



〈特集：企業セミナー（第33回年次学術集会より）〉

認知症の血液診断への取り組みのご紹介 HISCL™ β -アミロイド 関連試薬を中心に

三浦 雅央

Introduction of blood based biomarkers for dementia with a focus on HISCL™ β -amyloid related reagents

Masahiro Miura

Summary In this progressively aging world, diagnostic and therapeutic techniques for dementia have garnered attention. Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. AD is pathologically characterized by continuous β -amyloid and Tau accumulation in the brain as well as neurodegeneration. A new therapeutic technique called disease-modifying therapies (DMTs) has emerged recently. DMTs target the cause of pathological changes, thereby necessitating the need to establish a diagnostic method to confirm the presence of these pathological changes in the patient's brain. We focused on blood-based diagnostic technologies to establish a simple and minimally invasive diagnostic method. To realize blood-based biomarkers, constructing a highly sensitive and specific measurement method with appropriate sample handling is necessary. Herein, we discuss the efforts made toward establishing plasma β -amyloid assays, which are expected to reflect amyloid pathology in the brain. We also elaborate on p-Tau181 and Tau assays, which can reflect other pathologies underlying dementia.

Key words: Dementia, Alzheimer's Disease, β -amyloid, Blood based biomarker

I. 背景

本邦をはじめとした世界的な高齢化の進展に伴い、認知症に関する診断・治療技術への注目が高まっている。2025年には本邦の60歳以上の高齢者の5人に1人が認知症となり、今後も認知症の患者数は増大していくと予想されている。認知症は、患者本人の医療費だけでなく、その介護にあたる家族等の負担も大きく、2060年には本邦だけで24兆円もの社会的コストが生じる

可能性があると考えられ、その対策が急務となっている¹⁾。

認知症とは、認知機能が低下して社会生活に支障をきたした状態を意味する。認知機能が低下することで、興奮・攻撃性・脱抑制といった行動症状や、不安・うつ・幻覚・妄想などの心理症状を呈するようになるとされている²⁾。認知症には、その原因となる複数の疾患が存在しており、中でも最も多いのがアルツハイマー型認知症(AD)である。

シスメックス株式会社 中央研究所 応用診断研究グループ 主任研究員
〒651-2271 神戸市西区高塚台4-4-4
E-mail: Miura.Masahiro@sysmex.co.jp

Senior Researcher, Applied Diagnostic Research Group,
Central Research Laboratories, Sysmex Corporation
4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, 651-2271, Japan

ADは、脳の神経細胞が変性・脱落し、脳が委縮することで認知機能が低下した認知症であるとされている。AD患者の脳では、認知機能障害などの症状を呈する20年以上も前から、脳内にアミロイド β と呼ばれるペプチド分子が凝集・沈着していることが知られている（アミロイド病理）。その後、タウ蛋白質の異常リン酸化と凝集・沈着が引き起こされ（タウ病理）、これらの病理変化によってやがて神経細胞の障害が誘発される（神経変性）とされている³⁾。

近年、このような原因病理に対して直接作用する疾患修飾薬と呼ばれるタイプの治療薬の開発が加速化している。2021年にはアデカヌマブが米国食品医薬品局から条件付きで迅速承認を受けており、2023年7月にはレカネマブが正式承認されている。2023年8月には本邦においても厚生労働省の専門部会においてレカネマブの承認が了承されており、疾患修飾薬を用いた認知症治療が現実のものになりつつある。

これらの疾患修飾薬の標的となっているのはアミロイド病理である。これらの治療薬は脳内に沈着したアミロイド β に対して作用し、脳内の凝集物を分解・除去する効果があるとされている。したがって、疾患修飾薬の適切な使用には、作用対象となる原因病理の存在を確認することが重要となる。

現在用いられている脳内アミロイド病理の有無を確認する方法は、陽電子放射断層撮影（Positron Emission Tomography: PET）検査と、脳脊髄液（Cerebrospinal Fluid: CSF）検査の2種である。しかしながら、これらの検査は設備や検体採取上の制約^{4,5)}により、手軽に実施することができないのが実情である。そこで注目を集めているのが、血液を用いた検査技術である。血液検査によって簡便に原因病理の有無を推定することができれば、より疑わしい患者のみを対象としてPETやCSF検査を行うなど、認知症診療フローの効率化に寄与できると期待される。

II. アミロイド病理に対する取り組み

弊社では、このような血液検査による認知症の診断技術の確立を目指し、脳内原因病理を反映すると考えられる様々なバイオマーカー測定技術の開発に取り組んでいる。中でも最も開発

が進んでいるのが、アミロイド病理に対する血液検査技術である。

本検査技術は、血液中に微量に存在する2種類のアミロイド β （ β -アミロイド1-40および β -アミロイド1-42）を測定し、その比を求めることによって、アミロイド病理の進行に伴って生じる β -アミロイド1-42の減少を検出することを原理としている。

血液中のアミロイド β は、その存在量が非常に少なく、脳脊髄液と比較して50分の1程度の濃度でしか存在していないとされており、高感度な検出技術が必要となる。また、血液中には検出対象である β -アミロイド1-40や β -アミロイド1-42以外にも様々なアミロイド分子が存在していることから、これらを正確に見分ける高い検出特異性が求められる。さらに、アミロイド β は凝集・沈着しやすい性質であることより、不適切な検体の取扱いによる検査精度への影響を回避するための厳密な検体取扱い条件を決定する必要がある^{6,7)}。

III. 高感度検出技術の開発

弊社では、高い検出感度を達成するために、化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescence Enzyme Immunoassay: CLEIA）によるアミロイド β の測定技術の開発に取り組んできた。本技術は全自動免疫測定装置であるHISCL™シリーズ*を測定プラットフォームとして採用しており、全17分の反応工程中に2度の洗浄工程を挟むことでバックグラウンドノイズを低減させるとともに、高感度発光基質を用いることで高いシグナルを得ることが可能である（Fig. 1）。このような取り組みにより、血漿中に存在する β -アミロイド1-40、 β -アミロイド1-42いずれも定量可能な高感度プロトタイプ試薬の開発に成功している（Fig. 2）。

※ 全自動免疫測定装置HISCL-5000（製造販売承認番号：28B1X10014000011、製造販売業者：シスメックス株式会社）および全自動免疫測定装置HISCL-800（製造販売承認番号：28B1X10014000012、製造販売業者：シスメックス株式会社）の総称

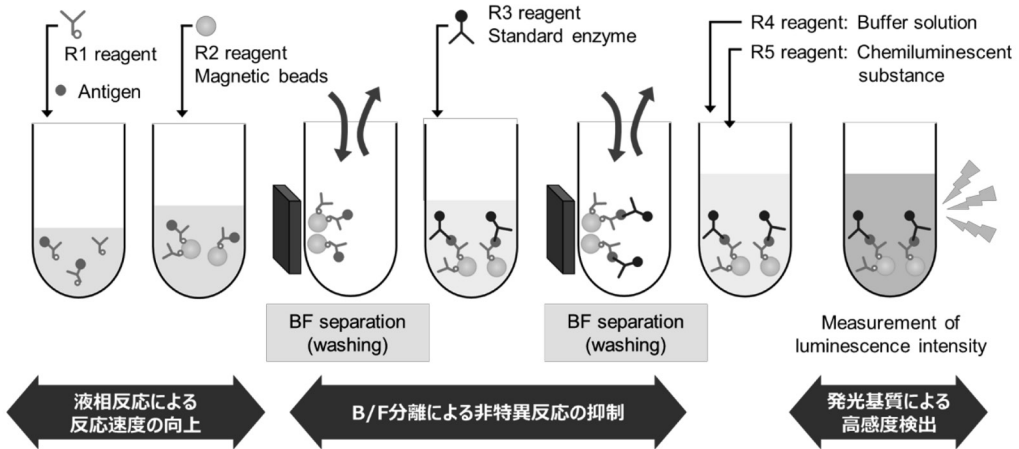


Fig. 1 HISCLの反応原理

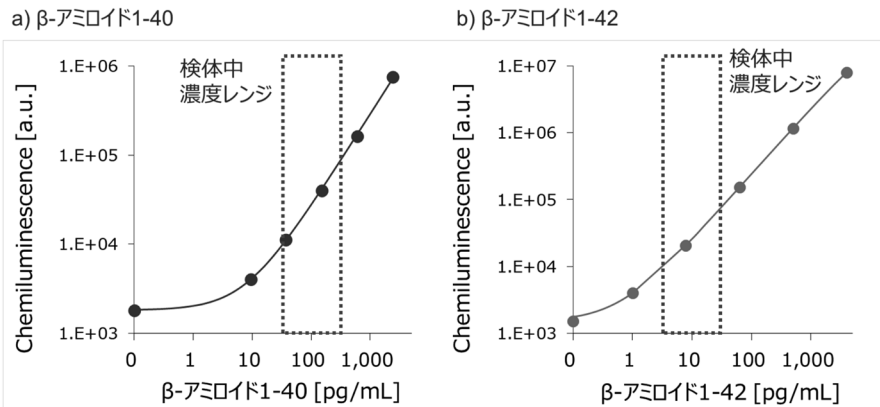


Fig. 2 β -アミロイド1-40, 1-42測定試薬の検量線

IV. 高い特異性を有する抗体組み合わせの選定

脳内アミロイド病理の予測に有用とされているのは、 β -アミロイド1-42と1-40の比 ($A\beta_{42/40}$ ratio) である。しかしながら、血液中には1-38や2-40などと呼ばれる、多数のアミロイド β 関連分子が存在しているとされている。そこで弊社では、高い特異性を有する測定手法である質量分析法をリファレンスとして、 β -アミロイド1-40と1-42を選択的に検出可能な抗体の組み合わせを選定した。市販の血漿検体を用いて質量分析法との相関を評価した結果、 β -アミロイド1-40ではPearsonのカイ2乗検定において $r = 0.91$ ($p < 0.001$)、1-42では $r = 0.82$ ($p < 0.001$) の高い相関を確認することができている (Fig. 3)⁸⁾。

血液中に存在するとされる様々な β -アミロイド関連分子種に対する反応性を評価したところ、 β -アミロイド1-40、1-42のいずれもほとんど交差反応性を示さず、高い特異性を有する試薬の開発に成功できたと考えられる (Table 1)。

V. 検体取扱い条件の検討

血液中のアミロイド β は非常に不安定であることが知られている。特に β -アミロイド1-42は疎水性の高いペプチド分子であり、アミロイド β 同士の凝集や分解、また検体保管容器表面への吸着が生じやすいと考えられている。したがって、これら凝集・分解・吸着といった影響を受けない、適切な検体の取扱い条件を決定するこ

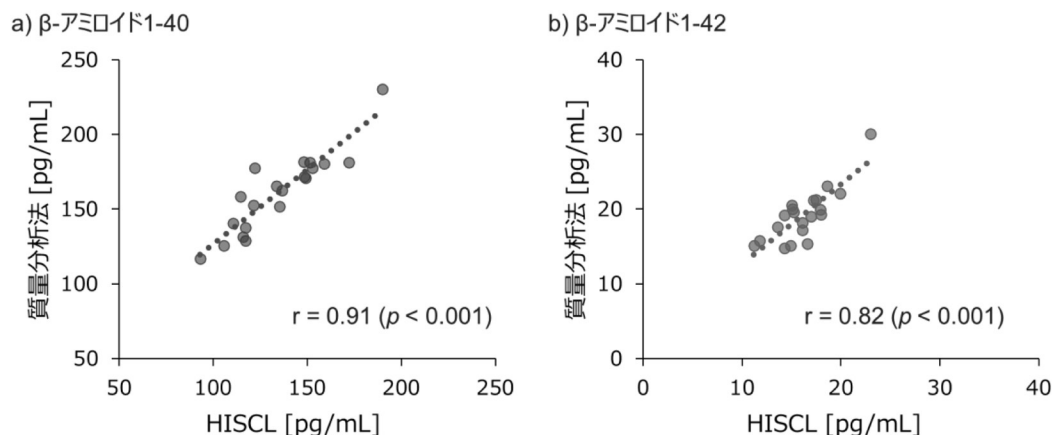


Fig. 3 質量分析法と免疫測定法の相関

Table 1 β -アミロイド関連分子種に対する交差反応性

β -アミロイド分子種 (1000 pg/mL)	交差反応性 (%)	
	β -アミロイド1-40試薬	β -アミロイド1-42試薬
1-40	-	0.1
1-42	-0.1	-
1-38	-0.2	0.1
2-40	0.4	0.0
3-40	0.2	0.0
Pyr3-40	0.1	0.0
Pyr3-42	-0.3	0.0
4-42	-0.2	0.0
11-40	-0.3	0.0
Pyr11-40	-0.1	0.0
17-40	-0.2	-0.1
22-42	-0.4	-0.1

Pyr: ピログルタミル化

とが重要である。

そこで我々は、採血から血漿分離までの全血状態での安定性、血漿状態での安定性、凍結状態での安定性など、種々の取扱い条件がA β 42/40 ratioに与える影響を評価することで、検体取扱いの推奨条件を決定している。検討の結果、全血状態では室温1時間、2~8℃では6時間まで、血漿状態では2~8℃で6時間まで、-20℃の凍結状態では2週間までの保存であれば、A β 42/40 ratioに影響は及ぼさないこと等を確認できている。これらの知見を踏まえ、検体取扱いの推奨条件をFig. 4の通りに定めている。

VI. アミロイド病理の予測性能

開発した β -アミロイド1-40、1-42測定試薬で求めた血漿A β 42/40 ratioの脳内アミロイド病理の予測性能を確認するために、臨床的に早期アルツハイマー病（軽度認知機能障害またはMild AD）と判断された、患者由来の血漿を用いた性能検証を実施している⁹⁾。

本検証ではカットオフ値を設定するための探索的試験 (n = 197) と、カットオフ値の妥当性検証を目的とした検証的試験 (n = 200) の2試験を実施した。探索的試験においては、アミロイドPET検査での読影判定結果を対照法とした

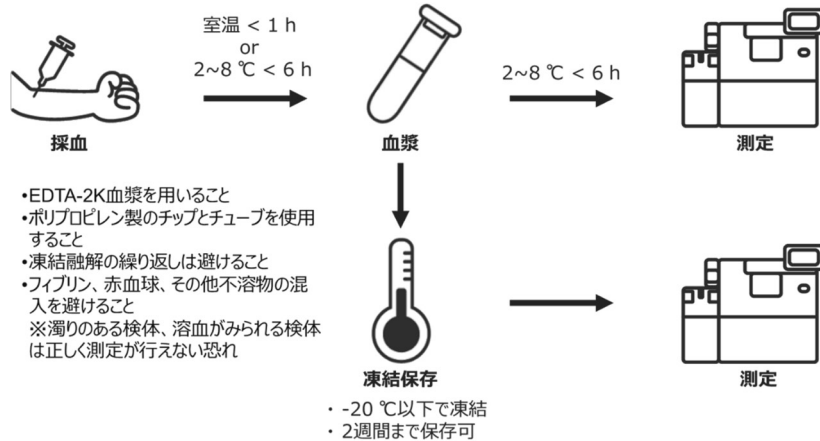


Fig. 4 検体取り扱い推奨手順

場合、Youden indexに基づき定まるカットオフ値は0.102であり、受信者動作特性曲線 (Receiver Operating Characteristic: ROC) 解析における曲線下面積 (Area Under the Curve: AUC) 0.941、感度96.0 % (95 %信頼区間90.1~98.9 %)、特異度83.5 % (74.6~90.3 %)であった (Fig. 5a)。また、探索的試験とは異なる早期アルツハイマー病由来の検体を用いて、同一のカットオフ値を適用して行った検証的試験においては、AUC 0.868、感度88.0 % (80.0~93.6 %)、特異度72.0 % (62.1~80.5 %)であった (Fig. 5b)。さらに、本試験で求めた血漿Aβ42/40 ratioは、アミロイドPETの定量的指標の1つであるセンチロイドと有意に相関 (探索的試験: Spearmanの順位相関係数 $r_s = -0.75, p < 0.001$ 、検証的試験: $-0.73, p < 0.001$) ず

ることが確認できたことから (Fig. 6)、本試薬によって求めた血漿Aβ42/40 ratioにより、脳内アミロイド蓄積状態の把握を補助できる可能性が示された。

現在、本プロトタイプ試薬を元に開発されたHISCL™ β - アミロイド 1-40 試薬 (製造販売承認番号: 30400EZ00105000、製造販売業者: シスメックス株式会社) およびHISCL™ β - アミロイド 1-42 試薬 (製造販売承認番号: 30400EZ00104000、製造販売業者: シスメックス株式会社) が体外診断用医薬品として承認を受けている。

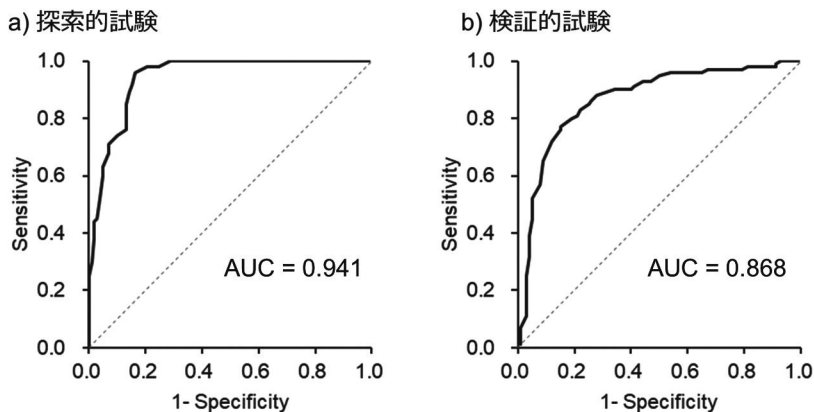


Fig. 5 探索的および検証的試験のROC解析

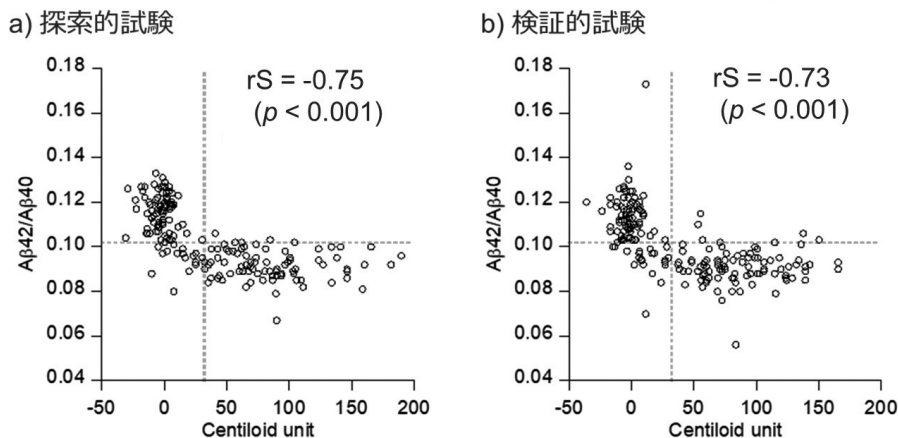


Fig. 6 センチロイドとの相関

Ⅶ. その他病理に対する取り組み

現在開発が進んでいる疾患修飾薬の多くはアミロイド病理を対象としたものである。一方で、将来的には下流のタウ病理や神経変性を対象とした治療薬開発の進展が期待されている。また、各病理の有無に基づく患者層別化の流れも加速しており、アミロイド病理・タウ病理・神経変性の頭文字を取ったATN分類と呼ばれる研究的分類手法も提唱されている¹⁰⁾。

そこで弊社では、これらタウ病理・神経変性に対するバイオマーカーの開発にも取り組んでいる。タウ病理を反映する可能性のあるマーカーとしてp-Tau181を、また神経変性を反映す

る可能性のあるマーカーとしてTauに着目しており、すでに血漿中の各バイオマーカーを測定可能な高感度試薬の開発に成功している (Fig. 7)¹¹⁾。

開発した試薬を用いて、市販のAD、軽度認知機能障害、認知機能正常者の血漿検体を測定したところ、いずれのマーカーも疾患ステージ依存的な濃度変化を示すことを明らかにしている (Fig. 8)。これらの測定試薬は、現在も早期の実用化を目指した開発が進行中である。

Ⅷ. 終わりに

ADに対する治療技術、取り分け疾患修飾薬の

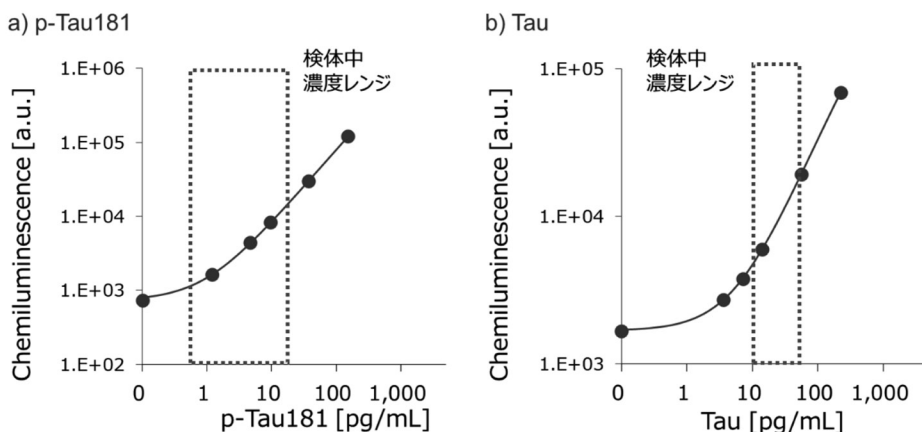


Fig. 7 p-Tau181, Tau測定試薬の検量線

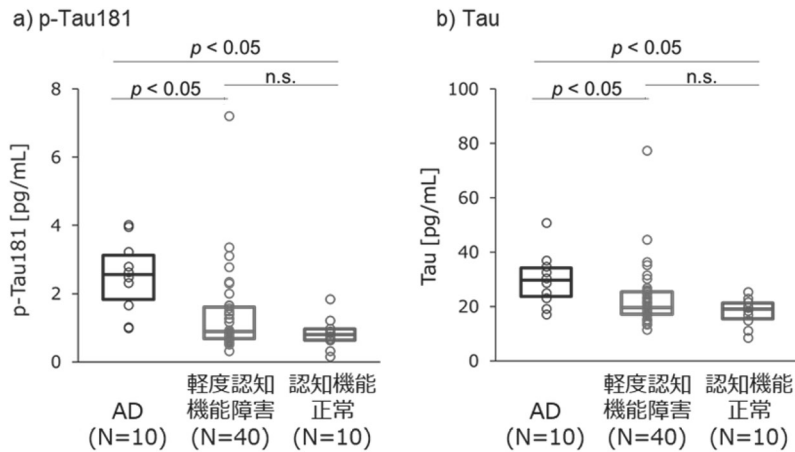


Fig. 8 p-Tau181, Tauの疾患ステージ依存性

開発が急速に進む中で、患者の背景病理に基づく正確な診断に対するニーズはますます高まってくるものと考えられる。

弊社では、簡便で負荷の小さな血液検査によって、この診断ニーズに応えるための検査技術の開発に取り組んでいる。今後は、開発済みのβ-アミロイド試薬に続き、p-Tau181やTauなどのバイオマーカーパネルの構築を進め、適切な認知症診断・治療の普及に貢献していきたい。

利益相反は以下のとおり：三浦雅央（シスメックス株式会社の従業員）

文献

- 1) 佐渡充洋: わが国における認知症の経済的影響に関する研究, 厚生労働科学研究費補助金 (認知症対策総合研究事業)、2015.
- 2) 日本神経学会: 認知症疾患診療ガイドライン, 2017.
- 3) Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ: Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 9: 119-128, 2010.
- 4) Costerus JM, Brouwer MC, Beek DVD: Technological advances and changing indications for lumbar puncture in neurological disorders. *Lancet Neurol*, 17(3): 268-278, 2018.
- 5) Hoff EI, Roks CMAA, Mendonca AD, Papma DM, Izagirre A, Tàga M, Struyfs H, Alcolea DA, Froelich L, Balasa M, Minthon L, Twisk JWR, Persson S, Zetterberg H, Flier WMVD, Teunissen CE, Scheltens P, Blennow K: Performance and complications of lumbar puncture in memory clinics: Results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. *Alzheimers Dement*, 12(2): 154-163, 2016.
- 6) Verberk IMW, Misdorp EO, Koelwijjn J, Ball AJ, Blennow K, Dage JL, Fandos N, Hansson O, Hirtz C, Janelidze S, Kang S, Kirmess K, Kindermans J, Lee R, Meyer MR, Shan D, Shaw LM, Waligorska T, West T, Zetterberg H, Edelmayer RM, Teunissen CE: Characterization of pre-analytical sample handling effects on a panel of Alzheimer's disease-related blood-based biomarkers: Results from the Standardization of Alzheimer's Blood Biomarkers (SABB) working group. *Alzheimers Dement*, 18(8): 1484-1497, 2022.
- 7) Rózga M, Bittner T, Batrla R, Karl J: Preanalytical sample handling recommendations for Alzheimer's disease plasma biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)*, 2;11: 291-300, 2019.
- 8) Yamashita K, Watanabe S, Ishiki K, Miura M, Irino Y, Kubo T, Matsui J, Hagino K, Iwanaga S, Yoshida T: Fully automated chemiluminescence enzyme immunoassays showing high correlation with immunoprecipitation mass spectrometry assays for β-amyloid (1-40) and (1-42) in plasma samples. *Biochem Biophys Res Commun*, 576: 22-26, 2021.
- 9) Yamashita K, Miura M, Watanabe S, Ishiki K, Arimatsu Y, Kawahira J, Kubo T, Sasaki K, Arai T, Hagino K, Irino Y, Nagai K, Verbel D, Koyama A, Dhadda S, Niuro H, Iwanaga S, Sato T, Yoshida T, Iwata A: Fully automated and highly specific plasma β-amyloid immunoassays predict β-amyloid status defined by amyloid positron emission tomography with high accuracy. *Alzheimers Res Ther*, 14: 86, 2022.

- 10) Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo JL, Montine T, Phelps C, Rankin KP, Rowe CC, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM, Sperling R: NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*, 14: 535–562, 2018.
- 11) 渡部 俊介、石木 健吾、山下 和人、三浦 雅央、入野 康宏、岩永 茂樹、吉田 智一: アルツハイマー型認知症の病態分類を目指した血漿バイオマーカー全自動免疫測定法開発、第40回日本認知症学会学術集会、2021.