

汎用生化学自動分析装置に適応可能な オートタキシン活性測定試薬の基礎性能評価

Basic performance evaluation of an autotaxin activity measurement reagent
applicable to general-purpose automatic biochemical analyzers

大久保基博, 小林真衣, 飛田明子, 吉川直之, 小野佳一

要旨 ATX活性測定試薬であるATXオートワコー（富士フイルム和光純薬株式会社）の基礎性能検討を行った。併行精度、室内再現精度は良好であり、直線性および検出限界は試薬添付文書に記された測定可能範囲を満たしていた。また、ATX蛋白定量試薬であるAIA-パックCL[®]オートタキシン（東ソー株式会社）との相関性も良好な結果であった。共存物質では、高濃度のアスコルビン酸およびビリルビンCで負誤差が認められたため、これら物質が高濃度に含まれる検体では注意が必要であると思われる。以上より、ATX活性測定試薬であるATXオートワコーは日常検査に導入する上で概ね満足できる基礎性能を有していることが確認された。ATXは肝線維化の早期マーカーであるため、汎用生化学自動分析装置に適応可能な本試薬は、臨床上有用であると考えられる。

Key words Autotaxin, ATX, ATX Auto wako

1. はじめに

オートタキシン（以下、ATX）はヒト悪性黒色細胞株のA2058の培養上清より、同細胞の運動促進因子として単離、同定された糖蛋白質であり¹⁾、リゾホスファチジルコリンをリゾホスファチジン酸とコリンに分解するリゾホスホリパーゼD活性を有している²⁾。肝線維化ステージ分類には肝生検が必要とされるが、侵襲性が高いため代替となる非侵襲的な肝線維化マーカーの開発が進む中で、ATXは従来の肝線維化マーカーでは困難であった初期の線維化の判別³⁾および疾患特異性に優れており⁴⁾、従来の肝線維化マーカーを補うマーカーとして平成

30年6月より保険収載され臨床応用されている。

この度、富士フイルム和光純薬株式会社から、汎用生化学自動分析装置で測定可能なATX活性測定試薬であるATXオートワコーが販売されたので基礎性能検討を行った。

2. 材料および方法

1) 対象

当院検査部に提出された患者残血清を使用した。なお、本研究は東京大学医学部附属病院検査部と富士フイルム和光純薬株式会社との共同研究契約に基づき、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て実施した。（審査番号：2019300NI-13）

2) 検討試薬および測定原理

検討試薬と装置は、ATXオートワコー（富士フイルム和光純薬株式会社）およびTBA-120FR（キャノンメディカルシステムズ株式会社）を用いた。ATX分析のキャリブレーションとコントロール測定には、それぞれATXキャリブレーター（表示値：17.4 U/L）、ATXコントロール1（表示値：9.4 U/L）、ATXコントロール2（表示値：27.6 U/L）（いずれも富士フイルム和光純薬株式会社）を用いた。なお、測光波長は主波長：548 nm / 副波長：700 nmで行

Received Feb. 10, 2025; Accepted May 16, 2025
Motohiro OKUBO, Mai KOBAYASHI,
Akiko TOBITA, Naoyuki YOSHIKAWA,
Yoshikazu ONO
東京大学医学部附属病院検査部
University of Tokyo Hospital
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
Tokyo Bunkyo-ku Hongo 7-3-1
Corresponding author: 大久保基博
TEL: 03-3815-5411 (内線35021)
E-mail: okubom-lab@h.u-tokyo.ac.jp

った。

相関性試験の対照試薬と装置は、CLEIA法を測定原理とするATX蛋白濃度測定試薬のAIA-パックCL[®]オートタキシン（東ソー株式会社）および全自動化学発光酵素免疫測定装置AIA-CL2400（東ソー株式会社）を用いた。

検討試薬の測定原理は、ATXのリゾホスホリパーゼD活性を利用したものであり、リゾホスファチジルコリンに試料中のATXが作用することで、コリンとリゾホスファチジン酸が生じ、そのコリンにコリンオキシダーゼが作用することで過酸化水素が生じる。生じた過酸化水素は、ペルオキシダーゼ（POD）の作用により4-アミノアンチピリンとN-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン（TOPS）を定量的に酸化縮合させ、その結果生じる青紫色色素の生成速度を測定することにより、試料中のATX活性を求める。

3) 検討内容

(1) 併行精度

ATXコントロール1, ATXコントロール2および低濃度（L）、中濃度（M）、高濃度（H）に調製したプール血清をそれぞれ10回測定し、その平均値および標準偏差（SD）より変動係数（CV %）を算出した。

(2) 室内再現精度

ATXコントロール1, ATXコントロール2およびプール血清（P）をそれぞれ1日3回、20日間測定し、日内変動と日間変動を合成した総変動係数（CVs %）を算出した。

(3) 希釈直線性

低濃度試料（ATXキャリブレーション）および高濃度試料（活性値：60 U/L）を生理食塩水にて10段階に希釈し、各試料を3重測定した。

(4) 共存物質の影響

共存物質試験用試液と最大濃度は、L（+）-アスコルビン酸は25 mg/dL、溶血液（ヘモグロビン）は500 mg/dL、ビリルビンFは50 mg/dL、ビリルビンCは40 mg/dL（富士フイルム和光純薬株式会社製）、乳びは静注用脂肪乳剤イントラリポス2.0 %（株式会社大塚製薬工場製）とし、各共存物質によるATX測定への影響を検討した。

各共存物質試験用試液を添加した血清と、精製水を添加した共存物質非添加血清を用いて混合系列を作製し、非添加血清および混合試料について、それぞれ3重測定した。非添加血清の測定値を100%として各混合試料の相対値を算出し、非添加血清と比較し±5 %以内までは影響がないものと判断した。

(5) 検出限界

ATXコントロール1を5倍希釈した試料を検出限界検討用の低濃度試料とし、低濃度試料を生理食塩水で3段階に希釈した後、試料と生理食塩水をそれぞれ20回測定した。生理食塩水（0活性）の平均値+2SDと試料の平均値-2SDが重ならない最小の活性値（±2SD法）を検出限界とした。

(6) 相関性

患者検体175例について、検討試薬で測定した活性値と対照試薬で測定した蛋白濃度の相関性を確認した。なお、50 U/Lを超える検体は50 U/L以下となるように生理食塩水で希釈と測定を行い、希釈倍率を乗じることで測定値を求めた。

3. 検討成績

(1) 併行精度

CVは0.38~0.48 %であった（Table 1）。

(2) 室内再現精度

CVsは1.38~1.67 %であった（Table 2）。

(3) 希釈直線性

低濃度試料と高濃度試料ともに、各希釈段階での理論値と実測値の誤差は±10 %以内であり、高濃度試料では57.6 U/Lまで直線性があった（Fig. 1）。

(4) 共存物質の影響

ヘモグロビンは500 mg/dL、ビリルビンFは50 mg/dL、乳びは2.0 %の最大濃度まで影響がなかった。アスコルビン酸は5 mg/dL、ビリルビンCは16 mg/dLまで影響はなかったが、これら以上の濃度で負の影響は大きくなった（Fig. 2）。

Table 1 Repeatability

	Control1	Control2	L	M	H
MEAN (U/L)	9.5	27.9	10.1	17.7	27.2
SD (U/L)	0.04	0.11	0.05	0.07	0.10
CV (%)	0.44	0.38	0.48	0.38	0.38

(n=10)

L : Pooled serum of low ATX activity

M : Pooled serum of middle ATX activity

H : Pooled serum of high ATX activity

Table 2 Intermediate precision

	Control1	Control2	P
MEAN (U/L)	9.5	27.8	16.1
SDs (U/L)	0.16	0.38	0.26
CVs (%)	1.67	1.38	1.60

(n=20)

P : Pooled serum

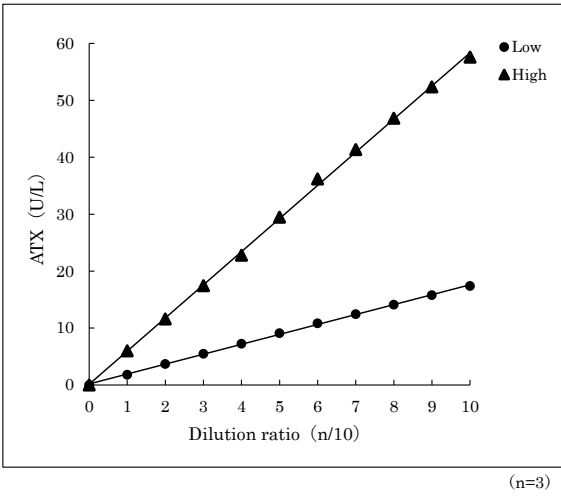


Fig. 1 Dilution linearity

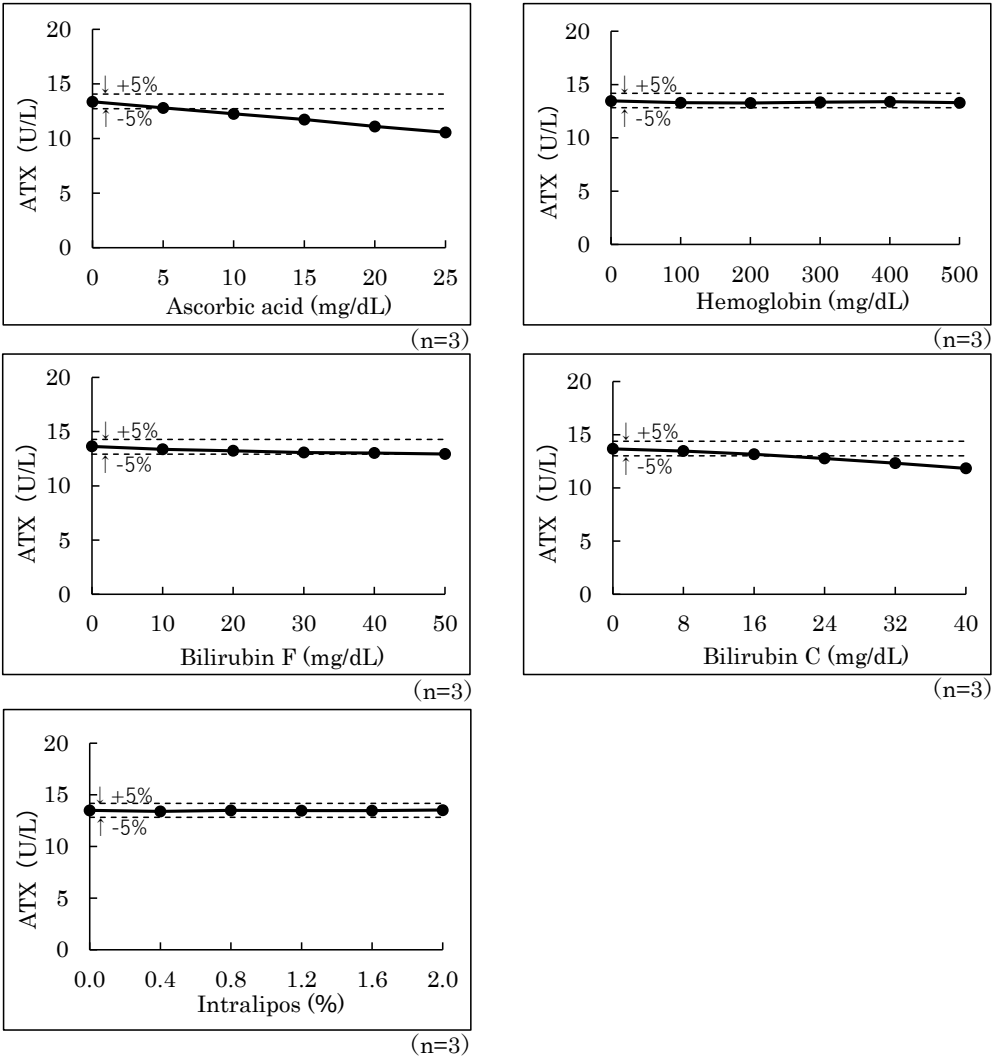


Fig. 2 Effect of interfering substances on ATX assay

(5) 検出限界

$\pm 2SD$ 法により検討した結果、生理食塩水の平均値 $+2SD$ と試料の平均値 $-2SD$ が重ならなかったのは、低濃度試料を1/4倍希釈した0.104 U/Lであった (Fig. 3)。

(6) 相関性

検討試薬で測定した活性値 (y) と対照試薬で測定した蛋白濃度 (x) の相関性 (n = 175) は、相関係数 $r = 0.991$ 、回帰式は $y = 10.2x + 2.1$ であった (Fig. 4)。

4. 考察

ATX 活性測定試薬である ATX オートワコーの基礎的検討を行った。精度 (併行精度および室内再

現性度) は良好であり、直線性および検出限界の結果から、添付文書の測定可能範囲を満たしていた。相関性試験で両試薬間の傾きが10.2となったのは、対照試薬である AIA-パック CL[®] オートタキシンは蛋白濃度、検討試薬は活性値を測定しているためと考えられる。一方、相関性は良好であったことから、両方で反応性の異なる検体はなかったと判断できる。共存物質の影響では、アスコルビン酸およびビリルビン C のように還元作用のある物質において負誤差があり、測定原理における ATX 作用で生成した過酸化水素をこれらの還元物質が還元したことで負誤差を生じたと考えるが、試薬中にはアスコルビン酸オキシダーゼが添加されていることから、過酸化水素に対する還元作用以外に、ATX が基質のリゾホ

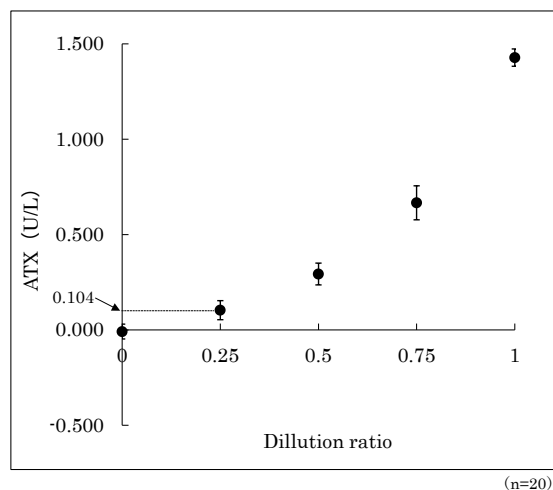


Fig. 3 Limit of detection

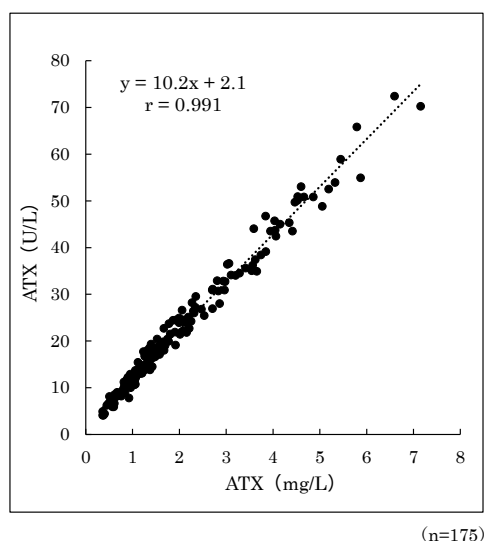


Fig. 4 Correlation with AIA-CL ATX

スファチジルコリンに作用する反応への影響などが考えられる。この点については明確な原因はわかっておらず、今後の改善課題である。したがって現状では、これら物質を高濃度に含む検体や異常低値を示した検体については、希釈測定による対処が必要である。

現在のところ、血清ATXの蛋白測定と活性測定の決定的な優劣は見いだせていないが、本試薬は専用装置を必要とせず、日常使用している汎用の生化学自動装置に適用できることから、他の検査項目と同時に測定値が得られる点、反応タイムコースで反応を観察できる点においては利点があると考えられる。最近では肝疾患の早期発見、早期治療を目的として、2023年6月に開催された第59回肝臓学会総会にて日本肝臓学会より奈良宣言2023（ALT>30U/Lでかかりつけ医へ）が報告された。また、ATXが基礎研究において肝疾患分野のみならず、肺非小細胞癌、甲状腺癌、乳癌⁵⁾、濾胞性リンパ腫⁶⁾等の多種多様な癌、妊娠⁷⁾などで関与しているとの報告もあり、今後、臨床検査として血清ATXの測定の需要が増加することが予想される。

5. 結語

ATX活性測定試薬であるATXオートワークスは日常検査に導入する上で概ね満足できる基礎性能を有していることが確認された。ATXは肝線維化の早期マーカーであるため、汎用生化学自動分析装置に適応可能な本試薬は、臨床上有用であると考えられる。

※本検討を実施するにあたり、開示すべきCOIはありません。

文 献

- 1) Stracke M L, Krutzsch H C, Unsworth E J, et al. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992;267:2524-2529.
- 2) Tokumura A, Majima E, Kariya Y, et al. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2002;277:39436-39442.
- 3) Yamazaki T, Joshita S, Umemura T, et al. Association of Serum Autotaxin Levels with Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *Sci Rep* 2017;7:46705.
- 4) Ikeda H, Kobayashi M, Kumada H, et al. Performance of autotaxin as a serum marker for liver fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2018;55:469-477.
- 5) Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin-an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 2010;148:13-24.
- 6) Masuda A, Nakamura K, Izutsu K, et al. Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2008;143:60-70.
- 7) Masuda A, Fujii T, Iwasawa Y, et al. Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clin Chim Acta* 2011;412:1944-1950.