

Pyrrolidino-methyltetracycline nitrate の 生体内濃度に関する研究

金沢大学医学部小児科学講座(主任 佐川一郎教授)

上 嶋 美 明

(昭和45年11月11日受付)

本論文の要旨の一部は1969年5月第144回日本小児科学会北陸地方会において発表した。

テトラサイクリン (TC) 系抗生物質はその適用症の広汎なこと、また副作用の軽微なことから現在化学療法界で広く、かつ多量に使用されている抗生物質の一つである。

ところでこの薬剤は難溶性で、また局所的副作用があるために経口的に使用されるのが普通であるが、重症感染症などの治療時高い血中濃度を期待するため注射剤としての製剤化が望まれていた。

1958年 Siedel らによって一連の aminomethyl-TC のうち Pyrrolidinomethyl-TC が合成され、つづいて誘導体である N-(Pyrrolidinomethyl) tetracycline nitrate (以下 PM-TC と略) が合成された。

本剤は1959年 Kaplan, M. A., Albright, H., and Buckwaite らによりすぐれた治療効果を有していることが明らかとなり、近時臨床各面において次第にその使用が広がりつつある。

本研究はこの薬剤についてその抗菌性、安定性、血中・赤血球内濃度、タンパク結合性、尿中、臓器内濃度などに関する一連の基礎実験を行なって、臨床における適正な使用法に資せんとした。

〔I〕 重層法による定量法

I. 重層法の基礎的条件

Tetracycline 系薬剤の生物学的検定には米国では枯草菌、ブドウ球菌、レンサ球菌などを試験菌とした希釈法が主に使用されている。

一方わが国では主としてカップ法が純度試験、ならびに安定性試験などの測定法として使用されている¹⁾
²⁾³⁾。

しかし著者は PM-TC の定量法として重層法を採用した。

重層法はカップ法に比し操作が簡単で被検物および培養材料が少量ですみ、かつ感度が良いからこれら純度試験以外に、臨床的に血中濃度ならびに尿中排泄濃度などの微量定量法としても応用できるものと考えたからである。

重層法による抗生物質の生物学的定量は主として被検菌と硝酸ナトリウムおよびメチレン青などを組合せた鳥居・川上氏法⁴⁾が用いられ、金沢⁵⁾、小嶋⁶⁾、片桐⁷⁾、西村⁸⁾によって各種抗生物質の定量がなされている。

著者は PM-TC の生物学的定量法を行なうにあたり被検菌として抗菌性物質製剤基準⁹⁾の検定法に採用されている *B. subtilis* ATCC 6633 (以下 *B. sub* と略) を使用して重層法における条件を検討し、さらに体液中の微量定量を行なう場合の基礎実験として血清・尿ならびに臓器による影響についても吟味した。

実 験 方 法

本実験の概要はペニシリン重層法(鳥居・川上氏法)に準拠した。

1. 培 地

肉エキス0.5%、ペプトン0.5%、寒天15%の普通寒天培地に指示薬として0.1%メチレン青液の2%ならびに2%硝酸ナトリウム液の1%を添加した。なお培地の pH はとくに修正しなかったが pH は5.8~6.0であった。

2. 標準 PM-TC 原液の調製

万有製薬会社より分与をうけた静注用 PM-TC 末

Studies on the microbial assay method to determine the concentration of Pyrrolidino-methyltetracycline nitrate in blood, urine, and tissue. **Yoshiaki Kamishima**, Department of Pediatrics (Director: Prof. I. Sagawa), School of Medicine, Kanazawa University.

5mg (力価) を吸湿しないようにすみやかに秤量し滅菌蒸留水 5 ml に溶解し、ついで pH 6.2 Sørensen Phosphate Buffer (以下 pH 6.2 磷酸緩衝液と略) を用いて全量 50 ml にした。

なおこの溶液は PM-TC の 100 mcg/ml 原液に相当するもので検定の都度新たに作製した。

3. 培養および判定

あらかじめ 100ml ずつ滅菌瓶に分注した培地を湯槽で溶融後、液温が 70°C 位に冷えてからメチレン青液、および硝酸ナトリウム液を加え、さらに 60°C 前後の温度で *B. sub* 芽胞浮遊液を加えてよく混和し、これらを内径 4.5mm の小試験管に 0.75 ml ずつ分注した。

分注後寒天の凝固を待って被検液 0.3 ml ずつ 3～4 本に重層し、直ちに 37°C フ卵器で 16 時間培養した。なお培養後阻止帯の長さを 0.1mm までノニウスで正確に計測し判定した。

実験成績

1. 被検菌の選定

Penicillin および Oxytetracycline などの検定菌として常用されている *B. sub* ならびに *Stap. aureus* FDA 209-P (以下 *Stap. aureus* と略) の 2 菌株についての感受性ならびに阻止帯域の幅をしらべた結果はそれぞれ表 1 および図 1 にしめす如くである。

被検液の同一濃度において *B. sub* は *Stap. aureus* に比し著しく感度がすぐれ、阻止帯が長く、かつ *Stap. aureus* を使用した場合にしばしばみられるような二重阻止帯像 (被検液の高濃度において阻止帯境界線の周域に濃・淡の阻止帯があらわれて測定困難である) もみられなかった。

このように感度もすぐれ、かつ芽胞浮遊液として常時保存することもできるので以後の実験における検定菌種として選んだ。

2. 培地の調製と pH の影響

1) 培地の選定

抗菌性物質の検定用培地として繁用されているペニシリン用培地および普通寒天培地の 5 種類を選び、表 2 における組成のものについてしらべた。

実験の結果は表 3-1, 3-2 および図 2-1, 2-2 にしめす如くである。

No. 1 培地では被検液の 40～20 mcg/ml においてしばしば阻止帯のあらわれない場合、ならびに全体に不鮮明 (特に二重阻止帯像) でバラツキが多く判定が困難であった。また No. 4, 5 では被検液の $\frac{1}{10}$ 希釈

濃度 4～0.03 mcg/ml まで測定することができたが、培地の栄養が低いため接種菌の発育が悪く、ために接種菌量とメチレン青 (以下 mb と略) などの関係から阻止帯のあらわれないことがあって不確実であった。

これに反し No. 2, 3 の感度は No. 4 および 5 に比しやや低かったが、被検液の 40～0.31 mcg/ml の範囲においてほとんどバラツキがなく測定することができた。

なお培地の組成中食塩の添加したものと、しないものとは阻止帯の長さに差異はみられなかったが、たまたま食塩添加培地において阻止帯境界線に凝溶血帯ができて測定困難な場合や、阻止帯のあらわれないことがあるので No. 3 の無食塩添加培地 (以下 K 培地と略) が最も適当と考えられた。

2) 培地の pH

K 培地の pH を $\frac{1}{10}$ N NaOH でそれぞれ pH 5.8, 6.8, 7.4, 8.0 に修正したものについてしらべた結果は表 4 および図 3 にしめす如くである。

pH 6.8 では高い感度をしめたが、被検液の 10 mcg/ml 以上の濃度において二重阻止帯像をつくり、境界線がやや不鮮明であった。また pH 7.4 および 8.0 では PM-TC の各濃度による阻止帯長の差がほとんどなく、ために測定培地としては不適當であった。

これに反し pH 無修正の 5.8～6.0 では、境界線が鮮明であり、かつバラツキが少なかった。

3. 接種菌および mb 濃度

1) 一定濃度の mb 液に *B. sub* の芽胞浮遊液*をそれぞれ 2.0, 1.0, 0.5, 0.1% ずつ加え、接種菌濃度による影響をしらべた結果は表 5 および図 4 にしめす如くである。

接種菌濃度の低いものほど阻止帯が長くあらわれ、最小有効濃度は低くなったが、これにともなって阻止帯境界線が次第に不鮮明になった。

2) 接種菌濃度を一定にし、これに mb の 4.0, 2.0, 1.0, 0.5% をくわえて mb 濃度による影響をしらべると表 6-1, 6-2 および図 5-1, 5-2 の如く mb 濃度が高くなるほど阻止帯が長くあらわれた。

*芽胞浮遊液: *Bacillus subtilis* の 2 日間 37°C で培養した寒天培地斜面から 5 白金耳をとり、これを 10 ml の蒸留水に浮遊させ、60°C 30 分間加熱して調製する。なお調製液は 10°C 以下の氷室に保存する (14 日間保存可)。

芽胞浮遊液の標準芽胞数は $10^9 \sim 10^{10}$ /ml である。

3) 接種菌濃度と mb 濃度との相互関係.

実験 1), 2) は主として阻止帯の長さから検討したが, 阻止帯境界線の読みを正確にするためには脱色前線と菌集落の前線とを一致させることが必要である.

この条件を常に一定にすることは非常にむずかしいことと思われる. そしてその間に次のような傾向がみとめられる.

i) mb がうすく接種菌の濃度がこい時には mb の還元部と非還元部との差ははっきりし両前線は一致する. 接種菌の濃度がうすいと阻止帯が不明瞭である.

ii) mb の濃度をこくした場合, 接種菌濃度がうすいと菌の発育がみとめられず, したがって接種菌の濃度は高くしなければならない. ただし mb 濃度が 2.0 % をこすと阻止帯境界線に二重阻止帯像をつくったり

表 1. 被検菌株による相違 (菌量 1%)

菌 種		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.13	blank
B. sub (斜面菌)	阻止帯の長さ mm	10.8	9.9	9.3	8.3	7.5	6.4	5.5	4.5	0
		11.0	10.0	9.0	8.1	7.0	6.2	5.2	4.2	0
		10.6	10.2	9.3	8.2	7.1	6.3	5.2	4.4	0
	平 均	10.8	10.0	9.2	8.2	7.2	6.3	5.3	4.3	0
B. sub (浮遊菌)	阻止帯の長さ mm	10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.2	3.2	0
		10.4	9.3	8.0	7.2	6.0	5.1	4.0	3.0	0
		10.0	9.1	8.4	7.2	6.5	5.3	4.1	3.2	0
	平 均	10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.1	3.1	0
Stap. aureus (斜面菌)	阻止帯の長さ mm	7.3	6.6	5.8	5.2	4.2	3.3	2.3	1.2	0
		7.5	6.8	6.0	5.0	4.4	3.2	2.0	1.4	0
		7.7	6.4	5.6	5.4	4.3	3.4	2.1	1.0	0
	平 均	7.5	6.6	5.8	5.2	4.3	3.3	2.2	1.2	0

図 1. 被検菌株による相違 (3例平均)

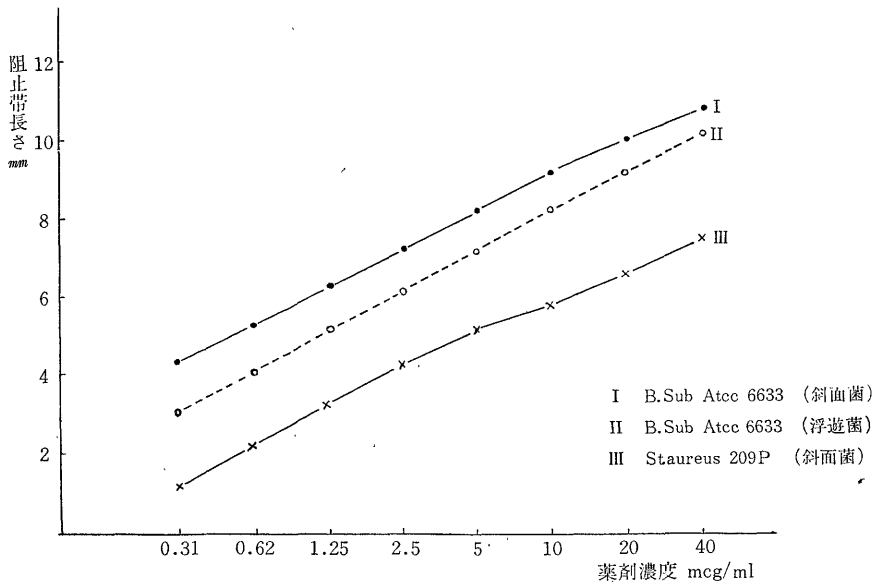


表 2. 検定用培地の組成

No.	1	2	3	4	5
処方 内容	ペプトン 10	ペプトン 5	ペプトン 5	ペプトン 2	ペプトン 2
	肉エキス 5	肉エキス 5	肉エキス 5	肉エキス 2	肉エキス 2
	食塩 2.5	食塩 2.5	—	食塩 1	—
	寒天 15	寒天 15	寒天 15	寒天 5	寒天 5
	蒸留水 1,000ml	蒸留水 1,000ml	蒸留水 1,000ml	蒸留水 1,000ml	蒸留水 1,000ml
pH	7.0	6.0	5.8	5.8	5.8

表 3-1. 培地による相違

培地の No.		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
No. 1	阻止帯の長さ mm	不能	不能	(7.0)	(6.4)	5.0	3.6	2.8	1.6	0
		8.2	7.6	7.0	6.0	5.4	3.8	2.6	1.4	0
		8.0	7.4	7.0	5.8	4.8	3.4	2.4	1.4	0
		不能	(8.0)	(7.4)	(6.2)	(5.4)	4.0	3.0	1.8	0
	8.4	7.6	6.8	5.6	4.5	3.2	2.0	1.2	0	
	平均	8.2	7.65	7.04	6.0	5.02	3.6	2.56	1.48	0
No. 2	阻止帯の長さ mm	(10.2)	9.2	8.6	7.4	6.4	4.8	4.0	3.0	0
		(10.1)	(9.0)	7.8	7.0	6.0	5.2	3.6	2.8	0
		10.2	9.4	8.4	7.4	6.2	5.2	4.0	3.0	0
	平均	10.16	9.2	8.26	7.36	6.2	5.06	3.86	2.93	0
No. 3	阻止帯の長さ mm	10.2	9.2	8.0	7.2	6.2	5.2	4.2	3.2	0
		10.0	9.0	8.0	7.1	6.2	5.2	4.1	3.2	0
		10.1	9.1	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	0
	平均	10.1	9.1	8.0	7.1	6.13	5.13	4.1	3.13	0

注: () 内の値は二重阻止帯像でやや不鮮明.

表 3-2. 培地による相違

培地の No.		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.03	blank
No. 4	阻止帯の長さ mm	8.1	7.2	6.2	5.0	4.0	2.8	1.2	0	0
		(10.2)	(9.0)	(7.8)	6.6	5.2	3.6	2.0	0	0
		不能	不能	6.5	5.5	4.5	3.0	1.0	0	0
	平均	9.15	8.1	6.83	5.7	4.6	3.13	1.4	0	0
No. 5	阻止帯の長さ mm	(12.4)	(10.4)	8.6	6.8	5.8	4.8	4.0	3.0	0
		(12.0)	(11.0)	(10.0)	9.0	7.8	6.8	(5.4)	(4.0)	0
		11.8	10.8	9.0	8.4	7.1	6.0	5.0	3.5	0
	平均	12.0	10.7	9.2	8.0	6.9	5.86	4.8	3.5	0

非脱色帯を生じて測定困難となる。

以上の結果より K 培地における mb と菌濃度の組合せは B. sub 芽胞浮遊液の 1.0% と 0.1% mb 液の 2.0% を添加する方法が最も適当と考えられる。

4. 重層液の pH

PM-TC を pH 5.3, 6.2, 7.0, 8.0 の M/15 磷酸緩衝液にそれぞれ溶解して重層し、重層液の阻止帯長におよぼす影響についてしらべた結果は表 7 および図 6 にしめす如くである。

酸性側で阻止帯が長く、ために最小有効濃度も低く

図 2-1. 培地による相違 (3 例平均)

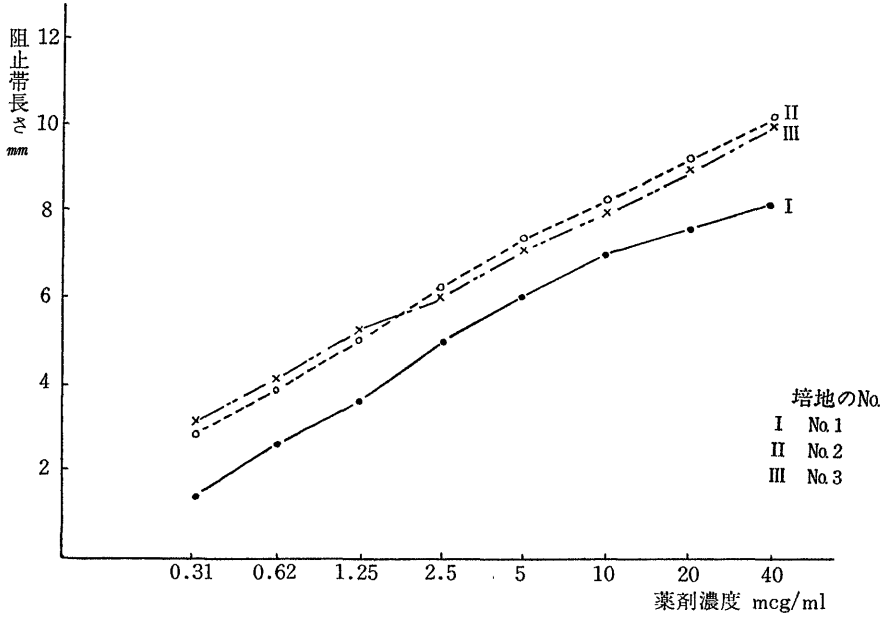


図 2-2. 培地による相違 (3 例平均)

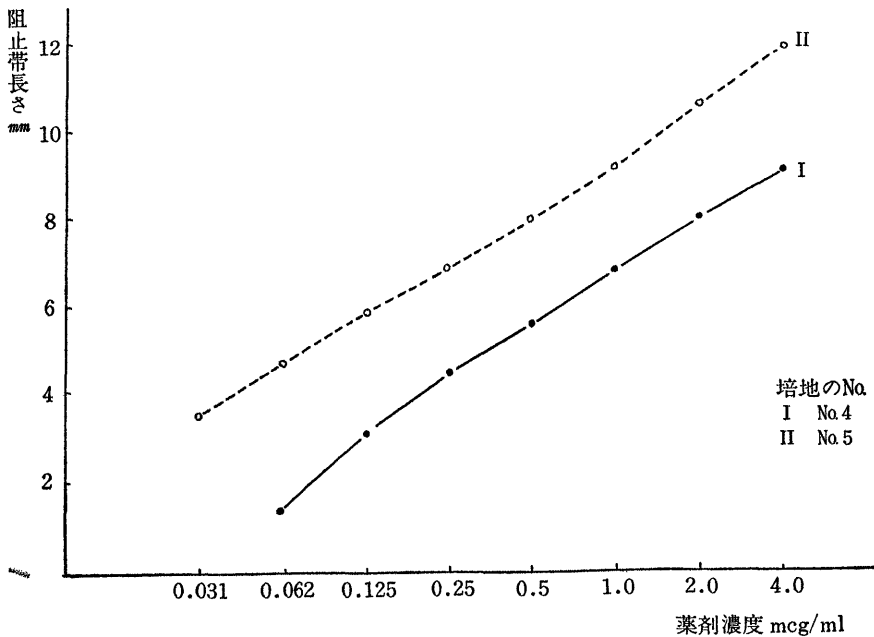


表4. 培地の pH による影響

培地の pH		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
5.8	阻止帯の長さ mm	10.4	9.6	8.8	7.8	6.8	5.8	4.6	3.6	0
		11.0	10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.0	4.0	0
		10.8	9.8	8.8	7.8	6.8	6.0	4.8	3.8	0
	平均	10.7	9.8	8.9	7.9	6.9	6.0	4.8	3.8	0
6.8	阻止帯の長さ mm	11.0	10.0	8.8	7.8	7.0	6.2	5.0	3.6	0
		(11.1)	(10.4)	(9.3)	8.2	7.4	6.6	5.3	4.1	0
		(11.2)	(10.2)	(9.2)	8.0	7.2	6.0	5.3	4.0	0
	平均	11.1	10.2	9.1	8.0	7.2	6.2	5.2	3.9	0
7.4	阻止帯の長さ mm	13.2	12.6	12.5	12.2	11.7	11.3	11.1	10.3	0
		13.6	12.2	12.0	12.0	11.0	10.8	10.6	10.2	0
	平均	13.4	12.4	12.2	12.1	11.3	11.0	10.8	10.2	0
8.8	阻止帯の長さ mm	13.8	13.9	13.6	13.5	13.8	12.9	12.4	12.1	0
		14.0	13.7	14.0	13.6	13.2	13.4	12.8	12.5	0
	平均	13.9	13.8	13.8	13.6	13.5	13.1	12.6	12.3	0

図3. 培地の pH による影響 (3例平均)

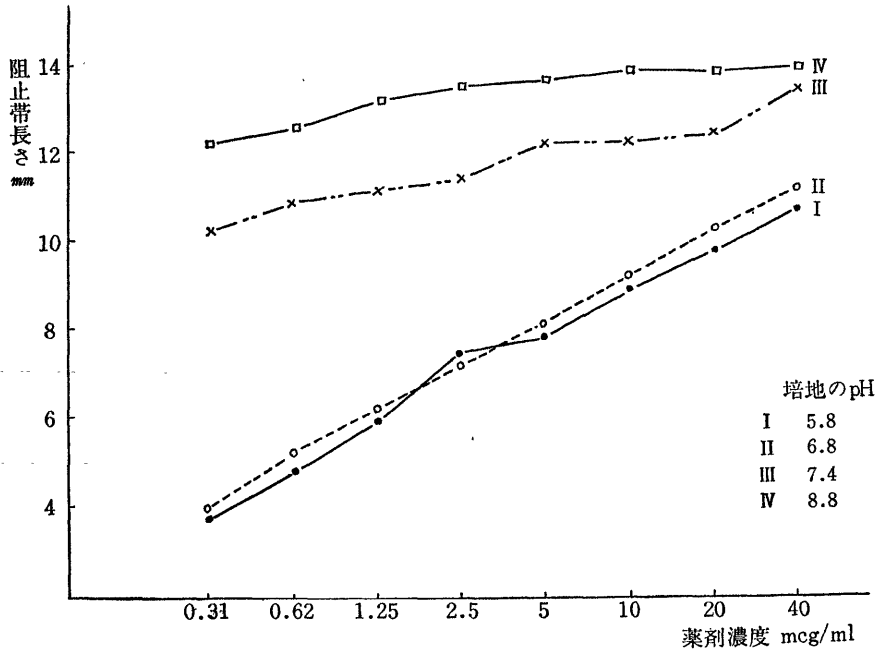
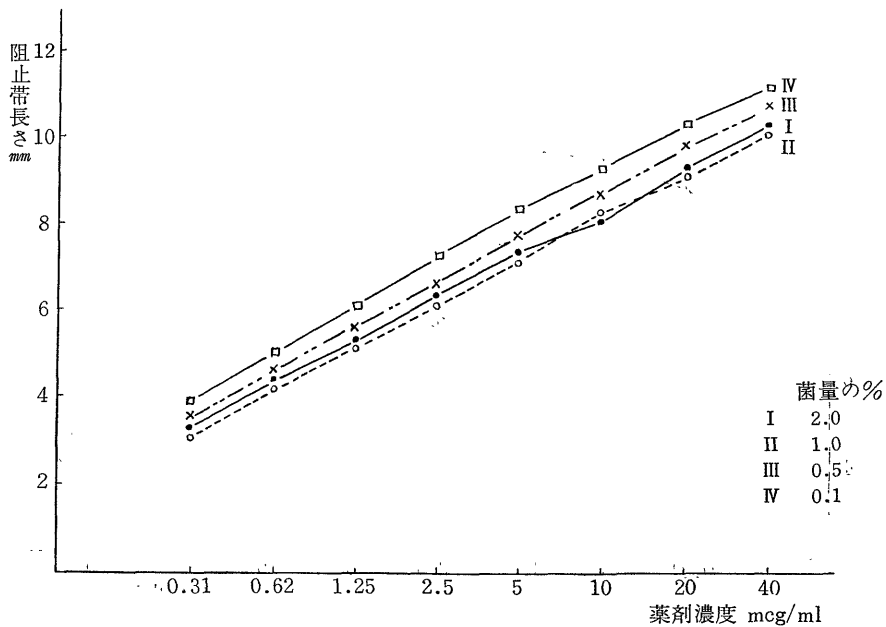


表5. 接種菌量による影響

菌量の%		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
2.0	阻止帯の長さ mm	10.4	9.4	8.0	7.4	6.4	5.0	4.6	3.2	0
		10.4	9.2	8.4	7.2	6.2	5.8	4.2	3.0	0
		9.8*	9.0*	8.0*	7.3	6.4	5.2	4.4	3.4	0
	平均	10.2	9.2	8.1	7.3	6.3	5.3	4.4	3.2	0
1.0	阻止帯の長さ mm	10.2	9.4	8.2	7.2	6.3	5.2	4.0	3.0	0
		10.2	9.2	8.2	7.0	6.1	5.3	4.2	3.2	0
		10.0	9.2	8.2	7.2	6.2	5.1	4.2	3.2	0
	平均	10.1	9.2	8.2	7.1	6.2	5.2	4.1	3.1	0
0.5	阻止帯の長さ mm	10.6	9.6	8.6	7.4	6.4	5.4	4.4	3.6	0
		(10.8)	(10.0)	(8.6)	7.6	6.6	5.6	4.6	3.4	0
		(10.8)	(9.8)	(8.8)	(8.0)	(6.6)	5.6	4.6	3.6	0
	平均	10.7	9.8	8.6	7.7	6.5	5.5	4.5	3.5	0
0.1	阻止帯の長さ mm	(11.2)	(10.4)	(9.4)	(8.4)	(7.4)	6.0	4.8	3.6	0
		(11.4)	(10.4)	(9.4)	(8.6)	7.2	6.2	5.0	4.0	0
		(11.2)	(10.4)	9.2	8.4	7.4	6.4	5.2	4.2	0
	平均	11.2	10.4	9.3	8.4	7.3	6.2	5.0	3.9	0

*境界線が太い, () は二重阻止帯像でやや不透明

図4. 接種菌量による影響 (3例平均)



なることが明らかである。ただし pH 5.3 においては阻止帯境界線がやや太くなってみにくい。これに反し pH 7.0 および 8.0 では阻止帯が短かく、かつ 2.5 mcg/ml 以下の低濃度では濃度による阻止帯長の差異がみとめられなかった。

以上の結果から pH6.2 は阻止帯も長く、かつ阻止帯境界線が最も鮮明で一線になるので重層液の pH として適していると思われる。

5. 重層法による PM-TC 検定誤差

PM-TC の静注用結晶を標準品として、10, 5, 2.5 mcg/ml の 3 濃度をつくり、それぞれについて18回実測し阻止帯長を求めた (表 8)。

その結果から 10mcg/ml と 5mcg/ml に相当する阻止帯の平均値をもって検量線を求めた。(検量線が

母数であると考え)

この検量線から 5 mcg/ml 近辺の未知濃度における18回の実測阻止帯長に対応する力価濃度について求めた結果は表 9 にしめす如くである。重層法による18回の平均力価は 4.96 mcg/ml であり、その信頼限界は1%の危険率で ± 0.14 をしめしている。また平均値における誤差は 2.8%でこの値は梅沢ら¹³⁾のペニシリン、および西村⁸⁾のエリスロマイシンにおけるカップ法による誤差 2.1%に比べほぼ同等の成績をしめしている。

これらのことから PM-TC の重層法は生物学的検定精度においてカップ法に比しならおとるところがなく、体液中における試料の低力価、および微量定量法として充分応用できるものと思われる。

表 6-1. 接種菌量と mb 濃度との関係

菌量%	mb%		PM-TC 濃度 mcg/ml									
			40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank	
1.0	2.0	阻止帯の長さ mm	10.0	9.2	8.6	7.4	6.8	4.8	4.0	3.0	0	
			10.0	9.0	7.8	7.0	6.0	5.2	4.2	2.8	0	
			10.2	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	3.8	3.0	0	
		平均	10.0	9.0	8.1	7.1	6.2	5.0	4.0	2.9	0	
1.0	1.0	阻止帯の長さ mm	9.0	8.0	7.4	6.2	5.4	4.6	3.8	2.8	0	
			9.4	8.2	7.2	6.2	5.5	4.4	3.2	2.4	0	
			9.2	8.1	7.0	6.0	5.0	4.2	3.2	2.0	0	
		平均	9.2	8.1	7.2	6.1	5.3	4.4	3.4	2.4	0	

注: mb の 0.5% は完全脱色し, mb 4% は非脱色とともに測定できない。

表 6-2. 接種菌量と mb 濃度との関係

菌量%	mb%		PM-TC 濃度 mcg/ml									
			40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank	
1.0	2.0	阻止帯の長さ mm	11.2	10.4	9.2	8.2	7.2	6.0	5.0	3.8	0	
			11.4	10.2	9.4	8.4	7.2	6.2	5.2	4.0	0	
			11.0	10.0	9.0	8.0	7.0	6.2	5.0	4.0	0	
		平均	11.2	10.2	9.2	8.2	7.1	6.1	5.0	3.9	0	
2.0	2.0	阻止帯の長さ mm	9.8	9.0	8.0	7.4	6.4	5.2	4.4	3.4	0	
			9.6	9.0	8.0	7.0	6.2	5.0	4.2	3.2	0	
			10.2	9.3	8.0	7.2	6.0	5.1	4.0	3.0	0	
		平均	9.9	9.1	8.0	7.2	6.2	5.1	4.2	3.2	0	

注: 接種菌量の 1.0, 2.0% ともに mb の 4% では非脱色で測定できない。

II. 血清中・尿中および臓器内濃度の測定法

著者は前項で PM-TC の一重層法を設定したが、これに引続いて本重層法で血液、尿および臓器などの薬剤濃度を測定する場合の実試条件を検討しそれぞれの試料に適した実施法を定めた。

1. 血清中濃度測定法

実験方法および結果

血液成分の重層法に与える影響を調べるため薬剤を血清、血漿などで希釈し、重層法を行ない、得られた標準曲線と pH 6.2 磷酸緩衝液の標準曲線から得られた標準曲線とを比較し、また培地の組成による影響についても検した。

図5-1. 接種菌量と mb 濃度との関係 (3例平均)

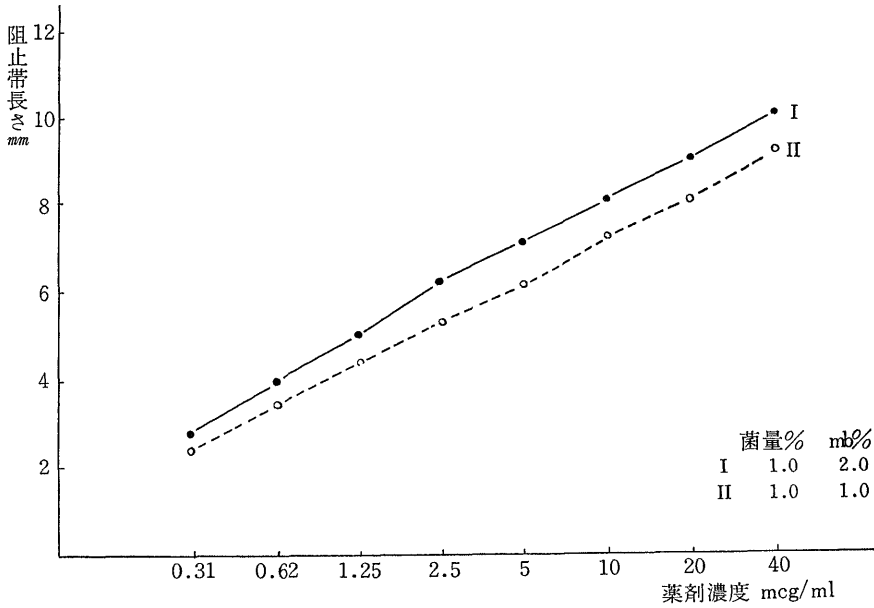


図5-2. 接種菌量と mb 濃度との関係 (3例平均)

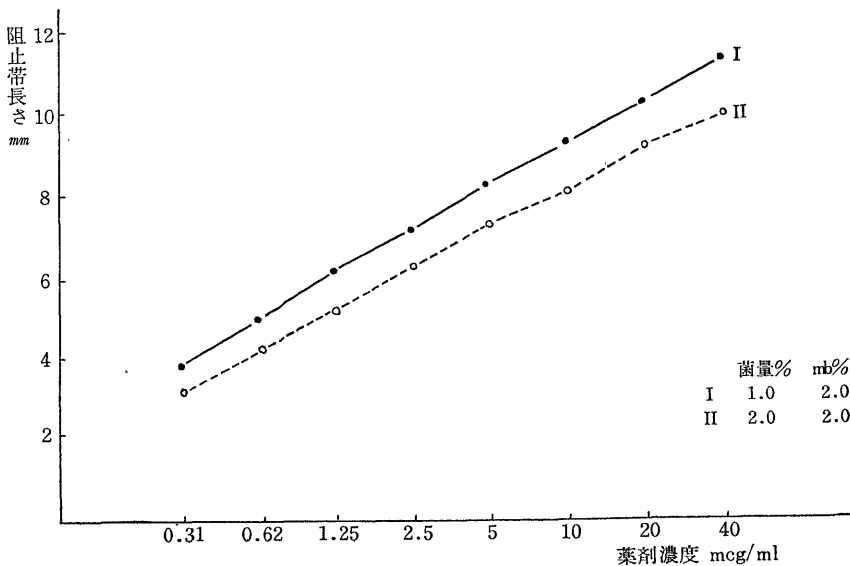


表7. 重層液の pH による影響

磷酸緩衝液のpH		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
5.3	阻止帯の長さ mm	10.8	10.0	8.8	7.8	7.0	6.2	5.2	4.2	0
		10.8	9.6	8.4	8.0	7.2	6.2	5.2	4.5	0
		10.6	9.8	8.6	8.0	7.0	6.0	5.0	4.5	0
	平均	10.7	9.8	8.6	7.9	7.0	6.1	5.1	4.4	0
6.2	阻止帯の長さ mm	9.8	9.2	8.0	7.6	6.8	5.6	4.6	3.6	0
		10.0	8.8	8.0	7.2	6.2	5.6	4.4	3.4	0
		10.2	9.2	8.0	7.6	6.4	5.4	4.2	3.2	0
	平均	10.0	9.0	8.0	7.4	6.4	5.5	4.4	3.4	0
7.0	阻止帯の長さ mm	9.2	8.2	7.4	6.8	6.2	不能	不能	不能	0
		8.8	8.0	7.2	6.6	5.6	5.5	5.0	不能	0
		9.0	8.0	7.0	6.2	5.2	4.0	4.0	3.8	0
	平均	9.0	8.0	7.2	6.5	5.6	4.7	4.5	3.8	0
8.0	阻止帯の長さ mm	9.0	8.2	7.4	6.8	6.4	6.4	6.4	6.0	0
		9.2	8.2	7.0	6.8	6.4	6.2	6.2	6.0	0
		9.1	8.6	7.2	7.0	6.1	不能	不能	不能	0
	平均	9.1	8.1	7.2	6.9	6.3	6.3	6.3	6.0	0

図6. 重層液の pH による影響 (3例平均)

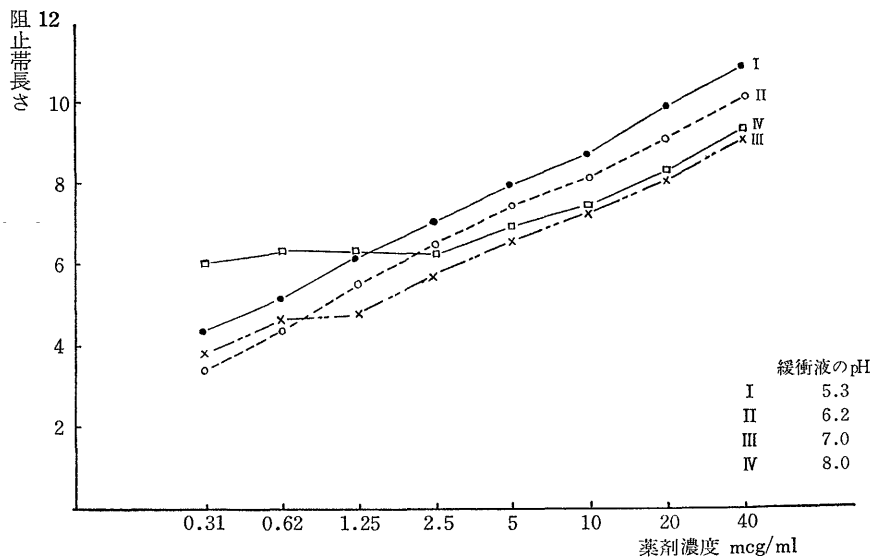


表8. 重層法による阻止帯長の比較

濃度 mcg/ml	10	5	2.5
No.			
1	8.4	7.2	6.2
2	8.35	7.2	6.2
3	8.2	7.3	6.15
4	8.2	7.2	6.1
5	8.2	7.3	6.2
6	8.2	7.2	6.2
7	8.1	7.1	6.35
8	8.2	7.2	6.3
9	8.2	7.2	6.1
10	8.2	7.15	6.2
11	8.3	7.2	6.2
12	8.0	7.3	6.15
13	8.2	7.3	6.15
14	8.3	7.15	6.2
15	8.2	7.2	6.35
16	8.2	7.35	6.3
17	8.2	7.3	6.2
18	8.35	7.2	6.2
平均	8.22	7.23	6.21

血清はつぎの如く調製した。

ヒトの静脈血を採取し直ちに脱線維素法により、または血液を 5°C で2時間放置後 3,000 r.p.m. で10分間遠心分離して血清を得た。

血漿はつぎの如くして得た。

ヒト・保存血液*を 3,000 r. p. m. 10分間遠心分離し上清液を取った。

1) 血清による標準液

血清を pH 6.2 磷酸緩衝液で 90%, 50%, 25%, 20%および10%に希釈し、標準液を調製し重層法により標準曲線を求め、同時に pH 6.2 磷酸緩衝液の標準液による標準曲線を作り比較した。

結果は表10, 11 および 図7, 8 にしめす如くである。50%以上の血清による標準液では pH 6.2 磷酸緩衝液によるそれに比べ阻止帯は明らかに短くなり、血清試料 100%をそのまま検液として測定すると相当誤差が大となることが判明した。

*ヒト・保存血液：あらかじめ滅菌した減圧採血瓶に抗凝固剤 ACD 液 30 ml を入れ、これにヒトから採血した静脈血 200 ml を ACD (クエン酸ソーダ 22g, クエン酸 8.0g, ブドウ糖 22g, 蒸留水全量 1,000 ml) 液をとおして徐々に瓶中に採血する。

表9. 検量線から得た阻止帯長の力価 (x)

No.	x	x ²
1	4.9	24.01
2	4.9	24.01
3	5.2	27.04
4	4.9	24.01
5	5.2	27.04
6	4.9	24.01
7	4.6	21.16
8	4.9	24.01
9	4.9	24.01
10	4.7	22.09
11	4.9	24.01
12	5.2	27.04
13	5.2	27.04
14	4.7	22.09
15	4.9	24.01
16	5.3	28.09
17	5.2	27.04
18	4.9	24.01
	$\Sigma x = 89.4$	$\Sigma x^2 = 444.72$

x の平均 $\bar{x} = \Sigma x / N = 89.4 / 18 = 4.967$

平方和 $S_{xx} = \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / N = 444.72 - 89.4^2 / 18 = 0.70$

不偏分散推定量 $S_x^2 = S_{xx} / N - 1 = 0.04118$

標準偏差 $S_x = \sqrt{S_x^2} = 0.203$

標準誤差 $S_{\bar{x}} = S_x / \sqrt{N} = 0.203 / \sqrt{18} = 0.048$

信頼限界 (99%の信頼率)

(1) 平均値 \bar{x} の信頼限界

$\bar{x} \pm t_{17}(0.01) S_{\bar{x}}$

t 分布表より $t_{17}(0.01) = 2.898$

$= 4.967 \pm 2.898 \times 0.048$

$= 4.967 \pm 0.1391 = 4.828 \text{ or } 5.106$

信頼限界は 4.828~5.106 mcg/ml

推定力価から限界値までの相対誤差

$\frac{0.1391}{4.967} \times 100 = 2.801\%$

(2) 個々のデータ x の信頼限界

$x \pm t_{17}(0.01) S_x$

$= x \pm 2.898 \times 0.203$

$= x \pm 0.5883$ もし $x = 4.967$ ならば

$= 4.967 \pm 0.5883 = 4.379 \text{ or } 5.555$

信頼限界は 4.379~5.555 mcg/ml

推定力価から限界値までの相対誤差

$\frac{0.5883}{4.967} \times 100 = 11.844\%$

また血清を蒸留水、0.9%食塩水および0.1%クエン酸ソーダ液で希釈して50%液となし、標準液を調製し各標準曲線を求めた結果は表12および図9に示す如くである。

この場合 0.9%食塩水および蒸留水で希釈した血清では pH6.2 磷酸緩衝液で希釈した血清と同様阻止帯は短くなった。

一方 0.1%クエン酸ソーダで希釈した血清では対照より阻止帯が長くなった。これは測定感度が高くなることを意味するから好ましい結果である。

2) 血漿による標準液

保存血液の血漿を用いて標準液を調製したもの、ならびにこれらをさらに pH 6.2 磷酸緩衝液で1.5倍、2倍に希釈したものについて標準曲線を描き pH 6.2 磷酸緩衝液の標準液による標準曲線と比較した結果は

表13および図10に示す如くである。

この場合は先の血清の結果とは異なり血漿の標準液による阻止帯の方が対照より長くなった。

すなわち測定感度が高くなるとの奇異な結果を得た。

3) クエン酸ソーダ、二重蔞酸、E.D.T.A.などの添加標準液

血漿による標準液の場合阻止帯が対照より長くなった原因として血漿を調製する際の原料の保存血液中に抗凝固剤としてクエン酸ソーダ、二重蔞酸、D.E.T.A. (エチレンジアミンテトラアセテート)などが添加されており、これらが血漿中に残存していたためではないかと考えられた。

そこで pH6.2 磷酸緩衝液にクエン酸ソーダ、二重蔞酸、あるいは E.D.T.A. をくわえた溶液で標準液

表10. 血清の濃度と阻止帯長

血清の希釈%		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
90	阻止帯長 mm	6.0	4.8	3.2	2.2	0.8	不能	不能	不能	0
		6.0	5.0	3.2	2.2	0.8	不能	不能	不能	0
		5.7	4.9	3.0	2.0	0.6	不能	不能	不能	0
	平均	5.9	4.9	3.1	2.1	0.7	不能	不能	不能	0
66.6	阻止帯長 mm	7.4	6.2	5.0	4.0	3.0	1.8	1.0	0.4	0
		7.4	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.1	0.5	0
		7.5	6.1	5.0	4.1	3.1	1.9	1.0	0.5	0
	平均	7.4	6.1	5.0	4.0	3.0	1.9	1.0	0.5	0
50	阻止帯長 mm	7.6	6.8	5.6	4.4	3.6	2.4	1.4	1.0	0
		7.5	6.7	5.6	4.6	3.4	2.4	1.4	1.1	0
		7.6	6.6	5.6	4.5	3.5	2.5	1.5	1.2	0
	平均	7.6	6.7	5.6	4.5	3.5	2.4	1.4	1.1	0
25	阻止帯長 mm	7.8	6.8	5.4	4.4	3.6	2.4	1.4	1.0	0
		7.6	6.6	5.6	4.4	3.2	2.4	1.5	0.8	0
		7.7	6.7	5.5	4.4	3.4	2.4	1.6	1.0	0
	平均	7.7	6.7	5.5	4.4	3.4	2.4	1.5	1.0	0
pH6.2磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	10.0	8.8	7.8	6.6	5.6	4.6	3.4	2.2	0
		9.8	8.8	7.8	6.6	5.6	4.4	3.2	2.1	0
		9.9	8.8	7.8	6.6	5.6	4.5	3.3	2.3	0
	平均	9.9	8.8	7.8	6.6	5.6	4.5	3.3	2.3	0

を調製し重層法を行なった結果は表14, 15および図11, 図12に示す如くである。図11に示す如くクエン酸ソーダを添加した標準液では対照に比べて阻止帯が長くなった。すなわち測定感度が高くなり、薬剤の低濃度を測定する場合に有利であると思われた。

また図12に示す如く二重蓆酸を添加しても同様に阻止帯は長くなった。この場合は阻止帯の境界線が不鮮明で測定法として採用するには不適當であり、5% E. D. T. A. を溶媒とした場合には測定が不能となった。

4) 培地にクエン酸ソーダを添加すると感度増強に有効と思われたので本重層法の規定培地にクエン酸ソーダを0.2%および0.5%添加して測定した。標準液は pH6.2 磷酸緩衝液により調製した。

結果は表16および図13に示す如くである。

クエン酸ソーダの添加により阻止帯の長さは無添加の培地より明らかに長くなり、特に低濃度でこの傾向が著しかった。

以上の結果からつぎの方法が最適と思われた。

培地: 肉エキス 5g, ペプトン 5g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000 ml, pH 5.8~6.0 (無修正), 120°C 20分間殺菌して保存, 使用時に加熱溶解し, この 100 ml に 1%硝酸ナトリウム液 (100°C 1時間殺菌したもの) 1.5 ml, 0.1%メチレン青液 (エタノール溶液) 2 ml, 20% クエン酸ソーダ (100°C 1時間殺菌したもの) 5

ml を加える。

標準液: pH 6.2 磷酸緩衝液で調製し, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mcg/ml (力価)/ml の倍数濃度系列とする。

試料 (検液): 血清を pH 6.2 磷酸緩衝液で5倍に希釈して検液とする。

その他は既報の重層法に準じて行なう。

測定濃度の算定法: 標準曲線を半対数方眼紙上で作図し検液の阻止帯から検液の薬剤濃度を算定しこれを5倍して試料中薬剤濃度とする。

2. 尿中濃度測定法

実験方法および結果

尿はヒトの自然排尿を用いこれをそのまま, あるいは混濁している場合は東洋濾紙定性 No. 2 で濾過した。この尿に殺菌の目的でキシロールを 0.5%くわえて30分間放置し, さらに0.9%食塩水, または pH6.2 磷酸緩衝液で10倍に希釈してそれぞれ薬剤系列を調製し, 重層法によりえられた曲線と尿を含まない pH 6.2 磷酸緩衝液のそれと比較した。

結果は表17, 18および図14, 図15に示す如く10%尿の標準曲線は対照の標準曲線とほとんど一致し尿の影響は現われなかった。

以上の実験結果からつぎの方法で尿中濃度測定を行なうことにした。

尿試料: キシロールを 0.5%添加し30分間放置す

表11. 血清の濃度と阻止帯長

血清の希釈%		PM-TC 濃度 mcg/ml									
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	black	
20	阻止帯長 mm	9.8	9.2	8.1	7.2	6.2	5.4	4.4	3.4	0	
		10.2	9.2	8.2	7.2	6.4	5.2	4.2	3.6	0	
		10.0	9.2	8.1	7.2	6.3	5.3	4.3	3.2	0	
	平均	10.0	9.2	8.1	7.2	6.3	5.3	4.3	3.4	0	
10	阻止帯長 mm	10.2	9.2	8.2	7.4	6.4	5.4	4.4	3.6	0	
		10.0	9.2	8.2	7.2	6.2	5.3	4.2	3.2	0	
		10.1	9.2	8.2	7.3	6.3	5.3	4.3	3.4	0	
	平均	10.0	9.2	8.2	7.3	6.3	5.3	4.3	3.4	0	
pH6.2磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	10.2	9.2	8.2	7.4	6.4	5.4	4.4	3.6	0	
		10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.4	4.4	3.5	0	
		10.2	9.2	8.1	7.0	6.3	5.4	4.4	3.5	0	
	平均	10.2	9.2	8.2	7.2	6.3	5.4	4.4	3.5	0	

る。これを pH6.2 磷酸緩衝液で10倍に希釈して被検液とする。

標準液: pH6.2 磷酸緩衝液で調製し, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mcg/ml の倍数濃度系列とする。

その他の実施法は既報の重層法に準ずる。

測定濃度の算出法: 先の血清中濃度測定法に準じ, ただしこの場合は算定値の10倍を試料中薬剤濃度とす

る。

3. 臓器内濃度測定法

実験方法および結果

臓器ホモジネートの調製: ラット (ICR, 雄, 200g 前後) を瀉血して屠殺し各臓器を取り出し水洗後秤量する。

歿で細断して, これに一定量の薬剤を含量した臓器重量値の10倍容量の0.9%食塩水をくわえ 20,000 r.p.

図7. 血清濃度による影響 (3例平均)

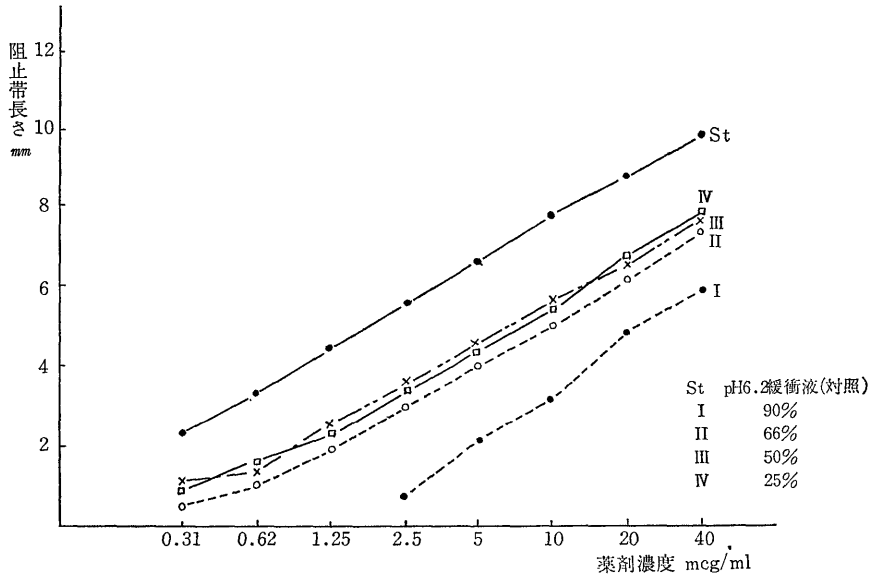


図8. 血清濃度による影響 (3例平均)

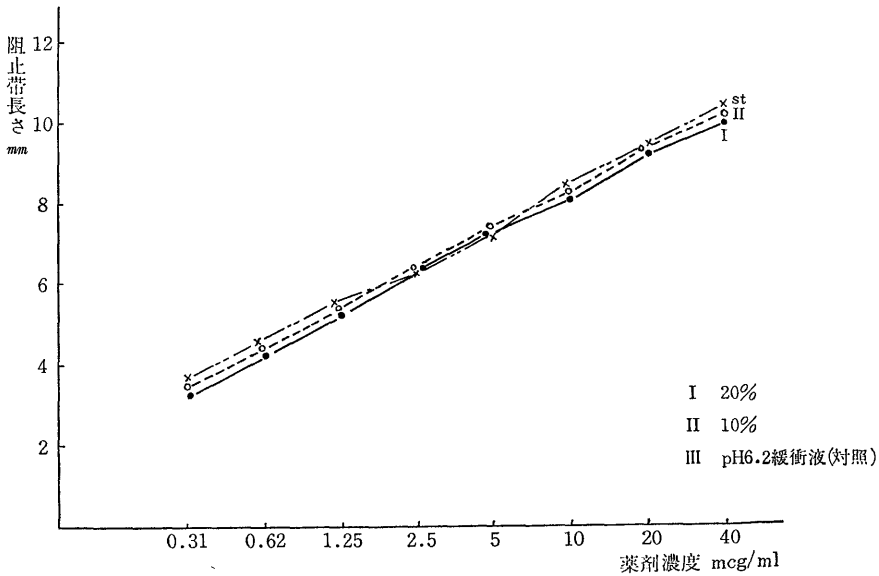


表12. 重層液の溶媒の種類と阻止帯長

重層液の溶媒		PM-TC 濃度 mcg/ml							
		20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
蒸 留 水	阻止帯長 mm	4.6	3.2	2.0	0.8	不能	不能	不能	0
		4.8	3.4	2.1	0.6	不能	不能	不能	0
		4.7	3.3	2.1	0.7	不能	不能	不能	0
	平 均	4.7	3.3	2.1	0.7	不能	不能	不能	0
pH6.2磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	8.2	7.1	6.2	5.4	4.4	3.2	2.2	0
		8.1	7.2	6.1	5.2	4.2	3.4	2.2	0
		8.2	7.2	6.2	5.3	4.3	3.3	2.2	0
	平 均	8.16	7.16	6.16	5.3	4.3	3.3	2.2	0
0.9% 食塩水	阻止帯長 mm	6.8	5.8	4.8	3.4	2.0	不能	不能	0
		6.8	5.6	4.6	3.3	2.2	不能	不能	0
		6.8	5.7	4.7	3.3	2.1	不能	不能	0
	平 均	6.8	5.7	4.7	3.3	2.1	不能	不能	0
0.1% クエン酸 ソーダ液	阻止帯長 mm	8.8	8.2	7.4	7.0	6.6	5.8	5.2	0
		9.0	8.2	7.6	7.2	6.4	5.6	4.8	0
		8.9	8.3	7.5	7.1	6.5	5.4	4.6	0
	平 均	8.9	8.2	7.5	7.1	6.5	5.6	4.8	0

図9. 重層液の溶媒による影響 (3例平均)

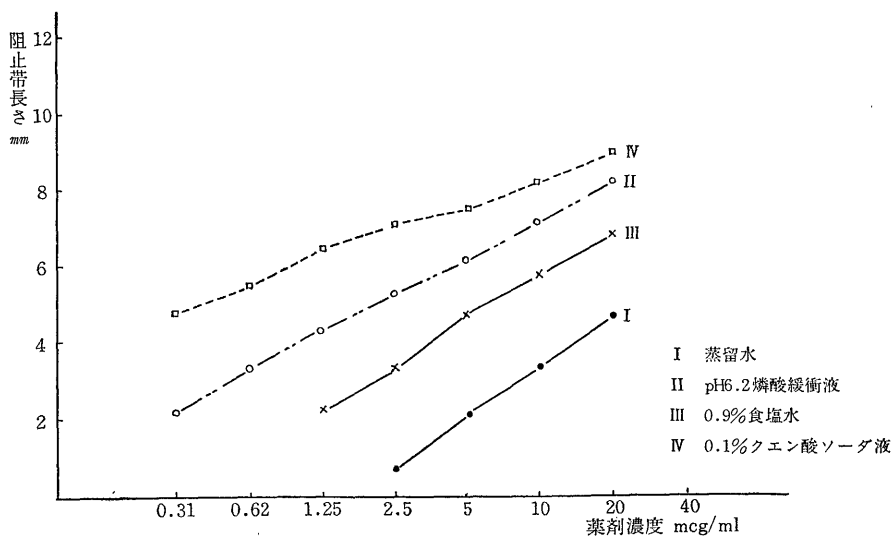
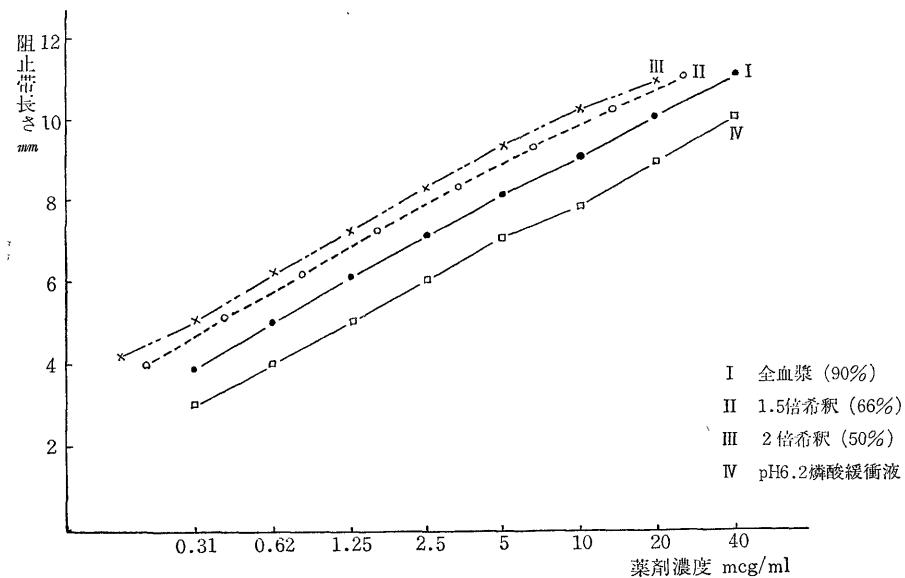


表13. 希釈血漿による阻止帯長 (保存血液O型)

血漿の希釈倍数		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
全血漿 (90%)	阻止帯長 mm	11.2	10.2	9.0	8.2	7.2	6.2	5.0	4.0	0
		11.0	10.4	9.2	8.4	7.2	6.4	5.2	4.0	0
		11.4	10.0	9.1	8.0	7.1	6.0	5.1	4.1	0
	平均	11.2	10.2	9.1	8.2	7.2	6.2	5.1	4.0	0
1.5倍 (66%)	*1	26.6	13.3	6.6	3.3	1.6	0.8	0.4	0.2	blank
	阻止帯長 mm	11.0	10.0	9.6	8.6	7.4	6.2	5.0	3.9	0
		11.2	10.4	9.4	8.2	7.2	6.0	5.2	4.1	0
		11.1	10.2	9.0	8.1	7.0	6.4	5.2	4.0	0
平均	11.1	10.2	9.3	8.3	7.2	6.2	5.2	4.0	0	
2倍 (50%)	*2	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.16	blank
	阻止帯長 mm	11.0	10.2	9.4	8.2	7.1	6.2	5.0	4.2	0
		10.8	10.2	9.4	8.4	7.2	6.2	4.8	4.1	0
		10.9	10.1	9.1	8.3	7.3	6.2	5.2	4.0	0
平均	10.9	10.2	9.3	8.3	7.2	6.2	5.0	4.1	0	
pH6.2 磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	10.2	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.2	3.2	0
		10.0	9.0	7.8	7.2	6.0	5.1	4.2	3.2	0
		10.1	9.1	7.9	7.1	6.0	5.2	4.0	3.0	0
	平均	10.1	9.0	7.9	7.1	6.0	5.1	4.1	3.1	0

*1 標準液 40~0.31μg/ml を1.5倍希釈した PM-TC 濃度
 *2 " " " 2.0倍希釈した PM-TC 濃度

図10. 血漿の影響 (3例平均)



m. 高速 Blender で2分間処理する。この方法で各臓器の10%ホモジネートをつくった。

1) 肝臓ホモジネートの回収率に与える影響

肝臓片に各種濃度の PM-TC をくわえて上記の如く10%肝臓ホモジネートをつくり、これを pH6.2 磷酸緩衝液で希釈し 0.5~1.0 ホモジネートとした。

これを被検液とし、pH 6.2 磷酸緩衝液の薬剤液を標準として重層法を行なった結果は表19および図16の如くである。

肝ホモジネートに薬剤をくわえてそのまま重層法で測定すると回収率ははなはだ悪く特に1%ホモジネートで 10 mcg/ml 以上では顕著であった。

この原因としては、被検液中の浮遊物が重層法実施中に沈降して寒天層正面をおおいこのため薬剤の拡散が阻止されるのではないか、または重層法実施中(37

°C, 18~20時間)に被検液に混在する臓器内酵素が薬剤を不活性化するのではないかなどが考えられる。

2) ホモジネート試料の前処理の効果

薬剤添加量 500mcg/g のホモジネートをつくりこれを1)と同様にして 0.25~1.0%のホモジネートに希釈し、3,000 r.p.m. 遠心分離、あるいは 100°C 1分間加熱、あるいはこれを併用するなどの前処理を行ないこれらの液を被検液として重層法を行なった結果は表20および図17に示す如くである。

回収率は1分間加熱と遠心分離の前処理を併用した被検液が最も高い。1分間加熱のみの被検液の回収率は最も悪いがこれは加熱により生じたタンパク凝固物が重層法を行なう際被検液と寒天層の境界面に沈積して被検液中の薬剤が寒天層へ移行するのを阻止するためと考えられる。

表14. クエン酸ソーダによる阻止帯長への影響

クエン酸ソーダ %		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
0.5	阻止帯長 mm	17.6	15.6	不能	13.6	不能	14.8	15.4	15.4	15.4
		16.4	16.0	15.5	14.0	14.5	14.6	15.0	15.0	15.0
		不能	不能	15.0	15.0	14.8	15.0	14.5	14.0	14.5
	平均	(17.0)	(15.8)	(15.2)	14.2	(14.6)	14.8	14.9	14.8	15.0
0.2	阻止帯長 mm	14.4	13.4	12.0	11.0	10.2	9.2	8.2	7.2	10.0
		14.6	13.5	12.2	11.0	10.1	9.0	8.1	7.2	5.0
		14.2	13.3	12.1	11.1	10.0	9.4	8.3	7.2	7.5
	平均	14.3	13.4	12.1	11.0	10.1	9.2	8.2	7.2	7.5
0.1	阻止帯長 mm	13.2	12.4	11.0	9.6	8.6	7.8	6.7	5.9	0.4
		13.4	12.2	10.8	9.8	8.6	7.6	6.7	5.6	0.5
		13.4	12.3	10.6	10.0	9.0	7.7	6.8	5.7	0.5
	平均	13.3	12.3	10.8	9.8	8.7	7.7	6.7	5.7	0.5
0.05	阻止帯長 mm	12.4	10.8	9.8	8.8	7.9	6.8	5.7	4.8	0.2
		12.6	11.0	10.0	9.0	8.0	6.9	5.8	5.0	0.3
		12.2	11.2	9.9	9.1	8.1	7.0	6.0	5.0	0.2
	平均	12.4	11.0	9.9	8.9	8.0	6.9	5.8	4.9	0.2
pH6.2 磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	10.0	9.0	8.0	7.0	6.1	5.1	4.1	3.1	0
		10.2	9.1	8.1	7.0	6.2	5.0	4.1	3.1	0
		9.9	8.9	8.0	7.0	6.0	5.1	4.0	3.2	0
	平均	10.0	9.0	8.0	7.0	6.1	5.1	4.1	3.1	0

表15. 二重蓚酸・E.D.T.A. による阻止帯長への影響

重層液の溶媒		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
1% E.D.T.A.	阻止帯長 mm	18.0	15.6	15.0	14.4	13.8	13.4	13.0	12.4	12.0
		17.4	16.2	15.2	13.8	13.8	13.6	13.0	12.4	12.0
		17.7	15.9	15.1	14.1	13.8	13.5	13.0	12.4	12.0
	平均	17.7	15.9	15.1	14.1	13.8	13.5	13.0	12.4	12.0
1% E.D.T.A. 血清 等量	阻止帯長 mm	13.2	12.4	11.4	10.5	9.5	8.6	7.4	6.5	6.4
		13.4	12.8	11.6	10.6	9.7	8.8	7.5	6.8	6.0
		13.0	12.2	11.2	10.4	9.3	8.4	7.3	6.2	6.2
	平均	13.2	12.4	11.4	10.5	9.5	8.6	7.4	6.5	6.2
5% E.D.T.A.	阻止帯長 mm	19.2	19.0	19.0	不能	不能	19.0	18.8	18.6	18.0
		19.0	19.0	18.9	19.0	18.5	19.0	18.6	18.8	不能
		19.4	18.9	19.0	不能	不能	不能	18.8	19.0	18.0
	平均	19.2	19.0	19.0	(19.0)	(18.5)	19.0	18.8	18.8	18.0
5% E.D.T.A. 血清 等量	阻止帯長 mm	14.0	13.8	12.2	11.4	10.6	不能	不能	不能	不能
		14.2	13.6	12.4	11.8	10.8	9.6	不能	不能	7.0
		14.1	14.0	12.0	11.3	10.4	不能	8.8	8.0	5.0
	平均	14.1	13.8	12.2	11.5	10.6	(9.6)	(8.8)	(8.0)	(6.0)
* 1%二重蓚酸液	阻止帯長 mm	13.6	12.4	11.4	10.5	9.4	8.4	7.4	6.2	5.6
		13.6	12.4	11.2	10.2	9.6	8.6	7.6	6.2	5.4
		13.6	12.5	11.3	10.3	9.5	8.5	7.5	6.5	5.0
	平均	13.6	12.4	11.3	10.3	9.5	8.5	7.5	6.3	5.3
1%二重蓚酸液 血清 等量	阻止帯長 mm	10.4	9.8	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.2	3.8
		10.6	10.0	9.1	8.1	7.0	6.1	5.3	4.0	3.6
		10.2	9.6	9.3	8.2	7.2	6.2	5.1	4.4	3.7
	平均	10.4	9.8	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.2	3.7
pH6.2 磷酸緩衝液	阻止帯長 mm	10.0	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	0
		10.2	9.0	8.1	7.1	6.2	5.0	4.1	3.0	0
		9.8	9.0	7.9	7.0	5.8	5.0	3.9	3.0	0
	平均	10.0	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	0

* 二重蓚酸液: 蓚酸アンモン 1.25g, 蓚酸カリ 0.75g, 蒸留水 100ml

図11. クエン酸ソーダの影響 (3例平均)

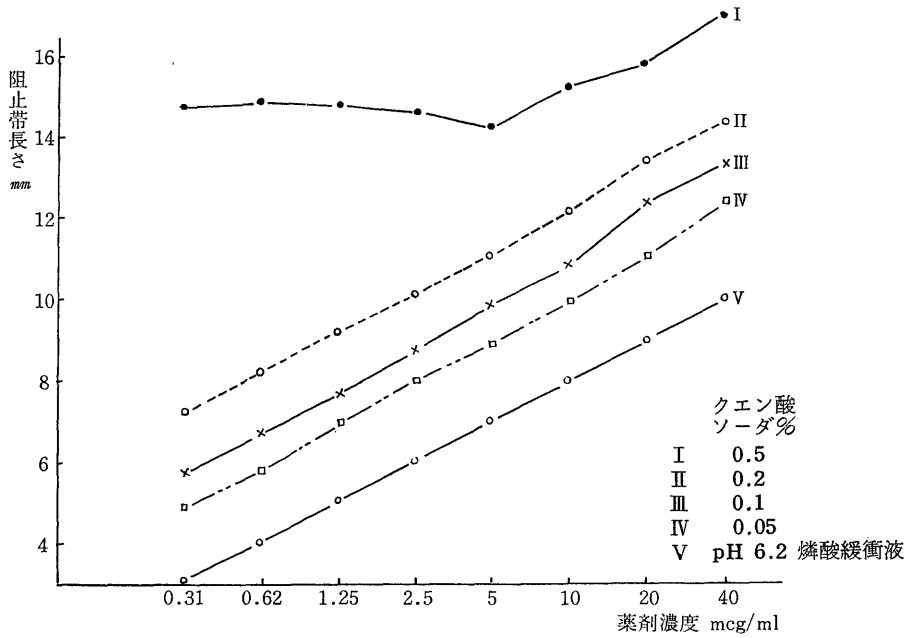


図12. E.D.T.A.・二重蓚酸の影響 (3例平均)

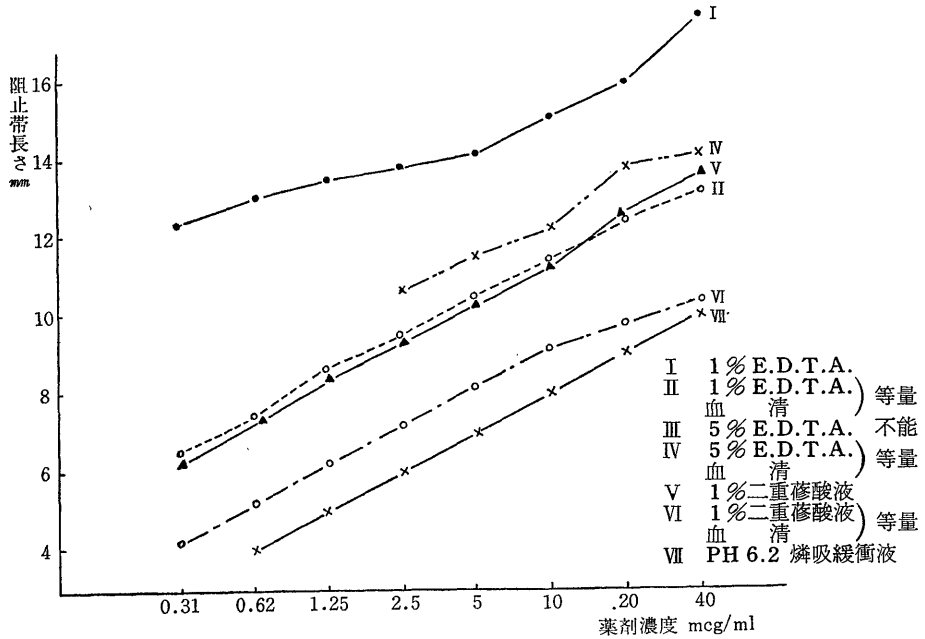


表16. 培地にクエン酸ソーダを添加した場合の阻止帯長

培地中のクエン酸ソーダ W/W	重層液 *	PM-TC 濃度 mcg/ml								
		10	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	blank
0	A	6.6	5.0	3.8	2.7	2.0	0.8	—	—	0
		6.2	5.0	3.6	2.6	1.5	0.8	—	—	0
		6.4	4.8	3.7	2.6	1.7	0.7	—	—	0
	平均	6.4	4.9	3.7	2.6	1.7	0.8	—	—	0
	B	7.0	6.0	5.1	4.1	3.1	2.1	0.8	—	0
0.2	A	10.0	8.4	7.3	6.2	5.0	3.2	1.4	0.8	0
		9.8	8.6	7.2	6.1	4.8	3.1	1.3	0.8	0
		9.9	8.5	7.2	6.1	4.9	3.1	1.3	0.7	0
	平均	9.9	8.5	7.2	6.1	4.9	3.1	1.3	0.8	0
	B	11.4	10.2	9.0	7.7	6.5	5.0	2.7	0.8	0
0.5	A	10.5	8.9	7.6	6.5	5.0	3.6	1.8	0.8	0
		10.4	8.6	7.7	6.5	5.2	3.6	1.8	0.8	0
		10.4	8.7	7.6	6.6	5.2	3.5	2.0	0.7	0
	平均	10.4	8.7	7.6	6.5	5.2	3.6	1.9	0.8	0
	B	11.7	10.7	9.7	8.6	7.3	5.6	3.2	2.0	0

* 重層液 A: 50%血清, B: pH6.2 磷酸緩衝液

図13. 培地中のクエン酸ソーダの影響 (3例平均)

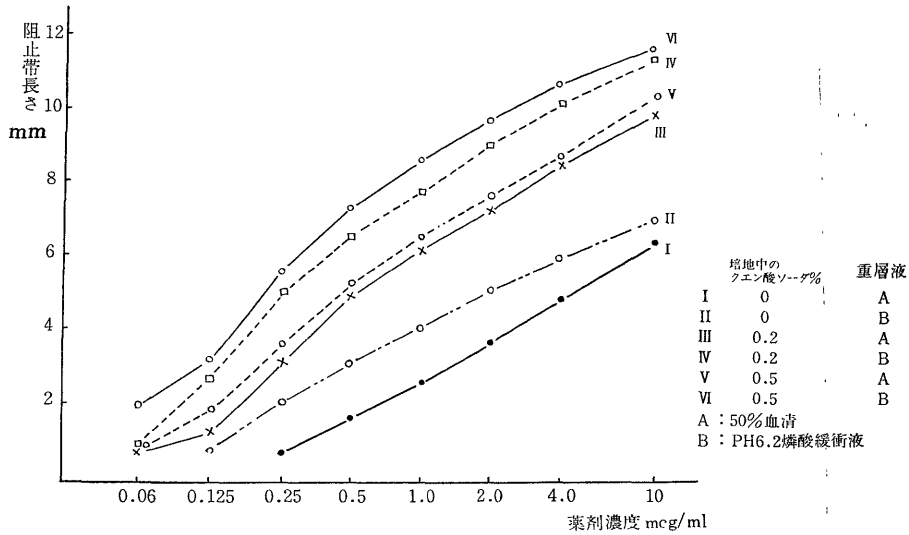


表17. 希釈液の種類と阻止帯長 (健康人尿)

希釈液の種類		PM-TC 濃度 mcg/ml								
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank
原尿を 0.9% 食塩水で10倍希釈	阻止帯長mm	8.6	7.4	6.6	6.0	5.2	4.2	3.2	2.2	0
		8.6	7.5	7.0	5.8	5.0	4.2	3.0	2.1	0
		8.7	7.5	6.8	6.2	5.1	4.2	3.4	2.3	0
	平均	8.6	7.5	6.8	6.0	5.1	4.2	3.2	2.2	0
原尿を pH6.2 緩衝液で10倍希釈	阻止帯長mm	9.6	8.6	7.4	6.6	5.7	5.0	4.0	3.1	0
		9.6	8.6	7.8	6.6	5.6	5.0	4.0	3.0	0
		9.6	8.6	7.6	6.6	5.6	5.1	4.0	3.0	0
	平均	9.6	8.6	7.6	6.6	5.6	5.0	4.0	3.0	0
* 原尿 100ml) キシロール 0.5ml) 0.9% 食塩水で10倍希釈	阻止帯長mm	8.8	7.8	7.0	6.0	5.0	4.2	3.2	2.2	0
		8.6	7.8	7.1	6.2	5.0	4.0	3.1	2.4	0
		8.7	7.8	7.0	6.1	5.1	4.1	3.0	2.0	0
	平均	8.7	7.8	7.0	6.1	5.0	4.1	3.1	2.2	0
原尿 100ml) キシロール 0.5ml) pH6.2緩衝液で10倍希釈	阻止帯長mm	9.7	9.0	7.9	6.8	5.8	5.2	4.0	3.2	0
		9.6	8.6	7.8	6.8	6.0	5.0	4.2	3.0	0
		9.8	8.8	7.7	6.6	5.7	5.1	4.1	3.0	0
	平均	9.7	8.8	7.8	6.8	5.8	5.1	4.1	3.1	0
** 標準液 (対照)	阻止帯長mm	9.6	8.6	7.7	6.8	5.8	5.0	4.1	3.2	0
		7.7	8.7	7.7	6.7	5.8	5.2	4.2	3.0	0
		9.8	8.7	7.7	6.6	5.7	5.1	4.1	3.1	0
	平均	9.7	8.7	7.7	6.7	5.8	5.1	4.1	3.1	0

* 30分静置後2回濾紙で濾過 ** pH6.2 緩衝液

図14. 尿 の 影 響 (3例平均)

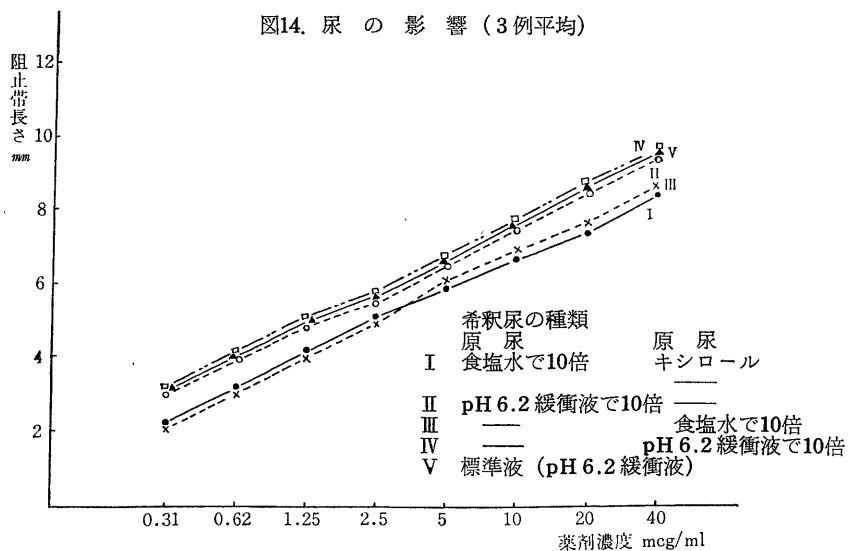


表18. 尿希釈倍数と阻止帯長

希釈倍数		PM-TC 濃度 mcg/ml									
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	blank	
*	0	阻止帯長 mm	11.4	10.7	10.0	9.3	8.6	7.9	7.2	6.5	0
			11.8	10.9	10.2	9.4	8.8	7.5	7.4	6.8	0
			11.0	10.5	10.1	9.2	8.7	7.6	7.0	6.2	0
	平均	11.4	10.7	10.1	9.3	8.7	7.6	7.2	6.5	0	
**	5	阻止帯長 mm	11.0	10.2	9.4	8.5	7.6	6.7	5.8	4.9	0
			11.2	10.4	9.3	8.7	7.6	6.9	6.0	4.8	0
			11.1	10.0	9.5	8.3	7.7	6.5	5.5	4.8	0
	平均	11.1	10.2	9.4	8.5	7.6	6.7	5.8	4.8	0	
**	10	阻止帯長 mm	10.2	9.4	8.4	7.4	6.6	5.0	4.2	3.2	0
			10.4	9.4	8.4	7.2	4.4	5.4	4.2	3.4	0
			10.3	9.5	8.5	7.3	6.2	5.2	4.2	3.3	0
	平均	10.3	9.4	8.4	7.3	6.4	5.2	4.2	3.3	0	
**	標準液 (対照)	阻止帯長 mm	10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.2	3.2	0
			10.4	9.2	8.3	7.2	6.2	5.3	4.3	3.0	0
			10.0	9.1	8.2	7.2	6.2	5.2	4.1	3.4	0
	平均	10.2	9.2	8.2	7.2	6.2	5.2	4.2	3.2	0	

* 健康人尿 500ml } キンロール 0.5ml } → 濾紙で濾過 ** pH6.2 緩衝液で希釈

図15. 尿の影響 (3例平均)

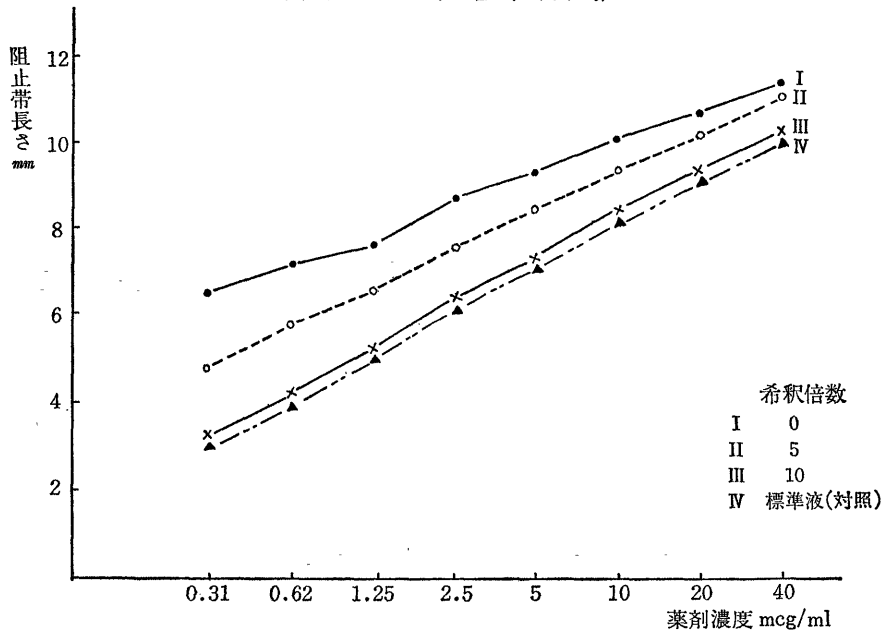
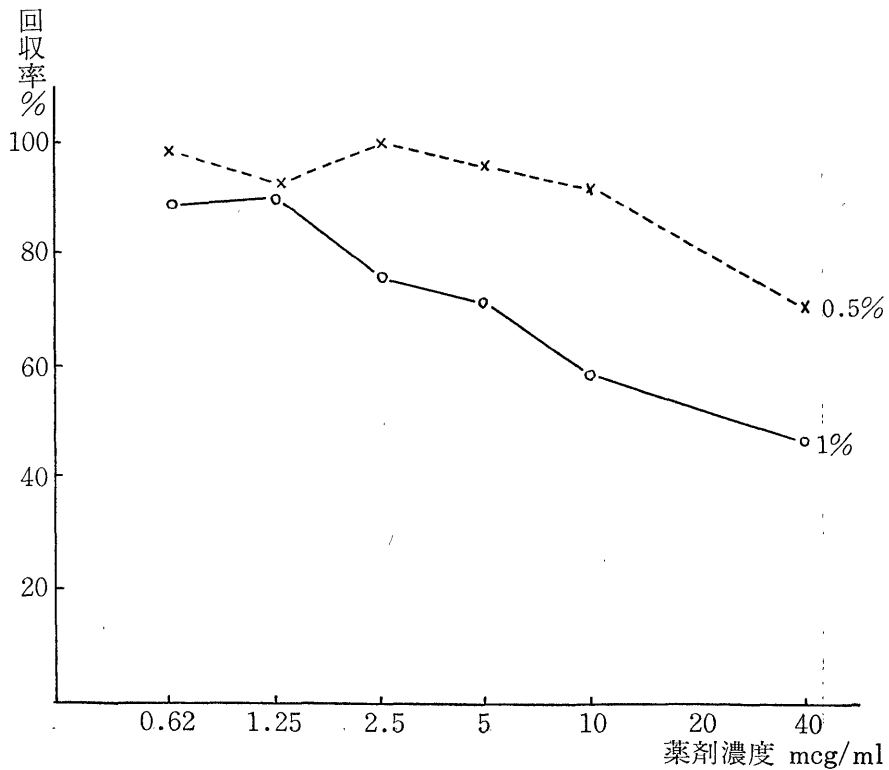


表19. 肝ホモジネート試料中の薬剤回収率 (ラット3匹の平均)

肝ホモジネート濃度 (%)		薬剤添加濃度 (計算値) mcg/ml					
		40	10	5	2.5	1.25	0.62
0.5	阻止帯長 mm	9.8	8.2	7.4	6.6	5.4	4.6
		10.0	8.4	7.4	6.4	5.5	4.5
		9.9	8.3	7.5	6.5	5.4	4.5
	平均	9.9	8.3	7.4	6.5	5.4	4.5
	計算値 mcg/ml	28.0	9.2	4.8	2.4	1.15	0.59
	回収率 %	70.0	92.0	96.0	100.0	92.0	98.3
1.0	阻止帯長 mm	9.2	7.6	7.1	6.0	5.2	4.5
		9.4	7.7	7.0	6.2	5.4	4.4
		9.3	7.8	7.0	6.1	5.6	4.4
	平均	9.3	7.7	7.0	6.1	5.4	4.4
	計算値 mcg/ml	18.5	5.8	3.6	1.9	1.15	0.54
	回収率 %	46.2	58.0	72.0	76.0	92.0	90.0

図16. 肝ホモジネート中の薬剤回収率 (ラット3匹の平均)



3) 各種臓器ホモジネートの回収率

前項2)と同じ方法で各種臓器について1%ホモジネート・薬剤濃度 10 mcg/ml, 1分間加熱遠心分離の前処理を行なった被検液の薬剤濃度を測定した結果は表21および図18にしめす如くである。

すなわち測定誤差を勘案すればどの臓器でもほとんど100%の回収率を得た。

以上の結果からつぎの方法で臓器内濃度を測定するのが最適と思われた。

被検液の調製: 臓器を秤量し鉢で細断しこれに試料

重量 (g) の10倍容量 (ml) の 0.9% 食塩水を加え 20,000 r.p.m. 高速 Blender で2分間処理してホモジネートする。

これを pH6.2 磷酸緩衝液で10倍希釈する。沸騰水中に1分間加熱する。3,000 r.p.m. で10分間遠心分離し上清液を被検液とする。

標準液: 血清中濃度測定法の時に準ずる。その他は既報の重層法に同じ。

測定濃度の算出法: 先の血清中濃度測定法と同様であるが図上算定値の100倍が試料中薬剤濃度となる。

表20. 前処理した肝ホモジネート中の薬剤の回収率 (ラット3匹の平均)

前 処 理	薬剤添加量 mcg/ml		ホモジネート濃度		
			1 %	0.5%	0.25%
無 処 理	500	阻止帯長 mm	7.3	6.2	5.2
			7.2	6.2	5.0
			7.1	6.2	5.1
		平 均	7.2	6.2	5.1
		計算値 mcg/ml 回収率 %	4.2 84.0	2.1 84.0	0.96 76.8
遠 心 分 離 液 ・ 上 清 液	500	阻止帯長 mm	7.2	6.6	5.4
			7.4	6.4	5.4
			7.3	6.5	5.4
		平 均	7.3	6.5	5.4
		計算値 mcg/ml 回収率 %	4.5 90.0	2.5 100.0	1.2 96.0
1 分 間 加 熱 ・ 遠 心 分 離	500	阻止帯長 mm	7.4	6.4	5.4
			7.4	6.6	5.5
			7.4	6.5	5.6
		平 均	7.4	6.5	5.5
		計算値 mcg/ml 回収率 %	4.9 98.0	2.5 100.0	1.25 100.0
1 分 間 加 熱	500	阻止帯長 mm	6.2	5.4	5.3
			6.3	5.4	5.2
			6.4	5.5	5.1
		平 均	6.3	5.4	5.2
		計算値 mcg/ml 回収率 %	2.3 46.0	1.15 46.0	1.0 80.0

考 察

血液、尿その他生体内の抗菌性物質を多数の標本についてすみやかに測定することを臨床その他の研究においてしばしば要求されるものである。

これらの定量にあたり、1)少量の検体で可能、2)微量まで測定できる、3)手技が比較的簡単である、4)培養基が少ないなどの利点から重層法が便利である。

しかしこれらを実施するにあたって i) 酸素供給体を培地に加える、ii) 阻止帯を明瞭にするための指示薬と菌量との組合せを調整する、iii) 体液に影響の少ない敏感な菌種を用いるなどの考慮がはられねばならない。

接種菌量と指示薬濃度との比が適当であれば両者は一致して阻止帯境界線が鮮明になるが指示薬が多すぎると境界線が不鮮明かつ阻止帯像の幅が太くなって測定困難である。

これらの原因について鳥居・川上⁴⁾は細菌の産生した溶血毒、または還元物質が上方に拡がるためではなからうかとしている。

重層法で微量の体液内濃度を鮮明にするためには小嶋ら⁶⁾は CTC および OTC の実験で培地の pH、

菌量、重層液の pH などを考慮すれば B. sub. の芽胞浮遊液で 0.05 mcg/ml まで可能であるとし、片桐ら⁷⁾も B. sub.-1219 を被検菌とし、メチレン青液の 1%、および菌液の 0.5% で重層し 11~17 時間培養することにより良好な結果を得るとしている。

また TC の Pfizer 標準法によれば B. sub.-9634 を用い試料を 0.1 N 塩酸で溶解して基準液とし、これを血清緩衝液を用いて 1.0~0.02 mcg/ml に希釈して測定している。

著者も培地の組成などを種種変えて検討し 0.2% および 0.1% 普通寒天培地で PM-TC の標準系列 4~0.03mcg/ml の低濃度まで測定できることを知った。

しかしこの方法は菌の活性度と指示薬濃度、および培養条件などからしばしば阻止帯のあらわれぬこともあったのでやむなく安定した阻止帯をしめす K 培地法を採用したものでこの点体液の影響をうけない菌種の探索、培地の組成改良、試料の希釈法などについてさらに検討を要するものである。

小 括

Pyrrolidinomethyl tetracycline nitrate の定量法として重層法を採用し、基礎的条件を検討するとともに血清・尿および臓器による影響をしらべた。

図17. 肝ホモジネート中の薬剤回収率 (ラット 3 匹の平均)

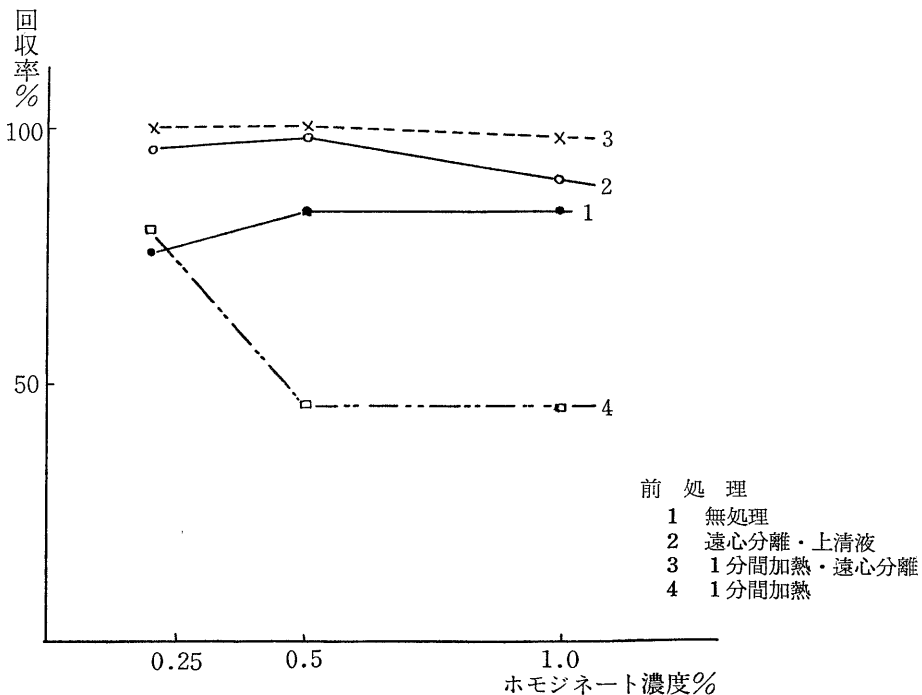
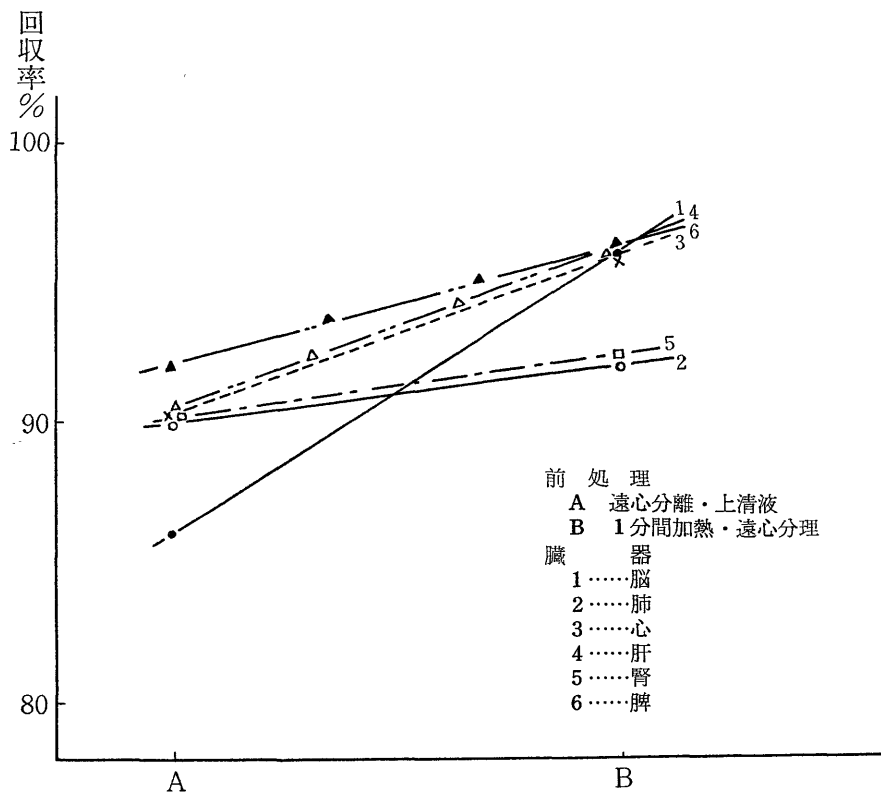


表21. 各種臓器ホモジネートの回収率 (ラット3匹の平均)
(1%ホモジネート, 10mcg/ml 液, そのまま・加熱処理)

前 処 理		臓 器 の 種 類					
		脳	肺	心	肝	腎	脾
遠心分離・ 上清液	実測値 mcg/ml	8.8	9.0	9.2	9.1	9.4	9.4
		8.6	9.0	9.0	9.0	9.0	9.2
		8.4	9.0	8.8	8.9	8.6	9.0
	平均	8.6	9.0	9.0	9.0	9.0	9.2
	回収率 %	86	90	90	90	90	92
1分間加熱・ 遠心分離	実測値 mcg/ml	9.6	9.3	9.7	9.6	9.2	9.7
		9.4	9.2	9.5	9.8	9.3	9.6
		9.2	9.1	9.6	9.4	9.1	9.5
	平均	9.6	9.2	9.6	9.6	9.2	9.6
	回収率 %	96	92	96	96	92	96

図18. 各種臓器ホモジネートの回収率 (ラット3匹の平均)



1. 枯草菌 ATCC-6633 を被検菌として最小濃度 0.31 mcg/ml まで測定可能なことを知った。

2. 0.5% 普通寒天培地 (無修正, pH 6.0) および試料の希釈液として pH 6.2 磷酸緩衝液を使用したほうが阻止帯が長く, かつ阻止帯境界線が鮮明であった。

3. 接種菌量と指示薬との関係は枯草菌芽胞浮遊液の 1%, 0.1% メチレン青液の 2%, および 2% 硝酸ナトリウム液の 1% を添加したほうが阻止帯境界線が一線になって明瞭であった。

4. 本法による検定の平均信頼限界は 1% の危険率で ± 0.1391 であり平均値に対する誤差は 2.8% であった。

5. 体液の阻止帯におよぼす影響が大で血清および臓器では短かく尿では長くあらわれた。

したがって血清中濃度は抗凝固剤の入らない血清を用いこれを pH 6.2 磷酸緩衝液で 5 倍希釈して測定し, 尿中濃度は尿にキシロールを 0.5% 添加して pH 6.2 磷酸緩衝液で 10 倍希釈して測定した。

また臓器内濃度は細断した試料を 0.9% 食塩水および pH 6.2 磷酸緩衝液で 100 倍希釈しこれを沸騰水中に加熱・遠心分離した上清液について測定した。

6. 血清中および臓器内濃度測定培地には既報の重層培地に 20% クエン酸ソーダ液 5 ml の添加したものをを用いた。

〔II〕 PM-TC 静注による血清中濃度

本章において PM-TC の静注による血清中濃度を健康年長児について測定した成績を述べる。

実験方法

1. 標準液の調製

一定量の PM-TC を 5ml の蒸留水に溶解しついで pH 6.2 磷酸緩衝液をくわえて 100 mcg/ml の基準原液をつくる。

この基準原液をさらに 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mcg/ml に倍数希釈して標準系列液とした。

2. 使用薬剤および投与量

市販静注用 PM-TC (ロットを統一する) および静注用 Tetracycline-Hcl (以下 TC と略) を使用し, PM-TC 250 mg を滅菌蒸留水, および 5% ブドウ糖液 20~40 ml に溶解したものを 1 回量とし 3~5 分間をかけて徐徐に静注した。

また TC は多くは点滴静注が試みられるが PM-TC と同容量, 同方法でただ注入時間を 5 分以上かけてゆるやかに静注された。一方点滴静注では入院患児に生食水, 5% ブドウ糖液, および総合アミノ酸補液などの 500 ml に PM-TC の 250 mg を溶解したものを 1 回量とし注入速度 60~90 分をかけて点滴注入された。

表22. PM-TC 250mg (力価) 1回静注後の血清濃度 (健康年長児 10例)

症 例	性別	Pro mg/kg	血 清 中 濃 度 (mcg/ml)							
			15分	30分	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	
1	♂	4.0	8.8	6.2	3.8	2.5	1.9	1.5	1.0	
2	♂	4.0	10.3	6.7	3.3	3.0	2.4	2.0	1.4	
3	♀	5.0	10.1	7.5	4.3	3.1	2.6	2.0	1.3	
4	♂	3.6	8.8	6.0	3.9	3.3	2.2	1.6	1.3	
5	♀	4.5	9.5	6.0	3.7	3.0	2.3	1.8	1.2	
6	♀	4.5	13.6	6.8	4.6	3.6	2.5	2.0	1.2	
7	♂	4.3	9.8	6.6	4.1	3.7	2.4	1.7	1.4	
8	♂	4.0	8.8	7.6	5.2	3.3	2.6	1.9	1.5	
9	♀	4.5	11.05	6.5	2.5	1.7	1.4	0.95	0.8	
10	♂	4.0	10.5	7.6	3.0	2.0	1.7	1.2	1.0	
平均値		4.24	10.12	6.75	3.84	2.92	2.20	1.66	1.21	
標準偏差		± 0.39	± 1.71	± 0.58	± 0.78	± 0.66	± 0.31	± 0.56	± 0.22	
血清中の濃度の範囲			8.8 } 13.6	6.0 } 7.6	2.5 } 5.2	1.7 } 3.6	1.4 } 2.6	0.95 } 2.0	0.8 } 1.5	

3. 試料の作製

静注および点滴静注後の採血は薬液注入後15分, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, および10時間とした。採取血液(通常10ml)を冷蔵庫にやく2時間放置し凝固させた後, 3,000 r.p.m. で5分間遠心分離して血清をえた。血清は測定直前まで凍結しておき, また再実験の場合を考慮して力価検定後も血清を凍結保存した。

血清試料は希釈しないで, あるいは pH6.2 磷酸緩

衝液で5倍希釈したものを使用して既報の重層法による血清中濃度測定法に準じて測定した。なお TC の定量は PM-TC の重層法に準じて行なった。

実験成績

注射後における各経過時間の測定値は表22, 23, 24 および図19, 20, 21, 22にしめす如くである。

1. 投与後の血清中濃度

表23. TC 250mg (力価) 1回静注後の血清中濃度 (健康年長児3例)

症 例	性別	Pro mg/kg	血 清 中 濃 度 (mcg/ml)							
			15分	30分	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	
1	♂	4.1	9.5	5.5	2.65	1.8	0.9	0.55	0.35	
2	♀	4.5	11.5	6.45	3.2	2.25	0.75	0.4	0.28	
3	♂	4.0	8.6	4.3	2.4	1.5	0.82	0.6	0.4	
平均値		4.2	9.86	5.41	2.75	1.85	0.82	0.52	0.34	
標準偏差			±1.48	±1.08	±0.41	±0.37	±0.075	±0.104	±0.060	
血清中の濃度の範囲			8.6 } 11.5	4.3 } 6.45	2.4 } 3.2	1.5 } 2.25	0.75 } 0.9	0.4 } 0.6	0.28 } 0.4	

表24. PM-TC 250mg (力価) 1回点滴静注後の血清中濃度 (入院患児13例)

症 例	性別	Pro mg/kg	血 清 中 濃 度 (mcg/ml)								添加補液 500ml
			15分	30分	1時間	2時間	4時間	6時間	8時間	10時間	
1	♀	4.0	8.4	6.9	6.3	4.56					(1)
2	♀	7.1	10.5	5.64	4.64	2.22					(3)
3	♂	4.0	7.5	6.6	5.4	3.0					(2)
4	♂	5.0	9.0	6.6	5.4	3.0					(2)
5	♀	7.5	10.8	7.5	6.3	4.8					(1)
6	♂	4.5	8.4	7.5	4.8	1.5					(3)
7	♀	5.0			5.5		4.0	3.9	2.4		(2)
8	♂	4.0			3.7		2.8	2.6	1.6		(2)
9	♀	5.0			3.9		2.0	1.7	1.2		(3)
10	♀	4.6			4.2		2.65	1.5	1.7		(1)
11	♂	4.0			5.6		3.0	2.0	2.2		(3)
12	♂	3.6			2.8		1.6	1.0	1.1		(3)
13	♂	5.7			5.85		2.85	2.55	1.8		(1)
平均値		4.92	9.1	6.79	4.94	3.18	—	2.7	2.19	1.71	
標準偏差		±1.21	±0.41	±0.71	±1.07	±1.29	—	±0.77	±0.96	±0.48	
血清中の濃度の範囲			8.4 } 10.8	5.64 } 7.5	2.8 } 6.3	1.5 } 4.8		1.6 } 4.0	1.0 } 3.9	1.1 } 2.4	

注: (1)…5%ブドウ糖液 (2)…総合アミノ酸液 (3)…リンゲル氏液

図19. PM-TC の血清中濃度 (250mg 1回静注健康児) (10例の平均)

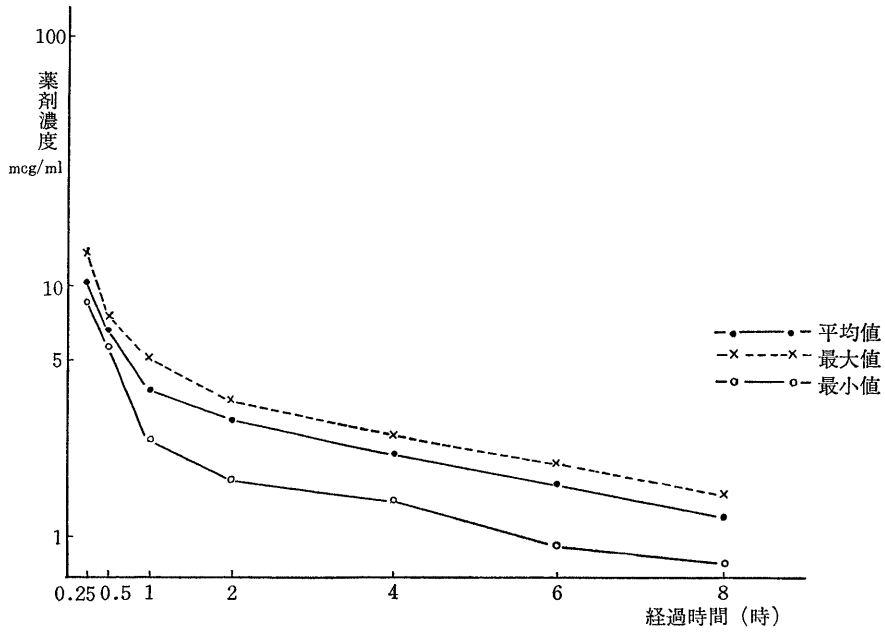


図20. TC の血清中濃度 (250mg 1回静注健康児) (3例の平均)

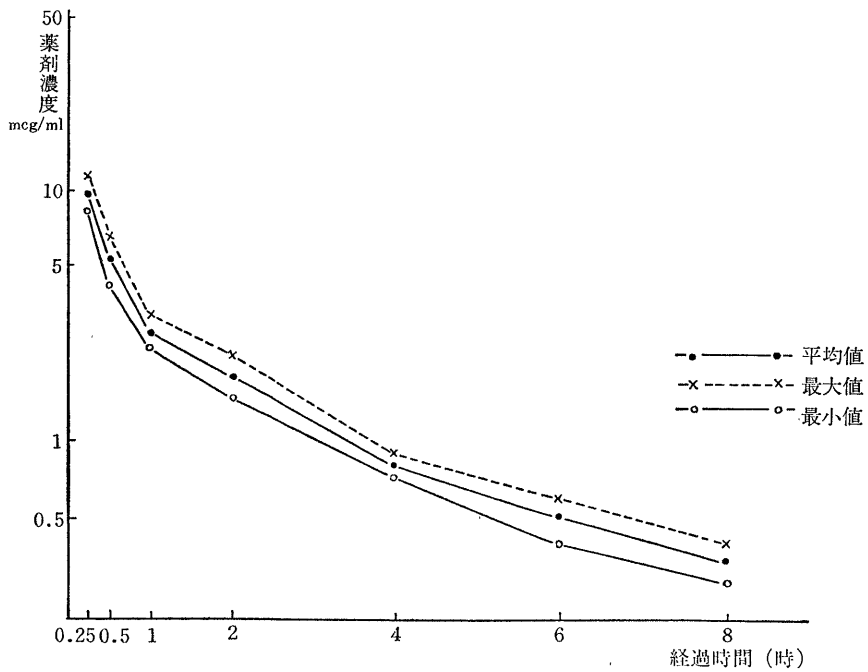


図21. PM-TC の血清中濃度 (250mg 1回点滴静注入院患児) (13例の平均)

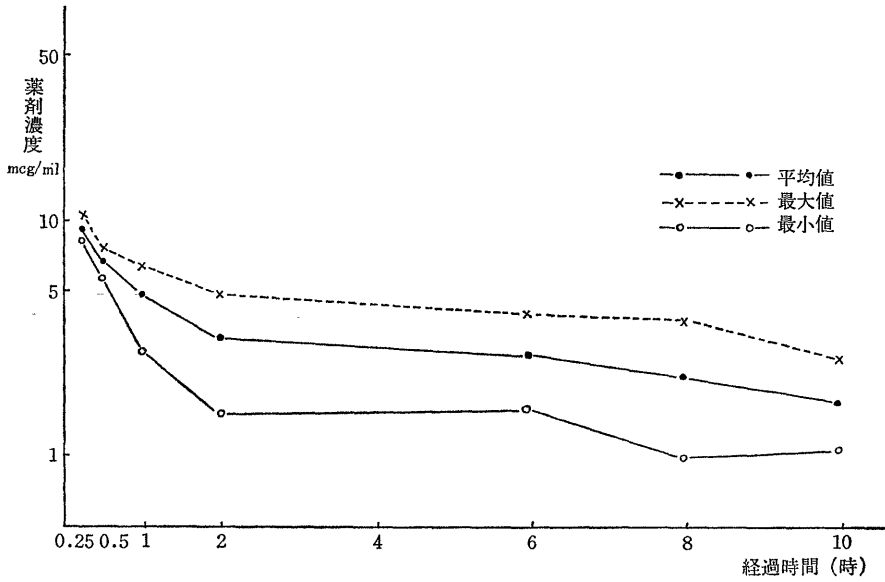
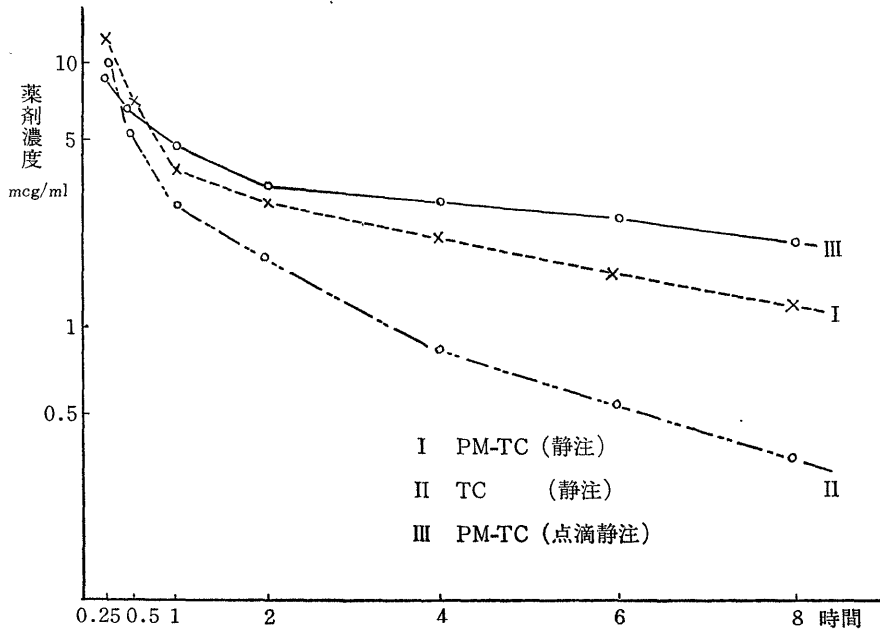


図22. 1回量 250mg 投与の PM-TC (静注) TC (静注) PM-TC (点滴静注) の血清中濃度



投与15分後における血清中濃度では急速な濃度上昇がみられ、PM-TC 静注で平均 10.1 mcg/ml, TC で 9.8mcg/ml の高い値をしめした。一方 PM-TC の点滴静注では 9.1 mcg/ml とほぼ前者に匹敵する値をしめした。これら15分後における3者の値はすべて血清中濃度のピークである。

その後時間の経過につれて濃度曲線は図4の如くPM-TC 静注ではゆるやかに、TC 静注では4時間以後に急速に低下する傾向をしめした。

なお経過8時間後における3者の血清中濃度はPM-TC 静注で 1.2 mcg/ml, TC静注で 0.34 mcg/ml, PM-TC 点滴静注で 2.5mcg/ml をしめした。

これをPM-TC 静注の力価を1としてみると、TC は約1/3になるが、逆に PM-TC 点滴静注では2倍強の高い値になっている。

2. 血清中濃度獲得性

著者はPM-TC の性格判定の一資料として唐崎¹²⁾らがポリエー系抗生物質に採用している算出法にならって血清中濃度獲得性を算出した。

血清中濃度獲得性とは注射直後の血清中濃度の計算値に対する比率を指す。この計算値は薬剤投与量をヒトの流血量で除した値でしめされる。この比率は当然100より低い値をしめすものでその差が血液や臓器により不活性化されたり、あるいは臓器と結合した薬剤量にあたるわけである。そこでPM-TC の3例とTC の2例について注射終了5分後の濃度を実測し、その値について血清中濃度獲得性を求めると表25の如くである。

獲得率の平均値ではPM-TC 30.9%, TC 27.1%で両者の初期血清中濃度獲得性はあまり良い値ではない。また表22, 23, 24における血清中濃度の実測値から注射終了後の15分, 30分, 1時間および2時間値についてPM-TC の10例とTC の3例についてそれぞれ同様の方法で算出すると表26, 27, 28の如くである。

静注時における初期獲得性ではPM-TC とTC とはほとんど差がなかったが1時間値以後においてTC がやや悪い結果をしめした。一方PM-TC 点滴静注による6例の平均値では初期濃度において静注時に比しやや低かったが1~2時間値では血清中濃度の低下率がゆるやかなためほとんど差がなかった。

3. 血清中濃度の持続性

1) 生物学的半減期

静脈注射された薬物は組織に分配され平衡に達するまでに若干の時間を必要とし、あとは直線的に低下する。

すなわち各濃度のプロットが一直線上にならぶようになった時には、その分配、平衡が完了したことをしめすものである。

著者はPM-TC の持続性判定の一資料として表1, 2, 3にもとめられた血清中濃度測定値から、ヒトにおけるPM-TC およびTC の生物学的半減期ならびに血清中からの消失速度定数を求めた。

血清中濃度・半減期計算法

Schanker ら¹³⁾により多くの薬物は一次反応式にしたがって吸収され、また血清中からの消失(排泄)も一次反応式にしたがうことが明らかにされている。よって化学反応での一次式は次のようになる。

$$-\frac{dc}{dt} = KC \dots\dots\dots(1)$$

$$\ln C = -Kt + \ln Co \dots\dots\dots(2)$$

$$\log C = -\frac{K}{2.303}t + \log Co \dots\dots\dots(3)$$

$$t_{1/2}^* = 0.693/K \dots\dots\dots(4)$$

$$K = 0.693/t_{1/2}^* \dots\dots\dots(5)$$

Co: 注射直後の理論的血清中濃度

c: 血清中濃度

t: 経過時間

K: 血清中からの消失の速度定数

* 血清中濃度がCからその半分の c/2 になるまでの時間。

t_{1/2} およびKの値を求める計算法については次の簡単な方法をとった。

生物学的半減期の計算

種 類	スタートの時間	実 測 (時)	時間軸の移動 (時)	血清中濃度 (mcg/ml)	血清中濃度 (%)
PM-TC 静注	2	2	0	2.92	100
		4	2	2.2	75.3
		6	4	1.66	56.8
		8	6	1.21	41.8
T C 静注	2	2	0	1.85	70
		4	2	0.82	44.3
		6	4	0.52	28.1
		8	6	0.34	18.3
	4	4	0	0.82	100
		6	2	0.52	63.4
PM-TC 点滴静注	6	6	0	3.0	100
		8	2	2.19	73
		10	4	1.71	57

上記の時間に対して血清中濃度%の対数をプロットすると図23, 24, 25にしめす如くである。図上より50%に相当する時間 t_{1/2} が求められ、この t_{1/2} より(5)

表25. 静注後5分における血清中濃度 (健康児)

種類	性別	投与量 Pro mg/kg	血清中濃度 mcg/ml	計算血清中濃度 mcg/ml*	獲得性 %
PM-TC (静注)	♂	4.0	16.5	50	33.0
	♂	4.1	15.8	51.2	30.8
	♂	4.0	14.5	50	29.0
	平均	4.03	15.6	50.4	30.9
T C (静注)	♂	4.0	14.0	50	28.0
	♂	4.4	14.5	55	26.3
	平均	4.2	14.25	52.5	27.1

* ヒトの流量量を 80ml/kg とした場合の投与直後の計算血清中濃度

表26. PM-TC 静注後の血清中濃度獲得性

薬剤投与量 mg/kg	計算血清中濃度 mcg/ml*	血清中濃度 mcg/ml							
		15分 mcg/ml	獲得性 %	30分 mcg/ml	獲得性 %	1時間 mcg/ml	獲得性 %	2時間 mcg/ml	獲得性 %
4.0	50	8.8	17.6	6.2	12.4	3.8	7.6	2.5	5.0
4.0	50	10.3	20.6	6.7	13.4	3.3	6.6	3.0	6.0
5.0	62.5	10.1	16.1	7.5	12.0	4.3	6.8	3.1	4.9
3.6	45	8.8	19.5	6.0	13.3	3.9	8.6	3.3	7.3
4.5	56.2	9.5	16.9	6.0	10.6	3.7	6.6	3.0	5.3
4.5	56.2	13.6	24.1	6.8	12.1	4.6	8.2	3.6	6.4
4.3	53.7	9.8	18.2	6.6	12.2	4.1	7.6	3.7	6.8
4.0	50	8.8	17.6	7.6	15.2	5.2	10.4	3.3	6.6
4.5	56.2	11.05	19.6	6.5	11.5	2.5	4.4	1.7	3.0
4.0	50	10.5	21.0	7.6	15.2	3.0	6.0	2.0	4.0
平均4.24	53	10.12	19.0	6.75	12.7	3.84	7.2	2.92	5.5

* ヒトの流量量を 80ml/kg とした場合の投与直後の計算血清中濃度

表27. TC 静注後の血清中濃度獲得性

薬剤投与量 mg/kg	計算血清中濃度 mcg/ml*	血清中濃度 mcg/ml							
		15分 mcg/ml	獲得性 %	30分 mcg/ml	獲得性 %	1時間 mcg/ml	獲得性 %	2時間 mcg/ml	獲得性 %
4.1	51.2	9.5	18.5	5.5	10.7	2.65	5.2	1.8	3.5
4.5	56.2	11.5	20.4	6.45	11.4	3.2	5.7	2.25	4.0
4.0	50.0	8.6	17.2	4.3	8.6	2.4	4.8	1.5	3.0
平均4.2	52.4	9.86	18.7	5.41	10.2	2.75	5.2	1.85	3.5

* ヒトの流量量を 80ml/kg とした場合の投与直後の計算血清中濃度

式からKが求められる。すなわち PM-TC 静注では $t_{1/2}$ = 約 4.7 時間, $K = 0.147 \text{ hr}^{-1}$, TC 静注では $t_{1/2}$ = 約 3 時間, $K = 0.23 \text{ hr}^{-1}$, PM-TC 点滴静注では $t_{1/2}$ = 約 5 時間, $K = 0.138 \text{ hr}^{-1}$ である。

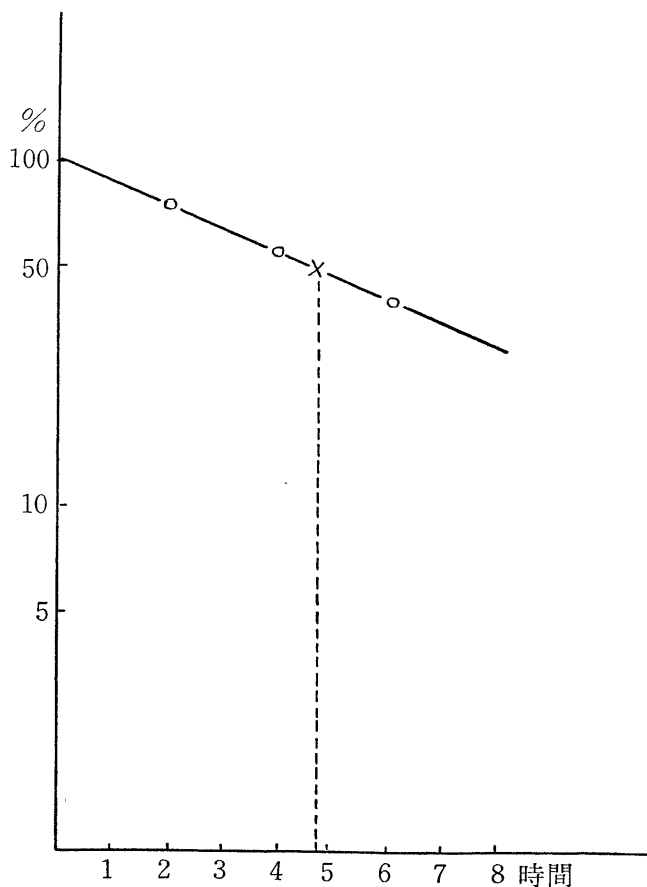
$t_{1/2}$ の大なるものほど血清中での存在時間が長い, すなわち一般に排泄が遅く, 効力発現時間が長いと考えられるので本実験では, PM-TC 点滴静注 > PM-TC 静注 > TC 静注の順である。

表28-1. PM-TC 点滴静注後の血清中濃度獲得性

薬剤投与量 mg/kg	計算血清中 濃度 mcg/ml*	血 清 中 濃 度 mcg/ml							
		15分 mcg/ml	獲得性 %	30分 mcg/ml	獲得性 %	1時間 mcg/ml	獲得性 %	2時間 mcg/ml	獲得性 %
4.0	50	8.4	16.8	6.9	13.8	6.3	12.6	4.56	9.1
7.1	88.8	10.5	11.8	5.64	6.3	4.64	5.2	2.22	2.5
4.0	50	7.5	15.0	6.6	13.2	5.4	10.8	3.0	6.0
5.0	62.5	9.0	14.4	6.6	10.5	5.4	8.6	3.0	4.8
7.5	93.7	10.8	11.5	7.5	8.0	6.3	6.7	4.8	5.1
4.5	56.2	8.4	14.9	7.5	13.3	4.8	8.5	1.5	2.6
平均5.36	67	9.1	14.0	6.79	10.8	4.94	8.7	3.18	5.0

* ヒトの血流量を 80ml/kg とした場合の投与直後の計算血清中濃度

図23. 静注による PM-TC の生物学的半減期 (ヒト血清)



2) 面積比
 血清中濃度の判定評価として各経過時間における血清中濃度の値を連続的にプロットして面積を求める方法が最近用いられている。

それには複式プランメーターで実測する方法と、各経過時間毎におけるプロットした面積を算術平均で求め加算する方法とがあるが著者は後者により算出した。

表28-2. PM-TC 点滴静注後の血清中濃度獲得性

薬剤投与量 mg/kg	計算血清中濃度 mcg/ml*	血清中濃度 mcg/ml							
		1時間 mcg/ml	獲得性 %	6時間 mcg/ml	獲得性 %	8時間 mcg/ml	獲得性 %	10時間 mcg/ml	獲得性 %
5.0	62.5	5.5	8.8	4.3	6.8	3.9	6.2	2.4	3.8
4.0	50	3.7	7.4	2.9	5.8	2.6	5.2	1.6	3.2
5.0	62.5	3.9	6.2	2.1	3.3	1.7	2.7	1.2	1.9
4.6	57.5	4.2	7.3	2.85	4.9	1.5	2.6	1.7	2.9
4.0	50	5.6	11.2	3.8	7.6	2.0	4.0	2.2	4.4
3.6	45	2.8	6.2	1.9	4.2	1.0	2.2	1.1	2.4
5.7	71.2	5.85	10.2	3.15	4.4	2.55	3.5	1.8	2.5
平均4.56	57	4.5	7.8	3.0	5.2	2.19	3.8	1.71	3.0

図24. 静注による TC の生物学的半減期 (ヒト血清)

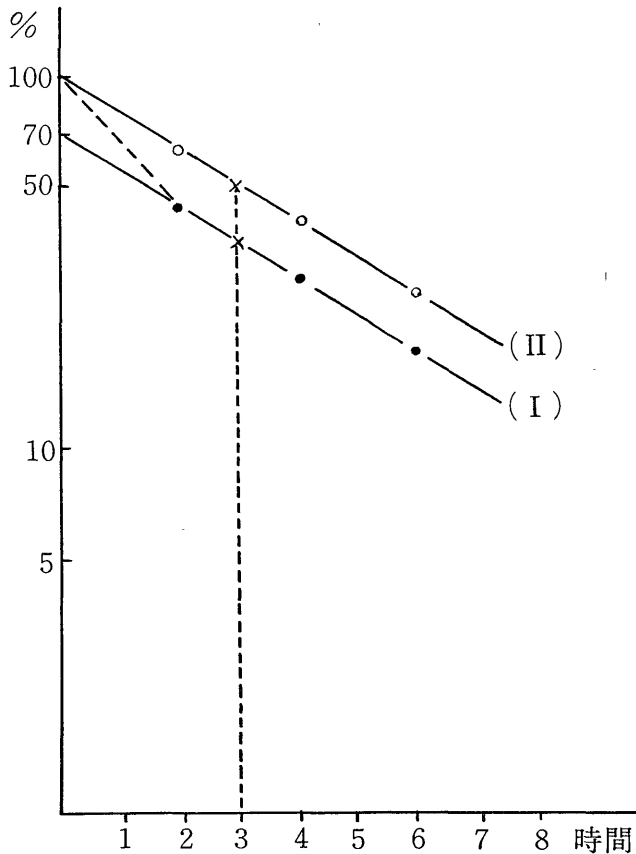


図1, 2, 3より求めた結果は表29にしめす如くである。

注射終了後の0~2時間における初期濃度の面積では PM-TC 静注 18.7cm², TC 14.9cm², PM-TC

点滴静注 20.2cm²で, PM-TC 静注面積を1として比較すると TC は 0.79, 点滴静注は 1.09 倍であった。

また注射終了後の0~8時間における長時間の濃度

図25. 点滴静注による PM-TC の生物学的半減期 (ヒト血清)

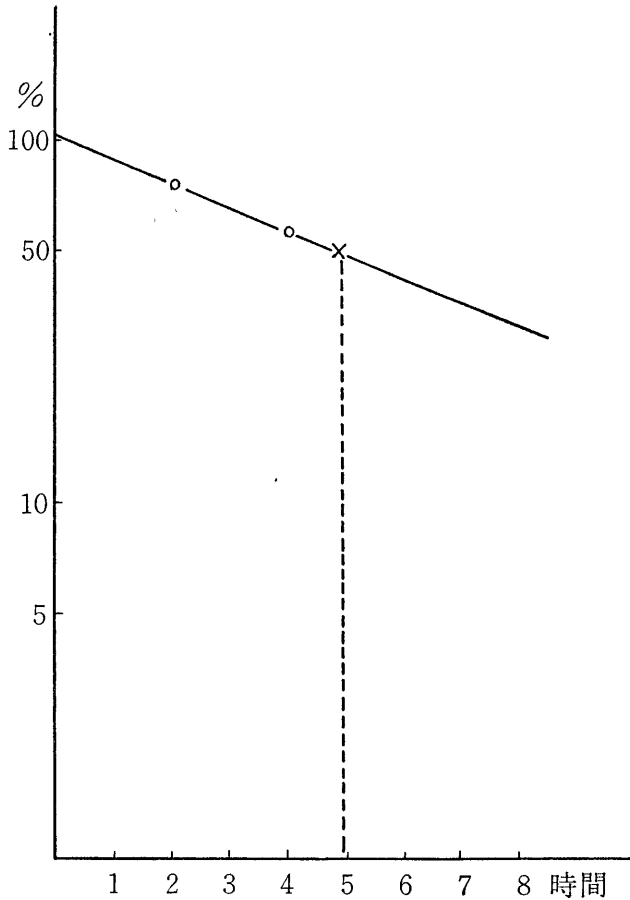


表29. 血清濃度曲線による面積比

注射終了後の経過時間		抗 生 物 質		
		T C (静注)	PM-TC (静注)	PM/TC (点滴静注)
0~2時間	面 積 (cm ²)	14.957	18.797	20.23
	T C を1とした比率	1	1.23	1.35
	PM-TC (静)を1とした比率	0.79	1	1.08
0~8時間	面 積 (cm ²)	24.697	42.497	54.84
	T C を1とした比率	1	1.72	2.22
	PM-TC (静)を1とした比率	0.58	1	1.29

面積では PM-TC 静注 42.5 cm², TC 24.9 cm², PM-TC 点滴静注 54.8 cm² で, PM-TC 静注面積を1として比較すると TC は 0.58, 点滴静注は 1.3 倍であった。

以上の実験から PM-TC の普通静注と点滴静注とを比較すると血清中濃度のピークでは静注の方が初期濃度において高く, また濃度の持続性については点滴静注の方が長いことを知った。

考 察

1. 血清中濃度

Tetracycline 系薬剤の経口投与では金属イオンによる抗菌力の低下, 腸内細菌によるビタミンB産生の抑制, また血清中濃度の低いことなどが指摘されている。

一方非経口投与では注射液の調製, 使用量, および使用方法などに制約をうけるとともに血清中濃度の持続性などが問題となっている。

これに反し本実験で採用した PM-TC は溶解性が高くかつ高濃度の薬液を静注することも可能で局所的・全身的耐薬性が良いとされている。Dimmling ら¹⁴⁾の実験では PM-TC 1 回量 (250 mg) の静注で24時間中治療上の有効血清中濃度を維持すると述べており, また Strauch ら¹⁴⁾は注射終了後の8時間値においてもかなりの有効濃度を保つとともに24時間後でも測定可能であると報告している。薬剤の静脈内投与により急激に高濃度に達するがその代りに体内より速やかに排泄されてゆくのもまた当然である。

この点 PM-TC 静注後の血中濃度を生物学的に定量し 250 mg 1 回静注後のピークは15分~1時間以内にあり, 15分値 10.2 mcg/ml, 30分値 6.75 mcg/ml で経口投与に比し著しく高濃度で, 以後漸次低下するが8時間後においてもなお 1.21 mcg/ml の有効濃度をたもち本剤の静注剤としての価値をしめしている。

これに反し TC 静注の初期血中濃度は PM-TC にほぼ匹敵する値をしめすが1時間後においては低下がはなはだしく持続性が悪い。また PM-TC は点滴静注のように長時間をかけて注入する必要はないとされているが最近の傾向として各種補液ならびに種類の薬品との混合点滴静注がさかんに使用されるようになってきたので, 著者も5%ブドウ糖, 生食水, 総合アミノ酸などの補液を溶媒として点滴注入し血清中濃度の消長について検討したところ, 初期濃度においては直接静注に比しやや低い値をしめしたが以後の濃度においては, かなり高い濃度を維持し8時間後に最高 3.9

mcg/ml, 平均 2.19 mcg/ml, また10時間後に最高 2.4 mcg/ml, 平均 1.71 mcg/ml をしめた。

これらの成績は白羽¹⁵⁾らが TC の点滴静注において, その血清中濃度が16時間以上においてもなお高濃度を持長するとし, また Maynard ら¹⁶⁾が塩酸 TC をゆるやかに持続点滴注入した後の血清中濃度においても20~24時間にわたって高い濃度を持長すると述べていることと同じ傾向をしめすものと思われる。

2. 血清中濃度獲得性

同一薬物の投与方法を変えた場合, 薬物効果の持続性を比較する方法の一つとして血清中濃度獲得性がある。

これは循環血液量 80ml/kg から求める方法と, ヒトの体液が体重の約60%をしめることから抗生物質が均等に体液中に分布したとする Volume of Distribution¹⁷⁾ から求める方法とがある。

著者は前者の方法によって血清中濃度獲得性を求め比較したところ15分値では静注のほうが点滴静注に比し1.36倍高い値をしめた。しかし15分における獲得性値を100%とし, それが50%まで低下する時間を求めると静注で46.5分, 点滴静注で67.5分で, 点滴静注のほうが1.45倍長かった。

3. 生物学的半減期

$t_{1/2}$ は薬物が反応速度式の一次式にしたがって血中から50%が消失する時間である。この場合 $t_{1/2}$ は化学構造式が変わらない限り変化しないはずであり, また $t_{1/2}$ の大なるものほど血中の存在時間が長くなる。すなわち一般に排泄が遅く効力持続時間が長いとされている¹⁷⁾。

しかし本実験でみられる如く PM-TC の静注と点滴静注とでは同一試料でありながら投与方法のちがいに $t_{1/2}$ に相違がみられた。一般に薬物の $t_{1/2}$ は投与方法によってあまり変わらないとされているが, 見かけ上 $t_{1/2}$ が点滴静注の方が普通静注よりもやや長くあらわれた。その原因については PM-TC の溶媒として用いた総合アミノ酸液が血清中濃度を増強させるためか, また測定上における阻止帯長の増大をきたすためか, あるいは投与方法による対象患者を変えたためにおこるものであるか詳細については明らかでない。

各種抗生物質の血清中半減期は Walter, Heilmeyer ら¹⁸⁾によれば, Penicillin-G 0.5時間, Keflin 0.5~0.8時間, Keflodin 1.5時間, Tetracycline 9時間, Chlor-tetracycline 6時間, Chloramphenicol 2~3時間, Streptomycin 3時間と報告されている。

このうち Tetracycline系薬剤である Tetracycline

9時間、Chlor-tetracycline 6時間とされているがこの値は著者が実験したところでは TC で約3時間および PM-TC 約4.7時間であり、試料および条件が異なるため両者の間にやや差異があるように思われる。今後の検討を待たねばならない。

4. 経口投与と非経口投与

経口投与による TC 療法の価値と限界は早くから知られており、また実験的・臨床的研究によって理論づけられている。すなわち経口投与では腸粘膜による吸収能力をこえて用量を増してもそれほど血清中濃度のめだつた上昇がみられず、過量の大部分は利用されずに糞便とともに排泄されかつ副作用を増加させる原因となっている。

これがため非経口投与によって経口投与よりも高い血清中濃度をえようと試みられたが製剤の耐薬性が充分でないためいままで大きな障壁につきあたっていた。

しかし最近本実験に採用した PM-TC の如く高い血清中濃度をうる事が技術的に可能になり、その結果高血清中濃度という問題に強い関心が寄せられるようになってきた。

PM-TC では注射後の初期血清中濃度において経口投与では全く得られないような高い値をしめし、しかも長時間その濃度を持続させることができるので重症感染症などに著効を得ることが可能になってきた。

一方経口投与では初期血清中濃度は低いが6時間おきに投与することにより一定の血清中濃度が維持される。

小 括

1. PM-TC および TC の1回量 250mg 静注後の血清中濃度を生物学的に定量した結果、PM-TC は TC に比し初期血清中濃度をはじめ長時間にわたって持続性の高い濃度がえられた。

すなわち血清中濃度は15分後に最も高く 10.1mcg/ml、その後漸次下降するが8時間後において最高 1.5mcg/ml、平均 1.2mcg/ml を維持した。

2. PM-TC の点滴静注は静注に比し初期血清中濃度がややおとるが1時間値以後において8時間値 2.19 mcg/ml、10時間値 1.71 mcg/ml のすぐれた持続性の高い濃度をしめた。

3. PM-TC の血清中濃度獲得性は計算値に対し約1/3で TC に比しわずかに高かった。また PM-TC の静注と点滴静注における獲得性では、15分値で静注が1.36倍高かったが、ピーク時からの50%低下時間では点滴静注のほうが1.45倍長かった。

4. 静脈注射による生物学的半減期は PM-TC 静注4.7時間、TC 静注3時間、PM-TC 点滴静注5時間で血清中濃度持続性から PM-TC 点滴静注が最も長かった。

5. 血清中標準時間曲線による面積比では PM-TC 1.0、TC 0.79、PM-TC 点滴 1.09 で血清中濃度の占める総体的効力比では PM-TC 点滴静注が最も大であった。

〔Ⅲ〕 血清タンパク結合性

投与された薬剤と生体タンパクとの結合は薬理学上重要な問題の一つであって、この問題の解決は薬剤の作用機序解明への鍵となっている。

タンパク質との結合に関する報告はこれまで数多く、Davis¹⁹⁾、Anton²⁰⁾、真下²¹⁾らはスルファミン剤について、また Brodie および Hoghen ら²²⁾はペニシリン剤についての実験において、タンパクと結合したものは抗菌力を失ない、遊離の状態にあるもののみが抗菌力をもっていることを明らかにした。

一方タンパク結合と排泄速度および作用時間との関係は血中タンパクとよく結合するものほど効果は劣るが排泄速度が小さく、ために作用時間が延長する傾向にあることがスルファミン剤ばかりでなく¹⁹⁾²⁰⁾、バルビツール酸誘導体²³⁾、サリチル酸誘導体²⁴⁾などの実験において証明されている。

抗生物質の血清タンパクとの結合に関する研究では PC の Chow²⁵⁾、Oeff²⁶⁾、SM の Kornegay²⁷⁾、Boxer²⁸⁾、CM・TC の Smith²⁹⁾、Bliss³⁰⁾、MM の English³¹⁾、Finland³²⁾ ならびに一連の抗生物質についての黒田³³⁾らの研究があって、種種論ぜられている。

著者は PM-TC と血清タンパク質との結合状態を物理・化学的にしらべるために平衡透析法によって結合量を測定し結合力を算出した。

実 験 方 法

1. 透析法および結合率の測定法

透析膜としてセロファン膜*を用い、25~100%の種類の濃度のヒト血清 5ml を内液として、5~20mcg/ml の pH 6.2 磷酸緩衝液溶液の薬剤液 10 ml を外液として48時間透析を行ない、外液の薬剤濃度を重層法で測定し b 値とした。

別に対照として内液を pH6.2 磷酸緩衝液とした場合についても同様透析法を行ない、この場合の外液の薬剤濃度を重層法で測定し a 値とした。

結合率をつぎの如く算出した。

$$\text{タンパク結合率} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

なお透析終了後の外液についてはトリクロール酢酸法によりタンパク陰性を確かめた。

2. 使用した血清・pH

ヒト血清は次表にみられる如く採血分離後の pH が次第に変化するので実験には原則として 2~4 日間冷蔵庫内に保存し、pH の安定したものをを用いた。

なお使用時にはタンパク計で血清の総タンパク量をあわせしらべた。

ヒト血清 pH の時間的变化

時 間	1時間	6時間	24時間	2日	4日	6日	8日
pH	7.8	8.0	8.25	8.3	8.3	8.35	8.4

3. アルブミンとの結合率の測定

ヒト血清に PM-TC の一定濃度をくわえ30分間室温に放置した後、硫酸で40%飽和となし1時間放置して塩析し濾過後遠心分離して得た上清液の薬剤濃度を重層法で測定し b 値とした。別に対照としてヒト血清の代わりに pH6.2 磷酸緩衝液を用いて同様の操作をした上清液に相等する液の薬剤濃度を重層法で測定し a 値とした。

結合率をつぎの如く算出した。

$$\text{アルブミン結合率} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

4. 静注による血清中薬剤のタンパク結合率の測定

PM-TC を健康年長児に静脈注射し、1~2時間後に採血してこれより血清を調製した。この血清 5 ml を内液とし、pH6.2 磷酸緩衝液 10 ml を外液として48時間透析を行ない、内液、外液の薬剤濃度を重層法により測定しそれぞれ a 値、b 値とした。

結合率をつぎの如く算出した。

$$\text{全薬剤量} = 5a + 10b \quad \text{ただし } a, b \text{ の単位 } \text{mcg/ml}$$

タンパク結合薬剤量 5(a-b)

$$\text{結合率} = \frac{5(a-b)}{5a+10b}$$

5. タンパク結合薬剤の解離について

PM-TC 濃度が 40 mcg/ml あるいは 10 mcg/ml の90%ヒト血清 5 ml を内液とし、pH 6.2 磷酸緩衝液 10 ml を外液として48時間透析を行なった後、外液を新しい緩衝液に替えて同様透析を再び行なう。こ

*Visking: seamless cellulose tubing 白井松器械舗

れを4回まで行ない、各回の内液、外液の薬剤濃度を重層法で測定した。

実 験 成 績

1. 透析液の時間的变化

内・外液とも磷酸緩衝液とし、外液には一定濃度の PM-TC をくわえて透析した。

透析30, 36, 40, 44, 48, 52時間後における内・外液の濃度を測定すると表30, 表31および図26, 図27にみられる如く44時間後において内・外液の濃度が同一になり以後48時間にわたって変動なく完全に均等化していることを知った。

よって以後の透析時間は48時間とした。

2. 薬剤濃度の影響

PM-TC の活性度が最も安定である pH 6.2 磷酸緩衝液を用いて 5, 10, 20 mcg/ml の濃度として外液とし、内液にはヒト血清の 25, 50, 100% 5 ml を用いて透析を行ない、タンパク結合率を算出すると表32に示す如くである。

PM-TC 濃度を高くしても結合率はほとんど影響されない。これに対してヒト血清による結合率は血清濃度が25%から 50, 100%に上昇するにつれて著しく増大した。

3. pH 7.4 における結合率

生体内の pH である pH 7.4 におけるタンパク結合率をしらべるため pH7.4 1/15M 磷酸緩衝液を用いて透析すると表33の如くである。

結合率は2)と同様 PM-TC の濃度にはほとんど関係なく、血清の濃度が増大するにつれて結合率上昇が著明で、100%ヒト血清では 70~76%をしめした。

また前記 pH6.2 を用いた結合率とは大差がなかった。

4. テトラサイクリン系抗生物質によるタンパク結合率

テトラサイクリン系薬剤のなかから繁用されている Oxytetracycline (以下 OTC と略), Tetracycline (以下 TC と略) および PM-TC の3品種を選定し100% ヒト血清による同一条件下におけるタンパク結合率を求めると表34の如くである。

結合率は PM-TC > TC > OTC の順で、PM-TC が最も強い結合力をしめした。

なお OTC および TC の測定は PM-TC の重層法に準じた。

5. pH の影響

一定濃度における PM-TC の pH を 1/15 M 磷酸緩衝液で pH 4.7~9.0 に調製し、ヒト血清に対す

るタンパク結合率をしらべた結果は表35の如くである。

pH が酸性から中性・弱アルカリ性へと増大するにつれ結合率が上昇した。

なお試料液の pH が 8.0 および 9.0 では重層液がやや濁濁を生じた。

6. アルブミン結合率

ヒト血清に PM-TC の 100, 200, 400mcg/ml の一定量をくわえ30分間室温に放置した後、この試料液 1 容に飽和硫酸液の 1.5容をくわえ 1 時間反応させて塩析し、濾過後遠心分離してえた上清液について力価を測定し PM-TC の濃度をしらべ、対照液は磷酸緩

表30. 透析液の時間的变化

経過時間 (時)	外 液 PM-TC濃度 mcg/ml	透析後の測定値 (PM-TCmcg/ml)		
		内 液 (5ml)	外液 (10ml)	
30	40	阻止帯長 mm	8.2	8.6
			8.15	8.4
			8.1	8.5
		平均	8.15	8.5
		計算量 mcg/ml	25.0	32.0
36	40	阻止帯長 mm	8.35	8.6
			8.4	8.45
			8.05	8.3
		平均	8.26	8.45
		計算量 mcg/ml	27.5	31.0
40	40	阻止帯長 mm	8.35	8.5
			8.3	8.4
			8.4	8.4
		平均	8.35	8.43
		計算量 mcg/ml	29.0	30.5
44	40	阻止帯長 mm	8.5	8.4
			8.4	8.4
			8.3	8.4
		平均	8.4	8.4
		計算量 mcg/ml	30.0	30.0
48	40	阻止帯長 mm	8.4	8.45
			8.4	8.4
			8.4	8.35
		平均	8.4	8.4
		計算量 mcg/ml	30.0	30.0
52	40	阻止帯長 mm	8.6	8.5
			8.4	8.45
			8.2	8.35
		平均	8.4	8.4
		計算量 mcg/ml	30.0	30.0

衝液を用いた。その結果は表36にみられる如く PM-TC の濃度が増大するにつれわずかながら結合率が上昇した。

なお本実験における試料液が硫酸液によってほぼ2倍容に希釈されることから、当然血清の含量も50%位に低下されるものと考えられるので比較検討の意味か

ら50%ヒト血清によるタンパク結合率もあわせ求めると、両者の結合率がほぼ接近していることを知った。

以上の実験から定性的ではあるが PM-TC の血清によるタンパク結合は、主としてアルブミンによるものと考えられる。

7. 静注による薬剤の血清タンパク結合率

表31. 透析液の時間的変化

経過時間(時)	外液 PM-TC濃度 mcg/ml	透析後の測定値 (PM-TCmcg/ml)		
		内液 (5ml)	外液 (10ml)	
30	4.0	阻止帯長	5.8	5.9
		mm	5.7	5.8
			5.6	6.0
		平均	5.7	5.9
		計算量 mcg/ml	2.66	3.0
36	4.0	阻止帯長	5.75	5.8
		mm	5.7	5.8
			5.8	5.8
		平均	5.75	5.8
		計算量 mcg/ml	2.75	2.8
40	4.0	阻止帯長	5.8	5.9
		mm	5.8	5.89
			5.8	5.65
		平均	5.8	5.8
		計算量 mcg/ml	2.8	2.8
44	4.0	阻止帯長	5.8	5.8
		mm	5.9	5.8
			5.7	5.8
		平均	5.8	5.8
		計算量 mcg/ml	2.8	2.8
48	4.0	阻止帯長	5.8	5.9
		mm	5.8	5.8
			5.8	5.7
		平均	5.8	5.8
		計算量 mcg/ml	2.8	2.8
52	4.0	阻止帯長	5.8	6.0
		mm	5.7	5.7
			5.6	5.7
		平均	5.7	5.8
		計算量 mcg/ml	2.66	2.8

図26. セロファン透析による平衡曲線 (3例平均)
(外液の PM-TC 濃度 40mcg/ml.)

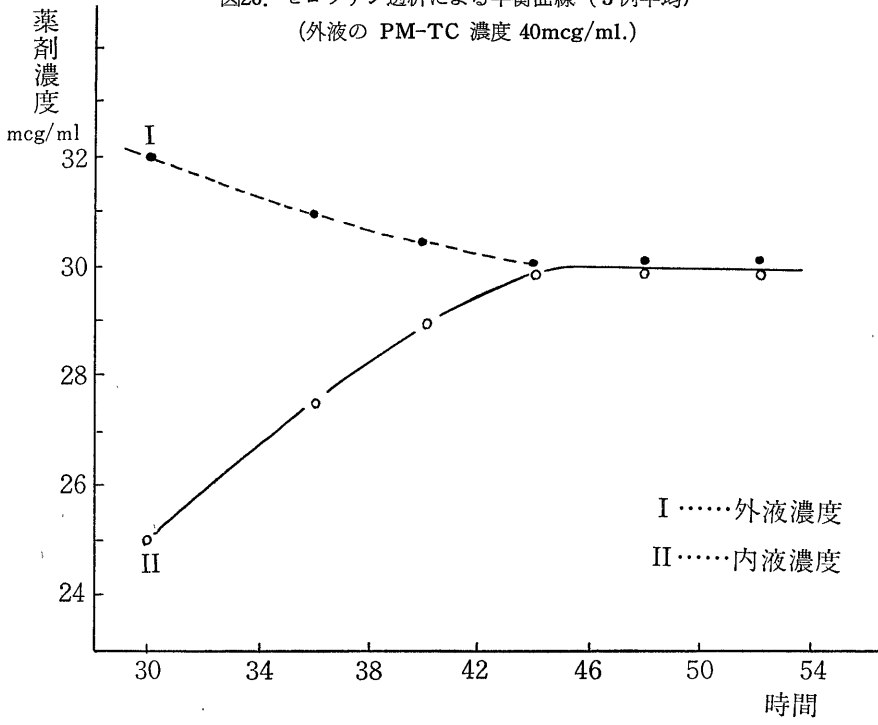


図27. セロファン透析による平衡曲線 (3例平均)
(外液の PM-TC 濃度 4.0mcg/ml)

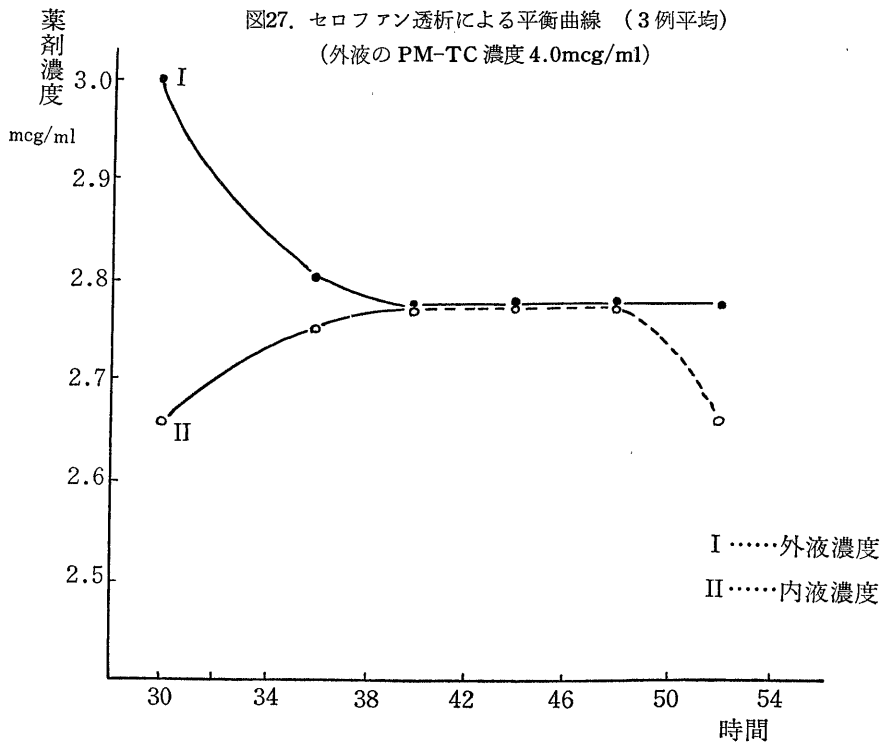


表32. 血清タンパク結合率 (pH6.2 磷酸緩衝液)

血清の%	外液濃度 mcg/ml	透析後の濃度 mcg/ml		結合率 %	
		対緩衝液 外液中濃度	対血清 外液中濃度		
25	5.0	阻止帯長 mm	7.0	6.3	40.0
			7.0	6.2	
			7.0	6.4	
		平均	7.0	6.3	
	計算量 mcg/ml	4.0	2.4		
25	10.0	阻止帯長 mm	8.0	7.1	48.0
			8.1	7.0	
			7.9	7.2	
		平均	8.0	7.1	
	計算量 mcg/ml	8.0	4.16		
25	20.0	阻止帯長 mm	9.0	8.05	47.5
			9.0	8.0	
			9.0	8.1	
		平均	9.0	8.05	
	計算量 mcg/ml	16.0	8.4		
50	5.0	阻止帯長 mm	7.0	5.8	58.0
			7.2	5.6	
			6.8	6.0	
		平均	7.0	5.8	
	計算量 mcg/ml	4.0	1.68		
50	10.0	阻止帯長 mm	7.8	6.6	64.0
			8.2	6.6	
			8.0	6.0	
		平均	8.0	6.6	
	計算量 mcg/ml	8.0	2.88		
50	20.0	阻止帯長 mm	9.1	7.4	70.0
			9.0	7.2	
			8.9	7.3	
		平均	9.0	7.3	
	計算量 mcg/ml	16.0	4.8		
100	5.0	阻止帯長 mm	7.1	5.3	70.0
			7.0	5.2	
			6.9	5.4	
		平均	7.0	5.3	
	計算量 mcg/ml	4.0	1.2		

100	10.0	阻止帯長	8.0	6.1	73.0	
			mm	8.0		6.3
			8.0	6.2		
		平均	8.0	6.2		
		計算量	mcg/ml	8.0	2.16	
100	20.0	阻止帯長	9.0	6.9	76.0	
			mm	9.0		6.8
			9.0	7.0		
		平均	9.0	6.9		
		計算量	mcg/ml	16.0	3.84	

ヒト血清：総タンパク 7.0g/dl, pH8.4

PM-TC の一定量を年長児に直接静注および点滴静注した場合における一定時間後の薬剤の血清中タンパク結合率を常法の透析法でしらべた。

なお結合率は一定時間後に採血してえた血清を内液とし、pH 6.2 磷酸緩衝液を外液として透析し、内・外液中の PM-TC をそれぞれ測定して求めた。同一試料を 3 回測定した。

結果は表37にみられる如く静注時におけるタンパク結合率は1時間値 32.0%，2時間値 42.8%であったが、点滴静注では表38にみられる如く両試料の1時間値および2時間値ともほとんど差異がなく50%前後の結合率をしめた。

8. タンパク結合薬剤の解離について

PM-TC と血清タンパクとの結合が可逆的であるか否かを平衡透析法で検討した。

第1回の透析には100%ヒト血清と PM-TC の 400 および 100 mcg/ml の一定量をくわえ30分放置し、これを内液とし、外液には内液の2倍容に相当する pH 6.2 磷酸緩衝液を入れ常法により48時間透析した。

なお透析終了後内液の1部および外液をとり、のぞいてそれぞれの濃度を測定し結合率を算出した。

2回以後の透析は透析外液をのぞき新たに内液量の2倍容量に相当する pH6.2 磷酸緩衝液をくわえて透析を行ない、この操作を繰返していったん血清タンパクに結合した PM-TC がどのように離れて外液中に移行するかをしらべた。

結果は表39に示す如くである。

外液中への移行率は No. 1 では 1～2 回の透析ではほぼ 1/2 量が移行し、4 回透析では 96.6% とほとんどすべて外液中に移行した。

No. 2 では 1～2 回透析ですでに 2/3 量が移行し、

4 回透析では前者同様 93.3% が外液中に移行した。

以上のことから血清タンパクに結合した PM-TC が透析外液を順次に新しく変えることにより再び解離して外液中へ移行することを知った。

なお移行率は薬剤の濃度差に関係なく大部分が移行した。

考 察

1. 抗生物質血清タンパク結合の意義

抗生物質の血清タンパク結合に関しては storm van Leewen³⁴⁾, Bennhold³⁵⁾, Davis¹⁹⁾, Goldstein³⁶⁾らによって論議されている。

すなわち、(1)血清タンパクの存在における有効濃度、(2)薬物の身体内における転送に演ずるタンパク質の役割、(3)組織内外における薬物の移行とタンパク質との結合の関係などいろいろ複雑な問題がある。

このように血清タンパク、リンタンパク、核タンパクなどの組織成分と結合して、運搬体として炎症病巣への移行に関与し、これらの複合体はまた貯溜体として腎からの排泄などに関係し抗生物質の血中濃度、組織濃度の維持に有利な影響をおよぼすものと考えられる。さらに血清タンパク結合性は抗生物質の血液内分布を左右しその血中濃度測定上に重大なる意義を有している。

2. 血清タンパク結合率

タンパク結合の実験を *in vitro* で行なう場合ウシなどのアルブミンを用い測定されているが、著者はすべてヒト血清について行なった。

抗生物質の血清タンパク結合率については Tompsett はじめ多くの報告がある。なかでも黒田³³⁾らの実験で CTC で 66%，OTC で 17%，TC で 18% の結合率をしめたとしているが著者の PM-TC によ

る実験では 70~75% の高い結合率を、また 静注用 OTC, TC, PM-TC の 3 製剤についての実験では OTC で 66.6%, TC で 72.4%, PM-TC で 75% を しめし前者に比しやや高い結合率をしめた。

これらの事実から PM-TC はこれまでの TC 系製

剤に比しかなり高い結合率を有することが明らかとな った。

3. pH の影響

pH はタンパクの組織ならびに薬物の解離に作用 し、ひいてはタンパク結合にも影響をおよぼすので

表33. pH7.4 緩衝液を用いたタンパク結合率

血清の%	外液濃度 mcg/ml	透 析 後 の 濃 度 mcg/ml		結 合 率 %	
		対 緩 衝 液 外 液 中 濃 度	対 血 清 外 液 中 濃 度		
50	2.5	阻 止 帯 長 mm	5.4	4.3	51.5
			5.3	4.4	
			5.5	4.2	
		平 均	5.4	4.3	
計 算 量 mcg/ml		2.0	0.97		
50	5.0	阻 止 帯 長 mm	6.2	5.15	57.5
			6.4	5.1	
			6.6	5.2	
		平 均	6.4	5.15	
計 算 量 mcg/ml		4.0	1.7		
50	10.0	阻 止 帯 長 mm	7.4	5.8	65.4
			7.3	5.8	
			7.5	5.8	
		平 均	7.4	5.8	
計 算 量 mcg/ml		7.8	2.7		
100	2.5	阻 止 帯 長 mm	5.6	3.6	70.0
			5.4	3.7	
			5.2	3.5	
		平 均	5.4	3.6	
計 算 量 mcg/ml		2.0	0.6		
100	5.0	阻 止 帯 長 mm	6.5	4.4	73.7
			6.4	4.4	
			6.3	4.4	
		平 均	6.4	4.4	
計 算 量 mcg/ml		4.0	1.05		
100	10.0	阻 止 帯 長 mm	7.2	5.3	75.6
			7.4	5.4	
			7.6	5.2	
		平 均	7.4	5.3	
計 算 量 mcg/ml		7.8	1.9		

ヒト血清: 総タンパク 7.2g/dl, pH8.3

血液の pH の変化は必然的に薬物の体内分布にも関係する。

サルファ剤のタンパク結合におよぼす pH の働らきについては Davis¹⁾, 中垣ら³⁷⁾ の報告があるが、その変動範囲はごく狭いとされている。この際問題となるのは緩衝液の組成で Klotz^ら³⁸⁾ が指摘しているように緩衝液に含まれているイオンの作用のため薬物の真の結合量がなかなか測定しにくい。

著者はこれらの影響が最も少ないとされているリン酸緩衝液を用いて実験したところ結合率は pH の上昇につれて徐々に増大し特に pH 6.8~8.0 の範囲内では大であったが pH 9.0 ではそれほどでなかった。

このように pH の上昇につれて結合量が増加する理由は不明である。

4. 静注における結合率

著者は先に *in vitro* における PM-TC と血清タンパクとの結合性について実験した結果高い結合率を有することを知ったので、さらにヒトの静脈注射および点滴静脈注射後の血清について PM-TC と血清タンパクとの結合性を検討した。

薬液注入後の血清からタンパク結合薬剤量を知るには最近もっぱら超遠心法、限外濾過法などが使用され

ているが、著者はセロファンバッグ透析法で行なった。

実験の結果結合率は静注では 1 時間値より 2 時間値が高くなったが、点滴静注では 1 時間値と 2 時間値の差がなかった。これは両者の手技的差異による薬液の注入量、注入速度、血清中濃度と吸収量などの相違によるものと考えられる。

5. タンパクとの結合の可逆性

注射後における血中濃度の測定は一般に血漿または血清を緩衝液で 2~10 倍に希釈したものについて測定している。この場合緩衝液で希釈することによって血清タンパクと結合した抗生物質がタンパクから離れて遊離の抗生物質活性をしめすものとされている。

血清タンパク結合率が 70~75% の高い値をしめす PM-TC がもし注射後血中で血清タンパクと結合したまま離れないとすれば大部分不活性のまま排泄されることになり、抗菌力におよぼす影響が大である。

よって著者は平衡透析法によっていったんタンパクと結合した抗生物質の可逆性をしらべたところ、結合した抗生物質が緩衝液中に徐々に遊離されてくることを知った。

表34. TC 系抗生物質のタンパク結合率

抗生物質 種類	外液濃度 mcg/ml	透 析 後 の 濃 度 mcg/ml		結 合 率 %	
		対 緩 衝 液 外 液 中 濃 度	対 血 清 外 液 中 濃 度		
O T C	10.0	阻 止 帯 長	7.6	6.1	66.6
		mm	7.6	6.0	
			7.6	5.9	
		平 均	7.6	6.0	
	計算量 mcg/ml	6.6	2.2		
T C	10.0	阻 止 帯 長	7.8	5.8	72.4
		mm	7.4	6.0	
			7.6	5.6	
		平 均	7.6	5.8	
	計算量 mcg/ml	6.6	1.8		
P M-T C	10.0	阻 止 帯 長	7.5	5.6	75.0
		mm	7.6	5.5	
			7.7	5.7	
		平 均	7.6	5.6	
	計算量 mcg/ml	6.6	1.65		

ヒト血清：総タンパク 7.2g/dl, pH8.3

表35. 各種 pH によるタンパク結合率

外液の pH	外液濃度 mcg/ml	透析後の濃度 mcg/ml		結合率 %	
		対緩衝液 外液中濃度	対血清 外液中濃度		
4.7	10.0	阻止帯長 mm	8.2	6.5	65.9
			8.0	6.6	
			7.8	6.4	
		平均	8.0	6.5	
計算量 mcg/ml		9.1	3.1		
5.4	10.0	阻止帯長 mm	8.2	6.4	72.1
			8.3	6.2	
			8.1	6.6	
		平均	8.2	6.4	
計算量 mcg/ml		10.4	2.9		
6.2	10.0	阻止帯長 mm	7.8	6.0	73.0
			7.8	6.0	
			7.8	6.0	
		平均	7.8	6.0	
計算量 mcg/ml		7.8	2.1		
6.8	10.0	阻止帯長 mm	7.7	5.6	77.7
			7.9	5.8	
			7.5	5.4	
		平均	7.7	5.6	
計算量 mcg/ml		7.2	1.6		
7.4	10.0	阻止帯長 mm	7.7	5.6	76.1
			7.6	5.6	
			7.5	5.6	
		平均	7.6	5.6	
計算量 mcg/ml		6.7	1.6		
8.0	10.0	阻止帯長 mm	7.9	5.4	80.5
			7.3	5.0	
			7.6	5.2	
		平均	7.6	5.2	
計算量 mcg/ml		6.7	1.3		
9.0	10.0	阻止帯長 mm	8.0	5.8	83.3
			7.8	5.0	
			7.6	5.4	
		平均	7.8	5.4	
計算量 mcg/ml		7.8	1.3		

表36-1. 硫酸塩析上清液の薬剤濃度

液の組成		a 上清液中の 濃度 mcg/ml	b pH6.2磷酸緩 衝液中の濃度 mcg/ml	上清液移行率 $\frac{a}{b}$ %	50%ヒト血清 によるタンパ ク結合率%*
ヒト血清 4.5ml PM-TC 100mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 5.4	8.7	42.1	50.5
		mm 5.0	8.6		
		mm 5.2	8.8		
		平均 5.2	8.7		
	計算量 mcg/ml	1.6	3.8		
ヒト血清 4.5ml PM-TC 200mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 6.2	9.6	50.0	58.0
		mm 6.2	9.5		
		mm 6.2	9.4		
		平均 6.2	9.5		
	計算量 mcg/ml	3.3	6.5		
ヒト血清 4.5ml PM-TC 400mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 7.1	10.2	54.3	63.6
		mm 7.2	10.4		
		mm 7.15	10.3		
		平均 7.15	10.3		
	計算量 mcg/ml	6.25	11.5		

*50%ヒト血清による PM-TC 単独のタンパク結合率で、塩析上清液との結合ではない。
総タンパク: 7.0g/dl のヒト人血

表36-2. 硫酸塩析上清液の薬剤濃度

液の組成		a 上清液中の 濃度 mcg/ml	b 対照液の濃 度 mcg/ml	上清液移行率 $\frac{a}{b}$ %	50%ヒト血清 によるタンパ ク結合率
ヒト血清 4.5ml PM-TC 100mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 4.6	7.8	45.0	51.5
		mm 4.7	7.7		
		mm 4.5	7.6		
		平均 4.6	7.7		
	計算量 mcg/ml	1.35	3.0		
ヒト血清 4.5ml PM-TC 200mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 5.5	8.4	50.5	59.5
		mm 5.7	8.4		
		mm 5.3	8.4		
		平均 5.5	8.4		
	計算量 mcg/ml	2.65	5.2		
ヒト血清 4.5ml PM-TC 400mcg/ml 0.5ml	阻止 帯長	mm 6.5	9.0	61.9	67.5
		mm 6.7	9.0		
		mm 6.6	9.0		
		平均 6.6	9.0		
	計算量 mcg/ml	6.5	10.5		

総タンパク: 7.2g/dl のヒト血清

このような可逆性は高い結合性をもったPM-TCにおいて活性が永く持続して効果を発揮することからも有利な抗生物質ともいえる。

小 括

セロファンバッグ透析法により PM-TC のヒト血清タンパクとの結合率を検討した。

1. PM-TC の結合率は抗生物質濃度にほとんど関係なく血清濃度の増大につれて上昇した。

2. pH6.2 磷酸緩衝液における結合率は 70~76% の高い値をしめした。

また生体内 pH である pH 7.4 磷酸緩衝液でも同様の値をえた。

一方緩衝液の pH 4.7~9.0 においては pH が上昇するにつれ結合率が増大した。

3. 抗生物質各剤の結合率は OTC 66.6%, TC 72.4%, PM-TC 75% であった。

4. PM-TC と血清タンパクとの結合は主としてアルブミン分画によるものである。

5. ヒトに静注し結合率をみると、1時間値 26.1~32.0%, 2時間値38.6~42.8% であり、点滴静注では1時間値46.1~52.2%, 2時間値46.7~47.0%であった。

6. 血清タンパクと結合した PM-TC は可逆的であった。

表37. 静注後の血清タンパク結合率 (健康年長児 2 例)

例・No.	投与量 Pro mg/kg	採血時間 (時)	血清中濃度 mcg/ml	a		b		結合率 $\frac{5(a-b)}{5a+10b}\%$
				透析後の内液 濃度 mcg/ml	透析後の外液 濃度 mcg/ml	透析後の内液 濃度 mcg/ml	透析後の外液 濃度 mcg/ml	
1	4.2	1	3.5	阻止帯長	3.2*	4.2	32.0	
				mm	3.3	4.6		
					3.4	4.4		
				平均	3.3	4.4		
				計算量 mcg/ml	3.5	1.45		
		2	2.4	2.4	2.4	阻止帯長	3.1	3.6
mm	2.9					3.6		
	3.0					3.6		
		平均	3.0	3.6				
		計算量 mcg/ml	2.7	0.83				
2	4.2	1	3.4	阻止帯長	3.5	4.6	26.1	
				mm	3.3	4.4		
					3.1	4.8		
				平均	3.3	4.6		
				計算量 mcg/ml	3.5	1.7		
		2	2.4	2.4	2.4	阻止帯長	2.9	4.0
mm	2.8					3.2		
	2.7					3.6		
		平均	2.8	3.6				
		計算量 mcg/ml	2.4	0.83				

* 血清が入っているなので 5 倍希釈して測定, 計算量は阻止帯長から得られた濃度を 5 倍する

〔IV〕 赤血球内濃度

本章において PM-TC の赤血球内移行について実験を試みた³⁹⁾⁻⁴³⁾。

このことは薬物の吸収・代謝および毒性などに若干の資料を与えるものと思われる。

実験方法

1. 赤血球浮遊液調製

新鮮ヒト血液（抗凝固剤の入らないもの）および保存血液O型（採血後7日以内）を用い、3,000 r.p.m. 5分間遠心分離し、えられた血球を生食水で数回洗浄し、沈渣を濃厚赤血球生食浮遊液（ヘマトクリット値49.5~50%）とした。

この赤血球原液に一定量の生食水をくわえ各種濃度の血球浮遊液を調製した。

2. 実験方法

上記の血球浮遊液 4.5 ml に PM-TC ・ 生食液の倍数希釈液 50~200 mcg/ml の 0.5 ml をくわえ、軽く振盪混和した後、1時間、37°C フ卵器中に静置し、これを遠心、食塩水による洗浄、遠心を3回繰返し最後に一定量の蒸留水をくわえて強く攪拌し完全に溶血させた。

溶血液をさらに沸騰水中に2分間ひたして除タンパクし、遠心分離後上清液について重層法により PM-TC を測定した。

実験成績

・ 血球内含量（表40, 41, 42）

赤血球濃度および PM-TC 濃度の増大にともなって、血球に含まれる PM-TC 力価が増大した。

PM-TC が血球膜を通して明らかに内部に移行することをしめすものである。

表38. 点滴静注後の血清タンパク結合率（入院患児2例）

例・No.	投与量 Pro mg/kg	採血時間 (時)	血清中濃度 mcg/ml	a*		b 透析後の外液 濃度 mcg/ml	結合率 $\frac{5(a-b)}{5a+10b}\%$	
				透析後の内液 濃度 mcg/ml	計算量 mcg/ml			
1	組成 PM-TC 250mg EL 3号 500ml ♂ 4.0	1	3.5	阻止帯長	5.6	5.8	52.2	
				mm	5.4			5.7
					5.2			5.6
				平均	5.4			5.7
				計算量	3.0	0.7		
		2	2.7	阻止帯長	4.8	5.4	47.0	
				mm	5.2			5.5
					5.0			5.3
				平均	5.0			5.4
				計算量	2.2	0.6		
2	組成 PM-TC 250mg フルクトン 500ml ♀ 5.0	1	7.6	阻止帯長	6.9	7.2	46.1	
				mm	6.8			7.3
					6.7			7.4
				平均	6.8			7.3
				計算量	7.5	2.1		
		2	5.4	阻止帯長	6.0	6.8	46.4	
				mm	6.3			6.8
					6.6			6.8
				平均	6.3			6.8
				計算量	5.4	1.5		

* 血清が入っているので5倍希釈して測定、計算量は阻止帯長から得られた濃度を5倍する

表39. タンパク結合薬剤の遊離性

No.	内 液	外 液	透析回数	a *		b	外液への移行率 $\frac{b}{a} \times 100\%$
				透析後の内液濃度 mcg/ml	透析後の外液濃度 mcg/ml		
1	100%ヒト血清 4.5ml PM-TC 400mcg/ml 0.5ml	pH6.2磷酸緩衝液 10ml	1	阻止帯長	mm 6.6 6.5 6.4	7.2 7.3 7.1	36.9
				平均	6.5	7.2	
				計算量	mcg/ml 26.0	9.6	
				阻止帯長	mm 5.5 5.1 5.3	6.4 6.4 6.4	
2	1回透析後の内液 5ml	"	2	阻止帯長	mm 5.5 5.1 5.3	6.4 6.4 6.4	44.8
				平均	5.3	6.4	
				計算量	mcg/ml 11.6	5.2	
				阻止帯長	mm 4.2 4.4 4.6	6.1 6.0 6.2	
3	2回透析後の内液 5ml	"	3	阻止帯長	mm 4.2 4.4 4.6	6.1 6.0 6.2	65.0
				平均	4.4	6.1	
				計算量	mcg/ml 6.0	3.9	
				阻止帯長	mm 3.15 3.1 3.2	5.3 5.4 5.2	
4	3回透析後の内液 5ml	"	4	阻止帯長	mm 3.15 3.1 3.2	5.3 5.4 5.2	95.8
				平均	3.15	5.3	
				計算量	mcg/ml 2.4	2.3	
				阻止帯長	mm 4.4 4.4 4.4	5.6 5.5 5.4	
2	100%ヒト血清 4.5ml PM-TC 100mcg/ml 0.5ml	pH6.2磷酸緩衝液 10ml	1	阻止帯長	mm 4.4 4.4 4.4	5.6 5.5 5.4	42.1
				平均	4.4	5.5	
				計算量	mcg/ml 6.4	2.7	
				阻止帯長	mm 3.2 3.2 3.2	4.95 5.0 4.9	
2	1回透析後の内液 5ml	"	2	阻止帯長	mm 3.2 3.2 3.2	4.95 5.0 4.9	72.6
				平均	3.2	4.95	
				計算量	mcg/ml 2.48	1.8	
				阻止帯長	mm 2.05 2.0 2.1	4.0 4.0 4.2	
3	2回透析後の内液 5ml	"	3	阻止帯長	mm 2.05 2.0 2.1	4.0 4.0 4.2	88.6
				平均	2.05	4.1	
				計算量	mcg/ml 1.06	0.94	
				阻止帯長	mm 0.9 1.0 0.8	3.0 3.2 3.1	
4	3回透析後の内液 5ml	"	4	阻止帯長	mm 0.9 1.0 0.8	3.0 3.2 3.1	93.7
				平均	0.9	3.1	
				計算量	mcg/ml 0.48	0.45	
				阻止帯長	mm 0.9 1.0 0.8	3.0 3.2 3.1	

* 内液の阻止帯長は pH6.2 磷酸緩衝液で 5 倍希釈した値, 計算量 mcg/ml はその阻止帯長から得られた濃度を 5 倍した
ヒト血清: 総タンパク 7.1g/dl, pH8.3

表40. ヒト血球内含量
(抗凝固剤の入らない)

血球浮遊液の濃度 %	PM-TC 濃度 mcg/ml	ヘマトク リット %	血球内濃度 mcg/ml
5.0	50	3.0	阻 0 止 mm 0 帯 0 長 0 平均 0
			計算量 mcg/ml 0
5.0	100	3.0	阻 0.8 止 mm 0.8 帯 0.8 長 0.8 平均 0.8
			計算量 mcg/ml 0.22
5.0	200	3.0	阻 1.4 止 mm 1.5 帯 1.5 長 1.5 平均 1.46
			計算量 mcg/ml 0.32
10.0	50	6.0	阻 1.6 止 mm 1.8 帯 1.7 長 1.7 平均 1.7
			計算量 mcg/ml 0.38
10.0	100	6.0	阻 2.1 止 mm 2.2 帯 2.2 長 2.2 平均 2.16
			計算量 mcg/ml 0.51
10.0	200	6.0	阻 3.0 止 mm 3.1 帯 3.2 長 3.2 平均 3.1
			計算量 mcg/ml 0.9
20.0	50	9.5	阻 2.0 止 mm 2.1 帯 2.1 長 2.1 平均 2.06
			計算量 mcg/ml 0.47
20.0	100	9.5	阻 2.6 止 mm 2.4 帯 2.5 長 2.5 平均 2.5
			計算量 mcg/ml 0.62

20.0	200	9.5	阻 3.8 止 mm 3.6 帯 3.7 長 3.7 平均 3.7
			計算量 mcg/ml 1.35

表41. 保存血液における血球内含量
(保存血液O型)

血球浮遊液の 濃度 %	PM-TC・生 食濃度 mcg/ml	血球内濃度 mcg/ml
10.0	10.0	0
10.0	40.0	0.28
20.0	10.0	0
20.0	40.0	0.36
40.0	10.0	0
40.0	40.0	0.54

表42. ヒト血漿より分離した血球内含量
(抗凝固剤E.D.T.A.入り)

血球浮遊液の 濃度 %	PM-TC・生 食濃度 mcg/ml	血球内濃度 mcg/ml
10.0	40.0	0.51
10.0	80.0	0.92
20.0	40.0	0.39
20.0	80.0	0.65
40.0	40.0	0.58
40.0	80.0	0.96

考 察

抗生物質の血球内移行性を論ずるにあたって、数回の洗浄によって膜の外側に附着したものが完全に膜と分離するか、あるいは操作による浸透圧の変動で血球内薬剤の膜外浸出がおこなわれないか、また蒸留水、界面活性剤などを用いて血球を溶血させる場合、赤血球膜に吸着したものと、血球内に移行したものと区別しなくてもよいかなどの問題が考えられる。

著者は以上の個個について測定することができなかつたので、浜田ら⁴⁴⁾がビタミン剤の赤血球移行試験⁴⁵⁾に採用している測定法にならって血球に蒸留水をくわえて溶血させ、100°C 2分間加熱後 3,000 r.p.m. 5分間遠心分離し、その上清について抗生物質含有量

表43. PM-TC 250mg 1 回点滴静注後の尿中濃度

No.	0 ~ 6 時間			6 ~ 12 時間			12 ~ 24 時間			24時間の総排泄量		
	尿中濃度 mcg/ml	尿量 ml	尿中の全量 mg	尿中濃度 mcg/ml	尿量 ml	尿中の全量 mg	尿中濃度 mcg/ml	尿量 ml	尿中の全量 mg	尿量 ml	尿中の全量 mg	%
1	360	300	108.0	72	250	18.0	35.0	350	12.2	900	138.2	55.2
2	185	320	59.2	112	250	28.0	91.0	500	45.5	1,070	132.7	53.0
3	125	350	43.7	102	420	42.8	82.0	420	34.4	1,190	120.9	48.3
4	200	265	53.0	119	352	41.9	80.0	525	42.0	1,142	136.9	54.7
5	180	310	55.8	85	136	11.6	68.0	450	30.6	896	98.0	39.2
6	262	395	103.5	110	350	38.5	65.0	310	20.15	1,055	162.1	64.8
7	220	285	62.7	102	315	32.1	67.5	365	24.6	965	119.4	47.7
8	150	430	64.4	117	354	41.4	92.0	450	41.4	1,234	147.2	58.8
9	225	306	68.8	120	346	41.5	81.5	350	28.5	1,002	138.8	55.5
10	155	352	54.6	120	320	38.4	83.5	440	36.7	1,112	129.7	51.8
平均	206.2	331.3	67.38	105.9	309.3	33.4	74.5	416	31.6	1,056.6	132.38	52.8
標準偏差	67.29	50.23	21.39	12.71	79.08	10.97	17.33	70.23	14.04	116.19	34.48	6.90
最大値	360	430	108	120	420	42.8	92	525	45.5	1,234	147.2	64.8
最小値	125	265	42.7	72	136	11.6	35	310	12.2	896	98	39.2

を測定して血球内移行量とした。

小 括

ヒト血の赤血球生食浮遊液より PM-TC の赤血球内移行量を測定した。

PM-TCは赤血球内に移行することが認められた。

〔V〕尿 中 濃 度

薬物は生体内で一定の作用をあらわした後漸次排泄される。

排泄は薬物の作用に重要な関係をもっており排泄の速い薬物は作用が一過性であるから、たびたび使用しなければならないし、また逆に排泄が遅い薬物は連用すると蓄積し慢性中毒をおこす恐れがある。

著者は前章において PM-TC の静注後初期高い血中濃度に達しさらに長時間持続性の濃度を維持することを報告した。

これら高い血中濃度の持続が尿中排泄濃度にどのような関係をしめすかを検討するため PM-TC 250mg 1回点滴静注後の24時間にわたる尿中への総排泄量を測定した。

実 験 方 法

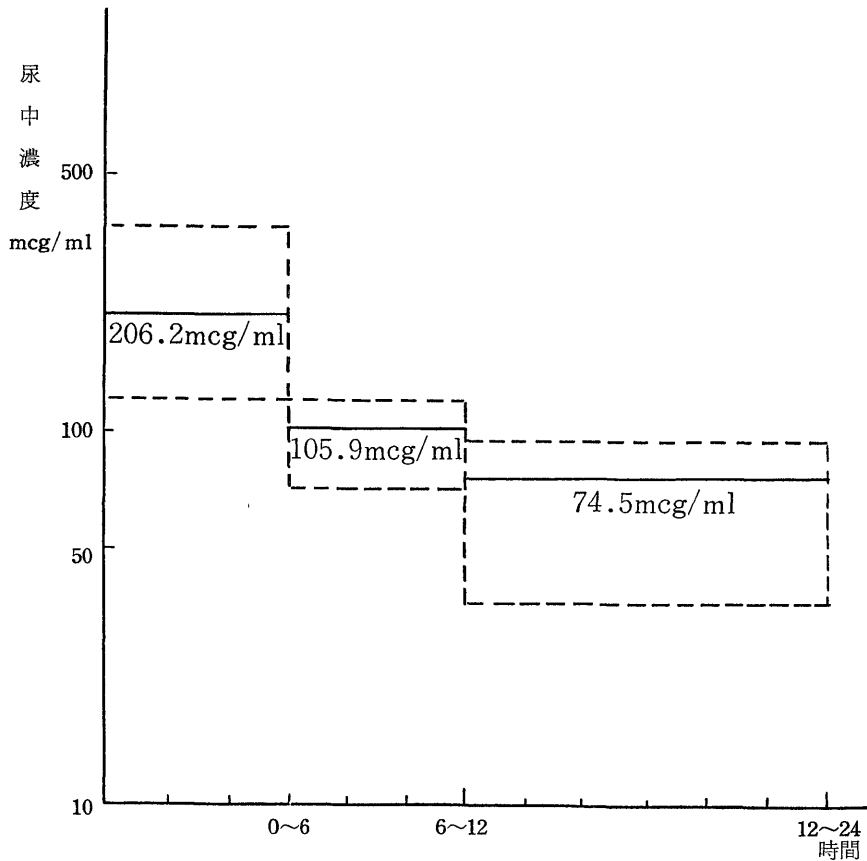
当院入院中の外科的感染症患児10人につきPM-TC 250 mg を 500 ml の補液に溶解したものを60~90分を要して点滴静注し注射後24時間にわたる尿中への総排泄量を求めた。

なお尿は、第1回9~15時、第2回15~21時、第3回21~翌朝9時までの3回にわたり各時間内の自然排泄尿を集めた。

なお第3回の採取時間は患児の就寝時になるので睡眠および症状への影影を考慮して12時間尿とした。

採取した尿についてそれぞれ容量と比重をはかり、PM-TC 濃度を既報の重層法による尿中濃度測定法

図28. PM-TC 250mg 点滴静注後の尿中濃度 (平均値および最高最低10例)



により測定した。

なお採取した被検尿は 2～6°C の冷蔵庫に保存し 3 検体の PM-TC 濃度を同時に測定した。

実験成績

PM-TC 1 回 250 mg 点滴静注後における尿中排泄濃度は表43および図28, 図29の如くかなり高いことが証明された。

すなわち注射終了後 1～2 時間内に排泄した患者の尿中濃度はすでに血清中濃度の10～30倍高かった。

第 1 回採取ブロックの 0～6 時間内における尿中濃度では最高 360 mcg/ml, 最低 125 mcg/ml とかなり個人差は大きいとその平均尿中濃度 206 ± 67.29 mcg/ml は PM-TC に換算して排泄量 67.38 mg とする。

この量は PM-TC の投与量に対し約 25% にあたり、これがすでに尿中に排泄されたことをしめすもの

である。

平均尿中濃度の低下は引続く24時間の間、血清中濃度の低下よりも緩慢で 6～12時間に 105.9 mcg/ml, 12～24時間に 74.5 mcg/ml をしめた。

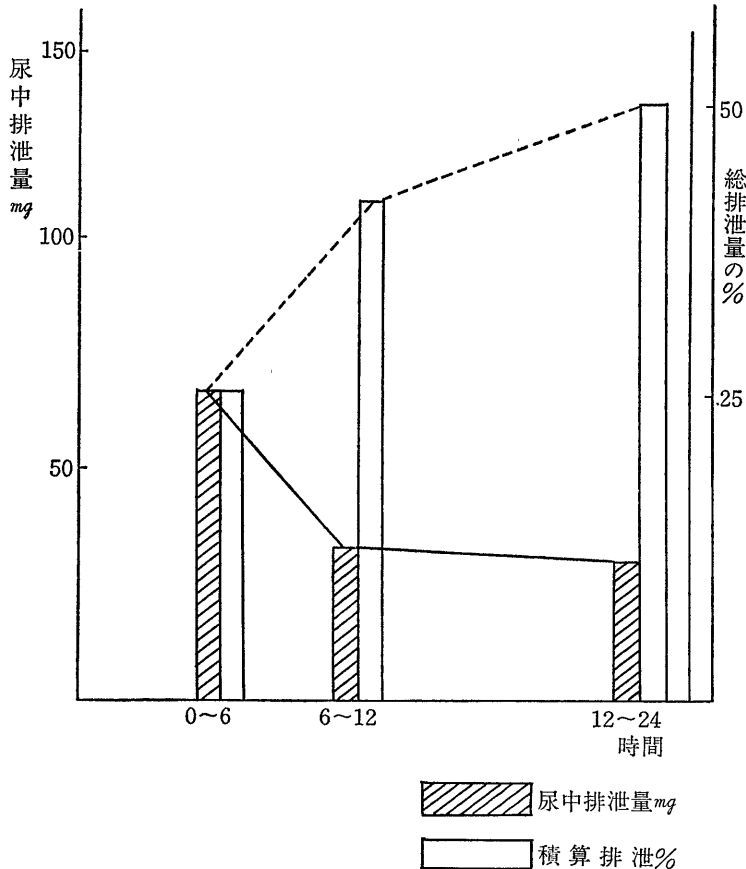
以上 尿中総排泄量 (0～24時間) は PM-TC 250 mg 投与量に対し52.8%の排泄率をしめた。

考察

Tetracycline 系抗生物質の尿中排泄は経口的に与えても、また静注してもかなり長時間にわたり高濃度を持続するもので Wright⁴⁷⁾ および Finland⁴⁸⁾ は Tetracycline の内服後12時間以内に投与量に対し 9～21%, その後12時間においてさらに 4～7%が排泄されるとしている。

D. Strauch⁴⁹⁾ は PM-TC の 250 mg 静注により尿への排泄量は投与後 2 時間までに16%, また24 時間中の全量は55.4%をしめたとしている。

図29. 尿中積算排泄量 (点滴静注 250mg)



同様に Dimmling ら⁵⁰⁾ の実験において24時間中の総排泄量は個人差がやや大きく最高 77.2% から最低 24.3% で、平均 51.3% と報告している。これに反し柴田ら⁵¹⁾ は Pyrrolidino-methyl tetracycline (以下 PRM-TC と略) の24時間中の尿中排泄量はいちじるしく遅く、かつ少なく排泄量として、19.8 mg、投与量に対して 11.5% と報告し、これが PRM-TC が長時間血中に持続する最大の理由であると述べている。

また中沢ら⁵²⁾ の小児における実験では1回量 125mg の静注において12時間までに46.3% の排泄量を、また 100 mg 筋注において12時間までに 34.9~49.8% の排泄量をしめし、どちらも尿中への排泄が高度であることを証明している。

著者の実験は投与方法の異なった点滴静注後における尿中排泄濃度であるが、0~6時間に投与量の約25%、6~12時間に約13%、また24時間中における総排泄量では 132.3 mg で投与量に対して52.8%をしめした。

この値は中沢らの直接静注後における排泄量に比しやや低値ではあるが D. Strauch および Dimmling らの値にはほぼ類似した傾向をしめすもので、いずれにしても尿中への移行が良好で、かつ長時間にわたり高濃度に排泄されることが証明された。

小 括

PM-TC の1回量 250 mg 点滴静注後における尿中濃度はいちじるしく高いことが証明された。

すなわち注射終了後0~6時間の平均尿中濃度は、67.29 mcg/ml で投与量に対し約25%が排泄された。

また引続く24時間の間、尿中濃度の低下は血清中濃度の低下よりも緩慢で、6~12時間では 105.9 mcg/ml、12~24時間では 74.5 mcg/ml であった。なお0~24時間における総排泄量は投与量に対し52.8%であった。

〔VI〕 臓器内濃度

従来より化学療法剤の血中濃度が起炎菌に対する治療効果の指標とみなされてきた。

しかし Ehrlich⁵³⁾、Pratt⁵⁴⁾、Dost⁵⁵⁾、Kuemerle と Contzen ら⁵⁶⁾ は抗菌性物質の効果は血中よりむしろ臓器内濃度、とくに感染をうけている臓器内の濃度に関係すると述べ、また Whelan とその共同研究者ら⁵⁷⁾ は血中濃度が高くなっても臓器内濃度がかならずしも高くない場合や、また逆に血中濃度が低くても臓器内濃度が高くなる場合などがあるので薬物の臓器内濃度を知ることが極めて重要であると報告し

ている。

抗菌性物質のうち PC 濃度は腎に最も高く、血液、肝、腸壁筋、副腎、脳がこれにつき、TC は血中から広く組織内に移行して腎、脾、肝に多く、CP は全身によく行きわたり髄液にも移行する。

また SM は血中量の1/10ぐらいいか組織内に移行しないが、そのうち腎に最も高く、肝、筋、甲状腺がこれにつき、脳、肺、脾などには低いとされている⁵⁸⁾。

臓器内濃度に関する詳細なデータがほとんどないので著者は PM-TC および Oxytetracycline (以下 OTC と略) についてラットを用いて静注後の臓器内濃度の移行と経過時間、および血清中濃度との関係について検討した。

実 験 方 法

ラット (ICR 系、雄、200 g 前後) に静注用 PM-TC 末の蒸留水溶液 (20 mg/ml)、あるいは静注用 O.T.C. 液の 0.9% 食塩水溶液 (20 mg/ml) を 0.5 ml、1回、尾静脈内に注射した。したがって投与量は 50mg/kg となり、これは臨床使用量の5~10倍量で

表44. PM-TC 25mcg/g をラットに投与後の臓器内濃度 (予備実験)

測定時間 臓器	15分	30分	1時間	2時間	4時間	6時間
脳	0	0	0	0	0	0
肺	右 { (不) 54 62	32 30 30	23 23 (不)	(不) 50	25 (不) (不)	(不) (不) (不)
	左 { 62 54 56	(不) 32 42	(不) (不) (不)	23 28 (不)	(不) (不) (不)	(不) (不) (不)
心	15 (不) 11	14 14 10	(不) 10 (不)	14 14 11.5	(不) 6.2	(不) (不) (不)
肝	36 25 46	70 42 70	(不) (不) 36	25 50 50	25 (不) (不)	20 (不) 11
腎	右 { 100 100 90	88 78 (不)	62 46 100	115 100 115	54 50 62	62 42 (不)
	左 { 88 100 90	(不) (不) 88	80 78 90	62 54 70	50 54 56	32 28 (不)
脾	(不) 50 62	54 70 (不)	18 12.5 (不)	16 16 18	(不) 9.4 (不)	10 16 (不)

注: 単位は mcg/g, (不)は測定不能。

ある。

薬液の注入後 5 分, 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間および 6 時間後におおの 3 匹ずつ心臓穿刺により採血し, 直後瀉血して屠殺した。

その後直ちに脳, 肺, 心, 肝, 腎, 脾の各臓器からほぼ等しい大きさの組織片をとり, 血液を十分拭いさって計量し既報の臓器内濃度測定法による重層法で測定した。なお血清中濃度および各臓器希釈液について 3 回ずつ測定して平均値をえた。

注: 予備実験

PM-TC のヒトに用いる 1 回常用量 5 mg/kg の 5 倍量に相当する 25]mcg/g を予備実験としてラットに静注し注入後 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 6 時間におおの 3 匹ずつ屠殺し, 脳, 肺, 心, 肝, 腎, 脾における濃度を臓器内濃度測定法に準じて測定した結果は表 44 にしめす如くである。測定値はバラツキが多く, かつ組織片を 100 倍希釈ホモジネートにするため組織内濃度がうすくなり, 脳, 肺, 心にお

いてことに注射後の 4 ~ 6 時間後の値が測定できないことが多い。

よって以後の実験には 50 mcg/g を使用することにした。なお肺と腎については念のため左と右をわけてそれぞれ測定したところやや異なった値がえられたので以後の実験には左右の組織片を均等に混じて測定することにした。

実験成績および考察

ラットの血清中および臓器内濃度を PM-TC について求めた結果は表 45 に, また OTC については表 46 にしめす如くである。

表中の値はそれぞれ 3 匹のラットについて 3 回あて測定した値である。

これらの平均値を図 30, 31, 32 にまとめ臓器内濃度と血清中濃度をかかげた。

これらから明らかなように PM-TC ならびに OTC を静注すると 5 分後においてすでに PM-TC では, 96.8 mcg/ml, また OTC では 70.7 mcg/ml とき

図30. 血清・脳・肺臓内濃度

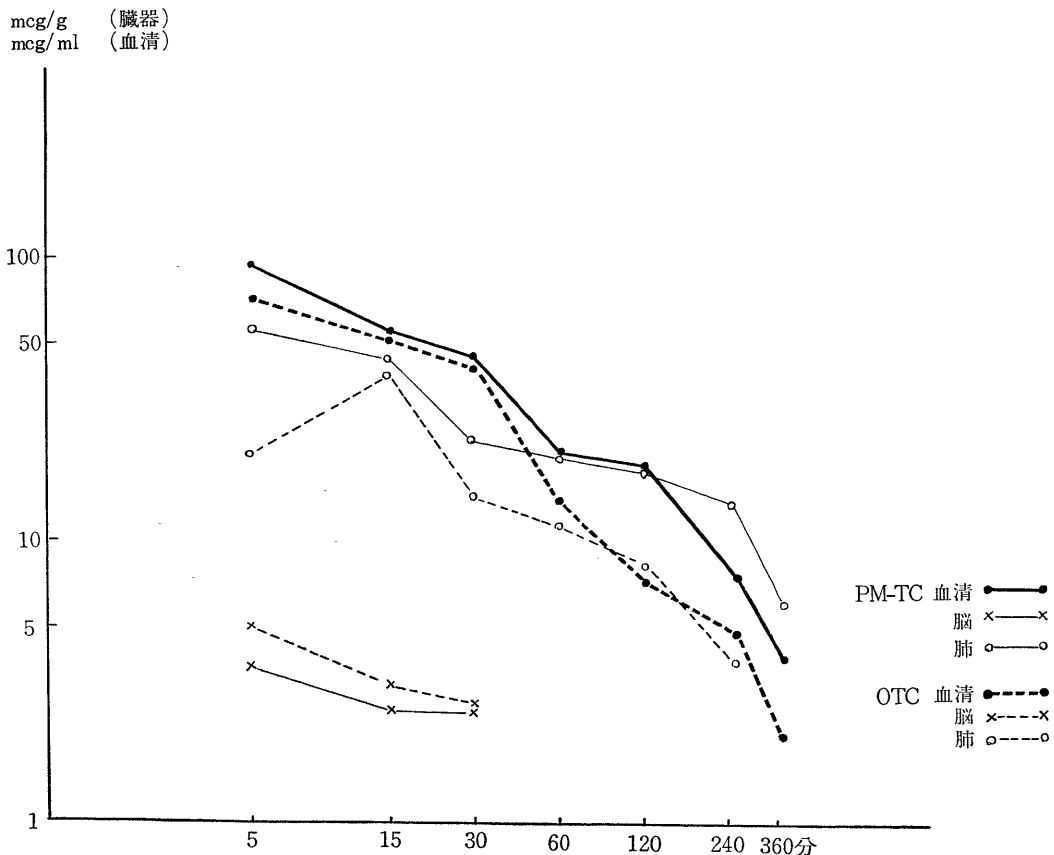


表45. PM-TC 50mcg/g をラットに投与後の血清中および臓器内濃度

測定時間			5 分	15 分	30 分	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間
検体	血清	阻止帯長	10.1	9.15	8.8	7.6	7.3	6.0	4.4
		mm	10.2	9.2	9.0	7.5	7.2	5.8	4.6
		平均	10.15	9.1	8.6	7.4	7.4	5.6	4.8
		計算量 mcg/ml	10.15	9.15	8.8	7.5	7.3	5.8	4.6
			96.5	55.0	45.0	21.0	18.5	7.5	3.8
脳	阻止帯長	mm	4.4	2.8	3.0	0	0	0	0
			4.6	2.6	2.2	痕跡	0	0	0
			4.5	2.4	2.6	痕跡	0	0	0
		平均	4.5	2.6	2.6	0	0	0	0
	計算量 mcg/g	3.6	2.5	2.5	0	0	0	0	
肺	阻止帯長	mm	9.0	8.7	7.6	7.6	7.4	6.8	5.8
			9.2	8.8	7.6	7.2	7.2	6.6	5.6
			9.1	8.6	7.6	7.4	7.3	—	5.4
		平均	9.1	8.7	7.6	7.4	7.3	6.7	5.6
	計算量 mcg/g	54.0	43.0	22.0	20.0	18.5	13.0	6.8	
心	阻止帯長	mm	8.2	7.2	7.0	7.0	6.1	5.5	4.0
			8.3	7.2	6.6	6.4	6.0	5.6	4.4
			8.1	7.2	6.8	6.7	6.2	5.4	4.2
		平均	8.2	7.2	6.8	6.7	6.1	5.5	4.2
	計算量 mcg/g	32.0	17.5	14.0	13.0	9.0	6.4	3.1	
肝	阻止帯長	mm	7.2	7.2	7.05	7.8	7.6	8.1	8.2
			7.0	7.3	6.9	7.6	7.5	8.0	8.3
			7.4	7.4	7.2	7.4	7.4	8.2	8.1
		平均	7.2	7.3	7.05	7.6	7.5	8.1	8.2
	計算量 mcg/g	17.5	18.5	16.0	22.0	21.0	30.0	32.0	
腎	阻止帯長	mm	9.0	10.0	10.2	11.0	9.6	9.4	8.6
			8.7	10.2	10.3	10.8	9.8	—	8.4
			8.4	9.8	10.1	10.6	9.4	9.3	8.2
		平均	8.7	10.0	10.2	10.8	9.6	9.35	8.4
	計算量 mcg/g	43.0	93.0	101.5	150.0	73.0	62.5	36.0	
脾	阻止帯長	mm	7.4	8.25	8.6	8.0	7.55	7.1	6.8
			7.2	8.4	8.6	7.8	7.6	7.0	6.6
			7.3	8.1	8.6	7.6	7.5	7.2	6.4
		平均	7.3	8.25	8.6	7.8	7.55	7.1	6.6
	計算量 mcg/g	18.5	33.0	40.0	25.0	20.3	16.5	12.0	

注: 単位は mcg/ml (血清), mcg/g (臓器).

表46. OTC 50mcg/g をラットに投与後の血清中および臓器内濃度

測定時間		5 分	15 分	30 分	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間
検体								
血 清	阻止帯長 mm	8.6	8.1	7.8	6.2	5.2	4.5	2.3
		8.55	8.0	7.75	6.3	5.4	4.7	2.4
		8.5	7.9	7.7	6.4	5.3	4.9	2.5
	平均	8.55	8.0	7.75	6.3	5.3	4.7	2.4
計算量	mcg/ml	70.5	50.0	42.5	14.5	7.2	5.0	2.1
脳	阻止帯長 mm	4.7	3.8	3.8	0	0	0	0
		4.6	4.2	3.4	0	0	0	0
		4.8	4.0	痕跡	0	0	0	0
	平均	4.7	4.0	3.6	0	0	0	0
計算量	mcg/g	5.0	3.1	2.6	0	0	0	0
肺	阻止帯長 mm	6.7	7.6	6.4	6.0	5.8	4.2	0
		6.75	7.8	6.3	6.1	5.3	4.2	0
		6.8	7.7	6.2	5.9	5.5	—	0
	平均	6.75	7.7	6.3	6.0	5.5	4.2	0
計算量	mcg/g	20.5	39.5	14.5	12.0	8.0	3.6	0
心	阻止帯長 mm	6.6	6.4	6.3	5.8	5.2	4.6	0
		6.8	6.5	6.2	5.8	5.3	4.4	0
		6.4	6.3	6.1	—	5.1	4.5	0
	平均	6.6	6.4	6.2	5.8	5.2	4.5	0
計算量	mcg/g	18.5	15.5	13.5	10.0	6.7	4.2	0
肝	阻止帯長 mm	6.0	6.4	6.8	6.4	5.8	5.6	3.4
		6.1	6.6	7.0	6.6	6.0	5.6	3.5
		6.2	6.2	6.9	6.5	5.6	—	3.6
	平均	6.1	6.4	6.9	6.5	5.8	5.6	3.5
計算量	mcg/g	12.5	15.5	23.0	17.0	10.0	8.6	2.5
腎	阻止帯長 mm	11.6	11.0	10.4	9.8	8.2	7.4	5.6
		11.8	10.8	10.8	10.0	8.1	7.5	5.4
		11.7	10.9	10.6	9.6	8.3	7.3	—
	平均	11.7	10.9	10.6	9.8	8.2	7.4	5.5
計算量	mcg/g	340.0	235.0	205.0	145.0	55.0	33.0	8.0
脾	阻止帯長 mm	7.55	7.1	6.75	6.7	6.2	5.1	4.5
		7.6	7.2	6.75	6.5	6.4	5.2	4.7
		7.5	7.3	—	6.6	6.6	5.3	4.9
	平均	7.55	7.2	6.75	6.6	6.4	5.2	4.7
計算量	mcg/g	36.0	27.5	20.5	18.0	15.5	6.7	5.0

わめて高い血清中濃度に達した。

このような高い血清中濃度は PM-TC では2時間にわたって持続するが、OTC では1時間しか続かなかった。また6時間後における血清中濃度では PM-TC の血清中濃度が 3.9 mcg/ml の高い値を持続したが、OTC は 2.1 mcg/ml で PM-TC にくらべほぼ1/2に低下した。

一方臓器内濃度は注射初期においては血清中濃度より低いが、注射1時間後には心臓や肺臓内の濃度は血清中濃度と同時に高くなり、脾臓や肝臓内の濃度は血清中濃度よりはるかに高くなった。

ただ肝臓において PM-TC と OTC との間に異なった現象がみられた。

すなわち PM-TC では注射後の初期において肝臓内の濃度が低く時間とともに次第に増加して、4~6時間後にピークに達したのに反し、OTC では初期の30~60分に最も高く以後ゆるやかに低下した。

しかし脳へは両薬剤とも移行が悪いことは注意をひいた。

血清と腎との関係については図32にしめしたがこれは静注後の排泄に関してとくに重要な点である。

著者は臓器内濃度の測定によって腎臓が両者の主要排泄器官であることを知ったが、PM-TC と OTC では排泄の状況に相違があることもわかった。

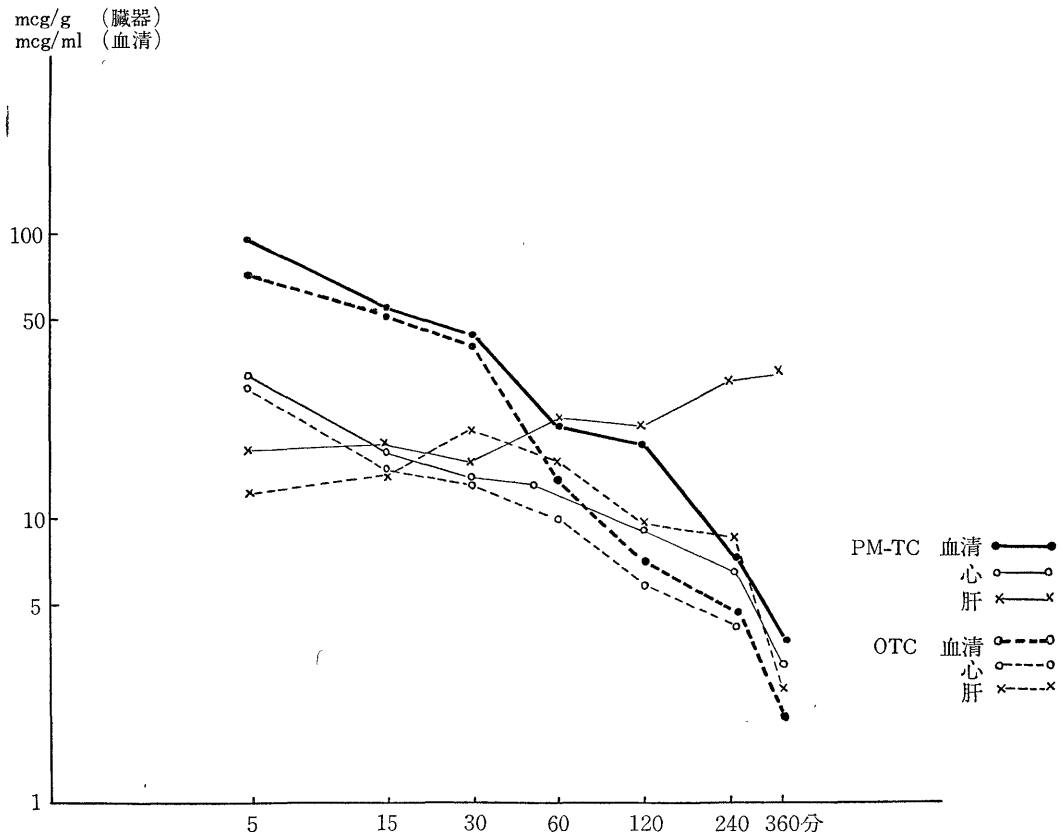
すなわち PM-TC の腎臓内濃度は注射直後では血清中濃度のほぼ1/2であったが時間とともに次第に高くなって1時間後にピークとなり 150 mcg/g に達した。

以後の濃度はゆるやかに低下したが腎臓内濃度は最初の5分間を除いては血清中濃度よりも高く6時間後においてもなお血清中濃度の5~10倍に保たれていた。

一方 OTC の腎臓内濃度は注射直後の初期濃度において最も高く 340 mcg/g をしめた。この値は血清中濃度の約5倍に相当するものである。以後は1時間後まで高濃度を保ちながら徐々に低下し6時間後に急激に減少した。

このように PM-TC では徐々に腎から排泄される

図31. 血清・心臓・肝臓内濃度



のに対して OTC では注射後組織に分布される前に、直ちに大量が腎臓に入りすみやかに排泄されるのである。その結果両者の初期血清中濃度においても当然相違がみられるのである。

以上のことから PM-TC と OTC とは抗生物質として同じ抗菌スペクトルをもっているが動物の臓器内濃度の動きは同一ではないことを知った。

なお臓器内濃度は血清中濃度と密接な関係を持っていることも確認された。

小 括

静注用 PM-TC と OTC との臓器内分布をしらべるためラットを用いて 50 mcg/g あてを静注し注射終了後の 5 分, 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間および 6 時間後における血清中濃度と脳, 肺, 心, 肝, 腎, 脾の各臓器における濃度を測定してつぎのこ

とを知った。

1. PM-TC および OTC とも静注後の初期濃度において高い血中濃度に達した。

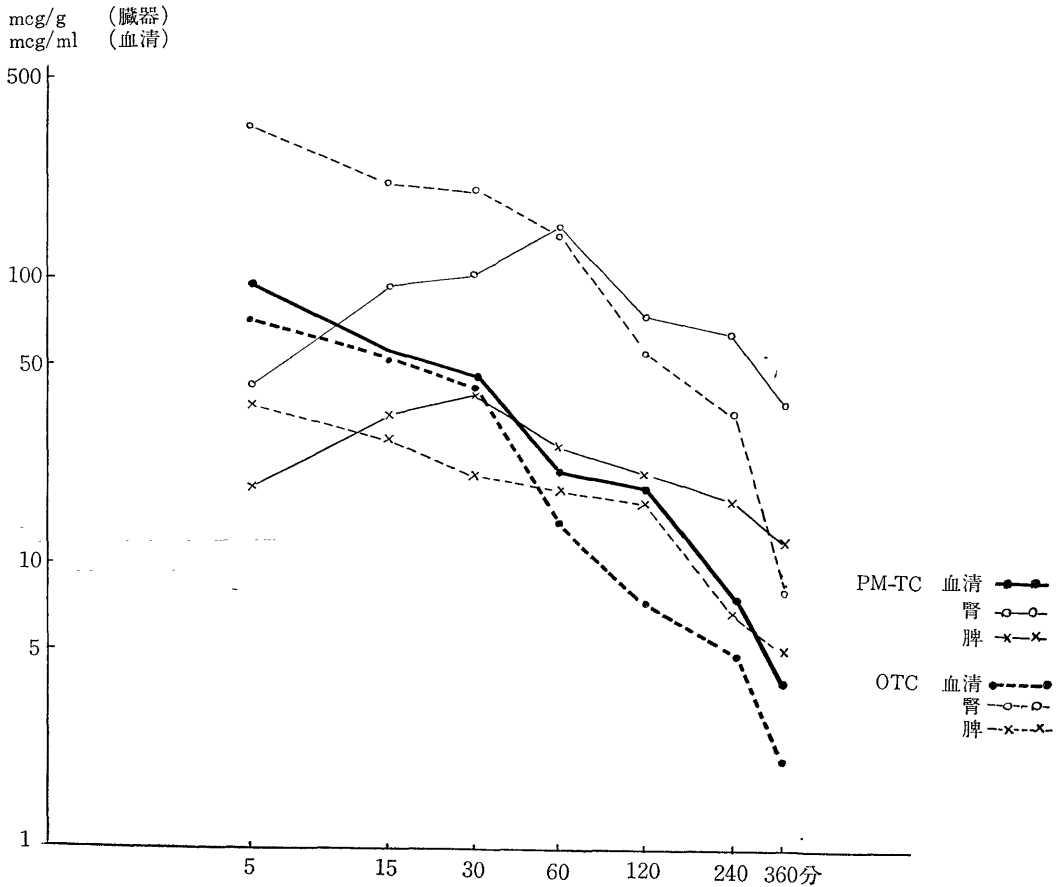
PM-TC では 96.8 mcg/ml, OTC では 70.7 mcg/ml をしめた。なお高い濃度は前者では 2 時間持続したが, 後者では 1 時間しか持続しなかった。

2. 両製剤とも各臓器に高濃度に分布されることが認められた。しかし脳質へは移行しにくいことも明らかにされた。

なお初期の 2 時間においては, 血中濃度の方がむしろ高かったが以後次第に臓器内濃度の方が高くなった。

3. PM-TC は OTC にくらべ初期血中濃度が高く, また臓器内濃度においても腎をのぞき, 肺, 心, 肝, 脾の含有量が高かった。PM-TC の臓器内濃度は初期において肺>腎>心>脾>肝の順であり, また 6 時間後では腎>肝>脾>肺の順に高かった。

図32. 血清・腎臓・脾臓内濃度



4. OTC の腎臓内濃度は注射後の15~30分に最も高く以後の排泄が早かったが、PM-TC では注射後徐々に上昇して1時間後にピークとなり以後ゆるやかに下降した。

5. 臓器内濃度を高めるためにはやはり血中濃度を高める必要がある。

〔VII〕 臓器による不活性化

薬物は経口投与により腸管から肝に達するが、静脈注射では直ちに体循環を経て大部分は肝に入る。

これら投与法はいずれであれ加水分解を除けば、薬物の大部分は肝ミクロゾームで変化をうけるもので、これについて腎、肺、脾、脳、筋肉などで分解される。

しかしときには肝が主要部位でない場合もある⁵⁹⁾。

たとえば Glycine 抱合などは肝よりむしろ腎の方が強い活性をしめすことが知られており、これは反応に関与する酵素の分布によるものである⁶⁰⁾。抗生物質の生態を考える時、臓器における不活性化が生体内における薬物の運命に重要な意義を有することは明らかである。

しかし臓器内における薬剤の不活性化については報告が少なく PC について Tepperman⁶¹⁾, Rakieten⁶²⁾, SM について大村⁶³⁾, CM について Ley⁶⁴⁾, Smith⁶⁵⁾, EM について Lee⁶⁶⁾, TC について Mazzeo⁶⁷⁾, また黒田⁶⁸⁾らの一連の抗生物質に関する比較実験があるのみである。

よって著者はラット臓器ホモジネートによる PM-TC の不活性化について試験管内実験を行ない抗生物質の作用機転の一面を明らかにせんとした。

実 験 方 法

ラット (ICR 系, 雄, 200g 前後) を頸動脈から出血させて殺し、屠殺直後の 3 匹の臓器から脳, 心, 肺, 肝, 腎, 脾などの各臓器組織片を均等にとりだし計量して既報の臓器ホモジネート調製法に準じて調製した。

標準曲線および臓器内濃度の可測範囲は既報の臓器内濃度測定法と同様である。

一定量の臓器組織片に PM-TC 含有の 0.9% 食塩水の一定量をくわえて 10% ホモジネート液をつくり、さらに pH6.2 磷酸緩衝液で 1% ホモジネート液を調製した。

これらを混合直後 および 37°C 恒温槽に置いて 30 分, 60 分, 120 分ごとにその一部をとりだし既報の重層法による臓器内濃度測定法に準じて測定した。

実 験 成 績

混合直後および 37°C 恒温槽における臓器内薬剤の不活性化の時間的影響を調べた結果は表 47, 表 48 および図 33 にしめす如くである。

PM-TC の各臓器による不活性化の影響は 250mcg/ml では各臓器による不活性化の影響が弱く、60 分後で脳, 腎が混合直後に比し約 20%, 120 分後で肝が約 30% の力価低下がみられた。

これに対して 1,000 mcg/ml では混合後の 30~60 分に各臓器とも不活性化が急速に進み、特に心, 腎, 肝では混合直後の力価に比し約 30~40% も力価低下がみられ以後漸減した。

考 察

生体内に入った薬物は効果をあらわすとともに、ある時間を経過するとその薬効が消失する。それは薬物が生体内で不活性化されるか、または排泄されるためである。

薬物の生体内変化には酸化, 還元, 加水分解, 抱合など種々の生化学反応があつて極めて複雑である。大部分のものは肝ミクロゾームに局在する酸化酵素により、また肝臓, 腎臓で作られる抱合体により不活性化し、高度にイオン化し水溶液となって容易に尿中に排泄されるようになる。

抗生物質も種々の条件下で体内諸臓器により不活性化されるが⁵⁹⁾⁻⁶⁷⁾、なかでも黒田⁶⁸⁾らの同一条件下による抗生物質各剤の試験管内実験で PC は脾臓, 腎臓, CM は肺臓, 腎臓, TM は肺臓, TC は脳, 肺臓, 肝臓, 脾臓などにより不活性化される傾向がみられ、SM, AM, EM などはいずれの臓器にも不活性化されなかったと報告している。

著者はラットの各臓器による PM-TC の不活性化の影響を調べたところ、肝臓による作用が最も強く抗菌力が時間とともに徐々に低下することを知った。

臓器による不活性化の経時的変化を検討するには、対照となる混合直後における PM-TC の力価を正確に測定することが必要である。これは混合直後のものと以後の各経過時間におけるものとを同一条件下で測定する方法と、各時間毎に単独で測定して総体から比較する方法とがあるが、両者の間にはそれぞれ培地の組成, 重層液の温度, 培養時間などの関係で不活性化作用におよぼす影響が異なるものと考えられる。

これらについて黒田⁶⁸⁾らは一定量の試料をくわえた臓器ホモジネート液を対照とするため、臓器酵素活性が抑制されると思われる -2°C に保って測定してい

表47. 臓器ホモジネートにおける抗菌力の経時的変化 (PM-TC 250mcg/ml と混合)

時間 **臓器		室温*	37°C 恒温槽		
		混合直後	30分	1時間	2時間
脳	阻止帯長 mm	6.2	6.2	6.1	6.2
		6.0	6.0	5.9	5.8
		6.1	6.1	6.0	6.0
	平均	6.1	6.1	6.0	6.0
計算値mcg/ml 回収率 %		2.15 86	2.15 86	2.0 80	2.0 80
*		100	100	93.0	93.0
肺	阻止帯長 mm	6.2	6.1	6.1	6.1
		6.3	6.4	6.1	6.1
		6.1	6.1	5.9	5.8
	平均	6.2	6.2	6.0	6.0
計算値mcg/ml 回収率 %		2.3 92	2.3 92	2.0 80	2.0 80
*		100	100	86.9	86.9
心	阻止帯長 mm	6.3	6.3	6.2	6.2
		6.5	6.1	6.1	6.1
		6.1	5.9	6.0	6.0
	平均	6.3	6.1	6.1	6.1
計算値mcg/ml 回収率 %		2.4 96	2.15 86	2.15 86	2.15 86
*		100	89.5	89.5	89.5
肝	阻止帯長 mm	6.4	6.3	6.3	6.0
		6.3	6.1	6.1	5.6
		6.2	6.2	6.2	5.8
	平均	6.3	6.2	6.2	5.8
計算値mcg/ml 回収率 %		2.4 96	2.3 92	2.3 92	1.8 72
*		100	95.8	95.8	76.0
腎	阻止帯長 mm	6.2	6.1	6.1	6.1
		6.3	6.3	6.0	6.0
		6.1	5.9	5.9	5.9
	平均	6.2	6.1	6.0	6.0
計算値mcg/ml 回収率 %		2.3 92	2.15 86	2.0 80	2.0 80
*		100	93.4	86.9	86.9
脾	阻止帯長 mm	6.1	6.0	5.8	5.9
		6.3	6.4	6.2	6.1
		6.2	6.2	6.0	6.0
	平均	6.2	6.2	6.0	6.0
計算値mcg/ml 回収率 %		2.3 92	2.3 92	2.0 80	2.0 80
*		100	100	86.9	86.9

注: PM-TC 250mcg/ml の100倍希釈 (計算値 2.5 mcg/ml).

* 各臓器の混合直後における力価を100%とした場合
** 3匹のラット臓器による

表48. 臓器ホモジネートにおける抗菌力の経時的変化 (PM-TC 1,000mcg/ml と混合)

時間 **臓器		室温*	37°C 恒温槽		
		混合直後	30分	1時間	2時間
脳	阻止帯長 mm	8.0	7.6	7.2	7.5
		8.4	8.0	8.0	7.9
		8.2	8.4	7.6	8.3
	平均	8.2	8.0	7.6	7.9
計算値mcg/ml 回収率 %		9.0 90	7.8 78	6.0 60	7.3 73
*		100	86.6	66.6	80.1
肺	阻止帯長 mm	8.3	8.6	8.4	7.7
		8.2	8.2	8.0	8.2
		8.1	7.8	7.6	8.7
	平均	8.2	8.2	8.0	8.2
計算値mcg/ml 回収率 %		9.0 90	9.0 90	7.8 78	9.0 90
*		100	100	86.6	100
心	阻止帯長 mm	8.2	8.2	8.0	8.0
		8.4	7.9	7.8	7.6
		8.0	7.6	7.6	7.2
	**	8.2	7.6	7.8	7.6
計算値mcg/ml 回収率 %		9.0 90	7.3 73	6.8 68	6.0 60
*		100	86.6	86.6	75.5
肝	阻止帯長 mm	8.1	8.0	8.0	7.8
		8.2	8.2	8.3	8.3
		8.3	7.8	7.7	7.3
	平均	8.2	8.0	8.0	7.8
計算値mcg/ml 回収率 %		9.0 90	7.8 78	7.8 78	6.8 68
*		100	86.6	86.6	75.5
腎	阻止帯長 mm	8.2	7.6	7.4	7.3
		8.4	8.2	8.2	8.3
		8.0	7.9	7.8	7.8
	平均	8.2	7.9	7.8	7.8
計算値mcg/ml 回収率 %		9.0 90	7.3 73	6.8 68	6.8 68
*		100	80.1	75.5	75.5
脾	阻止帯長 mm	8.6	8.2	8.3	8.3
		8.4	8.0	8.0	8.1
		8.2	7.8	8.0	8.2
	平均	8.4	8.0	8.1	8.2
計算値mcg/ml 回収率 %		9.6 96	7.8 78	8.3 83	9.0 90
*		100	81.2	86.4	93.7

注: PM-TC 1,000mcg/ml の100倍希釈液 (計算値 10mcg/ml).

* 各臓器の混合直後における力価を100%とした場合
** 3匹のラット臓器による

るが、この方法にも種種の問題があったたとえば試料の調製後フ卵器で培養する場合対照の温度と各試料の温度差が培養後における阻止帯長に影響をおよぼすことも考えられる。

よって著者は混合直後の対照試料を氷冷保存することなく直ちに室温下で、また経時変化は 37°C で定量した。

不活化は 37°C 30~60分に急速に進み以後漸減したがこの現象は PM-TC の高濃度液との混合において強くあらわれ、特に心、肝、腎では時間とともに力価が減少した。これに対して低濃度液との混合では各臓器の不活化の影響がそれほど明瞭にあらわれずただ肝のみが時間とともに徐徐に力価が低下した。

小 括

ラットの脳、肺、心、肝、腎、脾などの臓器ホモジネートによる PM-TC の不活化の影響を既報の重層法による臓器内濃度測定法に準じて調べた。

各臓器による不活化作用は 37°C において初期急速に進み以後漸減した。

この現象は PM-TC の高濃度溶液との混合に強くあらわれ、とくに心、肝、脾では混合後の30~60分における力価低下が著しく以後も徐徐に減少した。

これに対して低濃度溶液との混合では不活化作用が弱く、ただ肝にのみ力価低下がみられた。

〔Ⅷ〕 met Hb の形成について

従来塩酸テトラサイクリンを静脈注射するには、大

量の溶媒に溶解して使用しなければならなかった。しかしこのような予防策にもかかわらずしばしば静脈炎や血栓症などをひきおこした。

この理由について H'. Bohn, E. Koch ら⁶⁹⁾はテトラサイクリンの濃度が高いためではなく、むしろ溶液の pH が関係していると考えている。

PM-TC の静脈内注射においてもまれに血管痛、悪心、嘔吐、および灼熱感などの副作用をとまうとの報告がある⁶⁹⁾⁻⁷²⁾。これらの副作用の原因を知るため著者はヒト血液について溶血試験を *in vitro* において試みた。

実験方法

1. 試料

1) 赤血球浮遊液の作製

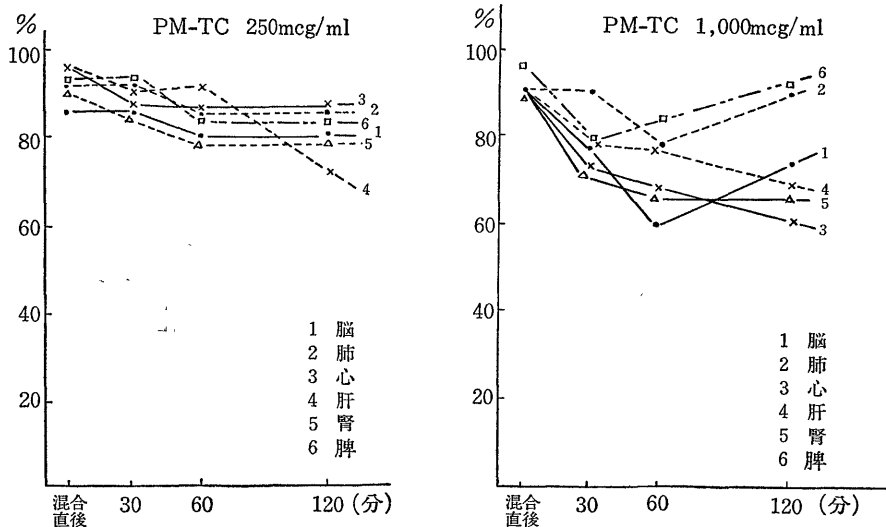
i) 新鮮ヒト血液(抗凝固剤の入らない)の 1 ml をとり、滅菌生食水 9 ml 中にゆるやかに注入し、2,500~3,000 r.p.m. で遠心分離を3分間した後上清をのぞき、同量の生食水で3~4回洗浄を繰り返して10%赤血球浮遊液をつくった(以下ヒト血球液と略)。

ii) E.D.T.A.(第一化学)加健康人血液を i) と同様の操作で数回洗浄して血漿をのぞき、赤血球食塩浮遊原液をつくり、実験の都度この原液に生食水の適当量を加えて10~20%血球浮遊液をつくった(以下 E.D.T.A. 血球液と略)。

2) 脱線維素血液

無菌的にとった新鮮ヒト血液をガラス玉の入ったコルペン中でふり脱線維素血液をえた。

図33. 臓器ホモジネートにおける抗菌力の経時的变化



3) 薬液

PM-TCの純末, ならびに静注用末, Tetracycline (以下 TC と略), Tetracycline-Hcl (以下 TC-Hcl と略), また 対照として Saponin-Na 末などを生食水を用いておのおの倍数希釈液 20~0.156 mg/ml 液をつくった.

2. 溶血試験

薬液の 9ml に赤血球浮遊液の 1ml を加え, 37°C 恒温槽中に静置し, 1 時間値を予備観察とし, 2 時間値をもって判定した.

結果の読取りは完全溶血をおこなっている最少希釈倍数をもって溶血指数 (H.I.)* とした⁷³⁾. なお溶液の pH はガラス電極 pH メータ (東洋科学製) で測定した.

3. 色調の変化

薬液 5 ml に脱線維素血液 5 滴を加え室温において 1 時間観察し, メトヘモグロビン (以下 met Hb と略) 特有の暗褐色の変化をしらべた⁷⁴⁾.

$$* \quad H. I. (\text{溶血指数}) = \frac{V}{\frac{P}{100} \times S}$$

V; 試験管内の全量

P; 検液中の生薬%

S; 用いた検血量

4. PM-TC と赤血球浮遊液の吸収スペクトル測定

PM-TC 静注用末の 12.5~200 mcg/ml および 10% ヒト赤血球液をそれぞれ 0.85% 生食水を溶媒とし, PM-TC 液 9 ml に血球液 1 ml を加え, 日立 Ep 型自記分光光度計で紫外部・可視部スペクトルを測定した.

実験成績

1. 薬剤溶血試験

まず予備実験として Saponin-Na による溶血度についてしらべた. Saponin-Na の 400~6.2 mcg/ml の倍数希釈液をつくり, これに 10% ヒト血球液を加えて溶血をしらべたところ表 49 にしめす如く完全溶血は 20,000 倍 (50mcg/ml) で, H. I. は 22,222 であった.

つぎに PM-TC の純末, および静注用末の溶血度を Saponin-Na を対照として 800~6.2 mcg/ml の倍数希釈液についてしらべたところ表 50 にしめす如く PM-TC の純末を用いた濃度範囲ですべて溶血作用は認められなかった.

ただし静注用末では 10,000 倍数 (100 mcg/ml), 以上の濃度では橙赤色の溶血作用が認められなかったが met Hb 様の淡暗褐色~黒褐色の変化が認められた.

表 49. Saponin による溶血試験

濃度 mcg/ml	No.						
	1	2	3	4	5	6	7
400	200	100	50	25	12.5	6.2	
判定	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
希釈倍数値	2,500	5,000	10,000	20,000	40,000	80,000	160,000

表 50. PM-TC による溶血試験

濃度 mcg/ml	No.									対照
		1	2	3	4	5	6	7	8	生食
PM-TC 純末	判定	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	pH	5.91	6.1	6.15	6.15	6.25	6.3	6.45	6.5	6.6
PM-TC 静注用末	判定	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	pH	4.25	4.28	4.3	4.48	4.65	5.5	6.2	6.25	6.6
Saponin-Na	判定	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	
希釈倍数値		1,250	2,500	5,000	10,000	20,000	40,000	80,000	160,000	

(37°C 2 時間値)

表51. E.D.T.A. 加血球液の PM-TC 静注用末による溶血試験

濃度 mg/ml	No.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	対照
判定	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
pH	3.42	3.49	3.55	3.65	3.7	3.9	4.1	4.5	5.5	5.7	5.9	6.25	6.3

これは静注用末に添加してある安定剤や緩衝剤による影響と思われる。

この現象は E.D.T.A. 加血球液の実験においても同様で表51に示す如く 160 mcg/ml 以上において暗褐色の変化をみとめた。

さらに PM-TC の純末、および静注用末溶液を加えたヒト血球液、E.D.T.A. 加血球液の pH を測定すると、表50, 51, 52に示す如く静注用では各試料において純末液に比しはるかに pH が低かった。これら両者における pH の相違が血球変性をおこす誘因となっているのではなからうかと思われる。

つぎに Clak-Lubs 緩衝液を用いて、静注用末液の pH を pH 3.1, 4.05, 5.09, 6.31, 7.05 などの5段階に調製し、これに10%ヒト血球液を加え上記試験に準じてしらべると、pH 3.1 で直ちに暗褐色に、pH 4.05 では10~20分後に、また pH 5.09 では10~12時間後に淡暗褐色に変化した。

2. PM-TC による色調の変化

ヒト脱線維素血液について PM-TC の純末、および静注用末の生食水溶液による色調の変化をしらべると表53に示す如く PM-TC 純末液では 0.01~10 mg/ml 範囲ではなんらの変化も認められなかったが、PM-TC 静注用末液では 0.62 mg/ml において(±)、1.25mg/ml 以上において (+) であった。

なお PM-TC の 1.25mg/ml における1滴の含有量はほぼ 42mcg/ml である。

つぎに被検液の pH についてしらべると、反応を生じた PM-TC 静注用液の 0.62 mg/ml で pH 4.7 であり、10 mg/ml で pH 3.52 の強酸性であった。

これに反し PM-TC 純末液では、0.62 mg/ml で pH 7.1 であり高濃度の 10 mg/ml でさえ pH 6.35 の弱酸性であることから両者の pH による差が色調変化に関与しているのではなからうかと思われる。

3. met Hb 確認試験

PM-TC (静注用末) の12.5, 25, 50, 100mcg/ml とヒト赤血球浮遊液を、それぞれ 9:1 の割に混合し吸収スペクトルをしらべると、図34に示す如く

表52. PM-TC 純末、静注用末の生食水液の pH

濃度 mcg/ml	種類	
	純末	PM-TC 静注用末
800	4.85	3.55
400	5.08	3.6
200	5.35	3.65
100	5.4	3.7
80	5.45	3.8
40	5.5	4.0
20	5.5	4.3
10	5.52	4.7
5	5.52	5.1
2.5	5.53	5.25
1.25	5.54	5.3
生食水	5.65	5.65
市販注射用生食水	6.4	6.4

表53. PM-TC 純末、静注用末による色調の変化

PM-TC 純末 mg/ml	pH	暗褐色様色調度合	PM-TC 静注用末 mg/ml	pH	暗褐色様色調度合
10	6.35	(-)	20	3.4	(卅)
5	6.55	(-)	10	3.52	(卅)
2.5	6.85	(-)	5	3.7	(卅)
1.25	7.0	(-)	2.5	4.1	(+)
0.62	7.1	(-)	1.25	4.32	(+)
0.31	7.28	(-)	0.62	4.7	(±)
0.156	7.3	(-)	0.31	5.75	(-)
0.08	7.32	(-)	0.156	6.6	(-)
0.04	7.35	(-)	0.08	7.1	(-)
0.02	7.38	(-)	0.04	7.3	(-)
0.01	7.4	(-)	0.02	7.35	(-)
			0.01	7.4	(-)
生食水	7.4	(-)	生食水	7.4	(-)

(ヒト脱線維血液)

色調の判定

- 卅: 20分後に完全に暗褐色を形成
- 卍: 30分後 "
- +: 50分後 "
- : 60分後においても変化はみとめられない

PM-TC の 11.25, 22.5, 45 mcg/ml では, Hb 特有の極大吸収のほうが高く、わずかに met Hb 様スペクトルのあらわれることが認められた。

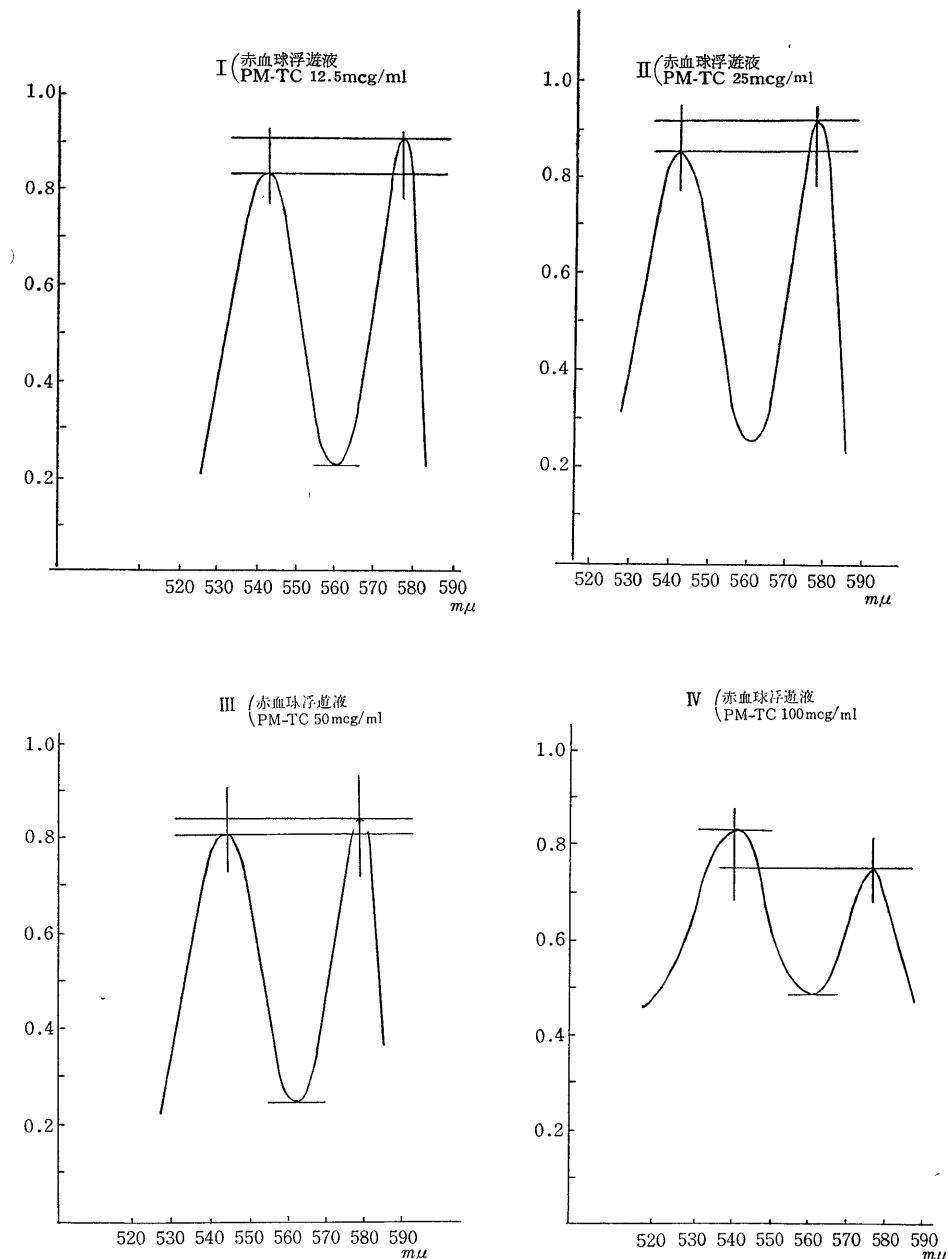
しかし 100 mcg/ml ではピークの高さが逆転して 530~540 m μ に強い吸収があらわれた。

この範囲の吸収帯は met Hb, および sulf-Hb の特有のスペクトルである。

さらに met Hb を確認するため PM-TC 100mcg/ml に青酸カリ溶液を添加して前同様の方法でスペクトルを求めると、前回の 530~540 m μ に認められた吸収帯がほとんど消失した⁷⁵⁾。

よってこれらの実験から定性的ではあるがPM-TC と赤血球液との間には特有な分子間作用がおこることが推定される。

図34. Hb および metHb の吸光曲線



考 察

著者が本実験で検討した PM-TC 純末液の濃度範囲では溶血現象がみられなかった。

一方 PM-TC 静注用末液では溶血現象がみられなかったが、暗褐色の met Hb 様の変化を生じた。

一般に met Hb 血を生ずる薬物には、アセトアニリド、アンチピリン、スルファミン剤などがある。

本実験において PM-TC の純末液ではなんら変化なく静注用末液のみ met Hb 変性がみられるのは、PM-TC の安定剤として加えてあるグルコン酸マグネシウム、およびアスコルビン酸などが溶液の酸性度を一層強めるため、Hb 分子中の還元型 Fe²⁺ が酸化をうけて褐色の Fe³⁺、すなわち met Hb に変化するのではなからうかと思われる。

投与方法と副作用：PM-TC の静注時に使用される濃度は 12.5 mcg/ml の高濃度であり、また 1 秒間に 1.38 mg が注入されることになる。この程度は著者が赤血球浮遊液の *in vitro* において確認した met Hb 形成濃度にほぼ近いものである。

ただ上記の血球浮遊液による実験値をもってそのまま実際投与の場合にあてはめるわけにはゆかない。なぜなら血液中では血球のしめる割合がほぼ50%にすぎないからである。

つぎにこれらの濃度を実際にヒトに静注してみると往々悪心、口内異和感、血管痛などをともなうことがある。ことに注射速度を 1～2 分間位に早めて注入すると、注入中あるいは注入後にこのような症状が強くあらわれる。ただしこれらの副作用はすべて一過性で注射終了後 3～5 分間で消失する。

以上のことから PM-TC の高濃度であることが、直ちに血栓症や静脈炎の原因になるとは断定し難いが、高濃度溶液は赤血球と met Hb 変性をおこしやすいということからも、副作用を誘発する一因をなしているのではないかと考えられる。

よって PM-TC を静注する時には、できるだけ溶媒で希釈するか、あるいは注入速度をゆるやかにして注射するほうがより安全であり、また点滴静注は著者の実験においてなんら副作用をともなわないことをみたので良い投与方法といわねばならない。

小 括

1. PM-TC のヒト血球浮遊液による溶血試験において、純末液では 6.2～800 mcg/ml の濃度範囲において未変化であった。

これに反し静注用末では溶血現象がみられなかったが、50 mcg/ml 以上の濃度において黒褐色のメトヘモグロビン様変性を生じた。

2. PM-TC 静注用末はヒト脱線維素血液では 42 mcg/ml (PM-TC 1.25mg/ml の 1 滴の含有量) 以上の濃度で茶褐色のメトヘモグロビン様反応を生じた。なお反応生成物は可視部スペクトル分析により 530～540m μ に特有な吸収帯をもつことが明らかになり、メトヘモグロビンであることを確認した。

3. 静注時における副作用は溶媒により希釈度を大にするか、あるいは注入速度を 5 分間以上かけてゆるやかに注射したほうがある程度防ぐことができる。

一方大量の補液で希釈して行なう点滴静注は副作用をともなうことなく安心して使用できる投与方法である。

〔IX〕 総 括

Tetracycline は毒性が非常に少ない Broad spectrum 抗生物質であるが、その反面経口投与時における血清中濃度が比較的低いのでこの欠点を補うため静脈注射用として N-(Pyrrolidino-methyl) tetracycline nitrate (以下 PM-TC と略す) が合成された。

本研究は PM-TC の抗菌性、血清中・尿中濃度の動態、タンパク結合性、赤血球吸着性、臓器内濃度、臓器による不活性化、Hb に対する作用などに関する一連の基礎研究を行なって、薬剤の生物学的活性を明らかにして、臨床における適正な使用法の研究に資せんとした。

PM-TC の微生物定量法として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株を用いて重層法をとりあげた。この重層法により血清中・尿中・臓器内における濃度を測定した。

1. 微量定量を目的として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を試験菌とする重層法を検討し、枯草菌芽胞浮遊液の 1%、0.1% メチレン青液の 2%、2% 硝酸ナトリウム液の 1% を添加した 0.5% 普通寒天培地 (無修正, pH6.2) および試料の希釈液として pH6.2 磷酸緩衝液を使用して最低 0.31 mcg/ml の薬剤を測定し得る実験法を得た。

つぎにこの重層法の生体試料への適用法について検討し、血清試料は抗凝固剤の入らない血清を用いこれを pH 6.2 磷酸緩衝液で 5 倍希釈して最低 0.5 mcg/ml を、尿試料ではキシロールの 0.5% 添加したものについて pH 6.2 磷酸緩衝液で 10 倍希釈して最低 3

mcg/ml を、また臓器試料では細断した試料を 0.9% 食塩水 および pH 6.2 磷酸緩衝液で ホモジネート・100倍希釈しこれを 沸騰水中に加熱・遠心分離した上清液で 30 mcg/g を測定し得る実験法を得た。

なお血清中および臓器内濃度測定培地には阻止帯を大にするため既報の重層培地に20%クエン酸ソーダ液 5 ml を添加したものを用いた。

2. 健康年長児に静脈注射ならびに点滴静脈注射した場合の血清中濃度は Tetracycline 系薬剤の経口投与ではえられない高血清中濃度をしめし、また持続性も予想外にすぐれていた。

すなわち PM-TC の 1 回量 250mg を静脈注射した場合の血清中濃度は 15分後に最も高く 10.1 mcg/ml、その後漸減し 8 時間後で最高 1.5mcg/ml、平均 1.2 mcg/ml であった。

また点滴静脈注射では初期血清中濃度が普通 静脈注射よりおとるが 8 時間値 2.19 mcg/ml、10 時間値 1.71 mcg/ml で持続性がやや長くなった。

つぎに血清間の PM-TC および 対照とした TC の生物学的半減期を求めると PM-TC 静注4.7時間、TC 静注 3 時間、PM-TC 点滴静注 5 時間であり、血清中標準時間曲線による面積比では PM-TC 静注 1.0、TC 静注 0.79、PM-TC 点滴静注 1.09 であった。

3. 血清中濃度に関連して PM-TC の血清タンパクとの結合性をセロファンバッグを用いた透析法により測定し、結合率は抗生物質濃度にはほとんど関係なく血清濃度の増大につれて上昇することを認めた。

すなわち PM-TC のヒト血清によるタンパク結合率は血清濃度100%、対 pH6.2 磷酸緩衝液で 70~76%、対照とした OTC 66.6% および TC 72.4% とほぼ同程度の結合率をしめた。

なお PM-TC の血清のタンパクとの結合は主としてアルブミン分面によるものであり、またタンパク結合が可逆的であることを知った。

4. ヒト赤血球浮遊液に PM-TC 溶液をくわえると少量ではあるが細胞内に移行し得ることを認めた。

5. PM-TC を年長児に 1 回量 250 mg 点滴静脈注射した場合の尿中濃度は 6 時間後までで 100~200 mcg/ml であり、これは 同時刻の血清中濃度の約20倍に相当する。12~24時間後でも 70 mcg/ml の高濃度をしめし、また24時間後までに投与量の約 50% が尿中排泄された。

6. PM-TC と対照 OTC の臓器内分布をしらべためラットにそれぞれの薬液 50 mcg/ml あてを尾静脈注射し、注入後の 5 分~6 時間における血清中濃

度と脳、肺、心、肝、腎、脾の各臓器内分布をしらべた結果、両薬剤とも静注後の初期血清中濃度が高く、PM-TC 96.8 mcg/ml、OTC 70.7 mcg/ml であった。

また臓器内濃度は両薬剤とも脳を除いて各臓器内に高濃度に分布され、初期の 2 時間では血清中濃度のほうが高かったが以後次第に臓器内濃度が血清中濃度より高くなった。

PM-TC の臓器内濃度は 5 分後で肺>腎>心>脾>肝の順に高く、肺では 50 mcg/g、腎、心では 40~30 mcg/g であった。以後の薬剤の消長は臓器によって異なり、たとえば脳、肺、心では時間経過とともに漸減するのに対し、肝では 6 時間後まで漸増し、腎では 1 時間後をピークとして漸増し、以後漸減した。

この消長状況は対照の OTC とは明らかに異なることをしめし、同じ Tetracycline 誘導体であっても各化合物によってこの面における特性をそれぞれ有していることが判った。

7. 臓器片と薬剤液を混合して調製した臓器ホモジネート液について薬剤液の臓器による不活化の影響を調べた結果、PM-TC の 1,000 mcg/ml では混合後の30~60分に各臓器とも力価低下が急速に進み、特に心、腎、肝では混合直後の力価に比し約30~40%も力価低下がみられ以後漸減した。

一方 250 mcg/ml では臓器による不活化の影響がやや弱く、60分後で脳、腎が約 20%、120分後で肝が約30%の力価低下がみられた。

8. PM-TC の血液に対する作用を in vitro で調べた結果溶血作用は認められなかったが、賦形薬の添加された注射用末では 50 mcg/ml 以上の濃度で黒褐色のメトヘモグロビン反応を生じた。

稿を終るに当り、御指導、御校閲をたまわつた 恩師 佐川一郎教授、終始御鞭撻を仰いだ 谷口昂助教授に深甚なる謝意を表します。

また御協力をいただいた教室員諸兄に厚く御礼申し上げます。

文 献

1) 伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要，第 2 版，326~342頁，東京，丸善，1958. 2) 住木諭介・梅沢浜夫：微生物工学講座第 9 卷，抗生物質・医薬品，初版，20頁，東京，共立出版社，1957. 3) 梅沢浜夫：抗菌性物質，第 1 版，512，東京，執風館. 4) 鳥居敏雄・川上保雄：ペニシリン，I，5，281~445 (1947). 5) 金沢裕：ペニシリン，II，2，781 (1949). 6) 小嶋碩夫・多田 勉：J, Antibiotics, III, 12,

- 786 (1950). 7) 片桐謙・井上正男・下平正文 : J, Antibiotics, IV, 6, 373 (1951).
- 8) 西村治雄・下平正文 : 塩野義研年報, 4, 490 (1951). 9) 厚生省 : 抗菌性物質製剤基準, O29-31, C4-6, B3-5, 東京, 厚生省, 1959. 10) 梅沢浜夫・鈴木幸朗・竹内富雄 : ペニシリン検定法の研究, III, 1, 373~376(1947). 11) 黒田善雄 : Chemotherapy, 6, 6, 351 (1958). 12) 唐崎正 : Chemotherapy, 7, 5 (1959)・9, 6 (1959).
- 13) Schanker : Annu. Rev. Pharmacol, 1, 29 (1961). 14) Th, Dimmling, H. Hüner, W. : Münch, med. Wschr, 17, 676 (1958). D. Strauch, E. Koch. : Münch, med, Wscher, 17, 668 (1958).
- 15) 白羽佑右衛門 : 診療, 7, 11, 12 (1952).
- 16) Maynard : Antib, Ann, 56 (1953).
- 17) 梅村甲子郎 : 薬局, 17, 45 (1966).
- 18) Walter, Heilmeyer : Antibiotika, Fibel, 510 (1965). 19) Davis, B. O. : J. clin. Invest., 22, 753 (1943). 20) Anton, A, H. : J, Pharmacol, 129, 282 (1960).
- 21) 真下啓明 : 日新医学, 36, 456 (1949).
- 22) Brodie, B. B. & Hogben, C. A. M. : J, Pharm, Pharmacol, 9, 345 (1957).
- 23) Goldbaum, L. R. & Smith, P. K. : J. Pharmacol, 111, 197 (1954). 24) 掛見喜一郎 : 薬誌, 82, 536 (1962). 25) Chow, B. F. : Science, 101, 67 (1945). 26) Oeff, K. : Klin, Wschr., 33, 419 (1955).
- 27) Kornegay, G. B. : J. Lab. clin. Med., 31, 523 (1946). 28) Boxer, G. E. : J. Biol. chem., 170, 491 (1947). 29) Smith, R. M. : J. Bact., 55, 425 (1948). 30) Bliss, E. A. : Proc, Soc, Exp. Biol. Med., 69, 467 (1948). 31) English, A. R. : Antibio. chemo., 4, 411 (1954).
- 32) Finland : New. Eng. J. Med., 249, 310 (1953). 33) 黒田善雄 : Chemotherapy, 6, 6, 346 (1958). 34) W. Storm. Van. Leeuwen. : J. Pharmacol. Exptl. Therap., 24, 13, 21 (1924). 35) Benhold, H. : Erg. Inn. Med. Kind., 42, 273 (1932). 36) Goldstein, A. : Phar. Rew., 1, 102 (1949).
- 37) 中垣正幸 : 薬誌, 83, 4, 586 (1962).
- 38) Klotz, I. M. : Cold spr. Harb. Symp. Quant. Biol, 14, 97 (1950). 39) Davis, B. D. : Science, 95, 78 (1942). 40) 真下啓明 : 日新医学, 36, 401 (1949).
- 41) Smith, R. M. : J, Bact., 55, 425 (1948).
- 42) English, A. R. : Antibio, chemo, 4, 400 (1954). 43) 黒田善雄 : Chemoteraphy, 6, 6, 348 (1958). 44) 浜田 稔・早川太郎・山口哲二・小池正彦 : ビタミン, 35, 6, 474 (1967). 45) 品川嘉也 : 化学の領域, 増刊 61号, 東京, 南江堂, 1964. 46) 中垣正幸 : 医学のあゆみ, 63, 13, 771 (1967). 47) Wright, S. S., Purcell, E. M., Love, Ben D. Jr., Mou.T. W., Kass, E. H., Finland, M. : Antibiotics Annual, 92 (1953).
- 48) Finland, M., Purcell, E. M., Wright, S. S., Love, Ben Del. Jr., Mou, T. W., u. Kass, E. H. : J. Amer. Med. Ass., 561 (1954). 49) Strauch, D. : Münch. med. Wscher. 17, 668~670 (1980). 50) Dimmling : Münch. med. Wscher., 17, 676~684 (1958). 51) 柴田清人・由良二郎・石崎肇子 : ホスタサイクリン文献集, 56~60, 日本ヘキスト会社. 52) 中沢進・岡秀・岩田正昭・佐藤 肇 : ピロサイN文献集, 16~21, 万有製薬会社. 53) Ehrlich, P, & Hatta. S. : The experimental chemotherapy of spirillosis, 117 (1911). 54) Pratt, R. : J. Pharm. Sic., 51, 2 (1962). 55) Dost, F. H. & Weingartner, L. : Schweiz. med. wscher., 82, 1310 (1952). 56) Kummerle, H. P., Contzen, H. & Schülke, K. : Chemotherapia (Basel) 5, 193 (1962). 57) 掛見喜一郎訳 : 薬物の吸収と分布, 初版, 185頁, 東京, 広川書店, 1966. 58) 酒井 威 : 化学と薬学の教室, 13, 79, 東京, 広川書店, 1967. 59) 掛見喜一郎訳 : 薬物の吸収と分布, 初版, 62~72, 189~190, 233~253頁, 東京, 広川書店, 1966. 60) 赤木満州雄 : 薬物の代謝の生化学, 初版, 11頁, 東京, 南山堂, 1965. 61) Tepperman, T. : Science, 105, 18 (1947). 62) Rakieten, N. : Antib. chemo, 1, 113 (1951). 63) 大村順一・小松須賀男 : Chemotherapy, 2, 120 (1954). 64) Ley, H. L. : Proc, Soc, Exp. Biol. Med., 68, 9 (1949). 65) Smith, R, M. : J. Bact., 55, 425 (1948). 66) Lee, C, C. : Antib, Annual, 493 (1953~1954). 67) Mazzeo,

- M. : Deut, Med, Wschr., 80, 355 (1954).
68) 黒田善雄 : Chemotherapy, 6, 6, 353~358 (1958). 69) H. Bohn, E. Koch : Munch, med, Wschr, 17, 671 (1958). 70) 水野光重・松田静治 : J. Antibiotics, Ser, B, 12-2 (1959). 71) 三辺武右衛門・古屋慶隆・高橋光子 : J. Antibiotics, Ser, B, 12-2 (1959). 72) 市橋 治雄・星山 健二・釜江 正春・紺野 昌後 : J. Antibiotics, Ser, B, 12-2 (1959). 73) 藤田路一・西本和光 : 薬誌, 72, 1646 (1952). 74) 金井 泉 : 臨床検査法提要, 第24版, VI-18, VI-103~108頁, 東京, 金原出版社, 1967. 75) EM 新書刊行会 : 臨床化学診断演習, 第1版, 21頁, 東京, 金芳堂, 1965.

Abstract

Tetracycline has a broad adsorption spectrum to visible light. The tetracycline is also less toxic in clinical use, but it does not reach high concentration in blood by oral administration. Therefore, N-(pyrrolidino-methyl) tetracycline nitrate was synthesized for the purpose of intravenous injections.

Concerning N-(pyrrolidino-methyl) tetracycline nitrate, changes in its concentration in serum and urine, the capacity of its binding to plasma protein and the accumulation to erythrocytes were observed upon the intravenous injections. The estimation of antibacteric activities and other bacteriological analysis were performed by using *Bacillus subtilis* (ATCC 6633 strain) as material.

The results were as follows.

1) By both intravenous injection and drip infusion of N-(pyrrolidino-methyl) tetracycline nitrate, the concentration of the drug in serum amounted to a considerably higher level than that in the case of the oral administration of tetracycline. The stability of the effective level of the drug was quite satisfactory compared with the tetracycline dosage.

2) The affinity of the drug to serum protein was observed by the cellophan-equilibrium dialysis method. The results were almost equal to that of using tetracycline.

3) When the drug was added to the suspension of human erythrocytes, it possibly incooperated in them.

4) The concentration of the drug in urine after the intravenous injection amounted to 100-200 μg per ml. It was also observed that nearly fifty per cent of the injected drug was excreted into the urine for twentyfour hours.

5) Experiments were performed on the distribution of the drug to the livers, spleens and kidneys of rats by the intravenous injection. The change in concentration of the drug in these organs did not always coincide with that of the drug in blood. Oxytetracycline was used as a control of the experiments in which a somewhat different result was obtained. From these results it is likely that the affinities of different kinds of drugs to various organs are not always the same but also depend on the structural difference among tetracycline derivations.

6) When the drug was mixed with the homogenate of various organs, heart, kidney and liver, the concentration of the drug rapidly decreased in the first 30-60 minutes and then gradually decreased.

7) *In vitro* experiments, the drug did not cause haemolysis, but the injectable powder of the drug with adjuvant induced methohaemoglobin reaction.