

Hitach-7600 P-module을 이용한 Methotrexate 정량분석 평가

가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과

김민희·차경호·김승희·김남주·채효진

Quantitative Analysis of Methotrexate using Hitach-7600 P-module

Min-Eui Kim, Kyong-Ho Cha, Seung-Hee Kim, Nam-Joo Kim, and Hyo-Jin Chae

Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul St. Mary's Hospital, Seoul 137-701, Korea

Methotrexate (MTX) is one of the antineoplastic drugs and it is known to be effective in the management of acute lymphoblastic leukemia in children, management of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women, management of carcinomas of the breast, tongue, pharynx, and testis, maintenance of remission in leukemia and treatment of severe, debilitating psoriasis. Intermediate to high-dose methotrexate administration followed by leucovorin rescue is effective in the treatment of carcinoma of the lung and osteogenic sarcoma. Intrathecal administration is effective in treating meningeal leukemia or lymphoma. There are FPIA (Fluorescence polarization immunoassay) and EMIT (Enzyme multiplied immunotest) methods that measure for MTX. We evaluated the FPIA and EMIT methods. MTX was measured by Hitachi-7600 P-module using EMIT and FPIA using TDX in the sera of 60 patients. The performance characteristics evaluated were, light influence, linearity, comparison with FPIA. Also, precision evaluated were three level controls through put following CLSI evaluation protocols (EP10-A). When the MTX value of $4.16 \pm 5.78 \mu\text{mol/L}$ (mean, SD) by the Hitachi-7600 P-module was compared with that of $4.05 \pm 5.47 \mu\text{mol/L}$ by FPIA, coefficients of correlation of 0.988 was obtained. The regression equation was Y (Hitachi-7600 P-module) = $0.9408 \times (\text{FPIA}) + 0.1316$ ($r=0.9885$, $n=60$). CVs of MTX measured by Hitachi 7600 P-module was 6.78% at $0.33 \mu\text{mol/L}$, 0.96% at $1.16 \mu\text{mol/L}$, and 0.96% at $8.04 \mu\text{mol/L}$. The precision was excellent in each group. The linearity was acceptable. We evaluated that MTX is light-sensitive on prolonged exposure to direct sunlight. Comparing with the FPIA using TDX, the Hitachi-7600 P-module using EMIT showed good coefficient of correlation and precision. Therefore the Hitachi-7600 P-module can replace the FPIA for quantitative analysis of MTX.

Received 28 OCT 2009 / Returned for modification 11 DEC 2009 / Accepted 16 DEC 2009

Key Words : Methotrexate, Quantitative analysis, Hitachi-7600 P-module, FPIA, EMIT, Antineoplastic drug

I. 서론

교신저자 : 김민희 (우)137-701, 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과
TEL : 02-2258-1667, 010-2738-4286
E-Mail : polomini@catholic.ac.kr

항암제(antineoplastic drug)의 종류로는 대사길항제로

methotrexate, 5-fluorouracil가 있으며, 식물성 알칼로이드로는 vinca alkaloid, taxanes, epipodophyllotoxin가 있고, 항종양 항생제로는 anthracycline, mitomycin-C, bleomycin가 있으며, 알킬화제로서는 cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan 등이 있으며 platinum 화합물cisplatin과 carboplatin이 있다(Evans 등, 1992; 신, 1994; Gross, 1998 Eadie, 2001). 이 중에서 항암제인 methotrexate (MTX)는 소아의 급성백혈병 및 임파종에 유효하며 부인의 섬모막암에 쓰이고 다른 항암제와 병용하여 유방암, 난소암, 결장암, 고환암 등에 광범위하게 사용된다(이와 김, 1988; 장, 1995 윤과 임, 2000). 면역억제제로서 면역매개질환에도 사용되며 독성을 경감하기 위하여 leucovorin과 병용하여 골수기능억제, 점막염, 신독성을 최소화한다(Spector 등, 1988 Wolf, 1996; Allwood, 2002). 이러한 MTX 만의 특징으로 다른 약물보다 항암제로 주로 쓰이고 있다(Bethesda, 1993). MTX를 측정하는 방법으로는 크게 면역측정법과 크로마토그래피법으로 나눌 수 있는데 면역측정법에는 EMIT(enzyme multiplied immunotechnique), FPIA(fluorescence polarization immunoassay), RIA(radio immunoassay), ELISA(enzyme-linked immunoassay) 및 NII(nephelometric inhibition immunoassay)가 있으며 크로마토그래피법에는 가스 크로마토그래피(GC) 및 고압액체크로마토그래피(HPLC)법이 이용되고 있다(Beller 등 1971; Buice 등, 1980). 대부분 임상에서는 상용모니터링 시 FPIA법으로 MTX를 측정하고 있으나, EMIT법으로 측정하는 Hitachi-7600(Hitachi, Japan) P-module이 소개되어 다른 장비에 비해 측정 속도가 빠르고 사용에 편리한 것으로 보고되었다. 이에 Hitachi-7600 analyzer P-module을 이용한 EMIT측정과 TDX(Abbott, USA)을 이용한 FPIA법, 두 방법의 상관성을 측정하였고, CLSI Guideline에 따라 EMIT법을 적용한 Hitachi-7600 analyzer p-module에서의 MTX의 정밀도와 직선성을 평가 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과에 MTX

측정이 의뢰된 검체 중 저농도, 중간농도, 고농도가 고르게 분포되도록 선택한 60검체를 대상으로 하였다..

2. 방법

1) MTX의 측정

먼저 FPIA방법을 이용한 Abbott사의 TDX장비로 MTX를 측정하였으며, 비교대상인 HITACH-7600 생화학 자동 분석기에 EMIT2000 시약(Siemens Syva, USA)으로 측정하였다. 검체는 채취 후 차광처리 하였으며 도착 즉시 혈청분리 하여 측정 시까지 냉장보관 하고 채혈 후 4시간 이내에 MTX 정량분석을 완료하였다.

2) 직선성평가

기존 FPIA법을 이용한 Abbott사의 TDX장비에서 측정 한 MTX 치가 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 과 20.5 $\mu\text{mol/L}$ 인 두 검체를 저농도와 고농도의 검체로 하여 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 섞어, 각각을 EMIT방법을 사용하는 Hitach-7600 analyzer로 CLSI Guideline EP6-A의 지침에 따라 4회 반복 측정한 측정치와 계산치를 회귀 분석하여 회귀방정식과 결정계수를 구하였다.

3) 정밀도 평가

Bio-Rad에서 제조한 TDM control level 1,2,3의 3가지 농도를 CLSI Guideline EP5-A2의 지침에 따라 20일간 1일 2회, 1회 2번씩 반복적으로 측정하였다.

4) 상관성평가

기존 FPIA법을 사용한 Abbott사의 TDX장비에 의한 MTX측정치가 골고루 분포하게 60개의 환자검체를 선별하여, EMIT법을 적용한 Hitachi-7600 생화학분석기를 이용하여 측정하고 상관방정식과 피어슨 상관계수(r)를 구하였다.

5) 광노출에 의한 농도변이의 평가

광노출에 의한 황색침전물의 형성으로 MTX 농도감소를 주의해야 한다(Robinson와 Taylor, 1986)는 제조사의 보고를 확인하기 위하여 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 부터 13.8 $\mu\text{mol/L}$ 범위에 속하는 20개의 검체를 선별하여 차광 전 MTX 측정치와 6시간 직사광선 노출 후 농도차를 비교평가 하였다.

6) 농도별 분석건수 조사

장비 간 MTX 측정가능범위를 상회하는 검체의 비율을 조사하여 희석검사를 시행함으로써 추가적인 시약 소모량을 비교하기 위하여 2009년 6월부터 8월까지의 의뢰된 MTX 정량검사의 결과를 평가하였다.

III. 결 과

1. 직선성 평가

FPIA법과 EMIT 측정치와 계산치로 구한 직선의 회귀 방정식은 $y = 1.014x + 0.141$ 이었고 결정계수(r^2)는 0.997 이었다(Fig. 1).

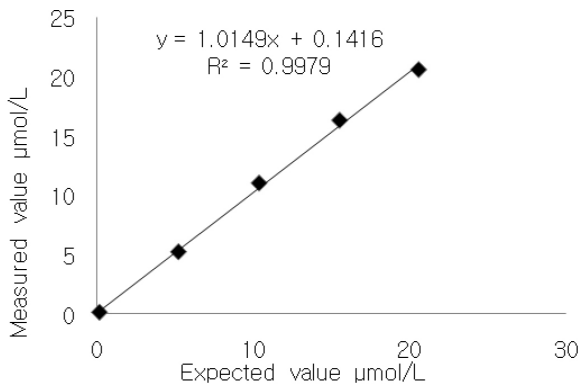


Fig. 1. The linearity curve of MTX analyzed by Hitachi-7600 analyzer

2. 정밀도 평가

검사 내 정밀도 변이계수는 level 1 이 6.78%, level 2 가 0.96%, level 3 이 0.96%이었다. 검사일 간 변이계수는 각각 9.88%, 4.72%, 3.56%이었고, 총 정밀도는 각각 11.24%, 4.77%, 3.66% 였다. (Table 1.)

Table 1. The precision for MTX on the Hitachi-7600 analyzer

	Level of µmol/L MTX		
	Level 1	Level 2	Level 3
Mean (µµmol/L MTX)	0.33	1.16	8.04
Within-run CV (%)	6.78	0.96	0.96
Between-day CV (%)	9.88	4.72	3.56
Total precision CV (%)	11.24	4.77	3.66

3. 상관성 평가

장비간 측정범위와 희석된 범위 모든 농도를 포함한 결과로 신뢰도는 0.98이상으로 확인이 되었다(Table 2) (Fig. 2).

Table 2. The correlation between Hitachi-7600 and TDX for MTX

Method	n	Mean (µmol/L)	SD	r ²	p- value
TDX	60	4.05	5.47	0.988	>0.001
Hitach-7600	60	4.16	5.78		

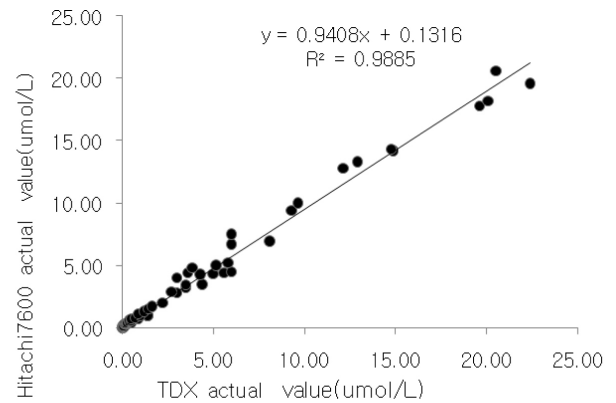


Fig. 2. The comparison of MTX results assayed by Hitachi-7600 and TDX

두 장비간 mean값을 통한 각 농도별 결과차는 두 검사 장비의 원리에 이하면 FPIA법의 측정감도는 0.02~1.0 µmol/L 이며 EMIT법의 측정감도는 0.3~2.0 µmol/L로 낮은 농도에서 더 큰 차이를 보이기 때문에 실제 농도별 결과 차에서도 2 µmol/L의 농도에서는 평균 0.2 정도로 차이가 있으나 그 이상의 농도에서는 대략 0.1 µmol/L인 것을 확인하였다(Fig. 3)(Table 2).

4. 광노출에 의한 농도변이의 평가

차광하여 Hitach-7600 analyzer에서의 MTX 측정 농도 값보다 인위적으로 직사광선에 6시간 동안 노출하여 측정된 MTX 측정치가 높게 나왔다(Table 3, Fig. 4) 직사광선에 대한 MTX의 안정성은 미흡하므로, TDX에서 측정해왔듯이 Hitach-7600 analyzer에서도 차광을 해야 한다는 결론이 나왔다. MTX는 빛에 대해 민감하므로, 빛을

오랫동안 쪼이면 노란 침전물을 형성한다. 검체는 반드시 차광을 해야 하며, MTX 농도가 24시간 후 최대 12% 감소한다고 밝혀졌다. 7시간 후 11% 감소한다는 보고도 있다(Allwood, 2002).

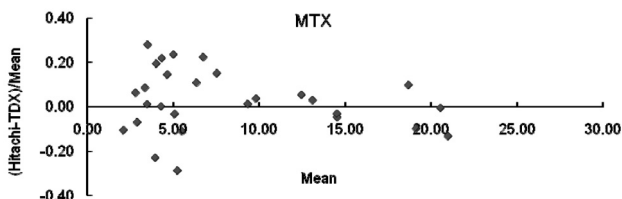


Fig. 3. The result difference according to concentration of mean

Table 3. The comparison between protected and exposed light

Method	n	Sum	Mean ($\mu\text{mol/L}$)	SD	Diff*
Protect light	20	91.9	4.56	3.78	0.46
Exposed light	20	100.5	5.02	3.86	

* (mean of exposed light) - (mean of protect light)

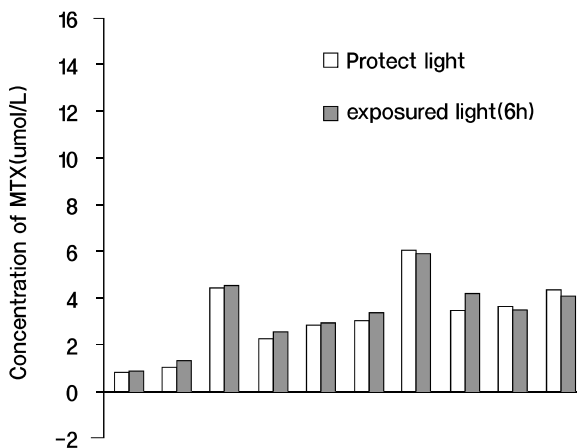


Fig. 4. Measurement of MTX by a direct ray of light

5. 농도별 분석건수 조사

대상 검체 중 희석없이 측정가능한 검체 수를 알아보기 위하여, 서울성모병원에서 최근 3개월간의 MTX 결과 값 중, 1.0~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 사이인 검체를 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 6월에는 6.25%의 검체, 7월에는 11.53%, 8월에는 9.65%의 검체가 이에 속하였다. FPIA법

의 측정감도는 0.02~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 이며 EMIT법의 측정감도는 0.3~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 로 임상에서 사용하는 MTX의 용량이 고농도인 점을 감안하면 희석 없이 측정할 수 있는 부분이, 즉 1.0~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 인 샘플의 경우가 대략 본 원의 경우 대략 전체의 10% 정도로 이 농도의 경우 희석 없이 즉시검사가 가능하고 이로 인한 시약의 소모분을 줄일 수 있는 장점이 확인되었다(Table 4).

Table 3. The analyze statistic according to concentration of MTX test

Month	Total test	1.0~2.0 $\mu\text{mol/L}$ (N)	%
June	128	8	6.25
July	130	15	11.53
August	145	14	9.65

IV. 고 찰

일반적으로 MTX 측정에 있어서 HPLC 방법은 가장 정확하고, 민감하여 표준법으로 알려져 있다(Oellerich, 1980; OSHA, 1991). 그러나 보고에 의하면 HPLC 법은 EMIT, FPIA 방법보다 큰 변이성을 가지고 있다고 한다(Buice 등, 1980). 현실적으로 HPLC 법으로 MTX의 측정은 시간 소모가 크고, 조작 및 유지보수에 숙련된 인력이 필요로 하므로 검사실에서는 많은 제한점을 지니고 있으며, 또한 EMIT법과 FPIA법보다 많은 검체량을 요구한다. 특히, 많은 양의 검체를 채취하기 힘든 소아들에게는 더욱 어려움이 있어, 소아 백혈병을 치료하는데 있어서는 용이하지 않다고 한다(Albertioni 등, 1996). 면역측정법인 FPIA 법이나 EMIT 법 등이 실용화되어 검사실에서 자동화 검사법으로 이용되고 있으며 FPIA 법을 이용한 TDX 장비는 전통적으로 널리 사용되고 있었으나, 최근 시약생산을 중단할 예정에 있다는 제조사의 보고가 있었으므로 대체할 수 있는 방법을 검토할 필요성이 대두되었다. 그러한 관점에서 EMIT 법을 이용하는 Hitach-7600은 생화학 검사를 수행하는 동시에 추가 장비 없이 MTX를 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있으며 주말에도 분석요청이 빈번한 본원의 검사환경 상 응급검사로 적용하여 높은 효율성을 확보할 수 있었다. 충분한 검증사례가 보고

되지 않은 점을 고려하여 정밀도 평가에서 정도관리물질 TDM level 1, 2, 3의 3가지 농도를 CLSI EP5-A2의 지침에 따라 20일간 1일 2회, 1회 2번씩 반복적으로 측정하고, 총 6회의 보정을 시행한 점은 MTX 시약이 다른 시약에 비해 고가의 시약이라는 점을 고려하면 다소 어려운 결정이었으나 본 보고를 통해 사례를 제공하는 것으로 의의가 있다고 사료된다. 보정 안정성은 EMIT 시약을 전용으로 검사하는 Syva 장비에서는 결과 관리와 시약을 냉장고에 따로 보관하는 장비 특성상 약 10일에 1번씩 시행되어야 하는데, Hitach-7600에서는 EMIT 시약이 P-module에 냉장으로 보관되고, 공기의 유출이 없으므로, 보정작업의 안정성이 보다 우수하였다. 높은 장비 간 상관성은 임상에서 TDX 장비로 검사하였던 MTX 측정치를 Hitach-7600에서 검사하더라도 검사장비 교체로 인한 혼돈을 최소화할 수 있으며, Hitach-7600에서의 MTX 측정결과를 신뢰성있는 결과로 받아 들일 수 있을 것으로 사료된다.

측정 시 차광에 대한 불편함과 지침을 준수하지 않을 시 재검체를 채취해야 하는 불편함을 확인하고자 광노출에 의한 농도변이를 평가한 내용에 있어서는 검체를 차광한 MTX 측정값보다 인위적으로 직사광선에 6시간 동안 노출하여 측정된 MTX 측정값이 높게 나왔다. 시간마다 경과에 따른 변화를 확인하는 등의 추가적인 실험을 통해 증명되어야 하겠다.

장비 간 측정가능범위 비교에 있어서 EMIT 법의 측정범위는 0.3~2.0 $\mu\text{mol/L}$ 로 FPIA 법의 범위(0.02~1.0 $\mu\text{mol/L}$)보다 넓어 약 10% 정도의 시약의 소모분을 줄일 수 있는 장점이 확인되었다. 또한, EMIT 방법의 특성상 혈청과 혈장을 모두 측정할 수 있다는 장점이 있는데, 본원에서는 부족했던 시약의 재고와 혈청과 동시에 혈장을 채취하기 힘든 점으로 혈장으로 MTX를 측정할 수 있는지의 평가는 실행하지 못하였다. 혈장으로 MTX를 검사를 시행하게 되어서 그 결과 혈장 검사치가 혈청 결과와 일치하는 검사치를 나타내고, 다른 문제점이 없다고 밝혀지면, 임상에서는 MTX 검체를 의뢰할 때 검체의 선택의 폭이 넓어 지고, 환자에게 검체 채취 하기에 용이한 검체를 의뢰하여 검사함으로써 Hitach-7600에 의한 MTX 검사에서 더욱 큰 장점으로 부각 될 수 있을 것이다.

결론적으로 아직 보고되지 않은 TDX 방법과 EMIT 방

법을 비교 평가하여 보고할 수 있었던 점은 좋은 경험이 되었고 Hitach-7600 analyzer에서 MTX를 측정하는 새로운 방법인 EMIT 방법이 직선성, 정밀도 및 상관성이 모두 우수하므로 임상검사에서 MTX를 측정하는 효율적인 새로운 방법임을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Beller GA, Smith TW, Abelmann WH, Haber E, Hood WB Jr. Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations. *N Eng J Med* 284:989-997, 1971.
2. Buice RG, Evans WE, Karas J, Nicholas CA, Sidhu P, Straughn AB, Meyer MC, Crom WR. Evaluation of enzyme immunoassay, radioassay, and radioimmunoassay of serum methotrexate, as compared with liquid chromatography. *Clin Chem* 26:1902-1904, 1980.
3. Crom WR, Taylor RH, Pratt CB. Methotrexate Therapeutic use and serum concentration monitoring. In Taylor WJ and Finn AL (eds). *Individualizing Drug Therapy: Practical Applications of Drug Monitoring*. p149-173, Gross, Townsend, Frank, Inc, New York, 1981.
4. Evans WE, Schentag JJ, Jusco WJ: *Applied pharmacokinetics*, 3rd ed, Applied Therapeutics, Vancouver, WA, 1992.
5. Eadie MJ. Therapeutic drug monitoring-antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 52(Suppl 1): 11S-20S, 2001.
6. Albertioni F, Rask C, Eksborg S, Poulsen JH, Pettersson B, Beck O, Schroeder H, Peterson C. Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma. *Clin Chem* 42(1):39-44, 1996.
7. Oellerich M. Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends. *J Clin Chem Clin Biochem* 18(4):197-208, 1980.
8. OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens-OSHA. Final rule. Part II; Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration (OSHA); 29 CFR

- Part 1910.1030. *Fed Regist* 56(235):64004-64182, 1991.
9. Robinson JD, Taylor WJ. Interpretation of serum drug concentration. In: Taylor WJ, Caviness MHD, eds. *A Textbook For The Clinical Application of Therapeutic Drug Monitoring*. P31-45, Abbott Laboratories, 1986.
10. Spector R, Park GD, Johnson GF, Vesell ES. Therapeutic drug monitoring. *Clin Pharmacol Ther* 43(3):345-353, 1988.
11. Allwood M. *The cytotoxics handbook* by Michael Allwood, Andrew Stanley, Patricia Wright, 2002.
12. Wolf BA. Overview of therapeutic drug monitoring and biotechnologic drugs. *Ther Drug Monit* 18:402-404, 1996.
13. 신재국. 적정약물요법과 TDM. *대한의학협회지* 37(2): 170-180, 1994.
14. 윤영란, 임영채. 적정약물요법을 위한 TDM의 임상적 이용. *임상약리학회지* 8(1):132-143, 2000.
15. 이귀녕, 김진규, 임상화학. 의학문화사, 서울, 1988.
16. 장인진. 치료적 약물농도 모니터링. In: 신상구 등. *임상약리학*. p17-29, 서울대학교 출판부, 서울, 1995.