

私の α -フェトプロテイン小史(9)

香川医科大学 名誉教授 西岡 幹夫

糖鎖構造に基づく AFP の亜分画

Radioimmunoassay (RIA) による AFP テストの普及は肝細胞癌の日常診療において大きなインパクトを与えるとともに、一方では肝炎、肝硬変など良性疾患においても血清中の AFP 値が上昇することが分かった。これらの良性疾患の30-40%の症例に低濃度ながら AFP が認められ、AFP は stage-specific antigen として注目される。しかし、肝細胞癌に特異的な AFP テストのためには AFP L 3 分画とその測定法の確立を待たねばならない。

糖鎖構造に基づく AFP の亜分画はコンカナバリン A (Con A) 親和グラマトグラフィーによって、Smith C, J らによって報告された¹⁾。これは AFP 糖鎖のレクチン結合性を利用したもので、これを契機に糖鎖構造の差に基づく AFP 亜分画の研究が進む。そして、糖鎖構造の特異的な変化を検出して、AFP の蛋白エピトープ部分の検索では求められないような情報が得られるようになる。各検体の AFP は、免疫沈降反応を用いると、AFP 抗体と完全に一本の沈降線となり、また、検体の沈降線はお互いに完全につながるにもかかわらず、その AFP のレクチン結合性に差のあることは、当然と言えば当然だが、私には驚きであった。

ヒト AFP の Con A に対する反応性は肝由来とヨークサック由来では異なり、また、両者は妊娠初期羊水ではほぼ同じ割合、一方、晩期羊水では Con A 反応性 AFP が主であるという Rouslahti E らの報告²⁾ に私は特に興味を持つ。すでに述べたように、当時、私は癌細胞に対する T 細胞の免疫応答が AFP によって抑制されるのではないかと考え、ラット抗腫瘍性 T 細胞に対する AFP の抑制作用、さらに、ヒトリンパ球研究の一環として、AFP に

よる非特異的免疫抑制能などを解析していた。そこで、糖鎖構造の異なると思われる AFP を妊娠後期羊水、肝硬変、肝細胞癌やヨークサック腫瘍の患者血清から精製し、これら AFP についてヒト T 細胞の非特異的抑制能 (PHA による幼若化反応、ならびにロゼット形成能) を解析する。しかし、いずれの AFP もこれらの抑制作用はなく、AFP の T 細胞免疫抑制能は認められなかった。

各種疾患における AFP 亜分画

各疾患における AFP 糖鎖構造の差が明らかになったが、その糖鎖構造をそれぞれの患者で決定し、診断に応用することは手技的に困難である。しかし、親和グラマトグラフィーや親和電気泳動法を用いて、検体 AFP の各種レクチン結合性 (Con A, レンズマメ・レクチン (LCA)、赤血球凝集性インゲン豆レクチン (E-PHA)、カブト虫幼虫レクチン (allo A) など) から AFP 亜分画が同定され、その臨床応用が始まる。

各疾患について、レクチン親和電気泳動法による代表的な AFP 泳動パターンを後に示すが、AFP バンドについては、一番陽性側に移動するバンドを 1 とし、移動が遅れる順に、つまりレクチンへの親和性が強くなる順に、2、3 などとし、その番号を用いたレクチンの頭文字の後に記載する^{3, 4)}。これは武田の命名法で現在も使われている。

臍帯血清では Con A 反応性 AFP-C2、LCA-A と非反応性 AFP-L1、E-PHA と非反応性 AFP-P2 がほとんどである。慢性肝炎と肝硬変では臍帯血清のパターンを示す。肝細胞癌では Con A-2、LCA- A 反応性 AFP-L3、E-PHA 反応性 AFP-P4 が増加する。ただ、劇症肝炎や急性肝炎においても、時に、AFP-L3、

やAFP-P4が増加し、急激な肝壊死後の未分化肝細胞の再生によると考えられた。ヨークサック腫瘍や肝外AFP産生腫瘍ではAFP-C1、AFP-L2、3とAFP-P5がみられる(図1;武田ら)。従って、各種疾患において、レクチン結合性AFP亜分画に特徴があることが分かる。なお、各バンドのレクチンの割合、また、各バンドの組み合わせなども鑑別診断に役立つ。

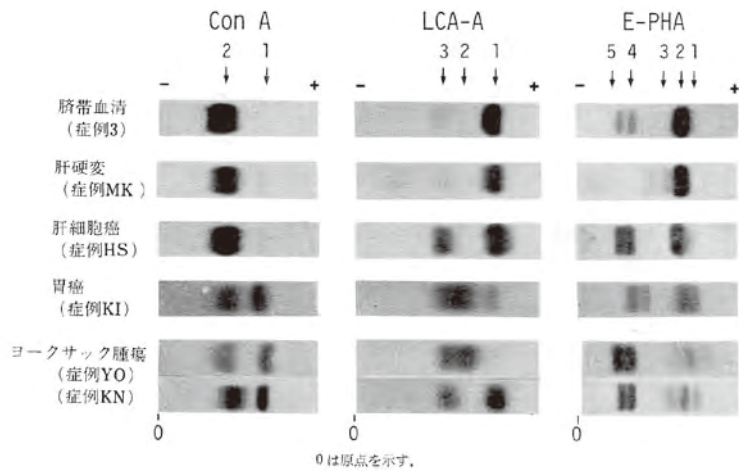


図1 AFPのレクチン親和電気泳動パターン

AFP-L3検査

AFP-L3の肝細胞癌特異性が明らかとなり、その測定法が吟味され、臨床応用が始まる。坂本はLCA結合セファロースを用いた親和性クロマトグラフィーにより検体を分離し、得られた各分画のAFP濃度をELISAで測定する⁵⁾。AFP-L3分画の測定は良性肝疾患と肝癌との鑑別にも有用であった。

武田らはレクチン含有アガロースで分画されたAFPを、抗AFP抗体を結合させたニトロセルロース膜に特異的に転写し、さらに、酵素抗体間接法によって染色するという抗体親和プロット法を開発した⁶⁾。酵素抗体間接法の発色にテトラゾリウムを用いてAFP検出感度をあげ、また、多数の検体を同時に泳動することを可能にした。本法は他施設共同研究によって有用性が確認され⁷⁾、和光純薬工業株式会社によって商品化された。

そのAFP-L3分画テストワコーを用いて、われわれは肝細胞癌の早期診断の意義について和光純薬と共同研究した。対象症例は肝細胞癌の合併のないAFP陽性慢性肝炎34例(AFP値は平均113.6ng/ml)とAFP陽性の肝硬変35例(同、315.9)で、3-4カ月ごとにAFP-L3を測定し、同時に肝癌の画像診断を行う。慢性肝炎から肝癌へ移行した症例は平均3年間後に14例(41.2%)、肝硬変から肝細胞癌へ移行した症例は平均2.7年間後に21例(60%)であった。AFP陽性慢性肝疾患69例中35例(50.7%)は肝細胞癌に移行したことになり、その22例

(62.9%)がAFP-L3陽性であった。これらの症例の7例(31.8%)は肝細胞癌と診断される以前に、15例はほぼ同時にAFP-L3が陽性であり、本研究から、AFP-L3は肝細胞癌の早期発見においても有用な腫瘍マーカーであると報告した⁸⁾。約20年前、肝細胞癌の画像診断の精度が今に比べると劣る時代であり、AFP-L3は有用なマーカーと考えた。なお、当時、和光純薬の宮本義夫取締役は私の高校時代の同級生で、偶然にも、旧交を温めることができた。

AFP-L3測定キットは臨床検査として普及し、和光純薬ではさらに、短時間で測定可能な第2世代AFP-L3キット、さらに高感度な第3世代の機種、ミュータスAFP-L3が数年前から実用化され、AFP 1mgでも分離可能で、AFP-L3が7%以上あれば肝細胞癌を疑うという学会発表もあると聞く。

武田先生の国際腫瘍マーカー学会受賞

武田先生は、もう50年以上前のことだが、岡山大学の第1内科、小坂内科に所属し、日本肝臓学会などで活発に討議に加わっておられた。米国に留学後、肝臓の糖新生酵素の研究に従事し、成果は一流誌、J Biol Chemに数編を発表され、TCA cycleで有名なノーベリスト Krebs H教授とも旧知の仲とのことだ。

武田先生は1980年、香川大学の保健管理センター



図2 ダッカにて



図3 ハノイにて

に教授として移られ、少し遅れて、私も香川医科大学に勤務し、大学はもとより当地の研究会等でもいろいろお世話になった。先生はこの頃からAFPの研究、特にAFPの糖鎖に関する研究を始められたらしい。1991年には岡山大学の公衆衛生教授になられ、その後もAFPの基礎的、臨床的研究を続け、すでに述べたように、AFPのレクチン親和電気泳動を發展させ、肝細胞癌のルーチンの診断薬を開発された。

これらの業績に対して、武田先生は国際学会賞、International Society of Oncology and BioMarkers Abbott (ISOBM Abbott AWARD 2008) 受賞の栄誉に輝かれた。遅ればせながら、この紙面を借りて、お祝いを申し上げたい。

先生はHuH-7(分化型肝細胞癌細胞株)を樹立され、本株は世界的に使われており、この細胞を用いてB型ならびにC型肝炎ウイルスは分離されると聞く。また、長年、ミャンマー等に出かけて研究、診療等にNPO法人の一員として活躍され、知人ぞ知る所である。

いささか古い言い回しだが、先生は国際人で、英語の講演もうまい。私は先生と一緒に、何度か諸外国に講演旅行に出かけた。その当時、私の教室に大学院生や研修生を派遣している大学等からしばしば当地で講演や肝臓病に関する講演会のコーディネートを頼まれたものだ。ダッカ大卒後医学教育施設、肝臓科やハノイ大学医学部では武田先生にも講演をお願いした。“The Second Symposium on Liver Disease in Dhaka 1996”に参加した時の懇親会のス

ナップ(図2)、ならびにThe first Symposium on Hepato-Biliary Diseases in Hanoi Viet Nam 2000における講演後のスナップ(図3)を示す。

つづく

文献

- 1) Smith C, J and Kelleher P, C. α -fetoprotein : Separation of two molecular variants for affinity chromatography with concanavalin-agarose. *Biochim. Biophys. Acta*, 317: 231-235, 1973.
- 2) Rouslahti E and Seppala M. Developmental changes in carbohydrate moiety of human α -fetoprotein *Int. J. Cancer*, 22: 515-520, 1978.
- 3) Taketa K, Sekiya C, Namiki M, et al. Lectin-reactive profiles of alpha-fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions *Gastroenterology*, 99: 508-518, 1990.
- 4) 武田和久 AFP糖鎖構造の差による肝疾患の鑑別 *消化器外科* 7(1): 79-88, 1987
- 5) 坂本直子 α -フェトプロテイン分画測定の意義 *SRL宝函* 12(3): 30-33, 1988.
- 6) Taketa K, Ichikawa E, Tage H, et al. Antibody-affinity blotting, a sensitive technique for the detection of α -fetoprotein separated by lectin affinity chromatography in agarose gels *Electrophoresis*, 6: 492-497, 1985.
- 7) Taketa K, Endo Y, Sekiya C, et al. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive α -fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma *Cancer Res* 53: 5419-5423, 1993.
- 8) 市川えりこ、宮内嘉明、西岡幹夫 AFP陽性慢性肝疾患の長期経過観察-レンズマメレクチン反応性AFP-L3の有用性 腫瘍マーカー研究会誌 12: 205-206, 1998.