

ガスクロマトグラフおよび Homogeneous Enzyme Immunoassay Technique による Sodium Valproate 血中濃度の測定

兼子 直 本間 博明
SUNAO KNEKO HIROAKI HONMA

小林 弘明 佐藤 時治郎
HIROAKI KOBAYASHI TOKIJIRO SATO

弘前大学医学部神経精神医学教室 (主任 佐藤時治郎 教授)

小出 信雄 羽根田 敏
NOBUO KOIDE SATOSHI HANEDA

渡辺 準 武部 幸侃
JUN WATANABE YUKINAO TAKEBE

弘前大学医学部小児科学教室 (主任 横山 雄 教授)

(昭和56年1月22日 受付)

KEY WORDS : anticonvulsant
sodium valproate
plasma level
gas chromatography-
micromethod
immunoenzyme technic

序 言

抗てんかん剤の血中濃度測定はてんかんの薬物療法においては欠くべからざる臨床検査となり、治療有効性を高めていることは論¹⁻⁴⁾またないところである。

現在では临床上主要な抗てんかん剤のほと^{3,5-10)}んどが種々の方法により測定可能となっている。ことに sodium valproate (VPA) は小児てんかんにおいて高頻度に使用されつつあるが、最近、homogeneous enzyme immunoassay technique (EMIT) により血中濃度の測定が可能となり、その結果が報告¹¹⁾されている。著者らは従来のガスクロマトグラ

フ法 (GLC) と静脈からの採血が困難な新生児、小児の症例に対し、われわれが開発した GLC-micromethod によって血中 VPA 濃度を測定し、これらの方法による測定値と EMIT による測定値を比較してそれぞれの手技の限界と臨床応用可能性を検討したのでここに報告する。

測定方法

a) GLC 法^{10,12)}

血清 0.5ml を塩酸性 (pH 1-2) とし内部標準 diphenylchloroform 溶液 (50 µg/ml) 0.5ml を加え30秒間攪拌する。次に、3000回転/分で10分間遠心分離した。この chloroform 層 3 µl を FID 装備の GLC (日立063) にて測定した。測定条件は内径 3mm, 長さ 2m のガラスカラムに 5% diethylene glycol + 1% H₃PO₄, Chromosorb W, (AW), HMDS, 60-80 mesh を充填し、カラム温度

180°C, 試料注入口温度 300°C, 検出器温度 250°C, N₂ 流量 40ml/min とした. VPA の濃度は内部標準との高さの比から求めた. 血清に対する VPA の添加回収率は 100±1%

Table 1 Assay procedure of plasma VPA using GLC-micro method

Capillary blood from an ear-lobe (finger-tip, heel)
↓
Centrifuge at 10,000 rpm for 5 min
↓
50 μl of plasma +150 μl of TCA +200 μl of diphenylchloroform(50μg/ml)
↓
Mix with vortex mixer
↓
Centrifuge at 1500 rpm for 10 min
↓
Measurement with GLC

で 1μg/ml~250μg/ml の範囲で直線性を示した.

b) GLC-micro 法

耳血をヘマトクリット管2本に採血し, 10,000回転/分で5分間遠心し血漿を分離する. 次に血漿部分を切離し, 一方を putty (Hemat-seal, KDS) で閉じ, 分析するまで冷所保存する. 測定は 50μl の血漿に 10% TCA 150μl, diphenylchloroform (50μg/ml) 200μl を加える. これらの操作は氷水中で行う. ついで vortex mixer にて 10秒間3回攪拌し1500回転/分, 10分間の遠心後 chloroform 層の 2.5~3μl を GLC にて測定する. GLC の条件は前述 a) の方法と同様である. 抽出操作は表 1 に GLC 法および GLC-micro

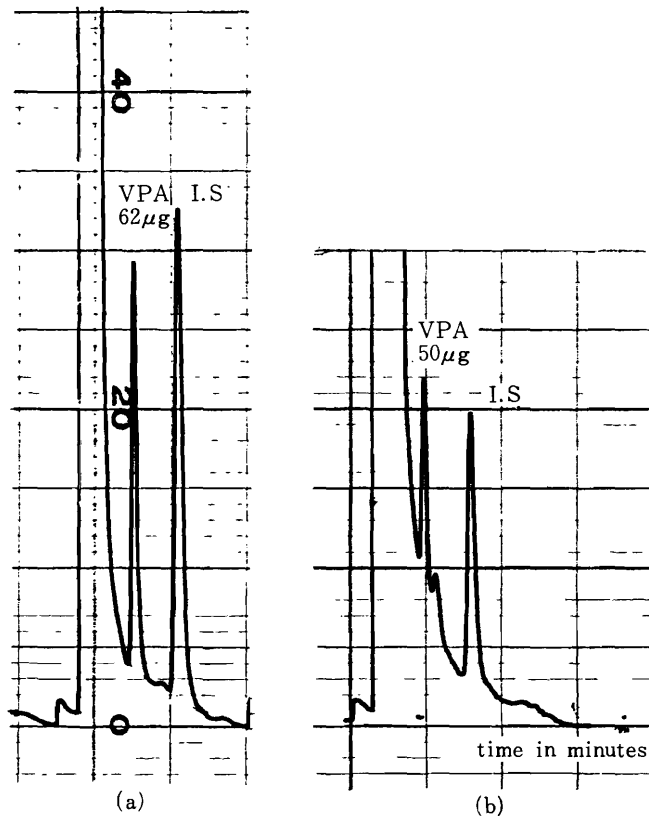


Fig. 1 Gas chromatograms of VPA with internal standard taken from routine determinations of plasma of epileptic patients. Gas chromatogram of (a) was determined by GLC and that of (b) was determined by GLC-micro-method. The internal standard (I. S) is diphenylchloroform.

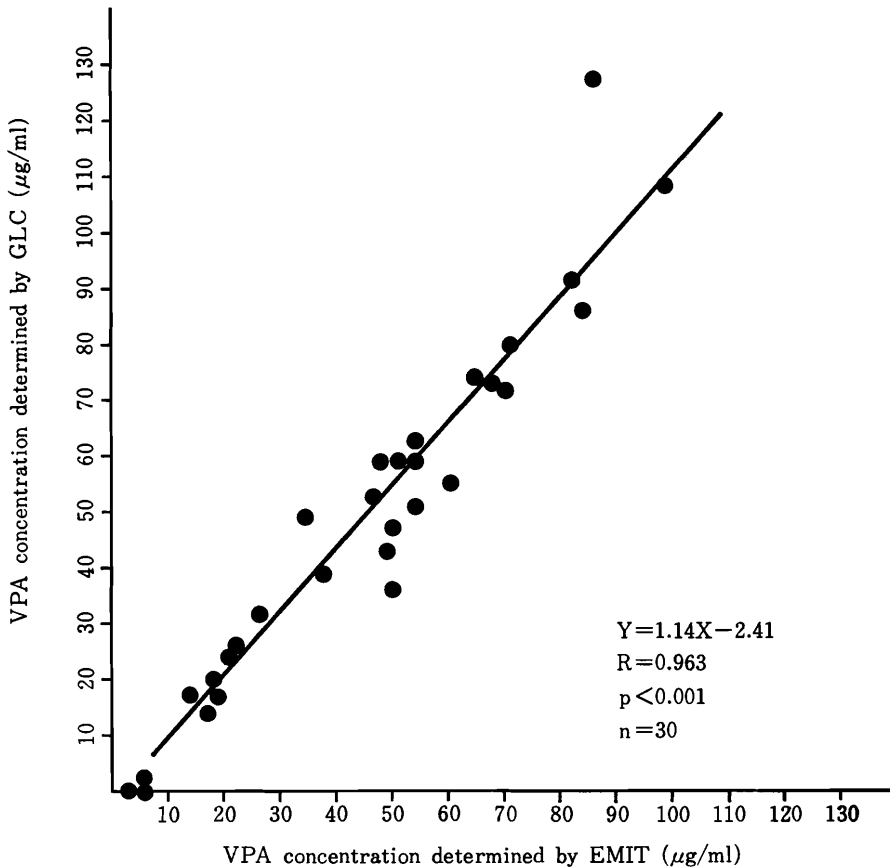


Fig. 2 Comparison of plasma VPA concentrations determined by GLC and EMIT.

法によるガスクロマトグラムを図1に示した。VPA、内部標準の保持時間はそれぞれ1分、1.7分であった。

c) EMIT

測定法は EMIT による他の抗てんかん剤の測定と同様で、EMIT-aed¹³⁾ 測定に準じて測定した。まず血漿 50 μl に試薬Aを加える。試薬Aには VPA に対する抗体と、標識酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G 6 PDH) の基質が含まれているので抗体の働きにより VPA のみが特異的に抗体と結合する。次に、G 6 PDHで標識された試薬Bを加える。標識された薬剤はフリーの抗体の結合部位すべてに結合し、その結果、酵素活性は比例的に低下する。したがって残存酵

素活性は、血漿中の VPA 濃度に直接関係する。この酵素活性の増減を補酵素 NAD が NADH に変換される時に生ずる反応液の吸光度変化として読みとる。この定量に用いている標識酵素は *leuconostoc mesenteroides* 起源であり、補酵素 NAD と特異的に反応するため、血漿中の G 6 PDH の干渉を避けることができる。

結 果

(1) GLC 法, GLC-micro 法および EMIT による静脈血内濃度測定値の比較。

VPA 服薬中の患者30名の肘静脈から採血し、GLC 法に 0.5ml, GLC-micro 法および EMIT に各 50 μl の血漿を使用した。図2

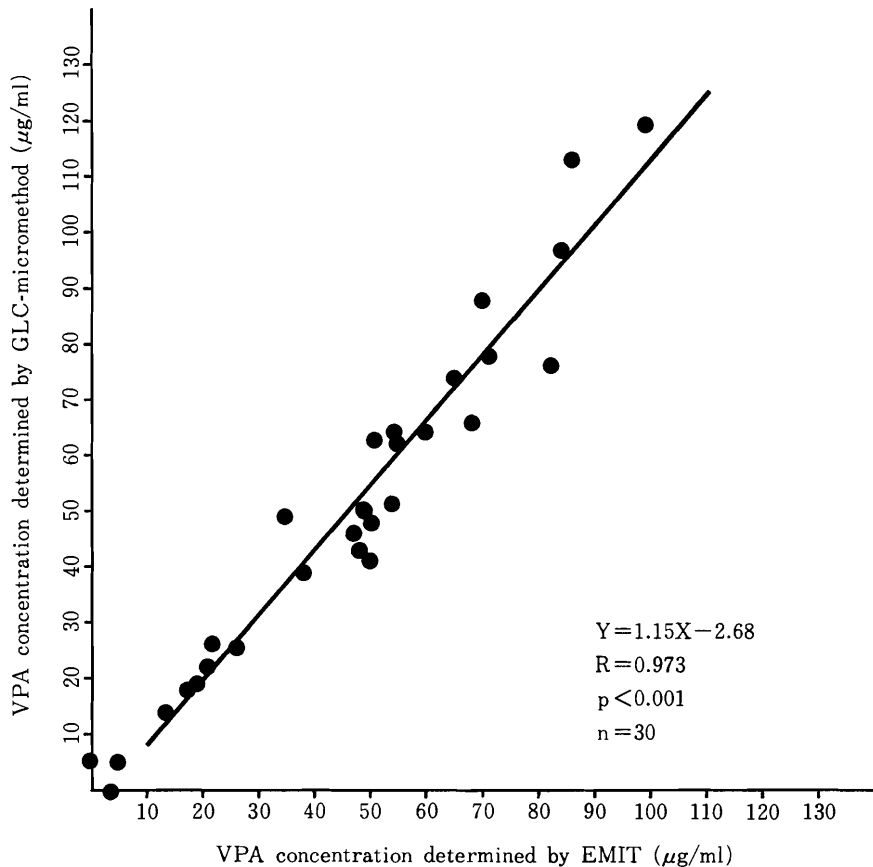


Fig. 3 Comparison of plasma VPA concentrations determined by EMIT and GLC-micromethod.

に GLC 法と EMIT で得た測定値を示した。横軸は EMIT の値，縦軸は GLC 法による値で，両者による回帰直線は $Y=1.14X-2.41$ ，相関係数 $R=0.963$ ($P<0.001$) であった。

図3は GLC-micro 法と EMIT による測定結果であるが，縦軸に GLC-micro 法による値，横軸に EMIT による測定値を示した。両者による回帰直線は $Y=1.15X-2.68$ で相関係数 $R=0.973$ ($P<0.001$) であった。また GLC 法と GLC-micro 法の回帰直線および相関係数は $Y=0.99X+0.04$ ， $R=0.971$ ($P<0.001$) であった。

EMIT による測定可能範囲は $5\sim150\mu\text{g/ml}$ で，GLC-micro 法によるそれは $7\sim250$

$\mu\text{g/ml}$ であった。

(2) GLC 法，GLC-micro 法による耳血と静脈血測定値の比較，

協力の得られた入院患者10名の耳血，肘静脈血を同時に採取した。耳血は GLC-micro 法，静脈血は GLC 法および GLC-micro 法で測定した。

図4は静脈血を GLC 法と GLC-micro 法で測定した結果で，GLC 法による値を縦軸に，GLC-micro 法による値を横軸にとった。この回帰直線，相関係数は $Y=1.0X-1.51$ ， $R=0.995$ ($P<0.001$) であった。

図5は GLC-micro 法による耳血（横軸）と静脈血（縦軸）の測定値を示している。これらの回帰直線，相関係数は $Y=0.98X$

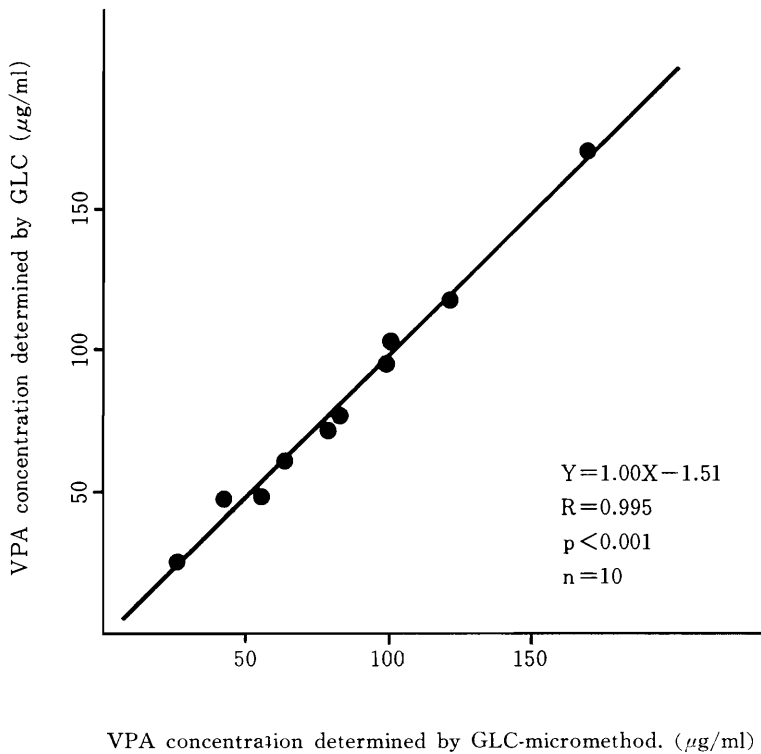


Fig. 4 Comparison of venous plasma VPA concentrations determined by GLC and GLC-micromethod.

-1.14, $R = 0.992$ ($P < 0.001$)であった。

図6はGLC-micro法による耳血の測定値(横軸)とGLC法による静脈血の測定値(縦軸)を示している。回帰直線および相関係数は $Y = 0.98X - 3.18$, $R = 0.994$ ($P < 0.001$)であった。

考 察

最近、VPAは抗てんかん剤として広く使用されており、とくに小児では高頻度に用いられている。したがって定期的な血中濃度測定は自覚的な副作用症状を治療者に訴えることが困難な年少者ではきわめて重要といわなければならない。加えて近年、抗てんかん剤服用者から生まれた新生児に種々の先天性障

害が報告されており^{14,15)}、これらの原因説明には新生児の体液内抗てんかん剤の濃度測定が必要である。しかし、VPAは唾液には排泄されないため^{12,16)}、いきおい血中濃度を測定せざるをえない。本報告では微量のplasmaを用いてGLC-micro法、EMITでどの程度臨床使用に耐えられるデータが得られるかどうかを検討した。図2から従来のGLC法とEMIT法の測定値がよく一致していることがわかる。ただ、EMITで測定する際に低濃度では幸田らの指摘する¹¹⁾ように正の誤差が若干みられる。EMIT法による測定値はGLC-micro法による値ともよく相関するが、GLC法との比較と同様GLC-micro法と比較しても低濃度では若干高値を示す可能性が

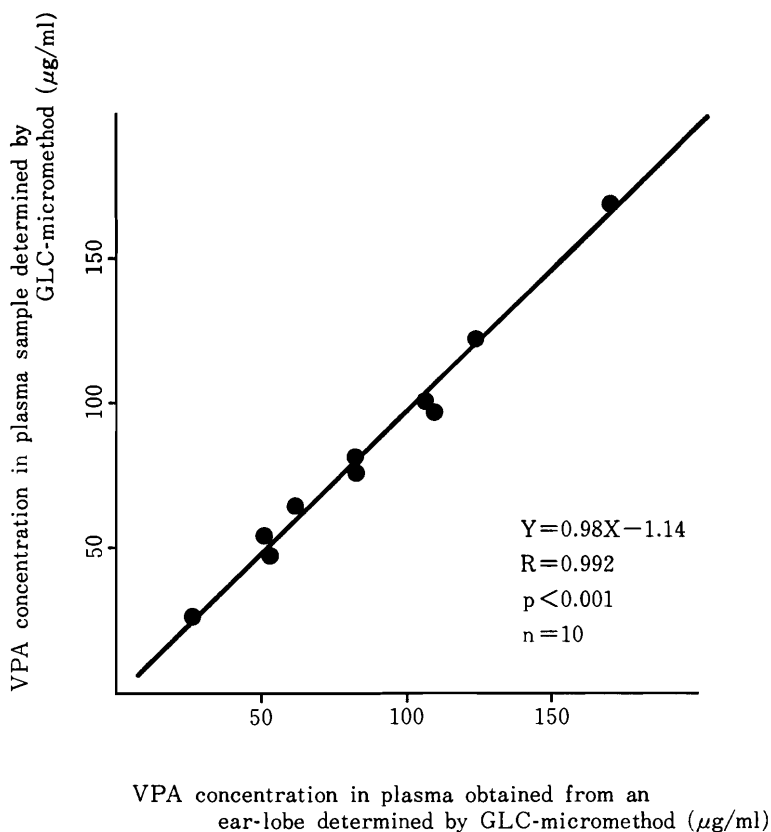


Fig. 5 Comparison of plasma VPA concentrations between venous blood samples and those obtained from ear-lobes.

ある (図3)。

次に、著者らが開発した GLC-micro 法と従来の GLC 法との比較結果であるが、静脈血濃度をこれら2つの方法で測定した結果を示した図4からも明らかなように回帰直線の勾配は $Y = X$ で非常によく相関している。また図5のごとく GLC-micro 法で測定した静脈血濃度と耳血濃度とがよく一致することから、GLC-micro 法は従来の GLC に比較して十分正確な測定値を提供しえるものと考えられる。これは図6の結果からも支持されるが図6の結果は更に耳血、指尖などからえられた試料でも静脈血濃度を十二分に反映することを示唆している。

EMIT および GLC-micro 法ではその測定下限値がそれぞれ $5\mu\text{g/ml}$, $7\mu\text{g/ml}$ であ

ったが、VPA のいわゆる有効治療濃度が $50 \sim 100\mu\text{g/ml}$ といわれているので、これらの2つの方法による測定可能範囲は臨床使用上とくに問題がないといえる。測定に要する時間は EMIT で約5分 (triplicate), GLC-micro 法で約10分とともに短時間である。ただ、測定費用については EMIT そのものが高価であるため、これらの点を考慮した上で各施設が測定法を選択する必要がある。

以上の測定時間、測定可能範囲、測定法の精度などを考慮すると EMIT, GLC-micro 法はともに臨床的に有用な技法と考えられる。

ま と め

1) EMIT および著者らが開発した GLC-micro 法により小児患者の静脈血と耳血内の

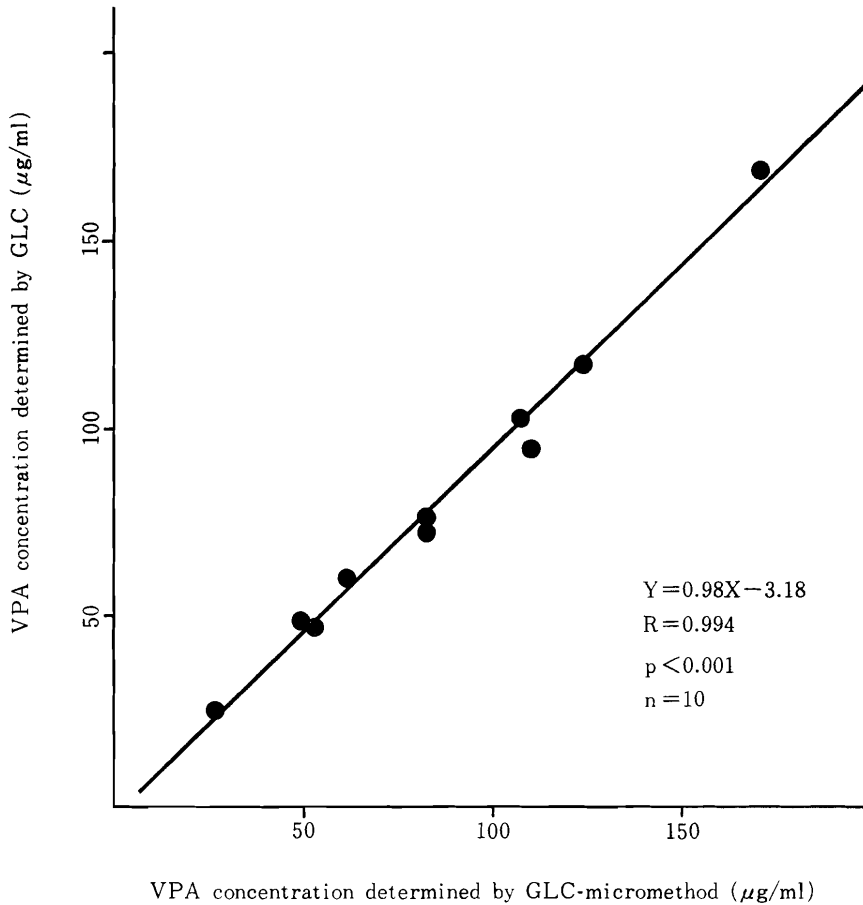


Fig. 6 Comparison of VPA concentrations between antecubital venous samples and those obtained from ear-lobes.

VPA を測定し、その値を従来の GLC 法による値と比較検討した。

2) EMIT, GLC-micro 法による測定結果は GLC 法の結果とよく相関し、精度、測定時間、測定範囲などの面から臨床応用が十分可能と考えられた。

3) 耳血、指尖などからえられた微量の検体からでも信頼できる血中濃度の測定が可能である。

EMIT 用試薬は第 1 化学薬品(株), sodium valproate の原末は協和発酵(株), 大日本製薬(株)よりそれぞれ提供をうけた。

文 献

1) 武田明夫, 他: 新しい抗てんかん剤 Sodium Valproate の血中及び髄液中濃度に関する臨床的研究. 脳と発達, 8: 401-408, 1976.

2) 細川 清, 他: Dipropylacetic acid sodium (Depakene) の血中レベルと臨床. 脳と発達, 29: 885-890, 1977.

- 3) 兼子 直：抗てんかん剤体液内濃度。第一報：血清内濃度および薬物相互作用。精神経誌，**79**：609-627，1977。
- 4) 兼子 直：抗てんかん剤体液内濃度。第二報：血清蛋白非結合型，髄液内，唾液内濃度について。精神経誌，**80**：29-42，1978。
- 5) BASTIANI, R. T. et al. : Homogeneous immunochemical drug assay. *Am. J. Med. Technol.*, **39** : 211-216, 1973.
- 6) MIYAMOTO, K. et al. : Gas chromatographic determination of phenytoin, phenobarbitone, primidone, carbamazepine and pheneturide (or acetylpheneturide) from the same specimen. MEIJER, J. W. A., et al. (eds.) : *Methods of Analysis of Anti-epileptic Drugs*. 106-110, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973.
- 7) RUBENSTEIN, K. E. et al. : Homogeneous enzyme immunoassay : new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47** : 846-851, 1972.
- 8) RIEDEL, E. et al. : Separation of drugs by gas-liquid chromatography (GLC) and high-pressure liquid chromatography (HPLC). MEIJER, J. W. A. et al. (eds.) : *Methods of Analysis of Anti-epileptic Drugs*. 194-197, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973.
- 9) SCHNEIDER, H. : Clinical and laboratory aspects of the routine spectrophotometric determination of anti-epileptic drugs in Bethel, Federal Republic of Germany. MEIJER, J. W. A., et al. (eds.) : *Methods of Analysis of Anti-epileptic Drugs*. 61-71, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973.
- 10) 掛川紀夫, 他 : Sodium Valproate の血中濃度の臨床的意義。臨床精神医学，**7** : 321-328, 1978。
- 11) 幸田幸直, 他 : バルプロ酸の血漿中濃度測定のためのホモジニアス エンザイム イムノアッセイ法の臨床評価。医学のあゆみ，**115** : 813-815, 1980。
- 12) 羽根田敏, 他 : 乳幼, 年少てんかん児および痙攣児の Valproic acid 血中濃度と代謝 (C_{min} , C_{max} を中心として)。脳と発達，**13**(3) : 1981。(印刷中)。
- 13) Emit-aed (Valproic acid assay) Package Insert, Syva, Corp. Palo. Alto. Calif. 94364, 1980.
- 14) KANEKO, S. et al. : The problems of anti-convulsant medication in the neonatal period : Is breast feeding advisable? JANZ, D. (ed.) : *Epilepsy, Pregnancy and the Child*. Raven, New York, 1981.
- 15) OGAWA, Y. et al. : Insidious effects of anticonvulsants at the perinatal period. JANZ, D. (ed.) : *Epilepsy, Pregnancy and the Child*. Raven, New York, 1981.
- 16) 玉井 勇 : 唾液中の Phenobarbital, Valproic acid 濃度および唾液 pH の検討。日児誌，**83** : 1089-1095, 1979。
- 17) SIMON, D. and PENRY, J. K. : Sodium di-N-propylacetate (DPA) in the treatment of epilepsy. A review. *Epilepsia*, **16** : 549-573, 1975.
- 18) BRUNI, J. et al. : Clinical efficacy of valproic acid in relation to plasma levels. *Can. J. Neurol. Sci.*, **5** : 385-387, 1978.
- 19) BRUNI, J. and WILDER, B. J. : Valproic acid. Review of a new anti-epileptic drug. *Arch. Neurol.*, **36** : 393-398, 1979.

**MICRODETERMINATION OF SODIUM VALPROATE BY GAS
LIQUID CHROMATOGRAPH AND BY HOMOGENEOUS ENZYME
IMMUNOASSAY TECHNIQUE**

By

SUNAO KANEKO, HIROAKI HONMA, HIROAKI KOBAYASHI,
and TOKIJIRO SATO

*Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University School of Medicine
(Director : Prof. T. SATO)*

NOBUO KOIDE, SATOSHI HANEDA, JUN WATANABE,
and YUKINAO TAKEBE

*Department of Pediatrics, Hirosaki University School of Medicine
(Director : Prof. M. YOKOYAMA)*

Sodium valproate is a new, broad spectrum antiepileptic drug in the treatment of epilepsy. Owing to great individual differences in dosage requirements to achieve a therapeutic plasma level and to avoid side-effects of the drug particularly in newborns and older children, a specific and accurate procedure is needed for repeated determinations of valproic acid. The procedure should permit analysis in 50 μ l of plasma.

With the development of an EMIT homogeneous enzyme immunoassay for valproic acid, levels of the drug can now be rapidly and easily determined in the plasma (or serum) of patients receiving the drug although the reagents necessary for this assay are very expensive.

In this report, EMIT and a new GLC-micromethod developed by us were tested and these two methods were compared with an ordinary GLC method.

EMIT involves no separation step and is compatible with most existing instrumentations used in enzyme activity measurement. A test was performed in less than 5 minutes by mixing two reagents with 50 μ l of untreated serum or heparinized plasma.

The GLC-micromethod was performed in less than 10 minutes by using a capillary blood sample obtained from an ear-lobe. This detailed procedure was as follows. Capillary blood from an ear-lobe, finger-tip or heel was collected in a heparinized capillary tube as used for routine haematocrit determination. Two tubes (75mm in length and 1.2mm in diameter) of blood was enough to obtain 50 μ l of plasma for determination. The tubes were centrifuged for 10 minutes at 10,000rpm in a haematocrit centrifuge. Fifty microliter of plasma, 150 μ l of TCA and 200 μ l of diphenylchloroform (50 μ g/ml) were mixed with a vortex mixer for 30 seconds. After centrifugation, 2.5-3.0 μ l of organic phase was analyzed by GLC.

These two methods permitted analysis in 50 μ l of plasma and the data obtained by these methods were consistent with those by ordinary GLC method. Accordingly, these two methods reported here are proved to be accurate and rapid enough for clinical use.

(Autoabstract)

KEY WORDS : anticonvulsant
plasma level
immunoenzyme technic

sodium valproate
gas chromatography-micromethod