

TE-031の体液内濃度測定法に関する研究(第1報) Bioassay 法による体液内濃度測定

長手尊俊・杉田和彦・宮地純子・宮崎真奈美
竹市千恵・小野武夫・大竹盾夫・大村貞文
大正製薬株式会社総合研究所

新規マクロライド系抗生物質 TE-031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 Heart infusion agar(栄研; pH 8.0)を用いたペーパーディスク法が最適であった。血中濃度測定には、その標準液としてヒトプール血清(Consera)を、尿中濃度測定には、メタノール・リン酸塩緩衝液(メタノール:0.02 M リン酸塩緩衝液, pH7.4=4:1)と一部には1/15 M リン酸塩緩衝液を、組織内濃度測定にはメタノール・リン酸塩緩衝液を用い TE-031の定量が可能であった。各サンプルの調製は各々のサンプルに応じた希釈液を用いて行った。また、TE-031ヒト主要代謝物で最も強い抗菌力を有する M-5も上記と同様の方法にてその定量が可能であり、TE-031とはほぼ同様の検量線が得られた。

TE-031の測定範囲は0.025~100 $\mu\text{g/ml}$ (但し1/15 M リン酸塩緩衝液; 0.2~100 $\mu\text{g/ml}$)であった。また、これら bioassay 法は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる chemical assay 法と良好な相関性を示した。

TE-031はその構造がFig. 1に示すごとく、Erythromycin(EM)の6位にメトキシ基を導入した新規マクロライド系抗生物質である。

本物質は、EMと同等ないしやや強い抗菌力を有するが¹⁾そのヒト主要代謝物である M-5も EM とほぼ同等の抗菌力を有している²⁾。また代謝物を含め、TE-031関連化合物は水に難溶であること、タンパク結合が認められることより³⁾、体液内濃度を抗菌活性により表示する bioassay 法においては、これらの性状が測定値に及ぼす影響について検討する必要がある。

本報では、体液内濃度の表示に、代謝物の抗菌活性も含めて表示できるような bioassay 法を確立するため、検定菌、菌濃度、培地、pH、希釈液、検定手法、さらには、chemical assay 法との相関性について検討した。

I. 実験材料および方法

1. 使用薬剤

TE-031およびその代謝物である M-1, M-2, M-3, M-4, M-5, M-6, M-7およびM-8は大正製薬(株)総合研究所で調製したものをを用いた⁴⁾。これら各代謝物の構造式(M-7は構造未決定)はFig. 1に示す通りである。

2. 最小発育阻止濃度(MIC)測定法

日本化学療法学会標準法に準拠し行った⁵⁾。

3. Bioassay 法

1) 検定菌

Micrococcus luteus(*M. luteus*) ATCC 9341, *Bacillus sub-*

tilis(*B. subtilis*) ATCC 6633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 Heart infusion agar(HIA, 栄研), 感受性ディスク用培地(Sensitivity test agar, STA, 栄研)および日抗基力価試験法1-2-(1)-1-iに記載⁶⁾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, 以下MRAPJ培地と略す)を用いた。

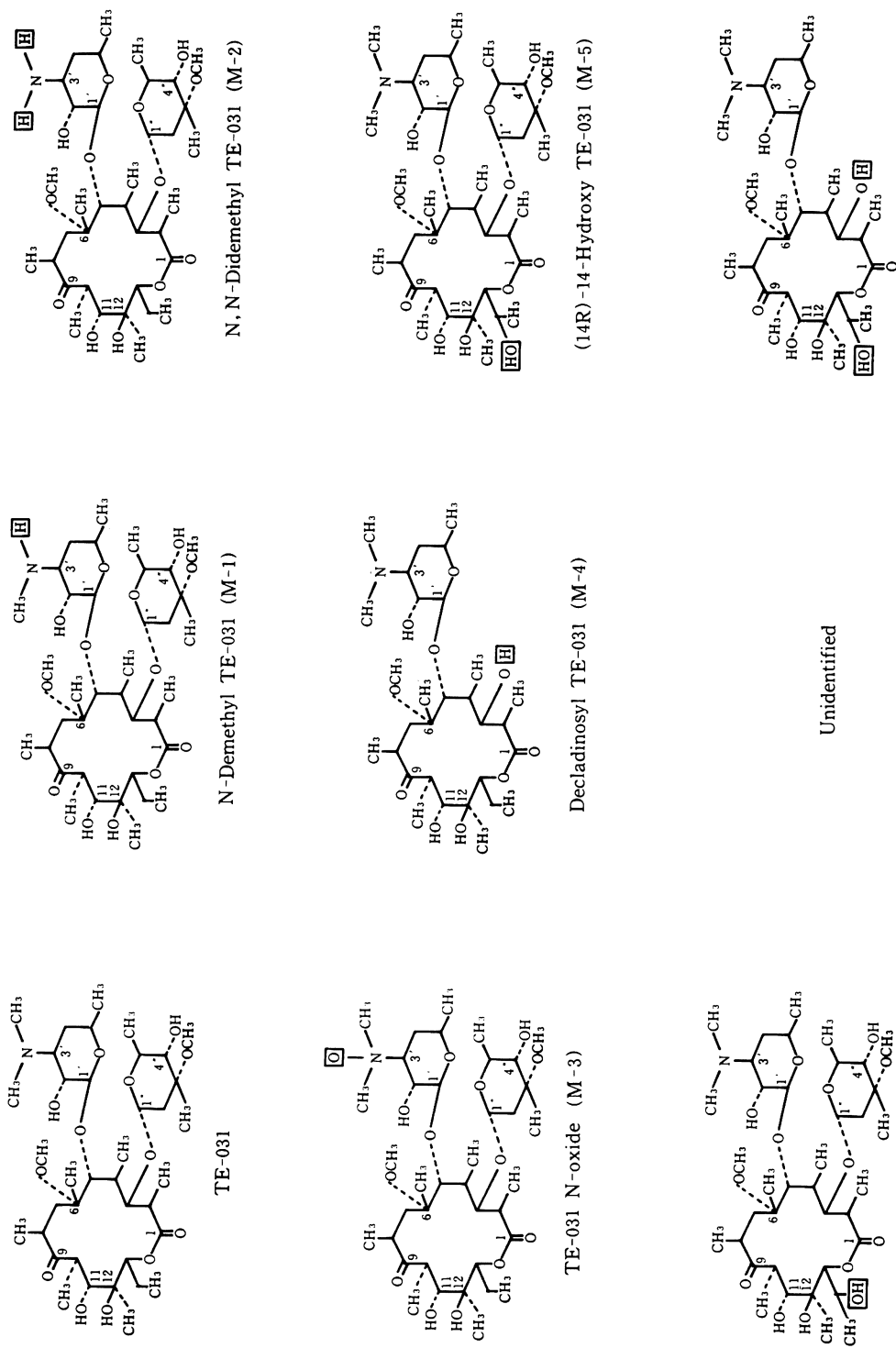
3) 検定菌液の調整法および検定培地への接種

M. luteus ATCC 9341および *S. aureus* ATCC 6538 Pを、斜面または平板の増菌用培地(HIA, pH 7.4)に接種し、37°C, 一夜(約16~18時間)培養した。さらに同培地にて、同様に増菌した後、菌体をかきとり生理食塩水またはBSG(buffered saline with gelatin; リン酸一カリウム, リン酸二ナトリウム, NaCl, ゼラチン)に懸濁しOD: 660 nm=0.5に調整したものを検定菌液として用いた。また、*M. luteus* ATCC 9341については増菌用培地として Brain heart infusion broth(BHIB)または Heart infusion broth(HIB)を用い、37°C, 約16~18時間振とう培養したものを菌液の原液とし、生理食塩水にて希釈調製したものを検定菌液とした。*B. subtilis* ATCC 6633は、日抗基、一般試験法、力価試験法に準じて孢子液を調製した⁷⁾。

4) 希釈液

薬剤を正確に秤量しメタノールを加え、溶解して1000

Fig. 1 Chemical structures of TE-031 and its metabolites



Decladinosyl-(14R)-14-hydroxy TE-031 (M-8)

(M-7)

$\mu\text{g/ml}$ の薬剤溶液を作製した。希釈液として1/15 M リン酸塩緩衝液(pH 6.0, 7.2, 8.0), メタノール・リン酸塩緩衝液(メタノール:0.02 M リン酸塩緩衝液, pH 7.4 = 4:1), ヒトプール血清(Consera, 日本製薬), ヒト新鮮血清, 尿, 唾液および胆汁を用いた。標準溶液の作製には, 薬剤溶液を上記希釈液にて10倍希釈した後, 2倍希釈系列を作製した。

5) 濃度測定法

ペーパーディスク法およびカップ法を用いた。

i) ペーパーディスク法

検定平板は検定菌を接種した検定用培地10 ml を径90 mm のシャーレに注入した後水平固化して用いた。濾紙ディスクは直径8 mm (Thick size 8 M/M Dia. 東洋製作所(株))のものをを用いた。3枚のディスクには検体を50 μl チャージし, 風乾した後, それぞれを3枚の異なった平板上に張り付けた。1時間室温で予備拡散後, 37°C, 約16~18時間培養した。

ii) カップ法

検定用平板は, 基層培地(検定用培地)20 ml および種層培地4 ml を径90 mm のシャーレに流し水平固化したものをを用いた。ステンレスカップ(内径 \times 外径 \times 高さ:6 \times 8 \times 10 mm)を各4個それぞれ異なった平板上に立て, 検液(0.28 ml)をそれぞれのカップに注入し予備拡散後, 37°C約16~18時間培養した。

6) 検液中の濃度算出法

ペーパーディスク法およびカップ法での標準曲線はその濃度(x)の対数が阻止円直径(y)に比例するとされている⁹⁾。われわれは最小二乗法により一次式 $\log x = ay + b$ を求めた。検液から得られたy値の実測値をこの式に代入してTE-031および代謝物濃度xを求めた。なお, 薬物投与後のサンプルのbioassayは主に株式会社バイオスにて行った。

7) Chemical assay

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる方法にて行った⁹⁾。

HPLC; ESA 電気化学検出器付き島津 LC-6A型高速液体クロマトグラフィー

カラム; NUCLEOSIL C18 5 μm , 4 mm i. d. \times 150 mm (センシウ科学(株)製パッドカラム)

移動相; アセトニトリル:0.05 M リン酸緩衝液(pH 6.5):メタノール(5:3:2)

検出器; Environmental Sciences Associates 製電気化学検出器(Coulochem 5100 A型)

電位; Analytical cell 5010型 cell I 0.65 V, cell II 0.90 V, Guard cell 5020型0.95 V

II. 実験結果

1. TE-031の検量線に及ぼす諸因子の影響

1) 検定菌

検定菌選定にはTE-031の感受性が良く標準検定株として使用されている *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633および *S. aureus* ATCC 6538 P を用い, ペーパーディスク法にて比較検討した。その結果, *M. luteus* ATCC 9341が最も感度が良く阻止円径が大きいので本株を検定菌として用いることとした(Fig. 2)。

2) 検定培地

検定培地として, HIA, STAおよび日抗基力価試験法の培地(MRAPJ)を用い, TE-031の検量線を比較検討した。その結果, ペーパーディスク法では, HIAが感度がやや高く, 阻止円も大きく, かつ明瞭であったのでこれを測定用培地として選定した(Fig. 3)。

3) 接種菌量

測定用培地に, 検定菌を0.5%, 1%および2%の割合で接種し, TE-031の検量線を比較検討した。その結果, 0.5%菌濃度接種では大きい阻止円を示すものの, 検量線にバラツキがあり, また, 2%菌濃度接種では阻止円がやや不明瞭であった。一方1%菌濃度接種では, 測定の再現性が良く, 明瞭な阻止円が得られた(Fig. 4)。

なお, 前培養の方法として液体培養(BHIB, またはHIB)にて約18時間培養し, OD:660 nm=0.5に調整)と寒天培養を比較したが, 上記寒天培養したものの方が良好な感度を示した(Fig. 5)。また, 菌調整に際し生理食塩水とBSGのTE-031検量線に及ぼす影響を比較検討したが何ら差異は認められなかった。

4) 培地 pH

HIA 培地の pH を6.0, 7.4および8.0に調整し, TE-031の検量線を比較検討した。その結果, pH 8.0の培地は他と比べて最も感度が高く, 阻止円が大きくかつ明瞭であった(Fig. 6)。なお, pH 7.4と pH 8.0の両培地を用い, 濃度の異なるヒト血清サンプルについて各々測定を行ったが両培地で検出感度は異なるものの, ほぼ一致した値を示した(Fig. 7)。

5) 希釈液の種類

i) 1/15 M リン酸塩緩衝液 pH の影響

1/15 M リン酸塩緩衝液の pH を6.0, 7.2, 8.0に調整し, TE-031の検量線に及ぼす影響について検討した。その結果, 各 pH のリン酸塩緩衝液間に大きな差はみられなかった(Fig. 8)。

なお, リン酸塩濃度を1/15 M, 1/75 M, 1/375 Mにしてリン酸塩濃度の検量線に及ぼす影響を比較検討したが, これについても各濃度間に差は認められなかった。

ii) 血清の影響

Fig. 2 Comparison of standard curves of TE-031 on various test organisms by disc plate method

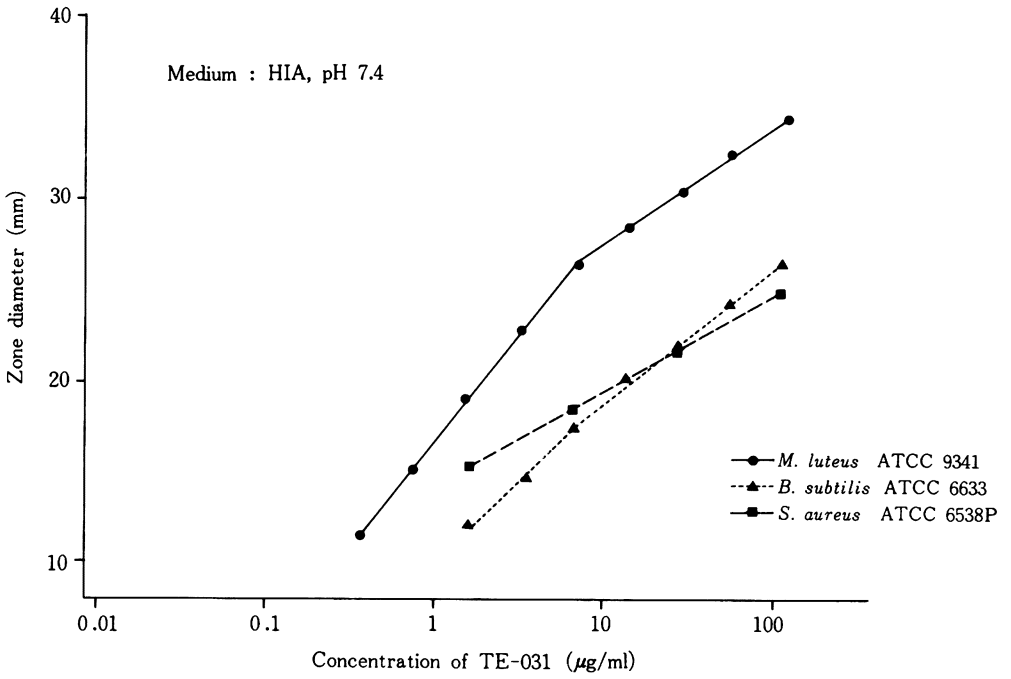


Fig. 3 Standard curves of TE-031 with various media by disc plate method

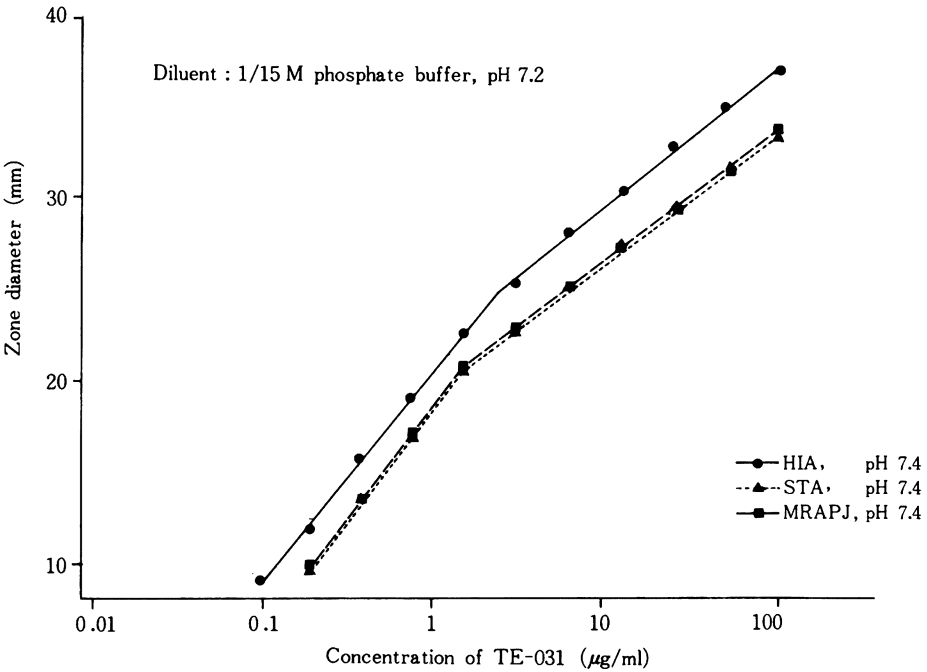


Fig. 4 Effect of inoculum size on standard curves of TE-031 by disc plate method

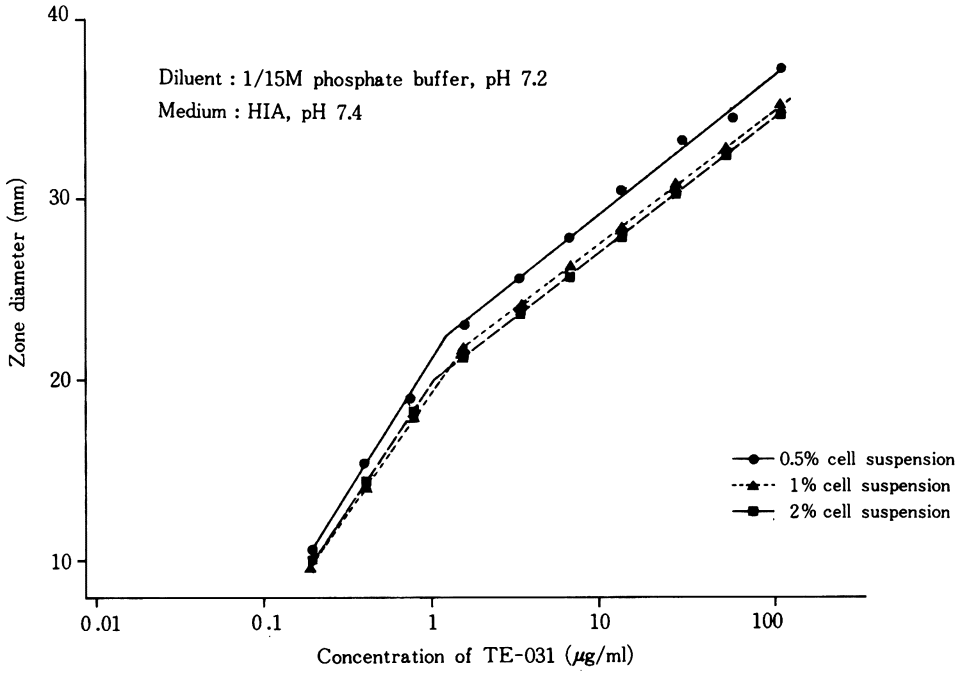


Fig. 5 Effect of preculture on standard curves of TE-031 by disc plate method

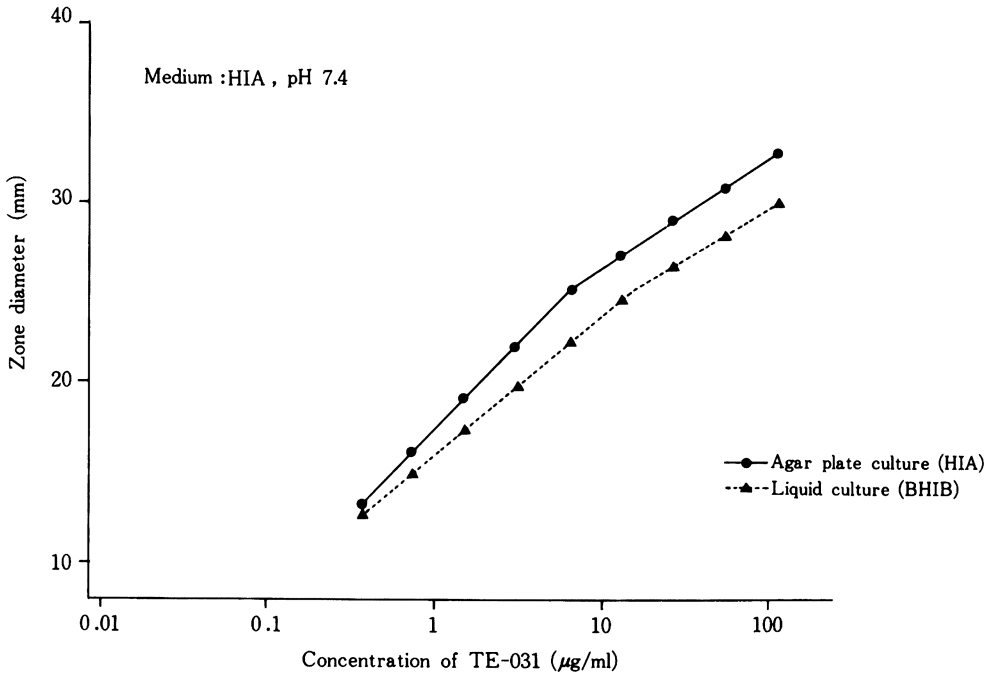


Fig. 6 Effect of pH of medium on standard curves of TE-031 by disc plate method

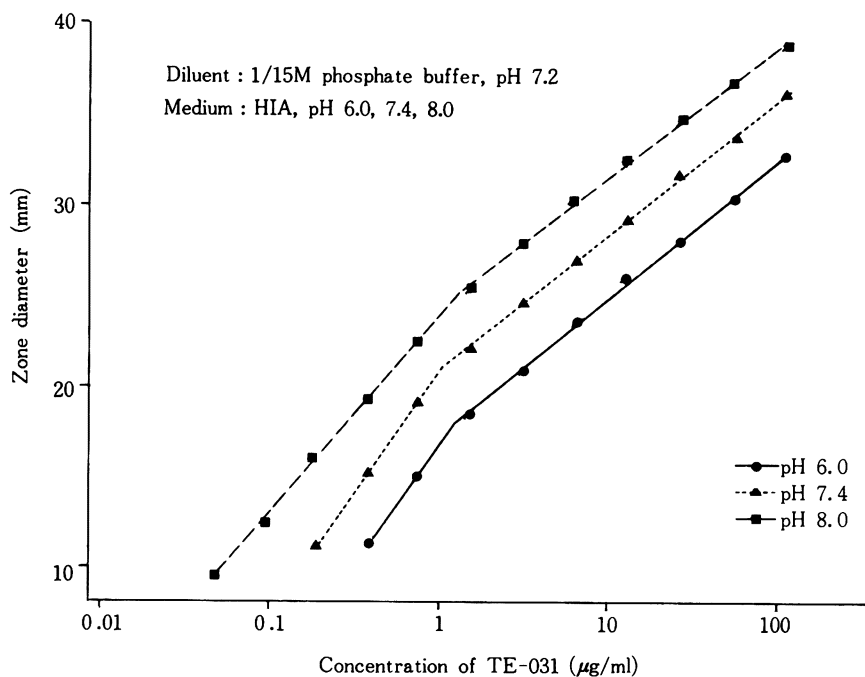
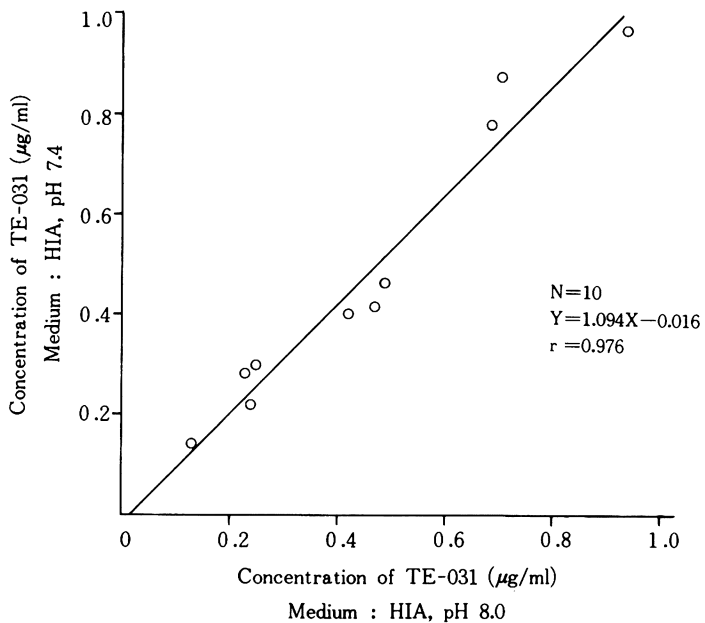


Fig. 7 Correlation between TE-031 concentrations obtained from bioassay with medium pH 7.4 and with medium pH 8.0



TE-031の定量に及ぼすヒト血清(凍結乾燥プール血清および新鮮血清)の影響を検討した。ヒト血清を希釈液として用いると、リン酸塩緩衝液を用いた場合と異なり、より低濃度まで測定が可能で検量線の直線性も良好であった(Fig. 9)。なお、ヒト血清としてプール血清および新鮮血清のいずれを用いてもほぼ同様の検量線であった(Fig. 10)。

iii) 尿, 唾液, その他組織液の影響

ヒト尿を希釈液として用いた場合とリン酸塩緩衝液を希釈液とした場合のTE-031検量線を比較検討した。

まず、希釈液として尿原液を用いた場合、血清を希釈液として用いた場合と同様検出感度が高かった(Fig. 11)。一方、尿をリン酸塩緩衝液で10倍希釈すると、感度は低いもののその検量線は、標準リン酸塩緩衝液の検量線とほぼ同じであり、尿の影響はそれほど認められなかった。なお、唾液、胆汁等各組織液(原液)についても尿の場合と同様の傾向が認められた(Fig. 12, 13)。

iv) メタノール・リン酸塩緩衝液の影響

TE-031の定量は標準液としてリン酸塩緩衝液を用いた場合と、尿あるいは各組織液の原液を標準液とした場合とではその検量線が明らかに異なった。従って、各組織液中のTE-031の定量に希釈液として一般に組織等の

抽出に使われているメタノール・リン酸塩緩衝液(メタノール:0.02 M リン酸塩緩衝液 pH 7.4 = 4:1)を用いて比較検討した。その結果、尿および組織液中のTE-031定量にメタノール・リン酸塩緩衝液を用いると感度も良好で安定した定量が可能であることがわかった(Fig. 14 ~ 16)。メタノール・リン酸塩緩衝液の組成が、メタノール:リン酸塩緩衝液 = 4:1, 3:2 および 2:3 のそれぞれについても比較検討したが、いずれの場合もほぼ同様の検量線を示した。なお、TE-031 200 mg を健康成人男子に経口投与し、投与後得られた尿サンプルをリン酸塩緩衝液で希釈した場合とメタノール・リン酸塩緩衝液で希釈した場合とでその定量値を比較したが、両者は感度はやや異なるもののその値はほぼ同じであった。従って、いずれの希釈液を用いてもその定量が可能と考えられた。またメタノール・リン酸塩緩衝液をペーパーディスクにチャージした場合、風乾すればメタノールは菌の増殖および阻止円の形成に何ら影響を与えないことがわかった。

v) ふん便内濃度測定における酢酸エチル抽出物の影響

TE-031のふん便内濃度測定にはふん便を0.1 M トリス緩衝液にてホモジナイズし、その酢酸エチル抽出液を

Fig. 8 Effect of pH of diluent on standard curves of TE-031 by disc plate method

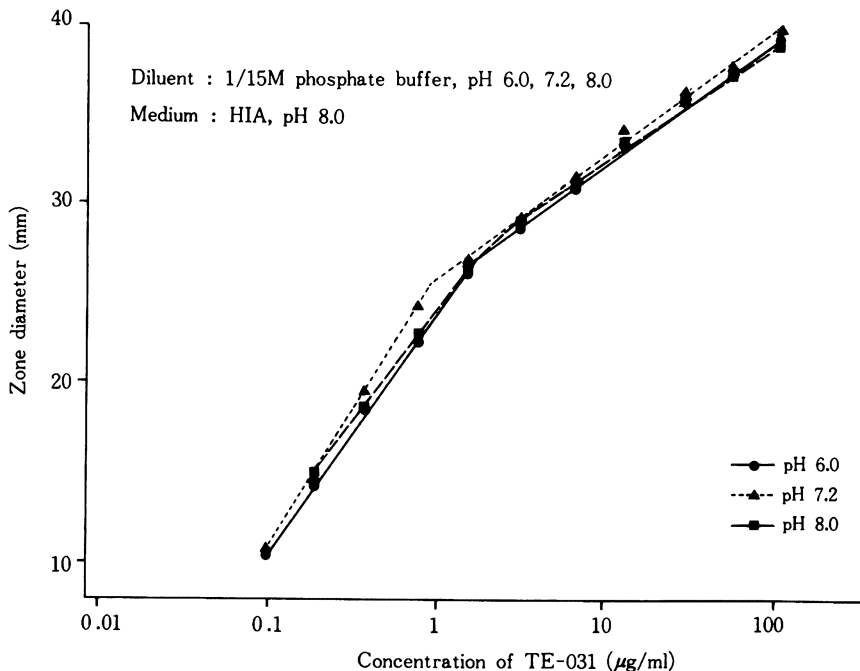


Fig. 9 Effect of human serum on standard curves of TE-031 by disc plate method

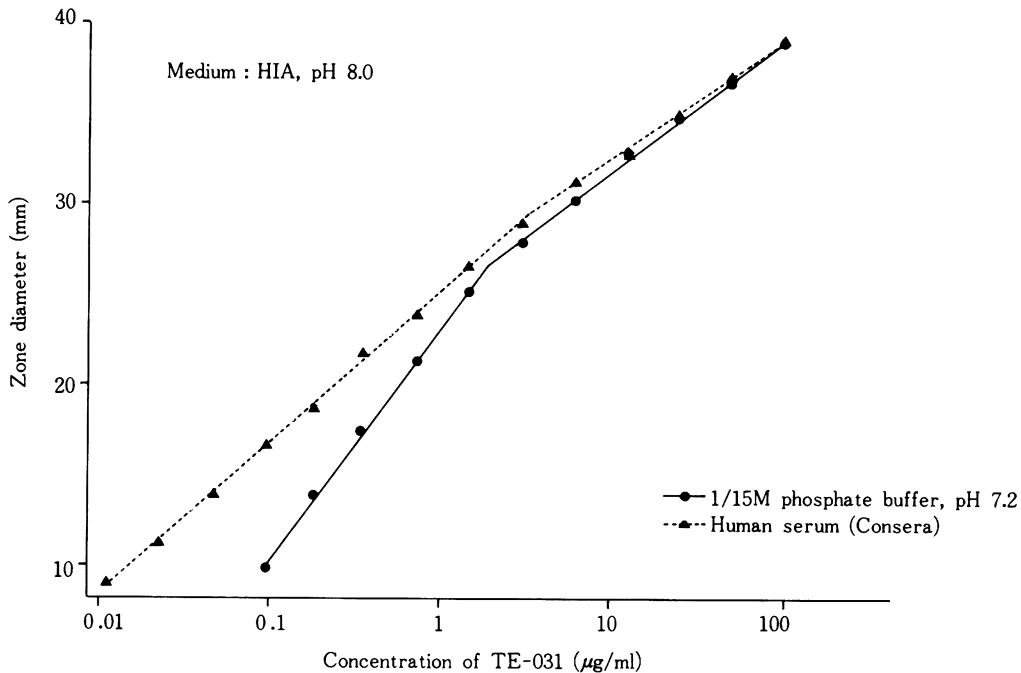


Fig. 10 Effect of human pool serum and human fresh serum on standard curves of TE-031 by disc plate method

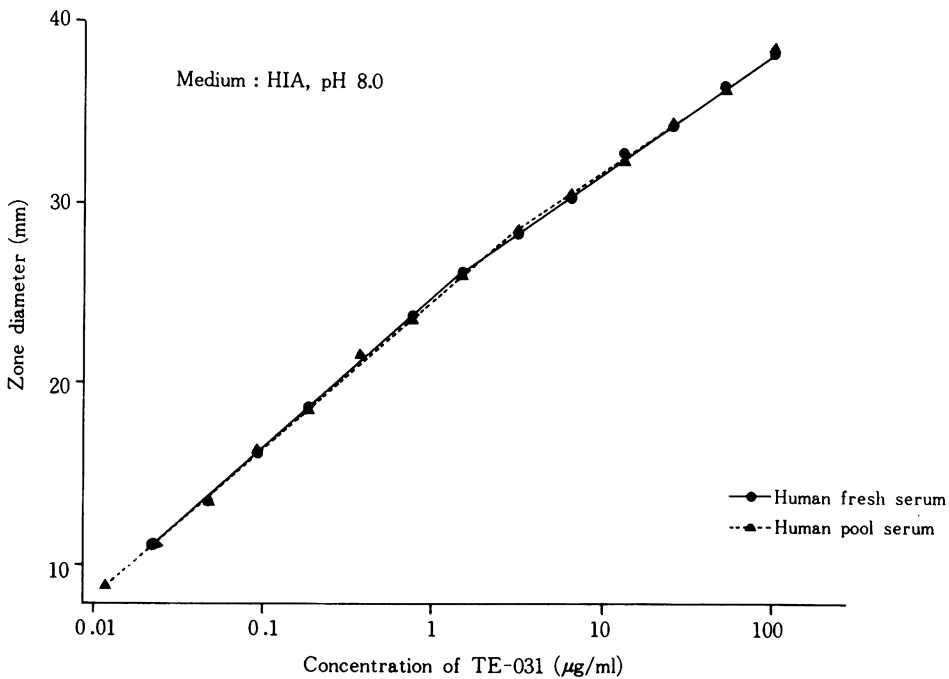


Fig. 11 Effect of human urine on standard curves of TE-031 in 1/15M phosphate buffer by disc plate method

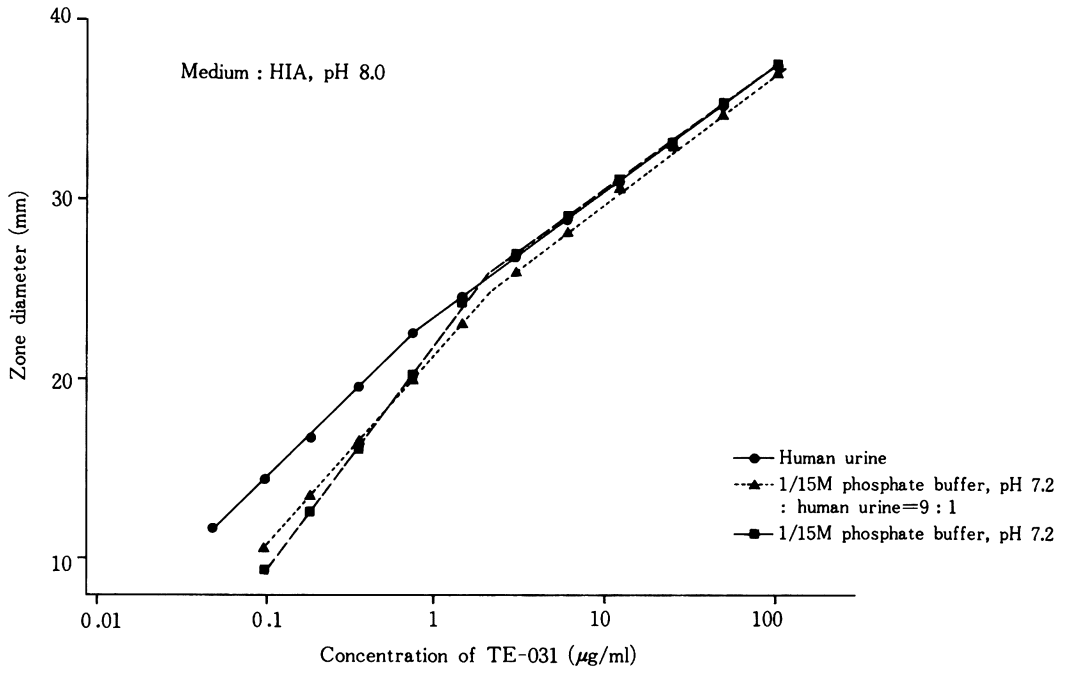


Fig. 12 Effect of human saliva on standard curves of TE-031 by disc plate method

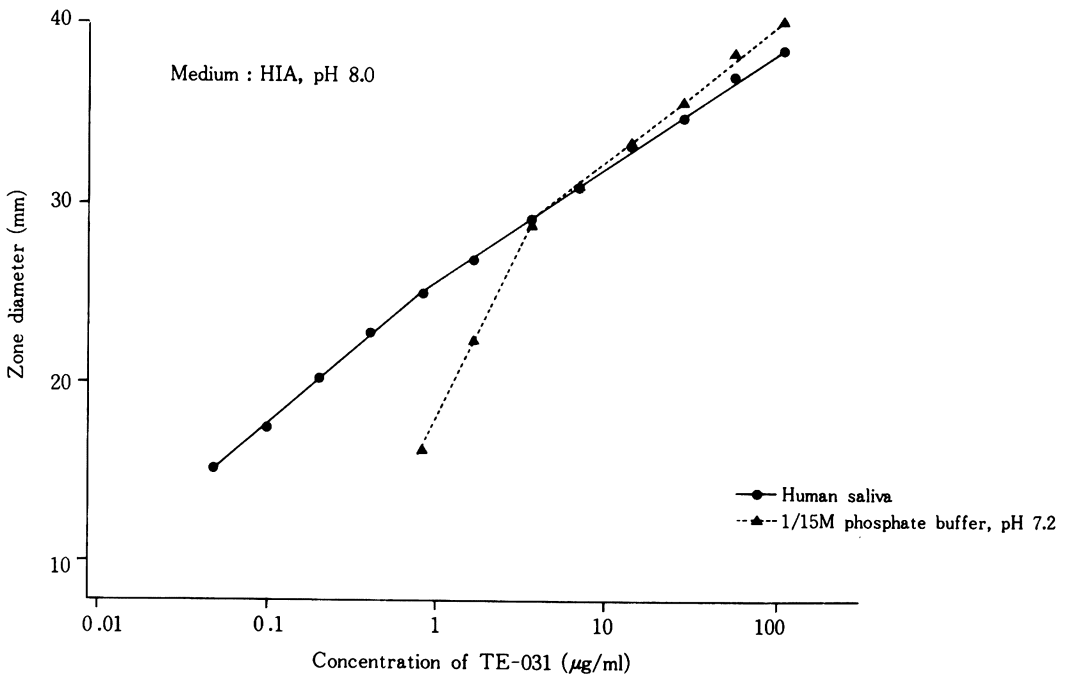


Fig. 13 Effect of human bile on standard curves of TE-031 in 1/15M phosphate buffer by disc plate method

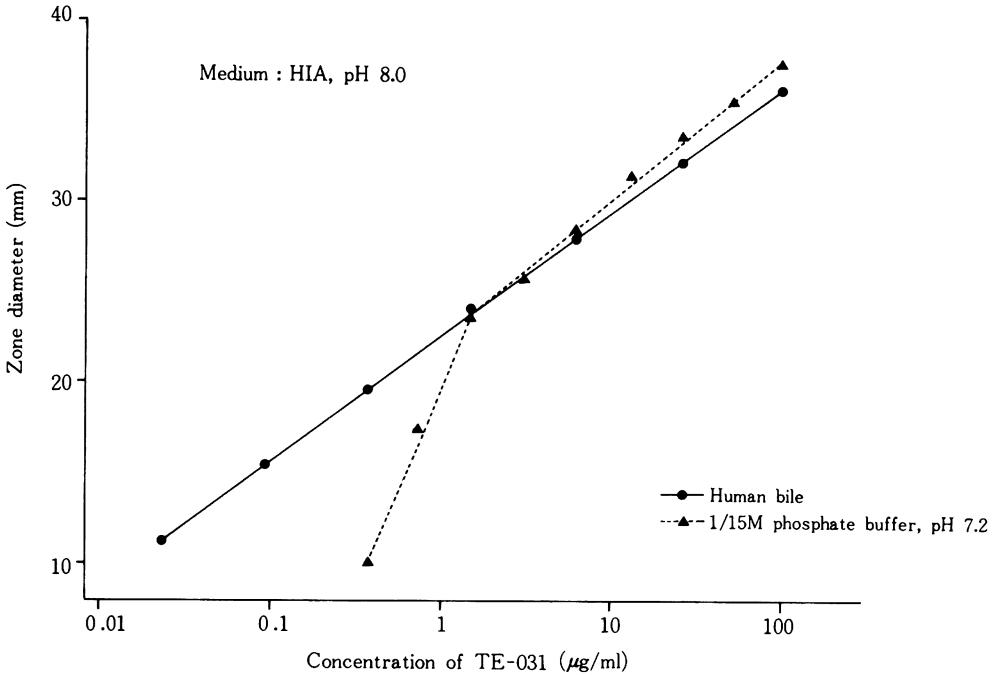


Fig. 14 Effect of human urine on standard curves of TE-031 in methanol · phosphate buffer by disc plate method

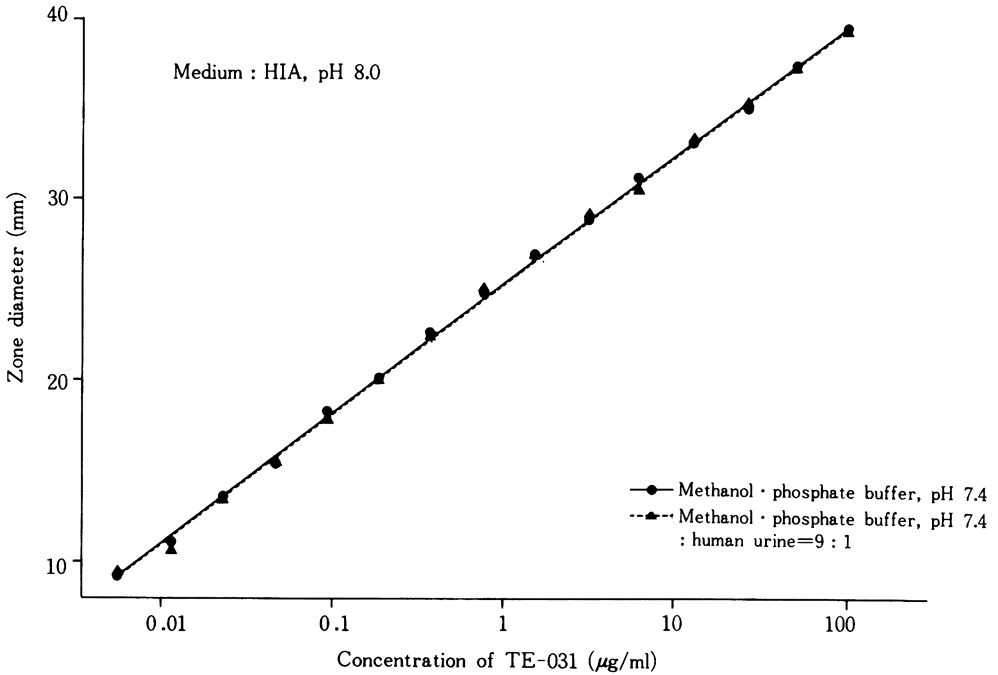


Fig. 15 Effect of human saliva on standard curves of TE-031 in methanol · phosphate buffer by disc plate method

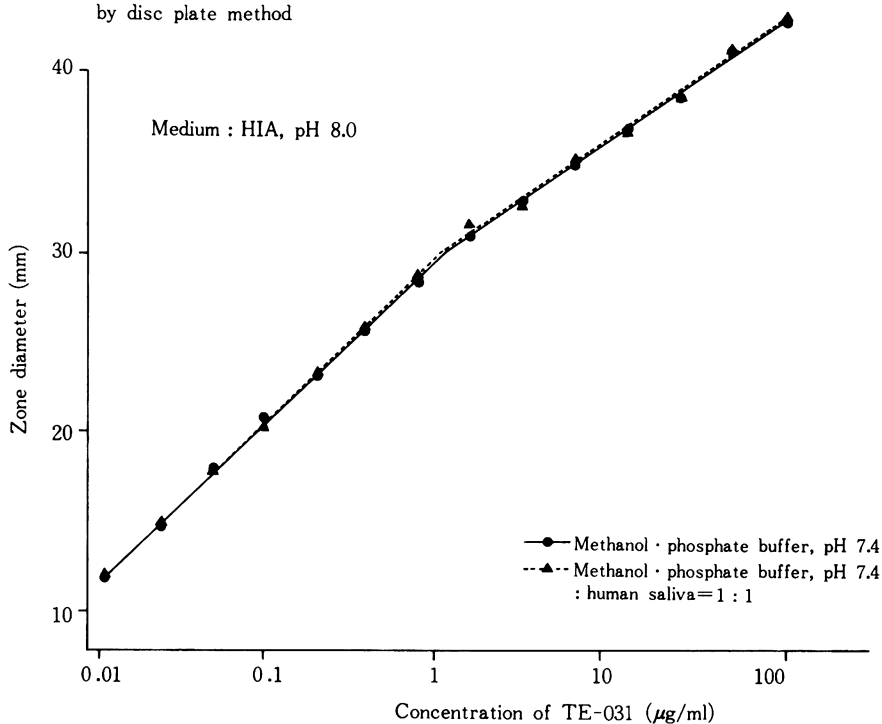
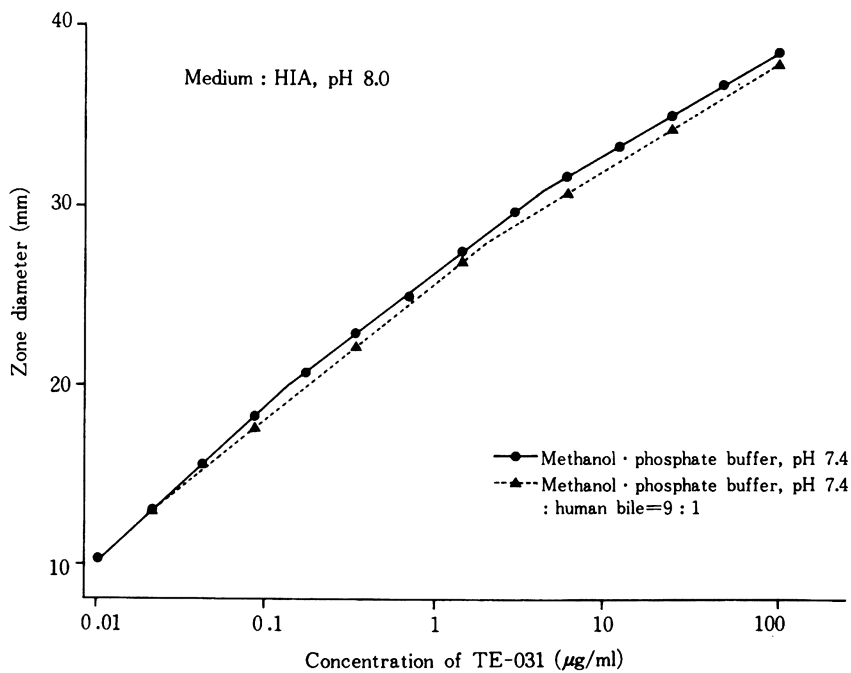


Fig. 16 Effect of human bile on standard curves of TE-031 in methanol · phosphate buffer by disc plate method



用いるため、ふん便酢酸エチル抽出物の検量線に及ぼす影響について検討した。その結果、ふん便の酢酸エチル抽出物はその検量線に大きな影響を及ぼさないことがわかった(Fig.17)。

6) 測定方法

TE-031の定量法をペーパーディスク法と日抗基によるカップ法について比較検討した。その結果、ペーパーディスク法による定量はカップ法によるそれと比べ、感度、阻止円の大きさおよび明瞭性からみてほとんど差がなく、カップ法は定量が煩雑であること、およびメタノール・リン酸塩緩衝液等の有機溶媒系を使えないことから、TE-031の定量にはペーパーディスク法を用いることとした(Fig.18)。

7) EM との比較

TE-031の検量線をEMと比較した。その結果、TE-031の検量線はEMのそれとほぼ同一であった(Fig.19~21)。従って、EMのbioassay法による定量も本法で可能と考えられた。

8) 代謝物の影響

TE-031のヒトおよび動物の代謝物にM-1, M-2, M-3, M-4, M-5, M-6, M-7およびM-8が知られている。

これら代謝物の抗菌力はM-5がTE-031とほぼ同等ないし1/2で最も強いものに対して、M-5を除く他の代謝物ではTE-031と比べ2~11管弱かった(Table 1, 2)。そこで、これら代謝物が*M. luteus* ATCC 9341を用いるTE-031の定量に及ぼす影響について検討した。

i) 代謝物のTE-031定量に及ぼす影響

TE-031代謝物が*M. luteus* ATCC 9341を用いるTE-031の定量に及ぼす影響について検討した。その結果、M-5の検量線は、TE-031のそれとほぼ同一であったが、M-1, M-2, M-3, M-4, M-6, M-7およびM-8の検量線はTE-031と比べその抗菌力(MIC)にほぼ相関した(Fig.22, 23)。また、強い抗菌力を有した代謝物M-1, M-5およびM-6が検定菌*M. luteus* ATCC 9341に対し、TE-031と相乗効果が認められるかどうか検討したが、これら代謝物には相乗効果または阻害効果等が全く認められなかった。従って、TE-031の定量には未変化体TE-031のみならず、抗菌力の強い代謝物M-1, M-5およびM-6を考慮する必要がある。しかし現在のところヒト検体中に代謝物としてはM-5が多いことから、M-5の定量に及ぼす影響が重要であると考えられた。また、TE-031とほぼ同一の検量線を示すM-5については、

Fig. 17 Effect of extract of human feces with ethyl acetate on standard curves of TE-031 by disc plate method

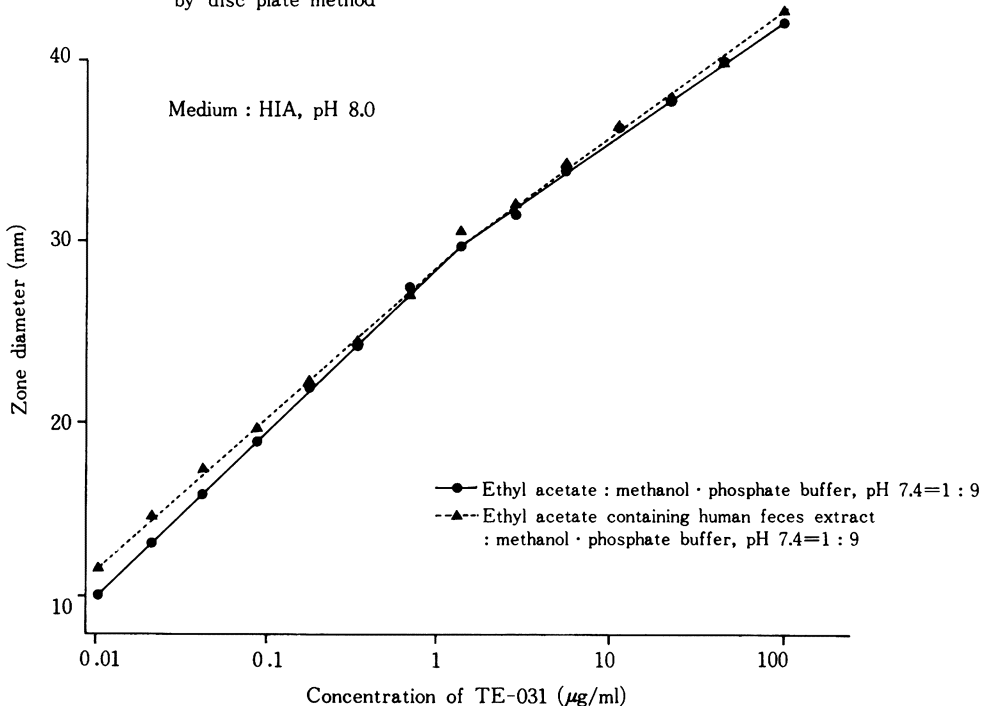


Fig. 18 Standard curves of TE-031 by cylinder plate and disc plate methods

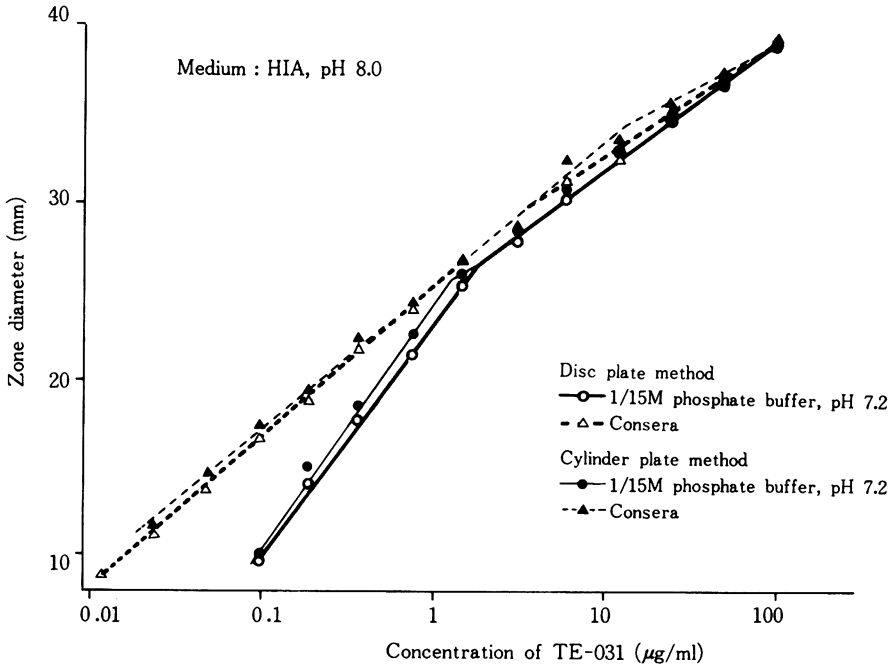


Fig. 19 Standard curves of TE-031 and EM by disc plate method

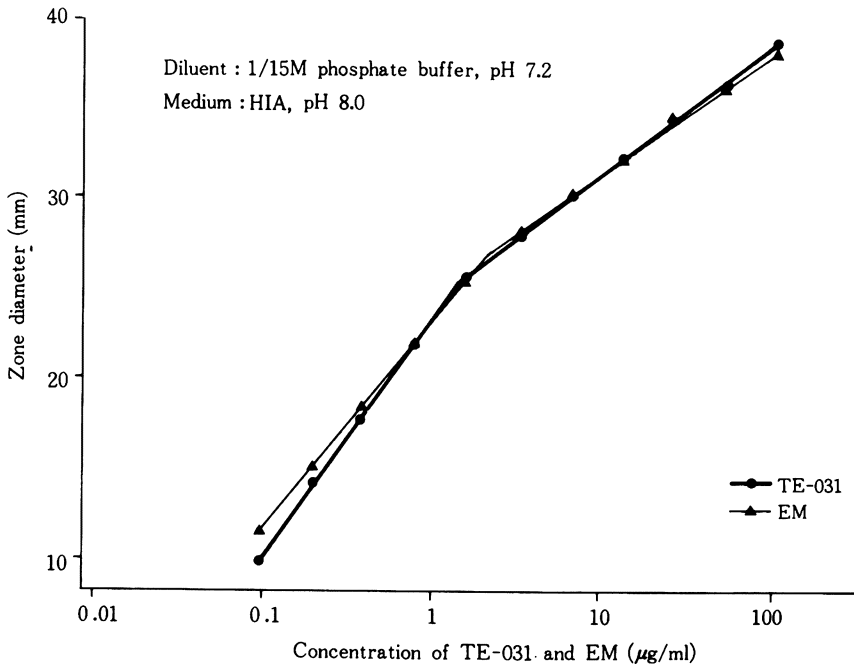


Fig. 20 Standard curves of TE-031 and EM by disc plate method

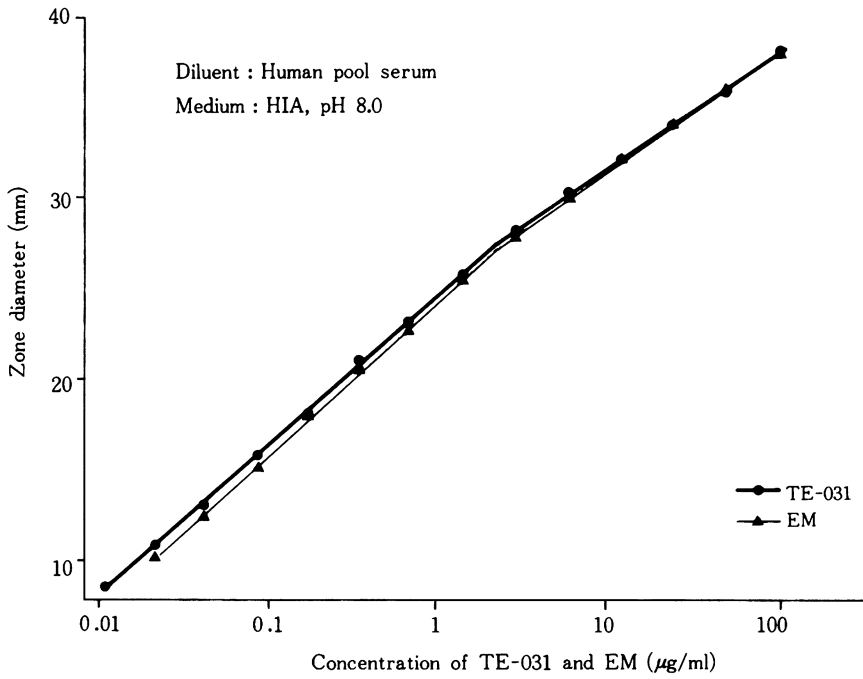
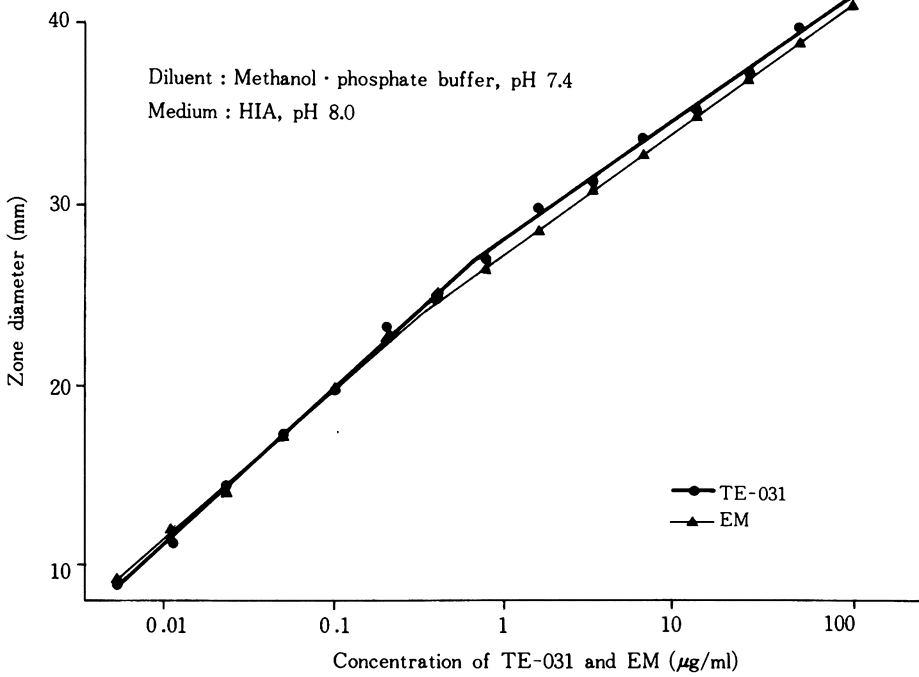


Fig. 21 Standard curves of TE-031 and EM by disc plate method



TE-031の検量線を用いてその定量が充分可能であると考えられた。

ii) TE-031代謝物 M-5の定量に及ぼす各種希釈液および組織液の影響

M-5の定量に及ぼす各種希釈液の影響をTE-031の場合と同様検討した。その結果、ヒト血清、メタノール・リン酸塩緩衝液およびメタノール・リン酸塩(酢酸エチル)緩衝液のいずれを用いてもTE-031とほぼ同様の検量線を示した(Fig. 24~26)。またM-5の検量線に及ぼすヒト尿、ヒト唾液、ヒト胆汁およびヒトふん便抽出物の影響をも検討したが、それらはTE-031とほとんど同じであった(Fig. 27~30)。

2. TE-031のbioassay法とchemical assay法との相関性

TE-031 200 mg を健康成人男子 8 名に単回経口投与

して得られた各種ヒトサンプル(血清, 唾液, 尿)をbioassay法およびchemical assay法(HPLC)により定量しその相関性を検討した。chemical assay法による定量は抗菌力が強くかつ生体内でその量が多い未変化体TE-031および代謝物M-5について行った。

その結果、最小二乗法で求めた相関係数は血清, 唾液および尿サンプルでそれぞれ $r=0.986$, $r=0.969$ および $r=0.966$ であり良好な相関が得られた(Fig. 31)。また、両測定法間の回帰直線式の傾きは、血清および唾液サンプルでそれぞれ0.897および0.885であった。このことは、bioassay法によって測定した値がchemical assay法によって測定した値よりは若干高いものの、両者はほぼ一致していると考えられた。従って、bioassay法によって測定した値(抗菌活性)はほとんどが未変化体TE-031および代謝物M-5の両者の抗菌活性によると考

Table 1 Antibacterial activity of TE-031, M-1, M-2, M-3, M-4 and M-5 against standard strains

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	TE-031	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5
<i>S. aureus</i> 209P-JC	0.05	0.78	3.13	12.5	12.5	0.10
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.05	0.78	6.25	12.5	12.5	0.10
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.025	0.10	0.39	1.56	3.13	0.025
<i>E. faecalis</i> ATCC 8043	0.025	0.10	0.39	3.13	3.13	0.05

Inoculum size : 10^6 cfu/ml

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

Table 2 Antibacterial activity of TE-031, M-6, M-7 and M-8 against standard strains

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	TE-031	M-6	M-7	M-8
<i>S. aureus</i> 209P-JC	0.10	0.78	25	12.5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.05	0.39	100	6.25
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.012	0.05	3.13	0.78
<i>E. faecalis</i> ATCC 8043	0.025	0.20	12.5	3.13

Inoculum size : 10^6 cfu/ml

Medium : Sensitivity test agar (Eiken)

Fig. 22 Standard curves of TE-031, M-1, M-2, M-3, M-4 and M-5 by disc plate method

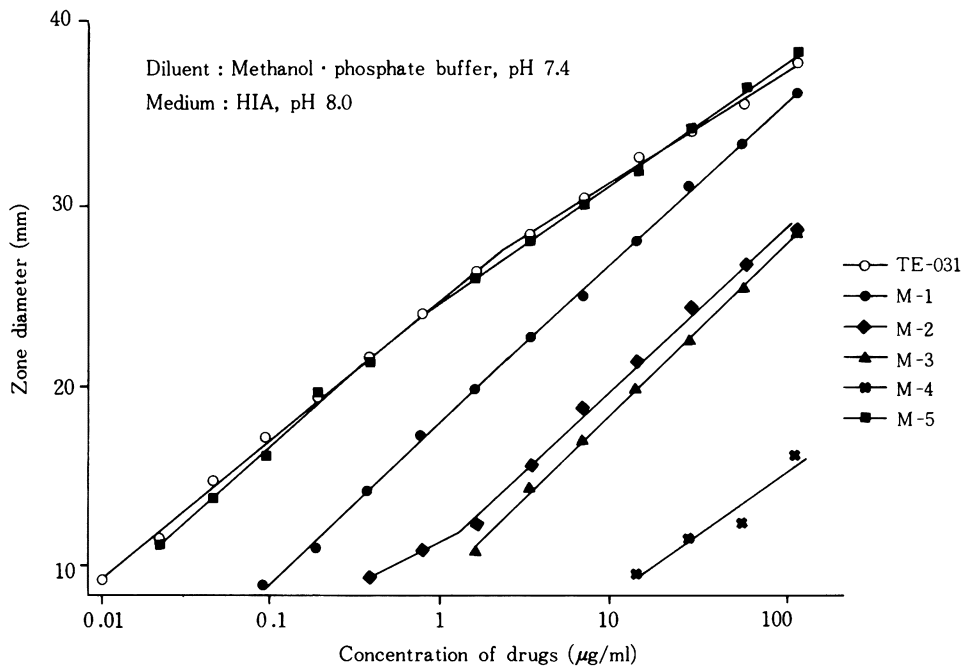


Fig. 23 Standard curves of TE-031, M-6, M-7 and M-8 by disc plate method

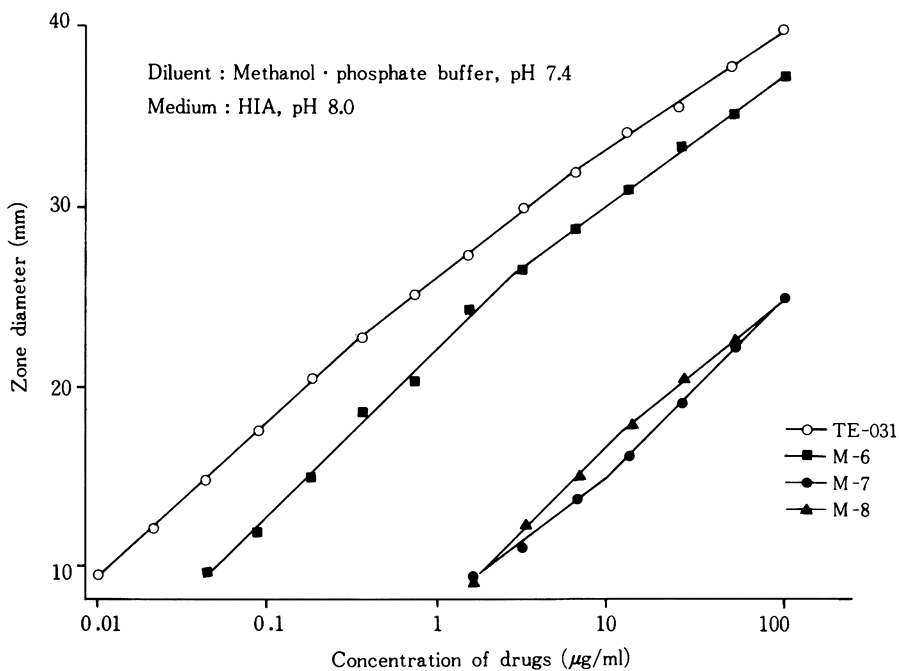


Fig. 24 Effect of consera on standard curves of TE-031 and M-5 by disc plate method

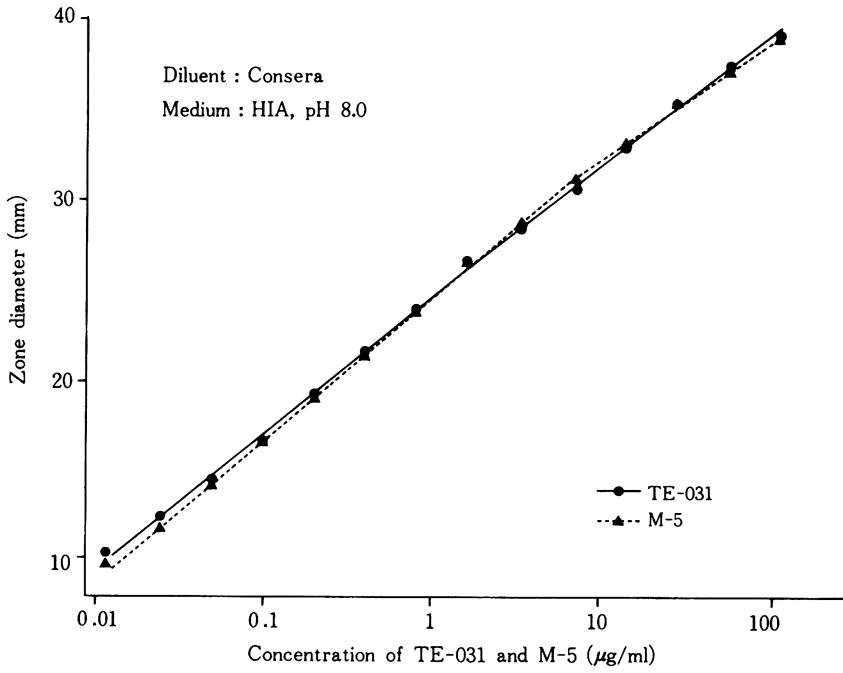


Fig. 25 Effect of methanol · phosphate buffer on standard curves of TE-031 and M-5 by disc plate method

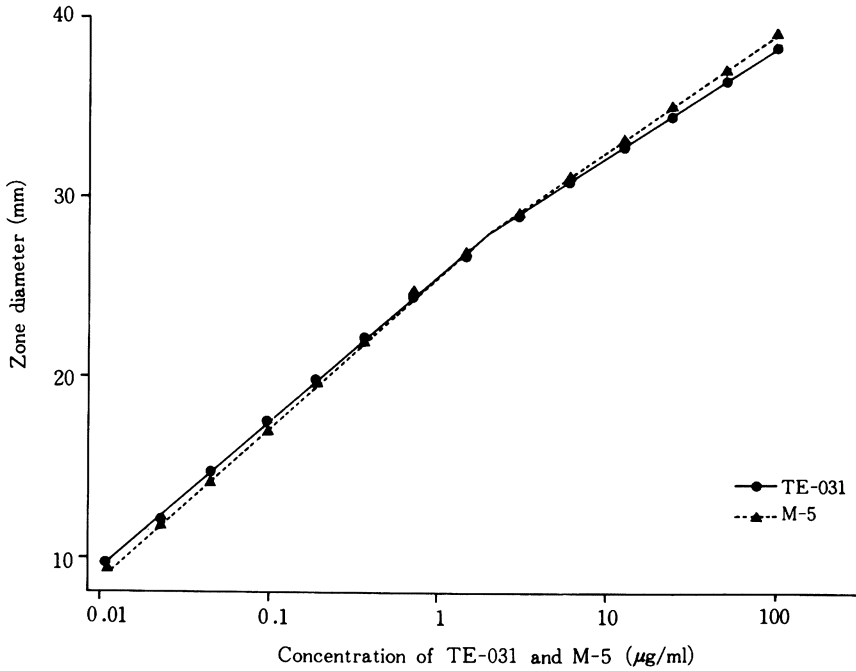


Fig. 26 Effect of methanol · phosphate buffer with ethyl acetate on standard curves of TE-031 and M-5 by disc plate method

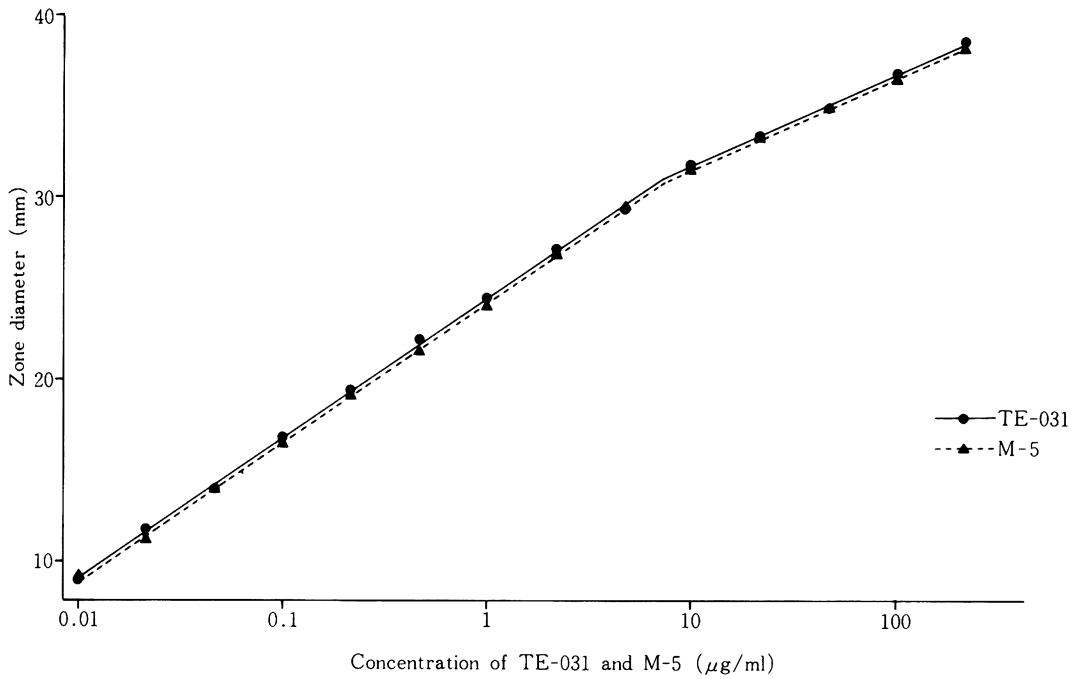


Fig. 27 Effect of human urine on standard curves of M-5 in methanol · phosphate buffer by disc plate method

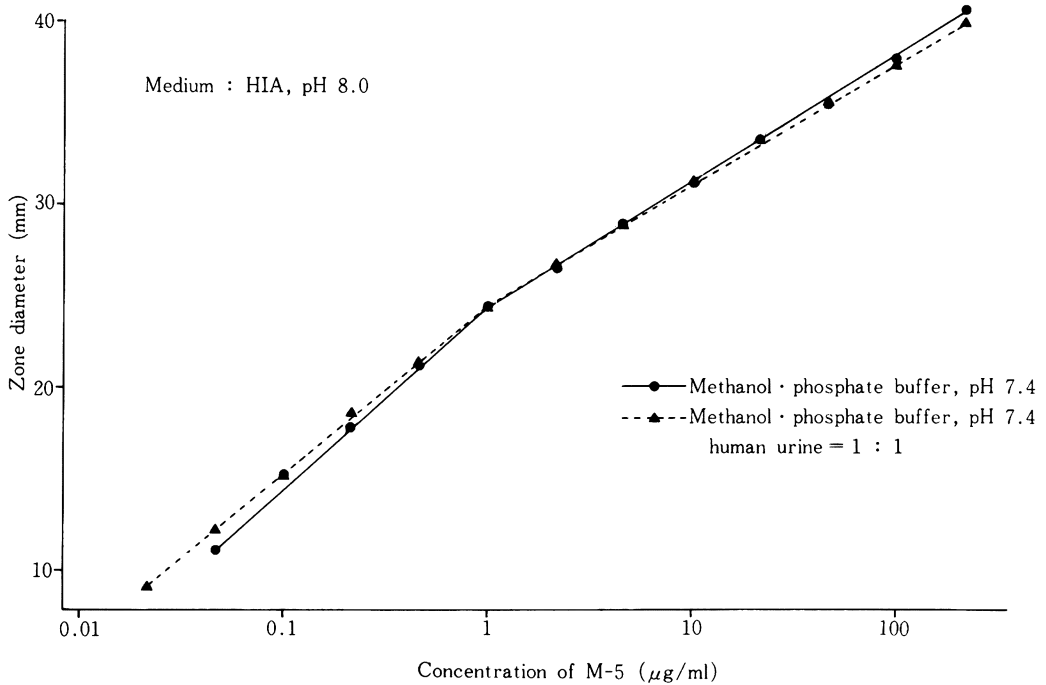


Fig. 28 Effect of human saliva on standard curves of M-5 in methanol · phosphate buffer by disc plate method

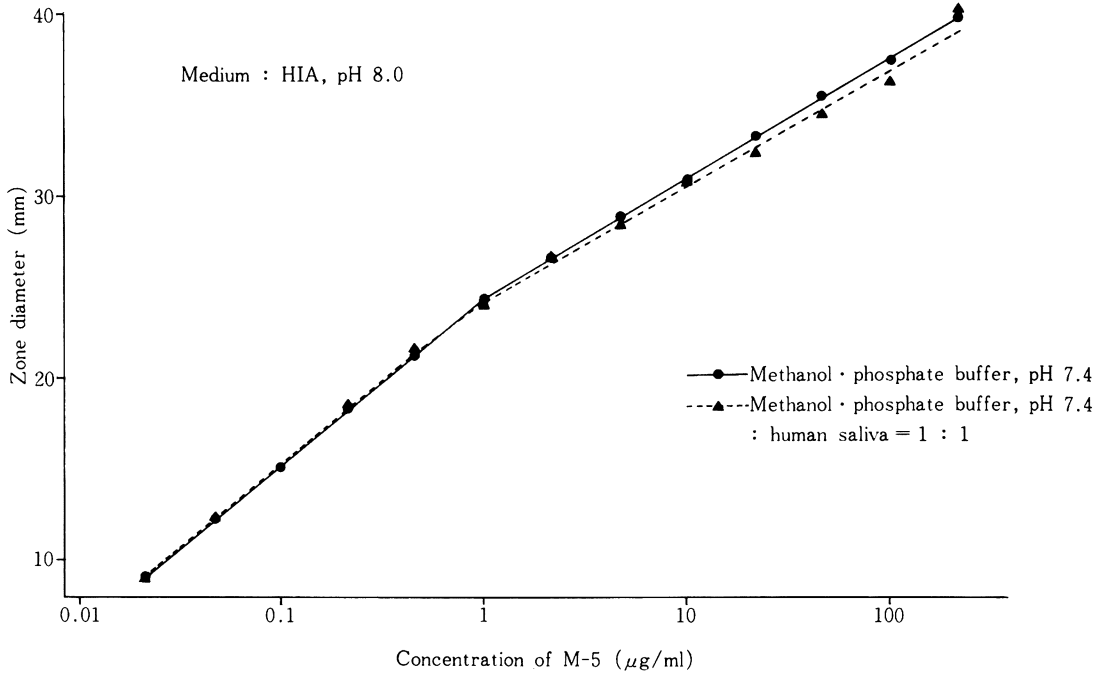
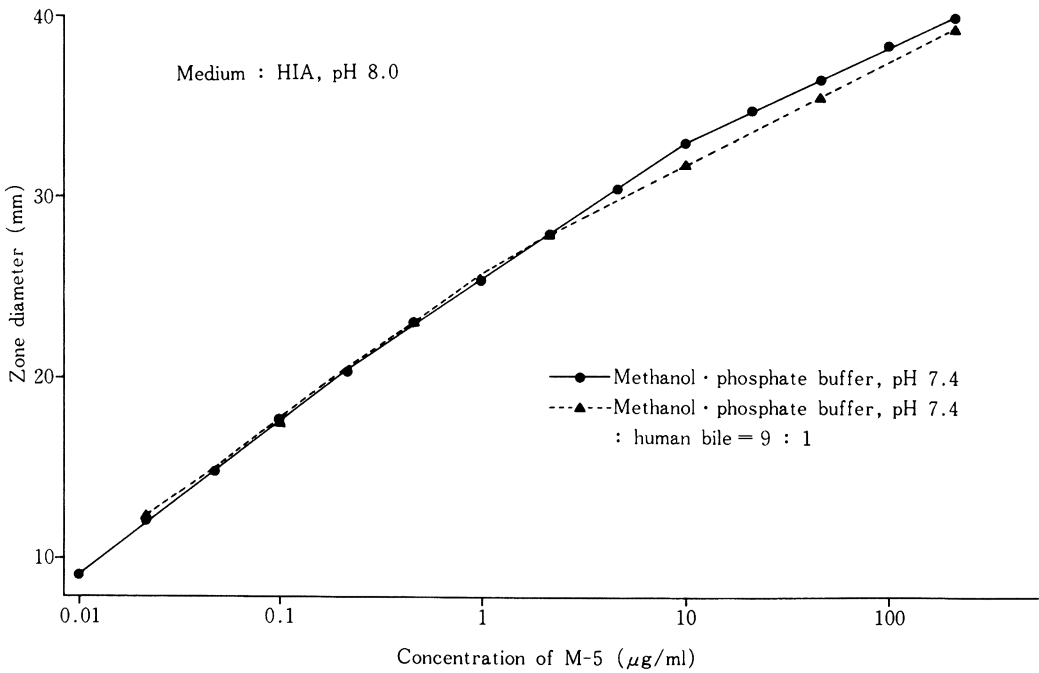


Fig. 29 Effect of human bile on standard curves of M-5 in methanol · phosphate buffer by disc plate method



えられ、M-5以外の抗菌活性を有する代謝物は少ないことが示唆された。しかし、尿サンプルにおける回帰直線式の傾きは0.738であり、bioassay法による幾分高い値は他の代謝物によることも考えられ、現在検討中である。

Ⅲ. 考 察

マクロライド系薬剤の中には16員環マクロライド系抗生物質 Rokitamycin のごとく、生体内で代謝を受け LM A₇ のような強い抗菌力を有する代謝物を生じることが知られている。そしてこの LM A₇ は bioassay 法による Rokitamycin の生体内濃度の定量に大きな影響を及ぼすことが明らかにされている¹⁰⁾。14員環マクロライド抗生物質 TE-031 も同様に生体内で代謝を受け、M-1、M-2、M-3、M-4、M-5、M-6、M-7 および M-8 を生成する。これら代謝物の検定菌 *M. luteus* ATCC 9341 に対する抗菌力 (MIC) は未変化体 TE-031 が 0.012~0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対し、代謝物 M-1、M-5 および M-6 は TE-031 と同等ないし 1/4 と強く、一方、代謝物 M-2、M-3、M-4、M-7 および M-8 は TE-031 と比べ 3~11 管弱いものであった。これら代謝物のうち特に、M-5 は各種臨床分離株に対する抗菌力が TE-031 とほぼ同等ないし 1/2 と強

く、かつマウスを用いた実験的全身感染症、呼吸器感染症に対し優れた抗菌力を有することが報告されている²⁾。またヒトにおいて、M-5 は未変化体 TE-031 と、ほぼ同等量血中、尿中等に存在することが報告されている¹¹⁾。従って、TE-031 の臨床効果を説明するには代謝物 M-5 の抗菌力を充分反映するような M-5 の血中、尿中および組織中の測定方法が確立しなければならないと考えられた。また、TE-031 のヒト尿、ヒト血清およびヒト各種組織液等のサンプルの測定においてリン酸塩緩衝液で作成した検量線を用いると、ヒト血清、ヒト尿あるいはヒト各種組織液で希釈作成した検量線と比べ明らかに相違が認められた。そこでこれらサンプルの測定に希釈液および標準液として、ヒト血清、尿または組織液に代えてメタノール・リン酸塩緩衝液を用いたところ、定量値は尿および組織液によって影響を受けることなく chemical assay とよく一致した。その他、培地、接種菌量等種々検討した結果、感度が良く、阻止円が明瞭で、かつ *in vitro* 抗菌力および chemical assay 法 (HPLC) と良好な相関を有する *M. luteus* ATCC 9341 を検定菌とし、Heart infusion agar 培地を検定培地とするペーパーディスク法が最も優れていることを認めた。

Fig. 30 Effect of extract of human feces with ethyl acetate on standard curves of M-5 by disc plate method

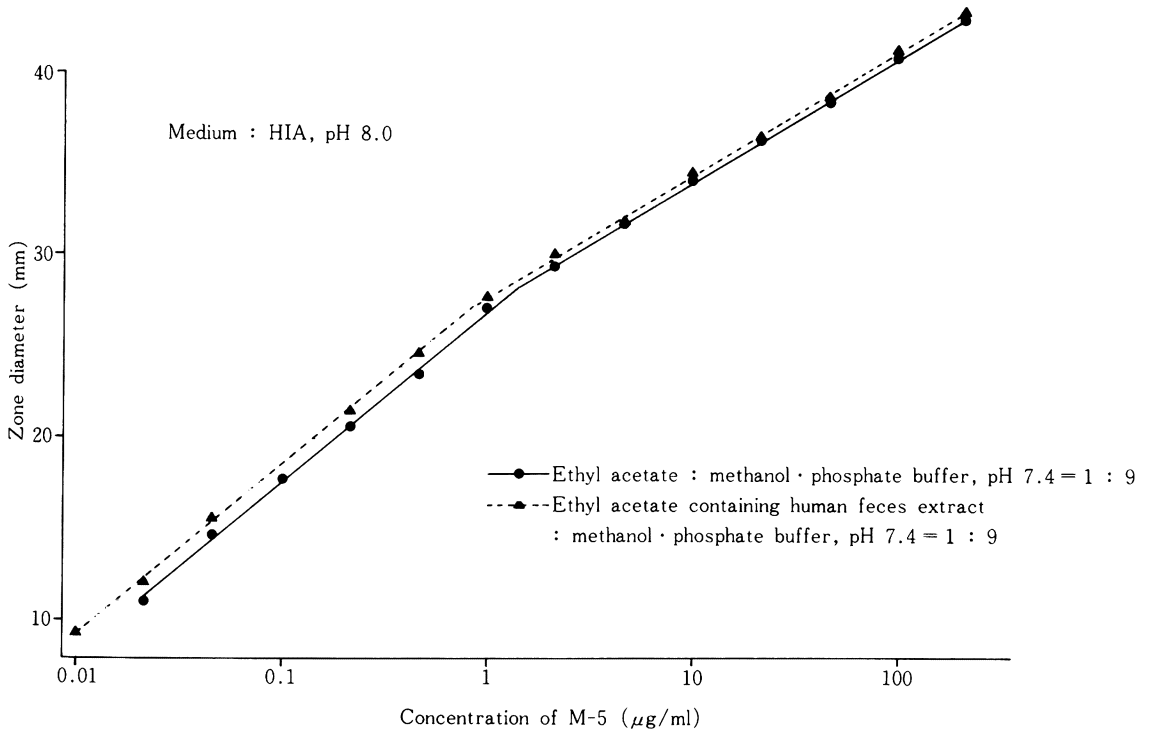
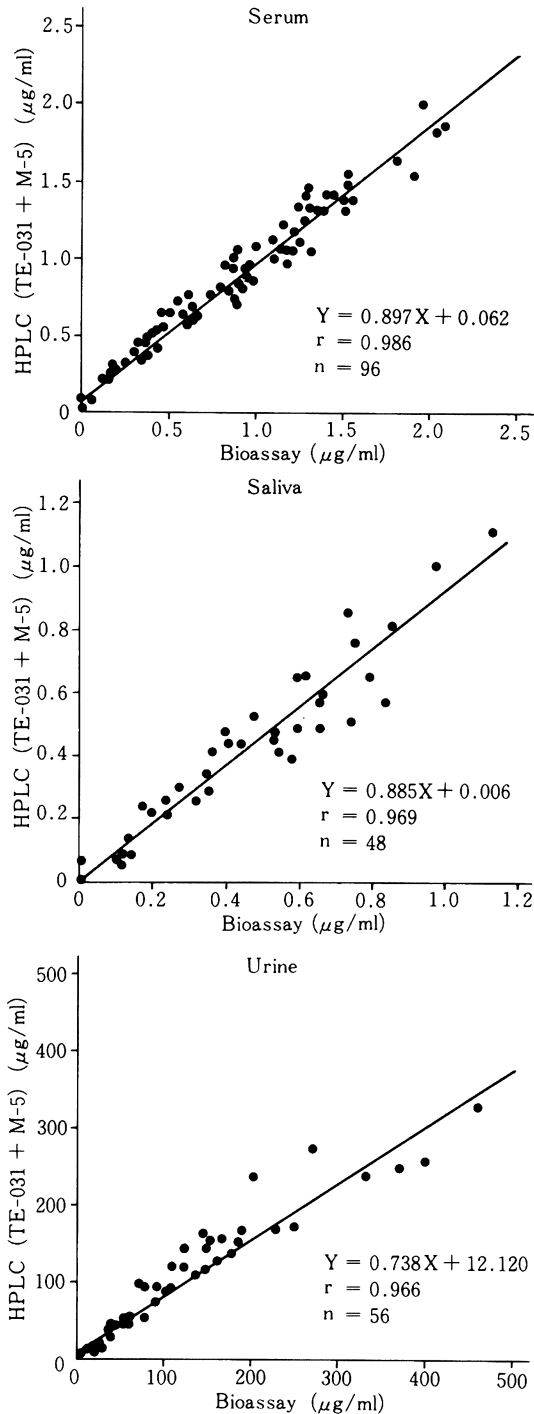


Fig. 31 Correlation between HPLC (TE-031 + M-5) and bioassay



本来 bioassay 法においては簡便な操作で、かつ正確な値を求めることが大切である。TE-031の bioassay はサンプルを溶媒抽出等の複雑な前処理を要せず、それぞれのサンプルに応じて血清、メタノール・リン酸塩緩衝液、一部尿サンプルではリン酸塩緩衝液等を用いることにより、chemical assay 法とも良く相関する測定値が得られた。

以上の結果に基づき、TE-031の体液内濃度測定法として、下記に示す方法を設定した。

TE-031体液内濃度測定法

1. 検定菌

M. luteus ATCC 9341

2. 検定用培地

Heart infusion agar (pH 8.0)

3. 検定菌液および接種菌量

M. luteus ATCC 9341を増殖用培地に接種し、37°C約16~18時間前培養後、さらに同培地にて増菌し、培地より菌をかき取り、生理食塩水またはBSG (Buffered saline with gelatin)に懸濁し、OD: 660 nm = 0.5に調整したものを検定菌液とする。検定用培地への検定菌液の接種菌量は1.0%とする。

4. 検定方法

ペーパーディスク法により行う。

5. 標準液

TE-031をメタノールにて1000 $\mu\text{g/ml}$ に溶解した後、各検体に応じヒト血清 (Consera, 日本製薬)、メタノール・リン酸塩緩衝液、1/15 Mリン酸塩緩衝液にて希釈する。

6. 検量線による測定範囲

0.025~100 $\mu\text{g/ml}$ (但し、1/15 Mリン酸塩緩衝液; 0.2~100 $\mu\text{g/ml}$)

7. 検体の処理法

血清、尿、各組織液および組織抽出液をそれぞれ各希釈液にて所定濃度まで希釈する。

文 献

- 1) 長手尊俊, 杉田和彦, 沼田和生, 小野武夫, 宮地純子, 森川悦子, 大村貞文: 新マクロライド系抗生物質 TE-031の抗菌作用について。Chemotherapy 投稿中
- 2) 長手尊俊, 小野武夫, 杉田和彦, 明石 敏, 森川悦子, 宮崎真奈美, 竹市千恵, 大村貞文: TE-031のヒト主要代謝物 M-5の抗菌作用について。Chemotherapy 投稿中
- 3) 諏訪俊男, 吉田英生, 河野喜郎, 吉富幸代, 亀井慶子: TE-031の動物における体内動態。第35回

- 日本化学療法学会, 新薬シンポジウム(TE-031)抄録: p. 76, 1987
- 4) NAGATE T., T. ADACHI, T. OTAKE, H. YOSHIDA J. MIYAJI, E. SEKIGUCHI, S. MORIMOTO & S. OMURA: A new macrolide antibiotic, TE-031. Structures and activity of metabolites. Abstracts of papers of 26th Intersci. conf. on Antimicrob. Agents Chemother. No. 410, New Orleans, La., 1986
- 5) 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 29: 76~79, 1981
- 6) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法: p. 680~681, 1986
- 7) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法: p. 682~684, 1986
- 8) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準・一般試験法・力価試験法: p. 685, 1986
- 9) 大竹盾夫, 小椋 薫, 岩立周子, 諏訪俊男: TE-031の体液内濃度の測定法に関する研究(第2報) HPLC法による体液内濃度測定。Chemotherapy投稿中
- 10) 森下真孝, 酒井敦史, 遠藤里子, 鈴木忠清: TMS-19-Qの体液内濃度測定法に関する研究(I)。Chemotherapy 32(S-6): 70~79, 1984
- 11) 斉藤 玲, 石川清文, 篠原正英, 福原育夫, 中山一郎, 富沢摩須美, 佐藤 清: TE-031に関する研究。第35回日本化学療法学会, 新薬シンポジウム(TE-031)抄録: p. 77, 1987

ASSAYS FOR TE-031(A-56268)IN BODY FLUIDS(I) MICROBIOLOGICAL ASSAY

TAKATOSHI NAGATE, KAZUHIKO SUGITA, JUNKO MIYACHI, MANAMI MIYAZAKI,
CHIE TAKEICHI, TAKEO ONO, TATEO OHTAKE and SADAFUMI OMURA
Research Center, Taisho pharmaceutical Co. Ltd., Saitama

To establish a bioassay for a new antibiotic, TE-031(A-56268), in body fluids, various methods and conditions were studied. The most suitable assay used a disc plate method with *Micrococcus luteus* ATCC 9341 as test organism in heart infusion agar, pH 8.0. As standard solution of TE-031, consera for human serum, methanol phosphate buffer(methanol : 0.02M phosphate buffer, pH 7.4 = 4 : 1) and partly 1/15M phosphate buffer, pH 7.2 for urine, and methanol phosphate buffer for tissue were used. Samples were prepared by diluting the above standard solutions.

The most active metabolite of TE-031, M-5, was also measured by the same bioassay. Its standard curve was almost the same as that of TE-031. The detectable range of TE-031 concentrations was 0.025~100 $\mu\text{g/ml}$ (except 1/15M phosphate buffer : 0.2~100 $\mu\text{g/ml}$). There was good correlation between the bioassay and chemical assays.