

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：25503

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16530

研究課題名（和文）FRETに基づくトシリズマブの新規HPLC法の開発と薬物相互作用解明への応用

研究課題名（英文）Development of a novel HPLC analysis method for tocilizumab based on FRET and its application to elucidate drug interaction.

研究代表者

高田 誠（Takada, Makoto）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：60551348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、塩基性試薬であるオクチルアミンを含むアセトニトリル溶液とトリフルオロ酢酸水溶液を組み合わせることでIgG1を除去しトシリズマブ（TCZ）を選択的に回収できる画期的な選択的沈殿法を見出した。さらに、ヒト血清中のTCZを選択的沈殿法による前処理後にHPLCを用いてTCZの自然蛍光を検出することで極めて迅速かつ簡便に定量する分析法を開発した。選択的沈殿法は物理化学的な前処理法であることから、ELISAのように抗体医薬品ごとに前処理を変更する必要がなく、汎用性の面でも優れた手法であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCZは関節リウマチなどの慢性疾患の治療のみならず、近年ではCOVID-19などによるサイトカイン放出症候群（CRS）の治療にも適用が拡大され、急性期治療時の効果確認の必要性が増加している。本研究は、慢性疾患の治療効果を確認するための感度としては不十分であったものの、これまで報告されているいずれの分析法と比較しても迅速性の面で極めて優れていることから、緊急性の高い場面における治療効果確認においては有用な手法となる。また、開発した選択的沈殿法は、抗原-抗体反応を用いない物理化学的手法であることから、マウス由来のアミノ酸比率の異なるキメラ型抗体やヒト型抗体に対しても有用であることが期待される。

研究成果の概要（英文）：An extremely simple and rapid HPLC analysis assay for determining tocilizumab (TCZ) in human serum with selective precipitation using octylamine was developed. The sensitivity of the method to confirm the therapeutic efficacy of chronic diseases such as rheumatoid arthritis (RA) was insufficient, so more detail study to overcome the problem is needed. On the other hand, this method may be more useful than conventional methods in urgent situations, such as confirming the therapeutic efficacy of cytokine-release syndrome (CRS) by COVID-19.

研究分野：分析化学

キーワード：トシリズマブ HPLC 選択的沈殿法 COVID-19 サイトカイン放出症候群

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の治療に用いられるトシリズマブ (TCZ) は、日本で開発された初の生物学的製剤であり、炎症誘因物質である IL-6 の活性を阻害することで関節の炎症を改善し、関節破壊から生じる機能障害等の全身症状を緩和する。IL-6 は C 反応性タンパク (CRP) の発現に直接的に影響を及ぼすことから、TCZ 投与後、血中 CRP 濃度を血中 TCZ 濃度の指標とすることができることが知られており、広く利用されている。TCZ と RA 治療薬の第一選択薬であるメトトレキサート (MTX) との薬物相互作用を確認した報告でも CRP 濃度が利用されており、MTX との間薬物相互作用はなく通常用量で併用可能であると結論付けている [Schmitt C., et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **50**, 218-23 (2012)]。しかしながら、TCZ は投与中に重篤な有害事象を合併する可能性があり、一部 TCZ 投与患者において CRP の低下と症状改善が必ずしも一致しない傾向がみられることが知られている。また、TCZ 濃度を直接モニターして、他の疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) との併用における相互作用について報告されていない。そのため、血中 TCZ 濃度を直接測定することは有用であると考えられる。

一般的に、TCZ などの生物学的製剤は他の低分子医薬品と異なり通常の高速度液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離・分析が困難とされている。これは、ヒト抗体である TCZ の全アミノ酸配列の 90% 以上はヒト IgG1 抗体が占めていることから、TCZ の実際の血中濃度を測定するためには、TCZ を血中に多量に存在する IgG1 から分離・検出する必要があるためである。そのため、TCZ の血中濃度測定には現在、主に選択性の高い ELISA などの酵素免疫測定法が用いられている。しかしこの方法は、操作が煩雑で分析に時間がかかるといった問題点がある。この様な理由から、臨床現場では院内において血中濃度測定が行われておらず、外部の分析専門機関へ委託しており、コストがかかる上、結果が出るまでに時間がかかるため、治療効果の確認には適さない現状がある。

## 2. 研究の目的

前項目で述べたように、現在実用化されている TCZ 定量法としては酵素免疫測定法があるが、近年では HPLC を用いた抗体医薬品測定法も開発されつつあり、既にいくつかの報告もなされている。TCZ は IgG1 サブクラスであることから、クロマトグラム上で生体由来の IgG1 と完全に分離することが難しい。そのため、HPLC を用いて血中 TCZ を定量する場合、適切な前処理や分離操作により TCZ を IgG1 から選択的に分離することが必要となる。そこで、トリプシン消化を行い、得られた抗体医薬品に特異的なペプチド断片を高速クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で測定する方法、前処理の一部に抗原抗体反応を用いて血中の夾雑成分から抗体医薬品を精製し、その後、高温逆相 LC (HT-RPLC) で分離して自然蛍光を検出する方法などが報告されている。しかしながら、いずれの方法も高額な機器が必要であることや前処理操作が煩雑であること、ランニングコストがかかることといった問題点が依然として存在する。

よって、本研究では、臨床現場に適用可能な迅速・簡便かつ安価なヒト血清中 TCZ 濃度の HPLC 測定法を開発する、さらにその方法を用いて TCZ と DMARDs や NSAIDs との薬物相互作用解明へと応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

抗原抗体反応を用いずに、物理化学的手法により TCZ と IgG1 を分離する前処理法の検討を進め、塩基性試薬と有機溶媒を組み合わせることで TCZ から IgG1 を選択的に除去できる可能性を見出した [Takada M., et al., *Luminescence*, **34**, 347-52 (2019)]。また、これには用いた塩基性試薬の疎水性が関係しており、疎水性相互作用により TCZ 内部の疎水ポケットに取り込まれ、TCZ の表面電荷が増強されることで高次構造が安定化し、凝集が起こりづらくなっているとの知見を得た。一方で、本測定系を実施料へと適用するにあたり、市販のヒト血清を用いて検討を行った。その結果、血清中の IgG1 を完全には除去できなかったことから、より選択的な分離・分析手法が必要であった。そこで、本研究では、前処理に用いる塩基性試薬や有機溶媒の検討を行うとともに、HPLC 分離条件の検討を行うことで、簡便な前処理のみで迅速に分析可能な方法の開発を行った。

## 4. 研究成果

本研究により、塩基性試薬であるオクチルアミンを含むアセトニトリル溶液とトリフルオロ酢酸水溶液を組み合わせることで IgG1 を除去し TCZ を選択的に回収できる画期的な選択的沈殿法を見出した。さらに、ヒト血清中の TCZ を選択的沈殿法による前処理後に HPLC を用いて TCZ の自然蛍光を検出することで極めて迅速かつ簡便に定量する分析法を開発した。TCZ は RA などの慢性疾患の治療のみならず、近年では COVID-19 などによるサイトカイン放出症候群 (CRS) の治療にも適用が拡大され、急性期治療時の効果確認の必要性が増加している。本法は

慢性疾患の治療効果を確認するための感度としては不十分であったものの、これまで報告されているいずれの分析法と比較しても迅速性の面で極めて優れていることから、緊急性の高い場面における治療効果確認や副作用回避においては有用な手法となる。また、選択的沈殿法は物理化学的な前処理法であることから、ELISA のように抗体医薬品ごとに前処理を変更する必要性がなく、汎用性の面でも優れた手法である。加えて、ランニングコストについても抑えられていることから、臨床現場において適用可能な TCZ 定量法として非常に有用なツールとなり得ると考える。

本申請研究により開発した前処理法である選択的沈殿法は、抗原 - 抗体反応を用いない物理化学的手法あることから、マウス由来のアミノ酸比率の異なるキメラ型抗体やヒト型抗体に対しても有用であることが期待された。一方で、バイオシミラーは先発抗体医薬品との比較において品質、安全性、および有効性については「同等性 / 同質性」が求められているものの、分子量が大きいため品質特性については同等でない可能性がある。これらの製剤の品質管理や生体中医薬品分析は極めて有用であることから、同じ IgG1 サブクラスでありキメラ型抗体医薬品のインフリキシマブ (IFX) へと本法を適用した。まず、先発品をモデル医薬品として使用して分析法を開発し、バリデーション評価を行った。更に、現在上市されている IFX バイオシミラーについても検討を行い、本法のバイオシミラーに対する応用性についても確認した。現在、こちらの知見についても論文を発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takada Makoto, Watanabe Ichika, Naito Kazuya, Mutoh Junpei, Ohba Yoshihito, Kabashima Tsutomu, Wada Mitsuhiro	4. 巻 71
2. 論文標題 Extremely Simple and Rapid HPLC Analysis of Tocilizumab in Human Serum with Selective Precipitation Using Alkylamine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 19 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○高田 誠、内藤和哉、渡邊一華、武藤純平、大庭義史、椛島 力、和田光弘
2. 発表標題 選択的沈殿法によるヒト血清中トシリズマブの極めて迅速かつ簡便なHPLC分析法の開発
3. 学会等名 第33回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○渡邊一華、高田 誠、武藤 純平、大庭義史、椛島 力、和田光弘
2. 発表標題 選択的沈殿法によるヒト血清中インフリキシマブの迅速・簡便なHPLC分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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