

ヒト消化器癌におけるCarcinoembryonic Antigen(CEA)の研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8807

ヒト消化器癌における Carcinoembryonic Antigen(CEA) の研究

金沢大学がん研究所外科部門 (主任: 中川原儀三教授)

福 原 毅

(昭和54年11月28日受付)

(本論文の要旨は、昭和52年10月13日 第36回 日本癌学会総会および昭和53年10月27日 第7回 国際大学結腸直腸外科学会にて発表した)

腫瘍組織と宿主との関係は、腫瘍組織の抗原性と腫瘍組織に対する宿主の免疫応答や、腫瘍組織の産出する種々の物質がおよぼす宿主への影響としてとらえられている。そこで、ヒト腫瘍特異抗原の存在を明らかにし、その検出方法を確立し、それに対する免疫応答を証明することや高めたりすること、あるいは治療への応用が多くの人によって試みられている。すでに1965年 Gold ら¹⁾ は、大腸癌組織に腫瘍特異抗原が存在することを異種の動物を免疫して得た抗血清により示し、胎生2~6カ月の消化管組織にも共通の抗原性をもつものが存在することから、彼ら²⁾ はこの大腸癌抗原を Carcinoembryonic Antigen (以下 CEA) 省略) と命名した。ついで Thomson ら³⁾ はこの CEA の Radioimmuno assay (以下RIA と省略) 法を開発し、この方法によって種々の疾患における血中 CEA 値を測定した。その結果 CEA は大腸癌特異性の非常に高いものであると報告した。

その後多数の研究者の追試⁴⁻⁹⁾によると、血中 CEA は大腸癌に必ずしも特異的ではなく、種々の癌組織に多く含まれるばかりでなく、正常の組織にも微量に存在することが明らかにされた。今日では CEA は腫瘍特異抗原 (tumorspecific antigen) よりむしろ腫瘍関連抗原 (tumor associated antigen) とみなされている。このように Gold ら¹⁾ の唱えた CEA は大腸癌特異性が低いことが証明されたが、癌の補助的診断、治療効果の判定¹⁰⁾や癌手術後の経過追跡のモニターとして有用であることが明らかにされる¹⁰⁻¹⁶⁾におよび日常臨床に広く用いられている。一方 CEA の免疫学的解析

が抗血清の反応を中心として行われ、より高い抗血清を得ようという努力がなされている¹⁷⁾。また CEA と交叉反応を示す CEA 関連物質については、研究者によりそれぞれ NCA¹⁸⁾、CEX¹⁹⁾、CCEA - 2²⁰⁾、NGP²¹⁾、CCA - III²²⁾、 β_2 - protein²³⁾、TEX²⁴⁾として CEA と比較報告されている。

著者は、腫瘍関連抗原として考えられている CEA について、腫瘍特異抗原の実体と、CEA 関連物質との関係に興味を持ち、ヒト大腸癌の肝転移組織より、CEA の分離、精製と抗原の解析を試みた。その結果、癌組織中より CEA のほか、CEA 関連抗原を単離しえたので、CEA と CEA 関連抗原の関係を検討しさらに、市販の抗 CEA 血清との比較評価を行った。

また著者が分離精製した大腸癌に特異性の高い CEA および抗血清の免疫化学的解析を行ったのでその成績についても論じたい。

材料および方法

1. 組織材料

研究に用いたヒト大腸癌の肝転移組織は、大阪大学医学部第一病理宮本誠博士より供与されたもので、組織学的に腺癌であることを確認した。剖検により摘出された肝転移組織は、ただちに -20°C に凍結し、以後使用まで -20°C に保存した。

2. 抗原の抽出

腫瘍組織からの抽出は Krupey ら²⁵⁾の方法に準じて行った。すなわち大腸癌肝転移組織材料より肉眼的に非癌組織をできるだけ除去したのち、ミンチ状にし、

Studies on Carcinoembryonic Antigen(CEA) From Carcinoma of the Human Digestive System Takeshi Fukuhara Surgical Department of Institute Cancer Research (Director: Prof. Gizo Nakagawara) School of Medicin, Kanazawa University.

等量の生理食塩水を加えミキサー（ナショナル MX140S型）により、10分間ホモジネイトした後11960g、30分、4°Cで遠心した。その上清に最終濃度0.6Mになるように過塩素酸（以下PCAと省略）を加え撹拌したのち再び11960g、30分、4°Cで遠心した。その上清をビスキングチューブ（18/32）にて流水中で48時間透析後、脱イオン水にて更に24時間透析し、凍結乾燥を行った（得られた粉末を以下PCA抽出物と省略する）。

3. 抗原の精製

PCA抽出物をBio-Gel A-5m (Bio Rad社) (2.6 × 90 cm)のカラムでゲル濾過を行い、CEA活性のある分画を日本ロシュ社CEAキットのZirchonylゲル（以下Z-gelと省略）（日本ロシュ社）RIA法^{25,26}により、A、B、C分画に分けた。次にB、C分画について、Sephacryl S-200 (1.6 × 80 cm)カラムで再びゲル濾過を行った。溶出には、いずれも0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、再ゲル濾過後もCEA活性を示す各フラクションを、同じくZ-gel法にて測定し、CEA活性をもつ分画を集め精製し、これをCEA抗原とし、再び脱イオン水にて24時間透析し、凍結乾燥を行い以後の実験に用いた。

4. 抗血清の作製

抗血清の作製はPCA抽出物をBio-Gel A-5mカラムでゲル濾過を行ったのち、CEA活性部をSephacryl S-200カラムで再びゲル濾過し得られたCEA活性を示す分画つまりB I、C I・C II分画の乾燥粉末約0.6mgを1ml脱イオン水に溶解し、等量の Freund complete adjuvant (DIFCO社製)を加えて乳化したものを抗原として用いた。雑系白色モルモット（日本クレア社）80匹の背部皮下数ヶ所に抗原を注射し、さらに4週間後に等量の追加免疫を行い、追加免疫後2週目に採血し、血清を分離し、これを抗血清として以下の実験に用いた。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下PAGEと省略）

本法は、ゲル濾過により精製したヒト大腸癌PCA抽出物の純化程度、蛋白、糖含量の検討および分子量を測定するために行った。

Davisら²⁸の方法に準じて5%ポリアクリルアミドゲルを用いたPAGEを各チューブ(0.5 × 7 cm)当り5mA、4時間の通電を行った。さらにShapiroら²⁹、林ら³⁰の方法により0.1% Sodium dodecyl sulfate (以下SDSと省略)を含む10%アクリルアミド電気泳動(以下SDS-PAGEと省略)を初めの1時間は各チューブ(0.5 × 7 cm)当り1mA、以後各チ

ューブ当り8mA 7時間の通電で行った。泳動後のゲルの染色は、蛋白染色にはCoomassie-Brilliant blue³¹を糖染色にはPASを用い、分子量測定のマーカーとしてCalibration KIT (Pharmacia製)を使用した。

6. ゲル内二重拡散沈降反応

抗原の解析あるいは抗血清の反応性の検討は、Ouchterlony法³²によるゲル内二重拡散沈降法で行った。プレートは十分に二日間0.15M塩化ナトリウム加ホウ酸緩衝液（以下BSBと省略）で洗滌後乾燥してアミドブラック10B染色を行いついで10%酢酸、25%エチルアルコール溶液で脱色を行った。

7. ¹²⁵I標識CEAと抗血清の結合能の測定（二抗体法によるRIA法）

CEAキット（ロシュ社）に含まれる¹²⁵I標識CEA標品（以下¹²⁵I-CEAと省略）を利用して著者のモルモット抗血清の特異性を検討しあわせてCEA精製過程における抗原分画の活性を調べた。¹²⁵I-CEAと抗体の結合能と、その結合能の阻害活性を測定するために、二抗体法は、Mac Sweenら³³、渡辺ら³⁴の方法を用いた。

第二抗体として家兎抗モルモットIgG血清を加え、得られる沈降物と、Z-gel法によって得られる沈降物の対射活性をウェル型γカウンター（Searle社 auto well gamma counter type 1185）で測定し解析した。すなわちあらかじめ5倍に生理食塩水で希釈してある正常モルモット血清により、モルモット抗CEA血清を、種々の濃度に希釈し、その25μlを血清として使用した。またこれに阻害活性をを検討する抗原を種々の濃度で加え、ついで¹²⁵I-CEAを25μl加え37°C、2時間反応させ、さらに4°C、12時間反応させた後、第二の抗体として家兎抗モルモットIgG血清100μlを加えて再び4°C、24時間静置して沈降物を形成させた。この沈降物にBSBを2ml加え遠心（1500g、20分）する。洗滌操作を2回行った後、γカウンターで¹²⁵I放射活性を測定した。同時にモルモット抗CEA血清の特異性の比較検討にCEAキット（ロシュ）による方法も用いた。

8. 精製CEA抗原の化学的修飾

CEAの生化学的性状を検討し、抗原決定基を明らかにするために、精製抗原に次にのべる化学的修飾を行った。

1) 還元・アルキル化 : Edelmanら³⁵の方法に準じ、6Mグアニジン塩酸（0.5Mトリス塩酸緩衝液、0.2mM EDTAを含む）緩衝液に精製CEA抗原を溶解し窒素ガスを封入し、2-メルカプトエタノール（2-

ME) 160mM を加えさらに、50℃、4時間インキュベートした。アルキル化には、320mM ヨードアセトアミド (IAA) を還元反応後の反応液に窒素を封入しながら加え、暗室にて24時間静置し、そののち脱イオン水で24時間透析を行い、反応液の試薬を除き、凍結操作を行った。

2) 蛋白分解酵素処理 : Westwood ら³⁰⁾の方法に従い、ペプシン (P-L社製)、細菌アルカリプロテアーゼ (P-L社製) トリプシン (Difco社製) の三種蛋白分解酵素をそれぞれの至適pH下に精製 CEA との重量比 1:50 になるように溶解し 37℃にて反応させた。

3) ノイラミダーゼによる消化 : Burton ら³⁷⁾の方法に従い Vibriocholera Neuramidase (Sigma社製) を 0.01M 塩化カルシウムを加えた 0.1M クエン酸ソーダ (pH 5.5) に精製 CEA 抗原重量 1mg 当り Neuramidase 30 単位になるよう加え 37℃、48時間処理を行った。

4) グアニジン、尿素、SDS 処理 : 6M グアニジン緩衝液、2% SDS、6M 尿素を作製しそれぞれ精製 CEA 抗原を 2.5 mg/ml になる様溶解し、37℃、2時間反応し、透析後実験に用いた。

9. アフィニティクロマトグラフィによる検討

CN Br - activated Sepharose 4B (Pharmacia 製) 乾燥重量 1gr づつを用いファルマシアの文献³⁸⁾に従い、精製 CEA の C I・C II 分画をそれぞれ乾燥重量 28 mg、2.8 mg、0.28 mg をカップリングさせて、アフィニティクロマトカラムを作りモルモット抗 B I

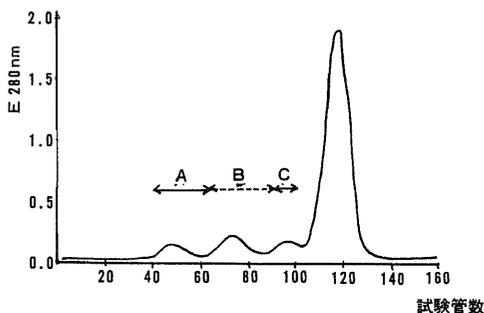


図1 大腸癌肝転移組織の過塩素酸抽出物の Bio-Gel A-5m カラムによる溶出パターン

添加 : 400mg 凍結乾燥標品を 4ml の水に可溶化したもの
カラム : 2.6×90cm
流速 : 20ml/時間
採取液量 : 4ml/試験管
溶出液 : 0.1モルトリス塩酸緩衝液 pH 8.0

CEA 血清の吸収実験を行い抗血清の反応性を検討した。

10. アミノ酸分析

精製した抗原の化学的性状を検討するためアミノ酸分析を行い、従来の報告と比較した。すなわちアミノ酸組成分析は、6M 塩酸、24時間、107℃で加水分解した後、高速アミノ酸オートアナライザー (日立 835) を用い清水章博士 (大阪大学中検) の御協力によって行った。

11. 液体クロマトグラフィーによる検討

高速液体クロマトグラフィー (島津 CC-3AR) を用い、水系 GPC 法により、パターン分析を行った。本実験は島津製作所計測事業本部分析センター (京都) の協力にて行った。

12. 糖の測定

糖成分の測定には、Dubois ら³⁹⁾の方法に従って、フェノール硫酸法によりグルコース量を測定した。

成 績

1. 抗原の精製と性状

1) Bio-Gel A-5mゲル濾過の結果

大腸癌肝転移組織の PCA 抽出物を Bio-Gel A-5m カラムによりゲル濾過した溶出物の 280nm における吸光度より得られる溶出パターンは図 1 に示す通りである。溶出された各チューブについて、CEA ロシュキットを用いて直接法により CEA 活性を測定すると、CEA 活性をもつ三つの分画に分けられる。それらをそれぞれ A, B, C 分画と名づけた (図 1)。

この A, B, C 分画とモルモット抗 CEA 血清 (No. 28) を用いてゲル内二重拡散沈降反応を行うと写真 1 に示すごとく B 分画は、最も強い沈降線を形成する。しかし A および C 分画は濃縮することによりようやく弱い沈降線を形成するにすぎなかった。特に C 分画は、健康ヒト糞便の PCA 抽出物と抗原性が一致する沈降線が得られた (写真 1)。しかし抗 CEA 血清 (No. 28) は健康ヒト血清、大腸粘膜組織、脾臓および肝臓の PCA 抽出物とは、全く沈降線を示さなかった。A, B, C 抗原の抗原活性を検討するために以下の実験を行った。すなわちモルモット抗 CEA 血清 (No. 28) と¹²⁵I-CEA との抗原抗体反応物と第二抗体を加えて生じる放射活性沈降物をカウント (cpm) しそれを 100% とし、これに A, B, C 各分画を加えた時の放射活性沈降物のカウントの低下を比較した。加える A, B, C 各分画の蛋白量を波長 280nm での吸光度であらわし横軸に示した (図 2)。その結果、B 分画が最も阻害活性が強く、ついで C 分画 A 分画の順に阻害活性が低下するこ

とがわかった。50%阻害活性を示す抗原必要量を比較すると表1に示すごとく、A分画、B分画、C分画の比は約1:19:9になった。

同様にA,B,C分画についてフェノール-硫酸法でグルコース量を測定し、A,B,C各分画の阻害活性度をグル

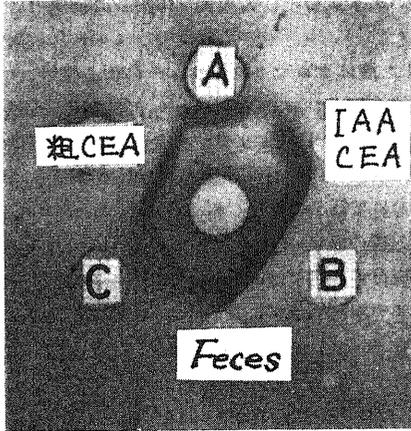


写真1 モルモット抗 CEA 血清と A, B, C 分画のゲル内二重拡散沈降法

中心孔: モルモット抗 BI 血清 (No28)

A : A分画 20mg/ml

B : B分画 1mg/ml

C : C分画 50mg/ml

Feces : 糞便過塩素酸抽出物 100mg/ml

粗CEA : 大腸癌肝転移組織過塩素酸抽出物 10mg/ml

IAACEA : ヨードアセトアミド処理 B分画 10mg/ml

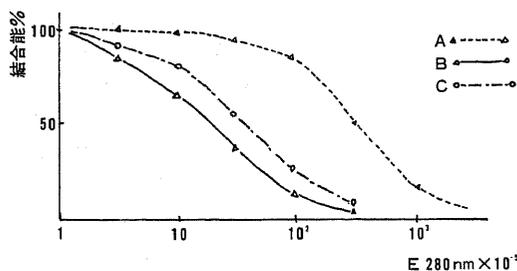


図2 二抗体法による¹²⁵I CEA とモルモット抗 CEA 血清の結合能に対する A, B, C 分画による阻害度

横軸: A, B, C 各分画の蛋白量を波長 280nm における吸光度であらわしたのもの

縦軸: ¹²⁵I CEA 抗原とモルモット抗 CEA 血清複合物の二抗体法による沈降物のカウント 100%とし A, B, C 分画を添加したときの沈降物のカウントを百分率で示したもの

ルコース量で検討すると、前述の蛋白量で測定した結果と同様に、B分画で最も強い阻害活性がみられた(図3)。50%阻害活性を示す抗原必要量を抗原中に含まれるグルコース量で示すと、A分画 3500ng、B分画 130ng、C分画 500ng であって、A,B,C分画のグルコース当りの必要抗原量の比は、約 1:27:7 になった(表1)。

次に A, B, C 各分画のそれぞれについて、5%ポリアクリルアミドを用いた PAGE を行い精製の程度および蛋白と糖の組成について比較した(写真2)。その結果、A分画は5%ポリアクリルアミドゲル内に入らず、かなり高分子のものと考えられた。PASによる糖染色は濃染するが、Coomassie-Brilliant blueによる蛋白染色は淡青色に染色された。B分画は5%ポリアクリルアミドゲル内に入る易動度の遅い一本の幅広いバンドであって、糖染色の濃度は蛋白染色と同程度であった。また一部に次にのべる C分画がわずかに混入していることが認められた。C分画は蛋白染色では易動度の早い多数のバンドに分かれるが、糖染色ではそのうちの一本のバンドのみが染色されるにすぎず C分画の組成は多様性であると考えられた。

2) Sephacryl S - 200 ゲル濾過による検討

前述の結果から B分画には C分画の混入が C分画には B分画の混入が認められた。そこで B, C分画の分離精製をすすめるため Sephacryl S - 200 カラムによるゲル濾過を行った。その溶出パターンを 280nm の波長における吸光度で表すと図4に示す通りである。溶出された各チューブについて CEA キット(ロシュ)

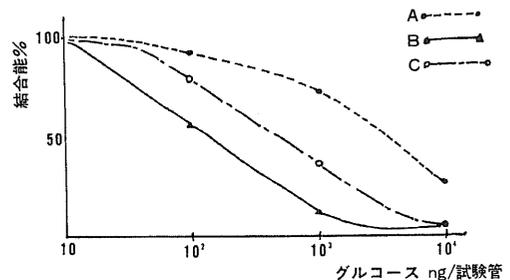


図3 二抗体法による¹²⁵I CEA とモルモット抗 CEA 血清の結合能に対する A, B, C 分画による阻害度

横軸: A, B, C 各分画の糖量をフェノール硫酸法で測定したグルコース量であらわした

縦軸: ¹²⁵I-CEA 抗原とモルモット抗 CEA 血清複合物の二抗体法による沈降物のカウントを 100%とし A, B, C 分画を添加したときの沈降物のカウントを百分率で示したもの

を用いて CEA 活性を測定し、CEA 活性のある部分のみを集めて精製した。その結果 B 分画は、接近した大小二つのピーク、B I、B II とさらに遅れて溶出する小さなピーク B III に分けられ、初めの B I ピークは一致して CEA 活性が認められた。C 分画は極めて接近した C I、C II の小さな二つのピークとこれに遅れて溶出される大きなピーク C III の図 4b に示すような溶出パターンである。CEA 活性は C I・C II にはあるが、C III には認めなかった。これらについて SDS-PAGE を行いさらに Coomassie-Brilliant blue による蛋白染色を行うと写真 3 のごとくである。

同時に行った分子量測定マーカーキットの結果から B I は分子量約 20 万ダルトンの一本の濃いバンドと分子量約 6 万ダルトンと考えられる薄い一本のバンド

に分かれた。

C I・C II は分子量約 6 万ダルトンの位置に一本のバンドを示すのみであった。これらの CEA 活性の認められる B I、C I・C II について水系リン酸緩衝液による高速液体クロマトグラフによるパターン分析を行った。その結果は図 5 のごとくであって、B I は一本のピークであり、その形状も対称性であることから分子量が均一であると示され、これが SDS-PAGE の条件により二本のバンドに分かれたものと考えられた。一方 C I・C II も高速液体クロマトグラフィーのパターン分析を行うと、左右対称の均一な同じ分子量の大きさのものからなり、B I より小さく SDS-PAGE によっても一本のバンドしか示さず、上述の B I より分離してくる分子量約 20 万ダルトンと 6 万ダ

表 1 二抗体法RIAによる¹²⁵I-CEAとモルモット抗CEA血清の免疫沈降物を50%阻害するに要する各分画の蛋白量または糖量

分 画	蛋 白 量		グルコース量	
	280 nmにおける吸光度	比 率	重量 ng	比 率
A	35×10^4	1	3500	1
B	1.8×10^4	19	130	27
C	4.8×10^4	9	500	7

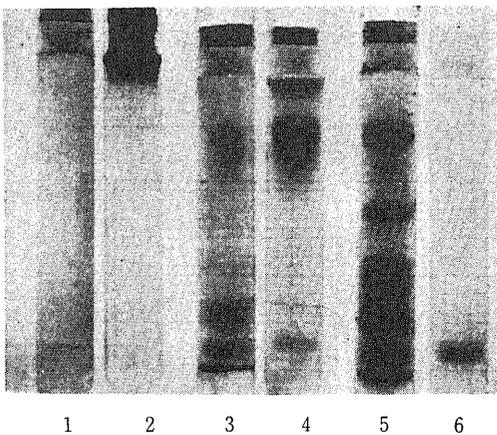


写真 2 Bio-Gel A-5m 抽出物 A(1, 2) B(3, 4) C(5, 6) 分画の 5%ポリアクリルアミドディスク電気泳動 1, 3, 5: Coomassie-Brilliant blue 染色
2, 4, 6: PAS 染色

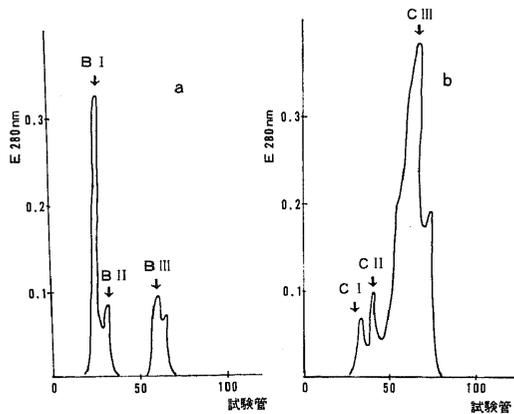


図 4 B, C 分画の Sephacryl S-200 カラムによる溶出パターン

添 加: 20mg 凍結乾燥標品を 2ml の水に可溶化したもの (a は B 分画, b は C 分画)

カラム: 1.6×80 cm

流速: 4ml/時間

採取液量: 2ml/試験管

溶出液: 0.1M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0

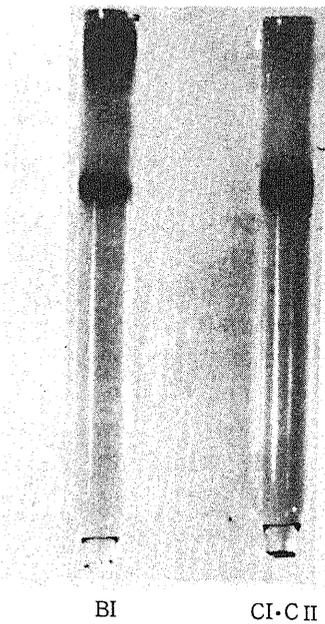


写真3 Sephacryl S-200 ゲル濾過後の BI (左) CI·CII (右) 分画の 0.1% SDS 10% アクリルアミドディスク電気泳動

ルトンの後者に一致するものと考えられる。

3) アミノ酸分析による検討

アミノ酸分析の結果から BI と CI・CII についてアミノ酸組成を比較すると表2のごとく BI と CI・CII とでは、組成が若干異っていることが判明した。すなわち BI では、CI・CII に比較して、リジン、イソロイシンが少く、逆にスレオニン、バリンが多かった。その他のアミノ酸については、BI と CI・CII の間に含量の差はほとんど認められなかった。その他アミノ酸組成分析のパターンより明らかに糖含量にも差があり BI の方が CI・CII よりはるかに糖含量が多いことを示している。

2. モルモット抗 CEA 血清の特異性の検討

1) 二抗体法 RIA 法による検討

精製 CEA 抗原である BI 分画を抗原として、モルモットを免疫して得た抗血清 (No. 28, No. 39) について反応性の検討を加えた。まず BI に対する抗血清の 50 倍希釈を用い、 ^{125}I -CEA との二抗体法による結合沈降反応に対する大腸癌 (2 例) 胃癌 (2 例) 健康人の糞便 (2 例) 正常肺組織 (1 例) 肝癌 (1 例) の PCA 抽出物との結合阻害活性を比較すると図 6a に示

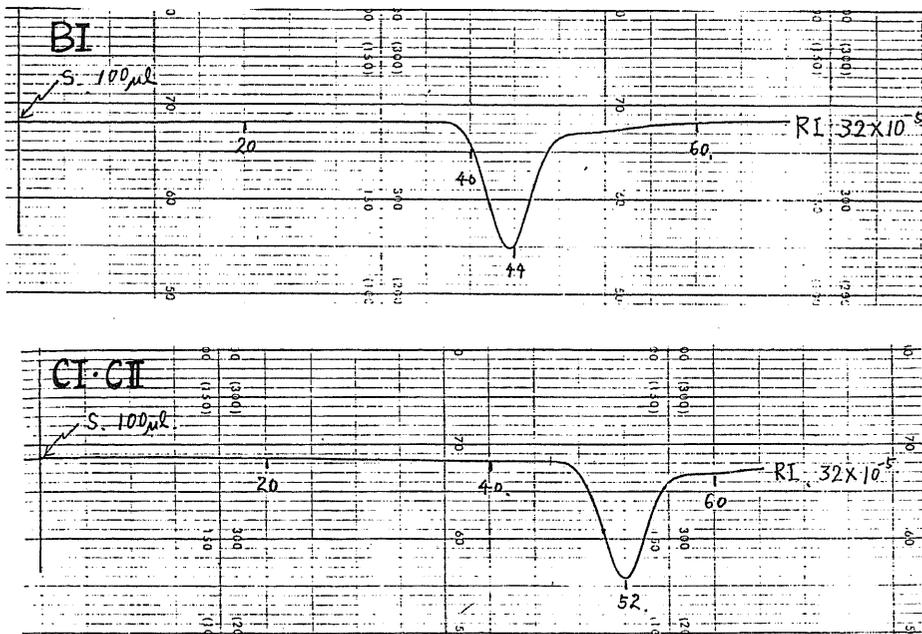


図5 高速液体クロマトグラフィーによるパターン分析

島津高速クロマトグラフィー (LC-3AR) により試料 BI, CI·CII を水 100 μl に溶かし水系 GPC 法により分析したパターン。移動相には 0.05M リン酸第一カリウムを用いカラム圧 70 kg/cm^2 流速 1.5ml/分、感度 32×10^{-5} 屈折率で示したもの

すごとく、大腸癌で最も阻害活性をうけ易く、糞便や肺組織、肝癌では阻害能が低いことが示された。同じ PCA 抽出物について CEA ロシユキットに含まれるヤギ抗 CEA 血清と ¹²⁵I - CEA の Z - gel 法の阻害活

性をみると、大腸癌、胃癌、糞便、肺組織などいづれの PCA 抽出物によっても 100 % 近い阻害能を示した(図 6b)。

このことは、B I を抗原として作製したモルモット抗 CEA 血清 (No. 28, No. 39) はヤギ抗 CEA 血清よりも大腸癌に特異性が高いことを意味する。

2) ゲル内二重拡散沈降反応による検討

精製 CEA 抗原 C I・C II についても前述の方法でモルモットに免疫して抗 CEA 血清 (No. 54) を作製した。これらの抗血清 (No. 28, No. 54) を用いて、B I、C I・C II および CEA 関連抗原である胎便の PCA 抽出物との間のゲル内二重拡散沈降反応を行った。写真 4 に示すごとく抗 B I 血清 (No. 28) は B I とは強い一本の沈降線を示し、C I・C II および胎便 PCA 抽出物などとは反応性が弱く、しかも B I との間に spur を形成する。このことは B I と C I・C II および胎便 PCA 抽出物は抗原性が一部分異なるが他の部分は、共通していることを示している。

一方抗 C I・C II 血清 (No. 54) は B I との間に 1 本の沈降線を形成し、さらに C I・C II との間には、B I と融合する二本の沈降線を形成する。また抗 C I・C II 血清は胎便 PCA 抽出物と 2 本の沈降線を生じその沈降線は C I・C II との間に生じた沈降線とも融合する。このことから抗 C I・C II 血清は、二つ以上の成分からなることが判明した。しかし液化クロマトグラ

表 2 BI分画とCI・CII分画のアミノ酸組成の比較

アミノ酸	BI % n mol	CI・CII % n mol
リジオ	3.0	5.0
ヒスチジン	1.9	1.4
アルギニン	1.0	0.3
アスパラギン酸	8.3	7.9
スレオニン	10.6	8.1
セリン	11.9	9.4
グルタミン酸	10.9	12.4
プロリン	9.8	11.2
グリシン	5.8	5.8
アラニン	6.4	6.5
バリン	7.3	5.9
メチオニン	0.6	1.3
イソロイシン	4.6	6.2
ロイシン	9.4	9.6
チロジン	4.3	4.2
フェニールアラニン	4.1	5.0

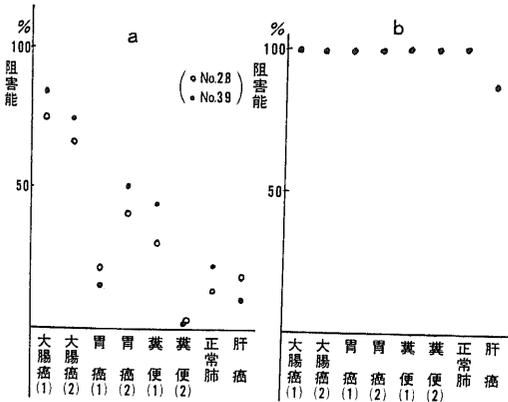


図 6 ¹²⁵I CEA と抗 CEA 血清の結合に対する各種組織過塩素酸抽出物の阻害能
 a: モルモット抗 CEA 血清 (No. 28, No. 39) を用いた二抗体法ラジオイムノアッセイ
 b: ヤギ抗 CEA 血清 (ロシユ) を用いた Z-ゲル法ラジオイムノアッセイ

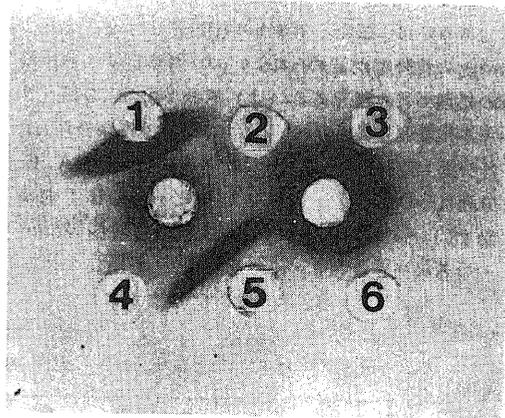


写真 4 抗 BI 血清および抗 CI・CII 血清のゲル内二重拡散沈降法
 中心孔
 左: モルモット抗 BI 血清 (No. 28)
 右: モルモット抗 CI・CII 血清 (No. 54)
 1, 5 BI 1 mg/ml
 2, 6 CI・CII 10 mg/ml
 3, 4 胎便 PCA 抽出物 100 mg/ml

フィによるC I・C IIの解析では、約6万ダルトンの均一の物質であった。以上の事実からC I・C IIは胎便PCA抽出物にも存在するCEA関連抗原と抗原性の点で同一のものであることを示している。

3) アフィニティクロマトグラフィーによる検討

B IとC I・C IIの関係を明らかにするためモルモット抗B I血清(No.28)について、C I・C IIをCN Br-Sepharose 4Bに結合させて作製したアフィニティクロマトカラムを用いて吸収実験を行った。結合させるC I・C II量を増加するにつれカラムを通過後の抗B I血清は、C I・C IIに対する活性が低下するばかりでなくB Iに対しても低下する。C I・C IIが28 mg/乾燥重量1grのカラムでは、B IおよびC I・C IIに対する抗体活性も消失した。このことは抗B I血清は、C I・C IIおよびB Iに共通の抗原決定基に対する抗体活性をもっていることを示している。

3. CEA抗原分子の化学的修飾および酵素分解による抗原性におよぼす影響の検討

1) 還元およびアルキル化による抗原性におよぼす影響の検討

B Iに還元、アルキル化および還元とアルキル化などの化学的修飾を行うことにより抗原性がどのような変化を示すかを、ゲル内沈降反応で検討した。まずアルキル化処理のみではモルモット抗B I血清(No.28)と沈降線を形成し、この沈降線はアルキル化処理を行わないB Iと完全に融合し同一の反応を示した。B Iの還元あるいは、還元とアルキル化処理を行うと抗B I血清との沈降線が認められなかった(写真5)。さらに同様の処理つまり還元あるいはアルキル化および還元アルキル化処理をBio-Gel A-5mゲル濾過後のA, B, C各分画(図1参照)について行った。処理後のA, B, C分画について¹²⁵I-CEAとモルモット抗B I血清(No.28)との結合能に対する阻害活性を波長280nmにおける吸光度0.300/mlの溶液10 μ lを用いて百分

率で示すと表3のごとくである。すなわちA分画は未処理の場合に比較して還元またはアルキル化処理、あるいは還元とアルキル化処理により抗原性が著しく低下あるいは失活した。B分画は、還元あるいはアルキル化のみでは抗原性にほとんど影響がないが還元とアルキル化処理によってはじめて抗原性が低下した。C分画は、還元あるいは還元とアルキル化による抗原性の低下および失活が認められた。以上により最も強いCEA活性をもつB分画が還元とアルキル化により抗原性を失活することから、B分画の抗原決定基は蛋白性の性質を持つことが考えられる。

2) B分画の蛋白分解酵素の処理による抗原性におよぼす影響の検討

B分画について、ペプシン、トリプシン、細菌アルカリプロテアーゼの3種類の蛋白分解酵素処理を行ったのちの抗原性の変化を検討すると図7に示すごとく還元とアルキル化の処理を行った場合と同様に処理前

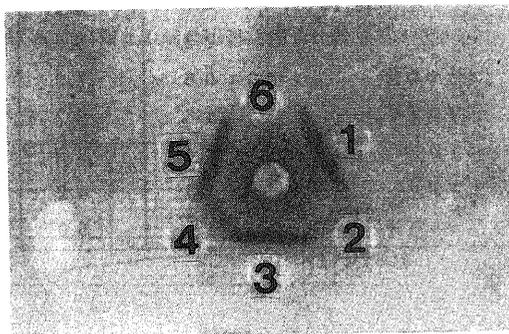


写真5 還元アルキル化処理後のB I分画とモルモット抗B I血清のゲル内二重拡散沈降法
中心孔：モルモット抗B I血清(No.28)
1, 3, 5：未処理B分画 1mg/ml
2, :還元B分画 1mg/ml
4, :アルキル化B分画 1mg/ml
6, :還元アルキル化B分画 1mg/ml

表3 還元アルキル化によるA, B, C分画の阻害活性の比較

分画	未処理	アルキル化	還元	還元とアルキル化
A	81.6%	38.3%	15.8%	11.6%
B	94.7%	90.4%	84.8%	22.9%
C	86.9%	85.0%	55.0%	2.7%

¹²⁵I-CEAとモルモット抗CEA血清の免疫沈降物に対し、各分画を加えた時の、結合能を百分率で示した。

各分画量は波長280nmにおける吸光度0.3/mlを10 μ l使用した。

比べて著明に抗原性が低下するのが結合能の阻害活性から証明された。

3) B分画のノイラミダーゼおよび6M尿素, 2% SDS, 6Mグアニジン処理による抗原性的変化におよぼす影響の検討

ノイラミダーゼ処理および6M尿素, 2% SDS, 6Mグアニジンなどのdetergent処理を行ったのちのB分画の抗原性的変化をみると, 二抗体法RIAにおいて未処理の場合と同様に¹²⁵I-CEAと抗B I血清の結合能を阻害し, 抗原性には変化を認めなかった(図8)。

以上のB分画の抗原の各修飾による抗原性的変化について表4にまとめて示した。

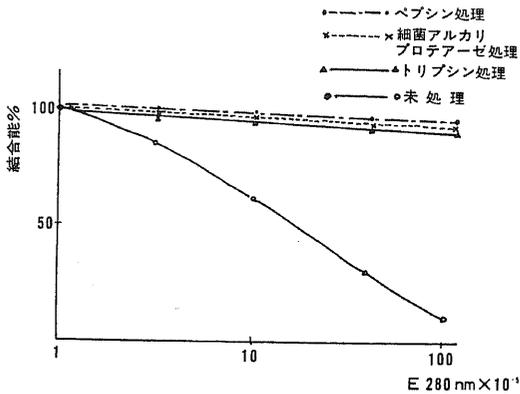


図7 ¹²⁵I-CEA とモルモット抗 CEA 血清の結合に対する蛋白分解酵素処理をしたB分画の阻害能 横軸はB分画の量を波長 280nm における吸光度であらわしたもの

考 察

ヒト大腸癌肝転移組織のPCA抽出物を, Bio-Gel A 5mカラムを用いてゲル濾過し, CEAキット(ロシュ)を用いてCEA活性を測定した。その結果, CEA活性を含むA, B, Cの3分画に分けることができたので, さらにこれをSephacryl S-200カラムでより精製したところ, B IとC I・C IIの2分画を得ることができた。PCA抽出物の精製は, Krupayら²⁷⁾の方法に準じてSephrose 4BとSephadex G-200を用いるのが一般に行なわれている。著者のようにBio-Gel A-5mとSephacryl S-200を用いて精製を行ったのは, 本研究がはじめてである。

次にB IおよびC I・C IIに対する抗血清を作製し, これらを用いて二抗体法のRIA法によるB IおよびC I・C II分画の免疫学的解析を行った。その結

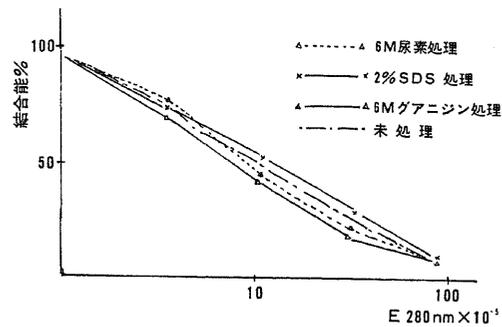


図8 ¹²⁵I-CEA とモルモット抗 CEA 血清の結合に対する6M尿素, 2% SDS, 6Mグアニジン処理をしたB分画の阻害能

表4 CEA の化学的修飾によっておこる CEA 抗原性的変化

CEA の 処 理	免疫二重拡散沈降法	Z - ゲ ル 法	二 抗 体 法
未 処 理	+	+	+
グアニジン塩酸処理	+	+	+
アルキル化	+	+	+
還 元	-	+	+
還元アルキル化	-	-	-
蛋白分解酵素処理	-	-	-
ノイラミダーゼ処理	+	+	+

+ : 沈降線を形成するもの, あるいはRIAで阻害活性を示すもの
 - : 沈降線を形成しないもの, あるいはRIAで阻害活性を示さないもの

果, Coligan⁴⁰⁾ら Rogers⁴²⁾らが指摘しているように CEA は種々の分子を含んでいるという結果になった. すなわち PCA 抽出物の CEA 活性をもつものは, 5% ポリアクリルアミドの PAGE に入らない分子量約 30 万ダルトン以上の分子量の大きいものから, 分子量約 6 万ダルトン前後の小分子までの広範囲の分子の大きさであることがわかった. この様な分子の多様性は, CEA 抽出操作の過程における PCA 抽出などの操作による CEA 分子の凝集や分解に基づくものと推測される. B I, C I・C II の分子は均一で CEA 活性をもつことが判明した. このことと, 前述のごとく PCA 抽出物を Bio-Gel A 5m により濾過した物質や, Coligan ら Rogers らが CEA 分子の多様性を示したことを考えあわせると, B I および C I・C II は精製純化されたものといえる.

そこでこれらを SDS-PAGE にかける分子量測定マーカーキットで検討すると, B I は分子量約 20 万ダルトンと約 6 万ダルトンの 2 つのバンドにわかれることが示された. このことは, Sephacryl S-200 カラムにより抽出された B I は, 上述のごとく均一であったが SDS-PAGE の SDS と還元条件により一部分離して 20 万ダルトンと 6 万ダルトンの分子が生じたと考えられる. 次に C I・C II について同様の検討を行った結果, C I・C II は分子量約 6 万ダルトンであり, B I に認められた小分子のバンドのものとはほぼ同じ分子量であることが判った. この成分は, Kessler ら²⁴⁾のいう分子量 11 万ダルトンのいわゆる TEX とは分子の大きさからも一致しない. しかし CEA と交叉反応を示す物質として報告されている von Kleist ら¹⁸⁾の NCA, Mach ら²¹⁾の NGP, Turberville ら²⁰⁾の CCEA-2 はいずれも分子量 6 万といわれているので著者の C I・C II と分子量の大きさは一致する.

B I あるいは C I・C II を抗原として得られたモルモット抗血清を用いてゲル内二重拡散沈降法を行った. その結果, C I・C II は抗 C I・C II 血清 (No. 54) と 2 本の沈降線を形成し, そのうち 1 本は, B I と抗 C I・C II 血清により形成される 1 本の沈降線と融合する. 一方 C I・C II と抗 C I・C II 血清との間の 2 本の沈降線は, CEA 関連抗原といわれる胎便 PCA 抽出物と抗 C I・C II 血清との間に生じる沈降線と一致する. 抗 B I 血清は B I との間に強い 1 本の沈降線を形成し, C I・C II および胎便 PCA 抽出物とはごく弱い沈降線しか認めず, しかも B I とは spur を形成する. このような抗原解析からの結果と, 前述の B I, C I・C II の分子量の検討から, B I と C I・C II は一部共通した抗原決定基をもつが, 他の部分は異なる抗原決

定基をもっていると考えられる. さらに C I・C II は分子量約 6 万ダルトンの成分からなるが, 抗原性については明らかに異なる 2 つの成分が含まれていることも判明した. しかし現在のところ両者の分離および精製には成功していない. いづれも CEA 関連抗原と考えられる胎便 PCA 抽出物にも含まれるであろう.

また興味あることには, B I が高速液体クロマトグラフィーから均一かつ単一の成分から成るものと考えられたが, SDS-PAGE により分子量約 20 万ダルトンの主なバンドと C I または C II に相当する分子量約 6 万ダルトンのバンドの 2 つの subcomponent に分かれたことである. 著者の用いたモルモット抗 B I 血清は主として, この 2 つの subcomponent の複合体に対する抗体活性をもつものと考えられる. 現在これらの subcomponent のみの分離精製を試みるとともに, これら 2 つの subcomponent のいずれかとのみに反応する抗血清を作るため努力している.

本研究における抗血清の作成のために 80 匹のモルモットを用いたが, そのうち強い抗体活性を示す No. 28 と No. 54 の抗血清を主として使用した. 現在までのところ No. 28 のような 2 つの複合体に共通の抗原決定基に対する抗体活性をもつ抗血清が得られたにすぎない. 実際に C I・C II を結合させたアフィニティクロマトカラムの吸収実験の結果に示した様に抗 B I 血清が, C I・C II を結合させることによって抗 B I 血清の C I・C II に対する活性が消失するばかりでなく, B I に対しての活性をも消失する.

以上より B I は分子量約 20 万ダルトンの大腸癌に対する特異抗原と分子量約 6 万の CEA 関連抗原の複合体であり, C I・C II は分子量 6 万の CFA 関連抗原と推測し図 9 に示すような CEA 分子モデルを仮定した. すなわち, 大腸癌肝転移組織内の CEA 分子の構成は図 9 の I に示す様に B' I, C I・C II の 3 つの抗原

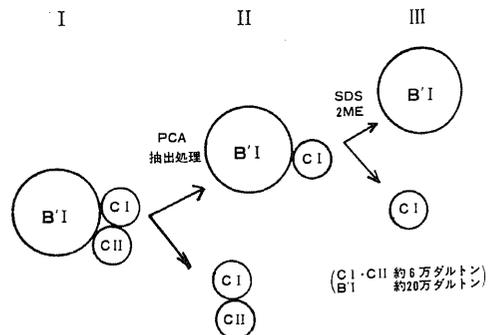


図 9 CEA 抗原の分離精製

成分からなっていて、これに PCA 抽出操作を加えると B' I, C I および C I · C II に分離する。B' I はさらに SDS とメルカプトエタノール処理で図 9 III のごとく B' I と C I に分かれる。また抗 B I 血清を用いた二抗体法による RIA 法において各種癌組織 PCA 抽出物による阻害活性が抗 B I 血清では CEA キット (ロシュ社) のヤギ抗 CEA 血清より大腸癌により強い特異性⁴³⁾を持っていることから、B' I が大腸癌特異抗原決定基と密接な関係があると考えられる。さらに C I · C II が CEA 関連抗原決定基と関係があることが、二重沈降拡散法による結果から示される。

B I および C I · C II の化学的性状を比較するとアミノ酸組成では両者に差異があり、B I は C I · C II に比べリジン、イソロイシンが少なくスレオニン、バリンが比較的多い。Kessler ら²⁴⁾は C I · C II と類似の物質を単離し TEX と名づけ分子量は 11 万ダルトンであるとしている。しかし TEX のアミノ酸組成は従来報告されている CEA のアミノ酸組成と差がないと述べている。著者らが精製した B I のアミノ酸組成を Banjo ら⁴⁴⁾の報告と比較すると B I は Banjo らの報告に比べアスパラギン酸の含量が少ないことが特徴である。

次に糖蛋白である CEA の抗原決定基が蛋白部分にあるのか糖部分にあるのかを知るために、蛋白含量と糖含量で抗原性を検討したところ、二抗体法による RIA 法では差を認めなかった。抗原性が蛋白部分に存在する⁴⁵⁻⁴⁸⁾のか糖部分⁴⁴⁾とくに N-アセチルグルコサミンが関与するかについては議論のある所であり、それらを明らかにするために、抗原に種々の修飾を行ってその影響を検討した。その結果、還元とアルキル化処理によりはじめて抗原性を失活することや、蛋白分解酵素により抗原活性を消失するがノイラミダーゼ処理では抗原性は失活しないことが判明し、CEA の抗原性は、蛋白部分に存在するという結論に達した。

今後は大腸癌に対して特異抗原決定基を含むと考えられる B' I の部分の単離あるいはそれに対する抗体活性をもつ抗血清の作製により、Thomson ら³⁾の示したような血清学的に大腸癌特異性のある診断が可能となると考えている。

結 論

1) ヒト大腸癌肝転移組織の PCA 抽出物を Bio-Gel A 5m カラムで分画すると CEA 活性をもつ 3 つの分画 (A, B, C) に分けられた。それらの分画は分子量約 6 万ダルトンから 30 万ダルトン以上におよび、分子の多様性を示す。

2) PCA 抽出物中の CEA 活性分画をさらに Sephacryl S-200 カラムで分離精製し、高速液体クロマトグラフィーにより検討した。その結果、分子量が均一である 2 つの成分 (B I と C I · C II) に分離することができた。

3) B I と C I · C II の SDS-PAGE による分子量測定の結果、B I は約 20 万ダルトンと約 6 万ダルトンよりなり、C I · C II は約 6 万ダルトンの均一な物質よりなる。

4) B I と C I · C II それぞれに対する抗血清を作製しゲル内沈降反応を行った。その結果、C I · C II は抗原性の異なる 2 種の成分からできていて、しかも胎便 PCA 抽出物と抗原性が一致した。B I は C I または C II のいずれかと同じ抗原性をもつ成分と大腸癌に特異的と考えられる成分からなる。

5) 抗血清の解析から抗 B I 血清は、B I の分子量約 20 万ダルトンの大腸癌特異抗原分子と考えられる subcomponent と CEA 関連抗原と考えられる C I または C II の両者に共通な約 6 万ダルトンの分子量の抗原に対する抗体活性をもつことおよびこの抗 B I 血清は、CEA キット (ロシュ社) のヤギ抗 CEA 血清より大腸癌に対する特異性の高いことが明らかになった。

6) B 分画が還元・アルキル化処理、蛋白分解酵素処理で抗原性を失活することから CEA 分子の糖蛋白のうち蛋白部分に抗原決定基が存在すると考えられた。

7) 今後さらに CEA を分離、精製することにより、大腸癌に特異的な抗 CEA 血清の作製が可能である。

稿を終るに臨み、御懇切な御指導、御校閲を賜った中川原儀三教授、近畿大学陣内傳之助教授ならびに安富正幸教授および親しく御指導、御協力頂いた渡辺信一郎助教授に深甚の謝意を表します。またアミノ酸分析に際し御教示賜った清水章博士および研究に御協力頂いた霜野英子嬢に深く感謝致します。

文 献

- 1) Gold, P. & Freedman, S. O. : Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, **121**, 439-462 (1965).
- 2) Gold, P. & Freedman, S. O. : Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, **122**, 467-481 (1965).
- 3) Thomson, D. M. P., Krupcy, J., Freedman, S. O.

- & Gold, P.** : The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**, 161 - 167 (1969).
- 4) **Egan, M. L., Lautensctrleger, J. T., Coligan, J. E. & Todd, C. W.** : Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry*, **9**, 289 - 299 (1972).
- 5) **Kupchik, H. Z., Zamcheck, N. & Saravis, C. A.** : Immunochemical studies of carcinoembryonic antigen : Methodologic considerations and some clinical implication. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1741 - 1749 (1973).
- 6) **Laurence, D. J. R., Stevens, U., Bettlheim, R., Darcy, D., Leese, C., Turberville, C., Alexander, P., Johns, E. W. & Neville, A. M.** : Evaluation of the role of plasma carcinoembryonic antigen (CEA) in the diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma. *Br. Med. J.*, **3**, 605 (1972).
- 7) **Reynoso, G., Chu, T. M., Holyoke, D., Cohen, E., Valensuela, L. A., Nemoto, T., Wang, J. J., Chuang, J., Guinan, P., & Murphy, G. P.** : Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers. *JAMA.*, **220**, 361 (1972).
- 8) **Neville, A. M. & Laurence, D. J. R.** : Report of the workshop on the carcinoembryonic Antigen (CEA) : The present position and proposals for future investigation. *Intern. J. Cancer*, **14**, 1 - 18 (1974).
- 9) 渡辺信一郎・鬼沢三郎: Carcinoembryonic antigen (CEA) の Radioimmunoassay 法. 免疫実験操作法 V (日本免疫学会編), 1101 - 1106 頁, 金沢, 日本免疫学会 1975.
- 10) **Hansen, H. J., Snyder, J. J., Miller, E., Vandervoort, J. P., Miller, O. N., Hines, L. R. & Burns, J. J.** : Carcinoembryonic antigen (CEA) assay. A laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer. *Human, Pathol.*, **5**, 139 - 147 (1974).
- 11) **Zamcheck, N.** : The present status of carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis detection of recurrence, prognosis and evaluation of therapy of colonic and pancreatic cancer. *Clinics in Gastro Enterology*, **5**, 625 - 638 (1976).
- 12) **Herrera, M. A., Chu, T. M., Holyoke, E. D. & Mittelman, A.** : CEA monitoring of palliative treatment for colorectal carcinoma. *Ann. Surg.*, **185**, 23 - 30 (1977).
- 13) **Hirai, H.** : A collaborative study of carcinoembryonic antigen in Japan. *Cancer Res.*, **37**, 2267 - 2274 (1977).
- 14) **Martin, E. W., Jr. James, K. K., Hurtubise, P. E., Catatano, P. & Minton, J. P.** : The use of CEA as an early indicator for gastro-intestinal tumor recurrence and second - look procedures. *Cancer*, **39**, 440 - 446 (1977).
- 15) **Staab, H. J. & Anderer, F. A.** : Postoperative differentiation of local tumor recurrence and generalized metastasizing in patients with adenocarcinoma of the digestive system by CEA follow-up study. *Scand. J. Immunol.*, **8**, (Suppl. 8) 459 - 464 (1978).
- 16) 福原毅・原満・明石明・安積圭三・多田正安・安富正幸・陣内傳之助・渡辺信一郎: 癌胎児性抗原 (CEA) による消化器癌とくに大腸癌の診断的意義. 日本消化器外科会第 6 回大会, 抄録集, 28 頁, 1976.
- 17) 原満・渡辺信一郎: 癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen) の抗血清の特異性. 医学のあゆみ, **89**, 366 - 367 (1974).
- 18) **Von Kleist, S., Chavanel, G. & Burtin, P.** : Identification of an antigen from normal human tissue that cross reacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2492 - 2494 (1972).
- 19) **Darcy, D. A., Turberville, C. & James, R.** : Immunological study of carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein. *Brit. J. Cancer*, **28**, 147 - 160 (1973).
- 20) **Turberville, C., Darcy, C. A., Laurence, D. J. R., Johns, E. W. & Neville, A. M.** : Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein CCEA - 2. Preparation and chemical characterization. *Immunochemistry*, **10**, 841 - 843 (1973).
- 21) **March, J. P. & Pusztaszeri, G.** : Carcinoembryonic antigen (CEA) : Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry*, **9**, 1031 - 1034 (1972).
- 22) **Newman, E. S., Petras, S. E., Georgiadis, A.**

- & Hansen, H. J. : Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen - III. *Cancer Res.*, **34**, 2125 - 2130 (1974).
- 23) Orjasagter, H. : Demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA). Nonspecific cross - reacting antigens (NCA) and an associated alpha protein in normal Human tissues and fluids by immunodiffusion techniques. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **82**, 387 - 395 (1974).
- 24) Kessler, M. J., Shively, J. E., Pritchard, D. G. & Todd, C. W. : Isolation, immunological characterization and structural studies of a tumor antigen related to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.*, **38**, 1041 - 1048 (1978).
- 25) Hansen, H. J., Lance, K. P. & Krupey, J. : Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel. *Clin. Res.*, **19**, 143, (1971).
- 26) 鬼沢三郎・渡辺信一郎・八倉隆保・山村雄一: Zirconyl gel 法による CEA の radioimmunoassay 法の技術的検討. *医学のあゆみ*, **96**, 887 - 889 (1976).
- 27) Krupey, J., Gold, P. & Freedman, S. O. : Purification and characterization of carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Nature*, **215**, 67 - 68 (1967).
- 28) Davis, B. J. : Disc electro - phoresis - II Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of sciences*, **121**, 404 - 427 (1964).
- 29) Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Marzel, Jr. J. R. : Molecular weight estimation of poly peptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**, 815 - 820 (1967).
- 30) 林健志・大場義樹: ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. *蛋白質核酸酵素*, **17**, 304 - 311 (1972).
- 31) 向井鏡三郎: Coomassie brilliant blue による Disc 電気泳動の染色. 免疫実験操作法 A (日本免疫学会編), 196 - 197 頁, 金沢, 日本免疫学会, 1971.
- 32) Ouchterlony, ö. & Nilsson, L. A. : Immunodiffusion and immuno-electrophoresis p. 19 - 37 In D. M. Weir (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*, 2nd ed, Blackwell Scientific Publications, London, 1973.
- 33) Mac Sween, J. M., Warner, N. L., Bankhrst, A. D. & Mackay, I. R. : Carcinoembryonic antigen in whole serum. *Brit. J. Cancer.*, **12**, 42 - 54 (1973).
- 34) 渡辺信一郎: 考える臨床検査 (121) CEA (癌胎児性抗原). *臨床科学*, **11**, 771 - 777 (1975).
- 35) Edelman, G. N. & Poulik, M. D. : Studies on structural units of the γ -globin. *J. Exp. Med.*, **113**, 861 - 884 (1961).
- 36) Westwood, J. H., Bessell, E. M., Bukhari, M. A., Thomas, P. & Walker, J. M. : Studies on the structure of the carcinoembryonic antigen - I. Some deductions on the basis of chemical degradations. *Immunochemistry*, **11**, 811 - 818 (1974).
- 37) Burton, R. M. : The action of neuraminidase from clostridium perfringens on gangliosides. *J. Neuro - drem.*, **10**, 503 - 512 (1963).
- 38) ファルマシア ジャパン株式会社 : CNBr - activated Sephrose 4B. *Affinity chromatography*, 9 - 16 頁, 東京, ファルマシアジャパン株式会社, 1976.
- 39) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. : Phenol - Sulfuric Acid Reaction. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 40) Coligan, J. E., Henkart, P. A., Todd, C. W. & Terry, W. D. : Heterogeneity of the carcino - embryonic antigen. *Immunochemistry*, **10**, 591 - 599 (1973).
- 41) Newman, E. S., Petras, S. E., Georgiadis, A. & Hansen, H. J. : Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen - III. *Cancer Res.*, **34**, 2152 - 2130 (1974).
- 42) Rogers, G. T. : Heterogeneity of Carcinoembryonic Antigen. Implications on its role as a tumour marker substance. *Biochimica et Biophysica*, **458**, 355 - 373 (1976).
- 43) 松田泰次・福原毅・岩佐善二・安富正幸・橋本重夫・渡辺信一郎: 酵素抗体法による CEA の細胞組織的研究 (I). *近大医誌*, **3**, 379 - 390 (1978).
- 44) Banjo, C., Gold, P., Gehrke, C. W., Freedman, S. D. & Krupey, J. : Preparation and isolation of immunologically active glycopeptidases from carcinoembryonic antigen (CEA). *Int. J. Cancer*, **13**, 151 - 163 (1974).

- 45) Egan, M. L., Pritchard, D. G., Todd, C. W. & Go, V. L. W. : Isolation and immunochemical and chemical characterization of carcinoembryonic antigen-like substances in colon lavages of healthy individuals. *Cancer Res.*, **37**, 2638-2643 (1977).
- 46) Coligan, J. E. & Todd, W. C. : Structural studies on carcino-embryonic antigen periodate oxidation. *Biochemistry*, **14**, 805-810 (1975).
- 47) Hammarstoröm, S., Engvall, E., Johansson, B. G., Svensson, S., Sundblad, G. & Goldstein, I. J. : Nature of the tumor-associated determinant (s) of carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 1528-1532 (1975).
- 48) Egan, M. L., Colligan, J. E., Pritchard, D. G., Schnute, W. C. & Todd, C. W. : Physical characterization and structural studies of the carcinoembryonic antigen. *Cancer. Res.*, **36**, 3482-3485 (1976).

Studies on Carcinoembryonic Antigen (CEA) from Carcinoma of Human Digestive System—
Takeshi Fukuhara, Surgical Department of Cancer Research Institute, School of Medicine,
Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen. Med. Soc.*, 88, 867—881 (1979)

Abstract To isolate the carcinoembryonic antigen (CEA), the liver metastasis of the colorectal adenocarcinoma were extracted with 0.6M perchloric acid according to the method of Krupey et al and then were fractionated into three fractions (A, B and C) on the Bio-Gel A-5 m gel filtration column. The CEA activities were assayed on each fraction by the zirconyl phosphate gel (Z-gel) method using the CEA Roche kit. These three fractions, A, B and C proved to have the CEA activities. By the 5% acrylamide gel electrophoresis, the molecular size having CEA activities varied from 60,000 daltons to more than 300,000 daltons. From these three fractions, B and C fractions proved to be contaminated with each others, so we tried to separate them by the Sephacryl S-200 gel filtration.

From B fraction, we separated the BI fraction having CEA activities and from C fraction, we obtained the mixture of CI and CII fractions. The BI fractions proved to be separated into 200,000 dalton and 60,000 dalton fractions by the SDS-PAGE, where CI and CII fractions showed the same molecular size of 60,000 daltons. By the analysis of highly sensitive high speed liquid chromatography, the BI fraction eluated in a single peak and the CI and CII fractions eluated at the same position having smaller molecular size than the BI fraction. From these results, it is indicated that the BI fractions were separated into two fractions by the reduction procedure, whereas the CI and CII fractions were unchanged. The complete separation of CI and CII was impossible in our experiments.

From the analysis of antiserum against BI or CI and CII, it could be concluded that BI had partial identity with CI and CII but that CI and CII were different from each other by the antigenic determinant in spite of the same molecular moiety and mobility. CI and CII proved to be identical with the PCA extract from normal meconium from the antigenic analysis. By the double antibody technique using anti BI antiserum, we could obtain more specific antibody specificity against the colon cancer antigen than the commercial anti CEA Roche kit.

The antigenicity of CEA after both reduction and alkylation or the proteolytic enzyme treatment was destroyed but not after neuraminidase. These findings indicated that more colon cancer specific antiserum could be obtained by the more delicate approach or by chance get antibody against BI subcomponent.