

蛍光偏光免疫測定法による抗てんかん薬の唾液中
濃度の測定鈴木吉成*¹ 植松俊彦*¹ 水野淳宏*¹
忍頂寺紀彰*² 藤井喜一郎*³ 中島光好*¹

(受付: 1989年7月5日)

Determination of Concentrations of Antiepileptic Agents in Saliva
by Fluorescence Polarization Immunoassay TechniqueYoshinari SUZUKI*¹ Toshihiko UEMATSU*¹ Atsuhiko MIZUNO*¹
Toshiaki NINCHOJI*² Kiichiro FUJII*³ and Mitsuyoshi NAKASHIMA*¹

*¹ Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine, 3600
Handa-cho, Hamamatsu 431-31, Japan

*² Department of Neurosurgery, Hamamatsu University Hospital

*³ Division of Pharmacy, Hamamatsu University Hospital

We intended to determine the concentrations of antiepileptic agents in saliva, as a substitute of serum, by the fluorescence polarization immunoassay technique, using the TDx analyzer (Dainabot). It had been considered that it would be difficult to handle a very small amount of saliva samples (2-10 μ l) with the TDx analyzer because of its high viscosity. However, the drug concentrations in saliva could be determined by the analyzer after the saliva sample was diluted with an equal volume of saline. Using the salivary concentrations determined by this technique, we could obtain the simple and practical equations, which correlate the total concentrations of drugs in serum (Ct) with those in saliva (Cs) without taking the salivary pH into consideration as follows: 1) phenytoin (PHT): $C_t = 9.422 C_s$, $r = 0.965$, $n = 5$; 2) phenobarbital (PB): $C_t = 4.261 C_s$, $r = 0.883$, $n = 27$; 3) carbamazepine (CBZ): $C_t = 3.200 C_s$, $r = 0.734$, $n = 10$.

As for sodium valproate (VPA), we could predict the maximal saturated concentration of the bound drug (Cb) with serum protein as 102 μ g/ml from double-reciprocal plot between the bound and free (Cf) concentrations in serum as follows: 4) sodium valproate: $C_b^{-1} = 0.0575 C_f^{-1} + 0.00981$, $r = 0.850$, $n = 38$. And this maximal value of Cb would indirectly support the upper therapeutic range (about 100 μ g/ml) of VPA in Japanese. However, the above equations must be reconstructed in each laboratory, because they were obtained from a small population.

*¹ 浜松医科大学薬理 〒431-31 浜松市半田町 3600

*² 浜松医科大学附属病院脳神経外科 *³ 同 薬剤部

Key words: antiepileptic agent, serum concentration, saliva concentration, fluorescence polarization immunoassay

緒 論

近年、薬物治療の適正化ならびに至適用量設定のため、抗てんかん薬の血液中濃度のモニタリング (TDM) が実施されている。そこでは、血液中総薬物濃度を測定する方法が一般的である。著者らは、汎用されている測定機器により、血液に代わりうる体液、すなわち唾液中の薬物濃度の TDM を検討した。とくに唾液による TDM¹⁾ は無侵襲であることから、頻繁に実施できることと、小児あるいは高齢者にも容易に適用できる利点がある。今回は、Dainabot 社の TDx アナライザーを用いて、蛍光偏光免疫測定法で薬物を定量することを試みた。TDx アナライザー内部では約 2~10 μl の試料を扱うので、唾液の場合、その粘性が大きいためにピペッティングが正確にできないという理由で、不可能とされていた。しかし、測定前に唾液を約 2~3 倍に希釈することで、その粘度を低下させ、定量が可能になると推定される。抗てんかん薬として、phenytoin (PHT) phenobarbital (PB), carbamazepine (CBZ), sodium valproate (VPA) を検討した²⁾。

対象および方法

1. 被験者

当病院。脳神経外科の外来患者で、PHT [3 人 (男 2, 女 1), 5 例, 体重 52~65 kg (平均 59), 年齢 26~49 歳 (平均 31)], PB [20 人 (男 11, 女 9), 27 例, 体重 17~80 kg (平均 53), 年齢 6~64 歳 (平均 41)], CBZ [7 人 (男 5, 女 2) 10 例, 体重 39~68 kg (平均 58), 年齢 25~49 歳 (平均 33)], VPA [23 人 (男 12, 女 11), 38 例, 体重 37~76 kg (平均 56), 年齢 10~65 歳 (平均 37)] を単独あるいは併用して服用し、定常状態にあると推定される人を選んだ。また検体採取に当たり、医師が口頭で被験者に実験内容を十分説明し、これに参加することの承諾を得た。

2. 検体採取

検体は外来診療終了後採取した。したがって全患者の検体採取時間は服用後 0.1~18.7 hr (平均 5.1) であった。

血液は、シリコン処理した真空採血管に約 5 ml 揺取りし、常法どおり遠心分離して血清を得た。唾液は、約 500 μl を直接試験管に吐き出してもらい、ただちにその pH を測定した (5.2~8.16, 平均 6.32)。

血清および唾液は測定まで -20°C で保存した。

3. 測定機器および試薬

測定機器は、Dainabot 社の TDx アナライザーを用いた。試薬キットは、Dainabot 社の phenobarbital (free 兼用), phenytoin, free phenytoin, carbamazepine, free carbamazepine, sodium valproate, free sodium valproate を用いた。pH の測定は、日立堀場社の pH メータに富士化学計測社の超小型 pH 複合電極を取り付けて行った。

4. 正確度

PB, PHT, VPA, CBZ の各薬剤の希釈唾液中の薬物濃度を、正確に測定できるかをまず検討した。すなわち、これら薬剤を服用していない健康人から唾液を得て、PB (1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PHT (0.5, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), VPA (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CBZ (0.5, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の各濃度の唾液溶液を三組ずつ作成し、これらの溶液 100 μl をとり、生理食塩水 100 μl を加え、よく混和後その濃度を定量した。

5. 測定方法

血清中総薬物濃度 (Ct) の測定は、試料血清を常法どおり操作して行った。

血清中遊離薬物濃度 (Cf) の測定は、試料血清を Centrifree YMT membrane (Amicon 社) を用い、室温、2,000 g, 20 min 限外濾過し、得られた濾液について行った。

唾液中総薬物濃度 (Cs) の測定は、低温で保存した唾液を常温に戻した後よく混和し、固形物を遠沈した。その上澄 100 μl を取り、100 μl の生

理食塩水を加え、よく混和して実施した。

唾液中薬物の定量のための検量線は、PHT では free phenytoin 用キット、PB では free 兼用の phenobarbital 用キット、CBZ では free carbamazepine 用キット、VPA では free sodium valproate 用キットの血液測定用で代用した。

6. 濃度関係式の評価法

pKa 値の知られている PB, PHT については、Inaba³⁾ (または Matin⁴⁾) らの式(1)を用いて、唾液中薬物濃度 (Cs) から血清中総薬物濃度 (Ct) を推定した。また PHT, PB, CBZ において、実測した Ct と Cs との間の直線回帰式を求めた。

$$P = \frac{Cs \times \{1 + 10^{(pH_p - pKa)}\}}{Ct \times \{1 + 10^{(pH_s - pKa)}\}} \times 100 \quad (1)$$

P: 血清中の非結合率の実測値 (平均), pH_p: 血清の pH (7.4), pH_s: 唾液の pH

VPA では、血清中総薬物濃度 (Ct) と血清中遊離薬物濃度 (Cf) との関係を直線回帰、あるいは

二次曲線回帰式で解析した。また結合薬物濃度 (Cb) と Cf との関係については、Michaelis-Menten 型の関係が考えられるため、これらの double-reciprocal プロット⁵⁾ による直線回帰を試みた。

回帰式の計算は、いずれも非線形最小二乗法による山岡らのプログラム MULTI 2⁶⁾ を用い、相関係数 (R), 赤池の AIC, 推定値と実測値との差の標準誤差 (Se) および最終残差平方和 (SS) を計算した。

結果

1. 正確度

PB, PHT, VPA, CBZ に対して、Tab. に示したように、唾液に添加した各薬物は希釈すれば、TDx アナライザーで定量可能で、実測値を希釈倍率(2)で補正して元の唾液中濃度を求めることができた。

Tab. Within-day Precision Test of PB, PHT, VPA, CBZ, Added in Control Saliva

PB (μg/ml)		PHT (μg/ml)		VPA (μg/ml)		CBZ (μg/ml)	
Added	Found	Added	Found	Added	Found	Added	Found
1.0	0.98	0.5	0.49	0.5	0.46	0.5	0.51
2.5	2.29	1.0	1.00	1.0	1.19	1.0	1.14
5.0	4.52	2.0	2.01	2.5	2.31	2.0	1.96
10.0	9.73	3.0	3.13	5.0	5.13	3.0	3.31

Each "Found" data represents the mean of three determinations.

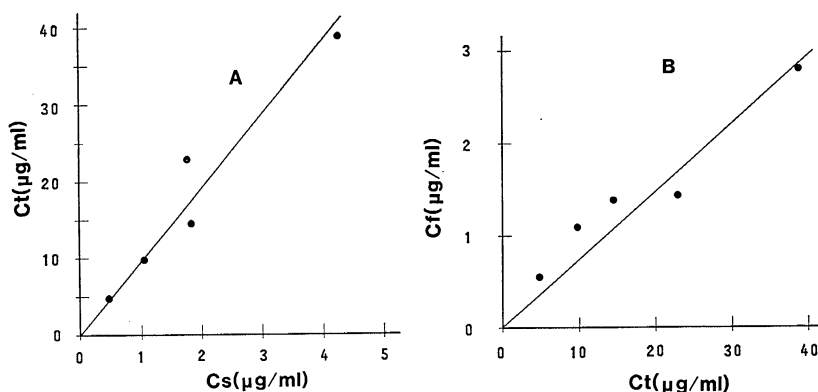


Fig. 1 Relationship between serum and saliva concentrations of PHT in three epileptic patients.

A) Relationship between total saliva concentrations (Cs) and total serum concentrations (Ct).

Ct=9.422 Cs, r=0.965, AIC=21.400, SS=48.426, Se=4.018, N=5

B) Relationship between total serum concentrations (Ct) and free serum concentrations (Cf).

Cf=0.0742 Ct, r=0.936, AIC=-3.333, SS=0.344, Se=0.339, N=5

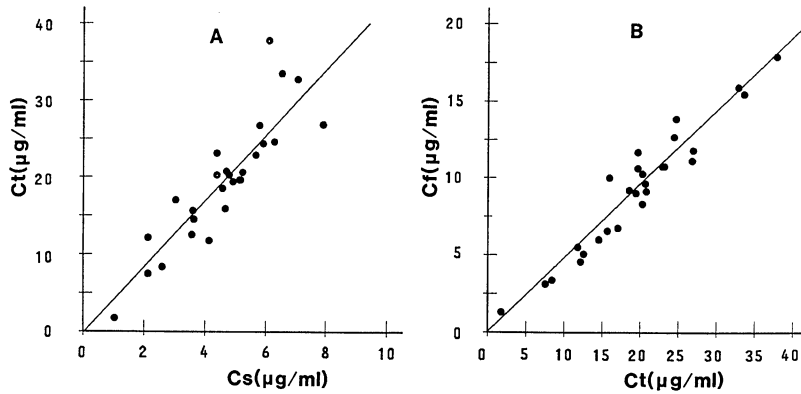


Fig. 2 Relationship between serum and saliva concentrations of PB in 21 epileptic patients.

A) Relationship between total saliva concentrations (Cs) and total serum concentrations (Ct).

$$Ct = 4.261 Cs, r = 0.883, AIC = 162.007, SS = 374.723, Se = 3.872, N = 27$$

B) Relationship between total serum concentrations (Ct) and free serum concentrations (Cf).

$$Cf = 0.475 Ct, r = 0.962, AIC = 95.542, SS = 31.962, Se = 1.131, N = 27$$

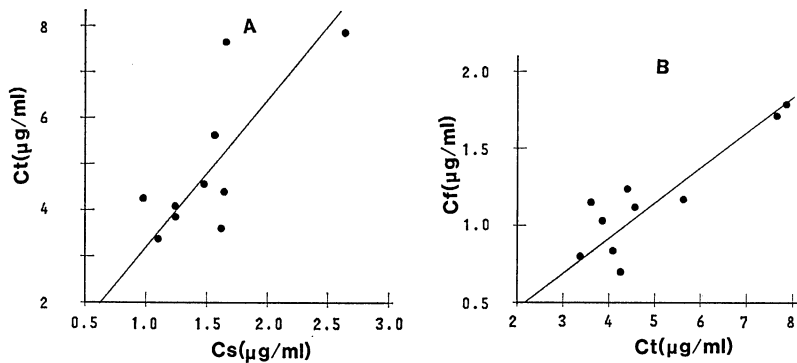


Fig. 3 Relationship between serum and saliva concentrations of CBZ in 7 epileptic patients.

A) Relationship between total saliva concentrations (Cs) and total serum concentrations (Ct).

$$Ct = 3.200 Cs, r = 0.734, AIC = 25.731, SS = 10.731, Se = 1.158, N = 10$$

B) Relationship between total serum concentrations (Ct) and free serum concentrations (Cf).

$$Cf = 0.231 Ct, r = 0.868, AIC = -10.473, SS = 0.287, Se = 0.190, N = 10$$

2. Phenytoin

血清中総薬物濃度 (Ct) と唾液中薬物濃度 (Cs) との関係直線回帰式で表すことができた (Fig. 1 A). また血清中総薬物濃度 (Ct) と血清中遊離薬物濃度 (Cf) の関係も同様であった⁷⁾ (Fig. 1 B). これらの回帰式を用いることにより、容易に Cs から Ct (あるいは Cf) を推定できた。

3. Phenobarbital

この薬物も phenytoin と同様、Ct と Cs の関係は直線回帰式で表すことができた (Fig. 2 A).

PB の Cs から Ct (あるいは Cf) を求める場合、PB の pKa 値が 7.41⁸⁾ であり、血液の pH 7.4 に近い場合、唾液 pH を考慮した Inaba (あるいは Matin) らの式を用いるのが一般的である⁷⁾。しかし、彼らの式から計算される推定値と実測値との差の標準誤差 (Se=7.82) は、今回得た回帰式から計算される推定値と実測値との差の標準誤差 (Se=4.356) より大きかった。

4. Carbamazepine

Ct と Cs, あるいは Ct と Cf の関係はいずれも

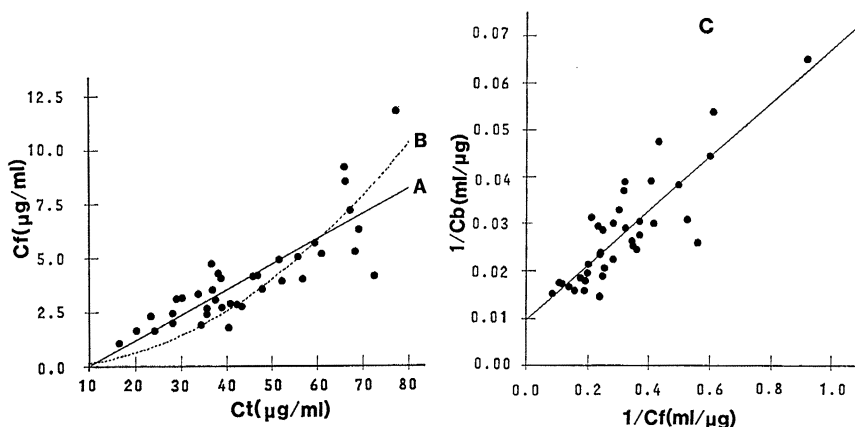


Fig. 4 Relationship among total (Ct), bound (Cb) and free serum (Cf) concentrations of VPA in 23 epileptic patients.

A) Linear equation. $Cf = 0.0932 Ct$, $r = 0.807$, $AIC = 159.891$, $SS = 63.734$, $Se = 1.331$, $N = 38$

B) Quadratic equation. $Cf = 0.00163 Ct^2$, $AIC = 164.469$, $SS = 71.916$, $Se = 1.433$, $N = 38$

C) Double-reciprocal plot. $Cb^{-1} = 0.0575 Cf^{-1} + 0.00981$, $r = 0.850$, $AIC = -248.478$, $SS = 0.001302$, $Se = 0.00601$, $N = 38$

直線回帰式⁹⁾で表すことができた (Fig. 3 A, 3B). この薬物の pKa 値は報告されていないため、とくに今回得た回帰式は実用的であると思われる.

5. Sodium valproate

この薬物の Ct と Cf の関係は二次の曲線回帰式で表すことができると報告されている¹⁰⁾ (Fig. 4 B). そのほか直線回帰 (Fig. 4 A) および Michaelis-Menten 型の解析 (1/Cb と 1/Cf との直線回帰) も行った (Fig. 4 C). この結果、相関係数, AIC, SS あるいは推定値と実測値との差の標準誤差 (Se) などから判断して, Michaelis-Menten 型の関係が成立しているように思われる. すなわち, Cb と Cf との関係は単純な一次式で表されるより, むしろ Cb が増加するにつれて Cf がより急速に増加する傾向にある. また Cs と Ct の関係については, PB, PHT, CBZ に見られるような一次の回帰式を求めることができなかった.

考察

免疫測定法は, 薬物に特異的に反応する抗体を用いるため, 本来血液用に開発されたものでも, これ以外の体液, たとえば唾液中の薬物でも定量可能であると推定される. 実際に, 標準溶液を唾液に添加した場合, いずれの抗てんかん薬でも正

確に唾液中濃度を測定できた. とくに問題となったのは, 唾液の粘度が比較的高く, TDx アナライザー内部でのピペッティングが約 2~10 µl と少ないため, 血清と比較して不正確になるということであった. この点は, 測定前に唾液を生理食塩水などの電解質溶液で 2 倍に希釈することで解決された. 希釈した唾液は血清と同様に操作して, 薬物を定量できた.

血中濃度といっても, 蛋白結合していない遊離形が薬物に直接結び付くとすれば, また, 唾液中濃度を測定することで, 血中遊離薬物濃度が推定できるとすれば, 高価なメンブランフィルターを用いて血中遊離薬物濃度を測るより, 唾液中濃度を測ったほうが良いと考えられる. すなわち著者らは, 多数回の唾液中濃度と最小限の血清中濃度の両者から TDM を行うことは, 臨床上有用であると考えている.

実際に, PB, PHT, CBZ において, TDx アナライザーを用いて測定した唾液中濃度と血清中の遊離薬物濃度あるいは血清中総薬物濃度との間に良い相関関係を見いだすことができた.

今回の結果は Inaba (あるいは Matin) らの推定式を否定するものではない. 本多らが述べているように⁷⁾, 唾液 pH 測定の迅速さの必要性, お

よび日内変動が大きいため、推定式を使用するにあたって、毎回、唾液 pH を測定しなければならないという煩雑さがある。また CBZ では pKa 値が報告されていないため、Inaba らの推定式は使用できない。VPA においても、pKa 値はわかっているものの、推定式には当てはまらない。したがって、抗てんかん薬の TDM 上、唾液中濃度を利用したいと考えるならば、実験式を使用することも考慮しなければならない。

VPA では、Fig. 4C で示したように double-reciprocal プロットが成立し、その y 軸切片および傾きからそれぞれ結合パラメータ ($1/n[\text{Pt}]$, $K_d/n[\text{Pt}]$: $n[\text{Pt}]$; 全結合部位の濃度, K_d ; 解離定数) が得られた。

これらのパラメータは薬物治療の上限値を与えるものではない。しかしながら薬物治療濃度の範囲内で薬物の蛋白結合に対し飽和が考えられる場合、この値を越えれば、遊離薬物濃度は急激に上昇することになる。実際に VPA の治療領域は、日本人では約 50~100 $\mu\text{g/ml}$ とされているが、上記プロットから、 $n[\text{Pt}] = 102 \mu\text{g/ml}$ が得られ、この値は C_b の蛋白結合に対する飽和値と考えられる。したがって、総薬物濃度としてはこの値に C_f を加えた値 (C_t の約 10% が C_f とすれば $C_t = C_f \times 1.1$)、すなわち 112.2 $\mu\text{g/ml}$ となる。それゆえに蛋白結合の解析からも、治療領域の上限を間接的に支持できるのではないか。しかし外国での報告¹⁰⁾、および日本病院薬学の小委員会(投与设计のための population pharmacokinetic parameters の設定)の集計によれば、最高 180 $\mu\text{g/ml}$ の濃度も報告されている¹¹⁾。したがって今後も VPA の治療濃度の範囲については、遊離薬物濃度を含めて総合的に検討する必要があると考えられる。

なお室温実験で求めた PHT, CBZ の血清中遊離薬物濃度は、実際の生体内の血清中遊離薬物濃度より温度依存的に小さい値を示すことが、海野ら¹²⁾により示唆されている。したがって 37°C 恒温遠心分離機を設置していない施設では、彼らの補正值を用いることが望ましいと思われる。ただし唾液中薬物濃度から直接血清中総薬物濃度を求

める場合は、室温での実験式を用いても何ら問題はない。また著者らの得た回帰式は例数が少ないし、患者の年齢層がおよそ 20~60 歳であるので、各施設で改めて回帰式を求めてから、臨床応用されることが望ましいと思われる。

結 論

TDx アナライザーで唾液中の抗てんかん薬の定量を検討した結果、唾液を生理食塩水で 2 倍に希釈すれば定量可能であった。さらに PHT, PB, CBZ において、唾液 pH を測定しないで、唾液中濃度 (C_s) から血清中総濃度 (C_t) を推定する簡便で実用的な回帰式を得ることができた。

- 1) PHT; $C_t = 9.422 C_s$
- 2) PB; $C_t = 4.261 C_s$
- 3) CBZ; $C_t = 3.200 C_s$

また VPA では、血清中結合濃度 (C_b) と血清中遊離濃度 (C_f) との double-reciprocal プロットから、薬物治療範囲内(約 50~100 $\mu\text{g/ml}$) で蛋白結合に対し飽和が考えられ、その値は血清中結合濃度として 102 $\mu\text{g/ml}$ と推定できた。この値は間接的に日本人の薬物治療濃度の上限を支持するものと思われる。

- 4) VPA;

$$Y = 0.0575X + 0.00981,$$

$$Y = 1/C_b,$$

$$X = 1/C_f,$$

$$C_t = C_b + C_f$$

これらの回帰式は例数が少ないので、各施設で改めて回帰式を求めてから、臨床応用されることが望ましい。

本研究は文部省科学研究費一般研究 B—課題番号 61480440—を得て行われた。

文 献

- 1) Suzuki, Y., Uematsu, T., Mizuno, A. et al.: Determination of caffeine in saliva by high-performance liquid chromatography: New sampling method for saliva using filter paper. *Ther. Drug Monit.*, 11: 88-92 (1989).
- 2) 鈴木吉成, 藤井喜一郎, 忍頂寺紀彰ほか: TDx システムによる唾液中抗てんかん薬の定量. 日本薬学

- 会第 108 年会講演要旨集, p. 503 (1988).
- 3) Inaba, T. and Kalow, W.: Salivary excretion of amobarbital in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **18**: 558-562 (1975).
 - 4) Matin, S. B., Wan, S. H. and Karam, J. H.: Pharmacokinetics of tolbutamide. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**: 1053-1058 (1974).
 - 5) 花野 学 (編): フェーマコキネティクス 応用編, 第 1 版, 南山堂, 東京, pp. 191-210 (1989).
 - 6) Yamaoka, K., Nakagawa, T., Tanaka, H. et al.: Nonlinear multiple regression program, MULTI 2 (BAYES) on Bayesian algorithm for microcomputers. *J. Pharmacobiodyn.*, **8**: 246-256 (1985).
 - 7) 本多 裕, 西原カズヨ, 幸田幸直ほか: Phenytoin および Phenobarbital の混合唾液中濃度測定信頼性と有用性. *臨床精神医学*, **7**: 309-319 (1978).
 - 8) Kakemi, K., Arita, T., Hori, R. et al.: Absorption of barbituric acid derivatives from rat stomach. *Chem. Pharm. Bull.*, **15**: 1534-1539 (1967).
 - 9) Hata, M., Egoshi, N., Haraguchi, H. et al.: Plasma and saliva concentrations of carbamazepine in healthy human and epileptic children. *Yakuzaigaku*, **46**: 87-93 (1986).
 - 10) Cramer, J. A., Mattson, R. H., Bennett, D. M. et al.: Variable free and total valproic acid concentrations in sole—and multi-drug therapy. *Ther. Drug Monit.*, **8**: 411-415 (1986).
 - 11) 堀 了平, 奥村勝彦, 北澤式文ほか: 投与設計のための population pharmacokinetic parameters の設定. *病院薬学*, **13**: 63-73 (1987).
 - 12) 海野勝男, 須藤一郎, 福井了三ほか: 抗てんかん薬の血中濃度に関する研究 (第 14 報) 抗てんかん薬併用患者における遊離型血中濃度の測定. 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, p. 503 (1988).