

《技術報告》

血中 CA125 測定用キット BALL ELSA CA125-II KIT の 基礎的検討

垣崎 純子* 宮崎 忠芳** 前田 知穂*

要旨 モノクローナル抗体 M11 を固相抗体に OC125 を標識抗体に用いた血中 CA125 測定用キット BALL ELSA CA125-II KIT について基礎的検討を行った。測定値はインキュベーション時間、インキュベーション温度、振盪条件による影響を受けるため測定条件を守る必要があった。再現性、回収試験、希釈試験の結果は良好であった。プロゾーン現象に関しては、5,000 U/ml 以上の濃度域に見られた。最小検出感度は 7.5 U/ml である。従来のセントコア CA125 RIA キットと本法との測定値の比較では回帰曲線 $y = 1.058x - 0.106$, $r = 0.973$ と良好であるが個別には乖離する例もあった。

(核医学 30: 807-812, 1993)

I. はじめに

1980 年 Bast らによりヒト卵巣漿液性嚢胞腺癌の腹水細胞培養を免疫原としてモノクローナル抗体 (OC125) が作製された^{1,2)}。その後本抗体に反応する Cancer Antigen 125 (CA125) はヒト血清中にも存在し、卵巣癌、特に非ムチン性上皮性卵巣癌で高値を示すとともに、卵巣癌患者の経過観察にも有用であることが報告され³⁻⁵⁾、また良性疾患である子宮内膜症、特に子宮腺筋症での高値が報告されている⁶⁾。

今回 CIS (フランス原子力庁) 製 CA125 測定キット (BALL ELSA CA125-II) の基礎的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

BALL ELSA CA125-II は、腹水由来の CA125

抗原を免疫原として作製されたモノクローナル抗体 M11⁷⁾ を固相抗体とし、OC125 を標識抗体として用いた Immunoradiometric assay 法による測定キットである。

2. 測定方法

測定手順を Table 1 に示す。標準曲線作製には、直線補間式を用いた。

3. 検討項目

1) 標準曲線、2) インキュベーション時間、3) インキュベーション温度、4) 振盪条件、5) 洗浄回数、6) 再現性、7) 回収試験、8) 希釈試験、9) プロゾーン現象、10) 最小検出感度、11) セントコア CA125 RIA キットとの測定値の比較、12) 健常人の血清 CA125 値。

III. 結 果

1. 標準曲線

標準曲線を Fig. 1 に示す。日を変えて測定した時の 0 濃度を除く各標準液の平均結合率 (B/T) の変動係数 (CV) は Lot 2002 において 4.8~6.9% ($n=5$)、Lot 2004 において 4.2~12.8% ($n=3$) であった。図に示すように CA125 RIA キットに比べて結合率がおおきく改善された。

* 京都府立医科大学附属病院放射線科

** 宇治病院

受付: 5 年 2 月 1 日

最終稿受付: 5 年 4 月 6 日

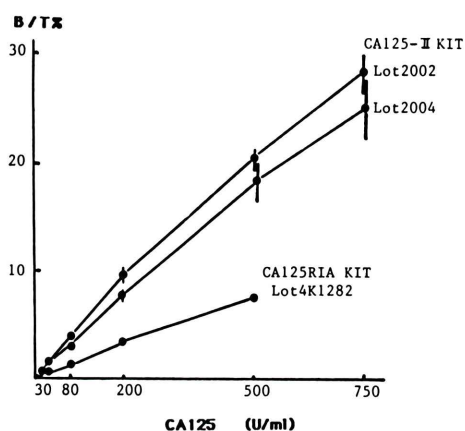
別刷請求先: 京都市上京区河原町通広小路上ル (☎602)

京都府立医科大学附属病院放射線科

垣 崎 純 子

Table 1 Assay procedure of BALL ELSA CA125-II

Standards or samples	100 μ l
125 I-Anti CA125 antibody	200 μ l
↓	
Anti CA125 antibody coated BALL ELSA	
↓	
Mix	
Incubate for 2 hours at 20°C under agitation	
↓	
Wash the tubes 2 times with 1.5 ml distilled water	
↓	
Count and calculate	

**Fig. 1** Standard curve for BALL ELSA CA125-II.

2. インキュベーション時間

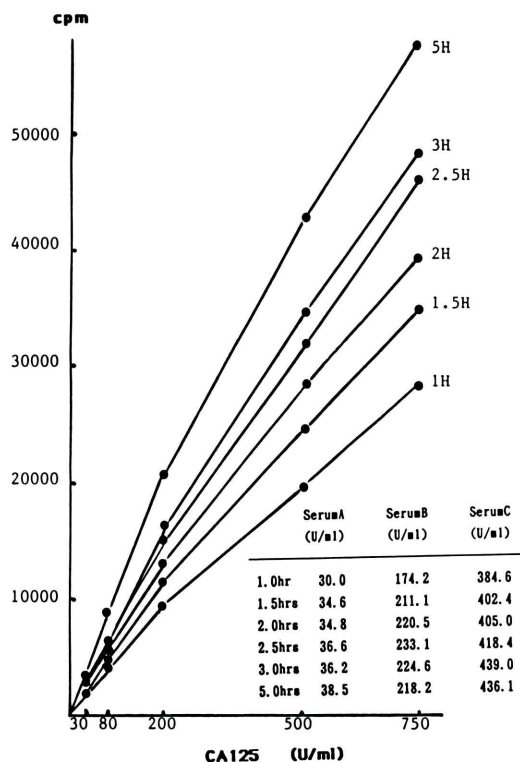
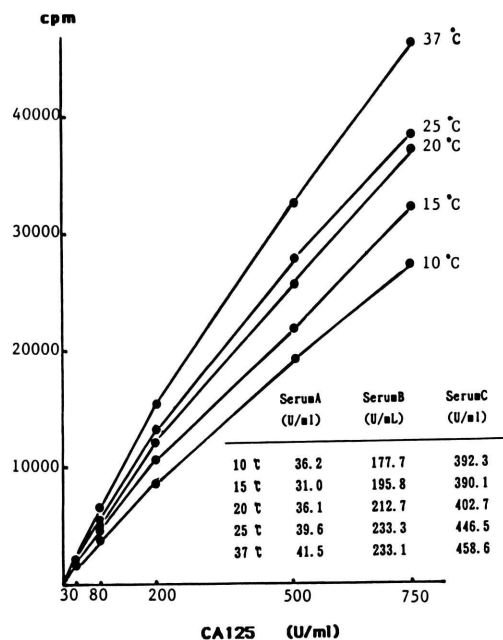
インキュベーション温度を 20°C, 振盪条件を 250 rpm と一定にして, インキュベーション時間を 1, 1.5, 2, 2.5, 3.5 時間とした時の標準曲線の変化とコントロール血清の値を Fig. 2 に示す. 高濃度部ではインキュベーション時間が長くなるほど測定値が高くなる.

3. インキュベーション温度

インキュベーション時間を 2 時間, 振盪条件を 250 rpm と一定にして, インキュベーション温度を 10, 15, 20, 25, 37°C と変化させた時の標準曲線の変化とコントロール血清の値を Fig. 3 に示す. 中〜高濃度部ではインキュベーション温度が高くなるほど測定値が高くなる.

4. 振盪条件

インキュベーション温度を 20°C, インキュベ

**Fig. 2** Effect of incubation time.**Fig. 3** Effect of incubation temperature.

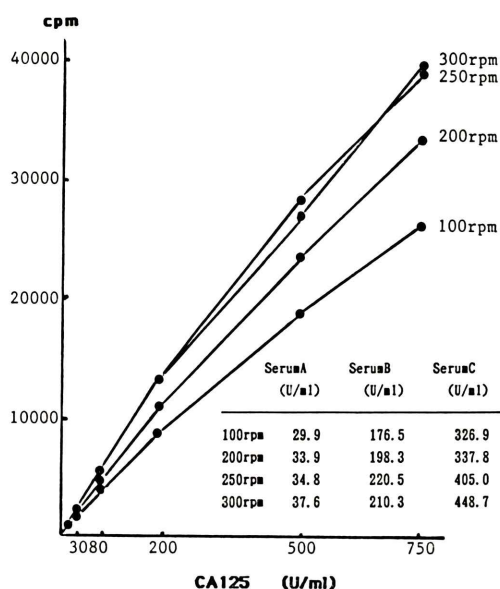


Fig. 4 Effect of agitation speed.

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility

1) Intraassay

Sample	No.	Mean±SD (U/ml)	CV (%)
Serum D	10	31.4±2.3	7.4
Serum E	10	74.8±4.0	5.4
Serum F	10	181.6±4.3	2.4

2) Interassay

Sample	No.	Mean±SD (U/ml)	CV (%)
Serum A	10	37.4±3.5	9.4
Serum B	10	220.7±13.3	6.0
Serum C	10	420.2±19.3	4.6

ション時間を2時間と一定にして、振盪条件を100, 200, 250, 300 rpm と変化させた時の標準曲線の変化とコントロール血清の値を Fig. 4 に示す。高濃度部では振盪回数が多くなるほど測定値が高くなる。

5. 洗浄回数

1 回の洗浄液量を 1.5 ml とし、洗浄回数を 1, 2, 3, 4, 5 回と変化させて標準曲線および血清値の変化をみた。2 回以上の洗浄回数で変化はみられない。またビーズのトランスファーの有無につ

Table 3 Recovery test

	Added (U/ml)	Measured (U/ml)	Recovery (%)
Serum G	0	99.2	
	15	113.1	92.7
	40	138.2	97.5
	100	192.1	92.9
	250	342.6	97.4
	Mean		95.1
Serum H	0	39.2	
	15	56.2	113.3
	40	87.4	120.5
	100	142.5	103.3
	250	326.2	114.8
	Mean		113.0
Serum I	0	14.1	
	15	29.7	104.0
	40	52.8	96.8
	100	121.0	106.9
	250	271.2	102.8
	Mean		102.6

$$\text{回収率} = \frac{\text{測定量} - \text{対象検体の測定量}}{\text{添加標準液濃度}} \times 100$$

いても検討したが、測定値の変動係数の減少にはつながらなかった。

6. 再現性

濃度の異なる3種類の血清を用い、同一測定内 (n=10) および測定間 (n=10) の再現性を調べた結果を Table 2 に示す。同一測定内再現性の変動係数は 7.4, 5.4, 2.4%, 測定間再現性の変動係数は 9.4, 6.0, 4.6% であった。

7. 回収試験

濃度の異なる3種類の検体を用い、キット添付の標準溶液を等量添加し、添加回収試験を行った。結果を Table 3 に示す。平均回収率は 95.1%, 113.0%, 102.6% であった。

8. 希釈試験

濃度の異なる3種類の検体を用い、標準溶液 0 U/ml で2倍から16倍まで倍数希釈した。結果を Fig. 5 に示す。ほぼ、原点を通る直線が得られた。

9. プロゾーン現象

CA125 値が 10,000 U/ml を超える2種類の検体につき希釈試験を行い、プロゾーン現象の影響

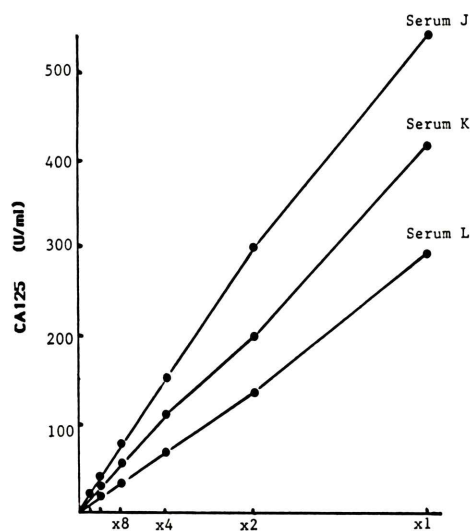


Fig. 5 Effect of serum samples dilution.

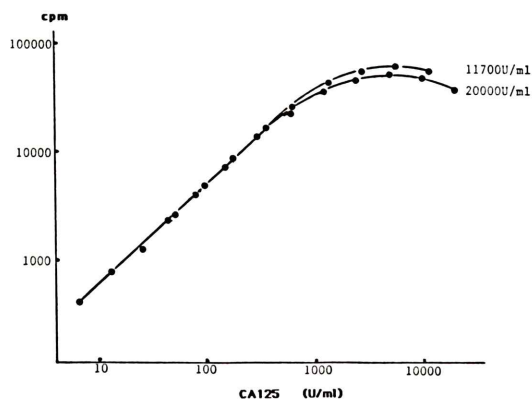


Fig. 6 Prozone phenomenon. Serum samples with high CA125 values were obtained from patients.

をみた。結果を Fig. 6 に示す。標準液の最高濃度である 750 U/ml を超えた 800 U/ml あたりから平滑化し始め 5,000 U/ml 付近で最大カウントを示し、より高濃度で減少した。図に示されるように 20,000 U/ml 以上の検体において標準液の最高濃度である 750 U/ml 以下の読取値を示す可能性がある。

10. 最小検出感度

キット添付の最小濃度標準溶液 15 U/ml を標準溶液 0 U/ml で 2 倍から 16 倍まで倍数希釈して CA125 濃度を測定し (n=5), 0 U/ml との間の有

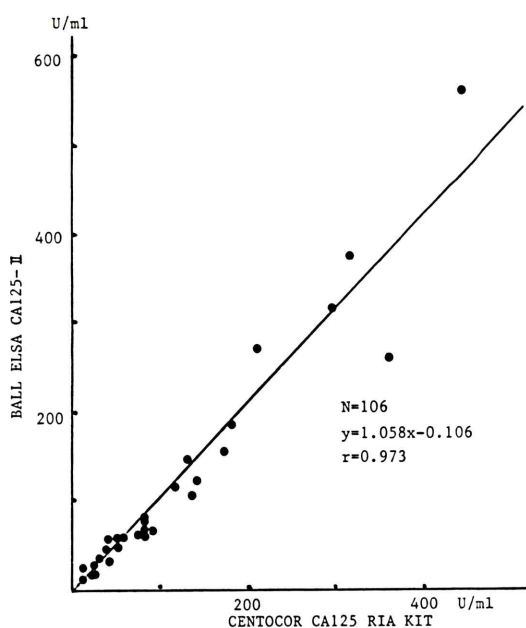


Fig. 7 Correlation between assay results of CENTOCOR CA125 RIA KIT and those of BALL ELSA CA125-II.

Table 4 Normal CA125 concentrations in different age groups

	Female (Age)				Male
	16-29	30-39	40-49	50-	
n	12	7	15	34	13
Mean	24.3	17.4	18.0	11.1	9.6
SD	8.1	6.5	7.6	4.8	3.0
Mean					
+2SD	40.5	30.3	33.1	20.7	15.7
(U/ml)					

意差検定 (Student's t test) を行った。0 U/ml と有意差の認められる濃度は 1.9 U/ml であるが、7.5 U/ml 未満は標準曲線の延長線上にプロットされない。したがって、實際上 7.5 U/ml が感度と考えられる。

11. セントコア CA125 RIA キットとの測定値の比較

血清検体 106 例について、本法とセントコア CA125 RIA キットとの測定値を比較した。結果を Fig. 7 に示す。両者の間には相関係数 $r=0.973$ 、回帰直線 $y=1.058x-0.106$ と良好な相関が認め

られた。しかし個別にみるとセントコア社キットで 80 U/ml であったものが本法で 358 U/ml を示す乖離例もみられた。

12. 健常人の血清 CA125 値

性別および年齢別の CA125 値を Table 4 に示す。16~49 歳の女性の血中 CA125 は 20.1 ± 8.0 U/ml (Mean \pm 2 SD, n=34) であり、50 歳以上の女性および男性より有意に高値を示した ($p < 0.001$)。50 歳以上の女性と男性群の間に有意差はなかった。

IV. 考 察

2 種類のモノクローナル抗体を用いた BALL ELSA CA125-II KIT の基礎的検討を行った。標準曲線は、従来品に比べ測定範囲が広がるとともに結合率が高くなり、精度の向上がみられた。インキュベーション時間、インキュベーション温度、振盪条件の検討の結果、高濃度検体においておのおの影響がみられるため、アッセイ条件を守る必要がある。再現性、回収試験、希釈試験の結果は良好であった。抗原過剰域の検討では 20,000 U/ml 以上の検体において 750 U/ml 以下の値を示す可能性がある。しかし、CA125 の場合 20,000 U/ml 以上を示す血清検体の出現頻度はきわめてまれであり、当検査室においては過去一年間に一例であった。最小検出感度は、7.5 U/ml 未満の濃度において用量反応性に差がみられるため、7.5 U/ml が感度と思われる。セントコア CA125 RIA キットとの相関は良好であった。ただし、検査依頼があった 138 検体を両キットにて測定の結果、セントコア CA125 RIA キットで 80 U/ml、BALL ELSA CA125-II KIT で 358 U/ml を示した慢性膵炎患者検体について、他日採血された検体にて希釈試験をした結果、前者のキットにおいては、原液で 56.7 ng/ml、2 倍希釈で 51.7 ng/ml、4 倍希釈で 27.2 ng/ml、8 倍希釈で 19.2 ng/ml と希釈直線性はみられなかった。後者のキットにおいては、ほぼ直線性を示した。CA19-9 と同様 CA125 のような heterogeneity のある抗原の測定では、検体の希釈曲線が標準曲線と平行しないことがある。

血清個々の抗原の性状の違いが希釈試験の結果に影響を及ぼすと考えられるが、詳細は現在のところ不明である。2 種類のモノクローナル抗体を用いた CA125-II KIT を用いることにより、希釈直線性が改善された症例といえるだろう。健常成人の性別・年齢別基準値の検討では、平均値 $+2$ SD の結果、50 歳未満の女性の血中 CA125 値は 36 U/ml、50 歳以上の女性では 21 U/ml、男性では 16 U/ml であった。50 歳以上の女性と男性の間に有意差はなかった。カットオフ値については Bast らが報告した 99% が包括される 35 U/ml とほぼ一致する結果であった。以上、BALL ELSA CA125-II KIT の基礎的検討の結果、アッセイ条件の厳密さ、およびプロゾーン現象の影響に関して注意が必要であるが、従来品に比べ精度管理上、より安定したデータが得られるものと思われる。

文 献

- 1) Bast RC, Lazarus H, Feeney M, Knapp RC: Reactivity of a Monoclonal Antibody with Human Ovarian Carcinoma. *Am Assoc Cancer Res* 21: 207, 1980
- 2) Bast RC, Jr Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 68: 1331-1337, 1981
- 3) Bast RC, Klug TL, St John E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, et al: A Radioimmunoassay using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer. *New Engl J Med* 309 (15): 883-887, 1983
- 4) 葛谷和夫, 千原 勤, 有吉 寛, 桑原正喜, 鈴木亮而, 須知泰山, 他: CA125—卵巣癌の新しい血清腫瘍マーカー。医学のあゆみ 129 (5): 327-329, 1984
- 5) 高身沢裕吉, 稲葉憲之, 岩沢博司, 深沢一雄, 伊地知幹雄, 佐藤尚美, 他: 産婦人科領域における新しい腫瘍 Marker・Cancer Antigen 125。医学と薬学 12 (1): 248-257, 1984
- 6) 高橋健太郎, 木島 聡, 吉野和男, 渡川敏彦, 森山政司, 岩成 治, 他: 新しい卵巣腫瘍マーカー CA125 を利用した子宮平滑筋腫と子宮腺筋症の鑑別。日本産科婦人科学会雑誌 37: 591-595, 1985
- 7) O'Brien TJ, Raymond LM, Bannon GA, Ford DH, Hardardottir H, Miller FC, et al: New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA125 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1857-1864, 1991

Summary

Basic Studies of BALL ELSA CA125-II KIT for Detection of Serum Cancer Antigen 125

Junko KAKIZAKI*, Tadayoshi MIYAZAKI** and Tomoho MAEDA*

**Department of Radiology, Kyoto Prefectural University of Medicine*

***Uji Hospital*

We made basic studies of BALL ELSA CA125-II KIT which is a solid phase two site immunoradiometric assay. The first monoclonal antibody (M11) is coated on the BALL ELSA solid phase, and the second one (OC125), radiolabeled with ^{125}I , is used as a tracer. Since serum CA125 values varied by incubation time, incubation temperature and agitation speed, the conditions of the assay had to be kept strictly. Intra- and interassay reproducibility, recovery test and dilution test were well satisfied. Prozone phenomenon was observed

over 5,000 U/ml. The minimum detectable concentration was 7.5 U/ml. Serum CA125 values measured using BALL ELSA CA125-II KIT was correlated with those measured using conventional CENTOCOR CA125 RIA KIT ($y=1.058x-0.106$ $r=0.973$), although in the serum of a patient with chronic pancreatitis the discrepancy between serum CA125 values measured using these kits was observed.

Key words: CA125, IRMA, Monoclonal antibody.