不溶性抗体を用いた血清中カルバマゼピンとバルプロ酸濃度の 酵素免疫測定法の臨床への適用

西原カズヨ, 幸田幸直, 斎藤侑也, 中川富士雄, 田村善蔵
東京大学医学部附属病院薬剤部*

Clinical Application of Insolubilized Antibody-enzyme Immunoassay Technique for Determination of Carbamazepine and Valproic Acid in Serum

KAZUYO NISHIHARA, YUKINAO KOHDA, YUKIYA SAITOH,
FUJIO NAKAGAWA and ZENZO TAMURA
Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tokyo*

(Received March 26, 1982)

The insolubilized antibody-enzyme immunoassay technique (MARKIT method) was studied in terms of its clinical application in determination of carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) in serum. Each coefficient of variation for the three levels of CBZ or VPA was less than 8% within-run and between-run. The serum CBZ concentration determined by the MARKIT method was compared with that determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) or the homogeneous enzyme immunoassay technique (Emit method). There was good agreement between the MARKIT method and HPLC results, and the MARKIT method and the Emit method results, where the correlation coefficient was 0.999 and 0.998. The metabolite of CBZ, carbamazepine-10,11-epoxide, did not interfere with the MARKIT method under therapeutic conditions. The serum VPA concentration determined by the MARKIT method was compared with that determined by gas liquid chromatography (GLC) or the Emit method. There was good agreement between the MARKIT method and GLC results, and the MARKIT method and the Emit method results, where the correlation coefficient was 0.996 and 0.997.

Consequently the MARKIT method will be useful for the serum level monitoring to patients undergoing CBZ and VPA therapy.

Keywords—insolubilized antibody-enzyme immunoassay technique; carbamazepine; valproic acid; high-performance liquid chromatography; homogeneous enzyme immunoassay technique; carbamazepine-10,11-epoxide; gas liquid chromatography; serum level monitoring

臨床における抗てんかん薬の血清中濃度測定法として種々の方法が用いられているが、簡便性の面から酵素免疫測定法が広く利用されている。この酵素免疫測定法の一つとして、不溶性抗体を用いて血清(漿)中のフェニトイン (PHT), フェノバルビタール (PB), プリミドン (PRM) 濃度を測定する方法 (MARKIT 法) がある。¹⁻³⁾ さらにこの方法を用いて、血清中のカルバマゼ

ピン (CBZ) あるいはバルプロ酸 (VPA) 濃度を測定するキットが市販されているが、その有用性についてはまだ報告されていない。

本報告では MARKIT 法により測定した血清中 CBZ 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法) あるいは Emit 法の測定値と、血清中 VPA 濃度をガスクロマトグラフィー (GLC 法) あるいは Emit 法の測定値と比較し、臨床における血清中 CBZ と VPA 濃度測定への MARKIT 法の適用性を検討した。

*東京都文京区本郷 7 丁目 3-1; 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

実験の部

1. 対象

東京大学病院神経内科, 精神神経科, 小児科に入院中で, CBZ または VPA をそれぞれ単独投与, あるいは他の抗てんかん薬と併用中のてんかん患者を対象にした. 測定に用いた血清は上記患者の肘静脈から採血して分取した後, 測定時まで冷凍庫中に保存した.

2. 測定方法

1) MARKIT 法による血清中 CBZ および VPA 濃度測定

測定機器は酵素活性測定用 UV-60 E 形分光光度計 (日本分光メディカル株式会社) を用いた. マーキット® (大日本製薬株式会社) を用いた血清中 CBZ および VPA 濃度測定操作は既報¹⁻³⁾ と同様に行った. 測定には単一ロットのキットを用いた.

2) Emit 法による血清中 CBZ および VPA 濃度測定

Emit 法による血清中 CBZ および VPA 濃度測定は, 酵素活性測定用 UV-60 E 形分光光度計 (日本分光メディカル株式会社) を用いて既報⁴⁾ に従った. 測定には単一ロットのキットを用いた.

3) HPLC 法による血清中 CBZ および代謝物の濃度測定

血清中 CBZ およびその代謝物カルバマゼピン-10,11-エポキシド (CBZ-epoxide) 濃度は, 島津分光光度計 SPD-1 を接続した島津高速液体クロマトグラフ LC-2 (島津製作所株式会社) を用いた HPLC 法⁵⁾ により測定した.

4) GLC 法による血清中 VPA 濃度測定

血清中 VPA 濃度は GLC 法⁶⁾ により, 島津 GC-4 BMPF 形ガスクロマトグラフを用いて測定した. バルプロ酸ナトリウムの標準品は協和醗酵工業株式会社より提供を受けた.

3. MARKIT 法における薬物抗体の交差反応性

CBZ 抗体に対する交差反応性試験には, 薬物を含まない健康人の血清に PHT, PB および PRM をそれぞれ 30, 50, 20 μ g/ml 濃度になるように添加した血清および CBZ-epoxide を 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μ g/ml になるようにそれぞれ添加した血清を用いた. CBZ-epoxide は日本チバガイギー社より提供を受けた.

VPA 抗体に対する交差反応性試験には, PHT, PB, PRM および CBZ をそれぞれ 30, 50, 20 および 20 μ g/ml になるように添加した健康人血清を用いた.

結 果

1. MARKIT 法により測定した血清中 CBZ または VPA 濃度の再現性

MARKIT 法の定量範囲内にある 3 水準の濃度の CBZ または VPA を含む患者血清について, 測定値の再現性を検討した. 同一測定者による CBZ または VPA のそれぞれ 3 水準の測定値の変動係数 (C.V.) は 7% 以内であり良好な結果を得た (Table 1).

CBZ または VPA のそれぞれ 3 水準の濃度の血清について, 同一測定者が行った 10 日間の測定値の C.V. はいずれも 8% 以内であり良好な結果を得た (Table 2).

Table 1. Within-run Precision of Serum Carbamazepine (CBZ) or Valproic Acid (VPA) Concentration Determined by MARKIT Method

Specimen No.	Serum concentration		C.V. (%)	n
	mean (μ g/ml)	S.D.		
CBZ	1 2.74	0.17	6.25	10
	2 8.15	0.37	4.60	10
	3 12.97	0.57	4.38	10
VPA	1 19.28	0.66	3.44	10
	2 79.50	2.84	3.57	10
	3 114.90	4.53	3.94	10

Table 2. Between-run Precision of Serum Carbamazepine (CBZ) or Valproic Acid (VPA) Concentration Determined by MARKIT Method

Specimen No.	Serum concentration		C.V. (%)	n
	mean (μ g/ml)	S.D.		
CBZ	1 1.99	0.14	7.28	10
	2 5.38	0.27	5.02	10
	3 17.97	0.65	3.61	10
VPA	1 15.14	0.67	4.44	10
	2 36.13	1.75	4.85	10
	3 149.70	3.71	2.48	10

2. HPLC 法または Emit 法と MARKIT 法により測定した血清中 CBZ 濃度の比較

CBZ を含む患者血清 36 試料について, HPLC 法と MARKIT 法の両方法で測定した濃度を比較した (Fig. 1). その回帰直線は $y=1.045x-0.111$, 相関係数は 0.999, 測定値の MARKIT/HPLC 比の平均 $\pm$ 標準偏差

(S.D.) は 1.03 ± 0.05 であり, 両測定値はよく一致した。

CBZ を含む患者血清 24 試料について, Emit 法と MARKIT 法で測定した濃度を比較した (Fig. 2). その回帰直線は $y=1.026x-0.284$, 相関係数は 0.998, 測定値の MARKIT/Emit 比の平均 $\pm$ S.D. は 1.01 ± 0.05 であり, 両測定値はよく一致した。

Fig. 1. Comparison of Serum Carbamazepine (CBZ) Concentration Determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and MARKIT Method $y=1.045x-0.111$, $r=0.999$, $n=36$

Fig. 2. Comparison of Serum Carbamazepine (CBZ) Concentration Determined by Emit Method and MARKIT Method $y=1.026x-0.284$, $r=0.998$, $n=24$

3. GLC 法または Emit 法と MARKIT 法により測定した血清中 VPA 濃度の比較

VPA を含む患者血清 38 試料について, GLC 法と MARKIT 法の両方法で測定した濃度を比較した (Fig. 3). その回帰直線は $y=1.004x-0.510$, 相関係数は 0.996, 測定値の MARKIT/GLC 比の平均 $\pm$ S.D. は 1.00 ± 0.05 であり, 両測定値はよく一致した。

VPA を含む患者血清 24 試料について, Emit 法と MARKIT 法で測定した濃度を比較した (Fig. 4). その回帰直線は $y=1.021x-0.625$, 相関係数は 0.997, 測定値の MARKIT/Emit 比の平均 $\pm$ S.D. は 1.01 ± 0.06 であり, 両測定値はよく一致した。

Fig. 3. Comparison of Serum Valproic Acid (VPA) Concentration Determined by Gas Liquid Chromatography (GLC) and MARKIT Method $y=1.004x-0.510$, $r=0.996$, $n=38$

4. MARKIT 法における薬物抗体の交差反応性

PHT, PB および PRM をそれぞれ, 30, 50, 20 μ g/ml 含む血清では, CBZ 抗体に対する交差反応性は認められなかった。しかし, 代謝物である CBZ-epoxide 添加血清では, Table 3 に示したように CBZ 抗体に対する交差反応性が認められた。PHT, PB, PRM および CBZ をそれぞれ 30, 50, 20 および 20 μ g/ml 含む血清では, VPA 抗体に対する交差反応性は認められなかった。

考 察

MARKIT 法により測定した血清中 CBZ 濃度は,

Fig. 4. Comparison of Serum Valproic Acid (VPA) Concentration Determined by Emit Method and MARKIT Method
 $y=1.021x-0.625$, $r=0.997$, $n=24$

Table 3. Cross-reactivity of MARKIT Reagent with Synthetic Carbamazepine-10, 11-epoxide (CBZ-epoxide) Added to Drug-Free Serum

CBZ-epoxide added (A) (µg/ml)	CBZ-type response (B) (µg/ml)	B/A ratio
6.25	1.43	0.23
12.50	2.60	0.21
25.00	5.10	0.20
50.00	7.80	0.16
100.00	14.00	0.14

HPLC 法あるいは Emit 法による測定値とよく一致する (Fig. 1, 2) ことから、臨床の場における血清中 CBZ 濃度測定に MARKIT 法は十分適用できる。MARKIT 法における CBZ 抗体に対する CBZ-epoxide の交差反応性は、本報告における患者血清中 CBZ-epoxide 濃度の最高値 4.8µg/ml では 25% 程度である。一

方 HPLC により測定した結果、CBZ 単独投与患者の CBZ-epoxide/CBZ 濃度比は約 0.1 であったが、他の抗てんかん薬併用患者のそれは約 0.25 であった。これらのことから CBZ の治療濃度 (5~10µg/ml) の上限では CBZ-epoxide 濃度は 1~2.5µg/ml 程度にすぎないので、CBZ-epoxide の交差反応性はほとんど無視できると考えられる。

MARKIT 法により測定した血清中 VPA 濃度は、GLC 法または Emit 法による測定値とよく一致する (Fig. 3, 4) ことから、臨床において十分適用できる。

Emit 法による VPA 濃度測定に用いる試料は、血清およびヘパリン採血して得られる血漿に限られ、エチレンジアミン四酢酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩などを抗凝固剤として用いると抗原として作用するために測定値が高くなる。⁷⁾ 一方、MARKIT 法にはこのような作用を及ぼさないために抗凝固剤を使いわけることがない。⁸⁾ この理由は両キットで使用されている VPA に対するハプテン抗体の違いによるものと考えられる。

以上のことから MARKIT 法による血清中 CBZ および VPA 濃度の測定法は臨床に十分に有用なものである。

文 献

- 1) 渡辺昌祐, 久山千衣, 横山茂生, 久保信介, 岩井關之, 吉田周逸, 河田隆介, 宮前文彦, 渡辺洋一郎: 臨床精神医学, 8, 111 (1979).
- 2) 西原カズヨ, 幸田幸直, 斎藤侑也, 中川富士雄, 田村善蔵: 病院薬学, 6 (1), 29 (1980).
- 3) 名倉益男: 神経内科, 12, 287 (1980).
- 4) 渡辺昌祐, 相川秀夫, 松本 宏: 医学と生物学, 94, 165 (1977).
- 5) 西原カズヨ, 幸田幸直, 斎藤侑也, 中川富士雄, 田村善蔵: 病院薬学, 8 (3), 211 (1982).
- 6) 幸田幸直, 西原カズヨ, 斎藤侑也, 中川富士雄, 田村善蔵: 医学のあゆみ, 115, 813 (1980).
- 7) C. De Porceri-Morton, J. Turner and R. Bastiani: Emit-Valproic Acid Assay, Clinical Study No.80 Summary Report, Syva Co., Palo Alto, CA, U.S.A. 1980.
- 8) 金久保好男, 粕谷泰次, 斎藤侑也, 平山広喜, 峰正俊, 力久忠昭: 病院薬学, 8, 49 (1982).