

液体クロマトグラフィー質量分析用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNE™」および「DOSIMYCO™」を用いたエベロリムスおよびミコフェノール酸測定の性能評価

Performance analysis of everolimus and mycophenolic acid using the “DOSIMMUNE™” and “DOSIMYCO™” immunosuppressant drug analysis kits for LCMS.

鈴木瑛真^{1,2)}, 小林 亮¹⁾, 田中真輝人^{1,2)}, 近藤 崇¹⁾, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡^{1,2)}

要旨 LC-MS/MS用免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™ およびDOSIMYCO™を用いたエベロリムスとミコフェノール酸測定の性能評価を行った。併行精度, 室内再現精度, 希釈直線性および定量限界は良好な結果であった。対照試薬との相関性を解析した結果, 両者とも良好な相関性が得られたものの, エベロリムスにおいてLC-MS/MS法で低値傾向を認めた。測定値の不一致は, 対照試薬における代謝産物あるいは代謝産物以外の物質との交差反応が要因である可能性が示唆された。以上より, DOSIMMUNE™およびDOSIMYCO™によるエベロリムスとミコフェノール酸の測定は日常検査に有用と考えられた。

Key words LC-MS/MS, Therapeutic drug monitoring, Everolimus, Mycophenolic acid

1. はじめに

エベロリムス (everolimus : EVL) およびミコフェノール酸 (mycophenolic acid : MPA) は免疫抑制剤として臓器移植後の拒絶反応の抑制に用いられる薬剤である。これらの薬剤は, 微量で強力な薬理効果を発揮する反面, 有効血中濃度域が狭いのみならず, 薬剤の吸収および代謝における個体差が大きいため, 副作用や移植後の拒絶反応を予防するために薬物血中濃度モニタリングが必要である¹⁾。また, EVLは血球移行率が82~87%と高く, 血中ではその大部分が血球中に存在するため²⁾, 全血を溶血させた処理液を用いた測定が必要となる。従来, これ

らの血中濃度測定には様々な免疫学的測定法が用いられてきたが, 各試薬で使用している抗体の違いにより測定値に試薬間差が生じることや, 同一試薬であってもロット間差が大きいなどの問題点が指摘されている³⁻⁶⁾。現在, 血中薬物濃度の分析手法として, 液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography with tandem mass spectrometry : LC-MS/MS) 法による測定が注目されている。LC-MS/MS法は試料中の成分を液体クロマトグラフィーにより分離後イオン化し, さらに選択した質量のイオンの量を測定する分析法であることから, 高い特異性を有する測定法である。しかし, 特異性を高めるため除蛋白等の検体前処理を

Received Mar. 18, 2024; Accepted May 16, 2024
Ema SUZUKI^{1,2)}, Ryo KOBAYASHI¹⁾, Makito TANAKA^{1,2)}, Takashi KONDO¹⁾, Akemi ENDOH¹⁾, Satoshi TAKAHASHI^{1,2)}

¹⁾ 札幌医科大学附属病院 検査部

Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital.

²⁾ 札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学講座
Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine.

〒060-8543 北海道札幌市中央区南1条西16丁目
South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543, Japan.
Corresponding author : 鈴木瑛真
TEL : 011-611-2111 (内線36460)
FAX: 011-615-3646
E-mail : maema@sapmed.ac.jp

用手法で行う必要があることや、機器操作の煩雑さ故に臨床検査における自動化が進んでいない。近年、採血管の搭載のみで検体前処理から質量分析までの自動分析を可能とした、LCMS前処理装置「CLAM™-2030」およびLC-MS/MS用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNE™」, 「DOSIMYCO™」が開発された。「DOSIMMUNE™」は、EVL, シクロスポリン (Cyclosporine: CSA), タクロリムス (tacrolimus: TAC), シロリムスの4剤同時検出を目的に開発されたキットであり、我々は以前、「DOSIMMUNE™」を用いたCSA, TAC測定の有用性を報告している⁷⁾。本研究では、CLAM-2030™を用いた「DOSIMMUNE™」および「DOSIMYCO™」によるEVLとMPA測定の基本性能を評価した。

2. 材料および方法

1) 材料

札幌医科大学附属病院において、EVLおよびMPAの検査依頼があった患者の残余検体を用いた。EVLの測定にはEDTA-2K加血の全血を用い、MPAの測定には腎移植後の透析患者のEDTA-2K加血漿を使用した。また、本研究は札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会の承認を得て実施した(承認番号 352-35)。

2) 測定試薬および機器

LC-MS/MS法の移動相, 洗浄液, カラムにはDOSIMMUNE™キットを用いた。内部標準液および抽出液は、EVL測定にはDOSIMMUNE™, MPA測定にはDOSIMYCO™の試薬を使用した(いずれも株式会社島津製作所)。分析装置には全自動LCMS前処理装置CLAM™-2030および高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS™-8060NX(いずれも株式会社島津製作所)を使用した。EVLの対照試薬には電気化学発光免疫測定法(Electrochemiluminescence immunoassay: ECLIA)を原理とするエクルーシス試薬エベロリムスを用い、cobas e411(いずれもロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)で測定した。また、MPAの対照試薬として、ラテックス免疫凝集阻害法(Particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay: PETINIA)を原理とするフレックスカートリッジミコフェノール酸MPATを用い、Dimension EXL200(いずれもシーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)で測定した。

3) LC-MS/MS法の前処理方法

EVL測定用試料はEDTA-2K加血を-80℃で15分間凍結して溶血させ、流水で5分間融解後に、

MPA測定用試料はEDTA-2K加血漿を直接CLAM™-2030に搭載した。CLAM™-2030において、専用のろ過フィルターに75%イソプロパノール20μLを分注後、試料25μL, 内部標準液12.5μLおよびメタノール, アセトニトリル, 硫酸亜鉛, ギ酸アンモニウムを含む専用抽出液175μLを添加した。各試薬の混合溶液を攪拌後、陰圧にて吸引ろ過した処理液をLC-MS/MS測定試料とした。

4) LC-MS/MS法の分析条件

試料のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化ポジティブモードで行い、定量は内部標準法を用いて検出項目の面積値/検出項目の内部標準面積値より算出した。質量分析条件は、EVLのプリカーサイオンとして975.5 m/z, フラグメントイオンとして908.6 m/zを設定し(EVL(m/z 975.6→908.6)), MPAも同様に、MPA(m/z 338.1→207.1)とした。内部標準として安定同位体である¹³C₂, ²H₄-EVR(m/z 981.6→914.6)および¹³C, ²H₃-MPA(m/z 342.1→221.1)を用い、分析を行った。

5) 評価内容

(1) 併行精度

EVLは3濃度のプール全血溶解溶液を、MPAは3濃度のプール血漿をそれぞれ20回連続測定し、併行精度を調べた。

(2) 室内再現精度

-80℃で凍結保存した併行精度と同一の試料を、15日間1日2回測定を行い、室内再現精度を求めた。

(3) 定量限界

DOSIMMUNE™キャリブレーターセットおよびDOSIMYCO™キャリブレーターセットを免疫抑制剤投与歴のないEDTA-2K加血(以下フリー血)またはEDTA-2K加血漿(以下フリー血漿)にて希釈し、8または7濃度の低濃度試料を作成した。各試料を5日間2重測定し、Precision profileより変動係数(Coefficient of variation: CV)が15%となる濃度を求め、定量限界とした。

(4) 直線性

DOSIMMUNE™キャリブレーターセットおよびDOSIMYCO™キャリブレーターセットの最高濃度試料を、フリー血およびフリー血漿で5段階希釈後、それぞれ3重測定した。

(5) 対照試薬との相関性

EVLは50件、MPAは97件の患者検体を被検試薬および対照試薬で測定し、測定値の相関性を解析した。

(6) EVLの代謝産物の影響

EVLに水酸基が付加した代謝産物をEVL-OHと

して高根らの報告⁸⁾に基づき (m/z 991.6→924.6) としてEVLと同時に検出し、検量線の一次式を用い、面積比から濃度を算出した。算出された代謝産物濃度をEVLに加えた値を用い、同様に対照試薬の測定値と比較し、代謝産物を含めた測定値の相関性を解析した。

3. 成績

1) 併行精度

3濃度のプール試料用いた併行精度のCVは、EVLでは5.12~7.42%，MPAでは5.96~11.69%であった (Table 1)。

2) 室内再現精度

室内再現精度のCVは、EVLでは8.67~11.09%，MPAでは6.15~12.39%であった (Table 2)。

3) 定量限界

EVLの定量限界は0.26 ng/mL, MPAは0.11 µg/mLであった (Fig. 1a, 1b)。

4) 直線性

EVLは39.2 ng/mLまで、MPAは59.2 µg/mLまで直線性が保たれていた (Fig. 2a, 2b)。

5) 対照試薬との相関性

EVLにおける対照試薬との相関性は、相関係数 (r)は0.94, 標準主軸回帰式は $y=0.629x-0.058$ であった (Fig. 3a)。一方、MPAは、 $r=0.99$, 標準主軸回帰式は $y=1.050x+0.208$ であった (Fig. 3b)。

6) 代謝産物の影響

被検試薬におけるEVLの測定値に、その代謝産物であるEVL-OHの測定値を加え、再度相関性を解析したところ、 $r=0.94$, 標準主軸回帰式は $y=0.720x+0.235$ となった (Fig. 4)。

4. 考察

今回我々は、LC-MS/MS用免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™およびDOSIMYCO™を用いたEVLおよびMPA測定における基本性能を評価した。

Table 1 Repeatability.

EVL	(n=20)		
	Low	Medium	High
Mean (ng/mL)	3.3	5.1	9.9
SD	0.25	0.37	0.51
CV (%)	7.42	7.12	5.12
MPA	(n=20)		
	Low	Medium	High
Mean (µg/mL)	1.3	9.8	15.1
SD	0.08	0.97	1.76
CV (%)	5.96	9.85	11.69

Table 2 Intermediate precision.

EVL	(n=30)		
	Low	Medium	High
Mean (ng/mL)	2.8	4.8	9.8
SD	0.31	0.53	0.85
CV (%)	11.05	11.09	8.67
MPA	(n=30)		
	Low	Medium	High
Mean (µg/mL)	1.3	9.5	14.7
SD	0.13	0.58	1.82
CV (%)	9.90	6.15	12.39

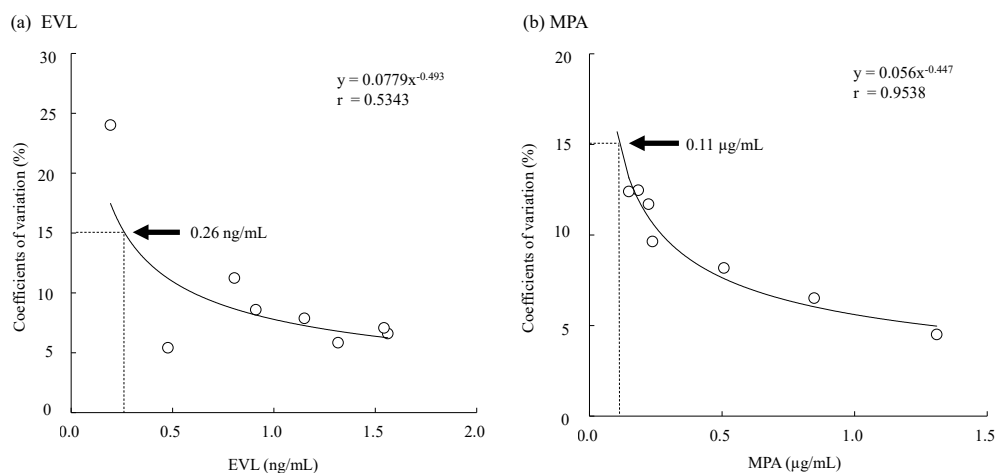


Fig. 1 Limit of quantitation. (a) is EVL and (b) is MPA.

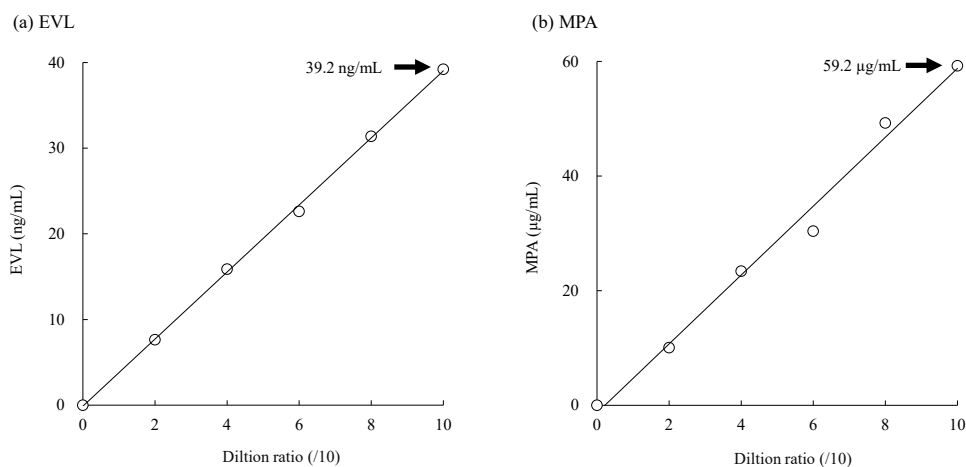


Fig. 2 Dilution linearity. (a) is EVL and (b) is MPA.

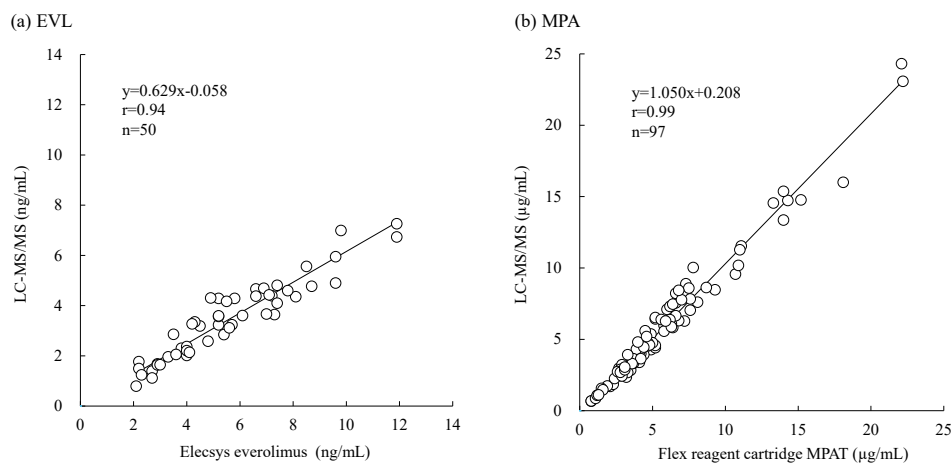


Fig. 3 Correlation between measured values of LC-MS/MS and comparative method.

- (a) EVL measured by LC-MS/MS and Elecsys everolimus
- (b) MPA measured by LC-MS/MS and Flex reagent cartridge MPAT.

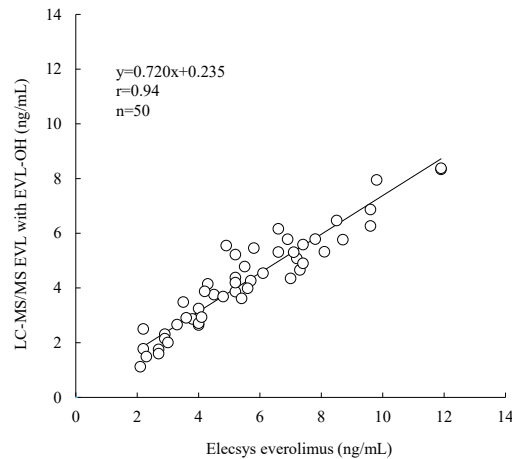


Fig. 4 Correlation between measured values of LC-MS/MS including EVL-OH and Elecsys everolimus.
EVL-OH: metabolic product of everolimus

アメリカ食品医薬品局から2018年に発行された Bioanalytical Method Validation では、LC-MS/MS 法を用いた分析における併行精度および室内再現精度は15%以下であることが推奨されている⁹⁾。我々が検証した併行精度および室内再現精度の結果は、これらの基準を満たすことからCLAM-2030™、DOSIMMUNE™およびDOSIMYCO™を用いた分析は良好な精度を有すると考えられた。また、これまでに対照試薬の測定範囲はEVLが0.30~22.1 ng/mL、MPAが0.16~33.7 μg/mLと報告されている¹⁰⁾、¹¹⁾。これに対し被検試薬はEVLが0.26~39.2 ng/mL、MPAが0.11~59.2 μg/mLと対照試薬と比較して測定範囲の拡大を認めた。次に、対照試薬との相関性を調べたところ、MPAにおいては良好な相関性が認められ、測定値も一致していた。MPAは肝において薬理活性を示さないグルクロン酸抱合体 (MPA glucuronide: MPAG) に代謝され、腎から排泄される¹²⁾。対照試薬はこのMPAGと交差反応することが知られており^{13,14)}、中野らは非透析例を対象とした検討において、高速液体クロマトグラフィー法と比較し、PETINIA法が高値傾向となることを報告している¹⁵⁾。本検討結果ではLC-MS/MS法と対照試薬で測定値が一致しており、既報と異なる結果となったが、この原因については、本検討が対象とした検体は全例透析患者由来であり、透析によってMPAGが除去されたためと考えられた¹⁶⁾。交差反応の一因となるMPAGが除去された検体において両者の測定値が一致した結果は、LC-MS/MS法が対照法のような非特異的の反応を引き起こしていない可能性を示唆するものと考えられる。一方

EVLは良好な相関性が認められたものの、被検試薬の測定値は対照試薬と比較し、低値となる傾向を認めた。Shipkovaらは、本検討結果同様にLC-MS/MS法の測定値が対照試薬と比較し3割以上低く、その一因が対照試薬における抗everolimus抗体と代謝産物の交差反応であると報告している¹⁷⁾。また、EVL-OHが腎移植患者におけるEVLの主要代謝物であるとの報告もある¹⁸⁾。そこで我々はLC-MS/MS法を用いてEVL-OHを検出し、EVL濃度にEVL-OHの推定濃度を加えた値と対照試薬のEVL濃度を用いて相関性の再解析を行い、測定値へ影響を及ぼしているか否かを検証した。その結果、回帰式の傾きは0.629から0.720と、測定値が近似したことから、対照試薬によるEVLの代謝産物との交差反応が、両者における測定値不一致の一因となっている可能性が示唆された。しかし、測定値の一致には至っておらず、代謝産物との交差反応以外の要因も関与していると考えられる。植田らは、免疫学的測定法において、移植患者血漿中に含まれる抗体が交差反応を引き起こすことを報告しており¹⁹⁾、対照試薬は代謝産物以外の血漿成分との反応性を有していることが推察される。臨床検査における血中薬物濃度測定は、現在のところ免疫学的測定法が一般的であるが、今後、特異性の高いLC-MS/MS法による測定の普及が望まれる。

従来LC-MS/MS法は、機器操作が複雑で習熟を要し、移動相や検量線作成のための標準液を自施設で調整する必要があった。加えて、検体の除蛋白などの前処理を的手法で行うため、測定者間差が生じることが問題となっていた。このような測定時の煩

雑さから、LC-MS/MS法は臨床検査への普及が進んでいなかった。今回我々が検討を行った全自動前処理装置CLAM™-2030は、除蛋白から質量分析装置への導入、分析までを全自動で行うことが可能な装置であり、従来の測定時の問題を克服した。また、移動相、洗浄液、抽出液、キャリブレーター、コントロール試料、内部標準液、カラムがキット化されたDOSIMMUNE™およびDOSIMYCO™を用いることで、自施設による試薬の調整が不要となり、煩雑性が解消された。また本検討結果より、DOSIMMUNE™キットの移動相、洗浄液、およびカラムを用いて、MPAの測定が可能であることが明らかとなり、カラムおよび移動相変更の際に必要な、装置内の移動相の置換操作を経ることなく、MPA測定が可能であることが示された。

5. 結論

LC-MS/MS用免疫抑制剤分析キットDOSIMMUNE™およびDOSIMYCO™を用いたEVLとMPAの測定は、十分な基礎性能を有しており、代謝産物の影響を受けないことから高い特異性を有し、日常検査に有用であると考えられた。

本論文の発表に関連して、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

文献

- Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. Clin Pharmacokinet 2004;43:83-95.
- Winkler M, Ringe B, Baumann J, et al. Plasma vs whole blood for therapeutic drug monitoring of patients receiving FK 506 for immunosuppression. Clin Chem 1994;40:2247-2253.
- 打田和治. 2011年シクロスポリン血中濃度測定精度管理結果報告 (ASI Ltd. & CCPF Joint Program) International quality control survey 結果より. 今日の移植 2011;24:568-572.
- 端幸代, 増田智先, 山本崇ほか. Tacrolimus血中濃度測定法の差異に関する臨床的評価: MEIA, CLIA, ACMA, EMIT間の比較検討. 移植 2012;47:75-81.
- Shipkova M, Rapp S, Rigo-Bonnin R, et al. Therapeutic drug monitoring of everolimus: comparability of concentrations determined by 2 immunoassays and a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. Ther Drug Monit 2017;39:102-108
- Vogeser M, Shipkova M, Rigo-Bonnin R, et al. Multicenter analytical evaluation of automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. Ther Drug Monit 2014;36:640-650.
- 鈴木瑛真, 村井良精, 小林亮ほか. 全自動LCMS前処理装置CLAM™-2030を用いた液体クロマトグラフィー質量分析用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNE™」の性能評価. 医療検査と自動化 2023;48(1):62-67.
- 高根真希, 田藤晶深, 金子結ほか. 全自動LCMS前処理装置CLAM™を用いた質量分析法による免疫抑制剤の血中濃度測定に関する評価. 移植 2021;56:15-23.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Biopharmaceutics ; U.S., 2018
- 笹野真紀, 木村茂樹, 前田育宏ほか. 血中エベロリムス濃度測定試薬 “エクルーシス® 試薬エベロリムス” の基礎的検討. 医学と薬学 2016;73(10):1321-1327.
- 大藪智奈美, 佐藤伊都子, 山本和宏ほか. PETINIA法による血中ミコフェノール酸測定試薬の基準測定法LC-MS/MS法との比較. 医学検査 2020;69(1):36-43.
- Bullingham R, Monroe S, Nicholls A et al. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after singledose oral and intravenous administration. J Clin Pharmacol. 1996;36:315-324.
- Hosotsubo H, Takahara S, Imamura R et al. Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. Ther Drug Monit. 2001;23:669-74.
- Dimension Mycophenolic Acid Flex reagent cartrid (MPAT). Declaration of Conformity. Issue Date 2011. SIEMENS.
- 中野恵一, 山田武宏, 安田慶子ほか. ミコフェノール酸血中濃度測定における代謝産物が与え

- る影響. JJCLA 2016;41(5):659-664.
- 16) Shaw LM, Mick R, Nowak I et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients with delayed graft function. J Clin Pharmacol. 1998;38:268-75.
- 17) Shipkova M, Rapp S, Rigo-Bonnin R, et al. Therapeutic drug monitoring of everolimus: comparability of concentrations determined by 2 immunoassays and a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. Ther Drug Monit 2017;39:102-108.
- 18) Strom T, Haschke M, Zhang YL, et al. Identification of everolimus metabolite patterns in trough blood samples of kidney transplant patients. Ther Drug Monit 2007;29:592-599.
- 19) 植田貴史, 山森元博, 小野由加里ほか. ACMA 法で異常高値を示す症例の判別法の検討. TDM 研究 2010;27:168-172.