総 説

////////////////////

腫瘍マーカーとラジオイムノアッセイ[†]

石 井 勝

埼玉県立がんセンター臨床検査部

362 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818

Key Words: tumor markers, radioimmunoassay, competitive assay, non-competitive assay, two antibody method, solid-phase sandwich method, fetal protein, cancer-associated antigen, carbohydrate antigen

1. はじめに

腫瘍マーカーによるがんのスクリーニングは、今日がんの検査法として不可欠のものとなりつつある。さらにがんの治療効果、再発のモニタリングとしても大いに役立つことが多数の腫瘍マーカーで報告されている。現在までに報告されている腫瘍マーカーは、がん細胞で産生され血中に移行する物質であるが、正常細胞あるいは非がん細胞にも若干産生される。すなわち、がん細胞にのみ質的に特異的な物質ではなく、量的にがん細胞で多量産生される物質である。したがって、正常人および非がん患者の血中にも微量存在し、がん患者の血中で増加が認められるものである。このためにがんと非がんを区別する腫瘍マーカーの一定の血中濃度を定める必要があり、この血中濃度をカットオフ値と称している。それゆえ、血中の腫瘍マーカーの測定には定量精度のすぐれた測定法を採用しなければならない。他方、がん細胞から血中へ腫瘍マーカーが移行することにより血中ではきわめて低濃度となる。たとえばがん患者でも腫瘍マーカーの大半は血中レベルではきわめて微量である。したがって、感度の鋭敏な測定法が腫瘍マーカーの検出に必要である。以上の理由から、腫瘍マーカーの検出には定量性がすぐれ、しかも高感度の測定法が必要なことは明白であるが、それに加えて特異性の高い測定法が必要である。このために腫瘍マーカーの大半はその検出に免疫学的測定法が採用されることが多い。免疫学的測定法の中でもとくに定量性がすぐれ、鋭敏な感度をもつ測定法

としてラジオイムノアッセイ（以下、RIA）と酵素免疫測定法（enzyme immunoassay, 以下、EIA）が挙げられる。とくに RIA は EIA に比べ感度がすぐれている。

RIA は、腫瘍マーカー発展の歴史上大きな貢献をしたことはいままでもない。同所性あるいは異所性ホルモン産生腫瘍における RIA による血中および尿中ホルモン測定は、従来のバイオアッセイに比べ飛躍的な学問の発達を促した。また、近年の腫瘍マーカー発展の発端となった α -フェトプロテイン(AFP)において RIA が多くの新しい知見をもたらした。EIA が実用化された今日でも、なお RIA が多用される理由は、たんに EIA よりも感度、定量精度および再現性が若干すぐれていることだけではなく、その研究歴に基づく知り尽くされた測定系に対する信頼性が高いことによると思われる。

以上、RIA が腫瘍マーカー測定に必要であるおもな理由を述べたが、以下に腫瘍マーカーについての概要を述べるとともに腫瘍マーカー測定に用いられる RIA を解説する。

2. 腫瘍マーカー

2.1 腫瘍マーカーとは

腫瘍マーカーの定義に関しては「主としてがんに由来する物質」と広く定義する説から「がん細胞が産生し、非がん細胞との間に質的あるいは量的差異を示し、体液中に移行する物質」と狭く定義する説まで諸説がある。具体的には、広範囲の定義ではがんの特異性の低い急性期反応物質(acute phase reactant)からがんと比較的特異性の高いがん胎児タンパク(oncofetal protein)まで相当広範囲の物質を含む。

腫瘍マーカーのはじまりは、1848年の骨髓腫におけ

[†] Tumor Markers and Radioimmunoassay. Masaru ISHII: Department of Clinical Medicine, Saitama Cancer Center, 818, Ina-machi, Kitaadachi-gun, Saitama Pref. 362, Japan.

る尿中 Bence Jones タンパク¹⁾で、ついで Aschheim-Zondek 反応²⁾に基づく悪性絨毛上皮腫における尿中の絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, HCG) である。さらに、腫瘍マーカー発展の基礎となったのは AFP である。1963年、ソ連の Abelev ら³⁾が肝がん移植マウスの血中に AFP の存在も指摘し、この現象は肝がん細胞が AFP を産生し血中に放出することによると解明した。これら腫瘍マーカー発展の歴史をふり返るならば、これらの物質はいずれもがん細胞によって直接産生されている。この腫瘍マーカーの歴史的事実に立脚して定義するならば、後者の定義づけが現段階では最も妥当と筆者は思う。今日までにヒトの腫瘍マーカーで、がん細胞のみが産生あるいは保有し、非がん細胞にはまったく存在しない、すなわちがん細胞に完全に特異的な物質は見出されていない。

筆者が主張する腫瘍マーカーの定義に合致する物質としては下記のようなことが実証される必要がある。
①がん組織抽出液中に存在し、しかも非がん組織抽出液と比較し多量に含有される物質であること、②蛍光抗体法あるいは酵素抗体法などにより病理組織学的にがん細胞に多量存在し、非がん細胞には微量しか存在しないか、まったく検出されないような物質であること、③培養がん細胞あるいはその培養液中に存在する物質であること、④がん移植動物 (たとえばヌードマウス) の血中およびがん組織中に存在が証明される物質であること。以上の4つの事実が証明されるならば腫瘍マーカーと判断して間違いがなく、臨床的にもがんの診断に役立つマーカーとなり得るであろう。

2.2 腫瘍マーカーの種類

腫瘍マーカーの分類にも種々の方法がある。がん細胞から容易に分泌されるタンパク (分泌型) と容易に分泌されないタンパク (非分泌型) に分類する場合、一般的に分泌型タンパクは原形質内に存在し、非分泌型タンパクは細胞膜タンパクであることが多い。また、特定臓器のがん診断に役立つ腫瘍マーカーと各種広範囲の臓器のがんと非がんの鑑別に役立つ腫瘍マーカーに分類される場合などがある。通常、つぎの4種類に大別されている。①胎児性タンパク、②がん関連抗原、③ホルモン、④酵素に分類される。表1にそれぞれに分類された各腫瘍マーカーを掲げた。これらの概要を以下に述べる。

2.2.1 胎児性タンパク

胎児期にのみ特異的に産生され、生後まもなく産生

表1 腫瘍マーカーの分類とその種類

1) 胎児性タンパク

α -フェトプロテイン (AFP), がん胎児抗原 (CEA), 塩基性フェトプロテイン (BFP), 臍がん胎児抗原 (POA), 胎児性プレアルブミン (EPA), β -がん胎児抗原 (BOFA)

2) がん関連抗原

骨髄腫タンパク (Mタンパク), アイソフェリチン, α_1 および β_2 -ミクログロブリン, 胎盤特異タンパク, 妊娠特異 β_1 -糖タンパク, 扁平上皮がん抗原 (TA-4), テネシー抗原, C3-DNA 結合タンパク, K-カゼイン, 結腸ムコタンパク抗原, 卵巣がん抗原, IAP, ポリアミン, CA19-9, CA125, CA50

3) ホルモン

HCG, 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH), リポトロピン (LPH), メラニン細胞刺激ホルモン (MSH), エンドルフィン, CLIP, 成長ホルモン (GH), 抗利尿ホルモン (ADH), ヒト絨毛性ソマトマンモトロピン (HCS), プロラクチン, カテコールアミン, 副甲状腺ホルモン, カルチトニン, インスリン, グルカゴン, ガストリン, エリスロポエチン, セクレチン, VIP, ソマトスタチン, プロスタグランジン, LH

4) 酵素

アルカリフォスファターゼ, γ -グルタミルトランスベプチダーゼ (GTP), アルドラーゼ, 前立腺性酸性フォスファターゼ, アミラーゼ

が停止され、したがって成人ではほとんど産生されないが発がんとともに、ふたたびがん細胞で産生されるようなタンパクを指す。いわゆるがん胎児共通タンパク、通常がん胎児タンパク (oncofetal protein あるいは carcinoembryonic protein) と呼ばれるものである。その代表例として AFP, CEA などが挙げられる。BFP (塩基性胎児タンパク) は、1974年筆者によってヒト胎児の血清および腸組織抽出液中に見出され、 γ グロブリン分画に電気泳動により易動する分子量73,000、等電点9.3の塩基性タンパクである⁴⁾。BFP はがん細胞の cytoplasm に主として局在する⁵⁾。1975年に BFP が精製され RIA が確立された⁶⁾。血清中の BFP を測定した成績では、正常ヒト血清中にも BFP は80 ng/ml 以下で存在する。BFP のカットオフ値を80 ng/ml に設定すると良性疾患の陽性率は19.7%で、とくに肝炎、肝硬変症で著しく高い陽性率が認められた。一方、がんの陽性率は44.2%で、とくに原発性肝がん、胆道系のがん、膵がん、白血病および肺がんなどで50%以上の高い陽性率が認められた。図1および図2に最も最近の血清 BFP 測定成績を示す。BFP は臓器特異性の低い腫瘍マーカーである。

図1 正常人, 諸種良性疾患症例の血清 BFP 測定成績

膵がん胎児抗原 (pancreatic oncofetal antigen, POA) は, 1974年 Banwo ら⁸ がヒト胎児膵および膵がん組織中に共通する抗原として発見した分子量約85万の糖タンパクである。POA は電気泳動上 β 位に易動する。胎児膵の ductal cellular element に局在する。POA は正常ヒト血清中にも存在するが, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下である。膵がんの26%, 胆道系がんの5%, 肺がんの20%, 大腸がんの14%が20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の陽性を呈すると報告⁷されている。大阪大学第2外科の島野らは POA が正常大腸組織に多量存在することを報告している。

2・2・2 がん関連抗原

最近, 最も注目される腫瘍マーカーは CA19-9 をはじめとする糖鎖抗原である。CA19-9 は, 1979年米国フィラデルフィアのウィスター研究所の Koprowski ら⁹ によって発見された糖鎖抗原である。彼らは, SW 1116 というヒト結腸がん由来培養細胞株を BALB/c マウスに静注免疫し, このマウスの脾細胞(B細胞)と BALB/cマウスの骨髓腫由来細胞株 (P3 $\times$ 63Ag 8) を融合させてハイブリドーマを作った。クローン化したハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の中で, 免疫に用いた SW 1116 ヒト結腸がん由来培養細胞の膜表面に最も強い抗体活性を示すモノクローナル抗体

が 1116 NS 19-9 と名づけた抗体であった。この抗体と反応する抗原は, 消化管の腺がん細胞膜に存在するため消化管がん関連抗原 (gastrointestinal cancer associated antigen, GICA) と呼ばれたが, 本抗原は monosialoganglioside であると解析された。さらに, 1982年には図3に示す構造をした糖鎖抗原であることが明らかにされた⁹。この抗原決定基は, ルイス式血液型抗原 Le^a のハプテンであるラクト-N フコペンタオース II のシアル化合物であった。本抗原は一種の carbohydrate antigen (CA) で, 1116 NS 19-9 抗体と反応するため CA19-9 と名づけられた。CA 19-9 は, 胃, 結腸, 膵, 胆嚢の腺がん組織に存在することがペルオキシダーゼ抗体法により証明された¹⁰。CA 19-9 は胎生 14-17週の消化管上皮にも存在する。このことは CA 19-9 が一種の oncofetal antigen であることを意味する。固相サンドウィッチ RIA による血清 CA19-9 測定成績を表2に示す。膵がんには79%の高い陽性率を示すが, 良性疾患では肝疾患を除けば陽性率はきわめて低く, 膵がんの腫瘍マーカーとして注目されている。

CA19-9 以外の糖鎖抗原として CA 125¹¹, CA 50¹² などが報告されている。CA 125 は Bast ら¹¹ によって報告された分子量11万の糖タンパクである。OVCA

表2 血清 CA19-9 測定成績 (Delvillano, B. らによる)

診 断	症例数	陽性率 (%)
正常人	2,700	0.4
良性疾患		
ウイルス性肝炎	103	3.9
薬物中毒性肝炎	14	14
慢性肝炎およびアルコール性肝炎	21	33
肝硬変症	106	19
原発性胆汁性肝硬変症	32	16
胆のう炎, 閉塞性黄疸	10	20
炎症性胃腸疾患	68	1.5
直腸良性腫瘍	40	2.5
脾 炎	34	2.9
自己免疫疾患	100	2.0
悪性腫瘍		
結腸直腸がん	145	38.6
胃がん	18	67
肝がん	94	49
胆道系がん	12	67
脾がん	85	79
肺がん	32	12
乳がん	57	10
他の非消化器系がん	141	7.1

瘍, とくに肺がんにみられる異所性産生 ACTH の多くは生物活性のない大分子 ACTH の増加による。このため, ACTH の RIA とラジオレセプタ アッセイ (RRA) の両測定を行い, RIA/RRA 比が高い場合には大分子 ACTH の増加を意味し, 肺がんの診断に役立つことが報告¹⁴⁾されている。異所性産生ホルモンとして HCG が原発性肝がん, 胃がんなどで報告されている。しかし, 異所性産生ホルモンの腫瘍マーカーとし

表3 血中 CA125 測定成績 (Bast, R.C. Jr. らによる)

測 定 対 象	総数	CA125 レベル	
		35U/ml 以上	65U/ml 以上
		例数 (%)	例数 (%)
健 常 献 血 者	888	9 1.0	2 0.2
男	537	4 0.7	2 0.4
女	351	5 1.4	0 0.0
良 性 疾 患	143	9 6.3	3 2.1
非婦人科領域がん	200	57 28.5	44 22.0
脾 が ん	29	17 58.6	13 44.8
肺 が ん	25	8 32.0	6 24.0
乳 が ん	25	3 12.0	2 8.0
大 腸 が ん	71	16 22.5	12 16.9
消化器系がん一般	30	8 26.7	6 20.0
非消化器系がん一般	20	5 25.0	5 25.0
卵 巢 が ん	101	83 82.2	75 74.3

ての有用性は一般に低い。

2・4 酵素

がんが特異的にアイソエンザイム (同位酵素) を産生することが, しばしば報告されている。しかし, 肺がん患者血中にみられる アルカリ フォスファターゼ (Reagan 型あるいは Nagao 型アルカリフォスファターゼ) などのように一般には出現頻度が少ない。臨床的に利用価値の高いエンザイムとしては原発性肝細胞がんの特異性の高い γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) アイソエンザイムと前立腺性酸フォスファターゼ (prostatic acid phosphatase, PAP) が挙げられる。原発性肝がんの特異的に出現する γ -GTP はグラジエン

(注) カットオフ値 2.0 ng/ml

図4 各種症例の血清 TA-4 測定成績 (RIA キットにて測定)

トポリアクリルアミドゲル電気泳動によりポストアルブミン領域に易動する γ -GTP 活性帯である。Sawabu ら¹⁵⁾は、原発性肝がん患者の55%にこの γ -GTP を検出したと報告している。PAP は、1964年 Shulman ら¹⁶⁾が、他の臓器由来の酸性フォスファターゼと抗原性が異なると報告して、PAP の免疫学的測定法による前立腺がん診断の試みがなされた。血清中 PAP をRIA で測定した Foti ら¹⁷⁾の成績によれば、正常域は3 ng/ml 以下で前立腺がんの約50-80%が陽性で、前立腺肥大症を主とする良性疾患の陽性率は約10%である。

3. 腫瘍マーカーに用いられる RIA

3.1 RIA の原理

競合結合法 (competitive assay) と非競合結合法 (non-competitive assay) の2つの様式がある。前者は、図5に示すように測定されるべき抗原 (腫瘍マーカー) とアイソトープ標識抗原の抗体に対する競合結合に基づく方法である。競合結合させた後に抗体結合アイソトープ標識抗原 (B) と非結合アイソトープ標識抗原 (F) を何らかの方法で分離し、BかFのどちらか一方の放射能活性を測定する。測定されるべき抗原 (腫瘍マーカー) の量が増加すればBは減少し、その結果Bの放射能活性は減少する。この方法には抗体、測定されるべき抗原 (検体中の腫瘍マーカー) およびアイソトープ標識抗原、3者ともに液体中で反応させる液相法と抗体を固体 (セルローズ膜ディスク、プラスチック試験管、ガラスまたはプラスチックビーズ、アガロースあるいはセファデックスゲルなど) に固着させた不溶化 (固相化) 抗体を用いた固相法の2方法がある。さらに、固相法には抗原 (腫瘍マーカー) を固体に不溶化し、アイソトープ標識抗体に対する検体中の抗原 (腫瘍マーカー) と不溶化抗原 (腫瘍マーカー) を競合させ、不溶化抗原に結合したアイソトープ標識抗体の放射能活性を測定する。この方法では測定されるべき抗原 (腫瘍マーカー) の増加に伴い不溶化抗原結合アイソトープ標識抗体が減少するため、その放射能活性が減少する。本法は radiometric assay と通常呼ばれている。液相法においてBとFの分離は諸種の方法があるが、B/Fの分離のすぐれた二抗体法とポリエチレングリコール (PEG) 法が最も多用されている。

非競合結合法はサイドウィッチ固相法とも呼ばれ、その原理は図6に示すように固体に固着させた抗体 (不溶化あるいは固相化抗体と呼ぶ) とアイソトープ標識抗体との間に測定されるべき抗原 (腫瘍マーカー)

図5 二抗体法 RIA の原理

図6 サンドウィッチ固相法 RIA の原理

をサンドウィッチする固相法である。

3.2 RIA の実際

現在市販されているホルモンを含む腫瘍マーカーの種類、標識アイソトープ (核種)、測定法、キット開発あるいは提供会社などを表4に示す。これらの大半は測定方法としては二抗体法と固相サンドウィッチ法、核種としては ^{125}I が用いられている。標識アイソトープとして ^{125}I が多く用いられる理由は、腫瘍マーカー (抗原) あるいは抗腫瘍マーカー (抗体) への標識が容易で、しかも放射能活性の減衰が比較的少ないことによる。二抗体法と固相サンドウィッチ法 RIA の実例としてヒト AFP について以下に述べる。

3.2.1 二抗体法ヒト AFP RIA

(1) ^{125}I 標識ヒト AFP の作製法

腫瘍マーカーの大半に用いられているクロラミンT法¹⁸⁾を用いて精製ヒト AFP を標識する。pH 7.4, 0.5 Mリン酸緩衝液50 μl に溶解した精製ヒト AFP 50-100 μg に37 MBq (1 mCi) の ^{125}I 溶液 (10 μl) を添加し、ついで蒸留水50 μl に溶解したクロラミンT 100 μg を加えて90秒間よく混和する。その後クロラミンTによる反応を停止するために蒸留水100 μl に溶解したメタ重亜硫酸ナトリウム240 μg を加える。よく混和し2分後蒸留水100 μl に溶解したヨウ化カリウム1 mg を加えて混和し ^{125}I の AFP への標識を終了する。 ^{125}I 標識 AFP と AFP に結合しなかった遊離の ^{125}I を分離するために直径10 mm、長さ22 cm のガラス管にセファデックス G-75 を pH 7.4, 0.1 Mリン酸緩衝液を用いて重鎮してゲルカラムクロマトグラフィーを行う。あらかじめ1%にウシ血清アルブミン

表 4 腫瘍マーカー RIA の種類

測定物質	核種	測定法	提供会社（開発会社）
I. 胎児性タンパク			
AFP	^{125}I	二抗体法	ダイナボット（自社開発）
	//	PEG 法	// （//）
	//	二抗体法	栄研イムノ（自社開発）
	//	PEG 法	科研（RCC）
	//	二抗体法	ミドリ十字（CIS）
	//	PEG 法	ヘキスト・ジャパン（Behring）
	//	二抗体法	第一 RI（自社開発）
	//	固相法	//（Mallinckrodt）
	//	二抗体法	日本トラベノール（Clinical Assay）
	//	固相法	塩野義（Pharmacia）
CEA	^{125}I	固相法	ダイナボット（自社開発）
	//	Z ゲル法	日本ロシュ（Roche）
	//	//	第一 RI（Roche）
	//	二抗体法	ミドリ十字（CIS）
	//	固相法	塩野義（Pharmacia）
	//	二抗体法	栄研イムノ（自社開発）
BFP	^{125}I	二抗体法	埼玉がんセンター 石井
POA	^{125}I	固相法	阪大、森ら
II. がん関連抗原			
フェリチン	^{125}I	固相法	ヘキスト・ジャパン（Behring）
	//	//	第一 RI（Mallinckrodt）
	//	二抗体法	ミドリ十字（CIS）
	//	//	日本トラベノール（Clinical Assay）
	//	//	ダイナボット（NEN）
	//	//	科研（RCC）
β_2 -マイクログロブリン	^{125}I	固相法	塩野義（Pharmacia）
	//	固相法	塩野義（Pharmacia）
	//	//	第一 RI（Pharmacia）
β_1 -SP ₁ (Pregnancy specific β_1 -glycoprotein)	^{125}I	二抗体法	ヘキスト・ジャパン（Behring）
TA-4	^{125}I	二抗体法	ダイナボット
CA19-9	^{125}I	固相法	富士レビュー（米国セントコア社）
	//	//	ミドリ十字（//）
CA125	^{125}I	固相法	北里バイオケミカル （プリストルマイヤー社）
CA50	^{125}I	固相法	Stena Diagnostic 社 （スウェーデン）
TPA (Tissue polypeptide antigen)	^{125}I	二抗体法	Sagtec Medical 社 （スウェーデン）
III. 酵 素			
PAP	^{125}I	二抗体法	栄研イムノ（自社開発）
	//	//	ダイナボット（NEN）
	//	//	日本トラベノール（Clinical Assay）
Aldorase	^{125}I	二抗体法	北大 浅香ら、埼玉がんセンター 石井ら
IV. ホルモン			
ACTH	^{125}I	DCC 法	科研（RCC）
	//	//	ミドリ十字（CIS）
アルドステロン	^{125}I	PEG 法	ダイナボット（自社開発）
	//	固相法	ミドリ十字（CIS）

測定物質	核種	測定法	提供会社 (開発会社)
Choriogonadotropin (HCG)	^{125}I	二抗体法	ミドリ十字 (CIS)
FSH	^{125}I	二抗体法	第一 RI (自社開発)
	//	DAPS 法	科研 (RCC)
	//	二抗体法	栄研イムノ (自社開発)
	//	PEG 法	ヘキスト・ジャパン (Behring)
	//	二抗体法	ミドリ十字 (CIS)
	//	DAPS 法	ダイナボット (DPC)
ガストリン	^{125}I	DCC 法	ダイナボット (自社開発)
	//	//	ミドリ十字 (CIS)
グルカゴン	^{125}I	DAPS 法	ダイナボット (自社開発)
	//	二抗体法	第一 RI (//)
インシュリン	^{125}I	二抗体法	ダイナボット (自社開発)
	//	固相法	// (//)
	//	//	塩野義 (Pharmacia)
	//	//	第一 RI (//)
	//	//	// (Mallinckrodt)
	//	二抗体法	栄研イムノ (自社開発)
	//	PEG 法	ヘキスト・ジャパン (Behring)
	//	二抗体法	ミドリ十字 (CIS)
	//	DCC 法	// (//)
	//	PEG 法	科研 (RCC)
LH	^{125}I	二抗体法	第一 RI (自社開発)
	//	DAPS 法	科研 (RCC)
	//	二抗体法	栄研イムノ (自社開発)
	//	PEG 法	ヘキスト・ジャパン (Behring)
	//	二抗体法	ミドリ十字 (CIS)
	//	//	ダイナボット (DPC)
C-ペプチド	^{125}I	二抗体法	第一 RI (自社開発)
	//	//	塩野義 (Pharmacia)
	//	PEG 法	ヘキスト・ジャパン (Behring)
プロスタグランディン E_2	^3H	二抗体法	日本トラベノール (Clinical Assay)
// $\text{F}_{2\alpha}$	//	//	// (//)
プロラクチン	^{125}I	二抗体法	ダイナボット (自社開発)
	//	//	第一 RI (//)
	//	//	ミドリ十字 (CIS)
	//	//	ヘキスト・ジャパン (Behring)
セクレチン	^{125}I	二抗体法	第一 RI (自社開発)
PTH	^{125}I	二抗体法	栄研イムノ (自社開発)
	//	//	ミドリ十字 (CIS)
HGH	^{125}I	二抗体法	ダイナボット (自社開発)
	//	//	栄研イムノ (//)
	//	固相法	塩野義 (Pharmacia)
	//	二抗体法	ミドリ十字 (CIS)
カルチトニン	^{125}I	二抗体法	第一 RI

を含む pH 7.4, 0.05Mリン酸緩衝化生理食塩水 1 ml を分注した各試験管にカラムクロマトからの溶出液を 1 ml ずつ採取する。各試験管に採取された 2 ml の溶液中 10 μl ずつ新たな試験管に採取し、ガンマカウンタで測定し、最初に溶出される放射能活性の分画が ^{125}I 標識 AFP であるので、このピークの分画を RIA

に用いる。図 7 にその分離例を示す。この方法で作製した ^{125}I 標識 AFP の ^{125}I 標識率は AFP 1 mg 当たり 370-740 MBq (10-20 mCi) である。標識された AFP は 4°C で保存する。

ホルモンの一部を除く腫瘍マーカーは、高分子糖タンパクのためクロラミンによる抗原の損傷は少なく、

図7 クロラミンT法で精製AFPを ^{125}I で標識した後に ^{125}I -AFPと遊離 ^{125}I をセファデックスG-75カラムクロマトにて分離した成績 (0.1 mCi=3.7 MBq)

簡単に標識率のすぐれたクロラミンT法が用いられるが、クロラミンの量、反応時間は腫瘍マーカーによって異なる。

(2) 抗AFP抗血清の作製法

RIAの感度に及ぼす大きな要因として抗原のアイソトープ標識率とともに抗血清のavidityの良し悪しが指摘される。Avidityの高い抗血清を得るためには十分な抗原量を比較的若い元気のよい動物に免疫することが肝要である。精製ヒトAFP 250 μg を生理食塩水500 μl に溶解し、これと等量のフロイント完全アジュバントと混和し乳化する。このエマルジョン液1 mlを家兎の大腿、腹壁の皮下および皮内に分割注射する。初回免疫後2週間間隔で同量のAFPを4回追加免疫して最終免疫後10~14日目に採血する。血清分離後56°C、30分間加温して非動化し、0.1%の率に窒化ソーダを加え4°Cで保存する。このようにして得られた抗血清はavidityの高い抗血清である。近年、ハイブリドーマ(抗体産生融合細胞)を用いて作製したモノクローナル抗体が腫瘍マーカーのRIAにも用いられつつある。その代表例としてはCA19-9、CA125が挙げられる。

(3) 第二抗体の作製法

BとFの分離に用いる抗血清(第二抗体)は、第一抗体(腫瘍マーカーに対する抗体)を作製するのに抗原(腫瘍マーカー)を免疫した動物の血清 γ -グロブリンを異種の動物に免疫して作製する。たとえば、抗ヒトAFP抗血清が兎を用いて作製したならば、第二抗体は兎の血清 γ -グロブリンを兎以外の動物、たとえば山羊に免疫して作製する。作製方法は第一抗体の作製と同様である。第一抗体を家兎で作製した場合、正常家兎血清より第二抗体の抗原として γ -グロブリン

を精製する。正常家兎血清を33%飽和硫酸アンモニウムを用いて塩析し、 γ -グロブリン分画を得る。この γ -グロブリン分画をさらにイオン交換カラムクロマトを用いて γ -グロブリンを精製する。精製 γ -グロブリン1 mgとフロイント完全アジュバントを混和したエマルジョン液を山羊の背部皮下に分割注射する。同様の方法で2週間間隔で4~5回同量の抗原を追加免疫し、最終免疫10日後に頸静脈から採血して抗家兎 γ -グロブリン山羊抗血清を得る。二抗体法RIAの測定精度、再現性は、この第二抗体の良し悪しにより影響を受けるところが大きい。

(4) AFP RIA 測定方法

上記に述べた ^{125}I 標識AFP、抗AFP家兎抗血清、

表5 二抗体法RIAのAFP測定手順

100 μl の被検血清または標準AFP液 500 μl の1%ウシ血清アルブミン, 0.01 M EDTA を含むpH 7.4, 0.05 Mリン酸緩衝化生理食塩水 100 μl の希釈抗AFP家兎血清 100 μl の ^{125}I 標識AFP (10,000 cpm)
↓ 4°C, 24-48時間インキュベーション (第1反応)
100 μl の希釈正常家兎血清(100倍希釈) 100 μl の抗家兎 γ -グロブリン山羊血清(第2抗体)
↓ 4°C, 12時間インキュベーション (第2反応)
3,000回転/分, 30分間遠心, 上澄液除去
↓ ガンマシンチレーションカウンタで沈殿物の放射能測定

図8 二抗体法AFP RIA標準曲線の一例

抗家兎 γ -グロブリン山羊抗血清を用いた二抗体法の AFP RIA の測定手順の一例を表5に示す。抗 AFP 家兎抗血清の ^{125}I 標識 AFP 結合能は、抗血清濃度、反応温度および時間によって左右されるので、あらかじめこれらを検討する。 ^{125}I 標識 AFP はガンマカウンタで約 10,000 cpmを用いる。抗 AFP 抗血清濃度は、用いた ^{125}I 標識 AFP の 50-70 %を結合する程度に希釈して用いる。B と F を分離する第二反応には第二抗体（抗家兎 γ -グロブリン山羊抗血清）のみでは B が沈殿しないので、第1抗体に用いた動物（家兎）の正常血清（正常家兎血清）を用いて B を共沈させる。第二抗体を十分量用いない場合には B と F の分離が悪く精度、再現性の低下を招く。図8に本法による標準曲線の一例を示す。AFP 16 ng/ml 以上では急峻な阻害曲線を示す。この標準曲線からは AFP 検出感度は 4 ng/ml 以上であるが、16 ng/ml から 256 ng/ml の範囲ではきわめて良好な精度が得られる。測定の実施にあたり操作上注意すべき点は、B・F 分離の遠心操作である。遠心後は速やかに上清を捨て、試験管口を下にして立て約5分間放置した後に試験管内壁に付着した上清をろ紙で拭きとる。このさい、遠心後は10分以内に上清を捨てることと管底の沈渣を拭き取らぬように細心の注意を払うことである。通常、標準抗原および検体ともに duplicate で測定し、その平均値を測定値とする。

3・2・2 サンドウィッチ固相法ヒト AFP RIA

固体に固着させた AFP 抗体（固相化 AFP 抗体）とアイソトープ（ ^{125}I ）標識 AFP 抗体間に測定されるべき AFP をサンドウィッチする方法である。このために固相化する AFP 抗体とアイソトープを標識する抗体を精製する必要がある。

(1) AFP 抗体の精製法

動物に免疫して作製した AFP 抗血清を 33%硫酸アンモニウムで塩析し γ -グロブリン分画を得る。さらに、硫酸アンモニウムを脱塩後に精製 AFP を結合させたセファロース 4 B ゲルを用いたアフィニティークラムクロマトにより AFP 特異抗体を精製する。この精製 AFP 抗体をペプシン消化して $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体としセファデックス G-150 カラムクロマトにより AFP $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体を精製する。

(2) 固相化 AFP 抗体の作製法

精製 AFP 抗体をプラスチック（ポリスチレン製、ポリ塩化ビニール製など）などの固体（ビーズ、試験管、マイクロタイタープレートなど）に固相化する。精製 AFP 抗体を pH 9.6, 0.1 M 炭酸緩衝液を用

表6 サンドウィッチ RIA 法の AFP 測定手順

AFP 抗体固着ペーパーディスク 50 μl の 5 倍希釈被検血清または標準 AFP 液
↓ 室温で3時間インキュベーション
希釈被検血清または標準 AFP 液を吸引除去 ペーパーディスクを生理食塩水で2回洗浄
↓
50 μl の ^{125}I 標識抗 AFP 液を添加
↓ 室温で18時間インキュベーション
^{125}I 標識抗 AFP 液を吸引除去 ペーパーディスクを生理食塩水で2回洗浄
↓
ガンマシンチレーションカウンタで放射能測定

図9 サンドウィッチ固相法 AFP RIA 標準曲線の一例

いて固相化する¹⁹⁾。固相化される AFP 抗体量は、抗体濃度、反応時間、温度により左右される。固相化された固体は緩衝液 (pH 8.0, 0.1 M トリス緩衝液など) 中で 4°C で保存する。

モノクローナル抗体を用いる場合は、抗体の精製は硫酸アンモニウム塩析法による γ -グロブリン分画程度で十分である。

(3) ^{125}I 標識 AFP 抗体の作製法

AFP 抗体への ^{125}I 標識方法は AFP 抗原への標識法とはほぼ同様である。用いる AFP 抗体は $\text{F}(\text{ab}')_2$ 抗体を用いるのが最良である。 ^{125}I 標識後はセファデックス G-75 カラムクロマトにより ^{125}I 標識 AFP 抗体

と非結合の ^{125}I を分離して ^{125}I -標識 AFP 抗体を得る。

(4) AFP RIA 測定方法

AFP 抗体を固相化したペーパーディスクを用いたサンドウィッチ AFP の測定手順を表 6 に示す。本法の特徴は二抗体法と異なり B/F の分離操作が不要なため熟練を要しない。測定操作上注意する点はペーパーディスクを乾燥させないことと生理食塩水で必ず 2 回は洗浄することである。図 9 に標準曲線の一例を示す。AFP 検出感度は 2 ng/ml 以上である。AFP $10\text{--}100\text{ ng/ml}$ の範囲は定量精度、再現性がとくに良好である。

4. む す び

腫瘍マーカーによる検査は、今日日常診療には欠かすことのできないがん検査法の一つであり、X線、超音波を用いた形態学的検査法、あるいは病理学的検査法と異なり簡便な検査法である。がんに対する診断の正確さは形態学的検査法より劣るが、最近 CA19-9 をはじめとするがんに対して特異性と陽性率の高い腫瘍マーカーも発見されますますます重視されつつある。さらに、がんの早期診断へ今後研究される必要があろう。数種の腫瘍マーカーを同時に測定することによりがんの陽性率を高める試みも報告され、早期がんのスクリーニングへの利用も考慮される。RIA は AFP, CEA, 各種ホルモンをはじめ多くの腫瘍マーカー測定に用いられているが、その理由は腫瘍マーカー検出感度が高く、定量精度がよいことによる。ヒトの腫瘍マーカーは正常ヒト血中にも微量存在するため、正確な正常域およびがんとなりを区別するカットオフ値の決定のためには、RIA に代表される特異性の優れた高感度測定法が必要である。RIA は酵素免疫測定法 (EIA) と近年比較されるが、RIA は EIA に比し、抗体量が少量で多数検体が測定でき、したがって抗体作製のための精製抗原 (腫瘍マーカー) 量も少量で済むという測定キット提供側にとって大きなメリットがある。さらに感度、定量精度の点でも EIA より優れた点があるため EIA が確立された今日でも RIA が腫瘍マーカー測定に用いられていると思われる。

以上、腫瘍マーカーと RIA について述べたが、日常診療、あるいは腫瘍マーカーの研究に少しでも役立つならば幸甚と思う次第である。

文 献

- 1) Johnes, H. B.: *Philosophical Transactions-Royal Society London*, **138**, 55-62 (1848)
- 2) Aschheim, S. and Zondek, B.: *Klin. Wschr.* **7**, 1453-57 (1928)
- 3) Abelev, G.I., et al.: *Transplantation*, **1**, 174-80 (1963)
- 4) Ishii, M.: *Scand. J. Immunol.*, **8** (Suppl.): 611-20 (1978)
- 5) Ishii, M.: "Carcino-Embryonic Proteins. Chemistry, Biology, Clinical Application" (ed. by Lehmann, F.-G.), Elsevier/North Holland-Bio-medical Press, Amsterdam, Vol. 1, pp. 333-40 (1979)
- 6) Banwo, O., et al.: *Lancet*, **I**, 643-45 (1974)
- 7) Gelder, F.B., et al.: *Cancer Res.*, **38**, 313-24 (1978)
- 8) Koprowski, H., et al.: *Cell Genet.*, **5**, 957-72 (1979)
- 9) Magnani, J.L., *J. Biol. Chem.*, **257**, 14365-69 (1982)
- 10) Atkinson, B.F., et al.: *Cancer Res.*, **42**, 4820-23 (1982)
- 11) Bast, R.C. Jr., et al.: *J. Clin. Invest.*, **68**, 1331-37 (1981)
- 12) Lindholm, L., *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **71**, 178-81 (1983)
- 13) Kato, H. and Torigoe, T.: *Cancer*, **40**, 1621-28 (1977)
- 14) Wolfson, A.R. and Odell, W.D.: *Arm. J. Med.*, **66**, 765-72 (1979)
- 15) Sawabu, N., et al.: *Gann*, **69**, 601-05 (1978)
- 16) Shulman, S., et al.: *Immunology*, **93**, 474-80 (1964)
- 17) Foti, A., et al.: *Clin. Chem.*, **23**, 95-99 (1977)
- 18) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: *Nature*, **194**, 495-96 (1962)
- 19) Catt, K. and Tregear, G.I.: *Science*, **158**, 1570-72 (1967)