うに．それと deoxycytidine kinase に関しましては，さっき示したとおりで確かに減っている．減っているということは resistance になっていることなわけですけども，その程度が，たった4，5倍程度の差で2万倍も強くなれるかどうか，というのは問題があると思います．で，僕らはやっぱり排泄機序がかなり大きいんじゃないかと考えております．もう一つは cytidine deaminase というのがあるんですが，これは僕ら実はやれないですよね，HPLC みたいなやつでないと．この中の deaminase の活性，或いは先生がおっしゃられた Ara-CTP とかですね，そういうやつはちょっと僕らのところで測れないもんですから，実際にはそっちのほうが，例えば deaminase が活性化されている可能性も否定はできないんです．しかし，僕らのこの結果は十分，排泄機序がこれに関与しているというのを説明するに足る結果じゃないかと考えているんですけども，実際にそういう一つ一つの enzyme，deaminase のほうは特にそうなんですけども，テクニックをちょっと持っていないもんですからやっておりません．

大西 第一内科の大西ですけども，ちょっと聞き逃したかもしれないんですけども，Ara-C の耐性株に，先生の唯一あったモノクローナル抗体をつけてですね，そして Ara-C を入れたらやはりその耐性は感受性のものになるんですか．

福田 今やっている最中というか，なかなかうまくそれがいかないもんですから，本当にそうかと言われると．ですから実際問題，まだ判りません．

司会 そこではまだあると思いますが，綜合討論のときにまた御発言いただくことにして．では二番目が，CEA および CEA 関連抗原（NCA）分子の性状について，検査診断の内山君．

2）CEA 及び CEA 関連抗原（NCA）分子の性状について

新潟大学医学部検査診断学教室（主任：屋形 稔教授）
内 山 一 晃

Molecular Characteristics of Carcinoembryonic Antigen and Nonspecific Cross-reacting Antigen

Kazuaki UCHIYAMA

Department of Laboratory Medicine, Niigata School of Medicine
(Director: Prof. Minoru YAKATA)

Carcinoembryonic antigen (CEA) is one of the most famous laboratory tests of tumor markers. CEA was first reported in 1965, but molecular structure of CEA was not clear untill recent years. Amino acid sequence of CEA was reported in 1987, by the success of cDNA clonig of CEA. The CEA molecule is composed of five major domains, called domain N, I, II, III, C from the $-NH_2$ terminal. But sugar chains of CEA are complicated and have much variety, so there are few informations about

Reprint requests to: Kazuaki UCHIYAMA,
Department of Laboratory Medicine,
Niigata University, School of Medicine,
Asahimachi-Dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部検査診断学教室
内山一晃

them.

If CEA is measured by several kits, there are much difference about the value of CEA. The CEA value by the highest kit is about 2 times higher than by the lowest kit in nearby normal range level.

Normal cross-reacting antigen (NCA) is the oldest discovered CEA related antigens. Amino acid sequence of NCA was first reported in 1988, and composed of three major domains, called domain N, I, M from the $-NH_2$ terminal. The domain N, and I are very similar to those of CEA. It is gradually clear that over 2 NCAs exist in different tissues by SDS-PAGE and western blotting research.

Key words: Carcinoembryonic antigen, nonspecific cross-reacting antigen
CEA, CEA 関連抗原

はじめに

Carcinoembryonic antigen (CEA) は癌の臨床において，最も良く有用性が確立されている腫瘍マーカーの一つである．この CEA が Gold ら[1] により1965年に報告されて四半世紀が過ぎようとしているが，1987年に CEA の分子構造，特にそのペプチド1次構造がようやく解明された[2]．ここでは，これまでに得られた CEA 及び CEA 関連抗原の1つである nonspecific cross-reacting antigen (NCA) の分子モデルを紹介すると同時に，実際の臨床応用に際しての血中濃度測定における問題点についても考察を加えたい．

1. CEA の分子構造

CEA は分子量約18万，糖を50～60%と大量に含む胎児性蛋白である．これまで大量に存在する糖鎖のゆえにペプチド構造の化学的解析が困難であったが，Oikawa ら[2] の cDNA クローニングの成功によりペプチド1次構造が明らかにされた．

それによると，CEA ペプチドは668個のアミノ酸により構成されている．図 1 にその分子モデルを示す[3]．N末端から108番目のアミノ酸までのドメインN，互に非常に高い相同性のある繰り返し構造を持つそれぞれ178個のアミノ酸からなるドメインⅠ，Ⅱ，Ⅲ，及びC末端側の主に疎水性の高いアミノ酸26個よりなるドメインCに分けられる．システイン残基はドメインⅠ，Ⅱ，Ⅲ，に各4個ずつ存在し，それぞれ完全に同一部位にある．その1番目と2番目のシステインの間に48個，その3番目と4番目のシステインの間に40個のアミノ酸よりなる2つのループが形成され，CEA 全体では6個のループからなると考えられている．

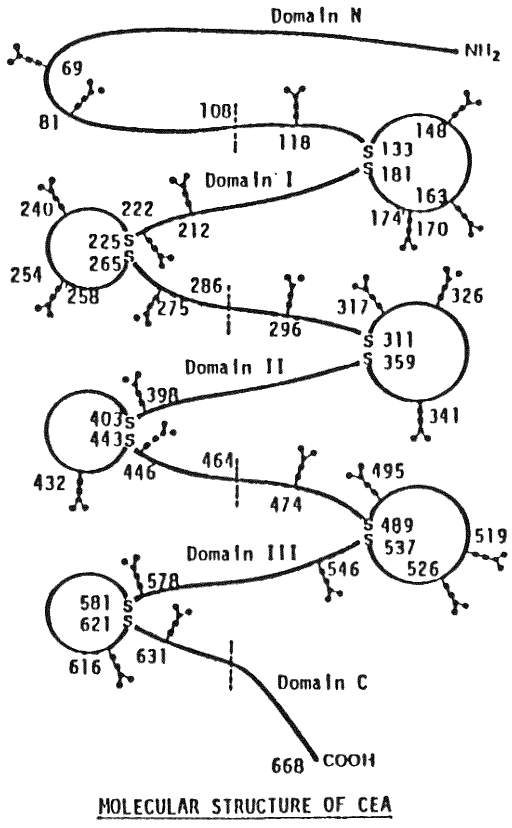


図 1 CEA の分子モデル
番号はN端からのアミノ酸番号．システイン残基と糖鎖結合のアスパラギン残基の位置を示す．糖鎖は GlcNAc と Man core のみが示してある．CEA の174と258の糖鎖は省略してあり，この図には26本の糖鎖が示されている．(文献3より引用)

ドメインⅠ，Ⅱ，Ⅲをそれぞれ前半92個と後半86個のサブドメインに分けると，この間には強い相同性が認められる．このサブドメイン単位で他の蛋白質との類似性を検討した結果 immunoglobulin κ 鎖の variable region，ウサギの polyimmunoglobulin receptor，マウス及びラットの Thy-1 抗原，T cell receptor γ 鎖等との間に有意の相同性が認められ，CEA が immunoglobulin supergene family の一員であることが明らかになってきた[4)5)]．

CEA ペプチド鎖にはアスパラギン結合型の糖鎖結合できる Asn-X-Thr/Ser（Xは Pro 以外のアミノ酸）という構造を持った場所が28個存在し，その分布はドメインNに2個，ドメインⅠ，Ⅱ，Ⅲにそれぞれ11，7，8個存在している．

CEA の糖鎖は，標品による糖鎖の数，組成共に著しい多様性が認められる．しかも**図 1** にように CEA 分子を殆ど満遍なくおおうようになっている．しかし，その割には，CEA の抗原性に寄与する割合は小さい．糖鎖自体の構造は最近概要が明らかになってきており，CEA には標品により異なるが24～26個の糖鎖が結合している．

Lectin affinity chromatography では，CEA の糖鎖は，fucose を持たない2枝複合糖鎖と fucose を持たない high mannose 部分を一部に持つ混成糖鎖が多く存在していることが筆者の実験では多い．これが，転移等で糖鎖の構成が変ることも多いと考えられる．

2. 血中 CEA 測定における問題点

CEA の腫瘍マーカーとしての有用性が確立するにつれて，多くの測定キットが市販され入手可能となった．ところが1つの検体の測定値が用いるキットによりまちまちで，測定値に整合性が見られないという問題が新たに出てきた．その原因を解析した結果，それは患者血清中の分子上の糖鎖構造の多様性と不安定性及び測定系に用いられている抗体標品中の糖鎖を認識する抗体の特異性や量の不均一性によるものであることが明らかになった．また，種々の CEA 関連抗原との特異性の差も各キットで異なる．以下に新潟大学病院検査部で実際のキットで各種疾患における測定値の比較検討した結果を示す[6)]．

検討したキットは CEA・EIA Ⅱ「アボット」（以下アボット），新潟大学病院検査部で使用している小野薬品ノイムノボール CEA（N）（以下イムノボール），ロシュ社Zゲル— RIA（以下Zゲル）である．前の2キットはともにビーズ固相による．emzyme immunnoassay（EIA）で，後のキットは radio immnoassay（RIA）である．**図 2** に各種癌における CEA 測定値を示した．

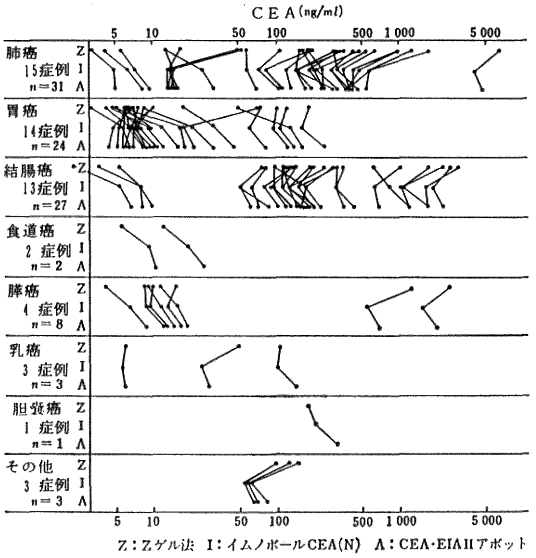


図 2　各種癌における CEA 測定値
（文献6より引用）

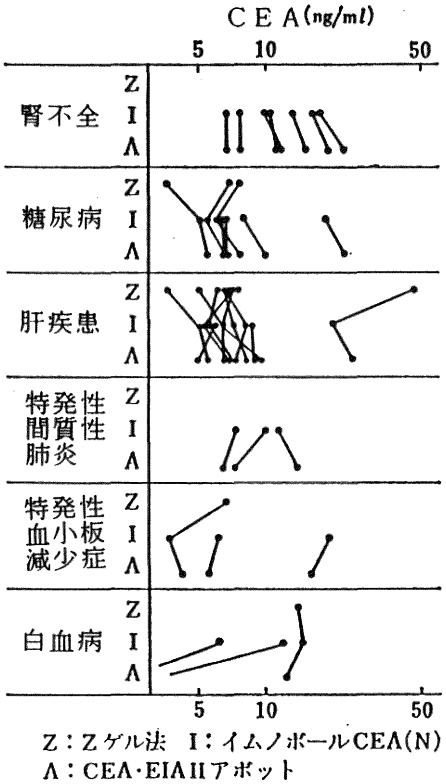


図 3　軽度上昇を示した非癌疾患における CEA 測定値の比較（文献6より引用）

低濃度域ではZゲルに比較し EIA は高値傾向であったが，Zゲル 50ng/ml 付近の検体の多くは EIA では約 1/2 と低く測定された．症例のほとんどが末期癌のもので，CEA による測定値で見ると，肺癌は 150～500ng/ml，胃癌は 5～10ng/ml，結腸癌は 100～200ng/ml，膵癌は 10～20ng/ml に分布する検体が多かった．

図 3 には非癌患者（白血病を含む）での CEA 測定値を示した．腎不全，糖尿病及び肝硬変等の肝疾患は，CEA が軽度上昇する疾患として知られている．イムノボールを用いる日常検査で，異常値を示した癌以外の症例について，アボットで測定した結果も図 2 同様で特に癌患者と非癌患者では差がない．しかし，白血病例にて EIA 法間の測定値の解離がある．この検体はゲル濾過により，アボットでは認められない CEA 以外のピークがイムノボールに認められた．このことから，イムノボールは白血球中の NCA も計りこんでしまい，CEA に対する特異性に関してはアボットのほうがより優れていると考えられる．

3. NCA の分子構造

CEA 関連抗原は，NCA の他に NCA-2，normal fetal antigen-1（NFA-1），biliary glycoprotein-1（BGP-1）があり，これらの類似抗原も多数報告されている．NCA は CEA 関連抗原の中で最初に見つけられ[7]，顆粒球，消化管上皮細胞，及びほとんどの CEA 産生腫瘍にて産生される糖蛋白で，分子量が 9 万～10万と云われていた．このペプチド一次構造が CEA の一次構造決定に引き続き，Tawaragi ら[8]により cDNA クローニングにより決定された．それによると NCA には CEA と同じく34個のアミノ酸よりなるシグナルペプチドに続き，108個のドメインNと 178個のドメインⅠが存在する．しかし，CEA のドメインⅡとⅢに相当する部分がなく，ドメインⅠに続きこの主として疎水性アミノ酸よりなるドメインMが存在する．NCA のドメインⅠの構造は CEA のドメインとアミノ酸レベルで90%弱の相同性を示し，4 個含まれるシステイン残基の位置も全く同じである．NCA には12個の糖鎖結合部位があり，その位置は 5 ケ所で CEA との差異が認められる他は全く同じである．図 4 にその分子モデルを示す．この分子モデルによると CEA 同様にドメインⅠは 2 個のサブドメインに分けられる．そして，ドメインM以外は CEA とほぼ同じ構造であり，抗原性が似ていることが容易に理解でき

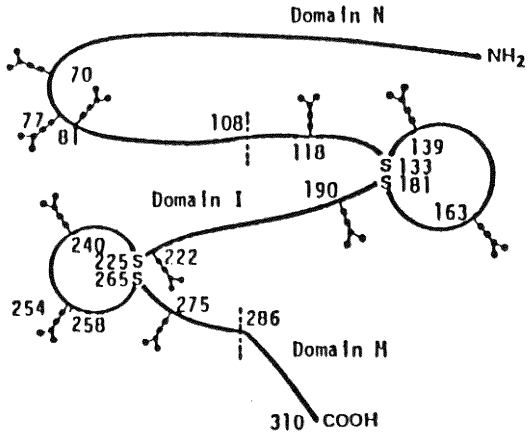


図 4　癌細胞中 NCA の分子モデル
番号はN端からのアミノ酸番号．システイン残基と糖鎖結合のアスパラギン残基の位置を示す．糖鎖は GlcNAc と Man core のみが示してある．NCA の 258 の糖鎖も省略し，11本の糖鎖が示してある．（文献 3 より引用）

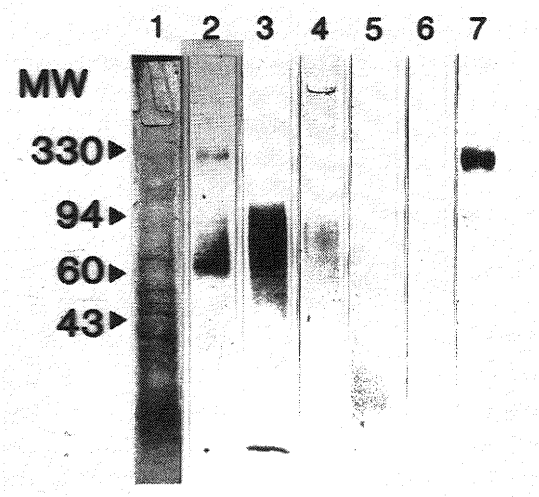


図 5　SDS-PAGE, Western blotting による腺癌細胞株及び正常各組織での CEA 及び NCA 抗原の検索
Lane 1: 膵癌細胞株（BxPC-3）の SDS-PAGE, Western blotting 後のクマシーブルーによる蛋白染色像．
Lane 2～Lane 6: 膵癌細胞株（BxPC-3）及び正常各組織での SDS-PAGE, Western blotting 後の抗 NCA 抗体（CEA とも弱く反応）の反応像．［Lane 2: 膵癌細胞株（BxPC-3），Lane 3: 白血球，Lane 4: 肝蔵，Lane 5: 脾臓，Lane 6: 膵臓］
Lane 7: 膵癌細胞株（BxPC-3）の SDS-PAGE, Western blotting 後の抗 CEA 抗体との反応像．

る．

ところで1980年代の半ばより，NCA は複数あることが明らかになってきた[9]．**図 5** は，2種の異なる分子量の NCA が存在することを示している．これは CEA 産生癌細胞株と各臓器のホモジェネートを SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 及び w estern blotting 後に CEA 関連抗原の検出を行ったものである．7本のレールのうち，1，2，7番目に CEA と NCA を大量に含む膵癌細胞株，3番目は NCA を含む白血球分画，4番に肝，5番に脾，6番には膵臓のサンプルをデタージェント抽出したものが電気泳動されている．これを1番は蛋白染色，2番から6番までは NCA にアフィニティーの高い抗体，7番目には抗 CEA 抗体を使い抗原の検出を行っている．2番に弱く，7番に強く CEA の 180kd のバンドがあり，また，NCA のバンドが2番，3番にあるが，それぞれ分子量が 55kd と 90kd と異なっている．これは消化器癌細胞中のと顆粒球中のとでは，分子量の異なる NCA が多く存在していることを示している．従って NCA 分子にも多様性があるので，**図 4** の NCA 以外の NCA 分子が存在することになる．そしてこの NCA は1個のサブドメインしか持たない NCA であると考えることができる．

おわりに

CEA 及び NCA 分子の構造について，現在の知見をまとめた．さらに，新潟大学病院検査部で検討した血中測定におけるキット間差の問題を示し，複数の NCA の存在についても電気泳動学的に示した．現在では CEA に関してはモノクローナル抗体の作成により，より CEA 特異性の高い測定法も出てきている．将来には，CEA の変化に富む糖鎖構造を臨床検査レベルで検知出来るようになれば，複雑な糖鎖構造が逆に役立つようになるとも思われる．

参考文献

1) **Gold, P. and Freedman, S.O.:** Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med., **121:** 439～462, 1965.

2) **Oikawa, S., Nakazato, H. and Kosaki, G.:** Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun., **142:** 511～518, 1987.

3) **松岡雄治:** CEA の分子構造と抗原構造．生物物理化学，**32:** 7～13，1988.

4) **Oikawa, S., Imajo, S., Noguti, T., Kosaki, G. and Nakazato, H.:** The cacinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains. Biochem. Biophys. Res. Commun., **144:** 634～642, 1987.

5) **Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A. and Stanners, C.P.:** Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembyonic antigen. Mol. Cell Biol., **7:** 3221～3230, 1987.

6) **松井朝子:** 酵素免疫測定法による CEA 測定キットの比較．衛生検査，**36:** 771～774，1987.

7) **von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P.:** Identification of an antigen from normal human tissue that cross-reacts with carcinoembryonic antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. (Washi.), **69:** 2492～2494, 1972.

8) **Tawaragi, Y., Oikawa, S., Matsuoka, Y., Kosaki, G. and Nakazato, H.:** Primary structure of nonspecific cross-reacting aantigen (NCA), a menber of cacinoembryonic antigen (CEA) gene family, deduced from cDNA sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun., **150:** 89～96, 1988.

9) **Buchegger, F., Schreyer, M., Carrel, S. and Mach, J.-P.:** Monoclonal antibodies identify a CEA crossreacting antigen of 95kD (NCA-95) distinct in antigenicity and tissue distribution from the previously described NCA of 55kD. Int. J. Cancer, **33:** 643～649, 1984.

司会　何かの御討論ございませんでしょうか．はい，追手先生．

追手　糖鎖のことに非常に興味があります．Con A，ピーナッツレクチン，WGA はよくくっつく．で，患者さんの血清を使うとさっきのアボット社なんかで変な値が出る，という話がありました．全くの素人で申し訳ないんですけど，こういう試みっていうのはなされているんでしょうか．例えばですね，その lectin で，CEA にはくっつかない，だけどかなり広い lectin binding のものをくっつけるというようなものがあってですね，

それで血清を前処理しておく．そして CEA を測るとよくなるとか，そういうような試みってのはあるんですか．

内山　前処理で実際の臨床上の検体をやったというのは，前処理に関してはないです．患者それぞれの CEA について今お示ししたような方法とか，いろいろ分けているっていうようなデータはあるけど lectin で前処理をしたというデータは見たことはまだないんですけども．

追手　するとそのアボット社の製品でですね，例えば経過を追った場合にはやっぱり他の社のものと同じように変化をするんですか．

内山　さっきも言いましたように，白血病みたいな，NCA が大量に出てくるような病気でない限り大体 parallel に変動するんですけれども，違うキット同士を比較するというのはかなり誤差が入ってくるんですね．場合によっては倍くらい値が違うこともあります．

追手　はい，どうも有難うございました．

司会　他にございませんでしょうか．

吉谷　臨床的な質問ですが，糖代謝異常，例えば，糖尿病等があったりすると CA125 陽性率が少し高くなるというような報告を聞くんですが，どれぐらい陽性率が上がるんでしょうか．

内山　ちょっとその点は僕も判りません．

司会　他にございませんか．検査室ではこのキット間差があってデータの互換性に問題があるというのは一番頭が痛いんですけども，解決の方向はどうですか．

内山　一つ言われているのは，要するに純品いろいろとりますけれどいろんなところでいろいろ精製した CEA をとっても結局それはみな，てんでばらばらなんですね．一つはさっきお示ししたように糖鎖の構造が複雑なもんですからそれだけで抗原性がかなり違ってしまうので，そこら辺は何か WHO みたいな所での標準 CEA を世界中で使用するようにすれば，多少は解決するだろうと思うんですけども．

司会　他にございませんでしょうか．それでは次に移らせていただきます．第三番目は，肝細胞癌の血清学的診断，第三内科の鈴木先生お願いします．

3）肝細胞癌の血清学的診断

厚生連豊栄病院内科　**鈴木　康史・板谷　啓司**
新潟大学医学部第三内科（主任：朝倉　均教授）
青柳　豊・小黒　仁
横田　剛・斉藤　敦
五十嵐健太郎・上村　朝輝
朝倉　均

Serological Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

Yasufumi SUZUKI and Keiji ITAYA
Kohseiren Toyosaka Hospital

Yutaka AOYAGI, Makoto OGURO, Kentarou IGARASHI, Atsushi SAITOU
Tsuyoshi YOKOTA, Tomoteru KAMIMURA and Hitoshi ASAKURA
The Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Hitoshi ASAKURA)

Reprint request to: Yasufumi SUZUKI or Yutaka AOYAGI, Third Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Asahimachi-Dori 1, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町1番町
新潟大学医学部第三内科学教室
鈴木康史・青柳　豊