

血液検査用メトトレキサートキット 「ルミパルスプレスト® メトトレキサート」の基礎的検討

Performance analysis of a methotrexate analysis reagent
“Lumipulse Presto Methotrexate”

鈴木瑛真^{1,3)}, 小林 亮¹⁾, 井山 諭^{1,2)}, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聡^{1,3)}

要旨 メトトレキサート測定試薬「ルミパルスプレスト® メトトレキサート」の基礎的検討を行った。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であり、共存物質の影響も認められなかった。対照試薬との相関性を解析した結果、被検試薬における高値傾向を認めた。代謝産物との交差反応性を比較した結果、対照試薬と比較して被検試薬で低減されていることが明らかとなった。以上より、「ルミパルスプレスト® メトトレキサート」の基本性能は良好であり、代謝産物との交差反応性も低減されていることから日常検査に有用と考えられた。

Key words Lumipulse Presto Methotrexate, DAMPA, Cross reactivity with metabolites

1. はじめに

葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート (methotrexate: MTX) は、抗がん剤、免疫抑制剤、抗リウマチ薬として幅広く使用されている。特に急性白血病、悪性リンパ腫および骨肉種等の悪性腫瘍に対してMTX大量療法が有効であり、その副作用防止を目的としてロイコボリン救援療法が行われている^{1,2)}。重篤な副作用は血中濃度に相関して発現することから、副作用回避のために血中濃度の測定が必須とされている³⁾。

現在MTXの測定には、主に免疫学的測定法を測定原理とした試薬が用いられているが、測定範囲が狭いことに加え、従来の免疫学的測定法はMTXの主要代謝物である7-ヒドロキシメトトレキサート (7-hydroxymethotrexate: 7-OH-MTX) や微量代謝物である2, 4-ジアミノ-N10-メチルプロテイン酸

(2, 4-diamino -N10-methylpteroic acid: DAMPA) と交差反応を起こすことが問題視されている^{4,5)}。また、MTX排泄遅延時の解毒薬としてグルカルピダーゼが2021年9月に本邦で製造販売承認を受けたが、その投与により従来MTXの微量代謝産物とされていたDAMPAへの代謝が亢進し、DAMPAの血中濃度が増加する⁶⁾。これまで用いられてきた免疫学的測定法による測定試薬では、試薬中の抗体とDAMPAが交差反応を引き起こすことが報告されており、グルカルピダーゼ投与例では血中のMTX濃度を適切に評価できない可能性がある⁷⁾。今回、測定範囲の拡大と代謝産物との交差反応の低減を目的に「ルミパルスプレスト メトトレキサート」が開発された。そこで、「ルミパルスプレスト メトトレキサート」の基本性能および、代謝産物の影響について検討を行ったので報告する。

Received Jul. 25, 2024; Accepted Nov. 7, 2024
Ema SUZUKI^{1,3)}, Ryo KOBAYASHI¹⁾, Satoshi IYAMA²⁾, Akemi ENDOH¹⁾, Satoshi TAKAHASHI^{1,3)}

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 血液内科学講座

Department of Hematology, Sapporo Medical University School of Medicine.

³⁾ 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.

Corresponding author: 鈴木瑛真

TEL: 011-611-2111 (内線36460)

FAX: 011-615-3646

E-mail: maema@sapmed.ac.jp

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、MTXの血中濃度測定依頼があった患者の残余検体35件を用いた。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 342-89）。

2) 測定試薬および機器

被検試薬には、化学発光酵素免疫測定法を原理とする「ルミパルスプレスト メトトレキサート」を用い、ルミパルスL2400（いずれも富士レビオ株式会社）を用いて測定した。対照試薬は、化学発光免疫測定法を原理とする「アーキテクト・メトトレキサート」を使用し、ARCHITECT PLUS i2000SR（いずれもアボットジャパン合同会社）にて測定した。

3) 被検試薬の測定原理

検体10 μ Lと酵素標識抗体（アルカリホスファターゼ標識メトトレキサート）50 μ L、抗体結合粒子（抗メトトレキサートマウスモノクローナル抗体）50 μ Lを混和し、37℃で16分間反応させる。この間、検体中のメトトレキサートと酵素標識抗体は抗体結合粒子と競合的に反応し、免疫複合体を形成する。B/F分離後、基質液（3-(2'-spiroadamantane)4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane: AMPPD）を添加し、37℃で4分間反応させる。AMPPDは粒子に間接的に結合したアルカリホスファターゼの触媒作用により分解され、その際の発光量を測定することで濃度を算出する。

4) 評価内容

(1) 併行精度

3濃度のプール試料を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

メトトレキサートキャリブレーターをMTX投与歴のない血清（以下フリー血清）にて希釈し、5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10%となる濃度を求め、定量限界とした。

(4) 直線性

メトトレキサートキャリブレーターの最高濃度試

料を、フリー血清で10段階希釈後、それぞれ3重測定した。

(5) 共存物質の影響

干渉チェックAプラス（シスメックス株式会社）およびRF高値試料を用いて、抱合型および遊離型ビリルビン、溶血ヘモグロビン、乳び、リウマトイド因子（Rheumatoid factor: RF）を使用し、測定値に及ぼす影響を検討した。未添加時の測定値 $\pm 5\%$ を許容基準として評価を行った。

(6) 対照試薬との相関性

35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。なお、両測定法の測定値の差を求め、差の平均値とSDを用いてBland-Altman分析を行った。平均値 $\pm 2SD$ から逸脱したものを乖離例とした。

(7) 代謝産物の影響

MTXの代謝産物である7-OH-MTXおよびDAMPAの影響について検証した。各代謝産物をそれぞれ2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 μ mol/Lになるように調整し、調整した各試料をMTX溶液（濃度約0.5 μ mol/L）を用いて10倍希釈して測定を行い、代謝産物が測定値に与える影響を調べた。

5) 統計解析

各測定性能の解析には、日本臨床化学会が提供している定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support-V62を用いた。

3. 成績

1) 併行精度

CVは0.86~1.18%であった（Table 1）。

2) 室内再現精度

CVは1.92~2.02%であった（Table 2）。

3) 定量限界

定量限界は0.011 μ mol/Lであった（Fig. 1）。

4) 直線性

25.0 μ mol/Lまで直線性が保たれていた（Fig. 2）。

5) 共存物質の影響

抱合型ビリルビンは20.1 mg/dL、遊離型ビリルビンは19.7 mg/dL、乳びは1,480 ホルマジン濁度、RFは697 IU/mL、溶血ヘモグロビンは480 mg/dLまで測定値への影響は認められなかった（Fig. 3）。

Table 1 Repeatability

	(n=20)		
	Low	Medium	High
Mean (μmol/L)	0.10	1.12	11.52
SD	0.001	0.010	0.136
CV (%)	1.17	0.86	1.18

Table 2 Intermediate precision

	(n=30)		
	Low	Medium	High
Mean (μmol/L)	0.10	1.13	11.63
SD	0.002	0.022	0.235
CV (%)	1.92	1.92	2.02

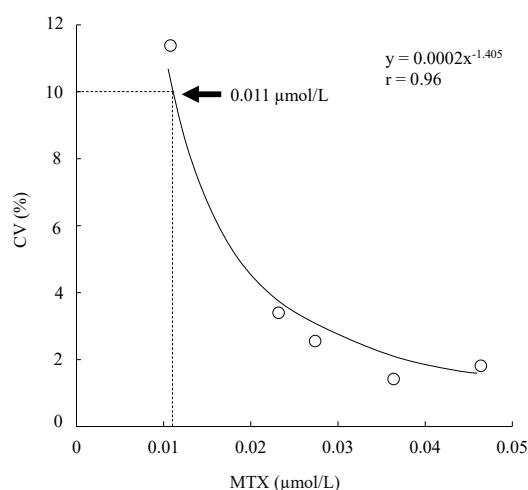


Fig. 1 Limit of quantitation

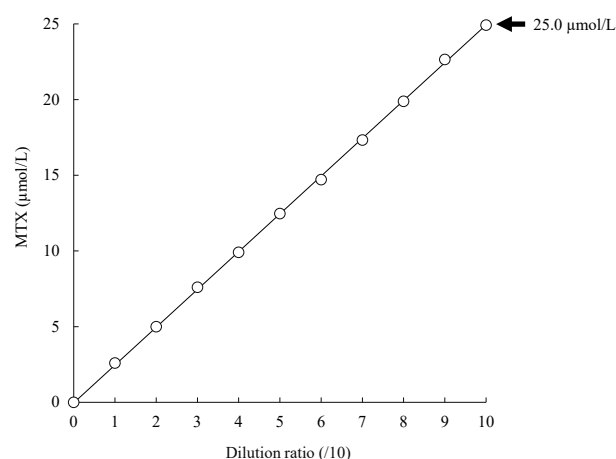


Fig. 2 Dilution linearity

6) 対照試薬との相関性

全35件の相関係数(r)は0.99であり、標準主軸回帰式は $y=1.222x + 0.010$ であった (Fig. 4a)。対照試薬の測定上限である1.5 μmol/L以下の検体のみを用いて再度相関を調べたところ、 $r=0.98$ 、標準主軸回帰式は $y=1.212x + 0.020$ であった (Fig. 4b)。また、両者の測定値において2例の乖離例を認めた。

7) 代謝産物の影響

7-OH-MTXに対する交差反応性は、被検試薬で-4.0~1.0 %, 対照試薬で0.0~8.0 %であった (Table 3)。DAMPAに対する交差反応性は、被検試薬で4.0

~10.8 %, 対照試薬で19.5~40.0 %であった (Table 4)。

4. 考察

今回我々は、ルミパルスL2400を用いた「ルミパルスプレスト メトトレキサート」の基礎的検討を行った。その結果、併行精度のCVは最大1.18%、室内再現精度のCVは最大2.02%と良好であり、低濃度域、高濃度域のいずれにおいても安定した測定が可能であることが確認された。また、被検試薬の定量限界は0.011 μmol/L、希釈直線性は25 μmol/Lと、対照試薬と比較して測定範囲の大幅な拡大を認

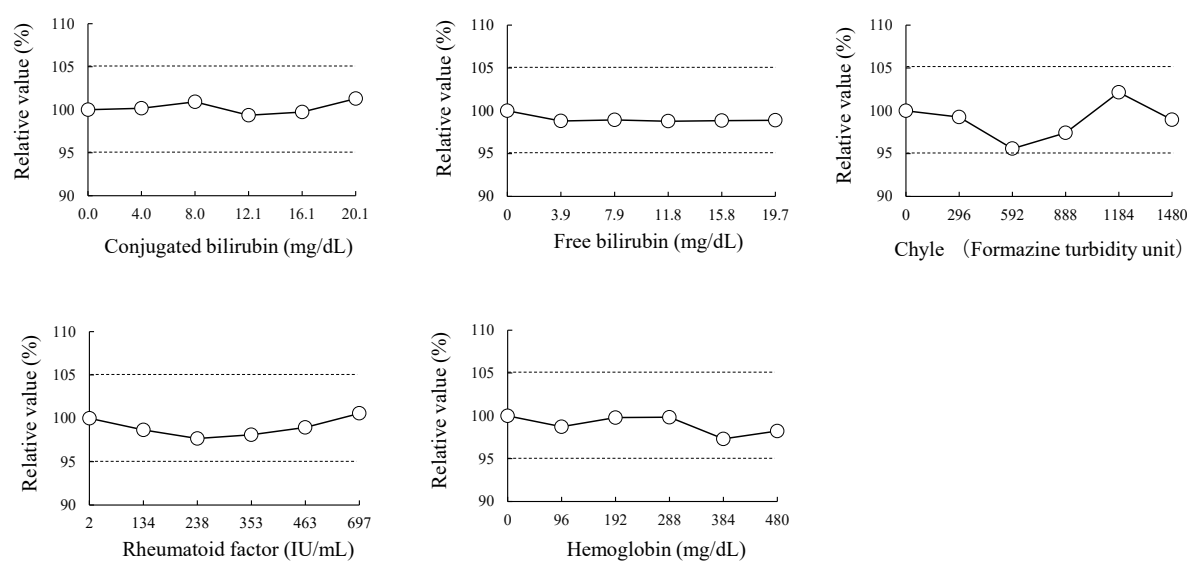


Fig.3 Effects of interfering substances.
Dotted line : $\pm 5\%$ of the value without addition

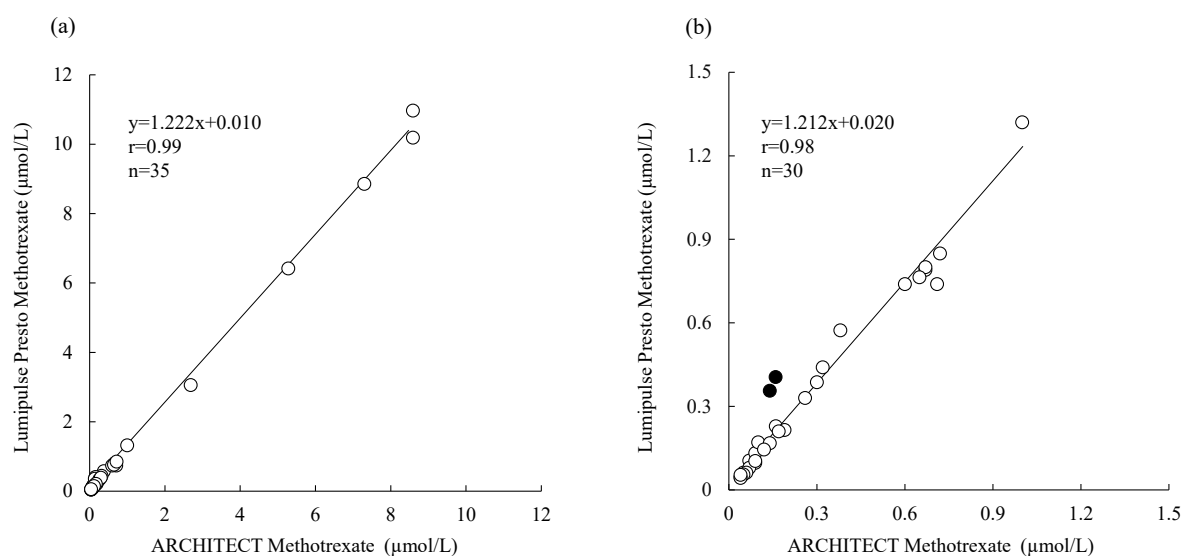


Fig.4 Correlation between measured values of "Lumipulse Presto Methotrexate" and "ARCHITECT Methotrexate"
(a) All sample (b) Concentrations up to 1.5 $\mu\text{mol/L}$ ● deviation

めた^{8,9)}。MTX・ロイコボリン救援療法において、MTX投与開始後24時間の濃度が10.0 $\mu\text{mol/L}$ を超えると副作用のリスクが高まるとされており¹⁰⁾、被検試薬の使用により、従来希釈再検を必要としたこの濃度域において再検率の減少が期待でき、迅速な結果報告が可能となる。2023年4月1日から2024年3月31日までの当院におけるMTX濃度測定件数は125件であり、対照試薬で希釈再検（20倍希釈）を必要とした割合は24%（30/125）であり、更にその

半数である15件において再希釈（400倍）が必要であった。一方、被検試薬において希釈再検（10倍希釈）が必要な割合は12%（12/125）であり、再希釈を必要とする検体は無かった。共存物質の影響は、いずれも既報同様 $\pm 5\%$ 以内であり、認められなかった¹¹⁾。また、対照試薬との相関性を解析した結果、相関係数は良好であったが、被検試薬で高値傾向を示した。ラテックス免疫比濁法を測定原理としたMTX測定試薬を対照とした既報においても、被検

Table 3 Cross reactivity with 7-OH-MTX

Lumipulse Presto Methotrexate							
7-OH-MTX concentration (μmol/L)	0.00 ^{※1}	0.25	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00
MTX concentration after 7-OH-MTX addition (μmol/L)	0.47	0.46	0.47	0.48	0.49	0.46	0.47
MTX concentration after 7-OH-MTX addition - Control sample concentration (μmol/L)		-0.01	0.00	0.01	0.02	-0.01	0.00
Cross-reactivity (%)		-4.0	0.0	1.0	1.0	-0.2	0.0
ARCHITECT Methotrexate							
7-OH-MTX concentration (μmol/L)	0.00 ^{※2}	0.25	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00
MTX concentration after 7-OH-MTX addition (μmol/L)	0.36	0.38	0.36	0.40	0.36	0.36	0.36
MTX concentration after 7-OH-MTX addition - Control sample concentration (μmol/L)		0.02	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
Cross-reactivity (%)		8.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0

※1 Lumipulse Presto Methotrexate 0.00 μmol/L calibrator

※2 ARCHITECT Methotrexate 0.00 μmol/L calibrator

Table 4 Cross reactivity with DAMPA

Lumipulse Presto Methotrexate							
DAMPA concentration (μmol/L)	0.00 ^{※1}	0.25	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00
MTX concentration after DAMPA addition (μmol/L)	0.48	0.49	0.52	0.57	0.65	1.00	1.56
MTX concentration after DAMPA addition - Control sample concentration (μmol/L)		0.01	0.04	0.09	0.17	0.52	1.08
Cross-reactivity (%)		4.0	8.0	9.0	8.5	10.4	10.8
ARCHITECT Methotrexate							
DAMPA concentration (μmol/L)	0.00 ^{※2}	0.25	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00
MTX concentration after DAMPA addition (μmol/L)	0.38	0.48	0.49	0.60	0.77	1.67	2.91
MTX concentration after DAMPA addition - Control sample concentration (μmol/L)		0.10	0.11	0.22	0.39	1.29	2.53
Cross-reactivity (%)		40.0	22.0	22.0	19.5	25.8	25.3

※1 Lumipulse Presto Methotrexate 0.00 μmol/L calibrator

※2 ARCHITECT Methotrexate 0.00 μmol/L calibrator

試薬の高値傾向を報告しており¹¹⁾、被検試薬は他の免疫学的測定法を原理とする測定試薬と比較して高値傾向であることが示された。MTXに限らず、現在用いられている免疫学的測定法を原理とする血中薬物濃度測定試薬は測定値の試薬間差が問題となっている⁸⁾。試薬間差の原因として、各測定試薬で使用する抗体の認識部位が異なることが指摘されており、本検討における測定値差の一因と考えられる。しかし、被検試薬は液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography with tandem mass spectrometry : LC-MS/MS) 法との相関性が高いことが示されており⁹⁾、より正確な血中濃度を反映

している可能性が考えられた。また、対照試薬の測定上限である1.5 μmol/Lまでの相関分析において、乖離例が2例認められた。いずれもMTX・ロイコボリン救援療法が施行された小児患者で、MTX投与後48時間の検体であった。乖離の原因については不明であるが、前述の通りMTXの副作用リスクが高まるとされている濃度は、MTX投与後48時間で、1.0 μmol/L以上であるため、この乖離の臨床的意義は低いと考えられる。また、被検試薬はMTX代謝産物との交差反応低減を目的としており、その効果について対照試薬と交差反応性を比較した。その結果、MTXの代謝産物である7-OH-MTXとの交

差反応性に大きな差は認められなかったが、DAMPAとの交差反応性は、対照試薬の19.5～40.0%に対し、被検試薬は4.0～10.8%と、明らかな交差反応の低減が認められた。すなわち、グルカルピダーゼ投与後のMTX濃度を評価する場合、対照試薬ではDAMPAとの交差反応性が高いことから、正確な血中濃度を評価することは困難であると考えられる。一方、被検試薬は対照試薬と比較してDAMPAとの交差反応性の大幅な軽減が認められ、本研究対象にはグルカルピダーゼ投与例は含まれていないものの、今後グルカルピダーゼ投与例が増加する可能性も考えられることから、被検試薬の有用性は高いと考えられる。

5. 結論

「ルミパルスプレスト メトトレキサート」の基本性能は良好であり、測定範囲が広く再検率の減少が期待できる。また、対照試薬と比較してDAMPAとの交差反応性が少なく、グルカルピダーゼ投与時のMTX測定に有用であることが示唆された。

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

- 1) Stoller RG, Hande KR, Jacobs SA, et al. Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity. *N Engl J Med*. 1977;297:630-634.
- 2) Hon YY, Evans WE. Making TDM work to optimize cancer chemotherapy: a multidisciplinary team approach. *Clin Chem*. 1998;44:388-400.
- 3) 国立がん研究センター中央病院. HD-MTX療法の手引き (メトトレキサート). 2020年10月版.
- 4) Slordal L, Prytz PS, Pettersen I, et al. Methotrexate measurements in plasma: comparison of enzyme multiplied immunoassay technique, TDx fluorescence polarization immunoassay, and high pressure liquid chromatography. *Ther Drug Monit*. 1986;8:368-372.
- 5) Howell SK, Wang YM, Hosoya R, et al. Plasma methotrexate as determined by liquid chromatography, enzyme-inhibition assay, and radioimmunoassay after high-dose infusion. *Clin Chem*. 1980;26:734-737.
- 6) Wolfrom C, Hepp R, Hartmann R, et al. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol*. 1990;39(4):377-383.
- 7) Al-Turkmani MR, Law T, Narla A, et al. Difficulty measuring methotrexate in a patient with high-dose methotrexate induced nephrotoxicity. *Clin Chem*. 2010;56:1792-1794.
- 8) 中村裕美 ほか. メトトレキサート試薬2法の性能評価. *医学検査*. 2016;65:290-297.
- 9) ルミパルスプレスト メトトレキサート 添付文書
- 10) Nirenberg A, Mosende C, Mehta BM, et al. High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue: predictive value of serum methotrexate concentrations and corrective measures to avert toxicity. *Cancer Treat Rep*. 1977;61:779-783.
- 11) 岡崎一幸, 大前星佳, 西山有紀子, ほか. ルミパルス®L2400を用いたメトトレキサート定量試薬「ルミパルスプレスト®メトトレキサート」の基礎性能評価. *医学と薬学*. 2022;79(10):1397-1406.