

博士(医学) 平野公美

論文題目

Suitability of chemiluminescent enzyme immunoassay for the measurement of blood tacrolimus concentrations in rheumatoid arthritis

(関節リウマチ患者における血中タクロリムス濃度の測定に対する化学発光酵素免疫測定法の適用性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

カルシニューリン阻害薬のタクロリムスは、臓器移植後の拒絶反応の抑制に使用される。タクロリムスにはラット肝ミクロソームを用いた検討により 8 つの代謝物が同定されており、その主代謝物は 13 位 O 脱メチル体である。また、ヒト肝ミクロソームではシトクロム P450 3A を介して、タクロリムスと同等の薬理活性を示す 31 位 O 脱メチル体が生成することも報告されている。近年、タクロリムスの適応は臓器移植後の拒絶反応の抑制だけでなく、関節リウマチ (RA)、重症筋無力症およびループス腎炎などの自己免疫疾患にも拡大された。臓器移植患者においては、血中タクロリムス濃度は薬効や有害作用と良好に相関するものの患者間で大きく異なるため、そのモニタリングを欠かすことができない。臨床現場における血中タクロリムス濃度の測定には、簡便性と迅速性に優れた免疫測定法が汎用されてきた。2007 年に European Consensus Conference において、3 ng/mL 以下の血中濃度で維持される低用量タクロリムス療法の管理には 1 ng/mL 以下の感度を持つ測定機器を用いることが推奨された (Wallemacq P *et al.* Ther Drug Monit 2009; 31: 139–152)。同年 12 月には 1 ng/mL 以下の感度を持つ化学発光免疫測定 (CLIA) 法を用いた測定機器であるアーキテクト[®]用のタクロリムス測定キットが上市された。これにより臓器移植患者においては、既存の免疫測定法と比較して高感度の CLIA 法によるタクロリムスの測定値に基づいた治療管理が可能になった。一般に RA 患者においては、臓器移植患者よりもタクロリムスの投与量が少ないため、さらに低濃度での血中濃度管理が求められる。しかし、RA 患者におけるタクロリムスの体内動態に関する報告はほとんどなく、RA 患者における血中タクロリムス濃度の測定に対する CLIA 法の適用性についての検証もなされていない。本研究では CLIA 法により得られる RA 患者の血中タクロリムス濃度について、代謝物との交差反応性を含めた適用性を腎移植 (RT) 患者と比較することにより評価した。

[患者ならびに方法]

対象は浜松医科大学病院を受診し、タクロリムス (プログラフ[®]カプセル) を 1 日 1 回服用している RA 患者 63 名と 1 日 2 回服用している RT 患者 47 名とした。血中タクロリムス、13 位 O 脱メチル体および 31 位 O 脱メチル体の濃度は、移動相に 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 60% アセトニトリル溶液 (pH 5.0) を用い (流速 0.2 mL/min)、分離カラムに 3 μ m の

粒子径を有する ODS を使用し、ESI 法による MRM モードでリトナビルを内部標準物質として HPLC-MS/MS 法により同時定量した (分析時間 15 分)。血中タクロリムス濃度は CLIA 法によっても測定した。CLIA 法と HPLC-MS/MS 法の正確性と再現性は、0.5、1、5、10 ng/mL の濃度で米国食品医薬品局 (FDA) のガイダンスに従ってバリデーションした。服用 12 時間後の血中タクロリムス濃度について CLIA 法と HPLC-MS/MS 法による測定値を Bland-Altman プロットにより比較し、測定間の乖離を交差反応として疾患別に評価した。患者検体における測定値の乖離の要因として、CLIA 法でのタクロリムスと 13 位 O 脱メチル体または 31 位 O 脱メチル体との交差反応性を検討した。

[結果]

HPLC-MS/MS 法においてタクロリムス、13 位 O 脱メチル体および 31 位 O 脱メチル体のピークは良好に分離し、血中夾雑物の影響は認められなかった。HPLC-MS/MS 法におけるタクロリムス、13 位 O 脱メチル体および 31 位 O 脱メチル体の測定においては、治療濃度の範囲で FDA のガイダンスに適合する良好な直線性 ($r = 1.0$)、正確性 (94–109%) および再現性 ($CV < 9.0\%$) が認められた。CLIA 法におけるタクロリムスの濃度測定も、FDA のガイダンスに適合する良好な直線性 ($r = 1.0$)、正確性 (103–109%) および再現性 ($CV < 11.0\%$) を示した。CLIA 法により得られた RA 患者の血中タクロリムス濃度は 3.2 ng/mL (中央値) であり、RT 患者の 4.2 ng/mL (中央値) に比べて有意に低値を示した。CLIA 法と HPLC-MS/MS 法の測定値の乖離におけるバイアスの 95% 信頼区間は、RA 患者では -20.7 から 109.9% であり、RT 患者の -5.0 から 74.1% に比べて大きなばらつきがみられた。CLIA 法と HPLC-MS/MS 法の測定値との間には、RA 患者で $r = 0.78$ 、RT 患者で $r = 0.87$ の有意な相関がみられたが、CLIA 法では HPLC-MS/MS 法に比べて RA 患者で 45% (平均値)、RT 患者で 35% (平均値) 測定値を過大評価する傾向がみられた。一方、添加試料を用いた検討では、両測定法間で測定値の乖離はみられなかった。CLIA 法による測定で、13 位 O 脱メチル体はタクロリムスと交差反応を示さなかったのに対し、31 位 O 脱メチル体は 120% の交差反応を示した。

[考察]

CLIA 法では 31 位 O 脱メチル体がタクロリムスと 120% の交差反応を示すことが、HPLC-MS/MS 法との測定値の乖離の要因として考えられる。13 位 O 脱メチル体はタクロリムスと交差反応性を示さなかったことから、13 位のメチル基は CLIA 法における抗原決定基に含まれており、13 位にメチル基を持つ他の代謝物も同様の交差反応を示す可能性が示された。RA を含む自己免疫疾患患者においては、臓器移植患者に比べて血中タクロリムスが低濃度域で推移している場合が多い。そのため、CLIA 法により得られたタクロリムスの測定値は、代謝物との交差反応により過大に評価されている可能性が示された。

[結論]

RA 患者においては、RT 患者に比べて CLIA 法により得られた血中タクロリムス濃度が過大評価されている可能性があり、測定値の解釈に注意する必要がある。

論文審査の結果の要旨

タクロリムスは、臓器移植後の拒絶反応の抑制に使用されてきたが、近年は関節リウマチ (RA) を始めとした自己免疫疾患にも使用されるようになってきた。しかし、その血中濃度が患者間で大きく異なるため、モニタリングが必要である。また、従来までの測定法は感度不足で、特に投与量が少なく低濃度で管理しなければならない RA 患者には適応が難しかった。近年、化学発光検出を用いた自動分析機、アーキテクトで測定 (CLIA 法) が可能となったこともあり、申請者は独自に構築したタクロリムスの代謝産物も同時に測定できる系と CLIA 法による測定法で、腎移植 (RT) と RA 患者検体を試料として比較検討した。

当院受診のタクロリムス服用の RA 患者 63 名と RT 患者 47 名を対象とした。まず、血中タクロリムスと、代謝産物である 13 位 O 脱メチル体、31 位 O 脱メチル体を HPLC-MS/MS 法により同時定量する測定系を構築した。分離能および定量性は良好であった。CLIA 法による測定も同様に良好な成績が得られた。しかしながら、RT, RA 患者検体の測定値は、CLIA 法が高かったため、代謝産物との交差反応を疑い、純品を血液に添加して測定したところ、CLIA 法では 31 位 O 脱メチル体も測り込んでいることが判明した。

本研究により、タクロリムスとその代謝産物のユニークで高感度な同時測定系を構築し、より高感度を必要とする RA 患者検体でも測定可能とし、さらに CLIA 法ではタクロリムスだけでなく代謝産物も一緒に測定してしまうため測定値が高くなることを明らかとし、データの判読に注意が必要であることを指摘した。審査員は新しい測定法の確立と新規の事象の発見を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人
副査 渡邊 裕司 副査 小川 法良