

《ノート》

血中 CA19-9 濃度測定の基礎的検討ならびに消化器癌 における臨床的有用性について

Basic and Clinical Studies on the Measurement of Serum CA19-9 Concentrations:
Usefulness as a Tumor Marker for Pancreatic Carcinoma

阪原 晴海* 遠藤 啓吾* 中島 言子* 中島 鉄夫*
太田 仁八* 鳥塚 莞爾* 内藤 厚司** 鈴木 敏**

Harumi SAKAHARA*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Tetsuo NAKASHIMA*,
Hitoya OHTA*, Kanji TORIZUKA*, Atsushi NAITO** and Takashi SUZUKI**

*Department of Radiology and Nuclear Medicine,

**First Division, Department of Surgery, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

I. はじめに

悪性腫瘍患者の病勢の評価, 治療効果の判定, 経過観察に“腫瘍マーカー”が広く用いられている. 現在“腫瘍マーカー”としては癌胎児性抗原 (CEA)¹⁾ や α -fetoprotein (AFP)²⁾ などの癌胎児性タンパク, ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) のようなホルモン, 前立腺酸性フォスファターゼ等の酵素がある. しかしこれらは癌にのみ特異的なものでなく, 良性疾患においても出現し, 必ずしも理想的な“腫瘍マーカー”ではない. 現在までのところ癌にのみ特異的ないわゆる腫瘍特異抗原は見つかっていないが, より癌に特異的な腫瘍関連抗原を見つけようとする努力がなされている.

Carbohydrate Antigen CA 19-9 は 1979 年, Koprowski らによりヒト大腸癌の培養細胞を用

いて作成されたモノクローナル抗体が認識する新しい腫瘍関連抗原^{3,4)} で, 現在抗原の解析^{5,6)} と新しい“腫瘍マーカー”としての臨床的有用性⁷⁻¹³⁾ が検討されつつある. 今回 CIS (フランス原子力庁) で開発された CA19-9 測定用キット“エルザ CA19-9”をミドリ十字より提供を受け, 基礎的ならびに臨床的検討を行い, 膵癌, 胆嚢癌, 胆管癌の診断に有用であったので報告する.

II. 対象および方法

1. 測定原理

本法に用いられる抗体はヒト大腸癌由来の培養細胞 (SW 1116) によって免疫されたマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞のハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体である. 測定原理は抗体を固定したチューブを使用する固相法の immunoradiometric assay (IRMA) で固相一次抗体に検体中の抗原を結合させる第一反応とそれにさらに ¹²⁵I 標識二次抗体を反応させる第二反応よりなる.

Key words: CA19-9, tumor marker, monoclonal antibodies, immunoradiometric assay, malignancy of the digestive system.

* 京都大学医学部核医学科放射線部

** 同 第一外科

受付: 58 年 10 月 26 日

最終稿受付: 59 年 1 月 18 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院核医学科

阪原 晴海

なおモノクローナル抗体の抗原決定基が2ヶ以上あるため、固相一次抗体と¹²⁵I-標識抗体は同一抗体を使用している。

2. 測定方法

特に指示のない場合は本キットの指示書¹⁴⁾に従ったが、その概略は以下の通りである。

1) 抗体を固定したチューブにクエン酸-EDTA 緩衝液 200 μ l および標準 CA19-9 または被検血清 100 μ l を入れる。

2) よく攪拌した後、37 \pm 1 $^{\circ}$ C で3時間インキュベーションする。

3) 反応残液を除去し、脱イオン水で3ml \times 4回洗浄する。

4) ¹²⁵I-標識二次抗体 300 μ l を加え、16~24時間、室温にてインキュベーションを行う。

5) 反応残液を除去し、脱イオン水で3ml \times 4回洗浄する。

6) 各チューブの放射活性を測定し、各測定値からバックグラウンドを引いたカウント数を求める。標準試料のカウント数(cpm)を縦軸に、濃度(U/ml)を横軸に方眼紙にプロットして標準検量線を得、検体のカウント数よりCA 19-9濃度を読みとる。

なお、CA 19-9 IU は精製された抗原 0.8 ng に相当する。

3. 基礎的検討

1) インキュベーション時間、温度の影響、2) 精度、再現性、3) 回収率、4) 希釈試験、5) 特異性、につき検討した。5)で行った交叉反応試験にはそれぞれCEA、フェリチン、カルシトニンはいずれも第一ラジオアイソトープ研究所、AFPはミドリ十字、 β_2 -ミクログロブリンはPhabedas (Sweden)、hCGは帝国臓器製のものをを用いた。

4. 臨床的検討

消化器疾患で本院にて手術により診断の確定した悪性腫瘍症例151例、各種臨床検査で診断された良性疾患症例124例、および健康人98例の計373例を対象とした。内訳は悪性腫瘍症例では胃癌28例、大腸癌23例、食道癌7例、肝細胞癌42例、胆嚢癌4例、胆管癌5例、膵癌42例であり、良性

疾患症例では胃潰瘍10例、胃炎7例、胃ポリープ3例、激症肝炎2例、急性肝炎5例、慢性肝炎33例、肝硬変症35例、胆石症11例、慢性膵炎18例である。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) インキュベーション時間、温度の影響

第一反応の標準 CA19-9 と固相一次抗体の結合におよぼすインキュベーション時間と温度の影響を Fig. 1 に示す。第一反応のインキュベーションの温度は25 $^{\circ}$ C または37 $^{\circ}$ C とし、1時間から24時間まで反応させた。なお第二反応のインキュベーションの条件は25 $^{\circ}$ C、24時間と一定にした。固相一次抗体へのCA19-9の結合は25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ Cともに5~24時間でまだプラトーに達していない。

次に第二反応であるCA19-9と¹²⁵I-標識二次抗体の結合におよぼすインキュベーション時間と温度の影響を検討した(Fig. 2)。第一反応のインキュベーションを37 $^{\circ}$ C、3時間と一定にして、第二反応のインキュベーションの温度を25 $^{\circ}$ Cまたは37 $^{\circ}$ Cとし、反応時間を1時間から48時間までとした。インキュベーション温度25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ Cとも3時間ではCA19-9への¹²⁵I-標識抗体の結合はプラトーに達していないが、24時間ではともにプラトーに達する。

さらに第一反応のインキュベーションの温度を25 $^{\circ}$ Cおよび37 $^{\circ}$ C(時間は24時間と一定)の二通り、第二反応のインキュベーションの時間を3時間および24時間(温度は25 $^{\circ}$ Cと一定)の二通り、計四通りの組み合わせの条件下における標準検量線と3つの検体の測定値をFig. 3に示す。それぞれの条件で若干、検量線が変化するが、その測定値はほぼ一定である。したがって以下のアッセイはキットの指示書の標準法通りに第一反応を37 $^{\circ}$ C、3時間、第二反応を25 $^{\circ}$ C、16~24時間のインキュベーションで行った。

2) 精度、再現性および回収試験

同一アッセイ内、異なるロットのアッセイ間における10回の測定値の再現性は良好で変動係数

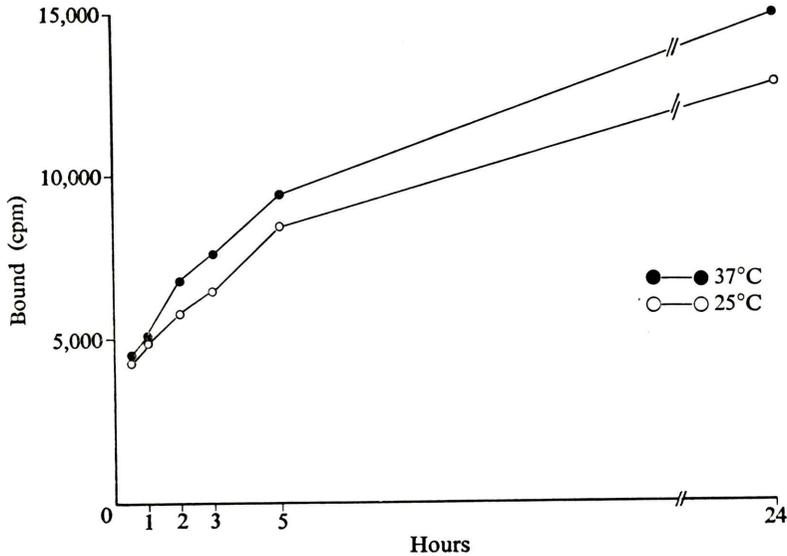


Fig. 1 Effect of time and temperature on the first incubation. The second incubation was performed for 16–24 hours at 25°C. Reaction of binding between solid phase first antibodies and CA19-9 did not reach plateau in 5 hours incubation, both at 37°C (●—●) and 25°C (○—○).

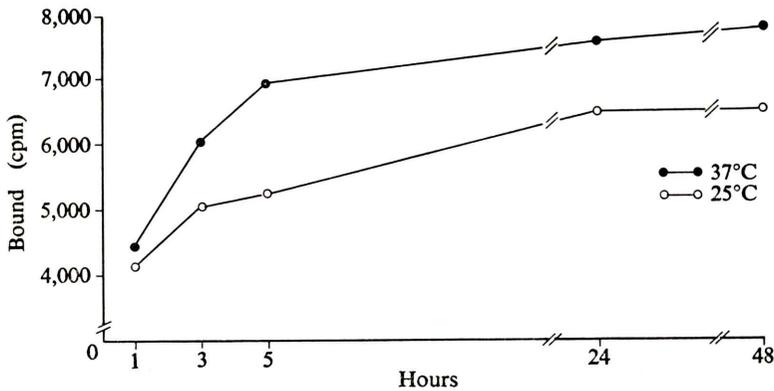


Fig. 2 Effect of time and temperature on the second incubation. The first incubation was performed for 3 hours at 37°C. Reaction of binding between CA19-9 and ¹²⁵I labeled second antibodies progressed from 3 hours to 24 hours incubation, both at 37°C (●—●) and 25°C (○—○).

(CV) はいずれも 10% 以内であった (Table 1, 2). また血清に標準 CA19-9 を添加して回収試験を行ったところ, 回収率はほぼ 100% であった (Table 3).

3) 希釈試験

CA19-9 濃度の異なる 3 検体をキット添付の希

釈液で希釈し, 測定した結果を Fig. 4 に示す. 希釈試験の直線性は不良であった.

4) 特異性

いわゆる“腫瘍マーカー”とされている CEA, AFP, フェリチン, β_2 ミクログロブリン, カルシトニン, hCG をそれぞれ最高濃度 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

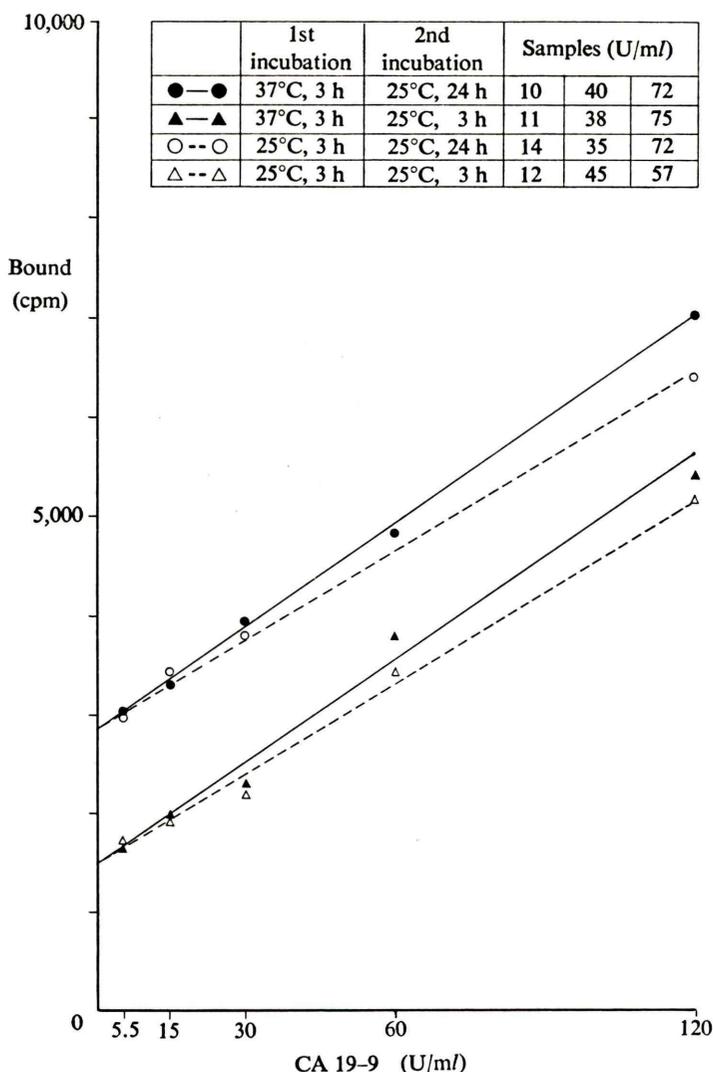


Fig. 3 Effect of time and temperature of the first and second incubation on the standard curves and CA19-9 values.

1 $\mu\text{g/ml}$, 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 64 ng/ml, 500 U/ml 添加してアッセイの特異性を検討したが、交叉反応はまったく認められなかった (Fig. 略).

2. 臨床的検討

1) 正常値

本キットによる19~75歳の健常人98例 (男性47例, 女性51例) の血中 CA19-9 濃度の分布を Fig. 5 に示す. 平均値±標準偏差は 3.5 ± 4.3 U/ml で最高値は 21 U/ml であった. 15 U/ml 以下に健

常人の97%, 20 U/ml 以下に99%が含まれるため, 正常値を 15 U/ml 以下とした.

2) 各種疾患患者の血中 CA19-9 濃度

消化器系悪性腫瘍患者の血中 CA19-9 濃度を Fig. 6 に示す. 悪性腫瘍患者における陽性率はそれぞれ胃癌 30% (9/28), 大腸癌 26% (6/23), 食道癌 0% (0/7), 肝細胞癌 38% (16/42), 胆嚢癌 100% (4/4), 胆管癌 100% (5/5), 膵癌 90% (38/42) であった. うち 120 U/ml を越える高い血中濃度を示

Table 1 Results of intra-assay reproducibility

No.	Serum (U/ml)				
1	38	20	10	36	77
2	37	18	11	38	67
3	38	20	10	38	75
4	33	20	11	32	74
5	43	19	10	33	74
6	38	21	8	37	61
7	38	20	10	32	67
8	36	20	10	36	62
9	38	19	10	35	77
10	38	20	11	33	76
Mean	37.7	19.7	10.1	35.0	71.0
S.D.	2.5	0.8	0.9	2.4	6.2
CV (%)	6.5	4.2	8.7	6.7	8.7

Table 2 Results of inter-assay reproducibility

No.	Serum (U/ml)		
1	39	26	59
2	39	27	60
3	38	26	63
4	40	29	60
5	39	30	56
6	38	29	58
7	36	21	65
8	37	26	57
9	40	27	65
10	39	25	62
Mean	38.5	26.6	60.5
S.D.	1.3	2.5	3.2
CV (%)	3.3	9.6	5.2

す症例は胃癌 7%, 大腸癌 0%, 食道癌 0%, 肝細胞癌 2%, 胆嚢癌 100%, 胆管癌 40%, 膵癌 81%と胆嚢癌, 胆管癌, 膵癌に多かった。これらのほとんどは10倍の希釈でも scale over するほどの高値であった。

一方良性疾患患者における陽性率はきわめて低く, わずかに肝硬変症で軽度の上昇例が散見される (9/25, 26%) のみで, 120 U/ml を越える症例は胆石症の 1 例のみであった (Fig. 7)。臨床的に膵癌との鑑別が問題となる慢性膵炎の陽性率は 22% (4/18) であり, 120 U/ml を越える症例は認められなかった。なお cut off 値 15 U/ml を Del

Table 3 Recovery test

added CA19-9	Serum (U/ml)		
0	19	10	12
7.5	25	18	21
	(94)*	(103)	(108)
15	35	25	25
	(103)	(100)	(93)
30	52	41	43
	(106)	(103)	(102)
60	78	69	70
	(99)	(99)	(103)
Recovery (%)	100.5±5.2**	101.3±2.1	101.5±6.2

* recovery % ** Mean±SD

Villano ら¹⁵⁾に従い 37 U/ml とした場合, 良性疾患における陽性率は 15% (18/124) から 3% (4/124) に, 悪性腫瘍における陽性率は 52% (78/151) から 38% (58/151) と低下する。しかし正診率は cut off 値 15 U/ml で 67% であったのに対し, cut off 値 37 U/ml で 65% とほとんど変わらない結果が得られた。

IV. 考 察

CA19-9 はモノクローナル抗体の手法を用いて開発され臨床的に使用される初めての“腫瘍マーカー”である。1975年 Köhler, Milstein によるハイブリドーマ法を用いるモノクローナル抗体の手法¹⁶⁾は免疫学的分野に大革命を引き起こした。つまりこれまでの抗原を精製し, 動物に免疫して得られるポリクローナル抗血清では, いかにも精製された抗原を用いても得られる抗体は均一なものではなく種々の抗原決定基に対する抗体が混じたものしか得られなかった。しかしモノクローナル抗体の手法を用いるとその抗体は均一であり, 無制限に抗体を分泌しながら増殖する細胞を用いるため抗体の量的制限がない。しかも免疫に用いる抗原が必ずしも精製されたものでなくてもよいためモノクローナル抗体の手法は抗原の精製が困難な“腫瘍マーカー”の開発に有用と考えられていた。CA19-9 は 1979 年 Koprowski らにより開発されたモノクローナル抗体を利用した初めての“腫瘍マーカー”である。その抗原はノイラミダーゼに

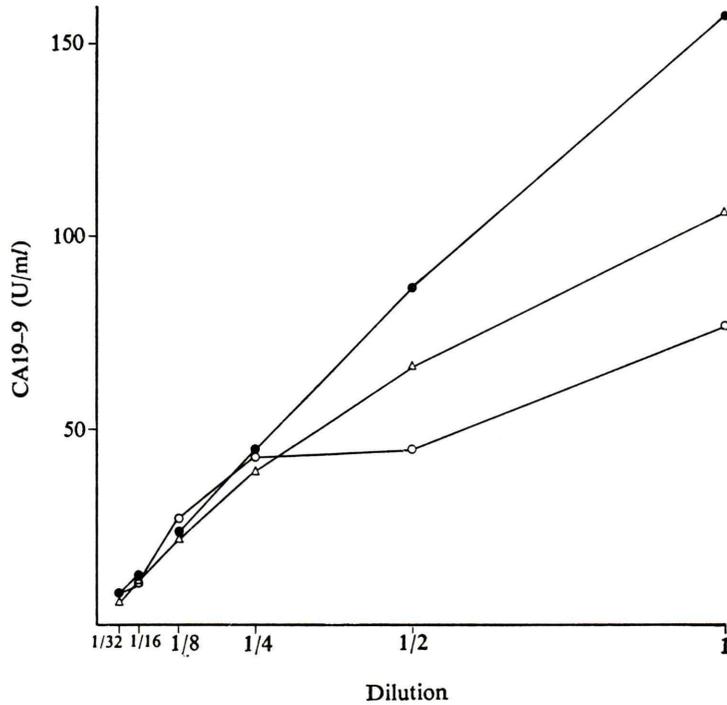


Fig. 4 Effect of sample dilution on CA19-9 estimation. All specimens were obtained from patients with high CA19-9 values and diluted by diluent equipped with the kit.

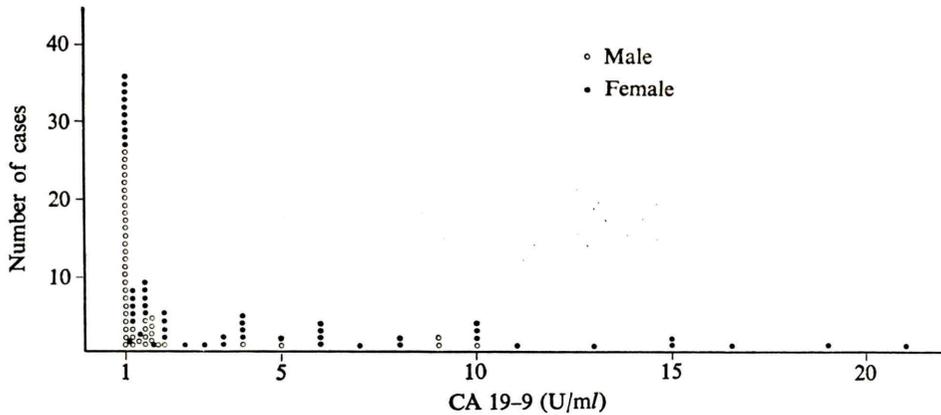


Fig. 5 Serum CA19-9 levels in 98 normal subjects.

より失活することよりガングリオシドを含むことが明らかとなり⁵⁾, その抗原の一部も解明されている⁶⁾.

動物の免疫には大腸癌細胞を用いたため、当初

大腸癌に有用な“腫瘍マーカー”と考えられていた^{7,9)}が、今回の検討のごとく膵癌の診断に有用であることが明らかになりつつある^{8,11)}.

今回検討した“エルザ CA19-9”キットは固相

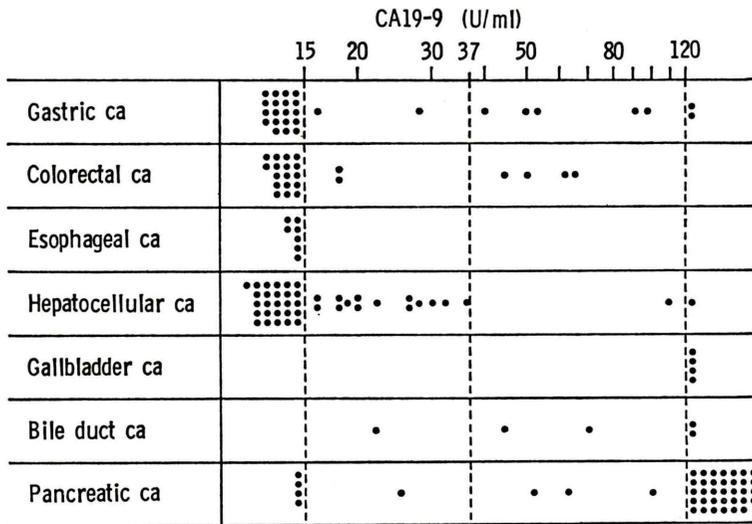


Fig. 6 Serum CA19-9 levels in 151 patients with various malignant tumors.

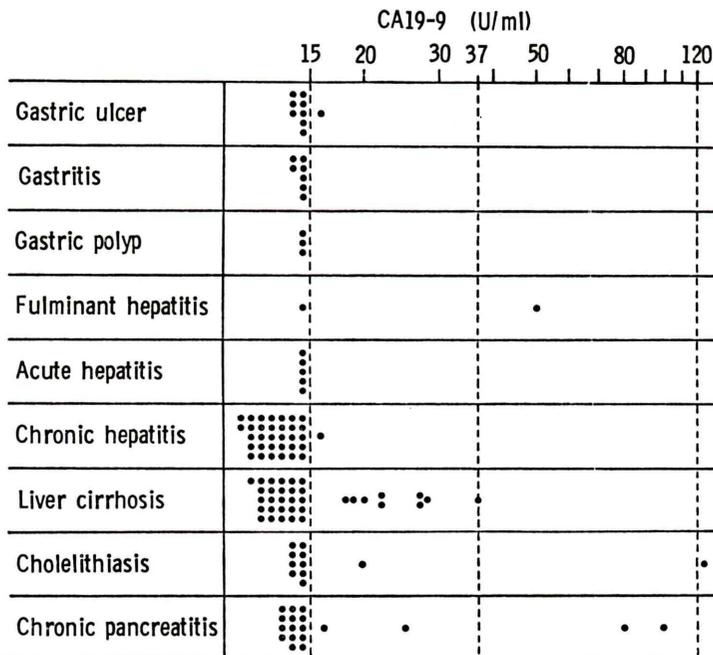


Fig. 7 Serum CA19-9 levels in 124 patients with various benign diseases.

法の IRMA である。抗体をチューブに結合させる固相法のアッセイは大量の抗体を必要とするが、その操作とくに B/F 分離が容易で近年多用されている。この固相法を用いたサンドウィッチ法に

よる IRMA は CA19-9 のような抗原が十分精製されておらず、一方抗体は大量に使えるモノクローナル抗体の系においては適したアッセイ法といえる。

キットの基礎的検討としては第一反応が5~24時間ではプラトーに達しておらず、反応の安定性にやや問題を残す。第二反応はプラトーに達するのに24時間かかり、3時間インキュベーションの短時間法よりは16~24時間インキュベーションの標準法の方が安定した値が得られるものと思われた。しかし得られた測定値にはほとんど差がなかった。再現性、回収試験では満足すべき結果が得られ、またこれまでのCEAやAFPなどの“腫瘍マーカー”との交叉反応は認められず、CA19-9は従来の“腫瘍マーカー”とは異なったまったく新しいものであると考えられた。ただ固相法の欠点ともいえるが、本キットも希釈試験で直線性が得られないことが今後の検討課題と考えられた。しかも測定範囲が狭く、さらに希釈液に若干のCA19-9が含まれるために希釈測定 of 計算が複雑で、CA19-9が高値の場合にはその正確な濃度の決定が困難な場合もありうると思われる。

これまで膵癌は臨床所見、超音波検査、およびX線CTや血管造影検査などの各種放射線学的検査を駆使しても腫瘍形成慢性膵炎との鑑別診断は著しく困難であった。しかし膵癌におけるCA19-9の陽性率は90%と高く、またその値もきわめて高い。一方慢性膵炎における陽性率はcut off値を15 U/mlとして22%、37 U/mlとして11%と低く、120 U/mlを越える症例は認められなかった。事実、術前のCA19-9が陰性であったが画像診断により膵癌と診断されて手術を受けたところ慢性膵炎であった症例を経験しており、血中CA19-9濃度の測定が今後膵癌と慢性膵炎の鑑別診断の主役となる可能性がある。他の腫瘍では胆嚢癌、胆管癌にも有用と思われる。これら以外の悪性腫瘍では一般に陽性率はそれほど高くなく、CEAなどとの比較検討が必要である。

このようにCA19-9は膵癌、胆嚢癌、胆管癌の診断に有用であったが、CA19-9は初めてモノクロナール抗体の手法を用いて開発された新しい“腫瘍マーカー”であり、今後同じ手法を用いて他の部位の悪性腫瘍に対するモノクロナール抗体が開発され、臨床的に実用化するものと期待される。

V. ま と め

CIS“エルザCA19-9”キットの基礎的および臨床的検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) 本法は操作が簡便であり、再現性、回収率も良好で、他の“腫瘍マーカー”との交叉反応もなかった。
- 2) しかし測定範囲が狭く、希釈試験の直線性が不良で、高値血清の測定に改善の余地があると思われる。
- 3) 膵癌においては陽性率が高くまたきわめて高値をとる一方、慢性膵炎では陽性率は低く、有用な“膵癌マーカー”となる可能性が示唆された。
- 4) その他、胆嚢癌、胆管癌の診断にも有用であった。

文 献

- 1) 向島 達：癌胎児抗原(Carcinoembryonic Antigen, CEA). 日本臨床 34: 2599-2604, 1976
- 2) 石井 勝： α -fetoprotein 日本臨床 34: 2576-2588, 1976
- 3) Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, et al: Colorectal carcinoma-specific antigen: Detection by means of monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 76: 1438-1442, 1979
- 4) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somat Cell Genet 5: 957-972, 1979
- 5) Magnani J, Brockhaus M, Smith D, et al: A monosialoganglioside is a monoclonal antibody defined antigen of colon carcinoma. Science 212: 55-56, 1981
- 6) Magnani J, Nilsson B, Brockhaus M, et al: The antigen of tumor-specific monoclonal antibody is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. Fed Proc 41: 898, 1982
- 7) Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, et al: Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. Science 212: 53-55, 1981
- 8) Herlyn M, Sears HF, Steplewski Z, et al: Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. I. presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric and pancreatic carcinoma. J Clin Immunol 2: 135-140, 1982
- 9) Sears HF, Herlyn M, Del Villano B, et al: Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. II. a longitudinal evaluation of patients with colorectal cancer. J Clin Immunol 2:

- 141-149, 1982
- 10) 古川 信, 小坂 進, 芦田義尚, 他: 消化器腺癌に対するモノクローナル抗体 (19-9) の有用性に関する検討. 日消外会誌 **16**: 936, 1983
 - 11) 山中恒夫, 北川泰久, 関 秀一, 他: モノクローナル抗体を用いた消化器癌関連抗原 CA19-9 の測定とその臨床的意義. 日消誌 **80**: 1352, 1983
 - 12) 有吉 寛, 桑原正喜, 須知泰山, 他: 糖鎖抗原 CA 19-9, 新しい消化器癌関連抗原——膵癌マーカーとしての可能性——. 医学のあゆみ **125**: 918-920, 1983
 - 13) Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, et al: Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res* **42**: 4820-4823, 1982
 - 14) CIS ELSA-CA19-9™ kit, manual
 - 15) Del Villano B, Brennan S, Brock P, et al: Radioimmunoassay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA19-9. *Clin Chem* **29**: 549-552, 1983
 - 16) Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975