

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：37303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659355

研究課題名(和文) 抗ダビガトランモノクローナル抗体を活用したダビガトラン血中濃度測定法の確立

研究課題名(英文) Development of a method of serum dabigatran concentration assay using anti-dabigatran monoclonal antibody

研究代表者

大磯 茂 (Oiso, Shigeru)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：40513106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：トロンビン阻害剤ダビガトラン(DT)は、腎排泄型薬物であり、腎機能障害患者に投与すると出血性副作用の危険性が増す。そのような副作用防止への応用を目的に、DT-スカン貝ヘモシアニン複合体をマウスに免疫し作製した抗DTモノクローナル抗体(DT-mAb)を用いたELISAを開発した。このELISAの競合法による測定の結果、7.8-125 ng/mLの濃度域のDTが測定可能であった。この濃度域において、血清中DTサンプルの測定結果は非直線性となったが、限外ろ過血清中DTサンプルの測定結果は直線性となった。このDT-mAbを用いたELISAは、血清中DTの遊離型濃度の測定に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dabigatran (DT) is a direct thrombin inhibitor used for the prevention of venous and arterial thromboembolism. DT produces an increased incidence of bleeding in patients with renal dysfunction. Circulating levels of DT are increased in such patients because it is mainly eliminated by renal excretion. To measure DT concentration, we developed a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an anti-DT monoclonal antibody (DT-mAb) which was generated by immunization of mice with a DT-keyhole limpet hemocyanin conjugate. The measurement range of dabigatran in competitive ELISA using DT-mAb was 7.8-125 ng/mL. The ELISA signal was not linear using DT-spiked serum in the concentration range of 7.8-125 ng/mL, but was linear when serum ultrafiltrate was used. These results suggested that this competitive ELISA may provide an analysis tool for the determination of free DT in serum ultrafiltrate during therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies.

研究分野：医療薬学

キーワード：ダビガトラン モノクローナル抗体 ELISA 血中濃度 リンゲル液

### 1. 研究開始当初の背景

ダビガトランエテキシラートは、生体内でエステラーゼ的作用により活性体であるダビガトランへと変換され、直接的にトロンピンを阻害し抗凝固作用を示す。心房細動時の血栓形成防止などに用いられているが、同様の効能・効果で汎用されてきたワルファリンカリウムと比較して、医薬品や飲食物との相互作用が少なく、また効果面でも優れた結果が得られており、新規抗凝固薬としての期待が高まっている。しかしながら一方で、重大な有害事象として、出血性副作用が発現することが報告されている。特に、腎機能障害患者での発現頻度が高く、それらの中には致死例も報告されている。ダビガトランは、腎排泄型薬物であり、腎機能障害により排泄を阻害されたダビガトランの血中濃度が上昇し、出血性副作用を引き起こすものと考えられている。従って、腎機能障害患者にダビガトランエテキシラートを使用する場合は、用量を減らすよう勧告されている。通常、このように腎機能等により血中濃度が変動する薬物に対しては、血中薬物濃度モニタリング (TDM) が有用であることが知られている。しかしながら、ダビガトランの血中濃度を簡便に測定する方法が確立されていないため、TDM を実施できない状況にある。通常用量を服用した後のダビガトランの血中濃度は約 40 ~ 180 ng/ml であり、ダビガトランの濃度測定には高感度な測定法が必要となる。高感度な薬物の血中濃度測定法としては、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法が利用される。ELISA は、抗原抗体反応を利用した検出方法であり、特異的抗体が必要となる。通常、ダビガトランのような低分子化合物は、そのままでは抗原性を示さず、抗体は作製できない。しかしながら、スカシ貝ヘモシアニン (KLH) などのキャリア蛋白との複合体を作製し、それらを免疫することにより、抗体を作製できることが知られている。

### 2. 研究の目的

ダビガトランに対するモノクローナル抗体を作製し、ダビガトランの濃度測定のための ELISA を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダビガトラン - キャリア蛋白複合体の作製

ダビガトランの複合体形成に用いるキャリア蛋白には、KLH またはヒト血清アルブミン (HSA) を用いた。ダビガトランのカルボキシル基を N-hydroxysuccinimide (NHS) および 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) により活性化し、各キャリア蛋白を反応させることにより、カルボキシル基の部分にキャリア蛋

白が結合した複合体を合成した。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、精製した。Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) を用いて、複合体の結合ハプテン数を確認した。

#### (2) 抗ダビガトラン抗体の作製

ダビガトランと KLH の複合体 (DT-KLH) をマウスに免疫することにより、ダビガトランに対する抗体を作製した。免疫は 2 週間おきに計 8 回行った。血清中のダビガトランに対する抗体価上昇を確認後、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。細胞融合後の細胞からヒポキサンチン、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、さらに限界希釈法により、抗ダビガトラン抗体を産生するハイブリドーマを選別した。選別したハイブリドーマの培地から protein G sepharose などを用い、抗ダビガトランモノクローナル抗体 (DT-mAb) を精製した。

#### (3) ELISA の手順

ELISA の固相化抗原として、ダビガトラン-HSA 複合体 (DT-HSA)、KLH、HSA、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。固相化抗原 1 mg/mL を 96 ウェルプレートに 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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、直接法では水を、競合法では規定濃度の DT 水溶液を 50  $\mu$ L ずつ添加し、さらに 1 次抗体として T-PBS で希釈した DT-mAb を 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L ずつ分注し、37  $^{\circ}$ C で 20 分間発色させた。検体の 405 nm および 492 nm における吸光度差 A を測定結果とした。競合法では、検体の吸光度差 A のダビガトラン濃度 0 ng/mL のときの吸光度差 A<sub>0</sub> に対する比率 A/A<sub>0</sub> を求め、それを縦軸にプロットしたグラフを作成した。

#### (4) 交差反応性の測定

ELISA の競合法により、ダビガトランおよび各試験薬物の 50% 抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。それらの値を用いて、以下の式より交差反応性 (CR) を算出した。

$$CR (\%) = \left( \frac{\text{ダビガトランの IC}_{50}}{\text{試験薬物の IC}_{50}} \right) \times 100$$

#### 4. 研究成果

##### (1) ダビガトラン - キャリア蛋白複合体のハプテン数の確認

ダビガトランとキャリア蛋白との複合体の形成状態を確認するために、MALDI TOF mass を用いてダビガトラン-HSA 複合体の分子量を調べた。図1にその結果を示す。複合体を示す幅広いピークが  $m/z$  68082の周囲にみられた。HSA の分子量 66458 と、ダビガトランの分子量 471 から計算すると、約3分子のダビガトランが HSA と複合体を形成しているものと考えられた。ダビガトランと KLH の複合体については、KLH の分子が大きすぎるため、MALDI TOF mass による測定が困難であるが、KLH は HSA より複合体形成に利用されるアミノ基が多いことから HSA よりも多いダビガトランが結合していることが推察される。このハプテン数で抗体作製に成功した報告もあり、これらの複合体を用いて、マウスへの免疫を行うこととした。

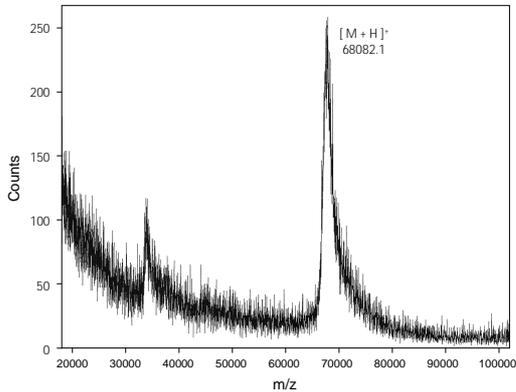


図1 ダビガトラン-HSA複合体のMALDI TOF massによる測定結果

##### (2) 抗ダビガトランモノクローナル抗体の作製

ダビガトラン-KLH 複合体を BALB/c マウスに免疫したところ、ELISA において、ダビガトランに対する抗体価が徐々に上昇した。免疫を8回実施した後、マウスから脾臓を摘出し、SP2/0 ミエローマ細胞との細胞融合を行った。スクリーニングおよび限界希釈法による細胞の単離を行い、ダビガトランに反応するモノクローナル抗体 (DT-mAb) を作製するハイブリドーマを得た。このモノクローナル抗体は、軽鎖を有する IgG<sub>1</sub> 抗体に分類された。

ダビガトランに対する反応性を種々の濃度の DT-mAb で調べた(図2)。吸光度が 1.5 となる抗体濃度 (0.215  $\mu\text{g/ml}$  as IgG) を競合的 ELISA に用いる抗体濃度にする事とした。

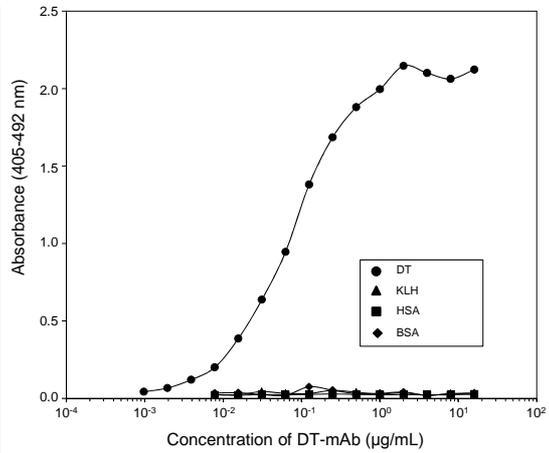


図2 種々抗原に対する抗ダビガトランモノクローナル抗体の反応性

##### (3) DT-mAb を用いた ELISA による血清中ダビガトラン濃度の測定

種々濃度のダビガトラン水溶液を用いた競合的 ELISA の結果を図3に示す。測定可能な直線性の濃度域は 7.81 ~ 125 ng/mL であった。この ELISA で血清に溶解したダビガトラン濃度の測定が可能か検討したところ、図4に示すように水溶液サンプルとは大幅に異なる測定値が得られた。ダビガトランの血清サンプルを限外ろ過し、ろ液中のダビガトラン濃度を測定すると、血清サンプルと類似した吸光度推移が得られた(図4)ことから、血清サンプルの測定値の大幅なずれは、ダビガトランの蛋白結合が影響していると考えられた。そこで、血清の限外ろ過ろ液にダビガトランを溶解し、競合的 ELISA を行ったところ、測定可能濃度域において直線性の濃度推移が得られた(図4)。しかしながら、水で調製した標準液の結果とのずれがみられたことから、標準液をリンゲル液に変更して、同様に測定を行った結果、ほぼ一致した結果が得られた(図5および表1)。このことから、ダビガトランの血中濃度測定には、リンゲル液で調製した標準液で検量線を作成し、血清の限外ろ過ろ液をサンプルにすることで、血中の遊離型ダビガトラン濃度測定に適用できるものと考えられた。また、本 ELISA には、血清中の電解質が何らかの影響を及ぼすものと考えられた。

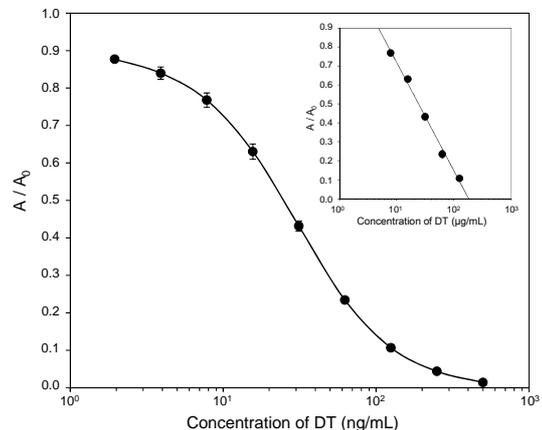


図3 ダビガトラン水溶液の競合的ELISA

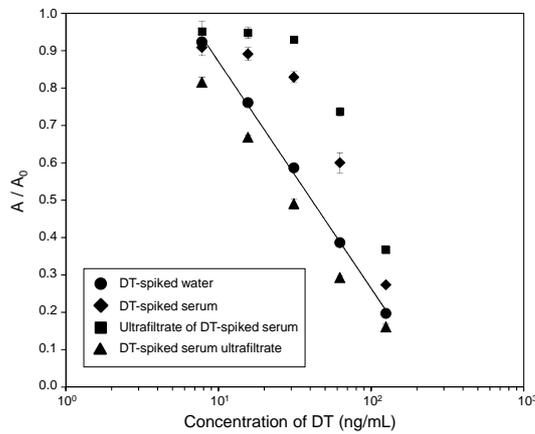


図4 血清中ダビガトラン溶液の競合的ELISA

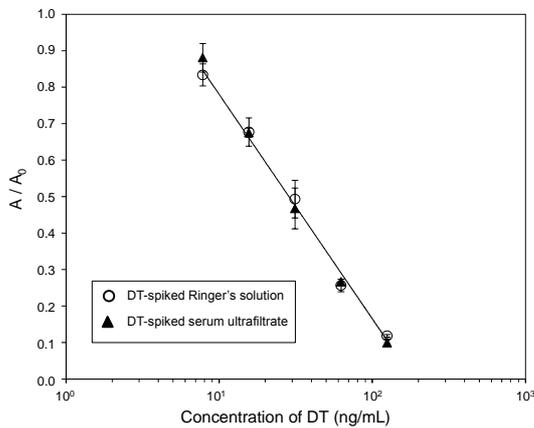


図5 限外ろ過血清液中ダビガトラン溶液の競合的ELISA

表1 限外ろ過血清液中ダビガトラン溶液の競合的ELISAの測定結果

Spiked concentration (ng/mL)	Measurement (ng/mL) <sup>a</sup>	Recovery (%)
7.81	7.18 ± 0.85	91.4
15.62	14.74 ± 0.67	94.4
31.25	32.79 ± 6.52	104.9
62.50	68.67 ± 2.32	109.8
125.00	126.19 ± 3.49	100.9
	Average	100.4

<sup>a</sup> Values are mean of six determination ± SD.

#### (4) DT-mAb を用いた ELISA の精度

免疫化学測定法においてその再現性および精度は、測定における重要な因子である。本競合的 ELISA の測定濃度域である 7.81-125 ng/mL における測定変動を調べた。ウェル間の変動係数 (Intra-assay)、プレート間の変動係数 (Inter-assay) 共に良好な値であった (表 2)。一般的に、免疫学的測定の精度は、ウェルにコートしたハプテンの量や質、試薬の分注誤差、インキュベーション温度により影響を受ける。そのような変動因子に注意を払いながら、測定プロトコールを実施する必要があると考えられる。

表2 DT-mAbを用いた競合的ELISAの測定精度

Concentration of DT (ng/mL)	CV (%)			
	Intra-assay (n = 5)		Inter-assay (n = 4)	
	Ringer's solution	Serum ultrafiltrate	Ringer's solution	Serum ultrafiltrate
7.81	2.37	2.00	4.06	3.59
15.62	2.63	3.35	3.49	6.01
31.25	1.42	2.05	5.43	6.45
62.50	2.72	2.87	4.97	5.10
125.00	4.17	2.52	6.67	4.42

#### (5) 交差反応性

DT-mAb を用いた ELISA におけるダビガトランとの交差反応性について調べた。対象とした薬物は、ダビガトランのプロドラッグ体であるダビガトランエテキシラート、心房細動の治療に適応を有する薬物、ダビガトランと類似した部分構造を有している薬物とした。それぞれの薬物のダビガトランに対する交差反応性の結果を表 3 に示す。その結果、プロドラッグ体であるダビガトランエテキシラートは 1.57 ~ 1.68% の交差反応性を示し、それ以外の薬物にはすべて 0.03% 以下と交差反応性を示さなかった。ダビガトランエテキシラートはダビガトランのプロドラッグ体であることから、ダビガトランと多くの類似構造を有するため、交差反応性がみられたと考えられるが、その反応性は非常に低いこと、ダビガトランエテキシラートは生体内のエステラーゼで、そのほとんどがダビガトランに変換されることから、ダビガトランの血中濃度測定において、その交差反応性はほとんど影響しないものと思われる。

表3 DT-mAbを用いたELISAにおける交差反応性

Compound	Cross-reactivity (%)	
	Ringer's solution	Serum ultrafiltrate
Dabigatran (DT)	100	100
Dabigatran etexilate	1.57	1.68
Amiodarone	<0.03	<0.03
Disopiramide	<0.03	<0.03
Propranolol	<0.03	<0.03
Verapamil	<0.03	<0.03
Digoxin	<0.03	<0.03
Omeprazole	<0.03	<0.03
Lansoprazole	<0.03	<0.03
Candesartan cilexetil	<0.03	<0.03
Telmisartan	<0.03	<0.03
Allopurinol	<0.03	<0.03
Theophylline	<0.03	<0.03
Indomethacin	<0.03	<0.03

以上の結果より、本研究で作製に成功した抗ダビガトランモノクローナル抗体 (DT-mAb) を用いた ELISA により特異的に、さらに高い精度で、ダビガトランの濃度測定が可能であると考えられた。本 ELISA は、リンゲル液で調製した標準液で検量線を作成し、血清の限外ろ過液をサンプルにすることで、血中のタンパク結合していない遊離型ダビガトラン濃度の測定に応用できるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Oiso S, Morinaga O, Goroku T, Uto T, Shoyama Y, Kariyazono H. Generation of an anti-dabigatran monoclonal antibody and its employment in a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for serum dabigatran. *Therapeutic Drug Monitoring* doi: 10.1097/FTD.000000000000184. 査読有

Yin FT, Futagawa T, Li D, Ma YX, Lu MH, Lu L, Li S, Chen Y, Cao YJ, Yang ZZ, Oiso S, Nishida K, Kuchiiwa S, Watanabe K, Yamada K, Takeda Y, Xiao ZC, Ma QH. Caspr4 interaction with LNX2 modulates the proliferation and neuronal differentiation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cells and Development* 24, 640-652, 2015. 査読有

Oiso S, Takayama Y, Nakazaki R, Matsunaga N, Motooka C, Yamamura A, Ikeda R, Nakamura K, Takeda Y, Kariyazono H. Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells. *Oncology Reports* 31, 719-726, 2014. 査読有

Oiso S, Nobe M, Yamaguchi Y, Umemoto S, Nakamura K, Kariyazono H. Establishment of a gastric cell-based assay system for exploring inhibitors of octanoylated ghrelin production. *Journal of Biomolecular Screening* 18, 1035-1042, 2013. 査読有

Uto T, Sakamoto A, Tung NH, Fujiki T, Kishihara K, Oiso S, Kariyazono H, Morinaga O, Shoyama Y. Anti-Proliferative Activities and Apoptosis Induction by Triterpenes Derived from *Eriobotrya japonica* in Human Leukemia Cell Lines. *International of Molecular Sciences* 14, 4106-4120, 2013. 査読有

Oiso S, Ikeda R, Nakamura K, Takeda Y, Akiyama S, Kariyazono H. Involvement of NF- $\kappa$ B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells. *Oncology Reports* 28, 27-32, 2012. 査読有

[学会発表](計 16 件中 10 件掲載)

大磯茂、森永紀、宇都拓洋、正山征洋、仮屋園博子、ELISA によるダビガトラン血中濃度測定法の開発、第 76 回九州山口薬学大会、2014 年 11 月 23-24 日、長崎県・長崎市

仁位和加奈、山口祐平、大磯茂、中村和男、仮屋園博子、ヘプタン酸は活性型グレリンの産生を抑制する、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28-30 日、熊本県・熊本市

合六貴昭、大磯茂、森永紀、宇都拓洋、正山征洋、仮屋園博子、抗ダビガトランモノクローナル抗体の交差反応性の検討、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28-30 日、熊本県・熊本市

大磯茂、森永紀、宇都拓洋、正山征洋、仮屋園博子、特異的モノクローナル抗体を用いたダビガトラン濃度測定法の検討、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7-8 日、長崎県・佐世保市

大磯茂、森永紀、合六貴昭、山口祐平、正山征洋、仮屋園博子、ダビガトラン血中濃度測定を目指した ELISA の開発、第 23 回日本医療薬学会年会、2013 年 9 月 21-22 日、宮城県・仙台市

大磯茂、森永紀、正山征洋、仮屋園博子、抗ダビガトランモノクローナル抗体を用いたダビガトラン ELISA 法の開発、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28-30 日、神奈川県・横浜市

大磯茂、野邊みゆき、中村和男、仮屋園博子、グレリン産生・分泌細胞株を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索、第 29 回日本薬学会九州支部大会、2012 年 12 月 8-9 日、熊本県・熊本市

宇都拓洋、坂本綾奈、日高由貴、藤木司、岸原健二、大磯茂、仮屋園博子、森永紀、正山征洋、コロソール酸による癌細胞増殖抑制能とその作用機構解明、第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2012 年 11 月 1-2 日、大阪府・大阪市

Yamaguchi Y, Oiso S, Nobe M, Kariyazono H, Inhibitory effects of some fatty acids on active ghrelin production in a stable ghrelin-expressing AGS-GHRL8 cell line. *World Congress on Oleo Science (WCOS 2012)*, September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.

Oiso S, Nobe M, Nakamura K, Kariyazono H, Establishment of a cell-based assay system for exploring inhibitors of active ghrelin production. World Congress on Oleo Science (WCOS 2012), September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.

〔その他〕

長崎国際大学ホームページ

<http://www.niu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大磯 茂 (Shigeru Oiso)

長崎国際大学大学院・薬学研究科・准教授  
研究者番号：40513106

### (2) 研究分担者

仮屋園 博子 (Hiroko Kariyazono)

長崎国際大学大学院・薬学研究科・教授  
研究者番号：20437958

森永 紀 (Osamu Morinaga)

長崎国際大学大学院・薬学研究科・准教授  
研究者番号：60465771

### (3) 連携研究者

なし