

ヒト甲状腺癌に高度に関連する抗原

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/2297/9057

ヒト甲状腺癌に高度に関連する抗原

金沢大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科 (主任: 梅田良三教授)

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

森 下 保 子

(昭和58年2月9日受付)

本論文の要旨は第41回日本癌学会 (1982年8月, 大阪) において発表した。

ヒト甲状腺の乳頭状腺癌, 濾胞状腺癌, 未分化癌から抽出した不溶性分画をデオキシコール酸塩で可溶化し, affinity chromatography による reverse immunoabsorption で不純抗原を減らしたものを免疫抗原としモルモットに抗血清を作った。適当な吸収を行った抗血清を用い, 免疫蛍光法で上記の3癌に共通する細胞膜性抗原の存在を認めたが, 胎児甲状腺や正常各臓器, 甲状腺 medullary carcinoma を含む他種の癌には存在が見られなかった。なお, enzyme-linked immunosorbent assay によっても同様な抗原分布が認められた。抗原は β_2 の泳動度を示し, 最小分子量約 63,000, 蛋白部分に活性が有ると推定された。甲状腺癌患者血中に上記抗原レベルのやや高い例があった。

Key words ELISA, human thyroid cancer, immunology, tumor-associated antigen.

結節性の甲状腺腫脹において, 良性腫瘍と癌を鑑別診断することは臨床的に困難な場合が少なくないし, 病理組織学的検査ですら難しい場合がある。そこで甲状腺癌に特異的あるいは高度に関連するマーカーの発見が大いに望まれる。しかし, これまでに傍濾胞細胞由来である medullary carcinoma に高レベルの癌胎児抗原 (carcinoembryonic antigen; CEA) とカルチトニンの存在が知られている¹⁾²⁾ぐらいで, より普遍的な濾胞上皮由来の甲状腺癌のマーカーについては CEA に関するもの³⁾⁴⁾以外に殆んど何も報告されていない。

そこで, 筆者はヒト甲状腺癌組織から不溶性蛋白分画を抽出し, 可溶化して部分精製した分画を用い異種抗血清を作製し, 適当な吸収を行ってから免疫蛍光法と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用い, 濾胞上皮由来の甲状腺癌に高度関連する抗原の存在を示し, その性状の一部を明らかにした。なお, このマーカーを利用した甲状腺癌診断の可能性についても予備的検討を行った。

材料と方法

1. 組 織

ヒト甲状腺の乳頭状腺癌 (thyroid papillary adenocarcinoma, 以下 TPC と略) 10 例, 濾胞状腺癌 (thyroid follicular adenocarcinoma, 以下 TFC と略) 2 例, 未分化癌 (thyroid undifferentiated carcinoma, 以下 TUC と略) 1 例, 良性濾胞状腺腫 (thyroid follicular adenoma, 以下 TFA と略) 8 例の原発巣を, 手術から摘出後 3 時間以内に入手し, -20°C に保存した。大部分の例についてはその際別に小片を瞬間凍結して -80°C に保存するか, O.C.T. Compound (Division Miles Laboratories Inc. Illinois, USA) に封入して -40°C に保存し, 免疫蛍光法の材料とした。

正常臓器は数例の非癌患者の死後 8 時間以内の剖検材料から得た。胎児甲状腺は 6 カ月胎児から得た。他種の癌は死後 8 時間以内の剖検材料から得られた。組

Detection of an Antigen(s) Highly Associated with Human Thyroid Cancer. Yasuko Morishita, Department of Otorhinolaryngology (Director: Prof. R. Umeda), School of Medicine, Kanazawa University and Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

織はいずれも上記と同様に処理、保存した。なお、腫瘍材料はすべて別にフォルマリン固定・パラフィン切片・ヘマトキシリン-エオジン染色標本を作製し、病理組織学的診断を確認した。

2. 抗原の作製

1) 粗抗原液

凍結保存した組織からそれぞれの不溶性リポ蛋白質分画を Kurata, Okada⁹⁾の方法に従って抽出・可溶化した。即ち、ホモジネートを“Solution I”⁹⁾ (0.16 M 塩化カリウム, 0.017 M クエン酸ナトリウム, 0.001 M ヨード酢酸) で作り、ガーゼで濾過後、濾液を 10,000×g 30 分遠心して沈渣 (R) をわけ、上清 (S) は pH 4.3 に補正して 4°C に一夜置いた。R は Sol. I で更に 1 回 “Solution II”⁹⁾ (1 M 塩化カリウム, 0.034 M クエン酸ナトリウム, 0.01 M ヨード酢酸, pH 4.7 に補正) で 8 回 homogenisation と遠心をくり返し、最終沈渣 (“LP”) を得た。S に生じた沈殿も同様に Sol. I で 1 回、Sol. II で 8 回処理し、最終沈渣 (LPi と呼ぶ) を得た。LP と LPi をまぜ、約 4 倍量の 0.2% sodium deoxycholate (以下 DOC と略) を加えてホモジナイズした後 4°C で 48 時間攪拌後、遠心上清をわけ、沈渣を再び 0.2% DOC で 48 時間攪拌した。2 回の抽出上清を合わせて 10 倍容量の冷アセトンに加え、-20°C に 1 夜置いて生じた沈殿 (“LPsol”) を集め、少量の蒸留水に溶かし、以下の操作を行った。

2) 抗原の部分精製

3 種の吸収用家兎抗血清を成熟家兎に作った。(1) ヒト正常甲状腺の LPsol 10 mg を Freund's complete adjuvant (以下 FCA と略) で乳化して 2 週間隔 5 回筋肉注射後 1 週目の抗血清、(2) 正常ヒト血清 1 ml を FCA とともに同様に注射して得た抗血清、(3) ヒト正常肝の 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (以下 PBS と略) による 25% (W/V) ホモジネート 1 ml を FCA とともに同様に注射して得た抗血清。使用時、(1) 2 ml (2) 2 ml (3) 1 ml をまぜ、硫酸アンモニウム 50% 飽和によるグロブリン分画をとり、膨潤させた AH-Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) (乾燥量 1 g) に Cambiaso⁹⁾の方法で結合させた。1.5×2 cm のカラムとし、2 ml (蛋白質量 50 mg 以下) の甲状腺癌 LPsol を通し、溶出されたピークを 2 ml に濃縮して免疫抗原とした。カラムは 3 M チオシアン酸アンモニウムで再生し、4~5 回使用した。抗原量は Lowry¹⁰⁾の方法による蛋白質量で示した。

材料による変動が大きいが、甲状腺癌 10 g (湿量) あたり 10 mg 前後の LPsol, 2 mg 前後の部分精製抗原を得ることが多かった。

3. 抗血清の作製

TPC 約 50 g (湿量, 以下同じ) の 1 例と約 10 g の TPC のプール (2 例の TPC より成る), TFC 1 例 (8 g), TUC 1 例 (10 g) から作製した 4 個の部分精製抗原標品で体重約 400 g のモルモット 4 匹を別々に免疫した。抗原 0.5 ml (蛋白質量 100-500 μg) に等量の FCA を加えて乳化し、背筋内に数箇所分割注射した。1 週間隔で 3 回、2 週おいて 1 回の合計 4 回注射を行い、5 週目に心穿刺によって採血し血清を使用時まで -40°C に保存した。以上の抗血清は抗 TPC 抗血清として ATP-1, ATP-2, 抗 TFC 抗血清として ATF, 抗 TUC 抗血清として ATU と名付け、対照として FCA のみを注射したモルモットの血清も作製した。

4. 抗血清の吸収

免疫蛍光法の為に抗血清は以下のような吸収を行った。抗血清 1 ml あたりヒト正常血清 0.25 ml, 甲状腺・肝・脾・肺・腎の 25% (W/V) PBS ホモジネート各 0.25 ml を加え、室温 2 時間放置後 4°C 1 夜低速回転を行った。10,000×g 30 分遠心上清に再び肝・脾・腎のホモジネート各 0.25 ml を加え、室温 2 時間 4°C 1 夜の吸収を行った。上清を PBS で 16 ml とし、その 1 ml あたり CEA 標品 23 mg を加え、室温 2 時間放置 4°C 1 夜回転後その上清を 1 ml に補正し、0.1% 窒化ナトリウム存在下で 4°C に保存した。なお、必要に応じ上記吸収抗血清 1 ml 当りフェリチン標品 0.8 mg による吸収を追加した。

ELISA の為には抗血清に以下の様な吸収を行った。未吸収抗血清 10 μl あたりヒト正常血清 5 ml, 甲状腺 25% PBS ホモジネート 2 ml, 肝・脾・腎・肺の 25% PBS ホモジネート各 1 ml, CEA 90 mg, フェリチン 0.2 mg を加え、室温 2 時間静置 4°C 1 夜回転後の 10,000×g 30 分遠心上清をとり、0.1% 窒化ナトリウム存在下に 4°C に保存した。

CEA 標品はヒト大腸癌の剖検材料から抽出、精製したものを金沢大学がん研病態生理部の清水弘子氏から、フェリチン標品はヒト悪性リンパ腫 (B 細胞型) の手術材料から抽出、精製したものを同部平井 洋氏から恵与された。

5. 免疫学的検査

1) 免疫蛍光法

間接蛍光抗体法を用いた。厚さ 6 μm の cryostat 切片を作製し、未固定のまま 37°C 30 分乾燥後、吸収抗血清 (16 倍希釈) を室温 1 時間作用させ、洗浄後 FITC 標識抗モルモット IgG (家兎抗血清; MBL 製, 名古屋) の 25 倍希釈液で 30 分反応させた。洗浄後グリセリンで封入し、干渉フィルター 2 枚を設置したオリンパス落射蛍光顕微鏡 BH-RFL で検鏡・撮影した。

2) 免疫蛍光阻止試験

吸収抗血清の16倍希釈液0.1 mlにつき以下の標品をデシケーターで室温乾燥して加えた。(1) 甲状腺癌 LPsol 2 mg, (2) CEA 0.4 mg, (3) CAP-1¹¹⁾ 2 mg, (4) 肝, (5) 腎, (6) 胎児肝, (7) 大腸癌, (8) 胃癌の各25% PBS ホモジネート 0.2 ml, それぞれを攪拌後, 室温2時間静置4°C 1夜回転し, その遠心上清について上記の蛍光抗体法を行った。CAP-1は大腸癌より作製した。

3) ELISA

96-well vinyl assay plates (Costar, USA) に0.01 M 炭酸バッファ (pH 9.6) で希釈した抗原資料を100 μ l まき, 37°C 2時間放置後 PBS-Tween 液 (0.05% Tween 20, 0.15 M NaCl を含む 0.01 M PBS) で3回洗浄, blocking 液 (1% ウシ血清アルブミンを含む PBS) を well あたり 175 μ l 加え, 37°C 2時間おき, PBS-Tween 液で3回洗った。つぎに ELISA 用に吸収された抗甲状腺癌抗血清を希釈液 (0.5% ウシ血清アルブミン, 0.05% Tween 20 を含む PBS) で1,000倍に希釈したものを各 well に100 μ l まき, 37°C 2時間おき PBS-Tween 液で3回洗った。Peroxidase 標識抗モルモット IgG 家兎抗血清の IgG フラクシオン (646 μ g/ml の IgG にモル比 1:1.3 に peroxidase を山田・中根法¹²⁾ で結合させたものを金沢大がん研分子免疫部, 徳山春彦博士から恵与された, peroxidase は Grade I-C, Toyobo, Japan) を上記希釈液で1,000倍に希釈し, その100 μ l を well にまき, 37°C 2時間おいて PBS-Tween 液で6回洗浄した。McIlvaine リン酸塩・クエン酸 (アミノ酸自動分析用) バッファ, pH 4.8 で1回洗浄後, 同バッファ 10 ml, 0-フェニレンジアミン 10 mg, 30% 過酸化水素 5 μ l の新製溶液 150 μ l を加え, 室温10分後100 μ l をとり, 1 N 塩酸 1.2 ml を加えて反応を止め, 分光光度計 (日立 139 型) で波長 492 nm の吸光度を測定した。

なお, 抗原資料はすべて LPsol を Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia) のカラム (1.5 \times 4 cm) を通して混在するアルブミンを除去すると同時に pass 分画も除き, 遅れて溶出されるピーク分画をプールし, 適当に濃度を補正して使用した。

6. 化学的分析

1) 酵素・化学的分解試験

TPC の未固定 cryostat 切片 (厚さ 6 μ) を以下の溶液中で 37°C 30分反応させた。(1) トリプシン (Type III, Sigma Chemical Company, USA) 0.0025%, 0.15 M NaCl を含む 0.1 M トリスバッファ, pH 7.4 (tris-buffred-saline; TBS と略) 溶液, (2) プロナーゼ E (科研化学) 0.01 μ g/ml, 0.05 M 塩化カルシウムを含む TBS 溶液, (3) ノイラミナーゼ (Type V; Sigma) 2 mg/ml, 0.2 M 酢酸バッファ, pH 5.0, 溶液, (4)

β -グルコシダーゼ (Sigma) 2 mg/ml, 2 mg/ml の還元グルタチオンを含む 0.2 M 酢酸バッファ, pH 5.0 溶液, (5) メタ過沃素酸ナトリウム 0.01 M PBS 溶液。なお, バッファのみで処理した対照標本も作製した。反応後 PBS で30分洗浄し, 間接蛍光抗体法を行った。また, 10% フォルマリン-PBS 溶液, 無水エタノール, 無水アセトンでそれぞれ10分間処理した切片についても PBS で30分洗浄後蛍光抗体法を行った。

2) Immunofixation 電気泳動

Cellogel (Chemtron, Italy) を使用し, immunofixation 電気泳動¹³⁾を行った。部分精製した甲状腺癌 LPsol (500 μ g/ml) を塗布し, 電気泳動後, 吸収抗血清を使用して固定を行い, Silver stain (Bio-Rad Laboratories, USA) により染色した。対照として正常血清を泳動後, 抗ヒトトランスフェリン抗血清 (MBL 社) などによる固定・染色を行った。

3) 分子量測定

TPC の部分精製した LPsol (1 ml, 700 μ g) を Sephacryl S-200 (Pharmacia) のカラム (1.5 \times 95 cm) に負荷し, PBS を溶出液として下降法でゲル濾過を行った。分子量マーカーには Blue dextran (Pharmacia), 牛血清アルブミン (Pharmacia), フェリチン, カタラーゼ, アルドラーゼ, キモトリプシノーゲン A (以上 Combitek; Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を使用した。溶出液の 280 nm の吸収と ELISA による測定を行った。

7. 患者血中抗原の測定

甲状腺癌患者 17 名 (乳頭状腺癌 12 名, 濾胞状腺癌 3 名, 未分化癌 2 名), 甲状腺濾胞状腺腫 10 名, 他臓器癌患者 5 名 (食道癌 1 名, 胃癌 1 名, 大腸癌 1 名, 肺癌 1 名, 膀胱癌 1 名) の治療前の血清並びに正常者 5 名の血清について ELISA による抗原活性を測定した。血清は測定時まで 0.1% 窒化ナトリウム存在下に 4°C に保存した。抗原として使用する際には 0.01 M 炭酸バッファ (pH 9.6) で10倍に希釈して使用した。

ELISA 用に吸収された抗甲状腺癌抗体の1,000倍希釈を1次抗体とし, 1,000倍希釈の peroxidase 標識抗血清を2次抗体として, 前記の方法で測定を行った。

成 績

1. 免疫蛍光法所見

正常モルモット血清や adjuvant コントロール血清による間接蛍光抗体法では, 甲状腺癌切片は何らの陽性部位を示さなかった。しかしながら, 吸収抗血清 ATP, ATF, ATU による染色ではすべての TPC, TFC 切片が癌細胞とくにその細胞膜の陽性染色を示した。細胞質は弱く, 核は全く陰性であった。TPC では細胞膜で

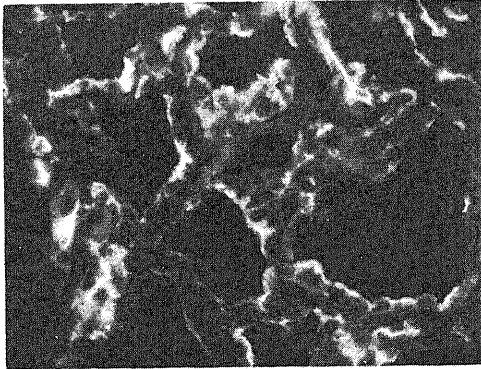


Fig. 1. Immunofluorescent staining of a thyroid papillary adenocarcinoma with absorbed anti-thyroid papillary adenocarcinoma antiserum (ATP-1). $\times 300$.

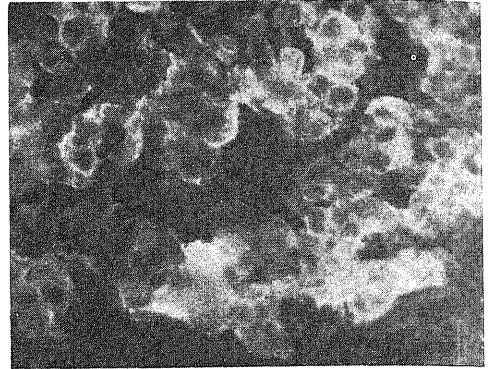


Fig. 2. Immunofluorescent staining of a thyroid follicular adenocarcinoma with absorbed anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF). $\times 300$.



Fig. 3. Immunofluorescent staining of non-neoplastic thyroid tissue at a site near thyroid papillary adenocarcinoma with absorbed anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF). $\times 300$.

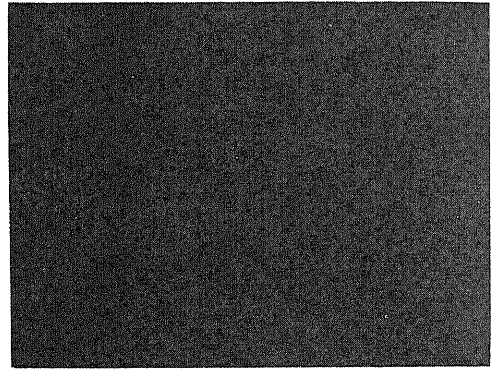


Fig. 4. Immunofluorescent staining of a fetal thyroid with absorbed anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF). $\times 300$.

も絨毛様突起の多い濾胞腔側の部分が強く染まったが(図1)、その様な突起の乏しいTFCでは細胞膜はほとんど均質に染色された(図2)。このような甲状腺癌細胞の染色は甲状腺癌各LPsolで吸収した抗血清を用いた免疫蛍光阻止試験では陰性化した。しかし、CEA, CAP-1¹¹⁾のような癌関連抗原, 粘液性の癌関連抗原を含む胃癌や大腸癌のホモジネート, あるいは正常肝・腎・胎児肝などによる吸収を加えても甲状腺癌の染色性に変化が起らなかった。

正常甲状腺はTPC, TFCに付属した甲状腺部分も含め, これらの吸収抗血清では陽性染色を示さず(図3), また, 胎児甲状腺も陰性であった(図4)。正常の心・肺・肝・脾・膵・腎・大腸・副腎・胸腺の各切片でも陽性染色は見られなかった。

腫瘍ではTFA 8例がすべて陰性であり(図5), 甲

状腺 medullary carcinoma の癌細胞も陰性であった(図6)。他臓器の癌では上顎癌0/1, 肺腺癌0/2, 肝癌0/1, 膀胱癌0/1, 腎細胞癌0/2, 大腸癌0/1, 卵巣胎児性癌0/1, 卵巣偽粘液性のう胞腺癌0/1, 悪性リンパ腫0/1, 脂肪肉腫0/1で, 陽性所見を示した癌はなかった。

2. ELISA の成績

TUCのLPsolの各濃度については, ELISA用の吸収を行った抗TPC, 抗TFC, 抗TUCの抗血清を使用して測定を行い, 図7のような結果を得た。同様な成績はTPCのLPsolを抗原とした場合にも得られた。正常の組織や他種の癌などの対照資料を測定してみると, それらは甲状腺癌に比し著しく低値であった(図8)。即ち, ELISAによってもTPC, TFC, TUCに共通する甲状腺癌高度関連抗原の存在が示された。

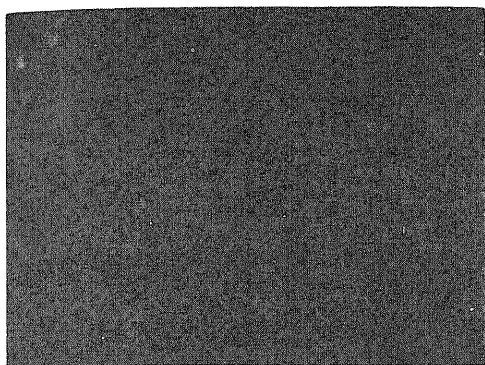


Fig. 5. Immunofluorescent staining of a follicular adenoma with absorbed anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF). $\times 300$,

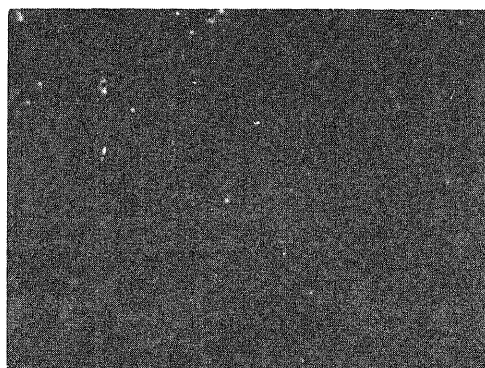


Fig. 6. Immunofluorescent staining of a thyroid medullary carcinoma with absorbed anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF). $\times 300$.

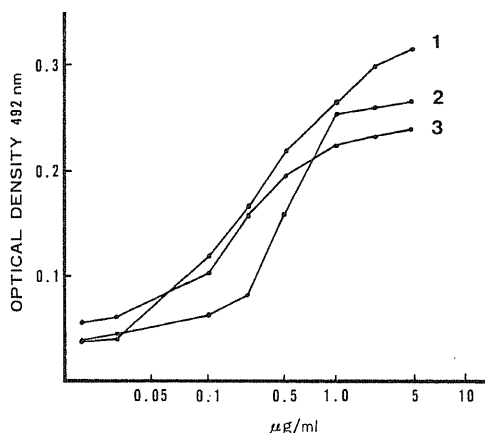


Fig. 7. Standard curves for the thyroid cancer-associated antigen assay with various antibodies. 1, anti-thyroid follicular adenocarcinoma antiserum (ATF); 2, anti-thyroid undifferentiated carcinoma antiserum (ATU); 3, anti-thyroid papillary adenocarcinoma antiserum (ATP-1).

3. 抗原の性質

甲状腺癌抗原の化学的性質をしらべるため蛋白分解酵素、糖分解酵素や過沃素酸が cryostat 切片の抗原に及ぼす影響を免疫蛍光法で検査した。トリプシンやプロナーゼ処理で切片中の抗原は失活し、ノイラミニダーゼ、グルコシダーゼあるいは過沃素酸処理では抗原の失活は起こらなかった。なお、使用した pH 7.4 あるいは pH 5.0 のバッファーのみによる処理では抗原の失活は起こらなかった。フォルマリン・エタノール・アセトンのような組織固定剤は既述の条件では抗原失活をひき起こさなかった。

Cellogel による電気泳動では甲状腺癌抗原はトラン

スフェリンより陰極側、 γ -グロブリンよりは陽極側、即ち β_2 -グロブリン位の泳動度を示した (図 9)。

ゲル濾過法による分子量測定結果は最小分子量 63,000 であった (図 10)。なお、分子量 300,000 付近にも活性をもつピークが認められたが、溶出液を 0.1 M KCl を含む 0.05 M トリス・塩酸バッファー、pH 8.2 溶液に変えると、このピークのかわりに約 180,000 のピークを生じた。この場合も最小分子量に変化は見られなかった。

4. 患者の血中抗原

測定成績は (図 11) のようである。甲状腺癌患者 17 例中 10 例が正常レベルあるいは他臓器癌レベルを上まわった。なお、良性甲状腺腫には稀に高値のものが有ったが、それが一部癌化が起っていたことによるか否かは決定できなかった。

考 察

以上の免疫蛍光法と ELISA の成績からヒト甲状腺濾胞上皮由来の癌には少なくとも 1 つの癌特異あるいは高度関連抗原が存在すると考えられる。それは TPC, TFC, TUC に共通して存在するが、傍濾胞上皮細胞由来の medullary carcinoma には存在せず、良性の TFA にも認められない。正常甲状腺や他の正常臓器にはなく、他臓器の癌にも調べた限りでは見いだされない。胎児甲状腺にないから oncofetal な抗原とは考え難い。既知の癌関連抗原 CEA, CAP-1¹³⁾, M 抗原¹⁴⁾, フェリチンなどとも異なっている。移植抗原との関係は十分明らかではないが、同一個体の甲状腺(非癌部位)には存在しない点などから一応否定される。

抗原は細胞膜に存在するらしく、蛍光抗体法で細胞膜が良く染まり、特に濾胞腔側に絨毛様突起が多い

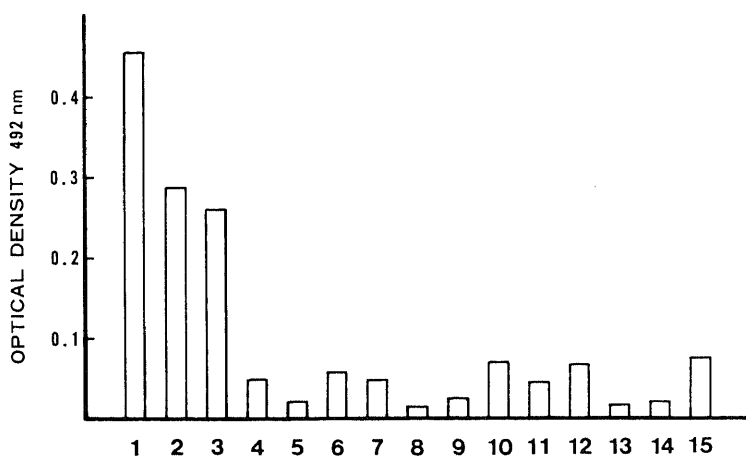


Fig. 8. Distribution of the antigenic activity assayed by ELISA of the partially purified antigenic material from various tissues. (1) thyroid papillary adenocarcinoma, (2) thyroid follicular adenocarcinoma, (3) thyroid undifferentiated carcinoma, (4) thyroid gland, (5) liver, (6) kidney, (7) lung, (8) spleen, (9) normal serum, (10) thyroid follicular adenoma, (11) gastric cancer, (12) pancreas cancer, (13) colon cancer, (14) lung cancer, (15) melanoma. The antigenic material (50 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with a functionally specific ATP-1 (1 : 1,000), followed by incubation with peroxidase conjugated IgG of anti-guinea pig IgG antiserum (1 : 1,000).

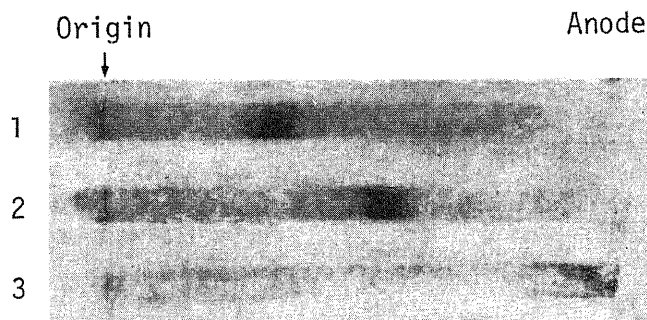


Fig. 9. Immunofixation electrophoresis on Cellophane of TPC LPSol and control serum proteins. (1) TPC LPSol. (2) transferrin. (3) albumin.

TPC ではその部分が強く染まる。

抗原活性は抗原分子の蛋白部分にあるらしく、糖分解酵素や過沃素酸処理に抵抗性があり、蛋白分解酵素処理に弱い。抗原の電気泳動度は β_2 位で、ゲル濾過による見かけ上の分子量 (最小) は約 63,000 である。溶出条件で変動する高分子のピークもあるが、それは抗原分子の凝集によるものと推定される。

ヒトの癌の特異あるいは高度関連抗原に関する報告は年々増加し、最近モノクローナル抗体を使った報告が多い。筆者の成績は微小な癌でも癌抗原の分析や

ある程度の精製が可能であることを示し、甲状腺癌についても特異性の高いモノクローナル抗体作製に可能性の有ることを示唆している。

甲状腺癌に特異性の高い抗原が有って、それを感度よく測定できるとするならば、当然それを患者の診断に応用することが期待される。そこで筆者は本研究に使用した異種抗血清を用い、患者血清の ELISA による予備的測定を行った。甲状腺癌が発見時は全般的に小さく、血中へ遊離する抗原量は比較的少ないであろうこと、使用抗血清が高単位ではなく、しかも高度の吸

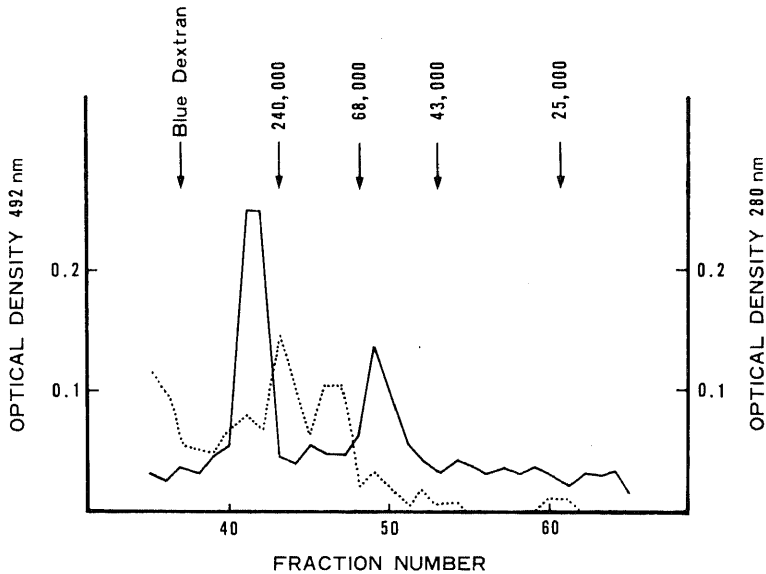


Fig. 10. Gel filtration chromatographic fractionation on Sephacryl S-200 of the partially purified antigenic material of thyroid papillary adenocarcinoma. The column was calibrated with proteins of known molecular weight as indicated by arrows. Sample: 700 μ g protein; flow rate: 12.0 ml/hr; fraction volume: 1.8 ml. Solid line, enzyme activity; dotted line, optical density at 280 nm.

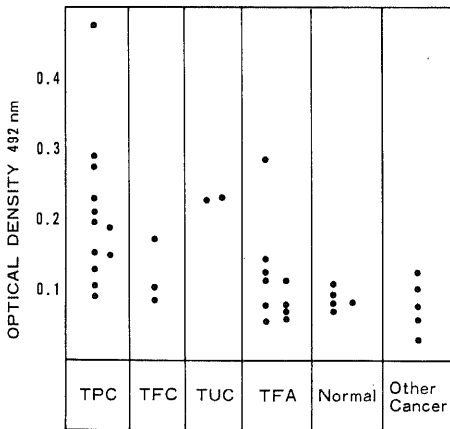


Fig. 11. Values of the antigenic activity of individual sera from thyroid cancer patients and those of controls. TPC, thyroid papillary adenocarcinoma; TFC, thyroid follicular adenocarcinoma; TUC, thyroid undifferentiated carcinoma; TFA, thyroid follicular adenoma.

ポリクロナールでも高単位の抗血清の作製と応用が今後の課題である。

結 論

ヒト甲状腺の乳頭状腺癌、濾胞状腺癌、未分化癌から不溶性分画を抽出し、デオキシコール酸塩で可溶化し、reverse immunoabsorption で混在抗原を減らしたものを使用し、モルモットに抗血清を作製した。抗血清に適当な吸収を加えた後、免疫蛍光法と ELISA を行って以下の様な成績を得た。

1. 三種の甲状腺癌に共通し、既知癌関連抗原とは異なった抗原が存在し、それは甲状腺癌特異性が高く、正常臓器・胎児甲状腺・他種の癌には存在が認められない。
2. 抗原は β_2 位の泳動度を持ち、最小分子量約 63,000、抗原活性基はその蛋白部分に有る。
3. 甲状腺癌患者血中の抗原を ELISA で測定することには診断的価値があると思われる。

収が加えられていることなどが恐らくは原因となって、血中抗原量の高い例を高率に見出すまでに至っていないが、対照群に比し測定値のやや高い例が多いことだけは明らかにされた。モノクロナール抗体あるいは

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師梅田良三教授に心から感謝の意を表します。また終始御指導を頂き御校閲を賜りました金沢大学がん研病態生理部倉田自章教授に深甚なる感謝を捧げます。更に同部岡田収司助教授ならびに教室員の皆様深く感謝します。また資

料収集に際し御協力を頂きました金沢大学第一病理学教室、第一外科教室、第二外科教室、福井県立病院外科、厚生連高岡病院耳鼻咽喉科、東京大学第一内科金子義保生、並びに金沢大学耳鼻咽喉科古川伊先生、教室各位の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Hamada, S. & Hamada, S.: Localization of carcinoembryonic antigen in medullary thyroid carcinoma by immunofluorescent techniques. *Brit. J. Cancer*, **36**, 572-576 (1977).
- 2) Cox, C. E., VanVickle, J., Froome, L. C., Mandelsohn, G., Baylin, S. B. & Wells, S. A. Jr.: Carcinoembryonic antigen and calcitonin as markers of malignancy in medullary thyroid carcinoma. *Surg. Forum*, **30**, 120-121 (1979).
- 3) Rochman, H., deGroot, L. J., Rieger, C. H. L., Varnavidae, L. A., Refetoff, S., Joung, I. J. & Hoyo, K.: Carcinoembryonic antigen and humoral antibody response in patients with thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, **35**, 2689-2692 (1975).
- 4) Economidou, J., Karacoulis, P., Manousos, N., Manesis, E., Kydonakis, A. & Koutras, D. A.: Carcinoembryonic antigen in thyroid disease. *J. Clin. Path.*, **30**, 878-880 (1977).
- 5) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. II. On the salivary gland-characteristic antigens. *Int. J. Allergy*, **35**, 392-401 (1969).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.: Cellular lipoproteins. I. The insoluble lipoprotein of whole liver cell. *Exp. Cell Res.*, **13**, 96-102 (1957).
- 9) Cambiaso, C. L., Goffinet, A., Vaerman, J. P. & Heremens, J. F.: Glutaraldehyde-activated aminohexylderivative of Sepharose 4B as a new versatile immunoabsorbent. *Immunochemistry*, **12**, 273-278 (1975).
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 11) Klavins, J. V.: Tumor markers of pancreatic carcinoma. *Cancer*, **47**, 1597-1601 (1981).
- 12) 山田剛太郎・中根一穂: 酵素抗体法. 免疫実験操作法VI (日本免疫学会編), 2版, 1835-1844, 金沢, 日本免疫学会, 1977.
- 14) Cawley, L. P., Minard, B. & Penn, G. M.: Electrophoresis & immunochemical reactions in gels. 2nd ed. 23-26, Educational Products Division, Am. Soc. of Clin. Pathologists, Chicago, 1978.
- 14) Bara, J., Loisillier, F & Burtin, P.: Antigens of gastric and intestinal mucous cells in human colonic tumours. *Brit. J. Cancer*, **41**, 209-221 (1980).

Detection of an Antigen(s) Highly Associated with Human Thyroid Cancer Yasuko Morishita, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University and Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. J. *Juzen Med. Soc.*, **92**, 199-207 (1983)

Key words: ELISA, human thyroid cancer, immunology, tumor-associated antigen

Abstract

The insoluble lipoprotein fraction of human thyroid cancers including papillary carcinoma, follicular carcinoma and undifferentiated carcinoma was solubilized by the aid of deoxycholate. After partial purification, the dissolved extract was used to raise antisera in guinea pigs. The antisera, when absorbed with homogenates of several normal organs, serum, and a CEA preparation, were reactive, in immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay, only with

thyroid cancers and sera from some patients with thyroid cancer. No reactivity was observed with fetal thyroid, normal adult organs or other cancers. The antigen was shown to have a β_2 -mobility on immunofixation electrophoresis and an apparent molecular weight of 6.3×10^4 D on gel filtration.