[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
技術報告
17(5) 388-394 (1991)

モノクローナル抗体を用いた FPIA 法による全血中 シクロスポリン濃度モニタリング

結城祥充†¹, 唯野貢司†¹, 高橋保志†¹, 富所謙吉†¹, 井関 健†²,
宮崎勝巳†², 平野哲夫†³

市立札幌病院薬局†¹

北海道大学医学部附属病院薬剤部†²

市立札幌病院腎移植科†³

The Clinical Evaluation of Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) Based on Monoclonal Antibody for Monitoring of Cyclosporine in Whole Blood

YOSHIMITSU YUHKI†¹, KOHJI TADANO†¹, YASUSHI TAKAHASHI†¹,
KENKICHI TOMIDOKORO†¹, KEN ISEKI†², KATSUMI MIYAZAKI†²,
and TETSUO HIRANO†³

The Department of Pharmacy, Sapporo City General Hospital†¹

The Department of Pharmacy, Hokkaido University, School of Medicine,
Hokkaido University†²

The Department of Renal Transplant, Sapporo City General Hospital†³

(Received May 22, 1991)

The clinical advantage of fluorescence polarization immunoassay for determination of cyclosporine (CYA) based on monoclonal antibody (M-FPIA) was compared with high-performance liquid chromatography (HPLC), radio immunoassay on monoclonal antibody (M-RIA), and fluorescence polarization immunoassay on polyclonal antibodies (P-FPIA). To clarify the evaluation of this method (M-FPIA), whole blood levels of CYA in 24 renal transplant recipients, who were treated by CYA therapy, were determined by each analytical method.

The coefficients of variation obtained by M-FPIA for the within-run and between-run precisions were 2.1 to 2.5% and 1.5 to 3.2%, respectively. There was a significantly good correlation between the data of HPLC and those of M-FPIA ($r=0.988$), M-RIA and M-FPIA (0.988), P-FPIA and M-FPIA (0.942), however, the value of CYA by P-FPIA was 2-fold of the value of the drug by M-FPIA. The values with M-FPIA were approximately the same as those with HPLC and M-RIA. These results suggest that M-FPIA be very useful for the emergent and routine monitoring of CYA on the clinical practice.

Keywords—cyclosporine; through level monitoring; fluorescence polarization immunoassay; renal transplantation; monoclonal antibody

†^{1,3} 札幌市中央区北1条西9丁目; Kita-1-jo, Nishi-9-chome, Chuo-ku, Sapporo-shi, 060 Japan

†² 札幌市北区北14条西5丁目; Kita-14-jo, Nishi-5-chome, Kita-ku, Sapporo-shi, 060 Japan

はじめに

シクロスポリン (CYA) は、その強力な免疫抑制効果により腎、骨髄移植の経過において著しい

成績向上をもたらし、現在広く臨床に使用されている。しかし、CYA の治療有効濃度域は狭く、腎毒性、肝毒性等の副作用を発現させることなく十分な免疫抑制効果を得るには血中濃度モニタリングによる投与設定が必要とされる¹⁾。CYA 血中濃度測定法としては、全血試料を用いて CYA 未変化体のみを測定することが重要であり、現在、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) やラジオイムノアッセイ法が繁用されている。現在、これらの測定法の欠点として、前者では測定試料調整の繁雑さ、後者では特殊な設備を必要とすることなどが指摘されており、日常の頻用性に適しているとはいえない。

このため、迅速性、簡便さの面から蛍光偏光免疫測定法 (Fluorescence Polarization Immunoassay : FPIA) による血中濃度モニタリングを行っている施設も多く、HPLC の比較に関する報告もいくつかみられる^{2~5)}。

しかしながら、現在使用されている FPIA はポリクローナル抗体を使用したキット (P-FPIA) であるため CYA 代謝物との交差反応が、測定値に影響を及ぼすことが指摘されている^{6~8)}。

近年開発されたモノクローナル抗体を用いた FPIA キット (M-FPIA, ダイナバック, ダイナボット社) は、全血中より選択的に CYA 未変化体のみを測定することが可能であり、代謝物との交差反応性も極めて低いことが報告されている^{9~10)}が、実際の腎移植患者血液試料への適用例はほとんど報告されていない。

そこで今回、この M-FPIA の有用性について種々検討することを目的として、CYA 投与中の腎移植患者24名の全血試料を用い、本 M-FPIA と従来の P-FPIA、モノクローナル抗体を用いたラジオイムノアッセイキット (M-RIA) および HPLC による各測定値の相関性を比較した。また、CYA 血中濃度の日内変化が著しい腎移植患者症例において、M-FPIA を用いて血中濃度変動の要因について検討したので報告する。

方 法

1. 対象

市立札幌病院腎移植科で行った腎移植症例24名を対象とした。

2. 投与方法

体重当たりから算出した CYA 内服液 (サンディミュン: サンド社) の1日量を2分割し経口投与した。他の免疫抑制剤としてプレドニゾロンおよびミゾリピンを併用した。

3. 測定試料

CYA は赤血球との親和性が高く、一般的に測定試料としている血漿 (血清) を使用すると血漿 (血清) 分離の際の温度条件およびヘマトクリット値により赤血球への CYA 取込み量が異なるため¹⁾、温度条件等に影響されない全血を測定試料とした。

4. CYA 血中濃度測定法

移植後2~3日目より週2回、主に朝、夜服薬直前 (トラフレベル) に採血し HPLC, M-RIA, P-FPIA および M-FPIA を用いて検討した。また、血中濃度変動の要因を検討するため、朝服薬直前、朝服薬後1, 2, 3, 4, 6, 8時間、夜服薬直前、夜服薬後1, 2, 3, 4, 5, 8時間、朝服薬直前の採血 (経時的採血) を行った。

1) HPLC^{11~12)}

試験管内に内標準物質 (cyclosporin D : サンド社, 500ng/ml) を含むメタノール溶液 1ml を加え溶媒留去後、全血試料 1ml 並びに pH 9.2 の 0.1M リン酸緩衝液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 1ml を加え、5秒間攪拌して溶血させた後、ジエチルエーテルを 7ml 加えて10分間振とうし、3,000rpm で5分間遠心分離を行い、上層を 5ml 分取した。上層留去後の残渣にメタノール : 0.1N 塩酸 (2 : 1) の混液を 600 μl 加え、再溶解させた後 n-hexane を 2ml 加えて10分間振とうし、3,000rpm で5分間遠心分離を行い、下層を 500 μl 分取し溶媒を留去した。次いで溶媒留去後の残渣にアセトニトリル 100 μl を加えて HPLC の試料とした。

HPLC 装置は日立 L-6000 型を用い、カラム (Hiber LiChrosorb RP-18, 5 μm , 4mm $\times$ 125

mm, Merck), 移動相 (アセトニトリル:水=63:37), 流速 (0.7 ml/min), カラム温度 (70°C), 検出器 (UVモニター), 検出波長 (210nm) の条件で測定を行った. CYA 濃度は内標準物質とのピーク面積比によって算出した.

2) M-FPIA^{9,10)}

モノクローナル抗体を用いた CYA 全血用ダイナパック・キット (ダイナボット社) を使用した. 前処理として全血 150 μ l に, 可溶化剤を 50 μ l 分注し, さらに沈殿用試薬 300 μ l 添加後10秒間 Vortex Mixer で攪拌し, 遠心分離 (9,500 $\times$ g, 5分間) して得られた上清を測定試料とした.

次いで, 上澄液 300 μ l 以上を, サンプルカートリッジに分取し, TDX-全自動螢光偏光免疫測定装置 (アボット社) にセットした. CYA 濃度はあらかじめ検量線用既知 CYA 濃度血液 (キャリブレータ) を用いて作成しておいた検量線により算出した.

3) P-FPIA²⁻⁴⁾

ポリクローナル抗体を用いた CYA 全血用ダイナパック・キット (ダイナボット社) を使用した. 前処理法については, ほぼ M-FPIA と同様であるが, 検体量は 50 μ l を用いた.

4) M-RIA¹³⁾

シクロトラック・キット (バクスター社) を用いた. 測定は (株) SRL (スペシャルレファレンス・ラボラトリー) に依頼し, 得られた結果を M-RIA による全血中 CYA 濃度測定値とした.

結 果

1. M-FPIA の再現性

1) 日内再現性

CYA の各濃度 既知試料 (150, 400, 800ng/ml) を用いて20回同時に測定し日内再現性について検討した. その結果, Table 1 に示すように変動係数 (CV) は 2.1~2.5% と良好な値を示した.

2) 日間再現性

日内再現性の検討と同様に, 3濃度の CYA 添加全血について測定毎に毎回検量線を作成する方法で5回測定を行い, 日間再現性について検討した. その結果, 変動係数 (CV) は 1.5~3.2% と良好な値を示した (Table 1).

2. 各測定方法間の相関性

腎移植患者の全血試料について HPLC, M-FPIA, P-FPIA および M-RIA を用いて CYA 血中濃度測定を行い, それぞれの相関性について検討した.

HPLC 値と M-FPIA 値の相関関係は, Fig. 1 に示したように $n=121$ で $r=0.988$ と良好な相関関係を示し, M-FPIA 値は CYA 未変化体を選択的に定量していると考えられた. また, M-RIA 値と M-FPIA 値の相関関係は, Fig. 2 に示したように $n=63$ で $r=0.988$ と HPLC 値と同様に良好な相関関係を示した.

次に, トラフレベルにおける P-FPIA 値と M-FPIA 値の相関関係を Fig. 3 に示した. $n=100$ で $r=0.942$ と良好な相関関係を示したが, 代謝物と交差反応を示すと考えられている P-FPIA^{6,7)} は M-FPIA より測定値の約2倍高い値を示した.

3. CYA 経口投与中の腎移植患者における血中濃度日内変動

CYA 2分割経口投与後の血中濃度日内変動の

Table 1. Precision of M-FPIA Method

	Within-run (n=20)			Between-run (n= 5)		
	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	CV (%)	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	CV (%)
L	150.4	3.8	2.5	154.3	2.8	1.8
M	394.1	8.1	2.1	393.1	6.0	1.5
H	787.1	17.5	2.2	795.6	25.7	3.2

Fig. 1. Comparison of Cyclosporine (CYA) Concentrations in Whole Blood by HPLC and M-FPIA

Fig. 2. Comparison of Cyclosporine (CYA) Concentrations in Whole Blood by M-RIA and M-FPIA

Fig. 3. Comparison of Cyclosporine (CYA) Concentrations in Whole Blood by P-FPIA and M-FPIA

著しい腎移植患者を対象として、M-FPIA を用いて CYA 濃度測定を行うとともに投与計画について検討した。

患者は腎移植手術後、CYA 投与量を 7.4mg/kg/day とし、朝 8 時および夜 8 時の等間隔・等用量で朝、夜ともに食後経口投与で開始した。しかしながら CYA 血中濃度は朝と夜のトラフレベルの差が著しく、その後に続く至適投与量の設定は困難をきわめたため、その体内動態の推移を確認する目的で 24 時間の経時的採血を行った。

Fig. 4 に経時的 CYA 濃度推移の結果を示した。図から明らかなように日中と夜間では血中動態に大きな違いが認められた。すなわち、朝のトラフレベルは夜のトラフレベルに比べ約 2 倍高い測定値を示したにもかかわらず生物学的利用率 (AUC) は夜間で明らかな低下が認められた。このような日内変動が起こる理由については、すでに報告しているように食直後(朝)、および食後ある程度の時間経過後(夜)における薬物の胃排泄挙動の違いによることが考えられた^{14,15)}。したがって、この日内変動のバラツキを改善する目的で、

夜を食前投与とし CYA の血中動態をさらにモニタリングした。

Fig. 5 は投与計画を変更した後、定常状態に達した時点での 24 時間の経時変化を示したものである。投与時間を変更することにより本症例では日中と夜間の血中動態はほぼ一定の推移を示し、至適投与量の設定を行うことが可能であった。この患者の場合、その後投与量を 7mg/kg/day とし、現在、トラフレベルにおける CYA 血中濃度および副作用の発現等について経過観察を続行中である。

考 察

今回、M-FPIA を用いて全血中 CYA 濃度測定法について検討した。その結果、測定精度は、日内再現性が CV=2.1~2.5%，日間再現性が CV=1.8~3.2% といずれも良好な再現性が得られた。また、M-FPIA は従来繁用されている HPLC および M-RIA と比較して、定量操作の簡便さ、迅速性共にすぐれた測定法であり、臨床応用する際には極めて有用と考えられた。さらに、

Fig. 4. Whole Blood Cyclosporine (CYA) Concentration-time Curve Obtained by M-FPIA in a Patient (male, 33year, 54kg) after Oral Administration

各測定方法間の相関性については、1) HPLC, M-RIA および M-FPIA : 良好な相関関係を示し、かつ3測定法から得られた値はよく一致するものであった。2) P-FPIA と M-FPIA : 良好な相関関係を示したが、代謝物も同時に測定すると思われる^{6,7)} P-FPIA は、M-FPIA による測定値の約2倍高い値を示した。これらの結果から、実際の患者全血試料を用いた場合も、M-FPIA は HPLC および M-RIA と同様に CYA 未変化体を選択的に測り得るものと考えられた。

また、本手法を用いて CYA 血中濃度の日内変動が著しかった患者に対し、より迅速かつ的確に投与設計の変更を行うことが可能であった。これらのことより、今後、迅速性を要求される臨床の

場において、M-FPIA は CYA 血中濃度測定法として極めて有用であることが示唆された。

引用文献

- 1) 打田和治, 高木 弘, *Medical Immunology*, 14, 598 (1987).
- 2) 唯野貢司, 結城祥充, 高橋保志, 富所謙吉, 平野哲夫, *臨床検査機器・試薬*, 11, 443 (1988).
- 3) 唯野貢司, 結城祥充, 高橋保志, 富所謙吉, 平野哲夫, *医学と薬学*, 20, 475 (1988).
- 4) 唯野貢司, 結城祥充, 高橋保志, 富所謙吉, 宮崎勝巳, 平野哲夫, 片岡是充, 大橋伸生, 山田智二, 山崎秀博, 斯波光生, 桜井哲男, 上田峻弘, 移植, 24, 585 (1989).
- 5) 大林雅彦, 堀江芳子, 原 明宏, 安生紗枝子, 近藤由利子, 小原武博, *病院薬学*, 16, 288 (1990).

Fig. 5. Whole Blood Cyclosporine (CYA) Concentration-time Curve Obtained by M-FPIA in a Patient (male, 33year, 54kg) after Oral Administration

- 6) A. Lindholm, S. Henricsson, *Ther. Drug Monit.*, **12**, 344 (1990).
- 7) 打田和治, 高木 弘, “シクロスポリンの臨床”, 高木弘編, 医歯薬出版, 東京, 1989, pp. 11-25.
- 8) 結城祥充, 臨床病理, **38**, 157 (1990).
- 9) P. Wang, V. Meucci, E. Simpson, M. Morrison, S. Lunetta, M. Zajac, R. Boeckx, *Transplant. Proc.*, **22**, 1186 (1990).
- 10) R. W. Yatscoff, K. R. Copeland, C. J. Faracl, *Clin. Chem.*, **36**, 1969 (1990).
- 11) 結城祥充, 唯野貢司, 高橋保志, 国分邦男, 平野哲夫, 札病誌, **47**, 65 (1987).
- 12) K. Tadano, Y. Yuhki, Y. Takahashi, K. Koku-bun, T. Hirano, K. Miyazaki, T. Arita, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **18**, 537 (1987).
- 13) 結城祥充, 唯野貢司, 高橋保志, 富所謙吉, 平野哲夫, 宮崎勝巳, TDM 研究, **6**, 22 (1989).
- 14) 結城祥充, 唯野貢司, 高橋保志, 富所謙吉, 宮崎勝巳, 丹田勝敏, 平野哲夫, 臨床薬理, **21**, 475 (1990).
- 15) 平野哲夫, 丹田勝敏, 結城祥充, 唯野貢司, *TRENDS & TOPICS in Transplantation*, **1**, 14 (1990).