

●新規肝線維化マーカー E テスト「TOSOH」Ⅱ (オートタキシン)

バイオサイエンス事業部 第一開発部 探索 G

島本 怜史

新谷 晃司

バイオサイエンス事業部 開発管理室

五十嵐浩二

1. はじめに

本邦における B 型又は C 型肝炎ウイルス保持者は、それぞれ 110～140 万人、190～230 万人と推定されている。ウイルス肝炎患者の炎症持続は肝臓の線維化を進行させ、やがて肝硬変や肝臓癌に至ることが知られている。C 型肝炎では抗ウイルス療法により高確率でウイルス排除が可能となり、B 型肝炎においてもウイルスの沈静化が可能となっているが、ウイルスを排除しても肝臓癌の発生はゼロではなく、肝臓の線維化を診断することは、肝臓癌発症リスクの予測や治療方針の決定において極めて重要である。

肝線維化診断の最も信頼性の高い方法である肝生検検査は、診断のゴールドスタンダードであり肝臓の線維化の程度 (F-stage 診断; 新犬山式分類) と炎症の活動度 (A-grade 診断; 新犬山式分類) を独立して評価できる。しかし、侵襲性が高く、病理医のいる専門病院に限られた検査方法である。

超音波エラストグラフィを原理としたフィブロスコピックは、物理的な線維化評価法であり、肝臓の硬度を測定、数値化するもので、肝生検の結果と相関性が高いが、皮下脂肪の厚い患者、肝線維化が進むとあらわれやすい腹水のある患者には使用できない問題がある。

日常診療では血小板数、肝機能を反映する酵素類、それらを組み合わせた指標 (FIB4、APRI 等)、ヒアルロン酸、IV 型コラーゲン・7S 等が肝臓の線維化進展の診断補助として利用されているが、感度・特異度が必ずしも十分ではなく、慢性肝疾患以外の背景疾患や運動、食事等でも測定値に影響を与える場合がある¹⁾。そのため、これらに代わる新規血清マーカーの開発が進められており、2015 年には Mac2 結合蛋白 (M2BP) 糖鎖修飾異性体 (M2BPGi) が保険収載された。

オートタキシン (autotaxin、以下 ATX) は、1992 年にヒト悪性黒色腫細胞 A2058 の培養上清より、細胞遊走促進因子として単離された分子量 125 kDa の糖蛋白質であり²⁾、リゾホスファチジルコリンを加水分解しリゾホスファチジン酸を産生するリゾホスホリ

パーゼ D 活性を有する酵素である^{3),4)}。様々な疾患患者の臨床検体の血清 ATX 濃度を測定したところ、慢性肝疾患患者^{5),6)}、悪性リンパ腫患者⁷⁾、妊婦の血清⁸⁾において ATX 濃度が健常者に比較し高濃度であることが明らかになった。肝臓の線維化による ATX 濃度上昇機序は、肝類洞内皮細胞の表現形の変化による各種レセプターの損失^{9),10)} によることが示されており、スカベンジャーレセプターを介しての ATX の代謝不良が想定されている。

今回、我々は自動免疫測定装置を用いて、簡便かつ迅速に ATX を測定可能な試薬の開発を行ったので、基本性能および肝線維化の診断における有用性について報告する。

2. 測定原理と材料

2007 年に開発した ATX 測定系は 2 種類のラット抗 ATX 抗体 (R10.21、R10.23) を用いたサンドイッチ EIA 法である¹¹⁾。磁性ビーズに固定化したラット抗 ATX 抗体 (R10.23) とアルカリ性ホスファターゼ標識された抗 ATX 抗体 (R10.21) が、凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。この試薬カップに検体 (血清) と分注水を注入すると、凍結乾燥試薬が溶解され免疫反応が開始される。37°C、10 分間の反応後、未反応の検体成分と未反応の酵素標識抗体を B/F 分離により洗浄除去する。酵素基質である 4-メチルウンベリフェリルりん酸 (4MUP) を分注後、経時的に蛍光強度を測定し単位時間あたりの 4-メチルウンベリフェロン (4MU) の生成量を測定する (図 1)。基質の蛍光強度は ATX を介して固相に固定化された酵素量に依存するため、予め既知濃度の ATX を含む標準品を用いて、その蛍光強度と ATX 濃度による標準曲線を作成し、ATX 濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当する ATX 濃度を標準曲線より算出することにより ATX の定量が可能となる。測定の際、検体のカップへの分注、一定時間下での反応、B/F 分離、基質分注蛍光強度の測定は東ソー株式会社製の自動免疫測定装置 (AIA-2000、AIA-1800、AIA-900、AIA-

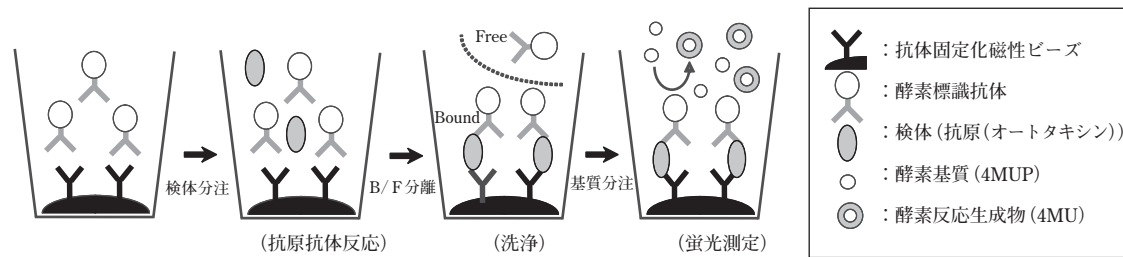


図1 オートタキシン測定原理図

600II、AIA-360)により自動で行われ、測定開始から約20分後に結果が得られる。

なお、標準品のATX抗原は、動物細胞にヒトATX遺伝子を導入して発現を行い、抗体アフィニティー精製により得た。標準品のATX濃度は社内基準により設定した。

3. 基本性能評価

[1] 測定下限

健常者検体(男性410例、女性277例)を測定したところ、男性は平均値0.613 mg/L(95%信頼区間(ノンパラメトリック法)0.388～0.912 mg/L)、最小値0.115 mg/L、女性は平均値0.842 mg/L(95%信頼区間(ノンパラメトリック法)0.450～1.28 mg/L)、最小値0.275 mg/Lだったため、臨床的に必要とされる濃度範囲の下限は、0.1 mg/Lで十分であると考えられた。

ATXを標準品(1)に添加調製したものを検体希釈液で希釈し、希釈系列(0.360、0.288、0.216、0.144、

0.0720、0.0360 mg/L)を作製した。これらを4日間5重測定した結果、サンプル6(0.0360 mg/L)においても表示値に対する正確性、同時再現性5.9%(製品規格15%)と良好であり、0.1 mg/Lを測定することが十分可能であることが確認された。

[2] 再現性試験

測定内再現性、測定間再現性試験を濃度の異なる3種の血清検体を用いて行った。使用した3検体(Low、Middle、High)は1回の測定分を小分け分注し使用まで凍結保存した。10重同時測定による測定内再現性試験の結果、各検体の測定値の変動係数(coefficient of variation; CV)は、1.5～2.9%の範囲内であった。90日間の測定を各2重測定にて行った測定間再現性試験の結果、各検体の測定値のCVは、2.0～2.9%の範囲内であった(表2)。

[3] 希釈直線性試験

希釈直線性試験を濃度の異なる3種の血清検体を用い4重測定にて行った。各々の検体を専用希釈液で5段階の希釈系列を作製し測定した結果、良好な希釈直線性を示した(図2)。

表1 測定下限に関する試験

サンプル	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5	サンプル 6
表示値[mg/L]	0.360	0.288	0.216	0.144	0.072	0.036
Mean[mg/L]	0.365	0.295	0.223	0.147	0.071	0.036
SD	0.014	0.014	0.007	0.006	0.003	0.002
同時再現性(CV[%])	3.7	4.8	3.1	3.8	4.6	5.9
正確性 (表示値に対する回収率[%])	101.4	102.4	103.2	102.1	98.6	100.0

表2 測定内および測定間再現性試験

	測定内再現性試験(n=10)			測定間再現性試験(n=20、94日間)		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
Mean[mg/L]	0.796	1.64	7.20	0.777	1.56	6.83
SD	0.015	0.025	0.210	0.023	0.042	0.140
CV[%]	1.8	1.5	2.9	2.9	2.7	2.0

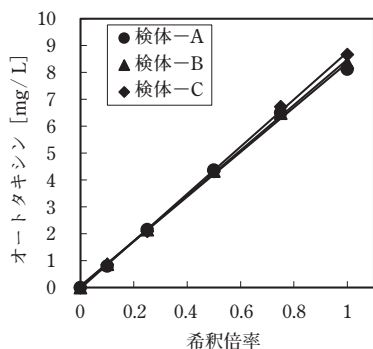


図2 希釈直線性試験

[4] 共存物質の影響試験

検体中に含まれる可能性のある各物質を高濃度で血清へ添加し、測定値への影響を確認した。共存物質としてヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸を各々表3に記載の濃度まで添加し測定した結果、未添加に対して測定値はいずれも±10%以内であり、これら物質による影響は添加量上限まで認められないと判断した。

[5] 検体の凍結保存長期保存安定性

血清検体29例について-20℃で3年6ヶ月保存後の測定値を比較した。

相関係数、相関の傾き共に良好な結果だった(図3)。肝線維化診断のゴールドスタンダードである肝生検は、侵襲性が高いため新たに検体収集することは困難であったため、凍結保存でATXの安定性を確認し、

表3 共存物質の影響試験

ヘモグロビン	[mg/dL]	630
遊離型ビリルビン	[mg/dL]	42
抱合型ビリルビン	[mg/dL]	47
脂質	[mg/dL]	1,600
ヒト血清アルブミン	[g/dL]	5.0
アスコルビン酸	[mg/dL]	20

過去の肝生検を行った慢性肝疾患患者の凍結保存血清により評価を実施した。

4. 臨床上的有用性確認

[1] 肝生検による判定との一致率

ATX濃度は女性の方が男性よりも高値と明らかな性差が認められるため¹²⁾、臨床的意義の大きい線維化進展例(C型肝炎治療ガイドラインの「肝線維化F2以上」)ならびに肝硬変(F4)のカットオフ値は、ROC解析により予め男女別に設定し、慢性肝疾患患者216例(男性112例、女性104例)ならびに健常者60例(男性30例、女性30例)の計276例について、肝生検による判定とATX濃度による線維化ステージの判定を検討した結果、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン・7Sと比較し、高い一致率を示した(表4)。

[2] 肝臓の線維化ステージとオートタキシン濃度との関係

慢性肝疾患患者ならびに健常者ATX濃度の分布を示す(図4)。肝生検で判定した肝臓の線維化ステージ上昇に伴い、ATXは濃度上昇を示した。また、肝生検による線維化ステージとATX濃度のROC解析から、ROC曲線下面積(AUC)を求めて有用性を評価

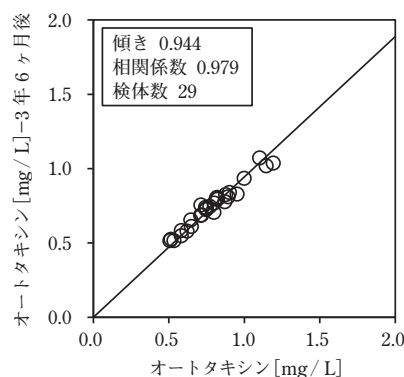


図3 検体凍結保存長期安定性

表4 肝生検による判定と各線維化マーカーによる判定との一致率

線維化マーカー	性別	線維化進展例		肝硬変	
		カットオフ値	一致率(95%信頼区間)	カットオフ値	一致率(95%信頼区間)
オートタキシン	男性	0.910[mg/L]	84.5% (78.6%-90.5%)	1.69[mg/L]	85.9% (80.2%-91.6%)
	女性	1.27[mg/L]	86.6% (80.8%-92.3%)	2.12[mg/L]	79.1% (72.2%-86.0%)
	全体	—	85.5% (81.4%-89.7%)	—	82.6% (78.1%-87.1%)
ヒアルロン酸	全体	50[ng/mL] ^{※1}	72.1% (66.8%-77.4%)	130[ng/mL] ^{※1}	70.3% (64.9%-75.7%)
IV型コラーゲン・7S	全体	6.0[ng/mL] ^{※2}	60.4% (54.6%-66.2%)	—	—

※1 添付文書のカットオフ値

※2 検査会社で採用のカットオフ値

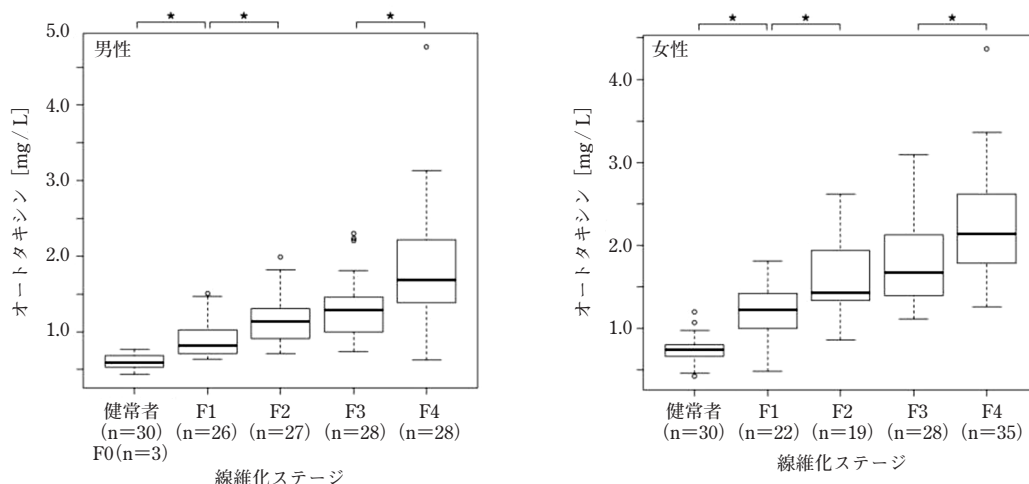


図4 肝臓の線維化ステージとオートタキシン濃度との関係

表5 線維化ステージとAUC値の推移

判定	AUC (95%信頼区間)	
	男性	女性
F1以上	0.975 (0.956-0.995)	0.980 (0.959-1.000)
F2以上	0.922 (0.876-0.967)	0.943 (0.907-0.989)
F3以上	0.870 (0.812-0.927)	0.883 (0.827-0.939)
F4	0.870 (0.793-0.948)	0.860 (0.798-0.823)

した(表5)。ATXは、軽度線維化進展例で判定能が高い傾向が見られた。

5. まとめ

今回開発したATX測定試薬の仕様は表6の通りである。測定試薬の基本性能は、測定内、測定間再現性は5%以内と良好であり、検体の希釈直線性も良好であった。また、検体中の共存物質の影響がないことが確認された。

临床上の有用性については、線維化ステージの上昇に伴い、ATXは濃度上昇を示し、臨床的意義の大きい線維化進展例ならびに肝硬変の判定に有用な結果

を示した。特に軽度線維化進展例ほど判定能が高い傾向を示した。また、最近直接作用型抗ウイルス薬により、ウイルス排除が可能となったC型肝炎において、ウイルス陰性化後の肝線維化改善の程度を知るためにも、ATX測定は有用と考えられる。

ATXは血清中で非常に安定な酵素であり¹³⁾、低温保存や、特殊な採血方法などを必要としないことから、ATX測定値は信頼性が高いと考えられる。

以上より、血清ATX測定は、肝線維化進展の診断補助に高い有用性を示すことが期待される。今後、さらに多施設、多検体での評価、肝線維化治療のモニターとしての評価を進める予定である。

6. 謝辞

本開発において、臨床評価、基礎評価ならびに多くの助言頂いた東京大学大学院医学系研究科臨床病態検査医学・矢富裕教授、池田均准教授、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学・青木淳賢教授に厚く御礼申し上げます。

表6 Eテスト「TOSOH」II(オートタキシン)の試薬構成及び仕様

試薬構成			検体種	検体量 [μ L]	測定範囲 [mg/L]	有効期間 [月]
免疫反応試薬	標準品セット (6濃度)	検体希釈液				
凍結乾燥	凍結乾燥	液状	血清	10	0.1~10	12
基質セット (基質/基質溶解液)	分注水	洗浄水				
凍結乾燥/液状	液状	液状				

7. 文 献

- 1) 江藤奈緒、他、日本老年医学会雑誌、39 (2)、176-180 (2002)
- 2) Stracke, M. L., et al., Journal of Biological Chemistry, 267 (4), 2524-2529 (1992)
- 3) Tokumura, A, et al., J Biol Chem, 277, 39436-39442 (2002)
- 4) Umezu - Goto M, et al., J Cell Biol, 158, 227 - 233 (2002)
- 5) Watanabe N, et al., J Clin Gastroenterol, 41, 616 - 623 (2007)
- 6) Nakagawa, H., et al., Clinica chimica acta, 412 (13), 1201-1206 (2011)
- 7) Masuda, A., et al., British journal of haematology, 143 (1), 60-70 (2008)
- 8) Masuda, A., et al., Clinica Chimica Acta, 412 (21), 1944-1950 (2011)
- 9) Jansen, S., et al., Cancer letters, 284 (2), 216-221 (2009)
- 10) Watanabe N, et al., Life Sci, 81, 1009-1015 (2007)
- 11) 五十嵐浩二、井出和史、三苫惠民、東ソー研究・技術報告、51 (88)、37-46 (2007)
- 12) Nakamura K., et al., Clinica chimica acta, 388 (1), 51-58 (2008)
- 13) 五十嵐浩二、三苫惠民、井上益男、東ソー研究・技術報告、53 (90)、3-10 (2009)

