《ノート》

モノクローナル抗体を用いたCA 130 RIA キット (D-7111) の基礎的ならびに臨床的検討；CA 125 キットとの比較

Basic and Clinical Evaluation of CA 130 RIA Kit (D-7111) Using Two Newly Developed Monoclonal Antibodies; Comparison with CA 125 Kit

佐賀　恒夫*　遠藤　啓吾*　中島　鉄夫**　中島　言子*
松岡洋一郎***　小泉　満*　河村　泰孝*　渡辺　祐司*
羽藤　明子*　国松美帆子*　小西　淳二*　藤井　信吾****
森　崇英****

Tsuneo SAGA*, Keigo ENDO*, Tetsuo NAKASHIMA**, Kotoko NAKAJIMA*, Yoichiro MATSUOKA***, Mitsuru KOIZUMI*, Yasutaka KAWAMURA*, Yuji WATANABE*, Akiko HATO*, Mihoko KUNIMATSU*, Junji KONISHI*, Shingo FUJII**** and Takahide MORI****

**Department of Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine, Kyoto*
***Department of Radiology, Fukui Medical School, Fukui*
****Department of Radiology, Mie University School of Medicine, Mie*
*****Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University School of Medicine, Kyoto*

I. はじめに

卵巣癌の腫瘍マーカーCA 125は，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OC 125により認識される分子量20万以上の糖蛋白質である[1,2]．血中CA 125抗原濃度の測定には，OC 125抗体を用いたIRMAが利用されており，現在，卵巣癌をはじめとする婦人科疾患の補助診断や経過観察に利用されている[3~7]．

最近われわれは肺腺癌細胞で免疫して得た2つのモノクローナル抗体，130–22, 145–9が肺腺癌組織のみならず，卵巣癌組織とも反応することを見いだした[8~10]．この抗体130–22, 145–9は，ともにCA 125抗原と反応するが，OC 125抗体とは異なった部位に結合することが明らかとなった[8~10]．抗体130–22をI-125標識抗体，抗体145–9をビーズ固相化抗体としたone-stepサンドイッチ法IRMAが第一ラジオアイソトープ研究所により開発されたので，このCA 130 RIAキットの基礎的ならびに臨床的検討，特にCA 125キットと比較した成績について報告する．なお，130–22, 145–9の認識する抗原決定基がOC 125の認識する部位とは異なるため，本論文では130–22, 145–9を用いて測定される抗原をCA 130抗原と呼ぶこととした．

* 京都大学医学部核医学科
** 福井医科大学放射線科
*** 三重大学医学部放射線科
**** 京都大学医学部産婦人科
受付：63年3月7日
最終稿受付：63年7月11日
別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町54 (〒606)
京都大学医学部附属病院核医学科
佐賀恒夫

Key words: CA 125, IRMA, Tumor marker, Lung cancer, Ovarian cancer.

II. 対象および方法

CA 130 RIA キットの測定原理は，モノクローナル抗体 145–9 を固相化したポリスチレンビーズ，抗原(検体)，および I-125 標識モノクローナル抗体 130–22 を同時に混合反応させる one-step 法 IRMA に基づく．

1. 測定方法

CA 130 RIA キットの測定方法は，特別な場合を除き以下のとおりとした．

1) 標準液 (0, 10, 30, 100, 300, 500 U/m*l*) または検体 50 μl, I-125 標識抗体 100 μl (約 80,000 cpm), 145–9 抗体固相化ビーズをチューブに入れる．

2) 室温で 4 時間，回転させながらインキュベーションを行う．

3) 反応液を吸引除去し，1 m*l* の生理食塩水で 3 回洗浄する．

4) 各ビーズへの結合放射能を測定し，バックグラウンドを引いた値を求める．標準液のカウント数より，標準検量線を作成し，検体のカウント数より抗原濃度を求める．なお最小検出感度は 3 U/m*l* なので，3 U/m*l* 以下のカウントを示した検体もまとめて 3 U/m*l* とした．

5) 300 U/m*l* 以上の検体は，添付の希釈液にて適当に希釈した後再測定する．

2. 基礎的検討

アッセイの反応時間，標準曲線，アッセイの精度・再現性，回収試験，希釈試験について検討した．

3. 臨床的検討

対象 453 例を，健常人 152 例，内訳は男性77例，女性75例，婦人科疾患患者135例，内訳は子宮筋腫28例，子宮内膜症19例，良性卵巣腫瘍19例，子宮頸部扁平上皮癌30例，子宮体部癌16例，悪性卵巣腫瘍23例 (うち漿液性嚢胞腺癌 7 例)，非婦人科疾患患者166例，内訳は慢性肝炎・肝硬変15例，胆石症20例，肝細胞癌35例，胃癌31例，大腸癌42例，肺癌23例に分けて検討した．健常人を除く対象者は，いずれも手術等で診断の確定したもので，手術例では手術前の血清を用いた．

4. CA 125 キットとの比較検討

CA 130 RIA キット添付の標準抗原液を CA 125 測定用キット (エルザ CA 125, 株式会社ミドリ十字製) で測定して標準曲線を作製し，CA 130 RIA キットでのそれと比較した．さらに，健常人および患者血清中の抗原濃度を両キットを用いて測定し，両者の値の相関関係を求めた．なお最小検出感度は 3 U/m*l* なので，3 U/m*l* 以下の検体は計算から除外した．アッセイはそれぞれのキット添付の指示書に従ったため，両キットで I-125 標識抗体量，検体量，インキュベーション時間は異なり，CA 125 キットでは検体量 100 μl を用い，20時間反応させて求めた[3,5]．

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 反応時間および標準曲線の再現性

インキュベーション時間を 1, 3, 4, 6, 16, 24 時間と変化させ，ビーズへの結合放射能を求めて，標準曲線を作製するとともに，異なる 3 検体の値を読み取った (Fig. 1)．反応時間が 1 時間のものでは，ビーズへの結合放射能が低く標準曲線が大きく下方へずれるが，3～24 時間反応させたものでは，結合放射能に大きな差異は認めなかった．インキュベーション時間が 4～24 時間のものでは，

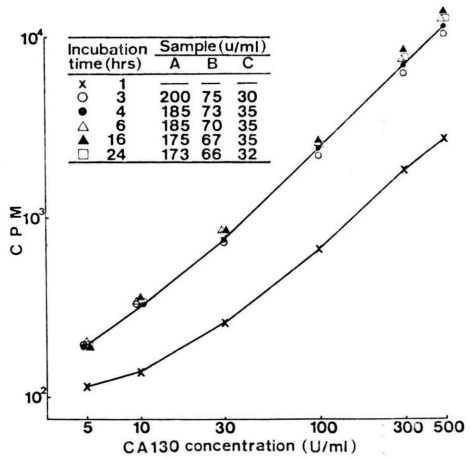

Fig. 1 Effect of incubation time on standard curves and serum CA 130 values of 3 samples.

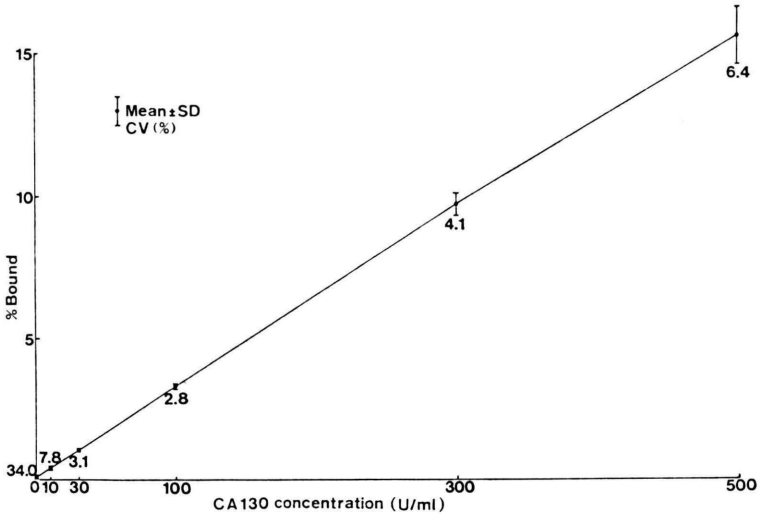

Fig. 2 Reproducibility of standard curve. (N=10)

Table 1 Intra- and inter-assay reproducibility

Intra-assay reproducibility

	n	Mean (U/m*l*)	S.D. (U/m*l*)	C.V. (%)
Sample 1	10	506.7	8.4	1.7
2	10	308.6	6.96	2.4
3	10	175.5	5.66	3.4
4	10	65.8	1.47	2.4
5	10	35.4	1.2	3.6

Inter-assay reproducibility

	n	Mean (U/m*l*)	S.D. (U/m*l*)	C.V. (%)
Sample 1	10	300.6	4.55	1.5
2	10	172.6	7.49	4.3
3	10	64.8	1.55	2.4
4	10	31.5	1.65	5.2

Table 2 Recovery test

	Added CA 130 Ag (U/m*l*)				
	0	15	50	150	250
Sample 1					
Measured (U/m*l*)	65	85	120	220	325
Recovery (%)		107.7	107.7	107.7	115.5
Sample 2					
Measured (U/m*l*)	72	86	124	220	324
Recovery (%)		98.6	102.8	97.2	102.8
Sample 3					
Measured (U/m*l*)	93	110	144	250	344
Recovery (%)		102.1	101.1	107.5	101.1

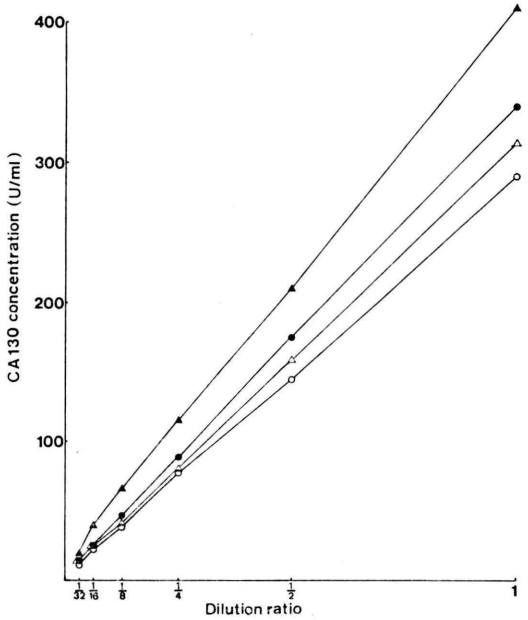

Fig. 3 Dilution test of 4 samples.

検体の測定値にも大きな差異はなかった.

6種類の濃度の標準液を4時間反応させて10回測定し，その平均値を求めて標準曲線を作製したところ，500 U/m*l* で傾きがやや鈍化するものの，0～300 U/m*l* の間では良好な直線性を示した(Fig.

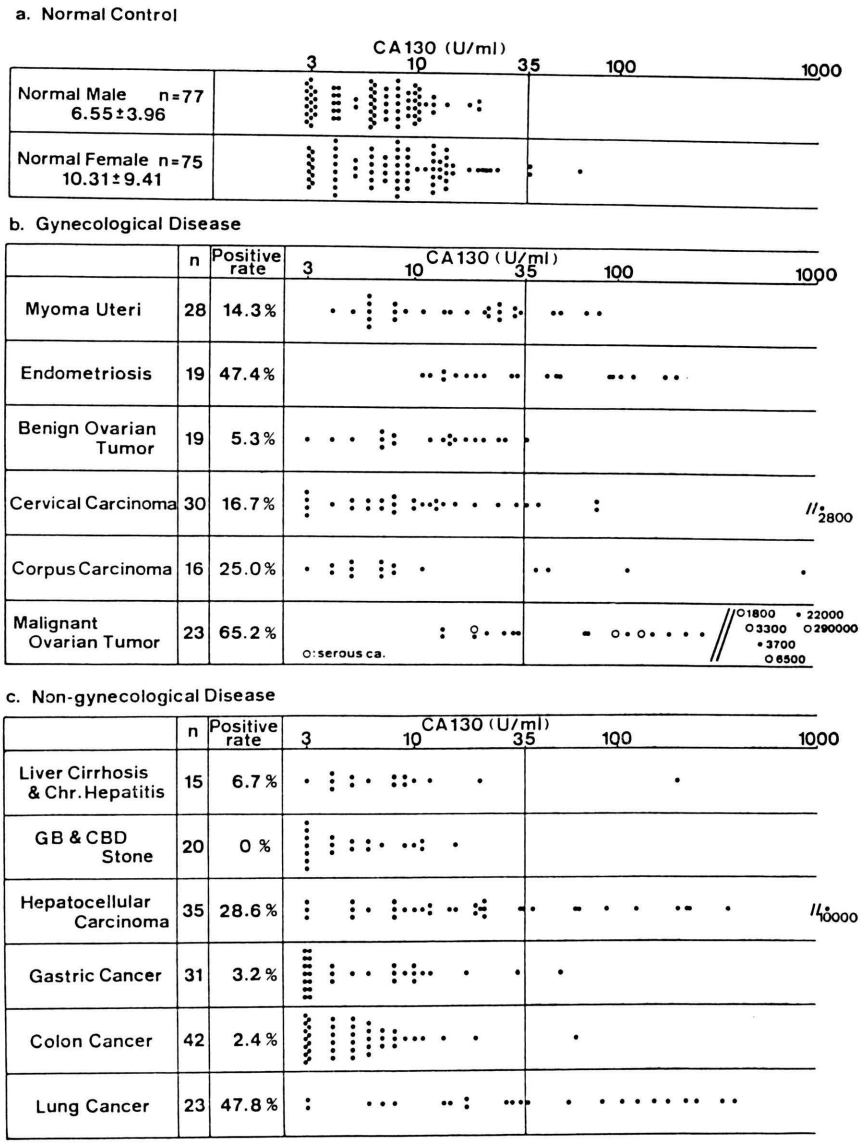

Fig. 4 Serum CA 130 values in normal controls and patients with several benign and malignant diseases.
a. normal control, b. gynecological disease, c. non-gynecological disease.

2). 各抗原濃度における10回測定の変動係数は，0 U/m*l* を除いて2.8～7.8％と，標準曲線の再現性は良好であった．

2) 測定値の精度・再現性

抗原濃度の異なる5種類の血清を同一アッセイ内で10回，また4種類の血清を異なるアッセイ間で10回測定し，それぞれの平均値，標準偏差，変動係数を求めた(Table 1). 変動係数は同一アッセイ内で1.7～3.6％, 異なるアッセイ間で1.5～5.2％といずれも満足できる値であった．

3) 回収試験

3種類の血清それぞれ25 μl に，キット添付の

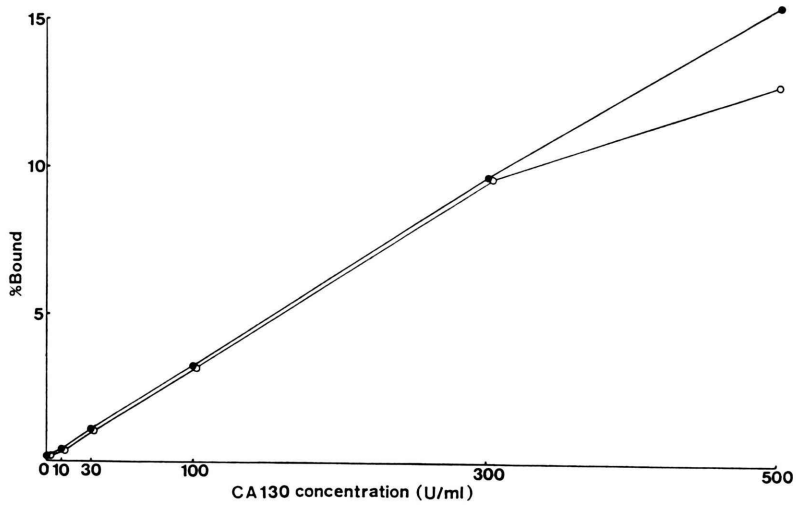

Fig. 5 Comparison of standard curves obtained with CA 130 RIA kit (●) and CA 125 kit (○). Assays were performed on identical standards of CA 130 RIA kit.

標準液 25 μl (30, 100, 300, 500 U/m*l*) を添加し，CA 130 抗原濃度を測定してその回収率を求めた (Table 2). 回収率は，97.2～115.5%，平均 104.3% と満足すべき結果であった.

4) 希釈試験

4 種類の血清をキット添付の検体希釈液で希釈したところ，その測定値はいずれも良好な直線性を示した (Fig. 3).

2. 臨床的検討

1) 健常成人の血中 CA 130 抗原濃度

CA 130 RIA キットを用いて，健常男性 77人の血中抗原濃度を測定したところ，3 U/m*l* から 20 U/m*l* の間に分布し，その平均値および標準偏差は 6.55±3.96 U/m*l* であった (Fig. 4-a). 健常女性 75人では，3 U/m*l* から 66 U/m*l* と男性よりも幅広く分布し，その平均値および標準偏差は 10.31 ±9.41 U/m*l* であった．カットオフ値を Bast らの CA 125 キットでの報告に従って 35 U/m*l* とすると[3]，偽陽性率は男性で 0% であったのに対し，女性では 4% にみられた.

2) 婦人科疾患患者の血中 CA 130 抗原濃度

良性婦人科疾患のうち，子宮内膜症での陽性率が最も高く，約半数の患者で 35 U/m*l* を超える値を示したが，いずれも軽度～中等度の上昇であった (Fig. 4-b). 悪性疾患患者では，卵巣癌患者が 65.2% の陽性を示し，特に漿液性嚢胞腺癌では，7 例中 6 例で 35 U/m*l* 以上の値であった．そのうち 4 例では，1,000 U/m*l* 以上と血中 CA 130 抗原濃度の著明な高値がみられた．子宮頸部扁平上皮癌，子宮体部癌では，それぞれ 16.7%，25% の陽性率であった.

3) 非婦人科疾患患者の血中 CA 130 抗原濃度

良性疾患患者では，肝硬変症の 1 例で中等度高値例を認めたのみで，胆石症では陽性例はみられなかった (Fig. 4-c). 悪性疾患患者のうち，胃癌，大腸癌では，それぞれ 1 例 (3.2%, 2.4%) で 35 U/m*l* 以上の値を示したのに対し，肝細胞癌患者では 28.6% の陽性率を示し，肺癌患者では，約半数の症例で 35 U/m*l* 以上の血中抗原濃度の上昇を示した.

3. CA 125 キットによる測定値との比較検討

1) 標準曲線

CA 130 RIA キット添付の標準液を CA 130 RIA キット，CA 125 キットの 2 つのキットを用いて，それぞれのキットの指示書に従って測定した．CA 130 RIA キットでは検体量 50 μl を，CA

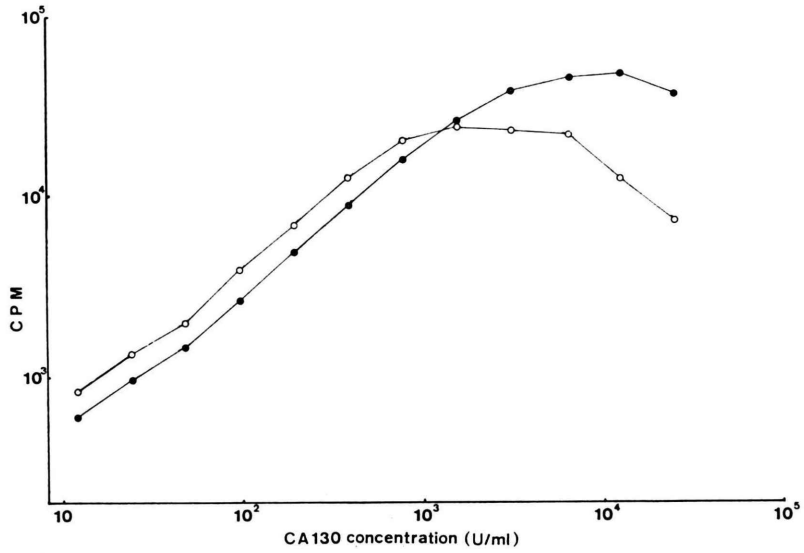

Fig. 6 Dose-response curves for CA 130 RIA kit (●) and CA 125 kit (○). Samples were prepared by diluting a serum of ovarian cancer patient in the sample diluent provided for each assay.

125 キットでは 100 μl を，それぞれ 4 時間，16時間反応させた後，添加した I-125 標識抗体のビーズへの結合率で表示した (Fig. 5)．両キットとも，300 U/ml まではほぼ同一の直線となったが，500 U/ml では CA 125 キットの方で傾きの鈍化がみられた．

2) プロゾーン現象

血中抗原濃度が 25,000 U/ml と異常高値を示した卵巣癌患者血清をそれぞれのキット添付の希釈液で段階希釈し，2 つのキットで測定した (Fig. 6)．CA 125 キットでは，1,000 U/ml 以上の抗原過剰域でビーズへの結合放射能がかえって低下するプロゾーン現象がみられ，25,000 U/ml では 200 U/ml 程度の結合放射能のレベルまで低下した．これに対し，CA 130 RIA キットでは，プロゾーン現象の起こる抗原レベルは，10,000 U/ml 以上と高濃度で，結合放射能の低下の程度も CA 125 キットに比し軽度であった．さらに 4 種類の著しい高値を示した卵巣癌患者血清についても検討を加えたが，ほぼ同様のプロゾーン現象が確かめられた．

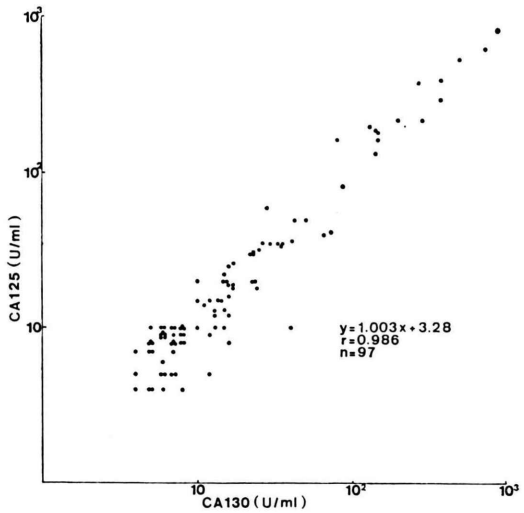

Fig. 7 Correlation between serum CA 130 values and CA 125 values. Identical samples were measured by using each reagent.

3) CA 130 RIA キットと CA 125 キットの測定値の相関関係

健常人および患者血清を両キットを用いて測定し，測定値が 1,000 U/ml 以下のもの 97 例につい

てそれぞれの測定値をプロットしたところ，両測定値の間には，良好な正の相関関係が認められた．($y=1.003x+3.28$, $r=0.986$) (Fig. 7).

IV. 考　察

CA 125 抗原は，モノクローナル抗体 OC 125 が認識する糖蛋白質で，主として婦人科領域において用いられる腫瘍マーカーである[1~7]．これまで血清 CA 125 濃度の測定には，I-125 標識抗体，固相化抗体ともに OC 125 抗体を用いた one-step 法 IRMA キットが使用されてきた[4]．今回検討した CA 130 RIA キットは，新しく開発されたモノクローナル抗体 130–22 を I-125 標識抗体，145–9 を固相化抗体として用いた one-step 法 IRMA キットである．

CA 130 RIA キットは使用する検体量が 50 μl，反応時間が 4 時間とこれまでの CA 125 キットに比較し，短時間で結果が得られ，血清量も少ない．アッセイの精度，再現性，感度も満足すべき結果が得られた．また，両キットでの測定値の間には良好な相関関係が認められた．両キットとも，one-step 法 IRMA に基づくため，理論的には抗原量が非常に多量な領域ではビーズへの結合放射能がかえって低下し，見かけ上抗原濃度が低値となるプロゾーン現象は避けられない[11,12]．実際，Fig. 6 で示したごとく，CA 125 キットでは，プロゾーン現象のため測定値が 200 U/ml 以上の検体は希釈して再検する必要がある[5]．一方，CA 130 RIA キットにおいても，同様の現象が若干観察されたが，CA 125 キットのそれに比し，プロゾーン現象は，はるかに軽度であった．少なくとも標準曲線の範囲内 (0～500 U/ml) では，測定値の信頼性が高いと思われた．

Matsuoka, Kunimatsu らによれば，130–22, 145-9 抗体とも，従来からの腫瘍マーカー CEA や AFP とは全く交叉しないが，CA 125 抗原と反応し，OC 125 抗体とは結合部位が異なるものの，130–22, 145–9 抗体は同一か，またはきわめて類似した抗原を認識するという[8,9]．したがって，この 2 つの抗体を組み合わせた CA 130 RIA キットにより測定した抗原濃度と，OC 125 抗体を用いた CA 125 キットによる測定値がほぼ一致したものと思われる．しかしそれぞれの抗体の認識する抗原決定基は異なっているため，両キットによる測定値が解離する症例が存在する可能性は否定できない．130–22 抗体と 145–9 抗体とは認識する抗原決定基がオーバーラップするとはいえ，CA 130 RIA キットでは，異なる 2 種類の抗体 130–22, 145–9 をそれぞれ I-125 標識抗体，ビーズ固相化抗体に用いたため，アッセイの測定感度が上昇し，検体量の減少，反応時間の短縮が得られたものと思われる．CA 130 RIA キットでのプロゾーン現象の改善は，用いた抗体の抗原結合能あるいはビーズに結合させた固相化抗体量の違いを反映したものと考えられる．

健常人血清の CA 130 抗原濃度は，女性が男性より 4 U/ml 高い平均値となり，4%の女性で，カットオフ値 35 U/ml 以上の偽陽性が認められた．抗体 130–22, 145–9 が子宮内膜とも反応することが確かめられており，性周期で血中抗原濃度が変動したものと思われる．血中 CA 125, CA 130 濃度とも，月経期では 100 U/ml を超える高値を示す場合もあり，閉経前の女性では，採血時の性周期を考慮に入れる必要がある[13]．

血中抗原濃度が最も高値を示したのは，今回の検討でも卵巣癌，特に漿液性嚢胞腺癌症例であった[3,7]．一方，子宮内膜症でも軽度～中等度の高値を示す例が多く，診断の一助となると考えられる[14]．

非婦人科疾患では，肺癌で陽性率が高く，臨床的に有用と思われたが，今後，血中抗原濃度と病理組織像との関係の検討も必要である．OC 125, 130–22, 145–9 抗体ともに，卵巣癌，肺癌組織や子宮内膜のみならず，胸膜・心膜・腹膜などの中皮細胞とも反応するため，原因によらず，胸水，腹水貯溜例では，血中濃度の上昇をもたらす[15]．したがって，肺癌，肝癌症例で血中抗原濃度が陽性を示した場合には，それぞれ胸水，腹水の関与が考えられ，胸水，腹水を有する例では，血中抗原濃度の解釈に注意が必要である．

V. まとめ

CA 130 RIA キットの基礎的および臨床的検討より，以下の結果を得た．

1) CA 130 RIA キットの精度・再現性，回収試験，希釈試験は良好で，CA 125 キットによる測定値とほぼ一致した値が得られた．

2) CA 125 キットより少量の検体，短い反応時間で良好な標準曲線が得られ，プロゾーン現象も弱かった．

3) 健常男性では血中抗原濃度はいずれも 35 U/m*l* 以下の値だったが，健常女性では若干の偽陽性が認められ，性周期との関連がうかがわれた．

4) 婦人科疾患では，卵巣癌，子宮内膜症で臨床的に有用と思われ，非婦人科疾患では，肺癌症例で陽性率が高かった．

謝辞：CA 130 RIA キットを提供してくださった㈱第一ラジオアイソトープ研究所に深謝いたします．

文献

1) 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
2) Davis HM, Zurawski VR Jr, Bast RC Jr, et al: Characterization of the CA 125 antigen associated with human epitherial ovarian carcinomas. Cancer Res **46**: 6143–6148, 1986
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) Klug TL, Bast RC Jr, Niloff JM, et al: Monoclonal antibody immunoradiometric assay for antigenic determinant (CA 125) associated with human epithelial ovarian carcinomas. Cancer Res **14**: 1048–1053, 1984
5) 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
6) 杉本友子，遠藤啓吾，阪原晴海，他：転移性卵巣癌(Krukenberg 腫瘍)における血中 CA 125 濃度測定の臨床的有用性．癌の臨床 **31**: 1893–1897, 1985
7) 小西郁生，藤井信吾，岡村 均，他：卵巣腫瘍患者における血清 CA 125, CEA, AFP, LDH, 及び LDH isoenzyme の検討——とくに腫瘍組織型と各腫瘍マーカーの相関について——．日産婦誌 **38**: 827–836, 1986
8) Matsuoka Y, Nakashima T, Endo K, et al: Recognition of ovarian cancer antigen CA 125 by murine monoclonal antibody produced by immunization of lung cancer cells. Cancer Res **47**: 6335–6340, 1987
9) Kunimatsu M, Endo K, Nakashima T, et al: Development of new immunoradiometric assay for CA 125 antigen using two monoclonal antibodies produced by immunizing lung cancer cells. Annals of Nucl Med (in press)
10) 中島鉄夫，鳥塚莞爾，遠藤啓吾，他：モノクローナル抗体 (130–22, 145–9) を用いる新しい腫瘍マーカー；卵巣癌での有用性．第6回腫瘍マーカー研究会記録，pp. 113–115, 1986
11) 池田勲夫，飯沼一茂，高井 優，他：2-サイト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**: 1051–1069, 1982
12) 池田勲夫，関口 潔，飯沼一茂，他：2サイト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及びその感度について——．核医学 **20**: 723–731, 1983
13) 有吉 寛，葛谷和夫，桑原正喜：血液・尿化学検査，免疫学的検査——その数値をどう読むか——CA 125．日本臨床，秋期増刊(下巻)：438–440, 1985
14) 小林 浩，金山尚裕，早田 隆，他：子宮内膜症の診断・治療における血清 CA 125 値測定の有用性．日産婦誌 **39**: 1054–1060, 1987
15) Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, et al: Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC 125. Intern J Gyneco Patho **2**: 275–285, 1983