臨床薬物動態理論に基づく投与設計への応用を目的とした 螢光イムノアッセイ法によるネチルマイシン測定法の検討

篠崎公一*¹, 篠 道弘*³, 増原慶壮*¹, 高尾良洋*¹, 山崎 顕*¹,
田中美雄*¹, 高橋 悟*², 佐野隆志*², 染谷一彦*², 緒形宏泰*³

聖マリアンナ医科大学病院薬剤部*¹

聖マリアンナ医科大学第3内科*²

明治薬科大学薬理学教室*³

Evaluation of Assay Method for Serum Netilmicin by Substrate Labeled Fluoroimmunoassay

KIMIKAZU SHINOZAKI*¹, MICHIIHIRO SHINO*³, KEISO MASUHARA*¹,
YOSHIHIRO TAKAO*¹, AKIRA YAMAZAKI*¹, YOSHIO TANAKA*¹,
SATORU TAKAHASHI*², TAKASHI SANO*², KAZUHIKO SOMEYA*²,
YASUHIRO OGATA*³

Pharmacy Department*¹, The 3rd Department of Internal Medicine*²,
St. Marianna University School of Medicine and Hospital
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meiji College of Pharmacy*³

(Received July 4, 1986)

The measurement of serum netilmicin (NTL) by substrate labeled fluoroimmunoassay (SLF-IA) was evaluated with the purpose to apply to the clinical pharmacokinetic dosing regimen service. Three serum dilution methods including 51-, 16-, and 6-fold dilution factors were used for the measurement based on the method recommended by the manufacture of the assay apparatus and slightly modified by the authors. The maximum within-assay variance (CVw%), between-assay variance (CVb%) and the range of analytical recovery (%) measured by 51-fold dilution method were 4.2%, 11.9% and 102–104% (minimum–maximum values) respectively in NTL concentration ranging from 2 to 10 mcg/ml, but low precision (14.7%), very low reproducibility (30.2%) and large negative bias (68.5%) were observed in 1 mcg/ml. CVw%, CVb% and the range of recovery (%) by 16-fold dilution method were 6.5%, 12.6% and 104.1–115.6% respectively in NTL concentration ranging from 0.7 to 2 mcg/ml, but very low reproducibility (29.3%) was observed in 0.3 mcg/ml. CVw%, CVb% and the range of recovery (%) by 6-fold dilution method were 3.2%, 12.2% and 100.6–119.3% respectively in NTL concentration ranging from 0.3 to 1 mcg/ml. It may be a rational and practical idea with the purpose to apply to NTL dosing regimen that SLFIA-NTL assay of serum NTL concentration should be concomitantly used by 51-fold and 16-fold dilution method. This combination procedure may give accuracy through value and patient pharmacokinetic parameters, therefore, a safe and effective manner of dosing of NTL can be decided.

Keywords—netilmicin; fluoroimmunoassay; serum concentration; monitoring therapy; clinical pharmacokinetics

*^{1,2} 川崎市宮前区菅生2095; 2095, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki-shi, 213 Japan

*³ 東京都世田谷区野沢1丁目35-23; 35-23, Nozawa 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, 154 Japan

はじめに

近年グラム陰性桿菌感染症の増加に伴いアミノ糖系抗生物質は感染症治療上重要な薬剤となっている^{1,2,12)}。一方、アミノ糖系抗生物質は、聴覚器障害および腎障害などの重篤な副作用を有しており、報告にあたっては細心の注意を払うことが必要である。ネチルマイシン (NTL) は不活性化酵素の作用点が少ないためゲンタマイシン (GM) およびトブラマイシン (TOB) 耐性菌に対して有効であるという特徴を有している³⁾。血中 NTL 濃度は頂値が $5\sim 10\mu\text{g/ml}$ 、谷値が $0.5\sim 2\mu\text{g/ml}$ の治療域となるように投与設計をすることがよいとされており、薬物動態値の個体差が大きいことから薬物血中濃度モニタリングの重要性が指摘されている^{4,13)}。

今回、我々は NTL の臨床薬物動態理論に基づく投与設計への応用を目的として蛍光免疫アッセイ法 (SLFIA 法) による NTL 測定法の基礎的検討を行った。

方 法

1. 測定装置、器具および試薬

測定にはマイルス三共社製のエームス TDA 測定用蛍光光度計 (フルオロスタット®) と希積分注器 (エームスダイリューター®) を用い、反応および蛍光測定用のキューベツはマイルス三共社指定のエルケイ社ウルトラビューキューベツを用いた。試薬は濃縮緩衝液、濃縮抗体-酵素試薬、発蛍光性薬物試薬 (Fluorogenic Drug Reagent: FDR と略す) および検量線作成用の 5 濃度 ($18, 12, 8, 4, 0\mu\text{g/ml}$) の NTL 添加ヒト血清 (カリブレーター) からなる測定キットを用い、すべての試薬は冷所密栓保存 (5°C) とし、室温に戻してから使用した。

2. 測定原理

蛍光免疫アッセイ法による NTL 測定法の測定原理を Fig. 1 に示す。ゲンタマイシン系薬物に対する抗体 [シソマイシン (SISO) に対するモノクローナル抗体] の結合部位に対して、血清試料中の NTL と FDR 標識抗原が競合的に結合し、余剰の FDR 標識抗原が β -ガラ

Fig. 1. SLFIA 法による NTL 測定原理

クトシダーゼにより加水分解され蛍光物質となる。この蛍光物質に波長 400nm の励起光を照射し波長 450nm で蛍光強度を専用の蛍光検出器で検出する。蛍光強度は薬物濃度に応じて変化するため、既知濃度のヒト血清 (カリブレーター) における蛍光強度を測定し検量線を作成することにより未知濃度の血清中の NTL 濃度が測定できる。

3. 測定法の検討

3-1. 検量線の検討

キット添付の 5 濃度のカリブレーター ($18, 12, 8, 4, 0\mu\text{g/ml}$) をキット指定の操作法により測定し検量線を作成した。測定は 2 重測定で行い異なる日に 6 回検量を作成した。各濃度の蛍光強度を $18\mu\text{g/ml}$ の蛍光強度で除し 90 を乗じて相対蛍光強度を求め、相対蛍光強度の変動係数を算出した。

3-2. 精度および再現性の検討

4 濃度のカリブレーターと健康人から得た NTL を含まないヒト血清より 5 濃度の NTL を含有する血清 (コントロール血清) をオストワルドピペットを用いて作成し、容器への吸着を避けるため⁶⁾ プラスチック製容器に分注し -20°C で凍結保存とした。各濃度のコントロール血清を一連の測定バッチ (測定作業) ごとに 2 重測定で、5 ~ 7 回繰り返して測定した。測定結果は Rodbard の方法⁷⁾ により解析し測定内変動および測定間変動を算出した。本キットの測定限界は $1\mu\text{g/ml}$ とされているため⁸⁾ 低濃度域では希釈倍率を変えた場合の検討も行った。すなわち、キット指定の血清希釈倍率 (51 倍) により $1.09\sim 10\mu\text{g/ml}$ のコントロール血清を測定し、16 倍希釈により $0.33, 0.68, 1.09$ および $2.0\mu\text{g/ml}$ を、さらに 6 倍希釈により $0.33, 0.68$ および $1.09\mu\text{g/ml}$ を測定した。

3-3. 回収率の検討

コントロール血清をくりかえし測定し、濃度測定値の平均値と理論値を比較し分析時回収率を算出した。

結 果

1. 検量線の検討

6 回作成した検量線の変動を Table 1 および Fig. 2 に示す。 $18\mu\text{g/ml}$ のカリブレーターの蛍光強度測定値を 90 としたときの各濃度での相対蛍光強度は、 $12\mu\text{g/ml}$ では 76.57 ± 2.01 (2.63%) [平均 ± 1 標準偏差 (変動係数: CV%)], $8\mu\text{g/ml}$ では 62.94 ± 1.59 (2.53%), $4\mu\text{g/ml}$ では 45.25 ± 1.78 (3.94%), $0\mu\text{g/ml}$ では 28.69 ± 1.38 (4.81%) であった。0 ~ $8\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において極めて良好な直線性が得られたが、8 ~ $12\mu\text{g/ml}$ の

Fig. 2. Standard Curve for Netilmicin

濃度範囲では前者と比較して傾きが減少しており、12～18 µg/ml の濃度範囲ではさらに傾きが減少していた。

2. 精度および再現性

2-1. 測定内変動

キット指定の操作法による血清希釈倍率を51倍で行う測定では、2.09～10.23 µg/ml の濃度範囲で、測定内変動は2重測定で1.07～4.19%と良好な精度を示した。しかし 0.75 µg/ml においては2重測定で14.67%とやや変動が大きかった。

16倍希釈による測定では0.32 µg/ml, 0.77 µg/ml および 2.31 µg/ml で2重測定で、変動係数はそれぞれ10.47%, 6.48%, 2.30% および 2.41% であり、0.32 µg/ml においてやや変動が大きかった。

6倍希釈による測定では、0.39 µg/ml, 0.81 µg/ml および 1.10 µg/ml で2重測定で、3.19%, 1.46% および 1.77%と良好な精度を示した。(Table 2)

2-2. 測定間変動

51倍希釈による測定では 6.12 µg/ml と 10.23 µg/ml において測定間変動は2重測定で3.92%と6.18%と良好な再現性を示した。2.09 µg/ml においては2重測定で11.94%であった。また 0.75 µg/ml においては2重測定で30.15%と変動が大きかった。

16倍希釈による測定では 0.32 µg/ml, 0.77 µg/ml, 1.14 µg/ml および 2.31 µg/ml では2重測定で、それぞれ 29.29%, 12.61%, 10.09% および 8.04% と、0.32 µg/ml において変動が大きかった。

6倍希釈による測定では、0.39 µg/ml, 0.81 µg/ml および 1.10 µg/ml で、2重測定ではそれぞれ12.17%, 8.97% および 6.93% であった。(Table 3)

3. 回収率

51倍希釈による測定では、2～10 µg/ml の濃度範囲では、回収率は102.0～104.33%と良好であった。しかし 1.09 µg/ml では68.49%と低値を示した。16倍希釈による測定では 0.68 µg/ml と 2 µg/ml において、それぞれ 113.51%と115.64%とやや高値を示したが、0.33 µg/ml と 1.09 µg/ml においては、それぞれ 94.63%と 104.08%と良好であった。また6倍希釈による測定では、0.33 µg/ml と 0.68 µg/ml においてそれぞれ 116.06% と 119.31% とやや高値を示したが、1.09 µg/ml においては 100.62% ときわめて良好であった。(Table 4)

考 察

SLFIA 法による NTL 測定キットは、ゲンタマイシン系化合物 (GM, SISO, NTL) に対するモノクローナル抗体、シソマイシンを結合させた FDR および β-ガラクトシダーゼを用いている⁹⁾。Place ら⁹⁾は本法による GM および NTL の検量線について、GM では 0～12 µg/ml の範囲で良好な直線性が得られたのに対し、NTL では 0～8 µg/ml の範囲では直線性があるが、8～12 µg/ml の範

Table 1. Reproducibility of Standard Curve for NTL

NTL Conc. of SLFIA Standard Sample	Relative Fluorescent Potency (Absolute Potency of Standard/Potency of 18 µg/ml Standard × 90)								
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	Mean	S.D.	C.V. %
18 µg/ml	90	90	90	90	90	90	90	—	—
12 µg/ml	78.88	75.17	75.41	77.52	73.92	78.49	76.57	2.01	2.63%
8 µg/ml	64.49	61.79	62.49	63.81	60.56	64.47	62.94	1.59	2.53%
4 µg/ml	43.32	46.83	45.44	43.86	44.20	47.82	45.25	1.78	3.94%
0 µg/ml	29.63	28.08	28.60	27.34	27.53	30.95	28.69	1.38	4.81%

Table 2. Within Assay Variance of SLFIA® NTL Kit

Dilution Factor	Test Level (I~VI)	Number of Assay Set (Duplicate Measurement)	Observed NTL Value		Within Assay C.V(%) for Duplicate Measurement
			Mean ($\mu\text{g/ml}$)	S. D. ($\mu\text{g/ml}$)	
51	VI	6	10.23	0.11	1.07
51	V	6	6.12	0.09	1.46
51	IV	6	2.09	0.87	4.19
51	III	5	0.75	0.11	14.67
16	IV	5	2.31	0.06	2.41
16	III	7	1.14	0.03	2.30
16	II	5	0.77	0.05	6.48
16	I	6	0.32	0.03	10.47
6	III	5	1.10	0.03	1.77
6	II	5	0.81	0.01	1.46
6	I	6	0.39	0.01	3.19

Table 3. Between Assay Variance of SLFIA® NTL Kit

Dilution Factor	Test Level (I~VI)	Number of Assay Set (Duplicate Measurement)	Observed NTL Value		Between Assay C.V(%) for Duplicate Measurement
			Mean ($\mu\text{g/ml}$)	S. D. ($\mu\text{g/ml}$)	
51	VI	6	10.23	0.63	6.18
51	V	6	6.12	0.24	3.92
51	IV	6	2.09	0.25	11.94
51	III	5	0.75	0.23	30.15
16	IV	5	2.31	0.19	2.41
16	III	7	1.14	0.11	10.09
16	II	5	0.77	0.10	12.61
16	I	6	0.32	0.09	29.29
6	III	5	1.10	0.08	6.93
6	II	5	0.81	0.07	8.97
6	I	6	0.39	0.05	12.17

Table 4. Analytical Recovery of SLFIA® NTL Kit

Dilution Factor	Test Level (I~VI)	Number of Total Assay	Theoretical NTL Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Observed NTL Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Analytical Recovery %
51	VI	12	10.00	10.23	102.3
51	V	12	6.00	6.12	102.0
51	IV	12	2.00	2.09	104.33
51	III	10	1.09	0.75	68.49
16	IV	10	2.00	2.31	115.64
16	III	14	1.09	1.14	104.08
16	II	10	0.68	0.77	113.51
16	I	12	0.33	0.32	94.63
6	III	10	1.09	1.10	100.62
6	II	10	0.68	0.81	119.31
6	I	12	0.33	0.39	116.06

固では傾きが減少したことを報告している。我々の検量線についての検討結果では、0~8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では良好な直線性が得られたが、8~12 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では前者に比し傾きが減少し、12~18 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では8~12 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲での傾きよりさらに減少していた。したがって SLFIA 法による NTL の検量線は GM の検量線と異なり 8 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度範囲においては濃度の増加に伴う傾きの減少が顕著であると考えられる。

検量線の再現性の検討では 0~18 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では相対蛍光強度の変動係数は4.81%以下と良好な再現性を示した。しかし8および12 $\mu\text{g/ml}$ の血清における変動係数が2.53%および2.63%と非常に良好であるのに比して、4 $\mu\text{g/ml}$ では3.94%と相対的に大きい値を示しており、また NTL を含んでいない血清における変動係数は4.81%であり4 $\mu\text{g/ml}$ における変動係数とほぼ同等の値を示した。したがって、低濃度域での蛍光強度の再現性は高濃度域に比較してやや劣ると考えられる。

SLFIA 法の NTL 測定法の精度、再現性および回収率についてのマイルス共済株式会社の資料¹⁰⁾では、繰り返し3回測定を行った場合の測定内変動の変動係数(CV%)は、6 $\mu\text{g/ml}$ では2.0%、9.9 $\mu\text{g/ml}$ では1.8%、16 $\mu\text{g/ml}$ では2.3%であり、異なる日に繰り返し20回測定を行った場合の測定間変動の CV% は、6 $\mu\text{g/ml}$ では3.5%、9.9 $\mu\text{g/ml}$ では4.2%と報告している。一方、White ら¹¹⁾は繰り返し10回測定した場合の測定内変動の CV% は 2.4~2.5 $\mu\text{g/ml}$ では9.16%以下、9.8~10.4 $\mu\text{g/ml}$ では4.69%以下であり、2重測定で異なる日に繰り返し5回測定した場合の測定間変動の CV% は2.4ないし2.5 $\mu\text{g/ml}$ で、8.57%以下および10.1~10.4 $\mu\text{g/ml}$ では4.50%以下と報告している。

Rodbardの方法を用いて検討した我々の結果では、キット指定の51倍血清希釈率で測定した場合については、谷値が治療域の上限ないし中毒域、あるいは頂値が無効域ないし治療域内に位置すると想定した2~10 $\mu\text{g/ml}$ 、すなわち、レベルⅣ~Ⅵのコントロール血清における測定内変動の CV% は2重測定では1.07~4.19%であり、従来の報告に比較し同等ないし優れていた。同濃度範囲における測定間変動の CV% は2重測定では3.92~11.94%であり、従来の報告に比し低濃度(2 $\mu\text{g/ml}$)ではやや再現性が劣っていたが、ほぼ同等な再現性を有していると考えられた。一方、分析時回収率は102.0~104.3%ときわめて良好であった。したがって、2.0~10.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲ではキット指定の51倍希釈により測定可能であると判断した。

谷値が治療域内の中央から上方に位置すると想定した0.7~2.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲、すなわちレベルⅡからレベルⅣにおけるコントロール血清において51倍希釈により測定を行った場合では、レベルⅣではほぼ良好な精度、再現性および回収率を示したが、レベルⅢにおいては再現性と回収率が著しく劣っており、2 $\mu\text{g/ml}$ を下回る NTL濃度は正確に測定し得ないと考えられる。一方、同濃度範囲を血清希釈率を16倍として測定した場合では、測定内変動の CV% は2重測定で2.30~6.48%と精度は良好であり、測定間変動の CV% はレベルⅡで変動係数は12.61%とやや変動が大きく、また回収率は0.68 $\mu\text{g/ml}$ と2 $\mu\text{g/ml}$ においてそれぞれ113.51と115.64%とやや高値を示す傾向があったが、測定可能な精度、再現性および回収率を有していると考える。

谷値が治療域の下方に位置すると想定した0.3~0.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において、レベルⅠのコントロール血清を16倍希釈率で測定した場合には測定間変動の CV% が2重測定で29.29%と著しく劣っており正確に測定し得ないと考えられる。一方、0.33 $\mu\text{g/ml}$ と0.68 $\mu\text{g/ml}$ すなわちレベルⅠとレベルⅡにおけるコントロール血清を6倍希釈で測定した場合では、測定内変動の CV% は2重測定で3.19%と1.46%であり、精度はきわめて良好であった。測定間変動の CV% は、レベルⅠにおいて2重測定で12.17%とやや変動が大きく、分析時回収率も116.06%と119.31%と高値を示す傾向があった。しかし、測定目的が特殊な場合に限られると思われるが、0.3~0.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲を測定する必要がある場合には51倍希釈、16倍希釈および6倍希釈の順で合計3回の測定を要するため煩雑であり、また測定値がやや高値を示す傾向に留意すべきであるが、測定可能な精度および再現性を有していると考える。

総 括

キット指定の51倍希釈で測定を行う場合では頂値が5 $\mu\text{g/ml}$ 未満の無効域と5~10 $\mu\text{g/ml}$ の治療域のいずれの場合でも精度、再現性および回収率ともに良好に測定でき、また谷値が2 $\mu\text{g/ml}$ 以上、すなわち治療域の上限であるか中毒域であるかの判定が可能である。しかし谷値が2 $\mu\text{g/ml}$ を下回っていた場合では、正確な測定値が得られないため、臨床薬物動態理論に基づく投与設計を行う際に患者の薬物動態値の推定値に誤差を生じ、投与量および投与間隔の設計が困難になると考えられる。もしキット指定の操作法により谷値の測定値が2 $\mu\text{g/ml}$ を下回る値が得られた場合には、血清希釈率を16倍として再度測定することにより谷値が治療域内に位置しているか

否かの判定が可能となり、さらに $0.7 \mu\text{g/ml}$ 以上、すなわち谷値が治療域の中央から上方に位置するときには正確な測定値を得ることができる。したがって16倍希釈を併用することにより NTL の投与設計をより適切に行い得ると考える。

結 語

個々の患者の NTL 血中濃度を測定し、臨床薬物動態理論に基づく投与設計を行う観点から、実際に臨床検体で遭遇する濃度範囲のコントロール血清を用いて SLF-IA 法の精度、再現性および回収率について検討し、考察を加えた。なお本研究の要旨は第3回 TDM 研究会総会において発表した。

謝辞 エームス TDA ネチルマイシンキットを提供されたマイルス三共株式会社に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 猪狩 淳, 小酒井望: 最新医学, **35**, 1765-1771 (1980),
- 2) 清水喜八郎: 総合臨床, **30**, 2169-2174 (1981).

- 3) P. Noone: *Drugs*, **27**, 548-578 (1984).
- 4) United States Pharmacopeal Convention: Netilmicin (Systemic), U.S.P. DI/Update, No. 1, 1984, pp 6-9.
- 5) 田中信夫: 月刊薬事, **24**(2), 251-258 (1982).
- 6) L. Josephson, P. Houle, M. Haggerty: *Clin. Chem.*, **24**(2), 251-258 (1982).
- 7) D. Rodbard: *Clin. Chem.*, **20**, 1255-1275 (1974).
- 8) マイルス三共(株)學術部: エームス TDA ネチルマイシン操作説明書, 1984年11月, pp 1-36.
- 9) J.D. Place, S. Thompson: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24**, 246-251 (1983).
- 10) マイルス三共(株)學術部: SLFIA法による薬物血中濃度の測定, 1984年7月, p 22.
- 11) L.O. White, M. J. Bywater, D.S. Reeves: *J. Antimicrob. Chemother.*, **12**, 403-406 (1983).
- 12) 橋本 一ほか: 臨床と微生物, **13**, 137-208 (1986).
- 13) J.C. Rotschafer, K.B. Crossley, D.E. Zaske, N.J. Russillo, R.G. Strate, R.W. Tofte and L.D. Solem: *Ther. Drug. Monit.*, **5**, 263-267 (1983).