《ノート》

腫瘍関連糖蛋白抗原 CA 72-4 測定用キット "ELSA CA7 2-4 kit" の基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Studies on ELSA CA 72-4 Kit for Measurement of Serum CA 72-4 Concentrations: Usefulness in Patients with Gastrointestinal Cancer

中井　敏晴*　遠藤　啓吾*　中島　言子*　服部　典子*
細野　　真*　佐賀　恒夫*　渡辺　祐司*　阪原　晴海*
小西　淳二*　戸部　隆吉**

Toshiharu NAKAI*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Noriko HATTORI*, Makoto HOSONO*, Tsuneo SAGA*, Yuji WATANABE*, Harumi SAKAHARA*, Junji KONISHI* and Takayoshi TOBE**

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

I. はじめに

CA 72-4 抗原は 1981 年 Colcher らによって作製されたモノクローナル抗体 B72.3 が認識する腫瘍関連糖蛋白抗原(Tumor associated glycoprotein)である[1,2]．抗体 B72.3 は乳癌の肝転移組織より得られた膜分画を免疫源として作製されたが，その抗原は乳癌以外にも消化器系悪性腫瘍に幅広く分布することが明らかになった．血中 CA 72-4 抗原濃度の測定は特にこれまで有用な腫瘍マーカーの少なかった胃癌での有用性が報告されている．そこで今回われわれは，CA 72-4測定用キット ELSA CA 72-4 (CIS, Saclay, France) について，基礎的および臨床的検討を行ったのでその結果を報告する．

* 京都大学医学部核医学科
** 同　第一外科
受付：元年 11 月 30 日
最終稿受付：2 年 2 月 13 日
別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (〒606)
京都大学医学部核医学科
中井敏晴

II. 対象および方法

1. 測定原理

ELSA CA 72-4 キットは CA 72-4 抗原を認識する 2 つの抗体 CC49 と抗体 B72.3 を用いた 2 ステップ法による immunoradiometric assay である．抗体 CC49 はチューブ内のフィン (ELSA) に固相化されており，1 ステップ目で CA 72-4 抗原と反応する．チューブを洗浄後に 2 ステップ目で I-125 標識した抗体 B 72-3 が，フィンに捕えられた CA 72-4 抗原と結合し，その濃度に比例した放射能を示す．

2. 測定方法

(1) CC49 抗体を固相化したフィンを入れたチューブに 200 μl の緩衝液を分注する．100 μl の標準液，または検体を加え，Vortex ミキサーで静かに攪拌する．
(2) 室温下 4 時間水平振とうする．
(3) チューブ内容をできる限り吸引し，3 回各 3 ml の蒸留水を加え洗浄吸引する．

Key words: CA 72-4, B72.3, Tumor marker.

Presented by Medical*Online

(4) 300 μl の I-125 標識 B 72-3 抗体をチューブに加え，(2) と同様にミキサーで攪拌する．

(5) 4°C にて18時間インキュベーションする．

(6) (4) と同様に洗浄し，フィンに結合した放射能を計測する．標準液より得られたカウント (cpm) をそれぞれの濃度に対応させてグラフ上にプロット，得られた曲線より検体中の CA 72-4 値を読み取る．標準液には 3, 10, 25, 50, 100 U/ml の各 CA 72-4 濃度のものが添付されている．

3. 基礎的検討

アッセイの標準曲線の検討を行った後，検体の再現性試験，回収率試験，希釈試験を行った．

4. 臨床的検討

本院において手術され，病理的に診断の確定した悪性腫瘍 220 例および手術，各種検査で診断された良性疾患 69 例，および健常人 114 例，合計 403 例を対象に，その血中 CA 72-4 値を測定し検討を行った．悪性腫瘍患者の内訳は胃癌53例，大腸癌61例，膵癌31例，卵巣癌 8 例，胆嚢癌および胆管癌23例，食道癌13例，肝細胞癌21例である．このうちの 177 例については Centocor 社製 CA 72-4-RIA キットでもキット添付の指示書に従って測定し，本キットによる測定値との比較検討を行った．

III. 結　果

1. 基礎的検討

(1) 標準曲線

標準 CA 72-4 溶液を用いて作製した標準曲線を Fig. 1 に示す．縦軸は各濃度の検体より得られた放射能 (cpm) を加えた総放射能量 (cpm) で割った結合率 (%binding) で示している．標準曲線は 3-100 U/ml の間で良好な直線を示し，7 回のアッセイの測定値より得られた各濃度における変動係数は低濃度においても10%以下であった．

(2) 再現性試験

同一キット内で CA 72-4 濃度の異なる 3 検体についてそれぞれ10回の測定を行い，測定値の再現性を求めた (intra-assay reproducibility) (Table 1A)．その変動係数は，測定値が 25.0, 61.5 U/ml といった高濃度ではそれぞれ 4.8 および 5.4% であり，11.5 U/ml の抗原濃度の検体では，9.6% であった．

濃度の異なる 3 検体について異なったキット間

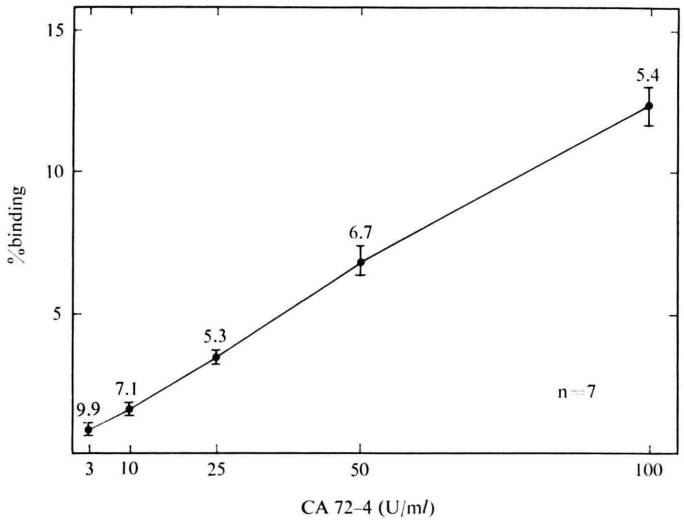

Fig. 1 Reproducibility of standard curves. Vertical bars represent mean±2 SD of 7 assays.

Presented by Medical*Online

Table 1 Intra-assay (A) and inter-assay (B) reproducibility

A

Sample	Number of assay	Mean (U/m*l*)	S.D. (U/m*l*)	C.V. (%)
1	10	11.5	1.1	9.6
2	10	25.0	1.2	4.8
3	10	61.3	3.3	5.4

B

Sample	Number of assay	Mean (U/m*l*)	S.D. (U/m*l*)	C.V. (%)
1	10	7.5	1.3	17.3
2	10	22.6	1.2	5.3
3	10	56.3	3.8	6.7

Table 2 Recovery of CA 72–4 added to serum samples

Sample	Added CA 72–4 concentrations (U/m*l*)			
	0	12.5	25	50
1	4	17	28	55
	—	(103.0%)	(97.6%)	(101.9%)
2	5	17	30	57
	—	(97.1%)	(100%)	(103.6%)
3	13	24	38	60
	—	(94.1%)	(100%)	(95.2%)
4	33	44	59	73
	—	(96.7%)	(101.7%)	(88.0%)

( ) represents percentages of recovery

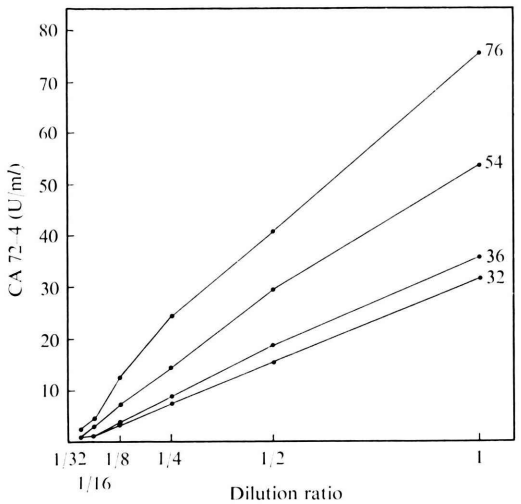

Fig. 2 Dilution test of serum containing high CA 72–4 levels.

での測定値の再現性 (inter-assay reproducibility) を同様に検討した (Table 1B). 測定値 7.5 U/m*l* では 17.3% と若干のバラツキが認められたものの, 22.6 および 56.3 U/m*l* といった高い CA 72 濃度の検体では, それぞれ変動係数は 5.3 および 6.7% と良好であった.

(3) 回収試験

濃度の異なる 4 検体にキット添付の標準液を混和して CA 72–4 値を測定し, その回収率を検討した. その回収率は 88% から 103.6% であった (Table 2).

(4) 希釈試験

濃度の異なる 4 検体にキット添付の希釈液を加えることにより 2 倍から 32 倍に希釈して, その CA 72–4 濃度を測定した. 希釈曲線はほぼ直線を示し, 満足すべきものであった (Fig. 2).

2. 臨床的検討

(1) 健常成人

健常人男性58例, 健常人女性56例, 合計 114 例について血清 CA 72–4 濃度を測定したが, すべての検体の血中 CA 72–4 濃度は 3 U/m*l* 以下であった. そこで 3 U/m*l* 以下の値は標準曲線を延長して算定した. 男性が 1.51±0.45 U/m*l* (平均±標準偏差) 女性では 1.40±0.41 U/m*l* と, 男女間には血中 CA 72–4 濃度に差異は認められなかった. 平均値 +2 標準偏差は 2.32 U/m*l*, 平均値 +3 標準偏差は 2.76 U/m*l* であるが, 添付されている標準抗原液濃度の最小値が 3 U/m*l* であるので, 血清 CA 72–4 濃度の正常上限値 (カットオフ値) を 3 U/m*l* として以下の検討を行った.

(2) 良性疾患

良性疾患 69 例における CA 72–4 測定値は平均値が 2.05 U/m*l* と低値を示し, うち 66 例 (96%) はカットオフ値の 3 U/m*l* 以下を示した. 8.7 U/m*l* の偽陽性を示したのは胃潰瘍の 1 例で, 内視鏡的にボールマン 4 型の胃癌を思わせた. しかし病理学的には erosion とともに上皮の増殖が目立ち固有層に炎症性細胞浸潤が著しく, 4×3 cm の範囲の中に 5×3 mm の潰瘍が見つかったものの, 悪性細胞は検出されなかった.

Presented by Medical*Online

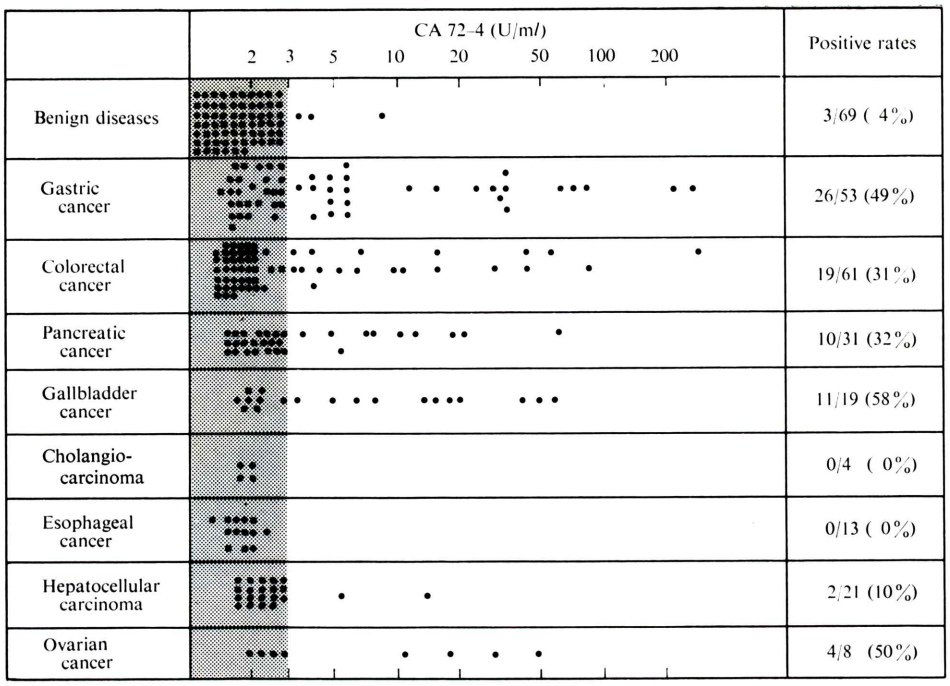

Fig. 3 Serum CA 72–4 concentrations and positive rates in patients with benign diseases and various malignant diseases.

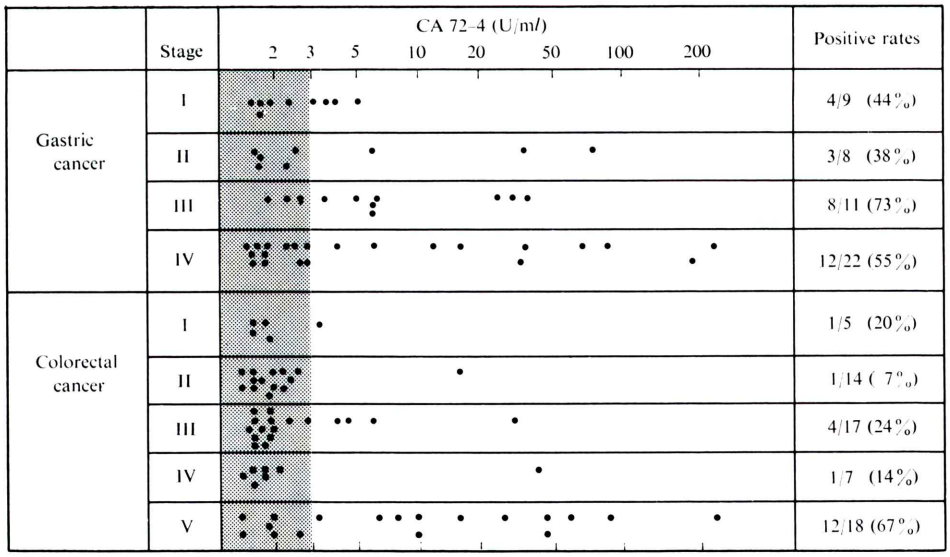

Fig. 4 Serum CA 72–4 concentrations and stage of diseases in patients with gastric and colorectal cancer.

Presented by Medical*Online

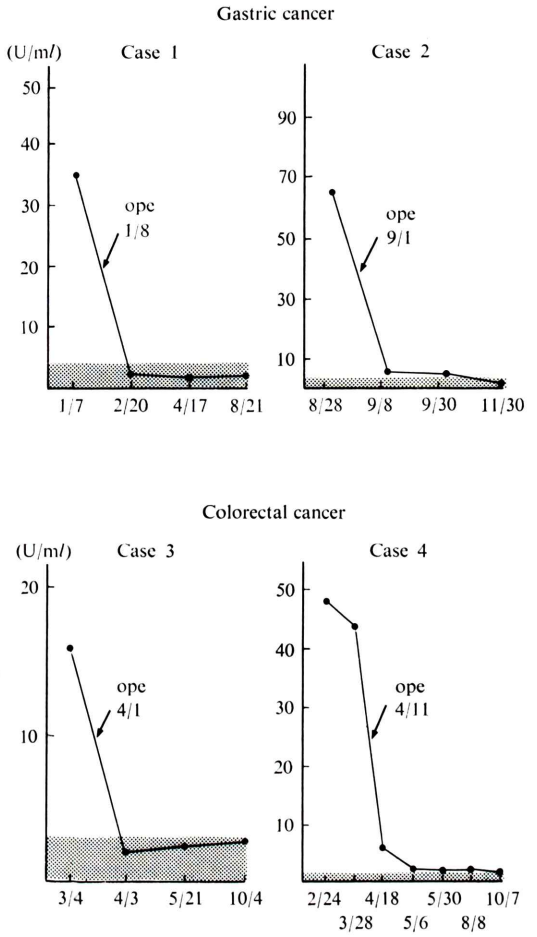

Fig. 5 Change of serum CA 72-4 concentrations in patients with gastric and colorectal cancer after operation. ope: the date of operation.

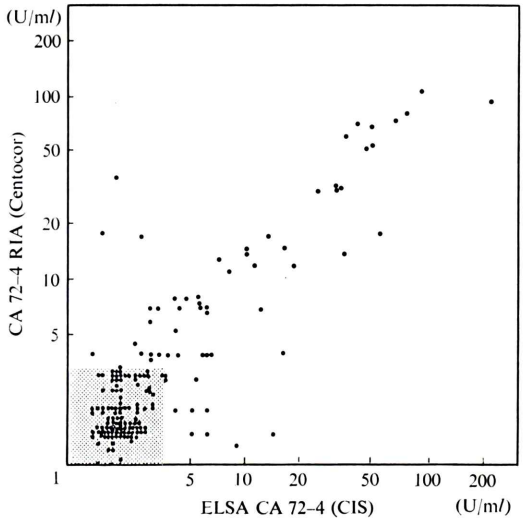

Fig. 6 Correlation between serum CA 72-4 values measured by CA 72-4 (Centocor) and ELSA CA 72-4 (CIS).

2 例の良性卵巣腫瘍症例では，それぞれ 3.8 U/ml および 4 U/ml の軽度陽性であった．しかし，その他の良性卵巣腫瘍症例では 19 例 (90%) が正常値であった．

(3) 悪性疾患群

各種悪性疾患症例の血中 CA 72-4 値は，胃癌，大腸癌，膵癌，胆嚢癌，卵巣癌で陽性率が高く，それぞれ53例中26例 (49%)，61例中19例 (31%)，31例中10例 (32%)，23例中11例 (48%)，8 例中 4 例 (50%) が陽性を示した．一方，肝細胞癌では 21 例中 2 例 (9.5%) のみが陽性であり，食道癌では陽性を示す症例は認められなかった (Fig. 3).

胃癌および大腸癌患者において病期と血中 CA 72-4 濃度との関係を見たところ，CA 72-4 の陽性率は病期が進むにつれ高くなり，病期の進んだものでは高い CA 72-4 濃度を示すものが多くなった (Fig. 4).

手術前，血清 CA 72-4 値が上昇していた悪性疾患患者の治療前後の CA 72 濃度の推移を示す (Fig. 5). 症例 1 (胃癌 II 期)，および症例 3, 4 (大腸癌 V 期) は病巣の切除後速やかに CA 72-4 値が低下した．症例 2 (胃癌 IV 期) では手術後 CA 72-4 濃度は低下したものの，その正常化にはさらに 3 か月を要した．

(4) 従来のキットとの相関

177例においてこれまでの CA 72-4 測定用 RIA (Centocor 社，Malvern, PA, 米国) による測定値と本キットとの相関関係は，相関係数 0.94 ときわめて良好であった．

$(Y=0.975X+0.692,\ N=177)$ (Fig. 6)

IV. 考　察

モノクローナル抗体 B72.3 は，1981 年 Colcher

Presented by Medical*Online

らによってヒト乳癌肝転移巣の膜分画を抗原として作られたヒト乳癌組織と反応するが，正常組織とはほとんど反応しない一連の抗体の一つとして報告された[1]．この B72.3 が認識する抗原は分子量 1,000 kd 以上のムチン様糖蛋白[2]で tumor-associated glycoprotein 72 (TAG-72) とも呼ばれている．しかし多くの研究にもかかわらず，抗原のエピトープは十分解明されておらず，抗原の性状の詳細については不明な点が残っている．

免疫組織染色によって B72.3 抗体は早期癌を含む胃癌，膵癌，卵巣癌，非小細胞性肺癌等の悪性細胞のほかに，一部のポリープ，腸化生を示す組織などの胃良性疾患病変と反応する．しかし B72.3 抗体は成人の正常組織とはほとんど反応しないことが確認された[1,3~7]．

一方，抗体 CC49 は大腸癌組織より B72.3 抗体を用いて精製された抗原を免疫源として新しく作られた一連の抗体の一つで，抗原に対して抗体 B72.3 より高い結合親和性を示すと言われている[8]．

今回の CA 72–4 測定用キット ELSA CA 72–4 は I-125 標識 B72.3 抗体および，チューブ内のフィンに固相化されている抗体 CC49 の二つの CA 72–4 を認識する抗体を用いた2ステップ法の immunoradiometoric assay の原理に基づく．CA 72–4 測定用キットの基礎的検討では標準曲線，測定値の再現性試験，回収率試験，希釈試験とも満足できる結果であった．

今回のキットでは114例の健常人の血中 CA 72–4 濃度がいずれも 3 U/m*l* 以下であることより，カットオフ値を 3 U/m*l* とした．今までに CA 72–4 測定系はいくつか報告されている[9~11]が，Klug, Schlom らの報告している参考値はそれぞれ 6 U/m*l*, 10 U/m*l* であり，わが国の報告では 4 U/m*l* をカットオフ値としているものが多い．今回の結果はいずれの報告よりも低い正常上限値であった．Klug, Scholom らの測定法は I-125 標識抗体，固相化抗体にともに B72.3 抗体を用いた同時サンドイッチ法による測定系である[9,10]．それに対し今回の測定法は2ステップ法を用いていること，2つの異なる抗体を組み合わせたものであるため，従来のキット[11]に比べ低濃度領域におけるフィンへの結合放射能量が大きくなり，その結果低濃度領域での測定感度，精度が向上したと考えられる．

良性疾患では胃潰瘍の1例で血中 CA 72–4 濃度の上昇が見られた．B72.3 は胃の良性疾患でも特に異型性の強い細胞に集まることが報告されており[3]，いわゆる‘前癌状態’にある症例の中に CA 72–4 の有意の上昇を示すものが含まれる可能性についてはさらに検討を要すると思われる．その他2例の良性卵巣腫瘍で CA 72–4 陽性例が見られたのみで，従来より CA 72–4 は良性疾患で偽陽性がきわめて少ないことが報告されている[11]が，今回の測定系でも良性疾患での偽陽性は少ないことが確認された．これは CA 72 抗原の腫瘍マーカーとして優れている点といえる．

悪性腫瘍のうちでは，胃癌，胆嚢癌，大腸癌，膵癌等の消化器系癌，および卵巣癌で 30–50% の陽性率を示した．胃癌，大腸癌では病期の進行とともに陽性率，血清 CA 72–4 濃度が上昇，手術による腫瘍の切除とともに血清 CA 72–4 濃度は低下し，病変の程度をよく反映していると考えられる．100 U/m*l* 以上の高 CA 72–4 濃度を示した検体は胃癌の症例に多く，いままで有用な腫瘍マーカーの少なかった胃癌において，CA 72–4 測定の有用性が期待される．

B72.3 は腫瘍マーカーとしてのみならずインビボでの応用も行われており，Carrasquillo らは I-131 標識 B72.3 抗体を大腸癌患者に投与し，大腸癌の再発部位検出に成功している[12]．今後は胃癌や大腸癌の疑われる患者において B72.3 抗体を用いたシンチグラフィによる原発巣の局在診断や，アイソトープ，抗癌剤を結合させた特異的な癌治療法の開発も期待される．

V. まとめ

1) CA 72–4 測定用キット“ELSA CA 72–4”の測定感度，再現性，回収率試験および希釈試験などの基礎的検討の結果は良好であった．これま

Presented by Medical*Online

での Centocor 社製 CA 72-4 RIA キットとよく相関するが，本キットは特に低濃度での安定性が優れている．

2) 健常人で偽陽性は認められなかった．良性疾患での偽陽性例は 4% と，きわめて少ない．

3) 消化器系癌での CA 72-4 陽性率は，胃癌で 49%，大腸癌では 31%，膵癌で 32%，胆嚢癌で 58% であった．特に胃癌で高値を示すものが多く認められた点が注目される．病期の進行とともに陽性率，CA 72-4 濃度とも増加し，手術後血清 CA 72-4 濃度はすみやかに低下した．

4) CA 72-4 は臨床的に，胃癌，大腸癌などの消化器系癌の腫瘍マーカーとして有用と考えられる．

文　献

1) Colcher D, Horan Hand P, Nuti M, et al: A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA **78**: 3199–3203, 1981
2) Johnson VG, Schlom J, Paterson AJ, et al: Analysis of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody B72.3. Cancer Res **46**: 850–857, 1986
3) Ohuchi N, Thor A, Nose M, et al: Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) detected in adenocarcinomas and benign lesions of the stomach. Int J Cancer **38**: 643–650, 1986
4) Thor A, Ohuchi N, Szpak C, et al: Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. Cancer Res **46**: 3118–3124, 1986
5) Stramignoni D, Bowen R, Atkinson B, et al: Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas. Int J Cancer **31**: 543–552, 1983
6) Horan Hand P, Colcher D, Salomon D, et al: Influence of spatial configuration of carcinoma cell populations on the expression of a tumor-associated glycoprotein. Cancer Res **45**: 833–840, 1985
7) Paterson AJ, Schlom J, Sears HF, et al: A radioimmunoassay for the detection of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) using monoclonal antibody B72.3. Int J Cancer **37**: 659–666, 1986
8) Muraro R, Kuroki M, Wunderlich D, et al: Generation and characterization of B72.3 second generation monoclonal antibodies reactive with the tumor-associated glycoprotein-72 antigen. Cancer Res **48**: 4588–4596, 1988
9) Klug TL, Sattler MA, Colcher D, et al: Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 72) on a novel pancarcinoma antigen (TAG 72). Int J Cancer **38**: 661–669, 1986
10) Schlom J, Johnston WW, Szpak CA, et al: The use of MAb B72.3 in the diagnosis of human carcinoma. J Tumor Marker Oncol **2**: 95–112, 1987
11) 渡辺祐司，遠藤啓吾，中島言子，他：腫瘍関連糖蛋白測定キット 'Centocor CA 72-4 RIA' の基礎的ならびに臨床的検討．基礎と臨床 **22**: 2907–2913, 1988
12) Carrasquillo JA, Sugarbaker P, Colcher D, et al: Peritoneal carcinomatosis; Imaging with intraperitoneal injection of I-131-labeled B72.3 monoclonal antibody. Radiology **167**: 35–40, 1988

Presented by Medical*Online