

《原 著》

癌胎児性抗原 CEA の isomeric species の分離精製と その radioimmunoassay の臨床的評価

—— 第一編 CEA の isomeric species の分離精製 ——

吉 井 正 雄*

要旨 大腸癌肝転移病巣より、過塩素酸抽出、sepharose 4B ゲル濾過、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、sepharose G-200 ゲル濾過、等電点電気分画法および超遠心分画法によって CEA の single isomer (CEA-S) を分離精製した。この CEA-S は従来の heterogenous な CEA のうち、等電点電気分画法によって pI 4.5 の分画を採り、超遠心分画法によって密度 1.410 g/dl に相当する分画を採った CEA の isomer であり、分子量は約 185000 であった。この CEA-S のアミノ酸組成は Plow および Edgington の CEA-S と近似していた。また糖組成は全重量の 27.7% で、従来の CEA の糖組成より著しく少なく、sialic acid や N-acetyl galactosamine は検出されなかった。この CEA-S は、石川の CEA および Gold の CEA に比べて CEA 活性が約 1/4~1/6 であった。

以上の結果より、この CEA-S は Plow および Edgington の CEA-S に近い CEA の isomer であると考えられた。

I. 緒 言

癌胎児性抗原 carcinoembryonic antigen (CEA) は、1965 年 Gold および Freedman¹⁾ によって人の大腸癌組織および胎生期の消化管組織中に見出された癌関連物質である²⁾。

CEA の物理化学的性状については抽出材料や精製方法などによって多少異なり、分子量は 16 万から 20 万、沈降定数は 5.47 S から 8.0 S などの報告³⁾ があり、電気泳動法によっても β -グロブリン域に幅広い band を示すことが知られている。さらに等電点電気泳動法、超遠心分画法によれば、精製された CEA でも幾つかのピークに分かれることが報告されている^{4,5)}。

このように、CEA は heterogenous であることが認められているが^{6,7)}、Plow および Edgington⁸⁾ は大腸癌の肝転移組織より数種のゲル濾過、等電点電気泳動法、超遠心分画法などの分離精製法を組み合わせ、CEA の “a homogenous isomeric species” を分離精製し、これを CEA-S と命名した。さらにこの CEA-S の radioimmunoassay (RIA) を確立し各種疾患患者の血中 CEA-S 値を測定し、その結果、CEA-S は消化器癌により特異的であると報告した⁹⁾。

共同研究者の石川¹⁰⁾ および著者はこれまでに CEA を精製し、その RIA を確立し、血中 CEA 値測定の臨床的意義を追求して来た^{11,12)}。

今回著者は大腸癌の肝転移組織より Plow および Edgington⁸⁾ の方法に準じて CEA-S を分離精製し、得られた最終品の物理化学的性状の検討および各種悪性腫瘍患者の血中 CEA-S の RIA による測定を行って、その臨床上的有用性を検索した。第一編では CEA-S の分離精製法および最終品の物理化学的性状の検討成績について述べる。

* 京都大学医学部附属病院放射線科

受付：56 年 9 月 7 日

最終稿受付：57 年 1 月 28 日

別刷請求先：京都市左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部附属病院放射線科核医学科

吉 井 正 雄

II. 材 料

CEA-S を精製するための材料は大腸癌患者の剖検時の肝転移巣を用いた。肝の全重量は約1500 g であり、これより取り出した大腸癌肝転移病巣の重量は約 875 g であった。なお本材料は病理組織学的に大腸腺癌の肝転移病巣であることが確診されている。

III. 方 法

CEA-S の精製は Fig. 1 に示す順序で行い以下にその詳細を述べる。

1. 過塩素酸抽出

大腸癌肝転移病巣 (875 g) を細断し挽肉機でミンチ状にし、日本精機 SM-3 homogenizer にて 20000 rpm で3分間の homogenization を10回行い、さらに Virtis 60 homogenizer にて 40000 rpm で3分間の homogenization を5回行った。次に重量 1 g に付き 4 ml の割合で脱イオン水を加え 4°C にて1時間攪拌した後、2 M-過塩素酸(PCA) を攪拌しながら同量加え30分間攪拌した。Sorvall 社製冷却遠心機を用いて 4°C, 10000 rpm で30分間遠心分離を行い、この上清を透析チューブに入れて流水に対して2日間、脱イオン水に対して3日間透析した。脱イオン水は頻回に新しいものと交換し持続的に攪拌した。この透析した PCA 抽

出液を 40000 rpm, 30 分間遠心し、変性蛋白を除いた後、Amicon 社製限外濾過装置(DIAFLO)を用いて PM-10 filter にておよそ 10 倍に濃縮しこれを凍結乾燥した。

2. Sepharose 4B ゲル濾過

PCA 抽出物の凍結乾燥粉末を 10 ml の溶出液 (0.05 M 第1 磷酸ナトリウム溶液を含む 0.9%食塩水, pH 7.2, 以下 PBS と略す) に溶解し, 40000 rpm, 30 分間遠心し沈渣を除去した後, Sepharose 4B ゲルカラム (Pharmacia 製 2.5×80 cm) を用いて上行性に溶出した。溶出速度 60 ml/hour, 分画量 13 ml/tube で行い, 溶出濃度を東洋科学社製自記紫外線吸収計 UV-540 M を用いて OD 280 で監視した。この分画の CEA 活性を 0.01 MPBS pH 7.4 を含む寒天平板上で Ouchterlony 法にて確認し, CEA 活性部分を採り脱イオン水にて透析した後凍結乾燥した。

3. DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

上述の CEA 活性分画の凍結乾燥粉末 226.5 mg を溶出液 (0.05 M PBS) 10 ml に溶解し、遠心して沈渣を除いた後、Pharmacia 社製 DEAE セルロースカラム (2.5×30 cm) を用いてカラムクロマトグラフィーを行った。初期緩衝液 (starting buffer) は 0.05 M 第1 磷酸溶液で最初のピークが溶出した後、極限緩衝液 (0.5 M 第2 磷酸溶液) に変えて溶出を続けた。溶出速度は 30 ml/hour で分画量は 5 ml/tube で行い、溶出濃度は UV/540 M 用い OD 280 で監視した。この分画を Ouchterlony 法で CEA 活性を調べ、CEA 活性のみられた最初のピークを採り脱イオン水に対して透析した後凍結乾燥した。

4. Sephadex G-200 ゲル濾過

上述の凍結乾燥粉末 (96.6 mg) を 0.01 M PBS (pH 7.2) の 4 ml に溶解し、よく混和した後遠心して沈渣を除いた。この上清に石川¹⁰⁾が精製した CEA を ¹²⁵I で標識した ¹²⁵I-CEA (約 30 μ Ci/ μ g) を 200 μ l 加えよく混和した。これを 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った。溶出速度は 10

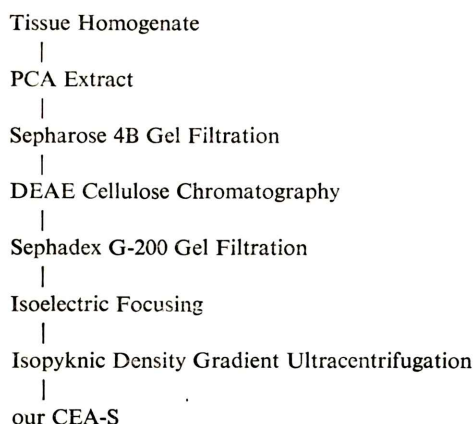


Fig. 1 Author's procedure for isolation of an isomeric species of CEA: CEA-S.

ml/hour で分画量は 5 ml/tube で行い、溶出濃度は Shimadzu UV-200 autosampler にて OD 280 を測定した。この分画の ^{125}I の放射能は Aloka auto well scintillation counter にて測定し、Ouchterlony 法によって検出した CEA 活性部を採り、脱イオン水に対して透析した後凍結乾燥した。

5. 等電点電気分画法 (isoelectric focusing)

上述の Sephadex G-200 ゲル濾過後に得られた凍結乾燥粉末 (32 mg) のうち、16 mg を 2.5 ml の脱イオン水に溶解した。これを LKB 社製等電点電気分画装置 (LKB 8101, カラム容量 110 ml) で pH 4-6 の carrier ampholine を用いて等電点電気分画を行った。通電時間は定電圧 600 volt で 24 時間行った後 1000 volt で 24 時間行った。通電終了後の分画は 1 試験管に 5 分をかけて静かに行い、分画量 1.2 ml/tube で 101 本の試験管に採った。これらの分画の濃度を Shimadzu UV-200 autosampler にて OD 280 で測定し、次いで各分画の pH を測定した。測定した蛋白量のピークより (Fig. 4), 試験管の 1 本目~30 本目の溶液を集め pool No. 1 とし、31 本目~38 本目を pool No. 2, 39 本目~55 本目を pool No. 3, 56 本目~69 本目を pool No. 4, 70 本目~101 本目を pool No. 5 とし、おのおの透析チューブに入れ脱イオン水にて透析した後、凍結乾燥した。以上の pool No. 1 から pool No. 5 の粉末をおのおの 0.1 M 磷酸緩衝液 (PB) (pH 7.4) 約 2.6 ml に溶解し、これらの蛋白量を Lowry 法¹³⁾によって測定した。次いで 0.1 MPB で希釈し、おのおのが 1 mg/ml の濃度になるようにし、これを原液 (1 倍) として、pool No. 1 から pool No. 5 まですべてについて 10 倍, 50 倍, 100 倍, 200 倍, 400 倍の希釈液を作製し、寒天ゲル板状で Ouchterlony 法によって CEA 活性の強さをみた。

6. 超遠心分画法

Plow ら⁸⁾の方法に準じて上述の pool No. 1 から pool No. 5 の溶液に 0.1 M PB (pH 7.4) を加え全量が 8 ml になるようにした。これらの refractive index (屈折率) を Abbe's refractometer により測定し、密度が 1.41 g/ml になるように CsCl

(およそ 5.0 g) を添加しよく混和し、さらに ^{125}I -CEA (約 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) 100 μl を加えた。これを日立分離用超遠心機 (RPS 40 T tube の径 1.5 cm, 長さ 9.6 cm) にて 30000 rpm (約 7200 g), 72 時間, 20°C で超遠心分離を行った。超遠心終了後、各 pool とも滴下により 1 試験管に 20 滴ごとを採り、次に各試験管ごとの refractive index と ^{125}I の放射能量を測定した。その後すべての試験管に 1 ml の脱イオン水を加えて Shimadzu UV-280 で OD 280 により蛋白量を測定した。以上より pool No. 1 から pool No. 5 ごとに超遠心分画の蛋白量、密度および ^{125}I 放射能量の曲線を描き、これより密度が $1.410 \pm 0.040 \text{ ng/ml}$ の範囲の分画を採り、脱イオン水にて透析した後凍結乾燥した。この粉末を最終精製品とした。

7. CEA の single isomer の分子量測定

上述の方法により得られた CEA の single isomeric species (CEA-S) の分子量を SDS (sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミド電気泳動法によって測定した。操作法は Weber-Osborn の方法に従って行い、指標蛋白 (marker protein) には Schwarz-Mann 社製の no enzymatic protein molecular weight markers より apoferritin, γ -globulin, phosphorylase a および catalase を用いて行った。これらの markers と先の CEA の single isomer (CEA-S) を同時に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、おのおのの相対移動度 (Rm) を計算して marker protein による検量線を作成し、これより CEA の single isomer (CEA-S) の分子量を求めた。

8. CEA の single isomer (CEA-S) のアミノ酸組成の分析

得られた CEA の single isomer のアミノ酸組成の分析を京都大学薬学部製薬化学教室の川崎博士に依頼し、アミノ酸と糖の組成を検索した。

9. 精製された CEA の isomers (CEA-S) の抗 CEA 抗血清による標準曲線

抗 CEA 抗血清は石川¹⁰⁾が作製した精製 CEA を Freund 完全アジュバントに混合して成熟家兎を免疫し、得られた抗血清を正常肺、肝および大

腸粘膜の生理的食塩水抽出物および正常人血清にて吸収したものをを用いた。

CEA の single isomer の ^{125}I での標識は, Hunter ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。

10. 石川の CEA, Gold の CEA および CEA-S の抗 CEA 抗血清による標準曲線

石川¹⁰⁾の, CEA, Gold の CEA (P. Gold より得た) および CEA-S の 2, 4, 8, 16, 64, 125, 250, 500 ng/ml 液を作成し, これと上述の抗 CEA 抗血清 (3000 倍稀釈) および ^{125}I -CEA-S を用いて標準曲線を描き, 三者を比較した。

IV. 成 績

1. Sepharose 4B ゲル濾過および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

大腸癌肝転移病巣 875 g からの PCA 抽出物の凍結乾燥粉末の重量は 1160 mg であった。この抽出物を Sepharose 4B ゲル濾過した後の溶出曲線は二峰性で, CEA 活性は第二峰に認められた。この CEA 活性部分を探って透析し, 凍結乾燥した粉末の重量は 226.5 mg であった。

次いでこれを DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにて溶出した結果を Fig. 2 に示すが, 二峰性の溶出曲線が得られ, 最初のピーク (non bound fraction) に CEA 活性がみられた。この活性部分を探り凍結乾燥した粉末の重量は 96.6 mg であった。

2. Sepharose G-200 ゲル濾過

上述の凍結乾燥粉末を PBS に溶解し, 同時に ^{125}I -CEA 液 200 μl を加えた後 Sephadex G-200 ゲル濾過を行った溶出曲線を Fig. 3 に示す。溶出曲線は大きく分けて二峰性で第一峰には三つの分峰がみられた。Ouchterlony 法によってみた CEA 活性は主に第一峰の中心に強くみられ, 同時に加えた ^{125}I -CEA の放射能量は第一峰の後方にピークがみられた。この第一峰の部分 (Tube No. 39 から No. 57 まで) を透析し凍結乾燥した後の粉末の重量は 32 mg であった。

3. 等電点電気分画法 (isoelectric focusing)

Sephadex G-200 ゲル濾過によって得られた乾

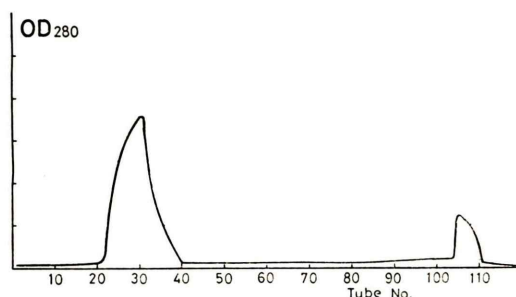


Fig. 2 Elution curve of ion exchange chromatography on DEAE-cellulose.

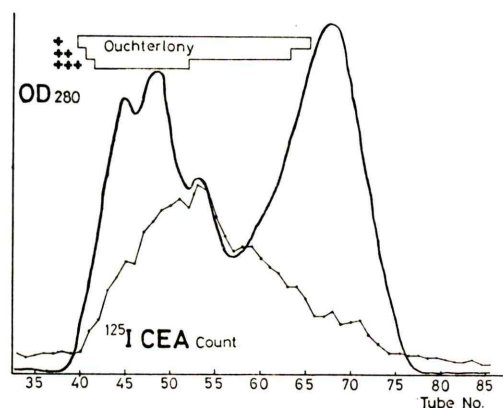


Fig. 3 Elution curve of gel filtration of fractions with CEA activity after DEAE-cellulose chromatography on Sephadex G-200. CEA activity detected by Ouchterlony method is also demonstrated.

燥粉末 32 mg のうち, 16 mg を用いて等電点電気分画を行った。この溶出曲線を Fig. 4 に示す。蛋白の濃度は多くの小さな峰に分かれたが, Fig. 4 の縦の破線に示すごとく 5 つの pool に分けた。pool No. 3 はちょうど pH 4.5 を中心とする分画から得られ, Plow ら⁸⁾の CEA-S の等電点 pI 4.5 の性状に一致する部分と考えられた。

5 つの pool の凍結乾燥粉末の重量はそれぞれ pool No. 1, 5.12 mg, No. 2, 0.96 mg, No. 3, 2.7 mg, No. 4, 1.55 mg, No. 5, 5.66 mg であった。これらをそれぞれ 0.1 M PB にて 1 mg/ml の割合になるように溶解し, それぞれ 1, 10, 50, 100, 200 および 400 倍稀釈液を作成し, Ouchterlony 法に

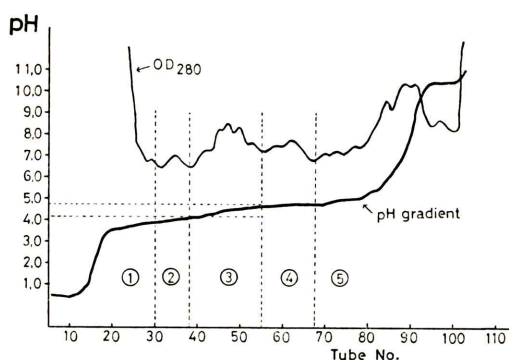


Fig. 4 Fractionation of extract with CEA activity after Sephadex G-200 chromatography by isoelectric focusing in pH 3-6 ampholytes. There are five major peaks and they are divided into five groups and utilized for further purification of CEA-S.

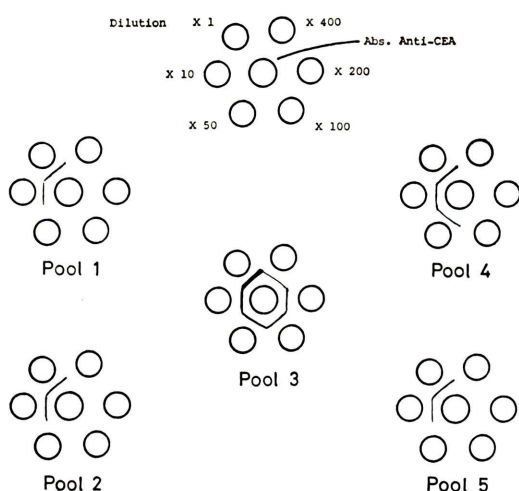


Fig. 5 Degree of CEA activity of each pool (Pool 1-5) demonstrated by Ouchterlony double immunodiffusion method with absorbed antiserum to CEA prepared in our laboratory.

て CEA 活性の強さをみた結果のスケッチを Fig. 5 に示す。これによると各 pool ともに CEA 活性はあるが、pool No. 3 に最も強い活性が認められた。

4. 超遠心分画法

等電点電気分画法によって得た 5 つの pool をそれぞれ超遠心分画を行い、溶出した分画の密度

勾配、蛋白濃度および同時に添加した ^{125}I -CEA の放射エネルギーを測定し、作成した溶出曲線を Fig. 6 の (1) から (5) に示す。

Pool No. 1 から No. 5 までいずれも蛋白濃度は大小いくつかのピークに分かれたが、 ^{125}I -CEA の放射エネルギーは当然ながらすべて同様な二峰性の曲線を示し、第一峰の中心は密度 1.410 g/ml 近傍に位置した。Pool No. 1 より No. 5 までの超遠心分画後に溶出された分画より、Plow らの報告にしたがって密度が 1.410 g/ml に相当する分画を採り、透析した後凍結乾燥し、得られた粉末を最終精製品とした。なお pool No. 3 からは大きな峰の前半 (密度 1.410 g/ml の位置) と後半に分けて採った。この pool No. 3 の前半の分画は、CEA の heterogenous isomers のうちで等電点分画上 pH 4.5 に位置し、CsCl による超遠心分画法では密度 1.410 g/ml に位置することにより、Plow らの CEA-S に相当するものである。

なお各 pool ごとの最終精製品の重量は、pool No. 1 は 0.9 mg 、pool No. 2 は 0.1 mg 以下、pool No. 3 前半は 1.77 mg 、pool No. 3 後半は 2.15 mg 、pool No. 4 は 3.15 mg 、pool No. 5 は 1.47 mg であった。

5. CEA の single isomer の分子量

上述のごとく、得られた pool No. 3 前半の CEA の single isomer の分子量を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により指標蛋白と single isomer の相対移動度 (R_m) を計算し、指標蛋白の検量線より single isomer の分子量を算出し、Fig. 7 に示すごとく分子量は約 185000 と計算された。なおこの CEA の single isomer は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ではゲル内に一本の明瞭なバンドを形成し、蛋白として homogenous であると認められた。

6. CEA-S のアミノ酸組成および糖組成

京大薬学部製薬化学教室の川崎博士に依頼して分析された CEA-S のアミノ酸組成表を Table 1 に示し、同時に Edgington¹⁵⁾らの CEA-S と Banjo ら⁷⁾の CEA (P_1) のアミノ酸と糖組成を示す。

これによるとアミノ酸組成は三者は互いによく

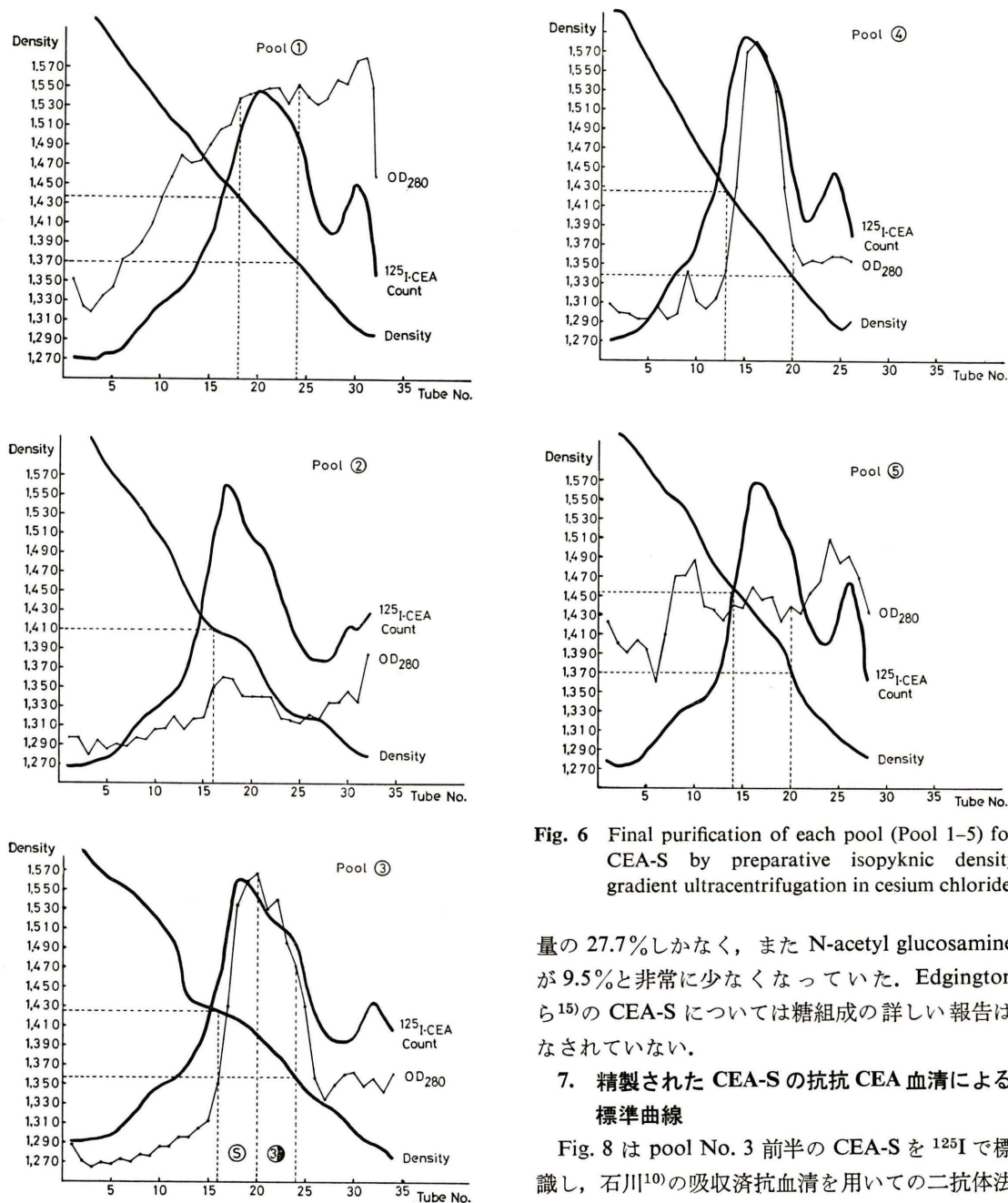


Fig. 6 Final purification of each pool (Pool 1-5) for CEA-S by preparative isopycnic density gradient ultracentrifugation in cesium chloride.

量の 27.7%しかなく、また N-acetyl glucosamine が 9.5%と非常に少なくなっていた。Edgington ら¹⁵⁾の CEA-S については糖組成の詳しい報告はなされていない。

7. 精製された CEA-S の抗抗 CEA 血清による標準曲線

Fig. 8 は pool No. 3 前半の CEA-S を ^{125}I で標識し、石川¹⁰⁾の吸収剤抗血清を用いての二抗体法 RIA による標準曲線、および同時に pool No. 1 (①), No. 3 後半 (③), No. 4 (④), No. 5 (⑤) の最終精製品の標準稀釈液を用いての標準曲線を示す。Fig. 8 にみられるように CEA-S が最も強く抑制され、等電点電気分画法によって得られた 5 つの

類似しているが、著者の精製した CEA-S は Banjo ら⁷⁾の CEA(P_1)よりも Edgington ら¹⁵⁾の CEA-S に近いようである。しかし糖組成が全重量の 63.7%も占めるのに対して著者の CEA-S は全重

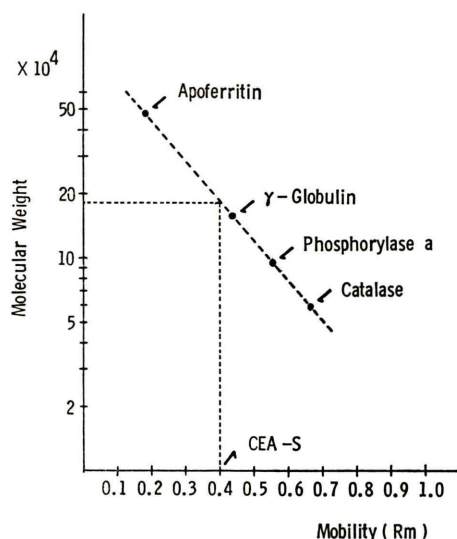


Fig. 7 Estimation of molecular weight of CEA-S by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using standard protein-markers.

分画のうち、pH 4.5 から遠く離れた pool No. 1 や pool No. 5 では抑制は弱かった。これによっても、pool No. 3 前半の分画がもっとも CEA 活性が強く、CEA-S としてもっとも適したものであることが認められた。

8. 石川の CEA (CEA_I), Gold の CEA (CEA_G), および CEA-S の抗 CEA 抗血清による標準曲線

¹²⁵I 標識 CEA-S, 吸収済抗血清 (3000 倍稀釈液), CEA-S, 石川¹⁰⁾の CEA (CEA_I), および Gold から提供された CEA¹⁰⁾ (CEA_G) を用いて、二抗体法 RIA による CEA_I, CEA_G, および CEA-S の標準曲線を作成し、三者の免疫活性を比較した。Fig. 9 にその成績を示すが、CEA_I と CEA_G は同程度に強く抑制され、50% の competitive inhibition を来す濃度でみると、CEA-S は両者にくらべて免疫活性はおおよそ 1/4~1/6 であると計算された。

V. 考 案

CEA は Gold および Freedman¹⁾ が結腸癌組織および人の胎児期の消化管組織の過塩素酸 (PCA) 抽出物に見出した癌関連物質である^{1,2)}。

Table 1 Chemical compositions of author's CEA-S and comparison of amino acid and carbohydrate compositions among author's CEA-S Edgington's CEA-S and Banjo's CEA (P₁).

Amino acid Composition*

Amino acid	Our CEA-S	Edgington ¹⁴⁾ CEA-S	Banjo ⁷⁾ CEA (P ₁)
Lysin	4.0	3.3	2.87
Histidine	2.1	1.8	1.53
Arginine	3.8	3.6	4.54
Aspartic acid	15.9	14.0	16.50
Threonine	9.2	8.4	8.56
Serine	10.2	9.9	9.31
Glutamic acid	10.7	10.7	12.48
Proline	7.6	7.6	7.15
Glycine	5.0	6.2	3.20
Alanine	5.2	5.8	4.08
Cysteine	0	1.6	0
Valine	6.1	7.1	6.11
Methionine	0	0.2	0
Isoleucine	4.8	4.6	5.13
Leucine	9.0	8.3	9.41
Tyrosine	3.7	3.4	4.70
Phenylalanine	2.5	2.4	4.31
Tryptophan	not done	1.4	not done

* mole percentage of individual amino acid as a portion of the protein content of the CEA-S or CEA.

Carbohydrate Composition**

	Our CEA-S	Banjo ⁷⁾ CEA (P ₁)
Sialic acid	not detected	6.3
N-Acetylglucosamine	9.5	24.9
N-Acetylgalactosamine	not detected	3.1
		Fucose 7.7
Neutral Sugar	18.2	Mannose 8.9
		Galactose 12.8

** percentage of individual monosaccharide as a portion of the total weight of CEA-S or CEA.

CEA の精製法は最初 Krupey ら³⁾ が結腸癌組織の PCA 抽出物を paper block 電気泳動, Sephadex G-200 ゲル濾過を用いて行っていたが、その後 PCA 抽出, Sephadex 4B ゲル濾過, Sephadex G-200 ゲル濾過および Sephadex G-25 block 電気泳動によって精製し¹⁶⁾、現在この方法が一般的に用いられている。さらにこのほか、免疫吸着法, concanavalin A Sepharose affinity chromatography, 3 M KCl 抽出法などを用いて抽出精製する方法

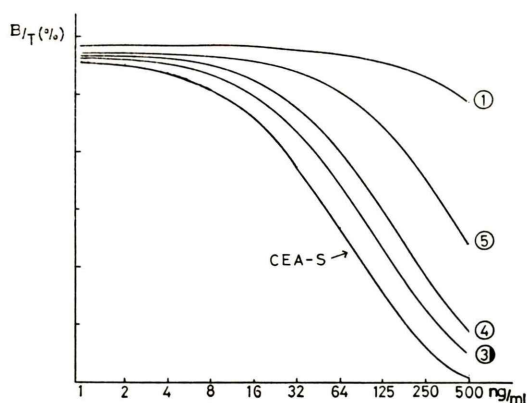


Fig. 8 Inhibition curves of final products from each pool using double antibody radioimmunoassay.

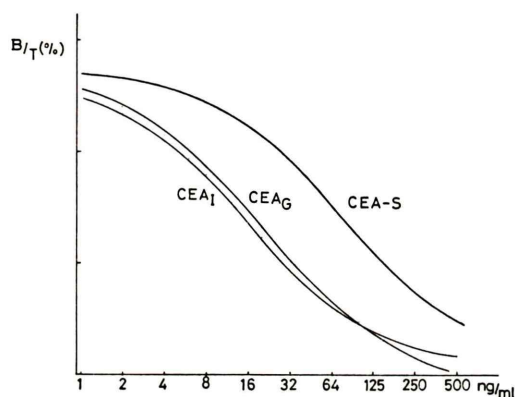


Fig. 9 Comparison of inhibition curves of radioimmunoassay made by author's CEA-S, conventional CEA (CEA_I) and Gold's CEA.

も用いられている^{17,18)}。しかしこれらの方法によって精製された CEA の物理化学的性状は報告者によって多少異なり、分子量は16万~20万、沈降定数は4.1 S~10.1 S と幅があり、またアミノ酸組成には余り差はみとめないが糖組成には部分的に大差が見られている^{19,20)}。これらは CEA を精製するのに用いた原材料の相違、精製法の相違などによると考えられている。

次に、精製された CEA はさらに等電点電気分画法や CsCl による密度勾配を用いた超遠心分画法などによっていくつかの peak に分かれることが示され^{4,5)}、これらは物理化学的性状や CEA 抗

血清に対する反応性がわずかであるが異なっていることが報告⁴⁾されていた。

Plow および Edgington⁸⁾ はそれまでに報告されていた分離精製法のすべてを組み合わせた方法、すなわち PCA 抽出、等電点電気泳動法、Sephadex G-200 ゲル濾過、DEAE セルロースクロマトグラフィー、Sephadex 2B による免疫吸着法、CsCl による密度勾配超遠心分画法によって CEA を精製分離し、免疫化学的分析によりこれを CEA の“a homogenous isomeric species”とし“CEA-S”と命名した。この CEA-S の物理化学的性状は分子量 181000、等電点 pI 4.5、沈降定数 6.6 S、密度 1.41 g/ml であると報告した⁸⁾。さらにこの CEA-S の RIA 法によって各種疾患者の血清 CEA-S 値を測定し、CEA-S は CEA よりも癌特異性が高く、かつ消化器系癌特異性が高いと報告した^{9,21)}。

石川¹⁰⁾ならびに著者らは先に Gold^{1,3)}らの方法に準じて CEA を精製してその二抗体法 RIA を確立し、各種疾患者の血清 CEA 値を測定し、その臨床的意義を追求していくつかの知見を得た^{10~12)}。

しかしながら現在の CEA 測定系では、癌診断の立場からは非腫瘍性疾患での偽陽性率が高く、また α -fetoprotein や prostatic acid phosphatase のような高い臓器特異性がみられないことから、特に消化器系癌に特異性の高い tumor-marker の出現とその in vitro RI 測定法の開発が望まれていた。

そこで著者は Plow および Edgington⁸⁾の方法に準じて CEA をさらに精製した。著者の精製法は Fig. 1 に示すごとく、PCA 抽出、Sephadex 4 B ゲル濾過、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-200 ゲル濾過、等電点電気分画法、密度勾配超遠心分画法の順に行い、Plow および Edgington の精製順序とは異なる。精製順序の変更は、CEA-S の精製は従来の CEA 精製法に次いで等電点電気分画法や密度勾配超遠心分画法を加えていけば良いと考えたためと、等電点電気分画法の 1 回の操作で使用できる蛋白量

は 5～20 mg であり, PCA 抽出物 (1160 mg) を Plow らのごとく直ちに等電点電気分画法を行えば頻回の操作と多量の ampholine を使用しなければならず, この操作と費用を軽減させたためである。

まず大腸癌肝転移病巣組織 875 g から PCA 抽出後の凍結乾燥粉末は 1160 mg であり, Sepharose 4B ゲル濾過後では 226.5 mg であり, さらに CEAE セルロースカラムクロマトグラフィー後では 96.6 mg であった。

次に Sephadex G-200 ゲル濾過では, DEAE カラムクロマトグラフィー後の乾燥粉末の溶液と, 石川¹¹⁾ が作成した ¹²⁵I-CEA を同時に投与し溶出させた溶出曲線を Fig. 3 に示したが, 蛋白の曲線は二峰性を示し, Ouchterlony 法でみた CEA 活性は第一峰にみられ, ¹²⁵I 標識 CEA は蛋白の第一峰の後部にピークとなる幅広い一峰を示した。以上よりこの第一峰は粗精製 CEA 品とみなされることが考えられる。

ここで得られた乾燥粉末 (32 mg) の溶液をカラム等電点電気分画を行ったところ, Fig. 4 に示すごとく, 大別して 5 つの峰に分かれ, これらを No. 1～No. 5 の pool とした。これらは Fig. 5 に示すごとく, いずれも CEA 活性を有し, このうち pool No. 3 の峰はちょうど pH 4.5±0.2 の範囲に含まれた。これは Plow および Edgington が行った等電点電気分画での pH 4.5 の峰の分画に相当すると考えられた。

No. 1 から No. 5 までの 5 つの pool を CsCl を用いた密度勾配超遠心分画を行った結果では, Fig. 6 (1)～(5) に示すごとく pool No. 1, No. 2 および No. 5 は小さな峰が多発する複雑な溶出曲線となったが, pool No. 3 と No. 4 は一つの大きな高い峰を有する曲線となり, 峰の頂点は Plow および Edgington⁸⁾ の CEA-S の密度 1.41 g/ml に相当する部分に一致した。Pool No. 3 では, 1,410±0.010 g/ml の密度に相当する峰の前半と, 密度 1,400 g/ml 以下の峰の後半部分とに分けて採った。

著者の精製法では immunoabsorbant による

blood group A および B antigen の吸着法は行っていないが, pool No. 3 前半を Plow および Edgington⁸⁾ の CEA-S に相当するものとして CEA-S とした。

したがって CEA-S はこれまでの精製 CEA の heterogenous なもののうち, pH 4.5, 密度 1,410 g/ml に相当する部分である。分子量は著者が行った marker proteins を用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によれば, およそ 185000 と計算された。これは Plow および Edgington⁸⁾ の CEA-S の分子量 181000 にほぼ近似した値が得られ, 本法による分子量測定法の精度からみてほぼ満足できる成績と考えられる。またこの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって, 著者の CEA-S は単一の明瞭なバンドを形成したことにより, 蛋白としては homogenous であることが認められた。

CEA-S のアミノ酸および糖組成については, アミノ酸組成は Plow および Edgington の CEA-S とよく近似しており, aspartic acid, glutamic acid, serine などが比較的多く, metionine および cysteine は検出されなかった。糖組成は著者の CEA-S では全重量の 27.7% しかなく, Banjo⁷⁾ の CEA (P₁) の 63.7% と比較して非常に少なくなっており, sialic acid や N-acetyl galactosamine は検出されなかった。また N-acetyl glucosamine は 5.9% 含まれているが, Banjo⁷⁾ の CEA (P₁) に比べて 1/3 近くになっている。なお A 型物質に特異的な抗原決定基であるとされている N-acetyl galactosamine が検出感度以下であったことは, 著者の CEA-S には A 型物質は含まれていないと推定されるが検証は行っていない。

等電点電気分画法で得られた pool No. 1 から No. 5 の 5 つの蛋白のうち, 密度勾配超遠心分画法によって密度 1,410 g/ml の部分を選った最終精製品 (CEA-S, pool No. 1, pool No. 3 後半, pool No. 4, pool No. 5) の抗 CEA 抗血清による標準曲線では, CEA-S がもっとも強く抑制され, pH 4.5 から遠く離れた pool No. 1 および No. 5 では抑制は緩やかであった。

また CEA_i, CEA_g と CEA-S の免疫活性を比較するために三者の標準(抑制)曲線を作成したところ、三者はほぼ平行したが、CEA_i と CEA_g は CEA-S にくらべて強く抑制された。CEA_i と CEA_g の CEA の免疫活性は同程度で、CEA-S は両者にくらべておよそ 1/4~1/6 程度の CEA 活性であると計算された。この CEA-S の CEA 活性の低下は、CEA よりさらに精製過程が加わったため、その過程での CEA 活性の損傷によるものと考えられるが、Plow および Edgington⁸⁾ が CEA-S と CEA の免疫活性は 5.26 倍の差があるとしたのに近い成績が得られた。

以上より、最終的に得られた CEA-S は CEA 抗原性を有し、従来の heterogenous な CEA 精製品のうち等電点 pI 4.5、密度 1,410 g/ml の糖成分の少ない糖蛋白質であり、Plow および Edgington の言う CEA-S に近い CEA の isomer であると結論された。

VI. 総括ならびに結論

1) 大腸癌肝転移病巣より、過塩素酸抽出、Sephacrose 4B ゲル濾過、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-200 ゲル濾過、等電点電気分画法および超遠心分画法によって CEA の single isomer (CEA-S) を分離精製した。

2) CEA-S は従来の CEA のうち pI 4.5、密度 1,410 g/ml に相当する isomer で、分子量は約 185000 であった。

3) CEA-S のアミノ酸組成は、Plow および Edgington の CEA-S と近似しており、糖組成は全重量の 27.7% と少なく、Sialic acid や N-acetyl galactosamine は検出されなかった。

4) 著者の CEA-S は、石川の CEA および Gold の CEA にくらべて約 1/4~1/6 の CEA 活性であると計算された。

5) 以上より著者の CEA-S は、Plow および Edgington の CEA-S に近い CEA isomer のであると考えられた。

稿を終るに臨み、終始直接御指導いただきました浜田哲博士(現天理よろず相談所病院内分泌内科)および御校閲いただきました鳥塚莞爾教授(京大核医学講座)に深く感謝の意を表します。また研究に御協力いただきました石川演美博士(現筑波大学臨床医学系放射線医学)に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* **121**: 439-462, 1965
- 2) Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* **122**: 467-481, 1965
- 3) Krupey J, Gold P, Freedman SO: Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *J Exp Med* **128**: 387-398, 1968
- 4) Coligan JE, Henkart PA, Todd CW, et al: Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Immunochimistry* **10**: 591-599, 1973
- 5) Turner MD, Oliveares TA, Harwell L, et al: Further purification of perchlorate-soluble antigens from human colonic carcinomata. *J Immunol* **108**: 1328-1339, 1972
- 6) Eveleigh JW: Heterogeneity of carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **34**: 2122-2124, 1974
- 7) Banjo C, Joseph S, Gold P: Intermolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **34**: 2114-2121, 1974
- 8) Plow EF, Edgington TS: Isolation and characterization of a homogeneous isomeric species of carcinoembryonic antigen: CEA-S. *Int J Cancer* **15**: 748-761, 1975
- 9) Edgington TS, Astarita RW, Plow EF: Association of an isomeric species of carcinoembryonic antigen with neoplasia of the gastrointestinal tract. *N Engl J Med* **293**: 103-107, 1975
- 10) 石川演美: 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. *日放誌* **39** (2): 113-119, 1979
- 11) 石川演美: 癌胎児性抗原に関する研究, 第二編 二抗体法による血清中癌胎児性抗原の Radioimmunoassay に関する基礎的検討ならびに臨床的評価. *日放誌* **39** (2): 120-131, 1979
- 12) Hamada S, Ishikawa N, Yoshii M, et al: Roles of circulating carcinoembryonic antigen and calcitonin in diagnosis of medullary thyroid carcinoma: A comparative study. *Endocrinol Japan* **23**: 505-510, 1976

- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 14) Hunter WM, Greenwood FC: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496, 1962
- 15) Edgington TS, Plow EF, Chavkin CI, et al: The influence of CEA-S from different tumors and of CEA as ¹²⁵I ligands on the specificity of the CEA-S radioimmunoassay. *Bulletin du Cancer* **63**: 673-688, 1976
- 16) Krupey J, Wilson T, Freedman SO, et al: The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry* **9**: 617-622, 1972
- 17) Kimball PM, Brattain MG: A comparison of methods for the isolation of carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **38**: 619-623, 1978
- 18) Keep PA, Leake BA, Rogers GT: Extraction of CEA from tumor tissue, foetal colon and patients' sera, and the effect of perchloric acid. *Br J Cancer* **37**: 171-182, 1978
- 19) Newman ES, Petras SE, Georgiadis A, et al: Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen-III. *Cancer Res* **34**: 2125-2130, 1974
- 20) De Young NJ, Ashman LK: Physicochemical and immunochemical properties of carcinoembryonic antigen (CEA) from different tumour sources. *Ajebak* **56**: 321-331, 1978
- 21) Nakamura RM, Plow EF, Edgington TS: Current status of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-S assays in the evaluation of neoplasm of the gastrointestinal tract. *Ann Clin Lab Sci* **8**: 4-10, 1978

Summary

I Isolation of an Isomeric Species of Carcinoembryonic Antigen (CEA): CEA-S

Masao YOSHII

Department of Radiology and Nuclear Medicine, Kyoto University, School of Medicine

A single isomeric species of carcinoembryonic antigen was isolated by extraction of tumor tissue of metastatic liver cancer from colon adenocarcinoma, with 1M perchloric acid (PCA) followed by Sepharose 4B gel filtration, DEAE cellulose chromatography, Sephadex G-200 gel filtration, isoelectric focusing and isopyknic density gradient ultracentrifugation. The final product, representing approximately 0.31% of the PCA soluble glycoprotein of the tumor, showed a single discrete band in SDS polyacrylamide gel electrophoresis and was estimated to have a molecular weight of about 185000. This single species of CEA, CEA-S

represent a density of 1.41 mg/g in cesium chloride and an isoelectric point (pI) of 4.5 of heterogenous conventional CEA. Amino acid compositions of the CEA-S share 27.7% in weight of total weight and are lack of sialic acid and N-acetyl galactosamine. Competitive inhibition analyse demonstrated the CEA-S had about one-fifth of reactivity to anti CEA antiserum compared to conventional CEA.

Thus the CEA-S is considered to represent an isomeric species of CEA and to be similar to Plow's CEA.S.

Key words: CEA, CEA-S, Heterogeneity of CEA.