

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H01036

研究課題名 免疫学的定量法を基盤とした脳脊髄液中メトトレキサート濃度測定環境の構築

研究代表者

横田 翼 (Yokota, Tsubasa)

宮崎大学・医学部・薬剤師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：抗悪性腫瘍薬Methotrexate (MTX) は、静脈内投与のみならず、髄腔内投与も行われる。副作用マネジメントのためには、血液に加え、髄液中MTX濃度測定も望まれる。本研究では、簡便かつ迅速な髄液中MTX濃度測定の実現を目的に、血液中MTX濃度測定で広く普及する化学発光免疫測定法による髄液中MTX濃度測定環境の構築を試みた。そのために、HPLC-UV法による髄液中MTX定量環境の構築、及び化学発光免疫測定法との測定法差異の検証を行った。その結果、HPLC-UV法による髄液中MTX測定に成功した。さらに2法の測定法差異を検証することで、日常的に髄液中MTX濃度を評価できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄腔内投与は、髄液中の薬物濃度を高く維持するとともに全身性の副作用が最小化される利点を有する。一方で高濃度暴露の持続は危険でもあることから、副作用回避のために、血液に加え、髄液中MTX濃度測定も必要となる。血液中MTX濃度の測定に関しては全自動測定装置による免疫学的測定法が広く普及している。一方で髄液中MTX濃度の測定には、分離分析法が使用されるが、簡便性や迅速性に欠け、結果を即時的に診療へ反映しづらい点が問題となる。本研究では、化学発光免疫測定法を基盤とした髄液中MTX濃度測定環境を構築したことで、日常的な脳脊髄液中MTX濃度測定が実施できる可能性を示した有益な知見であると考えられる。

研究分野：医療薬学

キーワード：methotrexate 脳脊髄液

1. 研究の目的

抗悪性腫瘍薬である Methotrexate (MTX) は、静脈内投与に加え、髄腔内投与も行われている。髄腔内投与は、髄液中の薬物濃度を高く維持するとともに全身性の副作用が最小化される利点を有する。一方で、高濃度暴露の持続は危険でもあるため対策を講じる必要がある。また脳室内薬物のクリアランスは全ての患者で一律ではないことから、副作用マネジメントの観点から、血液に加え、脳脊髄液中の MTX 濃度を測定することも望まれる。血液中 MTX 濃度の測定に関しては全自動測定装置による免疫学的測定法が広く普及している。一方、髄液中 MTX 濃度の測定には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの分離分析法が使用されるが、簡便性や迅速性に欠け、結果を即時的に診療へ反映しづらい点が問題となる。そこで本研究では、日常的な脳脊髄液中 MTX 濃度測定の実現を目的に、化学発光免疫測定法による髄液中 MTX 濃度測定環境の構築を試みた。そのために HPLC-UV による脳脊髄液中 MTX 定量環境の構築、化学発光免疫測定法との測定法差異について検証を行った。

2. 研究成果

HPLC-UV 法の構築

前処理には固相抽出法を用いた。メタノール及び蒸留水でコンディショニング・平衡化したカートリッジに、試料/内標準物質液/1 N 塩酸/PBS (-) (1/1/0.2/7, v/v/v/v) の混合液を添加した。洗浄後、メタノールで検出対象物質を溶出した。溶出液は 45 °C 窒素気流下で乾燥後、PBS (-) で再溶解し、遠心分離した。得られた上清を HPLC に注入した。HPLC には Prominence UFLC システム (島津) カラムには C18 カラム (3 μm , 150 mm \times 3 mm) を使用した。移動相の組成は、酢酸緩衝液 (pH 3.6; 50 mM) - アセトニトリル (77:13, v/v) 流速は 0.8 mL/min、カラム温度は 40 °C、検出波長は 307 nm とした。本法について、FDA の Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry 2018 に沿ってバリデーションを実施した。Blank 髄液に MTX を 0.10 μM - 1.50 μM でスパイクし、検量線試料を作成した。また、同様に MTX 濃度が 0.10、0.20、0.60、1.20 μM となるよう調製した髄液試料を用いて、定量下限、正確性、精度および試料の安定性を検証した。

検証の結果、検出対象物質の各ピーク保持時間における生体成分由来の妨害ピークは認められなかった。検量線は、0.10 μM - 1.50 μM の間で良好な直線性を示した (相関係数 $r = 0.999$)。定量下限濃度は 0.10 μM であった。正確性は、定量下限での誤差が 15.8%、その他の濃度で 0.8% - 2.6% であった。精度は、定量下限での変動係数が 1.97%、その他の濃度で 1.10% - 1.56% であった。試料の安定性に関して、室温あるいは -20 °C で 24 時間保存後の誤差は、5.7% - 13.3% であった。以上、本法は Validation Guidance の基準を満たした。

測定法の比較

化学発光免疫測定法による MTX 濃度測定には、ARCHITECT システムを使用した。キャリブレーションには専用試薬キット (0.040 μM - 1.500 μM) を使用し、常法に従い測定を行った。臨床髄液検体およびスパイク髄液検体に関して、構築した HPLC-UV 法と化学発光免疫測定法で MTX 濃度を測定した。2 法の測定結果の相関は、Passing-Bablok 回帰および Pearson の積率相関解析を用いて解析した。また、2 法の測定結果の誤差は、Bland-Altman プロットにより検証した。

Passing-Bablok 回帰により算出された 2 法の測定値に対する回帰直線式は、HPLC-UV 法 = $1.205 \times$ 化学発光免疫測定法 - 0.024 であった。また相関係数は $r = 0.995$ であり、良好な相関性を示した。Bland-Altman プロットから、2 法の測定結果には比例誤差が認められた。

以上、本研究では、脳脊髄液中 MTX 濃度測定のために HPLC-UV 法を構築し、化学発光免疫測定法による脳脊髄液中 MTX 濃度測定の検証に成功した。MTX が細胞傷害性を示す濃度は 1 μM 以上であり、髄腔内投与直後の脳脊髄液中 MTX 濃度は 1 μM を超えることが報告されている。今回構築した HPLC-UV 法は、脳脊髄液中 MTX 濃度の有害性を高精度に判定可能な感度を示した。また、今回検証した化学発光免疫測定法も同様に判定可能な感度であるが、HPLC-UV 法の測定値と一定の乖離が生じた。しかしながら、誤差の傾向から 2 法の測定値に対する回帰直線式から補正が可能であると考えられる。従って、本研究で得られた補正式を使用することで、広く普及している化学発光免疫測定法により脳脊髄液中 MTX 濃度を評価可能であると考えられる。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naoki Yoshikawa , Ai Yamada , Tsubasa Yokota , Hiroshi Moritake , Yasutoshi Hidabara , Ryuji Ikeda	4. 巻 35
2. 論文標題 Measurement of methotrexate in human cerebrospinal fluid using a chemiluminescence immunoassay intended for serum and plasma matrices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Laboratory Analysis	6. 最初と最後の頁 e23661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcla.23661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Yoshikawa, Tsubasa Yokota, Ayako Matsuo, Nobuhiro Matsumoto Nobuhiro, Tomomi Iwakiri, Ryuji Ikeda	4. 巻 37
2. 論文標題 Role of FK506 Binding Protein on Tacrolimus Distribution in Red Blood Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 143-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-020-02875-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Teramoto, Yu Tsurekawa, Mary Ann Suico, Shota Kaseda, Kohei Omachi, Tsubasa Yokota, Misato Kamura, Mariam Piruzyan, Tatsuya Kondo, Tsuyoshi Shuto , Eiichi Araki , Hirofumi Kai	4. 巻 10
2. 論文標題 Mild electrical stimulation with heat shock attenuates renal pathology in adriamycin-induced nephrotic syndrome mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75761-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsubasa Yokota, Naoki Yoshikawa, Kazuhiko Arimori, Ryuji Ikeda	4. 巻 75
2. 論文標題 Retrospective analysis of risk factors for liposomal amphotericin B-associated nephrotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Die Pharmazie	6. 最初と最後の頁 599-601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2020.0731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Naoki Yoshikawa, Ayako Matsuo, Tsubasa Yokota, Tomomi Iwakiri, Ryuji Ikeda
2. 発表標題 FK506-binding protein contributes to tacrolimus distribution in red blood cells
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川直樹、山田愛、横田翼、盛武浩、平原康寿、池田龍二
2. 発表標題 血清・血漿マトリックスを分析対象とした化学発光免疫測定法によるヒト脳脊髄液中Methotrexate濃度の測定
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Yoshikawa, Ai Yamada, Tsubasa Yokota, Hiroshi Moritake, Yasutoshi Hidabara, Ryuji Ikeda
2. 発表標題 A HPLC method for analysis of methotrexate in human cerebrospinal fluid and comparison with the chemiluminescence immunoassay
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田翼、吉川直樹、有森和彦、池田龍二
2. 発表標題 Liposomal-amphotericin Bによる腎機能障害発現の危険因子の後方視的調査
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
吉川 直樹	(yoshikawa naoki)
池田 龍二	(ikeda ryuji)