

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06726

研究課題名(和文)L-アスパラギナーゼ投与に伴う抗体価評価の有用性と抗体産生に関する個体要因の検討

研究課題名(英文)Evaluation of anti-L-asparaginase antibody and difference of antibody production in each patient

研究代表者

田中 庸一 (Tanaka, Yoichi)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号：40525341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：L-アスパラギナーゼによる治療を受けた小児血液がん患者より血清の提供を受け、血清中の抗アスパラギナーゼ抗体(IgG及びIgE)の抗体価を電気化学発光法で定量する方法を構築した。アスパラギナーゼ投与に伴い過敏症を発現した経験のある患者では、非発現患者に比べて有意に抗アスパラギナーゼIgG及びIgE抗体の抗体価が高値である事が明らかになった。過敏症発現に関してROC解析を行い、IgG及びIgEはROAUCが0.8程度であり、過敏症発現を感度高く診断できる可能性が示唆された。また、抗アスパラギナーゼIgE抗体について、抗体の細胞応答性をEXiLE法で評価したが、患者血清では応答性が確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスパラギナーゼ投与に伴う過敏症を経験した患者において、抗アスパラギナーゼ抗体の抗体価が高値を示すことから、アスパラギナーゼ投与時に発現した症状が過敏反応かを判別する場合に抗体価を指標とする事ができる可能性がある。また、IgGまたはIgE抗体が高値になる事と過敏症の発現について更なる検討を行うことで、メカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The method was established to quantify antibody titers of anti-asparaginase antibodies (IgG and IgE) in serum by electrochemiluminescence, based on serum samples provided by pediatric hematological cancer patients treated with L-asparaginase. It was found that the titers of anti-asparaginase IgG and IgE antibodies were significantly higher in patients who had experienced hypersensitivity to asparaginase than in those who had not experienced hypersensitivity to asparaginase. ROC analysis of hypersensitivity development revealed that the ROAUC for IgG and IgE was about 0.8, suggesting that hypersensitivity development could be diagnosed with high sensitivity. For anti-asparaginase IgE antibody, the cellular responsiveness of the antibody was evaluated by the IgE-Crosslinking-induced Luciferase Expression method, but no response was confirmed in patient serum.

研究分野：医療系薬学

キーワード：アスパラギナーゼ 抗体 IgG IgE 過敏症 小児血液がん

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病 (ALL) は、小児がんの中で頻度が高く、年間、500 人程度の新規患者が発生している。小児 ALL は薬物療法の発展が目覚ましく、先進国では 80% 以上の長期生存率が得られるようになってきている。一方で、薬物療法の中には有害事象を発現する患者が一定の割合で存在し、重篤化することで治療の中断や継続不可となる。薬物治療による有害事象の治療前の予測や軽減は、治療の中断などを減少させることにつながる。ALL の治療成績を向上させる上で、薬物療法による有害事象の要因を明らかにすることは不可欠である。

L-アスパラギナーゼ (L-Asp) は、ALL に対して、寛解導入療法、強化療法で投与される。L-Asp は白血病細胞内の L-アスパラギンを枯渇させることによって、細胞の増殖抑制へ導く薬剤である。本邦で使用できる L-Asp は *Escherichia coli* (*E. coli*) を利用して生成されている。そのため、投与された個体が L-Asp を異物と捉えて抗体を産生し、L-Asp 投与に伴う過敏反応を発現させることがあり、その頻度は 10 ~ 30% と高頻度である。さらに、過敏反応は発現しないまでも、生体内で L-Asp の中和抗体が産生することによって、L-Asp の活性が低下し、標準投与量で治療を行っても治療効果が得られない "silent inactivation (SI)" という現象が問題となることがある。L-Asp の治療中断や中和抗体産生による治療効果の減弱は予後を悪化させる。

2. 研究の目的

L-Asp を投与された日本人 ALL 患者から得た保存血清を用いた抗 L-Asp 抗体価の高感度測定法を確立し、抗 L-Asp 抗体価の定量的評価を行い、過敏症や SI 発現との関連性を明らかにする。L-Asp 投与に伴う抗 L-Asp 抗体産生の個体差と関連する患者の臨床情報 (背景、他の臨床検査情報、ALL タイプなど) を明らかにする。以上の検討より得られた結果から、抗 L-Asp 抗体価等の評価について臨床における有用性と抗体産生に関連する要因が明らかになることにより、過敏症や SI 発現の診断、さらにはこれら発現の予測に資することを目的とする。

3. 研究の方法

L-Asp によって治療を受け、過敏症を発現した患者を登録して血清の提供を受けるために、日本小児がん研究グループに参加している医療機関に L-Asp によって過敏症を発現した患者の有無を調査した。過敏症発現患者としては、1 年以内に L-Asp の投与を行い、臨床上で L-Asp 過敏症と診断され、血清採取時にステロイド治療を受けていない者とした。非発症患者は、1 年以内に L-Asp 投与を受けて、過敏症状を発症していない者とした。倫理承認を受けた後に各医療機関の医師より患者本人及び年齢に応じて保護者へインフォームド・コンセントを実施した。対象患者より末梢血 3 mL を採取し血清を得て、国立衛研に検体を送付して解析を行った。検体とともに、L-Asp 治療経過及び過敏症状に関する情報を得た。

L-Asp を投与された患者の血清中 IgE 抗体及び IgG 抗体の定量を行うための測定法を電気化学発光法 (ECL: Electrochemiluminescence) で構築した。また、細胞応答性の評価について Fc RI 細胞を利用した方法で実施した。

4. 研究成果

(1) 抗 L-Asp 抗体の抗体価測定法の構築

L-Asp 投与によって過敏症を発症した患者より得た血清を用いて、抗体価測定法の検討を行った。ECL で測定法を構築するために ECL 用の未コーティングプレート (Standard, Hi-Bind) に *E. coli* 由来の L-Asp 製剤であるロイナーゼ (協和キリン) を固相化し、Anti-human-IgG 抗体または Anti-human IgE 抗体で検出する測定系について発光強度と血清希釈の関係性から希釈直線性を両対数グラフにプロットして評価した。抗 L-Asp IgG 抗体については、患者血清を 200 ~ 12,800 倍に希釈して測定した発光強度については、希釈倍率との間に良好な直線性が得られた。抗 L-Asp IgE については、IgG 抗体よりも抗体価が低い事が予測されるため、希釈倍率を 5 ~ 1280 倍で検討を行い、発光強度と希釈倍率の間に良好な直線性が得られた。

(2) L-Asp によって治療を受けた患者の抗 L-Asp 抗体定量

日本小児がん研究グループ参加施設 9 施設の協力を得て、L-Asp によって治療を受けた患者 35 例 (過敏症発現患者 13 名、非発現患者 23 名) より血清を得て、抗 L-Asp 抗体の抗体価を定量した。定量値は ECL の発光強度 (Intensity) で評価を行った。全血清において希釈系列を作成し、IgG 抗体では 800 ~ 6400 倍、IgE では 5 倍 ~ 40 倍について測定を行った。各患者血清で希釈直線性を評価し、最適な希釈倍率を決定し、IgG では 3200 倍、IgE では 10 倍とした。

(3) L-Asp 過敏症と抗 L-Asp 抗体価との関連性の評価

患者を L-Asp 過敏症の有無で群分けし、抗 L-Asp IgG 及び IgE の測定値を比較した結果を図 1 に示した。過敏症患者と非発現患者において、抗 L-Asp IgG ($\times 3200$) の中央値は、897、263 であり、抗 L-Asp IgE ($\times 10$) 抗体の中央値は 415、170 であり、共に過敏症患者で統計的に有意に

高値を示していた ($P = 0.0262, 0.0023$)。非発現患者で IgG が高値を示した 4 例のうち 2 例では L-Asp の治療効果が低下する SI が疑われていた。

また、過敏症発現と IgG および IgE との関連性について ROC 解析を行い、曲線下面積はそれぞれ 0.73、0.81 であり中程度の関連性があった。過敏症発現の感度、特異度はと IgG で 69%、82% および IgE 69%、91% であった。この結果より、L-Asp 過敏症の発現に IgE 抗体が関係する事が示唆された。

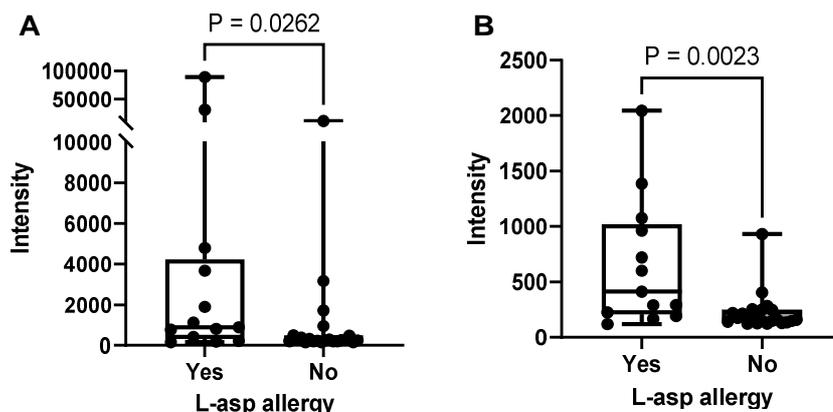


図 1 過敏症発現の有無と抗体価 . A, IgG; B, IgE.

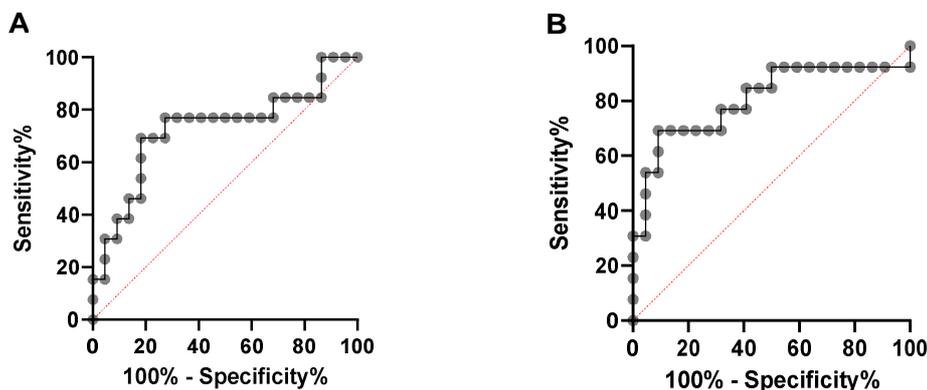


図 2 過敏症発現と抗体価の ROC 曲線 . A, IgG; B, IgE.

(4) 抗 L-Asp IgE 抗体の細胞応答性評価

抗 L-Asp IgE 抗体の抗体価が高値であった 8 例について、Fc RI 細胞を用いた EXiLE 法で細胞応答性を評価した。患者血清を添加して感作させた後に抗原としてロイナーゼ(協和キリン)加え、Luciferase 発光を測定した。抗原と抗体が作用して細胞応答性があった場合には Luciferase 発光が検出されるが、L-Asp 過敏症で IgE 抗体が検出された検体では、発光が検出されなかった。この結果より、IgE 抗体の産生はあるものの、IgE と抗原の反応により細胞応答するのではなく、他の経路や免疫複合体などの産生などによって過敏反応が発現する可能性があることが示唆された。今後、L-Asp 過敏症の発現機序について、他手法を含めて検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------