

《ノート》

乳癌に対するモノクローナル抗体を用いた “エルザ CA 15-3” キットの基礎的, 臨床的検討

Basic and Clinical Studies on “ELSA CA 15-3” Kit

阪原 晴海* 遠藤 啓吾* 中島 言子* 小泉 満*
中島 鉄夫* 河村 泰孝* 太田 仁八* 稲本 俊**
小澤 和恵** 鳥塚 莞爾*

Harumi SAKAHARA*, Keigo ENDO*, Kotoko NAKAJIMA*, Mitsuru KOIZUMI*
Tetsuo NAKASHIMA*, Yasutaka KAWAMURA*, Hitoya OHTA*,
Takashi INAMOTO**, Kazue OZAWA** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Nuclear Medicine, **Second Division, Department of Surgery, Kyoto University Hospital

I. はじめに

モノクローナル抗体の手法により, 各種の腫瘍マーカーが開発され, そのうち特に CA 19-9 は膵癌の, CA 125 は卵巣癌の腫瘍マーカーとして, その臨床的有用性が高く評価されている^{1,2)}. 最近, 同じくモノクローナル抗体の手法を用いて乳癌に対する新しい腫瘍マーカー CA 15-3 が開発された. 今回, その測定用 CIS (オリス工業㈱) 製 “エルザ CA 15-3” キットについて基礎的検討を行い, 本キットを用いて各種疾患患者の血中 CA 15-3 濃度を測定したので, その結果を報告する.

II. 方法と対象

1. 測定原理と測定方法

本法の測定原理は固相化抗体に抗原を結合させ,

洗浄後, ¹²⁵I 標識抗体を添加反応させる固相法の immunoradiometric assay である. 固相化抗体は Hilkens らがヒト milk fat globule membrane を用いて作製したモノクローナル抗体 115D8^{3,4)} で, ¹²⁵I 標識抗体は Kufe らによりヒト乳癌の腫瘍細胞の抽出物で作製されたモノクローナル抗体 DF3 を用いている⁵⁾.

測定方法の概略を以下に示す (Fig. 1).

1) モノクローナル抗体 115D8 が固相化された矢羽の入ったチューブに緩衝液 300 μ l および標準液または検体 25 μ l を入れる.

2) 37°C で 1 時間インキュベートする.

3) 反応残液を除去し, 洗浄後, ¹²⁵I 標識モノクローナル抗体 DF3 300 μ l を加える.

4) 室温で 1 時間インキュベートする.

5) 反応残液を除去し, 洗浄後, チューブの放射能を測定する. 標準液の放射能 (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曲線を作成し, 検体の放射能より CA 15-3 濃度を読みとる. 標準液は 0, 25, 50, 95, 200 U/ml

* 京都大学医学部附属病院核医学科

** 同 第二外科

受付: 61年4月1日

最終稿受付: 61年7月10日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町540 (☎606)

京都大学医学部附属病院核医学科

阪原 晴海

Key words: Tumor marker, CA 15-3, Breast carcinoma, Monoclonal antibody.

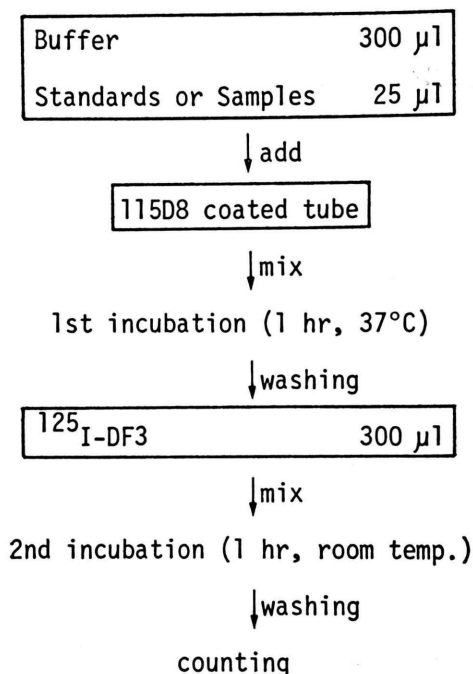


Fig. 1 Assay procedure.

の各濃度のものが添付されており, 0~200 U/ml の範囲の CA 15-3 濃度の測定が可能である。

2. 基礎的検討

アッセイの反応条件, 再現性, 希釈試験, 回収試験, 特異性につき検討した。特異性はアッセイ系に α -fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), CA 19-9, CA 125 の標準液を添加して交叉反応をみた。AFP はミドリ十字(株), CEA は第一ラジオアイソトープ研究所(株), CA 19-9, CA 125 は CIS のものをそれぞれ用いた。

3. 臨床的検討

健常人60例(男性21歳~66歳, 30例, 女性24歳~81歳, 30例), 診断の確定した悪性腫瘍症例112例, 良性疾患症例40例の計212例の血中 CA 15-3 濃度を測定した。悪性腫瘍症例の内訳は乳癌38例, 胃癌15例, 膵癌9例, 胆道癌12例, 食道癌8例, 肺癌15例, 子宮頸癌8例, 卵巣癌7例であり, 良性疾患症例の内訳は透析患者9例, 慢性肝炎5例, 肝硬変症10例, 慢性膵炎10例, 糖尿病6例であった。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 反応条件

キット添付の指示書では第1反応は 37°C, 1時間, 第2反応は室温, 1時間と指示されている。Fig. 2 は第2反応を室温, 1時間と固定して, 第1反応の条件を変化させたときのコントロール血清の結合放射能の変化を示す。温度が高いほど, また時間が長いほど結合放射能は増した。いずれの温度でも3時間では反応はプラトーに達していなかった。次いで第1反応を 37°C, 1時間に固定して, 第2反応の条件を変えたところ, ほぼ同様の傾向が見られたが, 第1反応の条件を変えた時よりも結合放射能に及ぼす影響は少なかった (Fig. 略)。さらに第1反応, 第2反応の温度を変えた場合の標準曲線の変化を Fig. 3 に示す。標

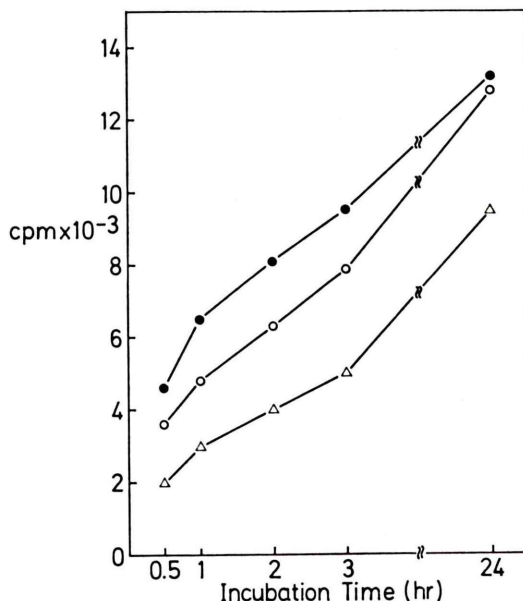


Fig. 2 Effect of the time and temperature of the first incubation on the CA 15-3 binding to the antibody coated tube. The first incubation was performed with 100 U/ml of CA 15-3 at 37°C (●), room temperature (○), and 4°C (△). The second incubation was performed at room temperature for 1 hour.

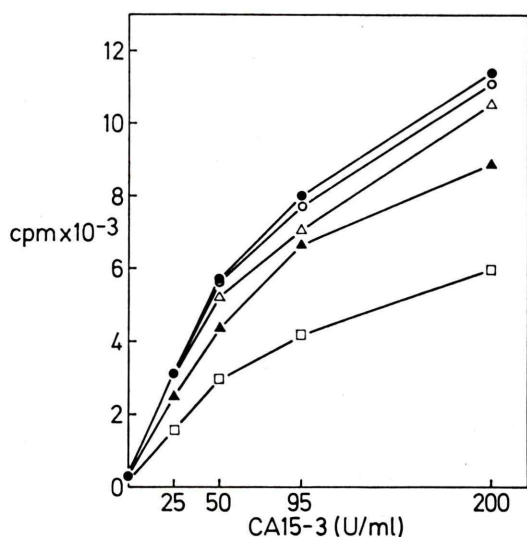


Fig. 3 Effect of the incubation temperature on the standard curve. Both the first and the second incubation were performed at various temperature for 1 hour. The incubation temperature was 37°C-37°C (●), 37°C-room temperature (○), room temperature-room temperature (△), 37°C-4°C (▲), and 4°C-room temperature (□) for the first and the second incubation, respectively.

準曲線はそれぞれの条件で異なるが、コントロール血清の値はほとんど変わらなかったため、以後のアッセイは指示書どおり、第1反応は 37°C, 1 時間, 第2反応は室温, 1 時間とした。

2) 再現性

同一アッセイ内、異なるロット間のアッセイでの再現性を検討した。測定量の変動係数は同一ア

Table 1 Intra-assay reproducibility

	N	mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
Sample 1	10	22.7	1.9	8.3
Sample 2	10	38.3	2.9	7.5
Sample 3	10	51.5	4.7	9.1
Sample 4	10	72.1	4.8	6.7
Sample 5	10	109.5	8.7	8.0
Sample 6	10	130.0	11.2	8.6

Table 2 Inter-assay reproducibility

	N	mean (U/ml)	S.D. (U/ml)	C.V. (%)
Sample a	10	36.4	3.3	9.0
Sample b	10	76.3	6.7	8.7
Sample c	10	145.4	13.9	9.6

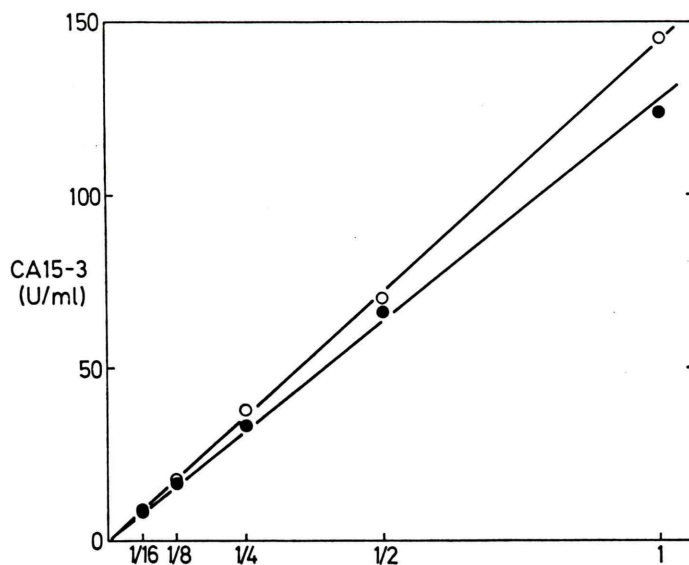


Fig. 4 Dilution test. Two samples of sera from different patients with elevated CA 15-3 value were diluted using the diluent equipped with the kit.

Table 3 Recovery test

		Added CA 15-3 (U/ml)			
		0	25	47.5	100
Sample A					
measured (U/ml)	17	42	58	128	
expected (U/ml)	—	42	64.5	117	
recovery (%)	—	100.0	89.9	109.4	
Sample B					
measured (U/ml)	35	60	78	128	
expected (U/ml)	—	60	82.5	135	
recovery (%)	—	100.0	94.5	94.8	
Sample C					
measured (U/ml)	64	87	105	168	
expected (U/ml)	—	89	111.5	164	
recovery (%)	—	97.8	94.5	102.4	

ッセイ内で 6.7~9.1%, 異なるロット間のアッセイで 8.7~9.6% であった (Tables 1, 2).

3) 希釈試験

患者血清をキット添付の希釈液で 2~16 倍まで希釈したところ, その測定値はほぼ原点に向かう直線上にプロットすることができた (Fig. 4).

4) 回収試験

濃度の異なる 3 種類の患者血清について, キット添付の標準 CA 15-3 を等量混合して回収率を検討した. 回収率は 89.9%~109.4%, 平均 98.1% であった (Table 3).

5) 特異性

AFP, CEA, CA 19-9, CA 125 を CA 15-3 のアッセイ系にそれぞれ最高濃度 10 $\mu\text{g/ml}$, 300 ng/ml, 120 U/ml, 500 U/ml 添加して特異性を検討した. AFP, CEA ではまったく交叉反応が認められなかったが, キット添付の CA 19-9 と CA 125 の標準品では CA 15-3 に対するモノクローナル抗体の結合が若干認められた. そこでこれら

の標準品と抗 CA 19-9, 抗 CA 125 抗体を固相化したチューブとインキュベーションし, インキュベーション前後で CA 15-3 および CA 19-9, CA 125 の濃度を測定した. CA 19-9, CA 125 はそれぞれの抗体により吸収されたが, CA 15-3 の測定値はインキュベーション前後において変化なく, CA 15-3 と CA 19-9, CA 125 は免疫学的に交叉しないと考えられた.

2. 臨床的検討

健常人および各種悪性腫瘍患者, 良性疾患患者の血中 CA 15-3 濃度の分布を Fig. 5 に示す. 健常人 60 例の血中 CA 15-3 濃度は 8.8 ± 2.9 U/ml で, 男女差は認められず, 健常人での最高濃度は 15 U/ml であった. これまでの報告に従いカットオフ値を 30 U/ml とすると⁶⁾悪性腫瘍患者における陽性率はそれぞれ乳癌 39% (15/38), 胃癌 33% (5/15), 肝癌 11% (1/9), 胆道癌 25% (3/12), 食道癌 0% (0/8), 肺癌 7% (1/15), 子宮頸癌 0% (0/8), 卵巣癌 43% (3/7) であった. 200 U/ml を超える高い血中濃度を示した症例は乳癌においてのみ 4 例認められたが, いずれも再発患者であった. 一方, 良性疾患で 30 U/ml を超えた症例は 40 例中, 慢性肝炎の 1 例と糖尿病の 2 例の計 3 例のみであった.

IV. 考 察

モノクローナル抗体を用いて開発された腫瘍マーカー CA 19-9 や CA 125 は固相化抗体と ¹²⁵I 標識抗体に同一のモノクローナル抗体を用いているのに対し, CA 15-3 測定用の本キットは異なった抗原を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を用いた immunoradiometric assay である. 固相化された抗体 115D8 は分子量 400 KD 以上の糖蛋白の MAM-6 を認識する. この抗体は乳癌と高頻度に反応するが, 正常乳腺上皮をはじめ, 他の上皮細胞や各種の癌細胞とも反応することが報告されている⁴⁾. ¹²⁵I 標識抗体として用いられる DF 3 はヒト乳癌細胞の分子量 290 KD の膜成分を認識し⁵⁾, 免疫ペルオキシダーゼ染色では乳癌と良性乳腺疾患の染色性の違いより良性, 悪性の鑑別

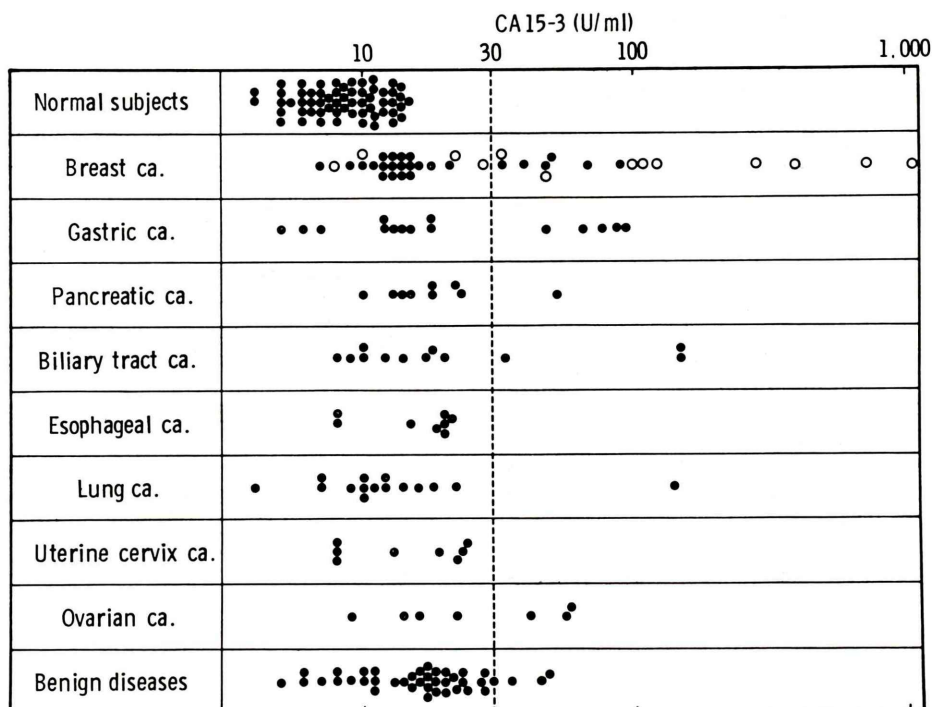


Fig. 5 Serum CA 15-3 concentrations in normal subjects and patients with various malignant and benign diseases. (○)=recurrent breast carcinoma. Broken line represents a reference value of 30 U/ml.

が可能であるとされている。115D8 と DF3 の認識する抗原がどのような関係にあり、このアッセイが成りたっているのかなお不明であるが、115D8 により種々の悪性腫瘍に関係した物質をとらえ、DF3 により乳癌の特異性を高めようとするものと考えられる。

基礎的検討の結果、反応条件はキット添付の指示書に示された条件で十分であり、再現性、希釈試験、回収試験とも良好な結果が得られた。また本アッセイ系においてはこれまで報告されている他の腫瘍マーカーである CEA, AFP, CA 19-9, CA 125 との交叉反応性はないものと考えられた。

血中 CA 15-3 濃度の正常上限値は報告者により多少異なるが⁶⁻⁸⁾、30 U/ml をカットオフ値とした場合、健常人はすべて陰性となり、良性疾患患者における血中 CA 15-3 濃度の陽性率も低かった。健常人、良性疾患患者において陽性例が少

ないことは CA 19-9, CA 125 など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すぐれた特徴と言えよう。悪性腫瘍では胃癌, 胆道癌, 卵巣癌などで陽性例が認められたが, 高値をとるのは乳癌に多かった。しかし CA 15-3 が陽性のこれらの乳癌患者は主に再発症例で早期の乳癌での陽性例は少なかった。血中 CA 15-3 濃度の測定により乳癌の早期診断は困難と思われるが, 再発の予知には有用かもしれない。今後さらに詳細な病期との関係や術後の経過観察における有用性につき検討する予定である。

V. ま と め

“エルザ CA 15-3”キットの基礎的，臨床的検討を行い，以下の結果を得た．

1) 再現性, 希釈試験, 回収試験, 特異性の基礎的検討は良好であった.

2) CA 15-3 のカットオフ値を 30 U/ml とした場合、健常人はすべて陰性で、良性疾患患者での血中 CA 15-3 濃度は低く、陽性率も低かった。

3) 乳癌の陽性率は 39% (15/38) で、再発症例で高値をとるものが多かった。

4) 胃癌、胆道癌、卵巣癌でも陽性例が認められた。

文 献

- 1) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 他: 血中 CA 19-9 濃度測定の基礎的ならびに消化器癌における臨床的有用性について. 核医学 **21**: 273-281, 1984
- 2) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 他: 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. 核医学 **22**: 1391-1397, 1985
- 3) Hilkens J, Hilgers J, Buijs F, et al: Monoclonal antibodies against human milkfat globule membranes useful in carcinoma research. *Proc Biol Fluids* **31**: 1013-1061, 1984
- 4) Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, et al: Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer* **34**: 197-206, 1984
- 5) Kufe D, Inghirami G, Abe M, et al: Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* **3**: 223-231, 1984
- 6) 吉本賢隆, 渡辺 進, 霞富士雄, 他: 乳癌関連抗原 CA 15-3 の測定とその臨床的意義. 医学と薬学 **14**: 677-681, 1985
- 7) 剛 勇, 安達 勇, 大倉久直, 他: 二種類のモノクローナル抗体 (115D8, DF3) を用いた新しい腫瘍マーカー, CA 15-3 の基礎的検討とその臨床的意義. 癌と化学療法 **12**: 2379-2386, 1985
- 8) 桑原正喜, 有吉 寛, 須知泰山, 他: 乳癌マーカー, CA 15-3 の基礎的・臨床的検討. 臨床検査 **30**: 81-85, 1986