

# Analysis of an Antigen Highly Associated with Human Gastric Adenocarcinoma by Xenoantisera

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7846">http://hdl.handle.net/2297/7846</a>

# ヒト胃腺癌に高度に関連する抗原の異種抗血清による分析

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

関 誠

(昭和61年1月10日受付)

癌特異抗原を物質として同定することは腫瘍免疫学上の主要な問題である。ヒト胃癌の研究において多数の抗原が見いだされてきているが、胃癌に特異的あるいは高度に関連する抗原はまだみいだされていない。著者は胃腺癌の不溶分画をデオキシコール酸塩で可溶化し、可溶化蛋白分画(solubilized protein, SP)をセファロース4Bでゲル濾過し、ついでBlue Sepharose CL-6Bで混在アルブミンを除去したものを免疫原としてモルモットに高度免疫抗血清を作らせた。活性の高い抗血清 $\alpha$ SC5を選び、ヒト血清で吸収したのち酵素結合免疫吸着剤検定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)や免疫ブロットティングについての全実験に使用した。胃腺癌と胃腺癌細胞培養株MKN-28のSPをアルブミン除去後、高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)と $\alpha$ SC5によるELISAで分析し、アルブミン溶出部位の直後に活性のピーク(P2)の出現を認めた。正常成人臓器、胎児胃、胎児腸の各SPにはP2は欠如した。胃腺癌のP2成分はアガロースゲル電気泳動では $\beta_2$ 泳動度を示したが、正常成人及び胎児臓器のP2領域の成分はアルブミン $\sim\beta_1$ 泳動度を示した。胃腺癌とMKN-28の $\beta_2$ 位の成分についてウェスタンブロットティングを行い、胃腺癌特異と思われる59Kのバンドを認めた。胃腺癌の $\beta_2$ 領域の溶出液を抗原としてhumoral leukocyte adherence inhibition(H-LAI)試験を行うと、胃腺癌患者血清が陽性反応を示し、対照血清は陰性反応を示した。

---

**Key words** gastric cancer, tumor antigen

---

ヒト癌における癌特異抗原(tumor-specific antigen, TSA)の存在については悲観論もあるけれども、その存在を示唆するデータもまた少くない。胃癌についてはTSAを求めた1960年代前半の先駆的な研究<sup>11-13)</sup>ののち、散発的に抗原分析が行われてきたが<sup>14-12)</sup>、それらは(1)癌胎児抗原、(2)腸上皮抗原、(3)糖結合マーカーのいずれかに属する特異性の必ずしも高くはない抗原を示したに止まっている。最近のモノクローナル抗体による抗原分析も胃癌と大腸粘膜または大腸癌に共通する抗原を示すか<sup>13-15)</sup>、胃癌特異らしい抗原の存在を暗示はしながら<sup>16)</sup>、抗原の性質にはふれていない。教室の程<sup>17)</sup>は胃腺癌の可溶化蛋白(solubilized protein, SP)に対する異種抗血清を使用して胃癌特異と思われる抗原の存在を示し、ついで三好<sup>18)</sup>は

胃腺癌SPを抗原として胃腺癌患者の白血球粘着阻止(leukocyte adherence inhibition, LAI)試験を行い、患者の白血球あるいは血中抗体に胃腺癌特異な認識があることを示している。しかしそれらの研究も抗原の測定系や精製については不十分な点が多かった。そこで筆者は酵素結合免疫吸着剤検定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)を測定系として胃腺癌特異と思われる抗原の分析とその精製についての検討を行った。

## 材料および方法

### I. 材 料

胃癌及び対照とした肺癌、卵巣癌、平滑筋肉腫は手術時に入手し、正常成人臓器と大腸癌、胆嚢癌、乳癌

---

Abbreviations: CEA, carcinoembryonic antigen; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC, high performance liquid chromatography; H-LAI, humoral leukocyte adherence inhibition; LAI, leukocyte adherence inhibition; NCA, nonspecific cross-reacting

の各肝転移巣，並びに原発肝癌，膀胱癌は剖検時に入手した。胎児臓器はいずれも6ヵ月胎児のものである。各組織は摘出後直ちに密閉して使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ に保存した。

胃癌の高分化型腺癌株 MKN-28 (新潟大，鈴木利光博士より御恵与) をウシ胎児血清 10%加 RPMI-1640 で培養して使用した。細胞はラバー・ポリスマンにより剥離し，0.01 M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline of pH 7.4, PBS) で3回洗浄後，遠心沈渣として使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

## II. 可溶性蛋白 (SP) の作製

凍結組織を融解後，Kurata, Okada ら<sup>20-22)</sup>の方法に従って不溶性蛋白分画を抽出した。既ち，組織に 0.16 M 塩化カリウム，0.017 M クエン酸ナトリウム，0.001 M モノヨード酢酸溶液を加えてワーリングブレンダーでホモジネートを作る。次にガーゼ 1, 2, 4, 8 枚で順に濾過し，濾液を 10000 G 30 分遠心する。沈澱を 1 M 塩化カリウム，0.034 M クエン酸ナトリウム，0.001 M モノヨード酢酸 (塩酸を加えて pH 4.7 に補正) 溶液でホモジナイズし，10000 G 30 分遠心する操作を以後 7 回繰返す。最終沈澱に約 4 倍量の 0.2% デオキシコール酸ナトリウム液を加えてホモジネートを作り，つづいて  $4^{\circ}\text{C}$  48 時間の攪拌を行った。10000 G 30 分冷却遠心の後，上清をわけ，沈澱は再び上記同様に 0.2% デオキシコール酸ナトリウム液を加えてホモジネートを作り  $4^{\circ}\text{C}$  48 時間攪拌した。2 回の遠心上清を合わせて 10 倍容量の冷アセトンに加え  $-20^{\circ}\text{C}$  に 1 夜おいた。生じた沈澱を遠心により集め，少量の PBS にとかし，セファロース 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) のカラムに負荷し，PBS を溶出液としてゲル濾過を行い，溶出液の波長 280 nm における吸光度を測定した。通常 pass 分画のピークと低分子の単一のピークが認められるが，後者のピーク分画を集めてセロファンチューブに入れ，冷室で扇風機にあてて濃縮した。蛋白量はプロテイン・アッセイキット (Bio-Rad Laboratories, USA) による色素結合法により測定した。この分画を以後可溶性蛋白 (SP) と呼ぶ。胃腺癌 10 g (湿量) あたりの収量は通常 6~8 mg 蛋白であった。この分画には血清蛋白とくにアルブミンの混在が多いため，以下のアルブミン除去操作を行った。SP をセロファンチューブに入れ扇風機にあてて濃縮し 0.1 M 塩化カリウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液，pH 7.0 に対して冷室で透析する。同緩

衝液で平衡化した Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia) を充分量 (分画中の蛋白をすべてアルブミンとしても充分吸着できる量) を加え，1 夜冷室で低速攪拌する。翌日，内容をカラムに移し，ゲル容量の 3 倍量以上の上記緩衝液で溶出した。溶出液は Centriflo CF 25 (Amicon, USA) を使用して 800G で遠心濃縮する。濃縮途中に 0.1 M リン酸緩衝液，pH 7.0 を添加してさらに濃縮をくり返し，溶媒を置換するとともに最終的に 2 mg 蛋白/ml の溶液を作製する。

## III. 異種抗血清の作製と吸収

胃腺癌 5 例の SP を Freund 完全アジュバントで乳化し，それぞれ体重約 400 g のモルモットの背筋内に 1 回 650  $\mu\text{g}$  蛋白以上を分割注射した。1~2 週間隔で 4~5 回注射をくり返し，最終注射後 7~10 日目に心穿刺により全採血した。血清を分離して使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。同様に正常胃の SP でも抗血清を作製した。なお，乳癌，膀胱癌，肺腺癌の各抗血清はそれぞれの SP を 1 回 1~5 mg 蛋白，1~2 週間隔で 4~5 回，注射して作製した。

抗血清はすべて 100  $\mu\text{l}$  あたりヒト血清 20 ml を加え， $37^{\circ}\text{C}$  1 時間静置後，0.1% 窒化ナトリウムを加え，回転ドラムにかけて 1 夜低速回転した。10000 G 30 分遠心して上清をとり，吸収抗血清として  $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。さらに必要に応じこの吸収抗血清 100  $\mu\text{l}$  に胃腺癌以外の腫瘍の SP (2.7~8.5 mg 蛋白/ml) を 100~300  $\mu\text{l}$  加え，上記同様の操作を行った吸収抗血清も作製した。

## IV. 分析方法

### 1. ELISA

96 穴のビニール測定プレート (Coster, USA) の各 well に抗原材料を 50  $\mu\text{l}$  ずつ加え， $37^{\circ}\text{C}$  にて 1 時間静置後，0.05% Tween-20 を含む PBS (以下 PBS-T と略) で 3 回洗浄した。ついで 0.5% ウシ血清アルブミン含有 PBS を well あたり 200  $\mu\text{l}$  加えて  $37^{\circ}\text{C}$  1 時間おいたのち，PBS-T で 3 回洗浄した。吸収抗血清を well に 50  $\mu\text{l}$  ずつ加え， $37^{\circ}\text{C}$  1 時間静置後，PBS-T で 3 回洗浄した。パーオキシダーゼ標識抗モルモット IgG ウサギ抗血清 (DAKO, Denmark) を 0.5% ウシ血清アルブミン含有 PBS で 1000 倍に稀釈後，同量のヒト血清を加え， $37^{\circ}\text{C}$  1 時間おいたものを well あたり 50  $\mu\text{l}$  まき， $37^{\circ}\text{C}$  1 時間おいてから PBS-T で 6 回洗浄した。さらに，McIlvaine のリン酸・クエン酸緩衝液，pH 4.8 で 2 回洗浄した。McIlvaine の緩衝液 10 ml, O-フェニ

antigen; PBS, 0.01M phosphate-buffered saline of pH7.4; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SP, solubilized protein; TSA, tumor-specific antigen.

レンジアミン 10 mg, 30%過酸化水素 5  $\mu$ l の溶液(用時新製)を well あたり 100  $\mu$ l 加え, 室温 30 分後に EIA-Reader Model 307 (Bio-Tek Instruments, Inc., USA) により波長 490 nm の吸光度を測定した。なお, 抗ヒト nonspecific cross-reacting antigen (NCA) 抗血清(程明先生より御恵与), 抗ヒトアルブミン抗血清 (MBL, 東京), 抗ヒト carcinoembryonic antigen (CEA) 抗血清 (DAKO), 抗ヒト  $\alpha_1$ -antitrypsin 及び抗ヒト  $\alpha_1$ -acidglycoprotein 抗血清 (以上 Behringwerke AG., Hoechst, Germany) を 1 次抗血清とした ELISA の場合には, それぞれを 0.5%ウシ血清アルブミン含有 PBS-T で 500 倍に希釈して使用した。また 2 次抗血清にはパーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヒツジ抗血清 (Cappel, USA) の 0.5%ウシ血清アルブミン含有 PBS による 1000 倍希釈液に同量のヒト血清を加え, 37°C 1 時間おいたものを使用した。

## 2. 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC)

高速液体クロマトグラフ・システムとしてポンプ, モデル 302; マノメトリックモジュール, モデル 802; UV ディテクター, モデル 111(以上, Gilson, France); レコーダー, モデル 1202 (Linear Instruments Corporation, USA) を使用し, TSK ガードカラム SW 及び TSK gel G3000 SW カラム (以上, 東洋曹達) を設置し, 500  $\mu$ l (約 1 mg 蛋白以下) のアルブミン除去 SP を負荷した。流速 0.5 ml/分, Refill 9, Compensation 5 で溶出し, 2 ml ずつ分取した。溶出パターンは波長 280 nm, Range 0.2, Chart speed 15cm/時で記録した。

## 3. アガロースゲル電気泳動

Sea Kem<sup>®</sup> HE (FMC Corporation, Marine colloids Div., USA) を 0.025 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 ( $\mu=0.025$ ), で 1%溶液とし, 8  $\times$  12 cm のガラス板上に厚さ 2 mm のゲル層を作った。このゲル層に 4  $\times$  40 mm の抗原槽をつくり HPLC の溶出分画 (Centriflo で濃縮して波長 280 nm の吸収を一定にしたもの) を加え, 上記緩衝液を使用して 2.5 mA/cm の電流を通した, 泳動時間は同時に泳動させたブromフェノールブルーが陽極側へ 3.5 cm 移動するまで (約 1.5 時間) とした。泳動終了後, 直ちに抗原槽の陽極側縁から陽極側へ幅 5 mm 長さ 4 cm の短冊形ゲルを 10 本, 陰極側へ 6 本を切り出し, それぞれを小試験管に入れ, 500  $\mu$ l の蒸留水を加えて細切し, 4°C に 1 夜おいてから, 上清 50  $\mu$ l について ELISA を行った。なお, 上記プレート上ではヒト血清も同時に泳動させ, 後から抗体槽を作って, 抗ヒト全血清抗血清 (MBL) を加え, 沈降線の生成を待って, 被検抗原の泳動度の基準とした。

## 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) とウェスタンブロットティング

SDS-PAGE は Laemmli<sup>23)</sup> の方法によった。試料にサンプルバッファーを加えて 100°C 3 分煮沸後, ミニスラブディスク電気泳動装置 (SJ-1060 MSD, Atto, 東京) を用い, 10%ゲルを使用し, 2.2 mA/cm の定電流で約 75 分泳動を行った。分子量のマーカにはチトクローム系の分子量マーカ蛋白 (オリエンタル酵母), ゲルの染色には Bio-Rad Silver Stain<sup>®</sup> を使用した。

ウェスタンブロットティングは Burnette<sup>24)</sup> の方法に準じた。転写膜には Durapore filter (Milipore Corp., USA) を使用し, 転写は 7 v/cm の電場で 3~5 時間行った。膜は PBS-T, ついで PBS で充分洗浄後, 3%ウシ血清アルブミン含有 PBS で 1 夜ブロッキングを行い, ベクタステイン ABC のモルモット IgG キット (Vector Laboratories, Inc., USA) による免疫染色を行った。1 次抗血清には, モルモット各抗血清 100  $\mu$ l あたりヒト血清 20 ml を加えて既述のように吸収を行ったものに同量の PBS-T を加えて使用し, 反応時間を室温 8~12 時間とした。洗浄にはすべて PBS-T を使用したが他の操作はキットの指定に従った。

## 5. Humoral leukocyte adherence inhibition (H-LAI) 試験

Sanner ら<sup>25)</sup> の方法に小改変を加えて使用した。(1) O 型健康人より Lymphoprep<sup>®</sup> (Nyegaard & Co., Norway) を使用して白血球を分離し, 0.02%トリプシン (Type I, Sigma Chemicals Co., USA) を同量加えて室温 45 分振盪し, 199 培地 (日水製薬) により 3 回洗浄後, 細胞数  $1.2 \times 10^7$ /ml としたもの, (2) LAI index 陽性の胃腺癌患者又は陰性の対照患者血清<sup>19)</sup> (同愛記念病院, 三好俊策先生より御恵与) をそれぞれ 199 培地で 1%に希釈したもの, (3) 胃腺癌あるいは肺腺癌の HPLC とアガロース電気泳動による精製抗原を 199 培地で一定濃度に希釈したもの, を作製し, ディスポーザブルプラスチック試験管 (サンリアチューブ M, 三光純薬) に (1)(2)(3) 各 50  $\mu$ l に 199 培地 50  $\mu$ l を加えたものと, (1)(2) に 199 培地 100  $\mu$ l を加えたものを作った。5 分毎の振盪混和を加えながら 37°C に 30 分おき, TATAI 計算盤 (萱垣医理工) に注入して粒子アナライザー (Luzex 401, Nihon Regulator Co., LTD.) により白血球数を計測した。計算盤を水蒸気飽和シャーレ内に水平位におき, 37°C 60 分静置後, PBS 中に水平にせずめてカバーガラスをすべらせて除き, ついで計算盤を垂直位にして静かに引上げ, カバーガラスをかけて粘着白血球数を

計測した。LAI index の計算は Sanner ら<sup>25)</sup>に等しく、index 10 以上を陽性とした<sup>18)</sup>。

## 成 績

### 1. HPLC

胃腺癌の SP の HPLC による溶出曲線の定型的なものは図 1 A の如くである。吸収胃腺癌抗血清を使用して ELISA を行うと、溶出時間 20~24 分の pass 分画に活性のやや高いピーク (以後、P1 と呼ぶ) と 36~40 分のピーク (以後、P2 と呼ぶ) とが際立った。P1 分画は抗 CEA 抗血清の反応物質を多少とも含んでいる。各分画について抗正常胃抗血清による ELISA を行うと、やや低い P1 が認められるのみで、P2 は欠如した。しかし、使用する抗胃腺癌抗血清により活性の高さがばらつくので、以後の実験には最も高い活性を示す吸収抗血清  $\alpha$ SC5 (アルブミン除去を行った胃腺癌 SP650 $\mu$ g 2 週間隔で 4 回免疫したモルモット抗血清、ヒト血清で吸収) のみを使用した。なお、P2 分画は抗アルブミン、抗 CEA、抗 NCA、抗  $\alpha_1$ -anti-trypsin、抗  $\alpha_1$ -acidglycoprotein 各抗血清とは ELISA で有意な反応を示さなかった。

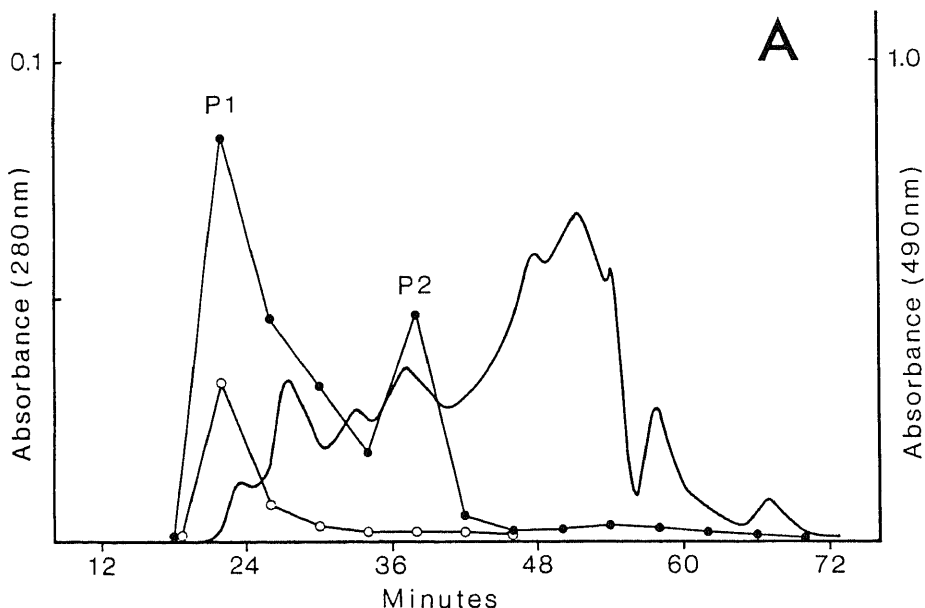
手術による胃腺癌材料では、癌細胞の充実した 10 g 以上の 4 例からの SP に HPLC 分画における P2 の存在を認め得たが、湿量 3 g 以下の腺癌や、より大きくても癌実質の著しく乏しい材料には P2 を認めることが困難であった。胃扁平上皮癌では 25 g 以上のものから得た SP についても P2 を認め得なかった。しかし、胃

腺癌培養株 MKN-28 では湿量 350 mg の細胞からの SP でも P2 の存在が認められた。なお、この場合 SP を pH6.5 以下の酸性にすると HPLC 分画の P2 が消失し、後述の 59 K 分子は P1 中に出現した。これは酸による抗原分子の凝集によるものと理解される。

成人正常胃の粘膜固有層あるいは筋層から作製した SP の HPLC 分画には  $\alpha$ SC5 あるいは抗正常胃抗血清による ELISA で P2 の存在は見られなかった (図 1 B)。胎児胃についても P2 は認められず、同様に胎児腸、成人の小腸、大腸、肝、脾、膵、腎にも P2 は存在しなかった。他種の悪性腫瘍については、大腸癌 (肝転移巣) に P2 が存在せず (図 1 C)、肺腺癌、乳癌、卵巣癌、平滑筋肉腫では HPLC で 40 分以後の分画になだらかなピークは出現したが、胃腺癌 P2 に相当するピークは見あたらなかった。ただ、胆嚢癌 (肝転移巣) と膵癌には P2 領域に胃腺癌とは多少形の異なる小ピークが出現した。

### 2. アガロースゲル電気泳動

HPLC 分画上 P2 のあるもの、P1 または 40~48 分のピークの裾が P2 領域に及んでいて、多少とも波長 490 nm の吸収の高いものなどを含む多数の試料についてアガロースゲル電気泳動を行い、ゲルを切り出し、その溶出液について  $\alpha$ SC5 による ELISA を行った。図 2 のように胃腺癌では  $\beta_2$  領域に明瞭な活性ピークが認められた。成人の大腸、肝、膵では  $\alpha_2$  位、成人肺、胎児胃は  $\alpha_1$  位、胎児腸は  $\alpha_2$ - $\beta_1$  位、成人腎はアルブミン位に活性ピークを示したが、 $\beta_2$  領域には活性を示さな



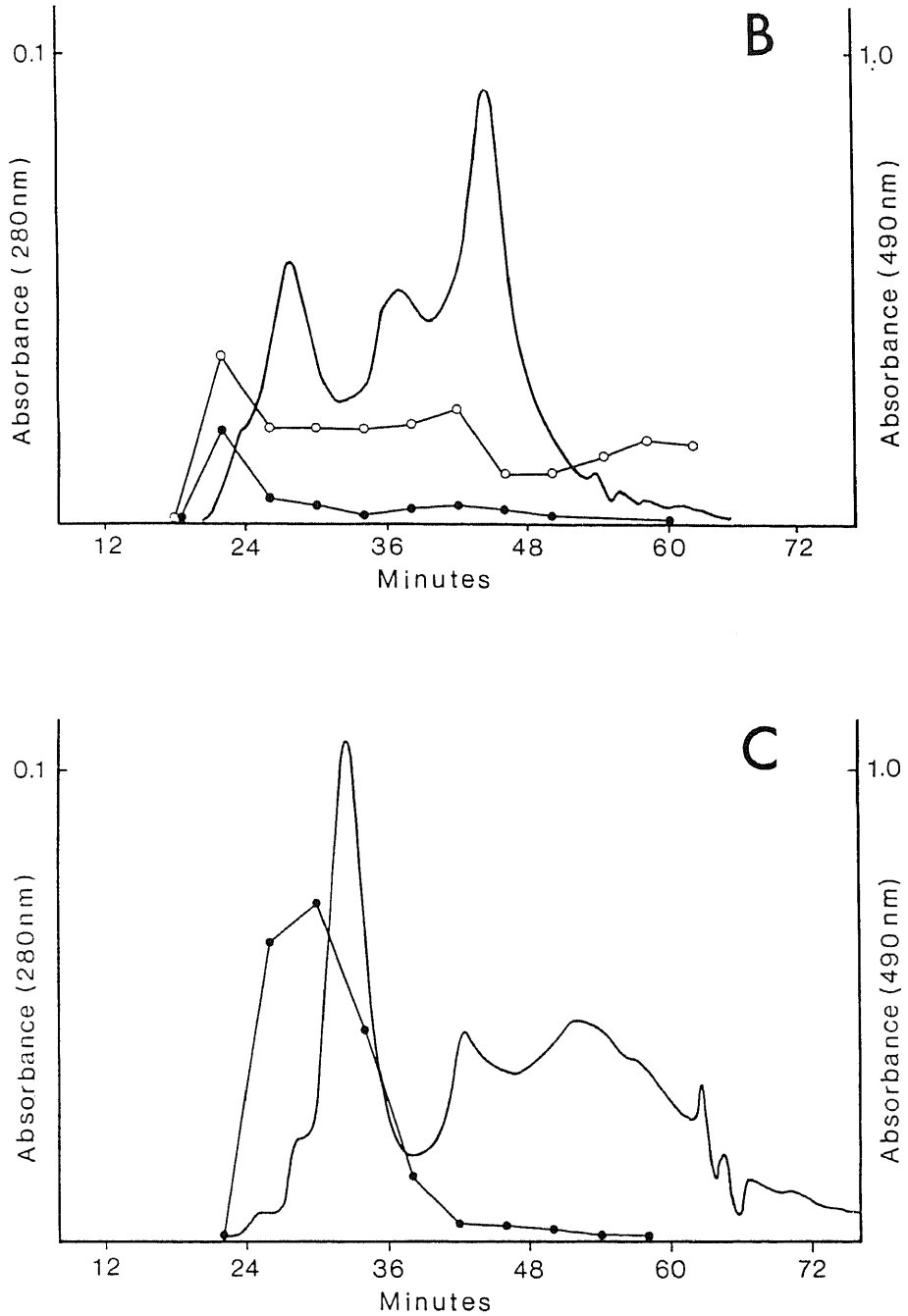


Fig. 1. Protein elution profiles (O. D. 280nm) after high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilized proteins of a gastric adenocarcinoma [A], a normal gastric mucosa [B], and a colon carcinoma [C], and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results (O. D. 490nm) with an anti-gastric adenocarcinoma antiserum  $\alpha$ SC5 ( $\bullet$ — $\bullet$ ) and an anti-normal gastric mucosa antiserum ( $\circ$ — $\circ$ ) against eluates. Instrument, Gilson HPLC system; Column, TSK gel G3000SW with guard column (Toyo-Soda); Eluant, 0.1M phosphate buffer of pH7.0; Flow rate, 0.5ml/min.

かった。また、大腸癌(肝転移巣)は $\alpha_2$ 位、胆嚢癌(肝転移巣)、肝癌は $\alpha_1$ 位、卵巣癌は $\alpha_1$ ・ $\alpha_2$ 位にピークを示したが、 $\beta_2$ 位のピークは示さなかった。一方、膵癌、肺腺癌、乳癌(肝転移巣)(図2)、平滑筋肉腫はアルブミンあるいは $\alpha_1$ 位のピークとともに $\beta_1$ 位に小さなピークの存在を示した。このうち平滑筋肉腫については、 $\alpha$ SC5を平滑筋肉腫のSPで吸収したものでELISAを行うと $\beta_2$ 位の活性が消失したが、胃腺癌の $\beta_2$ 位の活性は残存した。しかし、このような吸収実験では膵癌、肺腺癌、乳癌については明確な成績が得られなかった。

### 3. ウェスタンブロットティング

手術により得た胃腺癌からのSPよりアルブミンを除去し、その1mg蛋白質についてHPLCを行い、そのP2分画をさらにアガロースゲル電気泳動にかけ、 $\beta_2$ 領域を切り出して溶出し、濃縮後SDS-PAGEを行なった。Durapore filterに転写後、 $\alpha$ SC5による免疫ブロットティングを行った結果、51K、59K、66Kのバンドを認めた(図3)。転写後の膜を抗肺腺癌、抗膵癌、抗乳癌抗血清を使用して染めた場合59Kのバンドは認められなかった。また肺腺癌、膵癌、乳癌材料につき同様の操作を行った膜を $\alpha$ SC5で染色するといずれにも59Kのバンドは出現しなかった。培養細胞株MKN-28ではHPLCとアガロースゲル電気泳動によって抽出した分画をSDS-PAGEにかけると、還元剤の有無にかかわらずほとんど59Kのバンドのみが

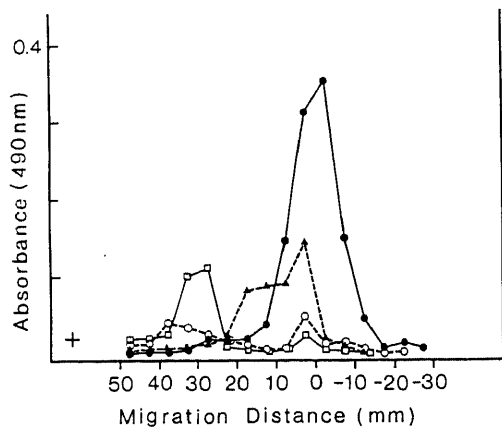


Fig. 2. Analysis by agarose gel electrophoresis of P2 fractions on HPLC from various carcinomas using an anti-gastric adenocarcinoma antiserum  $\alpha$ SC5. The agarose gels, after electrophoresis, were cut into 0.5-cm slices and then prepared for ELISA. (●—●), gastric adenocarcinoma; (▲---▲), pancreatic carcinoma; (□—□), breast carcinoma; (○---○), lung carcinoma.

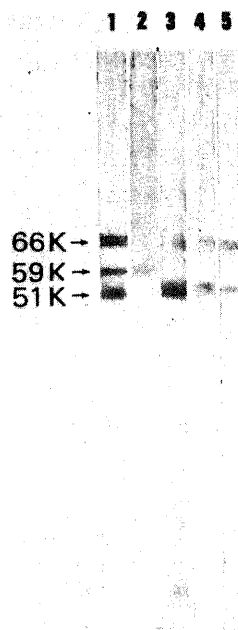


Fig. 3. Western blot analysis of components of  $\beta_2$ -mobilities from a gastric adenocarcinoma (lane 1, 3, 4, 5) and a gastric adenocarcinoma cell line (lane 2) using antisera and a Vectastain® ABC kit. Lane 1 and 2, stained with an anti-gastric adenocarcinoma antiserum  $\alpha$ SC5; lane 3, stained with an anti-pancreatic carcinoma antiserum; lane 4, stained with an anti-breast carcinoma antiserum; lane 5, stained with an anti-lung carcinoma antiserum.

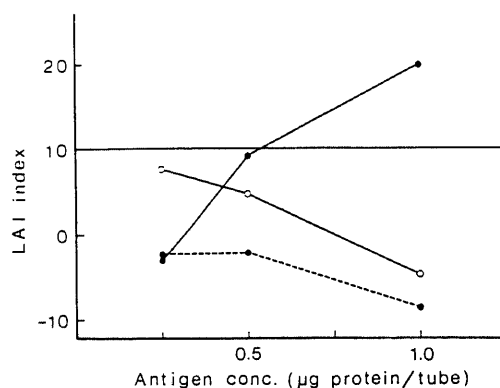


Fig. 4. Effect of concentration of eluates at the  $\beta_2$ -region on agarose gel electrophoresis of solubilized proteins from a gastric adenocarcinoma (●) and a lung carcinoma (○) on a humoral leukocyte adherence inhibition test of sera from a patient with gastric adenocarcinoma (—) and from a control person (·····).

silver stain で染め出され、転写後免疫ブロッティングを行うと、そのバンドが染色された。

#### 4. H-LAI

LAI index が既知の胃腺癌患者血清及び対照患者血清について、胃腺癌のアガロースゲル電気泳動による $\beta_2$ 領域の抽出抗原を使用してH-LAI試験を行った(図4)。胃腺癌抗原が550 ng 蛋白/tube 以上の場合にLAI index は陽性値(index 10 以上)を示したが、肺腺癌抗原では抗原量にかかわらず同血清は陰性値を示した。なお、LAI index 陰性の対照患者血清は胃腺癌抗原量にかかわらず陰性値を示した。

### 考 察

ヒト癌組織の不溶性分画をデオキシコール酸塩で可溶化した分画に癌特異性の高い抗原の存在することが金沢大がん研病態生理部において種々の癌について免疫化学的分析により示されており<sup>22) 26)~30)</sup>、胃腺癌についても既に程<sup>1)</sup>がそのような抗原の存在を示唆している。

著者は手術材料あるいは培養細胞を使用して、胃腺癌の可溶性蛋白分画についてHPLCのゲル濾過を行いその36~40分溶出液に正常胃粘膜には存在しない活性ピーク(P2)を見いだした。このようなピークは他の正常成人臓器や胎児胃腸には認められない。胃腺癌のP2分画はアガロース電気泳動では $\beta_2$ 泳動度の活性のピークを示すが、これは正常臓器のピークが、 $\alpha$ 位あるいはより陽極側にピークを示すことと対照的である。胃腺癌の $\beta_2$ 位のピーク分画を抗原としてH-LAIを行うと、胃腺癌患者血清は陽性indexを示すが、肺腺癌の同分画には活性は見られない。アガロース電気泳動とウェスタンブロッティングにより胃腺癌の $\beta_2$ 位の分画には59Kの抗原分子の存在が見られたが、他の癌にはこの分子はまだみつからない。以上の結果から、胃腺癌には高度に局限している抗原分子が存在すると一応結論できる。この抗原はその分布から見ても既知の胃癌関連抗原<sup>1)~5)</sup>とは異なっており、また、この抗原が抗CEA抗血清、抗NCA抗血清とは反応せず、 $\beta_2$ 位の泳動度を示すことからCEA、NCA、 $\alpha$ -フェトプロテインと異なることも明らかである。

しかし、以上の成績はいずれもポリクローナルの異種抗血清を使用して得られたものであって、この抗原分子が真に胃腺癌特異抗原であるか、また、どのような遺伝子支配を受けるかを明らかにするためには当然モノクローナル抗体の作製が必須の条件になる。標的抗原が明らかになると、それに対するモノクローナル抗体の作製はそう困難なことではなく、その努力は既

に始められている。

### 結 論

ヒト胃腺癌の不溶性分画をデオキシコール酸塩で可溶化したのち、セファロース4Bカラムでゲル濾過を行って低分子ピーク(SP)をとり、混在するアルブミンを除去したものを免疫抗原として異種抗血清を作製した。この抗血清を使用したELISAを測定系として免疫学的分析を行って以下の結論をえた。

1. 胃腺癌(手術材料)及び胃腺癌培養株(MKN-28)のSPについてHPLCによるゲル濾過を行い、抗胃腺癌抗血清 $\alpha$ SC5によりELISAを行うと36~40分の溶出液に活性ピーク(P2)が認められた。P2は正常胃その他の成人正常臓器や6ヵ月胎児の胃腸には認められなかったが、胆嚢癌(肝転移巣)や膀胱については小さなものが見られた。

2. アガロースゲル電気泳動によると胃腺癌のP2分画は $\beta_2$ 泳動度を示し、正常成人及び胎児臓器のP2域の溶出液はすべてアルブミン $\sim\beta_1$ 泳動度、胆嚢癌は $\alpha_1$ 泳動度のピークを示し、肺腺癌、膀胱癌、乳癌、平滑筋肉腫は $\beta_1$ 泳動度の小ピークを示した。平滑筋肉腫は吸収実験により胃腺癌との差が示された。

3. SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングを行うと胃腺癌の $\beta_2$ 泳動位の溶出分画に抗胃腺癌抗血清 $\alpha$ SC5にプロットされる51K、59K、66Kの抗原分子が認められた。しかし抗他種癌(肺腺癌、膀胱癌、乳癌)各抗血清によっては59Kの分子がプロットされなかった。

4. 胃腺癌 $\beta_2$ 位の溶出分画は胃腺癌患者血清によるH-LAI試験において陽性indexを示した。

### 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲をいただきました金沢大学がん研究所病態生理部、倉田自章教授並びに御指導と御助言を戴いた岡田収司助教授、佐藤信生博士、北京生物製品研究所、程明先生および教室の方々に厚く御礼申し上げます。なお貴重な材料を御分与下さった金沢大学医学部第一病理学教室、第一外科学教室、新潟大学病理、鈴木利光博士に深謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Itakura, K.: Studies on human cancer antigens by gel diffusion method. Gann, 54, 93-104 (1963).
- 2) 荒川 弥: 胃癌の免疫学的解析, 癌化における組織糖蛋白の変化について. 十全医会誌, 70, 354-364 (1964).
- 3) 平井秀松, 多賀弘子, 中村浩一, 吉原忠男, 原 親



男, 篠原将郎: 胃癌および Rhabdomyosarcoma の特異抗原の証明. 最新医学, 19, 499-505 (1964).

4) Kimoto, E., Kuranari, T., Masuda, H. & Takeuchi, M.: Isolation and characterization of a glycopeptide from mucinous carcinoma of human stomach. *J. Biochem.*, **63**, 542-549 (1968).

5) Häkkinen, I., Järvi, O. & Grönroos, J.: Sulphoglycoprotein antigens in the human alimentary canal and gastric cancer. An immunohistological study. *Int. J. Cancer*, **3**, 572-581 (1968).

6) Häkkinen, I., Korhonen, L. K. & Saxén, L.: The time of appearance and distribution of sulphoglycoprotein antigens in the human foetal alimentary canal. *Int. J. Cancer*, **3**, 582-592 (1968).

7) De Boer, W. G. R. M., Forsyth, A. & Nairn, R. C.: Gastric antigens in health and disease. Behaviour in early development, senescence, metaplasia, and cancer. *Br. Med.J.*, **3**, 93-94 (1969).

8) Deutsch, E., Appfel, C. A., Mori, H. & Walker, J. E.: A tumor-associated antigen in gastric cancer secretions. *Cancer Res.*, **33**, 112-116 (1973).

9) Kawasaki, H. & Kimoto, E.: Mucosal glycoproteins in carcinoma cells of gastrointestinal tract, as detected by immunofluorescence technique. *Acta. Path. Jap.*, **24**, 481-494 (1974).

10) Vuento, M., Engvall, E., Seppälä, M. & Ruoslahti, E.: Isolation from human gastric juice of an antigen closely related to the carcinoembryonic antigen. *Int. J. Cancer*, **18**, 156-160 (1976).

11) Bara, J., Paul-Gardais, A., Loisillier, F. & Burtin, P.: Isolation of a sulfated glycopeptidic antigen from human gastric tumors: its localization in normal and cancerous gastrointestinal tissues. *Int. J. Cancer*, **21**, 133-139 (1978).

12) Bara, J., Loisillier, F. & Burtin, P.: Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human colonic tumours. *Br. J. Cancer*, **41**, 209-221. (1980)

13) Sekine, T., Hirohashi, S., Kitaoka, H., Hirota, T. & Sugimura, T.: A monoclonal antibody reactive with gastric carcinoma. *Gann*, **75**, 106-108 (1984).

14) Atkinson, B. F., Ernst, C. S., Herlyn, M., Steplewski, Z., Sears, H. F. & Koprowski, H.: Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res.*, **42**, 4820-4823 (1982).

15) Togashi, H., Terasaki, P. I., Chia, D., Kukes, G., Mugishima, H., Kasai, K., Suyama, N., Fukushima, K. & Hirota, M.: A monoclonal antibody, CSTO-1, against a stomach adenocarcinoma-associated antigen. *Cancer Res.*, **44**, 3952-3956 (1984).

16) Yachi, A., Imai, K., Moriya, Y., Fujita, H., Tanda, M. & Kawaharada, M.: Monoclonal antibodies against human gastric carcinomas. *Protides Biol. Fluids*, **30**, 369-373 (1983).

17) 程 明: ヒト胃癌高度関連抗原とその精製. 十全医会誌, **90**, 669-675 (1983).

18) 三好俊策: 部分精製抗原を用いた白血球粘着阻止 (LAI) 試験による胃癌患者の抗腫瘍免疫反応. 十全医会誌, **94**, 457-465 (1985).

19) 北条晴人: ヒト胃癌細胞培養株の樹立とその形態学的特性. 新潟医学会雑誌, **91**, 737-752 (1977).

20) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. II. On the salivary gland characteristic antigens. *Int. Arch. Allergy*, **35**, 392-401 (1969).

21) Okada, S., Kurata, Y., Konishi, K. & Matsuda, T.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. III. Characterization of the lipoprotein-bound thyroid gland-specific antigen. *Int. Arch. Allergy*, **39**, 6-15 (1970).

22) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. *Eur. J. Cancer*, **15**, 1085-1093 (1979).

23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

24) Burnette, W. N.: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203 (1981).

25) Sanner, T., Kotlar, H. K. & Eker, P.: Measurement of humoral anti-tumour immune responses by a modified leucocyte adherence inhibition assay. p179-186. *In* K. Letnansky (ed.), *Biology of the cancer Cell*, Kugler Pub., Amsterdam, 1980.

26) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & OoKawa, M.: Demonstration and preliminary

characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **16**, 1451-1458 (1980).

27) Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y. & Okada, S.: Extraction and preliminary characterization of tumor antigens in human bronchogenic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur. J.*

*Cancer*, **16**, 781-792 (1980).

28) 森下保子: ヒト甲状腺癌に高度に関連する抗原. 十全医会誌, **92**, 199-207 (1983).

29) 平井 洋: ヒト B細胞型悪性リンパ腫に高度に関連する抗原. 十全医会誌, **92**, 296-304 (1983).

30) 冨田哲夫: ヒト卵巣ムチン性嚢胞腺癌の特異抗原. 十全医会誌, **93**, 417-426 (1984).

**Analysis of an Antigen Highly Associated with Human Gastric Adenocarcinoma by Xenotiser** Makoto Seki, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 – *J. Juzen Med. Soc.*, **95**, 19–27 (1986)

**Key words:** gastric cancer, tumor antigen

#### Abstract

Identification of the tumor-specific antigen as an entity will be a major problem in tumor immunology. In studies concerning human gastric carcinoma, a number of antigens have been detected, but antigens specific to or highly associated with tumors have not yet been found. The insoluble fraction of gastric adenocarcinoma was solubilized by the aid of deoxycholate. Then the solubilized protein (SP) was passed through a column of Sepharose 4B. The contaminated serum albumin was removed with Blue Sepharose CL-6B by batch procedure. This fraction was used to raise hyperimmune antisera in Guinea pigs. A potent antiserum  $\alpha$ SC5 was selected. Then  $\alpha$ SC5 was absorbed extensively with human whole serum. The absorbed  $\alpha$ SC5 was used throughout the experiments for ELISA and immune blotting. The SPs from gastric adenocarcinomas and a gastric adenocarcinoma cell line MKN-28 treated with Blue Sepharose CL-6B by batch procedure were analyzed on HPLC and ELISA with  $\alpha$ SC5, showing an active peak (P2) eluting close at the albumin position's tail. The SPs from normal adult organs, a fetal stomach, and a fetal gut showed no P2 activity. Agarose gel electrophoresis showed that the P2 components from gastric adenocarcinomas and MKN-28 have  $\beta_2$ -mobilities while the components at the P2 region of normal adult and fetal organs have only albumin $\sim\beta_1$ -mobilities. Western blotting of the  $\beta_2$ -components from gastric adenocarcinomas and MKN-28 showed a putatively tumor-specific 59K band. When examined by a H-LAI test using the eluate from the  $\beta_2$ -region of a gastric adenocarcinoma, positive responses of a serum from a patient with gastric adenocarcinoma and negative responses of a control serum were observed.