



●新規卵巣がんマーカー E テスト 「TOSOH」[®] II (TFPI2)

バイオサイエンス事業部	第一開発部	技術グループ	明庭 昇平
バイオサイエンス事業部	第一開発部	探索グループ	大竹 則久
			千々岩信勝
			新谷 晃司

1. はじめに

本邦における年間の卵巣がん患者は、罹患数が約13,000人、死亡数が約5,000人と推定され、婦人科悪性腫瘍で最も死亡数が多い疾患である。卵巣がんは、病理学的な特徴に基づき主に4種類の組織型(漿液性、粘液性、類内膜、明細胞)に分類される。中でも明細胞癌は、本邦において発生頻度が高く(欧米:約8%、日本:約24%)、他の組織型と比べて抗がん剤が効きにくい予後不良例が多いとされている¹⁾。また、明細胞癌は良性疾患である子宮内膜症を母地として高頻度に発生することが知られている²⁾。

卵巣がんは自覚症状に乏しいため、発見時には進行している場合も少なくない。一般的な卵巣がん診断の流れとしては、超音波画像診断で骨盤内腫瘍が認められた患者について、血液検査やMRIなどを実施して良性か悪性かが推定される。組織型によって性質が異なるため治療方針の策定にあたって腫瘍の病理学的分類は非常に重要であるが、卵巣は体深部に存在し生検が困難であるため、手術前に組織型の鑑別はできないのが現状である。

卵巣がんの血液検査では、CA125を主として複数の項目を適宜組み合わせることが推奨されている³⁾。CA125は卵巣悪性腫瘍全般における陽性率は高いものの、子宮内膜症や腹膜炎などでの偽陽性⁴⁾により過剰治療を生じるケースがあり問題となっている。一方で明細胞癌など一部の組織型では感度が低く、それに伴う癌の発見や治療介入の遅れ、再発率の上昇が臨床上の課題となっている。

TFPI2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) は、胎盤中に豊富に存在する分泌型セリンプロテアーゼインヒビターとして報告された分子量約29kDaの糖タンパク質である⁵⁾。詳しい分子生物学的機能は不明だが、ヘパリン結合性を有し妊娠周期に伴い血中濃度が上昇することから、周産期における血液凝固系への関与が推察されている^{6,7)}。卵巣がん細胞株培養上清のプロ

テオーム解析によりTFPI2が新たな卵巣がんマーカー候補として見出され⁸⁾、婦人科腫瘍患者の血清TFPI2濃度を測定したところ、卵巣がん、とりわけ明細胞癌の患者で高い値を示すことが確認された^{9,10)}。また、卵巣がん組織検体を用いた免疫組織学的解析においても、TFPI2は明細胞癌症例において特徴的に発現上昇することが明らかとなっている¹¹⁾。

今回、我々は自動免疫測定装置(AIA[®]シリーズ)を用いて簡便かつ迅速にTFPI2を測定可能な試薬を開発し、基本性能および卵巣がん診断における臨床的有用性を検証したので、報告する。なお、本技術は全世界で増加傾向にあるがんという疾患に対し、適切な診断や治療を提供するための一助として医療に貢献することを目指すものである。

2. 測定原理と材料

2016年に開発したTFPI2測定系は、2種類の抗TFPI2抗体(TF01-04, TF11-03)を用いたサンドイッチEIA法である。磁性ビーズに固定化したラット抗TFPI2抗体(TF11-03)とアルカリ性ホスファターゼ標識されたマウス抗TFPI2抗体(TF01-04)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て免疫反応が開始される。37°C、10分間の反応後、未反応の酵素標識抗体と検体成分を洗浄除去する(B/F分離)。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て単位時間あたりの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TFPI2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TFPI2を含む標準品を用いて、その蛍光強度とTFPI2濃度による標準曲線を作成しTFPI2濃度未知の患者検体の蛍光強度に相当するTFPI2濃度を標準曲線より算出することによりTFPI2の定量が可能となる。測定の

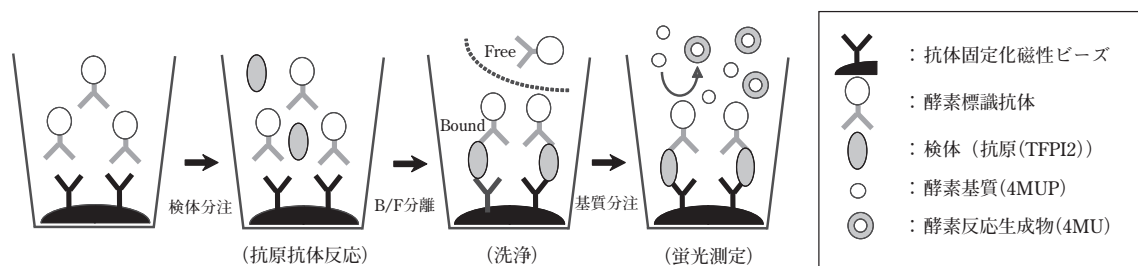


図1 TFPI2測定原理図

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-600 II、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。

3. 基本性能評価

[1] 測定下限

妊娠していない健常者検体241例（男性102例、女性139例）を測定したところ、ノンパラメトリック法による95%信頼区間は62.1～211.4 pg/mL、最小値が42.6 pg/mLだったため、臨床的に必要とされる濃度範囲の下限は10 pg/mLで十分であると考えられた。

TFPI2標準品の測定値から検量線を作成し、標準品(1)の蛍光単位(FU)の[平均値+2×SD(5回測定の標準偏差)]に対応する濃度として低濃度検出限界(minimum detectable concentration; MDC)を算出した。以上の操作を、4ロットのTFPI2測定試薬を用いて実施した結果、いずれのロットを用いた場合もMDCは2.7 pg/mL以下となり、10 pg/mLを測定することが十分可能であることが確認された(表1)。

[2] 再現性試験

測定内再現性および測定間再現性試験をTFPI2濃度の異なる3種の血清検体を用いて行った(表2)。使用した3検体(Low、Middle、High)は1回の測定分を小分け分注し、使用時まで凍結保存した。5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、2.2～2.7%

表1 測定下限に関する試験

免疫反応試薬	Lot-A	Lot-B	Lot-C	Lot-D
標準品セット	Lot-a	Lot-b	Lot-c	Lot-d
Mean [nM/S]	0.018	0.030	0.045	0.038
SD [nM/S]	0.003	0.007	0.010	0.007
MDC [pg/mL]	0.6	1.5	2.7	1.7

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=5)	血清	血清	血清
	Low	Middle	High
Mean [pg/mL]	300	1890	2670
SD [pg/mL]	6.57	50.1	167
CV [%]	2.2	2.7	2.2

測定間再現性試験 (n=20、93日間)	血清	血清	血清
	Low	Middle	High
Mean [pg/mL]	319	1998	7527
SD [pg/mL]	7.58	61.0	203
CV [%]	2.4	3.1	2.7

の範囲内であった。各検体を93日間の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、2.4～3.1%の範囲内であった。

[3] 希釈直線性試験

TFPI2濃度の異なる3種の血清検体を用い、希釈直線性試験を行った。各々の検体を専用希釈液で5段階の希釈系列を作製し4重測定した結果、良好な希釈直線性を有することが示された(図2)。

[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(表3)。共存物質としてヘモグロビン、遊離型ビリルビン、抱合

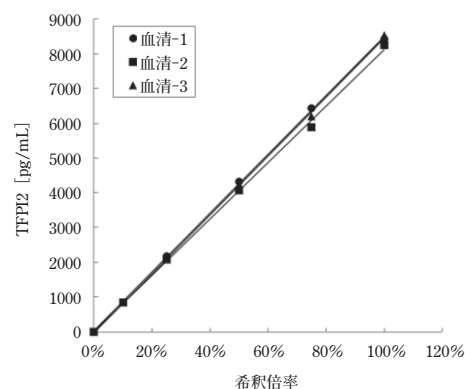


図2 希釈直線性試験

型ビリルビン、脂質、ヒト血清アルブミン、アスコルビン酸、卵巣がんの治療に使用される薬剤の主成分、TFPI2と類似の構造を有するタンパク質を各々表3に記載の濃度まで添加して測定した結果、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濃度まで認められないと判断した。

[5] 検体の凍結保存安定性

血清検体 37 例について、凍結前後および-80℃で11ヶ月～2年7ヶ月凍結保存後の測定値を比較した。

相関係数、相関の傾きのいずれも良好な結果であり、検体の凍結と長期間凍結保存によるTFPI2測定値への影響は認められなかった(図3)。

4. 臨床上的有用性確認

[1] 卵巣腫瘍における良性/悪性の判別性能

国内5施設で収集した卵巣腫瘍患者の血清351例

表3 共存物質の影響試験

共存物質	添加濃度	回収率 [%]
ヘモグロビン	454.5 [mg/dL]	99.1~102.3
遊離型ビリルビン	19.8 [mg/dL]	97.6~104.3
抱合型ビリルビン	18.5 [mg/dL]	98.2~105.5
脂質	1666.7 [mg/dL]	97.0~101.4
ヒト血清アルブミン	5.0 [g/dL]	98.6~108.5
アスコルビン酸	20.0 [mg/dL]	96.9~106.6
カルボプラチン	500.0 [μg/mL]	96.7~107.4
シスプラチン	200.0 [μg/mL]	90.3~101.9
クロトリマゾール	1.0 [μg/mL]	93.8~106.7
シクロホスファミド	500.0 [μg/mL]	97.1~107.1
デキサメタゾン	10.0 [μg/mL]	97.8~104.9
ドキシソルピシン	10.0 [μg/mL]	92.6~104.9
テガフル	10.0 [μg/mL]	99.3~106.2
メルファラン	10.0 [μg/mL]	96.1~105.1
メトトレキサート	100.0 [μg/mL]	95.0~108.8
バクリタキセル	1.0 [μg/mL]	97.1~106.3
イリノテカン	10.0 [μg/mL]	95.9~107.7
ヘパリン	100.0 [U/mL]	95.9~102.6
ヒトTFPI	500.0 [ng/mL]	94.8~103.3
ヒトHAI-2A	500.0 [ng/mL]	95.5~101.6

(良性77例、悪性274例)について、TFPI2とCA125の濃度分布および良性/悪性判別の受信者動作特性(receiver operating characteristic: ROC)解析結果を図4に示す。

TFPI2はCA125と同様に、卵巣悪性腫瘍全般で有意に上昇した。良性腫瘍を陰性、悪性腫瘍を陽性としたROC曲線の曲線下面積(areas under the curve: AUC)はTFPI2(0.749)とCA125(0.761)で同等であり、TFPI2はカットオフ191pg/mLにおいて感度(54.4%)ではCA125に劣るものの、非常に優れた特異度(85.7%)を示した。この結果は、良性腫瘍における偽陽性の発生頻度が低い¹²⁾ことに起因するものと考えられる。

一方で、TFPI2とCA125の間には相関がなく、卵巣悪性腫瘍の検出において互いに補完関係にあると考

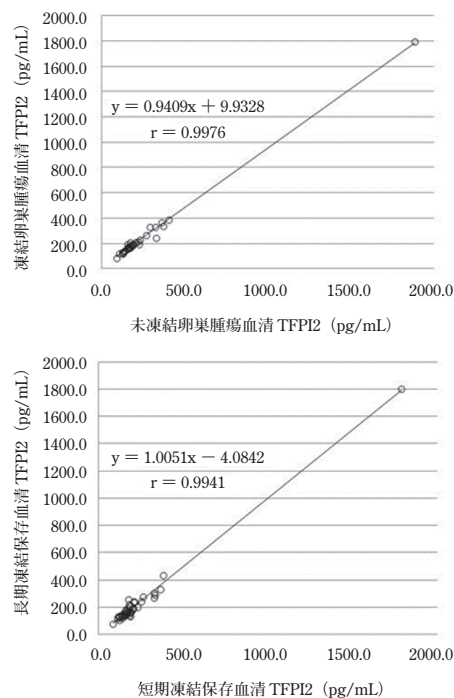


図3 検体の凍結保存安定性

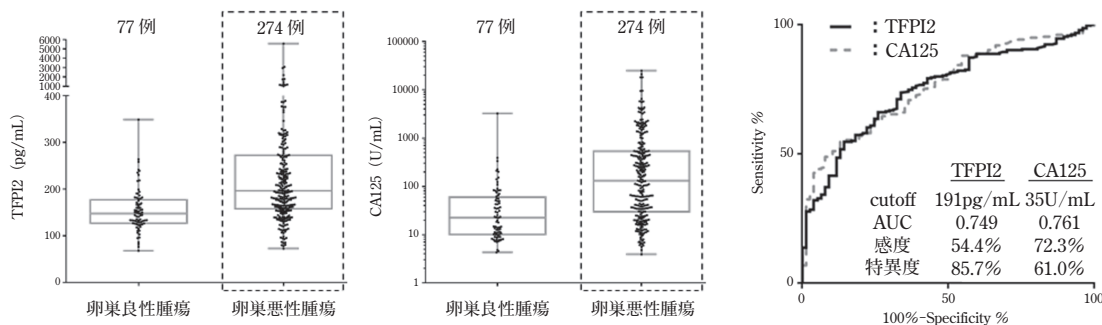


図4 TFPI2およびCA125による卵巣腫瘍の良性/悪性判別性能

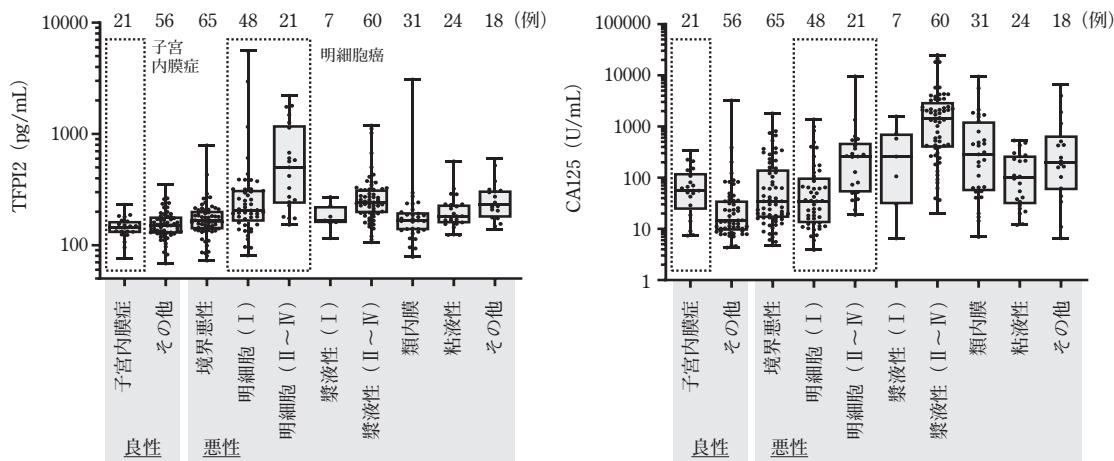


図5 卵巣腫瘍組織型別濃度分布

えられる¹⁰⁾。卵巣悪性腫瘍 274 例の陽性率を TFPI2、CA125、両者の組合せで比較すると (表 4)、CA125 のみでは 73.0%であったのに対し TFPI2 を組み合わせると 82.1% (+9.1%) に向上した。特に CA125 陰性の割合が高まるステージ初期 (I 期) では、TFPI2 との組合せにより陽性率が 56.2%から 70.4% (+14.2%) に向上し、より高い効果を示した。

[2] 卵巣明細胞癌の判別性能

卵巣腫瘍患者 351 例について、TFPI2 と CA125 の組織型別濃度分布を図 5 に示す。

TFPI2 は他の組織型に比べて明細胞癌 (II 期以上) で高値傾向を示した。CA125 は II 期以上の漿液性癌で非常に高く、その他の組織型も高値傾向にあったが、明細胞癌と粘液性癌は比較的 low 値を示し、良性腫瘍で有意に上昇傾向にある子宮内膜症や境界悪性腫瘍と同程度の分布となった。

TFPI2 による明細胞癌判別の ROC 解析 (明細胞癌 69 例 vs 明細胞癌以外の卵巣腫瘍 282 例) の結果、AUC が 0.699、カットオフ 270pg/mL における感度 43.5%、特異度 84.8%となり、先行研究^{9,10)}と比較して感度が低いものの、高い特異性を有することが確認された。感度低下の要因としては、明細胞癌における I 期症例の割合が高かったためと推察されるが、一定期間の適格症例を無作為に収集した本試験結果が実臨

床に近いものと考えられる。

また、明細胞癌の発生母地とされる子宮内膜症との鑑別性能の ROC 解析 (明細胞癌 69 例 vs 子宮内膜症 21 例) の結果、TFPI2 (AUC:0.855) は CA125 (AUC:0.520) と比較して非常に優れた結果を示し (図 6)、CA125 で課題とされている子宮内膜症の適切な診断において有用となり得る可能性が示唆された¹²⁾。

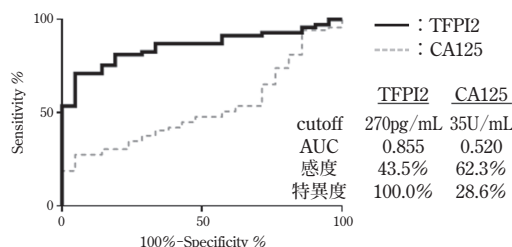
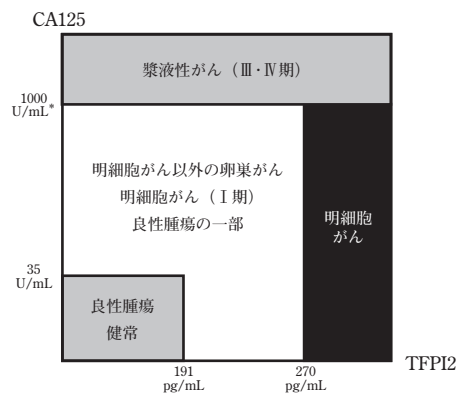


図6 子宮内膜症と明細胞癌の判別性能

表4 臨床病期別の陽性率

項目	卵巣悪性腫瘍の陽性率 [%]		
	CA125	TFPI2	CA125+TFPI2
I 期	56.2	41.4	70.4
II 期	95.2	58.3	95.8
III 期	98.3	74.6	100.0
IV 期	96.6	86.2	100.0
I ~ IV 期	73.0	54.7	82.1



*漿液性がん III~IV 期の判別値としておりますが、本試験結果から仮に設定した値です。

図7 組合せによる卵巣腫瘍分類モデル

5. まとめ

今回開発したTFPI2測定試薬について、基本性能と臨床的有用性を確認した。

試薬性能としては、十分な感度を有しており、再現性や希釈直線性も良好であった。また、検体の凍結保存や共存物質による影響がないことも確認された。

臨床的意義については、TFPI2測定により①卵巣腫瘍における良性/悪性判別(カットオフ191 pg/mL)と②卵巣悪性腫瘍における明細胞癌判別(カットオフ270 pg/mL)が可能であり、診断上有用であると考えられた。さらに、TFPI2とCA125と組み合わせることにより図7のような分類が可能となり、卵巣腫瘍患者の個別化診療の一助になることが期待される。

なお、これらの性能・有用性が認められ、本試薬は2020年6月に体外診断用医薬品として製造販売承認を取得し、TFPI2は新規腫瘍マーカーとして2021年4月に保険収載された。また、これまでプロテオーム解析技術に基づくマーカー探索で臨床応用に至った例はほぼなく、本成果に対して日本プロテオーム学会より研究開発功績賞(2020年度)が授与された。

今後は、未知な部分も多いTFPI2について基礎的な研究を推進し、更なる有用性向上や臨床応用につなげていきたいと考えている。試験参加施設とは現在も継続的に臨床研究を実施しており、病態や治療との経時的な相関や子宮内膜症がん化との関係性などについて評価を進めていく予定である。

6. 謝辞

本開発において、基礎検討から臨床評価、そして保険適用に至るまでの幅広いご協力、ならびに多くのご助言をいただいた横浜市立大学大学院医学系研究科産婦人科学・宮城悦子教授、医療法人平治会ミズクリニクメイワン病院長・小林浩先生に厚く御礼申し上げます。

7. 文献

- 1) T. Sugiyama, *Cancer*, 88 (11), 2584-2589 (2000)
- 2) H. Kobayashi, *International Journal of Gynecological Cancer*, 17 (1), 37-43 (2007)
- 3) 日本産婦人科学会、産婦人科診療ガイドラインー婦人科外来編2020、腫瘍、72-75 (2020)
- 4) 小林浩、日本産婦人科学会誌、40 (4)、467-472 (1988)

- 5) Y. Miyagi, *Journal of biochemistry*, 116 (5), 939-942 (1994)
- 6) K. Udagawa, *Placenta*, 23 (2), 145-153 (2002)
- 7) M. Ogawa, *Placenta*, 28 (2), 224-232 (2007)
- 8) N. Arakawa, *Journal of proteome research*, 12 (10), 4340-4350 (2013)
- 9) N. Arakawa, *PLOS ONE*, 11 (10), e0165609 (2016)
- 10) 大竹則久、東ソー研究・技術報告、62、23-28 (2018)
- 11) Y. Ota, *Oncology Reports*, 45 (3), 1023-1032 (2021)
- 12) E. Miyagi, *International Journal of Clinical Oncology*, 26, 1336-1344 (2021)

