

Tumor-Specific Antigen(s) in Human Mucinous Cystadenocarcinoma of the Ovary

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/2297/7730

ヒト卵巣ムチン性嚢胞腺癌の特異抗原

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

富田 哲夫

(昭和59年4月14日受付)

本論文の要旨は日本癌学会第39回 (1980) において発表された。

ヒト卵巣の mucinous cystadenocarcinoma (以下 MCC と略) の不溶性分画をデスオキシコール酸で可溶化した分画を免疫抗原として異種抗血清を作製した。十分な吸収を行った抗血清を使用し、ゲル内二重拡散法で1部の MCC に特異的沈降線の形成を認めた。胎児臓器を含む対照各組織はいずれも沈降線を生じなかった。蛍光抗体法では MCC 細胞とくにその細胞膜が特異的に陽性であった。enzyme-linked immunosorbent assay ではすべての MCC 標品に対照組織より高い活性が認められた。抗原は β_1 -泳動度を持ち、SDS-ポリアクリルアミド・グレジエント・ゲルでは分子量約 65,000 であった。

Key words mucinous cystadenocarcinoma, ovarian cancer
tumor-specific antigen

卵巣癌のような体深部の腫瘍については免疫学的な早期診断法の確立がとくに望まれるが、その可能性はひとえに特異な腫瘍抗原の有無にかかっている。卵巣嚢胞腺癌のマーカー抗原の研究は1970年代に活発に行われ、幾つかの腫瘍抗原が見いだされたが、それらは漿液性嚢胞腺癌 (serous cystadenocarcinoma, 以下 SCC と略) についてのみの分析^{1,2)}や SCC とムチン性嚢胞腺癌 (mucinous cystadenocarcinoma, 以下 MCC と略) を区別せずに行った抗原分析³⁻⁵⁾がかなり多く、両者を区別した分析でも大部分は特異性の低い抗原の存在を見いだしているのみである⁶⁻⁹⁾。わずかに Chow¹⁰⁾ は MCC 特異と思われる抗原の存在をゲル内拡散法で示しているが、抗原の性質や胎児分布については触れるに至らなかった。1980年代に入り、Bhattacharya ら¹¹⁾ が MCC のホモジネートを抗原としてモノクロナール抗体の作製に成功し、SCC と無関係な MCC 抗原の存在を明らかにしている。しかしその抗原は胎児腸にも存在の示される oncofetal な抗原であった。

著者は MCC の不溶蛋白部分を可溶化して得た分画を免疫抗原として異種抗血清を作製し、ゲル内拡散法、免疫蛍光法、enzyme-linked immunosorbent assay

(以下 ELISA と略) によって抗原分析を行い、MCC 特異と思われる抗原の存在を示し、抗原の二・三の性状を明らかにしたのでここに報告する。

材料および方法

1. 材 料

MCC 7例と対照の卵巣腫瘍 (SCC 9例その他) はすべて手術時に、卵巣以外の腫瘍は主として剖検時に、一部は手術時に得られた。正常臓器は数例の非癌患者から死後8時間以内の剖検に際して入手し、胎児臓器は4~6ヵ月胎児3例から得た。これらの組織は使用時まで -30°C に保存した。なお、組織の小片は包埋剤 Tissue Tek II, O. C. T. Compound (Division Miles Inc., USA) に封入して -40°C に保存し、蛍光抗体法に使用した。腫瘍材料はすべて一部からホルマリン固定、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、病理診断を確認した。

2. 粗抗原分画の作製

凍結保存組織を融解し、Smith ら¹²⁾の方法の変法¹³⁻¹⁵⁾により不溶性蛋白分画を抽出した。この不溶分画に5倍容量の0.2%デスオキシコール酸ナトリウム液 (sodium desoxycholate, 以下 DOC と略) を加え

Tumor-Specific Antigen(s) in Human Mucinous Cystadenocarcinoma of the Ovary.
Tetsuo Tomita, Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

てホモジナイズし、マグネティック・スターラーを使用して48時間4～8°Cで攪拌後、10,000×g 30分冷却遠心して上清を得た。沈渣について0.2%DOCによる抽出操作を更に2回行った。抽出3回の上清にはそれぞれ10倍容量の冷アセトンを加えて1夜以上-20°Cにおき、生じた沈澱を低速遠心により集めた。沈澱を合せて少量の蒸留水に溶かし、3,000×g 5分遠心後の上清をSephrose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)のカラムに負荷し、蒸留水または0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)で溶出すると小さなpass分画のピークとretainする低分子分画の主ピークが現れる。pass分画のピークはDOCによる第1回抽出液では痕跡かあるいは欠如する。低分子分画の主ピーク("Pfr2"と呼ぶ)をプールしてセロファンチューブに入れ、冷室内で扇風機にかけて濃縮し、用時まで-20°Cに保存した。蛋白定量はLowry法¹⁶⁾によった。

別に抗原として組織の20% (W/V) 生理食塩水ホモジネートあるいは25% (W/V) 0.01 M リン酸緩衝液・食塩水 pH 7.2 (phosphate-buffered saline, 以下 PBS と略) ホモジネートも作製し、使用時まで-20°Cに保存した。

3. 部分精製抗原分画の作製

下記の家兎抗血清 IgG 分画を BrCN-activated Sepharose 4B (Pharmacia) にメーカー記載の方法に従って結合させ、エタノールアミン処理・洗浄後 1.5×10 cm のカラムにつめ、MCC の Pfr2 (蛋白量 5 mg) を負荷し、0.1 M 重碳酸ナトリウム液で溶出し、波長 280 nm の吸収ピークを集めて濃縮した。すべての操作は 4～8°C で行った。家兎抗血清は以下の4種の抗原液を 1 ml の Freund's complete adjuvant (以下, FCA) で乳化してそれぞれ別の成熟家兎の肩甲骨下腔に 0, 7, 14, 28 日目の4回注射し、最終注射の1週後に全採血して4種類作製した。(1)正常卵巣ホモジネート 1 ml, (2)肝ホモジネート 0.5 ml, 腎ホモジネート 0.5 ml, (3)肺ホモジネート 0.5 ml, 脾ホモジネート 0.5 ml, (4)正常ヒト血清 1 ml. ホモジネートはいずれも 20% (W/V) 生理食塩水ホモジネートを使用した。抗血清は-20°Cに保存し、用時4種の抗血清を等量混合したものから硫酸アンモニウム 50%飽和により IgG 分画を得た。

4. 抗血清の作製

体重約 400 g のモルモット 9 匹に MCC 3 例, SCC 6 例の Pfr2 標品各 1 ml (5 mg 蛋白) を FCA 1 ml で乳化して肩甲骨下腔に注射した。0, 7, 14, 28 日目に注射を行い、35 日目に心採血し、抗 MCC 抗血清 3 種, 対照の抗 SCC 抗血清 6 種を作製した。抗血清は少量ずつ分割して-20°Cに保存し、凍結・融解を繰返すこと

は極力避けた。

ゲル内拡散用にはモルモット抗血清 1 ml につき正常ヒト血清 0.5 ml, 卵巣, 肝, 脾, 肺, 胃粘膜, 大腸粘膜, 胎児肝の 20% (W/V) 生理食塩水ホモジネート各 0.5 ml 及び大腸癌の 20% (W/V) 生理食塩水ホモジネート 1 ml を加えて室温に1時間置き、ついで 4～8°C で1晩低速回転し、10,000×g 20分冷却遠心後、上清を Minicon B-15 (Amicon Corporation, USA) により 1 ml に濃縮して使用した。

蛍光抗体法用には抗血清 0.1 ml に正常ヒト血清 0.2 ml, 卵巣と大腸癌の 25% (W/V) PBS ホモジネートを各 0.2 ml, 胎児腸の 25% (W/V) PBS ホモジネート 0.3 ml を加え、室温1時間、冷室での回転1夜後遠心して上清をとり、PBS を加えて 1.6 ml (最終濃度 1:16) あるいは 3.2 ml (最終濃度 1:32) として使用した。

ELISA 用には抗 MCC 抗血清 0.01 ml につき正常ヒト血清 7.5 ml, ヒト血清凍結乾燥品 200 mg, 卵巣 25% (W/V) PBS ホモジネート 1 ml, 胎児腸 25% ホモジネート 2 ml, 粗 CEA 標品 4 mg (CEA として 130 μg), SCC の Pfr2 標品 3 mg を加え、上記同様の操作で吸収を行い、最終上清に等量の 0.2 M 酢酸ナトリウム液を加えて室温 30 分放置後 10,000×g 30 分冷却遠心し、その上清を PBS で透析後、PBS で 10 ml (最終濃度 1:1000) として使用した。なお、粗 CEA 標品は大腸癌の剖検材料から Krupey ら¹⁷⁾の方法により抽出した。

5. 免疫学的検査法

ゲル内二重拡散法 (Ouchterlony 法) には厚さ 1.5～2.0 mm の寒天層に直径 3 mm, 間隔 3 mm または直径 3 mm, 間隔 4 mm の抗原・抗体孔を作製した。抗原標品の蛋白濃度は 3 mg/ml とした。湿潤状態で 4～8°C におき 1 週間観察した。免疫電気泳動には厚さ 1～1.5 mm の Agarose HE (FMC Corporation, Marine Colloids Inc., USA) 層に作った抗原孔に MCC Pfr2 を加えて 20 mA (定電流) で約 2 時間電気泳動後、抗原孔より 4 mm 離れた槽 (幅 1.5 mm) を作製して吸収抗 MCC 抗血清を入れ、4～8°C で反応させた。

蛍光抗体法は未固定 cryostat 切片について間接法を行った。終濃度 1:16 または 1:32 の吸収抗血清を室温 1 時間、FITC 標識抗モルモット IgG (家兎) (Behringwerke AG, Germany) の 1:25 稀釈を室温 30 分反応させた。観察・撮影は Olympus 落射蛍光顕微鏡 BH-RFL-B によった。

ELISA は Voller ら¹⁸⁾の操作の小変法¹⁹⁾に従って行った。2次抗体にはパーオキシダーゼ標識抗モル

モット IgG アフィニティー精製抗体〔山羊〕(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., USA) を使用し、o-phenylenediamine による反応を室温 15 分とし直ちに EIA Reader EL307 (Bio-Tek Instruments Inc., USA) により比色定量を行った。

6. 物理化学的分析

分析用ディスク電気泳動は 7.5% ポリアクリルアミドゲルカラム (分離ゲル pH 8.9, 重層ゲル pH 6.7) を使用し、トリス・グリシン緩衝液 pH 8.3 を溶媒とし、

泳動は 4 mA/tube で約 75 分間行った。泳動後のゲルカラムにつき以下の操作を行った。(1) Coomassie brilliant blue R-250 による染色。(2) ゲルを agarose HE (FMC Corp.) の薄層に作った槽内におき、免疫電気泳動の場合と同様に 4 mm 離れた平行槽を作って吸収抗血清を入れ、湿潤状態で 4 ~ 8 °C 1 週間反応。(3) ゲルを 2 mm 間隔で横断し、各スライスを 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) の 0.3 ml で抽出し、各抽出液につき ELISA による抗原活性の測定。

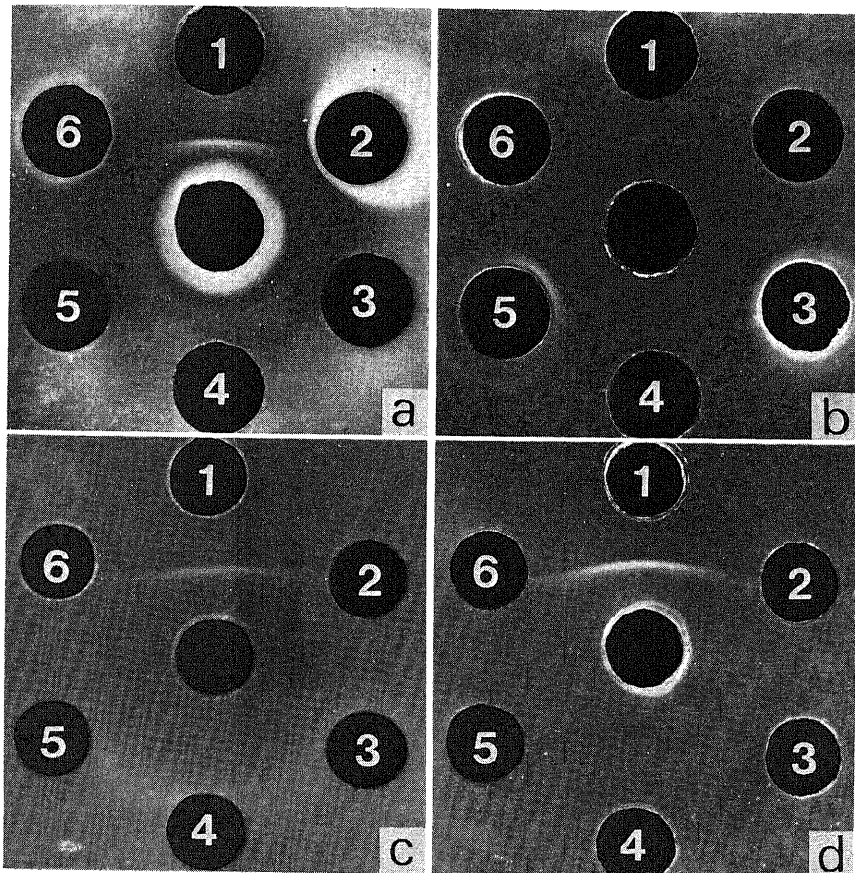


Fig. 1. Examples of immunodiffusion patterns of absorbed antiserum to ovarian mucinous cystadenocarcinoma (MCC) extract in center wells against MCC extract and various control samples.

- (a) 1, MCC extract; 2, normal human serum; 3, liver extract; 4, spleen extract; 5, lung extract; 6, ovary extract.
 (b) 1, MCC extract; 2, fetal lung homogenate; 3, fetal liver homogenate; 4, fetal spleen homogenate; 5, fetal stomach homogenate; 6, fetal intestine homogenate.
 (c) 1, MCC extract; 2, Krukenberg tumor extract; 3, granulosa cell tumor extract; 4, ovarian mucinous cystadenoma extract; 5, embryonal carcinoma extract; 6, ovarian serous cystadenocarcinoma extract.
 (d) 1, MCC extract; 2, colon cancer extract; 3, gastric cancer extract; 4, uterine cervical cancer extract; 5, renal cell carcinoma extract; 6, lung adenocarcinoma extract.

Polyacrylamide gradient gel PAA 4/30 (Pharmacia) を使用し, MCC の部分精製抗原分画を泳動して分子量の測定を行った. 分子量マーカーには cytochrome 系の MW-Marker Proteins (オリエンタル酵母工業) を使用した.

酵素による抗原分解試験を以下のように行った. MCC Pfr2 (50 μ g 蛋白/ml) を ELISA 用プレートのウェルあたり 50 μ l 加えて pH 9.6, 37°C 2 時間吸着させた. ウェル内液をすて, (1) PBS, (2) trypsin (Type III, Sigma) 5 μ g を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, (3) phospholipase D (Type III, Sigma) 25 μ g を含む 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.0, (4) neuraminidase (Type V, Sigma) 50 μ g を含む 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液, pH 5.3, をウェルに 50 μ l 加えて 37°C 2 時間おき, 洗浄後 ELISA により各ウェルの抗原活性を測定した.

成 績

1. ゲル内拡散法の成績

未吸収抗 MCC Pfr2 抗血清は MCC Pfr2 に限らず 対照各組織の Pfr2 あるいはホモジネートに対して多数の沈降線を生じる. そこで既述の吸収を加えた抗血清を使用すると MCC Pfr2 または 25% (W/V) ホモジネートとの間とのみ 1 本の沈降線を生じ, 正常各組織の Pfr2 またはホモジネート, 胎児臓器ホモジネート並びに他腫瘍の Pfr2 またはホモジネートに対しては沈降線を生じなかった (図 1). 7 例の MCC Pfr2 標品中 4 例が特異沈降線を生じたが, 対照の成人臓器, 胎児臓器あるいは他種の卵巣癌, 他臓器癌は 1 例も沈降線を生じなかった (表 1). 一方, 同様な吸収を行った 6 種の抗 SCC Pfr2 抗血清はすべての MCC Pfr2 標品に対して沈降線を生じなかった. なお, MCC Pfr2

Table 1. The distribution of ovarian mucinous cystadenocarcinoma (MCC)-specific antigens by gel diffusion

Tissue extract	No. tested	No. positive	Tissue extract	No. tested	No. positive
Normal adult organs*			Ovarian neoplasms*		
Liver	5	0	MCC	7	4
Lung	5	0	SCC***	9	0
Spleen	5	0	Embryonal carcinoma	3	0
Kidney	5	0	Krukenberg tumor	4	0
Stomach	5	0	Mucinous cystadenoma	3	0
Large intestine	5	0	Granulosa cell tumor	3	0
Small intestine	5	0	Other neoplasms*		
Ovary	10	0	Gastric cancer	5	0
Pancreas	3	0	Colon cancer	4	0
Adrenal	3	0	Renal cell carcinoma	4	0
Thyroid	3	0	Breast cancer	2	0
Heart	2	0	Lung adenocarcinoma	2	0
Serum	10	0	Cervical cancer	1	0
Fetal organs**			Hepatoma	1	0
Liver	3	0	Pancreatic cancer	1	0
Lung	3	0	Prostatic cancer	1	0
Spleen	3	0	Seminoma	1	0
Kidney	3	0	Wilms' tumor	1	0
Stomach	3	0	Rhabdomyosarcoma	1	0
Intestine	3	0	Leiomyosarcoma	1	0
Cerebrum	2	0	Malignant lymphoma	1	0
Adrenal	2	0	Chondrosarcoma	1	0
Heart	2	0			

* The low-molecular-weight fraction (termed Pfr 2) of the desoxycholate-solubilized extract prepared from the insoluble fraction of each tissue (3 mg protein/ml).

** 20% (W/V) homogenate in saline.

*** Serous cystadenocarcinoma.

は抗ヒトアルブミン、抗ヒトフィブリノーゲン（以上 MBL Ltd, 名古屋）抗ヒト α_1 -アンチトリプシン、抗ヒトIgG（以上 DAKO immunoglobulins Ltd., Denmark）抗血清とは沈降線を生じるが、抗 α_1 -フェト蛋白（DAKO）や抗 β_2 -ミクログロブリン（生化学工業、東京）とは反応せず、他のヒト正常血清蛋白に対する市販の抗血清とも沈降線を生じたことはなかった。

免疫電気泳動では MCC 特異と思われるアークは β_2 グロブリン位に生じた（図 2）。

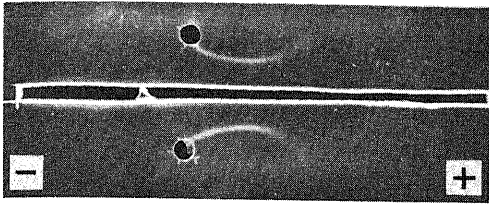


Fig. 2. Immunoelectrophoresis: MCC extract, developed with absorbed antiserum to MCC extract.

2. 蛍光抗体法の成績

蛍光抗体法用の吸収を行った抗 MCC Pfr2 抗血清（終濃度 1:16 または 1:32）を使用し、間接法で MCC の未固定切片を染色すると MCC 細胞とくにその細胞膜が陽性染色を示した（図 3 a）、卵巣（図 3 b）、心、肝、脾、膵、腎、胃、甲状腺、筋肉、胎児腸（図 3 c）は陽性染色を示さず、SCC（図 3 d）、子宮頸部扁平上皮癌、絨毛上皮癌、胃腺癌、肝癌、腎細胞癌の切片はいずれも陰性であった。なお、吸収抗 MCC Pfr2 抗血清（1:16）0.1 ml を子宮頸部扁平上皮癌あるいは Krukenberg 腫瘍の Pfr2 の 4 mg 蛋白で吸収し、0.1 ml に濃縮したものでは依然として MCC 細胞は陽性染色を示したが、MCC Pfr2 による同様な吸収では MCC の染色性は失われた。

3. ELISA の成績

MCC Pfr2 および対照材料の各濃度について、ELISA 用の吸収を行った抗 MCC Pfr2 抗血清（終濃度 1:1000）により測定を行い、図 4 のような dose

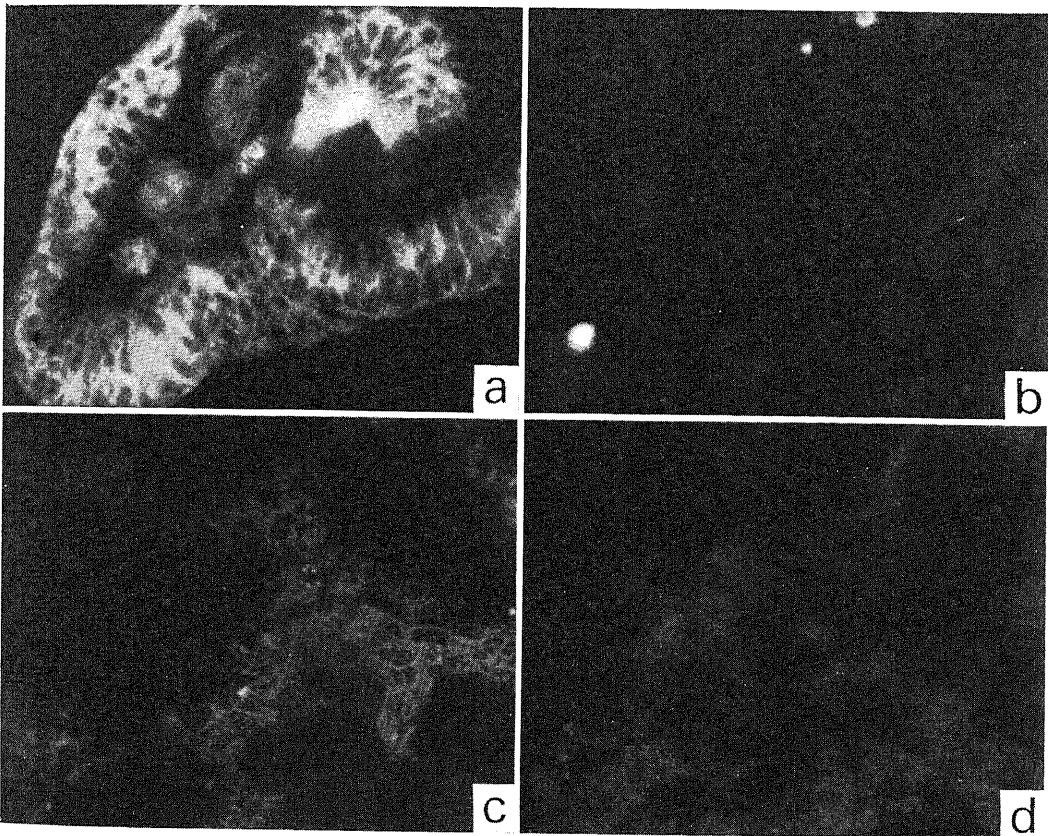


Fig. 3. Immunofluorescence of absorbed antiserum to MCC extract on section of MCC (a), normal ovary (b), fetal intestine (c), and ovarian serous cystadenocarcinoma (d).

response curve を得た。徹底的な吸収を行っているため有効抗体量も低下し、測定感度は ELISA としては著しく低くなるが、MCC Pfr2 では $2.5 \mu\text{g/ml}$ からカーブの立上がりが見られ、対照の SCC Pfr2, 卵巣 Pfr2 は $100 \mu\text{g/ml}$ でも活性は見られない。

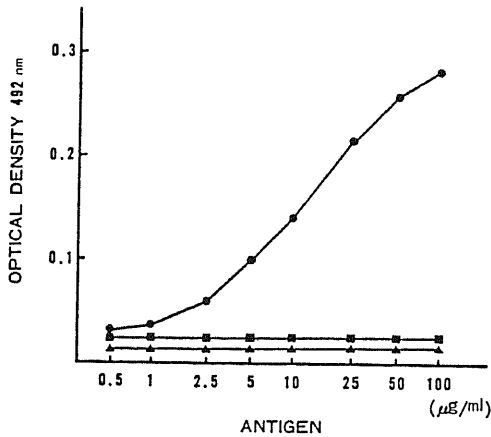


Fig. 4. Dose response curves obtained enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with absorbed antiserum to MCC extract. (●), MCC; (■), ovarian serous cystadenocarcinoma; (▲), normal ovary.

ついで $50 \mu\text{g/ml}$ の各資料について測定を行った。表 2 のように 7 種の MCC Pfr2 では O.D. 492 nm が $0.15 \sim 0.29$ であったのに対し、肝、脾、肺、腎、心、胃粘膜、大脳の Pfr2 標品は $0.01 \sim 0.05$ であった。胎児臓器の場合 Pfr2 標品の作製は困難だから、 $50 \mu\text{g/ml}$ の PBS ホモジネートについて同様の測定を行った。肝、肺、胃、腸は $0.04 \sim 0.05$ の吸光度を示した。なお、MCC の $50 \mu\text{g/ml}$ PBS ホモジネートは MCC Pfr2 標品に近い吸光度を示した。Upper normal cut-off point を吸光度 0.06 として他種癌の Pfr2 について測定を行ってみると、SCC, 肺腺癌, 肺扁平上皮癌, 肺小細胞癌, 胃腺癌, 乳癌, 腎細胞癌, 前立腺癌, Krukenberg 腫瘍の各 1 例の Pfr2 はいずれもそれ以下であった。なお、CEA 標品 ($130 \mu\text{g/ml}$) の吸光度も 0.02 以下であった。

4. 物理化学的分析の成績

MCC の部分精製標品についてディスク電気泳動を行うと図 5 a のように 5~6 本のバンドが認められたが、最も強く染まるバンドは $R_f=0.8$ の位置にあり、カラムのゲル内埋込みによる吸収抗血清との二重拡散を行うとそのバンドに一致する沈降線が生じた (図 5 b)。なお、泳動後のカラムを切出し、抽出した分画について ELISA を行った結果も $R_f=0.8$ の領域に活性のピークが認められた (図 6)。

Table 2. The distribution of MCC-specific antigens by ELISA

Tissue extract	O.D. 492 nm*	Tissue extract	O.D. 492 nm*
Normal adult organs**		Neoplasms**	
Liver	0.05	MCC-1	0.16
Lung	0.04	MCC-2	0.20
Spleen	0.05	MCC-3	0.22
Kidney	0.01	MCC-4	0.15
Stomach	0.05	MCC-5	0.21
Ovary	0.01	MCC-6	0.15
Pancreas	0.05	MCC-7	0.29
Heart	0.04	SCC	0.05
Cerebrum	0.02	Lung adenocarcinoma	0.05
Serum	0.04	Lung squamous cell carcinoma	0.05
Fetal organs***		Lung small cell carcinoma	0.04
Liver	0.05	Gastric cancer	0.01
Lung	0.05	Krukenberg tumor	0.04
Stomach	0.04	Breast cancer	0.04
Intestine	0.05	Renal cell carcinoma	0.06
		Prostatic cancer	0.02
		CEA (purity = 3.25%)	0.02

* optical density with 492 nm.

** Pfr 2 ($50 \mu\text{g}$ protein/ml).

*** 25% (W/V) homogenate in phosphate-buffered saline.

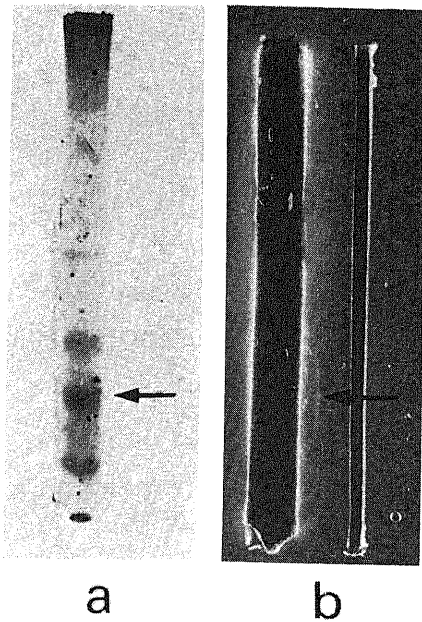


Fig. 5. Polyacrylamide disc gel (7.5%) analysis of a partially purified MCC antigen preparation. Duplicate gels were subjected to electrophoresis at 4 mA/tube for 75 min.; one was subjected to immunoprecipitation and the other was stained with Coomassie blue. The cathode is uppermost. The stained gel demonstrated several bands. A band ($R_f=0.8$, indicated by arrow) was identified as MCC antigen by immunoprecipitation.

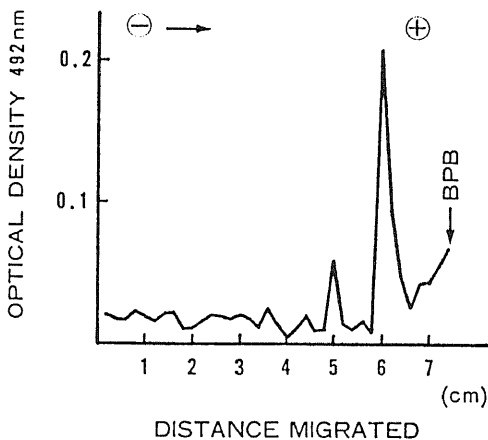


Fig. 6. Electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gel of a partially purified MCC antigen preparation. The gel was cut off at intervals of 2 mm, and the antigenic activity of the extract from each slice was assayed by ELISA with absorbed antiserum to MCC extract. BPB, bromphenol blue.

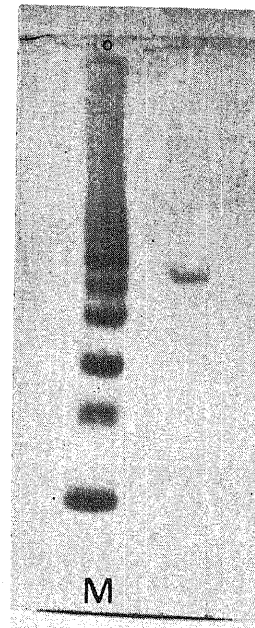


Fig. 7. Pattern on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of a purified MCC antigen (right column). Polyacrylamide gradient gels PAA 4/30 were used. For comparison, monomer and polymers of cytochrome C were also subjected to electrophoresis (M).

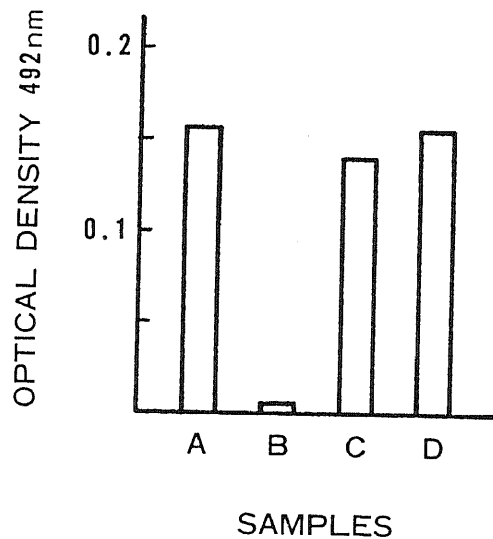


Fig. 8. Enzymatic degradation test of MCC antigen by ELISA. The antigenic activity was lost by trypsin but not influenced by phospholipase D and neuraminidase. Sample A, no enzyme; B, trypsin; C, phospholipase D; D, neuraminidase.

部分精製抗原標品をディスク電気泳動にかけ、 $R_f = 0.8$ 領域を切出して抽出したものについて polyacrylamide gradient gel による SDS 存在下の電気泳動を行うと、チトクローム 5 倍体と 6 倍体の間にバンドを認め (図 7)、その分子量は約 65,000 と計算された。

MCC Pfr2 をウェルに吸着させ、酵素処理を行った後 ELISA を行うと図 8 のような結果が得られた。この抗原活性が trypsin sensitive で phospholipase D や neuraminidase 処理に抵抗することが示されている。trypsin 処理後大豆トリプシンインヒビター (1 mg/ml) 50 μ l を加え、37°C 30 分処理後に ELISA を行っても結果に差はなかった。

考 察

ゲル内拡散法、蛍光抗体法、ELISA による以上の成績からヒト MCC には β_2 -泳動度をもつ分子量約 65,000 の特異な抗原が存在すると考えられる。同抗原は正常成人臓器にも胎児臓器にも存在が認められないし、SCC を含む他の卵巣腫瘍や子宮頸部癌を含む他臓器腫瘍にも調べた限りでは存在しないように見える。このような抗原分布はこれまでに MCC に関連して知られている抗原例えば MCC-SCC 共通抗原⁵⁾⁶⁾⁸⁾⁹⁾²⁰⁾、MCC-SCC-子宮頸部癌共通抗原²¹⁾、MCC-SCC-子宮内膜癌共通抗原²²⁾、MCC-SCC-胃共通抗原²³⁾などの分布とは明らかに異なっている。また胎児腸に存在が認められないことから、Bhattacharya ら¹¹⁾のモノクローナル抗体が認識する抗原とも異なっていると思われる。Chow¹⁰⁾の抗原との異同は現在判らない。CEA や α -フェト蛋白とは関係がないし、抗原が抗 β_2 -ミクログロブリン抗血清と反応しないことや分布が MCC に限っていることから組織適合抗原との関連も考え難い。

MCC や SCC は上述のように特異性の低い多くの抗原を含んでおり、その大きさの割には癌細胞が少ないので抗原の精製が難しい。筆者らが部分精製した抗原分画 (Pfr2) は抗原として良く用いられる 3M-KCL 抽出液などと比較すると明らかに混入物が少いけれども、その分画に対する抗血清にはなお不純な抗体が多く生じているので、機能的に単一な特異性を示す抗血清を得るためには更に十分な吸収を行う必要がある。しかし必要で十分な吸収条件の決定は容易でなく、試行錯誤が避けられない。実験初期に行ったゲル内拡散法には、過剰の吸収を行った抗血清を使用したか、それらの吸収の中で真に重要なのは正常血清と卵巣、ついで CEA や SCC Pfr2 などで、他の臓器による吸収は常に必要ではないことが以後の蛍光抗体法や ELISA

の成績から示された。しかし、どの検査方法を用いるにしてもやはり大量の吸収物質による抗血清の吸収が必要で、とくに ELISA のような方法の場合、抗血清の高度吸収が特異抗体の量をも減少させるため、感度の著しい低下をきたした。その点の克服にはモノクローナル抗体の作製がどうしても必要になる。ただしその場合も MCC や SCC のような複雑な抗原組成をもつ材料を抗原に用いると特異性をもった抗体の得られる確率は極めて低いであろう。抗原の一層の精製が今後の重要な課題になる。

結 論

ヒト卵巣癌 MCC から不溶性分画をとり、DOC 処理で可溶化したものを免疫抗原として異種 (モルモット) 抗血清を作製した。抗血清の十分な吸収条件を明らかにした上で、ゲル内拡散法・蛍光抗体法・ELISA を行い、以下の様な成績を得た。

1. ゲル内二重拡散法で MCC 4 例が特異な沈降線を生じた。対照の正常成人臓器、胎児臓器、SCC を含む他種卵巣腫瘍、他臓器腫瘍はすべて沈降線を生じなかった。
2. 蛍光抗体法で MCC の細胞とくにその細胞膜の陽性染色を認めた。対照組織 (胃粘膜、胎児腸、SCC、子宮頸癌を含む) はいずれも陰性であった。
3. 高度吸収抗血清を使用するため感度は低下するが、ELISA により MCC 特異な抗原の分布を測定出来た。MCC 標品 7 例はいずれも対照組織より高い活性を示した。
4. 抗原は β_2 位の泳動度を持ち、分子量は約 65,000 で、トリプシン感受性を示した。

この抗原の臨床応用には抗原の一層の精製と精製標品によるモノクローナル抗体の作製が努力されなければならない。

稿を終るにあたり、御指導・御校閲を賜った倉田自章教授、本研究の機会をお与え下さった金沢医科大学産婦人科桑原惣隆教授に深甚なる謝意を表します。また終始御指導・御教示を頂いた岡田収司助教授ならびに御協力を頂いた病態生理部教室員各位に心から感謝致します。

文 献

- 1) Levi, M. M.: Antigenicity of ovarian and cervical malignancies with a view toward possible immunodiagnosis. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 109, 689-698 (1971).
- 2) Bhattacharya, M. & Barlow, J. J.: Immunologic studies of human serous cystadenocarcinoma of ovary. *Cancer*, 31, 588-595 (1973).

- 3) Dorsett, B. H. & Ioachim, H. L.: Common antigenic component in ovarian carcinomas: Demonstration by double diffusion and immunofluorescence techniques. *Immun. Communications*, **2**, 173-184 (1973).
- 4) Kitschka, H. J., Krebs, D. & Kleinhaus, V.: Purification of tumor-specific antigens from human ovarian cancers. p301-304. In A. Centaro & N. Carretti (ed.), *Immunology in obstetrics and gynecology*, Excerpta Medica, Amer. Elsevier Pub. Co., New York, 1974.
- 5) Gerber, M. A., Faiferman, I., Cohen, C. J. & Koffler, D.: Studies on xenogenic antisera to tumor-associated antigen of ovarian carcinoma. *Clin. Imm. Immunopath.*, **8**, 171-180 (1977).
- 6) Chen, S., Koffler, D. & Cohen, C. J.: Cell-mediated immunity in patients with ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **115**, 467-470 (1973).
- 7) Knauf, S. & Urbach, G. I.: Ovarian tumor-specific antigens. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **119**, 966-970 (1974).
- 8) Chatterjee, M., Barlow, J. J., Allen, H. J., Chung, W. S. & Piver, M. S.: Lymphocyte response to autologous tumor antigen(s) and phytohemagglutinin in ovarian cancer patients. *Cancer*, **36**, 956-962 (1975).
- 9) Bhattacharya, M. & Barlow, J. J.: Tumor-specific antigens associated with human ovarian cystadenocarcinoma. p277-295. In H. Waters(ed.), *The Handbook of Cancer Immunology*, Vol. 4, Garland STPM Press, New York, 1978.
- 10) Chow, S., Chiang, W. & Wei, P.: Detection of tumor-specific antigens in human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary by immunodiffusion. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **14**, 280-284 (1976).
- 11) Bhattacharya, M., Chatterjee, S. K., Barlow, J. J. & Fuji, H.: Monoclonal antibodies recognizing tumor-associated antigen of human ovarian mucinous cystadenocarcinomas. *Cancer Res.*, **42**, 1650-1654 (1982).
- 12) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins. 1. The insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Research*, **13**, 96-102 (1957).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 17) Krupey, J., Wilson, T., Freedman, S. O. & Gold, P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochimistry*, **9**, 617-622 (1972).
- 18) Voller, A. & Bidwell, D. E.: Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *J. Exp. Path.*, **57**, 243-247 (1976).
- 19) 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).
- 20) Dawson, J. R., Kutteh, W. H., Whitesides, D. B. & Gall, S. A.: Identification of tumor-associated antigens and their purification from cyst fluids of ovarian epithelial neoplasms. *Gynecol. Oncol.*, **10**, 6-17 (1980).
- 21) Gall, S. A.: A review of tumor antigens in gynecologic malignancies. *J. Reprod. Med.*, **14**, 12-16 (1975).
- 22) Knauf, S. & Urbach, G. I.: Identification, purification, and radioimmunoassay of NB/70K, a human ovarian tumor-associated antigen. *Cancer Res.*, **41**, 1351-1357 (1981).
- 23) Dawson, J. R. & Kutteh, W. H.: Cross-reactivity of normal gastric tissue components with ovarian tumor-associated antigens. *Brit. J. Cancer*, **42**, 481-484 (1980).

Tumor-Specific Antigen(s) in Human Mucinous Cystadenocarcinoma of the Ovary Tetsuo Tomita, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., 93, 417–426 (1984)

Key words: Mucinous cystadenocarcinoma, Ovarian cancer, Tumor-specific antigen

Abstract

The insoluble fractions from human mucinous cystadenocarcinomas (MCC) were solubilized by the aid of desoxycholate. The soluble products, after gel filtration, were used to raise antisera in guinea pigs. The thoroughly absorbed antisera were reactive in gel diffusion with fractions of some MCC but not with fractions of control tissues including fetal organs and other types of neoplasms. The absorbed antisera were reactive only with MCCs, in immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. The antigen was shown to have β_1 -like mobility in immunoelectrophoresis and an apparent molecular weight of 65,000 in SDS-polyacrylamide gradient gels.