

## ネチルマイシンの鼻腔内分布測定法の検討

柴原 健・所司原 真由美

エッセクス日本株式会社滋賀工場研究開発部\*

石 田 稔

市立吹田市民病院耳鼻咽喉科

(昭和63年4月18日受付)

ネブライザー療法におけるネチルマイシン (NTL) の鼻腔内分布測定法について検討した。アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は、粘膜組織中への浸透性が低く、粘膜組織中の薬物量から薬物の移行量を判断するには難点があり、ネブライザー療法時の有用性については十分な検討がなされていない。

今回、ネブライザー直後の鼻腔内分布の測定法として、鼻腔内に貼付したガーゼからの NTL の定量的な回収を試みた。従来、AGs はガーゼなどのセルロースに吸着し、定量的な回収が困難とされていたが、抽出溶媒に 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を用いることにより NTL の定量的な回収が可能となった。定量法にはバイオアッセイおよび HPLC を用いた。ガーゼに血液が付着した場合でも、回収および定量に及ぼす影響がないことを確認した。

副鼻腔炎患者 25 症例 76 検体についてガーゼ (約  $1\text{ cm}^2$ ) 中 NTL 含量をバイオアッセイおよび HPLC で測定した結果、バイオアッセイでは  $0.1\sim 678\ \mu\text{g}/\text{ガーゼ}$ 、HPLC では  $0.1\sim 740\ \mu\text{g}/\text{ガーゼ}$  といずれもすべての検体について測定できた。また、バイオアッセイと HPLC の測定値の相関は  $y=0.94x+4.63$ ,  $r=0.963$  と良好であった。

ネブライザー直後の NTL 鼻腔内分布の測定が可能となったことにより、今後、ネブライザー療法の有用性を検討する際のパラメーターとして有益な情報となり得ることが示唆された。

**Key words:** アミノ配糖体系抗生物質, Netilmicin, エーロゾル療法, HPLC, バイオアッセイ

ネブライザー療法は、慢性副鼻腔炎の治療に対して最も一般的に行なわれている保存的かつ直接的な治療法である。最近、使用する抗生物質として、広い抗菌スペクトラムを有し、粘膜組織に対する刺激性の少ないアミノ配糖体系抗生物質 (AGs) が注目されている<sup>1-6)</sup>。

細菌感染症に対する抗生物質の効果は、抗生物質が直接細菌に接触し、作用する必要がある。ネブライザー療法時、抗生物質がどの程度炎症巣に到達するかは、この治療法の有用性を検討する上で重要なポイントとなるが、一般に AGs は粘膜組織中への浸透性が弱い<sup>7,8)</sup>ため、粘膜組織中の薬物量を測定するのみで、有用性を直ちに判断するには難点がある。また、鼻腔内に貼付したろ紙あるいはガーゼ小片に吸着させて直接的な分布をみる方法は、薬物の局所到達量が確認できるが、AGs はこれらろ紙あるいはガーゼなどのセルロースと強く吸着する<sup>9)</sup>ことから、定量的な回収を行なうことは従来困難で

あった。

そこで我々は、AGs にネチルマイシン (NTL) を用い、あらかじめ鼻腔内に貼付したガーゼ小片からの NTL の回収および定量を試みた。本法によって、ネブライザー直後の NTL の鼻腔内分布を求めることが可能となり、さらに、臨床的な評価を行なうにたりの実用分析法としての有用性が確認できたので報告する。

### I. 実験材料及方法

#### 1. 薬剤および試薬

NTL 原末 (アメリカンシェリング社)、ペクタシン注 (エッセクス日本)、リンデロン注 (塩野義製薬)、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)、 $\beta$ -メルカプトプロピオン酸 (特級, 半井)、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (PICB-7, 日本ウォーターズ)、培地 (Antibiotic Medium No. 5, Difco)。その他の試薬は特級品を用いた。

\* 滋賀県甲賀郡水口町笹が丘 1-4

## 2. 器具

HPLC 装置 (ポンプ; 510 型, 蛍光検出器; 420 型, 試料注入装置; U6K 型, カラム;  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> 3.9 mmI. D.  $\times$  300 mm, 以上, 日本ウォーターズ社製) を用いた。

## 3. 臨床検体

副鼻腔炎患者の鼻腔内にあらかじめ約 1 cm<sup>2</sup> のガーゼ小片を貼付し, NTL の 20 mg/3 ml 溶液 (ベクタシン注 0.4 ml, 0.1% リンデロン液 0.3 ml および生理食塩液 2.3 ml をそれぞれ混合した) をジェット式ネブライザーにより 3 分間噴霧した後ガーゼを取り出し, これを臨床検体とした。なお, 検体は試験に供するまで -20 °C にて保存した。

## 4. ガーゼからの NTL 抽出法

藤本ら<sup>10)</sup>のろ紙血中からのゲンタマイシン抽出法を準用した。すなわち, 臨床検体をふた付きプラスチックチューブに入れ, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9.1) を 500  $\mu$ l 添加し, 20°C, 30 分インキュベートした後の抽出液をバイオアッセイおよび HPLC の試料とした。

## 5. HPLC による定量

大月ら<sup>11)</sup>の方法により測定した。なお, 移動相の硫酸ナトリウムの濃度は 0.16 M とした。

## 6. バイオアッセイ (アガーウェル法<sup>12)</sup>) による定量

培地に *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を終濃度 10<sup>6</sup> spores/ml 培地となるように接種し, これをペトリ皿 (内径 9 cm) に 7 ml ずつ分注した後, 直径 6 mm の寒天孔を 6 個あけ, 試料および 0.1  $\mu$ g/ml の補正用試料液を加えて, 37°C 16~20 時間培養した。阻止円の直径を計測し, 同時に 0.02~1.0  $\mu$ g/ml の 6 段階の NTL 溶液を用いて作成した標準曲線より試料中の NTL 濃度を算出した。

## II. 実験結果

### 1. ガーゼからの NTL 抽出法の検討

約 1 cm<sup>2</sup> のガーゼに NTL 10  $\mu$ g を添加し, 50°C の乾燥器中で 10 分間乾燥させたものを検体とした。検体に 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> または蒸留水を 500  $\mu$ l 加え, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> では 20, 35 および 50°C で, 蒸留水では 35°C で, 15, 30, 45 および 60 分間インキュベーションした後の抽出液を HPLC で測定した。Fig. 1 に示したように, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いた場合, 20°C, 35°C および 50°C のいずれの温度においても 15 分のインキュベーションで回収率は 90% 以上となった。なお, 蒸留水を用いた時には 60 分においても回収率は 0% であった。ろ紙血中からのゲンタマイシンの抽出法同様, 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いることにより, ガーゼから NTL を定量的に回収できることを確認した。これらの結果が

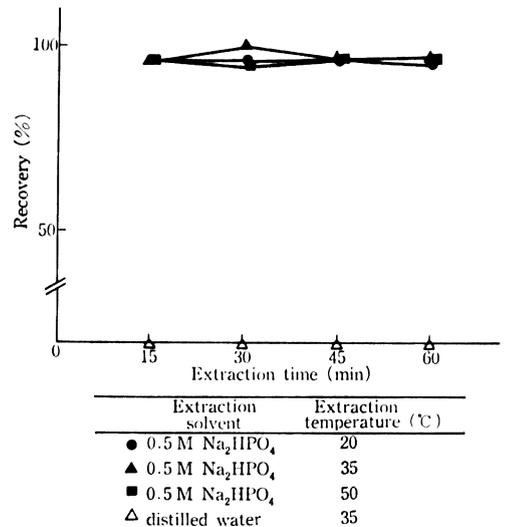


Fig. 1. Influence of extraction time and extraction temperature on recovery of netilmicin from gauze

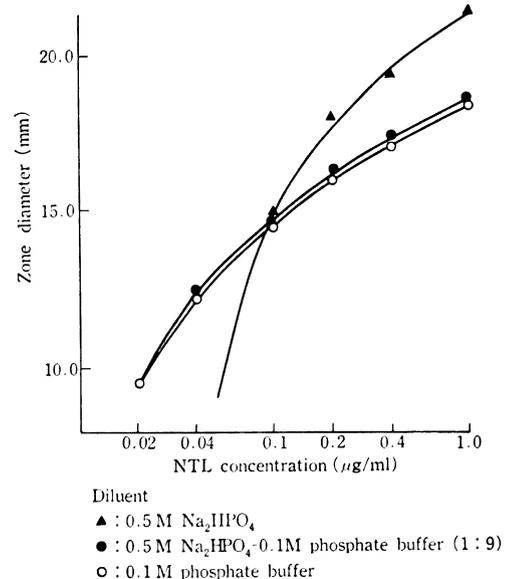


Fig. 2. Effect of diluent on calibration curve for assay of netilmicin by agar well method

ら, 以下の実験には抽出溶媒として 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用い, 20°C で 30 分間インキュベーションすることとした。

### 2. バイオアッセイ

0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> はイオン強度が高く, 強塩基性である。このため, バイオアッセイ時にそのまま試料液として用いた場合, 阻止円に影響を及ぼすことが考えられるので, 次の検討を行なった。

Table 1. Effect of blood on determination of netilmicin by agar well method

Blood concentration (%)	Concentration of netilmicin ( $\mu\text{g/ml}$ )	n	Measured mean ( $\mu\text{g/ml}$ )	Analytical recovery (%)	RSD* (%)
1.0	0.1	5	0.1028	102.8	3.3
2.5	0.1	5	0.1021	102.1	1.8
5.0	0.1	5	0.1053	105.3	2.3
10	0.1	5	0.1047	104.7	4.6
20	0.1	5	0.1025	102.5	3.3
	0.04	5	0.0999	99.9	2.4
	0.02	5	0.1063	106.3	5.7

\* relative standard deviation

0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9.1), 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) および 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を 0.1 M リン酸緩衝液で 10 倍に希釈した (pH 8.1) 3 種の溶液を用いて NTL 標準液を調製し、その標準曲線を比較した。Fig. 2 に各標準曲線を示したが、0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を用いた場合、0.04  $\mu\text{g/ml}$  以下の濃度では阻止円が現われず、また、0.2  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度では 0.1 M リン酸緩衝液を用いたものに比べ阻止円が 20~30 mm ほど増大したことより、0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を試料液として用いることは適切でないと考えた。次に、0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を 10 倍に希釈した液の標準曲線は、0.1 M リン酸緩衝液の標準曲線とほぼ一致し、影響はほとんど無視できた。この結果より、バイオアッセイに用いる試料は、0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を 0.1 M リン酸緩衝液で少なくとも 10 倍に希釈した試料液を用いることとした。なお、この時の NTL の最低検出限界は約 0.2  $\mu\text{g/ml}$  (0.1  $\mu\text{g/g}$  ガーゼ) であった。

### 3. 体液成分の影響

臨床検体には鼻腔内浸出液あるいは血液が付着し、特に血液は抽出および定量に及ぼす影響が大きいと考えられることから、以下の検討を行なった。

約 1  $\text{cm}^2$  のガーゼに吸着可能な血液量を求めたところ、その量は約 100  $\mu\text{l}$  であった。したがって、0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  500  $\mu\text{l}$  で抽出した溶液中には最高 20% の血液が含まれる可能性があるため、NTL の定量に及ぼす血液成分の影響の有無を検討した。0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  500  $\mu\text{l}$  中に NTL 0.1~0.5  $\mu\text{g}$  と血液 1, 2.5, 5, 10 および 20% をそれぞれ含むように調製した各種の溶液を試料として、バイオアッセイで測定した結果を Table 1 に示した。いずれの溶液からの回収率も 99.9~106.3% で、この時の相対標準偏差 (RSD) は 1.8~5.7% となり、血液成分の影響なくバイオアッセイで測定できることを確認した。また、HPLC について検討した結果、血

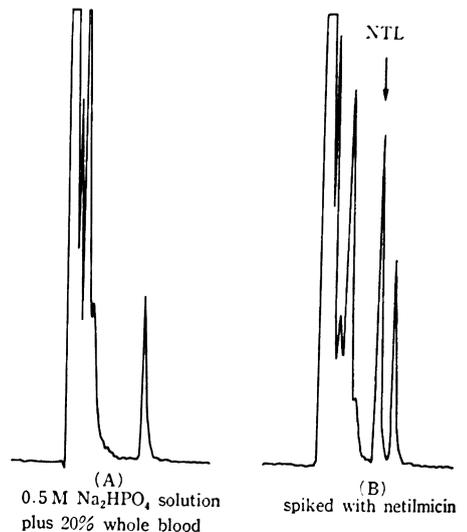


Fig. 3. HPLC chromatograms

Table 2. Recovery of netilmicin from gauze\* by HPLC and agar well method

Netilmicin added to gauze ( $\mu\text{g}$ )	Recovery %** (RSD)	
	HPLC	agar well method
0.5	83.2 (5.2)	—***
1.0	83.3 (3.1)	103.9 (6.1)
2.5	85.4 (2.0)	—
5.0	86.6 (2.4)	—
10.0	81.6 (3.2)	93.2 (7.0)
1,000	89.7 (3.4)	89.6 (6.4)

\* the gauze contained blood (100  $\mu\text{l}$ ) and was dried

\*\* n=5

\*\*\* not tested

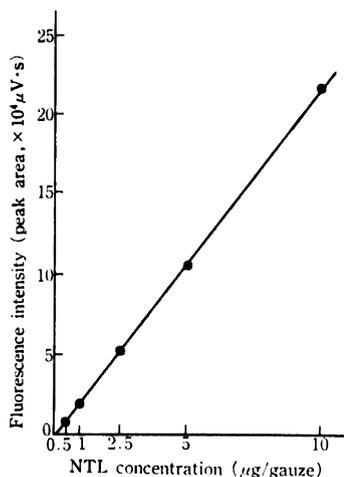


Fig. 4. Calibration curve for HPLC of netilmicin in gauze

液 20% の混入でもクロマトグラム上に NTL の定量を妨害するピークは現われなかった (Fig. 3)。

次に、ガーゼからの NTL の回収に及ぼす血液成分の影響を検討した。ネブライザー用 NTL 溶液 (20 mg/3 ml) がガーゼに十分に浸透した時 (100 µl) のガーゼ中 NTL 含量は約 670 µg であった。そこで、1 片 (約 1 cm<sup>2</sup>) の NTL 含量が 0.5~1,000 µg になるように調製したガーゼに血液を浸透させ、乾燥したものを検体とし、抽出操作を行ない、バイオアッセイおよび HPLC で回収率を求めた。回収率は Table 2 に示したようにそれぞれ 89.6~103.9% および 81.6~89.7% であり、また、相対標準偏差も良好であったことより、NTL 抽出時に血液成分の影響がないことを確認した。なお、Fig. 4 に HPLC による検量線を示した。

#### 4. 臨床検体の測定

副鼻腔炎患者 25 名より採取した 76 検体について、バイオアッセイおよび HPLC により測定した結果、ガーゼ中 NTL 含量はそれぞれ 0.1~678 µg/ガーゼおよび 0.1~740 µg/ガーゼであった。また、HPLC とバイオアッセイの測定値との相関は Fig. 5 に示したように、 $y=0.94x+4.63$ ,  $r=0.963$  と良好であった。

### III. 考 察

アミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は副鼻腔炎などの気道感染症に対するネブライザー療法に繁用されているが<sup>1-6,13)</sup>、薬剤の鼻腔内分布については明らかにされておらず、治療上の有効性が充分であっても、薬動学的な面では検討がなされていなかった。

一般に、全身的に投与された AGs の分布は細胞外液であり、細胞内への移行は極めて低いと報告<sup>7,8)</sup>されて

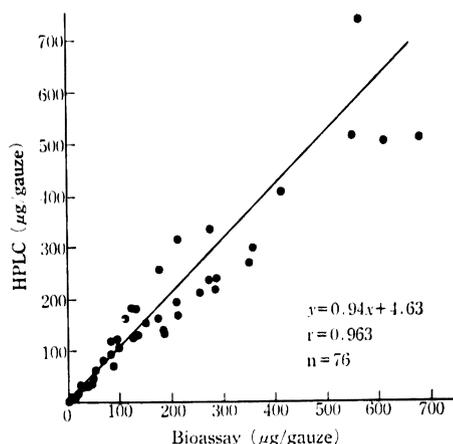


Fig. 5. Correlation of netilmicin concentration in gauze between bioassay and HPLC after aerosol administration

いる。したがって、局所使用にあっても、組織内へ移行する AGs の量は極めて少ないと考えられる。このため、局所の組織内濃度を求めた結果を、そのまま分布・消失の指標として直ちに用いるには難点がある。また、鼻腔内に添付したガーゼから AGs を回収して直接的な分布をみる方法も、AGs がガーゼなどのセルロースに強く吸着する<sup>9)</sup>ため、定量的な回収は困難とされてきた。しかし、最近、藤本ら<sup>10)</sup>によりろ紙血からのゲンタマイシンの定量的な回収法が報告された。

そこで今回、ガーゼから NTL の定量的な回収を試み、ネブライザー直後の鼻腔内粘膜上の NTL 沈着量の測定法として実用化した。

抽出溶媒に 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いることにより、ガーゼから NTL を定量的に回収することができた。得られた溶液をバイオアッセイに応用する場合、少なくとも 0.1 M リン酸緩衝液で 10 倍以上に希釈する必要がある。この時のガーゼ中 NTL 含量の最低検出限界は約 0.1 µg/ガーゼであり、臨床的に分離される各種の細菌に対する効果を考慮する上で十分な検出限界であると考える。

鼻粘膜にガーゼを貼付するため、粘膜浸出液あるいは血液など付着することが当然考えられるが、ガーゼに血液が充分付着した場合でも、NTL の回収および定量に及ぼす影響がないことを確認した。一般に血清などの生体試料は、定量を妨害する成分を含み、何らかの前処理が必要とされる場合が多い。しかし、臨床検体中に含まれる血液の量を血清に換算すると最高でも約 10% であり、本報告で用いた測定条件では前処理を必要としなかった。また、血漿中の NTL 濃度を HPLC を用いて測定する場合、血漿を等量の移動相で希釈することによ

り、定量に及ぼす血漿成分の影響が無視できたことが報告<sup>10)</sup>されている。

副鼻腔炎患者 25 名より採取した 76 検体について測定した結果、ガーゼ中 NTL 含量はバイオアッセイで 0.1~678  $\mu\text{g}$ , HPLC で 0.1~740  $\mu\text{g}$  であった。この時のバイオアッセイと HPLC の測定値は良好な相関  $y=0.94x+4.63$ ,  $r=0.963$  を示し、いずれの方法によっても測定が可能であり、本法の実用性が確認できた。

本法により、ネブライザー直後の NTL 鼻腔内分布の測定が可能となった。今後、ネブライザー療法の有用性を検討する際の測定法として有益な情報を与える方法であると考えられる。

### 文 献

- 1) 二木 隆, 洲崎春海: 慢性副鼻腔炎に対する Sisomicin (シセプチン<sup>®</sup>) ネブライザーの使用経験。診療と新薬 20: 379~383, 1983
- 2) 坪川俊仁, 斎藤 等, 高波二三, 黒川泰資, 松本順雄: 慢性副鼻腔炎に対する硫酸ゲンタマイシン・ネブライザー療法の基礎と臨床。耳鼻咽喉科臨床 80: 1729~1739, 1987
- 3) 和田 淳: 慢性副鼻腔炎に対するエキストラマイシンネブライザーの使用経験。診療と新薬 21: 1736~1744, 1984
- 4) 洲崎春海, 杉田公一, 杉本正弘, 原 誠: 慢性副鼻腔炎に対する硫酸ミクロノマイシン (サガミシン<sup>®</sup>) ネブライザーの使用経験。診療と新薬 21: 2629~2633, 1984
- 5) 森中節子, 吉信敏子, 釜本安敏: トブラシンの鼻ネブライザー療法の検討—その安全性に関して—。耳鼻咽喉科臨床 75: 2219~2223, 1983
- 6) 小西一樹: 抗生物質の吸入・注入療法。呼吸 3: 376~380, 1984
- 7) 上田 泰綱: アミノ配糖体薬, 5 吸収, 分布, 代謝, 排泄 (石川清文), 156 頁, 南江堂, 1985
- 8) MCCracken, G H CHRANE JR. D F and THOMAS M L: Pharmacologic evaluation of gentamicin in newborn infants. J Infect Dis 124 (Supple.): s 214~223, 1971
- 9) LAMB, J W MANN J M and SIMMONS R J: Factors influencing the microbiological assay of tobramycin. Antimicrob Agents & Chemother 1: 323~328, 1972
- 10) FUJIMOTO, T TUDA Y TAWA R and HIROSE S: Fluorescence polarization immunoassay of gentamicin in blood spotted on filter paper. Chemotherapy: submitted
- 11) 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: 571~575, 1986
- 12) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 片桐 謙: 体内 Tobramycin の微生物学的微量定量法に関する検討。Chemotherapy 23: 886~893, 1975
- 13) 小林一豊, 志藤文明, 下田和夫, 三部重雄, 森本賢治: 急性咽喉頭炎に対するシセプチンネブライザー療法。現代医療 16: 1485~1488, 1984
- 14) 藤本 尚, 松島宏規: 高速液体クロマトグラフィーによる血漿中ネチルマイシンの分析。薬剤学 41: 172~176, 1981

## NETILMICIN CONCENTRATION IN THE NASAL CAVITY DURING NASAL AEROSOL THERAPY

TAKESHI SHIBAHARA and MAYUMI SHOSHIHARA

Research and Development Laboratories, Essex Nippon Kabushiki Kaisha,  
1-4 Sasagaoka, Minakuchi-cho, Koga-gun, Shiga 528, Japan

MINORU ISHIDA

Dept. of Otorhinolaryngology, Suita Municipal Hospital

We determined netilmicin (NTL) concentrations in the nasal cavity of patients on aerosol therapy.

Since aminoglycoside antibiotics (AGs) have a relatively low distribution in the nasal mucosa, it is difficult to evaluate the efficacy of aerosol therapy from the AG concentration. We therefore tried to determine NTL concentration after aerosol administration in gauze (1 cm<sup>2</sup>) placed in the nasal cavity. Though difficult, since AGs are strongly adsorbed to cellulose, quantitative analysis by bioassay and HPLC, using 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as extraction solvent, was well controlled.

We determined NTL in 76 samples from 25 patients with paranasal sinusitis by bioassay and HPLC. Both assay data agreed closely, and the coefficient of correlation was 0.963.

As it was possible to determine the concentration of NTL in the nasal cavity after aerosol administration, these data are a useful parameter in investigating the efficacy of aerosol therapy.