

蛍光偏光免疫測定法によるアミノ配糖体系抗生物質 Netilmicin の測定

宮崎 弘和¹⁾・村田健次郎¹⁾・能塚隆之²⁾・古澤元之助²⁾

久保博昭³⁾・朝長文弥⁴⁾・村瀬勢津子⁴⁾

1) 国立病院九州がんセンター薬剤科

2) 国立病院九州がんセンター消化器部外科

3) 北里大学薬学部薬品分析学

4) 北里大学病院薬剤部

(昭和61年6月12日受付)

蛍光偏光免疫測定法 (FPIA 法) によるヒト血中ネチルマイシン (NTL) 濃度測定を検討し、次の結果を得た。

- 1) FPIA 法による NTL 測定の同時再現性は C. V. =7% 以下であった。
- 2) FPIA 法による NTL 測定では、一度作成した検量線は少なくとも 16 週間安定であった。
- 3) FPIA 法による NTL 測定の回収率は 99.0~104.3% であった。
- 4) FPIA 法による NTL 測定の希釈直線性は良好な結果であった。
- 5) FPIA 法による NTL 測定ではヘモグロビン 400 mg/dl, ビリルビン 20 mg/dl まで測定値に影響は認められなかった。

6) FPIA 法 (Y) と Bioassay (BA ; X_1), High performance liquid chromatography (HPLC ; X_2) の測定値間には、

$$Y=0.783 X_1+0.581, r=0.904, Y=0.949 X_2-0.168, r=0.987$$

の良好な相関性が認められたが、BA 法は FPIA 法に比べ約 20% 高値を示す傾向が認められた。

以上より、FPIA 法による血中 NTL 測定は臨床上有用であると考えられる。

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は、主として重症または難治性感染症に対して使用される抗生物質の一つであり、臨床で用いられる場合、本邦においては、原則として筋肉内注射で投与されている。しかし、患者によっては、出血傾向などのために、静脈内投与を余儀なくされる場合も少なくない。AGs は、有効治療域が狭く、かつ重篤な副作用を有しているものが多いので、このような薬剤の静脈内注射に際しては、その体内動態を正確に把握し、副作用発現に充分注意を払う必要がある¹⁻³⁾。

したがって、近年、本邦においても AGs の TDM (Therapeutic Drug Monitoring) に関心が高まり、各種 AGs 測定法が開発されてきている^{4,5)}。

今回我々は、AGs の一つであるネチルマイシン (NTL) の点滴静注法を確立する目的で、血中 NTL 測定法として、蛍光偏光免疫測定法 (Fluorescence Polarization Immunoassay : FPIA) を実施し、非常に有用であったので報告する。

I. 対 象

対象は健康成人男子 5 名で、年齢は 29~40 歳 (平均

35.0 歳)、体重は 55~80 kg (平均 68.4 kg) であった。各人に NTL 100 mg を筋肉内注射して、それぞれ経時的に 9 回 (投与前, 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4, 8, 12 hr) 採血して実験に用いた。また、測定の精度検定にはネチルマイシンコントロール、ネチルマイシンキャリブレーターおよび薬物を含まないヒト血清を用いた。

II. 実験方法

1. FPIA 法

1) 試薬 (ダイナボット社)

i) TDx Netilmicin

○ネチルマイシン-トレーサー (T)

○ネチルマイシン抗体 (S)

○ネチルマイシン用緩衝剤 (P)

ii) ネチルマイシンキャリブレーター

A ; 0.0 μ g/ml, B ; 0.5 μ g/ml, C ; 1.5 μ g/ml

D ; 3.0 μ g/ml, E ; 6.0 μ g/ml, F ; 10.0 μ g/ml

iii) ネチルマイシンコントロール

L ; 1.0 μ g/ml, M ; 4.0 μ g/ml, H ; 8.0 μ g/ml

iv) 希釈用リン酸緩衝液

2) 測定機器

TDx-アナライザー (ダイナボット社)

3) 原理

FPIA 法は、B/F 分離を必要としない競合反応に基づく免疫測定法であり、測定原理は以下のとおりである。

フルオレセインで標識された NTL (トレーサー) は、485 nm の偏光励起光によって励起され、525 nm の偏光を生ずる。ところがトレーサーは、小分子であるため、分子の回転運動が大きく蛍光を生ずるまで (励起寿命の間) に、分子軸がランダムな方向を向いてしまい偏光は解消され、得られる蛍光は散乱光となる。一方、抗原抗体反応の結果、抗体と結合したトレーサーは巨大分子となり回転運動が抑制されるため、偏光は解消されずに励起光と同じ偏光面をもった蛍光として観察される。この蛍光の偏光化している程度 (蛍光偏光度) は、トレーサーおよび抗 NTL 血清の量を一定にすると、検体中の NTL 量の関数として表わすことが可能である。したがって、NTL 濃度既知の血清 (キャリブレーター) を用いて作成した検量線から検体中の NTL 濃度を求めることができる。なお、一度作成された検量線は TDx-アナライザーに記憶され、測定毎の検量線作成は必要としない。

2. Bioassay (BA) 法および High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 法

対照の方法として、BA 法と HPLC 法を以下のとおり実施した。

1) BA 法

B. subtilis ATCC 6633 株を検定菌とする薄層平板法 (37°C, 20 hr 培養) で測定した。培地には、ハートインフュージョン寒天培地を使用した。

2) HPLC 法

装置は、Waters QA-1 Analyzer, Waters QA-1 Date System, Waters M-105 Reaction System および日立 F1000 Fluorescence Spectrophotometer を用いた。

HPLC の条件は次のとおりである。カラム: ラジアルパック C₁₈, 移動相: 5 mM オクタンスルホン酸ナトリウムと 60 mM 1,2-エタンジスルホン酸二ナトリウム (pH 3.3) を含む 20% アセトニトリル溶液, カラム温度: 20°C, 流速: 1.5 ml/分, ポストカラム誘導化試薬: o-フタルアルデヒド試薬, ポストカラム誘導化試薬流速 1.0 ml/分, 検出波長: 励起波長 355 nm, 蛍光波長 455 nm。

検体の測定に当たって、FPIA 法の操作は全自動であるので、2名で測定し、BA 法および HPLC 法は手法であるため 1名で測定を実施した。FPIA 法における試薬は、すべて同一ロットを用い、ネチルマイシンコントロ

ール, キャリブレーターは冷暗所 (2~10°C), 被験血清は -70°C で測定まで保存した。

III. 成績

1. FPIA 法の精度

i) 同時再現性

3 濃度のコントロール (1.0, 4.0, 8.0 µg/ml) および被験血清 8 検体 (1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4, 8, 12 hr) を同時に多重測定 (コントロール 10 回, 被験血清 5 回) し、その平均値, 標準偏差 (S. D.) および変動係数 (C. V.) を求めた (Table 1, 2)。

1.0 µg/ml 以下では、C. V. = 3.23~6.90% で若干バラツキが認められたが、1.0~8.0 µg/ml においては、C. V. = 0.60~2.04% で非常に良好な結果が得られた。

ii) TDx 装置に記憶された検量線の安定性

ネチルマイシンキャリブレーターにより初回に作成した検量線を用いて、3 種のコントロールを 4 週毎、16 週間にわたり測定し、安定性を検討した (Fig. 1)。

3 濃度とも、その表示値の ±10% の範囲を超えることなく、16 週間にわたり、安定した測定値が得られ、C. V. も 1.00~2.07% で非常に良好であった。

iii) 添加回収試験

NTL をヒト血清に添加した濃度既知血清に 3 種のコントロールを 1:1 でそれぞれ添加し、回収率試験を行った (Table 3)。各添加量での平均回収率は 104.3%, 102.7%, 99.0% で良好であった。

iv) 希釈直線性試験

3 種のコントロールをヒト血清でそれぞれ倍々希釈し、希釈直線性を検討した (Fig. 2)。

Table 1 Within-run precision of FPIA with NTL control serum, (n=10)

NTL control serum	Mean ± S.D. (µg/ml)	C.V. (%)
L	0.93 ± 0.03	3.23
M	3.97 ± 0.07	1.76
H	7.86 ± 0.16	2.04

Table 2 Within-run precision of FPIA with NTL volunteer samples, (n=5)

NTL sample	Mean ± S.D. (µg/ml)	C.V. (%)
A (1/4 hr)	5.14 ± 0.10	1.59
B (1/2 hr)	4.54 ± 0.04	0.88
C (1 hr)	4.44 ± 0.04	0.90
D (2 hr)	3.36 ± 0.02	0.60
E (3 hr)	2.46 ± 0.03	1.22
F (4 hr)	1.82 ± 0.03	1.65
G (8 hr)	0.61 ± 0.03	4.92
H (12 hr)	0.29 ± 0.02	6.90

Table 3 Recovery test of FPIA with NTL control serum.(n=5)

Actual NTL concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)	Recovery (%)
1.5	1.56 \pm 0.08	4.8	104.3
3.0	3.08 \pm 0.08	2.7	102.7
5.0	4.95 \pm 0.07	1.5	99.0

Fig. 1 Stability test of calibration curve

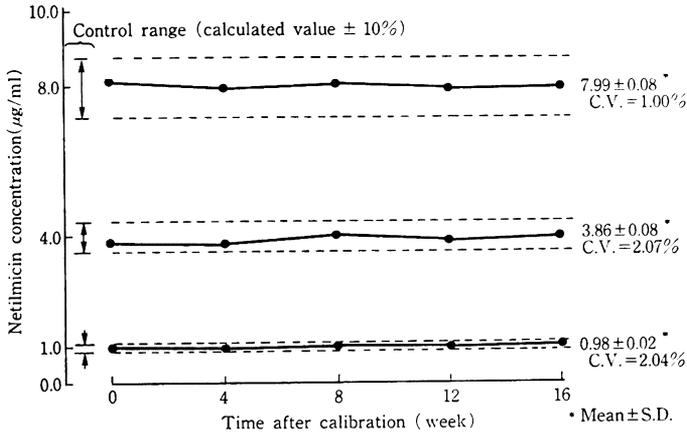


Fig. 2 Dilution study (n=2) of FPIA with NTL control serum

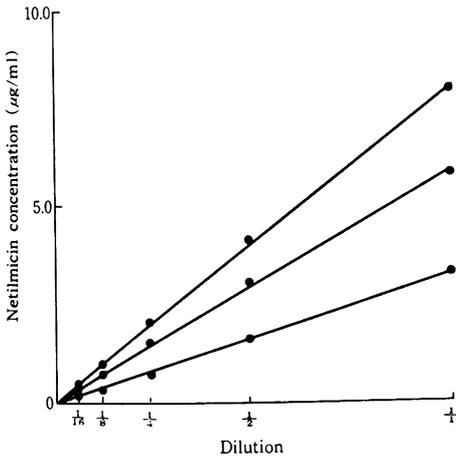
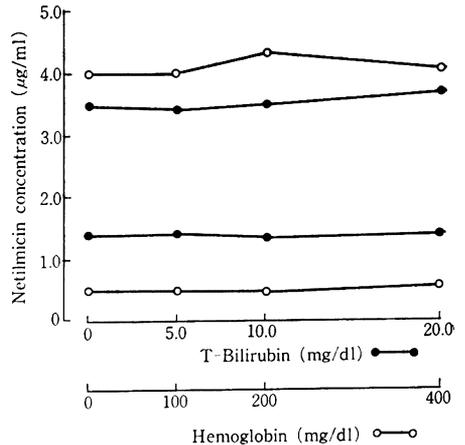


Fig. 3 Interference with NTL levels by total bilirubin and hemoglobin



いずれの系列も原点を通る良好な直線が得られ、その測定感度は少なくとも $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。

v) 血液共存成分の測定値に対する影響

a) ヘモグロビン (Hb)

2種のコントロールにヒトヘモグロビン (日本商事) を1:1に混和し、ヘモグロビン濃度として0, 100, 200, 400 mg/dlに調製した検体について検討した (Fig.

3)。

ヘモグロビン濃度 400 mg/dl まで測定値への影響は認められなかった。

b) 総ビリルビン

2濃度のコントロールにビリルビンコントロール血清 (ハイランド) を1:1に混和し、ビリルビン濃度として0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/dlに調製した検体について検討

Fig. 4 Comparison of serum NTL concentrations determined by FPIA and bioassay

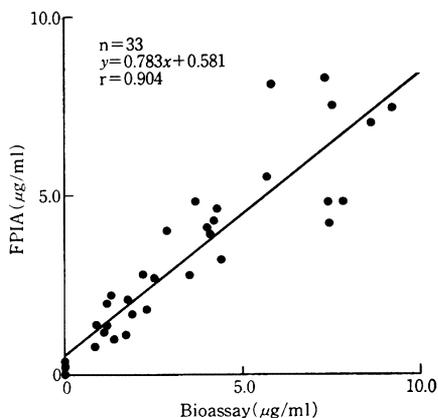
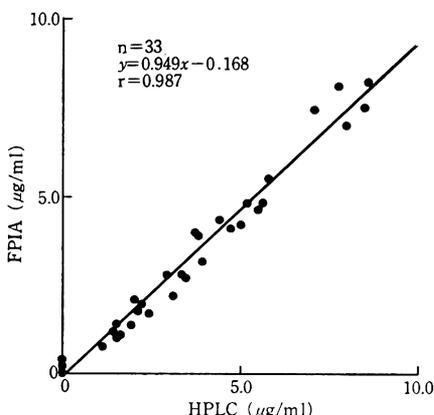


Fig. 5 Comparison of serum NTL concentrations determined by FPIA and HPLC



した (Fig. 3)。

ビリルビン濃度 20.0 mg/dl まで測定値への影響は認められなかった。

2. BA 法および HPLC 法との相関

FPIA 法と BA 法および HPLC 法による NTL 測定値の相関性を被験血清 33 検体を用いて検討した (Fig. 4, 5)。

BA 法との相関は、 $y(\text{FPIA}) = 0.783x(\text{BA}) + 0.581$, $r = 0.904$ で BA 法が約 20% 高値を示す傾向を認めた。一方、HPLC 法との相関は、 $y(\text{FPIA}) = 0.949x(\text{HPLC}) - 0.168$, $r = 0.987$ で良好な結果を得た。

IV. 考 察

NTL は、新しく開発された AGs であり、その腎毒性、聴器毒性は従来の AGs に比べて少ないといわれている^{6,7)}。しかし、これら副作用がないわけではないの

で、投与に際しては副作用発現防止のために、血中濃度を指標とした厳重な管理が必要である。

血中 NTL 測定法としては、BA 法が一般的であるが、BA 法は測定に時間を要し、精度的にもやや劣っていることが指摘されており^{5,9)}、臨床応用には必ずしも適さない。

今回、我々が検討した FPIA 法は、アミカシン、トブラマイシンなど、他の AGs に対してすでに応用されキット化されている。本法は、検体の前処理、試薬の調製などを必要とせず専用機器に検体と試薬をセットするだけで、後の操作はすべて自動化されている。また、処理時間も 20 検体約 15 分と非常に簡便、迅速な方法である。

一方、本法での再現性については、感度付近の 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以下では C.V. = 7% 程度のバラツキが認められたが、臨床問題とされる 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度域⁹⁾では C.V. = 3% 以下と非常に良好な結果が得られた。また、添加回収試験も平均 102.0% で良好であり、ヘモグロビン、ビリルビン等血液成分の影響も認められないことなど、正確性、精度ともに良好で、FPIA 法による他の AGs 測定と同程度¹⁰⁾の結果を得た。

他の測定法との相関性については、BA 法と $y(\text{FPIA}) = 0.783x(\text{BA}) + 0.581$, $r = 0.904$ を示し、相関性は良好であったが、測定値が BA 法で高値を示す傾向にあり、バラツキも大きかった。しかし、HPLC 法との相関では $y(\text{FPIA}) = 0.949x(\text{HPLC}) - 0.168$, $r = 0.987$ と良好であり、測定値もほぼ 1:1 の結果を得た。BA 法が他測定法に比べ高値を示す傾向にあり、精度的に劣ることは、トブラマイシン測定において田中ら⁸⁾も報告しており、AGs 測定に対して BA 法が主流を占めている本邦においては、その精度管理の重要性を含め、今後検討されるべき問題であろう。

V. 結 語

以上、今回検討した FPIA 法に基づく NTL 測定は、迅速性、正確性、精度ともに優れ、臨床的にも有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) BARZA, M. & R. T. SCHEIFE: Drug therapy reviews; Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics-part 4; aminoglycosides. Am. J. Hosp. Pharm. 34: 723~732, 1977
- 2) GILMAN, A. G.; L. S. GOODMAN & A. GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics, 6th edition (Macmillan), pp. 1175~1176, 1980
- 3) CIPOLLE, R. J.; R. D. SEIFERT, D. E. ZASKE & R. G. STATE: Systematically individualizing¹⁰⁾

- bramycin dosage regimens. *J. Clin. Pharmacol.* 20: 570~580, 1980
- 4) STEVENS, P.; L. S. YOUNG & W. L. HEWITT: I-radioimmunoassay of amikacin and comparison with a microbioassay. *J. Antibiot.* 29: 829~832, 1967
- 5) 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
- 6) BOWMAN, R. L.; F. J. SILVERBLATT & G. J. KALOYANIDES: Comparison of the nephrotoxicity of netilmicin and gentamicin in rats. *Antimicrob. Agent and Chemother.* 12: 474~478, 1977
- 7) LUFT, F. C.: Netilmicin; A review of toxicity in laboratory animals. *J. Int. Med. Res.* 6: 286~299, 1978
- 8) 田中美雄, 篠崎公一, 増原慶壮, 荒井 栄, 高橋 悟, 佐野隆志, 染谷一彦, 佐々木康人: 血中トブラマイシン測定法5種の比較検討。 *Chemotherapy* 31: 324~329, 1983
- 9) 第26回日本化学療法学会東日本支部総会, 新薬シンポジウム "Netilmicin", 1979 (東京)
- 10) JOLLEY, M. E.; S. D. STROUPE, C-H. J. WANG, H. N. PANAS, C. L. KEEGAN, R. L. SCHMIDT & K. S. SCHWENZER: Fluorescence polarization immunoassay I, Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. *Clin. Chem.* 27: 1190~1197, 1981

DETERMINATION OF NETILMICIN IN SERUM BY FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY (FPIA)

HIROKAZU MIYAZAKI¹⁾, KENJIRO MURATA¹⁾, TAKAYUKI NOTSUKA²⁾,
MOTONOSUKE FURUSAWA²⁾, HIROAKI KUBO³⁾, FUMIYA TOMONAGA⁴⁾
and SETSUKO MURASE⁴⁾

- 1) National Kyushu Cancer Center, Hospital Department of Pharmacy
2) National Kyushu Cancer Center, Hospital Department of Gastroenterological Surgery
3) School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry
4) Kitasato University Hospital Department of Pharmacy

We evaluated fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method for the determination of netilmicin (NTL) in human serum.

The following results were obtained:

- 1) Within-run coefficient of variation was less than 7%.
- 2) The calibration curve for NTL in FPIA method had been stabilized for 16 weeks.
- 3) Analytical recoveries of NTL from serum spiked with varying concentration of NTL averaged between 99.0~104.3%.
- 4) Dilution of NTL had been shown to be linear.
- 5) FPIA method was not interfered with hemoglobin (up to 400 mg/dl) and bilirubin (up to 20 mg/dl) in determination of NTL.
- 6) The relationship between FPIA (Y) and bioassay (X_1) or high performance liquid chromatography (X_2) was followed.

$$Y = 0.783 X_1 + 0.581, \quad r = 0.904, \quad Y = 0.949 X_2 - 0.168, \quad r = 0.987.$$

Bioassay was measured about 20% higher than FPIA method.

We conclude that FPIA is a very reliable and reproducible method for clinical NTL level monitoring.