

抗生剤併用投与時の血中濃度同時測定法の開発

—高速液体クロマトグラフィーによる Cefmetazole と Gentamicin の同時測定—

吉 田 幸 洋

順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院産婦人科

(昭和62年1月16日受付)

逆相イオン対分配クロマトグラフィーによって、併用投与された Cefmetazole (CMZ) と Gentamicin (GM) の血中濃度を迅速かつ簡便に同時定量する方法を開発した。

移動相は1,2-エタンジスルホン酸ナトリウム 0.1 M とオクタンスルホン酸ナトリウム 0.005 M を酢酸で pH 3.2~3.3 に調整し、アセトニトリルは 16% で用いた。カラムは Zorbax ODS を用い、測定は、CMZ は紫外線吸収測定 (254 nm)、GM は蛍光測定 (EM 452 nm, EX 357 nm) で行なった。流速は、移動相は 1.2 ml/min、蛍光相 (蛍光試薬: *o*-フタルアルデヒド) は 0.3 ml/min とした。血清の前処理はメタノール除蛋白 (血清 50 μ l, 内部標準 20 μ l メタノール 100 μ l) 後にイオン対溶液 200 μ l (移動相の2倍濃度, pH 2.5) を加え 100 μ l を注入した。

CMZ のリテンションタイムは5分で、GM の C_{1s} , C_2 , C_1 はそれぞれ 15 分, 18 分, 22 分であり、1検体当たり約 25 分で測定を終了した。同時再現性は、CV で CMZ 2.2~4.6%, GM 6.4~7.9% であった。日差再現性は、カラムにより差があったが、CV で CMZ 8.2~9.1%, GM 2.2~13.3% であった。GM の測定限界は 1 μ g/ml であった。腎機能正常な婦人科患者 9 名に CMZ 2 g (点滴静注) と GM 40 mg (筋注) を併用投与した際の CMZ と GM の血中濃度を測定し、臨床応用価値の高いことを確認しえた。

抗生剤の併用療法は、相乗効果が期待されること、抗菌スペクトルの拡大が期待されること、その結果薬剤の用量と副作用の軽減をはかることが可能と考えられることから、単剤投与では奏効しない難治感染症への対策として近年多く試みられるようになった¹⁾。そのなかでも、セフェム系抗生剤 (CEPs) とアミノグリコシド系抗生剤 (AGs) との併用投与は最もしばしば用いられている併用組合せの一つである^{2,3)}。しかしながら抗生剤の併用投与では、単剤投与の場合と異なり、併用抗生剤それぞれの体内動態、相互作用に関してなお不明の点が多い⁴⁾。

近年、薬物療法を安全かつ有効に行なうために、薬物療法時に血中薬物濃度モニタリングを実施する治療的薬物モニタリング therapeutic drug monitoring (TDM) が進歩発達し、種々の薬物濃度測定方法が開発されている。抗生物質では、バイオアッセイ法、ラジオイムノアッセイ法 (RIA)、酵素イムノアッセイ法 (EIA)、蛍光イムノアッセイ法 (FIA)、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) がある。これらの方法はそれぞれ一長一短があるが^{5,6)}、併用投与の際にバイオアッセイ法は一般に困難である。

これまで、HPLC 法による CEPs の濃度測定⁷⁾ や、AGs の濃度測定についての報告^{8,9)} は多いが、併用投与の場合はそれぞれの薬剤を別々に測定するのが従来の方法であり、同時測定についての報告は皆無に等しい。

今回、イオン対クロマトグラフィーにより汎用されている CEPs である Cefmetazole (CMZ) と、AGs である Gentamicin (GM) の血中濃度を同時測定する方法を開発し臨床応用を試みたので、その成績を報告する。

I. 材料と方法

1. 試薬

標準品である。CMZ (力価 935 μ g/mg) は三共、GM (力価 590 μ g/mg) と Tobramycin (TOB) (力価 93 μ g/mg) は塩野義製薬より提供された。HPLC の移動相とカウンターイオン試薬調製に用いた 1,2-エタンジスルホン酸ナトリウムと 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、および蛍光試薬である *o*-フタルアルデヒドは東洋化成工業製を用いた。また実験に際しては脱イオン水¹⁰⁾ を用い、アセトニトリル、メタノールは HPLC 用 (関野化学株式会社) を用いた。

1) 移動相の調整

移動相は 1,2-エタンジスルホン酸ナトリウム 0.11

と、1-オクタンスルホン酸ナトリウム 0.005 M を、酢酸で pH 3.2~3.3 に調整し、アセトニトリル濃度を 16% となるように加えた。

2) カウンターイオン試薬の調製

カウンターイオン試薬としては、1,2-エタンジスルホン酸ナトリウム 0.2 M と、1-オクタンスルホン酸ナトリウム 0.01 M を酢酸で pH 2.5 に調整したものを用いた。

3) 蛍光試薬の調製

ANHALT ら⁴⁾の方法に準拠し、測定の際行なった。

2. 装置

Fig. 1 に装置の概要を示した。HPLC は島津 LC-4 A 型。カラムは逆相クロマト用 Zorbax ODS (250 mm × 4.6 mm ID) (Dupont) を使用し、2 台のポンプは、移動相を送り出すためには LC-4 A 付属のもの (流速は 1.2 ml/min)、蛍光試薬輸送用には Model 6000 A (Waters) を用いた (流速は 0.3 ml/min)。蛍光試薬反応用リアクションコイルは、テフロン製 (5 m × 0.4 mm ID) を利用し、反応は室温で行なった。CMZ 用紫外外部吸収検出器は Model 440 (Waters) で、検出波長は 254 nm、蛍光検出器は RF-53 (島津製作所) で、励起波長 357 nm、検出波長 452 nm で測定した。記録装置は Model VP-6621 A (松下製作所) で CMZ 用、GM 用それぞれ別のペンで記録した (記録速度は 0.5 cm/min)。

3. 検体処理

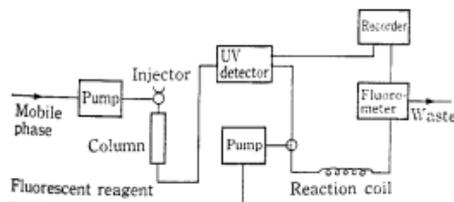
検体血清 50 μ l に内部標準物質 (TOB 30 μ g/ml) 20 μ l と 99.7% メタノール 100 μ l を加え混和する。10 分間放置した後、析出した蛋白を 10,750 rpm (9,500 G) で 2 分間遠沈し除蛋白する。上清にカウンターイオン試薬 200 μ l を加え 30 分間放置後再度 10,750 rpm (9,500 G) で 2 分間遠沈し、上清 100 μ l を HPLC に注入した。

4. 測定値処理と濃度計算法

標準添加濃度血清と検体に添加した内部標準 (TOB) から次の計算により CMZ, GM 濃度を求めた。

(a) CMZ: 定法通り標準液ピーク高さとの一点測定比により求める。

Fig. 1 Flow diagram of HPLC system for CMZ and GM assay



$$x (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{検体の CMZ の peak (mm)} \times \text{標準液濃度 } (\mu\text{g/ml})}{\text{標準液 peak (mm)}}$$

(b) GM: CMZ と異なり内部標準 (TOB) の蛍光を基準に行なうので次式による。

$$x (\mu\text{g/ml}) = \frac{H_T \times H_{O1}}{H_O \times H_{T1}} \times C$$

H_T : 標準液 TOB の peak 高さ (mm)

H_O : 標準液 GM の peak 高さ (mm)

H_{T1} : 検体の TOB の peak 高さ (mm)

H_{O1} : 検体の GM の peak 高さ (mm)

C : 標準液 GM の濃度 (μ g/ml)

5. GM の検出限界の確認実験

ブール血清 0.95 ml に GM の希釈液 (精製水) 0.05 ml を加えて最終濃度 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 3 μ g/ml となるように調整したものを試料とし各 4~5 回測定し、ピーク高さ (mm) を比較した。

II. 成績

1. クロマトグラム

Fig. 2 は今回得られたクロマトグラムである。CMZ のリテンションタイムは約 5 分で、GM のリテンションタイムは C_{1a} , C_2 , C_1 それぞれ約 15 分, 18 分, 22 分であった。

2. 検量線の作成

Fig. 3 は 5 μ g/ml~200 μ g/ml の CMZ 添加血清を用いたスタンダードカーブである。ピーク高さとの間には良い直線性が得られた。Fig. 4 は 2 μ g/ml~15 μ g/ml の GM 添加血清を用いたスタンダードカーブである。GM と内部標準物質である TOB のピーク高さの

Fig. 2 Chromatograms of CMZ and GM

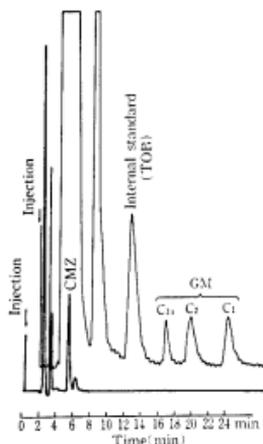


Fig. 3 Standard curve (CMZ)

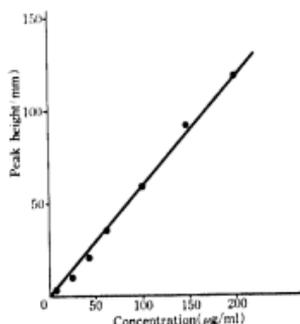
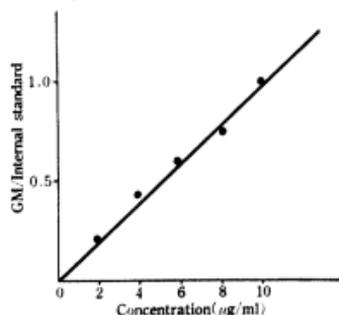


Fig. 4 Standard curve (GM)



比と、GM 濃度との間には、同様に良い直線性が得られた。

3. 同時再現性

CMZ および GM の同時再現性をみると、両者ともに 10 回の施行で、低、中、高濃度ともに良好な再現性が得られ、CMZ で CV は 5% 以下、GM で 8% 以下であった (Table 1)。

4. 日差再現性とカラムの寿命

患者検体では少量のため日差繰り返し測定不能なので、プール血清に CMZ, GM を添加して求めた標準液のピーク高さの日差で求めた。したがって除蛋白液添加前処理からの誤差全てを含んだものである。データはカラム A, B と測定値が違いすぎるので区別して Table 2 に示した。

カラム樹脂 Bondapak C₁₈ は 1 日 4 ~ 6 回の使用で 25 日間約 120 回使用したところ機能低下をきたし、必要な流出速度が得られなくなり A より B に交換した。カ

Table 1 Repeatability

(n=10)

Concentration		Mean concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Variation coefficient (%)
CMZ	low	51.3 \pm 2.38*	4.6
	middle	98.0 \pm 2.17	2.2
	high	192.1 \pm 4.65	2.4
GM	low	3.56 \pm 0.28	7.9
	middle	11.8 \pm 0.75	6.4
	high	18.3 \pm 1.19	6.5

* Mean \pm SD.

Table 2 Reproducibility of CMZ and GM (day to day)

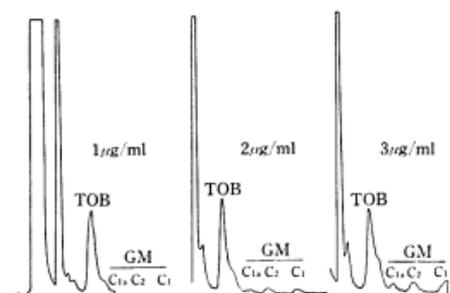
Column	CMZ		GM	
	Peak height (mm)	Mean \pm SD (CV)	Peak height (mm)	Mean \pm SD (CV)
A	87.0	88.5 \pm 3.08 (9.1%)	90.5	92.8 \pm 2.04 (2.2%)
	92.3		94.3	
	96.8		93.7	
	78.0			
B	41.2	45.2 \pm 3.7 (8.2%)	49.2	56.9 \pm 7.5 (13.3%)
	42.5		51.9	
	44.3		63.5	
	50.3		53.5	
	47.5		66.3	

CMZ: 150 $\mu\text{g/ml}$, GM: 10 $\mu\text{g/ml}$.

Table 3 Minimum detectable concentration of gentamicin

No.	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Peak height					$\bar{x} \pm \text{SD}$
		C_{1s} (mm)	C_2 (mm)	C_1 (mm)	Total (mm)	Int. st. (mm)	
1	1	2.5	4.0	2.5	9.0	79.0	8.75 \pm 0.27
2		1.5	3.5	3.5	8.5	71.5	
3		2.5	3.0	3.0	8.5	71.5	
4		2.5	3.5	3.0	9.0	86.0	
1	2	5.5	6.5	5.5	17.5	80.0	16.9 \pm 0.63
2		5.0	6.0	5.0	16.0	76.0	
3		6.0	6.0	5.0	17.0	73.5	
4		5.5	6.0	5.5	17.0	68.5	
1	3	8.0	9.0	8.0	25.0	69.5	24.8 \pm 0.76
2		7.5	8.0	8.0	23.5	66.0	
3		8.0	9.0	8.0	25.0	65.0	
4		8.0	9.0	8.0	25.0	70.0	
5		8.5	9.0	8.0	25.5	69.0	

Fig. 5 Chromatograms of GM assay for minimum detectable concentration



ラムの劣化はカウンターイオン試薬の濃度が高いことによるが、注入口にも日とともに析出するので絶えず除去する必要がある。

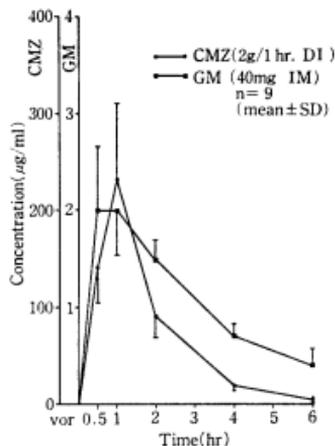
5. GM の検出限界

GM の 1~3 $\mu\text{g/ml}$ 繰り返し測定実験の成績は、Table 3 に示す通りである。ピーク高さで 1 $\mu\text{g/ml}$ と 2 $\mu\text{g/ml}$ との差は t 検定で 0.1~0.5% 水準で有意であった。これは GM の血中有効最低濃度は確かに検出しており、1 $\mu\text{g/ml}$ と 2 $\mu\text{g/ml}$ の間には本法で検出可能な差の存在することを確認できた。Fig. 5 は本実験におけるチャートを示したものである。

6. 臨床例

9人の腎機能正常な婦人科患者に CMZ 2g を1時間かけて点滴静注を行ない、また CMZ 点滴静注開始と同時に GM 40mg を筋注した際の CMZ と GM の血中濃度を本法で測定した結果を Fig. 6 に示した。CMZ の血

Fig. 6 Serum levels of CMZ and GM in gynecological patients



中濃度のピークは点滴終了時で、最高血中濃度は range 115~357 $\mu\text{g/ml}$ で平均 234 $\mu\text{g/ml}$ (SD 78.3) であり以後漸減した。GM の血中濃度のピークは筋注後 60 分であり、最高血中濃度は range 1.3~2.6 $\mu\text{g/ml}$ で平均 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (SD 0.46) で以後漸減した。今回の投与方法では CMZ と GM はほぼ同時に血中濃度のピークに達した。この結果は、我々が CMZ と TOB を併用投与し、それぞれ HPLC と SLFIA 法で血中濃度を測定した結果¹⁰⁾とはほぼ同様の結果であった。

III. 考 案

抗生剤の血中濃度測定法には種々の方法がある。バイ

オファッセイ法は抗菌活性を測定することから各種測定法の基準となるべき方法であるが、抗生剤が併用投与された場合には特別な前処置が必要であるか、特殊な菌が必要であることから併用投与の際には利用できない。免疫学的測定法には RIA 法、EIA 法、FIA 法があり、特異性が高く併用投与の際にも測定が可能であり、結果が得るまでの時間も早く良い方法である。各種キットが市販されているが、抗生剤では対象はすべて AGs に限られている。HPLC 法は、検体をメタノールで除蛋白すれば、ほとんどの薬物の分離定量が可能であることから、TDM に広く用いられている¹¹⁾。

HPLC 法は固定相であるカラムで、目的とする薬物を極性の差により分離し、分離された薬物を、その薬物のもつ物理学的性質から測定するものである。カラムから溶出してくる時間は一般に移動相の流速、移動相中の有機溶媒の混合比、さらには pH を変えたり、またカウンターイオンを加えることにより変化させることができる。今回の方法では、移動相中の有機溶媒としてアセトニトリルを使用した。条件の設定上混合比を正確に 16% にすることが CMZ と GM の分離に重要であった。またカウンターイオンは、GM の分離に必須であった。今回使用したカウンターイオンは、1,2-エタンジスルホン酸イオンと、1-オクタンスルホン酸イオンの混合カウンターイオンである。これは AGs のアミノ基とイオン対を形成し、本来逆相分配クロマトグラフィー用カラムには保持されない水溶性イオンもカラムに保持され分析できるようになる。しかしアミノ基を持たない CEPs とはイオン対が形成されず CEPs は影響を受けにくいものと思われる。

現在 HPLC に用いられている検出器は、紫外線や蛍光検出器が主である。CMZ は紫外外部に吸収を持つため、254 nm の固定波長紫外線吸収検出器により検出が可能である。AGs は紫外吸収を示さず直接測定できない。今回は 2-メルカプトエタノール存在下でアミノ基と反応して蛍光誘導体を生ずる *o*-フタルアルデヒドを用いてフィルター式蛍光光度検出器で検出した。しかし、この蛍光試薬は比較的不安定であるので測定の都度調製が必要である。大月ら¹²⁾は *o*-フタルアルデヒドと反応するチオール化合物として、2-メルカプトエタノールよりも β -メルカプトプロピオン酸を用いたほうが、蛍光強度も強く蛍光試薬の安定性も良いと報告している。

以上のような方法により HPLC 法を用いて CEPs や、AGs を測定した報告は多い^{7,8)}。しかしながら、同一系において一度に CEPs と AGs を同時測定したのは今回が初めてである。もともと、HPLC 法により AGs を測定する場合には、移動相輸送用と蛍光相輸送用の 2 台

のポンプが必要であった。今回の方法では AGs 測定のための HPLC 系の途中、すなわちポストカラムで、蛍光物質ラベリングの前に紫外線吸収検出器をおくという非常に簡単な方法で、CEPs も測定することが可能であった。

従来、併用投与された CEPs と AGs の体内動態を知る目的で血中濃度測定を行なう場合、AGs は免疫学的測定法で、CEPs は HPLC 法で測定するケースが多かった¹⁰⁾。この場合、検体量がそれぞれの測定法に分だけ必要であること、検体処理に二重の手間がかかること等のデメリットが考えられるが、最も重要なことは、併用投与時にそれぞれの薬剤の測定法が異なるということは、一方では薬剤の免疫原性から測定値を求め、一方は紫外線吸収部分の物理化学的特性を求めるといった違いが生じる。もちろん、それぞれの測定値自体バイオアッセイとの相関は高いが、同一生体中の体内動態を論ずる場合に正確度の統一という点で問題となる。

今回の方法では、1) 測定法が統一されることにより濃度を比較して論ずることができる。2) CEPs, AGs をそれぞれ HPLC 法の別の系で測定するような場合に比較して検体処理に要する時間、および測定結果が得るまでの時間を短縮できる。3) 検体量が少なくすむ。などの利点が考えられる。

産婦人科領域における重症感染症例、特に compromised host における感染症では複数菌検出例が多く¹³⁾、CEPs と AGs の併用療法は今後ますます行なわれる機会が多いことと思われる。また、compromised host では腎機能低下例も多く、AGs は慎重な投与が要求される。特に CEPs と併用投与された場合、副作用発現頻度が高いという報告もある¹⁴⁾。したがって迅速正確な薬物血中濃度測定の意義は今後ますます大きくなると思われるが、今回の方法は CMZ 以外の他の CEPs と GM 以外の他の AGs の組み合わせにも応用可能であり臨床における TDM への役割は大きいものと思われる。

〔謝辞〕 稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師高田道夫教授に謹んで深謝いたしますとともに、御懇篤な御指導御鞭撻を頂きました、順天堂大学臨床病理学教室林 康之教授に深く感謝いたします。また御指導頂いた、久保田武美講師および臨床病理学教室西園寺 克先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 国井乙彦, 熊田徹平, 清水喜八郎: 抗菌薬相互の併用, 現状と 2, 3 の考察. 臨床医 12: 190~199, 1986
- 2) GIAMARELLOU, H.: Aminoglycosides plus beta-lactams against gram-negatives—Evaluation

- of *in vitro* synergy and chemical interactions—*Am. J. Med.* 80(6B): 126~137, 1986
- 3) LAETHEM, Y. V.; H. LAGAST & J. KLASTERSKY: Serum bactericidal activity of ceftazidime and cefoperazone alone or in combination with amikacin against *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 435~439, 1983
- 4) 小川正俊, 宮崎修一, 五島雅智子: 抗菌薬併用に關する研究—実験的膿腫菌感染における併用効果と投与方法—。*Chemotherapy* 34: 232~239, 1983
- 5) 西園寺 克, 飯塚 慶, 坂野幸江, 川上恭子: Gentamicin の血中濃度測定法の検討。臨床例理 29: 627~632, 1981
- 6) 西園寺 克, 飯塚 慶, 坂野幸江: Tobramycin 血中濃度測定法の検討 (Bioassay, HPLC, EMIT, SLFIA, MARKIT)。Chemotherapy 30: 509~513, 1982
- 7) SEKINE, M.; K. SASAHARA, T. KOJIMA & T. MORIOKA: High-performance liquid chromatographic method for determination of cefmetazole in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 740~743, 1982
- 8) ANHALT, J. P. & S. D. BROWN: High-performance liquid-chromatographic assay of amino glycoside antibiotics in serum. *Clin. Chem.* 24: 1940~1947, 1978
- 9) KUBO, H.; T. KINOSHITA, Y. KOBAYASHI & K. TOKUNAGA: Micro determination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatograph* 227: 244~248, 1982
- 10) 吉田幸洋, 久保田武美, 高田道夫: 子宮全摘手術後における Cefmetazole と Tobramycin の血中濃度および骨髄死腔液中濃度—併用投与と単独投与との比較—。*Chemotherapy* 35: 184~188, 1987
- 11) 林 康之, 西園寺 克: 抗生物質の生体内動態とそれに係る問題。*順天堂医学* 31: 488~496, 1985
- 12) 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—蛍光試薬に *o*-フタルアルデヒド/ β -メルカプトプロビオン酸を用いた分析—。*Chemotherapy* 34: 571~576, 1986
- 13) 久保田武美, 高田道夫: 産婦人科領域における複数菌検出例の臨床的考察。*感染症学雑誌* 56: 476~485, 1982
- 14) HANSEN, M. M. & K. KAABER: Nephrotoxicity in combined cephalothin and gentamicin therapy. *Acta Med. Scand.* 201: 463~467, 1977

NEWLY DEVELOPED HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SIMULTANEOUS ASSAY OF CEFMETAZOLE AND GENTAMICIN IN COMBINATION THERAPY

KOUYOU YOSHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo Urayasu Hospital,
Juntendo University, School of Medicine

A new reversed phase ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the assay of cefmetazole (CMZ) and gentamicin (GM) in human serum which were administered in combination therapy was developed. The condition of HPLC system was as follows: Mobile phase was prepared to contain 0.1 M disodium 1,2-ethanedisulfonate and 0.005 M sodium octanesulfonate in 16% acetonitrile solution adjusted to pH 3.2-3.3 with acetic acid. Counter-ion reagent was prepared to contain 0.2 M disodium 1,2-ethanedisulfonate and 0.01 M octanesulfonate adjusted to pH 2.5 with acetic acid. Flow rate of mobile phase and fluorescent phase (*o*-phthalaldehyde) was 1.2 and 0.3 ml/min respectively. After detection of CMZ by UV absorption (254 nm), three major components of GM (C_{1a} , C_2 , C_1) were measured with the fluorescent detection method (EM 452 nm, EX 357 nm). Deproteinization was performed by adding 99.7% methanol (100 μ l) to a mixture of serum sample (50 μ l) and internal standard (tobramycin; 20 μ l). After centrifugation, 200 μ l of counter-ion reagent was added to a supernatant. After being centrifuged, a supernatant of 100 μ l was injected on a reversed phase column (Zorbax ODS). The results were as follows: Retention time of CMZ was 5 min and those of C_{1a} , C_2 and C_1 of GM were 15, 18 and 22 min respectively. Peak height of CMZ and peak height ratio of GM to the internal standard were proportional to the concentrations in the range of therapeutic concentrations. Minimum detectable concentration of GM by this method was 1 μ g/ml. Favorable within-day repeatability from low to high concentrations (CMZ; 2.2~4.6%, GM; 6.4~7.9%) and day-to-day reproducibility (CMZ; 8.2~9.1%, GM; 2.2~13.3%) (CV) were obtained. Serum concentrations of CMZ and GM were measured in 9 gynecologic patients with normal renal function who had been given 2 g of CMZ by intravenous drip infusion for 1 hour combined with 40 mg of GM by intramuscular injection. Thus, this method proved useful for the rapid monitoring of CMZ and GM in the combination therapy.