

《ノート》

新しい膵癌関連抗原 SPan-1 測定キット “SPan-1 RIABEAD” の基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Studies on SPan-1 RIABEAD Kit: Usefulness in Patients
with Pancreatic and Biliary Tract Cancer

渡辺 祐司* 遠藤 啓吾* 中島 言子* 服部 典子*
阪原 晴海* 佐賀 恒夫* 中井 敏晴* 細野 真*
姚 正生* 馬場 信雄** 大塩 学而** 真辺 忠夫**
戸部 隆吉** 小西 淳二*

Yuji WATANABE*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Noriko HATTORI*,
Harumi SAKAHARA*, Tsuneo SAGA*, Toshiharu NAKAI*, Makoto HOSONO*,
Zheng-Sheng YAO*, Nobuo BABA**, Gakuji OHSHIO**,
Tadao MANABE**, Takayoshi TOBE** and Junji KONISHI*

*Department of Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

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

I. はじめに

モノクローナル抗体の手技の確立により腫瘍関連抗原の解析は急速な進歩をとげ、CA 19-9, CA 125 など臨床的に有用な腫瘍マーカーが次々に開発されている¹⁻⁴⁾。SPan-1 抗原は 1985 年鄭らによりヒト膵癌細胞株 SW1990 を免疫して作製されたマウスモノクローナル抗体 SPan-1 が認識する腫瘍関連抗原で、末端にシアル酸を有する糖鎖がその抗原決定基であると考えられている^{5,6)}。

この SPan-1 抗原は高分子ムチン様糖蛋白質で、膵癌をはじめとする消化器悪性腫瘍に幅広く分布し、膵臓癌の腫瘍マーカーとして臨床的にその有用性が注目されるようになった。

今回ダイナボット社製 SPan-1 測定キット “SPan-1 RIABEAD” の提供をうけ、基礎的ならびに臨床的な検討を行ったのでその結果を報告する。

II. 対象および方法

1. 測定原理

本キットは I-125 標識抗体と、抗体をビーズに固相化した固相法による Two-Step 法イムノラジオメトリックアッセイ (IRMA) に基づき測定する。固相化抗体、I-125 標識抗体はともに SPan-1 抗体が用いられている。

2. 測定方法

測定は本キット添付の指示書に従ったが、その概略は以下のとおりである。

1) 標準抗原液または血清 25 μ l と、緩衝液 200 μ l と、SPan-1 抗体を固相化したビーズ 1 個をチューブに入れる。

Key words: SPan-1, CA 19-9, Pancreatic cancer, Biliary tract cancer, Cancer marker.

* 京都大学医学部放射線核医学科

** 同 第一外科

受付：元年 7 月 24 日

最終稿受付：元年 9 月 8 日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部放射線核医学科

渡辺 祐司

2) よく振盪し、37°Cで1時間インキュベートを行う。

3) 反応液を吸引除去し、生理食塩水 1 ml で2回洗浄する。

4) I-125 標識 SPan-1 抗体 200 μ l を加え、37°Cで2時間インキュベートする。

5) 生理食塩水 1 ml を加えた後、反応液を吸引除去し、さらに生理食塩水 1 ml で2回洗浄する。

6) ビーズの放射能を測定し、各測定値からバックグラウンドを引いた値を求める。標準液のカウント数 (cpm) を縦軸に、濃度 (U/ml) を横軸にとり、標準検量線を得、検体のカウント数より、SPan-1 抗原濃度を読み取る。標準液として 0, 10, 30, 100, 300, 1,000 U/ml が添付されている。

なおルイス式血液型は患者赤血球を用いて、指示書に従って凝集反応により測定した (国際試薬, 神戸)。

3. 基礎的検討

測定の精度、再現性、回収試験、希釈試験につき検討した。

4. 臨床的検討

本院にて、手術により診断の確定した悪性腫瘍症例 242 例、手術および各種臨床検査で診断された良性疾患症例 135 例、および健常成人 78 例の計 455 例を対象とした。

悪性腫瘍症例の内訳は、胃癌46例、大腸癌42例、肺癌54例、胆道系悪性腫瘍31例、食道癌21例、肝細胞癌48例である。良性疾患症例の内訳は、胆石症71例、肝硬変症23例、慢性膵炎9例、炎症性腸疾患13例、良性肝腫瘍6例、慢性腎不全13例である。

またこれら全疾患に対し、SPan-1 と CA 19-9 との相関について検討し、さらに肺癌、胆道系癌ではルイス式血液型別による SPan-1 と CA 19-9 との比較検討もあわせて行った。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

標準 SPan-1 抗原溶液を用いて作成した標準曲

線は、0~1,000 U/ml の間でほぼ良好な直線が得られた。

7回の測定における標準曲線の変動係数 (標準偏差/平均値) は、10, 30 U/ml でそれぞれ 12.8% と 11.2% と低濃度域で若干大きいものの、100, 300, 1,000 U/ml ではそれぞれ 5.2, 6.7, 6.7% と良好な再現性が得られた (Fig. 1)。

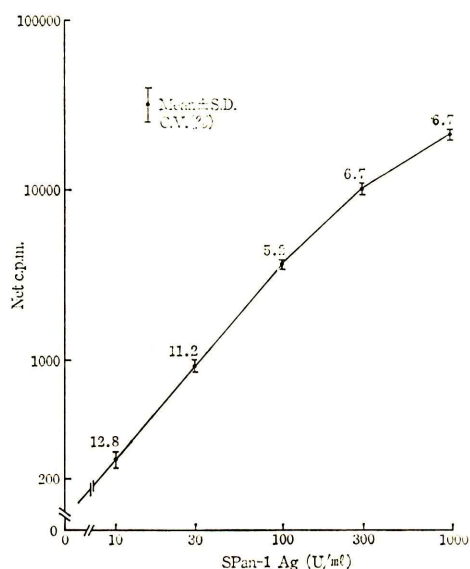


Fig. 1 Standard curve of the assay. Vertical bars represent mean \pm S.D. of 7 assays.

Table 1 Intra-assay reproducibility

Sample	n	Mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
1	10	24.5	0.8	3.4
2	10	101.1	4.0	4.2
3	10	211.2	11.8	5.9
4	10	315.5	16.0	5.3

Table 2 Inter-assay reproducibility

Sample	n	Mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
1	10	24	1.3	5.6
2	10	101.6	4.2	4.3
3	10	210.5	10.9	5.5
4	10	318.5	17.8	5.9

Table 3 Recovery test

Sample		Added Span-1 (U/ml)			
		0	50	150	500
A	Measured (U/ml)	4	48	150	502
	Recovery (%)	—	89	97	100
B	Measured (U/ml)	22	62	173	532
	Recovery (%)	—	86	100	102
C	Measured (U/ml)	25	77	178	531
	Recovery (%)	—	102	102	101
D	Measured (U/ml)	29	77	173	517
	Recovery (%)	—	97	97	98
E	Measured (U/ml)	46	96	195	545
	Recovery (%)	—	100	99	100

2) 血清 SPan-1 濃度測定の変異性

SPan-1 濃度の異なる 4 検体を用いて、同一測定内で 10 回、異なる測定間で 10 回測定した。それぞれの変動係数は同一測定内では 3.4~5.9%，異なる測定間でも 4.3~5.9% といずれも良好な測定値の再現性が得られた (Tables 1, 2).

3) 回收試験

5種類の異なる検体に、キット添付の標準液を等量混合して SPan-1 濃度を測定し、その回収率を求めた。回収率はいずれも 86% から 102%, 平均 98% と満足できる結果であった (Table 3).

4) 希釈試験

濃度の異なる3種類の患者血清を、キット添付

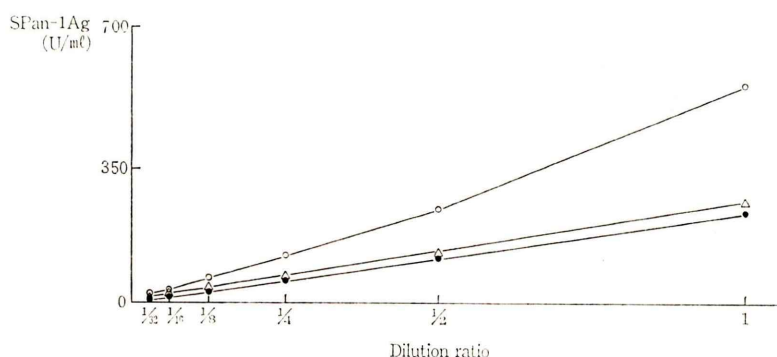

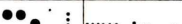
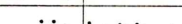

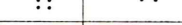




Fig. 2 Dilution test.

Diseases	n	SPan-1 Ag (U/ml)	Positive rate (%)
		28 100 1000 //	
Healthy controls	78		1.3
Cholecysto-choledocholithiasis	71		22.5
Liver cirrhosis	23		78.3
Chronic pancreatitis	9		33.3
Inflammatory bowel dis.	13		23.1
Benign liver tumor	6		0
Chronic renal failure	13		23.1

● : n=10

Fig. 3 Serum SPan-1 levels in normal healthy controls and patients with various benign diseases.

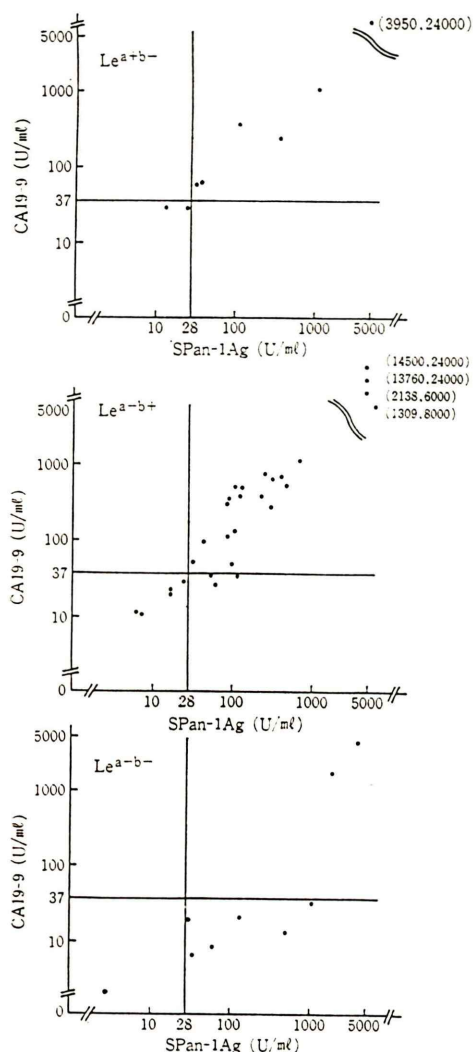


Fig. 6 Relationships between serum SPan-1 and CA 19-9 levels and Lewis blood phenotype in patients with pancreatic or biliary tract cancer.

CA 19-9 は血液型物質であることが知られており、膵癌25例、胆道系癌21例を対象に赤血球のルイス式血液型と、血清 SPan-1 濃度および、CA 19-9 濃度との関係をみた (Fig. 6).

血液型がルイス (a+b-) 型、ルイス (a-b+) 型の 37 症例では、SPan-1 と CA 19-9 は良好な正の相関が認められ、かつ陽性率が70%以上とほぼ同等であった。これに対しルイス (a-b-) 型の

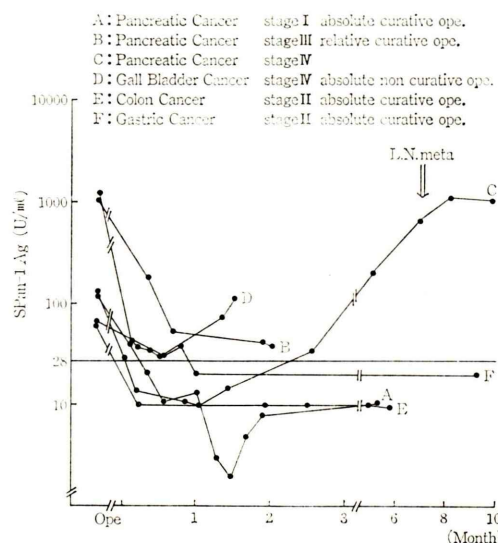


Fig. 7 Serial determination of serum SPan-1 levels after surgery in patients with pancreatic (A: stage I, B: stages III, C: stage IV), gall bladder (D: stage IV), colon (E: stage II) or gastric cancer (F: stage II).

9 症例では、SPan-1, CA 19-9 がともに陽性例、陰性例、および SPan-1 陽性、CA 19-9 陰性例が見られたのに対し、SPan-1 陰性、CA 19-9 陽性例は認められなかった。

5) 治療前後の血清 SPan-1 濃度の変動

膵癌、胆道系癌、大腸癌、胃癌の代表例について、手術前後の血清 SPan-1 濃度の変化を Fig. 7 に示す。膵癌 (I 期・III 期・IV 期)、胆のう癌 (IV 期)、大腸癌 (II 期)、胃癌 (II 期) では、いずれも手術後の血清 SPan-1 濃度は速やかに低下した。これに対し、膵癌 IV 期の症例 (Fig. 7C) では、リンパ節転移による腫瘍の再発とともに血中 SPan-1 濃度も再上昇した。

IV. 考 察

SPan-1 抗体は高分子ムチン様糖蛋白質を抗原として認識し、抗原決定基はシアル酸を含む糖鎖であると考えられている⁵⁻⁷⁾。

SPan-1 抗原測定用キットには I-125 標識抗体・固相化抗体ともに、この SPan-1 抗体が用いられ、

ビーズ固相法による Two-Step 法 IRMA の原理に基づく。今回の検討で, SPan-1 RIABEAD キットによる測定値の再現性, 回収率, および希釈試験は良好な結果で, 血清 SPan-1 測定の基礎的検討は満足すべきものと考えられた。

本キットを用いて測定した健常成人78例の血清 SPan-1 濃度は 8.94 ± 6.23 U/ml (平均値 \pm 標準偏差) で, 平均値 $+3$ 標準偏差より 28 U/ml を正常上限と設定した。このカットオフ値は, 梅山ら⁸⁾ の提唱する参考値 30 U/ml よりも若干低値であるが, ほぼ同等の値と考えられた。

カットオフ値を 28 U/ml としたとき, 各種良性疾患でも少数例で偽陽性を示す症例がみられた。従来, 腫瘍マーカーが偽陽性を示すことが多いとされている肝, 腎疾患を対象として主に検討したが, 血中 SPan-1 濃度も肝硬変や胆石症で偽陽性を示す例がみられ, これは現在臨床的に利用されている腫瘍マーカーと共通の問題点と思われた。ただ今回の検討では, これら良性疾患での偽陽性の多くは 100 U/ml 以下と比較的軽度の上昇であった。また, 肝細胞癌でも 83.3%と高率に陽性を示したが, 合併した肝硬変の病態を反映したものとおもわれる。

消化器系悪性腫瘍では, SPan-1 抗原は膵癌 (83.3%), 胆道系癌 (67.7%) で高率に陽性を示し, 手術により血清 SPan-1 濃度は急速に低下し, 再発に伴い再上昇した。

免疫組織染色法による検討で, SPan-1 抗原は膵癌をはじめとして消化器系癌に高頻度に存在し, 正常膵, 腎尿細管, 胆管上皮, 気管支上皮などの正常組織にもわずかに発現していることが明らかにされている¹⁰⁾。このため, SPan-1 抗体を用いて測定される血清中の SPan-1 抗原濃度が, 膵癌・胆道系癌・大腸癌などの消化器系癌で上昇していたことは, SPan-1 抗原の組織分布を反映したものとして解釈される。

血中 SPan-1 濃度は CA 19-9 濃度との間に正相関が認められたが, 膵癌での陽性率は従来の CA 19-9 の陽性率 (80%) を若干上回るものであった。CA 19-9 がルイス式血液型の影響を強くう

け⁹⁾, ルイス式血液型が (a-b-) 型の症例では, 血清 CA 19-9 陽性率が他のルイス式血液型の症例よりも著しく低かったのに対し, SPan-1 ではルイス式血液型の影響を受けることが少ないためと思われる。

血中 SPan-1 濃度の測定は, 膵癌, 胆道癌の診断, 手術後の経過観察にきわめて有用である。

V. まとめ

- 1) 血中 SPan-1 濃度測定法の精度, 再現性, 回収率試験および希釈試験の結果は良好であった。
- 2) カットオフ値を 28 U/ml に設定したところ, 膵癌・胆道系癌で高率に SPan-1 陽性例がみられ, 手術後血清 SPan-1 濃度は速やかに低下した。またルイス式血液型に影響を受けにくいことが示唆された。
- 3) 肝硬変・胆石症などの良性疾患でも陽性例がみられたが, 多くは軽度の上昇であった。
- 4) 血中 SPan-1 濃度は臨床経過をよく反映し, 膵癌・胆道系悪性腫瘍に有用な腫瘍マーカーと考えられた。

文 献

- 1) 大倉久直: 血液尿化学検査——その数値をどう読むか——糖鎖抗原 19-9 (CA 19-9). 日本臨床, 秋期増刊, 435-437, 1985
- 2) Sakahara H, Endo K, Nakajima K, et al: Serum CA 19-9 concentration and computed tomography findings in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 57: 1324-1326, 1986
- 3) 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
- 4) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 他: 卵巣癌に対するモノクローナル抗体を用いたエルザ CA 125 RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討. 核医学 22: 1391-1397, 1985
- 5) Chung YS, Ho JLL, Kim YS: Monoclonal antibody reactive with sera of pancreatic cancer patients (Abstract). *Dig Dis Sci* 30: 967, 1985
- 6) Ho JLL, Chung YS, Fujimoto Y, et al: Mucin-like antigens in a human pancreatic cancer cell line identified by murine monoclonal antibodies SPan-1 and YPan-1. *Cancer Res* 48: 3924-3931, 1988
- 7) Chung YS, Ho JLL, Kim YS, et al: The detection of human pancreatic cancer-associated antigen (SPan-

- 1 antigen) in the serum of cancer patients. *Cancer* **60**: 1636, 1987
- 8) 梅山 馨, 竹内 正, 鄭 容錫, 他: 新しい膀胱癌関連 SPan-1 抗原の測定法とその臨床的有用性に関する検討. *膀胱* **3**: 528-539, 1988
- 9) 中島言子, 遠藤啓吾, 阪原晴海, 他: 健常人におけるルイス式血液型と血清 CA 19-9 濃度. *医学のあゆみ* **134**: 467-468, 1985
- 10) 鄭 容錫, 田中 肇, 佐竹克介, 他: 膀胱癌関連抗原 SPan-1 抗原の臨床診断応用. 第 45 回日本癌学会抄録: 104, 1986