

博 士 論 文

薬物動態解析のための
免疫化学的方法の開発研究

平成 30 年度

崇城大学 大学院 工学研究科

応用生命科学専攻 博士課程

生命情報科学講座

1619D04

山本 雄大

目次

第1章 緒論	1
第2章 がん分子標的治療薬の TDM に応用可能な competitive ELISA の開発	
緒言	8
第1節 Lapatinib の competitive ELISA の開発	
2-1-1. 材料および方法	13
2-1-2. 結果	
2-1-2-1. Lapatinib の ELISA	17
2-1-2-2. 抗 Lapatinib 抗体の特異性	19
2-1-2-3. 薬物動態の解析	21
2-1-3. 考察	23
第2節 Nilotinib の competitive ELISA の開発	
2-2-1. 材料および方法	25
2-2-2. 結果	
2-2-2-1. Nilotinib の ELISA	29
2-2-2-2. 抗 Nilotinib 抗体の特異性	31
2-2-2-3. 薬物動態の解析	33
2-2-3. 考察	35
第3節 Erlotinib の competitive ELISA の開発	
2-3-1. 材料および方法	37
2-3-2. 結果	
2-3-2-1. Erlotinib の ELISA	41
2-3-2-2. 抗 Erlotinib 抗体の特異性	44
2-3-2-3. 薬物動態の解析	47
2-3-3. 考察	49
第4節 Sorafenib の competitive ELISA の開発	
2-4-1. 材料および方法	51
2-4-2. 結果	
2-4-2-1. Sorafenib の ELISA	55
2-4-2-2. 抗 Sorafenib 抗体の特異性	59

2-4-2-3. ELISA と HPLC の相関	61
2-4-3. 考察	63
第 3 章 がん分子標的治療薬 Imatinib の sandwich ELISA の開発	
緒言	65
3-1. 材料および方法	67
3-2. 結果	
3-2-1. 抗 MPMB 抗体と抗 AMPP 抗体の特異性	73
3-2-2. Sandwich ELISA	76
3-2-3. Sandwich ELISA の特異性	79
3-2-4. Sandwich ELISA と HPLC の相関	
3-3. 考察	81
第 4 章 2 型糖尿病治療薬 Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体の作製と 免疫組織化学の開発	
緒言	84
4-1. 材料および方法	85
4-2. 結果	
4-2-1. AG モノクローナル抗体の特異性	90
4-2-2. 免疫組織化学	96
4-3. 考察	99
第 5 章 総論	102
参考文献	107
謝辞	116

第1章 緒論

ヒトは誰しも、「病気やケガに合わずに健康な生活を送りたい」、「不幸にしてそのような状態に陥った場合は、できるだけ早く健康な状態に回復したい」と望んでいる。その思いは古代の人々も同様であり、病気やケガの治療に効果があるものを、試行錯誤によって身の回りの植物、動物、鉱物などから経験的に探し出して用いるようになったのが薬の起源と考えられる。従って薬の歴史は古く、すでに紀元前 5000 年ごろのメソポタミア地方で、シュメール人が医薬に関して楔形文字で粘土板に刻んでおり[1]、これが最古の記録と考えられている。また、古代エジプトにおいてはパピルスに象形文字で医薬に関する記録が残された。なかでも紀元前 1550 年ごろのパピルス・エーベルスは古代エジプトの医学薬学全書とも呼ばれ、700 種類の薬と魔術的な要素も含まれるが 800 種類の処方記されている。さらに古代中国では、伝説上の王である三皇五帝の一人で、自らの体を使って数多くの本草について効果を試したと言われる神農が医薬と農業をつかさどる神として信仰されている。その名を冠して後の漢代（1~2 世紀ごろ）に成立した「神農本草経」では 365 種類の薬物について、名称、気味（薬性）、薬効などが記載されている。このように、ヒトは古代から薬を利用してきたが、薬となる物質の発見やその処方は長い間試行錯誤によるものであった。自然科学の発達により、19 世紀になって鎮痛作用が知られていたヤナギの樹皮から有効成分であるサリチル酸が抽出され、1897 年には副作用を抑えるために化学構造を変化させたアセチルサリチル酸が合成された。さらに 20 世紀初頭に、P. Ehrlich による化学療法の提唱（1909 年）、Alexander Fleming による抗生物質 penicillin の発見（1928 年）などが続き、現在の薬に繋がる基礎が築かれた。

現代では多種多様な薬があり、病気の診断や予防などに用いられる物もある

が、その多くは治療に用いられる薬である。それらの治療薬には、有害事象（副作用）を引き起こさずに、病気の回復や症状の改善が期待されている。そのためには、単にその病気・症状に効果のある物質を選択して患者に与えればよいというものではなく、その用法や用量が重要になる。適切な用法・用量を設定するためには体内での薬物の動態を知ることが必要である。治療のために投与した薬が効果を発揮するためには、まず、薬が体内に取り込まれなければならない。薬の投与経路は（Fig. 1）に示すように種々の経路があるが、口から薬を飲む経口投与が最も一般的である。経口投与の場合、口腔より摂取された薬物は、胃を通り大部分は小腸で吸収（Absorption）され、血中に入る。そして、血流によって全身をめぐり、作用する部位（臓器・組織・細胞）に届けられる。これを分布（Distribution）と呼ぶ。しかし、いつまでも薬物が体内に留まったままだと副作用を生じる可能性が高くなるので、作用後の薬物は速やかに活性のない形に代謝（Metabolism）され、体外へ排泄（Excretion）されることが望ましい。多くの薬物は肝臓で代謝を受け、胆汁中や尿中に排泄される[1]。この一連の流れを薬物動態（ADME）と言う（Fig. 1）。

薬物の吸収、分布、代謝、排泄 (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)

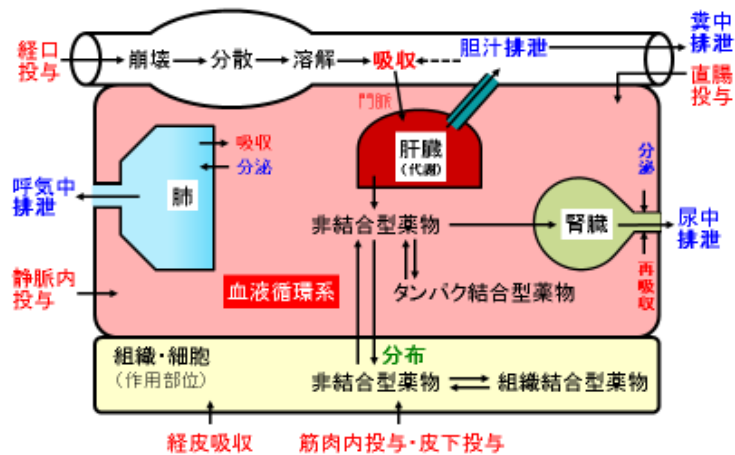


Fig. 1 生体内における薬物動態図

薬物動態に関する情報は、より効果的で安全な薬物治療を行う上で非常に重要である。そのため、薬の取扱説明書（添付文書）には、用法・用量、使用上の注意、副作用などに加えて、薬物動態データに関する記載もされている。そのデータは血中の薬物濃度推移に関係したものである。Fig. 2 に示すようなグラフや、 C_{max} （最高血中濃度）、 T_{max} （最高血中濃度到達時間）、 $T_{1/2}$ （消失半減期）、AUC（血中濃度-時間曲線下面積：利用された薬の総量）などのパラメーターが記されている。 C_{max} が高いほど効果が強くなるが、副作用が発現する可能性も高くなる。 T_{max} は薬効発現までの時間に、 $T_{1/2}$ は代謝や排泄などにより体内から消失するまでの時間、即ち薬効の持続時間に、AUCは薬効の強弱と作用の持続時間の両者に関係している。

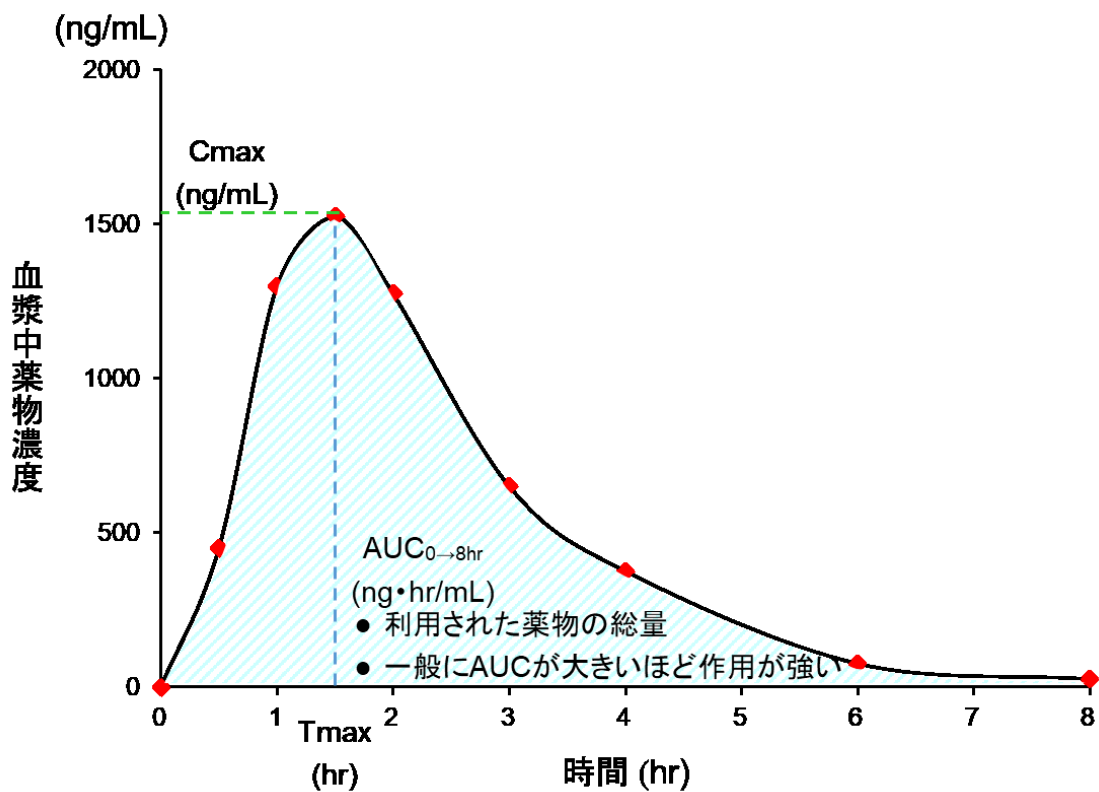


Fig. 2 血中における薬物濃度

患者の血液サンプルより血中薬物濃度を測定し、薬物動態を解析することは以前より行われており、できるだけ薬効を高くし、副作用を低減させるための最適な薬用量、投与法を設定するための治療薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) に必須である。この TDM は、血中濃度と効果・副作用が相関している薬、薬効が得られる濃度と副作用が発現する濃度の差が小さい (治療域が狭い) 薬、薬効の判定に時間がかかる一方重篤な副作用が発現しやすい薬などで特に有効である。現在、抗てんかん薬、抗不整脈薬、抗菌薬や抗がん剤など多くの薬物で TDM が実施されている。例えば、本研究でも取り扱う、慢性骨髄性白血病の治療を劇的に改善した imatinib の場合、トラフ値 (薬物を反復投与し定常状態に達した際の最低薬物血中濃度) が 1000 ng/mL 以上でないと十分な効果を得られないことが知られている [2]。また、好中球減少症や眼瞼浮腫、顔面浮腫

などの副作用は 1165 ng/mL 以下の場合に比べて 3180 ng/mL 以上で発現率は 2-3 倍になることが報告されている[3]。このようなデータから imatinib の場合、TDM を行い血中濃度のトラフ値が 1000 ng/mL 以上で、かつ 3000 ng/mL を超えないよう投与量を調節する必要がある。

薬物血中濃度測定法には、high-performance liquid chromatography (HPLC) [4] や liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [5]などの分離分析法や抗原抗体反応を利用した免疫測定法などがある。分離分析法は、高額な測定装置が必要であり、所有していない場合は外部の検査センターなどに依頼せねばならず、結果を得るまでに時間がかかるなどの短所も持っている。一方、免疫測定法は、市販のキットを用いれば、簡便・迅速かつ効率的に薬物血中濃度を測定できる優れた方法である。しかし、TDM の対象となっている薬の中にはキットが無いものが多数（例えば対象の抗不整脈薬のうち、約半数の薬に市販キットがない）あるため、それらについては現状では HPLC などの分離分析法に頼らざるを得ない。

免疫測定法は、1959 年に Berson と Yalow により開発された放射免疫測定法 (radioimmunoassay : RIA) が始まりである[6]。この RIA は高感度で特異性が高いため、血液などの複雑なマトリックス中に混在する極微量成分の濃度測定にとりわけ威力を発揮する。それゆえ、微量しか存在しない生体成分の分析法として急速に発展し、医学、薬学および生化学などの幅広い分野で利用されるようになった。しかし、本法は放射性同位元素を使用するために、特殊な設備が必要などの種々の欠点も持ち合わせており、現在ではあまり使用されなくなった。この欠点を補った測定法として、非放射性的ラベル化合物を用いる免疫学的測定法が、数多く報告され実用化されている。特に酵素をラベル化合物として用いる酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) は、誰で

も、どこでも、できる測定法であり、測定感度も、RIA と同等か、それ以上である。したがって、現在では、ELISA は、RIA に代わって、医学、薬学および生化学などの幅広い分野で利用されている。

前述したように、薬物血中濃度推移に関するデータは臨床で薬物療法を行う上で非常に重要である。しかし、血中濃度だけでは薬物動態を把握したとはいえず、薬物の効果や副作用の機構解明、効果や副作用の発現部位の予測などのためには不十分であることもまた事実である。例えば、anthracycline 系抗がん抗生物質、daunorubicin、doxorubicin、epirubicin は化学構造の違いは極僅かであり、血中濃度推移にも大きな差はないにもかかわらず、daunorubicin は白血病などの血液のがんにしか効果を示さないのに対して、doxorubicin、epirubicin はそれに加えて固形がんにも効果を示すことが知られていたが、その理由についてはよくわかっていなかった。これを明らかにするためには組織・細胞レベルでの薬物局在とその経時的変化に関するデータが必要になる[7]。薬物の組織・細胞中の局在や動態を解析する方法として、以前から autoradiography が行われていた。しかし、この方法は、まず高価で危険なアイソトープ標識薬物を合成する必要がある、検出操作は煩雑で時間がかかる、標本作製中に標識薬物が移動する可能性がある、親化合物と代謝物との区別がつかないなどの欠点があるため、薬物動態解析は、一般研究室には殆ど普及していない。そのため、これに代わる方法として、薬物の免疫組織化学的検出法が開発され、応用されるようになって来た。本法は、放射性物質を使わず、操作も 1~2 日で完了し、薬物の分布状態を直接、顕微鏡下に観察できるなど、安全性、経済性、簡便性、正確性、等において全て、autoradiography 法を凌駕する方法である。そのため、薬物の免疫組織化学法は、autoradiography 法に代わって、薬物動態解析の

解析法として期待されている。しかし、薬物に対する抗体で市販されているものはほとんどなく、その薬物に対する特異抗体を作製する必要があるため、残念ながら一般に普及しているとは言い難い。

本研究では、ELISA や免疫組織化学法などの免疫化学的方法の開発が望まれているにもかかわらず、未だ開発がなされていない薬物をターゲットとして、それら薬物の動態研究に応用可能な免疫化学的方法の開発を試みた。

本研究は以下の章によって構成されている。第2章では、4種類のがん分子標的治療薬に対する TDM に応用可能な competitive ELISA の開発について述べる。第3章では、がん分子標的治療薬 imatinib に対する超特異的で高感度な sandwich ELISA の開発について述べる。第4章では、2型糖尿病治療薬 alogliptin に対する特異モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学の開発について述べる。第5章はこれらをまとめた総論である。

第2章 がん分子標的治療薬の TDM に応用可能な competitive ELISA の開発

緒言

近年、分子生物学の発展により、がん細胞と正常細胞の違いが徐々に明らかとなり、がん薬物療法において、新しいタイプの抗がん剤であるがん分子標的治療薬の開発が盛んに行われるようになった。すなわち、がん分子標的治療薬は、がん細胞が特異的にあるいは過剰に発現している分子（遺伝子、タンパク質）を阻害することを目的に開発されている。現在臨床応用されているがん分子標的治療薬は、分子量の大きい抗体薬と分子量の小さな低分子化合物の2つに大別される。抗体薬は細胞の膜上に発現している抗原をターゲットとした抗体で、細胞内には入らず、主としてADCC作用（antibody-dependent-cellular-cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害）あるいはCDC作用（complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害）でがん細胞をアポトーシスに陥らせ、抗がん効果を発揮する。これらは高分子であるため、注射剤として臨床応用されている。一方、低分子化合物は、抗体薬に比し分子量が極めて小さく、細胞内に取り込まれて、受容体の細胞内ドメインやシグナル伝達系の主要な酵素を阻害して抗がん効果を発揮する。これらは低分子であり、脂溶性が高いため、腸管からの吸収が高く、その多くが内服薬として臨床応用されている。

がん分子標的治療薬は、従来の抗がん薬（代謝拮抗剤やアルキル化剤など）と比較して優れたがん細胞選択性と安全性が期待され、多くのがん分子標的治療薬で劇的な腫瘍縮小が認められている。しかしながら、想定外の毒性も認められ、間質性肺炎など、一旦生じると重い副作用が現れることもあるため、今後も副作用の現れ方に注意が必要とされている。

抗体薬のがん分子標的治療薬は、血中半減期が長く生体内安定性が高いため、週に1回から数週に1回程度の投与が標準的である。したがって、

therapeutic drug monitoring (TDM) は必要ないと考えられている。一方、多くの低分子化合物のがん分子標的治療薬（低分子がん分子標的治療薬）は、血中半減期は1日以内と短く、毎日1~3回の服薬が必要となる。また、これらの効果は、薬物濃度の時間的推移である薬物動態と治療標的の薬物感受性である薬物動力に依存することが知られている。そのため、治療効果を得るために薬物血中濃度を閾値濃度以上に保つことが重要である。しかし、血中濃度が高くなりすぎても副作用が発現する可能性もある。それゆえ、薬物の血中濃度を測定し、そのデータについて薬物動態解析を行って、患者個人別に投与量を調整するためにTDMが必要とされている。現在、これらがん分子標的治療薬の定量法としてHPLCや、LC-MS/MSが用いられているが、高価な機械の使用および高い技術的専門知識を必要とするため、日常的な臨床の場での使用には適さない。それゆえ、高感度で特異的であり、簡便で、多数検体処理能力などの特徴をもっている免疫測定法の開発が望まれている。免疫測定法を開発するためには、対象となる化合物の抗体を作製する必要がある。対象化合物が低分子の場合、それ自身では抗原となり得ないため、その低分子化合物をキャリアタンパク質に共有結合させ、ハプテン抗原を作製しなければならない。しかしながら、低分子がん分子標的治療薬の多くは、タンパク質と共有結合できる官能基を有していないため、ハプテン抗原の作製が非常に難しい。また、これら薬物の多くは、生体内で多種多様に代謝されるため、代謝物とは、交差反応を示さない非常に特異的な抗体を作製する必要がある。これらの理由により、低分子がん分子標的治療薬の免疫測定法は、これまでほとんど開発されていない。そこで本研究では、「薬物の主要代謝物の構造を考慮し、キャリアタンパク質と共有結合できる官能基を有する薬物の部分構造体を選択し、ハプテン抗原を作製する」というユニークな方法を考案し、未だ免疫測定法が開発されていない4

種類のがん分子標的治療薬であるlapatinib、nilotinib、erlotinib、sorafenib (Fig. 1) に対するTDMや動態研究に応用可能な免疫測定法の1つであるcompetitive ELISAの開発を行った。

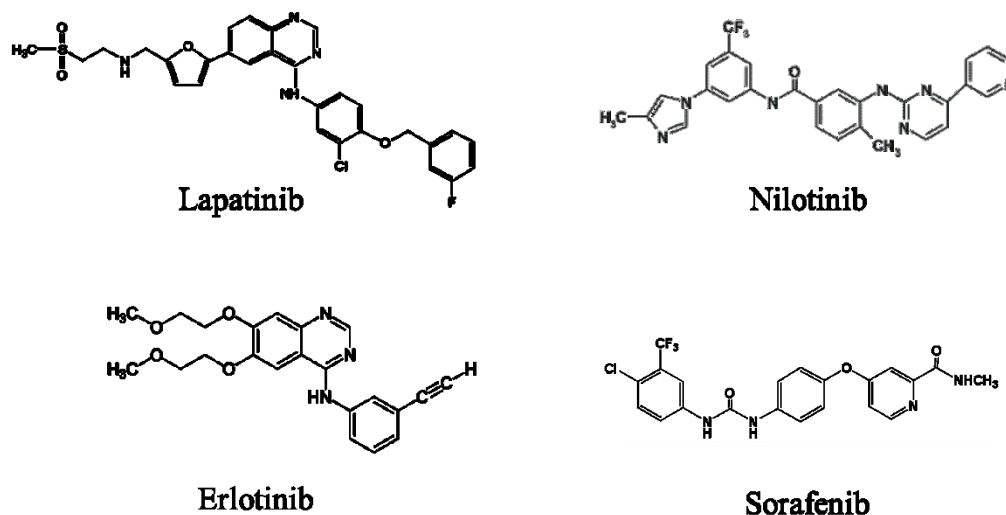


Fig. 1 Chemical structure of molecular targeted therapy of cancer

Lapatinib は、上皮成長因子 (EGF) ファミリーの上皮成長因子受容体 (または ErbB1) および HER-2 / neu (erbB2) 受容体を阻害するがん分子標的治療薬であり、主に乳がん患者に使用される[8]。重篤な副作用として、肝機能障害や間質性肺炎、心不全や不整脈などの心臓障害が報告されている[9]。したがって、血中濃度を測定することは、最適な治療レベルを達成するため重要である。そこで今回、lapatinib の部分構造体である 3-chloro-4-{(3fluorobenzyl)oxy}aniline (CFBA)を用いて特異抗体を作製し、competitive ELISA の開発を行った (第 1 節)。

Nilotinib は、Bcr-Abl を阻害するがん分子標的治療薬として慢性骨髄性白血病の治療に用いられており、imatinib 抵抗性または忍容性の患者にも有効であることが知られている[10, 11]。重篤な副作用として、QT 間隔延長や心不全が報告されている。また、nilotinib を服用している患者は、高ビリルビン血症の発現と nilotinib のトラフ値との間に相関性があると報告がある[12]。血中濃度を測定す

ることは、薬物相互作用または有害な副作用を経験した患者、用量の調整を必要とする患者のために最適な治療レベルを達成するため重要である。そこで今回、nilotinib の部分構造体である 2-(5-amino-2-methyl-anilino)-4-(3-pyridyl)pyrimidine (AMPP) を用いて特異抗体を作製し、competitive ELISA の開発を行った（第 2 節）。

Erlotinib は、血管新生や腫瘍増殖などのシグナル伝達系を阻害するがん分子標的治療薬で、非小細胞肺癌の治療薬に用いられている[13, 14]。しかし、副作用として間質性肺疾患、肝機能障害などが報告されており[15]、その上、表皮基底細胞層や皮膚付属器の EGFR の発現を阻害することで、ざ瘡様の発疹を引き起こすことから、減量や休薬、中止の原因にもなっている[16, 17]。Erlotinib は、CYP3A4 や CYP1A2、CYP3A5 によって代謝され、喫煙により CYP3A4 が誘導されることで erlotinib の血中濃度が約 50% 低下することが報告されている[18]。また高脂質、高カロリーの食事後に erlotinib を服用すると、トラフ値と血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が約 1.5–2% 増加することも知られている[19]。さらに erlotinib が皮膚に与えるダメージの重症度は、血中の erlotinib 濃度と相関している[20]。それゆえ血中濃度、治癒効果の改善や、毒性を最小限に抑えるために TDM が求められている。そこで今回、erlotinib の部分構造体である ethyl 3,4-bis(2-methoxyethoxy)benzoate (EBMB) を用いて特異抗体を作製し、competitive ELISA の開発を行った（第 3 節）。

Sorafenib は、腫瘍増殖抑制および血管新生抑制の両方の効果を有するがん分子標的治療薬であり、肝細胞癌 (HCC)、腎細胞癌および甲状腺癌の治療に使用されている[21, 22, 23]。しかしながら、肝不全、肝性脳症、肺炎などの重篤な副作用が生じることがあり、sorafenib を服用している HCC 患者の 20% が、治療開始 1 ヶ月以内になんらかの副作用により投薬を中止している[24, 25]。最近の研

究では、sorafenib の血漿中濃度は重篤な副作用と相関することが報告されている[26, 27]。臨床的に関連する薬物との相互作用の可能性についていくつかの研究が行われている。Sorafenib は主に肝臓の CYP3A4 により代謝されるが[28]、CYP3A4 の代謝に影響を及ぼす薬物との相互作用の可能性について研究が行われている。例えば、カルシウム拮抗薬である felodipine は CYP3A4 を阻害し、sorafenib 代謝を阻害することが報告されている[29]。逆に、prednisolone は CYP3A4 の働きを活性化させ sorafenib の代謝を促進させると報告されている[30]。このような薬物相互作用による sorafenib の代謝の変化は、臨床的に有害な作用を引き起こしうる。血中 sorafenib 濃度の評価は、薬物相互作用または有害な副作用を経験した患者、用量調整が必要な患者にとって最適な治療を達成するために重要である[27,31]。そこで今回、sorafenib の部分構造体である 4-(4-aminophenoxy)-*N*-methyl-2-pyridinecarboxamide (AMPC) を用いて特異抗体を作製し、competitive ELISA の開発を行った。(第 4 節)。

第1節 Lapatinib の competitive ELISA の開発

2-1-1. 材料および方法

2-1-1-1. 試薬

Lapatinib (AdooQ BioScience LLC Irvin, CA, U.S.A.)

3-Chloro-4-{{(3-fluorobenzyl)oxy}}aniline (CFBA) (Ark Pharm, Inc. Ventura Drive, Arlington Heights, U.S.A.)

Horse radish peroxidase (HRP) and 3,3, 5,5-tetramethylbenzidine (TMB) (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Binger , Ingelheim am Rhein , Germany)

2-1-1-2. Lapatinib 抗原の作製

Lapatinib 抗原の作製には、lapatinib の部分構造体である CFBA を用いた (Fig. 1)。*N,N*-Dimethylformamide (DMF) 100 μ L 中に溶解した CFBA (10 mg, 40 μ mol) に 1 M acetic acid 100 μ L を添加して酸性化し、蒸留水 50 μ L に溶解した sodium nitrite (2.8 mg, 40.5 μ mol) を加えて 0°C で 10 分間ジアゾ化を行った。次いで、得られた溶液との 0.1 M borate buffer (pH 9.0) 4 mL 中に溶かした BSA (20 mg) を室温で 1 時間反応させた。反応物を 1 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.0) 中で 48 時間連続して透析し、得られた CFBA-BSA 複合体を、lapatinib 抗原として使用した。

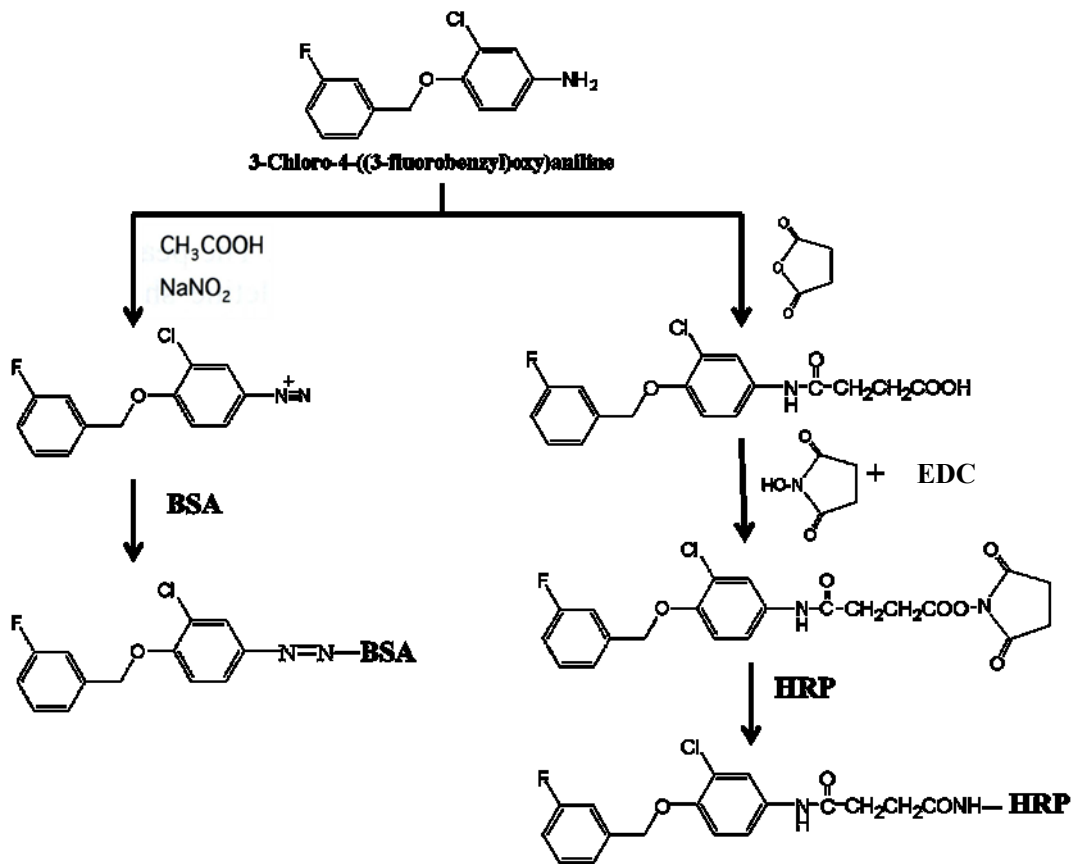


Fig. 1 Scheme for the preparation of immunogen and enzyme conjugate in the ELISA for lapatinib

2-1-1-3. 抗 Lapatinib 抗体の作製

作製した CFBA-BSA 複合体 (タンパク質量 1 mg) を等量の Freund's complete adjuvant と乳化し、成雌日本白ウサギの背部皮下及び筋中に投与した。その後、2 週間ごとに 3 回、初回の半量で感作を繰り返した。最初の免疫から 10 週間後に採血し、得られた血清を 55°C で 30 分間非働化した後に、HiTrap protein G column (GE Healthcare, Stockholm, Sweden) を用いて、IgG 分画まで精製した。得られた IgG 分画を抗 lapatinib 抗体として使用した。

2-1-1-4. Lapatinib 酵素標識体の作製

酵素標識体は、horse radish peroxidase (HRP) を CFBA と結合させて作製した (Fig. 1)。Pyridine 0.5 mL 中に溶解した CFBA (10 mg, 40 μ mol) と succinic anhydride (4.0 mg, 40 μ mol) を溶解させて、60°C で一晩反応させた。その後、反応物を ethyl acetate で抽出し、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 1 mL に溶解し、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) (5.2 mg, 80 μ mol) と *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (9.2 mg, 80 μ mol) を加えて室温で 2 時間反応させた。反応溶液の 30 μ L を 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.0) 0.5 mL 中に溶解した HRP (0.5 mg) と室温で 1 時間反応させた。反応後、Sephadex G-75 column を用いて精製し、得られた CFBA-HRP を lapatinib の酵素標識体として使用した。この複合体は、酵素活性を失うことなく、4°C で 6 ヶ月以上安定であった。

2-1-1-5. Lapatinib の ELISA

ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で希釈した抗 lapatinib 抗体

(2 µg/mL) を 100 µL 加えて 37°C で 1 時間放置することにより固相化した。次に 1% skim milk を 100 µL 加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に既知濃度の lapatinib または検体 25 µL と、0.1% BSA 含む PBS で 100 倍希釈した CFBA-HRP 75 µL を加えて 37°C で 3 時間競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% dimethyl sulfoxide (DMSO)、0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 µL 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、の 2 M sulfuric acid 100 µL を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalje Nunc Int.Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いた分光分析により 450 nm の発色強度を測定した。

2-1-1-6. 薬物動態の解析

一晩絶食後の成雄の Wistar ラット (体重 180~200 g) に methyl cellulose (0.5%, w/v water) 中に lapatinib を 2 mg/mL になるように溶解した溶液を lapatinib 量 10 mg/kg となるよう調整し経口投与した。投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 および 24 時間後に頸静脈から採血し、得られた血清を ELISA 用の血清検体とした。

2-1-2. 結果

2-1-2-1. Lapatinib の ELISA

至適条件を確立し、検量線を作成した。その結果、Fig. 2 に示すように、検量線の測定範囲は lapatinib 濃度 1.6~5000 ng/mL を示し、40~5000 ng/mL の範囲で直線性が得られた。Lapatinib の血漿中における有効治療濃度範囲は約 550~1710 ng/mL であるため[32]、この ELISA は TDM および薬物動態研究において、十分な測定感度であった。

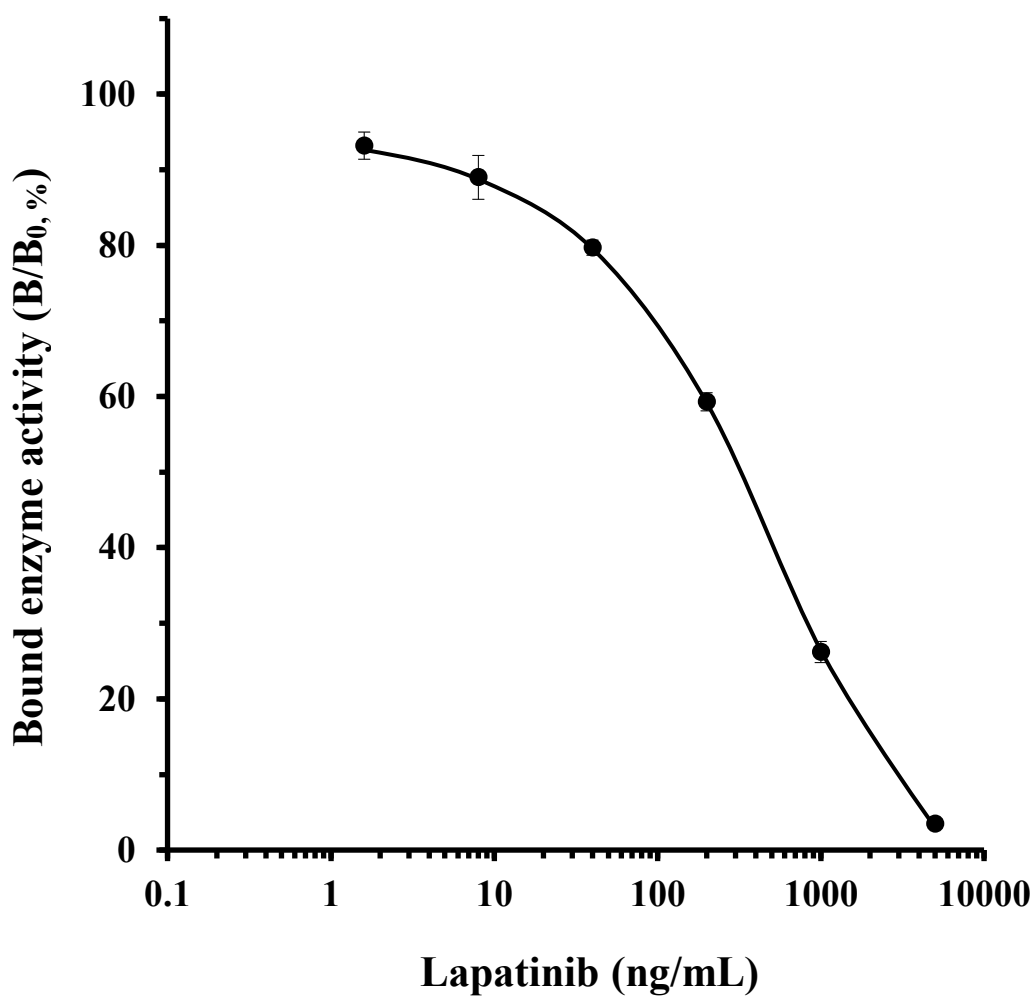


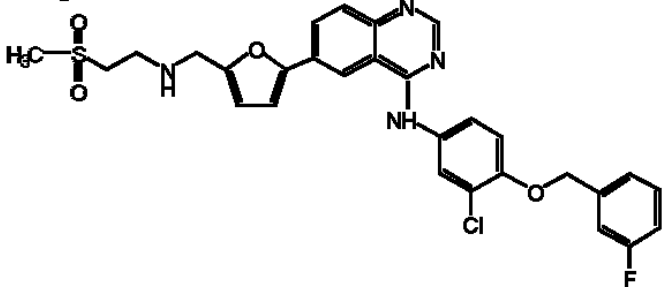
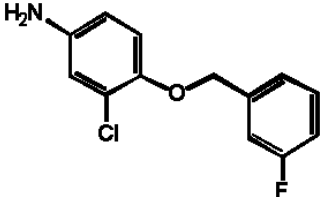
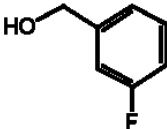
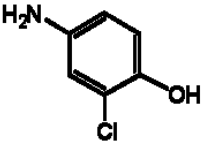
Fig. 2 Standard curves for lapatinib in human serum

The curves show the amount (%) of bound enzyme activity for various doses of each drug (B) as a ratio of that bound by HRP-labeled drug alone (B_0). Each point represents the mean \pm S.D. of 3 replicates.

2-1-2-2. 抗 Lapatinib 抗体の特異性

抗 lapatinib 抗体の特異性については、類似化合物を用いる交差反応試験により検討した。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な CFBA の濃度を比較する類似化合物のそれで除し、%として計算した。抗 lapatinib 抗体は lapatinib と 100.0%の交差反応性を示した。しかし、*m*-fluorobenzyl alcohol または 4-amino-2-chlorophenol とは交差反応性を示さなかった (Table. 1)。

Table. 1 Specificity of anti-lapatinib antibody

Compounds	Cross-reactivity (%)
<p data-bbox="284 548 432 582">Lapatinib</p> 	100.0
<p data-bbox="284 880 384 913">CFBA</p> 	100.0
<p data-bbox="284 1149 635 1182"><i>m</i>-Fluorobenzyl Alcohol</p> 	< 0.3
<p data-bbox="284 1339 639 1373">4-Amino-2-chlorophenol</p> 	< 0.3

2-1-2-3. 薬物動態の解析

単回投与後のラット血液中の薬物動態を解析した。経口投与された lapatinib は、直ちに吸収され、 T_{\max} は 2 時間で C_{\max} が 650 ng/mL であった (Fig. 3)。

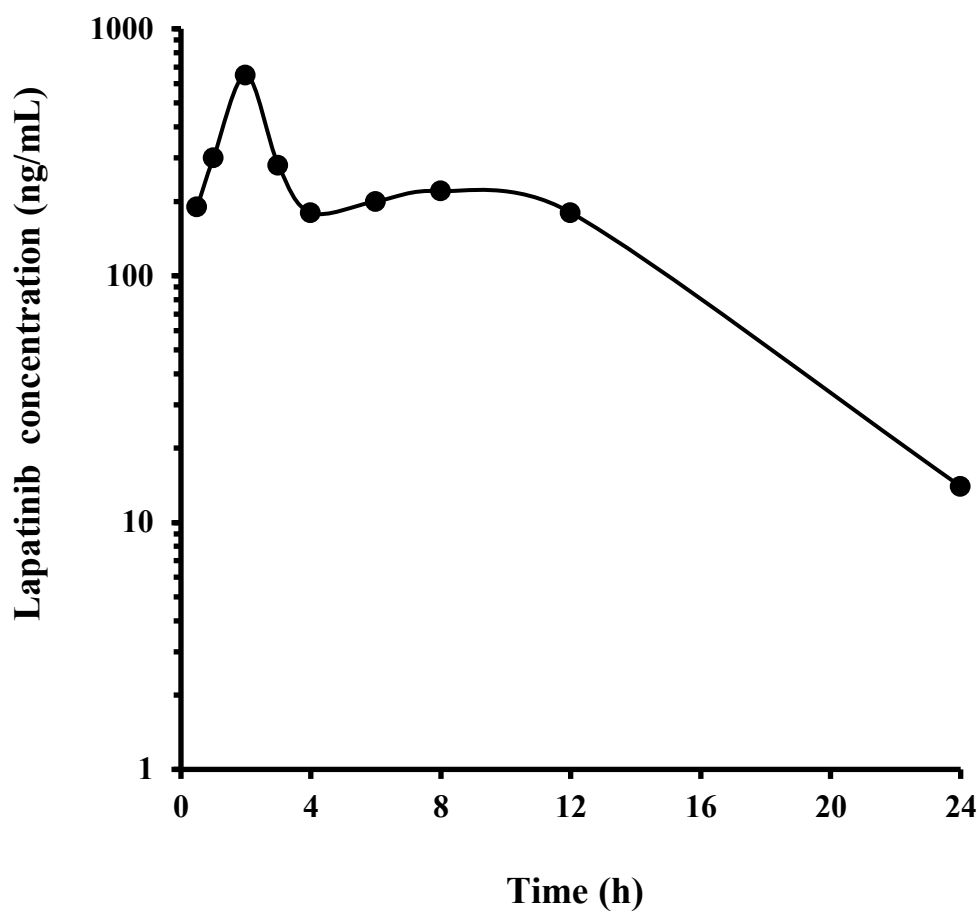


Fig. 3 Mean serum concentration–time profiles for lapatinib in rat following single oral administration of lapatinib (10 mg/kg)

The rat was injected of 10 mg/kg lapatinib. At each interval, blood samples were collected and serum levels of lapatinib was measured by the ELISA.

2-1-3. 考察

Lapatinib の吸収は食事の影響を受けることが知られており、食後に服用すると血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) は増加する[33]。また、制酸剤と併用した場合、lapatinib の AUC は低下することが知られている[34]。したがって、lapatinib の血中濃度は、食事や併用薬物によって大きく変動する可能性があるため、TDM が必要であると言われている。本研究では、lapatinib に対する特異抗体を作製し、TDM に応用可能な competitive ELISA を開発することを目的とした。

Lapatinib に対する抗体を作製することが困難な理由の 1 つは、BSA などのキャリアタンパクと簡単に結合できるような官能基を持たないことである。したがって、ここでは官能基を有する lapatinib の部分構造体 (CFBA) を用いて lapatinib 抗原を作製した。具体的には、CFBA をキャリアタンパクのチロシンまたはヒスチジン残基にジアゾカップリングさせることによって結合させた。得られた抗原をウサギに免疫することにより抗 lapatinib 抗体を得た (Fig. 1)。酵素標識体である CFBA-HRP 複合体は、HRP との架橋部位を認識する抗体の影響を除くために抗原作製とは異なった方法により作製した (Fig. 1)。

抗 lapatinib 抗体の特異性を検討した結果、抗 lapatinib 抗体がハプテンとして使用した CFBA のほぼ全体を認識し、lapatinib の構造に対して十分に特異的であった。Lapatinib は主に CYP3A4 によって代謝され、*O*-または *N*-脱アルキル化体となる。これらの代謝物と抗 lapatinib 抗体との交差反応性はまだ確認出来ていないが、抗 lapatinib 抗体が CFBA のほぼ全体を認識していると考えられることから、*O*-脱アルキル化代謝物は、ほとんど交差反応性を示さないことが予想される。対照的に、*N*-脱アルキル化代謝物は、lapatinib と同様の交差反応性を示すと予想された。しかしながら、ヒト血漿中に検出される *N*-脱アルキル化

代謝物の濃度が比較的低いことが知られている[35]。したがって本 ELISA は、ヒトにおける lapatinib の動態研究を行う上で、十分に特異的であると考えられる。

結論として、lapatinib の部分構造体を用いて抗原を作製することによって、lapatinib に対する特異抗体の作製に成功し、本抗体を用いて lapatinib の TDM および薬物動態研究に応用可能な competitive ELISA を開発した。

第2節 Nilotinib の competitive ELISA の開発

2-2-1. 材料および方法

2-2-1-1. 試薬

2-(5-Amino-2methylanilino)-4-(3-pyridyl) pyrimidine (AMPP) (Tokyo Chemical Industry Co, Ltd. Tokyo, Japan)

HRP and TMB (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Binger , Ingelheim am Rhein , Germany)

2-2-1-2. Nilotinib 抗原の作製

Nilotinib 抗原の作製には、nilotinib の部分構造体である AMPP を用いた (Fig. 1)。Pyridine 0.5 mL の中に AMPP (10 mg, 36 μ mol) と succinic anhydride (3.6 mg, 36 μ mol) を溶解させて、60°Cで一晩反応させた。その後、溶媒を揮発させて残った反応物を DMF 100 μ L 及び 95% dioxane 2 mL 中に溶解し、EDC (13.8 mg, 72 μ mol) と NHS (8.3 mg, 72 μ mol) を加えて室温で2時間反応させた。得られた溶液を 0.1 M PB (pH7.0) 1 mL 中に溶かした BSA (20 mg) と室温で1時間反応させた。反応物を 1 mM の PBS 中で 48 時間連続して透析し、得られた AMPP-BSA 複合体を、nilotinib 抗原として使用した。

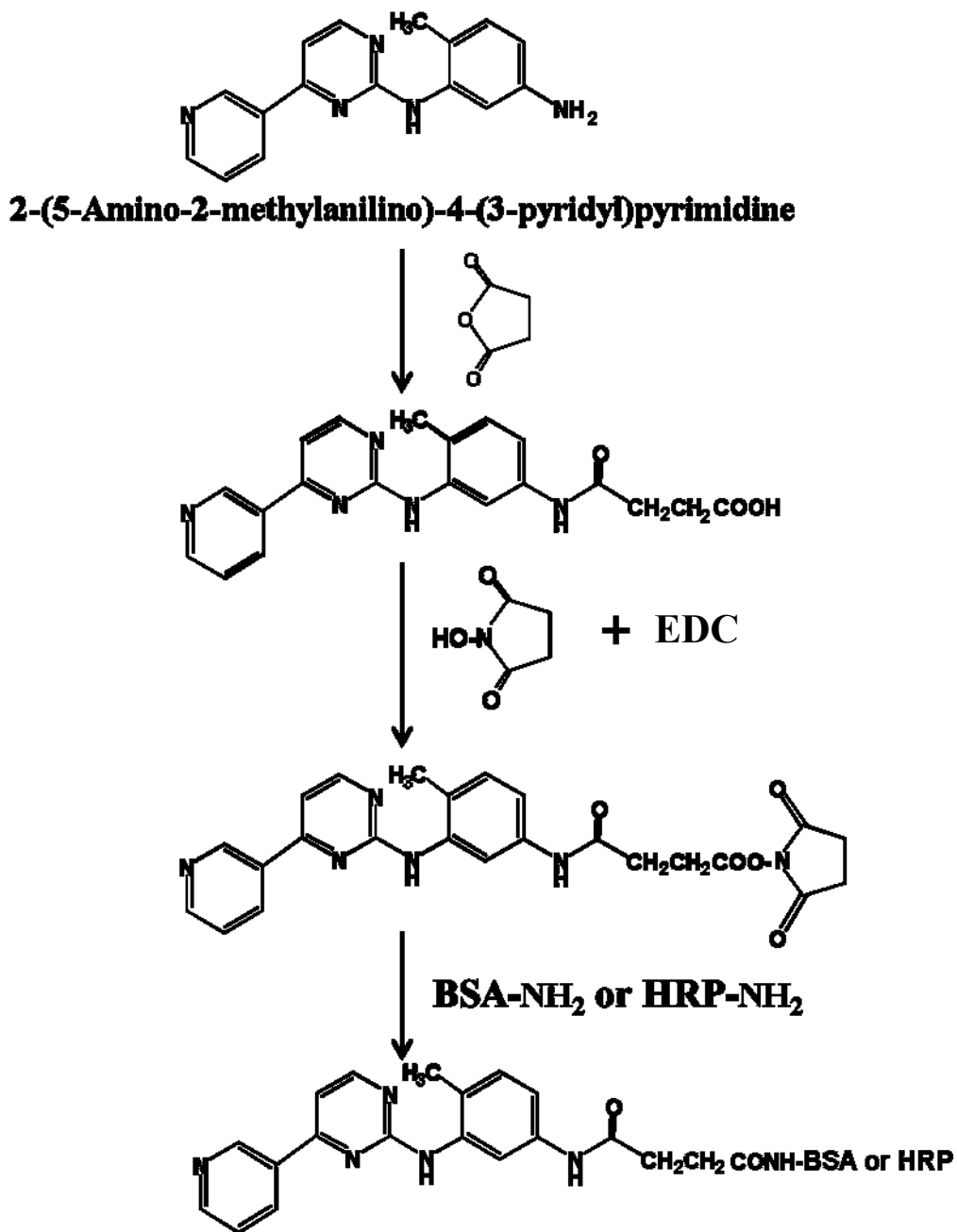


Fig. 1 Scheme for the preparation of immunogen and enzyme conjugate in the ELISA for nilotinib

2-2-1-3. 抗 Nilotinib 抗体の作製

作製した AMPP-BSA 複合体 (タンパク質量 0.5 mg) を等量の Freund's complete adjuvant と乳化し、成雌 BALB/c マウスの腹腔内に投与した。その後、2 週間ごとに 3 回、初回の半量で感作を繰り返した。最初の免疫から 10 週間後に採血し、得られた血清を 55°C で 30 分間非働化したものを抗 nilotinib 抗体として使用した。

2-2-1-4. Nilotinib 酵素標識体の作製

酵素標識体は、HRP を AMPP と結合させて作製した (Fig. 1)。Pyridine 0.5 mL 中に AMPP (5 mg, 18 μ mol) と succinic anhydride (1.8 mg, 18 μ mol) を溶解させて、60°C で一晩反応させた。その後、反応物を ethyl acetate で抽出し、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 1 mL に溶解し、EDC (8.0 mg, 36 μ mol) と NHS (4.15 mg, 36 μ mol) を加えて室温で 2 時間反応させた。反応溶液の 140 μ L を 0.1 M PB (pH 7.0) 0.5 mL 中に溶解した HRP (0.5 mg) と室温で 1 時間反応させた。反応後、Sephadex G-75 column を用いて精製し、得られた AMPP-HRP を nilotinib の酵素標識体として使用した。この複合体は、酵素活性を失うことなく、4°C で 6 ヶ月以上安定であった。

2-2-1-5. Nilotinib の ELISA

ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で 5000 倍希釈した抗 nilotinib 血清を 100 μ L 加えて 37°C で 1 時間放置することにより固相化した。次に 100 μ L の 1% skim milk を加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に既知濃度の nilotinib または検体 25 μ L と、0.1% BSA 含む PBS で 200 倍希釈した AMPP-HRP

75 μ L を加えて 37°C で 3 時間競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% DMSO、0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μ L 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、100 μ L の 2 M sulfuric acid を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer を用いた分光分析により 450 nm の発色強度を測定した。

2-2-1-6. 薬物動態の解析

一晩絶食後の成雄 Wistar ラット (体重 180~200 g) に methyl cellulose (0.5%, w/v water) 中に nilotinib を 4 mg/mL になるように溶解した溶液を nilotinib 量 20 mg/kg となるよう調整し経口投与した。投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 および 24 時間後に頸静脈から採血し、得られた血清を ELISA 用の血清検体とした。

2-2-2. 結果

2-2-2-1. Nilotinib の ELISA

至適条件を確立し、検量線を作成した。その結果、Fig. 2 に示すように、検量線の測定範囲は nilotinib 濃度 0.32~1000 ng/mL を示し、8~1000 ng/mL の範囲で直線性が得られた。Nilotinib の血漿中における有効治療濃度範囲は約 1123~1595 ng/mL であるため[36]、この ELISA は TDM および薬物動態研究において、十分な測定感度であった。

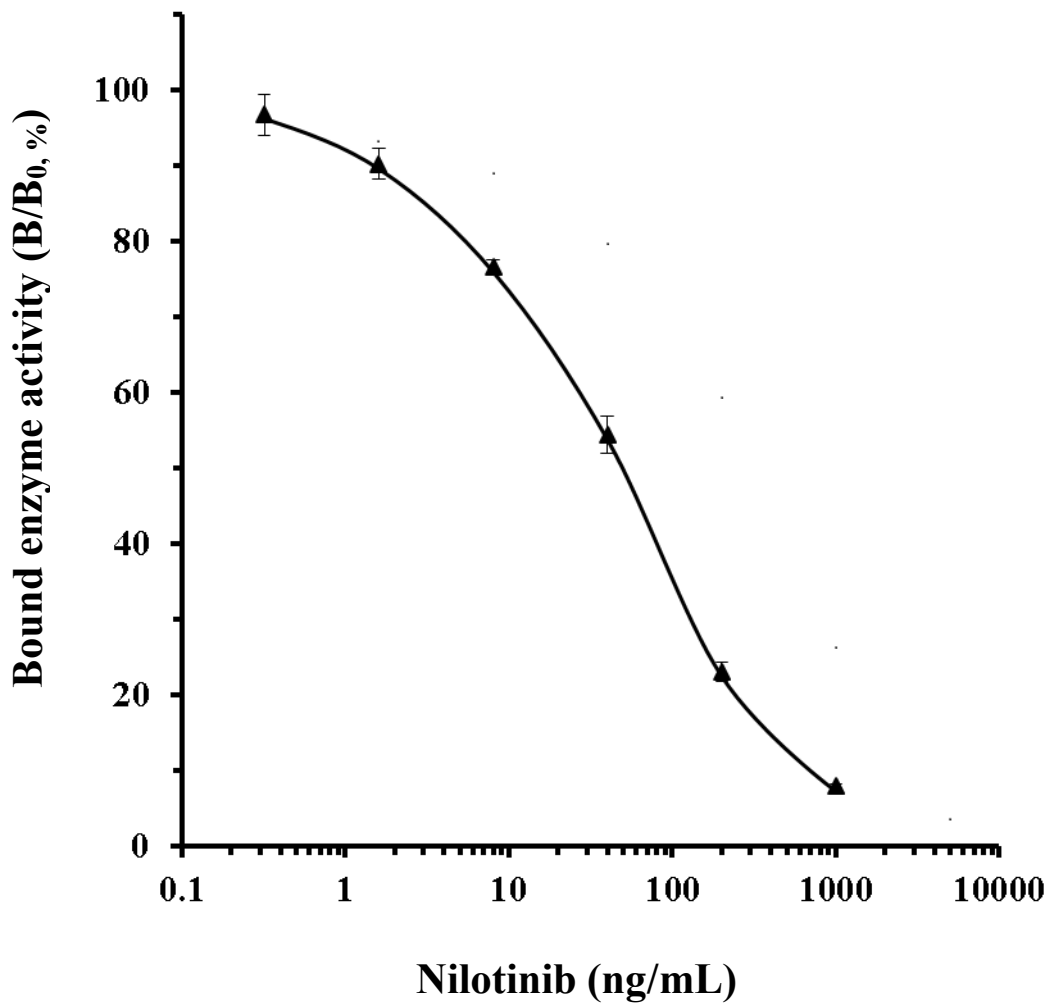


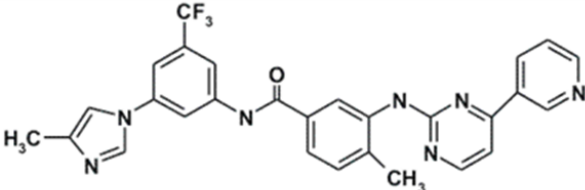
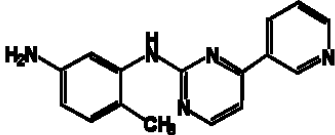
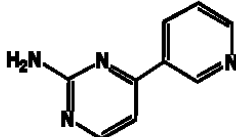
Fig. 2 Standard curves for nilotinib in human serum

The curves show the amount (%) of bound enzyme activity for various doses of each drug (B) as a ratio of that bound by HRP-labeled drug alone (B_0). Each point represents the mean \pm S.D. of 3 replicates.

2-2-2-2. 抗 Nilotinib 抗体の特異性

抗 nilotinib 抗体の特異性については、類似化合物を用いる交差反応試験により検討した。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な AMPP の濃度を比較する類似化合物のそれで除し、%として計算した。抗 nilotinib 抗体は nilotinib と 100.0%の交差反応性を示した。しかし、4-(3-pyridyl)-2-pyrimidineamine には、交差反応性を示さなかった (Table. 1)。

Table. 1 Specificity of anti-nilotinib antibody

Compounds	Cross-reactivity (%)
Nilotinib 	100.0
AMPP 	100.0
4-(3-Pyridyl)-2-pyrimidineamine 	< 0.1

2-2-2-3. 薬物動態の解析

単回投与後のラット血液中の薬物動態を解析した。経口投与された nilotinib は、直ちに吸収され、 T_{\max} は 6 時間で C_{\max} が 2300 ng/mL であった (Fig. 3)。

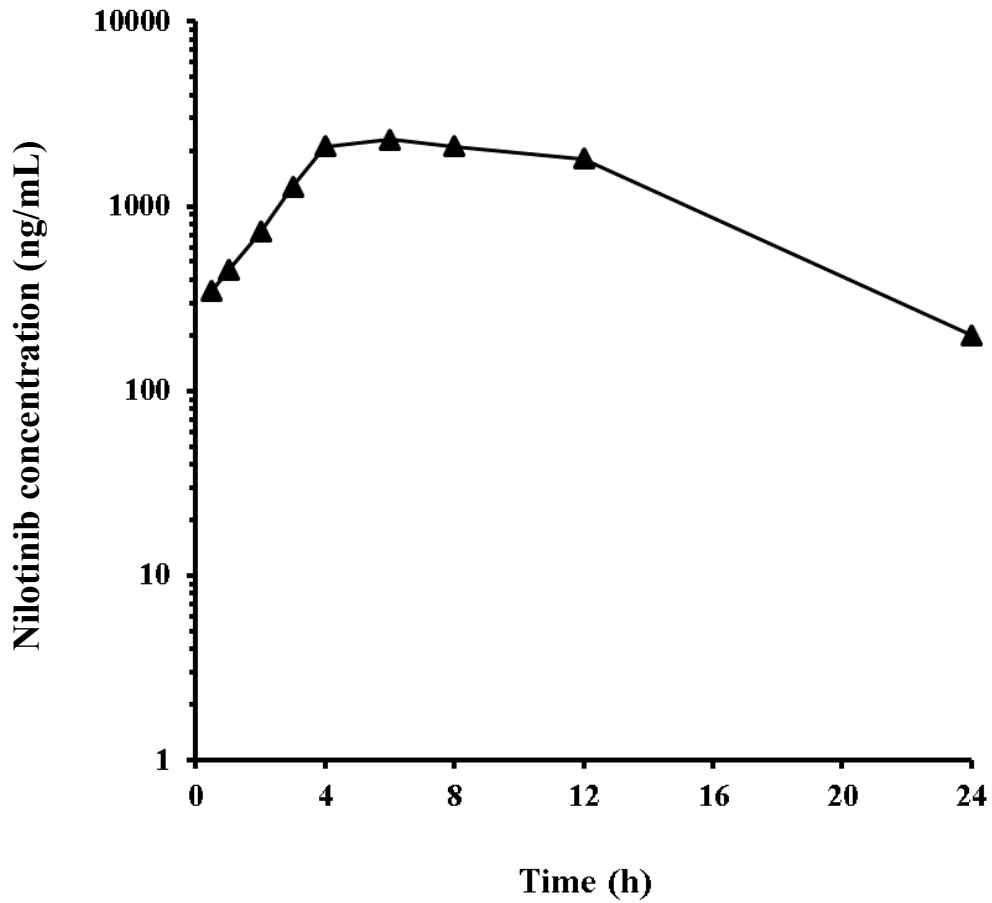


Fig. 3 Mean serum concentration–time profiles for nilotinib in rat following single oral administration of nilotinib (20 mg/kg)

The rat was injected of 20 mg/kg nilotinib. At each interval, blood samples were collected and serum levels of nilotinib was measured by the ELISA.

2-2-3. 考察

Nilotinib の吸収は、lapatinib 同様に食事の影響を受けることが知られており、食後に服用すると血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC) は増加する[37]。また、制酸剤と併用した場合、nilotinib の AUC は低下することが知られている[38]。また、Giles らは nilotinib のトラフ値と高ビリルビン血症との間に相関性があることを報告している[12]。したがって、nilotinib の TDM を行うことは、薬物相互作用または有害な副作用を経験した患者、用量の調整を必要とする患者のために重要である。本研究では、nilotinib に対する特異抗体を作製し、TDM に応用可能な competitive ELISA を開発することを目的とした。

Nilotinib に対する抗体を作製することが困難な理由の 1 つは、BSA などのキャリアタンパクと簡単に結合できるような官能基を持たないことである。したがって、ここでは官能基を有する nilotinib の部分構造体 (AMPP) を用いて nilotinib 抗原を作製した。具体的には、AMPP をキャリアタンパクのアミノ基とアミド結合させた。得られた抗原をマウスに免疫することにより、抗 nilotinib 抗体を得た。酵素標識体である AMPP-HRP 複合体も、抗原と同様の方法で作製した (Fig. 1)。

抗 nilotinib 抗体の特異性を検討した結果、抗 nilotinib 抗体がハプテンとして使用した AMPP のほぼ全体を認識し、nilotinib の構造に対して十分に特異的であった。Nilotinib は主に CYP3A4 によって代謝され、酸化体またはヒドロキシル化体となる[39]。これらの代謝物と抗 nilotinib 抗体との交差反応性はまだ確認できていないが、これらの代謝物の最大濃度は比較的 low、血漿中ではほとんど未変化体である[39]。したがって本 ELISA は、ヒトにおける nilotinib の動態研究を行う上で、十分に特異的であると考えられる。

結論として、nilotinib の部分構造体を用いて抗原を作製することによって、nilotinib に対する特異抗体の作製に成功し、本抗体を用いて nilotinib の TDM および薬物動態研究に応用可能な competitive ELISA を開発した。

第3節 Erlotinib の competitive ELISA の開発

2-3-1. 材料および方法

2-3-1-1. 試薬

Erlotinib Hydrochloride (TARCEVA) and *O*-desmethyl erlotinib (OSI-420) (AdooQ BioScience LLC Irvin, CA, U.S.A.)

Ethyl 3,4-bis (2-methoxyethoxy) benzoate (EBMB) (AK Scientific, Inc. Union City, CA, USA)

2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan)

HRP and TMB (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Binger , Ingelheim am Rhein , Germany)

2-3-1-2. Erlotinib 抗原の作製

Erlotinib 抗原の作製には、erlotinib の部分構造体である EBMB を用いた (Fig. 1)。1N Sodium hydroxide 0.5 mL 中に EBMB (10 mg, 33.5 μ mol) を加えてエステル部分を加水分解し、ethyl acetate で抽出を行った。その後、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 1 mL に溶解し、EDC (12.7 mg, 67 μ mol) と NHS (7.7 mg, 67 μ mol) を加えて室温で2時間反応させた。得られた溶液を 0.1 M PB (pH7.0) 1 mL 中に溶かした BSA (20 mg) と室温で1時間反応させた。反応物を 1 mM の PBS 中で 48 時間連続して透析し、得られた EBMB-BSA 複合体を、erlotinib 抗原として使用した。また、BSA に結合した EBMB の数を Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 法を用いて測定すると、BSA 1 mol に約 18.1 mol の EBMB が結合していることを確認した。

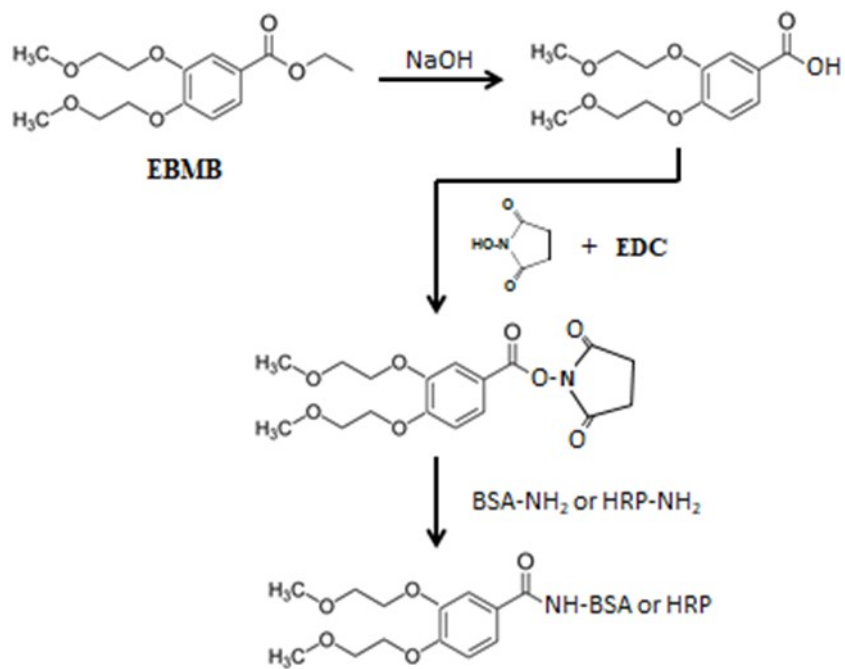


Fig. 1. Scheme showing the preparation of the immunogen and enzyme conjugate.

2-3-1-3. Erlotinib 抗体の作製

作製した EBMB-BSA 複合体 (タンパク質量 0.5 mg) を等量の Freund's complete adjuvant と乳化し、成雌 BALB/c マウスの腹腔内に投与した。その後、2 週間ごとに 3 回、初回の半量で感作を繰り返した。最初の免疫から 10 週間後に採血し、得られた血清を 55°C で 30 分間非働化したものを抗 erlotinib 抗体として使用した。

2-3-1-4. Erlotinib 酵素標識体の作製

酵素標識体は、HRP を EBMB と結合させて作製した (Fig. 1)。1N Sodium hydroxide 0.5 mL 中に EBMB (10 mg, 33.5 μ mol) を加えてエステル部分を加水分解し、ethyl acetate で抽出を行った。その後、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 1 mL に溶解し、EDC (12.7 mg, 67 μ mol) と NHS (7.7 mg, 67 μ mol) を加えて室温で 2 時間反応させた。反応溶液の 50 μ L を 0.1 M PB (pH 7.0) 0.5 mL 中に溶解した HRP (0.5 mg) と室温で 1 時間反応させた。反応後、Sephadex-G75 column を用いて精製し、得られた EBMB-HRP を erlotinib の酵素標識体として使用した。この複合体は酵素活性を失うことなく、4°C で 6 ヶ月以上安定であった。

2-3-1-5. ELISA

ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で希釈した抗 mouse-IgG (2 μ g/ml) を 100 μ L 加えて 37°C で 1 時間放置することにより固相化した。次に 1% skim milk 含む 2000 倍希釈した抗 erlotinib 血清 100 μ L を加えて、37°C で 30 分間反応させた。Well に既知濃度 erlotinib または 検体 50 μ L と、0.1% BSA 含む PBS

で20倍希釈した EBMB-HRP 50 μ L を加えて4 $^{\circ}$ Cで一晩競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% DMSO、0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間酵素反応させた。反応終了後、の 2 M sulfuric acid 100 μ L を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer を用いた分光分析により 450 nm の発色強度を測定した。

2-3-1-6. 薬物動態の解析

一晩絶食後の成雌 BALB/c マウス (体重 25~30 g) に methyl cellulose (0.5%, w/v water) 中に erlotinib を 6 mg/mL になるように溶解した溶液を erlotinib 量 30 mg/kg となるよう調整し経口投与した。投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 および 24 時間後に尾静脈から採血し、ELISA 用の血液検体とした。

2-3-2. 結果

2-3-2-1. Erlotinib の ELISA

至適条件を確立し、検量線を作成した。その結果、Fig. 2 に示すように、検量線の測定範囲は erlotinib 濃度 8~25000 ng/mL を示し、40~5000 ng/mL の範囲で直線性が得られた。この濃度範囲で 5 回測定したときの日内変動は 1.9~9.2%、日差変動は 2.3~7.3% であり、精度、真度ともに満足しうるものであった (Table 1)。Erlotinib の血漿中における有効治療濃度範囲は約 600~2500 ng/mL であるため[40]、この ELISA は TDM および薬物動態研究において、十分な測定感度であった。

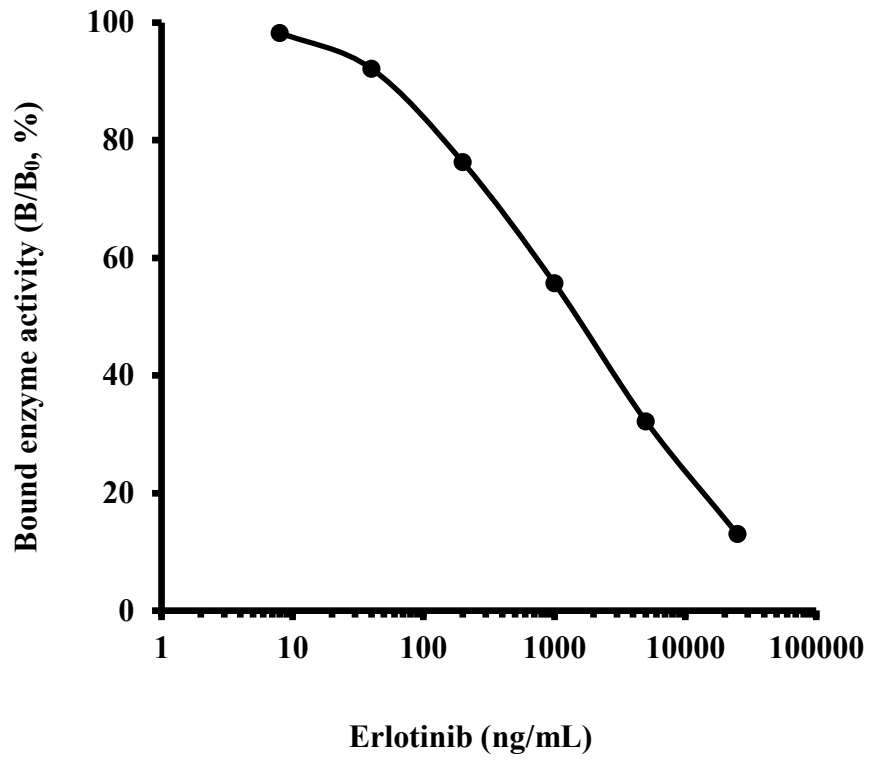


Fig. 2 Standard curve of the developed ELISA for erlotinib in human serum

The curve shows the bound enzyme activity (%) for various doses of erlotinib (B) as a ratio to that bound using erlotinib-HRP alone (B₀). Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 1 Recoveries of erlotinib from human serum and precision of ELISA for erlotinib

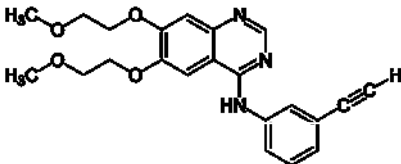
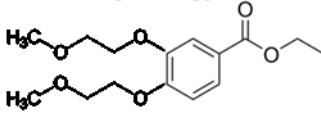
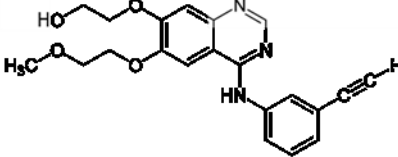
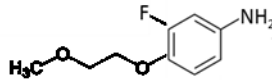
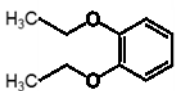
	Added (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)	C.V. (%)
Intra-assay	40.0	42.2 ± 3.9	105.5	9.2
	200.0	197.6 ± 10.2	98.8	5.2
	1000.0	979.0 ± 25.7	97.9	2.6
	5000.0	4922.0 ± 95.5	98.4	1.9
Inter-assay	40.0	43.1 ± 1.8	107.5	4.2
	200.0	194.6 ± 14.3	97.3	7.3
	1000.0	966.4 ± 23.6	96.6	2.4
	5000.0	4964.4 ± 114.5	99.2	2.3

Values represent the mean ± S.D. (n = 5).

2-3-2-2. 抗 Erlotinib 抗体の特異性

抗 erlotinib 抗体の特異性については、類似化合物を用いる交差反応試験により検討した。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な erlotinib の濃度を比較する類似化合物のそれで除し、%として計算した。抗 erlotinib 抗体は EBMB とは 100%の交差反応性を示し、主要代謝物である *O*-desmethyl erlotinib とは 6.7%、3-fluoro-4-(2-methoxyethoxy)aniline とは 1.3%、1,2-diethoxybenzene とは 0.8%の交差反応性を示した (Table. 2)。これらのことから、本抗体は、ハプテン抗原として用いた EBMB のほぼ全体の構造を認識しており、erlotinib の構造に非常に特異的であることが示唆された。加えて、エピトープ間の距離は、およそ 8.5Å であると推測された (Fig. 3)。

Table 2 Percent cross-reactivity of metabolite and analogs measured by ELISA

Compounds	Cross-reactivity (%)
Erlotinib 	100.0
Ethyl 3,4-bis(3-methoxyethoxy) benzoate 	100.0
O-Desmethyl erlotinib 	6.7
3-Fluoro-4-(2-methoxyethoxy)aniline 	1.3
1,2-Diethoxybenzene 	0.8

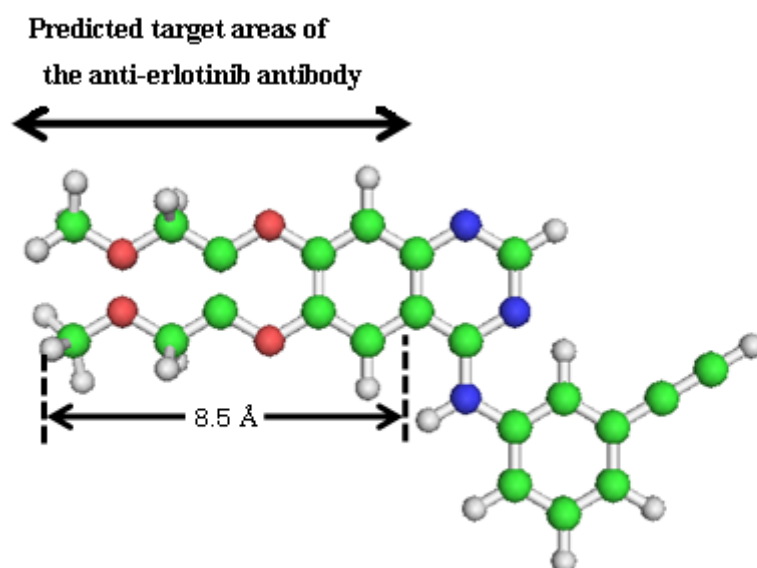


Fig. 3 The predicted target areas of the anti-erlotinib antibody.
The length of epitope was approximately 8.5 Å

2-3-2-3. 薬物動態の解析

単回投与後のマウス血液中の薬物動態を解析した。経口投与された erlotinib は、直ちに吸収され、 T_{\max} は 1 時間で C_{\max} が 2987 ng/mL であった (Fig. 3)。

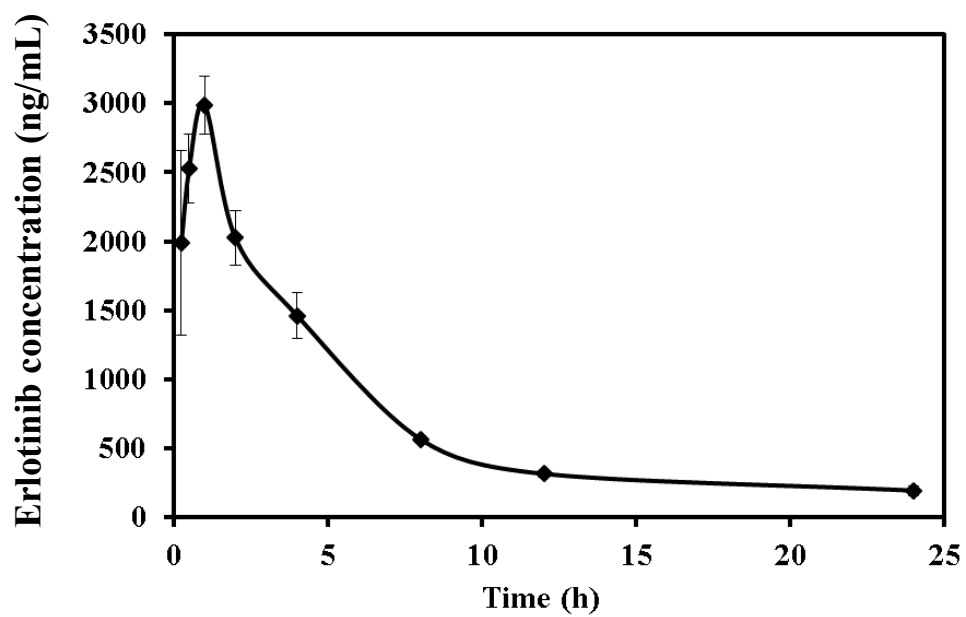


Fig. 4. Blood erlotinib levels in mice after a single oral administration of erlotinib

Three mice weighing 25–31 g were injected with 30 mg/kg erlotinib. At each interval, blood was collected and the levels of erlotinib were measured by ELISA. Each point represents the mean \pm S. D. (n=3).

2-3-3. 考察

ヒトでは *O*-desmethyl erlotinib が erlotinib の主要代謝物として知られている[41]。長期反復投与時の *O*-desmethyl erlotinib の血清濃度は erlotinib の約 10%で推移することが報告されている[41]。したがって、ヒトの血清中の erlotinib 濃度を正確に測定するためには、*O*-desmethyl erlotinib とは交差反応を示さない抗 erlotinib 抗体を作製する必要がある。すなわち、erlotinib に対する抗体は、erlotinib が主に代謝される構造部位である bis(2-methoxyethoxy)基を特異的に強く認識しなくてはならない。抗体は、一般にハプテン抗原の構造において、キャリアタンパクから一番離れた範囲を特異的に認識すると言われている[42, 43]。したがって、erlotinib の抗原を作製するときは、タンパク結合部位から最も離れた位置に bis(2-methoxyethoxy)基が配置されるよう考慮しなければならない。しかし、erlotinib はキャリアタンパクと簡単に結合できるような官能基を持っていない。したがって、ここでは官能基を有する erlotinib の部分構造体 (EBMB) を用いて erlotinib 抗原を作製した。具体的には、EBMB をキャリアタンパクのアミノ基とアミド結合させ、得られた抗原をマウスに免疫することにより、抗 erlotinib 抗体を得た。酵素標識体である EBMB-HRP 複合体も、抗原と同様の方法で作製した (Fig. 1)。

抗 erlotinib 抗体の特異性を検討した結果、抗 erlotinib 抗体は、erlotinib に対して高い特異性を示したが、主要代謝物である *O*-desmethyl erlotinib や他の類似体とはほとんど反応性を示さなかった。これらより、本抗体はハプテンとして使用した EBMB のほぼ全体を認識し、erlotinib の構造に対して十分特異的であることを示唆した。したがって本 ELISA は、ヒトにおける erlotinib の動態研究を行う上で、十分に特異的であると考えられる。

結論として、erlotinib の部分構造体を用いて抗原を作製することによって、erlotinib に対する特異抗体の作製に成功し、本抗体を用いて erlotinib の TDM および薬物動態研究における貴重なツールとなる competitive ELISA を開発した。

第4節 Sorafenib の Competitive ELISA の開発

2-4-1. 材料および方法

2-4-1-1. 試薬

Sorafenib and sorafenib *N*-oxide (Toronto Research Chemicals Inc. North York, ON, Canada)

4-(4-Aminophenoxy)-*N*-methyl-2-pyridinecarboxamide (AMPC) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Tokyo, Japan)

HRP and TMB (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Binger , Ingelheim am Rhein , Germany)

2-4-1-2. Sorafenib の抗原の作製

Sorafenib 抗原の作製には、sorafenib の部分構造体である AMPC を用いた (Fig. 1)。Pyridine 0.5 mL の中に AMPC (10 mg, 41 μ mol) と succinic anhydride (4.1 mg, 41 μ mol) を溶解させて、60°Cで一晩反応させた。その後、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 0.5 mL に溶解し、EDC (12.5 mg, 65 μ mol) と NHS (7.5 mg, 65 μ mol) を加えて室温で 2 時間反応させた。得られた溶液を 0.1 M PB (pH 7.0) 1 mL 中に溶かした BSA (20 mg) と室温で 1 時間反応させた。反応物を 1 mM の PBS 中で 48 時間連続して透析し、得られた AMPC-BSA 複合体を、sorafenib 抗原として使用した。また、BSA に結合した AMPC の数を TNBS 法で測定すると、BSA 1 mol に約 20 mol の AMPC が結合していることを確認した。

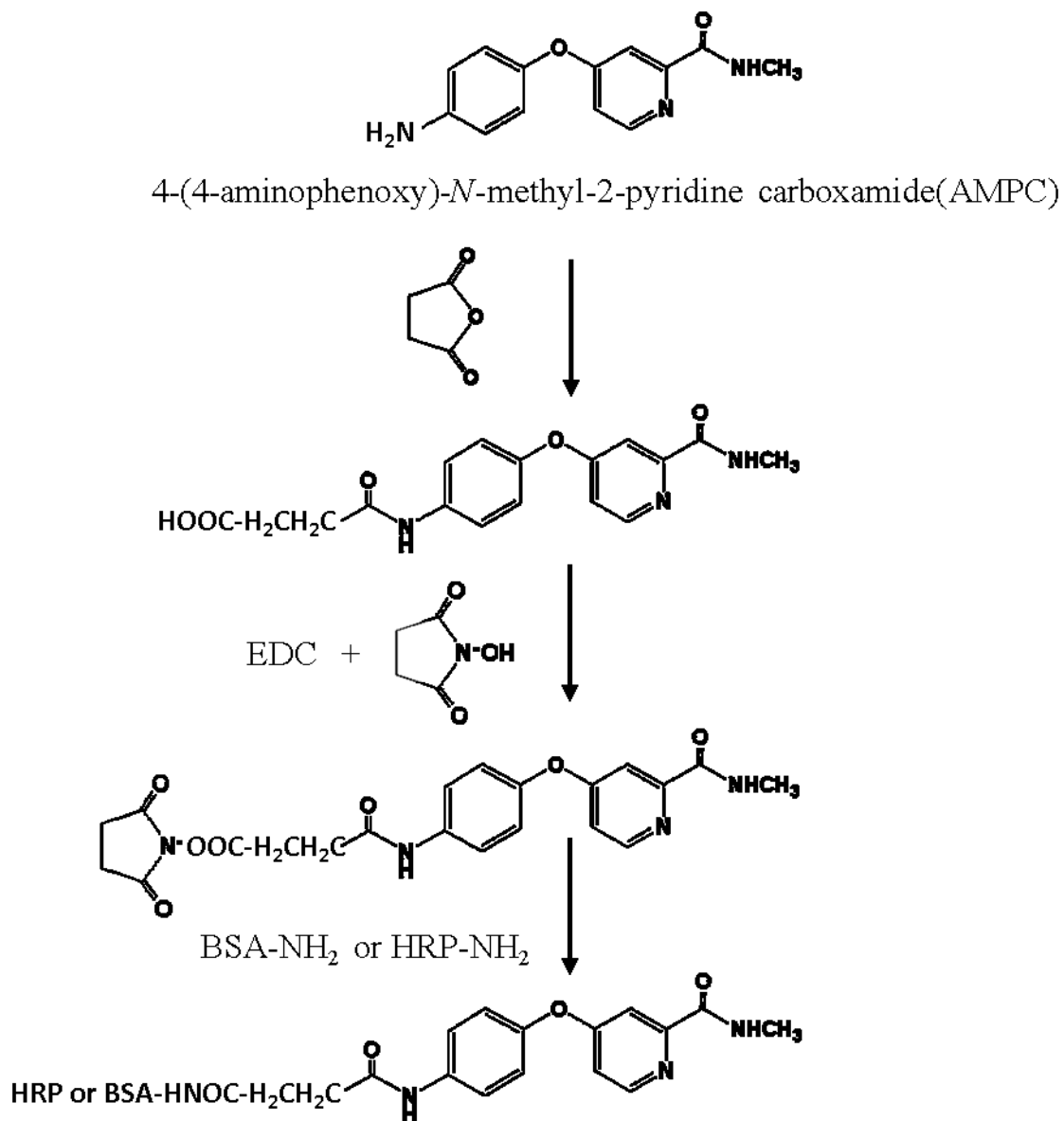


Fig.1 Scheme showing the preparation of the immunogen and enzyme conjugate in ELISA for sorafenib

2-4-1-3. 抗 Sorafenib 抗体 の 作 製

作製した AMPP-BSA 複合体 (タンパク質量 0.5 mg) を等量の Freund's complete adjuvant と乳化し、成雌 BALB/c マウスの腹腔内に投与した。その後、2 週間ごとに 3 回、初回の半量で感作を繰り返した。最初の免疫から 10 週間後に採血し、得られた血清を 55°C で 30 分間非働化したものを抗 sorafenib 抗体として使用した。

2-4-1-4. Sorafenib 酵素標識体の作製

酵素標識体は、HRP を AMPC と結合させて作製した (Fig. 1)。Pyridine 0.5 mL 中に AMPC (10 mg, 41 μ mol) と succinic anhydride (4.1 mg, 41 μ mol) を溶解させて、60°C で一晩反応させた。その後、反応物を ethyl acetate で抽出し、溶媒を揮発させて残った反応物を 95% dioxane 0.5 mL に溶解し、EDC (12.5 mg, 65 μ mol) と NHS (7.5 mg, 65 μ mol) を加えて室温で 2 時間反応させた。反応溶液の 30 μ L を 0.1 M PB (pH 7.0) 1 mL 中に溶解した HRP (0.5 mg) と室温で 1 時間反応させた。反応後、Sephadex G-75 column を用いて精製し、得られた AMPC-HRP を sorafenib の酵素標識体として使用した。この得られた複合体は、酵素活性を失うことなく、4°C で 6 ヶ月安定であった。

2-4-1-5. Sorafenib 血清検体の調整

Sorafenib 検体 10 μ L に DMSO 20 μ L を加えて、タンパク質を沈殿させた後に遠心分離し、上清を 1 mM ethylenediaminetetraacetate acid (EDTA)、0.5% β -cyclodextrin、0.1% BSA 含む 0.2 M Tris buffer で希釈して ELISA で使用した。

2-4-1-6. Sorafenib の ELISA

ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で 5000 倍希釈した抗 sorafenib 血清を 100 μ L 加えて 37°C で 1 時間放置することにより固相化した。次に 1% skim milk 100 μ L を加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に既知濃度 sorafenib または 検体 50 μ L と、1 mM EDTA、0.5% β -cyclodextrin、0.1% BSA 含む 0.2 M Tris buffer で 100 倍希釈した AMPP-HRP 50 μ L を加えて 4°C で一晩競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% DMSO、0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μ L 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、の 2 M sulfuric acid 100 μ L を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer を用いた分光分析により 450 nm の発色強度を測定した。

2-4-1-7. HPLC 法

Sorafenib の HPLC 法は、Noda らの方法に従って行った[30]。

2-4-2. 結果

2-4-2-1. Sorafenib の ELISA

至適条件を確立し、検量線を作成した。検量線の測定範囲は buffer 中において 0.16~500 ng/mL、血清中において 4~12500 ng/mL を示した (Fig. 2)。血清中において測定感度が低下したため、血清検体を徐タンパク処理した。その結果、Fig. 3 に示すように、検量線の測定範囲は sorafenib 濃度 8~25000 ng/mL を示し、40~5000 ng/mL の範囲で直線性が得られた。この濃度範囲で 5 回測定したときの日内変動は 5.0~9.5%、日差変動は 4.9~9.7%であり、精度、真度ともに満足しうるものであった (Table 1)。Sorafenib の血漿中における有効治療濃度範囲は約 2000~9000 ng/mL であるため[44]、この ELISA は TDM および薬物動態研究において、十分な測定感度であった。

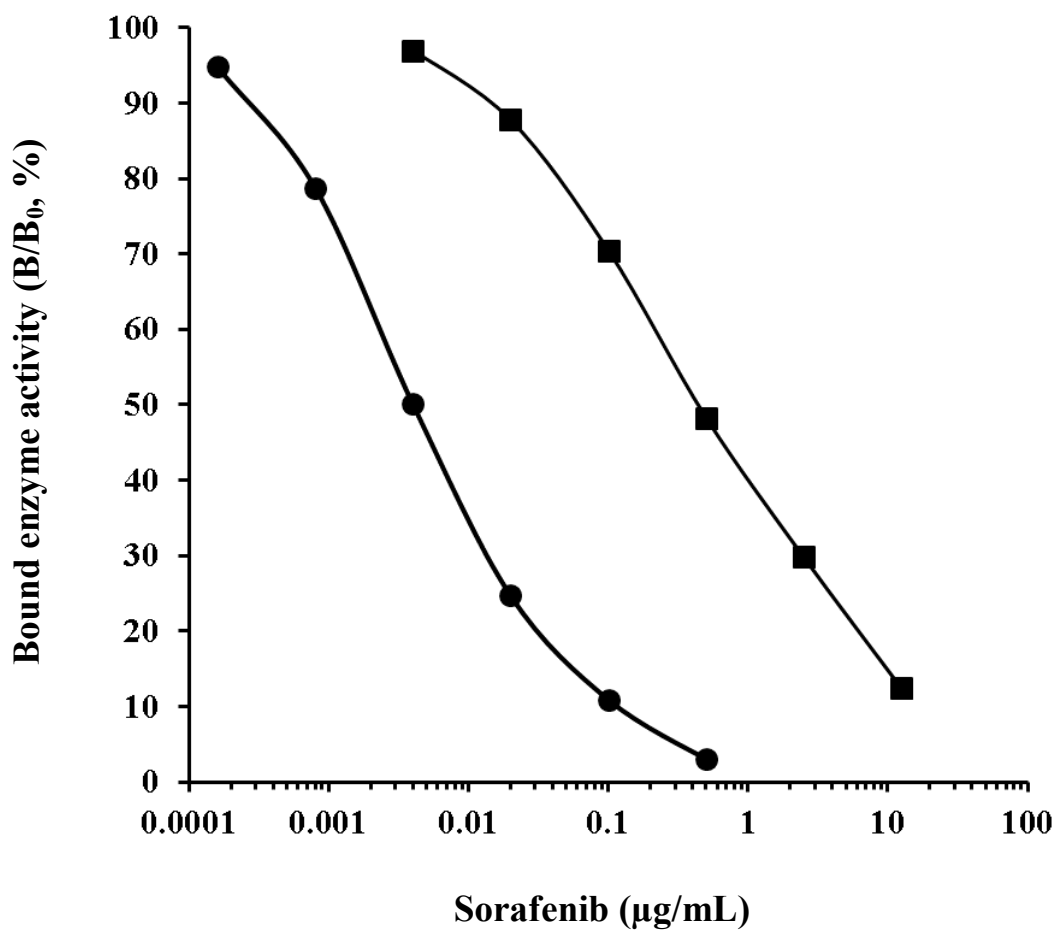


Fig.2 Standard curve for sorafenib in buffer and human serum

The curve shows the ratio (%) of bound enzyme activity for various doses of sorafenib (B) to that using sorafenib–HRP alone (B_0). Buffer: ●, human serum: ■.

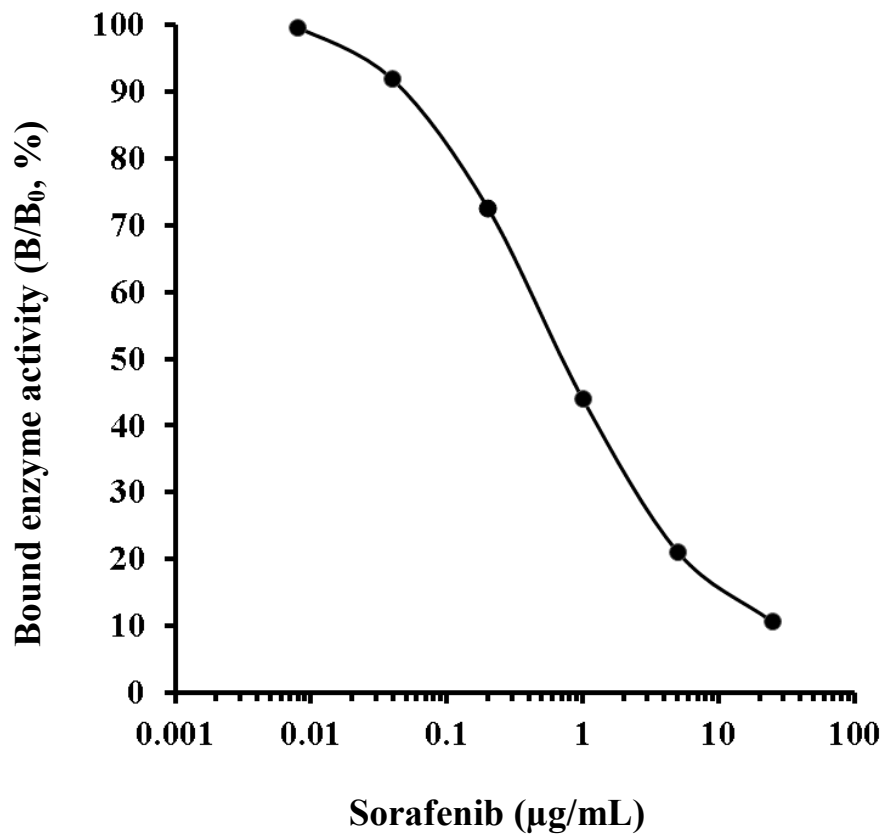


Fig. 3 Standard curve for sorafenib in deproteinized human serum

The curve shows the ratio (%) of bound enzyme activity for various doses of sorafenib (B) to that using sorafenib–HRP (B_0). The curve was essentially linear on a semilogarithmic plot between 0.008 and 25 $\mu\text{g/mL}$. Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3$).

Table 1. Precision and Recovery of ELISA for Sorafenib in Human Serum

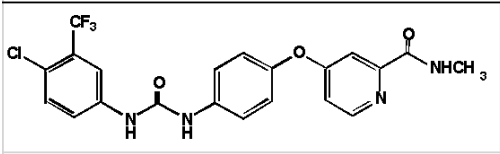
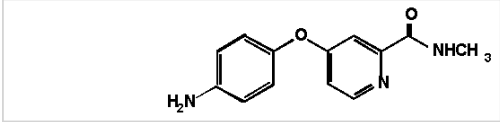
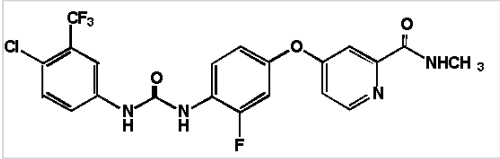
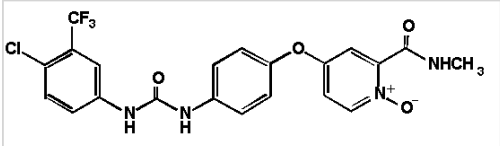
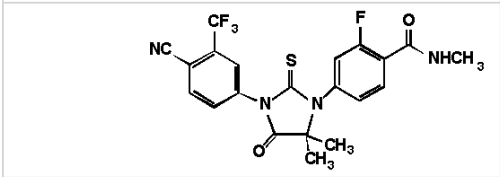
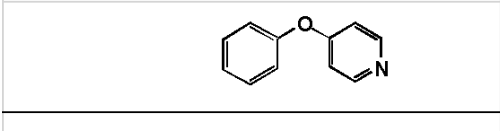
	Added ($\mu\text{g/mL}$)	Estimated ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	C.V. (%)
Intra-assay	0.04	0.0378 \pm 0.003	94.5	7.9
	0.2	0.197 \pm 0.016	98.5	8.1
	1.0	1.028 \pm 0.0511	102.8	5.0
	5.0	5.14 \pm 0.4883	102.8	9.5
Inter-assay	0.04	0.0396 \pm 0.0024	99.0	6.1
	0.2	0.1904 \pm 0.0107	95.2	5.6
	1.0	1.0216 \pm 0.0988	102.2	9.7
	5.0	4.988 \pm 0.2445	99.8	4.9

Values represent the mean \pm S.D. of 5 experiments.

2-4-2-2. 抗 sorafenib 抗体の特異性

抗 sorafenib 抗体の特異性については、類似化合物を用いる交差反応試験により検討した。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な sorafenib の濃度を比較する類似化合物のそれで除し、%として計算した。抗 sorafenib 抗体は AMPC とは 100%の交差反応性を示し、regorafenib で 83.3%、主要代謝物である sorafenib-*N*-oxide で 2.5%、enzalutamide で 0.44%であったが 4-phenoxyridine とは交差反応性を示さなかった (Table.2)。

Table. 2 Specificity of Anti-Sorafenib Antibody

Compounds		% Cross-reaction (50%)
 <p>The structure shows Sorafenib, which consists of a central benzimidazole core. One benzimidazole ring is substituted with a chlorine atom and a trifluoromethyl group. The other benzimidazole ring is substituted with a methanesulfonyl group. The two benzimidazole rings are linked via a para-substituted ether bridge.</p>	Sorafenib	100.0
 <p>The structure shows AMPC (4-amino-2-methyl-5-(4-aminophenoxy)pyridine-3-carboxamide), which is a pyridine ring substituted with an amino group at the 4-position, a methanesulfonyl group at the 2-position, and a 4-aminophenoxy group at the 5-position.</p>	AMPC	100.0
 <p>The structure shows Regorafenib, which is similar to Sorafenib but has a fluorine atom at the 4-position of the central benzimidazole ring.</p>	Regorafenib	83.3
 <p>The structure shows Sorafenib N-oxide, where the nitrogen atom of the pyridine ring in Sorafenib is oxidized to an N-oxide group.</p>	Sorafenib <i>N</i> -oxide	2.5
 <p>The structure shows Enzalutamide, which features a central thiazolidine ring. One nitrogen of the thiazolidine is substituted with a 4-cyano-2-(trifluoromethyl)phenyl group, and the other is substituted with a 4-(methanesulfonylamino)phenyl group. The thiazolidine ring also has a methyl group and a carbonyl group.</p>	Enzalutamide	0.44
 <p>The structure shows 4-phenoxy pyridine, which is a pyridine ring substituted with a phenoxy group at the 4-position.</p>	4-Phenoxy pyridine	<0.01

2-4-2-3. ELISA と HPLC の相関

32 人の sorafenib 服用患者の血清検体を用いて ELISA と HPLC で測定し、濃度比較を行った (Fig. 4)。回帰直線 $Y(\text{HPLC}) = 1.016X(\text{ELISA}) - 0.137$ 、相関係数は 0.979 (n = 32) で両測定値に良好な相関性が確認された。

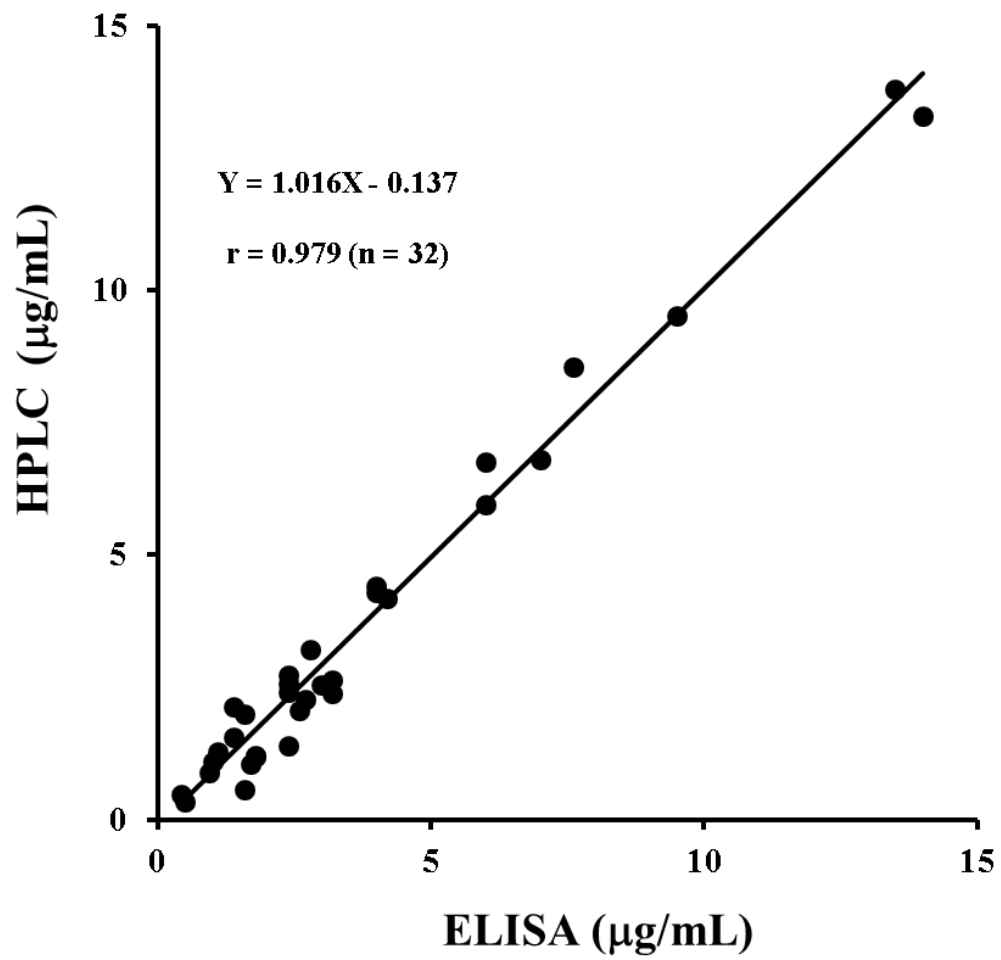


Fig. 4 Correlation between serum sorafenib concentrations of patients determined by the present ELISA and HPLC methods

考察

Sorafenib-*N*-oxide は、sorafenib が CYP3A4 によって代謝される主要な代謝物であり、sorafenib と同様の作用を有する[28]。いくつかの臨床試験において、血漿中で sorafenib は約 70~85%、sorafenib-*N*-oxide は約 9~17%を占めている[28]。したがって、sorafenib を特異的に測定できる ELISA を開発するには、sorafenib-*N*-oxide と交差反応を示さない抗 sorafenib 抗体を作製しなければならない。一般に、ハプテンに対する抗体の特異性は、キャリアタンパクとの結合部位から最も離れた部位を認識する特性を持つ[42, 43]。したがって、sorafenib の *N*-methyl-2-pyridinecarboxamide 部分を特異的に認識する抗体を作製するために、sorafenib の部分構造体 (AMPC) を用いて抗原を作製した。具体的には、AMPC をキャリアタンパクのアミノ基とアミド結合させ、得られた抗原をマウスに免疫することにより、抗 sorafenib 抗体を得た (Fig. 1)。酵素標識体である AMPC-HRP 複合体も、抗原と同様の方法で作製した (Fig. 1)。

Sorafenib の測定感度は、正常ヒト血清 (50 μ L) を加えることによって低下した。この結果は、ELISA の測定に影響するなんらかの血清タンパクの存在が示唆された。血清タンパク質は、様々な病的状態によって変動することが一般的に周知されている。したがって、血清タンパク質による影響を除くために、血清試料を DMSO によって除タンパクした。ヒト血清を除タンパクして得られた sorafenib の検量線は、40~5000 ng/mL の範囲において直線性が得られた。臨床での sorafenib 血漿中濃度の範囲は、約 2000~9000 ng/mL である[44]。したがって、この ELISA は TDM および薬物動態研究において、sorafenib を定量するのに十分な測定感度であった。抗体の特異性は、交差反応性の結果より抗体が AMPC のほぼ全体を認識しており、sorafenib に対して十分特異的であることを

示唆した。長期治療中、主要代謝物である sorafenib-*N*-Oxide は血漿中に約 9～17%の割合で存在するが[28]、抗体の特異性から判断して、sorafenib-*N*-Oxide が測定に影響する可能性が低いことが示唆された。また、sorafenib は、uridine diphosphate glucuronosyl transferase (UGT1A9) 経路によってグルクロン抱合される[45]。尿中において、sorafenib のほとんどが未変化体と代謝物のグルクロン酸抱合体として排泄される。これらのグルクロン酸代謝物との交差反応性はまだ確認できていないが、抗 sorafenib 抗体の特異性から判断すると、sorafenib と同様の交差反応性を示すと推測される。ELISA と HPLC によって血清検体における濃度比較を行った結果、相関係数は 0.979 (n = 32) となり 2 つの方法の間で、両測定値に良好な相関性が見られた。したがって本 ELISA は、ヒトにおける sorafenib の動態研究を行う上で、十分に特異的であると考えられる。

結論として、sorafenib の部分構造体を用いて抗原を作製することによって、sorafenib に対する特異抗体の作製に成功し、本抗体を用いて sorafenib の TDM および薬物動態研究における貴重なツールとなる competitive ELISA を開発した。

第3章 がん分子標的治療薬 imatinib の sandwich ELISA の開発

緒言

薬物の血中濃度を測定し、そのデータについて臨床薬物動態学的な検討を行って、患者個人別に投与量を調整する therapeutic drug monitoring (TDM) が行われている。TDM が広く行われるようになったことは、分析化学の進歩によって血中の低濃度の薬物を容易に定量できるようになったことが大きく寄与している。特に、抗体を用いる免疫測定法は、簡易かつ迅速な測定法として、一般に広く利用されている。免疫測定法の原理は、競合型と非競合型に大別される。現在タンパク質などの高分子化合物の場合サンドイッチ法と呼ばれる2種類の抗体を使う方法で測定されている。サンドイッチ法は、抗原に同時に結合できる2種類の抗体を用意する必要があるが、その高い特異性と感度から好んで使われている。しかし、分子量1000以下の低分子薬物は小さすぎて2種類の抗体でサンドイッチすることが難しいため、通常競合法で測定されている。すなわちエピトープが一つしかない単価抗原であるため、低分子薬剤は通常競合法でしか測定できない。低分子薬物の免疫測定法を開発するためには、その薬剤の代謝物と交差反応性を示さない特異抗体を作製する必要がある。しかしながら、多種多様に代謝される薬物において、1つの抗体では、その薬物のすべての代謝物の影響を取り除くことができないため、TDM に応用可能な免疫測定法を開発することが不可能な場合がある。もし、多種多様に代謝される薬物において、その薬物のほぼ全ての構造部分を同時に結合できる2種類の抗体を作製することができれば、薬物がどのように代謝されたとしても、その代謝物の影響を受けない超特異的な sandwich ELISA の開発が可能となると考えられ

る。それゆえ最近になって、分子量 1000 以下の低分子薬物においても sandwich ELISA の開発が試みられている。

2005 年に anti-metatype antibody を用いた sandwich ELISA が開発され、分子量 781 の digoxin が測定されている[46-48]。しかし、anti-metatype antibody は、抗原結合状態の抗体のみを認識する抗体であるため、調整が極めて難しく、応用例は今のところ限られている。一方、特殊な抗体ではなく 2 種類の抗薬物抗体を用いた tacrolimus（分子量：804）の sandwich ELISA が開発され、分子量 1000 以下であっても 2 種類の抗体でサンドイッチできることが報告されている[49]。さらに、分子量わずか 580 の naringin においても、sandwich ELISA の開発が可能であることが報告されている[50]。それゆえ、我々は、分子量 494 である imatinib（Fig. 1）に対する sandwich ELISA の開発を試みた。

Imatinib は、慢性骨髄性白血病の治療を劇的に改善し、臨床の場で広く使用されている[51-53]。作用機序として、bcr-Abl タンパクのチロシンキナーゼ活性を阻害し、増殖シグナルの伝達を遮断することによって、がん細胞の増殖を抑制する。また、imatinib の治療効果は、血漿中のトラフ値と相関し[2, 54]、体内動態の個体間変動が大きいことでも知られている[55, 56]。さらに、主要代謝物である *N*-desmethylinatinib や pyridine-*N*-oxideimatinib のように様々な部位が代謝されることから、競合法での測定は困難であると考えられる。そこで、今回、imatinib の部分構造体である MPMB と AMPP を用いて 2 種類の特異抗体を作製し、この 2 つの抗体を用いて sandwich ELISA の開発を行った。

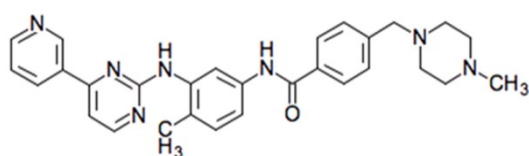


Fig. 1 Chemical structure of imatinib

3-1. 材料および方法

3-1-1. 試薬

Imatinib mesylate (LKT Laboratories, Inc. Phalen Blvd, St.Paul, MN)

N-Desmethyl imatinib (TLC Pharmachem, Inc. Aurora, Ontario, Canada)

Imatinib (pyridine) *N*-oxide(Toronto Research Chemicals Inc. North York, ON, Canada)

4-{(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl}-benzoic acid dihydrochloride (MPMB) and 2-(5-amino-2-methylanilino)-4-(3-pyridyl) pyrimidine (AMPP) (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. Tokyo, Japan)

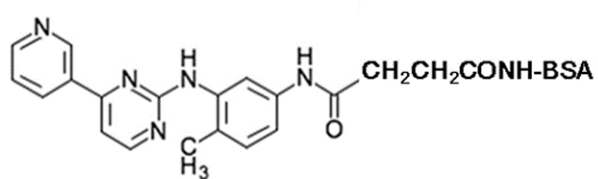
Histofine® Simple Stain Mouse MAX-PO (Nichirei BioScience Inc. Co. Ltd. Tokyo, Japan)

3,3,5,5-Tetramethylbenzidine (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH. Binger, Ingelheim am Rhein , Germany)

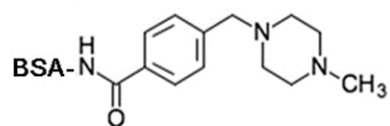
EAH sepharose 4B gel (GE Healthcare. Bjorkgatan ,Uppsala, Sweden)

3-1-2. 抗 MPMB 抗体と抗 AMPP 抗体の作製

抗 MPMB 抗体については、Saita らが報告した方法[57]で作製した抗原 (Fig. 1) をウサギに免疫し、抗 MPMB-IgG 分画を得た。抗 AMPP 抗体については、第 2 章で作製した抗原 (Fig. 2) をマウスに免疫し、得られた抗 AMPP 血清を抗 AMPP 抗体として使用した。



AMPP-BSA conjugate



MPMB-BSA conjugate

Fig. 1 Chemical structure of the two immunogens for imatinib

3-1-3. MPMB-IgG の affinity 精製

MPMB (10 mg, 32.5 μmol) を 95% dioxane 1 ml 中に溶解させ、EDC (14 mg, 72 μmol) と NHS (8 mg, 70 μmol) を加えて、室温で 2 時間反応させた。その後、0.1 M PB (pH 7.0) 4 mL に溶解した EHA sephalose 4B gel 2 mL と室温で 1 時間反応させた。得られた gel を洗浄し、MPMB affinity column を作製した。続いて、抗 MPMB 抗体 5 mg/mL を affinity column に流して吸着させた。Column を洗浄後、0.1 M glycine (pH 2.7) 3 ml を column に流し、溶出液を 1 M Tris (pH 9.0) 300 μL 中に加えて、得られた溶液を抗 MPMB 抗体として使用した。

3-1-4. Imatinib に対する 2 種類の competitive ELISA

ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。具体的な方法については、Saita らが報告した[57, 58]に従って行った。

3-1-5. Imatinib の sandwich ELISA

Sandwich ELISA の原理については (Fig. 2) に記載し、以下の手順で行った。Microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で希釈した抗 MPMB 抗体 (2 $\mu\text{g/mL}$) を 100 μL 加えて 37°C で 1 時間放置することにより固相化した。次に 100 μL の 1% skim milk を加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に 100 μL の imatinib 検体を加えて 37°C で 90 分間反応させた。反応後、10000 倍希釈した抗 AMPP 抗体を加えて 37°C で 90 分間反応させ、続いて 1000 倍希釈した simple stain を加えて 37°C で 60 分間反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% dimethyl sulfoxide (DMSO)、0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μL

添加し、37℃で30分間酵素反応させた。反応終了後、2 M sulfuric acid 100 μL を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer を用いた分光分析により 450 nm の発色強度を測定した。

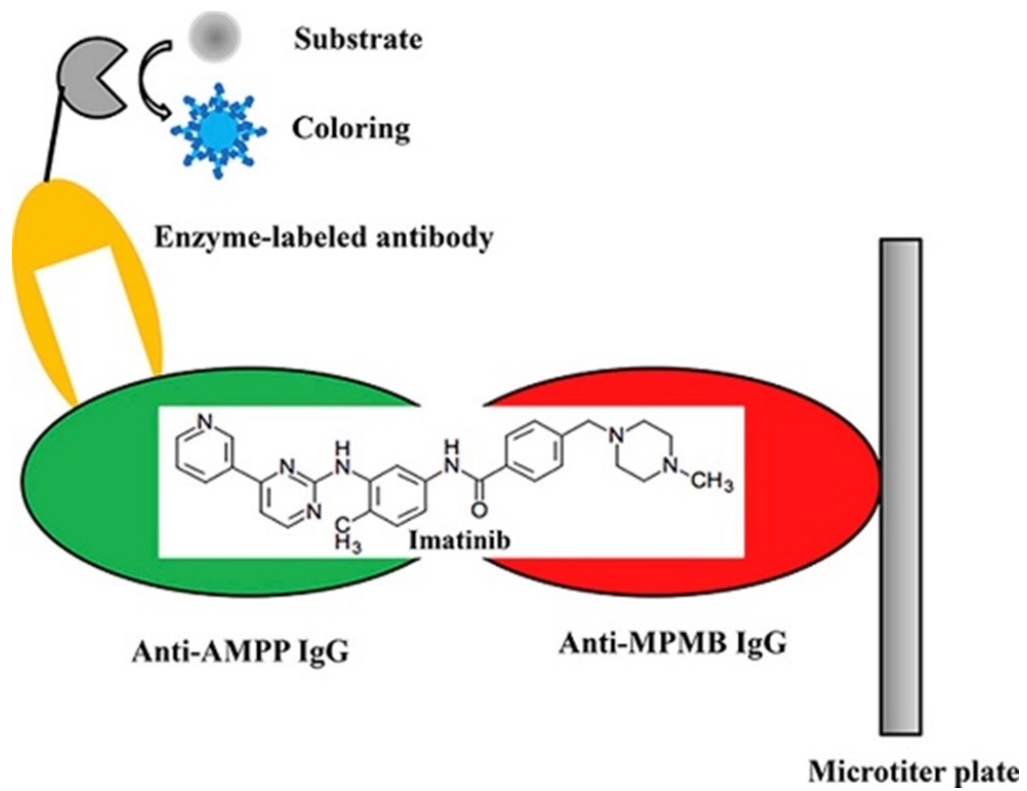


Fig. 2. Principle of sandwich ELISA for imatinib

3-1-6. ラット血清検体の作製

一晩絶食後の成雄 Wistar ラット（体重 180～200 g）に methyl cellulose (0.5%, w/v water) 中に imatini を 6 mg または 20 mg/mL になるように溶解した溶液を nilotinib 量 30 mg または 60 mg/kg となるよう調整し経口投与した。投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 および 12 時間後に頸静脈から採血し、得られた血清を ELISA 用の血清検体とした。

3-1-7. HPLC 法

Imatinib の HPLC 法は、Miura らの方法[59]に従って行った。

3-2. 結果

3-2-1. 抗 MPMB 抗体および抗 AMPP 抗体の特異性

至適条件を確立し、検量線を作成した。その結果、Fig. 3 に示すように、検量線の測定範囲はどちらも imatinib 濃度 0.008~25 ng/mL を示し、0.04~5 ng/mL の範囲で直線性が得られた。両抗体の特異性については、類似化合物を用いる交差反応試験により検討した。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な CFBA の濃度を比較する類似化合物のそれで除し、%として計算した。抗 MPMB 抗体は MPMB と 100.0%の交差反応性を示し、pyridine-*N*-oxide-imatinib で 100%、*N*-desmethyl imatinib で 1.2%の交差反応性を示した。AMPP、1-methylpiperazine、または 4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidine amine とは交差反応性を示さなかった。他方、抗 AMPP 抗体は AMPP と 100.0%の交差反応性を示し、pyridine-*N*-oxide-imatinib で 4.3%、*N*-desmethyl imatinib で 100%の交差反応性を示した。MPMB、1-methylpiperazine、または 4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidine amine とは交差反応性を示さなかった (Table. 1)。

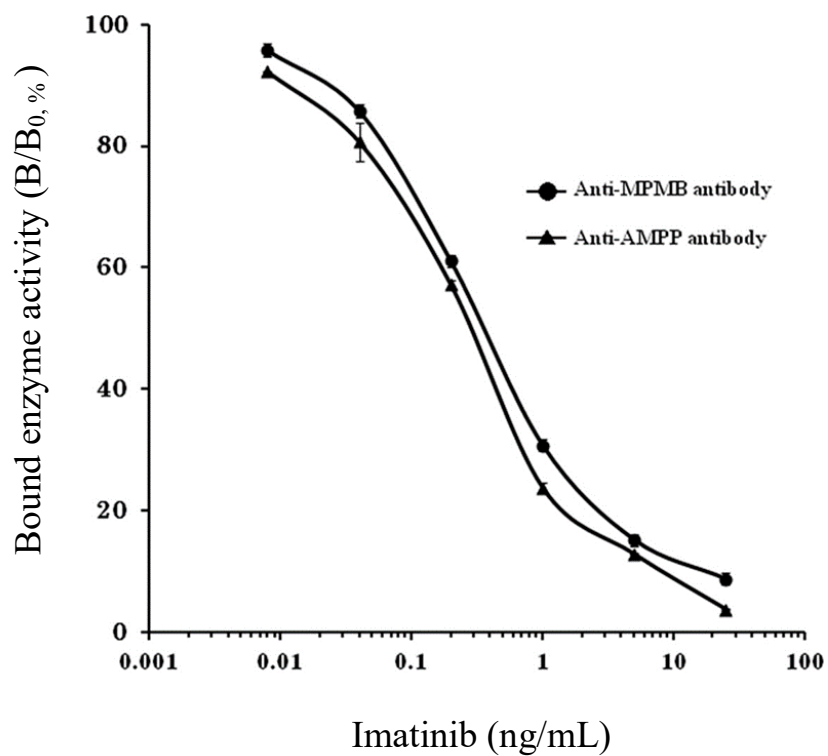


Fig. 3 Standard curves of imatinib in human serum using anti-MPMB antibody and anti-AMPP antibody, as determined by competitive ELISA

The curve shows the amount (%) of bound enzyme activity for various doses of imatinib (B) as a ratio of that bound using enzyme-labeled drug alone (B₀). Each point represents the mean ± S.D. (n = 3).

Table. 1 Percent cross-reactivity of metabolites and analogs measured by two competitive ELISAs and sandwich ELISA

Metabolite and analog name	Competitive ELISA using anti-MPMB, %	Competitive ELISA using anti-AMPP,%	Sandwich ELISA, %
Imatinib	100.0	100.0	100.0
MPMB	100.0	< 0.1	< 0.1
AMPP	< 0.1	100.0	< 0.1
<i>N</i>-Desmethyl imatinib	1.2	100.0	< 0.5
Pyridine-<i>N</i>-oxide-imatinib	100.0	4.3	< 0.5
1-Methylpiperazine	< 0.1	< 0.1	< 0.1
4-(3-Pyridinyl)-2-pyrimidine amine	< 0.1	< 0.1	< 0.1

3-2-2. Imatinib の sandwich ELISA

至適条件を確立し、検量線を作成した。その結果、Fig. 4 に示すように、検量線の測定範囲は imatinib 濃度 0.00256~40 ng/mL を示し、0.064~8 ng/mL の範囲で直線性が得られた。この濃度範囲で5回測定したときの日内変動は4.8~5.8%、日差変動は3.1~7.3%であり、精度、真度ともに満足しうるものであった (Table. 2)。

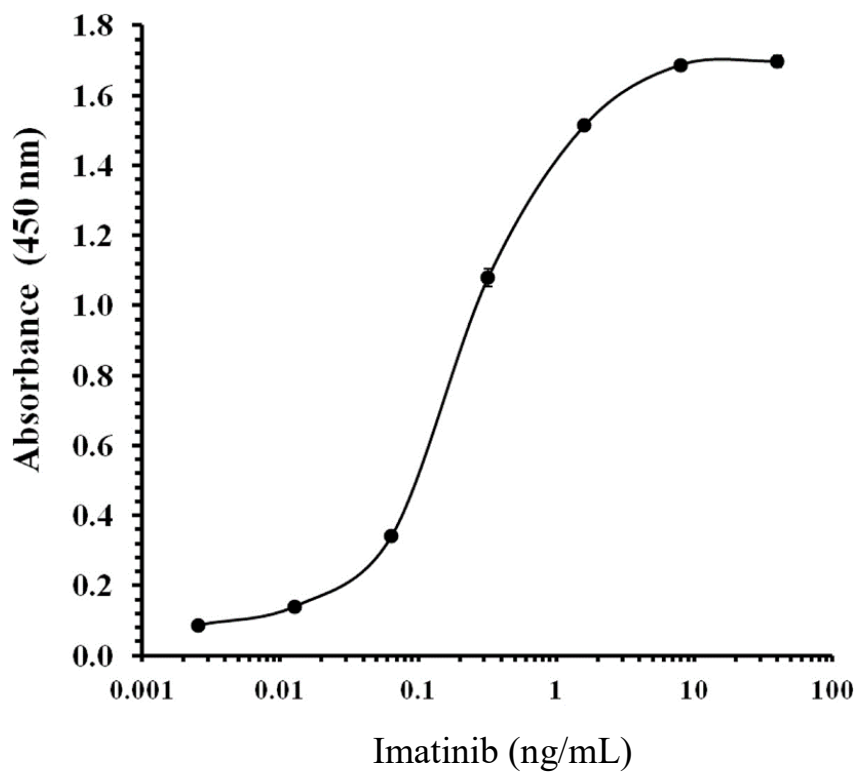


Fig. 4 Standard curve of the developed sandwich ELISA for imatinib in human serum

Each point represents means \pm S.D of the optical density (OD) of imatinib concentration. (n = 3).

Table 2 Precision and recovery of sandwich ELISA for imatinib in human serum

	Added (ng/mL)	Estimated (ng/mL)	Recovery (%)	C.V. (%)
Intra-assay	0.064	0.0634 ± 0.0037	99.1	5.8
	0.32	0.322 ± 0.013	100.6	4.0
	1.6	1.52 ± 0.08	95.0	5.3
	8.0	8.00 ± 0.32	100.0	4.0
Inter-assay	0.064	0.0637 ± 0.0020	99.5	3.1
	0.32	0.330 ± 0.009	103.1	2.7
	1.6	1.67 ± 0.09	104.4	5.4
	8.0	7.94 ± 0.58	99.3	7.3

Values represent the means ± S.D. of five experiments.

3-2-3. Sandwich ELISA の特異性

Sandwich ELISA の特異性については、2 つの主要な代謝物や類似化合物を用いて決定した。交差反応性は、Weiler の式に従って決定した[60]。Sandwich ELISA は、imatinib に対して特異的であり、*N*-desmethyl imatinib、pyridine-*N*-oxide-imatinib、MPMB、AMPP、1-methylpiperazine、4-(3-pyridinyl)-2- pyrimidine amine とは交差反応性を示さなかった (Table. 1)。

3-2-4. Sandwich ELISA と HPLC の相関

23 種類のラット血清検体を用いて測定し、ELISA と HPLC で imatinib 濃度 (0.88-20.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の比較を行った (Fig. 5)。その結果、回帰直線 $Y(\text{HPLC}) = 0.983X (\text{ELISA}) + 0.0812$ 、相関係数 $r = 0.948$ ($n = 23$) で両測定値に良好な相関性が確認された。

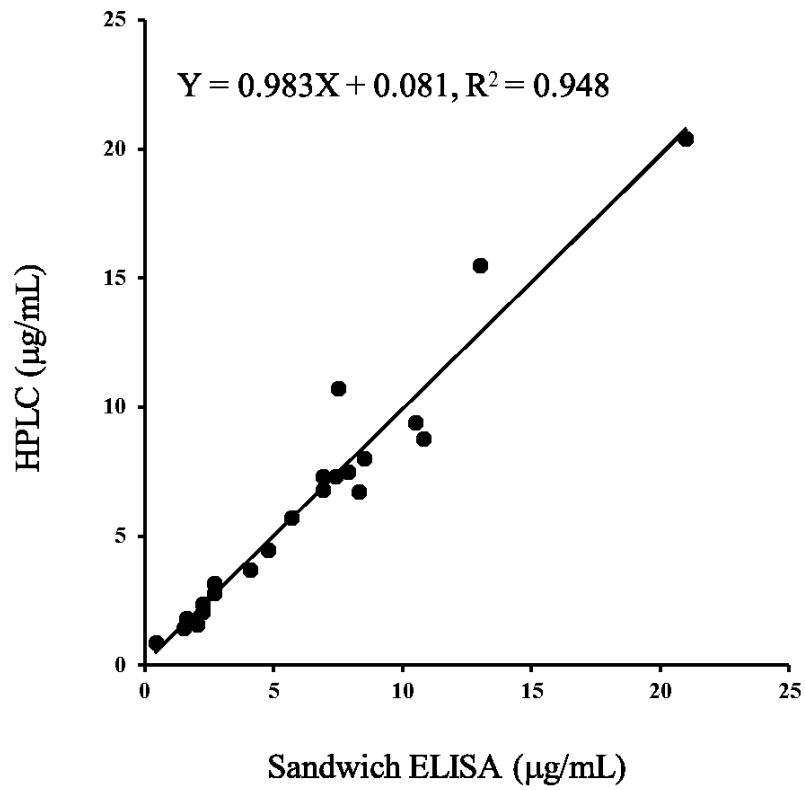


Fig. 5 Correlation between imatinib concentrations in rat serum determined by the sandwich ELISA and HPLC methods

考察

Imatinib 構造のほぼ中心部分から二分する 2 種類の部分構造体(MPMB および AMPP) をハプテンとして imatinib 抗原を作製し、2 種類の imatinib 抗体を得た [57, 58]。得られた 2 つの抗体 (抗 MPMB 抗体および抗 AMPP 抗体) は、imatinib の異なるエピトープを同時に認識することができた。交差反応性データより、抗 MPMB 抗体は MPMB の 4- $\{(4\text{-methyl-1-piperazinyl) methyl}\}$ 部分を含む、安息香酸の一部にまで認識していると推測された。同様に、抗 AMPP 抗体は、AMPP の pyridyl 部分から methylaniline の一部までの範囲を認識していると予測された。一般的に、2 つの抗体が一つの抗原に同時に結合するためには、エピトープ間の距離が 5Å 以上離れなければならないと報告されている [61]。Fig. 6 に示すように、抗 MPMB 抗体および抗 AMPP 抗体の予測されたエピトープ領域に基づいて、これらの 2 つのエピトープ間の距離は約 5Å 以上であると推測された。したがって、これらの 2 つの抗体は、imatinib のほぼすべての構造部位を同時に認識していると示唆された。

ヒト血漿、尿および糞中に多種多様に代謝された imatinib が検出されている [62]。したがって、本研究では、sandwich ELISA において使用される 2 つの抗 imatinib 抗体が、これらの代謝物に交差反応を示すかどうかを確認した。その結果、本 sandwich ELISA は、imatinib の主要な代謝物である *N*-desmethyl imatinib、pyridine-*N*-oxide-imatinib とは交差反応を示さなかった (Table. 1)。他の imatinib 代謝物との交差反応性については確認していないが、上記に示すように、これら 2 つの抗体は imatinib のほぼ全体を認識していることから、他の imatinib 代謝物においても交差反応を示さないことが予測された。この sandwich ELISA は、既に関連されている imatinib の competitive ELISA より非常に特異的であった [57]。

さらに、sandwich ELISA によって測定されたラット血清中 imatinib 濃度は、HPLC によって測定した値とほぼ同等であり、2 つの方法によって測定された値の間に良好な相関性があった。したがって、この sandwich ELISA は、imatinib の TDM および薬物動態研究において、十分に特異性があることが示された。

今回開発した sandwich ELISA は再現性があり、64 pg/mL 以上の imatinib 濃度を測定するのに十分な感度を示した (Fig. 4, Table. 1)。CML の患者では、臨床的に効果を得るために定常状態のトラフ値において、血漿中 imatinib の濃度が 1002 ng/mL を超えなければならない[2]。したがって、この ELISA は、imatinib の TDM および薬物動態研究において、十分な感度であることが示された。

本 ELISA は、超特異的で高感度であり、さらに簡便さ、多数検体処理能力などの特徴を持っており、imatinib の TDM や薬物動態研究などを進めるうえで有用なツールとなることが示唆された。また、本研究の成功により、imatinib と同程度あるいはそれ以上の大きさの構造を有する薬物であれば、超特異的な sandwich ELISA の開発が可能であることが証明された。今まで、代謝物の影響で特異的な免疫測定法の開発が困難だった薬物に対しても本法が利用されることが期待される。

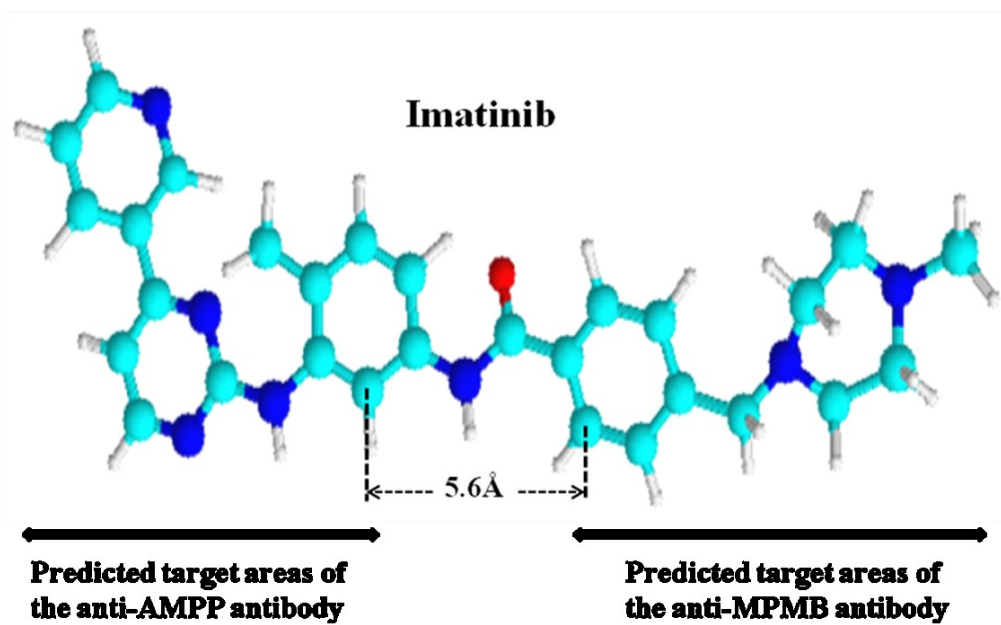


Fig. 6 The predicted target areas of the anti-MPMB and anti-AMPP antibodies. The distance between the two epitopes was approximately 5 Å.

第4章 2型糖尿病治療薬 Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学の開発

諸言

一般には薬物動態は、薬物血中濃度をパラメーターとして研究されている。しかし、薬効・副作用の予測やその機構解明、薬物相互作用の解析などのためには、組織・細胞レベルでの薬物動態に関するデータも重要である。組織・細胞レベルでの薬物動態が把握できれば、薬物が影響する細胞を特定し、薬効や副作用の予測に繋がる可能性がある。さらに、薬物の分布を正確に把握し制御できれば、副作用を低減させつつ適切な効果を得ることも可能と思われる。薬物の組織・細胞中の分布状態を知る方法としては従来から autoradiography 法があるが、この方法は、高価で危険なアイソトープ標識薬物を合成し専用の施設で行う必要があること、暗視野像のため組織・細胞構造との相関研究が困難なこと、親化合物と代謝物との区別が出来ないことなどの原理的欠点を有し、一般研究室には殆ど普及していない。そこで、これらの欠点を克服し、経済性、安全性、簡便性、正確性、特異性の全てにおいて autoradiography 法を凌駕し、一般研究室でルーチンに組織・細胞レベルでの薬物動態研究が可能な「薬物の免疫組織化学的検出法」を開発できれば、各種薬物の組織・細胞レベルでの薬物動態に関する詳細な情報を得ることができる。このような情報の蓄積は、生体での薬剤の作用や副作用（毒性）の機序を解析するうえで、また薬剤のより適切な臨床使用法（chemotherapy）や次世代薬の開発研究にとって、基礎的かつ重要なデータとなると考えられる。そこで本研究では、インクレチン関連薬の一つである alogliptin (AG) に対する特異モノクローナル抗体を作製し、本薬に対する免疫組織化学法を開発を行った。

4-1. 材料および方法

4-1-1. 試薬

1) 抗原作製

Alogliptin (Takeda Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan)

N-(γ -Maleimido-butyryloxy) succinimide (GMBS; Dojindo

Laboratories, Kumamoto, Japan)

Modified lowery protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

2) 抗体の作製と特性解析

Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Freund's incomplete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Mouse monoclonal sub-isotyping kit (American Qualex Manufactures, San Clemente, CA, USA)

Goat anti-mouse IgG labeled with horseradish peroxidase (HRP)
(Cappel, West Chester, PA, USA)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (F. Hoffmann-La Roche Ltd.,
Basel, Switzerland)

3) 免疫組織化学

Sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA)

Heparin sodium (AY Pharmaceuticals Co., Ltd. Tokyo, Japan)

Hydrogen peroxide (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)

Protease (Type XXIV: Bacterial; Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO,

USA)

Sodium borohydride (NaBH₄) (Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Simple Stain Rat MAX-PO(M) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)

3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

Mouse IgG immunoassay kit (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)

4-1-2. Alogliptin 抗原の作製

抗原は、Fujiwara らが以前、抗 daunomycin 抗体の作製について報告した方法に従って、異反応性架橋剤 *N*-(γ -maleimido-butyl) succinimide (GMBS) を用いて作製した[63, 64]。AG (2 mg, 5.9 μ mol) の 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.0) 2 mL に溶解し、GMBS (1.6 mg, 5.7 μ mol) を Tetrahydrofuran 0.5 mL に溶解し、これらを攪拌しながら室温で 1 時間反応させ、GMBS-アシル化 AG 溶液を作製した。その後、遠心分離機で 2,000 rpm、10 分間遠心分離し、上清を集めた。次に、acetylmercaptosuccinyl-bovine serum albumin (AMS-BSA) からアセチル基を除くため、AMS-BSA (15 mg, 0.1 μ mol) を 0.1 M PB (pH 7.0) 200 μ L に溶解し、0.5 M hydroxylamine (pH 7.4) 50 μ L を加えて室温で 10 分間反応した。反応物である mercaptosuccinyl BSA (MS.BSA) に 0.1 M PB (pH 7.0) 1 mL を加えて希釈し、直ちに GMBS-アシル化 AG 上清を混合し、ゆっくり攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。この複合体を 10 mM PB (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-75 column で精製し、溶出液を 3 mL ずつ分画しフラクションコレクターで回収した。複合体の濃度は Modified Lowery Protein Assay Kit を用いて求めた。

4-1-3. 抗 AG 特異モノクローナル抗体の作製

成雌 BALB/c マウスに、Freund's complete adjuvant と共に乳化した AG-GMBS-BSA 複合体 100 μg を腹腔内投与した。その後 2 週間間隔で、Freund's incomplete adjuvant と共に乳化した複合体 50 μg を 2 回投与した。3 回目の免疫後、血清を採取し、ELISA 法 (4-1-4 に順拠) により目的とする抗体を含んでいることを確認した。最も高い反応性を示した血清のマウスをハイブリダイゼーションに用いることとし、4 回目の感作を行なった。その 4 日後、マウスの脾臓を摘出し、ポリエチレングリコールを用いて脾臓細胞 (2×10^8 個) とヒトミエローマ細胞 (NS-1; 3×10^7 個) を融合した[64]。フィーダー細胞を播種した 96 穴組織培養プレートに、hypoxanthine aminopterin thymidine 培地に懸濁した細胞を 10^5 個/well となるよう播種し、ハイブリドーマを選択した。細胞融合の 10 日後から 20 日後の間に、ELISA 法 (4-1-4 順拠) により、培養上清の抗原への結合性を調べ、ハイブリドーマの選択を行なった。陽性を示した細胞集団を 2 ~ 3 回 Limiting dilution し、単一クローンを得た。抗体のサブタイプは、Mouse Monoclonal Sub-Isotyping Kit を使用し決定した。

4-1-4. ELISA 法 (Dilution ELISA)

Fujiwara らの方法[64]と同様に行った。Microtiter plate の well に AG-GMBS-BSA 複合体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL 、または BSA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL を加え、37°C で 60 分固相化したのち、1% skim milk を用いて、室温 30 分間 blocking を行った。培養上清を抗 AG 特異モノクローナル抗体の原液とし、0.1% BSA、0.1% Tween-20 含む phosphate buffer saline (PBS) で 5 倍希釈系列を作製し、各 well に 100 μl 加え、37°C、90 分間 1 次反応を行った。洗浄後、2 次抗体として 1000

倍希釈した HRP labeled goat anti-mouse IgG 100 μ L と、37 $^{\circ}$ C、60 分間反応させた。その後、TMB 基質溶液を加えて発色させ、ELISA analyzer を用いて、450 nm における吸光度を測定した。

4-1-5. Inhibition ELISA

Fujiwara らの方法[64]に従って、well に AG-GMBS-BSA を固相化し、skim milk で blocking した。続いて、50 倍希釈した抗 AG モノクローナル抗体 AAG-78 mAb を 50 μ L と AG-GMBS-BSA、Vancomycin (VCM)-GMBS-BSA または Amoxicillin (AMPC)-glutaraldehyde (GA)-BSA を 50 μ L 加えて、37 $^{\circ}$ C で 90 分間競合的に反応させた。反応後、1000 倍希釈した HRP labeled goat anti-mouse IgG 100 μ L と 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。その後、酵素活性を測定した。

4-1-6. Binding ELISA

AG のような一級アミンをもつ化合物は、GA によってアミノ酸の一級アミンに固定することができる。Fujiwara らの方法[65]に従って、Poly-L-Lysine (30 μ g/mL) を well に固相化し、2.5%GA を 1 時間反応させた。続いて、種々の濃度の薬物を加えて室温で 1 時間反応させ、残ったアルデヒド基を 1% sodium borohydride で水酸基に還元した。続いて、well を 1% skim milk で 1 時間 blocking し、100 倍希釈した一次抗体 AAG-78 100 μ L を加えて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後、2000 倍希釈した HRP labeled goat anti-mouse IgG 100 μ L を 37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、酵素活性を測定した。

4-1-7. 組織試料

本研究では、組織試料を得るために、成雄 Wistar ラット (体重 200~250 g)

(Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。ラットは、温度と光を調節した室内で飼育し、自由に食料と飲み水を摂取させた。3匹のラットに 5 mg/kg の AG を単回経口投与した。1 時間後にラットをペントバルビタール (60 mg/kg, b.w.) で麻酔し、50 mL/min の流速でヘパリンを 2 分間、次いで 2%GA を 6 分間心臓から流し、灌流固定を行った。その後、十二指腸、空腸、回腸を速やかに摘出し、同様の固定液を用いて 4°C で一晩後固定した。

4-1-8. 免疫組織化学

免疫組織化学法は Fujiwara らの方法に従った[65, 66]。後固定後、小腸の組織を常法によりパラフィンに包埋し、試料を厚さ 5 μm の切片に薄切しスライドガラスに貼付した。続いて脱パラフィン後、1) 6% hydrogen peroxide で 30 分間、2) 2N hydrochloride で 30 分間、3) 0.03 mg/mL の protease を 30°C、種々の時間(15 分~2 時間)、4) 5 mg/mL sodium borohydride で 10 分間などの前処理を行った[67, 68]。その後、10%正常ヤギ血清、1.0% BSA、および 0.1%サポニンを含む TBS 溶液を用いて室温で 1 時間 blocking した。次いで 20 倍希釈した AAG-78 mAb を 4°C で一晩反応させた。反応後、Simple Stain Rat MAX-PO (M) を用いて室温で 2 時間反応させ、TBS で洗浄後に 0.5 mg/ml diaminobenzidine および 0.012% hydrogen peroxide を用いて反応部位を可視化した。

2 種類の陰性対照実験として、一般的な対照実験および吸収実験を行った。従来の対照実験では、一次反応時に抗体溶液の代わりに 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整した normal mouse IgG を切片に反応させた。また、吸収実験では、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう AG-GMBS-BSA を抗体溶液に加えた後、切片と反応させた。

4-2. 結果

4-2-1. 抗 AG 特異モノクローナル抗体の作製と特徴づけ

細胞融合により、150 のハイブリドーマ系統が得られた。ELISA によるスクリーニングにより、その中の 2 系統 (No. 73, 78) が AG-GMBS-BSA 複合体に結合するが、BSA を認識しない抗体を産生していた。それらのクローンが産生する抗体をそれぞれ AAG-73、AAG-78 と名付け、Mouse Monoab-ID Kit によりサブタイプを検討したところ、共に IgG1 であった。以下の実験には、AAG-78 を使用した。

Dilution ELISA

Microtiter plate の well に AG-GMBS-BSA 複合体または BSA 10 $\mu\text{g/mL}$ を固相化し、段階希釈した抗 AG モノクローナル抗体 (AAG-78) を反応させ、抗体の結合活性を測定した。その結果、AAG-78 は 500 倍希釈しても AG 複合体に強い結合活性を示したが、BSA に対してはどの希釈倍率でも反応しなかった (Fig. 1)。また、サブタイプが同じ (IgG1) 抗 polyamine (spermine 及び spermidine) 特異モノクローナル抗体 (ASPM-29) は、AG-GMBS-BSA 複合体と結合しなかった (データ未提示)。

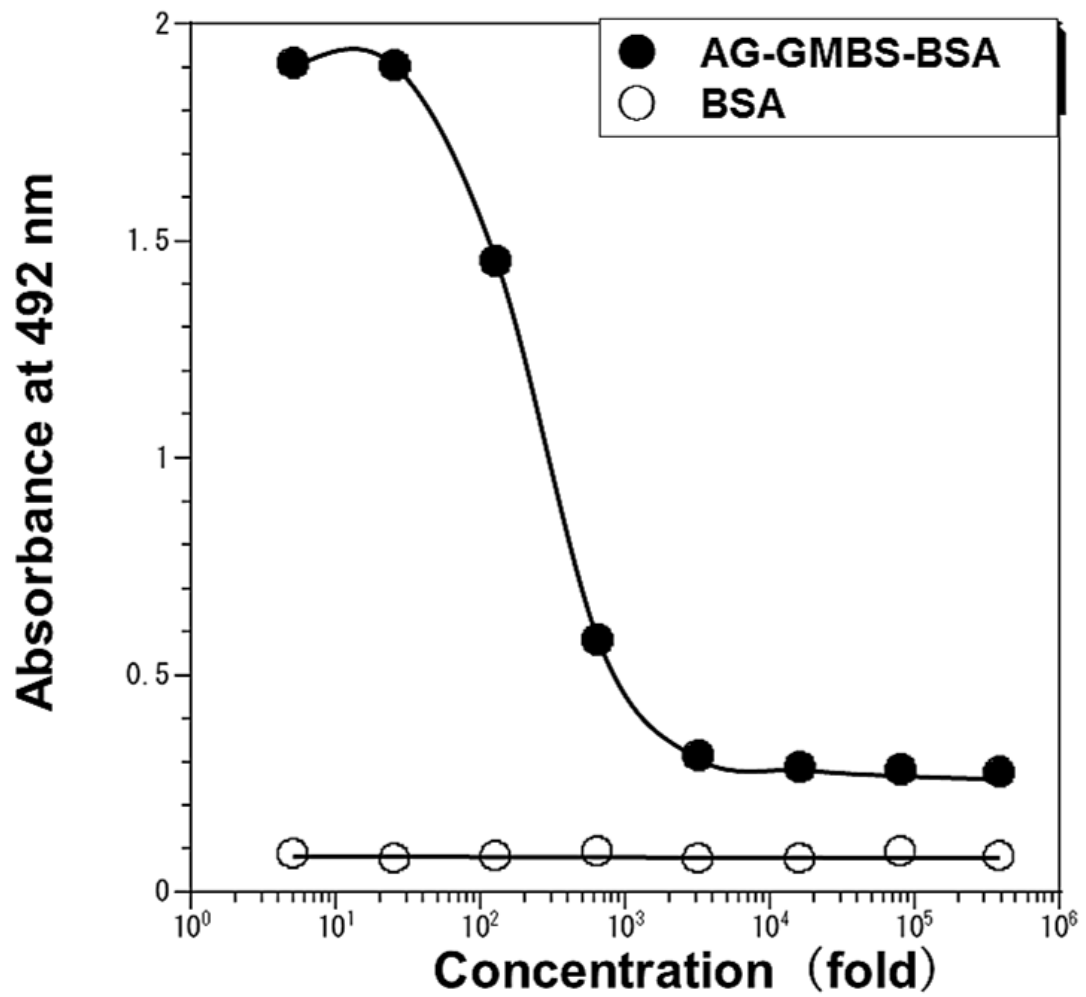


Fig. 1 ELISA measurements of the binding of serially diluted anti-AG monoclonal antibody (AAG-78) to the solid phase coated with AG-GMBS-BSA (closed circles) or BSA (open circles)

Inhibition ELISA

溶液中の種々の濃度の検体（AG-GMBS-BSA 複合体、VCM-GMBS-BSA 複合体または AMPC-GA-BSA 複合体）と well 上に固相化された一定量の抗原（AG-GMBS-BSA 複合体）が、抗体の限られた数の結合部位を奪い合うことを原理とする inhibition ELISA により、抗体の特異性を検定した。

グラフは、検体濃度と AAG-78 mAb の結合活性（検体がない場合を 100%とした相対値）間の関係を示している。抗体の結合活性は、AG-GMBS-BSA 複合体の添加によって強く阻害され 0.1 nM~100 nM の間で濃度依存的阻害曲線が得られた。その結合活性 50%阻害濃度（IC₅₀）は 0.4 nM であった（Fig. 3）。しかし、VCM-GMBS-BSA 複合体及び AMPC-GA-BSA 複合体は、1 μM まで加えても結合を阻害しなかった（Fig. 2）。

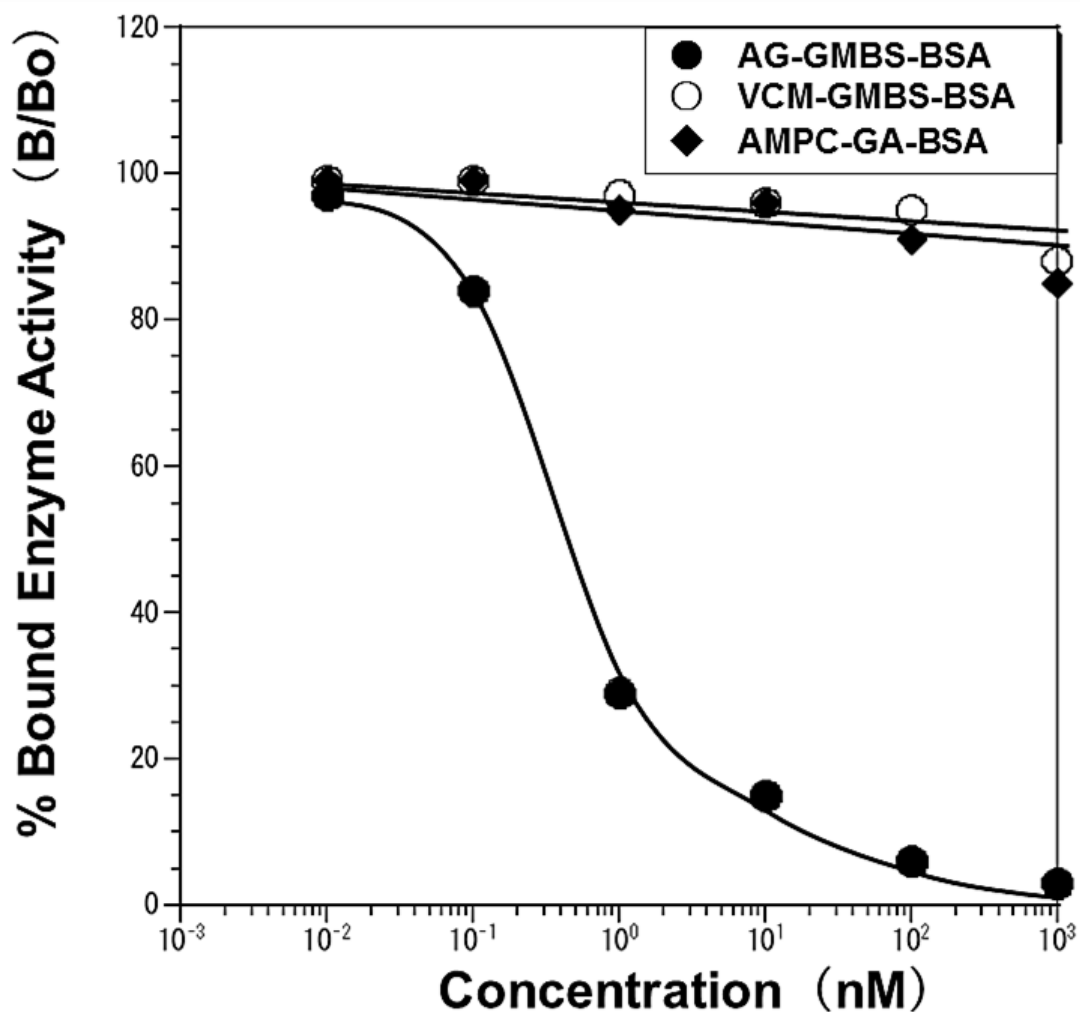


Fig. 2 ELISA measurements showing competition between conjugated AG, VCM and AMPC coated to the solid phase for binding to the anti-AG mAb

The curves show the amount (percentage) of bound enzyme activity (B) for various doses of AG-GMBS-BSA (closed circles), VCM-GMBS-BSA (open circles), or AMPC-GA-BSA (closed rhombuses) as a ratio of that bound using the HRP-labeled second antibody alone (B_0). The concentrations of these conjugates were calculated assuming that the molecular weight of each conjugate was 66 kDa, which is that of BSA, because the molecular weight of each drug is smaller than BSA.

Binding ELISA

抗体の特異性を再確認すると共に、本抗体が免疫組織化学で使用可能か否かをシミュレートするために、well に固相化した poly-L-lysine に、GA を架橋剤として検体（薬物）を結合させた後、抗体を反応させることにより、組織切片上での免疫組織化学法をシミュレートする binding ELISA を行った。Fig. 3 は、種々の濃度の各検体と AAG-78 mAb との結合活性を示している。本抗体は、AG には 0.3 μ M から 10 μ M の範囲で濃度依存的に強い結合活性を示したが、Sitagliptin (SG)、VCM、AMPC とは全く反応しなかった (Fig. 3)。

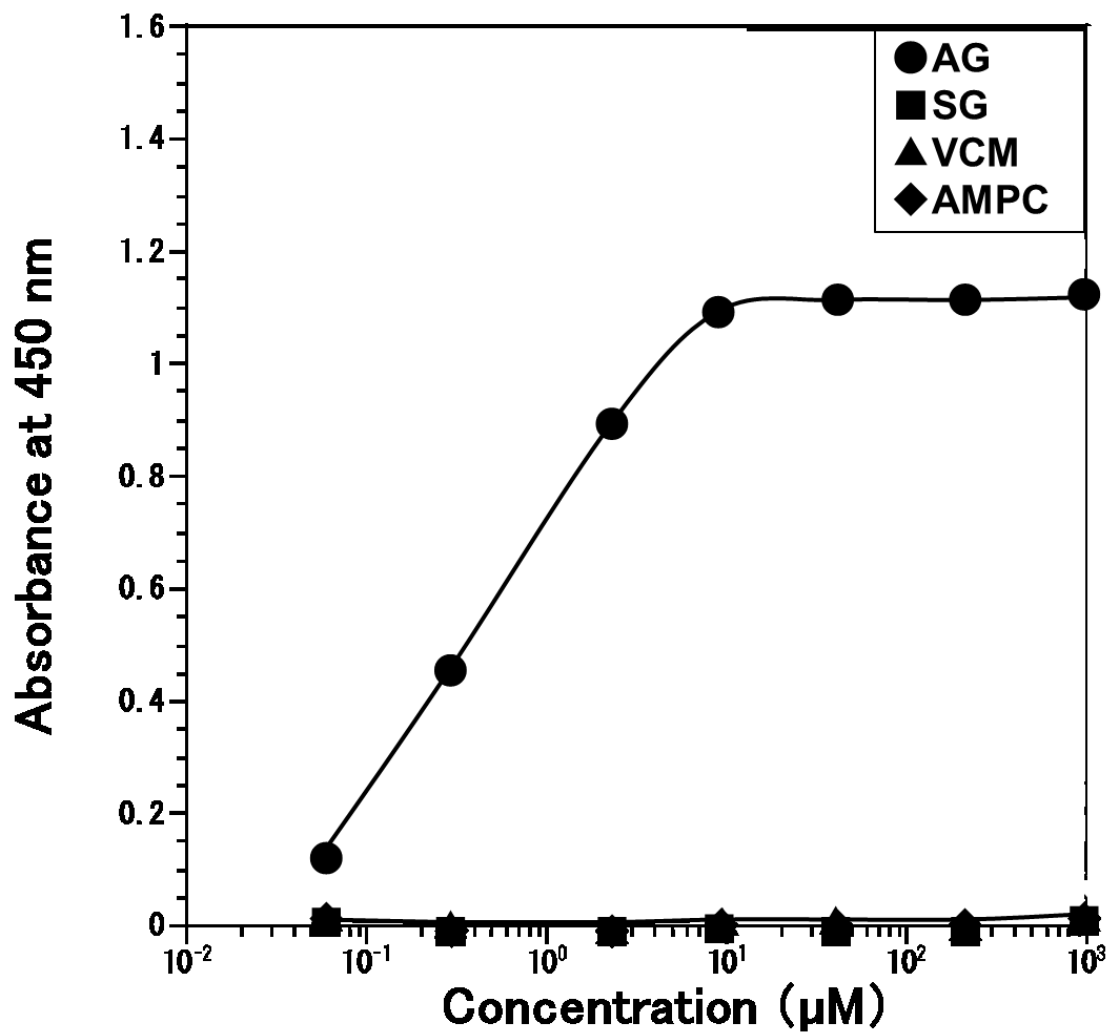


Fig. 3 Reactivity of AAG-78mAb determined from its immunoreactivity in the binding ELISA

Activated wells prepared for the binding ELISA were incubated with various concentrations of AG (closed circles), SG (closed squares), VCM (closed triangles) or AMPC (closed rhombuses). The wells were treated with NaBH₄ and

4-2-2. 免疫組織化学によるラット小腸における AG の局在

薬物の免疫組織化学では、GA 固定を必要とする。したがって、プロテアーゼ処理の強度によって抗体の浸透性が増加するため、得られる反応の強度および局在に差がある。一般的にプロテアーゼ処理時間を長くすると反応強度が増加し、隠れていた陽性部位が現れるが、逆に処理なしまたは短い時間の処理で観察されていた反応が減弱または消失する[66]。本研究では、1 時間のプロテアーゼ処理切片において強い反応が得られ、他の処理時間で見られた反応も消失していないため、以下はプロテアーゼ処理 1 時間の結果のみを示す。

十二指腸

十二指腸では、微弱からやや強いまでの種々の程度の陽性反応がほぼすべての組織および細胞に見られた (Fig. 4b)。吸収上皮細胞の刷子縁と腸線は弱陽性であった (Fig. 4b, c)。絨毛内の粘膜固有層はやや強く染色されたが、腸腺周囲の粘膜固有層や粘膜下組織はほとんど染色されなかった (Fig. 4a, b)。平滑筋は中等度に陽性だった (Fig. 4b)。少数の AG 陽性細胞が腸腺上皮中に観察された (Fig. 4h)。

空腸

絨毛の吸収上皮細胞および粘膜固有層は、十二指腸よりも強い反応を示した (Fig. 4d)。特に、吸収上皮細胞の微絨毛の染色強度は、十二指腸に比べて著しく増加していた (Fig. 4c, e)。しかし、腸腺上皮、腸腺周囲の粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下組織および筋層の陽性反応は、十二指腸とほぼ同様であった (Fig. 4d)。腸腺上皮内の AG 陽性細胞は空腸でも観察された (Fig. 4i) 粘膜下

組織のマイスナー神経叢および筋層間のアウエルバッハ神経叢の神経細胞も陽性反応を示した (Fig. 4j-m) 。

回腸

回腸では、ほぼ全ての組織および細胞で中等度から非常に強い陽性反応が観察された (Fig. 4d)。吸収上皮細胞は、十二指腸および空腸と比較して、微絨毛だけでなく細胞質もより強く染色された (Fig. 4c, e, g)。腸腺上皮細胞および管腔内の内容物もまた陽性を示した (Fig. 4n)。

陰性対照実験

1次抗体 (AAG-78 mAb) の代わりに normal mouse IgG を反応させた試料では染色は見られなかった (Fig. 4o)。また、吸収実験においても、AG-GMBS-BSA を一次抗体溶液に 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるよう添加することで反応は消失した (Fig. 4p)。

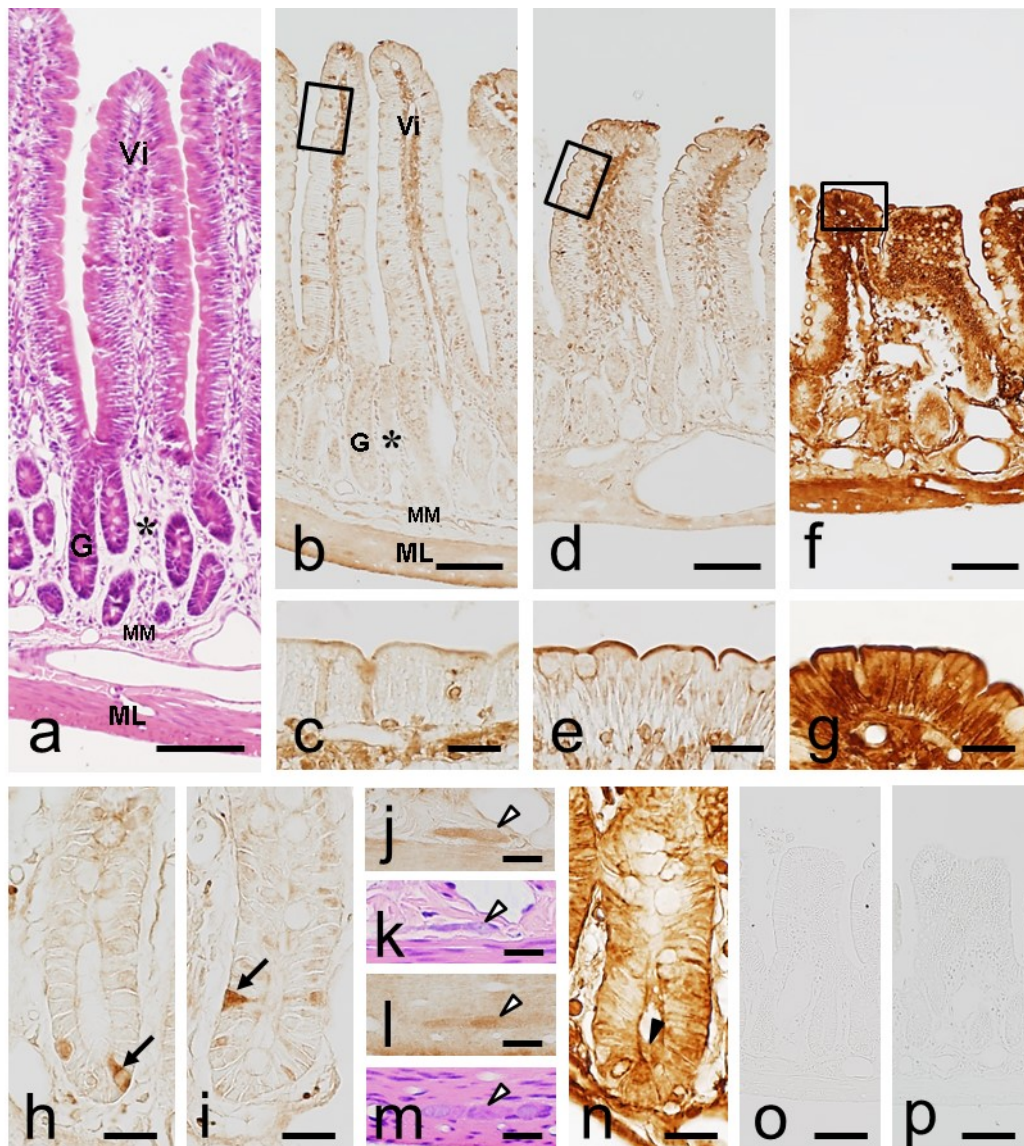


Fig. 4 Rat small intestine stained by immunohistochemistry for AG using anti-AG mAb (AAG-78). **a, b, c, h**: duodenum, **d, e, i-m**: jejunum, **f, g, n-p**: ileum. **a, k, m**: HE staining. **a, b** Vi: villi, G: intestinal gland, MM: muscularis mucosae, ML: muscle layer, *: lamina propria around the intestinal glands. **c, e, g** The high magnification images of the box area of **b, d, f**. **h, i** Basal-granulated cells among glandular epithelial cells (arrows). **j, k** Meissner's plexus (open arrow head). **l, m** Auerbach's plexus (open arrow head). **n** The high magnification images of intestinal gland. The luminal contents showed positive (closed arrow head). **o** The conventional control. **p** The absorption control.

Bars: **a, b, d, f, o, p** = 100 μ m; **c, e, g, h-n** = 20 μ m

4-4 考察

DPP-4 は、リンパ球の表面抗原 CD26 としても知られているセリンプロテアーゼである。この酵素は、リンパ球以外に、小腸、腎臓、肝臓、膵臓および血管内皮細胞においても高い活性を示すことが報告されている[69, 70, 71]。また、血漿中には可溶性 DPP-4 が循環している[71, 72]。DPP-4 は、血糖値依存的にインスリン分泌を促進するインクレチンを急速に不活性化するため、2 型糖尿病の発症に密接に関与している。従って、DPP-4 活性の阻害は、インクレチンの分解を抑制し、その有効濃度を上昇させることになり、2 型糖尿病の治療法として有効であると考えられている。そのため新しい種類の 2 型糖尿病治療薬として DPP-4 阻害剤が使用されており、数多くの薬剤が開発され、臨床的に使用されている[73, 74]。

アログリプチン安息香酸塩（商品名 Nesina）は、2 型糖尿病の治療薬として、日本では 2010 年 4 月に承認された[75]。AG は、小腸で速やかに吸収され、単回経口投与後 15 分で血漿中 DPP-4 の阻害が認められた[76, 77]。AG は CYP2D6 および CYP3A4 によってわずかに代謝されるが、活性代謝物 M-I (N-脱メチル化) は、尿中 AG 濃度の 2%未満、不活性代謝物 M-II (N-アセチル化) も 6%未満であり[77, 78, 79]、大半は尿中に未変化体として排泄される (60%~71%) [77]。

この研究では、特異的な抗 AG mAb を作製し、薬物吸収を担う主要な器官である小腸における AG 局在部位を解析するための IHC を開発した。今回作製した AAG-78 mAb の特徴は、ELISA によって解析した結果、inhibition ELISA により、抗体の結合活性が AG-GMBS-BSA では強く阻害されるが、VCM-GMBS-BSA または AMPC-GA-BSA では全く阻害されないことが示された。binding

ELISA により、本 mAb が AG-GA-Lysine には結合するが、SG, VCM および AMPC-GA-Lysine に結合できないことが示された。これらの結果から、AAG-78 mAb は AG を非常に特異的に認識し、GA 固定組織における AG の局在の IHC 研究に有用であると考えられる。

本抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、小腸の各部位における AG の染色パターンは、ほぼ同様であり、吸収上皮細胞、腸腺上皮細胞、結合組織、神経細胞および平滑筋組織で陽性であった。染色強度は、小腸の遠位部分に向かって、即ち十二指腸、空腸、回腸の順に、より強くなった。吸収上皮細胞の細胞質および粘膜固有層の結合組織に見られる陽性反応は、そのメカニズムは不明であるが、AG が吸収上皮細胞を介して体内に取り込まれることを示唆している。これらの部位の染色強度は小腸の下部に行くに従って強くなるので、小腸の上部よりも下部からより積極的に吸収されると考えられる。さらに、膜結合型の DPP-4 が吸収上皮細胞の微絨毛に存在し、十二指腸よりも空腸および回腸に多く発現することが報告されている[80, 81]。したがって、吸収上皮細胞の刷子縁に見られる強い陽性反応は、取り込まれている AG と DPP-4 に結合した AG の総和を表している可能性が高い。微絨毛の DPP-4 は、上皮細胞によるペプチドの分解および取り込みに関与しているため、AG は、小腸からのタンパク質およびペプチドの吸収に影響を及ぼしている可能性がある。

腸腺上皮細胞および管腔内の内容物にも陽性反応が観察されたが、薬物が腸液の流れに逆らって腸腺内に入り込み、細胞の頂端側から取り込まれる可能性は考えにくい。したがって、腸腺上皮細胞内の薬物は、吸収上皮細胞から取り込まれて結合組織に運ばれた薬物が基底側から細胞内に吸収されたものであり、管腔内の薬物は、腸腺上皮から分泌されたものである可能性が高い。また、管腔内の AG は、腸腺上皮細胞から腸液と共に分泌され、小腸内に流出

し、再び吸収上皮細胞から吸収される可能性がある。

胃腸管上皮には基底顆粒細胞と呼ばれる様々な種類の内分泌細胞が存在している[82, 83]。それらの細胞は、胃液、腸液、膵液、胆汁などの分泌や、腸の運動および血糖コントロールに影響を及ぼす多様なホルモンを分泌している。腸腺上皮に散在していた AG 陽性細胞は、その特徴的なピラミッド状または紡錘状の形態から、基底顆粒細胞であると考えられる。さらに、AG は、腸管の神経細胞に局在していた。これらの細胞への薬物の取り込みにはトランスポーターが関与していると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。これらの結果は、薬物が腸管の分泌能および運動能に影響を与え、便秘や腸閉塞などの副作用に影響を与える可能性があることを示唆している。

結論として、本研究は、AG-GMBS-BSA に対して作製した抗 AG mAb が、AG に対して非常に特異的であり、この mAb を用いた免疫組織化学法は、細胞および組織における AG の局在を解析するために非常に有用であることを明らかにした。本法により、AG の蓄積部位と、ラット小腸における膜結合型 DPP-4 の発現部位が密接に相関することが明らかとなった。従って、AG が、膜結合型 DPP-4 を発現している種々の細胞の機能に影響を与える可能性が示唆された。

第5章 総論

薬物の血液・組織内濃度および組織内局在を解析することは、薬物の基礎研究や適正使用において、極めて重要である。従って、薬物の血中濃度および組織局在を簡便に解析できる免疫化学的方法の開発は、必要不可欠である。そこで、本研究では、免疫化学的方法の開発が望まれているにもかかわらず、未だなされていない5種類のがん分子標的治療薬と2型糖尿病治療薬の免疫化学的方法の開発を試みた。

第2章では、4種類のがん分子標的治療薬に対する competitive ELISA の開発について述べた。がん分子標的治療薬の多くは、生体内で多種多様に代謝される。そのため、特異的な免疫測定法を開発するためには、その薬物の代謝物とは交差反応性を示さない特異抗体を作製する必要がある。特異的な抗体を得るための重要なポイントは、免疫に用いるハプテン-キャリアー複合体の構造に大きく左右される。一般に、ハプテン分子のうちキャリアーとの結合部位から離れた部分構造を鋭敏に認識する反面、キャリアー結合部位の近傍は“死角”となり認識が困難になる。したがって、抗体に認識させたい部分構造がキャリアーより露出して保持されるように、両者を結合させる部位を工夫する必要がある。また、今回ターゲットとするがん分子標的治療薬は、キャリアータンパク質と結合できる官能基を持っていない。以上の知見から、薬物の主要代謝物の構造を考慮し、キャリアータンパク質と結合できる官能基を有する薬物の部分構造体を選択し、ハプテン抗原を作製することで、それぞれの薬物の主要代謝物には交差反応性を示さない特異抗体を得ることに成功した。これらの特異抗体を用いて、それぞれの薬物の competitive ELISA の開発を行った。

第1節では、乳がんの治療薬である lapatinib の competitive ELISA について報

告した。本 ELISA は、lapatinib 濃度 40 ng/mL 以上を、再現性よく正確に測定できた。lapatinib の常用量における薬物血中濃度推移は、1000~3000 ng/mL であるため、生体内での lapatinib 濃度を測定するために十分な感度であった。また、抗 lapatinib 抗体の特異性に関しては、主要代謝物である M1 (O-脱アルキル化体) には交差反応性を示さないであろうと推測された。今回開発した ELISA は、感度および特異性において lapatinib の TDM や動態研究に適していた。

第 2 節では、慢性骨髄性白血病の治療である nilotinib の competitive ELISA について報告した。本 ELISA は、nilotinib 濃度 8~1000 ng/mL を再現性よく、正確に測定できた。nilotinib の常用量における薬物血中濃度推移は、数百 ng/mL であるため、生体内での nilotinib 濃度を測定するために十分な感度であった。Nilotinib 投与後の血中動態は、大部分が未変化体で推移することが報告されている[39]。そのため、測定系に対する nilotinib 代謝物の影響は殆ど無視できるものと予測された。今回開発した ELISA は、感度および特異性において nilotinib の TDM や動態研究に適していた。

第 3 節では、非小細胞肺癌の治療薬である erlotinib の competitive ELISA について報告した。本 ELISA は、erlotinib 濃度 40 ng/mL 以上を、再現性よく正確に測定できた。Erlotinib の常用量における薬物血中濃度推移は、数百 ng/mL であるため、生体内での erlotinib 濃度を測定するために十分な感度であった。

また、抗 erlotinib 抗体は、erlotinib の主要代謝物である O-脱メチル化 erlotinib に対して 8.9%の交差反応性を示した。この O-脱メチル化 erlotinib の血中動態は erlotinib の 10%以下で推移することが報告されている[41]。したがって、測定系に対する主要代謝物の影響は殆ど無視できるものと予測された。今回開発した ELISA は、感度および特異性において erlotinib の TDM や動態研究

に非常に適していた。

第4節では、肝臓がん、腎臓がんの治療薬である sorafenib の ELISA について報告した。本 ELISA 法は、sorafenib 濃度 40~5000 ng/mL を再現性よく、正確に測定できた。また、抗 sorafenib 抗体は、sorafenib の主要代謝物である sorafenib-*N*-oxide に対してほとんど交差反応性を示さず、特異性が高い事が示された。今回開発した ELISA 法は、感度及び特異性において sorafenib の TDM や動態研究に非常に適していることが示唆された。

以上、4種類のがん分子標的治療薬の TDM や動態研究に応用可能な competitive ELISA に成功した。本法は、高感度で特異的であり、さらに、簡便さ、経済性、安全性、多数検体処理能力などの特徴を持っている。また、キット化や全自動化されれば、多くの施設で利用可能になり、これら薬物の適正使用に貢献できる。さらに、この ELISA 法の開発技術は開発したがん分子標的治療薬のみならず、その他のがん分子標的治療薬にも応用可能である。

第3章では、がん分子標的治療薬 imatinib に対する sandwich ELISA の開発について報告した。薬物の代謝物が多種多様に存在する場合、1種類の抗体ではその薬物のすべての代謝物の影響を取り除くことができない可能性があるため、1種類の抗体を用いる competitive ELISA では、十分な特異性が得られない場合がある。そこで、imatinib 構造のほぼ中心部分から二分する2種類の部分構造体 (MPMB および AMPP) をハプテンとして imatinib 抗原を作製し、立体障害を起こさずに同時に薬物の両端から結合できるような2種類の抗体でサンドイッチすることで、薬物がどのように代謝されたとしても、その代謝物の影響を受けない超特異的な sandwich ELISA が可能になると考え、開発を行った。

Imatinib 濃度 64 pg~8 ng/mL の範囲を再現性良く検出することができる

sandwich ELISA の開発に成功した。本法は 2 つの抗体で imatinib のほとんどの構造部分を覆っているため、主要代謝物である *N*-desmethyl imatinib やその他の代謝物や類似化合物に対して殆ど反応性を示さず、非常に特異的であった。本法は簡易で特異的であることから imatinib の TDM や薬物動態研究などを進める上で有用なツールと考えている。

これまで分子量 1,000 以下の低分子薬物は小さすぎて 2 種類の抗体でサンドイッチすることができないと考えられ、低分子薬物の sandwich ELISA は殆ど開発されていなかった。本研究の成功により、imatinib と同程度あるいはそれ以上の大きさの構造を有する薬物であれば、超特異的な sandwich ELISA が開発できる可能性が証明された。今まで、代謝物の影響で特異的な免疫測定法の開発が困難だった薬物に対しても本法が利用されることが期待される。

第 4 章では、2 型糖尿病治療薬 alogliptin に対する特異モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学法の開発について述べた。今回作製した特異モノクローナル抗体 (AAG-78 mAb) は、inhibition および binding ELISA によって、AG に特異的であることが確認された。免疫組織化学法によって明らかとなった、小腸の各部位での AG の染色パターンはほぼ同様であり、吸収上皮細胞、腸腺上皮細胞、結合組織、神経細胞および平滑筋組織で陽性であった。染色強度は、小腸の下部に行くに従って強くなったので、AG は小腸の上部よりも下部からより積極的に吸収されると考えられる。さらに、ペプチドの分解および取り込みに関与する膜結合型の DPP-4 が吸収上皮細胞の微絨毛に存在しているため、AG は小腸からのタンパク質およびペプチドの吸収に影響を及ぼしている可能性がある。また、AG は基底顆粒細胞や腸管の神経細胞にも局在していた。これらの結果は、薬物が腸管の分泌能および運動性に影響を与える可能性を示唆

している。結論として、今回作製した抗 AG mAb は AG に対して非常に特異的であり、この mAb を用いて細胞および組織における AG 局在の解析が可能であることが示された。

参考文献

- [1] 高島英伍, 薬学概論, 廣川書店
- [2] Picard S, Titier K, et al., Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 109, 3496-3499, (2007).
- [3] Guilhot F, Hughes TP, et al., Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial. *Haematologica*. 97, 731-738, (2012).
- [4] Pirro E, Francia S, et al., A new HPLC-UV validated method for therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors in leukemic patients. *J Chromatogr Sci*. 49, 753-7, (2011).
- [5] Merienne C, Rousset M, et al., High throughput routine determination of 17 tyrosine kinase inhibitors by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 150, 112-120, (2018)
- [6] Rosalyn S, Solomon A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*. 39(7), 1157-1175, (1960).
- [7] Masashi S, Hayato M, et al., Differences in accumulation of anthracyclines daunorubicin, doxorubicin and epirubicin in rat tissues revealed by immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol*. 133(6), 677-82, (2010).
- [8] Xia W, Mullin RJ, et al., Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/ erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene*. 21, 6255-6263, (2002).
- [9] Geyer CE, Forster J, et al., Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 355, 2733-2743, (2006).
- [10] Golemovic M, Verstovsek S, et al., AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res*. 11, 4941-4947, (2005).

- [11] Weisberg E, Manley PW, et al., Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 7, 129-141, (2005).
- [12] Giles FJ, Yin OQ, et al., Nilotinib population pharmacokinetics and exposure-response analysis in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69, 813-823, (2013).
- [13] Shepherd FA, Rodrigues J, et al., Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.* 353, 123-132, (2005).
- [14] Czarnecka AM, Korzeń P, et al., Prolonged complete response following gemcitabine-erlotinib combined therapy in advanced pancreatic cancer, *Oncol. Lett.* 11, 1101-1104, (2016).
- [15] Hein R, Bosch RT, et al., Fatal interstitial lung disease associated with high erlotinib and metabolite levels. A case report and a review of the literature, *Lung Cancer.* 75, 391-397, (2012).
- [16] Sato S, Kurishima K, et al., Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer patients undergoing dose reduction and those with a low body surface area, *Mol. Clin. Oncol.* 2, 604-608, (2014).
- [17] Yamada K, Azuma K, et al., Phase II Trial of Erlotinib in Elderly Patients with Previously Treated Non-small Cell Lung Cancer: Results of the Lung Oncology Group in Kyushu (LOGiK-0802), *Anticancer Res.* 36, 2881-2887, (2016).
- [18] Hughes AN, Brien ME, et al., Overcoming CYP1A1/1A2 mediated induction of metabolism by escalating erlotinib dose in current smokers, *J. Clin. Oncol.* 27, 1220-1226, (2009).
- [19] Ling J, Fettner S, et al., Effect of food on the pharmacokinetics of erlotinib, an orally active epidermal growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitor, in healthy individuals, *Anticancer Drugs.* 19, 209-216, (2008).
- [20] Lu JF, Eppler SM, et al., Clinical pharmacokinetics of erlotinib in patients with solid

tumors and exposure-safety relationship in patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 136-145, (2006).

- [21] Wilhelm S, Carter C, et al., Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 835-844, (2006).
- [22] Liu L, Cao Y, et al., Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 66, 11851-11858, (2006).
- [23] Lee HJ, Ryu H, et al., Sorafenib for patients with differentiated thyroid cancer. *Lancet.* 385-228, (2015).
- [24] Ogasawara S, Kanai F, et al., Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Int.* 5, 850-856, (2011).
- [25] Shimada M, Okawa H, et al., A quantitative HPLC-UV method for determination of serum sorafenib and sorafenib N-oxide and its application in hepatocarcinoma patients. *Tohoku J. Exp. Med.* 233, 103-112, (2014).
- [26] Boudou P, Narjoz C, et al., Early sorafenib-induced toxicity is associated with drug exposure and UGT1A9 genetic polymorphism in patients with solid tumors: a preliminary study. *PLoS ONE.* 7, e42875, (2012).
- [27] Boudou P, Ropert S, et al., Variability of sorafenib toxicity and exposure over time: a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Oncologist.* 17, 1204-1212, (2012).
- [28] Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs.* 69, 223-240, (2009).
- [29] Gomo C, Coriat R, et al., Pharmacokinetic interaction involving sorafenib and the calcium-channel blocker felodipine in a patient with hepatocellular carcinoma. *Invest. New Drugs.* 29, 1511-1514, (2011).
- [30] Noda S, Shioya M, et al., Pharmacokinetic interaction between sorafenib and prednisolone in a patient with hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother.*

Pharmacol. 72, 269-272, (2013).

- [31] Terada T, Noda S, et al., Management of dose variability and side effects for individualized cancer pharmacotherapy with tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 152, 125-134, (2015).
- [32] Fumoleau P, Koch KM, et al., A phase I pharmacokinetics study of lapatinib and tamoxifen in metastatic breast cancer (EORTC 10053 Lapatam study). *Breast.* 23, 663-669, (2014).
- [33] Koch KM, Reddy NJ, et al., Effects of food on the relative bioavailability of lapatinib in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 27, 1191-1196, (2009).
- [34] Ohgami M, Homma M, et al., Influence of meal and antacid drugs on the blood concentration of tyrosine kinase inhibitors. *Jpn. J. Ther. Drug Monit.* 30, 125-133, (2013).
- [35] Castellino S, Mara M, et al., Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: implications for hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 40, 139-150, (2012).
- [36] Larson RA, Yin OQ, et al., Population pharmacokinetic and exposure-response analysis of nilotinib in patients with newly diagnosed Ph⁺ chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68, 723-733, (2012).
- [37] Tanaka C, Yin OQ, et al., Clinical pharmacokinetics of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87, 197-203, (2010).
- [38] Yin OQ, Gallagher N, et al., Effect of the proton pump inhibitor esomeprazole on the oral absorption and pharmacokinetics of nilotinib. *J. Clin. Pharmacol.* 50, 960-967, (2010).
- [39] DeRemer DL, Ustun C, et al., Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Ther.* 30, 1956-1975, (2008).

- [40] Lankheet NA, Schaake EE, et al., Concentrations of Erlotinib in Tumor Tissue and Plasma in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients After Neoadjuvant Therapy, *Clin. Lung Cancer*. 16, 320-324, (2015).
- [41] Togashi Y, Masago K, et al., Pharmacokinetics of erlotinib and its active metabolite OSI-420 in patients with non-small cell lung cancer and chronic renal failure who are undergoing hemodialysis, *J. Thorac. Oncol.* 5, 601-605, (2010).
- [42] Weeman BK, Schuurs AH, The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays. *Immunochemistry*. 12, 667-670, (1975).
- [43] Fujiwara K, Saikusa H, et al., Enzyme immunoassay for the quantification of mitomycin C using β -galactosidase as a label, *Cancer Res.* 42, 1487-1491, (1982).
- [44] Blanchet B, Billemont B, et al., Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 1109-1114, (2009).
- [45] Lathia C, Lettieri J, et al., Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57, 685-692, (2006).
- [46] Ueda H, Tsumoto K, et al., Open sandwich ELISA: a novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region, *Nat. Biotechnol.* 14, 1714-1718, (1996).
- [47] Suzuki C, Ueda H, et al., Open sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of small haptens, *Anal. Biochem.* 286, 238-246, (2000).
- [48] Aburatani T, Sakamoto K, et al., A general method to select antibody fragments suitable for noncompetitive detection of monovalent antigens, *Anal. Chem.* 75, 4057-4064, (2003).
- [49] Wei TQ, Zheng YF, et al., Sandwich assay for tacrolimus using 2 antitacrolimus antibodies, *Clin. Chem.* 60, 621-630, (2014).

- [50] Qu H, Wang X, et al., Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for naringin, *Anal. Chim. Acta.* 903, 149-155, (2016).
- [51] Capdeville R, Buchdunger E, et al., Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 493-502, (2002).
- [52] Dagher R, Cohen M, et al., Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors, *Clin. Cancer Res.* 8, 3034-3038, (2002).
- [53] Deininger M, Buchdunger E, et al., The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, *Blood.* 105, 2640-2653, (2005).
- [54] Kawaguchi T, Hamada A, et al., Relationship between an effective dose of imatinib, body surface area, and trough drug levels in patients with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Hematol.* 89, 642-648, (2009).
- [55] Faber E, Friedecký D, et al., Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting, *Ann. Hematol.* 91, 923-929, (2012).
- [56] Yoshida C, Komeno T, et al., Adherence to the standard dose of imatinib, rather than dose adjustment based on its plasma concentration, is critical to achieve a deep molecular response in patients with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Hematol.* 93, 618-623, (2011).
- [57] Saita T, Shin M, et al., Development of a specific and sensitive enzymelinked immunosorbent assay for the quantification of imatinib, *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1964-1968, (2013).
- [58] Saita T, Yamamoto Y, et al., Preparation of antibodies and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the tyrosine kinase inhibitors Lapatinib and Nilotinib, *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1652-1657, (2015).
- [59] Miura M, Takahashi N, et al., Quantitative determination of imatinib in human plasma with high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection, *J.*

Chromatogr. Sci. 49, 412-415, (2011).

- [60] Weiler EW, Zenk MH, Iodinated digoxin derivatives with improved reactivity and stability, for use in radioimmunoassay, *Clin. Chem.* 25, 44-47, (1979).
- [61] Quinton J, Charruault L, et al., Toward the limits of sandwich immunoassay of very low molecular weight molecules, *Anal. Chem.* 82, 2536-2540, (2010).
- [62] Gschwind HP, Pfaar U, et al., Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers, *Drug Metab. Dispos.* 33, 1503-1512, (2005).
- [63] Fujiwara K, Yasuno M, et al., Novel preparation method of immunogen for hydrophobic hapten, enzyme immunoassay for daunomycin and adriamycin. *J. Immunol. Methods.* 45, 195-203, (1981).
- [64] Fujiwara K, Shin M, et al., Distribution of anticancer antibiotic daunomycin in the rat heart and kidney revealed by immunocytochemistry using monoclonal antibodies. *Histochem. Cell Biol.* 127, 69-77, (2007).
- [65] Fujiwara K, Yoshizaki Y, et al., Immunocytochemistry for vancomycin using a monoclonal antibody that reveals accumulation of the drug in rat kidney and liver. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5883-5891, (2012).
- [66] Fujiwara K, Shin M, et al., Immunocytochemistry for amoxicillin and its use for studying uptake of the drug in the intestine, liver, and kidney of rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 62-71, (2011).
- [67] Clancy B, Cauller LJ, Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J. Neurosci. Methods.* 83, 97-102, (1998).
- [68] Haraguchi CM, Yokota S., Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of Epon-embedded tissues. *Histochem. Cell Biol.* 117, 81-85, (2002).
- [69] Fukasawa KM, Fukasawa K, et al., Immunohistochemical localization of dipeptidyl

aminopeptidase IV in rat kidney, liver, and salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 337-343, (1981).

[70]Hartel S, Gossrau R, et al., Dipeptidyl peptidase (DPP) IV in rat organs. Comparison of immunohistochemistry and the activity histochemistry. *Histochemistry.* 89, 151-161, (1988).

[71]Lambeir AM, Durinx C, et al., Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40, 209-294, (2003).

[72]Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85, 9-24, (1999).

[73]Drucker DJ, Nauck NA, The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 368, 1696-1705, (2006).

[74]Mest HJ, Mentlein R, Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 48, 616-620, (2005).

[75]Saisho Y, Alogliptin benzoate for management of type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk Manag.* 11, 229-243, (2015).

[76]Lee B, Shi L, et al., Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy profiles of alogliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4, in rats, dogs, and monkeys. *Eurp. J. Pharmacol.* 589, 306-314, (2008).

[77]Takeda Pharmaceuticals U.S.A., Inc., 2013, Necina (alogliptin), prescribing information.

[78]Christopher R, Convingtone P, et al., Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of single increasing doses of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in healthy male subjects. *Clin. Ther.* 30, 513-527, (2008).

[79]Scheen AJ, Pharmacokinetics of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors. *Diabetes Obes.*

Metab. 12, 648-658, (2010).

- [80] Bai JP, Distribution of brush-border membrane peptidases along the rat intestine. Pharm. Res. 11, 897-900, (1994).
- [81] Mentzel S, Dijkman HB, et al., Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice. J. Histochem. Cytochem. 1996, 445-461, (1996).
- [82] Fothergill LJ, Furness JB, Diversity of enteroendocrine cells investigated at cellular and subcellular levels: the need for a new classification scheme. Histochem Cell Biol. 150, 693-702, (2018)
- [83] Suzuki H, Yamada K, et al., CXCL14-like Immunoreactivity Exists in Somatostatin-containing Endocrine Cells, and in the Lamina Propria and Submucosal Somatostatinergic Nervous System of Mouse Alimentary Tract. Acta Histochem Cytochem. 50, 149-158, (2017).

謝辞

本研究を行うに際し、終始ご懇切にご指導を賜りました進正志教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する過程で適切な実験指導、ご助言を賜りました齋田哲也教授に心より御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ご校閲ならびに有益なご助言をいただき、副査をご快諾くださいました安藤祥司教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は、佐賀大学病院、九州中央病院、滋賀医科大学病院との共同研究です。患者さんの血清サンプルの提供と HPLC による分析や、様々なご助言をいただき深く感謝いたします。