

免疫蛍光法による抗菌剤濃度の迅速測定法 —ゲンタマイシンに関する基礎的検討—

松田聖士・加藤直樹・坂 義人・河田幸道・西浦常雄

岐阜大学医学部泌尿器科学教室

(昭和 56 年 1 月 5 日 受付)

Gentamicin (GM) の血中濃度測定として immunoassay と蛍光偏光測定法を組み合わせた新しい測定法を開発した。今回は本法に関する基礎的な各種の検討を行ない、抗原、抗体の添加量、反応時間、反応温度、反応時の pH などに関して至適条件を求め、さらに濃度測定域、生物学組測定法との相関性、検体保存の条件および交叉反応性などについても検討を加えた。これらの検討により、本法は微量の検体 (5 μ l) で簡便・迅速に GM 濃度が測定でき、さらに生物学的測定法ともよく相関し、他の多くの抗生物質とも交叉反応を示さないすぐれた測定法であることが判明した。本法を用いて実際にヒトの血中 GM 濃度を測定した場合にも生物学的測定法とよく一致し、臨床応用の可能性が裏付けられた。

抗菌剤の体液内濃度を逐次、監視しつつ、化学療法を行ない得るならば、抗菌剤を最も適正かつ効果的に投与することが可能となる。とくに重症感染症や難治性感染症、あるいは体液内濃度の安全域の狭い薬剤を用いる場合には有効な手段となる。抗菌剤の濃度測定方法に関しては各種の生物学的測定法の他に、非生物学的測定法として高速液体クロマトグラフィーを用いる方法、放射性同位体を抗菌剤に label する方法があり、さらに最近では radio-immunoassay や enzyme immunoassay などの方法が開発され、少量の検体量で迅速に測定されるようになった。しかし、これらの方法にも手技上の問題や、放射性物質による被曝の問題など、一長一短があり、また、一般化するには至っていない。そこで、われわれはこれらの欠点を補い得る方法として immunoassay に蛍光偏光測定法を応用して抗菌剤の濃度測定を試みたところ、少量の検体で正確、迅速かつ簡便に測定しうるということが判明したのでその基礎的検討の結果を報告する。

I. 測定原理と測定装置

(1) 蛍光偏光を用いた抗菌剤濃度測定法の原理

蛍光偏光度の測定に際しては無配向分散している蛍光性分子を直線偏光で励起し、 0° 方向 (平行方向) に偏光させて放射した蛍光の 0° 方向の強度 ($I_{||}$) を測定し、次に偏光子を 90° 方向 (垂直方向) にして I_{\perp} を測定する。偏光度 P は $P = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$ で表わされる。蛍光分子が回転運動をしていると、静止している時よりも蛍光偏光度 P は小さくなる (回転拡散による蛍光の偏光解消)。PERRIN¹⁾ はこれを $(P_0/P_1) = 1 + A \cdot (K \cdot T/3 V_0 \cdot b) \cdot \tau$

なる式にまとめている (P_1 : 偏光度, P_0 : 極大の偏光度, V_0 : 球状粒子の体積, b : 媒体の粘度, T : 媒体の絶対温度, K : ボルツマン定数, τ : 蛍光性分子の励起寿命)。一般に液体中での分子の回転運動は分子の大きさによって異なるが、試料中の FITC labelled Gentamicin (以下、GM-FITC と省略する) に抗 GM 抗体が結合すると結合前に比べて分子量が増大するのでその分子回転運動が緩徐となり、蛍光偏光度に変化が生じる。偏光度の変化する度合は抗体結合 GM-FITC と抗体非結合の GM-FITC の量比によって規定される。一方、抗体結合型 GM-FITC と抗体非結合型の GM-FITC の量比は試料に含まれている GM 量により、決定される。したがって蛍光偏光度の変化から検体血清中の GM 量が定量できることになる。

(2) 蛍光偏光測定装置

日本抗体研究所製作の IBF-129 を使用した。この装置では真の蛍光偏光値は小数点以下の小さい値となり、実用上、不便であるため、この値を約 2.4×10^4 倍した値 (Parb.: Polarization value) が表示されるように電気的に調整されている。

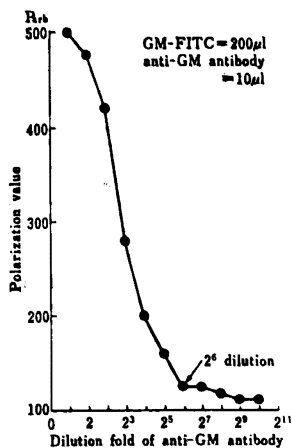
II. 実験材料

(1) GM 標準液

硫酸ゲンタマイシン (力価: 654 μ g/mg) を pH 7.0, 1/15 モルの Phosphate buffered saline (PBS) に溶解して 1, 2, 4, 8, 12, 20 μ g/ml の各濃度の標準液を作製した。

(2) Fluorescein isothiocyanate labelled GM

Fig. 1 Fluorogenic ability of anti-GM antibody



(GM-FITC)

2.5 μg/ml の濃度になるように GM を pH 7.0, 1/15 モルの PBS に溶解させたものを 51 ミリモルの FITC (isomer I; Sigma) と反応させ、さらに Sephadex G-25 (0.9×4.5 cm) にてゲル濾過して遊離 FITC を除去させたものを用いた。

(3) 抗 GM 抗体 (Technia Diagnostics 製)

Ouchterlony 法にて他の抗生物質との交叉反応性がないことを確認した。抗体力価は蛍光偏光反応にて 2⁶ 希釈まで有効であることを確認した (Fig. 1)。

(4) 使用検体血清

腎機能正常な健康成人に GM を 40~80 mg 筋注または静注した後、一定時間ごとに採血し、ただちに血清を分離した。検体はできるだけ、当日中に測定したが、一部は -70°C の deep freezer にて凍結保存 (1 週間以内) して測定した。

III. 実験方法

(1) 操作手順

被験血清あるいは GM 標準液を pH 7.0, 1/15 モルの PBS 2 ml に加え、これに抗 GM 抗体の一定量を加えて 25°C で 20 分間、反応させた。その後、GM-FITC の一定量を加えて攪拌後、室温中に 5 分間、静置した後、蛍光偏光測定装置にて蛍光偏光度を測定した。得られた結果を片対数グラフ上にプロットして標準直線を作製し、その標準直線から検体濃度を求めた。

具体的な反応条件である検体血清量、抗 GM 抗体量、GM-FITC 量、反応時間および反応温度の至適条件は以下の実験にて決定した。

(2) 抗 GM 抗体量と GM-FITC 量の決定

蛍光偏光測定装置は基準電圧と蛍光偏光から転換された。入力直流信号電圧が同一になるように印加電圧が自

動的に制御を受けており、印加電圧が 700 mV の時、最も鋭敏になるように設計されている。印加電圧が 700 mV になるような FITC 量は 200 μl であったのでまず、GM-FITC 量を 200 μl としてこの条件下で抗 GM 抗体量を変化させて最も鋭敏な蛍光偏光値の変化度を示すような抗体量を決定し、次いで求めた抗体量にて再び、GM-FITC 量を変化させ、蛍光偏光値がピークをとるような GM-FITC 量が 200 μl になるかどうかを確認した。このようにして求めた GM-FITC 量と抗 GM 抗体量を用いた場合に、本法の定量性は最良となった。

(3) GM と抗 GM 抗体との量的比と測定範囲

GM と抗 GM 抗体の量的比率が 1:10, 1:5, 1:2 および 5:1 になるように調整し、おのおの標準直線を求めて検討した。

(4) 反応時間

抗原抗体反応を進行させるための至適反応時間を求めるために、検体中の GM と抗 GM 抗体との反応時間をそれぞれ、10 分、20 分、40 分の 3 段階に分けて標準直線を求めた。

(5) 反応温度

反応温度を 10°C, 25°C および 37°C の 3 段階に設定しておのおの標準直線を求めて至適温度を決定した。

(6) pH の影響

検体の pH が本反応に及ぼす影響を調べる目的で pH 4, 5, 6, 7 および 8 の GM 検体を PBS (1/15 モル) にて作製し、蛍光偏光値の pH による変動を調べた。なお、GM 濃度は 1 および 10 μg/ml について検討した。

(7) 再現性

① Within assay run

同一検体を 5 本の試験管に分注し、それぞれの蛍光偏光値を同時に測定し、その差異を求めた。

② Between assay run

検体を 5 本の試験管に分注し、-70°C で 1~5 週間、凍結保存し、1 週ごとに各 1 本を取り出して蛍光偏光値を測定し、その変動を求めた。

(8) 交叉反応試験

本反応において GM 以外の抗菌剤との交叉反応性をみる目的で Dibekacin (DKB), Tobramycin (TOB), Amikacin (AMK), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Cefalothin (CET), Carbenicillin (CBPC) および Ampicillin (ABPC) について GM の場合と同様に、本反応を試みた。

(9) 生物学的測定法との相関性

従来の生物学的測定法と本法との相関性をみるために同一検体について両法により、GM 濃度を求め、比較検討した。生物学的測定法は *Bacillus subtilis* ATCC

Fig. 2 Appropriate volume of anti-GM antibody

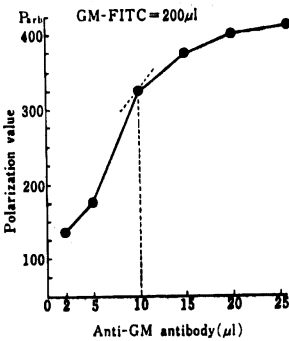


Fig. 3 Appropriate volume of GM-FITC

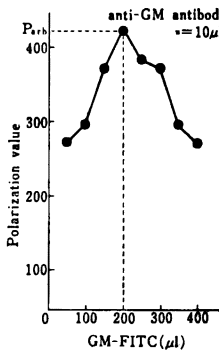
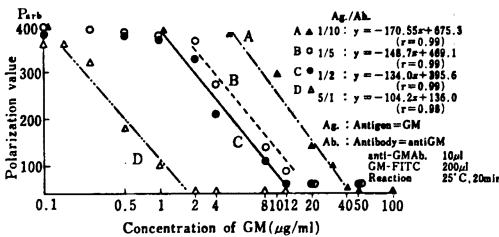


Fig. 4 Ratio of antigen to antibody and detectable range



6633 を検定菌とした薄層カップ法を用いた。なお、標準液は硫酸ゲンタマイシン (力価: 654 μg/mg) を pH 7.0, 1/15 モルの Phosphate buffer (PB) に溶解して作製した。

IV. 実験結果

(1) 抗 GM 抗体量と GM-FITC 量

Fig. 2 に示したように GM-FITC 量 200 μl では抗 GM 抗体 10 μl の時に蛍光偏光値の変化が最も鋭敏となった。逆に、抗 GM 抗体 10 μl 添加時の最適 GM-FITC 量を再検すると Fig. 3 に示したように GM-FITC 200 μl の時が最適であることが確認された。したがってこの条件 (GM-FITC 量 200 μl, 抗 GM 抗体 10 μl)

Fig. 5 Reaction time

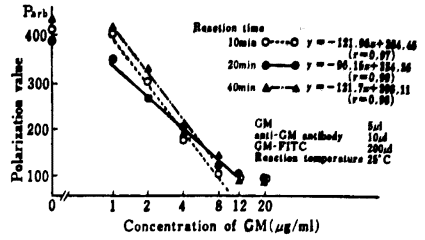
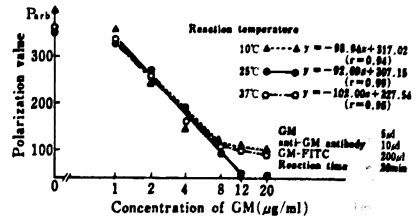


Fig. 6 Reaction temperature



が抗原抗体反応による蛍光偏光度の変化を最も鋭敏に反映し、定量性にもすぐれていることが確認された。

(2) GM と抗 GM 抗体との量的比と測定範囲

Fig. 4 に示したようにいずれの抗原・抗体の比率の場合も、すぐれた定量性が認められた。しかし、臨床的に有意義な GM の濃度範囲は、血中濃度については有効濃度、副作用の面から、1~12 μg/ml であると考えられるので²⁾、この濃度範囲に良好な定量性が認められる抗原/抗体比は抗原 1 : 抗体 2 の割合が適当であると考えられた。

(3) 反応時間

Fig. 5 に示したように、反応時間が 10 分の場合は GM 濃度が 8 μg/ml を超えると直線性が失われたが、反応時間が 20 分および 40 分の場合は 12 μg/ml の GM 濃度まで直線性が保たれた。一方、回帰直線の相関係数 r は 20 分の場合も 40 分の場合もそれぞれ 0.99, 0.98 と大差はないので、反応時間の短い 20 分を以後の反応時間とした。

(4) 反応温度

Fig. 6 に示したように、反応温度が 10°C および 37°C の場合はともに GM 濃度が 8 μg/ml を超えると直線性が失われたが、25°C の場合は 12 μg/ml まで直線性を有した。回帰直線の相関係数は 25°C の場合が 0.99 と最も良い値を示し、反応温度は 25°C が適当と考えられた。

(5) pH の影響

Fig. 7 に示したように GM 濃度が 1 μg/ml, 10 μg/ml のいずれの場合もほとんど差異を認めなかった。したがって少なくとも pH 4~8 の範囲であれば測定上、問題は無いものと考えられた。

Fig. 7 Influence of pH

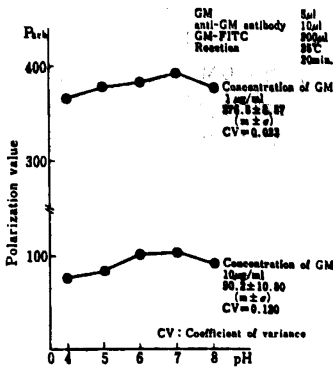


Fig. 8 Reproducibility test (CV: coefficient of variance)

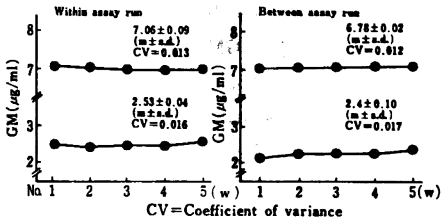
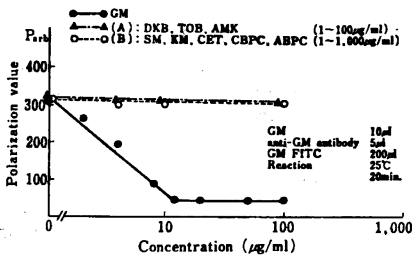


Fig. 9 Cross reactivity test



(6) 再現性

Fig. 8 に本法の Within assay run と Between assay run の結果を示したが、ともにほとんど、変動を認めないことより、本法は十分の再現性を有しており、少なくとも5週間以内の検体保存 (-70°C) が可能であることが確認された。

(7) 交叉反応試験

Fig. 9 に示したように(A)群の DKB, TOB, AMK についてそれぞれ 1.5, 10, 100 µg/ml 濃度の基準液で本反応を用いて測定したが、いずれも、定量性を示さなかった。また、(B)群の SM, KM, CET, CBPC, ABPC についてもそれぞれ、1, 5, 10, 100, 1,000 µg/ml の濃度の基準液を本法にて測定したが、同様に定量性が認められなかった。以上の結果より、GM 以外のこれらの抗

Fig. 10 Standard line

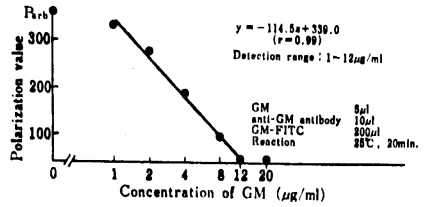


Table 1 Procedure

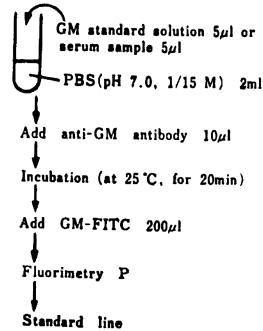
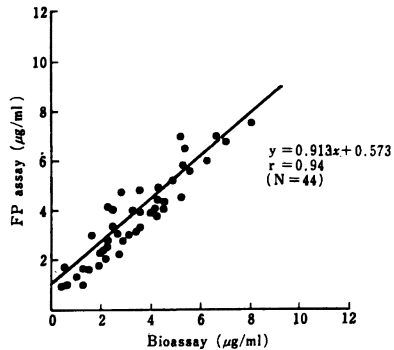


Fig. 11 Correlation of GM concentration between FP assay and bioassay



菌剤は本反応と交叉反応を示さないことが確認された。

(8) 生物学的測定法との相関性

B. subtilis ATCC 6633 を検定菌とする生物学的測定法による測定結果と本法による測定結果との関係を Fig. 10 に示した。検体数は45検体であり、Pearson法による両者の相関係数は0.94とすぐれており、本法は少なくともGMに関しては生物学的測定法とよく一致することが確認された。

(9) 標準直線

以上の結果をふまえて本法の操作手順を Table 1 に示し、また、この方法で得られた標準直線を Fig. 11 に示した。Detection range は 1-12 µg/ml であるが、臨床上、有意義な GM 濃度範囲をよくカバーしており、十

分に実用に耐え得るものと考えられた。

V. 考 察

重症、難治化する感染症に対して緻密で適正な化学療法を行なうためには体内の抗菌剤濃度の推移を監視しつつ、薬剤投与を行ない得る system が望まれる。そのためには少量の検体で、簡便で短時間内に正確な結果が得られることが要求されるが、その1つの方法として抗菌剤の immunoassay に蛍光偏光測定法を応用した新しい抗菌剤濃度測定法を試みた。抗菌剤以外の薬剤の immunoassay についてはすでに以前より、多くの検討がなされ、実用に供しているものも多いが、抗菌剤に関しては近年になって目が向けられるようになってきた^{2,9)}。抗菌剤に immunoassay を応用する場合に問題となることは、抗体作製の問題と免疫反応の検知方法とである。抗菌剤は一般に分子量が小さいため、抗体作製が容易でないが、後者に関しては radio-immunoassay, enzyme immunoassay および fluorogenic 基をもつ酵素を利用した immunoassay が開発されている。これらはおのの長所・短所を兼ね備えており、radio-immunoassay は感度的には非常にすぐれているが、放射性物質を用いる点が問題で、被爆防護施設などで使用にある程度の制約が加わる。他の方法は感度もよく、使用上の制約を受けない点ですぐれているが、ともに酵素を必要とし、非特異性反応の可能性はさけられない。今回、われわれの用いた方法は酵素を全く必要としない点が方法論上の大きな特長で、そのため、操作が一層、簡便となり、すぐれた方法といえる。蛍光偏光解消法は免疫反応の結果を分子の大きさ、ひいては分子の物理的な運動でとらえるところに特長があり、実用化への研究は近年、とくに脚光をあびている^{4,5)}。

さて、今回の検討により、本法実施上の基礎的検討がなされたが、約 5 μ l の微量の検体量でほぼ 30 分以内に生物学的測定法とよく一致するデータの得られることが判明した。検体が微量でよいため、ヘマトクリット管を用いた耳朶採血によっても測定可能と思われ、さらに、微量の組織を採取してその濃度を測定することも将来、可能になるのではないかと考えられる。pH による影響が少ないことは尿などの比較的、幅の広い pH を有する検体でも pH を修正することなく、使用できる利点があり、また、少なくとも 2 週間以内の保存も可能である。そして各種の抗菌剤を併用して臨床使用している場合でも、GM 単独の濃度をそれらと関係なく、簡単に測定することができるという点は、生物学的測定法に比べて重要な長所といえる。しかし、一方、本法で定量性が認められる濃度範囲はやや狭く、この点が欠点といえるが、検体により、測定域を変化させることが可能であ

る。今回の検討では低濃度域では約 0.2~2 μ g/ml、高濃度域では約 5~40 μ g/ml までの測定が可能であるが、血中の GM 濃度測定には 1~12 μ g/ml の濃度範囲が有意義とされ^{6,9)}、血中 GM 濃度測定上は問題はない。ちなみに他法の定量域に関しては radio-immunoassay では MAHONS⁹⁾ らの 10~100 μ g/ml, enzyme immunoassay では WILLIS¹⁰⁾ らの 1.25~20 μ g/ml が最も広い定量範囲を示すと報告であるが、前者は被験血清を一度、希釈してから測定しなければならない。

以上のように、本法は抗体作成の問題と測定域が多少、狭小であるという欠点はあるが、測定上は放射能に関する問題がなく、簡便で pH に影響されないという長所をもち、臨床面では検体が微量で済み、したがって頻回の検討が容易で、かつ迅速に成績が判明し、さらに他剤併用時の測定も容易というきわめてすぐれた利点を有するすぐれた方法と考えられる。今回はまず、副作用などの面から安全域の狭い GM を選んで検討を行なったが、今後は他の aminoglycoside 系薬剤、さらに penicillin 系、cephalosporin 系薬剤などについても拡大すべきものと考えられる。

文 献

- 1) PERRIN M. F. : Fluorescence polarization. *J. Physic. radium*, 7 : 390~401, 1926
- 2) BROUGHTON A. & J. E. STRONG : Radioimmunoassay of iodinated Gentamicin. *Clinica Chemica Acta*. 66 : 125~129, 1976
- 3) APPEL G. B. & H. C. NEU : Gentamicin in E. I. A., *Annals of Internal Medicine*, 89 : 528~538, 1978
- 4) 前田 浩 : 蛍光偏光法の抗原抗体反応定量への応用. *Biomedical Journal*, 2 : 11~19, 1978
- 5) 中嶋克行, 水田敏信 : 臨床検査を目的とした蛍光偏光測定システムの開発について. *Biomedical journal*, 3 : 111~117, 1979
- 6) BROUGHALL J. M. & D. S. REEVES : The acetyltransferase enzyme method for the assay of serum gentamicin concentrations and a comparison with other methods. *J. Clinical Pathology*, 28 : 140~145, 1975
- 7) SHAW E. J. *et al.* : Estimation of serum gentamicin by quenching fluoroimmunoassay of gentamicin. *J. Clinical Pathology*, 30 : 526~531, 1977
- 8) WATSON R. A. *et al.* : Polarization fluoroimmunoassay of gentamicin. *Clinica Chemica Acta*. 73 : 51~55, 1976
- 9) MAHONS J. P. & P. F. JACOBS : Evaluation of the bacteric serum gentamicin assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16 : 631~634, 1979
- 10) WILLIS P. J. & R. WISE : Rapid, Simple En-

zyme Immunoassay for Gentamicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7:40

~42, 1979

A NEW SIMPLE RAPID METHOD OF THE ASSAY
FOR SERUM ANTIMICROBIAL CONCENTRATION
USING A FLUORESCENCE POLARIZATION TECHNIQUE
—FUNDAMENTAL STUDY CONCERNING TO GENTAMICIN—

SEIJI MATSUDA, NAOKI KATO, YOSHIHITO BAN,
YUKIMICHI KAWADA and TSUNEO NISHIURA
Department of Urology, Gifu University School of Medicine

The rapid and accurate estimation of serum levels of antimicrobial agents would be most valuable for the chemotherapy of the infection on compromised host.

For the purpose, we established a new simple method using fluorescein polarization technique. This method does not require any enzyme or isotope. Many fundamental experiments about this method were carried out using gentamicin as an antimicrobial agent, and the JIMCO IBF-129 as a fluorescence polarization analyzer. As the results, this method revealed to be simple reliable method for the measurement of serum gentamicin level. The characteristics of this method are as follows. The advantages are (1) to require only about half an hour and no skillfulness. (2) to show good correlation to ordinary bioassay. (3) to display no cross reaction to other antibiotics. (4) to need no more than 5 μ l of sera.

The disadvantages are (1) to have relatively narrow detectable range and (2) to demand a specific fluorimeter.