

《ノート》

イムノラジオメトリック (IRMA) 法による α -fetoprotein (AFP) 濃度測定用 RIA kit “ELSA AFP RIA kit” の基礎的ならびに臨床的検討Fundamental and Clinical Evaluation of “ELSA AFP RIA kit”
for Radioimmunoassay of α -fetoprotein高坂 唯子* 遠藤 啓吾** 阪原 春海** 小泉 満**
中島 鉄夫** 鳥塚 莞爾**Tadako KOUSAKA*, Keigo ENDO**, Harumi SAKAHARA**, Mitsuru KOIZUMI**,
Tetsuo NAKAJIMA** and Kanji TORIZUKA***The Central Clinical Radioisotope Division, **Department of Nuclear Medicine
and Radiology, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

I. はじめに

1956 年 Bergstrand¹⁾ により分子量 6,500, 3%の糖を含む胎児性蛋白 (α -フェトプロテイン: AFP) の存在が報告され, 1964 年 Tatarinov²⁾ がこの蛋白がヒト原発性肝癌中に多量に存在することを報告して以来, 肝癌の腫瘍マーカーとして注目されるようになった。

1972 年^{3,4)} にラジオイムノアッセイ (RIA) による測定が可能になって以来, AFP は原発性肝癌や卵黄嚢腫瘍の腫瘍マーカーとして広く用いられるようになった。現在種々の測定用キットが市販されているが, 今回フランス原子力庁 (CIS) により開発された AFP 測定用 ELSA-AFP リアキットを使用する機会を得, 若干の検討を加えたのでその成績について報告する。

II. 測定原理と手技

本法の測定原理は風車様のプラスチック片に固相化された抗体と抗原を反応させ, 洗浄後 ^{125}I -標識抗体を添加反応させるイムノラジオメトリックアッセイ (IRMA) 法に基づく。固相化抗体にはヤギ抗 AFP 抗体を用い, ^{125}I -標識抗体にはヒツジで作成したポリクローナル抗体とマウス・モノクローナル抗体の混合物を用いている。

測定手技の概略⁵⁾ を Fig. 1 に示す。

III. 実験方法と測定対象

基礎的検討として反応条件, 稀釈試験, 回収試験, 再現性について検討を行った。臨床的検討として, 健常人 31 例および肝疾患 91 例 (急性肝炎 11, 慢性肝炎 23, 肝硬変 26, 原発性肝癌 31 例) の合計 122 例につき測定を行った。そのうちの 51 例についてはポリクローナル抗体による IRMA 法を用いた α -フェト・リアビーズキット (ダイナボット社製) による測定を併せ行い, 本法により得られた測定値との比較を行った。

Key words: Radioimmunoassay, α -fetoprotein, Immunoradiometric assay, Liver diseases, Tumor marker.

* 京都大学医学部附属病院放射線部

** 同 放射線核医学科

受付: 60 年 7 月 18 日

最終稿受付: 60 年 9 月 12 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

IV. 結果

1. 基礎的検討

本法は、第1, 第2反応ともに 37°C, 2時間のインキュベーションにより行う。そこで Fig. 2, Fig. 3 に示すように温度と時間の条件をそれぞれ

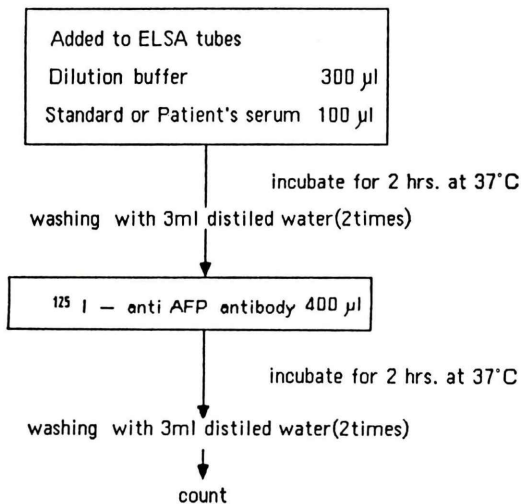


Fig. 1 Assay procedure for ELSA-AFP RIA kit.

変化させたところ、温度の上昇、時間の延長に伴い、 ^{125}I -標識抗体の固相化抗体への結合率は高くなることが認められた。しかし同時に測定したコントロール血清の値は、温度・時間条件の変化に影響されずほとんど変わらないため、キット指示の第1反応, 第2反応ともに 37°C, 2時間のインキュベーションで十分と考えられた。

AFP 高値患者血清 3 例について、キット添付の希釈バッファーを用いて 2~16 倍まで希釈したところ、いずれも良好な直線性を示した (Fig. 4)。

同様に患者血清 3 例について、キット添付の標準品 0~240 ng/ml まで等量混合を行って回収率をみたところ、それぞれの回収率は 82.5~105.7% の間であり、平均回収率は $95.0 \pm 7.5\%$ と満足できる結果であった (Table 1)。

測定値の再現性については、異なった 3 つの濃度のコントロール血清を用いて 10 回繰り返し測定を行ったところ、キット内での変動係数 (C.V. %) は 3.6~7.0%, キット間では 6.1~12.2% と良好であった (Table 2)。

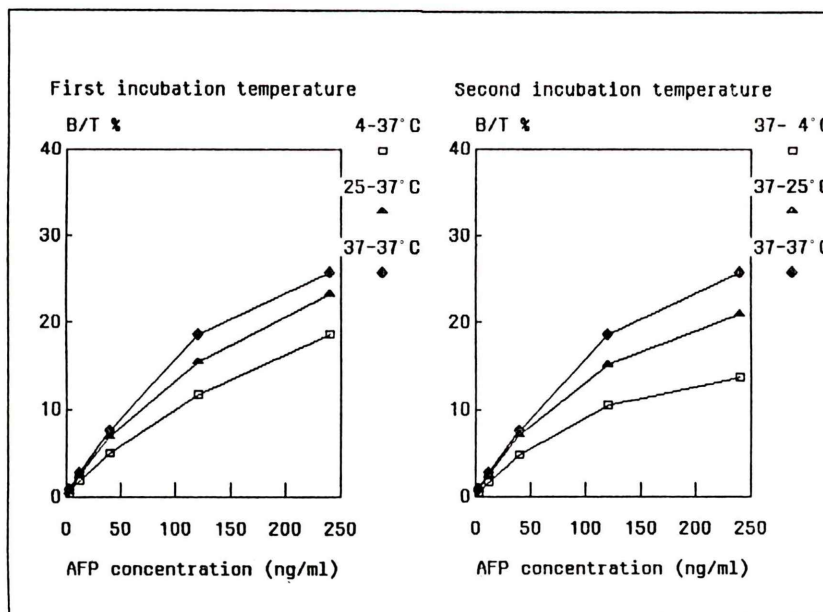


Fig. 2 The effect of incubation temperature on the standard curve of AFP. The first and second incubation was performed at 4, 25 and 37°C.

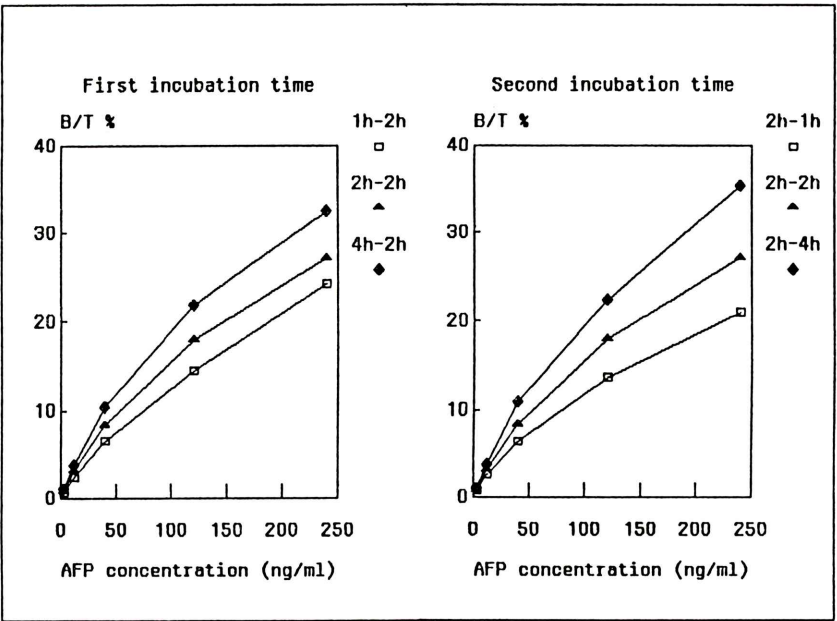


Fig. 3 The effect of incubation time on the standard curve of AFP. The first and second incubation was performed for 1, 2 and 4 hours.

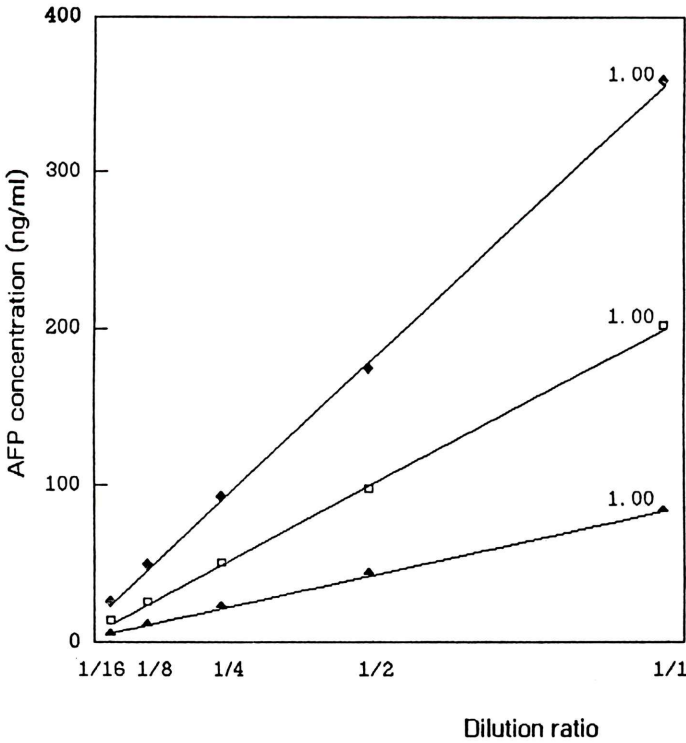


Fig. 4 Dilution test.

Table 1 Recovery test

		Added AFP concentration (ng/ml)			
		0.0	20.0	60.0	120.0
Sample 1	Measured	15.8	34.6	79.2	124.6
	Recovered	—	18.8	63.4	108.8
	Recovery (%)	—	94.0	105.7	90.7
Sample 2	Measured	16.1	32.6	75.6	140.4
	Recovered	—	16.5	59.5	124.3
	Recovery (%)	—	82.5	99.2	103.6
Sample 3	Measured	8.7	26.4	63.9	126.9
	Recovered	—	17.7	55.2	118.2
	Recovery (%)	—	88.5	92.0	98.5
Mean recovery (%)=95.0±7.5					

Table 2 Reproducibility of the assay

Intra-assay No.	Sample			Inter-assay No.	Sample		
	1	2	3		1	2	3
1	18.2	33.0	91.9	1	11.7	29.5	79.6
2	17.3	32.3	94.0	2	17.9	33.3	86.1
3	18.7	34.2	93.7	3	17.1	32.6	92.5
4	17.3	33.3	86.8	4	16.6	29.0	89.6
5	17.7	33.4	88.0	5	18.7	34.2	80.4
6	18.1	33.8	86.9	6	16.2	32.8	79.7
7	18.3	35.5	81.0	7	17.3	29.7	84.3
8	17.7	34.0	76.5	8	18.9	32.0	72.4
9	17.6	31.8	80.4	9	17.0	31.3	76.8
10	18.4	31.5	82.2	10	18.6	29.0	83.7
Mean	17.93	33.28	86.14	Mean	17.00	31.34	82.51
S.D.	.48	1.20	6.00	S.D.	2.08	1.92	5.99
C.V. (%)	2.67	3.61	6.97	C.V. (%)	12.22	6.13	7.26

2. 臨床的検討

Figure 5 に示すように、健常人 31 例の測定値はいずれも 7.1 ng/ml 以下であった。このうち 24 例は 3 ng/ml 以下で、8 例が 3～7.1 ng/ml の間に分布したが、正常上限値は他キットの場合と同様に 10 ng/ml として以下の検討を行った。

急性肝炎 11 例中 8 例が 10 ng/ml 以下で、3 例が 12～66 ng/ml の間に分布した。慢性肝炎 23 例では 10 ng/ml 以下が 14 例、9 例が 12.3～121.8 ng/ml の間に、肝硬変では 26 例中 15 例が 10 ng/ml 以下、11 例が 10～174 ng/ml の間に分布した。これに対し原発性肝癌では 31 例中 4 例のみが 10 ng/ml 以下、27 例は 21～112,400 ng/ml の間に分

布し、22 例は 174 ng/ml 以上のきわめて高値を示した。

本法と α -フェト・リアビーズキットで同時に測定し得た 51 例について、両測定値の関係をみたところ、Fig. 6 に示すように両者間にはきわめて良好な正相関が得られた。

V. 総括ならびに考案

今回検討したエルザ AFP リアキットは IRMA による測定法で、¹²⁵I-標識抗体としてポリクローナルおよびモノクローナル抗体の混合物を用いている点に特色がある。

基礎的検討の結果、反応条件は原法に示す方法

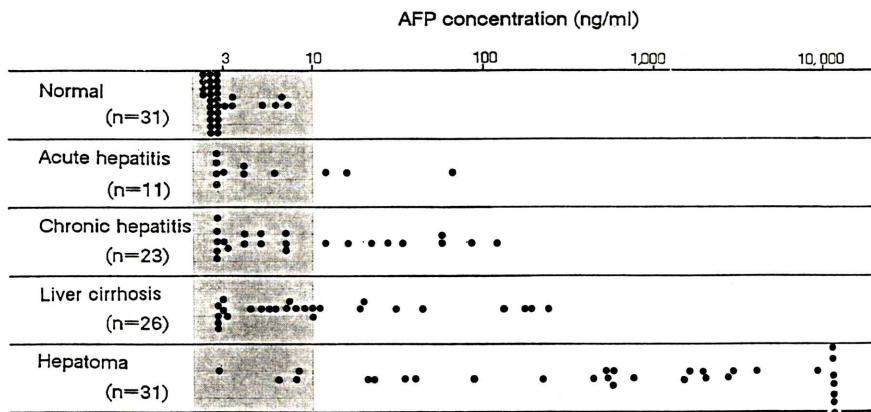


Fig. 5 Serum AFP concentrations of normal subjects and various diseases. Shaded area represents normal ranges.

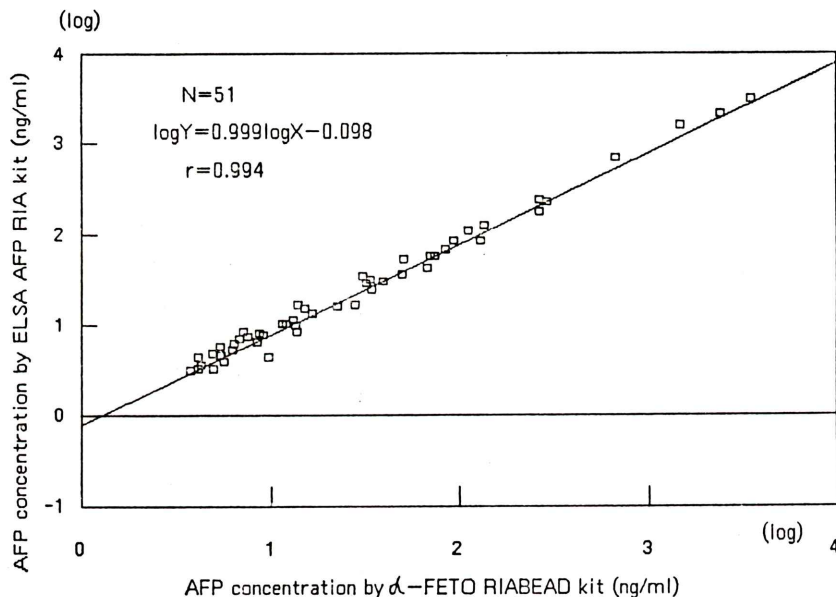


Fig. 6 Correlation between serum AFP concentrations obtained by α -FETO RIABEAD kit and those by ELSA-AFP RIA kit.

で十分であり、4時間程度で血中 AFP 濃度を得ることができる。稀釈試験、回収試験とも良好であった。また 10 回の重複繰り返し測定による再現性も、キット内で 2.7~7.0、キット間で 6.1~12.2 (C.V.%) と満足すべきもので操作も簡便であった。

臨床例の測定成績では、健常人 31 例の測定値は 7 例が 3~7.1 ng/ml の間に分布したが、残り 24

例はすべて 3 ng/ml 以下であった。AFP のカットオフ値の決め方には種々の方法があるが、ここでは他キットの場合^{6,7)}と同様に 10 ng/ml を上限とした。

正常値上限の 10 ng/ml における固相化抗体への結合放射能はほぼ 7,000~8,000 cpm と十分な放射能が得られるため、再現性も良好で満足すべき結果が得られる測定範囲と思われる。

AFPは原発性肝癌に特異的な胎児性蛋白とされているが、RIAのような高感度測定法を採用すれば原発性肝癌以外の他の疾患でもかなり高率にAFPの上昇例が認められることはよく知られた事実である。

われわれがすでに報告したAFP RIA kit III⁶⁾およびリアグノストAFP-タキソルブ⁷⁾キットを用いた測定成績では、それぞれ急性肝炎20.7, 38.5%, 肝硬変60.0, 66.7%, 原発性肝癌86.1, 83.7%の陽性率が得られ、良性肝疾患と肝癌患者の血中AFP濃度には重なりが認められた。

今回検討したELSA-AFPキットでは急性肝炎、慢性肝炎、原発性肝癌において、これまでの検討と同様に陽性率に著差を認めなかったが、肝硬変症では本キットの場合40.2%と従来の成績よりやや低い陽性率であった。本キットでは原発性肝癌に特異性の高いモノクローナル抗体を作成し、アフィニティーを高めるためにポリクローナル抗体との混合物を用いている。したがって今回得られた成績が測定対象の違いによるものなのか使用抗体の特異性に由来するものかどうかは明らかではなく、さらに検討の必要があろう。

さて、AFPは約3%の糖を含む糖蛋白であるが、肝由来のものと卵黄嚢由来のものでは、コンカナバリンAへの吸収が異なることが報告⁸⁾されている。つまり電気泳動を用いた検討により、AFPにはコンカナバリンAに吸着するものと吸着しないものがあり、前者は肝由来のもの、後者は卵黄嚢由来のものである。

しかし肝細胞癌でのAFPと良性の肝硬変におけるAFPとはコンカナバリンAへの吸着の程度に差異がないといわれているが⁹⁾、モノクローナル抗体はごく微量の抗原に対する均一な抗体の特徴を有しており、モノクローナル抗体作製の手法を用いれば肝細胞癌と肝硬変におけるAFPを鑑別できるのではないかと期待される。

実際このような良・悪性のAFPを識別できるようなモノクローナル抗体が報告されているが¹⁰⁾その後追試験に成功したという報告は知らない。本キットでも¹²⁵I-標識抗体の一部にAFPに対す

るモノクローナル抗体を用いており肝癌と肝硬変症における血中AFPの鑑別を期待したが、Fig. 6のごとくこれまでの α -フェト・リアビーズキットとの間にきわめて良好な相関関係が得られており、今回の検討ではAFPが174 ng/ml以下の場合には肝癌と肝硬変との間に重なりが認められた。しかし血中AFP濃度が174 ng/mlを越えた場合には強く肝細胞癌を疑うことができると思われる。

VI. 結 論

本キットによるAFPの測定は簡便で、短時間で測定可能であり、再現性も良好であった。また得られた測定値はこれまでのキット α -フェト・リアビーズ法によるものとほぼ同一で、肝疾患の診断に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Bergstrand CG, Czer B: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 8: 174, 1956
- 2) Tatarinov YS: Detection of embryospecific α -globulin in the blood sera of patients with primary liver tumor. *Vopr Med Khim* 10: 90-91, 1964
- 3) Purves LR, Geddes EW: A more sensitive test for alphaprotein. *Lancet* 1: 47-48, 1972
- 4) 石井 勝, 池原英夫, 戸沢辰雄, 他: α -Fetoprotein Radioimmunoassayとその臨床的意義. *医学のあゆみ* 79: 77-79, 1971
- 5) ELSA AFP リアキット使用説明書
- 6) 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
- 7) 高坂唯子, 野口正人, 福田善弘, 他: 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. *核医学* 19: 1551-1558, 1982
- 8) 西 信三, 山城春城: モノクローナル抗体とその応用. α -Fetoprotein特異モノクローナル抗体の作製と診断への応用. *臨床科学* 18: 1070-1074, 1982
- 9) 石黒達也, 杉立市兵衛, 福井正憲, 他: AFP分画の臨床的意義. 高感度レクチン吸着交叉免疫, 電気泳動法による成績を中心に. *日癌治会誌* 20: 832-833, 1985
- 10) Bellet DH, Wards JR, Isselbacher KJ, Bohuon C: Serum α -fetoprotein levels in human diseases: Prospective from a highly specific monoclonal radioimmunoassay. *Proc Nat Acad Sci USA* 81: 3869-3873, 1984