

免疫沈降阻止反応 (i-PiT 法) による血漿中 テオフィリン濃度測定の基礎的検討

元山 茂, 小林譲司, 早田道治, 吉村正一郎,*¹
堀場通明, 伊藤 仁, 鈴木 清*²
大垣市民病院薬局*¹
大垣市民病院第3内科*²

Determination of Plasma Theophylline Concentration by Immuno-precipitation Inhibition Technique (i-PiT System)

SHIGERU MOTOYAMA, JOJI KOBAYASHI, MICHIHARU HAYATA,
SHOICHIRO YOSHIMURA,*¹ MICHIAKI HORIBA,
MASASHI ITO, and KIYOSHI SUZUKI*²
Pharmacy, Ogaki Municipal Hospital*¹
Third Department of Internal Medicine, Ogaki Municipal Hospital*²

(Received February 28, 1983)

Plasma theophylline concentration was determined by immuno-precipitation inhibition technique (i-PiT system). Immuno-reaction is dependent on incubation time and temperature, and therefore it is necessary to optimize the reaction. Within-day and between-day variances (C.V.) of analysis on 3 levels were less than 10%. The results of dilution test and recovery test were good. Forty-two plasma specimens of patients receiving theophylline therapy were studied by i-PiT system and high-pressure liquid chromatography (HPLC). The correlation coefficient was 0.988 and the regression line gave $y = 0.978x + 0.918$ (y : i-PiT, x : HPLC).

Keywords—immuno-precipitation inhibition technique (i-PiT system); plasma theophylline concentration

はじめに

喘息治療薬として広く用いられているテオフィリンは治療血漿中濃度が $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ ¹⁾ と狭く, $20 \mu\text{g/ml}$ 以上では悪心, 頭痛, 下痢, 発作, 心不整脈²⁾ などが生じる。そのため安全かつ有効な治療を行う上で, 血漿中濃度測定が重要な手段となる。測定法として, ガスクロマトグラフィー (GLC), 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), ホモジニアス エンザイムイムノアッセイ (EMIT)³⁾ などが報告されているが, 最近, 免疫沈降阻止反応に基づくホモジニアスイムノアッセイ (i-PiT 法)

が中外製薬によりシステム化された^{4),5)}。今回著者らは i-PiT 法による血漿中テオフィリン濃度測定の基礎的検討を行ったので, その結果を報告する。

i-PiT 法は抗原抗体反応を直接みる方式であり, 低分子の抗原 (薬物) と多価抗原 (ポリハプテン) とが共通の抗体に対して競合する反応が利用されている。抗原抗体反応により両者ともに結合物を生成するが, 多価抗原との不溶性沈降物のみが光散乱を示すため, その散乱光強度を測定することにより抗原量が決定できる。

実験方法

1. 測定検体

大垣市民病院呼吸器科に入院中で, テオフィリン治療をうけている喘息患者の血漿を検体とした。血漿は凍結

*^{1,2} 大垣市南瀬町 4-86; 4-86, Minaminokawa-cho
Ogaki-shi, Gifu, 503 Japan

保存し、測定時に室温にもどした。

2. 測定方法

1) i-PiT 法による測定

標準血清はネフェロテスト薬物標準血清「Bセット」、測定試薬はネフェロテスト・テオフィリン、測定機器はレーザーネフェロメーター (i-PiT) を使用した。ネフェロテスト・テオフィリンは検体希釈液、ポリハプテン、ポリハプテン溶解液、抗体液よりなっている。

前操作：検体希釈液、ポリハプテン溶解液、抗体液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した。ポリハプテンは1瓶あて、ろ過済みポリハプテン溶解液 10 ml で溶解した。

希釈操作：標準血清および検体を $50\mu\text{l}$ ずつ採り、検体希釈液 1 ml をそれぞれに加えて21倍に希釈した。

測定：キュベットに希釈標準血清および希釈検体をそれぞれ $50\mu\text{l}$ 採り、溶解したポリハプテン $500\mu\text{l}$ を加え、i-PiT で散乱光強度を測定した (ブランク測定)。

ブランク測定後、抗体液 $100\mu\text{l}$ を 30 秒おきに加え混和した。室温 ($20\sim 30^\circ\text{C}$) で $20\sim 60$ 分放置後、散乱光強度を30秒おきに i-PiT で測定すると、テオフィリン濃度は検量線から自動的に換算され同時にプリントアウトされた。

2) HPLC による測定

久保らの方法⁶⁾ に従い、島津 LC-3A、島津 SPD-2A を用いて血漿中テオフィリン濃度を測定した。

結果および考察

1. 検量線

1) 同時再現性

同一ロット番号の試薬を使用し、インキュベーション時間、温度をそれぞれ 30 分、 25°C に設定して 5 回同時に測定した。各標準血清濃度における散乱光強度の平均値、標準偏差および変動係数を Fig. 1 に示した。変動係数は $10\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度では 2.7~5.1% と良好で

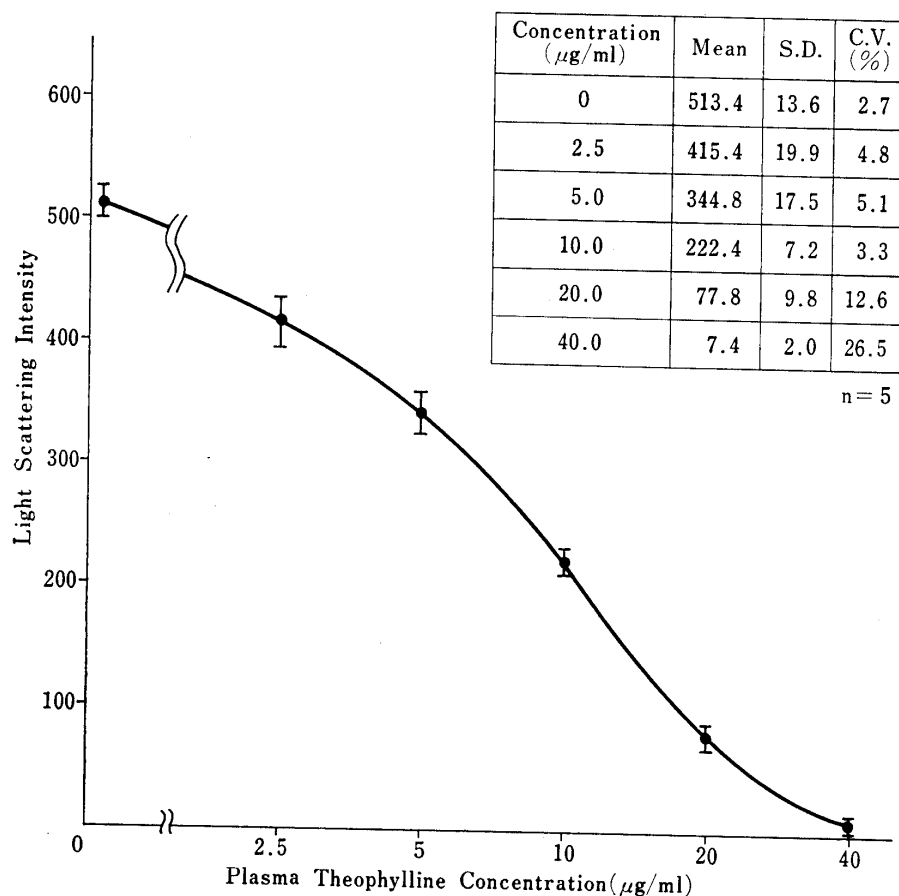


Fig. 1. Reproducibility within Day of Standard Curve by i-PiT Method Incubating at 25°C for 30 Minutes

The mean light scattering intensities, standard deviations and coefficients of variation are shown in the table.

あったが、40 $\mu\text{g/ml}$ では 26.5% と悪かった。これは高濃度では散乱光強度が弱く、その平均値が小さいためである。

2) インキュベーション時間

20分、30分、45分、60分間と時間を変えて 25°C でインキュベーションを行った後、散乱光強度を測定した。各時間の検量線を Fig. 2 に示した。20分では高濃度間、60分では低濃度間の散乱光強度の差が小さいため、それぞれ高濃度検体、低濃度検体の測定が困難と思われる、25°C ではインキュベーション時間は 30~45 分が適当であった。

3) インキュベーション温度

20°C、25°C、30°C と温度を変えて 30 分間インキュベーションを行った後、散乱光強度を測定した。各温度の検量線を Fig. 3 に示した。20°C では 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の

散乱光強度が弱く、高濃度検体の測定が困難となるため、30分以上のインキュベーション時間が必要であった。30°C では短時間で不溶性沈降物が生成するため、30分以下のインキュベーション時間で測定可能であった。

2. 再現性

1) 同時再現性

同一測定者により低濃度、中濃度、高濃度の検体を同時に 10 回測定し Table 1 の結果を得た。変動係数 3.9~5.6% と良好であった。

2) 日差変動

同一測定者により低濃度、中濃度、高濃度の検体を 1 日同時に 3 回、5 日間測定し Table 2 の結果を得た。なお検量線は毎日作成した。変動係数 6.3~8.2% と良好であった。

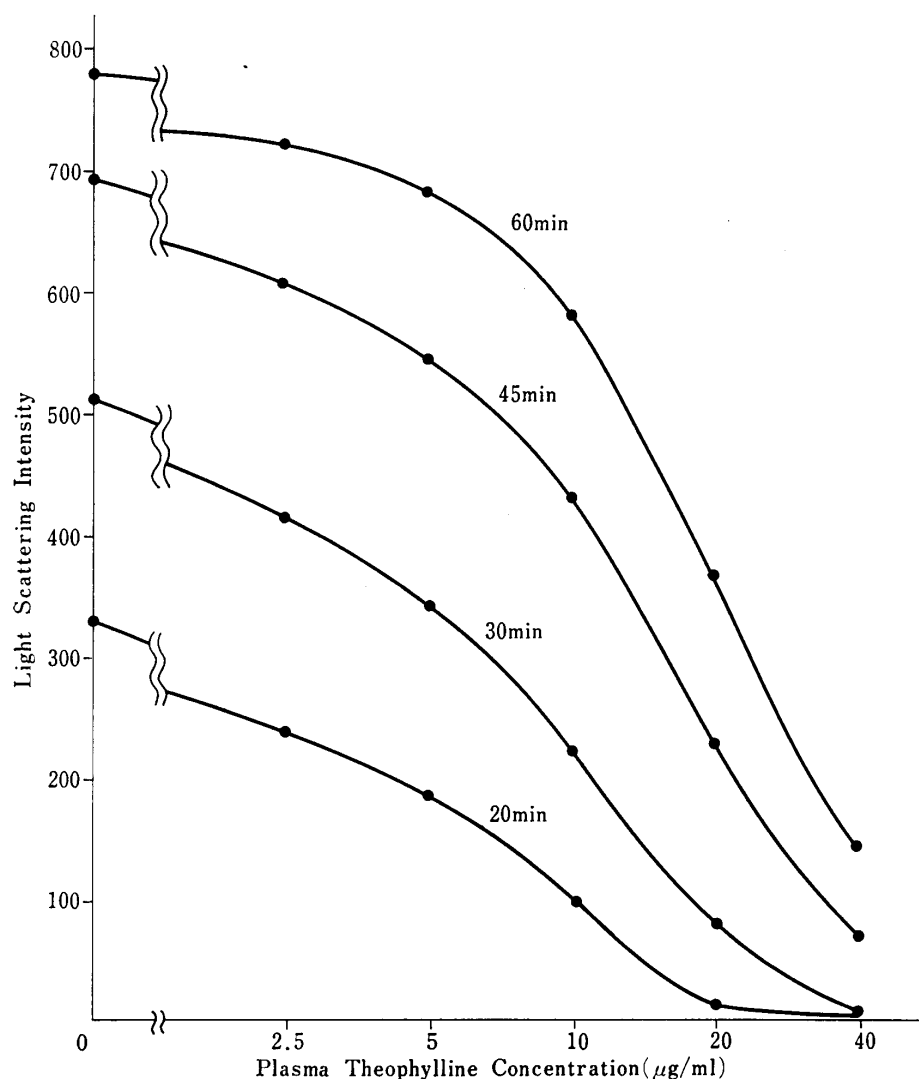


Fig. 2. Effect of Incubation Time at 25°C on Standard Curve by i-PiT Method

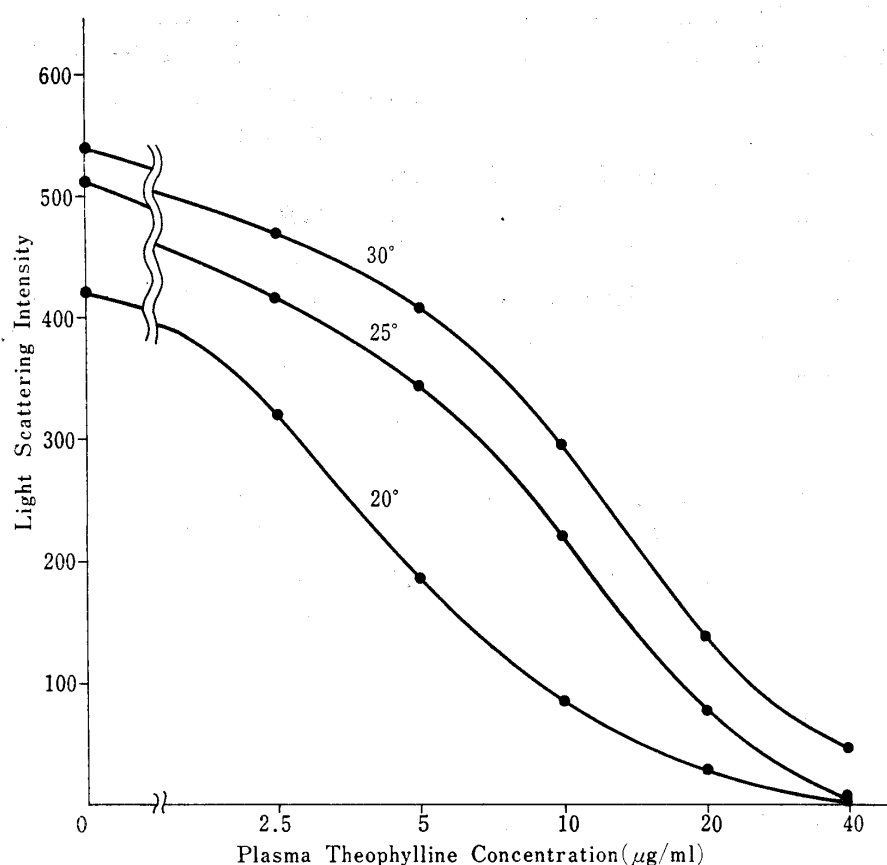


Fig. 3. Effect of Incubation Temperature for 30 Minutes on Standard Curve by i-PiT Method

Table 1. Reproducibility within Day of Plasma Theophylline Concentrations Determined by i-PiT Method

No.	Sample A (μg/ml)	Sample B (μg/ml)	Sample C (μg/ml)
1	3.6	16.5	23.2
2	3.3	17.5	24.6
3	3.6	15.5	26.4
4	3.4	16.0	23.6
5	3.3	16.1	24.5
6	3.7	16.7	21.8
7	3.8	16.3	22.4
8	3.6	17.2	25.0
9	3.5	17.0	24.1
10	3.2	17.3	24.0
Mean	3.50	16.61	23.96
S.D.	0.19	0.65	1.32
C.V.(%)	5.6	3.9	5.5

Table 2. Reproducibility between Days of Plasma Theophylline Concentrations Determined by i-PiT Method

Days	Sample A (μg/ml)	Sample B (μg/ml)	Sample C (μg/ml)
1	6.0	12.5	21.2
	7.1	12.9	22.0
	6.0	11.8	19.2
2	5.7	12.7	18.6
	6.4	12.5	19.8
	6.4	14.0	21.3
3	5.9	12.5	18.6
	6.2	14.0	22.8
	6.3	12.5	23.0
4	6.9	11.9	19.3
	6.8	12.1	21.4
	5.8	10.9	21.4
5	6.5	13.2	22.7
	5.1	12.5	19.3
	6.5	12.2	20.0
Mean	6.24	12.55	20.71
S.D.	0.51	0.79	1.54
C.V.(%)	8.2	6.3	7.4

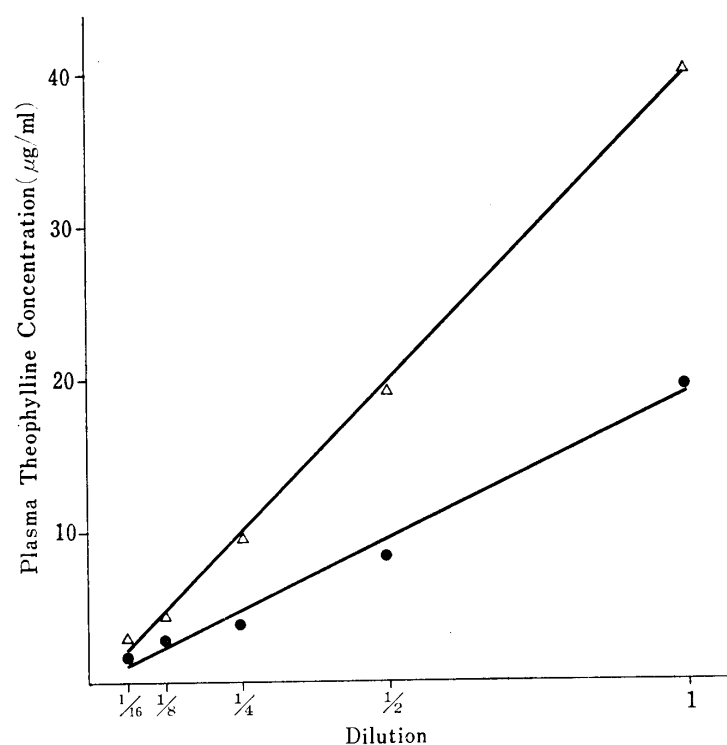


Fig. 4. Result of Dilution Test by i-PiT Method
 Δ : Standard (40.0 $\mu\text{g/ml}$), $\bullet$: Sample (19.0 $\mu\text{g/ml}$)

3. 希釈試験

40 $\mu\text{g/ml}$ の標準血清と 19.0 $\mu\text{g/ml}$ の検体 (i-PiT 法で測定) に 0 $\mu\text{g/ml}$ の検体を加えて 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 濃度に希釈し測定した。Fig. 4 に示すような結果となり良好な直線性が得られた。

4. 回収試験

6.2 $\mu\text{g/ml}$ と 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の検体 (i-PiT 法で測定) に標準血清 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ を等量加え測定した。Table 3 の結果が得られ、回収率は 93.9~108.6% と良好であった。

5. i-PiT 法と HPLC との相関

i-PiT 法で測定して 0~25 $\mu\text{g/ml}$ の 42 検体を HPLC で測定した。Fig. 5 に示すように相関係数が 0.988, 回帰直線が $y=0.978x+0.918$ と良好な相関が得られた。高濃度検体の比較は 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上のものがなかったため、今後さらに検討が必要であった。i-PiT 法は散乱光強度測定を用いるため、高脂血または凍結と融解を繰り返した検体の測定値が真の値からはずれることが考えられる。今回の HPLC との比較ではそのような検体が特に異常値となることはなかったが、ブランク値の高い検体はあらかじめフィルターでろ過することが望ましいと思われた。

Table 3. Result of Recovery Test
by i-PiT Method

	Added $\mu\text{g/ml}$	Expected $\mu\text{g/ml}$	Measured $\mu\text{g/ml}$	Recovery %
Sample A	5	5.6	5.9	105.4
	10	8.1	8.7	107.4
	20	13.1	13.9	106.1
	40	23.1	21.7	93.9
Sample B	5	8.75	8.3	94.9
	10	11.25	11.7	104.0
	20	16.25	15.7	103.5
	40	26.25	28.5	108.6

結 論

i-PiT 法により血漿中テオフィリン濃度を測定し、基礎的検討を行い次の結果を得た。

1. 検量線の再現性は良好であったが、温度、時間により変動するので、室温によりインキュベーション時間を変える必要があった。
2. 低濃度、中濃度、高濃度について同時再現性、日差変動を検討した。同時再現性、日差変動の変動係数は

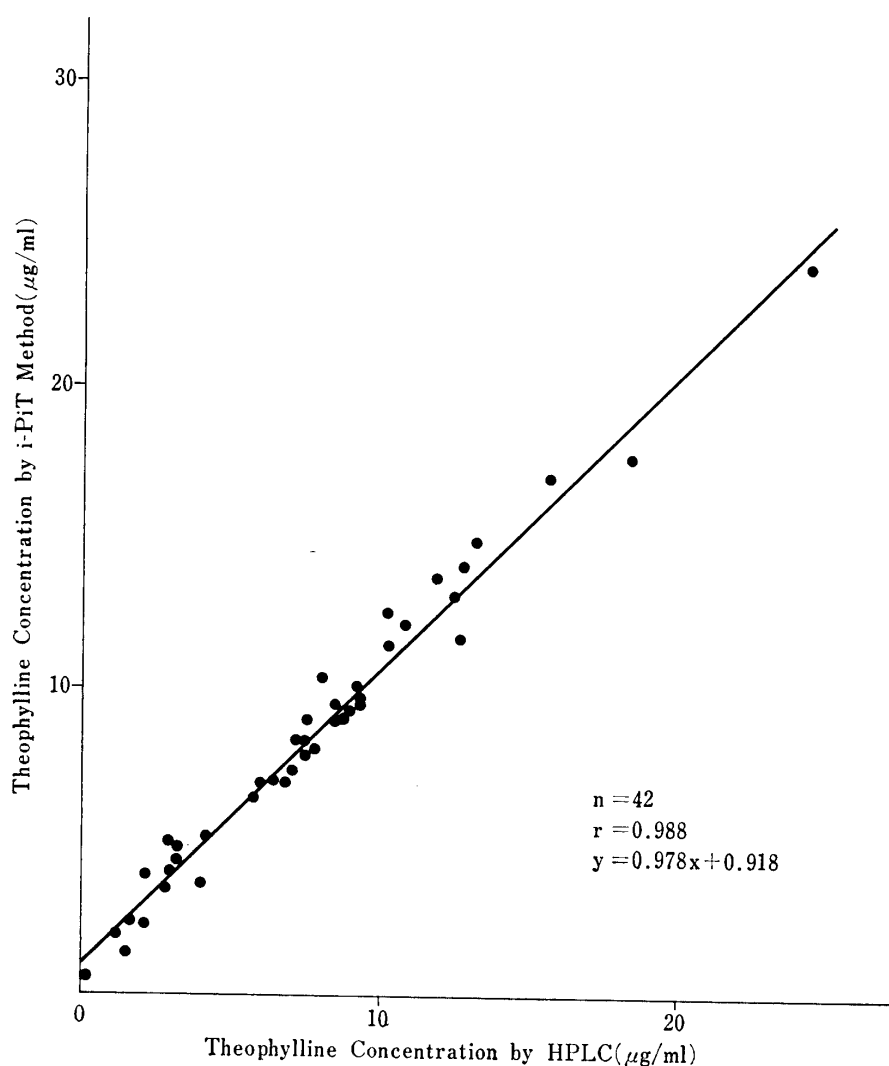


Fig. 5. Comparison of Plasma Theophylline Concentrations between HPLC and i-PiT Method

それぞれ 3.9~5.6%, 6.3~8.2% と良好であった。

3. 2種の高濃度検体について希釈試験を行い良好な直線性が得られた。

4. 2種濃度の検体について回収試験を行い回収率 93.9~108.6% と良好であった。

5. i-PiT 法と HPLC との相関は相関係数が 0.988, 回帰直線が $y = 0.978x + 0.918$ と良好であった。

以上により i-PiT 法は操作も簡便であり, 臨床的に十分応用できる測定法と考えられる。

文 献

- 1) K. M. Pfafsky, R. I. Ogilvie: New Eng. J. of Med., 292, 1218 (1975).
- 2) L. Hendels, M. Weinberger & G. Johnson: Clin. Pharmacokin., 3, 294 (1978).
- 3) 西川 隆: Med. Tech., 7, 805 (1979).
- 4) T. Nishikawa, H. Kubo & M. Saito: Clin. Chim. Acta, 91, 59 (1979).
- 5) i-PiT 取り扱い説明書, 中外製薬, 1980.
- 6) 久保博昭, 竹内泰博, 西川隆, 斉藤正行, 中嶋英彦, 後呂みえ: 医学のあゆみ, 101, 904 (1977).