

《原 著》

Non-specific cross-reacting antigen (NCA)-Radioimmunoassay の基礎的、臨床的検討

浦 恭章* 越智 幸男* 浜津 尚就** 石田 正夫***
梶田 芳弘*** 中嶋 良行***

要旨 精製 NCA と NCA 特異抗体を用いて、Polyethylene Glycol (PEG) 法による NCA-RIA を確立した。正常人および各種疾患患者の血漿 NCA 値を測定し、Roche CEA-RIA 法による CEA 測定法と比較検討した。

正常人の血漿 NCA 値は $105 \pm 45 \text{ ng/ml}$ (mean \pm S.D.) であり、 200 ng/ml 以下を正常範囲とした。悪性腫瘍では、CEA 陽性率は 72%，NCA 陽性率は 17% であった。悪性疾患の肝転移例では高率かつ高値 ($1,000 \text{ ng/ml}$ 以上) の NCA 陽性例が認められた。悪性疾患では NCA と CEA の相関は相関係数 $r=0.446$ ($p<0.001$) を認めた。悪性疾患で NCA と CEA とも高値例が認められたが、NCA 高値で CEA 低値例が認められないことおよび悪性疾患での NCA 陽性率の低さより、NCA は CEA ほど有用な腫瘍マーカーではないと推定された。

I. はじめに

Carcinoembryonic Antigen (CEA) は、1965 年 Gold ら^{1,2)}によって大腸癌から抽出された糖蛋白で、2~6か月の胎児の腸管にも存在することから名づけられた。その後臨床的に広く利用されていることは周知のとおりである。また CEA と免疫学的に交叉反応を示す物質が正常組織、癌組織、糞便中などにも存在することが見いだされ、これらの物質は CEA 関連抗原と呼ばれている。その中で von Kleist ら³⁾が正常肺および脾臓に存在する CEA と交叉反応を示す物質を 1972 年に報告し、non-specific cross-reacting antigen (NCA) と名づけた。これは、他の CEA 関連抗原である NGP (normal glycoprotein)⁴⁾、CEX⁵⁾、CCEA-2 (colonic

carcinoembryonic antigen 2)⁶⁾、CCA III⁷⁾、BE⁸⁾、TEX⁹⁾などと呼ばれているものと免疫学的に同一とされている。

CEA と NCA の大きな相違は、分子量が CEA が 18 万前後、NCA は 6 万前後 (報告者により 10 万¹⁰⁾) と異なることで、この 2 つの糖蛋白の糖組成やアミノ酸組成はきわめて類似している¹¹⁾。

CEA は各社によりキットが出され頻用されているが、NCA の Radioimmunoassay (RIA) の報告は散見されるにすぎない^{7,12,13)}。今回われわれは NCA の RIA を確立したので、CEA と比較検討した結果を報告する。

II. 材料と方法

1. 標識抗原の作製

¹²⁵I-CEA 標品は Roche 社の CEA-RIA キットのものを使用した。NCA は大腸癌患者の肝転移から精製された Dr. Hammarstöm (ストックホルム大学；スウェーデン)¹⁴⁾ より提供 (T-NCA-50) されたものを使用し、Bolton-Hunter 法¹⁵⁾にて ¹²⁵I で標識した。標識後 NCA は Sephadex G-75 カラムを用いて遊離ヨードを分離した。なお specific

* 滋賀医科大学検査部

** 同 放射線部

*** 南丹病院内科

受付：60年4月30日

最終稿受付：61年3月18日

別刷請求先：大津市瀬田月輪町（番号 520-21）

滋賀医科大学検査部

越智 幸男

activity $15 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ protein であった。また、精製 CEA 標品は Dako 社 (Code No. 556) のものを用いた。

2. 抗血清の作製

CEA 抗体は Dako 社および Roche 社の CEA-RIA キットを使用した。NCA 抗体は、精製 NCA $50 \mu\text{g}$ を Freund 完全アジュバンドと混合し、成熟家兎に数回免疫し¹⁶⁾、得られた抗血清を、精製 CEA 標品と 3 日間 5°C 反応させた後、遠心分離することにより、吸収操作を行って NCA 特異抗血清を作製した。

3. 操作手順

CEA 測定には Roche 社の CEA-RIA キットを用いた。NCA-RIA 法の操作手順の概略は Fig. 1 に示した。

NCA 標準曲線作製に当たっては、 $0\sim2,000 \text{ ng}/\text{ml}$ 各濃度の標準 NCA $50 \mu\text{l}$ と normal rabbit serum (NRS), 2,000 倍に希釈した標識 NCA

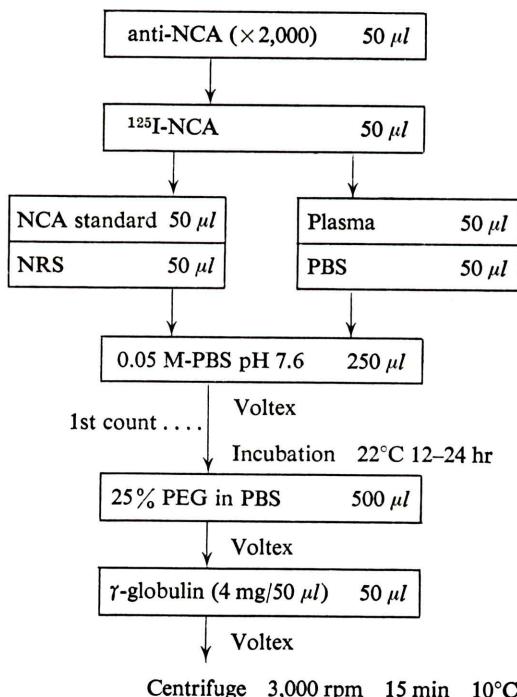


Fig. 1 NCA radioimmunoassay procedure.

(20,000 cpm) をそれぞれ $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 0.05 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.6 にて、合計 $450 \mu\text{l}$ にした。被検検体(血漿)の測定には NRS の代わりに 0.1 M PBS $50 \mu\text{l}$ を加えた。 22°C で 24 時間インキュベーション後、25% PEG (Polyethylene Glycol, No. 6,000) を $500 \mu\text{l}$ 加え、さらに沈殿物の安定のため、ウシ γ -globulin (Miles Lab) $4 \text{ mg}/50 \mu\text{l}$ を加えた。 $3,000 \text{ rpm}$ 15 分遠心して沈殿物の放射能 (B) を計測した。なお測定は、duplicate で行った。

III. 対象

滋賀医科大学医学部附属病院外来および入院患者で、臨床症状、理学的所見および諸検査にて診断した良性疾患 70 例(肝疾患 18 例、胃腸疾患 24 例、胸膜炎 15 例、喫煙者 13 例)、悪性疾患 290 例(肺癌 58 例、胃癌 102 例、脾癌 16 例、大腸癌 35 例、肝癌 6 例、その他の癌 73 例)につき測定した。正常者は本学職員で定期健診にて異常所見なく肝機能正常の 39 例を対象とした。

IV. 結果

1. 基礎的検討

1) CEA 抗体の CEA と NCA の交叉性

^{125}I -CEA または ^{125}I -NCA と希釈した、CEA 抗体 (Dako 社) との titration curve を検討した。CEA 抗体は ^{125}I -CEA と特異的に反応し、抗体 250 倍希釈によって結合率は 68% であったが、100,000 倍希釈により 10% 以下となった。そして、 ^{125}I -NCA は、CEA 抗体 250 倍希釈で 60%, 5,000 倍で 20% の結合性を示した (Fig. 2-A)。

2) NCA 抗体の CEA と NCA の交叉性

NCA 抗体と ^{125}I -NCA との反応は特異的であったが³、 ^{125}I -CEA とは弱い交叉反応が認められた。NCA 抗体の 4,000 倍希釈では CEA との結合性は非特異的結合と考えられた。本検討で使用された NCA 抗血清の特異性を示した (Fig. 2-B)。

3) NCA-RIA における CEA との交叉反応

CEA での吸収操作前の NCA 抗体 (4,000 倍に希釈) を $50 \mu\text{l}$ 使用して、NCA の標準曲線を作製

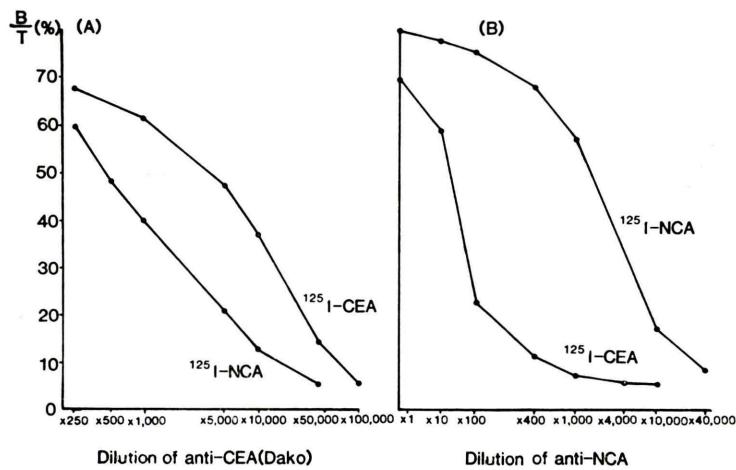


Fig. 2 Titration curves of anti-CEA or anti-NCA reactivity with ^{125}I -CEA and ^{125}I -NCA, respectively.

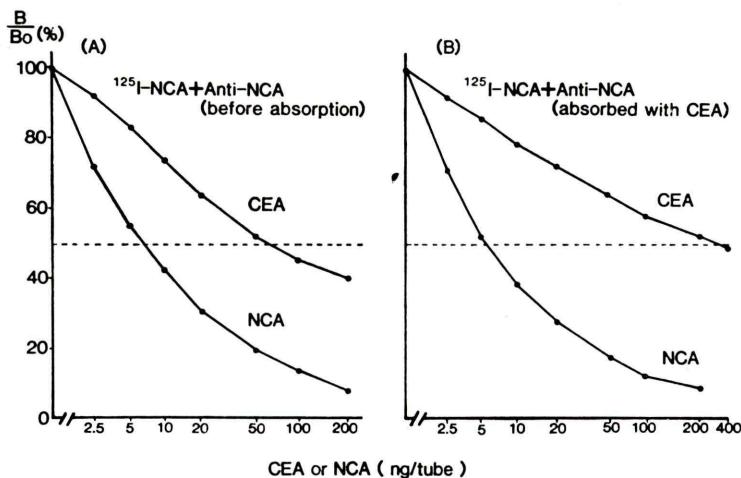


Fig. 3 Dose response curves of CEA and NCA in NCA-RIA.

した。精製CEA標品を加えて交叉反応を検討したところ、 $B/B_0\%$ を50%阻害するNCA量は7 ng、CEAは65 ngのため、CEAの交叉反応は約10.7%であった(Fig. 3-A)。このNCA抗体を精製CEA標品で吸収操作を行い、NCA抗体を2,000倍希釈した時のNCA標準曲線を作製した。精製CEA標品の交叉反応を上記のごとく検討すると、 $B/B_0\%$ を50%阻害するNCA量6 ng、CEAは370 ngのためCEAの交叉反応は約1.5%であった(Fig. 3-B)。

4) NCA-RIAの標準曲線

NCA抗体はCEAで吸収操作を行うと、CEAとの交叉反応が低下したので、この吸収NCA抗体(2,000倍希釈)を用いて、NCA-RIAの標準曲線を作製した。100~500 ng/mlの範囲で直線に近く、2,000 ng/ml以上で平坦となった(Fig. 4)。

5) インキュベーション時間および温度

Figure 5のごとく、標準曲線に及ぼすインキュベーション時間と温度の影響をみた。22°Cで時間を1, 6, 24時間で検討すると、24時間インキュベ

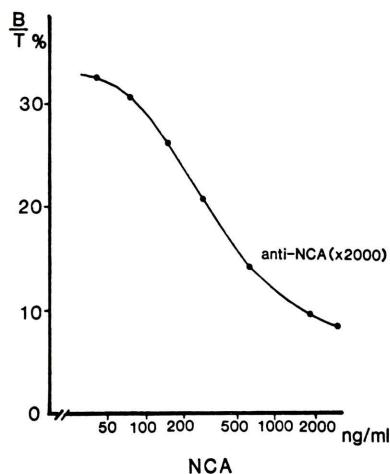


Fig. 4 A typical example of NCA-RIA standard curve.

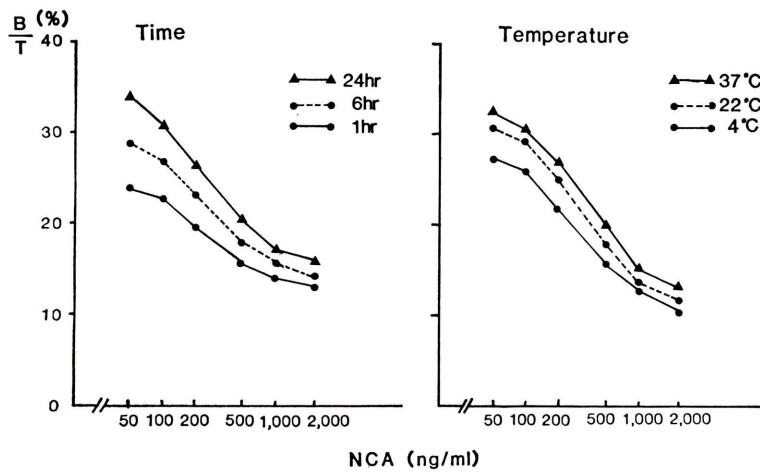


Fig. 5 Effect of incubation time and temperature.

Table 1 Intraassay and interassay reproducibility

Intraassay

	n	mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
A	10	30	5.27	7.4
B	10	83	6.31	7.6
C	10	225	17.75	13.0

Interassay

	n	mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. (%)
D	5	35	4.87	7.7
E	5	88	7.92	9.0
F	5	231	17.03	12.1

7) 希釈試験

比較的高値の濃度の異なる3検体(A:225 ng/ml, B: 190 ng/ml, C: 160 ng/ml)をNRSで2, 4, 8および16倍に希釈して得た希釈曲線は、2倍希釈にて若干の低値を示し、以下ほぼ0点に向かう直線となる結果が得られた(Fig. 6)。

8) 回収試験

濃度の異なる検体50 μ lに、それぞれ標準NCAを0, 25, 35および75 ng/ml加えて、NCA濃度を測定した。得られた回収率は90, 118, 93%であり、平均回収率は100%と良好な結果が得られた(Table 2)。

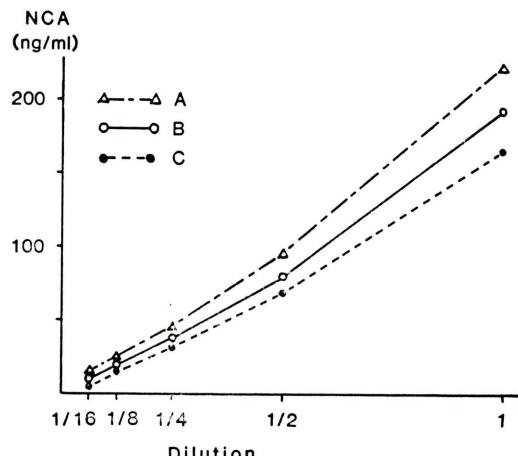


Fig. 6 Dilution test.

9) 添加 γ -グロブリン濃度

1 mg/50 μ lから6 mg/50 μ lまでの添加ウシ γ -グロブリンについて検討したところ、図には示していないが、3 mg/50 μ lでプラトーに達した。ゆえにPEG最終濃度12.5%，ウシ γ -グロブリン4 mg/50 μ lの条件で実験した。

2. 臨床的検討

1) 正常値

39例(男19, 女20)の測定結果は 105 ± 45 ng/ml (mean \pm S.D.)を示したので、正常値を200 ng/ml (mean \pm 2 S.D.)以下とした。

2) 臨床成績

(1) 各種疾患の血中CEA値とNCA値の比較
良性疾患70例、悪性疾患290例のRoche CEAおよびNCAの値をFig. 7に示した。CEAとNCAの良性疾患での陽性率は、それぞれ50%(35/70), 3%(2/70)でNCA陽性率が非常に低く、NCA陽性例は胃炎と脾炎であった。また癌患者の陽性率は、それぞれ肺癌で81%(47/58)と12%(7/58), 胃癌で75%(77/102)と15%(15/102), 脾癌で69%(11/16)と6%(1/16)であり、いずれの場合もCEAの陽性率が高かった。また大腸癌ではCEAは51%(18/35)であるが、NCAは全例陰性であった。癌患者中肝転移例では、CEAは91%(55/60), NCAでも24%(24/60)の陽性率が認められ、NCA 1,000 ng/ml以上を示した症例(肺癌,

Table 2 Recovery test

Added NCA (ng/ml)	Sample A		Sample B		Sample C		Mean recovery (%)
	Measured (ng/ml)	Recovery (%)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)	
0	23		44		85		
25	40	68	70	144	101	104	105
35	60	106	84	114	115	86	102
75	94	95	126	95	151	88	93
Mean recovery (%)	90		118		93		100

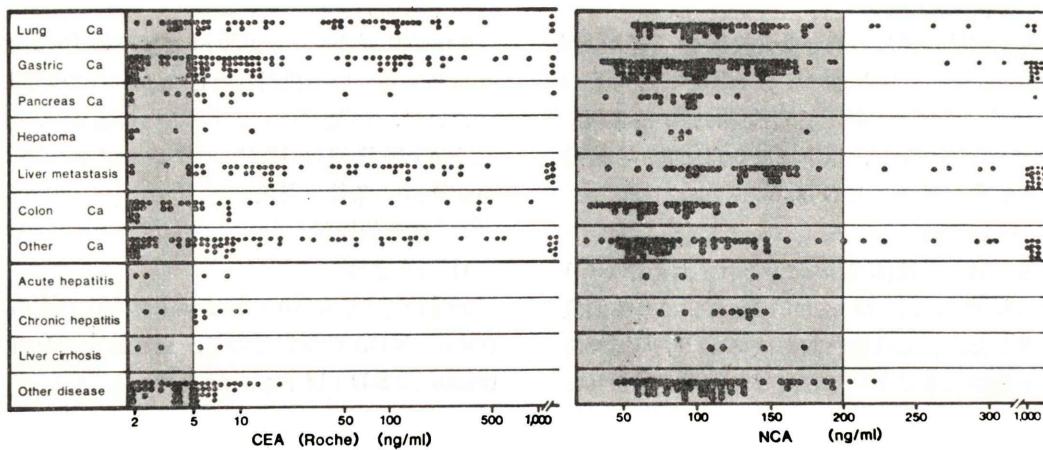


Fig. 7 Plasma CEA and NCA levels in patients with benign diseases and malignant tumors.

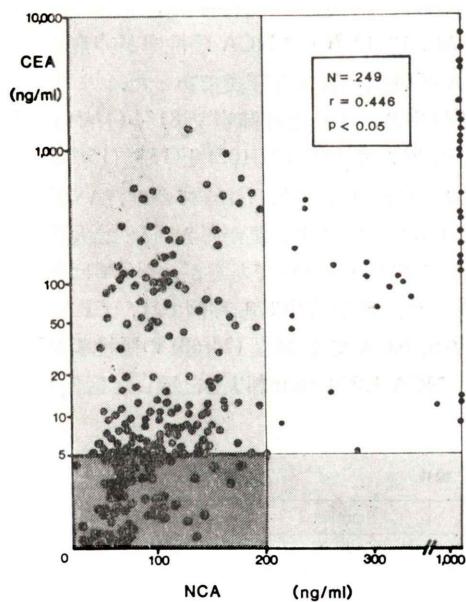


Fig. 8 Comparison for plasma CEA levels and plasma NCA levels in patients with malignant diseases.

胃癌、その他の癌)はほとんど肝転移例であった。

(2) 悪性疾患の CEA 値と NCA 値の相関

悪性疾患 249 例について CEA と NCA の相関を検討すると、相関係数 $r=0.446$ ($p<0.001$) で良好な相関は認められなかった (Fig. 8)。しかし CEA と NCA とも高値例 (CEA 5 ng/ml 以上,

NCA 200 ng/ml 以上) は 52% (129/249) あったが、CEA 低値で NCA 高値例 (CEA 5 ng/ml 以下、NCA 200 ng/ml 以上) は 1 例も認められなかった。

V. 考 察

CEA は臨床的に広く利用されている腫瘍マーカーであり、今回 CEA 関連抗原の 1 つである NCA の RIA 法を確立し、その臨床的有用性を検討した。今回用いた Hammarström から提供された NCA は、すでに報告されているごとく¹⁴⁾、純度も高く、分子量約 6 万の糖蛋白であり、この NCA に対する抗体を作製し、われわれの RIA に供した。

基礎的検討では、CEA 抗体は CEA と、NCA 抗体は NCA とそれぞれ特異的に反応したが、CEA 抗体は NCA とも、一方、NCA 抗体は CEA ともそれ弱い交叉反応を示した。未吸収の NCA 抗体を用いる NCA-RIA 測定系では、CEA の交叉反応は 10.7% であり、NCA 抗体を CEA で吸収操作を行った場合には、交叉反応は約 1.5% と弱く、より NCA に特異的となった。

この吸収抗体を用いて PEG 法を用いる NCA-RIA 法を確立した。この測定法の標準曲線は 50~1,000 ng/ml で測定可能であった。再現性に関しては、同時再現性は C.D. 7.4~13.0%，日差再現

性は 7.7~12.1%といずれも良好な再現性を示し、希釈曲線も 0 点に向かう直線性が得られた。回収試験は平均回収率 100%と安定した回収が得られた。

NCA の臨床的意義の検討においては、現在まで報告されている血中 NCA の正常値は、von Kleist¹³⁾ の 130 ng/ml, Edginton¹⁷⁾ の 105 ng/ml, Newmann¹⁸⁾ の 700 ng/ml, Wahren¹²⁾ の 50 ng/ml と報告者により非常に相違がみられる。この原因の 1 つには、標準抗原の純度の差や抗原の臟器差、また使用抗血清の相違によるものと思われる。測定法の確立された CEA の場合でも、市販 CEA-RIA キットでの単位は、CIS 社は Roche 社の 2~3 倍、Roche 社はダイナボット社の 3~5 倍である。このように各社によって単位が非常に異なっており国際的標準値がないのが現状である。糖含有量の多い糖蛋白に起因するためとも思われるが、CEA 関連抗原の早急な標準化が望まれる。今まで報告された NCA の正常値は、CEA の 5 ng/ml に比べて、いざれも 10~100 倍も高値である。このことは血中に NCA は CEA に比べて比較的多量存在することが示唆される。

良性疾患 70 例を測定すると、同一検体での CEA と NCA の陽性率はそれぞれ 50%, 3% であった。なお NCA で陽性を示したのは脾炎と胃炎の 2 例であった。肝疾患時の NCA 値を検討すると、肝疾患の 18 例とも陰性であり、肝疾患に特異的でないという報告を支持する結果であった¹³⁾。また、NCA は炎症性疾患での上昇がよく認められることが報告されている。von Kleist¹³⁾ は、NCA が豊富に存在する肺において、肺癌での陽性率よりも肺結核症での上昇を認めている。

悪性疾患 290 例の CEA 陽性率は 72% (210/290), NCA は 17% (50/290)、で、肺癌や胃癌、脾癌などいざれも CEA の方が NCA よりも陽性率が高かった。また大腸癌では NCA は全例陰性であった。また、NCA 値が 1,000 ng/ml 以上を示したのは、肺癌や胃癌などいざれも肝転移を有するものがほとんどであった。このように肝転移例のような進行癌では高率かつ高値の NCA 陽性が認められた。

これは NCA が進行癌や癌の原発部位に関係なく、あまり上昇しないという報告¹³⁾ とは異なっていた。また、多核白血球やマクロファージに NCA は存在しているので、慢性骨髓性白血病の blastic crisis のような病態の経過観察の指標として有用であるとの報告¹⁹⁾もあるが、この点に関しては今回検討していない。

悪性疾患での CEA 値と NCA 値の相関は、相関係数 $r=0.446$ ($p<0.001$) であった。

以上の結果は、NCA が CEA ほど臨床的に有用でないという von Kleist¹³⁾, Edginton ら¹⁷⁾の報告と同一の結果である。NCA は、CEA と類似の構造をもっており、それぞれの抗体は交叉反応を示す CEA 関連抗原であるが、CEA ほど有用な腫瘍マーカーでなく、CEA との相関もあまりない。しかし進行癌で CEA 上昇の場合に NCA 上昇をしばしば認めることは興味深い。

VI. 結 語

NCA の RIA 法を作成し、NCA 測定の基礎的検討を行うとともに、これを用いて各種疾患の血漿 NCA を測定し、その臨床的評価ならびに意義を検討した。

1) 今回の NCA-RIA において、CEA は NCA との交叉反応が 10%あり、吸収操作を行って NCA 特異抗体を作製して測定した。

2) 正常人の NCA 値は 105 ± 45 ng/ml (Mean \pm S.D.) で、200 ng/ml 以下を正常値とした。

3) 諸種の悪性疾患で、CEA 陽性率は 72%, NCA 陽性率は 17% であったが、CEA 低値で NCA 高値例は 1 例もなかった。

4) 悪性疾患では、肝転移例で高率かつ高値 (1,000 ng/ml 以上) の陽性例が認められた。

5) 悪性疾患の CEA と NCA の間に、相関係数 $r=0.446$ の相関を認めた。

以上より NCA は CEA ほど有用な腫瘍マーカーではないと考えられた。

文 献

- 1) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor specific antigens in human colon carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* **121**: 439-462, 1965
- 2) Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* **122**: 467-481, 1965
- 3) von Kleist S, Chavanel G, Burtin P: Identification of an antigen from normal human tissue that cross reacts with carcinoembryonic antigen. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**: 2492-2499, 1972
- 4) Mach JP, Pusztaszteri G: Carcinoembryonic antigen (CEA); Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochem* **9**: 1031-1034, 1972
- 5) Darcy DA, Turberville C, James R: Immunological study of carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein. *Br J Cancer* **28**: 147-160, 1973
- 6) Turberville C, Darcy DA, Laurence DJR: Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein CCEA-2, Preparation and chemical characterization. *Immunochemistry* **10**: 841-843, 1973
- 7) Newman ES, Petras SE, Georgiadis A: Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen III. *Cancer Res* **34**: 2125-2130, 1974
- 8) Orjasaeter H: Demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA), non-specific cross-reacting antigens (NCA), and an associated alpha protein in normal human tissues and fluids by immunodiffusion technique. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* **82**: 387-395, 1974
- 9) Kessler MJ, Shively JE, Pitchard DG: Isolation, immunological characterization, and structural studies of a tumor antigen related to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **38**: 1041-1048, 1978
- 10) Krop-Watorek A, Sedlaczek P, Lisowska E: The subunit structure of non-specific cross-reacting antigen (NCA). *Mol Immun* **20**: 775-785, 1983
- 11) Engvall E, Shively JE, Wrann M: Isolation and characterization of the normal cross reacting antigen: Homology of its NH₂-terminal amino acid sequence with that of carcinoembryonic antigen. *Proc Nat Acad Sci USA* **75**: 1670-1674, 1978
- 12) Wahren B, Gahrton G, Hammarström S: Non-specific cross-reacting antigen in normal and leukemic myeloid cells and serum of leukemic patients. *Cancer Res* **40**: 2039-2044, 1980
- 13) von Kleist S, Troupel S, King M, et al: A clinical comparison between non-specific cross-reacting antigen and CEA in patient's sera. *Br J Cancer* **35**: 875-880, 1977
- 14) Hammarström S, Svenberg T, Heiden A: Antigens related to CEA. *Scand J Immunol Suppl* **6**: 33-46, 1978
- 15) Bolton AE, Hanter WM: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acetylating agent. *Biochem J* **133**: 529-539, 1973
- 16) Ochi Y, Ura Y, Hamazu M: Immunochemical identification of an α_1 -acid glycoprotein-antigenic determination carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific cross-reacting antigen (NCA). *Clin Chem Acta* **138**: 9-19, 1984
- 17) Edgington TS, Plow EF, Go W, et al: A comparison of CEA-S and CEA concentrations in sera and the independence of CEA-S, NCA and blood group antigens. *Bulletin du Cancer* **63**: 613-626, 1976
- 18) Newman ES, Petras SE, Georgiadis A, et al: Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen-III. *Cancer Res* **34**: 2125-2130, 1974
- 19) Frenoy N, Bartin P: Non-specific cross-reacting antigen serum concentration in myeloid leukemias. *Clin Chem Acta* **103**: 22-31, 1980

Summary

Fundamental and Clinical Evaluation of Radioimmunoassay (RIA) for Non-specific Cross-reacting Antigen (NCA)

Yasuaki URA*, Yukio OCHI*, Masanari HAMAZU**, Masao ISHIDA***,
Yoshihiro KAJITA*** and Yoshiyuki NAKAJIMA***

*Central Clinical Laboratory, **Department of Radiology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga
***Nantan General Hospital, Yagi, Kyoto

NCA-RIA by PEG (polyethyleneglycol) method was established using purified NCA and the specific antibody for NCA. NCA preparation (Mr; 60,000) purified from colon cancer and anti-NCA absorbed with the purified CEA preparation were used. CEA was determined by Roche CEA-RIA kit. Plasma NCA value of 39 normal subjects was 105 ± 45 ng/ml (mean \pm S.D.), and normal range was under 200 ng/ml. Positive ratio of CEA and NCA was 50% and 3% respectively in benign diseases (70 cases), and 72% and 17% respectively

in malignant diseases (290 cases). Many cases of malignant diseases with liver metastasis showed high NCA levels ($>1,000$ ng/ml). A correlation coefficient of $r=0.446$ was noted between CEA and NCA in cancer patients.

NCA was less useful than CEA as tumor marker, although some cases among cancer patients showed increased NCA accompanied by increased CEA.

Key words: CEA-, NCA-Radioimmunoassay, Tumor marker.