

## 《技術報告》

## サイトケラチン測定キットとして新しく開発された “ボールエルザ CYFRA 21-1”の有用性の検討

木村 良子\* 阿多まり子\* 中村 誠治\* 藤井 崇\*  
河村 正\* 棚田 修二\* 濱本 研\*

**要旨** サイトケラチン19フラグメント測定用に新たに開発された“ボールエルザ CYFRA21-1”キットの検討を行った。本キットの操作性は簡便であるがインキュベーション条件を一定にする必要を認めた。キットの再現性、回収率、希釈試験は良好であり、最小測定感度は 1 ng/ml であった。CYFRA21-1 は、TPA と強く相関し、患者血清の CYFRA21-1 活性は TPA 固相化抗体で完全に吸収された。

カットオフ値を 2 ng/ml と設定した場合、健常人 0%，全良性疾患 32.7%，間質性肺疾患以外の良性疾患 21.4% の陽性率であった。悪性腫瘍患者における CYFRA21-1 陽性率は 56.0% と高く、特に、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、子宮頸癌で高い陽性率を認めた。

結論：CYFRA21-1 測定キットの操作性、信頼性は十分満足でき、腫瘍マーカーとしての有用性は TPA と類似のものと考えられるが、間質性肺疾患において高い陽性率を認め、注意を要すると考えられた。

(核医学 31: 199-206, 1994)

### I. 緒 言

癌の血清補助診断、スクリーニング、経過観察に、さまざまな腫瘍マーカーが臨床利用されている。近年、新たに、肺癌の腫瘍マーカーとしてサイトケラチン19フラグメント測定キットが開発された<sup>1)</sup>。使用モノクローナル抗体 (KS19-1, BM 19-21) の名称よりこのフラグメントは、CYFRA 21-1 (CYtokeratin FRAgment) として命名され<sup>2)</sup>、肺癌での有用性が報告されている<sup>1,2)</sup>。

今回、CYFRA21-1 測定キットの基礎的検討および臨床例での検討を行ったので、その結果を報告する。

### II. 対象と方法

#### 1. 測定キット

“ボールエルザ CYFRA21-1”(シー・アイ・エス・ダイアグノスティック株式会社) は、サイトケラチン19フラグメントを免疫原として作成した 2 種のモノクローナル抗体 KS19-1 および BM19-21 をそれぞれ固相化抗体および標識抗体とした、one-step immunoradiometric assay 法に基づく測定キットである。操作法を、Fig. 1 に示す。

#### 2. 測定条件の検討

インキュベーション時間を一定にし、インキュベーション温度を変えて標準曲線の作成、検体の測定を行った。同様に、温度条件を一定にし、インキュベーション時間を変えて検討した。

#### 3. キットの信頼性の検討

同時再現性は、4 種の検体を同じ日に、2 重測定、10 列で行った。日差再現性は、あらかじめ検体を分注した後 -20°C に凍結保存し、5 か月に

\* 愛媛大学医学部放射線科

受付：5年9月10日

最終稿受付：5年12月21日

別刷請求先：愛媛県温泉郡重信町志津川 (〒791-02)

愛媛大学医学部放射線科

木 村 良 子

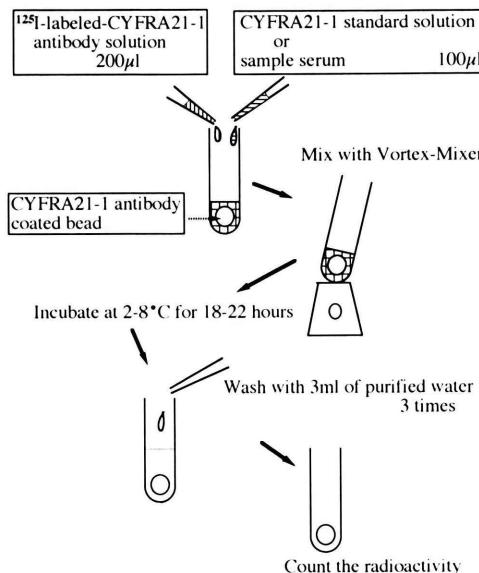


Fig. 1 The assay method of the CYFRA21-1 kit.

わたって 13 回測定を行った。回収率の検討は、検体にキット添付標準液を等量加えたものを測定し、回収された量（添加後測定値－対照検体測定値）を添加量で除し百分率で表した。希釈試験は各種濃度の血清を 0 ng/ml の添付標準液で希釈して行った。最小測定感度の検討は、検体を 0 ng/ml 標準液で希釈、6 重測定時の標準偏差の有意差検定より求める方式と、0 ng/ml 標準液の 6 重測定時の標準偏差幅より求める方式で検討した。

#### 4. CYFRA21-1 抗原の安定性

数種 CYFRA21-1 濃度の血清を凍結融解を繰り返して測定値の変動を検討した。

#### 5. 各種腫瘍マーカーとの関連性

CYFRA 測定キットで、CEA (CEA キット第一 II), TPA (プロリフィゲン TPA キット第一) (以上、第一ラジオアイソトープ研究所), SCC (SCC リアビーズ), AFP ( $\alpha$  フェトリアビーズ) (以上、ダイナボット株式会社), NSE (NSE 栄研; 栄研化学株式会社), CA125 (セントコア CA125 リアキット), CA19-9 (セントコア CA19-9 リアキット), CA15-3 (セントコア CA15-3 リアキット) (以上、トーレフジバイオニクス株式会社) 測定キット

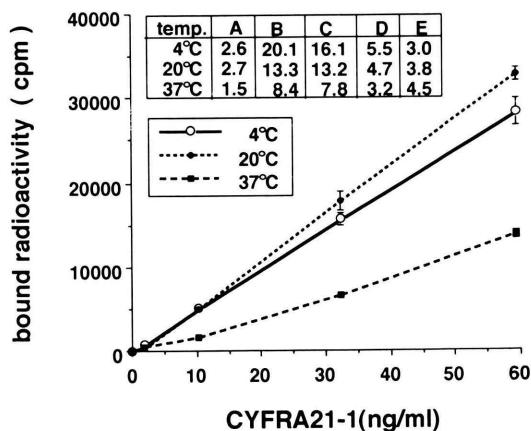


Fig. 2 The effect of incubation temperature on assay results. Incubation time was 20 hours. Standard curves at various temperature are shown on the graph and measured values of various samples are shown on the table.

トに添付されている標準液中の CYFRA21-1 抗原量を測定した。また、CA15-3, SCC, TPA の固相化抗体と CYFRA21-1 の標識抗体により、CYFRA21-1 標準液を測定した。さらに、CYFRA21-1 および TPA 高値血清を TPA ビーズで吸収後 CYFRA21-1 濃度の測定を行った。

#### 6. 血 清

1977 年より 1993 年 3 月までの間に採血され、当院放射線部 RI 検査室に保存されている血清より各種悪性腫瘍疾患血清および良性疾患血清を選択し CYFRA21-1 濃度を検討した。また、健常人コントロールとして、当院職員 44 名の血清を測定した。血清は、測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### III. 結 果

#### 1. インキュベーション条件と測定結果

インキュベーション時間を 20 時間に固定し、温度による標準曲線の変化、検体測定結果の変化を見ると、Fig. 2 に示すように温度が高くなると RI の結合率が低下し、検体測定値も低くなった。次に、温度を  $4^{\circ}\text{C}$  に固定し、時間による変化を検討すると、RI 結合率は時間と共に増加したが、検体測定値は 4 時間インキュベーションが、やや

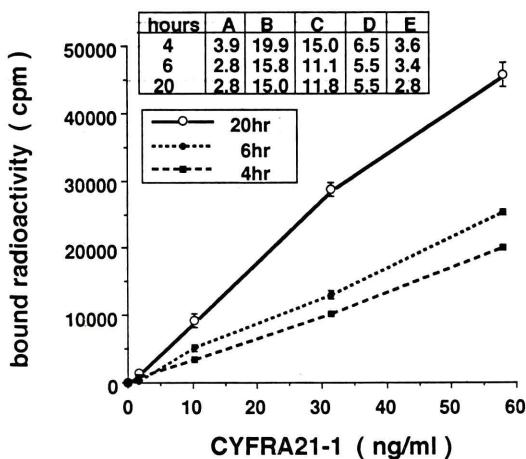


Fig. 3 The effect of incubation time on assay results. Incubation temperature was 4°C. Standard curves at various incubation times are shown on the graph and measured values of various samples are shown on the table.

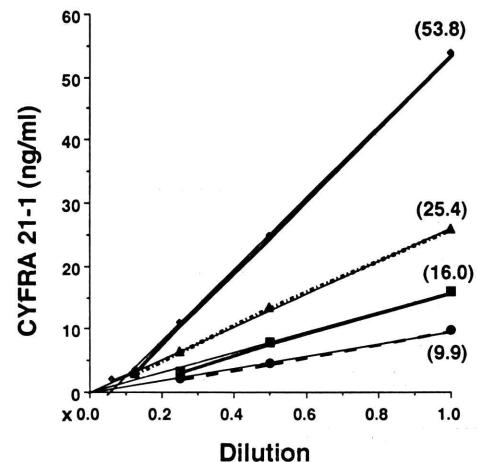


Fig. 4 The dilution curves of serum samples with various concentrations of CYFRA21-1. Sera were diluted with standard solution of 0 ng/ml. The CYFRA21-1 levels are indicated in the parentheses.

Table 1 Reproducibility test

Sample	n	Mean (ng/ml)	s.d.	c.v. (%)
intra-assay				
A	10	11.23	0.57	5.08
B	10	5.08	0.39	7.68
C	10	15.58	1.33	8.54
D	10	3.66	0.27	7.38
inter-assay				
A	13	3.38	0.42	12.43
B	13	16.81	2.01	11.89
C	13	15.72	0.99	6.30
D	13	5.79	0.47	8.12

高値をとった (Fig. 3). 以後の検討は、キットに指定されている 4°C, 20 時間のインキュベーション条件で行った。

## 2. キットの信頼性

日差再現性、同時再現性の結果を Table 1 に示す。同時再現性の変動係数は 5.08–8.54, 日差再現性の変動係数は 6.3–12.43 であった。回収率は、平均回収率 105.7% (88.9–131.5%) とおおむね良好であった。

希釈試験では、原液 53.8 ng/ml の高濃度血清で若干原点よりずれたが、他はほぼ原点を通る直線上にのった (Fig. 4)。

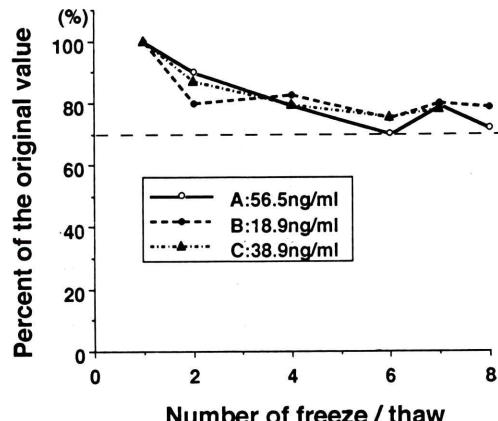


Fig. 5 The effect of freezing and thawing on the assay results. Sera were frozen at -20°C. On another day they were thawed, assayed and refrozen.

## 3. 最小測定感度

希釈液の標準偏差および、0 ng/ml 標準液の標準偏差から求めた最小測定感度は、1.0 ng/ml であった。

## 4. CYFRA21-1 抗原の安定性

1–3 回の凍結融解で前値の約 20% の活性の低下をみ、7 回までの凍結融解で前値の約 30% の活性が低下した (Fig. 5)。

Table 2 CYFRA21-1 levels in standard solutions of various assay kits

Assay kit of standard	Concentration of standard	CYFRA21-1 (ng/ml)	Assay kit of standard	Concentration of standard	CYFRA21-1 (ng/ml)
AFP purified Ag*	700 ng/ml	0.0	SCC serum**	150 ng/ml	4.1
	150	0.0		50	0.3
	35	0.0		10	0.0
TPA purified Ag	2,000 U/l	20.0	CA15-3 serum***	200 U/ml	17.6
	1,000	10.4		100	8.3
	400	3.4		50	4.7
CEA purified Ag	500 ng/ml	0.0	CA19-9 serum***	240 U/ml	0.5
	100	0.0		120	0.5
	30	0.0		60	0.6
NSE purified Ag	128 ng/ml	0.0	CA125 serum***	500 U/ml	1.1
	64	0.1		200	0.6
	32	0.3		80	0.7

\* standard solutions are prepared from purified antigen

\*\* standard solution is prepared from serum

\*\*\* standard solutions are prepared with serum

Table 3 Cross reactivity of CYFRA21-1 antibody (Radiolabeled antibody was CYFRA21-1 antibody)

Solid phase	Samples	Results
CA15-3	1 (1.8)	0.0
	2 (10.2)	0.0
	3 (32.3)	0.0
	4 (59.4)	0.0
SCC	1 (1.8)	0.0
	2 (10.2)	0.0
	3 (32.3)	0.0
	4 (59.4)	0.0
TPA	1 (1.8)	1.5
	2 (10.2)	5.9
	3 (32.3)	16.1
	4 (59.4)	28.5

Standard solutions of CYFRA21-1 assay kit were assayed with catcher beads of various tumor marker assay kits and radiolabeled CYFRA21-1 antibody. The CYFRA21-1 levels are indicated in the parentheses.

##### 5. 各種腫瘍マーカーとの関連

CYFRA21-1 と既存の腫瘍マーカーとの関連を見るため、当院 RI 検査室で扱っている腫瘍マーカーキットの標準液をポールエルザ CYFRA21-1 で測定した。Table 2 に示すように TPA, SCC, CA15-3 で高い CYFRA21-1 レベルが測定された。そこで、これら腫瘍マーカーの測定キットの固相

Table 4 Absorption of CYFRA21-1 antigen by anti-TPA antibody

	Date	TPA (U/l)	CYFRA21-1 (ng/ml)
Before Abs.	Nov. 13	440.9	12.1
1st Abs.	Feb. 18	176.3	N.E.
2nd Abs.	Feb. 24	0.0	<1.0
Before Abs.*	Feb. 24	N.E.	13.6

N.E.: not examined, \*: original serum

600  $\mu$ l of a serum with high CYFRA21-1 and TPA levels was absorbed with 6 TPA beads and assayed the TPA level, then remaining serum was further absorbed with 4 TPA beads.

化抗体とポールエルザ CYFRA21-1 の標識抗体で CYFRA21-1 標準液を測定した。Table 3 に示すように、SCC, CA15-3 固相化抗体では、CYFRA21-1 を捉えることができず、TPA 固相化抗体が CYFRA21-1 を捉えた。さらに、CYFRA21-1, TPA ともに高値の血清を TPA 固相化抗体で吸収し、TPA 値が 0 となった時点で CYFRA21-1 を測定したところ CYFRA21-1 は完全に吸収され検出されなかった (Table 4)。CYFRA21-1 と TPA をともに測定した 63 検体についてきわめて強い相関が見られたが (Fig. 6), 2 例で TPA と CYFRA21-1 値に乖離が見られた (Fig. 6 矢印)。1 例は 44 歳女性、胃癌再発例。乳頭

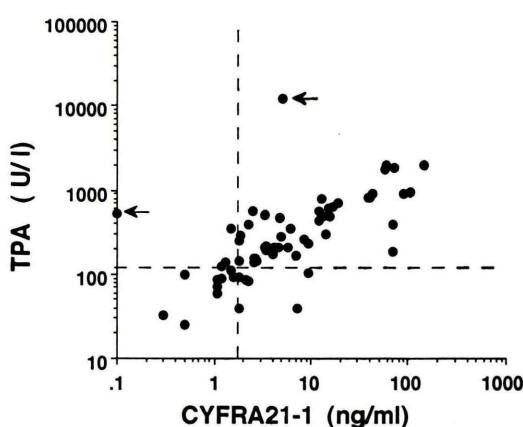


Fig. 6 The correlation between serum CYFRA21-1 and TPA levels. CYFRA21-1 and TPA are relatively well correlated but some sera showed discrepancy between CYFRA21-1 and TPA levels (arrow).

Table 5 Characteristics of the patients

Benign diseases	55 cases
interstitial pulmonary diseases	13 cases
pulmonary diseases	39 cases
Male : Female	31:24
Mean age	56.0 years (9-90 years)
Malignant diseases	257 cases
Male : Female	161:96
Mean age	62.7 years (12-86 years)
Diseases	
head & neck tumor	36 cases
lung cancer	100 cases
GI tract cancer	68 cases
gynecological cancer	40 cases
others	13 cases
Stages	
stage 0, I, II	53 cases
stage III, IV	139 cases
stage unknown	9 cases
recurrence	44 cases
post-treatment state	9 cases

部および大腸に広範な転移を認め、TPA 514.3 U/l に対し CYFRA21-1 は 0 ng/ml であった。他の 1 例は 54 歳女性、上頸癌病期 IV 未治療例で、TPA 12,000 U/ml に対し CYFRA21-1 は 5.1 ng/ml であった。

## 6. 各種疾患での血清 CYFRA21-1 値

健常人 44 名(男性 28 名、女性 16 名、年齢 20-59 歳、平均年齢 34.4 歳)の血清 CYFRA21-1 値は全例測定感度以下であり、喫煙者においても高値を示す者はいなかった。対象疾患の内訳を Table 5 に示す。対象とした悪性腫瘍患者は、病期の進行した症例が多かった。悪性腫瘍患者全体の CYFRA21-1 陽性率は 56.0% であった。Fig. 7 に示すように様々な悪性腫瘍において 10-100 ng/ml の高値をとるものが見られ、陽性率も 50% 以上のものが多かった(Table 6)。しかし、食道癌では、進行期(3 例)および遠隔再発例(1 例)のみであったが、CYFRA21-1 は正常域に留まっていた。

良性疾患 55 例中 39 例が肺に病変部をもった症例であったが、CYFRA21-1 陽性率は全体では 32.7% であった。特に、間質性肺炎(9 例)および肺線維症(4 例)の症例において 69.2% という高い陽性率を示し、これを除いた疾患群では 21.4%、肺に限定して検討すると上記以外の肺疾患(サルコイドーシス 9 例、結核 7 例、細菌性肺炎気管支炎 4 例、気管支喘息 3 例、気管支拡張症 2 例、肺膿瘍 1 例)では 15.4% となった。Table 6 に示した疾患以外の良性疾患で陽性となった症例はバレット食道(1 例)、紅皮症(1 例)等であった。肺膿瘍の 1 例は陰性であった。

## IV. 考 案

CYFRA21-1 はサイトケラチン 19 フラグメントを検出するマーカーとして特に肺癌における有用性が示唆されている新しい腫瘍マーカーである<sup>1-3</sup>。“ボールエルザ CYFRA21-1”キットは一般的な測定キットとしての信頼性は良好であると考えられるが、測定条件、特に温度条件を一定にすることは必要であると考えられた。再現性、回収率、希釈性はおおむね良好であった。抗原の安定性は良好で、数か月の凍結保存では活性の低下は見られず(Table 4)、1-3 回の凍結融解にも比較的安定と思われる。

既存の腫瘍マーカーとの関連の検討では、TPA、SCC、CA15-3 の標準液中に CYFRA21-1 活性を

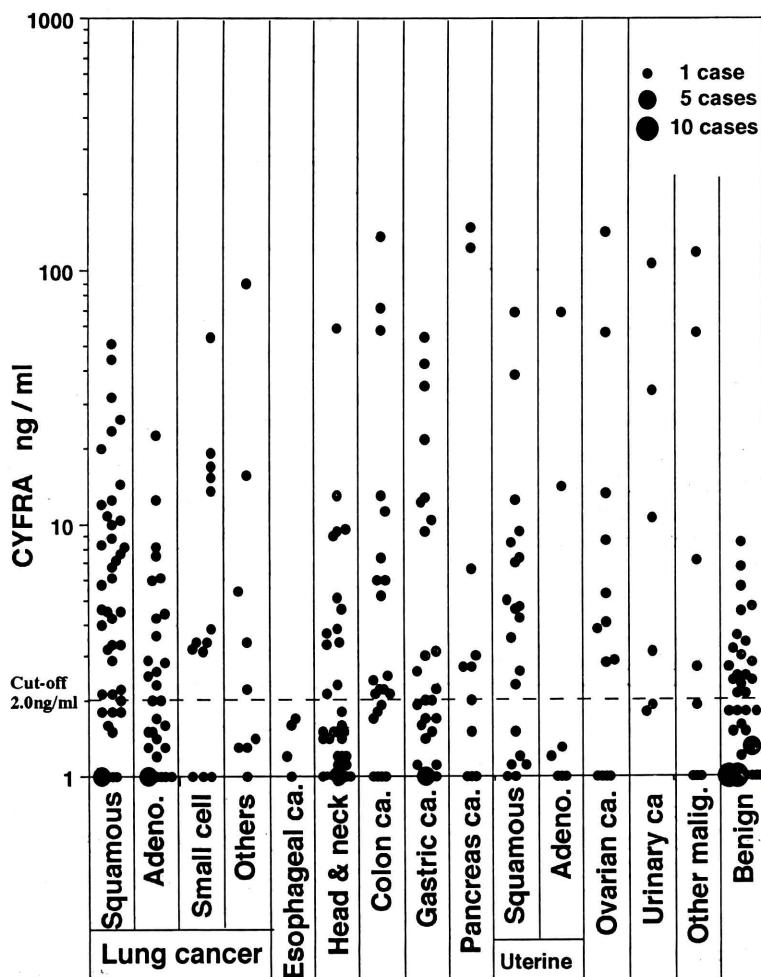


Fig. 7 Serum CYFRA21-1 levels in patients with various diseases.

認めたが<sup>3</sup>、SCC, CA15-3 では固相化抗体との交差試験で活性を認めず、標準液中に併存した CYFRA21-1 抗原を認識したものと考えられる。

これは、SCC, CA15-3 測定キットで使用している標準液が血清を使用しているためと考えられる。

TPA 固相化抗体との交差試験では、ボールエルザ CYFRA21-1 で測定した場合の約半分の値として測定され、さらに、TPA 固相化抗体で、CYFRA21-1 が完全に吸収されたことは、CYFRA 21-1 と TPA がきわめて類似したものであることを示している。しかし、多数の検体の中には、

CYFRA21-1 と TPA の乖離するものも見られ (Fig. 6)、これら腫瘍マーカーの異同については、さらに検討が必要である。

今回の検討では、健常者の血清 CYFRA21-1 値は全例 1.0 ng/ml 以下であった。そのためカットオフ値は、この測定値からは算定せず、1993年6月に開催されたサイトケラチン研究会にて提唱された 2.0 ng/ml をカットオフ値として検討を行った<sup>3)</sup>。その結果、肺癌のみならず、各種悪性腫瘍疾患において高い陽性率を認めた。特に高い陽性率を認めたのは、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、子

Table 6 CYFRA21-1 levels and positive ratios in various diseases

Diagnosis	n	Mean (ng/ml)	s.d.	Positive ratio (%) (cut-off 2.0)
Benign diseases	55	1.84	1.63	32.7
interstitial pneumonitis	9	4.07	2.29	77.7
pulmonary fibrosis	4	3.30	0.42	50.0
infectious pulmonary dis.	17	1.35	1.06	17.6
sarcoidosis	9	1.08	0.63	11.1
benign diseases*	42			21.4
Lung cancer	100	7.50	12.90	61.0
squamous	45	8.51	11.20	71.1
adeno	33	3.30	4.35	42.4
small cell	13	10.63	14.84	76.9
large cell	7	16.13	32.60	57.1
Esophageal cancer	4	1.33	0.41	0.0
Gastric cancer	29	7.92	13.63	41.4
Colon cancer	23	14.76	32.17	65.2
Pancreas cancer	11	26.45	54.24	54.5
Head & neck cancer	36	4.27	9.84	36.1
Urinary tract cancer	6	26.18	41.03	66.7
Uterine cervical cancer	20	9.21	16.20	70.0
Endometrial cancer	7	12.47	25.46	28.6
Ovarian cancer	13	18.67	40.30	69.2
Other malignancies	8	23.54	42.68	50.0

\* benign diseases excluding interstitial pulmonary diseases

宮頸癌であった。一方、扁平上皮癌でありながら、食道癌、頭頸部癌の陽性率はあまり高くなかった。特に、舌癌では、3期、4期のものでもカットオフ値以下(4/4)であった。これは、これら腫瘍の腫瘍量が、病期の割には他の腫瘍に比して少なかったためと考えられる。喉頭癌、上頸癌等では病期の進行したものに陽性率やCYFRA21-1値が高くなる傾向が見られた。これらの成績は、同じサイトケラチン抗原であるTPAで示された陽性率あるいは傾向<sup>4~7)</sup>とほぼ同等である。今回のわれわれの検討症例は、約3/4が進行期もしくは再発例で、病期に偏りがあるため、病期および早期での検出率の検討は行わなかったが、これらの点についてさらに検討が必要と思われる。

良性疾患における陽性率はTPAと同じように<sup>7)</sup>、必ずしも低くなく、特に間質性肺炎、肺線維症できわめて高い陽性率を示した。このことは、肺癌の有病率の増加する高齢者のスクリーニングにおいては問題となると考えられる。

## 文 献

- 1) Mazier C, Malard V, Merono V, Mombrial C, Coste P, Pons D: Ball ELSA CYFRA<sup>TM</sup> 21-1: a new tumor marker in the field of lung cancer. Proc ISOBM 20th Anniversary Meeting: 61, 1992
- 2) Pujol J-L, Grenier J, Daures J-P, Daver A, Pujol H, Michel F-B: Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. Cancer Res 53: 61-66, 1993
- 3) 正岡 昭, 深井一郎, 藤村重文, 佐藤雅美, 永井 鑑, 三宅 智, 他: ヒトサイトケラチン19フラグメント(CYFRA21-1)の肺癌血清腫瘍マーカーとしての臨床的有用性. 肺癌(印刷中)
- 4) 鳥塚莞爾: 新しい腫瘍マーカー Tissue polypeptide antigen (TPA) 測定用プロリフィゲン TPA キット “第一” の臨床応用. 核医学 22: 1419-1429, 1985
- 5) 村上 稔, 西川彰治, 福地 稔: プロリフィゲン TPA キット “第一” II に関する基礎的ならびに臨床的検討. TPA 研究会論文集, 第一ラジオアイソotope研究所, 東京, 1988, pp. 24-28
- 6) 西村 治, 横井秀樹, 前部屋進自, 清水達也, 中山 均, 木下貴裕, 他: 肺癌における血清 TPA (IRMA) の検討. TPA 研究会論文集, 第一ラジオアイソotope研究所, 東京1988, pp. 35-36

7) 木村良子, 武智知子, 阿多まり子, 宮川直子, 藤井崇, 飯尾篤, 他: IRMA法によるTPA測定キット

トの基礎的および臨床的検討. 核医学 25: 665-672, 1988

### Summary

#### The Evaluation of the Newly Produced Assay Kit for the Cytokeratin Fragment, "Ball ELSA CYFRA21-1"

Yoshiko KIMURA, Mariko ATA, Seiji NAKAMURA, Takashi FUJII,  
Tadashi KAWAMURA, Shuhji TANADA and Ken HAMAMOTO

*Department of Radiology, Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan*

We evaluated the newly produced tumor marker assay kit, "Ball ELSA CYFRA21-1", which detects cytokeratin 19 fragment in the sera of patients with malignancies, especially lung cancers.

The assay procedure is simple based on the one-step radioimmunoassay method. The measured values depend somewhat on incubation temperature and time. Reproducibility and recovery were good. The minimum measurable level was 1 ng/ml. The dilution test was satisfactory.

The CYFRA21-1 levels were gradually decreased by repeated freezing and thawing and after seven such exercises its activity dropped to about 70% of that of first assay. The presence of CYFRA21-1 antigen was strongly correlated with TPA antigen and, although some discrepancies could be observed in clinical samples, CYFRA21-1 activity was completely absorbed by anti-TPA

antibody-coated beads in one sample.

CYFRA21-1 levels of 44 normal controls were below 1.0 ng/ml. Assuming a cut-off value of 2.0 mg/ml, 32.7% of all cases with benign disease had values greater than 2.0 ng/ml. This fell to 21.4% on exclusion of cases of interstitial pulmonary disease. Those with malignant diseases had high CYFRA21-1 levels whether associated with lung cancer or not. The most high positive ratios were observed in squamous cell lung cancer, small cell lung cancer, and uterine cervical cancer.

In conclusion, CYFRA21-1 may be a good tumor marker comparable to TPA not only for lung cancer but also other malignancies as well. High false positives for lung cancer, however, were observed in other pulmonary diseases.

**Key words:** CYFRA21-1, Tumor marker, IRMA, Cytokeratin.