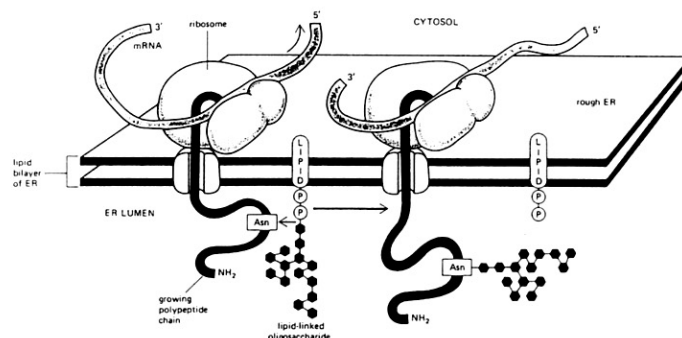


新規癌マーカーGT-II 測定キットの 開発とその評価

Evaluation of Sandwich Enzymeimmunoassay for Galactosyltransferase Isoenzyme II (GT-II)

植村盛人
山崎誠彦
吉田伸也
技術研究所



Abstract:

Recently, glycoproteins and glycolipids of aberrant glycosylation have been recognized as tumor marker candidates, but there are few reports on the glycosyltransferases that may be responsible for these altered glycosylation patterns in tumors. However, monoclonal antibody technology has given new hope for developing improved methods not only of characterizing tumor markers, but also of quantitating levels of tumor markers in serum with specificity and accuracy. We previously reported the preparation of a monoclonal antibody (MAb3872) against galactosyltransferase isoenzyme II (GT-II) and the characterization of GT-II. Preliminarily, the GT-II levels in serum were assayed by a method based on GT enzyme activity being bound to MAb 3872, but that type of assay is so tedious and inaccurate that a more generally used type of assay for clinical application is clearly needed. We describe here a recently developed sandwich enzymeimmunoassay (EIA) for GT-II, including its assay specifications.

The procedure of the GT-II EIA is as follows. Plastics beads coated with MAb3872 are incubated with 50 μ L of serum sample and 200 μ L of buffer at room temperature overnight. The beads are washed three times and are incubated with 200 μ L of MAb 3872-HRP conjugate at room temperature for two hours. Afterwards, the beads are washed four more times, and HRP activity remaining on the beads is measured by the color development of o-phenylenediamine. The assay standard showed a straight line ranging from 0 U/mL to 150 U/mL. Assay reproducibility of inter- and intra-assay were less than 9% and 7%, respectively.

Uemura, Morito
Yamasaki, Masahiko
Yoshida, Shinya
Research & Development Center

1

緒言

近年、癌の診断は、医学上、また社会的にも、ますます重要な課題となっているが、癌の多様性、複雑性から、総合診断が、その主流になっている。

画像診断の急速な進歩は枚挙にいとまはないが、検体検査、特に、血液中の癌マーカー検査も癌の早期発見までには寄与できないまでも、癌の進行、治療効果のモニタリングにと、広く利用されてきている。すでに臨床上用いられているいくつかの癌マーカーは、診断効果の点で十分満足いくものとは言えず、より優れた癌マーカーの開発が、医療業界の間でも活発に行われている。

最近注目を集めている癌マーカーとしては、正常細胞から癌細胞への移行に伴う現象の一つとして明らかになっている糖蛋白質及び糖脂質上のオリゴ糖の不規則性を指標としたマーカーがあげられる。これら異常糖鎖に対するモノクロナール抗体が作製され、そのいくつかは、実際臨床的に価値あるものとして認められ、癌診断薬として実用化しているものもある。

さて、我々は、これら癌における異常糖鎖（ガングリオシド）及びその異常糖鎖を生合成する糖転移酵素（ガラクトース転移酵素）に着目し、それらに対するモノクロナール抗体を作製したことをすでに発表している。

癌に特異性を有する、ガラクトース転移酵素イソ酵素（GT-II）が、癌患者血清中に於いて、高値を示すという報告は過去にいくつかあったが、臨床的に用いられる為には、現実の検査システムの要求性能に合う測定方法でなければならない。

我々は、これまでにGT-II特異的モノクロナール抗体を使った実験室的にGT-IIを定量可能な酵素アッセイ法（GT-II Enz.法）を開発し、その臨床意義を示した。しかしながら、このGT-II Enz.法は、(1)放射性同位体であるUDP-[³H]Galを使う (2)操作が煩雑であり熟練技能を要する (3)測定法の精度、再現性が所望のレベルに達していない という点から、癌診断薬として実用化するには障害を有していた。

今回我々は、これらの問題点を解決した新しいGT-IIの測定法であるGT-II EIA法を開発したので、その詳細について報告する。

2

方法

GT-II Enz.法 (Fig.1)

- (1) 12×75mm ディスポ試験管中、50μL MAb3872固定化ゲル及び100μL検体血清を加え、4℃一昼夜放置する。
- (2) 2mLバッファー (0.1Mトリス・0.15MNaCl PH7.3)を加え、ゲルが沈澱後、上澄みをアスピレーターで除く。

GT-II Enz. Assay protocol

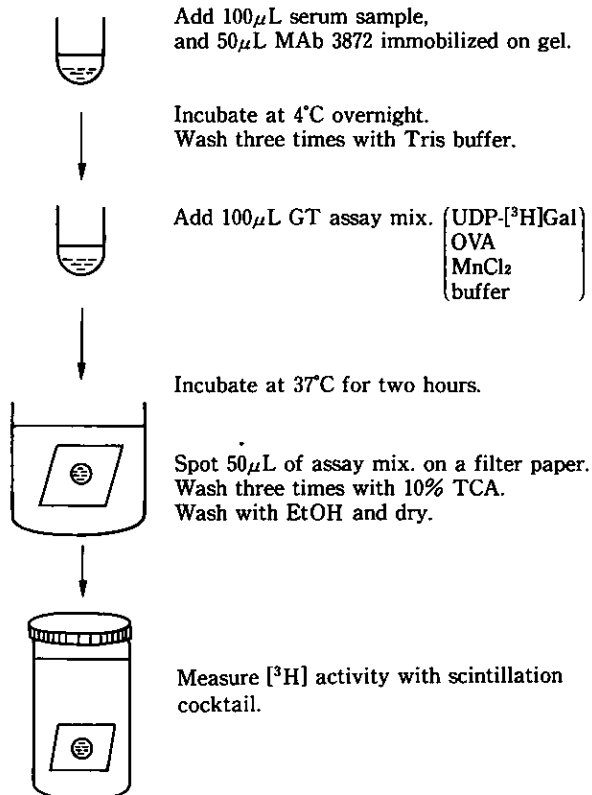


Fig.1

- (3)(2)の操作をさらに2回繰返す。
- (4)100μL酵素基質液 (UDP-[³H]Gal、卵白アルブミン、塩化マンガン、0.1MカコジレートバッファーPH7.3)を加え、37°C 2時間振とうする。
- (5)氷浴中へ移し、反応を停止後、50μLの反応液を2×2cmの口紙上に滴下する。
- (6)この口紙を10%トリクロロ酢酸中、10分間浸せきする。
- (7)(6)の操作を3回繰返す。
- (8)口紙をアルコール中、10分間浸せきする。
- (9)口紙を風乾した後、シンチレーション液とともに測定バイアル中へ入れる。
- (10)シンチレーションカウンターにより2分間測定する。

GT-II EIA法 (Fig.2)

- (1)アッセイトレイ中、50μL検体血清、200μLバッファー (0.1M炭酸ナトリウム 0.15MNaCl PH9.5) 及び、MAb3872固定化ビーズを加え、室温一昼夜静置する。
- (2)生理食塩水1mLでビーズを3回洗浄する(専用ビーズウォッシャーを使用することもできる)。
- (3)200μL酵素抗体液 (MAb3872-HRP、BSA、リン酸バッファーPH7.3)を加え、室温2時間静置する。
- (4)生理食塩水1mLでビーズを4回洗浄し、ビーズを試験管中へ移動する。

GT-II EIA Assay protocol

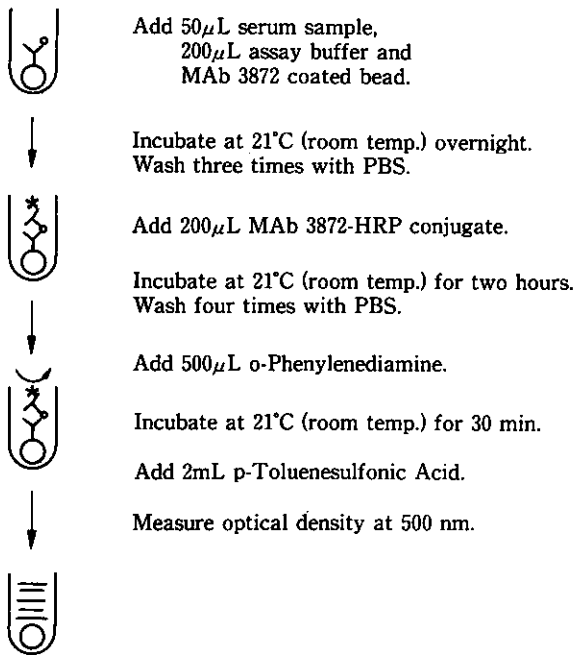


Fig.2

- (5) 500µLペルオキシターゼ基質液 (o-フェニレンジアミン、H₂O₂クエン酸バッファー-PH5.0) を加え、室温30分静置する。
- (6) 2 mL 10%p-トルエンスルホン酸を加え反応停止後、500 nmの吸光度を測定する。

3

結果

アッセイの方式は、固相ビーズ法2ステップサンドイッチ酵素免疫アッセイ法を採用した。市販されている25穴アッセイ用トレー、及び、ピペット、アスピレーター、分光光度計、生理食塩水を用意し、それ以外の試薬類は全てキットの型態として構成され、特別な器具、試薬類は必要とせず、誰でもどこでも測定できる簡便な方法であることを目標に置いた。

標準曲線を作製する為にキット中に含まれているキャリブプレート (0、20、50、150U/mL) を測定し、検体の濃度をU/mLに換算する。(Fig.3)

アッセイの最低感度は、 $Sen. (U/mL) = \bar{X}$ (バックグラウンドの平均値) + 2SD (標準偏差) で示され、約1.5 U/mLであり、正常人血清中のGT-IIレベルをも十分識別できる値が得られた。

再現性については、日内再現性で5~7%、日差再現性で6~9%であり、この種の免疫アッセイでは十分な性能を有することを確認した。

添加回収試験、希釈試験については、アッセイの正確

Standard curve

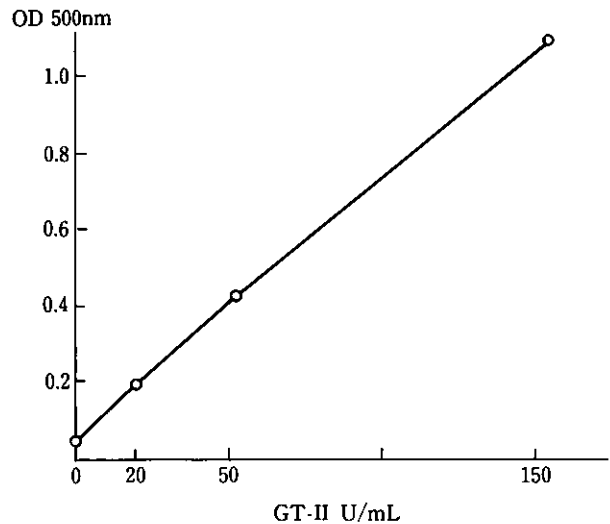


Fig.3

Table 1

Sensitivity:

N=25 0 U/mL OD. 0.023-0.044
 $\bar{X}=0.031$ SD=0.005
 minimum sensitivity $\bar{X}+2SD=1.5$ U/mL

Reproducibility:

intra-assay		N=25	
	\bar{X} (U/mL)	SD	CV (%)
Serum A	11.5	0.83	7.2
B	24.3	1.31	5.4
C	50.5	2.42	4.8
D	68.0	4.42	6.5
E	93.1	5.77	6.2

inter-assay		N=10	
	\bar{X} (U/mL)	SD	CV (%)
Serum A	11.2	0.99	8.8
B	25.3	1.62	6.4
C	50.8	3.70	7.3
D	67.9	5.43	8.0

Linearity:

Serum dilun.	Observed	Calculated	% Recovered
1:1	124.9 (U/mL)		
1:2	62.4	62.5	99.6
1:4	30.2	31.3	96.8
1:8	16.8	15.6	104.4
1:16	8.6	7.8	110.2

さ(直線性)を試す手法であり、その偏差は±10%以内に納まっている。(Table 1)

保存安定性については、EIAキットの場合、半年以上の保証期間(4~10°C)を必要とする。本アッセイ法に於いては、特に安定性に問題が生じた為、次の3点について改良を加えた。

- (1) 酵素抗体液中にヒドロキノンモノエチルエーテルを含むことにより酵素抗体の活性を維持する。
- (2) 酵素基質液中にトリポリリン酸を含むことにより、過

酸化水素を保存安定化するとともに、バックグラウンドの上昇を押さえる。

(3)発色停止液を、p-トルエンスルホン酸とすることにより、発色濃度の安定性を良くする。

以上GT-II EIA法は、血中GT-II濃度を定量する方法として、感度・信頼性・安定性共に満足し得る性能を有していると言える。

4

考察

この開発研究は、癌の血液診断として用いられる新規な癌マーカーGT-IIの測定方法に関するものであり、これまでの評価に使われていたGT-II Enz.法と比較した特徴を以下に示す。(Table 2)

Table 2 Comparison between GT-II Enz. and GT-II EIA

GT-II ENZ. (従来法)	GT-II EIA (本法)
MAb3872を固相としたGTの酵素活性測定法。	MAb3872を固相としMAB3872-HRPで検出するエンザイムイムノアッセイ。
UDP-[³ H]Galを使いラジオアイソトープの施設を使う。	一般の実験室で行える。
技術的に熟練を要し操作が煩雑、実験室レベル。	半自動化が可能であり簡便、一般臨床検査に適合。
再現性CV10%以上であり直線性、保存性について問題有。キットとして組上げ困難。	再現性CV5~10%の範囲であり市販イムノアッセイのレベル範囲内にある。キットとしての完成度高い。

Table 2からもわかる通り、GT-II EIAは、従来法のGT-II Enz.法に比べ、操作法、測定値の信頼性に関して飛躍的に改良されている。

GT-II Enz.法は、GT-II特異的モノクローナル抗体MAb 3872に反応したタンパクを、GTの酵素活性により測定する方法であり、明らかに、GT酵素の特異的な一部を測定している系である。

一方、GT-II EIAは、MAb3872に反応するタンパクを、さらにMAb3872ペルオキシターゼ結合第二抗体で検出する系である。

すなわち、この方法は、GT酵素活性を示さないタンパクをも検出する可能性も有すること、さらに、そのタンパ

クは、MAb3872が反応する抗原決定基(エピトープ)を二ヶ所以上有する分子を検出していることが想定される。

GT-II Enz.法については、その臨床上の意義について、これまで確認されてきたが、上記の2種の測定法が同一物質を測定しているとは断言できないという理由から、必ずしも、GT-II EIA法が、GT-II Enz.法と同じ臨床結果となる保証はない。

現在、GT-II EIA法について、正常人、種々の良性疾患、種々の癌の患者血清について、臨床評価を進めているが、この二つの測定法の間の相関はかなり見られている。

新規癌マーカーが、臨床的に利用される為には、その癌マーカーが臨床的に癌診断上、価値あるものと認められること、さらに、その測定方法が、今日行われている臨床検査システムに受け入れられるべく、操作性、信頼性を有していることが挙げられる。

この報告で、上記目標の後者の部分について達成したことを述べた。

●参考文献

- 1) Uemura M, Winant R C, Sikić B, Brandt A E, Characterization and immunoassay of human tumor associated galactosyl transferase isoenzyme II. Cancer Research 48:5325-5334, 1988
- 2) Uemura M, Winant R C, Sikić B, Brandt A E, Immunoassay of serum galactosyl transferase isoenzyme II in cancer patients and normal subjects. Cancer Research 48:5335-5341, 1988
- 3) Uemura M, galactosyl transferase isoenzyme II as a tumor associated antigen. 6th Tumor marker symposium abstract 321-323, 1986
- 4) Nozawa S, et al. Comprehensive basic study on the expression mechanism of some oncofetal antigen and their clinical application. Acta. Obst. Gynaec. Jpn 39(8), 1987
- 5) Uemura M, Yamasaki M, Yosida S, Establishment of monoclonal antibodies against cancer associated antigens and their application to cancer diagnosis. KONICA technical report Vol.1, 1988