

## 《使用経験》

## Carcinoembryonic Antigen の Radioimmunoassay キットの基礎的検討とその臨床応用

辻野大二郎<sup>1)</sup> 佐々木康人<sup>1)</sup>  
 岡部和彦<sup>3)</sup> 尾形正方<sup>4)</sup>  
 林 方也<sup>6)</sup> 長田尚夫<sup>7)</sup>

千田麗子<sup>1)</sup> 草刈幸次<sup>2)</sup>  
 亀谷忍<sup>5)</sup> 黒田義則<sup>5)</sup>

### I. はじめに

1965 年に Gold<sup>1)</sup> らが結腸癌から過塩素酸で抽出し、Carcinoembryonic Aniegen (CEA) と名づけた物質は、分子量約20万の糖蛋白であることが知られている<sup>2)-4)</sup>。初めいわれた大腸癌特異性については以後の多くの報告がむしろ非特異性を強調している<sup>5)-8)</sup>。しかし、CEA は癌随伴抗原としてスクリーニング検査<sup>9)</sup>、癌加療前後の進行度の判定、経過観察での有用性をすでに広く認められている<sup>10)-12)</sup>。従来 CEA の Radioimmunoassay (RIA) 法が数種報告されているが<sup>13)-17)</sup>、最近結腸癌の肝転移巣より抽出した CEA を抗原として用い、抗原抗体結合体の分離に Zirconyl phosphate gel (Z-gel) を使用する Hansen<sup>14)</sup> らの方法が Roche 社によりキット化されている。本キットを使用する機会を得たので、その基礎的検討の結果と、臨床的有用性について報告する。

### II. 方法と対象

血中 CEA の測定には Roche CEA Kit を用いた。本キットは Hansen らの開発した Z-gel 法によるものである。患者静脈血 4~8 ml を採取後 EDTA を加えた試験管にとり、1,000×g 30 分遠心して血漿を分離した。血漿 0.5 ml に生理食塩水 2.0 ml を混和し、1.2 M 冷過塩素酸溶液 2.5 ml を加え、攪拌後遠心分離 (100×g, 20 分) により除蛋白した。上清を透析袋につめ、脱イオン水で 3 時間ずつ 3 回透析、さらに 0.01M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.5) で 3 時間透析した (Fig. 1-A)。pH 6.5±0.1 であることを確認したのち、検体ならびに標準 CEA 液に CEA 抗血清 25 µl を加えて 45°C 30 分インキュベート、さらに <sup>125</sup>I-CEA 25 µl を加え 45°C 30 分インキュベートした。Z-gel 2.5 ml を加えたのち、1,000×g 5 分遠心分離し、上清をデカント後、抗体と結合した標識抗原 (Bound, B) の放射活性をオートウェルシンチレーションカウンターで測定した (Fig. 1-B)。CEA 値が 25 µg/ml 以上の場合は直接法で再検した。直接法は 0.01M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.25) 5.0 ml に未透析血漿 10 µl, 50 µl を加えて Fig. 1-B に示したと同様の操作で測定した。

対象は正常対照 24 例および、聖マリアンナ医科大学病院外来または入院患者 236 例、計 260 例である。男性 112、女性 148、非癌患者 107、癌患者 129 例である。

1) 聖マリアンナ医大第3内科  
 2) 同 第1内科  
 3) 同 第2内科  
 4) 同 第1外科  
 5) 同 第2外科  
 6) 同 産婦人科  
 7) 同 泌尿器科

受付：51年1月29日

採用：51年3月11日

別刷請求先：川崎市高津区菅生 2095 (〒213)

聖マリアンナ医大第3内科

辻野大二郎

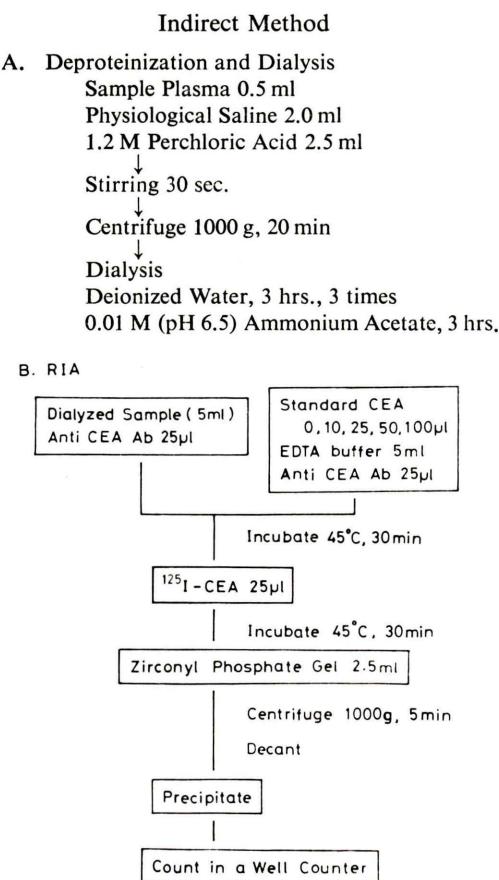


Fig. 1 Procedures for the measurement of plasma CEA levels using Roche CEA Kit.

### III. 結 果

#### 1) 基礎的検討

(1) 標準曲線: 代表的標準曲線を Fig. 2 に示す。縦軸に計数率 (Fig. 2-上), B の放射活性と全放射活性 (T) の比 (B/T) (Fig. 2-中) をとったものを比較すると前者の方が勾配の急な感度の良い曲線となった。また B と  $B_0$  (添加標準抗原 O の場合の B) の放射活性の比 ( $B/B_0$ ) を logit Y ( $\text{logit } Y = \log_e(Y/100 - Y)$ ) に変換し、横軸を  $\log$  で表わしたプロット (Fig. 2-下) は直線とならなかった。この結果よりキットの指定通り、計数率を縦軸にとって標準曲線を描くことにした。

(2) 再現性と感度: 同一検体を 10 回同時に測

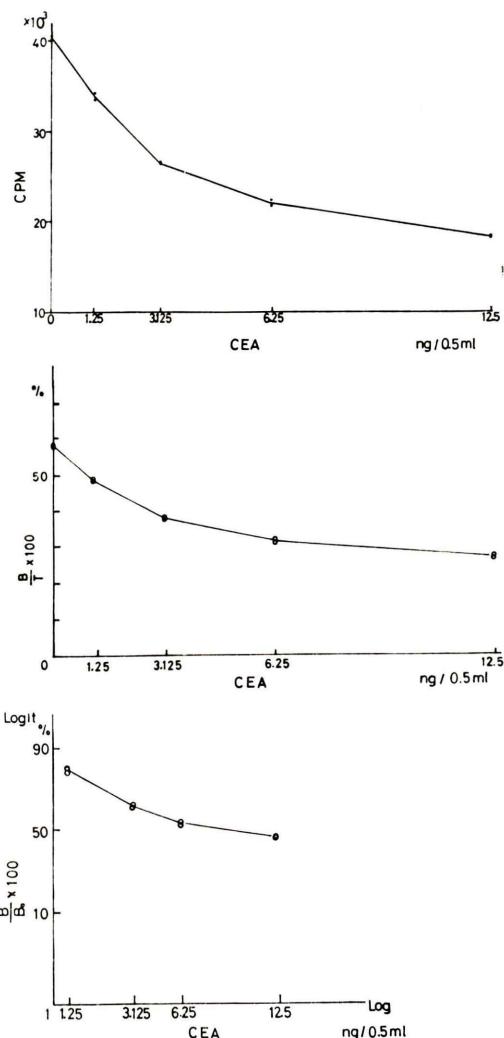


Fig. 2 Typical standard curve expressed as count rate (上), B/T (中) and log-logit transformation of  $B/B_0$  (下).

定した結果えられた within assay error は Table 1 の如く、2.1 ng/ml ~ 3.6 ng/ml では C.V. 約 10% であり 0.4 ng/ml では 100% であった。従って本キットの最少測定域は 1~2 ng/ml と考えられる。

プール血漿を 9 回連続測定してえた between assay error は  $2.92 \pm 0.24 \text{ ng/ml}$  ( $m \pm 1\text{S.D.}$ ), C.V. 8% であった (Fig. 3)。

2 施設で同一検体を独立に測定した結果は Fig.

4 に示す如くよく一致した ( $r=0.97$ ).

(3) 回収率: プール血漿に標準 CEA 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ng/ml を添加して測定した結果より回収率を求める Table 2 に示す如く、100~116% 平均 111% であった。

(4) 希釀試験: 結腸癌患者で CEA 高値 (23.8

Table 1 Within assay error of the CEA measurements.

	$\bar{m}$ (ng/ml)	1 S. D.	C. V. (%)
1	3.58	0.41	11
2	2.09	0.21	10
3	0.42	0.42	100

(n=10)

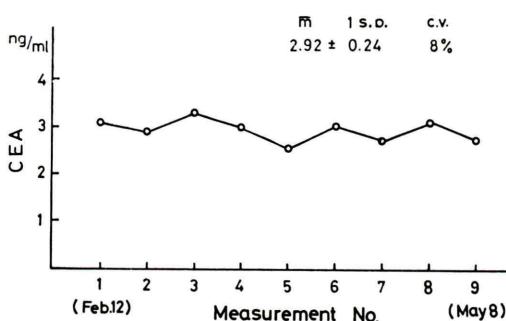


Fig. 3 Between assay error calculated by 9 successive measurements.

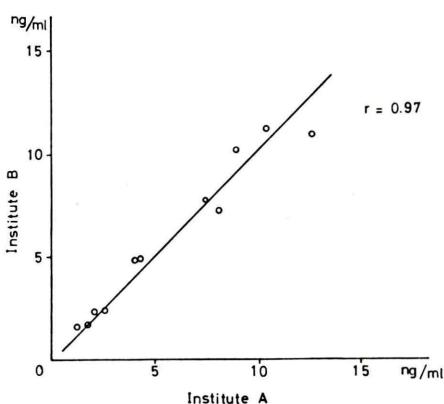


Fig. 4 Comparison of CEA values measured independently in two institutes.

ng/ml) を示した血漿を生理食塩水で倍々希釀して測定した。結果は Fig. 5 に示す如く理論値を示す直線によく一致した値がえられた。

Table 2 Recovery rate in CEA measurements.

Std. CEA added (ng/ml)	CEA assay (ng/ml)	Recovery (%)
0	2.95	—
2.5	5.74	111
5.0	8.75	116
7.5	10.52	100
10.0	14.78	118

$\bar{m} = 111\%$

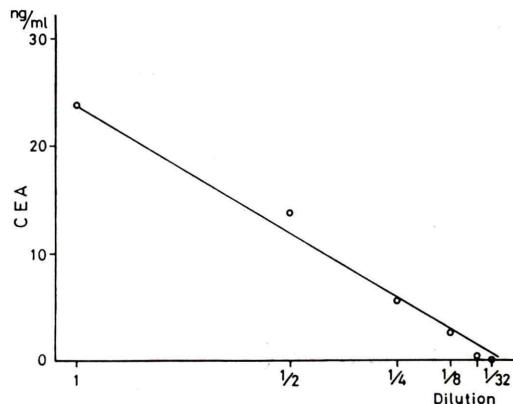


Fig. 5 Dilution test of CEA. Original plasma obtained from a patient with colonic carcinoma contains 23.8 ng/ml of CEA. The linear line indicates calculated values for diluted samples.

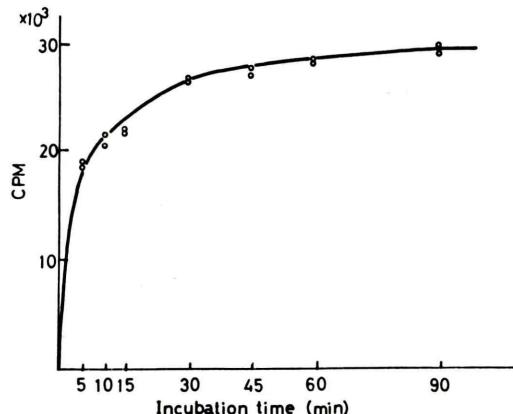


Fig. 6 Effect of incubation time on count rates of the bound.

(5) インキュベーション時間、溶血および採血時間の影響：インキュベーション時間を長くすると Bound の計数率は 5~30 分で急速に上昇し、

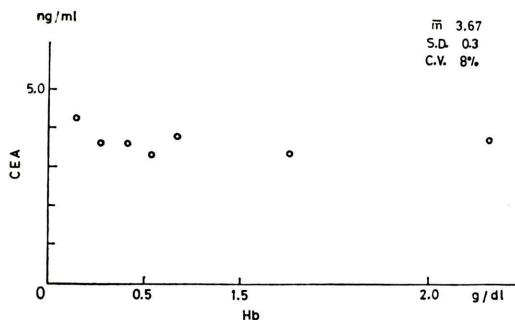


Fig. 7 Effect of hemolysis at blood sampling on the CEA measurement.

45 分以上でも緩徐な上昇を示したが 90 分でほぼプラトーに達した (Fig. 6).

採血時の溶血が測定値におよぼす影響をみるため、同一検体に溶血 (AB 型) を加えて測定した結果、Hb 濃度 0~2.3 g/dl の範囲で測定値は有意の変化を示さなかった (Fig. 7).

正常対照 2 例で 9:00 a.m. から 11:00 p.m. にわたり食前食後を含み各 6 回採血し CEA 値を測定した結果は Fig. 8 に示す如く日内変動はみられなかった。従って検体の採血時間は特に指定しなかった。

## 2) 臨床応用

(1) 正常域：正常対照 24 例 34 検体の測定結果は、男性  $2.42 \pm 1.52 \text{ ng/ml}$  ( $m \pm 1\text{S.D.}$ )、女性  $2.26 \pm 0.78 \text{ ng/ml}$  ( $m \pm 1\text{S.D.}$ ) と性差はみられず ( $p > 0.5$ )

Table 3 CEA values in normal controls.

	No. of Subjects (no. of Samples)	Age (mean)	CEA Level (ng/ml) $\bar{m} \pm 1\text{ S.D.}$
Total	24 (34)	19-64 (37.1)	2.34 1.21
Male	8 (18)	27-47 (32.3)	2.42 1.52
Female	16 (16)	19-64 (40.0)	2.26 0.78

Normal Range  $2.34 \pm 2.42 < 5.0 \text{ ng/ml}$   
( $\bar{m} \pm 2\text{ S.D.}$ )

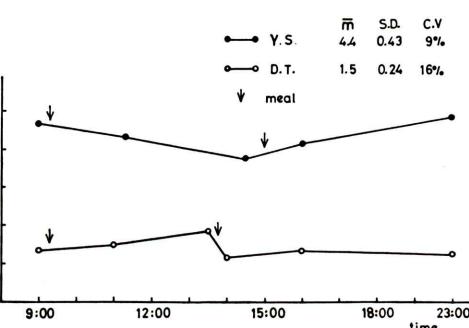


Fig. 8 Diurnal variation of CEA values.

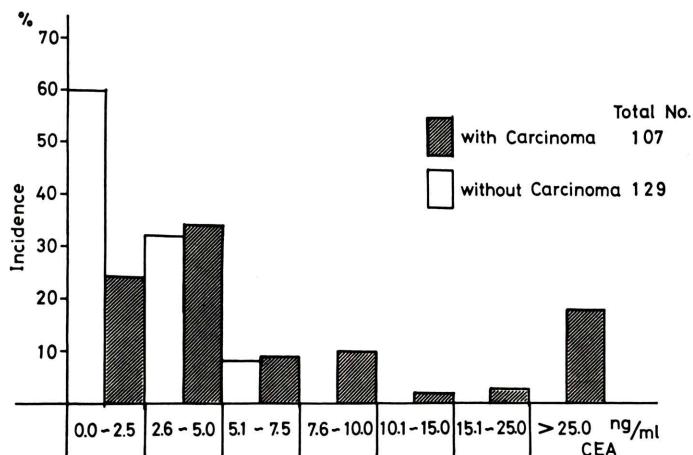


Fig. 9. Distribution of CEA values in patients with and without carcinoma.

総平均  $2.34 \pm 1.21$  ng/ml であった(Table 3)。平均  $\pm 2$  標準偏差をとると 0~4.76 ng/ml となるので、正常値を 5.0 ng/ml 以下と定めた。

(2) 癌患者と非癌患者の CEA 値: 癌を証明された患者 107 症例、癌を証明されなかった患者 129 症例につきそれぞれの血中 CEA 値をみると、非癌患者では 92% は正常域 5.0 ng/ml 以下であり、全例が 7.5 ng/ml 以下であった。一方癌患者では 5.1 ng/ml 以上が 42%, 7.6 ng/ml 以上 33%, 25.0 ng/ml 以上が 18% であり (Fig. 9) 最高値は S 状結腸癌で肝転移のみられた患者で 8,990 ng/ml であった。

癌患者で 5.0 ng/ml 以上を示した症例の比率、すなわち CEA 陽性率を原発臓器別をみると、肺 (82%), 肝 (68%), 結腸直腸 (62%), 胃 (54%), 脾 (50%), 喉頭 (50%) に高く、子宮 (38%), 卵巣 (25%), 食道 (22%), 腎および尿路 (20%) では低い傾向がみられたが、著しい臓器特異性は認められなかった (Fig. 10)。

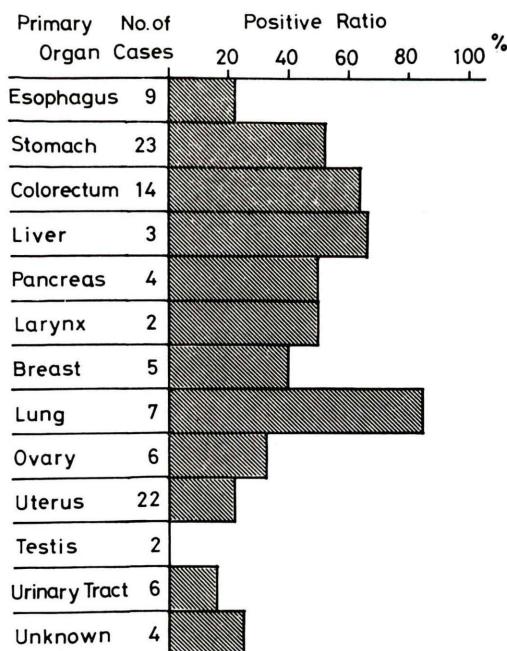


Fig. 10 CEA positivity compared among primary organs of carcinoma.

癌患者のうち転移巣の証明された症例と証明されなかった症例について CEA 値を比較すると、転移の証明された症例の比率は正常域 0~5 ng/ml では 29%, 5.1~25 ng/ml では 56%, 25 ng/ml 以上では 93% と CEA 高値のものほど転移巣を有する率が高かった (Table 4)。

Table 4 CEA values in patients with metastatic carcinoma.

CEA Level (ng/ml)	Metastasis proven	Metastasis not proven	% of proven Metastasis
0~5.0	14	35	29
5.1~25.0	9	7	56
<25.0	13	1	93

(3) 術前術後の CEA 値: 手術前後の CEA 値を追跡した食道癌、胃癌、結腸直腸癌合計22例の中には、術前高値を示し、術後正常値に下った症例、術前正常域にあっても術後明らかな下降を示した症例がみられた。Fig. 11 に示した症例は盲腸癌で転移巣は証明されなかったが、術前 CEA 値は 65 ng/ml と高値を示したもので、腫瘍摘出後 26 日目には CEA 値は正常域に下降し、以後 5 ヶ月間正常値を持続し、臨床的に良好な経過を示している。

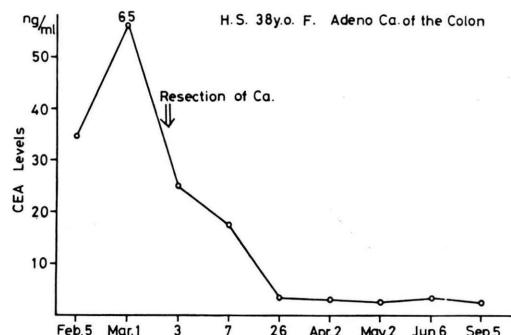


Fig. 11 Pre- and post-operative CEA values in a patient with colonic carcinoma.

#### IV. 考 按

##### 1) Roche CEA Kit の検討

CEA の RIA 法として今まで報告されている主なものが 4 種ある。Thomson<sup>13)</sup> らの開発した Farr 法, Hansen<sup>14)</sup> らの Z-gel 法, Egan<sup>15)</sup> らの二抗体法, 平井ら, McPherson<sup>17)</sup> らの固相法である。

Farr 法は抗原抗体複合体 (Bound, B) を 50% 硫安で沈殿分離する方法であるが, 測定に長時間 (3~5 日間) を要し, また <sup>125</sup>I-CEA の一部が B と共に沈殿するため低値の測定には不利であるといわれる<sup>18)</sup>。Farr 法, Hansen 法が血清または血漿中の CEA を過塩素酸で抽出して測定する間接法であるのに対し, 二抗体法では抽出せずに直接測定するため, 測定に要する時間は短かい (1 日) が, 非特異的交叉反応物質をも測定するため, 一般に高い値が得られる。今回われわれの使用したキットは Hansen らの Z-gel 法によるものであり, B を Z-gel に吸着して遠心分離するものである。その特徴は Farr 法と比較すると検体量がダブルの測定で 1 ml と Farr 法の 1/5 であること, CEA を凍結乾燥する必要がなく透析に要する時間の短いことである<sup>18)~20)</sup>。しかし最近開発された固相法では必要検体量が 0.5 ml で透析を必要としていない。測定している “CEA” は用いる抗原, 抗体によりある程度異なっていると考えられる<sup>21)</sup>。

われわれの検討結果では 2.1~3.6 ng/ml の範囲で within assay error が 10~11% (C.V.) であり, between assay error も 8% と比較的よい精度, 再現性を示した。これは透析操作による誤差が含まれていることを考慮すれば他の RIA 法と比較しても満足すべき値である。0.5 ng/ml での within assay error は C.V. 100% であり, 本キットによる測定感度は 1~2 ng/ml と考えられる。われわれの研究室と Roche 社研究所で同一検体を全く独立に測定した結果もよく一致し ( $r=0.97$ ), 測定操作に熟練すれば研究室間の測定値も安定していることがわかる。われわれの経験では大きな誤差の出る原因としては透析操作中のあやまりが最も

多いようである。特に透析液の循環を十分に行なう必要がある。われわれは 50×35×30 cm の水槽に 80 検体を懸垂し, 日立 Handy Pump C-P 68 で透析液を還流することにより極めて安定した結果を得ている。

インキュベーション時間はキット指定通り 30 分で行なったが, この時間ではまだ反応が完結しておらず, 時間の差による変動がみられるので注意を要する。

溶血の測定値に及ぼす影響, 血液型物質による交叉反応が指摘されているが<sup>22)</sup>, われわれの用いた AB 型血液ではヘモグロビン濃度 2.3 g/dl 以下では測定値に影響をみとめなかった (Fig. 6)。

以上のごとく, 本キットによる CEA 測定は精度, 再現性, 敏感度, 安定性等臨床検査法として満足すべきものと考える。しかし, 繁雑で時間がかかる透析操作を要することが, 日常検査法としての制約となるであろう。この点, 平井らの固相法は, 加熱処理により除蛋白するため, 透析を必要とせず, 操作は簡単である。両方法による測定値には差がみとめられるが, これについては別に報告する。

##### 2) 正常値の検討

Hansen ら<sup>23)</sup>は 1,425 人の健常者の CEA 値を測定し, 2.5 ng/ml 以下 88.5%, 2.6~5.0 ng/ml が 10.2%, 5.1~10.0 ng/ml 1.2%, 10.1~20.0 ng/ml 0.1% であったと報告した。後に喫煙の影響を考慮すると正常の非喫煙者 892 人の 97% が 2.5 ng/ml 以下, 3% が 2.6~5.0 ng/ml であったのに対し, 現在喫煙しているもの 620 例中 81% が 2.5 ng/ml 以下, 15% は 2.6~5.0 ng/ml, 3% が 5.1~10.0 ng/ml 1% が 10.0 ng/ml 以上と, 喫煙者では CEA 値が高い傾向にあることを示した。われわれの正常対照群は 24 人と少ないが, CEA 値は平均 2.34 ng/ml で, 64% が 2.5 ng/ml 以下, 36% が 2.6~5.0 mg/ml で, 5.1 ng/ml 以上はみられなかった。喫煙者では 71% が 2.5 ng/ml 以下, 29% が 2.6~5.0 ng/ml, 非喫煙者では 61% が 2.5 ng/ml 以下, 39% が 2.6~5.0 ng/ml で, 喫煙者に高い傾向はみられなかった。しかし, 正常対照に非癌患者を加

えた121例についてみると非喫煙者では2.5 ng/ml 以下65%, 2.6~5.0 ng/ml が32%, 5.1~7.5 ng/ml が3%であるのに対し、喫煙者では2.5 ng/ml 以下47%, 2.6~5.0 ng/ml が40%, 5.1~7.5 ng/ml が13%であった。また正常対照群に非癌患者を含めた147例について、年齢別にCEAの平均値をみると、10代(6例)2.1 ng/ml, 20代(23例)1.8 ng/ml, 30代(30例)2.2 ng/ml, 40代(55例)3.0 ng/ml, 50代(21例)3.6 ng/ml, 60代(12例)2.8 ng/ml, と40代以降にやや高い傾向がみられた。Hansenら<sup>23)</sup>の報告にも同様の傾向がうかがわれる。

以上の点を勘案すると、われわれが、正常対照群の平均値±2S.D.をとって定めた5.0 ng/ml 以下という正常範囲は、年齢差、喫煙の影響等をも含めた実用に即した正常域であると考えられる。

### 3) CEA測定の臨床的意義について

CEAは最初結腸癌に特異的な抗原として報告された<sup>11)</sup>。しかし、その後の多くの報告<sup>5)-8)</sup>は消化器癌に高率に出現する傾向はあるにしても、他の臓器の癌でも陽性となり、臓器特異性は低いこ

とが認められている。われわれの症例でも極めて広範な種類の癌で陽性となり特に転移を有する場合に高値を示すことが認められた。また初期癌においては陽性率は低かった。従って、多くの報告<sup>5)-12)</sup>が示唆する如くCEAが陽性を示した場合はいずれかの臓器に癌のある可能性が高く、又その値の高低が転移巣の有無、ひいては予後の判定、治療方針の決定に有用であると考えられる。又、治療効果の判定、再発の検出に有用な場合がある。しかし、CEA値が正常域にあっても癌の存在を否定することはできない。従来2.5 ng/mlを正常上界とした場合、癌の検出率は60~70%といわれている<sup>7), 23)</sup>が、われわれの症例では癌患者の76%が2.5 ng/ml以上となるが、この場合非癌患者の40%がこの範囲内に入り、false positiveが高率となる。正常域を5.0 ng/ml以下とすると癌患者の陽性率は42%と低くなるがfalse positiveは8%以下となる。

癌以外でも肺炎<sup>23)</sup>、潰瘍性大腸炎<sup>7)</sup>などで陽性となることが報告されているが、われわれの症例では非癌患者は92%が5.0 ng/ml以下、全例が

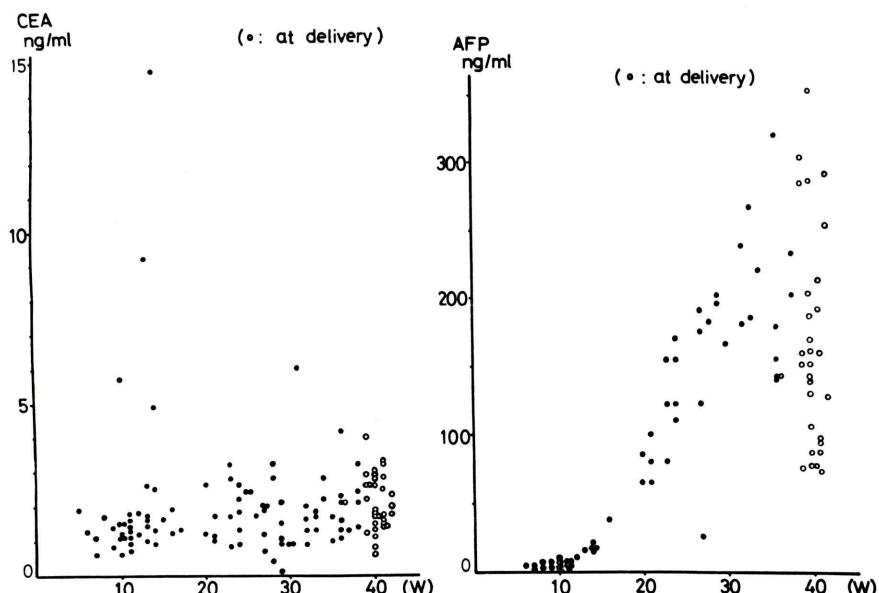


Fig. 12 CEA and AFP values during pregnancy.

7.5 ng/ml 以下であった。なお今日までに CEA を測定した千余検体の臨床的解析の詳細は別に報告する。

妊娠における CEA 値につき、Hansen ら<sup>23)</sup>は 360 症例の測定結果で、2.5 ng/ml 以下が 96%，2.6～5.0 ng/ml 3%，5.1～10.0 ng/ml 1% と報告している。われわれもここに報告した以外に 93 例の妊娠の CEA を測定したが、2.5 ng/ml 以下 84%，2.5～5.0 ng/ml 11%，5.0 ng/ml 以上 5% であった。AFP と異なり<sup>26)</sup>妊娠時期における CEA 値の明らかな差は認められなかった (Fig. 12)。

#### V. おわりに

Z-gel 法による RIA キットを検討した結果、精度、感度、再現性等臨床検査法として満足すべき結果を得た。日常臨床検査法としては透析操作の繁雑さが制約となろう。

正常値を実用上適切と考えられる 5.0 ng/ml 以下と定めると非癌患者の 92% は正常範囲となり、癌患者の 42% が陽性となる。血中 CEA の定量は臓器特異性は低いが、癌のスクリーニングテスト、又、進行度、予後、治療効果、再発の判定に有用であると考えられる。

本論文の要旨は第17回日本消化器病学会秋季大会、第15回日本核医学会総会、第13回日本癌治療学会に報告した。

#### 文献

- 1) Gold P, Freedman SO: Demonstration of Tumor-Specific Antigen in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* **121**: 439-462, 1965
- 2) Krupey J, Gold P, Freedman SO: Physicochemical Studies of the Carcinoembryonic Antigen of the Human Digestive system. *J Exp Med* **128**: 387, 1968
- 3) 小林邦彦、西 信三、平井秀松: がん胎児性抗原、とくに Gold の Carcinoembryonic Antigen (CEA) について。*総合臨床* **22**: 2177-2184, 1973
- 4) 松岡雄治: 癌胎児性抗原の免疫化学的性質。*代謝* **12**: 9-15, 1975
- 5) Lo Gerfo P, Krupey J, Hansen HJ: Demonstration of an Antigen Common to Several Varieties of Neoplasia. *New Eng J Med* **285**: 138-141, 1971
- 6) Laurence DJR, Neville M: Foetal Antigens and their Role in the Diagnosis and Clinical Management of Human Neoplasms: Review. *Brit J Cancer* **26**: 335-355, 1972
- 7) Zamcheck N, Moore TL, Dhar P, et al: Immunologic Diagnosis and Prognosis of Human Digestive-Tract Cancer: Carcinoembryonic Antigens. *New Eng J Med* **286**: 83-86, 1972
- 8) Holyoke D, Reynoso G, Chu TM: Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Patients with Carcinoma of the Digestive Tract. *Ann Surg* **176**: 559-564, 1972
- 9) Costanza ME, Das S, Nathanson et al: Carcinoembryonic Antigen—Report of a Screening Study, *Cancer* **33**: 583-590, 1974
- 10) Lo Gerfo P, Herter FP: Carcinoembryonic Antigen and Prognosis in Patients with Colon Cancer, *Ann. Surg* **181**: 81-83, 1975
- 11) Lo Gerfo P, Gerfo FL, Herter F, et al: Tumor-Associated Antigen in Patients with Carcinoma of Colon, *Am J Surgery* **123**: 127-131, 1972
- 12) Holyoke ED, Chu TM, Murphy GP: CEA as a Monitor of Gastrointestinal Malignancy. *Cancer* **35**: 830-836, 1975
- 13) Thomson DMP, Krupey J, Freedman SD et al: The Radioimmunoassay of Circulating Carcinoembryonic Antigen of the Human Digestive System. *Proc Natl Acad Sci* **64**: 161-167, 1969
- 14) Hansen HJ, Lance KP, Krupey J: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel. *Clin Res.* **19**: 143 (abst), 1971
- 15) Egan ML, Lutenschleger JT, Coligan JE: Radioimmuno assay of Carcinoembryonic Antigen. *Immunochemistry* **9**: 289-299, 1972
- 16) 西 信三、平井秀松: 第1回、第2回 CEA 研究会, 1975年6月, 12月
- 17) McPherson TA, Bond PR, Grace AM: Carcinoembryonic antigen (CEA): Comparison of the Fan and Solidphase methods for detection of CEA. *Int J Cancer* **12**: 42-54, 1973
- 18) 神前五郎、山本孝紀、内山節夫: Carcinoembryonic Antigen (CEA). *最新医学* **29**: 1673-1681, 1974
- 19) Kupchik H, Hansen HJ, Sorokin JJ, et al: Comparison of Radioimmunoassay for Carcinoembryonic Antigen. Proceedings of the Second Conference and Workshop Embryonic and Fetal Antigens in Cancer PP. 261-265, 1972
- 20) Chu TM, Reynoso G: Evaluation of a New Radioimmunoassay Method for Carcinoembryonic Antigen in Plasma, with Use of Zirconyl Phosphate Gel. *Clinical Chemistry* **18**: 918-922, 1972
- 21) Edgington TS, Astarita RW, Plow EF: Association of an Isomeric Species of Carcinoembryonic

- Antigen with Neoplasia of the Gastrointestinal Tract. *New Ent J Med* **293**: 103-107, 1975
- 22) Alastair D, Simons R, Perlman P: Carcinoembryonic Antigen and Blood Group Substances. *Cancer Res.* **33**: 313, 1973
- 23) Hansen HJ, Snyder JJ, Miller E, et al: Carcinoembryonic Antigen (CEA) Assay. *Human Pathology* **5**: 139-146, 1974
- 24) Ashman LK, Ludbrook J, Marshall VR: Probabilistic Application of Plasma Carcinoembryonic Antigen Assay in Cancer Patients. *Brit Med J* **28**: 721-723, 1975
- 25) Delwiche R, Zamchek N, Marcon N: Carcinoembryonic Antigen in Pancreatitis. *Cancer* **31**: 328-330, 1973
- 26) 西 信三, 平井秀松:  $\alpha$ -Fetoprotein. *総合臨床* **22**: 2167-2176, 1973