

原 著

血 中 CEA (CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN)
濃度測定における二種類の RADIOIMMUNOASSAY
KIT の比較検討

— ZIRCONYLPHOSPHATE GEL METHOD と ONE STEP
SANDWICH METHOD の比較 —

岩 佐 寧¹⁾ 小 泉 陽 一¹⁾ 山 田 隆 司¹⁾
飯 田 太²⁾ 降 旗 力 男²⁾ 野 口 浩³⁾

¹⁾ 信州大学医学部付属順応医学研究施設臨床部門

²⁾ 同 第二外科学教室

³⁾ 同 産科婦人科学教室

COMPARISON OF TWO METHODS FOR PLASMA CEA
(CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN) DETERMINATION

Yasushi IWASA¹⁾, Yoichi KOIZUMI¹⁾, Takashi YAMADA¹⁾
Futoshi IIDA²⁾, Rikio FURIHATA²⁾ and Hiroshi NOGUCHI³⁾

¹⁾ Department of Medicine, Institute of Adaptation Medicine, Faculty
of Medicine, Shinshu University

²⁾ Department of Surgery, Faculty of Medicine, Shinshu University

³⁾ Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine
Shinshu University

Key words: CEA (胎児性癌抗原) (CEA (Carcinoembryonic Antigen))
ジルコニルリン酸ゲル法 (Zirconylphosphate Gel Method)
一段階サンドイッチ法 (One Step Sandwich Method)

はじめに

1965年 Gold と Freedmann によって成人大腸癌患者の癌組織中より CAE (Carcinoembryonic Antigen) が発見され、大腸癌早期発見の手がかりを与えるものとして注目された¹⁾⁻⁴⁾。その後血中 CEA 測定法の開発が進められ、1971年 Hansen ら⁵⁾は低イオン強度下で Zirconylphosphate Gel を抗原抗体反応物の沈澱剤として用いるラジオイムフアッセイ法 (以下 RIA と略) を考案し、大腸癌のみならず他の消化管癌や泌尿生殖器癌患者にも高 CEA 血症を認め、癌一般の診断法として血中 CAE 濃度の測定が有用であることを報告した。1972年に Eagan ら⁶⁾は抗ヤギ IgG

ウマ血清を沈澱剤として用いる二抗体法の RIA を開発したが、この方法は複数のアイソトープ標識物を必要とするため実用化が遅れ、主に Zirconylphosphate Gel 法 (以下 Z法と略) が用いられてきた。しかし、Z法は透析操作が必要不可欠で煩雑であるうえに、イオン強度の微妙な差により非特異的反応が加わり⁷⁾、測定技術の習得が難しいために、簡便法の実用化が強く望まれていた。1975年、西と平井¹²⁾は本邦人大腸癌患者の肝転移巣より抽出した CEA を用いて One Step Sandwich 法 (以下 S法と略) による RIA の簡便法を開発した。S法はその後間もなくダイナボット RI 研究所にて実用化されキットとして生産されるようになったが、本法キットによる血中 CEA 濃度の測

定は日も浅く、その報告は極めて少い。

今回、我々はダイナボット RI 研究所より S 法を用いた CEA リアキット、と日本ロシ株式会社より Z 法を用いた CEA 「ロシ」キットの供与をうけ、二者の精度、実用性などについて比較検討する機会を得たので報告する。

対象及び方法

信州大学順応内科、同第 2 外科、同産婦人科の入院および外来患者を対象とした。

EDTA (3K 塩) 15mg, ソルビンサンカリウム 20 μ g の 0.1ml 水溶液が入った真空採血管にて血液 7~8ml を採取し、1000xg 30分間遠心し血球成分が混入しないように血漿を分離し、測定当日まで -20°C にて凍結保存した。同一サンプルの CAE 濃度を各キット付属の使用説明書に従い、Z 法及び S 法にて測定した。各キットは使用期限内に使用した。

S 法による測定は、冷凍保存したサンプルを室温にて常温にもどし、100 μ l ずつ duplicate で反应用プレート (80穴の血球凝集反应用プレート) の各穴に入れ、またキット付属の標準 CEA 溶液及び recovery 用血清も同様にして各穴に 100 μ l ずつ入れた。つぎに、 ^{125}I -抗 CEA 抗体を 100 μ l ずつ全穴に入れ、抗 CEA 抗体を coat した disc をピンセットにてピン中よりとり出し、ろ紙にて軽く水分を除き、一枚ずつ全穴に入れたのち、反应用プレートをキット付属のシールでおおい、shaker にセットして 100~120回/分、20時間 shake した。incubation 後、脱イオン水 1ml を各穴に加え、アスピレーターチップを使用して洗液を吸引除去した。さらに、同様の操作を 2 回くりかえし、3 回の洗浄後に、disc をアスピレーターチップの先に吸いつけ、counting tube 上で吸引をとめ、disc を tube 内に落とし、ガンマ線計測器にて cpm を測定した。各標準 CEA サンプルの cpm を両対数グラフの縦軸にとり、濃度を横軸にとって標準曲線を作成し、これから各サンプルの濃度を読みとった。

Z 法による測定は、冷凍保存したサンプルを室温にて常温にもどし、0.5ml ずつ duplicate で試験管にとり、またキット付属の 4 種の recovery 用血漿 0.5 ml ずつを同様に試験管にとった。生理食塩水 2ml を各試験管に加えて攪拌し、さらに冷却した 1.2M 過塩素酸 2.5ml ずつを加え、30秒間攪拌後、1000xg、20分間遠心して除蛋白をした。上清を脱イオン水で透析し、3 時間毎に透析水を 3 回交換した後、さらに 0.01

M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5) で 3 時間透析した。ついで透析袋内の検体を試験管にとり、CEA 抗血清 25 μ l を加えた。また、キット付属の EDTA 液を 10 倍希釈し、その 5ml ずつを 10 本の試験管にとり、それぞれに CEA スタンダード液を、0, 10, 25, 50, 100 μ l ずつ duplicate で加えて攪拌し、これに CEA 抗血清 25 μ l を加え、標準曲線作成用とした。すべての試験管を 45°C 、30分間恒温槽に放置後、 ^{125}I -CEA 25 μ l を加え、再び 45°C 、30分間 incubate し、Zirconylphosphate Gel 2.5ml を加え 1000xg 5分間遠心後上清を捨て、沈澱をガンマ線計測器にて測定した。標準曲線より各検体の CEA 濃度を読みとった。

測定結果

1. Z 法と S 法キットの再現性

各キット付属の recovery 用サンプルの測定値を表 1 に示した。Z 法による測定値は表示濃度より若干高目の傾向がみられ、低濃度 recovery 用サンプル (表示濃度 $2.0 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$) の反復測定の変動係数 (C.V.) は 23% であったが、中高濃度 recovery 用サンプルの C.V. はいずれも 10% 以下であり、ほぼ満足できる結果がえられた。また、S 法の C.V. は約 6% であった。

表 1 Precision of S method and Z method for CEA using recovery samples

method	indicated value ng/ml	found value* ng/ml
S	3.5 ± 0.5	3.1 ± 0.2
	2.0 ± 0.5	2.6 ± 0.6
Z	3.9 ± 0.5	4.1 ± 0.4
	7.7 ± 1.0	9.1 ± 0.9
	16.0 ± 2.0	16.6 ± 1.2

* mean and standard deviation of 4 determinations

2. 臨床例における陽性率

Z 法による測定の場合は文献⁽⁸⁾⁻¹⁰⁾に従い、2.5ng/ml 以上を陽性とし、S 法による場合も CEA 研究会でのまとめ¹¹⁾より同様に 2.5ng/ml 以上を陽性とした。以上の基準より、疾患名の判明している 78 症例での陽性率を表 2 に示した。癌例では Z 法 80%、S 法 19%、非癌例では Z 法 42%、S 法 5% で、全体では Z 法 66%、S 法 16% の陽性率であった。

血中 CEA (CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN) 濃度測定における二種類の
RADIOIMMUNOASSAY KIT の比較検討

表 2 Incidence of positive CEA results in
78 patients with various diseases

Patients (No.)	Method	% Positive ($\geq 2.5\text{ng/ml}$)
Cancer (59)	Z	80 %
	S	19 %
Non. Ca. (19)	Z	42 %
	S	5 %
Total (78)	Z	66 %
	S	16 %

3. 癌症例における血中 CEA 値の分布

従来報告より血中 CEA 濃度の変化は、癌の進展度と転移の有無¹³⁾、組織学的特徴¹⁴⁾、交叉免疫反応¹²⁾等により生ずると考えられるが、今回の Z 法での臨床例の測定値には 3 つのピークがみられた。すなわち、2.5ng/ml 未満の陰性群、2.5~7ng/ml の中濃度域群、7ng/ml 以上の高濃度域群（非癌例は含まれなかった）の 3 群である。この 3 段階に分けた場合の癌の種別による分布を表 3 に例数と % で示した。

表 3 CEA assays on 59 patients suffering
from cancer diseases

Cancer (No.)	Method	CEA levels ng/ml (%)		
		<2.5	2.5-7	7 \leq
Gastric Ca. (26)	Z	8 (31)	12 (46)	6 (23)
	S	21 (81)	4 (15)	1 (4)
Colon Ca. (6)	Z	-	3 (50)	3 (50)
	S	4 (66)	1 (17)	1 (17)
Pancreas Ca. (4)	Z	-	1 (25)	3 (75)
	S	2 (50)	2 (50)	-
Breast Ca. (13)	Z	4 (31)	9 (69)	-
	S	13 (100)	-	-
Uterus Ca. (7)	Z	-	5 (71)	2 (29)
	S	6 (86)	-	1 (14)
Others (3)	Z	-	-	3 (100)
	S	2 (67)	1 (33)	-

Others : Ovarian Ca., Thyroid Ca.,
Esophagus Ca.,

胃癌 : 早期癌例は両法共にすべて陰性域であった。Stage III 以上の進行癌例は Z 法では各段階に広く分散しているが、S 法では大半が陰性域であった。

結腸癌 : Z 法では全例、中濃度以上であったが S 法では % が陰性であった。

肺癌 : 全例手術不能例であったが、Z 法では高濃度域に集中しており、S 法では中濃度域以下であった。

食道癌 : 両法共に高濃度域であった。

乳癌 : S 法では全例陰性であったが、Z 法では % が陰性で、他は中濃度域であった。

子宮癌 : Z 法では中濃度域以上であったが、S 法では 1 例のみ高濃度域で、他は陰性であった。

卵巣癌 : 1 例のみであるが、Z 法では高濃度域で、S 法では陰性であった。

甲状腺癌 : 本例は組織学的には anaplastic carcinoma であり、卵巣癌と同様の結果を得た。

4. 非癌症例における血中 CEA 値の分布

癌症例の場合と同様に、非癌症例の 3 段階別の分布を表 4 に示した。S 法では慢性甲状腺炎の例のみが中濃度域で、他はすべて陰性域であった。この例は癌合併の可能性があった。Z 法では、胆石症の 1/2 の例、消化性潰瘍、結核性腹膜炎、白血病、慢性甲状腺炎、ネフローゼ、骨軟化症の各例が中濃度域であった。高濃度域の例は両法共になかった。

表 4 CEA assays on 19 patients suffering
from Non-Cancer diseases

Diseases (No.)	Method	CEA levels ng/ml (%)		
		<2.5	2.5-7	7 \leq
Cholelithiasis (6)	Z	4 (67)	2 (33)	-
	S	6 (100)	-	-
Peptic Ulcer (2)	Z	1 (50)	1 (50)	-
	S	2 (100)	-	-
Hypertension (2)	Z	2 (100)	-	-
	S	2 (100)	-	-
Graves' D. (2)	Z	2 (100)	-	-
	S	2 (100)	-	-
Others (7)	Z	2 (29)	5 (71)	-
	S	6 (86)	1 (14)	-

Others : Tbc. Peritonitis, Ileus, Leukemia,
Nephrosis,
Chr. Thyroiditis, Osteomalacia,
Pseudomembranous enterocolitis

5. 癌症例での経過による血中 CEA 値の変化

表 5 に Stage III 以上の進行胃癌 4 例（症例 1~4）、乳癌 2 例（症例 5 はリンパ節転移あり、症例 6 は転移

表 5 Plasma concentrations of CEA before and after surgery of 6 patients with gastric or breast cancer

Patient	Method	befor operation ng/ml	2 weeks after operation ng/ml
1	Z	2.46	6.00
	S	1.45	0.68
2	Z	4.90	5.46
	S	0.76	1.25
3	Z	1.00	4.30
	S	0.75	0.84
4	Z	2.26	4.10
	S	0.58	0.60
5	Z	3.50	5.46
	S	1.05	1.10
6	Z	5.46	2.50
	S	0.47	0.58

Patient 1, 2, 3, and 4 had advanced gastric cancer (Stage III, IV)

Patient 5 had metastatic breast cancer. Patient 6 had breast cancer with no metastasis

なし)の手術前と術後2週間後における血中 CEA 値の変化を示した。症例6のみは完全治癒切除が行なわれ、経過も良好であった。他の5症例はいずれも術後 down hill course をとっていた。Z法では術前の値は種々であったが、いずれも術後に上昇がみられ、経過をよく反映していた。しかし、S法では術前の値も低く、術後の変化も臨床経過を反映していなかった。

6. Z法とS法間の相関

図1に両法による測定値の散布図及び回帰直線を示した。図中・は癌症例を、×は非癌症例を示す。回帰方程式は $Y(S法) = 0.47X(Z法) - 0.88$ であり、相関係数 $r = 0.69$, $P < 0.005$ で有意の相関が得られた。

考 案

以上の測定データにおける両方法間の測定値上の大きな差の要因としては、分離法の違いと、用いられている抗体の質的差が考えられる。S法は抗体として抗 CEA 馬血清と disc に吸着された抗 CEA ヤギ血清を用いており、disc は抗原抗体複合物を吸着分離する役目を果している。また、Z法は抗 CEA ヤギ血清を抗体として用い、Zirconylphosphate Gel を分離剤として抗原抗体複合物を沈澱させている。しかし、

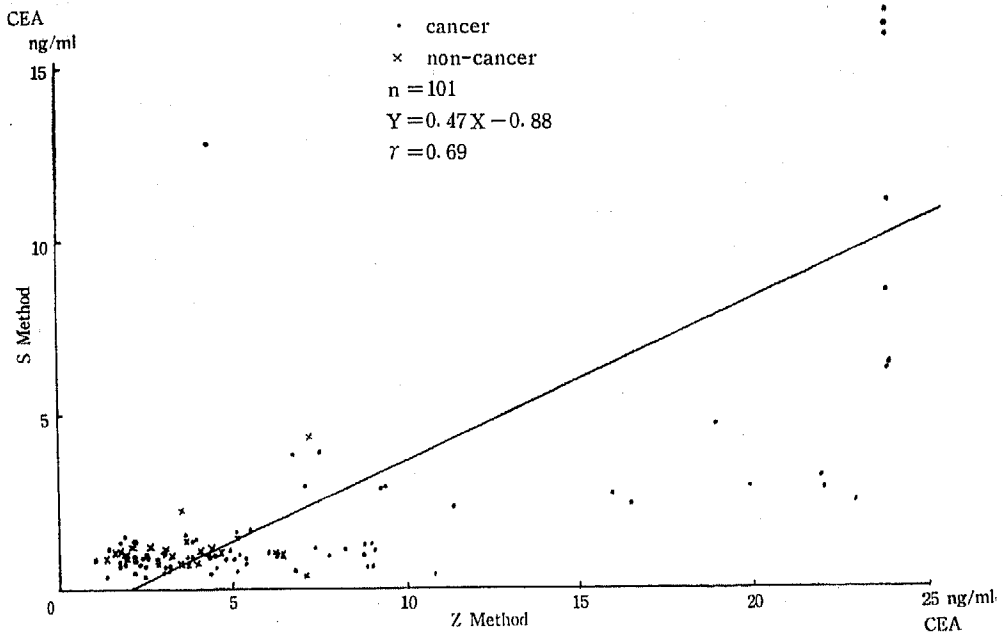


図 1 Comparison between S and Z method for plasma CEA determination

血中 CEA (CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN) 濃度測定における二種類の RADIOIMMUNOASSAY KIT の比較検討

現時点では、これらの分離法の違いにより測定値上に大きな違いを生ずるといふ報告はみられない。

つぎに、抗 CEA 抗体の質的相連による影響としては、S法キットに用いられている抗 CEA 抗体は本邦人大腸癌患者の肝転移巣より抽出した CEA をヤギ及び馬に免疫して得られたものであり、抗 CEA ヤギ血清中の抗体は吸収操作が行なわれていないが、抗 CEA 馬血清中の抗体は NCA (normal colon antigen) による吸収が行なわれている¹²⁾。従って、fecal antigen, lung antigen による交叉免疫反応は生じるが、NCA による交叉免疫反応は僅少と考えられる。いずれの疾患においても、NCA は抗原抗体反応上大きな部分を占めており、NCA で吸収を行った抗体を用いれば、その測定値は十分低くなると考えられ、今回の大腸癌症例における低陽性率がこれを支持するものと考えられる。

一方、Z法キットに用いられている抗体は米国人人大腸癌組織より抽出した CEA をヤギに免疫して作成され、NCA や fecal antigen 等の CEA 血中関連抗原による吸収を行っていない抗 CEA ヤギ血清で、CEA の ion sensitive site に対する抗体である⁷⁾。従って、操作中にイオン強度が上昇する条件がおこれば、交叉免疫反応が大きくなる⁷⁾。実際には、透析膜の洗浄程度、透析水の微妙な違い等により、測定値に大きな変化が生じる。又、血中関連抗原にて吸収を行っていないので、これらの関連抗原による交叉免疫反応が加わって測定値が高くなる。さらに、両方で抗体作成に用いられている CEA のアミノ酸組成、糖組成にも差があり¹²⁾、当然粗抗体そのものの差も考慮しなければならない。つぎに、癌種及び同一癌種内での症例間の血中 CEA の差については、従来より、1) 癌の進展度や転移の有無¹³⁾、2) 組織学的特長¹⁴⁾、3) 交叉免疫反応¹²⁾、等により生ずると考えられている。1) と 2) については、今後その詳細な報告が発表されると思われる。西と平井¹²⁾は CEA 関連抗原である NCA, fecal antigen, lung antigen の血中濃度を検討し、癌の種類により、又同一癌種でも個人により 3 者が種々様々な割合をとっており、また、関連抗原と CEA の血中割合は癌発生臓器と明らかな関連性がないと報告している。これは 2) に関する今後の検討にさいして大きな示唆を与えるものと思われる。

今回の結果は 1) と 3) による要因の可能性を支持するものと考えられる。

つぎに、S法とZ法の実用性については、S法で

は false positive がわずか 5% で非常に少なく、false negative は 90% もあるのに対し、Z法では false positive は 42% で高いが、false negative が 20% であることから、癌患者のスクリーニング法としてはZ法がすぐれている。また、今回示した例では、最初の測定値が高いほど経過判定に有用であり、Z法での測定値がS法より高いことから、癌患者の経過判定にはZ法がより実用的であった。

以上いずれの場合でもZ法がより有用であると考えられるが、前述したように、抗体の処理いかんにより測定値に大きな差が生ずるので、S法の抗体吸収の程度を検討すれば、簡便で有用なキットの製作が可能と考えられる。

S法とZ法間の相関については、現在 WHO により CEA スタンダードが準備されつつあり、WHO のスタンダードはS法とZ法の間中値を示し、S法、Z法ともに WHO スタンダードと有意の相関があると報告されている¹²⁾。今回、我々はS法とZ法間の相関を検討したが、期待通り有意の相関が得られた。

結 論

血中 CEA 濃度は、Z法で測定した場合は高く、S法の場合は低いが、両者間には有意の相関があった。この違いは用いられている抗体の質的差によると考えられる。現時点では、Z法の方が癌患者のスクリーニングや経過判定には実用性が高いと考えられる。

文 献

- 1) Gold, P. and Freedman, S. O. : Demonstration of Tumor Specific Antigen in Human Colonic Carcinomata by Absorption Techniques. *J. Exp. Med.* 121 : 439, 1965
- 2) Gold, P. and Freedman, S. O. : Specific Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System. *J. Exp. Med.* 122 : 467, 1965
- 3) Gold, P. and Freedman, S. O. : Specific Antigenic Similarity between Malignant Adult and Normal Fetal Tissue of the Human Digestive System. *J. Clin. Invest.* 44 : 1051, 1965
- 4) Gold, P. : Circulating Antibodies against Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System. *Cancer.* 20 : 1663, 1967
- 5) Hansen, H. J., Lance, K. P. and Krupey, J. :

- Demonstration of an Ion Sensitive Antigenic Site on Carcinoembryonic Antigen Using Zirconyl Phosphate. Clin. Res. 19 : 143, 1971
- 6) Eagan, M. L., Lautenschleger, J. T., Colligan, J. E. and Todd, C. W. : Radioimmunoassay of Carcinoembryonic Antigen. Immunochemistry 9 : 289, 1972
 - 7) LoGerfo, P., Krupey, J. and Hnsen, H. J. : Demonstration of an Antigen Common to Several Varieties of Neoplasma. New. Engl. J. Med. 285 : 138, 1971
 - 8) Reynoso, G., Chu, T. M., Holyoke, D., Cohen, E., Nemoto, T., Wang, J. J., Chuang, J., Guiman, P. and Murphy, G. P. : Carcinoembryonic Antigen in Patients with Different Cancers. J. A. M. A. 220 : 361, 1972
 - 9) Reynoso, G., Chu, T. M., Guiman, P. and Murphy, G. P. : Carcinoembryonic Antigen in Patients with Tumors of the Urogenital Tract. Cncer 29 : 1, 1972
 - 10) Holyoke, D., Reynoso, G. and Chu, T. M. : Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Patients with Carcinoma of the Digestive Tract. Ann. Surg. 176 : 559, 1972
 - 11) 平井秀松 : CEA 研究会での結語. 1975年12月6日, 於東京
 - 12) 西 信三, 平井秀松 : 第2回 CEA 研究会報告. CEA 研究会発表抄録, 4 : 1975
 - 13) 宮田陸彦, 吉川紀夫, 前田喜章, 佐々木英制, 葛西洋一 : CEA と各種癌疾患. CEA 研究会発表抄録, 6 : 1975
 - 14) 松原義人, 今村正之, 池田貞雄 : 肺癌患者における CEA 値の測定. CEA 研究会発表抄録, 58 : 1975

(51. 2. 19 受稿)