

《ノート》

Protein A を用いた α -fetoprotein 測定用 RIA kit “リアグノスト AFP-タキソルブ” の基礎的ならびに臨床的検討Fundamental and Clinical Evaluation of RIAGNOST AFP—Tachisorb kit for Radioimmunoassay of α -fetoprotein高坂 唯子* 野口 正人** 福田 善弘***
中野 博*** 森田 陸司* 鳥塚 莞爾**Tadako KOUSAKA*, Masato NOGUCHI**, Yoshihiro FUKUDA***,
Hiroshi NAKANO***, Rikushi MORITA* and Kanji TORIZUKA**

*The Central Clinical Radioisotope Division

**Department of Nuclear Medicine,

***and The 2nd Division of Internal Medicine

I. 緒 言

1956 年, Bergstrand¹⁾ らにより報告されたヒトの α -fetoprotein (AFP) は分子量約 7 万の糖蛋白を含む胎児性蛋白である。

1963 年, Abelev²⁾ らはマウス移植性肝癌が AFP を産出することを報告し, 1964 年には Tatarinov³⁾ が原発性肝癌のヒト血清中に大量の AFP が含まれていることを報告した。1972 年⁴⁾ にラジオイムノアッセイによる AFP 測定が可能になって以来, AFP 測定は肝疾患特に原発性肝癌の診断法として重要視されている。

現在, 多種類の測定キットが市販されているが, 今回, われわれはヘキスト社により開発されたリアグノスト AFP-タキソルブキットを入手し, 若干の検討を加えたので報告する。

* 京都大学医学部附属病院放射線部

** 同 核医学科

*** 同 第二内科

受付: 57 年 6 月 24 日

最終稿受付: 57 年 8 月 6 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院放射線部

高坂 唯子

II. 測定原理と測定方法

本法の測定原理は抗原抗体反応によるラジオイムノアッセイ法であるが, その特徴は BF 分離剤に黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) Cowan I 株菌の菌体成分である protein A の Fc-receptor 部分と第 2 抗体を結合させたものを用いている点である。

すなわち, 1940 年に Verway⁵⁾ がブドウ球菌に特異的抗原が存在することを報告し, 1959 年に Jensen⁶⁾ は同一のものに Antigen A と名づけた。この Antigen A は諸種の血清と寒天ゲル内沈降反応を起こすことが認められ, 後に免疫グロブリンとの反応であることが明らかになった。この Antigen A は Cowan I 株菌に最も多量に含まれているが, 現在, 単離生成が可能となり Protein A (分子量 41,000) と名づけられている。前述の沈降反応はこの Protein A の Fc-receptor 部と IgG との結合であるとされている。

本キットでは Fig. 1 の模式図に示すように

Key words: Radioimmunoassay, α -fetoprotein, Hepatoma, Cancer, Tumor marker.

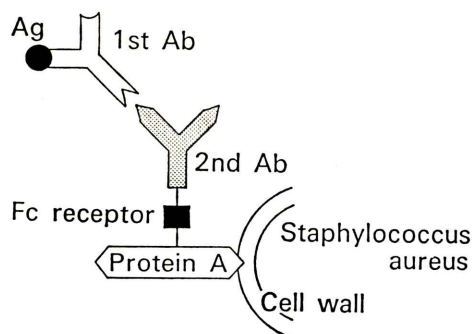


Fig. 1 Schema of Ag-Ab complex in bound fraction of RIA-gnost-Tachisorb assay.

Kessler⁷⁾の方法に基づいて作成された Cowan I 株菌の菌膜に存在する protein A の Fc-receptor 部に第2抗体を結合させて用いている。この方法によると、ブドウ球菌膜を含めて用いるため BF 分離の際の沈澱物の量を多く、かつ安定なものにできるという利点がある。

本キットによる測定方法は以下の通りであり、その概要⁸⁾を Fig. 2 に示す。

1) 標準血清または被検血清 100 μ l を各試験管に入れる。

2) 125 I-標識 AFP を各 200 μ l ずつ加える。

3) 抗 AFP 血清を各 200 μ l ずつ加える。

4) 全試験管を振盪混和した後、室温 (25°C) で24時間インキュベイトする。

5) インキュベーション後、タキソルブを各 500 μ l ずつ加える。

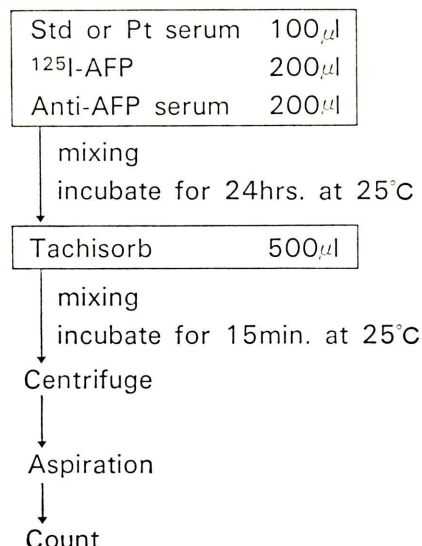
6) 全試験管を振盪混和した後、室温で15分間インキュベイトする。

7) インキュベーション後 4°C で 3,000 rpm (1,000 g 以上) 20分間遠心分離を行う。

8) 上清を吸引除去し、沈渣の放射エネルギーを測定する。

9) 標準品の結合カウントより標準曲線を作成し、未知の検体の AFP 濃度を読み取る。

注：タキソルブとは Kessler の方法に基づいて作成された Cowan I 株菌膜およびその菌体成分の protein A (カルビオケミカル社製商品名



Tachisorb : Pansorbin (Calbiochem)
+ Second antibody

Fig. 2 Assay procedure of RIA-gnost AFP-Tachisorb Kit.

Pansorbin) と第2抗体を結合させたものの商品名である。

III. 実験方法と対象

本キットに関する基礎的な検討項目として(1)インキュベーション条件、(2)希釈試験、(3)回収試験、(4)再現性、などについて検討し、また γ -グロブリンが測定系に及ぼす影響をみるため、1 mg, 1.5 mg および 2.5 mg/tube の γ -グロブリンを標準品に添加して PEG 法、タキソルブ法の両方で回収率をみた。また他の測定法との比較にはヘキスト社のリアグノスト AFP キット (PEG 法) およびダイナボット RI 研究所の AFP リアキット (2 抗体法) を用いた。

測定対象は、健康人29例、および肝生検または剖検にて確定診断された肝炎29例、肝硬変20例、原発性肝癌36例、外科手術または内視鏡生検にて確定診断された、膵癌10例、胃癌22例、食道癌6例の計152例における AFP 値を測定した。

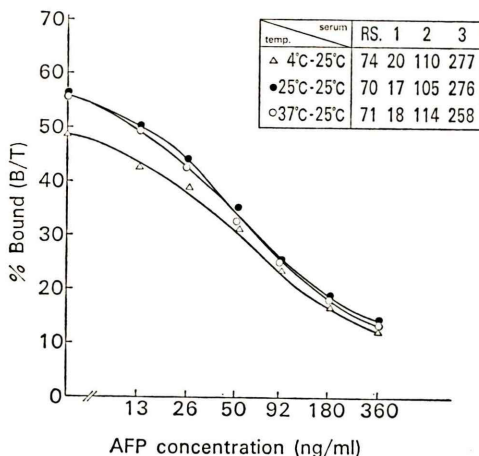


Fig. 3 Effect of temperature in first incubation on standard curve.

IV. 結 果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション条件

キットの使用説明書によるとインキュベーションの条件は、温度については17~25°C、時間については第1インキュベーションは3~24時間、第2インキュベーションは15分以上とされている。そこで第1インキュベーション時間を24時間、第2インキュベーション時間を15分間として、異なった温度条件における標準曲線ならびにキット添付の管理血清 (RS) および3種類の血清試料の測定値について検討した。Fig. 3 に第2インキュベーション温度を25°Cにして第1インキュベーションを4°, 25° および37°Cで行ったときの標準曲線とコントロール血清の値を示した。4°Cの場合には若干結合率 (B/T %) が低かったが、25°C, 37°Cの標準曲線は平行した。おのおのの標準曲線で読み取ったコントロール血清の値は、いずれの条件でもほぼ同一であった。そこで、第1インキュベーション温度を25°Cにして第2インキュベーション温度を4°, 25° および37°Cとした場合の標準曲線とコントロール血清の値をFig. 4に示した。いずれの標準曲線も一致しており、各種コントロール血清の値もほぼ同一であった。

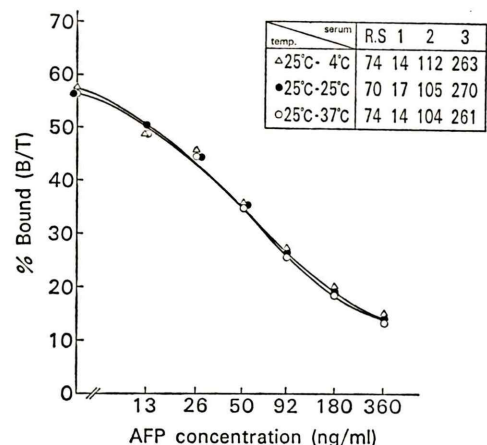


Fig. 4 Effect of temperature in second incubation on standard curve.

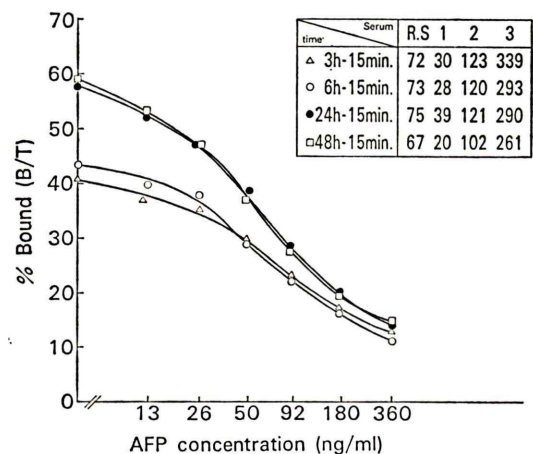


Fig. 5 Effect of first incubation time on standard curve.

以上の結果より、以後の検討は第1インキュベーション、第2インキュベーション温度とも25°Cで行った。次に第2インキュベーション時間を15分間にして、第1インキュベーション時間を3, 6, 24および48時間で行った場合の各標準曲線とコントロール血清の値をFig. 5に示した。

インキュベーション時間が3および6時間では、結合率が低く標準曲線の勾配は緩やかであったが、24および48時間の場合には両者とも平行した急峻な勾配の標準曲線が得られた。

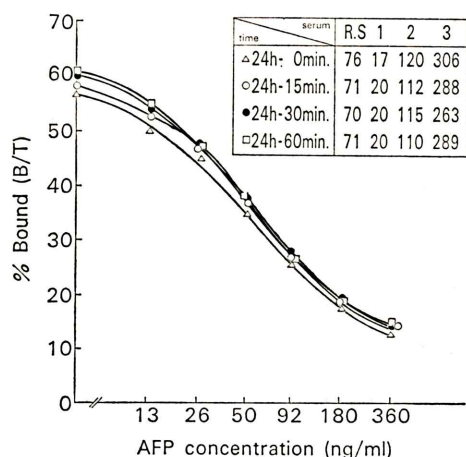


Fig. 6 Effect of second incubation time on standard curve.

コントロール血清の値は、48時間で各濃度とも、若干低く出る傾向が認められた。そこで第1インキュベーション時間を24時間にして第2インキュベーション時間を、タキソルブ添加直後、15、30および60分とした場合の標準曲線とコントロール血清の値を Fig. 6 に示した。

標準曲線は添加直後での結合率は全体にやや低かったが4者ともほぼ平行しており、コントロール血清の値にも著差は認められなかった。

以上の結果より、以後の検討は第1インキュベーション24時間、第2インキュベーション15分で行った。

2) 希釈試験

希釈試験は AFP 濃度高値を示した患者血清3例についてキット添付の検体希釈剤で16倍まで倍々希釈を行った。その結果を Fig. 7 に示した。

いずれの希釈曲線も直線性を示した。

3) 回収試験

AFP 濃度4および19 ng/mlの患者血清に25、46、90、180 ngの標準品を添加して回収試験を行った結果を Table 1 に示した。

各添加量における回収率は88.0~113.0%の間で平均回収率は104.9%であった。

4) 再現性

Table 2 に intra-assay および inter-assay にお

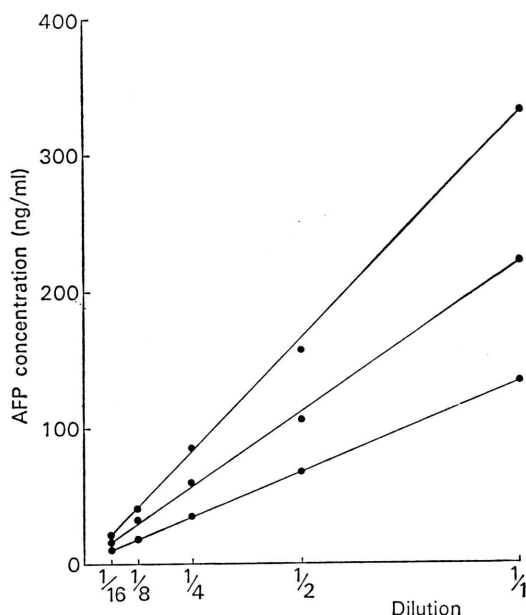


Fig. 7 Dilution curve.

ける各種血清試料の測定結果を示した。

同一キット内で10回行った intra-assay の測定値の平均値と標準偏差は 19.8 ± 1.0 , 116.3 ± 4.6 および 276.7 ± 17.6 ng/ml であり、それぞれの変動係数は5.2, 4.0 および 6.4%であった。また異なったキット間において10回行った inter-assay での管理血清および各種血清試料の測定値と標準偏差はそれぞれ 76.6 ± 3.1 , 20.0 ± 1.9 , 118.8 ± 7.1 および 289.2 ± 20.7 ng/ml で、その変動係数は4.1, 9.7, 5.9 および 7.2%であった。

5) γ -グロブリン添加回収試験

次に γ -グロブリンが測定系に及ぼす影響を PEG 法、タキソルブ法の両法について検討した結果を Fig. 8 に示した。

PEG 法における測定値は用いた標準品46 ng/ml に対して、42~45 ng/ml, 90 ng/ml で 77~71 ng/ml, 180 ng/ml で 148~121 ng/ml と高濃度になればなるほど実測値が低値を示した。それに対してタキソルブ法では46 ng/ml に対して実測値46~49 ng/ml, 90 ng/ml に対して90~92 ng/ml, 180 ng/ml に対して各170 ng/ml と、用いた標準品濃度とほぼ同程度の測定結果が得られた。

Table 1 Recoveries of added AFP

		AFP added (ng/ml)				
		0	25	46	90	180
Serum 1	measured (ng/ml)	19	41	68	109	201
	recovered (ng/ml)	—	22	49	90	182
	recovery (%)	—	88.0	106.5	100.0	101.1
Serum 2	measured (ng/ml)	4	32	56	102	202
	recovered (ng/ml)	—	28	52	98	198
	recovery (%)	—	112.0	113.0	108.9	110.0

mean recovery: $104.9 \pm 8.3\%$

Table 2 Reproducibility

intra-assay				inter-assay				
No.	Serum			No.	Serum			
	1	2	3		R.S	1	2	3
1	20	112	271	1	73	20	120	323
2	20	123	265	2	75	19	123	299
3	20	121	279	3	76	24	117	314
4	20	114	298	4	74	22	134	310
5	20	116	258	5	81	19	110	271
6	21	117	257	6	82	17	118	283
7	18	110	297	7	78	21	125	282
8	18	117	258	8	78	20	114	273
9	21	122	282	9	73	19	113	265
10	20	111	302	10	76	19	114	272
Mean	19.8	116.3	276.7	Mean	76.6	20.0	118.8	289.2
S.D.	1.0	4.6	17.6	S.D.	3.1	1.9	7.1	20.7
C.V. (%)	5.2	4.0	6.4	C.V. (%)	4.1	9.7	5.9	7.2

6) 標準曲線および PEG 法との比較

本キットは元来 B/F 分離に PEG を用いていたものを、PEG の代りにタキソルブを用いるようにしたもので、その他のキットの組成や測定手順は PEG 法と全く同じである。Fig. 9 は同一キットを用いて B/F 分離のみを PEG 法、タキソルブ法の両方で行った場合の標準曲線とコントロール血清の値を示す。両者の標準曲線はよく平行しているが、コントロール血清の値は高値域で PEG 法の方が若干低値を示した。また、タキソルブ法では $Bo\%$ の 2 標準偏差を取ると最少検出感度は、6.5 ng/ml となった。

Fig. 10 は、43 例の症例について両法で測定した結果を示しているが、両者間には $Y=1.092X+$

7.512 ($\gamma=0.997$) と良好な相関が認められた。

7) 他社キットとの比較

Fig. 11 に、32 症例について α -フェトリアキット (2 抗体法、ダイナボット RI 研究所) で測定した値との関係を示した。

両者間には $Y=0.724X+3.372$ ($\gamma=0.997$) の関係が得られた。

2. 臨床的検討の結果

Fig. 12 に健常人および各種疾患例における AFP の測定結果を示した。

健常人 29 例では測定感度以下を示したものが 25 例、4 例が 6.6~7.9 ng/ml の間に分布しており、正常値上限は他の報告者にならって 10 ng/ml とした。急性肝炎では、29 例中 20 例が感度以下であ

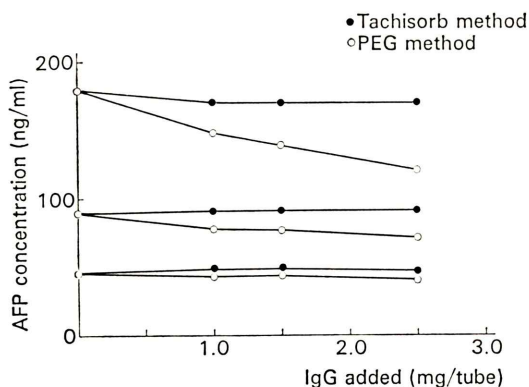


Fig. 8 Effect of human γ -globulin concentration on AFP value.

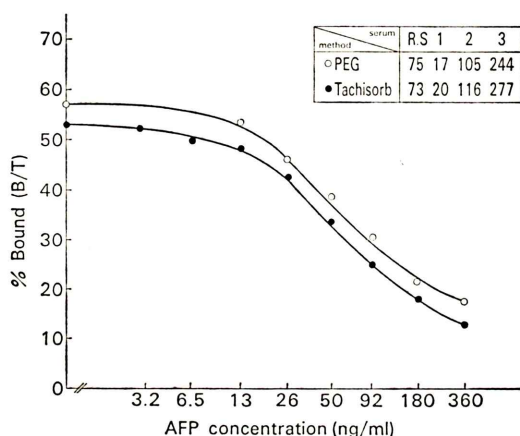


Fig. 9 Standard curve of RIA-gnost AFP Kit using PEG or Tachisorb method.

り、10 ng/ml 以上を示したものは6例(20.7%)であった。肝硬変症20例では、12例(60%)が、原発性肝癌では36例中31例(86.1%)が高値を示した。胃癌22例では1例がやや正常高値を示し、膵臓癌10例、食道癌6例はいずれも正常値を示した。

V. 総括ならびに考案

現在、AFPの測定法には2抗体法、PEG法などが多く用いられているが、2抗体法は反応時間が長い、PEG法が多用されている。しかし、PEG法の場合には血清中の蛋白濃度、組成の変化の影響を受けやすく先にわれわれの報告⁹⁾した例でも2抗体法と著しい差の出る場合が多い。特

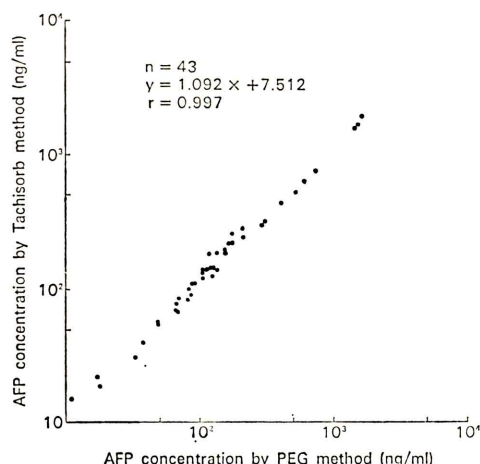


Fig. 10 Correlation between measured values by RIA-gnost AFP-PEG Kit and those by RIA-gnost AFP-Tachisorb Kit.

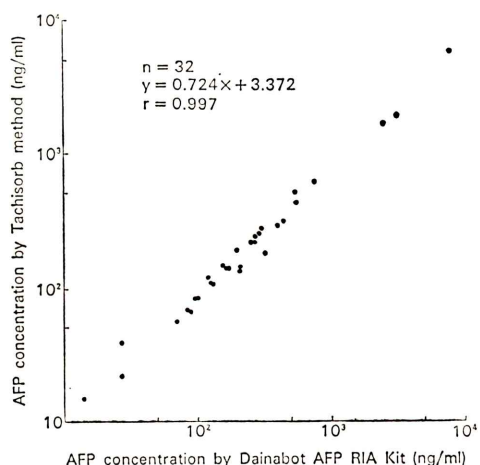


Fig. 11 Correlation between measured value by RIA-gnost AFP-Tachisorb Kit and those by Dainabot AFP RIA Kit.

にAFPの測定の場合は測定の対象となる疾患に肝疾患が多いため、これらの疾患例では血中の蛋白濃度組成の変化をきたす場合が多く、PEG法による測定は問題とされる^{10,11)}。

今回検討したタキソルブ法は黄色ブドウ球菌(死菌)の菌体成分である protein A の Fc-receptor 部と IgG (第2抗体)の結合を利用したものであり、原理的には2抗体法である。

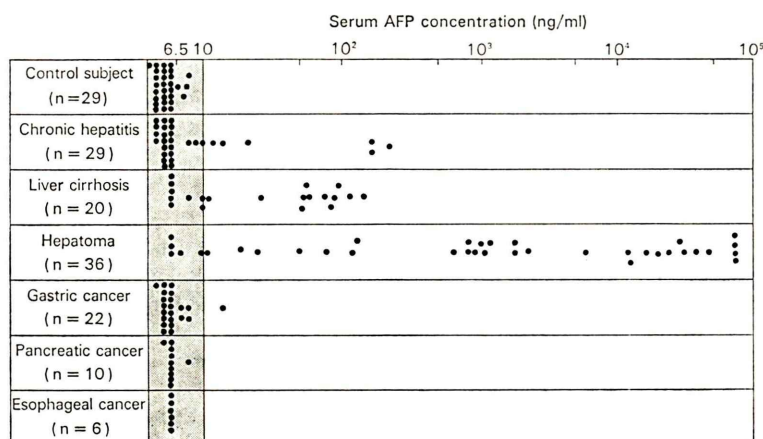


Fig. 12 Serum AFP concentrations in control subjects, patients with hepatic disease, and patients with gastrointestinal malignancy.

キットの基礎的な検討成績としてはインキュベーション温度は第1, 第2 インキュベーションとも室温 (25°C) で十分な結果が得られ, コントロール血清の値にも温度による影響は認められなかった. インキュベーション時間に関しては, 使用説明書によると第1 インキュベーション3~24時間とされており, ショートインキュベーションの可能性が示唆されている. 今回検討した結果でも第1 インキュベーションが3時間または24時間の場合でもコントロール血清の値にはほとんど差は認められなかった. しかし, 標準濃度0濃度における結合率は3時間で40.5%, 6時間で43.3%, 24時間で57.9%, 48時間で59.3%と時間の経過とともに上昇しており, 24~48時間でほぼ平衡に達する. したがって精度の高い結果を得るためには測定系が平衡に達した状態で行う方が望ましい. しかし, コントロール血清の値からみて, 結果を至急に必要とする場合には3時間インキュベーションも可能と考えられる.

希釈試験の結果は良好な直線性が得られ, 回収試験の結果も平均回収率104.9%と良好な結果であった.

再現性はキット内で変動係数4.0~6.4%, キット間で4.1~9.7%と満足できる結果であった.

PEG 法の場合, 検体の蛋白濃度, 組成の変化

が ^{125}I -AFPの共沈率に大きな影響を与えることが指摘^{10,11)}されているが, ヘキスト社のキットを用いてPEG法とタキソルブ法の両法で γ -グロブリン添加回収試験を行った結果, PEG法では γ -グロブリンの添加量が増加すればするほど, また被検体のAFP値が高いほど回収率は悪くなりAFPは予測値より低値を示した. γ -グロブリン2.5 mg/tube添加の場合で180 ng/mlの標準品の測定値は121 ng/mlと約30%の減少を示した. 一方, タキソルブ法では1.0~2.5 mg/tube添加のいずれの場合にも測定値にはほとんど影響を認めずPEG法に比し有用な結果が得られた. 同社のPEG法とタキソルブ法とを比較した場合, 標準曲線はほぼ平行しているがAFP高値域ではPEG法の値が若干低く出る傾向が認められた. また, タキソルブ法の最少検出感度は6.5 ng/mlであった.

ルーチン検査の検体の中から任意に抽出した43例についてタキソルブ法とPEG法, 32例について α -フェトリニアキット(ダイナボットRI研究所, 2抗体法)との比較を行ったところ, PEG法とは $Y=1.092X+7.512$ ($r=0.997$), α -フェトリニアキットとは $Y=0.724X+3.372$ ($r=0.997$)と良好な相関が得られたが, α -フェトリニアキットの値はやや高値に出る傾向があった.

臨床的には健常人29例では測定感度以下のものが25例で、4例が6.6~7.9 ng/mlの間に分布していた。正常値に関してはAFPの場合、報告者によりさまざまであるが、測定感度以上であった4症例の平均値と標準偏差が 7.4 ± 0.6 ng/mlでその2標準偏差を取ると6.2~8.6 ng/mlとなることから、正常値上限を10 ng/mlとすると健常人の測定値はほぼその範囲に入ると考えられた。その結果、10 ng/ml以上を示した陽性例は急性肝炎で20.7%、肝硬変症60%、原発性肝癌86.1%、胃癌4.5%、膵癌0%、食道癌0%であった。また、小西¹⁰⁾、谷内¹²⁾らは原発性肝癌の診断に100~500 ng/mlをhigh risk rangeとし、500 ng/ml以上の場合にはほぼ原発性肝癌として良いとしている。この方法に従えばわれわれの検討した症例でも500 ng/ml以上を示したものは原発性肝癌(36例中24例, 66.7%)のみであった。ただし原発性肝癌以外にもAFP高値を示す辜丸腫¹³⁾や胃癌の肝転移症例の報告¹⁴⁾もあり、確定診断には注意を要する。

VI. 結 語

ヘキスト社により開発されたリアグノストAFP-タキソルブについて基礎的検討ならびに臨床的検討を行った。

本法はBF分離にブドウ球菌の菌体成分であるprotein Aと第2抗体の結合を利用しており、第2抗体のみを使用した場合よりも安定した沈渣を得られるという利点がある。またPEG法に比して血清中の蛋白濃度の影響を受けることがなく、ショートインキュベーションも可能であるなどの利点を有している。

本キットでの正常値上限は10 ng/mlであり種々の肝疾患、特に原発性肝癌の診断にはきわめて

有用であった。

稿を終えるにあたり、キットをご提供頂いたヘキストジャパン社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Bergstrand CG, Czar B: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* **8**: 174, 1956
- 2) Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, et al: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* **1**(2): 174-180, 1963
- 3) Tatarinov YS: Detection of embryospecific α -globulin in the blood sera of patients with primary liver tumor. *Vopr Med Khim* **10**: 90-91, 1964
- 4) Purves LR, Geddes EW: A more sensitive test for alphafetoprotein. *Lancet* **1**: 47-48, 1972
- 5) Verway WF: A type-specific Antigenic Protein Deriver from the Staphylococcus. *J Exp Med* **71**: 635-644, 1940
- 6) Jensen K: A normally Occurring Staphylococcus Antibody in Human Serum. *Acta Pathol Microbiol Scand* **44**: 421-428, 1958
- 7) Kessler SW: Rapid Isolation of Antigens from Cells with a Staphylococcal Protein A Antibody Adsorbent: Parameters of the Interaction of Antibody-Antigen Complexes with Protein A. *J Immunology* **115**: 1617-1624, 1975
- 8) リアグノスト^(R) AFP-タキソルブ^(R) 使用説明書。
- 9) 高坂唯子, 横田和子, 小林香津子, 他: ビーズ固相法による α -fetoprotein濃度測定キット“AFP RIA Kit III”の検討。臨床成人病 **12**: 1289-1295, 1982
- 10) 小西奎子, 橋本幸子: α -Fetoprotein assay系の安定性と臨床的検討。臨床と研究 **54**: 2424-2429, 1977
- 11) 高橋和男, 大場操児: γ グロブリン量の違いによる α -フェトプロテイン値。検査と技術 **8**: 56-57, 1980
- 12) 谷内 昭, 坂本真一: 腫瘍マーカー: Alpha-fetoprotein. 臨床化学 **16**: 801-807, 1980
- 13) 東海林礼子, 大竹皓子, 加野象次郎: スパック α -キットの基礎的検討。医学と薬学 **5**: 583-588, 1981
- 14) 東 光生, 東輝一郎, 藤山重俊, 他: α -Fetoprotein高値を示した胃癌肝転移の2症例。臨床と研究 **53**: 2699-2703, 1976