

《ノート》

卵巣癌に対するモノクローナル抗体を用いたエルザ CA 125 RIA キットの基礎的ならびに臨床的検討

Basic and Clinical Studies on Elsa CA 125 RIA Kit:
Usefulness in Patients with Ovarian Carcinoma

阪原 晴海* 遠藤 啓吾* 中島 言子* 中島 鉄夫*
小泉 満* 太田 仁八* 鳥塚 莞爾* 小西 郁生**
藤井 信吾** 森 崇英**

Harumi SAKAHARA*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Tetsuo NAKASHIMA*,
Mitsuru KOIZUMI*, Hitoya OHTA*, Kanji TORIZUKA*,
Ikuo KONISHI**, Shingo FUJII** and Takahide MORI**

*Department of Nuclear Medicine, **Department of Gynecology and Obstetrics,
Kyoto University School of Medicine, Kyoto

I. はじめに

モノクローナル抗体の開発¹⁾により腫瘍関連抗原の解析は急速な進歩を遂げ、CA 19-9をはじめとして臨床的に有用な腫瘍マーカーが次々に報告されている。Cancer Antigen 125 (CA 125) は1980年、Bast らによりヒト卵巣癌培養細胞を用いて作製されたモノクローナル抗体²⁾が認識する腫瘍関連抗原であり、上皮性卵巣癌に対して有用な腫瘍マーカーであると注目されている³⁻⁵⁾。

今回、CIS (フランス原子力庁) 製 CA 125 測定用キット (エルザ CA 125 キット) をミドリ十字より提供を受け、基礎的ならびに臨床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

本法に用いられる抗体はヒト上皮性卵巣癌培養細胞 (OVCA 433) によって免疫されたマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞のハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体 OC 125 である。測定原理は抗体を固定したチューブに検体と ¹²⁵I 標識二次抗体を同時に添加する固相法の radioimmunoassay である。なお固相一次抗体と ¹²⁵I 標識二次抗体は同一抗体を使用しているため、用いる抗体が認識する抗原決定基は2個以上存在しているものと考えられる。

2. 測定方法

特に指示のない場合は本キットの指示書⁶⁾に従ったが、その概略は以下のとおりである。

1) 抗体を固定したチューブに標準液または検体および ¹²⁵I 標識抗体を入れる。

2) よく攪拌した後、室温で18~20時間、インキュベーションを行う。

Key words: CA 125, Tumor marker, Monoclonal antibody, Ovarian carcinoma.

* 京都大学医学部核医学科

** 同 産婦人科

受付: 59年12月26日

最終稿受付: 60年4月1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

阪原 晴海

3) 反応残液を除去し、脱イオン水で $3\text{ ml} \times 4$ 回洗浄する。

4) 各チューブの放射能を測定し、各測定値からバックグラウンドを引いたカウント数を求める。標準液のカウント数(cpm)を縦軸に、濃度(U/ml)を横軸に方眼紙にプロットして標準検量線を得、検体のカウント数より CA 125 濃度を読みとる。

3. 基礎的検討

アッセイの 1) 精度、再現性、2) 回収率試験 3) 特異性、4) 希釈試験につき検討した。特異性試験はアッセイ系に CEA, AFP, TPA, CA 19-9 の標準液を添加して検討したが、それぞれ CEA, TPA は第一ラジオアイソトープ研究所, AFP はミドリ十字, CA 19-9 は CIS 製のものを使用した。

またキット指示書には検体と ^{125}I 標識抗体の同時添加 (one-step 法) が指示されているが、それ以外にまず検体と固相一次抗体を反応させ、洗浄した後 ^{125}I 標識二次抗体を加える二段階法 (two-step 法) のアッセイも試みた。

CA 125 の性状を検討するため CA 125 高値血清を Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィにかけ、血中 CA 125 の分子量についても検討を行った。

4. 臨床的検討

本院にて手術により診断の確定した悪性腫瘍症例88例、各種臨床検査で診断された良性疾患症例83例、および健常人72例の計 243 例を対象とした。悪性腫瘍症例の内訳は胃癌12例、大腸癌13例、膵癌13例、中間群を含む悪性卵巣腫瘍21例(うち漿液性嚢胞腺癌4例、ムチン性嚢胞腺癌3例、類内膜癌3例、類中腎癌1例、Brenner 腫瘍2例、未分化胚細胞腫2例、胎児性癌2例、平滑筋肉腫1例、転移性腫瘍3例)、子宮頸癌23例、その他の婦人科系悪性腫瘍7例(卵管癌2例、子宮体癌4例、絨毛癌1例)である。良性疾患症例の内訳は急性肝炎10例、慢性肝炎10例、肝硬変症10例、良性卵巣疾患28例、子宮筋腫24例である。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線

6種類の濃度の標準液(6.5, 30, 80, 200, 350, 500 U/ml)を8回測定し、結合放射能の平均値、標準偏差を求め作成した標準曲線は Fig. 1 に示すとおりである。各濃度の変動係数は5.4~9.8%であり、標準曲線の再現性は良好であった。

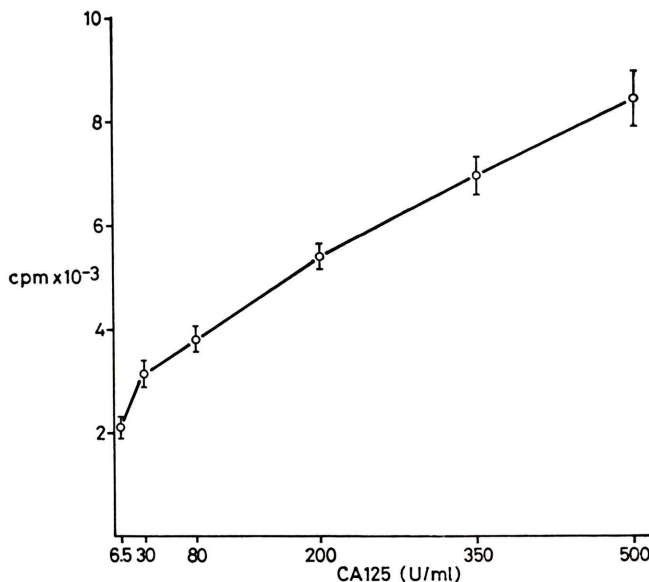


Fig. 1 Typical standard curve. Each point represents mean \pm SD (N=8).

2) 精度, 再現性

CA 125 濃度の異なる 3 種類の血清につき, 同一アッセイ内で 10 回, 異なるアッセイ間で 5~7 回測定を行い, それぞれの平均値, 標準偏差および変動係数を求め, その再現性を検討した. Tables 1, 2 に示すごとく, 測定値の変動係数は同一アッセイ内では 5.6~18.1%, 異なるアッセイ間では 12.1~23.9% の値を示し, いずれも CA 125 濃度低値の検体で変動係数がやや大きい傾向であった.

3) 回収率試験

血清にキット添付の標準液 (30, 80, 200, 500 ng/ml) を等量添加し, 回収率を求めた. Table 3 に示すように回収率 93.4~112.9%, 平均 105.3% と満足すべき結果であった.

4) 特異性

CEA, AFP, TPA, CA 19-9 をアッセイ系にそれぞれ最高濃度 300 ng/ml, 1,000 ng/ml, 3,000 U/L, 120 U/ml 添加して, ^{125}I 標識抗体の結合を測定し, アッセイの特異性を検討した. これらの腫瘍マーカーの添加により標識抗体の結合は増加せ

ず, CA 125 とこれらの腫瘍マーカーとの交叉反応はないと考えられた.

5) 希釈試験

3 種類の血清をキット添付の希釈液を用いて, 1/2~1/8 まで希釈測定した (Fig. 2). これらの検体では希釈曲線はほぼ原点を通る直線となった. しかし非常に高濃度の検体では以下に述べるプロゾーン現象が認められた.

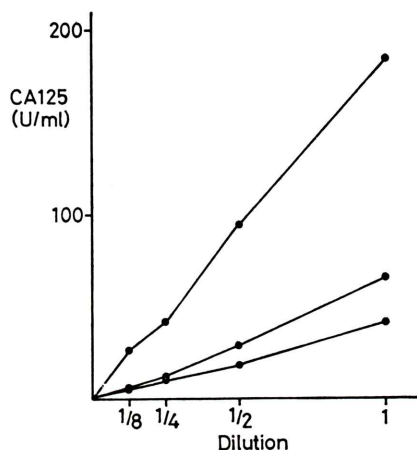


Fig. 2 Effect of sample dilution on CA 125 estimation. Specimens were obtained from patients and diluted by diluent equipped with the kit.

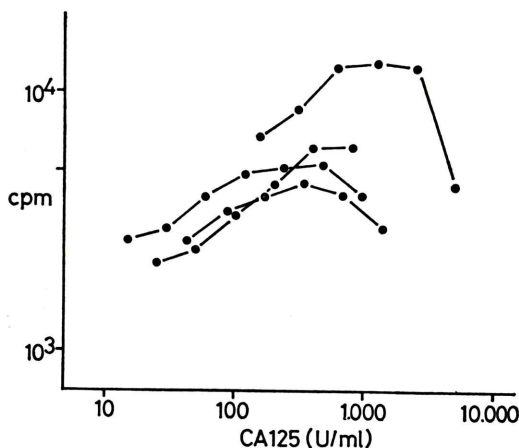


Fig. 3 Dilution of serum with high CA 125 values. Radioactivity of bound ^{125}I -labeled antibodies was plotted against CA 125 concentrations. Prozone phenomenon was observed.

Table 1 Results of intra-assay reproducibility

N	Mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
10	5.7	1.0	18.1
10	87.9	8.4	9.5
10	344.0	19.3	5.6

Table 2 Results of inter-assay reproducibility

N	Mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
5	6.8	1.6	23.9
7	80.3	9.7	12.1
5	352.0	43.7	12.4

Table 3 Recovery test

Added (U/ml)	Expected (U/ml)	Measured (U/ml)	Recovery (%)
—	—	42	—
30	36	39	105.4
80	61	57	93.4
200	121	129	106.6
500	271	306	112.9
(mean) 105.3			

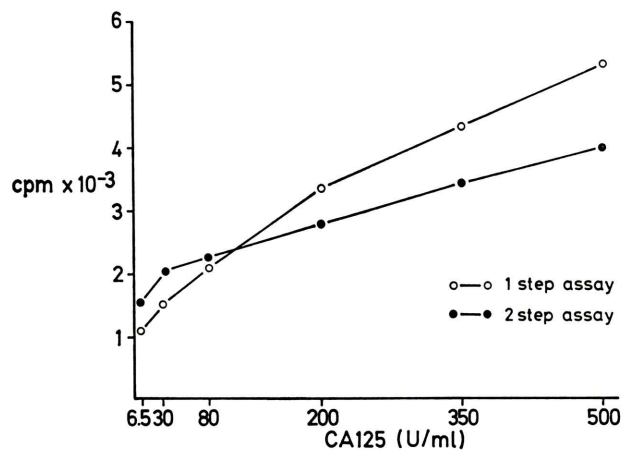


Fig. 4 Standard curves of one-step assay and two-step assay. The slope of the two-step assay was less than the one-step assay.

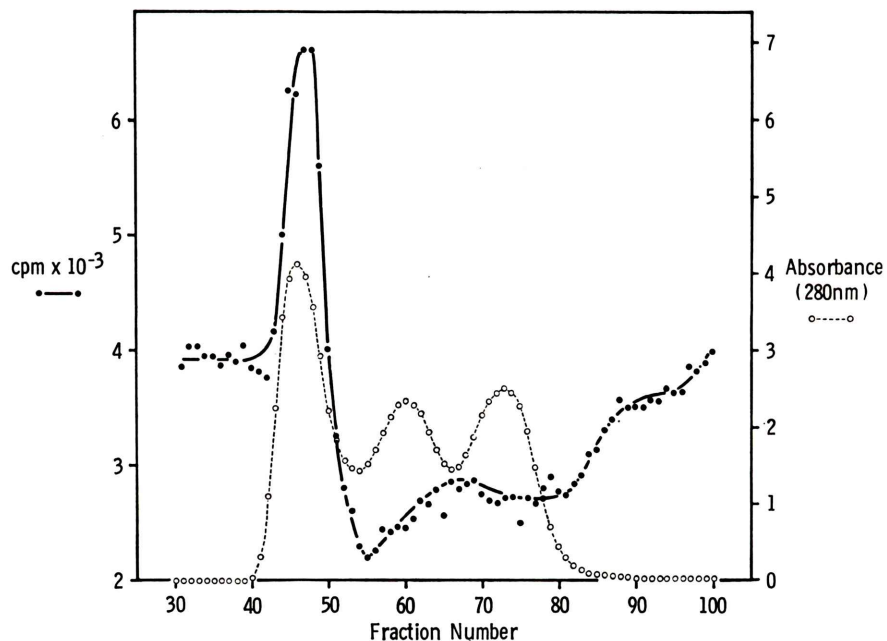


Fig. 5 Sephadex G-150 column chromatography of a serum sample with high CA 125 value. Each fraction was assayed by the kit and immunological activities of CA 125 were represented as radioactivity of bound ¹²⁵I-labeled antibodies (●—●). Protein concentration was measured by absorbance at 280 nm (○—○). CA 125 was eluted at the void volume.

6) プロゾーン現象

CA 125 濃度が非常に高い検体を希釈液で順次、希釈して測定した結果を Fig. 3 に示す。高濃度域で ^{125}I 標識抗体の結合放射能がかえって低くなるプロゾーン現象 (フック現象) が認められた。このため CA 125 が非常に高濃度の検体では、適当な希釈を行わないで測定した場合、血中 CA 125 を低値と読んでしまう可能性が示された。

7) 同時添加法 (one-step 法) と二段階法 (two-step 法)

このような顕著なプロゾーン現象は検体と ^{125}I 標識抗体を同時に添加する one-step 法に起因するのではないかと考え^{8,9)}、プロゾーン現象を少なくする目的で抗体を結合したチューブにまず検体のみを加え、室温で3時間インキュベーションした後、洗浄し、その後に ^{125}I 標識抗体を添加し

て室温で16時間インキュベーションを行う two-step 法を試みた。しかし two-step 法では全体に ^{125}I 標識抗体の結合が低下するとともに、CA 125 が高濃度と低濃度の場合で結合放射能の差が少なくなるため (Fig. 4)、以後の検討はすべて指示書通りの one-step 法による測定方法で行った。

8) 血中 CA 125 の性状

CA 125 高値の血清を Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィにかけたところ、CA 125 は void volume に溶出され (Fig. 5)、血中 CA 125 は分子量20万以上のかなり大きな分子で存在していると思われる。ただ ^{125}I 標識抗体の結合はアッセイ中のタンパク濃度に依存しており、CA 125 の含まれていない低タンパク濃度域で ^{125}I 標識抗体の非特異的結合が認められた。

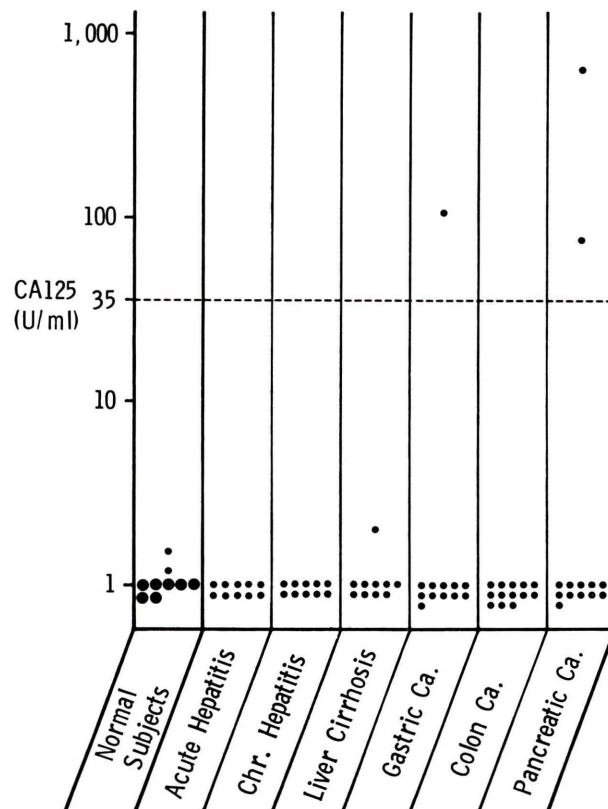


Fig. 6 Serum CA 125 levels in normal subjects and in patients with non-gynecological diseases. A large closed circle represents ten subjects.

2. 臨床的検討

健康人72例(男性37例, 17歳~72歳, 平均36.2歳, 女性35例, 19歳~68歳, 平均43.0歳)では全例5 U/ml以下の低値であった。Bastらに従い³⁾ 35 U/mlをカットオフ値とすると婦人科系疾患以外の肝炎, 肝硬変症などの良性疾患では全例陰性だったのに対し, 消化器系悪性腫瘍では胃癌12例中1例, 肺癌13例中2例で35 U/ml以上の陽性値を示した(Fig. 6)。一方, 婦人科系疾患では悪性卵巣腫瘍で高値症例が多く, 21例中9例が陽性であった(Fig. 7)。組織別にみると漿液性嚢胞腺癌4例中4例, 類内膜癌3例中2例, Brenner腫瘍2例中1例, 転移性腫瘍3例中2例で血中CA 125値は35 U/ml以上を示し, 最も高値血清では1,000 U/mlに達した。しかし今回の検討ではムチン性嚢胞腺癌の3例, 類中腎癌の1例, 未分化

胚細胞腫の2例, 胎児性癌の2例, 平滑筋肉腫の1例は35 U/ml以下に分布し, 子宮頸癌23例, その他の婦人科系悪性腫瘍7例でも陽性例は認められなかった。良性卵巣疾患では卵胞嚢胞の1例に高値例がみられたが, 良性卵巣腫瘍, 子宮筋腫ではCA 125は35 U/mlまでに分布し, カットオフ値を35 U/mlとした場合, いずれも全例陰性であった。

IV. 考 察

CA 125は肺癌に対する腫瘍マーカーCA 19-9と同じく, モノクローナル抗体の手法を用いて開発され, これまでのCEA, AFPとは異なる新しい腫瘍マーカーである。

測定は抗体を固相化したチューブに検体と¹²⁵I標識抗体を同時に添加するone-step法のimmuno-radiometric assayで, 今回の基礎的検討でもっとも大きな問題点はプロゾーン現象であった。すなわち非常に高い値をとるはずの検体でかえって¹²⁵I標識抗体の結合が低下して, 見かけ上低値になってしまうのである。この現象は抗原と¹²⁵I標識抗体を同時添加するone-step法である限り, 抗原過剰の場合, 理論的に避けられない^{8,9)}。そこで検体を加え, 洗浄した後に¹²⁵I標識抗体を加える二段階法(two-step法)を試みたが, Klugらの成績⁷⁾と同様, ¹²⁵I標識抗体の結合は低下してしまい, 標準曲線の傾きが緩やかとなり, 測定系としては成り立たなくなってしまった。CA 19-9がtwo-step法を採用しているのに対し, CA 125では抗体の抗原への結合親和性が低く, 洗浄により固相一次抗体に結合したCA 125が離れるためかもしれない。したがって当施設もキット指示書どおりの同時添加法(one-step法)を採用しているが, プロゾーン現象のため読み値が80 U/ml以上の検体はすべて希釈して測定しなおしている。

卵巣癌培養細胞の培養上清中あるいは細胞膜表面のCA 125は分子量20万以上のものと報告されているが¹⁰⁾, 今回のクロマトグラフィによる検討でも患者血中のCA 125はかなり大きな分子であることが示された。CA 125は糖タンパクである

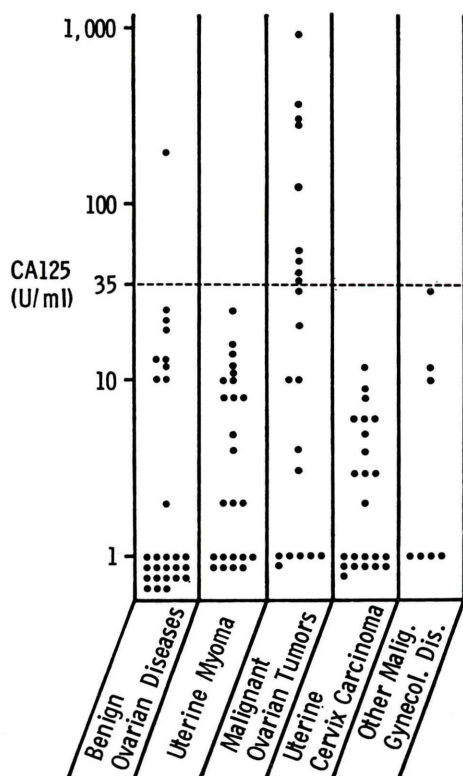


Fig. 7 Serum CA 125 levels in patients with various gynecological diseases.

ことが報告されているが、モノクローナル抗体を用いて開発された腫瘍マーカーの常として、その抗原の性状に関してはなお不明のことが多い。

臨床的には悪性卵巣腫瘍ことに上皮性卵巣癌で高い陽性率を示すとされており、今回の測定結果も症例数が少ないがその傾向が認められた。他の悪性腫瘍や良性疾患での陽性率は低く、CA 19-9と同様、比較的特異性の高い腫瘍マーカーと言える。ただ今回の検討ではカットオフ値を Bastらの報告に従い 35 U/ml としたが、早期の卵巣癌では 35 U/ml 以下のことが多く、カットオフ値の設定にはなお検討を要すほか、われわれも血中 CA 125 濃度と病理組織像、病期との関係、他の腫瘍マーカーとの比較などの検討を進めている。さらに血中 CA 125 濃度の測定は卵巣癌患者の経過観察にも有用で^{3,4,11)}、優秀な腫瘍マーカーと評価されているが、アッセイに用いるモノクローナル抗体の抗原への結合親和性と腫瘍特異性に関しては、なお不明の点が多く、今後さらに検討されるものと思われる。

V. ま と め

1. 血中 CA 125 濃度測定の精度、再現性、および回収率試験はほぼ良好であった。
2. しかしプロゾーン現象の影響を大きく受けるため、高値を示す検体の解釈には注意が必要である。
3. これまでの腫瘍マーカー CEA, AFP, TPA, CA 19-9 との交叉反応は認められなかった。
4. 健常人72例は全例 5 U/ml 以下の低値であった。
5. 良性疾患症例82例中、35 U/ml を越えたのは卵胞嚢胞の1例のみであった。
6. 悪性腫瘍症例89例では胃癌12例中1例、膵

癌13例中2例、悪性卵巣腫瘍21例中9例で35 U/ml以上の値を示し、CA 125 は優秀な卵巣癌腫瘍マーカーである。

文 献

- 1) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 2) Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, et al: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **68**: 1331-1337, 1981
- 3) Bast RC Jr, Klug TL, St John E, et al: A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **309**: 883-887, 1983
- 4) 葛谷和夫, 有吉 寛, 桑原正喜, 他: CA 125—卵巣癌の新しい血清腫瘍マーカー. *医学のあゆみ* **129**: 327-329, 1984
- 5) 高見沢裕吉, 稲葉憲之, 岩沢博司, 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**: 248-257, 1984
- 6) CIS ELSA-CA 125™ kit, manual
- 7) Klug TL, Bast RC Jr, Niloff JM, et al: Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 125) associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res* **44**: 1048-1053, 1984
- 8) 池田勲夫, 飯沼一茂, 高井 優, 他: 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ(サンドイッチ法)における平衡論的取扱い(その1)——固相化抗体と抗原との平衡定数が極めて大きい場合——. *核医学* **19**: 1051-1060, 1982
- 9) 池田勲夫, 関口 潔, 飯沼一茂, 他: 2-サイトイムノラジオメトリックアッセイ(サンドイッチ法)における平衡論的取扱い(その2)——平衡論的な標準曲線およびその感度について——. *核医学* **20**: 723-731, 1983
- 10) Masuho Y, Zalutsky M, Knapp RC, et al: Interaction of monoclonal antibodies with cell surface antigens of human ovarian carcinomas. *Cancer Res* **44**: 2813-2819, 1984
- 11) 小西郁生, 藤井信吾, 森 崇英, 他: 卵巣 Common Epithelial Tumours 患者における血清 CA 125 の腫瘍マーカーとしての意義. 産婦人科治療 (印刷中)