[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
技 術 報 告
19(5) 464-470 (1993)

Nephelometric Immunoassay 法によるフェノバルビタール

およびカルバマゼピンの血中濃度測定†¹

室 秀輝†², 龍原 徹†², 大坪健司†³

鳥取大学医学部附属病院薬剤部†²

九州大学医学部附属病院薬剤部†³

Quantitative Determinations of Phenobarbital and Carbamazepine in Serum by Nephelometric Immunoassay†¹

HIDEKI MURO†², TOHORU TATSUHARA†², KENJI OTSUBO†³

Department of Pharmacy, Tottori University Hospital†²

Department of Pharmacy, Kyushu University Hospital†³

(Received April 21, 1993)
(Accepted July 14, 1993)

An automated rate nephelometric assay (Beckman Array 360 System) for phenobarbital (PB) and carbamazepine (CBZ) was evaluated. The assay offers measuring ranges of 5-120 µg/ml serum for PB and 2-40 µg/ml for CBZ. The coefficients of variation for within-run and between-run precision for both PB and CBZ were <5.0%. Test results were not significantly affected by bilirubin-unconjugated (up to 19.2 mg/dl), bilirubin-conjugated (21.3 mg/dl), hemoglobin (540 mg/dl), turbidity (2070 units), or other antiepileptic drugs. The method produced satisfactory results in dilution tests. Quantitative results obtained by the Array 360 assay on serum samples from patients were compared with those obtained by the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and homogeneous enzyme immunoassay (EMIT) methods. The results correlated well with FPIA ($r=0.996$ and 0.981 for PB and CBZ, respectively) and EMIT ($r=0.994$ and 0.983). The Array 360 assay was concluded to be an appropriate and quick method for PB and CBZ determination.

Keywords—phenobarbital; carbamazepine; therapeutic drug monitoring; nephelometric assay

はじめに

フェノバルビタール (PB) およびカルバマゼピ

ン (CBZ) は抗てんかん薬として広く用いられている薬剤である。これら薬物の血中濃度測定にはガスクロマトグラフ法^{1,2)}, 高速液体クロマトグラフ法^{3,4)}などの報告もあるが, 一般には蛍光偏光免疫測定法 (FPIA 法)^{5,6)}, 酵素免疫測定法 (EMIT 法)^{7,8)}などによる全自動血中濃度測定装置が用いられ, 臨床的にもモニタリングが定着しつつある。

†¹ 本報は日本薬学会第113年会 (大阪, 1993年3月) で発表。

†² 鳥取県米子市西町36-1; 36-1, Nishi-Machi, Yonagoshi, Tottori, 683 Japan

†³ 福岡市東区馬出3-1-1; 3-1-1, Maidashi, Higashiku, Fukuokashi, 812 Japan

一方、免疫反応で生成する抗原抗体複合体による散乱光増加速度の最高変化速度 (peak rate) を捕らえ、抗原濃度に変換する Nephelometric immunoassay 法は、近年血中微量蛋白成分 (アポ蛋白⁹⁾, 免疫グロブリン¹⁰⁾など) の測定に応用されている。本法は Endpoint Assay に比べて処理能力に優れ、またバックグラウンドの影響を受けにくいとされている。

今回、Nephelometric immunoassay 法を原理とする PB および CBZ の血中濃度測定用全自動蛋白化学分析装置 Beckman Array 360 System (Array 360; Beckman 社) が開発され、試用する機会を得たので、その測定精度、共存物質の影響、他の抗てんかん薬との交差反応、希釈直線性などを検討するとともに、FPIA 法、EMIT 法による測定値との相関性についても検討したので報告する。

なお、本法の試薬の多価抗原はアポフェリチンにハプテン (PB, CBZ) を共有結合させたもので、抗体はヤギ血清より得られたものである。

実験の部

1. 測定試料

測定試料としては鳥取大学医学部附属病院において PB (100検体) または CBZ (69検体) の投

与を受けているてんかん患者の血清を用いた。

2. 装置および試薬

1) Array 360法 アレイ全自動蛋白化学分析装置 Array 360 System (ベックマン) を用いて測定した。試薬はベックマン社より提供されたフェノバルビタール試薬キット、カルバマゼピン試薬キット、薬物キャリブレーションキットおよび希釈用 Buffer 溶液を用いた。検量線は初日のみに作成し、以後の実験期間中 (2 週間) もそれを用いた。なお希釈用 Buffer 溶液以外の試薬は 6—8°C で保存した。

2) FPIA 法 TDX 全自動蛍光偏光免疫測定装置 (ダイナボット) を用い、試薬の他、キャリブレーション、コントロールを用いた。検量線は測定毎に作成した。

3) EMIT 法 エミットクリニカルプロセッサ Model CP-5000 (エミット) を用いて測定した。試薬はエミットフェノバルビタールアッセイ S, エミットカルバマゼピンアッセイ (モノクロナール), エミット AED キャリブレーションキットを用いた。検量線は測定毎に作成した。

4) その他の試薬 カルバマゼピン, エトスクシミド, フェノバルビタール, フェニトイン, プリミドン (いずれも和光純薬; 生化学用) および共存物質干渉チェック・A (国際試薬) は市販品

Table 1. Phenobarbital and Carbamazepine Precision Studies
Obtained by Array 360

	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)	n
Within-Run Precision				
Phenobarbital	19.5	0.65	3.35	10
	10.1	0.37	3.65	10
Carbamazepine	15.5	0.56	3.61	10
	7.4	0.34	4.57	10
Between-Run Precision				
Phenobarbital	20.6	0.80	3.87	6
	10.4	0.42	4.01	6
Carbamazepine	15.8	0.28	1.78	6
	7.4	0.32	4.36	6

Fig. 1. Interference from Bilirubin-unconjugated (A), Bilirubin-conjugated (B), Hemoglobin (C) and Turbidity (D) on Array 360 Assays for Phenobarbital

Fig. 2. Interference from Bilirubin-unconjugated (A), Bilirubin-conjugated (B), Hemoglobin (C) and Turbidity (D) on Array 360 Assays for Carbamazepine

を用いた。ゾニサミドは大日本製薬より提供を受けた。

結 果

1. 信頼性

PB および CBZ の各濃度 (PB, 20, 10 μ g/ml ; CBZ, 15, 7.5 μ g/ml) における Array 360 の測定値の日内再現性は PB または CBZ 添加血清を10回同時測定して検討した。変動係数は各濃度とも5%以下の良好な再現性が得られた (Table 1)。日間再現性は、2濃度の PB およびCBZ 添加血清について10日間にわたり6回測定して検討した。変動係数は各濃度とも5%以下の良好な再現性が得られた (Table 1)。

2. 共存物質の影響

定量を妨害すると考えられる血清中の共存物質として遊離ビリルビン、抱合型ビリルビン、ヘモグロビン、乳ビを用い Array 360 法への影響について検討した。PB および CBZ に対し、遊離ビリルビン 19.2mg/dl, 抱合型ビリルビン 21.3 mg/dl, ヘモグロビン 540mg/dl, 乳ビ2070度までいずれも影響はみられなかった (Fig. 1, 2)。

3. 希釈直線性

高濃度の PB (50, 30 μ g/ml) および CBZ (25, 15 μ g/ml) 添加血清を調製し、それぞれを希釈用 Buffer 溶液で希釈し、Array 360 法の直線性を

検討した。いずれもほぼ原点を通る直線が得られた (Fig. 3)。

4. 交差反応

他の抗てんかん薬との交差反応を検討する目的で、有効治療濃度の上限値と思われる PB (20 μ g/ml), CBZ (10 μ g/ml), エトスクシミド (100 μ g/ml), ゾニサミド (100 μ g/ml), バルプロ酸 (100 μ g/ml), フェニトイン (20 μ g/ml), プリミドン (12 μ g/ml) 添加血清を調製し、Array 360 法で測定した。PB (20.3 μ g/ml) で97.5—104.9%, CBZ (8.1 μ g/ml) で95.1—101.2%の測定値が得られ、他の抗てんかん薬との交差反応は認められなかった (Table 2)。

5. FPIA 法および EMIT 法との相関性

Array 360 法による PB の測定値 y_1 と FPIA 法による測定値 x_{11} との間には、回帰式 $y_1 = 9.974x_{11} + 0.348$, 相関係数 $r = 0.996$ ($n = 100$) (Fig. 4 A); EMIT 法による測定値 x_{12} との間には、回帰式 $y_1 = 0.970x_{12} + 0.438$, 相関係数 $r = 0.994$ ($n = 100$) (Fig. 4 B) が得られた。なお、測定値 x_{11} と x_{12} の間では、 $x_{11} = 1.017x_{12} - 0.204$, 相関係数 $r = 0.996$ であった。

Array 360 法による CBZ の測定値 y_2 と FPIA 法による測定値 x_{21} との間には、回帰式 $y_2 = 1.037x_{21} - 0.112$, 相関係数 $r = 0.982$ ($n = 69$) (Fig. 5 A); EMIT 法による測定値 x_{22} との間には、回

Fig. 3. Effect of Sample Dilution with Buffer on Linearity for Phenobarbital (A) and Carbamazepine (B)

Table 2. Cross-Reactivity of Other Anticonvulsant Drugs for Phenobarbital and Carbamazepine in the Array 360 Assays

Drug taken	Phenobarbital			Carbamazepine	
	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)
None	0	20.3	100.0	8.1	100.0
Carbamazepine	10	20.0	98.5	--	--
Ethosuximide	100	19.9	98.0	7.9	97.5
Phenobarbital	20	--	--	7.8	96.3
Phenytoin	20	21.3	104.9	7.7	95.1
Primidone	12	20.7	102.0	7.7	95.1
Valproic Acid	100	19.8	97.5	7.8	96.3
Zonisamide	50	20.1	99.0	8.2	101.2

Fig. 4. Correlations among the Array 360 System, Fluoresence Polarization Immunoassay (FPIA) (A) and Homogeneous Enzyme Immunoassay (EMIT) (B) for the Determination of Phenobarbital

帰式 $y_2 = 1.031x_{22} + 0.247$, 相関係数 $r = 0.984$ ($n = 69$) (Fig. 5 B) が得られた。なお、測定値 x_{21} と x_{22} の間では、 $x_{21} = 0.971x_{22} - 0.003$, 相関係数 0.973 であった。

考 察

Array 360 法における PB および CBZ の測定は日間・日内変動とも 5% 以下とほぼ満足できる結果であり、希釈直線性も良好であった。また他の抗てんかん薬との交差反応もほとんど認められず、血清中の共存物質の影響も受けなかった。

CBZ 投与患者の血清中には主代謝物である CBZ-10, 11-エポキシサイドが CBZ 濃度の約 15% 含まれていると報告されているが¹¹⁾、今回は Array 360 法に対するこのエポキシサイドの交差反応については検討しなかった。一方、FPIA 法によるエポキシサイドの交差反応性は 20% 程度¹²⁾、EMIT 法では CBZ 濃度 $8.0 \mu\text{g/ml}$ に対しエポキシサイド $50 \mu\text{g/ml}$ までは測定値に影響を与えないと Syva 社添付文書に記されている。Array 360 を用いて患者血清を測定した場合、従来広く用いられている FPIA 法および EMIT 法による測

Fig. 5. Correlations among the Array 360 System, Fluoresense Polarization Immunoassay (FPIA) (A) and Homogeneous Enzyme Immunoassay (EMIT) (B) for the Determination of Carbamazepine

定値との間に有意差が認められなかったことから Array 360 の測定値には十分信頼性があると考ええる。

測定に必要な患者の血清量は FPIA 法および EMIT 法では 50-60 μ l に対し、Array 360 法では 80 μ l とやや多いが (実質必要量; 60 μ l), 実用上は大差ないと思われる。

各メーカーが保証する PB および CBZ の測定下限値は、FPIA 法ではそれぞれ 0.65 μ g/ml および 0.5 μ g/ml に対し、Array 360 法では 5 μ g/ml および 2 μ g/ml で、EMIT 法と同等である。一方、測定上限値は FPIA 法と EMIT 法ではいずれもそれぞれ 80 μ g/ml および 20 μ g/ml に対し、Array 360 法では高濃度の試料の場合、自動希釈によりそれぞれ 120 μ g/ml および 40 μ g/ml まで測定できた。

Array 360 法による測定時間は 20 検体の測定に対し約 20 分と、従来の機器と同等であった。

また Array 360 法では、添付のキャリブレーションおよび抗血清のプログラムカードから標準曲線などの情報を読み取ることにより、1 点検量線や、長期間の検量線保持が可能である。

さらに、Array 360 法では CPU 上で測定項目・測定回数などを指示することにより、多種類

の項目を多数検体同時測定することが可能であり、日常検査への活用が期待される。

引用文献

- 1) K.W. Leal, A.J. Wilensky and R.L. Rapport, *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 214-218 (1978).
- 2) H.J. Kupferberg, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 284-286 (1972).
- 3) R.M. McDonald and L.L. Martan, *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 127-133 (1978).
- 4) M. Eichlbaum, L. Bertilsson, *J. Chromatogr.*, **103**, 135-140 (1975).
- 5) 宮本元昭, 平林真弓, 横溝協子, 伊藤機一, 丹羽正治, 最新検査, **2**, 76-81 (1984).
- 6) 武藤信治, 伊藤正博, 荒川光江, 太田拔徳, 岩田弘, 河合 忠, 臨床検査機器・試薬, **7**, 463-466 (1984).
- 7) G.H. Saunders and J.K. Penry, "Practical Applications of Drug Monitoring", Vol. 2, ed. by Gross, Townsend, Frank, Inc., New York, 1981, pp. 49-62.
- 8) J.J. MacKichan and H. Kutt, "Practical Applications of Drug Monitoring", Vol. 2, ed. by Gross, Townsend, Frank, Inc., New York, 1981, pp. 1-25.
- 9) 部谷多香美, 丸井洋二, 有末一隆, 甲田一馬, 林長蔵, 宮井 潔, 日本臨床検査自動化学会誌, **13**, 726-730 (1988).

-
- 10) 宮下徹夫, 石沢 天, 橋本安男, 田中 博, 岩田進, 河野均也, 臨床検査機器・試薬, **13**, 474-480 (1990).
- 11) M. Eichelbaum, K. Ekbom, L. Bertilsson, V. A. Ringberger and A. Rane, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **8**, 337-341 (1975).
- 12) 西原カズヨ, 太田拔徳, 武藤信治, 福山幸夫, 植松文江, 杉山都子, 清野昌一, 鷺坂昌史, 宮本侃治, 西村成子, 北村元仕, 仁科甫啓, 丹羽正治, 宮本元昭, 河合 忠, 臨床検査, **28**, 597-601 (1984).