

Temaflloxacinのbioassay法による体液内濃度測定法

武田勝男・佐久間由光・矢野 茂・小山八重子・山口東太郎

田辺製薬株式会社生物研究所**

(*現 田辺製薬株式会社薬理研究所)

ヒト血清および尿中のtemafloxacin濃度を測定するためのbioassay法を検討した。被検菌に*Escherichia coli* Kpを、検定培地にハートインフュージョン(HIA)寒天培地を用いたペーパディスク法を標準法と設定した。本法の測定下限濃度は血清、希釀尿および1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)のいずれも0.156μg/mlであった。

Key words : temafloxacin, キノロン剤, bioassay, 血清, 尿

Temaflloxacin(TMFX)は米国アボット社(Abbott Lab., North Chicago)で合成された広域な抗菌スペクトルをもつニューキノロン剤である¹⁻⁴。

本論文では体内動態に関して検討したbioassay法によるTMFXの体液内濃度測定法について報告する。

I. 実験材料および方法

1. 試薬および試料：TMFXは米国アボット社より供与された。血清および尿は健康成人から採取した。

2. 菌 株：*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031および*Escherichia coli* Kpを用いた。

3. 菌 液：Nutrient agar (NA, 栄研)斜面培地で37°C、一夜培養した新鮮な菌を滅菌生理食塩水に懸濁しOD_{560nm} 0.3～0.4(1.5～2.0×10⁹ CFU/ml)となるよう調製した。

4. 検定培地：Heart infusion agar (HIA, 栄研), Mueller-Hinton agar (MHA, 日水)およびAntibiotic medium 1 (AM-1, Difco)を用いた。

5. 標準液：TMFX標準品を蒸留水で溶解して1,000μg/ml(力値)の原液を作製した。この原液を1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0), 血清, Consera(日本)または尿で希釀し0.156～10μg/mlの濃度範囲の標準液を調製した。Consera(日本)はメーカー指定の処方に従い調製した。標準液の作製はポリエチレン製のチューブを使用した。

6. ペーパディスク法：菌を接種した検定培地をシヤーレ(90×15mm, 栄研)に分注して水平に固化させ, 4°Cに約1時間放置したものを検定平板とした。この平板に標準液50μlを浸み込ませたペーパディスク(8mm Thick, 東洋濾紙)を貼り付け, 37°C, 18～20時間培養した。

7. 薄層カップ法：ペーパディスクの代わりにステ

ンレスカップを用いた以外は前項に準じた。

8. アガーウェル法：検定用寒天平板を直径8mmのノズルを用いて穿孔し, 各孔に標準液を50μlずつ注入した。その他の操作はペーパディスク法に準じた。

9. 阻止円の計測法：阻止円の測定はノギスまたはゾーンアライザー(Zone Analyzer System ZA-FII, システムサイエンス社)によった。阻止円の計測値はコンピューターPC-9801 RXに転送した。検量線は標準液の濃度の対数と阻止円直径との関係を二次回帰して作成した。

II. 実験結果

1. 検定菌の選定

Fig. 1に2株の検定菌によるTMFXの検量線を示した。*K. pneumoniae* ATCC10031は低濃度で阻止円が大きく定量限界は*E. coli* Kpより優れた。一方, *E. coli* Kpは検量線の勾配が大きく測定精度の点で優れた。この結果から, 被検菌は測定精度の高い*E. coli* Kpを選定した。

2. 培地の選定

Fig. 2に3種の検定培地, HIA, MHA, AM-1を用いた時の検量線を示した。検定培地は鮮明かつ最も大きな阻止円を示したHIAを選定した。Fig. 3にHIAの培地pHを6.0, 7.0, 8.0と変えた時の検量線を示した。測定感度はpH6と7ではほぼ同じであったが, pH8では阻止円が小さくなった。この結果から, HIAはメーカー指定のpH無修正とした(pH7.1付近)。

3. 接種菌量および培地量

Fig. 4に接種菌量の影響を示した。阻止円は接種菌量を減らすと大きく, 阻止円は接種菌量の多い方が鮮明度を増した。鮮明かつ阻止円の大きい接種菌量の範

囲は0.1~0.5%であった。Fig. 5に培地量の影響を示した。培地量はシャーレ当たり7mlが10mlより低濃度域でより大きな阻止円を示した。

4. 測定方法

Fig. 6に3種の測定法を比較して示した。ペーパディスク法は測定感度の点でやや劣ったが多くの施設で簡便に測定できる利点をもつ。一方、より感度の高い測定法としてカップ法またはアガーワエル法が使用できることを確認した。

5. 血清の影響

Fig. 7にヒト血清、Conseraおよび1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)の検量線を示した。血清量線の阻止円はリン酸緩衝液に比べ幾分小さい。一方、Conseraは血清と同じ検量線を与えた。

6. 尿の影響

Fig. 8に希釀尿とリン酸緩衝液の検量線を示した。尿はリン酸緩衝液で10倍希釀した。希釀尿の検量線はリン酸緩衝液のそれと同じであった。

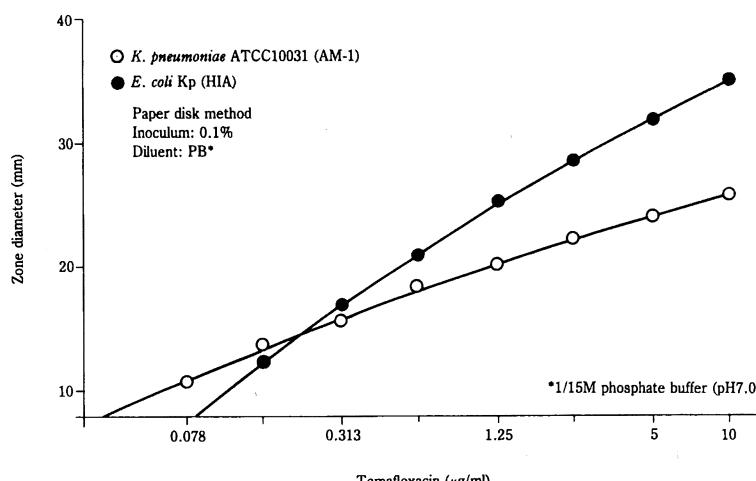


Fig. 1. Comparative standard curves of temafloxacin using different test organisms.

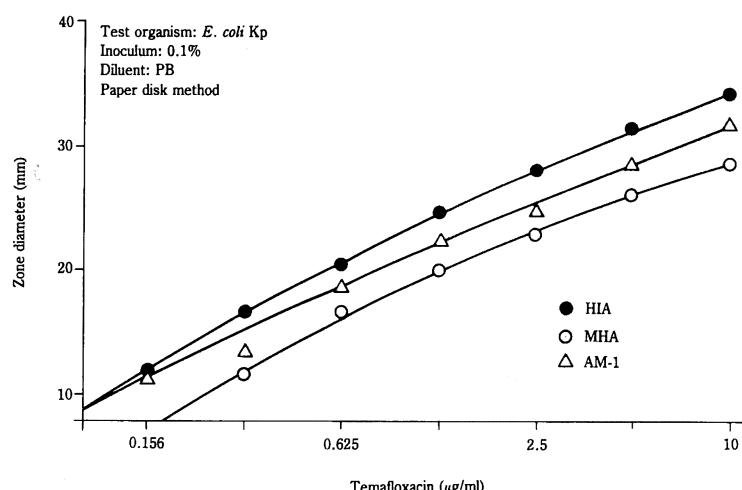


Fig. 2. Effect of test medium on the standard curve of temafloxacin.

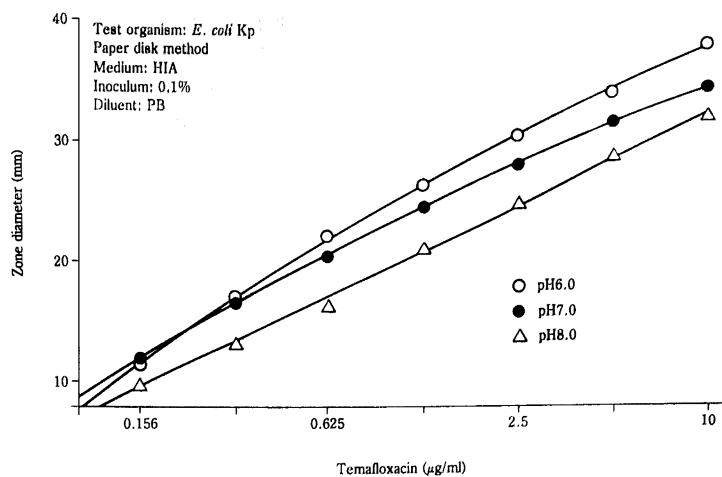


Fig. 3. Effect of pH of the medium on the standard curve of temafloxacin.

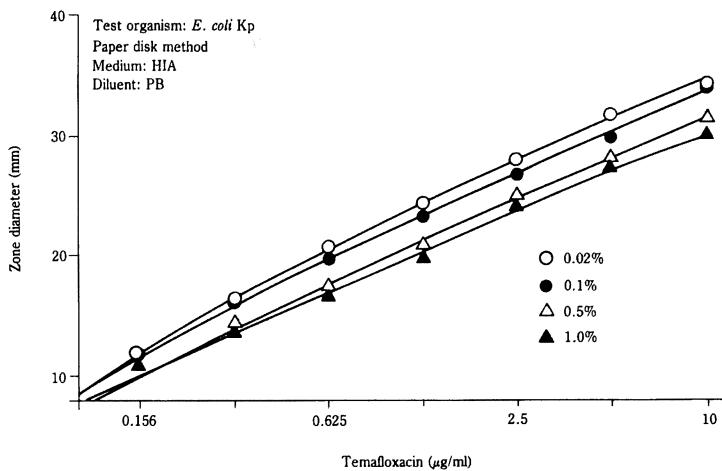


Fig. 4. Effect of inoculum size on the standard curve of temafloxacin.

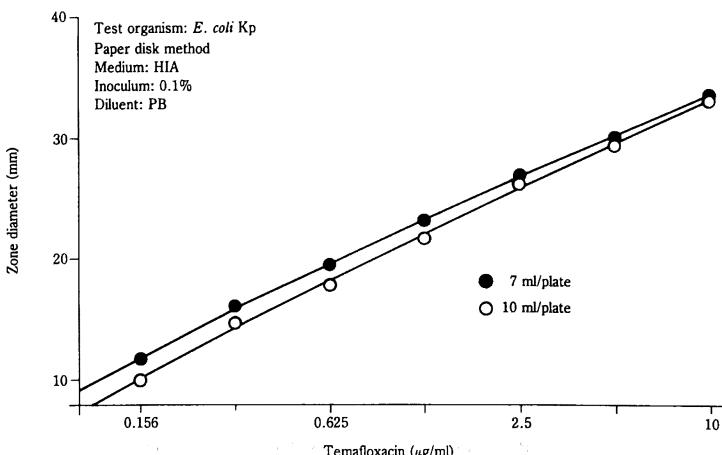


Fig. 5. Effect of the amount of test medium on the standard curve of temafloxacin.

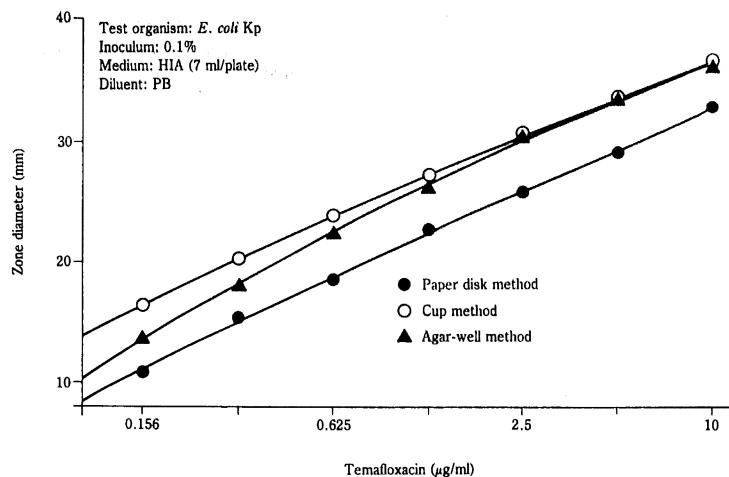


Fig. 6. Standard curves of temafloxacin by different methods.

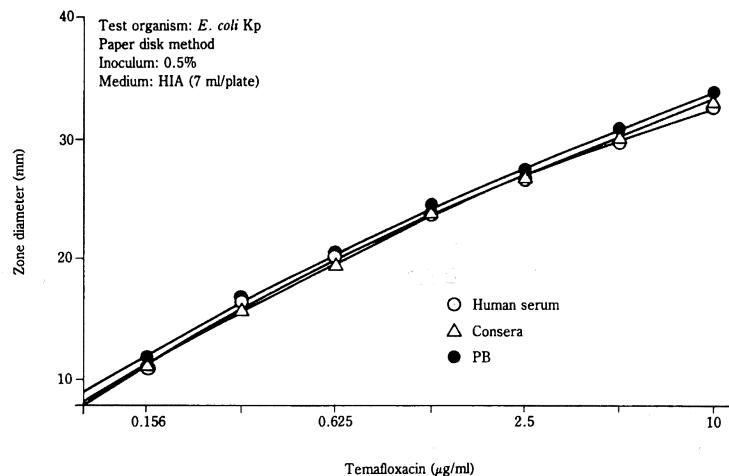


Fig. 7. Effect of human serum on the standard curve of temafloxacin.

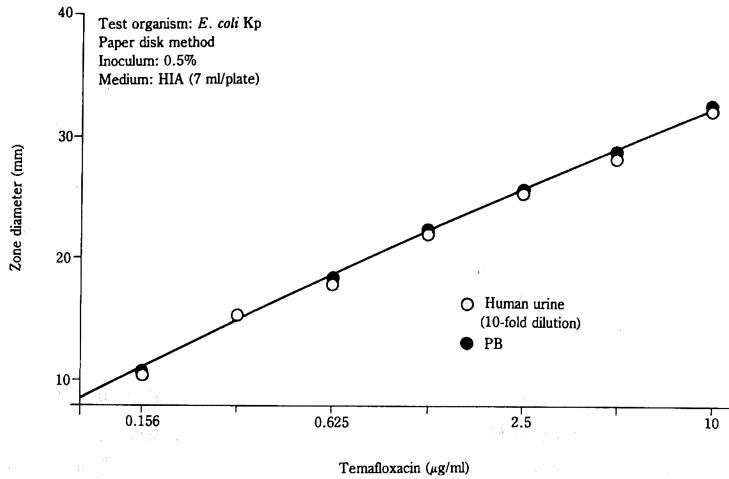


Fig. 8. Effect of human urine on the standard curve of temafloxacin.

Table 1. Standardization of bioassay for temafloxacin in human body fluids

Method	Paper disk method
Test organism	<i>E. coli</i> Kp
Inoculum	cell suspension ($OD_{560} = 0.3$): 0.5%
Medium	heart infusion agar (Eiken)
Assay range	0.156~10 μ g/ml
Standard solution	serum: consera or human serum other body fluids: 1/15M phosphate buffer (pH7.0)
Incubation	37°C, 18~24 hours

III. 考 察

本邦におけるキノロン剤のbioassay法による体液内濃度測定法をみると、その多くは*E. coli* Kp^{6~10)}を検定菌とし、検定培地にHIA^{8~11)}またはMHA^{6,7,11)}を用いている。一方、Hardyら¹¹⁾はTMFXのbioassay法の検定菌に*K. pneumoniae* ATCC 10031を、検定培地にAM-1を用いている。

著者らは本邦におけるTMFXの第Ⅰ相臨床試験¹²⁾に先立ち、これらのbioassay法を比較検討した。その結果、測定精度の点で優れた*E. coli* KpをTMFXの検定菌に選択し、HIA検定培地を用いたペーパディスク法をTMFXの標準bioassay法と設定した(Table 1)。本法による血清および尿の臨床検体の測定値はHPLCと良好な相関を示した¹³⁾。

本法のヒト血清における検量線は代用血清のConsera、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)と同じであった。この結果から臨床検体測定時には標準液をConseraで作製したが、この代用血清は製造lotにより抗菌活性を示すことを経験しているため使用に当たっては抗菌活性のないことを確認する必要がある。また、10倍希釀尿の検量線は1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)と同じであったことから、実際の臨床の尿試料はリン酸緩衝液の検量線で測定した。本法の検量線の測定限界は血清、10倍希釀尿、1/15Mリン酸緩衝液(7.0)いずれも0.156 μ g/mlであった。

文 献

- 1) 松下忠弘、押田忠弘、恩田時男、内藤真智子、山口東太郎：*Temafloxacin in vitro* 抗菌作用。Chemotherapy 41 (S-5): 67~80, 1993
- 2) 谷 佳都、芝田和夫、恩田時男、山口東太郎：*Temafloxacin* のマウス実験感染症に対する治療効果。Chemotherapy 41 (S-5): 89~101, 1993
- 3) Hardy D J, Swanson R N, Hensey D M, Ramer N R, Bower R R, Hanson C W, Chu D T W and Fernandes P B: Comparative antibacterial activities of temafloxacin hydrochloride (A-62254) and two reference fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 31: 1768~1774, 1987
- 4) Swanson RN, Hardy DJ, Chu DTW, Shipkowitz N L and Clement J J: Activity of temafloxacin against respiratory pathogens. Antimicrob Agents Chemother 35: 423~429, 1991
- 5) Bennet J V, Brodie J L, Benner E J and Kirby W M M: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Microbiol. 14: 170~177, 1966
- 6) 中村信一、黒部暢之、柏本茂樹、大植富夫、高瀬善行、清水富尚：*AT-2266*の実験動物における吸収、分布、排泄および代謝。Chemotherapy 32(S-3): 86~94, 1984
- 7) 津村光義、佐藤敬喜、采 孟、立澤晴男：第1報 Bioassay法とHPLC法によるイヌとサルにおける吸収、排泄の比較。Chemotherapy 32(S-1): 1179~1184, 1984
- 8) 小林宏行、志村政文：*BA Yo9867 (Ciprofloxacin)* の臨床第一相試験。Chemotherapy 33(S-7): 140~170, 1985
- 9) 保田 隆、渡辺泰雄、南 新三郎、熊野克彦、恒田礼子、金山淳子：*新ピリドンカルボン酸系* 抗菌剤 T-3262 の体液内濃度測定法。Chemotherapy 36(S-9): 137~142, 1988
- 10) 黒部暢之、大植富夫、山口俊和、中村信一：*Sparfloxacin* の体液内濃度測定法。Chemotherapy 39(S-4): 116~122, 1991
- 11) 桶崎英一、大道光一、小池祥二、高橋慶衛、牧野栄一、寺崎哲也、辻 彰：*NY-198*の体内動態I—Bioassay法による各種動物における吸収、分布および排泄—。Chemotherapy 36(S-2)

- ：132～137, 1988
- 12) 中島光好, 植松俊彦, 長嶋悟, 小菅和仁,
金丸光隆：Temaflloxacin の臨床第 I 相試験。
Chemotherapy 41 (S-5) : 242～259, 1993
- 13) 武田勝男, 矢野茂, 佐久間山光, 山口東太郎
：Temaflloxacin のHPLC法による体液内濃度測
定法。Chemotherapy 41 (S-5) : 122～127, 1993

Bioassay method for temafloxacin in body fluids

Katsuo Takeda, Yoshimitsu Sakuma, Shigeru Yano, Yaeko Koyama
and Totaro Yamaguchi

Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.
2-2-50, Kawagishi, Toda 335, Japan

A microbiological assay procedure has been developed for determining temafloxacin (TMFX) in human serum and urine. Drug concentrations were determined by the disk-plate method, using *Escherichia coli* Kp as the test strain and heart infusion agar as the test medium. The lowest detectable concentration of TMFX was 0.156 μ g/ml in serum, diluted urine and 1/15M phosphate buffer (pH7.0).