

イムニス[®] サイトケラチン18F EIAについて

Immunis[®] cytokeratin 18F EIA

いわ さ もと お なか がわ はや と
 岩 佐 元 雄 : 中 川 勇 人
 Motoh IWASA Hayato NAKAGAWA

はじめに

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) は、病理診断から提唱された疾患概念で、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) のなかの進行性の病態をさす。現在、わが国の NASH 患者数は約 200 万人、炎症を伴わない脂肪肝から NASH までを含む一連の NAFLD は 1,000 万人以上であると推定されており、社会的にも極めて注目度の高い疾患である。NAFLD に対する患者管理では、NASH への移行を評価することが重要であるが、NASH の診断には現時点では肝生検が必須となっている。

肝生検は、その侵襲性から繰り返し施行することは困難であり、簡便かつ経済的な診断方法の確立が希求されて久しい。そのなかで、サイトケラチン 18 フラグメント (CK-18F) は、カスパーゼ依存性の肝アポトーシス時に上昇することが知られており、NASH 診断におけるバイオマーカーとしての使用が期待され、世界的に研究が進んでいる。近年では単独使用ばかりでなく、他のバイオマーカーやスコアリングシステム、画像診断との併用により、その診断能の向上化が図られている^{1,2)}。本稿では、NAFLD/NASH の病態と、2024 年 1 月に保険収載された血清中の CK-18F を測定するイムニス[®] サイトケラチン 18F EIA の原理と可能性について、最近の知見を交えて概説する。

なお、2023 年 6 月、欧州肝臓学会 (EASL)、米国肝臓病学会 (AASLD)、ラテンアメリカ肝疾患研究協会 (ALEH) は、NAFLD、NASH を metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD)、

metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) と診断することを提唱し³⁾、日本肝臓学会、日本消化器病学会も病名変更賛同しているが、CK-18F の報告はすべて NAFLD/NASH を対象としていることから、本稿では NAFLD/NASH を用語として用いた。

I. NAFLD/NASH の病態

食生活の欧米化や、運動不足による相対的な過栄養状態は、糖尿病や脂質異常症など、さまざまな生活習慣病や心血管疾患、悪性疾患の発症を増加させる。肝疾患においてもその影響は大きく、NASH は、肝硬変、肝癌や他臓器癌、脳・心血管疾患発症の高リスク群である。また、NASH の病態に遺伝的素因が関与することが知られており、特に *PNPLA3* の遺伝子多型が線維化進展と関連する (図 1)。

NASH の発症には、肝組織内のみならず、肝と脂肪組織、腸管といった肝外臓器との相互作用が寄与している。具体的には、脂肪組織からは腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、インターロイキン (IL) -6、レプチン、アディポネクチンといった炎症性サイトカイン・アディポカインが分泌され、腸管ではフルクトースや遊離脂肪酸・トランス脂肪酸などの糖脂質の肝毒性に加えて、腸内細菌叢由来物質や短鎖脂肪酸が生じ、それぞれの分子が門脈を介して肝臓に達して、NASH の病態形成を促すと考えられている。肝組織内の病態としては、肝細胞内の脂肪滴形成はむしろ化学的に安定な中性脂肪への変換・貯留を誘導し、脂肪毒性を回避させているのに対して、脂肪蓄積のメカニズムの破綻が脂肪毒性を生じ、肝病態形成に寄与する (図 2)。

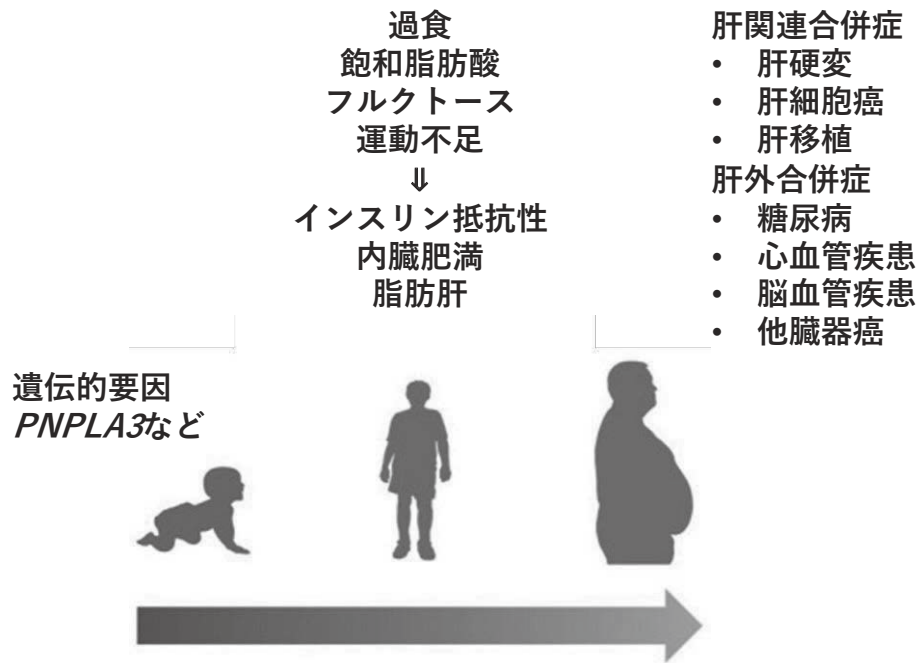


図1. NAFLD/NASHの進展要因と転帰 (著者作成)

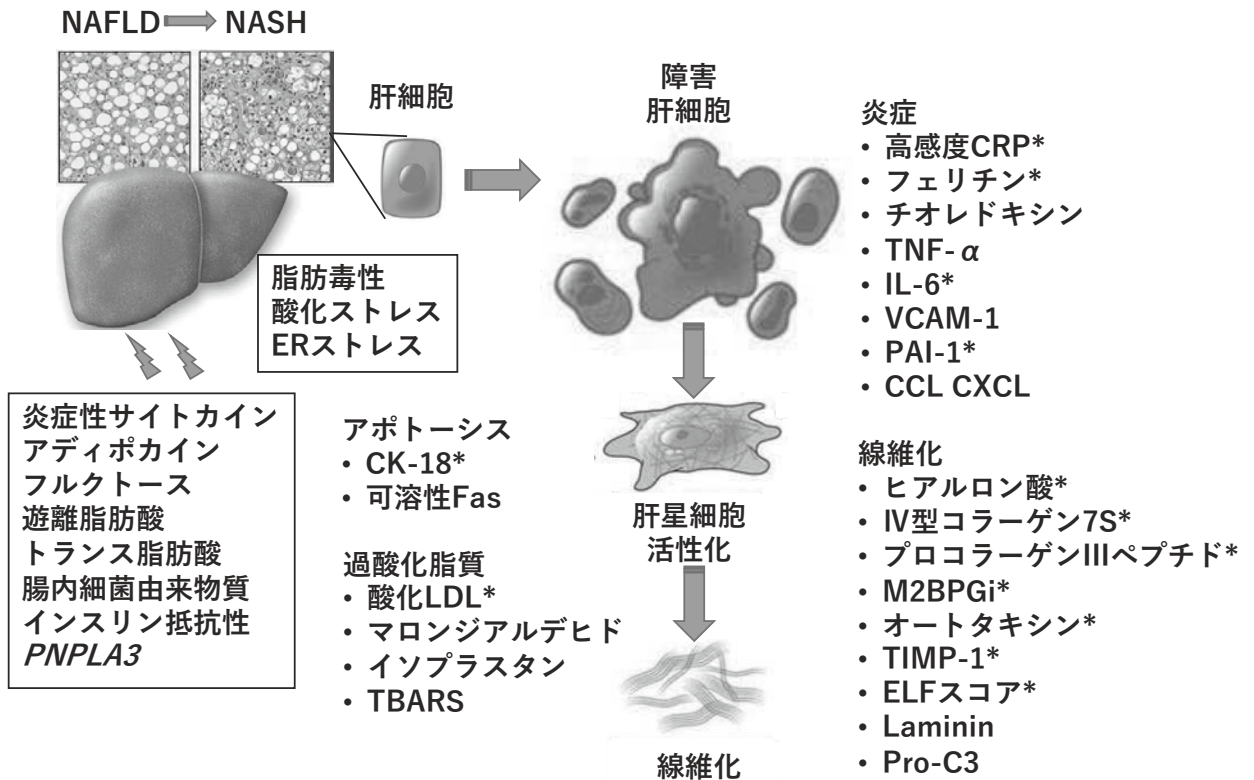


図2. NAFLD/NASHの病態と主なバイオマーカー
* 保険適用 (適応疾患は異なる)

文献4)を参考に著者作成

(図2は巻末にカラーで掲載しています)

II. NAFLD/NASHのバイオマーカー

このようにNASHの病態形成には、炎症、脂質過酸化、肝細胞のアポトーシスやミトコンドリア障害、肝線維化といった多彩なプロセスが関与しており、それを評価するバイオマーカーが多数報告されている(図2)⁴⁾。NAFLDで重要な肝線維化を評価するマーカーとして、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン7S、プロコラーゲン-III-ペプチド、Mac-2結合蛋白糖鎖修飾異性体(M2BPGi)、オートタキシンに加え、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、ELF(Enhanced Liver Fibrosis)スコアが保険適用となり、NAFLD/NASHの線維化ステージ診断にも有用性が多数報告されている。また、一般臨床検査で算出可能なFIB-4 indexも線維化進行例の鑑別に良好な診断能を有し、広く用いられている。しかしながら、NASHは病理診断による脂肪変性、

炎症、肝細胞の風船様変性が特徴であるが、これらの評価に有用なバイオマーカーは少ない。TNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカイン、アディポネクチン、酸化ストレスにより誘導されるチオレドキシン、糖とタンパク質の最終的な反応生成物である終末糖化産物(AGE)、酸化LDL、高感度CRPなどが報告されているが、臨床応用にはさらなる検討を要する。NAFLD/NASHの治療方針の決定には病理学的に非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver: NAFL)とNASHを鑑別することが求められているが(図3)⁵⁾、このような現状から、実臨床においては肝線維化が疑われる症例をNASHとして治療介入することも多い。

III. CK-18FとNAFLD/NASH

CK-18は分子量45kDaで、肝細胞の細胞骨格を構成する直径7~11nmの中間径フィラメントの1つであ

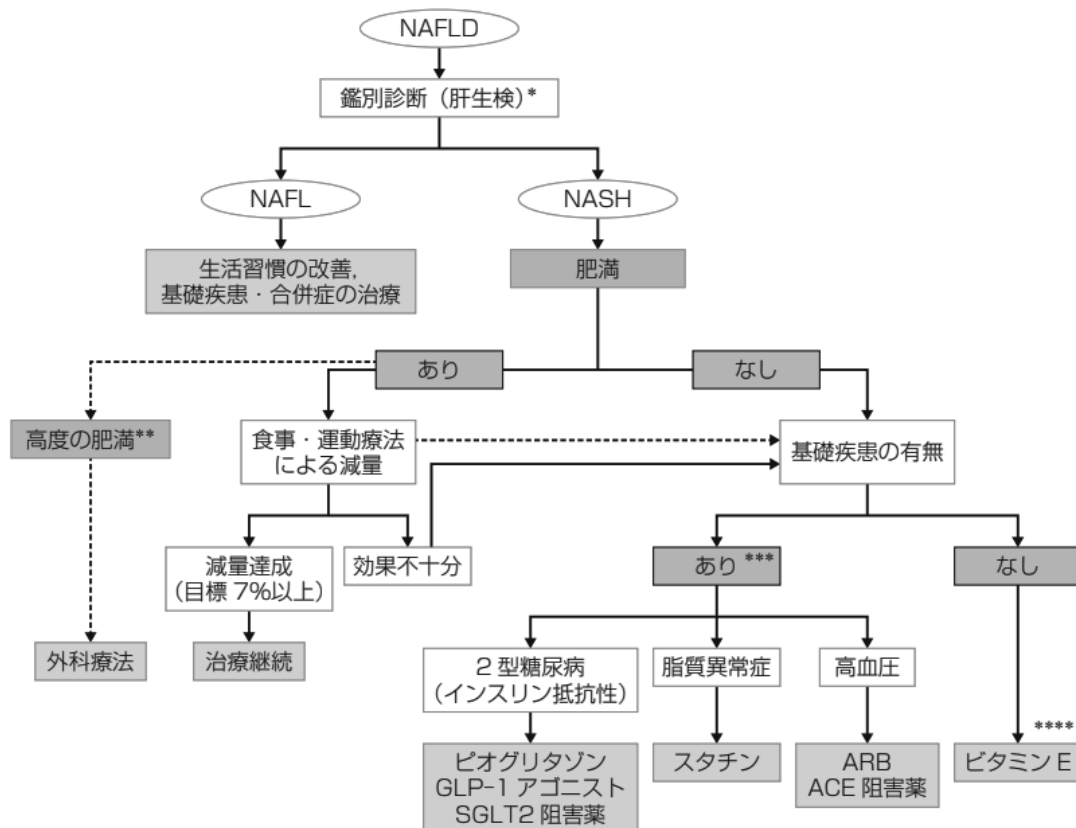


図3. NAFLD/NASH 治療フローチャート

「日本消化器病学会, 日本肝臓学会編: NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2020, 改訂第2版, p.xviii, 2020, 南江堂」より許諾を得て転載。注釈を省略。実際に使用する際には、必ず原典を参照すること。
文献5)より転載

る。上皮細胞などでアポトーシスが誘導されると、カスパーゼ3によりCK-18は3つの断片に切断され、それら断片の1つである30kDaのCK-18 M30抗原(M30)が血中に流出する。M30抗体はCK-18の断片を認識し、アポトーシスを検出すると考えられている。なお、M5/M6抗体はCK-18の中間部を認識する抗体で、全長および切断片に反応するため、ネクローシスを含む細胞死の検出に用いられる(図4)。

アポトーシスは、不要もしくはDNAに損傷を受けた細胞を迅速かつ効率良く生体から除去するための細胞死であり、細胞の能動死もしくはprogrammed cell deathと呼ばれている。NASHの病態進展には肝細胞のアポトーシスが促進的に作用している。病理学にはしばしばマロリー小体が見られるが、これはCK-18やp62などが不定形の構造物として蓄積したものである。血中M30のバイオマーカーとしての有用性は、健康人とNAFLDの鑑別、さらにNAFLとNASHの鑑別が可能であり⁶⁾、線維化高度例では軽度例に比して有意に高値を示すと報告されている⁷⁾。米国では、NASH Clinical Research Networkに参加する8施設で妥当性確認試験が行われ、CK-18F(M30)がNASHの独立した予測因子となることが示された⁸⁾。

しかし、CK-18FのNASH診断能は高くはないとした、相反する結果も報告されており^{9,10)}、他のバイオマーカーやスコアリングシステム、画像診断との併用によりその診断能の向上を図る報告^{1,2)}や、新たに作製した親和性の高い抗体を用いてCK-18Fを測定した報告もみられる^{11,12)}。一方、血中CK-18Fはアポトーシスが関連した病態、例えば、アルコール関連肝疾患¹³⁾、薬物性肝障害¹⁴⁾、肝細胞癌¹⁵⁾などにおいても測定されている。

IV. イムニス[®] サイトケラチン18F EIA

イムニス[®] サイトケラチン18F EIAは、血清中のCK-18F(M30)を測定する酵素免疫測定法(ELISA)試薬である。測定原理は、抗CK-18マウスモノクローナル抗体固相プレートにCK-18Fを含む検体を加え、HRP標識抗CK-18Fマウスモノクローナル抗体を添加すると、固相化抗CK-18抗体/CK-18F/酵素標識抗CK-18F抗体のサンドイッチ免疫複合体が形成される(1次反応)。洗浄後、酵素基質を添加すると、検体中のCK-18F量に応じて呈色反応が進行する(酵素反応)。反応停止後、吸光度を測定し、標準液で作成した検量線から検体中のCK-18Fの濃度を求める(図5)¹⁶⁾。

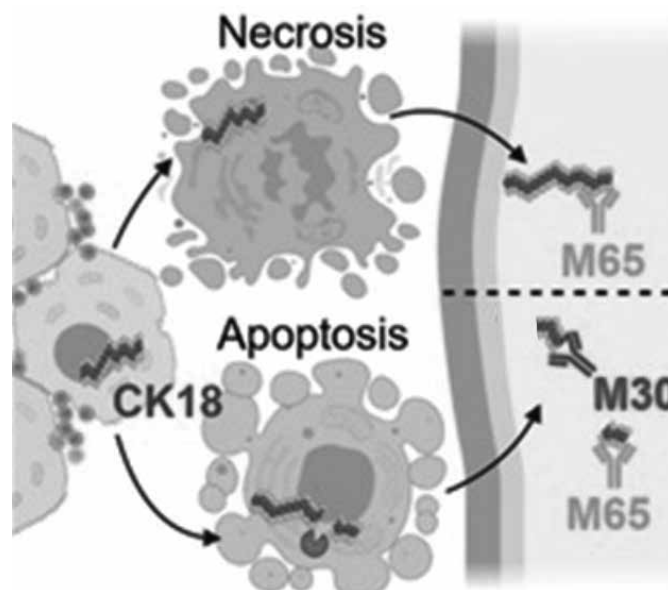


図4. M30およびM65とアポトーシス、ネクローシス
(著者作成)

M30抗体は断片化されたCK-18を認識する抗体で、アポトーシスの検出に用いられる。一方、M5/M6抗体はCK-18の中間部を認識する抗体で、ネクローシスを含む細胞死の検出に用いられる。

(図4は巻末にカラーで掲載しています)

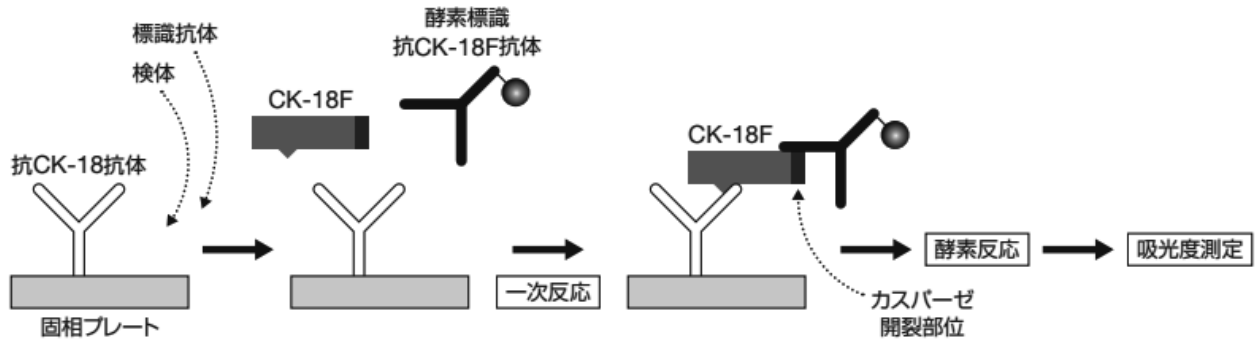


図 5. 測定原理

固相プレートに CK-18F を含む検体を加え、標識抗体を添加すると、サンドイッチ免疫複合体が形成される（1 次反応）。これに酵素基質を添加すると、検体中の CK-18F 量に応じて酵素反応が進行する。最後に吸光度を測定して CK-18F の濃度を求める。

出典：株式会社特殊免疫研究所 イムニス[®] サイトケラチン 18F EIA 添付文書

文献 16) より転載

本法を用いて、日本人を対象とした多施設共同研究が施行され、その研究成果が報告されている。組織学的に証明された NASH 185 例、NAFL 61 例において、CK-18F の中央値は全体、NASH 群、NAFL 群でそれぞれ、432.491、507.695、244.156 U/L であり、NAFL と比較して NASH で高値となることが示された¹⁷⁾。NASH 診断の AUROC（受信者動作特性曲線下面積）は 0.774、CK-18F のカットオフ値は 260 U/L、感度 82.7%、特異度 57.4%であった。この診断能は FIB-4 index と同等であり、感度は IV 型コラーゲン 7S や M2BPGi より高いことが示された（表 1）¹⁶⁾。また、脂肪化や炎症のスコア間では多重比較において関連は乏しかったが、肝細胞の風船様変性および NAFLD activity score (NAS) においてはスコアが進行するほど CK-18F が上昇した（図 6）。CK-18F と FIB-4 index との相関係数は 0.21 と低いことから、CK-18F のカットオフ値を 260U/L、FIB-4 index を 2.67 として

両者を組み合わせて検討すると、NASH 診断の感度、特異度は 88.6%、54.1%であり、FIB-4 index を 1.3 として両者を検討すると、感度、特異度は 95.7%、31.1%であった¹⁷⁾。この結果から、NASH の診断においては図 7¹⁶⁾ に示した診断アルゴリズムが推奨されている。すなわち、FIB-4 index 2.67 以上、または FIB-4 index 2.67 未満でも CK-18F 260U/L 以上であれば NASH の可能性が高く、専門医により肝生検や超音波、MRI によるエラストグラフィが検討されることになる。これらの結果を受けて、イムニス[®] サイトケラチン 18F EIA は、主な使用目的を NASH 診断の補助として 2024 年 1 月に保険収載された。

おわりに

日本には、1,000 万人以上の NAFLD が存在し、現在も NAFLD/NASH の罹患患者数および関連死亡

表 1. イムニス サイトケラチン 18F と他の肝線維化マーカーとの性能比較

検査項目	カットオフ値	ROC曲線 下面積	感度	特異度
イムニス サイトケラチン18F	260 U/L	0.774	82.7%	57.4%
FIB-4 index	1.3	0.776	74.6%	59.0%
IV型コラーゲン7S	5 ng/mL	0.726	59.8%	84.7%
M2BPGi	1.0 C.O.I.	0.604	32.7%	82.8%

文献 16) を参考に作成

者数は増加の一途をたどっている。病態も肝臓関連にとどまらず、全身疾患としてさまざまな病態や死亡原因の増加に関与することが報告されている。したがって、NAFLD においてはその疾患の重要性を理解し、

診断、治療、フォローアップなどの適切な医療介入を行っていく必要がある。今回、保険収載された血中CK-18F は肝細胞風船様変性の出現頻度やNAS と相関し、NASH の診断に有用である。非侵襲的な

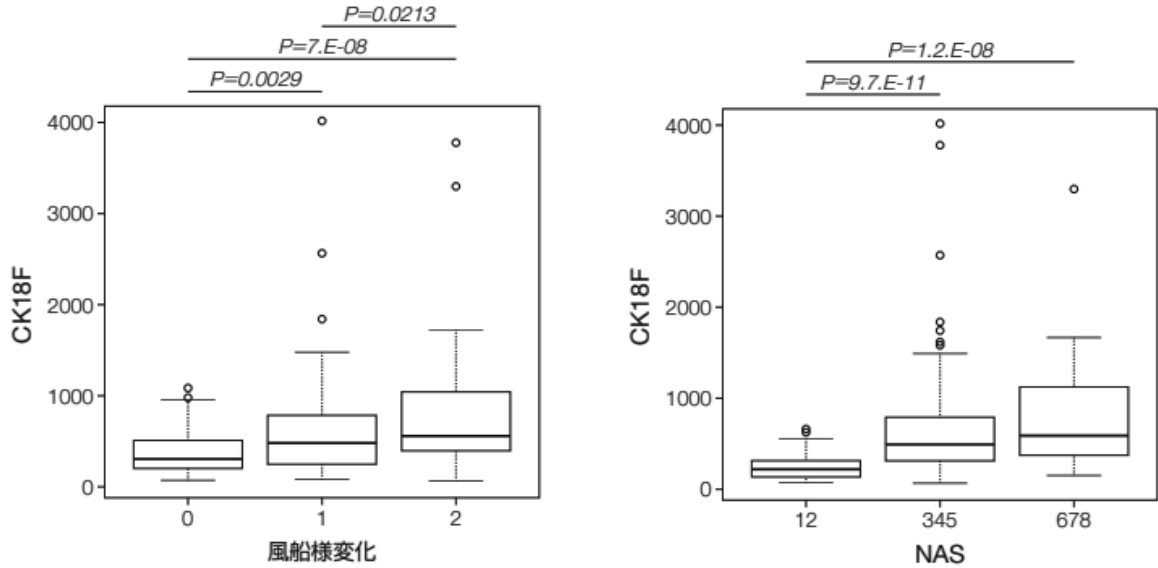


図 6. 組織所見と CK-18F 値の関係

CK-18F は肝細胞の風船様変性の程度や NAFLD activity score (NAS) が進行するほど上昇した。

(株式会社特殊免疫研究所よりご提供いただきました)

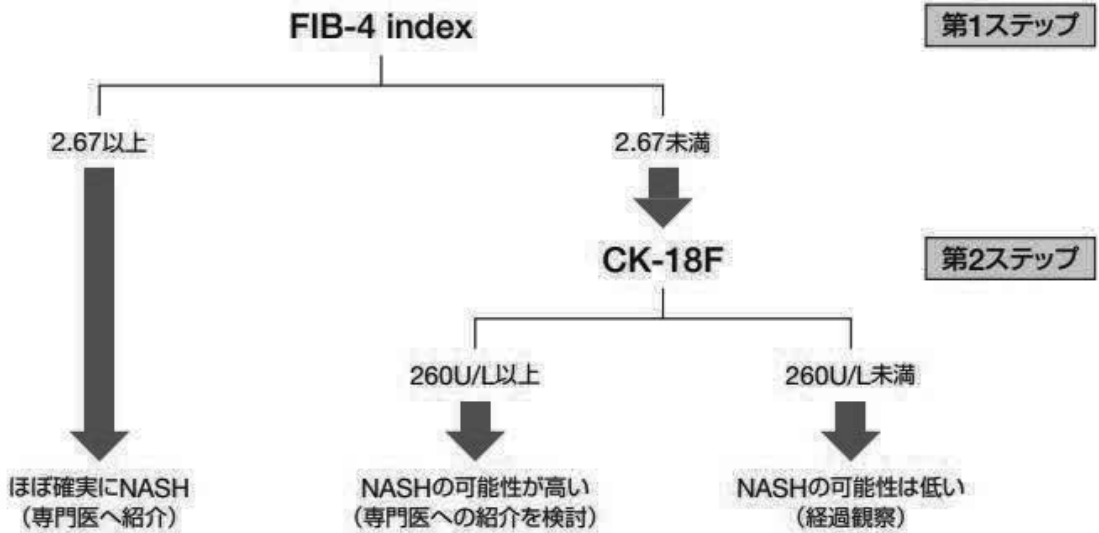


図 7. CK-18F を用いた NAFLD/NASH の診断アルゴリズム

FIB-4 index 2.67 以上、または FIB-4 index 2.67 未満でも CK-18F 260U/L 以上であれば NASH の可能性が高い。

出典：株式会社特殊免疫研究所 イムニス® サイトケラチン 18F EIA 添付文書

文献 16) より転載

NASH 診断法は、肝生検と比較して治療効果判定に用いることが容易なことから、今後イムニス[®] サイトケラチン 18F EIA が NAFLD/NASH の診療に貢献することを期待する。

文 献

- 1) Anty R, Iannelli A, Patouraux S, et al. A New Composite Model Including Metabolic Syndrome, Alanine Aminotransferase and Cytokeratin-18 for the Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32 (11-12): 1315–1322.
- 2) Chuah KH, Wan Yusoff WNI, et al. MACK-3 (Combination of hoMa, Ast and CK18): A Promising Novel Biomarker for Fibrotic Non-alcoholic Steatohepatitis. *Liver Int.* 2019; 39 (7): 1315–1324.
- 3) Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol.* 2023; 79(6): 1542-1556.
- 4) Gilcă-Blanariu GE, Budur DS, Mitrică DE, et al. Advances in Noninvasive Biomarkers for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolites.* 2023; 13(11): 1115.
- 5) 日本消化器病学会・日本肝臓学会編.NAFLD/NASH 診療ガイドライン2020(改訂第2版).2020;XVIII.
https://www.jsge.or.jp/committees/guideline/guideline/pdf/naflnash2020_2_re.pdf
- 6) Miller MH, Ferguson MA, Dillon JF. Systematic Review of Performance of Non-Invasive Biomarkers in the Evaluation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Liver Int.* 2011; 31(4):461–473.
- 7) Kwok R, Tse YK, Wong GL, et al. Systematic Review with Meta-Analysis: Non-Invasive Assessment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease—The Role of Transient Elastography and Plasma Cytokeratin-18 Fragments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(3): 254–269.
- 8) Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, et al. Cytokeratin-18 Fragment Levels as Noninvasive Biomarkers for Nonalcoholic Steatohepatitis: A Multicenter Validation Study. *Hepatology* 2009;50(4): 1072–1078.
- 9) Chan WK, Sthaneshwar P, Nik Mustapha NR, et al. Limited Utility of Plasma M30 in Discriminating Non-Alcoholic Steatohepatitis from Steatosis-a Comparison with Routine Biochemical Markers. *PLoS ONE* 2014; 9, e105903.
- 10) Lee J, Vali Y, Boursier J, et al. Accuracy of cytokeratin 18 (M30 and M65) in detecting non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020; 15(9): e0238717.
- 11) Yamada M, Eguchi A, Okuno K, et al. Development of a highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for fragmented cytokeratin 18 using new antibodies. *Sci Rep.* 2021 ;14; 11: 18187.
- 12) Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, et al. A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as a biomarker reflecting histologic activities of human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Commun.* 2022; 6(8): 1987-1999.
- 13) horhaug KH, Thiele M, Detlefsen S, et al. Serum keratin-18 detects hepatic inflammation and predicts progression in compensated alcohol-associated liver disease. *Hepatol Commun.* 2022; 6(12): 3421-3432.
- 14) Thulin P, Nordahl G, Gry M, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver Int.* 2014; 34(3): 367-378.
- 15) Eguchi A, Iwasa M, Tamai Y, et al. The prognostic potential of fragmented CK18 serum levels in HCC patients reflecting disease progression and overall hepatocyte damage. *Front Oncol.* 2022 23; 12: 993705.
- 16) 株式会社特殊免疫研究所.[「サイトケラチン18フラグメントキット イムニス[®]サイトケラチン18F EIA」イムニスサイトケラチン18F-EIA_E添文_2023年12月改訂_第2版_イM919602Z23.pdf (tokumen.co.jp) (引用2024年2月20日)
- 17) Tada T, Saibara T, Ono M, et al. Predictive value of cytokeratin-18 fragment levels for diagnosing steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 33(11): 1451-1458.

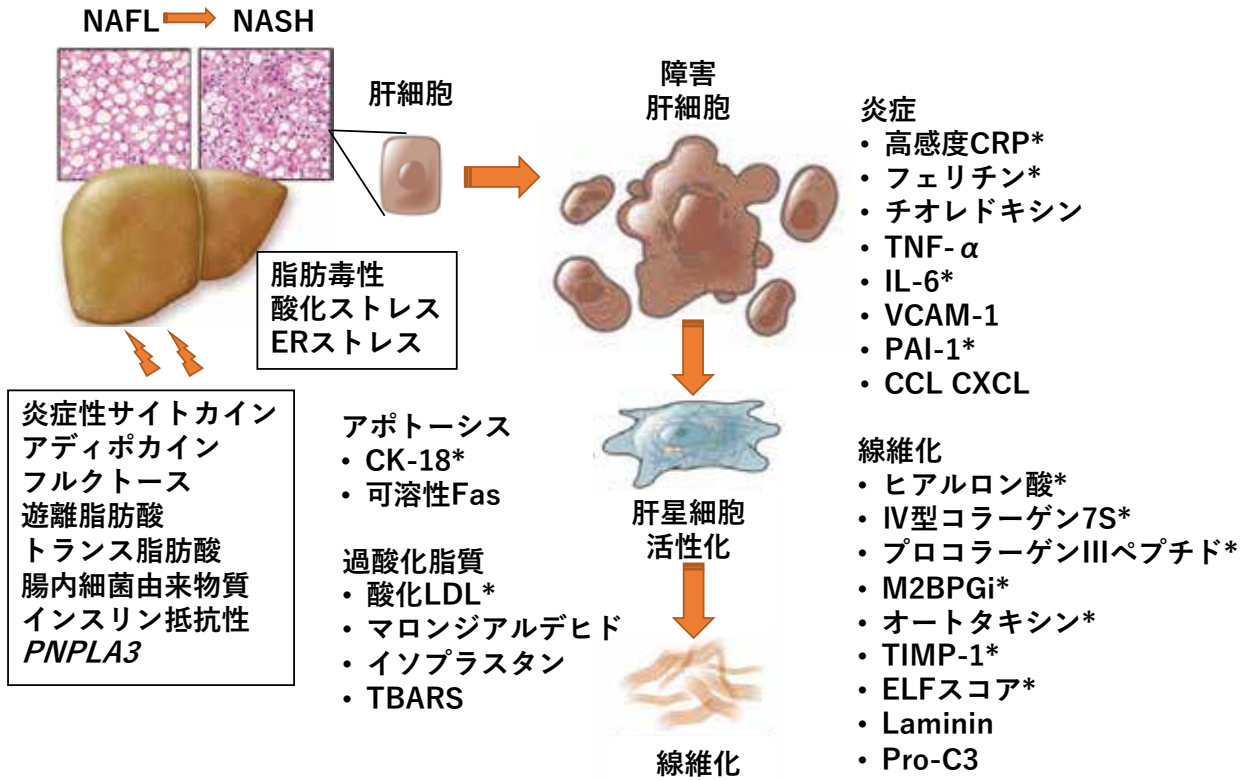


図 2. NAFLD/NASH の病態と主なバイオマーカー
*保険適用 (適応疾患は異なる)

文献 4) を参考に著者作成

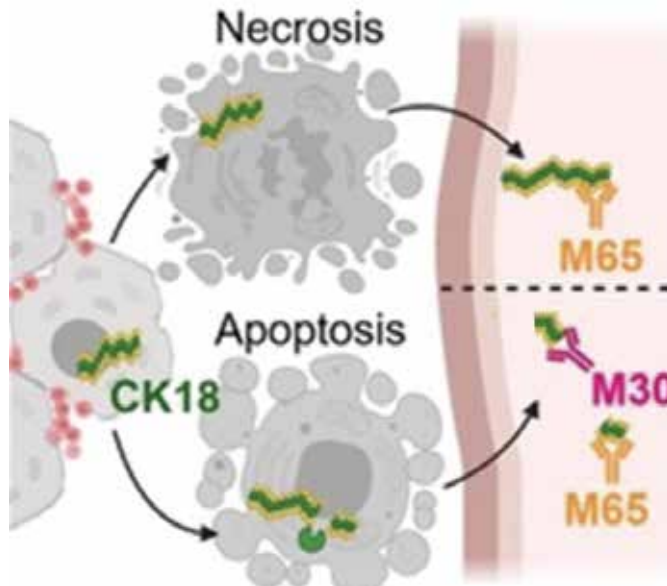


図 4. M30 および M65 とアポトーシス、ネクローシス
(著者作成)

M30抗体は断片化されたCK-18を認識する抗体で、アポトーシスの検出に用いられる。
一方、M5/M6抗体はCK-18の中間部を認識する抗体で、ネクローシスを含む細胞死の検出に用いられる。