

# 微生物を用いる netilmicin の比色分析法

## —指示薬を含有する濾紙を用いる比色分析法—

津田 良子・若松 浩美・藤本 尚

シュERING・プラウ株式会社滋賀工場研究開発部\*

(平成4年12月28日受付・平成5年2月24日受理)

アミノグリコシド系抗生物質である netilmicin (NTL) を測定するにあたり、酸・塩基指示薬である thymolphthalein (TP) および methylred (MR) をしみ込ませた濾紙を用い、*Bacillus subtilis* の発生する CO<sub>2</sub> の酸性度により、この濾紙が変色する度合いを比色分析法によって測定した後、この変化量から試料中の NTL の量を求める新しい bioassay 法について検討を行った。*B. subtilis* 懸濁液、nutrient broth、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) および NTL 水溶液をガラスバイアルに入れ、TP-MR および NaOH をしみ込ませた濾紙をバイアルのセプタムの内側に貼り付け、3 時間培養した。TP-MR 濾紙は培地中の *B. subtilis* の生育に伴い変色 (脱色) し、その色は NTL 濃度に依存した。この変色をコンプリメンタリートリスティミュラス法を利用し、pH 依存性である TP-MR 濾紙の色を分光光度計で測定した結果、NTL 濃度と濾紙の変色の間には十分な相関、 $y=0.0286x+0.0832$ ;  $r$  (相関係数) = 0.943、が得られた。本法は、従来の bioassay 法に比べて試験時間を 13 時間以上短縮することができ、NTL の簡便で有用な測定法であることが示唆された。

**Key words:** netilmicin, 比色分析, *Bacillus subtilis*, CO<sub>2</sub>, 酸・塩基指示薬, コンプリメンタリートリスティミュラス法

アミノグリコシド系抗生物質 (AGs) は、グラム陽性および陰性菌による感染症の治療に広く用いられている。AGs の臨床的有効性とその副作用の発現は用量依存性であり、血中濃度の推移と密接に関係している<sup>1)</sup>。また、AGs は副作用が発現すると考えられる血中濃度が有効血中濃度と近接していることから、適切な治療を行うためには therapeutic drug monitoring (TDM) の実施が有効とされている薬剤であり<sup>2)</sup>、種々の測定方法<sup>2-4)</sup>が開発されている。

微生物が培地中で増殖する際に、多くの場合は CO<sub>2</sub> の発生を伴う。この時、培地中に抗生物質が存在すれば、菌の増殖が抑制されるために CO<sub>2</sub> 発生量も少なくなる。したがって、この CO<sub>2</sub> の変化量を測定することによって培地中の抗生物質量を求めることが可能となる。菌由来の CO<sub>2</sub> 発生量を指標として目的とする化学種の量を求める方法には、発生した炭酸ガスの体積を直接求める古典的な方法、あるいはその濃度を CO<sub>2</sub> センサーを用いて求める方法などがある<sup>5-7)</sup> ものの、これらの方法によって迅速かつ簡便に抗生物質を定量するには種々の難点がある。

我々は、CO<sub>2</sub> 発生量を迅速かつ簡便に求めるため、CO<sub>2</sub> 吸収剤および水素イオン濃度の指示薬としてそれぞれ酸・塩基指示薬および NaOH を含ませた濾紙を用い抗生物質量を測定するという新しい比色分析法を開発した。本研究では AGs の代表として netilmicin を用いて本法の有用性について検討したのでその結果について報告する。

### I. 材料と方法

#### 1. 試料および試薬

Netilmicin (NTL) はアメリカシュERING社から入手した netilmicin sulfate を用いた。formalin, alizarin yellow GG (AY), thymolphthalein (TP), phenolphthalein (PP) および methylred (MR) はナカライテスク製のものを用いた。また、nutrient broth (Difco Laboratories 製), beef extract (極東製薬製), pepton (和光純薬製), agar (清水食品製) を用い、その他の試薬類は試薬特級を用いた。濾紙は採血用濾紙 type II (アドバンテック東洋製) を用いた。

#### 2. CO<sub>2</sub> 発生量の検討

\* 滋賀県甲賀郡水口町笹が丘 1-4

## (1) 試験菌

試験菌として、*Escherichia coli* NIHJ, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P および *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いた。

## (2) 培養容器およびインキュベーター

試験菌の選択の実験では 13 ml のプラスチック試験管 (アシスト), その後の実験では 5 ml のガラスバイアル (Reacti-Vial®, Pierce, USA) を培養容器として用い、インキュベーターには振盪式のウォーターバス (Model BT-25, ヤマト科学) を使用した。

## (3) ガスクロマトグラフィー (GC)

機器: ガスクロマトグラフ (Model 163, 日立製作所)。検出器: TCD。カラム: Molecular-Sieve 5 A<sup>®</sup> (80~100 mesh, 日本ウォーターズ) を充填した 2 mm i.d. × 2 m のステンレス管。カラム温度: 50°C。検出器温度: 85°C。注入口温度: 120°C。キャリアガス: He, 30 ml/min。試料注入量: 100 μl。なお、データ処理は Data module (Waters) により行った。

## (4) stock 菌液または孢子液の調製方法

*E. coli* および *S. aureus* の stock 菌液および *B. subtilis* の孢子液は、それぞれ日本抗生物質医薬品基準解説 (日抗基)<sup>9)</sup> に記載されている方法に従い調製し、生理食塩液に懸濁させた後、使用するまで 5°C で保存した。なお、本法によって調製した菌液および孢子液中の各々の生菌数をプレート法により求めると、*E. coli*:  $3.1 \times 10^9$ , *S. aureus*:  $7.2 \times 10^9$  および *B. subtilis*:  $1.9 \times 10^8$  CFU/ml であった。

## (5) NTL 標準溶液の調製方法

NTL 標準溶液は、NTL の原末を蒸留水に溶かし 2.5~20 μg (力価)/ml に希釈して用いた。

## (6) 液体培地を用いた試験方法

Simpson らの方法<sup>9)</sup> に準じ、液体培地を用いて試験を行った。nutrient broth は 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) に溶かして 24 mg/ml になるように調製し、菌液または孢子液は stock 菌液または孢子液を同緩衝液で種々の濃度になるように希釈して用いた。培地と菌液をそれぞれ 1 ml, NTL 標準溶液 0.1 ml および 0.1 M リン酸塩緩衝液 0.9 ml を培養容器に入れ、蓋をした。混合後、37 ± 1°C の振盪式ウォーターバスに入れ、一定時間培養した。

## (7) 寒天平板培地を用いた試験方法

Pepton 5.0 g, beef extract 3.0 g および agar 15.0 g を蒸留水に溶かし 1 l とし、pH 8.0 に調整した培地を用いた。なお、この培地は、日抗基<sup>9)</sup> に記載されている *B. subtilis* の種層および基層用寒天培地のうちの 1 つである。この培地に *B. subtilis* の stock 孢子液を

$3 \times 10^6$  CFU/ml となるように加え、あらかじめシャーレ横に直径 1 mm の穴をあけた後それを粘着テープで塞いだシャーレに 15 ml ずつ分注し、静置した。培地が固まった後、培地表面に 0.1 ml の NTL 標準溶液をコンラジ棒でまんべんなく塗り広げ、蓋をした後、シーロンフィルム<sup>®</sup> (富士フィルム) で密封し、恒温槽 (37 ± 1°C) で一定時間培養した。

(8) CO<sub>2</sub> の測定方法

培養後、培養容器を取り出し、プラスチック試験管の場合はキャップから、バイアルの場合はシリコンセプタムの部分から formalin をそれぞれ 0.1 ml ずつ注射器で注入した。その後、キャップまたはセプタムの部分から、シャーレの場合は粘着テープの部分から容器中のヘッドスペースガスをエアタイトシリンジで採取し、菌の呼吸により産出する CO<sub>2</sub> 量を GC を用いて測定した。GC によりヘッドスペース中の O<sub>2</sub> 量をまず求め、CO<sub>2</sub> 発生量は培養前の初期値より減少した O<sub>2</sub> 量から換算して求めた。

## 3. 呈色用濾紙の検討

## (1) 炭酸ナトリウムの変曲 (当量) 点の決定

0.1 M 炭酸ナトリウムを 0.1 M 塩酸で滴定し、変曲点の pH を求めた。

## (2) 酸・塩基指示薬の選択

Britton-Robinson 緩衝液 (pH 7.0~12.0) 5 ml に指示薬の AY, TP または PP 試液 (0.1% ethanol 溶液) を 20 μl 滴加し、各指示薬の吸収極大の波長 (それぞれ 425, 595 または 562 nm) で吸光度を測定し、各指示薬の pH 変色域を調べた。

(3) 濾紙中の酸・塩基指示薬の可視部吸収スペクトルの測定と Qr プロット<sup>10)</sup> の作成

Britton-Robinson 緩衝液 (pH 4.0~12.0) 5 ml に TP 試液および MR 試液 (0.1% ethanol 溶液) をそれぞれ 50 μl ずつ滴加し、この溶液を濾紙にしみ込ませ、濾紙の可視領域 (340~650 nm) の吸光度を分光光度計 (MPS-2000, 島津製作所) を用いて測定し、コンプリメンタリートリスティミュラス法 (CTS 法) により、Qr プロットを作成した。また、この溶液そのものについてもそれぞれ同様に行った。

CTS 法は、吸収スペクトルを 3 つの領域 (レンジ) に分け、それぞれのレンジの相対強度を式(1)~(4)で示される Qr で表し、さらに Qr の移動から混合物の組成を求めていく方法である。

$$Rr = \sum_{i=1}^n Ari \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$Qr = \frac{Rr}{\sum_r \sum_{u,v,w} Rr} = \frac{Rr}{J} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$J = \sum_r \sum_{u,v,w} Rr = \sum_r \sum_{i=1}^n Ari \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$J = E \cdot C \cdot L \quad \dots\dots\dots(4)$$

ただし、Rr: r-レンジの吸光度の和 (r-レンジは、3つのレンジ u, v および w の総称でそのうちの1つを表す)。Ari: r-レンジにおける i 番目の波長の吸光度。Qr: 3刺激値のうち r-レンジの値。J: 3つのレンジの吸光度の総和。E: 全吸光係数。C: モル濃度。L: 光路長。

式(1)~(4)より、一定の化学種はその濃度に関係なく同じ Qr の値を示す。Qr を使用した化学種のグラフは、その中の2レンジを含むグラフ上で表される。したがって、異なる化学種 A, B に相当する Qr は定めたレンジについてはそれぞれ固有の点となる。

(4) NTL 濃度と TP-MR 濾紙の変色との関係

2.(6)の方法で試験液を調製し、以下の操作を加えた。すなわち、バイアルの蓋をする前にあらかじめセプタムの内側に TP-MR 試液をしみ込ませた濾紙を貼り付け (Fig. 1)、培養直前に NaOH 水溶液を添加し、培養中に発生した CO<sub>2</sub> を吸収させた。一定時間培養後、バイアルの蓋をあけ、TP-MR 濾紙の色を肉眼で観察した後、この濾紙の 340~650 nm の吸光度を分光光度計を用いて測定し、3.(3)の項と同様に CTS 法により Qr プロットを作成した。

II. 結 果

1. 菌種を選択

AGs の微生物学的な定量に繁用される菌種から、*E. coli*, *S. aureus* および *B. subtilis* を選び、液体培地法により培養時間と CO<sub>2</sub> の発生量に関する検討を行

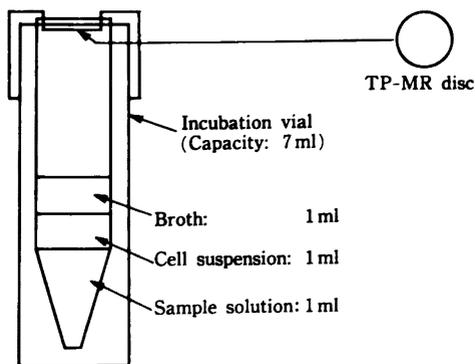


Fig. 1. Incubation container.

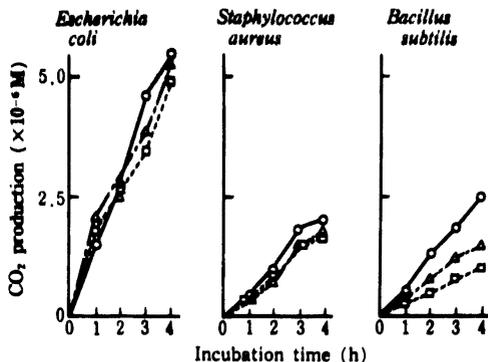


Fig. 2. Respiratory CO<sub>2</sub> production by bacteria in the presence of netilmicin.

Netilmicin concentration (μg/ml): ○, 0; △, 2.5; □, 10.0.

った。それぞれの菌液または孢子液を 4.5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml となるようあらかじめ 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) で希釈した後、1時間から4時間のそれぞれの培養時間での CO<sub>2</sub> 発生量を経時的に GC で測定した。結果は Fig. 2 に示したように、CO<sub>2</sub> 発生量は *E. coli* がもっとも多く、*S. aureus* と *B. subtilis* はほぼ同量であったが、*E. coli* と比較するとその量は半分以下であった。

2. 孢子液の濃度と培養時間

*B. subtilis* の 4.5 × 10<sup>6</sup>, 4.5 × 10<sup>7</sup> および 4.5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml の孢子液を用いて、孢子液濃度と培養時間の検討を行った。この結果を Fig. 3 に示した。CO<sub>2</sub> 発生量と NTL 濃度との相関性をもっとも良好である

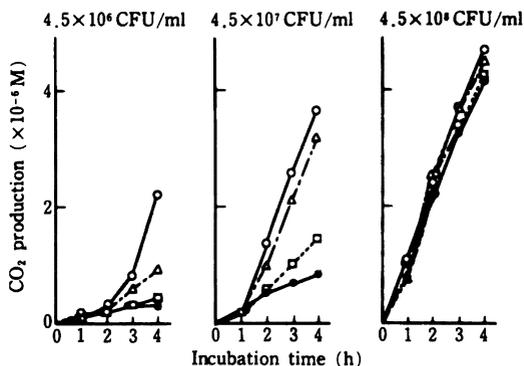


Fig. 3. Effects of stock cell (*Bacillus subtilis*) concentrations and netilmicin concentrations on CO<sub>2</sub> production.

Netilmicin concentration (μg/ml): ○, 0; △, 2.5; □, 10.0; ●, 20.0.

と考えられた孢子液濃度  $4.5 \times 10^7$  CFU/ml, 培養時間 3 時間を最適条件とし検量線を作成したところ, NTL 濃度 0~20  $\mu\text{g/ml}$  の間で良好な直線性, log

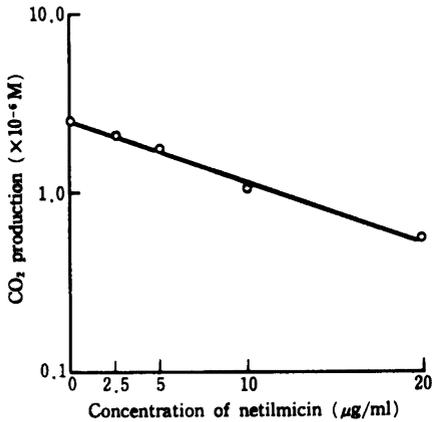


Fig. 4. Dose response curve for netilmicin on  $\text{CO}_2$  production by *Bacillus subtilis*. Stock cell concentration (CFU/ml):  $4.5 \times 10^7$ .

Table 1. Precision of respirometric assay for netilmicin on *Bacillus subtilis*

Concentration of netilmicin ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{CO}_2$ production ( $\times 10^{-6}\text{M}$ )	
	Intra-day <sup>a)</sup>	Inter-day <sup>b)</sup>
0	2.57 $\pm$ 0.20	2.57 $\pm$ 0.16
2.5	2.13 $\pm$ 0.14	2.16 $\pm$ 0.09
5.0	1.77 $\pm$ 0.18	1.93 $\pm$ 0.20
10.0	1.29 $\pm$ 0.20	1.11 $\pm$ 0.14

Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3-5 determinations.

<sup>a)</sup> No significant difference from b) at each concentration of netilmicin ( $p < 0.05$ ).

$y = -0.662x + 0.884$ ;  $r$  (相関係数) = 0.980, が得られた (Fig. 4)。また, この条件下で日内および日間の  $\text{CO}_2$  発生量の再現性を求めたところ, 得られた試験の精度は Table 1 に示した通りで, それぞれの再現性も良好であった。

### 3. 培地の選択

培地の種類による  $\text{CO}_2$  発生量の差を検討するため, 培地中の孢子の絶対数が  $4.5 \times 10^7$  CFU となるようにそれぞれ液体培地, 寒天平板培地を調製し,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  で 1~3 時間培養した。その結果, Table 2 に示したように 3 時間培養後の  $\text{CO}_2$  発生量はいずれの培地もほとんど同じであったが, 液体培地の方が均一な条件での培養となるために発生量のバラツキが小さかった。この結果より, 以後の実験には液体培地を用いることとした。また, 培養終了後測定を行うまでの間, バイアルを保存する必要があるため, formalin または氷水中で保存する 2 つの方法について検討を行った。その結果, formalin を用いた場合も, 氷水中で冷却した場合も, 培養終了直後から  $\text{CO}_2$  の発生を阻止できた (Table 3)。

### 4. 酸・塩基指示薬の選択

本研究では微生物から発生した  $\text{CO}_2$  の酸性度で明らかな変色を示す指示薬を選ぶ必要があるため,  $\text{CO}_2$  の第一変曲 (当量) 点である pH 8.3 前後に変色域を持つ AY, PP および TP を選び, pH と色の変化の関係を検討した。それぞれの指示薬の ethanol 溶液を pH 7 から 12 まで pH 1 毎に調製した緩衝液に加えただ後, 各指示薬の可視部の吸収極大波長で吸光度を測定した (Fig. 5)。その結果, 3 種の中で変色域において pH による吸光度変化がもっとも大きく, しかもこの変化が肉眼的にも明瞭に観察できる指示薬は TP であった。

### 5. 濾紙中の酸・塩基指示薬の可視部吸収スペクト

Table 2. Effects of medium and incubation time on  $\text{CO}_2$  production of *Bacillus subtilis*

Medium	Concentration of netilmicin ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{CO}_2$ production ( $\times 10^{-6}\text{M}$ )		
		1 h	2 h	3 h
Agar	0	0.23 $\pm$ 0.27	0.66 $\pm$ 0.04	2.23 $\pm$ 1.14 <sup>a)</sup>
	10.0	0.25 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.23	1.19 $\pm$ 0.38 <sup>b)</sup>
Broth	0	0.17 $\pm$ 0.10	1.38 $\pm$ 0.02	2.55 $\pm$ 0.13 <sup>c)</sup>
	10.0	0.17 $\pm$ 0.13	0.61 $\pm$ 0.07	1.04 $\pm$ 0.05 <sup>d)</sup>

Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3 determinations.

<sup>a)</sup> No significant difference from c) ( $p < 0.05$ ).

<sup>b)</sup> No significant difference from d) ( $p < 0.05$ ).

Table 3. Effect of formaldehyde on CO<sub>2</sub> production of *Bacillus subtilis*

Storage condition	Carbon dioxide production ( $\times 10^{-4}M$ )	
	1 h	2 h
Ambient	0.21 $\pm$ 0.21	0.64 $\pm$ 0.18
0°C	0.04 $\pm$ 0.05	-0.05 $\pm$ 0.09
Formaldehyde <sup>a)</sup> (Ambient)	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.05 $\pm$ 0.09

Each value represents the mean  $\pm$  SD of 3 determinations.

<sup>a)</sup> Concentration of formaldehyde: 1%

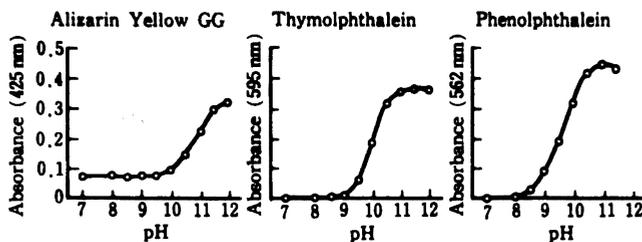


Fig. 5. pH-dependent absorption maxima of acid-base indicators.

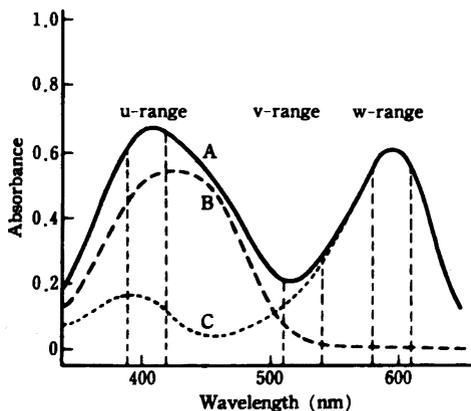


Fig. 6. Absorption spectra of thymolphthalein, methyl red and their mixed solutions.

A, Thymolphthalein; B, Methyl Red; C, Thymolphthalein + Methyl Red.

For complementary tristimulus colorimetry the following ranges were used, u-range, 390~420 nm; v-range, 510~540 nm; w-range, 580~610 nm.

#### ルの測定と Q<sub>r</sub> プロットの作成

pH 4 から 12 まで pH 1 毎に調製した緩衝液に TP または MR の ethanol 溶液を加え、これを濾紙にし

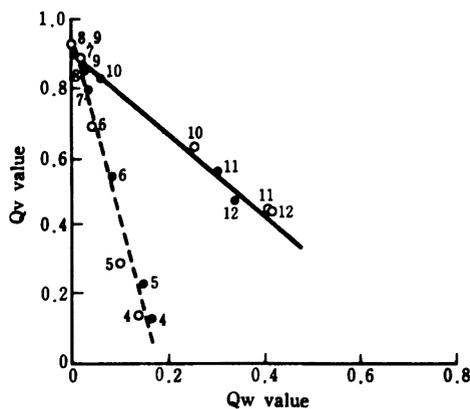


Fig. 7. Q<sub>v</sub>-Q<sub>w</sub> Plot at various pH-values for thymolphthalein-methyl red indicator disc.

○, standard solution (buffer); ●, indicator disc containing standard solution. Numbers in Q<sub>v</sub>-Q<sub>w</sub> plot represent pH values of the solutions.

み込ませた後にエンドオン型の検出器を有する分光光度計を用いて濾紙中の指示薬のスペクトルを測定した。同様の実験を TP と MR を混合したものについても行い、Fig. 6 に代表的なスペクトルを示した。なお、コントロールとして用いた緩衝液のみを含んだ濾

紙のスペクトルには、特異的なピークは認められなかった。

次に、TPおよびMRの吸収スペクトルから、CTS法を用いてQrプロットを作成した。v-レンジ(510~540 nm)およびw-レンジ(580~610 nm)を用いた濾紙のQrプロットは、Fig. 7に示したとおり、コントロールとして用いた溶液のそれとほとんど差が認められず、同一の直線上に存在することが見出された。

#### 6. TP-MR濾紙中のNaOH量の最適化

TPおよびMRを含んだ濾紙(TP-MR濾紙)にNaOHを含ませた濾紙は、培養中に*B. subtilis*が発生するCO<sub>2</sub>を吸収するとその色は濃青色から徐々に脱色される。しかし、その変色は加えたNaOHに大きく依存するために、添加するNaOH量を検討した。あらかじめバイアルのセプタムの内側にTP-MRを含んだ濾紙を貼りつけた後、20 μlのethanolを濾紙に滴下し、ただちに0.02, 0.06または0.10 MのNaOH水溶液50 μlずつをしみ込ませて蓋をした。その結果、NTL濃度によるTP-MR濾紙の色の差は、0.06 MのNaOHを加えた場合がもっとも明瞭であった。

#### 7. NTL濃度とTP-MR濾紙の変色の関係

TP-MR濾紙はNTLの濃度に従って変色し、肉眼観察すると、NTLの濃度2.5および10 μg/mlではそれぞれが薄青色、青色となった。NTLを加えなかったコントロールでは濾紙の色はTPの青色が完全に脱色されて、MRがpH 7前後で示す微黄色となっ

た。しかし、MRの変色域に至るまでの酸性にはならなかった。

また、NTLを含まないコントロール、NTLを2.5, 5および10 μg/ml含むように調製した試料を用いて算出した各Qrプロットは同一直線上に存在し(Fig. 8)、この直線の式( $y = -0.850x + 0.760$ ,  $r = 0.985$ )は、さきにpHを変化させた緩衝液およびこれをしみ込ませた濾紙を用いて得られた直線の式(Fig. 7, pH 7~12の直線,  $y = -0.860x + 0.770$ ,  $r = 0.991$ )とほぼ一致した。

次に、濾紙の初期の色であるTPの青色の挙動が特に明らかであるQwの値を用いて検量線を作成したところ、NTL濃度とTP-MR濾紙の変色の間には十分な相関関係が得られた( $y = 0.0286x + 0.0832$ ,  $r = 0.943$ )。

### III. 考 察

抗生物質の定量方法は、微生物学的方法と化学的方法に大別できる。近年、高速液体クロマトグラフィーを中心とした分析方法が多く、化学物質の測定の主流となっているが、抗生物質の本来の作用である抗微生物活性を測定する方法には、今日では古典的ときえ言われている微生物学的方法に優る分析法は残念ながら見出されていない。

AGsを微生物学的な定量方法によって測定する場合には、目的とするAGsに感受性を示す菌であれば使用可能であるものの、定量法として再現性、定量精度等を考慮すれば使用可能な菌は限定される。日抗基<sup>9)</sup>に記載されている菌種でAGsに適用可能な菌には*E. coli*, *S. aureus*および*B. subtilis*がある。しかし、GerkeおよびDewartの報告によれば、CO<sub>2</sub>の発生量は*E. coli*よりも*S. aureus*の方が少ないとされ<sup>11,12)</sup>、事実、我々の結果も彼らの報告を支持するものとなった。一方、*B. subtilis*は*E. coli*に比べてCO<sub>2</sub>発生量は少ないものの、CO<sub>2</sub>発生量が明らかにNTLの濃度と相関していた。また、この実験系では常にCO<sub>2</sub>の発生量を均一に保つことが重要であり、菌の保存性も大きな要因として考えなければならないが、この点でも*B. subtilis*は優れた保存性を有しているので、この菌を試験菌として用いることとした。

培養時間とCO<sub>2</sub>の発生量の関係について、本法の培養条件下で培養時間が4~5時間を超すと*B. subtilis*は対数増殖期に入るためにCO<sub>2</sub>の発生量が著しく大きくなった。この条件下では実験毎にCO<sub>2</sub>の発生量に大きな差を生じ、CO<sub>2</sub>の総量に影響を受ける本法では定量精度を維持することが困難となるので、もっとも安定な値の得られる3時間を培養時間と

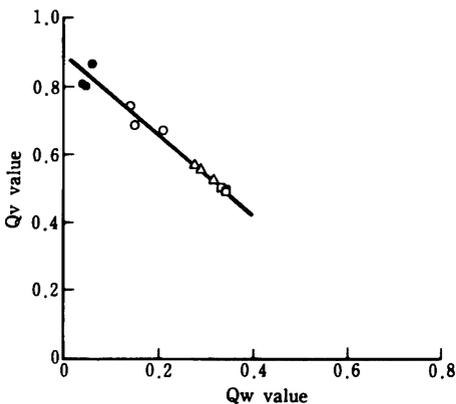


Fig. 8. Qv-Qw plot at various netilmicin concentrations for thymolphthalein-methyl red indicator disc.

Netilmicin concentration (μg/ml): ●, 0; ○, 2.5; △, 5.0; □, 10.0.

して選んだ。

本法では培養終了後にインキュベーターから取り出したバイアルをそのまま放置すると培地中の *B. subtilis* は  $\text{CO}_2$  の発生を続けるため、これが誤差となる。このため、 $\text{CO}_2$  の測定に影響しない殺菌剤を用いるか、取り出したバイアルをただちに急冷し、菌の呼吸を最小限にとどめる必要がある。本報ではバイアルに formalin を加えたものと、氷水中で保存したもののそれぞれについてガスクロマトグラフィーを用いてヘッドスペース中の  $\text{CO}_2$  濃度を測定した結果、いずれの方法でも  $\text{CO}_2$  の発生を十分に阻止することが可能であったが、実験の簡便さから formalin を加える方法を用いることとした。

酸・塩基指示薬は容量分析を行う際に汎用されているが、目的とする化学種の状態変化を検出する手段としても用いられている。本法では弱酸である  $\text{CO}_2$  の量の変化と、酸としての解離状態を確認する必要があるが、一種の指示薬のみを用いると、TP の変色域を超えた酸性度となった場合の変化を変色あるいはスペクトルの変化から求めることはできなくなり、結果として測定レンジはきわめて限られたものとなり実用性を期待することは不可能となる。したがって、この不利を避けるため、酸性側の指示薬として  $\text{CO}_2$  の第二変曲点である pH 4.5 前後に変色域を持つ MR を選択し、TP および MR の混合指示薬として精度良く測定できる方法とすることを考慮した。

次に、我々は濾紙中の指示薬の pH 変化に伴うスペクトルの変化を測定する方法として、エンドオン型検出器を有する分光光度計を用いて濾紙を試料として直接測定した。得られたスペクトルを CTS 法によって処理し、共存する化学種の pH 依存性の挙動を考察した結果、CTS 法の 3 つのレンジのうち v および w のレンジから得られた Qr プロットは同一の直線上に存在することが見出された。この結果から、 $\text{CO}_2$  の酸性度の変化は TP-MR 濾紙の TP の変色域にほぼ一致することが分光学的に確認できた。この TP-MR 濾紙のスペクトル変化から Qr を算出すれば抗生物質の量を求めることができる。

しかし、本法の欠点として、バイアルから取り出した TP-MR 濾紙を大気中に放置すると、大気中の  $\text{CO}_2$  の影響を受けるため TP-MR 濾紙の酸性度が低下し誤差の原因となるので、あらかじめ調整を行った

状態の下で素早く測定した。しかし、さらに分光光度計の検出部を  $\text{N}_2$  ガスで満たすなどの工夫が場合によっては必要かもしれないと考える。

今回、呈色濾紙を測定対象とし、得られたスペクトルを分光学的に優れた CTS 法によって処理する新しい測定方法について検討した。その結果、微生物を用いる方法としては短時間でしかも十分な精度を有する方法であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 嶋田甚五郎: 臨床。アミノ配糖体薬 (上田 泰編), p. 371~384, 南江堂, 東京, 1985
- 2) Danielson N T, Targove M A, Miller B E: Pre- and postcolumn derivatization chemistry in conjunction with HPLC for pharmaceutical analysis. *J. Chromatogr. Sci.* 26: 362~371, 1988
- 3) Jolley M E, Stroupe S D, Wang C J, Panas H N, Keegan C L, Schmidt R L, Schwenzer K S: Fluorescence polarization immunoassay I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. *Clin. Chem.* 27: 1190~1197, 1981
- 4) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体液内 Tobramycin の微生物学的微量定量法に関する検討. *Chemotherapy* 23: 886~893, 1975
- 5) 柳田友道: 生理的性状観察法。微生物学実験法 (微生物研究法懇談会編), p. 222~229, 講談社サイエンスフィク, 東京, 1976
- 6) Simpson D L, Kobos R K: Potentiometric microbiological assay of gentamicin, streptomycin, and neomycin with a carbon dioxide gas-sensing electrode. *Anal. Chem.* 55: 1974~1977, 1983
- 7) Colowick S P, Kaplan N O: *Methods in Enzymology*. vol. II, p. 836~846, Academic Press, New York, 1955
- 8) Aubeau R, Champeix L, Reiss J: Séparation et dosage du krypton et du xénon par chromatographie en phase gazeuse. *J. Chromatogr.* 6: 209~219, 1961
- 9) 厚生省薬務局監修: 力価試験法。日本抗生物質医薬品基準解説 1990 (日本抗生物質学術協議会編), p. 729~735, 薬業時報社, 東京, 1990
- 10) Flaschka H: Applications of complementary tristimulus colorimetry-I. *Talanta* 7: 90~106, 1960
- 11) Gerke J R, Haney T A, Pagano J F: Factors influencing automated microbiological assays. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 93: 640~643, 1962
- 12) Dewart R, Naudts F, Lhoest W: Automation in the microbiological assays of antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 130: 686~696, 1965

Studies on a colorimetric bioassay for netilmicin  
using an indicator disc

Yoshiko Tsuda, Hiromi Wakamatsu and Takashi Fujimoto

Research and Development Laboratories, Schering-Plough K. K., 1-4 Sasagaoka,  
Minakuchi-cho, Koga-gun, Shiga 528, Japan

A new colorimetric bioassay of an aminoglycoside antibiotic, netilmicin (NTL), was investigated. Discoloration of the color-indicator on the paper disc (indicator disc) is due to the presence of CO<sub>2</sub> produced by *Bacillus subtilis*. Discoloration of the indicator disc by CO<sub>2</sub> was studied as follows: A mixture of *B. subtilis* suspension, nutrient broth, 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) and NTL solution was transferred to a 5 ml Reacti-Vial<sup>®</sup>. An indicator disc containing thymolphthalein (TP), methyl red (MR) and NaOH was attached to the inside of the Reacti-Vial septum. The vials were then placed in a shaking water-bath (37±1°C) for 3 h. The blue indicator disc was discolored, the degree of discoloration depending on the growth of *B. subtilis* in the medium. When the concentration of NTL was high and the level of CO<sub>2</sub> low, no change was observed. The color of the indicator disc was determined spectrophotometrically after 3 h of incubation, using complementary tristimulus colorimetry, which is useful in determining pH-dependent chemical species like TP and MR. Our proposed method was found to save more than 13 h of working time when compared with the conventional bioassay method, so it is a useful and convenient method for determining NTL.