

《ノート》

ビーズ固相法 CEA ラジオイムノアッセイキットの基礎検討

Studies on a Solid Phase CEA Radioimmunoassay

長 田 篤 雄*

Atsuo NAGATA*

*Radioisotope Laboratory, Saitama Medical School

I. はじめに

Carcinoembryonic Antigen (CEA) の測定では現在 Radioimmunoassay (RIA) 法¹⁻⁵⁾ および Enzymeimmunoassay (EIA) 法⁶⁾ と開発が進み、測定キットとしてもすでに 5 種類以上^{2,6-20)} が実用に供されている。しかしすでに指摘されているように、CEA およびその類似抗原の多様性^{5,11-18)}、さらには抗 CEA 抗体の差異^{7,13)} によってこれらキット間での相関関係は認められてはいるものの、同一試料で測定値に相当な差異があるため、それぞれのキットによる測定値の互換性はほとんど無いとされている。これらの事情を考慮するといまだに完全な測定キットと断言できる状態にはないように思われる。しかし临床上ではすでに一部の癌のマーカーとして高く評価されており^{8,11,12,19)}、癌、非癌の認識度や経過観察のために、測定系に用いる抗原、抗体の質的改善、高値の希釈性の改善などの努力は続けられるべきであろう。

われわれは今回新しく開発された第一ラジオアイソトープ研究所の CEA Radioimmunoassay キット(以下、本法)を入手する機会を得たので、現在実施しているダイナボット社の CEA RIA キットとの比較を中心として検討を行った。

II. 実 験

1. キットの構成と標準的測定法

本キットは標準濃度品 6 バイアル (300, 50, 10, 3, 1, 0 ng/ml), ¹²⁵I-抗 CEA ヤギ抗体, 固相抗 CEA ヤギ抗体ビーズ, およびコントロール血清が含まれている。標識抗体と固相抗体は別々の CEA 標品に対して作製したヤギ抗体²⁰⁾である。Figure 1 にアッセイ手順を示す。抗体ビーズとサンプルによる第 1 インキュベーションと、それに続く¹²⁵I-CEA 抗体を加えての第 2 インキュベーションが必要なサンドイッチ法となっている。

2. 実験方法

標準曲線の安定性を確認するため、同一ロットで測定日を 3 回変えた場合、異なる 3 ロットで 3 回測定した場合の標準曲線およびコントロールの値を比較した。またインキュベーション時間の影響を第 1 インキュベーションでは 2, 4, 6, 24 時間と変化させ標準曲線とコントロールについて検討した。第 2 インキュベーションについても同様に 4, 24, 48 時間について検討した。この場合温度はすべて 23°C に固定した。アッセイ内変動については 3 種類の血清についてそれぞれ 10 回ずつ測定し、平均値、標準偏差 (SD), 変動係数 (CV) を求めた。またアッセイ間についても 6 種類の血清について 6~8 回測定し同様に評価した。

高濃度サンプルはキット添付の 0 ng/ml 標準液

Key words: CEA, radioimmunoassay, solid phase, plastic bead, dilution methods on sample.

* 埼玉医科大学研究施設

受付: 58 年 6 月 13 日

最終稿受付: 58 年 8 月 1 日

別刷請求先: 入間郡毛呂山町本郷 38 (☎ 350-04)

埼玉医科大学 RI 研究施設

長 田 篤 雄

Standard or Sample 50 μ l
 ↓
 Buffer 200 μ l
 ↓
 Antibody Bead 1
 ↓ first incubation (4 hrs, room temp.)
 Wash Bead
 ↓
 125 I-CEA antibody 200 μ l
 ↓ second incubation (20 hrs, room temp.)
 Wash Bead
 ↓
 Count

Fig. 1 Assay procedure of the CEA radioimmunoassay kit (Daiichi).

(1.2%ウシ γ -グロブリン, 0.5%BSAを含む0.1 M 酢酸緩衝液)²⁰⁾で倍々希釈を行い標準曲線との平行性および測定値の直線性を観察した。

他の測定法との相関性は従来から広く国内で使用されているダイナボット社の CEA RIA キット^{5,7,19)}(以下D法)との比較を行った。両測定法の無希釈での測定値と希釈での測定値についてそれぞれ比較した。D法については高値の際立った頭打ち現象²¹⁾が指摘されているので、われわれは10ng/ml以上のサンプルをすべて希釈測定している。この方法²²⁾の概要は、初期濃度を元に希釈倍率を決めて倍々希釈で3濃度のサンプルを調整し、これらの測定値と希釈比率の間に直線性が観察される値に希釈倍率を乗じて測定値を求める方法である。例えば10~20ng/mlでは5, 10, 20倍希釈系列, 20ng/ml以上では10, 20, 40倍希釈を行い、これらで直線性が確認されない場合はさらに高倍率希釈を採用する方法である。またこれら相関関係の観察以外にD法標準濃度を本キットで、また逆の測定も行い標準濃度品の比較を行った。

臨床的検討としては、健常男子25名(年齢20~45歳)について測定し正常範囲を推定した。また各種疾患については、胃癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌、肝癌、膵臓癌、糖尿病、肝炎、肝硬変について測定し比較を行った。この場合100ng/mlを超過するサンプルについては希釈測定を行った。

III. 結 果

1. 標準曲線の形状について

Figure 2Aに同一ロットで測定日を3回変えた場合の標準曲線を示すが、放射能減衰によるカウント低下は見られるものの平行性は失なわれていない。Figure 2Bに異なる3ロットの標準曲線を示す。ほとんど一致しており形状の差異も全く見られない。また標準曲線は両対数で表示されているが50ng/mlまでは直線的に経緯しているが50~300ng/mlでは抑制されている。しかしこれら2点のカウント差は50,000cpm以上あり、300ng/mlでの変動を2,000cpmとしても十分有意な読み取りが可能である。

2. インキュベーション時間について

第1インキュベーション時間を2~24時間まで変化させた場合、標準濃度では多少のパウンド率上昇が認められるが、コントロール血清およびサンプルでは相当な上昇を示した。したがってTable 1に示すように2時間に比較して24時間では約2倍の測定値が観察された。第2インキュベーション時間については4~48時間に変化させて観察したが、標準濃度、サンプルともに平行に近いパウンド率の上昇であった。したがって測定結果は多少の増加にとどまり影響は少ないと考えられた。これらの結果から、第1インキュベーションは原法の4時間程度で固定する必要があるが、第2インキュベーションは24時間を目処とし厳密である必要はない。また第1インキュベーション時間を無くし、抗体ビーズと標識抗体を同時に添加して24時間インキュベーションすると、標準濃度は原法と大差ないパウンド率を示したがサンプルにおいては特に高濃度でパウンド率の低下が顕著であり低測定値を示した。

3. アッセイ内、間の変動

3種類の血清サンプル(A, B, C)についてアッセイ内でそれぞれ10回測定したところ、Aでは平均値(\bar{A})5.3ng/ml, SD=0.212, CV=4.041%であった。また \bar{B} =29.7ng/ml, SD=1,160, CV=3,904%, \bar{C} =253ng/ml, SD=9,775, CV=3,864%であ

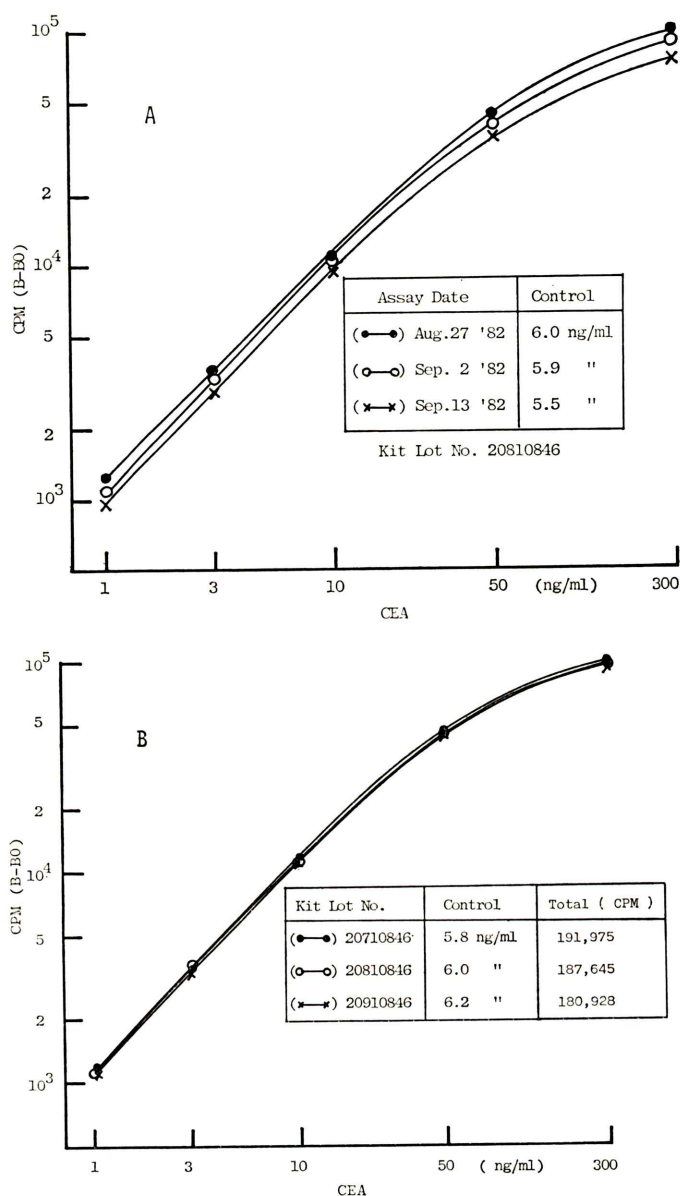


Fig. 2 Comparison of the standard curves within same lot (A) and among different lot (B).

りいづれも CV が 5% を切る良好な再現性であった。

アッセイ間変動については Table 2 に 6 種類のサンプルについて各アッセイにおける測定値を示す。キットに含まれるコントロール血清と Pool

A, Pool B については Lot No. 20810846 で 3 回測定しているが CV はいづれも 10% 以下であった。全体では Pool B が CV=10.56% を示した以外いづれも 10% 以下であり良好な再現性であった。

Table 1 Effect of the first incubation time on B/T % of the standards and samples

	Standard			Sample		
	1 (ng/ml)	10	300	Control	Pool A	Pool B
2 hours	0.44	4.09	42.72	2.37 (5.6)	18.00 (50.0)	1.11 (2.6)
4 „	0.52	4.75	43.81	2.95 (6.4)	24.54 (77.0)	1.65 (3.8)
6 „	0.43	4.34	43.11	3.37 (7.5)	24.12 (78.0)	1.72 (3.6)
24 „	0.52	4.73	44.65	5.13 (10.7)	32.20 (121.0)	2.58 (5.3)

(): calibrated values of samples

Table 2 Interassay variance (unit; ng/ml)

Lot. No. of kit	Control serum	Pool serum		Survey serum		
		A	B	A	B	C
20510846	5.7					
20710846	5.9	5.6	2.5	6.6	38	98
	5.8	5.9	3.3	6.3	40	92
20810846	6.0	6.6	3.1	7.1	43	88
	5.9	6.7	3.2	6.8	38	92
	5.4	5.8	2.8			
20910846	6.8			7.1	38	90
	6.4	6.7	3.3	6.9	42	98
Mean (20810846)	5.77	6.37	3.03			
S.D.	0.32	0.49	0.21			
C.V. %	5.57	7.75	6.86			
Mean (whole)	5.99	6.22	3.03	6.80	39.83	93.0
S.D.	0.43	0.50	0.32	0.31	2.23	4.15
C.V. %	7.22	8.10	10.56	4.56	5.59	4.46

4. 希釈試験

無希釈で高値を示したサンプルについてキット添付の 0 ng/ml 標準液で倍々希釈し、標準曲線との平行性を観察した。Figure 3A, B に示すようにほとんどのサンプルでは 4 倍以上の希釈で平行性が出現するが、一部のサンプルでは高倍率希釈が必要である。また平行性の有無は前述のような 3 点希釈を行うことで確認可能である。さらにこれら希釈実験で一部のサンプル (4, 6, 8, 13, 14) で高倍率希釈で若干平行性が失なわれることが示された。

それぞれの希釈率と測定値の関係を Figure 4 に示す。これから判断すると初期濃度が 100 ng/ml を超えるサンプルでは、希釈直線より初期濃度が低値に外れて観察され、その傾向は初期濃度が高値に

なるほど著しいことが示された。したがって初期濃度が 100 ng/ml 以上では希釈測定に適応となり、希釈倍率は前述のように 5, 10, 20 倍など 3 点希釈が有用と考える。

5. 他の測定法との相関性について

ダイナボット社 CEA RIA キット (以下 D 法) との比較を行った。無希釈での両測定法の値について相関を Figure 5A に示す。回帰式 $Y = 3.12X - 4.2$ 、相関係数 $r = 0.882$ (対数変換すると $\text{Ln}Y = 1.160 \text{Ln}X + 0.339$, $r = 0.922$) であり、D 法では 90 ng/ml、本法では 300 ng/ml を超えるサンプルは今回の検討では観察されなかった。対数変換による回帰式から D 法の基準値である 2.5 ng/ml に相当する値を求めたところ 4.1 ng/ml であった。

当施設では D 法については高値の頭打ち現象が

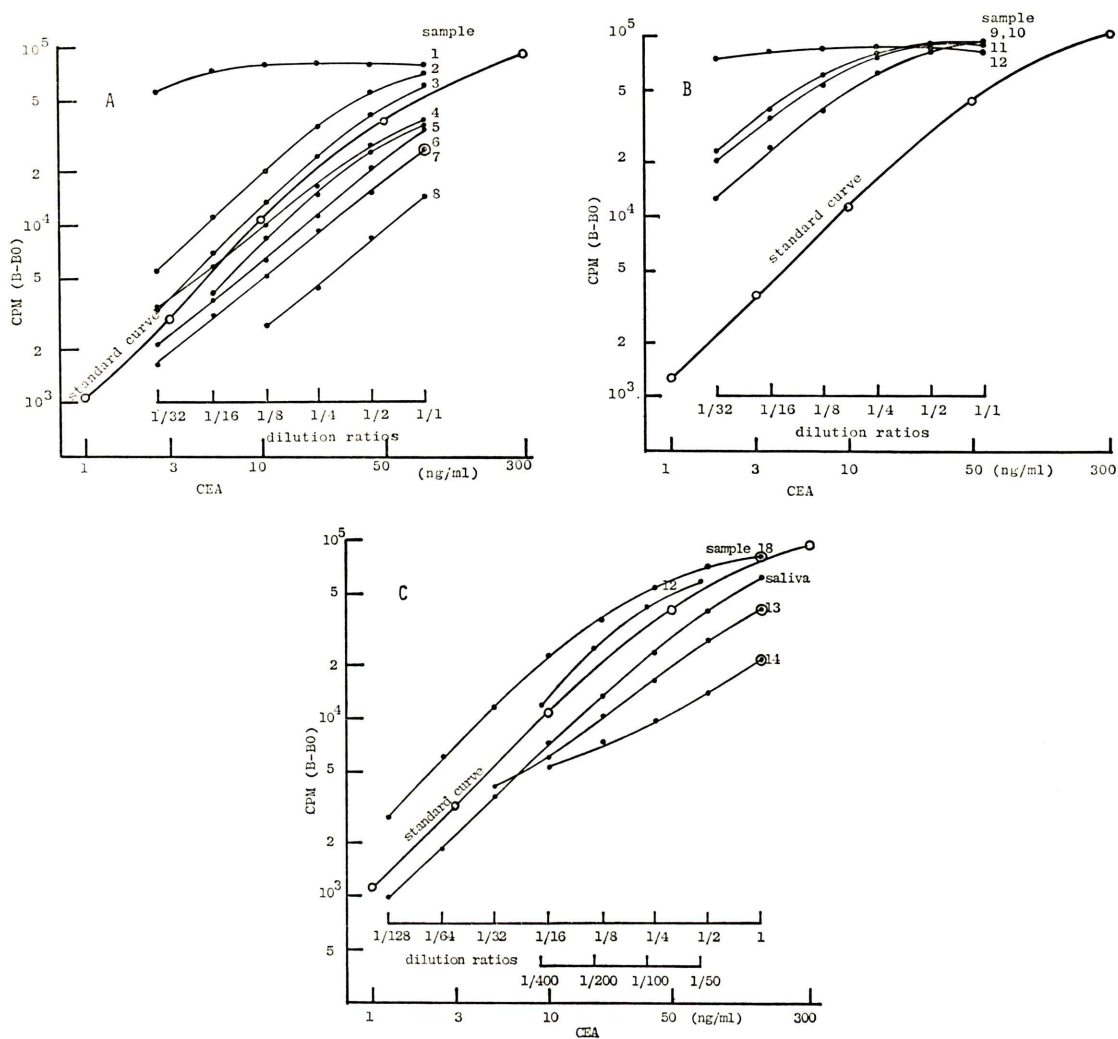


Fig. 3 Comparison of the dose-response curves between the standard concentrations and various high CEA concentration samples (A, B, C).

◎: ascites sample

あることから 10 ng/ml 以上を前述のようにすべて希釈測定している。Figure 5B に D 法での希釈測定結果と本法での同様の希釈測定結果の相関性を示す。回帰式は $Y = 3.21X - 49.5$, 相関係数 $r = 0.888$ ($\text{Ln}Y = 1.260 \text{Ln}X - 0.579$, $r = 0.902$) であった。対象が 16 例と少ないが希釈測定上の相関性は良好であり、希釈測定の意義は高いと考えられる。

6. 臨床的検討

健常男子 25 名 (年齢 20~45 歳) について測定した

ところ平均値 1.88 ng/ml, $SD = 0.70$ であり最大値は 3.7 ng/ml, 最小値は 1.4 ng/ml であった。平均値 $+2SD$ 以下を正常範囲とすると約 3.3 ng/ml 以下となった。しかし 25 例中 3.3 ng/ml 以上を示す例が 3 名有るのでこれらを考慮すると本法では 4.0 ng/ml まで正常範囲とすることが適当と考える。この値を参考として D 法における正常値 “2.5 ng/ml 以下”^{5,7,11,12)} を使って本法における値を比較した。まず D 法で 2.5 ng/ml 以下を示した

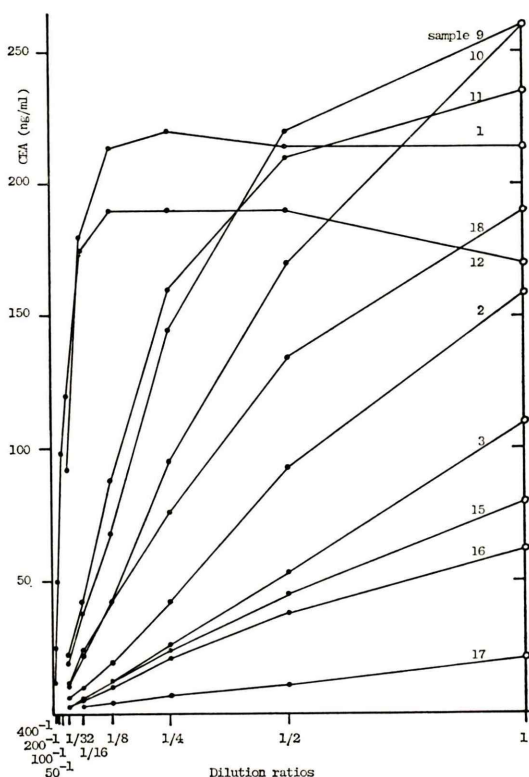


Fig. 4 Dilution test of various high CEA concentration samples. Same sample number was used in Fig. 3.

サンプルを本法で測定した場合では27例中5例(18.5%)が4.0 ng/mlを上回った。またD法で2.6~3.0 ng/mlに当たる疑わしいケースについては本法で4.0 ng/ml以下が30例中14例(46.7%)であった。さらにD法で3.1~5.0 ng/mlの値を示し何らかの異常が疑われるケースについては39例中2例のみ4.0 ng/ml以下を示した。これらの結果から4.0 ng/ml以下を本法における正常範囲として適当と考えるが、3.0~5.0 ng/mlには疑わしいケースが多く含まれると考える。これら健康人および各種疾患について測定した値をFigure 6に示す。100 ng/ml以上の値は前述のような方法による測定値である。最高値では胃癌の1,700 ng/mlが観察された。全体として消化器系癌で高値を示し、また肺癌、膵臓癌でも高値を示した。しかし子宮

癌、卵巣癌では正常範囲への重なりが多く観察された。また肝機能低下を伴う疾患でも若干高値が観察された。

IV. 考 察

第一ラジオアイソトープ社のCEA RIAキット²⁰⁾(以下、本法)について基礎的検討を主として行った。アッセイ方法はサンプルと抗体ビーズとの第1インキュベーションと、反応ビーズを洗浄後の¹²⁵I-CEA抗体を加えてからの第2インキュベーションに分れている。全操作行程が2日間にわたる方法であるが一操作に必要な時間は比較的短時間であり、また前処理なども不要なので使いやすい設定となっている。またサンプルも50 μ lで行う点では他の関連項目と合せて測定される場合に大変有利な点であろう。

基礎検討であるが、ロット内およびロット間でも標準曲線はきわめて安定しており、アッセイ間変動係数も10%以下を示し全体として安定な測定が可能であった。

インキュベーション条件では第1インキュベーション時間を延長すると原法に比較してサンプルのバウンド率の上昇が顕著であり特に高値では影響が大きい。これは標準濃度とサンプルの液性の違いが考えられ標準濃度では早期に平衡に達するが、サンプルにおいては何らかのInhibition factorによって遅延しているものと考えられる。これに対して第2インキュベーションでは4~48時間でわずかにバウンド率は上昇するが標準濃度とサンプルが平行的に増加するので影響は少ない。これは第1インキュベーション後に抗体ビーズを洗浄しサンプル中に含まれる種々のInhibition factorが取り除かれたためと考えられる。したがって第1インキュベーションは一定時間に定めて行う必要があり、最低標準濃度域および健康者サンプルのバウンド率から判断して指定法の4時間は適当な設定であろう。

高値サンプルの希釈試験では100 ng/ml以上で頭打ち現象が観察された。しかし100 ng/ml以下ではほとんど観察されず良好な希釈直線性および

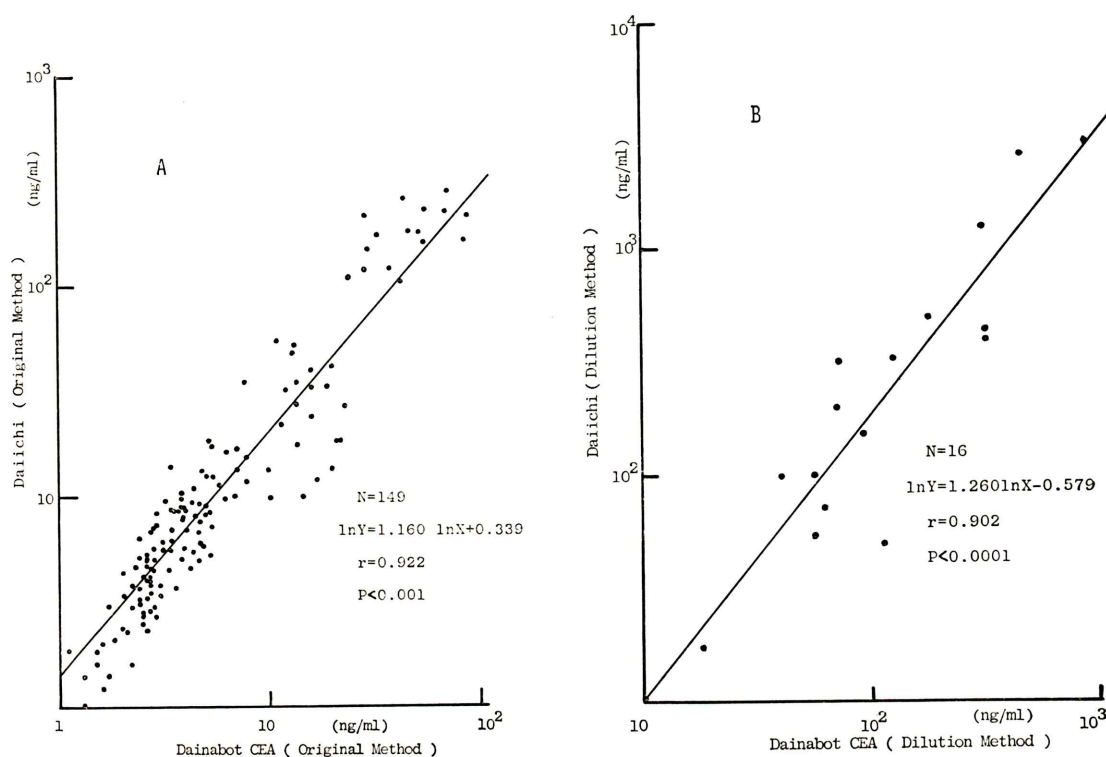


Fig. 5 Inter-relationship between CEA values calibrated with CEA RIA kit (Dainabot) and CEA radioimmunoassay kit (Daiichi).
 A: Non diluted values by the original procedure method of kits.
 B: Only diluted values.

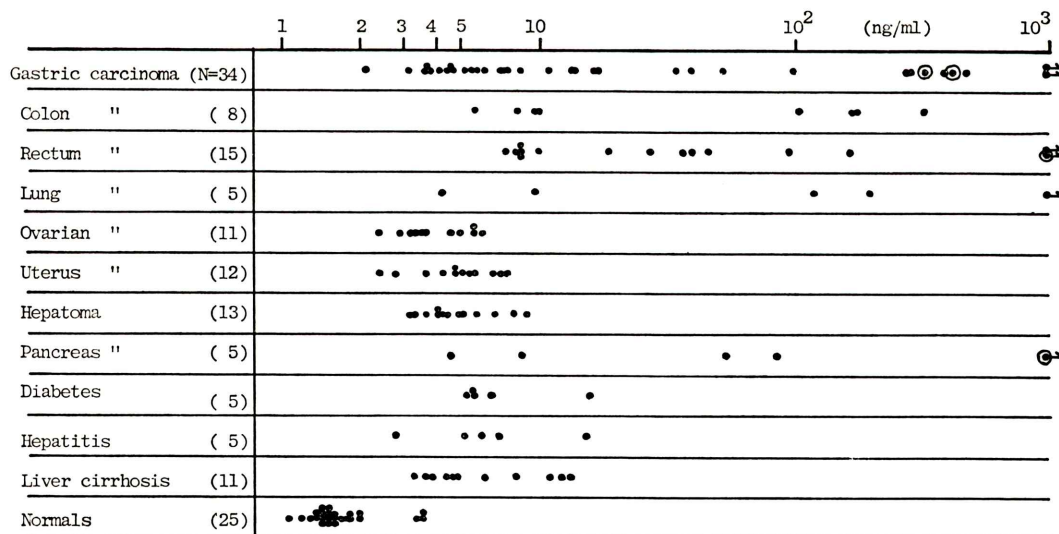


Fig. 6 Distribution of CEA values in various diseases or normals with CEA radioimmunoassay kit (Daiichi).
 ◎: ascites

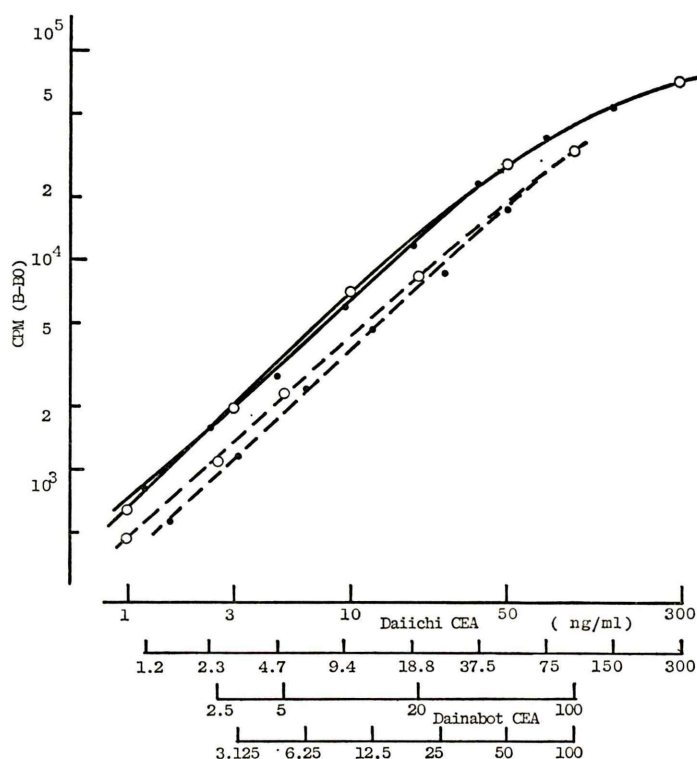


Fig. 7 Comparison of dose-response curves by the standard concentrations of CEA radioimmunoassay kit (Daiichi) and CEA RIA kit (Dainabot).

- (○—○): Original standard curve of CEA kit (Daiichi).
- (●—●): Standard curve obtained by dilution of 300 ng/ml standard (Daiichi).
- (○···○): Standard curve obtained by original standard concentrations of CEA kit (Dainabot).
- (●···●): Standard curve obtained by dilution of 100 ng/ml standard (Dainabot).

標準曲線との平行性があった。またこれらの現象は血清サンプルにとどまらず腹水、胸水にも認められた。希釈方法は理想的には直線性が出現するまで継続的に希釈系列を測定することが望ましいが、ルチン測定上では困難である。したがって前述のように最低3点による希釈測定が有用と考える。また高倍率希釈で若干平行性が失われるサンプルも観察された。この原因としてCEA類似抗原の影響も考えられるが最近の黒木らのNFA-1, NFA-2, NFCA^{13,15-17)}の報告に及んで、CEA測定値の解釈上留意すべき要素は多い。

本邦で広く使われているダイナボット社のCEA RIAキットとの比較では両法について無希

釈と希釈測定について相関を見た。無希釈では両法ともに頭打ち現象が観察されたが、相関係数は0.922と両法に強い相関が見られた。またD法で10 ng/ml以上のサンプルを希釈測定した結果では(本法では100 ng/ml以上を希釈測定)やはり相関係数0.902で有意な相関が認められた。Figure 7にD法の標準濃度を本法で測定し、合せて本法の300 ng/mlとD法の100 ng/ml標準濃度を本法の0 ng/ml標準濃度で希釈したそれぞれの標準曲線の平行性を示す。希釈した標準曲線はいずれもオリジナルの標準曲線より低いバウンド率を示したが、本法では誤差範囲の程度であり、D法でオリジナル標準曲線と希釈した標準曲線にやや解離が

認められるのは両法の液性の違いがバウンド率の違いとなって現われたためと考えられた。また D 法で本法の標準濃度を同様にして測定しても本法の標準濃度の方が高いバウンド率を示す結果が得られた。これら組合せ実験において相互の液性にほとんど差がないと考えられる低標準濃度域で、希釈した標準曲線相互がきわめてよく平行することから、両法の標準濃度品に用いている CEA 標品はきわめて性質の近いものと推定された。以上の相関関係や健常者の測定結果から正常範囲を 4.0 ng/ml 以下としたが、3~5 ng/ml は False negative/positive range として慎重な判断が必要であろう。

各種疾患の測定値では消化器系癌、肺癌、膵臓癌で高値が観察された。また肝炎、肝硬変、糖尿病で若干高値が認められたが、肝疾患では CEA の代謝速度の低下や消失の遅延²³⁾が原因と考えられており、今回の結果はこれに符合するが糖尿病については原因が明らかではない。しかし過去にも同様な報告^{19,24)}も見られ本法に特有な傾向ではないと考えられる。

健常人の唾液を 0 ng/ml 標準濃度で希釈を行い標準曲線との平行性を観察したところ、Figure 3C に示すように低濃度に至るまで良好な平行性が認められ、唾液中に CEA 抗原決定基を持つ類似物質の存在を示唆する結果であった。この結果ひとつを見ても癌特異性は否定されるが、これはむしろ採血、血清分離、CEA 測定の一連の過程において不特定な原因による唾液のサンプルへの混入に対する注意事項と考えるべきであろう。本法はアフィニティクロマトグラフィにより抗体の NCA による吸着で、CEA に対してより特異性の高い抗体を使用している²⁰⁾としており、一歩進化した CEA 測定法として評価しうるキットと考えられる。

キットを提供していただいた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝します。

文 献

- 1) Thomson DMP, Krupey J, Freedman SO, et al: The radioimmunoassay of circulating carcino-
- 2) Hansen HJ, Lance KP, Krupey J: Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel. *Clin Res* 19: 143, 1971
- 3) Martin F, Martin MS: Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in extracts of human colon and stomach. *Int J Cancer* 9: 641-647, 1972
- 4) Egan ML, Lautenschlager JT, Coligan JE, et al: Radioimmune assay of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry* 9: 289-299, 1972
- 5) Nishi S, Hirai H: Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen and its related antigens by the sandwich method. *Onco-developmental gene expression*, Fishman WH, Sell S, eds, Academic Press Inc., New York, 1976, p. 567
- 6) 北村元仕, 伊藤寿美子, 飯森糸子, 他: エンザイムイムノアッセイによる血清 CEA の正常値. *医学のあゆみ* 112: 519-521, 1980
- 7) 西 信三, 平井秀松: CEA (Carcinoembryonic Antigen) の測定法. *臨床病理*, 特 25: 55-67, 1976
- 8) 鳥塚莞爾, 石川演美, 浜本 研, 他: がん診断への応用(内科より). *癌と化学療法* 4: 231-244, 1977
- 9) 真坂美智子, 吉見輝也, 金子昌生: 二抗体法による CEA 測定の検討. *Biomedical Journal* 4: 663-670, 1980
- 10) 星野優子, 林 広子, 出村 博: 二抗体法による CEA '栄研' RIA kit の基礎的並びに臨床的検討. *Biomedical Journal* 4: 671-678, 1980
- 11) 平井秀松: CEA (その 1)——測定法とその臨床的検討——. *日本臨床* 34: 1274-1279, 1976
- 12) 平井秀松: CEA (その 2)——測定法とその臨床的検討——. *日本臨床* 34: 1486-1491, 1976
- 13) Kuroki M, Koga Y, Matsuoka Y: Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. *Cancer Res* 41: 713-720, 1981
- 14) Kupchik HZ, Zurawski VR, Hurrell JGR, et al: Monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen produced by somatic cell fusion. *Cancer Res* 41: 3306-3310, 1981
- 15) Kuroki M, Shinoda T, Takayasu T, et al: Immunological characterization and structural studies of normal fecal antigen-1 related to carcinoembryonic antigen. *Mol Immunol* 19: 399-406, 1982
- 16) Matsuoka Y, Kuroki M, Koga Y, et al: Immunochemical differences among carcinoembryonic antigen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces. *Cancer Res* 42: 2012-2018, 1982
- 17) 黒木政秀, 松岡雄治: 癌胎児性抗原の免疫化学的性状. *代謝* 18: 29-41, 1981

- 18) 吉井正雄：癌胎児性抗原 CEA の isomeric species の分離精製とその radioimmunoassay の臨床的評価. 核医学 **19**: 375-397, 1982
- 19) 木下文雄, 前川 全, 彌富晃一, 他：Carcinoembryonic Antigen 測定の臨床的評価. 臨牀放射線 **23**: 239-249, 1978
- 20) 松岡雄治, 黒木政秀, 古賀芳子, 他：血中癌胎児性抗原 (CEA) の新しい測定法の検討. 核医学 **19**: 1023-1033, 1982
- 21) 米山善夫, 永田弘治, 赤沢好温：高 CEA 検体における Z ゲル法とサンドイッチ法の比較検討. 新薬と臨床 **27**: 2233-2238, 1978
- 22) 長田篤雄, 大久保次男, 上野雅子, 他：2 ステップ サンドイッチ法 CEA 測定の高値に関する検討. 37 回日本放射線技術学会: 498-499, 1981
- 23) Shuster J, Silverman M, Gold P: Metabolism of human carcinoembryonic antigen in xenogeneic animals. Cancer Res **33**: 65-68, 1973
- 24) 藤原初雄, 吉田陽子, 村田健二郎, 他：Radioimmunoassay による血中 CEA (癌研) の基礎的ならびに臨床的検討. 医学と薬学 **6**: 135-140, 1981