

《ノート》

モノクローナル抗体チューブ固相 CEA IRMA 法の基礎と臨床応用の評価

Fundamental and Clinical Evaluation of a CEA Immunoradiometric Assay Using Monoclonal Antibody Coated Tube

長田 篤雄* 大久保次男* 茂田 二一**

Atsuo NAGATA*, Tsuguo OOKUBO*, Tsugikazu KOMODA**

*Radioisotope Laboratory, **Biochemistry, Saitama Medical School

I. はじめに

Carcinoembryonic Antigen (CEA) の測定は, Radioimmunoassay 法 (以下 RIA)^{1~3)} および Enzyme immunoassay 法⁴⁾ と数多く開発され, 多種の測定試薬^{2,4~8)} が実用に供されている。しかし, CEA およびその類似抗原の多様性^{3,9~14)} や, 抗 CEA 抗体の違い^{7,11)} によって, それぞれの方法で得られる結果には相当な差異がみられてきた。また従来のほとんどの測定法は, 過剰抗原域におけるフック現象^{8,15)} が存在し, CEA 測定上重要な課題であった。これらの問題を解決すべく, モノクローナル抗体を使う CEA 測定法¹²⁾ が以前から検討されてきたが, 実用化されている測定系は少ない。

われわれは, ドイツベーリング社が開発した CEA モノクローナル抗体をチューブ固相とした Immunoradiometric assay 法 (IRMA) を使用する機会を得たので, 基礎的検討を中心とした評価を行った。

II. 実験

1. キットの構成と標準的測定法

キットには標準濃度品 7 バイアル (ロットにより多少異なるが, 0, 2.7, 5, 10, 20, 60, 200 ng/ml), ¹²⁵I-抗 CEA マウスモノクローナル抗体チューブ, コントロール血清 2 種, アッセイバッファー (Tris buffer) および洗浄液用錠剤 (リン酸バッファー調整用) が含まれている。Fig. 1 に標準的なアッセイ手順を示すが, 抗体チューブとサンプルの第 1 インキュベーションと, チューブ洗浄後 ¹²⁵I-CEA 抗体を加えて行う第 2 インキュベーションよりなる, いわゆる IRMA 法による測定系である。インキュベーションには水平振盪が必要なため, 以下の実験においては東洋科学産業株式会社の水平振盪機 (ダイナシェーカー) で 250 rpm に固定した条件でインキュベートした。

2. 実験方法

インキュベーション時間の影響を観察するため, 第 1 インキュベーションについては, 30 分, 1, 3, 24 時間, 第 2 インキュベーションについても 30 分, 1, 3, 24 時間それぞれの標準曲線と, 同時に測定

* 埼玉医科大学 RI 研究施設

** 同 生化学教室

受付: 60 年 11 月 21 日

最終稿受付: 61 年 1 月 21 日

別刷請求先: 埼玉県入間郡毛呂山町本郷 38 (郵便番号 350-04)

埼玉医科大学 RI 研究施設

長田 篤雄

Key words: Carcinoembryonic antigen, Tumor marker, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody, Tube solid phase.

した血清サンプルの測定値を比較した。アッセイ内変動については3種類の血清をそれぞれ10回測定し、平均値、標準偏差(SD)、変動係数(CV)を求めた。またアッセイ間変動については2種類のコントロール血清を10回測定し、同様な評価を行った。

高濃度サンプルの希釈性は、サンプルをアッセイバッファーで希釈し、標準曲線との平行性を評価した。

本法はチューブに抗CEA抗体を結合した固相法のため、サンプルを添加した直後からインキュベーション(以下プレインキュベーション)が始まる可能性があり、サンプルの測定値への影響が考えられるので、プレインキュベーション5分、30分、1時間について検討した。

他のCEA測定法との相関性は、第1ラジオアイソトープ研究所のCEA RIAキット・第1^{7~8)}(以下第1法)およびダイナボット社のCEA RIA BEADキット¹⁶⁾(以下リアビーズ法)について比較した。第1法、リアビーズ法いずれもビーズ固相IRMAであるが、第1法は両抗体がポリクローナル抗体であり、リアビーズ法はビーズ抗体がモノクローナル抗体である。

さらに本キットの抗体特異性を検討するため、CA 19-9¹⁷⁾(CIS)、CA 125¹⁸⁾(CIS)、SCC¹⁹⁾(ダイ

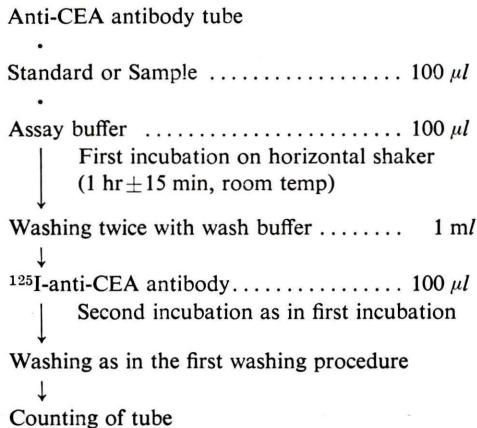


Fig. 1 Assay procedure of the RIA-gnost CEA IRMA kit (Behring).

ナボット)、NSE²⁰⁾(栄研)のキットの標準品を測定し、交差性を観察した。

臨床的検討としては、健常者(年齢20~45歳)43名を測定するとともに、各種疾患については胃癌(33例)、大腸直腸癌(32例)、肺癌(22例)、子宮癌(14例)、卵巣癌(11例)、肝癌(19例)、膵臓癌(6例)、乳癌(8例)、食道癌(8例)、膀胱癌(14例)、前立腺癌(6例)などの悪性疾患および良性疾患として肝硬変(31例)、肝炎(13例)、糖尿病(5例)、その他(14例)の合計279例のCEAを測定し、比較を行った。

III. 結 果

1. インキュベーション時間について

第2インキュベーションを1時間に固定し、第1インキュベーション時間を変えた場合、Fig. 2Aに示すように30分、1時間での変化は標準曲線にはみられない。しかし3時間から24時間と時間を延長するに従い、結合放射能が増加し特に低濃度での増加率が大きい。同時に測定した低値血清サンプルの濃度は、コントロールサンプルと比較して時間の延長に伴ってやや高値に測定される傾向が観察された。

第1インキュベーションを1時間に固定し、第2インキュベーション時間を変えた場合の影響は、Fig. 2Bに示すように時間を延長すると第1インキュベーションより高い増加率で結合放射能が増加したが、標準曲線間には平行性が観察された。また同時に測定した血清サンプルは、時間の延長に伴ってやや高濃度に測定される傾向がみられた。

2. アッセイ内およびアッセイ間の変動について

アッセイ内の血清サンプル(A, B, C)は、平均値 $\bar{A}=4.74 \text{ ng/ml}$, $SD=0.476$, $CV=10.06\%$, $\bar{B}=6.77 \text{ ng/ml}$, $SD=0.402$, $CV=5.93\%$, $\bar{C}=98.3 \text{ ng/ml}$, $SD=4.98$, $CV=5.05\%$ であり、良好な再現性であった。

アッセイ間変動については、Fig. 3に2種類のコントロールサンプルの測定値を示すが、7%以下のCVを示し優れた再現性が確認された。

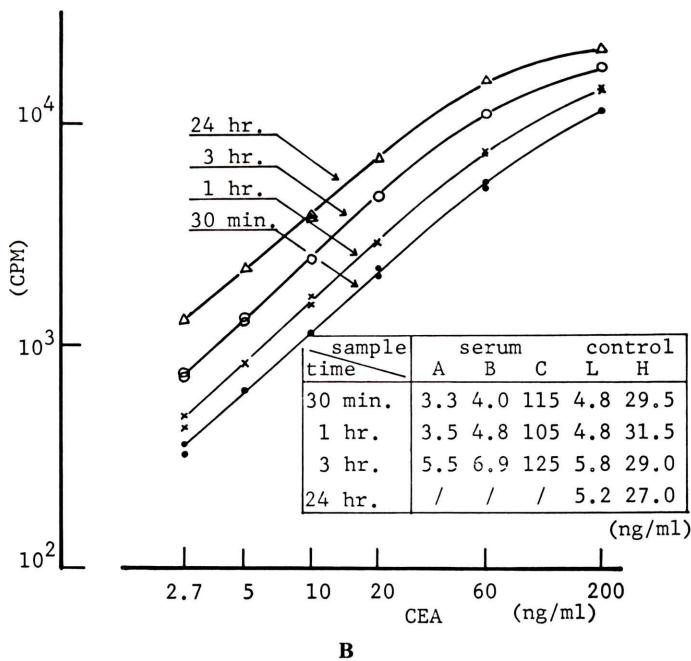
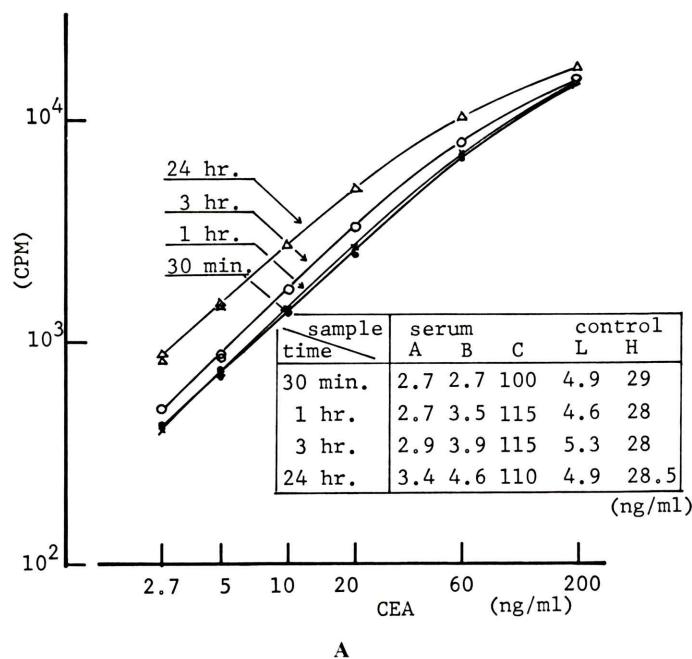


Fig. 2 Effects of the first incubation time (A) and the second incubation time (B) on the standard curves or the samples.

3. 希釈試験

原濃度が 200 ng/ml 以上を示した血清サンプルの希釈結果を Fig. 4 に示す。約 15,000 cpm 付近に結合放射能の飽和点が存在するが、200 ng/ml/

標準濃度の結合放射能以下ではいずれのサンプルにも良好な平行性が示された。またデータは示さないが、200 ng/ml 以下の範囲では希釈比率と測定値間に良好な直線関係が確認された。

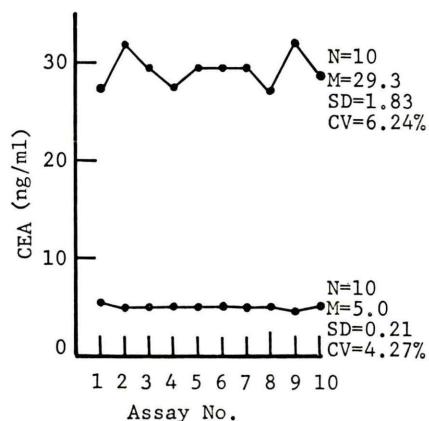


Fig. 3 The chart of ten interassay variance.

4. サンプル添加後の時間の影響

(プレインキュベーション時間の影響)

第1、第2インキュベーションをそれぞれ1時間に固定し、プレインキュベーションを5分、30分、1時間とした場合と、前もってアッセイバッファーを添加した後標準液とサンプルを加える方法で、プレインキュベーションを30分あるいは1時間とする方法について検討した。Fig. 5A にそれぞれの条件における標準曲線を示す。プレインキュベーションを延長すると結合放射能が若干低下した。またアッセイバッファーを前もって添加しておいても、さらに大きい影響がみられ、改善されなかった。Fig. 5B にこれらの条件で測定し

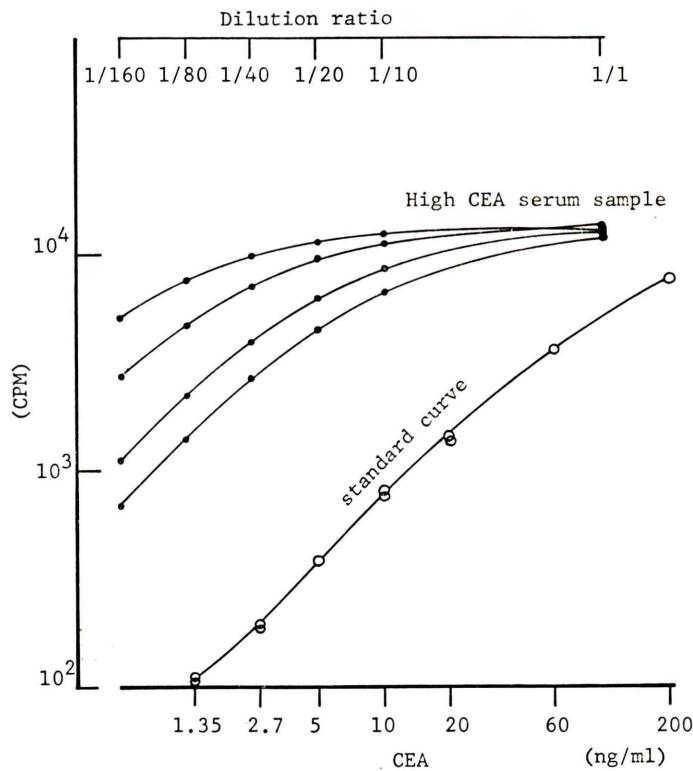


Fig. 4 Comparison of the dose-response curves between the standard preparations and high CEA concentration serum samples.

た血清サンプルの結果を示す。通常のアッセイではサンプルに先がけて標準液を分注するので、標準液とサンプルのプレインキュベーション時間が異なるほど高値に測定される結果であり、高濃度での影響が顕著であった。しかし30分以上1時間以内では、ほぼプラトーの状態にあった。またサ

ンプルと同一プレインキュベーション条件の標準曲線で求めた測定値は、高濃度サンプルの場合に影響がみられるが、H, L コントロールでは安定した結果であった。

5. 他の測定法との相関性

第1法^{7,8)}と同一の186サンプルを測定し、相関性をFig. 6Aに示す。対数グラフでの相関性で示すが相関係数=0.968が得られた。本法では5ng/ml以下でより低値となる傾向が観察されるが、全体には第1法と近似した結果であった。

108サンプルについて、リアビーズ法¹⁶⁾との相関性をFig. 6Bに示す。相関係数=0.981と高い相関性が得られたが、5ng/ml以下ではリアビーズ法でより低値に測定される傾向があった。

6. 他の項目との交差性

第1法のCEA標準液や、CA 19-9¹⁷⁾、CA 125¹⁸⁾、SCC¹⁹⁾、NSE²⁰⁾それぞれの標準液の交差性をFig. 7に示す。第1法の標準液は、同一の結合放射能で比較すると本法の約1.7倍の濃度を示した。SCCの標準液には11.2%の高い交差性がみられた。またCA 125にもやや高い結合放射能がみられたが、濃度依存性ではなかった。NSEでは結合放射能が極端に低いので図示はしなかったが、交差性はないと考えられた。

7. 臨床的検討

健常者43名の測定値は1ng/ml以下から4.5ng/mlに分布した。1未満を1ng/mlとして計算すると平均値=1.56ng/ml, SD=0.76であり、平

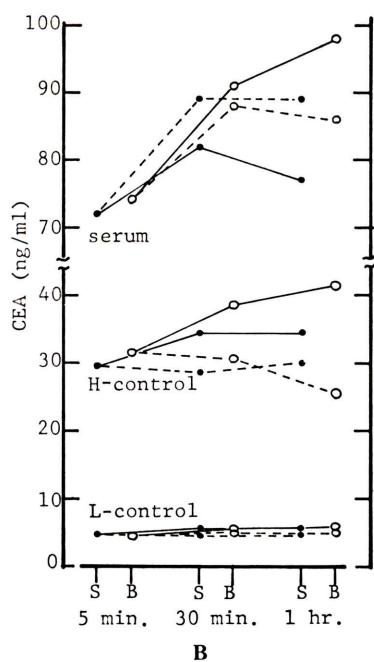
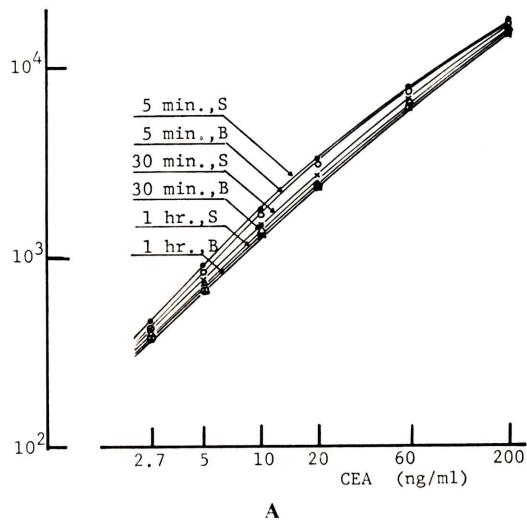


Fig. 5 Effect of the pre-incubation time on the standard curves (A), and on the calculated values (B) for the serum sample counts at the 5 minutes pre-incubation by the 30 minutes or the 1 hour pre-incubation standard curve.

S: pre-incubation was done after standard and serum sample dispensed into antibody coated tube without assay buffer.

B: assay buffer was pre-dispensed before dispensing of standard and serum samples.

●—●} : calculated values by 30 minutes or

○—○} : 1 hour pre-incubation standard curve

●---●} : calculated values by identical pre-

○---○} : incubation standard curve as sample

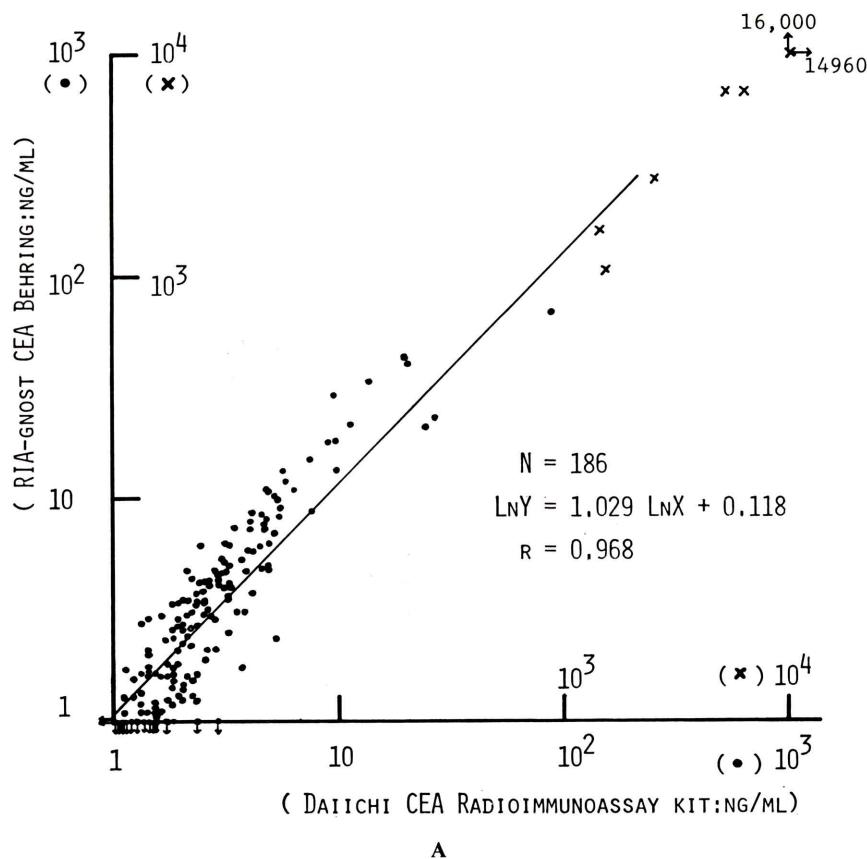
均値 $+2\text{SD}$ 以下を正常範囲とすると約3.1 ng/ml以下であった。また実分布はむしろ対数正規分布性を示すことから、測定値の対数について平均値 $+2\text{SD}$ を求め、これを真数範囲に変換すると約3.3 ng/ml以下となった。カットオフ値はこの範囲を参考とし、切り上げて3.5 ng/mlと決定した。Fig. 8に健常者と各種疾患の測定値分布を示す。最高では肺癌に16,000 ng/mlが観察された。消化器癌、肺癌、乳癌および子宮癌や卵巣癌に高値が認められた。またカットオフ値を3.5 ng/mlとした場合の陽性率は、肺腺癌、食道癌が100%で最も高く、胃癌、肺癌が72.7%と同率で高い陽性率を示した。良性疾患では肝硬炎や慢性肝炎、糖尿病などで高値が観察されたが、慢性腎不全でも20 ng/ml以下の高値がみられた。

IV. 考 察

ペーリング社のCEAモノクローナル抗体をチューブ固相としたCEA IRMAキットについて基礎的検討を中心とした評価を行った。

本法は試薬がほぼ調整済みであり、またチューブも50本単位で発泡スチロール製試験管立てに整理されているのでナンバリングが省略でき、洗浄操作においても50本単位で洗浄液をデカントできるなど高能率な操作性である。

アッセイ方法は第1、第2インキュベーションを室温1時間とする方法で十分な条件であった。インキュベーション時間を延長すると測定値に影響がみられるので標準アッセイ方法を遵守すべきであろう。またチューブ固相法のために起こりうる



A

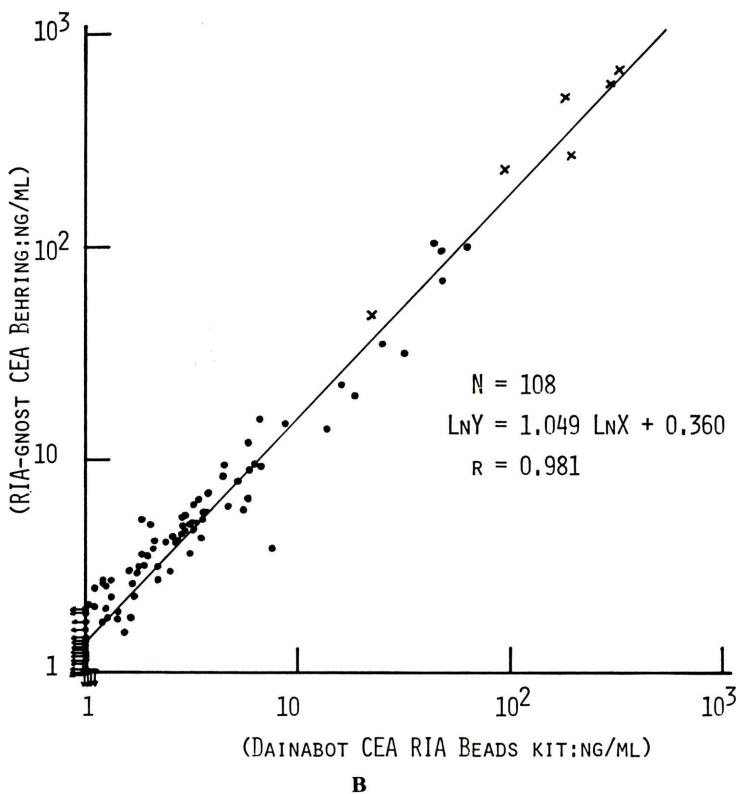


Fig. 6 Interrelationship between CEA values calibrated with the RIA-gnost CEA IRMA kit and CEA values calibrated with the other CEA kit.

A: RIA-gnost CEA IRMA kit vs. CEA radioimmunoassay kit (Daiichi)

B: RIA-gnost CEA IRMA kit vs. CEA RIA BEAD kit (Dainabot)

X: calculated values by dilution technique

るプレインキュベーションの影響を観察したが、時間を延長すると標準曲線の結合放射能が徐々に低下する現象が認められた。実際のアッセイを前提にして30分あるいは1時間プレインキュベーションをした標準曲線でプレインキュベーション5分のサンプルの測定値を求めるとき、高値に算出される傾向であったが、30分と1時間ではほとんど差が認められなかった。またアッセイバッファーを前もって分注する方法も検討したが、これらの現象は改善されなかった。アッセイ前半かあるいは後半に標準液を分注することで、測定値への影響は異なると考えられるが、全分注操作を可能なかぎり短時間に終了することが望ましい。

インキュベーションには水平振盪が必要である

が、これは反応時間の短縮に有効なだけではなく、反応液量が200 μl以下であるがチュープ固相法であるため、水平振盪によってチュープ塗布抗体を十分活用することにも役だっている。チュープを切断して放射能分布を測定し、抗体塗布上限を求めたところ、チュープ底から15~20 mmの範囲であった。

測定値の変動は、5 ng/ml以下の低濃度でもアッセイ間変動係数が5%以下を示し、安定した結果であったので、カットオフ値前後の判別に優れていると考えられた。また、最低検出感度をPrecision Profile法²¹⁾で求めると0.1 ng/ml以下の範囲にあり、臨床的に十分と思われた。

従来のCEA測定法の希釈性は、測定範囲内で

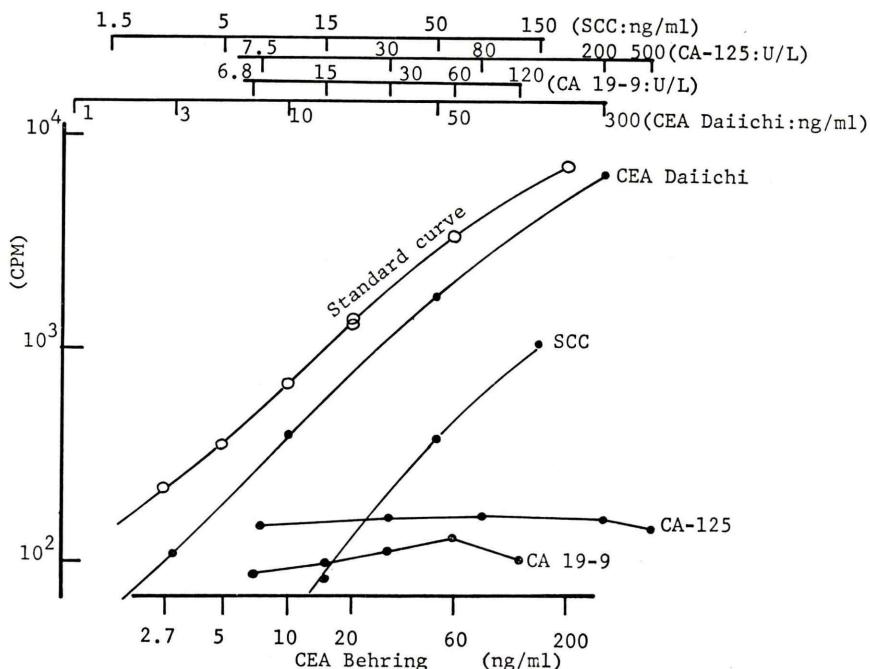


Fig. 7 Cross-reactivity of the other antigen.

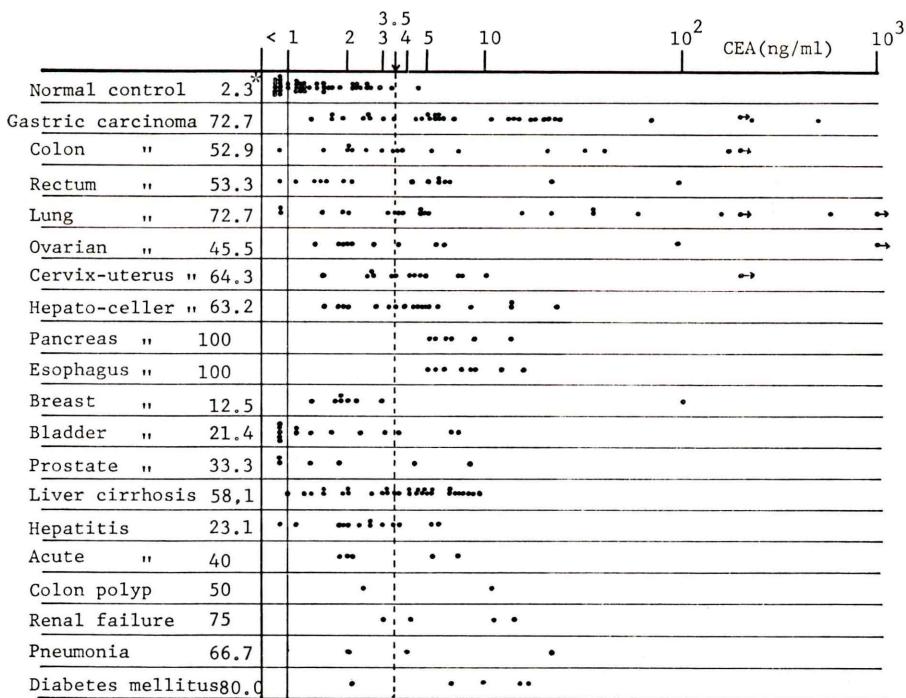


Fig. 8 Distribution of CEA values in various carcinomas and diseases or normals with the RIA-gnost CEA IRMA kit. *: percentage of positives.

フック現象が起こる^{8,11)} ことや、サンプルによってフックの程度に差がある^{8,11)} ことが重要な問題点となっていた。本法については、測定値上限である 200 ng/ml を超過した範囲では結合放射能の頭打ちがみられるが、測定範囲内では観察されないので高値検体でも適切な希釈倍率で精度高い測定が可能である。

他方法との相關性では、第 1 法^{7,8)} およびリアビーズ法¹⁶⁾ と比較したが、第 1 法には相関係数 $r=0.968$ 、リアビーズ法には 0.981 が得られ、リアビーズ法により良好な相關性であった。モノクローナル抗体を利用した方法として相關性が強調された可能性が考えられる。しかし 5 ng/ml 以下の低濃度においては三測定法間に微妙な違いが認められ、本法より第 1 法で高く、リアビーズ法で低い結果であった。第 1 法の標準液を本法で測定しそれぞれの標準曲線を比較すると、Fig. 7 に示すように第 1 法標準濃度は 1.7 倍高い結果であったが、平行性は良好であった。この結果から低濃度における測定法間の差は、標準濃度の表示差に起因している可能性が示唆される。三測定法のカットオフ値にも影響がみられ、本法の 3.5 ng/ml に対し第 1 法は 4 ng/ml⁸⁾、リアビーズ法では 2.5 ng/ml¹⁶⁾ とされているのと符合する。また第 1 法との相關性において 10 ng/ml 以上では本法でもむしろ高値を示しているが、第 1 法には測定範囲内にフック現象が存在する⁸⁾ ので低値に測定される影響が表われたものと考える。

他物質との交差性を検討したところ、SCC キットの標準液に濃度依存性の交差がみられた。ダイナボット社によれば、この標準液は粗抽出品のことであり、含有される CEA あるいは CEA 抗体交差物質による可能性を示唆している。また第 1 法の CEA 標準液を SCC キットで測定しても交差性は認められなかった。これらの結果からは CEA 抗体が SCC 抗原に対して交差性を有するか不明であり、精製 SCC 抗原による確認が必要である。

臨床検討では胃癌、結腸直腸癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌に 200 ng/ml を越える高値例がみられた。

また胃癌、肺癌、子宮癌、脾臓癌、食道癌では 60% を越える高い陽性率が観察された。さらに肝臓癌 63.2%，肝硬変 58.1% の陽性率であったが、肝臓機能障害による CEA 代謝速度の低下や消失の遅延²²⁾ が原因と考えられる。また糖尿病でも 30 ng/ml 以下の範囲ではあるが高陽性率であり、既報告の結果⁸⁾ と一致した。CEA の糖鎖と糖尿病における糖代謝の関係を暗示している可能性も考えられる。慢性腎不全や肺炎でも高陽性率であったが、少症例数のため母集団のかたよりが原因であろうと思われる。

V. まとめ

ベーリング社の RIA-gnost CEA IRMA 法について検討し、以下の結論を得た。

- 1) 標準アッセイ法は、全行程を 2~3 時間で終了できる迅速な方法である。また必要十分な結合放射能が得られ、時間的条件を変えると測定値に影響がみられるので、標準アッセイ法を遵守することが望ましい。
- 2) 低値感度に優れ、低値の再現性が安定している。
- 3) 前準備性や洗浄操作性に大変優れているが、抗体固相チューブを使用するため、標準液やサンプルを分注してから長時間放置すると結果に影響がみられるので、可能な限り短時間に全分注を終了することが望ましい。
- 4) 最大測定範囲は 200 ng/ml であるが、測定範囲内ではフック現象はみられない。
- 5) カットオフ値は 3.5 ng/ml であり、臨床成績では従来からの報告を再確認した。

以上のように本測定法は、数多くの優れた特性を持つモノクローナル抗体を有効に利用した方法であり、CEA 測定の新しい方向を示した方法と考える。

文 献

- 1) Thomson DMP, Krupey J, Freedman SO, et al: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of human digestive system. Proc Nat Acad Sci 64: 161-167, 1969

- 2) Hansen HJ, Lance KP, Kruey J: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel. *Clin Res* **19**: 143, 1971
- 3) Nishi S, Hirai H: Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen and its related antigens by the sandwich method. *Onco-developmental gene expression*, Fishman WH, Sell S, eds, Academic Press Inc., New York, 1976, p. 567
- 4) Maiolini R, Bagrel A, Chavance C, et al: Study of an enzyme immunoassay kit for carcinoembryonic antigen. *Clin Chem* **26**: 1718-1722, 1980
- 5) 西信三, 平井秀松: CEA (Carcinoembryonic Antigen) の測定法. *臨床病理特* **25**: 55-67, 1976
- 6) 鳥塚莞爾, 石川演美, 浜本研, 他: がん診断への応用(内科より). *癌と化学療法* **4**: 231-244, 1977
- 7) 松岡雄治, 黒木政秀, 古賀芳子: 血中癌胎児性抗原(CEA)の新しい測定法の検討. *核医学* **19**: 1023-1033, 1982
- 8) 長田篤雄: ビーズ固相法 CEA ラジオイムノアッセイキットの基礎検討. *核医学* **20**: 1377-1386, 1983
- 9) 平井秀松: CEA (その1)—測定法とその臨床的検討—. *日本臨床* **34**: 1274-1279, 1976
- 10) 平井秀松: CEA (その2)—測定法とその臨床的検討—. *日本臨床* **34**: 1486-1491, 1976
- 11) Kuroki M, Koga Y, Matsuoka Y: Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. *Cancer Res* **41**: 713-720, 1981
- 12) Kupchik HZ, Zurawski VR, Hurrell JGR, et al: Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen produced by somatic cell fusion. *Cancer Res* **41**: 3306-3310, 1981
- 13) Matsuoka Y, Kuroki M, Koga Y, et al: Immunochemical differences among carcinoembryonic anti-
- gen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces. *Cancer Res* **42**: 2012-2018, 1982
- 14) 吉井正雄: 癌胎児性抗原 CEA の isomeric species の分離精製とその radioimmunoassay の臨床的評価. *核医学* **19**: 375-397, 1982
- 15) 米山善夫, 永田弘治, 赤沢好温: 高 CEA 検体における Z ゲル法とサンドイッチ法の比較検討. *新薬と臨床* **27**: 2233-2238, 1978
- 16) 桑原康雄, 一矢有一, 馬場裕子, 他: ビーズ固相法を用いた CEA キット (CEA・RIA BEAD) の基礎ならびに臨床的検討. *核医学* **21**: 1513-1519, 1984
- 17) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* **5**: 957-972, 1979
- 18) Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, et al: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **68**: 1331-1337, 1981
- 19) Kato H, Torigoe T: Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* **40**: 1621-1628, 1977
- 20) Schmeichel D, Marangos PJ, Brightman M: Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* **276**: 834-836, 1978
- 21) Hall PE, Ekins RP, Jeffcoate SL, et al: Round table discussion on assay design, standardization and within laboratory quality control (1977), pp. 3-79, IAEA Vienna 1978
- 22) Shuster J, Silverman M, Gold P: Metabolism of human carcinoembryonic antigen in xenogeneic animals. *Cancer Res* **33**: 65-68, 1973