

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07487

研究課題名(和文)モノクローナル抗体を利用した新規抗てんかん薬濃度測定法の開発

研究課題名(英文) Development of method for the determination of new antiepileptic drug concentration using monoclonal antibody

研究代表者

大磯 茂 (Oiso, Shigeru)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40513106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗てんかん薬ピガバトリンおよびラコサミドのELISA法を確立すべく両薬物のモノクローナル抗体作製を行った。ピガバトリンは抗体価上昇がみられなかった。ラコサミドでは抗体価上昇が認められ、ラコサミドによる競合反応も観察されたが、その後の細胞融合によるモノクローナル抗体の単離には至らなかった。

一方、別の研究目的であるモノクローナル抗体を用いたドットブロット法による薬物濃度測定法の確立については、すでに保有していたダビガトランのモノクローナル抗体を用いて検討を行い、ナイロン膜を用いた高精度の測定法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により開発に成功したナイロン膜を用いたドットブロット法による薬物濃度測定法は、HPLCやLC-MSとは異なり高額な機器を必要とせず、簡便な操作により薬物濃度を高感度に測定可能とする手法である。また指先穿刺等で得られる微量の検体で測定可能であり、検体採取において医師や看護師による採血を必要としないことから薬局等において薬剤師が患者から直接検体を得て行う薬物濃度測定法として利用でき、医薬品適正使用のさらなる推進につながる事が期待できる。薬物毎に特異的に反応する抗体を必要とするが、基本とする原理は他薬物にも応用でき、汎用性が非常に高い測定法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tried to produce monoclonal antibodies for antiepileptic drug Vigabatrin and Lacosamide to develop enzyme-linked immunosorbent assay for those drugs. The increased antibody titer by immunization of an antigen for Vigabatrin was not observed. The antibody titer was increased with the immunization of an antigen for Lacosamide. As the competitive inhibition of the increased titer was observed by addition of Lacosamide, we practiced cell fusion method, but we could not isolate any monoclonal antibody.

On the other hand, we also investigated the establishment of a new measurement of drug concentration as a principle of dot blotting using an anti-Dabigatran monoclonal antibody and succeed a highly sensitive method using a Nylon membrane.

研究分野：医療系薬学

キーワード：薬物濃度測定法 モノクローナル抗体 ドットブロット法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳の過剰あるいは同期性の神経活動による一過性の症候・症状と定義される。成人では脳血管障害の合併症として、小児では脳の発達段階で発症することがある。てんかん治療の基本は、薬物療法であり、研究開始当初は約 20 種類の抗てんかん薬が上市されていたが、成因が様々な難治性てんかんに対応すべく、新たな抗てんかん薬の開発が活発に進められている。2016～2017 年にかけて、新規抗てんかん薬としてピガバトリン、ラコサミドなどが発売された。それらの使用上の注意として、ピガバトリンおよびラコサミドでは腎機能障害がある患者において用量を減らすなどの調整を行うよう記載されている。抗てんかん薬は、腎機能および肝機能が十分に発達していない小児への投与も多く、そのようなケースでは血中濃度測定により体内動態を解析して判断する必要がある。

抗てんかん薬の薬物療法では、一般的に治療薬物モニタリング (TDM) による用量調節が必要とされている。TDM には血中薬物濃度測定が必要であるが、多くの新規抗てんかん薬は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) または液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) による測定法が確立されている。しかしながら、それらは高額な装置に加え、多量の有機溶媒を必要とすること、薬物毎に使用する高価な分離カラムや移動相などの条件設定、装置の取り扱いに熟練したオペレーターが必要であること、装置の設置スペースの問題などを考えると一般の診療施設や薬局で導入するには、ハード面、ソフト面の両方に高いハードルを有している。また検体に 0.5mL 程度の血液を必要とすることから、検体採取時の患者負担が生じる状況がある。

2. 研究の目的

本研究は、ピガバトリンおよびラコサミドの特異的モノクローナル抗体 (MAb) を作製し、免疫化学的手法である ELISA による血中濃度測定法を開発することを目的とする。さらに ELISA 以外の免疫化学的検出法として、より少量の検体で、簡便な操作で実施可能なドットプロット法による薬物濃度測定法を開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗てんかん薬 - キャリア蛋白複合体の作製

抗てんかん薬の複合体形成に用いるキャリア蛋白には、スカシ貝ヘモシアニン (KLH) またはヒト血清アルブミン (HSA) を用いた。ピガバトリン (VIGA) は構造中のカルボキシル基と KLH または HSA を結合させた複合体 (VIGA-KLH または VIGA-HSA) の作製を行った。ラコサミドは構造中に反応性の置換基を有していないことから、誘導体である (R)-2-Amino-N-benzyl-3-methoxypropionamide (ABMP) を用いて、その構造中のアミノ基と KLH または HSA を結合させた複合体 (ABMP-KLH または ABMP-HSA) の作製を行った。架橋試薬として N-hydroxy-succinimide (NHS) および 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を用いた。合成した複合体は、透析処理により、余剰の試薬等を除去して精製した。

(2) VB-KLH および ABMP-KLH の免疫

VIGA-KLH および ABMP-KLH を Balb/cCrSlc マウス (日本エスエルシー) または Balb/cAJcl (日本クレア) に 2 週間おきに腹腔内注入することにより免疫を行った。1 回目の免疫時にはアジュバントとして完全フロイントアジュバント (シグマアルドリッチ) を、2 回目の免疫時には不完全フロイントアジュバント (シグマアルドリッチ) を用いた。免疫後のマウス血清中のピガバトリンまたはラコサミドに対する抗体価上昇を ELISA により確認後、マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローム細胞 SP2/0 との細胞融合を行った。細胞融合後細胞の培養培地は E-RDF 培地 (極東製薬工業株式会社) を用い、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン含有培地中でスクリーニングした。2 週間培養後に培地中抗体価を ELISA により調べた。

(3) ELISA

ELISA の固相化抗原として、VB-HSA、ABMP-HSA、KLH および HSA を用いた。固相化抗原 1 mg/mL を 96 ウェルプレートに 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液 (T-PBS) で 3 回洗浄後、各ウェルに 5% スキムミルク添加 PBS 溶液を 300 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングを行った。T-PBS で 3 回洗浄後、競合法では 50 μ g/mL のピガバトリンまたはラコサミド溶液を直接法では各薬物溶液の溶媒を、50 μ L ずつ添加し、さらに 1 次抗体として T-PBS で希釈した免疫マウスの抗血清を 50 μ L ずつ添加、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄後、T-PBS で 1000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体を 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄後、クエン酸緩衝液 : 水 : ABTS (6 mg/mL) を 10 : 9 : 1 になるように混合した ABTS 溶液を 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 20 分間発色させた。

(4) ドットプロット法による薬物濃度測定

ドットプロット法による薬物濃度測定法の開発では、すでに保有していた抗ダビガトランモノクローナル抗体 (DT-Mab) を用いた。ナイロン膜 (GE ヘルスケア バイオサイエンス) にダビガトラン (DT) 溶液をナイロン膜に 2 μ L 滴下する。EDC および NHS 溶液を染み込ませた紙上に DT を滴下したナイロン膜を 10 分間静置する。HSA 溶液を染み込ませた紙上に処置後のナイロン膜を 30 分間静置する。5% スキムミルク溶液中で 1 時間ブロッキングした後、DT-Mab 溶液中で 1 時間振とうする。洗浄バッファーで処理後、アルカリホスファターゼ標識マウス IgG (AP-IgG) 抗体溶液中で 1 時間振とうする。プロモクロロインドリルリン酸-ニトロブルー-テトラゾリウム (BCIP-NBT) を反応させ、発色像を得る。デジタルカメラで撮影した発色像を画像解析ソフト ImageJ に取り込み発色密度を数値化する。250 ng/mL の DT 検体に対する各濃度の DT 検体の発色密度比を算出し、DT 濃度に対してプロットする。

4. 研究成果

(1) 抗ビガバトリン抗体および抗ラコサミド抗体の作製

抗ビガバトリン抗体を作製するために VIGA-KLH を Balb/cCrSlc マウスに免疫した。7 回免疫後の血清抗体価を調べた結果を図 1 に示す。VIGA-KLH 固相化ウェルで吸光度の上昇が認められたが、VIGA 添加により吸光度が減弱しなかったことから VIGA に対する特異的抗体は産生されていないと考えられた。VIGA-HSA 固相化ウェルでは抗体産生を示唆するような吸光度上昇はみられなかった。VIGA は、分子量 129 と非常に低分子であるため十分な免疫原性を示さなかったものと考えられた。

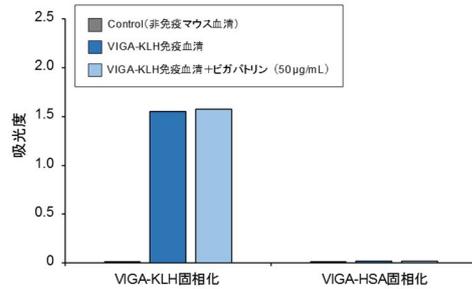


図1 ABMP-KLH免疫血清の抗体価(7回免疫後)

抗ラコサミド抗体を作製するために ABMP-KLH を Balb/cCrSlc マウスに免疫した。6 回免疫後の血清抗体価を調べた結果を図 2 に示す。ABMP-KLH および ABMP-HSA 固相化ウェルの両方において吸光度上昇が認められ、ラコサミド添加により吸光度の若干の減弱がみられた (約 31% および 22% 減弱)。非特異的な反応がみられるもののラコサミドに対する特異的な抗体も産生されていると考えられた。そこで細胞融合を行ったが、ラコサミドに対する抗体産生ハイブリドーマの単離には至らなかった。

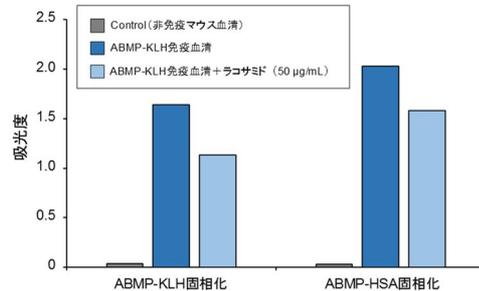


図2 ABMP-KLH免疫血清の抗体価(6回免疫後)

先の実験で抗血清の特異性は低かったもののラコサミドに対する抗体は生成している可能性があったため、以前に抗体産生の実績がある Balb/cAJcl マウスを用いて抗ラコサミド抗体作製を試みた。6 回免疫後の血清抗体価を調べた結果を図 3 に示す。ABMP-KLH 固相化ウェルでは抗体産生を示唆する吸光度上昇はみられなかったが、ABMP-HSA 固相化ウェルでは吸光度の上昇が認められ、ラコサミド添加により著しい減弱がみられた (約 81% 減弱)。非特異的な反応もあるもののラコサミドに対する特異的な抗体も多く生成していると考えられたため細胞融合を行ったが、ラコサミドに対する抗体産生ハイブリドーマの単離には至らなかった。

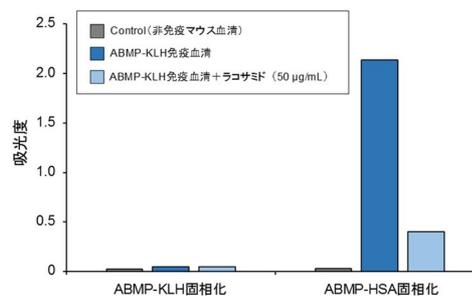


図3 ABMP-KLH免疫血清の抗体価(6回免疫後)

(2) ドットプロット法による濃度測定法の開発

リンゲル液中に溶解したダビガトラン (DT) 溶液 (15.625、31.25、62.5、125 および 250 ng/mL) を用いてドットプロットを行ったところ、図 4 に示す結果が得られた。31.25~250 ng/mL において非常に相関性の高い直線関係が得られた。DT の通常用量投与時の血中濃度域は約 90~180 ng/mL であることから本法は臨床適用可能な手法と考えヒト血清中の DT を検出可能か調べることとした。

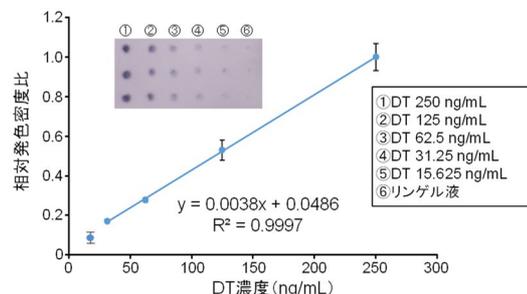


図4 DTのリンゲル溶液の検量線

そこで、ヒト血清中に溶解した DT 溶液で同様に測定可能かを検証するために、血清のみを

ナイロン膜上に滴下したところ、発色が得られ、その発色は血清を限外ろ過したる液ではみられなかったことから（図5）血清中の高分子タンパクにより非特異的な発色が生じたものと考え、以降の検討は血清の限外ろ過る液を用いて行うこととした。

血清の限外ろ過る液中に溶解した DT 溶液（15.625、31.25、62.5、125 および 250 ng/mL）を用いてドットプロットを行ったところ、図6に示す結果が得られた。リンゲル液に溶解した DT 溶液のときと同様に 31.25～250 ng/mL において非常に相関性の高い直線関係が得られた。

血清の限外ろ過る液中に溶解した DT 溶液（31.25、62.5、125 および 250 ng/mL）を用いてドットプロット法の精度について検討した。日内変動および日間変動を調べたところ、いずれの濃度においても日内および日間変動ともに相対標準偏差が 10% 未満であった（表1）。そのことから、本ドットプロット法の測定精度に問題はないと考えられた。

DT のタンパク結合の影響をみるために血清に DT を溶解後に限外ろ過したる液を用いてドットプロット法による DT 濃度測定を行った。ヒト血清に溶解後限外ろ過したる液中 DT の発色は、ヒト血清の限外ろ過る液に溶解した DT のそれと比較して薄かった（図7）。血清に溶解後限外ろ過したる液中の DT の回収率は 63.87% であった（表2）。DT の血漿タンパク結合率は 34～35% であることから、本法では血中遊離型 DT の検出が可能であると考えられる。

本研究において、ナイロン膜を用いたドットプロット法によるダビガトラン濃度の高感度かつ簡便な測定法の開発に成功した。本法は血中遊離型 DT の濃度測定に適用可能であることが明らかとなった。DT の通常用量投与時の血中濃度域は約 90～180 ng/mL であること、本法による測定に必要な検体容量は指先穿刺で得られる量で十分であること、測定手技が簡便なことから、本法の臨床応用は DT の適正使用において有用と考えられた。

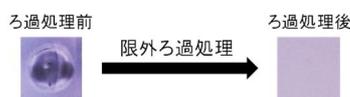


図5 限外ろ過による非特異的シグナルの消失

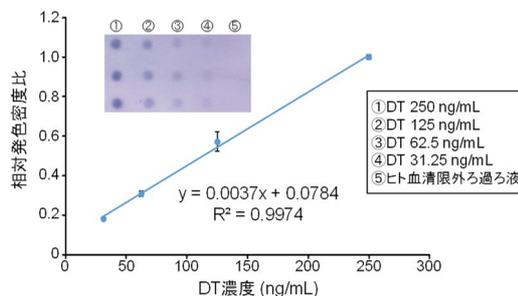


図6 ヒト血清の限外ろ過る液にDTを溶解した検体の検量線

表1 日内変動および日間変動

DT濃度 (ng/mL)	相対標準偏差 (%)	
	日内変動	日間変動
250	1.20	-
125	8.63	4.08
62.5	4.31	6.47
31.25	2.27	5.76

(n=3)

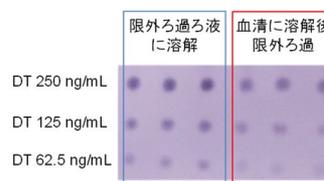


図7 血清の限外ろ過る液溶解DTまたは血清溶解後限外ろ過DTの発色結果

表2 血清に溶解後限外ろ過したる液中DTの回収率

調製濃度 (ng/mL)	検出濃度平均 (ng/mL)	回収率 (%)	回収率平均 (%)
250	181.64 ± 4.75	72.28 ± 1.89	63.87
125	76.31 ± 4.72	60.74 ± 3.75	
62.5	36.82 ± 5.64	58.61 ± 8.97	

(n=3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田祐成、松尾明穂、大磯茂、森永紀、宇都拓洋、仮屋園博子
2. 発表標題 ナイロン膜を用いたドットプロット法によるダビガトラン濃度の高感度簡易測定法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	仮屋園 博子 (Kariyazono Hiroko) (20437958)	長崎国際大学・薬学部・教授 (37303)	
研究分担者	森永 紀 (Morinaga Osamu) (60465771)	第一薬科大学・薬学部・教授 (37107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------