

《ノート》

AMERWELL-AFP-RIA-kit の基礎的および臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of "AMERWELL AFP RIA-kit"
for Radioimmunoassay of α -fetoprotein

木原 数弘* 飯野 優子* 坂田 裕行* 杉村 英一*
佐藤 邦夫* 出村 博*

Kazuhiro KIHARA, Yuuko IINO, Hiroyuki SAKATA, Hidekazu SUGIMURA,
Kunio SATO and Hiroshi DEMURA

The Radioassay Center, Tokyo Women's Medical College

I. はじめに

1963 年 Abelev ら¹⁾ によって、肝癌移植マウス血清中に α -fetoprotein (以下 AFP と略す) の存在が明らかになり、翌年 Tatarinov²⁾ によって、原発性肝細胞癌患者血清中に大量の AFP が証明されて以来、血清 AFP の測定は、原発性肝細胞癌の診断や経過観察および各種肝疾患の病態把握などに有効とされ、日常臨床検査の一環として幅広く活用されている。

医療技術の進歩とともに、市販されているキットの改良も多種にわたり、主に B/F 分離の簡略化、所要時間の短縮、モノクローナル抗体の利用、放射性廃棄物の減量化などが試みられ、簡便かつ高感度の測定キットが開発されている。

今回われわれは、抗 AFP マウスモノクローナル抗体を用いた Immunoradiometric assay (IRMA) 法によるアマウエル AFP RIA キット (アマシャム社製) を試用する機会を得たので、その基礎的および臨床的検討成績につき報告する。

II. 方法および対象

1. 測定原理および方法

ウェルに固相化した抗 AFP マウスモノクローナル抗体に、検体中の AFP と ^{125}I 標識抗 AFP ヒツジ血清を結合させるサンドウィッチ法によるツーステップの抗体固相法である。その操作方法の概略は、Fig. 1 に示した。

2. キットの構成および必要器具

- 1) ^{125}I -AFP 抗体溶液 (赤色、抗 AFP ヒツジ血清)
- 2) AFP 抗体ウェル (抗 AFP マウスモノクローナル抗体)
- 3) アッセイ試薬 (青色、リン酸緩衝液)
- 4) 標準 AFP ヒト血清液 (0, 3, 10, 50, 200, 750 IU/ml)
- 5) インキュベーター
- 6) エジェクタートレイ
- 7) カウント用チューブ
- 8) 洗浄液 (ホウ酸緩衝液)

3. 基礎的検討項目および対象

基礎的検討として、反応温度、反応時間、洗浄回数、アッセイ間における標準曲線の安定性、精度・再現性、回収試験、希釈試験、最小検出感度、

Key words: AFP, Immunoradiometric assay, Liver diseases, Tumor marker.

* 東京女子医科大学附属病院ラジオアッセイ科
受付: 62 年 5 月 7 日
最終稿受付: 63 年 7 月 11 日
別刷請求先: 東京都新宿区河田町 8-1 (☎ 162)
東京女子医科大学附属病院
ラジオアッセイ科

木原 数弘

他社キットとの相関について行い、検討項目以外の条件は指示書どおりとした。

臨床的検討においては、健常人 112 例、急性肝炎 13 例、慢性肝炎 36 例、肝硬変 24 例、原発性肝細胞癌 29 例および原発性肝細胞癌手術前後 3 例、Transcatheter arterial embolization (TAE) 前後 2 例の血清を対象とした。

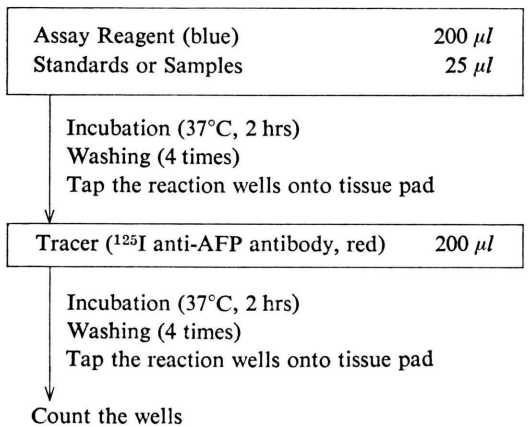


Fig. 1 Assay procedure.

III. 基礎的検討

1. 反応温度

第 1, 第 2 反応時間を 2 時間と一定にし、その際の第 1, 第 2 反応温度をおおの 4°C, 25°C, 37°C, 45°C と変化させた場合の標準溶液および 3 種類のコントロール血清の結合率 (B/T%) の変化を検討した (Fig. 2a, b).

その結果、第 1 反応では 37°C の条件で最も高い結合率が得られ、コントロール血清の値は 4°C において低値傾向を示し、45°C においては高値傾向を示した。第 2 反応では、温度が上昇するに従い結合率の上昇が認められ、コントロール血清の値は 4°C の条件で若干の高値を示した。

これらの結果から第 1, 第 2 反応温度は、結合率が高く安定な標準曲線およびコントロール血清の値が得られた 37°C が適当であった。

2. 反応時間

第 1, 第 2 反応温度を 37°C と一定にし、その際の第 1, 第 2 反応時間をおおの 30 分, 1 時間,

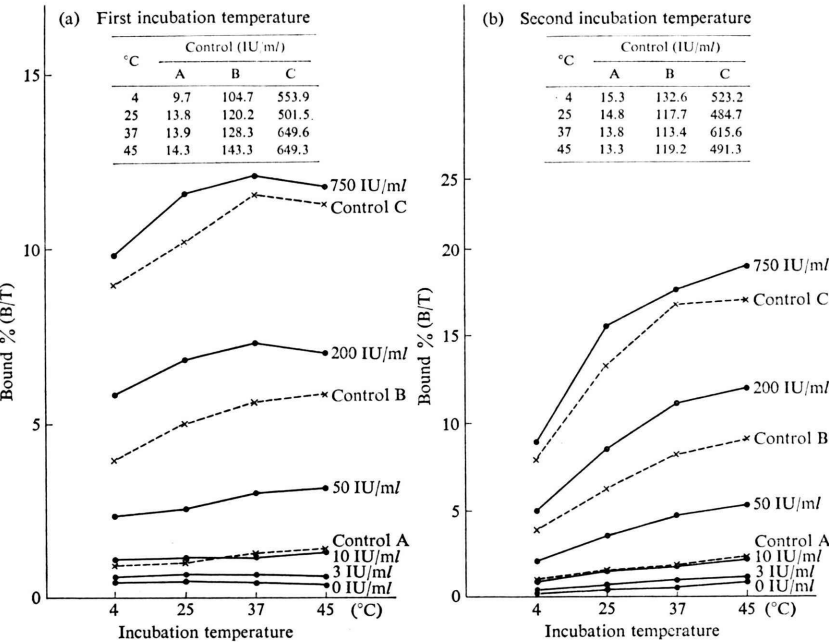


Fig. 2 Effect of incubation temperature on bound (B/T) %.

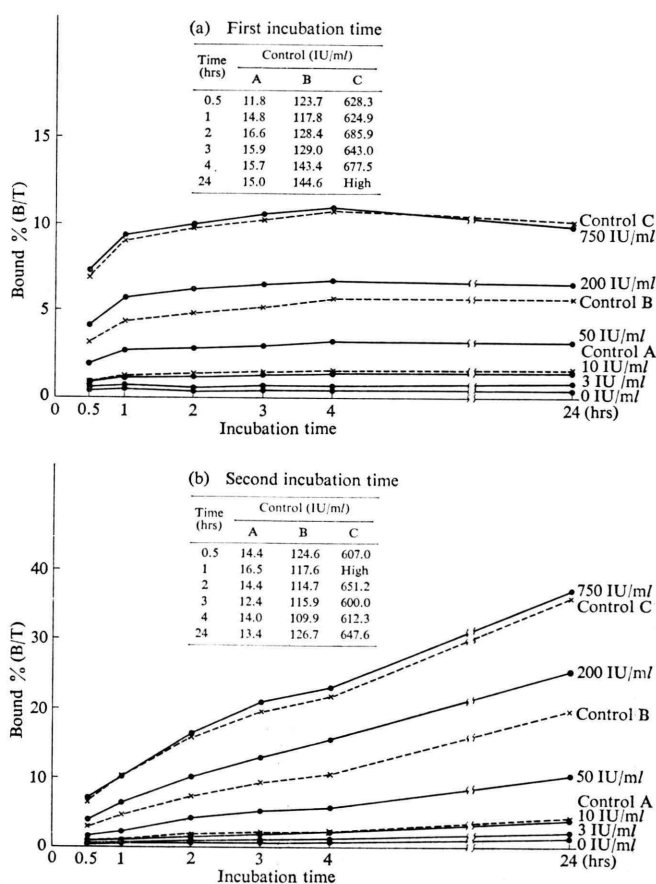


Fig. 3 Effect of incubation time on bound (B/T) %.

2 時間, 3 時間, 4 時間, 24 時間と変化させた場合の標準溶液と 3 種類のコントロール血清の結合率の変化を検討した (Fig. 3a, b).

その結果, 第 1 反応時間は 2 時間から 4 時間でピークに達しており, コントロール血清の値は 30 分でコントロール A の値が若干低値を示し, 4 時間, 24 時間においてコントロール B の値が高値を示した. また 24 時間において, 標準溶液 (750 IU/ml) とコントロール C の結合率が逆転し高値となった. 第 2 反応では, 時間の延長にともない結合率の上昇が認められ, 1 時間の条件において, コントロール血清 C の値が高値を示した.

これらの結果から第 1, 第 2 反応時間は, 安定した標準曲線およびコントロール血清の値が得ら

れた 2 時間が適当であった.

3. 洗浄回数

洗浄回数を 2 回から 5 回までの 4 段階について行い, その際の標準溶液とコントロール血清の結合率の動きから洗浄効果の検討を行った.

その結果, 2 回から 5 回におけるコントロール血清値の変動係数 (C.V.) $\langle n=4 \rangle$ は, A (2.5~6.1%), B (3.7~7.6%), C (3.4~7.1%) と大きな変動は認められなかった. よって, 洗浄回数は 2 回から 5 回までとし, 指示書どおり 4 回行うこととした (Fig. 4).

4. アッセイ間における標準曲線

10 回の異なるアッセイにおける標準曲線の変動を検討したところ, 各濃度における標準偏差

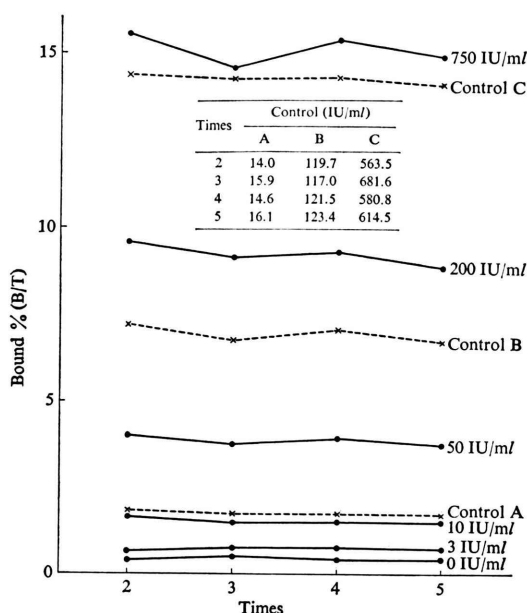


Fig. 4 Effect of washing times on bound (B/T) %.

(S.D.) は 0.04~0.74 IU/ml, C.V. は 4.6~11.6 % となり, 毎回安定した標準曲線が得られた (Fig. 5).

5. 精度・再現性

濃度の異なる 3 種類 (A, B, C) の血清のアッセイ内およびアッセイ間の精度・再現性は, C.V. おおの 5.4~7.1 %, 6.4~8.8 % と両者とも良好な結果が得られた (Table 1).

6. 回収率試験

濃度の異なる 2 種類の血清に, 濃度の異なる 5 種類の標準溶液を等量ずつ添加し, 添加量に対する回収率を検討した. なお回収率は

$$\frac{\text{添加後測定値} - \text{対照血清測定値}}{\text{添加濃度}} \times 100(\%)$$

の式で求めた.

その結果, おおのの平均回収率は 98.9 %, 104.9 % と良好であった (Table 2).

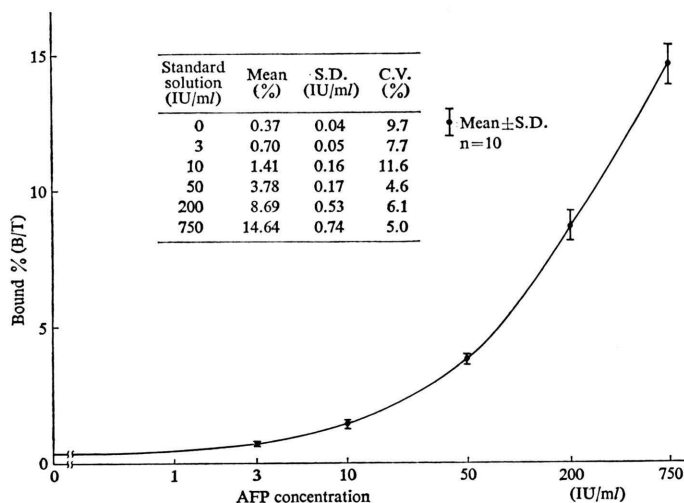


Fig. 5 Standard curve.

Table 1 Result of precision and reproducibility

n=10	Intraassay Variance			Interassay Variance		
	Serum (IU/ml)			Serum (IU/ml)		
	A	B	C	A	B	C
Mean	14.5	123.7	600.2	13.8	124.7	605.3
S.D.	0.93	6.74	42.60	1.21	7.97	41.37
C.V. (%)	6.4	5.4	7.1	8.8	6.4	6.8

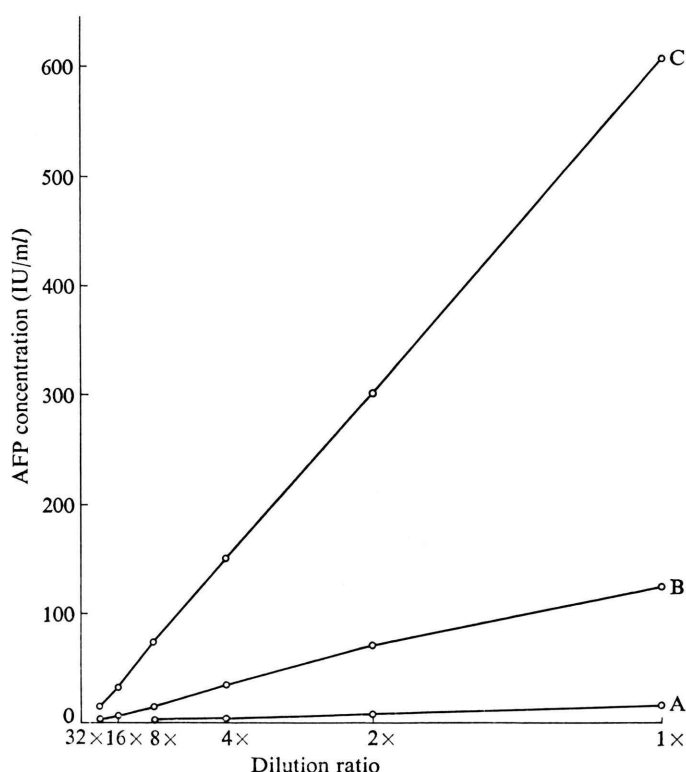


Fig. 6 Dilution test.

Table 2 Recovery test

Added (IU/ml)	Measured (IU/ml)	Recovered (IU/ml)	Recovery (%)
0	6.2	—	—
5	11.3	5.1	102.0
25	28.9	22.7	90.8
100	112.3	106.1	106.1
375	368.7	362.5	96.7
Mean recovery			98.9
0	70.2	—	—
5	76.3	6.1	122.0
25	93.9	23.7	94.8
100	177.2	107.0	107.0
375	429.2	359.0	95.7
Mean recovery			104.9

7. 希釈試験

濃度の異なる3種類の血清を生理食塩水で倍々希釈し検討した。3種類の血清とも良好な直線性を示した (Fig. 6)。

	Standard concentration (IU/ml)	Mean \pm S.D.	Significance level
		cpm	
1	0	564 \pm 45.5	<p>p < 0.2</p> <p>p < 0.001</p> <p>p < 0.001</p> <p>p < 0.001</p>
2	0.75	594 \pm 43.6	
3	1.5	677 \pm 63.2	
4	3.0	820 \pm 57.7	
5	5.0	1,058 \pm 61.3	

Fig. 7 Minimal detectable concentration.

8. 最小検出感度

標準溶液5種類をアッセイ内で10回測定し、有意差検定を行って求めた。なお標準溶液3 IU/ml以下の濃度については、3 IU/ml標準溶液を倍々希釈し検体として用いた。その結果、1.5 IU/mlまで明らかな有意差 (p < 0.001) が認められたため、

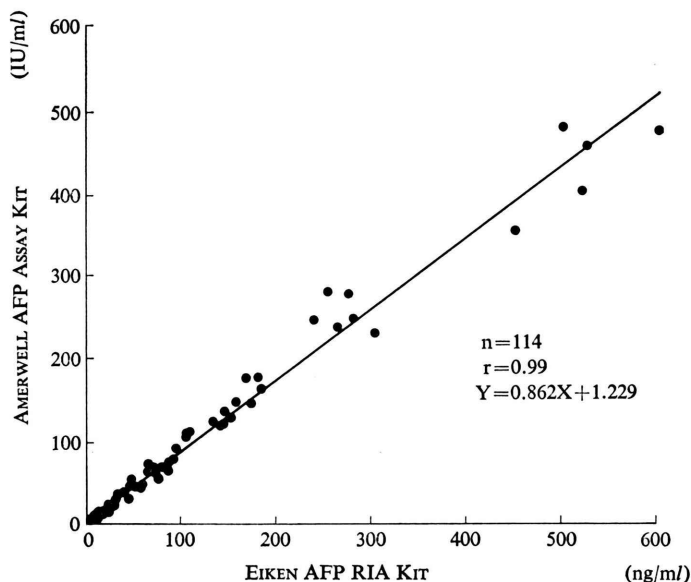


Fig. 8 Correlation between serum AFP values measured by EIKEN AFP RIA KITS and those by AMERWELL AFP ASSAY KITS.

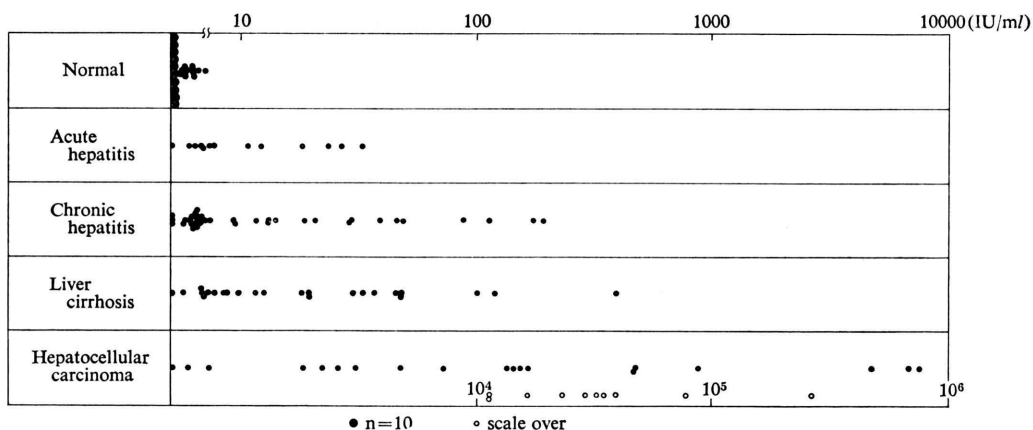


Fig. 9 Serum AFP concentration in normal subjects and in patients with various liver diseases.

最小検出感度を 1.5 IU/ml とした (Fig. 7).

9. 他社キットとの相関

114 例の患者血清を用いて、本キット (Y) と AFP 栄研 RIA キット (X) との測定値における相関性について検討した。

その結果、相関係数 $r=0.99$ と良好であったが、回帰直線は $Y=0.862X+1.229$ となり、本キットで若干低値を示す傾向にあった (Fig. 8)。

IV. 臨床的検討

1. 健常人および各種肝疾患における血清 AFP 値 (Fig. 9)

健常人 112 例における血清 AFP 値は、1.5~4.0 IU/ml の間に分布し (1.5 IU/ml 以下を 1.5 IU/ml として計算した場合)、その平均値 ± 1 S.D. は 1.6 ± 0.35 IU/ml となった。平均値 $+3$ S.D. 以下を正

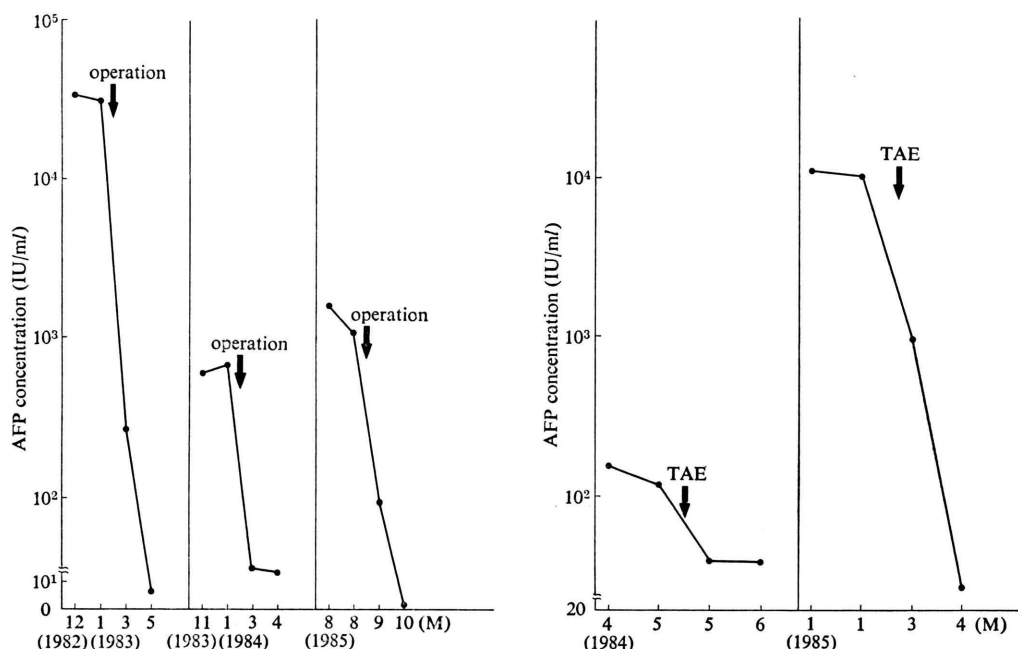


Fig. 10 Serum AFP values in a patient with Hepatocellular carcinoma before and after operation or TAE.

常範囲とすると上限値は 2.65 IU/ml となるが、低濃度領域でのバラツキなどを考慮に入れ、当施設においては、正常範囲を 3.0 IU/ml 以下と設定した。

各種肝疾患における血清 AFP 値の分布は、急性肝炎では 1.5~34.8 IU/ml に、慢性肝炎では 1.5~191.4 IU/ml に、肝硬変では 1.5~398.1 IU/ml に、また、原発性肝細胞癌では 1.5~268,350 IU/ml に分布する値が得られた。またおのおのの平均値±1 S.D. は、 10.3 ± 10.69 IU/ml, 28.7 ± 47.62 IU/ml, 40.2 ± 78.59 IU/ml, $19,544 \pm 51,064$ IU/ml, 陽性率は 46.1%, 47.2%, 79.2%, 93.1% であった。

2. 原発性肝細胞癌患者の手術前後および TAE 前後における血清 AFP 値 (Fig. 10)

手術前後および TAE 前後において、治療が有効とみなされた症例においては、血清 AFP 値の急激な低下が認められた。

V. 考 察

本キットは、従来のキットに比べ、アッセイ用チューブがコンパクトであり、ナンバリングが不

要のため使用し易く、遠心操作が必要なく簡便である。また測定後の放射性廃棄物量が、非常に少なくすむという利点をもっている。

基礎的検討において、反応温度、反応時間は、指示どおりの条件で良好であった。測定の精度・再現性もほぼ満足できるものであり、ルーチン検査として十分使用に耐えうるものであった。また最小検出感度を希釈法により有意差検定し求めた結果、1.5 IU/ml の値が得られた。希釈試験においては、検討を行った範囲内でいずれにおいても良好な直線性が得られた。AFP 栄研 RIA キットとの相関も、相関係数 $r=0.99$ 、回帰直線 $Y=0.862X+1.229$ と満足し得る結果であった。本キットは、全体的にやや低値を示す傾向にあった。その原因の一つとしては、モノクローナル抗体を使用しているためにポリクローナル抗体使用のキットよりも特異性が高く、より鋭敏に血清 AFP を測定しているものと考えられる。

本キットによる健常人の血清 AFP 値は 1.6 ± 0.35 IU/ml であった。他の報告^{3,4)} に比べ低値であった。今回は、正常範囲の上限値を 3 IU/ml と

設定したが、今後さらに例数を追加し決定する必要があると思われた。各種肝疾患における血清 AFP 値は、従来の報告^{5,6)}に一致する分布であった。原発性肝細胞癌患者において、追跡し得た手術前後および TAE 前後における血清 AFP の値を測定した結果、おのおのの血清 AFP 値が示すように治療後急激な AFP 値減少を示し、病状経過および治療効果等を把握するうえでの良い指標となった。

VI. ま と め

アマウエル AFP RIA キット (IRMA) 法について検討し以下の結論を得た。

- 1) 測定操作が簡便であり、種々の基礎的検討の結果、ほぼ満足のいく値が得られルーチン検査用キットとして十分使用可能なものであった。
- 2) 放射性廃棄物量が非常に少量ですむ。
- 3) 本法による最小検出感度は 1.5 IU/ml であった。
- 4) 各種肝疾患の診断、病態把握、肝細胞癌治療後の経過観察に有用であった。

謝辞：キットを提供していただいたアマシャム株式会社 に深謝いたします。

文 献

- 1) Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, et al: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplantation 1 (2): 174-180, 1963
- 2) Tatarinov YS: Detection of embryospecific α -globulin in the blood sera of patients with primary liver tumor. Yopr Med Khim 10: 90-91, 1964
- 3) Masseyeff R, Bonet C, Drouet J, et al: Radioimmunoassay of α -fetoprotein. I. Technique and serum levels in the normal adult. Digestion 10: 17-28, 1974
- 4) Nishi S, Hirai H: Radioimmunoassay of α -fetoprotein in hepatoma, other liver diseases, and pregnancy. Gann Monogr Cancer Res 14: 79-87, 1973
- 5) 河村信夫, 月田邦彦, 榊原弘之, 他: Pharmacia AFP RIA の基礎的検討. 医学と薬 13 (6): 1623-1628, 1985
- 6) 高坂唯子, 遠藤啓吾, 阪原晴海, 他: イムノラジオメトリック (IRMA) 法による α -fetoprotein 濃度測定用 RIA kit "ELSA AFP RIA kit" の基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 22 (12): 1851-1856, 1985