

《ノート》

ポリエチレングリコールを利用した RIA による 血中 α -フェトプロテインの測定

Measurement of α -fetoprotein by radioimmunoassay using
polyethylene glycol

飯尾 篤* 阿多まり子* 下岡 麻里* 須本 憲子*
河村 正* 浜本 研**

Atsushi Iio*, Mariko Ata*, Mari Shimooka*, Noriko Sumoto*,
Masashi Kawamura* and Ken Hamamoto**

*Central Radiology Division, Ehime University Hospital,
Faculty of Medicine, Ehime University

**Department of Radiology, Faculty of Medicine, Ehime University

I. はじめに

α -フェトプロテイン(AFP)発見の端緒は、1957年 Bergstrand ら¹⁾が胎児血清中に成人には存在しない蛋白を、電気泳動上 α -グロブリン領域に認めたことに始まる。Abelev ら²⁾は1963年マウスに肝細胞癌を移植すると出現する蛋白が、妊娠中または出産直後のマウスに存在する蛋白と同一であることを発見し、胎児性 α -グロブリンと名づけた。次いで1964年 Tatarinov³⁾は、原発性肝癌の患者血中にもこの蛋白が出現することを報告した。1970年 Ruoslahti ら⁴⁾は、radioimmunoassay (RIA) を用いて AFP を高感度で測定することに成功し、現在では原発性肝癌のほか、奇形腫、yolk sac tumor、胎児奇形の診断や、これら腫瘍の進行度、治療効果の判断に、RIA による AFP の測定が広く利用され、数社からキットが発売さ

れている。最近第2抗体の代わりにポリエチレングリコールを用いて、抗原抗体結合物を沈降させる比較的簡便、迅速な AFP 測定用キットが、英国 Amersham 社にて製造され、科研化学社から販売され、今回その基礎的ならびに若干の臨床的検討を行なう様会を得たので、その結果を報告する。

方 法

- 1) キットの組成 (44検体用)
 - i) ^{125}I 標識 AFP 4 μCi
 - ii) 抗 AFP 血清
 - iii) 標準 AFP : 0, 20, 50, 100, 200, および 400 ng/ml, 精確な濃度はロットによって若干違うのでバイアルに表示されている。以上の試薬は凍結乾燥されてバイアルに入っている。
 - iv) ポリエチレングリコール液 110 ml
 - v) 標準曲線作製用グラフ用紙およびデータ記録用紙
 - vi) 説明書
- 2) 測定原理
一定量の抗 AFP 抗体に検体中の AFP と ^{125}I -

* 愛媛大学医学部附属病院中央放射線部

** 愛媛大学医学部放射線科

受付: 54年6月26日

最終稿受付: 54年8月27日

別刷請求先: 愛媛県温泉郡重信町大字志津川 (☎791-02)

愛媛大学医学部附属病院中央放射線部

飯 尾 篤

Key words: α -fetoprotein, RIA, polyethylene glycol, kit

AFP が競合的に結合し、非標識 AFP が多いほど抗体と結合する ^{125}I -AFP は少なくなる。つまり、結合する ^{125}I -AFP の割合は、検体中の AFP の量と逆比例的関係になる。反応後ポリエチレングリコール液を加えることによって、結合物を沈殿させ、遠心によって生じた上清を捨て、沈渣の放射能を測定する。検体の代わりに AFP の量がわかっている標準血清を用いて同様に処理して得た放射能と AFP 量から標準曲線を描き検体中の AFP 量を求める。

3) 測定操作

0 濃度の標準 AFP の入ったバイアルには蒸留水を 5.0 ml, その他の標準 AFP バイアルには 1.0 ml を加えて、室温で溶解させる。抗 AFP と ^{125}I -AFP の入ったバイアルには、おのおの蒸留水 10.5 ml ずつを加えて溶解させる。全ての反応液は室温に放置して溶液の温度を室温にしておく。

試験管に標準血清または AFP 濃度の未知の検体 100 μl を採り、次に ^{125}I -AFP および抗 AFP を 100 μl ずつ加え、攪拌混合後、室温で 18 ~ 24 時間インキュベートする。ポリエチレングリコール液 1 ml を加え、攪拌混合し、1,500 g 10 分間遠心し、上清を捨て、沈渣中の放射能をガンマカウンターで測定する。以上は全て duplicate で行なう。既知 AFP 濃度の標準血清から得た放射能と、AFP 値から標準曲線を描く。この曲線を用いて未知濃度の検体から得た放射能より、AFP 値を読み取る。なお、AFP 値が 400 ng/ml より高い場合は、検体を AFP 濃度 0 の標準血清で希釈して測定する。

4) 測定対象

コントロール血清は、健常人のプール血清および栄研化学社の NMS-IIa を用いた。患者血清は愛媛大学医学部附属病院に入院中または外来に通院中の肝疾患を主とする種々の疾患患者 75 例から、および正常血清は健常人 18 例からそれぞれ採血し、血清分離後、通常測定時まで -20°C で保存し、測定時に融解して使用した。交叉反応の検討のため、ミドリ十字社の CEA 測定用キットの標準 CEA, 第一 RI 研究所の β_2 -microglobulin 測定用キット

の標準 β_2 -microglobulin を用いた。

4) 基礎的検討

i) インキュベーション温度：正常 AFP 値を示したコントロール血清 2 種、および高値を示すコントロール血清を用い、インキュベーション温度を 4°C , 25°C および 37°C と変えて AFP 値を測定した。

ii) インキュベーション時間：インキュベーション温度の検討で使用したのと同じ血清を用い、インキュベーション時間のみを 6, 12, 18 および 24 時間と変えておのおの AFP 値を求めた。

iii) 交叉反応性：標準 AFP を用いた測定と並んで、下記の血清を検体の代わりに用いて測定した。すなわち HB 抗原強陽性を示した患者血清を AFP 0 を示したプール血清で、2, 4, 8 倍に希釈したもの、CEA 測定用キットの標準 CEA 320, 160, 80 および 40 ng/ml を示すもの、 β_2 -microglobulin 測定用キットの標準 β_2 -microglobulin 96, 48, 24 および 12 ng/ml を示すものを測定した。なお、標準 CEA, β_2 -microglobulin は、いずれも凍結乾燥されてあるものを、AFP 値 0 を示したプール血清で溶解して使用した。

iv) 希釈試験：AFP 高値を示した患者血清を AFP 濃度 0 の標準血清で、1, 4, 8 および 16 倍に希釈して AFP を測定した。

v) 回収率試験：4 種類の患者血清 50 μl に濃度の異なる 3 種類の AFP 用標準血清 50 μl を加え、おのおの血清中の AFP を測定した。実測値から AFP の回収量を求め、加えた既知の AFP 量で除して回収率を求めた。

vi) 再現性：2 種類のコントロール血清を同時に おのおの 7 回測定し、変動係数を求めた。また同じ血清を 9 回および 6 回別の機会に測定して変動係数を求めた。

vii) 他キットによる測定値との比較：本キットとダイナボット社製の 2 抗体法を用いるキットの両者を用いて、40 種類の患者血清を同時に測定し、相関関係を検討した。

5) 臨床的検討：本キットを用いて各種肝疾患、奇形腫、yolk sac tumor, 種々の悪性腫瘍および

その他の疾患患者の血清 AFP 濃度を測定し、健常人における値と各疾患群における値や、疾患群相互間の比較も行なった。健常人および各疾患群における AFP の平均は幾何平均値を用い、平均値の有意差検定には Welch の t-test を用いた。

III. 結 果

基礎的検討

i) インキュベーション温度 (Fig. 1) : AFP の濃度の違う 3 種類の血清は全て、温度が高いほ

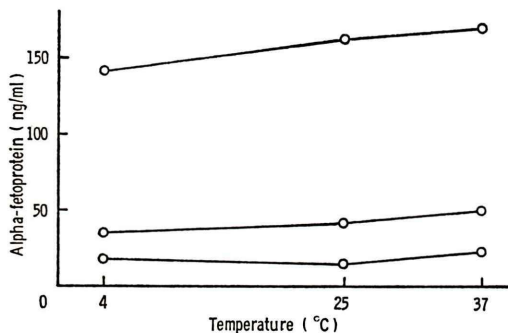


Fig. 1 Effect of incubation temperature on AFP measurement.

ど、AFP 値も高くでる傾向がみとめられた。37°C での値は 4°C に比較して 21%~43% 高くなった。

ii) インキュベーション時間 (Fig. 2) : 6 時間から 24 時間のインキュベーション時間の範囲では、AFP 値の増減に一定の傾向は認められなかった。

iii) 交叉反応性 (Fig. 3) : AFP の量を増やすとポリエチレングリコールによる沈渣中の放射能量は減少したが、HB 抗原、CEA、および β_2 -micro-

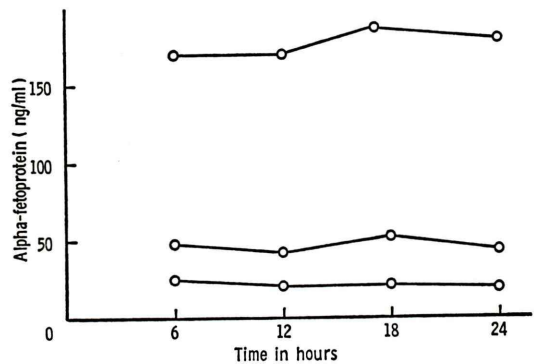


Fig. 2 Effect of incubation time on AFP measurement.

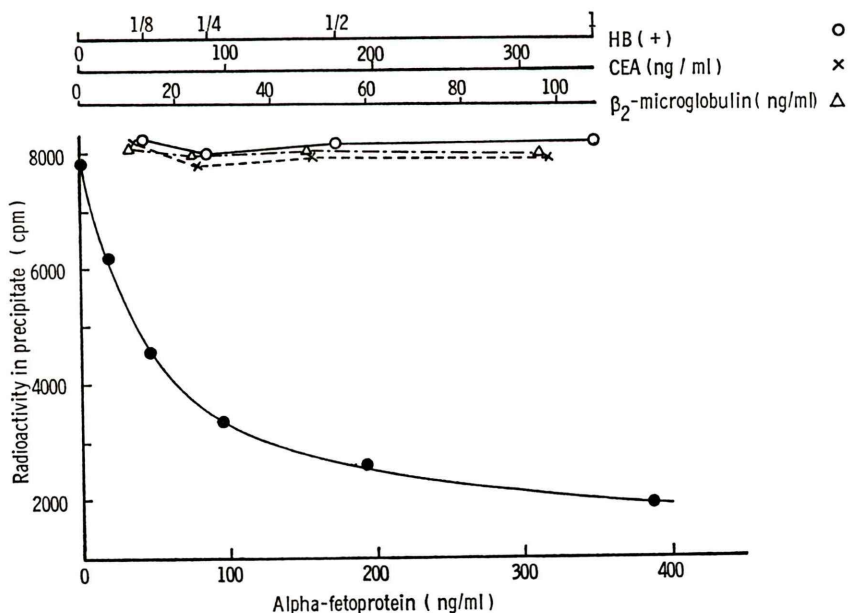


Fig. 3 Cross reactivity by various antigens in the radioimmunoassay system for AFP.

globulin を種々の濃度で加えても、沈渣中の放射エネルギーは 0 濃度の AFP を加えた場合の放射エネルギーと

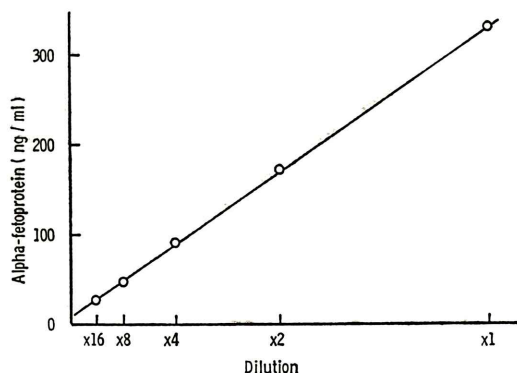


Fig. 4 Dilution test by serial dilution of a patient's serum with high AFP level.

Table 1 Recovery Test

Patient's serum (ng)	Standard serum added (ng)	Measured value (ng)	Recovery (%)
1.45	1.0	2.4	95
	2.45	3.7	92
	4.85	6.4	102
0.8	1.0	1.8	100
	2.45	3.0	90
	4.85	5.5	97
0.75	1.0	1.7	95
	2.45	3.3	104
	4.85	5.4	96
0.05	1.0	1.1	105
	2.45	2.4	96
	4.85	4.9	100

常にほぼ等しかった。なお、本キットによる原血清の AFP の測定範囲は約 5 ng/ml から 400 ng/ml であった。

iv) 稀釈試験 (Fig. 4): AFP 高値を示した患者血清を稀釈して測定した AFP 値と稀釈値の plot は、ほぼ直線的な関係を示した。

v) 回収率試験 (Table 1): 4 種類の患者血清に、おのおの 3 種類の既知量の AFP を加えて測定した値から回収率を求めた結果は、Table 1 に示すように 92%~105% に分布し、その平均は 98% であった。

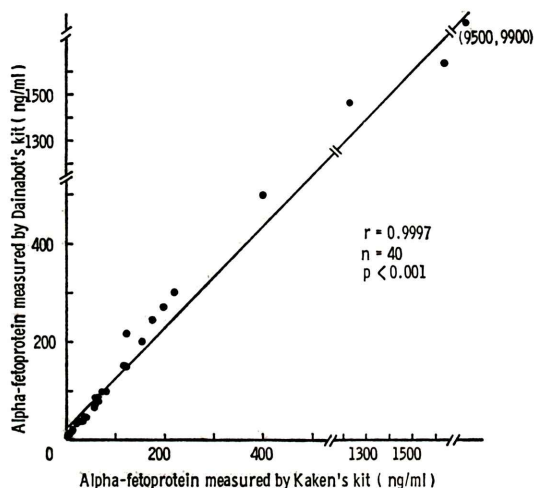


Fig. 5 Relationship of AFP values in sera of patients with various diseases measured by Kaken's and Dainabot's kit. Equation of the linear regression is $Y = 1.04X + 21$.

Table 2 Reproducibility

Intra-assay				
Control serum	Number of measurement	Mean value (ng/ml)	Standard deviation	Coefficient of variance (%)
A	7	62.1	2.5	4.0
B	7	69.3	1.5	2.2
Between-assay				
Control serum	Number of Measurement	Mean value (ng/ml)	Standard deviation	Coefficient of variance (%)
A	9	64.3	3.2	4.9
B	6	70.1	5.1	7.3

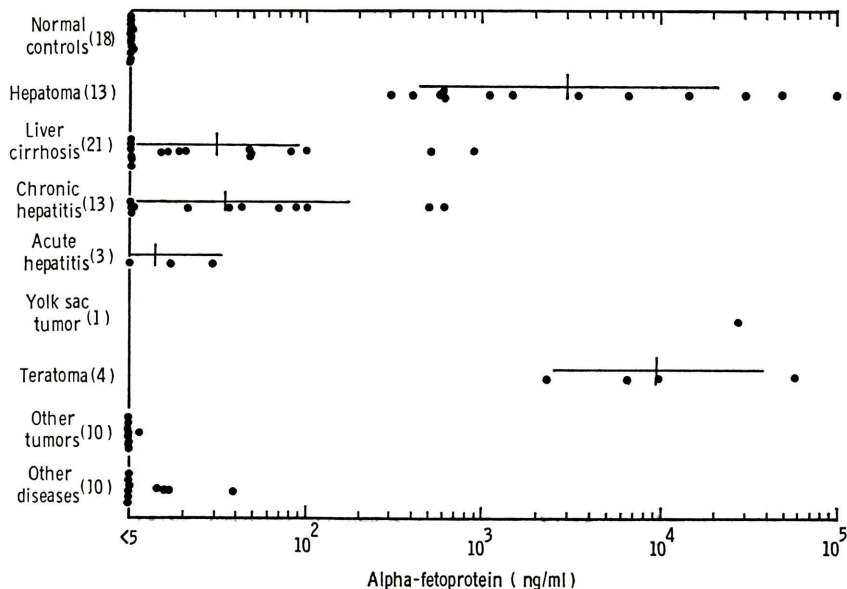


Fig. 6 AFP values in serum of patients with various disease groups and of healthy controls.
Horizontal bar represents geometric mean \pm S.D.

vi) 再現性 (Table 2): 2種類のコントロール血清を同じ機会におおの7回測定した場合の変動係数は、4.0%および2.2%であった。また、これら血清を別の機会に9回および6回測定した場合の変動係数は、おおの4.9%および7.3%であった。

viii) 他のキットによる測定値との比較 (Fig. 5): 40種類の患者血清を本キットと他社のキットとで測定し、その測定値の関係を検討した結果は、相関係数 0.9997 であって、危険率 0.1% 以下と推計学的に高度に有意な正の相関関係が認められた。

臨床的検討 (Fig. 6)

健常人のAFP値は、18例中17例は全て 5 ng/ml 以下、1例は 9.2 ng/ml を示した。一方原発性肝癌 13例の幾何平均は 2,993 ng/ml で、健常人に比べ著しい高値を示し、推計学的にも高度の有意差がみられた。21例の肝硬変症においても多くの症例は高値を示し、その平均は 20.2 ng/ml であって、健常人に比べ有意な高値が認められた。13例の慢性肝炎においても AFP 値は健常人に比べ明らかな高値を示す例が多く、その平均は 34.3 ng

/ml であって、有意な高値が認められた。3例の急性肝炎中2例において、AFP は健常人の平均値に比べて高値を示し、3例の平均は 13.6 ng/ml と有意な高値が認められた。Yolk sac tumor 1例における AFP は 28,000 ng/ml と著しい高値を示した。4例の奇形腫においては全例 AFP は著しい高値を示し、その平均は 9,800 ng/ml であった。しかし肺癌、食道癌、胃癌、直腸癌、Grawitz を含む10例の悪性腫瘍疾患における AFP は、胃癌疾患で 11.6 ng/ml を示したほかは全て 5 ng/ml 以下であって、健常人との間に有意差が認められなかった。胆道系疾患、糖尿病を含むそのほかの疾患患者10例における AFP は、軽度高値を示した5例を除いて全て 5 ng/ml 以下であり、その平均は 9.7 ng/ml であった。

VI. 考 案

本キットの特徴は、ポリエチレングリコールで抗原抗体結合物を沈降させるため、第2抗体法を用いる他のキットのようにインキュベーションを2回行なう必要がなく、1回のみでよいので比較

的短時間で結果が得られることである。インキュベーションは室温で行なうが、温度を 4°C から 37°C に変化させて AFP を測定したところ、温度が高いほどその値は高くなる傾向がみられた。しかし、その増加の程度は少なく、測定中全ての検体を同様に扱う限り、測定誤差を生じることはないと考えられる。インキュベーション時間についても、われわれの検討した 6 時間から 24 時間の範囲では測定値はほぼ同じであり、少なくとも 6 時間で反応は十分平衡状態に達しているものと考えられ、測定を急ぐ必要があれば、インキュベーション時間は説明書の 18 時間ないし 24 時間としなくて 6 時間でもよいと考えられる。

次に、本キットの特異性を、HB 抗原、CEA および β_2 -microglobulin を用いて検討したが、これらの濃度を増やしても全く AFP の測定系に影響を及ぼさなかったことから、少なくともこれら抗原が患者血清中に高濃度に存在しても、AFP 値には影響を及ぼさないことになり、本キットは、AFP を特異的に測定できると考えられる。また、高 AFP 値を示した患者血清を順次稀釈して AFP を測定したところ、その測定値は計算値とよく一致し、測定精度も良好と考えられる。回収率、再現性についても満足すべきものであった。本キットと第 2 抗体法を用いる他のキットとで同一血清を測定して求めた相関係数は、0.9997 と高度に有意な正相関が認められ、従来のキットに代わって本キットが使用できることが判明した。最後に、種々の疾患について本キットを用いて AFP を測定したが、原発性肝癌、yolk sac tumor および奇

形腫で一般に著しい高値が認められ、肝硬変症、慢性肝炎、急性肝炎の多くの例でも高値が認められ、これらは従来から報告されているものと類似の結果であった。

結 論

ポリエチレングリコールを使用した AFP 測定用キットに関する基礎的検討、ならびに若干の臨床的検討を行なった。本キットは、室温で 1 回のインキュベーションで AFP が測定でき、操作が簡便で、比較的短時間で結果が得られる。測定精度、特異性、他キットによる値との相関も良好であった。健常人、各種肝疾患、奇形腫、yolk sac tumor、各種悪性腫瘍疾患、およびその他の疾患における血清 AFP 値を測定し、従来からの報告と同様の結果を得た。

終わりにキットを提供された科研化学株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) Bergstrand CG, Czar B: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scan J Clin Lab Invest* 8: 174-179, 1956
- 2) Abelev GI, Perova SD, Khramkuva NI, et al: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1: 174-180, 1963
- 3) Tatarinov Y: Detection of embryospecific α -globulin in the blood sera of patients with primary liver tumors. *Vopr Med Khim* 10: 90-91, 1964
- 4) Rouslahti E, Seppala M: Studies of carcino-fetal proteins. III Development of a radioimmunoassay for α -fetoprotein: demonstration in serum of healthy human adults. *Int J Cancer* 8: 374-383, 1971