

このように RFP のファルマコキネティクスは初回治療日より21日頃「体内分布耐性」を現し、投与期間依存性のキネテックスであることが示唆された。RFP は初回通過効果のため、450mg (3カプセル) を単回投与しなければならず、結核菌の増殖期間が非常に長いので、1日1回の投与でよいとされてきた。しかしながら、このように、投与期間依存性のキネテックスを示し、「体内分布耐性」のある薬物の投与には、十分な配慮が必要ではないかと思われる。著者は RFP 投与後21日目以降に血中濃度モニタリングを実施し、その結果をもとに臨床症状との関係を考察し、投与計画を立てるべきであるとする。(Fig. 1 参照)

### 参 考 文 献

1) Breimer, D.D., et al.: *Europ J. Clin Phar-*

*macol*, 7: 217~225, 1974.

2) Kenny, M.T., et al.: *Drug Metab Rev.*, 12: 159~218, 1981.

3) Acocella, G., et al.: *Clin Pharmacokin*, 3: 108~127, 1978.

4) Kohno, H., et al.: *Yakugaku Zasshi*, 14: 884~888, 1984.

5) Loos, U.E., et al.: *Klin Wochenschr*, 63: 1205~1211, 1985.

司会 どうも有難うございました。次の2題は MTX になりますが、3番目の「MTX の代謝と血中濃度測定」について県立ガンセンター 検査室の佐藤先生お願いいたします。

### 3) MTX の代謝と血中濃度測定

新潟県立ガンセンター新潟病院化学検査室 佐藤 豊二・豊島 英一

村木 幸子・高橋 毅

池田 孝和

同 現生理検査室 西 勢津子

同 整形外科 堀田 利雄

同 小児科 浅見 恵子

同 薬剤科 高橋 栄一・斉藤 直也

現 新潟県立新発田病院化学検査室 小川真知子

### 略 語 表

MTX	: methotrexate
DHFR	: dihydrofolate reductase
Ig	: immunoglobulin
FH <sub>2</sub>	: dihydrofolate
APA	: 4-amino-4-deoxy-N <sup>10</sup> -methylp-terioic acid
MTX Gn	: MTX polyglutamates
7-OH-MTX	: 7-hydroxy-MTX
G6PD	: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
G6P	: Glucose-6-phosphate
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	: NAD reduced form
6PG	: 6-phosphogluconate
OD <sub>340</sub>	: optical density at 340nm
RA	: residual activity

当院整形外科では、1978年の12月より、小児骨肉腫の患者に、MTX 大量療法を開始した。MTX は腎障害や肝障害などの副作用を伴うことがあるため、血中 MTX 濃度測定が必要とされている。そのため、化学検査室では、血中 MTX 濃度測定の準備と、MTX の代謝、薬理作用、副作用などについて最小限の知識を得ることに、急を要した。

1979年からは、当院の小児科でも白血病の患者に MTX 大量療法を始めた。

ここでは、MTX 大量療法を開始した当時の我々の乏しい知識に、最近の知見などを多少加えて、次のことを記す。

- 1) MTX について一般的なこと。
  - 2) 血中 MTX の測定法。
  - 3) 血中 MTX 測定時に注意すべきこと。
  - 4) その他。
- 3) では、検査室側に重点をおいて記す。

### 1. MTX についてのアウトライン

#### 1) MTX の作用

MTX の分子量は 454.46 で、構造式は図 1 に示した。MTX は葉酸拮抗剤で dihydrofolate reductase と結合して、この酵素活性を阻害する。その結果 FH<sub>4</sub> の生成が阻害され、FH<sub>4</sub> が関与する one carbon transfer reactions が阻害される (図 2)。そのため、MTX は主に Pyrimidine 合成を阻害するが、Purine 合成も阻害する (図 3)。

MTX の大量療法は血中 MTX 濃度を上昇することにより、MTX の腫瘍細胞内への transport を高めて、抗腫瘍効果を大きくすることを目的としている。MTX の大量投与後に、MTX の副作用を抑制するために、leucovorin が投与される。このことを leucovorin rescue という。

MTX は抗腫作用のほか、抗炎症作用と免疫抑制作用も有する。このメカニズムは明らかでない<sup>3)</sup>。リウマチ性関節炎の患者に、MTX を小量投与すると、関節症状が改善したり、血沈と Ig (IgG, IgA, IgM) が減少したという報告もある<sup>3) 4)</sup>。しかし、免疫抑制作用を有することから、白血球や癌を誘発することもある<sup>5) 6)</sup>。

#### 2) MTX の代謝

MTX は人体内では、ほとんど代謝されず、そのまま尿に排泄されると考えられていた<sup>7)</sup>。最近では以前と異な

り、leucovorin rescue と併用した MTX の大量療法が可能になったこと、HPLC をはじめとする各種分析技術の進歩などにより、MTX の代謝の研究も行われている。

MTX の代謝物としては、人間では、APA, MTX Gn, 7-OH-MTX が知られている。

APA は経口投与したときに血中や尿中に出現し、消化管内の細菌による代謝物とも推測されているが明らかでない。

MTX Gn は人体では、赤血球内、肝組織内にみられる。Matherly らの *in vitro* 実験では、MTX Gn は MTX よりも細胞内に長く存在し、cytotoxicity には重要な step ではないかという<sup>8) 9)</sup>。

佐々木らはウサギを使った実験で、7-OH-MTX について、詳細な研究をしている<sup>7)</sup>。MTX 投与量の 20~30% が、投与時間内 (6 時間) に、7-OH-MTX に代謝され、またこの両者は圧倒的に腎に分布すると報告している。7-OH-MTX は MTX よりも DHFR の阻害率が約 300 分 1 といわれているが、詳しくは他にゆずる<sup>10) 11)</sup>。

MTX 及びその代謝物は、ほとんどが尿中に排泄され、一部は糞便中にも排泄される。

### 2. MTX の測定法

我々が経験を持つ 2 つの方法について記す。対象検体の MTX 濃度は 10<sup>-3</sup> ~ 10<sup>-8</sup> M である。

#### i) DHFR 阻害法

原理を図 4 に示した。MTX が DHFR に結合すると、この酵素活性が阻害されることを応用したものである。実際の測定法を図 5 に示した。図 4-c によって、各種濃度の MTX 標準液の RA を計算して検量線を作成する。

本法では、MTX の測定幅が 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-7</sup> M であるため、検体の希釈には慎重を要する。

検体の MTX 濃度は、検量線から得られる値に希釈倍数を乗じて求められる (図 6)。

#### ii) Emit homogeneous enzyme immunoassay

原理は、抗薬物抗体に酵素標式した同一の薬物が結合すると、酵素活性が阻害されることである (図 7)。MTX 高濃度の検体では、抗 MTX 抗体の結合部位に多くの MTX が結合する。従って、それだけ G6PD 標式した MTX は、抗 MTX 抗体に結合しないため、活性状態のものが多くなるから、OD<sub>340</sub> の変化量は大きくなる。

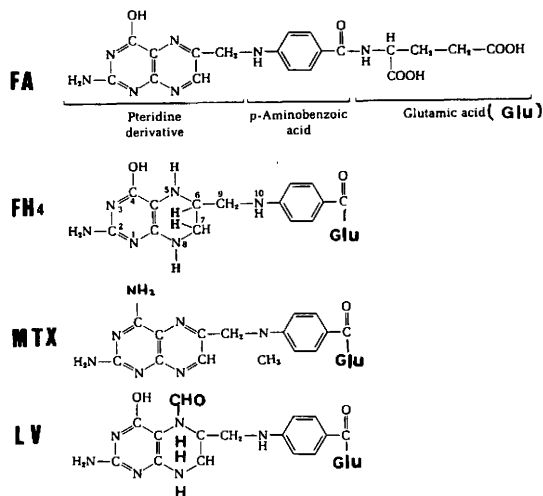


図 1 葉酸と MTX の構造式

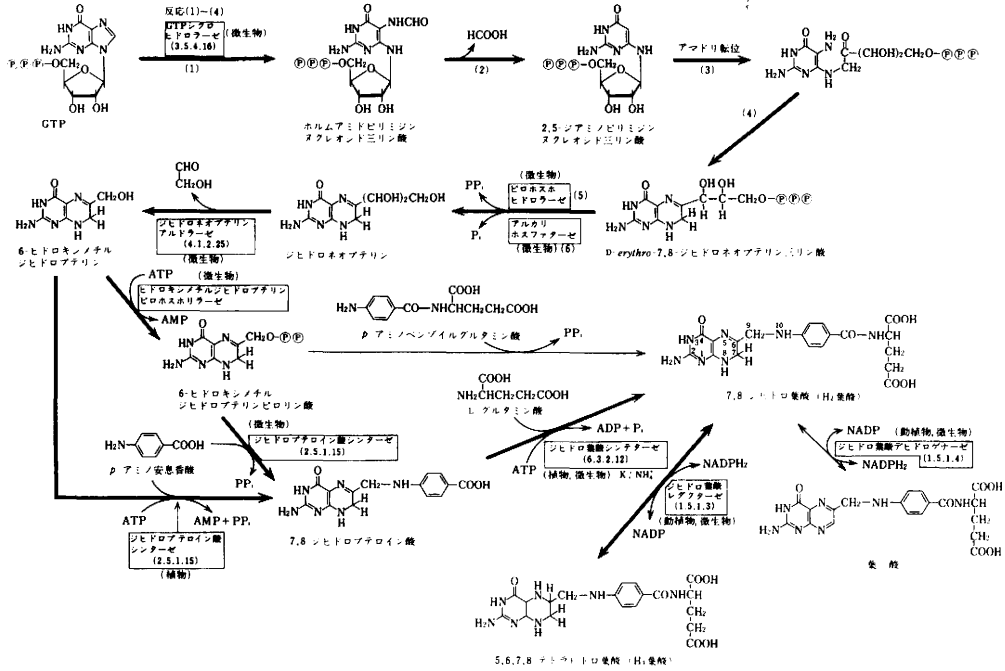
FA: folic acid, FH<sub>4</sub> tetrahydrofolate

LV: leucovorin (N<sup>5</sup>-formyltetrahydrofolate)

### 79. 葉酸の代謝

120

#### a. 葉酸の合成



#### b. 葉酸補酵素の相互変換とC1代謝の関係

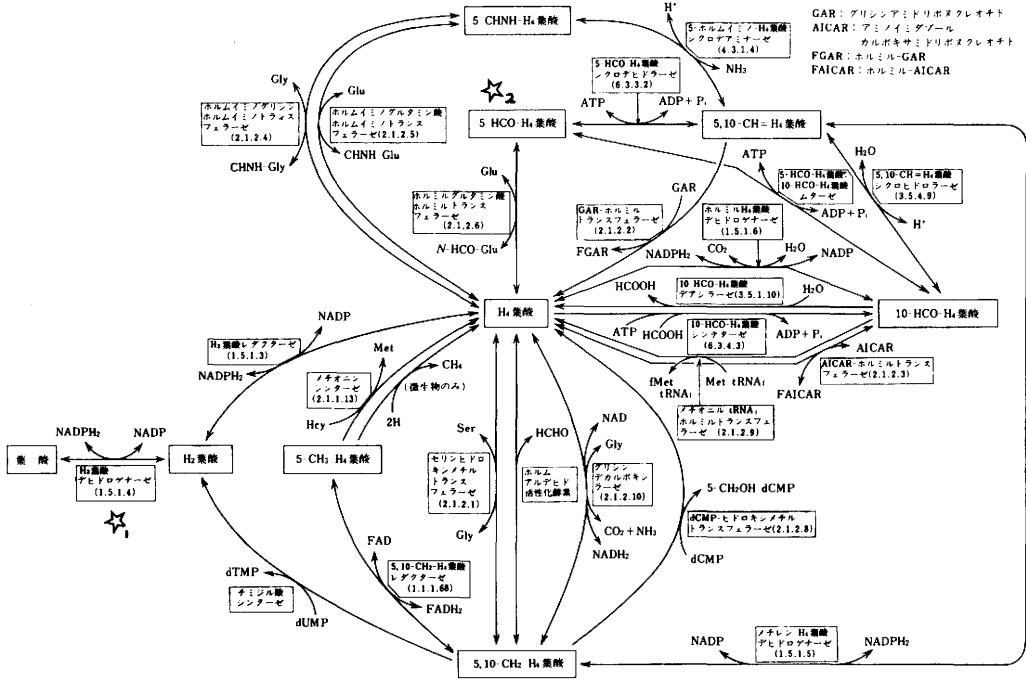


図2 葉酸補酵素の相互変換とC1代謝の関係

☆1: DHFR ☆2: N<sup>5</sup>-folmtyl tetrahydrofolate (leucovorin)

実際には、図8の方法でMTXは測定される。本法でも直接測定できる濃度は、0.3~2.0 $\mu$ M(10<sup>-6</sup>M)である。この範囲の標準液を用いて検量線が作成され、コンピューターに記憶される。検体も、この範囲の濃度になるように希釈して測定される。全く未知濃度の検体では、数回希釈操作を要する。

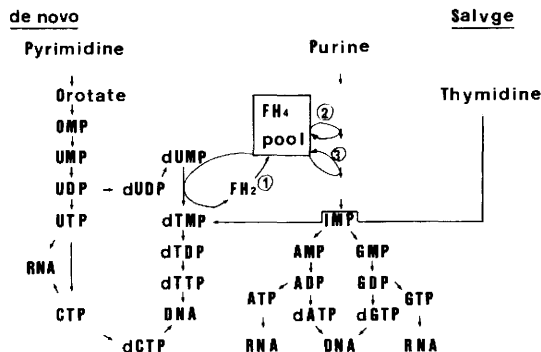


図3 MTXの作用点

- ① dihydrofolate reductase (DHFR)
- ② phosphoribosyl glycineamide formyltransferase
- ③ phosphoribosyl aminoimidazole carboxamide formyltransferase

文献2より改変

**Reagents**

- (A) 0.1M Tris-HCl, 0.01M 2-mercaptoethanol and 0.15M KCl, (pH 7.5)
- (B) 1mM NADPH in Buffer (A)
- (C) 1mM DHF in Buffer (A)
- (D) Enzyme
- (E) Methotrexate standard solution or sample

**Procedure**

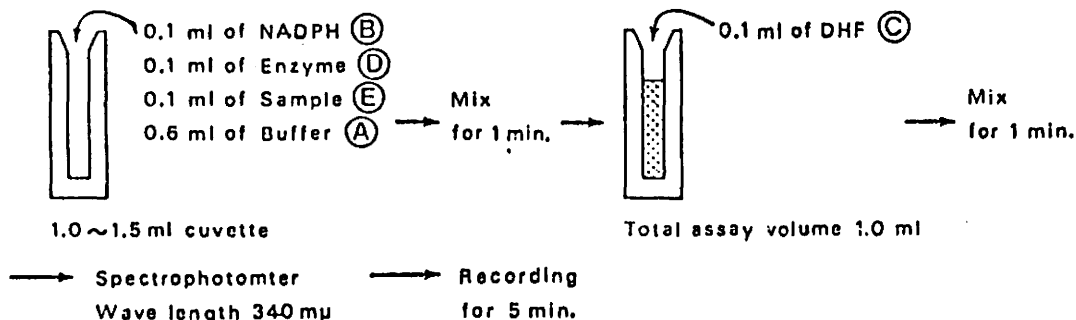


図5 DHFR阻害法によるMTXの測定法

日本レダグリー株式会社のキットを使用し、その説明書より引用した。

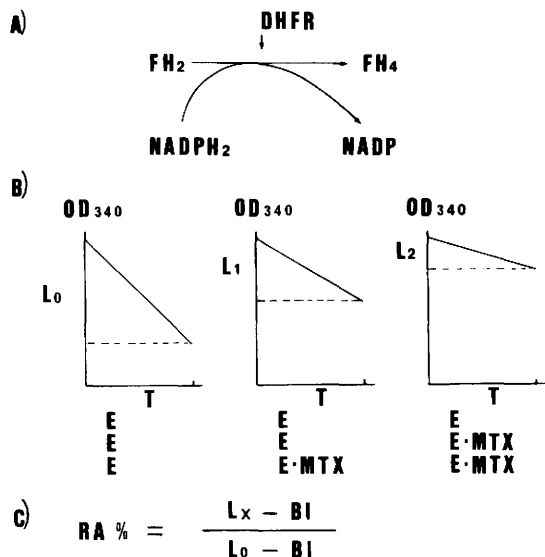


図4 DHFR阻害法の原理

- A) DHFRの作用。
- B) DHFRにMTXが結合すると、酵素活性が阻害され、単位時間(T分)当りのOD<sub>340</sub>の変化量が小さくなる。
- C) DHFRの残存率(RA%)の計算  
L<sub>0</sub>はMTX=0のときのOD<sub>340</sub>の変化量。  
L<sub>x</sub>は各種濃度のMTXを含む標準液又は検体のOD<sub>340</sub>の変化量。BIは盲検で、図5でFH<sub>2</sub>を入れないで得られるT分当りのOD<sub>340</sub>の変化量。

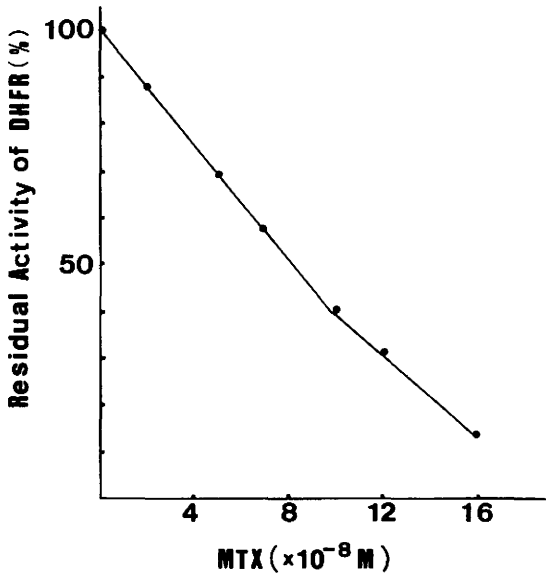


図6 MTXの検量線

例へば、RA=70%なら、MTXは $5 \times 10^{-8}$ Mとなり、これに希釈倍数を乗ずればよい。

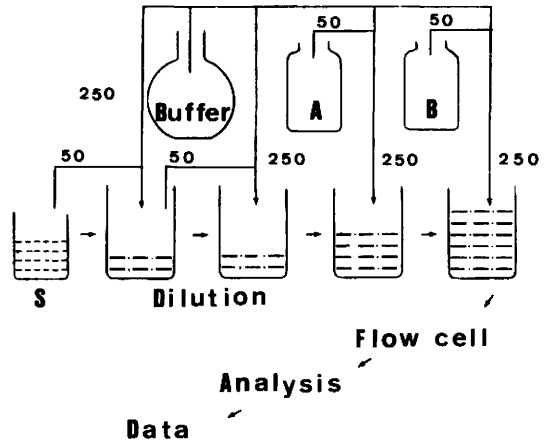


図8 Emit homogeneous enzyme immunoassayの手順

A: Reagent A (抗 MTX 抗体, G6P, NAD)  
 B: Reagent B (G6PD)  
 Buffer: 0.055M Tris-HCl pH8.0  
 S: 検体試料  
 50, 250: 検体試料, 試薬などの量を示し, 単位は  $\mu$ l である。

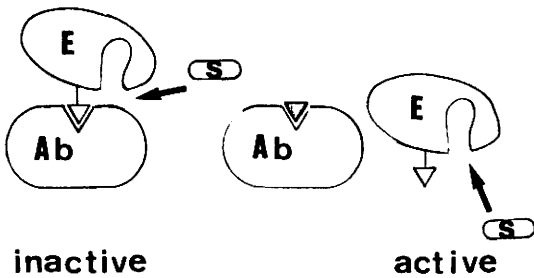


図7 Emit homogeneous enzyme immunoassayの原理

Ab: 抗 MTX 抗体, E: G6PD (MTX に標式されている), S: G6P (G 6 PD の基質),  $\nabla$ : MTX  
 $G6PD$   
 $G6P + NAD \longrightarrow 6PG + NADH$  が応用されている。

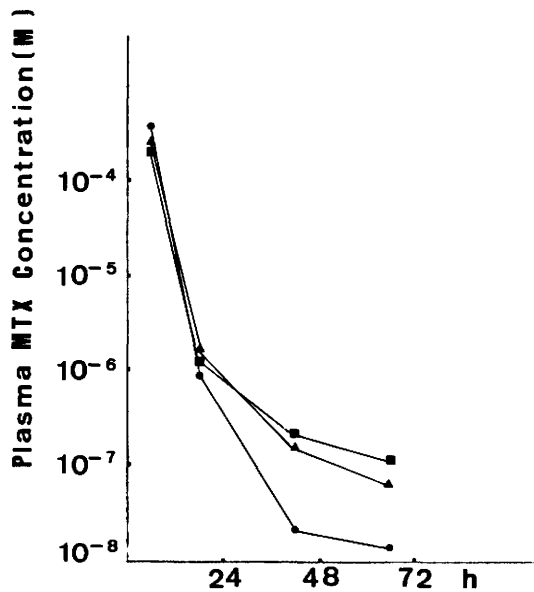


図9 血中 MTX 濃度測定例。

7才, 女児, 骨肉腫, 体重 18~19kg.

▲—▲ ●—●: 200mg/kg 体重,  
 ■—■: 150mg/kg 体重

本法による測定例も図9に示した。MTX 投与量が50~250mg/kg 体重では、24時間後には $10^{-6}$ Mあたり、48時間後には $10^{-7}$ Mあたりになる例がほとんどである。

### 3. 血中 MTX 測定時に注意すべきこと

MTX 大量療法には、腎障害、肝障害、造血障害などの副作用が合併することがある。このため、臨床側と検査室の十分な計画と連絡が必要なことは言うまでもない。実際的なことを簡条書にする。

① 試薬、測定機器の点検。できれば、検体の提出される時に合わせて warming up しておく。

② 血漿または血清をすみやかに分離する。

③ 尿 pH は、試験紙よりも pH メーターで測定するとよい。尿 pH が、酸性の時はすぐに病棟に連絡する。特に、朝がたは酸性になりやすい。

④ 前述の副作用のマーカーは、臨床医からセットでオーダーされる。例へば、腎機能検査にはクレアチニンと BUN、肝機能検査にはトランスアミナーゼとビリルビン、造血機能(?) 検査には白血数及びその分類と血小板数、などである。

⑤ 4日以後の MTX 濃度が、3日後のものより高いことが時にある。この時は、病棟に連絡し、かつ、患者に浮腫、腹水や胸水の有無なども聞いておく。

⑥ MTX の投与量と血中濃度の変化は一致しないことがよくある。投与量が150mg/kg 体重でも、大量療法の回数が多くなったり、間隔が短いときには、そうでないときの200mg/kg 体重投与よりも血中濃度が低下しないことがある。

### 4. そ の 他

MTX は抗腫剤であるため、その耐性についても研究されている。多くは、ヒトの白血病細胞を用いる *in vitro* の実験である。耐性の原因は次の2つに大別されそうである。

i) 耐性細胞では、MTX の membrane transport が減少する<sup>2) 3)</sup>。

ii) 耐性細胞内に DHFR が上昇したり<sup>14)</sup>、MTX 感受性細胞の DHFR と性質の異なる DHFR が産生される<sup>15) 16)</sup>。

MTX の大量療法を通して、臨床側と検査室が一体になって、仕事ができただけはきわめて意義深いことと思われる。今後は、このシステムをさらに進めて、MTX

投与時の尿中蛋白の検討などともしたいと考えている。

### 参 考 文 献

- 1) 日本生化学会編：代謝マップ—経路と調節— 東京化学同人，1981，p. 120.
- 2) Benz, C., et al.: *Cancer Res.*, **42**: 2081, 1982.
- 3) Willkens, R.F., et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **100**: 314, 1982.
- 4) Andersen, P.A., et al.: *Ann. Intern. Med.*, **103**: 489, 1985.
- 5) Hazleman, B.: *Amer. J. Med.*, **78**: 39, 1985.
- 6) Willkens, R.F., et al.: *J. Rheumatol.*, **7**: 501, 1980.
- 7) 佐々木邦明, 他: *癌と化学療法*, **9**: 1678, 1982.
- 8) Matherly, L.H., et al.: *Cancer Res.*, **43**: 2694, 1983.
- 9) Matherly, L.H., et al.: *Cancer Res.*, **45**: 1073, 1985.
- 10) Johns, D.G., et al.: *J. Pharmaceutical sciences.*, **56**: 356, 1967.
- 11) Howell, S.K., et al.: *Clin. Chem.*, **26**: 734, 1980.
- 12) Kamen, B.A., et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**: 3254, 1980.
- 13) Ohnoshi, T., et al.: *Cancer Res.*, **42**: 1655, 1982.
- 14) Chello, P.L., et al.: *Cancer Res.*, **36**: 2442, 1979.
- 15) Goldie, J.H., et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**: 11629, 1981.
- 16) Mini, E., et al.: *Cancer Res.*, **45**: 313, 1985.

司会 有難うございました。ずい分先生は考えてやっておられるようですが、enzyme immunoassayなどに比べると時間的にはいかがでしょうか。

佐藤 速いのです。数分でできるのですが、ただし warming up して待っているのですね。そうでないとズレたりするのです。試薬の調製は前の日にやっておきますし、割合簡単にできるのですが、機械が高いということが問題です。

司会 それでは次に堀田先生に「骨肉腫患者の MTX 使用経験」をお聞きしたいと思います。