上顎癌関連抗原の推定分子量とその局在

山内 進*・加藤 和夫**・小松 信行

斉藤 成明・堀内 正敏・三宅 浩郷

An Estimation of the Molecular Weight and Location of Maxillary Cancer Associated Antigen

Susumu Yamauchi, Nobuyuki Komatsu, Shigeaki Saitoh,
Masatoshi Horiuchi and Hirosato Miyake

(Tokai University)

Kazuo Katoh

(Nippon Kayaku Co., LTD)

It is well known that the early diagnosis of maxillary cancer (MC) is very difficult on the basis of its clinical appearance and symptoms, since nasal obstruction, bloody discharge, toothache and loosening of the teeth are common in the early stage.

A new technique was devised for the isolation and characterization of maxillary cancer associated antigens (MCAA), since elucidation of MCAA has been one of the major achievements of tumor immunology.

Frozen sections of MC 10 μ m thick were applied directly to PAG-plates for isoelectric focusing. Saline extract of tumor tissues and sera were treated in the same manner.

Specific components at around pH 6.1 were determined on PAG-plates and collected by chromatofocusing. Anti-MCAA rabbit serum was obtained by immunization with the components around pH 6.1 and anti-MCAA IgG serum was purified by protein A sepharose CL-4B.

The purpose of this study was to demonstrate the location of MCAA in tumor sections and determine its approximate molecular weight. Tissues of 10 out of 11 (91%) cases of MC were stained positively by indirect immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. This definitely positive staining was demonstrated on the cell membranes of MC, while in 8 control cases (normal maxillary sinus membrane, paratine tonsil, parotid gland and membranes from patients with chronic paranasal sinusitis) the staining was definitively negative.

The molecular weight of MCAA was investigated by SDS-PAG and Immune-Blotting. The former showed two components (170k-225k), and the latter detected two components (120k-136k) and one minor component of 76k.

Key words : maxillary cancer associated antigens (MCAA), isoelectric focusing (IF), Immune-Blotting (IB)

東海大学医学部耳鼻咽喉科学教室

*東海大学医学部共利研微生物

**日本化薬株式会社総合研究所

緒 言

近年, CEAやAFPあるいは, HCGやHPLの如き癌胎児性蛋白や癌胎盤性蛋白が担癌に随伴してみられることから, 癌の診断や治療効果の判定に利用されているが^{1)~4)}, これらの蛋白の中には癌以外の疾患にも検出され, また微量測定法の開発により正常組織にも微量ながら局在することが明らかになるにつれて^{5)~9)}, 特定の癌に特異的抗原あるいは関連抗原を検出する方法が期待されている,

著者らは, このような視点から, 上顎癌(MC)の早期発見と免疫学的治療への応用をめざし, 上顎癌関連抗原(MCAA)の分離と分取に関し, 新たな technique を開発し, 特異性の高い抗 MCAA 抗体の作製を企図した. MCAA の分離, 分取法および家兎への免疫によって得られた抗体の精製とその特異性に関してはすでに報告している¹⁰⁾.

本稿では, chromatofocusing 法により分取された MCAA の推定分子量および上顎癌組織における MCAA の局在部位と陽性率に関し, 免疫組織学的に検索したので報告する.

材料と方法

1) 分子量の測定

分子量の測定に関しては, 3例の上顎癌組織を材料に, Davies¹¹⁾の方法で得られた crude な抽出液を chromatofocusing (CF) (Pharmacia, Sweden) 法により pH6前後で分取し, 限外濾過にて濃縮したものを用いた.

それぞれの抽出液 (No. 2, 3, 4) は, 7.5% SDS-Polyacrylamide Gel (SDS-PAG) で泳動後, Nitrocellulose (NC) 膜 (Bio-Rad 社, U.S.A) に電氣的に transfer し, 一次抗体には抗 MCAA IgG 抗体を用い, Immuno-Blotting (IB) 法¹²⁾を採用した.

分子量の推定は, IBGel と並走した Marker Proteins (オリエンタル酵母 K.K.) の SDS-PAGE 後 Silver 染色 (Bio-Rad 社, U.S.A) により出現したバンドの位置から得た標準曲線によって算定した.

2) 上顎癌関連抗原の組織局在と陽性率

a) 被検対象:

上顎扁平上皮癌11例, 対照組織には, 慢性副鼻腔炎粘膜4例, 正常上顎洞粘膜1例, 口蓋扁桃2例および耳下腺1例を用いた.

b) 上顎癌関連抗原の組織局在の証明法:

検索は間接蛍光抗体法 (IIF) および間接

図1 Silver stain and Electro-Immuno-Blot

図2 MW Determination

酵素抗体法 (I P O) により行われた。即ち、各被検組織は $4\mu\text{m}$ 程度の凍結連続切片標本とし、1 検体につき 2 枚の標本が準備された。

固定は I I F 用に 4°C の純アセトンで 20 分、I P O 用には 4°C で 4 % Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で 30 分の処理を

行った。

一次抗体には、I I F, I P O 共に抗 MCAA IgG 抗体を 1 : 40 に稀釈し、二次抗体は FITC 標識抗ウサギ IgGF (ab')₂ ヤギ血清 (Capple 社, U.S.A) および H R P 標識抗ウサギ IgGF (ab')₂ ヤギ血清 (Capple 社, U.S.A) をそれぞれ

図 3 Specific fluorescence for MCAA was demonstrated on the surface of cancer cells. IIF staining of control was negative. (L : $\times 200$, R : $\times 100$)

図 4 The presence of MCAA was detectable on the cell surface of MC by indirect PO reaction. No peroxidase reactive products were demonstrated in control. (L : $\times 1000$, R : $\times 1000$)

れ 1 : 40 と 1 : 60 の稀釈倍数で用い, HRP の呈色反応には, 0.05% 過酸化水素加 3.3-Diaminobenzidine (DAB) 液を用いた.

一方, 対照には, 一次抗体の代わりに, 非免疫ウサギ IgG 血清を 1 : 40 に稀釈したものを使用した.

結 果

1) 上顎癌関連抗原の推定分子量

SDS—PAGE 後 Silver 染色により出現したバンドは, 図 1—A に示し, I B 法による特異的免疫化学反応の結果生じたバンドは図 1—B に矢印で示した.

Marker Proteins による標準曲線 (図 2) から算定された推定分子量は, 170K—225K の間に 2 成分, 120K—136K の間に 2 成分, また

約 76K に minor な 1 成分が得られた.

2) 上顎癌関連抗原の組織局在と陽性率

I I F 法による MCAA の局在を示したのが図 3 である.

抗 MCAA IgG 抗体によって認識された MCAA は, 上顎癌細胞膜上に明瞭な陽性像として鑑察されるが, 間質等では陰性の所見が示されている. 一方, 対照である非免疫ウサギ IgG 血清による上顎癌組織との反応では, 明らかな陰性像が得られた.

I P O 法による結果を示したのが図 4 である. MCAA の局在性とその程度に応じて, 癌細胞膜上にドット状や線状を呈する陽性反応がみられている. 一方非免疫ウサギ IgG 血清との反応による対照試験では陰性である.

表 1. Results of Maxillary cancer and controls by using indirect immunofluorescence (IIF) and immunoperoxidase (IPO)

Case No.	Subjects	Histological diag.	IIF	IPO	Decision
1	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
2	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
3	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
4	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
5	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
6	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
7	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
8	Maxillary Ca	S.C.C	±	—	—
9	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
10	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+
11	Maxillary Ca	S.C.C	+	+	+

Percent of positive : 91%

Unrelated MC as controls

1	Membrane of maxillary sinus	—	—	—
2	Palatine tonsil	—	—	—
3	Palatine tonsil	—	—	—
4	Parotid	—	—	—
5	Membrane of chronic paranasal sinusitis	—	—	—
6	Membrane of chronic paranasal sinusitis	—	—	—
7	Membrane of chronic paranasal sinusitis	—	—	—
8	Membrane of chronic paranasal sinusitis	—	—	—

上顎扁平上皮癌組織11例および、その他の各種組織8例に関する成績を表1に纏めた。No.8の症例は陰性と判定されたので、上顎癌に対する総括的陽性率は91%となる。

考 察

上顎癌では、腫瘍に特異的な初期症状に乏しく、主訴は鼻閉や歯痛といった一般的症状が多いことから早期診断が困難とされ、また癌の発生部位が顔面であることから外見上悲惨な状態を呈することが多く、早期発見が強く望まれている。

著者らはこれまで、上顎癌の腫瘍 Marker として、CEAやAFP、あるいはHCGやHPLを組織 level での局在や血清 level での検索を試み上顎癌においても、これらの癌胎児性蛋白や癌胎盤性蛋白が検出されることを報告して来たが¹³⁾¹⁴⁾、上顎癌の早期診断や特異性に関する parameter としての価値には疑問がある。

腫瘍免疫の研究に際し、最も重要な基礎作業の1つは、腫瘍特異抗原や腫瘍関連抗原の分離や分取であろう。

何らかの方法で、これらの抗原を分取出来れば抗体の作製は可能であり、また特定の腫瘍に特異性の高い抗体が得られれば、早期診断や再発の早期探知のための種々の technique の開発が期待される。

著者らは、この研究に際し、最初に試みたことは従来の方法と全く異った癌関連抗原分離法を開発し、MCAA を分取し、家兎を免疫し、特異性の高い抗 MCAA 抗体を作ることであった。上述した如く、著者らが考案した方法により作製した抗 MCAA IgG 抗体によって認識された MCAA は、上顎癌細胞膜上に局在することは明らかで、しかも全ての腫瘍細胞が常に様に陽性反応を呈するのではなく、MCAA の発現や局在の程度に応じて陽性像も多彩である。上顎癌の進展や浸潤の様相は、連続的に観察すると、あたかもねじれドーナツ状を呈しているものが多く興味深い。

抗 MCAA IgG 抗体による上顎扁平上皮癌の平均陽性率は、91%であったことから、今後上顎癌の早期診断への応用が期待される。さて、MCAA の推定分子量の測定に際し、CF によって分取された分画は、pH6前後のものであるが、本法は、ゲル濾過により分子量の違いから分画される従来の方法と異なり、物質の pH の差にもとづき分離されるもので、pH0.02 の幅で分離が可能な、今日最も分離能に優れた方法である。

pH6前後で分取された各サンプルは、SDS-PAGE の後 Silver 染色により多数のバンドが出現したが、抗 MCAA IgG 抗体はNC膜に転写された MCAA を認識し、その位置は複数のバンドとして示された。このことは、IIFやIPO法で上顎癌細胞膜上に証明された MCAA は単一のものでないことを示している。

著者らは、これまでの成績にもとづき、今後 MCAA を YMN 抗原（山内、三宅、日本化薬のイニシャルをとり）と命名し、またこの抗原により作製した抗体を YMN 抗体とよぶことにした。

結 語

著者らは、上顎癌の早期診断と治療への応用をめざして、特異性の高い抗体を作製せんとし、新しく腫瘍関連抗原の分離法を開発し、上顎癌関連抗原を分取し、家兎を免疫して抗 MCAA IgG 抗体を作製し、精製した。

今回は、この抗 MCAA IgG 抗体を用いて次の点を明らかにした。即ち、

1) SDS-PAGE および Immuno-Blotting 法により推定分子量が求められた。

2) 推定分子量は、170K—225Kの間に2成分、120K—136Kの間に2成分および約76Kに minor な1成分が得られた。

3) 抗 MCAA IgG 抗体によって認識された MCAA は IIF や IPO 法により上顎癌細胞膜上に局在することが明らかにされた。

4) 上顎癌以外の各種組織では、全例に MCAA は検出されなかった。

5) 上顎扁平上皮癌11例に対し, MCAA は10例に検出され, 陽性率91%であった.

稿を終るに臨み, 本研究の技術面で御協力をいただいた耳鼻咽喉科学教室の四十万均技術員に深謝の意を表します.

本論文の要旨は, 第85回日本耳鼻咽喉科学会総会(1984, 東京)における宿題報告「上顎癌をめぐる諸問題」の中で三宅浩郷教授によって演述された. なお, 本研究の一部は文部省科学研究費によるものであることを記し, 感謝の意を表します.

文 献

- 1) Gold P and Freedman SO: Demonstration of tumor specific antigens in human colon carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 121: 439~462, 1965.
- 2) Tatarinov YS: Presence of embryonal α -globulin in the serum of patients with primary hepatocellular carcinoma. *Vopr Med Khim (USSR)* 10: 90~91, 1964.
- 3) Husa RO: Human chorionic gonadotropin, a clinical marker: Review of its biosynthesis. *The Ligand Review* 2 Suppl 2: 1, 1981.
- 4) Sammaan NA, Smith JP and Rutledge FN: The significance of measurement of human placental lactogen, human chorionic gonadotropin and carcinoembryonic antigen in patient with ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 126: 186~189, 1976.
- 5) Goldenberg DM, Sharkey RM and Primus FJ: Carcinoembryonic antigen in histopathology: Immunoperoxidase staining of conventional tissue sections. *J Natl Cancer Inst* 57: 11~22, 1976.
- 6) von Kleist S, Chavanel G and Burtin P: Identification of antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2492~2494, 1972.
- 7) Endo Y: Clinical significance of α -fetoprotein in hepatitis and liver cirrhosis. *Ann NY Acad Sci* 259: 234~238, 1975.
- 8) Gitlin D: Normal biology of α -fetoprotein. *Ann NY Acad Sci* 259: 7~12, 1975.
- 9) Braunstein GD, Kamdar V, Rasor J, Swaminathan N and Wade ME: Widespread distribution of chorionic gonadotropin like substance in normal human tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 917~925, 1979.
- 10) 山内 進, 斉藤成明, 小松信行, 三宅浩郷: 上顎癌細胞より分離された腫瘍関連抗原. *耳鼻臨床* 78: 2875~2882, 1985.
- 11) Davies DAL: Mouse histocompatibility isoantigens derived from normal and from tumor cells. *Immunology* 11: 115~125, 1966.
- 12) Towbin H, Staehlin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350~4354, 1979.
- 13) 山内 進, 小沢 敦, 小松信行, 斉藤成明, 三宅浩郷: 上顎癌患者における免疫学的研究. 第2報, 癌胎児性および癌胎盤性蛋白の検索. 第10回日本臨床免疫学会総会, p 201, 1982.
- 14) 三宅浩郷: 上顎癌をめぐる諸問題. 第85回日本耳鼻咽喉科学会総会宿題報告. 147~157頁, 港北出版, 東京, 1984.

原稿到着: 昭和60年7月26日
 (別刷請求先: 山内 進
 〒259-11 伊勢原市望星台
 東海大学医学部共利研微生物)