

## Tacrolimus의 혈중농도측정법 비교 및 간이식환자에서의 집단 약동학

김은영<sup>2</sup> · 강원구<sup>3\*\*</sup> · 곽혜선<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>이화여자대학교 약학대학, <sup>2</sup>이화여자대학교 임상보건과학대학원, <sup>3</sup>대구가톨릭대학교 약학대학

### Comparison of Analytical Methods of Tacrolimus in Plasma and Population Pharmacokinetics in Liver Transplant Recipients

Eun-Young Kim<sup>2</sup>, Wonku Kang<sup>3\*\*</sup> and Hye-Sun Gwak<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Ewha Womans University

<sup>2</sup>Graduate School of Clinical Health Sciences, Ewha Womans University

<sup>3</sup>College of Pharmacy, Catholic University of Daegu

This study aimed to compare a microparticle enzyme immunoassay (MEIA) with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) technique for the measurement of tacrolimus concentrations in adult liver transplant recipients, to investigate how the assay choice influenced the population pharmacokinetics of tacrolimus and to identify patient characteristics that affected pharmacokinetic parameters in each assay. Tacrolimus concentrations from 29 liver (n=52 paired-samples) transplant recipients measured by both MEIA and LC/MS/MS were used to evaluate the performance of these methods in the clinical setting. Tacrolimus pharmacokinetics was studied independently using MEIA and LC/MS/MS data in 70 adult patients using a population approach performed with NONMEM. Patient characteristics which influenced pharmacokinetic parameters in each assay were compared. The relation between LC/MS/MS and MEIA measurements was best described by the regression equation  $MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336$  ( $r = 0.91$ ). Multiple linear regression analysis showed significant inverse relationships between assay difference and hematocrit (Hct) ( $p < 0.025$ ) in liver graft recipients. In MEIA, the population estimate of tacrolimus CL/F and apparent volume of distribution (Vd/F) were found to be 10.1 L/h and 226 L, and in LC/MS/MS, 13 L/h and 305 L respectively. Neither patient's age, weight, gender, grafted hepatic weight, albumin concentration, nor markers of liver function influenced tacrolimus CL/F. The final model of CL/F was found to be  $10.1 + (Hct/Hct\ mean)^{12.0}$  in MEIA and  $13 + (1 + Hct/578)$  in LC/MS/MS indicating that CL/F was influenced by hematocrit.

□ Key words – Tacrolimus, MEIA, LC/MS/MS, Population pharmacokinetics

Tacrolimus는 세포 내 단백질 FKBP-12와 결합하여 calcineurin을 통한 lymphokine (interleukin-2, gamma interferon) 생성을 억제하고 T림프구 활성화를 저해하여 동종이식 거부반응, 지연형 과민반응, 교원성 관절염, 이식 편대 숙주병 (graft versus host disease, GVHD) 등의 다양한 분야에서 사용되는 *Streptomyces tsukubaensis*에서 생성된 macrolide계 면역억제제이다.<sup>1-3</sup> 특히 간이식 환자의 경우 cyclosporine에 비해 급성 거부 반응 및 이식장기 3년 생존율에서 유의하게 좋은 결

과를 나타내었다.<sup>4</sup> 하지만 tacrolimus는 개체 간, 개체 내에서의 다양한 약동학적인 차이를 나타낼 뿐 아니라 cytochrome P450을 매개로 하는 약물 상호작용을 보이고 있어 적정 치료효과와 부작용 최소화를 위해 therapeutic drug monitoring (TDM)으로 약물용량을 조절하는 것이 권장되고 있다.<sup>5</sup> 약물에 의한 신독성 및 신경독성 등의 이상반응은 약의 총 투여량보다는 약물의 혈중농도와 더 상관성이 크다고 밝혀져 있으며 혈중 trough 농도는 급성거부반응과, peak 농도는 신독성 및 신경독성감소와 각각 유의한 관계를 나타내므로 정확한 혈중농도의 측정이 무엇보다 중요하다.<sup>6-7</sup>

현재 Tacrolimus의 혈중농도를 측정하기 위해 radio-receptor monitoring, enzyme immunoassay, tandem mass가 부착된 high-performance liquid chromatography (HPLC/MS/MS)를 포함한 다양한 분석법들이 개발되어 사용되고 있다.<sup>8</sup> 기존의 많은 약동학 및 약력학적인 임상 연구들은 주로 enzyme immunoassay에 의한 분석법으로 연구가 이루어져왔다. 그러

\*Correspondence to: 곽혜선

이화여자대학교 약학대학  
120-750 서울특별시 서대문구 대현동 11-1  
Tel: +82-2-3277-4376, Fax: +82-2-3277-2851  
E-mail: hsgwak@ewha.ac.kr

\*\*Co-correspondence to: 강원구

대구가톨릭대학교 약학대학  
경북 경산시 하양읍 금락1리 330번지  
Tel: +82-53-850-3619, Fax: +82-53-850-3602  
E-mail: wonkuk@cu.ac.kr

나 이 enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA)나 micro-particle enzyme immuno-assay (MEIA)의 경우는 tacrolimus 자체의 혈중 농도 뿐 아니라 tacrolimus의 대사체와도 교차 항체 반응(cross reactivity of the antibody)을 보여 약 30% 까지도 양성 유사 값을 발생시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>5,9)</sup> LC/MS/MS는 대사체가 아닌 parent drug만 측정하며, 또 다른 장점으로 tacrolimus와 병용 가능한 sirolimus나 mycophenolate 등 다른 면역억제제의 농도도 동시에 측정할 수 있으므로 임상적으로나 경제적으로 높이 평가받고 있어 기존 분석법에서 LC/MS/MS 분석법으로 전환하는 기관들이 늘고 있는 추세이다.<sup>10-12)</sup>

기존 연구들 중 이식환자를 대상으로 동일한 환자의 동일한 tacrolimus 샘플을 이용해 ELISA 방법과 LC/MS/MS를 비교한 연구들은 있으나 MEIA와 LC/MS/MS를 비교분석한 연구는 아직 부족한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 생체 부분 간 이식환자(living related liver transplantation)를 대상으로 tacrolimus 농도를 측정하는 두 분석법 MEIA와 LC/MS/MS법을 비교분석하고, 환자들의 tacrolimus 혈중농도를 이용하여 생체 부분 간 이식 환자의 집단약동학적 고찰을 함으로써 환자들의 개별화된 투여계획을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 연구방법

### 연구대상 및 자료 수집

본 연구는 삼성서울병원에서 생체 부분간이식을 받고 tacrolimus를 복용 중인 성인 환자(만 18세 이상) 중 해당기간(2005년 1월 1일~2005년 9월 30일)동안 tacrolimus 혈중농도를 적어도 1회 이상 측정했던 환자들을 대상으로 후향적으로 실시되었다. 이중 동일검체에 대해 MEIA와 LC/MS/MS분석법을 동시에 시행하였던 환자들(n=29)의 혈중농도를 이용해 두 분석법간의 관계를 연구하였다. 연구기간동안 MEIA법이나 LC/MS/MS법에 의해 측정된 tacrolimus 농도 값이 있는 환자들의 키, 체중, 연령, 성별 등의 인구학적 정보와 생체 부분 이식 간의 중량과 수술 후 경과일수(post-operative days, PODs), 상호작용이 예상되는 병용투여약물 [itraconazole (ITZ); nifedipine (NIFE); simvastatin (SIMV)], aspartate amino transferase (AST), albumin concentration, total bilirubin, hematocrit 등 검사결과자료를 수집하였다.

### 투여 약물 및 시료 채취

간 이식 후 초기 약 3개월간 스테로이드제제와 mycophenolate mofetil을 포함한 삼중면역억제요법(triple immunosuppressive regimen)을 받는 환자들의 경우 이식 직후에는 tacrolimus 권장초기용량인 0.075 mg/kg을 하루 2회 복용하였고, 이후 혈중 농도를 기반으로 조정되었다.

입원 환자들은 생체 부분간이식 직후부터 tacrolimus복용

전 1일 1회 전혈이 채혈되었고, 외래 환자의 경우는 진료 내원일 오전 중 채혈이 진행되어 EDTA 용기에 담아 즉시 진단의학검사실로 옮겨져 분석되었다.

### 분석방법 및 분석법 비교

Tacrolimus 혈중농도는 MEIA (Abbott IMx analyzer, IL, USA) 그리고/또는 LC/MS/MS (Waters Quattro Premier XE, Massachusetts, USA)법을 이용하여 측정되었다. 두 분석법간의 상관성을 연구하기 위해 LC/MS/MS법에 의해 측정된 tacrolimus 농도와 두 방법의 차이 값을 통계프로그램 SAS<sup>®</sup> 9.0(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 분석법간 가장 적합한 회귀 방정식을 구하였고, 표준 오차가 결정되었다. 두 분석법간의 일치도는 bias[(평균 차이 (mean difference)와 두 방법간 차이의 표준편차(SD)]와 두 분석법간의 비(LC/MS/MS÷MEIA)와 이 비의 SD를 계산해 요약하였다.

#### 일치도 평가법

- 1) 두 값 차이의 평균과 표준편차
- 2) LC/MS/MS÷MEIA의 비와 표준편차

또한 두 분석법 차이에 영향을 주는 변수를 분석하기 위해 두 분석법의 차이(MEIA-LC/MS/MS)와 환자의 검사수치간의 관계를 회귀분석을 이용하여 분석하였다.

### 집단약동학 모델링

집단약동학 모델링은 NONMEM (version 5.1.1, University of California, San Francisco, USA)을 이용하였고, tacrolimus 혈중농도는 1차 흡수 및 소실속도 상수를 갖는 one-compartment model (ADVAN2, TRANS2)에 의해 fitting되었다. 산출된 약동학적 파라미터들은 겉보기 클리어런스 (CL/F), 겉보기 분포용적 (Vd/F), 흡수 속도 상수 (Ka)이었다. 집단 약동학 분석은 상관성을 보이는 인자들을 population mean 값에 추가해 나가는 forward selection 방식에 의해 이루어졌으며 first-order estimation (FO)에 의해 estimation 한 후 first-order conditional estimation (FOCE) method와 비교하였다.

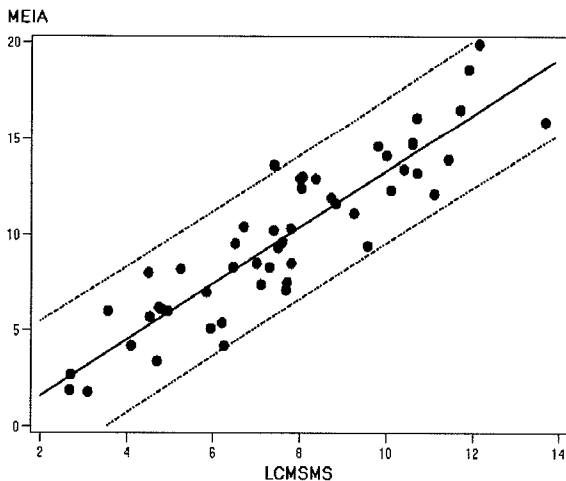
겉보기 클리어런스 (CL/F)와 겉보기 분포용적 (Vd/F) 등 파라미터의 개인의 간 차이( $\eta$ , eta)를 찾기 위해 다양한 식들이 적용되었고, base model에 환자들로부터 얻은 자료들 [covariates: 체중, 연령, 성별, total bilirubin, AST, hematocrit, 상호작용이 있는 약물과의 병용]을 추가해 가면서 개인간의 차이에 영향을 미치는 인자들을 찾았다. 모델의 선택은 Likelihood-ratio test에 의해 이루어졌다. 즉 objective function value (OBJ)를 비교하여 추가되는 parameter가 1개일 경우는 3.84 이상의 차이에서, 2개일 경우는 5.99 이상의 차이에서 통계적으로 유의성 ( $p < 0.05$ )이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 분석법 비교

성인 간이식 환자(남자 22명, 여자 7명) 29명의 약물농도가 두 분석법간의 비교를 위해 사용되었고 이 환자들은 적어도 1번 이상 동일한 tacrolimus 검체에 대해 MEIA법과 LC/MS/MS법에 의한 혈중농도측정 결과가 있는 경우로 총 52쌍의 혈중농도결과가 수집되었다. 이 샘플들의 관측 농도는 1.8~19.9 ng/mL (MEIA)와 2.7~13.7 ng/mL (LC/MS/MS) 이었다. 한 개체 당 얻어진 tacrolimus 농도는 1~10개였으며, 평균 2개였다. 샘플들은 이식 후 11일 째 이후부터 1722일까지의 환자에게서 얻어진 것으로 중앙값(median)은 37일이었으며, 평균(mean)은 173일이었다.

Figure 1은 MEIA 및 LC/MS/MS에 의해 측정된 혈중 tacrolimus 농도의 상관성을 나타낸 그림으로 두 결과는  $MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336$  ( $r = 0.91, p < 0.0001$ )의 관계를 나타내었다. Figure 2는 LC/MS/MS농도에 상응하는 두 분석 간의 차이를 보여주는 그림이다. 이 그래프에 근거해서 LC/MS/MS 농도가 4 ng/ml, 8 ng/ml, 12 ng/ml일 때 상응하는 MEIA의 농도(95% confidence interval)의 범위는 각각 0.8~8.4 ng/ml, 6.8~14.3 ng/ml, 12.7~20.4 ng/ml로 정확도로



$MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336$  (adj  $R^2 = 0.82$ )

Fig. 1. Correlation of tacrolimus concentrations determined by MEIA vs. LC/MS/MS ( $MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336, r = 0.91, p < 0.0001$ ). Dotted lines indicate the 95% of the confidence interval.

살펴보면 LC/MS/MS 농도가 4 ng/ml, 8 ng/ml, 12 ng/ml일 때 두 분석간(95% confidence interval) 상대적인 차이 값의 범위는 -80~110%, -15~78%, 6~70%로 낮은 농도에서 더 큰 폭의 차이를 보였다.

Table 1은 가장 적합한 선을 나타내는 회귀방정식(regression equations), 측정값의 표준오차(standard error of the estimate), 평균오차(mean biases), 그리고 평균 비(mean ratios)를 보여 주고 있다. MEIA와 LC/MS/MS분석법 사이의 mean bias를 나타내는 Table 2의 경우 tacrolimus 농도를 0~5 ng/mL, 5~10 ng/mL,  $\geq 10$  ng/mL로 3 구간으로 나누어 각 농도구간에 따른 두 분석법 간의 차이를 분석했다. Mean bias는 농도의 증가와 더불어 증가하였으나 bias range의 차이는 감소

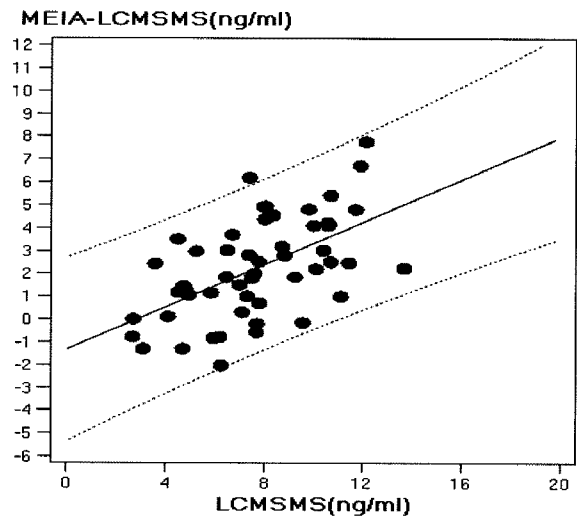


Fig. 2. Correlation of the method differences in tacrolimus concentrations: differences between MEIA-LC/MS/MS vs. LC/MS/MS. Dotted lines indicate the 95% of the confidence interval.

Table 2. Mean bias between MEIA and LC/MS/MS method for the determination of blood tacrolimus concentration.

Concentration range (ng/ml)	n	Bias, mean±SD (%)	Range
0≤con<5	11	14±38	-42~77
5≤con<10	28	25±27	-32~82
10≤con	13	34±16	9~64

$Bias = (MEIA - LC/MS/MS) / (LC/MS/MS) * 100\%$

Table 1. MEIA vs. LC/MS/MS for the determination of blood tacrolimus concentration.

Regression equation	SE. EST*	Mean bias† (±SD) (ng/ml)	Mean ratio‡ (±SD)§	Range of ratio
$MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336$	0.097	2.23±2.20	0.84±0.24	0.54~1.72

\*Standard error of the estimate (standard error of the regression slope)

†Mean and standard deviation (SD) of the difference (MEIA-LC/MS/MS) between methods

‡Ratio between MEIA and the reference method (i.e., LC/MS/MS ÷ MEIA)

§Standard deviation of the ratios

**Table 3. Demographic profile of the liver transplant recipients.****(38 females, 32 males)**

Characteristics	Mean±SD		Median		Range	
Age (years)	50.5±8		50		32-65	
Body weight (kg)	64.2±11.5		63		46-91	
Grafted hepatic weight (g)	734±117		720		500-1100	
Analysis method	MEIA (n=491)	LC/MS/MS (n=1262)	MEIA (n=491)	LC/MS/MS (n=1262)	MEIA (n=491)	LC/MS/MS (n=1262)
Tacrolimus (mg/dose)	1.4±0.9	1.6±0.9	1	1.5	0.125-5.25	0.125-6.5
Con. Tacrolimus (ng/ml)	9.1±4.5	8.1±3.8	6.5	7.5	1.0-30	0.8-24.1
Aspartate amino transferase (IU/L)	56.7±51.6	52.6±54.4	36	37	1-386	3-565
Total bilirubin (mol/L)	3.9±5.9	3.4±5.2	1.2	1.5	0.2-45.3	0.2-58.7
Con. Albumin (g/L)	3.6±0.5	3.3±0.4	3.6	3.3	2.1-4.5	2.5-4.6
Hematocrit	29.7±6.3	30.4±2.2	35.3	28.5	15.2-51	18-49.4

하였다.

이러한 두 분석법 간의 차이에 영향을 주는 요인들을 회귀분석을 이용해 albumin, bilirubin 수치 등 여러 값들을 평가하였고 그 중 통계적으로 유의성을 나타낸 값은 hematocrit 수치로 두 분석법의 차이값에 대해 약 0.5의 음의 관계를 나타내었다( $p < 0.025$ ).

### 집단 약동학 모델링

집단 약동학 모델링은 해당 연구기간 동안 두 가지 분석법을 모두 사용하여 tacrolimus의 혈중농도를 측정했던 생체부분간이식환자 70명을 대상으로 분석법별로 나누어 진행되었다. Table 3은 이 분석에 이용된 환자들에 대한 정보를 나타내고 있다. MEIA방법의 모델링에는 총 471개의 시료가 사용되었다. 이 샘플들의 농도는 1.0~30 ng/ml 범위 내로 대부분(90%)은 농도 2.2~15.4 ng/mL 사이이며, 평균(±SD)은 9.1(±4.5) ng/mL이었다.

한 개체에서 얻어진 샘플의 수는 1개에서 32개로 한 환자당 평균 7개의 혈중농도자료가 이용되었다. 대부분의 샘플(95%)이 지난 복용 후 8~9시간 후에 채혈되었다. 이 환자들의 1회 용량은 0.125~5.25 mg으로 1회 평균 1.4±0.9 mg (median, 1 mg/dose)이 투여되었다.

1차 속도 상수의 흡수 및 배설(first-order absorption and elimination)을 따르는 one-compartment model이 MEIA의 modeling에 적합했다. 첫 단계에서는 환자변수를 포함하지 않은 기본 모델(base model)을 구하였다. 그 뒤에는 각 파라미터들과 공변량들(covariates)과의 관계를 이용해 기본모델에 환자변수를 단계적으로 추가하여 모델을 설정하였다 (Table 4).

공변량들 중 hematocrit에 의해 CL/F가 영향을 받는 것으로 나타났으나 Vd/F에 대해서는 유의한 공변량이 없었다. 환자의 변수가 포함되지 않은 기본 모델에서 산출된 평균 CL/F와 Vd/F, Ka는 각각 10.1 L/hr, 226 L, 1.18 hr<sup>-1</sup>이었다.

**Table 4. Differences in the objective function value between the base model and the models including covariates. (MEIA)**

No.	Parameters	OBJ	Δ
Base model	$\theta_1, \theta_2, \theta_3$	-4533.84	0
model 1	$\theta_1 + \theta_4^*(\text{Hct}/29.8^{\S})$	-4543.42	-9.588
model 2	$\theta_1 + (\text{Hct}/29.8)^{\theta_4}$	-4567.95	-34.114
model 3	$\theta_1 + \text{Hct}^{\theta_4}$	-4431.02	102.812
model 4	$\theta_1^*(1 + \text{Hct}/\theta_4)$	-4534.19	-0.354
model 5	$\theta_2 + \theta_4^* \text{Hct}/29.8$	-4534.67	-0.834
model 6	$\theta_2 + (\text{Hct}/29.8)^{\theta_4}$	-4532.84	0.992
model 7	$\theta_2 + \text{Hct}^{\theta_4}$	-4534.63	-0.793
model 8	$\theta_2^*(1 + \text{Hct}/\theta_4)$	-4534.64	-0.8
model 9	$\theta_1 + (\text{Hct}/29.8)^{\theta_4} - \theta_5^* \text{ITZ}$	NA	NA
model 10	$\theta_1 - \theta_4^* \text{ITZ}$	NA	NA
model 11	$\theta_2 - \theta_4^* \text{ITZ}$	-4534.63	-0.794
model 12	$\theta_1^* (\text{Hct}/29.8)^{\theta_5}$ $\theta_2 - \theta_4^* \text{ITZ}$	-4532.90	0.936
model 13	$\theta_1 + \text{ALB}^{\theta_4}$	-4532.94	0.898
model 14	$\theta_1^* (1 + \text{ALB}/\theta_4)$	-4535.18	-1.347
model 15	$\theta_1 + \theta_4^* \text{ALB}/3.0^{\S}$	-4535.23	-1.393
model 16	$\theta_1 + (\text{ALB}/3.0)^{\theta_4}$	-4537.29	-3.458
model 17	$\theta_2 + \text{ALB}^{\theta_4}$	-3847.34	686.496
model 18	$\theta_2^* (1 + \text{ALB}/\theta_4)$	-4555.90	-22.064
model 19	$\theta_2 + \theta_4^* \text{ALB}/3.0$	-4533.49	0.345
model 20	$\theta_2 + (\text{ALB}/3.0)^{\theta_4}$	-4534.08	-0.244
model 21	$\theta_1^* (\text{Hct}/29.8)^{\theta_4}$ $\theta_2^* (1 + \text{ALB}/\theta_4)$	-3847.34	686.496

$\theta_1$ , clearance;  $\theta_2$ , volume of distribution;  $\theta_3$ , absorption rate constant  
<sup>§</sup>Mean value of hepatocrit (Hct); <sup>§§</sup>Mean value of albumin (ALB)  
 Note that the blood concentrations were determined by MEIA.

각 파라미터의 interindividual variability의 분산( $\omega^2$ )은 0.25 (CV%, 37), 0.14 (CV%, 50), 0.35(CV%, 59)이었으며 residual variability의 분산( $\sigma^2$ )은 0.019 (CV%, 14)이었다. Table 4는 MEIA법으로 측정된 혈중 농도를 이용해 개발된 약동학 파라미터 예측식과 OBJ(objective function value)값 및 base model 과 full model 사이의 OBJ값의 차이값을 나타낸 것으로 이를 근거로 환자의 변수가 고려된 최종 모델식(final model)은 다음과 같다.

$$CLF = 10.1 + (Hct/29.8)^{12.0}$$

Hct: Hematocrit value of a patient

29.8: Average hematocrit value

Figure 3의 상단 그림은 MEIA법에 의한 실측값과 최종 모델에 의해 산출된 혈중 tacrolimus의 농도와의 상관성을 나타낸 것이며 하단의 그림은 가중치가 부여된 잔량과 예측되는 농도간의 상관성을 도식한 것이다.

한편, 1,262개의 혈액농도-시간 샘플이 LC/MS/MS방법의 모델링에 이용되었는데 전체적 농도 범위는 0.8~24.1 ng/mL 이었으나 대부분(90%)은 2.8~15.3 ng/mL로, 평균( $\pm$  SD)치는

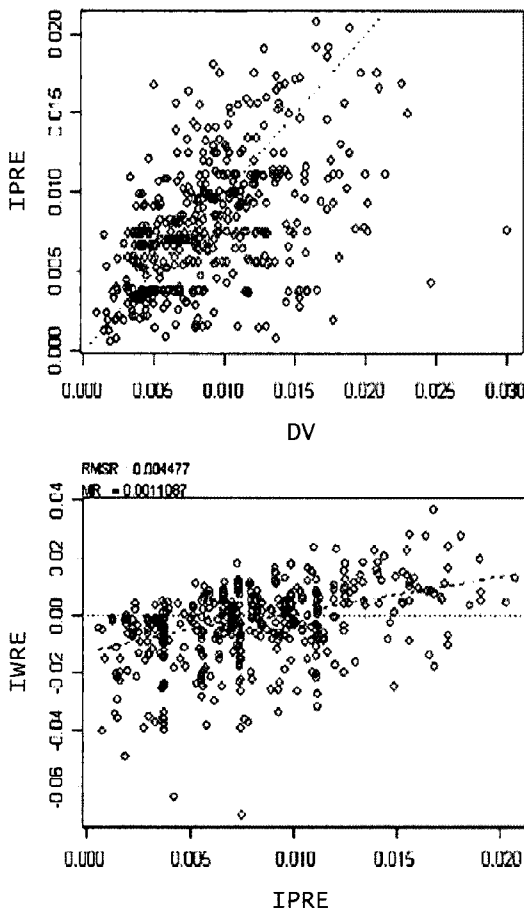


Fig. 3. Top: Scatter-plot of observed tacrolimus concentration measured by MEIA versus concentration predicted by final covariate model. Bottom: Plot of weighted residuals versus predicted concentrations.

Table 5. Differences in the objective function value between the base model and the models including covariates. (LC/MS/MS)

No.	Parameters	OBJ	$\Delta$
Base model	$\theta_1, \theta_2, \theta_3$	-12718.2	0
model 1	$\theta_1 + \theta_4 * Hct / 30.4^{\S}$	-12755.0	-36.8
model 2	$\theta_1 + \theta_4 * Hct$	-12719.8	-1.6
model 3	$\theta_1 * (1 + Hct / \theta_4)$	-12768.2	-50.0
model 4	$\theta_1 + Hct^{\theta_4}$	-12599.3	118.9
model 5	$\theta_1 * (1 + Hct^{\theta_4})$	-12599.3	118.9
model 6	$\theta_2 + \theta_4 * Hct / 30.4$	-10632.0	2086.2
model 7	$\theta_2 + \theta_4 * Hct$	-12728.5	-10.3
model 8	$\theta_2 * (1 + Hct / \theta_4)$	-12766.2	-48.0
model 9	$\theta_2 + Hct^{\theta_4}$	-12768.1	-49.9
model 10	$\theta_2 * (1 + Hct^{\theta_4})$	-12757.0	-38.8
model 11	$\theta_1 + \theta_4 * ALB / 3.3^{\S\S}$	-12718.2	0.0
model 12	$\theta_1 + \theta_4 * ALB$	-12690.4	27.8
model 13	$\theta_1 * (1 + ALB / \theta_4)$	-12719.8	-1.6
model 14	$\theta_1 + ALB^{\theta_4}$	NA	NA
model 15	$\theta_1 * (1 + ALB^{\theta_4})$	NA	NA
model 16	$\theta_2 + \theta_4 * ALB / 3.3$	-12706.1	12.1
model 17	$\theta_2 + \theta_4 * ALB$	-12749.2	-31.0
model 18	$\theta_2 * (1 + ALB / \theta_4)$	-12725.1	-6.9
model 19	$\theta_2 + ALB^{\theta_4}$	-10632.0	2086.2
model 20	$\theta_2 * (1 + ALB^{\theta_4})$	-12754.5	-36.3
model 21	$\theta_1 * (1 + Hct / \theta_4)$ $\theta_2 * (1 + ALB^{\theta_5})$	-12682.4	35.8

$\theta_1$ , clearance;  $\theta_2$ , volume of distribution;  $\theta_3$ , absorption rate constant  
 $^{\S}$ Mean value of hematocrit(Hct);  $^{\S\S}$ Mean value of albumin (ALB)  
 Note that the blood concentrations were determined by LC/MS/MS.

8.1( $\pm$ 3.8) ng/mL이었다. 한 개체에서 가능했던 tacrolimus 샘플 수는 1개에서 44개로 평균 18개였으며 대부분의 샘플은 (95%) 복용 후 8~9.1시간 후 trough농도였다. Tacrolimus 1회 투여량은 0.125~6.5 mg으로 1일 평균( $\pm$  SD) 1.6( $\pm$  0.9) mg (median, 1.5 mg/dose)이었다.

Table 5는 LC/MS/MS법으로 측정된 혈중 농도를 이용해 개발된 약동학 파라미터 예측식과 OBJ(objective function value) 값 및 basal model과 full model사이의 OBJ값의 차이값을 나타내었다. 각 파라미터들과 공변량들(covariates)과의 관계를 이용해 기본모델에 환자변수를 단계적으로 추가하여 모델을 설정하였다.

환자의 나이, 체중, 성별이나 간 기능 관련 지표 뿐 아니라 itraconazole 등 타 약물과도 유의한 관계를 보이지 않았으며, CLF와 Vd/F, Ka의 집단평균치(population mean)는 각각

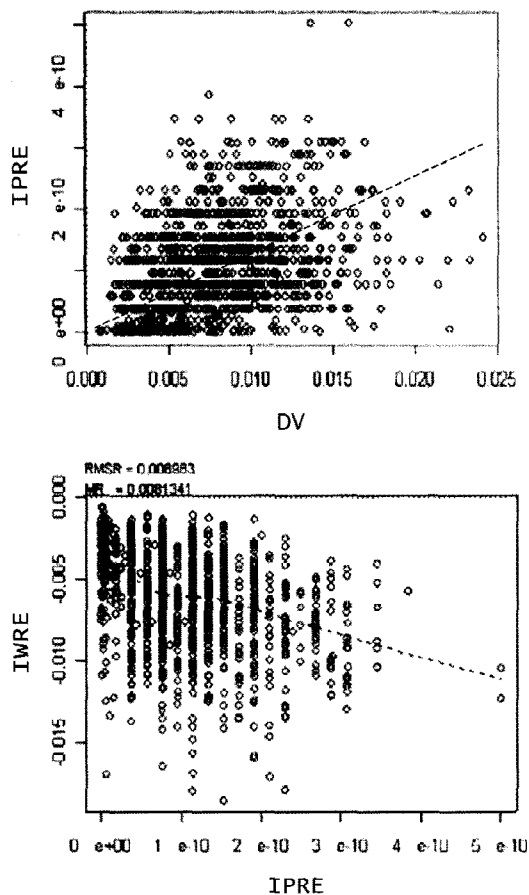


Fig. 4. Top: Scatter-plot of observed tacrolimus concentration measured by LC/MS/MS versus concentration predicted by final covariate model. Bottom: Plot of weighted residuals versus predicted concentrations.

13 L/hr, 305 L,  $4.43 \text{ hr}^{-1}$ 이었다. 각 파라미터의 interindividual variability의 분산( $\omega^2$ )은 0.18 (CV%, 42), 0.32 (CV%, 57), 0.34(CV%, 58)였으며 residual variability( $\sigma^2$ )는 0.035 (CV%, 19)였다. MEIA 방법과 동일한 방법으로 CL/F를 가장 잘 설명하는 최종 모델식(final model)은 다음과 같으며 Vd/F에 대해 유의한 공변량은 없었다.

$$CL/F = 13 * (1 + \text{Hct}/578)$$

Hct : hemocrit value of a patient

Figure 4의 상단 그림은 LC/MS/MS법에 의한 실측값과 최종 모델에 의해 산출된 혈중 tacrolimus의 농도와 상관을 나타낸 것이며 하단의 그림은 가중치가 부여된 잔량과 예측되는 농도간의 상관성을 도식화한 것이다.

## 고찰

본 연구에서는 동일한 tacrolimus 혈액샘플에 대해 MEIA 법과 LC/MS/MS분석법으로 측정된 자료들을 이용해 분석법간의 관계를 알아보고, 각 분석법으로 측정된 환자의 약물농

도 값들을 이용해 tacrolimus 용량 결정에 영향을 미치는 인자들을 찾아보고자 하였다.

두 분석법간의 positive bias는 46%이었으며, 회귀선의 slope가 positive인 것은 MEIA법에 의해 측정된 tacrolimus 농도가 대개는 LC/MS/MS법에 의한 것보다 더 높은 값이라는 것을 말해준다. Nigal 등의 연구에 의하면 positive bias는 10~34.5%로 연구들 간에 다양한 차이가 있는 것으로 보고되었다.<sup>13)</sup> 두 분석법들은 약물의 농도가 낮아질수록 상관성이 낮아지는 경향을 보이고 있는데 이는 MEIA측정법 자체가 낮은 농도의 약물측정 시 정확성이 감소한다는 타 연구보고들을 통해 MEIA분석법의 부정확성이나 낮은 민감도에 기인한다고 생각할 수 있다. 분석법간의 상관계수(r)는 0.91로 Gonschior 등의 연구와 동일한 값을 나타내었다.<sup>14)</sup>

이 두 분석법간의 차이에 영향을 미치는 요인을 연구한 Nigal 등의 보고에 의하면 hematocrit과 혈청 albumin이 두 분석법간의 차이값을 변화시킨다고 발표하였다. 즉 동일한 샘플에 대해 MEIA방법이 일반적으로 LC/MS/MS값보다 양의 큰 값을 나타내는 환자들의 관련인자로 낮은 albumin농도와 hematocrit 값이 유의하게 영향을 준다고 평가하고 있다.<sup>13)</sup> 즉, 전혈에 채취된 hematocrit치가 낮은 경우는 혈구로부터 tacrolimus의 추출에 영향을 미치거나 채혈된 샘플 속에 포함된 tacrolimus 유사물질(대사체 등)과 MEIA측정법에 사용된 항 tacrolimus 항체가 교차반응을 일으킨 false-positive 반응에 의해 tacrolimus농도가 over estimation된 것으로 해석될 수 있다.<sup>15-17)</sup> 또한 혈중 hematocrit 감소나 tacrolimus 결합단백질(1-acid glycoprotein and albumin)의 농도저하가 혈중 tacrolimus추출률 증가와 관련이 깊은 것으로 알려져 있으나 토끼의 간을 관류시킨 동물 실험결과에서는 albumin이 간 tacrolimus 추출률에 영향을 미치지 않은 것으로 보고되었다.<sup>18)</sup>

Tacrolimus는 혈중에서 혈중알부민이나 혈구에 단단히 부착되어 있는데, hematocrit 수치나 hemoglobin등의 수치가 감소되는 경우에는 tacrolimus의 비 결합률(unbound fraction)이 증가하게 되고, 증가된 비 결합형 tacrolimus는 쉽게 대사되거나 추출되므로 결국 비결합 tacrolimus와 그 대사체가 과잉으로 증가할 수 있다.<sup>18,19)</sup> 밝혀진 15개의 이상의 tacrolimus 대사체들 중 M2 (31-O-demethyl tacrolimus)만이 parent drug 과 비교해 실제 면역억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며 MEIA는 tacrolimus대사체인 M2, M3, M5 및 tacrolimus와 54-67%의 교차반응(cross-reactivity)를 나타내는 것으로 나타났다(Abbott MEIA II assay insert).<sup>20-22)</sup> 따라서 MEIA법으로 약물농도를 측정하는 경우 대사체와도 반응하게 되므로 hematocrit 수치나 hemoglobin등의 수치감소가 측정된 약물의 혈중농도를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다. 실제로 본 연구에서도 hemoglobin의 수치가 MEIA에 의한 tacrolimus의 농도 측정값에 영향을 미치는 것으로 평가되었다. Albumin의 경우 본 연구에서는 MEIA에 의한 tacrolimus의 농도 측정값에 유의한 영향을 보이지 않았으나 이는 본 연구에서

분석에 이용한 샘플 수의 제한 등에 의한 것일 수 있으므로 추가연구들을 통한 재검토가 요구된다.

두 분석법간의 차이에 대한 본 연구결과를 토대로 볼 때, 치료 trough농도의 목표치(target level)를 낮게 유지하는 환자의 혈중농도를 MEIA분석법으로 측정하는 경우 주의를 요한다. 비록 낮은 농도치에 대한 기준이나 분석법의 과측정치에 대한 임상적인 의미는 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만 Braun 등이 신 이식환자를 대상으로 한 case study를 살펴보면, 거부 반응이 진행 중인 환자들의 농도 분석기기에 따른 약물농도 측정값이 MEIA, ELISA, LC/MS/MS법에서 각각 10.5, 7.92, 2.93 ng/mL인 것으로 밝혀졌다.<sup>23)</sup> 즉 동일한 약물체혈 검체에 대해 LC/MS/MS로 측정되었다면 농도가 낮은 것이 확인되어 약물용량을 증량했을 환자들을 MEIA법에 의해 over-estimation된 농도를 보고 적절하다고 판단하여 결국 부적절한(sub-therapeutic) 면역억제치료를 시행했을 가능성을 제시하고 있다. 따라서 분석법간의 차이에 의한 약물용량조절의 차이는 이식받은 환자들의 치료에서 신중히 고려되어야 할 부분이라 사료된다.

MEIA와 LC/MS/MS의 각 분석법별 영향을 끼치는 약동학적 파라미터연구에서는 두 분석법 모두 hematocrit이 CL/F에 영향을 주는 것으로 나타났다. 이는 클리어런스의 유의한 변수로 hematocrit이 작용한다는 다른 연구결과들과도 일치한다.<sup>24-26)</sup> 하지만 다른 연구들에서 환자의 겔보기 클리어런스에 영향을 미치는 인자로 평가된 바 있는 albumin이나 total bilirubin 등과는 본 연구에서는 유의한 관계를 보이지 않았다.<sup>25)</sup> 간의 cytochrome P450효소를 억제해 tacrolimus의 혈중농도를 높이는 itraconazole이나 nifedipine과도 유의한 관계가 없는 것으로 나타났다. Tacrolimus와 병용 시 혈중농도를 약 2배 정도 상승시키는 것으로 알려져 있는 ketoconazole과의 상호작용에 있어 ketoconazole은 tacrolimus의 약동학적 파라미터인 클리어런스나 겔보기 분포용적에는 거의 영향을 미치지 않고 소장에서 tacrolimus의 대사 억제 및 소장 P-glycoprotein을 저해하는 것으로 연구되었다.<sup>27,28)</sup> 아직 itraconazole과 tacrolimus의 상호작용기전에 대한 연구는 부족하지만 본 연구에서 itraconazole이 tacrolimus의 약동학 파라미터인 겔보기 클리어런스에 영향을 미치지 않았던 결과를 ketoconazole의 예로 해석할 수 있을 것이다.

본 연구는 후향적으로 이루어져 채혈 시점기록의 부정확성 가능, tacrolimus의 혈중농도에 변화를 주는 다른 약물의 병용(외래환자의 자기약 등), 환자의 복약이행도, 외래 채혈시의 약물복용시점 등에 대한 평가가 불가하다는 제한점을 가지고 있다.

향후 tacrolimus의 혈중농도에 영향을 미치는 더 많은 다양한 변수들을 확인하고 이들과 약동학적인 파라미터들과의 관계를 분석하여 환자에게 적합한 약물용량 모델을 제시하고 혈중농도 분석법차이에 따른 약물용량결정에 영향을 주는 인자들을 찾아내어 최적의 약물치료가 가능하도록 해야 할 것

이다. 또한 간이식환자에서의 population parameters와 dosage prediction에서의 분석법에 의한 차이가 연구되어야 할 것이다. 그리고 무엇보다도 혈중약물농도 분석법간의 차이와 측정된 약물농도간의 해석 및 임상반응(clinical events)이 어떻게 상관하는 지에 대한 연구가 더 면밀히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

MEIA와 LC/MS/MS 두 분석법은 0.91의 상관관계 ( $p < 0.0001$ )를 보였으며 두 분석법사이에  $MEIA = 1.465 * LC/MS/MS - 1.336$ 의 회귀방정식이 도출되었다. Hematocrit의 변화가 두 분석법간의 차이에 유의한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

두 분석법 각각에 대해 NONMEM을 이용한 집단 약동학 파라미터에 대한 변량들을 확인한 결과 hemocrit이 CL/F에 영향을 주는 것으로 나타났다. 환자의 변수가 고려된 최종 모델식은 MEIA법의 경우  $CL/F, V_d, K_a$ 가 각각  $10.1 + (Hct/Hct\ mean)^{12}$  L/hr, 226 L,  $1.18\ hr^{-1}$ 이었으며 LC/MS/MS법의 경우 각각  $13 * (1 + Hct/578)$  L/hr, 305 L,  $4.43\ hr^{-1}$ 이었다.

## 참고문헌

1. Shapiro R. Tacrolimus in solid organ transplantation: an update. *Transplant Proc.* 1999; 31: 2203-2205.
2. Anon. The European FK 506 Multicentre Psoriasis Study Group: Systemic tacrolimus (FK 506) is effective for the treatment of psoriasis in a double-blind, placebo-controlled study. *Arch Dermatol* 1996; 132: 419-423.
3. Tzakis AG, Fung JJ, Todo S, et al. Use of FK 506 in pediatric patients. *Transplant Proc* 1991; 23: 924-927.
4. Glanemann M, Klupp J, Langrehr JM, et al. Mycophenolate mofetil is superior in combination with tacrolimus compared to cyclosporine for immunosuppressive therapy after liver transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33: 1069-1070.
5. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, et al. Consensus document : therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* 1995; 17: 606-614.
6. Backman L, Nicar M, Levy M, et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation* 1994; 57: 519-525.
7. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2001; 41: 542-551.
8. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, et al.,

- Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29(6): 404-430.
9. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 596-601.
  10. Taylor PJ, Lynch SV, Balderson GA, et al. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus (FK506) using tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 240-241.
  11. Zhang Q, Simpson J, Aboleneen HI. A specific method for the measurement of tacrolimus in human whole blood by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 470-476.
  12. Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. *Clin Biochem* 2001; 34: 285-290.
  13. Brown NW, Adams JE, Tredger M. Low hematocrit and serum albumin concentrations underlie the overestimation of tacrolimus concentrations by microparticle enzyme immunoassay versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 586-592.
  14. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, et al. Simplified high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for measurement of tacrolimus and its metabolites and cross-validation with microparticle enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 1995; 17(5): 504-510.
  15. Kuzuya T, Ogura Y, Motegi Y, et al. Interference of hematocrit in the tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 507-511.
  16. Homma M, Tomita T, Yuzawa K, et al. False positive blood tacrolimus concentration in microparticle enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1119-1120.
  17. Taylor PJ, Morris RG. Tacrolimus measurement by microparticle enzyme immunoassay II. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 259-260.
  18. Chow FS, Piekoszewski W, Jusko WJ. Effect of hematocrit and albumin concentration on hepatic clearance of tacrolimus (FK506) during rabbit liver perfusion. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 610-616.
  19. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus: an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 1997; 54: 925-975.
  20. Piekoszewski W, Jusko WJ. Plasma protein binding of tacrolimus in humans. *J Pharm Sci* 1993; 82: 340-341.
  21. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus): identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 28-34.
  22. Tamura K, Fujimura T, Iwasaki K, et al. Interaction of tacrolimus (FK506) and its metabolites with FKBP and calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 437-443.
  23. Braun F, Lorf T, Schutz E, et al. Clinical relevance of monitoring tacrolimus: comparison of microparticle enzyme immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, and liquid chromatography mass spectrometry in renal transplant recipients converted from cyclosporine to tacrolimus. *Transplant Proc* 1996; 28: 3175-3176.
  24. Zahir H, Andrew J, McLHamim Z, et al. Population Pharmacokinetic Estimation of Tacrolimus Apparent Clearance in Adult Liver Transplant Recipients. *Ther Drug Monit* 2005; 7: 422-430.
  25. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 660-669.
  26. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, et al. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 298-309.
  27. Floren LC, Bekersky I, Benet LZ, et al. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62: 41-9.
  28. Tuteja S, Alloway RR, Johnson JA, et al. The effect of gut metabolism on tacrolimus bioavailability in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 1303-7.