



Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-05-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 柴田, 海斗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003544

博士（医学）柴田 海斗

論文題目

Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin

（固相化トリプシンを用いたヒト血清中セツキシマブの絶対濃度測定のための簡易で迅速な LC-MS/MS 法）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

セツキシマブは上皮成長因子受容体を標的としたヒト・マウスキメラ型のモノクローナル抗体であり、頭頸部がんや大腸がんの治療薬として用いられている。がん患者において血中セツキシマブ濃度はその有効性や副作用に関連する可能性があるが、簡便性と定量性に優れた血中濃度測定法が開発されておらず、実臨床での血中動態はほとんど評価されていない。抗体医薬品のヒト血中濃度測定には ELISA 法などの免疫学的測定法が繁用されるが、測定に用いる抗体の作製に時間と費用を必要とするのに加え、患者に適用した場合に内因性物質との干渉が問題となる。

近年、これらの問題を克服するため、抗体精製と定量的標的プロテオミクスを組み合わせた抗体医薬品の血中濃度測定法が開発されている。既存の報告では、血清中に含まれるタンパク質から免疫グロブリンを精製し、トリプシン溶液によってペプチド断片に消化した後、セツキシマブに由来するサロゲートペプチドを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）によって測定する。この方法ではヒト血清中セツキシマブを特異的に測定できる一方で、抗体精製が煩雑であり、精製や消化に要する時間や費用の問題があるため、実臨床での適用には不向きである。

そこで本研究では、抗体精製を行わないヒト血清中セツキシマブの絶対濃度測定のための簡易で迅速な LC-MS/MS 法を確立することを目的とした。さらに、確立した測定法をがん患者へ適用し、その定量特性について免疫学的測定法との比較を行った。

〔患者ならびに方法〕

セツキシマブのトリプシン消化物から、フーリエ変換型質量分析計（FT-MS）を用いてセツキシマブ由来のペプチドを同定した。トリプル四重極型質量分析計（TQ-MS）を用いてサロゲートペプチドの定量条件の最適化を行った。内部標準物質（IS）にはその安定同位体標識ペプチドを使用した。血清の前処理に関して、抗体精製を行わずに変性、還元、アルキル化を行い、固相化トリプシンを用いて 10 分間の遠心消化を 2 回繰り返し、血清消化物を精製した。その後、精製物を TQ-MS に接続した液体クロマトグラフへ注入し、サロゲートペプチド

と IS をポジティブイオン多重反応モニタリングモードで定量分析した。確立した絶対濃度測定法に対して、米国食品医薬品局（FDA）ガイダンスに従ったバリデーションを実施した。

対象患者は、浜松医科大学医学部附属病院において、頭頸部がんに対してセツキシマブの治療を受けている 15 名とした。セツキシマブの治療を開始して投与 5 回目以降における患者を対象に、本測定法および ELISA 法を用いて血清中セツキシマブ濃度を測定し、それらの結果を比較した。

本研究のヒトを対象とした臨床研究は、浜松医科大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。本研究のヒトを対象としたすべての試験は、ヘルシンキ宣言の精神を遵守し実施した。被験者には、本研究について口頭および文書で説明した後、自由意思に基づく参加への同意を文書で得た。

[結果]

FT-MS で同定したセツキシマブ由来のペプチドの中から、可変領域に位置する ASQSIGTNIHWYQQR のペプチドをサロゲートペプチドとして選択した。LC-MS/MS による分析時間は 10 分で、セツキシマブを添加した血清消化物からサロゲートペプチドおよび IS のピークが 3.27 分に観察された。その一方で、健康成人およびがん患者の血清消化物からサロゲートペプチドのピークは観察されなかった。血清中セツキシマブは 4–200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で直線性を示し、その定量下限は 4 $\mu\text{g/mL}$ であった。健康成人 6 名の血清消化物を用いたマトリックス効果の評価では、サロゲートペプチドのマトリックスファクター（MF）は 59.5%であったが、IS で補正した MF は 90.0%であった。測定内・測定間の精度および真度は、それぞれ 13.2%以下、88.0–100.7%以内であった。

本測定法で得られたがん患者の血清中セツキシマブの濃度範囲は 19–140 $\mu\text{g/mL}$ であり、これら測定値は ELISA 法で得られた測定値と良好に相関し ($r = 0.899$ 、 $P < 0.01$)、その平均バイアスは 1.5%であった。

[考察]

サロゲートペプチドの配列にはセツキシマブの相補性決定領域が含まれており、ヒト血清消化物からそのピークは確認されなかったため、サロゲートペプチドの選択は妥当であると考えられた。トリプシン溶液を用いた長時間の消化では夾雑ペプチドが多量に発生し、質量分析計でのイオン化飽和が起きるため、その対策として抗体精製が行われている。本測定法では血清に対して抗体精製を行わず、固相化トリプシンを用いて 20 分で迅速消化しているため、既存の方法に比べて前処理時間が短縮された。また、サロゲートペプチドに及ぼすヒト血清消化物のマトリックス効果は、IS 補正により制御可能であった。分析のバリデーションに関して、本測定法で得られた真度・精度は米国 FDA ガイダンスに従っていた。

本測定法で得られたがん患者の血清中セツキシマブ濃度は検量線の範囲内であり、本測定法と ELISA 法との間には高い相関性が認められた。

〔結論〕

本研究において、固相化トリプシンを用いたヒト血清中セツキシマブの絶対濃度測定のための簡易で迅速な LC-MS/MS 法を確立した。本測定法はがん患者への適用が可能であり、測定値における免疫学的測定法との良好な相関性および同等性が認められた。