

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 村山 寛

学位授与の日付 平成19年2月20日

論文名 「免疫学的測定法を利用した血中診断マーカーの開発とその臨床応用」

論文審査委員 主査 乾 博
副査 宮武 和孝
副査 中野 長久

論文要旨

肝臓は沈黙の臓器と言われるように、障害により自覚症状が認められた時には、重症になっていることが少なくない。そこで可能な限り早期に症状を把握し、迅速に治療を開始するためには、肝臓からの逸脱酵素マーカーを血中検査することが広く行われている。

本研究では肝臓に局在する酵素であるタイプ I アルギナーゼ (ARG) とオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT) に対するモノクローナル抗体を利用した酵素免疫測定 (ELISA) 法を開発し、その肝細胞障害マーカーとしての有用性を検討した。また、1 型糖尿病の発症マーカーであるインスリン自己抗体 (IAA) を測定するラジオイムノアッセイ (RIA) 法の高感度化を検討した。

アルギナーゼは尿素サイクルを構成する酵素で、主に肝臓に存在するタイプ I と腎臓、小腸などに存在するタイプ II が知られている。これまでにポリクローナル抗体を利用した ELISA 法が報告されているが、赤血球由来のアルギナーゼにも交差するため、溶血による影響を除くことができなかった。また、ポリクローナル抗体を用いると一定した性能のものが得られ難いという問題があった。そこで、モノクローナル抗体を用いた高感度な ELISA 法の開発を開始した。

リコンビナント ARG を免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合し、ハイブリドーマを作製した。抗 ARG 抗体産生クローンを酵素標識免疫測定法にてスクリーニングした。モノクローナル抗体の特異性は免疫沈降法にて確認した。溶血度は、赤血球中ヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性を利用して発色基質の吸光度より求めた。

合計 42 クローンのハイブリドーマを得て、その中から ELISA に最適な組み合わせを選択し、ELISA を確立した。確立した測定系はリコンビナント、ネイティブ肝臓由来アルギナーゼ、ネイティブ赤血球由来アルギナーゼに対してほぼ同等の反応性を有していた。再現性、添加回収、希釈直線性などの基本性能は比較的良好であった。

ペルオキシダーゼ基質の発色は、ヘモグロビン濃度に依存して直線的であった。赤血球中のヘモグロビン、アルギナーゼの含量は比較的一定しており、赤血球に由来するアルギナーゼの濃度を計算により求めることが可能であった。

本 ELISA は基本性能も良好であり、高感度に安定した結果を得ることが可能であった。また、溶血の影響も簡便な方法により取り除くことができた。

次に、OCT は尿素サイクルを構成する酵素で、主に肝臓に局在するとされている。これまでに主に酵素活性測定法が用いられてきたが、測定感度が十分ではなく、広く利用されるには至っていなかった。そこで、モノクローナル抗体を用いた高感度な ELISA 法の開発を開始した。リコンビナント OCT を免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合し、ハイブリドーマを作製した。抗 OCT 抗体産生クローンを酵素標識免疫測定法にてスクリーニングした。モノクローナル抗体の特異性はウェスタンブロッティングにて確認した。合計 22 クローンのハイブリドーマを得て、その中から ELISA に最適な組み合わせを選択し、ELISA を確立した。

OCT 蛋白の長期安定性を検討したところ、pH6.7 の条件で安定化することが分かった。ところがこの条件では ELISA のネイティブ OCT に対する反応性が低く、最適な条件を検討したところ、アルカリ (pH9.5) 条件で向上することが確認された。確立した測定系は再現性、添加回収、希釈直線性の基本性能は比較的良好であった。本 ELISA は基本性能も良好であり、高感度に安定した結果を得ることが可能であった。

マーカーとしての評価はヒトでの臨床意義を示すのが最終目的であるが、ヒトの場合、患者毎に様々な疾患バックグラウンドを持っており、結果を同一の条件として解釈できない。そこで、ラットの肝臓障害モデルを用いて ARG、OCT の有用性を他のマーカーと比較して評価を行った。

ウィスター雄ラット 9 週齢にチオアセトアミド (200mg/kg) を腹腔内投与して急性障害モデルを作製し、経時的に採血し、肝障害マーカーとして一般に広く利用されるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) と比較した。慢性障害モデルは 8 週齢ウィスター雄ラットにチオアセトアミド (20mg/kg) を連日経口投与し、16 週間後まで経時的に採血してマーカーの変動を比較した。また、投与中止後の各マーカーの変動についても検討した。

急性障害モデルラットでは各マーカーの上昇ピークは 24 時間後にみられ、ARG は他のマーカーに先がけて 8 時間後に有意な上昇を示し、上昇の程度も他のマーカーより大きかった。OCT は ARG ほどでないが AST、ALT より上昇の程度は大きくなった。慢性障害モデルラットでは、OCT は投与開始 1 週間後にすでにコントロール群と比べて有意に上昇し、その後 16 週間まで継続して上昇がみられた。ARG は 8 週後、AST、ALT は 12 週後に有意な上昇がみられた。投与中止後、ARG は 1 週間後に正常レベルに戻ったが、他のマーカーは 2 週間後まで上昇が続いた。これらの成果から ARG は肝障害を鋭敏に示すリアルタイムなマーカーとして、特に急性障害において有用であると考えられた。OCT は慢性障害のマーカーとして優れていると考えられた。

そこで、ARG は血中へ逸脱し易い性質を有するとされ、血中半減期が 1 時間以内と比較的短いことから、鋭敏な障害マーカーとして実用化が期待されたので、各種肝臓疾患、特

に急性障害時における有用性をヒト臨床検体を用いて検討した。

健常者、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、B型及びC型慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各種慢性肝疾患患者より採取した血清のARG濃度を測定し、他のマーカーと陽性率を比較した。また、経時的に採取した急性肝炎、薬剤性肝障害、肝臓癌の内科的処置、外科手術前後の急性障害時における血清サンプルについて、その変動を検討した。各種慢性肝疾患におけるARGの陽性率は、いずれの疾患においてもAST、ALTより低くなった。一方、急性障害時におけるARGの変動はリアルタイムで、障害が無くなった時点で速やかに陰性化した。ARGの陰性化はAST、ALTより数日から2ヶ月早かった。これらの結果から、ARGは急性障害時における変動は鋭敏で肝障害をリアルタイムに示す経過観察マーカーとして有用であることが示された。

OCTは肝臓特異的な障害マーカーとして期待されてきたが、臨床的有用性の検討は十分ではなかった。ミトコンドリアに局在することから、細胞質由来の酵素とは挙動が異なることが考えられる。OCTとALTとの比が慢性肝炎と比べ肝臓癌において高いとする報告があり、その有用性を中心にヒト臨床検体を用いて詳細に検討した。

健常者、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、B型及びC型慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各種慢性肝疾患患者より採取した血清のOCT濃度を測定し、他のマーカーと比較した。慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各患者については肝臓癌の血中マーカーである α フェトプロテイン(AFP)、PIVKA-IIについて測定し、OCTおよび他のマーカーとの関係を解析した。また、経時的に採取し得た肝臓癌の内科的処置、外科手術前後における血清サンプルについても同様に検討した。

OCTは慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌と肝炎ウイルスによる病状が進行するにしたがって高くなる傾向を示し、逆の傾向を示すALTとの比を見ることにより肝硬変との差が有意となった。OCT/ALTのカットオフ値を3.0としたとき、肝臓癌における陽性率は64.3%(9/14)、肝硬変に対する特異度は90.5%(19/21)となり、AFP、PIVKA-IIの陽性率を上回った。肝臓癌の内科的処置・外科手術前後の変動を検討したところ、AFPと類似した動きを示した。以上の結果から、OCT/ALTはAFP、PIVKA-IIより陽性率が高く、肝臓癌のマーカーとして有用であると考えられた。

従来のIAA-RIAは標識インスリンの非特異的結合が高く測定感度が十分ではなかったため、抗体価の低い1型糖尿病初発患者における自己抗体の検出には用いられてこなかった。そこで、非特異的結合の原因を究明し、抑制することができれば高感度なIAA測定系が確立できると考え、検討を開始した。

非特異的結合の原因物質の分子量をゲルろ過により解析した。非特異的結合を抑える物質をスクリーニングし、測定系に添加した後、IAAの測定感度に寄与するか検討した。

ゲルろ過による検討の結果、標識インスリンを結合するメインのピークは分子量約700kDaにあり、 α 2-マクログロブリンの分子量と一致した。 α 2-マクログロブリンを反応系に添加したところ、非特異的結合の上昇がみられ、原因物質の一つと考えられた。非特異的結合を抑制する物質を検索したところ、プロクリン300などのトリプトファンと類似した複素環構造を持つ物質を反応系に添加することにより抑制効果が得られ、患者におけるIAAの陽性率が向上した。

プロクリン300を反応系に添加するだけで、非特異的結合が効果的に抑制され、IAA-RIAの性能を向上させることができた。

審査結果の要旨

肝臓は沈黙の臓器と言われるように、障害により自覚症状が認められた時には、重症になっていることが少なくない。そこで可能な限り早期に症状を把握し、迅速に治療を開始するには、肝臓からの逸脱酵素マーカーを血中検査することが広く行われている。本研究では肝臓に局在する酵素であるタイプ I アルギナーゼ (ARG) とオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT) に対するモノクローナル抗体を利用した酵素免疫測定 (ELISA) 法を開発し、その肝細胞障害マーカーとしての有用性を検討した。また、1型糖尿病の発症マーカーであるインスリン自己抗体 (IAA) を測定するラジオイムノアッセイ (RIA) 法の高感度化を検討した。その結果、以下の成果を得た。

ARGは主に肝臓に存在するタイプ I と腎臓、小腸などに存在するタイプ II が知られている。ポリクローナル抗体を用いると一定した性能のものが得られ難いという問題があった。そこで、モノクローナル抗体を用いた高感度な ELISA 法を開発した。リコンビナント ARG を免疫したマウスの脾臓細胞とのハイブリドーマから抗 ARG 抗体産生クローンをスクリーニングした。合計 42 クローンのハイブリドーマを得て、最適な組み合わせを選択し、ELISA を確立した。確立した測定系はリコンビナント、ネイティブ肝臓由来 ARG、ネイティブ赤血球由来 ARG に対してほぼ同等の反応性を示した。再現性、添加回収、希釈直線性など基本性能は良好であった。ペルオキシダーゼ基質の発色は、ヘモグロビン濃度に依存して直線的であった。赤血球中のヘモグロビン、ARG の含量は一定しており、赤血球に由来する ARG の濃度を計算により求めることが可能であった。本 ELISA は基本性能も良好で、高感度に安定した結果を得ることが可能であった。また、溶血の影響も簡便な方法により取り除くことができた。

次に、OCT は主に肝臓に局在する。これまでに主に酵素活性測定法が用いられてきたが、測定感度が十分ではなく、広く利用されるには至っていなかった。そこで、モノクローナル抗体を用いた高感度な ELISA 法を開発した。リコンビナント OCT を免疫したマウスの脾臓細胞とのハイブリドーマから抗 OCT 抗体産生クローンをスクリーニングした。合計 22 クローンのハイブリドーマを得て、その中から ELISA に最適な組み合わせを確立した。OCT 蛋白の長期安定性を検討したところ、pH6.7 の条件で安定化することが分かった。ところがこの条件では ELISA のネイティブ OCT に対する反応性が低く、最適な条件を検討したところ、アルカリ (pH9.5) 条件で向上することが確認された。測定系は再現性、添加回収、希釈直線性の基本性能は良好であった。本 ELISA は基本性能も良好であり、高感度に安定した結果を得ることが可能であった。

マーカーとしての評価はヒトでの臨床意義を示すのが最終目的であるが、ヒトの場合、結果を同一の条件として解釈できない。そこで、ラットの肝臓障害モデルを用いて ARG、OCT の有用性を他のマーカーと比較して評価を行った。ウィスター雄ラット 9 週齢にチオアセトアミドを腹腔内投与して急性障害モデルを作製し、経時的に採血し、肝障害マーカー

ーとしてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) と比較した。慢性障害モデルは 8 週齢ウィスター雄ラットにチオアセトアミドを連日経口投与し、16 週間後まで経時的に、また投与中止後も採血してマーカーの変動を比較した。これらの成果から ARG は肝障害を鋭敏に示すリアルタイムなマーカーとして、急性障害において有用であり、OCT は慢性障害のマーカーとして優れていると考えられた。そこで、ARG は血中へ逸脱し易い性質を有し、血中半減期が 1 時間以内と短いことから、鋭敏な障害マーカーとして実用化が期待されたので、各種肝臓疾患、特に急性障害時における有用性をヒト臨床検体を用いて検討した。

健常者、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、B 型及び C 型慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各種慢性肝疾患患者より採取した血清の ARG 濃度を測定し、他のマーカーと陽性率を比較した。また、経時的に採取した急性肝炎、薬剤性肝障害、肝臓癌の内科的処置、外科手術前後の急性障害時における血清サンプルについて、その変動を検討した。各種慢性肝疾患における ARG の陽性率は、いずれの疾患においても AST、ALT より低くなった。一方、急性障害時における ARG の変動はリアルタイムで、障害が無くなった時点で速やかに陰性化した。ARG の陰性化は AST、ALT より数日から 2 ヶ月早かった。これらの結果から、ARG は急性障害時における変動は鋭敏で肝障害をリアルタイムに示す経過観察マーカーとして有用であることが示された。

OCT は肝臓特異的な障害マーカーとして期待されてきたが、臨床的有用性の検討は十分ではなかった。その有用性を中心にヒト臨床検体を用いて詳細に検討した。健常者、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、B 型及び C 型慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各種慢性肝疾患患者より採取した血清の OCT 濃度を測定し、他のマーカーと比較した。慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌の各患者については肝臓癌の血中マーカーである α フェトプロテイン (AFP)、PIVKA-II について測定し、OCT および他のマーカーとの関係を解析した。また、経時的に採取し得た肝臓癌の内科的処置、外科手術前後における血清サンプルについても同様に検討した。OCT は慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌と肝炎ウイルスによる病状が進行するにしたがって高くなる傾向を示し、逆の傾向を示す ALT との比を見ることにより肝臓癌と肝硬変との差が有意となった。OCT/ALT のカットオフ値を 3.0 としたとき、肝臓癌における陽性率は 64.3% (9/14)、肝硬変に対する特異度は 90.5% (19/21) となり、AFP、PIVKA-II の陽性率を上回った。肝臓癌の内科的処置・外科手術前後の変動を検討したところ、AFP と類似した動きを示した。以上の結果から、OCT/ALT は AFP、PIVKA-II より陽性率が高く、肝臓癌のマーカーとして有用であると考えられた。

従来の IAA-RIA は標識インスリンの非特異的結合が高く、抗体価の低い 1 型糖尿病初発患者における自己抗体の検出には用いられなかった。そこで、非特異的結合を抑制することができれば高感度な IAA 測定系が確立できると考えた。非特異的結合を抑える物質をスクリーニングし、測定系に添加した後、IAA の測定感度に寄与するか検討した。ゲルろ過で標識インスリンを結合するメインのピークは分子量約 700kDa にあり、 α 2-マクログロブリンの分子量と一致した。これを反応系に添加したところ、非特異的結合の上昇がみられ、原因物質の一つと考えられた。非特異的結合を抑制する物質を検索したところ、プロクリン 300 などのトリプトファンと類似した複素環構造を持つ物質を反応系に添加することにより抑制効果が得られ、患者における IAA の陽性率が向上した。プロクリン 300 を反応

系に添加するだけで、非特異的結合が効果的に抑制され、IAA-RIA の性能を向上させることができた。

以上の成果は、生化学、分子生物学、医学、酵素化学および栄養分子生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、学力確認の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。