

《ノート》

 α -Fetoprotein の Radioimmunoassay に関する検討Studies on Radioimmunoassay of α -feto-Protein

笠井 正樹* 真坂美智子* 佐藤 誠也*

Masaki KASAI, Michiko MASAKA and Seiya SATO

Kitasato Biochemical Laboratories

I. はじめに

血中の α -フェトプロテイン (以下 AFP) は原発性肝癌における特異診断指標として注目されていた¹⁾が、近年になって高感度でしかも定量的に測定できる radioimmunoassay (以下 RIA) が導入されて以来^{2),3)}、原発性肝癌のみならず肝炎、肝硬変、胃癌などでも高値に検出されることが指摘⁴⁾され、その特異性は若干薄らいだものの、上記疾患の経過観察や予後の推定に利用されている。また産科領域においても異常妊娠時の胎児の重要な情報源⁵⁾⁻⁷⁾として、その有用性は高く評価されている。

現在 AFP-RIA kit は数社より市販されており、測定方法もポリエチレングリコールを用いる方法と二抗体法とがある。今回われわれは、 α -フェトプロテイン“栄研”の基礎的検討を試みる機会を得たが、この方法が二抗体法であるにもかかわらず測定日数が1~2日で終了し、再現性にも優れているという結果を得たので報告する。

II. 方 法

1. キットの内容

1 キットは50テスト分で下記のものが含まれて

* 北里バイオケミカル・ラボラトリーズ内分泌部

受付: 52年10月13日

最終稿受付: 53年1月27日

別刷請求先: 相模原市麻溝台1 北里大学病院内 (☎228)

北里バイオケミカル・ラボラトリーズ

内分泌部

佐藤 誠也

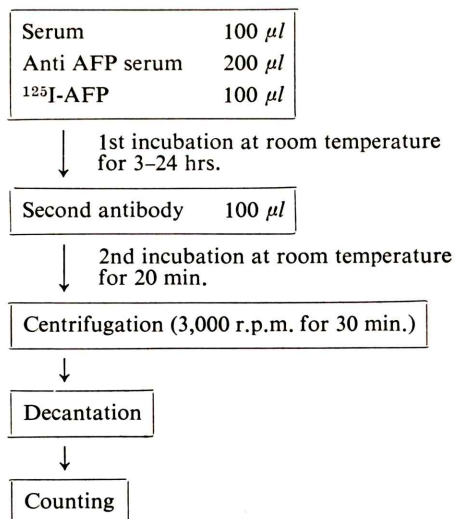
いる (標準曲線用も含む)。

- 1) ^{125}I -AFP (黄色), 放射能濃度 $1\ \mu\text{Ci}$ 以下 $5.4\ \text{ml}$ 1本
- 2) AFP 抗体 (赤色), $10.5\ \text{ml}$ 1本
- 3) 標準 AFP 溶液 $0.5, 10, 20, 40, 80, 160\ \text{ng/ml}$ の各にバイアル
- 4) 第2抗体 (青色), $5.4\ \text{ml}$ 1本

2. 測定手技

第2抗体を B/F 分離剤として用いる RIA 法である。全操作は室温 ($20^{\circ}\sim 30^{\circ}\text{C}$) で行なう。その手技は Table 1 に示した。

Table 1 Procedure of AFP radioimmunoassay



Key words: α -feto-protein, RIA, Second Antibody, Short Time Assay, Primary liver Cancer

3. 測定対象

臨床検討においては、正常者19例、妊婦57例、肝疾患11例、消化器系疾患9例、性腺系疾患7例、総計103例について、その血中AFPを測定した。全ての検体は測定時まで -20°C にて凍結保存した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線と希釈曲線、測定感度：4ロットにわたる標準曲線をFig. 1に示した。AFP濃度が0における時の抗原抗体結合率(B%)は常に75%前後を保ち、他のRIA-kitと比較して高い結合性を示していた。各濃度間におけるB%は、5 ng/ml で $89.9 \pm 2.5\%$ (mean \pm S.D.) 10 ng/ml で $79.8 \pm 3.0\%$, 20 ng/ml で $63.4 \pm 3.2\%$, 40 ng/ml で $47.5 \pm 3.2\%$, 80 ng/ml で $31.5 \pm 2.9\%$, 160 ng/ml で $21.7 \pm 2.7\%$ とよい再現性を示した。同時に測定した自家製プール血清のAFP値も再現性がよかった。

Fig. 2は高濃度AFP血清を測定感度以下に検

出された正常ヒト血清および蒸留水で順次希釈したものである。Normal Serum (○-○)の希釈曲線は標準曲線とよく一致していた。ただし蒸留水で希釈した場合については例数が少ないためさらに検討したい。

測定感度として、標準曲線5 ng/ml以下を描くと抗体過剰域であり、reverse現象を起こしたため5 ng/mlが測定感度と考えられる。

2) インキュベーション時間：まず第2次インキュベーション時間を20分に設定し、1次インキュベーション時間を0, 1, 3, 6, 18, 24, 48時にそれぞれ設定した場合の抗原抗体結合率をFig. 3に示した。AFP濃度が0の場合の結合率は18時間以降で平衡に達しているが、高濃度の場合は3時間で平衡に達していた。次いで第1次インキュベーション時間を6時間に設定し、第2次インキュベーション時間について検討した(Fig. 4)。低濃度、高濃度共にほぼ20分の反応時間で平衡に達していた。

3) 回収率：AFP高濃度血清および低濃度血清に標準AFPを添加し、その回収率をTable 2

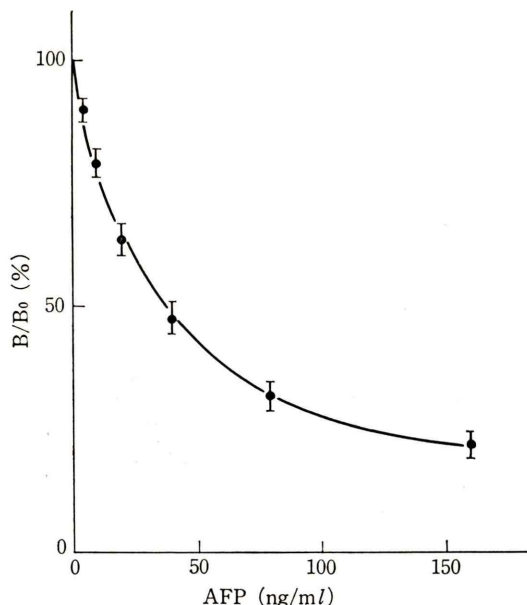


Fig. 1 Standard curve of AFP radioimmunoassay by Eiken-Kit

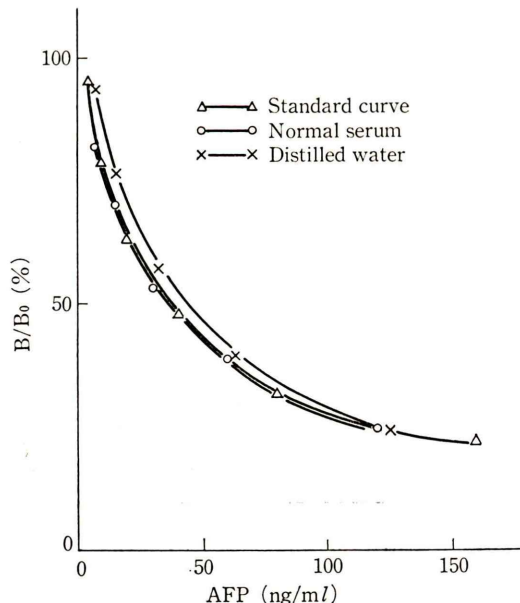


Fig. 2 Dilution curve of high AFP serum with distilled water or normal serum

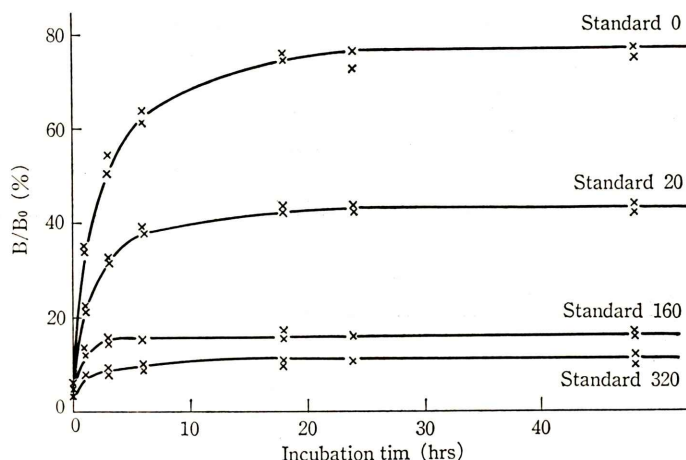


Fig. 3 Effects of 1st incubation time on standard curve at room temperature under the condition of 20 min of 2nd incubation time.

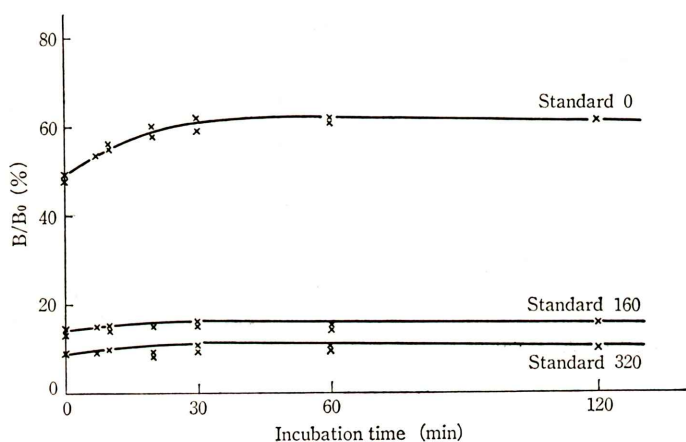


Fig. 4 Effect of 2nd incubation time on standard curve at room temperature under the condition of 6 hrs of 1st incubation time.

Table 2 Recovery of AFP added to normal serum

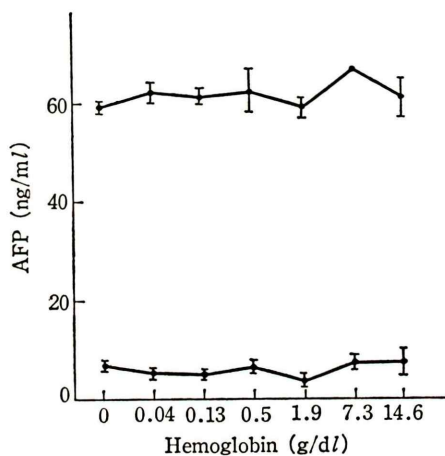
Serum	Calculated values (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Recovery (%)
A	16.0	15.0	92.6
		15.0	92.6
		13.0	80.3
B	64.8	62.0	95.7
		65.0	100.4
		65.0	100.4

に示した。低濃度で $88.5 \pm 7.1\%$ (mean \pm S.D.), 高濃度で $98.8 \pm 2.7\%$ と良好な回収率を示した。

4) 再現性: 同一測定系における AFP 値の変動 (intra assay variation) を AFP 高値, 中値, 低値を示す試料でそれぞれ20回測定して求めた結果, Table 3 のように高値の変動係数 (C.V.) は 17.6%, 中値では 7.6%, 低値では 6.8% であった。また異なるロット番号のキットを用いて, 日を変えて同一検体を20回測定して得た再現性 (inter assay

Table 3 Reproducibility of AFP radioimmunoassay by Eiken-Kit

intrassay variation		(n=20)
Mean	S.D.	C.V. (%)
8.1	1.4	17.6
25.7	2.0	7.6
89.3	6.1	6.8
interassay variation		(n=20)
Mean	S.D.	C.V. (%)
6.8	1.3	18.9
21.0	1.6	7.8
92.9	7.1	7.6

**Fig. 5** Effect of hemolysis on AFP values

variation) も intra assay variation の C.V.% と近似の値を示し、異なるロットでの差は見い出されなかった。

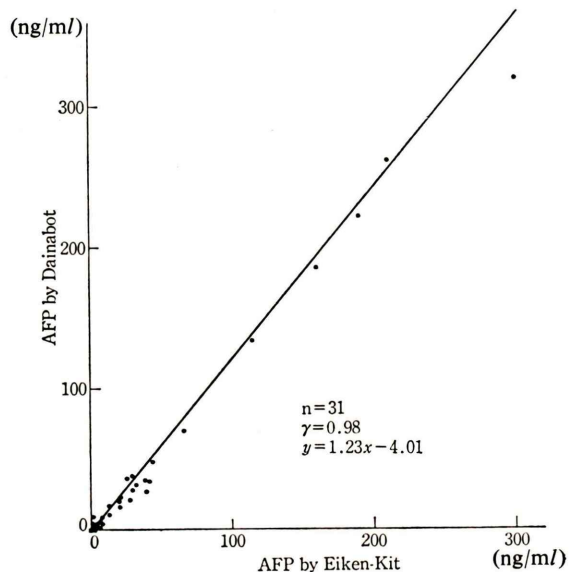
5) 溶血の影響: AFP 高濃度および低濃度血清にヒトヘモグロビンを添加し、各ヘモグロビン濃度の測定値に及ぼす影響を Fig. 5 に示した。高濃度では 61.2 ± 2.4 ng/ml (mean \pm S.D.), 低濃度は 6.1 ± 1.9 ng/ml とヘモグロビンによって測定値が影響をうけることはなかった。

6) 抗凝固剤の影響: AFP 高値、中値の血清にヘパリン、クエン酸、EDTA を添加して測定した結果をまとめたのが Table 4 である。これらの抗凝固剤が RIA の測定系に影響することはなかった。従って、試料は血清、血漿を問わず測定可

Table 4 Effects of various anticoagulator on AFP values

Serum	None	Heparin (1 mg/ml)	Citrate (500 mg/ ml)	EDTA-2K (200 mg/ ml)
Serum-1	49	50	51	53
Serum-2	210	207	210	200

(ng/ml)

**Fig. 6** Correlation between AFP values by Dainabot-Kit and those by Eiken-Kit.

能である。

7) 他法との相関: 第2抗体を B/F 分離剤として用いているダイナボット RI 研究所製の α -フェット kit との相関を Fig. 6 に示した。ダイナボット α -フェットの測定は使用書に従って行なった。相関係数は0.98, 回帰直線は $y=1.23x-4.01$ を示し、両者の間には極めて良好な正の相関がみられた。

2. 臨床的検討

臨床例の RIA 法による AFP の測定結果を Fig. 7, 8 にまとめた。健常人 19 例の血中 AFP 値は 0~8 ng/ml の範囲に分布し、そのうち 9 例は測定感度以下であった。平均値 \pm S.D. は 1.26 ± 2.08 ng/ml であった。妊娠 16 週頃までの AFP 値は著明な変化がないが、20週以降急激な上昇傾向を示

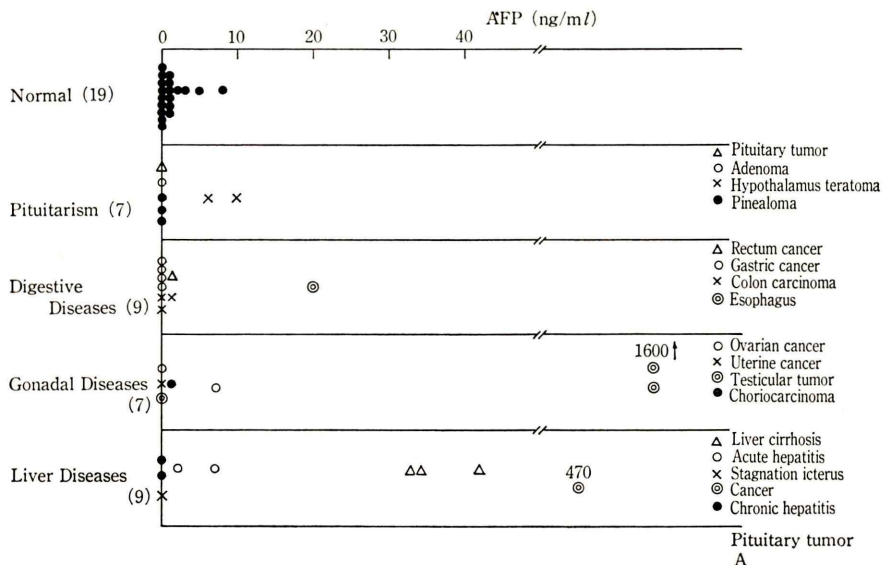


Fig. 7 Serum AFP concentration in normals and patients with various diseases

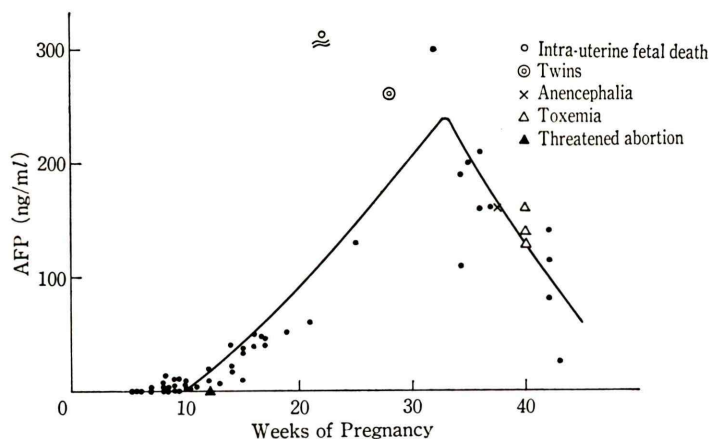


Fig. 8 Serum AFP concentration in normal and abnormal pregnancy

した。消化器系癌疾患のうち 20 ng/ml に検出された 1 例は食道癌の例であった。性腺系疾患 7 例のうち睾丸腫瘍が 3 例あったが、そのうち妊娠反応が陽性であった 2 例において AFP 値が異常高値に検出された。肝疾患 11 例中肝硬変 3 例は全例が異常高値に検出されたが、慢性・急性肝炎 4 例は正常範囲内であった。原発性肝癌 1 例は 435 ng/ml と高値を呈した。これらの臨床成績は従来より報告されている AFP 値とほとんど変わらない

値であると思われる。また脳下垂体系に何らかの障害がある 7 例は全例が正常範囲内であった。

IV. 考 案

RIA法は微量の蛋白質をはじめとする種々の物質を免疫学的な特異性を利用して測定する非常にすぐれた測定方法である。しかし微量の抗原抗体反応であるため、標識抗原の安定性の問題などから低温長時間の反応が必要である。特に第 2 抗体

を B/F 分離剤として用いる 2 抗体法は 2 段階の反応であるため、測定に 2~5 日を要し routine test としての迅速性に欠けるという一面も有している。今回われわれが検討した α -フェト“榮研”は 2 抗体法であるにもかかわらず反応時間が短く、全操作は 24 時間以内に終了する。また標識抗原は一般的に不安定である。その安定度は分子量によって、また化学的性質の差によって異なるが、アンギオテンシン I の例に見られるように反応温度を上昇させることによって damage をうけ、抗原抗体結合率が著しく低下し、測定値の信頼性に欠けるという傾向があった⁸⁾。 α -フェト“榮研”は室温のインキュベーションにも耐え、標識抗原の damage による抗原抗体結合率の低下もなかったことは標識抗原が非常に安定していることを示している。AFP 濃度 0 における抗原抗体結合率は 18 時間の 1 次反応時間で平衡に達し、それ以後も低下することなく持続していた。低~高濃度領域においては 6 時間の反応時間でほぼ平衡に達していた。これは抗体の親和性が高く、従って routine test として用いる場合、1 次反応時間は 6 時間で充分と思われる。長時間に渡る反応時間でも結合率の低下がみられなかったことは測定系が安定していることを意味している (Fig. 4,3)。

RIA による測定の場合、その測定感度や特異性は抗体によっても著しく影響されることはよく知られている。そこで、高濃度 AFP 値を示した試料について蒸留水および測定感度以下に検出された血清を用いて希釈試験を行ってみた。希釈曲線は標準曲線とよく平行一致し、また希釈した場合の理論値と実測値はよく一致し原点を通る直線を描いた。この事実は、本抗体は血清蛋白成分による非特異的干渉をうけることなく測定可能な極めて特異性の高い抗体であることを示唆している (Fig. 2)。

本キットは標準物質があらかじめ希釈調整して添付してあり、測定時に生ずる希釈誤差が抑えてあり、測定間のばらつきを最小限にすることができる。また異なるロットによって生ずるばらつき (inter assay variation) は標準曲線、プール血清共

に小さく、C.V. 約 7~1.9% であった。8 ng/ml 以下の濃度におけるばらつきは多少大きいとも思えるが、RIA の C.V. としてはほぼ満足すべき値と思われる。異なるロットでの測定値に大きい解離がないことは同一患者の経過観察の上で有用性が高い。以上述べたように、希釈試験、標準曲線の再現性などから本法の測定感度は 5 ng/ml といえる。最近、免疫反応が一段階のみの B, F 分離剤としてポリエチレングリコール (PEG) を用いる方法が導入されるようになってきた⁸⁾⁻¹⁰⁾¹¹⁾。PEG 法は時間の短縮という利点があるものの測定時における蛋白量の補正が必要である。AFP PEG 高濃度血清を希釈して測定した場合、 γ -グロブリン濃度が低下するため PEG による沈降能が低下する。従って測定系の γ -グロブリン濃度を一定に保つよう添加することが要求されてくる。このことは血清蛋白の濃度や組成の影響が free の ¹²⁵I-AFP の共沈として現われ、高蛋白血清ではみかけ上やや低値に測定されるということが予想される。以上の点を考慮にいれると反応時間の短縮が可能であれば 2 抗体法による測定方法が、より簡便で信頼性も高いことが推測される。本キットはこの点を解決しているので routine test としての有用性が高いと思われる。

被検体の蛋白濃度による影響や溶血および抗凝固剤の影響もほとんどなく、検体中の AFP を正確にとらえている (Fig. 5, Table 4)。

臨床成績については例数が少ないため明確なことは論じられないが、正常値は 1.26 ± 2.08 ng/ml (mean \pm S.D.) と従来の報告値と比較して低値の傾向を示した。従来血中 AFP の正常値は 20 ng/ml 以下と設定されていたが、最近渡辺ら⁹⁾は 15 ng/ml 以下を、湯本ら¹²⁾は 10 ng/ml 以下を正常値として報告している。われわれの成績からも本キットを使用する場合 10 ng/ml 以下を正常範囲と考え、20 ng/ml 以上に検出された場合は何らかの疾患を疑うことが望ましいと考えられた。正常人に関して特に性差、年齢による影響はなかった。各種疾患における血中 AFP 値の変動や妊娠週数と血中 AFP 値の変動は諸家の成績とよく一致し

ていた。注目すべきことは、食道癌 1 例が高値を呈したことおよび睾丸腫瘍の特に妊娠反応陽性例に血中 AFP 値が高値であったこと、しかも妊娠反応陰性の睾丸腫瘍は低値であったことは興味深い。また各臨床例についてダイナボット RI 研究所製 α -フェト・リア・キットを用いて測定した結果 (Fig. 6), 両者はよく相関していた。

先に述べたように、本キットは従来の 2 抗体法に比較して反応時間がかなり短縮化されていること、調整済の標準物質が添付されているので測定誤差を最小にとどめられること、そして標識抗原、抗 AFP 血清、第 2 抗体が操作ステップによる試薬のとり違いを防止する方策がとられているなど日常検査として普及してゆくための利点を備えていると思われる。

V. ま と め

α -フェト “栄研” に関する検討の機会を得たが、基礎的・臨床的に測定法としての条件を十分に満

足していた。検査結果も迅速に提出でき、かつ信頼性も高いことは従来の方法と比較して優れていると思われた。

最後に本キットを供与して頂いた栄研イムノケミカル研究所に深く感謝致します。

文 献

- 1) Abelev GI, Perora SD, et al: Transplantation **1**: 174, 1963
- 2) 西 信三, 平井秀松: 免疫実験操作法別刷, 免疫学会編; 215, 1971
- 3) 石井 勝, 他: 医学のあゆみ, **79**: 77, 1971
- 4) 赤井貞彦, 加藤 清, 飛田祐吉: 内科; 230, 1972
- 5) 遠藤康夫: 代謝, **12**: 33, 1975
- 6) Brock DJH, Sutcliffe RG: Lancet **2**: 197, 1972
- 7) Seppälä M and Rouslahti E: Lancet **1**: 155, 1973
- 8) 小西奎子, 橋本幸子: 臨床と研究; **54**: 334, 1977
- 9) 渡辺清次, 筒井一哉, 他: 現代医療; **9**: 381, 1977
- 10) 油野民雄, 多田明, 他: 核医学; **14**: 355, 1977
- 11) Desbuquois B and Aurbach GD: J Clin Endocrinol **33**: 732, 1971
- 12) 湯本泰弘, 難波経雄, 他: 臨床成人病; **7**: 767, 1977