

血中トブラマイシン測定法5種の比較検討

田中 美雄・篠崎 公一・増原 慶壮・荒井 栄

聖マリアンナ医科大学病院薬剤部

高橋 悟・佐野 隆志・染谷 一彦

聖マリアンナ医科大学第三内科

佐々木 康人

東邦大学医学部放射線科

(昭和57年8月25日受付)

血中トブラマイシン (TOB) 濃度モニタリングを目的として、5種の測定法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、2種のエンザイムイムノアッセイ (EIA) (EMIT と SLFIA) および Bioassay を比較検討し、それぞれの特徴を評価した。

TOB を含まないヒトブール血清に TOB を添加して 0, 0.45, 1.05, 2.0, 3.98, 7.94, 13.16 $\mu\text{g/ml}$ の7濃度の試料を作製し、各々5本ずつに分注して得た35検体を random に配列し各測定法で二重測定を行なった。また、健常人6名、患者12名より得た154検体を5測定法で測定し、その結果を比較した。

TOB 添加血清における測定精度は、HPLC と RIA では全濃度域で、EMIT と SLFIA では中・高濃度域で良好であったが、Bioassay は全濃度域で他法に比べ劣っていた。回収率は HPLC と RIA では期待値と実測値が一致しており、SLFIA も低濃度 (0.45 $\mu\text{g/ml}$) を除き全体としては1対1に対応していたが、Bioassay および EMIT は全体的にやや高値を示す傾向があった。健常人および患者より得た154検体の HPLC の測定値に対し、RIA, EMIT, Bioassay および SLFIA は高い相関を示し、SLFIA を除きほぼ1対1に対応した ($r=0.92\sim0.98$)。

個々の患者の薬物動態値を算出し投与法の最適化を行なうためには Bioassay は測定精度、回収率とも劣るために必ずしも適さない。迅速性、検体処理能力、経済性を考慮して測定法を選択する必要がある。

近年、グラム陰性桿菌による感染症が増加し¹⁾、アミノ糖系抗生物質の使用頻度が増加している²⁾。しかし、本剤は腎または第8脳神経毒性が知られており、治療量と中毒量とが接近しているため、血中濃度測定と薬物動態理論に基づく投与設計をすることの必要性が指摘されている³⁻⁵⁾。われわれは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて血中トブラマイシン (TOB)、ゲンタマイシン (GM) およびアミカシン (AMK) 濃度を測定し、投与設計に応用してきた^{6,7)}。しかし、アミノ糖系抗生物質の血中濃度測定としては、HPLC 以外にも、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、Bioassay などが利用されている⁸⁾。これら測定法の特性を比較検討し、日常臨床の場で適正な投与設計を行なうに際しての得失を評価したので報告する。

対象薬剤としては腎毒性が比較的少なく^{9,10)}、最近頻用される傾向のある TOB を選択した¹¹⁾。

I. 方 法

1. 測定法

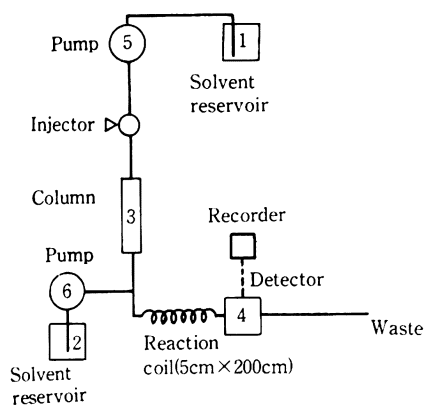
測定には、(1)高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法、(2)ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ (EIA) 法 [(3) EMITTM および (4) SLFIATM] および (5) Bioassay 法を用いた。

2. 測定装置および測定操作

(1) HPLC 法

装置：日本分光社製 HPLC を用いた。測定システムは分離装置と反応装置により構成されている。前者は移動相送液ポンプ、試料注入装置と ODS カラムからなり、後者は反応液送液ポンプ、反応コイル (5cm $\times$ 200cm)、蛍光検出器および記録計を有する。測定システムのブロックダイアグラムを Fig. 1 に示す。測定にあたっては血清試料 0.5 ml を CM セフデックスTM (C-25) にかき、1.25 ml の TOB 抽出液を得た。この 5 μl を HPLC

Fig. 1 HPLC system for measurement of TOB



に注入し、1-ペンタンスルホン酸ナトリウム (1.8 mM)、硫酸ナトリウム (0.09 M) および酢酸 (0.2 v/v %) を含む溶液で分離した。

フタルジアルデヒド (400 mg/L)、メルカプトエタノール (0.2 v/v %) を含む蛍光誘導体化反応液 (pH10.4) を分離後の流路を注入し、TOB を蛍光誘導体化して蛍光検出器により測定した。測定法の詳細については別に報告した¹²⁾。

(2) RIA法

Gammacoat™-(¹²⁵I)-トブラマイシン kit (日本トラベノール提供) を用いた。1.0 μg/ml~16.0 μg/ml の濃度範囲は、キット指定の操作法で測定した。また、0.1~1.6 μg/ml の低濃度域の測定には、プール血清に標準 TOB を添加して 6 種の標準試料を調整して、再度

標準曲線を作製し測定した (Fig. 2)。

(3) EIA 法 (i)

EMIT™-トブラマイシン kit (第一化学薬品提供) を用いた (以下、EMIT 法と略す)。測定は、Syva System CP-5000 を用いキット指定の操作法で測定した。

(4) EIA 法 (ii)

SLFIAT™-トブラマイシン kit (マイルス三共提供) を用いた (以下、SLFIA 法と略す)。測定装置は米国アミンコ社製アミンコ蛍光比色光度計およびエームス・ダイリューターを用い、キット指定の操作法で測定した。

(5) Bioassay 法

Bacillus subtilis ATCC 6633 株による Agar well 法¹³⁾により測定した。

3. 測定法の比較検討

(1) TOB 添加血清による精度および回収率の検討

TOB を含まないヒトプール血清に TOB 標準液 (Eli Lilly 社製: 濃度 1 mg/ml, Lot. No. SI-36-8 T) を添加し、0, 0.45, 1.05, 2.00, 3.98, 7.94, 13.16 μg/ml の 7 濃度の TOB 添加血清を調製した。各濃度とも 5 本ずつに分注して得た合計 35 検体を 1 組として測定に供した。検体は random に配列し測定者には濃度がわからないようにし、それぞれの測定法で二重測定を行ない全 5 種の測定が終了後、検体配列順序を明らかにし、同一濃度 10 回の測定値より測定精度および回収率を評価した。

(2) 臨床試料における測定値の比較

健康人 (投与量 1.5 mg/ml) 6 名より得た 65 検体お

Fig. 2 Assay procedures of RIA for measuring serum TOB with high level concentrations ranging from 1.0 to 16 μg/ml (left branch) and low level concentrations ranging from 0.1 to 1.6 μg/ml (right branch).

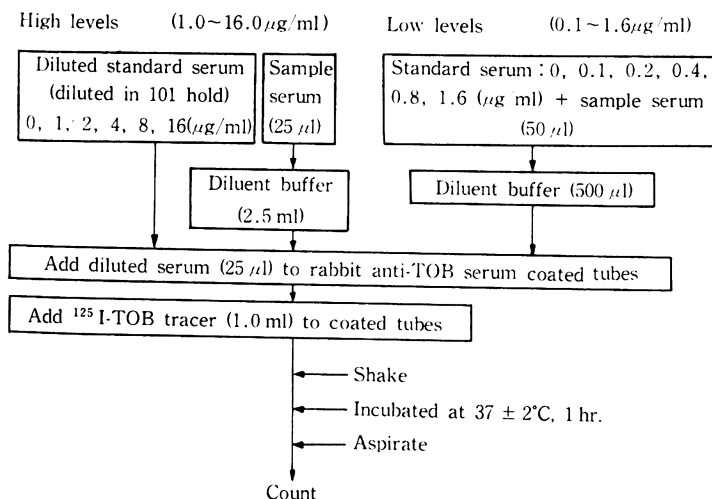


Table 1 Precision of 5 kinds of assay in 7 different concentration ranging from 0 to 13.16 $\mu\text{g/ml}$; In each group (I-VII), 10 repeated measurement were performed and mean, 1 S. D. and C. V. % were calculated.

Group		I	II	III	IV	V	VI	VII
Target conc. ($\mu\text{g/ml}$)		0	0.45	1.05	2.00	3.98	7.94	13.16
HPLC	Mean	0	0.43	1.06	1.83	3.48	7.74	13.55
	1 S. D.	0	0.03	0.08	0.10	0.14	0.20	0.38
	C. V. %	—	6.0	7.1	5.2	4.0	1.6	2.8
RIA	Mean	<0.1	0.38	0.97	1.92	3.61	7.63	12.77
	1 S. D.	—	0.02	0.08	0.07	0.16	0.82	1.08
	C. V. %	—	4.4	8.2	3.9	4.5	10.7	8.4
EMIT	Mean	0.05	0.49	1.47	2.51	4.54	8.78	14.94
	1 S. D.	0.02	0.02	0.22	0.14	0.23	0.45	0.23
	C. V. %	—	3.2	15.0	5.5	5.0	5.1	1.9
SLFIA	Mean	0.14	0.58	1.17	2.15	4.40	7.89	13.49
	1 S. D.	0.10	0.11	0.08	0.21	0.94	0.25	0.42
	C. V. %	—	18.4	7.0	9.9	2.1	3.2	3.1
Bioassay	Mean	0	0.54	1.26	2.13	4.03	8.37	15.52
	1 S. D.	0	0.07	0.11	0.27	0.45	0.86	1.31
	C. V. %	—	12.9	8.5	12.5	11.0	10.2	8.5

よび TOB 適応患者 (投与量 40~360 mg/day) 12 名より得た 89 検体, 合計 154 検体について, それぞれの測定法で TOB 濃度を測定した。

II. 結果

1. 精度についての比較検討成績

I~VII 群各濃度ごとに 10 回の測定値より平均($\bar{m}$)および 1 標準偏差 (S. D.) と変動係数 (C. V. %) を求めた (Table 1)。変動係数は HPLC で 1.6~7.1%, RIA で 3.9~10.7%, EMIT で 1.9~15.0%, SLFIA で 2.1~18.4% および Bioassay で 8.5~12.9% であった。変動係数が最大となった濃度は 1.05 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC), 7.94 $\mu\text{g/ml}$ (RIA), 1.05 $\mu\text{g/ml}$ (EMIT), 0.45 $\mu\text{g/ml}$ (SLFIA および Bioassay) であり, 最小となった濃度は 7.94 $\mu\text{g/ml}$ (HPLC), 2.00 $\mu\text{g/ml}$ (RIA), 13.16 $\mu\text{g/ml}$ (EMIT), 3.98 $\mu\text{g/ml}$ (SLFIA) および 1.05 と 13.16 $\mu\text{g/ml}$ (Bioassay) であった。

TOB は trough 値を 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下, peak 値を 5~10 $\mu\text{g/ml}$ に設定することが必要とされている³⁻⁵⁾。

trough 値の決定に多く用いられる 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下の 3 群 (II~IV) では変動係数は HPLC で $6.1 \pm 1.0\%$ ($\bar{m} \pm 1$ S. D.), RIA で $5.5 \pm 2.4\%$, EMIT で $7.9 \pm 6.3\%$, SLFIA で $11.8 \pm 5.9\%$ および Bioassay で $11.3 \pm 2.4\%$ ($n=3$) であり, 変動係数の平均値は RIA が最も低く HPLC も良好であったが, SLFIA および

Bioassay は変動係数 10% 以上と他法に比べ劣っていた。

trough 値が中毒域, peak 値が無効域または治療域にある場合に用いられる濃度範囲 (2.00~7.94 $\mu\text{g/ml}$) の 3 群 (IV~VI) の変動係数は, HPLC で $3.6 \pm 1.8\%$, RIA で $6.4 \pm 3.8\%$, EMIT で $5.2 \pm 0.3\%$, SLFIA で $5.1 \pm 4.2\%$ および Bioassay で $11.2 \pm 1.2\%$ であり, HPLC, RIA, EMIT, SLFIA とも良好な精度を示したが, Bioassay は変動係数 10% 以上と劣っていた。

peak 値が中毒域にある場合を想定した 13.16 $\mu\text{g/ml}$ (VII) では, 変動係数は HPLC 2.8%, RIA 8.4%, EMIT 1.9%, SLFIA 3.1% および Bioassay 8.5% と, RIA と Bioassay が, やや変動係数が大きい, いずれも 10% 以内であった。

2. 回収率についての比較検討成績

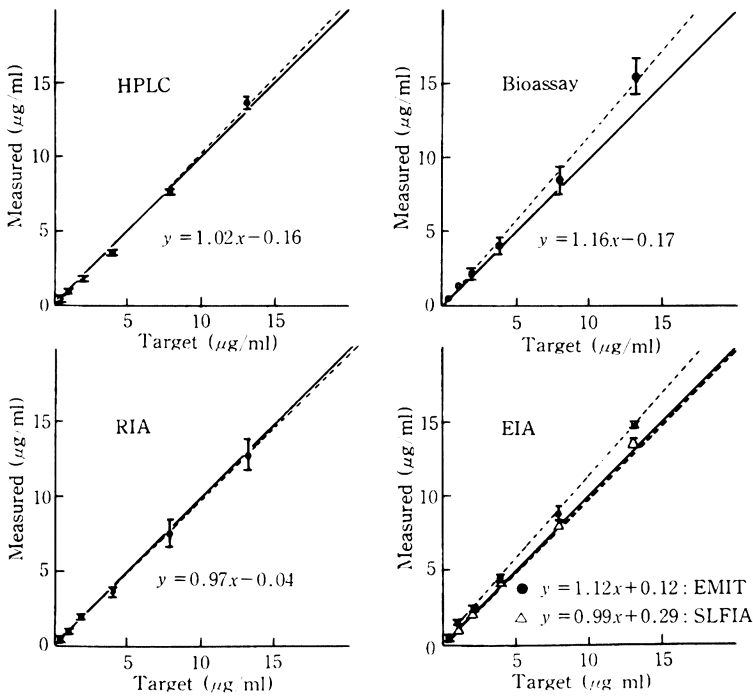
各群ごとに 10 回の測定値を含有濃度 (期待値) で除して百分率とし, これを平均して回収率を求めた。この 6 群 (濃度 0 $\mu\text{g/ml}$ を除く) の回収率を Table 2 に示す。HPLC および RIA では全濃度域を通じて期待値と測定値が一致し, 回収率は 84.4~103.0% であった。EMIT, Bioassay および SLFIA では平均回収率が 110% 以上とやや高値を示した。

Bioassay および EMIT は全体的にやや高値を示す傾向があり, SLFIA は低濃度において回収率が高いこ

Table 2 Recovery study of 5 kinds of assays in 6 different concentrations. Mean values of 10 repeated measurements were divided by each target value and expressed as recovery percent.

Group	II	III	IV	V	VI	VII		
Target concentration (μg/ml)	0.45	1.05	2.00	3.98	7.94	13.16		
Assay method	Recovery percent (%)						Mean (%)	1 S. D.
HPLC	95.6	101.0	91.5	87.4	97.5	103.0	96.2	5.8
RIA	84.4	92.4	96.0	90.7	96.1	97.0	92.8	4.8
EMIT(EIA)	108.9	140.0	125.5	114.1	110.6	113.5	118.8	11.9
SLFIA(EIA)	128.9	111.0	107.5	110.6	99.4	102.5	110.0	10.3
Bioassay	120.0	120.0	106.5	101.3	105.4	117.9	111.9	8.4

Fig. 3 Comparative recovery tests correlating measured concentrations with target concentrations in HPLC (upper left), RIA (lower left), Bioassay (upper right) and two kinds of EIA (EMIT and SLFIA) (lower right): Solid lines show perfect fit lines, $y=x$.



とが原因で平均値は高値を示しているが、全体的には HPLC, RIA と同様に期待値と実測値は 1 対 1 に対応した (Fig. 3)。

3. 臨床検体における測定値の比較

同一検体中の TOB を HPLC, RIA, EMIT, SLFIA および Bioassay で測定した結果を HPLC と他の測定法とを比較して Fig. 4 に示す。HPLC 法に対して他の 4 測定法は高い相関 ($r=0.92\sim0.98$) を示した。回帰式は SLFIA 法を除き $y=x$ に極めて近似していた。

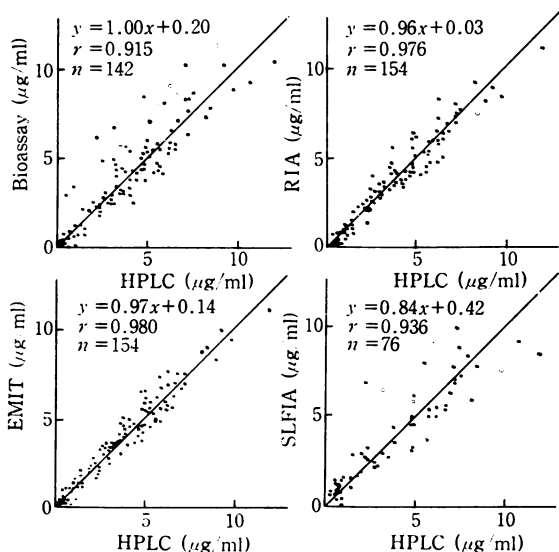
SLFIA 法は $y=0.84x+0.42$ と高値域でやや低値

を示す傾向がみられた。 $y=x$ の直線のまわりのバラツキをみると RIA 法および EMIT 法は少なく、Bioassay 法, SLFIA 法では比較的バラツキが大きかった。

III. 考 察

アミノグリコシドの投与法の評価と投与設計のために血中濃度を測定することの、臨床的有用性が認められている³⁻⁷⁾。的確な臨床的意志決定に寄与するためには測定の正確さが要求される。したがって測定系に付随する系統的誤差および測定に伴うランダムな誤差を評価検討することは重要な意味をもつ。われわれが実施した測定

Fig. 4 Correlation between each of 4 assay and HPLC for measurement of serum TOB: Bioassay (upper left), EMIT (lower left), RIA (upper right) and SLFIA (lower right); solid lines show perfect fit lines.



法の検討結果を総括して各測定法の特徴を以下に述べる。

(1) Bioassay は精度が全体的に他法に比べ劣っており、回収試験ではやや高値を示した。臨床検体の測定値は HPLC と 1 対 1 に対応し高い相関が得られたがバラツキは大きかった。

(2) RIA と HPLC は精度、回収率とも良好であり両者の臨床検体における相関は非常に高く、ほぼ原点を通る 1 対 1 の対応を示した。

(3) EMIT は精度がⅢ群 (1.05 μg/ml) で不良であったが (C. V.=15%), その他の濃度域では良好であり、回収率では全体にやや高値を示した。臨床検体における EMIT と HPLC の測定値は非常に高い相関を示し、原点を通る 1 対 1 の対応を示した。

(4) SLFIA は精度がⅡ群 (0.45 μg/ml) で不良で

あったが (C. V.=18.4%), その他の濃度域では良好であり、回収率はⅡ群 (0.45 μg/ml) で高値 (128.9%) を示したが全体としては良好であった。臨床検体では HPLC に対して良い相関を示したが、高濃度域でやや低値を示しており、バラツキも比較的大きかった。

以上のように 5 種類の測定法の比較検討をみてみると、(1) HPLC と RIA は臨床応用する際に最も誤差が少ない方法であり、EMIT は添加回収試験ではやや高値を示したもののそれに次ぐ良い方法と思われる。(2) SLFIA は臨床検体における HPLC の測定値に対し高濃度域で低値を示しバラツキが比較的大きかった。しかし添加試験では精度、回収率ともほぼ良好といえる範囲であった。(3) 最後に Bioassay であるが、精度は他法に比べ劣っており、HPLC の測定値と比較して良く相関しているがデータがばらついている。このことは血中濃度に基づいて投与法の評価と設計を行なう際に、投与法の最適化を行ないえない可能性が高いと思われる。

REEVES らが 1974 年に行なった調査によれば、英国内で Bioassay によりゲンタマイシンを測定している 82 施設について、同一検体を測定して比較したところ 20% しか精度の良好な施設がなく、このことはアミノグリコシド投与法の最適化について精度管理が重要な課題であることを示唆した^{14,15)}。また、西園寺らは Bioassay を基準として HPLC、EIA の健康人血清試料測定値を比較して測定法の評価を行なっている¹⁶⁾。われわれは実際に臨床で遭遇する濃度範囲の血清 TOB 濃度がどの程度正確に測定できるかを、TOB 添加血清を random に配列、測定し比較検討した。この方法で広範囲の濃度について得られた各濃度法の精度は測定値を薬物速度論的に解析し、生体内半減期を算出する際に行なう非線形最小自乗法の重みづけ (weighting)¹⁷⁾ の factor として臨床的に利用することができる。今回の検討では、患者の薬物動態値を求めるうえで RIA と HPLC が最も正確であり、EMIT と SLFIA はこれに次ぎ応用可能であるが、Bioassay は誤差が大きく臨床応用に必ずしも適さない。

Table 3 Comparison of speed, ability of assay performance, equipment costs and running costs in 5 methods for measurement of serum TOB.

Method	Speed	Ability of assay performance	Cost	
			Equipment	Running
HPLC	30 min.	+	High	Low
RIA	1~1.5 hrs.	++	High	High
EMIT	2 min.	+++	High	High
SLFIA	30 min.	++	Middle	High
Bioassay	24 hrs.	-	Low	Low

臨床に応用するためには、測定法の精度、再現性、回収率と同時に迅速性、検体処理能力および経済性も重要である。これらの5測定法の比較をTable 3に示した。測定時間ではEMITが最短であり2分以内、Bioassayを除き他の3法とも30分～1時間半以内でありトブラマイシンの投与間隔が4から48時間であることを考慮すれば次回投与までに測定値を得ることは可能である。しかし、HPLC法は検体処理能力の点で限界があり、RIA, EMIT, SLFIAなどの免疫化学的測定法は優れている。特にEMITは測定が随時追加できるという利点の特徴となっている。

次に測定コストでは、測定装置(設備)および試薬に費すコストがあるが、前者についてはRIA, EMITおよびHPLCでは数百万円、SLFIAでは百万円程度、Bioassayはそれ以下となっているが、日常の測定に要する試薬のコストは免疫化学的測定法が圧倒的に高く、少数検体の場合はさらにコスト高となることが欠点としてあげられる。

われわれの施設では、1日当りの検体量がそれほど多くないため、正確かつ経済的なHPLC法で実際には測定している。しかし、もし1日20～30検体に昇る測定を行なうとすれば、次回投与時までには結果を報告することが不可能である場合も生じると考える。

IV. 結 語

現在利用可能な5種類のTOB測定法の測定精度、回収率をTOB添加血清を用いて評価した。また臨床検体について各測定法間の相関を検討した。各測定法の臨床応用上の得失について考察した。

本研究の要旨は第11回日本病院薬剤師会関東ブロック学術大会および日本薬学会第102年会上に報告した。

<謝辞> TOB標準品を提供され生物学的測定に御協力いただいた塩野義製薬、EMITキットを提供された第一化学薬品、SLFIAキットを提供されたマイルス三共、およびRIAキットを提供された日本トラベノールに感謝の意を表します。

文 献

- 1) 猪狩 淳, 小酒井 望: 最近の血液分離菌の動向と臨床的背景。最新医学 35: 1765～1771, 1980
- 2) 清水喜八郎: 最近の感染症「病態, 治療」—新しい抗生物質を中心に。総合臨床 30: 2169～2174, 1981
- 3) BARZA, M. & R. T. SCHEIFE: Drug therapy reviews; Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics—part 4; aminoglycosides. Am. J. Hosp. Pharm. 34: 723～737, 1977
- 4) GILMAN, A. G.; L. S. GOODMAN & A. GILMAN: The Pharmacological Basis of Therapeutics,

6th edition (Macmillan), pp. 1175～1176, 1980

- 5) CIPOLLE, R. J.; R. D. SEIFERT, D. E. ZASKE & R. G. STRATE: Systematically Individualizing Tobramycin Dosage Regimens. J. Clin. Pharmacol. 20: 570～580, 1980
- 6) 高橋 悟, 篠崎公一, 佐々木康人, 田中美雄, 荒井 栄, 染谷一彦: 血中 Tobramycin 濃度の測定と臨床薬物動態理論に基づく投与設計法の検討。第28回日本化学療法学会東日本支部総会, 1981年10月, 東京
- 7) 高橋 悟, 篠崎公一, 佐々木康人, 田中美雄, 荒井 栄, 染谷一彦: One Compartment Modelによる血中 Aminoglycoside 投与設計法の検討。臨床薬理 13: 103～104, 1982
- 8) PEHERE, J. C. & R. DUGAL: Clinical Pharmacokinetics of Aminoglycoside Antibiotics. Clin. Pharmacokinet. 4: 170～199, 1979
- 9) SCHENTAG, J. J.; M. E. PLAUT & F. B. CERRA: Comparative Nephrotoxicity of Gentamicin and Tobramycin: Pharmacokinetic and Clinical studies in 201 patients. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 859～866, 1981
- 10) SMITH, C. R. et al: Double-Blind Comparison of the Nephrotoxicity and Auditory Toxicity of Gentamicin and Tobramycin. New Engl. J. Med. 302: 1106～1109, 1980
- 11) SADEE, W. & G. C. M. BEELEN: Drug Level Monitoring (斎藤正行, 田村善三 監訳), (広川書店) pp. 18, 1982
- 12) 篠崎公一, 佐々木康人, 高橋 悟, 土居眞理, 田中美雄, 増原慶壮, 荒井 栄, 染谷一彦: 高速液体クロマトグラフィーによる血中アミノ糖系抗生物質測定法。臨床化学 11: 132～137, 1982
- 13) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体液中 Tobramycin の微生物学的微量定量法に関する検討。Chemotherapy 23: 886～893, 1975
- 14) REEVES, D. S.: Accuracy of gentamicin assays. Postgrad. Med. J. 50 (Suppl. 7): 20～21, 1974
- 15) REEVES, D. S.: Quality control of gentamicin assays. Lancet 2: 667～668, 1974
- 16) 西園寺 克, 飯塚 建, 坂野幸江: Tobramycin 血中濃度測定法の検討。Chemotherapy 30: 509～513, 1982
- 17) MCINTOSH, J. E. A. & R. P. MCINTOSH: Mathematical Modeling and Computers in Endocrinology. (Springer-Verlag), pp. 74～102, 1980

COMPARATIVE EVALUATION OF FIVE METHODS FOR MEASURING TOBRAMYCIN CONCENTRATION

YOSHIO TANAKA, KIMIKAZU SHINOZAKI, KEISO MASUHARA, SAKAE ARAI,
SATORU TAKAHASHI*, TAKASHI SANO*, KAZUHIKO SOMEYA* and YASUHIITO SASAKI**

Pharmacy Department, The 3rd Department of Internal Medicine*,
St. Marianna University School of Medicine and Hospital,
Department of Radiology**, Toho University School of Medicine.

With the purpose to apply for drug monitoring and dosage regimens, we compared 5 methods for measuring serum TOB concentrations. The methods included high-performance liquid chromatography (HPLC), radioimmunoassay (RIA), two kinds of enzymeimmunoassay (EIA) (EMIT and SLFIA) and bioassay (BA).

Pooled sera containing standard TOB (spiked sera) in concentrations of 0, 0.45, 1.05, 2.0, 3.98, 7.94, 13.16 $\mu\text{g/ml}$ were prepared. The samples were arranged in random order and provide to examiner without being notified the drug concentration in each sample. The TOB concentrations were independently measured by each method. The TOB concentrations of clinical sample ($n=154$) obtained from 6 healthy volunteers and 12 patients were measured by 5 assay methods for comparison.

In precision and reproducibility for measuring spiked sera, HPLC and RIA were better than other 3 methods. BA had low degree of accuracy.

The correlation of HPLC with each of other 3 methods for measuring clinical samples was high ($r=0.92\sim0.98$). The one to one correspondence was observed between HPLC and RIA, EMIT or BA. The concentration measured by SLFIA showed a slightly lower value than HPLC in the high TOB levels. BA and SLFIA, when compared with HPLC, revealed relatively large variance around the perfect fit lines.

HPLC and RIA are superior in precision and recovery to other methods. However, for the clinical purpose EMIT and SLFIA can be used with good correlation to HPLC. BA has relatively large assay variance and is less suitable to be applied for dosage regimen of TOB.

The cost-benefit of each assay method was included in the discussion.