

## 《技術報告》

# 乳癌の新しい腫瘍マーカー CA549 測定の基礎的検討 および臨床的有用性の評価

山口 敦子\*    牛込真理恵\*    今井 俊幸\*    大竹 英則\*  
五十嵐 均\*    羽鳥 昇\*    富吉 勝美\*    井上登美夫\*  
遠藤 啓吾\*

**要旨** モノクローナル抗体を利用した乳癌の腫瘍マーカー CA549 測定用 IRMA キット「BL-CA549」の基礎的、臨床的検討を行うとともに、CA15-3 抗原との関係を検討した。CA549 測定の再現性、希釈試験などは満足すべき結果が得られ、乳癌患者で高値を示す症例が多く認められた。血中 CA549 濃度は CA15-3 濃度と強く相関した。CA549, CA15-3 の測定に用いる  $^{125}\text{I}$ -標識トレーサ、抗体固相化ビーズを組み合わせた 4 つのアッセイを行ったところ、いずれのアッセイでもキット添付の CA15-3 抗原の測定が可能であった。また CA549 に対するモノクローナル抗体は  $^{125}\text{I}$ -標識抗 CA15-3 抗体の抗原への結合を完全に阻害した。これらの結果は CA549 と CA15-3 がほぼ同一の性状の抗原であることを示唆する。

(核医学 30: 317-322, 1993)

## I. はじめに

米国では乳癌が女性の悪性腫瘍の第 1 位を占めているが、わが国でも近年乳癌の増加が著しい。乳癌の腫瘍マーカーとして、CEA, CA15-3 がもっぱら臨床応用されているが、疾患特異性が低く、陽性率が低いなど、種々の問題点が残されており、乳癌の新しい腫瘍マーカーの開発が待たれる<sup>1,2)</sup>。

近年米国ハイブリテック社で開発された乳癌の新しい腫瘍マーカー「CA549」<sup>3-5)</sup> 測定用 IRMA キット「BL-CA549」(米国、ハイブリテック社製)を使用する機会を得たので、血中 CA549 抗原測定の基礎的、ならび臨床的検討結果および CA15-3 抗原との関係について報告する。

## II. 対象と方法

### 1. 測定原理および測定方法

CA549 は  $^{125}\text{I}$ -標識マウス IgG モノクローナル抗体 (BC4E549) と、マウス IgM モノクローナル抗体 (BC4N154) を固相化したビーズを用いた IRMA 法キット「BL-CA549」を用いて測定される糖蛋白抗原である。そのアッセイの手順を以下に示す。

- (1) 測定チューブに検体または、標準液、コントロール溶液 20  $\mu\text{l}$  入れる。
- (2) 各チューブに、アッセイ用緩衝液 300  $\mu\text{l}$ 、マウスモノクローナル IgM 抗体固相化ビーズを 1 個ずつ加える。
- (3) 室温で 2 時間インキュベートする。
- (4) チューブおよびビーズを、洗浄液 2 ml で 2 回洗浄、アスピレートする。
- (5) 各チューブに、 $^{125}\text{I}$ -標識マウスモノクローナル IgG 抗体溶液 200  $\mu\text{l}$  を入れる。
- (6) 室温で 2 時間インキュベートする。
- (7) チューブおよびビーズを、洗浄液 2 ml で 2

\* 群馬大学医学部核医学科・中央放射線部

受付: 4 年 10 月 16 日

最終稿受付: 4 年 12 月 4 日

別刷請求先: 前橋市昭和町 3-39-15 (☎ 371)

群馬大学医学部附属病院

中央放射線部核医学診断棟

山口 敦子

回洗浄, アスピレートする。

- (8) ビーズの放射能を測定し, 標準曲線より, CA549 濃度を求める。

なお対照とした血中 CA15-3 濃度の測定は, 2 つのモノクローナル抗体 115D8 と DF3 を組み合わせた CA15-3 キット (CIS 製, フランス) を, 血中 CEA 濃度の測定は, 「CEA」RIA キット (栄研化学株式会社, 東京) を使用した。

## 2. 基礎的検討

標準曲線に対する温度の影響・標準曲線の安定性, 測定精度, 希釈試験などの基礎的検討を行った。

## 3. 対象

健常人志願者, 男性 33 人 (年齢 22~57 歳), 女性 21 人 (年齢 22~58 歳) から得た 54 検体, および乳癌 74 検体, 卵巣癌 15 検体, 前立腺癌 10 検体, その他の癌 46 検体, 腎不全患者 24 検体, その他の良性疾患 26 検体の合計 249 検体を測定の対象とした。

## 4. CA549 と CA15-3 との関係

CA549 抗原と CA15-3 抗原の免疫学的な関係を検討するため, 「BL-CA549」キットと「CA15-3」キットのそれぞれの  $^{125}\text{I}$ -標識トレーサ, 抗体固相化ビーズを組み合わせた。4 つのアッセイを行った。つづいてそれぞれのアッセイ系の 2 次反応に, 非標識抗体 BC4E549 を添加し, CA549 抗原と CA15-3 抗原の抗原決定基についても検討した。

## III. 結果

### 1. 基礎的検討

#### 1) 標準曲線に及ぼす反応時間, 温度の影響

標準液 (0, 10, 25, 50, 75 U/ml の 5 本) の濃度を用いて描いた標準曲線は, Fig. 1 のように, 再現性よく得られた。

インキュベーション温度を 4°C, 25°C (室温), 37°C と変化させた場合の標準曲線の変化を Fig. 2 に示す。4°C では, 他の 2 つの温度での反応に比べ, ビーズへの結合放射能が低く, 25°C, 37°C の曲線は, ほとんど同等の値を示した。

5 種類の異なった標準 CA549 液を用いて, 反

応時間を 1 時間, 2 時間, 3 時間, 4 時間と変えて, 反応時間の影響を検討した (Fig. 3)。第 1 反応と第 2 反応, それぞれの時間を同じ時間で反応させた。インキュベーション時間が長くなるにつれて, ビーズへの結合放射能も増加し, 3 時間未満では反応時間の影響が大きかった。

#### 2) 希釈試験

高濃度値の 3 検体 (52.2 U/ml, 70.5 U/ml, 93.4

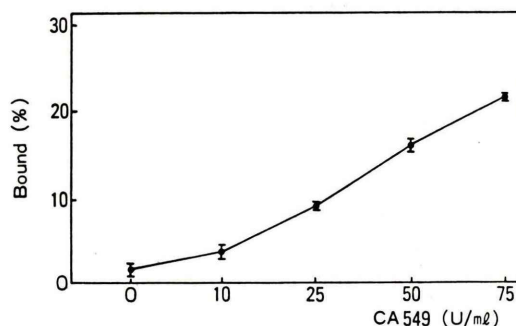


Fig. 1 Standard curve of CA549.

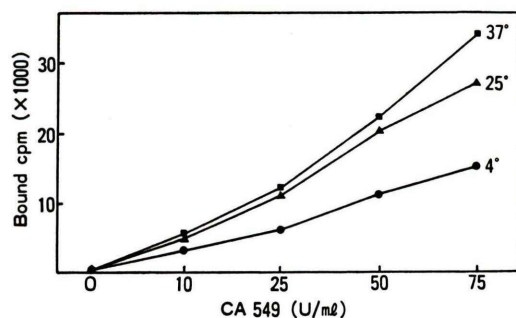


Fig. 2 Effect of temperature on the bead-bound radioactivity.

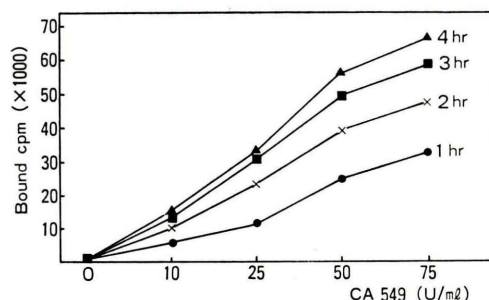


Fig. 3 Effect of time on the bead-bound radioactivity.

U/ml) をゼロ濃度標準溶液で倍々希釈して測定をした (Fig. 4). 3 検体中, 低, 中濃度検体 2 つは, ほぼ直線関係にあった. 75 U/ml を超えた高濃度 (93.4 U/ml) の検体では, やや低値を示し, 頭うちとなった.

### 3) アッセイの精度と再現性

平均濃度 10.0, 34.2, 64.1 U/ml の 3 種類の検体を, 異なった日に 10 回測定して得られた日差変動を見たところ, 変動係数 (CV) はそれぞれ

14.0%, 17.5%, 10.6% であった (Table 1). また, 2 種類の検体 (濃度平均 12.8, 47.6 U/ml) を, 同一アッセイ内で 10 回測定した同時再現性は, それぞれ 3.9%, 8.4% と, ほぼ満足される成績であった (Table 1).

### 2. 臨床的検討

健常人合計 54 検体で測定した CA549 の平均血中濃度は, 男性, 女性それぞれ  $3.2 \pm 1.5$  (平均  $\pm$  標準偏差) U/ml,  $3.5 \pm 1.1$  U/ml であった. 正常

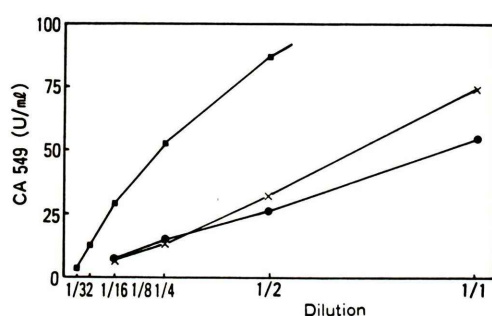


Fig. 4 CA549 dilution test.

Table 1 Reproducibility of serum CA549 measurements

Case No.	Mean (U/ml)	SD	CV (%)
Intra-assay reproducibility (n=10)			
1	10.0	1.4	14.0
2	34.2	6.0	17.5
3	64.1	6.8	10.6
Interassay reproducibility (n=10)			
1	12.8	0.5	3.9
2	47.6	4.0	8.4

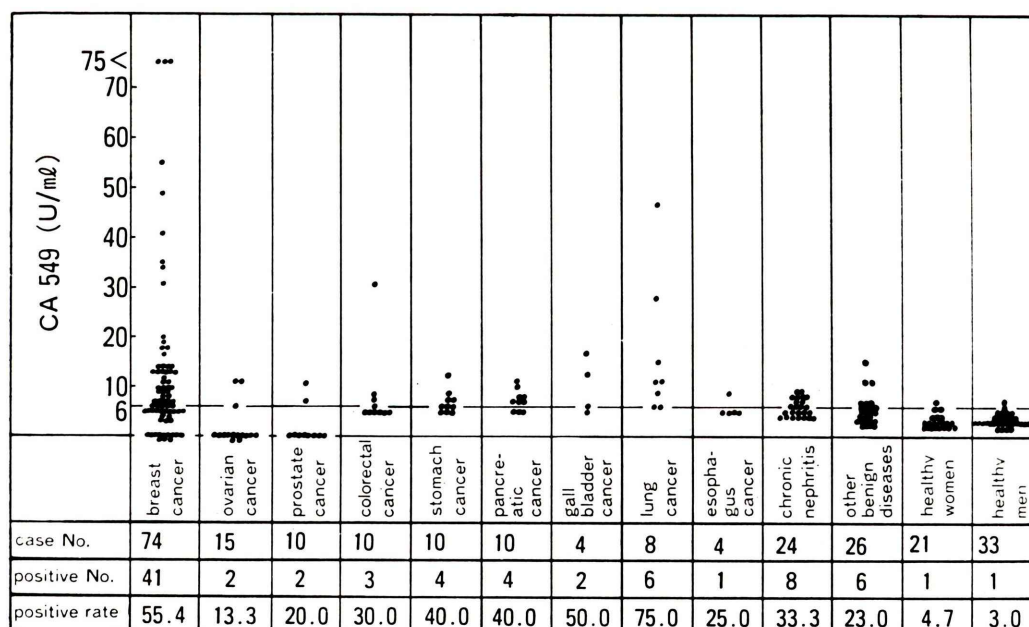


Fig. 5 Serum CA549 levels in healthy individuals and patients with benign and malignant diseases.



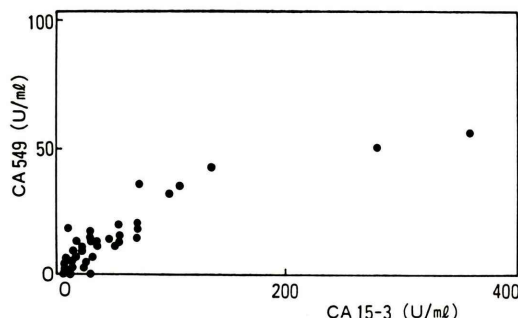


Fig. 6 Correlation between serum concentrations of CA549 and CA15-3.

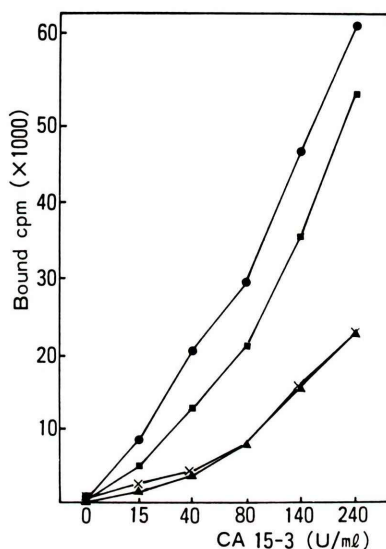


Fig. 7 Measurements of CA15-3 antigens with assay systems using different combinations of  $^{125}\text{I}$ -labeled antibody and antibody-bound beads. ●—●;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody and CA15-3 antibody-coated beads, ■—■;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA549 antibody and CA15-3 antibody-coated beads, ×—×;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody and CA549 antibody-coated beads, ▲—▲;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA549 antibody and CA549 antibody-coated beads

上限値(カットオフ値)を 6.0 U/ml としたところ、正常上限値を超える例が男性、女性ともに 1 名ずつ観測された。

良性疾病患者 50 例のうち 14 例 (28.0%) で、6.0 U/ml を超える例が観測されたが、ほとんど

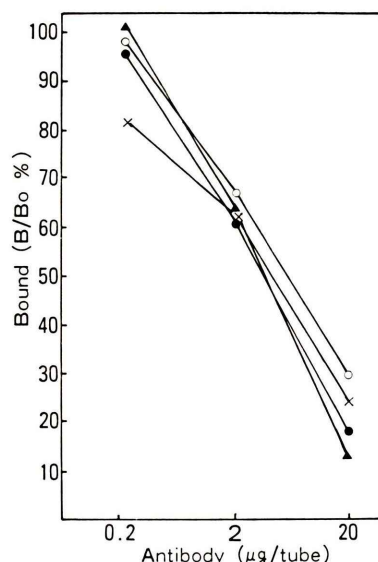


Fig. 8 Effect of unlabeled anti-CA549 antibody on the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA549 antibody and  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody to antigen-captured beads.

○—○;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA549 antibody and CA15-3 antibody-coated beads, ×—×;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA549 antibody and CA549 antibody-coated beads, ●—●;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody and CA15-3 antibody-coated beads, ▲—▲;  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody and CA549 antibody-coated beads

10 U/ml 以下の低い値であった。これに対し 20 U/ml を超える CA549 濃度の高値例は良性疾病患者ではなく、乳癌患者に多く見られた (Fig. 5)。また CA549 陽性率も乳癌では、55.4% (74 例中 41 例) と高かった。また肺癌でも 8 例中 6 例 (75%) が CA549 陽性を示し、他の卵巣癌 (13.3%)、前立腺癌 (20.0%)、食道癌 (25.0%)、胃癌 (40.0%)、肝癌 (40.0%)、大腸癌 (30.0%) などよりも、高い陽性率であった。

### 3. CA549 と CA15-3 との関係

乳癌患者血清を用いて CA549 濃度、CA15-3 濃度を測定したところ、両者の間には強い相関関係 ( $r=0.88$ ,  $N=142$ ) が認められた (Fig. 6)。そこで、両キットに用いられている  $^{125}\text{I}$ -標識トレーサと抗体固相化ビーズを組み合わせた、4 つのアッ

セイ系を用いて、キット添付の CA15-3 標準抗原液を測定した (Fig. 7). いずれのアッセイでも CA15-3 抗原の測定が可能であった。

さらに CA549 キットに用いられている BC4E549 抗体をアッセイに添加したところ、 $^{125}\text{I}$ -標識抗 BC4E549 抗体のみならず、「CA15-3」キットに用いられている  $^{125}\text{I}$ -標識 115D8 抗体のビーズへの結合も完全に阻害された (Fig. 8).

#### IV. 考 察

CA549 抗原は、これまでの CA15-3 抗原と類似した糖蛋白抗原であり、血中 CA549 濃度と血中 CA15-3 濃度は非常によく相関する、乳癌の腫瘍マーカーであることが明らかとなった。

CA549 も CA15-3 も、 $^{125}\text{I}$ -標識トレサ、ビーズへの固相化に異なったモノクローナル抗体を使用した、IRMA により測定される。ともに第 1 反応、第 2 反応のある 2 ステップ法により測定されるが、CA15-3 のアッセイは、まず血清を 51 倍に希釈し、希釈した検体中の抗原濃度を測定するのに対し、CA549 では、血清 20  $\mu\text{l}$  をそのままアッセイに使用するため、操作が著しく簡便である。

CA549 キットの標準曲線、測定値の再現性は良好であったが、反応はインキュベーション時間と温度に依存しており、インキュベーション時間が長いほど、温度が高いほど、ビーズへの結合放射能が増加することが明らかとなった。特にインキュベーション時間の影響は大きく、室温 (25°C) では第 1 反応、第 2 反応ともインキュベーション時間を一定にするよう注意する必要がある。キット添付の指示書に従って、第 1 反応、第 2 反応とも室温、2 時間が適当と思われた。

CA549 濃度が最も高値を示し、陽性率の高いのは、乳癌症例である<sup>3-5)</sup>。肺癌でも高い陽性率 (75%) が得られたが、CA549 濃度はそれほど、高値を示さないことが多い。今後症例数を増やして、肺癌における CA549 測定の臨床的有用性の検討が必要と思われる。腎機能、肝機能の低下に伴い、腫瘍マーカーが偽陽性を呈することが多く、CA549 濃度も偽陽性例が少数見られた。しかし

腎不全患者でも 20 U/ml 以上の CA549 高値例はなく、CA549 は腫瘍特異性の高い腫瘍マーカーと考えられた。

新しい乳癌の腫瘍マーカー CA549 と、これまでの乳癌の腫瘍マーカー CA15-3 との関係を見たところ、

(1) 血中 CA549 濃度は、CA15-3 濃度とよく相関すること

(2)  $^{125}\text{I}$ -標識 BC4E549 抗体と DF-3 抗体固相化ビーズを用いたアッセイで、CA15-3 抗原の測定ができること

(3) BC4E549 抗体が  $^{125}\text{I}$ -標識 115D8 抗体の CA15-3 抗原への結合を完全に阻害すること

これらの結果は「BL-CA549」と「CA15-3」の IRMA キットに用いられている、2 つの  $^{125}\text{I}$ -標識モノクローナル抗体の抗原決定基が overlap し、CA15-3 と CA549 がほぼ同一の免疫活性をもつ糖蛋白抗原であることを示唆する。

#### V. 結 論

モノクローナル抗体 BC4E549 を  $^{125}\text{I}$ -標識トレサ、BC4N154 抗体をビーズ固相化抗体として用いた血中 CA549 抗原測定用 IRMA キット「BL-CA549」の基礎的ならびに臨床的検討を行った。

1) 測定値の再現性、希釈曲線などの基礎的検討は満足すべきものであった。

2) 乳癌患者血清で CA549 濃度の高値を示す検体が多く見られ、乳癌の診療に有用と思われる。

3) 肺癌でも高い陽性率が得られ、さらに検討が必要である。

4) 血中 CA15-3 濃度と強い相関関係が見られ、CA549 と CA15-3 は、きわめて類似した免疫活性の抗原と考えられた。

#### 文 献

- 1) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 小泉 満, 中島鉄夫, 河村泰孝, 他: 乳癌に対するモノクローナル抗体を用いた“エルザ CA15-3”キットの基礎的、臨床的検討. 核医学 23: 1485-1490, 1986
- 2) 後藤真澄, 安達 勇: CA15-3. 日本臨床 48: 967-970, 1990

- 3) Bray KR, Koda JE, Gaur PK: Serum levels and biochemical characteristics of cancer-associated antigen CA549, a circulating breast cancer marker. *Cancer Res* 47: 5853-5860, 1987
- 4) Chan DW, Beveridge RA, Bruzek DJ, Damron DJ, Bray KR, Gaur PK, et al: Monitoring breast cancer with CA 549. *Clin Chem* 34: 2000-2004, 1988
- 5) Beveridge BR, Chan DW, Bruzek D, Bamron D, Bray KR, Gaur PK, et al: A new biomarker in monitoring breast cancer: CA 549. *J Clin Oncol* 6: 1815-1821, 1988

### Summary

#### Basic Study of CA549, a New Tumor Marker for Breast Cancer, and Evaluation of Its Clinical Usefulness

Atsuko YAMAGUCHI, Marie USHIGOME, Toshiyuki IMAI, Hidenori OTAKE,  
Hitoshi IGARASHI, Noboru HATORI, Katsumi TOMIYOSHI,  
Tomio INOUE and Keigo ENDO

*Department of Nuclear Medicine and Central Radiation Center, School of Medicine, Gunma University*

We performed basic and clinical studies of IRMA kits for serum CA549 antigen and examined the immunological correlation between CA549 and CA15-3 antigens. Satisfactory results were obtained in the basic studies of CA549 assays, such as the reproducibility and the dilution test. Many patients with breast cancer had elevated serum CA549 concentrations and significant cor-

relation was observed between serum CA549 and CA15-3 values. Anti-CA549 antibody completely inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled anti-CA15-3 antibody to its antigens. These results suggest that CA549 and CA15-3 antigens have similar immunological characteristics.

**Key words:** CA549, CA15-3, Breast cancer, Immunoradiometric assay.