

ラスブリカーゼ適正使用を目標とする抗ラスブリカーゼ抗体測定に関する研究

藤田保健衛生大学医学部
血液内科 臨床教授 赤塚 美樹

1. 研究の背景・目的

ラスブリカーゼは尿酸分解酵素であり、腫瘍の増殖が激しい造血器腫瘍において初発時、もしくは化学療法導入時に併発する高尿酸血症および続発する腎不全の予防ないし治療として臨床に導入され用いられるようになった。ラスブリカーゼは真菌由来であり抗原性があるため、投与後に抗ラスブリカーゼ抗体が産生される可能性があるが、現在実臨床において抗体の測定は困難である。再投与が必要となる病状において危険な免疫反応を伴う有害事象が報告されているが、実際の抗体産生頻度や抗体価の動態については詳しい情報がなく、安全性が確立していないのが現状である。また抗体産生の有無の正式な検査は製薬会社もルーチンには行っていない。研究レベルでは国内でも ELISA で測定した報告があるが、標準化されていないため日常診療には利用できない。

以上より本研究ではまず抗ラスブリカーゼ抗体の生成を評価する ELISA を確立し、ラスブリカーゼを使用した血液腫瘍患者の試料（血清）を投与前・後に採取し、抗体生成の有無を測定するとともにアナフィラキシーショックの出現との関与について詳細に解明することを目的とした。これに加えて ELISA と同等な感度で、より簡易に測定できる系を開発することを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 対象症例：

申請者の施設の血液内科で腫瘍崩壊症候群に伴う高尿酸血症に対してラスブリカーゼを使用予定でありインフォームド・コンセントを得られた患者 50 例を目標とした。採血のタイミングとして、day1（入院時、ラスブリカーゼ投与前）、day8（±3 日）、day15（±3 日）、day22（±3 日）、day29（±3 日）、以後 3 ヶ月（±2 週間）、6 ヶ月（±3 週間）、1 年（±3 週間）の 8 ポイントを設定した。得られた血液は遠心分離し、血清部分を分注し-30℃のフリーザーで測定まで凍結保存した。本研究は藤田保健衛生大学医学研究倫理審査委員会にて承認を受け（HM14-301、承認日 2015 年 03 月 12 日）、患者からは書面にて同意を得た上で採血やデータの収集を行った。

(2) ELISA による抗体価測定：

測定には ELISA 法を用いた。測定時に標準曲線を作成する陽性コントロールとして、ラスブリカーゼ製剤（ラスリテック®）をウサギに複数回免疫し、その抗血清に

ついてプロテイン A/G カラムで精製して得られたポリクローナル IgG 抗体を用いた。ELISA の抗原としてラスブリカーゼ製剤を 1mg/mL に調整し、希釈して用いた。具体的には予備実験で決定されたラスブリカーゼ濃度で 96 穴 ELISA 用プレートをコーティングし、洗浄後にブロッキングバッファーで処理した。その後、2 倍ずつ段階希釈した被検血清、ウサギ抗ラスブリカーゼ抗体（陽性コントロール）を加えて室温でプレートを 1 時間振盪し、抗体を固相化ラスブリカーゼに結合させた。検出にはそれぞれ、ビオチン標識抗ウサギ抗体、ビオチン標識抗ヒト IgG 抗体を加えて 1 時間反応させた後に Poly-HRP20-Streptavidin 溶液を加え 30 分振盪後、最後に発色用の基質である 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 溶液を加えて発色させた。抗体の濃度は吸光度計にて 655nm における吸光度 (OD) を測定した。反応時間は陽性コントロール検体の吸光度が 0.1 となるのを目安に調節した。

(3) フローサイトメトリーを用いた抗体価測定法の開発：

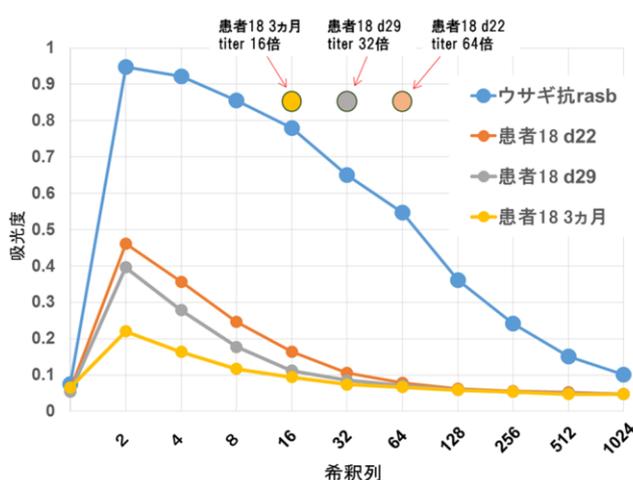
ベクトンディッキンソン社から Cytometric Bead Array (CBA) Functional Bead を購入し、ジチオトレイトールで還元した後、sulfo-SMCC でラスブリカーゼをビーズに結合した。このビーズ浮遊液と抗ラスブリカーゼ抗体（陽性コントロールウサギ抗体、患者血清）を混合後に振盪して結合させ、1 回洗浄後にそれぞれ Phycoerythrin 標識抗ウサギ IgG 抗体、Phycoerythrin 標識抗ヒト IgG 抗体を添加し結合させ、フローサイトメトリーでビーズの発する蛍光強度を測定した。解析には専用の BD CBA Analysis Software を用いた。

3. 研究結果

(1) ELISA 法の確立：

ELISA の感度を最大とするとともに、擬陽性やバックグラウンドを防ぐために諸試薬の濃度の適正化を行った。プレートに結合する抗原に用いたラスブリカーゼの最終濃度は 1.0µg/mL とし、検出に用いるビオチン標識抗ウサギ/ヒト IgG/IgA/IgM 抗体の濃度は 2.0µg/mL が至適濃度となった。また Poly-HRP20-Streptavidin 試薬は 4,000 倍希釈にて妥当な結果を得た。図 1 に典型的な抗ラスブリカーゼ抗体液の希釈列と吸光度の関係を示す。ポジティブコントロールに用いたウサギ抗ラスブリカーゼ（開始濃度 4.35 µg/mL）は少なくとも 1024 倍希釈までは検出されたため、抗体の検出感度は 4.2ng/mL 付近と考えられた。患者血清の評価には標準曲線を用いて抗体濃度に変換せず、吸光度の低下がフラットになった時点における希釈倍率を抗体価とこれ以降の患者検体の評価を行った。

図1 抗体価の決定の1例

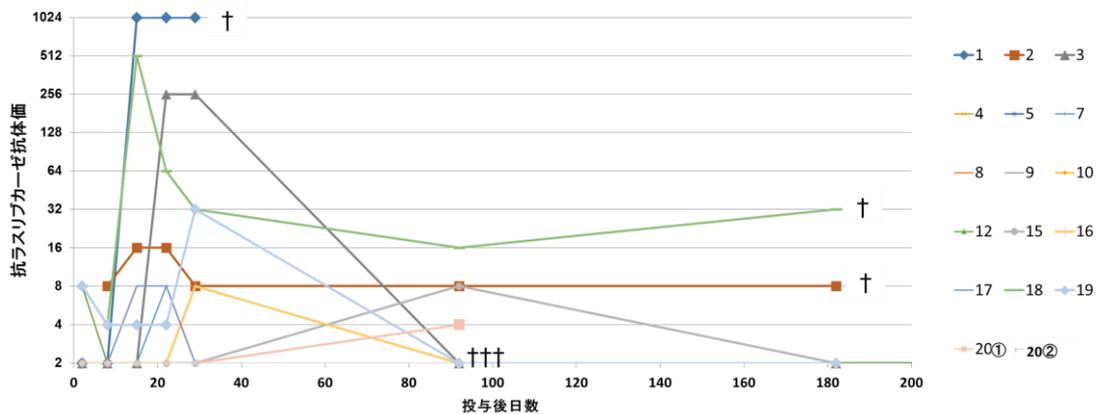


(2) ラスブリカーゼ投与例における解析

今回の報告時点で 20 例が本研究に登録され、のべ 21 回の投与が行われた。内訳は悪性リンパ腫 11 例、急性リンパ性白血病 4 例、急性骨髄性白血病 4 例、多発性骨髄腫 1 例であった。初発時投与は 14 回、再発時投与は 7 例であった。再発 7 例のうち 3 例がラスブリカーゼの再投与であった。図 2 にラスブリカーゼ投与後の抗体産生状況について経時的推移を示す。

図2 ラスブリカーゼ抗体価の推移

患者番号14は投与前から発色を認めたが、投与後も吸光度に上昇がなく、感作はなかったものとし、擬陽性として除いた。
患者番号6,11,13は生存期間が短く、除いた。



全体を通じて 16 例で day29 の試料を得られた。各時点での抗体検出頻度を表 1 に示す。さらにこの 16 例のうち 5 例 (32%)で投与後いずれかの時点で少なくとも 1 回以上ラスブリカーゼ抗体が検出された。

表1. 経時的な抗ラスブリカーゼ抗体の陽性率

経過日数	陽性例/評価可能例	陽性率
8日	0 / 17	0 %
15日	3 / 17	18 %
22日	4 / 17	24 %
29日	4 / 16	25 %
3月	1 / 14	7 %
6月	1 / 10	10 %
1年	0 / 5	0 %

3ヶ月の時点で 4 例中 3 例で抗体が検出されなくなった。また、3 症例が再投与を受けた (表 2)。

表2. 再投与例の状況

経過日数	初回投与からの期間	陽転時期	アレルギー症状
case 1	297日	15, 22, 29日（以降は死亡）	なし
case 2	237日	15,22日、29日以降陰性	なし
case 20	108日	陽転せず	なし

表2に示すように、3例中2例で経過中に抗体が検出されたが、いずれの再投与例においてもアレルギー症状は認められなかった。

(3) フローサイトメトリーを用いた抗体価測定法

ELISAの抗原に用いたラスブリカーゼを用いてビーズへの結合を試みたが、陽性コントロールであるウサギ抗ラスブリカーゼ抗体を用いたタイトレーション実験ではELISAの1/100以下の感度しか得られなかった。医薬品のラスブリカーゼに含まれている安定化のための添加物が原因と推測されたため、Sephadex G-25で低分子化合物を除去した後、Centricon-30で濃縮してから再度同様な結合反応を行った。この結果、フローサイトメトリーで検出された下限のウサギ抗ラスブリカーゼ抗体濃度は1.0ng/mLとなり、ELISAよりもやや感度が高いことが判明した。

4. 考察

本研究によりラスブリカーゼ抗体はラスブリカーゼ製剤を適切に希釈し抗原とし、抗ヒトイムノグロブリン抗体を検出試薬とすることで、通常のELISA法を用いて容易に測定できることがわかった。また陽性コントロール（ウサギ抗ラスブリカーゼ抗体）の段階希釈実験によりELISAの感度は約4ng/mLであり、成人のイムノグロブリン濃度を平均1g/dLとするとその1/250万の特異抗体を検出できると判明した。

本研究ではラスブリカーゼ投与を受けた患者の32%がday 29までに抗体を産生した。他方で、本邦で行われた50名を対象とした第2相試験におけるday 29の時点の抗体産生率は0.15mg/kg投与群で8%、0.2mg/kg投与群で12%と報告されており

(Ishizawa K, et al. Cancer Sci.100:357-362, 2009)、本研究ではその2倍以上の頻度であった。この説明として本研究の対象は20例と少なくまだ誤差が大きい可能性、我々のELISAの感度が高かった可能性、我々のコホートには再投与例が3例あり、抗体を産生した2例が含まれたために陽性例が見かけ上過大評価された可能性などが挙げられる。感度については、Ishizawaらの報告ではELISAの感度について言及がないため比較は困難である。また少数例ではあるが再投与例の3例中2例(67%)が抗体を産生したことから、メモリーB細胞が形成されており、再投与時に反応した可能性がある。さらに抗体は5例中3例でday 15から検出されており、免疫抑制を来たしうる化学療法中にも関わらずラスブリカーゼのような異物に対する免疫反応はそれほど抑制されていないことが判明した。

本研究の目的の1つに抗体産生とアナフィラキシー発症との関連を調査することであったが、対象の20例においてはアナフィラキシーを起こした症例がなかったため、今後さらに症例を重ねて検討する必要がある。

最後に、短時間で抗体価が測定できるようにラスブリカーゼを固相化した蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー測定の新系も開発できる目処が立った。現段階では専用のソフトウェアが解析に必要であるが、臨床検査室で用いられているいかなるフローサイトメトリー測定機器でも抗体が測定できるように、カスタム化出来ないか検討中である。もし抗体の有無を日常検査レベルで測定できるようになれば、ラスブリカーゼの再投与時における安全性の指標の一つとして利用出来るようになる可能性がある。

以上の研究成果は下記の学会で発表した。症例が蓄積でき次第、論文化予定である。

5. 文献

<学会発表>

安藤舞子、赤塚美樹、伊藤佳織、他 10 名. 「Rasburicase 投与後の抗体産生の頻度と抗体価の推移に関する研究」、第 80 回日本血液学会学術集、ポスターPS2-42-3. 東京国際フォーラム、東京. 2017 年 10 月 20 日-22 日. (抄録:臨床血液 58 巻 9 号、1763 頁、2017 年)