

氏名（本籍）	あお 青	やぎ 柳	かつ 克	み 己
学位の種類	博士（薬学）			
学位記番号	薬第506号			
学位授与年月日	平成18年1月18日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			

学位論文題目

ガストリン放出ペプチド前駆体およびC型肝炎ウイルス抗原の高感度酵素免疫測定法開発に関する研究

論文審査委員	(主査) 教授	大内和雄
	教授	福永浩司
	教授	大泉康

論文内容要旨

近年、血液など生体試料中の物質の量を高感度で検出する方法の1つとして、免疫測定法が汎用されている。免疫測定法は、検体中に存在する対象物質に対して特異的に結合する抗体やレセプター等を用いて、対象物質を単離することなく検出することができる。さらに、全自動免疫測定機器の開発により、その精度や利便性が高まり、臨床検査室で幅広く利用されている。

現在、臨床の間では、血液など生体試料中に ng/mL の濃度以上存在する物質を測定対象物として免疫測定が多く行われている。一方、生体試料中には、一般的な免疫測定法を用いても検出できない極微量の物質が存在しており、このような物質を測定するためには、より高感度な測定法を開発する必要がある。また高感度化することによって、より信頼性の高い診断が可能になったり、その疾病マーカーの臨床的有用性が向上することが期待される。

第1章では、肺小細胞癌の新規腫瘍マーカーであるガストリン放出ペプチド前駆体 (pro-gastrin-releasing peptide: ProGRP) の高感度酵素免疫測定法の開発について述べた。また第2章では、C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染のマーカーであるC型肝炎ウイルスコア抗原 (hepatitis C virus core antigen: HCVcAg) の2種類の簡便な高感度酵素免疫測定法の開発について述べた。これらの測定法はそれぞれ生体内物質と外来抗原を検出するものであるが、測定対象物および抗体の性質から各種測定最適条件を検討し、必要とされる高感度化技術の開発を行うことにより、それぞれを高感度に測定できる酵素免疫測定法を開発した。

第1章 新規肺小細胞癌腫瘍マーカー：ガストリン放出ペプチド前駆体の高感度酵素免疫測定法の開発

肺癌は病理組織学的に主に4つの組織型に分類され、その中でも肺小細胞癌は、増殖が速く早期に遠隔転移を起こすため、特に早期発見、早期治療が必要である。また、肺小細胞癌は抗癌剤に感受性が高いことから、化学療法が第1に選択される。そのため、肺小細胞癌と肺非小細胞癌を鑑別診断することは、治療方針を決定する上で極めて重要である。しかし、喀痰検査、X線検査あるいは血清中の神経特異エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) を測定するだけでは、肺小細胞癌の早期発見や肺小細胞癌の鑑別診断にとって十分ではなかった。

GRP および ProGRP は、肺小細胞癌の腫瘍マーカーとして有望視されていたが、血中に極微量しか存在しないため、臨床応用可能な高感度測定法の開発が必要とされていた。本研究では、臨床応用を目的として、ProGRP を測定対象物に選択し、2種類の ProGRP に対するモノクローナル抗体固相化法の検討などを行い、簡便な高感度 ProGRP 酵素免疫測定法を開発した。測定範囲は2~1,000 pg/mL であり、暫定的カットオフ値として、健常人血清平均値+3SD である50 pg/mL に設定した。

血清 ProGRP 値は、非腫瘍性肺疾患および肺非小細胞癌で0~1.5%、肺小細胞癌では63.0%が陽性となり、肺小細胞癌に対して高い特異性を示した。また、肺小細胞癌の比較的早期である limited disease (LD) 期においても、56.9%と高い陽性率を示した。肺小細胞癌の ProGRP の平均値は、カットオフ値の21.0倍に上昇し、LD 期においてもカットオフ値の10.9倍に上昇し、判別しやすく信頼できるマーカー

一であることが確認された。肺小細胞癌患者治療前後の血清 ProGRP 値の変動について検討した結果、臨床診断とほぼ一致し、特に部分寛解 14 例中 6 例でカットオフ値よりも高値となり、腫瘍の残存を示した。また、初回治療中の血清 ProGRP 値は、多くの症例で X 線による腫瘍画像の消退とよく相関し、治療効果を正確に反映するマーカーであることが確認された。さらに、再発 8 例のうち 5 例で臨床的に再発が発見される 1～7ヶ月前に、血清 ProGRP 値がカットオフ値以上に上昇していた。以上のように、ProGRP は、肺小細胞癌の早期発見、肺非小細胞癌との鑑別診断、治療のモニタリング、再発のモニタリングといった様々な局面で、既存の肺小細胞癌のマーカーである NSE よりも優れていることが示された。

第 2 章 C 型肝炎ウイルスコア抗原の高感度酵素免疫測定法の開発

HCV は主に血液を経由して感染し、感染後急性肝炎症状を呈した後、高率に慢性化し、肝硬変、肝癌へと移行するため、感染早期に発見し早期治療することが重要である。しかし、現在 HCV 感染の診断に汎用されている HCV 抗体検査は、感染初期の診断ができず、HCV 感染者と既往例との区別をすることができない。また、HCV 感染者の治療法の選択、病態の把握および各種治療による効果予測と効果判定には、高感度で HCV を検出する必要性があり、HCV 構造蛋白質である HCVcAg を測定対象物として選択した。HCVcAg は HCV 粒子内に存在していると考えられ、感染数ヶ月後には血中に HCV 抗体が出現してくる。そのため、感染から HCV 抗体出現後も HCVcAg を測定するためには、HCV 粒子を破壊し、HCV 抗体を不活性化し、HCVcAg を遊離させる前処理工程が必要であった。

本研究では、sodium dodecyl sulfate などの界面活性剤を高濃度に含む溶液を検体に添加し、56℃に加熱する簡便な検体前処理法を開発し、次に、固相抗体および 2 次抗体として 2 種類ずつのモノクローナル抗体を用いて、高感度 HCVcAg 酵素免疫測定法 (chemiluminescence enzyme immunoassay for HCV diagnosis : CLEIA-DI 法) を開発した。この測定法の分析感度は 3 fmol/L で、125 例の健常人血清を測定した結果、カットオフ値を暫定的に 7.5 fmol/L と設定した。

購入した HCV 抗体陽性検体において、CLEIA-DI 法による HCVcAg、AMPLICOR HCV test (市販の HCV-RNA 定性検査) および AMPLICOR HCV Monitor test (市販の HCV-RNA 定量検査) による陽性率は、各々 78.1 %、80.8 % および 74.0 % であった。CLEIA-DI 法による測定結果と AMPLICOR HCV Monitor test による測定結果との相関性は、良好な正の相関 (相関係数は 0.846) を示した。

次に、信州大学医学部附属病院受診者の臨床検体を用いて、CLEIA-DI 法の臨床的有用性を検討した。その結果、慢性 C 型肝炎患者における陽性率は 97%、他の肝疾患患者や健常人の血清では全て陰性となり、C 型肝炎患者に高い特異性と高い感度を示すことが明らかになった。HCV 抗体陽性者の陽性率は、in-house RT-PCR (Nested cDNA reverse transcription-polymerase chain reaction) 法では 100 %、AMPLICOR HCV test では 94 %、CLEIA-DI 法では 98 % であった。CLEIA-DI 法は、AMPLICOR HCV Monitor test と有意な正の相関 (相関係数は 0.627) を示した。慢性 C 型肝炎患者のインターフェロン- α 治療における responder (治療終了後、血中 HCV-RNA は検出されず治療効果が認められた群) と non-responder (治療終了後、血中 HCV-RNA は検出され治療効果が認められなかった群) となった検体を用いて、CLEIA-DI

法の治療モニタリングへの有用性を検討した。治療前では全ての患者血中で HCVcAg が検出され、そのうち全ての responder では治療終了後 24 週目で陰性となり、全ての non-responder では治療終了後 24 週目で陽性のままであり、血中 HCVcAg 量と治療効果は相関していた。輸血後急性 C 型肝炎患者血清を用いた検討では、CLEIA-DI 法による HCVcAg は in-house RT-PCR 法による HCV-RNA と同様に HCV 抗体検査よりも早期に検出された。また、National Institute of Health (USA) で確認された輸血後急性 C 型肝炎 3 例においても、in-house RT-PCR 法による HCV-RNA 測定値と CLEIA-DI 法による HCVcAg 測定値は経時的にほぼ同じ挙動を示した。2 例の患者の輸血直後に HCV-RNA が陰性、HCVcAg が陽性となった期間が認められ、HCVcAg 検査法は信頼性が高いと思われた。

次に、現在の輸血用血液のスクリーニング検査では、主に HCV 抗体検査が用いられているが、感染から HCV 抗体が出現してくるまで、HCV 感染を診断できない期間が約 70～80 日間存在する。この期間を短縮させ、輸血による 2 次感染のリスクを減少させることが求められている。HCV 抗体が存在しないこの感染初期に HCVcAg を測定するためには、HCV 粒子を破壊し、HCVcAg を遊離させることが必要である。

本研究では、主にポリマー酵素を用いた新規酵素標識抗体の開発と、検体中の HCV 粒子から HCVcAg を露呈させる反応液の開発を行い、前処理を行うことなく簡便な高感度 HCVcAg 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay for HCV screening : ELISA-SC 法) を開発した。この測定法の分析感度は 4 fmol/L、カットオフ値を暫定的に 30 fmol/L とした。

市販の HCV セロコンバージョンパネルを測定した結果、ELISA-SC 法は、AMPLICOR HCV Monitor test の感度とほぼ同等であり、さらに、HCV 抗体検査では検出できない感染初期の期間を、約 1/3 に短縮することができた。また、HCV 抗体陰性検体の測定において、ELISA-SC 法による測定結果は AMPLICOR HCV Monitor test による測定結果と正の相関 (相関係数は 0.664) を示した。

以上のように、ProGRP の高感度免疫測定法の開発により、この新規腫瘍マーカーが臨床の場で使用できるようになり、治癒可能な時期の肺小細胞癌の確定診断、治療効果の判定、再発の早期発見などができるようになった。また、2 つの HCVcAg 高感度免疫測定法の開発により、HCV 感染の早期診断や、HCV 感染者の病態把握、および各種治療のモニタリングなどの臨床的有用性が向上した。このような免疫測定法の高感度化技術は、他の疾病マーカーの開発にも十分応用することが可能である。

審査結果の要旨

本研究は、生体試料中のガストリン放出ペプチド前駆体 (ProGRP) および C 型肝炎ウイルスコア抗原 (HCVcAg) の疾病マーカーについて、それぞれ高感度酵素免疫測定法を開発することにより、その臨床的有用性を大きく向上させ、より簡便に信頼性の高い疾病の診断を可能にしたものである。

まず、肺癌の中でも特に早期発見が必要である肺小細胞癌の新規腫瘍マーカーとして、簡便な高感度 ProGRP 測定法を開発した。この測定法は血清中の濃度が 2 pg/mL まで検出できるため、全ての健常人の値を測定できるようになった。従来のマーカーとは異なり、ProGRP は、健常人、非腫瘍性肺疾患および肺非小細胞癌ではほとんどが陰性で、肺小細胞癌で高い陽性率と特異性を示すことから、肺小細胞癌と肺非小細胞癌の鑑別診断ができることを示した。さらに、早期肺小細胞癌においても陽性率が高いことから、肺小細胞癌を早期発見できる可能性を示した。また、ProGRP 値は、肺小細胞癌においてカットオフ値よりも大きく上昇するため、判別しやすく信頼できるマーカーであることを示した。さらに、肺小細胞癌患者治療前後の ProGRP 値の変動は臨床診断結果とほぼ一致し、治療効果を正確に反映するマーカーであること、および臨床的再発発見時よりも 1~7ヶ月前に ProGRP 値が再上昇することから、再発のモニタリングにも有用であることを示した。

次に、HCV 感染者の早期発見、治療法の選択、病態の把握、および治療による効果判定には、高感度で HCV を検出する必要があるため、簡便な前処理を行う高感度 HCVcAg 測定法 (CLEIA-DI 法) を開発した。カットオフ値を 7.5 fmol/L と設定し、CLEIA-DI 法による測定は、C 型肝炎患者において高い感度と高い特異性をもち、HCV-RNA 検査と高い相関性を示すことを明らかにした。また、CLEIA-DI 法が、慢性 C 型肝炎患者のインターフェロン治療効果と相関することから、治療モニタリングにも有用であることを示した。

さらに、HCV 感染初期の輸血による 2 次感染のリスクを減少させるために、前処理を行わず、簡便、安価で汎用性が高い高感度 HCVcAg 測定法 (ELISA-SC 法) を開発した。この測定法のカットオフ値は 30 fmol/L で、ELISA-SC 法で測定することにより HCV 抗体検査では検出できない感染初期の期間を約 1/3 に短縮できることを示した。

以上のように、本研究により、簡便に肺小細胞癌の早期発見、鑑別診断、および正確な治療モニタリングができるようになり、また、簡便に C 型肝炎患者の早期発見、きめ細かな治療モニタリングが可能になり、さらに、輸血による C 型肝炎ウイルスの感染を安価で迅速に防止できるようになった。

これら一連の研究成果により、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。