

消化管粘膜における糖蛋白抗原

第1編 その免疫化学的分析ならびに正常胃腸粘膜における免疫組織学的研究

川上 康博 赤保内 良和
札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Glycoprotein Antigens in the Gastrointestinal Mucosa I. Their Immunochemical Analysis and Immunohistological Studies in Normal Gastrointestinal Mucosa

Yasuhiro KAWAKAMI and Yoshikazu AKAHONAI
Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. A. Yachi)

Glycoprotein antigens designated as M_1 , M_2 and M_3 respectively were obtained from ovarian mucinous cyst fluids, gastric mucosa and colonic mucosa, and specific antibodies against each of these antigens were prepared. The immunochemical and immunohistological characteristics of these antigens and their antibodies were investigated, and the following results were obtained:

1. The molecular weights of both M_1 and M_3 were estimated to be over 1,000 K daltons. On immunoelectrophoresis, the mobility of M_1 was found in the prealbumin region, while that of M_3 was found in the β -region. However, it was impossible to identify the immunochemical properties of M_2 because of the low titer of anti- M_2 .

2. M_1 consisted mainly of PAS-positive neutral glycoprotein, whereas M_3 consisted of alcian blue-positive acidic glycoprotein.

3. The sugar composition of M_1 was characterized by N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, galactose and fucose present in molar ratios of 1:1:1.6:1.1, respectively, while that of M_3 was characterized by molar ratios of 1:1.7:3.5:2.4, respectively.

4. Both anti- M_1 and anti- M_2 sera were identified as organ-specific for the gastric mucosa by immunohistological methods. The localization of M_1 in normal human gastric mucosa was confirmed in epithelial cells and foveolar cells. On the other hand, that of M_2 was confirmed in the cells composing the pyloric, fundic and cardiac glands in the gastric mucosa and, in addition, in the cells of Brunner's gland in the duodenal mucosa.

5. The reaction of anti- M_3 was also organ-specific for the colon and intestine, while the localization of M_3 was confirmed in the goblet cells.

From these results, three antigenically different glycoprotein antigens were demonstrated in normal human gastrointestinal mucosa. (Received June 1, 1983 and accepted July 18, 1983)

Key words: Gastrointestinal mucosa, Neutral glycoprotein, Acidic glycoprotein, Immunohistology, Sugar composition

1 緒 言

消化管粘膜に存在する種々の糖蛋白は粘膜の防御機

構に重要な役割を演ずると言われている¹⁾。それらの糖蛋白の性状については、これまで生化学的および組織化学的方法により検討されてきたが、まだ不明の点がある。

残されている。近年免疫化学的方法が導入され、とくに carcinoembryonic antigen (CEA)²⁾をはじめ、多くの抗原が研究されている³⁻⁷⁾。胃液および胃粘膜の糖蛋白については Häkkinen の研究⁸⁾があるが、教室の前田⁹⁾も Häkkinen 分画について検討を加え批判的な成績を報告している。

最近 Bara *et al.*^{10,11)} は胃粘膜および卵巣のう腫粘液より抗原性の異なる3種の糖蛋白抗原(M₁, M₂およびM₃)を免疫化学的および免疫組織学的に証明し、胃および腸粘膜におけるそれらの分布について検討している。

本研究の第1編においては、まず Bara *et al.* に従って M₁, M₂および M₃ を分画し、それらの免疫化学的性状および物理化学的性状を調べるとともに、それらに対する特異抗体を作製した。ついで免疫組織学的にこれらの抗原の正常消化管粘膜における出現と分布について検討した成績を報告する。

2 方 法

2.1 消化管粘膜の糖蛋白抗原的分画

2.1.1 糖蛋白抗原的分画用素材

胃および大腸粘膜組織を、胃潰瘍および十二指腸潰瘍、大腸癌および腸閉塞患者の手術組織から肉眼的に正常と思われる部分を採取した。とくに大腸癌の場合は癌との境界部から5 cm以上離れた部分を採取した。また粘液性卵巣のう腫患者より摘出した卵巣のう腫内より粘液を吸引して、いずれも糖蛋白抗原的分画用素材とした。

2.1.2 ゲル濾過分画

Fig. 1 に示した操作で糖蛋白抗原の粗分画を得た。すなわち胃および大腸粘膜は筋層部分を除去したのち、粘膜部分をカミソリで剝離し、0.15 M 食塩水により homogenate を作製した。ついで0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.0)で24時間、4°Cで透析し、5,000 rpm, 15分間遠心して核蛋白を除去した。上清を脱イオン水で透析したのち凍結乾燥試料とした。

卵巣のう腫粘液はガーゼで濾過し、5,000 rpm, 15分間遠心後、同様に上清を脱イオン水で透析して凍結乾燥試料とした。

次にこれらの凍結乾燥試料を2 M NaCl 加0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で200 mg/8 ml になるように溶解させ、Sephacryl 6B (Pharmacia 社; 2.5×100 cm column)によるゲル濾過を行い、蛋白を280 nm で測定して第1分画を得た。ついでこの分画を Minicon B-15 (Amicon 社)で10倍に濃縮し、上記緩衝液で透

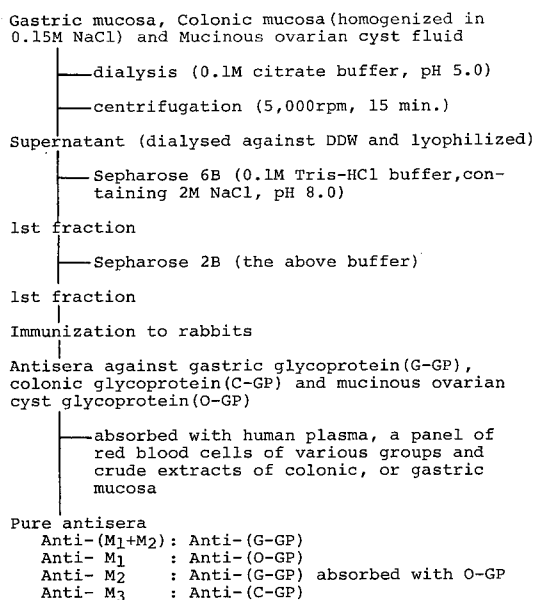


Fig. 1 Preparation of glycoprotein antigens and their specific antibodies.

析後、Sephacryl 2B (Pharmacia 社; 2.5×100 cm column) で再びゲル濾過し、同様に第1分画を得て凍結乾燥し、胃粘膜、大腸粘膜および卵巣のう腫粘液の糖蛋白抗原(それぞれ G-GP, C-GP および O-GP と略す)を作製した。

2.2 糖蛋白抗原に対する抗体の作製

G-GP, C-GP および O-GP をそれぞれ2 M NaCl 加0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に1 mg/ml になるように溶解させ、等量の Freund's complete adjuvant (Difco 社)を加えて十分混和し、家兎の皮下に注射した。2週間後に booster を行ない、以後は1週間々隔で合計4回の booster を行ない、試験採血して力価を確かめ、抗血清(抗 G-GP, 抗 C-GP および抗 O-GP 血清)を得た。

まず Avrameas and Ternynck¹²⁾に従って glutaraldehyde で固相化した正常人血漿を作製し、それを抗血清と等量混和し、24時間反応させたのち遠心して上清を得、同様な操作を再度くり返し、抗血清を十分に吸収した。

ついで血液型物質に対する反応性を除去するため、ヒトの A 型, B 型および O 型赤血球を0.15 M NaCl 加0.1 M リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)で洗浄し、それぞれ20%の割合いで抗血清に加えて吸収を行なった。

また、抗 G-GP および抗 O-GP 血清はいずれも胃粘

膜のみならず大腸粘膜とも反応し得るので¹⁰⁾、それぞれの抗血清 1 ml に凍結乾燥した C-GP 50 mg を加え、4°C、24 時間、混和して吸収し、大腸粘膜糖蛋白抗原との反応性を除去した。このように 3 段階の吸収によって得られた抗 G-GP 血清を抗 (M₁+M₂) 血清、抗 O-GP 血清を抗 M₁ 血清と仮称した。一方、抗 (M₁+M₂) 血清を O-GP でさらに吸収して抗 M₂ 血清を作製したが、この場合、抗血清 1 ml に O-GP 250 mg を加え、4°C、24 時間混和し、遠心して上清を採取した。さらに免疫組織学的検索で吸収が不充分の場合には、この操作をくり返した。

また、抗 C-GP 血清は正常人胃粘膜糖蛋白と共通抗原性を有する¹⁰⁾ので、抗血清 1 ml に G-GP 50 mg を加え吸収し、C-GP のみと反応する抗体を得、これを抗 M₃ 血清とした。

これらの抗血清に対応する抗原を M₁、M₂ および M₃ と名付けたが、これらの関係を Table 1 に一括して示した。

2.3 糖蛋白抗原の分析法

2.3.1 免疫化学的分析

Immunodiffusion (ID) 法および免疫電気泳動法により、標準抗原および抗体 (Dr Bara, J., CNRS, Villejuif, France より供与) を用いて自製の抗体および抗原の性状を検討した。

また fibrinogen, pepsinogen, CEA および nonspecific cross reacting antigen (NCA)¹³⁾ との反応についてもあわせて検索した。

2.3.2 生化学的分析

M₁ および M₃ の凍結試料を PBS で 10 mg/ml に溶解させその可溶部分をセルローズ・アセテート膜上にマイクロピペットで 4 μl を浸みこませ、Amidoblack 10 B, PAS および alcian blue 染色を行ない、糖の組成を検索した。なおこの場合 M₁ および M₃ の蛋白濃度は、

それぞれ 4.16 mg/ml, 1.26 mg/ml であった。

また M₁ および M₃ の糖組成の化学的分析は北里大学医学部生化学教室 (堀田恭子教授) の御厚意により行なわれた。

2.4 糖蛋白抗原の免疫組織学的検討

2.4.1 対象

健常部の胃および大腸組織は胃潰瘍 3 例、大腸癌 3 例の手術材料より、病巣部から 5 cm 以上離れた部を用いた。

2.4.2 組織標本の作製

胃の組織材料は Sainte-Marie¹⁴⁾ に従って、95% アルコールで固定後、低融点のパラフィンで包埋し、5 μ 厚の連続切片を作製した。ただし、大腸組織は 10% フォルマリンまたは 4% パラフォルム固定して用いた。

これらの組織標本はそれぞれヘマトキシリン・エオジン (HE), PAS, および alcian blue 染色を施した。

2.4.3 蛍光抗体法

作製した抗 M₁、抗 M₂ および抗 M₃ 血清を用い上記組織標本内の各糖蛋白抗原の存在を蛍光抗体間接法により検索した。

一次抗血清として用いた抗 M₁ 血清は前記の PBS で 20~40 倍に希釈し、抗 M₂ 血清は 4 倍希釈および抗 M₃ 血清は 20 倍に希釈して用いた。

二次抗血清は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗家兎 γ グロブリン抗体 (Behringwerke 社製) を同様に PBS で 15~20 倍希釈して用いた。

2.4.4 Peroxidase-antiperoxidase 法

ホルマリン固定の大腸組織は PBS で十分洗浄後、上記の一次抗血清と反応させ、peroxidase-antiperoxidase 法¹⁵⁾により糖蛋白抗原を検討した。

Table 1 Glycoprotein antigens and their antibodies: Abbreviations were summarized summarized.

Antigen	Glycoprotein Fractions* used as immunogens	Specific antibodies	Antibodies# absorbed with plasma and RBC were further absorbed with'
M ₁	O-GP	Anti-M ₁	Anti-(O-GP)#-(C-GP)*
M ₁ +M ₂	G-GP	Anti-(M ₁ +M ₂)	Anti-(G-GP)-(C-GP)
M ₂	G-GP	Anti-M ₂	Anti-(G-GP)-(C-GP+O-GP)
M ₃	C-GP	Anti-M ₃	Anti-(C-GP)-(G-GP)

* O-GP: ovarian mucinous cyst glycoprotein

G-GP: gastric mucosa glycoprotein

C-GP: colonic mucosa glycoprotein

3 成 績

3・1 糖蛋白抗原および抗体の免疫化学的性状

3・1・1 糖蛋白抗原の性状

Fig. 2 に示すように、Sepharose 6 B および Sepharose 2 B によるゲル濾過で採取した第 1 分画より、ID 法で抗原的に単一な M_1 ならびに M_3 、および $M_1 + M_2$ 混合物を得た。これらはいずれも分子量 100 万以上の高分子蛋白で、2M NaCl 加 PBS 溶液には可溶性であった。

M_1 および M_3 をセルロース・アセテート膜上に塗布し、Amidoblack 10 B, PAS および alcian blue 染色を施して比較すると、Fig. 3 に示すように M_1 は M_3 に比較して Amidoblack 10 B および PAS 染色に強く染まり、蛋白および中性多糖が多く、一方 M_3 は M_1 より alcian blue に強く染まり、酸性多糖が多いことが示された。

これらの関係は M_1 および M_3 の糖鎖の化学分析 (Table 2) と一致する傾向がみられ、 M_1 で蛋白濃度が高値を示した。また N-acetylgalactosamine (GALNAc) を 1 とし各糖組成のモル濃度の比率をみると M_1 では galactose (GAL) がやや多いが、N-

acetylglucosamine (GNAc) および fucose (FUC) はほぼ同濃度を示す。一方 M_3 では GNAc, GAL および FUC の濃度が高く、とくに後二者が著明に高い。しかし mannose, sialic acid および uronic acid は M_1 および M_3 の間に著明な差は認められなかった。

3・1・2 抗血清の検討

抗 ($M_1 + M_2$) 血清および抗 M_1 血清の反応を ID 法で検索し、Fig. 4 に示した。抗 ($M_1 + M_2$) 血清はその免疫源である G-GP との間に 2 本の沈降線をまた O-GP とは 1 本の沈降線を形成する。G-GP の 2 本のうち 1 本は O-GP の 1 本と共通であるが、1 本は部分共通抗原性を示す。

一方、抗 M_1 血清は G-GP および O-GP と 1 本の沈降線を作り、両者は完全な共通抗原性を示す。すなわち、抗 ($M_1 + M_2$) 血清には M_1 に対する抗体の他に、もう 1 つの抗体があることが示された。

抗 M_2 血清は抗 ($M_1 + M_2$) 血清を O-GP で吸収して作製したが、抗体価が著しく低下し、ID 法では G-GP との間に沈降線の形成はみられなかった。

抗 M_3 血清は C-GP と 1 本の沈降線を形成したが、G-GP および O-GP との間には反応が認められなかった。

またこれらの抗原および抗体を免疫電気泳動により

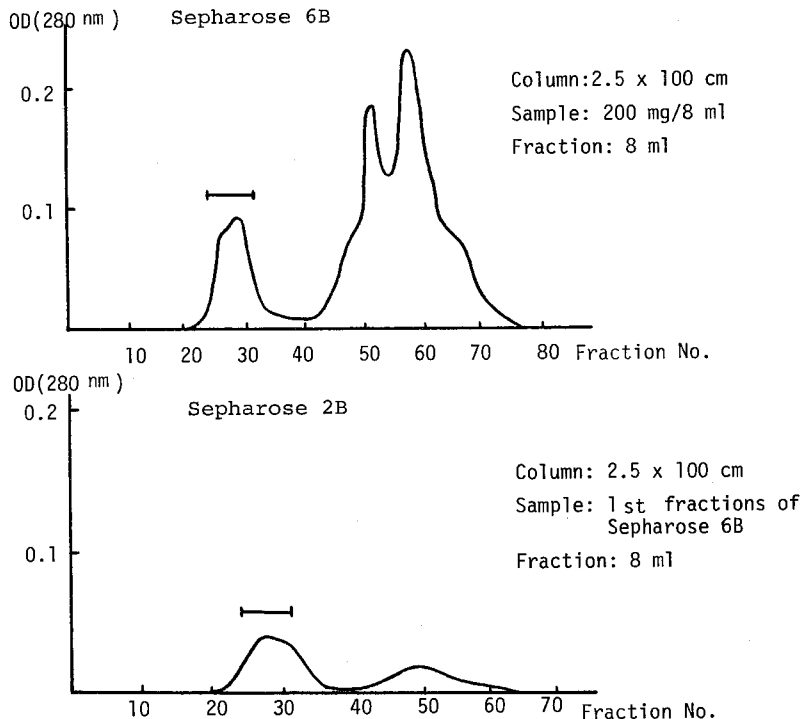


Fig. 2 Gel filtration patterns of glycoprotein antigens
Sample: homogenate of gastric mucosa.

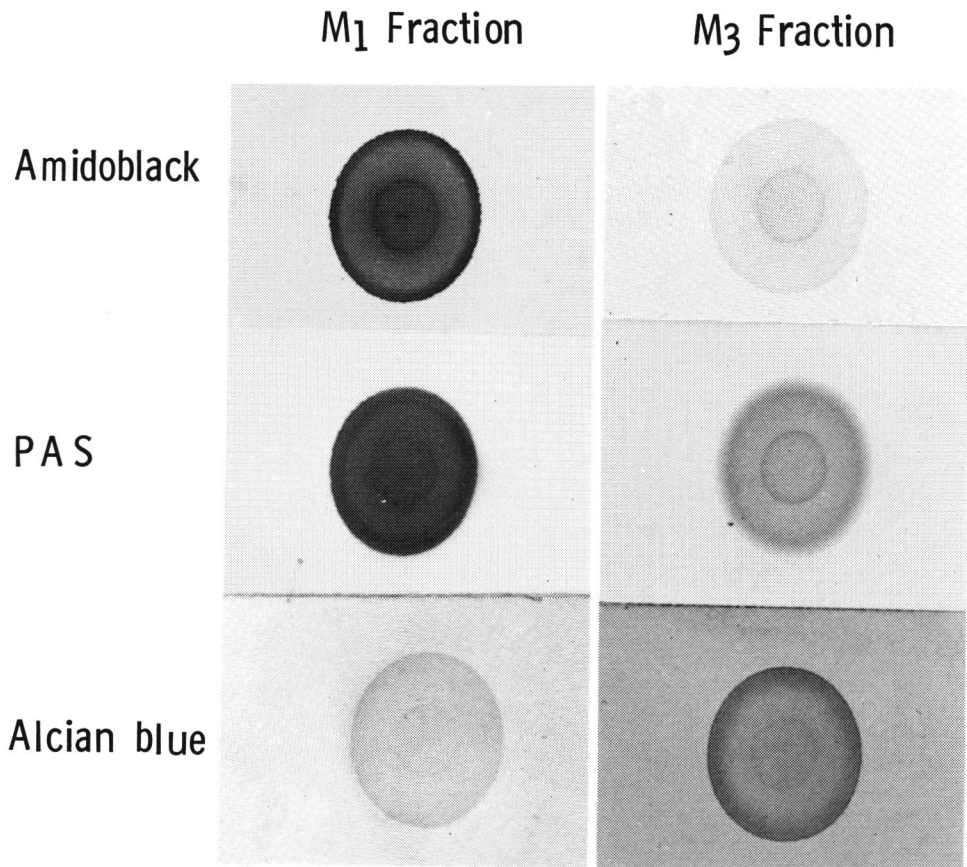


Fig. 3 Staining patterns of glycoprotein antigens on cellulose acetate membrane.

検索すると、Fig. 5に示すように、 M_1 は抗 M_1 血清に対する反応で、prealbuminから β 領域にかけて長い1本の沈降線を作るが、その主体はprealbumin領域に存在することが明らかにされた。また、抗 M_1 血清は正常人血清とは反応せず、 M_1 分画には血清成分の混入はほとんどないことが明らかにされた。 M_2 については検索が不可能であったが、 M_3 は原点からほとんど泳動されず、抗 M_3 血清との反応で β 領域に1本の沈降線を形成した。

またこれらの4種類の抗血清はいずれも pepsinogen, fibrinogen, CEA および NCA と反応しないことを確かめた。

3・2 糖蛋白抗原の免疫組織学的研究

3・2・1 正常胃腸粘膜における糖蛋白抗原の局在

M_1 抗原：Fig. 6(a)に示すように、胃前庭部粘膜における M_1 の局在を抗 M_1 血清を用いた蛍光抗体間接法で検索すると、 M_1 は胃粘膜上の粘液、被覆上皮および胃小窩細胞内にその特異蛍光が認められる。 M_1 の胃粘膜における分布は胃底部、胃体部および幽門部上皮に同

Table 2 Sugar composition in M_1 and M_3 fractions.

	M_1 fraction	M_3 fraction
N-acetyl-galactosamine	2.55*(1.00)**	1.14*(1.00)**
N-acetyl-glucosamine	2.62 (1.03)	1.98 (1.74)
Galactose	4.15 (1.63)	4.02 (3.53)
Fucose	2.81 (1.10)	2.73 (2.40)
Mannose	trace	—
Sialic acid	0.18 (0.07)	0.06 (0.05)
Uronic acid	0.25 (0.10)	0.14 (0.12)

* : μ mole/ml

** : ratio to N-acetylgalactosamine

Protein concentrations: 4.16 mg/ml for M_1 fraction and 1.26 mg/ml for M_3 fraction.

様にみられるが、正常の食道、十二指腸、小腸および大腸粘膜には全く認められなかった。また特異蛍光は間質にはほとんど認められず、糖蛋白抗原に対して特異性の高い抗血清であることが確認された。なお M_1 の

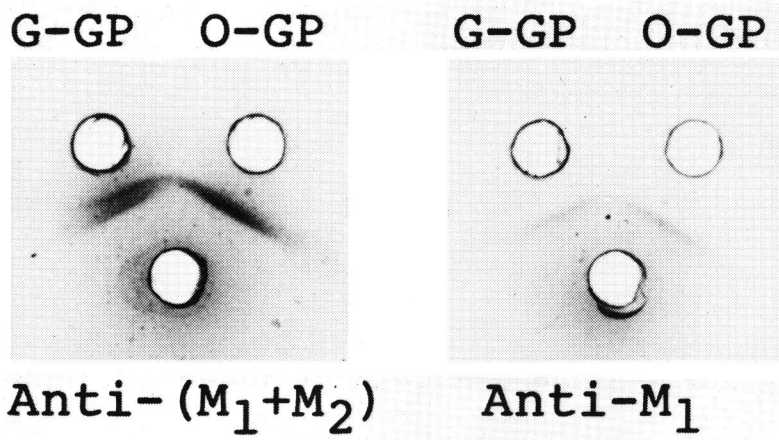


Fig. 4 Double diffusion analysis of glycoprotein antigens and antibodies.
 G-GP: gastric glycoprotein.
 O-GP: ovarian mucinous cyst glycoprotein.

Immunoelectrophoretic Pattern

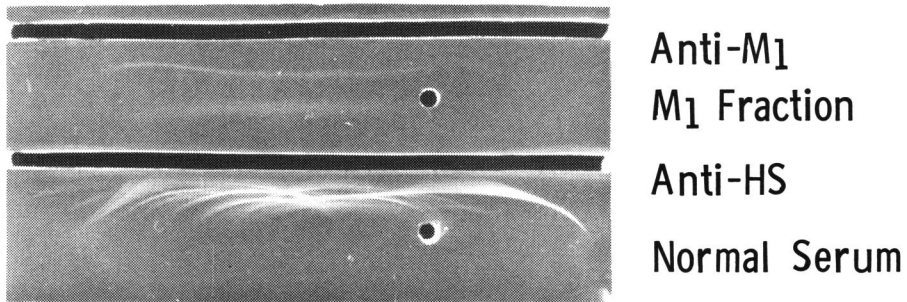


Fig. 5 Electrophoretic mobility of the M_1 antigen.

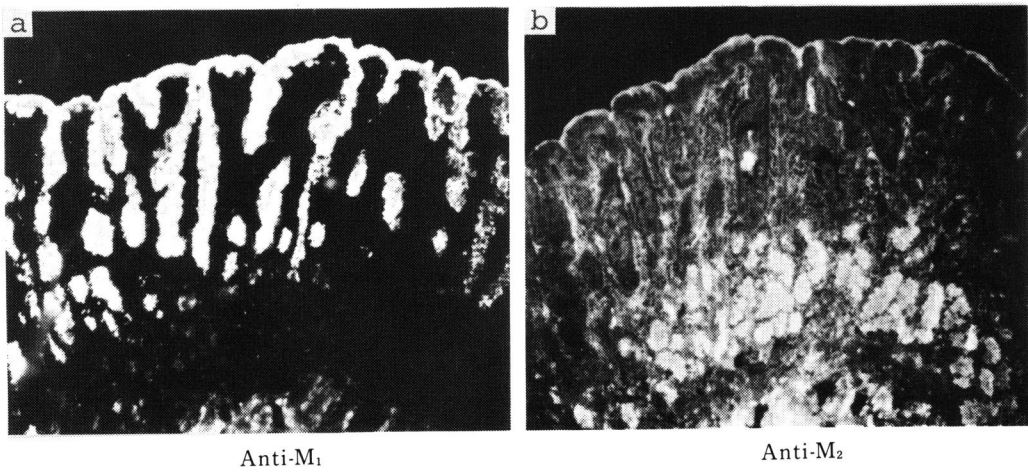


Fig. 6 Localization of glycoprotein antigens in human gastric mucosa (indirect immunofluorescent method, $\times 40$).
 a, b: serial section.

分布はPAS陽性部に一致した。

M_2 抗原： M_1 検索と同一組織の連続切片について、抗 M_2 血清を用いた M_2 の分布を Fig. 6 (b) に示した。 M_2 は幽門腺に豊富に認められるが、 M_1 陽性の粘膜上部にはほとんど認められない。さらに図には示していないが、 M_2 は噴門腺、胃底腺の上部に認められ、底部には認められなかった。また十二指腸の Brunner 腺にも認められたが、他の部位の消化管粘膜には認められなかった。 M_2 の分布も PAS 陽性部に一致した。

また Fig. 6 に示すように、 M_1 および M_2 の境界は明瞭であり、両者が overlap して存在する可能性はほと

んど認められなかった。

なお抗 (M_1+M_2) 血清を用いると、図には示していないが、 M_1 および M_2 全体の分布に一致し、粘膜上部から胃底腺、幽門腺の糖蛋白に特異蛍光が認められた。

M_3 抗原：Fig. 7 に示すように、 M_3 は十二指腸、小腸および大腸粘膜の杯細胞中の粘液に特異的に認められる。一方、使用した抗 M_3 血清は正常胃粘膜の糖蛋白抗原で十分吸収しているため、正常胃粘膜に M_3 は全く検出されなかった。

以上の成績より、胃および小腸・大腸粘膜内の糖蛋白抗原の分布を模式化して Fig. 8 に示した。ヒトの食

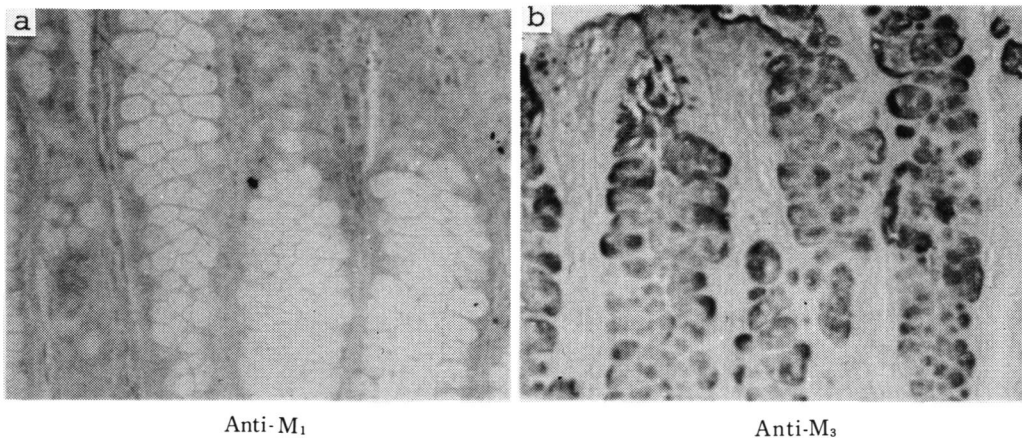


Fig. 7 Localization of glycoprotein antigens in human colonic mucosa (peroxidase-antiperoxidase method, $\times 100$).
a, b: serial section.

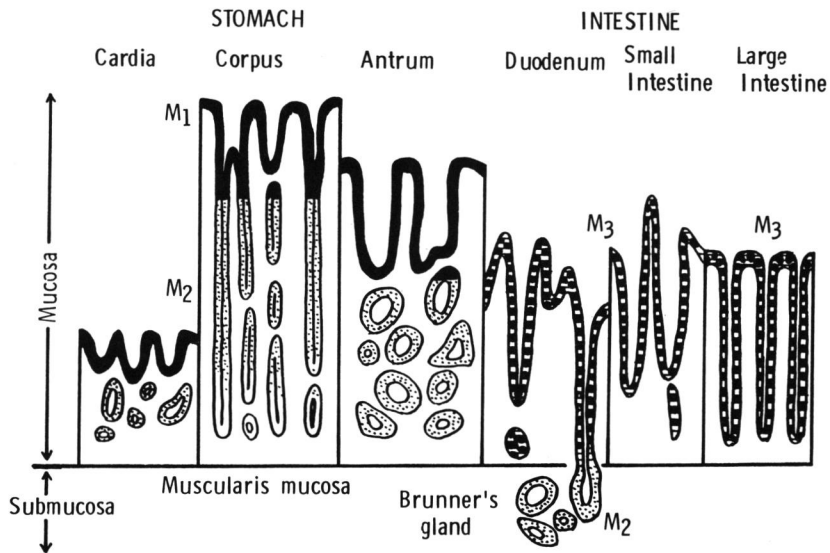


Fig. 8 Scheme of the distribution of M_1 , M_2 and M_3 antigens in the gastrointestinal mucosa.

道、肝、脾、肺、膵および甲状腺についてこれらの糖蛋白抗原を検索したが、いずれの組織においても検出されなかった。

4 考 案

胃および大腸粘膜ならびに卵巣のう腫粘液より抗原性の異なる3種の糖蛋白 (M_1 , M_2 および M_3) に対する特異性の高い抗血清を作製し、抗原の性状を検討するとともに、免疫組織学的方法によりこれらの糖蛋白抗原の正常胃および大腸粘膜における出現状況を検索した。以下得られた成績について考案を加える。

まず糖蛋白抗原・抗体の免疫化学的成績について考察すると、 M_1 は分子量100万以上のPAS陽性の糖蛋白であり、免疫電気泳動的に M_1 の主成分は pre-albumin 領域に認められる。著者らが作製した抗 M_1 血清は Bara *et al.*¹⁰⁾ のそれと同一の反応性を有するが、彼らは M_1 の電気易動度は α_1 から β 領域であるとしている。この理由は明らかでないが、支持体として用いた agarose と寒天の違いや、粗分画の糖蛋白の分子量に相違があるかもしれない。

M_1 に比較的類似すると考えられる糖蛋白として Goldenberg *et al.*⁷⁾ の high molecular weight colon-specific antigen (HMW/CSA) がある。これは大腸粘膜よりフェノールおよびアルコール抽出後ゲル濾過によって得られ、分子量 $1.7\sim 9.0\times 10^6$ で電気易動度は prealbumin 領域にあるが、後に述べるように免疫組織学的に分析した消化管粘膜内の分布をみると、 M_1 とは明らかに異なっている。Kawasaki and Kimoto⁵⁾ は胃粘膜よりエタノール処理、アミラーゼ消化により gastric mucoprotein (GMP) を得ているが、PAS陽性の fucomucin および sialomucin が主体で、セルロース・アセテート膜電気泳動で易動度は $\beta\sim\gamma$ 領域であると述べている。しかし、電気易動度は M_1 とは異なっているが、特異抗血清による粘膜内局在については胃の被覆上皮、粘膜頸細胞、胃底腺・幽門腺および Brunner 腺にみられ、 M_1+M_2 に類似した分布がみられる。Gold and Miller⁶⁾ の colonic mucoprotein antigen (CMA) も M_1 に類似する糖蛋白と考えられるが、電気易動度などについては検討されていない。

M_1 は卵巣のう腫粘液から得られた糖蛋白であるが、それが胃粘膜に特異的な糖蛋白と共通抗原性を有することは、その組織発生・分化を考えるうえで興味深い。McNeil *et al.*¹⁶⁾ は卵巣のう腫粘液と大腸癌には共通抗原性を有する糖蛋白が存在することを認め、Nairn *et al.*⁴⁾ も卵巣のう腫上皮と大腸粘膜にのみ共通に認められ

る糖蛋白抗原を指摘している。これらの抗原の中に M_1 または M_3 が含まれている可能性があるが互いに比較はされておらず、また性状も十分には分析されていない。また Scawen and Allen¹⁷⁾ は両者の mucin の化学的組成が似ていると報告している。しかし本研究では M_1 は腸粘膜の糖蛋白抗原で吸収後の抗血清により検討しており、胃粘膜固有の糖蛋白を特異的に検索している点で従来の報告とは異なり興味ある点である。

M_2 については沈降線を形成させるに十分な力価の抗体価が得られなかったため免疫化学的分析は行ない得なかった。しかし PAS 陽性で、また Brunner 腺に M_2 の存在が認められることから fucomucin を主体とした中性 mucin と推測される¹⁸⁾。

M_3 は大腸粘膜より糖蛋白の粗分画を得て検索したが、分子量100万以上の alcian blue 陽性の酸性糖蛋白が主体で、電気易動度は β 領域であった。自製の抗 M_3 血清についても Bara *et al.*¹¹⁾ と交換し、完全に一致した反応性を有することを確認しているが、彼らは M_3 抗原を胃癌患者の胃粘膜より sulfated glycopeptidic antigen (SGF) として cetylpyridinium chloride および DEAE-Sephadex A 50 を用いて精製している。その電気易動度は β 領域にあり、alcian blue 陽性で、免疫組織学的検索では小腸・大腸の杯細胞に特異的に認められ、著者らの抗 M_3 血清とはほぼ同一の糖蛋白を検出していると考えられる。

M_3 に類似する糖蛋白としては、Kawasaki and Kimoto⁵⁾ の intestinal mucoprotein (IMP), Rapp *et al.*¹⁹⁾ の intestinal goblet cell antigen (GOA¹) および Mori *et al.*²⁰⁾ の intestinal mucoprotein antigen (IMA) がある。これらの糖蛋白はいずれも alcian blue 陽性で腸の杯細胞に局在するが、IMP は α_1 領域に電気易動度を有し、GOA¹ は過塩素酸可溶性の sulfomucin で α_2 領域に泳動するといわれ、それぞれの糖蛋白の性状には相違があることが推測される。この点は糖蛋白の抽出材料や精製法の違いに基づくとも考えられるが、杯細胞内には sialomucin および sulfomucin が種々の割合いで混在し、それらの sialic acid の含量にも差異が認められており、またこれらの糖蛋白はそれぞれ多少抗原性が異なることも推測される。

一方、Häkkinen *et al.*⁸⁾ はすでに胃癌患者の胃液より cetylpyridinium chloride を用いて sulfated glycoprotein antigen (SGA) を精製し、その抗原性および組織内局在を調べ、SGA は N 抗原、I 抗原および fetal sulphoglycoprotein antigen (FSA) の3種を区別できると報告しているが、I 抗原には正常胃腸粘

膜に共通に認められ、 M_3 に類似する糖蛋白と思われる。しかし、本研究で用いた抗 M_3 血清は吸収操作の過程で胃粘膜糖蛋白と共通抗原性を有する一部の糖蛋白との反応性を完全に除去しているから、 M_3 の免疫組織学的検出は腸粘膜由来の糖蛋白に特異的と考えられる。

以上のように腸粘膜の糖蛋白はほとんど杯細胞に関連するものが多いが、*Ma et al.*²¹⁾は cetylpyridinium chloride の密度勾配遠心法により分子量 70,000~100,000 の non-sulfated type の糖蛋白を発見し、十二指腸および空腸粘膜に限局すると述べている。この糖蛋白は M_1 、 M_2 および M_3 ならびに、今まで報告されたものとは異なっており、消化管粘膜の分化抗原の1つとして今後比較検討したいと考えている。

次にこれらの糖蛋白抗原を生化学的および組織化学的に検討すると、 M_1 および M_3 はPAS, alcian blue 染色の態度から、 M_1 は中性糖蛋白、 M_3 は酸性糖蛋白が主体であると考えられる。今回の糖組成分析の結果は、 M_1 および M_3 は粗分画であるため、そのまま M_1 および M_3 の正確な糖組成を示しているとは言えないが、従来の報告と比較すると、胃粘膜の糖蛋白を分析した *Schranger and Oates*²²⁾ および *Allen and Garner*²³⁾ は GALNAc に対し、GAL および GNAc が 3~4 倍多いと報告し、また *Schranger and Oates*²⁴⁾ は腸上皮化生部では GAL および GNAc の占める割合が減少すると述べている。一方、腸粘膜の糖蛋白を分析した *Gold and Miller*⁶⁾ は GALNAc と GAL, GNAc はほぼ等モル濃度であり、*Bara et al.*¹¹⁾ は SGA の GNAc/GALNAc 比がむしろ低いと述べている。すなわち糖分析のみの成績からみると、 M_1 は *Gold and Miller*⁶⁾ の CMA に、 M_3 は *Schranger and Oates*²²⁾ の胃粘膜糖蛋白に類似する。消化管粘膜の糖蛋白は分子量が大きく多くの抗原決定基を有すると考えられるので、どのような分子量単位で M_1 、 M_2 および M_3 が抗原決定基を有するかが注目される。*Peason et al.*²⁵⁾ は pepsin を用いてブタの胃粘膜糖蛋白の分解を試み、 $5.2\sim 5.8\times 10^5$ 分子量単位の subunit の単離に成功している。*Shochat et al.*²⁶⁾ も CSA より Con A-Sepharose を用いて分子量 1.2×10^5 の糖蛋白を分離しているが、抗原性は一部消失しており、必ずしも subunit の単離には成功していない。この点 M_1 および M_3 についても同様の検討が必要と考えられる。

M_1 、 M_2 および M_3 の正常消化管粘膜内に局在を免疫組織学的に検索すると、 M_1 は胃の被覆上皮および胃小窩細胞内にみられ、 M_2 は幽門腺、胃底腺上部、噴門腺および Brunner 腺にみられ、 M_3 は腸の杯細胞内に

それぞれ特異的に認められ、各々の抗原は組織内分布において overlap して認められることはなかった。これらの成績は PAS-alcian blue および high iron diamine (HID)-alcian blue 染色の所見と関連性が認められた。*Sheahan and Jervis*²⁷⁾ は消化管粘膜の neutral mucin, sialomucin, sulfomucin およびそれらの混合 mucin の分布状態を詳細に検討し、胃粘膜では neutral mucin が主体で acidic mucin はみられず、十二指腸の Brunner 腺も neutral mucin であるが、小腸粘膜では sialomucin, 大腸粘膜では sulfomucin が主体であると述べている。

*Tatematsu et al.*²⁸⁾ はさらに paradoxical concanavalin A 染色法を用い、I型、II型およびIII型粘液をそれぞれ neutral および acidic mucin の計6種に分類しているが、今回の成績と比較すると、 M_1 はII型粘膜の neutral mucin、 M_2 はIII型粘液の neutral mucin、 M_3 はII型粘液の acidic mucin および labile III型にはほぼ相当すると考えられる。これらの反応は糖鎖によるものであるが、一般に糖蛋白に対する抗体は糖蛋白の糖鎖よりはむしろ core protein と強く反応すると考えられるので、これらの成績の間には多少のずれがあるように思われる。

M_1 は胃粘膜にみられる臓器特異性を有する糖蛋白抗原であるが、*Bara et al.*¹⁰⁾ が指摘するように胃粘膜と大腸粘膜には共通抗原性を有する糖蛋白が存在する。先に述べたように現在まで M_1 類似の糖蛋白が免疫組織学的に検討されているが、いずれも一部あるいは大部分が大腸粘膜の糖蛋白との反応が認められている。しかし M_1 は食道粘膜および十二指腸以下の腸粘膜の糖蛋白とは異なり、胃粘膜にのみ特異性を有する点で従来の報告にはみられない注目すべき糖蛋白抗原である。

M_1 の胃における分布は胃体部、前庭部ともほぼ一様で被覆上皮および胃小窩を構成する粘膜細胞に広く認められるが、幽門腺・胃底腺など腺腔を構成する細胞には認められない。これらの分布から胃液内への粘液として分泌されていることが推測されるが、試験的に ID 法により胃液との反応性をみたが、 M_1 の抗原性を検出するには至らなかった。この点はその分泌、変性過程を含めて検討すべきものと考えている。

M_2 については免疫化学的に検索しえなかったが、免疫組織学的にはきわめて明らかにその存在が示され、 M_1 と同様に胃の臓器特異性を有する糖蛋白であると言える。幽門腺に豊富にみられ、胃底腺および噴門腺にも共通して認められるが、組織内局在のうえでは M_1 と overlap して認められず特徴的な分布を示した。また

Brunner 腺にも存在し、従来より組織化学的に幽門腺と Brunner 腺の粘液蛋白に類似性があると考えられていたが、本研究においてそれが免疫組織学的にも証明された。

M_3 は腸粘膜の杯細胞に限局して認められ、吸収上皮には認められなかった。杯細胞に特異的な糖蛋白に関しては先にも述べたように多くの報告があるが、免疫組織学的検索では IMP⁵⁾, GOA¹⁾¹⁹⁾ および IMA²⁰⁾ は M_3 と臓器組織分布がほぼ同一と考えられる。一方杯細胞内粘液の主体をなす酸性糖蛋白は大腸の陰窩の上下部で sialomucin および sulfomucin の構成が異なっており¹⁸⁾, 抗原として用いられた糖蛋白により作製された抗体の性状が多少異なることが推測される。しかし免疫組織学的に検討する限りでは、他の報告者の糖蛋白に対する抗体は酸性糖蛋白と共通抗原性を有する部分を認識している可能性がある。今回の M_3 に対する抗体について小腸・大腸における分布および粘膜での局在をみると sialomucin および sulfomucin の両方の酸性糖蛋白に対する抗体を含み、両者を区別し得なかったものと考えられる。この点については抗原の精製を図り、詳細な抗体の反応性について検討が必要と考えられる。

5 結 論

胃・大腸粘膜および卵巣のう腫粘液よりそれぞれの糖蛋白分画 (M_1 , M_2 および M_3) を得て、それらに対する特異性の高い抗体を作製し、免疫化学的および免疫組織学的に検討して以下の結論を得た。

1 卵巣のう腫粘液および大腸粘膜より抽出し、免疫化学的に単一成分を示すまで精製した M_1 および M_3 は分子量 100 万以上の糖蛋白で、その電気泳動度は前者は prealbumin 領域に、後者は β 領域にあった。なお胃粘膜に存在する M_2 については免疫化学的に単一分画を得るに至らなかった。

2 M_1 は PAS 陽性糖蛋白が主体であり、 M_3 は alcian blue 陽性糖蛋白が主体であった。

3 M_1 と M_3 の糖組成を検討すると、それぞれの分画の GALNAc モル濃度に比べ、 M_1 は GAL が多く、 M_3 は GNAc, GAL, および FUC が高値を示した。しかし mannose および sialic acid は M_1 , M_3 で差は認めなかった。

4 M_1 および M_2 に対して作製された特異抗体により免疫組織学的に新知見を得た。すなわちこれらの抗体は胃に臓器特異性を有し、 M_1 は胃粘膜の被覆上皮細胞および胃小窩の細胞内に認められ、 M_2 は幽門腺、胃底腺および噴門腺に認められ、両者の分布は画然とし

た差が認められた。 M_2 はまた十二指腸の Brunner 腺にも認められた。

5 M_3 に対する抗 M_3 抗体は腸に臓器特異性を有する抗体で、 M_3 は腸粘膜の杯細胞に特異的に認められた。

本研究において御助言をいただいた和田武雄学長、御指導いただいた内科学第一講座谷内昭教授、糖分析を施行していただいた北里大学医学部生化学堀田恭子教授に深謝します。

なお、本研究は文部省科学研究費：一般研究(B) 57480219 の助成による。

文 献

1. 和田武雄, 川上康博, 菅 充生: Gastric mucous barrier の新しい解釈. 最新医学 **34**, 2087-2097 (1979).
2. Gold, P. and Freedman, S. O.: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **122**, 467-481 (1965).
3. De Boer, W. G. R. M., Forsyth, A. and Nairn, R. C.: Gastric antigens in health and disease. Behaviour in early development, senescence, metaplasia and cancer. *Br. Med. J.* **3**, 93-94 (1969).
4. Nairn, R. C., Wallace, A. C. and Gun, E. P. G.: Intestinal antigenicity of ovarian mucinous cystadenomas. *Br. J. Cancer* **25**, 276-282 (1971).
5. Kawasaki, H. and Kimoto, E.: Mucosal glycoproteins in carcinoma cells of gastrointestinal tracts, as detected by immunofluorescence technique. *Acta Pathol. Jap.* **24**, 481-494 (1974).
6. Gold, D. and Miller, F.: Chemical immunological differences between normal and tumoral colonic mucoprotein antigen. *Nature* **255**, 85-87 (1975).
7. Goldenberg, D. M., Pant, K. D. and Dahlman, H. L.: Antigens associated with normal and malignant gastrointestinal tissues. *Cancer Res.* **36**, 3455-3463 (1976).
8. Häkkinen, I. P. T., Jarvi, O. and Grönroos, J.: Sulfoglycoprotein antigens in the human alimentary canal and gastric cancer. An immunohistological study. *Int. J. Cancer* **3**, 572-581 (1968).
9. 前田 貫: 胃液糖蛋白 (Häkkinen 分画) の電気泳動的ならびに免疫学的研究. 札幌医誌 **46**, 9-22 (1977).
10. Bara, J., Malagewicz, A., Loisillier, F. and Burtin, P.: Antigen common to human ovarian

- mucinous cyst fluid and gastric mucosa. *Br. J. Cancer* **36**, 49-56 (1977).
11. Bara, J., Gardais, P. A., Loisillier, F. and Burtin, P.: Isolation of a sulfated glycopeptidic antigen from human gastric tumor. *Int. J. Cancer* **21**, 133-139 (1978).
 12. Avrameas, S. and Ternynck, T.: The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* **6**, 53-64 (1969).
 13. von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2492-2494 (1972).
 14. Sainte-Marie, G.: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 250-256 (1962).
 15. Nakane, P. K. and Pierce, G. B.: Enzyme-labeled antibody: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 929-931 (1967).
 16. McNeil, C., Ladle, J. N., Helmick, W. M., Trentelman, E. and Wentz, M. W.: An antiserum to ovarian mucinous cyst fluid with colon cancer specificity. *Cancer Res.* **29**, 1535-1540 (1969).
 17. Scawen, M. and Allen, A.: The action of proteolytic enzymes on the glycoprotein from pig gastric mucus. *Biochem. J.* **163**, 363-368 (1977).
 18. Filipe, M. I.: Mucus in the human gastrointestinal epithelium: A review. *Invest. Cell Pathol.* **2**, 195-216 (1979).
 19. Rapp, W., Windisch, M., Peschke, P. and Wurster, K.: Purification of human intestinal goblet cell antigen (GOA¹), its immunohistological demonstration in the intestine and in mucus producing gastrointestinal adenocarcinoma. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **382**, 163-177 (1979).
 20. Mori, T., Inaji, H., Nakajo, Y., Ikenaka, T. and Kosaki, G.: Immunochemical studies of intestinal mucus antigen (IMA) and CEA-related antigen (NCA-2, NCA) in normal intestinal mucosa. *Proceeding of the 7th International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* p 179 (1979).
 21. Ma, J., De Boer, W. G. R. M., Ward, H. A. and Nairn, R. C.: Another oncofetal antigen in colonic carcinoma. *Br. J. Cancer* **41**, 325-328 (1980).
 22. Schranger, J. and Oates, M. D. G.: The isolation and partial characterization of a glycoprotein isolated from human gastric aspirates and from extracts of gastric mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* **372**, 183-195 (1974).
 23. Allen, A. and Garner, A.: Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection — progress report. *Gut* **21**, 249-262 (1980).
 24. Schranger, J. and Oates, M. D. G.: Relation of human gastrointestinal mucus to disease states. *Br. Med. Bull.* **34**, 79-82 (1978).
 25. Peason, J., Allen, A. and Venables, C.: Gastric mucus: Isolation and polymeric structure of the undigested glycoprotein: Its breakdown by pepsin. *Gastroenterology* **78**, 709-715 (1980).
 26. Shochat, D., Archey, R. L., Panti, K. D., Dahlgren, H. L., Gold, D. V. and Goldenberg, D. M.: Characterization of colon-specific antigen-p and isolation of immunologically active tryptic peptides. *J. Immunol.* **126**, 2284-2289 (1981).
 27. Sheahan, D. G. and Jervis, H. R.: Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *Am. J. Anat.* **146**, 103-132 (1976).
 28. Tatematsu, M., Katsuyama, T., Fukushima, S., Takahashi, M., Shirai, T., Ito, N. and Nasu, T.: Mucin histochemistry by paradoxical concanavalin A staining in experimental gastric cancers induced in Wistar rats by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-Nitroquinoline 1-oxide. *JNCI* **64**, 835-843 (1980).
-
- 別刷請求先：
 (〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
 札幌医科大学内科学第1講座 川上康博