

Title	正常ヒト大腸粘膜から分離・精製した腓癌関連抗原の物理化学的性状
Author(s)	北田, 昌之
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34924
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	きた 北	だ 田	まさ 昌	し 之
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6658	号	
学位授与の日付	昭和59年11月30日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	正常ヒト大腸粘膜から分離・精製した膵癌関連抗原の物理化学的性状			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	坂本	幸哉	教授 宮井 潔

論文内容の要旨

(目的)

膵癌の新しい血清学的診断法として、いくつかの膵腫瘍マーカーの臨床応用が試みられている。Pancreas cancer-associated antigen (PCAA) は、膵癌患者腹水より分離・精製された分子量約100万の酸性糖蛋白で、精製 PCAA に対する抗血清は、膵癌患者腹水に対して、Pancreatic oncofetal antigen (POA) に対する抗血清 (Dr. Gelderより恵与された) と identical に反応する。また、抗 PCAA 抗血清を用いた enzyme immunoassay による血清 PCAA の測定では、膵癌患者の約67%において高値をとることが明らかにされている。一方、免疫組織学的検索で、PCAA は膵癌細胞に存在し、正常膵組織には検出されなかったが、膵以外では腸粘膜の杯細胞など多くの正常粘液腺に検出された。本研究は、これらの知見にもとずき、正常腸粘膜に存在する PCAA 様物質 (以下 PCAAc) と PCAA との異同を明らかにすることを目的として、PCAAc を抽出・精製し、その物理化学的性状を明らかにするとともに、PCAAc に対する抗血清を作成し、その臨床応用を試みたものである。

(方法ならびに成績)

1. PCAAcの抽出と精製

剖検により得られた正常大腸より粘膜を剝離し、その生理食塩水抽出液を硫酸塩析 (20—35%) して PCAAc の粗標品を得た。ついで DEAE セファセルカラムによるイオン交換クロマトグラフィーを2回行ったが、1回目は NaCl の stepwise elution とし、2回目は 0—0.5M NaCl の gradient elution によった。さらに、セファローズ 6 B カラムによるゲル濾過を2回行い、精製標品を得た。なお各分画の PCAA 活性のチェックは、抗 PCAA 抗血清を用いたロケット免疫電気泳動法 (以下、rIEP) にて行い、

蛋白定量には Lowry 法を用いた。正常大腸粘膜 50gr, wet weight より 1.76 mg の精製 PCAAc 標品を得たが、その精製倍率は 48.4 倍で、収率は 10.6 % であった。精製標品の純度は、3.75 % ポリアクリルアミド・ディスク電気泳動で確認した。精製標品は免疫電気泳動法にて、抗ヒト血清抗血清とは反応せず、抗 PCAA 抗血清に対して、 $\alpha_2\sim\beta$ 領域に単一の arc を示した。

2. PCAAc の物理化学的性状

セファローズ 6 B カラムクロマトグラフィーの溶出パターンより、分子量は約 60 万と計算され、イオン交換ゲルを用いた等電点測定法 (chromatofocusing) の結果、等電点は 4.4 であった。また、化学分析の結果、PCAAc は 70% の蛋白、30% の糖より成り、アミノ酸ではアスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸に富み、芳香族アミノ酸を含んでおり、糖組成ではヘキササミンを多く含み、シアル酸は含まれなかった。その化学組成の特徴から、PCAAc は N-グリコシド型の糖蛋白と推定された。

3. 抗 PCAAc 抗血清の作製

精製 PCAAc 標品 100 μg を生理的食塩水 1 ml に溶解し、等量の Freund's complete adjuvant に懸濁し、雄ウサギ (2.5 kg) の皮下 4 か所以上に分注した。4 週後より booster shot を開始し、十分な抗体価の得られるまで 1 週毎に筋注をくり返した。抗 PCAAc 抗血清は、ゲル拡散法 (micro-Ouchterlony 法) で正常ヒト血清とは反応せず、大腸粘膜抽出液と膵癌患者腹水に対してお互いに fuse する 1 本の沈降線を形成した。また、fused rIEP においても、大腸粘膜抽出液と膵癌患者腹水とその混合液に対して fuse する 1 本の arc を形成した。さらに、抗 PCAAc 抗血清と抗 PCAA 抗血清は、正常大腸粘膜抽出液、膵癌患者腹水のそれぞれに対して、fuse する 1 本の沈降線を形成した。

4. PCAAc の組織学的局在

抗 PCAAc 抗血清を用い、蛍光抗体間接法あるいは酵素抗体法 (PAP 法) にて免疫組織学的に検討したところ、PCAAc は正常膵組織には全く検出されなかったが、大腸・小腸の杯細胞には例外なく検出され、食道腺、気管支腺、顎下腺組織の粘液細胞にも PCAAc の存在が認められた。癌組織では、膵の分化型腺癌 5 例中 5 例にその存在が認められ、胃癌では印環細胞癌、低分化腺癌の細胞質に検出され、大腸癌では高分化腺癌の apical portion に検出された。なお、胃癌、大腸癌では PCAA はあまり検出されず、免疫組織学的に PCAA と PCAAc の間に差異が認められた。

5. PCAAc の臨床的意義

rIEP にて健常人ならびに種々の癌患者血清の PCAAc 量を検討した。健常人 47 例では平均 14.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、標準偏差 7.06 であったのに対して、膵癌患者 21 例では平均 38.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、標準偏差 23.3 であって、健常人に比べて膵癌患者血清の PCAAc レベルは有意に上昇していた。また、28.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (健常人の mean + 2 S. D.) を cut off 値とすると、膵癌では 62% (13/21 例) が陽性となり、胃癌 3.8% (1/26 例)、大腸癌 12.5% (3/24 例)、乳癌 4.5% (1/22 例) に比べ、膵癌患者の陽性率は著しく高かった。

(総括)

1. 正常大腸粘膜より、膵癌関連抗原 (PCAA) と免疫学的に同一と考えられる PCAAc を精製し、その物理化学的性状を明らかにした。PCAAc は分子量約 60 万、等電点 4.4 の糖蛋白で、糖およびアミノ酸組成の特徴から、糖とペプチド鎖の結合は N-グリコシド型と推定された。

2. 抗 PCAAc 抗血清と抗 PCAA 抗血清は PCAAc と PCAA に対して identical に反応したが、免疫組織学的な検索では胃癌、大腸癌に対する反応に差異が認められた。
3. 健常人および癌患者の血清 PCAAc 量の測定により、PCAAc は膵癌患者の62%において異常高値を示し、膵癌の診断に有用であった。

論文の審査結果の要旨

Pancreas cancer-associated antigen (PCAA) は膵癌患者の血中に高率に検出され、膵癌の重要な腫瘍マーカーであるが、現在用いられている抗 PCAA 抗血清は、正常腸粘膜とも反応することが知られている。本研究は、正常大腸粘膜より immunoreactive PCAA を抽出、精製し、その物理化学的性状、免疫化学的性状を膵癌 PCAA と比較、検討したもので、両者はともに N-グリコシド型糖蛋白であるが、両者の間に heterogeneity のあることを明らかにした。この知見は、膵癌マーカーの基礎的、臨床的研究の展開の上で極めて重要であり、学位に値する。