

甲状腺穿刺液サイログロブリンのレクチン親和測定法 —甲状腺分化癌診断の可能性—

加藤亮二¹⁾, 菅谷 昭²⁾, 飯田太²⁾

A Novel Lectin-Affinity Assay of Thyroglobulin in Thyroid Aspirated Specimens: A Clue to the Diagnosis of Differentiated Thyroid Cancer

The sugar chain residue of thyroglobulin produced in thyroid cancer (C-Tg) has a modified structure compared with that in the normal thyroid (N-Tg). We have measured the remaining unbound-thyroglobulin (ub-Tg) in thyroid specimens by an enzyme immunoassay (EIA) after treatment with Concanavalin A (ConA) lectin, taking advantage of different affinity of C-Tg to lectin.

Three thyroid tissue specimens (1 normal, 1 papillary carcinoma, 1 benign goiter) and 28 thyroid aspirated specimens (16 papillary carcinoma and 12 benign goiter) were analyzed.

Tg to lectin ratio of 1 : 3 was at the zenith of the ub-Tg%. Thus, ConA at a ratio of 1 : 3 were used for subsequent studies.

The ub-Tg value for papillary carcinoma tissue was significantly higher than the benign goiter.

Five of 16 specimens obtained by aspiration from thyroid cancer manifested elevated ub-Tg levels after ConA treatment.

Thus, measurement of ub-Tg in thyroid aspirated specimens after treatment with ConA may prove to be useful for the diagnosis of thyroid cancer.

key Words :

Lectin(レクチン), Concanavalin A(コンカナバリンA), Thyroglobulin(サイログロブリン), Aspirated Specimens (穿刺液), Thyroid Cancer (甲状腺癌)

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; Ryoji Kato, Department of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医学部第二外科; Akira Sugeno, Futoshi Iida, The Second Department of Surgery, School of Medicine, Shinshu Univ.

はじめに

甲状腺癌細胞が産生するサイログロブリン (Cancer-Tg; C-Tg) と正常組織由来 Tg (Normal-Tg; N-Tg) の糖鎖は異なることが知られ¹⁾, N-Tg では高マンノース型および複合型の 2 枝の糖鎖からなるのに比べ, C-Tg では 3~5 枝へ増加していることが認められている²⁾。これら糖鎖の違いを各種レクチン (lectin) を用いて検討し, 張ら³⁾は癌組織と正常組織における染色性の違いを, Tarutani⁴⁾や佐藤⁵⁻⁶⁾らは組織および血清 Tg の物理・生化学的性状を調べ, その違いを明らかにした。今回, レクチンの糖鎖に対する親和性の差を利用した Tg 測定法を考案し, 甲状腺穿刺液からの甲状腺癌診断の可能性を検討した。

実験材料および方法

1. 測定対象

対象は病理診断で確定された乳頭状腺癌組織 1 例, パセドウ病組織 1 例, 良性腫瘍 1 例, 癌の手術時に得られる周辺部分の正常組織 1 例と細胞診検査時と本検査の為に入手された穿刺液 28 例 (a. 乳頭状腺癌 16 例: 嚢胞形成 11 例, 嚢胞形成なし 5 例, b. 良性腫瘍 12 例: 嚢胞形成 8 例, 嚢胞形成なし 4 例) である。なお, 組織および穿刺液は使用まで -20℃ で凍結保存した。

2. 各組織から Tg 精製

凍結しておいた各組織切片を少量の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2, 0.9% NaCl 加: 以下 PBS) に浮遊し, ホモジナイズした後, 100,000 g 60 分間遠心して上清を得た。この液を FPLC 液体クロマトグラフィによるゲル濾過 (Superdex-200: ファルマシア社) 法で分離し, Tg を得た。Tg 測定は既報⁷⁾の

Enzyme Immunoassay (Tg-EIA) で行った。

3. 穿刺液 Tg サンプルの調整

細胞診検査のために得られた穿刺液試料は量が少ない為に以下の処理を行った。100 μ l の PBS に浮遊し, 攪拌した後 100,000 g 60 分間遠心して上清を得, これをサンプルとした。また, SDS-PAGE 電気泳動には前記のゲル濾過法で分離した穿刺液 Tg を使用した。なお, すべての穿刺液は遠心後の結果から 2 群に分類した。細胞成分がなく嚢胞形成があり, 変性度が強いものを穿刺液 I, 嚢胞形成がなく細胞成分があるものを穿刺液 II とした。

4. レクチン

レクチンは Concanavalin A (ConA; 豊年製油社) を用いた。使用前に, ConA レクチンを PBS で 1 mg/ml の濃度に調整後使用した。

5. Tg 測定法とサンプルのレクチン処理法

Tg 測定は著者らが考案した既報⁷⁾の方法で実施した。抗 Tg ポリクロナール抗体結合固相 (96 穴平底マイクロプレート: Nunc 社) に緩衝液 (1% FCS 添加 PBS) 100 μ l, サンプル 50 μ l 加え 60 分反応, 洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗 Tg 抗体 100 μ l 加えて 60 分間反応, 再び洗浄後, 基質であるテトラメチルペンタジン (TMB) 100 μ l を加えて 30 分間発色, 1M リン酸 50 μ l で反応停止後比色した。レクチン処理法は図 1 に示すように組織 Tg と穿刺液 Tg 液をそれぞれ 50 μ l (0.1 mg/ml) とり ConA レクチン 0~450 μ l (1 mg/ml) の比で反応 (4℃, 一夜) させた後, 3000 回転 30 分遠心してレクチン結合 Tg を除去, 残存する未結合 Tg (ub-Tg: 上清) 分画を測定した。なお, 結果は ub-Tg 値をレクチン無添加 Tg 値で除し ub-Tg% で表現した。

6. 組織 Tg と穿刺液 Tg のウエスタンブロット

癌および正常組織 Tg と癌穿刺液 Tg を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜にブロッティングし、免疫染色と ConA 染色を行った。免疫染色の一次抗体は抗 Tg 抗体マウス腹水 (300倍希釈：自家製)、二次抗体はペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (2000倍；DAKO 社)、ConA 染色はペルオキシダーゼ標識 ConA レクチン (500倍希釈：DAKO 社) であり、SDS-PAGE およびブロッティング法とともに成書⁹⁾の方法で行った。

Tg (0.1mg/ml) 50 μl
 ConA-lectin (1mg/ml) 450 ~ 0 μl
 Buffer 0 ~ 450 μl
 ↓ Mix
 Incubated at 4°C for over night
 ↓
 Centrifuge 3000rpm/min
 ↓
 Take supernatant for Tg measurement

図1 Tg の ConA レクチン処理法

測定原理

本法の測定原理を図2に示した。癌 Tg は正常 Tg に比べ、レクチンに対する反応性が異なることを利用するものである。両者に一定量のレクチンを加えると癌 Tg の ub-Tg は変化を伴うため、一定時間反応後、遠心して上清の未結合 Tg を従来の Tg 測定法で鑑別する。

結 果

1. 組織 Tg と穿刺液 Tg の測定精度

バセドウ組織 Tg と癌穿刺液 Tg を緩衝液で希釈し、表1のような濃度に調整した。10日間繰り返し測定による日差再現性は31~33 ng/ml 付近の Tg 値で CV 8~9.5%，220

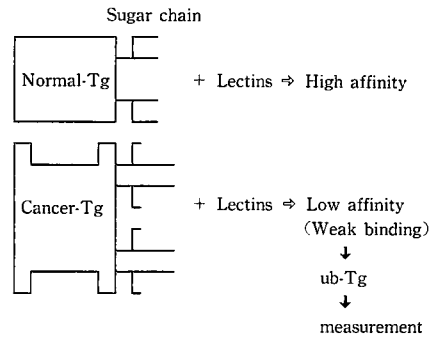


図2 レクチン親和 Tg 測定法の原理

表1 Tg の測定精度 (日差再現性)

Samples	組織 Tg*		穿刺液 Tg**	
	S 1	S 2	S 1	S 2
N	10	10	10	10
Mean ng/ml	31.1	221.6	32.8	218.9
SD ng/ml	2.5	12.1	3.1	15.7
CV %	8.0	5.4	9.5	7.2

*バセドウ組織 **癌穿刺液

表2 ConA レクチン至適量の検討

Tg : Lectin	ub-Tg%		
	Cancer	Benign goiter	Ratio*
1 : 0	100 %	100 %	1
1 : 1	43.5%	1.7%	25.5
1 : 2	12.5%	0.6%	20.8
1 : 3	6.3%	0.1%	63.0
1 : 5	0.9%	0.2%	4.5
1 : 10	0.6%	0.1%	6.0

* ratio は Cancer ub-Tg% / Benign goiter ub-Tg% で求めた。

ng/ml 付近で CV 5~7% と両者のサンプルで良好な精度を認めた。

2. 至適レクチン処理量の検討

表2に示すように甲状腺癌 Tg と良性腫瘍組織 Tg (0.1 mg/ml) 1容に対して ConA レクチン (1 mg/ml) を 0~10容量まで比を変え測定した。レクチン無添加を100%とした

時、癌と良性腫瘍の ub-Tg 値の比は 1 : 1 で 25.5 倍, 1 : 2 で 20.8 倍, 1 : 3 で 61 倍, 1 : 5 で 4.5 倍となり, 1 : 3 が最も大きい差を示した。

3. 甲状腺穿刺液における ub-Tg 値

穿刺液 28 例について ConA レクチンとの比 1 : 3 で ub-Tg 値を測定したところ, 図 3 に示すように穿刺液 I 群では癌 $11.1 \pm 11.1\%$ (Mean \pm SD), 良性腫瘍 $4.9 \pm 2.8\%$ (Mean \pm SD) であった。両者には有意な差はなかったが, 癌 11 例中 4 例が良性腫瘍に対して高値を示した。穿刺液 II 群でも癌 $11.2 \pm 20.6\%$ (Mean \pm SD), 良性腫瘍 $3.5 \pm 3.5\%$ (Mean \pm SD) が得られ, 癌 5 例中 1 例に高値例がみられた。

4. 組織 Tg と穿刺液 Tg のウエスタンブロット

図 4 に ConA レクチンと抗 Tg 抗体を用いて組織 Tg と穿刺液 Tg を染色したウエスタンブロットを示した。正常組織 Tg は ConA レクチン, 免疫抗体いずれにおいても幅広く多数のバンドが認められたが, 癌組織 Tg では免疫染色でやや弱く, ConA レクチンではほとんど染色されない結果であった。癌穿刺液 Tg の中で ub-Tg 値の高い例について検討したところ, 癌組織と同様, 免疫染色と ConA 染色共に弱い結果を示した。

考 察

甲状腺濾胞内に存在する蛋白のほとんどはサイログロブリン (Tg) で占められる。その Tg はおよそ 10% の糖⁹⁻¹³⁾を含む糖蛋白からなり, 分子量は 66 万の巨大な分子である。Tg を構成する代表的な糖はマンノース (Man), ガラクトース (Gal), N-アセチルグルコサミン (GluNAc), シアル酸 (NANA), フコース (Fuc) の 5 種⁹⁻¹³⁾といわれ, Unit-A 鎖と

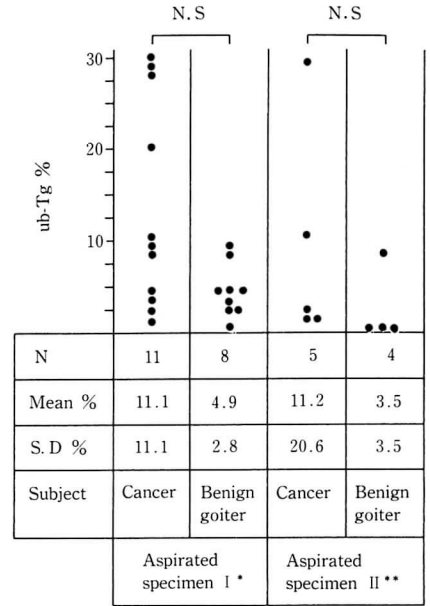


図 3 甲状腺穿刺液の ub-Tg 値

* Aspirated specimen I : 細胞成分なし

嚢胞あり, 変性が強い

** Aspirated specimen II : 細胞成分あり

嚢胞なし, 変性なし

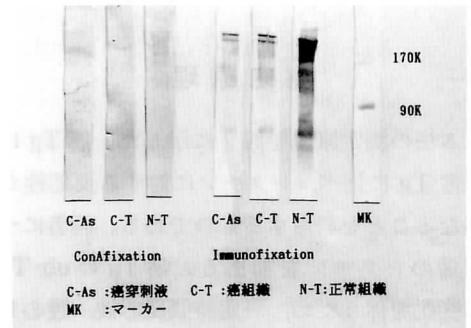


図 4 組織 Tg と穿刺液 Tg のウエスタンブロット

Unit-B 鎖の 2 枝の糖鎖を持っており, Unit-A は典型的な高 Man 型, Unit-B は複合型である。癌化した細胞が産生する Tg の糖鎖は Yamamoto²⁾らによると 3 ~ 5 枝に変化していると報告されている。最近, 張³⁾らは 12 種類のレクチンを用いて種々の甲状腺組織における糖質の分布と変動を観察したところ, コ

ロイドにおけるレクチンの反応性は正常組織にくらべ癌組織は多様な染色性を示すと報告している。また、中島¹⁾、Tarutani⁴⁾、佐藤⁵⁻⁶⁾らも各組織と血清 Tg の性状を調べたところ、Tarutani⁴⁾らは癌組織由来 Tg の中に ConA カラムを素通りする分画があることを報告し、違いのあることを見いだした。このように癌細胞が産生する Tg と正常細胞の Tg 糖鎖は異なることが明らかにされてきた。

さて、現状の甲状腺癌診断は細胞診、超音波検査、X線を含む画像診断をはじめ腫瘍マーカーである Tg 測定が一般的である。従来の血清 Tg は甲状腺に結節を有する例で高値を示すが、そのうち良性と癌の鑑別はできないとされている。また、血清 Tg は癌細胞が産生する Tg と癌細胞が正常細胞を破壊し、逸脱する Tg の混合物を測定している為に Tg 分泌や逸脱が少ない癌は高値を示さないと考えられる。

これに加え、加藤¹⁴⁾らや樽谷¹³⁾らが述べているように癌 Tg と正常 Tg の違いは糖鎖のみならず蛋白抗原性も異なると言われ、正常 Tg やバセドウ病 Tg を抗原とする抗体を使用している従来法はこれらの問題点も抱えているのが現状である。

今回、これらの例について癌診断向上の目的で穿刺液をサンプルとするレクチン親和 Tg 測定法の可能性を検討した。まず、癌 Tg と正常組織 Tg の ConA レクチンに対する反応性を見る為に電気泳動による染色性の違いを検討した。免疫染色と ConA レクチン染色はいずれも癌 Tg に対し染色性が弱い結果を認め、特に ConA レクチンの染色性は著しい減少を示した。これらの結果は Tarutani⁴⁾らの ConA カラムを素通りする Tg と同様、癌 Tg は α -Mannose をはじめとする糖鎖変

異^{13,16)}が生じていることが推測された。

次に癌 ub-Tg 値が良性腫瘍 ub-Tg と差を大きくする重要な条件の一つとして、レクチン量と Tg 量の反応比があげられる。レクチン量が多い場合には Tg との結合量は増加し、逆に少量であれば結合が起こりにくい。今回は Tg と ConA 比で 1 : 3 が最も良い結果であり、濃度に換算すると Tg 0.1 mg に対してレクチン 3 mg であった。結果を示さなかったが、他のレクチン (Ricinus communis agglutinin: RCA-120) でも同様な結果¹⁶⁾を認めた。

これらをもとに嚢胞形成、非形成の穿刺液をサンプルとして測定したところ、癌組織 16 例中 5 例 (31.2%)、特に嚢胞形成群では 11 例中 4 例 (36.3%) が高値であった。本法の陽性率の低い原因は定かではないが、張³⁾らが述べているように癌組織は各個人でレクチンに対する染色性が多様であったことから、糖鎖変化の程度が個人レベルでかなりバラツキのあること、また、穿刺液中における癌 Tg と正常 Tg の混合比、さらに使用抗体がバセドウ病 Tg 由来のものであったことも反応性が低下した原因と考えられた。しかし、本法は陽性率は低いものの、血清 Tg 測定と同様、癌 Tg を抗原とした抗体を今後使用することにより細胞診や画像診断で困難な例の有用性が示唆され、癌診断の補助的検査法として期待される。

結 語

穿刺液をサンプルとするレクチン親和性測定法を考案した。癌 Tg は ConA レクチン処理することで ub-Tg の増加が認められた。穿刺液では 33.3% と陽性率は低いものの高値を示す例が認められたことから本法は癌診断補助的検査法として有用であることが示唆され

た。

文 献

- 1) 中島博：ヒト甲状腺腫瘍組織におけるチロ globulin の性状に関する研究. 北関東医学, 32 : 177-187. 1982.
- 2) Yamamoto, K., Tuji, T., Tarutani, O. and Osawa, T. : Phosphorylated high mannose-type and hybrid-type oligosaccharide chain of human thyroglobulin isolated from malignant thyroid tissue. *Biochimica. Biophysica. Acta*, 838 : 84-91. 1985.
- 3) 張裕泰：ヒト甲状腺の組織化学的研究, 一特にレクチン染色による糖鎖構造の解析—信州医学雑誌, 38 : 13-39. 1990.
- 4) Tarutani, O. and Ui, N. : Properties of Thyroglobulins from Normal Thyroid and Thyroid Tumor on a Concanavalin A-Sepharose Column. *J. Biochem*, 98 : 851-857. 1985.
- 5) 佐藤浩司：甲状腺癌患者血清チログロブリンの性状に関する研究. 北関東医学, 38 : 353-360. 1988.
- 6) 佐藤浩司, 石北敏一, 石田常博, 泉雄勝, 斉藤公幸, 河野陽一, 樽谷修：ヒト血清チログロブリンの物理学的性状および免疫化学的性状に関する検討. *ホルモンと臨床*, 38 : 1183-1188. 1988.
- 7) 加藤亮二, 野口志郎, 野口秋人：血中 Thyroglobulin の高感度免疫測定法. *臨床病理*, 33 : 940-946. 1985.
- 8) 今井利夫, 高浜康弘：電気泳動のすべて. *Medical Technology 別冊*, 74-85. 1991.
- 9) Spiro, R. : The carbohydrate units of thyroglobulin. *J. Biol. Chem*, 240 : 1603-1610. 1965.
- 10) Arima, T., Spiro, M. J. and Spiro, R. G. : Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. *J. Biol. Chem*, 240 : 1603-1610. 1965.
- 11) Spiro, M. J. : Presense of a glucuronic acidcontaining carbohydrate unit in human thyroglobulin. 252 : 5424-5430. 1977.
- 12) 樽谷修：チログロブリンの化学. 鈴木光雄, 松崎茂(編), 甲状腺学, その生理と病態, 第1版, P 68-86, 共立出版. 1980.
- 13) 樽谷修：チログロブリン. 細谷東一郎(編), 甲状腺ホルモンと関連蛋白, 一基礎と臨床一, 第1版, P33-51, 朝倉書店. 1991.
- 14) 加藤亮二, 菅谷昭, 飯田太：Thyroglobulin (Tg) および Tg 合成ペプチドのエピトープ解析. *日本内分泌学会雑誌*, 69 : 922. 1993.
- 15) 加藤亮二, 菅谷昭, 飯田太：レクチン親和性サイログロブリン測定による甲状腺癌診断の可能性. *日本内分泌学会雑誌*, 69 : 392. 1993
- 16) Kato, R. Sugenoya, A. Iida. F : Lectin-Thyroglobulin Affinity Test for Diagnosing Thyroid cancer. 投稿中

受付日：1993年10月14日

受理日：1993年11月29日