<原 著>

慢性肝疾患における新しい抗体を用いた血清

IV型コラーゲンの測定

斎藤 俊司 渋谷 明隆 西元寺克禮¹⁾
丸尾 直子²⁾ 高橋 俊雄³⁾

要 旨: IV型コラーゲンに対する2つのモノクローナル抗体を作製し、それらを用いた新しいIV型コラーゲン測定系としてEIA法によるIV-67法、IV-238法を開発した。健常者血清の測定より正常値をIV-67法では8.2ng/ml以下、IV-238法では91.6ng/ml以下とした。IV型コラーゲンは、IV-67法では慢性肝炎の87.8%、肝硬変の97.9%で、IV-238法ではそれぞれ62.2%、89.4%で高値を示した。さらに、慢性肝炎、肝硬変と病態が進展するに従いそれぞれの測定値は有意に上昇した。IV-67法、IV-238法による測定値は組織学的な線維化の程度と正の相関を示し、門脈域や小葉内の炎症・壊死の程度には影響されなかった。以上から、IV-67法、IV-238法とも従来法と同様にすぐれた肝線維化マーカーである上に、測定法は簡便で従来法より少量の検体で短時間に多数の測定が可能なることから、有用な血清IV型コラーゲンの測定法になりうると考えられた。

索引用語: 慢性肝炎 肝硬変 IV型コラーゲン 肝線維化マーカー

緒 言

IV型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり、肝線維化の進展に伴い血清IV型コラーゲン濃度が上昇する事が知られている¹⁾。これまで血清IV型コラーゲンの測定法としては、7S domainを認識する抗体を用いたRIA法(日本DPC、以下7-S法)と、7S domainとtriple helical domainを認識する2種類の単クローン抗体を用いたEIA法(パナッセイIV-C、富士薬品、以下IV-C法)があり、慢性肝疾患の診断におけるこれらの方法の有用性が報告されている²⁻⁷⁾。

今回我々は、IV型コラーゲンに対する特異性の異なる2種類の単クローン抗体(COL IV-67及びCOL IV-238)を新たに樹立し、それぞれを用いたIV型コラーゲン測定系(IV-67法、IV-238法)を開発した。これらにより血清IV型コラーゲンの濃度を測定し、肝線維化マーカーとしての有用性について従来法と比較検討した。

対象と方法

1. 測定方法

ヒトIV型コラーゲンはSageらの方法⁸⁾に従って調製した。これをFreund's complete adjuvantと混合し家兎皮下に免疫し抗ヒトIV型コラーゲン抗血清を得、さらにヒトIV型コラーゲン固相化カラム、プロテインAセファロースカラムにより精製して抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体を得た。このポリクローナル抗体は、IV型コラーゲン特異的でありI、III、V型コラーゲンとは反応しないことを確認している。

一方、精製したヒトIV型コラーゲンを免疫したBALB/cマウスより脾細胞を調製し、常法に従ってミエローマ細胞と融合させクローニングを行い、抗ヒトIV型コラーゲンモノクローナル抗体を産生する2つのハイブリドーマクローンを樹立した。これらから得られたモノクローナル抗体COL IV-67、COL IV-238は、ともにIV型コラーゲンに特異的なモノクローナル抗体であり、I、III、V型コラーゲンと反応しなかった。さらに、Risteliらの方法⁹⁾に従って調製したIV型コ

Shunji SAITOH¹⁾, Akitaka SHIBUYA¹⁾, Katsunori SAIGENJI¹⁾, Naoko MARUO²⁾ and Toshio TAKAHASHI³⁾

1) 北里大学内科, 2) 東ソー(株), 3) (株) 森永生科学研究所

<受付日1995年10月5日>

ラーゲン7S domainと上記3抗体の反応性を検討したところ、COL IV-67およびポリクローナル抗体は7S domainを認識するのにに対し、COL IV-238は7S domainを認識しないことが明らかとなった。また、ポリクローナル抗体はIV型コラーゲン、7S domain両者と反応した。

EIA系の構築は下記のように行った。標識ポリクローナル抗体はウシ小腸由来アルカリ性ホスファターゼを標識酵素として用い、石川ら¹⁰⁾の方法に従って酵素-抗体結合物を作製した。この標識抗体とCOL IV-67及びCOL IV-238を常法により固相化したポリスチレンビーズを用い、1ステップサンドイッチ法によるIV型コラーゲン測定系(IV-67法およびIV-238法)を構築した。基質には4-メチルウンベリフェリルリン酸を用い、測定は市販の全自動免疫診断装置(AIA-1200, 東ソー社製)を用いて行った。

2. 対象

B型及びC型の慢性肝疾患133例(慢性肝炎, 以下CH:85例, 肝硬変症, 以下LC:48例)および対照として健康者33例の血清を試料とし、IV-67法およびIV-238法のそれぞれを用いて上述の方法により血清IV型コラーゲンを測定した。同時に比較のため同じ検体を用いて従来法である7-S法とIV-C法により血清IV型コラーゲンをそれぞれのキットに添付された方法で測定した。上記の測定検体と同時期のtotal bilirubin値(以下, TB), γ -globulin値(以下, γ -gl), 血小板数(以下, PLT), およびGPT値を測定し、各々の血清IV型コラーゲン値との相関を調べた。またCH群のうち肝生検を施行した80例について、組織学的な炎症及び線維化の程度をHAI score¹¹⁾で評価し、各測定系による血清IV型コラーゲン値と比較した。尚、保存血清量の関係で組織所見との比較は、IV-67法, IV-238法, 7-S法で行い、IV-C法は除外した。

得られた結果はMean $\pm$ SDで表し、有意差検定について2群間の比較はt検定を用い、多群間の比較は分散分析にて各群間に有意差があることを確認後、Post-Hoc test (Fisher's PLSD法, Scheffeの方法, Bonferroni/Dunn法)を行った。Receiver operating curvesにより求めた各方法による特異度および感度に対しては符号検定を行った。2変数の相関はPearsonの相関係数で求めた。いずれも危険率5%以下を有意差ありと判定した。

Table 1 Correlation between serum type IV collagen determined by IV-67 test, IV-238 test, 7-S and IV-C.

	IV-238	7-S	IV-C
IV-67	.854*	.911*	.728*
IV-238		.794*	.779*
7-S			.790*

*: $p < 0.01$

Table 2 Correlation between serum type IV collagen determined by IV-67 test, IV-238 test and clinical data.

	γ -gl	GPT	PLT	TB
IV-67	.543*	-.148	-.362*	.578*
IV-238	.366*	-.093	-.194	.408*

*: $p < 0.01$

結 果

1. 正常域の設定

健康者33例を対象にIV-67法, IV-238法により血清IV型コラーゲンを測定した。結果はIV-67法では 5.6 ± 1.3 ng/ml, IV-238法では 67.7 ± 11.9 ng/mlであった。IV-67法, IV-238法の正常域を平均 $\pm$ 2SDを考慮し、それぞれ8.2 ng/ml以下, 91.6 ng/ml以下とした。尚、7-S法およびIV-C法の正常値はキットに示されるようにそれぞれ5.0 ng/ml以下, 140 ng/ml以下とした。

2. 従来法との相関

従来法である7-S法およびIV-C法とIV-67法, IV-238法との相関関係を示す(Table 1)。それぞれの測定値の間には相関が認められた。

3. 臨床検査値との相関

TB, γ -gl, 血清GPT値, 血小板数とIV-67法およびIV-238法との相関を示す(Table 2)。IV-67法, IV-238法とも γ -glおよびTBと正の相関を認めた。またIV-67法は血小板数と負の相関を認めた。IV-67法, IV-238法ともGPT値との相関はなかった。

4. 疾患群別測定値

健康人, CH群, LC群の各測定法による測定値をFig. 1, 2に示した。IV-67法は, CH群 17.0 ± 8.9 ng/ml, LC群 44.7 ± 27.6 ng/ml, IV-238法はCH群 110.8 ± 44.3 ng/ml, LC群 170.6 ± 91.6 ng/ml, 7-S法ではCH群 6.0 ± 2.3 ng/ml, LC群 11.9 ± 5.1 ng/mlであり、IV-67法, IV-238法, 7-S法ともCH, LCと病態の進展に伴い高値を示した。IV-C法では健康人 $84.5 \pm$

Fig. 1 Concentrations of serum type IV collagen determined by IV-67 test and IV-238 test in the sera from patients with chronic liver disease.
CH: chronic hepatitis, LC: liver cirrhosis.

19.9ng/ml, CH 群 125.5 ± 133.1 ng/ml, LC 群 241.5 ± 197.4 ng/ml であり CH 群と LC 群の間には有意差を認めたものの健常人と CH 群の間には有意差はなかった。

また、前述の如く設定した IV-67法, IV-238法の正常域より高値を示すものを陽性とし、それぞれの陽性率を7-S法, IV-C法とともに Table 3 に示した。IV-67法, IV-238法とも CH 群より LC 群で陽性率が高い傾向にあるが、IV-67法では CH 群の87.8%, LC 群の97.9%に陽性を認め、従来法の7-S法および IV-C法に比べ陽性率が高かった。IV-238法は CH 群で62.2%, LC 群で89.4%の陽性率であり、7-S法とほぼ同等で、慢性肝炎をスクリーニングする上で、IV-C法よりは優れた陽性率であった。

5. Reciever operating curves による検討

Reciever operating curves を作成しこれらの血清 IV型コラーゲン測定法が慢性肝炎と肝硬変の鑑別診断法になりうるかを検討した (Fig. 3, 4)。その結果、IV-

Table 3 The rate of abnormalities in patients with chronic hepatitis (CH) and liver cirrhosis (LC).

	IV-67	IV-238	7-S	IV-C
CH	87.8% (n=82)	62.2% (n=82)	61.7% (n=81)	20.7% (n=29)
LC	97.9% (n=47)	89.4% (n=47)	95.7% (n=47)	78.4% (n=37)

7-S : type IV collagen 7S domain (DPC corporation),
IV-C: type IV collagen (Fuji).

67法では、cut off 22ng/ml 以下で、特異度76.8%, 感度76.6%で肝硬変の診断が可能であった。同様に IV-238法では cut off 130ng/ml 以下で特異度72%, 感度66%, 7-S法では cut off 8.0ng/ml 以下で特異度87.7%, 感度85.1%, IV-C法では cut off 値は140ng/ml 以下で特異度79.3%, 感度78.4%であった。7-S法と IV-C法の感度, 特異度の差について符号検定によりその有意性を検定したところ、感度において両者間に有意差はなく ($p > 0.1$), 特異度については7-S法の

Fig. 2 Concentrations of 7-S and IV-C in the sera from patients with chronic liver disease.
CH: chronic hepatitis, LC: liver cirrhosis.

Fig. 3 Receiver operating curves of serum type IV collagen concentration determined by IV-67 test and IV-238 test in predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis.
The best cut off value for differentiating chronic hepatitis from cirrhosis is 22ng/ml for IV-67 test and 130ng/ml for IV-238 test.

Fig. 4 Receiver operating curves of serum 7-S and IV-C concentrations in predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis.

The best cut off value for differentiating chronic hepatitis from cirrhosis is 8ng/ml for 7-S and 140ng/ml for IV-C.

Table 4 Association of serum levels of type IV collagen and pathological findings in patients with chronic hepatitis C.

		IV-67	IV-238	7-S
HAI I	0.1 (n=33)	14.0±7.7	98.8±33.6	5.5±2.5
	3.4 (n=33)	17.9±8.7	117.4±47.8	6.1±1.9
HAI II	0.1 (n=53)	16.0±8.7	109.3±44.1	6.0±2.5
	3.4 (n=27)	19.5±9.4	117.3±47.4	6.1±2.0
HAI III	0.1 (n=35)	17.4±9.6	108.6±38.3	6.1±2.6
	3.4 (n=45)	17.0±8.5	114.7±47.5	6.0±2.0

方が優れていた ($p<0.05$).

6. 病理組織学的所見との比較

病理組織所見の検討は HAI scoring system にて行った。慢性肝炎の壊死、炎症反応の grade を示す HAI のカテゴリー I～III について、軽度群(スコア 0, 1 点), 中等度以上群(スコア 3, 4 点)に分けて検討したところ, IV-67法, IV-238法, 7-S 法, IV-C 法とも各群との間で有意差はなかった (Table 4)。

線維化の stage を示す HAI カテゴリー IV について

は, スコア 0 点は 3 例のみのため, スコア 0 および 1 点群, 3 点群, 4 点群の 3 群間で検討した (Fig. 5)。IV-67法, IV-238法ではそれぞれの間に有意差を認めたが, 7-S 法においてはスコア 0, 1 点群と 3 点群の間には有意差はなかった。また, カテゴリー I のうち bridging necrosis (以下 BN) を呈する群と, BN のない群で比較すると IV-67法と 7-S 法では有意差を認めたが, IV-238法では有意差はなかった (Fig. 6)。

考 察

慢性肝炎から肝硬変へと病態が進展するのに伴い, 組織学的には肝細胞の壊死, 炎症反応とともに線維化が進行し小葉構築の改変がおこる。線維化の程度 (stage) の直接的な評価には肝生検が必要であるが, 肝生検は苦痛とリスクを伴う検査であり頻回に行いうる検査ではない上, 常に sampling error の問題が付きまとう。そこで, これまでヒアルロン酸, PIIP など各種の血中線維化マーカーの有用性について検討が行われてきている¹²⁻¹⁴⁾。

これらいわゆる血中線維化マーカーのうち IV 型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり, 肝線維化の進展に伴い血清中の IV 型コラーゲン濃度が増加することが報告されている¹⁾。また五十嵐ら²⁾は, 血清 IV 型コラーゲン値はコラーゲンの生合成のみならず分解や沈

Fig. 5 Serum concentrations of type IV collagen determined by IV-67 test, IV-238 test and 7-S test with the degree of liver fibrosis in patients with chronic liver disease.

Fig. 6 Concentrations of type IV collagen determined by IV-67 test, IV-238 test and 7-S test in sera from patients with or without bridging necrosis in liver biopsy. BN: bridging necrosis.

着をも反映すると述べている。IV型コラーゲンは網目状を呈し7S domain, triple helical domain, NCI domainの3領域から成っている。これまでこれらに対する抗体を用いた血清IV型コラーゲンの測定系が確立し、肝線維化の程度の評価、慢性肝炎と肝硬変の診断や治療方針の決定の指標の1つとして検討されてきた²⁻⁷⁾。

今回、我々はIV型コラーゲンに対する2つのモノクローナル抗体を作製し、それぞれを用いた2つの新しいIV型コラーゲン測定系としてEIAによるIV-67法、IV-238法を開発した。このうちIV-67法に用いたCOL IV-67抗体は7S domainを認識すると推定される。IV-238法に用いたCOL IV-238抗体は精製IV型コラーゲンとは反応するものの7S domainとは反応せず、7S domain以外の部分を認識していると推定される。

最近、Murawakiら¹⁵⁾は肝線維化マーカーとして、Type III procollagen peptide, 7-S法, IV-C法, およびTissue inhibitor of metallo proteinases活性をとりあげ、Receiver operating curvesを作製して肝硬変の診断能について検討し、これらの4つの肝線維化マーカーのうちでは7-S法が最も診断能に優れていると述べている。今回我々が開発したIV-67法は、慢性肝疾患の診断および慢性肝炎と肝硬変の鑑別において7-S法と同様に優れた診断法と考えられた。IV-238法は、慢性肝炎と肝硬変の鑑別能において7-S法, IV-67法よりやや劣るが慢性肝疾患の診断能においてIV-C法より良好な結果であった。

次に、IV-67法, IV-238法による血清IV型コラーゲン測定値と組織学的所見との関連について検討した。その結果、IV-67法, IV-238法とも、肝の炎症所見の程度には影響されず、肝線維化のstageを反映していることが確認された。興味深いことにIV-67法, 7-S法ともbridging necrosisのある例で有意に高値を呈していることから、この時期にすでに基底膜IV型コラーゲンが形成されつつあることが示唆された。

慢性肝炎と肝硬変の鑑別について7-S法とIV-67法の各々の結果を符号検定により比較すると感度においては両者に有意差はなかったが特異度はわずかに7-S法の方が優れていた。肝線維化マーカーの重要性の1つは慢性肝炎と肝硬変の鑑別である。本来肝硬変の診断は臨床的には血液検査所見、画像診断、生検などにより総合的に確認されるべきもので、この点について肝線維化マーカーは精査を進める1つのきっかけとしての意味を有する。符号検定の結果からはIV-67法は

慢性肝炎の患者の一部を肝硬変とover diagnosisする率が7-S法より高いと考えられるが肝硬変を慢性肝炎と診断する率は同等であるといえる。さらに、Table 3に示したように、慢性肝炎および肝硬変それぞれの診断能において、IV-67法は7-S法より優れている。以上よりIV-67法は肝線維化マーカーとしての役割を十分果たしうると考えられる。さらに、IV-67法は7-S法に比べ測定法が簡便である。すなわち7-S法はRIA法であり、測定に2日かかり、使用血清量は200 μ lを要する。これに対し、今回開発した測定系は自動化されたEIA法であり、操作は簡便なうえに、測定時間も約1時間と短く、使用血清量は30~50 μ lと少量である。今後更に多数例での検討が必要であるが、臨床的な有用性は十分期待できると考えている。

一方、IV-238法について、モノクローナル抗体COL IV-238の対応抗原部位は現段階では明らかではない。肝線維化過程のIV-238法の意義づけについて基礎的、臨床的に更なる検討が必要である。

近年、C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の評価の一つとして、肝線維化マーカーの有用性が報告されており^{16,17)}、今後線維化の評価のみならず、治療に伴う病態の変化を検討する面からも、我々の開発した血清IV型コラーゲン測定法での検討を行いたいと考えている。

結 語

1. EIA法を用いた新しい血清IV型コラーゲンの測定系(IV-67法, IV-238法)を開発した。

2. IV-67法, IV-238法とも組織学的な肝線維化のstageをよく反映していることが確認された。とくに、IV-67法は従来法の7-S法とほぼ同等のすぐれた測定系であった。

3. これによりラジオアイソトープを用いることなく従来法より少量の試料による短時間での多数検体の測定が可能となった。

本研究は文部省科学研究費課題番号07770383の補助を得た。記して謝意を表します。

文 献

- 1) Hahn E: Distribution of basemembrane proteins in normal and fibrotic human liver: Collagen type IV, laminin, and fibronectin. Gut 21: 63-71, 1980
- 2) 五十嵐省吾, 舟木直也, 旗原照昌, 他: 各種肝疾患患者血清における7Sおよびtype IVコラーゲン

- の測定と他の肝線維化マーカー, P-III-P およびラミニン P1 との対比. 肝臓 31: 524—530, 1990.
- 3) 三崎盛治, 矢野 裕, 住田安弘, 他: ウイルス性慢性肝疾患における血清タイプIVコラーゲン・7S 測定の有用性について. 医学と薬学 20: 1286—1290, 1988
 - 4) 小出博子, 井上登美夫, 富吉勝美, 他: 血清タイプIVコラーゲン・7S の Radioimmunoassay の基礎的および臨床的検討. 医学と薬学 25: 160—168, 1991
 - 5) 佐藤博明, 佐藤裕美子, 坂井志津, 他: 慢性肝疾患におけるIV型コラーゲン・7S の検討. 和歌山医学 43: 461—465, 1992
 - 6) 中山 一: Type IV collagen および laminin による肝線維化の血清学的診断に関する研究. 慈恵医大誌 104: 807—820, 1989
 - 7) 長田篤雄, 菰田二一: Collagen Type IV, 7S-domain の Radioimmunoassay と臨床的意義. 医学と薬学 20 (6): 1507—1515, 1988
 - 8) Sage H, Woodbury RG, Bornstein P: Structural studies on human type IV collagen. J Biol Chem 254: 9893—9990, 1980
 - 9) Risteli J, Bochsinger HP, Engel J, et al: 7-S collagen: Characterization of an unusual basement membrane structure. Eur J Biochem 108: 239—250, 1980
 - 10) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔編: II. 基本技術 2 酵素標識法. 1) 高分子, 「酵素免疫測定法第3版」, 医学書院, p117—119, 1987
 - 11) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1: 431—435, 1981
 - 12) 丸山勝也, 岡崎 勲, 小林利次, 他: 血清 type III procollagen aminopeptide の測定による肝線維化診断の試み. 肝臓 25: 24—35, 1984
 - 13) 五十嵐省吾, 旗原照昌, 舟木直也: 慢性肝疾患とくに慢性肝炎と肝硬変症における Type III procollagen N-peptide 測定の意義. 肝臓 25: 731—736, 1984
 - 14) 中村仁美, 高松正剛, 辻井啓之, 他: 慢性肝疾患における血清ヒアルロン酸測定の臨床的意義—とくに肝線維化との関連—. 肝臓 34: 452—456, 1993
 - 15) Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, et al: Serum type IV procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: Relationship to liver histology. Hepatology 20 (4): 780—787, 1994
 - 16) 宮林千春, 樋口清博, 愛場信安, 他: 血中線維化マーカーによる C 型慢性肝炎のインターフェロン治療効果の予測. 肝臓 34: 940—931, 1993
 - 17) 石橋一伸, 松田裕之, 保城秀雄, 他: C 型慢性肝炎 Interferon 療法における血清 procollagen III peptide および type IV collagen 7s 動態の検討. 肝胆膵 27 (2): 295—299, 1993

Measurement of serum type IV collagen level in chronic liver disease using new assay systems

Shunji SAITOH*, Akitaka SHIBUYA*, Katsunori SAIGENJI*,
Naoko MARUO** and Toshio TAKAHASHI***

Serum level of type IV collagen is a biochemical marker of hepatic fibrosis in chronic liver disease. We prepared 2 kinds of monoclonal antibodies to human type IV collagen named COLIV-67 and COLIV-238. Using these antibodies, we established new EIA systems of serum type IV collagen level named as IV-67 test and IV-238 test. We measured type IV collagen level using new assay systems in sera from 133 patients of chronic liver disease in order to evaluate these assay systems as a markers of hepatic fibrosis. 87.8% of chronic hepatitis and 97.9% of liver cirrhosis indicated high levels of type IV collagen by IV-67 test, and 62.2% and 89.4% by IV-238 test. Concentrations of serum type IV collagen using IV-67 test and IV-238 test were significantly increased as progresses with hepatic disease.

IV-67 test was better to differentiate liver cirrhosis from chronic hepatitis than IV-238 test. For the detection of cirrhosis, serum type IV collagen level using IV-67 test was 76.8% specific and 76.6% sensitive with a cut-off value of 22 ng/ml.

Histological examination revealed that serum type IV collagen levels determined by new assay systems were significantly higher in patients with bridging fibrosis and bridging necrosis than in those without them.

These new systems are available with smaller amount of serum samples (30-50 μ l) than conventional method, and do not need radioisotope.

* Department of Internal Medicine, Kitasato University School of Medicine (Kanagawa)

** Tosoh Corporation (Kanagawa)

*** Morinaga Institute of Biological Science (Kanagawa)