

会長講演

AFPを見直そう

北海道大学大学院医学研究科 病態制御学専攻・生殖発達医学講座

教授 藤本 征一郎

Clinical Application of Serum Alpha-fetoprotein Microheterogeneity

Seiichiro FUJIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo

Key words : Alpha -fetoprotein · AFP L3 · *Lens culinaris* agglutinin · Trisomy 21 · Prenatal screening

はじめに

Alpha-fetoprotein (AFP) は、 α 1-グロブリン領域に泳動される癌胎児性蛋白質で、分子量は約7万、590個のアミノ酸からなり、またN末端から232番目のアミノ酸に、アスパラギン結合型糖鎖を1本有している¹⁾。AFPの研究は1963年の Tatarnov, Abelev によるものが世界最初ということになっているが、AFPの精製は1969年まではだれもが成功しておらず、同年の北海道大学における Nishi²⁾によるAFPの精製と、その化学的同定の報告³⁾が世界初ということになる。1969年北海道大学においてAFPが精製された後、AFPの化学的同定の詳細、産生部位あるいは機能について、多くの報告がされている。すなわち、AFPはヒト胎児の卵黄嚢及び肝臓において生理的に産生されること、またAFPとアルブミンの構造の類似点⁴⁾やそれらのregulationの解明⁵⁾により、AFPが胎児においてはアルブミン様蛋白質として機能している可能性、さらにAFPが癌あるいは胎児の発生に関して免疫抑制作用をもっている可能性などが示唆された。しかし従来これらの系統的研究の結果によっても、胎児AFPと肝臓癌AFPとは化学的に区別し難いとされていた。

これまでのAFP

AFPの測定は1970年までは Ouchterlony 法や Mancini 法などの寒天ゲル内沈降反応によって行

われていたが、1971年、2抗体法を用いる radioimmunoassay が北海道大学の Nishi and Hirai⁶⁾により確立されるに及び、AFP測定は定性から定量へと代わり、AFPの臨床的意義が大きく変化することとなった。Radioimmunoassayの高い感度は、AFPが成人においては肝臓癌に特異的に出現するという従来の考えを根本的にくつがえすこととなり、AFPは正常成人血中にも低濃度に存在することが明らかとなった。その後、やはり Nishi and Hirai⁷⁾によりAFPのradioimmunoassayは初期の2抗体法から、ろ紙片を用いるサンドイッチ法に改良され、さらに感度を増して現在広く臨床応用されている。そしてその応用範囲は、我々の産婦人科領域において広範囲にわたっている(図1)。

AFPは胎児期に大量に産生されるが、出生後にはその産生が急激に低下し、健常成人ではほとんど認められなくなる。一方アルブミンの産生は胎児の発達とともに、そして出生後も徐々に増加し、成人で一定値を保つ。AFPとアルブミンの発現とは対照的だが、これらの2つの遺伝子は同一祖先遺伝子に由来すると考えられ、構造的にも多くの類似点が推測されている⁴⁾⁵⁾。アルブミンは糖鎖をもっていないが、AFPは232番目のアミノ酸にアスパラギン結合型糖鎖を1本有している¹⁾。

AFPにおける糖鎖

我々の研究過程において糖鎖の重要性を感じさ



図1 臨床における AFP

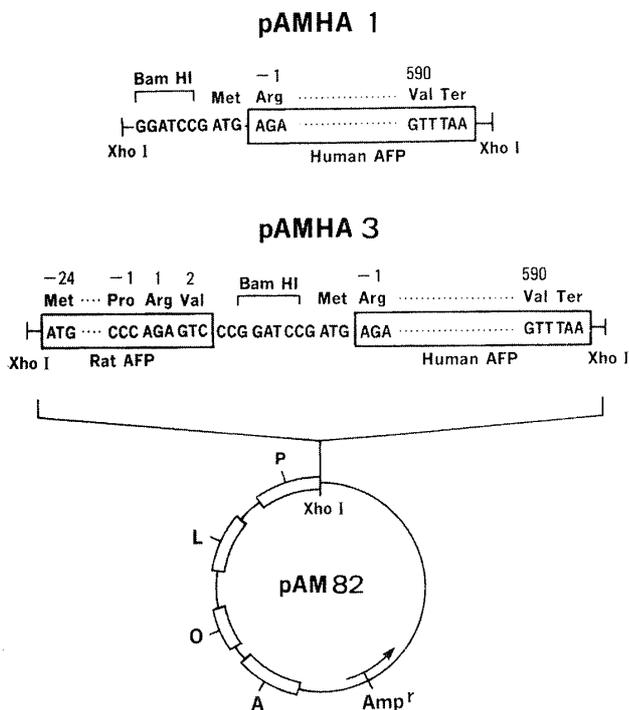


図2 pAMHA 1及び pAMHA 3の構造 (Yamamoto R. et al. Life Sciences 1990)

AFP cDNA を発現ベクターに組み込んだものであるが、1983年に得られたヒト AFP cDNA は N 末端にシグナルペプチド領域をもたず、発現プラスミド pAMHA 1を用いて酵母を形質転換した実験では蛋白質を得ることができなかった。そこでシグナルペプチドにラット由来のものを用いて pAMHA 3 を作製すると、大腸菌ならびに酵母においてヒト recombinant AFP の発現、及びその蛋白質の精製に成功することができた。

精製したヒト recombinant AFP とヒト肝細胞癌由来の AFP を、SDS PAGE と Ouchterlony 二重免疫拡散法により、それらの分子量と抗原性を比較すると、抗原性に関してはヒト recombinant AFP とヒト肝細胞癌由来の AFP の 2 つの AFP は完全に fusion しており、これらが同一の抗原性を有していることが確認された(図3, 右). しかし分子量においてヒト recombinant AFP が若干小さいことが明らかとなり(図3, 左), この理由として、酵母はほ乳動物と異なった glycosylation process をもつことが知られており、このためヒト肝細胞癌 AFP とヒト recombinant AFP においては、ヒト肝細胞癌 AFP の糖鎖が complex and

せたのは、教室の Yamamoto et al.^{8)~10)}による recombinant AFP の産生実験であった。図2はヒト

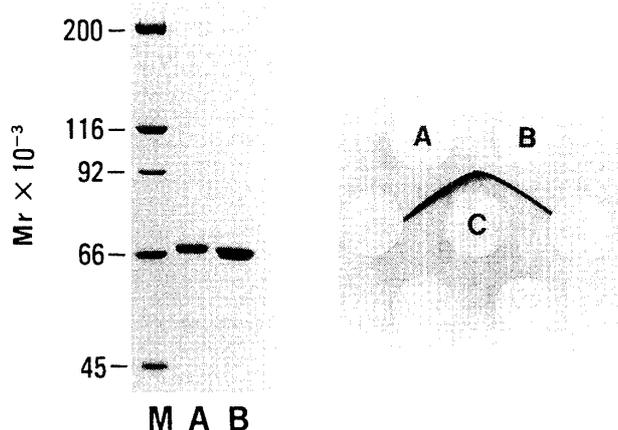


図3 左：recombinant AFP の SDS-PAGE による分析 (Yamamoto R. et al. Life Sciences 1990)

A；Hepatoma AFP (1.5 μ g)，B；recombinant AFP (1.5 μ g)，M；サイズマーカー myosin (M.W. 200,000)， β -galactosidase (M.W. 116,000)，phosphorylase b (M.W. 92,000)，bovine serum albumin (M.W. 66,000)，ovalbumin (M.W. 45,000)

右：Ouchterlony 二重免疫拡散法による recombinant AFP の分析

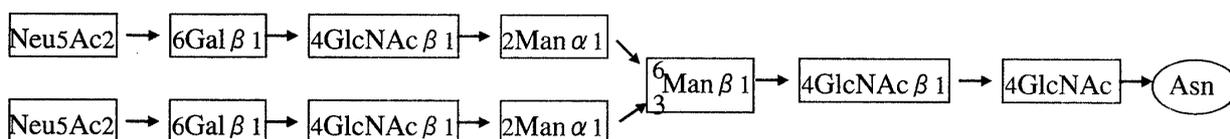
A；Hepatoma AFP (1.5 μ g)，B；recombinant AFP (1.5 μ g)，C；affinity-purified horse anti-human hepatoma AFP (20 μ g)

branched タイプ，ヒト recombinant AFP が high-mannose タイプというような，炭水化物成分の差が影響したのではないかと考えられた⁸⁾。

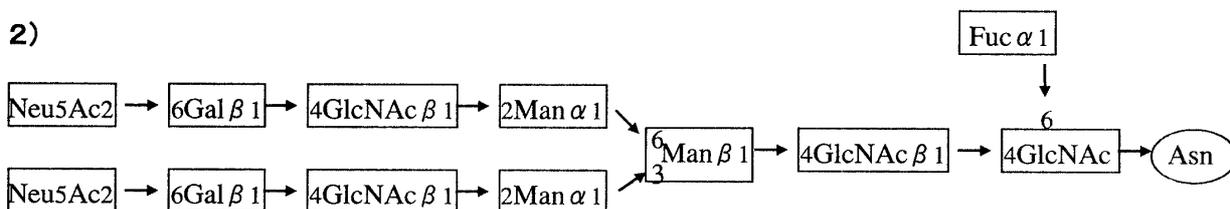
また，ラット AFP を大腸菌と酵母により産生する実験⁹⁾において，それぞれの recombinant AFP で estradiol-binding assay を行うと，酵母 recombinant AFP では authentic AFP にみられるエストロゲン結合能が保たれているが，大腸菌 recombinant AFP ではエストロゲンとの結合能が著明に低下していた。この理由のひとつとして，大腸菌と酵母において発現する AFP の糖鎖の違いが，それぞれの AFP の機能の差となって現れた可能性が考えられた。

これらの研究結果より，糖蛋白質における糖鎖の重要性が示唆されたが，図4に推定されている一部の AFP の糖鎖構造を示す。今回の研究で我々が特に注目した糖鎖構造は肝細胞癌，特に低分化な悪性度の高い肝細胞癌で高頻度に増加が認められる，還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合した，図4の2)及び3)のタイプのものであった。

1)



2)



3)

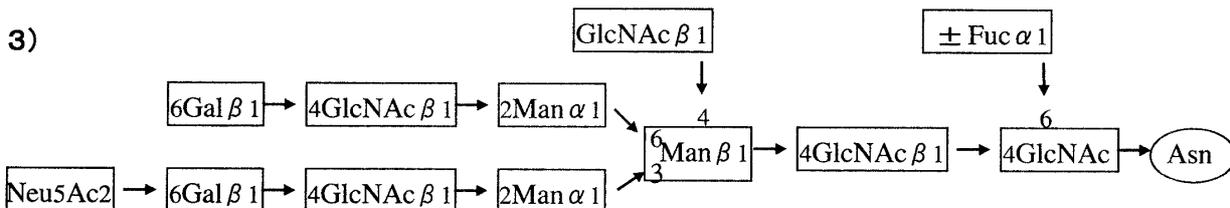


図4 AFP の代表的糖鎖構造

Fuc, Fucose；GlcNAc, N-acetylglucosamine；Man, mannose；Gal, galactose；NeuAc, N-acetylneuraminic acid

AFP レクチン親和性電気泳動法

糖鎖の違いの検出法として、我々が用いたのは Taketa et al.¹¹⁾により報告されたレクチン親和性電気泳動法であった。この方法の利点は複数のサンプルを同時に泳動し、それらの違いが視覚的にはっきりと確認できることである。我々はこの電気泳動法を用いて岡山大学衛生学教室の協力により、1995年以来産婦人科領域におけるAFPの臨床応用に関する研究を進めてきた。一方、内科領域においては肝細胞癌のスクリーニングにおける本電気泳動法の有用性が認められ、検査キットとして商品化されている。その原理はゲルの中に含まれるレクチンとAFPの結合能の相違により生ずる泳動幅の差を比較するものである。すなわち還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖は、LCA すなわちレンズ豆レクチンに結合し泳動速度が遅くなるため、このタイプの糖鎖をもつAFPはあまり移動しないが、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖はLCAと結合しないため、この糖鎖をもつAFPはより速く移動する。したがってこのAFPレクチン親和性電気泳動法を用いるこ

とにより、AFP産生性子宮体部癌、卵黄嚢腫瘍などのAFP産生腫瘍の患者あるいは正常新生児臍帯血から得られた血清において、コンカナバリンA(Con A)やレンズ豆レクチン(LCA)、赤血球凝集性インゲンマメレクチン(E-PHA)、及びカブトムシ幼虫レクチン(allo A)の4種類のレクチンに対する結合性の差を比較し、それらの糖鎖の違いを視覚的に明らかにすることが可能となった。

AFP産生性腫瘍由来AFP糖鎖

種々の臓器に発症した肝様腺癌^{12)~14)}、すなわち胃・卵巣・子宮体部由来のAFPのレクチン結合性を、肝細胞癌のそれと比較すると、それぞれの臓器由来の細胞が肝細胞へ分化する過程において、糖鎖の合成に関しては肝細胞へ分化後も、それぞれの臓器に規定された分化前の細胞のもつ性格が反映された可能性が示唆された。すなわち同一臓器由来のAFPのレクチン結合性は類似し、臓器が異なると、明らかな差異を認めることが示された(図5)。

また異所性卵黄嚢腫瘍^{15)~17)}由来AFPを用いた検討では、腔に発症した卵黄嚢腫瘍由来AFPは卵

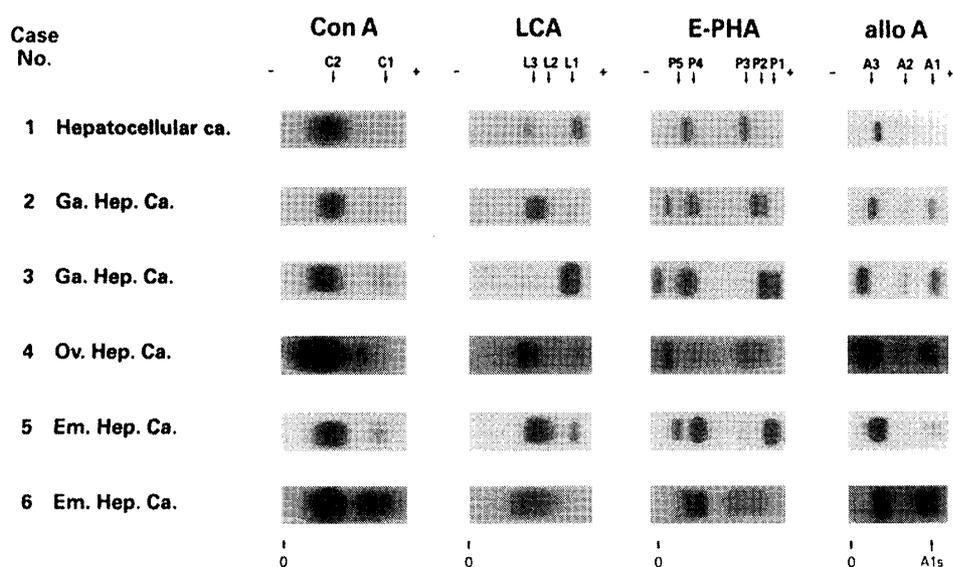


図5 肝細胞癌及び肝様腺癌由来AFPのレクチン結合性の検討(Yamamoto R. et al. Tumor Biology 1999)

Hepatocellular ca., 肝細胞癌; Ga. Hep. Ca., 原発性胃肝様腺癌; Ov. Hep. Ca., 卵巣肝様腺癌; Em. Hep. Ca., 子宮体部肝様腺癌; Con A, concanavalin A; LCA, *Lens culinaris* agglutinin; E-PHA, erythroagglutinating phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*; allo A, *Allomyrina dichotoma* lectin

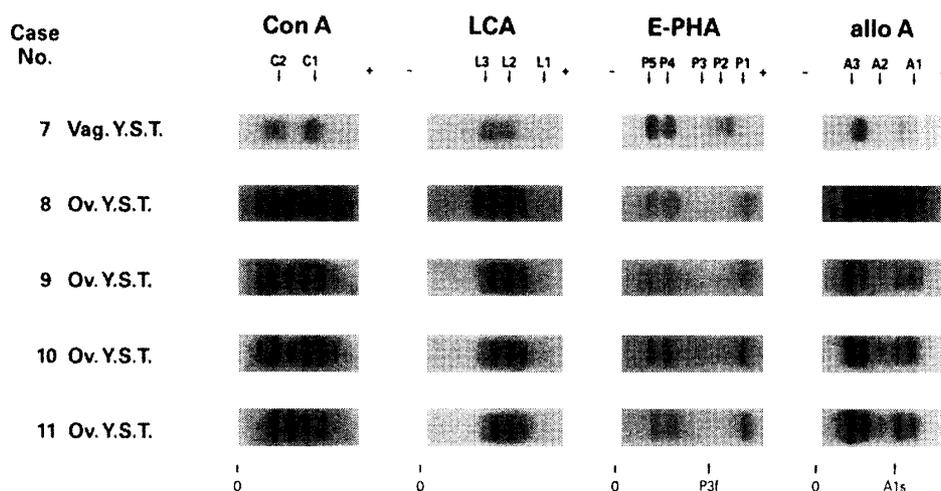


図6 卵黄囊腫瘍由来AFPのレクチン結合性の検討(Yamamoto R. et al. Tumor Biology 1999)

Vag. Y.S.T., 腔原発卵黄囊腫瘍; Ov. Y.S.T., 卵巣原発卵黄囊腫瘍

巢由来のものと比較し、ほとんど変化を認めなかった(図6)。卵黄囊腫瘍は肝細胞癌と異なり、腔あるいは卵巣と、発症した臓器は異なっても、同一種の同一細胞の癌化した細胞により産生されたAFPの糖鎖が、ほぼ同一のレクチン結合性を示している。肝様腺癌の発生機構として細胞のmetaplasiaあるいはtransdifferentiationなどが考えられているのに対し、異所性卵黄囊腫瘍の発生機構として胚細胞の遊走異常が考えられていること¹⁷⁾に矛盾しないことが示された。

糖蛋白質における糖鎖は、種及び細胞特異的であり、細胞の発生・分化・老化により規則正しく変化することが知られているが、このことと今回の我々の研究の結果をまとめると、卵黄囊腫瘍以外のAFP産生腫瘍においては、AFPの糖鎖における癌性変化が臓器特異的であるため、患者血清中のAFPを分析することにより原発臓器を同定、あるいは病巣の原発性・転移性の鑑別をすることが可能となると考えられる。また、妊孕能温存手術が施行されることの多い卵黄囊腫瘍患者において、妊娠成立後の再発の有無を知るうえで有用であると思われる。

胎児染色体異常症とAFP

染色体異常をもつ胎児の産生するAFPに関して、インフォームドコンセントを得た後、検討を

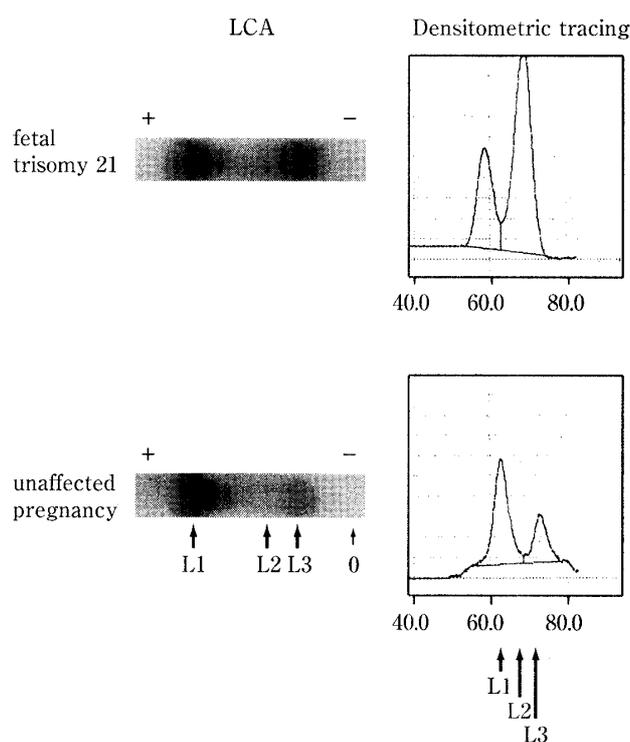


図7 胎児21trisomy及び正常胎児妊娠婦人の血清の、LCAレクチン親和性電気泳動法ならびにデンストメーターによる分析(Yamamoto R. et al. Clinica Chimica Acta 2001)

加えた。胎児肝臓組織抽出液・羊水・母体血清を種々のレクチンを用いて、レクチン親和性電気泳動を繰り返し行い、その結果を詳細に検討した^{18)~21)}。たとえば、21trisomyに関しては図7に

示すように AFP L3分画比は高値を示し、母体血清中の AFP L3分画比を測定することが胎児21trisomy の検出において極めて有効であることが明らかとなった。

この AFP L3分画として得られる AFP は、図4に示した糖鎖の構造では2)のフコシル化 AFP に相当し、このタイプの AFP は妊娠初期の胎児肝臓で産生され、正常妊娠の経過とともに漸減することが知られている。また正常妊娠初期の羊水中にフコシル化 AFP に bisecting N-acetylglucosamine をもつ AFP、すなわち L2分画の AFP がみられることも知られている(図4-3)。これらのフコシル化 AFP 分画、すなわち AFP L2, L3分画を羊水及び母体血清を用いて測定すると、胎児21trisomy では両者の間に強い相関が存在することが明らかとなった(図8)。また羊水から母体血中への移行が、これらフコシル化 AFP では良好で、このタイプの AFP は卵膜の透過性が極めてよいことも判明した。

母体血清の AFP L3分画比の測定が、胎児21trisomy の検出にどの程度の有用性をもつかを、他の母体血清マーカーすなわち AFP・hCG β (human chorionic gonadotropin, β subunit)・uE3(un-

conjugated estriol)の MoM 値と ROC 曲線を用いて比較した。これら4種の母体血清マーカーの中では AFP L3分画比の AUC が最も大きく、胎児21trisomy 症例22例、正常核型胎児227例での検討であるが、他の3種の母体血清マーカーと比較し優れていることが明らかとなった(図9)。

次に21trisomy 以外の胎児染色体異常症におけるフコシル化 AFP の変化を検討した²¹⁾。羊水とペアで検討し得た母体血清の測定結果では、AFP L2, L3分画比は正常妊娠婦人に比較し胎児18trisomy では、胎児21trisomy 同様有意に高値を示すことが明らかとなった(図10)。しかし羊水 AFP L2, L3分画比は胎児18trisomy では有意な変化はみられず、興味深いことに、胎児47 XXY が正常妊娠婦人に比較し有意に低値を示していた(図11)。これらの検討はフコシル化 AFP が妊娠経過とともに変化するが知られているため、結果が妊娠週数の違いによる影響を受けないように、対象のすべてを妊娠16週前後の一定期間に限定しているため、症例数が非常に少なくなっており、なぜこのように性染色体トリソミーにおいて、低値を示す結果が生じたのかは今後さらに症例数を増やし

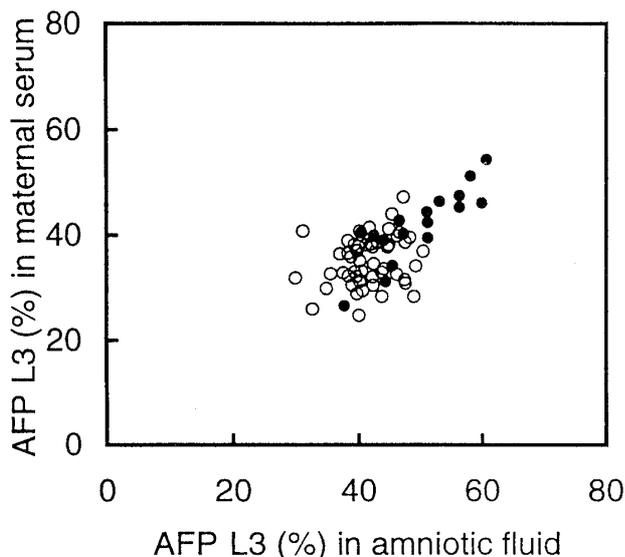


図8 羊水と母体血清との間における AFP L3分画比の相関 (Yamamoto R. et al. Human Reproduction 2001)
●: 胎児21trisomy, ○: 正常核型胎児

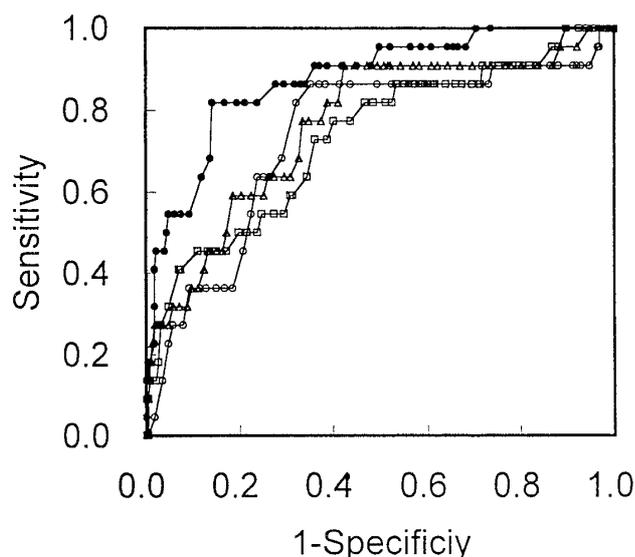


図9 AFP L3, MoM AFP, MoM hCG β , MoM uE3の ROC 曲線による検討 (Yamamoto R. et al. Human Reproduction 2001)
●: percentage of AFP L3, ○: MoM AFP, △: MoM hCG β , □: MoM uE3

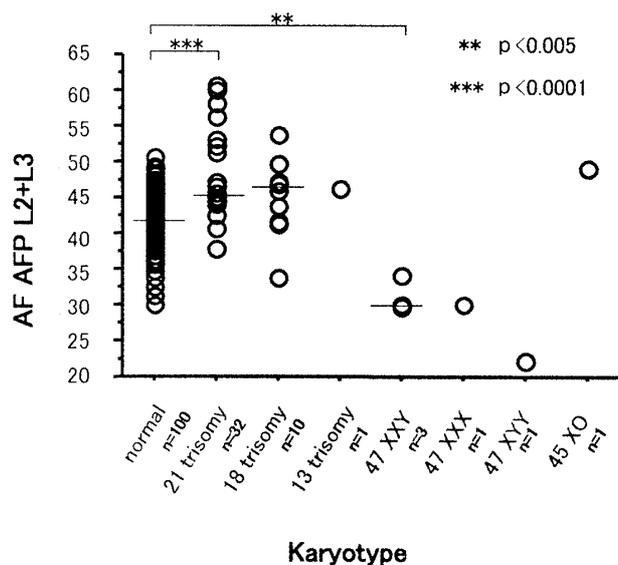
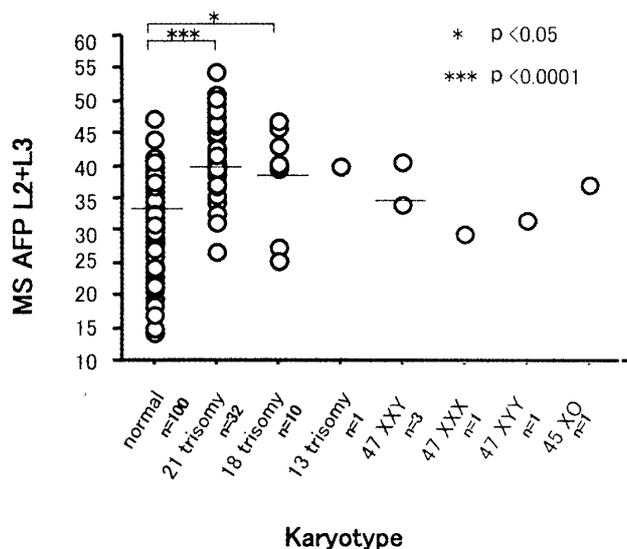


図10 胎児染色体異常症における母体血清 AFP L2, L3分画比の検討
—, 中央値(Mann-Whitney U-test)

図11 胎児染色体異常症における羊水 AFP L2, L3分画比の検討
—, 中央値(Mann-Whitney U-test)

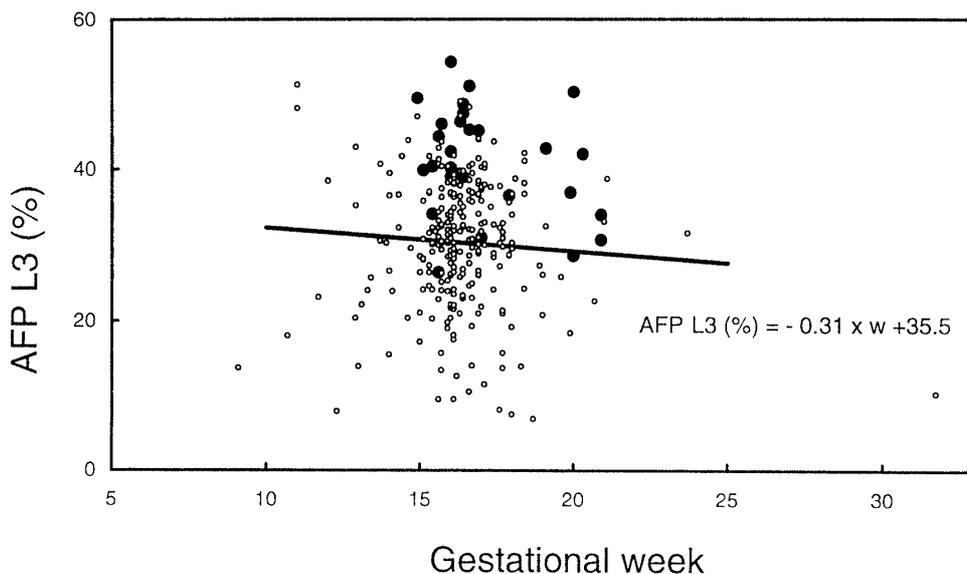


図12 母体血清 AFP L3の妊娠の推移による変化(Yamamoto R. et al. Human Reproduction 2001)
実線は正常核型胎児妊婦の50パーセントイルを表示。
●：胎児21trisomy, ○：正常核型胎児

て検討していく必要がある。

母体血清フコシル化 AFP 分画比の測定が、胎児 21trisomy などの検出に有用であることが明らかとなったが、ここで2つの問題点も出現した。それは母体血清フコシル化 AFP 分画比が、AFP・hCG などと同様に妊娠の経過により変化するこ

と、そして電気泳動の煩雑さにより、大量のサンプルの測定が困難であることであった。図12に我々が検討した227例の正常妊娠婦人の母体血清 AFP L3分画比を示すが、以前の報告同様、妊娠の経過にともない漸減することが確認された。

この問題の解決のため、レクチン親和性電気泳

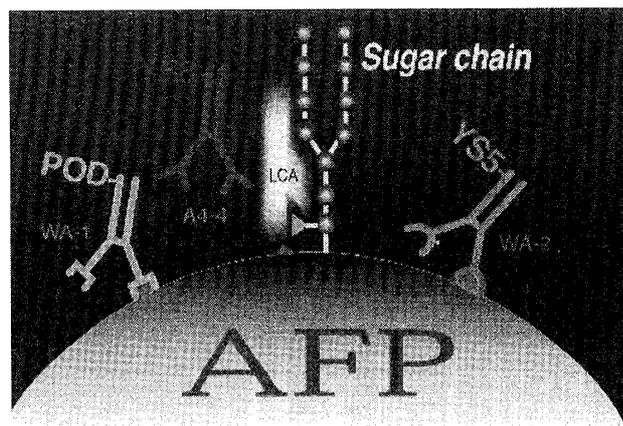


図13 抗AFPモノクローナル抗体YS8とレクチンLCAとの競合反応(Wako Pure Chemical Industries Ltd., 1999)

動法ではなく、抗体とレクチンとの競合反応を利用した、より簡便・迅速な Liquid-phase Binding Assay キット²²⁾が新たに1999年に開発された。図13にAFPの3カ所の抗原決定基と、それに対応するモノクローナル抗体を示す。ここでAFPの糖鎖にフコースが結合すると、それがレンズ豆レクチン、すなわちLCAと結合し、そのことがAFPと抗AFPモノクローナル抗体YS8との結合を阻害すること、すなわち、YS8抗体とレクチンの競合反応を利用して母体血清AFP L3分画を測定することで、臨床応用への解決を図った。

血清反応液中には5つの硫酸基をもつYS5抗体が結合したComplex 1と、YS5抗体のほかにさらに8つの硫酸基をもつYS8抗体が結合し、合計13個の硫酸基をもつComplex 2が存在する(図14)。これらはそれぞれAFP L3とAFP L1に相当するものであるが、これらの免疫複合体を硫酸基数の違いにより生ずる電荷の違いにより、陰イオン交換カラムを用いて分画し、あとは分画液にPODの蛍光基質を加え、2種類の免疫複合体の蛍光強度を測定することで、AFP L3分画比を得られると同時に、両者の合計からAFP濃度を測定することも可能となる。図14のクロマトパターンからは、AFP L3分画比は約30%であることを示している。

Liquid-phase Binding Assay法を用いて、胎児染色体核型の確認された正常妊娠婦人2,054例の母体血清AFP L3分画比を各妊娠日ごとにプロット

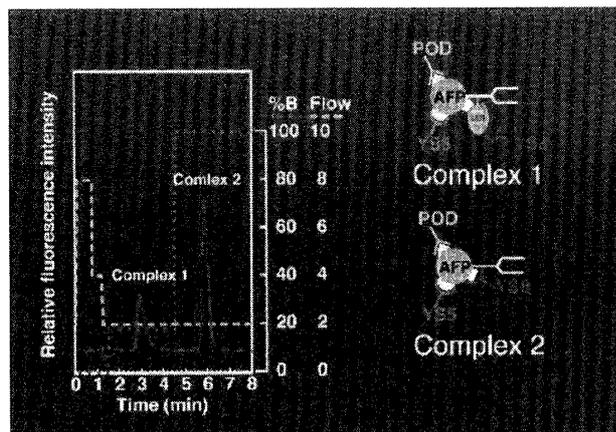


図14 Liquid-phase Binding Assay法によるAFP L3分画の測定(Wako Pure Chemical Industries Ltd., 1999)

し、妊娠日ごとの中央値から回帰直線を求めた。これにより妊娠の経過により漸減するAFP L3分画比を、MoMを用いて検討することが可能となり、また対象症例も、レクチン親和性電気泳動法を用いた検討では手技の煩雑さから約250例にとどまっていたが、今回は2,000例を越える対象症例による検討が可能となった。

Liquid-phase Binding Assay法による測定では、胎児21trisomyと正常妊娠婦人の母体血清AFP L3分画比のMoMでは、胎児21trisomyではAFP L3分画比のMoMの中央値は1.7、範囲は1.1~2.1で、正常妊娠婦人のMoM値に比較し有意($p < 0.00001$)に高値を示していた。

以上、胎児染色体異常症におけるAFPの糖鎖を分析すると、胎児21あるいは18trisomy及び胎児47 XXYなどの血清または羊水から得られたAFPの糖鎖に、さまざまな特徴がみられることが明らかとなってきたが、なかでも我々産婦人科臨床医にとって最も重要なことは、胎児21trisomyにおけるAFP L2とL3、すなわち母体血清フコシル化AFP分画比の異常高値である。この理由としてデータはここでは示さないが、21trisomy胎児の肝臓におけるフコシル化AFP産生の増加と、その卵膜透過性の亢進とが考えられる。Liquid-phase Binding Assay法によるAFP L3分画比の測定は、この結果の臨床応用を極めて容易なものとし、Cole et al.のhCG糖鎖variantの測定²³⁾²⁴⁾とと

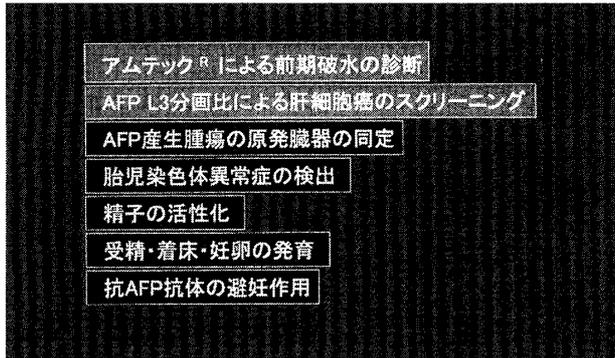


図15 臨床応用における AFP の今後の展望

もに、第二世代の母体血清マーカーとして意義を有するものと考えられる。

臨床応用における AFP の展望

AFP の新たなる可能性を示す検討として、卵管に発現する AFP の PCR 産物を確認した。我々は AFP の受精・着床・妊卵の発育、あるいは精子の活性化に及ぼす影響を検討してきたが、排卵期周辺の卵管液内の AFP 濃度が上昇してくることも解明されている。

30年も前に発見され、臨床応用の点では、25年間余りほとんど進歩がないかのように考えられてきた AFP という糖蛋白質も、このようにもう一度真剣に取り組んでみるとさまざまな新しい臨床応用への可能性がみえてくる。近年、腔内の AFP 濃度上昇をベッドサイドで簡便に知ることができる前期破水診断キットが一般臨床に用いられ、また AFP L3分画比の測定²⁵⁾が肝細胞癌の腫瘍マーカーとして保険適応を認められたことは周知である(図15)。しかし AFP はまだまだ他にも多くの可能性を秘めた糖蛋白質であるといえ、我々は、今後この古くから身近にある、ともすれば忘れられがちな蛋白質の、新たなる臨床応用への可能性を信じ、追求していく所存である。

まとめ

一人一人の患者の病態を固定観念にとらわれることなく、ありのままに正確に把握し、病因を自分自身の頭の中で素朴に考察するところから臨床医学の展開が始る。その意味で、一人一人の患者

は最もすぐれた教科書である。また、先達の歩んできた道程は決して行き止まりの道ではなく、未踏の未来に連っており、後輩に魅力ある多くの贈り物を残してくれている。そして、症例を積み重ねてたゆまなく診療を継続することが我々に臨床研究の力を与えてくれる。基礎医学から臨床応用への Translational Research も必要であるが、臨床情報から基礎医学を展開する逆方向も、とくに前途ある若者が追求しなければならない Human Medicine の大切な方向といえる。

医学において、臨床医による臨床研究の発展なくして基礎医学の真の展開はないともいえる。

古いことを調べて、新しい考えを得ること、古きを温ねて新しきを知ることは我々の研究姿勢としてこれからも永遠に生き続けるであろう。

文 献

1. Morinaga T, Sakai M, Wegmann TG, Tamaoki T. The primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 4604—4608
2. Nishi S. Isolation and characterization of a human fetal α -globulin from sera of fetuses and a hepatoma patient. Cancer Res 1970; 30: 2507—2513
3. Nishi S, Hirai H. Purification of human, dog and rabbit α -fetoprotein by immunoabsorbents of Sepharose coupled with anti-human α -fetoprotein. Biochim Biophys Acta 1972; 278: 293—298
4. Law SW, Dugaiczkyk A. Homology between the primary structure of alpha-fetoprotein, deduced from a complete cDNA sequence, and serum albumin. Nature 1981; 291: 201—205
5. Urano Y, Sakai M, Watanabe K, Tamaoki T. Tandem arrangement of the albumin and α -fetoprotein genes in human genome. Gene 1984; 32: 255—261
6. Nishi S, Hirai H. The use of radioimmunoassay of α -fetoprotein for the diagnosis of hepatoma. Jap J Nucl Med 1972; 9: 155—156
7. Nishi S, Hirai H. A new radioimmunoassay of α -fetoprotein and CEA. Protides Biol Fluids 1976; 23: 303—307
8. Yamamoto R, Sakamoto T, Nishi S, Sakai M, Morinaga T, Tamaoki T. Expression of human α -fetoprotein in yeast. Life Sciences 1990; 46: 1679—1686

9. Nishi S, Koyama Y, Sakamoto T, Soda M, Kaeriyama CB. Expression of rat alpha-fetoprotein cDNA in *Escherichia coli* and in yeast. *J Biochem (Tokyo)* 1988 ; 104 : 968—972
10. Nishi S, Matsue H, Yoshida H, Yamamoto R, Sakai M. Localization of the estrogen binding site of α -fetoprotein in the chimeric human-rat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 3102—3105
11. Taketa K, Ichikawa E, Taga H, Hirai H. Antibody-affinity blotting, a sensitive technique for the detection of α -fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis in agarose gels. *Electrophoresis* 1985 ; 6 : 492—497
12. Yamamoto R, Ishikura H, Azuma M, Hareyama H, Makinoda S, Koyama Y, Nishi S, Fujimoto S. Alpha-fetoprotein production by a hepatoid adenocarcinoma of the uterus. *J Clin Pathol* 1996 ; 49 : 420—422
13. Koyama Y, Taketa K, Azuma M, Yamamoto R, Fujimoto S, Nishi S. Expression of α -fetoprotein, albumin and transferrin by a uterine endometrial adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996 ; 87 : 612—617
14. 山本 律, 小山芳一, 石倉 浩, 金内優典, 藤野敬史, 佐川 正, 櫻木範明, 武田和久, 西 信三, 藤本征一郎. 子宮体部原発肝様腺癌と, それにより産生される alpha-fetoprotein の検討. *産と婦* 2000 ; 67 : 384—388
15. Yamamoto R, Taketa T, Ebina Y, Chou Y, Hareyama H, Sakuragi N, Makinoda S, Kobayashi K, Nishi S, Fujimoto S. Lectin affinity electrophoresis in a yolk sac tumour in the vagina with yolk sac tumour-type glycoform of α -fetoprotein. *J Clin Pathol* 1997 ; 50 : 856—858
16. 山本 律, 東 正樹, 小山芳一, 石倉 浩, 藤野敬史, 佐川 正, 櫻木範明, 武田和久, 西 信三, 藤本征一郎. 幼児腔原発ヨークサック腫瘍の1症例と, ヨークサック腫瘍により産生される alpha-fetoprotein のレクチン結合性の検討. *産と婦* 2000 ; 67 : 679—683
17. Yamamoto R, Taketa K, Ishikura H, Nishi S, Wakui Y, Ebina Y, Fujimoto S. A study on the lectin reactivity of alpha-fetoprotein produced by hepatoid adenocarcinoma and yolk sac tumor. *Tumor Biol* 1999 ; 20 : 212—217
18. Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, Kishida T, Yamada H, Okuyama K, Sagawa T, Shimizu K, Satomura S, Fujimoto S. Alpha-fetoprotein microheterogeneity : A potential biochemical marker for Down's syndrome. *Clin Chim Acta* 2000 ; 304 : 137—141
19. 山本 律, 東 正樹, 岸田達朗, 山田秀人, 奥山和彦, 藤本征一郎, 里村慎二. 母体血・羊水中の AFP 分画—胎児21トリソミーについての検討—.*産婦人科の世界* 2000 ; 52 : 31—36
20. Yamamoto R, Azuma M, Yamada H, Kishida T, Satomura S, Fujimoto S. *Lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein, an alternative to AFP in prenatal screening for Down syndrome. *Hum Reprod* (in press)
21. Yamamoto R, Azuma M, Kishida T, Yamada H, Satomura S, Fujimoto S. Total alpha-fetoprotein and *Lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in fetal chromosomal abnormalities. *Br J Obstet Gynaecol* (in press)
22. Katoh H, Nakamura K, Tanaka T, Satomura S, Matsuura S. Automatic and simultaneous analysis of *Lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein ratio and total α -fetoprotein concentration. *Anal Chem* 1998 ; 70 : 2110—2114
23. Cole LA, Cermik D, Bahado-Singh RO. Oligosaccharide variants of hCG-related molecules : potential screening markers for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1997 ; 17 : 1188—1190
24. Cole LA. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay : A new basis for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 1999 ; 45 : 2109—2119
25. Taketa K, Endo Y, Sekiya C, Tanikawa K, Koji T, Taga H, Satomura S. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive α -fetoprotein in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 5419—5423

Abstract

Rat alpha-fetoprotein (AFP) cDNA spanning the complete coding region was cloned and expressed in *Escherichia coli* as well as in yeast, in 1988. The recombinant AFPs (rAFP) were purified and characterized. The yeast rAFP was found to be indistinguishable from authentic AFP in the Ouchterlony immunodiffusion test, radioimmunoassay and estradiol-binding assay while *E. coli* rAFP was less reactive in these tests. The explanation for the difference in the properties of AFPs might be that yeast cells produced mature AFP by processing the signal peptide properly but *E. coli* rAFP lacked the N-terminal 53 amino acid residues of preAFP, and/or the characteristics of the transformed cell regarding the carbohydrate chain synthesis were reflected.

In the past, human serum AFP is considered to be only one of the most reliable tumor marker of the yolk sac tumor and hepatocellular carcinoma in a Gynecologic field, which can be used to monitor the effectiveness of therapy and to detect recurrences. It is well known that the carbohydrate chain synthesis inside a cell gets catalyzed by a set of glycosyltransferase, and those enzymes are considered to be cell type-specific.

We have focused on the heterogeneity in carbohydrate chain of AFP, and demonstrated that a AFP producing tumor having similar histologic characteristics and originating from different organs or tissues could be distinguished in carbohydrate chain heterogeneity of AFP. Furthermore, in an Obstetric field, we have determined the percentage of AFP variants that react with lectins as a way to find out whether the analysis of the carbohydrate chain microheterogeneities of maternal serum or amniotic fluid AFP could be useful for prenatal screening of fetal chromosomal abnormalities.

With receiver operating characteristics (ROC) analyses using 22 trisomy 21-affected pregnancies and 227 unaffected pregnancies, the percentage of AFP L3 in maternal serum was revealed to exist a greater area under the curve than those of MoM AFP and MoM uE3, and it was revealed to have a tendency of larger area than that of MoM hCG. Therefore, this potentially valuable marker with the use of an automatic analyzer for measuring AFP L3 was tested. It is revealed that the analysis of the carbohydrate chain microheterogeneities of maternal serum AFP by an automatic analyzer is extremely useful for prenatal trisomy 21 screening.
