

## 蛍光偏光免疫測定法によるゲンタマイシンの尿中濃度測定

所司原真由美・上 洋 司・藤 本 尚

エッセクス日本株式会社研究開発部

秋 田 博 伸

大和市立病院小児科

岩 田 敏\*

尾利赤十字病院小児科

(\* 現 国立釧ヶ浦病院小児科)

佐 藤 吉 壮

総合太田病院小児科

市 橋 保 雄

国立小児病院

(昭和61年12月13日受付)

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) の尿中濃度測定法について検討した。従来、AGs の尿中濃度はバイオアッセイ、HPLC により測定されているが、測定の迅速性、簡便性を考慮すれば TDX (蛍光偏光免疫測定法)、SLFIA (蛍光酵素免疫測定法) などのイムノアッセイが優れていると考えられる。しかし、尿中濃度測定については十分な検討がなされていないので今回、イムノアッセイの一種である TDX により、AGs としてゲンタマイシン (GM) を用い尿中濃度の測定を試みた。その結果、正確性を損なうことなく従来の血中濃度測定法によって、その定量範囲内に検体を適宜希釈することにより GM 尿中濃度を測定することができた。

11 症例 (小児) 41 検体の GM 尿中濃度を TDX、HPLC およびバイオアッセイで測定した結果、TDX による測定値は HPLC およびバイオアッセイの測定値とよく一致し本法の実用性が確認できた。

TDX により尿中濃度の測定ができるようになったことで、今後は薬動学的な検討をする際のパラメーターとして尿中濃度を加えることが容易となり、AGs の投与計画上有益な情報となり得ることが示唆された。

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は、血中有効濃度域と中毒濃度域が接近しており、臨床場でのモニタリングが実施されている薬物であるが、血中および尿中濃度を薬動学的に解析した報告はまだ少ない。

これは、血中のモニタリングの方法として TDX (蛍光偏光免疫測定法)<sup>1-3)</sup>、SLFIA (蛍光酵素免疫測定法)<sup>4,5)</sup> などの正確性、簡便性に優れた方法があるのに対し、尿中濃度の測定法としては、HPLC<sup>6-8)</sup>、バイオアッセイ<sup>9)</sup> などの方法によらざるをえないことと、尿中濃度を測定する意義が特定の感染症を除いて現在明らかにされていないなどによるものと考えられる。

しかし、尿中濃度の測定がエンザイムイムノアッセイ

などによって血中濃度と同様に簡便にできれば、腎からの排泄を把握することが可能で、AGs の投与計画上有益な情報となり得るものと考えられる。今回、AGs としてゲンタマイシン (GM) を用い、イムノアッセイの一種である TDX により尿中濃度の測定を試みた。

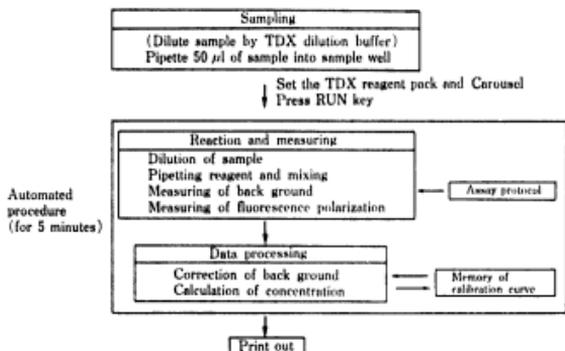
その結果、血中濃度の測定法に変更を加えることなく尿中の GM 濃度を正確かつ簡便に測定することができたので報告する。

## I. 方 法

## 1. 試 料

添加実験には、ヒト健康人 (成人および小児) 尿に GM を種々の濃度に添加して用いた。また、臨床試料の

Fig. 1 Assay procedure of TDX system



測定は、GM 適応患者（小児）11 名より採尿した 41 検体を用いた。いずれの試料も試験に供するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

## 2. 試薬

硫酸ゲンタマイシン（GM）はアメリカシェリング社より入手した原末を用いた。

ウシ- $\gamma$ -グロブリン（Sigma）、ヒト血清アルブミン（USP 25%, Armour）、ウロビリン（Sigma）、ビリルビン（Sigma）、Antibiotic medium No. 11（Difco）、無水硫酸ナトリウム（蛍光分析用、和光）、*o*-フタルアルデヒド（蛍光分析用、半井）、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム（PIC B-7、日本ウォーターズ）。その他の試薬は、特級品を用いた。

## 3. TDX による測定

### 1) 測定装置

TDX-全自動蛍光偏光測定装置「アポット」（ダイナポット社製）

### 2) 測定操作

測定は付属の使用説明書に従い、指定の試薬を用いて行なったが、希釈緩衝液の検討には別に調製したものをを用いた。Fig. 1 に TDX システムの概要を示した。

3) 希釈緩衝液の検討には、リン酸塩緩衝液のモル濃度および pH をそれぞれ 0.01~1 M、pH 6~9 に調製したものをを用いた。なお、これらにはウシ- $\gamma$ -グロブリンを 0.01%、アジ化ナトリウムを 0.01% それぞれ含む<sup>10)</sup> ように加えた。

### 4. バイオアッセイによる測定

試験菌は *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P、培地は Antibiotic medium No. 11（Difco）を用い、日抗基、一般試験法、力価試験法、II. 標準曲線法に従い測定した。標準希釈液は GM を添加した尿を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 8.0）で希釈し、GM 濃度が 1, 2, 4 およ

び  $8 \mu\text{g/ml}$  になるよう調製した。また試料液は、この緩衝液で 10 倍以上に希釈して測定に用いた。

## 5. HPLC による測定

検体の前処理には CM-セファデックス C-25 を用い、大月ら<sup>11)</sup> の方法により測定した。

## II. 結果

### 1. 希釈緩衝液の検討

#### 1) pH の影響

希釈緩衝液の pH が TDX の抗原抗体反応に及ぼす影響について検討した。0.1 M リン酸塩緩衝液の pH を 6, 7, 7.5, 8 および 9 に調整したものを希釈緩衝液として用い、GM を  $0.25 \mu\text{g/ml}$  および  $4 \mu\text{g/ml}$  になるよう添加した尿（成人）を試料として蛍光偏光度を測定した。TDX では、蛍光偏光度の差が大きいほど検量線の傾きが大きくなり正確に測定できるが、Fig. 2 に示したようにこの差は pH 7.5 で最大となった。なお、pH 6 の場合蛍光偏光度が装置の検出限界以下となり測定できなかった。

Fig. 2 Effect of buffer pH on determination of gentamicin in urine

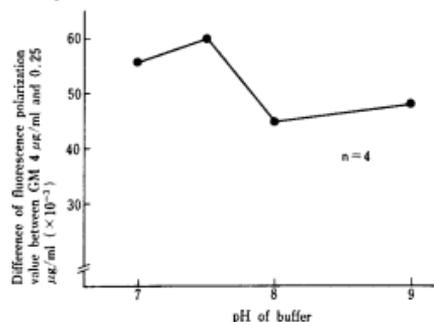
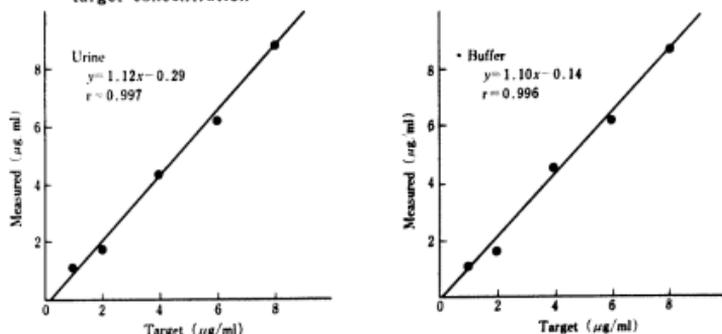


Fig.3 Comparative recovery tests correlating measured concentration with target concentration



## 2) モル濃度の影響

尿の pH は 4.6~8.0 の間で変化することが認められている<sup>1)</sup>が、TDX では試料の pH を 7.5 に調整することが望ましいので、0.01 M、0.1 M および 1 M のリン酸塩緩衝液 (pH 7.5) を用い、尿に対する緩衝能を検討した。

尿に 1 N 硫酸または 10% アンモニア水を加え pH 4, 6 および 8 に調整した後、これにリン酸塩緩衝液を加えていき、pH 7.5 に達するまでの所要量を希釈倍率に換算することにより調べた。その結果、最も希釈倍率が高かったのは、尿 (pH 4) と 0.01 M リン酸塩緩衝液の場合で 300 倍であった。本法によれば、試料は希釈緩衝液で最終的に 2,000 倍希釈されるため、0.01~1 M の間であればいずれのモル濃度の緩衝液を用いても差し支えないと考えられた。

この結果より、以後の実験には測定操作の簡便性、測定時間の短縮および血中、尿中濃度を同時に測定することを考慮し、指定の緩衝液 [0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.5)] を希釈緩衝液として用いた。

## 2. 高濃度検体希釈液の検討

GM 投与後、腎機能が正常であれば血中濃度の推移からみてその尿中濃度は投与後約 12 時間まで<sup>1)</sup>は高濃度に排泄されることが予想されるため、予め試料を本システムの測定可能範囲とされている 0.16~10 µg/ml 尿ま

Table 2 Recovery test of TDX

Gentamicin conc. added (µg/ml)	n	Measured mean (µg/ml)	Analytical recovery (%)
1.00	30	1.03	103.0
4.00	30	4.16	104.0
8.00	30	8.43	105.4

で希釈する必要がある。尿に GM を 200 µg/ml となるように添加したものを高濃度検体とし、これらを尿または指定の緩衝液で希釈して GM 濃度 1, 2, 4, 6 および 8 µg/ml とし測定した。得られた測定値と理論値の回帰直線式は Fig.3 に示したように  $y = 1.12x - 0.29$  (尿で希釈)、 $y = 1.10x - 0.14$  (緩衝液で希釈) であり、高濃度検体の希釈液として尿または指定の緩衝液どちらを用いても測定可能であったが、希釈液としては尿以外のものを用いる方が取扱いの容易さから優れ、臨床試料の測定には指定の緩衝液を用いた。

## 3. 測定精度

### 1) 相対標準偏差及び回収率

尿に GM を 1, 4 および 8 µg/ml となるよう添加した試料につき測定した結果、相対標準偏差は Table 1 に示したように日内変動で 1.7~2.5%、日差変動で 1.5~4.3% であり、いずれも臨床応用には充分な精度であっ

Table 1 Precision and reproducibility of TDX

Gentamicin conc. added (µg/ml)	Within-Day variance (n=30)			Between-Day variance (n=5)		
	Mean (µg/ml)	SD	RSD* (%)	Mean (µg/ml)	SD	RSD* (%)
1.00	1.03	0.03	2.5	0.99	0.04	4.3
4.00	4.16	0.07	1.7	4.11	0.15	3.6
8.00	8.43	0.17	2.0	7.58	0.11	1.5

\* Relative standard deviation

Table 3 Effect of TDX reagent lot

Reagent lot No.	Relative standard deviation (%) <sup>*</sup>		
	1 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$
88-526-AZ	1.7	3.1	2.7
88-795-AZ	2.8	1.3	1.3
78-307-AZ	1.8	0.9	2.1

\* n=10

Table 4 Effect of age on determination of gentamicin concentration in urine

Age	Sex	Measured value (n=5) <sup>*</sup>	
		Mean ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)
27	Male	4.17	1.5
4	Male	4.10	1.3
2	Female	4.15	1.3

\* Target value is 4  $\mu\text{g/ml}$ 

た。また、回収率も Table 2 に示したように良好であった。

## 2) 試薬ロットの影響

本法は血中濃度の測定を目的としたイムノアッセイであるため、試薬ロットによっては尿中濃度の測定値にバラツキの出ることが懸念される。そこで、測定値の再現性を異なるロットの試薬キットを用いて検討した。試料は先の実験と同様に尿に GM を 1, 4 および 8  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加したものをを用いて測定したが、その結果は Table 3 に示したようにロットの影響はみられなかった。

## 3) 尿の年齢による影響

小児と成人ではその生活環境の違いから尿成分は大きく異なることが考えられるため、小児尿および成人尿を用いて測定値への影響を検討した。すなわち、小児尿および成人尿にそれぞれ GM を 4  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加したものを試料とし測定した。その結果は Table 4 に示したように年齢による差は認められなかった。

## 4. 尿中の干渉物質

### 1) 尿の色および蛍光性物質の影響

尿の色業成分であるウロビリニンおよび黄疸患者の尿中に多量に含まれるビリルビンを用いて測定値に及ぼす尿の色とこれらの成分の影響を検討した。GM 4  $\mu\text{g/ml}$  を含む尿を対照尿とし、この尿にウロビリニンまたはビリルビンを 5, 10 および 15 mg/dl になるように添加したものを試料として測定した。Fig. 4 に示したように対照尿に比べ、ウロビリニンおよびビリルビンの添加濃度が高くなるに従って測定値はわずかに低くなる傾向がみられたが、尿中濃度のモニタリングを目的とした時にはほとんど

Fig. 4 Effect of urobilin or bilirubin

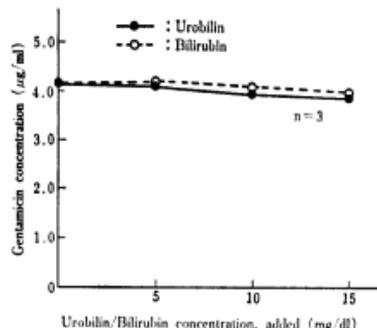
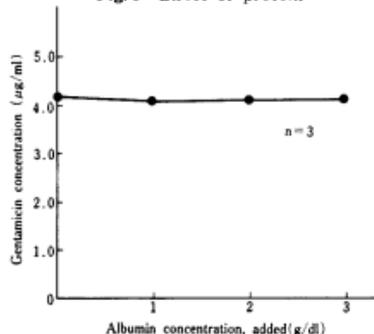


Fig. 5 Effect of protein



と影響しない程度のもと考えられる。

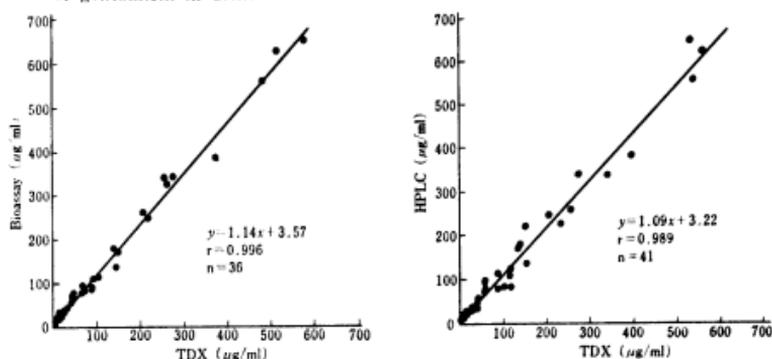
### 2) タンパク質の影響

タンパク質はしばしば尿中に多量に含まれることがある。TDX は本来血中濃度測定を目的としているので、タンパク質の影響は受けないものと考えられるが、尿中にタンパク質が多量に存在した時の測定値への影響を確認するために行なった。GM 4  $\mu\text{g/ml}$  を含む尿を対照尿とし、この尿にヒト血清アルブミンを、1, 2 および 3 g/dl となるように添加したものを試料として測定した結果は、Fig. 5 に示したようにタンパク質の影響はみられなかった。

### 5. 尿の濁り

新鮮尿は通常透明であるが放置しておくことと濁ることがあり、TDX で測定する際に装置への影響を考慮すれば、予めこの濁りを除去することが必要と思われる。透明な尿およびこの透明な尿に 0.1 N 水酸化ナトリウムを加え沈殿物を析出させた尿を調整し、これらに GM を 4  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加したものを試料として測定した。濁った尿を直接試料として測定すると、装置内の配管系につまりを生じ正常な測定操作ができない恐れが

Fig. 6 Correlation of TDX with bioassay (left) or HPLC (right) for determination of gentamicin in urine



ある。このため予めミリポアフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) で濾過し、濁りを除去してから測定した結果、濾過の影響はみられなかった。

#### 6. 他の測定法との相関

GM 適応患者 (小児) 11 名より経時的に採取した 41 検体について GM 尿中濃度を TDX, バイオアッセイ (併用薬剤の影響により、測定可能な 36 検体について実施した) および HPLC により測定した。Fig. 6 に示すように TDX に対する相関係数はバイオアッセイで  $r=0.996$ , HPLC で  $r=0.989$  と両者とも非常に良い相関であった。なお、バイオアッセイおよび HPLC の再現性はそれぞれ相対標準偏差 2.8~4.3% および 2.4~5.1% であった。

### III. 考 察

AGs の血中濃度測定に繁用されている方法の一つである TDX を用いて、GM の尿中濃度測定を試みた結果、本法の特徴である簡便性、正確性を損なうことなく測定できることを確認した。

一般に尿中の AGs を測定する方法として HPLC, バイオアッセイなどの方法が用いられているが、いずれも精度よく尿中の AGs を測定するには技術、簡便性などからみて普選性のある方法とはいえない。イムノアッセイは、血中濃度の測定法として特異性、迅速性に優れ、ベッドサイドモニターの方法として適しているが、血液と比べ成分組成およびその量の変動が著しく大きい尿中の AGs を測定するには未だ充分な検討のなされていない方法である。また抗原抗体反応を用いているため特異性に優れているが、その反面結合部位が同一の構造であれば類似化合物、代謝物等を含めすべて測定される危険性を含み、尿中の目的成分を測定するにあたっては適用できる薬剤もおのずと限定される。しかし、今回検討を

行なった AGs はヒト体内で代謝を受けず、また構造が類似した化合物も体内中には存在しないことから、TDX は尿中の AGs 測定法として非常に適した方法であると考えられる。

TDX により尿中の AGs を測定する際に、測定値へ影響を与えるものとして、一般的に尿成分の干渉はもとより、尿の特質として、ヒトの尿の色は、生活環境、健康状態の差により殆ど無色のものから黄褐色のものまであり、ネフローゼまたは黄疸患者の尿中には多量のタンパク質、ビリルビンなどが存在するが、検討の結果、これらはすべて測定の妨害物質とならなかった。一方、健康人の新鮮尿を試料として測定する際には尿中の不溶性物質を考慮する必要性は殆どないが、採取した尿を放置しておくで経時的に綿状物質を生成すること、病態によっては尿が濁ることもあるので、このような尿を試料とする時には、予めミリポアフィルターで濾過することによって測定および装置系への影響を除くことができた。GM 適応患者 (小児) 11 名より採取した 41 検体について GM 尿中濃度を測定した結果、HPLC およびバイオアッセイの測定値とよく一致し、本法の実用性が確認できた。

TDX は、蛍光偏光消滅現象を利用した Fluorescence polarization immunoassay であり、本システムでは、試料および試薬をセットした後は全自動で測定結果までプリントアウトされ、バックグラウンド蛍光偏光度も自動で補正されている。そのため、本法で検討した干渉物質以外にそれ自身蛍光強度および蛍光偏光度を有する物質が存在してもその影響を受けることなく、また蛍光偏光度を利用するため試薬ロットが同一であれば標準曲線も分析ごとに測定することなく同一のものを使用して、分析することができる。また、本報では AGs として GM

を用いたが、TDX の測定原理および検討結果から GM 以外の AGs についてもそれぞれの血中濃度測定用の試薬を用いて尿中濃度の測定は充分可能と思われる。

AGs は、体外排泄機序として腎外排泄は小さく、投与されたもののほとんどは尿中に排泄されるので、尿中では高い AGs 濃度を得られるが、この瞬時的な推移を把握しても血中濃度のモニタリングとは異なって AGs の投与計画の指標とはなり難く、単に治療上の一情報として扱われるのが尿路感染症などの特定疾患を除いた場合の現状である。しかし、これは従来の測定対象が主として血液であり、尿は腎機能の指標としての測定が行われてきたことによると思われるが、本法によれば血中濃度の測定系を用いて尿中濃度を簡便に測定することが可能となる。これにより薬動学的な検討をする際のパラメーターとして尿中濃度を加えることも容易となり、血中濃度および臨床検査値に加えて尿中濃度モニターの有用性が確立されるとともに AGs の投与計画に反映されるものと思われる。

#### 文 献

- JOLLEY, M. E.; S. D. STROUPE, CHAO-HUEI J. WANG, H. N. PANAS, C. L. SCHMIDT & K. S. SCHWENZER: Fluorescence Polarization Immunoassay I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma. *Clin. Chem.* 27: 1190~1197, 1981
- JOLLEY, M. E.; S. D. STROUPE, K. S. SCHWENZER, C. J. WANG, M. LU-STEFFES, H. D. HILL, S. R. POPELKA, J. T. HOLEN & D. M. KELSO: Fluorescence Polarization Immunoassay III. An automated system for therapeutic drug determination. *Clin. Chem.* 27: 1575~1579, 1981
- 西園寺 克, 他 13 名: アミノ配糖体系薬物における蛍光偏光免疫測定法の Therapeutic Drug Monitoring への応用。生物試料分析 6: 24~39, 1983
- BURD, J. F.; S. G. THOMPSON & C. A. MILLER IN NELSON, J. D. & GRASSI, C. (ed): Substrate-labeled fluorescent immunoassays for measuring levels of the aminoglycoside antibiotics gentamicin, sisomicin, netilmicin, tobramycin, kanamycin and amikacin. *Current Chemotherapy and Infections Disease Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy and the 19th Interscience Conference on Antimicrob. Agents and Chemother., American Society for Microbiology*: pp. 517~519, 1980
- 初田和由, 扇谷茂樹, 久城英人, 児玉順三: 蛍光酵素免疫測定法 (SLFIA) による血中アミカシン, トブラマイシンならびにゲンタマイシン測定法の評価。臨床検査機器・試薬 4: 410~413, 1981
- WALKER, S. E. & P. E. COATES: High-performance liquid chromatographic method for determination of gentamicin in biological fluids. *J. Chromatogr.* 223: 131~138, 1981
- HANGHEY, D. B.; D. M. JANICKE, M. ADELMAN & T. J. SCHECTAG: High-pressure liquid chromatography analysis and single-dose disposition of tobramycin in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 649~653, 1980
- d'SOUZA, J. & R. I. OGLIVIE: Determination of gentamicin components C<sub>12a</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>1</sub> in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 232: 212~218, 1982
- 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体液内 Tobramycin の微生物学的微量定量法に関する検討。Chemotherapy 23: 886~893, 1975
- SUSAN R. POPELKA, D. M. MILLER, J. T. HOLEN & D. M. KELSO: Fluorescence Polarization Immunoassay II. Analyzer for rapid, precise measurement of fluorescence polarization with use of disposable cuvettes. *Clin. Chem.* 27: 1198~1201, 1981
- 大月秀夫, 上 洋司, 村川英雄, 藤本 尚: 高速液体クロマトグラフィー-ポストラベル法によるネチルマイシンの分析。Chemotherapy 34: 571~576, 1986
- WHITE, A.; P. HANDLER, E. L. SMITH, R. L. HILL, I. R. LEHMAN: Principles of Biochemistry, Sixth edition (鈴木 旺, 堀内忠郎, 松村 剛, 山科都男, 山羽 力 監訳), 1069 頁, 広川書店, 1983
- 上田 泰綱: アミノ配糖体系薬, 6. 臨床 (熊沢浄一), 306 頁, 南江堂, 1985

## DETERMINATION OF GENTAMICIN IN URINE BY FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY

MAYUMI SHOSHIHARA, HIROSHI KAMI and TAKASHI FUJIMOTO

Research and Development Laboratories, Essex Nippon Kabushiki Kaisha

HIRONOBU AKITA

Department of Pediatrics, Yamato City Hospital

SATOSHI IWATA\*

Department of Pediatrics, Ashikaga Red Cross Hospital

(\* Present address : Department of Pediatrics, Kasumigaura National Hospital)

YOSHITAKE SATO

Department of Pediatrics, Ohta General Hospital

YASUO ICHIHASHI

National Children's Hospital

Determination of aminoglycoside antibiotics (AGs) in urine was investigated.

Though AGs concentration in urine is usually determined by bioassay or HPLC, immunoassay is considered to be the best method due to its rapidity and convenience. Since determination of AGs in urine by immunoassay has not been investigated enough, we tried to determine gentamicin (GM), a kind of AGs, in urine by fluorescence polarization immunoassay (TDX)<sup>®</sup>. In consequence, while keeping its accuracy, we could determine GM in urine by the usual TDX method when the samples were diluted in the range of determination.

We determined GM in 41 urine samples of 11 patients (infants) by TDX, HPLC and bioassay. Assay data by TDX agreed closely with those by HPLC and bioassay, and practical use of this method was confirmed.

As it has become possible to determine urine concentration by TDX, it is easy to use urine concentration as a parameter in pharmacokinetics. This data can be utilized as useful information for administration protocol.