薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (10) 960-966 (1982)

レーザーイムノケミカルシステム (i-PiT) による血中薬物濃度測定法の検討¹⁾

藤原邦彦,* 高橋勝雄, 池田 實

岩手医科大学薬剤部

Studies of Laser Immunochemical System (i-PiT) for Determination of Drugs in Serum¹⁾

KUNIIHIKO FUJIWARA,* KATSUO TAKAHASHI, and MAKOTO IKEDA

Hospital Pharmacy, Iwate Medical University, 19-1, Uchimarui,
Morioka-shi, Iwate, 020, Japan

(Received March 23, 1982)

The determination of drug concentration in the serum by laser immunochemical system (i-PiT) is a method based on the inhibition of immunoprecipitation by hapten (drug) when the antibodies can react with both hapten and polyhapten.

We studied the i-PiT method using formalin to stop the antigen-antibody reaction after a regular reaction period, because of the fact that when the antibody is treated with formalin the reactivity is completely lost.

At first, we investigated the formalin concentration in assay solution to inhibit the reaction completely and immediately after the addition of formalin. Consequently, we recognized that the reaction was inhibited almost completely at $35 \times 10^{-1}\%$ of formalin, and more completely at $50 \times 10^{-1}\%$. Thus, commercial formalin as an inhibiting reagent was added into the assay solution to contain about $50 \times 10^{-1}\%$ of formalin, the precision and accuracy of i-PiT method using formalin were studied in phenobarbital (PB) and phenytoin (PHT) assay. Hourly change, expressed as coefficient of variation, was less than 7.1%, and daily change for five days was less than 6.3% in PB and PHT assay. Mean recovery was 102.1% in PB assay, and 102.7% in PHT assay. The patients' serum specimens were analyzed, and the values correlated well to those determined by EMIT method. The coefficient correlation was 0.989 ($n=37$) for PB, and 0.980 ($n=29$) for PHT.

In view of good precision and accuracy, i-PiT method using formalin was recognized as a useful method for the determination of PB and PHT in the serum.

Keywords—laser immunochemical system; EMIT; phenobarbital; phenytoin; serum concentration; formalin; precision; accuracy

緒 言

レーザーイムノケミカルシステム (i-PiT) による薬物血中濃度測定法は、ハプテンとポリハプテンの両者が同一反応液中において共通の抗体に対して競合し合い、その結果生じるポリハプテン-抗体結合物 (沈降物) の量をレーザー光線による散乱光強度におきかえて測定し、薬物濃度を求める方法である。²⁾

しかし、競合反応の結果生じる沈降物は、反応時間の経過とともに増加することが西川らにより報告されており、³⁾ 検量線作成時と検体測定時の反応時間のずれが測定値に大きく影響することが示唆される。従って、より正確な測定値を得るためには、この反応時間のずれをなくすことが必要で、一定反応時間後に競合反応を停止させることが最も良いと考えられるが、この点に注目した検討例は現在のところ認められていない。

そこで、著者らはホルマリンがタンパク質である抗体と反応して抗原との反応性を失わせる⁴⁾ ことに着目し、反応停止液としてホルマリンを応用し、i-PiT による測定法の検討を試み、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 測定対象薬物 Phenobarbital (PB と略す) および phenytoin (PHT と略す) を測定対象薬物とした。
2. 測定機器 i-PiT (中外製薬社製): レーザーネフエロメーター, 専用キューベット, 濾過装置としてはメンブランフィルター (孔径 $0.45 \mu\text{m}$) および濾過器を用いた。

EMIT (Syva 社製): 分光光度計 (Gilford Stasar III), コンピュータ・プリンター (Syva CP-1000) およびピペッタ・ダイリュータ (Syva 1500 型) から構成されるセミ・オートマチックシステムを用いた。

3. 測定試料 ホルマリン添加による i-PiT の PB および PHT 測定法の再現性を検討するため, EMIT-aed キャリブレーションおよび aed コントロール血清 (第一化学薬品) を用いた。また, EMIT の測定値と比較検討するため, 被検血清として PB および PHT 投与を受けている患者血清を用いた。

4. 測定用試薬 i-PiT 測定法: ネフェロンテスト-フェノバルビタールおよびフェニトインの試薬キット, 薬物標準血清「A セット」(いずれも中外製薬) を用いた。また, 反応停止の目的で, 35—38% のホルムアルデヒドを含有する日本薬局方ホルマリン (丸石製薬) を用いた。

EMIT 測定法: フェノバルビタールおよびフェニトイン測定用キット, aed キャリブレーション (いずれも第一化学薬品) を用いた。

5. i-PiT 測定方法 従来の測定方法を一部改変して測定を実施した。すなわち, ピペッタ・ダイリュータを用い薬物標準血清および被検血清それぞれ 50 μ l をキット添付の検体希釈液で 21 倍希釈し, 50 μ l をキュベットに採取した。次に, ポリハプテン溶液 0.5 ml をこれに加え, 振とう混和し, ブランクを i-PiT で測定した。ブランク測定終了後, それぞれに抗体液 100 μ l を 15 秒間隔で加え, 十分に振とう混和し, 正確に 30 分間室温放置した。放置後ただちに, 反応液中のホルマリン濃度が約 $50 \times 14^{-1}\%$ となるようにホルマリン原液 (1 滴: 約 25 μ l) を添加し, 十分に振とう混和して i-PiT にて検体の散乱光強度を測定させ, あらかじめ標準血清を用いて得られた検量線をもとに, 内蔵コンピュータにより薬物濃度を算出させた。

6. EMIT 測定方法 EMIT の測定方法はマニュアル⁵⁾に従って行った。

結 果

I. 検量線および測定値に及ぼす反応時間の影響

ホルマリンを添加しない方法で, 反応時間は 15 分, 30 分, 40 分および 50 分とし, PB および PHT 検量線の経時変化を検討した (Fig. 1)。その結果, 西川らの報告の通り,³⁾ 時間経過にともない散乱光強度が増加し, 検量線は上方に移行することが認められた。すなわち, 反応時間が検量線に大きく影響し, ひいては測定値に影響を及ぼすことが考えられ, より正確な測定値を得るためには反応を停止させることが必要と考えられた。

II. ホルマリンの反応停止能

ホルマリンが抗体と反応して抗原との反応性を失わせることから,⁴⁾ i-PiT 法の測定原理である免疫沈降阻止反応の停止を目的としてホルマリンを応用することとし, ホルマリンの反応停止能を検討した (Fig. 2)。

反応停止液としてはホルマリン原液の 7, 10, 20, 25, 30, 35 および 50% 希釈水溶液など 7 濃度を試用し, 反

Fig. 1. Effect of Incubation Time on Phenobarbital and Phenytoin Standard Curve

Incubation time of each standard curve;
(a) 15 min, (b) 30 min, (c) 40 min, (d) 50 min.

反応液中のホルマリン濃度がそれぞれ 7×14^{-1} , 10×14^{-1} , 20×14^{-1} , 25×14^{-1} , 30×14^{-1} , 35×14^{-1} および 50×14^{-1} % となるように各停止液を 50 μ l 添加した. 試料としては, 標準血清 No. 1 (PB: 5 μ g/ml, PHT: 2.5 μ g/ml 含有) および No. 6 (PB: 80 μ g/ml, PHT: 30 μ g/ml 含有) を用い, 正確に 30 分間反応を行わせた後に各停止液 50 μ l を反応液に添加した. 次に, 添加後 5 分および 30 分の散乱光強度を測定し, 反応液中の各ホルマリン濃度における反応阻止率を計算した.

その結果, 両試料とも反応液中のホルマリン濃度 35×14^{-1} % において 98—100% の阻止率を示し, さらに, 50×14^{-1} % の濃度ではより完全な反応停止が認められた. このことは言い換えれば, 100% 反応を阻止するのに必要なホルマリン最小濃度は 35×14^{-1} % であることを示しており, それ以上の濃度, すなわち 50×14^{-1} % ではより完全に反応を阻止することを示している.

そこで, 著者らは反応液中のホルマリン濃度が約 50×14^{-1} % となるようにホルマリン原液を添加することとし, 測定値の経時変化を検討した (Fig. 3).

その結果, 同一キューベットで 10 回の連続測定による平均測定値は, PB 測定で 29.8—31.8 μ g/ml, PHT 測定で 16.2—16.7 μ g/ml であり, 経時的な測定値の変化はほとんど認められず, どの時点で測定しても安定した測定値を得られることが認められた.

以上の成績から, 以下においては反応停止液としてホルマリン原液を用いることとし, i-PiT 法の精度および正確性について検討を実施することとした.

III. 精度および正確性

1) 同時再現性 PB 測定では, 低, 中および高濃度の検体 3 種, PHT 測定では, 低および高濃度の検体 2 種を用い, 同時再現性について調べ, その結果を Table I に示した.

Fig. 2. Relationship between Formalin Concentration in Assay Solution and Inhibition of Reaction

—; phenobarbital, ---; phenytoin.

○; standard serum No. 2 (contains 5 μ g/ml of PB, 2.5 μ g/ml of PHT).

●; standard serum No. 6 (contains 80 μ g/ml of PB, 30 μ g/ml of PHT).

Inhibition(%) = $(\Delta N - \Delta N_0) \times 100 / \Delta N_0$

$\Delta N = (N_{30min} - N_{5min})$; increase of the scattered light intensity obtained with each formalin concentration.

$\Delta N_0 = (N_{30min} - N_{5min})$ at control; increase of the scattered light intensity obtained with control (formalin-free).

ホルマリン添加の方法では, 変動係数 (CV) は PB で 6.1% 以下, PHT で 7.1% 以下であり, ホルマリンを用いない方法では, PB で 7.3% 以下, PHT で 9.2% 以下であった.

2) 日差再現性 PB および PHT 測定における 5 日間の日差再現性について調べ, その結果を Table II に示した.

Fig. 3. Effect of Time after Formalin Addition on the Value of Phenobarbital and Phenytoin by i-PiT

●; phenobarbital, ○; phenytoin.

Each circle is the mean of 10 determinations and vertical bars represent standard deviation.

TABLE I. Within-day Precision of i-PiT Phenobarbital (PB) and Phenytoin (PHT) Assay^{a)}

Drug		Sample ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	No. replicated anal.	Range ($\mu\text{g/ml}$)	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	S.D. ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
Formalin addition	PB	Low (5.0)	10	5.0—6.3	5.7	± 0.348	6.1
		Med. (10.0)	8	9.9—11.4	10.7	± 0.468	4.4
		High (40.0)	10	36.6—42.9	40.9	± 1.849	4.5
	PHT	Low (5.0)	8	5.4—6.6	5.9	± 0.421	7.1
		High (20.0)	8	20.2—22.3	21.2	± 0.755	3.6
No formalin	PB	Low (5.0)	10	4.6—5.9	5.1	± 0.371	7.3
		Med. (10.0)	10	10.9—13.7	12.2	± 0.826	6.8
		High (40.0)	10	37.4—46.6	40.3	± 2.610	6.5
	PHT	Low (5.0)	10	4.4—6.2	5.1	± 0.468	9.2
		High (20.0)	10	18.8—21.6	20.0	± 0.862	4.3

^{a)} incubation time=30 min.^{b)} sample=EMIT aed-calibrator.TABLE II. Day-to-day Precision of i-PiT Phenobarbital (PB) and Phenytoin (PHT) Assay^{a)}

Sample ^{b)} No.	Formalin addition		No formalin	
	PB ($\mu\text{g/ml}$)	PHT ($\mu\text{g/ml}$)	PB ($\mu\text{g/ml}$)	PHT ($\mu\text{g/ml}$)
1	31.6	14.4	29.7	16.2
2	29.8	16.2	27.1	14.8
3	28.2	14.6	30.2	14.8
4	32.4	15.6	31.8	15.6
5	31.0	17.0	27.9	14.7
Mean	30.6	15.6	29.3	15.2
$\pm$ S.D.	1.469	0.975	1.674	0.588
CV (%)	4.8	6.3	5.7	3.9

^{a)} incubation time=30 min.^{b)} sample=EMIT aed-control serum.
concentration ($\mu\text{g/ml}$); PB: 30.0, PHT: 15.0.TABLE III. Analytical Recovery of Phenobarbital (PB) and Phenytoin (PHT) by i-PiT^{a)}

Drug		Sample ^{b)} A+B ($\mu\text{g/ml}$)	Calculation ($\mu\text{g/ml}$)	Found ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Mean (%)
Formalin addition	PB	5.0+10.0	7.5	7.5	100.0	102.1
		5.0+20.0	12.5	12.0	96.0	
		5.0+40.0	22.5	24.8	110.2	
	PHT	5.0+10.0	7.5	7.3	97.3	102.7
		5.0+20.0	12.5	13.2	105.6	
		5.0+30.0	17.5	18.4	105.1	
No formalin	PB	5.0+10.0	7.5	7.5	100.0	103.1
		5.0+20.0	12.5	12.7	101.9	
		5.0+40.0	22.5	24.2	107.4	
	PHT	5.0+10.0	7.5	7.7	102.7	99.7
		5.0+20.0	12.5	12.1	97.1	
		5.0+30.0	17.5	17.4	99.4	

^{a)} incubation time=30 min.^{b)} sample=EMIT aed-calibrator.^{c)} Each value of PB in formalin addition is the mean of two analyses and others is the mean of three analyses.

I. no formalin

II. formalin addition

Fig. 4. Correlation of Phenobarbital (PB) and Phenytoin (PHT) Concentration in Serum between i-PiT and EMIT

- A; phenobarbital
 $r=0.954$ ($p<0.01$), $y=1.06x-0.207$, std.error=3.13, $n=31$.
 B; phenytoin
 $r=0.945$ ($p<0.01$), $y=0.975x+1.583$, std.error=2.82, $n=23$.
 C; phenobarbital
 $r=0.989$ ($p<0.01$), $y=1.09x-0.313$, std.error=2.27, $n=37$.
 D; phenytoin
 $r=0.980$ ($p<0.01$), $y=0.933x+0.746$, std.error=1.47, $n=29$.

各測定における CV は、ホルマリン添加の方法で 6.3% 以下、ホルマリンを用いない方法で 5.7% 以下であった。

3) 添加回収性試験 PB および PHT 測定について、理論値と実測値をもとに回収率を計算し、添加回収性を調べた (Table III)。

その結果、ホルマリン添加の方法による平均回収率は、PB 測定で 102.1%, PHT 測定で 102.7% であり、ホルマリンを用いない方法では、PB 測定で 103.1%, PHT 測定で 99.7% であった。

4) EMIT 法と i-PiT 法との測定値の比較 i-PiT のホルマリン添加および無添加による方法での測定値と、EMIT 法での測定値とを比較し、結果を Fig. 4 に示した。

反応停止液としてホルマリンを用いない場合の i-PiT 法による測定値と EMIT 法による測定値との相関係数は、PB で 0.945, PHT で 0.945 であった。また、ホルマリンを添加した i-PiT 法による測定値と EMIT 法による測定値との相関係数は、PB で 0.989, PHT で 0.980 であった。

考 察 お よ び 結 論

i-PiT による薬物血中濃度測定法は、ハプテンとポリハプテンの両者が共通の抗体に対して競合反応し、その結果生じる沈降物の量をレーザー光線により測定して薬物濃度を求める方法であるが、この沈降物は、反応時間の経過とともに増加することが西川らにより報告されており、³⁾ 著者らの実験でもこれを確認した (Fig. 1)。

この事実は、最初の各標準血清測定時の反応時間と、その後の試料測定時における反応時間を正確に守る必要があることを意味しており、特に、一度に多くの試料を処理しなければならない場合には、この反応時間のずれが生じやすくなると考えられ、得られた測定値は不正確なものとなる恐れが示唆される。

しかし、一定反応時間後に、適当な反応停止薬により反応を停止することができるならば、この反応時間のずれはなくなり、標準血清を含む全試料の条件を均一化することができると考えられた。

そこで著者らは、ホルマリンが抗体の分子表面に分布する反応性アミノ酸残基を修飾して抗原との反応性を消失させる作用⁴⁾を有する点に注目し、停止薬としてホルマリンを応用することにより反応を停止できるのではないかと考え、検討を試みることにした。

まず、ホルマリン原液の 7, 10, 20, 25, 30, 35 および 50% 希釈水溶液を用い、ホルマリン添加後ただちに反応液中における抗原抗体反応を停止させるためのホルマリン濃度を検討した (Fig. 2)。その結果、 $35 \times 10^{-1}\%$ のホルマリン濃度においてほぼ完全な反応停止が認められ、さらに、 $50 \times 10^{-1}\%$ で反応停止はより完全であった。

そこで、反応液中におけるホルマリン濃度が約 $50 \times 10^{-1}\%$ となるようにホルマリン原液を添加することとし、PB および PHT 測定における測定値の経時変化について、添加 150 分後まで追跡したところ、いずれにおいても経時変化が少なく、ホルマリン添加後であればどの時期に測定を行っても変動の少ない測定値が得られると考えられた (Fig. 3)。

さらに、i-PiT 法によるホルマリン添加および無添加での PB および PHT 測定値と EMIT 法による測定値との比較を試みた (Fig. 4)。その結果、最小二乗法により得られた回帰直線より、ホルマリン添加、無添加にかかわらず、i-PiT 法による測定値は EMIT 法による測定値に比べて高値を示す傾向が認められた。また、回帰直線の標準誤差は、ホルマリン添加による i-PiT 法の方がホルマリンを添加しない場合よりも小さく、さらにまた、各々の場合の相関係数を比較したところ、相関係数に有意差は認められなかったが、ホルマリン添加による方法の方が EMIT 法との間により高い相関性が認められた。これらのことより、ホルマリン添加による方法は、正確性の面で、ホルマリンを用いない場合よりもよりすぐれた方法であると考えられた。

また、ホルマリン添加による i-PiT 法の同時再現性 (Table I)、日差再現性 (Table II)、添加回収性 (Table III) は、ホルマリンを用いない場合と比較して同等か、あるいはやや良好な成績が得られ、精度の面でもすぐれていると考えられた。

なお、ホルマリン添加による方法は、ホルマリンそのものによる測定値への影響も危惧されるが、EMIT 法との間に高い相関性が確認されていることから、その恐れは全くないか、あっても極めて少ないものと思われた。

一方、ホルマリンを用いない i-PiT 法においても、十分な正確性および精度を有している点で有用な方法であると考えられるが、この方法においては、標準血清を含む全試料の反応時間の均一化という点において、特に多

数の試料を処理する場合に問題となり、さらに、測定期間を通じて、反応時間の均一化のために時間的な制約をまぬがれない。しかし、ホルマリンを添加する方法では、一定反応時間後に反応を停止させることができるため、全試料の反応時間を均一化することができ、さらに、その後の操作における時間的制約も不必要となる。

以上のことより、ホルマリン添加による i-PiT 法は、実際の薬物血中濃度測定において、特に多数の試料を処理する場合には極めて有用であり、意義ある方法と考えられた。

謝辞 本研究に際し、i-PiT 装置の貸与に御協力をいただきました中外製薬 K.K. に深謝いたします。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会東北支部大会にて発表, 仙台, 1981 年 10 月.
- 2) T. Nishikawa, H. Kubo, M. Saito, *Clin. Chim. Acta*, **91**, 59 (1979); T. Nishikawa, H. Kubo, M. Saito, *J. Immunol. Methods*, **29**, 85 (1979).
- 3) 西川 隆, 斎藤正行, 鉢村和男, *Biomedical Journal*, **5**, 295 (1981).
- 4) B.F. Chow, W.F. Goebel, *J. Exp. Med.*, **62**, 179 (1935); H. Eagle, *J. Exp. Med.*, **67**, 495 (1938); 児玉桂三, 左右田徳郎, 佐橋佳一, 森高次郎, 上代皓三編, “生物化学ハンドブック,” 技報堂, 東京, 1977, p. 589.
- 5) Syva Corp. (ed.), “Emit-aed,” Package Insert, Palo Alto, Calif., 1980, pp. 14—16.