

《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¹⁾ 佐々木康人¹⁾ 千田麗子¹⁾ 草刈幸次²⁾
 岡部和彦³⁾ 尾形正方⁴⁾ 亀谷忍⁵⁾ 黒田義則⁵⁾
 林方也⁶⁾ 長田尚夫⁷⁾

I. はじめに

1965年にGold¹⁾らが結腸癌から過塩素酸で抽出し、Carcinoembryonic Antigen (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²⁾⁻⁴⁾。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⁵⁾⁻⁸⁾。しかし、CEAは癌随伴抗原としてスクリーニング検査⁹⁾、癌治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¹⁰⁾⁻¹²⁾。従来CEAのRadioimmunoassay (RIA)法が数種報告されているが¹³⁾⁻¹⁷⁾、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Hansen¹⁴⁾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4~8ml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0.5mlに生理食塩水2.0mlを混和し、1.2M冷過塩素酸溶液2.5ml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25μlを加えて45°C 30分インキュベート、さらに¹²⁵I-CEA 25μlを加え45°C 30分インキュベートした。Z-gel 2.5ml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エ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25μg/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) 5.0mlに未透析血漿10μl, 50μl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: 川崎市高津区営生 2095 (〒213)

聖マリアンナ医大第3内科

辻野大二郎

Indirect Method

A. Deproteinization and Dialysis

Sample Plasma 0.5 ml
Physiological Saline 2.0 ml
1.2 M Perchloric Acid 2.5 ml

↓
Stirring 30 sec.

↓
Centrifuge 1000 g, 20 min

↓
Dialysis

Deionized Water, 3 hrs., 3 times
0.01 M (pH 6.5) Ammonium Acetate, 3 hrs.

B. RIA

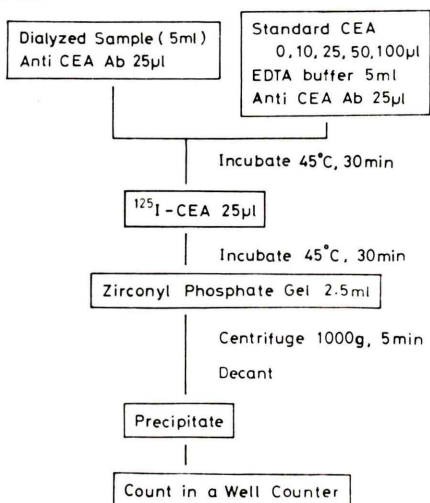


Fig. 1 Procedures for the measurement of plasma CEA levels using Roche CEA Kit.

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 0 の場合の B) の放射活性の比 (B/ B_0) を logit Y (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

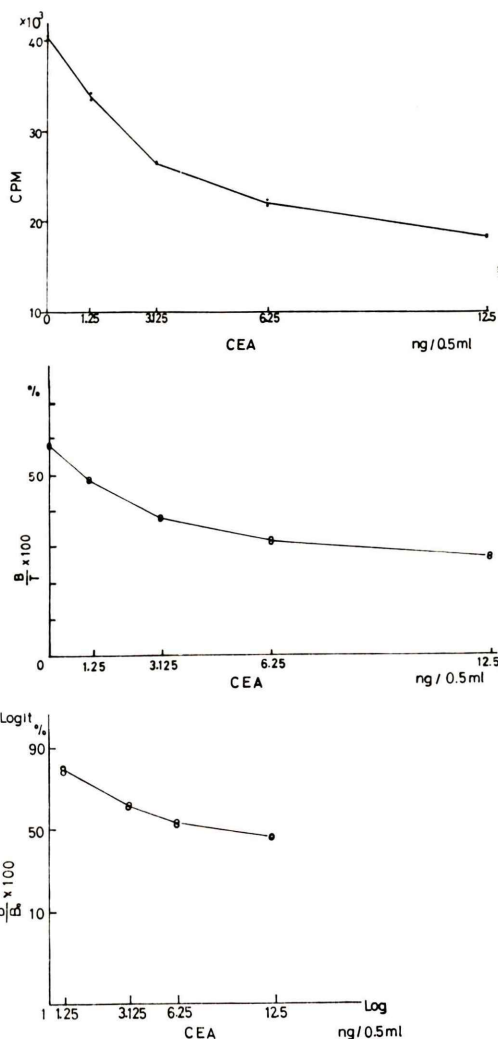


Fig. 2 Typical standard curve expressed as count rate (上), B/T (中) and log-logit transformation of B/ B_0 (下).

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 ± 0.24 ng/ml ($m \pm 1S.D.$), 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と Table 2 に示す如く, 100~116% 平均 111% であった.

(4) 希釈試験: 結腸癌患者で CEA 高値 (23.8

ng/ml) を示した血漿を生理食塩水で倍々希釈して測定した. 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%

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

($n=10$)

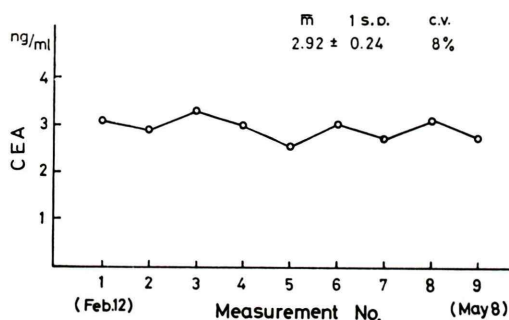


Fig. 3 Between assay error calculated by 9 successive measurements.

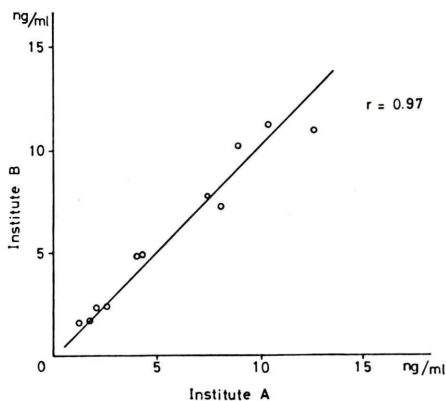


Fig. 4 Comparison of CEA values measured independently in two institutes.

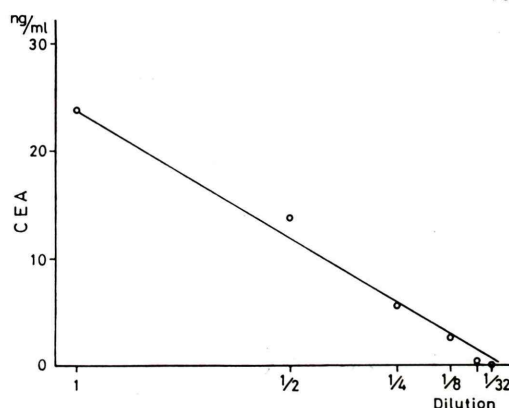


Fig. 5 Dilution test of CEA. Original plasma obtained from a patient with colonic carcinoma contains 23.8 ng/ml of CEA. The linear line indicates calculated values for diluted samples.

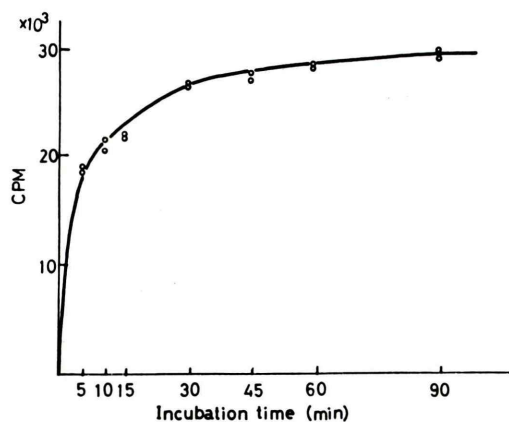


Fig. 6 Effect of incubation time on count rates of the bound.

(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、

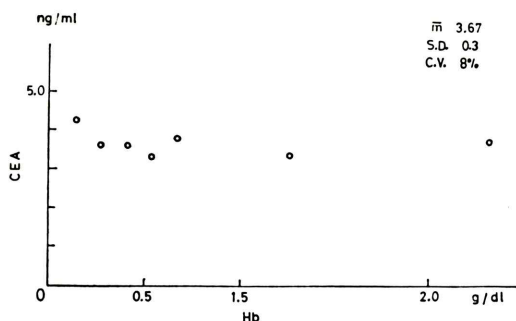


Fig. 7 Effect of hemolysis at blood sampling on the CEA measurement.

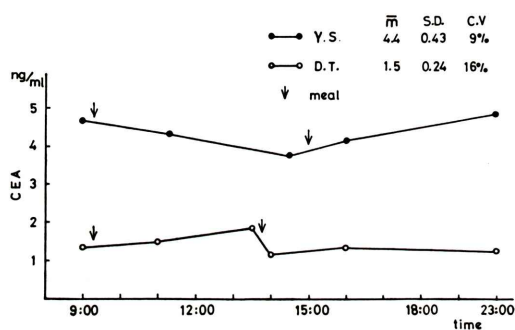


Fig. 8 Diurnal variation of CEA values.

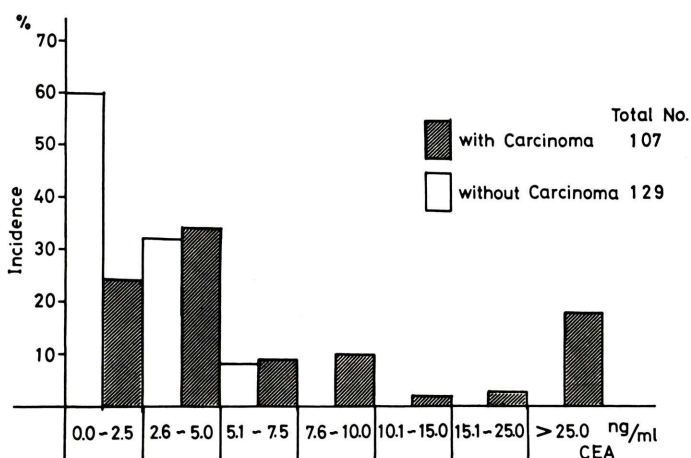


Fig. 9. Distribution of CEA values in patients with and without carcinoma.

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 ± 1.52 ng/ml ($m \pm 1S.D.$), 女性 2.26 ± 0.78 ng/ml ($m \pm 1S.D.$) 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}	1 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 $2.34 \pm 2.42 < 5.0$ ng/ml
($\bar{m} \pm 2 S.D.$)

総平均 2.34 ± 1.21 ng/ml であった (Table 3). 平均 ± 2 標準偏差をとると $0 \sim 4.76$ 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).

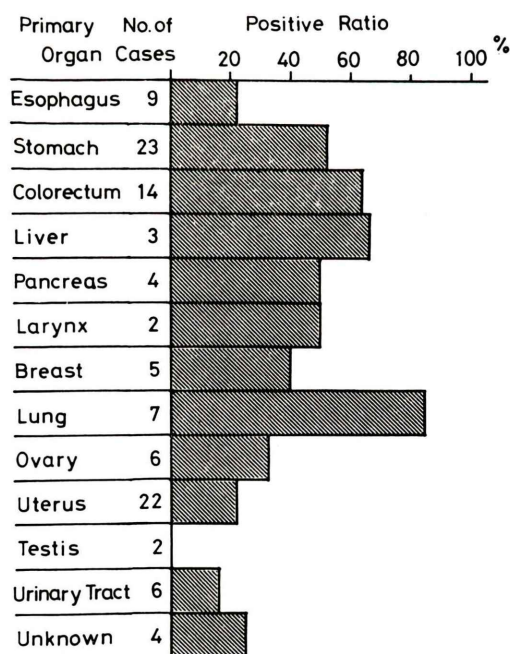


Fig. 10 CEA positivity compared among primary organs of carcinoma.

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 $0 \sim 5$ ng/ml では 29%, $5.1 \sim 25$ 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, 臨床的にも良好な経過を示している.

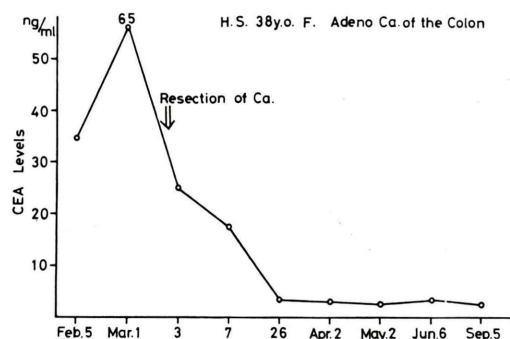


Fig. 11 Pre- and post-operative CEA values in a patient with colonic carcinoma.

IV. 考 按

1) Roche CEA Kit の検討

CEA の RIA 法として現在までに報告されている主なものが4種ある。Thomson¹³⁾らの開発した Farr 法, Hansen¹⁴⁾らの Z-gel 法, Egan¹⁵⁾らの二抗体法, 平井ら, McPherson¹⁷⁾らの固相法である。

Farr 法は抗原抗体複合体 (Bound, B) を 50% 硫酸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 ¹²⁵I-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¹⁸⁾。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 1ml 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¹⁸⁾⁻²⁰⁾。しかし最近開発された固相法では必要検体量が 0.5ml で透析を必要としない。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²¹⁾。

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 ($r=0.97$), 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²²⁾, 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, 感度, 安定性等臨床検査法として満足すべきものとする。しかし, 繁雑で時間の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²³⁾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 ng/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²³⁾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 $\pm 2S.D.$ 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 of 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¹⁾. しかし, その後の多くの報告⁵⁾⁻⁸⁾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⁵⁾⁻¹²⁾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巢の有無, 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^{7), 23)}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.

癌以外でも肝炎²³⁾, 潰瘍性大腸炎⁷⁾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

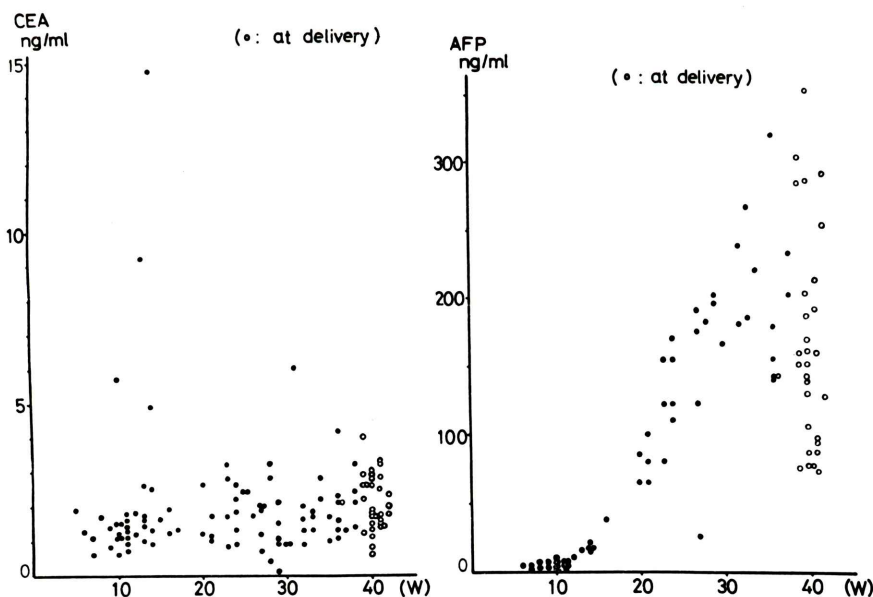


Fig. 12 CEA and AFP values during pregnancy.

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。

妊婦における CEA 値につき、Hansen ら²³⁾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 例の妊婦の 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²⁶⁾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

- 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
- Krupey J, Gold P, Freedman SO: Physicochemical Studies of the Carcinoembryonic Antigen of the Human Digestive system. *J Exp Med* **128**: 387, 1968
- 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
- 松岡雄治: 癌胎児性抗原の免疫化学的性質. *代謝* **12**: 9-15, 1975
- 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
- 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
- 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
- Holyoke D, Reynoso G, Chu TM: Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Patients with Carcinoma of the Digestive Tract. *Ann Surg* **176**: 559-564, 1972
- Costanza ME, Das S, Nathanson et al: Carcinoembryonic Angigen—Report of a Screening Study. *Cancer* **33**: 583-590, 1974
- Lo Gerfo P, Herter FP: Carcinoembryonic Antigen and Prognosis in Patients with Colon Cancer. *Ann. Surg* **181**: 81-83, 1975
- 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
- Holyoke ED, Chu TM, Murphy GP: CEA as a Monitor of Gastrointestinal Malignancy. *Cancer* **35**: 830-836, 1975
- Thomson DMP, Krupey J, Freedman SD et al: The Radioimmunoassay of Circulating Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System. *Proc Natl Acad Sci* **64**: 161-167, 1969
- Hansen HJ, Lance KP, Krupey J: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphategel. *Clin Res.* **19**: 143 (abst), 1971
- Egan ML, Lutenschleger JT, Coligan JE: Radio-immune assay of Carcinoembryonic Antigen. *Immunochemistry* **9**: 289-299, 1972
- 西 信三, 平井秀松: 第1回, 第2回 CEA 研究会, 1975年6月, 12月
- 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
- 神前五郎, 山本孝紀, 内山節夫: Carcinoembryonic Antigen (CEA). *最新医学* **29**: 1673-1681, 1974
- 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
- 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
- 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: α -Fetoprotein. *綜合臨床* **22**: 2167–2176, 1973