

## 私の $\alpha$ -フェトロテイン小史

愛媛労災病院 院長、香川医科大学 名誉教授

### 西岡 幹夫



われわれは、現在、必要とする腫瘍マーカーを、わずかな血清から EIA や RIA、最近では CLIA（化学発光免疫測定法）などを用いて測定し、また、検査センターに外注し、診断や治療のマーカーとして使用している。しかし、これら腫瘍マーカー研究とその普及にも、やはり、歴史があり、私も約40年前ではあるが、その研究の一端に関われたことは、今、思い出しても懐かしい。

#### 腫瘍マーカーとしての AFP

$\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) はがん胎児性蛋白として、また、各種腫瘍マーカーの中で最初に発見され、この分野の歴史を作った大変意義深い蛋白であることは言うまでもなからう。

AFP 研究は1944年、Pedersen<sup>1)</sup> が牛胎血清から、胎児特異蛋白を超速心法を用いて発見し、Fetuin と命名したのが始まりである。その後、1963年、ロシアの Abelev<sup>2)</sup> が肝がん移植マウスの血液中に胎児蛋白が出現するという重大な発見をし、癌胎児性蛋白として報告した。その翌年、ロシアの Tatarinov<sup>3)</sup> は原発性肝癌（肝がん）患者血清にヒト AFP を検出した。1967年、Abelev、フランスの Uriel ら、1968年、英国の Foli ら、米国の Alpert らによって、同様な報告がなされ、AFP はヨークサック腫瘍を除いては、原発性肝癌にきわめて特異性のある蛋白、また、がんの血清学的診断法として注目される。

#### AFP 測定の追試

わが国では、その頃、肝がんは稀な疾患であり、進行したものが多かった。恩師、藤田輝雄教授（山口大学第一内科）はその早期診断に主眼をおいておられたので、Abelev や Tatarinov らの研究を見逃されるわけではない。1968年ごろだったと思うが、その追試を、われわれのグループに指示される。

私は当時、山口大学大学院を修了し、京都大学病理学教室（濱島義博先生）に内地留学し、最先端の技術であった蛍光抗体法を学び、慢性活動性肝炎への免疫化学的アプローチをしていた。

早速、Abelev や Tatarinov の文献を読み返し、がん化による胎児蛋白の再産生、脱分化現象の機序、さらに、未分化という癌の属性に関する物質的な根拠に大変興味を持つ。また、濱島先生仕込みの免疫組織化学的手技は AFP による肝がん診断の追試のみならず、発がんの研究にも役に立つと思った。

#### AFP 抗体の作成

まず、特異性の高いヒト AFP 抗体の作製から始める。今のように抗体は市販されていない。効果的に抗血清を作るために、一工夫し、患者血清の34%飽和硫酸上清（グロブリン分画を除いた粗 AFP 分画）を抗原として使い、Freund's complete adjuvand と共に、家兎に数回免疫した。免疫法は濱島先生自らの手で教わったものだ。抗体産生が待ち遠しく、家兎の耳から何回も採血し、Ouchterlony 法によるゲル内二重沈降反応

でAFP抗体活性を調べる。2ヶ月後、粗AFP抗原をブースター注射し、採血し、粗AFP分画、肝がん患者血清、3ヶ月胎児組織抽出液などと反応し、正常ヒト血清とは反応しない抗体、少なくとも1:10以上の抗体価を持つ家兎血清を免疫開始3ヶ月後には得ることが出来た。意外に簡単にAFP抗体が作成され、自分の目を疑う。正常ヒト血清で十分吸収し、当座はAFPの検出に用いた(図1)。恩師、奥田邦雄先生(千葉大学、名誉教授)が山口大学時代に英語で論文を書いていたので、下手な英語ながら、このAFP抗体作成法と臨床応用について論文に仕上げ、ヨーロッパの学術誌に投稿した。即座に受理され<sup>4)</sup>、われわれの研究に少々自信を持ったものだ。

### 肝がん診断への応用

肝がん、ならびに各種疾患の血清との反応性をゲル内沈降反応で調べると、海外のTatarinovやAlpertらと同じような成績が得られた。この成果を藤田教授にお話しすると、わざわざ研究室まで来られ、ゲル内の沈降線を確認、早く、写真を撮るよう指示される。大変喜ばれたご様子で、発表するようにと急がされる。そして、早速、第43回山口医学会例会(1969年、11月)に、副手だった沖田極君(山口大学、現名誉教授)が“ $\alpha$ -fetoproteinに関する研究—特にその臨床”といタイトルで発表し、論文にする<sup>5)</sup>。なお、わが国におけるAFPの臨床応用は、東大の遠藤康夫<sup>6)</sup>(13週胎児の組織抽出液を用い作成したAFP抗体)、また、九大の平山千里、入佐俊武<sup>7)</sup>(胎児血清のゲルろ過分画で作成したAFP抗体)らが、われわれよりやや先行していたと思う。

### 日本癌学会シンポジウムで発表

肝がんにおけるAFP研究はわが国では極めて短期間に進展し、1971年11月、東京で、“Alpha-fetoprotein and Hepatoma”という日本癌学会シンポジウムが世界の研究者を集めて開催された<sup>8)</sup>。そこには1970年12月における肝がんのデー

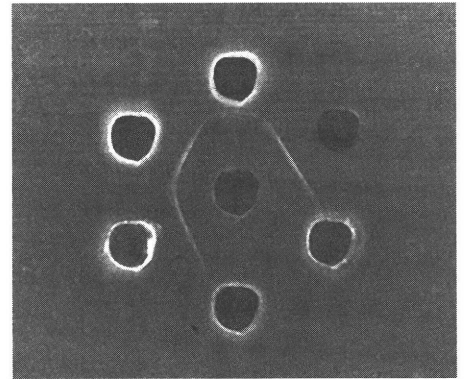


図1 寒天ゲル内二重拡散法によるAFPの検出  
中心のwellにはAFP抗体、周辺のwellには肝がん患者血清、また、胎児抽出液を入れる。各沈降線が完全に融合すれば、同一の抗原性を有する。

タとして、北大、札幌医大、新潟癌センター、東大、癌センター、日大、岡山大、山口大、九大におけるAFP陽性率の成績が示され、われわれも日本における初期のAFP研究に貢献したことになろう。平井秀松教授(北大、生化学)はこのモノグラフの序文で“*In Japan it has been only three years since the study of this protein began, nevertheless the procedure mentioned has been widely employed, and more than several hundred cases of primary liver carcinoma have already been examined.*”と述べられているが、斬新な研究もまた、進んでいた。これらはAFPの生化学、ならびに、病態生理学的研究、AFPによる肝がんの診断、その他のがんとAFP、肝がんにおけるAFP局在と病理、ならびに、実験肝がんとAFPなどなどで、量、質ともに世界をリードするものであったと思う。

1968年から始めたわれわれのAFP研究はこの頃にはほとんど仕上がっており、本シンポジウムで発表の機会が与えられた。①AFPの精製法と検出法の問題点、②肝疾患や各種腫瘍におけるAFP、③血清AFPレベルの意義と肝組織内AFP局在、④肝がんのhistological gradingsとAFP、

⑤過去3年間のAFP testの成績、などについて述べる<sup>9)</sup>。国内外におけるこの領域の専門家と初めて議論できたことは、若輩の、世間知らずの私にとって、大変有意義であったことは言うまでもない。

同シンポジウムにおいて、また、Messeyeffが述べたように、U.S.S.R、France、U.S.A.は勿論のこと、Spain、Greece、Great Britain、Asia (Hong Kong、Indonesia、Malaysia、Taiwan)、さらに、Africa (Congo、Kenya、Mozambique、Nigeria、Senegal、South Africa、Uganda)において肝がんにおけるAFP陽性率が1970~1971年にすでに報告されていたことは驚きであった。有用な、普遍性のあるトピックは短期間に世界中を駆け巡り、研究が進展するのは科学の常であろうと考えた。なお、世界各地において、肝がんのAFP陽性率に差があることは、私には興味深かった。

### PGAEによる肝がん血清の解析

1960年代の初めから、チゼリウスの電気泳動法の他に、免疫電気泳動法、さらには、ディスク電気泳動法(PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis)がヒト血清や体液の研究にも応用されていた。われわれも早速、中村正二郎教授(山口大学、医化学)の指導で、肝がん、ならび

に、ヒト胎児蛋白の分析にかかる。肝がん患者血清には正常血清と異なった泳動像が見られ、とくに、albuminのすぐ後、alpha 1-lipoproteinの前に特異分画の存在に気づく(図2)。本分画は肝がん11例中7例に、さらに、胎児やその肝臓組織抽出液にも認められ、ヒト健康人血清には存在しないことから、本分画はAFPと考えられた<sup>10)</sup>。

そこで、これまでのPAGEによる血清蛋白の研究をよく調べてみると、中村らはヒト血清にalbuminのすぐ後に出現する分画をpostalbumin分画( $\delta$ 分画)と命名している。さらに、私の同級生、茂木五郎(大分大学、名誉教授)が肝がん11例中7例に、さらに、胎児やその肝臓組織抽出液にも認められ、ヒト健康人血清には存在しないことから、本分画はAFPと考えられた<sup>10)</sup>。しかし、その他の悪性腫瘍や腎疾患でも本分画は陽性と述べている。その後、よく話したものだが、中村、茂木らは本分画を臨床との関連で詳細に検討しておれば、Abelevに先駆けて本分画を肝がん特異的蛋白として捕えていたに違いない。如何せん、茂木は耳鼻咽喉科を専攻していた。

われわれは弘長恭三(山口大学付属病院、薬剤部)とともに、早速、本分画の解析を始めた。肝がん患者血清を泳動したpolyacrylamide gelを手製の、前もって切れ目の入ったゲル切断チューブに入れ、真横に2分し、さらに2mm幅で縦にゲルを切る(図3)。その一方をアミドブラック染

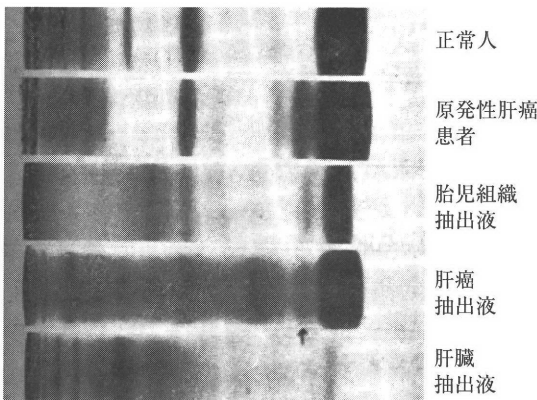


図2 血清ならびに組織抽出液のディスク電気泳動像  
矢印はAFP分画を示す

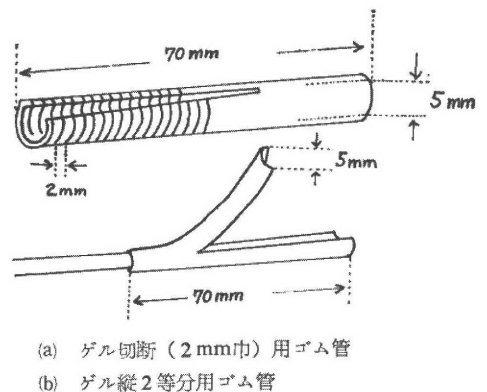


図3 われわれの考案したゲル切断装置

色し、目的とする分画であることを確認し、他方を AFP 抗体を用いてオクテルロニー法によって AFP と同定する<sup>12)</sup>。後日談ではあるが、このわれわれの PAGE 蛋白同定法は、ヨーロッパの研究者によってほぼ同じ手法で発表され、特許が取られたらしい。

### 高感度 AFP 測定法を求めて

肝がんにおける AFP 検出率は必ずしも100%ではない。そこで、AFP Test の特異性や高感度測定法の開発が検討された。われわれは調整ディスク電気泳動法装置（高さ；20cm、幅；15cm、厚さ；1.5cm）用いて、胎児組織抽出液より AFP を精製し、特異抗体を作成する。そして、臨床応用するも、AFP 陽性率には影響を及ぼさなかった。

AFP 検出方法に関しては、ゲル内二重拡散法には限界があり、つまり、感度が高くなく、免疫電気泳動を取り入れた Bussard の electrosyneresis (IES) を導入した。1%寒天 (Difco noble) ペロナールバッファー (pH 8.4) を用いてスライドグラスに高さ 1~2 mm のゲルを作成する。これにペアーの well を 10mm 間隔でいくつか作り、陰極側に被検血清を、陽極側に AFP 抗体を入れて泳動する。AFP は陽極側に、AFP 抗体は陰極側に流れて沈降線を形成する。われわれはさらに、陽極側の well に蛍光標識抗家兎  $\gamma$ -グロブリンを加え、もう 1 回、泳動する。つまり、松橋らの蛍光免疫拡散法を応用して検出感度を高めた。この場合、沈降線は蛍光顕微鏡で観察しなくてはならないので、やはり煩雑といえよう。この免疫拡散法を AFP 検出に取り入れたのはわれわれが最初であった。なお、AFP の測定限界はオクテルロニー法では 1.7mg/dl、IES では 0.4mg/dl、蛍光拡散法では 0.1mg/dl である<sup>13)</sup>。

肝がん患者血清の AFP 濃度は多くの症例で、経時的に増加し、その濃度の測定は治療、予後のマーカーとしても有用であった。われわれも Mancini らの一元免疫拡散法によって AFP 定

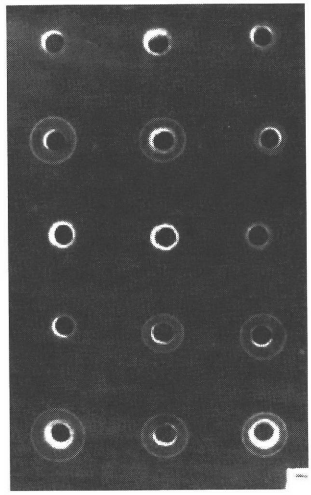


図4 一元免疫拡散法 (Mancini 法) による AFP 定量

量を行った。温熱溶解させた 1%寒天 (Difco noble) 生塩液に少量の AFP 抗体を加え、スライドグラス、また、シャーレに注ぎゲルを作る。これに小さな well を作り、被検血清、ならびに、基準となる粗 AFP 液を入れる。翌日、出来上がった抗原抗体複合体のリング (図4) を計測し、AFP 濃度を算定する。この基準となる AFP 濃度は粗 AFP 液をキエルダール法によって窒素定量し、粗 AFP 液のディスク電気泳動像をもとに算定する。なお、AFP が精製されたのちは、これを用いて基準線を作成したことは言うまでもない。

その後、西 信三ら、石井 勝らは Radioimmunoassay を確立し、AFP 濃度の測定は ng/dl 単位となり、また、AFP の定量は検査センターなどで行われるようになった。

### 研究の楽しさ

資料や器具であふれかえる机の上で、朝から夜遅くまで毎日、本当によく実験した。いつ実験しても、誰がやっても同じ結果が出る。つまり、実験の再現性と普遍性があり、さらに予想した結果がどんどん出るので研究に夢中になった。獲物を追うように毎日が楽しかった。ま

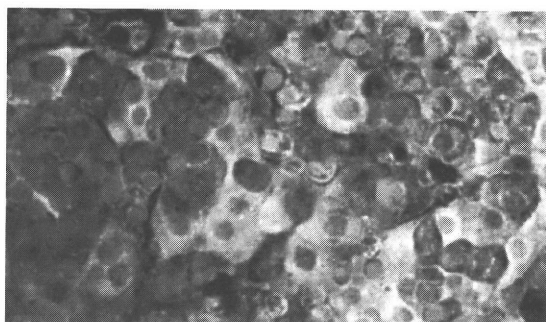


図5 肝がん細胞におけるAFPの局在肝

た、凍結切片を作る大きなクレオスタットは大変高額な器具で、貴重品のように大切に使い、アフターケアも十分にしたものだ。夜遅く実験が終了すると、皆で街に出かけ、赤ちょうちんで一杯飲んだのも良い思い出である。宮里 薫（山口大学大学院生）、井端孝義（同大学院生）、沖田 極（山口大学副手）、弘長恭三（山口大学薬剤部）君らがこの研究の当初の仲間だった。PAGEによる胎児蛋白の研究に青春をかけた弘長恭三君は薬学部出身ながら、この研究で医学博士となったが、その彼はもういない。

### AFP 産生細胞の証明

肝がん細胞がAFPを合成するという直接の証明はなく、この解析には蛍光抗体法が良いことはAbelevも述べていた。AFPの組織内固定法が問題であった。われわれはAFPの組織内固定にはAFPがアルブミンとほぼ同じ等電点を持つことから、Albumin固定法にならい、95%アルコールに0.5%氷酢酸を加える方法を利用した。染色法にいろいろ工夫を加えることにより、肝がん細胞におけるAFPの局在を証明できた（図5）。山口大学にはツァイスの蛍光顕微鏡がなく、プレパラートを持って、京都大学、濱島教室にまで出かけ、良い写真を時間をかけて撮ったものだ<sup>14)</sup>。肝がん細胞には、3つのAFP局在様式がみられ、細胞質、細胞膜、ならびに、核膜に認められ

る。細胞質型が多く、また、高濃度AFP陽性患者では腫瘍細胞の約20%にAFP陽性細胞が存在する。したがって、AFPは肝がん細胞の構成成分やマーカーではなく、分泌蛋白と思われた。また、胎児肝細胞においても、ほぼ同様なAFP局在所見を認める。これらは世界で最初に明らかにされた所見と思い、Cancer Researchにその旨をintroductionに書いて投稿した。Reviewerから“肝がん細胞におけるAFP産生”についてはすでに、Engelhardt<sup>15)</sup>が報告しているので、この文献を加えるようにとcommentが返ってきた。早速これを加えて、再投稿し、即刻、publishされた<sup>16)</sup>。なお、この論文はいろいろな点でうまくまとめられていた。研究が行き詰まったり、論文が書けなくなった時など、しばしば読み返し、そして、勇気を鼓舞されたものだ。大げさな言い方が、私のバイブルといえようか。

— つづく —

### 文献

- 1) Pedersen, K.O.: J. Phys. and Colloid Chem., 51: 164, 1947.
- 2) Abelev, G. I., *et al.*: Transplantation, 1: 174, 1963.
- 3) Tatarinov, Y. S.: Vopr. Med. Khim., 10: 90, 1964.
- 4) Nishioka, M., *et al.*: Digestion, 4: 65, 1971.
- 5) 沖田 極, 他: 肝臓, 11: 194, 1970.
- 6) 遠藤康夫, 他: 肝臓, 10: 143, 1969.
- 7) 平山千里, 入佐俊武, 他: 福岡医誌, 60: 615, 1969.
- 8) Hirai, H. *et al.*: GANN Monograph of Cancer Research, 14: 1, 1973.
- 9) Nishioka, M. *et al.*: GANN Monograph of Cancer Research, 14: 205, 1973.
- 10) 西岡幹夫, 他: 肝臓, 11: 402, 1970.
- 11) 茂木五郎, 他: 生物物理化学, 11: 171, 1965.
- 12) Nishioka, M., *et al.*: Clinica Chimica Acta, 31: 439, 1971.
- 13) Nishioka, M., *et al.*: Digestion, 6: 205, 1972.
- 14) 西岡幹夫, 他: 医学のあゆみ, 77: 150, 1971.
- 15) Engelhardt, N. V., *et al.*: Int. J. Cancer, 7: 198, 1971.
- 16) Nishioka, M. *et al.*: Cancer Research, 32: 162, 1972.