

《使用経験》

PEG 法による AFP ラジオイムノアッセイに関する検討

油野 民雄* 多田 明* 窪田 昭男*

利波 紀久* 久田 欣一*

I. はじめに

α_1 -胎児蛋白 (以下 AFP) 測定は、原発性肝細胞癌¹⁾, yolk sac tumor²⁾ (悪性奇形腫の一部に認める) の他、瀰漫性肝疾患、胃癌を始めとする悪性疾患の一部³⁾ にも AFP 高値を示すことが指摘され、かかる疾患の診断ならびに経過観察、予後の推定に利用されてきた。また妊娠時の異常⁴⁾ や胎児奇型⁵⁾、乳児肝炎⁶⁾ や ataxia teleangiectasia⁷⁾ 等先天性疾患の一部にも AFP 高値を示すことが報告され、産科、小児科領域でも AFP 測定の重要性が認識されるに至った。

ラジオイムノアッセイ (以下 RIA) による AFP 測定は、他の免疫学的方法に比し測定感度の面で優っており、従来より二抗体法 (以下 DA 法)⁸⁾ による RIA 法が施行されてきた。DA 法の場合、測定値が判明するまで最低 3 日間必要とするが、最近ポリエチレングリコール (以下 PEG) を結合型 (B)、遊離型 (F) 分離に用いた RIA 法がダイナボット RI 研究所より開発され測定結果が 1 日で得られるようになった。今回著者らは PEG 法による AFP・RIA キットの使用機会を得たので、従来の DA 法と対比しながら基礎的臨床的検討を試みた。

II. 方 法

1) 測定方法

測定は duplicate で行ない、AFP 高濃度血清 (320 ng/ml 以上) に関しては生理的食塩水で希釈 (10 倍, 100 倍, 1,000 倍など) して用いた。以下、測定操作の概略を紹介すると、1) 各試験管に標準 AFP (0, 10, 30, 80, 160, 320 ng/ml) 0.1 ml または被検血清 0.1 ml (希釈血清に関しては血清 0.05 ml に仔牛血清 0.05 ml を加える) を加える。2) ¹²⁵I-AFP 0.1 ml を加える。3) 抗 AFP 山羊血清 0.1 ml を加える。4) 振盪混和し、室温 (25±10°C) で 3 時間インキュベート。5) 全カウント (cpm) の測定。6) インキュベーション終了後、21% PEG 液 1 ml を加える。7) 内容物を完全に混和後、3,000 rpm で 20 分間遠心分離する。上澄除去後、沈降物のカウントを測定。8) 沈澱 % (B/T %) の算出: (Background カウントは ¹²⁵I-AFP 0.2 ml に PEG 1 ml を加えた内容物の沈澱カウントを Background カウントとして設置する。) 沈澱 % の算出は、全カウント、沈澱カウントより Background カウントを差引いた値より、求める。9) 普通目盛グラフの縦軸に B/T %, 横軸に標準 AFP 濃度を記入し標準曲線を作成し、これより各検体の AFP 濃度を読取る。

2) 検討事項

インキュベーション時間、温度の標準曲線に及ぼす影響、再現性、回収率、希釈試験、希釈血清使用時の沈澱 % に及ぼす影響を基礎的事項として

* 金沢大学医学部核医学教室

受付: 51 年 9 月 24 日

最終稿受付: 51 年 12 月 20 日

別刷請求先: 金沢市宝町 13-1 (☎920)

金沢大学医学部核医学教室

油 野 民 雄

検討した。また、急性肝炎3例、慢性肝炎12例、肝硬変13例、原発性肝細胞癌10例、転移性肝癌7例、他の悪性疾患17例、その他良性疾患12例の計74例、120検体を対象とし、PEG法にて測定すると同時にDA法にて測定した。

III. 結 果

1) 基礎的検討

i) インキュベーション時間および温度: Fig. 1, Fig. 2 にインキュベーション時間および温度の標準曲線に及ぼす影響を示した。1時間のインキュベーション時間では、2時間、3時間に比し低濃度領域の結合率(B/T%)が低く、また5時間、24時間では高濃度領域の結合率の増加を認めた。温度の変化に関する結果では、4°C 3時間では全体に結合率が低下したが、4°C 24時間では37°C、25°C 3時間にほぼ類似した結果が得られた。

ii) 再現性: 2種類の異なる血清A, Bを用いて、intraassay (4回測定), interassay (6回測定)の変動係数(C.V.)を求めた(Table 1)。A, Bともに

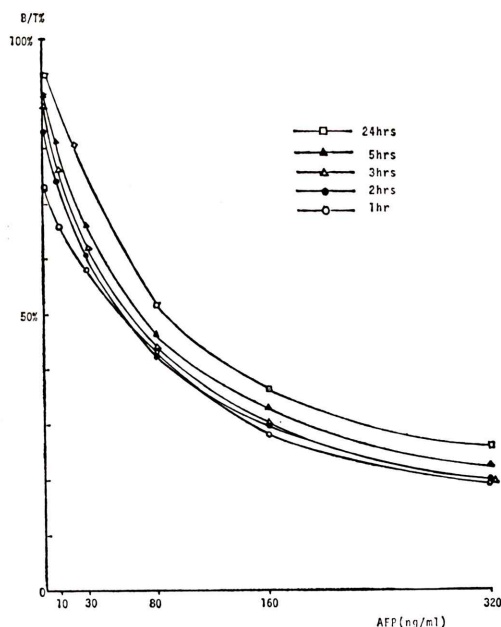


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve at 25°C.

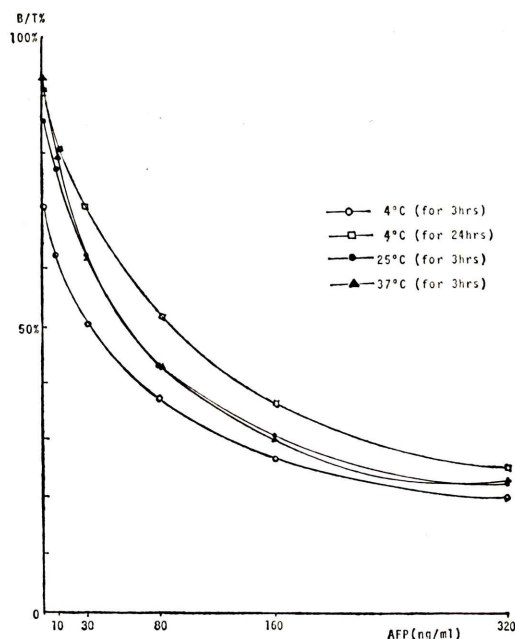


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curve.

Table 1 Reproducibility of AFP radioimmunoassay by PEG method.

Sample	Intraassay		Interassay	
	Mean \pm SD (ng/ml)	CV (%)	mean \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	118.3 \pm 2.3	1.9	117.7 \pm 6.4	5.4
B	62.3 \pm 4.3	6.9	62.0 \pm 4.6	7.4

C.V. は 10% 以内の値が得られた。

iii) 希釈試験および回収率に関し、PEG法およびDA法にて検討した結果をTable 2, Table 3に示す。希釈試験に関しては、PEG法、DA法ともに2検体中1検体で希釈とともに測定値の低下が認められたが、残りの1検体では良好な結果が得られた。回収率に関しては、PEG法、DA法ともに良好な結果を呈した。

iv) 血清希釈時の結合率(B/T%)に及ぼす影響: 仔牛血清を生理的食塩水に倍数希釈し、その0.1 mlに 125 I-AFPおよび抗AFP山羊血清各0.1 ml, PEG 1 mlを加え沈澱率を求めた結果をFig. 3

Table 2 Comparison of dilution tests between PEG and DA methods.

	PEG method			DA method	
	diluted	determined	% of predicted	determined	% of predicted
C	1/2	189 ng/ml	—	170 ng/ml	—
	1/4	97	103%	76	71%
	1/8	42	89	30	71
	1/16	20	85	14	66
	1/32	9	76	5	47
D	1/2	130 ng/ml	—	113 ng/ml	—
	1/4	75	115%	63	112%
	1/8	40	123	36	127
	1/16	19.8	122	14	99
	1/32	10	123	8	113

Table 3 Comparison of recovery rates between PEG and DA methods.

	PEG method			DA method	
	added	determined	recovery rate	determined	recovery rate
E	0	38 ng/ml	—	38 ng/ml	—
	15	54	102%	55	104%
	40	80	103	78	100
	80	120	102	124	105
	160	214	108	223	113
F	0	100 ng/ml	—	100 ng/ml	—
	15	122	106%	125	109%
	40	140	100	162	116
	80	170	94	189	105
	160	280	108	271	104

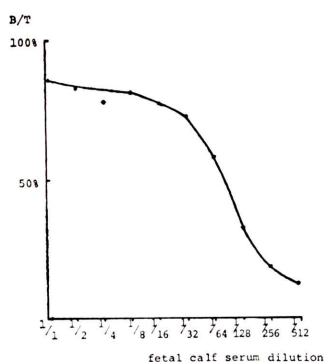


Fig. 3 Effect of the use of diluted serum on bound per cent in PEG method.

に示したが、16 倍希釈以上では沈澱率の著しい低下を示した。ゆえに、AFP 高濃度血清を希釈 (10

倍以上) して測定する場合、仔牛血清または AFP 陰性正常ヒト血清の添加が必要とされる。

2) 臨床的検討

上記疾患 74 例に関して PEG 法にて血清 AFP 値を測定した結果を Fig. 4 に示す。コントロールとして、妊娠 8 か月女性 1 例を除く、肝に異常を認めない良性疾患 11 例の血中 AFP を測定したが、11 例全例 20 ng/ml 以下の値を示した。原発性肝癌 8 例、肝硬変 8 例、転移性肝癌 3 例、他の悪性疾患 2 例、妊婦 (妊娠 8 か月) 1 例にて 20 ng/ml 以上の AFP 値を示した。著者らは現在、原発性肝癌に対する最低陽性基準として 200 ng/ml を設置している⁹⁾が、200 ng/ml 以上の高値を呈したのは、原発性肝癌 6 例、肝硬変 2 例、転移性肝癌 (胃癌の転移) 1 例、yolk sac tumor (嚢丸) の再発

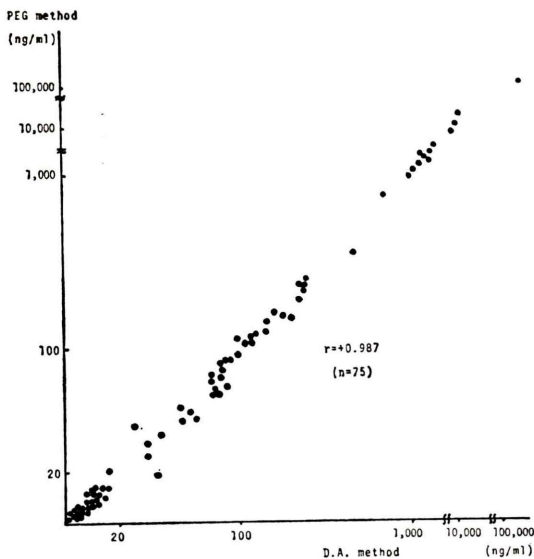


Fig. 5 Correlation of AFP values between PEG and DA methods.

DA 法にて同一検体を測定した結果は、Fig. 5 のごとく良好な相関関係が得られた。

V. 結 語

今回、PEG 法による AFP・RIA キットに関し、基礎的・臨床的評価を試みたが、測定法としての条件を基礎的・臨床的に十分満足しており、かつ測定結果が迅速に得られる点で DA 法に優って

おり、今後 DA 法に代わり広く臨床的に応用されるものと思われる。

今回の検討にあたり PEG 法 AFP・RIA キットを提供していただいたダイナボット RI 研究所に深謝いたします。

文 献

- 1) 西信三： α -フェトプロテインによる肝癌の診断。最新医学 28: 465-473, 1973
- 2) 土田嘉昭, 浦野順文, 斉藤純夫他：悪性奇形腫と α -Fetoprotein. 医学のあゆみ 85: 657-664, 1973
- 3) 赤井貞彦, 加藤清, 飛田祐吉：いわゆる“ α -Fetoprotein 偽陽性例”の検討——とくに α -fetoprotein 陽性癌について——. 内科 30: 230-238, 1972
- 4) Seppala M, and Ruoslahti E: Alpha-fetoprotein in abortion. Brit Med J 4: 759-761, 1972
- 5) Brock DJH, and Sutcliffe RG: Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet 2: 197-199, 1972
- 6) Zeltzer PM, Neerhout RC, Fonkalsrud EW, et al.: Differentiation between Neonatal Hepatitis and Biliary Atresia by Measuring Serum Alpha-Fetoprotein. Lancet 1: 373-375, 1974
- 7) Waldmann TA, and McIntyre KR: Serum-Alpha-fetoprotein Levels in Patients with Ataxia Teleangiectasia. Lancet 2: 1112-1115, 1972
- 8) 西信三, 平井秀松： α -Fetoprotein の Radioimmunoassay について。免疫実験操作法(免疫学会編) 215-221, 1971
- 9) 久田欣一, 利波紀久, 油野民雄他： α_1 -フェトプロテインのラジオイムノアッセイ。日本医事新報 2527: 27-31, 1972