

原 著

当センターにおける免疫抑制剤(シクロスポリン・タクロリムス) 測定法の検討

臨床検査科

越 智 楓 入 汐 弘 美 四 井 昭 二 正 木 裕 美 子
松 田 忠 司 岩 田 和 友 子 岡 田 倫 之

The basic evaluation of immunoassay for immunosuppressive drugs (cyclosporine and tacrolimus)

Kaede Ochi, Hiromi Irishio, Shoji Yotsui, Yumiko Masaki, Tadashi Matsuda, Yoshiko Iwata, Noriyuki Okada

Abstract

We evaluated the basic performance of electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA) for immunosuppressive drugs (cyclosporine and tacrolimus). Within-run reproducibility, between-run reproducibility, linearity in dilution test, effective sensitivity, correlation between ECLIA and chemiluminescence immunoassay (CLIA), sample stability and difference between measurer were showed satisfactory results. There was no difference in the 0-24hr blood levels of tacrolimus and area under the concentration-time curve (AUC) 0-24hr between ECLIA and CLIA. ECLIA for immunosuppressive drugs is more useful in clinical practice because of higher sensitivity, easier pretreatment and shorter measuring time.

Key words : tacrolimus, cyclosporine, immunoassay, ECLIA

要 旨

電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) におけるシクロスポリン・タクロリムス測定の基礎的検討を行った。同時再現性、日差再現性、希釈直線性、実効感度、対照法 (CLIA) との相関、検体の安定性、測定者間差の有無について結果は良好であった。タクロリムスのトラフ・投与後の血中濃度には ECLIA 法と CLIA 法とで差はみられなかった。ECLIA 法では CLIA 法に比しシクロスポリン・タクロリムスとも感度が良く、前処理が簡便で測定時間も短いことから臨床的に有用と考えられる。

は じ め に

当センターでは、免疫抑制剤であるシクロスポリン、タクロリムスの血中濃度を院内測定している。シクロスポリンは土壌細菌 *Tolypocladium inflatum* から分離され、主に T 細胞のサイトカイン産生を阻害する。タクロリムスは土壌細菌 (放線菌 *Streptomyces tsukubaensis*) より分離され、主として細胞障害性 T 細胞の分化増殖を抑制する。両免疫抑制剤は静脈内あるいは経口投与されるが、経口投与では消化管からの吸収率に個人差がある。また、有効治療域や安全域が狭く、投与不足による拒絶反応や過剰投与による副作用の発現を回避するため血中濃度の測定が必要不可欠である。当セ

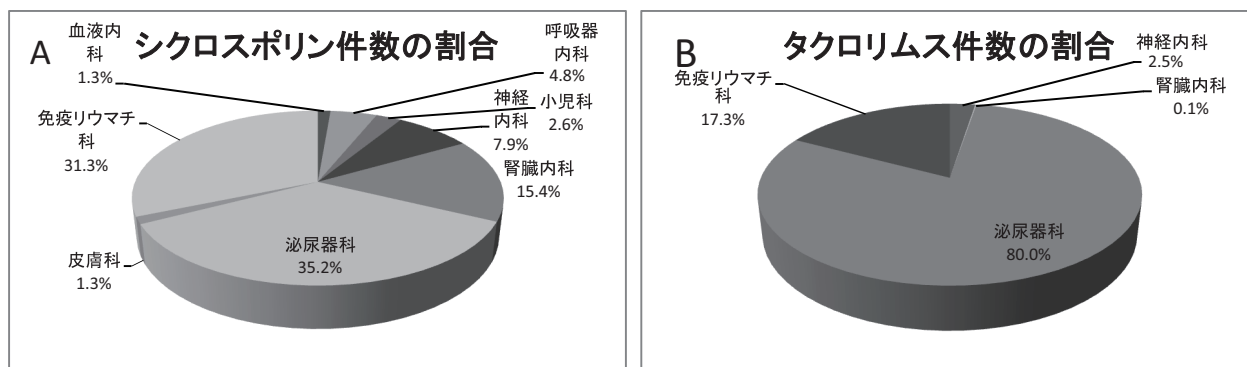


図1 当センターにおけるシクロスポリン、タクロリムスの科別依頼状況 (3ヶ月間:2016年5月1日～7月31日)

ンターにおける測定依頼は2016年5月より7月末までの3ヶ月間でシクロスポリンは227件、タクロリムスは746件あり、シクロスポリンは8診療科、タクロリムスは4診療科から測定依頼があり、泌尿器科からの依頼が両項目とも最多であった(図1)。

測定原理には化学発光免疫測定法 CLIA 法、カラム使用酵素免疫測定法 ACMIA 法 (affinity column mediated immune assay)、競合的酵素免疫分析法 EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique)、電気化学発光免疫測定法 ECLIA 法があり、同一原理による複数の測定機器がある。今回、アボット・ジャパン社の CLIA 法 (以下 A.CLIA) から測定時間が短く、検体前処理が簡便なロシュ・ダイアグノスティック社の ECLIA 法 (以下 RECLIA 法) へ変更するために、RECLIA 法によるシクロスポリン・タクロリムス測定の基礎的検討を行った。また、A.CLIA 法と RECLIA 法により移植関連の経時的に提出された検体のタクロリムス血中濃度比較を行った。

対 象 と 方 法

1. 対象

シクロスポリン測定検体は2015年4月27日から2015年7月21日の約3ヶ月に依頼のあった EDTA-2K 全血検体76件、タクロリムス測定検体は2015年4月21日から2015年8月12日の約4ヶ月の間に依頼のあった EDTA-2K 全血検体274件 (腎移植例20例を含む) を用いた。腎移植例の背景は、平均年齢46.1歳 (19-66歳)、性別は男性9例 (19-66歳)、女性3例 (41-49歳) であった。タクロリムス濃度は移植前が6例、移植後1週間2例、2週間4例、3週間2例、1ヶ月1例、3ヶ月3例、1年2例で測定した。タクロリムスの投与量は1-12mg/日で、術後1年目の依頼のうち1例 (タクロリムス1mg/日) がエベロリムス併用である。

2. 方法

RECLIA 法の測定機器はロシュ・ダイアグノスティック社の COBAS® e411、A.CLIA 法の測定機器はアボット・ジャパン社の ARCHITECT® i2000SR、RECLIA 法の測定試薬はロシュ・ダイアグノスティック社のエクルーシス® シクロ

スポリンとエクルーシス® タクロリムス、A.CLIA 法の測定試薬はアボット・ジャパン社のアーキテクト® シクロスポリンとアーキテクト® タクロリムスである。

RECLIA 法での基礎的検討内容は①同時再現性、②日差再現性、③希釈直線性、④実効感度、⑤対照法との相関、⑥検体の安定性、⑦前処理の測定者間差である。また、タクロリムスの血中濃度推移を見るために、経時採血検体の血中濃度曲線を作成し、A.CLIA 法との比較を行った。外部精度管理は一般社団法人の品質管理機構のコントロールサーベイに参加した。

尚、統計解析は表計算ソフト Excel 付属の統計解析ソフトを用いた。結果は平均±標準偏差 ($M \pm ISD$) で表し、二群間の比較は student's t test で行い、測定者間差は一元配置分散分析で行った。尚、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 基礎的検討結果

- ① 同時再現性：シクロスポリンの3種類の専用コントロール L,M,H の20回同時測定の変動係数 (CV) はそれぞれ3.5%, 1.9%, 2.1%でタクロリムスの3種類の専用コントロール20回の同時測定でのCVはそれぞれ2.3%, 1.8%, 2.0%であった (表1)。

表1 同時再現性
シクロスポリン (ng/ml)

	M±SD	CV(%)
L(n=20)	69.7±2.5	3.5
M(n=20)	295.2±5.6	1.9
H(n=20)	1007.9±20.8	2.1

タクロリムス (ng/ml)

	M±SD	CV(%)
L(n=20)	2.80±0.06	2.3
M(n=20)	9.36±0.17	1.8
H(n=20)	17.56±0.34	2.0

- ② 日差再現性：シクロスポリンの3種類の専用コントロール L,M,H 20日間測定のCVはそれぞれ6.8%, 4.5%, 3.4%で、タクロリムスの3種類の専用コントロール L,M,H 20日間のCVはそれぞれ5.4%, 4.0%, 2.8%であった (表2)。

表2 日差再現性

シクロスポリン(ng/ml)

	M±SD	CV(%)
L(n=20)	65.9±4.5	6.8
M(n=20)	272.2±12.1	4.5
H(n=20)	1005.9±34.0	3.4

タクロリムス(ng/ml)

	M±SD	CV(%)
L(n=20)	2.84±0.15	5.4
M(n=20)	9.38±0.38	4.0
H(n=20)	17.26±0.48	2.8

- ③ 希釈直線性：高濃度患者検体を用いて段階的にシクロスポリン、タクロリムスを投与されていない全血で希釈したところ、シクロスポリンは1796ng/ml (図2A)、タクロリムスは28.6ng/mlまで直線性を認めた (図2B)。
- ④ 実効感度：低濃度検体を段階的に希釈して測定した。CV10%の値はシクロスポリン11.6ng/ml (図3A)、タクロリムス0.45ng/ml (図3B) であった。
- ⑤ A.CLIA法との相関：シクロスポリンの回帰式は $y=0.989x+8.355$ 、相関係数は $r=0.984$ (n=70) (図4A)、タクロリムスの回帰式は $y=1.028x+0.137$ 、相関係数は $r=0.991$ (n=274) (図4B) であった。ただし、

表3 検体の安定性

シクロスポリン(ng/ml)

	1日目	2日目	3日目	5日目	M±SD	CV(%)
検体A	1337.1	1329.0	1330.3	1358.1	1338.6±13.5	1.0
検体B	181.9	183.5	192.7	190.1	187.1±5.2	2.8
検体C	100.8	99.9	110.1	109.5	105.1±5.4	5.2
検体D	45.2	49.9	51.7	53.4	50.1±3.6	7.1
検体E	324.4	333.4	327.7	332.2	329.4±4.2	1.3

タクロリムス(ng/ml)

	1日目	2日目	3日目	5日目	M±SD	CV(%)
検体A	27.02	26.79	30.81	29.98	28.65±2.05	7.1
検体B	9.40	10.54	10.30	9.49	9.93±0.50	5.8
検体C	3.60	3.63	3.50	3.56	3.57±0.06	1.6
検体D	20.49	19.52	21.72	21.46	20.80±1.00	4.8
検体E	7.47	7.56	7.52	7.88	7.61±0.19	2.4
検体F	2.18	1.98	1.99	2.11	2.07±0.10	4.7

y=RECLIA法 x=A.CLIA法とした。

- ⑥ 検体の安定性：シクロスポリンは5検体 (A-E) を、冷蔵保存1日目、2日目、3日目、5日目に測定、タクロリムスは6検体 (G-L) を、冷蔵保存1日目、2日目、3日目、5日目に測定した。両項目とも血中濃度は安定していた (表3)。
- ⑦ 前処理の測定者間差：4名 (A・B・C・D) の検査技師がシクロスポリン、タクロリムスについてそれぞれ3種類の専用コントロールL, M, Hを5回、同時に前処理から測定までを行った。測定者間差は認められなかった (表4)。

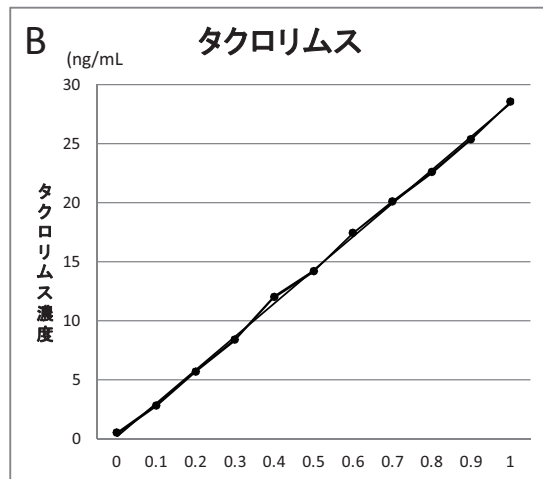
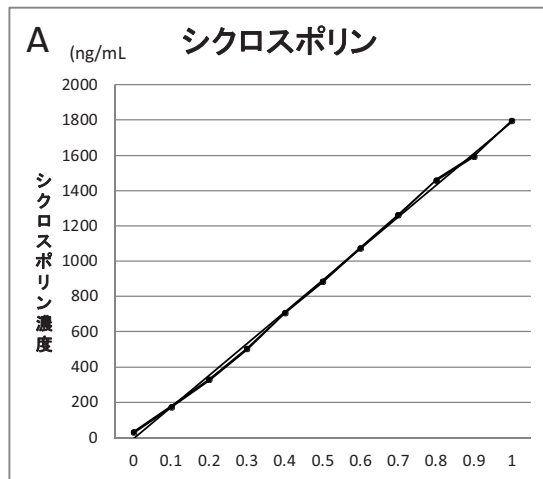


図2 希釈直線性

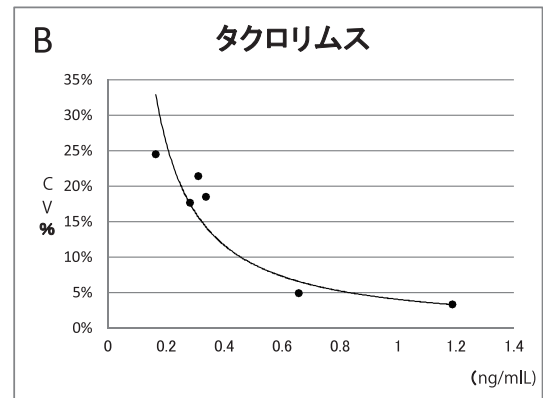
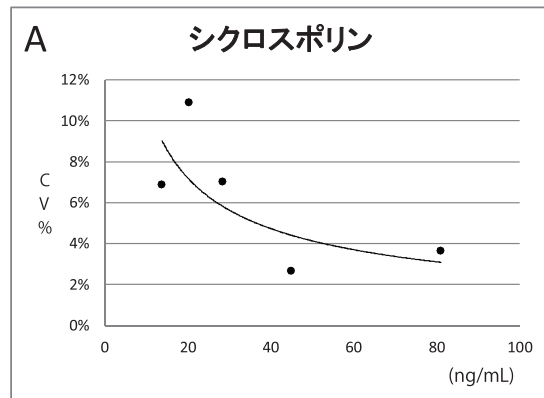


図3 実効感度

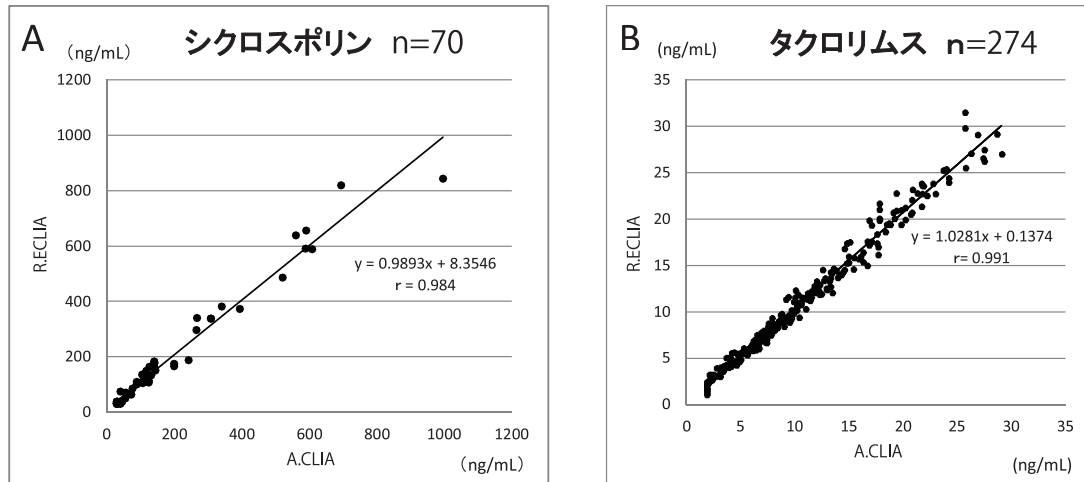


図4 A.CLIA法とRECLIA法との相関

表4 測定者間差

シクロスポリン(ng/ml)	技師A	技師B	技師C	技師D	p
L(n=5)	65.4±1.9	64.7±3.0	65.6±3.4	65.8±2.5	ns
M(n=5)	264.7±5.5	262.4±6.0	277.2±8.1	271.0±7.5	ns
H(n=5)	1003.84±10.1	985.5±33.8	1043.0±19.6	1017.1±19.2	ns

タクロリムス(ng/ml)	技師A	技師B	技師C	技師D	p
L(n=5)	3.09±0.03	3.10±0.10	3.12±0.11	2.92±0.10	ns
M(n=5)	9.80±0.07	9.76±0.05	9.81±0.15	9.84±0.18	ns
H(n=5)	17.90±0.52	17.84±0.18	18.03±0.27	18.10±0.47	ns

2. 血中濃度推移

タクロリムスのRECLIA法とA.CLIA法の代謝産物に対する交差反応性の違いをみるため、経時採血検体20件の血中濃度曲線を作成し、比較した。トラフ、投与1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、8時間後、12時間後、24時間後のそれぞれの血中濃度を比較した結果、トラフから投与後1時間～24時間の測定値には有意差がみられなかった（表5）。RECLIA法、A.CLIA法のそれぞれのトラフ値と24時間値には差はみられなかった。また、台形法より算出した0-24時間血中濃度時間曲線下面積（AUC_{0-24hr}）においても有意差はみられなかった（表5）。最高血中濃度到達時間の比較ではRECLIA法では1時間14例、2時間6例に対し、A.CLIA法では1時間12例、2時間6例、3時間1例、その他（1時間値と2時間値が同じ）が1例であった。

表5 タクロリムス 血中濃度推移とAUC (n=20)

	A.CLIA法(ng/ml)	RECLIA法(ng/ml)	p
0h(トラフ)	6.48±2.40	6.75±2.31	ns
1h	18.56±6.68	19.09±6.88	ns
2h	17.83±5.87	18.31±6.13	ns
3h	15.09±5.10	15.79±5.33	ns
4h	14.21±5.16	14.68±5.20	ns
8h	11.51±4.70	12.14±4.99	ns
12h	9.37±3.11	9.93±3.48	ns
24h	6.61±2.31	6.91±2.31	ns
	A.CLIA法(ng/ml·hr)	RECLIA法(ng/ml·hr)	p
AUC _{0-24hr}	251.00±82.66	262.90±86.06	ns

3. 外部精度管理

一般社団法人TDM品質管理機構による免疫抑制薬TDMコントロールサーベイに参加した。シクロスポリン、タクロリムスの薬剤を添加した3濃度（QA,QB,QC）の試料が送付され、webを通じて結果を報告した。シクロスポリン：ECLIA法（COBAS）は9施設が参加し、QA値195±21.7（平均±SD）ng/ml、QB値53.7±6.7ng/ml、QC値792±43.2ng/mlに対し、当センターの測定値はQA値211.6ng/ml、QB値61.75ng/ml、QC値877.5ng/mlであった。タクロリムス：ECLIA（COBAS）の9施設の各測定値QA値0.53±0.04ng/ml、QB値11.3±0.7ng/ml、QC値1.5±0.24ng/mlに対し、当センターの測定値はQA値<0.5ng/ml、QB値11.39ng/ml、QC値1.47ng/mlであった。

考 察

シクロスポリン、タクロリムスの血中濃度測定は多くの医療機関において複数の免疫測定法から自施設に適した方法を選択し行われている。シクロスポリン、タクロリムスは血液中においてそれぞれ50%、90%が赤血球中に移行するため、抽出・除蛋白処理が必要であり、測定にはこの前処理を含む時間を要する。また前処理後の測定時間は今までのA.CLIA法では28分を要したが、現在のRECLIA法では18分へ短縮された。今までのA.CLIA法の前処理ではシクロスポリンの場合は全血200μlに溶解剤100μlと除蛋白剤400μlを加え混和遠心後、上清を機器に載せ、タクロリムスの場合は全血200μlに溶解剤200μlを加え混和遠心後、上清を機器に載せていた。RECLIA法での前処理はシクロスポリン、タクロリムスとも全血300μlに同一の前処理液300μlを加え混和遠心後、上清を機器に載せる。以上の様にA.CLIA法では前処理方法がシクロスポリンとタクロリムスで異なるため、至急依頼以外は複数の検体を集め、項目毎に測定していた。RECLIA法では前処理がシクロスポリンとタクロリ

ムスとで同一の簡便な処理で、機器搭載時間が短く、基礎的性能である再現性、希釈直進性、感度、相関性はシクロスポリン、タクロリムスとも良好であった。他施設でも良好な結果が得られている¹⁾。特にタクロリムスは実効感度が0.45ng/mlと低値であり、腎移植においてmTOR阻害剤であるエベリムスが併用され²⁾、タクロリムスのターゲット血中濃度が低値の症例の検体が増加している現状に適している。当センターにおいても2016年5月から7月の3ヶ月間に106件の併用例があり、平均測定値は3.2 (0.8-6.5) ng/mlであった。また、免疫リウマチ科においても上記の期間中2.0ng/ml以下の症例が33件(約26%)あった。精度良く低濃度が測定できる測定方法は有用と考えられる。シクロスポリン、タクロリムスとも検体は冷蔵で5日間は安定であるため、期間内であれば後日測定も可能である。前処理はピペッターを使用し、用手で行うため、測定者間の誤差が問題となるが³⁾⁴⁾、今回の検討ではシクロスポリン、タクロリムスともに測定者間での有意差はみられなかった。電動ピペッターを用い、粘度の高い全血と有機溶剤を主成分とする粘度の低い前処理液を条件設定し、使い分けている効果と考えられる。

タクロリムスの主な代謝物にはMI、MII、MIII、MIVが知られているが、これらは徐々に出現し、増加してくる。それらに対する反応性の違いが測定値に影響すると報告されているが、今回の2方法検討では血中濃度経推移の測定値に差は認められなかった。そのためA-CLIA法から現在のRECLIA法への変更は問題とはならないが、他施設と比較する場合は測定原理、測定法、代謝物に対する交差反応性に注意が必要である。さらにCYP3A5遺伝子多型を考慮する必要があり、今回比較した測定試薬の交差性は類似しているため差はみられなかったが、今後新たな試薬を検討する際には、必ず代謝物に対する交差反応性を確認する必要がある⁵⁾。

一般社団法人TDM品質管理機構による免疫抑制薬TDMコントロールサーベイは今回は79施設の参加があり、当センターで測定しているRECLIA法は9施設であった。当センターの結果はECLIA法(COBAS)内でシクロスポリンの2濃度が1SD以内、シクロスポリン1濃度は2SD以内、タクロリムス全濃度1SD内であった。今回は薬剤が添加された試料のコントロールサーベイが行われたが、今後、代謝物に対する反応性の影響による測定値の違いを調べるため、

薬剤投与後の血液試料を用いた外部精度管理が行われることを期待する。その上で測定法の標準化が望まれる。

結 語

今回評価したECLIA法によるシクロスポリン、タクロリムス測定法はともに基礎的性能は良好であった。また、前処理が簡便で測定者間の差がみられず、1テストあたり前処理後18分と短時間で測定が可能であるため診察前検査としても有用であると考えられた。

タクロリムスの血中濃度推移を比較した結果、ECLIA法とCLIA法で測定値の差はみられなかった。

外部精度管理への参加した結果は良好であり、今後も積極的に参加する予定である。

本論文の要旨は第55回日本臨床検査技師会近畿支部医学検査学会で発表し、近畿支部学術奨励賞を受賞した。

文 献

- 1) 古屋実, 堀美奈子, 友田雅己, 三浦ひとみ, 川島眞: 免疫抑制剤血中濃度測定試薬エクルーシス試薬シクロスポリン, エクルーシス試薬タクロリムスの基礎的性能評価, 医学と薬学, 70: 961-973, 2013
- 2) 矢野貴久, 川尻雄大, 末次王卓, 山田孝明, 山本奈々絵, 梶原望渡, 増田智光: 電気化学免疫測定法(ECLIA)法を用いたtacrolimusおよびcyclosporine血中濃度測定に関する臨床的評価, 移植, 51: 58-65, 2016
- 3) 向井田麻由, 畑信顕, 井山茂, 林貞夫, 日高洋: 全自動化学発光免疫測定装置(ARCHTECT i2000SR)によるタクロリムス測定の基礎的検討, 医学と薬学, 60: 133-141, 2008
- 4) 中尾美佐子, 堀内祐次, 尾代剛典, 及川信次, 菱沼明, 家入蒼生夫: 血中シクロスポリン測定試薬アーキテクトシクロスポリンの評価, 医学と薬学, 61: 913-920, 2009
- 5) 三浦昌朋, 増田智先, 江川裕人, 湯沢賢治, 松原和夫: Tacrolimusの血中濃度測定の精度管理と評価, 移植, 50: 55-61