

6059-S の微生物学的定量法による体液内濃度測定法に関する検討

木村 靖雄・吉田 正
塩野義製薬株式会社研究所

Oxacephem 系の新注射用抗生剤 6059-S の体液内濃度測定法を各種の微生物学的定量法について検討した。

6059-S に高感度の変異株 *Escherichia coli* 7437 を検定菌として使用した。培地には Trypto-soy agar (栄研) を使用し、最終菌量 5×10^8 cells/ml を接種すれば鮮明な阻止像が得られ、6059-S を感度良く測定できる。

6059-S 測定感度は、薄層カップ法で $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、帯培養法で $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、寒天孔平板法で $0.4 \mu\text{g/ml}$ 、ペーパーディスク法で $0.8 \mu\text{g/ml}$ であった。

血漿中濃度の測定に際しては、標準溶液はプールした人血漿、または Moni-Trol I, Consera 等で調製することが望ましいが、phosphate buffer (pH 7.0) で 5 倍に希釈すれば、buffer 標準溶液を用いて測定することができる。尿、胆汁試料は、buffer でそれぞれ 10 倍、5 倍以上希釈することによって検量線に与える影響はなくなった。

6059-S 標品には微量 (約 1% 以下) の脱炭酸体が含まれているが、これらの検定法で両薬は同じ感受性を示し、検量線がよく一致した。

セルロース薄層クロマトグラフィーによって分離すれば、bioautography によって分別定量が可能であり、この方法は活性代謝物の検索法として有効である。

各種体液試料は、 -20°C に凍結保存する方法で、6059-S は少なくとも 1 週間は安定に保たれた。

緒 言

6059-S は、特にグラム陰性菌に対して優れた抗菌作用を示し、その抗菌スペクトラムは、極めて広範で、緑膿菌や嫌気性菌にも有効である^{1,2)}。

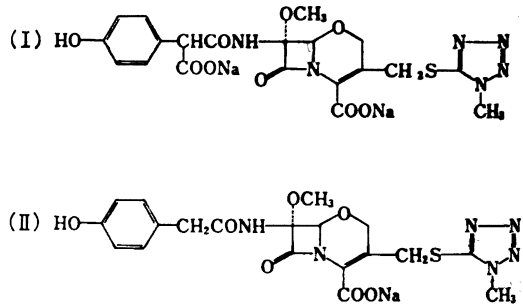
生体試料中の濃度測定は、治療濃度の体内動態を知る意味からも MIC 濃度附近まで測定できることが望ましい。6059-S の MIC 値は、菌種間でそれほど拡がらずに、多くの場合、狭い濃度範囲 ($0.1 \sim 1 \mu\text{g/ml}$) に分布するのが特徴で、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 程度まで測定できる方法が望まれた。そこで、6059-S に感受性を高めた大腸菌の変異株、*E. coli* 7437 を誘導し、濃度測定用の検定菌とした。そして、この菌株を用いてヒト体液内濃度を測定するために各種測定法における至適条件を検討した。更に、体液中での安定性および活性代謝物検索のための bioautography 法による 6059-S の分離検出方法について検討したので、その成績を併せて報告する。

材料と方法

1. 使用薬剤

6059-S (100 mg 力価充填凍結乾燥標準品, Lot No. FW 12-73 F) と、その標品中に微量 ($0.5 \sim 1\%$) に含有している 6059-S の側鎖構造から脱炭酸した構造を有する誘導体である 6059-S の脱炭酸体を使用した (Fig. 1)。

Fig. 1 Structural formulas of 6059-S(I) and decarboxylated product (II)



2. 検定菌

Escherichia coli 7437 を用いた。本菌株は、グラム陰性菌のうち、寒天拡散法で 6059-S にもっとも感受性の高かった *E. coli* X-161 を、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine で処理して導かれた変異株である。本菌を、Trypto-soy agar (TS agar, 栄研) に 37°C 、一夜斜面培養する。継代後 7 日以内の斜面より菌叢を、滅菌した 0.85% NaCl 溶液に懸濁して、 $\text{OD}_{600} = 0.3$ の菌懸濁液を調製する。この菌懸濁液は、 2.5×10^8 CFU/ml を含むので、適量接種して所定の最終菌量を得る。

3. 検定用培地

TS agar (栄研) を処方通り調製して使用した。帯培

養法の場合に限り、通常処方¹⁾の 1/2 濃度に希釈調製した培地を使用した。この他に、培地検討の目的で、Antibiotics agar medium No. 1 (AM-1, Difco), Antibiotics agar medium No. 2 (AM-2, Difco) Nutrient agar (N-agar, 栄研), Heart infusion agar (HI-agar, 栄研) を使用した。培地は、53°C の水浴中で恒温に保ったのち、平板作製の直前に検定菌を接種した。

4. 濃度測定法

次に述べる方法を用いて検定した。培養温度は 37°C、培養時間は 18~20 時間とした。

a) 薄層カップ法 (Cylinder-plate method)

検定菌を接種した検定用培地の 10 ml を、自動分注器を使って、直径 9 cm のプラスチックシャーレに分注し、水平に保ってかたまらせる。Cup は、内径 6 mm、外径 8 mm の stainless 製を用いた。標準溶液および検液は、0.2~0.25 ml を分注した。

b) ペーパーディスク法 (Disc-plate method)

薄層カップ法に述べた方法で作成した寒天平板に、ディスク (直径 6 mm, Whatman AA disc) をのせて、標準溶液または検液の 0.02 ml を定容ピペットを使って、ディスク中に浸み込ませた。

c) 寒天孔平板法 (Agar well method)

薄層カップ法に述べた方法で作成した寒天平板に、直径 6 mm の孔を作る。すなわち、先端に外径 6 mm の薄刃をつけた円筒シリンダー (stainless 製) で平板上に孔を切り、切り取られた寒天ディスク片を吸引除去する。寒天孔に標準溶液および検液の 0.02 ml を定容ピペットを使用して溢れないように分注した。

d) 帯培養法 (Band-culture method)

大久保等²⁾によって報告されている方法に改良を加えた方法³⁾で行なった。すなわち、強化ガラス板 (210×150×7 mm) に、巾 5 mm、深さ 5 mm、長さ 150 mm の溝 (band) を等間隔に 20 列設けた帯培養板を作成した。各溝には、検定菌を接種した検定用培地、3 ml を定容分注器を使って分注し、水平に固らせる。

次いで、各寒天列毎に位置をきめて 2 個所に 5 mm の長さに寒天を切り、吸引除去して寒天孔を作成する。この寒天孔に、標準溶液または検液の 0.05 ml を定容ピペットを使って分注した。溶液は、列毎に 2 個の孔に同一のものを配した。通常、寒天列の No. 2 から No. 7 までに標準希釈液を、No. 8 から No. 19 までに検液を配した。両端の No. 1 及び No. 20 には、溶液を加えない。検定平板上にガラス板をのせ、プラスチック薄膜で封じたのち培養した。

5. 標準曲線

阻止円の直径、あるいは、阻止帯の長さを正確に計測

し、その平均値 (Y) を求めた。標準曲線は、標準希釈系列の濃度 (X) の対数と、対応する (Y) の関係を、最小自乗法によって、二次式 $Y = a + b \log X + c(\log X)^2$ に近似させる方法⁴⁾で作成した。検液から得られた Y 値の実測値をこの式に代入して、濃度 X を求めた。

6. 標準溶液および希釈液

6059-S 標準品を、0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) に溶解して、1,000 µg (力価)/ml 溶液を調製した。この溶液は適量分注して、-20°C 以下に凍結保存すれば、凍結融解をくりかえさない限り、1 カ月間安定に使用できる。標準希釈系列は、実験毎に上記の buffer により 2 倍希釈を行なって調製した。実験の目的に応じて、各種の体液、または、その代用品で希釈系列を作成する場合は、あらかじめ buffer で 50 倍濃度の希釈系列を作り、希釈剤に 2% (v/v) を添加して同様の標準系列を作成した。血清または血漿は、健康人から得たものをプールして用いた。Moni-Trol I (ミドリ十字), Consera (日水製薬) は処方通り調製して用いた。尿は、健康成人数名から集め、各々の pH を測定し、個別またはプールして使用した。胆汁は、胆道疾患の手術例から菌汚染のないことを確かめたものを用いた。

7. 薄層クロマトグラフィー

螢光剤を含まない TLC 用セルロースプレート (0.1 mm, Merck 製) を 1 cm 中に切断したものを用いた。下端から 2 cm の位置に、標準溶液、または検液の 0.005 ml を定容ピペットで spot し、室温で約 10 分間風乾してから、70% n-propanol を展開溶媒として、室温で上昇法により、溶媒先端が原点から約 15 cm (約 90 分) になるまで展開した。展開終了後、約 30 分風乾した。

8. Bioautography

検定菌、*E. coli* 7437 を接種した Trypto-soy agar (最終菌量 5×10^8 CFU/ml) の 150 ml を、バイオアッセイディッシュ (243×243×18 mm, 住友ベークライト) に分注して、水平上台でかたまさせた寒天平板上に、方法 7. で得た TLC プレートを密着させた。約 20 分間室温で拡散させたのち、TLC プレートを取り除いて、37°C で 16~18 時間培養した。得られた阻止像の横径 (Y) と濃度との間に、方法 5. に述べたようにして標準曲線の関係式を計算した。

成績ならびに考察

1. 測定条件に関する検討

a) 検定菌の選択

6059-S は、抗菌スペクトルがグラム陰性菌に傾いているので、通常のグラム陽性菌は、測定感度が低く適当

ではない (Table 1)。そのうえ、6059-S 標品中に微量 (0.5~1%) に含まれる脱炭酸体 (Fig. 1) は、グラム陽性菌に対して、6059-S の 30~60 倍の抗菌活性を示し (Table 1)、従って、グラム陽性菌を使用した場合に、誤差の要因になることが考えられるので、6059-S の検定菌としてはグラム陰性菌を使用することにした。

Table 1 から MIC 値の低い菌種について、多くの菌株を選び、Agar well 法により標準曲線を作成したところ、大腸菌が最も測定感度にすぐれ、この中から *E. coli* X-161 を選んだ (Fig. 2)。しかしながら、*E. coli* X-161 を検定菌とした場合でも測定下限は 1.5 $\mu\text{g/ml}$ で、6059-S のグラム陰性菌に対する MIC レベル (0.1 $\mu\text{g/ml}$) の濃度を測定するには満足といえない。そこで、この菌株から nitrosoguanidine 処理による変異株を作成して、6059-S に寒天拡散法で高感受性を示す *E. coli* 7437 を誘導することができた。原株 *E. coli* X-161 と変異株 *E. coli* 7437 の標準曲線の比較から明らかなように、測定感度は約 5 倍上昇した (Fig. 2)。そこで、*E. coli* 7437 を検定菌とすることにして、各種の測定法について感度、精度および簡便さのうえから体液内濃度の測定に最も望ましい測定条件を検討した。検定法としては、Band-culture 法、Disc-plate 法、Agar well 法および Cylinder-plate 法の四種を用いた。これらの方法は、いずれも寒天拡散法に属する。1 濃度を測定するために必要な検液の最小容量は、それぞれ 0.05 ml, 0.02 ml, 0.02 ml, 0.2 ml であり、十分な精度を得るために、それぞれ 2, 4, 4 および 4 個の測定値の平均を用いた。Cylinder-plate 法を除き、測定は 0.1 ml

以下の検液量で可能となり、微量定量法ということができ。

b) 検定培地の検討

5 種類の寒天培地で調製した平板を用い、6059-S の Agar well 法による検定曲線を描くと、Fig. 3(b)に示すようになり、TS agar において最も高感度に測定でき、感受性の低い AM-2 agar にくらべて感度は 2 倍程度高く得られた。また、TS-agar は、他の培地よりも検量線の直線性にすぐれ、鮮明な阻止円が得られた。方法をかえて、Band-culture 法でみた場合、Fig. 3(a)に示すように、N-agar が最も感度が高い。しかし、いずれの培地でも直線性は良好であり、阻止帯の鮮明度では TS agar がすぐれていた。培地 pH をかえると、酸性側で感度上昇の傾向がみられるが、通常処方 TS agar にくらべて pH 6 にすると、菌の成育が低下するために阻止帯が不鮮明になるので、通常処方 (pH 7.3) で使用することとした (Fig. 4)。

c) 接種菌量の影響

Band-culture 法で最終菌量を 1.7×10^6 から 5.2×10^6 CFU/ml までかえると、菌量を少なくする程感度は上昇したが (Fig. 5)、colony が大きく疎になるために、阻止帯の境界が判別しにくくなった。比較的明確に測定し得る菌量として、 5×10^6 附近が適当と考えられた。

d) 溶剤組成の影響

Band-culture 法で感度の良好であった N-agar および TS agar の 2 種の培地を用いて、検液の溶剤として予想される組成が検量線に与える影響をしらべた

Table 1 Agar dilution MIC ($\mu\text{g/ml}$) against bacteria

Organism	6059-S	Decarboxylated product
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.1	0.1
<i>E. coli</i> EC-14	0.1	0.39
<i>E. coli</i> 73	0.2	0.78
<i>K. pneumoniae</i> SRL-1	0.1	0.2
<i>K. pneumoniae</i> 363	0.05	0.2
<i>P. mirabilis</i> PR-4	0.1	0.39
<i>P. vulgaris</i> CN-329	0.1	0.78
<i>P.morganii</i> MOR-9	0.2	6.25
<i>E. cloacae</i> 233	0.2	100
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	0.39	6.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	6.25	>100
<i>P. aeruginosa</i> PS-24	25	>100
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	6.25	0.2
<i>S. pyogenes</i> C-203	3.13	0.05
<i>S. pneumoniae</i> Type-I	3.13	0.05
<i>S. faecalis</i>	>100	50

Fig. 2 Standard curve of 6059-S by agar well method

Medium: Trypto-soy agar

Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0

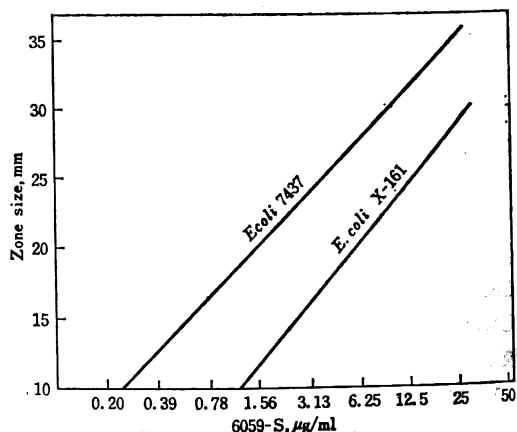


Fig. 3 Standard curves of 6059-S in different media
 Organism: *E. coli* 7437, 1.5×10^8 CFU/ml
 Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0

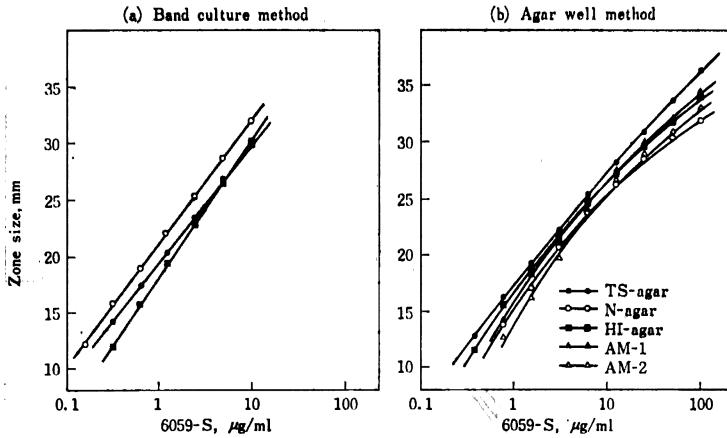


Fig. 4 Influence of medium-pH in band culture method
 Organism: *E. coli* 7437, 5×10^8 CFU/ml
 Medium: Trypto-soy agar
 Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0

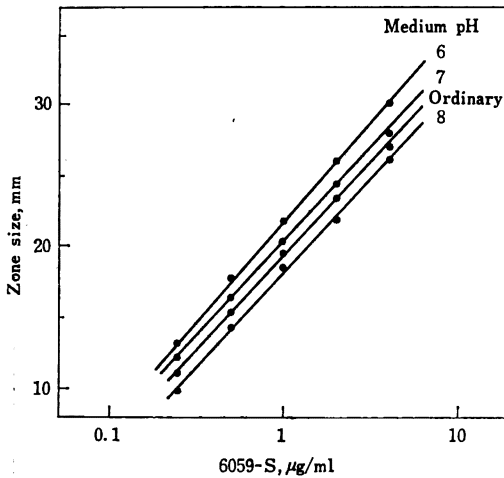
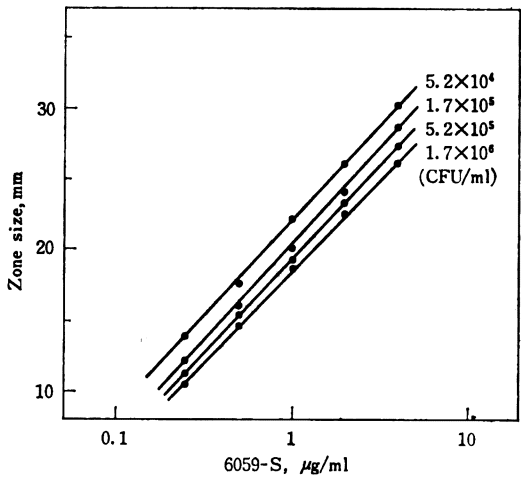


Fig. 5 Influence of inoculum size in band culture method

Organism: *E. coli* 7437
 Medium: Trypto-soy agar
 Diluent: 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0



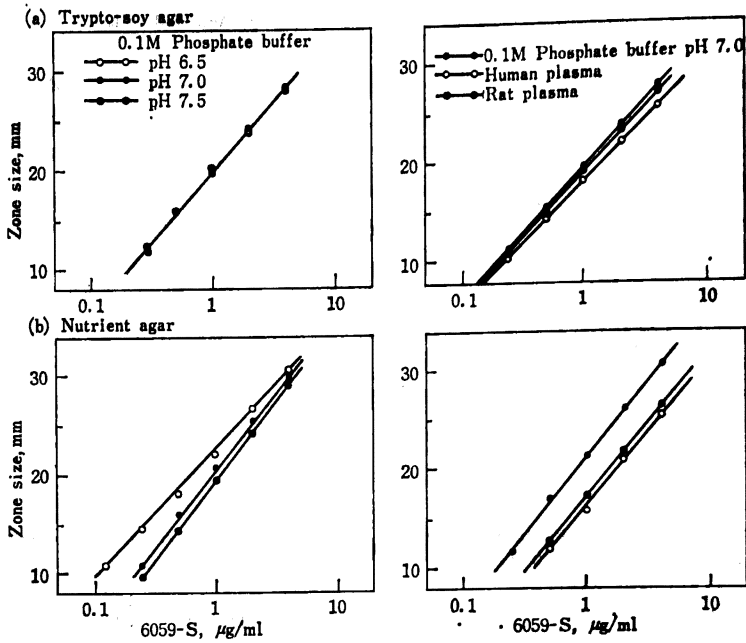
(Fig. 6). TS agar を使用した場合、試料液の buffer の pH を 6.5 から 7.5 にかえても検量線は一致しており、人血漿、または rat plasma で調製したときも buffer 調製で得られた検量線に近似していた。一方、N-agar を使用した場合の 6059-S の検量線は、検液の pH が酸性側に傾くと阻止帯を増加させたり、plasma にすると感度が半減するなど、検液の組成の変化に大きな影響を受けた。また、buffer のモル濃度を 0.05 M

から 0.2 M まで変えてみたが、TS agar 培地を用いたときには、検量線にずれが生じず、イオン強度の影響も受けにくいことなども前述の成績とともに TS agar を検定培地として選択する理由となった。

2. 体液内濃度測定におよぼす諸因子の影響

血清、尿、胆汁中の濃度を測定する際に、これら体液や、それに含まれる添加剤等によって、検量線が変動しにくい測定条件を設定することが望ましい。また、変動

Fig. 6 Influence of diluent-pH and plasma in different media
 Method : Band culture method
 Organism: *E. coli* 7437



する場合には、検液と同じ溶剤で標準溶液を調製するか、または、補正する方法をとる必要があるので、その影響について把握しておかねばならない。前項までの検討から設定された測定条件を用いて、4種の検定法におけるこれらの因子の影響を調べた。これら4つの方法の測定限界は、buffer標準溶液でCylinder-plate法、Band-culture法が $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以下になり、ほぼMICレベルまで測定し得るようになった (Fig. 7)。Agar well法では $0.4 \mu\text{g/ml}$ 、Disc-plate法では $0.8 \mu\text{g/ml}$ となり、測定感度はやや低下した。

a) 血清または血漿の影響

プールした人血漿で調製した標準溶液から検量線を求め、buffer標準液のそれと比較して Fig. 8 に示した。Cylinder plate法では、人血漿の検量線は右辺に移動し、測定感度は半減した。他の3法については、6059-Sの高濃度でやや阻止帯が小さくなる傾向があるが、低濃度ではbufferの検量線とよく一致し、plasmaの影響はほとんど無視できる。Plasmaをbufferで5倍希釈した場合には、 $100 \mu\text{g/ml}$ までの濃度域でbuffer検量線と一致した。さらに、代用血清、Conseraを用いたところ、検量線はplasmaのそれとよく一致し (Fig. 8)、Moni-Trol Iでも同様の結果が得られた。血

Fig. 7 Standard curves of 6059-S in different methods
 Organism: *E. coli* 7437, 5×10^8 CFU/ml
 Method : Tryptsoy agar
 Diluent : 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0

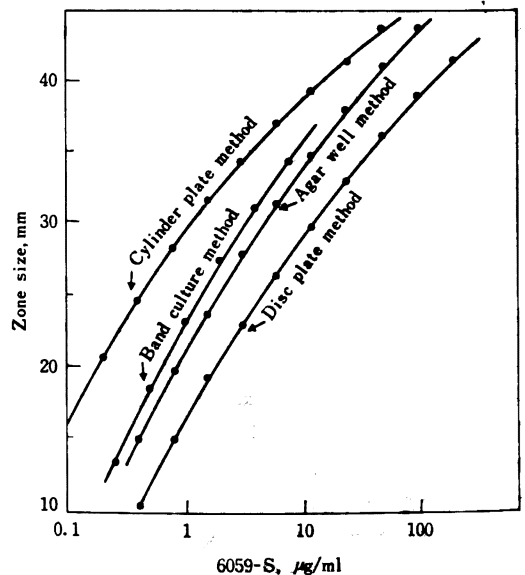
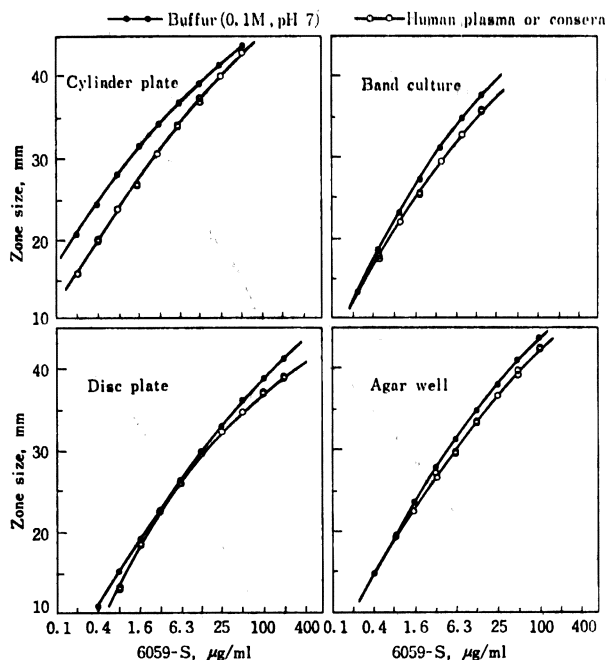


Fig. 8 Standard curves of 6059-S in human plasma by different methods

Organism: *E. coli* 7437

Medium: Tryptsoy agar



漿を調製する際の血液凝固阻止の添加剤を Fig. 9 に示す濃度で血清に加えた場合、いずれも血清の検量線とよく一致し、これらの影響は受けなかった。したがって、血清または血漿中濃度測定に際しては、6059-S が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含まれる試料のときは、buffer で 5 倍以上の希釈を行なえば buffer の検量線で測定できるが、希釈して測定できないような低濃度の場合には、原液をそのままプールの人血漿、または、代用血清などで調製した標準溶液の検量線で測定する必要があると考えられる。

b) 尿の影響

人尿で求めた検量線を、buffer による検量線と比較した例は Fig. 10 に示したようになり、尿成分が検量線に与える影響は比較的小さかった。前述したように、検液の pH、イオン濃度の影響を受けにくいことを裏づけた。尿は、buffer で 10 倍に希釈すれば buffer の検量線と一致し、その影響は除かれた。尿中濃度は、通常、いずれの検定法における測定濃度域よりも大きく上まわっており、希釈する必要があるから問題とならないと考えられる。

c) 胆汁の影響

胆汁の原液で求めた検量線の一例を Fig. 11 に示した。尿の場合と同様に、検量線に与える影響は小さい

Fig. 9 Influence of anticoagulant for standard curves of 6059-S

Method: Agar well method

Organism: *E. coli* 7437

Medium: Tryptsoy agar

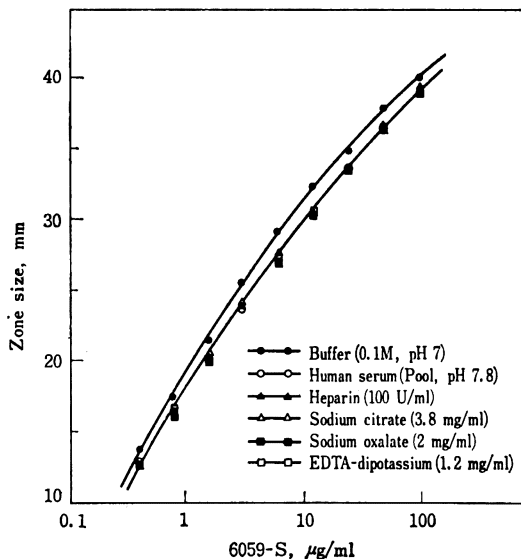


Fig. 10 Standard curves of 6059-S in human urine by different method
 Organism: *E. coli* 7437, 5×10^5 CFU/ml
 Medium : Trypto-soy agar

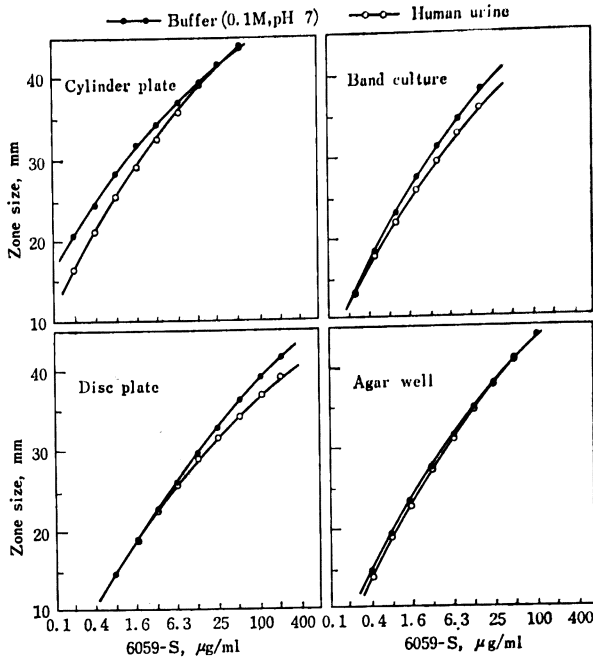
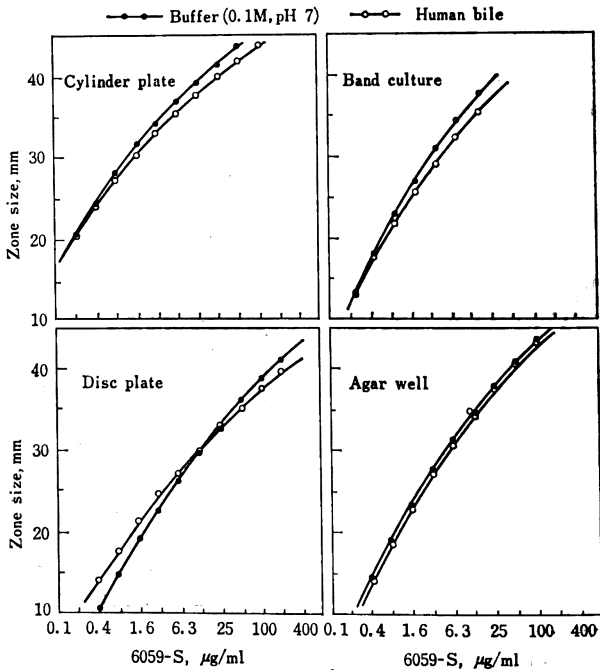


Fig. 11 Standard curves of 6059-S in human bile by different methods
 Organism: *E. coli* 7437, 5×10^5 CFU/ml
 Medium : Trypto-soy agar



が、buffer で 5 倍に希釈すれば buffer の検量線と一致し、測定可能である。

3. 6059-S と脱炭酸体の分離定量と活性代謝物の検索法

6059-S は、標品中に脱炭酸体を微量に含んでいるので、この影響をしらべた。Table 1 に示したように、脱炭酸体の抗菌スペクトラムは、6059-S のそれと著しく異っているが、大腸菌、肺炎桿菌などに対しては 6059-S よりも、やや劣る程度であった。しかしながら、寒天拡散法では、*E. coli* 7437 に対して両者は同じように挙動し、Agar well 法の場合、両者の検量線はよく一致し (Fig. 12)、また他の方法についても同様の結果であった。脱炭酸体は、6059-S と同様に human plasma による影響は無視できる程度であった。

6059-S と脱炭酸体は、セルロース薄層クロマトグラフィによって、70% n-propanol で展開すれば、容易に分離することができる。*E. coli* 7437 を用いた bioautography を行なうと [3 μg/ml 以上の濃度で正円形の阻止像が得られた (Fig. 13)。この条件を用いれば、阻止像の横径は濃度の対数とよく比例しており、検量線からそれぞれの物質の濃度の定量が可能になった。ここでも、二つの物質は、まったく同じ挙動を示した。この方法は、活性代謝物の検索法として用いられる。

6059-S の濃度測定の際に、試料中に脱炭酸体が無視できない程度に含まれる場合でも、前述の拡散法による 4 種の bioassay で、両者は等しく評価されるので、6059-S 検量線を用いて測定しても濃度は両者の和として計算されることになる。しかし、bioautography 法で脱炭酸体の 6059-S に対する含有比が測定されるので、

bioassay で求めた濃度を補正することによって 6059-S 含量を計算することができる。

4. 6059-S の体液中安定性

6059-S を各種溶剤に溶解して、温度をかえて安定性を調べた結果を Table 2 に示した。蒸留水、または phosphate buffer (pH 6~8) 中では、37°C で少なくとも 6 時間まで安定であった。血漿、尿、胆汁中では、

Fig. 12 Standard curves of 6059-S and decarboxylated product

Organism: *E. coli* 7437, 5 × 10⁸ CFU/ml
Medium: Trypto-soy agar
Method: Agar well method

6059-S : Buffer (0.1M, pH 7) (●), human plasma (○)
Decarboxylated product: Buffer (0.1M, pH 7) (▲), human plasma (△)

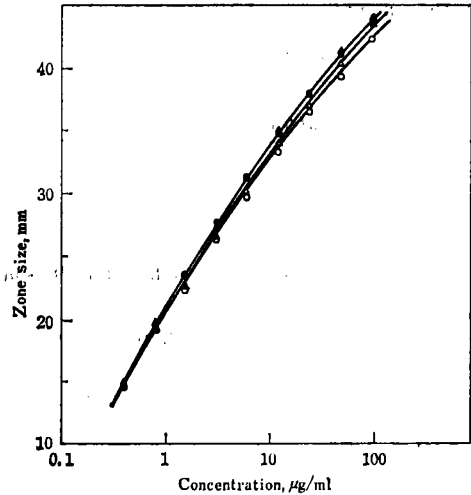


Fig. 13 TLC-Bioautography of 6059-S and decarboxylated product

TLC : Cellulose (MERCK)

Solvent system : 70% n-Propanol

Bioautogram : *E. coli* 7437 in TS agar

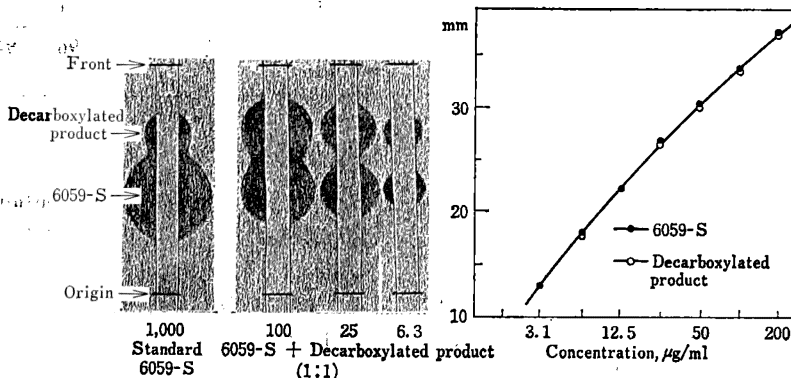


Table 2 Stability of 6059-S in human body-fluids at different conditions

Solution	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity (%)							
			0	1	2	3	4	5	6	24 hrs
Dist. water	100	37	100	107	102	101	-	-	103	92
0.1M Phosphate buffer	20	0	100	96	101	-	101	-	-	-
		20	100	94	100	-	107	-	-	-
		37	100	97	103	-	107	-	-	-
	2,000	37	100	93	-	92	-	-	93	85
			100	100	-	91	-	-	103	91
			100	100	-	103	-	-	100	88
Human plasma	20	0	100	95	93	-	102	-	93	-
		20	100	98	85	-	91	-	85	-
		37	100	81	69	-	59	-	41	-
Human urine	20	0	100	100	94	-	96	-	88	-
		20	100	96	93	-	86	-	85	-
		37	100	92	84	-	66	-	54	-
Human bile	100	37	100	95	91	89	-	84	-	-

Table 3 Stability of 6059-S in human body-fluids at different conditions

Solution	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Remaining activity (%)							
			0	1	2	3	4	7	14	28 days
Dist. water	500	-20	100	-	-	-	-	99	102	100
0.1M Phosphate buffer	100	-20	100	98	-	105	-	100	-	99
	1,000	-20	100	105	-	-	-	101	97	103
	100	-20	100	99	91	79	-	-	-	-
Human plasma	100	-20	100	91	99	99	97	99	83	66
	100	4	100	102	102	101	89	87	55	20
	100	28	100	58	38	22	9	< 1	-	-
	100	37	100	25	6	< 1	< 1	< 1	-	-
Human urine	1,000	-20	100	98	103	91	-	89	56	34
	1,000	4	100	101	92	90	-	85	53	30
	1,000	28	100	71	58	23	-	20	-	-
	1,000	37	100	47	31	14	-	< 1	-	-
Human bile	20	-20	100	-	-	100	-	96	84	81
	100	-20	100	106	103	92	-	98	-	-

37 $^{\circ}\text{C}$ にすると 2 時間以降失活の傾向が認められた。したがって、体液試料については、低温条件下に保存することが望ましい。Table 3 に示したように、血漿試料を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 3 日間、-20 $^{\circ}\text{C}$ に凍結すれば 7 日間、6059-S は安定に保存された。胆汁、尿については、試料によって個体差がみとめられたが、-20 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間安定

に保存することができた。なお、buffer 溶液中では、濃度にかかわらず、-20 $^{\circ}\text{C}$ 凍結条件で 6059-S は 1 カ月間失活しなかった。

5. 6059-S の体内濃度測定法

以上の検討成績から、薄層寒天拡散法による測定法を次のように設定した。

(1) 検定菌および接種菌量

検定菌には *E. coli* 7437 を用いる。接種菌液の調製は次のようにする。

トリプトソイ寒天培地、または普通寒天培地に 37°C、1 夜斜面培養し、冷蔵庫 (4°C) に保存する。継代培養は 2 カ月毎に行なう。使用に際し、保存菌株から継代して新鮮斜面を作る。斜面より菌を生理食塩液に懸濁して OD₆₄₀ = 0.3 の菌液を作り、検定培地中に 0.2% (v/v) 接種する (最終菌量 = 約 5×10^5 CFU/ml)。継代した斜面は、7 日間、接種菌液の調製に使用しうる。

(2) 薄層寒天平板の作成

トリプトソイ寒天培地 (栄研製, pH 7.3) を処方どおりに調製し、約 52°C に冷却してから、検定菌を加え、プラスチックシャーレ (直径 9 cm) に 10 ml を加えて固まらせる。

(3) 標準溶液の調製

6059-S の標準品を 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) に溶解して 1,000 μ g (力価)/ml の標準溶液を作る。-20°C 以下に凍結保存すれば、少なくとも 1 カ月間は安定である。ただし、凍結融解を繰り返さないようにする。

標準希釈系列は、標準溶液 (1,000 μ g (力価)/ml) を 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)、または正常血漿、Moni-Trol I あるいは Consera 等の代用血清で希釈して、作製する。

濃度範囲は、100~0.1 μ g (力価)/ml の 2 倍希釈系列が望ましい。

(4) 測定感度

以上の条件で行なうとき、最低測定可能濃度は、薄層カップ法で 0.1 μ g/ml、薄層 Agar well 法で 0.4 μ g/ml、薄層ディスク法で 0.8 μ g/ml である。

(5) 被検液の希釈

試料中の濃度が測定範囲を超える場合は、上記の

buffer (pH 7.0) で希釈する。血漿、尿、胆汁試料は、それぞれ 5, 10, および 5 倍に希釈すれば影響はなくなり、buffer 調製の検量線で測定できる。血清、または血漿試料を原液のまま測定する場合は、プールした人血漿または Moni-Trol I、あるいは Consera 等の代用血清で希釈して調製した標準溶液で検量線を作成して測定する。

(6) 試料の保存

試料は、採取後、測定に供するまで冷蔵庫に保存することが望ましい。測定が翌日以降になる場合は、凍結して保存する。凍結条件下では、少なくとも 7 日間安定である。

(7) 培養条件

37°C 18~20 時間培養後、阻止円を測定する。

(8) 判定

通常の標準曲線法に従って濃度を計算する。

文 献

- 1) 吉田 正, 亀田康雄, 元川清司: Oxacephem 系抗生物質 6059-S の *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 28(S-7): 86~131, 1980
- 2) 真山三賀雄, 永田 弘, 大瀬満寿代: 6059 S の嫌気性菌に対する *in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 28 (S-7): 139~162, 1980
- 3) 大久保 澁, 岡本綴子: 体液, 組織中の抗生物質濃度の生物学的微量測定——とくに帯培養法 Band-Culture Method について——。日本臨床 31: 441~447, 1973
- 4) 木村靖雄, 土肥正善, 吉田 正: 抗生剤の微量定量——帯培養法の応用。Chemotherapy 25: 449~450, 1977
- 5) BENNET, J. M.; J. L. BRODIE, E. J. BENNER & W. M. M. KIRBY: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Microbiol. 14: 170~177, 1966

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHODS OF 6059-S CONCENTRATIONS IN BODY FLUIDS

YASUO KIMURA and TADASHI YOSHIDA

Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

The assay methods using *Escherichia coli* 7437 for measuring serum and urinary levels of 6059-S, oxacephem derivative, were established.

The suitable conditions for the assay resulted from the use of Trypto-soy agar inoculated with 5×10^6 CFU per ml. The least detectable concentration of 6059-S was as low as 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{g/ml}$ by the cylinder-plate assay, the band-culture assay, the agar well assay and the disc-plate assay method, respectively. Concentrations of 6059-S were determined from the inhibition zone sizes by using polynomial regression for a curve fitting of adequate standard solutions.

For determination of 6059-S levels in human plasma, Moni-Trol I or Consera were equally employed as diluents of the standard in place of the pooled human plasma. The use of the phosphate buffer (pH 7.0) was possible for preparing the standard solution, when the specimens of urine, bile and plasma were diluted by the buffer solution to over 10-, 5- and 5-fold, respectively.

The behavior of decarboxylated product, which is usually contaminated by less than 1% in the preparation of 6059-S, was very much alike to that of 6059-S in the abovementioned assay methods and both regression curves were almost superimposed.

Bioautography method of cellulose thin layer chromatography was also established for assaying 6059-S and decarboxylated product, or detecting active metabolites in the body fluids.

The activity of 6059-S in human body fluids remained unchanged during one week storage at -20°C .