その他の濃度においてはまったく無関係であった。AB-206 と M-1 の検量線を *E. coli* Kp と *E. coli* B を用いて検討したが、Fig.12 に示すように、M-1 は AB-206 と同一の阻止円を示すために AB-206 の約 100 倍量を要した。また AB-206 中に M-1 を AB-206 の 3 倍量まで添加しても阻止円直径にはまったく影響を認めなかった。

以上のように、AB-206 はヒトまたは実験動物に投与検出される程度の代謝物によっては、微生物学的定量に際してまったく影響を受けないと考えられる。

9. AB-206 の安定性

AB-206 原体はきわめて安定であり、50°C 3 カ月間放置してもほとんど分解しないほど安定であるが、水溶液とした場合に光に不安定な傾向を示す⁴⁾。M/15リン酸緩衝液で作製した AB-206 の標準希釈系列液を i) 冷暗所保存, ii) 蛍光灯照明の明るい室内に 2 時間, iii) 同じく 4 時間放置後、薄層カッ法にて抗菌力を比較したが、いずれの検量線も完全に一致し、通常の定量操作時間程度ではほとんど測定結果に影響のないことが明らかとなった (Fig.13)。

Fig.13 Influence of illumination on stability of AB-206 in solution; stored in cold and dark place (○), illuminated for 2 hr. (●) and for 4 hr. (Δ) at room temperature



III. 考 察

AB-206 は経口投与可能な化学療法剤であり、投与後の生体内濃度を測定する場合、経口投与による吸収のばらつき、およびグラム陰性菌を検定菌にした場合、検量線の勾配が小さいなどの理由によりばらつきや誤差を生じやすい。そこでできるだけ検量線の勾配が大きく、か

つ再現性の良い条件の検討を行なったところ、結果的には Pipemidic acid の体液濃度測定法⁹⁾に近い方法となった。すなわち *E. coli* Kp 株を用いた検量線が最も大きな勾配となり、*E. coli* B や *E. coli* NIHJ JC-2 を用いるよりも誤差が少ないと判断された。

また AB-206 の抗菌活性が血清添加により阻害され、阻止円が小さくなることは別報¹⁾に記載したように蛋白結合に由来するものである。血清中の薬剤濃度は薬効、吸収・排泄および安全性の観点より蛋白結合したものも含めた総薬物量を表示するのが通例であり、血清を用いた検量線を使用すべきと思われる。

水溶液中の AB-206 は紫外線に不安定であるが、直射日光の入らない通常の室内光下においては比較的安定である。しかし AB-206 は遮光した場合はより安定なので、できるかぎり遮光条件下で定量操作を実施した方がより定量誤差を小さくすることができると思われる。

なおカップ法に準じて、ペーパーディスク法についても検討を行なったが、培地組成、検定菌、接種菌量、血清添加の影響など、カップ法で得られたのと同様の結果を示し、良好な検量線が得られた。したがって AB-206 の生体内濃度測定はカップ法およびペーパーディスク法によって行なうことが可能と考える。

IV. 結 論

AB-206 の微生物学的定量法としては次の方法が最も適当と考えられる。

1. 薬剤の溶解：AB-206 は中性および酸性の水に難溶なため、1% 炭酸ソーダ溶液で 5mg/ml の溶液を作製し(薬剤原液)、これを適宜希釈して使用する。このように調製した薬剤原液は褐色ビン中には保存できるが、用時調製の方が望ましい。

2. 標準液の調製：ヒト血清中濃度測定の場合、薬剤原液を Moni-Trol I (DADE) または Consera (日水) で 2 倍系列希釈して標準液とする。動物血清中濃度測定の場合、同種血清で作製する。

尿、胆汁、組織内、糞便中濃度測定の場合は M/15 リ

ン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈、調製する。

3. 定量用検定菌：*E. coli* Kp 株を用いる。

4. 定量用菌液の調製：普通寒天斜面培養菌 (培養後 7 日間使用可能) の 1 白金耳を Heart infusion broth 10 ml に接種し、37°C 18 時間培養し、接種菌液とする。

5. 定量用培地：感性ディスク用培地 (日水製薬) が最も定量感度が高い。

6. 平板の作製 (薄層平板)：定量用培地を溶解滅菌後 45°C 前後に冷却後、4) 項の接種菌液を 0.5% 混合し、10 ml ずつシャーレ (9 cm 直径) に分注、水平に固化させる。

7. 定量用試料の希釈：血清試料は原液のまま測定するが、必要に応じて同種血清で希釈する。尿、胆汁、組織ホモジネート、糞などの試料は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて希釈する。

8. 定量操作：通常のカップ法またはディスク法による。37°C 18 時間培養後、阻止円を測定する。

(本研究は昭和 47 年 2 月から 52 年 1 月までに行なった。)

文 献

- 1) 井沢昭雄, 木崎容子, 入江健二, 江田靖子, 小松敏昭, 並木信重郎, 水谷 卓, 長手尊俊, 神那邦男, 大村貞文: 新化学療法剤 AB-206 の抗菌作用. *Chemotherapy* 26(Suppl. 4): 48~59, 1978
- 2) MIC 測定法改定委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について. *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 3) 吉武 彬, 川原一夫, 庄野文章, 井沢昭雄, 小松敏昭, 山森芬: ¹⁴C 標識 AB-206 の各種実験動物における代謝. *Chemotherapy* (Suppl. 4): 83~90, 1978
- 4) 吉武 彬, 井沢昭雄, 川原一夫, 庄野文章, 小松敏昭: 新化学療法剤 AB-206 の *in vitro* における代謝. 未発表
- 5) 清水喜八郎, 紺野昌俊, 深谷一太, 松本文夫, 中山一誠, 岩井重富, 清水当尚, 中村信一: Pipemidic acid の体液内濃度測定に関する検討. *Chemotherapy* 23: 2707~2716, 1975

THE BIOASSAY METHOD OF AB-206

AKIO IZAWA, YOHKO KISAKI and TOSHIAKI KOMATSU
Research and Development Center, Pharmaceuticals Division,
Sumitomo Chemical Co., Ltd.

HIROSHI HARA, KAZUHIKO SUGITA and SADAFUMI OHMURA
Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

The bioassay method of AB-206 was investigated by using various media, assay organisms and inoculum sizes and the results were as follows :

Since AB-206 was insoluble in water at acidic and neutral pH, it was dissolved at 5 mg/ml in 1% sodium bicarbonate aqueous solution. This solution is able to be stocked in a brown bottle but it is desirable to make it just before use.

AB-206 standard calibration line was prepared in Moni-Trol I and animal serum for the determination of serum level of human and animal respectively and in M/15 phosphate buffer (pH 7.4) to determine level in urine, bile, tissue homogenates and feces. The AB-206 solution (5 mg/ml) was serially 2-fold diluted to give concentrations of 10 to 0.1 μ g/ml.

E. coli Kp, employed as the assay organism, was harvested in heart infusion broth from nutrient agar slants, and 0.5 ml of this suspension was used to inoculate into 100 ml of melted modified Mueller-Hinton agar (Nissui). A 10 ml amount of this seeded agar was poured to Petri-dishes (9 cm diameter). Four or six stainless-steel cylinder cups were placed on the solidified surface of each plate. The standard solutions or unknown samples were placed into the cups and the dishes were incubated for 18 hr. at 37°C, and the zones of inhibition were measured.

The biological activity in serum was determined from the standard curve which was constructed by a standard serum solution and to determine the levels in urine, bile, tissue homogenates and feces, the standard curve by using M/15 phosphate buffer was employed.