

ろ紙採血法を用いた血中ネチルマイシン測定法の臨床応用

津田良子・藤本 尚

エッセクス日本株式会社滋賀工場研究開発部

田和理市・広瀬 信吾

京都薬科大学薬品分析 I

中江 信義・山田 雅明

仙台赤十字病院周産期センター

(昭和 63 年 6 月 27 日受付)

ろ紙採血法を用いたアミノ配糖体系抗生物質 (AGs) の血中濃度測定法について検討した。

AGs を有効に、かつ安全に使用するためには、血中濃度のモニタリングが必要とされている。重篤な患者に対し、治療の 1~2 日目に行なうモニタリングの重要性は、血中濃度が治療域にあることを確認するためであるが、一般には、過量投与となって中毒域に達することよりも、過少投与となって十分な治療効果が得られない場合が多く見受けられる。

我々は、ろ紙採血法と AGs の測定法を組み合わせ、有効治療域の血中濃度測定法を報告してきた。特に小児を対象とした場合、微量な検体で測定が可能なる紙採血法は、簡単で安全な方法である。

今回、AGs の一種であるネチルマイシン (NLT) を点滴静注により投与した 7 名の患児について、本法を用いて血中濃度を測定した。また、そのうちの 4 名について、薬動力学的パラメーターを算出したところ、 T_{max} (h) : 0.77~0.98, K_{el} (h^{-1}) : 0.039~0.119, $T_{1/2}$ (h) : 5.84~17.72, V_d (l/kg) : 0.316~0.545, Cl (l/h) : 0.012~0.072, C_{max} ($\mu g/ml$) : 3.70~6.27 (投与量 1.78~2.16 mg/kg) であった。

Key Words : ネチルマイシン, ろ紙採血法, FPIA

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は広範な抗菌スペクトルを有する薬剤で、特にグラム陰性菌による感染症に対して常用されている。

AGs は小児科領域においても投与の機会の多い薬剤である。なかでも、新生児期は免疫機能が未熟で、防御力が弱いため感染が起こりやすく、特にグラム陰性桿菌による感染症が優位を占めている。また、経胎盤性感染や産道感染等の原因により、出生直後から投与が開始される場合も多い。しかし、一般に AGs は有効血中濃度と中毒濃度域が接近しているため、適切に使用するためには血中濃度のモニタリングが必要とされている。

更に、小児においては発育に伴う解剖学的、生理学的変化が薬物の代謝・排泄に及ぼす影響が大きい。AGs はほとんど未変化体のまま腎より排泄されるが、新生児は特に腎機能が未発達であるため、体外への排泄能力は個々の患児に大きな差があり、AGs の血中濃度の推移には留意しなければならない。

一般に、血中濃度のモニタリングには血清または血漿が検体として用いられている。しかし、保育器に入れられた状態の未熟児では静脈からの採血は困難であり、また、モニタリングを目的とした繰り返し採血は、患児の負担が余りにも大きく、モニタリングを行なうことは困難である。

我々は、小児を対象とした AGs の血中濃度モニタリングの方法を採血法から見直した。採血時の苦痛の軽減と採血量の少量化を考慮して、新生児の代謝異常のチェックなどに用いられている皮膚穿刺によるろ紙採血法^{1,2)}により得た血液を、AGs のモニタリングの検体として用いることの応用性を検討してきた。測定法には、HPLC 法に加え操作が簡単で迅速に結果の出るイムノアッセイの一種である FPIA 法 (TDX) を用いる簡便法も報告した^{3,4)}。今回、ネチルマイシン (NLT) を投与した患児を対象としてこの方法を用い、全血中濃度と計算により求めた血清中濃度の関係を、採血直後の血清を

* 滋賀県甲賀郡水口町笹が丘 1-4

用いた測定値と比較検討したところ、本法の有用性が臨床的にも確認されたので報告する。

I. 方法

1. 試料

添加回収実験には健康な成人男子の静脈血に、NTLを種々の濃度に添加した試料を用い、ろ紙血 (dried blood spots: DBS) を作製した。静脈血には抗凝固剤としてヘパリンを添加した。また、臨床試料としては1988年1月から2月に仙台赤十字病院周産期センターNICUに入院した患児のうち、当科における使用経験からNTLの投与が必要と考えられた患児7名より採取した血清およびDBSの各々34検体を用いた。なお、患児は生後0~44日で、出生体重は810~3,140gであり、NTLは30分間かけて点滴静注により投与した。

2. 採血方法

NTL投与前、または投与開始45分後に足底穿刺し、採血用キャピラリーを用いて約150 μ l採血した後、その部位に採血用ろ紙 (Type I) を押し当て、湧出する血液を十分にしみ込ませた。

キャピラリー中の血液は血清分離した後、試験に供するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。またDBSは試験に供するまで室温で保存した。

3. 試薬および機器

硫酸ネチルマイシン (NTL) はアメリカシェリング社より入手した原末を用いた。

採血用ろ紙; Type I (東洋濾紙), 採血用キャピラリー; テルモキャピラリー VC-C 110 P (TERUMO), 限外ろ過ユニット; ミニセント (東ソー), リン酸水素ナトリウム (ナカライテスク), ヘモグロビンテストワーク (和光純薬), TDX "ネチルマイシン" 測定キット (ダイナボット), 分光光度計 (日立), 蛍光偏光免疫測定装置; TDX (ダイナボット)。その他、試薬は特級品を用いた。

4. 測定方法

血清中 NTL 濃度および DBS 中 NTL 濃度はともに蛍光偏光免疫測定法 (TDX)⁹⁾ により測定した。

DBS 中の NTL は以下の方法で抽出した。

抽出法: DBS の吸血部分を5, 6枚に細断し, 限外ろ過ユニット (ミニセント) に入れ, あらかじめ35 $^{\circ}$ Cに加熱した0.5 M Na₂HPO₄ 500 μ lを加えた。35 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした後, 3,000 xgで15分間遠心分離したろ液を検液とした。

また, DBS の抽出液中のヘモグロビン (Hb) 濃度はシアンメトヘモグロビン法により測定した。

II. 結果

1. 添加回収実験

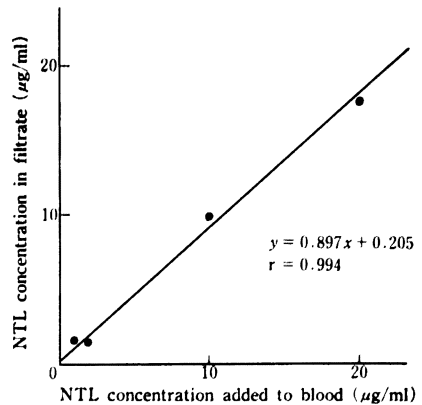


Fig. 1. Calibration curve of netilmicin from dried blood spots by ultrafiltration

健康な成人男子の静脈血に NTL を 1, 2, 10 および 20 μ g/ml となるように添加し, 各々の試料を用いて DBS を作製し, 添加回収実験を行なった。その結果, Fig. 1 に示したように良好な回収率および精度が得られた。また, DBS は室温および 35 $^{\circ}$ C の両条件で少なくとも 8 日間は安定であった。

2. DBS 中の血液量

今回用いた Type I の採血用ろ紙の吸血部位に含まれる血液量を重量法によって確認した。あらかじめ重量を測定したろ紙に 100 μ l の血液をしみ込ませ, 乾燥した後, 重量を求めた。別に, 採血用ろ紙の先端部より徐々に血液をしみ込ませ, 拡散部分まで十分に吸着させた後, 同様に操作した。吸血部分を切断した後, この部分の重量を求めた結果, 約 100 μ l に対応する血液量であった。この結果より, ろ紙の吸着部分に血液が充分しみ込んでいれば, 血液量を 100 μ l として差し支えないと判断した。

3. ヘマトクリット値とヘモグロビン濃度との関係

試験に用いた臨床検体のヘマトクリット (Hct) 値と Hb 濃度との関係は Fig. 2 の通りで, その相関係数は 0.903 となり, 良好な相関が得られた。

DBS から得られた NTL の測定値を血中濃度として補正するためには, 指標として Hb 濃度または Hct 値が考えられる。

AGs は血球中には取り込まれないとされているため, 血液中では血球以外の部分に存在すると考えられる。また, Hb 濃度, Hct 値および赤血球数の三者の値は平行して変化するとは限らないものの, 今回の実験で Hct 値と Hb 濃度との間に良い相関が得られたことから, このいずれを用いても全血中濃度からの換算は可能であることが示唆された。

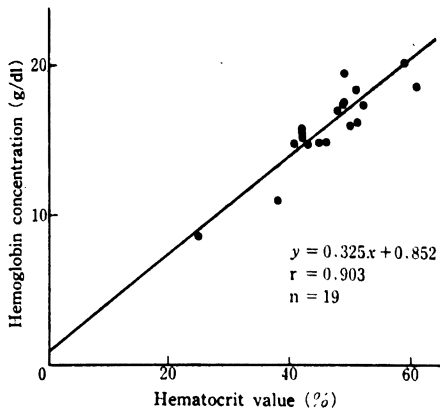


Fig. 2. Correlation of hematocrit value with hemoglobin concentration

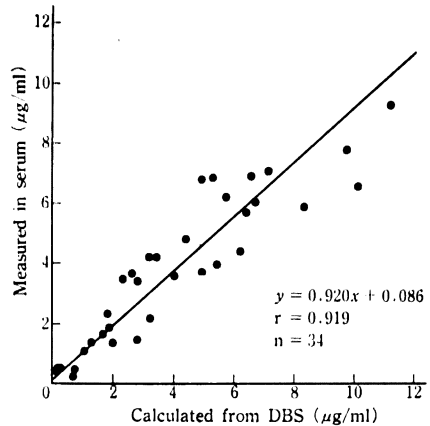


Fig. 3. Correlation of netilmicin concentrations measured in serum and calculated from dried blood spots

以上のことより、本実験においては DBS から得られた NTL の濃度を血清中濃度に換算するため Hct 値を用いた。

4. 血清を用いた値と DBS から得られた値の相関
血清を検体として用いた測定値と、DBS の測定値から算出した血清中濃度との関係を求めた。DBS を用いた際の血清中濃度は、DBS の測定値から Hct 値を用いて算出したが、血清の測定値と DBS から算出した血清推定値との間には Fig. 3 に示したように $y=0.920x+0.086$, $r=0.919$ と良好な相関が存在した。また、血清の測定値と DBS の血清推定値の対応する各々について有意差検定 (t 検定) を行なったが、5% の危険率で有意差は認められなかった。

Table 1 に各臨床検体の Hct 値、血清測定値、DBS の実測値 (全血中濃度) および血清推定値を示した。

5. Pharmacokinetic parameters の算出

新生児の腎機能は出生時の状況、週齢などによって大きく異なり、至適な投与プログラムを設定するにはパラメーターの算出が重要である。パラメーターの算出方法には種々の方法が提唱されているが、今回は、初回投与した時の投与直後のピーク値と次回投与直前のトラフ値から、one-compartment model によってパラメーターの算出を試みた。4名の患児についての結果は Table 2 に示した通りであった。

III. 考 察

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) とペニシリン系薬剤との併用が小児科領域では第一選択剤として使用されることが多いが、一方で副作用の発現を過度に恐れるあまり、投与量が少な過ぎ有効な治療濃度に達していない場合も多く、適切な治療効果を得るためには血中濃度の

モニタリングが効果的とされている。

TDM は、採血した場所で採血後すぐに測定し、すぐに投与計画に反映させるというベッドサイドのモニタリングを目的としている。しかし、小児特に未熟児を含む新生児を対象とした場合は、採血そのものが成人に比べて困難である。新生児の場合、足底穿刺によるキャピラリー採血が行なわれているが、血清分離して使用するため、採血量は必要血清量の約2倍となる。また、新生児の血液の性質は Hct 値が一般に高く、赤血球はもろい。このため採血時に溶血しやすく、血清を用いた測定値は検体中の Hb の影響を受け、実際よりも高値となることがある。

今回用いた採血用ろ紙は、吸血部分に約 100 μ l の血液が吸着されるように作られている。しかし、ろ紙にむらが生じるような採血法であったり、組織液が混入した場合には血液量が一定しないため、Hb 濃度などを測定して血液量の推定を行なわなければならない。しかし、今回のようにろ紙に充分な量の血液をしみ込ませた場合には、血液量を 100 μ l としても何ら支障のないことが明らかとなった。

AGs の濃度は、従来血清中または血漿中濃度として示されているが、本法によって得られる値は全血中濃度である。AGs の TDM で用いられるトラフ値およびピーク値は血清あるいは血漿中濃度で示されているので、全血中濃度として得られた値と直接比較することはできない。しかし、AGs の血球中への移行はほとんどないとされていることから、血清中あるいは血漿中濃度に Hb 濃度または Hct 値を用いて換算し、推定値として表示することが可能であった。

Table 1. Clinical data for blood concentrations of netilmicin in serum and dried blood spots

Sample no.	Hematocrit value (%)	Concentration of netilmicin ($\mu\text{g/ml}$)		
		Serum	DBS	
			measured	calculated
1	48	0.5	0.40	0.77
2	48	0.5	0.15	0.29
3	43	0.3	0.40	0.70
4	43	3.6	1.50	2.63
5	38	0.5	0.15	0.24
6	38	4.2	1.95	3.15
7	25	0.4	0.10	0.13
8	25	6.8	3.65	4.87
9	49	1.4	0.65	1.27
10	49	3.5	1.15	2.25
11	42	1.7	0.90	1.73
12	42	4.2	1.95	3.36
13	51	9.3	5.50	11.22
14	51	3.7	2.40	4.90
15	51	6.6	4.95	10.10
16	42	3.6	2.30	3.97
17	49	1.1	0.55	1.08
18	49	4.8	2.25	4.41
19	50	2.3	0.90	1.80
20	50	6.2	2.85	5.70
21	59	4.4	2.55	6.22
22	49	1.5	1.45	2.84
23	49	7.2	3.60	7.06
24	61	2.2	1.25	3.21
25	61	5.9	3.25	8.33
26	45	4.0	3.00	5.45
27	46	1.4	1.10	2.04
28	46	6.1	3.60	6.67
29	43	7.8	5.55	9.74
30	52	1.9	0.90	1.89
31	52	5.7	3.05	6.35
32	42	3.5	1.60	2.76
33	42	6.9	3.80	6.55
34	41	6.8	3.10	5.25

DBS の測定値および Hct 値から算出した血清中濃度と血清の測定値との間には良好な相関関係が得られ、対応する各々の値に有意差は認められなかった。

本法の測定下限は、TDX の機器の検出限界と全血を用いた添加回収実験の結果より、全血中濃度で約 0.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。Hct 値を約 50% と仮定すると、血清中濃度は約 1.4 $\mu\text{g/ml}$ となる。今回の実験において、血清中濃度で約 0.3 $\mu\text{g/ml}$ まで測定は可能であったが、添加回収実験の測定精度より、血清中濃度で 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下の値の信頼性については保証できないと考えた。しか

し、一般に NTL のトラフ値は約 4 $\mu\text{g/ml}$ 以下とされており⁶⁾、NTL 投与の際に前回投与の NTL の血清中濃度がトラフ値まで低下していることが確認できれば、次回投与の判断ができ、血清中濃度 2 $\mu\text{g/ml}$ という測定下限でも臨床的には充分有効なモニタリングであると考えた。

NTL の中毒発現濃度は 16 $\mu\text{g/ml}$ 以上、有効治療域の下限は 4~6 $\mu\text{g/ml}$ 、その上限は 12 $\mu\text{g/ml}$ とそれぞれいわれ、今回の検討では 8 割以上の症例が有効治療域であった。一般に、モニタリングの結果、血中濃度が中毒域

Table 2. Pharmacokinetic parameters of netilmicin in newborn infants

Patient*	Gestation period (weeks)	BW (g)	Dose (mg/kg)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (h)	K _{el} (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)	V _d (l/kg)	Cl. (l/h)
A	31	1,684	1.78	3.97	0.82	0.090	7.74	0.416	0.063
B	26	970	2.10	6.27	0.98	0.039	17.72	0.316	0.012
C	32	1,666	2.16	5.45	0.77	0.119	5.84	0.362	0.072
D	29	1,650	2.12	3.70	0.90	0.058	11.96	0.545	0.052

* Age: 0 days

に達している場合よりもむしろ有効治療域にも達していない場合が多いといわれている。本法は、有効治療域のモニタリングを行なうことを目的として、十分な精度を有し、有効治療域に達しているか否かを容易にチェックできる。また、複数の検体を同時に測定することができ、迅速に結果が得られることも本法の特徴である。

この採血法では、血液量が充分であればろ紙の吸血部分には 100 μl の血液が含まれているとしても問題はなかったが、採血時の理由からろ紙上に血液のむらなどがあった場合には血液量の補正をしなければならない。しかし、投与後のピーク濃度をモニタリングするのであれば、血液が充分しみ込んでいた部分をパンチし、disk (5φ mm)⁷⁾ を作製した後、抽出溶媒を 150 μl として操作して結果を得ることができ、一滴の血液からでも実施可能であった (血液量約 10 μl)。

本法は、採血および測定 の両面において簡便であり、特殊な手技も必要としないので極めて実用的な方法と考えられる。また、測定機器を持たない施設においても、採血後のろ紙は、血清のような特別な配慮も必要とせず通常の郵送により、測定機関で迅速に測定することが可能である。

血中濃度のモニタリングが手軽に行なえることは、投与された AGs の体外排泄量を確実にとらえることができ、腎機能が一定していない新生児でも投与計画に反映でき、その結果は疾患の臨床経過を判断する際に極めて重要な指標となる。

以上のことより、ろ紙採血法と FPIA 法とを組み合わせた本法は、臨床的に有用な方法であると判断した。

文 献

- 1) COOMBS E J; GAMLEN T R; BATSTONE G F; HOLGATE S T: The validation of a fluorimunoassay for the determination of theophylline concentration in dried blood spots suitable for domiciliary therapeutic drug monitoring. *Clin Chim Acta* 136: 187~195, 1984
- 2) LI P K; LEE J T, CONBOY K A, ELLIS E F: Fluorescence polarization immunoassay for theophylline modified for use with dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 32: 552~555, 1987
- 3) FUJIMOTO T, TAWA R, HIROSE S: Fluorometric determination of sisomicin, an aminoglycoside antibiotic, in dried blood spots on filter paper by reversed-phase high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *Chem Pharm Bull* 36: 1571~1574, 1988
- 4) FUJIMOTO T, TSUDA Y, TAWA R, HIROSE S: Fluorescence polarization immunoassay of gentamicin in blood spotted on filter paper. *Chemotherapy* (in press).
- 5) 宮崎弘和, 他: 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。 *Chemotherapy* 34: 1111~1115, 1986
- 6) 上田 泰: アミノ配糖体薬, 6. 臨床 (松本文夫), 208 頁, 南江堂, 1985
- 7) TAWA R, FUJIMOTO T, HIROSE S: Application of filter paper punching to determination of sisomicin, an aminoglycoside antibiotic, in whole blood by high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* (in press).

FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY FOR
THERAPEUTIC RANGE OF NETILMICIN IN
DRIED BLOOD SPOTS ON FILTER PAPER

YOSHIKO TSUDA and TAKASHI FUJIMOTO

Research and Development, Lab., Essex Nippon K. K.
1-4 Sasagaoka, Minakuchi-cho, Koga-gun, Shiga 528

RIICHI TAWA and SHINGO HIROSE

First Department of Analytical Chemistry I, Kyoto Pharmaceutical University

SHINGI NAKAE and MASA AKI YAMADA

Department of Pediatrics, Sendai Red Cross Hospital, Miyagi

Monitoring the serum concentration of netilmicin (NTL) should be helpful in maintaining optimal therapeutic ranges and avoiding undesirable side-effects. Namely, blood-drug monitoring of a critically ill individual early in the therapy, for example at the end of the first or second day of treatment, should be utilized to ensure the presence of adequate therapeutic drug concentrations, since underdosing rather than overdosing is a common prescribing error.

Dried blood spots can easily and safely be obtained by venipuncture. This is an adequate method of specimen collection even from pediatric patients.

We developed a therapeutic drug monitoring method for NTL blood concentration by dried blood spot (DBS) method. By this method, NTL blood concentrations were monitored in 7 patients and the pharmacokinetic parameters were calculated for 4 patients after drip infusion. The pharmacokinetic parameters obtained were: T_{max} (h) : 0.77~0.98, K_{el} (h^{-1}) : 0.039~0.119, $T_{1/2}$ (h) : 5.84~17.72, V_d (l/g) : 0.316~0.545, Cl (l/h) : 0.012~0.072, C_{max} ($\mu g/ml$) : 3.70~6.27 (administration range : 1.78~2.16 mg/kg).