

《ノート》

Phadebas CEA PRIST キットの基礎的および臨床的検討

Evaluation of Phadebas CEA PRIST Kit

千田 麗子* 辻野大二郎* 白倉 広久* 四方田 裕*

清水 真* 福島 正道* 佐々木康人** 染谷 一彦*

Reiko CHIDA*, Daijiro TSUJINO*, Hirohisa SHIRAKURA*, Yutaka YOMODA*,
Makoto SHIMIZU*, Masamichi FUKUSHIMA*, Yasuhito SASAKI**
and Kazuhiko SOMEYA*

**The 3rd Department of Internal Medicine, St. Marianna University School of Medicine*

***Department of Radiology, Toho University School of Medicine*

I. はじめに

近年、臨床医学における癌の血清学的診断法の必要性は高まってきており、多くの腫瘍マーカーが報告されその臨床での応用が進んでいる。中でも Gold ら¹⁾により大腸癌特異抗原として報告された Carcino embryonic antigen (CEA) はその後、結腸癌以外の多くの種類の癌でも血中に出現すること、また非癌患者や正常人にも存在することが認められ癌関連抗原の一つと考えられ、現在腫瘍マーカーの代表的なものとされている。血中 CEA 濃度の測定は、癌の早期診断的価値は低いが癌のスクリーニング検査、進行度の判定、治療効果の観察、再発の予知などの臨床的有用性が広く知られている²⁾。しかし CEA 自身が多様性を示すといわれ、この為各測定法の標準 CEA もある程度異なり、また抗体も異なるといわれている³⁾。さらに CEA と抗原の部分共通性を示す関連抗原 (NCA⁴⁾, NCA-2⁵⁾ なども知られ現在使用

されている各測定法はある程度これらを含めて測定されていると考えられる。それゆえ各測定法の測定結果の判定基準値も異なっている。

従来われわれはロシュ社製キット (Z-gel 法)⁶⁾、ダイナボット社製キット (Sandwich 法)⁷⁾ により CEA の測定を続けてきたが今回 Phadebas CEA PRIST キット (Pharmacia 社製、塩野義製薬提供) を使用する機会を得たのでその基礎的検討、ロシュ社製キットとの比較検討および各種疾患における血中 CEA 濃度を測定した知見について報告する。

II. 対象および方法

検討の対象としたのは、正常対照 31 例 (男 16 例、女 15 例)、癌患者 121 例、良性疾患患者 113 例、合計 265 例である。癌患者のうちわけは、食道癌 10 例、胃癌 18 例、大腸癌 19 例、肝癌 16 例、脾癌 16 例、肺癌 20 例、乳癌 12 例、その他 7 例であり、良性疾患は急性肝炎 10 例、慢性肝炎 10 例、肝硬変 15 例、胆石症 11 例、胃潰瘍 10 例、胃ポリープ 5 例、結腸ポリープ 8 例、脾炎 8 例、肺炎 7 例、甲状腺機能亢進症 17 例、甲状腺機能低下症 12 例である。

臨床検体は EDTA 加採血により得た血漿を用

* 聖マリアンナ医科大学第三内科

** 東邦大学医学部放射線科

受付：57年2月8日

最終稿受付：57年5月12日

別刷請求先：川崎市宮前区菅生 2095 (〒213)

聖マリアンナ医科大学第三内科

千田 麗子

Key words: CEA, Sandwich method, Tumor marker.

いた。

Phadebas CEA PRIST キットは抗体を固相化したペーパーディスクと標識抗体との間に抗原をはさむ Sandwich 法によるものである。測定操作はキットの指示に従った (Fig. 1)。CEA 抗体ペーパーディスクを試験管に入れ、標準 CEA 溶液または希釈未知検体 $100 \mu\text{l}$ を加え室温で 3 時間水平振盪する (第一反応)。アスピレーターを用い反応液を吸引除去したのち 0.9% 生理食塩水 2.5 ml でペーパーディスクを洗浄する。この操作を 3 回行ったのち ^{125}I -CEA 抗体溶液 $50 \mu\text{l}$ を加え室温で 16~20 時間静置する (第二反応)。第一反応と同様に生理食塩水で 3 回洗浄したのちペーパーディスクの放射活性 (Bound, B) および総放射能 (Total, T) をウェル型シンチレーションカウンターを用いて測定する。片対数グラフの横軸に $0.5 \sim 50 \text{ ng/ml}$ の CEA 濃度、縦軸に B/T % をとり標準曲線を作製し、これを用いて検体中 CEA 濃度を求めた。検体はキットに添付された希釈血清を用い通常は 5 倍希釈にて測定、 200 ng/ml 以上の場合にはさらに希釈して測定した。

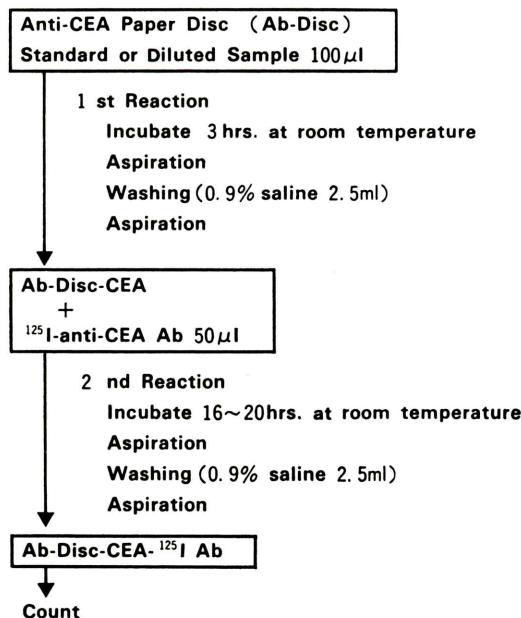


Fig. 1 Assay Procedures.

キットの評価のために一連の基礎的検討と臨床検体測定を行った。またロシュ社製 CEA キットで同一臨床検体を測定し、測定値の比較を行った。

III. 結 果

1. 基礎的検討

(1) 標準曲線

12回の測定で得られた標準曲線の各標準 CEA 濃度における平均値 ± 1 標準偏差 ($\bar{x} \pm 1 \text{ S.D.}$) を Fig. 2 に示す。CEA 濃度 $0.5 \sim 50 \text{ ng/ml}$ での結合率 B/T % は 2~25% であり各濃度における 12 回測定の変動係数 (C. V.) は 10.1~15.5% で毎回安定した標準曲線が得られた。

(2) インキュベーション時間の影響

第一反応でのインキュベーション時間の影響を検討するため、測定値 132.5 ng/ml の臨床検体を 5 倍希釈で用い、インキュベーションを 30 分から 5 時間まで 8 段階で行った。抗 CEA ペーパー

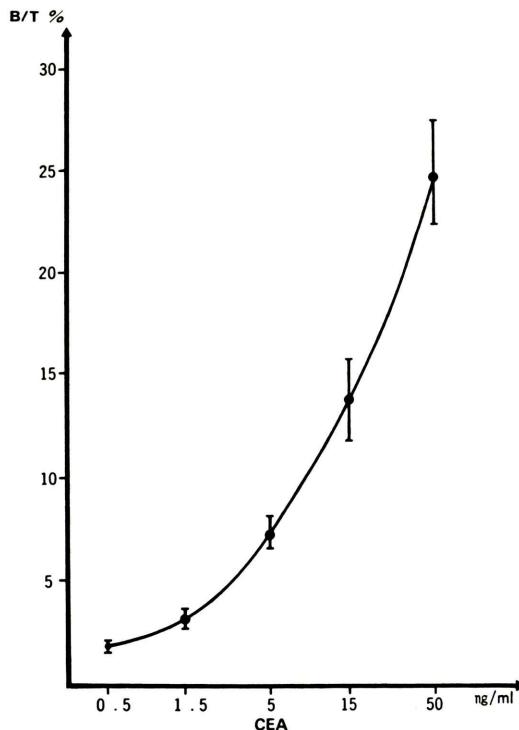


Fig. 2 Standard curve.

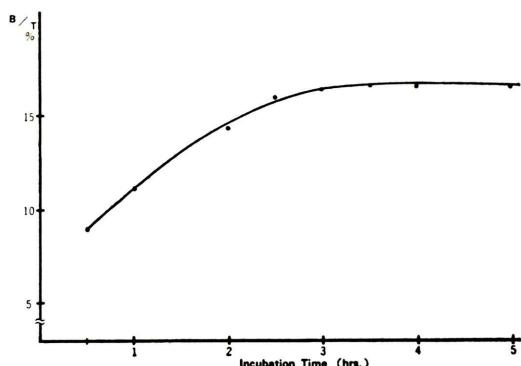


Fig. 3 Effect of Incubation Time on the 1st Reaction.

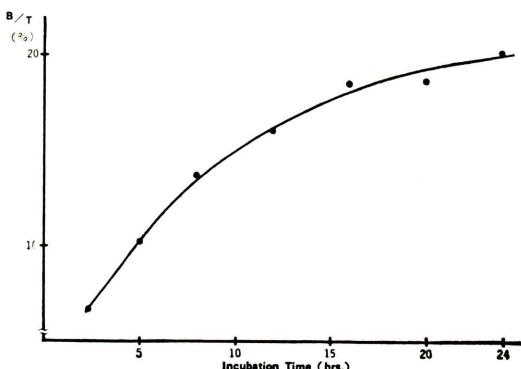


Fig. 4 Effect of Incubation Time on the 2nd Reaction.

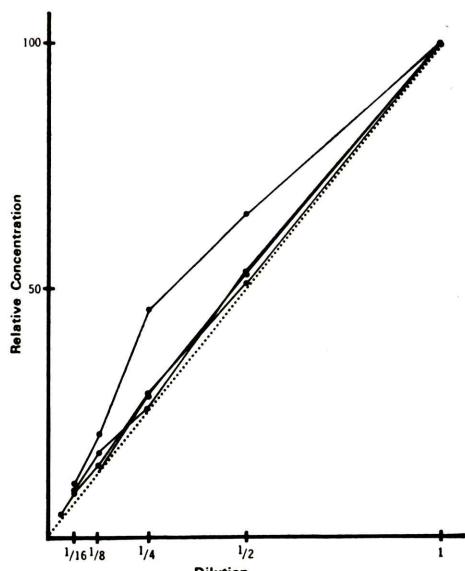


Fig. 5 Dilution Test.

ディスクに対する CEA の結合率(B/T %)の変化をみるとキットの指示時間である 3 時間のインキュベーションで結合率はプラトーに達した (Fig. 3)。

第二反応では測定値 230 ng/ml の臨床検体を 10 倍希釈で用い、インキュベーション時間を 2 時間 15 分から 24 時間まで 7 段階で検討した。結合率はキットの指示時間である 16~24 時間ではまだ緩慢な上昇傾向を示した (Fig. 4)。

(3) 再現性

精度管理のために低、中、高濃度の 3 種のコントロール検体を作製し、2 重測定で 12 回測定した。この結果より Within assay variance と Between assay variance を Rodbard⁸⁾ の方法により計算した。Within assay variance は平均濃度 5.28 ng/ml で C. V. は 6.5 %, 57.8 ng/ml で 5.1 %, 135.6 ng/ml で 5.9 % であり Between assay variance は、それぞれ 14.6 %, 12.6 %, 12.0 % であった。

(4) 希釈試験

患者検体 4 例につきキットに添付されている希釈血清を用いて希釈試験を行った。肺癌、鉄欠乏性貧血の 2 例は原液より、大腸癌の 1 例は 2.5 倍希釈、膀胱の 1 例は 10 倍希釈より倍々希釈し測定を行った。4 例のうち 3 例では希釈測定の結果はほぼ直線性を示したが原液より測定した肺癌の 1 例では直線を示さなかった (Fig. 5)。

(5) 回収試験

CEA 濃度 1.92 ng/ml の正常対照血漿に 0.75~25.0 ng/ml の濃度の標準 CEA を加えて測定した結果より得た回収率は 79.6~96.0 %, 平均 87.9 % であった (Table 1)。

(6) 血漿試料と血清試料の比較検討

検体として血漿または血清を用いた場合の測定値の差を検討するため正常対照男女 18 名より同時に採血して得た血清と EDTA 加採血による血漿を同時に測定し、その結果を比較した。血清 $2.63 \pm 1.62 \text{ ng/ml}$ ($\bar{x} \pm 1 \text{ S. D.}$)、血漿 $2.64 \pm 1.45 \text{ ng/ml}$ であり両者の相関係数は $r=0.967$ と非常に良い相関を示した。

(7) 検体の凍結解凍による影響

検体の凍結解凍をくり返すことによる測定値への影響を検討するため同一検体を用い凍結解凍を0~11回までくり返し測定した。測定値は凍結解凍回数増加に伴う一定の増減の傾向は示さずC.V.は8.2%であった。

(8) ロシュ社製キットとの相関

本キット(X)とロシュ社製キット(Y)の両者で同一検体を測定することができた良性疾患100例、癌99例計199例でその測定値を比較した。ロシュ社製キットにおいて20.0 ng/ml以上を示す検体についてはキットの測定法が異なるため20.0 ng/ml以下を測定する場合の過塩素酸による除タンパクを行う間接法で測定できた検体について検討を行った。

本キットとロシュ社製キットによる測定結果の相関係数は $r=0.921$ と良い相関を示し、回帰直線は $Y=0.54X+0.25$ であり、本キットの測定結果はロシュ社製キットに比し高値を示した(Fig. 6)。

2. 臨床検討

(1) 正常対照のCEA値

正常対照31例(男16例、女15例、年齢22~47歳、平均31.4歳)の血漿をキットの指示通り5倍希釈で測定したところ約半数がキットの感度限界(2.5 ng/ml)以下を示したため正常値を求め

Table 1 Recovery Test

Added (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (%)
0	1.92	—
0.75	2.64	96.0
2.5	3.91	79.6
7.5	8.25	84.4
25.0	24.8	91.5

$$\bar{m}=87.9\%$$

るために感度以下を示した検体については2倍希釈で測定した。

結果は男性 2.96 ± 1.73 ng/ml ($\bar{m} \pm 1$ S.D.)、女性 1.68 ± 0.70 ng/ml、全体で 2.32 ± 1.34 ng/mlであった。正常上限値として正常対照の平均値 \pm 2標準偏差($\bar{m} \pm 2$ S.D.)をとると5.0 ng/mlとなる。

(2) Cut off point の検討

本キットとロシュ社製キットの両者で同一検体を測定することができた各種癌121例、良性疾患84例につきCEA測定値の分布を検討した。

現在世界的に広く利用されているロシュ社製キットの正常上限値はロシュ共同研究会⁹⁾で5.0 ng/mlと設定されたが著者らの成績⁶⁾でもこれに一致している。上記の同一症例でロシュ社製キットで5.0 ng/mlをCut off pointとするとsensitivity 33.1%，specificity 82.1%となる。一方Phadebas CEAキットでは5.0 ng/mlをCut off pointとす

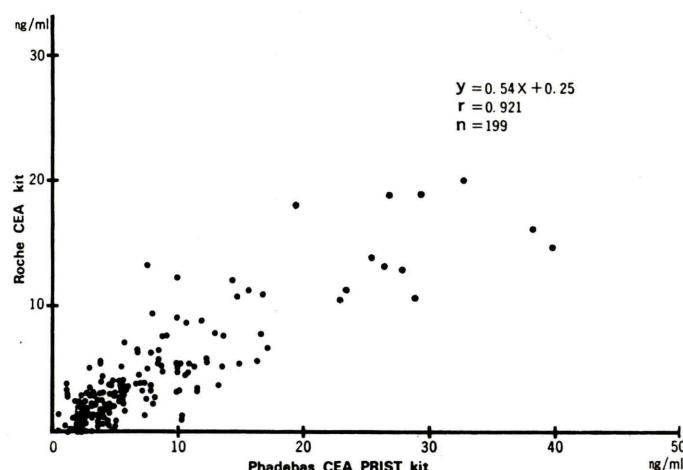


Fig. 6 Correlation of CEA Levels between two different RIA kits.

ると sensitivity 45.5%, specificity 57.1% となり 7.5 ng/ml を Cut off point とすると sensitivity 33.1%, specificity 72.6% となる (Table 2). この

Table 2 Assessment of cut off point

	>5.0 ng/ml	Carcinoma	Benign Disease
		121 cases	84 cases
Roche kit	>5.0 ng/ml	40	15
Phadebas kit (1)	>5.0	55	36
(2)	>7.5	40	23
Roche kit	<5.0	81	69
Phadebas kit (1)	<5.0	66	48
(2)	<7.5	81	61

$$\text{Roche kit} \quad \frac{40}{121} \times 100 = 33.1\%$$

$$\text{Phadebas kit (1)} \quad \frac{55}{121} \times 100 = 45.5\%$$

Specificity	
Roche kit	$\frac{69}{84} \times 100 = 82.1\%$
Phadebas kit (1)	$\frac{48}{84} \times 100 = 57.1\%$
(2)	$\frac{61}{84} \times 100 = 72.6\%$

結果より両キットの測定結果を臨床的に比較するに当っては本キットでは Cut off point を 7.5 ng/ml とするのが適当と思われた。以下この濃度以上を CEA 陽性と表現した。

(3) 各種癌における CEA 値

各種癌 121 例につき 血漿中 CEA 値を測定した。原発臓器別にみると、血漿中 CEA 陽性例は食道癌 10 例中 1 例 (10%), 胃癌 18 例中 4 例 (22.2%), 大腸癌 19 例中 9 例 (47.4%), 肝癌 16 例中 4 例 (25.0%), 膵癌 16 例中 5 例 (31.3 %), 肺癌 20 例中 9 例 (45.0%), 乳癌 12 例中 2 例 (16.7%), その他 7 例中 5 例 (71.4%) であり、癌全体での陽性率は 33.1 % であった。また 20.0 ng/ml 以上の著明な CEA 高値を示した症例は、大腸癌 6 例、膵癌 4 例、肺癌 7 例など計 22 例 18.2% にみられた (Fig. 7).

(4) 良性疾患における CEA 値

良性疾患 113 例につき血漿中 CEA 値を測定した。全体での陽性率は 26.5% であった。しかし CEA 陽性を示した症例も癌症例に比しその濃度は低値なものが多く、肝硬変、慢性肺炎、甲状腺機能低下症各 1 例ずつ計 3 例 2.7% を除きすべて 20.0 ng/ml 以下であった。疾患別にみると、陽性

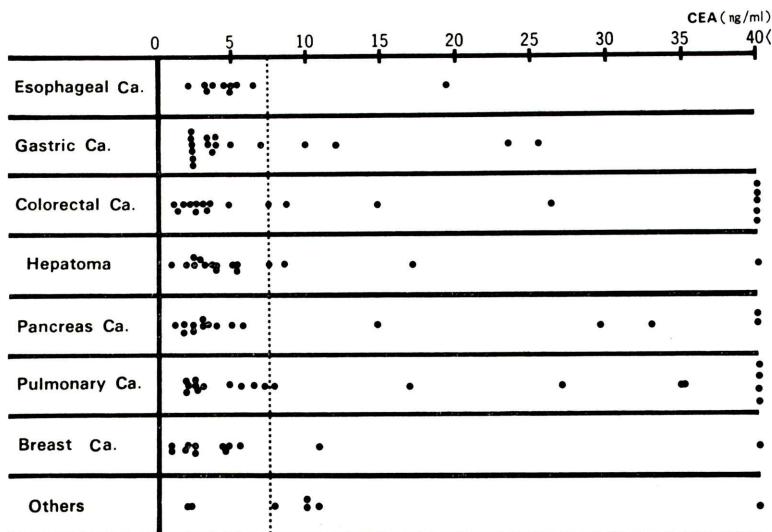


Fig. 7 Plasma CEA Levels in Various Carcinomas.

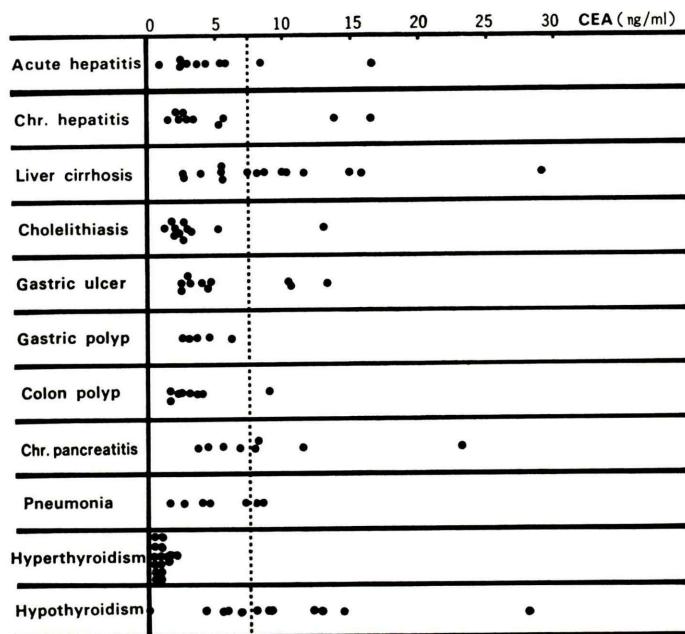


Fig. 8 Plasma CEA Levels in Benign Diseases.

率の高い疾患は甲状腺機能低下症 12 例中 7 例 (58.3%), 肝硬変 15 例中 8 例 (53.3%), 慢性膀胱炎 8 例中 4 例 (50.0%) であった。甲状腺機能亢進症は全例 2.5 ng/ml 以下と著明な低値を示し、甲状腺機能低下症と明らかな対比をみせた (Fig. 8)。

IV. 考 察

CEA の測定法としては Radioimmunoassay (RIA) が広く用いられている。わが国では Z-gel¹⁰ 法を用いたロシュ社製キット、Sandwich¹¹ 法を用いたダイナボット社製キット、二抗体法¹² を用いた CIS キットなどがすでに臨床で広く利用されている。近年 RIA 法以外に酵素免疫測定法 (Enzymeimmunoassay) によるアボット社製の CEA-EIA キットも知られている。今回検討した Phadebas CEA PRIST キットは Sandwich 法の原理によるものであり、測定法は現在本邦で広く使用されているダイナボット社製キットとほぼ同じである。ダイナボット社製キットでは加熱処理により検体の除タンパクを行うが本キットでは除タンパクは行わず直接希釈測定する。

本キットの測定操作は簡便であり測定は約 1 日半で終了する。キットの基礎的検討の結果では Within assay variance は 5.1~6.5% (C. V.) であり Between assay variance も 12.0~14.6% と比較的良好な精度、再現性を示した。

インキュベーション時間の影響をみた結果 Bound の計数率は第一反応ではキットの指示時間である 3 時間でプラトーに達した。第二反応ではキットの指示時間ではまだ反応は完結していなかったがその時間差による計数率の変化はわずかであり、測定操作による時間の影響は少ないとと思われた。

本キットの測定原理である Sandwich 法では高濃度で high dose hook effect¹³ といわれる現象がみられるため通常高濃度検体は希釈測定する。今回希釈試験を行った臨床検体 4 例中原液より測定した肺癌の 1 例で結果は直線性を示さずかなり強い彎曲を示した。原因として第一に検体中に存在する CEA 物質とキットの標準 CEA の差が考えられる。これは CEA そのものの多様性や交叉反応を示す CEA 関連抗原の存在のため他のキット

でも同様のことが知られている¹⁴⁾。第二に本キットでは除タンパクを行わないための高濃度血清タンパクによる非特異的抗原抗体反応の阻害が考えられる。キットでは後者の影響を考え、検体はキットに添付されている希釈血清を用い5倍希釈で測定し、200 ng/ml以上の場合再検するよう指示している。

検体の血漿と血清の差が測定値に影響するかを検討したが差はみられなかった。検体としては両者とも使用でき、測定値も同様に比較できると思われた。他に検体の凍結解凍試験も行ったが測定値に明らかな差はみられなかった。

以上のように本キットによる血中CEA濃度測定の基礎的検討の結果は日常臨床検査として満足できるものと思われる。

本キットとロシュ社製キットとの測定値の相関をみたが相関係数は $\gamma=0.921$ と除タンパクの有無、抗原、抗体、測定法がおのおの異なる両測定法としては良い相関を示した。

本キットの正常上限値は今回検討した正常対照の測定結果より5.0 ng/mlとした。しかし対照がCEA低値を示すといわれる¹⁵⁾平均年齢31.4歳の若年層であるので現在世界的に広く使用されているロシュ社製キット(正常値5.0 ng/ml)との臨床検体測定値の比較より今回はCut off pointを7.5 ng/mlとし、これ以上をCEA値陽性と表現し臨床検討を行った。

臨床症例の測定結果も癌の原発巣別陽性率、全体での陽性率も他のキットでの報告^{9,11)}とほぼ同様であった。良性疾患での偽陽性例の多い疾患は、肝疾患¹⁶⁾、慢性肺炎¹⁷⁾、甲状腺機能低下症¹⁸⁾など他の報告と同様であった。

甲状腺機能亢進症が全例2.5 ng/ml以下の低値であり、甲状腺機能低下症の多くがCEA高値を示したことは血中CEA濃度上昇の原因として肝疾患や腎不全の場合と同様CEAの代謝が重要な因子となることを推測させる興味ある所見と考えられた。

V. おわりに

Phadebas CEA PRIST キットを検討した結果、精度、感度、再現性など良好であり、日常臨床検査法として満足すべき結果を得た。CEA測定法として広く臨床に利用できうるものと考えられる。

文 献

- Gold P, Freedman SO: Demonstration of Tumor-Specific Antigen in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* **121**: 439-462, 1965
- 大倉久直、向島達：癌胎児性抗原(CEA). *日本臨床* **38**: 1403-1413, 1980
- Vrba R, Alpert E, Isselbacher KJ: Immunological heterogeneity of serum carcinoembryonic antigen (CEA). *Immunochemistry* **13**: 87, 1976
- Von Kleist S, Chavanel G, Burtin P: Identification of an Antigen from Normal Human Tissue that crossreacts with the Carcinoembryonic Antigen. *Proc Nat Acad Sci USA* **69**: 2492-2494, 1972
- Burtin P, Chavanel G, Hirsch-Marie H: Characterization of a Second Normal Antigen that Cross-Reacts with CEA. *J Immunology* **111**: 1926-1928, 1973
- 辻野大二郎、佐々木康人、千田麗子、他：Carcinoembryonic Antigen の Radioimmuno assay キットの基礎的検討とその臨床応用. *核医学* **13**: 533-541, 1976
- 染谷一彦、辻野大二郎、千田麗子、他：血中Carcinoembryonic antigen 測定の臨床的検討. *臨床成人病* **7**: 131-136, 1977
- Rodbard D: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immuno-radiometric assays. *Clin Chem* **20**: 1255-1270, 1974
- CEA 調査結果, CEA ロシュ共同研究会, 1976
- Hansen HJ, Lance KP, Krupey J: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel. *Clin Res* **19**: 143 (abst), 1971
- 平井秀松：CEA その1. *日本臨床* **34**: 1274-1279, 1976
- Egan ML, Lutenschleger JT, Coligan JE: Radioimmuno assay of Carcinoembryonic Antigen. *Immunochemistry* **9**: 289-299, 1972
- Miles CEM, Lipschitz DA, Bieber CP, et al: Measurement of serum ferritin by a 2-site immuno-radiometric assay. *Anal Biochem* **61**: 209-224, 1974
- 村田健二郎、藤原初雄、菅 優子：CEA (Carcinoembryonic antigen) 測定法の比較検討. *癌の臨床* **25**: 107-114, 1979

- 15) Hansen HJ, Snyder JJ, Miller E, et al: Carcinoembryonic Antigen (CEA) Assay. Human Pathology **5**: 139-146, 1974
- 16) Loewenstein MS, Zamcheck N: Carcinoembryonic antigen and the liver. Gastroenterology **72**: 161-166, 1977
- 17) Delwiche R, Zamcheck N, N Margon: Carcinoembryonic Antigen in Pancreatitis. Cancer **31**: 328-330, 1973
- 18) Amino N, Kuro R, Yabu Y, et al: Elevated Levels of Circulating Carcinoembryonic Antigen in Hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab **52**: 457-462, 1981