

Bioassay による AM-715 の体液濃度測定法に関する研究

大森 康男・村山 哲・阿部 泰夫・入倉 勉
杏林製薬株式会社中央研究所

新規 nalidixic acid 類縁化合物, AM-715 の bioassay 法による体液内濃度測定法を検討し, 次の結果を得た。

Bioassay は *E. coli* NIHJ JC-2 を検定菌とし, 感性ディスク用培地を用いる薄層カップ法で行なったところ, AM-715 の検出限界は 0.05 $\mu\text{g/ml}$ であった。尿中に僅かに検出される AM-715 代謝物は, この bioassay 法に全く影響を与えなかった。

AM-715 は人血清中で -40°C , 人尿中で 4°C および -40°C で少なくとも15日間安定であった。

AM-715 (1-Ethyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid) はグラム陽性ならびにグラム陰性菌に対し広い抗菌スペクトルを示す nalidixic acid 類縁化合物である¹⁾。薬剤投与後の血液, 組織への移行ならびに尿中への排泄濃度ならびに量を測定することはその薬剤の有効性, 安全性を評価する上で非常に重要と考えられる。そこで本薬剤投与後の体液内濃度を bioassay 法によって測定するための最適条件を検討し, 測定法を設定したので, その成績を報告する。

I. 実験材料と方法

1. 使用薬剤

本研究に用いた AM-715 および代謝物の標品は杏林製薬株式会社中央研究所で合成²⁾した。

2. 菌 株

使用した菌株は次に示す当研究所保存株, 11菌株である。*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus*

209 P, *S. aureus* ATCC 14775, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* Kp, *Proteus vulgaris* IFO3167, *P. vulgaris* XK Denken, *Klebsiella pneumoniae* IFO 3512, *Pseudomonas aeruginosa* V-1 および *P. aeruginosa* IFO 12689

3. 感受性試験

日本化学療法学会標準法に準じ最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した³⁾。

4. 薄層カップ法

検定菌を含む寒天培地 5 ml を直径 90 mm のペトリ皿に分注し水平に固まらせる。寒天平板上にカップを置き, 試料をカップに注入する。37°C で 18~20 時間培養後, 生じた阻止円の直径を 0.1 mm まで判読した。

II. 実験結果

1. 検定菌の選定

各試験菌に対する AM-715 および 6 種の代謝物の

Fig. 1 Chemical structures of AM-715 and its metabolites

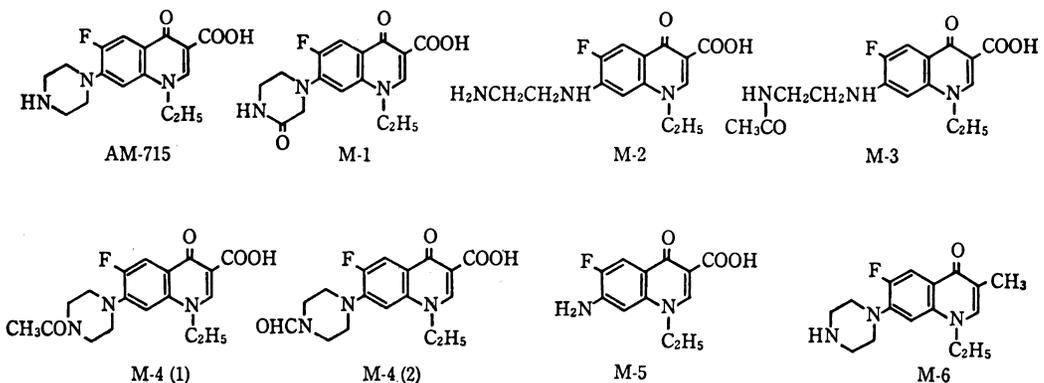


Table 1 Antibacterial activity of AM-715 and its metabolites

Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				10^6 cells/ml			
	AM-715	M-1	M-2	M-3	M-4(1)	M-4(2)	M-5	M-6
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.10	0.78	6.25	25	0.20	≤ 0.10	6.25	25
<i>S. aureus</i> 209P	0.78	3.13	>100	>100	0.78	1.56	>100	>100
<i>S. aureus</i> ATCC 14775	3.13	6.25	>100	>100	1.56	1.56	>100	>100
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.05	0.39	6.25	25	1.56	0.39	3.13	12.5
<i>E. coli</i> ATCC 10536	0.05	0.78	12.5	50	1.56	0.39	6.25	12.5
<i>E. coli</i> Kp	0.05	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i> IFO 3167	0.05	0.78	6.25	6.25	0.39	≤ 0.10	6.25	12.5
<i>P. vulgaris</i> XK Denken	0.05	0.39	6.25	12.5	1.56	0.39	6.25	25
<i>K. pneumoniae</i> IFO 3512	0.10	0.10	12.5	25	≤ 0.10	≤ 0.10	3.13	6.25
<i>P. aeruginosa</i> V-1	0.78	12.5	50	>100	25	6.25	>100	50
<i>P. aeruginosa</i> IFO 12689	1.56	25	100	>100	25	6.25	>100	>100

MIC を Table 1 に示した。AM-715 は緑膿菌を含むグラム陰性菌に対し強い抗菌力を示した。その中で特に強い抗菌力を示した *E. coli* 3 株と比較的一般に検定菌として用いられる *B. subtilis* ATCC 6633 を用いて以下の試験を行なった。

上記菌株を Heart infusion broth (Nissui) で 37°C, 18~20時間培養し、これを接種菌液とした。この菌液を 0.1% になるように滅菌後 48~50°C に冷却した感性ディスク用培地 (Nissui) に接種し充分混和した後、検定用薄層平板を作成した。Fig. 2 に示したように、*E. coli* Kp で阻止円が最も大きく、検量線の勾配が最も大きかった。しかし阻止円の判読のしやすさは *E. coli* NIHJ JC-2 が最もよく、他の株はこれに及ばなかった。以上の結果より阻止円が判読しやすく、かつ阻止円の大きさが比較的大きい *E. coli* NIHJ JC-2 を検定菌とした。

2 薄層カップ法の検討

1) 検定培地の検討

E. coli NIHJ JC-2 を検定菌とし、感性ディスク用培地、Tryptosoya agar, Heart infusion agar (以上 Nissui)、普通寒天培地 (Eiken) および MÜLLER-HINTON Medium (Difco) を用いて、検量線を作成し比較した。Fig. 3 に示したように感性ディスク用培地で阻止円が最も大きく、普通寒天培地および MÜLLER-HINTON Medium で最も小さかった。さらに阻止円の判読しやすさは感性ディスク用培地が最もよく、普通寒天培地および MÜLLER-HINTON Medium では不鮮明であった。以上の結果より

阻止円の判読しやすさ、阻止円の大きさ、ならびに検量線の傾きより、感性ディスク用培地が最も適していた。

2) 培地 pH の検討

E. coli NIHJ JC-2 を検定菌として、検定培地に感性ディスク用培地を用い、この培地の pH を希 HCl あるいは希 NaOH で 6.2, 7.0 および 8.1 に調整して、検量線を比較した。Fig. 4 に示したように pH 7.0 と 8.1 の検量線に差はなく、pH 6.2 では感度が劣っていた。また阻止円の明瞭さは、pH 7.0 の方がすぐれていた。以上の結果より、とくに市販の培地 (pH 7.0) の pH を変えることなく使用するのが最も適していた。

3) 培地量の検討

E. coli NIHJ JC-2 を検定菌として、検定培地に感性ディスク用培地を用い、平板作成に用いる培地量を 5 および 10 ml とし、検量線を作成した。Fig. 5 に示したように 5 ml を用いる方が定量感度ははるかによかった。

4) 接種菌量の検討

E. coli NIHJ JC-2 を検定菌とし、感性ディスク用培地に接種菌液を 0.1, 0.5 および 1.0% 濃度となるように加え、検量線を比較した。Fig. 6 に示したように感度に差はないが、傾きは 0.1% が最も大きく、阻止円の判読しやすさも最もよかった。また 0.5 あるいは 1.0% を接種した時、多重阻止円が生じ判読し難かった。従って接種菌液は 0.1% 濃度が最も適していた。

3. 希釈液の検討

1) 希釈液 pH の影響

Fig. 2 Standard calibration lines for AM-715 by *E. coli* NIHJ JC-2 (○—○), *E. coli* Kp (●—●), *E. coli* ATCC 10536 (▲—▲) and *B. subtilis* ATCC 6633 (△—△).

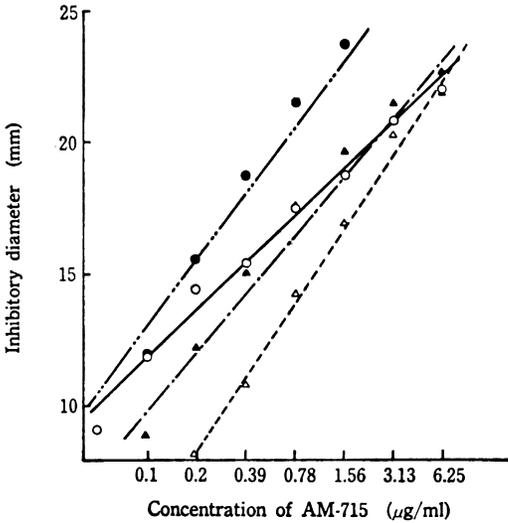


Fig. 3 Standard calibration lines for AM-715 by *E. coli* NIHJ JC-2 in Modified MÜLLER-HINTON Agar (○—○), Nutrient Agar (●—●), Heart Infusion Agar (△—△), Tryptosoya Agar (▲—▲) and MÜLLER-HINTON Agar (□—□).

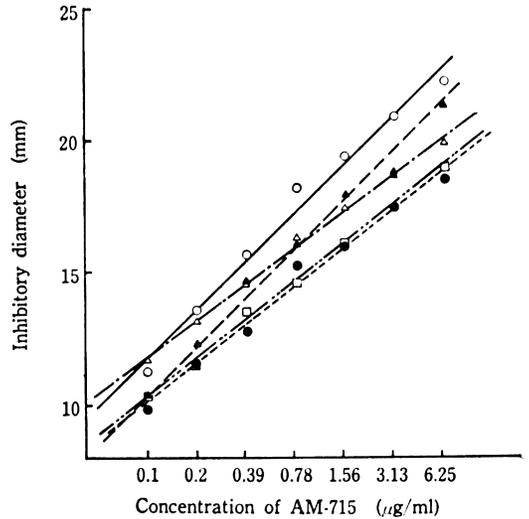


Fig. 4 Standard calibration lines for AM-715 by *E. coli* NIHJ JC-2 in Modified MÜLLER-HINTON Agar adjusted pH to 6.2 (△—△), 7.0 (○—○) and 8.1 (●—●).

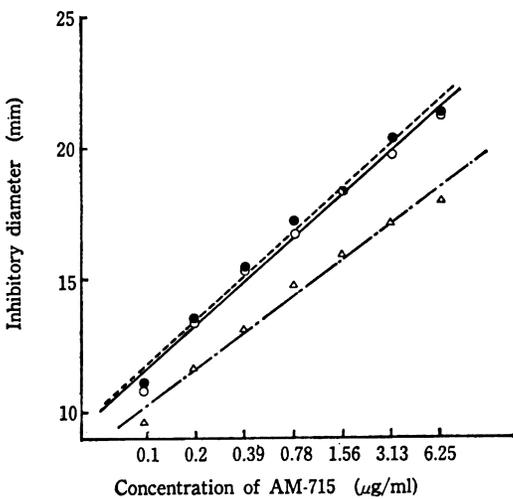


Fig. 5 Standard calibration lines for AM-715 by *E. coli* NIHJ JC-2 in 5 ml (○—○) and 10 ml (●—●) of Modified MÜLLER-HINTON Agar.

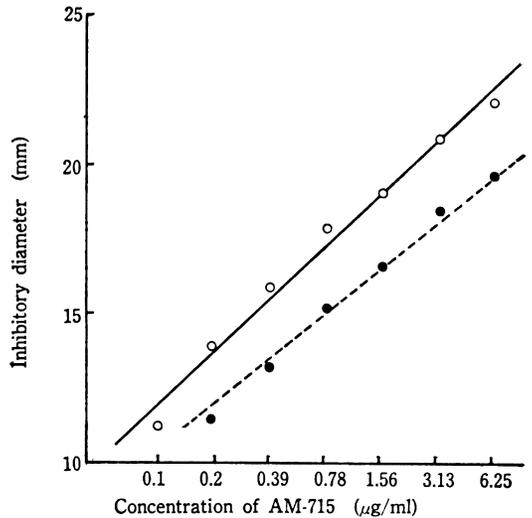


Fig. 6 Standard calibration lines for AM-715 by *E. coli* NIHJ JC-2 inoculated 0.1 (○—○), 0.5 (●—●) and 1.0% (△—△).

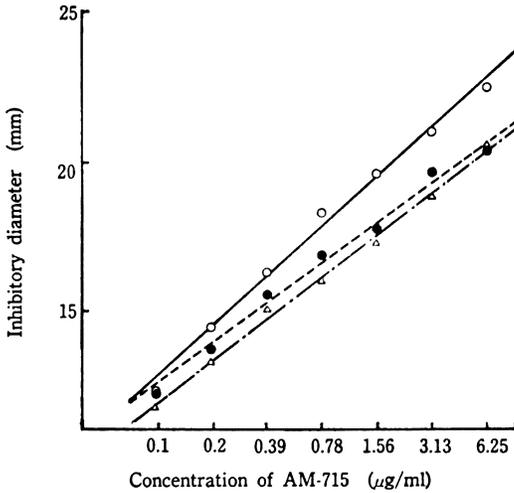


Fig. 7 Standard calibration lines for AM-715 diluted with M/15 phosphate buffer, pH 6.0 (▲—▲), 7.0 (●—●), 7.5 (○—○) and 8.0 (△—△) by *E. coli* NIHJ JC-2.

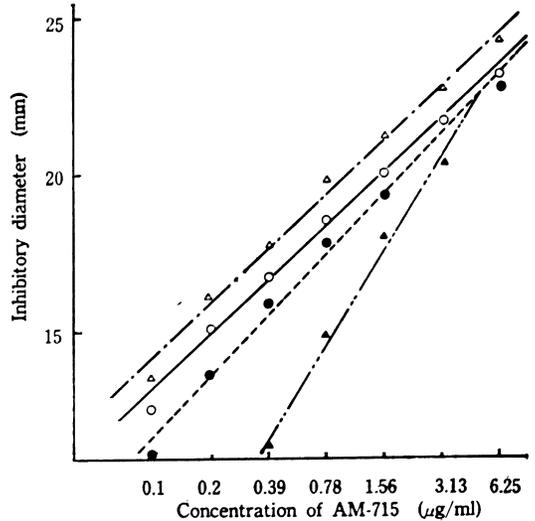
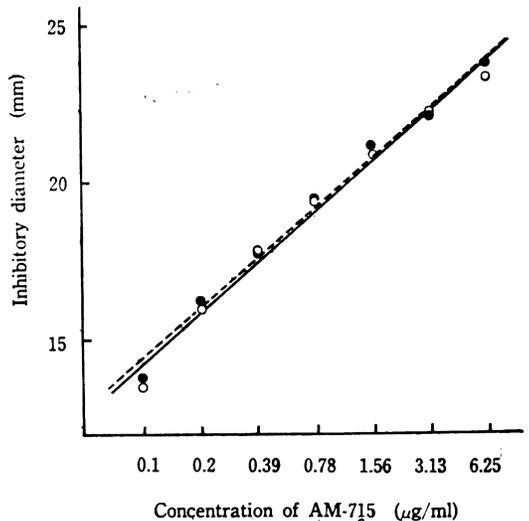


Fig. 8 Standard calibration lines for AM-715 diluted with fresh human serum (○—○) and Consera (Nissui) prepared at pH 7.5 (●—●) by *E. coli* NIHJ JC-2.



E. coli NIHJ JC-2 を検定菌とし、感性ディスク用培地を用い、AM-715 を希釈するリン酸緩衝液の pH を 6.0, 7.0, 7.5 および 8.0 とし、検量線を比較した。Fig. 7 に示したように pH 6.0 では傾きは大きい、検出限界濃度が高く、また pH が 7.0 から 8.0 へと上昇するにつれて阻止円が大きくなる傾向が見られた。従って測定する検体と同一の pH の希釈液を用いるのが良かった。

2) 血清の影響

E. coli NIHJ JC-2 を検定菌とし、感性ディスク用培地を用いて AM-715 の希釈液としてヒト血清 (健康人の新鮮血清) と pH 7.5 に調整した Consera (Nissui) を使用した場合の検量線を比較した。Fig. 8 に示したように両者の間には差がなく、この結果から血清検体の検量線作成希釈液として Consera を pH 7.5 に調整して用いれば良いことが判った。

4. 代謝物の影響

ヒトや動物に投与された AM-715 は大部分 (83~89%) 未変化のまま排泄され、一部は代謝され M-1 および M-2~M-6 の微量代謝物となって排泄される^{4),5)}。AM-715 代謝物のコード名と構造を Fig. 1 に、*in vitro* 抗菌活性を Table 1 に示した。代謝物中、検定菌である *E. coli* NIHJ JC-2 に対し比較的強い抗菌活性を示すのは M-4 および M-1 であり、この 2 者のうち量的に問題となるのは M-1 である。そこで AM-715 の微生物学的定量法に及ぼす M-1 の影響を検討した。AM-715 と

M-1 の *E. coli* NIHJ JC-2 に対する共存効果を checker board 法で検討した。Fig. 9 に示した結果を PARSLEY らの方法⁶⁾ に準じ FIC 係数を求めたところ両者間に有意な相乗効果は認められなかった。またヒト尿中存在量比あるいは等量比で両者を存在させても、AM-715 の検

Table 2 Stability of AM-715 in human serum and urine

	AM-715 concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	Serum	Urine 1	Urine 2
Before storage	0.84	112	132
After storage for 15 days	0.86 ^{b)}	116 ^{a)} 120 ^{b)}	140 ^{a)} 130 ^{b)}

a) Stored at 4°C

b) Stored at -40°C

量線に影響を及ぼさなかった。

5. ヒト血清および尿中での安定性

ヒトに AM-715 を 200 mg 経口投与後 1.5 時間に採血し、血清を分離した。また、尿は 0.5~1.5 時間 (Urine 1) および 5~6 時間 (Urine 2) に採取した。採取直後の血清または尿をコントロールとして、血清は -40°C、尿は 4°C および -40°C で 15 日間保存した後、残存活性を測定し、ヒト血清中およびヒト尿中での安定性を検討した。Table 2 に示すように各検体とも 15 日間の保存で AM-715 濃度に変化はなかった。

III. 考 察

AM-715 の有効性、安全性を評価する上で重要な意義をもつ体液濃度の測定法を検討した。検定菌としては、AM-715 に感受性がよく阻止円の判断しやすい *E. coli* NIHJ JC-2 が適当と考えられた。検定培地は阻止円の判読しやすさ、阻止円の大きさならびに検量線の勾配から判断して感性ディスク用培地を採用した。AM-715 を希釈する緩衝液の pH が 6.0~8.0 へと上昇するに従い、阻止円の大きさが大きくなる傾向が見られた。この現象から検体と検量線作成時に用いる希釈用緩衝液の pH を一致させることにより、正確な濃度測定が行なえたと考えられた。血清中濃度測定に用いる希釈液としては新鮮ヒト血清とほぼ一致する検量線を示す pH 7.5 に調整した Consera (Nissui) を用いるのが適していると考えられた。Consera は蒸留水で調製するよう指示されているが、ロットにより pH が異なり、また AM-715 の検量線は希釈液の pH に影響されるため、ヒト血清に近い pH 7.5 に調製し用いることにした。AM-715 代謝物中、抗菌活性が比較的強くかつヒトに投与された場合最も多く検出される M-1 できえ、等量比存在させても阻止円に影響を及ぼさなかった。AM-715 は -40°C においてヒト血清ならびにヒト尿中、また 4°C においてヒト尿中で少なくとも 15 日間は安定であった。

以上の結果に基づき、著者らは AM-715 の体液内濃

度測定法として、下記に示した方法を設定した。また本法での検出限界は 0.05 $\mu\text{g/ml}$ であった。

AM-715 体液内濃度測定法 (微生物学的定量法)

1) 検定菌

E. coli NIHJ JC-2

2) 検定用培地

感性ディスク用培地 (Nissui)

3) 接種菌液

Heart infusion agar (Nissui) で 37°C 1 晩斜面培養した検定菌 (培養後 4°C 保存で 1 週間使用可能) 1 白金耳を Heart infusion broth (Nissui) 10 ml に接種し、37°C、18~20 時間培養し、接種菌液とする。

4) 薄層寒天平板

接種菌液を感性ディスク用培地に 0.1% 接種する。接種時の培地温度は 48~50°C で行ない、よく混和後 5 ml ずつ直径 90 mm のペトリ皿に分注し、水平に固まらせる。

5) 標準液

AM-715 10.0 mg を 0.2N NaOH 2 ml で溶解したのち蒸留水で正確に 10 ml とし、1,000 $\mu\text{g/ml}$ の標準原液を調製する。血清中濃度測定の場合は pH 7.5 に調整したヒト血清 (Consera: Nissui) または同種動物の血清で標準原液を 10 倍希釈した後、2 倍希釈系列を作製し標準液とする。尿中濃度測定の場合は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で、また組織内濃度の場合は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.5) で同様に希釈し、標準液を調製する。

6) 検量線による測定範囲

0.05~6.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

7) 検体の希釈液

血清は pH 7.5 に調整したヒト血清 (Consera; Nissui) または同種動物の血清で、尿は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) で、また組織抽出液は M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈する。

8) 定量操作

薄層カップ法により行なう。カップ内に被験液または

標準液を満たし、1時間室温放置した後、37°C、18~20時間培養後測定する。

文 献

- 1) ITO, A. ; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 17: 103~108, 1980
- 2) KOGA, H. ; A. ITO, S. MURAYAMA, S. SUZUE & T. IRIKURA: Structure-activity relationships of antibacterial 6,7- and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.* 23: 1358~1363, 1980
- 3) MIC 測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改訂について。 *Chemotherapy* 22: 1126~1128, 1974
- 4) 永津芳雄, 遠藤恭平, 入倉 勉: ¹⁴C 標識 AM-715 による代謝に関する研究。 *Chemotherapy* 29 (S-4): 119~127, 1981
- 5) 尾崎敏夫, 内田 広, 入倉 勉: AM-715 のヒトにおける代謝に関する研究——高速液体クロマトグラフィーによる——。 *Chemotherapy* 29 (S-4): 128~135, 1981
- 6) PARSLEY, T. L. ; R. B. PROVONCHEE, C. GLICKSMAN, & S. H. ZINNER: Synergistic activity of trimethoprim and amikacin against gram-negative bacilli. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 12: 349~352, 1977

THE STUDIES ON THE BIOASSAY METHOD OF AM-715 IN BODY FLUIDS

YASUO OOMORI, SATOSHI MURAYAMA, YASUO ABE and TSUTOMU IRIKURA

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Studies on the bioassay method of AM-715 in body fluid were performed and following results were obtained.

It was conceivable that the thin layer cup method, using *E. coli* NIHJ JC-2 as an assay organism and modified MÜLLER-HINTON Medium, was the best way for determination of AM-715 levels in body fluids. Detectable sensitivity limit of this method for AM-715 was 0.05 µg/ml.

It seemed that metabolites of AM-715 did not affect practically the bioassay of AM-715. AM-715 was stable in human serum at -40°C and in human urine at 4°C and -40°C, at least, for 15 days.