

## レクチン阻害サイログロブリン測定による 新しい甲状腺乳頭癌診断法の開発

加藤亮二<sup>1)</sup>\* 亀子文子<sup>2)</sup> 天川雅夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 香川県立医療短期大学臨床検査学科

<sup>2)</sup> 信州大学医学部保健学科

### Development of a New Diagnostic Method for Thyroid Papillary Carcinoma by Measurement of Lectin Inhibitory Thyroglobulin

Ryoji Kato<sup>1)</sup> Fumiko Kameko<sup>2)</sup> Masao Amakawa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences*

<sup>2)</sup> *Department of Biomedical Laboratory Sciences, School of Health Sciences, Shinshu University.*

#### Abstract

The aim of this study was to differentiate thyroid papillary carcinoma from benign thyroid tumors. We have developed new monoclonal antibodies that can specifically recognize epitopes on thyroglobulin(Tg). Using the monoclonal antibodies, an ELISA system was established to identify patients with thyroid cancer by measuring tissue levels of Tg. Our previous observation indicated that the sugar chains of Tg associated with thyroid cancer react with lectins differently from that of normal Tg. We then investigated the ratios of unbound Tg { Lectin Inhibitory Tg(%) } in various thyroid tissues by ELISA using LCA lectin. The Lectin Inhibitory Tg in papillary carcinoma was significantly higher than that observed in benign follicular adenoma. This result clearly indicates that the monoclonal antibody-based ELISA would significantly contribute to the diagnosis of patients with thyroid papillary carcinoma.

**Key Words** : 甲状腺癌 (Thyroid cancer)

モノクローナル抗体 (Monoclonal antibody)

酵素免疫測定法 (ELISA)

LCA レクチン (LCA lectin)

\* 連絡先 : 〒 761-0123 香川県木田郡牟礼町大字原 281-1 香川県立医療短期大学臨床検査学科

\* Correspondence to: Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, kita-gun, kagawa, 761-0123, Japan

## はじめに

現在、日常診療に広く用いられている甲状腺腫瘍性病変マーカー検査として、血液中の Thyroglobulin (Tg) を指標とする Radioimmunoassay (RIA) と Non-RIA (ELISA または CILA) 法<sup>1-4)</sup> が知られている。これらは感度が高く、簡便で手軽に測定できる特長を持っているものの、甲状腺癌、特に濾胞細胞由来の分化癌である乳頭癌と濾胞癌ならびに良性腫瘍でいずれも高値を示すため、両者の鑑別は困難である。

これまで Tg 測定以外の腫瘍マーカー検査の報告例としては、甲状腺濾胞細胞を抗原として作製されたモノクローナル抗体を組織染色に応用する方法<sup>5)</sup>、FGF の検出<sup>6)</sup>、BSP の検出<sup>7)</sup>、Cathepsin B 活性の検出<sup>8)</sup> および末梢血流中の Tg 遺伝子を見出す方法<sup>9-11)</sup> などがあるが、これらは簡便で安価な検査試薬としてのルーチン化に、未だ至っていない。

今回の研究目的は、甲状腺癌の簡便な鑑別検査法を確立し、現状の Tg 測定に比べて、より臨床的意義の高い診断法の開発をめざした。

## 方 法

### 1. Tg の精製

手術後得られた甲状腺組織 { 乳頭癌 15 例、濾胞癌 3 例、濾胞腺腫 (良性腫瘍) 13 例、バセドウ病 3 例: 信州大学第二外科より供与 } を 0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.2, 1mM PMSF 添加) 中でそれぞれホモジェナイズし、10,000xg 60 分間遠心後、上清を得、それを Shulman<sup>12)</sup> らの方法で Tg を分離した。Tg の蛋白量は 280nm で測定した。

なお、抗体作製の免疫原、固相抗原および Tg 標準液作製にはバセドウ病組織由来 Tg を使用し、糖鎖変異の検索には乳頭癌組織由来 Tg、濾胞癌組織由来 Tg および濾胞腺腫組織由来 Tg を使用した。

### 2. モノクローナル抗体 (MAb) 作製法

上記の方法で得たバセドウ病組織由来 Tg を免疫原とし、滅菌生理食塩水に溶解後 Freund's の完全アジュバントと 1:9 の比率で混合してエマルジョンを作成し、マウス腹腔内に投与した (1  $\mu$ g/匹)。さらに、同濃度の抗原を 2 週間隔で追加免疫を行い、抗 Tg 抗体価が十分に上昇したことを酵素免疫測定法 (ELISA) で確認後、マウスから採取した脾臓リンパ球と P3U1 細胞 (和光純薬より供与) をポリエチレングリコール法で細胞融合した。抗体価のスクリー

ニングおよびクローニングを経て目的抗体を産生するクローンを得た。高力価の抗体を得るために産生クローン 10<sup>6</sup> 個をマウス腹腔内に移植後、増殖させた。腹水から IgG の分離精製は、Protein-A Sepharose-4B カラム (Pharmacia 社) を用いた。

### 3. モノクローナル抗体 (MAb) の検定

採取された MAb のサブクラスは、培養上清を用いてイムノグロブリン・タイピングキット (和光純薬) で調べた。また、各 MAb の抗体価は、以下に示す酵素免疫測定法 (ELISA) で調べた。

まず、バセドウ病組織由来 Tg を固相化したマイクロプレート (Nunc 社) に適宜希釈した各抗体液をそれぞれ 50  $\mu$ l 分注し、30 分間室温で反応させた。0.05% Tween20 添加リン酸緩衝液 (以下洗浄液) で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (自家製) を 100  $\mu$ l 加えて室温で 30 分間反応させた後、3 回洗浄してテトラメチルベンチデン 100  $\mu$ l で発色させた。1M リン酸 50  $\mu$ l で反応停止後、ELISA-Auto Reader (BIO-RAD 社) を用いて 450/660nm で比色し、その吸光度を抗体価とした。

### 4. 甲状腺組織由来 Tg の糖鎖変異の検出

#### 1) ELISA 法による検索

得られた MAb の中から目的にかなう抗体を選別するために図 1 に示すような Tg 測定法を作製した。まず、MAb を個別に固相化 (1  $\mu$ g/well) したマイクロプレートを準備し、MOPS 緩衝液 50  $\mu$ l と各組織由来 Tg 液 (乳頭癌 1 例、濾胞癌 1 例、濾胞腺腫 1 例をそれぞれ 200~500ng/ml 程度に調整) 50

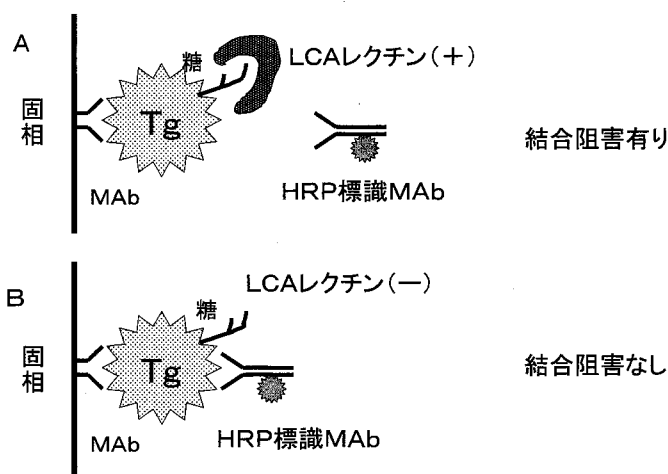


図 1 レクチン阻害 Tg 測定法の原理 MAb: モノクローナル抗体, HRP: 酵素標識モノクローナル抗体

μl をそれぞれの穴に入れて4℃で1時間反応させた。洗浄後、1mg/ml に調整した各種レクチン(ConA, LCA: 豊年社) 100 μl と MOPS 緩衝液のみを入れた2つの系を作成し、両者を4℃で1時間反応させた。洗浄後、各 MAb をペルオキシダーゼで個別に標識したものをそれぞれ100 μl 分注(2,000倍希釈)して1時間反応させた。洗浄後、抗体価測定と同様に発色、比色した。レクチン添加群の Tg 値と無添加群の Tg 値の比(レクチン添加 Tg 値/レクチン無添加 Tg 値)を求め、阻害率(または Tg-unbound%) として表現し、癌組織由来 Tg と濾胞腺腫組織由来 Tg の中で阻害率の差が大きい MAb の組み合わせを求めた。

組み合わせが決定後、乳頭癌 15 例、濾胞癌 3 例、濾胞腺腫 13 例の組織由来 Tg について同様の方法で検査した。

表1 抗体の性質と抗体価

抗体名	サブクラス	腹水	精製IgG
p1	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p2	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p3	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p4	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p5	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p6	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p7	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p8	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
p9	IgG <sub>1</sub> k	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>

2) レクチン染色法による検索

それぞれの組織由来 Tg を 1mg/ml に調整後、SDS 電気泳動用サンプルバッファーと等量混合し、8% ゲル1ウエル当たりそれぞれ10 μl 添加後、20mA, 80分間の条件で泳動した。プロテイングは、ミニトランスプロット (BIO-RAD 社) を使用し、150mA, 45分間の条件で冷却(4℃)しながらニトロセルロース膜に転写した。膜をリン酸緩衝液で5倍希釈したブロックエース(大日本製薬)で30分間ブロッキングした後、洗浄液で1回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識 LCA レクチン(1,000倍希釈)液に浸して4℃1時間反応させた。膜を十分に洗浄した後、ジアミノベンチジン(DAB: Sigma)で発色させた。

結果

1. 各モノクローナル抗体の性状と抗体価

今回の抗体作製で9種類の MAb が得られた。表1に示すように、この MAb のサブクラスは、すべて IgG1 型, k 型を示し、腹水および精製 IgG の抗体価は、ELISA 法でいずれも 10<sup>6</sup> 倍希釈まで認められた。

2. 甲状腺組織由来 Tg の糖鎖異常の検索

1) ELISA 法による結果

9種類の MAb を組み合わせて各組織由来 Tg の糖鎖異常を調べたところ、図2に示すように LCA レクチンを用い、MAb-p1 を固相、MAb-p8 を標識に使用した系において、乳頭癌、濾胞癌ならび

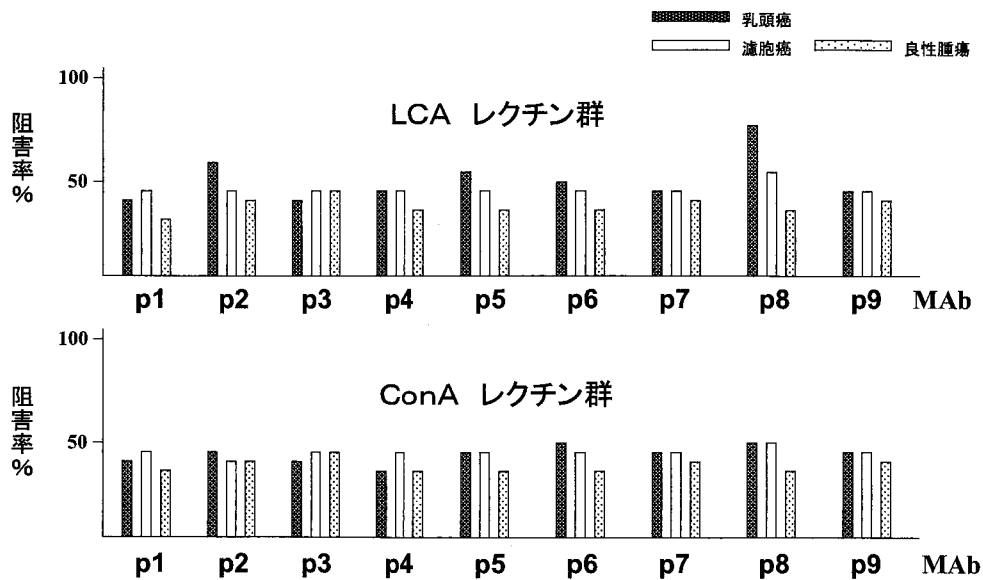


図2 レクチンとモノクローナル抗体の違いにおけるレクチン阻害立の変化 MAb: モノクローナル抗体

表2 Tg標準液の測定

Tg (ng/ml)	0	10	100	1000
新法*	0.059	0.21	0.78	2.12
従来法*	0.088	0.22	0.80	2.18

\*吸光度

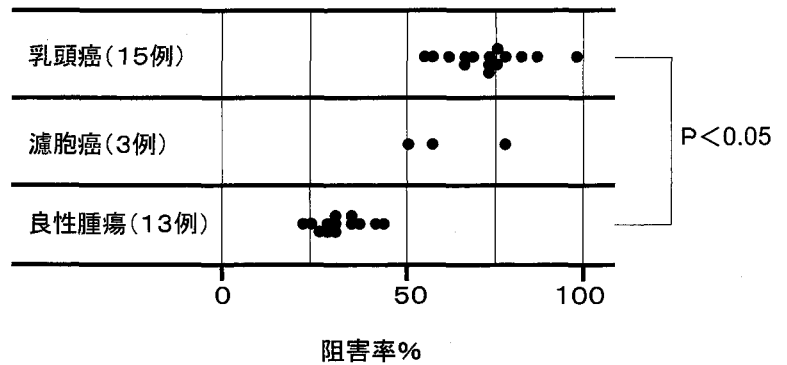


図3 各甲状腺組織 Tg におけるレクチン阻害率の変化

に濾胞腺腫の間に大きな阻害率の差が認められた。ConA レクチンを使用した系では、いずれの組み合わせにおいても乳頭癌および濾胞癌と濾胞腺腫との間に阻害率の差を認めなかった。

以上の結果から、MAb-p1 と MAb-p8 および LCA レクチンを組み合わせた系を新法とし、まず、バセドウ組織から得た Tg 標準液との反応性について従来法の ELISA 法と比較した。新法と従来法の Tg 液における測定吸光度は、表 2 のように一致した結果であった。

次に、乳頭癌 15 例、濾胞癌 3 例、濾胞腺腫 13 例の症例に対して、新法による各組織由来 Tg の阻害率を検索したところ、図 3 に示すように乳頭癌および濾胞癌での阻害率は、濾胞腺腫のそれより全例高い値を示し、乳頭癌と濾胞腺腫の間には有意な差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

## 2) レクチン染色法による結果

乳頭癌 15 例、濾胞癌 3 例および濾胞腺腫 13 例の Tg を SDS-PAGE で電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写して、ペルオキシダーゼ標識 LCA レクチンで反応させたところ、乳頭癌の 15 例中 4 例 (26.6%) と濾胞癌 3 例中 1 例 (33.3%) は、レクチンとの染色性がほとんど肉眼で見えないか、もしくは非常に弱い結果であった。濾胞腺腫 13 例では全例 LCA レクチンとの強い染色性を認めた。

## 考 察

現在、甲状腺濾胞細胞を発生母地とする分化癌である乳頭癌および濾胞癌の診断には超音波検査や細胞診検査が有効であり、日常臨床で多用されている。しかし、健常者集団の中からより早く異常者を見出すための集団検診や日常の外來時診断では、コストが安価で、簡便かつ検査時間が早く、大量処理が可

能な検査法<sup>13)</sup>が望まれている。

現状では、これらすべてを満足させる方法はないが、甲状腺全摘出後に癌の再発マーカーとして血清 Tg 測定が用いられている。しかし、この方法では、甲状腺癌患者および良性腫瘍患者の Tg 値がいずれも高い値を示すために、これを用いた両者の鑑別診断は困難であった。

これを解決する目的で、これまで多くの研究<sup>5-9)</sup>が行われてきたが、日常検査に導入可能な簡便な方法としては、未だ確立されたものがない。そこで、本研究では、血清中に存在する Tg をそのまま測定するのではなく、癌組織と良性組織が産生する Tg の糖鎖異常の程度を見出す測定法を開発した。

この測定法の構築にあたり、まず、バセドウ病組織由来 Tg を免疫原に使用した新たな MAb の作製を試み、それと反応する MAb 9 種類を得た。この MAb は、従来法で使用されてきた Tg 標準物質と良く反応し、Tg を認識していることが確認された。

MAb が認識する Tg のエピトープ部位は、Tg の糖鎖異常を直接認識しているか、あるいは、Tg 糖鎖の近傍エピトープを認識することが重要である。特に後者では、標識された MAb と固相化 MAb 側に結合した組織由来 Tg との反応を、レクチンが阻害する部位でなければならない。今回得られた 9 種類の抗体の中で MAb-p8 が後者を満足する抗体と推測された。

次に、レクチンの性質が重要である。今回使用したレクチンは、Tg 分子内の糖鎖を構成している  $\alpha$  マンノース、ガラクトース、N アセチルガラクトサミン、フコースなどと親和性が高い ConA と LCA を用いた。

通常 Tg の分子内では、高マンノース型および糖の複合型として規則的に付加<sup>14)</sup>されているが、甲状腺細胞が癌化されることでこの規則性のバランスが壊れると考えられている。

ConA レクチンの結合部位は、 $\alpha$ -マンノースが 2

残基以上必要であり、糖鎖構造は、直列でも並列でも良いとされている。また、LCA レクチンも  $\alpha$ -マンノースに対して特異的に結合するが、アスパラギンに結合した N アセチルグルコサミン残基の C-6 位に結合したフコースの存在が必要であり、特に糖鎖構造の骨格が要求される。

今回、これらの性質を有する 2 つのレクチンを比較すると LCA レクチンで良い結果が認められた。ConA レクチンとの阻害率に差が生じた原因は、おそらく癌化による細胞の糖付加の際に生じる糖鎖構造の異常がレクチン親和性の差として現れたと推測された。

また、この Tg 測定法は、レクチンの反応性をより起こり易くしてある。すなわち、使用する組織および血清中には糖蛋白が多く存在するので、レクチンを加える前にあらかじめ MAb と Tg を反応後、洗浄という操作を行うことで使用するレクチンが他の Tg 以外の物質に影響を受けることなく反応できる。

以上の条件をもとに癌組織由来 Tg と良性腫瘍組織由来 Tg について、MAb-p8 と LCA レクチンを用いた方法で測定した結果、濾胞腺腫由来 Tg に比べて乳頭癌由来 Tg では有意にレクチンによる阻害率が高値を示し、Tg 中の糖鎖変異の違いを見出すことが可能であった。本法は、甲状腺乳頭癌の腫瘍マーカー検査として臨床的意義が極めて大きいものと考えられる。

しかし、本実験では甲状腺癌の症例が乳頭癌に偏っており、対象とした 3 例の濾胞癌における阻害率は高かったものの、症例が少ないために有用性に関する検討は困難であった。

## 結 語

甲状腺癌の簡便な鑑別検査法を確立するため、Tg を抗原とする MAb を作製し、LCA レクチンとの組み合わせで、新しい Tg 測定法を開発した。本法は、癌組織が産生する Tg と良性組織が産生する Tg 分子内の糖鎖変異の違いを検出するものである。実際に癌組織由来 Tg と良性組織由来 Tg を測定すると、明らかに両者でレクチンとの反応性に差が生じていたことから、本法を用いることで、甲状腺乳頭癌と良性腫瘍との鑑別が可能となり、腫瘍マーカー検査としての高い意義が認められた。

今後、本法を血清診断や細胞診時に得られる組織液の検査に応用することで、この分野の癌診断に大きく寄与することが期待される。

本研究は平成 13 年度～14 年度文部省科学研究費(基盤研究 C)により行われた。

## 文 献

- 1) Torrigiani G, Doniach D, and Roitt IM. (1969) Serum thyroglobulin levels in healthy subjects and in patients with thyroid disease. *J Clin Endocrinol* 29: 305-314.
- 2) Van Herle A and Uller RP (1975) Elevated serum thyroglobulin; A marker of meta-stases in differentiated thyroid carcinomas, *J Clin Invest* 56: 272-277.
- 3) Kato R, Noguchi S, Noguchi A (1987) A human serum thyroglobulin determination with monoclonal antibody one-step assay minimum interference of autoantibody. *Endocrinol Jpn* 34: 171-178.
- 4) Marquet PY, Daver A, Sapin R (1996) Highly sensitive immunoradiometric assay for serum thyroglobulin with minimal interference from autoantibody. *Clin Chem* 42: 258-262.
- 5) Takeyama H, Hosoya T, Sakurai K (1996) Production of a novel monoclonal antibody, JT-95, which can detect antigen of thyroid carcinoma. *Cancer Res* 56: 1817-1822.
- 6) Singu Kiyoshi, Sugeno A, Kato R (1994) Expression of basic fibroblast growth factor in thyroid disorders. *World J Surgery* 18: 550-505.
- 7) Eui Y Soh, Quan-Yang Duh, Saif A Sobhi, Dave M Young (1997) Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *JCEM* 82: 3741-3749.
- 8) Shuja S, Cai J, Iacobuzio-Donahue C (1999) Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, Graves' disease and multinodular goiters. *Thyroid* 9: 569-577.
- 9) Fabio Orlandi, Enrico Saggiorato, Giovanni Pivano (1998) Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 58: 3015-3020.
- 10) Beth Ann Ditkoff, Michael R. Marvin, Shrishailam Yemul. E (1996) Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 120: 959-960.
- 11) Matthew D. Ringel, Paul W. Ladenson, and Michael A. Levine (1998) Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *JCEM* 83: 4435-4442.
- 12) Shulman S, and Armenia J (1963) Studies on thyroid proteins. The components of hog thyroid tissue, and the preparation of purified thyroglobulin, by column

chromatography. *J Biol Chem* 238: 2723–2731.

13) Spencer CA, Takeuchi M (1996) Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem* 42: 164–173.

14) Maruyama M, Kato R, Kobayashi S (1998) A method to

differentiate between thyroglobulin derived from normal thyroid tissue and from thyroid carcinoma based of reactivity to lections. *Arch Pathol Lab Med* 122: 715–719.

---

受付日 2003年10月30日