

TMS-19-Q の体液内濃度測定法に関する研究 (I)

Bioassay 法による体液内濃度測定

森下真孝・酒井敦史・遠藤里子・鈴木忠清

東洋醸造株式会社リサーチセンター 製剤研究所

新規マクロライド系抗生剤 TMS-19-Q の体液内濃度測定法について検討した。

検定菌として *Micrococcus luteus* ATCC 9341, 検定培地として日抗基力価試験用培地 (ペプトン 6g, 酵母エキス 3g, 肉エキス 1.5g, ブドウ糖 1g, 寒天 15g, 蒸留水 1l, pH 6.5) を用いた Agar well 法が最適であった。

濃度測定範囲は TMS-19-Q およびその代謝物により異なり, TMS-19-Q で 0.35 $\mu\text{g/ml}$ ~20 $\mu\text{g/ml}$, LM A₇ で 0.43 $\mu\text{g/ml}$ ~20 $\mu\text{g/ml}$, 10''-OH-TMS-19-Q で 0.70 $\mu\text{g/ml}$ ~20 $\mu\text{g/ml}$, LM V で 2.4 $\mu\text{g/ml}$ ~20 $\mu\text{g/ml}$, 14-OH-LM V で 28 $\mu\text{g/ml}$ ~200 $\mu\text{g/ml}$ が可能であった。

血中濃度測定に際し, TMS-19-Q はエステラーゼにより加水分解を受けるので, これを停止させるため Diisopropylfluorophosphate (DFP) を添加し, さらに代謝物の種類によりタンパク結合率が異なるため, CH₃CN による除タンパク操作が必要であった。

尿中濃度は CH₂Cl₂ で抽出後, 20% CH₃CN 含有 1/15M Phosphate buffer (pH 6.5) に溶解し, Bioassay を行なった。

各種体液試料は -20°C 以下で保存する方法で少なくとも 2 週間は安定に保たれた。

TMS-19-Q は中範囲抗菌スペクトルをもつ新規半合成マクロライド系抗生物質である¹⁾。その構造は Fig. 1 に示したように Leucomycin A₅ の誘導体; 3''-propionylleucomycin A₅ である。

本物質は水に難溶性の塩基性薬物で, 脂溶性が高く培地中での拡散がその代謝物に比べて遅いこと, 代謝物自身もかなりの抗菌活性を有すること, タンパク結合率が代謝物も含めてそれぞれ異なることなどの特性を有している。したがって, 体液内濃度, 特に血中濃度を抗菌活性により表示する Bioassay 法では, これらの性質が測定値に及ぼす影響について十分に検討する必要がある。

本報では, 血中濃度の表示に代謝物も含めて総合力としての抗菌活性が極力反映されるような Bioassay 法を確立するため, 検定菌, 培地, pH, 生体試料の前処理

法, 検定手法などの検討を行ない, 併せて TLC/Bioautography による代謝物の分離検出法について検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

TMS-19-Q およびその代謝物である 10''-OH-TMS-19-Q, LM A₇, LM V, 14-OH-LM V は東洋醸造(株)リサーチセンターで調製したものを使用した。これら各代謝物の構造式を Fig. 2 に示した。

2. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

日本化学療法学会標準法³⁾に準拠し行なった。

3. Bioassay 法

1) 検定菌

Micrococcus luteus (*M. luteus*) ATCC 9341, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) Cook 株および *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538 P を用いた。

2) 検定用培地

市販培地の Nutrient agar (NA, 栄研), Heart infusion agar (HIA, DIFCO), Brain heart infusion agar (BHIA, DIFCO) および日抗基力価試験法 I-2-(1)-①-i に記載の培地 (ペプトン 6g, 酵母エキス 3g, 肉エキス 1.5g, ブドウ糖 1g, 寒天 15g, 蒸留水 1l, pH 6.5, 以下 MRAPJ 培地と略す)

3) 検定菌液の調製法および検定培地への接種

Fig. 1 Chemical structure of TMS-19-Q

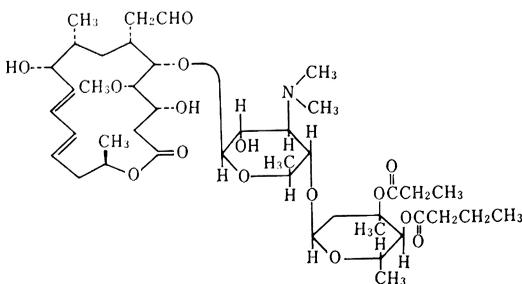
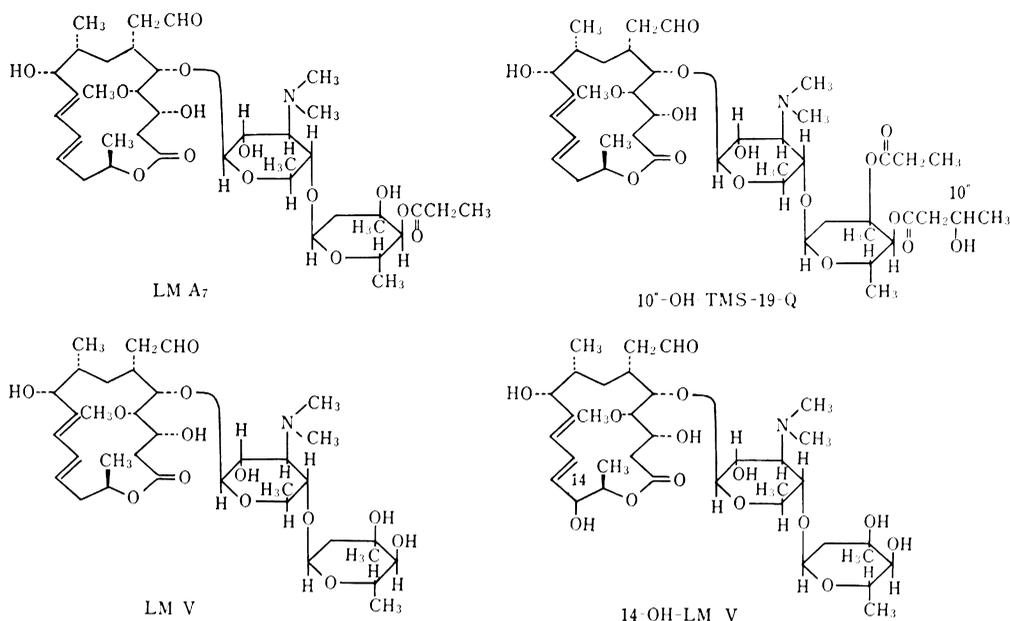


Fig. 2 Chemical structures of LM A₇, LM V, 10''-OH-TMS-19-Q and 14-OH-LM V

M. luteus ATCC 9341 は、斜面とした増菌用培地（ペプトン 10g, 肉エキス 2.5g, 酵母エキス 2.5g, 塩化ナトリウム 3g, 寒天 15g, 蒸留水 11, pH 6.5）を用い、30°C, 約 18 時間培養し、その 1 白金耳を試験菌遊用液状培地（トリプトン 17g, ソイペプトン 3g, ブドウ糖 2.5g, 塩化ナトリウム 5g, リン酸一水素カリウム 2.5g, 蒸留水 11, pH 7.3）100 ml に接種し、30°C, 約 18 時間振盪培養したものを検定菌液として用いた。

S. pyogenes Cook 株は、ヒツジ脱線維素血液加寒天（基層として BHIA）に 37°C で約 24 時間培養し、この 1 白金耳を BHI broth 50 ml に接種し 37°C, 約 18 時間培養したものを検定菌液とした。

S. aureus ATCC 6538 P は、日本抗生物質医薬品基準に従って、増菌用斜面培地で 37°C, 約 16 時間培養し、菌体を生理食塩水 10 ml に懸濁し検定菌液とした。各検定菌液は菌数を確認後、検定用培地に接種した。

4) 濃度測定法

Paper disc 法, Cup 法および Agar well 法を用いた。

検定菌を接種した検定用培地を Paper disc 法では 8 ml, その他では 16 ml を径 90mm のシャーレに流し水平固化した。Agar well 法においては, agar well 穿孔機 (YAMATO) を使用して, 各シャーレに 4 つの注液孔 (径 8mm, well) をあけこれに試料 (80 μl) を注液した。培養は 37°C, 約 18 時間とした。

5) 希釈液

1/15M Phosphate buffer (pH 6.5, 7.0, 8.0), 20% CH₃CN 含有 1/15M Phosphate buffer (pH 6.5), プールしたヒト血漿およびヒト新鮮尿を用いた。

6) 試料の調製法

血漿は Chart 1 に示したように溶媒で除タンパク後減圧下乾固し、溶解後 Bioassay に供した。使用した血漿はエステラーゼによる TMS-19-Q の分解を阻止するため最終濃度 3mM で DFP 処理した。また尿は NaHCO₃ で pH 8~9 にした後、CH₂Cl₂ (3 倍量) にて抽出し減圧下乾固し、溶解後 Bioassay に供した。

4. 試料の保存安定性

生体試料の保存安定性を血漿, 尿について行なった。各体液試料の予想される保存状態, すなわち血漿では 3 mM DFP 処理後, 尿では CH₂Cl₂ 抽出後の CH₂Cl₂ 層 (Chart 1) を -20°C, 15 日間保存し, 保存前後の抗菌活性を Agar well 法で測定した。

1) In vitro

3mM DFP 処理ヒト血漿 9 容, あるいはヒト新鮮尿 9 容に TMS-19-Q 溶液 1 容を加え, 10 μg/ml 溶液を調製し, これを試料とした。

2) In vivo

健康成人男子に TMS-19-Q-GC 錠 600mg を経口投与して得た血液を DFP 処理し, 遠心分離後の血漿を試料とし安定性試験に供した。

5. TLC/Bioautography 法

試料調製は Bioautography 法に準じ, Chart 1 の方

Chart 1 Pretreatment method of sample for bioassay (Human)

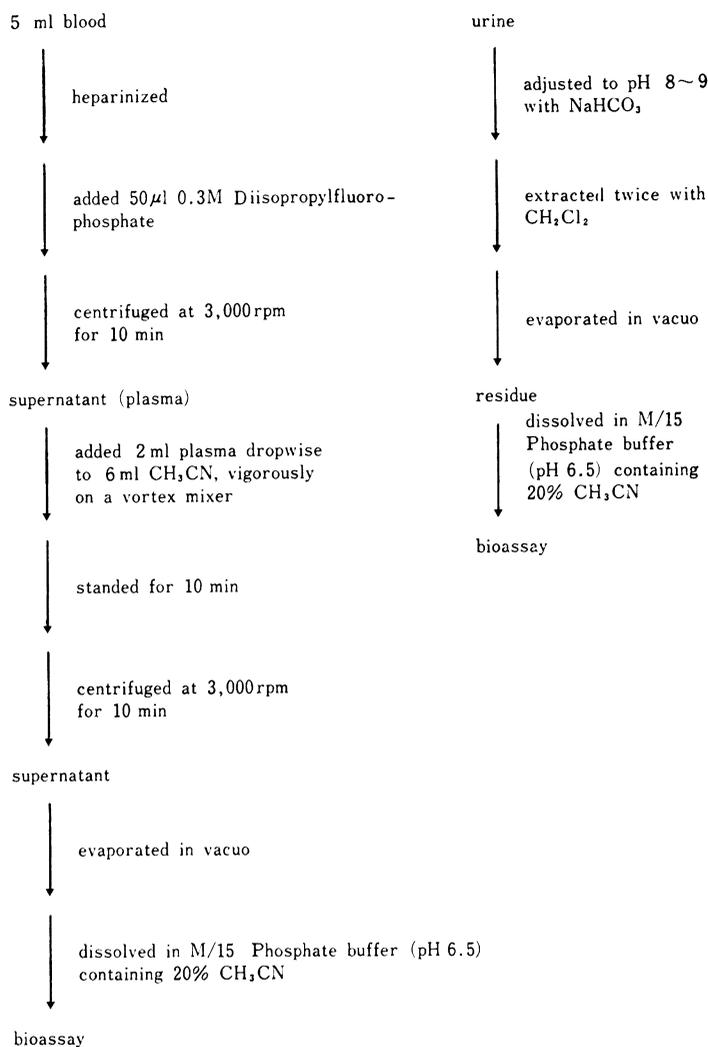


Table 1 Antibacterial spectra of TMS-19-Q and its metabolites

Organisms	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	TMS-19-Q	$10''\text{-OH-TMS-19-Q}$	LM A ₇	LM V
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	0.10	0.78	0.39	12.5
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.0125	0.0125	0.0125	0.20
<i>M. luteus</i> ATCC9341	0.0125	0.0125	0.0125	0.20

10⁶ CFU/ml

Organisms	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	TMS-19-Q	$10''\text{-OH-TMS-19-Q}$	LM A ₇	LM V
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	0.10	1.56	0.78	12.5
<i>S. pyogenes</i> Cook	0.0125	0.0125	0.025	0.39
<i>M. luteus</i> ATCC9341	0.0125	0.025	0.025	0.20

10⁸ CFU/ml

法にて行ない、 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} (1 : 2)$ に溶解後 TLC 用シリカゲルプレート (Merck 社製 Art. 5721) を用い、基底より 3cm にスポットし、15cm 展開した。展開溶媒は $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{O} (70 : 11 : 8 : 2)$ を用いた。抗菌活性の検出には *M. luteus* ATCC 9341, NA 培地 (pH 8.0) を使用し 37°C, 約 18 時間培養した。

II. 実験結果

1. TMS-19-Q および代謝物の抗菌力

TMS-19-Q および代謝物の MIC を *S. aureus* ATCC 6538 P, *S. pyogenes* Cook および *M. luteus* ATCC 9341 につき 10^6 CFU/ml と 10^8 CFU/ml で測定した。

マクロライド系抗生物質の対象疾患における代表的な分離菌の一つである *S. aureus* ATCC 6538 P において TMS-19-Q および代謝物の抗菌活性は $\text{TMS-19-Q} > \text{LM A}_7 > 10''\text{-OH-TMS-19-Q} > \text{LM V}$ の順となった (Table 1)。

さらに *S. aureus* 臨床分離株 79 株を用いて TMS-

19-Q および代謝物の感受性分布を測定したところ、それぞれの MIC 値は、TMS-19-Q 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, LM A₇ 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$, LM V 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。このときの対照薬物 Josamycin (JM) の MIC は 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$ であり、代謝物である LM A₇ と同等であった (Table 2)。

2. Bioassay 法

1) 血漿中濃度の測定方法

(1) 検定菌および培地の検討

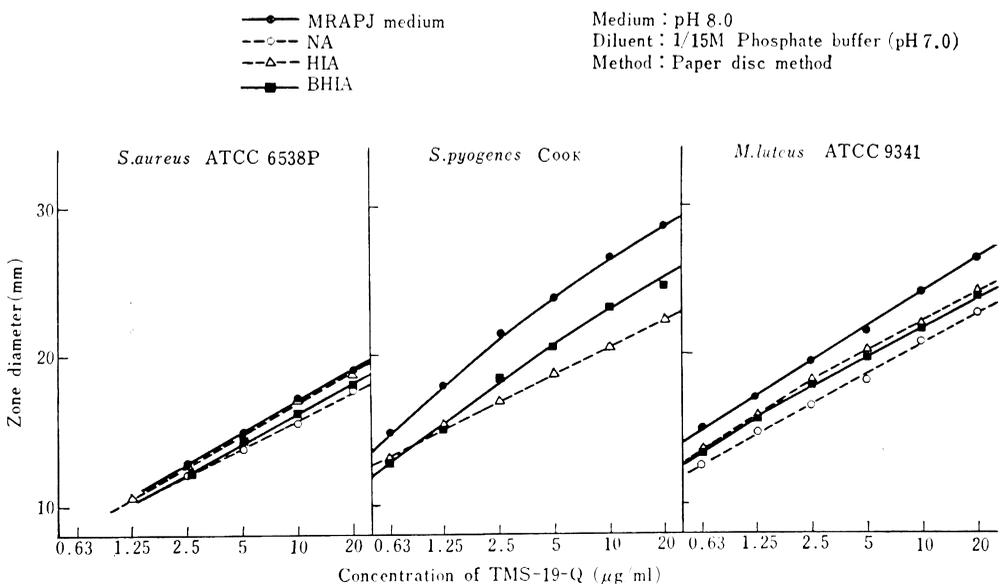
検定菌は感受性の良い *M. luteus* ATCC 9341, *S. pyogenes* Cook 株および *S. aureus* ATCC 6538 P の 3 種類について検討した。

培地は NA, HIA, BHIA および日抗基力価試験法 (MRAPJ) の培地の 4 種類とし、この組合せで TMS-19-Q の検量線を Paper disc 法で作成し、Fig. 3 に示した。これらの検定菌および培地の各々の組合せの総合判定を Table 3 にまとめた。その結果、検定菌としては *M. luteus* ATCC 9341, 培地としては MRAPJ 培

Table 2 Susceptibility distribution against clinically isolated *S. aureus* 79 strains

Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)												
	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
TMS-19-Q			7	26	32		1						13
LM A ₇				2	54	8	1						14
LM V							2	39	16				22
JM				5	35	26							13

Fig. 3 Effect of various test organisms on standard curves of TMS-19-Q



Medium : pH 8.0
 Diluent : 1/15M Phosphate buffer (pH 7.0)
 Method : Paper disc method

Table 3 Comparison of various test organisms and media in bioassay of TMS-19-Q

Test organisms	Media	Diameter of inhibition zone	Clearness of inhibition zone	Slope of standard curve
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	MRAPJ medium	+	+	+
	NA	+	+	+
	HIA	+	≡	+
	BHIA	+	+	+
<i>S. pyogenes</i> Cook	MRAPJ medium	≡	+	≡
	NA	*	*	*
	HIA	+	+	+
	BHIA	≡	+	≡
<i>M. luteus</i> ATCC9341	MRAPJ medium	≡	≡	≡
	NA	+	≡	≡
	HIA	≡	≡	≡
	BHIA	≡	≡	≡

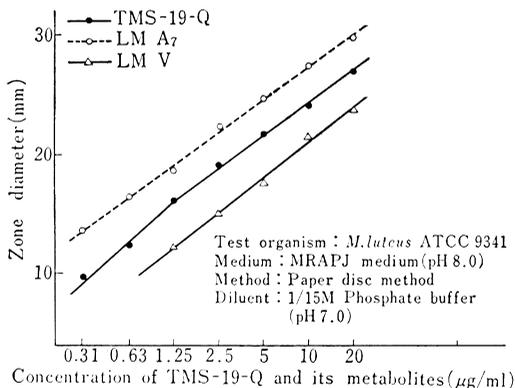
* : No growth

≡ : Excellent

+ : Good

. + : Poor

Fig. 4 Relationship of standard curves between TMS-19-Q and its metabolites



地の組合せが検量線の精度および感度において最も優れていた。

(2) 代謝物の抗菌力と検量線との関係

次に代謝物である LM A₇, LM V は Table 1, 2 に示したような抗菌活性を示すことから, これらの検量線を同様に作成した。Fig. 4 に示したように阻止円径は LM A₇ > TMS-19-Q > LM V となり, 1. における *in vitro* の抗菌力と矛盾する成績が得られた。このためさらに以下の検討を加えた。

(3) 培地 pH の影響

Fig. 5 に培地 pH を 6.5~8.0 に変化させた場合の TMS-19-Q, LM A₇, LM V の検量線を示した。pH 6.5 において代謝物間の関係が最も良かったため, 培地 pH は 6.5 とした。

(4) 希釈液 pH の影響

Fig. 6 に希釈液である 1/15M Phosphate buffer の pH を 6.5~8.0 に変化させた場合の検量線を示した。pH 6.5 において阻止円径は TMS-19-Q > LM A₇ > LM V となり *in vitro* の抗菌力を反映するようになった。しかしながら阻止円は二重リングとなり明瞭性にかけたため, これを改善すべく測定方法を検討した。

(5) 測定方法の検討

Paper disc 法以外に Agar well 法および Cup 法を検討し, Fig. 7 の検量線を得た。その結果, Table 4 に示すとおり, 総合判定では Agar well 法が阻止円の相対比, 明瞭性および検量線の傾きにおいて最も優れていた。

(6) 菌数の影響

M. luteus ATCC 9341 の菌液 (10⁸CFU/ml) を MRAPJ 培地 (pH 6.5) に接種するにあたり, 0.1, 0.2, 0.4% の濃度になるように培地に接種し, 検量線を作成した。Agar well 法において菌液の濃度は, 精度, 感度および阻止円の明瞭性に何ら影響を与えなかったため, 以降 0.1% 接種とした。

(7) 血漿試料の前処理方法

プールヒト血漿 9 容に薬液 1 容を混和し, 0.63 µg/ml ~ 20 µg/ml の標準溶液を調製した。これを用いて作成した検量線を Fig. 8 に示したが, ヒト血漿での阻止円の大きさは LM A₇ > TMS-19-Q > LM V となり, TMS-19-Q と LM A₇ が逆転した。この現象は各測定物質の血清タンパクとの結合能の違いに起因するものと考え, 種々の除タンパク剤について検討した結果, Chart

Fig. 5 Effect of medium pH on standard curves of TMS-19-Q and its metabolites

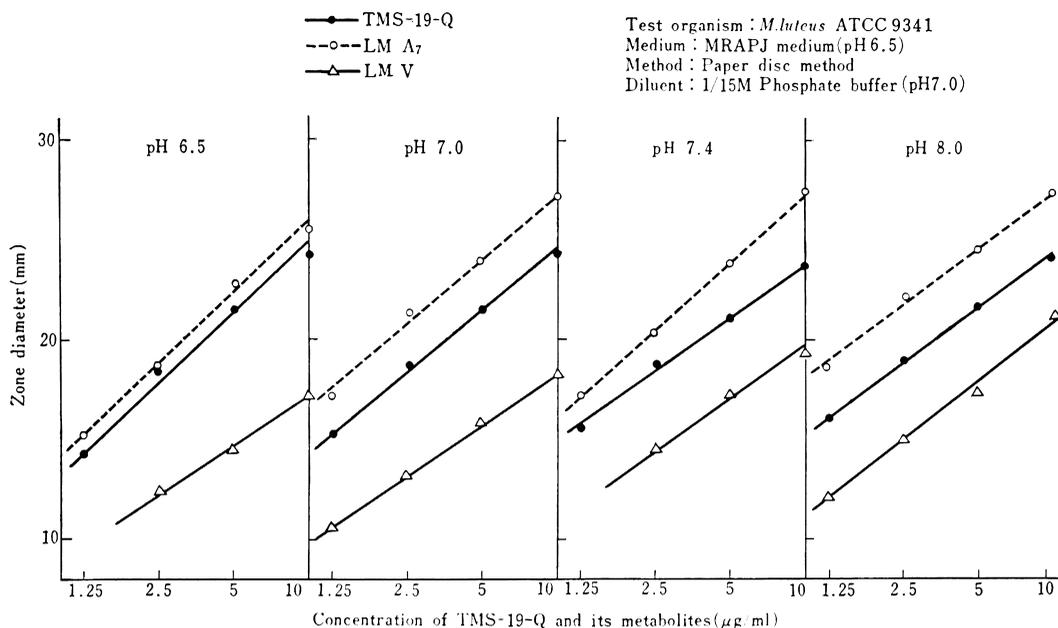
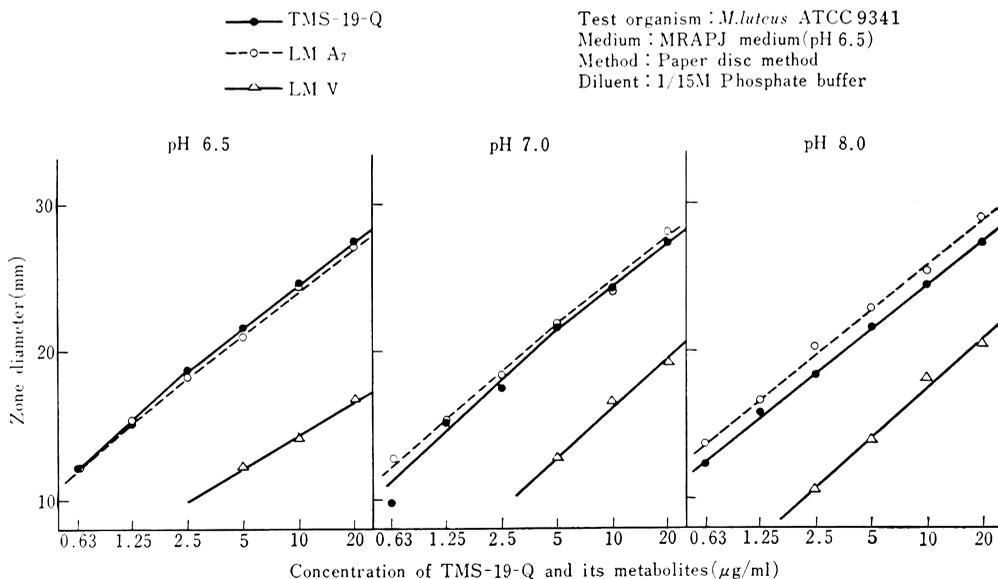


Fig. 6 Effect of pH of diluent on standard curves of TMS-19-Q and its metabolites



1に示す CH_3CN を用いることとした。すなわち 6ml CH_3CN 中に 2ml の血漿を徐々に滴下して除タンパクし、この遠心上清を減圧下乾固した。乾固物は 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.5) では、充分に溶解されなかったため、20% CH_3CN を含有した同液で溶解後検

量線を作成した。この操作で、阻止円の大きさは TMS-19-Q > LM A₇ > LM V の順となり抗菌力の順序と一致したので、本法を血漿中濃度測定の前処理法として用いることにした。また、20% CH_3CN の添加は、菌の増殖および阻止円の形成に何ら影響を与えず良好な結果を得

Fig.7 Effect of various method on standard curves of TMS-19-Q and its metabolites

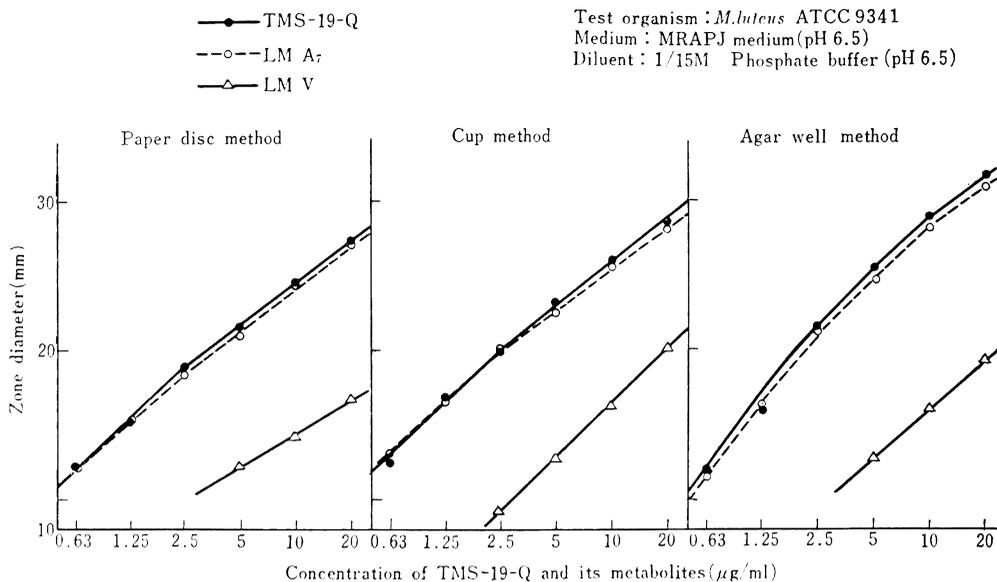


Fig.8 Effect of human plasma on standard curves of TMS-19-Q and its metabolites

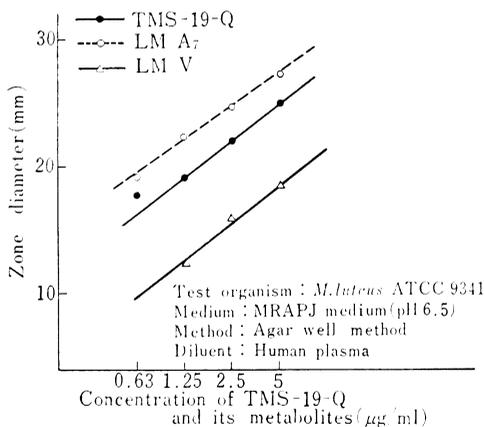


Fig.9 Standard curves of TMS-19-Q and its metabolites in human plasma

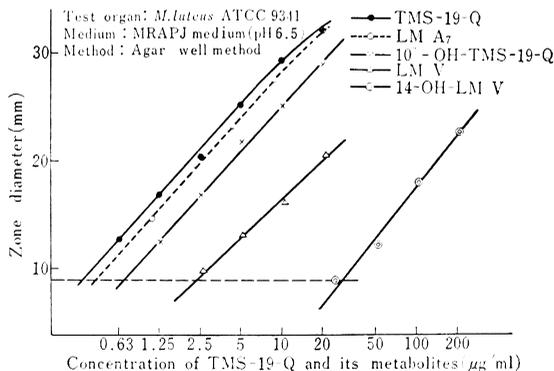


Table 4 Comparison of different method in bioassay of TMS-19-Q and its metabolites

Method	Diameter of inhibition zone	Clearness of inhibition zone	Slope of standard curve	TMS-19-Q > LM A ₇ > LM V
Paper disc method	+	++	++	++
Cup method	++	##	++	##
Agar well method	##	##	##	##

: Excellent
 ++ : Good
 + : Poor

たので、以後の 1/15M Phosphate buffer (pH 6.5) による検量線の作成には、20% CH₃CN 含有溶液を用いた。

この方法により 10''-OH-TMS-19-Q および 14-OH-LM V も合わせてヒト血漿中における検量線を作成した (Fig. 9)。

この検量線に表示される抗菌力は、TMS-19-Q を 1 としたとき 10''-OH-TMS-19-Q 0.51, LM A₇ 0.86, LM V 0.114, 14-OH-LM V 0.015 となり、TMS-19-Q および各代謝物の *in vitro* における抗菌力を良く反映する結果となった。なお、本法における検出限界は TMS-19-Q で 0.35 μg/ml, LM A₇ で 0.43 μg/ml, 10''-OH-TMS-19-Q で 0.70 μg/ml, LM V で 2.4 μg/ml, 14-OH-LM V で 28 μg/ml であった。

2) 尿中濃度の測定方法

尿中濃度の測定に関しては、試料を Chart 1 に従って CH₂Cl₂ で抽出を行なった。CH₂Cl₂ 層を減圧下乾固し、これを血漿と同様 20% CH₃CN 含有 1/15M Phosphate buffer (pH 6.5) に溶解後 Bioassay に供した。

検量線は、ヒト尿 9 容に薬液 1 容を混和し、試料と同様の操作を行ない、Agar well 法にて Bioassay したところ、血漿の場合と同様、検出限界、阻止円の明瞭さも

良好であった。

3. 試料の保存安定性

ヒト血漿、ヒト尿を用いて TMS-19-Q の安定性につ

Table 5 *In vitro* stability of TMS-19-Q in human plasma and urine

	TMS-19-Q concentration (μg/ml)					
	Plasma			Urine		
	1	2	3	1	2	3
Before storage	10.2	10.6	11.0	8.6	8.4	9.8
After storage for 15 days	10.6	10.2	9.6	10.9	8.4	10.2

Stored at -20°C

Table 6 *In vivo* stability of TMS-19-Q in human plasma

	TMS-19-Q concentration (μg/ml)				
	1	2	3	4	5
Before storage	0.56	0.34	0.68	0.36	0.66
After storage for 15 days	0.58	0.35	0.63	0.38	0.64

Stored at -20°C

Fig. 10 TLC/Bioautogram of plasma after oral administration of TMS-19-Q to human

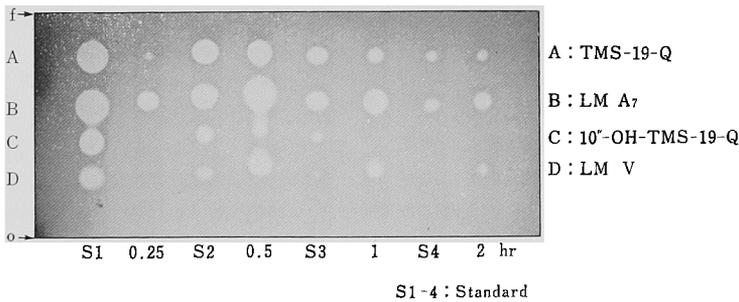
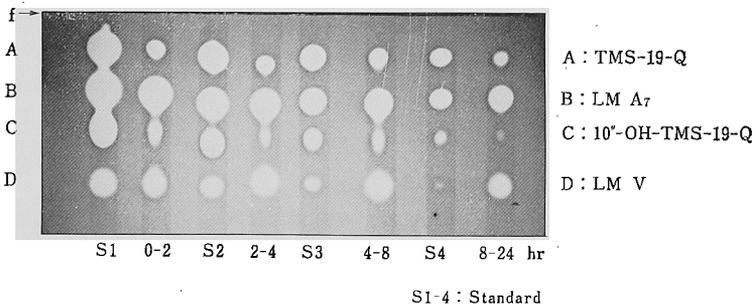


Fig. 11 TLC/Bioautogram of urine after oral administration of TMS-19-Q to human



いて検討した。

Table 5 に *in vitro* での血漿および尿中安定性を示した。血漿および尿中各3点とも保存前と、 -20°C 、15日間保存後とで抗菌活性に差は認められなかった。さらに健康人に TMS-19-Q を投与した後、採血し、その安定性を検討したところ、試料5点につき保存前後で差は認められず安定であった (Table 6)。

4. TLC/Bioautography 法

TMS-19-Q の代謝物の検索を Bioautography 法により検討した。Fig. 10, 11 にヒト血漿および尿中代謝物の Bioautogram を示した。Rf 値の大きい方から TMS-19-Q, LM A₇, 10''-OH-TMS-19-Q および LM V の順で展開され、各代謝物が分離検出された。

III. 考 察

TMS-19-Q は生体内で代謝を受け、LM A₇, 10''-OH-TMS-19-Q, LM V, 14-OH-LM V になることを別に報告した⁴⁾。

本剤の対象疾患における代表的な分離菌の一つである *S. aureus* 79 株の MIC 値は TMS-19-Q 0.39~0.78 $\mu\text{g/ml}$, LM A₇ 0.78~1.56 $\mu\text{g/ml}$, LM V 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、本剤の対象疾患における他の分離菌に対しても、本剤および各代謝物はほぼ同様な MIC 値を示した⁵⁾。したがって臨床での治療効果を十分に反映できる血漿中濃度の測定が確立されなければならないと判断し、種々検討を重ねた結果、*in vitro* の抗菌活性と良好な相関を有し、阻止円の明瞭な *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とし、日抗基力価試験法の MRAPJ 培地を検定培地とする Agar well 法を選択した。

測定法、測定培地を変化させたとき、各代謝物の検量線は変動し、相対力価が逆転する現象も観察され、測定条件によっては本来の抗菌力が正しく検量線に反映されないこともあり得た。この理由としては TMS-19-Q の脂溶性が代謝物に比べて高く、培地中での拡散が代謝物に比べて悪いため阻止円が見かけ上小さく表現されるためと考えられる。

本来 Bioassay 法においては極力簡便な手法で正確な値を求めることが大切であるが、本剤のように生体内での代謝が速やかで、なおかつ代謝物に相当の抗菌力を有する薬剤の Bioassay 法においては血中濃度などを正しく抗菌活性で表示するためには細心の注意が必要であろう。

したがって、培地組成、検定方法などで多少の煩雑さはあっても血中濃度などが代謝物も含めて総合的に TMS-19-Q として正しく表示されることの方が肝要であると考えた。血漿を前処理せずに検量線を作成した場合、阻止円の大きさは LM A₇ > TMS-19-Q > LM V の

順となった。これは TMS-19-Q, LM A₇, LM V のヒト血漿におけるタンパク結合率の違い (TMS-19-Q 85%, LM A₇ 40%, LM V 15%)⁶⁾ に基づくもので、培地条件や検定菌の検討で解決できるものではなかった。したがって、血漿を CH_3CN で除タンパクし、TMS-19-Q およびその代謝物を抽出することによってこの影響を除くことができた。また、血漿抽出乾固物は希釈液である 1/15M Phosphate buffer (pH 6.5) では溶解が困難なため、20% CH_3CN を含有する溶液で溶解することにした。さらに TMS-19-Q はエステラーゼにより加水分解を受けるので、DFP を加えることにより採血後試験管内で加水分解されることを防ぐことができた。

検体試料は採血後直ちに測定に供するのが最も望ましいが、ヒト血漿の場合は、3mM DFP 処理した状態で -20°C 以下に保存し、2週間以内に測定を行えば活性低下はみられず、DFP 添加と -20°C 以下に保存することで検体試料を安定に保存することが可能になった。

以上、我々は TMS-19-Q の体液中濃度を測定するにあたり、臨床効果をよく反映する Bioassay 法の確立について検討したが、一般にマクロライド系抗生物質のように代謝を受けやすい薬物の Bioassay に際しては、

1. 薬物の生体内運命
2. 代謝物を含めた測定物質の物理化学的性質
3. 代謝物の生物活性
4. 血清タンパクとの結合能
5. 採取後の検体の安定性

などを充分考慮して測定法を確立する必要がある。

以上の結果に基づき、著者らは TMS-19-Q の体液中濃度測定法として、下記に示した方法を設定した。

TMS-19-Q 体液中濃度測定法 (微生物学的定量法)

1) 検定菌

Micrococcus luteus ATCC 9341

2) 検定用培地

日抗基力価試験法 I-2-(1)-①-i に記載の培地 (pH 6.5)

3) 検定菌液および菌量

Micrococcus luteus ATCC 9341 を増菌用斜面培地に1白金耳接種し、 30°C 、約18時間培養 (4°C 保存で約2週間使用可能) 後、その1白金耳を試験菌浮遊液状培地 100 ml に接種し、 30°C 、約18時間振盪培養したものを検定菌液 (4°C 保存で約1週間使用可能) とする。

検定用培地への検定菌液の接種量は 0.1% とする。

4) 検定方法

Agar well 法により行なう。

5) 標準液

3mM DFP 処理ヒト血漿あるいはヒト新鮮尿9容に
既知濃度の TMS-19-Q 標準原液1容を加え、試料同様
の処理をする。

6) 検量線による測定範囲

0.35~20 $\mu\text{g/ml}$

7) 検体の処理法

1. DFP による代謝停止

2. CH_3CN による除タンパクおよび濃縮

3. 20% CH_3CN 含有 1/15M Phosphate buffer (pH
6.5) による溶解

8) 検体の保存

DFP 添加, -20°C 以下凍結保存

稿を終えるにあたり、終始御指導御助言を賜りまし
た東京女子医科大学清水喜八郎教授に深謝致します。

文 献

1) SAKAKIBARA, H.; O. OKEKAWA, T. FUJIWARA,
M. OTANI & S. ŌMURA: Acyl derivatives of 16-

membered macrolides I. Synthesis and biological properties of 3''-O-propionylleucomycin A₅. J. Antibiotics 34(8): 1001~1010, 1981

2) 森下真孝, 大野 勝, 芹沢和憲, 藤原達郎, 榎原秀夫: TMS-19-Q の代謝物の分離同定。Chemotherapy 32(S-6): 85~92, 1984

3) 日本化学療法学会 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) 酒井敦史, 鈴木忠清, 遠藤里子, 渡辺真由美, 森下真孝: 動物における TMS-19-Q の吸収, 分布, 代謝および排泄に関する研究。Chemotherapy 32(S-6): 93~98, 1984

5) 五島瑤智子, 辻 明良, 小川正俊, 横井山繁行, 嵯峨井 均, 鳥屋 実, 諸星俊郎, 早野和夫: TMS-19-Q の主要代謝物の細菌学的検討。Chemotherapy 32(S-6): 37~45, 1984

6) 森下真孝, 酒井敦史, 渡辺真由美, 鈴木忠清: TMS-19-Q のタンパク結合および血球結合。Jap. J. Antibiotics 投稿予定

MICROBIOLOGICAL ASSAY METHOD FOR TMS-19-Q CONCENTRATION IN BODY FLUIDS

MASATAKA MORISHITA, ATSUSHI SAKAI, SATOKO ENDO
and TADAKIYO SUZUKI

Pharmaceutical Research Laboratories, Toyo Jozo Co., Ltd.

To establish the quantitative bioassay system of TMS-19-Q in body fluids, various methods and conditions were studied.

Important factors influenced on the result were drug metabolism, physicochemical property, bioactivity, protein binding activity of metabolites and stability of samples.

The most suitable assay method was an agar well method using *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as the test organism in the medium consisting of peptone 6g, yeast extract 3g, beef extract 1.5g, glucose 1g, agar 15g and distilled water 1 liter at pH 6.5.

The detectable range of TMS-19-Q concentration was 0.35 $\mu\text{g/ml}$ to 20 $\mu\text{g/ml}$.

Prior to bioassay, human plasma was treated with 3mM Diisopropylfluorophosphate (DFP) to inhibit esterase activity, and also was deproteinized by CH_3CN to inhibit protein binding activity.

The concentration of TMS-19-Q in human urine was measured by the same method of plasma, after extraction with CH_2Cl_2 .

Activity of TMS-19-Q in various body fluids was stable at -20°C for at least 2 weeks.