

《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* 奠田 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 glycol(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。

* 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 (番号 920)

金沢大学医学部核医学教室

油野 民雄

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) 0.1ml 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) ^{125}I -AFP 0.1 ml を加える。3) 抗 AFP 山羊血清 0.1 ml 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 ^{125}I -AFP 0.2 ml に PEG 1ml 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 濃度を読み取る。

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

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

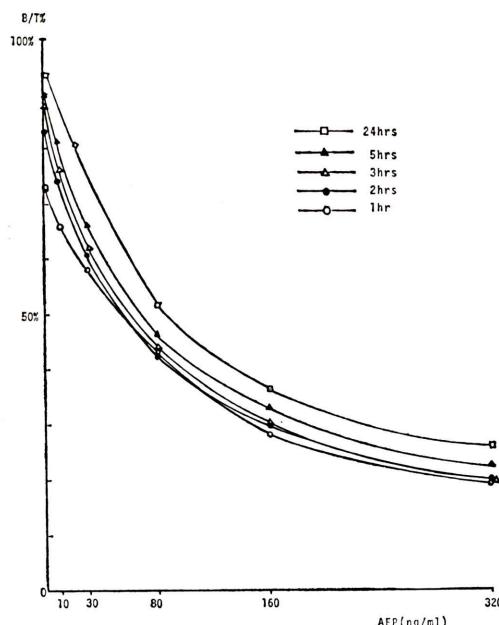


Fig. 1 Effect of incubation time on standard curve at 25°C.

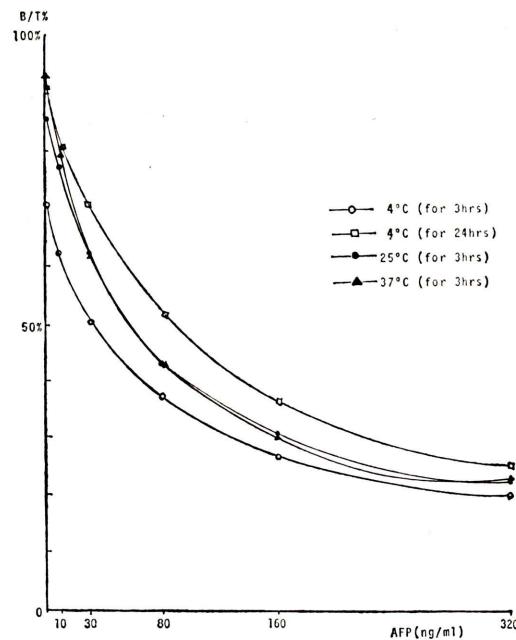


Fig. 2 Effect of incubation temperature on standard curve.

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

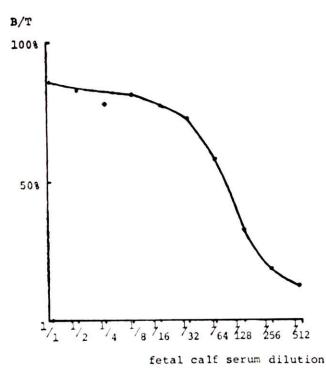


Fig. 3 Effect of the use of diluted serum on bound per cent in PEG method.

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 隆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、妊娠 (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 (睾丸) の再発

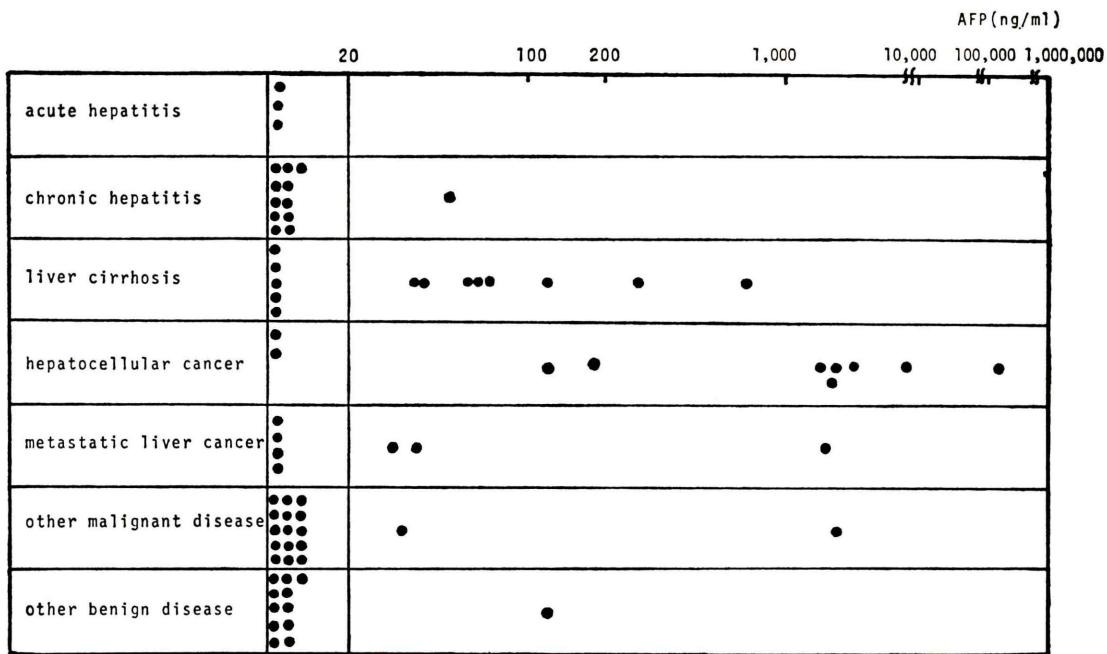


Fig. 4 Distribution of AFP values measured by PEG method in 74 cases with various disease.

1例の計10例である。このうち悪性疾患では持続性に200 ng/ml以上のAFP値を呈したが、肝硬変症2例中1例では700 ng/mlを呈した50日後の測定では84 ng/mlと著しい低下を示した。残り1例は持続性に200 ng/ml前後の値を呈し現在経過観察中である。

次に、主として比較的 AFP の高値を示した検体を対象とし、PEG 法と DA 法にての測定結果の相関を検討したが、Fig. 5 に示すがごとく相関係数 +0.987 と良好な正の相関関係が得られた。

IV. 考 案

体液中 AFP の測定意義に関してはすでに種々の領域において、その臨床的有用性が指摘され¹⁻⁷、日常欠くことのできない検査法の1つとなっている。

現在 RIA による AFP 測定は DA 法により行なわれるが、DA 法の場合結果が判明するまで操作に最低3日間要する。DA 法と PEG 法で異なる点は、BF 分離に第二抗体を使用するか PEG を

使用するかにある。PEG 法の場合、1日で結果が得られ、測定の簡便化が可能となった。インキュベーション時間、温度の変化の標準曲線に及ぼす影響に關し検討したが、室温なら2時間以上、および4°Cでは24時間のインキュベーションであればほぼ満足した標準曲線が得られた。再現性に關しては、intraassay, interassay ともに C.V. 10% 以内で良好であり、回収率、希釈曲線に關しても DA 法とほぼ同程度の結果が得られ、PEG 法の RIA キットの場合基礎的検討に關してはほぼ満足した結果が得られた。

AFP 高濃度血清を測定する場合、DA 法と異なり PEG 法では仔牛血清または AFP 隆性正常ヒト血清の添加が必要とされる。PEG の化学的性質は中性ないし弱アルカリ性の条件で γ -グロブリンを沈降させるが、Fig. 3 の結果からも明らかなるとく、高度に希釈された血清では γ -グロブリン濃度が減少するため、PEG による沈降能が低下する。それゆえ、検体内的 γ -グロブリン濃度を一定に保つことが要求される。臨床例にて PEG 法および

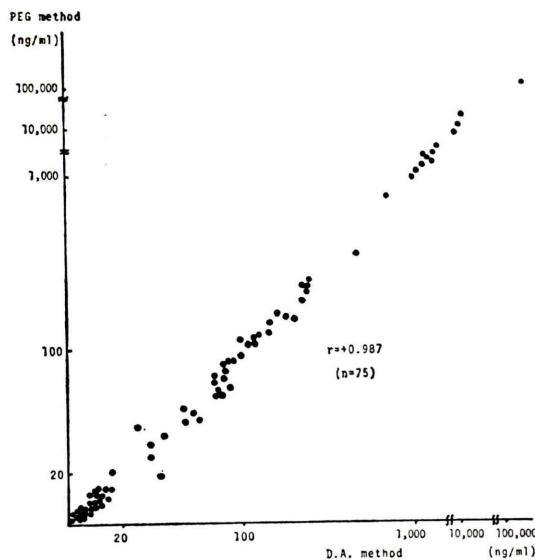


Fig. 5 Correlation of AFP values between PEG and DA methods.

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、齊藤純夫他：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 anecephaly 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 Telangiectasia. Lancet **2**: 1112-1115, 1972
- 8) 西信三、平井秀松： α -Fetoprotein の Radioimmuno-assay 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