

《技術報告》

サイトケラチン 19 測定用ボールエルザ CYFRA21-1 キットの検討

阪原 晴海* 高坂 唯子** 服部 典子* 細野 真*
小林 久隆* 白土 誠* 姚 正生* 小西 淳二*

要旨 サイトケラチン 19 測定用ボールエルザ CYFRA21-1 アッセイキットの評価を行った。本キットは 2 種類のモノクローナル抗体を用いており、immunoradiometric assay の原理に基づく。再現性、希釈試験、回収試験では良好な結果が得られ、最低検出感度は 0.42 ng/ml と考えられた。Tissue polypeptide antigen (TPA) と免疫学的に交差反応を示し、患者血中 CYFRA21-1 濃度と TPA 濃度の間には高い相関関係が認められた。カットオフ値を 2 ng/ml とすると健康人 26 名中 1 名 (4%) が陽性となった。食道癌では 10 名中 5 名、胃癌で 10 名中 5 名、大腸直腸癌で 10 名中 7 名、肝癌で 10 名中 6 名の患者が陽性となった。一方、良性疾患における偽陽性率は低く、胆石症で 10 名中 1 名、慢性肝炎で 10 名中 0 名、肝硬変症で 10 名中 1 名が陽性であった。ボールエルザ CYFRA21-1 キットは信頼しうるサイトケラチン 19 の測定系であり、消化器癌の腫瘍マーカーとして有用である可能性がある。

(核医学 30: 1475-1479, 1993)

I. はじめに

サイトケラチンは種々の脊椎動物の上皮細胞に存在する蛋白質ファミリーで、分子量が 40 kDa から 70 kDa の 19 の異なったポリペプチドが知られている¹⁾。

サイトケラチン 19 は 40 kDa の小さな分子量のサイトケラチンで、大腸粘膜、膀胱の移行上皮、アポクリン腺など各種の上皮組織で見られる。単層上皮の主要な構成成分であり、培養ケラチン細胞、扁平上皮癌細胞にも存在している¹⁾。肺癌におけるサイトケラチンの分布が検討され、腺癌、扁平上皮癌でサイトケラチン 19 が広く分布することが知られた²⁾。

* 京都大学医学部核医学教室

** 同 附属病院放射線部

受付: 5 年 9 月 8 日

最終稿受付: 5 年 10 月 25 日

別刷請求先: 京都市左京区聖護院川原町 54

(☎ 606-01)

京都大学医学部核医学教室

阪 原 晴 海

抗体 KS19-1 と BM19-21 はヒト乳癌培養細胞株 MCF7 を免疫原として得られたマウスモノクローナル抗体で、いずれもサイトケラチン 19 を特異的に認識する。ボールエルザ CYFRA21-1 キットは固相化抗体に KS19-1、標識抗体に BM19-21 を用いて、サンプル中のサイトケラチン 19 濃度を測定するキットである³⁾。今回、このキットの基礎的評価を行ったので報告する。なお、測定される抗原の名称は CYFRA21-1 とされる。

II. 材料と方法

1. 測定原理

本アッセイは immunoradiometric assay の原理に基づく。ボールエルザ表面で KS19-1 固相化抗体-抗原-¹²⁵I 標識 BM19-21 抗体の複合体を形成させた後、余剰の ¹²⁵I 標識抗体を除去し、ボールエルザの放射能を測定することにより、検体中の CYFRA21-1 濃度を求める。

2. 測定方法

以下にキット添付の説明書に指示されている本

キットの使用法の概略を示す。キットの評価はすべてこの条件で行った。

- 1) 試験管に標準 CYFRA21-1, 検体またはコントロール血清を 100 μ l 入れる。
- 2) 次に 125 I 標識 BM19-21 抗体を 200 μ l 加える。
- 3) それぞれの試験管に KS19-1 抗体を固相化したボールエルザを 1 個加える。
- 4) 攪拌した後, 2-8°C で 18-22 時間インキュベーションする。
- 5) 精製水 3 ml で 3 回洗浄する。
- 6) 試験管の放射能を測定する。
- 7) 標準曲線から検体の CYFRA21-1 濃度を読み取る。

3. 健常人および患者血清

健常人として 19 歳から 45 歳までの男性 9 名, 20 歳から 55 歳までの女性 17 名, 食道癌患者 10 名, 胃癌患者 10 名, 大腸直腸癌 10 名, 肺癌患者 10 名, 胆石患者 10 名, 慢性肝炎患者 10 名, 肝硬変患者 10 名の血清の CYFRA21-1 濃度を測定した。

4. TPA との関係

Tissue Polypeptide Antigen (TPA) との交差反

応性をそれぞれのキットで他方の標準液が測定されるかどうか, それぞれの標準液中の抗原が他方の抗体固相化ビーズで吸収されるかどうかを検討した。また, 食道癌, 胃癌患者血中の CYFRA-21-1 と TPA の濃度を比較した。TPA 測定用キットとしては AB SANGTEC MEDICAL 社製プロリフィゲン TPA キット“第一”II を用いた。

III. 結 果

5 回のアッセイにおける, 各濃度の標準液の結合率の平均値と標準偏差を Fig. 1 に示す。各標準液におけるばらつきは非常に少なく, 次に示す再現性試験の結果とともに, 本キットが安定した測定系であることを示す。アッセイ内再現性試験では, 3.8 ng/ml から 28.3 ng/ml の濃度の 3 種類の検体を 10 回測定したところ, 変動係数は 2.7% から 7.3% であった。アッセイ間再現性試験では, 3.4 ng/ml から 30.1 ng/ml の濃度の 3 種類の検体を 9 回測定したところ, 変動係数は 7.0% から 11.4% であった。キット添付の標準 CYFRA21-1 の最小濃度 1.68 ng/ml を 0 濃度標準液で 2 倍, 4 倍希釈した 0.84 ng/ml, 0.42 ng/ml の検体を同一アッセイ内で 6 回測定し, 0 濃度標準液の結合放射能と Welch の有意差検定を行った。0.84 ng/ml, 0.42 ng/ml いずれの結合放射能とも 0 濃度標準液の結合放射能と危険率 1% 以下 (それぞれ $p =$

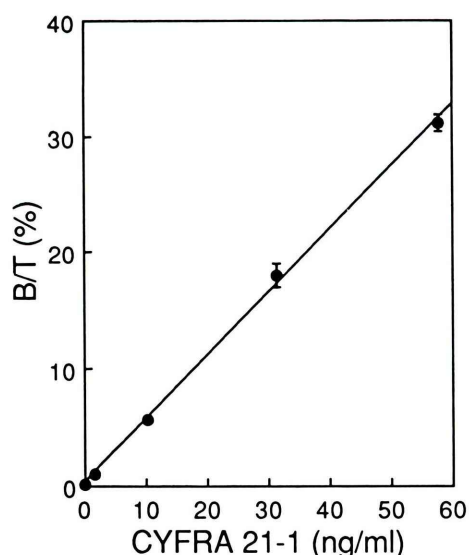


Fig. 1 Standard curve of CYFRA21-1. Mean \pm 1 standard deviation.

Table 1 Recovery test

Added concentration	0	5.1	15.8	29
Sample 1				
Measured	3.0	7.6	20.4	35.4
Recovered		4.6	17.4	32.4
Recovery %		90.2	110.5	111.9
Sample 2				
Measured	5.0	11.4	21.5	42.8
Recovered		6.4	16.5	37.8
Recovery %		125.5	104.8	130.6
Sample 3				
Measured	14.1	18.5	29.9	45.6
Recovered		4.4	15.8	31.5
Recovery %		86.3	100.3	108.8
Mean recovery (% , mean \pm SD)				109.8 \pm 13.9

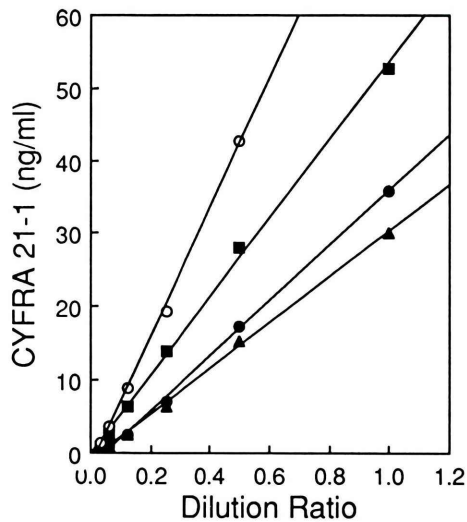


Fig. 2 Dilution test.

0.0002, $p=0.0033$) で有意差があり, かつ標準曲線の上ののったので, 少なくとも 0.42 ng/ml までは正確に測定できると考えられた. 回収試験の結果を Table 1 に示す. 回収率は 86.3% から 130.6% であった. 希釈試験ではいずれの血清も原点を通る直線を示した (Fig. 2).

TPA キットの標準液 2,000 U/ml を CYFRA 21-1 キットで測定すると 13.1 ng/ml と測定され, 逆に CYFRA21-1 キットの標準液 57.9 ng/ml を TPA キットで測定すると 2,000 U/ml 以上となった. さらに, TPA キットの 2,000 U/ml の標準液を CYFRA21-1 キットのビーズとインキュベーションした後, TPA のアッセイに戻すと測定値で 561 U/ml に, 標識抗体のビーズへの結合率で 18.3% から 5.7% へと著しい低下を認めた. 同様に CYFRA21-1 キットの 57.9 ng/ml を TPA ビーズとインキュベートすることにより, 測定値で 44.4 ng/ml に, 結合率で 24.1% から 19.5% に低下した. これらは CYFRA21-1 と TPA が免疫学的に交差することを示している. 患者血清においても CYFRA21-1 濃度と TPA 濃度との間には $y=46.4+29.1x$ (x : CYFRA21-1 の測定値, y : TPA の測定値, 検体数: 20) の回帰式が示され, 相関係数が 0.885 でよい相関が得られた (Fig. 3).

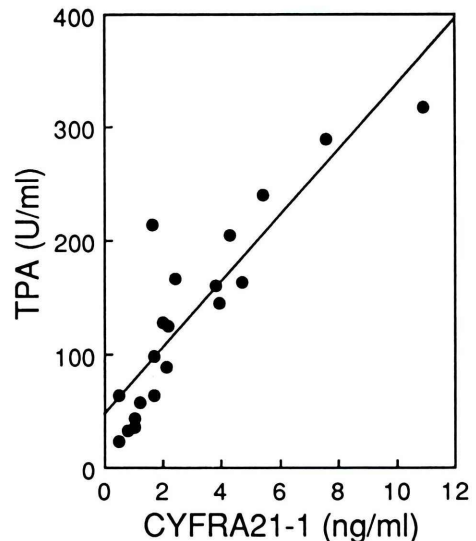


Fig. 3 Relationship between CYFRA21-1 and TPA concentrations in patient's serum.

男性健常者 9 名の測定値は 0 ng/ml から 3 ng/ml に分布し, 平均値は 0.6 ng/ml であった. 女性健常者 17 名では 0 ng/ml から 1 ng/ml に分布し, 平均値は 0.4 ng/ml であった. カットオフ値をサイトケラチン研究会に従い, 2 ng/ml とすると, 男性の 1 名が陽性となった.

Figure 4 に消化器疾患患者の血中 CYFRA21-1 濃度を示す. 食道癌患者では 0.5 ng/ml から 10.9 ng/ml に分布し, 5 名 (50%) が陽性であった. 胃癌患者では 5 名, 50%. 大腸直腸癌患者では 7 名, 70%, 膵癌患者では 6 名, 60% の陽性率であった. 一方, 良性疾患における偽陽性率は低く, 胆石症で 10%, 慢性肝炎で 0%, 肝硬変症で 10% であった.

IV. 考 察

ボールエルザ CYFRA21-1 キットは再現性, 希釈試験, 回収試験など基本的なアッセイの諸条件を満足し, 十分臨床に使用しうるキットである.

TPA は腫瘍細胞から抽出された蛋白で, 当初からサイトケラチンとの関係が示唆されていた. 今回の検討で CYFRA21-1 と TPA が免疫学的に

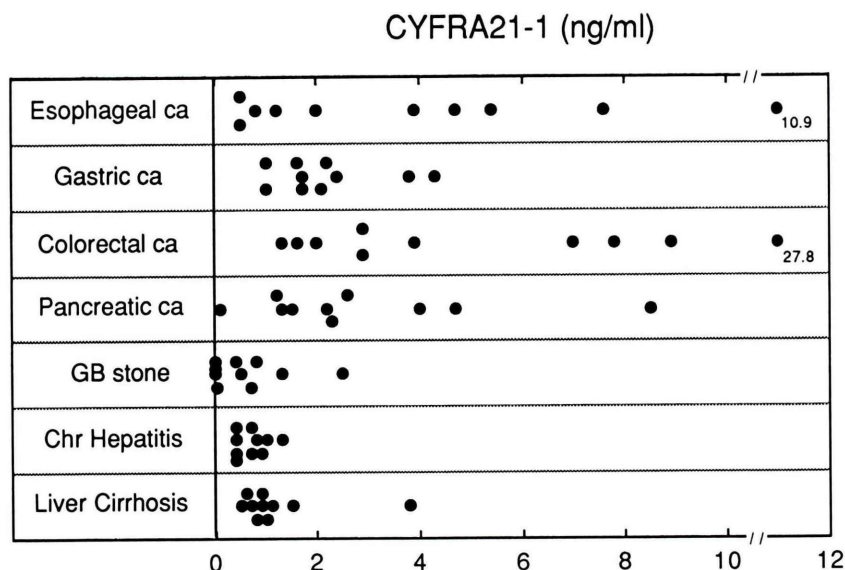


Fig. 4 Serum CYFRA21-1 concentration in patients with gastrointestinal disease.

交差することが確認された。TPA はポリクローナル抗体を用いて測定されるので、測定される物質が完全にサイトケラチン 19 ということにはならないが、少なくとも TPA として測定されているものにはサイトケラチン 19 が含まれていると考えられる。

臨床的には CYFRA21-1 は肺癌とくに扁平上皮癌のマーカーとして期待されている^{3,4)}。今回は消化器疾患を対象として検討したが、扁平上皮癌である食道癌だけでなく、腺癌である胃癌、大腸直腸癌、膵癌でも高値例が認められた。血中 CYFRA21-1 濃度は組織型よりむしろ進行度に依存する傾向がみられた。サイトケラチン 19 は腺癌細胞にも存在するので当然のことかもしれない。一方、良性疾患では偽陽性率が低かった。TPA は肝疾患で上昇することが知られている^{5,6)}。CYFRA21-1 は TPA と交差することから肝疾患における偽陽性が懸念されたが、予想外に偽陽性例は少なかった。サイトケラチン 19 がもともと肝細胞にはなく、CYFRA21-1 がサイトケラチン 19 に特異的であるのに対し、TPA は他のサイトケラチンを含んで測定しているためかもしれない。今後さらに例数を増やして、実際、肝疾患での

CYFRA21-1 の偽陽性例が少ないかどうか検討が必要である。

文 献

- 1) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**: 11-24, 1982
- 2) Broers JLV, Ramaekers FCS, Klein Rot M, et al: Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res* **48**: 3221-3279, 1988
- 3) Pujol J-L, Grenier J, Daures J-P, Daver A, Pujol H, Michel F-B: Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured CYFRA 21-1 immunoradiometric assay. *Cancer Res* **53**: 61-66, 1993
- 4) 石井 勝, 清野祐子: 肺癌の新しい腫瘍マーカー CYFRA (シフラ) 21-1 の臨床的有用性. *医学と薬学* **29**: 1451-1457, 1993
- 5) 遠藤啓吾, 阪原晴海, 中島言子, 中島鉄夫, 太田仁八, 鳥塚莞爾: Prolifigen® RIA キットによる血中 Tissue Polypeptide Antigen (TPA) 濃度の測定: 第 1 編 基礎的検討. *核医学* **21**: 75-81, 1984
- 6) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島言子, 中島鉄夫, 太田仁八, 鳥塚莞爾, 他: Prolifigen® RIA キットによる血中 Tissue Polypeptide Antigen (TPA) 濃度の測定: 第 2 編 消化器系悪性腫瘍患者における臨床的検討. *核医学* **21**: 83-89, 1984

Summary

Evaluation of a Cytokeratin 19 Assay Kit "BALL ELSA CYFRA21-1"

Harumi SAKAHARA, Tadao KOSAKA, Noriko HATTORI, Makoto HOSONO,
Hisataka KOBAYASHI, Makoto SHIRATO, Zhengsheng YAO and Junji KONISHI

Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University

We evaluated "BALL ELSA CYFRA21-1" kit, an immunoradiometric assay kit for cytokeratin 19. Monoclonal antibodies KS19-1 and BM19-21 are used for immunoadsorbent and indicator, respectively. There was no problems in reproducibility, dilution test and recovery test. Minimum detectable concentration was 0.42 ng/ml. The antigen measured by this kit was immunologically cross-reactive with tissue polypeptide antigen (TPA) and CYFRA21-1 concentration was closely correlated with TPA concentration in patient's serum. One of twenty-six healthy subjects showed serum concentration over a cut-off value of 2.0 ng/

ml. Serum CYFRA21-1 concentration elevated in 5 of 10 esophageal cancer patients, 5 of 10 gastric cancer patients, 7 of 10 colorectal cancer patients and 6 of 10 pancreatic cancer patients. Positive rate in patients with benign disease including hepatopathy was low. BALL ELSA CYFRA21-1 kit is reliable and CYFRA21-1 could be a useful tumor marker in gastrointestinal cancer.

Key words: Cytokeratin 19, CYFRA21-1, Tumor marker, Immunoradiometric assay, Monoclonal antibody.