

抗生物質の組織内有効濃度について

(菌の発育曲線による解析の試み)

杉山 正夫・山崎 太朗・山本 馨*

一般に抗生物質の測定は、既知の濃度の薬剤を buffer あるいは血清に溶し、これから標準曲線を作り、その曲線から sample の薬剤量を測定している。しかし組織内では、これらの標準曲線から得た薬剤量が存在しているだろうか。また組織内では、こうして得られた薬剤量が菌に対して medium の中にある時と同じ様に有効であろうか。これらを知る目的で若干の試みを行った。

摘出扁桃組織を slice にし、生理食塩水の中で、2枚のスライドグラスで軽くこするとリンパ球が遊出し、それを3000回転遠沈、上清を millipore filter を通過させ、無菌的な扁桃組織液（以後扁桃 extract と略す）を作った。

この扁桃 extract と plasma 液、phosphate buffer で CET (cephalothin) について重層法で標準曲線を作った。結果は図1の様に buffer に比べて extract は低い値になった。特に薬剤濃度の低い所でその差が大きい。このことは CET が蛋白と結合する結果と考えられる。次に組織液や血清のある所と medi-

um のみの所では、菌の増殖が異なるか、また抗生物質の効果が異なるかを知る目的で自記分光光度計 (biophotometer) を使って菌の増殖を経時的に調べた。

まず図2の様な組合せの試料を biophotometer の cell の中に入れ、実験を行った。結果は扁桃 extract を加えたものが一番早く菌が増殖した。以下血清添加、

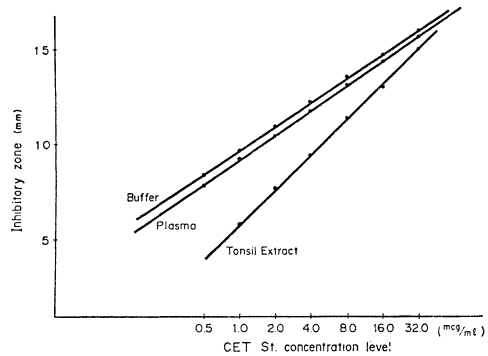
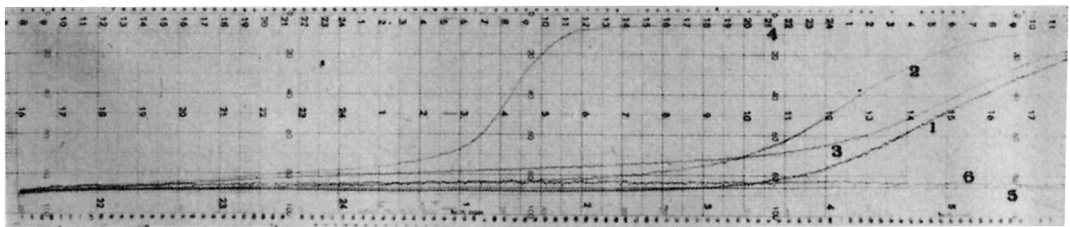


図1 CET Standard



- 1.....Penassay 3.0 ml + Bacteria 0.05 ml
- 2.....Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml + Bacteria 0.05 ml
- 3.....Penassay 2.5 ml + Inactivated Serum 0.5 ml + Bacteria 0.05 ml
- 4.....Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract 0.5 ml + Bacteria 0.05 ml
- 5.....Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml
- 6.....Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract 0.5 ml

Bacteria : *Sarcina lutea* ATCC 9431

菌量 : O.D. = 0.1 (550 m μ) の菌液を 0.05 ml (1.3×10^5 cells)

図 2

* 大阪市立大学耳鼻咽喉科学教室

表1 Optical density と 菌 量

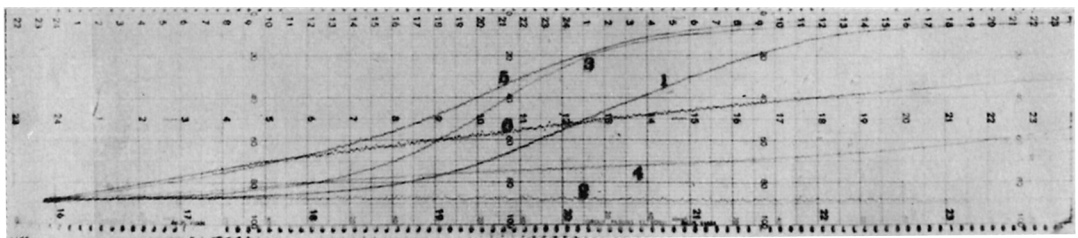
培養時間 medium	0	5 hr.	8 hr.	9 hr.	10 hr.	11 hr.	菌 数
Penassay	0.02	0.02	0.02	0.02	0.025 0.005	0.04 0.02	9.4×10^5 cells/ml
Penassay + Serum	0.09	0.09	0.10 0.01	0.10 0.01	0.11 0.02	0.14 0.05	2.4×10^6 cells/ml
Penassay + Tonsil Extract	0.18	0.20 0.02	0.25 0.07	0.27 0.09	0.29 0.11	0.32 0.14	4.5×10^6 cells/ml

非動化血清の添加, penassay medium のみのものの順で増殖が悪くなつた. これらのことから扁桃 extract や血清を加えると栄養条件が良く菌の増殖が早く起るものと思われる. この biophotometer で測定されている曲線は, 濁度を見ているのであつて, 菌の増殖そのものを見ているのではない. そこで表1の様な実験を行つた. 図2と同じ割合で medium に扁桃 extract・血清を加え, さらに medium のみものを作り, 同量の菌を入れ, 経時的に比色計で optical density (O.D.) を測定し, O.D. に差の出た所で colony count を施行した. 結果は O.O. が一番高い扁桃 extract を添加したものが, 菌数も一番多いが, 濁度の差ほど菌数が多くないことが判る. これらのことから菌が増殖すると extract には菌の増殖以外にも何か濁度を増すものがあるのでないかと思われる. だから濁度の増加に伴つて菌が増加していることは事実であるが, 濁度と菌数の増加は必ずしも平行して

いないことを考慮して以下の結果を解釈しなければならない.

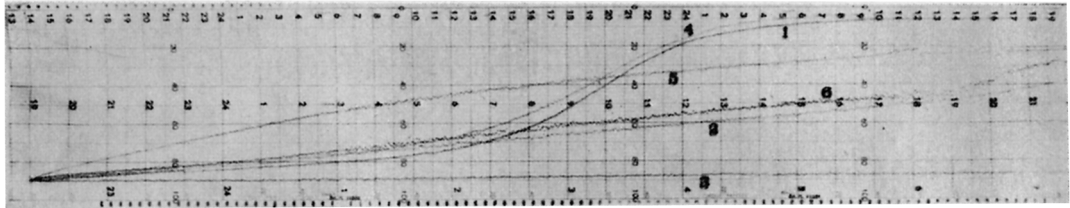
次に CET を用いて図3の様な組合せで biophotometer にかけた. 結果は CET を加えなかつたものでは, 図2の時と同じ様に extract 添加, 血清添加, medium のみの順で菌が増殖した. CET が添加したものの中では, medium のみものは, 菌の増殖がおさえられている. これに比べて extract, 血清を添加したものでは, 立ち上りが遅いが菌の増殖が認められた. これは CET が蛋白と結合するためか, medium のみものに比べて栄養が良いためかと思われる.

次に bioassay で測定した抗生物質の血中濃度とか組織内濃度というものが, どの程度のものであるかを知る1つの方法として図4の様な系を組んだ. 1は抗生物質を添加しないもの, 2は CET を静注10分後に採取した血清中の CET 濃度を図1の plasma の標準



- 1Penassay 3.0 ml
- 2Penassay 3.0 ml + CET (0.13 µg/ml)
- 3Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml
- 4Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml + CET (0.13 µg/ml)
- 5Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract 0.5 ml
- 6Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract 0.5 ml + CET (0.13 µg/ml)

図 3



- 1 ……Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml
- 2 ……Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml (CET 血中濃度 0.13 $\mu\text{g/ml}$)
- 3 ……Penassay 2.5 ml + Serum 0.5 ml + CET (0.13 $\mu\text{g/ml}$ 添加)
- 4 ……Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract
- 5 ……Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract (CET 組織内濃度 0.13 $\mu\text{g/ml}$)
- 6 ……Penassay 2.5 ml + Tonsil Extract (0.13 $\mu\text{g/ml}$ 添加)

図 4

曲線で測定した。その CET の入っている血清を同一個体の注射前の薬剤の入っていない血清で稀釈し、medium を加え final で 0.13 $\mu\text{g/ml}$ になる様に調整した。3 は薬剤の入っていない血清に CET を添加し final で 0.13 $\mu\text{g/ml}$ になる様に調整した。4 は扁桃 extract を添加し、抗生物質を加えないもの、5 は扁桃摘出前に CET を静注し、その扁桃 extract 内の CET 濃度を図 1 の扁桃 extract の標準曲線で測定し、他人の薬剤を含め扁桃 extract で稀釈し final で 0.13 $\mu\text{g/ml}$ になる様に調整した。6 は扁桃 extract を添加し final 0.13 $\mu\text{g/ml}$ になる様に CET を加えたものである。結果は図 4 の様に同じ 0.13 $\mu\text{g/ml}$ でも bioassay で測定された血中濃度や組織内濃度は、添加したものに比べて菌の発育が良い。これは bioassay の際に標準曲線を plasma や扁桃 extract で取っているために遊離型の薬剤が測定量より少ないためでないかと考えられる。以上のことをまとめると

1) 血清内や組織内の抗生物質全濃度は bioassay で測定する時に、血清あるいは組織液を稀釈溶剤として作った標準曲線から求めるべきであるが、遊離型の活性な有効薬剤量という意味では buffer で標準曲線を取った方がより適当であろうと考えられる。

2) 拡散法による bioassay では普通、標準液の最

下限は 0.125 $\mu\text{g/ml}$ であるが、増殖曲線ではこの下限以下でも有意の差がでるので、photometer によって濁度の経時的追跡をするこの方法は、MIC 以下の低濃度の抗生物質の効果を解析する手段になり得ると思われる。

〔質問〕本堂 潤 (名市大): 1) 標準 extract の作製法は? 2) biophotometer で抗生物質濃度の測定は可能か。

〔応答〕杉山正夫 (阪市大): 1) 細切した扁桃をスライドガラス 2 枚で圧縮し、組織 1g/生食 3ml のものを 3000~4000 回転で 3 回遠沈、上清を millipore filter にかけて無菌化する。2) 濃度の測定は出来ない。MIC 以下の濃度での抗生物質の効果を解析するのに応用出来るか否かを検討したのである。

〔質問〕岩沢武彦 (札幌通信): 1) 測定時の medium, buffer, 扁桃 extract の pH は一定にされたか。2) bioassay の場合の拡散時間は? 3) CET の場合、蛋白結合率をみたか。

〔応答〕杉山正夫 (阪市大): 1) pH はほぼ 7 である。しかし、培養中 pH を一定にすることが実際上はむづかしいと考える。2) 抗生物質添加後 4℃ で 1 時間置いた。3) 蛋白結合率は測定していない。