

## 《ノート》

## IRMA 法による TPA 測定キットの基礎的および臨床的検討

## Fundamental and Clinical Evaluation of a TPA Immunoradiometric Assay Kit

木村 良子\* 武智 知子\* 阿多まり子\* 宮川 直子\*  
 藤井 崇\* 飯尾 篤\* 浜本 研\*

Yoshiko KIMURA, Tomoko TAKECHI, Mariko ATA, Naoko MIYAKAWA,  
 Takashi FUJII, Atsushi IIO and Ken HAMAMOTO

Department of Radiology, Ehime University School of Medicine

## I. はじめに

近年、免疫学の目覚ましい進歩とともに各種腫瘍マーカーの測定法が開発され、臨床に応用されている。Tissue polypeptide antigen (TPA) は 1957 年, Björklund ら<sup>1)</sup>が、多種類のヒト癌組織混合ホモジェネートより抽出した蛋白抗原で、原発部位に関係なく各種悪性腫瘍患者において血清レベルの上昇がみられると報告されている<sup>2,3)</sup>。抗原の精製が複雑なため、臨床応用されたのは比較的最近のことであり、主として、ヒト子宮癌細胞株 HeLa 細胞をウマに免疫して得られた抗血清を用いた二抗体法 RIA キットで測定されてきたが、最近、精製抗体を用いた immunoradiometric assay (IRMA) 法キットが開発された。今回、これを使用する機会を得、検討を加えたので、ここに報告する。

## II. 方法と対象

1. 測定方法 TPA-IRMA キットは、第一ラジオアイソトープ研究所より供与をうけた。この

キットに使用されている抗体は、精製 TPA をウマに免疫して得た抗血清を、さらに affinity chromatography にて精製した特異的抗体である。測定原理は、固相化した抗体と <sup>125</sup>I 標識抗体によるサンドウィッチ法であり、以下に操作手順の概略を示す。

1. 0~2,000 U/l の標準液、管理血清溶液および被検血清 100  $\mu$ l ずつ分注。
2. 希釈試薬 100  $\mu$ l ずつを分注。
3. 抗体ビーズ試薬を加える。
4. 室温 (15~30°C) で 4 時間ローテートまたは振盪。
5. 反応液除去、生理食塩水 2 ml で 2 回洗浄。
6. トレーサー試薬 200  $\mu$ l ずつ分注。
7. 室温 17~20 時間ローテートまたは静置。
8. 反応液除去、生理食塩水 2 ml で 2 回洗浄。
9. ビーズの放射能を測定。
10. 標準液測定値より標準曲線を作成。被検検体の測定値より濃度を算定する。

従来法による TPA の測定は、第一ラジオアイソトープ研究所のプロリフィゲン TPA “第一” キットを使用した。

2. 対象 1987 年 1 月~10 月の間に当院中央放射線部 RI 検査室で取り扱った血清サンプルより、病理学的に、また、肝細胞癌においては臨床

\* 愛媛大学医学部放射線科

受付：63 年 3 月 17 日

最終稿受付：63 年 5 月 9 日

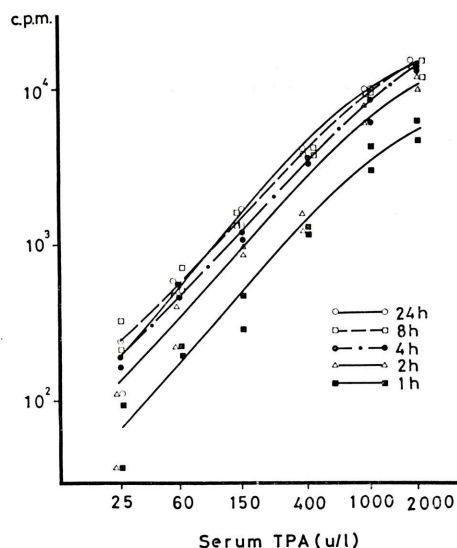
別刷請求先：愛媛県温泉郡重信町大字志津川

(☎ 791-02)

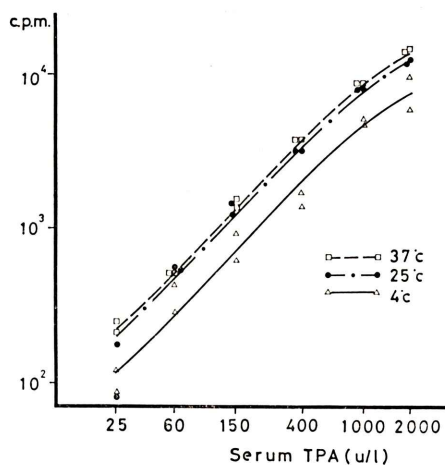
愛媛大学医学部放射線科

木村 良子

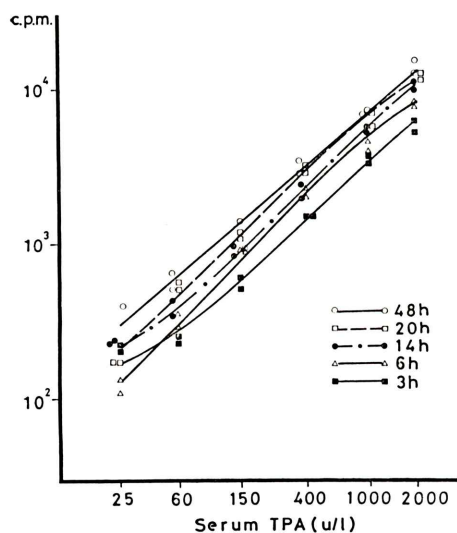
Key words: TPA, IRMA, Tumor marker.



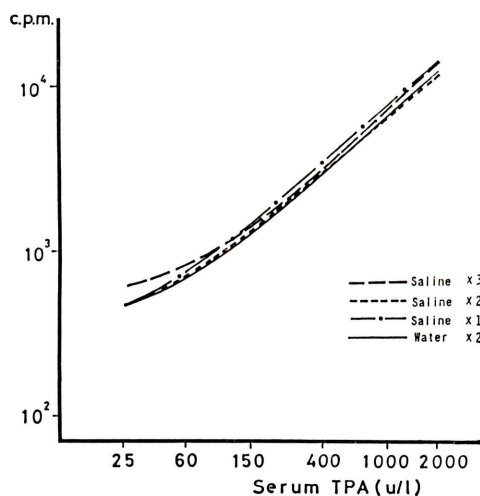
a. First incubation time



c. Incubation temperature



b. Second incubation time



d. Washing times

Fig. 1 The effects of various assay procedure conditions on measured counts.

的に診断の確定した悪性腫瘍例 159 例, 良性疾患例 47 例を抽出し検討した。また, 正常値の設定のため, 当院健常職員 116 人 (男性 64 人, 女性 54 人) より得た血清サンプルについても検討した。

### III. 結 果

#### 1. 基礎的検討

Figure 1 に示すごとく, 至適測定条件は, 第 1 インキュベーション 4 時間以上, 第 2 インキュベーション 14 時間以上 (Fig. 1a, b), インキュベ

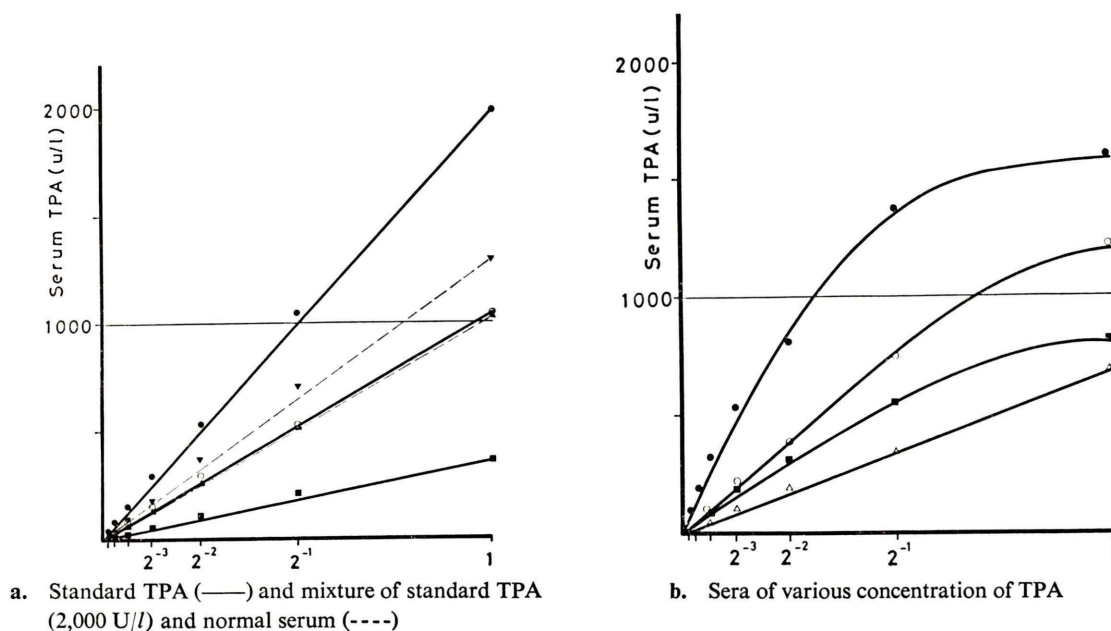


Fig. 2 Dilution test. Samples were diluted with the diluent (phosphate buffer) of the kit.

Table 1 Intra- and Inter-assay reproducibility

	Intra-assay reproducibility			Inter-assay reproducibility		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 4	sample 5	sample 6
	90.0*	275.0	740.0	95.0	315.0	815.0
	78.5	267.5	690.0	92.5	282.5	
	82.0	250.0	700.0	89.0	287.5	715.0
	82.5	265.0	710.0	82.0	290.0	700.0
	95.0	270.0	730.0	89.0	277.5	745.0
	90.0	247.5	645.0	90.0	275.0	740.0
	87.5	260.0	715.0	76.0	250.0	785.0
	92.0	255.0	645.0	79.0	242.5	740.0
	90.5	265.0	680.0	84.5	277.5	785.0
	94.5	247.5	705.0	91.0	265.0	725.0
				79.0	305.0	840.0
mean	88.3	260.3	696.0	86.1	278.9	759.0
SD	5.6	9.4	32.0	6.3	21.4	45.4
CV	6.3**	3.8	4.6	7.3	7.7	6.0

\* U/l \*\* %

ション温度室温ないし 37°C (Fig. 1c), 各洗浄回数 1 回以上 (Fig. 1d) であった。なお, 洗浄液は生理食塩水と蒸留水で差がなかった。

標準液希釈で求めた最小測定感度は 12 U/l と考えられたが, 通常の操作手順ではこの濃度域で

のバラツキが大きく, これを少なくするためには希釈液を用いず 200  $\mu$ l の試料で測定する必要があり, 以後の検討では 25 U/l を最小測定値とした。

標準液希釈試験では, 2,000 U/l 濃度のものま

Table 2 Recovery test

Added TPA (U/l)	Measured (U/l)	Recovered (U/l)	Recovery (%)
Exp. 1	35.0		
30.0	60.0	25.0	83.3
75.0	110.0	75.0	100.0
200.0	210.0	175.0	87.5
500.0	485.0	450.0	90.0
Exp. 2	33.5		
30.0	58.0	24.5	81.6
75.0	97.5	64.0	85.3
200.0	202.5	169.0	84.5
500.0	505.0	471.5	94.2
Exp. 3	116.0		
75.0	181.5	65.5	87.3
200.0	305.0	189.0	94.5
500.0	615.0	499.0	99.8

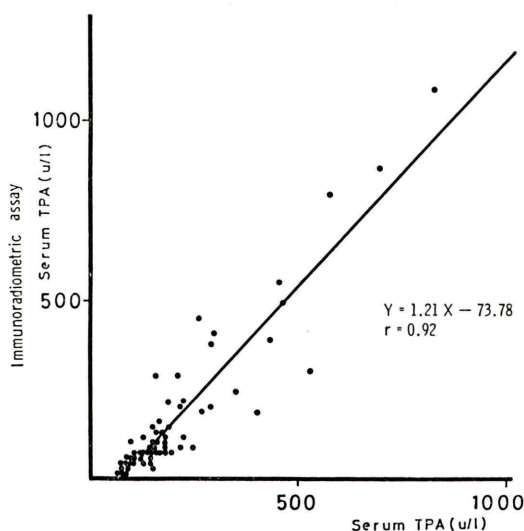


Fig. 3 Correlation between TPA assayed by immunoradiometric assay and that assayed by indirect radioimmunoassay.

で、原点を通るきれいな直線上にのった。また 2,000 U/l の標準液と TPA 濃度 25 U/l 以下の正常人血清を混合した混合液の希釈も原点を通る直線上にのったが (Fig. 2a), 各種被検血清を希釈した場合, 800 U/l 以上の濃度の血清では, 希釈曲線が直線上にのらない現象がみられた (Fig. 2b).

それぞれ 10 回測定した, 同時再現性は CV

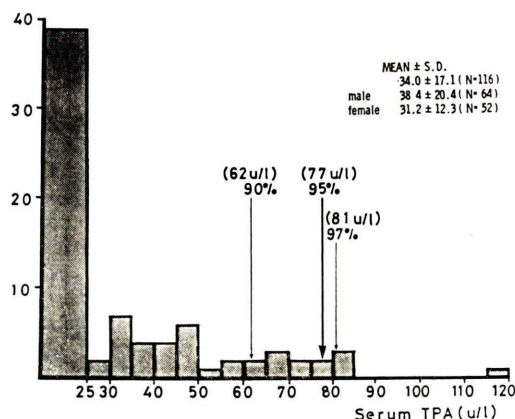


Fig. 4 Distribution of serum TPA among normal subjects.

3.8~6.3%, 日差再現性は CV 6.0~7.7% (Table 1), 被検血清に標準液を加えて測定した回収率は 81.6~100% (Table 2) と良好な結果が得られた。

Figure 3 に, 横軸に従来法, 縦軸に IRMA 法での測定値をプロットした.  $y = 1.21x - 73.78$ ,  $r = 0.92$  と良い相関を示した。

## 2. 正常人における TPA 値

健康人 116 名における TPA 値の分布は 119 U/l 以下に分布し (Fig. 4), 95% が 77 U/l 以下, 97.5% が 81 U/l 以下であった。性別では, 男性で若干高い傾向がみられ, また, 年齢が高くなるにつれて TPA 値が高くなる傾向がみられた。

## 3. 各種悪性腫瘍疾患での TPA 値

各種悪性腫瘍患者血清中の TPA 値の分布を, Fig. 5, Table 3 に示す。消化器癌, 肺癌, 婦人科系悪性腫瘍等, さまざまな悪性腫瘍疾患で TPA 値の上昇が見られ, 77 U/l をカットオフ値とした場合, 上皮性腫瘍では 40.0~94.1%, 悪性リンパ腫では 33.3% の陽性率であった。しかし, 良性疾患でも 42.6% と偽陽性率が高かった。カットオフ値を 1987 年大阪での TPA 研究会で設定された 110 U/l で評価すると, 上皮性悪性腫瘍での陽性率は 40.0~82.4%, 良性疾患での陽性率は 23.4% であった。早期癌の TPA 値はほとんどは 110 U/l 以下にとどまった。良性疾患で TPA 値 110 U/l 以上となった症例は, 肝硬変, 胸膜炎,



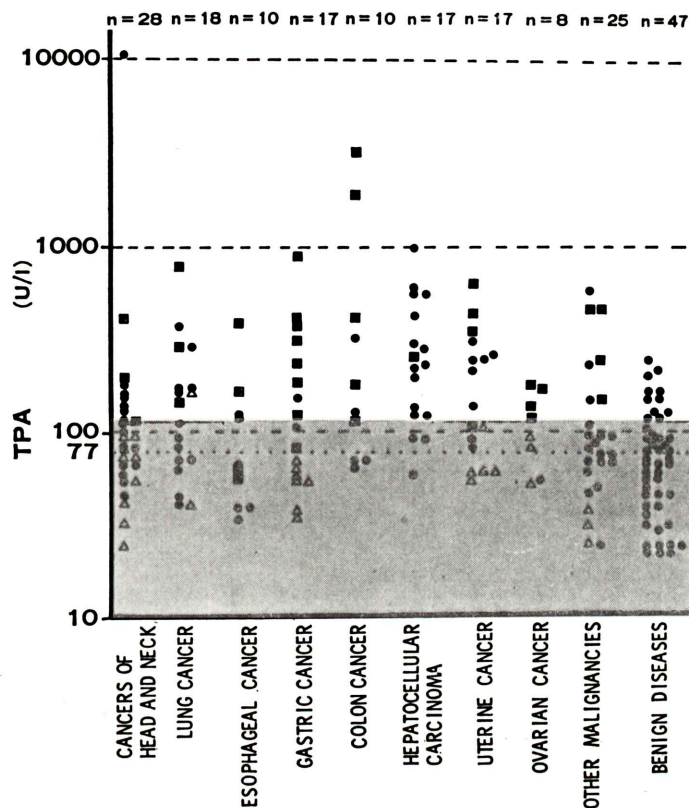


Fig. 5 Serum TPA levels in various diseases. Shadow indicates the normal range (cut off value 110 U/l).

△ cases with early stage  
 ■ cases with metastases

Table 3 Positivity of serum TPA in various malignant and benign diseases

Disease	Cases	Cut off value	
		77 U/l	110 U/l
Malignancy	159	101 (63.5%)	74 (46.5%)
Lung cancer	18	12 (66.7%)	10 (55.6%)
Esophageal cancer	10	4 (40.0%)	4 (40.0%)
Gastric cancer	17	10 (58.8%)	8 (47.1%)
Colon cancer	10	7 (70.0%)	6 (60.0%)
Hepatocellular carcinoma	17	16 (94.1%)	14 (82.4%)
Cancer of head and neck	28	17 (60.7%)	11 (39.3%)
Uterine cancer	17	13 (76.5%)	9 (52.9%)
Ovarian cancer	8	6 (75.0%)	4 (50.0%)
Malignant lymphoma	9	3 (33.3%)	2 (22.2%)
Others	25	13 (52.0%)	7 (28.0%)
Benign diseases	47	20 (42.6%)	11 (23.4%)

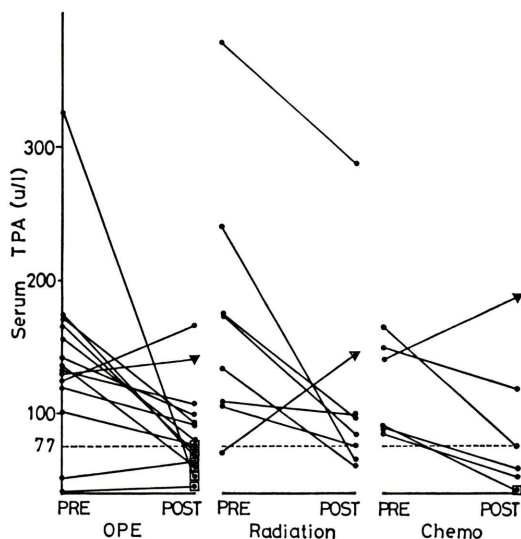


Fig. 6 Effects of treatments on serum TPA levels.

- cases of absolute curative operation or complete remission
- ▼ cases whose diseases progressed during treatment

食道炎, 皮膚筋炎, 光線性類細網症, 進行性球麻痺, 腎不全例であった。特に, 胸膜炎は 3 例中 3 例が TPA 陽性となった。

#### 4. 臨床経過との比較

Figure 6 に示すように, TPA 値は治療とともに低下した。特に, 根治手術のなされた症例では, 術後肺炎を起こした 1 例を除いては, 全例 TPA 値が 77 U/l 以下になった。放射線治療や化学療法でも, 治療効果と比例して TPA 値の改善がみられた。

次に, 臨床経過を反映する TPA 値の変動を示した 2 症例を Fig. 7 で示す。症例 1 は 61 歳女性, 卵巣癌, serous cystadenoma の症例である。手術時, 腹膜播種が認められ腹腔内にスポット状に腫瘍が残存したため, 術後化学療法が施行された。血中 TPA, CA 125 とともに術前高値を示した。術後低下傾向を認めたが正常化しなかった。しかし, 化学療法施行後, 血中 TPA, CA 125 とともに正常化し, 63 年 1 月現在再発をみていない。

症例 2 は 54 歳女性, 卵巣癌, dermoidcyst with malignant transformation の症例である。根治手

術後 3 か月して腹壁に再発した。術前血中 TPA, SCC, CA 19-9, CA 125 とともに高値であった。術後いずれもカットオフ値以下となったが, 3 か月後腹壁への再発とともに, 血中 TPA, SCC の上昇を認めた。血中 CA 125, CA 19-9 は, 再発時上昇しなかった。

#### IV. 考 察

TPA は, 初期には, 腫瘍細胞に対する細胞障害試験や, 抗体に対する競合反応を利用した赤血球凝集阻止試験により測定されていたが<sup>4,5)</sup>, 操作が煩雑であったり鋭敏性にかけるなどの問題点があり, 臨床応用されるようになったのは 1981 年二抗体法 RIA が導入されてからである。しかし, RIA も 3 日間の時間が必要で, 測定結果が繁雑な操作に左右されやすいという欠点を有していた。近年新たに, 精製特異抗体をビーズに固相化した, IRMA 法キットが開発された。

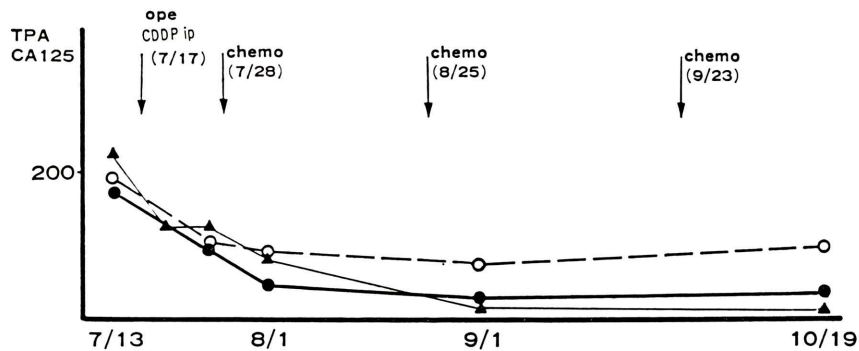
今回のわれわれの検討では, インキュベーション時間は 18 時間と, 二抗体法の約半分以下に短縮可能で, 室温操作でも安定した結果が得られた。非結合物を抗原抗体複合物より分離除去するために, 二抗体法では 4°C, 30 分の遠心を 2 回必要とし, 遠心前後の混和, 吸引操作は煩雑で測定結果に影響を与えた。IRMA 法ではこれら操作を必要とせず, ビーズ洗浄時間も比較的短く, 操作も簡便となった。

標準液による希釈試験では原点を通る直線が得られ, 2,000 U/l 濃度までの TPA 抗原はプロゾーン現象なしに測定しうることが示された。しかし患者血清では, 800 U/l 以上の血清で希釈検定線は直線上にのらず, 単に抗原過剰による阻害だけでなく, 患者血清中に反応系に干渉する物質の存在することが示唆された。

日差再現性, 同時再現性, 回収率は, それぞれ良好な結果が得られ, キットの信頼性は満足するものであった。

従来二抗体法による測定値との相関は,  $r=0.92$  と良好で, 350 U/l を境にして, これより高

## Case 1. 61yr ♀ Ovarian Cancer



## Case 2. 54yr ♀ Ovarian Cancer

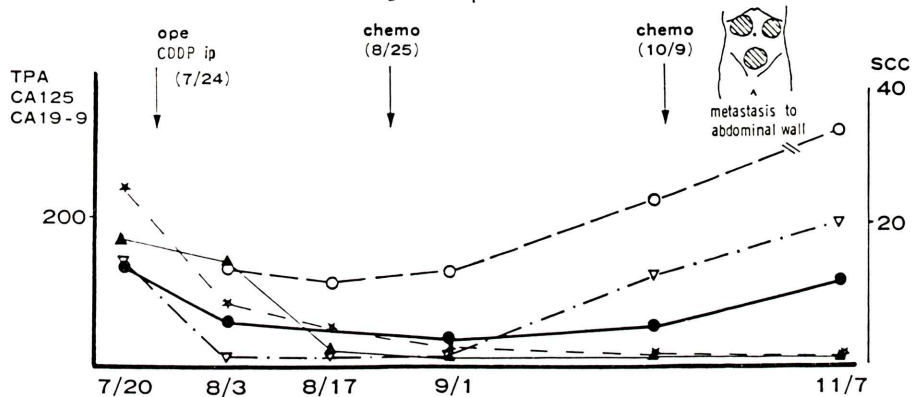


Fig. 7 Clinical courses and serum TPA levels.

●—● TPA assayed by IRMA; ○—○ TPA assayed by RIA;  
 ▲—▲ CA 125; ★—★ CA 19-9; ▽—▽ SCC

値では IRMA 法が、これより低値では二抗体法での測定値が高くなる傾向にあった。これは正常人の血清レベルにも反映され、二抗体法での当院のカットオフ値が 180 U/l であったのが、同じ条件でカットオフ値を設定すると 77 U/l となった。しかし、この場合、良性疾患での偽陽性率が高くなり、腫瘍マーカーとしての特異性にかけるため、110 U/l をカットオフ値とした。二抗体法での従来の報告では、年齢、性差による若干の変動を認めている<sup>6)</sup>が、この傾向は、IRMA 法においても同様であった。

159 例の悪性腫瘍症例では、特に上皮性腫瘍で高い陽性率を示し、造血器悪性腫瘍、肉腫では陽性率は低かった。また、早期症例では、ほとんど

の症例でカットオフ値以下となり、早期癌のスクリーニングには有用でない成績であった。逆に、TPA 高値例は広汎な転移を有する症例が多く、特に肝転移のある症例で顕著であった。

治療前 TPA 高値を示した症例では、治療後の TPA 値は、治療後の腫瘍量を比較的良好に反映し低下し、治療効果を判定する上で有用であると思われる。放射線治療開始直後では、むしろ TPA 値の一過性の上昇がみられたが、これは腫瘍の崩壊によるものと考えられる。臨床経過ともよく一致し、他の腫瘍マーカーとの組み合わせにより、再発の発見にも有用なマーカーとなりうることを示唆された。

## V. 結 語

- 1) IRMA 法 TPA 測定キットにより, 測定時間の短縮と, 簡便化が得られた.
- 2) 25 U/l~2,000 U/l 濃度までのサンプル測定時の誤差は小さく, 再現性試験, 回収率ともに良好であった.
- 3) 800 U/l 濃度以上の患者血清中に, 測定系に干渉する物質の存在が示唆された.
- 4) 上皮性悪性腫瘍では陽性率が高く, 特に進行例で高値であった.
- 5) 治療前に高値であった TPA 値は, 臨床経過を比較的良好に反映し, 治療経過を追う上で有用なマーカーと思われた.

## 文 献

- 1) Björklund B, Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. Presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. *Int Arch Allergy Appl Immun* 10: 153-184, 1957
- 2) 高橋 弘, 出浦正倫, 亀田治男: 組織ポリペプチド抗原 (TPA). *日本臨床* 43 (秋期臨時増刊号): 450-454, 1985
- 3) 渡辺直樹: 腫瘍マーカーマニュアル, 第1版, 漆崎一郎編, ライフ・サイエンス社, 東京, 1987, p. 30
- 4) Björklund B, Lundblad G, Björklund V: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. II. Nature of tumor antigen. *Int Arch Allergy Appl Immun* 12: 241-261, 1958
- 5) Björklund B, Paulsson JE: Studies of hemagglutination as a means for assay of malignant and normal tissue antigens. *J Immunol* 89: 759-766, 1962
- 6) 鳥塚莞爾: TPA 研究会論文集, 第1版, 第一ラジオアイソトープ研究所編, 東京, 1985, p. 1