

液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた免疫抑制剤 血中濃度測定における液体窒素による溶血処理法の検討

Examination of hemolysis treatment using liquid nitrogen for measurement of immunosuppressant concentrations by liquid chromatography-mass spectrometry.

鈴木瑛真^{1,2)}, 近藤 崇¹⁾, 村井良精¹⁾, 田中信悟^{1,2)}, 遠藤明美¹⁾, 高橋 聰^{1,2)}

要旨 LC-MS/MS法を用いた免疫抑制剤血中濃度測定における液体窒素による溶血処理の有用性について検討した。液体窒素への検体の浸漬時間は15秒が妥当であった。ヘマトクリット値の影響を調べたところ、シクロスボリンは25.2~72.2 %, タクロリムスは23.0~66.0 %の範囲において影響は認められなかつた。現行法と被検法で測定値を比較したところ、良好な相関性を示した。検体到着から結果報告までの時間を比較したところ、シクロスボリンは約16分、タクロリムスは約6分短縮されていた。以上より、液体窒素を用いた溶血処理は有用であることが示唆された。

Key words liquid nitrogen, hemolysis treatment, immunosuppressants, hematocrit, LC-MS/MS

1. はじめに

シクロスボリン (Cyclosporine : CSA), タクロリムス (tacrolimus : TAC) 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ている。これらは有効血中濃度域が狭く、個人間での薬物動態の変動が大きいため、投与にあたり継続的な血中濃度のモニタリングが必要となる^{1,2)}。また、従来これら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が異なることや、同一試薬であっても試薬ロット間差が大きいなどの問題点がある³⁻⁶⁾。これらの問題を解決するために、我々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) 法による測定法の有用性を報告し、日常検査に用いている⁷⁾。CSA

とTACは血液中ではその大部分が赤血球中に存在するため^{8,9)}、血液検体の溶血処理が必要となる。溶血処理は凍結融解による方法が簡便であるが、-80°Cの場合、完全溶血には15分程度の凍結時間と5分程度の融解時間を要する¹⁰⁾。外来診療においては、検査結果の確認後に薬物の投与量を決定する場合もあり、迅速性が求められる。そこで我々は、溶血処理の凍結時間を短縮することを目的に液体窒素を用いた溶血処理時間について検討したので報告する。

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、CSAおよびTACの検査依頼があった患者の残余検体 (EDTA-2K加血液) を使用した。

Received Aug. 7, 2025; Accepted Oct. 1, 2025

Ema SUZUKI^{1,2)}, Takashi KONDO¹⁾,
Ryosei MURAI¹⁾, Shingo TANAKA^{1,2)},
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36440)
FAX : 011-615-3646
E-mail : maema@sapmed.ac.jp

2) 測定試薬および機器

分析にはLC-MS/MS用免疫抑制剤分析キット「DOSIMMUNE™」を用い、全自动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LCMSTM-8060NX（いずれも株式会社島津製作所）で測定した。移動相、洗浄液、カラムは全てDOSIMMUNE™キットの試薬を用い、エレクトロスプレーイオン化ポジティブモードで分析を行った。MSの分析条件は、ネブライザガス流量：3.0 L/min、ドライングガス流量：10 L/min、ヒーティングガス流量：10 L/min、インターフェース温度：200°C、脱溶媒温度：250°C、ヒートブロック温度：200°Cで行った。測定モードは多重反応モニタリング（multiple reaction monitoring: MRM）で行い、CSA (m/z 1219.8→1202.9), [2H12]-CSA (m/z 1231.7→1214.9), TAC (m/z 821.5→768.3), [13C, 2H4]-TAC (m/z 826.5→773.4) とし、各項目の定量には内部標準法を用い、ピーク面積値／内部標準ピーク面積値より算出した¹⁰⁾。ヘマトクリット値の測定には多項目自動血球分析装置NX-3100（システムズ株式会社）を使用した。

3) 凍結時間の検討

CSAおよびTACについてそれぞれ5濃度のプール試料（以下、Sample 1～Sample 5）を作成し、プール試料約250 μLを1.5 mLスクリューキャップチューブに移し替え、以下に示す現行法と被検法で溶血処理を行った。現行法は-80 °Cで15分凍結し、5分間流水融解した。被検法は液体窒素にそれぞれ15秒、30秒、60秒、300秒浸漬し、流水で5分間融解した。その後、溶血処理後の現行法と被検法のCSAおよびTAC濃度を比較した。

4) 併行精度

現行法と被検法（浸漬時間15秒）を用いて検体を10重測定して併行精度を調べ、変動係数CV（%）を算出した。評価はアメリカ食品医薬品局から2018年に発行されたBioanalytical Method Validation¹¹⁾を参考に、CV15%以内を良好とした。

5) ヘマトクリット値の影響について

EDTA-2K加血を遠心分離後、血漿を分離し、ヘマトクリット値をおよそ30%，50%，70%になるように調整した。被検法（浸漬時間15秒）で溶血処理後、CSAおよびTAC濃度を測定し、現行法と

比較してヘマトクリット値の影響を調べた。

6) 相関分析

患者検体（CSAは30検体、TACは50検体）を被検法（浸漬時間15秒）と現行法で溶血処理後、CSAとTACを測定し相関性を検討した。

7) Turnaround timeの比較

現行法と被検法（浸漬時間15秒）の検体到着から結果報告までの時間（Turnaround time: TAT）を比較した。1か月間に当院の診療前検査において現行法および被検法（浸漬時間15秒）で検査されたTACとCSAのTATの最短時間、最長時間、および平均値を比較した。

3. 成績

1) 凍結時間の検討

(1) CSA

凍結時間15秒の場合、現行法との濃度の比率は97.6 %～110.8 %、同様に30秒の場合は86.9 %～107.7 %、60秒の場合は87.8 %～116.8 %、300秒の場合は95.1 %～114.3 %であった（Table 1）。

(2) TAC

凍結時間15秒の場合、現行法との濃度の比率は、97.3 %～114.8 %であった。同様に30秒の場合は91.7 %～108.9 %、60秒の場合は93.3 %～111.4 %、300秒の場合は97.5 %～106.2 %であった（Table 2）。

凍結時間15秒～300秒の現行法との濃度の比率についてt検定を行ったところ、各凍結時間に有意な差は認められなかったため最も短い凍結時間15秒を以降の検討で用いることとした。

2) 併行精度

2濃度のプール試料を10重測定した。

(1) CSA

変動係数CVは、5.72 %～5.81 %であった（Table 3）。

(2) TAC

変動係数CVは、7.47 %～10.10 %であった（Table 4）。

3) ヘマトクリット値の影響について

ヘマトクリット値の差がCSAおよびTAC濃度に及ぼす影響について調べた。

液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた免疫抑制剤血中濃度測定における液体窒素による溶血処理法の検討

Table 1 Comparison of dipping times in liquid nitrogen (CSA).

	Comparative Method	dipping time in liquid nitrogen (sec)			
		15	30	60	300
Sample 1 (ng/mL)	10.57	11.14	10.73	12.35	11.43
Ratio to Comparative method (%)		105.4	101.5	116.8	108.1
Sample 2 (ng/mL)	510.30	504.42	446.08	511.33	485.17
Ratio to Comparative method (%)		98.8	87.4	100.2	95.1
Sample 3 (ng/mL)	89.69	87.51	77.98	78.71	86.17
Ratio to Comparative method (%)		97.6	86.9	87.8	96.1
Sample 4 (ng/mL)	258.27	286.08	278.02	253.08	295.09
Ratio to Comparative method (%)		110.8	107.7	98.0	114.3
Sample 5 (ng/mL)	794.16	813.08	756.87	813.96	830.97
Ratio to Comparative method (%)		102.4	95.3	102.5	104.6

Table 2 Comparison of dipping times in liquid nitrogen (TAC).

	Comparative Method	dipping time in liquid nitrogen (sec)			
		15	30	60	300
Sample 1 (ng/mL)	11.45	12.71	12.47	12.75	12.16
Ratio to Comparative method (%)		111.0	108.9	111.4	106.2
Sample 2 (ng/mL)	3.68	4.22	3.37	3.93	3.586
Ratio to Comparative method (%)		114.8	91.7	106.9	97.5
Sample 3 (ng/mL)	8.19	7.97	8.64	8.36	8.25
Ratio to Comparative method (%)		97.3	105.5	102.1	100.7
Sample 4 (ng/mL)	5.96	6.36	6.34	5.57	6.01
Ratio to Comparative method (%)		106.6	106.2	93.3	100.7
Sample 5 (ng/mL)	14.78	15.31	15.04	14.90	14.83
Ratio to Comparative method (%)		103.5	101.7	100.8	100.3

Table 3 Repeatability (CSA).

(n=10)		
dip in liquid nitrogen for 15 seconds	Low	High
average (ng/mL)	47.18	208.68
SD (ng/mL)	2.74	11.93
CV (%)	5.81	5.72

Table 4 Repeatability (TAC).

(n=10)		
dip in liquid nitrogen for 15 seconds	Low	High
average (ng/mL)	4.97	16.56
SD (ng/mL)	0.37	1.67
CV (%)	7.47	10.10

Table 5 Effect of hematocrit (CSA).

Hematocrit (%)	Comparative method (ng/mL)	dip in liquid nitrogen for 15 seconds (ng/mL)	Ratio to comparative method (%)
23.0	11.5	11.0	95.7
33.4	6.3	6.0	95.2
40.7	17.7	17.6	99.4
44.3	7.1	7.3	102.8
63.5	9.3	9.2	98.9
66.0	19.7	19.9	101.0

Table 6 Effect of hematocrit (TAC).

Hematocrit (%)	Comparative method (ng/mL)	dip in liquid nitrogen for 15 seconds (ng/mL)	Ratio to comparative method (%)
25.2	100.3	98.4	98.1
28.3	301.2	302.3	100.4
48.4	119.7	119.3	99.7
50.1	376.5	377.2	100.2
65.8	475.3	453.7	95.5
72.2	128.6	128.7	100.1

(1) CSA

ヘマトクリット値23.0 %～66.0 %の範囲において測定値差は95.2 %～102.8 %であった (Table 5)。

(2) TAC

ヘマトクリット値25.2 %～72.2 %の範囲において測定値差は95.5 %～100.4 %であった (Table 6)。

4) 相関分析

被検法と現行法の相関性について分析した。

(1) CSA

相関係数 (r) は0.98, 標準主軸回帰式は $y=0.95x + 10.25$ であった (Fig. 1a)。測定値の最小値は46 ng/mL (現行法; 42 ng/mL), 最大値は486 ng/mL (現行法; 488 ng/mL) であった。

(2) TAC

相関係数 (r) は0.97, 標準主軸回帰式は $y=0.96x + 0.17$ であった (Fig. 1b)。測定値の最小値は1.5 ng/mL (現行法; 1.6 ng/mL), 最大値は14.5 ng/mL (現行法; 15.1 ng/mL) であった。

5) Turnaround timeの比較

現行法では, CSA の最短時間は34分31秒, 最長時間は1時間13分36秒, TAC の最短時間は34分7秒, 最長時間は1時間34分40秒であったのに対し, 被検法では, CSA の最短時間は20分56秒, 最長時間は1時間3分19秒, TAC の最短時間は17分49秒, 最長時間は1時間24分7秒であった (Table 7)。また現行法では, CSA が平均49分22秒, TAC が

液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた免疫抑制剤血中濃度測定における液体窒素による溶血処理法の検討

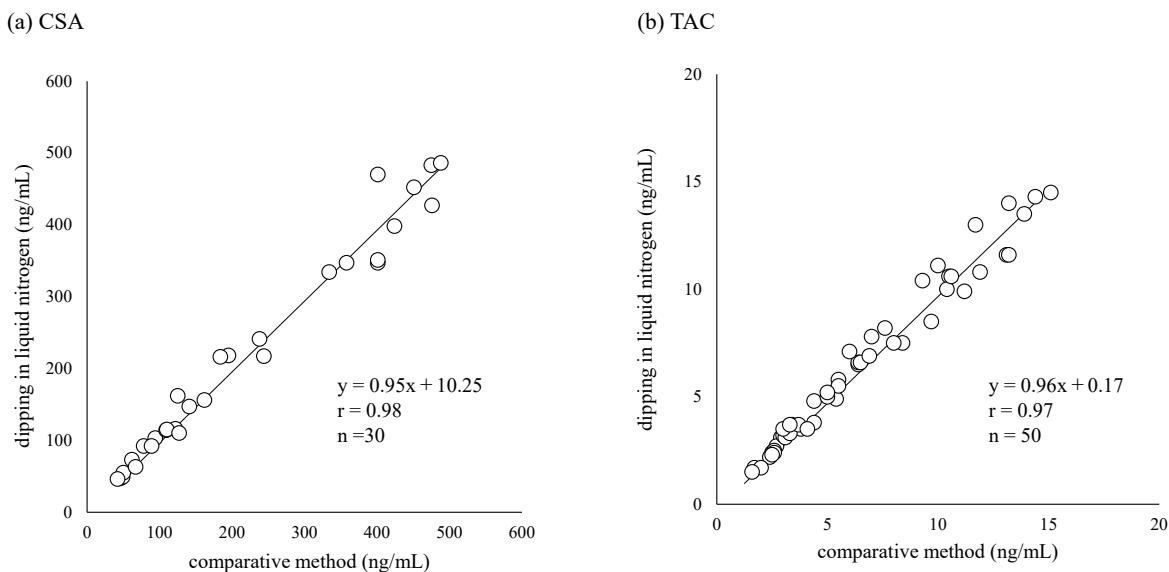


Fig. 1 Correlation between measured values of dipping in liquid nitrogen and comparative method.
(a)CSA (b)TAC

Table 7 Comparison of turnaround times over a month.

	CSA			TAC		
	Min	Max	Average	Min	Max	Average
Comparative Method (h:mm:ss) ^{※2}	0:34:31	1:13:36	0:49:22	0:34:07	1:34:40	0:43:30
dip in liquid nitrogen for 15 seconds (h:mm:ss) ^{※3}	0:20:56	1:03:19	0:33:46	0:17:49	1:24:07	0:37:21

※1 Turnaround Time : Time from sample arrival to result report.

※2 The collection period is August 1st - 31st, 2022.(CSA ; 25 samples. TAC ; 38 samples.)

※3 The collection period is February 1st – 28th, 2023. (CSA ; 17 samples. TAC ; 69 samples.)

平均43分30秒であったのに対し、被検法ではCSAが平均33分46秒、TACが平均37分21秒であった（Table 7）。単独測定では最短時間で測定されるが、検体が多くなるにつれて測定時間は長くなった。

4. 考察

今回我々は、免疫抑制剤血中濃度測定における、液体窒素を用いた溶血処理の有用性について検討した。代表的な溶血方法として血液の凍結融解が簡便な方法として知られており、その機序は、凍結融解による赤血球膜のATPase活性の増加、コリンエステラーゼ及びリン脂質の遊離、ウイルス吸着性の低下などによる膜構造の崩壊であるとされている¹²⁾。一方で、-80 °Cでも完全溶血には15分程度を要し¹⁰⁾、その他、加圧や塩類の浸透圧による溶血方法が知ら

れているが、加圧には数十分を要し、塩類を添加した場合は血中薬物濃度への影響が懸念される¹³⁻¹⁵⁾。液体窒素は-196 °Cと非常に低温かつ、比較的安価で購入できることから、溶血処理に有用であると考えられたため、液体窒素を用いた溶血処理について検討した。まず、適当な凍結時間について調べたところ、検討範囲の15秒から300秒まで測定値に差はなかったことから、凍結時間は最も短時間の15秒とした（Table 1, 2）。凍結時間15秒で溶血処理した場合の同時再現性を確認した結果、我々が以前報告⁷⁾した現行法の変動係数（CSA : 3.7 %~6.1 %, TAC : 4.2 %~7.3 %）と同等の再現性が得られた（Table 3, 4）。この条件を用いて、ヘマトクリット値の影響について調べたところ、CSAおよびTACのいずれにおいても、検討範囲内でヘマトクリット

値の影響を受けなかった (Table 5, 6)。ヘマトクリット値の影響については、大西らが一部の免疫学的測定法において、ヘマトクリット値が低値になるにつれてTAC濃度が偽高値を示すことを報告しており、その原因がTACの代謝産物と交差反応することであると推察している¹⁶⁾。本検討で用いているLC-MS/MS法は、測定原理上、交差反応のような免疫学的測定法特有の非特異的反応は起こらず、故に、非常に特異性の高い測定法である¹⁷⁾。したがって、本検討結果に矛盾はないと考える。

次に、現行法と被検法のTATを比較したところ、CSAは約16分、TACは約6分短縮されていた (Table 7)。免疫学的測定法2法のTAC濃度測定におけるTATを比較した島野らの報告によると、Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) 法は平均35分14秒、Affinity Chrome Mediated Immunoassay (ACMIA) 法は平均21分41秒であった¹⁸⁾。本研究で用いたLC-MS/MS法の特徴として、非常に特異性の高い分析法である一方、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) 部分と質量分析部を繋ぐ流路が1本であるため、複数検体の同時測定には時間を要することを以前筆者らが述べた¹⁹⁾。そのため、免疫学的測定法とTATの平均値を比較すると、LC-MS/MS法が最も長く37分21秒であった。しかし最短時間は、ACMIA法の20分54秒よりも短い、17分49秒であった。したがって、LC-MS/MS法を用いた血中免疫抑制剤濃度測定における液体窒素を用いた溶血処理方法は、TATの短縮に有用であるが、同時測定を必要とする場合には、TATが延長することを考慮する必要がある。

また、精密さの評価方法である室内再現精度については、溶血方法として液体窒素を用いている関係上、検討期間中検体を凍結保存しておくことが不可能であり、連続した測定が困難であったことから実施しなかった。

5. 結論

免疫抑制剤血中濃度測定における液体窒素を用いた溶血処理方法の凍結時間は、15秒が適当と考えられた。この処理方法は現行法と測定値の変動が少なく、TATを短縮できることから臨床的に有用である。

本研究は、当院臨床研究審査委員会の承認（承認番号：372-7）を得て、観察研究として実施した。

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) Ptachicinski JR, Venkataraman R, Burckart JG. Clinical Pharmacokinetics of Cyclosporin. *Clin Pharmacokinet.* 1986;11:107-132.
- 2) Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22:328-335.
- 3) 打田和治. 2011年シクロスボリン血中濃度測定精度管理結果報告 (ASI Ltd. & CPCF Joint Program) International quality control survey. *今日の移植* 2011;24:568-572.
- 4) 端幸代, 増田智先, 山本崇ほか. タクロリムス血中濃度測定法の差異に関する臨床的評価: MEIA, CLIA, ACMIA, EMIT間の比較検討. *移植* 2012;47:75-81.
- 5) Shipkova M, Vogeser M, Ramos PA, et al. Multi-center analytical evaluation of a novel automated tacrolimus immunoassay. *Clin Biochem* 2014;47:1069-1077.
- 6) Vogeser M, Shipkova M, Rigo-Bonni R, et al. Multicenter analytical evaluation of automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. *Ther Drug Monit* 2014;36:640-650.
- 7) 鈴木瑛真, 村井良精, 小林 亮ほか. 全自動 LCMS前処理装置CLAMTM-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.
- 8) 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.
- 9) Sketris I, Yatscoff R, Keown P, et al. Optimizing the use of cyclosporine in renal transplantation. *Clin Biochem* 1995;28:195-211.
- 10) 高根真希, 田靡晶深, 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薬の血中濃度測定に関する評価. *移植* 2021;56:15-23.
- 11) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation Guidance for*

液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた免疫抑制剤血中濃度測定における液体窒素による溶血処理法の検討

- Industry, Biopharmaceutics ; U.S., 2018
- 12) 荒木 忠. 凍結による赤血球の膜構造の変化について. 凍結及び乾燥研究会会誌 1977;23:58-61.
- 13) Kitajima H, Yamaguchi T, Kimoto E. Hemolysis of human erythrocytes under hydrostatic pressure is suppressed by crosslinking of membrane proteins. J Bio chem 1990;108:1057-1062.
- 14) Yamaguchi T, Kawamura H, Kimoto E, et al. Effects of temperature and pH on hemoglobin release from hydro static pressure-treated erythrocytes. J Bio chem 1989;106:1080-1085.
- 15) 笹川 渥, 徳永栄一. 保存血液の物理的および化学的性質の変化について II. 温度による影響. J.j.t.m 1974;21(1):8-15.
- 16) 大西和也, 吉岡訓子, 部屋衣美子ほか. 造血幹細胞移植におけるタクロリムス血中濃度測定法の評価-MEIA法及びACMIA法-. TDM研究 2009;26(2):47-51.
- 17) Shipkova M, Svinarov D. LC-MS/MS as a tool for TDM services: Where are we? Clin Biochem 2016;49:1009-1023.
- 18) 島野志都子, 大川龍之介, 戸塚 実ほか. Dimension EXL200によるタクロリムス測定の基礎的検討と Turnaround Time の評価. 医療検査と自動化 2020;45(1):53-58.
- 19) 鈴木瑛真, 小林 亮, 近藤崇ほか. LC-MS/MS法による血中免疫抑制剤濃度の測定と検査部での運用の実際. 医療検査と自動化 2024;49(2):108-111.