

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H01019

研究課題名 抗薬物抗体に着目したバイオマーカー探索に有用な血中トシリズマブ濃度測定法の検討

## 研究代表者

望月 啓志 (Mochizuki, Takashi)

浜松医科大学・医学部附属病院・薬剤師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：関節リウマチ(RA)治療薬のトシリズマブ(TCZ)の効果を予測するために、TCZの血中濃度を正確に評価できる測定法が必要である。一般的に使用されるELISA法は血中の抗薬物抗体(ADA)により偽低値を示す可能性がある。一方、当研究室で確立した新規血中TCZ濃度測定法であるLC-MS/MS法は、測定原理的にADAの影響を受けないと予想されるため、実際に検証した。RA患者22名の血中TCZ濃度を測定したところ、LC-MS/MS法の方がELISA法よりも高値を示した。上記患者の77.3%にADAが発現していたが、ADAはLC-MS/MS法とELISA法の測定値の差に影響していないことが示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質医薬品の血中濃度測定において、ELISA法とLC-MS/MS法により得られる測定値に差が生じることが知られている。しかし抗体医薬品においてLC-MS/MS法は新しい測定法であり、ELISA法との詳細な比較は行われていなかった。本研究により、TCZの血中濃度測定においてELISA法とLC-MS/MS法の測定値に差が生じることが明らかとなった。どちらの測定値が正しいのか結論付けるためには、更なる検討が必要であるが、最終的には、TCZの効果不十分な患者を、他剤への変更が必要な患者と投与量の増量が必要な患者に区別するためのバイオマーカーを提供することが可能になると期待される。

研究分野：医療系薬学

キーワード：トシリズマブ 血中濃度 抗薬物抗体 LC-MS/MS ELISA 関節リウマチ

1. 研究の目的

抗 IL-6 受容体抗体のトシリズマブ (TCZ) の治療効果を十分に得られない関節リウマチ (RA) 患者が一定数存在する。その原因として血中濃度の不足が考えられており、血中 TCZ 濃度は治療効果のバイオマーカーとなり得る。抗体医薬の定量に通常用いられる ELISA 法だが、血中の抗薬物抗体 (ADA) により測定結果が偽低値を示すことが報告されている。一方、LC-MS/MS 法はタンパク質間の相互作用に依存しない方法のため、ADA による影響を受けないと予想される。本研究では ELISA 法及び LCMS/MS 法による TCZ 定量への ADA の影響を解明し、ADA 存在下でも血中 TCZ 濃度を正確に評価できる測定法を提示することを目的とした。

2. 研究成果

(1) LC-MS/MS 法と ELISA 法により得られた血中 TCZ 濃度の比較

RA に対して TCZ を静脈内投与 (8 名) 又は皮下投与 (14 名) された患者を対象とした。TCZ の血中濃度は本研究室で確立した LCMS/MS 法及び市販の ELISA キットにより測定した。両測定法で得られた血中 TCZ 濃度を Scatter plot 及び Bland-Altman plot により比較し、両測定値に差が生じるかどうか確認した。

LC-MS/MS 法と ELISA 法により得られた血中 TCZ 濃度をプロットし、両者の相関を Pearson の相関係数より評価した (図 1)。両者の測定値は有意に相関した ( $r = 0.82, P < 0.01$ ) もの、回帰式  $y = 0.55x - 0.33$  で LC-MS/MS 法の方が ELISA 法に比べて高い値を示すことが示唆された。より詳細に両測定値を比較するために、Bland-Altman plot により評価したところ、平均バイアス 69.8%、95%信頼区間 47.9-91.7%であった (図 2)。95%信頼区間が 0 を跨がないことから、LC-MS/MS 法の測定値は ELISA 法に比べ有意に高い値を示し、両者の間に系統誤差が存在することが明らかとなった。

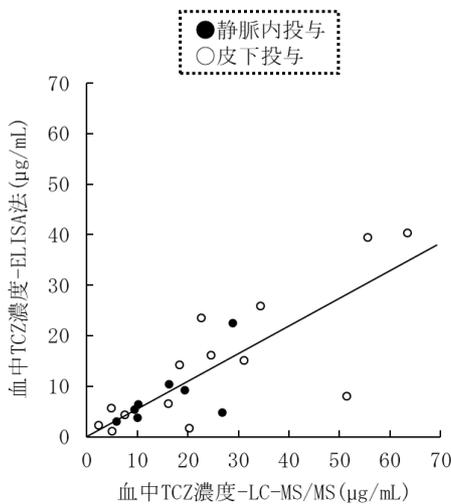


図1 LC-MS/MS法と免疫学的測定法の相関

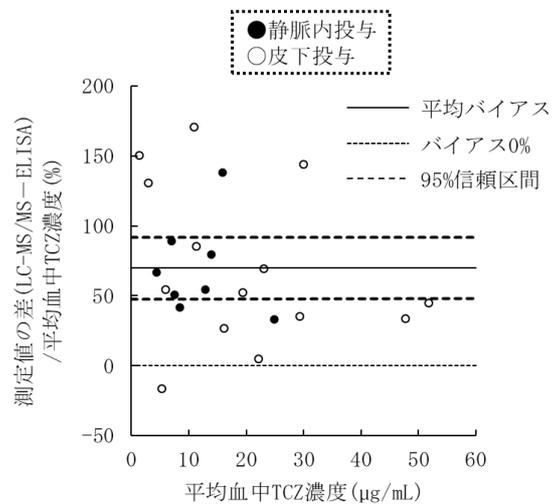


図2 LC-MS/MS法と免疫学的測定法の誤差

(2) 両測定法の測定値差に対する ADA の影響の評価

研究成果(1)で得られた LC-MS/MS 法と ELISA 法の系統誤差の原因として ADA に着目し、ADA による両測定法への影響を評価した。血中の ADA は市販の ELISA キットを用いて測定した。測定値の差 (LC-MS/MS - ELISA) を両測定法の平均血中 TCZ 濃度で除した値 (図 2 の縦軸の値) に ADA 陽性群と陰性群の間で違いが見られるか確認した。

22 名の RA 患者の内、17 名の患者に ADA の発現が確認され、その陽性率は 77.3%であった。測定値の差 (LC-MS/MS - ELISA) / 平均血中 TCZ 濃度の平均値は、ADA 陽性群で 71.8%、陰性群で 62.8%であり、有意な差は見られなかった ( $P = 0.574$ , Welch の t 検定)。従って、両測定法の測定値に差が生じる要因は ADA ではないことが示唆されたため、正確に血中 TCZ 濃度を評価できる測定法の提示をするまでには至らなかった。

従来の報告と比べると ADA 陽性率 77.3%という値はかなり高い値である。本研究ではトラフ値以外のポイントで採血された検体も含まれているため、交差反応による ADA 偽陽性の可能性が考えられる。引き続きトラフ値で採血された検体を収集し検討を重ね、正確に ADA の影響を評価し直す必要がある。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Mochizuki
2. 発表標題 A rapid analytical method using an LC-MS/MS for quantitation of serum tocilizumab and its clinical application
3. 学会等名 IATDMCT 2020 VIRTUAL CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月 啓志
2. 発表標題 固相化トリプシン消化を用いたヒト血清中トシリズマブ濃度のLC-MS/MS測定法開発とその臨床適用
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月 啓志
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるLC-MS/MS法を用いた血清中トシリズマブ濃度測定法の確立と免疫学的測定法との定量性の比較
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

浜松医科大学医学部附属病院薬剤部ホームページ  
[http://www2.hama-med.ac.jp/w6a/pharm/yakuzai\\_top.html](http://www2.hama-med.ac.jp/w6a/pharm/yakuzai_top.html)

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
柴田 海斗	(Shibata Kaito)
内藤 隆文	(Naito Takafumi)