限外濾過法による血清中遊離型バルプロ酸の定量^{*1}

藤田育志, 早勢伸正, 稲垣俊一, 橋高 毅

旭川医科大学医学部附属病院薬剤部^{*2}Determination of Serum Free Valproic Acid by Ultrafiltration Method^{*1}

YASUYUKI FUJITA, NOBUMASA HAYASE, SHUNICHI

INAGAKI, and TAKESHI KITUTAKA

Department of Hospital Pharmacy, Asahikawa Medical College Hospital^{*2}

(Received February 21, 1983)

The assay of free form of valproic acid (VPA) in serum was made on 71 serum specimens of epileptic patients. For the isolation of free VPA, ultrafiltration using micropartition system MPS-1 (Amicon Corp.) was applied and it was confirmed that this system was good in utility. For the lower levels of VPA as in ultrafiltrates, a modified single dilution technique was developed in EMIT assay instead of the standard double dilution procedure. The results were compared with those determined by the gas-liquid chromatography. Results determined by the above two methods were correlated well ($r=0.982$) and the regression line was $y=1.023x-0.143$. Ultrafiltration using MPS-1 is very simple and practical, because it requires small amount of serum sample. In 20 serum specimens from patients treated with VPA alone, the mean percentage of free VPA was $12.5 \pm 3.9\%$. The percentage of free VPA and total VPA levels showed a positive correlation ($r=0.808$).

Keywords—valproic acid; ultrafiltration; serum free valproic acid; homogeneous enzyme immunoassay; gas-liquid chromatography

はじめに

抗てんかん薬であるバルプロ酸(以下 VPA と略す.)は, 多くの薬物と同様に体内に吸収され一部が血漿蛋白と結合し, 残りは蛋白非結合型(遊離型)で存在している。遊離型が薬効発現に関係深く, これを測定することは臨床的意義が大きいと考えられる。しかしこの遊離型を測定するためには血中から蛋白結合型と遊離型を分離する必要がある。

血清中遊離型薬物を分離する方法¹⁾の一つとして限外濾過法があるが, 従来この方法は比較的多量の血清を必要とするため, 少量の患者血清を扱う臨床の場で実際に用いることは容易でなかった。著者らは限外濾過法の一

つであり少量の血清を処理できる遠心型蛋白結合試験器 MPS-1 (アミコン社製)を用いて, 患者血清から遊離型 VPA を分離し濃度を求めた。

本報告では, MPS-1 における限外濾過膜(メンブランフィルター)の蛋白分離性能, および VPA に対する影響ならびにメンブランフィルターの均一性について検討した。さらに血清中遊離型 VPA の定量は, 酵素免疫測定法(以下 EMIT 法と略す.)を利用した低濃度測定法によって行った。この方法とガスクロマトグラフ法(以下 GLC 法と略す.)とを比較しその相関性を調べた。また血清中 VPA 総濃度を EMIT 法および GLC 法で測定し遊離型%を算出したので報告する。

実験の部

1. 測定検体

旭川医科大学病院小児科において, VPA を単独あるいは他の抗てんかん薬と併用服用中のでんかん患者から

^{*1} 本報の一部は第29回北海道薬学会大会(札幌, 1982年6月)で報告した。

^{*2} 旭川市西神楽4線5号3番地11; 3-11, 4Sen 5Go, Nishikagura, Asahikawa-shi, 078-11 Japan

Table 1. Samples from Patients Treated with Antiepileptic Drugs

Samples	N
V P A	20
V P A + C Z P	9
V P A + C B Z	5
V P A + P B	12
V P A + P B + P H T	11
V P A + P B + C Z P	13
V P A + P B + P H T + C Z P	1
Total	71

V P A : Valproate Sodium

C Z P : Clonazepam

C B Z : Carbamazepin

P B : Phenobarbital

P H T : Phenytoin

採取した血清71検体を対象とした (Table 1). 検体は測定時まで冷凍庫中に保存した.

2. 血中遊離型 VPA の分離方法

Fig.1 に示す遠心型蛋白結合試験器 MPS-1 に血清を入れ, KUBOTA KN-70 型遠心分離器で毎分 3400 回転で30分間遠心分離を行い, 遊離型 VPA を分離した.

3. 遠心型蛋白結合試験器 MPS-1 の性能試験

1) メンブランによる血漿蛋白阻止率の検討試験
健康人血清の総蛋白量をビュレット法²⁾で測定し, この血清を限外濾過した濾液についてはモエレマンス

Fig. 1. Principle of Ultrafiltration

法²⁾で測定し阻止率を求めた.

2) メンブランの VPA に対する影響試験

VPA (協和醗酵工業株式会社) を生理食塩液で5段階の濃度 (20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に調製した試験液を限外濾過し, その濾液と濾過残液における VPA 濃度を EMIT 法で測定して比較した.

3) メンブランの均一性試験

同一ロットのメンブラン10枚を用いて患者のプール血清を限外濾過し, その濾液における VPA 濃度を EMIT 法で測定した.

4. EMIT 法による VPA の測定

Fig. 2. EMIT for Free VPA Levels

Fig. 3. Standard Curve for Free VPA Levels (EMIT)

1) 血清中 VPA 総濃度の測定

EMIT VPA Assay Kit (Syva 社製)を用い, 常法にしたがって操作し, EMIT 専用グラフ用紙による検量線から求めた。

2) 血清中遊離型 VPA 濃度の測定

血清検体 0.5—1 ml を MPS-1 に入れ遠心分離器で限外濾過し, その濾液を試験溶液とした。また, 健常人血清を同様に処理して得た濾液に VPA を加えて 0.5—50 μg/ml の濃度に調製し, これを標準溶液とした。Fig. 2 に示すように試験溶液および標準溶液を各々 50 μl とり, 緩衝液で 6 倍に 1 次希釈のみ行い, 後は常法にしたがっ

て測定した。標準溶液から得た検量線を Fig. 3 に示した。縦軸に吸光度差を対数目盛でとり, 横軸には濃度をとって二次曲線が得られた。

Fig. 4. GLC Method for VPA

Fig. 5. Influence of Membrane to VPA

5. GLC 法による VPA の測定

血清中 VPA 総濃度、ならびに遊離型濃度はいずれも Fig.4 に示すように掛川,⁹⁾ 幸田¹⁰⁾らの方法に準じて測定

した。すなわち、試料あるいは標準液を塩酸酸性とし内部標準物質としてジフェニルを加え、クロロホルムで振とう抽出し、遠心分離後クロロホルム層 2μl を日立 163

Table 2. Uniformity of Membrane

Membrane No.(Within Lot)	Ultrafiltrate Concentration
1	12.4 μg/ml (VPA, EMIT)
2	11.8
3	11.5
4	11.2
5	11.2
6	10.4
7	11.5
8	12.0
9	10.5
10	11.0
Mean	11.35
S.D.	0.63
C.V.	5.5 %

Fig. 6. Comparison of Total VPA Levels Determined by EMIT and GLC

型ガスクロマトグラフに注入し検量線から求めた。GLCの条件は、充てん剤として5% DEGS-H₃PO₄を用い、カラム温度130°, キャリアーガス N₂ 35ml/min, FID で分析した。

結果および考察

1. MPS-1 の性能

1) メンブランによる血漿蛋白阻止率

健康人血清の総蛋白量は 6.5 g/dl, 限外濾過した濾液のそれは 3 mg/dl で, 阻止率は 99.95% であった。

2) メンブランの VPA に対する影響

Fig.5 に示すように 5 段階の濃度を用いた 10 回の測定結果では濾液と濾過残液における VPA 測定値の相関係数は 0.995 と高く, VPA のメンブランへの吸着はほとんどないことがわかった。

3) メンブランの均一性

Table 2 に示すように同一ロットのメンブラン 10 枚を用いて行った測定結果では, 遊離型 VPA 濃度の平均値

が 11.35 μg/ml で, 変動係数は 5.5% でありメンブランの均一性が認められた。

2. EMIT 法と GLC 法における血清中 VPA 総濃度の比較

71 検体の血清中 VPA 総濃度を両法で測定した結果を Fig.6 に示したが, 高い相関関係が得られた。

3. EMIT 法と GLC 法における血清中遊離型 VPA 濃度の比較

48 検体の血清中遊離型 VPA 濃度を両法で測定した結果を Fig.7 に示したが, 同様に高い相関関係が得られた。EMIT VPA Assay Kit をそのまま用いた測定ではその測定可能範囲の下限が 10 μg/ml とされており, 低濃度域では日内変動の C.V. 値が大きく, 高めの値が得られる⁴⁾こと, また平衡透析して得られた遊離型濃度を測定すると, GLC 法よりはるかに高い値が得られる⁶⁾ことなどが報告されている。しかし著者らが行った低濃度測定法では, 10 μg/ml 以下の濃度についても GLC 法による値とよく一致した。

Fig. 7. Comparison of Free VPA Levels Determined by EMIT and GLC

4. 血清中 VPA 遊離型%の算出

EMIT 法による測定値から算出した結果を Table 3, Table 4 に示した. VPA 単独服用時での遊離型%の平均値および標準偏差は $12.5 \pm 3.9\%$ ($n=20$) であった. 他の抗てんかん薬併用時では 5.0% から 23.9% の範囲であり, PB, PB+PHT 併用時の遊離型%はいずれも VPA 単独服用時の値と比較して, 検定 (t-検定) の結果, 有意差は認められなかったが, CZP, CBZ, PB+CZP 併用時では有意差が認められた ($\alpha=0.01$). PB+PHT+CZP 併用時では検体数が少ないため比較できなかった.

5. VPA 単独服用時における血清中 VPA 総濃度と遊離型%との関係

Fig.8 に示すように, VPA 遊離型%は VPA の総濃度が大きくなるに従い増加し, 相関係数が 0.808 で正の相関関係が認められた. 血漿蛋白との結合定数の高い薬物では遊離型薬物の割合に濃度依存性がある⁷⁾といわれているが, VPA の場合にも同様の傾向が認められた.

結 論

血清中遊離型 VPA の分離に用いた遠心型蛋白結合試験器 MPS-1 は少量の試料でかつ短時間で分離でき, 方法も簡便であることから临床上実用性があると認めた. また EMIT を利用した低濃度測定法は, GLC 法との相関係数が 0.982 と高く有用であった.

血清中 VPA の遊離型%は, VPA 単独服用時では $12.5 \pm 3.9\%$ で Wulff,⁸⁾ Löscher,⁹⁾ Bruni¹⁰⁾ の報告に近い値が得られ, VPA の遊離型%は総濃度に依存していることが認められた. また他の抗てんかん薬との併用では, 少数例ではあるが VPA の遊離型%に対する影響は, 検定 (t-検定) の結果明らかには認められなかった. 今後は抗てんかん薬の相互作用を遊離型濃度のレベルでも検討する必要があると思われる.

謝辞 本実験にあたり検体を提供していただいた旭川医科大学附属病院小児科, 長 和彦講師, 沖潤一助手, また, 血清中総蛋白を測定していただいた検査部, 森山隆則技師に感謝します.

Table 3. Analytical Results (1)

Sample	Total VPA (EMIT)	Free VPA (EMIT)	% Free VPA	Mean $\pm$ SD
V P A	172.0 $\mu\text{g/ml}$	33.2 $\mu\text{g/ml}$	19.3 %	$12.5 \pm 3.9 \%$ ($n=20$)
	171.0	33.4	19.5	
	170.0	22.0	12.9	
	168.0	29.0	17.3	
	145.0	24.2	16.7	
	126.5	18.4	14.5	
	117.0	16.4	14.0	
	102.5	14.0	13.7	
	102.0	9.6	9.4	
	96.0	11.2	11.7	
	89.0	10.8	12.1	
	87.0	7.6	8.7	
	87.0	14.4	16.6	
	79.0	7.5	9.5	
	67.5	8.9	13.2	
	65.5	6.0	9.2	
	52.5	3.6	6.9	
	35.0	3.3	9.4	
	30.0	2.1	7.0	
	15.0	1.4	9.3	

Table 4. Analytical Results (2)

Sample	Total VPA (EMIT)	Free VPA (EMIT)	% Free VPA	Mean $\pm$ SD
V P A + C Z P	152.0 $\mu\text{g/ml}$ 142.0 99.0 94.0 87.5 86.0 81.0 74.0 56.0	31.8 $\mu\text{g/ml}$ 34.0 16.8 6.6 12.8 12.2 11.0 8.6 8.2	20.9 % 23.9 17.0 7.0 14.6 14.2 13.6 11.6 14.6	$15.3 \pm 4.9 \%$ (n=9)
V P A + C B Z	76.0 66.0 63.0 43.5 29.0	6.4 5.8 5.2 3.7 2.8	8.4 8.8 8.3 8.5 9.7	$8.7 \pm 0.6 \%$ (n=5)
V P A + P B	96.0 91.0 79.0 73.5 63.0 61.9 59.0 53.0 47.5 42.5 30.5	10.4 14.2 13.4 12.9 7.2 3.9 11.0 9.8 8.0 4.2 4.0	10.8 15.6 17.0 17.6 11.4 6.4 18.6 18.5 16.8 9.9 13.1	$14.2 \pm 4.1 \%$ (n=11)
V P A + P B + P H T	110.0 88.0 85.0 80.5 78.0 76.5 63.5 63.0 61.0 55.0 25.0	18.2 7.0 7.7 5.4 7.9 8.3 10.4 5.1 7.6 10.8 2.0	16.5 8.0 9.1 6.7 10.1 10.8 16.4 8.1 12.5 19.6 8.0	$11.4 \pm 4.3 \%$ (n=11)
V P A + P B + C Z P	126.0 118.0 115.0 105.0 100.0 94.5 89.5 84.5 77.5 67.0 55.0 50.0	6.6 6.1 7.0 6.0 9.2 7.1 10.6 7.4 3.9 4.7 5.7 5.3	5.2 5.2 6.1 5.7 9.2 7.5 11.8 8.8 5.0 7.0 10.4 10.6	$7.7 \pm 2.4 \%$ (n=12)
VPA+PB +PHT +CZP	115.0	14.8	12.9

Fig. 8. Relationship between % Free VPA and Total VPA Levels (EMIT)

文 献

- 1) H. Kurz, H. Trunk, and B. Weitz : *Arzneim.-Forsch.*, **27** (II), 1373 (1977).
- 2) 金井泉, 金井正光編: "臨床検査法提要," 金原出版, 東京, 1978.
- 3) 掛川紀夫, 宮越雅子, 鷺坂昌史, 清野昌一, 和田豊治: *臨床精神医学*, **7**, 321 (1978).
- 4) 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).
- 5) C. De Porceri-Morton, J. Turner, and R. Bastiani: "EMIT Valproic Acid Assay Clinical Study No. 80 Summary Report," Syva Co., Palo Alto, U.S.A., 1980.
- 6) N. Buchanan, P. Ponniah : *Med. J. Austl.*, **1**, 539 (1981).
- 7) M. C. Meyer, D. E. Guttman : *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895 (1968).
- 8) K. Wulff, H. Flachs, A. Würtz-Jørgensen, and L. Gram : *Epilepsia*, **18**, 149 (1977).
- 9) W. Löscher : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **204**, 255 (1978).
- 10) J. Bruni, J. M. Gallo, and B. J. Wilder : *Can. J. Neurol. Sci.*, **6**, 453 (1979).