

Title	癌胎児性抗原に関する研究 第一編 Polyacrylamide gel電気泳動による精製およびその性状について
Author(s)	石川, 演美
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1979, 39(2), p. 113-119
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14718
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

癌胎児性抗原に関する研究

第一編 Polyacrylamide gel 電気泳動による精製

およびその性状について

京都大学医学部放射線医学教室（主任：鳥塚莞爾教授）

石川 演 美*

（昭和53年7月12日受付）

（昭和53年9月19日最終原稿受付）

Purification of carcinoembryonic antigen (CEA) employing polyacrylamide gel electrophoresis

Nobuyoshi Ishikawa

Department of Radiology, Kyoto University, School of Medicine

(Director: Prof. Dr. Kanji Torizuka)

Research Code No.: 720

Key Words: Purification of CEA, Preparative disc electrophoresis, Isoelectric focusing

Carcinoembryonic antigen (CEA) was purified from extirpated tumor tissue of patients with adenocarcinoma of the colorectum. The tumor weighing 347 g were homogenized, extracted with perchloric acid, and filtrated on Sepharose 4 B gel. Collected eluates with high CEA activity were further filtrated on Sephadex G-200, and finally purified by preparative disc electrophoresis using 7.5% polyacrylamide, which has higher concentration than the one used by previous investigators.

The purified CEA, total weight of 6.7 mg, showed 2.4S by ultracentrifugation, was able to migrate in 7.5 % polyacrylamide gel and was stained with PAS.

Additionally this CEA was found to have identical immunogenicity as CEA of Gold by comparison of standard curves of radioimmunoassay using these two CEA, and to be heterogenous.

緒 言

Carcinoembryonic antigen (CEA) は Gold および Freedman¹⁾²⁾ によつて結腸癌組織の過塩素酸抽出物から発見された癌関連物質である。CEA は腫瘍表面の glycocalyx に局在し、分子量は約20万と測定され、免疫電気泳動ではβ易動度

を示す糖蛋白であり、アミノ酸分析の結果では、精製に供される材料の個体差または胃癌、肝癌などの違いに拘らず、ある程度一定の組成を示すことが知られている³⁾⁴⁾⁵⁾。しかし、沈降定数については様々な報告がなされており⁶⁾⁷⁾⁸⁾、分析ディスク電気泳動の結果でも均質であるが幅広い band

* 現愛媛大学医学部放射線医学教室

*Present address: Department of radiology, Ehime University, School of Medicine, Ehime Prefecture.

を呈し⁴⁾⁶⁾⁹⁾, CEA が heterogeneous であることが認められている。

著者は結腸直腸癌組織の過塩素酸抽出物から Gold ら¹⁰⁾の方法に準じて精製した標品を、7.5% ポリアクリルアミド・ゲルを用いた調製用ディスク電気泳動によつてさらに精製し、得られた最終標品について物理化学的ならびに免疫化学的性質を検討した。

材料と方法

材料

CEA を精製するための出発材料には、手術によつて切除された結腸癌および直腸癌組織を用いた。これらの切除標本から正常組織を剝離除去し、使用に供するまで -20°C に凍結して保存した。材料の合計重量は347g, 13症例で、組織学的にすべて腺癌であることを確かめた。

抗 CEA 特異抗血清は浜田らから提供された。作成の概略は Gold ら²⁾の方法に準じて、結腸癌の過塩素酸抽出物と Freund 完全アジュバントの混合物で成熟家兎を免疫し、得られた粗抗血清を正常人の肺、肝の組織と大腸粘膜の生理的食塩水抽出物および正常人血清で吸収したものである。

方法

1) 過塩素酸抽出

腫瘍組織を細断し、挽肉器でミンチにしたのち、Virtis "60" homogenizer を用いて氷冷下で合計30分間、45,000rpm で homogenize した。終了後脱イオン水を組織 1g につき 4ml の割合で加え、 4°C で1時間攪拌し抽出した。さらに2M 過塩素酸を攪拌しながら同量加え、攪拌をさらに30分間続けたのち、Sorvall 社製冷却遠沈機で 4°C , 12,000g で30分間遠沈し、上清を透析チューブに入れて流水に対して2日間、さらに脱イオン水に対して3日間透析した。脱イオン水は頻回新しいものと交換した。この透析された抽出液を前条件で遠沈して変性蛋白を除いたのち、Amicon 社製 PM-10 フィルターを用いた限外濾過装置 (DIAFLO) で濃縮し、凍結乾燥した。

なお一般試薬は「特級」を使用した。

2) Sepharose 4B ゲル濾過

過塩素酸抽出物の凍結乾燥粉末を10ml の溶出液 (0.05M 第一磷酸ナトリウムを含む 0.9% 食塩水) に溶解し、遠沈によつて沈渣を除き、 4°C で Sepharose 4B ゲル・カラム ($5.5 \times 80\text{cm}$, Pharmacia 社製) を用いて上行性に溶出した。溶出速度 60ml/h ., 分画量 11ml/tube で、溶出濃度を東洋化学製自記紫外線吸収計 UV-540M を用いて 280nm で監視した。

これらの分画の CEA 活性部を 0.01M , pH 7.4 磷酸食塩緩衝液を含む 1% 寒天平板上でオクタロニーによつて確認したのちプールし、脱イオン水に対して透析し、凍結乾燥した。

3) Sephadex G-200ゲル濾過

Sepharose 4B ゲル濾過による CEA 活性部分画の凍結乾燥粉末を溶出液の10ml に溶解し、遠沈して沈渣を除き、Sephadex G-200ゲル・カラム (Pharmacia 社製) を用いて、 4°C でクロマトグラフィーを行つた。用いられた溶出液、カラム規格、溶出速度、分画量などは Sepharose 4B ゲル濾過の場合と同一であつた。CEA 活性を同様に確認してプールし、透析、凍結乾燥した。

4) 調製用ディスク電気泳動

調製用ディスク電気泳動には東洋化学社製調製用ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動装置 (CD-50) を用いた。ポリアクリルアミド・ゲルの濃度 7.5% 、定電流 40mA 、溶出速度 30ml/h ., 分画量 5ml/tube であつた。CEA 活性部を同様にオクタロニーによつて確認してプールし、透析、凍結乾燥した。

これを最終標品とした。

以上の方法によつて精製した CEA の物理化学的および免疫学的性質を検討するため、次の方法を用いた。

5) ラジオイムノアッセイ

CEA の標識は Hunter ら¹¹⁾の方法に準じて行つた。CEA $20\mu\text{l}$ (1mg/ml) と $^{125}\text{-I Na}$ (約 2mCi) にクロラミン T $200\mu\text{l}$ (1mg/ml) を加えて90秒間作用させ、メタ重亜硫酸ナトリウム溶液 $200\mu\text{l}$ (1.5mg/ml) にて反応を停止させたのち直ちに Sephadex G-100ゲル・カラム ($0.8 \times 30\text{cm}$) で標

識 CEA と遊離 ^{125}I との分離を行つた。標識された CEA の比放射能は28~35 $\mu\text{Ci/g}$ であつた。

以上によつて標識された CEA を用いて、Laurence¹²⁾らの二抗体法に準じてラジオイムノアッセイを行つた。対照として Gold より提供された標準 CEA を使用した。方法の詳細は第二編に述べるが略述すると、検体100 μl 、約6,000倍に稀釈した抗血清100 μl 、および正常家兎血清を4%含む磷酸食塩緩衝液100 μl を混合して、一夜インキュベーション、標識 CEA 100 μl を加えてさらに一夜インキュベーションし、20%抗家兎 IgG 抗血清 (山羊) 100 μl を加え、室温で2時間インキュベーションしたのち遠沈し、沈渣の放射能を測定した。

6) 分析ディスク電気泳動

4%および7.5%のポリアクリルアミド・ゲルを使用し、Davis¹³⁾の方法に準じて行つた。泳動後のゲルをアミドブラック10B 染色、Shiff 試薬を用いた糖蛋白染色 (PAS 染色) およびブリリアント・ブルー染色を施した。

また泳動後のゲルの CEA 活性部を確かめるためには、同時に泳動したゲルを2mmの厚さにスライスし、0.01M、pH 7.4磷酸食塩緩衝液で溶解された厚さ2mmの1%寒天平板上で特異抗血清に対してオクタローンを行つた。

7) カラム等電点電気泳動

著者の標識 CEA および対照とした Gold より提供された標識 CEA の等電点電気泳動には、LKB 社製等電点電気泳動装置 MODEL 8,100 (110ml) を使用した。carrier ampholyte は pH 3—10および pH 4—6 のものを使用し、定電圧600Volt で24時間、さらに1,000Volt で24時間、4°Cで泳動したのち、33滴 (約0.8ml) ずつ分画採取し、各々の分画について pH と放射能を測定した。

8) 超遠沈分析

沈降定数測定は京大化学研究所 (宇治市五ヶ庄) に依頼した。使用機種は Beckman Model E (最大回転数59,700rpm) で、溶媒は0.01M、pH 7.4磷酸食塩緩衝液であつた。

成 績

1) Sepharose 4B および Sephadex G-200ゲル濾過

腫瘍組織からの過塩素酸抽出物の凍結乾燥粉末の重量は432mgであつた。この抽出物をSepharose 4B ゲル・カラムで溶出した結果、溶出曲線は二峰性で、CEA 活性は第一峰の上行脚部に局在するのが確かめられた (Fig. 1)。

Sephadex G-200ゲル濾過では CEA 活性は第一峰と第二峰の間に認められ、対照として正常人血清を同一条件で溶出させた結果、CEA 活性部は7S γ -グロブリンと一致した部位に相当した (Fig. 2)。

2) 調製用ディスク電気泳動

調製用ディスク電気泳動を行つた結果、蛋白は多峰性を示し、CEA 活性部は γ -グロブリンにやや遅れた位置に広い範囲に亘つて認められた。CEA 活性部をプールし、透析、凍結乾燥したも

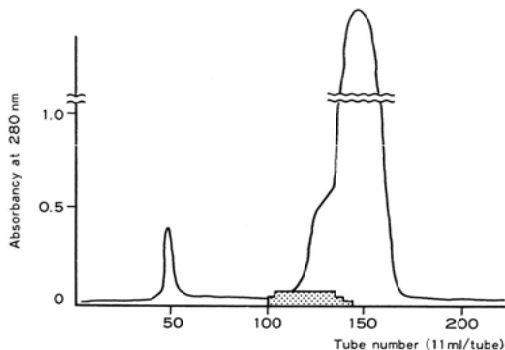


Fig. 1 Gel filtration of the perchloric acid extract on Sepharose 4B. CEA activity is shown in the shaded area.

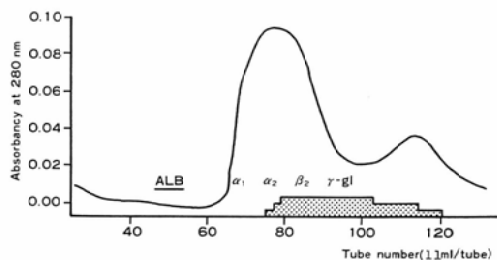


Fig. 2 Gel filtration of the partly purified CEA on Sephadex G-200. CEA activity is demonstrated in the shaded area.

の重量は6.7mg で、過塩素酸抽出物の1.55%に相当した (Fig. 3).

3) 分析ディスク電気泳動

4%および7.5%ポリアクリルアミド・ゲルを

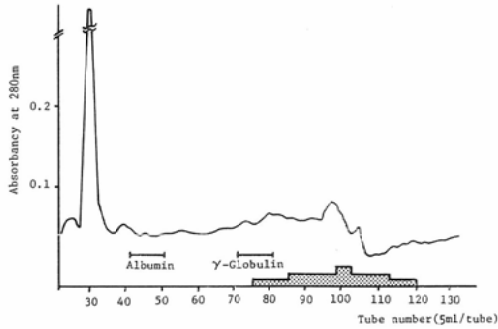


Fig. 3 Purification of the CEA by polyacrylamide disc gel electrophoresis. 7.5% polyacrylamide was used. CEA activity is shown in the shaded area.

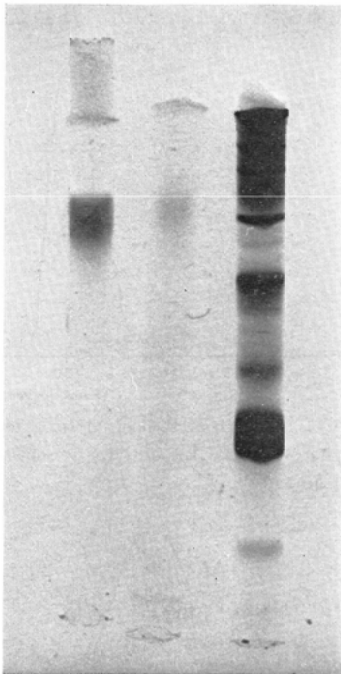


Fig. 4 Analysis of the purified CEA by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were well stained with PAS (left) and faintly with amide black 10B (center). The electrophoresis of normal serum stained with amide black 10B is shown as a control (right).

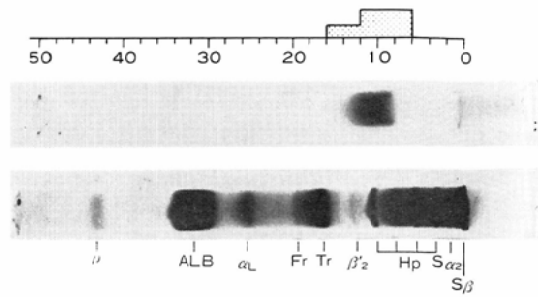


Fig. 5 Analytical disc electrophoresis. CEA activity is demonstrated in the shaded area on double diffusion technique. Electrophoresis pattern of the normal human serum performed in the same conditions is shown on the bottom.

用いて、最終標品と対照の正常人血清の分析ディスク電気泳動を行い、泳動後のゲルをアミドブラック10B および糖蛋白染色した結果、最終標品の均質かつ単一の band として染色され、最終標品の被染色部分はアミドブラック10B によるよりも糖蛋白染色でより明瞭に染色された (Fig. 4)。ブリリアント・ブルー染色の結果はアミドブラック10B とほぼ同様であった。

また同時に泳動されたゲルを 2mm の厚さに薄切して CEA 活性部を確認するため、抗血清に対して double diffusion を行つた結果、CEA 活性部は被染色部位に一致するのが確かめられた (Fig. 5)。

4) 超遠沈分析

超遠沈分析の結果、主なピークの沈降定数は 2.4S であつた。そのほかにもやや大きい component が2ヶまたは3ヶ認められたが、試料が微量であつたためピークが低く、定数算出は不可能であつた。

5) 等電点電気泳動

著者の標識 CEA を pH 3—10 の ampholyte を用いて等電点電気泳動を行つた結果、放射活性は二峰性を呈し、pH 3.0以下および pH 4.0にピークが認められた。Gold から提供された標識 CEA を同様に泳動分画したところ、著者の標識 CEA と相似のパターンを呈し、pH 3.0以下と pH 4.2にピークが認められた (Fig. 6)。

pH 4—6 の ampholyte を用いた泳動では、前

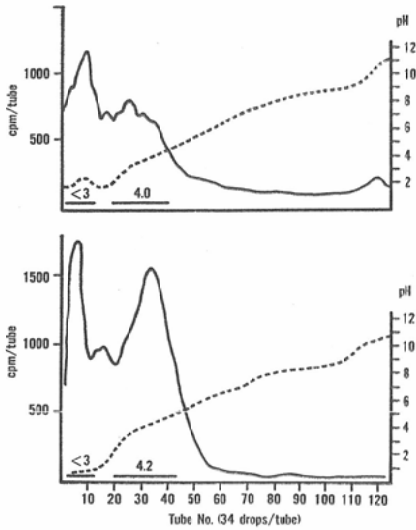


Fig. 6 Comparison of ^{125}I -CEA purified and labeled by author (top) with the one by Gold (bottom), using column electrofocusing with a pH 3-10 ampholyte.

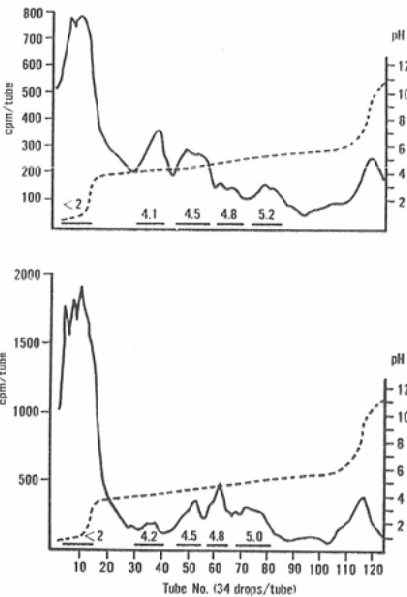


Fig. 7 Comparison of author's ^{125}I -CEA (top) with the Gold's (bottom), by column electrofocusing with a pH 4-6 ampholyte.

者は pH 2 以下, 4.1, 4.5, 4.8, 5.2 にピークを持ち, 後者は pH 2 以下, 4.2, 4.5, 4.8, 5.0 にピークが認められた. 前者の pH 4.1, 4.5 のピークが比較的大きいものに対して, 後者は pH 4.8 のピークが大きく, pH 3—10 の ampholyte による泳動の場合と同様にややアルカリ性の傾向が認められた (Fig. 7).

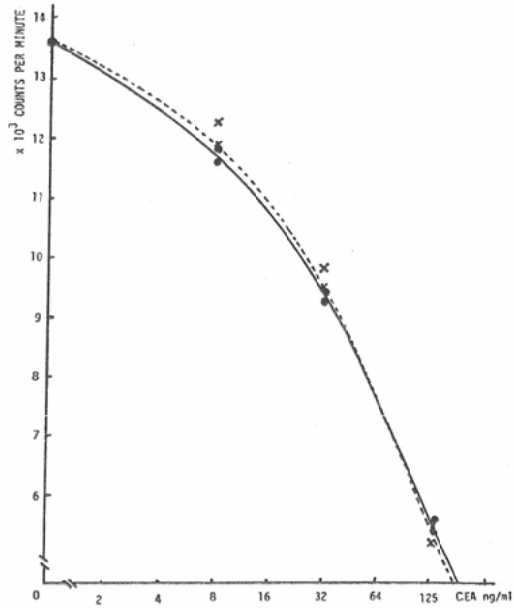


Fig. 8 Comparison of standard curves of radioimmunoassay made by author's CEA (O---O) with the Gold's (x---x)

6) 抑制曲線
著者の精製 CEA および Gold より提供された CEA を標準抗原として, 著者の標識 CEA および抗 CEA 抗血清を用いた二抗体法ラジオイムノアッセイ系において, 著者の精製 CEA による標準抑制曲線は, Gold の CEA による抑制曲線と概ね同一のパターンを示した (Fig. 8).

考案

最初 Gold らが結腸癌の過塩素酸抽出物中に癌関連物質を証明したのち, 同研究グループの Krupey らは 1M 過塩素酸による結腸癌からの抽出後, paper block 電気泳動, Sephadex G-200 ゲル濾過を用いた CEA の精製法を記載した⁷⁾ が, その後過塩素酸抽出後, Sepharose 4B ゲル濾過および Sephadex G-200 ゲル濾過による精製により純度の高い CEA を精製し¹⁰⁾, Coligan らもこの精製法に準じている. von Kleist らは過塩素酸抽

出液の飽和硫酸沈降物を Sephadex G-200ゲル濾過で精製したが⁶⁾、分析ディスク電気泳動で2本の染色帯を認めている。この様にして精製された CEA には分析ディスク電気泳動⁴⁾⁶⁾、等電点電気泳動⁴⁾¹⁴⁾、密度勾配を用いた遠沈分析¹⁴⁾アミノ酸分析³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾などによつて heterogeneity が認められ、さらに癌特異性の高い単一な CEA が検索される必要が認められている。1972年、Plow および Edington らは¹⁵⁾、Krupey らの方法に準じた CEA をさらに等電点電気泳動、DEAE-Cellulose カラム・クロマトグラフィー、密度勾配を用いた超遠沈分析によつて isomer CEA (CEA-S) を精製し、消化管の悪性新生物に非常に高い特異性を持つ癌関連物質が得られたと報告している。

CEA は従つて一般に heterogeneous なものではあるが、結腸癌、胃癌、膵癌またはそれらの肝転移巣など臓器の差異または個体の差など CEA 精製材料の相違にも拘らず、精製された CEA はほぼ一定したアミノ酸組成を示し、免疫化学的または、物理化学的にも一定の性質を有している³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

しかし沈降定数については精製された CEA によつてかなり差異がみられ、Gold らは5.47S~8.0S、Coligan らの CEA は6.8S、10.1S、von Kleist らは4.1S、7.2S と報告している。著者の標品の主なピークの沈降定数は2.4 Sで、これらにくらべるとかなり小さく、von Kleist らの small component の2.0S、2.4S に近似している。この差異の原因の1つは出発材料の個有の差で、糖部分のうち免疫原性に比較的關係の低いシアル酸などの含量の差異であり、1つは精製法によつて生ずると考えられている⁴⁾。著者の精製 CEA が小さかつた理由は、このいずれもが相当すると考えられる。

Coligan ら⁹⁾、von Kleist ら⁶⁾は4%ポリアクリルアミド・ゲルを用いて CEA の分析ディスク電気泳動を行つたが、著者はさらに高濃度の7.5%ポリアクリルアミド・ゲルにも CEA が進入可能であることを認め、この濃度のゲルを用いた

調製用ディスク電気泳動によつて純化をはかつた。泳動終了後の濃縮用ゲルおよび分離用ゲルに CEA 活性の残存は認められなかつたことから、著者の精製 CEA は従来報告された CEA より分子量は小さいことも考えられる。

この精製 CEA を ¹²⁵I で標識し、Sephadex G-200ゲル・カラムで溶出した結果では、対照として溶出した正常人の γ -グロブリン領域 (7~8 S) に一致して放射活性が認められた。これは一見矛盾した成績であるが、Sephadex の物理化学的特性によるもので、このゲル濾過では分子量よりも分子の大きさまたは分子構造の条件によつて溶出位置が決定されるため、CEA 個有の分子量よりも見掛け上大きい分画に溶出されたことによると考えられる。

pH 3—10の ampholyte を用いた等電点分画法では著者の精製標識 CEA は酸性領域に二峰性のピークを示した。pH 4—6の ampholyte を用いた泳動ではピークは数峰出現し、heterogeneousであることを示唆した。これらの泳動の成績は標識された Gold の CEA を泳動した場合とほぼ同様であつたが、著者の精製 CEA は Gold の CEA よりもやや酸性の傾向がみられた。この成績は Banjo ら⁴⁾の成績とほぼ同様である。Coligan ら⁹⁾は等電点分画法を用いて CEA の免疫化学的性質を検討し、数ケのピークのいずれにも抗原性を証明している。

最終標品の分析ディスク電気泳動後のゲルをアミドブラック10B、ブリリアントブルーおよびPASによる染色を行つた結果では、PAS染色がもつとも鮮明で、この標品が糖蛋白である1つの根拠を与えるものと考えられる。染色された幅は Banjo ら⁴⁾の CEA より幅が狭く、かつ境界が鋭と思われるが、泳動条件の差を考慮すると断定は出来ない。

この染色域に一致して double diffusion にて CEA 活性を証明した。

著者の精製 CEA の免疫化学的性質を検討するために二抗体ラジオイムノアッセイ系による標準抑制曲線を作成した。著者の標準 CEA は対照の

Gold の標準 CEA にくらべ、わずかに低い抑制が認められたが、ほぼ同一の曲線を呈し、両者はほぼ同じ免疫活性を有すると結論した。

結 語

結腸直腸癌組織の過塩素酸抽出物から Sepharose 4B ゲルおよび Sephadex G-200ゲル濾過、調製用ディスク電気泳動によつて CEA の精製を行った。

得られた標品は過塩素酸抽出物の1.55%の重量に相当し、糖蛋白染色で比較的限局された範囲が明瞭に染色され、超遠沈分析による主なピークの沈降定数は2.4S であつた。しかし等電点電気泳動を行うと多峰性を示し、heterogeneous なものであつたが、Gold の CEA よりやや酸性の傾向を示した。標準抑制曲線では Gold の CEA を用いた場合と略々同一の曲線を呈し、同一の免疫活性を有すると結論した。

稿を終るに臨み終始御指導をたまわつた浜田哲先生(京大放射性同位元素総合センター)および御校閲いただいた鳥塚莞爾教授(京大放射線核医学講座)に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gold, P. and Freedman, S.O.: Demonstration of tumor-specific antigen in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorpton techniques. *J. Exp. Med.* 121: 439—462, 1964.
- 2) Gold, P. and Freedman, S.O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467—481 1965.
- 3) Krupey, J., Gold, P. and Freedman, S.O.: Physiochemical Studies of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 128: 387—398, 1968.
- 4) Banjo, C., Shuster, J. and Gold, P.: Intermolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 34: 2114—2121, 1974.
- 5) Terry, W., Henkart, P.A., Coligan, J. and Todd, C.W.: Structural studies of the major glycoprotein in preparations with carcinoembryonic antigen activity. *J. Exp. Med.* 136: 200—204, 1972.
- 6) von Kleist, S. and Burtin, P.: Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors. *Cancer Res.* 29: 1961—1964, 1969.
- 7) Krupey, J., Gold, O. and Freedman, S.O.: Purification and Characterization of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Nature* 215: 67—69, 1967.
- 8) Coligan, J.E., Henkart, P.A., Todd, C.W. and Terry, W.D.: Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry*, 10: 591—599, 1973.
- 9) Coligan, J.E., Lautensohlegar, J.T., Egan, M.L. and Todd, C.W.: Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry* 9: 377—386, 1972.
- 10) Krupey, J., Wilson, T., Freedman, S.O. and Gold, P.: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry* 9: 617—622, 1972.
- 11) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of Iodine-133 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495, 1962.
- 12) Laurence, D.J.R., Stevens, U., Bettelheim, T., Darcy, D., Leese, C., Truberville, C., Alexander, P., Johns, W.E. and Nevile, A.M.: Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal mammary, and bronchial carcinoma. *Br. Med. J.* 9: 605—509, 1972.
- 13) Davis, B.J., Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. S i.* 121: 404, 1964.
- 14) Turner, M.D., Olivares, T.A., Harwell, L. and Kleinman, M.S.: Further purification of perchlorate-soluble antigens from human colonic carcinomata. *J. Immunology* 108: 1328—1333, 1972.
- 15) Plow, E.F. and Edington, T.S.: Isolation and characterization of a homogeneous isomeric species of carcinoembryonic antigen; CEA-S. *Int. J. Cancer* 15: 648—761, 1975.