

《ノート》

# IRMA 法による血中腫瘍関連糖蛋白抗原 CA 72-4 測定に関する基礎的ならびに臨床的検討

Fundamental and Clinical Evaluation of ELSA CA 72-4 Kit  
for Serum CA 72-4 Antigen

尾森 春艶\* 村上 稔\* 福地 稔\*,\*\*

Shunen OMORI, Minoru MURAKAMI and Minoru FUKUCHI

*Department of Nuclear Medicine, Hyogo College of Medicine*

## I. はじめに

1981 年 Colcher らは、乳癌の肝転移組織から得た膜分画を免疫源として作成したモノクローナル抗体 B 72-3 が認識する腫瘍関連糖蛋白抗原 CA 72-4 を報告した<sup>1,2)</sup>。CA 72-4 抗原は、消化器系腫瘍、とりわけ本邦で発症頻度の高い胃癌の腫瘍マーカーとして関心が向けられている<sup>4~7)</sup>。今回、われわれは Immunoradiometric assay (IRMA) による CA 72-4 測定用キット ELSA CA 72-4 に関する基礎的検討を行うとともに、胃癌を含む消化器癌で他の腫瘍マーカーとの比較を含め臨床的評価を行ったので報告する。

## II. 方法および対象

検討に用いた CA 72-4 抗原測定用 ELSA CA 72-4 キットは、株式会社ミドリ十字（千葉県佐倉市）の好意により提供を受け、実際の測定手順は Fig. 1 に示すとく行った。本キットは、CA 72-4 抗原を認識する 2 つの抗体すなわち CC 49 と B 72-3 を用いた 2 ステップ法による Immuno-

radiometric assay (IRMA) で CC 49 を固相化用に、B 72-3 を標識用に用いたものである。

### 1. 基礎的検討

#### 1) 標準曲線

異なる 5 回の測定で得られた標準曲線を平均±標準偏差 (mean±S.D.) で求め、その安定性と再現性を検討した。

#### 2) 再現性

CA 72-4 抗原濃度の異なる A, B, C 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 回の測定間での再現性を検討した。

#### 3) 希釈試験

CA 72-4 抗原濃度の異なる 2 種類の血清試料を用い、キット添付の希釈溶液 (3 U/ml) で 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 と段階的に希釈測定し、希釈液濃度を補正して希釈試験を行った。

#### 4) 回収試験

CA 72-4 抗原濃度の異なる A, B 2 種類の血清試料に濃度の異なる 4 種類の標準 CA 72-4 抗原を添加した際の回収率を検討した。

#### 5) インキュベーション条件

First incubation 時間を 4 時間と一定にして、first incubation 温度を 4°C, 室温 (25°C), 37°C と変えた際の標準曲線と、first incubation 温度を室温 (25°C) と一定にして first incubation 時間を

**Key words:** CA 72-4, IRMA, Tumor marker, Digestive system.

\* 兵庫医科大学病院核医学診療部

\*\* 同 核医学科

受付：元年 12 月 25 日

最終稿受付：2 年 3 月 14 日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1-1 (西 663)

兵庫医科大学核医学科

福地 稔

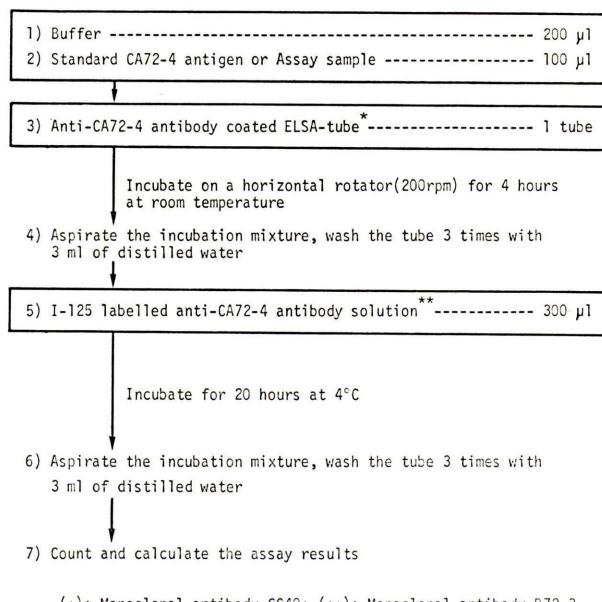


Fig. 1 Assay procedure of ELSA CA 72-4 kit for serum CA 72-4 antigen.

2時間, 4時間, 6時間, 8時間, 20時間と変えた際の標準曲線を, また, second incubation 時間を20時間と一定にしてsecond incubation 温度を4°C, 室温(25°C), 37°Cと変えた際の標準曲線と, second incubation 温度を4°Cと一定にしてsecond incubation 時間を4時間, 16時間, 20時間, 24時間, 28時間と変えた際の標準曲線を, おのおの検討した。

## 2. 臨床的検討

### 1) 健常人における血中CA 72-4抗原濃度

健常人69名を対象に血中CA 72-4抗原濃度を本測定法で測定した。これら69名の内訳は男性34名、女性35名で、年齢分布は20歳から62歳まで(平均33歳)である。

### 2) 良性消化器系疾患における血中CA 72-4抗原濃度

良性消化器系疾患105例を対象に血中CA 72-4抗原濃度を本測定法で測定した。これら良性消化器系疾患の内訳は、急性および慢性脾炎17例、胆のう症14例、急性および慢性肝炎17例、肝硬変症16例、急性および慢性胃炎6例、胃潰瘍19

例、十二指腸潰瘍4例、潰瘍性大腸炎12例である。

### 3) 悪性消化器系疾患における血中CA 72-4抗原濃度

悪性消化器系疾患152例を対象にCA 72-4抗原濃度を本測定法で測定した。これら悪性消化器系疾患の内訳は、脾癌28例、胆のう・胆管癌17例、原発性肝細胞癌21例、胃癌43例、大腸・直腸癌23例、食道癌20例である。

### 4) 胃癌の進行度と血中CA 72-4抗原濃度

胃癌43例中Borrmann(B)の分類がなされた31例についてはB分類と血中CA 72-4抗原濃度を基に評価した陽性率(%)とを比較した。

### 5) 血中CA 72-4抗原濃度による治療効果の評価

胃癌(B III)の手術後癌性腹膜炎を発症した患者に対する化学療法の効果を評価するため血中CA 72-4抗原濃度を経時的に測定した。

### 6) 同一血清におけるCA 72-4, CEA, CA 19-9およびSPan-1の陽性率の比較

本測定法で血中CA 72-4抗原濃度を測定した235例では同時に血中CEA、血中CA 19-9、血中

SPan-1 濃度を同時に測定しおのの陽性率を比較した。これら症例の内訳は、良性消化器系疾患 104 例、悪性消化器系疾患 131 例である。また、これらの成績を基に各腫瘍マーカーの Sensitivity, Specificity, Accuracy を求め比較した。なお、おののの測定は、CEA キット(第一)II(株式会社第一ラジオアイソトープ研究所)(カットオフ値: 3.0 ng/ml), セントコア CA 19-9 RIA キット(トレ・フジバイオニクス株式会社)(カットオフ値: 37 U/ml), SPan-1 RIA BEAD(ダイナボット株式会社)(カットオフ値: 30 U/ml)で測定した。

### III. 結 果

#### 1. 基礎的検討結果

##### 1) 標準曲線

異なる 5 回の測定で得られた標準曲線を平均士標準偏差 (mean±S.D.) で求め Fig. 2 に示した。

3 U/ml から 100 U/ml まで直線を示し、安定した再現性の良い標準曲線が得られた。

##### 2) 再現性

同一測定内 ( $n=10$ )、および異なる 10 回の測定間での再現性を C.V. で評価し、Table 1 に示した。同一測定内の C.V. は 3.4~8.8% で、異なる測定間の C.V. は 7.8~11.1% であった。

##### 3) 希釈試験

希釈試験の結果を Fig. 3 に示した。いずれも 0 点に集束する直線が得られた。

##### 4) 回収試験

回収試験の結果を Table 2 に示した。回収率は血清 A で平均 95.4%、血清 B で平均 103% であった。

##### 5) インキュベーション条件

インキュベーション条件に関する検討結果を Fig. 4 に一括した。反応温度は、first incubation

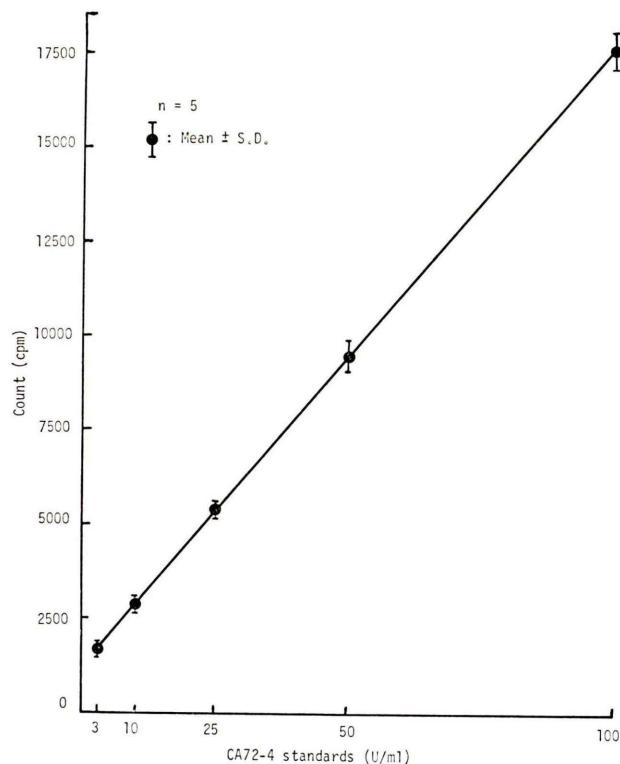


Fig. 2 Standard curve of ELSA CA 72-4 kit.

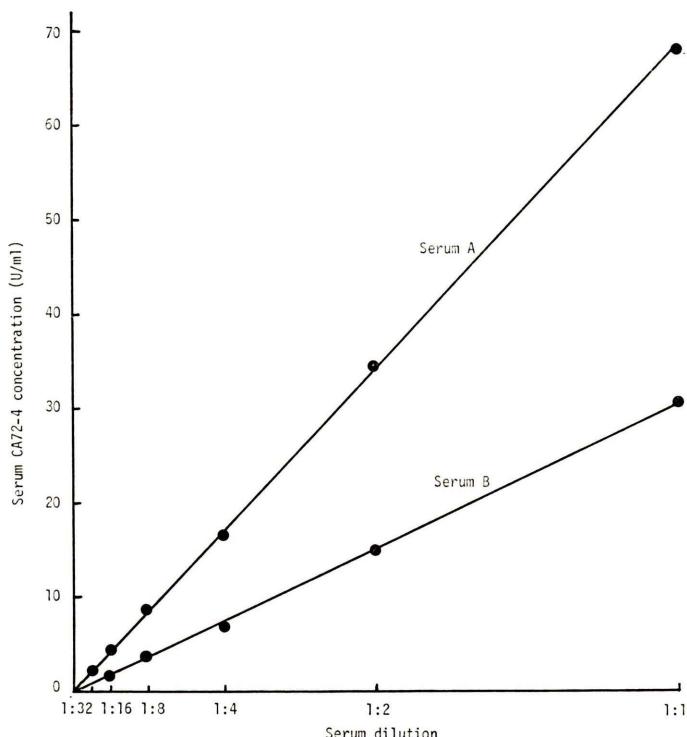
**Table 1** Intraassay and interassay reproducibility of ELSA CA 72-4 kit

## 1) Intraassay reproducibility

| Sample  | n  | Mean<br>(U/ml) | S.D.<br>(U/ml) | C.V.<br>(%) |
|---------|----|----------------|----------------|-------------|
| Serum A | 10 | 6.8            | 0.6            | 8.8         |
| Serum B | 10 | 22.2           | 1.2            | 5.4         |
| Serum C | 10 | 41.2           | 1.4            | 3.4         |

## 2) Interassay reproducibility

| Sample  | n  | Mean<br>(U/ml) | S.D.<br>(U/ml) | C.V.<br>(%) |
|---------|----|----------------|----------------|-------------|
| Serum A | 10 | 5.4            | 0.6            | 11.1        |
| Serum B | 10 | 20.0           | 1.9            | 9.5         |
| Serum C | 10 | 36.9           | 2.9            | 7.8         |

**Fig. 3** Dilution test of serum CA 72-4 measured by ELSA CA 72-4 kit.

で、温度を高くするほど、カウント数(cpm)が高くなる結果を得たが、室温での反応で十分満足できる標準曲線が得られた。また、second incubationは、室温や37°Cでは満足できる標準曲線が得られず、4°Cでのみ良好な標準曲線を得た。反応時間は、first incubationで、時間を長くするほど、カウント数(cpm)が高くなる結果を得たが、2時間を除く他の反応時間ではいずれも満足できる標準曲線が得られた。またsecond incubationは、4時間を除く他の反応時間ではいずれもほぼ

同様の標準曲線であった。

## 2. 臨床的検討結果

## 1) 健常人における血中CA 72-4抗原濃度

健常人69名の血中CA 72-4抗原濃度の測定結果をFig. 5に示す。69名中68名が最小測定濃度3 U/ml以下に分布し、1名が3.6 U/mlであった。最小測定濃度3 U/mlをカットオフ値とすると健常人の98.6%がカットオフ値以下に分布し、1.4%が偽陽性を示す成績を得た。

Table 2 Recovery test of CA 72-4 added to serum samples measured by ELSA CA 72-4 kit

|         |                     | Measured<br>(U/ml) | Added CA 72-4 (U/ml) |      |      |      | Mean<br>recovery<br>(%) |
|---------|---------------------|--------------------|----------------------|------|------|------|-------------------------|
|         |                     |                    | 5.0                  | 12.5 | 25   | 50   |                         |
| Serum A | Measured<br>(U/ml)  | 3.6                | 8.4                  | 16.2 | 26.4 | 50.3 |                         |
|         | Recovered<br>(U/ml) |                    | 4.8                  | 12.6 | 22.8 | 46.7 |                         |
|         | Recovery<br>(%)     | 96.0               | 101                  | 91.2 | 93.4 | 95.4 |                         |
| Serum B | Measured<br>(U/ml)  | 13.2               | 19.0                 | 26.0 | 36.9 | 62.7 |                         |
|         | Recovered<br>(U/ml) |                    | 5.8                  | 12.8 | 23.7 | 49.5 |                         |
|         | Recovery<br>(%)     | 116                | 102                  | 94.8 | 99.0 | 103  |                         |

Mean total recovery: 99.2%

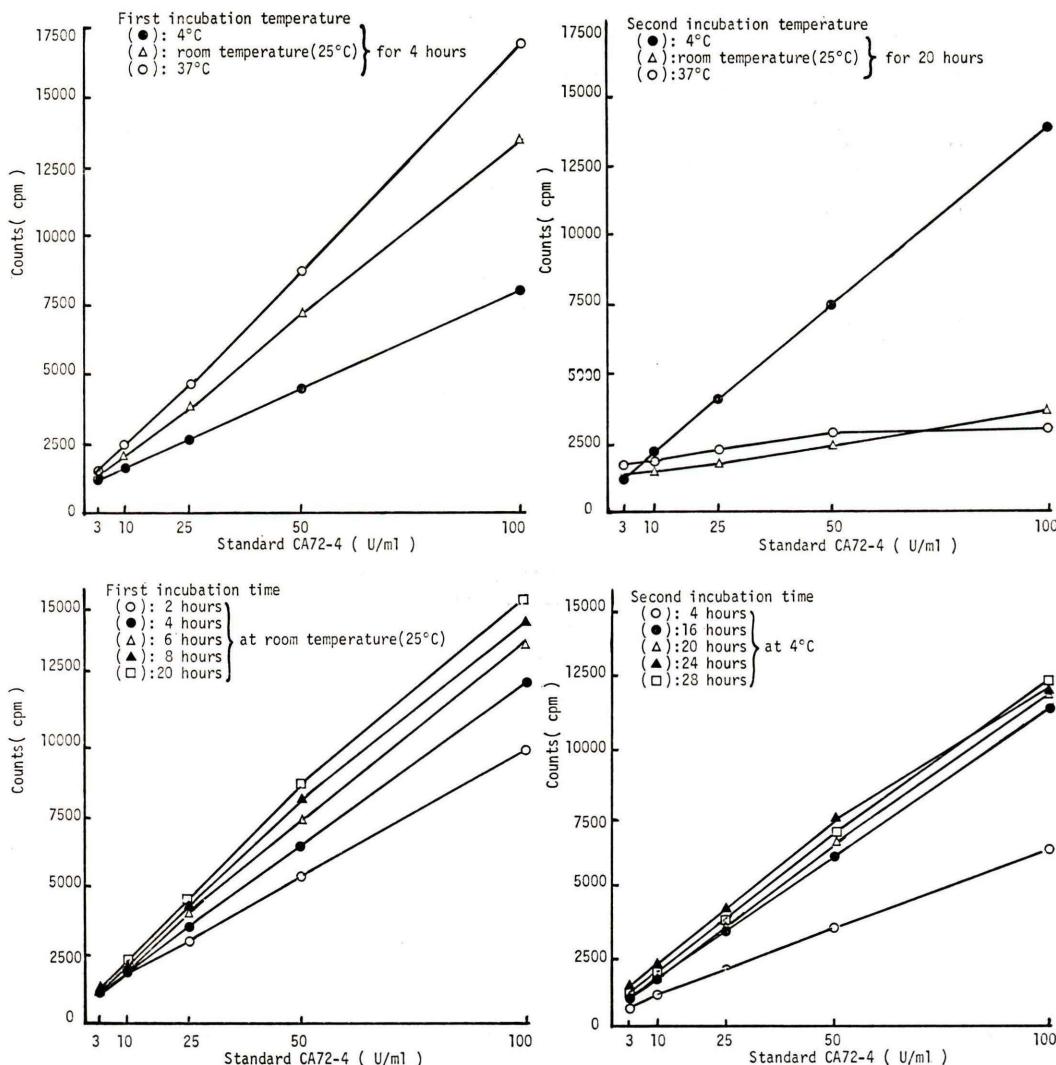


Fig. 4 Effect of incubation temperature and time on standard curve of ELSA CA 72-4 kit.

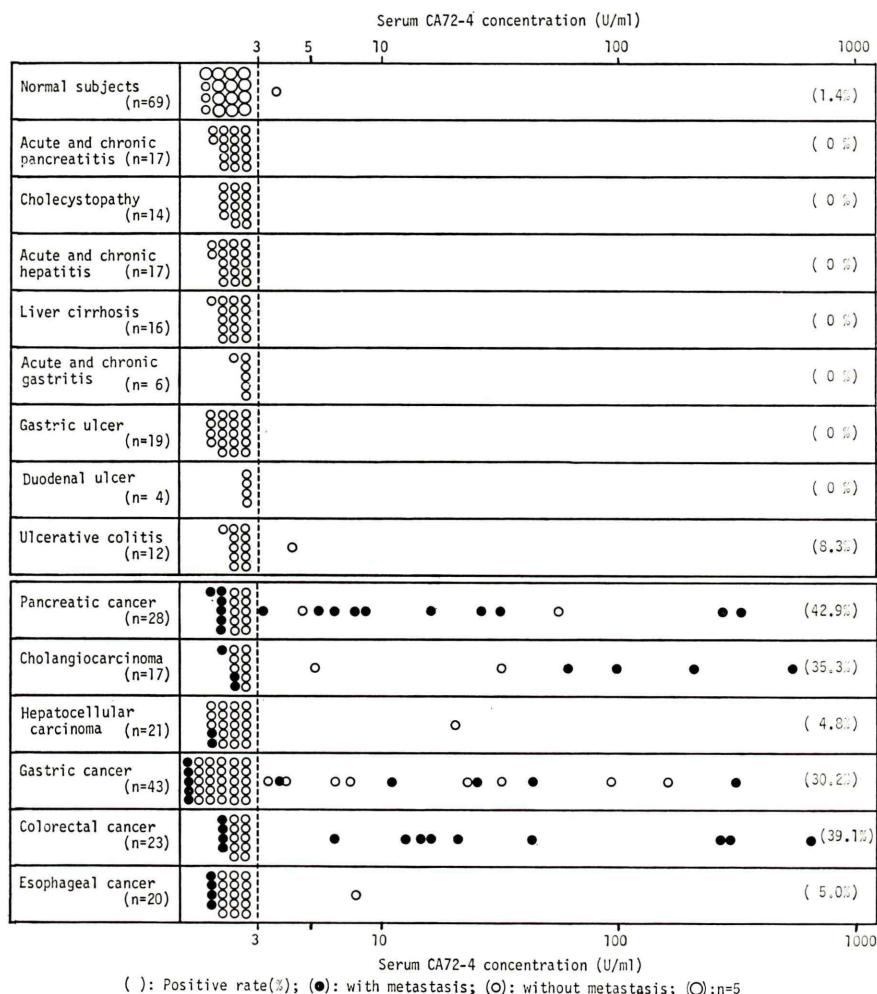


Fig. 5 Assay results of serum CA 72-4 antigen in normal subjects and patients with benign and malignant diseases of the digestive system.

## 2) 良性消化器系疾患における血中CA 72-4抗原濃度

良性消化器系疾患105例の血中CA 72-4抗原濃度の測定結果をFig. 5に示す。105例中104例(99.0%)が3 U/ml以下に分布し、僅かに潰瘍性大腸炎の1例(1.0%)が4.1 U/mlを示し偽陽性であった。

## 3) 悪性消化器系疾患における血中CA 72-4抗原濃度

悪性消化器系疾患152例の血中CA 72-4抗原

濃度の測定結果をFig. 5に示す。各疾患別の陽性率(3 U/ml以上)は、膵癌で12/28(42.9%), 胆のう・胆管癌で6/17(35.3%), 原発性肝細胞癌で1/21(4.8%), 胃癌で13/43(30.2%), 大腸・直腸癌で9/23(39.1%), 食道癌で1/20(5.0%)であった。

## 4) 胃癌の進行度と血中CA 72-4抗原濃度

胃癌43例中31例でBormann(B)の分類別に血中CA 72-4抗原濃度を評価した。症例数に差異があったが、各群における陽性率はI群で0/1(0%), II群で0/13(0%), III群で4/9(44.4%), IV

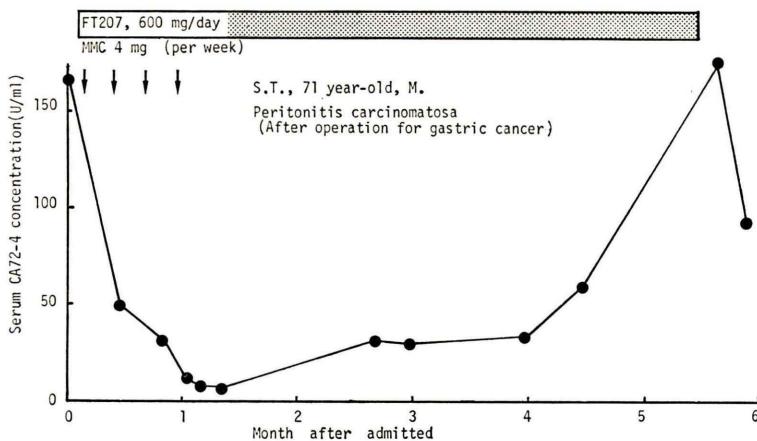


Fig. 6 Serum CA 72-4 concentrations in patient with peritonitis carcinomatosa before and after treatment.

Table 3 Comparison of positive rate between CA 72-4, CEA, CA 19-9 and SPan-1 in patients with benign and malignant diseases of the digestive system

|                                | (n)    | Positive rate (%) |      |         |        |
|--------------------------------|--------|-------------------|------|---------|--------|
|                                |        | CA 72-4           | CEA  | CA 19-9 | SPan-1 |
| Acute and chronic pancreatitis | (n=17) | 0                 | 23.5 | 17.6    | 5.9    |
| Cholecystopathy                | (n=14) | 0                 | 7.1  | 42.9    | 28.6   |
| Acute and chronic hepatitis    | (n=17) | 0                 | 0    | 17.6    | 17.6   |
| Liver cirrhosis                | (n=15) | 0                 | 20.0 | 13.3    | 26.7   |
| Acute and chronic gastritis    | (n=6)  | 0                 | 50.0 | 0       | 0      |
| Gastric ulcer                  | (n=19) | 0                 | 10.5 | 10.5    | 10.5   |
| Duodenal ulcer                 | (n=4)  | 0                 | 0    | 25.0    | 0      |
| Ulcerative colitis             | (n=12) | 8.3               | 8.3  | 8.3     | 8.3    |
| Pancreatic cancer              | (n=27) | 44.4              | 51.9 | 77.8    | 85.2   |
| Cholangiocarcinoma             | (n=16) | 31.2              | 31.2 | 62.5    | 81.2   |
| Hepatocellular carcinoma       | (n=21) | 4.8               | 28.6 | 42.9    | 57.1   |
| Gastric cancer                 | (n=26) | 23.1              | 30.8 | 34.6    | 42.3   |
| Colorectal cancer              | (n=23) | 39.1              | 56.5 | 47.8    | 47.8   |
| Esophageal cancer              | (n=18) | 5.6               | 5.6  | 11.1    | 11.1   |

群で 5/8 (62.5%) であり、胃癌の進行とともに CA 72-4 抗原の陽性率が高くなる成績を得た。

#### 5) 血中 CA 72-4 抗原濃度による治療経過の評価

胃癌 (Borrmann III) の手術後癌性腹膜炎を発症して入院した 71 歳、男性で化学療法施行前、および施行後 6か月間血中 CA 72-4 抗原濃度を経時的に測定した。その結果を Fig. 6 に示す。化

学療法により血中 CA 72-4 抗原濃度は減少し、4か月推移したが、病態の悪化とともに著しく増加し、死亡に至った。

#### 6) 同一血清における CA 72-4, CEA, CA 19-9 および SPan-1 の陽性率の比較

良性および悪性消化器疾患 235 例での消化器関連腫瘍マーカーの陽性率 (%) を比較した結果を Table 3 に示す。CA 72-4 抗原は悪性消化器系疾

患での陽性率は他の腫瘍マーカーに比べ低い成績を得たが、良性消化器系疾患での偽陽性率が著しく低く、腫瘍マーカーとしての特異性にすぐれていることを示す結果を得た。また、これらの成績を基に Sensitivity, Specificity, Accuracy をおのおの求めたところ、CA 72-4 は 26.0%, 99.0%, 58.3%，CEA は 35.9%，86.5%，58.3%，CA 19-9 は 47.3%，82.7%，63.0%，SPan-1 は 55.0%，85.6%，68.5% であった。

#### IV. 考 察

CA 72-4 は、乳癌の肝転移組織の膜分画を免疫源として作成されたモノクローナル抗体、B 72-3 が認識する腫瘍関連糖蛋白質抗原である<sup>1,2)</sup>。CA 72-4 抗原が臨床的に関心を集めているのは、悪性消化器系疾患、とりわけ胃癌の腫瘍マーカーとして注目されているためである<sup>4-7)</sup>。胃癌は本邦では発症頻度が比較的高く、その早期発見のため X 線診断による集団検診など種々努力がなされているように、大きな社会的課題となっている。血中 CA 72-4 抗原の測定がその一助になるとすればその意義は大きい。血中 CA 72-4 抗原の測定法としてはすでにいくつかの方法が報告されている<sup>8,9)</sup>。ELSA CA 72-4 キットは、CA 72-4 が認識する 2 つの抗体、すなわち CC 49 と B 72-3<sup>8)</sup>を用いた初めての 2 ステップ IRMA 法である。測定試料 100  $\mu\text{l}$  で first incubation 室温 4 時間、second incubation 4°C, 20 時間と夜間を有効に利用することで比較的容易に運用できる測定法であった。インキュベーション条件に関するわれわれの検討では、キット添付の指示どおりで満足できる結果が得られた。基礎的検討でも、標準曲線は 3 U/ml から 100 U/ml まで直線が保たれ、安定性、再現性も良好であった。同一測定内および異なる測定間の再現性や、希釈試験、回収試験の成績もほぼ満足できた。健常人における CA 72-4 抗原濃度は 98.6% が 3 U/ml 以下を示し、僅か 1 名 (1.4%) が 3.6 U/ml と 3 U/ml 以上を示した。良性消化器系疾患 105 例での測定値は、99.0% が 3 U/ml 以下を示し、僅か 1 例 (1.0%) のみが 4.1

U/ml を示した。健常人および良性消化器系疾患での成績から血中 CA 72-4 抗原濃度のカットオフ値は、標準 CA 72-4 抗原濃度の最小濃度である 3 U/ml で良いと思われた。この値を基に評価すると悪性消化器系疾患 152 例での陽性率は、27.6% とそれほど高い値が得られなかった。疾患別にみても、肺癌で 42.9%，大腸・直腸癌で 39.1%，胆のう・胆管癌で 35.3%，胃癌で 30.2% となり、原発性肝細胞癌 (4.8%) と食道癌 (5.0%) では著しく低い陽性率であった。他の腫瘍マーカーとの比較を目的に良性消化器系疾患 104 例、悪性消化器系疾患 131 例の計 235 例について同一血清による CA 72-4, CEA, CA 19-9, SPan-1 のおのおのの陽性率を比較したところ、CA 72-4 は、健常人および良性消化器系疾患での偽陽性率が著しく低いことが特徴であり、悪性消化器系疾患での陽性率は他の腫瘍マーカーに比べやや劣る成績であった。胃癌における陽性率も他の腫瘍マーカーに比べ特に高い成績は得られなかった。Sensitivity 26.0% と他の腫瘍マーカーに比べ低いのに対し、Specificity 99.0% と最も高いことから、感度より特異性に優れた腫瘍マーカーと考えられた。病期の進行とともに血中 CA 72-4 抗原濃度は高くなり、また治療効果の評価でも有用であった。陽性率が高いが、偽陽性率も高くなる腫瘍マーカーが多いなかで、CA 72-4 は特徴のある腫瘍マーカーとして臨床的意義は十分あると考えられた。

#### V. 結 語

IRMA による CA 72-4 抗原測定用 ELSA CA 72-4 キットに関する基礎的ならびに臨床的検討を行い以下の結論を得た。

- 1) 標準曲線、再現性、希釈試験、回収試験などの測定法の要求諸条件を満足していた。
- 2) インキュベーション条件は、キット添付の指示条件で満足できる結果が得られた。
- 3) CA 72-4 抗原濃度は、健常人の 98.6%，良性消化器系疾患の 99.0% で 3 U/ml 以下に分布し、偽陽性率は健常人 1.4%，良性消化器系疾患 1.0% と著しく低かった。

- 4) 悪性消化器系疾患での陽性率は 27.6% で、疾患別では肺癌 42.9%，大腸・直腸癌 39.1%，胆のう・胆管癌 35.3%，胃癌 30.2%，原発性肝細胞癌 4.8%，食道癌 5.0% であった。
- 5) 同一血清による CEA, CA 19-9, SPan-1, との比較では、CA 72-4 は偽陽性率が著しく低く、Sensitivity (26.0%) よりも Specificity (99.0%) にすぐれた腫瘍マーカーであった。
- 6) CA 72-4 抗原濃度は病期の進行とともに高値となり、また、治療経過の観察に有用であった。

稿を終えるに当たり ELSA CA 72-4 キットの提供をいただいた株式会社ミドリ十字に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Colcher D, Horan Hand P, Nuti M, et al: A spectrum of monoclonal antibodies reactive with human mammary tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA **78**: 3199-3203, 1981
- 2) Johnson VG, Schlom J, Paterson AJ, et al: Analysis of a human tumor associated glycoprotein (TAG-72) identified by monoclonal antibody B 72-3. Cancer Res **46**: 850-857, 1986
- 3) Ohuchi N, Thor A, Nose M, et al: Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) detected in adenocarcinomas and benign lesions of the stomach. Int J Cancer **38**: 643-650, 1986
- 4) Thor A, Ohuchi N, Szpack C, et al: Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B 72-3. Cancer Res **46**: 3118-3124, 1986
- 5) Stramignoni D, Bowen R, Atkinson B, et al: Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas. Int J Cancer **31**: 543-552, 1983
- 6) Horan Hand P, Colcher D, Salomon D, et al: Influence of spatial configuration of carcinoma cell populations on the expression of a tumor-associated glycoprotein. Cancer Res **45**: 833-840, 1985.
- 7) Paterson AJ, Schlom J, Sears HF, et al: A radioimmunoassay for the detection of a human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) using monoclonal antibody B 72-3. Int J Cancer **37**: 659-666, 1986
- 8) Klug TL, Scattler MA, Colcher D, et al: Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 72) on a novel pancreatic antigen (TAG 72). Int J Cancer **38**: 661-669, 1986
- 9) Schlom J, Johnston WW, Szpack CA, et al: The use of MAb B 72-3 in the diagnosis of human carcinoma. J Tumor Marker Oncol **2**: 95-112, 1987
- 10) Murano R, Kuroki M, Wunderlich D, et al: Generation and characterization of B 72-3 second generation monoclonal antibodies reactive with the tumor-associated glycoprotein-72 antigen. Cancer Res **48**: 4588-4596, 1988