Homogeneous Enzyme Immunoassay 法と高速液体 クロマトグラフ法との対比^{*1}

中埜末春, 長谷川高明, 須原清治^{*2}, 奥村一忠^{*3}, 栗屋雅就^{*4}
名古屋大学医学部付属病院薬剤部^{*2} 名古屋大学医学部付属臨床検査技師学校^{*3}
名古屋大学医学部第2内科教室^{*4}

Comparison of Homogeneous Enzyme Immunoassay with High-pressure Liquid Chromatography*

SUEHARU NAKANO, TAKAAKI HASEGAWA, KIYOHARU SUHARA^{*2},
KAZUTADA OKUMURA^{*3}, and MASANARI AWAYA^{*4}
Pharmacy, Nagoya University Hospital^{*2}
School of Medical Technology, Nagoya University^{*3}
Second Department of Internal Medicine, Nagoya University^{*4}

(Received June 2, 1978)

Plasma theophylline level was assayed by EMIT-aad (Syva Corp.), which is a newly developed homogeneous enzyme immunoassay method. The results were compared with those obtained by previously reported high-pressure liquid chromatography (HPLC). Results obtained by the above 2 methods were quite compatible with each other. In a total of 93 specimens from 9 asthmatics, the correlation coefficient was 0.980, the slope 1.047 $\mu\text{g/ml}$, and intercept $-0.03 \mu\text{g/ml}$. CV of replicate analyses on a spiked sample by EMIT was below 7%, and the correlation coefficient of theophylline-spiked sample to EMIT was 0.990. EMIT procedure, in view of its clinical application for determination of plasma theophylline levels, has considerable advantages over hitherto available methods: it requires only 50 μl of plasma for a single determination, saves deproteinization and extraction, and is operated in a quite simple method in as short time as 2 min.

緒 言

臨床上、血中テオフィリン測定は迅速にして、正確であると同時に患者として乳幼児もありうるので、試料量ができる限り小さいことが必要である。1977年 Schneiderら¹⁾により開発された Homogeneous Enzyme Immunoassay 法によるテオフィリン測定は、きわめて試料量が小さく、分離あるいは除蛋白等の操作が不要のため迅速に、しかも操作を自動化することによって簡便に血中濃度測定ができる。

そこで著者らはこの Homogeneous Enzyme Immuno-

assay 法の信頼度を検討するために、近く市販が予定されている EMIT-aad (Syva Corp.—第一化学薬品株式会社、以下 EMIT 法と略)を用いて、テオフィリン治療患者9名から得た血漿93検体について測定すると同時に、著者らが先に報告した全く原理を異とする液体クロマトグラフ法(以下 HPLC 法と略)²⁾でも同時測定を行い、両者を比較検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 対象

1.1. 患者血漿

当院第二内科においてアミノフィリン治療を受けている気管支喘息患者9名を対象とし、これらの患者には採血前日からキサンチン類含有飲食物の摂取を禁じた。アミノフィリン注射液1アンプル(10ml中アミノフィリン

*1 本報を「血中テオフィリン濃度に関する研究」第2報とする。

*2,3,4 名古屋市昭和区鶴舞町 65 ; 65, Tsurumaicho, Showa-ku, Nagoya, 466 Japan

を250mg含有；ネオフィリン注，エーザイ）を約10分間かけて左腕に静注し，右腕より経時的に採血分離した血漿93検体についてテオフィリン濃度を測定した。

1.2. スパイクサンプル

EMIT 法，HPLC 法の信頼性を検するために，血清に既知濃度テオフィリンを添加したスパイクサンプル5本（Syva 社製—第一化学薬品株式会社から提供）について測定を行った。

2. 方法

2.1. HPLC 法

HPLC 法は，既報²⁾のごとく血漿 200 μ l からメタノールで抽出，遠心分離で除蛋白したのち，日本分光 FLC-350を用い，カラムとして強陽イオン交換樹脂（JASCO-

PACK, CV-01-500），波長 278 nm, 0.01M 酢酸ナトリウム（pH 6.3），流量 0.3 ml/min の条件で操作し，得られたピーク面積より濃度を算出した。

2.2. Homogeneous Enzyme Immunoassay 法

2.2.1. 原理

Fig.1 に示すように，酵素で標識された薬剤がその抗薬剤抗体と抗原抗体反応を起こすと，基質が酵素の活性部位に接近できないため酵素の活性は低下する。試料中の遊離薬剤は酵素標識薬剤と競合して抗体と結合し，抗体との結合によって起こる酵素の不活化を減少させる。酵素活性は試料中の遊離薬剤の濃度と相関するので，基質に対する酵素作用によって起こる吸光度変化（補酵素 NAD $\rightarrow$ NADH による）を読みとることにより遊離薬剤

Fig. 1 Principle of Homogeneous Enzyme Immunoassay³⁾

の濃度を測定できる。

2.2.2. EMIT テオフィリン Kit

- (i) 試薬A：テオフィリン抗体（羊 γ -グロブリン），基質（グルコース-6-リン酸），補酵素（NAD）
- (ii) 試薬B：酵素標識テオフィリン（グルコース-6-リン酸脱水素酵素-テオフィリン複合体）
- (iii) 緩衝液：0.05M Tris-HCl（pH 7.9）
- (iv) キャリブレーション：No.0；0 μ g，No.1；2.5 μ g，No.2；5 μ g，No.3；10 μ g，No.4；20 μ g，No.5；40 μ g。

(V) 専用グラフ用紙

2.2.3. 装置

- (i) 分光光度計（Gilford Stasar III）

波長設定；340 nm，温度設定；30 $^{\circ}$

- (iii) Syva Timer-Printer（Model 1500）

試料採取量：50 μ l，出容量：試料 50 μ l＋緩衝液250 μ l

3. 測定

キャリブレーションまたは患者血漿 50 μ l をピペッタ・ディリュータを用いて採取し，緩衝液 250 μ l で希釈し，その 50 μ l をさらに同様操作により再希釈した検液に試薬A 50 μ l＋緩衝液250 μ l を添加した後，さらに試薬B 50 μ l＋緩衝液 250 μ l を添加した後，直ちに分光光度計のフローセルに検体溶液を吸入させると，タイマープリンターにて自動的に15秒後と45秒後の吸光度差 ΔA およびその ΔA とキャリブレーション No.0 における ΔA_0 との差 $\Delta A - \Delta A_0$ がブ

リントアウトされる。さらに試料の再希釈以後の操作を繰り返して得た $\Delta A - \Delta A_0$ の2回の平均を実測値とする。テオフィリン濃度は試料の実測値を、キャリブレーション

測値および専用グラフ用紙を用いて作製した標準曲線にあてはめることにより求められる。標準曲線の一例をFig.2に示す。

Fig. 2 Standard Curve

結果および考察

1. 定量精度

既知濃度テオフィリンを含有する5種類のスパイクサンプルをEMIT法およびHPLC法にて測定し、それぞれ測定値とスパイク量との相関を求めた。EMIT法では相関係数 $r=0.990$ で、その回帰直線は $Y=0.97X+0.28$

0.28であり、HPLC法ではそれぞれ $r=0.987$, $Y=0.94X+0.79$ であった。(Fig.3.1)。またEMIT法とHPLC法との相関をみると、 $r=0.996$, $Y=1.03X-0.48$ で高い相関にあり、両法とも正確な方法であることを示し、Y切片の -0.48 はEMIT法が低濃度で低めに出る可能性を示している。(Fig.3.2)。

Fig.3.1 Correlation of Theophylline-spiked Sample vs HPLC and EMIT

Fig. 3.2. Correlation of EMIT to HPLC (spiked sample analyses)

2. EMIT 法の繰り返し精度および要熟練度

EMIT 法の繰り返し精度および要熟練度を検討するため、スパイクサンプルの1つを用いて、熟練者と非熟練者各1名が重複定量を行ったところ、その結果は Table 1 にみられるように、CV がそれぞれ6.8%, 5.0%と精度よく、分散の比較と平均値の比較には有意差が認められず、特別の訓練なしに簡便に行えることが判明した。

Table 1. Precision of EMIT Procedure

	N	Mean (µg/ml)	CV (%)
Technician	10	9.55	6.8
Not technician	15	9.61	5.0

P(<0.01) no significance

3. 両法による患者血漿中テオフィリン濃度測定値の比較

93検体の患者血漿を EMIT 法、HPLC 法にて測定し、X軸に HPLC 法、Y軸に EMIT 法によるテオフィリン濃度をプロットすると Fig. 4 のようになった。両者の相関係数 $r=0.980$ 、その回帰直線は $Y=1.05x-0.03$ となり非常に良い相関を示し、誤差分散 $R^2=0.52(\mu\text{g/ml})$ であった。5µg/ml 以下の濃度域では Fig.3.2 と同様に EMIT 法がやや低めになり、5~10µg/ml では高めになる傾向が見られるが、総じて両法は良い相関にあるといえる。

HPLC 法の測定濃度範囲が 0.5µg/ml 以上であるのに対し、EMIT 法では測定濃度範囲が 2.5~40.0µg/ml に設定されているため⁴⁾、低濃度域での定量性が劣ったものと考えられる。この点テオフィリンの有効判定基準

Fig. 4 Correlation of EMIT to HPLC

の相違により、比較的低い値を有効血中濃度としている報告⁵⁾もあるので検討する必要があると思われる。また、EMIT 法は吸光度を用いるため極端な高脂血または高度溶血の試料では正確な値を得難い。一方、HPLC 法では測定前のコンディショニングに時間を要し、抽出、除蛋白およびクロマトグラフの所要時間が1検体につき20分余りを要するのにくらべ、EMIT 法では1検体の測定所要時間は2分以下と有意に短かいので、その結果把握が迅速を要する临床上において、十分有用であることが認められた。

結 論

Homogeneous Enzyme Immunoassay 法と著者らが考案した HPLC 法によるテオフィリン血中濃度を、患者血漿 93 検体 および 5 種類のスパイクサンプルにおいて測定比較し、さらにスパイクサンプルを用いて EMIT 法の定量精度、繰り返し精度および要熟練度を検討した。両法の相関係数は患者血漿において 0.980、スパイクサンプルにおいて 0.996 であった。またスパイクサンプルのスパイク量と定量値の相関係数は EMIT 法では 0.990、HPLC 法では 0.987 であった。EMIT 法の繰り返し精度は CV が 7% 以下であり、熟練者と非熟練者の間に有意差はなかった。以上により EMIT による血中テオフィリン濃度測定法は、その簡便さおよび迅速性においては、従来から有用といわれ利用されているガスクロマトグラフ法や高速液体クロマトグラフ法よりはるかに優れ、その精度も临床上十分信頼できる方法であることが認められた。

参考文献

- 1) J. B. Gushaw, M. W. Hu, P. Singh, J. G. Miller, and R. S. Schneider : Clin. Chem., **23**, 1144 (1977).
- 2) 長谷川高明, 中埜末春, 須原清治 : 病院薬学 **4** (1), 12 (1978).
- 3) R. S. Schneider et al. : Homogeneous enzyme immunoassay for opiants in urine, Clin. Chem., **19**, 821 (1973).
- 4) Syva Corp. (ed.), "Emit-add" (1977).
- 5) 河島弘文 : アレルギー, **25**, 765 (1976).

消化性潰瘍……胃炎・腸炎に……

消化器官の攣縮緩解・微小循環改善剤

自社開発

エスペラン[®]錠

健保適用

消化性潰瘍の形成・進行
→治療には
消化管粘膜血流が
重要な役割を
はたしています

胃・十二指腸潰瘍・胃炎・腸炎にエスペランは……

- 消化管粘膜の微小循環改善作用により防禦因子を強化し損傷組織を修復します。
- 強い胃酸分泌抑制作用により攻撃因子を弱体化します。
- 強力な鎮痙作用により疼痛を速かに改善します。

生命の未来を考え
医薬の明日を創造する

富山化学

用法・用量、使用上の注意等、添付文書をご参照下さい。ESPERANTab.

東京都新宿区西新宿3-2-5