

# Gentamicin enzyme immunoassay kit の 血中シソマイシン濃度測定への応用

高橋 勝雄・池田 實

岩手医科大学薬剤部\*

川名 林 治

岩手医科大学細菌学教室

(昭和 63 年 1 月 21 日受付)

ゲンタマイシンの酵素免疫測定用試薬 (EMIT Qst ゲンタマイシンアッセイキット) を血中シソマイシン濃度測定に応用するため検討した。

検量線はゲンタマイシンキャリブレーションに代えて、ヒト血清にシソマイシンを 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{g/ml}$  となるように調製したシソマイシンキャリブレーションを用い、作成は EMIT Qst 法のマニュアルに従った。

得られた検量線は良好なシグモイドカーブで、これを用いて検討した結果以下の成績を得た。

- 1) 日内再現性の変動係数は 10.4% 以下であった。
- 2) 日差再現性の変動係数は 9.8% 以下であった。
- 3) シソマイシンを種々の濃度に添加した血清からの平均回収率は 96.0~108.0% であった。
- 4) 今回改変した EMIT Qst 法 (Y) と高速液体クロマトグラフィー ( $X_1$ ) およびバイオアッセイ ( $X_2$ ) との測定値の相関は次の通りであった。

$$Y=0.751 X_1+0.590, r=0.991; Y=0.958 X_2+0.268, r=0.997$$

以上の結果より、今回試みた改変 EMIT Qst 法はシソマイシンの血中濃度モニタリングに有用な方法であると考えられる。

**Key words:** Gentamicin enzyme immunoassay, EMIT Qst method, 血中シソマイシン濃度

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は、主として難治性あるいは重症な感染症に対して使用されているが、一般に有効治療域が狭く、かつ血中濃度と中毒との関連性が指摘されていることから、より有効で安全な薬物療法を行なうためには therapeutic drug monitoring (TDM) が必要といわれている<sup>1,2,3)</sup>。そのため、近年種々の AGs に対応した簡便・迅速な測定法が開発され実用化されている<sup>4,5)</sup>。しかしながら、シソマイシン (SISO) に関しては、従来からの日抗基に準じた bioassay や HPLC 法<sup>6)</sup>での測定法が報告されているのみであり、これらは多忙な臨床でのルーチンな測定法としては操作の煩雑さや時間の長さなどのため最適とはいえない面がある。そこで、著者らは SISO がゲンタマイシン (GM) の構造に類似している<sup>7,8)</sup> ことに注目し、簡便・迅速な測定法である GM 酵素免疫測定法の試薬を血中 SISO 濃度測定に応用するため検討したので報告する。

## I. 実験方法

### 1. 測定試料

測定法の精度および正確性の検討のため、ddY 系雄性マウス (体重  $26.4 \pm 0.49 \text{ g}$ ) を用い、各マウスに SISO 0.25  $\mu\text{g}$ /マウスを腹腔内投与後 (1 群 6 匹)、それぞれ経時的に 6 点 (5, 10, 15, 30, 60, 120 分) 採血し、直ちに血清分離して試料とした。また添加回収試験および他法との測定値の比較などには、SISO 添加ヒト血清をも併せて用いた。

### 2. 酵素免疫測定法

試薬は homogeneous enzyme immunoassay の原理に基づいた EMIT Qst ゲンタマイシンアッセイキットをそのまま用い、方法を一部改変して実施した。すなわち、検量線の作成にはゲンタマイシンキャリブレーションに代えてヒト血清に SISO を添加して調整した SISO キャリブレーション (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{g/ml}$ ) を用

\* 盛岡市内丸 19-1

Table 1. Analytical conditions

|   |
|---|
| Column : YMC-pack ODS 6.0 mm I.D.×150 mm          |
| Column temp. : 45°C                               |
| Detector wave length : Ex 340 nm, Em 430 nm       |
| Flow rate : mobile phase <sup>1)</sup> 0.9 ml/min |
| O.P.A. reagent <sup>2)</sup> 0.8 ml/min           |
| Reaction temp. : 45°C                             |
| Injection volume : 50 μl                          |
| Chart speed : 2.5 mm/min                          |

- 0.22 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> including 0.0007 M heptane-sulfonate sodium.
- o-phthalaldehyde.

い、測定機器は Syva Sample Processor, Syva Clinical Processor CP-5000, Syva 分光光度計 S III (いずれもダインバ) を連結して、EMIT Qst 法のマニュアルに従い測定した。

### 3. 対照測定法

今回検討した一部改変 EMIT Qst 法による血中 SISO 濃度測定のための対照として以下の方法を実施した。

#### 1) Bioassay (BA) 法

日抗基に準じて、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 を検定菌とする円筒平板法にて測定した。

#### 2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は Waters 510, カラム恒温層: 島津 CTO-6 A, 蛍光検出器: 日立 65010 S, データ処理装置: 島津 CR 1 B を用いた。

試料 200 μl に内部標準液 (硫酸ネチルマイシン, 10 μg/ml 力価) 200 μl を混和後, CM Sephadex C-25 カラムに吸着させ, 0.4 M 酢酸緩衝液 1 ml で 2~3 回洗浄した。その後 10 mM NaOH 含有の 0.4 M 酢酸緩衝液で, 予め 1 N 塩酸 50 μl を入れておいた試験管に 4 回溶出し, その 50 μl を HPLC に注入した。

分析条件は Table 1 に示した通りである。なお, この

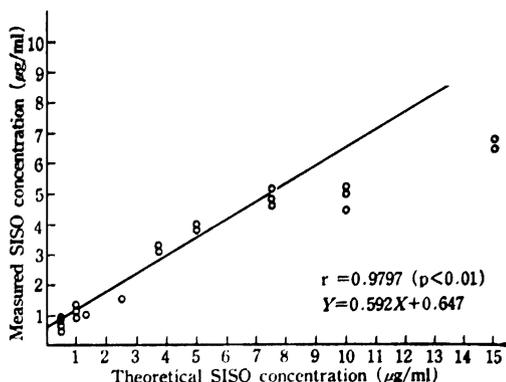


Fig. 1. Correlation of measured and theoretical sisomicin concentrations in spiked serum samples determined by EMIT assay

分析条件での同時再現性は変動係数が 2.0, 5.0, 10 μg/ml の濃度測定で, いずれも 10% 以下であった。

## II. 実験成績

### 1. 検量線の作成

EMIT Qst ゲンタマイシンアッセイキットに対する SISO の交差反応性を検討したところ, Table 2 に示すように, 0.5~7.5 μg/ml の濃度範囲では約 63.1~100.0% と極めて高い交差性が認められたが, 10.0 μg/ml 以上の濃度ではその交差性は低下し, Fig. 1 に示すように高濃度では直線から外れることが認められた。

そこで, SISO キャリブレーションの濃度を 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μg/ml とし, 検量線を作成した。Fig. 2 には横軸に SISO キャリブレーション濃度の対数を, 縦軸に吸光度をとり示したが, 良好な S 字状検量線であった。

なお, 実際の測定には Syva Clinical Processor CP-5000 により S 字状検量線を直線に変換した検量線を用い濃度を算出した。

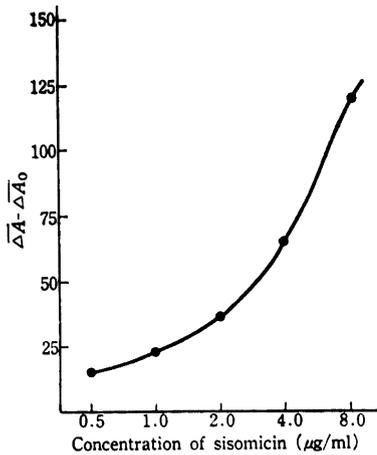
### 2. 測定法の精度

Table 2. Cross-reactivity of sisomicin in EMIT Qst gentamicin assay

| Theoretical sisomicin concentration (μg/ml) | n | Apparent gentamicin concentration (μg/ml) | Cross-reaction ratio* (%) | C.V. (%) |
|---|---|---|---------------------------|----------|
| 0.5   | 5 | 0.5±0.07                                  | 100.0±14.14               | 14.1     |
| 1.0   | 5 | 1.0±0.14                                  | 100.0±14.14               | 14.1     |
| 3.8   | 5 | 3.3±0.05                                  | 87.7± 0.71                | 1.0      |
| 5.0   | 5 | 3.9±0.05                                  | 77.3± 0.94                | 1.2      |
| 7.5   | 4 | 4.7±0.26                                  | 63.1± 3.51                | 5.6      |
| 10.0  | 5 | 3.9±0.31                                  | 39.3± 3.09                | 7.9      |
| 15.0  | 5 | 6.5±0.12                                  | 43.6± 0.84                | 2.0      |

All data are represented as mean ± S.D.

\* (apparent gentamicin concentration/theoretical sisomicin concentration)×100



$\overline{\Delta A} - \overline{\Delta A}_0$ : difference between average EMIT calibrator 0 reading ( $\overline{\Delta A}_0$ ) and average reading ( $\overline{\Delta A}$ ) of each of the other calibrators

Fig. 2. Standard curve of sisomicin obtained by modified EMIT Qst method

#### 1) 同時再現性

ヒト血清に低濃度として 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、中濃度として 5.0  $\mu\text{g/ml}$ 、高濃度として 8.0  $\mu\text{g/ml}$  の SISO を添加した検体 3 水準を作成し、それぞれについて連続 5 回測定し、平均値、標準偏差 (S. D.)、変動係数 (C. V.) を求め Table 3 に示した。低濃度では C. V. = 10.42% と若干のバラツキが認められたが、中濃度および高濃度では、各々の C. V. が 6.79%、1.30% と極めて良好な再現性が認められた。

一方、前記 3 水準の濃度検体を 5 日間連続して測定した日差変動をみると、低濃度で同様に若干の変動がみられるものの、中、高濃度ではバラツキが少なく C. V. = 1.30~2.61% の範囲であった (Table 4)。

Table 5. Recovery of SISO assay by modified EMIT Qst method

| Theoretical SISO concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Measured SISO concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Recovery (%) |
|---|--|--------------|
| 10  | 9.60   | 96.0         |
| 8   | 8.21   | 102.6        |
| 4   | 3.97   | 99.3         |
| 1   | 0.97   | 97.0         |
| 0.5   | 0.54   | 108.0        |

Each value is the mean of three determination.

#### 2) 添加回収試験

SISO を添加した濃度既知ヒト血清 (0.5, 1.0, 4.0, 8.0, 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) を用い、回収試験を実施し結果を Table 5 に示した。この濃度範囲での各添加量の平均回収率は 96.0~108% と良好な成績であった。

#### 3) 他法との相関性

今回試みた SISO 測定法の正確性を検討するため、SISO 投与マウス血清および SISO 添加ヒト血清を試料として BA 法および HPLC 法にも測定し、その相関性を検討した。

HPLC 法との相関性は極めて高く、相関係数  $r = 0.991$ 、回帰直線  $Y = 0.751 X + 0.590$  であった (Fig. 3)。

また、BA 法との相関をみると、 $r = 0.997$ 、 $Y = 0.958 X + 0.268$  で、ほぼ原点を通る直線で、HPLC 法同様高い相関性が認められた (Fig. 4)。

#### 4) 応用

これまでの実験成績より、今回試みた SISO の酵素免疫測定法は極めて信頼性の高いことが認められたので、この方法によりマウスの体内 SISO 動態を検討した。すなわち、SISO を雄性 ddY 系マウス (1 群 6 匹) の腹

Table 3. Within-run precision of SISO assay by modified EMIT Qst method

| Specimen | Range                | Mean | S.D. | C.V. (%) | n |
|----------|----------------------|------|------|----------|---|
|          | ( $\mu\text{g/ml}$ ) |      |      |          |   |
| Low      | 0.43-0.55            | 0.48 | 0.05 | 10.42    | 5 |
| Medium   | 4.60-5.10            | 4.73 | 0.32 | 6.79     | 5 |
| High     | 7.61-7.87            | 7.73 | 0.10 | 1.30     | 5 |

Table 4. Between-run precision of SISO assay by modified EMIT Qst method

| Specimen | Range                | Mean | S.D. | C.V. (%) | n |
|----------|----------------------|------|------|----------|---|
|          | ( $\mu\text{g/ml}$ ) |      |      |          |   |
| Low      | 0.39-0.55            | 0.49 | 0.05 | 9.80     | 6 |
| Medium   | 4.80-5.10            | 4.98 | 0.13 | 2.61     | 6 |
| High     | 7.61-7.87            | 7.71 | 0.10 | 1.30     | 6 |

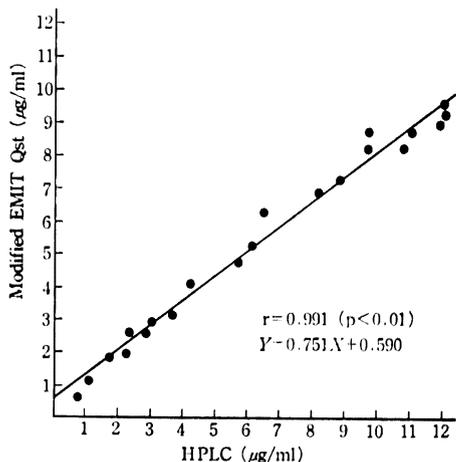


Fig. 3. Correlation between modified EMIT Qst method and HPLC method for sisomicin serum determination

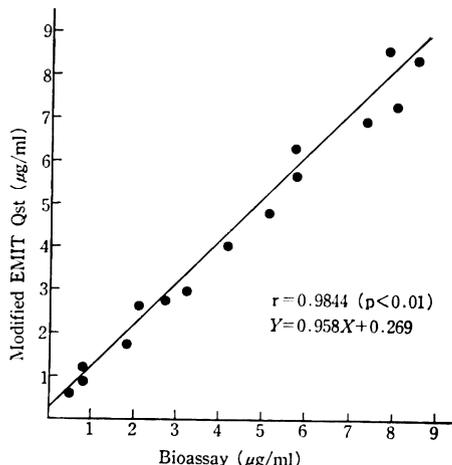


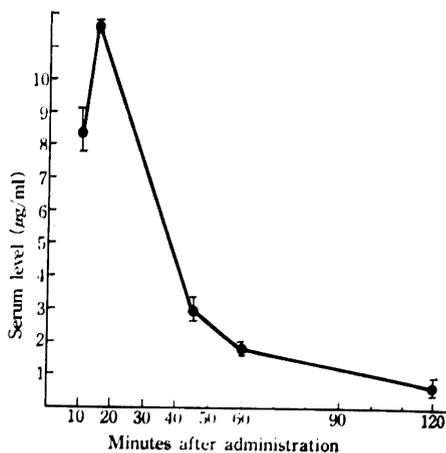
Fig. 4. Correlation between modified EMIT Qst method and bioassay for sisomicin serum determination

腔内に 0.25 mg/マウス投与後、5分、10分、15分、45分、60分、120分に採血し、血清中濃度を測定し解析した。

その結果、血中濃度のピークは約 15 分後にみられ、半減期は約 20 分であった。この結果は BA 法で測定した測定値の解析結果とほぼ一致していた (Fig. 5)。

### III. 考 察

Sisomicin は GM 同様幅広い抗菌力を有し、*Pseudomonas aeruginosa* に対しては GM よりも優れ、その殺菌力も GM や tobramycin よりも強いといわれている<sup>9,10,11</sup>。しかしながら、他の AGs 同様腎毒性や聴器毒性が強く、特に、腎機能障害者への適用には充分注意を



Each value is the mean of six determinations (dose : 0.25 mg/mouse)

Fig. 5. Serum levels of ddy mice after administration of sisomicin

要する<sup>12,13</sup>。また、筋肉内注射時の出血傾向のため静脈内投与が余儀なくされることもあり、血中濃度と副作用との関係には慎重に対処しなければならない。

こうしたことから、最近では血中濃度を測定することにより、患者個々の薬物動態学的パラメータを速度論的に解析し、至適投与量や投与間隔などを算出する方法が盛んに試みられている。そのためには、精度が高く、しかも簡便・迅速な測定法が临床上必要であるが SISO については現在見当たらない。

今回著者らが SISO の血中濃度測定に応用した EMIT Qst ゲンタマイシンキットは、これまでの酵素免疫ゲンタマイシンアッセイキットを改良したもので、1 バイアルごとに抗体、酵素標識薬物、基質、緩衝剤の凍結乾燥物を含み、希釈検体を加えることにより直ちに反応が進み測定が可能である。したがって、従来の酵素免疫測定法ばかりだけでなく BA 法や HPLC 法のように前もって試薬を調整しておく必要もなく、また検体試料の前処理も要しない。さらに、データ処理装置 (CP-5000) に検量線を保存しておくことにより、その検量線を再利用でき測定時間の短縮を計ることができる。このことは、多忙な臨床での血中濃度解析にとっては極めて重要なことであり、また必要なことと思われる。今回著者らが試みた方法は、まさにこれらのことを目的としたものであり、同時再現性、添加回収性、他法との相関性など、いずれの成績も満足できるものであった。同時に、マウスにおいて SISO の血中濃度解析に本法を応用したところ、極めて簡便迅速に測定でき、しかもその解析パターンは BA 法とほぼ同様であった。しかしなが

ら、本測定法は免疫反応の交差性を利用していることから、構造の類似している他の AGs や代謝産物には当然注意しなければならない。この点を考慮するならば本法は臨床的 TDM にとっても有用な測定法と考えられる。

(謝辞) 本研究を実施するにあたり、ご指導、ご協力を頂いた岩手医科大学医学部細菌学教室の諸氏ならびに同大学歯学部薬理学教室吉田講師に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) BARZA, M and SCHEIFE R T : 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 GOODMAN L S and GILMAN A : The pharmacological basis of therapeutics, 6th edition (Macmillan), pp. 1175~1176, 1980
- 3) APPEL, G B and NEW H C : Gentamicin in 1978. Ann Intern Med 89 : 528~538, 1978
- 4) STEVENS, P YOUNG L S and HEWITT W L : 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) 渡辺 誠, 近藤恭子, 真下啓明, 川本健志, 島津邦彦 : 高速液体クロマトグラフィーによる血中アミノ配糖体系抗生物質の測定。Chemotherapy 30 : 21~23, 1982
- 7) REIMANN, H JARET R S and COOPER D J : Sisomicin ; stereochemistry & attachment of the unsaturated sugar moiety. J Chem Soc 16 : 924~925, 1971
- 8) COOPER, D J JARET R S and REIMANN H : Structure of sisomicin, a novel unsaturated aminoglycoside antibiotic from *Micromonospora inyoensis*. J Chem Soc 7 : 285~286, 1971
- 9) WAITZ, J A MOSS JR. E L DRUBE C G and WEINSTEIN M J : Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin & tobramycin. Antimicrob Agents Chemother 2 : 431~437, 1972
- 10) CROWE, C C and SANDERS E : Sisomicin : evaluation *in vitro* comparison with gentamicin & tobramycin. Antimicrob Agents Chemother 3 : 24~28, 1973
- 11) 五島達智子 : 第 25 回日本化学療法学会総会, 新薬シンポジウムⅢ。Sisomicin—抗菌力—, 1977 (岐阜)
- 12) 山作房之輔, 武田 元 : 急性腎不全の薬物中毒—抗生剤による中毒性腎疾患—。血液と脈管 5(5) : 27~35, 1974
- 13) 武田 元, 庭山昌俊, 岩永守登, 蒲沢知子, 田中容, 木下康民, 川島士郎, 高頭正長 : Sisomicin の基礎的, 臨床的研究。Chemotherapy 26 : 107~112, 1978

GENTAMICIN ENZYME IMMUNOASSAY  
FOR DETERMINING SISOMICIN  
SERUM CONCENTRATIONS

KATSUO TAKAHASHI, MAKOTO IKEDA<sup>1)</sup> and RINJI KAWANA<sup>2)</sup>

- 1) Hospital Pharmacy, Iwate Medical University, 19-1 Uchimarui, Morioka 020, Japan
- 2) Department of Microbiology, School of Medicine, Iwate Medical University

We evaluated the gentamicin enzyme immunoassay kit (EMIT Qst GM kit) for the determination of sisomicin serum concentrations. We prepared sisomicin calibrators (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{g/ml}$ ) instead of gentamicin calibrators and then obtained a standard curve by use of a reagent for the EMIT Qst GM assay. This standard curve was a good sigmoid curve.

The following results were obtained.

1. The within-run coefficient of variation was less than 10.4%.
2. The between-run coefficient of variation was less than 9.8%.
3. Analytical recoveries of sisomicin from serum spiked with varying concentrations of sisomicin averaged from 96.0-108.0%.
4. The relationship between the modified EMIT Qst method ( $Y$ ) and high-performance liquid chromatography ( $X_1$ ) or bioassay ( $X_2$ ) was studied.

$$Y=0.751 X_1+0.590, r=0.991; Y=0.958 X_2+0.268, r=0.997$$

We confirmed that the modified EMIT Qst method is a very reliable and useful means of monitoring for clinical sisomicin levels.