それで血清を前処理しておく．そして CEA を測るとよくなるとか，そういうような試みってのはあるんですか．

内山　前処理で実際の臨床上の検体をやったというのは，前処理に関してはないです．患者それぞれの CEA について今お示ししたような方法とか，いろいろ分けているっていうようなデータはあるけど lectin で前処理をしたというデータは見たことはまだないんですけども．

追手　するとそのアボット社の製品でですね，例えば経過を追った場合にはやっぱり他の社のものと同じように変化をするんですか．

内山　さっきも言いましたように，白血病みたいな，NCA が大量に出てくるような病気でない限り大体 parallel に変動するんですけれども，違うキット同士を比較するというのはかなり誤差が入ってくるんですね．場合によっては倍くらい値が違うこともあります．

追手　はい，どうも有難うございました．

司会　他にございませんでしょうか．

吉谷　臨床的な質問ですが，糖代謝異常，例えば，糖尿病等があったりすると CA125 陽性率が少し高くなるというような報告を聞くんですが，どれぐらい陽性率が上がるんでしょうか．

内山　ちょっとその点は僕も判りません．

司会　他にございませんか．検査室ではこのキット間差があってデータの互換性に問題があるというのは一番頭が痛いんですけども，解決の方向はどうですか．

内山　一つ言われているのは，要するに純品いろいろとりますけれどいろんなところでいろいろ精製した CEA をとっても結局それはみな，てんでばらばらなんですね．一つはさっきお示ししたように糖鎖の構造が複雑なもんですからそれだけで抗原性がかなり違ってしまうので，そこら辺は何か WHO みたいな所での標準 CEA を世界中で使用するようにすれば，多少は解決するだろうと思うんですけども．

司会　他にございませんでしょうか．それでは次に移らせていただきます．第三番目は，肝細胞癌の血清学的診断，第三内科の鈴木先生お願いします．

3）肝細胞癌の血清学的診断

厚生連豊栄病院内科　**鈴木　康史・板谷　啓司**
新潟大学医学部第三内科（主任：朝倉　均教授）
青柳　豊・小黒　仁
横田　剛・斉藤　敦
五十嵐健太郎・上村　朝輝
朝倉　均

Serological Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

Yasufumi SUZUKI and Keiji ITAYA
Kohseiren Toyosaka Hospital

Yutaka AOYAGI, Makoto OGURO, Kentarou IGARASHI, Atsushi SAITOU
Tsuyoshi YOKOTA, Tomoteru KAMIMURA and Hitoshi ASAKURA
The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)

Reprint request to: Yasufumi SUZUKI or Yutaka AOYAGI, Third Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Asahimachi-Dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町1番町
新潟大学医学部第三内科学教室
鈴木康史・青柳　豊

The serum concentration and degree of fucosylation (Fucosylation index) of alpha-fetoprotein (AFP) were determined in serum samples from 322 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and 155 with benign liver diseases (BLD). The serum concentration of PIVKA-II, sialyl SSEA (SLX) and CA-50 were also determined 60 with HCC and 60 with BLD. When the serum AFP concentration was below 1000ng/ml, there was no demarcation line between HCC and BLD. However, the fucosylation index of AFP proved useful to discriminate HCC from patient with an increased concentration of AFP. On the other hand, positive reactions were noted in the following percentage of sera from HCC by PIVKA-II, 53% and SLX, 30%, respectively. It was concluded that the measurement of AFP concentration and of the fucosylation index together with PIVKA-II and SLX enable us to diagnose 88% of patients with HCC, serologically.

Key words: Hepatocellular carcinoma (HCC) Alpha-fetoprotein (AFP), PIVKA-II, SLX, CA-50
肝細胞癌，アルファフェトプロテイン，異常プロトロンビン

緒　　言

肝細胞癌の血清学的診断において広く用いられている腫瘍マーカーには，アルファフェトプロテイン（AFP），des-γ-carboxy prothrombin（PIVKA-Ⅱ）などが挙げられる．AFP は，1963年に Abelev[1] が発見して以来，その測定が肝細胞癌の診断においては最も主要な診断法のひとつと考えられてきた．第8回全国原発性肝癌追跡調査報告によると，肝癌患者血清中 AFP は，77%の症例で 21ng/ml 以上の陽性値を示している．しかしながら，良性肝疾患においても，数 100ng/ml 程度の上昇を示す例がしばしば経験され，絶対量のみの測定では鑑別診断が困難なことが多々認められる．他方，時代の推移とともに AFP 非産生例の血清学的診断が問題となり，登場したのが Liebman[2] らにより初めて報告された PIVKA-Ⅱ[3] である．本稿では，肝細胞癌の血清学的診断法につき，前記した二者ならびに最近注目されている各種糖鎖抗原について著者らの成績を中心に述べることとする．

1. AFP と肝細胞癌ならびに良性肝疾患

従来より，血清 AFP 値が 400ng/ml 以上を示す症例を high risk 群として各種画像診断を駆使し，肝細胞癌の発見に努めるというのが定説であった．しかしながら，今日では，図 1 に示すように，AFP の単なる血清中定量値では，肝細胞癌と良性肝疾患の鑑別診断が困難である症例の存在が問題となってきている[4]．すなわち，良性慢性肝疾患群においても，AFP が数 100ng/ml 程度に上昇する症例があり，まれには 1000ng/ml を越える例も認められる．さらに，最近の肝細胞癌症例においては 400ng/ml 以下の例が多数存在する．肝細

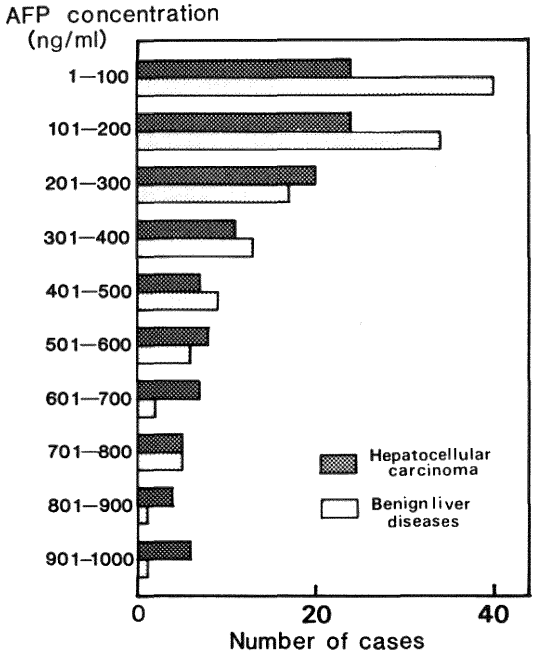


図 1　AFP 産生 HCC 322例中，AFP 値 1,000 ng/ml 以下の HCC 症例と同じく AFP 値 1,000ng/ml 以下の肝硬変をはじめとする非癌性肝疾患の各 AFP 濃度での分布を比較したもの．

胞障害にともなって上昇する AFP の場合には，トランスアミナーゼのピークに遅れてその上昇を来すが，肝硬変で上昇を示す場合には，トランスアミナーゼの上昇は多くの場合伴わない．さらに肝細胞癌においても，経過観察中自然低下を来す症例があり，AFP の定量値のみでの診断には限界があると言える．

2. AFP の亜種分析による肝細胞癌の識別

前述のごとく血清中 AFP 値のみにては，その経時的推移を考慮にいれても肝細胞癌の識別が困難の場合が多々ある．著者らは AFP の糖鎖変異に着目した癌性，非癌性 AFP の分子識別，すなわち，AFP のフコシル化率を指標とした肝細胞癌の診断を行なっている[4)5)6)7)]．方法は，レンズマメレクチン存在下による交差親和性電気泳動法で，総 AFP 量に対するレクチン結合性 AFP 亜種の割合を測定するものである[5)]．著者らは，このレンズマメレクチン結合性亜種には非結合性亜種には認められないフコースが存在することを報告し[8)]，AFP の Fucosylation Index（フコシル化率）測定による肝細胞癌診断，特に早期診断における有用性を報告してきた．

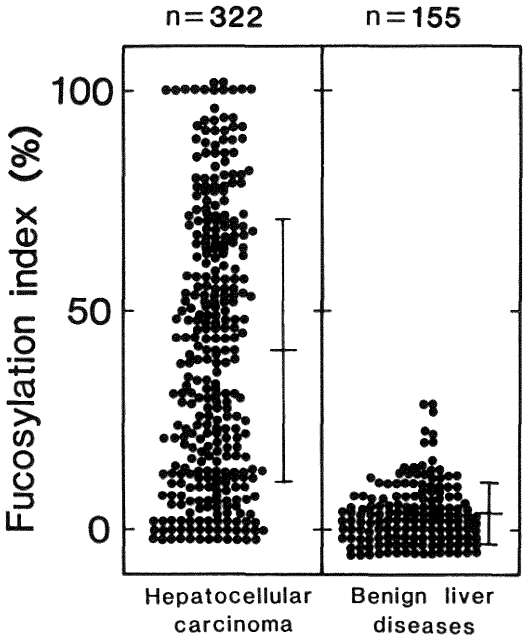


図 2　HCC 322 例と肝硬変をはじめとする良性肝疾患 155 例（急性肝炎 17 例，慢性肝炎59例，肝硬変 79 例）のフコシル化率をプロットしたもの．

フコシル化率は，HCC 群（41±30%，mean±SD）において良性肝疾患群（4±7%）に比較して統計学的に有意（$p<0.001$）な上昇を示した．

図 2 は，肝細胞癌 322例と良性慢性肝疾患 155例（急性肝炎17例，慢性肝炎59例，肝硬変79例）において AFP のフコシル化率を比較検討したものである．肝細胞癌群：41±30%（mean±SD），良性肝疾患群：4±7%と統計学的に有意（$p<0.001$）の肝細胞癌症例におけるフコシル化率の上昇を認める．良性肝疾患群のフコシル化率の mean＋2SD である18%を cut off value[4)] とすると，肝細胞癌では 322例中 222例69%が陽性を示した．非肝癌群での陽性例は，わずか 5 例のみであり，それらは重症型急性肝炎ならびに慢性肝炎の急性増悪であった．

次に AFP が比較的低値でかつ早期の肝細胞癌症例の AFP フコシル化率の検討を呈示する．

図 3 は，AFP 値 1000ng/ml 以下でかつ腫瘍最大径 3cm 未満の39例（A），400ng/ml 以下で 3cm 未満の23例（B）ならびに 400ng/ml 以下で 2cm 未満の11例（C）と非肝癌群との比較である．肝細胞癌群各々のフコシル化率は，31±29%，36±29%（$p<0.001$），32±26%（$p<0.01$）と良性肝疾患群に比較し統計学的に有意の上昇を認め，フコシル化率測定の早期肝細胞癌診断における有用性を示している[4)]．血清 AFP 濃度とフコシル化率の間には相関関係は認められない．また，煩雑な交差親和性電気泳動法にかわる測定法の試みとして，レンズマメレクチンと糖鎖結合部位近傍の epitope に対する抗 AFP モノクローナル抗体の AFP 分子上にお

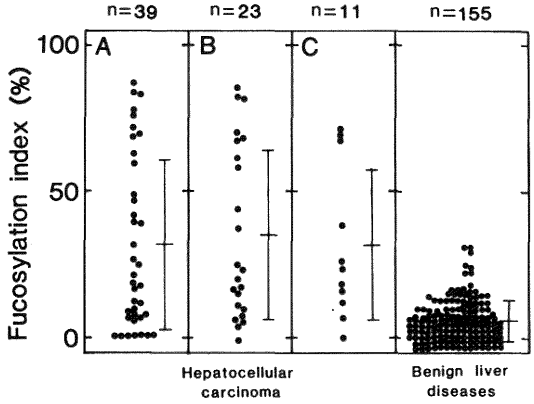


図 3　早期の HCC と考えられる AFP 値 1,000 ng/ml 以下でかつ最大径が 3cm 未満の 39例（D），400ng/ml 以下で 3 cm 未満の 23例（E）ならびに 400ng/ml 以下で 2cm 未満の 11例（F）のフコシル化率をプロットしたもの．

フコシル化率はそれぞれ，31±29%，36±29%（$p<0.001$），32±26%（$p<0.01$）と良性肝疾患に比較して有意な上昇を示した．

ける立体結合阻害現象を応用した酵素抗体法が，著者らにより開発されている[9)10)]．肝細胞癌由来のレンズマメレクチン結合性 AFP 亜種と非癌由来の非結合性亜種の分子識別が同法においても可能となっている．

3. PIVKA-II と肝細胞癌

PIVKA-Ⅱとは，Protein Induced by Vitamin K Antagonist or Absence のイニシャルの略であり，Ⅱとは第Ⅱ因子のプロトロンビンのことである．プロトロンビンは，precursor のグルタミン酸残基（Glu）の γ-位がカルボキシル化を受け，γ-カルボキシグルタミン酸（Gla）となって初めて凝固活性を持つにいたる．この γ-carboxylation の過程にビタミンKが必要であり，K-antagonist であるワーファリンや Methylthiotetrazole 側鎖を有する抗生剤投与などの場合に欠乏状態となるとカルボキシル化を受けていない PIVKA-Ⅱが血中に出現するようになり，別名 des-γ-carboxy prothrombin と呼ばれている．**図 4** は，肝細胞癌60例，転移性肝癌25例，肝硬変30例，慢性肝炎26例，その他14例の比較検討の結果である[11)]．測定には，エーザイ社製エイテストモノ P-Ⅱ ELISA キットを使用した．肝細胞癌において60例中32例（53%）に陽性であった．

感度は AFP に劣るものの，異常値を示す症例のほとんどが肝細胞癌であり，肝硬変や慢性肝炎において上昇する例のないこと（特異性が高い[3)]）が PIVKA-Ⅱの最大の利点である．肝細胞癌の腫瘍径と PIVKA-Ⅱの濃度との関係においては，大きな腫瘍ほどその濃度が上昇する傾向があり，小さな肝細胞癌における診断能にはやや問題が残っている．しかし，AFP 値と相関関係はなく，すなわち AFP 陰性の肝細胞癌の約半数が理論上識別可能である．ただし，ビタミンK投与により血中

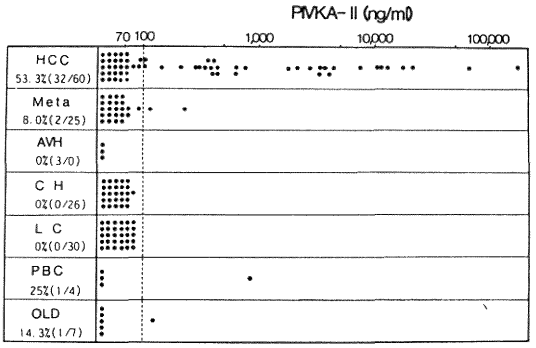


図 4　HCC 60例，転移性肝癌 25例，肝硬変 30例，慢性肝炎26例，その他14例のエーザイ社製エイテストモノ P-II による PIVKA-II の測定結果．

PIVKA-Ⅱの低下を認める症例があり，測定の際には充分な配慮が必要である．

4. シアリル Le^{x}-i 抗原（SLX），CA-50 と肝疾患

二型糖鎖に含まれる糖鎖性癌抗原である SLX（Sialyl SSEA-1（Stage-specific embryonic antigen））と一型糖鎖に属する CA-50（非フコシル化 CA19-9）の肝疾患における測定結果を以下に示す[11)]．SLX の測定は，大塚アッセイ社 SLX キット，CA-50 は，三井社 CA-50 キットを各々使用した．SLX は，肝細胞癌群（60例）：36±6U/ml（mean ＋SD），肝硬変群（30例）：26±6U/ml，慢性肝炎群（30例）：13±5U/ml と肝細胞癌症例における統計学的に有意の（$p<0.01$）上昇を示し，陽性率は30%と低いものの有用性が示唆された．また，AFP，PIVKA-Ⅱ陰性肝細胞癌 9 例中 2 例に SLX 陽性が認められた．CA-50 では，肝細胞癌において40%の症例に上昇が認められたが，肝硬変などの慢性肝疾患においても38%の症例に上昇がみられ両者の鑑別は困難と考えられた．

参　考　文　献

1) **Abelev, G.I., Perova, S.D., Khramkova, N.I. et al.:** Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplantation, **1:** 174～189, 1963.

2) **Liebman, H.A., Furie, B.C., Tong, M.J. et al:** Des-γ-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med., **310:** 1427～1431, 1984.

3) **服部　信:** 肝細胞癌における異常プロトロンビンの臨床的評価．臨床と研究，**65:** 249～258，1988.

4) **Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M. et al.:** The fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. Cancer, **61:** 769～774, 1988.

5) **Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M. et al.:** Differential reactivity of α-feto-protein with lectins and evaluation of its usefulness in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Gann, **75:** 809～815, 1984.

6) **Aoyagi, Y., Isemura, M., Suzuki, Y. et al.:** Fucosylated alpha-fetoprotein as marker of early hepatocellular carcinoma. Lancet ii, 1353～1354,

1985.
7) **Aoyagi, Y., Isemura, M., Suzuki, Y. et al:** Change in fucosylation of α-feto-protein on malignant transformation of liver cells. Lancet i, **210:** 1986.
8) **Aoyagi, Y., Isemura, M., Yosizawa, M. et al.:** Fucosylation of serum alpha-fetoprotein in patient with primary hepatocellar carcinoma. Biochim. Biopys. Acta, **830:** 217～223, 1985.
9) **Suzuki, Y., Aoyagi, Y., Muramatsu, M. et al.:** Close topographical relationship in alpha foetoprotein (AFP) between a lens culinaris binding glycan and the epitope recognized by AFP-reactive monoclonal antibody, 18H4. Brit. J. Cancer, **55:** 147～152, 1987.
10) **Suzuki, Y., Aoyagi, Y., Muramatsu, M. et al:** A lectin-based monoclonal enzyme immunoassay for distinction of fucosylated and non-fucosylated α-foetoproteinmolecular variants. Ann. Clin. Biochem., **27:** 1990, in press.
11) **小黒　仁, 青柳　豊, 斉藤　敦 et al.:** 肝細胞癌診断における AFP, PIVKA-II, シアリル Le^{x}-i 抗原 (SLX), CA-50 および Dupan-2 の臨床的意義, 肝臓, Vol. 30, No. 11, 1589～1595, 1989.

司会　御討論お願いします．追手先生どうぞ．

追手　assay 法のところでちょっと教えてもらいたいというか，discussion したいと思います．AFP の測定法を先生いろいろやっておられましたですね．ELISA はどういう系で，例えば何か酵素を使って．

鈴木　普通に測っておりますものはここの中検と同じで，ダイナボット社のキットです．あとちょっと度忘れしましたが凝集法を使うやつはちょっとだめそうだというので ELISA を組みました．あれは galactosidase をくっつけて，最初はこんなでかいやつをくっつけても大丈夫かなということだったんですけど，やり易い方法でということでマレイミドで interpose して galactosidase をくっつけるという方法で．

追手　そうすると酵素抗体法というのは抗体に何か酵素をくっつけたんでしょうか．

鈴木　最初にビーズに AFP をくっつけてそれで抗体を selection して，で要するに lectin による inhibition がかかるようなモノクロを selection してきて，サンドウィッチの系にもっていったということです．

追手　サンドウィッチ法のことなんですけど，そこに糖鎖の話がさっき出てきました．僕たち酵素抗体で組織学的なレベルでは抗体に HRP をくっつける，或いは酵素をくっつけるよりもですね，avidin, biotin を介して双方を結合するほうがすごく感度がいいんですね．だからそういう方法もあるのかなあと思います．

鈴木　やはりそういう方法で，実際 lectin をラベルしてみたいですけど．そういう形の ABC はあるみたいですけど．雑誌名忘れてしまったんですけど CCA か何かだったと思いますけど，lectin にラベルした ELISA 法っていうのが報告されています．

追手　lectin を使いほとんどの場合サンドウィッチ法で測定しているわけですね．そうするとモノクロを使ってその対応抗原を定量的にやっていこうとするとサンドウィッチ法が一番良さそうですね．

鈴木　私もそう思います．普通，抗原を固相化するのは back ground が上がってよくないと思います．それからただ，その conjngate が非常に specificity があるやつだったらいけると思いますけど．

追手　ELISA っていうのはやっぱり endoproduct，酵素反応物を見てるわけですよね．そうするとどうしても反応系に影響因子が沢山あるわけですね．Radioimmunoassay のほうがずっと原理は簡単だし，それからいちいち気温のことも考えなくてもいいし，それから何ていうんでしょうね，タンパクがそこら辺にあって，ちょっとでも手が触れたら色が変わるとか，反応を止める時間を非常に気にするとか，そういう心配がありません．定量性ということにかけても．なかなか規準曲線描くの難しいですよね，ELISA 法っていうのは．

鈴木　HB とかそれから AFP なんかでは RIA と EIA の検定がなされてまして，やはり低濃度のほうはちょっと違うという風なことはありますけど，ただ実際問題として我々がやるときには，ここで扱っておられると思いますけどやっぱりなるべく，何と言いますか，アイソトープと言いますか，RI に近づきたくないというのがありまして，ただまあ，おっしゃるとおりだと思います．

追手　固相法のことでもう一つあるんですが fixation する相手が，ビーズだとかそういうタイプのものですよね．

鈴木　プレートもやりましたけれども，やっておられる方は判りますけどプレートっていうのは結構うるさいですよね．慣れれば相当あれですけど．で，ビーズのほうは均一にくっつけるのが面倒くさいですけど，ビーズ

のほうが正確だと思いますけど.

追手　ただプレートもね，今，ウェル一つずつが外れるものもありますね.

鈴木　その通りだと思いますけども，私は一応この系はビーズでやって，その後のいろいろな peptide，抗 HBx だとか，我々のグループですけど，やはりプレートだとデータの信頼性が，全く新しいことをやる場合はなかなか難しくて周りも信用しないんです．そういうことだと思います.

追手　はい，どうも有難うございました.

司会　追手先生が言われた，その RIA と EIA の比較というのは立場で非常に違うと思うんですね．検査室レベルなんかはもう本当にこれからはずっと Enzyme-immunoassay のほうに流れていくだろうと思います．理由はやっぱりアイソトープのもっているいろんな問題点がありますし，非放射線性のやつで，またそれを用いた機械なんかもこれからどんどん開発されてきますと，かなり正確でたくさんの検体を扱うというようなことが可能で，どうしてもそっちへこれからはいくんじゃないか．研究者と実地の方の差もあるんじゃないかと思うんですが．では，肝細胞癌のたくさんのデータをきれいにお示しいただき有難うございました．それでは次に移らしていただきます．四番目は，婦人科腫瘍マーカーで，産婦人科の吉谷先生です.

4）上皮性卵巣癌における Secondary Operation と血清 CA−125 値との関連について

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：田中憲一教授）

吉谷　徳夫・青木　陽一

安達　茂実・金沢　浩二

Serum CA-125 Levels Correlated with Secondary Operations in Epithelial Ovarian Cancers

Norio YOSHIYA, Yoichi AOKI, Shigemi ADACHI and Koji KANAZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Kenichi TANAKA)

In an attempt to determine the relationship between serum CA125 levels and surgical findings in patients undergoing secondary operations for epithelial ovarian cancer, we have analyzed of 21 secondary laparotomies. CA125 level before treatment had beenn >35 U/ml in each patient studied. At the time of operation, 14 cases had normal

Reprint requests to: Norio YOSHIYA, Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University, School of Medicine, Asahimachi-Dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町 新潟大学医学部産科婦人科学教室 吉谷徳夫