抗てんかん薬の血中濃度測定における Substrate Labeled Fluorescent
Immunoassay 法の信頼性の検討—高速液体クロマトグラフ法および
Homogeneous Enzyme Immunoassay 法との比較^{*1}

野田浩司, 高橋浩二郎, 浅原稔生, 峯本正夫, 梅津剛吉
産業医科大学病院薬剤部^{*2}

On the Reliability of Substrate Labeled Fluorescent Immunoassay
for the Determination of Blood Concentration of Antiepileptic
Drugs—Comparison with High-Performance Liquid Chromato-
graphy and Homogeneous Enzyme Immunoassay^{*1}

HIROSHI NODA, KOJIRO TAKAHASHI, TOSHIO ASAHARA,
MASAO MINEMOTO, and GOKICHI UMETSU

Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, University of Occupational
and Environmental Health, Japan (Sangyo Ikadaigaku)^{*2}

(Received July 7, 1982)

In order to examine the reliability of substrate labeled fluorescent technique (SLFIA method) using AMES TDATM Antiepileptic Drug Kit, phenobarbital and phenytoin concentrations in patients' plasma as well as in spiked serum samples were determined to compare with those obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) and homogeneous enzyme immunoassay technique (EMIT method). Results showed that SLFIA method is a useful technique for the determination of concentration of antiepileptic drugs in plasma to meet the clinical requirements.

Key words—phenobarbital; phenytoin; fluorescent labeled immunoassay; homogeneous enzyme immunoassay; high-performance liquid chromatography

緒 言

適正な薬物療法の確立を目的とした医薬品の体液中濃度測定は、最近、病院薬剤部業務の新たな領域として徐々に定着しはじめている。これに伴ってルーチン臨床分析手段の進歩もめざましく、特に抗てんかん薬については、正確で迅速かつ簡便な測定法が数多く開発されている。すなわち、今日では以前まで最も有力な手段であったガスクロマトグラフ (GLC) 法に加えて、前処理の簡

単な高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法、簡便かつ短時間に多くの検体を処理しうるエンザイムイムノアッセイ (EMIT, Syva—第一化学薬品株式会社; MARKIT, 大日本製薬) 法などが目的に応じて繁用されている。

最近簡便なホモジニアスけい光イムノアッセイ法を原理とした Substrate Labeled Fluorescent Immunoassay (SLFIA) 法に基づく測定用キットが開発され^{1,2)}、すでに血漿中テオフィリン濃度に関し、わが国においては HPLC 法による測定値とよく一致することが報告されているが³⁾、その他の薬物についてはまだ検討した例がない。そこで著者は、抗てんかん薬における SLFIA 法の臨床上の信頼性を検討するために、市販のエームス TDATM キット (マイルス三共株式会社) を用いて、血

^{*1} 本報の一部は第48回九州山口薬学大会で報告した (宮崎, 1981年10月)。

^{*2} 北九州市八幡西区医 生ヶ丘 1-1; 1-1, Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-shi, 807 Japan

液中のフェノバルビタール (PB) および フェニトイン (PHT) 濃度を測定し、HPLC 法と EMIT 法との相関性の比較を行い、比較的満足すべき結果を得たのでその詳細について報告する。

実験の部

1. 試料

患者検体

産業医科大学病院小児科、九州大学病院小児科および同精神神経科に受診中の PB ならびに PHT を、それぞれ単独服用あるいは併用中の外来でかん患者から得た血清または血漿を検体として用いた。

スパイクサンプル

SLFIA 法、HPLC 法および EMIT 法の本実験における信頼性を検討するために、健常男子の血清に PB を 2.5, 5.0, 20.0 および 60.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に、また PHT を 2.5, 5.0, 15.0 および 30.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるようにそれぞれ加えてスパイクサンプルを調製した。

2. 測定方法

SLFIA 法

試薬は、エームス TDATM フェノバルビタールキットおよびフェニトインキットを用いた。測定機器はけい光光度計 (Rf-510, 島津) を使用した。定量は次のようにして行った。試料あるいは標準液 (検量線用) のそれぞれ 50 μl を希釈緩衝液 2.5 ml で希釈し、その 50 μl をあらかじめ用意した希釈抗体酵素試液 1.5 ml に混和し、さらに Fluorogenic 試液 (FDR) 50 μl を添加し、室温で 20 分間放置後、Ex. 400nm, Em. 450 nm におけるけい光強度を測定した。

HPLC 法

試料調製は、Kabra⁴⁾ および Soldin^{5,6)} らの方法を、HPLC は著者らの方法^{7,8)} をやや変えて行った。試料 100 μl に蒸留水 100 μl を加え、ついでアセトニトリル 200 μl を加えて除蛋白し、遠心分離 (10,000 rpm, 10min) 後その上清をとり高速液体クロマトグラフの注入試料とした。測定機器：島津高速液体クロマトグラフ (LC-3A), UV 検出器 (SPD-2A, 島津)。測定条件：カラム, 30 cm $\times$ 4 mm (TSK-GEL LS-410 ODS)；検出波長, 210 nm；溶媒, 33% アセトニトリル-0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5)；流速, 1.0 ml/min；内部標準物質 (I.S.), フェナセチン。定量はクロマトグラフ用データ処理装置 (Chromatopak C-R1A, 島津) を用い、面積比により行った (Fig. 1)。

EMIT 法

Emit®-aed キット試薬 (Syva 社-第一化学薬品株式

Fig. 1. High-Performance Liquid Chromatogram of PB and PHT

Column: TSK-GEL LS-410 ODS, 30 cm $\times$ 4 mm I.D.; Mobile phase: 33% acetonitrile in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5); Flow-rate: 1.0 ml/min; Detection: UV 210 nm, 0.04 a.u.f.s.

会社)を用いて、コンピュータープリンター CP5000 を装備した Gilford Stasar III (Gilford Instruments, 米国) により測定した。

結果

1. SLFIA 法、HPLC 法および EMIT 法による測定値の同時再現性ならびに日間変動

一定濃度の PB および PHT を含むスパイクサンプルを、SLFIA 法、HPLC 法および EMIT 法で測定し、同時再現性を検討した。SLFIA 法の場合に、両薬物とも低濃度における測定値のバラツキがやや大きく、かつ PB サンプルは他の 2 方法に比べ添加量よりもいく分高い測定値を示したが、変動係数 (C.V.) が 7 および 9 % 以内の良好な結果が得られ、3 測定法とも満足すべき精度を示した (Table 1a および 1b)。

次に PB および PHT のそれぞれ 20 $\mu\text{g/ml}$ スパイク

Table 1a. Intra-Assay Variation of PB in Serum by SLFIA, HPLC and EMIT Methods

Method	Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$)							
	2.5		5.0		20.0		60.0	
	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)
SLFIA	2.62	6.83	5.46	4.95	22.54	2.36	66.12	3.23
HPLC	2.36	2.32	4.88	1.71	19.16	1.55	57.22	2.29
EMIT	2.64	3.39	5.06	1.08	19.54	2.19	56.52	1.70

(n = 5)

Table 1b. Intra-Assay Variation of PHT in Serum by SLFIA, HPLC and EMIT Methods

Method	Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$)							
	2.5		5.0		15.0		30.0	
	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)	Mean	C.V. (%)
SLFIA	2.32	8.83	4.70	5.83	14.58	4.51	27.44	3.24
HPLC	2.48	6.99	4.73	6.22	15.30	2.33	31.27	2.87
EMIT	2.64	2.07	5.02	2.18	14.38	1.93	28.88	2.45

(n = 5)

サンプルを用いて、SLFIA 法による測定値の日間変動を検討したところ、この場合も PB サンプルは添加量よりもやや高い実測値を与えたが、両薬物とも測定値の変動係数が 4 % 以下のきわめて良好な結果を示した (Table 1c).

Table 1c. Intra-Assay Variation of PB and PHT in Serum by SLFIA Methods

	Spiked concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)	n
PB	20.0	23.0	1.9	3
PHT	20.0	19.6	3.9	3

2. SLFIA 法ならびに HPLC 法による患者検体中 PB および PHT 濃度の比較

PB あるいは PHT を含む患者検体のそれぞれ 37 および 38 検体について、SLFIA 法と HPLC 法の両方法で得られた濃度を比較した。それらの相関係数は PB で 0.986, PHT では 0.987 といずれの場合も高い相関性を示した (Fig. 2).

3. SLFIA 法ならびに EMIT 法による患者検体中 PB および PHT 濃度の比較

同様に SLFIA 法と EMIT 法の両方法で得られた濃度を比較したところ、PB で相関係数 0.991, PHT で 0.983 といずれの場合も高い相関性を示した (Fig. 3).

4. HPLC 法ならびに EMIT 法による患者検体中 PB および PHT 濃度の比較

PB および PHT を含む患者検体のそれぞれ 40 および 38 検体について、HPLC 法ならびに EMIT 法で得られた濃度を比較したが、両測定法ともほぼ一致した値が得られ、相関係数が PB で 0.998, PHT では 0.983 ときわめて高い相関性を示した (Fig. 4).

考 察

スパイクサンプル中の PB および PHT を SLFIA 法、HPLC 法および EMIT 法により測定し、同時再現性を検討した結果、3 測定法とも良好な再現性を示した。ただし、SLFIA 法については HPLC 法および EMIT 法に比べて PB および PHT とも特に低濃度域において、やや高い変動係数を示し、かつ PB サンプルでは添加量に比べてやや高い測定値が得られた。この原因は、SLFIA 法が他の 2 測定法に比べてマニュアル操作段階がやや多く、人為的誤差が入りやすいためと思われる。したがって、高精度の分注器やディスポ器具を用いるか、反応液の攪拌に留意するなどして操作上の誤差を小さくする若干の注意をすれば、さらに良好な結果が得られると思われる。

一方、患者検体を用いた場合の SLFIA 法の結果を HPLC 法および EMIT 法の結果とそれぞれ比較すると、PB および PHT とも高い相関性を示し、3 測定法間に

Fig. 2. Comparison of Plasma PB and PHT Concentrations Determined by HPLC and SLFIA Methods

Fig. 3. Comparison of Plasma PB and PHT Concentrations Determined by EMIT and SLFIA Methods

顕著な差は認められなかった (Fig. 2 および 3)。

以上の結果ならびに測定機器として通常のけい光光度計を利用できること、また室温で測定可能であることを総合すると、新しい原理に基づく SLFIA 法は臨床上要求される範囲内で十分に目的を満足する方法であるといえることができる。

謝辞 本研究に際し、試料の一部を提供され、加えて有益なご助言をいただいた九州大学病院薬剤部堀岡正義教授、青山敏信助教授、中尾奉史氏ならびに樋口駿氏に

感謝いたします。また SLFIA 測定にあたりエームス TDATM フェノバルビタールおよびフェニトインキットをご提供いただいたマイルス三共株式会社に感謝いたします。

参考文献

- 1) L. M. Krausz, J. B. Hitz, R. T. Buckler, and J. F. Burd: Therap. Drug Monitor., 2, 261 (1980).
- 2) R. C. Wong, J. F. Burd, R. J. Carrico, R. T.

Fig. 4. Comparison of Plasma PB and PHT Concentrations Determined by HPLC and EMIT Methods

Buckler, J. Thoma, and R. C. Boguslaski: Clin. Chem., **25**, 686 (1979).

- 3) 長谷川高明, 小倉庸蔵, 山田茂樹, 中埜末春, 吉田政己: 薬理と治療, **9**, 75 (1981).
- 4) P.M. Kabra, B.E. Stafford, and L.J. Marton: Clin. Chem., **23**, 1284 (1977).
- 5) S.J. Soldin and J.G. Hill: Clin. Chem., **22**, 856 (1976).
- 6) S.J. Soldin and J.G. Hill: Biological/Bio-

medical Applications of Liquid Chromatography, ed. G. L. Hawk, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 559-570, 1979.

- 7) H. Noda, M. Minemoto, A. Noda, K. Matsuyama, S. Iguchi, and T. Kohinata: Chem. Pharm. Bull., **28**, 2541 (1980).
- 8) H. Noda, M. Minemoto, T. Asahara, A. Noda, and S. Iguchi: J. Chromatogr., **235**, 187 (1982).