日消外会誌　16（1）：92～96，1983年

CEAよりみた癌関連抗原の回収に関する検討

千葉大学医学部第1外科
呉　正信　藤本　茂　宮崎　勝
橘川　征夫　石神　博昭　雨宮　邦彦
大山　欣昭　遠藤　文夫　志村　賢範
高橋　修　セレスターR.D.　奥井　勝二

INVESTIGATION UPON EXTRACTION OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN ON THE BASIS OF CEA CONTENTS

Masanobu KURE, Shigeru FUJIMOTO, Masaru MIYAZAKI, Yukio KITSUKAWA, Hiroaki ISHIGAMI, Kunihiko AMEMIYA, Yoshiaki OHYAMA, Fumio ENDOH, Takanori SHIMURA, Osamu TAKAHASHI, Ram Dhoj SHRESTHA and Katsuji OKUI
The First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

癌関連抗原の回収を検索する目的で，大腸癌15例（男9名，女6名，38～85歳，平均58.2±11.5歳）について，その癌組織および正常粘膜組織からHypotonic salt extraction（HSE）法とHypertonic salt extraction（3M-KCL）法の2種類の方法を用いて，同時に可溶性抗原を抽出し，それに含まれるCEAを測定した．その結果，HSE法では癌組織265.0±159.4ng/mg protein（平均±1×標準偏差），正常粘膜組織51.6±32.5ng/mg proteinであり，3M-KCL法では，それぞれ156.8±81.7ng/mg protein，27.5±20.3ng/mg proteinであった．すなわち，癌組織，正常粘膜組織ともHSE法が3M-KCL法より有意に高いCEA値を示した．また，組織分化度の高低，換言すればCEA産生能の多少にかかわらず，この事実が認められた．以上より，癌関連抗原の回収にはHSE法が3M-KCL法より優れていると推定された．さらに，HSE法，3M-KCL法ともに，血中CEAと腫瘍内全CEAの間には有意の相関を認め，かつ臨床病期の進行につれ腫瘍内全CEAは増加傾向を示した．

索引用語：癌関連抗原，CEA

はじめに

突然変異により発生した癌細胞を"not self"と認識して，これを宿主より完全に拒否する事が悪性腫瘍に対する最善の治療と考えられるが，非自己と認識するものは，癌細胞のみが産生する「癌特異抗原」である．すなわち，癌の免疫療法を行うのに最も必要であるのは，おのおのの癌患者より癌特異抗原を迅速簡単に抽出することであり，次いで，これを使用して癌患者の癌特異的免疫防御機構を特異的に賦活することにある．現在，臨床において特異抗原が見出されているのは悪性黒色腫のみ[1)2)]であり，一般的に消化器癌細胞の抗原特異性は，非常に低いものと考えられている．

1965年，Gold & Freedman[3)]により大腸癌組織より抽出されたCEAは，大腸癌特異性という性格は失なわれてきつつあるが，現在主に消化器癌患者のスクリーニング，あるいは術後のモニターリングとして臨床的意義を猶持ち続けている．一方，宮崎ら[4)5)]は抗原特異性の低いと言われている消化器癌組織よりcell wall peptideを抽出し，これが一定のstageの消化器癌患者のamplifier-T細胞を賦活することにより，癌特異抗原を含むfractionであることを屢々報告し，癌免疫療法の良き指標となり得ることを併せ報告している．

著者らの消化器癌組織より抽出した癌特異抗原を含むfraction中には，癌特異抗原の他に組織適合抗原，臓器特異抗原，またCEA，AFPなどの癌胎児性抗原などが多々含まれているものと考えられており，その抽出方法としては，Daviesにより報告された低張食塩水を用いたHypotonic salt extraction（HSE）法[6)]とReisfeldらによる3M-KCLを用いたHypertonic salt

extraction（3M-KCL）法[7]のいずれかを用いている．

今回は，これら2種類の抽出法の比較をする目的で，同一組織について同時に前記の二抽出法を施行した大腸癌患者15名の癌組織抽出物中のCEA量を測定し，両抽出法によるCEAの回収率を検討するとともに，血中CEAとの関係につき検索を加えた．

研究対象および研究方法

対象は大腸癌15症例（男9名，女6名，38～85歳，平均58.2±11.5歳），疾患の部位は結腸癌7名，直腸癌8名である．臨床病期別に分類すると，stage I 3名，stage II 4名，stage III 3名，stage IV 4名，stage V 1名であり，病期分類，組織型分類は，大腸癌取扱い規約により行なった．

これら15症例の術前早朝空腹時に末梢血を採血し，その血中CEAをsandwich法によるRIAで測定した．

次に，これら症例の手術時に得た癌組織および正常大腸粘膜組織より，図1に示したHypotonic salt extraction（HSE）法とHypertonic salt extraction（3M-KCL）法により可溶性抗原の抽出を行った．癌組織ならびに正常大腸粘膜組織より抽出した可溶性抗原の蛋白濃度を測定し，次いでsandwich法によりCEA量を測定しng/mg proteinにて表わし，血中CEAはng/mlとした．また，腫瘍径より腫瘍の面積を測定し，これに組織内CEA量を乗ずることによりestimated total CEA—全腫瘍CEA—とした．

成　績

1．2種類の抽出法による組織CEAの比較

図1　2種類の可溶性抗原抽出方法

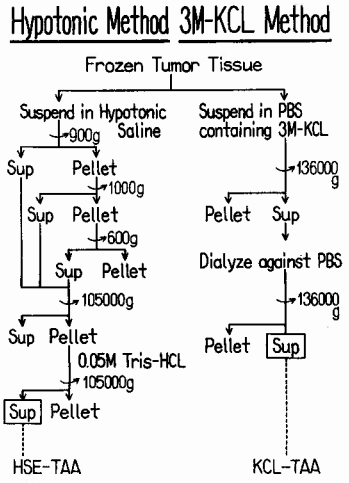


図2　2種類の抽出法による組織CEAの比較

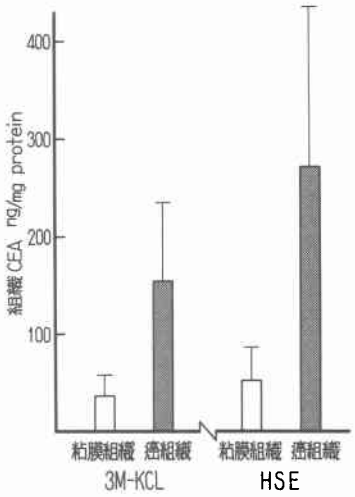


図2は癌組織および正常粘膜組織中のCEA量を比較したものである．3M-KCL法による可溶性抗原中のCEA量は，癌組織156.8±81.7ng/mg protein（平均値±1×標準偏差），粘膜組織27.5±20.3ng/mg proteinであり，HSE法による可溶性抗原中では，それぞれ265.0±159.4ng/mg protein，51.6±32.5ng/mg proteinであった．両者を比較した場合，粘膜組織中のCEA量は，$t=2.557, p<0.02$，癌組織中のCEA量は$t=2.230$，$p<0.05$で共にHSE法の場合が3M-KCL法に比較して有意に高値を示した．

2．組織像と組織CEA量の関係

次に，組織像による両抽出法の相違を検討した．図3に示したように，中等度分化型腺癌の癌組織内CEAは，HSE法では213.3±113.5ng/mg protein，3M-KCL法では120.0±32.7ng/mg proteinであり，HSE法が3M-KCL法に比較して高値を示す傾向が認めら

図3　組織像と組織CEA量の関係

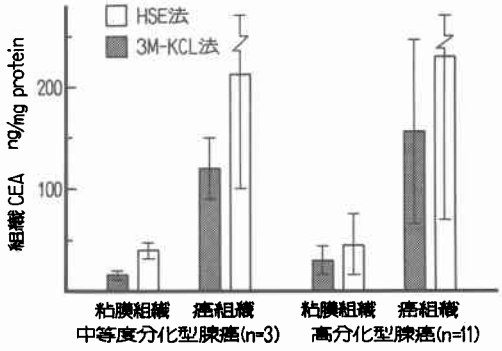


図4　癌組織内CEAと血中CEAの関係

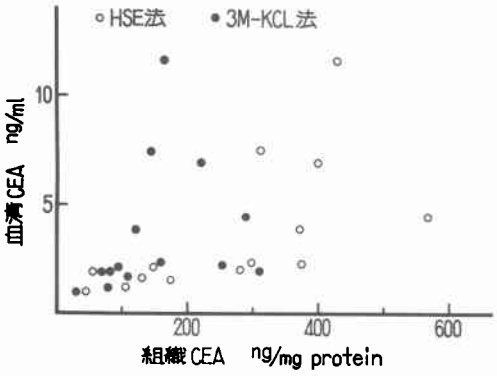
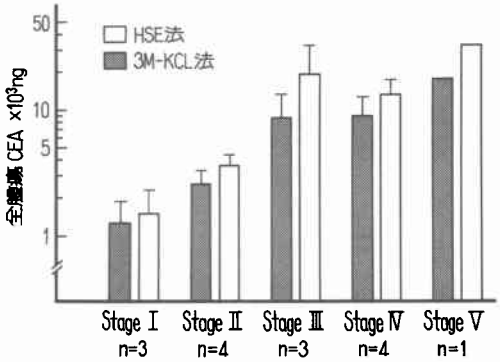


図6　臨床病期と全腫瘍CEAの関係



れた．また，高分化型腺癌においては，それぞれ240.7±120.7ng/mg protein, 175.0±82.4ng/mg proteinであり，同様の傾向が認められる．

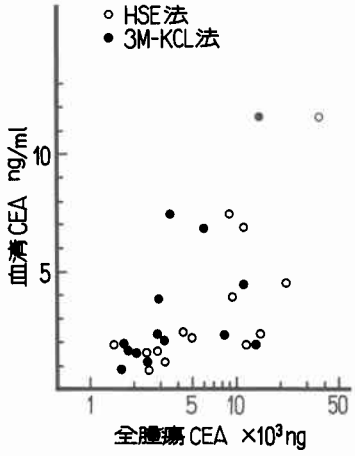
3．癌組織内CEAと血中CEAの関係

同一症例の癌組織内CEA値と，血中CEA値との相関が図4である．血中CEAが2.5ng以上の測定値を示したものは，15例中6例(40%)であり，平均12.8±13.6ng/mlであった．HSE法と血中CEAの相関は，$r=0.597$，$p<0.05$で有意の相関がみられたが，3M-KCL法では$r=0.230$，$p<0.5$で有意の相関はみられなかった．

4．全腫瘍CEAと血中CEAとの関係

図5は全腫瘍CEAと血中CEAとの関係を示したものである．HSE法では$r=0.865$，$p<0.001$，3M-KCL法では$r=0.637$，$p<0.02$であり，両者とも全腫瘍CEAと血中CEAは強い正の相関を示した．

図5　全腫瘍CEAと血中CEAの関係



5．臨床病期と全腫瘍CEAの関係

図6は臨床病期と全腫瘍CEAとの関係を示したものである．stage Ⅰにおける全腫瘍CEAは，HSE法で1,481±855ng，3M-KCL法では1,268±632ngである．stage Ⅱでは，それぞれ3,755±845ng，2,553±555ng，stage Ⅲ，19,226±13,885ng，8,633±4,683ng，stage Ⅳ，13,287±4,575ng，9,032±3,839ng，stage Ⅴは1例のみであるが，それぞれ33,660ng，17,820ngであった．

考　察

冒頭で述べたように，療免疫療法と癌特異抗原は不離不即のものであり，癌細胞に存在すると考えられている癌特異抗原が容易に抽出分離し得れば，amplifier-T細胞，Killer-T細胞の働きにより，癌特異的免疫療法を行うことが出来る．ヒトの癌特異抗原を認識するT細胞subsetの大きさについての報告は皆無であるが，結核に対するものがT細胞全体の5%前後[8]であることより，それがPHA, Con-Aなどに反応するT細胞と比べて遙かに小さいsubsetと推定される．著者らは，消化器癌組織よりの癌関連抗原を用いて測定し度々報告した[9]が，そのcpmより考えてPHA, Con-Aに関連するものの約1/10～1/20と推定している．

現在，臨床において用いられている抗原の抽出方法としては，Daviesらによる Hypotonic salt extraction (HSE) 法とReisfeldらによる Hypertonic salt extraction (3M-KCL)法であるが，前者はマウスのH-2抗原，後者は人間のHLA抗原の抽出，すなわち，いずれも細胞膜表在抗原の抽出に用いられた方法である．従って，これらの方法を用いて癌組織より抽出した抗原は，細胞膜に存在する抗原であるため癌特異抗原だ

けでなく，組織適合抗原，臓器特異抗原を含み，さらに，癌組織中には基質の他に多くの正常組織を含んでいるため，癌組織よりの抽出抗原に基くリンパ球幼若化反応を評価するに際しては，癌特異抗原以外の抗原による影響を除外する事が必要である．このため癌組織より抽出した抗原と患者リンパ球を混合培養することにより得られたcpm（幼若化リンパ球に取り込まれた^{3}H-thymidineの放射活性）を，正常組織より抽出した抗原を用いて得られたcpmで除しStimulation Indexとして表わしている．

抗原の抽出方法を略述すると，HSE法では図1のように手術時に得た組織を細切後，低張食塩水を加えてhomogenizeし遠沈（1,900×g，10分間）する．得られた沈渣に，同様に低張食塩水を加え1,000×g，600×gにて遠沈を繰返し，得られた上清を全て合わせて105,000×g，2時間の超遠心を行い，得られた沈渣がcrude insoluble membranous lipoproteinである．これをTris-HCL緩衝液により可溶化し，再度の超遠心により得られた上清を可溶性抗原とするものである．一般に細胞のhomogenateは1,000×g，10分間の遠沈により核分画は沈渣となり，105,000×g，60分間の超遠心により糸粒体，小胞体が沈殿するので，HSE法は細胞膜脂質蛋白質の回収，可溶化を目的としたものであることが判る．一方，3M-KCL法は同様に入手した組織を細切後，3M-KCLを含んだ燐酸緩衝液中でhomogenizeした後，16時間撹拌を続ける．次いで136,000×g，1時間の超遠心により得られた上清を24時間透析する．透析中にゲル状となって現われたDNA分画を再度の遠心にて除去し，得られた上清が可溶性抗原である．これらの操作によって前述のように，核分画は沈殿となり，さらに糸粒体分画，小胞体分画も沈殿となり除去されている．この場合HSE法よりさらに超遠心を行っているが，これはRapaportらが[10]が100,000×gで沈殿を生じない“可溶性分画”を200,000×gで遠沈し，その沈渣の微細構造を検討した結果，それが細胞膜片より成ることを確認しているためである．この事よりReisfeldら[11]は3M-KCLによる可溶性抗原の作製に当って，可溶性であるといえるためには，実用上長時間の透析に続いて130,000×gの遠沈を行い，その上清に抗原性の大きな喪失がみられないことが必要であるとしている．KCLの濃度については3M-KCLの場合が0.1M，1Mの場合よりも活性ある抗原が多く回収されたとして，3M-KCLを用いている．

以上の2つの方法で大腸正常粘膜組織および大腸癌組織から抽出した可溶性抗原の中に，どの程度細胞膜表在抗原が含まれているかを検討する目的で，癌関連抗原の1つであり特に大腸癌組織に多く含まれ，その測定方法がほぼ確立されているCEAをRIAにより測定し，ng/mg proteinで表わした．その結果は，粘膜組織中，癌組織中のCEAともにHSE法の場合の方が3M-KCL法に比較して有意に高値を示した（それぞれ$t=2.557, p<0.02$；$t=2.230, p<0.05$）．

組織型の相違による細胞膜表在抗原の回収率を検討する為に，対象とした15例を高分化型腺癌と中等度分化型腺癌の2群に分け，2種類の抽出法によるCEAの回収量を比較した．図3のように両抽出法ともに高分化型の方がCEAを多く回収しており，これは既にFujimotoらの報告[12]のように，高分化型腺癌の方がCEAをより多く含有していることを裏付けたものであると同時に，分化度の違いに関係なくHSE法が3M-KCL法に比較して単位蛋白量あたりの回収が多いことが窺われる．したがって，細胞膜表在抗原の1つであり，同時に癌関連抗原の1つであるCEAの収量を指標として，細胞膜表在抗原の回収法であるHSE法と3M-KCL法の2つの抗原抽出法を比較した場合，HSE法が3M-KCL法より癌関連抗原の回収には優れているのではないかと推定された．

血中CEAと癌組織内CEAとの関係については，今回の検討ではHSE法では相関あり（$r=0.597, p<0.05$），3M-KCL法では相関なし（$r=0.230, p<0.5$）と結果は一定しなかった．しかしながら，血中CEAと全腫瘍CEA量との関係では，HSE法，3M-KCL法ともに強い正の相関がみられた（それぞれ$r=0.865, p<0.001$；$r=0.637, p<0.02$）．血中CEAの消長は癌・大腸粘膜細胞において産生されたCEAの組織より血中への放出と，肝でのclearanceの差に依存すると考えられるので，全腫瘍CEA量の増大とともに血中CEAが上昇することは当然と思われた．

臨床病期との関係については，病期分類が患者の持つ腫瘍の総量を忠実に反映しているとすれば，病期の進行に伴なって全腫瘍CEA量が増大することも，また当然であろう．この場合も，組織CEAはHSE法が3M-KCL法より高値を示していることから，前述の回収率の結論がここにおいても裏付けられたと言える．

以上，15例の大腸癌症例よりHSE法と3M-KCL法の2種類の抽出法を同時に施行して得られた可溶性抗原につき，癌関連抗原の回収という観点よりCEAを

RIAにより測定し，HSE法が3M-KCL法より癌関連抗原の回収には優れているという結論が得られた．

まとめ

大腸癌患者15例の正常粘膜組織および癌組織から，同時に可溶性抗原をHSE法と3M-KCL法の2種類の方法を用いて抽出し，それに含まれるCEAを測定することにより癌関連抗原の回収につき検討した．

1．粘膜組織，癌組織ともに単位蛋白あたりのCEA量はHSE法が3M-KCL法より有意に高値を示した．

2．高分化型腺癌は中等度分化型腺癌よりCEAを多く含んでいるが，CEAの多少に関係なく1．に述べた傾向が認められた．

3．HSE法，3M-KCL法ともに，血中CEAと全腫瘍CEA量は有意の相関を認めた．

4．HSE法，3M-KCL法のいずれの場合も，臨床病期の進行につれて，全腫瘍CEAは増加していく傾向が見られた．

文献

1) Morton DL, Malgren RA, Holmes EC et al.: Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluoresence. Surgery **64**: 233—240, 1968
2) Fass L, Herberman RB, Ziegler JL et al.: Cutaneous hypersensitivity reactions to autologous extracts of malignant melanoma cells. Lancet **1**: 116—118, 1970
3) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techiques. J Exp Med **121**: 439—462, 1965
4) 宮崎　勝，藤本　茂，高橋　誠ほか：可溶性tumor-associated antigenによる消化器癌患者の特異的免疫能の証価．癌の臨　**25**：290—294, 1979
5) 宮崎　勝，藤本　茂，橘川征夫ほか：癌患者における腫瘍特異的リンパ球反応—癌進行度との関係および腫瘍切除の影響について—．臨免疫　**11**：149—156, 1979
6) Davies DAL: Mouse histocompatibility isoantigens derived from normal and tumor cell. Immunology **11**: 115—125, 1966
7) Reisfeld RA, Pellegrino MA, Kahan BD: Salt extraction of soluble HL-A antigens. Sceince **172**: 1134—1136, 1971
8) Uzgiris EE, Kaplan JH: Tuberculin-sensitized lymphocytes detected by altered electrophoretic mobility distributions after incubation with the antigen PPD. J Immunol **117**: 2165—2170, 1976
9) 宮崎　勝，藤本　茂，高橋　誠ほか：癌患者に対する免疫賦活剤投与の腫瘍特異的リンパ球反応に及ぼす影響．癌の臨　**26**：173—176, 1980
10) Rapaport FT, Dausset J, Converse JM et al.: Biological and ultrastructural studies of leucocyte fractions as transplantation antigens in man. Transplantation **3**: 490—500, 1965
11) Reisfeld RA, Kahan BD: Transplantation antigens. Adv Immunol **12**: 117—199, 1970
12) Fujimoto S, Kitsukawa Y: Further investigation of immunoreactive carcinoembryonic antigen (CEA) in colorectal cancer patients —With particular emphasis on th correlation between immunoreactive CEA levels in tissue, feces and blood—Jpn J Surg **11**: 27—32, 1981