

## ニワトリ型単クローン抗体を用いた肝細胞癌の診断

甲田 徹三 北條慎太郎\*

**要旨** シアル酸は糖蛋白や糖脂質の糖鎖末端に存在する炭素9個の酸性糖で、シアル酸を含む糖鎖は細胞間認識や細胞と病原体の認識に関与することが知られている。哺乳類において最も代表的なシアル酸はN-アセチルノイラミン酸とN-グライコリルノイラミン酸 (NeuGc) である。NeuGc はヒトとニワトリ以外の動物には存在するが、ヒトおよびニワトリの正常組織には存在せず、強い免疫原性を有することが知られている。従来から知られている胎児性癌抗原などの癌抗原とは異なる腫瘍関連抗原として注目されるようになった。本研究では、糖脂質型 NeuGc を認識する抗 NeuGc ニワトリモノクローナル抗体 (HU/Ch6-1) と糖脂質型および糖蛋白型の両 NeuGc を認識する抗体 (HU/Ch2-7) を利用し、免疫組織染色法による肝細胞癌における NeuGc の発現解析を行った。

その結果、肝細胞癌患者から手術摘出された肝細胞癌組織37例中17例 (45.9%) に糖脂質型 NeuGc の発現が認められた。肝細胞癌患者血清中で高頻度 (67.6%) に NeuGc 抗体 (IgM または IgG) の上昇が確認された。これらの抗体は肝細胞癌細胞に発現した NeuGc の刺激によるものと思われる。NeuGc 抗体 (IgM または IgG) と AFP、PIVKA-II 値との相関は認められなかった。血清中 NeuGc 抗体 (IgG または IgM) の測定が肝細胞癌の腫瘍マーカーである AFP および PIVKA-II と同様に肝細胞癌の腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

(キーワード: 肝臓癌, 腫瘍関連抗原, N-グライコリルノイラミン酸 (NeuGc) チラミドシグナル増強 (TSA))

## DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA USING CHICKEN ANTI-MONOCLONAL ANTIBODY

Tetsuzo KODA and Shintaro HOJYO\*

**Abstract** Sialic acid is a carbohydrate with 9 carbons, which is found on the terminal sugar chains of glycolipids and glycoproteins. It is known that sugar chains containing sialic acid play a role in intercellular signaling and in the recognition of cells and pathogens. N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) are the most widely detected sialic acids in mammals.

NeuGc is widely expressed in most mammals, but is not expressed in normal human or chicken tissues. NeuGc possesses immunogenicity in humans and chickens, and has attracted much attention as a tumor-associated antigen.

In this study, we performed the expression analysis of NeuGc in hepatocellular carcinoma by immunohistochemistry method with chicken 2 monoclonal antibodies, Hu/Ch6-1 (against glycolipid type NeuGc), Hu/Ch2-7 (against glycolipid/glycoprotein type NeuGc).

In frozen liver sections from patients with hepatocellular carcinoma, glycolipid-type NeuGc was detected on the surface of liver cancer cells in 17 out of 37 samples (45.9%) by immunostaining using two chicken monoclonal antibodies against NeuGc and the tyramide signal amplification

国立病院呉医療センター (現: 独立行政法人国立病院機構呉医療センター) National Kure Medical Center 臨床研究部長

\*広島大学生物生産学部 Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University 免疫生物学教室

Address for reprints: Tetsuzo Koda, Institute for Clinical Research, National Hospital Organization Kure Medical Center, 3-1 Aoyama, Kure, Hiroshima 737-0023 JAPAN

Received February 18, 2004

Accepted May 21, 2004

method. Increased serum levels of anti-NeuGc IgG and/or IgM were observed in 25 of the 37 patients with hepatocellular carcinoma (67.6%). The presence of these antibodies was mostly attributed to the expression of NeuGc on hepatocellular carcinoma cells. There was no correlation between serum AFP or PIVKAI levels and the presence of NeuGc or anti-NeuGc IgG and/or IgM.

We therefore consider that measurement of serum levels of anti-NeuGc antibodies is clinically meaningful and that anti-NeuGc antibody may be a useful screening test in combination with AFP and PIVKAI for diagnosis of hepatocellular carcinoma.

(Key Words : liver cancer tumor associated antigen n-glycolylneuraminic acid (NeuGc), tyramide signal amplification (TSA))

シアル酸は糖蛋白や糖脂質の糖鎖末端に存在する炭素9個の酸性糖で、シアル酸を含む糖鎖は細胞間認識や細胞と病原体の認識に関与することが知られている。自然界には30種近くのシアル酸分子種が存在し、哺乳類の代表的なシアル酸はN-アセチルノイラミン酸とN-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) である。

NeuGc はほとんどの哺乳類において広く発現しているが、正常ヒト組織、ニワトリ組織では NeuGc の発現は認められない<sup>1)</sup>。NeuGc はヒトおよびニワトリに対して免疫原性があり、動物の血清を投与されたヒト個体は、Hanganutziu-Deicher 抗体と呼ばれる NeuGc をエピトープとする抗体を産生することが知られている<sup>2) 3)</sup>。このような抗体を認識する抗原エピトープは、動物血清や細胞膜上に存在する糖脂質あるいは糖蛋白質の糖鎖である。その抗原を持たないヒトを含む動物に対して強力な免疫原として働き、抗体を惹起することが知られている。

NeuGc はヒトおよびニワトリに強い免疫原性を有することから、従来から知られている胎児性癌抗原と異なる腫瘍関連抗原として注目を集めるようになった。われわれは、以前にニワトリ細胞融合技術を利用して2種類の抗 NeuGc 単クローン抗体産生ハイブリドーマ、HU/Ch2-7 および HU/Ch6-1 の作出に成功した<sup>4)</sup>。

これらの抗体を用いて手術摘出された肝細胞癌組織中に糖脂質型 NeuGc の存在をフローサイトメトリー法で検出したことを報告した<sup>5)</sup>。

今回、このニワトリ抗 NeuGc モノクローナル抗体を利用し、組織学的・生化学的に肝細胞癌と診断された肝癌組織を材料として、免疫組織化学染色法による NeuGc の局在性および肝細胞癌患者血清中の抗 NeuGc 抗体の測定を行い、肝細胞癌と NeuGc の発現について検討した。

## 材料と方法

### 1. 臨床材料

1998年12月より2001年12月までに国立病院呉医療セン

ターを受診して組織学的、生化学的、画像診断等により肝細胞癌と診断され、手術摘出された肝細胞癌37例(男性28例、女性9例、平均64.1歳、HBs 抗原陽性11例、HCV 抗体陽性24例、両者陽性1例、両者陰性1例)について癌部、非癌組織(肝硬変25例、慢性活動性肝炎12例)について検討した(Table 1)。肝細胞癌と診断された時点で採血された患者血清を抗 NeuGc 抗体測定時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

対照として健常人237名(HBs 抗原、HCV 抗体とも陰性)の血清を用いた。得られた材料については、本人の同意を得て研究を行った。

### 2. 抗 NeuGc ニワトリ型単クローン抗体 (HU/Ch2-7, HU/Ch6-1) の作製

朝岡が<sup>4)</sup>作成した抗 NeuGc ニワトリ型単クローン抗体産生ハイブリドーマは、10% FBS (fetal bovine serum; Sigma 社) 添加 IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium; GIBCO BRL) を培地として、 $38.5^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。培養液は1,200×gで遠心後、その上清を回収し、これを免疫組織化学染色に供試した。

HU/Ch2-7 は HD3, HD5, HD7, および 4-O-Ac-HD3 および糖蛋白型 NeuGc と反応し、糖脂質型および糖蛋白型 NeuGc にも反応することが明らかになった。一方、HU/Ch6-1 抗体は HD3 および HD5 と反応し、糖蛋白型 NeuGc との反応は認められず、主として糖脂質型 NeuGc を認識していることがわかった。得られた HU/Ch2-7 および HU/Ch6-1 抗体はともに NeuGc を抗原エピトープとする IgG 抗体である。これら2種類の単クローン抗体を用いることにより、糖脂質型 NeuGc および糖蛋白型 NeuGc をそれぞれ識別することが可能となった。

### 3. 免疫組織化学染色法

肝細胞癌組織切片中の NeuGc の局在は、indirect tyramide signal amplification (TSA) kit (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA)<sup>6) 7) 8)</sup> を用いて室温で行った。37例の凍結肝細胞癌組織の連続切片を0.15

Table 1 Expression of NeuGc in cancer cells and anti-NeuGc antibody in sera from patients with HCC

Case no.	Age/sex	Tumor		Anti-NeuGc antibody		Immunohisto-chemistry		Tumor marker		Viral Marker	
		Size (cm)	Histologic characteristics	IgG	IgM	Hu/Ch6-1	Hu/Ch2-7	AFP (ng/ml)	PIVKA-II (mAU/ml)	Viral Marker	
										HBs-Ag	Anti-HCV
1	69/M	4.0 x 3.8	Well	0.479	0.194	+	+	7.85	4,850	-	+
2	66/M	2.0 x 1.5	Moderate	0.522	0.112	-	-	168.5	48	-	+
3	71/F	1.5 x 1.5	Well	0.866	0.313	-	-	4.63	18	-	+
4	45/M	1.5 x 1.4	Moderate	0.738	0.121	-	-	4.70	130	+	-
5	65/M	3.5 x 2.5	Well	0.760	0.119	-	-	5.23	117	-	+
6	54/M	2.5 x 2.5	Moderate	0.671	0.130	+	+	304.4	23	+	-
7	73/F	3.5 x 3.5	Moderate	0.594	0.196	+	+	4.50	25	-	+
8	71/M	3.5 x 1.5	Moderate	0.778	0.404	-	-	654.2	189	-	+
9	69/M	1.5 x 1.5	Well	0.390	0.259	+	+	23.0	23	-	+
10	68/F	3.0 x 2.5	Moderate	0.456	0.140	-	-	148.9	<10	+	-
11	67/M	1.5 x 1.5	Moderate	0.664	0.143	+	+	24.6	201	-	+
12	48/F	2.5 x 1.5	Moderate	0.744	0.229	+	+	219.5	55	+	-
13	73/M	3.6 x 2.5	Well	0.740	0.274	+	+	42.0	948	-	+
14	50/M	0.8 x 0.5	Well	0.323	0.069	-	-	9.4	31	+	-
15	69/M	11.0 x 10.0	Moderate	0.879	0.234	+	+	341	122	-	+
16	38/M	2.0 x 1.5	Moderate	0.498	0.071	-	-	40.2	67	+	-
17	59/M	3.2 x 2.5	Moderate	0.652	0.239	+	+	17.2	39	-	+
18	65/M	1.5 x 1.5	Moderate	1.078	0.243	-	-	7.4	28	-	+
19	63/F	3.5 x 3.2	Moderate	0.960	0.210	+	+	34.4	24	-	+
20	60/M	3.5 x 3.5	Moderate	0.381	0.095	-	-	50	31	+	-
21	73/M	2.0 x 2.0	Moderate	1.557	0.171	-	-	1,800	240	+	+
22	61/M	2.0 x 2.0	Well	0.582	0.170	-	-	4,506	79	-	+
23	73/F	2.2 x 2.5	Moderate	1.019	0.147	-	-	2.9	<10	+	-
24	67/F	3.0 x 3.0	Moderate	0.748	0.191	+	+	6.2	460	-	-
25	59/M	3.0 x 3.0	Poorly	0.803	0.970	+	+	85.7	30	-	+
26	69/F	21.5 x 2.5	Well	1.453	0.163	-	-	15.1	28	-	+
27	60/M	1.5 x 1.0	Moderate	0.531	0.133	-	-	62.5	36	+	-
28	55/M	1.3 x 1.3	Moderate	0.421	0.142	-	-	86.3	27	-	+
29	61/M	2.0 x 2.0	Moderate	0.500	0.180	-	-	3.6	<10	-	+
30	64/M	3.0 x 3.0	Well	0.242	0.100	+	+	3.6	13	-	+
31	81/M	1.6 x 1.5	Moderate	0.108	0.241	-	-	27.1	44	-	+
32	62/M	2.5 x 2.5	Moderate	0.184	0.092	+	+	711.2	37	+	-
33	70/F	3.5 x 3.5	Poorly	0.437	0.131	-	-	2,800	28	-	+
34	50/M	13.0 x 13.0	Moderate	1.061	0.218	+	+	85.8	2,700	+	-
35	73/M	4.5 x 4.5	Well	0.149	0.192	+	+	19.9	130	-	+
36	61/M	3.5 x 1.8	Moderate	0.213	0.204	+	+	6.3	100	-	+
37	70/M	7.1 x 5.8	Moderate	0.747	0.199	-	-	1,672	560	-	+
237	Healthy subjects (mean+2SD)			0.587	0.189						

HCC : Hepatocellular carcinoma, Well : well differentiated HCC, Moderate : moderately differentiated HCC

Poorly : poorly differentiated HCC, HU/Ch6-1 : react to glycolipid type NeuGc, HU/Ch 2-7 : react to both glycolipid and glycoprotein type NeuGc

M NaCl, 0.05% Tween20 添加 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5 ; 以下, TNT 緩衝液) で 3 回洗浄後, 5% 正常ヤギ血清 PBS (-) 希釈液を添加して 20 分間イキュベートした。次いで組織中の内因性ペルオキシダーゼを除去するため, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール中で 10 分間浸漬した。浸漬後, 組織切片を TNT 緩衝液で 2 回洗浄し, 0.15 M NaCl, 0.5% ブロッキング試薬 (kit 付属) 添加 0.1M-TrisHCl 緩衝液 (以下 TNB 溶液) を用いてブロッキング操作を 30 分間行った。その後, 1 次抗体として HU/Ch2-7 および HU/Ch6-1 の培養上清を 30 分間反応させ, TNT 緩衝液で 3 回洗浄後, 2 次抗体としてビオチン化抗ニワトリ IgG (H+L) 抗体 (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 30 分間反応させた。続いて TNT 緩衝液 3 回洗浄後, TNB 溶液で 100 倍希釈した streptavidin peroxidase (kit 付属) を 30 分間反応させた。さらに TNT 緩衝液で 3 回洗浄し, TNB 溶液で 50 倍希釈した Biotinyl Tramide (Kit 付属) を 10 分間反応させた。さらに, TNB 緩衝液で 3 回洗浄後, 再び TNB 溶液で 100 倍希釈した Streptavidin Peroxidase を 30 分間反応させ, TNB 緩衝液で 3 回洗浄した。最後に diaminobenzidine による NeuGc の染色および hematoxylin による対比染色を行った。

#### 4. ELISA 法による血清中抗 NeuGc 抗体の検出

肝細胞癌患者血清中の抗 NeuGc 抗体を ELISA 法に

よって検討した。HD3 固相化プレートを 3% egg albumin (Sigma 社製) および 1% polyvinyl pyrrolidone (ナカライテスク社製) 添加 PBS (-) で 37°C, 60 分間, ブロック操作を行った。次いで, プレートに PBS で 100 倍希釈したヒト血清 (1:100) を 100  $\mu$ L 添加し, 37°C, 60 分間反応させた。0.05% Tween 20 (Bio-Rad Laboratories 社製) 添加 PBS (-) で 5 回洗浄後, PBS (-) で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体および IgM 抗体 (BETHYL 社製) (1:3,000) をそれぞれ 100  $\mu$ L 添加し, 室温で 60 分間反応させた。反応後 5 回洗浄した後, クエン酸緩衝液 20 mL に *o*-フェニレンジアミン (Sigma 社製) 10 mg と 10 分後 2M 硫酸 100  $\mu$ L で反応を停止させた。プレートを Automated Microplate Reader Model EL 309 (BIO-TEK 社製) にセットし, 490 nm の波長で吸光度 (OD 値) を測定した。なお, 一次抗体として健康人血清 (1:100) を反応させたものを対照とした。

#### 5. 腫瘍マーカーおよびウイルスマーカーの測定

血清  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), HBs 抗原, HCV 抗体の測定は化学発光免疫測定法 (CLIA) (ABBOTT 社製) を用いて測定した。protein induced vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) はエイテストモノ P-II (エーザイ社製) を用いて測定した。肝細胞癌の組織学的分類は原発性肝癌取扱い規約 (第 3 版) にしたがった<sup>9)</sup>。

## 結 果

### 1. 免疫組織化学染色

手術摘出された 37 例の肝細胞癌組織および非癌組織中の NeuGc の発現について 2 種類の抗 NeuGc ニワトリ

単クローン抗体 (HU/Ch2-7 および HU/Ch6-1) を用いて TSA 法による解析を行った。

肝細胞癌 37 例中 17 例 (45.9%) に NeuGc の発現を認めた。17 例の肝細胞癌膜表面に褐色顆粒状に染色された糖脂質型 NeuGc を認めた。しかし, 非癌組織 17 例 (肝硬変 10 例, 慢性肝炎 7 例) では NeuGc の発現は認められなかった (Fig 1a, b)。

17 例中 2 例が IgG 型 NeuGc 抗体陽性, 4 例が IgM 型 NeuGc 抗体陽性, 9 例が IgG, IgM ともに陽性, 両者陰性 2 例であった。4 例が HBs 抗原陽性, 12 例が HCV 抗体陽性であった。1 例が HBs 抗原, HCV 抗体ともに陰性であった (Table 1)。

17 例中 5 例が AFP が陽性, 4 例が PIVKA-II が陽性, 5 例が両者陽性, 3 例が両者陰性であった。組織学的分類では 17 例中高分化型肝細胞癌は 5 例, 中分化型肝細胞癌は 11 例, 低分化型肝細胞癌 1 例であった。37 例中腫瘍径が 3.0 cm 以下は 21 例であったが, 21 例中 15 例が AFP または PIVKA-II 陽性であった。6 例の陰性例中 3 例が IgG または IgM 型 NeuGc 抗体陽性であった。

### 2. ELISA 法による血清中抗 NeuGc 抗体の検出

237 名の健康人血清中 NeuGc 抗体の平均 OD 値 + 2SD は IgG 型; 0.587, IgM 型; 0.189 であり, この値を cut-off とした。肝細胞癌患者 37 例の術前に採血した血清を -30°C に凍結保存し一括測定した。

IgG 型 NeuGc 抗体陽性率: 20/37 例 (54.1%), IgM 型 NeuGc 抗体陽性率: 17/37 例 (45.9%), IgM または IgG 型 NeuGc 抗体陽性率: 25/37 例 (67.6%) であった (Fig 2)。

NeuGc 抗体 (IgM, IgG) と AFP, PIVKA-II 値,

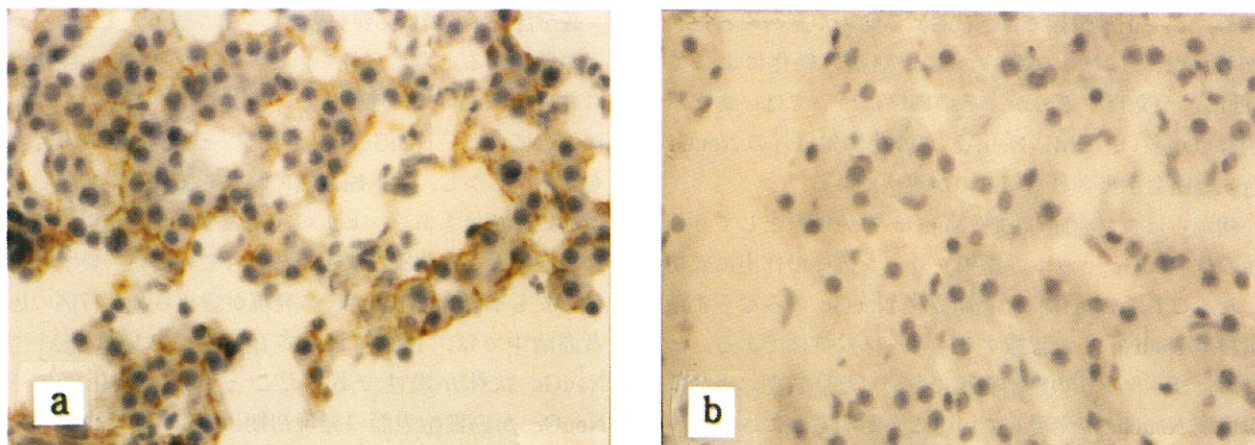


Fig. 1 Localization of NeuGc in HCC cells shown the TSA method. Tumor tissue (a) from an HCC patient (case7) was immunostained with an anti-NeuGc chicken monoclonal antibody (Hu/Ch6-1), whereas the non-cancerous tissue (b) from the same patient was unstained. (Original magnification : x400)

O. D	5/37 (13.5%)	12/37 (32.4%)
0.189 (IgM)	12/37 (32.4%)	8/37 (21.6%)
	0.587 (IgM)	O. D

Fig. 2 Comparison between anti-NeuGc IgG and IgM in patient with hepatocellular carcinoma

肝炎ウイルスマーカー (HBs 抗原, HCV 抗体) との相関は認められなかった。腫瘍径, 悪性度とも相関性は認められなかった (データは示していない)。

### 考 察

シアル酸の1種である NeuGc はヒトおよびニワトリの正常組織中ではその発現が認められないが, 従来より, NeUGc はヒト大腸癌<sup>10)</sup>, 胃癌<sup>11)</sup>, 乳癌<sup>12)</sup>, 黒色腫<sup>13)</sup>, 網膜芽腫<sup>14)</sup> およびニワトリマレックリンパ腫<sup>15)</sup> でその発現が確認されている。NeuGc は胎児性癌抗原など従来の腫瘍抗原とは明らかに異なる腫瘍マーカーとして期待されている。NeuGc がヒト正常組織中でその発現が認められない主要な原因として, 細胞内の NeuGc の生合成機構に関わる CMP-NeuGc 水酸化酵素が深く関与している。鈴木等はマウス CMP-NeuAc 水酸化酵素遺伝子<sup>16)</sup> を基に, HeLa 細胞 cDNA ライブラリーからヒトホモログを単離することに成功し, マウス CMP-NeuGc 水酸化酵素のアミノ酸配列との比較によって, ヒト CMP-NeuAc 水酸化酵素が酵素活性に必須である N 末端部位を欠損していることを発見した<sup>16)</sup>。このため, ヒト正常組織では NeuGc の発現が認められないと考えた。しかしながら, なぜ細胞の癌化によって NeuGc が発現するのか, その機序についてはいまだ不明な点が多い。CMP-NeuAc 水酸化酵素以外の NeuGc 合成経路も示唆されているのが現状である。

朝岡らはウマ赤血球由来 NeuGc を免疫原として2種類の抗 NeuGc ニワトリ型単クローン抗体の作出に成功した。これらの抗体は, 糖脂質型 NeuGc のみならず糖蛋白型 NeuGc をも認識するユニークな抗体である。ヒトおよびニワトリの癌細胞膜において糖脂質型および糖蛋白型 NeuGc が発現していることが明らかにされつつある現在, 2種類のニワトリ型 NeuGc 単クローン抗体は, 癌における NeuGc の解析だけでなく抗原検出による癌の診断にも応用が可能と考えられる。

本研究では, 朝岡らによって得られた抗体を用いて手術摘出された肝細胞癌組織に発現する NeuGc をフローサイトメトリー法で初めて検出に成功し, 肝細胞癌組織には少なくとも糖脂質型 NeuGc が発現していることが明らかとなった<sup>5)</sup>。胃癌細胞から糖蛋白型 NeuGc が検出されたとの報告があるが<sup>17)</sup>, 胃癌組織のそれとは明らかに異なった糖鎖抗原であると考えられる。

以前, フローサイトメトリー法で肝細胞癌組織に発現する NeuGc を確認しており, 今回, 従来のアベジシンオチン複合法では検出することができなかった肝細胞癌組織中の NeuGc を免疫組織化学 (TSA) 法で癌細胞の細胞膜で NeuGc が発現していることを確認した。TSA 法が NeuGc のような組織中に微量にしか存在ないし分子の検出に有効であることが示された。

肝細胞癌患者では血清中の抗 NeuGc 抗体の発現が認められるという報告がなされている<sup>13)</sup>。本研究でも肝細胞癌患者を対象として血清中における抗 NeuGc 抗体の発現について検討した結果, 血清中の抗 NeuGc 抗体は37例中25例 (67.6%) に IgG 型または IgM 型 NeuGc 抗体が陽性であったが, TSA 法で肝細胞癌細胞に発現している NeuGc を検出できたのは, 37例中17例 (45.9%) のみであった。血清中における抗 NeuGc 抗体の上昇は, 肝細胞癌患者中に発現した NeuGc の刺激によるものと考えられるが, 抗体の上昇と NeuGc の発現が一致しないことを考えると, NeuGc が腫瘍組織上に常に癌細胞表面に発現しているのではないと考える。抗 NeuGc 抗体産生を惹起する NeuGc は健康人では合成されないため, NeuGc が何らかの理由で浸入するか, あるいは細胞の癌化にともない NeuGc が合成されるかのどちらかである。現在のところ細胞の癌化にともない N-アセチルノイラミン酸から N-グライコシルノイラミン酸を合成するのに必要な酵素, シアル酸モノオキシダーゼが発現すると考えられている<sup>18)</sup>。ある種のヒト癌細胞において NeuGc が発現しているという報告がいくつかなされており, NeuGc の癌関連の一種と考える研究者もいる。しかし, ヒト癌組織においてまったく発現しないという意見もあり, ヒトの癌化と NeuGc 発現の関与は現在のところ明確な決着がなされていない。いずれにおいても本研究で NeuGc の発現が認められた17例の患者血清中では, 15例において IgG 型あるいは IgM 型 NeuGc 抗体が陽性であったことから, 癌化により NeuGc が癌細胞表面の発現初期に TSA 法で検出しえた可能性が考えられる。また, IgG 型, IgM 型 NeuGc 抗体が陽性でありながら NeuGc が検出できなかった10例は NeuGc の消失, 血清中抗体の結合, あるいは他

の組織中で NeuGc が発現していた可能はあるが本研究では明らかにすることができなかった。肝細胞癌患者血清中で高頻度 (67.6%) に抗 NeuGc 抗体が発現していたこと、さらに、肝細胞癌の腫瘍マーカーである AFP および PIVKA-II のいずれも陰性であった 7 例中 5 例 (71.4%) で IgG 型あるいは IgM 型 NeuGc 抗体が陽性であったこと、また 37 例中 36 例 (97.3%) で HBs 抗原または HCV 抗体が陽性であったことから、肝細胞癌の高危険群である肝炎ウイルスキャリア (とくに HCV キャリア) には血清中の抗 NeuGc 抗体を測定することにより、肝細胞癌の診断に有用であると考えられる。

ニワトリ型単クローン抗体を用いて、肝細胞の癌化と NeuGc 発現との関連性を明らかにすることは、肝細胞癌の新たな診断法の確立につながると思われる。また、肝細胞癌の腫瘍マーカーである AFP および PIVKA-II が検出されない患者血清中の抗 NeuGc 抗体を測定することで、肝細胞癌の診断に有用と考える。

#### 文 献

- 1) 川野武弘, 小堤安則: N-グリコシルノイラミン酸の発現制御. 蛋白 核酸 酵素 **37**: 1993-1996, 1993
- 2) Higashi H, Naiki M, Matuo S et al: Antigen of "serum sickness" type of heterophile antibodies in human sera: identification as gangliosides with N-glycolylneuraminic acid. Biochem Biophys Res Commun **79**: 388-395, 1977
- 3) Merrick JM, Zadarlik K, Milgrom F: Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing n-glycolylneuraminic acid. Int Arch Allergy Appl Immunol **57**: 477-480, 1978
- 4) Asaoka H, Matsuda H: Detection of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoproteins from various animal erythrocytes by chicken monoclonal antibody against Hanganutziu-Deicher antigens. J Vet Med Sci **56**: 375-377, 1994
- 5) Koda T, Shimosakoda T, Asaoka H et al: Detection of the Hanganutziu-Deicher antigen in patients with hepatocellular carcinoma. Int Hepatol Commun **2**: 310-315, 1994
- 6) Egan RM, Yorkey C, Black R et al: Peptide-specific T cell clonal expansion in vivo following immunization in the eye, an immune-privileged site. J Immunol **157**: 2262-2271, 1996
- 7) Litt GJ, Borow MN: Tyramide signal amplification: Applications in genetic and diagnostic testing. In: Biotechnology international 1996, Universal Medical Press, San Francisco, 299-306p, 1996
- 8) Van den Berg FM: Applications of a signal amplification technique for light microscopy. European-American Clin August: 8-9, 1996
- 9) Liver Cancer Study Group of Japan: General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer, 3rd edition: Kanehara & Co Ltd, Tokyo: 32-39, 1992
- 10) Higashi H, Hirabayashi Y, Fukui Y et al: Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. Cancer Res **45**: 3796-3802, 1985
- 11) Fukui Y, Maru M, Ohkawara K et al: Detection of glycoproteins as tumor-associated in human gastric cancer cell line, NUGC4. Biochem Biophys Res Commun **160**: 1149-1154, 1989
- 12) Marquina G, Waki H, Fernandez LE et al: Gangliosides expressed in human breast cancer. Cancer Res **56**: 5165-5171, 1996
- 13) Hirabayashi Y, Higashi T, Kato S et al: Occurrence of tumor-associated ganglioside antigens with Hanganutziu-Deicher antigenic activity on human melanomas. Jpn J Cancer Res **78**: 614-620, 1987
- 14) Ikuta K, Kitamoto N, Shoji H et al: Hanganutziu-Deicher type heterophile antigen expressed on the surface of Marek's disease lymphoma-derived cell lines. Biken J **24**: 23-37, 1981
- 15) Kawano T, Koyama S, Takematsu H et al: Molecular cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase. Regulation of species and tissue-specific expression of N-glycolylneuraminic acid. J Biol Chem **270**: 16458-16463, 1995
- 16) Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y et al: The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. J Biol Chem **273**: 15866-15871, 1998
- 17) Morito T, Nishimaki T, Masaki M et al

: Studies on Hanganutziu-Deicher antigens-  
antibodies. 1. Hanganutziu-Deicher antibodies  
of IgG class in liver diseases. Int Arch Allergy  
Appl Immunol **81** : 204-208, 1986

18) Shauer R : Biosynthesis of Sialic Acids. Methods  
Enzymol **50** : 374-384, 1978  
(平成16年 2月18日受付)  
(平成16年 5月21日受理)