(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
26(1) 110 — 115 (2000)

キャピラリー電気泳動法によりフェニトイン中毒を同定した一症例

牧野和隆*, 松永洋子, 中尾泰史, 片岡泰文, 大石了三
九州大学医学部附属病院薬剤部†

A Case Report of Phenytoin Intoxication Identified with Capillary Electrophoresis

KAZUTAKA MAKINO*, YOKO MATSUNAGA, YASUSHI NAKAO,
YASUFUMI KATAOKA and RYOZO OISHI

Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyushu University†

(Received August 30, 1999)
(Accepted November 15, 1999)

A 2-year and 5-month old male child was admitted to our hospital, due to signs of antiepileptic drug intoxication. He had been administered zonisamide and valproic acid for the treatment of epilepsy. One day after taking the medicines prepared in an outside pharmacy according to the doctor's prescription, he showed ataxia. The serum valproic acid concentration was within the normal therapeutic range, when measured using the fluorescence polarization immunoassay method (FPIA). We assayed the zonisamide concentration in patient serum using the capillary electrophoresis method. The peak of zonisamide was very low, but another extremely high peak was found. This peak was identified as phenytoin based on the migration time and absorption spectrum. We therefore concluded that the patient fell into phenytoin intoxication by taking a large amount of phenytoin that had been incorrectly prepared. The capillary electrophoresis method appears to be useful for therapeutic drug monitoring, especially in drug intoxication, because of its specificity of separation, simultaneous determination, speed of analysis, and small injection volume.

Key words — phenytoin, antiepileptic drug, intoxication, capillary electrophoresis

緒 言

当薬剤部では特定薬剤治療管理料の算定が可能となった1981年よりTDM業務を開始し、現在測定対象薬物は20種類を超え、年間総測定件数は約6,000件にのぼる。当初からTDM業務の中心を占めてきたのは抗てんかん薬で、現在の測定対象薬物はフェノバルビタール (PB)、フェニトイン

(PHT)、カルバマゼピン (CBZ)、バルプロ酸 (VPA)、およびゾニサミド (ZNS) である。抗てんかん薬の測定件数は年間総測定件数の約50%に相当するが、近年徐々に減少傾向にあり、早晚急増中の免疫抑制薬に中心的位置を譲られると思われる。

ところで、ZNSは他の抗てんかん薬と異なり簡便な蛍光偏光免疫法 (Fluorescence polarization immunoassay, FPIA 法) の測定キット¹⁾が発売されておらず、従って1996年に Enzyme linked im-

† 福岡市東区馬出3-1-1; 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, 812-8582 Japan

munosorbent assay (ELISA 法)²⁾にて測定を開始した。しかし ELISA 法は操作が煩雑な上、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法)³⁻⁴⁾を用いた測定値との比較検討において異常値を呈する症例を経験したため、一部 HPLC 法と併用して測定することとした。その一方で、HPLC 法は移動相に有機溶媒を使用し、特に業務で用いる場合使用総量がかなりの容量に及ぶため廃液処理や地球環境への影響が懸念された。そこで新しい分離・分析法として注目されているキャピラリー電気泳動法 (CE 法)^{5,6)}による ZNS および他の抗てんかん薬の血中濃度同時測定法を開発した^{7,8)}。本論文では、この CE 法を用いて中毒が疑われた患者の原因薬剤としてフェニトインを迅速に同定した一例を報告する。

症 例

患者は2歳5カ月の男児、体重15kg、身長92cm。抗てんかん薬による薬物療法を施行中。9月13日午後、小児科外来より抗てんかん薬の中毒が疑われるとのことで VPA および ZNS 血中濃度測定の緊急依頼があった。現病歴としては、当院院外処方せんに基づき9月5日保険薬局で調剤された薬品を服用した翌日より運動障害、歩行障害(フラフラ状態)が生じ、当日午後1時すぎに当院に緊急来院となった。院外処方せんの処方内容は以下のとおりである。

Rp.

バルプロ酸シロップ (VPA: 50mg/mL)
360mg 2×
ゾニサミド散 (ZNS: 200mg/g)
10mg 2×
28日分

VPA の血中濃度は FPIA 法により迅速な測定が可能であったが、当時 ZNS の測定は ELISA 法を中心に行っており、加えて本来の ZNS の測定曜日ではなかったため、準備から測定までかなりの時間を要すると予測された。そこで ZNS の CE 法による血中濃度測定を試みた。

方 法

VPA の血中濃度は FPIA 法により、ZNS の血中濃度は CE 法により、交付された製剤は篠田らの方法³⁾に準じた HPLC 法により分析した。CE 法における測定条件を以下に示す。

1. CE 装置⁹⁾

CE 装置には diode array UV detector (DAD) を備えた Hewlett-Packard 社製 HP^{3D} CE システムを用いた。キャピラリーカラムは同じく Hewlett-Packard 社のフューズドシリカ (溶融石英, 50 μ m × 有効長56cm) で、検出部位の内径を3倍に膨張させることにより、検出感度を上昇させたものを使用した。

2. 測定条件

泳動液には50mM SDS+10mM Phosphate buffer (pH8.0)、泳動前のキャピラリー洗浄およびコンディショニングとして泳動液を5分間泳動し、注入は50mmHgの加圧下2.0秒間、印加電圧は正の30.0kV、温度は30℃、検出波長は210nmを用いた。

3. 薬物添加標準血清および患者血清試料調製操作

キャリブレーション用薬物添加標準血清は市販ヒト血清またはボランティア血清に薬物標準溶液を添加して作製した。薬物添加標準血清および患者血清試料0.2mLに、内標準物質 n-propyl p-hydroxybenzoate 5 μ g/mL を含む酢酸エチル1mLを加えて攪拌、遠心した。上清0.5mLを窒素ガス下で蒸発乾固し、5%エタノール溶液50 μ Lで再溶解して CE 注入用試料とした。

結 果

1. CE 法の基礎的検討

CE 法による ZNS および他の抗てんかん薬の分離性、定性能、定量性に関する基礎的検討はすでに報告した⁷⁾。CBZ の代謝物を含む6種類の抗てんかん薬の分離は良好で、ZNS および PHT はそれぞれ4.2分、7.1分近傍に分離された (Fig. 1A)。

Fig. 1. Electropherograms Obtained from

(A) the extraction of serum spiked by standard mixtures of ethosuximide ($128 \mu\text{g/mL}$: 1), primidone ($16 \mu\text{g/mL}$: 2), zonisamide ($32 \mu\text{g/mL}$: 3), phenobarbital ($48 \mu\text{g/mL}$: 4), phenytoin ($32 \mu\text{g/mL}$: 5), n-propyl p-hydroxybenzoate (internal standard), carbamazepine-10, 11-epoxide ($10 \mu\text{g/mL}$: 6) and carbamazepine ($12.8 \mu\text{g/mL}$: 7); and

(B) the extraction of serum of the patient taking zonisamide (10 mg/day) and sodium valproate (360 mg/day). Migration time of each peak indicate that peak 3 and 5 correspond to zonisamide and phenytoin, respectively.

また薬物添加標準血清および患者血清における分離ピークのDAD吸収スペクトルを比較することにより各薬物の定性が可能であった。さらに、ZNS, PB, PHT および CBZ の定量性に関しては、

検量線の精度, 検出感度, 日内・日差誤差, HPLC 法・FPIA 法との比較検討により臨床上十分な定量性が示された (Table 1)^{1,3,4,7)}。なお, VPA は UV 吸収を持たないため CE 法による測定から除外した。

2. 中毒を疑われた患者の血中濃度測定

FPIA 法による VPA の患者血中濃度測定値は $62.2 \mu\text{g/mL}$, CE 法による ZNS の測定値は $5.0 \mu\text{g/mL}$ で, 両薬剤とも中毒濃度以下であった。しかし, CE 法による分析から得られた分離ピークに, 移動時間 (約 7 分) から PHT と推測される極めて高いピークが検出された (Fig. 1 B)。このピークから得られる UV 吸収スペクトル (Fig. 2 B) を PHT の標準品が与える吸収スペクトル (Fig. 2 A) と比較した結果, 同一であることから本ピークは PHT と同定された。そこで迅速性に優れた FPIA 法により再度患者血清中 PHT 濃度を測定したところ, $33.1 \mu\text{g/mL}$ と中毒域濃度を示した。この結果は即時主治医に連絡され, 採血からの所要時間は約 2 時間であった。

3. 交付された製剤の分析

該当散剤の一包の重量を測定したところ 0.473 g であった。そのうち 100 mg を秤量し, メタノール 10 mL に溶解した。メタノール溶液を蒸留水で 1000 倍に希釈し HPLC 法で測定したところ, メタノール溶液中 PHT 濃度は $8.71 \mu\text{g/mL}$ という結果が得られた。すなわち散剤 100 mg 中に 87.1 mg の PHT を含有するという概算が得られた。これを一包 0.5 g あたりに換算すると 0.4355 g に相当し, 調剤時の乳糖賦形量にほぼ相当した。なお, ZNS のピークもわずかに検出されたが, 散剤中の ZNS 量に相当するものと推察された。

4. 患者の経過と対処

本症例におけるその後の抗てんかん薬の血中濃度推移を Table 2 に示す。患者は 9 月 13 日に PHT の中毒が判明した時点で抗てんかん薬の服薬をすべて中止した。9 月 15 日の血中濃度測定で PHT は $21.5 \mu\text{g/mL}$ と治療域の上限付近の高値を示したが, VPA は $34.7 \mu\text{g/mL}$ と治療域以下に下

Table 1. Analysis Data of Antiepileptic Drugs by CE, HPLC and FPIA Methods

Anti-epileptic drug	Calibration curve with CE ^{a)} (range, $\mu\text{g/mL}$)	Detection limit ($\mu\text{g/mL}$)	Inter-day precision ^{b)}		CE vs. HPLC or FPIA ^{c)}
			C.V. (%)		
ZNS	$r=0.991(5-40)$	3.0 (CE) 0.1-0.5 (HPLC)	8.4- 9.3 (CE) 5.1- 9.1 (HPLC)		$r=0.981$ (HPLC)
PB	$r=1.000(7.5-60)$	2.5 (CE) 1.1 (FPIA)	9.9-11.1 (CE) 2.4- 2.8 (FPIA)		$r=0.992$ (FPIA)
PHT	$r=0.996(5-40)$	0.8 (CE) 0.5 (FPIA)	3.2- 7.3 (CE) 2.7- 3.6 (FPIA)		$r=0.998$ (FPIA)
CBZ	$r=0.997(2-16)$	0.6 (CE) 0.5 (FPIA)	5.8- 9.5 (CE) 2.0- 2.7 (FPIA)		$r=0.986$ (FPIA)

a) Internal standard method

b) Reproducibility of relative peak area

c) Linear regression analysis of antiepileptic drug levels determined by CE and HPLC or FPIA methods

Fig. 2. Absorption Spectrum of A and B Obtained as Slices from Data in Fig. 1 A and 1 B, respectively, Showing Phenytoin

がっていたので、VPAによる抗てんかん薬療法を再開した。9月19日にはPHTの血中濃度はFIPA法の測定感度以下まで減少し、一方VPAは治療域まで上昇した。

考 察

CE法は電場中の溶質の電荷や分子量の違いによる移動度の差を利用した分離・分析法である。従来のスラブゲルあるいはディスク電気泳動と異なり、25—150 μm の微細な孔径のキャピラリーを用いることにより、ジュール熱の発生が抑えられるとともに熱が効率よく放散されるので高電圧の印加が可能となる。その結果分析時間が短縮され、高い分離効率と分解能が得られる。また平面的な電気浸透流(EOF: 負に帯電したフューズドシリカ表面Si-O-に水和陽イオンが引き寄せられ、電圧を印加することによって生じる陰極への流れ)が発生するため理論段数が非常に高い。

その他、(1)試料の必要量が数 μL と微量である、(2)試料を前処理なしに直接分析できる、(3)測定系の開発が容易で、操作も簡便である、(5)有機溶媒を必要とせず、環境汚染が少ない、(6)

Table 2. Antiepileptic Drug Concentrations in the Patient Serum

Antiepileptic drug	Day	9/13	9/15	9/19
		($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
PHTa)		33.1	21.5	< 0.5
VPA ^{b)}		62.2	34.7	58.9
ZNS ^{c)}		3.0 1	< 3.0	< 3.0

a) FPIA method (detection limit: 0.5 $\mu\text{g/mL}$), b) FPIA method,c) Capillary electrophoresis method (detection limit: 3.0 $\mu\text{g/mL}$)

泳動コストが極端に低い、などの特徴を有する^{5,6)}。ZNSはFPIA法による測定キットが発売されていないため、ELISA法およびHPLC法により測定されている。初めて開発されたCEによるZNS測定法は、煩雑なELISA法に替わりうる方法である。またZNSの測定法として最も一般的であるHPLC法と比較した場合、簡便性、定量性で優れているとはいえないが (Table 1)、環境指向性、測定コストパフォーマンスの高さではより優れている。従って、ZNSの血中濃度が有効濃度域 (10–30 $\mu\text{g/mL}$) より極端に低い場合を除けば、ELISA法、HPLC法と同等あるいはそれ以上の有用性を持つと思われる。特に抗てんかん薬中毒時やサリチル酸治療時のように血中濃度が十分高く、さらに他の薬物も中毒原因として考えられる場合はその利点が一層発揮される¹⁰⁾。なお、CE法によるZNS定量法の測定感度が十分でない点に関しては、前処理法の改善、高感度セル¹¹⁾の使用などの検討を行っているところである。

本症例は本来乳糖で行うべきZNSの賦形が、何らかの原因でPHTにより行われたことが推察された。FPIA法およびELISA法は目的とする薬物以外の定量は不可能である。処方薬以外の抗てんかん薬を誤って摂取されていた本症例では、通

常ルーチンで行っているFPIA法およびELISA法による定量のみではPHT中毒を発見できず、HPLC法やCE法などクロマトグラフィーを原理とする分析が欠かせないことがわかった。特にCEは通常DAD装置を標準装備しており、Fig. 2に示すように、患者血清から得られる目的ピークの吸収スペクトルとすでに分離・登録済みの標準品スペクトルを比較できるので、定性能に優れている。著者らは臨床での中毒症例の多い7種類の抗てんかん薬や8種類の非ステロイド性抗炎症薬等について、泳動条件下でのUV吸収スペクトルを登録し、さらに他の医薬品も追加中である。

本症例では、採血後、血清分離 (10分)、前処理 (25分) および泳動 (15分) を含めて約1時間で分離が終了した。さらに原因薬物が抗てんかん薬であったことが迅速な定性、対応に結びついたが、他の薬物による中毒例でも、CE法による分析が有用であることが示唆された。CE法はさらに環境性やランニングコストの面でも有望な測定法である。従って、現在抗てんかん薬に加え、医療用や家庭用医薬品として汎用され、中毒の原因となりやすい薬物類のCEによるスクリーニング法の検討を進めている¹⁰⁾。

引用文献

- 1) TDx assay manual, Dinabot Laboratories.
- 2) K. Kaibe, S.Nishimura, H. Ishii, N.Sunahara, S. Naruto and S. Kurooka, *Clin.Chem.*, **36**, 24-27 (1990).
- 3) 篠田正彦, 秋田昌宏, 長谷川雅哉, 長谷川高明, 鍋島俊隆, *病院薬学*, **21**, 185-190 (1995).
- 4) K. Furuno, R.Oishi, Y.Gomita and K. Eto, *J. Chromatogr. B*, **656**, 456-9 (1994).
- 5) 本田進, 寺部茂編, “キャピラリー電気泳動 基礎と実際”, 講談社, 1995.
- 6) D.N.Heiger, “キャピラリー電気泳動入門”, Hewlett Packard, Waldbronn, 1994.
- 7) K.Makino, Y.Goto, M.Sueyasu, K.Futagami, Y. Kataoka and R. Oishi, *J. Chromatogr. B*, **695**, 417-25 (1997).
- 8) Y. Kataoka, K. Makino and R. Oishi, *Electrophoresis*, **19**, 2856-60 (1998).
- 9) D.N. Heiger, P. Kaltenbach and H.J.P. Sievert, *Electrophoresis*, **15**, 1234-47 (1994).
- 10) Y. Goto, K. Makino, Y. Kataoka, H. Shuto and R. Oishi, *J. Chromatogr. B*, **706**, 329-35 (1998).
- 11) Y. Mrestani and R. Neubert, *Electrophoresis*, **19**, 3022-5 (1998).