

肝癌の腫瘍マーカー”アルファフェトプロテイン”，
その量から質への評価の変遷

新潟大学名誉教授
新潟医療センター

青柳 豊

【はじめに】

アルファフェトプロテイン(AFP)は Abelev によりラットの移植腹水肝細胞癌系において見いだされ⁽¹⁾, この報告を契機に, 肝細胞癌(HCC)の血清免疫学的診断法として広く普及するに至った⁽²⁻⁴⁾. 発見当初, Micro-Ouchterlony 法を主体とするゲル内沈降反応がアッセイ系として用いられていた時代ではその検出感度は低く(検出限界, 10,000~1,000 ng/ml), 陽性者の HCC 特異性は非常に高いとされていた. しかしながら, Radioimmunoassay, Enzyme-immunoassay の開発により高感度化(検出限界, 6~20 ng/ml)が計られると肝硬変(LC),慢性肝炎などの慢性肝疾患においても20~30%の陽性例が認められ, 特異性の低下が問題となっていた^(5,6).

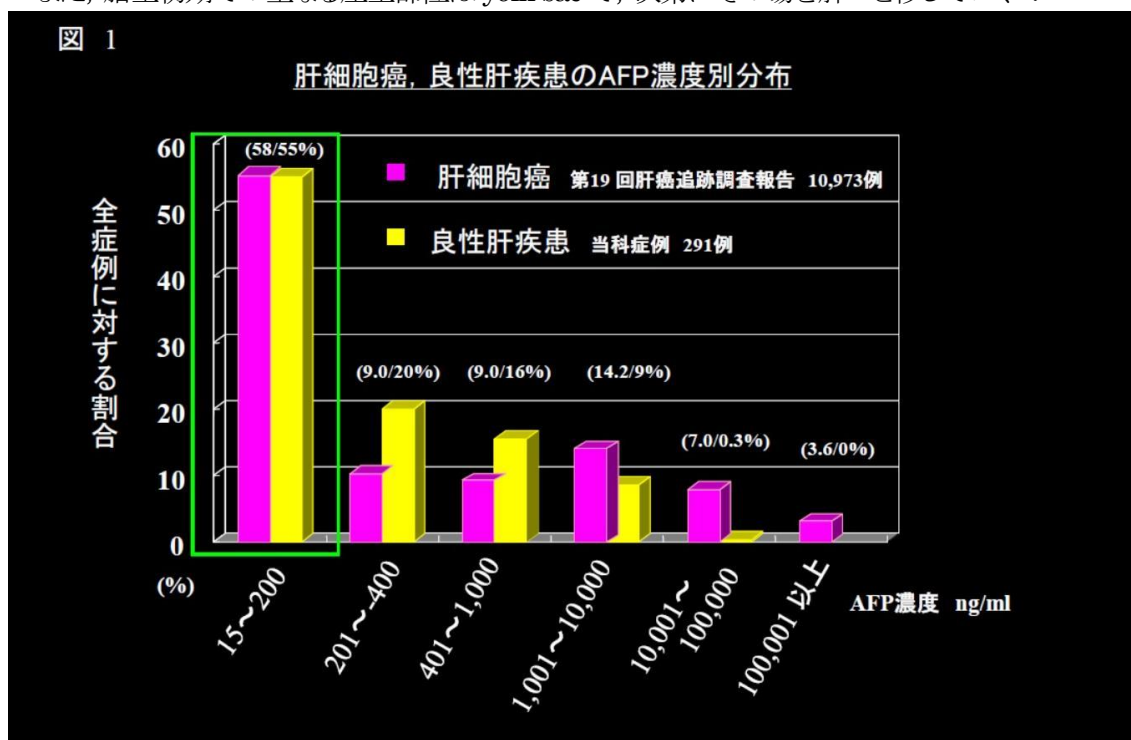
著者らはこの問題点を解決するため“HCC で産生される AFP と慢性肝疾患で上昇を示す AFP との間には蛋白化学的違いが存在する”という仮説の基, これらの差を見いだす研究を開始した. 約40年間にわたる translational research であり, レビューとは異なり, 主に著者らの研究の紹介とさせていただきたい.

I 基本的事項

1. 胎生期での AFP 推移

AFP は, 胎児期において主要血漿タンパクの一つであり, Gitlin らの報告によれば⁽⁷⁾, 胎生13週にはその濃度は300 mg/dl にまで達し, 同じ時期での血清アルブミン濃度(約500 mg/dl)に匹敵する. その後, 暫次, アルブミンの増加とともに減少し, 生下時の臍帯血濃度は5~15 mg/dl となり, 2歳頃までに, 正常レベルである20 ng/ml 以下に減少する.

また, 胎生初期での主なる産生部位は yolk sac で, 次第にその場を肝へと移していく⁽⁸⁾.



II 臨床的事項

1. AFP 陽性率

最も新しい第 19 回全国原発性肝癌追跡調査報告(2006-2007 年の集計結果)によれば, HCC の 60% (10,973/18,400 例)が AFP 陽性を呈しており, 現在でも HCC のスクリーニング法として有用である事が示されている⁹⁾.

2. AFP の特異性の問題

AFP のカットオフを 15~20 ng/ml とした場合, 慢性肝疾患においてもしばしばその軽微な上昇を認める. 新潟大学医歯学総合研究科, 消化器内科学分野(以後当科と略す)の検討では, LC で 25%, 慢性肝炎で 17%が陽性を示している.

図 1 に当科における HCC を否定した慢性肝疾患, 291 例(主に慢性肝炎, LC)での AFP 上昇帯域と第 19 回報告での HCC, 10, 973 例の AFP 上昇帯域を合わせて示す. この結果では良性肝疾患ならびに HCC での上昇はそれぞれ 55%と 58%が 15~200 ng/ml の間に分布している. すなわち, HCC と良性肝疾患の上昇濃度域は重なり, 両疾患の鑑別は単回の AFP 濃度測定のみでは極めて困難である事を示している.

III AFP の蛋白化学的比較研究

1. 蛋白部分の比較研究

40 年以上前に遡るが, 著者らは HCC で上昇する AFP と良性肝疾患で上昇する AFP の違いを見いだす目的で, 蛋白化学的比較研究を開始した.

AFP は HCC 患者血清ならびに臍帯血より純化精製し比較研究に用いた. 本来であれば良性肝疾患由来 AFP として LC または慢性肝炎由来 AFP の精製を行うべきであったが, 1970 年代の分析技術では, その比較には純化した AFP がミリグラム単位で必要であった. 高くとも数百 ng/ml 程度の上昇を示す LC や慢性肝炎からミリグラム単位の精製は極めて困難なため, 量的に充分精製可能な臍帯血から得られた AFP を分析対照として選択し比較検討した. その結果, HCC 患者ならびに臍帯血由来 AFP の限定的な比較ではあるが AFP の蛋白一次構造上に両者の大きな違いは認められないが“糖組成に差がある事”を報告した¹⁰⁾.

IV AFP の biological role

1. 銅イオン結合能

著者らが研究を開始した当時, AFP の生理的意義に関しては胎児期における母体からの免疫防御作用などが提唱されていたがはっきりした機能は不明であり, 著者らもその点に興味を持ち幾つかの検討結果を報告している.

蛋白一次構造上の検討でアミノ末端から 3 番目の位置にヒスチジン残基が存在する事が判明した. 血清アルブミンではアミノ末端から 3 番目のヒスチジンに 2 価の銅イオンが結合する事が知られていた. そのため, AFP においても銅イオン結合能を有するか否かの検討を行い, 血清アルブミン同様, 2 価の銅イオン, ニッケルイオンなどを結合する事を報告した¹¹⁾. アミノ末端に存在するヒスチジンが結合能と関連する事の証明としてアミノ末端合成ペプチド(当時 AFP 研究を行っていた Ruoslahti E より供与を受けた 11 個より成るアミノ末端合成ペプチド)を用いて検討し, 合成ペプチドも同様の活性を持つことを確認した.

2. ビリルビン結合能

黄疸のある HCC 症例の血清から生成した AFP では, 最終段階に至っても黄色調が取れないことより AFP のビリルビン結合能を検討し, ビリルビン結合活性を持つ事を合わせて報告した¹²⁾. これらの事実は AFP の carrier protein としての活性を示唆するものと当時は考えていた. しかし, その後に判明した血清アルブミンとの 1 次構造の相同性を考慮すれば当然の結果と考えられる.

3. グロビン合成阻害

以下に述べる検討は全く偶然の賜であるが、友人の研究者が無細胞系で蛋白合成の研究を行っており、無細胞系グロビン合成系に与える AFP の影響を検討した。その結果、AFP 存在下では容量依存性にグロビン合成を阻害し、その作用起点は蛋白合成の開始点に近い ternary complex を形成することの阻害であることを報告した⁽¹³⁾。また、対照実験として血清アルブミンで同様の検討を行ったが阻害活性は認められなかった。この事実は偶然とはいえ、蛋白構造相同性を有する血清アルブミンには認められない AFP の biological role として興味有る結果と考えている。

また、これまで述べた幾つかの生理活性においては HCC 由来ならびに胎児性 AFP の間に大きな差は認められなかった。

AFP の生理機能については現時点でも確たる結論は得られていない。血清アルブミンの ancestor protein との説明も提唱されてはいるが、胎生初期において主要な血清蛋白である AFP の生理機能解明が期待される。

V. AFP の一次構造決定

著者らが研究を開始した 1975 年には AFP の 1 次構造はアミノ末端に関する限定的な情報しか得られていなかった。当時より電気泳動の位置や推定分子量などから、血清アルブミンに近い蛋白化学的性質を有するのではと推定されていた。

1983 年に Morinaga らによって奇形腫由来 AFP の mRNA より得られた cDNA のクローニングでヒト AFP の全一次構造が決定された。それによれば、590 個のアミノ酸よりなる 1 本鎖のポリペプチドで、驚くべきことに、血清アルブミンと 39% のホモロジーを認め、S-S 結合により構成される 3 個のドメイン構造も AFP と血清アルブミンで共通している⁽¹⁴⁾。また、得られた一次構造より、アミノ末端から 232 番目にアスパラギンが存在し、Asn-(Phe)-Thr の N-グリコシド型の糖鎖認識構造が存在する事が判明した。

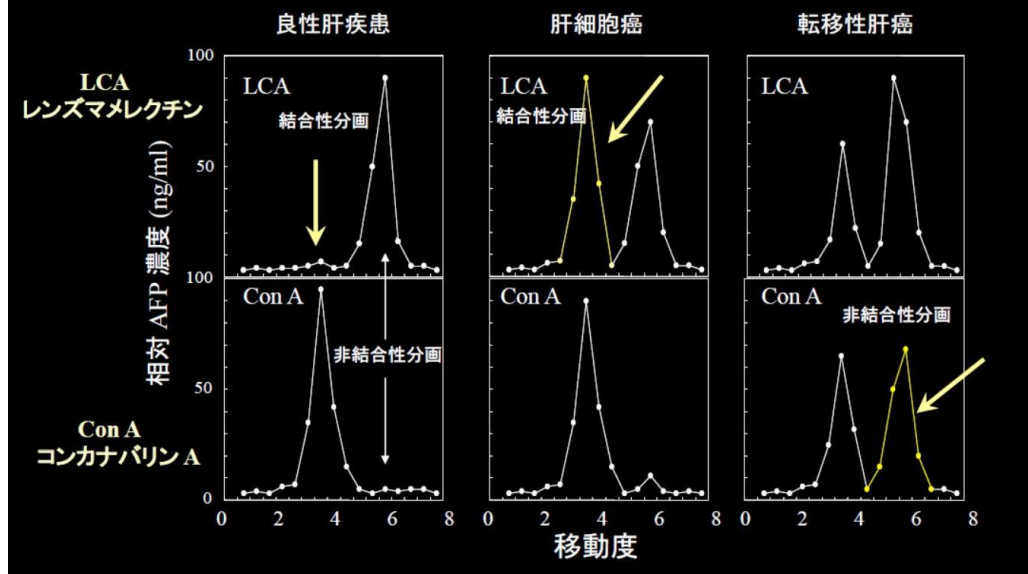
AFP の genomic DNA の構造は 1987 年 Gibbs らによって決定されており、15 個のエクソンと 14 個のイントロンよりなることが示されている⁽¹⁵⁾。また、その位置はヒトでは、第 4 染色体上にあり、アルブミン遺伝子の約 15 kb 下流に位置する⁽¹⁶⁾。

VI AFP のフコシル化糖鎖変異

1. 糖鎖を指標とした分子識別の試み

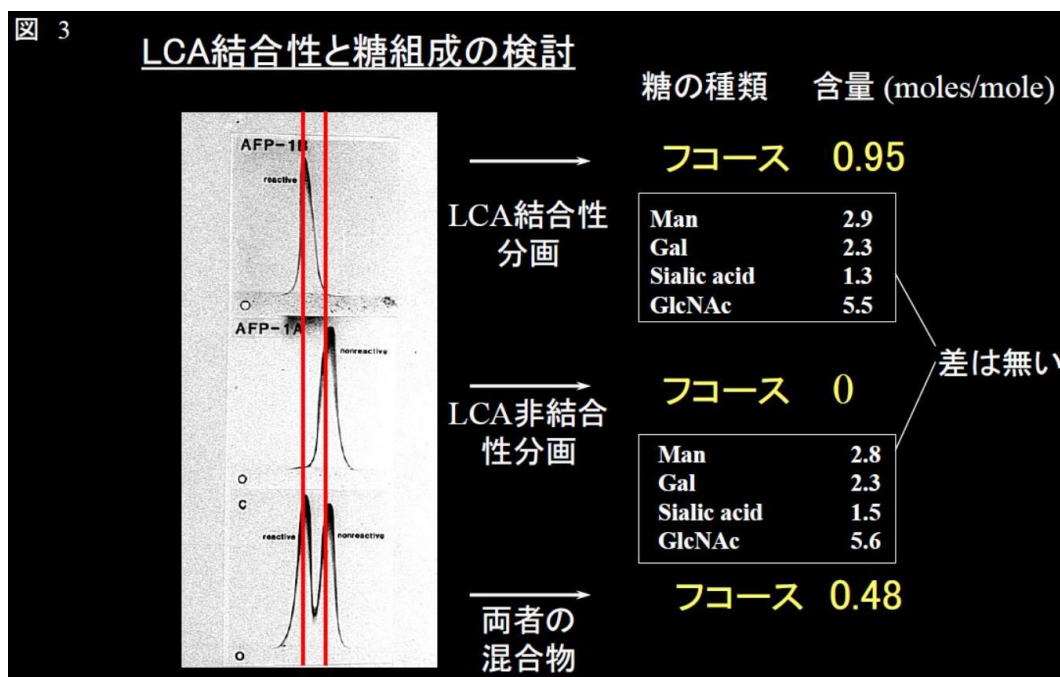
前述した糖鎖組成の差に着目し、糖鎖構造を反映する各種レクチンを用いて HCC ならびに良性肝疾患由来 AFP の分子識別を試み、以下に述べる 2 種のレクチンで反応性の異なる結果を得た。図 2 にレンズマメレクチン(LCA)ならびにコンカナバリン A(Con A)存在下の親和性電気泳動パターンを提示する。LCA に対する検討で、良性肝疾患由来 AFP では結合性分画は認められないのに対し HCC 由来 AFP において結合分画の出現を認めた。すなわち、HCC 由来 AFP においては、レンズマメレクチン(LCA)に結合性を有する分画が LC などの良性肝疾患由来 AFP に比較し有意な増加を示す結果であり、LCA 結合性による両由来 AFP の識別ならびに HCC の早期診断における有用性報告した(17-19)。他方 Con A に対しては、良性肝疾患ならびに HCC 由来 AFP では結合性分画が主であるのに対し AFP 産生性消化器癌やヨークサック腫瘍では非結合性分画の明らかな上昇を認める事を合わせて報告した(20, 21)。すなわち、LCA と Con A による結合性を検討することで、HCC、良性肝疾患ならびに消化器癌由来 AFP の 3 者を分子識別することが可能であり、これら疾患の鑑別に有用であると結論とした。

図 2 レクチン親和性電気泳動パターンによる良性、癌性AFPの識別



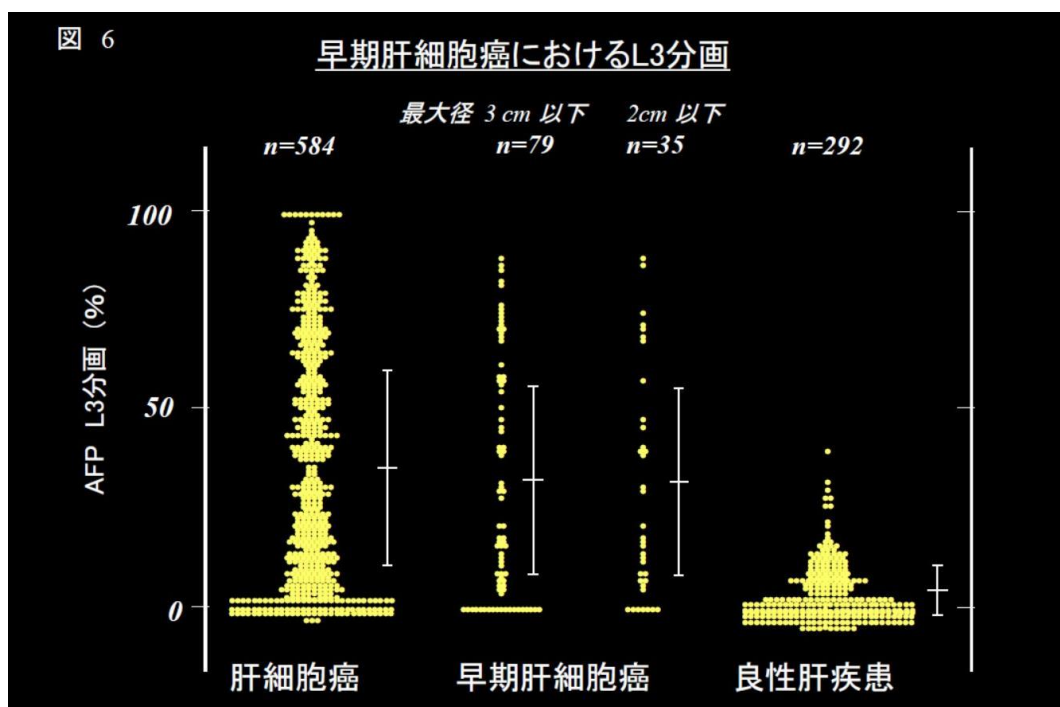
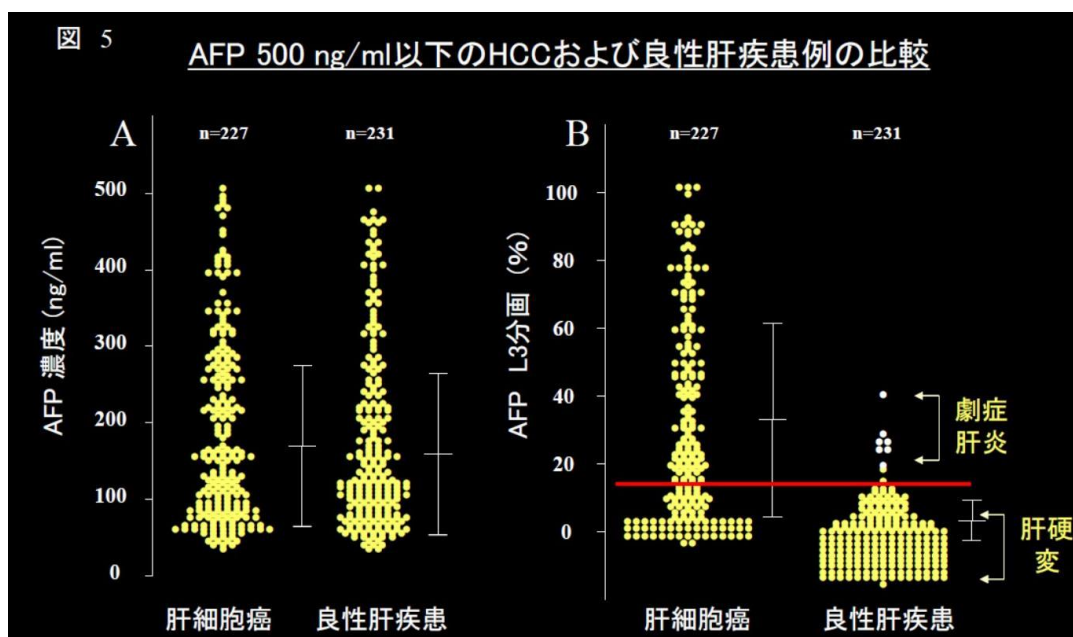
1. 糖鎖構造解析

HCCにおいて有意に上昇するLCA結合性分画の糖鎖構造解析を目的として、糖鎖組成分析ならびに糖ペプチドとフコシダーゼを用いた検討を行った。すなわち、図3に示すように、LCA結合性、非結合性分画の比較で結合性分画には中性糖の一つであるフコースがmole/moleで存在する結果を得た。その他の中性糖、アミノ糖ならびにシアル酸には明らかな差異は認めなかった(22)。その後に行った糖鎖構造解析を目的とした糖鎖微量蛍光標識法であるピリジルアミノ化法と高速液体クロマトグラフィーによる糖鎖解析で、LCA結合性AFPの糖鎖構造が二分岐型複合糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンに α 1-6の形式でフコースが結合した構造であること(図4)を明らかにした(23)。そして、総AFPに対するLCA結合性分画の割合をフコシル化率(fucosylation index)と表現し、このindexがLCをはじめとする慢性肝疾患経過観察中におけるHCCの早期診断に有用であることを提唱してきた



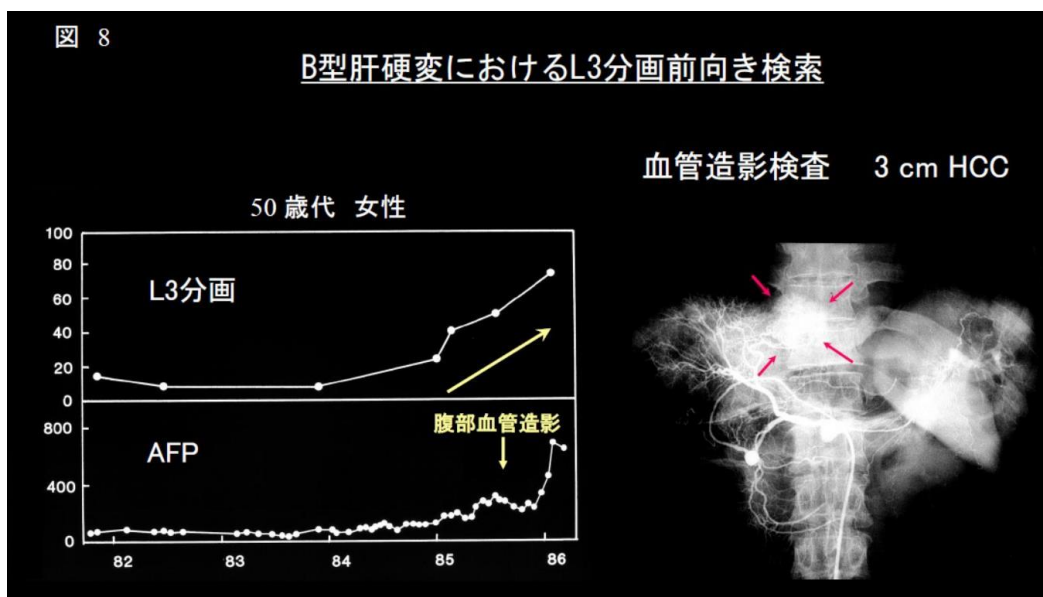
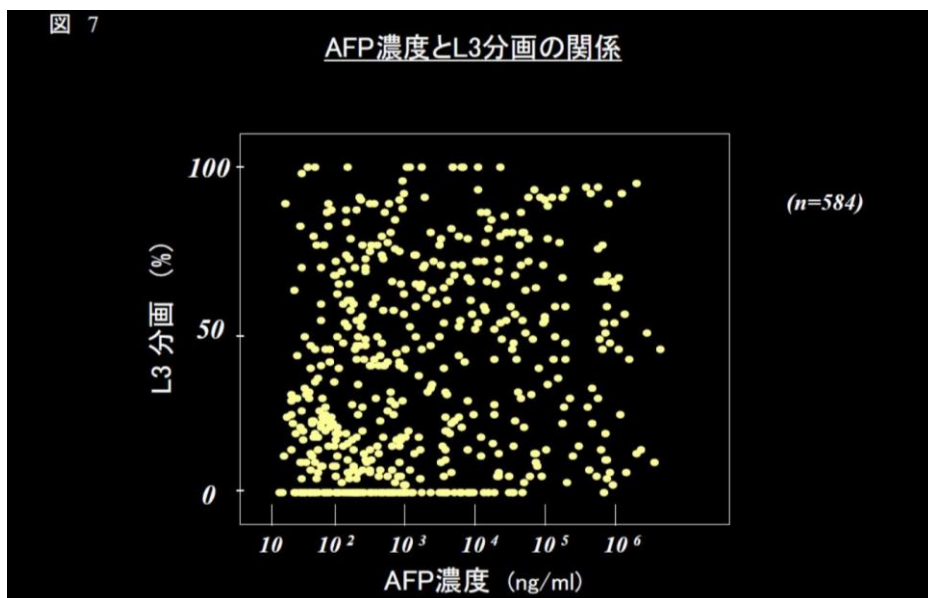
3. フコシル化AFPの命名

著者らは総AFPに対するフコシル化AFP分画の割合をフコシル化率と呼び使用していた。すなわち、分子構造を基盤とした命名である。その後 Taketa らにより開発された電気泳動測定キットが和光純薬より販売され、LCA 結合性分画は泳動位置よりL3分画と命名された。そして、多くの臨床施設がこのキットを用いた事よりL3分画という名前が一般化している^(24, 25)。そのため、著者らもフコシル化率はL3分画と同じであるということで、L3分画と表現するに至った。



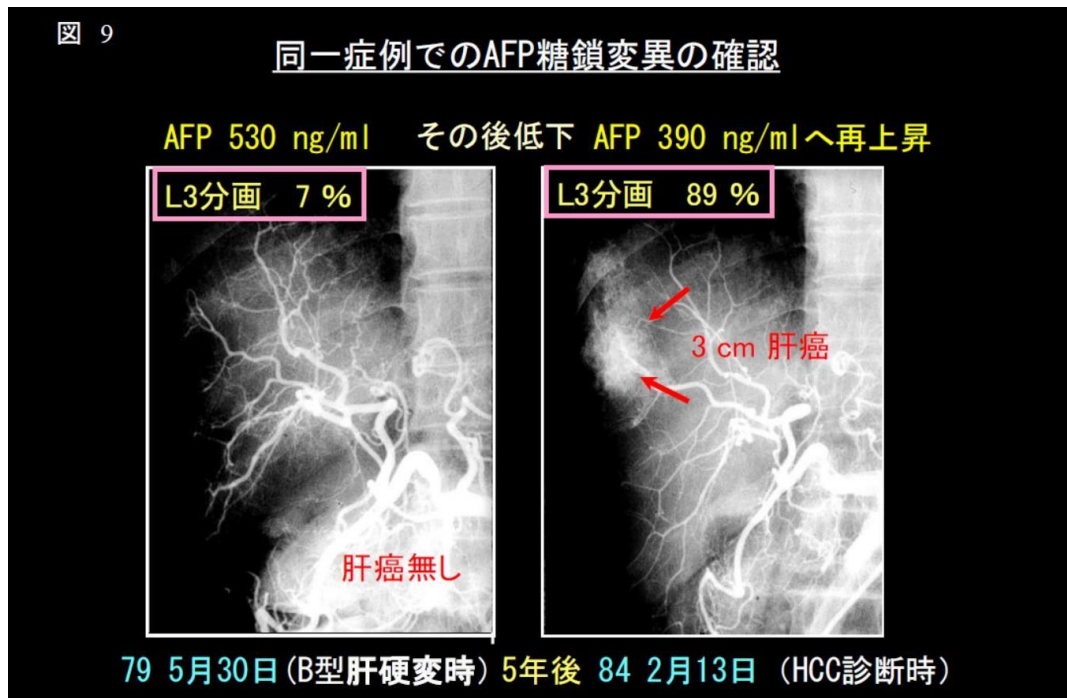
4. L3分画(フコシル化AFP)による鑑別

図5AはAFP濃度500 ng/mlを上限として、当科での200名あまりのHCCならびにLCを主とする慢性肝疾患のAFP濃度をプロットしたものであるが、濃度での両疾患の重なりが多く識別は困難である。しかしながら、図5Bは同じ症例のL3分画の割合をプロットしたものであるが、有意なHCCでの上昇を認め、両群の鑑別に有用であることが理解出来る⁽²⁶⁻²⁷⁾。その後の多数例の検討でも慢性肝疾患群に比較してHCC群での有意な上昇を示し、さらに、早期のHCCである血清AFP低値例や最大径3cm以下の症例、また、2cm以下の症例などにおいても統計学的に有意なL3分画の上昇を呈している(図6)。すなわち、AFP濃度では困難な両疾患の鑑別がL3分画測定で可能である事を示している。また、L3分画と血清AFP濃度とは有意な関連を認めず、互いに独立した因子と考えられる(図7)。当科では1980年代初めより本分画測定を臨床応用しており、前向き検討でL3分画上昇を契機に診断したB型LC合併HCC例(図8)を報告している⁽¹⁹⁾。L3分画測定は1996年より保険収載され、日常診療に導入された。



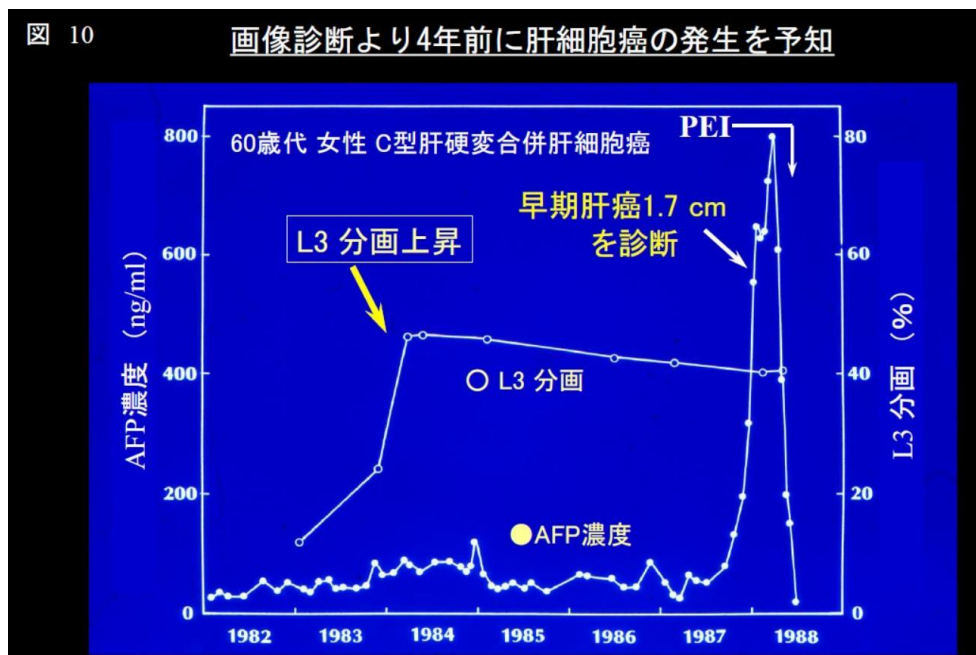
5. 同一症例でのフコシル化亢進

著者らは LC 経過観察中に AFP が上昇を示し、各種画像診断により HCC の存在が否定され、その後の数年の経過観察期間を経て HCC へ進展した症例における L3 分画の上昇確認を複数症例報告している。図 9 は典型例であるが、本症例では、B 型 LC 時の L3 分画は低値を呈するにもかかわらず HCC 進展時には L3 分画の明らかな上昇を示していた⁽²⁸⁾。



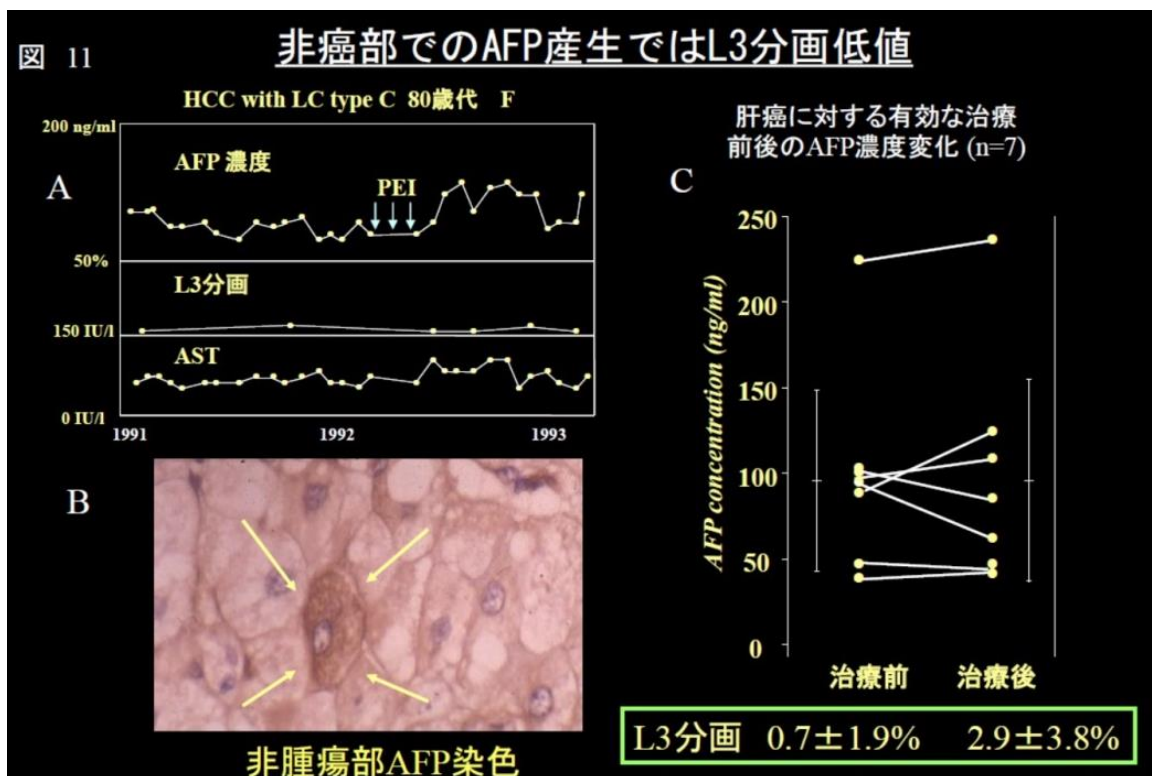
6. AFP-L3分画によるHCC予知の可能性

AFP 持続陽性 C 型 LC 例の前向き経過観察において、診断時最大径 2cm 以下の HCC を、画像診断による指摘より 2~4 年先行して L3 分画上昇を認め、HCC の出現を予知した症例(図 10)を複数報告している⁽²⁹⁾。この事実は AFP のフコシル化亢進という分子基盤が癌化の比較的早期の段階で起きていることを示すもと考えられる。



7. 非癌部からの AFP 産生と L3 分画

図 11A は C 型 LC 合併 HCC 例であるが, HCC に対して効果的な経皮的エタノール注入療法 (PEI) を行ったにもかかわらず AFP 値は上昇傾向を示している. 本例では治療時に得られた非腫瘍部組織の AFP 染色を行うと陽性を示した(図 11B). 同様の経過を示す 7 症例のまとめを図 11C に示すが AFP 値は効果的な治療後も低下を示さず, L3 分画も低値のまま推移している. すなわち, HCC が存在する場合でも腫瘍部以外の非癌部からの AFP 産生が起きていることがあり, この際は治療前, 後共に L3 分画は低値を示す.



8. 他の血清糖蛋白のフコシル化

AFP以外の正常者に存在する生理的血清糖蛋白であるα1アンチトリプシン^(30, 31)やトランスフェリン⁽³²⁾においても、HCCではAFPと同じLCA結合分画の増加ならびにその糖鎖構造変異である二分岐型複合糖鎖の還元末端側のα1-6形式のフコシル化亢進が起きていることを報告している。図12はα1アンチトリプシンのLCA存在下の親和性電気泳動のパターンとそのプロットを示すが、HCCにおいてLCA結合性分画の有意な上昇を認めている。

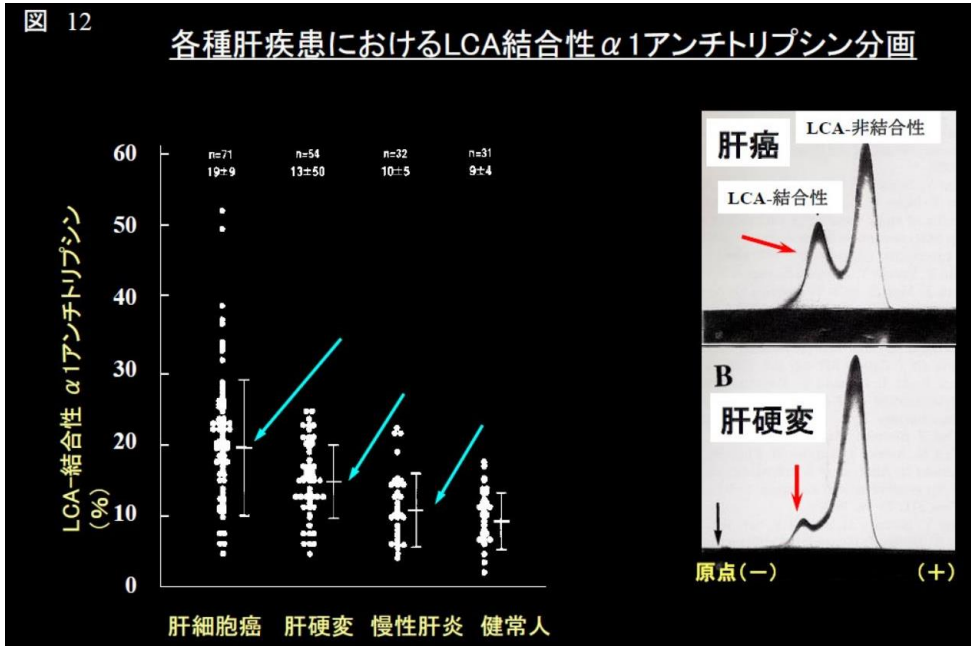
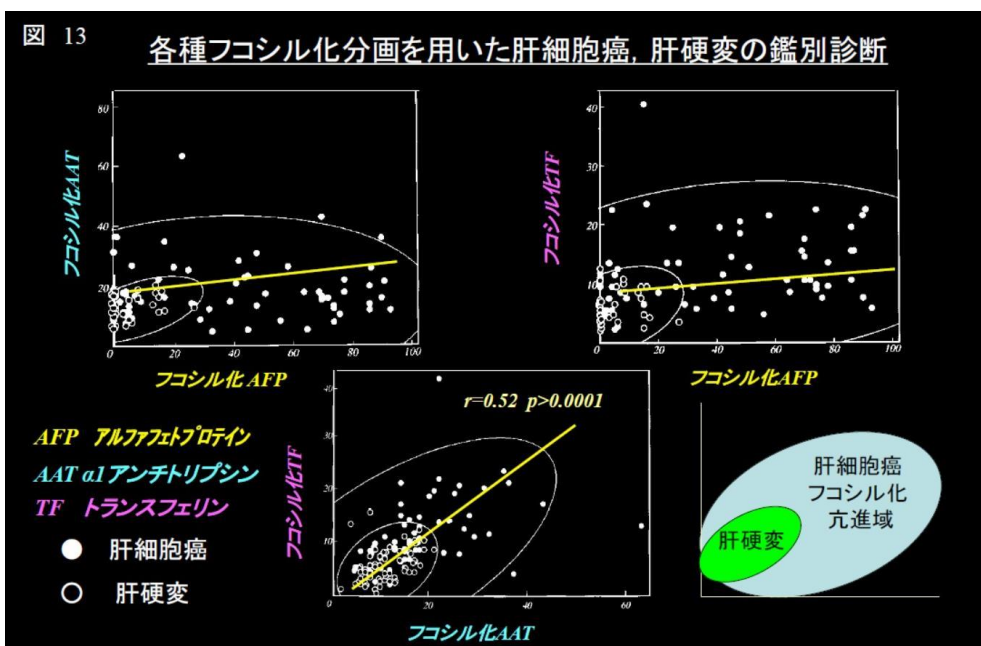


図13にAFP, α1アンチトリプシンならびにトランスフェリン3者におけるフコシル化の相関ならびに亢進域と非亢進域のHCC, LCのプロットを示す。LC症例の多くはフコシル化非亢進域に分布しHCC症例は亢進域に分布する。この事実は複合型糖鎖の還元末端側のフコシル化という事象が癌化において普遍的に起きている事を示しており、また、臨床的にはAFP非産生性HCCの診断に用いる事が出来ると考えられる⁽³³⁾。



9. HCC 予後規定因子としての L3 分面の意義

表 1 は当科にて内科的治療を行った HCC 302 例における予後とそれに影響をおよぼす因子を Cox の比例ハザードモデルを用いて検討した結果である。Stage や肝予備能を示す因子の他に、L3 分面が独立した有意な予後規定因子として抽出出来る。

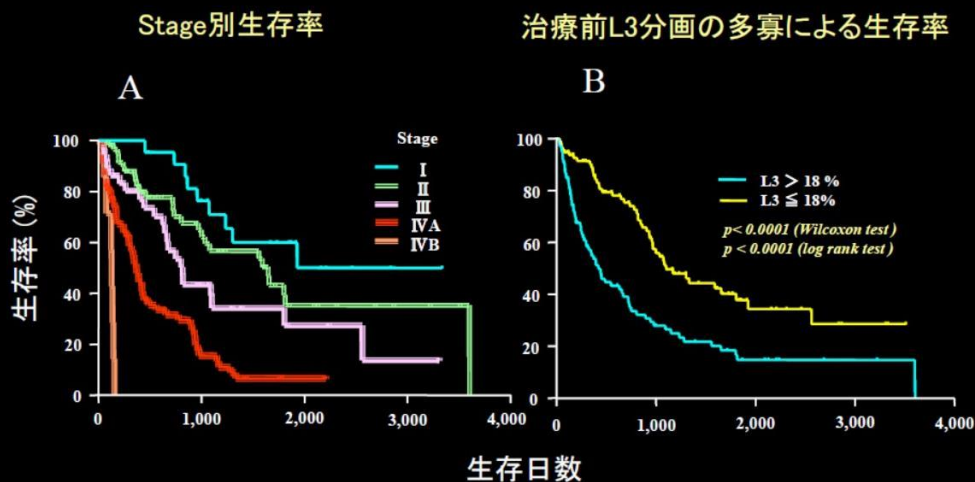
図 14A はこれらの HCC 群での Kaplan-Meier 法による Stage 別生存率であるが当然の事ながら Stage の進行に伴って予後は悪化している。図 14B は、治療前 L3 分面高値群と低値群の生命予後を示すが、両群間に有意な生存率の差が認められ、治療前 L3 分面が予後規定因子である事を示している⁽³⁴⁾。

表 1 Cox 比例ハザードモデルによる予後因子解析

Variables	Coefficient	SE	chi-square	relative risk	p value
L3分面	0.0146741	0.0056773	6.6805653	1.0147823	0.0097468
AFP	0.2307707	0.1127861	4.1864901	1.2595704	0.0407476
PIVKA-II	1.4912639	0.3695503	16.284027	4.4427069	0.00005
Stage	0.8289945	0.1946263	18.14263	2.291014	0.000207
ICG	-19.52404	5.1887524	14.158383	0	0.0001683
初回治療効果	0.5422798	0.1456772	13.856816	1.7199234	0.0001975
血小板	0.0998181	0.0311741	10.252493	1.1049699	0.001365
血清アルブミン	-1.225901	0.407672	9.0425025	0.2934933	0.0026376
プロトロンビン時間	0.022245	0.0113588	3.8353211	1.0224942	0.0501836
治療回数	-0.074957	0.0383296	3.824348	0.9277833	0.0505132
ALT	0.003535	0.0028498	1.5386116	1.0035412	0.2148244
血清ビリルビン	-0.211833	0.3168509	0.4469675	0.8091001	0.5037787
年齢	0.0067428	0.0159591	0.1785085	1.0067656	0.6726579
臨床病期	0.0720953	0.3659424	0.038814	1.0747578	0.8438177

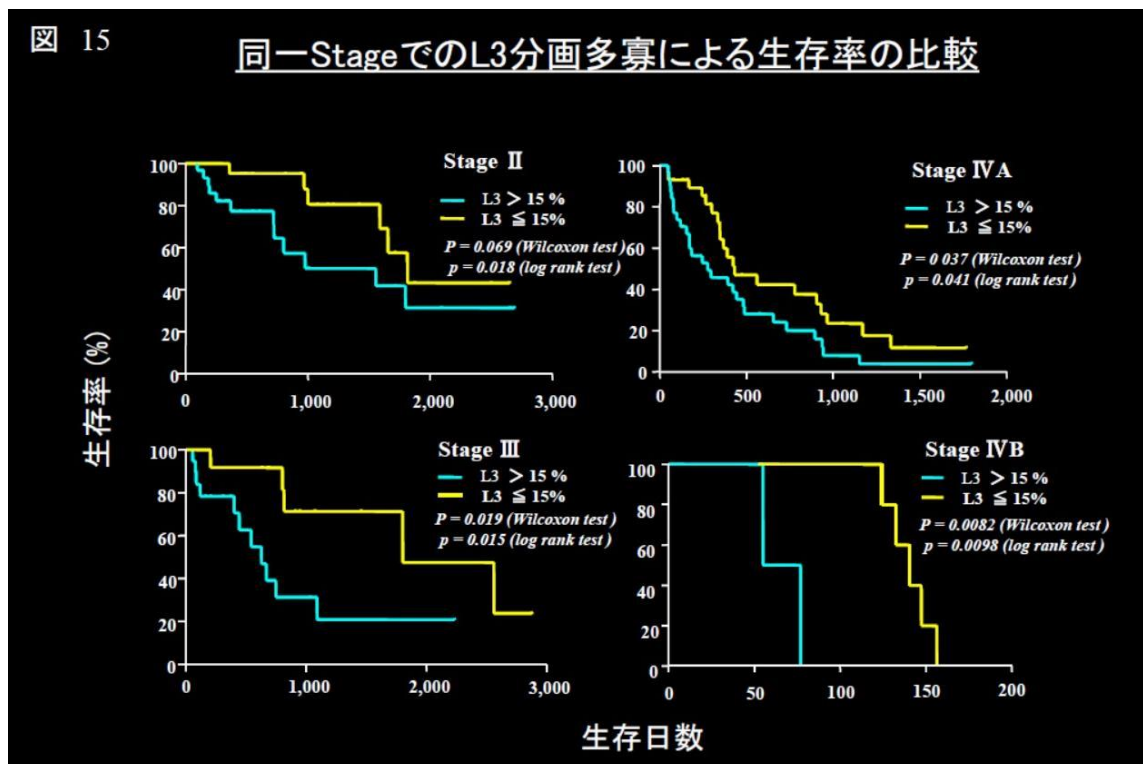
図 14

Kaplan-Meier法による肝癌 302 例の生存率の比較



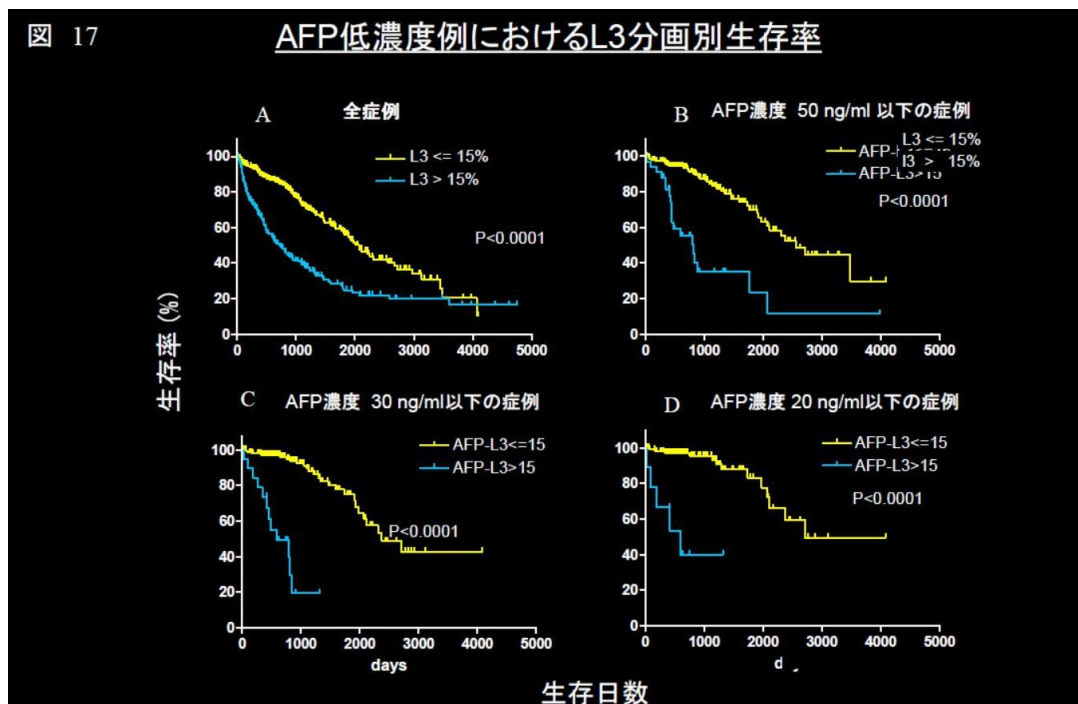
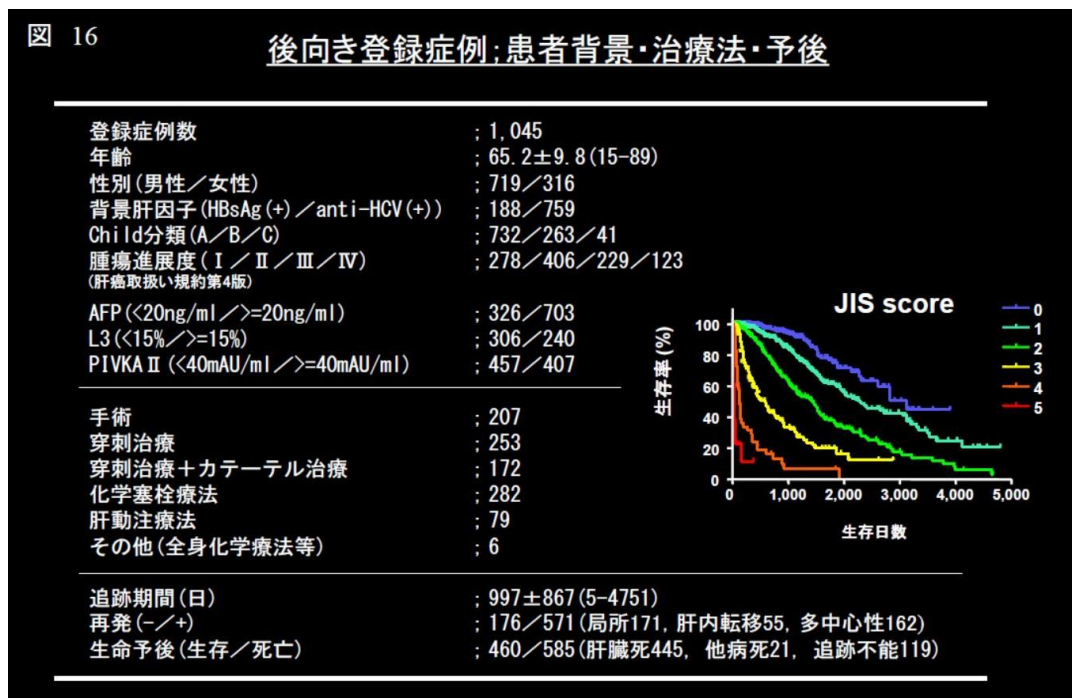
10. 生物学的悪性度を示す指標

図 14 で示した症例に対して Stage を同一にした群での検討でも, Stage I では有意差を認めなかったが, Stages II, III, IVA, IVB において治療前 L3 分画高値群では明らかに低値群に比較して予後不良であった(図 15). 診断時の HCC の進展度が同じにもかかわらず予後に差が生ずるという事である. すなわち, 今後の腫瘍進行速度などの malignant biological behavior を表しており, L3 分画が腫瘍の生物学的悪性度を評価出来るマーカーである事を示していると考えられる⁽³⁴⁾.

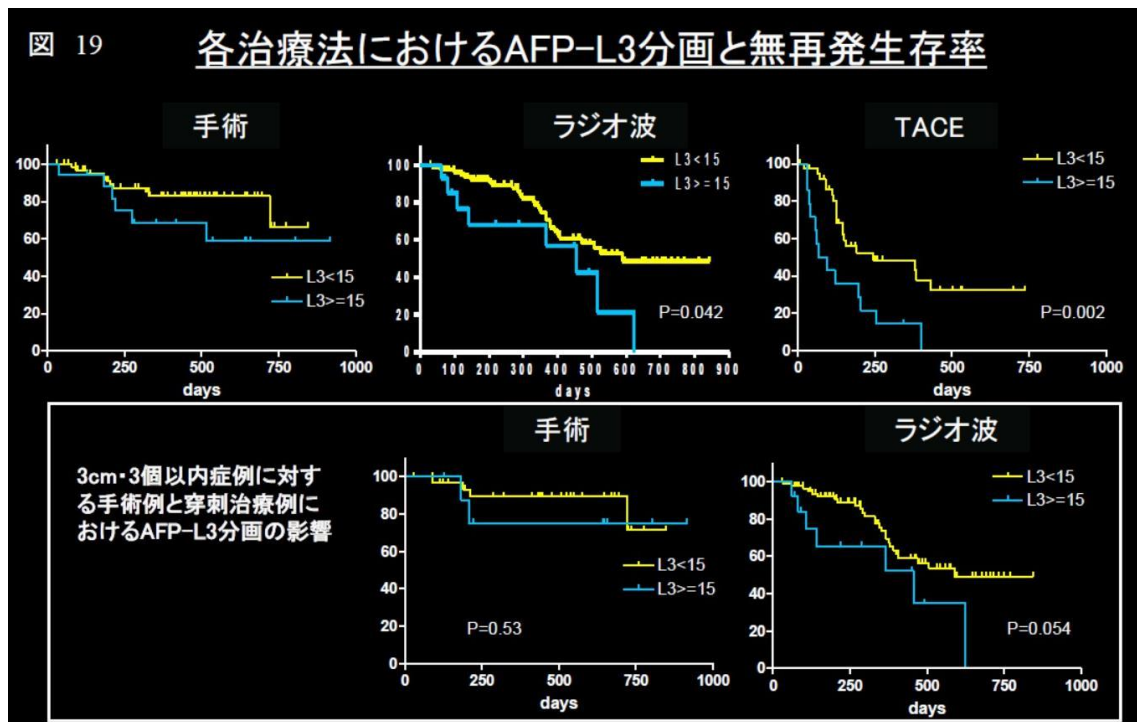


11. HCC 治療選択における L3 分画の意義

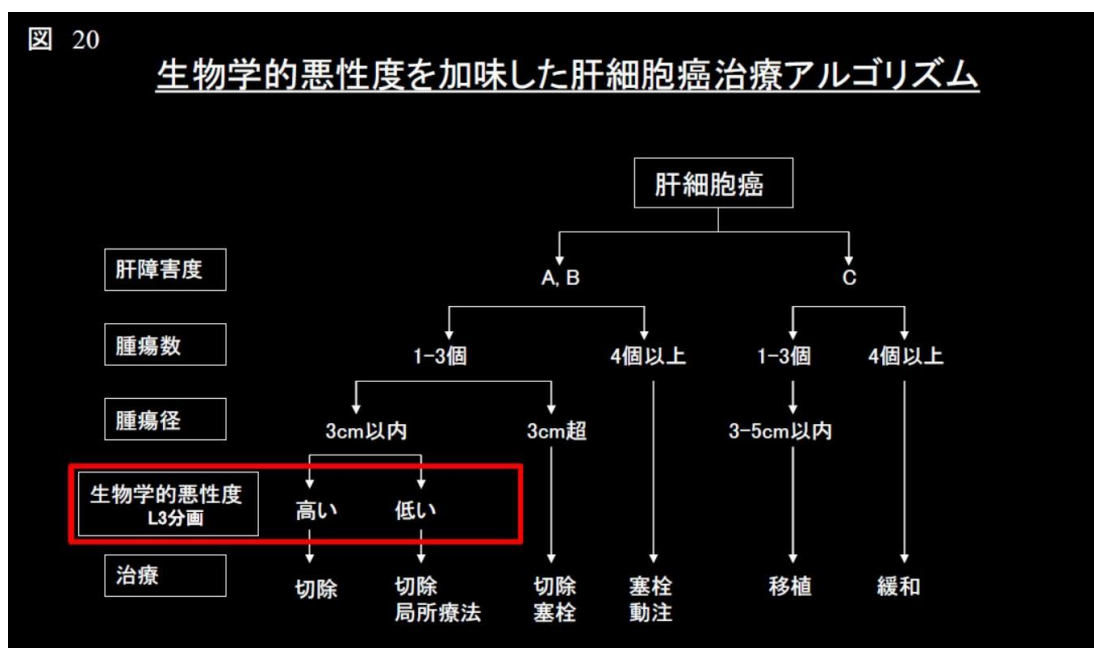
図 16 は著者が主任研究者となり行った厚生労働省科学研究費補助金(平成 17~19 年度肝炎等克服緊急対策研究事業, “L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌のサーベイランスの有用性”の新潟大学, 愛媛大学, 信州大学, 群馬大学での約 1,000 例の HCC の母集団の集計結果である. JIS スコアにおいてもきれいに層別化され, バイアスの無い集団と考えられる. 本集団においても HCC 治療前 L3 分画高値, 低値の間に明らかな生命予後の差を認めた(図 17A). この傾向は血清 AFP 値が低くなるにつれてさらに顕著となる結果であった(図 17B-D).



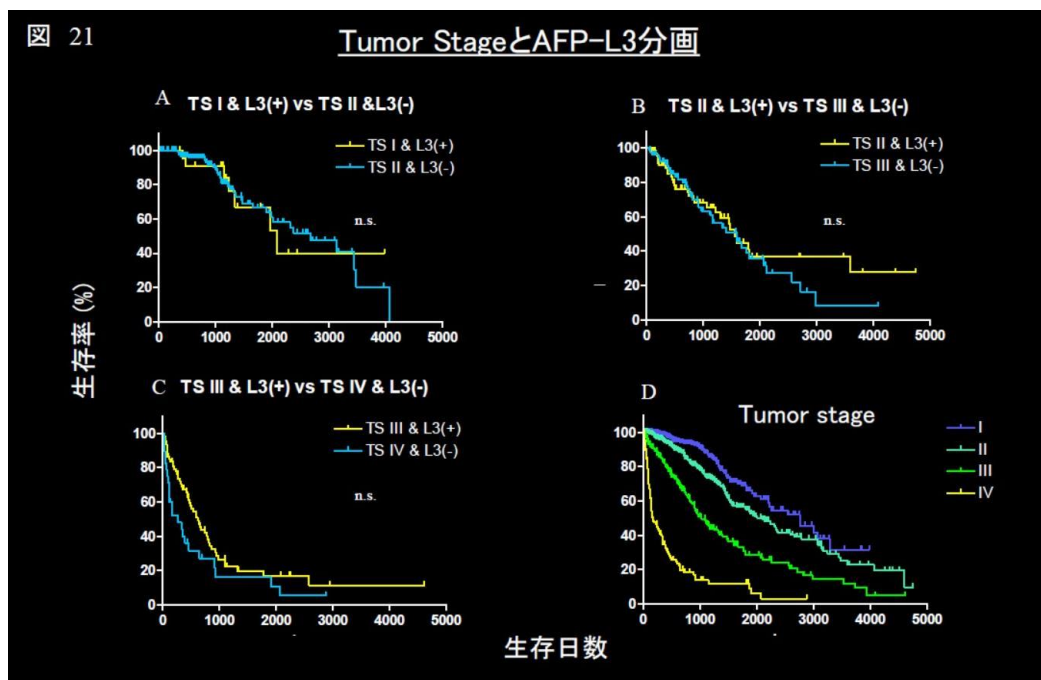
また, 治療法別で検討すると, HCC 制御能の比較的弱い経カテーテル性動脈塞栓療法 (TAE) や経皮的エタノール注入療法 (PEI) で明らかな差を認める一方 (図 18A, B), 制御能の比較的強いラジオ波焼灼療法ではその差が小さくなり (18C), 最も制御能の強力な手術 (18D) では L3 分画の高低は予後との関連を示さなかった. また, 無再発生存をアウトカムとした前向き検討でも同様, 手術のみが L3 分画高低と関連しない結果が得られた (図 19).



この事は, L3 分画陽性例においては肝予備能が許す限り腫瘍制御能の高い手術治療を選択すべきであり, L3 分画陰性例においては腫瘍温存に軸足を置く治療を選択しても良いとの事を示している. 現在治療アルゴリズムに取り入れられている肝障害度や腫瘍数, 腫瘍径の他に生物学的悪性度を表す L3 分画を反映させてはとの著者らの提案である (図 20).



HCC 治療は肝予備能を保つ事と十分な腫瘍制御という二律背反の中で行わなければならない。不完全な治療は再発を来し、また、過度な治療は術後の肝不全死を招来する。この様なジレンマの中での治療法選択の指標として HCC の生物学的悪性度を示す L3 分画測定が果たす役割は大きいと考えられる⁽³⁵⁾。



12. Tumor stage と Biological stage

図 21 は前記した厚労科研での検討結果であるが、HCC の解剖学的進展度である Tumor stage と L3 分画高値、低値との関連を示している。母集団では Tumor stage による予後の層別化が認められ、バイアスの無い集団と考えられる(図 21D)。この集団内において Tumor stage I で L3 分画陽性群と Tumor stage II で L3 分画陰性群の予後曲線がきれいに重なっている(図 21A)。同様に、Tumor stage II で L3 分画陽性群と Tumor stage III で L3 分画陰性群の予後曲線もきれいに一致している(図 21B)。Tumor stage III と VI 群においてもほぼ同様な結果を示している(図 21C)。この事は、L3 分画陽性を便宜的に Tumor stage が一段階進んでいるという臨床的な取り扱いでも良いのではないかという著者らの考えであり、仮に L3 分画の多寡を Biological stage と表現する提案である。

13. 自動化 L3 分画測定法の原理

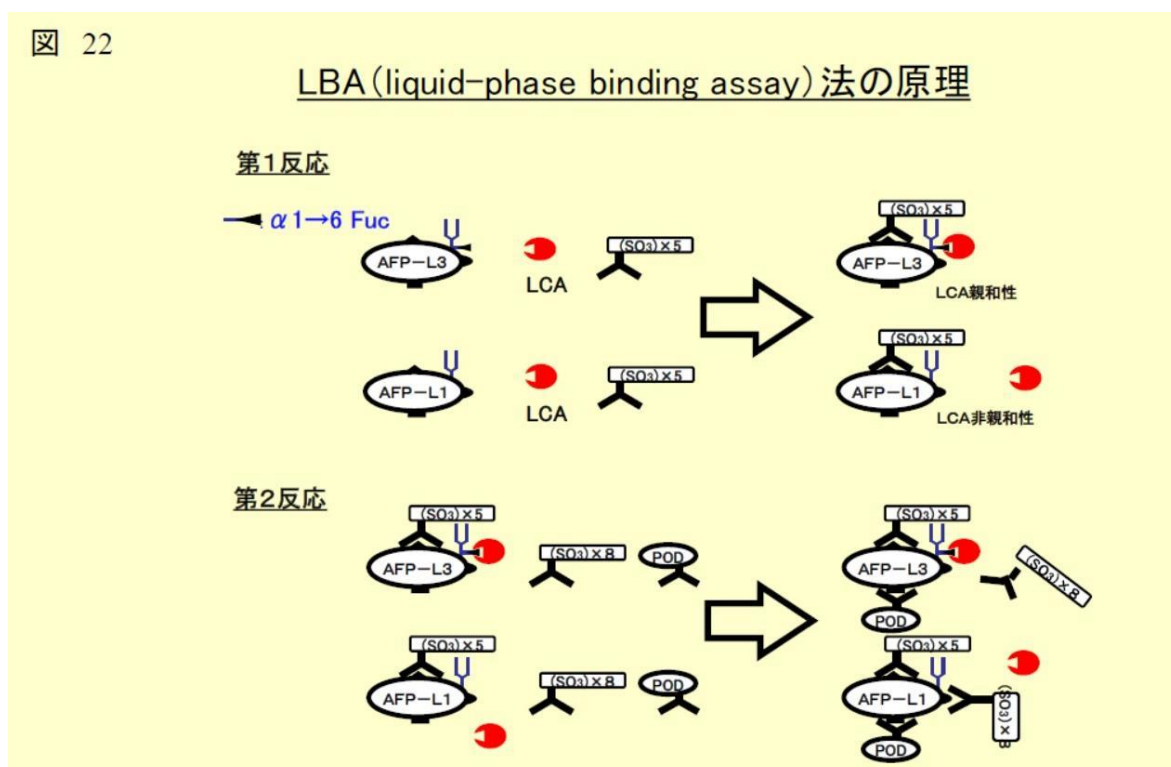
L3 分画は Taketa⁽²⁴⁾らの開発した LCA 含有ゲル電気泳動での測定法で行われていたが、現在は自動化測定系による高感度化が計られている⁽³⁶⁾。これらの基本的原理は著者らが報告提案している糖鎖結合部位近傍の抗原決定基を認識するモノクローナル抗体と LCA との競合阻害による測定系である^(37, 38)。

図 22 にその原理を示すが、第一反応で被験 AFP を LCA と反応させる。第二反応として糖鎖近傍認識モノクローナル抗体を反応させ、その結合度合いを評価するという原理である。すなわち、AFP 糖鎖の還元末端側にフコースが存在すればそこに LCA が結合する事ため、次のステップで糖鎖近傍認識モノクローナル抗体の結合を阻害する。フコースが無ければ糖鎖近傍認識モノクローナル抗体は自由に糖鎖近傍の抗原決定基に結合する事が出来る。このアッセイ系で重要な点は、AFP の糖鎖結合部付近、すなわち糖鎖結合のアスパラギン近傍に抗原決定基が存在するという事

である。文献 37 は糖鎖結合部付近認識抗体の存在に関する著者らの報告であり、文献 38 これらの競合阻害によるアッセイ系の報告である。

この原理を利用した Yamagata らの自動化アッセイ系の報告⁽³⁶⁾は著者らの報告に遅れること 10 年以上を経過している。

著者らがこの原理によるアッセイ系にこだわらなかった理由は、二分岐型複合型糖鎖の還元末端側 $\alpha 1-6$ フコースを直接認識するモノクローナル抗体によるアッセイ系を目指したためである。しかしながら、5 年あまりをかけて糖鎖認識抗体の作成を試みたが **failure** に終わった。その後、糖鎖直接認識のモノクローナル抗体に関する報告は散見するもののその結果は **not convincing** で、実用化はされていない。



14. 高感度化 L3 分画測定法

近年, 第一世代自動化測定系 (LiBASys 法) に変わる第二世代である μ TAS-Wako による高感度化が計られている。

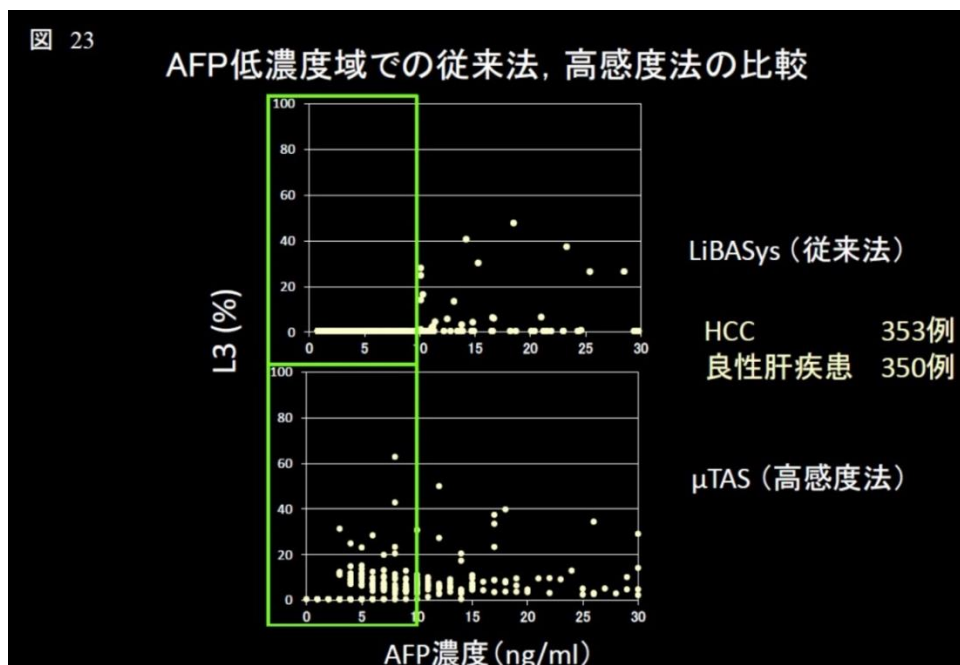


図 23 は AFP 濃度 30ng/ml 以下の HCC (353 例) ならびに良性肝疾患 (350 例) での μ TAS-Wako による計測結果である。AFP 濃度 10ng/ml 以下においては従来法 (LiBASys) では 0%ラインにドットがならび計測が出来ていないが, 高感度法 (μ TAS-Wako) では計測可能であることが示されている。ROC カーブ解析においても全対象例 (703 例, 図 24) ならびに 20ng/ml 以下の症例 (482 例, 図 25) で診断能の向上を認めている。

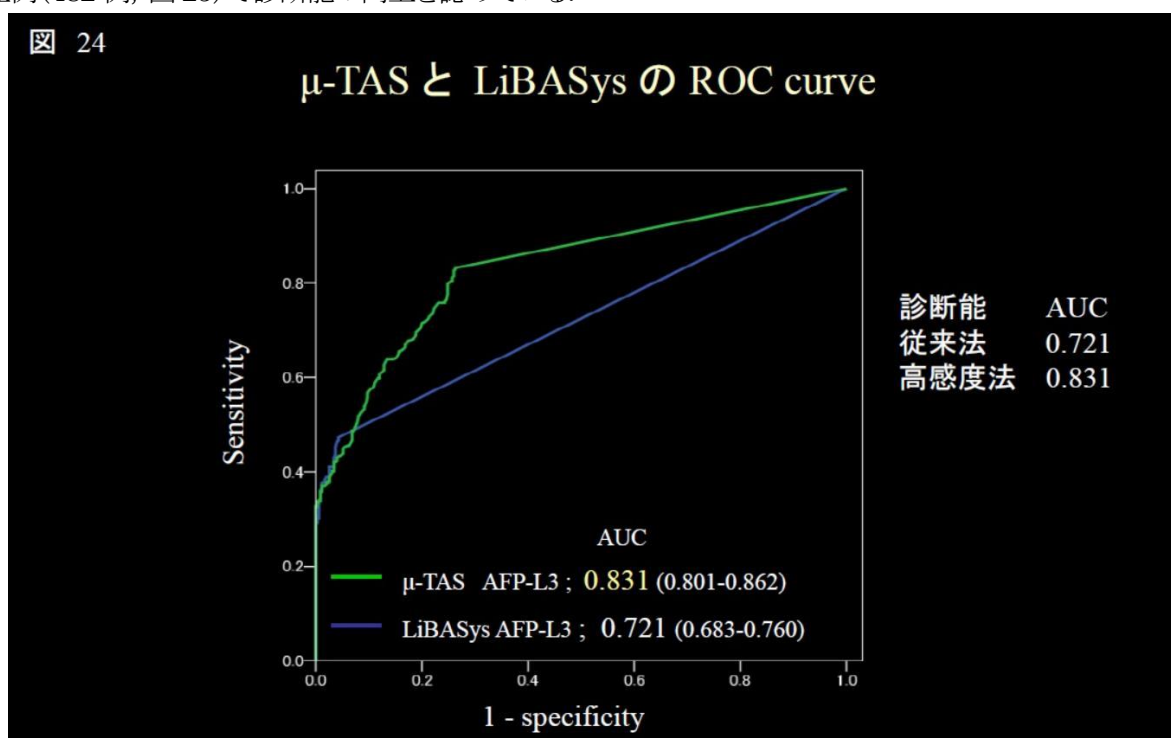
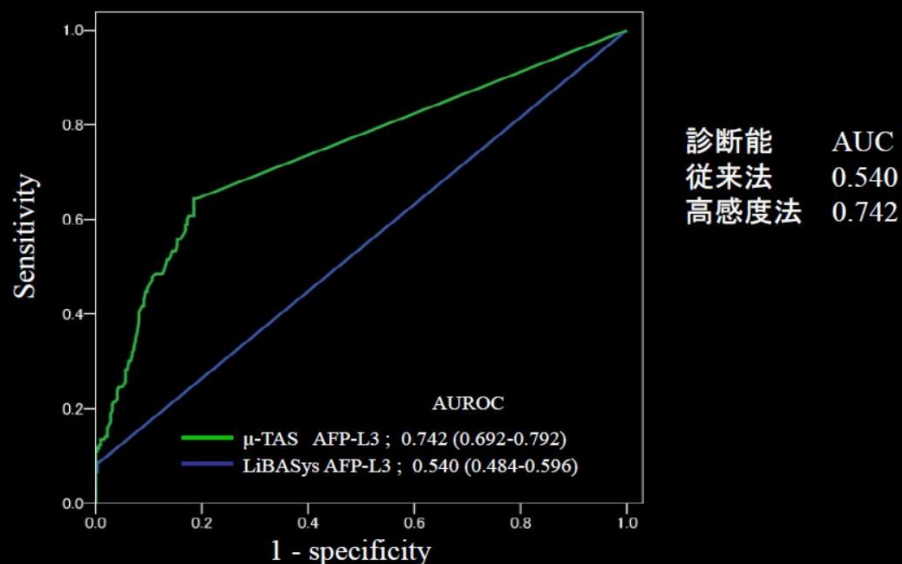


図 25

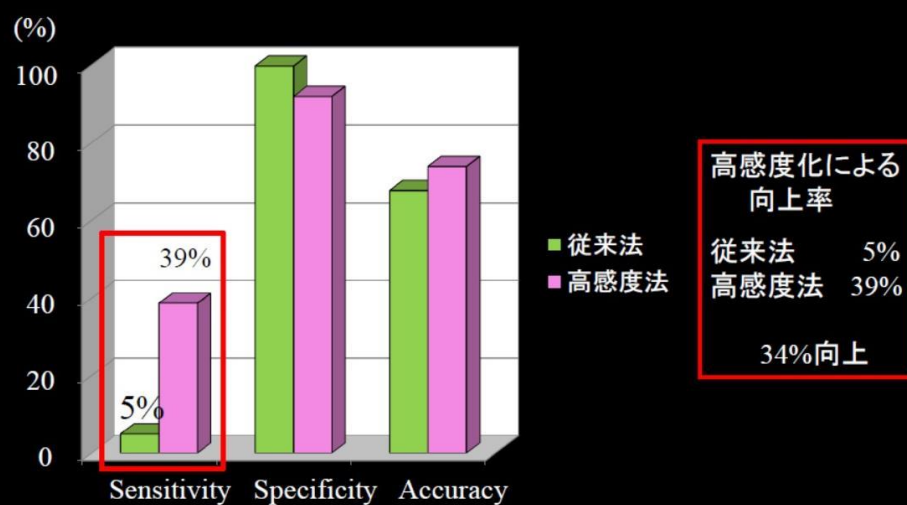
μ-TAS と LiBASys の ROC curve (20 ng/ml 以下)



703 例の測定結果では、従来法で(カットオフ値 10%)陽性率が 38%であったのに対し、高感度法は同じ 10%のカットオフ値で陽性率は 48%、さらにカットオフ値を 7%に引き下げることで、特異性を 90%以上に保ったまま、陽性率を 60%までに上昇させる結果であった。さらに、AFP 値が 20ng/ml 以下の集団においても従来法では陽性率は 5%であったのに対し特異性を 90%維持した上で陽性率は 39%まで上昇した(図 26)。

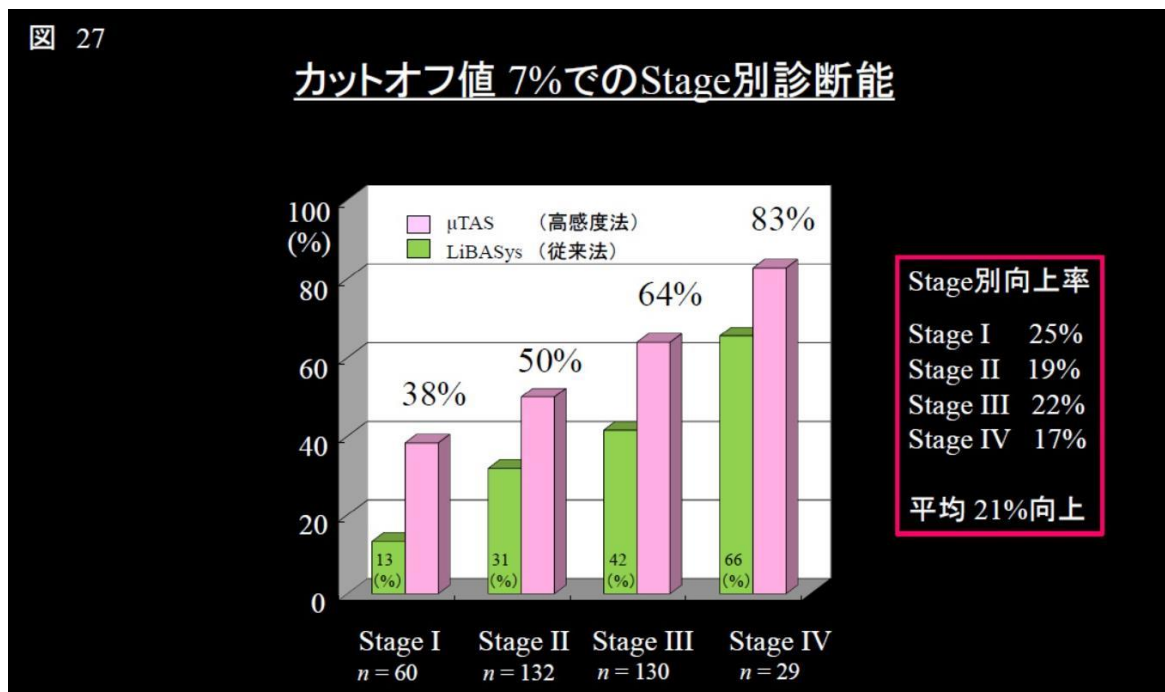
図 26

20 ng/ml以下症例での従来法と高感度法の診断能比較



482 patients (HCC ; 163, BLD ; 319),

また, Stage 別陽性率の比較においても Stage I で従来法では 13%であったのに対して, 38%まで診断能の改善が可能であり, Stage II, III, IV の全症例も平均 20%程度の上昇を示している(図 27)⁽³⁹⁻⁴³⁾.



分化度別陽性率においても従来高分化型 HCC の陽性率は数%であったのに対して高感度化法では 19%に上昇している(図 28). この結果は低値 AFP の評価が出来るようになった事とも関連するが今後期待できるものと思われる.

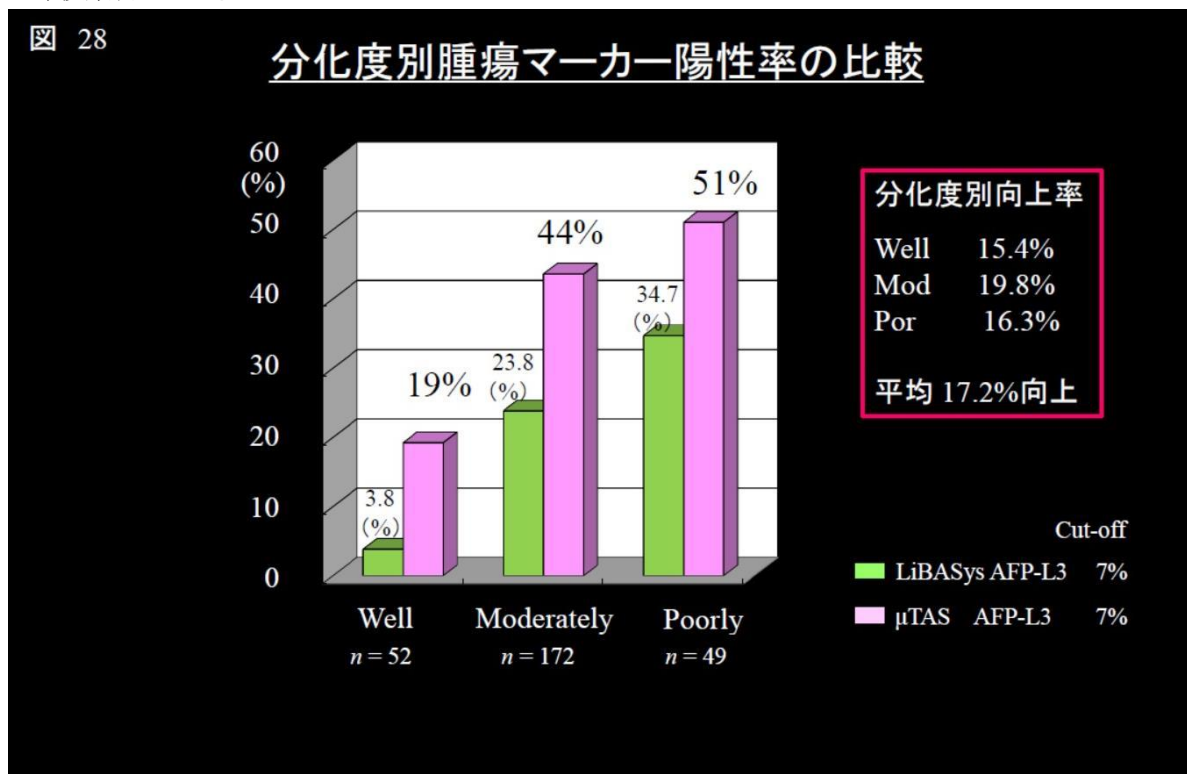


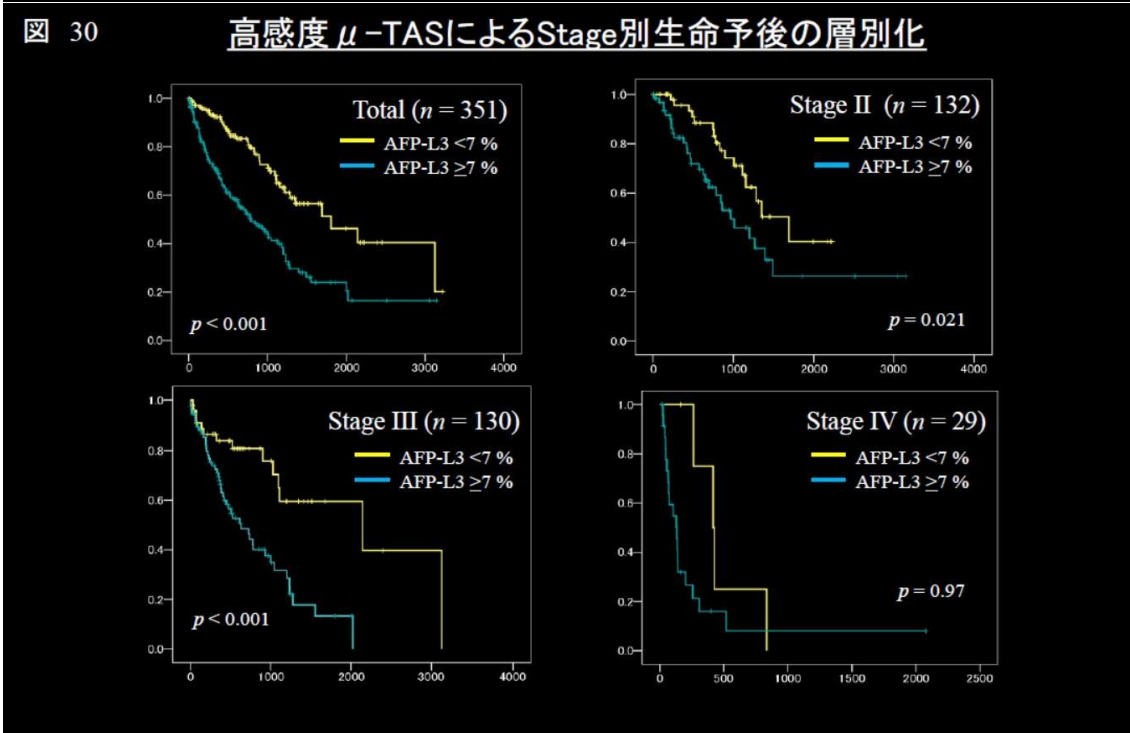
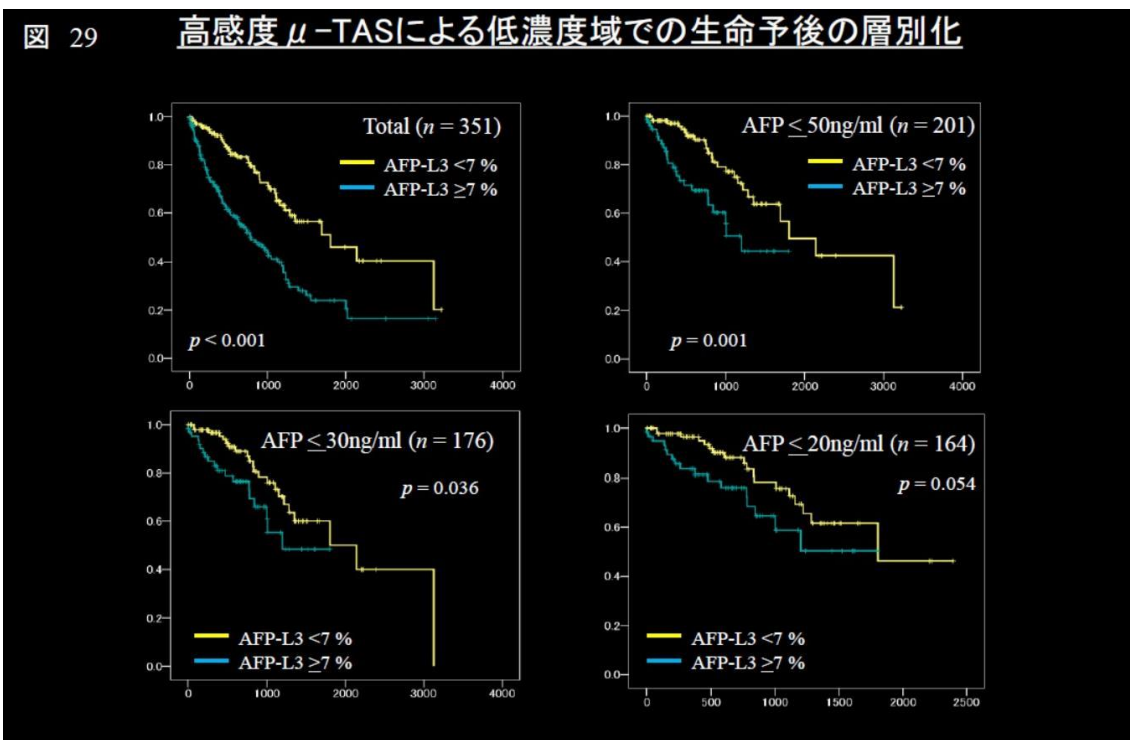
表 2 に高感度法と従来法の検出限界を示すが, L3 分画の値にもよるが, 従来 AFP 濃度では正常域とされる数 ng/ml のレベルでも検出を試みる価値が有る事を示してしる.

表 2 高感度法と旧法との比較

	L3最小検出濃度	AFP-L3%が測定可能な AFP濃度
AFP-L3テストワコー (電気泳動法)	2 ng/mL	20 ng/mL
LBAワコーAFP-L3 (LiBASys)	0.8 ng/mL	10 ng/mL
ミュータスワコーAFP-L3 (μ TAS-Wako)	0.3 ng/mL	2 ng/ml

15. 高感度化 L3 分画の予後因子としての評価

図 29 は低濃度域での L3 分画の多寡と生命予後の関連を示すが、著者らが従来述べてきた高値が予後不良であるという事実と一致する結果である。さらに、stage 別に行った予後との関連(図 30)においても以前の結果(図 14)と同一であった。この事は、アッセイ系として L3 分画が正確に測定されているという事と同時に、以前に明らかにされた腫瘍マーカーとしての behavior を正確に受け継いでいるという事を示している



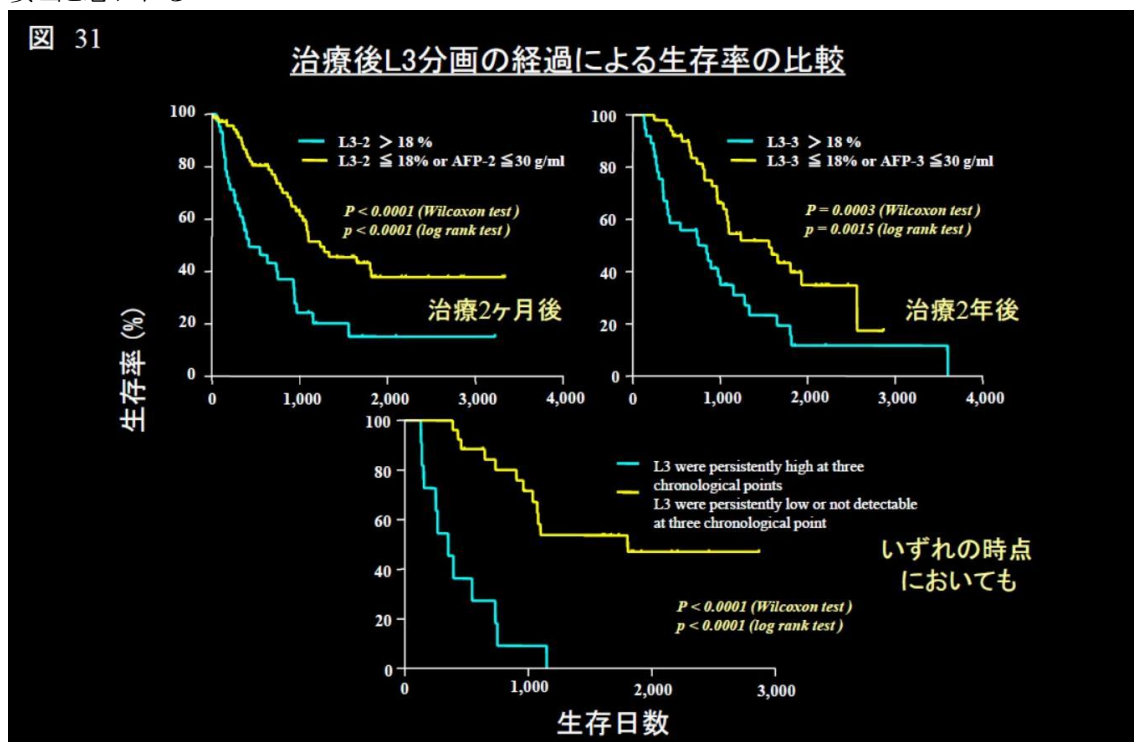
16. L3 分画解釈上の注意点

本検査法の特徴は特異性(specificity)が高いことであり、当科の検討では96%であった。また、良性肝疾患でL3分画20%以上を示した例は自己免疫性肝炎を含む劇症型、重症型急性肝炎例が多く、臨床的に鑑別可能例が大半であった⁽¹⁹⁾。

LC などにおける本分画の上昇(10%以上)は HCC が存在することを前提に各種画像診断を行う必要がある。また、重要なことは、低値がすなわち HCC の否定にはつながらない事に留意すべきである。当科のデータでは HCC の約 30%が本分画 10%以下を示している。

17. フコシル化 AFP よりみた HCC の治療目標

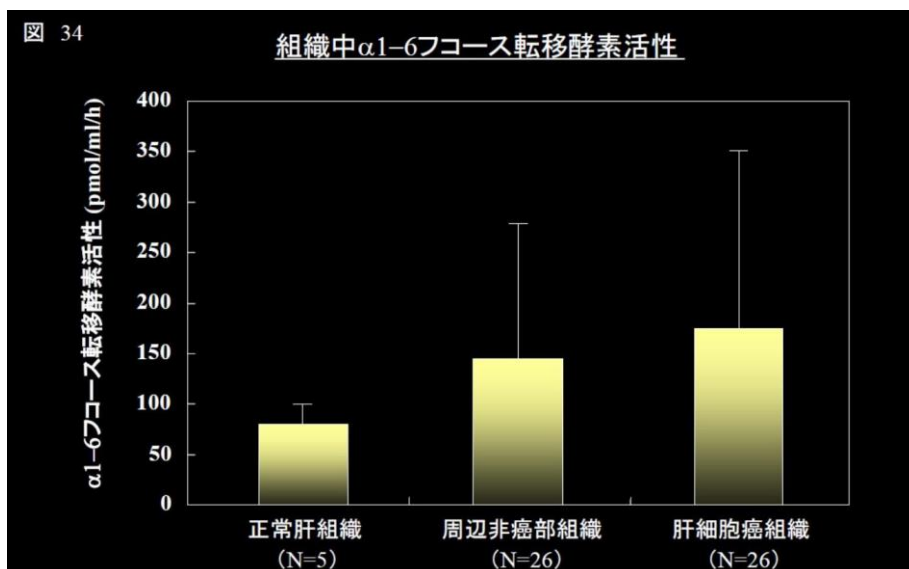
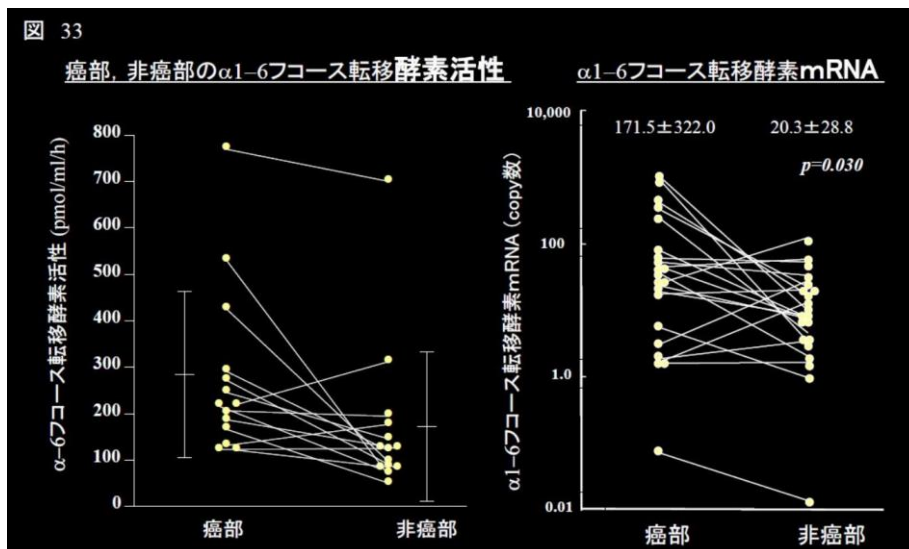
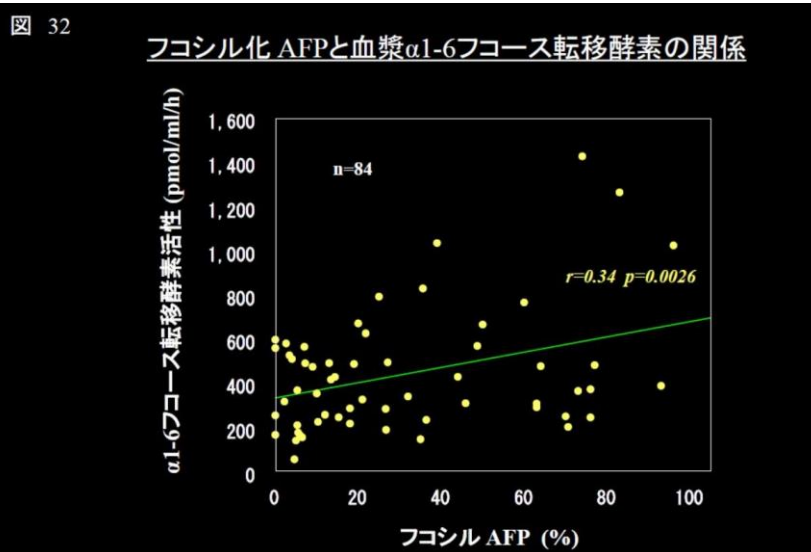
フコシル化を受けたAFPの分子種は肝癌細胞に極めて特異的であり、腫瘍の悪性度を示すマーカーであることより、治療後本分画の低下を確認する事が重要である。図 31 は治療後 2 ヶ月、2 年後の低下群ならびに高値群の予後を示すが、低下群では、非低下群に比較して明らかに生命予後の改善を認めている。すなわち、HCC の治療目標を AFP の L3 分画低下ないし陰性化を目指す事が妥当と思われる⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾。



しかしながら注意点として治療後短期間での L3 分画計測では高感度化された事もあいまって、L3 分画はパーセンテージであるため必ずしも低下しない事が上げられる。正確な L3 分画の治療後評価は少なくとも 2~3 ヶ月後に行う事が望ましいと考える。

18. フコシル化の酵素学的背景

フコシル化の酵素学背景である $\alpha 1-6$ フコース転移酵素(FUT8)の血漿中活性と L3 分画の関連を検討すると、両者には有意な正の相関々係が存在し、酵素活性と product の関係として矛盾しない結果であった(図 32)。また、HCC 組織中活性ならびにその mRNA は周辺非癌部組織に比較して高値を示し(図 33, 34)、脱分化に従ってその活性上昇を認めた(図 35)。しかしながら、疾患群として本酵素活性を計測すると慢性肝炎や LC においてすでに高値を呈しており AFP で認められた L3 分画ほど際だった差は得られなかった。今後、酵素活性と product としてのフコシル化の差を生ずる調節機構の解明が必要と考えられる⁽⁴⁷⁾。

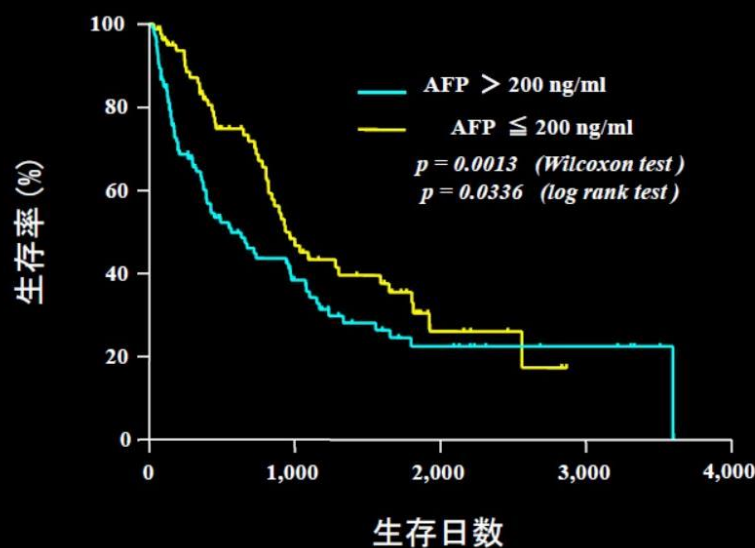


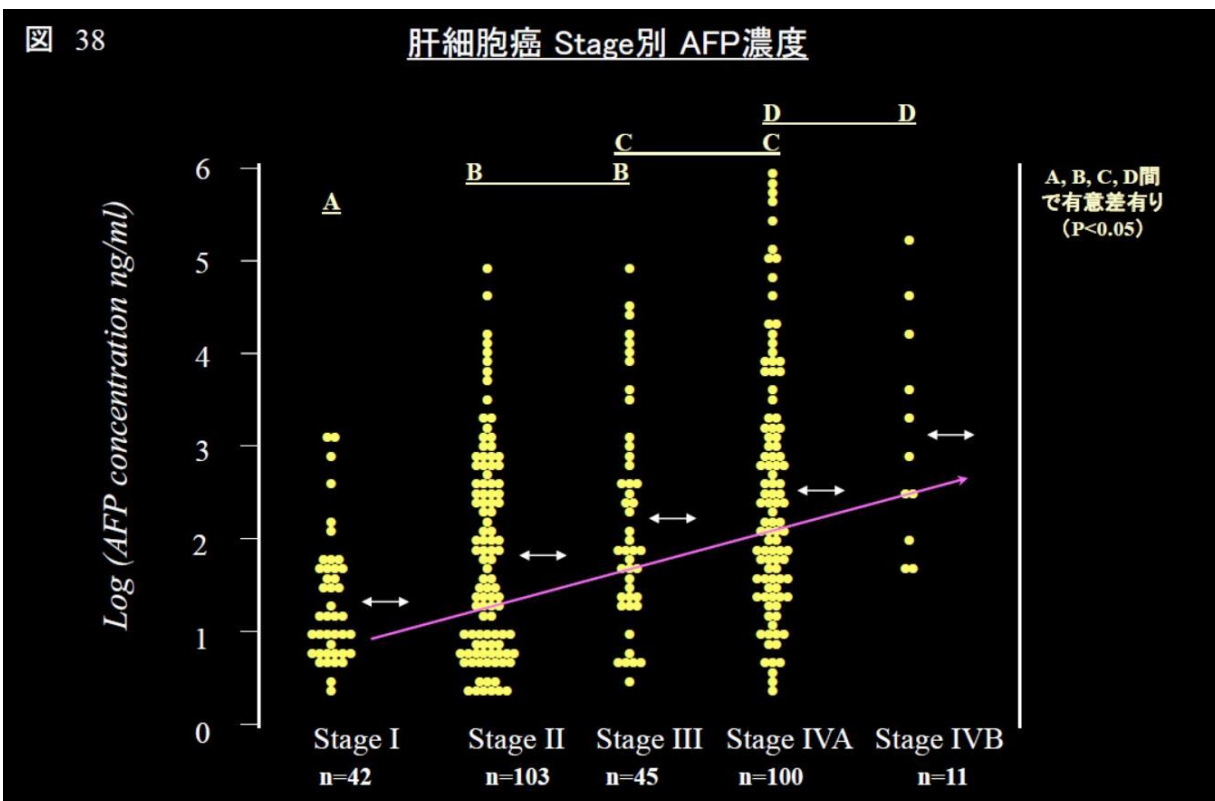
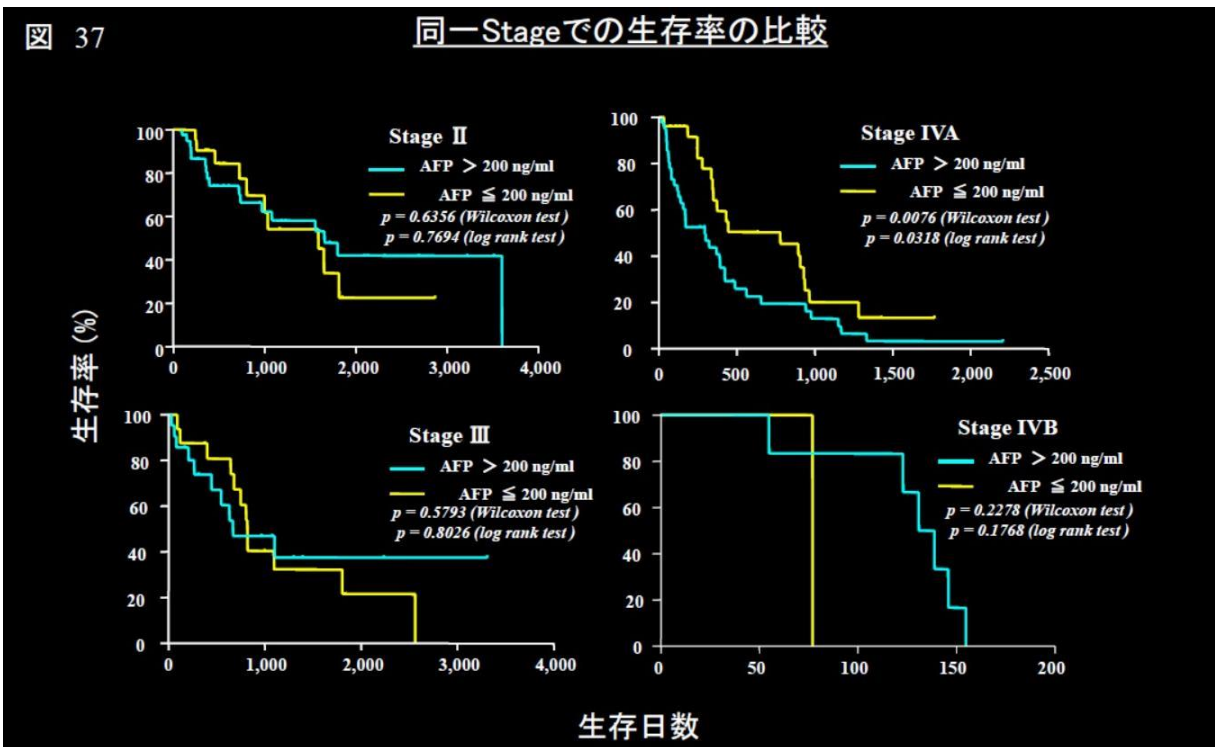
19. AFP 濃度ならびに L3 分画と腫瘍進展度の関係

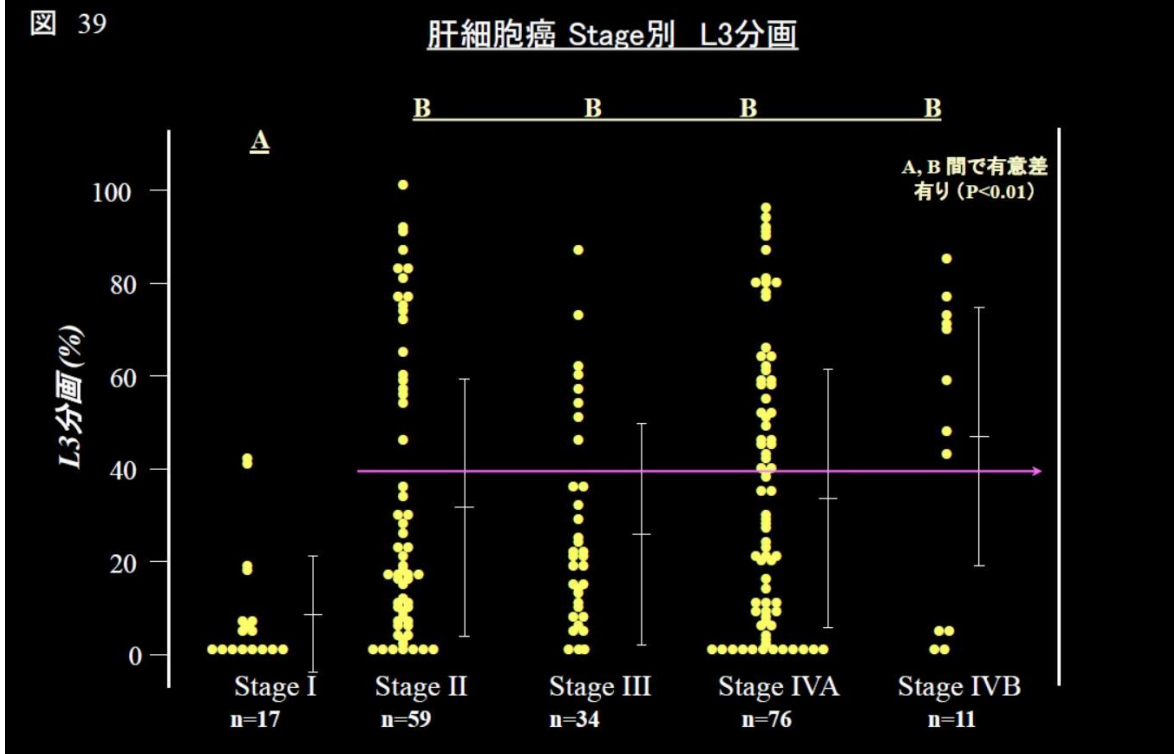
AFP 濃度と予後との関連は以前よりよく知られている事実であり, AFP 高産性の HCC は予後が悪いとされている. 図 36 は当科の HCC301 例の AFP 値 200ng/ml を境とした予後の比較であるが 200ng/ml 以上群で有意な生存率の低下を認める. この群での比較を腫瘍 stage 別で検討すると, stage IVA で弱い生存率の差を認めるがその他の stage では差が認められない(図 37). 図 38 は AFP 濃度と HCC 腫瘍進展度である stage の関連を示すが, 平均 AFP 濃度と stage の間には正の関連が認められる. すなわち, AFP 濃度はその高低で生命予後を反映するが, それは, stage と関連し, その進行を反映していると理解出来る. 他方, 図 39 は stage 別の L3 分画の関係を示すが, 同じ stage 内においても L3 分画は高値から低値と広く分布している. そして, 図 14 で示したとおり同一 stage 内においても L3 分画の高低により予後が異なる結果であった. すなわち, AFP という腫瘍マーカーは, その濃度は腫瘍進展度(stage)を反映し, また, L3 分画は stage と関連しない予後である腫瘍の生物学的悪性度を示していると理解出来る. この様に, AFP という単一の腫瘍マーカー内に腫瘍進展度(Tumor stage)と生物学的悪性度(Biological stage)という二つの情報を有しているという点も極めて興味深いと考えられる.

図 36

治療前のAFP濃度の高低による生存率の比較

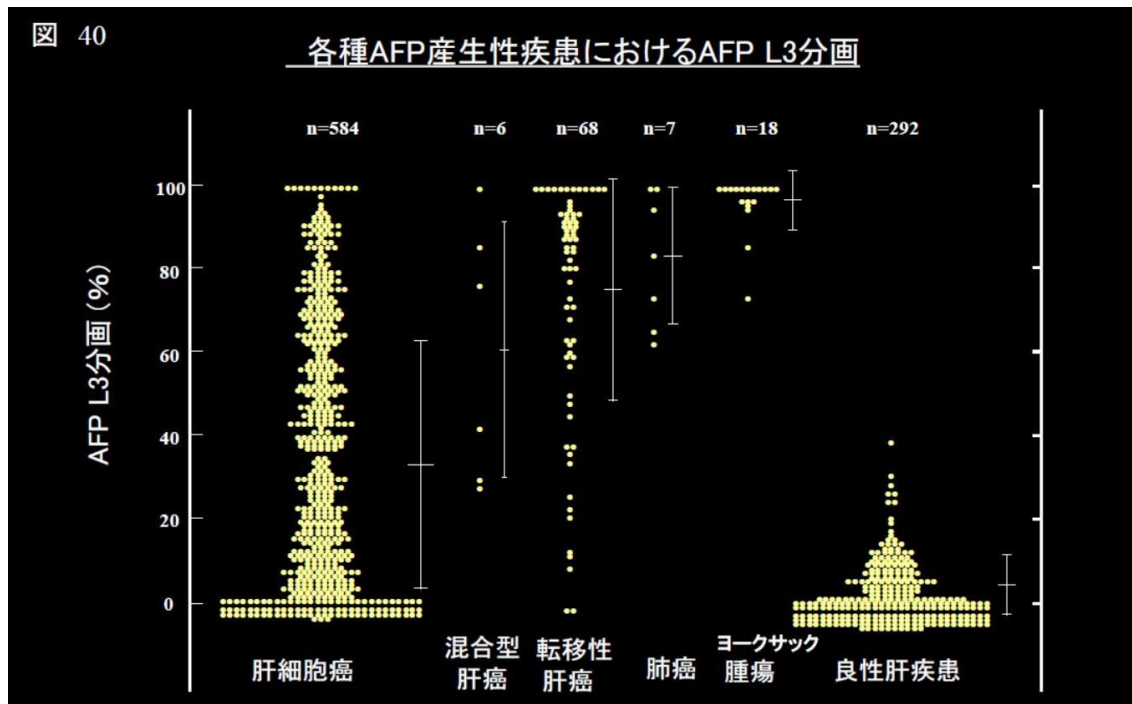






VII. 他の AFP 産生性疾患でのフォシル化

これまで HCC についての L3 分画, すなわちフォシル化の臨床的意義について述べて来たが, 図 2 に示したごとく消化管由来 AFP 産生性腫瘍やヨークサック腫瘍では L3 分画の上昇を認める. 図 40 は HCC, 良性肝疾患ならびに他の AFP 産生性腫瘍の L3 分画の疾患別プロットであるが, AFP 産生性消化器癌やヨークサック腫瘍などでは HCC に比較してより高い L3 分画の上昇を認める.



VIII. L3 分画絶対値評価について

L3 分画は総 AFP に対するフォシル化分画のパーセントで表現されている. このため L3 分画の絶対値表記でカットオフを設定すれば分かりやすいと考えられる. 実際に高感度化後はパーセント表記のため治療後の評価を複雑にしていることも事実である. しかしながら絶対値評価にした際の問題点が存在する. 総 AFP 濃度に割合を掛けた値として絶対濃度を表現した際に一番問題となる点は AFP 濃度のレンジが極めて広い事が上げられる. 高感度法では 20 ng/ml 程度でも充分検出可能となった訳であるが, 10%をカットオフとした際は 20 ng/ml では 2 ng/ml が絶対評価のカットオフとなる. 他方, 300 ng/ml の上昇の際は 30 ng/ml (300 の 10%) となり, 絶対評価のカットオフ値の設定の困難さが存在する. もし行くとすれば, AFP 濃度を最大 50 ng/ml の限定した際のカットオフ値などとする必要が出てくると思われる.

もう一点は L3 分画の腫瘍マーカーとしての性格にも起因すると思っている. 図 41 は L3 分画別の生存曲線であるが, L3 分画値の多寡を細かく区切っても当初著者らが設定していた 15%以下のラインと 15%以上のラインの間に少し大きな空間が存在する. L3 分画値 30%と 50%の間に大きな生存率の違いは見あたらない. すなわち著者らは L3 分画は, 高いか低いか, すなわち“オンオフマーカー”であるという認識を持っている.

図 41

AFP L3 分画別生存率の比較

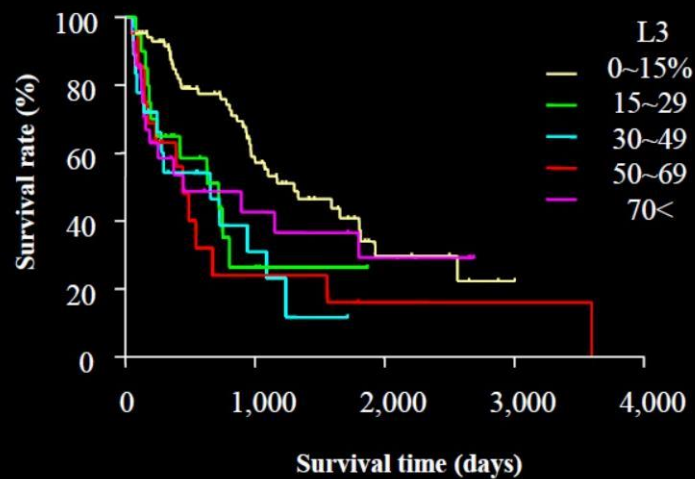
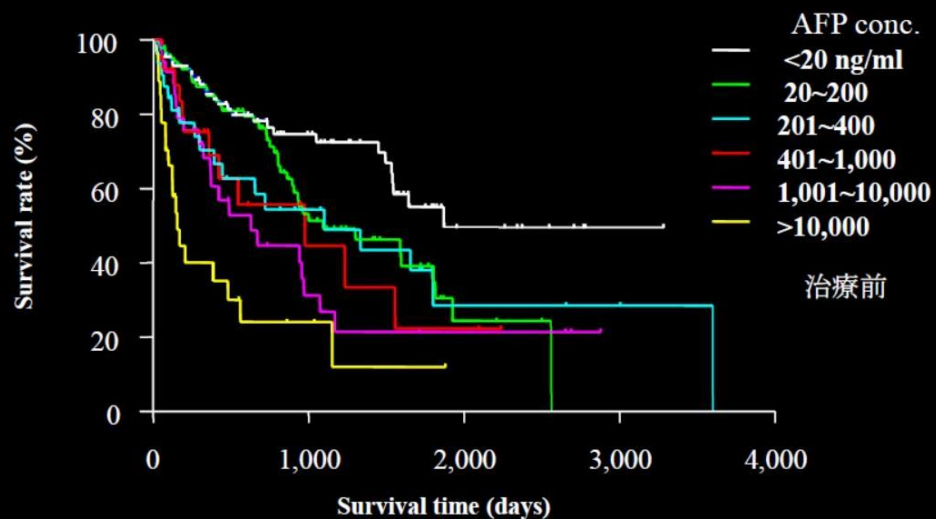


図 42

AFP濃度別生存率の比較



他方、同じ生命予後の検討を AFP 濃度で行ったものが図 42 であるが、AFP 濃度による階層化では濃度依存性に予後の低下を認めている。これは平均 AFP 濃度が腫瘍の進展度を表し、L3 分画は同じ進展度内での悪性度を表している事と矛盾しないように思われる。

IX. もう一つの糖鎖変異

1. AFP 糖鎖の多分岐化変異

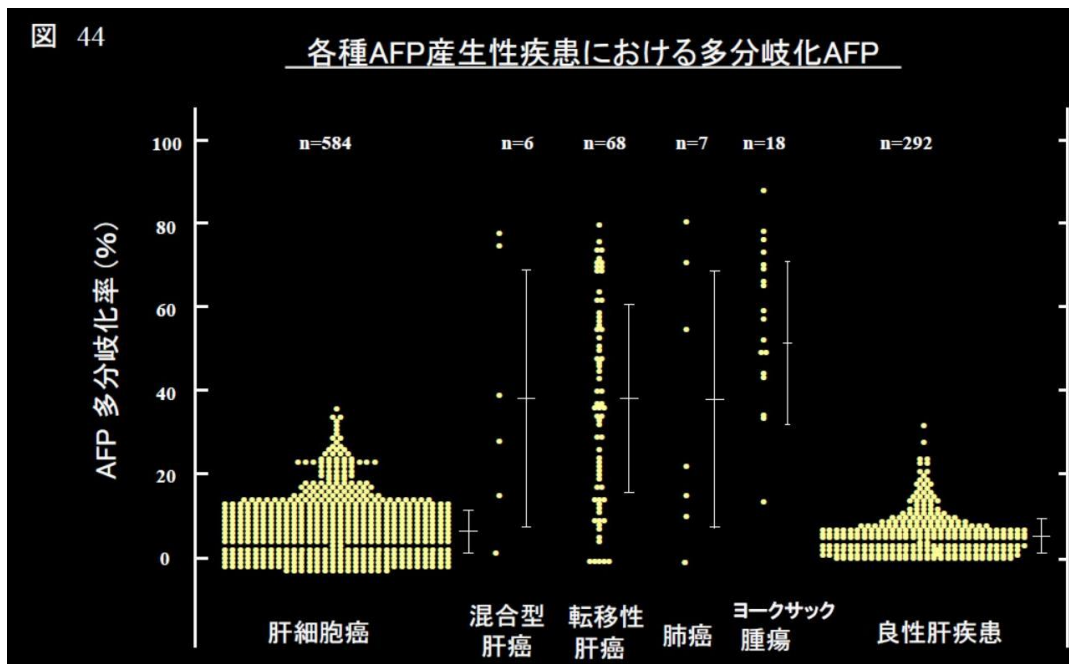
AFP 糖鎖においてはフコシル化と共にバイセクト型を含む多分岐化変異(グルコサミニル化)が各種 AFP 産生性腫瘍で認められる. これらの多分岐化糖鎖は trimannosyl core に *N*-アセチルグルコサミンが付加され(図 43), Con A に反応性を有しなくなるため, 総 AFP に対する Con A 非結合性分画として計測出来る. この変化は胃癌, 大腸癌, 膵癌などの消化管由来 AFP 産生腫瘍やヨークサック腫瘍において認められるものであり, その鑑別診断に有用である. この Con A 非結合性分画, すなわち多分岐化糖鎖の大半はフコシル化も受けており電気泳動法では L2 分画として検出されるが, 電気泳動法では L1 と L3 分画 の間に広く泳動され, 分離が難しく数値化が困難な場合も多い. そのため, 著者らは AFP のレクチン分画測定の際は, フコシル化(L3 分画)を評価するレンズマレクチンと多分岐化糖鎖(L2 分画)を評価する Con A の二者をペアーで行ってきた(20, 26, 27).なお, 現在の自動化システムでは多分岐フコシル化糖鎖の主要な部分は L3 分画と認識されると推定される.

図 43



2. 多分岐化糖鎖とその酵素学的背景の臨床的意義

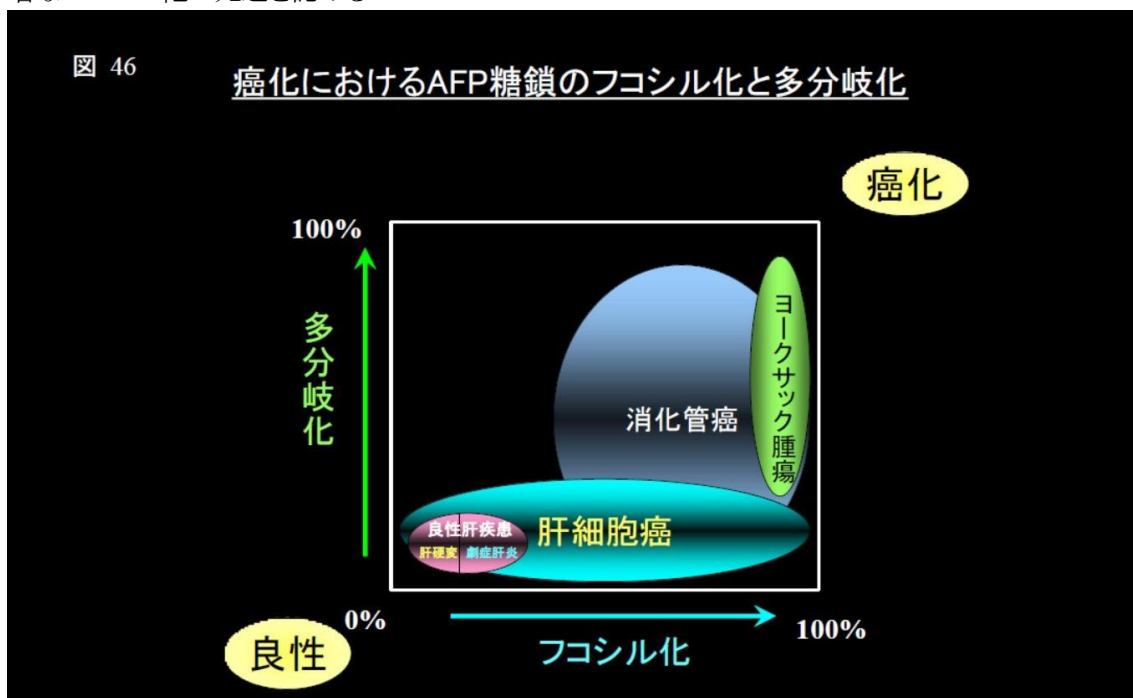
AFP の多分岐変異を HCC, 良性肝疾患ならびに AFP 産生性各種疾患につき検討すると(図 44), HCC, 良性肝疾患では上昇を示さないのに対して, AFP 産生消化器癌の肝転移や混合型肝癌では, 前二者に対して有意な上昇を示した. すなわち, 肝腫瘍の鑑別という立場より, 原発性か転移性の鑑別に有用と考えられる. また, これらの他にも yolk sac tumor においても明らかな上昇を示し, yolk sac 型 glycosylation の特徴と考えられる(20, 21). また, これら多分岐型糖鎖の酵素学的背景である III 型, V 型グルコサミン転移酵素が AFP 産生性腎癌ならびに HCC の転移浸潤能を評価する因子として臨床的に有用である結果を報告している(48-50).



X AFP糖鎖のフコシル化と多分岐化

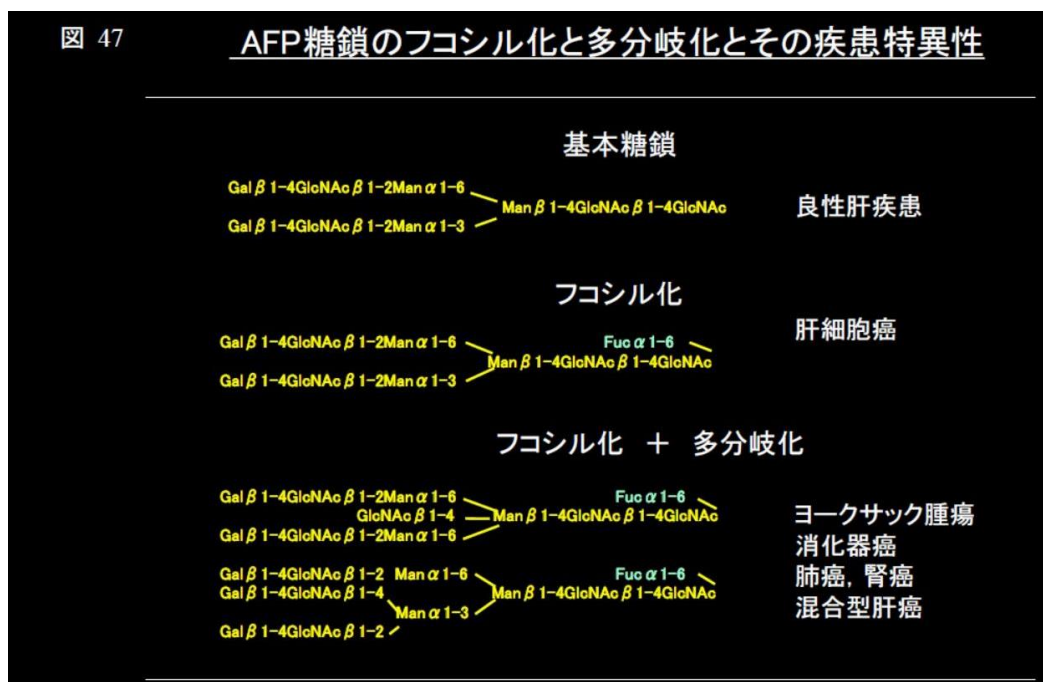
1. AFP糖鎖の疾患特異性

図 45 は HCC を含む各種 AFP 産生性腫瘍ならびに良性肝疾患のフコシル化 (LCA 結合性分画の%, X 軸), 多分岐化 (Con A 非結合性分画の%, Y 軸) をプロットしたものである. 良性肝疾患由来 AFP においては基本糖鎖である二分岐複合型糖鎖にフコシル化, 多分岐化のいずれの修飾も受けない糖鎖が主体である. これに対して, HCC においてはフコシル化の上昇を認めるが, 多分岐型糖鎖の出現頻度はそれほど高くない. 他方, 消化器癌の肝転移や混合型肝癌では, フコシル化ならびに多分岐化の両者の出現が認められる. ヨークサック腫瘍においては多分岐化と顕著なフコシル化の亢進を認める.



これらのプロットの疾患カテゴリー別の模式図を図 46 に示すが、二分岐型複合型糖鎖にフコシル化、多分岐化の二つの糖鎖変異が起きることが各種悪性腫瘍で起きている。すなわち、基本糖鎖から X 軸のフコシル化変異、Y 軸の多分岐化変異いずれも癌化の方向へ向かう変異であると思われ、AFP の糖鎖の疾患特異性とその診断的意義が理解できる。図 47 に AFP の糖鎖構造とその疾患特異性を示す。

AFP の糖鎖という極めて限られた領域においてもその疾患特異性が認められ、その調節機構の存在と疾患特異性による診断的意義が理解できる。



【おわりに】

これまで著者らが行ってきた AFP 研究、特に糖鎖変異に関する検討を紹介した。

著者らがこの研究に興味を持った理由は、AFP がひとつの分子上に、濃度変化という情報と、その質的变化である糖鎖変異という情報の二つを持ち、それぞれに臨床的意義を有しているという事である。また、この AFP 糖鎖という極めて小さな領域においてもその法則性、すなわち、AFP 糖鎖の疾患特異性が存在する事であり、これらを明らかに出来たことに多少なりとも満足している。

今後、これらの知見が AFP 産生性消化器疾患の鑑別診断のみならず、HCC の生物学的悪性度の評価指標などにも取り入れられ、さらに、囲い込みの極めて困難な非アルコール性脂肪性肝炎などを中心とする非ウイルス性 HCC の疾患のサーベイランスにおいて用いられることを期待するものである。

謝辞 本研究にあたっては多くの第3内科(現消化器内科)所属の研究者の協力により成し遂げられたものであり、ここに謝意を表明致します。