

薬物相互作用解明を志向した関節リウマチ治療薬の分析に関する研究

2018

長崎国際大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

高田 誠

Study on development of assay method of the anti-rheumatic drugs  
to analyze the drug-interactions

Makoto Takada



## 目次

緒言.....	-1-
第1章 MTX と NSAIDs の HPLC 同時定量法の開発.....	-6-
1-1 HPLC システム.....	-9-
1-2 HPLC 条件の検討.....	-9-
1-2-1 クロマトグラム.....	-9-
1-2-2 測定波長の検討.....	-10-
1-2-3 カラムの検討.....	-12-
1-2-4 移動相の検討.....	-12-
1-2-5 検出限界、精度及び直線性.....	-13-
1-3 ヒト血清試料への適用.....	-14-
1-3-1 血清試料の前処理.....	-14-
1-3-2 クロマトグラム.....	-15-
1-3-3 前処理法の検討.....	-16-
1-3-4 回収率及び精度.....	-17-
1-4 小括及び考察.....	-18-
第2章 HPLC 自然蛍光検出法による TCZ 定量法の開発.....	-19-
2-1 製剤の保存安定性及び凍結・解凍安定性評価への適用.....	-22-
2-1-1 HPLC システム.....	-22-
2-1-2 クロマトグラム.....	-23-
2-1-3 測定波長の検討.....	-24-
2-1-4 移動相の検討.....	-25-
2-1-5 カラム温度の検討.....	-25-
2-1-6 検出限界、直線性及び精度.....	-26-
2-1-7 室温条件下における製剤の安定性.....	-26-
2-1-8 冷蔵保存条件下における製剤の安定性.....	-28-
2-1-9 凍結・解凍安定性.....	-29-
2-2 TCZ と IgG1 の分離検討.....	-30-

2-2-1	クロマトグラム.....	30-
2-2-2	前処理に用いる試薬.....	31-
2-2-3	前処理条件.....	32-
2-2-4	前処理に用いる試薬の影響.....	33-
2-2-5	試薬の性質による TCZ と IgG1 の表面電荷の変化.....	37-
2-2-6	TCZ の RPH 値と塩基性試薬の性質との相関性.....	39-
2-3	血清中 TCZ 濃度の定量.....	41-
2-3-1	HPLC システム.....	41-
2-3-2	TCZ 標準クロマトグラム.....	41-
2-3-3	前処理.....	42-
2-3-4	添加血清及びブランク血清のクロマトグラム.....	43-
2-3-5	カラム長さの検討.....	44-
2-3-6	移動相の検討.....	44-
2-3-7	前処理に用いる試薬の最適化.....	46-
2-3-8	標準添加検量線.....	49-
2-3-9	検出限界、回収率及び精度.....	50-
2-4	小括及び考察.....	51-
	総括.....	53-
	実験の部.....	55-
	謝辞.....	58-
	参考文献.....	59-

## 【略語表】

本論文では、以下の略語を用いた。

ADL	activities of daily living (日常生活動作)
bDMARDs	biological DMARDs (生物学的製剤)
CDR	complementarity-determining region (相補性決定領域)
CHO	chinese hamster ovary (チャイニーズハムスター卵巣)
COX-2	cyclooxygenase-2 (シクロオキシゲナーゼ-2)
CRP	C-reactive protein (C反応性タンパク)
csDMARDs	conventional synthetic DMARDs (従来型疾患修飾性抗リウマチ薬)
CX	celecoxib (セレコキシブ)
DAS	disease activity score (疾患活動性スコア)
DF	diclofenac (ジクロフェナク)
DL	detection limit (検出限界)
DMARDs	disease-modifying anti-rheumatic drugs (疾患修飾性抗リウマチ薬)
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay (電気化学発光免疫測定法)
EDA	ethylenediamine (エチレンジアミン)
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay (酵素免疫測定法)
Em	emission wavelength (蛍光波長)
Ex	excitation wavelength (励起波長)
HPLC	high-performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HT-RPLC	high-temperature reverse phased liquid chromatography (高温逆相液体クロマトグラフィー)
IgG1	immunoglobulin G1 (イムノグロブリン G1)
IL-6	interleukin-6 (インターロイキン-6)
IPA	isopropanol (イソプロパノール)
LBA	ligand binding assay (リガンド結合法)
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry (高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法)

LP	loxoprofen (ロキソプロフェン)
LX	lornoxicam (ロルノキシカム)
MP	mobile phase (移動相)
MTX	methotrexate (メトトレキサート)
MX	meloxicam (メロキシカム)
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs (非ステロイド性抗炎症薬)
ODS	octadecylsilyl (オクタデシルシリル)
Phe	phenylalanine (フェニルアラニン)
PyD	pyridine (ピリジン)
QOL	quality of life (生活の質)
RA	rheumatoid arthritis (関節リウマチ)
RIA	radio immunoassay (放射免疫測定法)
RPH	relative peak height (相対ピーク高さ)
RSD	relative standard deviation (相対標準偏差)
S/N	signal-to-noise ratio (シグナルーノイズ比)
SPR	surface plasmon resonance (表面プラズモン共鳴法)
SRM	selected reaction monitoring (選択反応モニタリング)
STD	standard (標準)
TAA	trialkylamine (トリアルキルアミン)
TCZ	tocilizumab (トシリズマブ)
TEA	triethylamine (トリエチルアミン)
TFA	trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
TMA	trimethylamine (トリメチルアミン)
TPA	tripropylamine (トリプロピルアミン)
TRFIA	time-resolved fluorescence immunoassay (時間分解蛍光免疫測定法)
Trp	tryptophan (トリプトファン)
Tyr	tyrosine (チロシン)
UFLC	ultra-fast liquid chromatography (超高速液体クロマトグラフィー)
UV	ultraviolet (紫外)

## 緒言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は世界中で人口の約 1%の罹患率と考えられており [1]、本邦でも 60~70 万人の患者が苦しんでいる [2]。年齢が 40~50 歳代の働き盛りの女性に発症のピークがあり [3]、身体的障害に加えて家族を含めての精神的、社会的問題、併せて国家の経済的損失も大きく、その対策は今や急務となっている。RA の主症状は多関節滑膜の炎症によって引き起こされる疼痛と進行性関節破壊であり、関節外症状として肺、腎臓、皮下組織などにも病巣が広がる全身性炎症疾患である。また、RA は諸治療法に対し抵抗性があり、関節破壊により長年にわたり重篤な運動機能障害に陥ることから、社会問題となっている。近年 RA の種々の自己抗原が見出され [4]、免疫機能亢進を基盤とする慢性炎症性自己免疫疾患であることが明らかとなってきたが、自己抗原のどれが炎症の原因となり、どれが組織損傷の結果として産生されたものかは不明確で、いまだに病因、病態は明らかとなっていない。

現在に至るまで RA の病因に対するアプローチはまだ十分ではなく、RA を予防することは不可能であり、また RA の根治を目指した治療は実用化されていない。そのため、現在の治療手段はすべて RA の病態を改善することにより臨床症状を改善させ、関節破壊の進行を防止することである。したがって、現時点での治療目標は RA の根底にある免疫異常を是正することを中心として、症状のコントロールや関節破壊の抑制、日常生活動作 (activities of daily living: ADL) 障害の改善、長期的予後の改善を目指すことである。RA に対する薬物投与方法に関する基本的な考え方として、従来はまず副作用の少ない非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) を投与して疼痛の軽減を図り、それだけでは症状が改善されない場合に効果の不足に応じて疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease-modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs) を上乗せしていく、いわゆるピラミッド方式が原則であった [5]。しかし、近年各種薬剤の薬理作用解明が進み、医療体系にはパラダイムシフトがもたらされ、発症早期から DMARDs による積極的な治療を行い、タイトコントロールによる寛解を得て副作用の少ない薬剤に変えていく、いわゆるステップダウンブリッジ方式が一般化されてきている [6]。DMARDs は直接的な鎮痛作用はみられず速効性もないが、長期的には RA の疾患活動性を低下させ、関節破壊の進行を抑制するため発症早期か

らの使用が推奨されている [7, 8]。このように変化した理由として、NSAIDs では関節の疼痛がコントロールできたとしても関節破壊の進行を抑制できないこと、潰瘍や腎機能障害などの副作用が少なくないことなどがあげられる [9, 10]。

本邦における RA 治療もここ数年で飛躍的に進歩し、治療方針は寛解を導入して長期間維持する治療が進められている。現在における RA の薬物治療は、疾患活動性の制御と長期予後の改善を目的に投与する従来型疾患修飾性抗リウマチ薬 (conventional synthetic DMARDs: csDMARDs)、生物学的製剤 (biological DMARDs: bDMARDs) 及びステロイドを中心とする。治療方針を決定する上で、この 3 種類の薬剤をどの時点でどのように投与するか RA 治療アルゴリズムが重要である。治療アルゴリズムでは、csDMARDs の治療は診断が下ればできるだけ早く始めるべきと推奨されている [7, 8]。csDMARDs の草分けは金療法であり、Jacques Forestier (1929) により報告された [11]。これから 30 年以上後に次々と csDMARDs が開発され、RA の長期経過改善効果が期待されてきた。しかし、これらの csDMARDs はリウマチ炎症の寛解はもたらすが、関節破壊の経過を抑え得ていなかったことが認識され始めた。また、csDMARDs の中で免疫調節薬に分類される薬物に共通する問題点としては、効果発現までに数ヶ月間を要すること、効果に個人差が大きいことがあげられる [12]。その他にも、数ヶ月～数年の間に効果減弱 (エスケープ現象) がみられること、肺障害や血液障害などの重篤な副作用がみられることなどがある [13]。そこで、さらに有効な薬剤効果を求めて、csDMARDs の 2 剤併用、3 剤併用などが試み続けられたが、長期経過の評価では併用療法は脱落例が増す反面、有効性は不明確でガイドラインでの推奨度は低くなっている [2]。それに対して、csDMARDs の中で免疫抑制薬に分類されるメトトレキサート (methotrexate: MTX) は、他の csDMARDs に比べ効果発現が速く、高い有効率・継続率と優れた骨破壊進行抑制効果、生命予後の改善や心筋梗塞の発症率減少効果を兼ね備えた低分子 csDMARDs である [14-16]。そのため、MTX は RA 治療においてアンカードラッグとして位置づけられ、活動性 RA 患者に対する最初の治療手段の 1 つに含めるべきであると推奨されていることから、多くの場合早期診断が付き次第 MTX の治療が開始される [2]。また、効果が十分でない場合でも、bDMARDs や他の csDMARDs との併用療法のベースとなる薬とみなされ、生活の質 (quality of life: QOL) 改善や生命予後の改善も期待されている。一般的に MTX の効果が現れるまでの間、RA に



よる関節炎に伴う疼痛、腫脹などの症状を軽減することを目的として初期から対症的に NSAIDs が併用されている。現在の薬物療法の進歩により長期的な NSAIDs 使用は減少傾向にあるが、疾患活動性がコントロールされるまで、あるいはコントロール後も関節構造の破壊に伴う痛みについては依然として鎮痛薬の必要性は高い。一方で、MTX は、NSAIDs との薬物間相互作用により、血中濃度の上昇とそれに伴う骨髄抑制、消化器障害などの副作用の発現が報告されている [17, 18]。そのため、MTX と NSAIDs を併用する上で、血中濃度を同時に測定することは、薬物動態学的観点から、薬物相互作用の確認のみならず、副作用回避や、治療効果の確認上も有用であると考えられる。

bDMARDs は 2003 年以降に導入され、RA の病態に深く関与するサイトカインなどを選択的に抑制することを目的として遺伝子工学的技術を駆使して開発された抗体ないし融合蛋白で、いずれも注射薬である。インフリキシマブ (レミケード®) やアダリブマブ (ヒュミラ®)、アバタセプト (オレンシア®)、トシリズマブ (アクテムラ®) などの bDMARDs による日本人 RA での寛解導入率が報告され、それと関連する要因が明らかとなった [19-21]。いずれも従来の RA 治療ではなかった高い有効率や寛解率が認められ、さらに骨破壊抑制効果が期待される。中でもトシリズマブ (TCZ) は本邦で開発された bDMARDs であり、bDMARDs の中では安価なグループに分類され、MTX との併用が必須でないことや自己注射の選択などにより、経済的負担の緩和や働きながらの治療の実現を可能にしている。国内では約 1 万人以上の患者に投与されており、海外では 2009 年 1 月にヨーロッパで、2010 年 1 月にはアメリカでも承認を取得し、使用が開始されている。TCZ は interleukin-6 (IL-6) が結合する受容体に結合して、IL-6 の受容体への結合をブロックすることで炎症に由来する様々な症状を抑え、関節破壊の進行を抑制し、ADL を改善する [22]。また、TCZ はヒト IL-6 をマウスに接種して得た抗ヒト IL-6 レセプター抗体をもとに、遺伝子組み換え技術によってチャイニーズハムスター卵巣 (chinese hamster ovary: CHO) 細胞を用いて製造されているヒト化抗体である。ヒト化抗体とは、ヒトに対しての抗原性を減らす目的で、マウス型抗ヒト IL-6 レセプター抗体の抗原認識部以外の領域をヒト免疫グロブリン IgG1 に置き換えたもので、TCZ の全アミノ酸配列の 90% 以上をヒト IgG1 が占めている。そのためマウス由来のキメラ抗体に比べ、アレルギー反応などが起こりにくく、中和抗体出現率は 1~3% と少ない。加えて B 細胞

での抗体産生も抑制されるいといった利点がある [23]。

RAの寛解を目指す上で、治療の指標とされる数値が DAS (disease activity score) であり、全身 28 ヶ所の関節を調べる DAS28 値を算出するために、血液検査により赤血球沈降速度 (赤沈値) あるいは C 反応性タンパク (C-reactive protein: CRP) 値が測定されている [24]。また、血清中 TCZ の蓄積傾向がみられた症例では CRP が正常化することが知られている。IL-6 は CRP の産生に直接的に影響を及ぼすことから、血中 CRP 濃度を測定することで TCZ の抗 IL-6 作用をモニタリングすることができる [25]。この結果をもとに、TCZ により症状改善が不十分な患者では CRP を指標に投与間隔短縮が可能とされている。しかしながら、一部の患者では CRP の低下と症状改善が必ずしも一致しない傾向がみられた。加えて、RA 患者を対象とした臨床試験では、血清中 TCZ 濃度が維持されない状態で投与を継続すると、抗 TCZ 抗体が発現する可能性が高くなると考えられている [26]。また、TCZ は、投与中に重篤な有害事象を合併する可能性がある上、併用して用いられることがある他の csDMARDs や NSAIDs との相互作用について十分な説明がなされていない。以上のことから、TCZ の血中濃度を直接測定することは、薬物動態学的視点から、副作用回避や治療効果の確認にとどまらず、MTX や NSAIDs との併用上も非常に有用であると考えられる。

一般的に、TCZ などの抗体医薬品は血中のヒト IgG と構造が類似している上、血中には IgG が約 11 mg/mL と高濃度含まれている [27, 28]。そのため、通常の高速度液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) では抗体医薬品を IgG から分離することは非常に難しいとされている。現在、抗体医薬品の血中濃度分析には、一般的に enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) などの ligand binding assay (LBA) が用いられている [29-31]。LBA は、感度、特異性などに優れ、環境汚染物モニタリング、疾病スクリーニング等に有用な方法であり、比較的容易かつハイスループットな分析を可能とすることから広く使用されている。一方で、方法論の確立と最適化に時間を要し、用いる抗体の質が分析結果に大きく影響するといった問題点も存在する [32]。対して、HPLC 法による抗体医薬品の分析は、主にトリプシン消化 LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) 法が用いられている [33-35]。これは、トリプシン消化分解物の中で、分析対象である抗体医薬品に特徴的な配列のペプチド (signature peptide) をターゲットとして定量する方法である。LC-MS/MS

法は、非常に高感度であり、リガンドとの結合の有無にかかわらず定量できるため、遊離型と結合型の総濃度の測定が可能である。一方で、トリプシン消化過程における回収率が低いこと、前処理に長い時間を必要とすること、質量分析計という特別な検出器を必要とすることといった問題点も存在する [36, 37]。以上の理由により、実臨床では TCZ などの抗体医薬品の血中濃度の測定を行うことは現状では困難であるため、いずれの方法も汎用されていない。

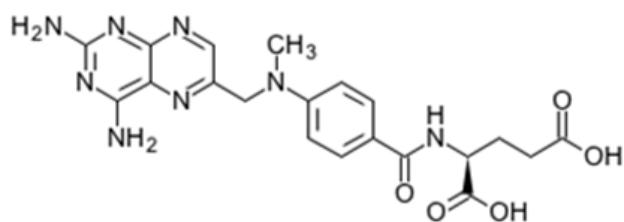
そこで本研究は、RA の治療に併用して用いられる薬剤の薬物相互作用解明に利用可能な迅速かつ簡便な HPLC 定量法を開発することを目的とした。第 1 章では、csDMARDs の中でもアンカードラッグと呼ばれ、世界的にも RA の第一選択薬とされる MTX と一般的に MTX の効果が現れるまでの間、RA による関節炎に伴う疼痛、腫脹などの症状を軽減することを目的として併用される NSAIDs との HPLC 同時定量法を開発を行った。第 2 章では、本邦で開発された bDMARDs である TCZ について、HPLC 自然蛍光検出法による迅速かつ簡便な TCZ 定量法を開発を行った。

## 第1章 MTX と NSAIDs の HPLC 同時定量法の開発

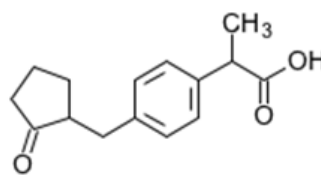
MTX は、RA 治療において csDMARDs の中でもアンカードラッグとされ、治療の要となる薬として位置付けられている [2]。MTX 単剤での有効性のみならず、bDMARDs との併用によってより高い有効性を引き出すことも、豊富なエビデンスで証明されている [1, 38]。一方で、肝障害、骨髄抑制、嘔気といった有害事象が数十%の患者に認められる問題もあり [39, 40]、寛解維持されている場合の減量、休薬に関する議論も盛んとなってきた。また、日本人では少量の MTX でも肝障害や骨髄障害が出ることが知られている [41]。このように、MTX は RA 治療の要といえる存在ではあるが、副作用も決して少なくはなく、bDMARDs とどのように使い分け、併用していくか、寛解導入時と寛解維持期では治療を変更させていくべきかなどの、未解決の問題が残っている。加えて、MTX は、NSAIDs との薬物間相互作用により、血中濃度の上昇とそれに伴う骨髄抑制、消化器障害などの副作用の発現も報告されている [17, 18]。NSAIDs は、RA において csDMARDs や bDMARDs が発展した現在では中心的な治療薬とは言えないが、炎症症状と疼痛への対症療法として依然として頻用されている。NSAIDs の発現は早く、主に鎮痛作用により RA 患者の QOL を改善する。一方で、消化管障害は頻度・重症度ともに高い副作用で、3-15%程度にみられる [42]。これは選択的シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2: COX-2) 阻害薬を用いることにより軽減できる可能性が知られているものの [43]、依然として消化管障害などの副作用の危険性を考慮する必要がある。以上のことから、MTX と NSAIDs を併用する上で、血中濃度を同時に測定することは、薬物動態学的観点から、副作用回避や、治療効果の確認の上でも有用であると考えられる。

MTX 定量法や NSAIDs 定量法として、これまでに多くの HPLC 法が開発されてきた。MTX の定量法としては、固相抽出による精製後、オクタデシルシリル (octadecylsilyl: ODS) カラムで分離し UV 検出する方法 [44, 45]、MTX に UV を照射し得られた蛍光性の光分解物を分離して蛍光検出する方法 [46]、除タンパクしたサンプルを直接 HPLC に注入し分離した後、オンラインで MTX を蛍光性

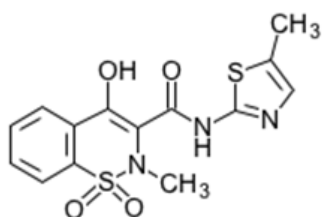
光分解物に変換し蛍光検出する方法 [47]、96 ウェルプレートを用いて液液抽出したサンプルを直接 HPLC に注入し分離した後、MS/MS を用いて検出する方法 [48]、除タンパクしたサンプルを HPLC に注入し、カラムスイッチングによる精製後、MS/MS を用いて検出する方法 [49] などが報告されている。NSAIDs の定量法としては、固相抽出による精製後、ODS カラムで分離し UV 検出する方法 [50]、HPLC で分離した後、UV 照射により得られる蛍光誘導体化物を蛍光検出する方法（オンラインポストカラム法）[51]、フルオラス誘導体化後にフルオラスカラムで分離し、自然蛍光検出により蛍光検出する方法 [52]、マイクロ固相抽出により自動的に精製したサンプルを注入し、MS/MS を用いて検出する方法 [53] などが報告されている。これらの測定法は、高感度測定を可能としているものの、LC-MS/MS などの特別な装置を必要することや誘導体化などの前処理を必要とすることなど、迅速性や汎用性に問題点を抱えている。そこで本章では、実臨床で利用可能な血中の MTX と NSAIDs 濃度の迅速かつ簡便な同時定量法の開発を行った。測定対象物として、RA に最も汎用される csDMARD である MTX と早期から併用されることが多い NSAIDs であるロキソプロフェン (loxoprofen: LP)、メロキシカム (meloxicam: MX)、ロルノキシカム (lornoxicam: LX)、ジクロフェナク (diclofenac: DF)、セレコキシブ (celecoxib: CX) の 6 種類の薬物 (Fig. 1-1) について検討を行った。今回測定対象とした LP、MX、LX、DF 及び CX の 5 種の NSAIDs は、いずれも RA に適応があり、選択的 COX-2 阻害剤あるいは COX-2 選択性が比較的高い薬剤となっている。



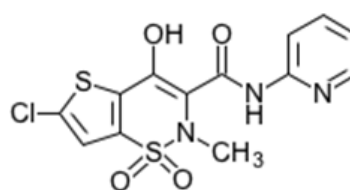
Methotrexate (MTX)



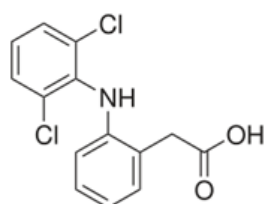
Loxoprofen (LP)



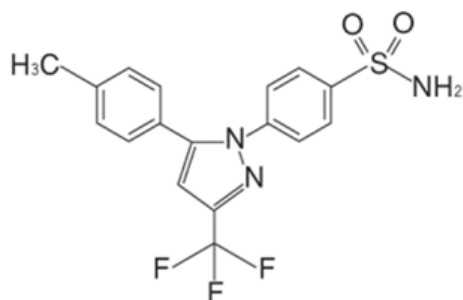
Meloxicam (MX)



Lornoxicam (LX)



Diclofenac (DF)



Celecoxib (CX)

Fig. 1-1 Structures of MTX and NSAIDs.

## 1-1 HPLC システム

カラムは Penomenex Gemini C6-Phenyl 110 A (150×3 mm I.D., 粒径 3 μm) を使用した。また、移動相 (mobile phase: MP) には 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを含む水溶液 (A) と 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液 (B) の混液を用い、グラジエント溶出により分離を行った。グラジエントプログラムは、B 濃度 (時間) ; 27% (0.00 分) → 27% (5.00 分) → 55% (5.01 分) → 70% (14.00 分) → 80% (14.50 分) → 80% (18.00 分) → 95% (18.01 分) → 95% (20.00 分) → 27% (20.01 分) → STOP (25.00 分) とした。流速は 0.35 mL/min とし、カラム温度は 35°C に設定した。測定は波長 (時間) ; 300 nm (0-8.99 分) → 222 nm (9.00-10.19 分) → 360 nm (10.20-13.49 分) → 270 nm (13.50-15.04 分) → 250 nm (15.05-25.00 分) とした。

## 1-2 HPLC 条件の検討

MTX と 5 種の NSAIDs の標準混液 (それぞれ 100 μmol/L) 10 μL を本 HPLC システムに注入し、分離条件の検討を行った。

### 1-2-1 クロマトグラム

カラムに Gemini C6-Phenyl 110 A を用い、移動相に 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを含む水溶液 (A) と 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを含むメタノール溶液 (B) の混液を用いてグラジエント溶出したとき、MTX と 5 種の NSAIDs はそれぞれ単一のピークとして 25 分以内に分離・検出された (Fig.1-2)。保持時間は、MTX、LP、MX、LX、DF 及び CX が、それぞれ 5.75、9.80、10.50、11.50、14.30 及び 17.60 分であった。

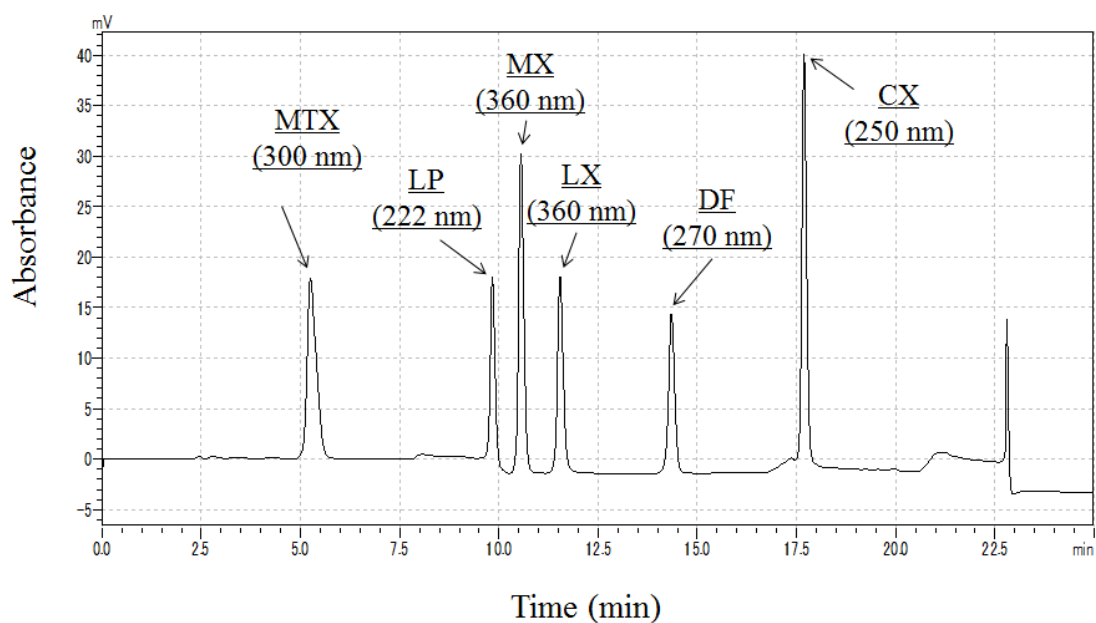


Fig. 1-2 Chromatogram obtained with a standard mixture of MTX and NSAIDs.

A portion (10  $\mu$ L) of a standard solution (100 pmol each on column) was applied to the HPLC system.

### 1-2-2 測定波長の検討

JascoV-530 型紫外可視分光光度計を用い、各測定対象物の濃度が 100  $\mu$ mol/L となるよう移動相で希釈して吸収スペクトルを測定したところ、それぞれ Fig. 1-3 の通りとなった。測定条件は、レスポンスが **Medium**、走査速度が 200 nm/min、データ取込間隔が 0.2 nm とした。従って、HPLC 測定の際の検出波長は、MTX、LP、MX、LX、DF 及び CX で、それぞれ 300、222、360、360、270 及び 250 nm とした。



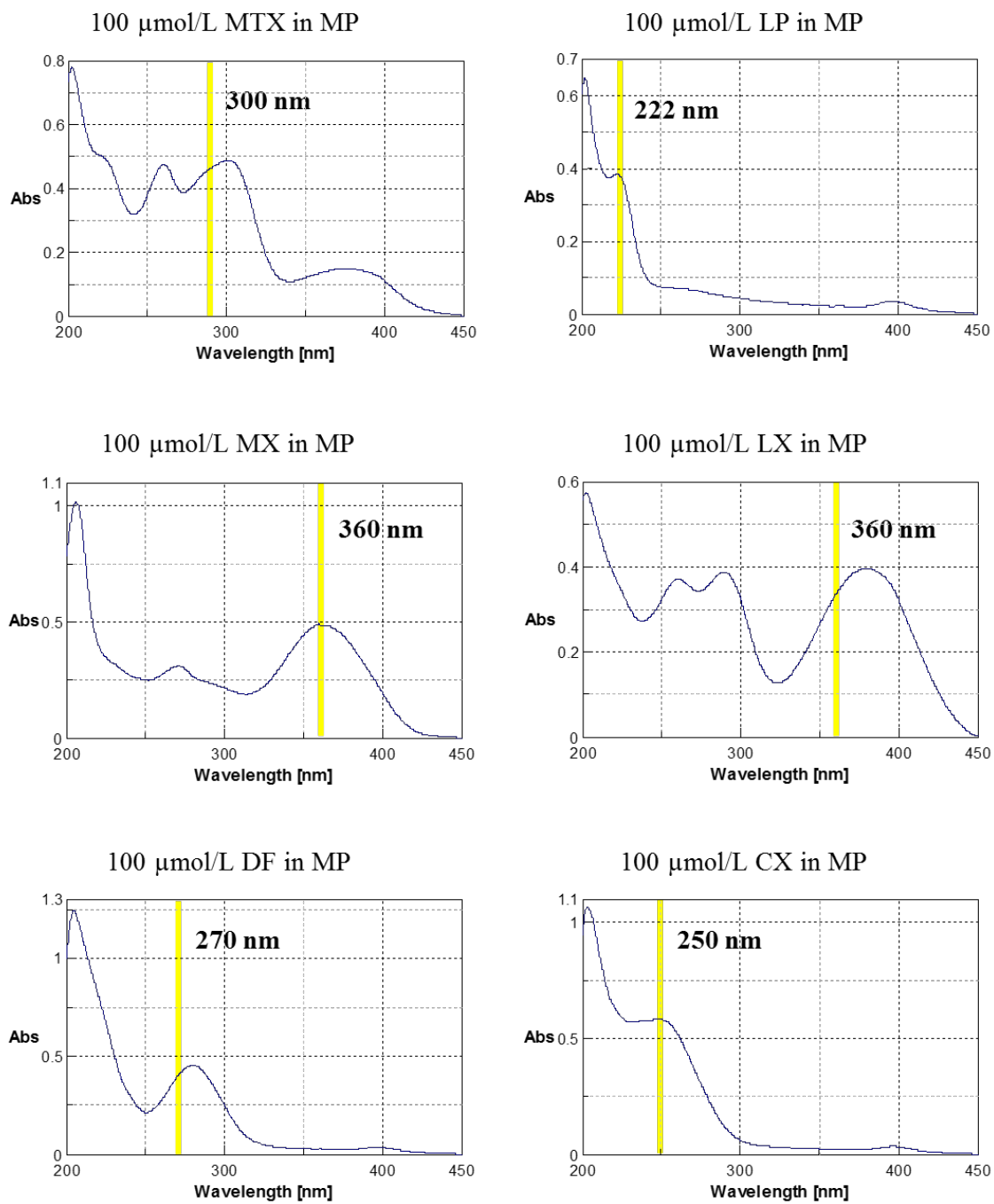


Fig. 1-3 Absorption spectra of MTX and NSAIDs.

### 1-2-3 カラムの検討

MTX の pKa は 4.84 と 5.51 であり [54]、通常の ODS カラムではピークが 2 本に分かれて溶出された。今回の測定対象物はいずれも平面構造を有していることから、固定相にフェニルヘキシル基を採用し安定性を向上させ、また、 $\pi$ - $\pi$  相互作用が働き芳香族化合物の選択性を向上させている Phenomenex 製 Gemini C6-Phenyl (150×3 mm I.D., 粒径 3  $\mu$ m) を用いた。

### 1-2-4 移動相の検討

移動相に添加する酸や塩として、酢酸緩衝液やリン酸緩衝液を用いて pH 1.5 ~8.0 の範囲で検討したところ、いずれの pH においても MTX の良好なピーク形状が得られず、6 種のピークを分離することができなかった。一方で、酢酸アンモニウムを用いて 1~10 mmol/L の濃度範囲で検討したところ、濃度の上昇に伴いより良好なピーク形状が得られた。従って、移動相は 10 mmol/L 酢酸アンモニウムを含む水とメタノール溶液を用いた。

### 1-2-5 検出限界、精度及び直線性

MTX と 5 種の NSAIDs の標準混液を用いて検量線を作成したときの、検出限界、精度及び直線性を Table 1-1 に示す。検量線は、MTX と 5 種の NSAIDs について、注入量 (10  $\mu$ L) 当たり少なくとも 10.0-10,000 pmol の範囲で、いずれも相関係数 0.9998 以上の良好な直線性が認められた。

また、標準混液 (それぞれ 100  $\mu$ M) を 5 回繰り返し測定したときの相対標準偏差は、5% 未満と比較的良好な精度が得られた。MTX と 5 種の NSAIDs の検出限界 (S/N=3) は、注入量 (10  $\mu$ L) 当たり 1.09 (MTX)、51.72 (LP)、10.00 (MX)、2.03 (LX)、6.86 (DF) 及び 96.00 fmol (CX) であった。これらの値は、LC-MS/MS 法の感度には及ばないものの、治療効果を確認する上で必要な感度を十分に満たしている結果が得られた。

Table 1-1 Detection limits (DLs), reproducibilities, and linearities of calibration curves.

Compound	Retention time (min)	DL <sup>a)</sup> (fmol)	Dynamic range		Linearity	RSD <sup>b)</sup> (%) (n=5)
			pmol per 10 $\mu$ L injection			
MTX	5.75	1.09	0.020 – 10,000		0.9999	0.99
LP	9.80	51.72	10.0 – 10,000		1.0000	3.07
MX	10.50	10.00	0.2 – 10,000		0.9999	4.62
LX	11.50	2.03	0.05 – 10,000		0.9999	0.92
DF	14.30	6.86	0.2 – 10,000		0.9998	0.85
CX	17.60	96.00	2.0 – 10,000		0.9999	3.46

a) Defined as the amount per injection volume (10  $\mu$ L) giving a signal-to-noise ratio of 3.

b) Relative standard deviation of absorbance intensity; 100 pmol per 10  $\mu$ L injection.

### 1-3 ヒト血清試料への適用

本法を RA 患者血清中の MTX 定量に適用可能か確認するため、市販の血清を用いて検討を行った。その際、前処理条件の最適化を行い、MTX と 5 種の NSAIDs について添加回収試験を行った。

#### 1-3-1 血清試料の前処理

MTX と 5 種の NSAIDs の濃度が各 10  $\mu\text{mol/L}$  となるように添加したヒト血清 200  $\mu\text{L}$  に 5% 酢酸を含むアセトニトリル溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、混合した後、5,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離を行う。得られた上清を全量採取しコンビニ・エバポ (BioChromato. Inc. 製) を用いて濃縮乾固した後、35% メタノール 200  $\mu\text{L}$  で再溶解させ、10  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入した。また、ブランク血清として、標準溶液を添加していないヒト血清 200  $\mu\text{L}$  に同様の前処理方法を適用して調製し、HPLC に注入した。

### 1-3-2 クロマトグラム

上記の前処理操作法に従って処理した時に得られたクロマトグラムを Fig. 1-4 に示す。標準添加血清とブランク血清の2つのクロマトグラムを比較したとき、目的の6種の薬物のピークが検出される保持時間にブランク血清由来の夾雑物ピークは重なっておらず、MTXと5種のNSAIDsを良好に分離・検出することができた。

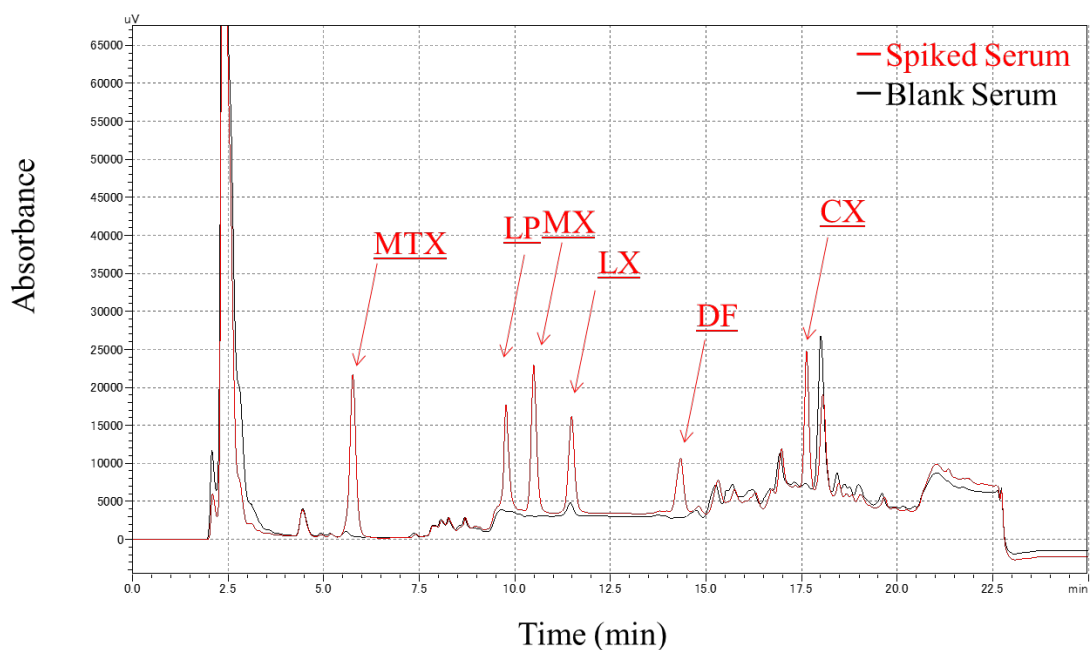


Fig. 1-4 Chromatograms obtained with human serum and the serum spiked with STDs.

### 1-3-3 前処理法の検討

除タンパクに用いる有機溶媒としてアセトニトリルとメタノールについて検討を行ったところ、アセトニトリルを用いたときに夾雑物の妨害ピークをより除去することができた。

有機溶媒に加える酸や塩基について検討を行ったところ、酢酸を添加するに従い、MTX、LP、MX、LX 及び DF の回収率が上昇したが、CX の回収率は低下した。一方で、トリエチルアミン (TEA) を添加するに従い、CX の回収率は上昇したが、他の NSAIDs の回収率は全体的に低下した。また、MTX と同じ保持時間に夾雑物由来の妨害ピークが検出された。

従って、前処理に用いる溶液には 5%酢酸を含むアセトニトリル溶液を用いることとした。

#### 1-3-4 回収率及び精度

10  $\mu\text{mol/L}$  となるように薬物を添加したヒト血清を用いて添加回収試験を行ったところ、回収率は MTX、LP、MX、LX、DF 及び CX が、56.8、82.0、80.6、59.5、78.5 及び 54.4% であり、全ての薬物において 54% 以上となった。また、5 回繰り返し測定したときの相対標準偏差は、MTX、LP、MX、LX、DF 及び CX が、6.16、10.19、3.80、6.89、7.43 及び 6.44% であり、全体としては 10.19% 以下と比較的良好な精度が得られた。

Table 1-2 Recovery and accuracy.

Compound	Recovery (%)	RSD (%) (n=5)
MTX	56.8	6.16
LP	82.0	10.19
MX	80.6	3.80
LX	59.5	6.89
DF	78.5	7.43
CX	54.4	6.44

Serum spiked with MTX and NSAIDs (10  $\mu\text{mol/L}$  human serum).

#### 1-4 小括及び考察

今回、測定対象物とした MTX と 5 種の NSAIDs は、いずれも平面構造を有していることから、HPLC カラムには Gemini C6-Phenyl を用いた。その結果、MTX と 5 種の NSAIDs の標準品を 25 分以内に良好に分離・検出することができた。検量線は全てにおいて  $r^2$  が 0.9998 以上という良好な直線性を得ることができ、相対標準偏差は 4.62% 以下と良好な精度が得られた (n=5)。検出限界は、注入量あたり 96.00 fmol 以下となり、検出波長を各医薬品の吸収極大波長に合わせることで良好な結果が得られた。また、本法の実試料に対する有用性を確認するために、市販のヒト血清を用いて添加回収試験を行ったところ、MTX と NSAIDs の各医薬品のピークは血清由来のピークと良好に分離することができ、その時の回収率は 54% 以上となった。また、その時の相対標準偏差は 10.19% 以下と良好な精度が得られた (n=5)。本法は、LC-MS/MS 法の感度には及ばないものの、治療効果を確認する上で必要な感度を十分に満たしている結果が得られた。

今回我々が開発した HPLC 分析法は、迅速かつ簡便な手法であり、実臨床でも利用可能と考えられることから、MTX と NSAIDs の副作用回避や治療効果の確認のみならず、薬物間相互作用の確認を行う上でも有用であると考えられる。



## 第2章 HPLC 自然蛍光検出法による TCZ 定量法の開発

RA の治療に用いられる TCZ は、投与中に重篤な有害事象を合併する可能性があり、また、他の NSAIDs や DMARDs との併用における相互作用についても解明がなされていない。そのため、MTX、NSAIDs を併用する上で、TCZ の血中濃度を測定することは、薬物動態学的視点から、副作用回避や、治療効果の確認上でも有用であると考えられる。

ヒト化抗体である TCZ は、ヒトに対する抗原性を減らす目的で、マウス型抗ヒト IL-6 レセプター抗体の相補性決定領域 (complementarity-determining region: CDR) 以外の領域をヒト免疫グロブリン IgG1 (immunoglobulin G1) に置き換えたものである (Fig. 2-1)。TCZ の全アミノ酸配列の 90%以上をヒト IgG1 抗体が占めていることから [55]、TCZ の血中濃度を測定するためには、TCZ と IgG1 を良好に分離して検出する必要がある。現在、bDMARDs の生体試料中薬物濃度分析には、主に選択性が高いリガンド結合法 (ligand binding assay: LBA) が標準的な分析法として用いられている [56-58]。LBA には、放射免疫測定法 (radio immunoassay: RIA) [59, 60]、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) [61, 62]、時間分解蛍光免疫測定法 (time-resolved fluorescence immunoassay: TRFIA) [63, 64]、表面プラズモン共鳴法 (surface plasmon resonance: SPR) [65, 66]、電気化学発光免疫測定法 (electrochemiluminescence immunoassay: ECLIA) [67, 68] などがあり、臨床検査から基礎研究の分野で広く活用されている。一方で LBA では、抗体作成が必要であること、前処理操作が煩雑で時間がかかること、マトリックスの影響が大きいこと、定量範囲が狭いこと、洗浄操作が必要なために低親和性抗体の検出が困難であることなどの問題点も存在する [69]。バイオアナリシスの分野で広く利用されている LC-MS/MS 法は、イムノアッセイ法と異なり抗体作成を必要としないことから短期間での分析法構築が期待できる [70-72]。この方法は、トリプシン分解を経た分析対象である bDMARDs に特徴的な配列のペプチドを分析ターゲットとし選択反応モニタリング (selected reaction monitoring: SRM) を行うもので、その技術は本質的に定量的プロテオミクスと同一のものである [73]。一方で LC-MS/MS 法では、小さいペプチドを除いて、インタクト測定が難しいことから酵素消化が必要となり、前処理操作が複雑になることに加え、酵素消化によるバックグラウンドの複雑化が高

分子 MS アナリシスの主な課題として挙げられる [74, 75]。その他、質量分析ではなく自然蛍光検出により検出を行うものも報告されている [31]。この方法では、前処理に抗原抗体反応を利用しており、抗イディオタイプ抗体を用いるアフィニティー精製により血中から抗体医薬品を精製後、IgG の高分離を実現する高温逆相 LC (high-temperature reversed-phase liquid chromatography: HT-RPLC) による分離を行い、抗体医薬品を構成するアミノ酸のトリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe) に由来する自然蛍光によって検出する。一方でこの方法でも、LBA と同様に抗体作成を必要とするために分析法の構築に時間がかかるなどの問題点が依然として存在する。

抗体医薬品を対象として、HPLC を用いて分離・分析する場合、低分子医薬品で確立されているような方法を用いる生体試料中薬物濃度分析は一般的に困難である。そのため、血中の抗体医薬品分析においては、適切な前処理やクロマトグラフィー条件により、抗体医薬品をヒト IgG から分離検出する分析法の構築が必要となる。これまで、タンパク質の逆相 HPLC 分析には吸着を抑えるため butyl カラム、移動相にはアセトニトリルと水の系が広く用いられてきた。一方、カラム温度を 75°C という高温条件に設定し、かつイソプロパノール (isopropanol: IPA) を多く含む移動相を用い、分離を向上させるため octyl カラムを用いた分離モードにより、IgG の直接分離を可能とした報告がなされている [76]。この HT-RPLC により、固定相表面への IgG の吸着抑制及び変性 IgG のリフォールディング抑制効果が期待できる。また、IPA を移動相に添加することで、吸着した IgG の高い脱離効率と IgG の凝集抑制効果が期待できる。これにより、抗体医薬品をシャープなピークとして分離検出することが可能となる。そこで本研究では、HPLC カラムにノンポーラスカラムである Presto FF-C18 カラムを用いることで高速に分離し、検出に特別な装置を用いず自然蛍光を検出する TCZ 定量法の開発を行い、製剤の安定性試験へ適用した。続いて、抗原抗体反応を利用しない迅速かつ簡便な前処理との組み合わせによる、TCZ の血中濃度定量法の開発を行った。

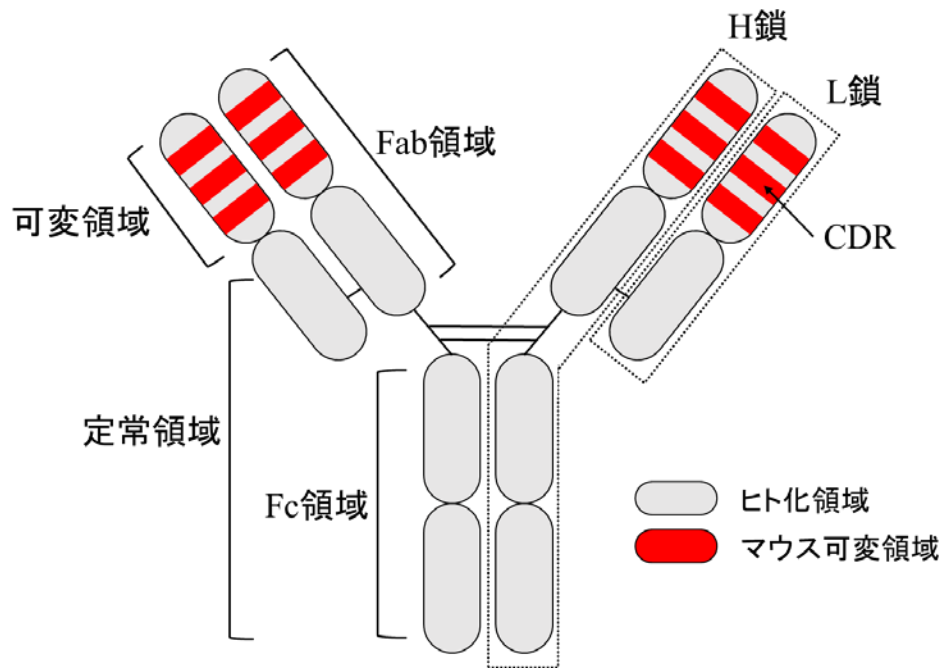


Fig. 2-1 Simplified diagram of the molecular structure of TCZ.

## 2-1 製剤の保存安定性及び凍結・解凍安定性評価への適用

Presto FF-C18 カラムを用いる HPLC 自然蛍光検出法の開発を行い、製剤中の TCZ の定量に適用し、製剤の安定性を検討した。TCZ の投与量はアクテムラ<sup>®</sup> 点滴静注用 80 mg (中外製薬) の添付文書によれば [77]、通常成人において 1 回 8 mg/kg、体重 25 kg 以上の場合、100-250 mL 日局生理食塩液に希釈し使用することとなっている。本剤の各バイアル中の TCZ 濃度は 20 mg/mL であり、体重当たりの換算式は以下の通りである [77]。

《体重あたりの換算式》

$$\text{抜き取り量 (mL)} = \frac{\text{体重 (kg)} \times 8 \text{ (mg/kg)}}{20 \text{ (mg/mL)}}$$

そこで、体重 60 kg と仮定し、抜き取った 24 mL の TCZ を 100 mL の生理食塩液に加えた高濃度のものを sample A (3,870 µg/mL)、250 mL の生理食塩液に加えた低濃度のものを sample B (1,750 µg/mL) として調製した。この sample A 及び sample B それぞれについて、室温条件、冷蔵保存条件 (4°C) 及び凍結・解凍条件における安定性の評価を行った。

### 2-1-1 HPLC システム

カラムは Imtakt Presto FF-C18 (50×3.2 mm I.D., 粒径 2 µm) を使用した。また、移動相には 0.1% トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: TFA) を含む水溶液 (A) と 0.1% TFA を含むアセトニトリル : IPA = 7 : 3 の混合溶液 (B) の混液を用い、グラジエント溶出により分離を行った。グラジエントプログラムは、B 濃度 (時間) ; 10% (0.00 分) → 30% (1.00 分) → 45% (7.00 分) → 95% (10.00 分) → 10% (10.01 分) → STOP (11.00 分) とした。流速は 0.5 mL/min とし、カラム温度は 75°C に設定した。測定波長は、励起波長 288 nm、蛍光波長 346 nm とした。

## 2-1-2 クロマトグラム

アクテムラ<sup>®</sup> 静注用 80 mg / 4 mL を TCZ 標準原液とし、1%TFA を含む 10% アセトニトリル水溶液で希釈して、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TCZ 標準溶液を調製した。この標準溶液 2.5  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入し測定を行った。

TCZ はシャープな単一のピークとして検出され、11 分以内に検出された (Fig. 2-2)。保持時間は、4.8 分であった。

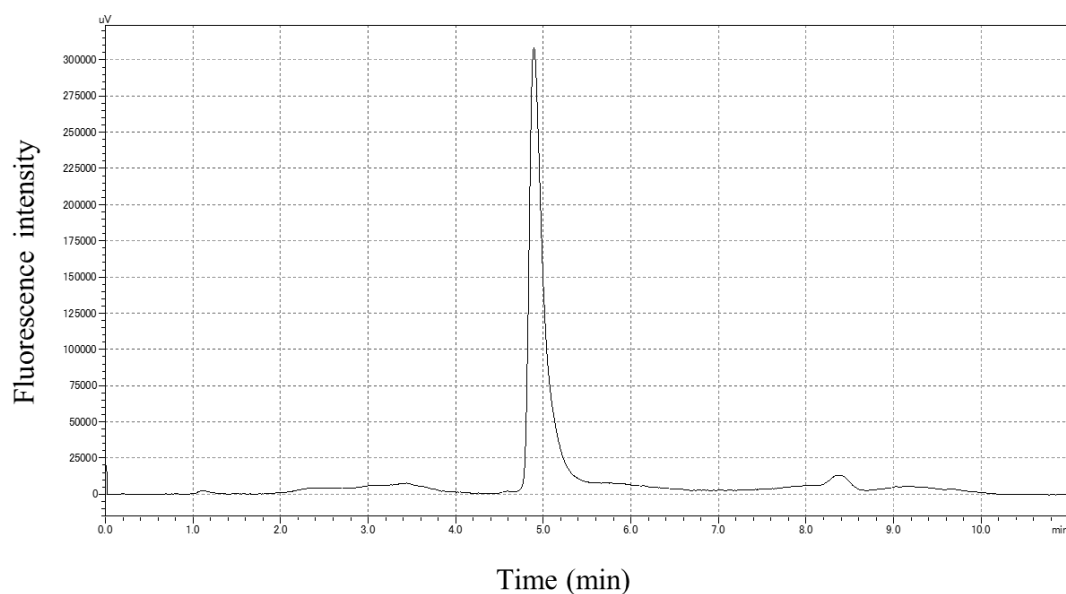


Fig. 2-2 Chromatogram obtained with a standard of TCZ.

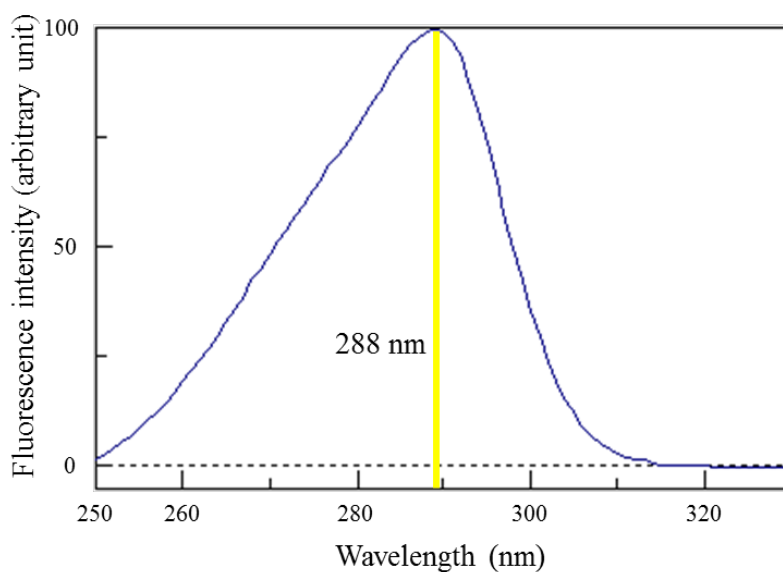
A portion (2.5  $\mu\text{L}$ ) of a standard solution (250 ng on column) was applied to the HPLC system.

### 2-1-3 測定波長の検討

装置は Jasco FP-6200 型分光蛍光光度計を用い、TCZ の濃度が 100  $\mu\text{g/mL}$  と  
なるよう移動相で希釈して励起スペクトルと蛍光スペクトルを測定したとこ  
ろ、それぞれ Fig. 2-3 の通りとなった。測定条件は、励起バンド幅が 5 nm、蛍  
光バンド幅が 5 nm、レスポンスが Medium、走査速度が 60 nm/min、データ取  
込間隔が 1 nm とした。蛍光波長 (Em) を 346 nm に固定し励起スペクトルを  
測定した結果、励起波長 288 nm で極大となった。また、同検出器を用いて励  
起波長 (Ex) を 288 nm に固定し蛍光スペクトルを測定した結果、蛍光波長 346  
nm で極大となった。TCZ 中には Trp が 10 個、Tyr が 30 個、Phe が 15 個存在  
することから、この自然蛍光は TCZ 中の Trp、Tyr 及び Phe 由来と考えられ  
る。

従って、HPLC の蛍光検出器の励起波長及び蛍光波長は、それぞれ 288 及び  
346 nm とした。

Excitation spectra (Em; 346 nm)



### Emission spectra (Ex; 288 nm)

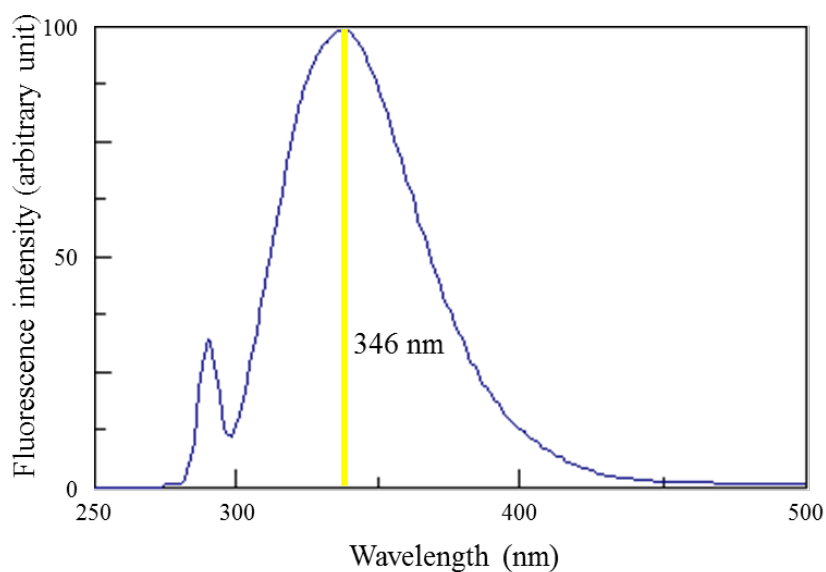


Fig. 2-3 Fluorescence spectra of TCZ

#### 2-1-4 移動相の検討

通常、HT-RPLC では、移動相に用いる有機溶媒として、アセトニトリルと IPA の混液が用いられる。そこで混液の比率を検討したところ、アセトニトリル : IPA = 7 : 3 の混合溶液のときに TCZ の良好な形状のピークが得られた。

従って、移動相 (B) の溶媒組成はアセトニトリル : IPA = 7 : 3 とした。

#### 2-1-5 カラム温度の検討

カラム温度を 35、55 及び 75°C としそれぞれ検討を行った結果、カラム温度の上昇に伴いピーク形状がシャープになった。また、Presto FF-C18 カラムは、使用温度上限が 80°C となっていることから、カラム温度は 75°C とした。

#### 2-1-6 検出限界、直線性及び精度

検出限界 (S/N=3) は、注入量 (2.5  $\mu$ L) 当たり 0.20 ng であった。この値は、医薬品の安定性を確認する上で必要な感度を十分に満たしていた。TCZ の標準溶液を用いて検量線を作成したときの、検出限界、直線性及び精度を Table 2-1 に示す。検量線は、注入量 (2.5  $\mu$ L) 当たり 2.5-12,500 ng の範囲で、相関係数 0.9999 以上の良好な直線性が認められた。また、標準溶液 (1,000  $\mu$ g/mL) を 5 回繰り返し測定したときの相対標準偏差は、5%未満と良好な精度が得られた。

Table 2-1 Detection limits (DLs), linearities of calibration curves, and reproducibilities.

Compound	DL <sup>a)</sup> (ng)	Dynamic range ng per 2.5 $\mu$ L injection	Linearity	RSD <sup>b)</sup> (%) (n=5)
TCZ	0.20	2.5 – 12,500	0.9999	3.16

a) Defined as the amount per injection volume (2.5  $\mu$ L) giving a signal-to-noise ratio of 3.

b) Relative standard deviation of absorbance intensity; 2.5  $\mu$ g per 2.5  $\mu$ L injection.

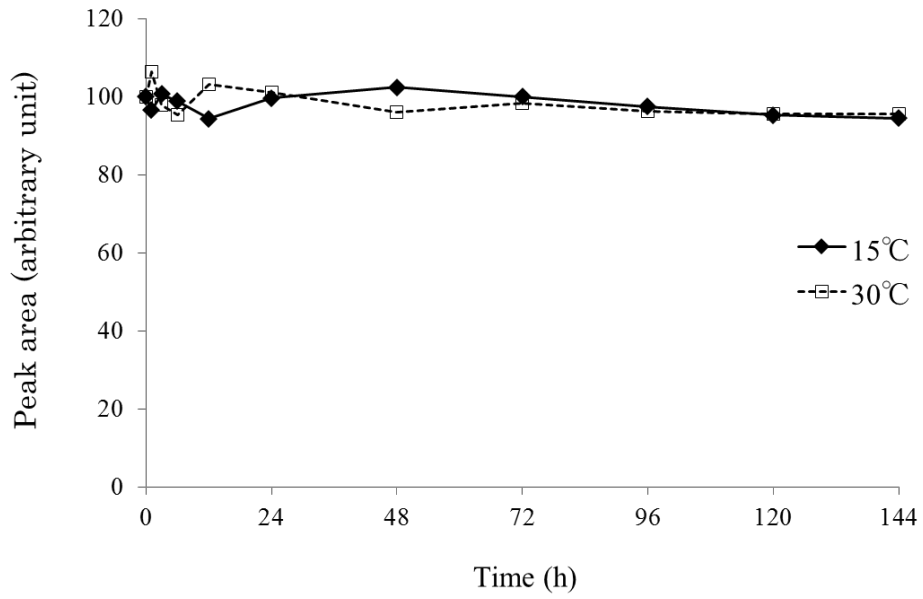
#### 2-1-7 室温条件下における製剤の安定性

sample A、sample B とともに 500  $\mu$ L ずつ分注し、15 及び 30°C で遮光して保存し、試料調製時を 0 時間とし、1、3、6、12、24、48、72、96、120 及び 144 時間後にそれぞれ HPLC に注入した。0 時間の面積値を 100% とし、繰り返し 5 回測定した平均の相対値を縦軸に、保存時間を横軸にとった測定結果を Fig. 2-4 に示す。

15 及び 30°C 条件下では、sample A、sample B とともに 144 時間までの時間経過に伴う TCZ 希釈溶液の濃度低下は認められなかった。従って、生理食塩液で希釈後のアクテムラ<sup>®</sup>を室温条件下においた場合、少なくとも 144 時間は安定であると考えられた。これは、これまで報告されている安定性試験のデータ内容と矛盾しない結果であった [26]。



**sample A**



**sample B**

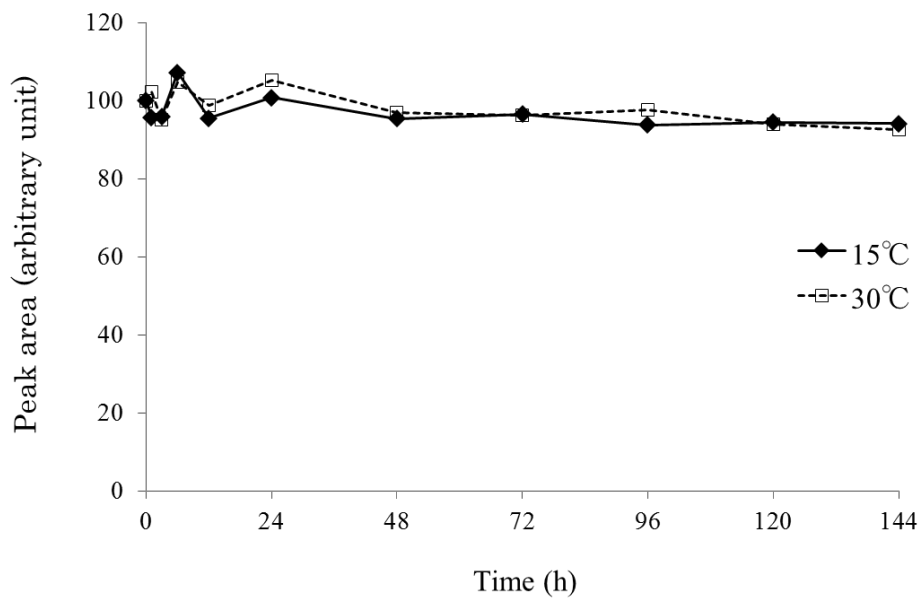


Fig. 2-4 Stability of TCZ at room temperature.

## 2-1-8 冷蔵保存条件下における製剤の安定性

sample A、sample B とともに 500  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、冷蔵保存条件下 (4°C) で遮光して保存し、試料調製時を 0 時間とし、24 時間ごとに 6 日後までそれぞれ HPLC に注入した。0 時間の面積値を 100% とし、繰り返し 5 回測定した平均の相対値を縦軸に、保存時間を横軸にとった測定結果を Fig. 2-5 に示す。

冷蔵保存条件下では、sample A、sample B とともに 6 日間までの時間経過に伴う TCZ 希釈溶液の濃度低下は認められなかった。従って、生理食塩液で希釈後のアクテムラ<sup>®</sup>を冷蔵保存条件下においた場合、少なくとも 6 日間は安定であると考えられた。これは、これまで報告されている安定性試験のデータ内容と矛盾しない結果であった [26]。

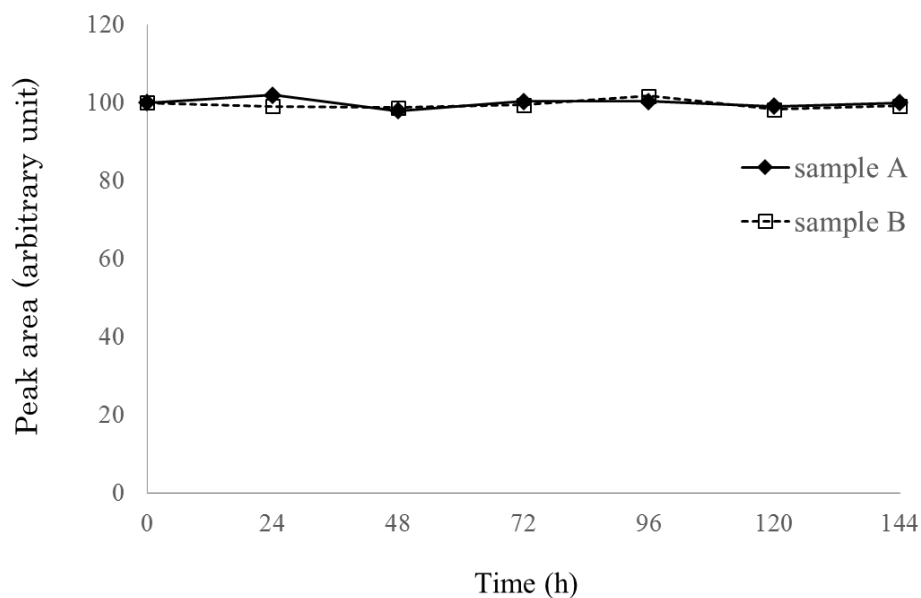


Fig. 2-5 Stability of TCZ in cold storage (4°C).

### 2-1-9 凍結・解凍安定性

sample A、sample B の各 500  $\mu$ L を冷凍条件下で遮光して保存し、試料調製時を 0 日とし、1、2、3、4、5 及び 6 日後にそれぞれ試料を解凍してから HPLC に注入した。0 日の面積値を 100% とし、繰り返し 5 回測定した平均の相対値を縦軸に、保存時間を横軸にとった測定結果を Fig. 2-6 に示す。

凍結・解凍条件下では、sample A、sample B とともに 6 日間までの時間経過に伴う TCZ 希釈溶液の濃度低下は認められなかった。従って、生理食塩液で希釈後のアクテムラ<sup>®</sup>を毎日繰り返し冷凍・解凍した場合、少なくとも 6 日間で 6 回までは安定であると考えられた。

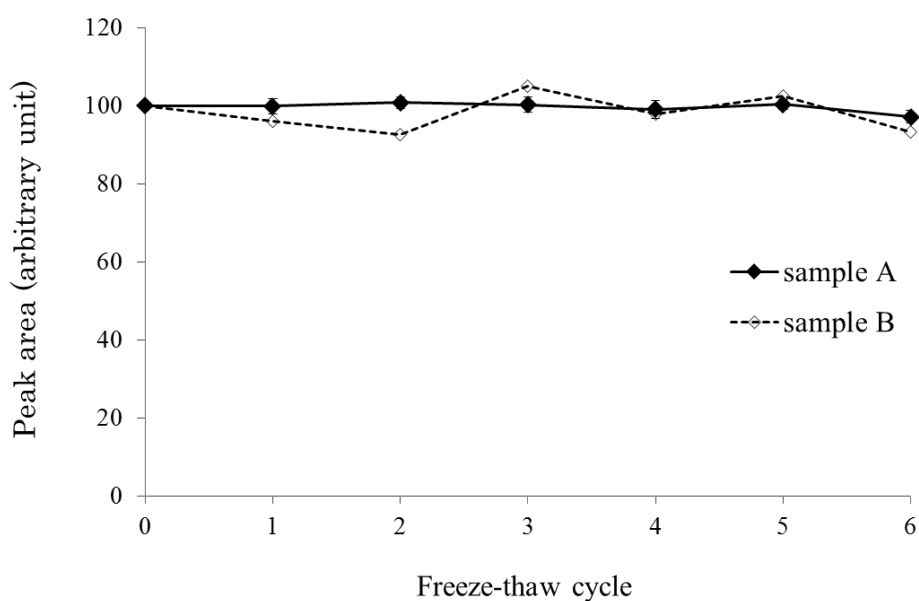


Fig. 2-6 Stability of TZ in freeze-thaw cycle.

## 2-2 TCZ と IgG1 の分離検討

ヒト化抗体である TCZ の血中濃度を測定するためには、TCZ と IgG1 を良好に分離して検出する必要がある。現在、血中の TCZ 濃度分析には、選択性が高い LBA や抗体作成を必要としない LC-MS/MS 法が用いられている [56-58, 70-72]。しかしながら、前処理操作が煩雑で時間がかかること、マトリックスの影響が大きいことなどの問題点も存在することから実臨床では汎用されていない。

そこで、実臨床における TCZ の血中濃度測定を可能とするために、抗原抗体反応や特別な装置を用いることなく、迅速かつ簡便な前処理と HPLC 自然蛍光検出法の組み合わせにより、TCZ をサブクラスである IgG1 から良好に分離可能な定量法の開発を行った。

### 2-2-1 クロマトグラム

アクテムラ<sup>®</sup> 静注用 80 mg/4 mL を TCZ 標準原液とし、1%TFA を含む 10% アセトニトリル水溶液で希釈して、100 µg/mL TCZ 標準溶液を調製した。また、IgG1 も同様にして、Natural Human IgG1 protein<sup>®</sup> (abcam) 3 mg/mL を IgG1 標準原液とし、1%TFA を含む 10%アセトニトリル水溶液で希釈して、100 µg/mL IgG1 標準溶液を調製した。これらの TCZ 標準溶液及び IgG1 標準溶液 2.5 µL を HPLC に注入しそれぞれ測定を行った。

その結果、TCZ は 4.8 分にシャープな単一のピークとして検出され、11 分以内に検出された。IgG1 は 4.8 分と 5.6 分にピークが検出された。このことから、ノンポーラス逆相カラムを用いた高温逆相分離により、TCZ がカラムに吸着することなくシャープに検出することが可能であること、一方で TCZ と IgG1 をクロマトグラム上で完全には分離することができないことが確認された (Fig. 2-7)。また、IgG1 はヒトの血中に 5~9.5 mg/mL と高濃度に存在しているため、血中濃度に適用した場合、本法による HPLC 分析では 4.8 分の IgG1 の妨害ピークはさらに増大することが考えられる。そこで、IgG1 を良好に除去し、TCZ を良好に回収することができる前処理操作について検討した。

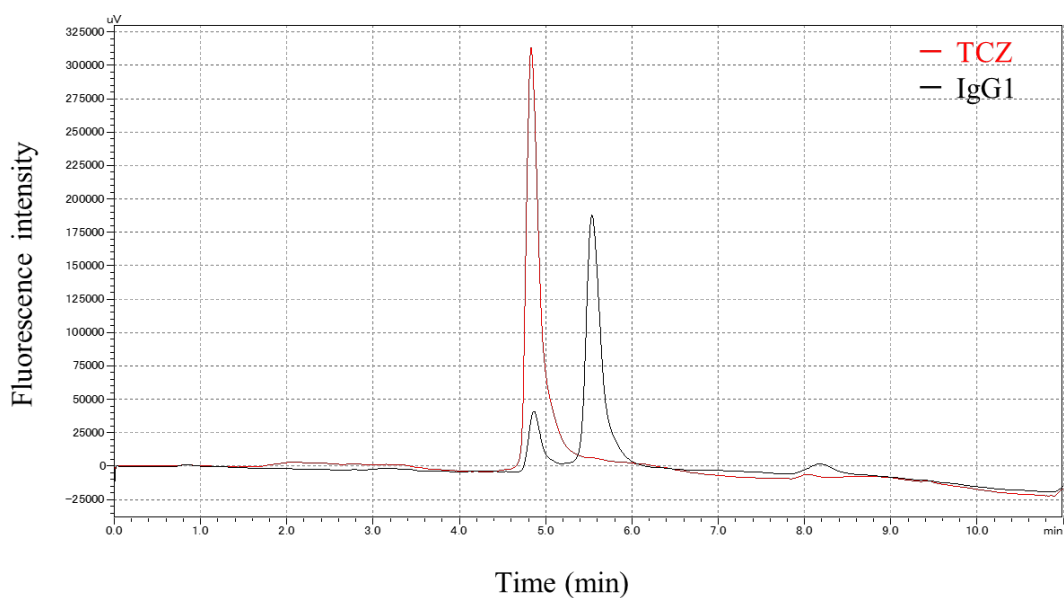


Fig. 2-7 Chromatograms obtained with a standard of TCZ and IgG1.

A portion (2.5  $\mu$ L) of a standard solution (250 ng each on column) was applied to the HPLC system.

### 2-2-2 前処理に用いる試薬

TCZ と IgG1 をクロマトグラム上で完全には分離することができないことが確認されたため、IgG1 を良好に除去し、TCZ を良好に回収することができる前処理操作の検討を行った。濃度の異なる酸や塩基 (Fig. 2-8) を含むアセトニトリルによる前処理操作を行い、それぞれの試薬の影響を確認した。

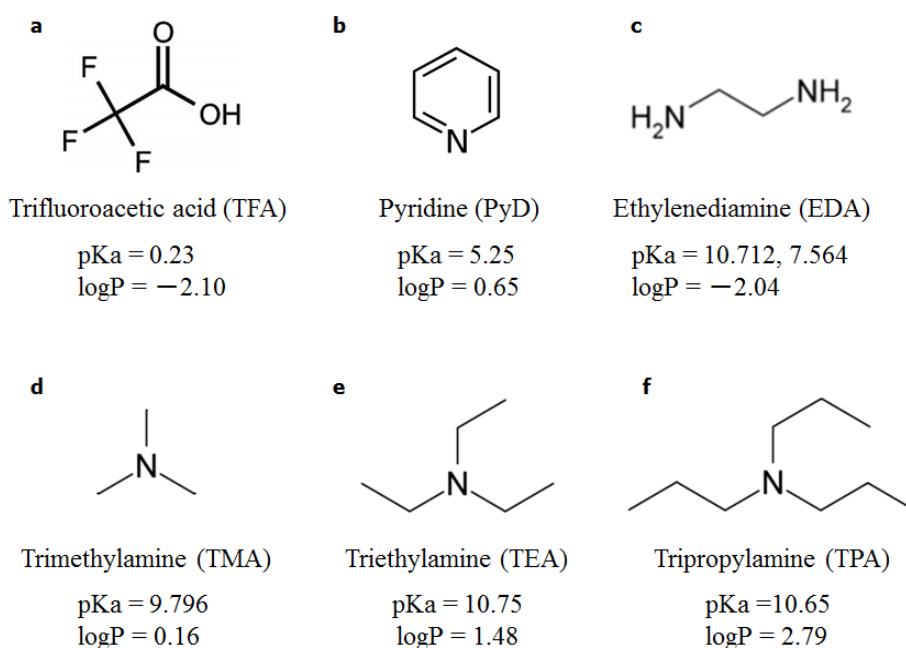


Fig. 2-8 Structures and physical characteristics of the reagents used for pretreatment.

### 2-2-3 前処理条件

TCZ 標準原液 (80 mg/4 mL) を生理食塩液で希釈して 250  $\mu\text{g/mL}$  に調製した。調製した 250  $\mu\text{g/mL}$  TCZ 100  $\mu\text{L}$  に濃度の異なる TFA、ピリジン (pyridine: PyD)、エチレンジアミン (ethylenediamine: EDA)、トリメチルアミン (trimethylamine: TMA)、トリエチルアミン (triethylamine: TEA) 及びトリプロピルアミン (tripropylamine: TPA) を含むアセトニトリル溶液 100  $\mu\text{L}$  をそれぞれ加え前処理を行った。5,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、それぞれに適した濃度の TFA 水溶液 50  $\mu\text{L}$  を加えて中和を行い 100  $\mu\text{g/mL}$  の試料溶液としたものを測定した。IgG1 抗体も同様にして、IgG1 (3 mg/mL) を希釈して 250  $\mu\text{g/mL}$  に調製し、TCZ と同様の前処理を行い試料溶液としたものを測定した。

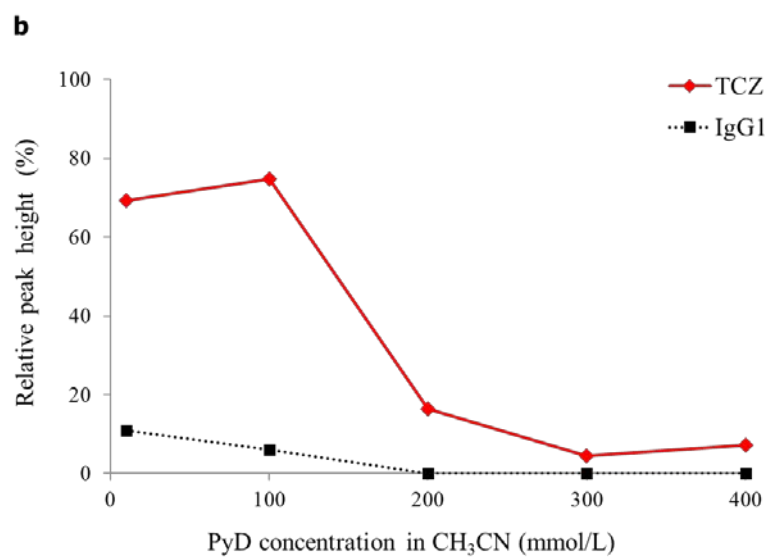
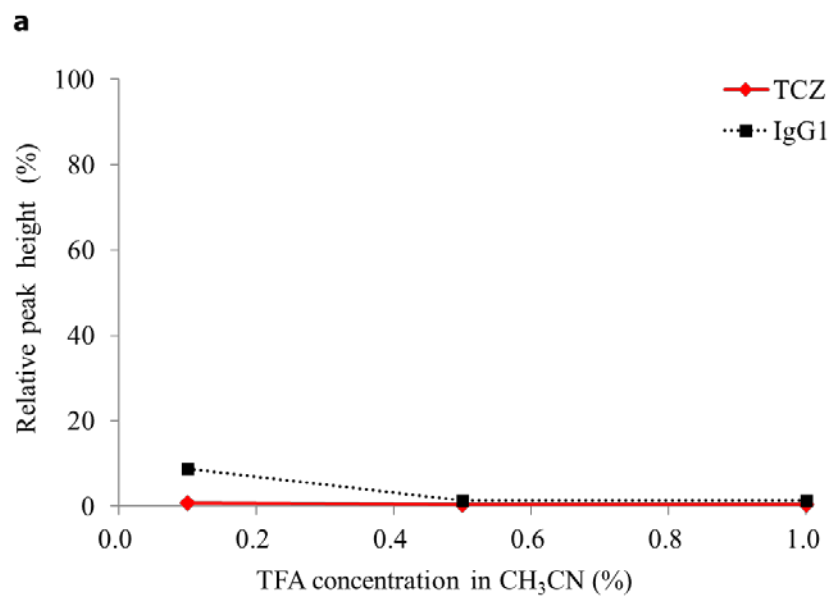
#### 2-2-4 前処理に用いる試薬の影響

前処理に用いる試薬ごとの TCZ と IgG1 の分離に対する影響を検討した結果を Fig. 2-9 に示す。Fig. 2-9 の縦軸は TCZ と IgG1 それぞれのピーク高さの相対値 (relative peak height: RPH) を示しており、横軸はアセトニトリル中の試薬の濃度を示している。TCZ の RPH は、前処理後の TCZ のピーク高さを標準の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TCZ のピーク高さで割った割合である。IgG1 の RPH は、4.8 分のピーク高さを用いて、TCZ と同様に算出した。

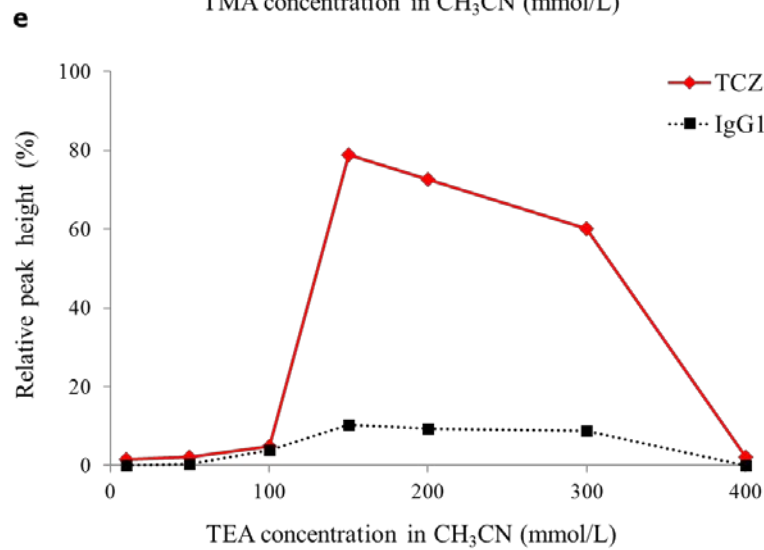
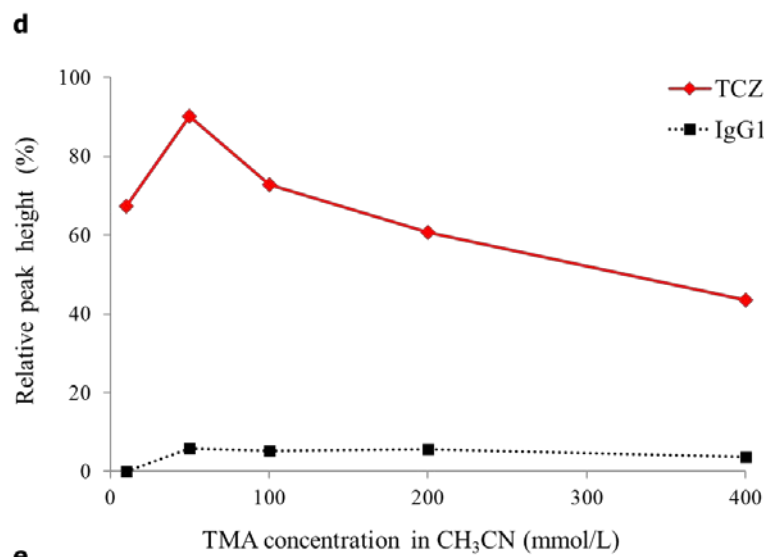
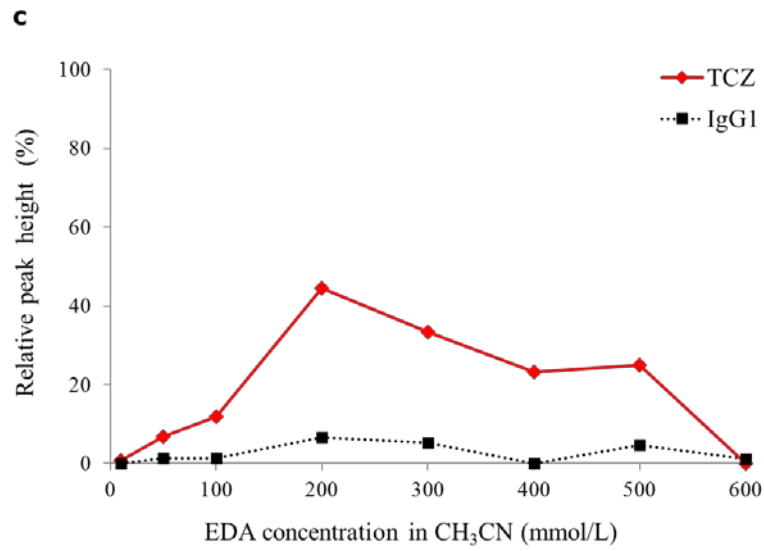
TFA について検討した結果、TFA の濃度が 0.1% のときに IgG1 の RPH は 8% となり、TFA の濃度の上昇に伴って IgG1 の RPH は低下した。しかしながら、TCZ では、いずれの TFA 濃度においてもピークが完全に消失してしまい、TCZ を良好に回収することはできなかった (Fig.2-9 (a))。PyD について検討した結果、PyD の濃度を上げていくと 100 mmol/L のときに最も良好に TCZ を回収することができ、それ以上の濃度では RPH は低下していった。また、IgG1 では PyD の濃度が上昇するにしたがって RPH が低下していき、200 mmol/L 以上ではピークは消失した (Fig.2-9 (b))。EDA について検討した結果、EDA の濃度を上げていくと 200 mmol/L のときに最も良好に TCZ を回収することができ、それ以上の濃度では RPH は低下していった (Fig.2-9 (c))。TMA について検討した結果、TMA の濃度を上げていくと 50 mmol/L のときに最も良好に TCZ を回収することができ、10 mmol/L から 200 mmol/L の濃度範囲の時に高い RPH の値が得られた (Fig.2-9 (d))。TEA について検討した結果、TEA の濃度を上げていくと 150 mmol/L のときに最も良好に TCZ を回収することができ、150 mmol/L から 300 mmol/L の濃度範囲の時に高い RPH の値が得られた (Fig.2-9 (e))。TPA について検討した結果、TPA の濃度を上げていくと 200 mmol/L のときに最も良好に TCZ を回収することができ、100 mmol/L から 500 mmol/L の広い濃度範囲で高い RPH の値が得られた (Fig.2-9 (f))。

以上の結果から、前処理に酸を含むアセトニトリル溶液を用いたときには TCZ を良好に回収することができず、IgG1 を良好に除去することができなかったが、塩基を含むアセトニトリル溶液を用いたときには TCZ を良好に回収することができ、IgG1 を良好に除去することができることが確認できた。特に、塩基としてトリアルキルアミン (trialkylamine: TAA) 類を用いたときに比

較的広い濃度範囲で TCZ を良好に回収できることが確認できた。







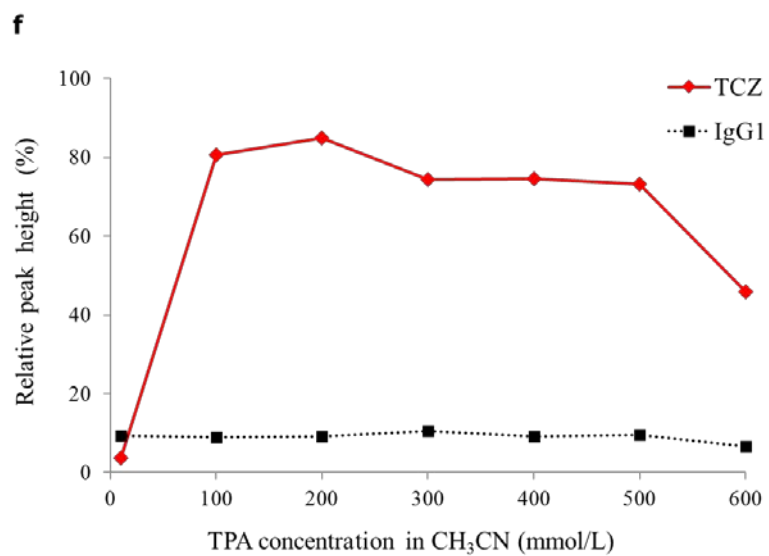


Fig. 2-9 Effect of reagents on the separation of TCZ and IgG1. Pretreatment with acetonitrile containing (a) TFA, (b) PyD, (c) EDA, (d) TMA, (e) TEA, and (f) TPA.

## 2-2-5 試薬の性質による TCZ と IgG1 の表面電荷の変化

ノンポーラス ODS カラムを用いる HT-RPLC により、TCZ と IgG1 を大まかに分離することができた。そこで、LBA を利用しない簡便な前処理法として、通常行われる有機溶媒による前処理に酸や塩基を含ませた方法を試みたところ、酸を含むアセトニトリル溶液を加えたときよりも塩基を含むアセトニトリル溶液を加えたときの前処理の方が TCZ を良好に回収し、IgG1 を良好に除去することができた。

ヒト化抗体である TCZ と IgG1 の分子配列構造の違いは CDR のみであり、そのアミノ酸配列の差異も 10% 以下とわずかである。にもかかわらず、本研究では LBA のような選択性の高い前処理を必要とせず、塩基を含むアセトニトリル溶液による簡便な前処理により両者を分離することができた。これにより、アミノ酸配列の差異が小さくてもそれによる抗体の高次構造に変化が起き、ひいてはこれに伴う表面電荷の変化が起こったために、酸と塩基で異なる結果が得られる要因となった可能性が示唆された。

ヒト IgG1 は弱酸性であることから、分子立体構造表面の電荷が主にマイナスに荷電していると考えられる。今回の結果より、IgG1 では、酸を含むアセトニトリルを加えると RPH があまり減少せず、塩基を含むアセトニトリルを加えると RPH が大きく減少することが分かった。このことから、IgG1 に酸を加えたときには IgG1 表面のプラスに荷電している箇所に酸がイオンペアとして働くことで分子構造全体のマイナスの荷電が増大し (Fig. 2-10 (a))、塩基を加えたときにはマイナスに荷電している箇所にイオンペアとして働くことで分子構造全体のマイナスの荷電が減少することが考えられる (Fig. 2-10 (b))。タンパク質である抗体は水溶液中では分子コロイドとして存在しており、表面電荷の静電的反発力により安定化している。タンパク質の分子構造全体の荷電が増大すると静電的反発力も増大し、アセトニトリルを加えても IgG1 の凝集が起こりづらくなり、逆に低下すると IgG1 が不安定となり凝集が起こりやすくなる。そのため、IgG1 を効率よく除去するためには表面電荷を減少させる塩基を加えることで IgG1 の凝集を促すことにより、良好な結果が得られたと推察した。一方で、TCZ では酸を加えると回収率が減少し、塩基を加えると回収率が增大することが分かった。このことから、TCZ は IgG1 に比べて分子構

造表面の電荷が主にプラスに荷電していることが推察された。そのため、IgG1とは逆の原理により、酸を加えたときには分子構造全体のプラスの表面電荷が減少し (Fig. 2-10 (c))、塩基を加えたときには分子構造全体のプラスの表面電荷が増大することが考えられる (Fig. 2-10 (d))。そのため、塩基を含むアセトニトリル溶液による前処理の際には TCZ が安定化され、RPHが増大したと推察した。

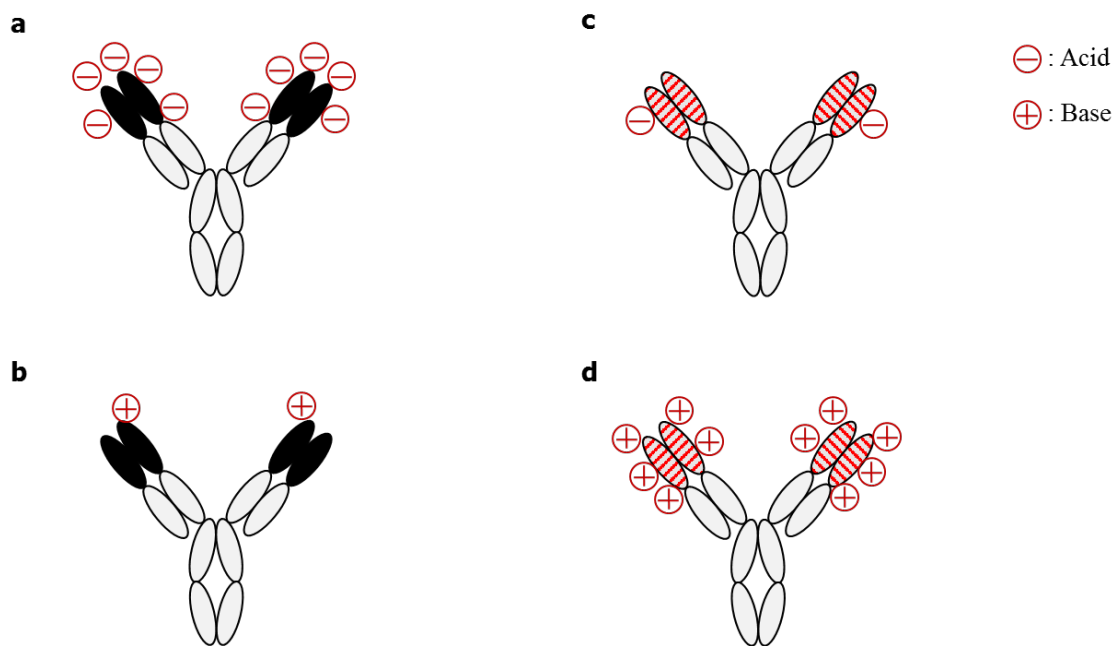


Fig. 2-10 Change in surface charge of IgG1 and TCZ due to pretreatment. IgG1 pretreated with (a) acid, and (b) base. TCZ pretreated with (c) acid, and (d) base.

## 2-2-6 TCZ の RPH 値と塩基性試薬の性質との相関性

前処理に用いた塩基ごとの結果を比較したところ、1 級アミンである EDA では他の塩基に比べると TCZ の最大 RPH 値が小さかった。そこで、TCZ の RPH の最大値と pKa 値との相関性を確認したところ、 $r^2=0.0197$  と相関性は認められなかった。これにより、塩基性度と TCZ の最大 RPH 値には相関性はないことが確認された (Fig. 2-11 (a))。また、TCZ の最大 RPH 値と logP 値との相関性を確認したところ、 $r^2=0.6034$  と相関性が認められた。これにより、疎水性と TCZ の最大 RPH 値には相関性があることが確認された (Fig. 2-11 (b))。これらの結果から、前処理に用いる塩基は静電的相互作用よりも抗体の疎水性ポケットとの疎水性相互作用に依存して抗体内部へ取り込まれ、内部表面電荷を増大させることで安定化に寄与している可能性が示唆された。TMA、TEA、TPA と 3 級アミンのアルキル鎖の延長に伴う TCZ の最大 RPH 値の変化を確認したところ、TEA と TPA はアルキル鎖の延長に伴う logP 値の増加により、TCZ の最大 RPH 値が増加していた。しかし、TMA は最もアルキル鎖が短く logP 値も小さいにもかかわらず、最も TCZ の最大 RPH 値が大きくなった。これは、TMA は分子量が最も小さく TCZ の立体分子構造の深部にまで取り込まれやすいため、疎水性ポケットに数多く取り込まれ、より静電的相互作用を増強したものと推察した。また、TPA を用いた前処理において、TPA の濃度を変化させても IgG1 の RPH の値にほとんど変化が見られなかった点については、TPA が今回用いた前処理試薬の中で最も疎水性が高く、疎水性相互作用が強く働き、静電的相互作用がほとんど影響しなかったために TCZ にも IgG1 にも取り込まれ、分子構造の安定化に寄与したと推察した。

以上のことから、塩基を含むアセトニトリル溶液によるシンプルな前処理とノンポーラスカラムを用いる HT-RPLC の組み合わせによって、TCZ をサブクラスである IgG1 から分離可能であることが示された。これにより、これまで抗体のサブクラス分離に主に用いられている抗原抗体反応を利用せず、また迅速かつ簡便な前処理のみによって血中の TCZ 濃度の HPLC 定量法の開発の可能性が示唆された。

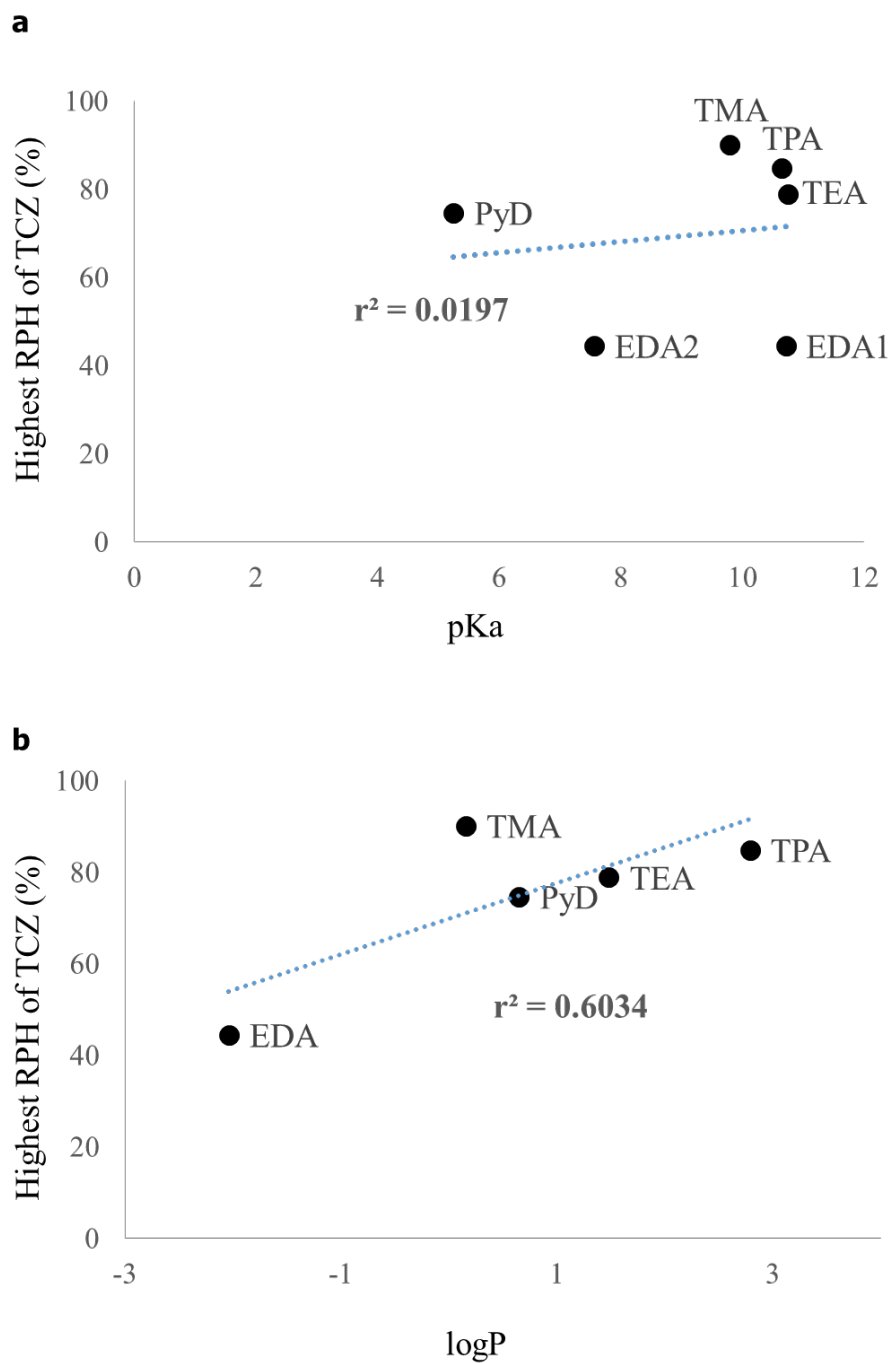


Fig. 2-11 Relationships between the highest RPH of TCZ and (a) the pKa or (b) the logP of the basic reagents used for pretreatment.

## 2-3 血清中 TCZ 濃度の定量

TCZ と IgG1 の標準品の分離条件を、RA 患者血清中の TCZ 定量に適用可能か確認するため、市販の血清を用いて検討を行った。塩基性試薬の中でも比較的広い濃度範囲で TCZ と IgG1 を良好に分離していた TAA 類 (TMA、TEA 及び TPA) について、それぞれ条件の最適化を行った。

### 2-3-1 HPLC システム

カラムは Imtakt Presto FF-C18 (100×3.2 mm I.D., 粒径 2 μm) を使用した。また、移動相には 0.1% TFA を含む水溶液 (A) と 0.1% TFA を含むアセトニトリル溶液 (C) の混液を用い、グラジエント溶出により分離を行った。グラジエントプログラムは C 濃度 (時間) ; 10% (0.00 分) → 36% (1.00 分) → 41% (7.00 分) → 90% (8.00 分) → 95% (10.00 分) → 10% (10.01 分) → STOP (11.00 分) とした。流速は 0.5 mL/min とし、カラム温度は 75°C に設定した。測定波長は、励起波長 288 nm、蛍光波長 346 nm とした。2-1-1 の条件からの変更点は、カラム長さ、移動相 (C) の組成及びグラジエント条件である。

### 2-3-2 TCZ 標準クロマトグラム

TCZ (80 mg/4 mL) 標準原液を、1% TFA を含む 10% アセトニトリル水溶液で希釈して、100 μg/mL TCZ 標準溶液を調製した。この標準溶液 2.5 μL を HPLC に注入し測定を行った。

TCZ はシャープな単一のピークとして検出され、11 分以内に検出された (Fig. 2-2)。保持時間は、5.2 分であった。

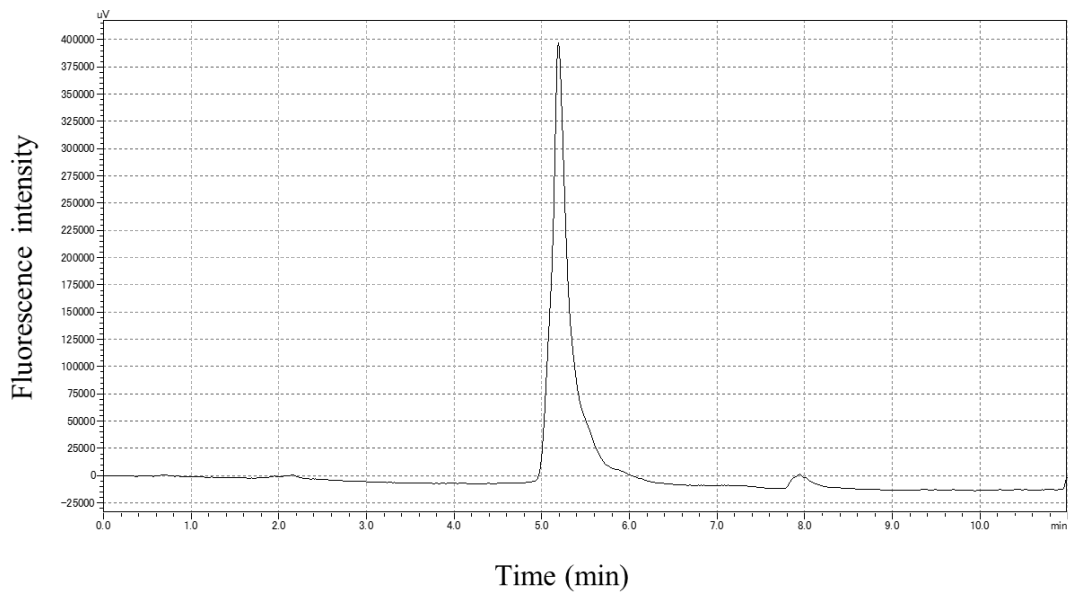


Fig. 2-12 Chromatogram obtained with a standard of TCZ.

A portion (2.5  $\mu\text{L}$ ) of a standard solution (250 ng on column) was applied to the HPLC system.

### 2-3-3 前処理

市販のヒト血清に TCZ を加え、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TCZ を含むヒト血清を調製した。この TCZ 添加血清 150  $\mu\text{L}$  に 250 mmol/L TPA を含むアセトニトリル溶液 150  $\mu\text{L}$  を加えて前処理を行った。5,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、上清 200  $\mu\text{L}$  を分取し、5.5% TFA 水溶液 50  $\mu\text{L}$  を加えて中和を行い 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の試料溶液としたものを 0.20  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過し、2.5  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入して測定を行った。ブランク血清としてヒト血清 150  $\mu\text{L}$  についても同様の操作を行い、測定を行った。



#### 2-3-4 添加血清及びブランク血清のクロマトグラム

上記の前処理操作法に従って処理した時に得られたクロマトグラムを Fig. 2-13 に示す。TCZ 添加血清、ブランク血清ともに 5.2 分にピークが検出され、血清由来のピークと TCZ のピークを分離することはできなかったが、TCZ 添加血清のピーク強度は増大した。

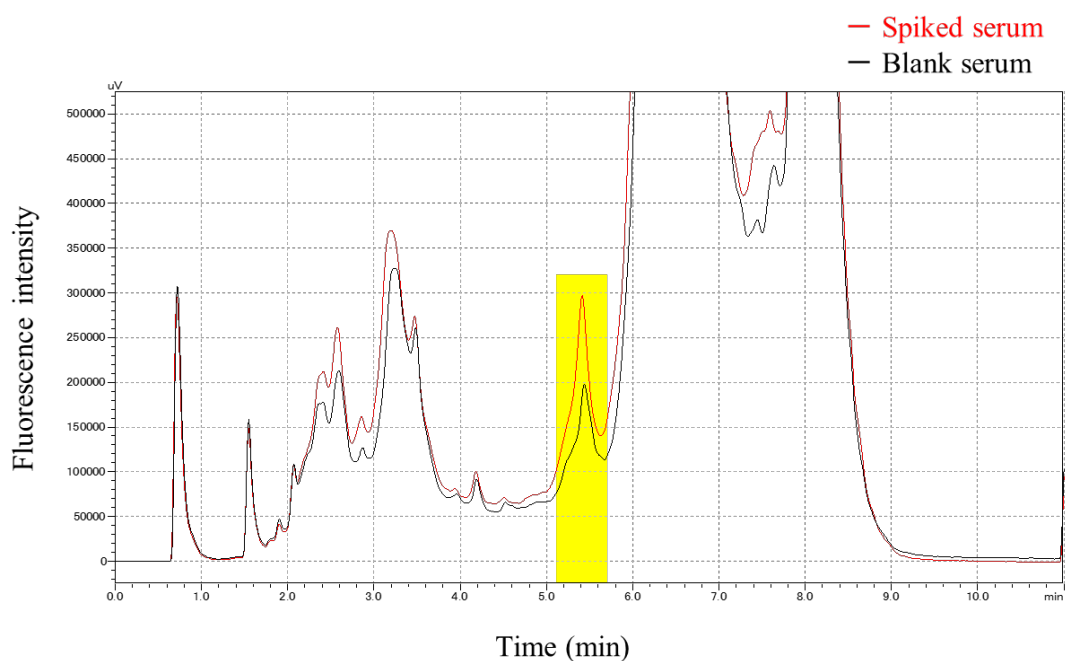


Fig. 2-13 Chromatograms obtained with human serum and the serum spiked with TCZ standard.

A portion (2.5  $\mu$ L) of a standard solution (250 ng on column) was applied to the HPLC system.

### 2-3-5 カラム長さの検討

長さ 50 mm の Presto FF-C18 カラムで血清試料を測定したところ、夾雑物の妨害ピークと目的成分の TCZ のピークを十分に分離できなかったため、カラムの長さを 100 mm にして検討を行った。その結果、100 mm のカラムでは血清由来の妨害ピークと TCZ のピークを分離することができた。250 mm のカラムでは TCZ のピークがブロードとなり、十分な感度が得られなかった。

従って、分析に用いるカラムは Presto FF-C18 (100×3.2 mm I.D., 粒径 2 μm) を使用することとした。

### 2-3-6 移動相の検討

通常、HT-RPLC による IgG の分離には、移動相に IPA とアセトニトリルを多く含有する水系移動相が用いられる。また、抗体がカラムに吸着することを防ぎピーク形状をシャープにするために、IPA の比率が高いことが望ましいとされている [76]。今回、TCZ のピーク近傍に夾雑物由来の大きな妨害ピークが存在したため、アセトニトリルと IPA の比率を変えて分離の改善を試みた。比率を変えた移動相で 100 μg/mL TCZ 標準溶液とヒト血清を測定した結果を Fig. 2-14 に示す。各クロマトグラム測定時のグラジエント条件は、TCZ のピークが約 5 分前後となるよう設定して測定を行った。その結果、IPA の濃度比率が高い移動相では TCZ のピークと妨害ピークを良好に分離することができなかったが (Fig. 2-14 (a))、IPA の濃度比率の低下に伴い、妨害ピークの保持時間が後方にシフトすることが分かった (Fig. 2-14 (b), (c))。0.1% TFA を含むアセトニトリル溶液を用いたところ、妨害ピークより先に TCZ ピークを溶出させることができた (Fig. 2-14 (c))。

従って、移動相の溶媒組成は、0.1% TFA を含む水溶液と 0.1% TFA を含むアセトニトリル溶液の混液とした。

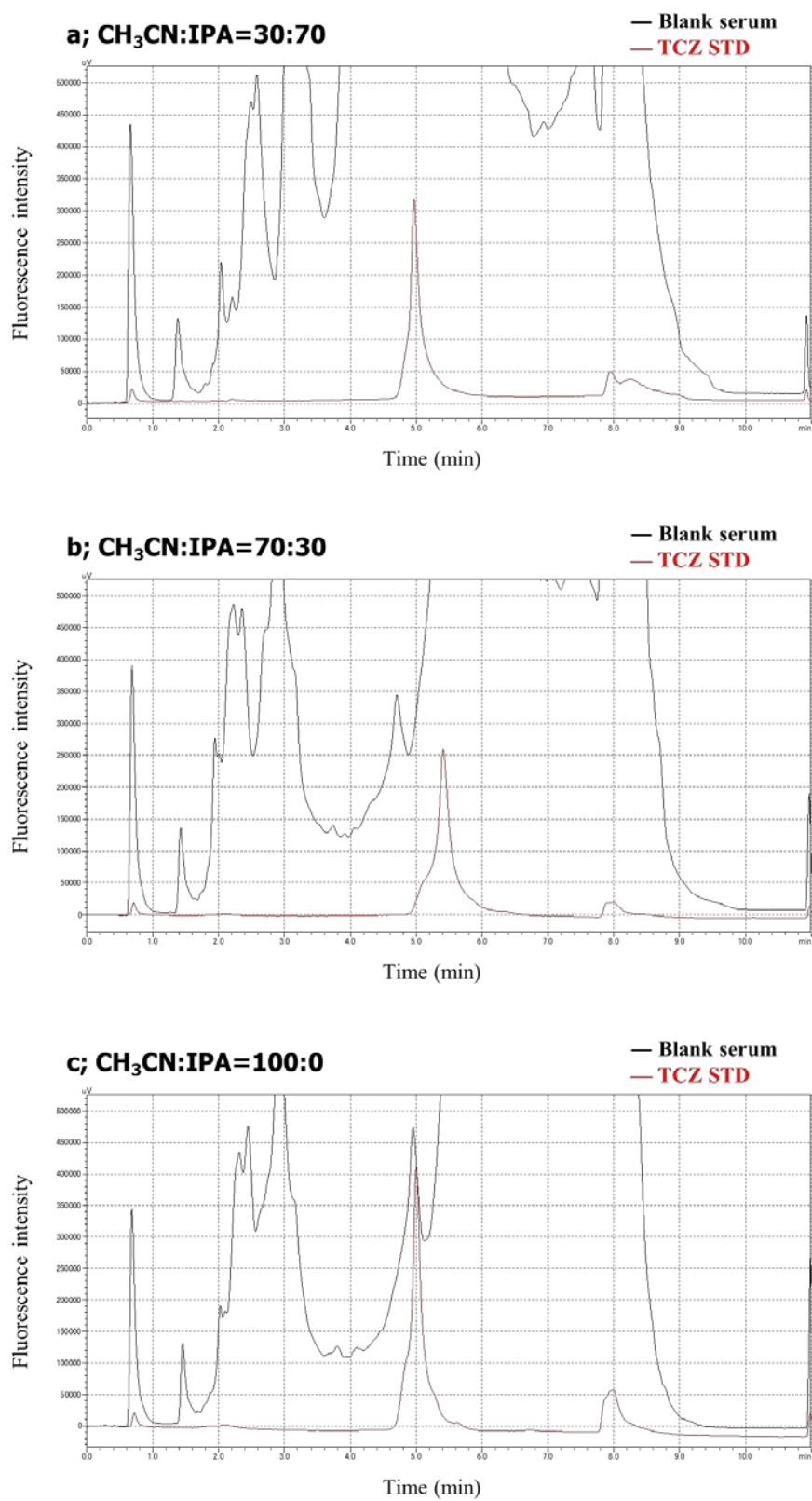


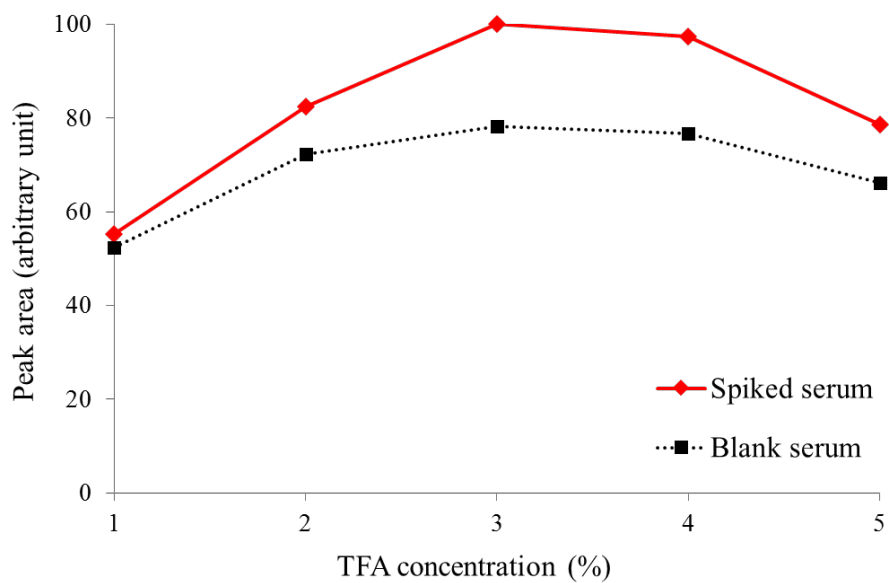
Fig. 2-14 Chromatograms obtained with pretreated human serum and TCZ STD.

### 2-3-7 前処理に用いる試薬の最適化

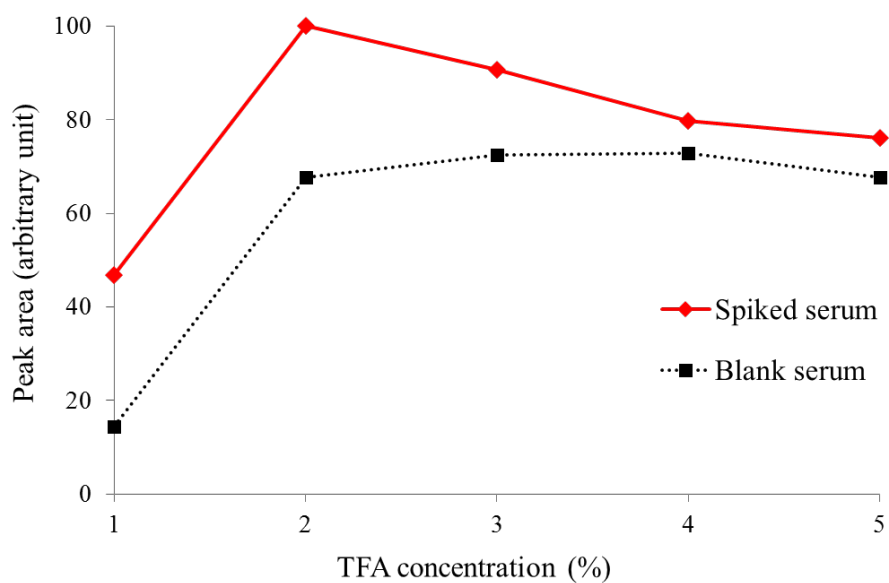
TCZ と IgG1 を比較的良好に分離することができた TAA 類の濃度範囲について、血清試料中での TMA (10~200 mmol/L)、TEA (150~300 mmol/L) 及び TPA (100~500 mmol/L) それぞれに加える TFA の濃度を検討し、条件の最適化を行った。その結果、TMA では、いずれの濃度においても前処理後の試験溶液がゲル化し、HPLC に注入すると圧力上限を超える結果となった。TEA では、200 mmol/L 以上の濃度で前処理を行うと TMA のときと同様に前処理後の試験溶液がゲル化した。150 mmol/L の試料溶液はゲル化しなかったが、TCZ 添加血清とブランク血清で 5.2 分のピーク面積値に大きな差は認められなかった。TPA では、300 mmol/L 以上の濃度で前処理を行うと TMA のときと同様に前処理後の試験溶液がゲル化した。そこで、TPA の濃度範囲 100~250 mmol/L について TFA の濃度の最適化を行い、標準添加血清とブランク血清のピーク面積の差が最も大きくなる条件を検討したところ、250 mmol/L TPA を含むアセトニトリル溶液による前処理後に 5.5%TFA 水溶液を加えたときに両者の面積値の差が最大となった (Fig. 2-15)。

従って、前処理に用いる TPA の濃度は 250 mmol/L、TFA の濃度は 5.5%とした。

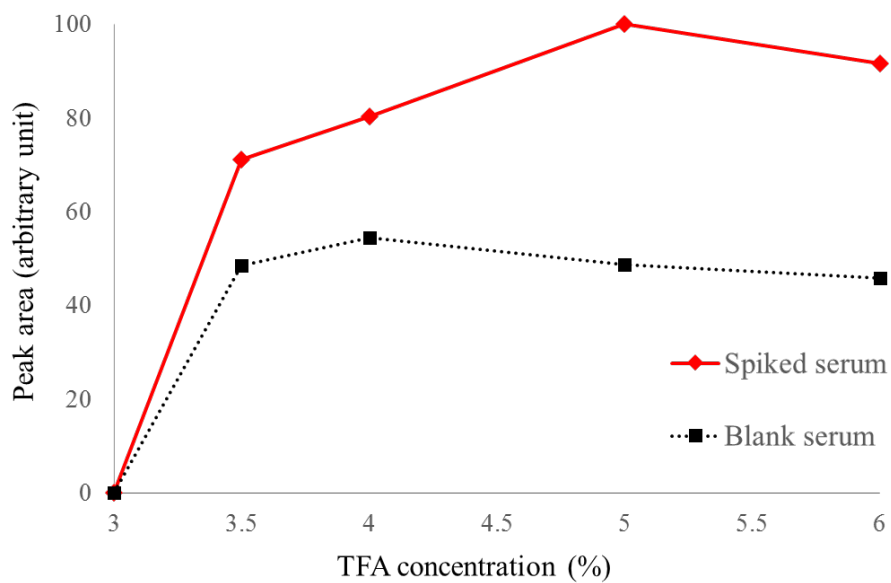
### 100 mmol/L TPA



### 150 mmol/L TPA



### 200 mmol/L TPA



### 250 mmol/L TPA

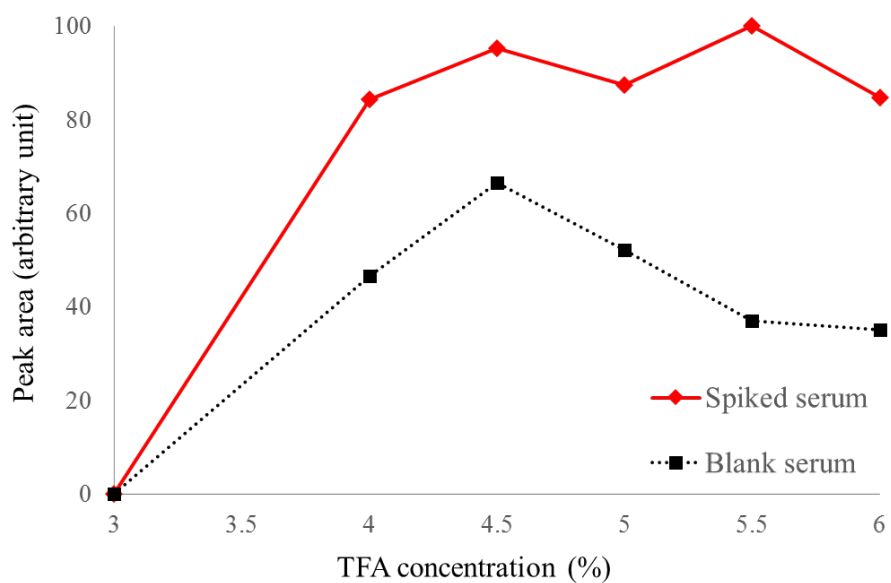


Fig. 2-15 Effect of TPA concentration on the separation of TCZ in human serum.

### 2-3-8 標準添加検量線

TCZ と同じ保持時間に血清由来の妨害ピークが検出されたため、本条件を用いて標準添加法による検量線を作成した。その結果、1-50  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で  $r^2 > 0.999$  と良好な直線性が得られた (Fig.2-16)。

従って、今回我々が開発した血清中の TCZ 定量法は、血中濃度の算出が可能であることが示された。

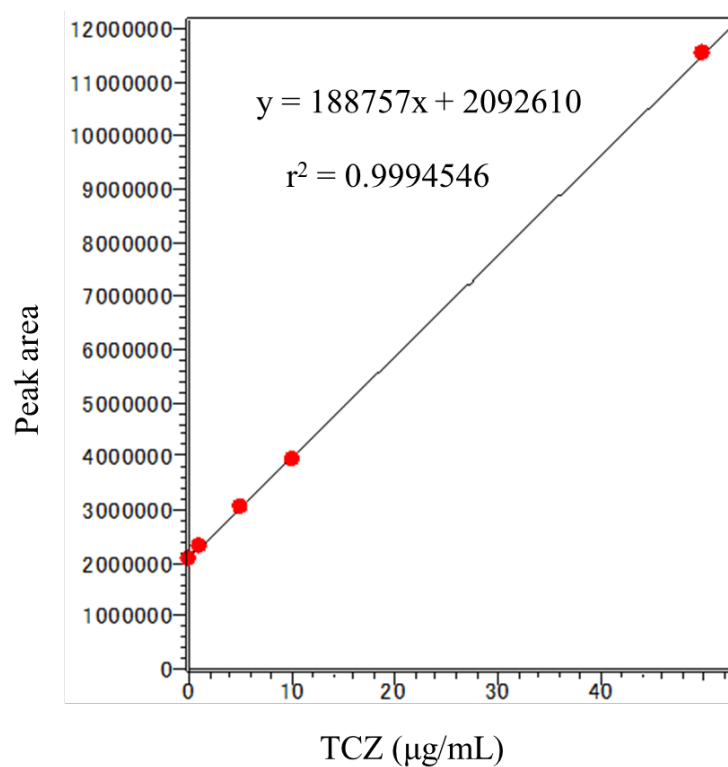


Fig. 2-16 Calibration curve by a standard addition method.

### 2-3-9 検出限界、回収率及び精度

本条件における TCZ の検出限界、回収率及び精度を Table 2-2 に示す。TCZ の検出限界 (S/N=3) は、注入量 (2.5  $\mu$ L) 当たり 0.27  $\mu$ g/mL であった。10  $\mu$ g/mL となるように TCZ を添加したヒト血清を用いて添加回収試験を行ったところ、回収率は 67.3% と比較的良好な結果となった。標準添加血清溶液 (10  $\mu$ g/mL) を 5 回繰り返し測定したときの相対標準偏差は、8.18% と比較的良好な精度が得られた。

Table 2-2 DLs, recovery, and accuracy.

Compound	DL <sup>a)</sup> (ng)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sup>c)</sup> (%) (n=5)
TCZ	0.68	67.3	8.18

- a) Defined as the amount per injection volume (2.5  $\mu$ L) giving a signal-to-noise ratio of 3.
- b) Serum spiked with TCZ (10  $\mu$ g/mL human serum).
- c) Relative standard deviation of absorbance intensity; 25 ng per 2.5  $\mu$ L injection.



## 2-4 小括及び考察

TCZ はノンポーラスカラムである Presto FF-C18 カラムを用いる HT-RPLC により高速分離を実現し、11 分以内にシャープな形状の単一ピークとして検出された。本分析は、TCZ の自然蛍光を利用して検出しているため、誘導体化などの複雑な前処理は必要としない、迅速かつ簡便な HPLC 蛍光法であると考えられる。

続いて、本法を製剤の安定性の評価に適用したところ、室温条件下、冷蔵及び冷凍保存条件下のいずれにおいても製剤の安定性を確認することができた。今回の結果は、これまでに報告のあった安定性試験のデータ内容と矛盾しない結果であったことから、本分析法は製剤安定性試験に適用可能な手法であると考ええる。また、今回得られた安定性情報は、臨床での製剤の取り扱いにおいて有用なデータとなりうると考える。

次に、本分析法を TCZ の血中濃度測定に適用するため、TCZ と IgG1 の分離検討を行った。ヒト化抗体である TCZ は、IgG1 との分子配列構造上の違いが CDR のみであり、そのアミノ酸配列の差異も 10%以下とわずかである。そのため、HPLC を用いて分離・分析する場合、低分子医薬品で確立されているような方法を用いた生体試料中薬物濃度分析は一般的に困難であるとされてきた。にもかかわらず、今回開発した分析法では、塩基を含むアセトニトリル溶液による簡便な前処理とノンポーラスカラムを用いる HT-RPLC の組み合わせによって、TCZ をサブクラスである IgG1 から分離可能であることが示された。また、前処理に用いる塩基性試薬の性質と TCZ の最大 RPH の相関を見たところ、TCZ の安定化に関与する塩基性試薬の TCZ への取り込みは、塩基性度よりも疎水性に依存していることが確認された。これにより、これまで抗体のサブクラス分離に主に用いられている LBA のような選択性の高い前処理を必要とせず、また、迅速かつ簡便な前処理のみによって血中の TCZ 濃度の HPLC 定量法の開発の可能性が示唆された。

最後に、市販のヒト血清を用いて血中 TCZ 濃度の定量法の開発を行った。250 mmol/L TPA を含むアセトニトリル溶液による前処理を行うことで、血中 IgG1 由来の夾雑物を良好に除去することができた。TCZ と同じ保持時間の血清由来の妨害ピークを完全には除去できなかったものの、標準添加検量線により血清

中の TCZ 濃度を定量することができた。また、今回開発した血清中 TCZ 濃度の定量法では、良好な直線性の標準添加検量線、回収率、検出限界及び再現性が得られた。

本法は、迅速かつ簡便な TCZ 血中濃度測定法として実試料へと適用可能であることが示唆されたため、今後、TCZ の重篤な有害事象の防止や治療効果の確認のみならず、RA 治療患者の NSAIDs や DMARDs との併用時における相互作用を解明する上でも有用であると考えられる。

## 総括

本研究では、RA 治療薬の薬物相互作用解明に関する研究として、RA 治療薬の迅速かつ簡便な薬物濃度測定法の開発を行った。

第1章では、MTX と NSAIDs (LP、MX、LX、DF 及び CX) の HPLC 定量法の開発を行った。測定対象物には、RA 治療薬のアンカードラッグに位置付けられている MTX 及び RA に適応がある NSAIDs を選択した。逆相系の Gemini C6-Phenyl カラムを用い、各医薬品の吸収波長に適した測定波長に合わせて検出することで、MTX と 5 種の NSAIDs の標準品を 25 分以内に良好に分離・検出することができた。また、検量線の直線性、5 回繰り返した際の精度及び検出限界はいずれも良好な結果が得られた。続いて、ヒト血漿を用いて添加回収試験を行ったところ、MTX と 5 種の NSAIDs の各医薬品のピークは血清由来のピークと良好に分離することができ、そのときの回収率及び 5 回繰り返した際の再現性は良好な結果となった。今回我々が開発した HPLC 分析法は、迅速かつ簡便な手法であり、実臨床でも利用可能と考えられることから、MTX と NSAIDs の副作用回避や治療効果のみならず、薬物間相互作用の確認を行う上でも有用であると考えられる。

第2章では、HPLC 自然蛍光検出法による TCZ 定量法の開発を行った。まず、TCZ 標準品の HPLC 自然蛍光検出を試みたところ、ノンポーラスカラムである Presto FF-C18 カラムを用いた HT-RPLC により高速分離を実現した。次に、製剤の保存安定性の評価に適用したところ、室温条件下、冷蔵及び冷凍保存条件下のいずれにおいても製剤の安定性を確認することができた。今回得られた安定性情報は、臨床での製剤の取り扱いにおいて有用なデータとなりうると考える。続いて、本分析法を TCZ の血中濃度測定に適用するため、TCZ と IgG1 の分離検討を行った。その結果、塩基を含むアセトニトリル溶液による簡便な前処理とノンポーラスカラムを用いた HT-RPLC の組み合わせによって、TCZ をサブクラスである IgG1 から分離可能であることが示された。これにより、これまで抗体のサブクラス分離に主に用いられている LBA のような選択性の高い前処理を必要としない血中の TCZ 濃度の HPLC 定量法の開発の可能性が示唆された。最後に、市販のヒト血清を用いて血中 TCZ 濃度の定量法の開発を行った。その結果、TPA を含むアセトニトリル溶液による前処理を行うことで、血中 IgG1 由来の夾雑物

を良好に除去することができた。TCZ と同じ保持時間の妨害ピークを完全には除去できなかったものの、標準添加検量線により血清中の TCZ 濃度を定量することができた。今回開発した血清中 TCZ 濃度の定量法では、良好な直線性の標準添加検量線、回収率、検出限界及び再現性が得られた。本法は、迅速かつ簡便な TCZ 血中濃度測定法として実試料へと適用可能であることが示唆された。今後、TCZ の重篤な有害事象の防止や治療効果の確認のみならず、RA 治療患者の NSAIDs や DMARDs との併用時における相互作用を解明する上でも有用であると考えられる。

以上述べたように、著者は RA 治療で併用される薬剤の薬物相互作用解明に利用可能な分析法開発を目的として、MTX と NSAIDs の HPLC 同時定量法と TCZ の HPLC 定量法を開発した。今回開発した定量法はいずれも MS などの特別な装置を必要とせず、また、LBA のような煩雑な前処理を必要としない、迅速かつ簡便な分析法であることから、製剤中または生体試料中の分析に極めて有用であると考えられる。今後、これらの分析法が実際の医療現場で利用され、RA の薬物治療時の治療効果の確認や副作用の回避のみならず、多剤併用療法が適用される RA において薬物相互作用解明に貢献できることを期待する。

## 実験の部

### 各章に共通の事項

#### (1) 水（精製水）

水道水を Elix-3 UV 純水製造装置 (Millipore 製) により前処理した後、Simplicity UV 超純水製造装置 (Millipore 製) により精製して使用。

#### (2) 試薬

特記しない限り、市販の特級品をそのまま使用。試薬溶液は、特記しない限り常法に従って調製して使用した。

#### (3) 機器

紫外可視分光光度計：Jasco V-530 型紫外可視分光光度計を使用。測定セルは角型石英セル (1.0×1.0 cm) を使用。

蛍光分光光度計：Jasco FP-6200 型分光蛍光光度計を使用。測定セルは角型石英セル (1.0×1.0 cm) を使用。

遠心機：Eppendorf MiniSpin plus 遠心機を使用。

高速液体クロマトグラフ：Shimadzu Ultra-fast liquid chromatography (UFLC) Prominence システムを使用。

システムコントローラー：Shimadzu CBM-20A システムコントローラーを使用。

ポンプ：Rheodyne 7725i サンプルインジェクターを装備した Shimadzu LC-20AD 高速液体クロマトグラフポンプを使用。

デガッサ：Shimadzu DGU -20A5R オンラインデガッサーを使用。

UV 検出器：Shimadzu SPD-20A UV/VIS 検出器を使用（第 1 章）。

蛍光検出器：Shimadzu RF-10AXL 蛍光検出器を使用（第 2 章）。

記録器：Shimadzu Lab Solutions LC (v. 1.21) を使用。

カラムオーブン：Sugai U-620（第 1 章）及び TOSOH CO-8010（第 2 章）を目的温度に設定し使用。

メンブレンフィルター：Sartorius Minisart RC4 (0.20  $\mu\text{m}$ ) シリンジフィルター  
を使用。

## 第 1 章に関する実験

### (1) 試薬

MTX 及び各種 NSAIDs については以下に示すものを用いた。

MTX : methotrexate (和光純薬製)

CX : celecoxib (東京化成工業製)

DF : diclofenac sodium (和光純薬製)

LP : loxoprofen sodium salt dehydrate (和光純薬製)

LX : lornoxicam (東京化成工業製)

MX : meloxicam (和光純薬製)

ヒト血清 : Pooled Human Serum (コスモ・バイオ製)

### (2) MTX と 5 種の NSAIDs の標準原液

MTX、DF 及び LP については市販の試薬をメタノールに溶解して 1 mmol/L に調製し、4°C 暗所保存。CX、LX 及び MX については市販の試薬をアセトニトリルに溶解して 1 mmol/L に調製し、4°C 暗所保存。それぞれの濃度にアセトニトリルで希釈して、1 ヶ月以内に使用。

### (3) 移動相

10 mmol/L となるよう酢酸アンモニウムを精製水又はメタノールに溶解して調製し、3 日以内に使用。

### (4) 機器

濃縮装置 : BioChromato. Inc. コンビニ・エバポを 40°C に設定して使用。

## 第2章に関する実験

### (1) 試薬

TCZ 及び IgG1 については以下に示すものを用いた。

TCZ : アクテムラ静注用 80 mg/4 mL (中外製薬製)

IgG1 : Natural Human IgG1 protein 3 mg/mL (abcam 製)

ヒト血清 : Pooled Human Serum (コスモ・バイオ製)

### (2) 1%TFA を含む 10%アセトニトリル水溶液

10%アセトニトリル水溶液に 1% (v/v) となるよう TFA を加えて調製。1 週間以内に使用。

### (3) TCZ 標準溶液

アクテムラ点滴静注用を生理食塩液で 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製し、4°C 暗所保存。1 ヶ月以内に使用。

### (4) IgG1 標準溶液

Natural Human IgG1 protein を生理食塩液で 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製し、4°C 暗所保存。1 ヶ月以内に使用。

### (5) 移動相

0.1% (v/v) となるよう TFA を精製水、アセトニトリル : IPA = 7 : 3 の混合溶液及びアセトニトリルに加えて調製し、3 日以内に使用。

## 謝辞

本研究は、長崎国際大学 中島憲一郎 学長の終始変わらざる暖かいご指導とご鞭撻の下に行われました。謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成に際し、ご多忙の中、終始御懇篤なご指導と激励を賜りました主担当指導教員である長崎国際大学大学院薬学研究科医療基盤薬学 大庭義史教授ならびに副担当指導教員である長崎国際大学大学院薬学研究科医療社会薬学 椛島 力 教授に謹んで感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご助言をいただきました副担当指導教員である長崎国際大学大学院薬学研究科医療社会薬学 神谷誠太郎 講師に謹んで感謝いたします。

本論文作成に際し、貴重な御教示とご高閲を賜りました長崎国際大学大学院薬学研究科医療社会薬学 長岡 寛明 教授、長崎国際大学大学院薬学研究科薬物治療設計学 仮屋菌博子 教授に心より感謝いたします。

本研究に関し、ご協力いただきました長崎国際大学薬学部製剤学研究室 大川内諒、光吉杏美香、吉住果穂、久保田美貴、吉富杏奈、坂本貴俊、住吉真太朗、深堀寛太、志久優里香、中元瑞綺の諸氏に深く感謝いたします。

本研究で使用したアクテムラ<sup>®</sup>静注用 80 mg / 4 mL をご提供くださいました中外製薬株式会社様に厚く御礼申し上げます。

また、日々の研究活動に協力していただいた長崎国際大学薬学部製剤学研究室の学生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、私を温かく励まし支えてくれた両親、友人、妻に心より感謝いたします。



## 参考文献

- [1] P. Emery, E. Keystone, H. P. Tony, A. Cantagrel, R. van Vollenhoven, A. Sanchez, E. Alecock, J. Lee, J. Kremer, IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial, *Ann. Rheum. Dis.*, 67 (2008) 1516-1523.
- [2] 日本リウマチ学会, 関節リウマチ診療ガイドライン 2014. Available at: <http://www.rheuma-net.or.jp/rheuma/rm400/library/pdf/guideline1to4.pdf> (Accessed: 14th June 2018).
- [3] J. E. Oliver, A.J. Silman, Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases?, *Arthritis. Res. Ther.*, 11 (2009) 252.
- [4] R. Tanaka, Disease-oriented research in rheumatoid arthritis, *Nippon Rinsho*, 72 (2014) 123-130.
- [5] C. J. Smyth, Therapy of rheumatoid arthritis. A pyramidal plan. *Postgraduate Med. Monogr.*, Issue 51 (1972) 31-39.
- [6] K. R. Wilske, L. A. Healey, Remodeling the pyramid-A concept whose time has come. *J. Rheumatol.*, 16 (1989) 565-567.
- [7] K. G. Saag, G. G. Teng, N. M. Patkar, J. Anuntiyo, C. Finney, J. R. Curtis, H. E. Paulus, A. Mudano, M. Pisu, M. Elkins-Melton, R. Outman, J. J. Allison, M. Suarez Almazor, S. L. Jr. Bridges, W. W. Chatham, M. Hochberg, C. MacLean, T. Mikuls, L. W. Moreland, J. O'Dell, A. M. Turkiewicz, D. E. Furst, American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 59 (2008) 762-784.

- [8] J. S. Smelson, R. Landewé, F. C. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, S. Gorter, R. Knevel, J. Nam, M. Schoels, D. Aletaha, M. Buch, L. Gossec, T. Huizinga, J. W. Bijlsma, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, C. Gabay, J. Gomez-Reino, M. Kouloumas, T. K. Kvien, E. Martin-Mola, I. McInnes, K. Pavelka, P. van Riel, M. Scholte, D. L. Scott, T. Sokka, G. Valesini, R. van Vollenhoven, K. L. Winthrop, J. Wong, A. Zink, D. van der Heijde, EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69 (2010) 964-975.
- [9] 塩川優一, 慢性関節リウマチの上部消化管障害に関する疫学調査委員会, 非ステロイド抗炎症薬による上部消化管障害に関する疫学調査, 31 (1991) 96-111.
- [10] F. Catella-Lawson, B. Mcadam, B. W. Morrison, S. Kappor, D. Kujubu, L. Antes, K. C. Lasseter, H. Quan, B. J. Gertz, G. A. Fitzgerald, Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics and vasoactive eicosanoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289 (1999) 735-741.
- [11] J. Forestier, L'Aurothiopie dans les rhumatismes chroniques, *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris.*, 53 (1929) 323-327.
- [12] E. Tanaka, H. Yamanaka, DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs), *Nippon Rinsho*, 71 (2013) 1199-1206.
- [13] R. S. Amos, T. Pullar, D. E. Bax, D. Situnayake, H. A. Capell, B. McConkey, Sulphasalazine for rheumatoid arthritis: toxicity in 774 patients monitored for one to 11 years, *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, 293 (1986) 420-423.
- [14] E. Rich, L. W. Moreland, G. S. Alarcón, Paucity of radiographic progression in rheumatoid arthritis treated with methotrexate as the first disease modifying antirheumatic drug, *J. Rheumatol.*, 26 (1999) 259-261.

- [15] K. Visser, W. Katchamart, E. Loza, J. A. Martinez-Lopez, C. Salliot, J. Trudeau, C. Bombardier, L. Carmona, D. van der Heijde, J. W. Bijlsma, D. T. Boumpas, H. Canhao, C. J. Edwards, V. Hamuryudan, T. K. Kvien, B. F. Leeb, E. M. Martín-Mola, H. Mielants, U. Müller-Ladner, G. Murphy, M. Østergaard, I. A. Pereira, C. Ramos-Remus, G. Valentini, J. Zochling, M. Dougados, Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative, *Ann. Rheum. Dis.*, 68 (2009) 1086-93.
- [16] E. Krishnan, V. B. Lingala, G. Singh, Declines in mortality from acute myocardial infarction in successive incidence and birth cohorts of patients with rheumatoid arthritis, *Circulation*, 110 (2004) 1774-1779.
- [17] Y. Uwai, R. Suzuki, K. Iwamoto, Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on pharmacokinetics of methotrexate: a meta-analysis, *Yakugaku Zasshi*, 131 (2011) 853-861.
- [18] 医薬品インタビューフォーム, 抗リウマチ剤 メトトレキサートカプセル 「リウマトレックス®カプセル」, 改訂第20版, ファイザー株式会社 (2017).
- [19] Y. Tanaka, T. Takeuchi, E. Inoue, K. Saito, N. Sekiguchi, E. Sato, M. Nawata, H. Kameda, S. Iwata, K. Amano, H. Yamanaka, Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan: one-year clinical outcomes (RECONFIRM-2), *Mod. Rheumatol.*, 18 (2008) 146-152.
- [20] N. Miyasaka, The CHANGE Study Investigators: Clinical investigation in highly disease-affected rheumatoid arthritis patients in Japan with adalimumab applying standard and general evaluation: the CHANGE study, *Mod. Rheumatol.*, 18 (2008) 252-262.

- [21] T. Takeuchi, H. Kameda, The Japanese experiences with biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 6 (2010) 644-652.
- [22] T. Nishimoto, Tocilizumab (anti-interleukin-6 receptor antibody), *Nippon Rinsho*, 68 (2010) 407-412.
- [23] I. N. Foltz, M. Karow, S. M. Wasserman, Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know, *Circulation*, 127 (2013) 2222-2230.
- [24] D. T. Felson, J. J. Anderson, M. Boers, C. Bombardier, M. Chernoff, B. Fried, D. Furst, C. Goldsmith, S. Kieszak, R. Lightfoot, H. Paulus, P. Tugwell, M. Weinblatt, R. Widmark, H. J. Williams, F. Wolfe, The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials, *Arthritis. Rheum.*, 36 (1993) 729-740.
- [25] N. Nishimoto, K. Yoshizaki, K. Maeda, T. Kuritani, H. Deguchi, B. Sato, N. Imai, M. Suemura, T. Kakehi, N. Takagi, T. Kishimoto, Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study, *J. Rheumatol.*, 30 (2003) 1426-1435.
- [26] 医薬品インタビューフォーム，ヒト化抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体「ACTEMRA®」，改訂第 22 版，中外製薬株式会社 (2017).
- [27] M. W. Kalff, A population study on serum immunoglobulin levels, *Clin. Chim. Acta.*, 28 (1970) 277-289.
- [28] J. Radl, J. M. Sepers, F. Skvaril, A. Morell, W. Hijmans, Immunoglobulin patterns in humans over 95 years of age, *Clin. Exp. Immunol.*, 22 (1975) 84-90.

- [29] H. Blasco, G. Lalmanach, E. Godat, M.C. Maurel, S. Canepa, M. Belghazi, G. Paintaud, D. Degenne, E. Chatelut, G. Cartron, C. Le Guellec, Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum, *J. Immunol.Methods.*, 325 (2007) 127-139.
- [30] B. Gorovits, D. J. Baltrukonis, I. Bhattacharya, M. A. Birchler, D. Finco, D. Sikkema, M. S. Vincent, S. Lula, L. Marshall, T. P. Hickling, Immunoassay methods used in clinical studies for the detection of anti-drug antibodies to adalimumab and infliximab, *Clin. Exp. Immunol.*, 192 (2018) 348-365.
- [31] C. W. N. Damen, E. R. de Groot, M. Heij, D. S. Boss, J. H. M. Schellens, H. Rosing, J. H. Beijnen, L. A. Aarden, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma, *Anal. Biochem.*, 391 (2009) 114-120.
- [32] A. N. Hoofnagle, M. H. Wener, The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry, *J. Immunol. Methods.*, 347 (2009) 3-11.
- [33] M. Dubois, F. Fenaille, G. Clement, M. Lechmann, J. C. Tabet, E. Ezan, F. Becher, Immunopurification and mass spectrometric quantification of the active form of a chimeric therapeutic antibody in human serum, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 1737-1745.
- [34] O. Heudi, S. Barteau, D. Zimmer, J. Schmidt, K. Bill, N. Lehmann, C. Bauer, O. Kretz, Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 4200-4207.
- [35] H. Li, R. Ortiz, L. Tran, M. Hall, C. Spahr, K. Walker, J. Laudernann, S. Miller, H. Salimi-Moosavi, J. W. Lee, General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal

standard with application to preclinical Studies, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 1267-1273.

- [36] K. J. Bronsema, R. Bischoff, W. W. M. Pim Pijnappel, A. T. van der Ploeg, N. C. van de Merbel, Absolute quantification of the total and antidrug antibody-bound concentrations of recombinant human  $\alpha$ -glucosidase in human plasma using protein G extraction and LC-MS/MS, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 4394-4401.
- [37] B. An, M. Zhang, R. W. Johnson, J. Qu, Absolute quantification of the total and antidrug antibody-bound concentrations of recombinant human  $\alpha$ -glucosidase in human plasma using protein G extraction and LC-MS/MS, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 4023-4029.
- [38] Y. P. Goekoop-Ruiterman, J. K. de Vries-Bouwstra, C. F. Allaart, D. van Zeben, P. J. Kerstens, J. M. Hazes, A. H. Zwinderman, H. K. Roodman, K. H. Han, M. L. Westedt, A. H. Gerards, J. H. van Groenendael, W. F. Lems, M. V. van Krugten, F. C. Breedveld, B. A. Dijkmans, Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial, *Arthritis. Rheum.*, 52 (2005) 3381-3390.
- [39] M. E. Weinblatt, J. S. Coblyn, D. A. Fox, P. A. Fraser, D. E. Holdsworth, D. N. Glass, D. E. Trentham, Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.*, 312 (1985) 818-822.
- [40] C. Salliot, D. van der Heijde, Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research, *Ann. Rheum. Dis.*, 68 (2009) 1100-1104.
- [41] Y. Kaneko, MTX, *Nippon Rinsho*, 74 (2016) 944-947.
- [42] N. Tanaka, S. Kawai, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Nippon Rinsho*, 68 (2010) 361-364.

- [43] L. S. Simon, A. L. Weaver, D. Y. Graham, A. J. Kivitz, P. E. Lipsky, R. C. Hubbard, P. C. Isakson, K. M. Verburg, S. S. Yu, W. W. Zhao, G. S. Geis, Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial, *JAMA*, 282 (1999) 1921-1928.
- [44] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, Determination of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, 690 (1997) 267-273.
- [45] X. Liu, J. R. G. Liu, Y. Chen, Determination of methotrexate in human serum by high-performance liquid chromatography combined with pseudo template molecularly imprinted polymer, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7533-7538.
- [46] P. Dolezalová, J. Krijt, J. Chládek, D. Nemcová, J. Hoza, Adenosine and methotrexate polyglutamate concentrations in patients with juvenile arthritis, *Rheumatology*, 44 (2005) 74-79.
- [47] M. Uchiyama, T. Matsumoto, T. Matsumoto, S. Jimi, Y. Takamatsu, K. Tamura, S. Hara, Simple and sensitive HPLC method for the fluorometric determination of methotrexate and its major metabolites in human plasma by post-column photochemical reaction, *Biomed. Chromatogr.*, 26 (2012) 76-80.
- [48] S. Steinborner, J. Henion, Liquid-liquid extraction in the 96-well plate format with SRM LC/MS quantitative determination of methotrexate and its major metabolite in human plasma, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2340-2345.
- [49] P. Guo, X. Wang, L. Liu, M. G. Belinsky, G. D. Kruh, J. M. Gallo, Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007) 1789-1795.

- [50] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B*, 692 (1997) 375-388.
- [51] E. Woolf, I. Fu, B. Matuszewski, Determination of rofecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, in human plasma using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection, *J Chromatogr. B*, 730 (1999) 221-227.
- [52] Y. Sakaguchi, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, Separation-oriented derivatization of native fluorescent compounds through fluorous labeling followed by liquid chromatography with fluorous-phase, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 5039-5045.
- [53] K. Ohcho, K. Saito, H. Kataoka, Automated Analysis of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Environmental Water by On-line In-tube Solid-phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Environm. Chem.*, 18 (2008) 511-520.
- [54] D. G. Liegler, E. S. Henderson, M. A. Hahn, V. T. Oliverio. The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 10 (1969) 849-857.
- [55] N. Nishimoto, T. Kishimoto, Humanized Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab, *Therapeutic Antibodies*, 181 (2008) 151-160.
- [56] N. Vande Castele, R. Khanna, Therapeutic Drug Monitoring of Golimumab in the Treatment of Ulcerative Colitis, *Pharm. Res.*, 34 (2017) 1556-1563.
- [57] H. Blasco, G. Lalmanach, E. Godat, M. C. Maurel, S. Canepa, M. Belghazi, G. Paintaud, D. Degenne, E. Chatelut, G. Cartron, C. Le Guellec, Evaluation of a



- peptide ELISA for the detection of rituximab in serum, *J. Immunol. Methods.*, 325 (2007) 127-139.
- [58] Y. Miwa, H. Furuya, R. Yanai, T. Kasama, K. Sanada, The Relationship between the Serum Oxytocin Levels, Disease Activity, the ADLs and the QOL in Patients with Rheumatoid Arthritis, *Intern. Med.*, 56 (2017) 3167-3172.
- [59] R. C. Bast Jr, T. L. Klug, E. St John, E. Jenison, J. M. Niloff, H. Lazarus, R. S. Berkowitz, T. Leavitt, C. T. Griffiths, L. Parker, V. R. Zurawski Jr, R. C. Knapp, A Radioimmunoassay Using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer, *N. Engl. J. Med.*, 309 (1983) 883-887.
- [60] J. K. Ma, T. Lehner, Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects, *Arch. Oral. Biol.*, 35 (1990) 115S-122S.
- [61] C. W. Damen, E. R. de Groot, M. Heij, D. S. Boss, J. H. Schellens, H. Rosing, J. H. Beijnen, L. A. Aarden, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma, *Anal. Biochem.*, 391 (2009) 114-120.
- [62] D. C. Roopenian, G. J. Christianson, T. J. Sproule, Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies, *Methods Mol. Biol.*, 602 (2010) 93-104.
- [63] H. P. Knopf, F. Duffy, R. Papoian, A time-resolved fluoroimmunoassay for recombinant human interleukin-3, *Ann. Clin. Biochem.*, 30 (1993) 69-71.
- [64] W. Q. Sun, Y. Wang, X. Z. Liu, L. Q. Li, C. C. Chen, L. C. Zhang, The development of dual-label time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for screening of ovarian cancer based on simultaneous detection of human epididymis protein-4 and

- cancer antigen 125, *J. Immunoassay Immunochem.*, 37 (2016) 453-462.
- [65] S. N. Davidoff, N. T. Ditto, A. E. Brooks, J. Eckman, B. D. Brooks, Surface Plasmon Resonance for Therapeutic Antibody Characterization, *Methods in Pharmacology and Toxicology.*, 53 (2015) 35-76.
- [66] R. Karlsson, Applications of Surface Plasmon Resonance for Detection of Bispecific Antibody Activity, *Biopharm. International.*, 28 (2015) 38-44.
- [67] G. F. Blackburn, H. P. Shah, J. H. Kenten, J. Leland, R. A. Kamin, J. Link, J. Peterman, M. J. Powell, A. Shah, D. B. Talley, S. K. Tyagi, E. Wilkins, T. G. Wu, R. J. Massey, Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics, *Clin. Chem.*, 37 (1991) 1534-1539.
- [68] B. Prieto, D. Miguel, M. Costa, D. Coto, F. V. Alvarez, New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement, *Clin. Chem.*, 48 (2010) 835-838.
- [69] A. N. Hoffnagle, M. H. Wener, The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry, *J. Immunol. Methods.*, 347 (2009) 3-11.
- [70] H. H. Chiu, H. W. Liao, Y. Y. Shao, Y. S. Lu, C. H. Lin, I. L. Tsai, C. H. Kuo, Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS/MS, *Anal. Chem. Acta.*, 1019 (2018) 93-102.
- [71] Q. Zang, D. S. Spellman, Y. Song, B. Choi, N. G. Hatcher, D. Tomazela, M. Beaumont, M. Tabrizifard, D. Prabhavalkar, W. Seghezzi, J. Harrelson, K. P. Bateman, Generic Automated Method for Liquid Chromatography–Multiple

Reaction Monitoring Mass Spectrometry Based Monoclonal Antibody Quantitation for Preclinical Pharmacokinetic Studies, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 8776-8784.

[72] D. C. Liebler, L. J. Zimmerman, Targeted Quantitation of Proteins by Mass Spectrometry, *Biochemistry*, 52 (2013) 3797-3806.

[73] Y. Q. Yu, M. Gilar, P. J. Lee, E. S. Bouvier, J. C. Gebler, Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6023-6028.

[74] H. Li, R. Ortiz, L. Tran, M. Hall, C. Spahr, K. Walker, J. Laudemann, S. Miller, H. Salimi-Moosavi, J. W. Lee, General LC-MS/MS Method Approach to Quantify Therapeutic Monoclonal Antibodies Using a Common Whole Antibody Internal Standard with Application to Preclinical Studies, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 1267-1273.

[75] Y. Shen, G. Zhang, J. Yang, Y. Qiu, T. McCauley, L. Pan, J. Wu, Online 2D-LC-MS/MS assay to quantify therapeutic protein in human serum in the presence of pre-existing antidrug antibodies, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 8555-8563.

[76] T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, M. Speed Ricci, Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A*, 1053 (2004) 299-305.

[77] 医薬品添付文書，ヒト化抗ヒト IL-6 レセプターモノクローナル抗体「アクテムラ®点滴静注用」トシリズマブ（遺伝子組換え）注，改訂第 18 版，ファイザー株式会社（2016）.