

<共催セミナー（第35回年次学術集会より）>



生化学汎用自動分析装置に適用した「ATX オートワコ」の紹介

鈴木 智明

Introduction of ATX Auto Wako applicable to general clinical chemistry analyzers

Tomoaki Suzuki

Summary The Nara Declaration 2023, announced by the Japanese Society of Hepatology on June 15, 2023, aims to enable early detection and treatment of liver disease through more detailed examinations in the gastroenterology department. Chronic liver disease leads to hepatocellular injury that triggers a pro-inflammatory state in several parenchymal and non-parenchymal hepatic cell types, ultimately resulting in liver fibrosis, cirrhosis, portal hypertension and liver failure. It is crucial to identify and halt the worsening of liver fibrosis given its important prognostic implications. However, the role of liver biopsy (LB), the traditional gold standard for assessing liver fibrosis, includes an invasive nature with the possibility of complications, sampling variability, and the subjective interpretation by pathologists; therefore, non-invasive tests are required. FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation has developed a novel diagnostic reagent. ATX Auto Wako is an in vitro diagnostic test (IVD) for the measurement of Autotaxin activity based on an enzymatic method. This method can be applied to general clinical chemistry analyzers. It is highly correlated with the one-step sandwich enzyme immunoassay, and the reagent is designed for good measurement performance. We anticipate that ATX Auto Wako will be useful for non-invasive hepatic fibrosis assessment and will contribute to improving the diagnosis of liver diseases in the future.

Key words: Autotaxin, ATX, ATX Auto Wako

I. はじめに

2023年6月15日に日本肝臓学会が発表した「奈良宣言2023」では、健康診断等でALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) >30以上の受診者を対象にかかりつけ医等を受診し、肥満や糖尿病、脂質異常症、高血圧を合併する場合は、血小板数20万/mm³未満、FIB-4 index 1.3以上の基準に当てはま

る場合は肝線維化を伴う脂肪肝疑いとして消化器内科へのコンサルテーションを推奨することが提言された。¹⁾ この提言では近年増加する生活習慣病を由来とした肝疾患を含め慢性肝疾患の高リスク患者を消化器内科へ適切に紹介し、肝疾患の早期発見・早期治療を行うことを目的としている。そこで本稿では、肝臓の基礎的な機能についての理解を深め、肝線維化に関連する検査方法および診断

富士フイルム和光純薬株式会社 臨床検査薬事業部
臨床検査薬学術開発本部 西日本学術部
〒540-8605 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

連絡先：富士フイルム和光純薬株式会社 カスタマーサポートセンター
Tel : +81-03-3270-9134

West Area Technical Service Department
Diagnostics Technical Service & Development Operations
Diagnostics Division
FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan

マーカーについて考察する。特に近年、低侵襲的な評価方法の重要性は高まっており、肝線維化を評価する新たな手法やマーカーの開発が求められている。以下の各章において、肝臓の生理機能と肝線維化に関する最新の研究成果や検査方法について解説するとともに、富士フイルムと光純薬株式会社が発売した「ATX オートワコー」の基礎性能について紹介する。

II. 肝臓と線維化

1. 肝臓の機能

肝臓は人体における最大の内部臓器であり、非常に多面的な機能を持つ。横隔膜の下、腹部の右上に位置し、半月上の形を持つこの臓器は、成人において通常1.2~1.5 kgの重さを有し、体重の約2~3%を占めている。この大きさは、肝臓が果たす様々な生理的機能を支えるために必要であり、右葉と左葉の二つの大きな葉によって構成される特異な構造には代謝、解毒、胆汁生成、免疫機能など様々な機能が含まれている。

2. 肝疾患の検査

肝臓は他の臓器と異なり感覚神経が通っていないことから、「沈黙の臓器」と呼ばれている。特に患者自身で痛みや違和感などの自覚症状に乏しいことから、重篤な症状が見られた際にはすでに病態が悪化しているケースが多い。そのため肝の健康状態を把握し、肝疾患の存在や進行度を判断するためにも肝疾患の検査は非常に重要であり、一般的に以下の3つの検査を総合して治療方針を計画する。

1) 肝疾患の存在を確認するスクリーニング検査

AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ) やALTなどの肝酵素項目から肝疾患の存在を推察

する。異常値が検出された場合は、肝疾患の疑いとして原因特定や肝生検などのより詳細な検査が必要となる。

2) 肝障害の原因を特定する検査

B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスなどのウイルスマーカー、自己免疫性肝炎の抗体、アルコール性肝疾患に関連する因子などの測定により肝障害の根本的な要因を特定する。特にウイルスマーカーが陽性となった場合は、抗ウイルス薬の投与などを検討し、治療を行う。

3) 疾患の進行度や重症度を評価する検査

肝生検や画像診断（超音波、CT、MRIなど）を通じて、肝疾患の状態や線維化の程度を確認する。肝疾患の進行状態をモニタリングし、患者に対し、適切な治療方針を選択する。

3. 肝線維化の評価方法

肝線維化の評価において、現在のゴールドスタンダードは肝生検による組織診断である。肝生検は、肝組織内の線維化や炎症の程度を直接観察するための手法であり、高い精度を持つ診断を期待できることが利点としてあげられる。また、組織診断基準においても新犬山分類や新ヨーロッパ分類といった確立された組織診断基準が存在しており²⁾、特に新犬山分類では、門脈域における線維化と持続的な炎症反応に基づき、線維化のステージをF0~F4の5段階、壊死・炎症のグレーディングをA0~A3の4段階に細分化して診断することで、肝疾患の進行状況を正確に把握し、適切な治療戦略を立案することが可能である。（Fig. 1）一方で、肝生検は侵襲性が高いことから、患者にとって心理的及び身体的な負担が大きいといった欠点があげられる。具体的には、針を用いて肝臓の一部を採取する際の痛みや不快感、術後の出血や感染といった重篤な合併症のリスクが懸念されている。また、肝生



Fig. 1 新犬山分類の線維化ステージ

検によって得られる情報は局所的なものであることから、肝全体の病変分布や進行状況を評価することが難しい点もあげられており、これらの欠点は肝疾患の管理における定期的なモニタリングを困難にしている。上記の課題を克服するためにも、低侵襲的かつ繰り返し検査が可能な肝線維化評価方法は強く求められており、現在、新しい肝線維化マーカーや診断技術の開発が世界中で積極的に進められている。

4. 肝線維化診断に利用される診断マーカー

現在、肝線維化診断に利用されている代表的な診断マーカーについて以下に示す。³⁻⁵⁾

1) ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid)

ヒアルロン酸はグリコサミノグリカンに分類される糖鎖構造を持つ高分子化合物であり、細胞外マトリックスの主要な構成成分として広範な組織で機能する。主に結合組織、関節液、眼球硝子体、皮膚などに存在し、組織の弾性、保水、潤滑性の維持に寄与するとともに、細胞間シグナルの伝達や創傷治癒などにおける多様な生理学的役割を担っている。肝線維化進行においては血中濃度の上昇が見られるが、肝星細胞の活性化に伴うヒアルロン酸を含む細胞外マトリックス成分の異常生成と蓄積、ヒアルロン酸受容体消失による処理能力低下が要因とされている。

2) IV型コラーゲン・7S (Type IV Collagen 7S)

IV型コラーゲンは基底膜における主要な構成成分であり、皮膚や腎臓、消化管などに分布する。中央部が三重らせん状の糖鎖領域 (THドメイン) 、C末端が非コラーゲン領域のNC1、N末端がNC2と7Sで構成された高分子タンパク質であり、重合して網目状の構造を形成している。通常血中には微量しか遊離していないタンパク質であるが、新たな基底膜の増殖や形成が起こることによって血中濃度が上昇することが知られており、肝線維化進展においては類洞周辺に新たな基底膜の増殖や形成が起こることから血中濃度が上昇する。近年では特に血中内で安定性の高いN末端の7Sを認識する抗体を用いた測定法が開発されており、病態の進展度を反映する特異的なマーカーとして注目されている。

3) M2BPGi

(Mac-2 Binding Protein Glycosylation isomer)

M2BPGiは、肝線維化に関連する糖タンパク質で

あり、Mac-2にリガンドするMac-2結合タンパクの異性体である。特に、肝臓における線維化や炎症の進行に合わせてその産生が増加し、肝生検との高い相関性を示すデータもあることから、慢性肝疾患や代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (MASLD) を含むさまざまな肝疾患の病態を評価する低侵襲的なバイオマーカーとして注目されている。また、M2BPGiの血中濃度は、肝線維化の進行度を反映するだけでなく、肝臓でのマクロファージや炎症性細胞の活性化、細胞外マトリックス形成との関連も示唆されており、今後の研究が期待される項目でもある。

4) FIB-4 index

FIB-4 indexは、慢性肝疾患における低侵襲的な肝線維化のリスク評価を目的として開発された計算式であり、年齢、AST、ALT、および血小板数といった日常的な臨床検査項目に基づいて算出される指標である。このスコアは、特に慢性肝疾患患者の初期評価やスクリーニングにおいて有用性が認められており、高い値を示す場合には肝線維化の進行や重症化のリスクが示唆される。FIB-4 indexは、計算が容易であることに加え、特別な装置や高度な検査を必要としないことから臨床現場における迅速な評価手法として非常に汎用性が高い。FIB-4 indexが高値を示した場合には、さらなる精密検査 (例: 肝生検、エラストグラフィーや画像診断) が推奨され、肝線維化や疾患重症度の詳細な評価が行われる。

$$\text{FIB-4 index} = (\text{年齢} \times \text{AST (U/L)}) / (\text{血小板数 (10}^9\text{/L}) \times \sqrt{\text{ALT (U/L)}})$$

5) オートタキシン (Autotaxin / ATX)

オートタキシンは、ヒト悪性黒色腫細胞株の培養上清から抽出された細胞運動促進因子であり、脂質メディエーターとしてさまざまな生理活性を持つ。脂肪組織や他の多様な細胞で産生されるが、肝臓では一般に類洞内皮細胞によって代謝されている。機能としては、リゾホスホリパーゼD活性を有する酵素であり、リゾホスファチジルコリン (LPC) からリゾホスファチジン酸 (LPA) を生成する役割を果たす。慢性肝疾患において血中濃度が上昇することが知られており、類洞内皮細胞の基底膜化が進行することでオートタキシンの取り込みが低下し、結果として血中濃度が上昇すると考えられている。このため、オートタキシンは肝線維化の初期段階からその進展を感知できる重要なバイオマーカーとして注目されており、その血中濃度は肝線維

化の進展と強く相關する。池田らが行った研究においては、特に慢性C型肝炎の症例で、オートタキシンはヒアルロン酸やaspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI) を上回る肝線維化診断能力を示しており、さらにM2BPGiと比較した場合、初期 (F2) の肝線維化診断においてオートタキシンが優位であるとの報告もある。

III. ATX オートワコーの基礎性能

1. 使用目的

本試薬は血清または血漿中のオートタキシン活性を測定することを目的としており、肝臓の線維化進展の診断の補助として活用される。

2. 測定原理

本試薬の測定原理は、試料中のオートタキシンのリゾホスホリバーゼD活性に基づいている。具体的には、試薬中のリゾホスファチジルコリンが試料中のオートタキシンによって加水分解されてコリンが生成される。生成されたコリンは、コリンオキシダーゼの作用により酸化され過酸化水素を生成する。さらに、この過酸化水素はペルオキシダーゼの作用により、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン (TOPS) と4-アミノアンチピリンとの間で定量的酸化縮合が行われ、青紫色の色素が生成される。この青紫色色素の生成速度を測定することにより、試料中のオートタキシン活性を算出す

る。(Fig. 2)

3. 試薬性能評価における対象と方法

測定機器については日立自動分析装置7180 (株式会社日立ハイテク) 及び日立自動分析装置3500 (株式会社日立ハイテク) を用いて試薬標準パラメーターに従い性能評価を行った。試薬盲検は試料として生理食塩水を用い、校正は社内標準を一次標準物質として値付けされたATX キャリブレーターを用いて行った。

1) 同時再現性

同時再現性の検討には2濃度のコントロール試料を用いた。各試料を20回連続測定し、平均値、標準偏差 (SD) 及びCVを算出した。

2) 相関性

既承認品であるオートタキシン濃度測定法 (EIA 法/A社) との相関性を評価するため、肝線維化マーカーの M2BPGi で肝線維化が疑われる検体を含む血清298検体を測定し、相関係数および直線回帰式を求めた。

3) 直線性

希釈直線性の検討にはオートタキシン高値試料を用い、高値試料を生理食塩水で10段階に希釈して試料を作製した。得られた結果を基に、希釈段階1/10の実測値を基準として各希釈段階の理論値を算出し、その理論値に対する偏差率が±15%以内であることを直線性の評価基準とした。

4) 共存物質の影響

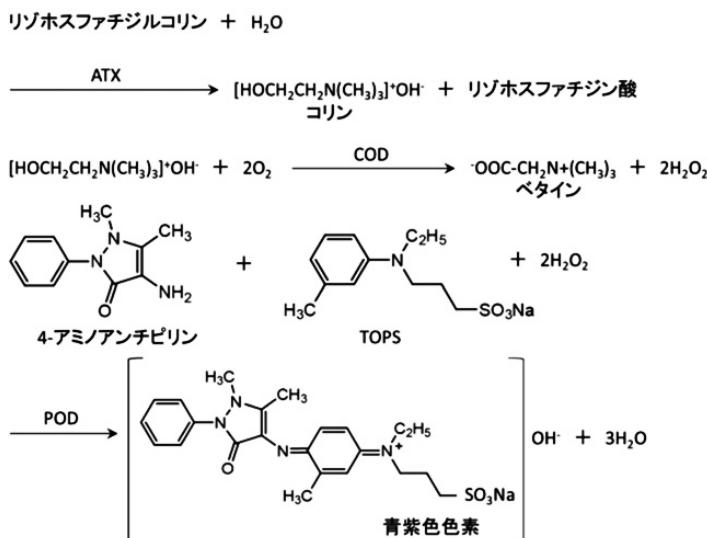


Fig. 2 ATX オートワコー 測定原理

共存物質の影響は添加物質にアスコルビン酸、ヘモグロビン、ビリルビン、ジタウロビリルビン、イントラリポス、塩化コリンを用いて行った。各々6段階の添加系列を作製し、各試料を測定した。評価基準は無添加試料との測定値との差が±15%以内とした。

4. 試薬性能評価の結果

1) 同時再現性

各コントロールの平均値はそれぞれ9.5 U/Lおよび27.7 U/L、SDはそれぞれ0.06 U/Lおよび0.11 U/Lであり、CVはそれぞれ0.6%および0.4%であった。(Table 1)

2) 相関性

オートタキシン濃度測定法(EIA法/A社、単位: mg/L)との相関は相関係数 $r=0.993$ と良好であり、回帰式として $Y=10.7X+0.1$ が得られた。(Fig. 3)

3) 直線性

高値試料を用いた希釈直線性は添付文書における上限50 U/Lまでの範囲において評価基準を満たす直線性が確認された。(Fig. 4)

4) 共存物質の影響

Table 1 ATX オートワコ 同時再現性

試料	コントロール1	コントロール2
1	9.6	27.5
2	9.6	27.8
3	9.6	27.6
4	9.5	27.7
5	9.5	27.8
6	9.6	27.6
7	9.5	27.7
8	9.5	27.7
9	9.5	27.8
10	9.5	27.7
11	9.5	28.0
12	9.5	27.6
13	9.5	27.8
14	9.5	27.6
15	9.4	27.7
16	9.5	27.7
17	9.5	27.6
18	9.6	27.6
19	9.4	27.6
20	9.6	27.8
Mean	9.5	27.7
SD	0.06	0.11
CV	0.006	0.004
MAX	9.6	28.0
MIN	9.4	27.5
R	0.2	0.5
	(U/L)	

アスコルビン酸(50 mg/dL)、ヘモグロビン(500 mg/dL)、ビリルビン(50 mg/dL)、ジタウロビリルビン(40 mg/dL)、イントラリポス(2%)、塩化コリン(0.5 mM)までの添加濃度域について検討を行った結果、アルコルビン酸について10 mg/dL以上の添加で10%以上の測定値の低下が見られた。また、本試薬の反応過程ではコリンを生じるが、検体中のコリンは0.5 mMまで影響しないことが確認された。その他の物質については添加濃度域内での15%以上の測定値の低下は見られなかった。(Fig. 5)

5. カットオフ値

相關試験の結果に基づき、オートタキシン濃度(mg/L)とオートタキシン活性(U/L)との関係式が導出され、「オートタキシン活性(U/L) = オートタキシン濃度(mg/L) × 10.7 + 0.1」と表された。

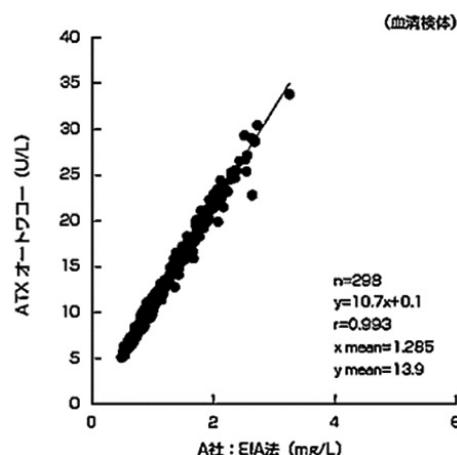


Fig. 3 ATX オートワコ 相関性

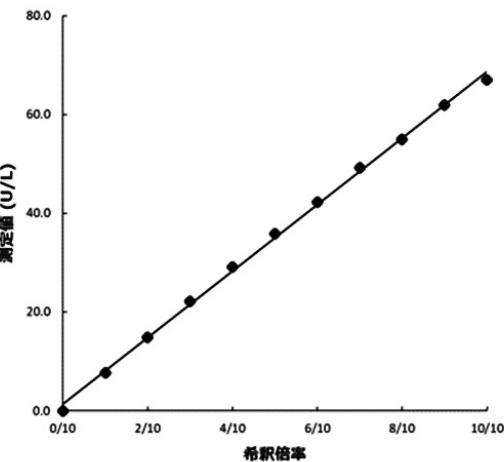


Fig. 4 ATX オートワコ 直線性

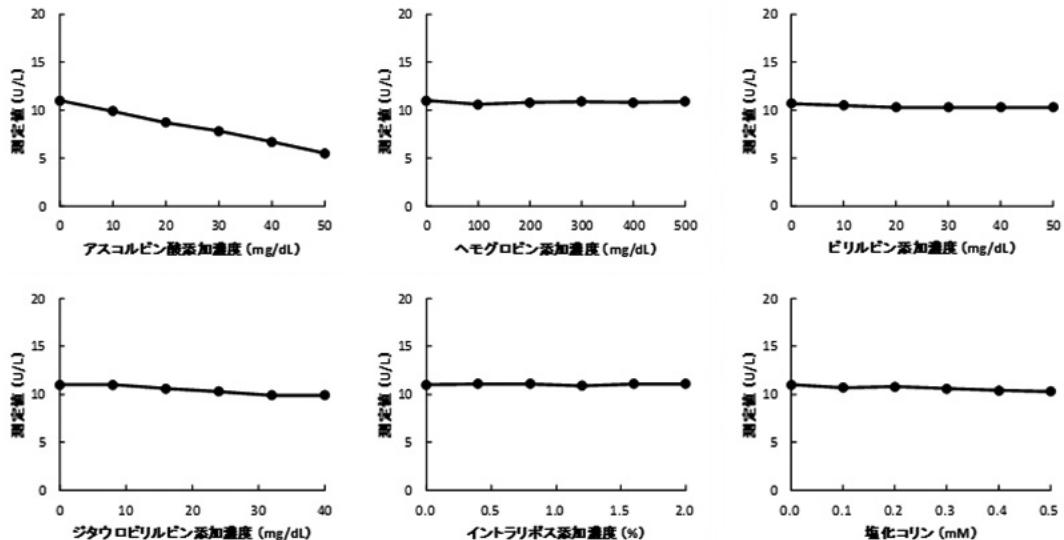


Fig. 5 ATX オートタキ活性測定における共存物質の影響

よってオートタキシン活性測定におけるカットオフ値は以下の通りとなった。

線維化進展例（肝線維化F2以上）

男性: 9.8 U/L、女性: 13.7 U/L

肝硬変

男性: 18.2 U/L、女性: 22.8 U/L

6. 測定上の注意点

ATX オートタキ活性は下記の要因において測定値に影響を受けるため注意する。

- 抗凝固剤であるEDTAおよびシウウ酸塩に対して負の影響を受ける。
- 妊娠では、週数が進むに従い、血中 ATX が高値となることが確認されているため妊娠検体の測定には適していない。
- 悪性リンパ腫患者、進行した悪性腫瘍患者血中ではATX が高値となることが確認されている。
- 心筋症や心機能が低下した患者では高値を示す場合がある。
- 副腎皮質ステロイドを服用している患者では ATX が低値を示す場合がある。

IV. 結語

肝線維化診断においては低侵襲かつ繰り返し測

定可能なマーカーの開発が求められており、富士フィルム和光純薬株式会社では酵素法に基づいてオートタキシン活性を測定する「ATX オートタキ活性」を新たに発売した。この試薬はオートタキシン濃度測定法（EIA法）との良好な相関性を持ち（ $n=298$ 、回帰式 $Y=10.7X+0.1$ 、相関係数 $r=0.993$ ）、多くの病院で使用されている汎用生化学自動分析装置で測定可能である。ASTやALT、 γ -GTなどの肝酵素項目と同時に結果を得ることができることは、迅速な肝線維化の診断補助として活用が期待できるものであり、本試薬の基礎性能に関する知見が、今後の肝疾患診断の向上に寄与することを期待する。

利益相反は以下のとおり：鈴木智明（給与等の支給：富士フィルム和光純薬株式会社）

文献

- 日本肝臓学会 奈良宣言特設サイト：https://www.jsh.or.jp/medical/nara_sengen/iryou.html
- 山田 剛太郎：慢性肝炎の新しい組織分類. 日本消化器病学会雑誌, 96(4): 377-384, 1999.
- 小田桐 直志、河田 則文：肝線維化進展の分子機序、血中肝線維化マーカー. 日本国内科学会雑誌, 111(1): 15-21, 2022.

- 4) 池田 均:新たな肝線維化マーカーとしてのオートタキシンについて. モダンメディア, 65(2): 20-23, 2019.
- 5) 玉木 信治:FIB-4 indexをどう活用すればよいですか?. 検査と技術, 52(6): 607-612, 2024.