

《ノート》

IRMA による血中 SPan-1 抗原測定法に関する
基礎的ならびに臨床的検討

— 消化器系癌における CA 19-9 と CEA との比較 —

Fundamental and Clinical Evaluation of IRMA for Serum SPan-1 Antigen

福田 容子* 村上 稔* 福地 稔*,**

Yoko FUKUDA, Minoru MURAKAMI and Minoru FUKUCHI

Department of Nuclear Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo

I. はじめに

モノクローナル抗体産生技術の進歩普及に伴い¹⁾, 血中腫瘍関連抗原の測定法が数多く開発され, 日常臨床上, 主に癌の補助的診断法や経過観察に活用されている。

消化器系の腫瘍関連抗原も CA 19-9 や CEA に代表されるごとく, 多くの血中腫瘍関連抗原が測定され, インビトロ核医学の主流となっている。ところが, これら消化器系の腫瘍関連抗原の測定法は, いずれも膵癌細胞以外の免疫原を用いて作成されたモノクローナル抗体を利用した測定法であった^{2~4)}。

1986 年, 鄭⁵⁾は膵癌培養細胞株 (SW1990) を免疫原とした新しいモノクローナル抗体, すなわち SPan-1 抗体を作成した。SPan-1 抗体が認識する腫瘍関連抗原, すなわち SPan-1 抗原は, 末端にシアル酸を必要とするムチン様糖蛋白と考えられている⁶⁾。SPan-1 抗原は分泌性であり, 膵癌に

特異性が高いことが期待できるため, 膵癌の腫瘍マーカーとして臨床的に注目されている^{7,8)}。

今回, われわれは, 血中 SPan-1 抗原測定用 Immunoradiometric assay (IRMA) につき, 基礎的検討を行うとともに, 同一血清を用い CA 19-9 や CEA との比較, コンビネーションアッセイ, などを中心に臨床的検討を行ったのでその成績を報告する。

II. 方法および材料

検討にはダイナボット株式会社より提供を受けた SPan-1 RIABEAD を用い, 実際の測定は Fig. 1 に示す手順で行った。

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出感度

各標準 SPan-1 抗原溶液添加の際のカウント数 (cpm) から, 標準 SPan-1 抗原 0 濃度溶液添加の際の cpm を, non-specific binding (NSB) として減算し, 標準曲線を作製した。また, 最小検出感度は, 標準 SPan-1 抗原溶液の最低濃度 (10 U/ml) を, キット添付の標準 SPan-1 抗原 0 濃度溶液で, 1.25 U/ml まで倍々希釈を行い, それぞれ 5 重測定してカウント数の平均値を求め, 標準 SPan-1

* 兵庫医科大学病院核医学診療部

** 兵庫医科大学核医学科

受付: 元年 11 月 27 日

最終稿受付: 2 年 2 月 8 日

別刷請求先: 西宮市武庫川町 1-1 (☎ 663)

兵庫医科大学核医学科

福地 稔

Key words: SPan-1 antigen, IRMA, Tumor marker, Pancreas cancer.

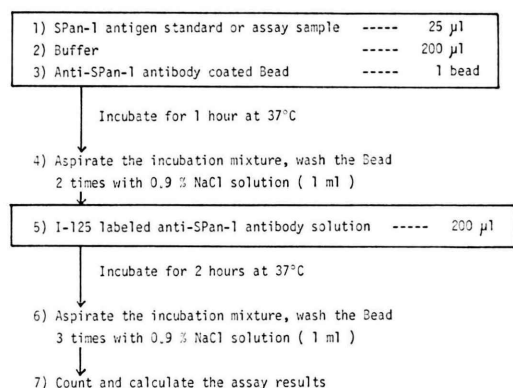


Fig. 1 Assay procedure of SPan-1 RIABEAD.

抗原 0 濃度溶液との間でおのおの有意差検定を行い求めた。

2) インキュベーション条件

インキュベーション温度とインキュベーション時間が本測定法の標準曲線に及ぼす影響につき以下の方法で検討した。反応温度は、second incubation を 37°C、2 時間と一定にして、first incubation 温度を 4°C、25°C、37°C、45°C とかえて 1 時間反応させ、また、first incubation 温度を 37°C、1 時間と一定にして、second incubation 温度を 4°C、25°C、37°C、45°C とかえて 2 時間反応させた際のおのおの標準曲線を比較検討した。一方、反応時間は、second incubation を 37°C、2 時間と一定にして、first incubation 時間を 37°C 下で 15 分、30 分、1 時間、2 時間、16 時間とかえて反応させ、また、first incubation を 37°C、1 時間と一定にして、second incubation 時間を 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、16 時間とかえて反応させ、それぞれの標準曲線を比較検討した。

3) 精度再現性

血中 SPan-1 抗原値の異なる 3 種類の血清試料を用い、同一測定内 (n=10) および異なる 10 回の測定間の再現性を C.V. で評価した。

4) 希釈試験

血中 SPan-1 抗原値が 628.9, 424.0, 118.2 U/ml の 3 種類の血清試料を用い、標準 SPan-1 抗原 0 濃度溶液で、1:1 から 1:32 まで段階的に希釈測

定して評価した。

5) 回収試験

血中 SPan-1 抗原値が 16.1, 37.6, 98.4 U/ml の 3 種類の血清試料に 5 種類の標準 SPan-1 抗原溶液 (5, 15, 50, 150, 500 U/ml) を添加し回収率を求めた。

2. 臨床的検討

1) 健康人における血中 SPan-1 抗原値

健康人 62 名を対象に SPan-1 抗原値を本測定法で測定した。その内訳は、男性 29 名、女性 33 名で、年齢は 21 歳から 62 歳まで分布し、平均 32 歳である。

2) 良性疾患での血中 SPan-1 抗原値

消化器系良性疾患群 81 例を対象に SPan-1 抗原値を本測定法で測定した。その内訳は、急性および慢性膵炎 17 例、急性および慢性肝炎 17 例、肝硬変 18 例、胆のう症 14 例、潰瘍性大腸炎 15 例である。

3) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値

診断が確定した消化器系悪性疾患 151 例を対象に SPan-1 抗原値を本測定法で測定した。その内訳は、肺癌 31 例、原発性肝細胞癌 23 例、胆のう・胆管癌 20 例、胃癌 29 例、結腸・直腸癌 27 例、食道癌 21 例である。

4) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値と血中 CA 19-9 値の比較

本測定法で SPan-1 抗原値を測定した消化器系悪性疾患 149 例を対象に、同時にセントコア CA 19-9 RIA キット (トーレ・フジバイオニクス株式会社) で CA 19-9 値 (カットオフ値 37 U/ml) を測定し比較した。

5) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値と血中 CEA 値の比較

本測定法で SPan-1 抗原値を測定した消化器系悪性疾患 149 例を対象に、同時に CEA RIABEAD (ダイナボット株式会社) で CEA 値 (カットオフ値 3.0 ng/ml) を測定し比較した。

6) コンビネーションアッセイの検討

血中 SPan-1 抗原値、CA 19-9 値、CEA 値を同時に測定した消化器系悪性疾患 148 例につき、

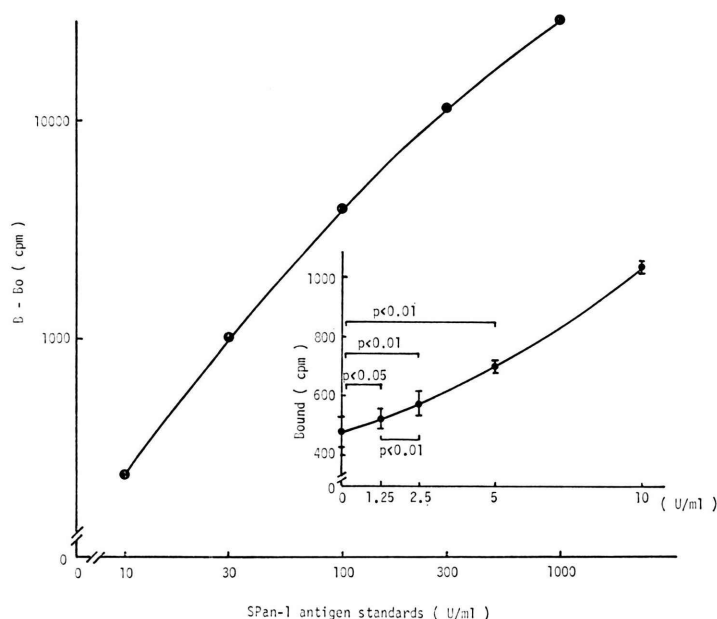


Fig. 2 Standard curve of SPan-1 RIABEAD.

消化器系良性疾患79例を対照にコンビネーションアッセイの意義につき単独測定の成績と比較した。

7) 血中 SPan-1 抗原値測定による治療効果の評価

治療経過中の SPan-1 抗原値の追跡測定を行った肺癌 (Stage IV) 患者 1 例で治療効果の評価を行った。

III. 結 果

1. 基礎的検討

1) 標準曲線および最小検出感度

本測定法の代表的標準曲線を Fig. 2 に示す。標準 SPan-1 抗原濃度 10 U/ml から 1,000 U/ml の範囲で、ほぼ満足できる標準曲線が得られた。最小検出感度は、有意差検定上、標準 SPan-1 抗原濃度 0 U/ml と 1.25 U/ml の間で結合カウントに有意差 ($p < 0.05$) が認められ、平均 ± 2 S.D. 間の重複を指標にすると標準 SPan-1 抗原濃度 0 U/ml と 2.5 U/ml との間に重複はみられなかった。

2) インキュベーション条件

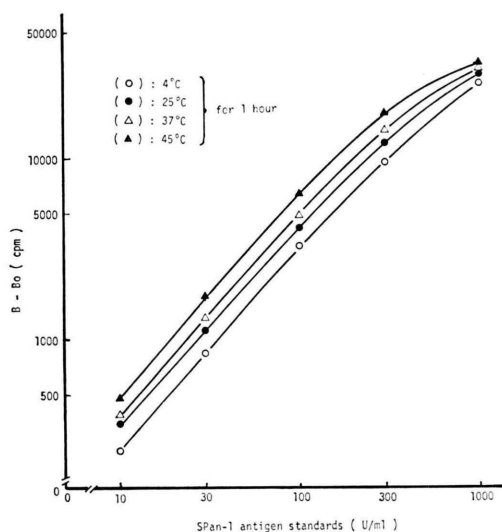
インキュベーション温度および時間に関する

検討成績を Fig. 3 に一括する。温度の検討では first incubation, second incubation とともに温度が上昇するのに比例して各濃度におけるカウント数 (cpm) が増加したが、first incubation では 1,000 U/ml の高濃度で 25°C, 37°C, 45°C の間で有意の差がないため、感度と高濃度域での精度を考慮し 37°C で十分であり、また second incubation は 37°C と 45°C との間に有意な差がなく、first incubation 同様 37°C で良いとの成績を得た。時間の検討では、first incubation および second incubation とともに反応時間が長くなるのに比例して各濃度での cpm は増加するが、標準曲線の直線性を重視すると first incubation 1 時間, second incubation 2 時間が良いとの成績を得た。

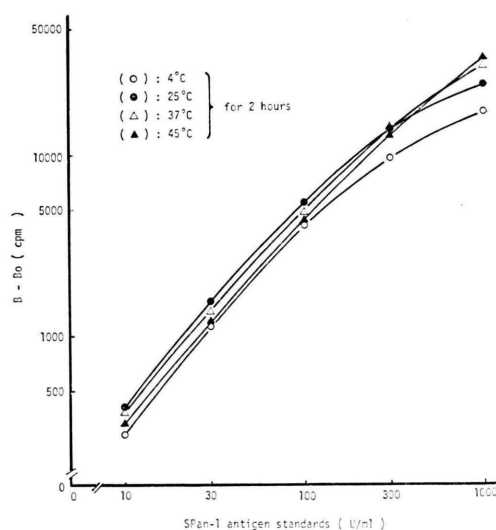
3) 精度再現性

同一測定内 ($n=10$) および異なる 10 回の測定間における精度再現性を変動係数 (C.V.) で評価した。同一測定内では血清 A (測定値: 24.1 ± 0.58 U/ml) で 2.4%, 血清 B (測定値: 127.9 ± 4.01 U/ml) で 3.1%, 血清 C (測定値: 340.0 ± 17.46 U/ml) で 5.1% との成績が得られた。一方、異なる測定

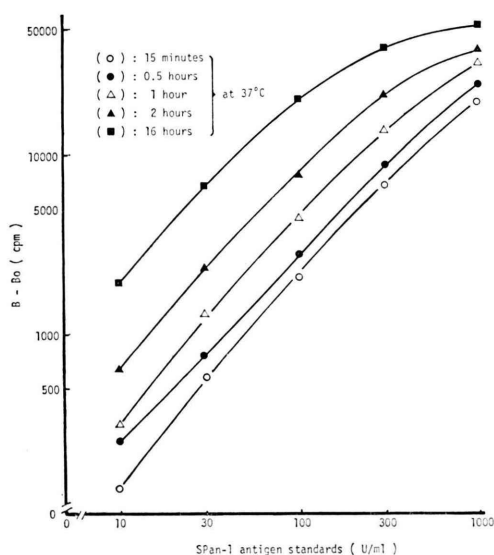
(1) First incubation temperature



(2) Second incubation temperature



(1) First incubation time



(2) Second incubation time

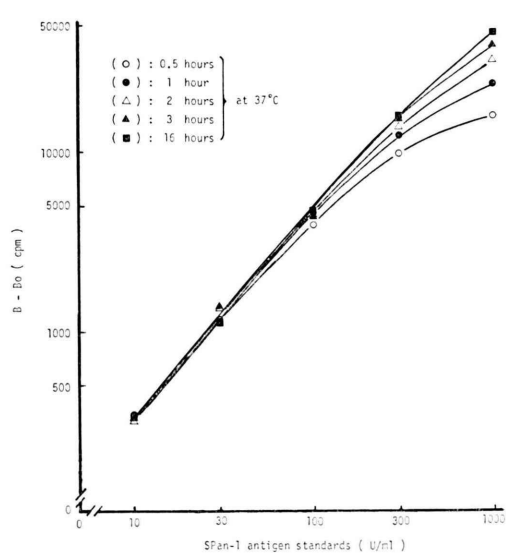


Fig. 3 Effect of incubation temperature and time on standard curve of SPan-1 RIABEAD.

間では血清 A (測定値: 24.8 ± 1.1 U/ml) で 4.4%, 血清 B (測定値: 125.3 ± 4.25 U/ml) で 3.4%, 血清 C (測定値: 322.2 ± 26.33 U/ml) で 8.1% であった。

4) 希釈試験

希釈試験の結果は、いずれの血清試料でも 0 点に集束する直線が得られた。

5) 回収試験

回収試験の結果は、血清 A で 104.3%, 血清 B で 100.2%, 血清 C で 96.3% で平均 100.3% であった。

2. 臨床的検討

1) 健常人における血中 SPan-1 抗原値

健常人 62 名の SPan-1 抗原値の測定結果を

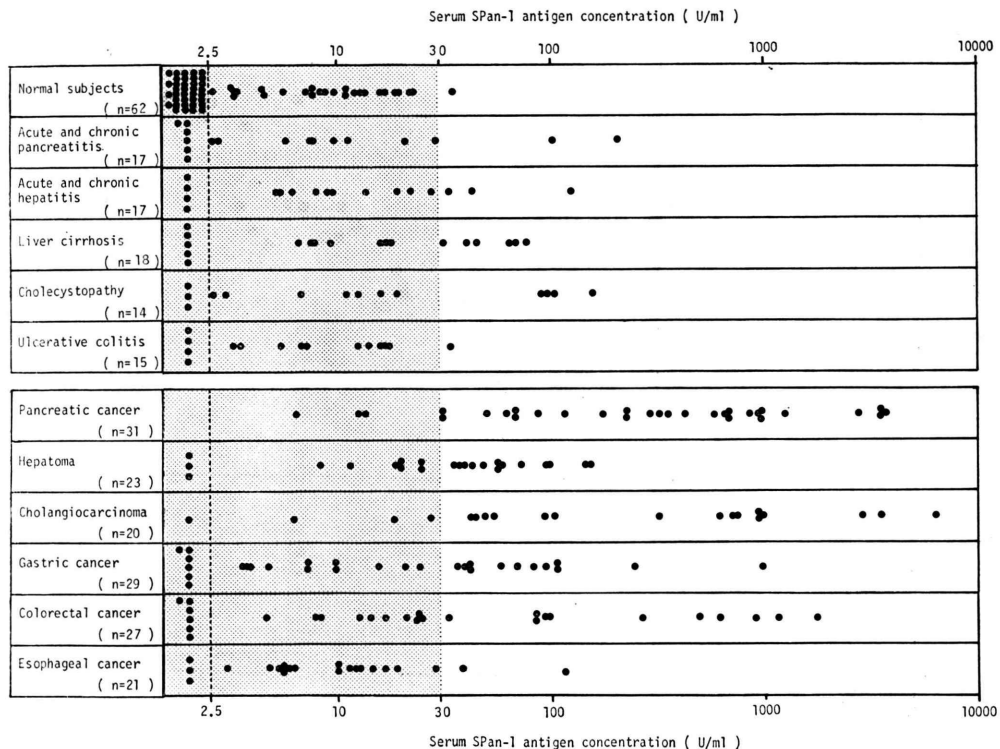


Fig. 4 Assay results of serum SPan-1 concentration in normal subjects and patients with various diseases of the digestive system.

Fig. 4 に示す。その範囲は 2.5 U/ml 以下から 35.4 U/ml の範囲に分布した。すでに報告されている⁷⁾ 多施設によるカットオフ値 30 U/ml で評価すると 62 名中 61 名 (98.4%) がカットオフ値以下に分布し、1 名 (1.6%) で 35.4 U/ml を示した。以下、臨床的検討ではカットオフ値として 30 U/ml を用いた。

2) 良性疾患における血中 SPan-1 抗原値

対照群として消化器系良性疾患 81 例の SPan-1 抗原値の測定結果を Fig. 4 に示す。81 例中 16 例 (19.8%) が偽陽性を示した。各疾患別の偽陽性率は肝硬変の 33.3%, 胆のう症の 28.6%, 急性および慢性肝炎の 17.6%, 急性および慢性膵炎の 11.8%, 潰瘍性大腸炎の 6.7% であった。

3) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値

消化器系悪性疾患 151 例の SPan-1 抗原値の測定結果を Fig. 4 に示す。全体では 151 例中 82 例

(54.3%) が陽性を示した。疾患別で見ると膵癌が 90.3%, 胆のう・胆管癌が 80.0% と高く、次いで原発性肝細胞癌で 56.5%, 胃癌で 41.4%, 結腸・直腸癌で 40.7%, 食道癌で 9.5% であった。

4) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値と血中 CA 19-9 値との比較

消化器系悪性疾患 149 例を対象に、同一血清を用い、同時に SPan-1 抗原値と CA 19-9 値を測定比較した成績を Fig. 5 に示す。このうち、測定値が得られた 128 例につき相関係数 (r) を求めたところ、両者の間には $r=+0.721$ と有意の相関を認めた。CA 19-9 値がカットオフ値以上で、SPan-1 抗原値がカットオフ値以下の症例が 2 例あったのに対し、CA 19-9 値がカットオフ値以下で、SPan-1 抗原値がカットオフ値以上の症例が 15 例あった。特に膵癌 1 例では CA 19-9 値が 38 U/ml であったのに対し、SPan-1 抗原値が 865

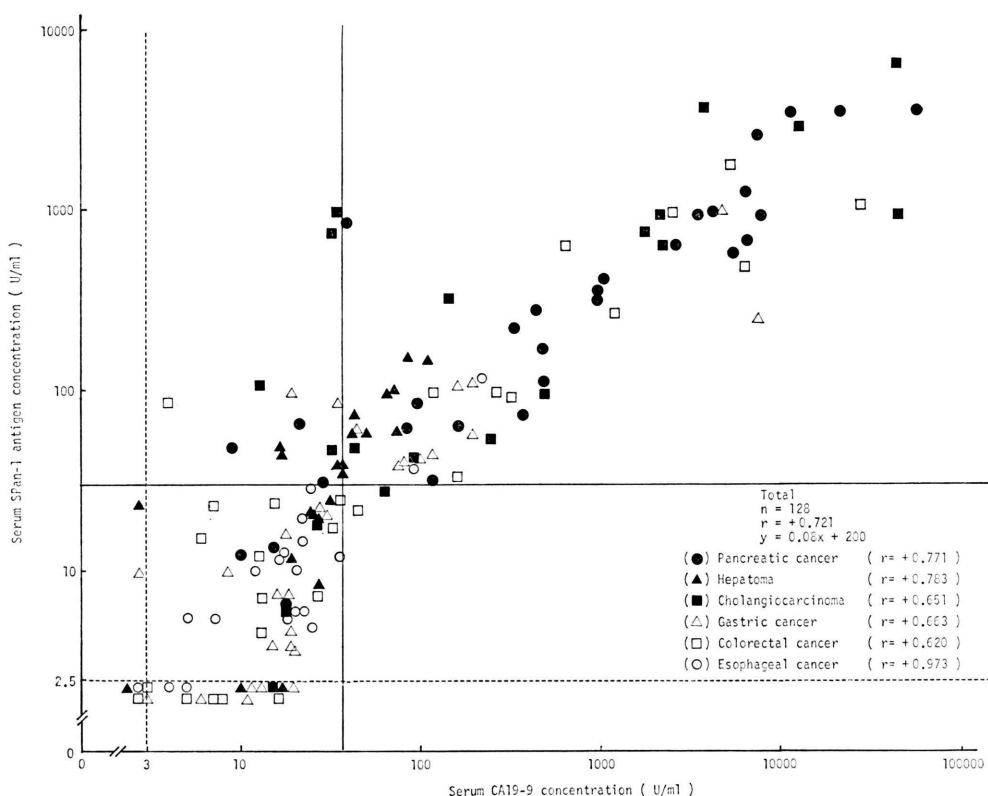


Fig. 5 Correlation between serum SPan-1 values and serum CA 19-9 values in patients with cancer of the digestive system.

U/ml, 胆のう・胆管癌 2 例では CA 19-9 値がおのおの 32 U/ml, 34 U/ml であったのに対し, SPan-1 抗原値はおのおの 706 U/ml, 950 U/ml と著しく高値であった。

5) 悪性疾患における血中 SPan-1 抗原値と血中 CEA 値の比較

消化器系悪性疾患 149 例を対象に, 同一血清を用い, 同時に SPan-1 抗原値と CEA 値を測定比較した成績を Fig. 6 に示す. このうち, 測定値が得られた 108 例につき相関係数 (r) を求めたところ, 両者の間には $r = +0.055$ と相関は認められなかった. SPan-1 抗原値がカットオフ値以下で, CEA 値がカットオフ値以上の症例が 10 例あった. また, 逆に SPan-1 抗原値がカットオフ値以上で, CEA 値がカットオフ値以下の症例が 38 例あったが, うち 12 例は膵癌患者であった。

6) コンビネーションアッセイの検討

同一血清で SPan-1 抗原値, CA 19-9 値, CEA 値を同時に測定した 148 例を対象にコンビネーションアッセイの臨床的意義を単独測定と比較した (Fig. 7). コンビネーションアッセイにより陽性率は若干上昇したが有意ではなく, 良性疾患群での偽陽性率が上昇することから, 消化器系悪性疾患では SPan-1 抗原値を指標とする場合には, さらにコンビネーションアッセイを行う意義はないとの結果を得た。

7) 血中 SPan-1 抗原値測定による治療効果の評価

膵癌患者 (Stage IV) 1 例で, 腫瘍摘出術施行前後の血中 SPan-1 抗原値を経時的に本測定法で測定した. 手術施行後血中 SPan-1 抗原値は急速に低値となり, 治療効果の評価に有用であった。

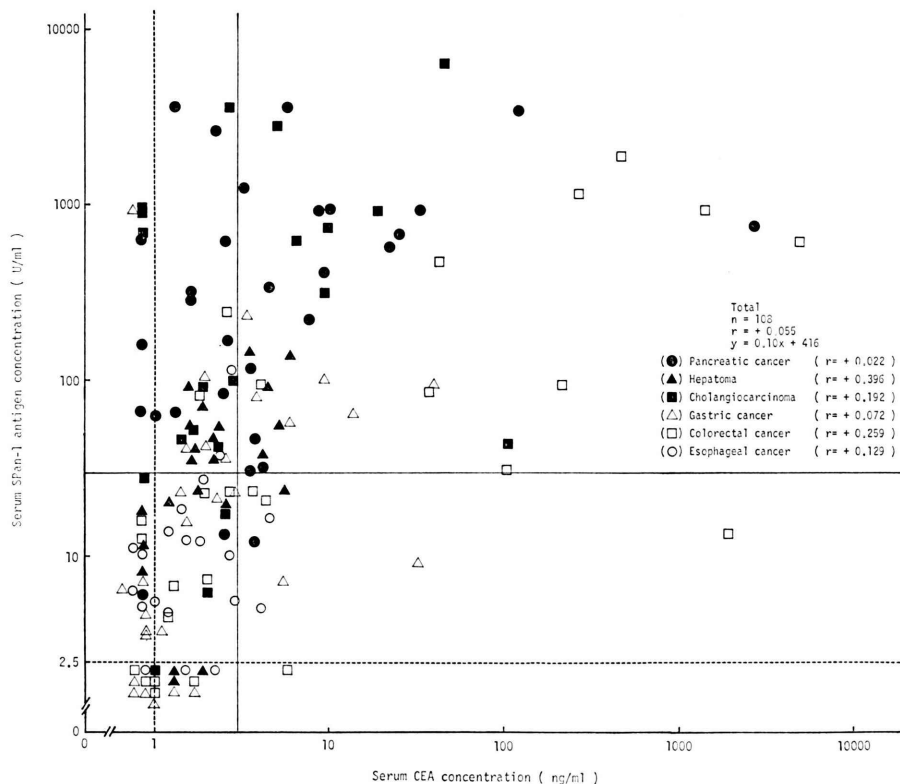


Fig. 6 Correlation between serum SPan-1 values and serum CEA values in patients with cancer of the digestive system.

IV. 考 察

膵癌は消化器系悪性疾患の中では最も診断が困難な疾患の1つである。近年、画像診断法が発達普及したことから、従来に比べやや進歩したとはいえ、まだ十分とは言えない現状にある。一方、モノクローナル抗体作成技術の普及により¹⁾、種種の腫瘍関連抗原の測定法が開発され、日常臨床に活用されている²⁻⁴⁾。膵癌の診断に際しても、血中膵腫瘍関連抗原の測定が補助的診断として、あるいは臨床経過の観察法として求められてきた。

鄭ら⁵⁾は、ヒト膵癌細胞 SW1990 を免疫原とした7種類のモノクローナル抗体 (SPan-1~7 抗体) を作成し、おのおのが認識する抗原を SPan-1~7 抗原と命名した。このうち、SPan-1 抗原は、膵癌細胞の膜構成成分で、分泌性が高いことから、膵癌

の新しい血中マーカーとして注目されている⁶⁻⁸⁾。そこでわれわれは、最近、その利用が可能となった血中 SPan-1 抗原測定用 IRMA につき、実際に測定する立場から、基礎的ならびに臨床的検討を行った。本測定法は、first incubation 1 時間、second incubation 2 時間と比較的短時間に測定結果が得られる。本測定法の標準 SPan-1 抗原濃度は 10 U/ml が最小濃度であるが、最小検出濃度の検討では有意差検定法で、1.25 U/ml とすぐれ、平均±2 S.D. の重複で評価しても 2.5 U/ml まで、検出可能であった。インキュベーション温度やインキュベーション時間もキット指示の条件で十分であることを確かめた。精度再現性、希釈試験、回収試験などの検討でも、本法は測定法に要求される諸条件を満足していた。健常人における測定値は、2.5 U/ml 以下から 35.4 U/ml の範囲に分布

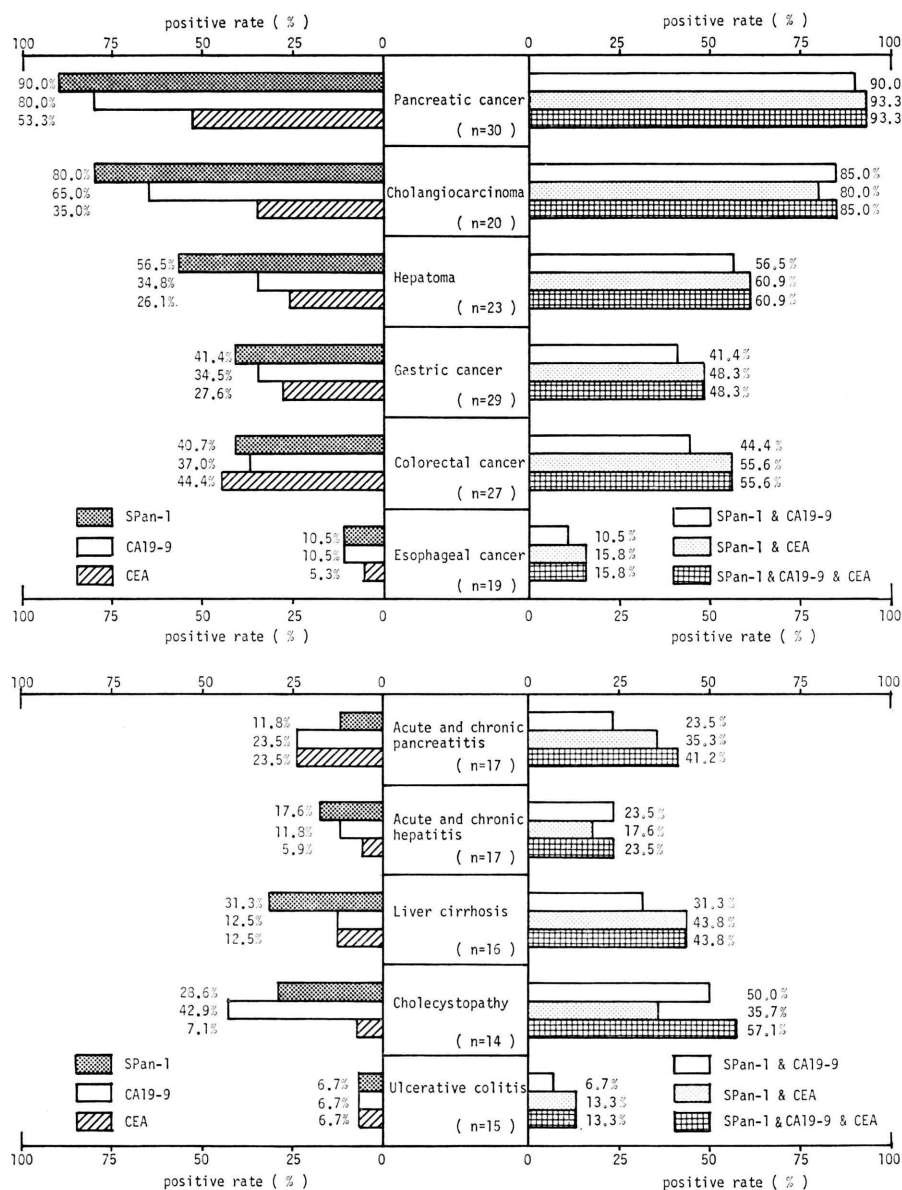


Fig. 7 Comparison between single assay and combination assay for SPan-1 antigen, CA 19-9 and CEA in patients with various diseases in the digestive system.

した。すでに報告されている多施設によるカットオフ値 30 U/ml⁸⁾ を基準に評価すると、98.4% がカットオフ値以下に分布し、カットオフ値以上を示したのは僅か 1 名であったことから、本測定法のカットオフ値 30 U/ml は妥当であると考えられた。カットオフ値 30 U/ml を基に検討したところ、

消化器系良性疾患群の 80.2% は陰性であったが、19.8% で偽陽性を示した。とりわけ、肝硬変、胆のう症、急性および慢性肝炎で偽陽性を示す症例が多かった。その理由については不明であるが、他の腫瘍マーカーでもみられる傾向と考えられた。消化器系悪性疾患群全体では陽性率は 54.3% で

あったが、疾患別にみると膵癌で90.3%、胆のう・胆管癌で80.0%と高く、比較的膵癌に特異性の高いことが示唆された。他の腫瘍マーカーとの比較では、CA 19-9 とは相関係数 $r=+0.721$ と相関が認められた。これは CA 19-9 が膵癌の補助的診断法として期待されてきたことから当然の結果と思われた。細部についてみると血中 CA 19-9 値がカットオフ値以上で、SPan-1 抗原値がカットオフ値以下の症例は僅か2例であったのに対し、その逆の結果を示した症例が15例あった。一方、CEA との比較では予想どおり、両者の間に相関は認められず、細部について検討しても、血中 CEA 値がカットオフ値以上で、SPan-1 抗原値がカットオフ値以下の症例が10例あったのに対し、その逆の結果を示した症例が38例あり、うち12例が膵癌患者であった。これらの成績は血中 SPan-1 抗原値の測定が臨床的に意義があることを示す成績と考えられた。腫瘍マーカーの診断精度を高める努力として、コンビネーションアッセイがある。血中 SPan-1 抗原値、CA 19-9 値、CEA 値について検討したが、結論的には悪性疾患群での陽性率が上昇する以上に、良性疾患群での偽陽性率が上昇するため、血中 SPan-1 抗原値を指標とする場合には単独評価で良いと考えられた。治療経過の観察における本法の意義につき検討したが、治療経過の評価が可能であることが確かめられた。これら今回の検討から、血中 SPan-1 抗原値測定用 IRMA は、新しい腫瘍マーカーの測定法として臨床的に有用であり、今後活用されると考えられる。

V. 結 語

血中 SPan-1 抗原測定法用 IRMA につき、基礎的ならびに臨床的検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) 本測定法の最小検出感度は有意差検定法で 1.25 U/ml 、平均 $\pm 2 \text{ S.D.}$ の重複で評価すると 2.5 U/ml であった。
- 2) 健常人の血中 SPan-1 抗原値は、 2.5 U/ml 以下から 35.4 U/ml の範囲を示し、98.4% が 30

U/ml 以下に分布した。

- 3) 消化器系良性疾患群では、80.2% が 30 U/ml 以下を示し、19.8% は偽陽性であった。

- 4) 消化器系悪性疾患群の 54.3% が 30 U/ml 以上を示し、特に膵癌で 90.3%、胆のう・胆管癌で 80.0% と高率で、比較的膵癌に特異性が高かった。

- 5) CA 19-9 とは相関係数 $r=+0.721$ と相関が認められたが、CEA とは相関はみられなかった。

- 6) SPan-1 抗原、CA19-9、CEA の3者のコンビネーションアッセイを検討したが、その意義は少ないとの結果を得た。

- 7) 血中 SPan-1 抗原値の測定は、治療経過の観察にも利用可能であった。

稿を終えるにあたり、血中 SPan-1 抗原測定用 IRMA キットの提供をいただいたダイナボット株式会社に謝意を表す。

文 献

- 1) Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 2) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* **5**: 957-972, 1979
- 3) Ichiki S, Kuroki M, Matsunaga A, et al: Antigenic alterations of carcinoembryonic antigen involved in the secretion from various human tumor cell lines. *Jpn J Cancer Res* **77**: 1005-1011, 1986
- 4) Bast RC, Feeney M, Lazarus H, et al: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **68**: 1331-1337, 1981
- 5) 鄭 容錫, 佐竹克介, 梅山 馨, 他: 膵癌細胞に対する新しいモノクローナル抗体 SPan-1 抗体の作成と基本的研究. 日外会誌(速報) **87**: 236, 1986
- 6) 鄭 容錫, 佐竹克介, 梅山 馨, 他: 膵癌細胞に対する新しいモノクローナル抗体 (SPan-1-7) の作成と免疫生化学的検討. 日外会誌 **88**: 89-95, 1987
- 7) 梅山 馨, 竹内 正, 鄭 容錫, 他: 新しい膵癌関連 SPan-1 抗原の測定法とその臨床的有用性に関する検討. 膵臓 **3** (4): 22-33, 1988
- 8) Chung YS, Ho JJJ, Umeyama K, et al: The detection of human pancreatic cancer associated antigen in the serum of cancer patients. *Cancer* **60**: 1636-1643, 1977