

《技術報告》

「BL-CA195」キットを用いた血中 CA195 抗原測定の基礎的ならびに臨床的検討

小林真理恵* 山口 敦子* 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* 阪原 晴海**

要旨 モノクローナル抗体を用いた血中 CA195 抗原測定用 IRMA キット「BL-CA195」を用いて、血中 CA195 抗原測定の基礎的、臨床的検討を行った。血中 CA195 抗原測定の再現性、希釈試験などの基礎的検討で満足される結果が得られた。血中 CA195 濃度は脾癌、大腸癌症例で高値を示し、CA19-9 濃度と相関を示した。キットに用いられている抗 CA195 抗体は、¹²⁵I 標識抗 CA195 抗体のみならず、¹²⁵I 標識 CA19-9 抗体の抗原への結合もほぼ完全に阻害した。CA195 は CA19-9 と類似した抗原決定基を有していると考えられる。

(核医学 30: 441-447, 1993)

I. はじめに

画像診断の進歩にもかかわらず、脾癌の診断は困難なことが多い。一方、モノクローナル抗体作製技術の確立により、新しい腫瘍マーカーが続々と開発されるとともに、モノクローナル抗体をビーズ固相化抗体、¹²⁵I-標識トレーサーに用いた Immunoradiometric assay (IRMA) 法の採用により、アッセイの特異性、感度が著しく上昇した。

今回、米国ハイブリティック社で開発されたモノクローナル抗体を用いた、血中 CA195 抗原測定用 IRMA キット「BL-CA195」¹⁻³⁾を使用する機会を得たので、測定の基礎的検討結果、および「BL-CA195」キットを用いて測定した、血中 CA

195 抗原の臨床的有用性について報告する。

II. 材料および方法

1. 測定原理および測定方法

「BL-CA195」キットはマウスモノクローナル IgM 抗体 CC3C195 (以下抗 CA195 抗体と呼ぶ) を¹²⁵I-標識トレーサー、および固相化抗体として用いた、ビーズ固相 IRMA 法である⁴⁾。その測定手順を以下に示す。

- (1) 濃縮洗浄液 1 バイアル (18.0 ml) に蒸留水 500 ml を加えよく混和しておく。
- (2) 測定チューブに検体または標準液をおのおの 50 μ l 入れる。
- (3) 各チューブに¹²⁵I-標識マウスモノクローナル IgM 抗体溶液を 200 μ l 加える。
- (4) 各チューブに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。
- (5) 水平攪拌しながら室温で 2 時間インキュベートする。
- (6) 洗浄液で 3 回洗浄する。
- (7) 各チューブの放射能をビーズとともに測定し、標準曲線より CA195 濃度を求める。

* 群馬大学医学部核医学科・中央放射線部

** 京都大学医学部核医学科

受付: 4 年 10 月 16 日

最終稿受付: 5 年 1 月 6 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

小林 真理恵

2. 基礎的検討

「BL-CA195」キットの性能を評価するため、標準曲線に対する温度の影響、反応時間、測定精度と再現性、希釈試験などの検討を行った。

また CA195 抗原と肺癌の代表的な腫瘍マーカー、CA19-9 抗原との関係を見るため、「CA19-9」キット(米国セントコア社製)を用いて以下の検討を行った。

(1) 「BL-CA195」キットを用いたアッセイ、(2) ^{125}I -標識抗 CA195 抗体と抗 CA19-9 抗体固相化ビーズを組み合わせたアッセイ、(3) ^{125}I -標識抗 CA19-9 抗体と抗 CA195 抗体固相化ビーズを組み合わせたアッセイ、(4) 「CA19-9」RIA キットでの通常のアッセイの 4 つの方法を用いて、「CA19-9」RIA キット添付の CA19-9 抗原標準液を測定した。

さらに上記の 4 つのアッセイ系に、非標識抗 CA195 モノクローナル抗体を添加し、認識する抗原の免疫学的性状について検討した。

3. 臨床的検討

臨床的検討は、正常人男性 35 名(年齢 22~57 歳)、正常人女性 25 名(年齢 22~57 歳)、および悪性腫瘍患者 225 名(大腸・直腸癌 69 名、胃癌 43 名、肺癌 23 名、肝癌 11 名、胆囊・胆管癌 8 名、食道癌 8 名、肺癌 23 名、前立腺癌 10 名、乳癌 10 名、卵巣癌 14 名、子宮・子宮体癌 6 名)、良性疾患患者 48 名の合計 333 名の血清を用いて行った。一部の症例では血中 CEA 濃度、CA19-9 濃度も測定し、CA195 との相関関係を求めた。

III. 結 果

A. 基礎的検討

1) 標準曲線

標準 CA195(0, 10, 30, 60, 90, 120 U/ml) を x 軸に、ビーズへの結合率(B/T)を y 軸にとって描いた標準曲線を Fig. 1 に示す。濃度 0~120 U/ml の範囲で急峻な曲線が得られ、6 回の測定での標準曲線の変動係数は、5.5~12.9% であった。

2) 測定値の再現性

平均血中 CA195 濃度 11.1, 21.0, 41.3 U/ml の 3

種類の検体を 10 回測定して得られた測定内変動係数は、それぞれ 5.4%・3.3%・4.8% であった (Table 1)。

また上記 3 種類の検体を 10 回、日を変えて測定して得られた測定間変動は、各濃度に対して 11.7%・23.9%・10.4% であった (Table 1)。

3) 反応温度の影響

インキュベーション温度を 4°C・25°C(室温)・

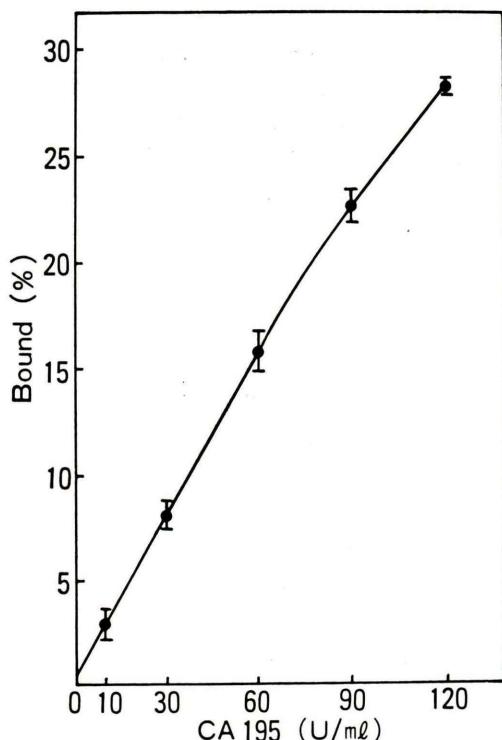


Fig. 1 Standard curves of CA195 assays. Closed circle and vertical bar show mean \pm SD of 6 assays.

Table 1 Reproducibility of CA195 measurements

| Case No. | Mean (U/ml) | SD | CV (%) |
|---------------------------------------|-------------|-----|--------|
| a. Intra-assay Reproducibility (n=10) | | | |
| 1 | 11.1 | 0.6 | 5.4 |
| 2 | 21.0 | 0.7 | 3.3 |
| 3 | 41.3 | 2.0 | 4.8 |
| b. Interassay Reproducibility (n=10) | | | |
| 1 | 10.3 | 1.2 | 11.7 |
| 2 | 28.0 | 6.7 | 23.9 |
| 3 | 47.2 | 4.9 | 10.4 |

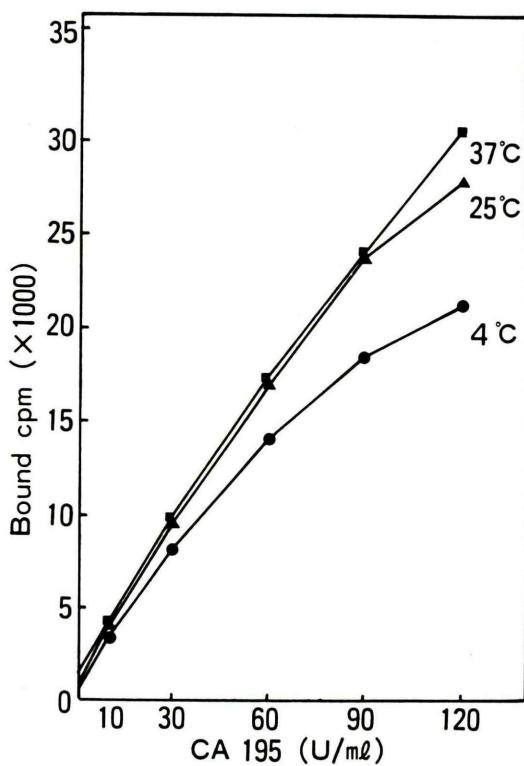


Fig. 2 Effect of incubation temperature.

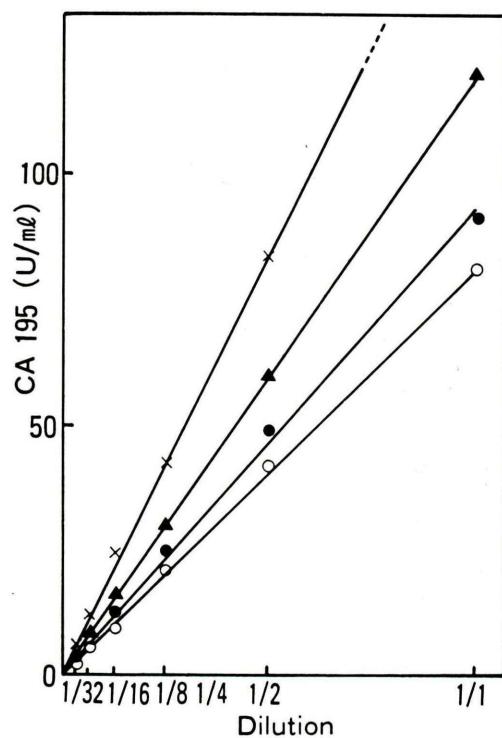


Fig. 3 Dilution test of samples with elevated serum CA195 concentrations.

37°C と変化させた場合の標準曲線を Fig. 2 に示す。25°C (室温) と 37°C では抗原濃度が高くなるに従って、ビーズへの結合放射能が増加したが、4°C では高濃度域の結合能が低かった。25°C (室温) と 37°C では、ほぼ類似した標準曲線を得ることができた。

4) 希釈試験

CA195 高濃度を示した 4 検体 (80.9 U/ml・92.0 U/ml・120.0 U/ml および 120.0 U/ml 以上) を、ゼロ濃度標準液で倍々希釈して測定した結果を Fig. 3 に示す。4 つの異なる CA195 濃度ともほぼ直線関係を示した。

5) 反応時間の影響

反応時間を 30 分から 4 時間の範囲で変えた時の標準曲線を Fig. 4 に示す。反応時間は 30 分、1 時間、2 時間、3 時間で、0 U/ml 濃度を除いてはいずれの濃度においても、反応時間が延びるに

つれて、ビーズへの結合放射能が増加し、2 時間未満の反応ではビーズへの結合放射能の低下が観察された。

B. 臨床的検討

1. 正常人および各種疾患患者の血中 CA195 濃度

正常人 60 検体を測定した結果、59 検体は 12 U/ml 未満で、血中 CA195 濃度の平均値は 3.1 U/ml (標準偏差 4.3 U/ml) であった。これより 60 例の 95% 信頼限界 (平均 + 2 × 標準偏差) より、正常上限値を 12 U/ml と設定した。悪性腫瘍患者の血中 CA195 濃度は 0 U/ml から 120 U/ml 以上まで幅広く分布して、CA195 の陽性率、測定値は癌の種類により著しく異なっていた。大腸・直腸癌 53.6% (37/69)、胃癌 46.5% (20/43)、膵臓癌 60.1% (14/23)、胆嚢・胆管癌 87.5% (7/8)、肝癌 54.5% (6/11) で高い陽性率を得た。このうち特に

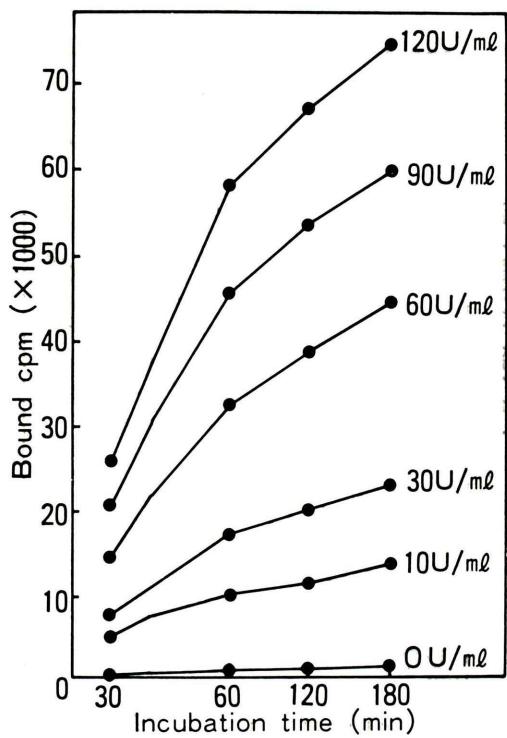


Fig. 4 Effect of incubation time.

脾癌、大腸癌、胃癌患者で、血中 CA195 濃度の異常高値を示す症例が多くみられたが (Fig. 5), 食道癌、肺癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌ではそれぞれ 37.5% (3/8), 21.7% (5/23), 20% (2/10), 20% (2/10), 42.9% (6/14), 33.3% (2/6) の陽性率であった。

これに対し良性疾患患者の血中 CA195 濃度の陽性率は 35.4% (17/48) で、しかもそれほど高い症例は見られなかった。

2. 他の腫瘍マーカーとの関係

同一検体について測定した血中 CA19-9 濃度の異常値は、大腸・直腸癌 31/44 (70.5%), 胃癌 15/28 (53.6%), 脾臓癌 15/22 (68.2%), 肝臓癌 3/7 (42.9%), 胆囊・胆管癌 8/8 (100%), 肺癌 5/16 (31.3%), 食道癌 1/4 (25.0%), 前立腺癌 1/9 (11.1%) で認められた。

CA195 と CA19-9 および CEA との相関関係を Fig. 6a および Fig. 6b に示す。両者の測定値間の相関関係を求めたところ、CA195 と CA19-9 では $r=0.74$ ($n=288$, $p<0.01$) の密接な相関関係が認められた。これに対し、CA195 と CEA では

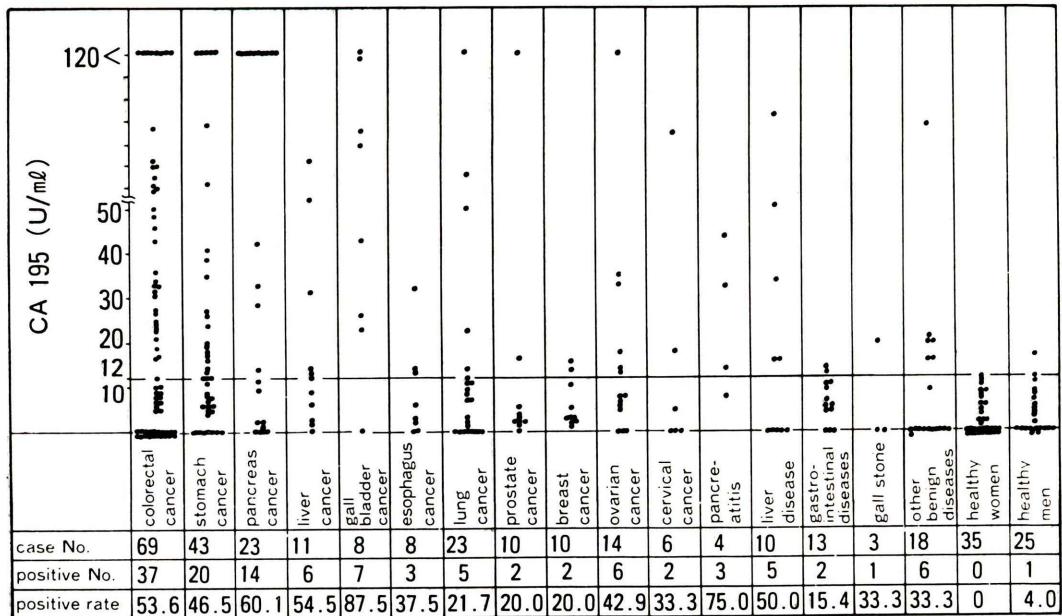


Fig. 5 Serum CA195 concentrations in healthy individuals in patients with benign diseases, and patients with malignant tumors.

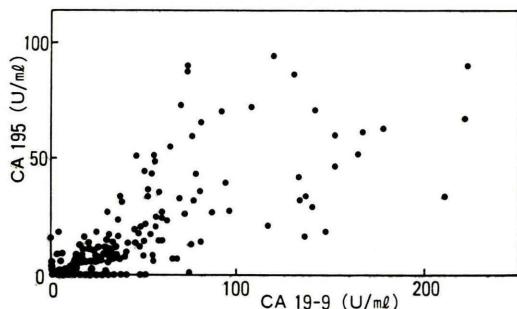


Fig. 6a Relation between serum concentrations of CA195 and CA19-9.
(n=288, r=0.74, y=0.35x)

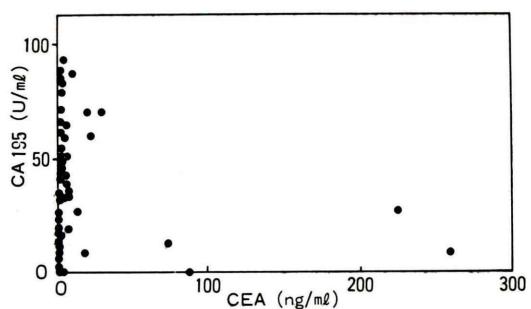


Fig. 6b Relation between serum concentrations of CA195 and CEA.
(n=163, r=0.04, y=0.03x+17.5)

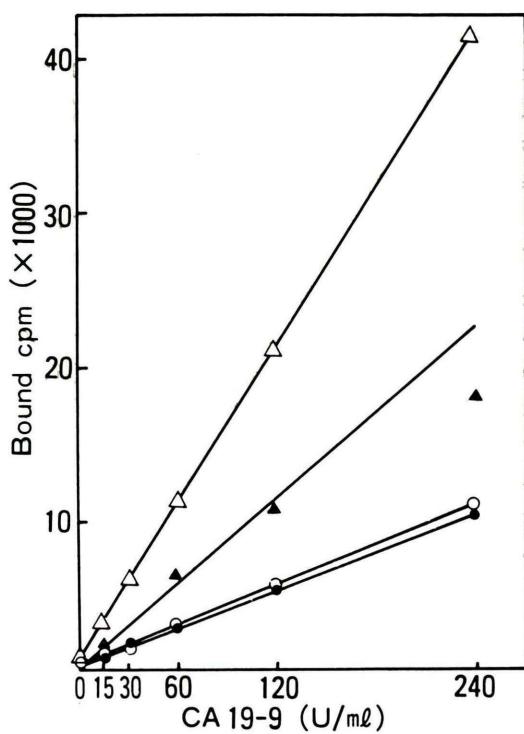


Fig. 7 CA19-9 measurement by four assays using different combinations of ^{125}I -labeled tracers and antibody-bound beads.
 ▲; ^{125}I -labeled anti-CA195 antibody and anti-CA195 antibody coated beads,
 ○; ^{125}I -labeled anti-CA195 antibody and anti-CA19-9 antibody coated beads,
 ▲; ^{125}I -labeled anti-CA19-9 antibody and anti-CA195 antibody coated beads,
 ●; ^{125}I -labeled anti-CA19-9 antibody and anti-CA19-9 antibody coated beads.

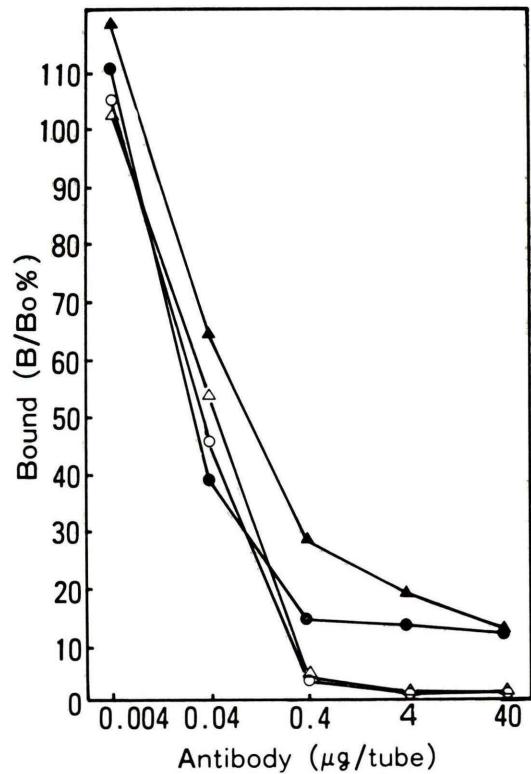


Fig. 8 Effect of unlabeled anti-CA195 antibody on the binding of ^{125}I -labeled tracers to the corresponding antigen captured on beads. Combinations of ^{125}I -labeled tracers and beads are the same with Fig. 7.

$r=0.039$ ($n=163$) と, CA19-9 と CEA の間には相関関係は認められなかった。

C. CA195 と CA19-9 の関係

血中 CA195 濃度が脾癌, 大腸癌で陽性率, および測定値が高いこと, 288 症例で測定した CA195 濃度と CA19-9 濃度が強い相関関係を示したことより, CA195 と CA19-9 の抗原の免疫学的な性状について検討した。

「CA19-9」キット添付の CA19-9 抗原標準液を使用して, 「BL-CA195」キットと「CA19-9」キットに添付されている ^{125}I -標識モノクローナル抗体, モノクローナル抗体固相化ビーズを用いた, 4つの組み合わせによるアッセイを行った。4つのアッセイいずれでも CA19-9 抗原の測定が可能であった (Fig. 7)。

「BL-CA195」キットに用いているモノクローナル抗体 CC3C195 を, 上記の 4 つのアッセイ系に添加したところ, いずれのアッセイでも容量反応をもって ^{125}I -標識抗 CA19-9 抗体, ^{125}I -標識抗 CA195 抗体の, ビーズへの結合をほぼ完全に阻害した (Fig. 8)。

IV. 考 察

^{125}I -標識トレーサー, ビーズ固相化抗体にモノクローナル抗体 CC3C195 を用いた「BL-CA195」キットの基礎的検討を行った結果, 標準曲線の再現性は良好で, CA195 測定の同時再現性 (C.V. 3.3~5.4%) もほぼ満足できる結果であった。ただ同じ検体を異なった日に測定した日差再現性 (C.V. 10.4~23.9%) は, 若干バラツキが見られた。

反応温度, 反応時間による変化は, 4°C の低温域で, 25°C・37°C に比べるとビーズへの結合放射能が低下するため, 室温以上の反応温度が必要とされる。また反応時間は 2 時間以上が望ましいと思われる。希釈試験では CA195 値が 120 U/ml 以上の検体においても直線性がよく, 全濃度に関して良好な結果をえられるなど, CA195 測定の基礎的検討は満足される結果であった。

大倉ら³⁾が報告しているごとく, 血中 CA195 濃度は, CEA とは相関しないが, CA19-9 とよ

く相関し, 特に脾癌, 大腸癌で有用であった。そこで CA195, CA19-9 抗原の免疫活性について検討した。「BL-CA195」キットと「CA19-9」キットに用いられる ^{125}I -標識トレーサーと抗体固相化ビーズを組み合わせた 4 つのアッセイで, 「CA19-9」キット添付の CA19-9 抗原濃度の測定が可能であった。さらに「BL-CA195」キットに用いている非標識抗 CA195 抗体は, ^{125}I -標識抗 CA19-9 抗体の抗原への結合をほぼ完全に阻害した。

これらの結果は, CA195 と CA19-9 の抗原決定基がきわめて類似していることを示す。したがって血中 CA195 濃度が CA19-9 濃度と相関すること, 脾癌, 大腸癌患者で CA195 の陽性率が高く, しかも陽性検体では, 血中濃度の著しい高値を示す症例が多いことも理解できる。CA19-9 と同じように, CA195 は脾癌, 大腸癌の腫瘍マーカーとして, 有用であると思われるが, さらに臨床例を重ねた検討が必要である。

CA19-9 の構造式はルイス式血液型にシアル酸が結合したもので, 人口の 10% を占めるルイス遺伝子のないルイス (a-, b-) 型の血液型の日本人では CA19-9 が産生されていない。ルイス (a-, b-) 型の血液型の症例では, たとえ進行した悪性腫瘍があっても, 血中 CA19-9 が上昇しない可能性が指摘されている⁵⁾。抗 CA195 抗体はルイス a 抗原およびシアル酸が結合したルイス a 抗原 (CA19-9) の 2 つの糖鎖に反応するとされている^{3,4)}。CA195 も, CA19-9 と同じように, 血中抗原濃度とルイス式血液型との関係, 特にルイス (a-, b-) 型症例での検討が必要と思われる。

V. 結 論

モノクローナル抗体 CC3C195 を ^{125}I -標識トレーサーおよび固相化抗体として用いた IRMA 「BL-CA195」キット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) 血中 CA195 濃度は CA19-9 濃度と強い相関関係が認められた。

- 3) CA195 は CA19-9 と互いにきわめて類似した抗原決定基であると考えられる知見が得られた。
- 4) 膜癌、大腸癌患者血清で CA195 濃度の高値を示す症例が多く見られ、これらの疾患で有用と思われる。

文 献

- 1) Bhargava AK, Petrelli NJ, Karna A, Brown WC, Douglass H, Herrera L, et al: Circulating CA-195 in colorectal cancer. *J Tumor Marker Oncology* **2**: 319-327, 1987
- 2) Gupta K, Arciaga R, Bokowski R, Gaur P: CA-195: A New sensitive monoclonal antibody-defined

- tumor marker for pancreatic cancer. *J Tumor Marker Oncology* **2**: 201-206, 1987
- 3) 大倉久直, 坂脇多津: CA195 VI. Tumor marker. *日本臨床* **48**: 982-984, 1990
- 4) Fukuta S, Magnani JL, Gaur PK, Ginsburg V: Monoclonal antibody CC3C195, which detects cancer-associated antigens in serum, binds to the human Le^a blood group antigen and to its sialylated derivative. *Arch Biochem Biophys* **255**: 214-216, 1987
- 5) Sakahara H, Endo K, Nakajima K, Nakashima T, Koizumi M, Ohta H, et al: Serum CA19-9 concentrations and computed tomography findings in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **57**: 1324-1326, 1986

Summary

Basic and Clinical Studies of Serum CA195 Antigen Assay with “BL-CA195” Kit

Marie KOBAYASHI*, Atsuko YAMAGUCHI*, Toshiyuki IMAI*,
 Hidenori OTAKE*, Hitoshi IGARASHI*, Noboru HATORI*,
 Katsumi TOMIYOSHI*, Tomio INOUE*, Keigo ENDO*
 and Harumi SAKAHARA**

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

**Department of Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine, Kyoto

We performed basic and clinical studies of IRMA “BL-CA195” kit in which monoclonal antibody CC3C195 was used as ^{125}I -labeled tracer and solid phase antibody. The reproducibility of the assay results and dilution curves were satisfactory. There was a close correlation between serum CA195 and CA19-9 values, and many patients with pancreatic and colorectal cancer had

elevated serum CA195 concentrations. Unlabeled CC3C195 antibody dose-dependently and completely inhibited the binding of ^{125}I -labeled anti-CA19-9 antibody to its corresponding antigen. These findings suggest that CA195 and CA19-9 share common antigenic determinants.

Key words: CA195, CA19-9, Immunoradiometric assay, Pancreas cancer.