

〈原著〉

MRI造影剤の影響を回避した新しい 血清カルシウム測定試薬の開発

外園 栄作¹⁾、中野 倫太²⁾、小口 雄二²⁾、大澤 進¹⁾

Development of new measurement reagent for serum calcium that avoids influences of gadolinium contrast agent for MRI

Eisaku Hokazono¹⁾, Tomota Nakano²⁾, Yuji Oguchi²⁾ and Susumu Osawa¹⁾

Summary We previously reported a serum calcium measurement method using Chlorophosphonazo-III (CPZ-III). In this method, the reagent stability is higher than in conventional methods to react samples in an acid medium. High specificity to calcium is also achieved due to the addition of a surfactant to the reagent. However, gadolinium, which is used as a contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI), causes a positive error in the measurement. Therefore, we have improved our previous method, and developed a new measurement reagent that is not affected by gadolinium. As a result, it was confirmed not to be unaffected by gadolinium to 2.0 mmol/L. Finally, even if our new method is employed just after using a contrast agent, the serum calcium tests should be unaffected. We expect this method to be used as a routine and emergency test in clinical laboratories because it is stable, accurate, and does not contain any heavy metals, dangerous materials, or mutagenic substances.

Key words: Calcium, Chlorophosphonazo-III, Chelator, Gadolinium,
Magnetic resonance imaging (MRI)

I. 緒言

磁気共鳴画像 (Magnetic Resonance Imaging; MRI) 検査において、腫瘍などの病変部のコントラストを増強させる目的で造影剤を使用する

事がよくある。この造影剤には、常磁性体の性質を持つガドリニウム (Gd) や鉄が用いられ、前者は特に強い磁性体効果を有し、画像信号強度を増強させる効果があるとされている。このガドリニウムは、イオンの状態では毒性が強い

¹⁾九州大学大学院 医学研究院 保健学部門 検査技術科学分野 生体情報学講座
〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

²⁾関東化学株式会社 伊勢原研究所

受領日 平成22年1月29日

受理日 平成22年2月2日

¹⁾Division of Medical Sciences and Technology, Department of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyushu University,

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

²⁾Clinical Department of Isehara Research Laboratory, Technology & Department Division, Kanto Chemical Co. Inc., Kanagawa, Japan

ため、これをキレート剤（ジエチレントリアミン5酢酸：DTPA）などと結合させ、安定化した状態にして用いる。ガドリニウムを使用した造影剤は、キレート剤の種類は多少異なるが、各種メーカーより市販されて、臨床現場で用いられている。

一方、臨床検査の現場、特に生化学検査において、従来よりこの造影剤がキレート剤を用いた血清カルシウム測定値に影響を及ぼすという報告²⁾がある。著者らも以前開発したクロロホスフォナゾ-Ⅲ（CPZ-Ⅲ）をキレート剤に用いたカルシウム測定試薬において、ガドリニウムを含む造影剤により正誤差を生じる事を確認している³⁾。

そこで、今回、我々は、従来の試薬にガドリニウムの影響を回避するための改良を加え、基本的試薬性能はそのまま維持しつつ、ガドリニウムを用いた造影剤による影響を受けない血清カルシウムの測定試薬の開発を行なったので、その基礎的性能評価について報告する。

Ⅱ. 材料と方法

1. 測定試薬

第1試薬（R-1）は、pH 5.0（25℃）、40 mmol/Lコハク酸緩衝液、10 mmol/Lクエン酸緩衝液、陰イオン界面活性剤、造影剤ガドリニウムマスキング剤（EDTA構造類似キレート剤）を加えて調整、第2試薬（R-2）は、R-1に108 mg/dL CPZ-Ⅲ（同仁化学研究所）を含有。

2. 測定機器

本研究の検討には、日立7170形自動分析装置（日立ハイテクノロジーズ）を用いた。

3. 分析条件

反応温度は37℃で行い、試料4.5 μLにR-1を160 μL加えて、5分後にR-2を80 μL加えた。測定方法は、1ポイントエンド法による主波長700 nm、副波長750 nmでの比色定量とした。検量は「マルチキャリブ6M」（Ca 9.8 mg/dL、関東化学株式会社）を用いて検量した。

4. 基本性能試験の検討方法

1) 同時再現性

市販管理血清であるQAPトロール009（1QL-109、2QL-209）（シスメックス株式会社）を用い、10回繰返し多重測定を行なった。

2) 希釈直線性試験および最小検出限界試験

カルシウム水溶液は塩化カルシウム特級（和光純薬工業株式会社）を用いて調製した。希釈直線性試験は、約30 mg/dLカルシウム水溶液を原液として、精製水により10段階希釈したのち、各濃度試料について3重測定を行なった。また、検出限界試験には約0.6 mg/dLカルシウム水溶液を調製し、これを精製水にて5段階希釈後、各濃度5多重測定を行った。各測定値の平均値±3SDの範囲が0濃度での平均値±3SDの範囲と重ならない濃度を検出限界とした。

3) 干渉試験

干渉チェック（シスメックス株式会社）を用い、日本臨床化学会の試案に従って生体試料内に存在する共存物質の影響について評価を行なった。

Table 1 Characteristics of each gadolinium contrast agent

造影剤の種類	主成分	安定化剤	その他特徴
オムニスキャン	ガドジアミド	カルジアミドナトリウム	溶液pH6.0～7.0
	Gd-DTPA-BMA	Na(Ca-DTPA-BMA)	K [*] = 10 ^{16.9}
マグネビスト	ガドペンテト酸メグルミン	ジエチレントリアミン5酢酸	溶液pH6.8～7.8
	Gd-DTPA	DTPA	K [*] = 10 ^{22.5}
マグネスコープ	ガドテル酸メグルミン	添加剤なし	溶液pH6.9～7.9
	Gd-DOTA		K [*] = 10 ²⁸
プロハンス	ガドテリドール	カルテリドールカルシウム	溶液pH6.0～7.0
	Gd-HP-DO3A	Ca(Ca-HP-DO3A) ₂	K [*] = 10 ^{22.8}

※ ガドリニウム(Gd)に対する各キレータの安定度定数logK

Table 2 Within-run reproducibility (n=10) and trueness of present method

同時再現性 (n=10)			
	1QL-109	2QL-209	
平均値 (mg/dL)	9.11	12.41	
SD (mg/dL)	0.03	0.06	
CV (%)	0.35	0.46	

正確性の評価			
試料	表示値 (mg/dL)	測定値 (mg/dL)	バイアス (%)
ReCCS (JCCRN321-5M)	9.54	9.50	-0.4
ReCCS (JCCRN321-5H)	11.71	11.68	-0.3

4) 抗凝固剤 (EDTA) の影響

血清9容にEDTA溶液 (2,000 mg/dL) を1容の比率で混合し、これを段階希釈して測定に及ぼす影響について評価した。

5) 特異性試験

2価の金属イオンであるマグネシウム、鉄、亜鉛、銅を用いて本法の特異性について調べた。また、ガドリニウムを含む非イオン性MRI造影剤には、「オムニスキャン」(第一製薬株式会社)、「プロハンス」(エーザイ株式会社)、「マグネスコープ」(テルモ株式会社)、「マグネビスト」(バイエル薬品株式会社)の4種を用いた (Table 1)。

6) 正確性

正確性の評価用試料には「検査医学標準物質機構 (ReCCS) 電解質標準血清」(JCCRM321-5M, JCCRM321-5H)を用いた。

7) 従来法との相関

健康者から採取した血清52検体を用い、改良法と従来法との相関性試験を行なった。検体の使用にあたっては、提供者との関係不可能匿名化を行い使用した^{3),4)}。

Ⅲ. 結果

1. 同時再現性

同時再現性は2種類の管理用血清 (表示値: 1QL-109; 9.32 mg/dL, 2QL-209; 12.52 mg/dL)を用いた。その結果、同時再現性の変動係数 (以下CV) は、いずれの試料においても0.46%以下となった。また、ReCCS電解質標準血清 (中、高濃度)を用いた正確性についての結果は、表示値に対する偏りの程度は、中濃度で-0.4%、高濃度では-0.3%であった (Table 2)。

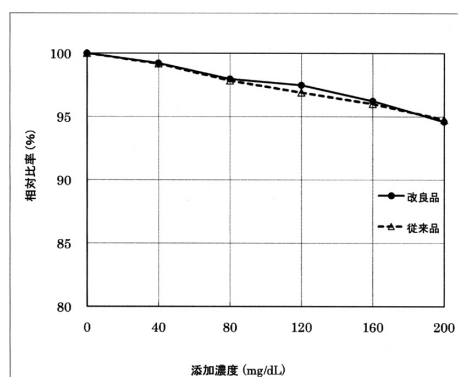


Fig. 1 Interference of anticoagulation (EDTA-2Na)

2. 希釈直線性試験

希釈直線性試験においては、約20 mg/dLまで原点を通る直線性が得られ、最小検出限界は0.24 mg/dLであった。

3. 干渉物質の影響

干渉物質の影響は、遊離型ビリルビン19.3 mg/dL、抱合型ビリルビン19.9 mg/dL、ヘモグロビン485 mg/dL、乳び1,550ホルマジン濁度まで干渉比率は±2.2%以下であった。同様にアスコルビン酸についても50 mg/dLまで影響は見られなかった。

4. 抗凝固剤EDTAの影響

抗凝固剤EDTAの影響については、従来法と同様にEDTA 200 mg/dLで約5%の低下が見られた (Fig. 1)。

5. 特異性

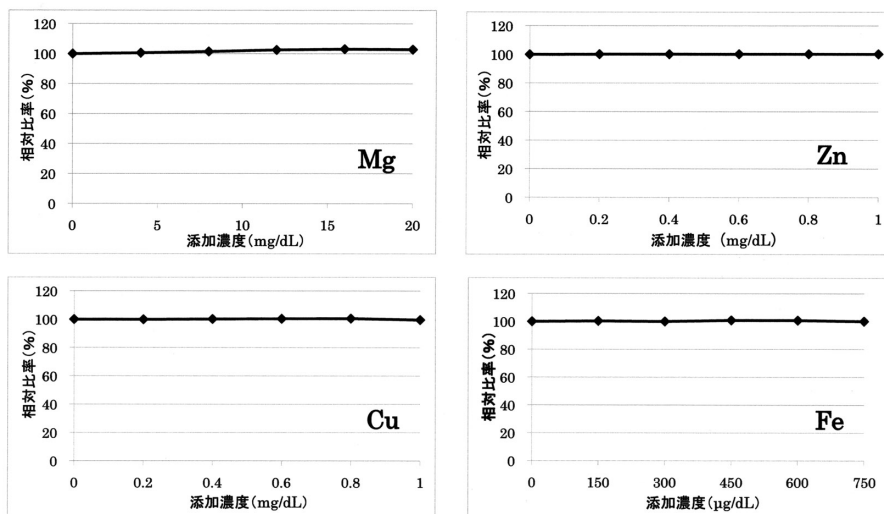


Fig. 2 Interference of cation (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+})

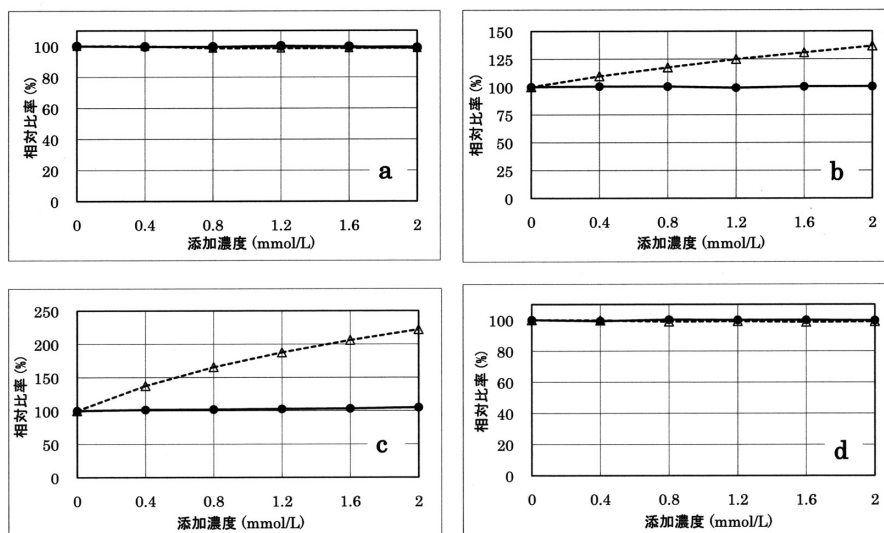


Fig. 3 Interference of each gadolinium contrast agent. a) Magnescape, b) Magnevist, c) Omniscan, d) Prohance
●: present method, △: conventional method

特異性に関しては、Fig. 2に示す通り、鉄750 μ g/dL、マグネシウム20 mg/dL、銅1.0 mg/dL、亜鉛1.0 mg/dLまで影響はなかった。

MRI検査に使用されるガドリニウムを含む各種造影剤の影響試験においては、Fig. 3に示したとおり、マグネスコープおよびプロハンスに対

しては、従来品、改良品試薬とも、2.0 mmol/Lまで、その影響は見られなかった。しかし、オムニスキャンおよびマグネビストを添加した場合、従来法で添加濃度2.0 mmol/Lにおいて約220%、140%とそれぞれ大きな正誤差を認めた。これに対して、改良法ではオムニスキャンで

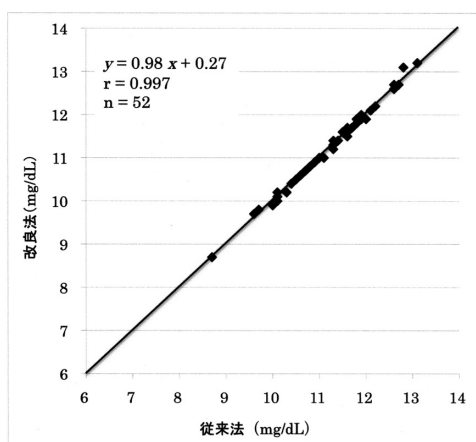


Fig. 4 Correlation between the present method (y) and the conventional method (x) in serum samples.

5.0%とやや正誤差を示したものの、マグネシウム0.4%とほとんどその影響は見られなかった。

6. 従来法と改良法との相関

従来法と改良法との相関をFig. 4に示した。その結果、両試薬間の相関は、直線回帰式 $y = 0.98x + 0.27$ 、相関係数 $r = 0.997$ と良好な相関を示した。

Ⅳ. 考察

カルシウムは、生体内において骨の成長やその強度を維持する上で非常に重要な要素の一つである。また、イオン化したカルシウムは、各種ホルモンをはじめ、血液凝固因子や酵素活性因子など様々な物質の調整因子としての役目を担うほか、神経・筋刺激伝達物質としても生体中において重要な役割を担う物質である。そのため、生体内でその量は厳密に調節され、恒常性が保たれている。臨床の現場では、血清カルシウムとして日常検査でごく一般的に測定される項目であり、副甲状腺機能異常に伴う代謝性疾患の診断や、腫瘍随伴症候群などにおける高カルシウム血清の診断に利用されている。

血清カルシウムの測定法は、*o*-cresolphthalein complexone (OCPC) 法⁹⁾が多くの検査室において広く普及してきたが、試薬安定性の問題や検

量線が湾曲していることなどから、最近ではarsenazo-Ⅲ (AZ-Ⅲ)⁶⁾や、CPZ-Ⅲ⁷⁾などの色素を用いた新しい測定方法が各メーカーより開発、市販されている。また、正確性に定評のある酵素法としてアミラーゼを用いた方法⁸⁾や、近年では比較的安価とされるホスホリパーゼDを用いた酵素法も開発⁹⁾、市販されている。我々は、以前にCPZ-Ⅲを用いたキレート法によるカルシウム測定試薬を開発¹⁰⁾した。この測定法は、精密性、正確性、特異性に優れ、二次基準測定操作方法である原子吸光法との相関も良好であったが、MRI検査時に使用する造影剤の影響により正の誤差を生じることが分かった。この造影剤がカルシウム測定に及ぼす影響については、高尾ら¹¹⁾がその詳細なデータを報告しており、キレート法の中でも特にOCPC法やmethylxlenol blue (MXB) 法¹¹⁾の測定値に大きな誤差を及ぼすとしている。

そこで、今回我々は、従来の測定試薬と同等の基本性能特性、並びに、試薬安定性を保ち、低コストで測定可能な試薬、また、試薬中に毒劇物、重金属、そして変異原性を持つ成分を含まない測定試薬という従来からのコンセプトを継承しながら、造影剤に含まれるガドリニウムの影響を受けない測定試薬の開発を目指した。

まず、従来法について、市販のガドリニウム含有MRI造影剤4種類を用いて、各薬剤が測定に及ぼす影響について調べた。従来法において、マグネシウムとオムニスキャンの各造影剤において大きな正誤差が確認された。この2種類の造影剤には、ガドリニウムとの結合安定化剤としてそれぞれ、DTPAおよびDTPA-BMAのキレーターがそれぞれ含まれており、その薬剤性状も生体成分に近いpH7付近にて使用されている。今回、これら造影剤において正誤差を生じた原因は、従来法で用いている緩衝液がpH5.0の弱酸性であるため、測定試薬反応液中におけるガドリニウムと安定化剤のキレート作用が弱まり、溶液中に遊離したガドリニウムがCPZ-Ⅲとキレーションを起こし呈色、正誤差をもたらしたためと考えた。一方、マグネシウムおよびプロハンスも同様に、DOTAやHP-DO3Aといった安定化剤を使用しているが、これら造影剤の添加においては、測定に影響は見られなかった。これは、DTPA-BMAのガドリニウムに対する安定

度定数が16.9であるのに対して、DOTAやHP-DO3Aの安定度定数は28、22.8と大きく、溶液中のガドリニウムと非常に強く結合するため安定である。したがって、この2種類の造影剤では、遊離するガドリニウムはほとんど無いため、カルシウム測定への影響が見られなかったと推察された。つまり、測定試薬反応溶液中において、ガドリニウムと安定化剤との結合が安定であるか否かによって、測定への影響の有無が左右されているのではないかとの推測を改良の糸口とした。しかし、正確性、反応特異性の面から、従来法の測定条件等を大きく変化させる事はできないため、今回の改良法では、この遊離してくるガドリニウムを如何にして隠蔽するかという事に焦点を当て改良を試みた。そこで、様々なキレート剤の中から、ガドリニウムに対するキレート安定度定数が大きくかつ、測定対象物であるカルシウムとのキレート安定度定数が比較的小さいキレート剤を14種類検索し、検討を行なった結果、EDTA構造類似キレート剤を添加することで、ガドリニウムの影響を回避できる可能性が示唆された。

その結果、今回の改良試薬は、オムニスキャン以外の3種の造影剤に対し、ほとんどその影響を受ける事なく測定可能な試薬となった。オムニスキャン2.0 mmol/L添加で約5%の正誤差を示したが、この造影剤の臨床における投与量は、体重あたり0.2 ml/kgであり、体重50 kgの成人に投与した時のガドジアミド血中濃度としては1.0 mmol/Lとなる。また、このガドジアミド水和物の血中半減期は、健常成人で60~74分^{12), 13), 14)}であることから、MRI検査時間を30分と仮定しても、検査終了時の血中濃度は0.7 mmol/L程度ということになる。実際に今回の結果を見ても、0.8 mmol/Lにおける影響は約2.0%程度であり、オムニスキャンを造影剤として使用した直後でもその影響は少ないと考えてよい。

その他の基本性能評価についても、同時再現性は、従来法と同様に非常に良好であり、健常者の個体内生理的変動の1/2以下¹⁵⁾の再現性であった。また、本法の希釈直線性は約20 mg/dLまで認められることから、日常血清検体のすべてを希釈なしに測定でき、検出限界の結果と合わせ、日常検査において十分な基礎的定量特性を認めた。共存物質の干渉試験では、検討を行っ

た物質による妨害は認められなかった。EDTAを用いた抗凝固剤による影響試験においては、従来法と同様に200 mg/dLで約5%の低下が見られた。一般的に使用されるEDTA採血管には、約1.0 mg/mL程度の抗凝固剤が含有されるとされているが、採血量が極端に少ない場合を除き、その影響はほとんど無視できると考えられる。実際、EDTA 1.0 mg/mL含有量による影響は2.5%ほどに過ぎない。つまり、救急時のEDTA採血管で直ちに遠心して血漿カルシウムを測定する場合にも対応可能な試薬と言える。

V. 結語

従来、キレート法を用いた血清カルシウム測定試薬において問題とされた造影剤使用後の測定への影響は、今回の改良により、その影響を受けずに測定可能な試薬となった。今回の改良試薬は、その他の基本性能評価においても、その精密性、正確性、特異性など従来法と同等の性能を有し、相関も良好であった。また、試薬性状が弱酸性側であることから開封後の試薬安定性にも優れている。このことから、今回の改良試薬は、日常検査はもとより、夜間緊急検査時の血漿検体（EDTA加血）を含め、造影剤使用後の検査のタイミングを気にする事なく使用可能な試薬であるため、実用性の高い試薬として臨床の現場へ大きく貢献できると考えられる。

参考文献

- 1) 高尾晶子, 西久保由香, 佐野俊一, 他: 特定のMRI造影剤が及ぼすカルシウム測定法間の測定乖離について. 医学検査, 55: 1312-1317, 2006.
- 2) 外園栄作, 中野倫太, 川元ゆかり, 他: クロロホスフォナゾ-IIIをもちいた新たな血清カルシウム測定試薬の開発. 生物試料分析, 30: 164-171, 2007.
- 3) 吉田 浩: 臨床検査材料の医の倫理. 臨床病理, 51: 89, 2003.
- 4) 林 貞夫, 末久悦次, 浅利誠志, 他: 臨床検査部における残余検体の教育・研究および精度管理への利用についてのインフォームドコンセント. 臨床病理, 49: 273-277, 2001.
- 5) 太田拔徳, 他: *o*-cresolphthalein complexoneによるCaの比色法に関する2, 3の検討. 臨床病理, 16: 659-662, 1968.
- 6) Morgan BR, Artiss JD and Zak B: Calcium determination in serum with stable alkaline arsenazo III and triglyc-

- eride clearing. Clin Chem, 39: 1608-1612, 1993.
- 7) 石澤 天, 秋元真由美, 山館周恒, 他: 血清Ca測定試薬としてのクロロホスホナゾⅢを利用するための基礎的検討. 生物試料分析, 29: 81, 2006.
 - 8) Kayamori Y and Katayama Y: Enzymatic method for assaying calcium in serum and urine with porcine pancreatic α -amylase. Clin Chem, 40: 781-784, 1994.
 - 9) Sugano M, Yamauchi K, Sugano K, et al.: New enzymatic assay using phospholipase D to measure total calcium in serum. Clin Chem, 51: 1021-1024, 2005.
 - 10) Hokazono E, Osawa S, Nakano T, et al.: Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-Ⅲ. Ann Clin Biochem, 46: 296-301, 2009.
 - 11) 風間 武, 真々田賢司, 伊藤順子, 他: Methylxlenol blueを用いた血清カルシウム測定法. 衛生検査, 39: 1820-1826, 1990.
 - 12) 松木茂樹, 新井重紀, 小林美苗, 他: MRI用造影剤 DV-7572 (GdDTPA-BMA: Gadodiamide)の第Ⅰ相臨床試験. 診療と新薬, 29: 2510-2527, 1992.
 - 13) 阿部雅紀, 久野 勉, 高橋佳子, 他: 透析患者におけるガドリニウム造影剤の除去能および安全性についての検討. 日本腎臓学会誌, 46: 810-814, 2004.
 - 14) Berg KJ, Lundby B, Reinton V, et al.: Gadodiamide in renal transplant patients effects on renal function and usefulness as a glomerular filtration rate marker. Nephron, 72: 212-217, 1996.
 - 15) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 生理的変動に基づいた臨床化学検査36項目における測定の許容誤差限界. 臨床化学, 35: 144-153, 2006.