

《ノート》

濾紙血液による AFP の測定

—原発性肝癌のスクリーニングに関する研究—

Measurement of Radioimmunoassay of Alpha-fetoprotein in Dried Blood Sample on Paper for Mass Screening of Hepatocellular Carcinoma

方 明* 金 華珠* 李 素香* 李 忠吉*

Ming FANG, Hua-Zhu JIN, Su-Xiang LI and Zhong-Ji LI

Yanbian Medical College, Yanji, Jilin, China

I. はじめに

原発性肝癌は症状発現後の経過が短いことが特徴とされ、平均3～4か月といわれる。それゆえ原発性肝癌の早期診断・早期治療が予後にとって大切である。

著者らは原発性肝癌のスクリーニングを目的とする濾紙血液 AFP ラジオイムノアッセイを確立し、基礎的ならびに臨床的検討を行ったのでその結果を報告する。

II. 材料と方法

1. 試薬

中國北方免疫試剤研究所によって開発された AFP ラジオイムノアッセイキット¹⁾を使用し、次のように試薬の調製を変更した。

- 1) 緩衝液：蒸留水 20 ml を加えて溶解する。
- 2) ¹²⁵I-AFP、緩衝液 6 ml を加えて溶解する。
- 3) 抗 AFP 血清、緩衝液 24 ml を加えてよく溶解する。
- 4) free AFP 血球、健康人の EDTA 静脈血を

遠心、血漿を捨てる。血球部分を食塩水で3回洗浄、3,000回転で10分間遠心し、血球上清液を注意して吸取る。

5) 標準 AFP、5種類の濃度の標準品におのおの緩衝液 0.25 ml を加えて溶解し、さらに試薬4)で2倍に希釈すると、25, 50, 100, 200, 400 ng/ml になる。それぞれの標準液を新華定性濾紙に採取し、室温(20°C)で乾燥する。

6) 被検査血液 1～2 滴を新華定性濾紙に浸し、室温(20°C)で乾燥する。

7) 14% PEG.

2. 方 法

直径 9.5 mm の円に打ち抜いた AFP 標準濾紙血液と被検濾紙血液 1 枚をそれぞれ試験管に入れ、緩衝液 200 μl を加え 20 分間振動して AFP を抽出した。濾紙はそのままにし、¹²⁵I-AFP と抗 AFP 血清それぞれ 100 μl を加え、37°C 温浴で 3 時間インキュベートした後に、正常人血清 100 μl と 14% PEG 300 μl を加え、ついで遠沈後上清を捨て、沈渣を自動γカウンターにより計測、標準曲線を用いることにより各サンプル中の AFP 濃度を測定、計算により ng/ml として表した。

3. 検討項目

基礎的検討として、標準曲線の評価、精度、再

* 延辺医学院附属病院核医学科

受付：61年2月5日

最終稿受付：61年5月19日

別刷請求先：中國吉林省延吉市

延辺医学院附属医院核医学科

方 明

Key words: Alpha-fetoprotein, Mass screening, Hepatocellular carcinoma.

現性、抽出時間、回収率試験、血清 AFP と濾紙血液 AFP との相関、ディスクの面積と AFP 含量との相関を検討した。臨床的検討として 1,120 例について濾紙血液 AFP 値を測定した。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

5 種類の濃度の標準濾紙血液を、8 回測定した標準曲線は、Fig. 1 に示すとおりである。その回帰曲線は $y = 65.73 - 0.085x$, $r = -0.937$ であった。キット指示書¹⁾によって 8 回作製した標準回帰曲

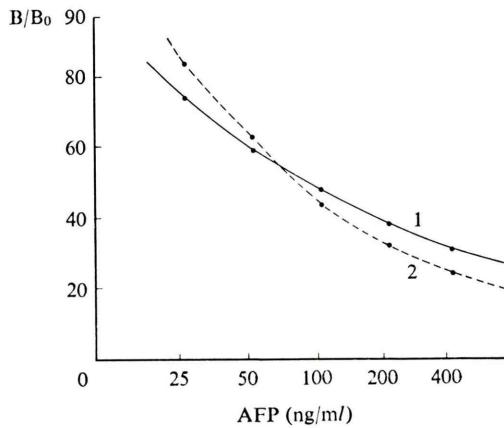


Fig. 1 Standard curve.
1: Dried blood RIA 2: Serum RIA

Table 1 Coefficient variation

Intra-assay		Inter-assay	
50 ng/ml	200 ng/ml	50 ng/ml	200 ng/ml
54	210	40	220
50	205	48	240
60	190	56	200
55	195	60	180
49	208	57	170
40	190	35	210
49	189	61	160
47	218	45	200
40	230	50	190
X	49.3	203.8	50.2
S.D.	6.2	13.1	8.5
C.V.	12.0	6.4	17.0
			190.7
			23.6
			12.0

線は $y = 80.34 - 0.133x$, $r = -0.963$ であり、2 種類の標準曲線はよく似ている。

2) 精度、再現性

Table 1 に示したように 50 ng/ml, 200 ng/ml 2 種類の濾紙血液につき、同一アッセイ内で 9 回測定した時の変動係数は、それぞれ 12.0 および 6.4 であった。一度作製した上記 2 種類の濾紙血液を室温(20°C)で保存し、5, 10, 16, 20, 24, 29, 35, 45 日と測定を行った。9 回の異なるアッセイでの変動係数は、それぞれ 17.0 および 12.0 であった。45 日間の AFP の測定値に著しい変化はなく、保存期間の AFP 活性はほとんど変化しないことが明らかになった。

3) 抽出時間

50 ng/ml 濾紙血液 4 枚をそれぞれ 5, 10, 20, 30, 40 分間振動抽出して測定したが、20 分で抽出は満足すべき結果(Table 2)であった。

4) 回収率試験

50 ng/ml, 200 ng/ml 2 種類の濾紙血液について測定した際の AFP 値と、同一濃度の標準 AFP を血清法によって測定した際の AFP 値と比較し、回収率を求めた。Table 3 に示すように、回収率は、それぞれ 91.8 および 93.6% であった。

5) 血清 AFP と濾紙血液 AFP との相関

Figure 2 は血清 AFP 値と同一検体の濾紙血液 AFP 値との相関関係をみたものであり、 $r = 0.86$ ($n = 46$) といよい相関がみられた。

6) ディスクの面積と AFP 含量との相関

300 ng/ml の濾紙血液の周辺から Table 4 のように異なる面積のディスクを切りとり、それぞ

Table 2 Effect of extraction time on AFP level (50 ng/ml)

Time (min)	5	10	20	30	40
Determine values (ng/ml)	29	51	50	49	47

Table 3 Recovery test

AFP (ng/ml)	Recovery (%)				$\bar{X} \pm S.D.$
	50	80	97	108	
50	80	97	108	85	91.8 ± 9.8
200	89	94	110	90	93.6 ± 8.7

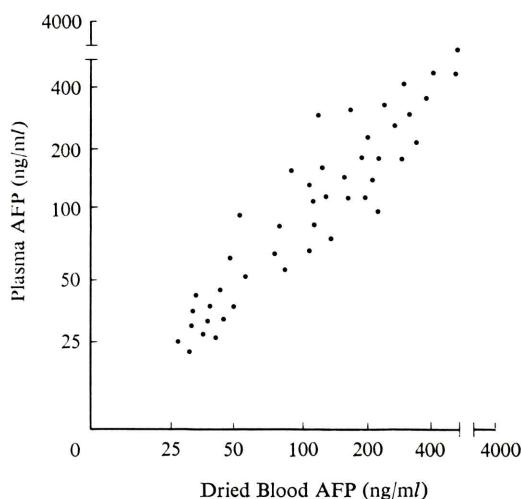


Fig. 2 Correlation between plasma AFP and dried blood AFP.

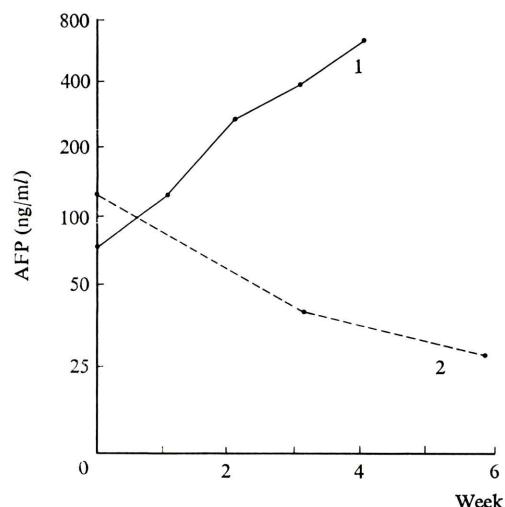


Fig. 3 Follow up study of AFP levels in a patient with primary liver Cancer (1) and a patient Hepatitis (2).

Table 4 Disc area and AFP values

Area (mm ²)	7.065	21.20	35.33	49.66	70.85
AFP (ng/ml)	29	85.5	150.0	199.5	305.0

れの AFP 含量を測定して、ディスク面積との相関関係をみたが、 $r=0.937$ というきわめて良好な相関が得られた。

2. 臨床的検討

従業員の保健検査として本稿のスクリーニング法により 1,120 例（年齢24～58歳、男 806、女 314）中、濾紙血液 AFP 異常値 72, 120 ng/ml の 2 例を発見した。上記 2 例ともに肝庇護の治療を施行して、 AFP がどのように推移するか follow up した結果、症例 1(男、42歳)の濾紙血液 AFP は急上昇し、第 4 週目には 670 ng/ml の高値を呈し、^{99m}Tc コロイド肝シンチグラフィー上、肝右葉に欠損が疑われた。

症例 2(男、52歳)の経過は治療第 3 週目の濾紙血液 AFP は 42 ng/ml、第 6 週目の AFP は正常 (AFP < 25 ng/ml) に回復し良好な予後であった (Fig. 3)。

IV. 考 案

Alpha-fetoprotein (AFP) は分子量が約 70,000

前後の、電気泳動図上、アルブミンと α -グロブリンの間に認められる胎児性蛋白質で、成人の正常血清中にも微量に存在するが原発性肝癌や睾丸の teratoblastoma、そして、時には激症肝炎でも、その血清濃度の上昇がみられ、特に原発性肝癌の早期診断に有効であることは周知のことである。原発性肝癌は急速に経過して死亡するのが常である。したがってその早期発見、早期治療はきわめて重要である。近年 AFP のラジオイムノアッセイが可能となり原発性肝癌の早期発見の可能性が生じてきた。しかし、血清 AFP ラジオイムノアッセイ法を原発性肝癌のスクリーニングに用いる時、検体の保存、輸送などにいろいろな問題が存在するため、その施行はなかなか難しい。したがってその濾紙血液を用いてスクリーニングするのはきわめて必要である。

濾紙血液からの AFP 測定は、感度のすぐれたラジオイムノアッセイの進歩によるところが大である。著者らは北方免疫試剤研究所の AFP キットが血清 10～20 μ l という微量で測定可能であること¹⁾を利用して、Mizejewski ら²⁾の方法に準じた緩衝液による濾紙血液からの AFP の抽出を行い、以下記のキットを用いてスクリーニングを

Table 5 Comparison of this method with literature

	This method	Literature ²⁾
Diameter of disc	9.5 mm	1.5 mm
Time of extraction	20 min	1 h
Volume blood of paper	10 μ l	60 μ l
Incubate	3 h	18 h
Recovery	91.8%	92.1%
C.V. Intra-assay	12	12
Inter-assay	17	12
Correlation with serum AFP RIA	r=0.867 (n=46)	r=0.96 (n=46)

行った。濾紙は先天代謝スクリーニングで使用されているPKU濾紙と東洋濾紙No.50を使用したが、一般に実験室で使われている新華定性濾紙を使用した方が実用的であった。濾紙9.5mm径1枚には約10 μ lの血液が浸される。抽出液全量を検体としたので血清相当量は(ヘマトクリット50%とすると)5 μ lになる。濾紙血液AFPは室温(20°C)で長期安定でありスクリーニングに適し、抽出の時に濾紙を取り除く必要がなく、操作がより簡便となった。

スクリーニングを目的とした濾紙血液からのAFP測定はGrenierら^{3,4)}がはじめて報告を行っているが、十分な感度を有しているラジオイムノアッセイ法はMizejewskiら²⁾によって報告された。本法とMizejewskiらの方法を比べ、その相違をTable 5に示した。

スクリーニングの結果、濾紙血液AFPが25ng/ml以上の時、鑑別診断が重要である。原発性肝癌と他の肝疾患との鑑別には AFP経時的变化の追究が役立つ。従業員保健検査のうち、早期の肝癌を発見するため施行したスクリーニングにより発見された2例の AFP異常値の経時的变化

をFig. 3に示した。本法によって肝疾患の一過性 AFP上昇と原発性肝癌の鑑別は明確にされると思われる。さらに、本法による AFP測定値と血清 AFP 値はよく相関し、ディスク面積と AFP 含量の相関も良好なので、本法は実際の原発性肝癌のスクリーニング法として非常に有用と考えられる。

V. 結論

以上原発性肝癌のスクリーニングに関するわれわれの成績について述べた。早期発見がきわめて重要な本症においては、スクリーニングはもっとも重要であると考えられる。

濾紙は室温(20°C)でも45日間保存で影響をみなかった。すなわち、国内の郵送による濾紙血液の収集も可能であると考えられる。

原発性肝癌の早期診断のためのスクリーニングに、今回検討した濾紙血液 AFP測定法が十分に応用できると考えられる。

文献

- 1) 北方免疫試剤研究所: AFP ラジオイムノアッセイ キット指示書.
- 2) Mizejewski CJ, Bellisario R, Beblowski DW, et al: Commercial radioimmunoassay kit for measurement of alpha-fetoprotein adapted for use with dried blood specimens newborns. Clin Chem **28**: 1207-1210, 1982
- 3) Grenier A, Belanger L, Laberge L: Alpha-fetoprotein measurement in blood spotted on paper: Discriminating test for tyrosinemia in neonatal mass screening. Clin Chem **22**: 1001-1004, 1976
- 4) Grenier A, Morissette J, Valet JP, et al: Polystyrene tube immunoradiometric assay for human alpha-fetoprotein and its use for mass screening. Clin Chem **24**: 2158-2160, 1978