

胆汁中 6059-S の安定性 — 保存温度との関係 —

吉田 簡・斎藤信義・野々下頼之・毛受松寿
東京医科歯科大学第1外科

体液中抗生物質濃度の測定にあたっては、一定期間検体を保存して後、測定を行なわざるをえない場合が多い。

胆嚢および胆管胆汁中に 6059-S を溶解し、25, 5, -20, -70°C 下に保存し、4 週にわたって、抗生物質の力価変動を観察した。

液状状態で、胆汁中抗生物質力価は、日を経るとともに低下し、各胆汁間の低下率の差も大きくなる。保存温度の低下とともに、力価低下は少なくなり、各胆汁間の力価変動のパラッキも小さくなる。凍結状態でも -20°C 下より、-70°C 下の方が力価低下は少ない。

胆汁中抗生物質の測定にあたっての胆汁保存温度等の諸条件を再検討する必要がある。

はじめに

最近、種々な抗生物質が開発され、その胆汁中排泄濃度の測定より胆道感染に対する効果が論じられている。しかし、その前提となる胆汁中抗生物質濃度の測定法に関する研究は少なく、その結果も一定でない。われわれは、さきに、胆汁中抗生物質濃度測定にさき立つ保存時の力価低下について報告¹⁾したが、今回は、胆汁中 6059-S の保存時の温度、期間と力価変動について検討したので報告する。

対象および方法

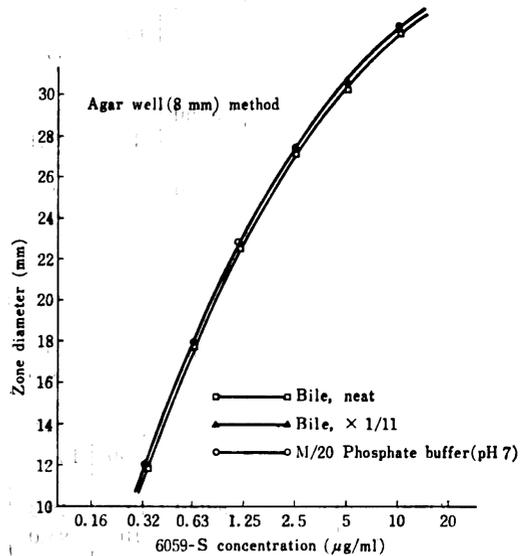
胆道疾患以外の病変による開腹手術の際、胆嚢穿刺によりえられた胆嚢胆汁 7 検体 および胆石症手術後 T-tube を留置した症例で、抗生物質を中止して後えられた胆管胆汁 2 検体を用いた。胆汁の好気性培養はいずれも陰性で、検査にさき立つ胆汁の bioassay で抗菌力は認められなかった。

各胆汁を 1 濃度につき 7~9 本の試験管に分け、これに 6059-S を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割に混じて、25, 5, -20, -70°C 下に保存し、保存開始時および開始後 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 日後に 1 本ずつとり出し、抗生物質力価を測定した。また、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 15 本に 6059-S を上記の割に混じ、5, -20, -70°C 下に保存し、保存開始時および開始後 3, 7, 14, 21, 28 日後に 3 本ずつとり出し、抗生物質力価を測定した。

測定には、*E. coli* 7437 を検定菌とし、agar well 法で行なった。M/20 リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)、胆汁自体、および胆汁:緩衝液 1:11 希釈液より標準曲線を作り (Fig. 1)、阻止円径より濃度を換算し、保存開始

時を基準として低下率を%で示した。

Fig. 1 Standard curve



結果

- 25°C 保存での抗生物質の力価変動 (Table 1)
24 時間後ですでに 10~30%, 3 日後には 20~50% 低下し、低下速度は著しく速い。
- 5°C 保存での抗生物質の力価変動 (Table 2)
7 日後に約 10% 有意に低下し ($P < 0.05$)、経過とともに各胆汁ごとの低下率の幅は大きくなって行く。胆嚢胆汁 C 例、胆管胆汁 H 例ではとくに低下率が大きい。A, B がこれに続く。
- 20°C 保存での抗生物質の力価変動 (Table 3)

Table 1 Stability of 6059-S in bile at 25°C

Bile	Patient	Days										
			0	1	3	5	7	10	14	21	28	
Gallbladder	A	μg/ml	19.6	18.4	15.4	12.7	10.6	6.9	5.3	2.3	1.6	
		%	100	93.8	78.6	64.8	54.1	35.2	27.0	11.7	8.2	
	B	μg/ml	22.4	19.2	18.5	14.7	13.2	12.3	9.7	-	-	
		%	100	85.7	82.6	65.6	58.9	54.9	43.3	-	-	
	C	μg/ml	20.3	13.9	9.5	5.8	3.5	1.8	-	-	-	
		%	100	68.5	46.8	28.6	17.2	8.9	-	-	-	

Table 2 Stability of 6059-S in bile at 5°C

Bile	Patient	Days										
			0	1	3	5	7	10	14	21	28	
Gallbladder	A	μg/ml	19.6	18.9	17.7	17.6	15.6	16.1	15.5	15.6	13.7	
		%	100	96.4	90.3	89.3	79.6	82.1	79.1	79.6	69.9	
	B	μg/ml	22.4	20.4	19.7	-	19.0	18.4	-	-	16.7	
		%	100	91.1	87.9	-	84.8	82.1	-	-	74.6	
	C	μg/ml	20.3	18.9	16.3	-	17.0	-	13.1	-	9.5	
%		100	93.1	80.2	-	83.7	-	64.5	-	46.8		
D	μg/ml	20.8	21.2	20.9	-	19.9	19.8	19.8	18.2	17.1		
	%	100	101.9	100.5	-	95.7	95.2	95.2	87.7	82.2		
E	μg/ml	20.4	20.2	20.8	-	20.4	21.3	19.6	18.8	17.4		
	%	100	99.0	102.0	-	100.0	104.4	96.1	92.2	85.3		
Bile duct	H	μg/ml	20.5	20.7	19.3	-	19.0	-	15.9	13.2	9.5	
		%	100	101.0	94.1	-	92.7	-	77.6	64.5	46.1	
I	μg/ml	19.7	19.3	19.4	-	19.4	-	18.6	17.9	16.2		
	%	100	98.0	98.5	-	98.5	-	94.4	90.9	82.2		
Buffer solution		%	100	-	102.5	-	95.6	-	90.9	84.9	80.0	

緩衝液中での力価はよく保たれ 4 週で約 5% の低下をみるにすぎない。胆嚢・胆管胆汁ともに、5°C 保存と比べて低下率は小さくなっているが、C 例では 10 日、A、B 例では 21 日ですぐれも 10% 以上の低下をみている。

d. -70°C 保存での抗生物質の力価変動 (Table 4)
緩衝液中、胆汁中ともに力価はよく保たれ、低下率は

4 温度条件中、最も小さい。4 週後 5°C で 54%、-20°C で 19% の低下をみた胆管胆汁 H 例でも 8% の低下に止まっている。

これらの関係を Fig. 2 に図示した。

考 案

抗生物質は胆汁中で不安定であるといわれる。畚野

Table 3 Stability of 6059-S in bile at -20°C

Bile	Patient	Days	Days								
			0	1	3	5	7	10	14	21	28
Gallbladder	A	μg/ml	19.6	-	19.3	-	-	19.5	-	17.2	16.9
		%	100	-	98.5	-	-	99.5	-	87.8	86.3
	B	μg/ml	22.4	-	22.6	-	21.6	20.6	-	19.1	19.1
		%	100	-	100.9	-	96.4	92.0	-	85.3	85.3
	C	μg/ml	20.3	-	20.5	19.0	-	17.0	-	16.0	14.7
		%	100	-	101.0	93.6	-	83.7	-	78.8	72.4
	D	μg/ml	20.8	-	21.7	-	20.9	21.1	22.0	21.2	20.2
%		100	-	104.3	-	100.5	101.4	105.8	101.9	97.1	
E	μg/ml	20.4	20.8	20.0	-	20.5	21.4	21.4	20.4	20.6	
	%	100	102.0	98.0	-	100.5	104.9	104.9	100.0	101.0	
F	μg/ml	20.4	20.1	20.6	-	20.2	-	19.1	19.9	20.3	
	%	100	98.5	101.0	-	99.0	-	93.6	97.5	99.5	
G	μg/ml	20.2	20.9	20.8	-	19.7	-	20.9	19.3	19.7	
	%	100	103.5	103.0	-	97.5	-	103.5	95.5	96.6	
Bile duct	H	μg/ml	20.5	20.0	19.6	-	20.6	-	18.9	18.9	16.6
		%	100	97.6	95.6	-	100.5	-	92.2	92.2	81.0
I	μg/ml	19.7	20.1	20.0	-	19.4	-	19.2	19.0	18.0	
	%	100	102.0	101.5	-	98.5	-	97.5	96.4	91.4	
Buffer solution		%	100	-	99.9	-	100.1	-	102.2	99.7	94.6

ら²⁾は、胆汁に CEC を添加した *in vitro* の 1 例で、凍結保存 1 週後に力価は 0 になったという。寺尾³⁾は、胆管胆汁に CET を添加し 25, 5, -20°C 下に保存した *in vitro* の 2 例の実験で、保存温度の低いほど力価の低下は少なかったが、同温度下保存の 2 例間の低下率の差は大きく、個人差があるとのべている。このように、胆汁の保存温度とその中の抗生物質力価の変動の関係を、濃度測定立場からのべた報告は少ない。この間の関係はむしろ、薬剤を保存し投与するという薬局の立場から観察されている。BOYLAN ら⁴⁾は、CET, CER の水溶液が -20°C 下で 6 週間安定であったとのべている。SAVELLO ら⁵⁾は、sodium ampicillin 水溶液の 27, 5, 0, -12, -20, -78°C 下の保存で 24 時間後の力価は、温度の低下にともなうよく保たれ、凍結された状態でも -20°C では、-12°C 下よりも力価の低下は少なかったと報告している。凍結状態でもその保存温度によって力価低下率の変化する理由について、彼は、

initial freezing point 以下でも、eutectic point 以上の温度では、凍結された溶液中に liquid phase と solid phase が存在し、liquid phase 中での力価の低下が進行するのであろうと推測している⁶⁾。

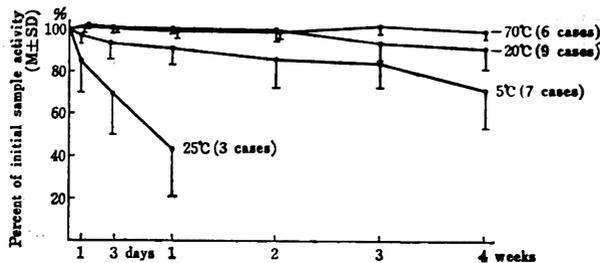
SAVELLO らの実験において、-78°C の保存では、抗生物質の濃度、溶解液の種類に関係なく、力価の低下はおこらなかった。この事実から、われわれも -70°C 下の保存を実験条件の一つに加えた。Fig. 2 に示したように、力価の低下は、保存温度の下がるとともに小となり、-70°C の保存では、胆汁中においても、4 週にわたってほとんど力価の低下はないといえる。しかし、胆管胆汁 H 例では、この温度下でも、14 日で 5%、28 日で 10% 近い低下がみられた。

SAVELLO らは、また、抗生物質の溶解液、pH 等が安定性に関与しているとのべている。さきの、われわれの行なった SBPC, CEC の保存胆汁中における力価変動の観察でも、胆汁の pH、成分と力価低下の間に関係がみ

Table 4 Stability of 6059-S in bile at -70°C

Bile	Patient	Days	Days									
			0	1	3	5	7	10	14	21	28	
Gallbladder	D	$\mu\text{g/ml}$	20.8	—	21.7	—	20.4	21.1	20.6	20.9	21.2	
		%	100	—	104.3	—	98.1	101.4	99.0	100.5	101.9	
	E	$\mu\text{g/ml}$	20.4	21.2	20.4	—	20.5	21.4	19.8	20.4	20.6	
		%	100	103.9	100.0	—	100.5	104.9	97.1	100.0	101.0	
	F	$\mu\text{g/ml}$	20.4	20.5	20.0	—	20.2	—	20.9	20.9	19.8	
		%	100	100.5	98.0	—	99.0	—	102.5	102.5	97.1	
	G	$\mu\text{g/ml}$	20.2	20.5	20.0	—	20.2	—	19.6	19.9	20.2	
		%	100	101.5	99.0	—	100.0	—	97.0	98.5	99.0	
	Bile duct	H	$\mu\text{g/ml}$	20.5	20.5	20.4	—	19.7	—	19.3	19.8	18.8
			%	100	100.0	99.5	—	96.1	—	94.1	96.6	91.7
		I	$\mu\text{g/ml}$	19.7	20.5	20.0	—	20.0	—	19.6	20.9	19.6
			%	100	104.1	101.5	—	101.5	—	99.5	106.1	99.5
Buffer solution	%	100	—	100.1	—	100.1	—	102.2	104.3	100.5		

Fig. 2 Percent stability pattern of bile samples containing 6059-S during storage at various temperatures for 4 weeks



られた。今回測定された胆汁中 6059-S の変動で、同一保存温度下でも各例の力価の低下にバラツキがみられ、とくに、C, H 例では、いずれの保存温度でも低下率が大きかったことは、力価の低下に胆汁の性状が関与する事実を示唆するが、この胆汁自体の影響を保存温度によってできるだけ取り除く可能性も示す事実と思われる。

今回の実験では、*in vitro* で胆汁に抗生物質が加えられており、経口的・経静脈的に投与され、胆汁中に排泄された抗生物質の変化とは異なるかもしれない。しかし、ラットに経口または経腹腔的に各種の抗生物質を投与し、その血漿を採取して -20°C 下に保存し、8 週間の力価変動を観察した BERT¹⁾ らは、CEX は安定して

いるが、PCG で 2 週後 10~20%、CER で 2 週後 40% の力価低下をみており、生理的経路を経てえられた検体においても、*in vitro* と同様の変動がおこることが推測される。

文 献

- 1) 吉田 篤, 野々下頼之, 斎藤信義, 玄 干亨, 逸見昭二: *In vitro*における胆汁中 Sulbencillin および Cephacetrile の安定性. *Jpn. J. Antibiot.* 33: 472~477, 1980
- 2) 畚野 剛, 前田憲一: Cephacetrile とその代謝物の分別定量法. *Chemotherapy* 24: 78~85, 1976
- 3) 寺尾征史: Sodium Cephalothin (CBT) のヒト胆汁内移行

- に関する検討 (第1報)。 Jpn. J. Antibiot. 28:179~187, 1975
- 4) BOYLAN J. C.; J. L. SIMMONS & C. L. WINELY: Stability of frozen solutions of sodium cephalothin and cephaloridine. Am. J. Hosp. Pharm. 29:687~689, 1972
- 5) SAVELLO D. R. & R. F. SHANGRAW: Stability of sodium ampicillin solutions in the frozen and liquid states. Am. J. Hosp. Pharm. 28:754~759, 1971
- 6) PINCOCK R. E. & T. E. KIOVSKY: Kinetics of reactions in frozen solutions. J. Chem. Educ. 43:358~360, 1966
- 7) BERTI M. A. & M. MACCARI: Stability of frozen rat plasma containing different antibiotics. Antimicrob. Agents & Chemoth. 8:633~637, 1975

STABILITY OF 6059-S IN BILE IN THE FROZEN AND LIQUID STATES

MASARU YOSHIDA, SHINGI SAITO, YORIYUKI NONOSHITA and MATSUTOSHI MENJO
First Department of Surgery, Tokyo Medical and Dental University

To establish the optimum conditions for storage before assay of antibiotic activity in bile, the antibiotic activity of 6059-S was determined after storage for up to 4 weeks in bile at 25, 5, -20 and -70°C.

The curves by plotting the values of antibiotic activity diverged widely as the days went on. However, the rank order decrease in degradation with decreasing temperature was observed.