血漿中クロナゼパム濃度測定における酵素免疫測定法の臨床評価^{*1}菱田 広, 高橋 朗, 佐治栄三^{*2}, 武田明夫^{*3}国立名古屋病院薬剤科^{*2}同臨床脳波センター^{*3}Evaluation of the Enzyme Immunoassay for the Quantitation of Clonazepam Concentration in Plasma^{*1}HIROSHI HISHIDA, AKIRA TAKAHASHI, EIZO SAJI^{*2}, and AKIO TAKEDA^{*3}Department of Pharmacy^{*2}, and Clinical Encephalographic Center, Department of Clinical Laboratory^{*3}, Nagoya National Hospital

(Received September 26, 1986)

We described the quantification of clonazepam in plasma using a semi-quantitative enzyme immunoassay reagent which rapidly identifies benzodiazepine overdosed in emergency cases. Since this reagent reacts with not only clonazepam but also several benzodiazepines and their metabolites, it is necessary to separate clonazepam from their metabolites before the measurement of its level. We excluded the interference of the clonazepam metabolites by using a sample preparation column. This method enabled the rapid quantification of clonazepam in plasma.

The between-run precision was established by 8 replicated analyses during 20 days, and the coefficient of variation values ranged from 8.0 to 14.8%. Assay precision of this method were shown to be lesser than that of the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The lowest measurable clonazepam concentration in plasma was about 10ng/ml in the case of 0.5ml of sample used. Concentrations of plasma clonazepam in 29 patients determined by this method and HPLC method were compared and showed good correlations in the order of 0.917 in the linear regression analysis. We concluded that this method was sufficiently sensitive, convenient, and practically acceptable for the conventional therapeutic drug monitoring.

Keywords—Enzyme Immunoassay; clonazepam; Anticonvulsant; high-performance liquid chromatography; plasma concentration

はじめに

ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬のクロナゼパムは、幅広いスペクトルを持つ付加的な抗てんかん薬として広く使用されている。またクロナゼパムの治療有効血中濃度範囲は、De Silva ら¹⁾によれば20~50ng/mlと報告されており、さらにミオクロニーに対しては15ng/ml以上、欠伸発作では20~30ng/ml、他の発作型では30ng/ml以上で効果がみられるとの報告もある²⁾。フェノバルビタール、フェニトインなどの他の抗てんかん薬治療

に、薬物血中濃度測定が必要とされているのと同様に、クロナゼパムも薬物治療をよりの確にする目的のため、薬物血中濃度測定が必要と考える。これまでクロナゼパムの血中濃度測定は^{3,4)}、ガスクロマトグラフィー (GLC)^{5,6)}、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁷⁻¹⁰⁾などにより行われている。しかしフェノバルビタール、フェニトインなどは、酵素免疫測定法 (EIA)、蛍光偏光免疫測定法により簡便に測定できる¹¹⁾のに比較して、クロナゼパムの血中濃度測定は試料の前処理が必要であったり、測定に時間を要するなどまだ簡便な測定法はない。したがって EIA による測定が可能になれば、測定機器の準備も容易であり、測定時間も短縮することができ、クロナゼパムの血中濃度測定が簡便になると考えた。

最近、ベンゾジアゼピンの半定量用 EIA 試薬が市販

*1 本報は日本薬学会106年会 (千葉市, 1986年4月) で発表。

*2,3 名古屋市中区三の丸4丁目1-1; 1-1, Naka-ku Sannomaru 4-chome, Nagoya-shi, 460 Japan

されたが、この測定試薬は、ベンゾジアゼピンの過量投与による副作用が疑われたときに、この副作用がベンゾジアゼピンによって引き起こされたものかどうかを緊急に確認するために用いられるものである。この EIA 試薬は、主としてジアゼパムを対象として開発されているが、他のベンゾジアゼピンに対しても交差反応性を有しており、クロナゼパムに対しても反応性を示すと考えられる。クロナゼパム以外の他のベンゾジアゼピンを服用していない場合に、クロナゼパムの代謝物を除去すれば、この試薬を利用してクロナゼパムの濃度を測定することが可能になるのではないかと考えた。そこで使用されている薬物抗体のクロナゼパムに対する反応性、クロナゼパムの代謝物による影響の確認、およびその除去法の検討を行い、この試薬を用いてクロナゼパムの濃度を測定することができた。

さらに HPLC によるクロナゼパム測定値との比較検討を行ったところ、高い相関が得られ、EIA によるクロナゼパム測定が可能となったので報告する。

実験の部

1. 試薬・機器

EIA 試薬は EMIT 血清ベンゾジアゼピンアッセイキットを用い、測定機器には Syva AC-5000 を用いた。HPLC 装置は Waters 製 6000A 型ポンプ、440型 UV 検出器、WISP710B オートサンプリングプロセッサ、730 型 Data module を用いた。標準薬物試薬としてクロナ

ゼパム、アミノクロナゼパム、アセタミドクロナゼパム（日本ロシュ、住友製薬）を用いた。

2. 薬物抗体のクロナゼパムおよびその代謝物に対する反応性

EIA の薬物抗体のクロナゼパムおよびその代謝物に対する反応性を検討した。クロナゼパムの濃度を $5\text{ng/ml} \sim 10\mu\text{g/ml}$ 、代謝物のアミノクロナゼパムの濃度を $10\text{ng/ml} \sim 10\mu\text{g/ml}$ 、アセタミドクロナゼパムを $1\mu\text{g/ml} \sim 10\mu\text{g/ml}$ とし、EIA の測定に用いる希釈用緩衝液で測定に影響しないと考えられる 0.055M Tris-塩酸緩衝液 (pH8.0) を用い調製した。薬物抗体に対する感受性は、各濃度試料 0.3ml を用い、測定試薬を加え反応後 15秒から60秒間の 340nm での吸光度変化量として表わした。

3. クロナゼパムと主要代謝物の分離

血清試料の前処理カラムとしてよく利用されている Bond Elute C_{18} (充填量 100mg) を用い、クロナゼパムと代謝物の分離法について検討した。クロナゼパムおよび代謝物のアミノクロナゼパムとアセタミドクロナゼパムを、薬物を含まない血漿に各 $0.5\mu\text{g/ml}$ になるように添加して試料とした。この試料 1ml を Bond Elute C_{18} に保持させ、蒸留水 2ml にて2回洗浄した後、アセトニトリルと蒸留水の混液 0.5ml にて3回溶出した。使用した混液のアセトニトリルの容量比率は、20, 25, 30%のものを調製し用いた。前処理カラムのクロナゼパムおよび代謝物の残存率を、用いた三種混液各々につい

Fig. 1. Typical Chromatograms of Drug Standard and Serum Extracts
A, B : clonazepam C, D : clonazepam metabolites
peak 1 : Clonazepam 2 : Nimetazepam (I.S.) 2 : Aminoclonazepam
4 : Acetamidoclonazepam 5 : Phenacetin (I.S.)

て求めた。残存率は、代謝物では各混液による溶出液中の代謝物を測定し、またクロナゼパムは各混液による溶出後、アセトニトリルで再度溶出させたときのアセトニトリル中濃度より、添加したクロナゼパムおよび代謝物の添加量に対する比率から求めた。なおクロナゼパムおよび代謝物濃度測定は HPLC にて行った。

Fig.1 に、クロナゼパムとその代謝物の標準及び患者血清試料のクロマトを示した。HPLC の条件として、カラムは NOVA PAK C₁₈ (Waters 製) を用い、クロナゼパムの移動相としてアセトニトリル/D-4 試薬(2/5) 混液を用い、また代謝物の測定の移動相にはアセトニトリル/D-4 試薬 (1/5) 混液を用いて分離を行った。クロナゼパムおよび代謝物の検出波長は 254nm, 感度0.005 aufs にて行った。

4. EIA によるクロナゼパム測定のための前処理操作

EIA によるクロナゼパム測定のための血漿前処理操作は、薬物抗体に対するクロナゼパムの感受性、およびクロナゼパムと代謝物の分離の結果に基づき Fig.2 に示す手順で行った。血漿 0.5ml を蒸留水にて希釈し、これを Bond Elute C₁₈ カラムに通し、薬物を保持させる。蒸留水 2ml にて2回洗浄した後、クロナゼパムの代謝物を除去する目的で25%アセトニトリル混液(アセトニトリルと蒸留水1:3混液) 0.5ml にて3回洗浄する。次いでアセトニトリル0.5ml にてクロナゼパムを溶出させた後、濃縮乾固する。残渣を 0.055 M Tris-塩酸緩衝液 pH8.0, 0.4ml に溶解し、その 0.3ml を EIA の試料とした。またクロナゼパムの検量線用標準液は、EIA の血漿前処理操作で濃縮乾固した試料を 0.055M Tris-塩酸緩衝液にて溶解していることより、クロナゼパム標準品を0.055 M Tris-塩酸緩衝液にて、血漿中クロナゼパムとして10, 25, 50, 75, 100ng/ml の濃度に対応するよう調製したものをを用いた。

5. EIA によるクロナゼパム測定の同時および測定間再現性

EIA によるクロナゼパム測定の再現性を検討するため、薬物を含まない血漿にクロナゼパムを添加し、10~100ng/ml の5段階の濃度をスパイクした試料を調製した。これらの試料を用いた場合の同時再現性では各試料を5回測定し、また測定間再現性は20日間にわたり、8回二重測定を行い検討した。

6. EIA と HPLC によるクロナゼパム服用患者血漿中濃度の比較

当院脳波センター受診のクロナゼパム服用患者29例の血漿中クロナゼパム濃度を、EIA と HPLC にて測定を

Plasma 0.5ml

added 2.5ml distilled water

Applied to the Bond Elute C₁₈

washed with 2ml distilled water 2times

Elution of Clonazepam metabolites

washed with 0.5ml acetonitrile : water (1:3)
3times

Elution of Clonazepam

added 0.5ml acetonitrile

Evaporated

Residue

added 0.4ml 0.055M Tris-HCl buffer (pH8.0)

Applied 0.3ml to EIA

Fig.2. Schematic Representation of The Sample Preparation Procedure from Plasma

EIA : EMIT tox Serum Benzodiazepine Assay

Instrument : Syva AC-5000

Setting : wavelength 340nm, delay a 15-second and a 60-second measurement period.

行い、両測定法の相関関係を調べ、比較検討を行った。

結果・考察

1. 薬物抗体のクロナゼパムおよびその代謝物に対する反応性

Fig.3 に示すように試料中の薬物濃度を横軸に、また薬物抗体の反応性として、EIA 試薬と反応後15秒から60秒間の吸光度変化量を縦軸にとった。その結果、クロナゼパム10~100ng/ml の濃度範囲は、治療濃度範囲を含んでおり、クロナゼパムの測定が可能ではないかと考えた。しかし Sjo ら¹²⁾により、主要代謝物であるアミノクロナゼパムの濃度がクロナゼパム濃度の1/3~3倍になると報告されている。そこでクロナゼパムの主要代謝物であるアミノクロナゼパムとアセタミドクロナゼパムのクロナゼパムに対する交差反応性も同様に検討した。その結果、アセタミドクロナゼパムはほとんど交差反応性がなく、測定には影響しないことが明らかとなった。一方アミノクロナゼパムにはかなりの交差反応性が認め

Fig. 3. Assay Reading of Clonazepam and It's Metabolites Against Concentration
 $\Delta A - \Delta A_0$: The change in absorbance over a 60-second measurement period after a 15-second delay of reaction

られ、アミノクロナゼパムは濃度 25ng/ml ではクロナゼパムとして 8.2ng/ml, 50ng/ml では 11.8ng/ml の測定値となる結果が得られた。このことから EIA によりクロナゼパムを測定するためには、クロナゼパムと主要代謝物を分離する必要があることがわかった。

2. クロナゼパムと主要代謝物の分離

20%アセトニトリル混液によるクロナゼパムと代謝物の分離では、代謝物が前処理カラムから十分に溶出されず、また30%アセトニトリル混液では代謝物はほぼ溶出されるが、クロナゼパムも溶出される結果が得られた。しかし25%アセトニトリル混液を用いたときには、Table 1 に示すように、3回溶出を行うことにより、クロナゼパムは保持されたまま代謝物のアミノクロナゼパムの残存率が0.3%、アセタミドクロナゼパムでは1.9%とほぼ分離することができた。

3. EIA によるクロナゼパム測定の同時および測定間再現性

同時再現性と測定間再現性の結果を Table 2 に示した。EIA の同時再現性の CV 値は、10ng/ml の試料で12.1%と比較的高い値を示したが、25~100ng/ml の試料では7.9%以下の結果が得られた。また測定間再現性の CV 値は、10ng/ml の試料で14.8%、25~100ng/ml の試料では9.3%以下の結果が得られた。同様に行った HPLC の同時再現性の CV 値は2.0~8.6%を示し、また測定間再現性では 10ng/ml の試料で11.8%、25~100ng/ml

Table 1. Absolute Recovery Values of Clonazepam and It's Metabolites Using Sample Preparation Column

Washing solvent; acetonitrile : water (1 : 3)

Compound	washing times		
	1	2	3
Clonazepam	99.7±4.2	100.4±3.7	99.8±1.3
Amino-clonazepam	53.9±6.8	5.0±0.3	0.3±0.4
Acetamido-clonazepam	58.5±5.8	7.1±1.5	1.9±0.3

(n=5)

Table 2. Within-run and Between-run Assay Precision Data for Clonazepam by EIA and HPLC

	Spiked (ng/ml)	E I A		H P L C	
		Measured (ng/ml)	C.V. (%)	Measured (ng/ml)	C.V. (%)
Within-run (n=5)	10	10.8	12.1	10.5	8.6
	25	25.2	6.5	26.1	4.0
	50	50.4	5.7	48.6	3.5
	75	75.2	4.1	77.4	2.0
	100	98.2	7.9	103.8	2.4
Between-run (n=8)	10	10.5	14.8	10.4	11.8
	25	24.5	9.3	25.6	5.5
	50	50.4	8.0	52.5	4.7
	75	73.1	8.1	76.5	4.6
	100	97.7	8.8	102.1	4.6

の試料では4.6~5.5%と、HPLC の方が EIA に比べ、同時および測定間再現性で若干よい結果が得られた。しかし EIA の測定間再現性は、治療域濃度範囲を含む25

Fig. 4. Correlation of Plasma Clonazepam Concentrations Determined by EIA and HPLC

~100ng/ml の試料の CV 値は10%以下であることから、臨床の場合における薬物モニタリングにおいては許容できる範囲の結果ではないかと考える。

4. EIA と HPLC によるクロナゼパム 服用患者血漿中濃度の比較

EIA と HPLC の両測定法による血漿中クロナゼパム濃度測定値の比較を行ったところ、Fig. 4 に示すようにその回帰直線は $y=1.086x+0.074$ で、相関係数 $r=0.917$ の結果が得られ、両測定法間に高い相関関係を認めた。また血漿中クロナゼパム濃度測定値の平均は EIA では $27.0 \pm 13.1 \text{ ng/ml}$ 、HPLC では $24.7 \pm 11.0 \text{ ng/ml}$ であり、EIA の方が9.3%高い測定値が得られる傾向がみられた。

以上のことから、EIA によるクロナゼパム濃度測定は HPLC に比較し測定値が若干高くなることと、再現性がやや悪いとの結果が得られたが、臨床の場合における薬物濃度測定法として十分利用できる範囲のものと考ええる。また、前処理操作を除いたクロナゼパムの測定時間が、HPLC では1試料15分要するのに比べ、EIA では

75秒程度で行うことができ、測定時間の短縮化が可能となること、また EIA では測定機器の準備が HPLC などに比べ容易であることなどから、EIA によるクロナゼパム測定は簡便性の点で優れた方法と考えられる。

今回使用した EIA の薬物抗体は、ジアゼパムを対象にしているため、クロナゼパムに対する反応性が不足していることもあり、よい測定再現性が得られなかったものとする。今後、クロナゼパムを対象にした薬物抗体が開発されれば、再現性も改善され、簡便な測定が可能になると考える。

謝辞 本研究に対しご援助いただいた第一化学薬品(株)、日本ロシユ(株)、住友製薬(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) J. A. F. de Silva, C. V. Pulglisi, N. Munno : J. Pharm. Sci., 63, 520 (1974).
- 2) C. Y. Huang, J. G. Mcleod, D. Sampson, W. J. Hensley : Proc. Aust. Ass. Neurol., 10, 67 (1973).
- 3) M. J. Eadie, J. H. Tyrer : "Benzodiazepine anticonvulsants, Anticonvulsant Therapy Pharmacological Basis and Practice", Churchill Livingstone, 1980 p. 236—262.
- 4) M. J. Eadie : Drug, 27, 328 (1984).
- 5) P. M. Edelbroek, F. A. Dewolff : Clin. Chem., 24, 1774 (1978).
- 6) W. Loscher, F. J. O. Al-Tahan : Ther. Drug Monit., 5, 229 (1983).
- 7) 菱田 広, 竹田信也, 米島隆一, 武田明夫 : 病院薬学, 10, 450 (1984).
- 8) E. H. Taylor, D. Sloniewsky, R. H. Gadsden : Ther. Drug Monit., 6, 474 (1984).
- 9) V. Rovei, M. Sanjuan : Ther. Drug Monit., 2, 283 (1980).
- 10) R. C. Williams, J. L. Viola : J. Chromatogr., 185, 505 (1979).
- 11) 菱田 広, 竹田信也, 米島隆一, 武田明夫 : 医療, 38, 612 (1984).
- 12) O. Sjo, E. F. Hvidberg, J. Naestoft, M. Lund : Europ. J. Clin. Pharmacol., 8, 249 (1975).