ろ紙採血法を用いた血中イセパマイシン濃度測定法の小動物への応用

加瀬公一郎,* 所司原真由美, 津田良子, 吉沢英子, 藤本 尚

シェリング・プラウ株式会社研究開発部

Determination of Isepamicin in the Eluates from the Dried Blood Spots on Filter Paper for Monitoring of Blood Levels in a Guinea-pig

Koichiro KASE,* Mayumi SHOSHIHARA, Yoshiko TSUDA,
Eiko YOSHIKAWA, and Takashi FUJIMOTO

Schering-Plough K.K., 1-4 Sasagaoka, Minakuchi-cho,
Koka-gun, Shiga, 528, Japan

(Received June 17, 1989)

In general, collection of serial blood samples from small experimental animals is difficult in terms of sampling site and operation technique.

To overcome these problems, a simple reproducible method has been improved by the use of filter papers.

Whole blood obtained by venipuncture from the ear vein of guinea-pig was spotted onto a filter paper. Isepamicin in the dried blood spot was extracted with 0.5 M Na_2HPO_4 buffer by incubation and determined by fluorescence polarization immunoassay. Linearity was established over the range of 5–150 $\mu\text{g/ml}$ by using only 100 μl of whole blood.

Consequently its accuracy and precision were good, with mean coefficient of variation of less than 5%. The method described here correlates well with a conventional sampling method and could be used for the pre-clinical study of isepamicin blood levels of individual guinea-pigs.

This method is suitable for the simultaneous measurement of aminoglycoside antibiotics or physiological parameters after the administration of aminoglycoside antibiotics for the pharmacokinetics study.

Keywords—isepamicin; dried blood spot; guinea-pig; pharmacokinetics; fluorescence polarization immunoassay

イセパマイシン (ISP) は, 広い抗菌スペクトルを有するにもかかわらず, 耳毒性, 腎毒性の極めて低いアミノ配糖体系抗生物質 (AGs) である。

新医薬品の開発に際しては, 前臨床試験として数多くの動物を用いた種々の実験が必要である。このなかで, 薬物の吸収, 分布, 代謝及び排泄などの実験の際に用いられる血中濃度の測定には, 古典的な bioassay 法を初めとし, high performance liquid chromatography (HPLC), enzyme immunoassay (EIA), fluorescence polarization immunoassay (FPIA) 法などの方法が汎用され, 必要とする血液量の微量化についても数多くの報告がなされている。

一般に, 医薬品開発の初期における動物実験では, マウス, ラット及びモルモットなどの小動物が繁用されており, これらの小動物の血中薬物動態の検討には採血手技の問題から群としての測定が行われている。しかし, 個々の動物について薬物の経時的な挙動を把握できれば, 求める薬動学的なパラメーターの精度の向上と共に供試動物の数を著しく少なくすることが期待できるなど利点が多い。

我々は, ろ紙採血法と HPLC あるいは FPIA 法と組み合わせた AGs の測定法について検討してきたが,¹⁻³⁾ モルモットを用いた ISP の生体内動態を検討するにあたり, ろ紙血法を用いて個々のモルモットの経時的な血中濃度の推移を求めることを試みた。

実 験 の 部

実験材料 1) 薬剤及び試薬——硫酸イセパマイシン (シェリング・プラウ). 採血用ろ紙; Type I (東洋アドバンテック). 限外ろ過ユニット; ミニセント-30, 分画分子量 30000 Da (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コー (シアンメトヘモグロビン法, 和光純薬). TDX イセパ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). その他の試薬は, 特級品を使用した.

2) 実験動物——ケアリーより購入したハートレイ系雄性モルモット (200—350 g) を, 温度 20—25°C, 湿度 40—60% の条件下, 固形飼料 (ORC-4, オリエンタル酵母) 及び水を自由に与え 1 週間馴化した. このうち健康状態の良好なモルモットを使用した.

添加回収実験 抗凝固剤として EDTA-3K 溶液を添加した遠沈管に, モルモットから採取した静脈血を入れ, プール血液とした. このプール血液に ISP を 2.5, 5, 25, 50 及び 150 µg/ml となるように添加し, それぞれ正確に 100 µl を採血用ろ紙に染み込ませた後乾燥し, ろ紙血 (dried blood spots; DBS) を作成した.

投与及び採血 1) 動物——モルモットを 5 匹使用した.

2) 投与方法——後肢の筋肉内に, ISP (100 mg/ml) を 0.25—0.35 ml (100 mg/kg) 投与した.

3) 採血方法——a) ろ紙採血法: ランセット (20G, ニプロ) により耳静脈を穿刺し, 湧出する血液を採血用ろ紙に十分に染み込ませた後, 室温にて風乾し DBS とした.

b) 心臓採血法: 穿刺針 (26G, ニプロ) により心臓から 3—4 ml 採血した.

採血は, 両採血法とも投与前, 投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4 及び 6 時間後に行った.

血漿中の ISP 濃度測定 心臓採血した血液を 3000 g で 10 分間遠心分離して血漿を得た後, これを検液として蛍光偏光免疫測定法 (TDX 法) により測定した.

DBS 中の ISP 濃度測定 DBS の吸血部分を 5—6 の小片に細断し, 限外ろ過ユニットに入れた後, 予め 35°C に加温した 0.5 M Na₂HSO₄ を 500 µl 加えた. 35°C で 120 分間インキュベーションした後, これを DBS 抽出液とした. DBS 抽出液の入った限外ろ過ユニットを 3000 g で 40 分間遠心分離し得られたろ液を検液とし, TDX 法により測定した. また, DBS 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.

薬動力学的パラメーター 筋肉内投与後の ISP の血中濃度を one-compartment model (修正 Marquardt 法⁴⁾) にあてはめ薬動力学的パラメーター, すなわち最高血中濃度 (C_{max}), 最高血中濃度到達時間 (T_{max}), 血中濃度曲線下面積 (AUC), 吸収速度定数 (K_a), 消失速度定数 (K_{el}), 消失半減期 ($T_{1/2}$), 分布容積 (V_d), 全身クリアランス (Cl) を算出した.

結 果 及 び 考 察

DBS の安定性

ISP 50 µg を含む DBS を 35°C の条件下で 14 日間保存した後, DBS 中の ISP 含量を TDX 法で求めた結果, 残存率は 95% であり, 含量の低下は認められなかった. 一般に, 薬物血中濃度の測定を目的とした検体としての血漿や血清は, 多くの場合, 冷蔵又は冷凍保存下での輸送を必要とする. しかし, ISP を含む DBS は, 常温下での保存に対しても安定であることから, 検体の郵送も可能である.

DBS 中の血液量

採血用ろ紙に 100 µl のプール血液を染み込ませた DBS と, 採血用ろ紙の先端部より徐々に血液を染み込ませ, 拡散部分まで十分に吸着させた DBS の重量を比較することによって, 採血用ろ紙の吸収部位に含まれる血液量を求めた.

その結果, 先端部より徐々に血液を染み込ませた DBS の重量は, 100 µl の血液を染み込ませた DBS の 75% ($n=5$, RSD=3.2%) となった.

採血用ろ紙は, 拡散部分まで十分に吸着させると 100 µl の血液を含むように設計されているが, モルモットの場合の吸血量は 75 µl であった. このことについて, 今回の実験では, モルモットの血液学的な特性によるものなのか, あるいは他の要因によるものなのかは確認できなかったものの, 吸血量の変動は, RSD 3.2% と比較的小さな値であった.

モルモットの H_{et} 値は 40% ($n=92$, RSD=3.0%), DBS 抽出液中の H_b 濃度は 7.3 g/dl ($n=42$, RSD=

11.4%)であった。この H_b 濃度を指標として DBS 中の血液量を推定すると、80 μl に相当する血液量であり重量法による結果に近似していた。

これらの結果から、拡散部分まで十分に染み込んでいれば、吸血部位中に含まれる血液の量はほぼ一定と見なすことができると考え、この場合の DBS 中の血液量を重量法で得られた 75 μl として計算した。

全血中濃度から血漿中濃度への換算

AGs は血球中に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。 H_b 濃度、 H_{ct} 値及び赤血球数の 3 者の値は平行して変化するとは考えられないものの、 H_{ct} 値と H_b 濃度との間には良い相関が得られているという報告¹⁾ もなされているので全血中濃度から血漿中濃度への換算には H_{ct} 値を用いた。また、今回測定したモルモットの H_{ct} 値は、40% ($n=92$, $RSD=3.0\%$) であり個体間のばらつきがなくほとんど一定であったことから、すべてこの値を用いて血漿中濃度への換算を行った。

添加回収実験

1) DBS からの ISP の抽出率 ISP 50 μg を含む DBS を 500 μl の Na_2HPO_4 で抽出した液と、ISP 50 $\mu\text{g/ml}$ を含むモルモットの全血 100 μl を Na_2HPO_4 で 5 倍希釈した液を用い、それぞれミニセントで限外ろ過し、ろ液を TDX で測定することにより DBS からの ISP の抽出率を求めた。その結果、モルモットの全血から得られた測定値は 42.2 μg ($n=3$, $RSD=3.2\%$)、DBS から得られた測定値は 32.6 μg ($n=5$, $RSD=3.3\%$) であった。このことから、DBS からの ISP の抽出率は 77% とした。

2) 限外ろ過膜と ISP との相互作用 限外ろ過法において、限外ろ過膜に種々の化合物が吸着することが知られている。このため、ISP を含む Na_2HPO_4 溶液 (100 $\mu\text{g/ml}$) を用いて、限外ろ過膜と ISP の相互作用について検討した。ISP を含む Na_2HPO_4 溶液をミニセントに入れた後、限外ろ過し、メンブラン上部に保持されているろ過残液と、ろ液中の ISP 濃度をそれぞれ測定した。その結果、ろ過残液中の ISP 濃度は 108 $\mu\text{g/ml}$ 、ろ液中の ISP 濃度は 91 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、モルモットの全血に ISP 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ を含むように調製した試料を用いて、各濃度での回収率を求めた結果、それぞれ 46, 81, 84% であった。

この原因として、薬物のろ過速度が水のそれよりも遅くなるために起こる一種の分子ふるい効果、薬物のろ過膜への吸着^{5,6)}及び血中高分子への吸着が考えられる。分子ふるい効果の存在は、ISP の Na_2HPO_4 溶液を用いた検討結果から考えられる。一方、全血を用いた検討結果から限外ろ過膜への吸着あるいは限外ろ過膜を通過しない血中高分子への吸着が生じていることは事実であるが、これらを区別することは困難であった。

以上のことから、DBS 中の ISP 濃度をより正確に求めるために、DBS 抽出液の測定値に対し、

1. DBS からの抽出率 77%
2. 限外ろ過膜及び血中高分子への吸着 2.4 μg
3. 分子ふるい効果 90%

の 3 つの値を用いて補正し、測定することにした。なお、補正式は以下の通りである。

$$\text{測定値 } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{TDX 実測値 } (\mu\text{g/ml}) + \text{ろ過膜} \cdot \text{血中高分子への吸着 } (2.4 \mu\text{g})}{\text{抽出率 } (0.77) \times \text{分子ふるい効果 } (0.9)}$$

添加回収実験において、この値を用いて添加量と測定値との相関を調べたところ、Fig. 1 に示したように $y = 0.988x + 0.604$, $r = 0.999$ と、良好な相関が得られた。

再現性

ISP 50 $\mu\text{g/ml}$ を含むように調製したプール血液を 100 μl 染み込ませた DBS を用いて、日内再現性と日間再現性を確認した。その結果、日内再現性と日間再現性は、それぞれ 30.2 $\mu\text{g/ml}$ ($n=5$, $RSD=3.0\%$)、30.9 $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$, $RSD=2.7\%$) となり、良好な再現性が得られた。

血漿中 ISP 濃度と DBS 中の ISP 濃度

血漿測定値と DBS からの推測値との相関は、Fig. 2 に示したように $y = 0.947x - 2.635$, $r = 0.975$ と、良好な直線関係と、相関が得られた。このことから、DBS 中の ISP 濃度を算出する補正式が適切であること、また、ろ紙採血法が心臓採血法と同様に定量性のある採血法であることがそれぞれ確認できた。

Fig. 1. Calibration Curve of Isepamicin from Dried Blood Spots by Ultrafiltration

$$Y = 0.988X + 0.604, r = 0.999$$

薬動学的パラメーター

ISP を筋肉内に投与後、心臓採血により得られた中心静脈血中の ISP 濃度の推移から算出した薬動学的パラメーターと、ろ紙採血法により得られた末梢静脈血中の ISP 濃度の推移から算出した薬動学的パラメーターを比較することを試みた (Fig. 3, Table I). なお、各薬動学的パラメーターは、心臓採血の場合は各採血時間における 5 匹のモルモットの平均血中濃度の推移から算出したのに対し、ろ紙採血法の場合は個々のモルモットの血中濃度の推移から算出した。心臓採血により求めたパラメーターは、ろ紙採血法により個々のモルモットから求めたパラメーターの平均値より若干低い値を示したものの、各時間においていずれの採血法でも血中濃度に有意差がない ($p > 0.05$, t -検定) ことから中心静脈血と末梢静脈血で、ISP の血中濃度に差がないと判断したが、Lamb⁷⁾ らによっても同様のことが AGs

Fig. 2. Correlation of Measured Isepamicin Concentration in Plasma and Calculated from Dried Blood Spots

$$Y = 0.947X - 2.635, r = 0.975, n = 42$$

Fig. 3. Time Profiles of Isepamicin Concentration after Intramuscular Administration (Dose: 100 mg/kg) in Guinea-pigs

●, DBS; ○, plasma.

Values represent the means $\pm$ S.E. of 5 guinea-pigs.

TABLE I. Pharmacokinetic Parameters of Isepamicin after Intramuscular Administration (Dose: 100 mg/kg) in Guinea-pigs

Sample		Parameter							
		$T_{1/2}$ (h)	AUC ($\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	Cl (l/h)	V_d (l)	K_a (h^{-1})	K_{el} (h^{-1})
DBS	No. 1	0.40	174.5	0.19	216.1	9.6	0.33	11.8	1.72
	No. 2	0.51	238.7	0.21	244.5	7.0	0.31	11.7	1.36
	No. 3	0.63	277.7	0.29	221.3	6.0	0.33	7.8	1.10
	No. 4	0.66	421.3	0.24	342.8	4.0	0.23	10.6	1.05
	No. 5	0.55	384.3	0.21	372.4	4.3	0.20	11.7	1.27
	Mean (S.E.)	0.55 (0.05)	299.3 (45.7)	0.23 (0.02)	279.4 (32.6)	6.2 (1.0)	0.28 (0.03)	10.7 (0.8)	1.30 (0.12)
Plasma		0.43	217.7	0.20	252.1	7.7	0.29	11.1	1.61

の一種であるトブラマイシンを用いた例で確認されている。

採血方法

モルモット、ラット及びマウスなどの小動物から採血を行う方法として眼窩、心臓穿刺、又はカニューレを用いる方法が一般に使われている。しかし、眼窩、心臓穿刺による採血法は、同一個体から繰り返し採血を行うことが困難であるため、薬物の血中濃度の推移を求める際には数匹の動物を1群とし、経時的に各群からの採血を行うなど、数多くの動物が必要である。また、カニューレを用いる採血方法は、手技の点から多数の動物を同時に扱えないという難点がある。これに対し紙採血法は操作が簡便で、同一個体より繰り返し採血することが容易であるため、使用する動物数を増やして代表的なパラメーターを動物種、あるいは投与群毎に得ることも容易である。

また、DBSを用いる方法では採血が容易であることもさることながら、均一に血液が吸着している部分を採れば血液の微量化を極めて容易に行える利点がある。採血用ろ紙の先端部に少量の血液を染み込ませた後、直径5 mmのディスクとし、分析する方法を報告^{8,9)}しているが、ディスク中に含まれる血液量は10 μ lであった。この方法ではシソマイシンを超微量分析に適したHPLCプレラベル法によって測定しているために10 μ lという微量の血液で定量可能であったが、今回検討したFPIA法では、ISPの定量下限が0.5 μ g/mlであるため血液の微量化を計ることは困難であった。

まとめ

採血法としての紙採血法、血中濃度測定法としてFPIA法を組み合わせることにより、小動物の個体毎の薬動力学的解析が可能となった。また、この方法は、マウス、ラット及びモルモットなどの小動物を用いて、クロソオーバー法による製剤間の生物学的利用能の比較も簡便に実施することができる優れた方法である。

引用文献

- 1) 津田良子, 藤本 尚, 田和理市, 広瀬信吾, 中江信義, 山田雅明, *Chemotherapy*, **36**, 787 (1988).
- 2) T. Fujimoto, R. Tawa, S. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1571 (1988).
- 3) T. Fujimoto, Y. Tsuda, R. Tawa, S. Hirose, *Clin. Chem.*, **35**, 867 (1989).
- 4) 刀根 薫, “プレイマイコンシリーズ BASIC,” 培風館, 1981.
- 5) H. Kurz, H. Trunk, B. Wetiz, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **27**, 1373 (1977).
- 6) 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二, “医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法,” 1985, p. 354.
- 7) J. W. Lamb, J. M. Mann, R. J. Simmons, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1**, 323 (1972).
- 8) T. Fujimoto, R. Tawa, S. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 174 (1989).
- 9) R. Tawa, S. Hirose, T. Fujimoto, *J. Chromatogr.*, **490**, 125 (1989).