

Tobramycin 血中濃度測定法の検討

(Bioassay, HPLC, EMIT, SLFIA, MARKIT)

西園寺 克

順天堂大学医学部臨床病理

飯塚 建・坂野 幸江

順天堂大学附属病院中央検査室

(昭和 56 年 8 月 15 日受付)

Tobramycin の有効治療域は狭く、適切な投与を行なうためには、迅速で、感度がよく、特異性が高く、正確な血中濃度測定法が必要とされる。

われわれは HPLC 法、3つの EIA 法すなわち EMIT 法、SLFIA 法、MARKIT 法を用いて、臨床検体の Tobramycin の濃度測定を行なった。

HPLC 法、EIA 法は、Bioassay 法と臨床検体について、よい相関を示した ($r=0.91\sim 0.95$)。

MARKIT 法は、特別な装置を必要としない利点をもつ。迅速性、再現性、簡便性の点からは、EMIT 法、SLFIA 法が優れていると思われる。

アミノ配糖体系抗生物質は、グラム陰性桿菌感染症に広く用いられ、その血中有効濃度と中毒濃度の幅が狭く、体液内濃度の monitoring が必要とされている。Gentamicin の血中濃度測定法¹⁾については、既に報告したが、今回、Tobramycin (TOB) の体液中濃度測定法について Bioassay を基準として、HPLC 法²⁾(High-performance liquid chromatography)、3種の EIA 法について検討したので、その成績を報告する。

I. 実験材料と方法

EIA 法は、Homogeneous type の EMIT 法 [Syva 社]³⁾、Homogeneous type の SLFIA 法 (Substrate-Labelled Fluorescent Immunoassay) [Ames 社]⁴⁾、Heterogeneous type の MARKIT 法 [大日本製薬] の 3 種類である。

A. 検体

1) 添加実験は、新鮮ヒト血清に TOB 標準品を加え、実験した。

2) 血中濃度の測定実験：健康成人 10 名に TOB 60 mg を筋注し、筋注前 (30 分)、1、2、3、4 時間後の 5 (6) 回採血し、各検体の TOB 濃度を 5 法で測定した。

B. Bioassay 法

1) 測定用培地：Heart-Infusion 寒天 (pH 7.4) を使用した。

2) 菌液：*B. subtilis* ATCC 6633 孢子液を 10^8 /ml に調製して使用した。

3) 標準血清：TOB (力価 941 $\mu\text{g}/\text{mg}$) を、0、0.5、

1、2、4、8、16、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度になるように、新鮮血清に添加し、標準液とした。中心常用標準希釈液は 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

4) Disc 法：菌液 1 ml を培地 100 ml の割合に混合し、ペトリシャーレ深型に 5 ml 流し込み平板培地とした。検体ならびに添加血清をそれぞれ東洋濾紙厚型直径 6 mm の Disc の 3 枚に含ませ、さらに 3 枚の中心常用標準を置き、冷蔵庫で 4°C、3 時間拡散後、16 時間、37°C で培養した。3 枚の Disc の阻止円直径を、中心常用標準の阻止円直径で補正後平均して検量線を作製し測定値を求めた。

C. HPLC 法

1. 検体前処理法 (Fig. 1)

a. カラムの調整：CM-Sephadex を 0.2 M \cdot Na₂SO₄ (pH 5.75) で一晩膨潤させ、ポリプロピレンのカラム (テルモ社製 2.5 ml 注射筒を利用) に高さ 5 mm に充填し、0.2 M \cdot Na₂SO₄ 2 ml で、2 回洗浄後使用した。

b. 上記カラムに、血清 400 μl を注入。

c. 血清成分を 0.2 M \cdot Na₂SO₄ 2 ml で、2 回洗浄して、液を棄てる。

d. アルカリ緩衝液 0.3 M \cdot NaOH、0.2 M \cdot Na₂SO₄、1.6 ml で TOB を回収する。添加血清、水性標準液より、Peak 高さ法による計算で、4 倍希釈で TOB をほぼ 100% 回収できた。

e. カラムは 0.2 M \cdot Na₂SO₄ 2 ml で、2 回洗浄後、10 回以上再使用可能である。

Fig. 1 Sampling chart of HPLC

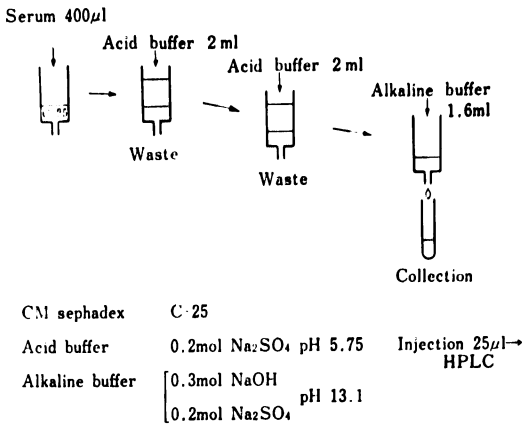
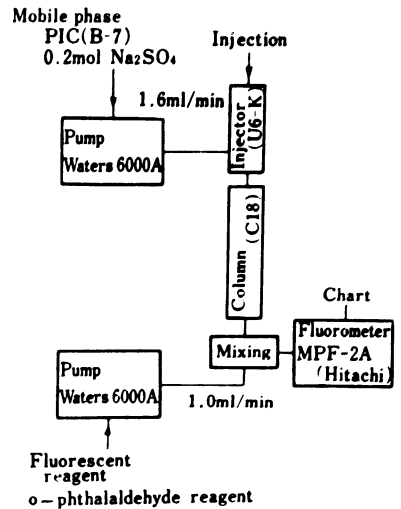


Fig. 2 Flow chart of HPLC



2. 測定操作 (Fig. 2)

a. 移動相: PIC (B-7) [Waters 社製] 1本を 0.2 M·Na₂SO₄ 500 ml に溶解させ使用した。

b. 蛍光相: o-phthalaldehyde 80 mg, 2-mercaptoethanol : 30% Brij 35 2 : 3 混合液 0.5 ml, Potassium borate buffer (Boric acid 24.73 g, KOH 21.32 g, H₂O 975 ml, pH 10.40±0.02) 100 ml の割合で調製する。

c. 装置: Waters 社 HPLC system で, M-6000 型 高圧ポンプ 2台, U-6-K universal injector, 日立 MPF-2A 蛍光光度計に, flow cell を使用し, μ -Bondapak C₁₈ 逆相カラムを使用した。

d. 移動相 1.6 ml/min, 蛍光相 1.0 ml/min, 注入量 25 μ l, Chart speed 25 mm/min で, 励起波長 340 nm, 二次蛍光 420 nm で測定した。retention time は約 7 分で, Peak 高さ法により検量線を作製し, 検体濃度を求めた。

D. EMIT 法

Syva 社製試薬 kit を用い, 測定装置として, ピペッタダイリユーターは Syva 1500 型, 分光光度計は Gilford 300 T 型を使用した。

測定操作:

- 1) 血清 50 μ l を kit 付属の緩衝液 250 μ l で希釈する。
- 2) 1) の 6 倍希釈血清 50 μ l をさらに, 緩衝液 250 μ l で希釈し, これに, 試薬 A 50 μ l + 緩衝液 250 μ l 試薬 B 50 μ l + 緩衝液 250 μ l を添加する。
- 3) 2) で調整した酵素反応液 900 μ l をただちに分光光度計のマイクロフローセル (37°C に調整) に吸引させ, 測定波長 340 nm で 15 秒後の吸光度 (A_{15}) および 45 秒後の吸光度 (A_{45}) を求めその差 ΔA ($A_{45} - A_{15}$) \times 2.667 を 30 秒法の値とする。
- 4) 1)~3) の操作を kit 付属のキャリブレーション (0

濃度を含む 6 種の濃度を有す) およびコントロールについて行ない検量線を作製し, 検体測定値を求めた。

E. MARKIT 法

大日本製薬社製 kit を用い, 測定装置にはピペッタダイリユーター Syva 1500 型を, 分光光度計は Gilford T 型を使用した。

測定操作:

- 1) 血清 50 μ l を kit 付属の緩衝液 1 ml で希釈する。
- 2) B/F 分離用のマーセントチューブに, 1) の希釈血清 100 μ l を取り, 酵素標識抗原 500 μ l 不溶化抗体 200 μ l を添加する。
- 3) 特殊ゴムキャップを取りつけ, 37°C 30 分加温する。
- 4) 特殊ゴムキャップを下にして, 3,000 rpm で 10 分遠心後, キャップを取りはずし, B/F 分離を行なう。
- 5) 残存液を 3~5 分予備加温後, 基質 100 μ l を添加し, 37°C 30 分加温する。
- 6) 酵素反応停止液 2.5 ml を添加する。
- 7) 測定波長 410 nm で吸光度を測定する。

1)~7) の操作を kit 付属のキャリブレーション (0 濃度を含む 6 濃度を有す) について行ない検量線を作製し, 検体測定値を求めた。

F. SLFIA 法

Ames 社製 kit を用い, 蛍光光度計は, アミンコ (T-7439) を使用した。

測定操作:

- 1) 血清 100 μ l を kit 付属の緩衝液 5 ml で希釈する。

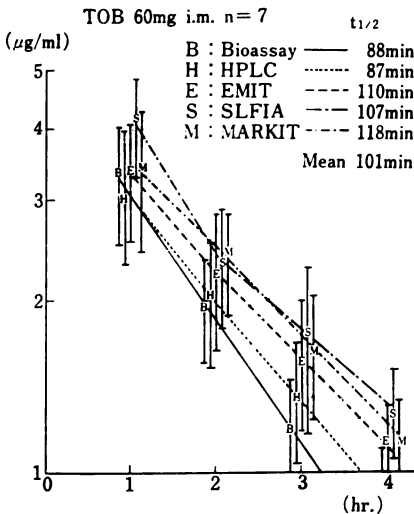
Table 1 Drug monitoring methods for tobramycin

Methods	Sample volume (μl)	Range (μg/ml)	Wave length (nm)	Excitation (nm)	Assay time	Others
Bioassay	300	0.5~40			20 hr	
HPLC	400	0.5~100	420	340	10 min	Extraction 30 min
EMIT	50	1~16	340		1 min	
MARKIT	50	1~16	410		2 hr	B/F separation
SLFIA	100	1~12	450	400	20 min	

Table 2 Reproducibility of EIA for tobramycin assay (EMIT, SLFIA and MARKIT methods)

Method	n	C. V. concentration	C. V. O. D. or F. U.
EMIT	low	10	< 5 %
	high	10	< 3 %
SLFIA	low	10	< 10 %
	high	10	< 5 %
MARKIT	low	10	< 10 %
	high	10	< 10 %

Fig. 3 Serum concentration of tobramycin in seven healthy adult volunteers after 60 mg intramuscular injection



2) 抗体・酵素試薬 3 ml に 1) の希釈血清 10⁰ μl を加え、これに蛍光抗原試薬 100 μl を添加する。

3) 20 分後に、励起波長 400 nm とし、二次蛍光 450 nm で測定する。

4) 1)~3) の操作を kit 付属のキャリブレーション (4 種の濃度を有す) について行ない、検量線を作製し、検

Fig. 4 Correlation coefficient between HPLC and bioassay

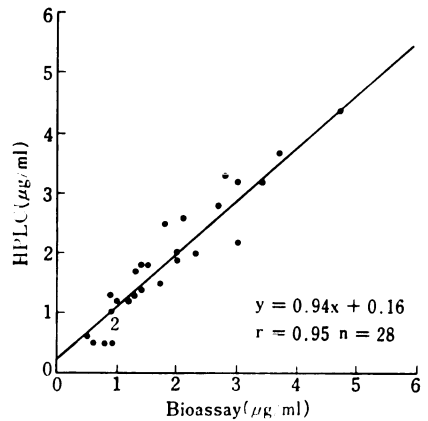
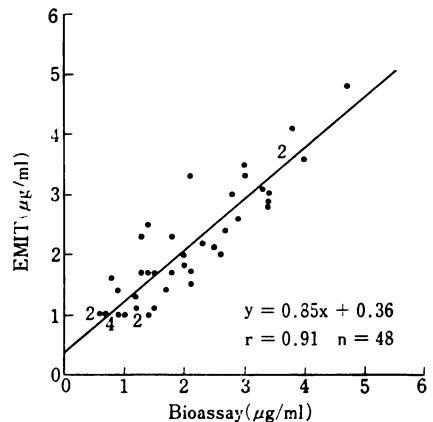


Fig. 5 Correlation coefficient between EMIT and bioassay



体測定値を求めた。

Table 1 に各方法の検体必要量、測定範囲、測定波長、所要時間をまとめて示した。

II. 結果

A. 同時再現性

Bioassay 法では、4 μg/ml の中心常用標準の阻止円

Fig. 6 Correlation coefficient between MARKIT and bioassay

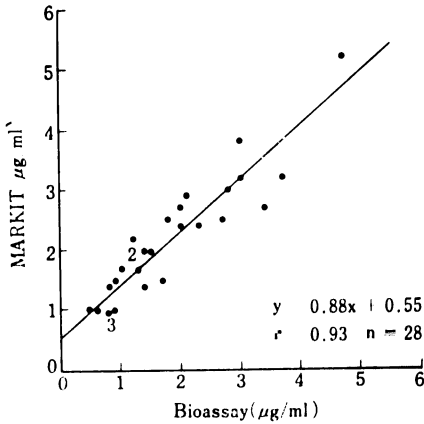
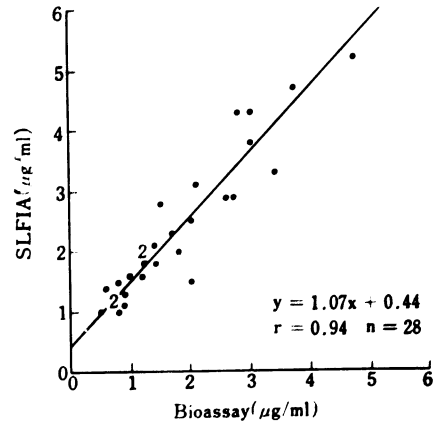


Fig. 7 Correlation coefficient between SLFIA and bioassay



直径の C. V. は、3%以下であった。

HPLC では、Peak 高さ法による C. V. は、2%以下、前処理を含めて Peak 高さ法による C. V. は、3%以下であった。

EIA 法の同時再現性を Table 2 に示す。

B. 血中濃度の推移 (Fig. 3)

健康人 7 名に、TOB 60 mg 筋注後の血中 TOB の、各測定時間における平均値 \pm SD を Fig. 3 に示す。Bioassay 法、HPLC 法の 3, 4 時間値は低値となっている。

各法の $t_{1/2}$ は図中に示したとおりである。血中濃度は、全体として低い傾向にあった。

C. 各測定法の相関

Bioassay 法と、他の 4 法の相関図を Fig. 4~7 に示す。図中の数字は同一例の数を示している。0.5 μ g/ml 以下、1.0 μ g/ml 以下は、0.5 μ g/ml、1.0 μ g/ml にプロットした。

III. 考 察

Bioassay 法は、検量線の設定に使用する血清、菌数、平板培地の状態等の因子により、変動しやすく、日差再現性に乏しく、施設間差も大きい。また、アミノ配糖体系抗生物質は、 β -lactum 系薬剤と併用されることが多いので、臨床的应用には不適當である。

HPLC法の技術上の問題点として、①血清の前処理を必要とする。②蛍光相の調整が複雑である。③Columnの安定化に時間を必要とするなどが挙げられる。装置の点では、Monitoring 専用 HPLC systemが必要となるので、EIA 法に比べて高価である。しかし、Bioassay 法と良好な相関を示し、再現性もよく臨床応用可能な方法である。

EMIT法は、専用測定装置を必要とするが、技術的に簡単に時間当たり血清の希釈操作を含めても 30 検体以上処理可能である。 β -lactum 系薬剤の併用時にも実施でき、再現性もよく、実用的な方法である。

MARKIT 法は、Heterogeneous type のため B/F 分離を必要とし、ピペット操作が複雑なため、同時再現性は C. V. 10% 以下である。特別な装置を必要としないのは大きな利点であり、小規模検査室でも導入可能な方法である。希釈操作の変更加温時間の短縮によって、より迅速な Monitoring が可能と思われる。

SLFIA 法は、安定した蛍光光度計が必要とされる。1 時間当たり 30~40 検体処理が可能である。ピペット操作が複雑であるが、ピペッタダイリユータの使用により、Bioassay 法ともよい相関を示し、臨床応用の可能な方法である。

TOB の有効濃度は、血清で peak 時 4 μ g/ml 以上、中毒濃度は peak 時 10 μ g/ml 以上、trough 時で、2 μ g/ml 以上とされている。半減期は 90 分~120 分とされている。TOB 60 mg の筋注では、中毒濃度に達していた症例はなかった。測定範囲が EIA 法では 1 μ g/ml 以上のため、みかけの半減期が、Bioassay 法に比較して長くなっている。Bioassay 法は、生物学的活性を、HPLC 法は、物理化学量を、EIA 法は免疫学測定法であり、その差が半減期の差になっていると思われる。健康成人では腎機能がよいこともあるが、血中濃度は低値の傾向にあり、臨床的には投与方法を含めて投与量を再検討する必要がある。測定法別にみた測定値の間には、例数の少ないこともあるが推計学的有意差は認められなかった。

文 献

- 1) 西園寺 克: Gentamicin の血中濃度測定法の検討。臨床病理 29 (6): 627~632, 1981
- 2) ANHALT, J.P. & S.D. BROWN: High-performance liquid chromatographic method for the assay of aminoglycoside antibiotics in serum. Clin. Chem. 24: 1940~1947, 1978
- 3) C. DE PORCERI-MORTON & J. TURNER: EMIT Tobramycin Assay: Clinical Study No. 81

Summary Report, 1980

- 4) BURD, J.F. et al: Homogeneous reactant-labeled fluorescent immunoassay for therapeutic drugs exemplified by gentamicin determination in human serum. Clin. Chem. 23: 1402~1408, 1977
- 5) 渡辺昌祐, 他: Competitive binding EIA 法による血中抗てんかん剤濃度の測定。臨床精神医学 8 (4): 497~502, 1979

A COMPARISON OF FOUR METHODS FOR DETERMINATION OF TOBRAMYCIN IN SERUM ON THE BASIS OF BIOASSAY

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, EMIT,
SUBSTRATE-LABELLED FLUORESCENT IMMUNOASSAY AND MARKIT

KATSU SAIONJI

Department of Clinicalpathology, School of Medicine, Juntendo University

KEN IIZUKA and YUKIE SAKANO

Clinical Laboratory, Juntendo University Hospital

Tobramycin has a narrow therapeutic range. For proper dosage adjustment, it is necessary to have a fast, sensitive, specific and accurate assay technique for measuring serum levels of tobramycin. We examined high-performance liquid chromatography and three enzyme immunoassay methods; EMIT, substrate-labelled fluorescent immunoassay (SLFIA) and MARKIT to measure the concentration of tobramycin in clinical serum samples.

HPLC and EIA yielded values which compared favorably to bioassay in clinical serum samples ($r=0.91\sim0.95$).

MARKIT has such an advantage that it doesn't need any particular equipments. In the view of sensitivity, specificity, simplicity, we recommend EMIT and SLFIA.