

癌に関連したバイオマーカーの研究

《研究の概要》

かかりつけ医及びがんの集団検診において、簡便に、しかも容易に早期がんを発見するための有用な新しい診断技術の開発を目指して次の4点に関する研究を行った。(1)子宮体癌の補助診断法の確立とその有用性(野澤):子宮体部より採取される細胞診検体を、モノレイヤー標本作製装置であるThinPrepを応用して処理した検体を用いて、子宮体癌に特異的に発現する糖鎖抗原(SN-Ag)をターゲットとし、SN-Agに対するモノクローナル抗体MSN-1によるSandwich assayにて検体中のSN-Ag量を測定する酵素免疫測定法(EmC-EIA法)を新たに開発した。本法を用いた外来検体137例(正常内膜84例、内膜増殖症17例、子宮体癌36例)の検討にて、子宮体癌例では正常内膜例に比べ高い陽性率を示したこと、内膜増殖症例の陽性率が両者の間の値を示したことなどから本EmC-EIA法は、検体が子宮腔内から正しく採取されるよう留意さえすれば、子宮体癌、特に細胞診断測定に苦慮することがまれではない高分化型体癌において細胞診の補助診断法として臨床応用可能であることが判明した。(2)がん関連遺伝子産物の血中自己抗体による癌の早期診断(石井):自己抗体測定のために、抗原と抗体を電解質溶液内で反応させ、溶液内の抗原抗体反応を経時的に電気伝導率(電気抗体)の変化でとらえる新しい免疫測定法を開発した。本法は、電解質溶液中に抗原と抗体が存在し、抗原抗体反応がおこった場合に、電気抵抗が大きくなり、電気伝導率が低くなる現象を利用したもので、安定な立体構造のもとで抗原抗体反応を行うことができ、反応をリアルタイムで観測できる利点がある。本法によるc-myc合成ペプチド抗原を用いた乳癌7例、胃癌2例、健常人2例における血中c-myc蛋白自己抗体の検討では、c-myc蛋白自己抗体は健常人にも微量存在するが、がん患者ではより多量に存在することが判明し、血中c-myc蛋白自己抗体の測定がこれらの癌の検出に役立つ可能性を示唆した。また、p53蛋白分解酵素であるがん関連遺伝子産物MDM2(Murine Double Minute 2)蛋白に対する自己抗体の検出にも成功した。(3)腫瘍組織細胞由来フェリチンの糖鎖の組成と腫瘍マーカーとしての意義(浅川):組織免疫染色法、Westernblot法、Inhibition ELISA法、液体クロマトグラフィー(HPLC)法で各種悪性腫瘍細胞、組織中に、ヒト正常細胞には存在しないグリコリルノイラミン酸(NGNA)を含む糖鎖GM3(NeuGc)が存在することを明らかにした。また、GM3(GeuGc)を固相化したELISA法にて、悪性腫瘍患者血清中にGM3(NeuGc)に対する自己抗体が存在することを明らかにし、各種悪性腫瘍患者血清96例(悪性血液疾患46例、固形癌50例)を用いた測定にて、正常者に比べGM3(NeuGc)に対する高い自己抗体値を示したことから、その腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにした。(4)癌の遺伝子診断(菅野):遺伝子欠失を高感度に検出する手法であるBluent-End SSCP法を開発し、各種悪性腫瘍のLOHの解析を行った。膀胱癌手術材料27例をもちいた17p、18q、9pのLOHの検討では、17pの欠失を認める膀胱癌では有意に予後不良であったことから、17pの欠失が膀胱癌の予後因子として有用であることを示した。また、膀胱癌66例の腫瘍組織および尿中脱落細胞を用いた9番染色体のLOHの検討では、本法が

腫瘍組織のみならず尿中の脱落細胞からの解析も可能であることを示すとともに9番染色体のLOHを認めた症例が、認めなかった症例に比べ再発率が有意に高かったことから、膀胱癌の有用な予後因子であることを明らかにした。一方、Metylation specific PCR法によるE-cadherin遺伝子プロモーターのメチル化の検出が、膀胱上皮内癌の診断に有用な遺伝子検査と成り得る可能性を示した。

石井 勝	埼玉県立がんセンター 総長（～平成13年3月） 客員研究員（平成13年4月～） （社）羽生市医師会立 介護老人保健施設 カノーブス羽生 施設長（平成13年4月～）	がん関連遺伝子産物の血中自己抗体による癌の早期診断
浅川英男	東京医科歯科大学医学部保健衛生学科 非常勤講師（～平成12年3月） 九段坂病院内科（平成12年4月～）	腫瘍組織細胞由来フェリチンの糖鎖の蘇生と腫瘍マーカーとしての意義
菅野康吉	栃木県立がんセンター研究検査部 遺伝子検査・DNA解析室 副主幹・医長（～平成13年3月） 栃木県立がんセンター研究所 がん遺伝子研究室・がん予防研究室 副主幹・医長・特別研究員（平成13年4月～）	癌の遺伝子診断

研究報告

I 研究目的

かかりつけ医及びがんの集団検診において、簡便に、しかも、容易に早期がんを発見するために、有用な新しい診断技術の開発を目指して、下記4点を目的とする。

1. 子宮体癌（以下「体癌」と略）は腺癌であるので細胞診判定が難しく、そのために疑陽性の頻度が高くなっているという問題点がある。そこで、体癌より採取される細胞診検体を用いて、体癌に特異的に発現される糖鎖を標的とした酵素免疫測定法の開発を行い、本法の体癌診断における有用性を検討する。
2. がん関連遺伝子産物に対する血中自己抗体を指標とした血清学的がん早期診断法を開発を行う。本測定法は、簡便で短時間に早期がんを効率的にスクリーニングでき、がん克服に多大な貢献が期待される。
3. 白血病を含めて悪性腫瘍患者血中には血清フェリチンがしばしば増加するが、腫瘍細胞の産生するフェリチンのみが真のマーカーとなる。とくに、グリコリルノイラミン酸（NeuGc）を含む糖鎖は腫瘍細胞フェリチンにのみ存在するので、その合成に関与するCMP-NeuAc-hydroxylaseを測定し、その発現メカニズムを解明し、早期診断法への応用を図る。

4. 各種の固形腫瘍を対象に、がん化と密接に関連した遺伝子の異常を明らかにし、それらの異常を血液、尿等の体液中から検出することによってがんの診断と早期発見に有用な診断技術を開発する。遺伝子診断は細胞の生物学的異常を検出する技術であり、その情報は従来の形態学的診断によって得られる情報とは異なるものである。遺伝子診断の臨床応用のためには、臨床の現場で従来の診断技術と比較することによってその有用性と限界を明らかにする研究が必要と考えられる。

II 研究計画及び材料と方法

1. 子宮体癌（以下「体癌」と略）より採取される細胞診検体を用いて、体癌に特異的に発現される糖鎖を標的とした酵素免疫測定法を開発し、体癌の新しい補助診断法としての有用性を検討する目的にて以下の研究を実施した。

①Liquid based cytology（検体細胞を一旦保存液中に懸濁し、懸濁液に圧をかけてスライドグラスに噴霧する検体作成法で、粘液の除去が可能で、スライドグラス上に塗布される細胞数もほぼ均一になる）と同様な方法を導入し、細胞検体懸濁液を小セルロイド膜に圧をかけて貼付し、セルロイド膜状の細胞検体を界面活性剤にて処理後、体癌ときわめて高率かつ特異的に反応するモノクローナル抗体 MSN-1 を用いた Sandwich EIA にて微小細胞断片検体における MSN-1 認識抗原量を測定する改良型 EmC-EIA 法 (Endometrial Cell Enzyme Immunoassay) を用いて、手術検体 34 例（子宮体癌 24 例、子宮筋腫 10 例）、正常内膜外来検体 10 例の計 44 例より内膜細胞検体を採取し、MSN-1 認識抗原量を測定した。

②体癌検体の陽性率を向上させる目的にて、改良型 EmC-EIA 法による測定で陰性であった G1 体癌 5 例における検討を行った。すなわち体癌組織、細胞診検体の MSN-1 免疫（組織・細胞）化学染色、界面活性剤処理後のセルロイド膜状の遺残細胞数、界面活性剤中の細胞分散度などについて検討した。

③②で得られた結果を基に、改良型 EmC-EIA 法における検体処理法の改良を行った。すなわち、セルロイド膜上に貼付された細胞検体を、ラバーポリスメンにてこすり取り、トリプシン、EDTA の混ざった細胞分散媒に入れ、4℃下に一夜静置したのち、1 分間超音波破碎を行い、14000rpm で 3 分間遠心分離した上清を測定検体とした。この再改良型 EmC-EIA 法を用いて、体癌 5 例より内膜細胞検体を採取し、MSN-1 認識抗原量を測定した。

④細胞診検体を液体中で固定・保存し、細胞が重積しないように機械的に分散させて単層に塗抹するモノレイヤー標本作製装置である、ThinPrep（米国 Cytec 社）を応用して検体処理を行った。

手術時採取した体癌 44 例（G1:32 例、G2:5 例、G3:5 例、Adenosquamous:2 例）、正常内膜 10 例における細胞診検体を、ThinPrep を利用してフィルター膜に吸着させ、フィルターごと細胞分散媒溶液に浸し攪拌した後、30 秒間超音波破碎器により微小細胞断片化したものを測定検体とした。検体中の SN-Ag 量の測定は、SN-Ag と特異的に反応するモノクローナル抗体 MSN-1 を用いた Sandwich EIA により行い、SN-Ag 量が測定できたものを陽性検体とした。

⑤上記により新たに改良した EmC-EIA 法により、多数の臨床検体による測定を行い、その実地臨床における有用性を検討した。すなわち、外来にて子宮腔内より細胞検体を採取

し、その後の病理組織検査にて診断が確定した 137 検体（正常内膜 84 検体、内膜増殖症 17 検体、体癌 36 検体）における細胞検体を、ThinPrep を利用してフィルター膜に吸着させ、フィルターごと細胞分散媒溶液に浸し攪拌した後、30 秒間超音波破碎機により微小細胞断片化したものを測定検体とした。

2.

- ①数種の異なる c-myc 合成ペプチド抗原を用いて家兔抗 c-myc 合成ペプチド抗体を製作し免疫病理組織学的研究を行い、がんに対する特異度と感度の優れた c-myc 抗原決定基に対する抗 c-myc 蛋白抗体を選択し、その血中自己抗体の測定法の開発を行い、腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を検討した。測定法は c-myc 抗原（C 末端側の 19 アミノ残基の合成ペプチド抗原）固相化マイクロプレートに対する血中 c-myc 自己抗体と c-myc 家兔 IgG 抗体（合成ペプチド抗原に対する抗家兔 IgG 抗体）との競合反応に基づく酵素免疫測定法（EIA）で行った。標準 c-myc 抗体は抗合成ペプチド c-myc 抗原家兔 IgG 抗体を 50ng/ml、25ng/ml、12,5ng/ml に希釈調整した溶液を用い、他方、被検血清は 50ng/ml の抗合成ペプチド c-myc 抗原家兔 IgG 抗体液で 9 倍希釈したものをを用いた。

本測定法により健常人 24 例（男性 13 例、女性 11 名）、乳癌 10 例（全例女性）、大腸癌 13 例（男性 7 例、女性 6 例）、胃癌 6 例（男女 3 例）および膀胱癌 5 例（男性 4 例、女性 1 例）、肺癌 10 例（全例男性）の計 68 例の血清について c-myc 自己抗体量を測定した。

- ②血中 c-myc 自己抗体の測定を c-myc 合成ペプチド抗原と被検血清中の c-myc 蛋白抗体を電解質溶液内で反応させ、溶液内の抗原抗体反応を経時的に電気伝導率（電気抵抗）の変化でとらえる方法で行った。電解質溶液では陽イオンと陰イオンの移動により電気伝導率（電気抵抗）は一定値を示すが、その電解質溶液に蛋白を加えると、加えた蛋白により陽イオンと陰イオンの移動が妨げられ電気抵抗が大きくなり、電気伝導率が低くなる現象を見いだした。

さらに、電解質溶液内に抗原または抗体が存在する場合、これに抗体または抗原を添加すると、抗原および抗体が単独で存在する場合よりも大分子の免疫複合物が形成され電気抵抗が増加した。その増加量は産生される免疫複合物量に正の相関を示し、抗原または抗体の定量ができる成績を得た。しかも免疫反応時の経時的な免疫複合物の増加に伴い電気抵抗も増加する現象が認められ、rate assay が可能であることが判明した。この原理に基づき電気伝導率による免疫測定法を開発した。本測定法により c-myc 合成ペプチド抗原とその抗原に特異的に反応する家兔ポリクローナル IgG 抗体の反応を測定したところ、免疫反応は抗体濃度が高いほど、反応時間が進むほどより電気伝導率は低値を示し、c-myc 抗体濃度の検量線を作成することができた。血中 c-myc 自己抗体の測定を行うにあたり、最初に健常人と患者血清を用い、c-myc 抗原 500pg、5ng、50ng を反応させて両血清で電気伝導率に差のある抗原濃度を検討した。c-myc 抗原 500pg では両血清で差をとることが出来ず、5ng 以上の c-myc 抗原が必要であることがわかり、血清検体に反応させる c-myc 抗原量を 10ng とした。c-myc 抗原量 10ng に対して標準 c-myc 抗体を 2pg と 20pg 反応させた時の電気伝導率の経時的变化を基準に、健常人 2 例、乳癌 7 例、胃癌 2 例、肺癌 1 例について血中 c-myc 自己抗体を測定した。

③さらに、p53 蛋白の分解酵素として、発がんおよびがん進展に重要な役割を演じている MDM2 (Murine Double Minute 2) 蛋白に対する自己抗体を検出するための、競合免疫反応に基づく酵素免疫測定法を確立した。大腸癌、胃癌、肺癌および乳癌などの血中 MDM2 蛋白自己抗体を測定し、血中 MDM2 蛋白自己抗体の早期がん診断に対する腫瘍マーカーとしての臨床的有用性を検討した。

【電気伝導度を利用した免疫測定法の開発】: 本測定法は、電解質溶液内の陽イオンと陰イオンの移動が免疫反応の結果生じた抗原抗体複合物分子により妨げられ、電気伝導率が低下する（電気抵抗が大きくなる）ことで反応物質を定量測定する原理に基づいている。現在までの研究で、定量可能または反応に必要な蛋白量が数十 pg から ng と少量で済み、電気伝導率電極の耐久性に優れ、精度の維持、良好な再現性を持ち、反応物質の修飾なしに生体内に近い電解質溶液内で反応させることができ、定量測定が可能な新しい免疫測定方法である。既知量の BFP (Basic Fetoprotein) 抗原と BFP 特異モノクローナル抗体 (K1 抗体) との免疫反応を電気伝導率法で測定し、市販の BFP-EIA キットで測定した血清検体中の BFP 抗原量とほぼ同等の BFP 値が本電気伝導率法で定量測定できることを確認したので、さらに定量精度の向上のために免疫反応時の湿度測定を行い、反応における湿度管理と温度変動を検討した。BFP 免疫反応は K1 抗体 0.5ng に対して BFP 抗原 0.6ng、1.2ng および 2.4ng を 40 分間 rate assay を行い、経過時間ごとの電気伝導率を測定した検量線を用い、K1 抗体 0.5ng に健常人または患者血清 2 μ l を加えた電解質溶液中で rate assay を行い、経過時間ごとの電気伝導率を測定し、血清 BFP 値を算出した。その際、免疫反応に伴う電気伝導率の低下とともに反応液湿が低下する現象を見いだした。そこで、免疫反応に伴う電気伝導率の変化を測定する時に電気伝導率計の温度補正機能を除去し、免疫反応本来の温度変化に伴う電気伝導率変化を測定した。その結果、従来の BFP 抗原抗体反応に比べより大きな電気伝導率の変化を測定することが出来た。例えば、BFP 抗原と K1 抗体反応では K1 抗体 0.5ng に対して BFP 抗原が 0.075ng、0.15ng でも測定が十分可能となった。温度補正機能を除去して測定した K1 抗体 0.5ng と BFP 抗原 0.15ng の反応は温度補正機能をつけて測定した K1 抗体 0.5ng と BFP 抗原 2.4ng との電気伝導率変化に匹敵する反応が認められ、測定感度がほぼ 16 倍から 20 倍上昇することが判明した。また、K1 抗体 0.5ng に対して BFP 抗原が 0.15ng の時、ほぼ反応モル比が 1:1 となり、BFP 抗原が 0.075ng よりも 0.15ng の方がより良く反応し、本来の免疫反応を反映する結果が得られた。以上の成績から、抗原と抗体反応には結合エネルギーが必要で、免疫結合が起こるとその反応液温はエネルギーを奪われて液温低下が起こり、それに伴う電気伝導率低下を測定していたと考えられた。免疫反応を電気伝導率を利用して測定する方法は、抗原と抗体による免疫複合物の産生に伴う電解質イオンの抵抗と抗原と抗体の結合エネルギー変化による液温変化に伴う電気伝導率変化の両方の影響により測定していることが判明した。

【電気伝導率を利用した血中 MDM2 自己抗体免疫測定法の開発】 上記の免疫測定法により MDM2 合成ペプチド抗原とその抗原に特異的に反応する家兔ポリクローナル IgG 抗体を用い MDM2 抗体の定量を試みた。一定量の MDM2 抗原 200ng に対して、MDM2 抗体濃度 6.25ng、12.5ng、25ng を 60 分間 rate assay を行い、経過時間ごとの電気伝導率を測定し反応させ検量線を作成した。BFP 抗原と K1 抗体との反応に比較し、MDM2 抗原がその抗

体に対して大量に必要であることが判明し、MDM2 合成ペプチド抗原とその特異家兔抗体との反応は BFP のように免疫反応モル比が 1:1 の場合が良いとは限らなかった。次に血清 MDM2 自己抗体の測定を試みた。MDM2 抗原 200ng と健常人、胃癌患者および大腸癌患者血清 $2\mu\text{l}$ を加え、電解質溶液中で rate assay を行い、経過時間ごとの電気伝導率を測定した。なお、測定は室温、測定検体は測定まで -20°C に凍結保存した血清を用いた。その結果、上記検量線から各血清中の MDM2 自己抗体量は健常人血清が $3.125\mu\text{g/ml}$ 以下、胃癌患者は $6.25\mu\text{g/ml}$ および大腸癌患者は $12.5\mu\text{g/ml}$ の相当量が存在すると考えられた。しかし、抗原と抗体反応のモル比からも抗体に対する抗原の反応が非常に悪い、または反応性は良いが解離しやすいなどの理由が考えられ、MDM2 自己抗体の存在は確認されたが、定量性についてはまだ問題が残った。なお、本研究は当センターの倫理審査委員会の承諾を受け、測定結果は本人の希望以外は絶対に第 3 者に知らせないこととした。

3. 白血病を含めて悪性腫瘍患者血中には血清フェリチンがしばしば増加するが、腫瘍細胞の産生するフェリチンのみが腫瘍マーカーとなる。特に、グリコリルノイラミン酸を含む糖鎖は腫瘍細胞フェリチンにのみ存在することが判明しているため、その発現メカニズムを解明し、腫瘍の早期診断法への応用を図る目的にて、以下の研究を実施した。

①HPLC で HeLa 細胞フェリチン (HeLa・F)、K562 細胞フェリチン (K562・F) 等の悪性腫瘍細胞フェリチンと正常肝組織フェリチン (HLF) との相違はシアル酸のうちグリコリルノイラミン酸 (NGNA) の有無によることが明らかとなった。そこで Westernblot 法で HeLa・F、K562・F、HLF と HeLa・F に対するモノクローナル抗体 (MoAb04231、04223) とグリコリルノイラミン酸を含む糖鎖 GM3 (NeuGc) に対するモノクローナル抗体 HU/Ch2-7 ニワトリを用いて酵素免疫染色法を行った。

②ELISA プレートに MoAb04231 を固相化しておき、そこに K562・F、および HeLa・F の 200ng/ml を結合させ、洗浄した後 HeLa・F の別のロットのモノクローナル抗体 MoAb04223 と HU/Ch2-7 抗体の希釈シリーズを同時にウェルに加えてインキュベートした。洗浄後 HRP 標識抗マウス IgG、発色剤を用いて発色させた。

③NGNA は正常ヒト、ニワトリには認められない。従ってヒトで悪性腫瘍が生ずれば、NGNA が出現し、やがてそれに対する抗体が生ずると考えられる。先ず各種白血病 46 例について GM3 (NeuGc) に対する抗体を検討した。塩化ビニール製の ELISA 用プレートに GM3 (NeuGc) の 2pM のメタノール溶液を入れて固相化し、2%ゼラチン加 PBS 溶液で blocking を行い、同じ溶液で 200 倍にした患者血清、ALP 標識抗ヒト IgG 抗血清を用いて行った。

④TLC (薄層クロマトグラフィー) に GM3 (NeuGc) の 1mg/ml をメタノールで 2~6 倍にした溶液でスポットを作り、クロロホルム、メタノール、 CaCl_2 を加えた溶液で展開する。それに一次抗体として希釈ヒト血清、ついでイムノステイン (コニカ社) を用いて免疫発色させた。オルシノールで染色させた位置に、即ち GM3、GM5 (NeuGc) のバンドに相当する位置のバンドを染色し得た。即ち、白血病患者血中に NGNA に対する抗体を認めた。

⑤HPTLC プレート (Merk 社) に GM3 (NeuGc) 1mg/ml をメタノールに希釈した溶液でスポットを作り、クロロホルム/メタノール/塩化カルシウム (0.2%) = 55/45/10 を加えた溶液で展開し、固定した。そこに悪性腫瘍患者血清、POD 標識抗ヒト IgG 抗血清、イムノステイン (Konica 社) で染色した。

- ⑥塩化ビニール製 ELISA プレート（住友ベークライト社）に GM3（NeuGc、NeuAc）のメタノール溶液を加え、乾燥した。2%オブアルブミン加 PBS（pH7.2）を加えてブロッキングを行った後、正常人および悪性腫瘍患者血清、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG（Cappel 社）を用いて抗体の検索を試みた。
- ⑦塩化ビニール製 ELISA 用プレートに GM3（NeuGc、NeuAc）の 2pM の溶液を用いて固定、2%ニワトリオブアルブミン加 PBS（pH7.2）でブロッキングを行った。そこに白血病患者血清、K562 細胞フェリチン 2mg/ml の 400×、200×、50×、25×の希釈溶液を加えて Inhibition ELISA Test を行った。
- ⑧HeLa 細胞、HL-60 細胞、K562 細胞からフェリチンを精製し、0.1%TFA、チオグリコール酸で処理後、逆相液体クロマトグラフィー（VydacC4 カラム）で H、L サブユニットを採取した。溶液は 0.1%TFA（トリフルオロ酢酸）とアセトニトリル両液を用いた。採取したものの凍結乾燥をした。このものを用いて HPLC 分析を行った。HPLC 分析には、ピークのリテンションタイムの許容保持時間を±5%と設定した。
- ⑨さらに質量分析（MS）による方法でも行った。20%チオグリコシート、0.1%TFA を用いて HPLC で分取した H、L サブユニットをスピードバックを用いて乾固した。それに 1ml の水を加えて溶解し、（セップバック C18 カラム、ウォーターズ社）に試料をアプライ後、2ml の水で溶出した。水溶出分を回収、スピードバックで乾固後、各試料に水 1ml を加え溶解した。その 2μl を分取し、50%イソプロピールアルコールを加え、計 100μl として分析に供した。

4.

- ①9 番染色体短腕および長腕の欠失は膀胱癌で高率に認められる遺伝子異常であることが知られている。膀胱癌を対象に遺伝子欠失を高感度に検出する方法である Blunt-End SSCP 法を用いて 9 番染色体短腕および長腕の 7 カ所の多型マーカーを用い膀胱癌患者 56 例の腫瘍組織および術前に採取した尿より LOH を解析し、各種臨床病理学的因子および術後再発等との関連について検討した。
- ②膵癌は最も高頻度に遺伝子異常を認める腫瘍であり、ヌードマウスを用いて株化した膵癌細胞株あるいは凍結組織切片から顕微鏡下に腫瘍細胞を回収し遺伝子解析を行う等の方法を用いることにより、9p、17p、18q、1q 等の欠失（LOH）等の異常あるいはこれらの染色体座位に存在するがん抑制遺伝子として p16、p53、DPC4 等の異常が報告されている。しかし、膵癌は間質の豊富な腫瘍であり、従来法では混入する正常細胞の影響により臨床材料から直接遺伝子の欠損を検出することは困難であった。我々は遺伝子欠失を高感度に検出する手法である Blunt-End SSCP 法を開発し、各種悪性腫瘍の LOH の解析を行っている。今回は膵癌手術材料 27 例を対象として 17p、18q および 9p の染色体欠失を解析した。使用した多型マーカーは D9S775（9p23-22）、9S925（9p22）、D9S304（9p21）、D17S695（17p13.3）、D17S919（17p13.2）、D17S969（17p12）、p53 遺伝子（17p13.1）の Intron 1、Exon 4、Intron 7 の多型部位、D18S51（18q21.33）および D18S499（18q21.32-33）の合計 11 カ所である。
- ③膀胱上皮内癌（Carcinoma in Situ; CIS）は上皮内に限局する未分化な移行上皮癌で、上皮内進展をきたし、筋層浸潤癌に移行しやすい。CIS では腫瘍細胞が粘膜から剥離しやすく尿細胞診で高率に陽性を示すことから、上皮細胞の細胞間接着機構における異常が

推察される。臨床的には CIS 単独例は比較的少なく、しばしば表在性あるいは浸潤性 TCC に随伴する病変 (pTis) として病理組織学的に診断されることが多い。本研究では、経尿道的膀胱腫瘍切除 (TUR-Bt) により採取された表在性および浸潤性膀胱癌 49 例を pTis 合併例と pTis 非合併例に分類し、E-cadherin 蛋白質の発現とプロモーター領域のメチル化およびヘテロ接合性の消失 (LOH) について解析し、CIS の発生と進展における E-cadherin 分子の関与について検討した。

III 研究成果および考察

1.

- ①子宮体癌検体 24 例 (G114 例、G24 例、G33 例、その他 3 例)、正常内膜検体 20 例における測定の結果は、MSN-1 認識抗原量が測定可能であった検体は、子宮体癌検体例で 11 例 (11/24: 陽性率 45.8%)、正常内膜検体例で 0 例 (0/20: 陽性率 0%) であった。また、体癌の組織分化度別では、G114 例中 8 例 (陽性率 57.1%)、G24 例中 2 例 (陽性率 50.0%)、G33 例中 1 例 (陽性率 33.3%) で MSN-1 認識抗原量が測定可能であった。今回の測定結果では、G1 体癌での陽性率が中間報告での陽性率 (75%) に比べやや低かったものの、正常例における偽陽性率が低く、測定値の同時再現性が高いことから、さらに体癌例の陽性率を向上させることができれば、体癌の補助診断法として有用であると考えられた。
- ②上記測定にて MSN-1 認識抗原が測定できなかった G1 体癌 6 例における組織検体、細胞診検体の MSN-1 免疫化学染色の結果は、陰性であったものは 1 例のみで、他の 5 例は陽性であり、組織検体、細胞診検体とも同様の染色結果を示した。界面活性剤にて処理後のセルロイド膜上の遺残細胞数を計測したところ、全例とも 70~80% の細胞がセルロイド膜上に遺残しており、界面活性剤による処理 (4℃下で一夜静置した後、1 分間攪拌) のみでは測定検体中の細胞数が著しく少なくなることが判明した。さらに、界面活性剤中の細胞をスライドガラスに塗抹し、パパニコロウ染色にて観察したところ、ほとんどのクラスターが集塊状で、検体の分散が不十分であることも判明した。以上の結果、G1 体癌例では、MSN-1 認識抗原は十分発現しているにもかかわらず、検体処理の段階で抗原量が減少し、しかも抗原の分散が不均一であるため EmC-EIA の測定では陰性を示した可能性が示唆された。
- ③②で得られた結果を基に、検体の処理法を前期の如く改良した再改良型 EmC-EIA 法により、5 例の体癌検体の測定を行った結果、陽性率は 5 例 (5/5: 陽性率 100%) であり、しかも、前回陰性を示した G1 体癌の 1 例でも MSN-1 認識抗原が測定可能であったことから、再改良型 EmC-EIA は、体癌の補助診断法として有用である可能性が示唆された。
- ④体癌 44 例における EmC-EIA の陽性率は 72.7% (G1:75.0%、G2:80.0%、G3:40.0%、Adenosquamous:100.0%) であり、正常内膜 12 例の 0% に比べ高い陽性率を示した。一方、実際の臨床検体で抗原量が測定可能であった検体は、子宮体癌例で 7 例 (7/10: 検出率 70%)、正常子宮内膜例では 8 例 (8/36: 検出率 22.2%) であり、手術検体とは異なり正常子宮内膜例での検出率 (偽陽性率) がやや高まるものの、体癌例での検出率は手術検体での検出率とほぼ同等の高値を示した。

細胞診検体を用いた EmC-EIA 法は、簡便であり、しかも体癌例 (特に G1 体癌) で正常内膜例に比し高い陽性率を示すことから、細胞診判定に苦慮することがまれではない高

分化型体癌において細胞診の補助診断法として有用である可能性が示唆された。

- ⑤体癌 36 検体における EmC-EIA の陽性率は 69.4% (G1:73.1%、G2:60.0%、G3:60.0%) であり、手術検体同様 G1 体癌で高い陽性率を示した。正常内膜 84 検体における陽性率は 15.5% であり、手術検体における陽性率 0% に比べ、臨床検体では偽陽性率の上昇を認めた。内膜増殖症検体の陽性率は 35.3% であり、体癌検体と正常内膜検体との間の陽性率を示した。また、正常内膜検体の内偽陽性を示した 13 検体の解析では、子宮筋腫合併例が 8 例と多く、しかも、同一検体より作製した 13 検体の ThinPrep 細胞診標本にて多数の頸管腺細胞の混入が認められたことから、偽陽性を示した 13 検体では細胞採取が正しく子宮体部から行われなかった可能性が示唆された。事実、追加実験として施行した正常頸管腺細胞検体 5 例における EmC-EIA の陽性率は 100% であり、体内膜細胞採取時の正常頸管腺細胞の多量の混入が偽陽性の原因と考えられた。以上の臨床検体での検討において、体癌検体（特に G1 体癌）で正常内膜検体に比べ高い陽性率を示したこと、内膜増殖症における陽性率が体癌と正常内膜の間の値を示したこと、検体採取時の頸管腺細胞の混入により、偽陽性率が上昇したことなどから、本 EmC-EIA における測定は、臨床検体における SN-Ag 量を正しく反映しており、検体が子宮腔内から正しく採取されるよう留意さえすれば、体癌、特に細胞診断測定に苦慮することがまれではない高分化型体癌において細胞診の補助診断法として臨床応用可能であることが明らかになった。

2.

- ①本測定法により、健常人を含む 68 例の血中 c-myc 自己抗体量を測定した結果、健常人血中の c-myc 自己抗体の平均値±SD (標準偏差) は男性 13 例では 128.9 ± 26.9 ng/ml であり、女性 11 例は 187.5 ± 36.8 ng/ml となり、女性が男性に比較し、有意に高い抗体値を示した。一方、がん症例において乳癌 10 例の c-myc 自己抗体の平均値±SD は 135.5 ± 29.4 ng/ml、大腸癌は男性 7 例が 114.9 ± 47.7 ng/ml、女性 6 例が 112.4 ± 63.5 ng/ml、胃癌は男性 3 例が 77.0 ± 36.9 ng/ml、女性 2 例が 58.4 ± 7.2 ng/ml、膵癌では男性 4 例が 108.0 ± 15.6 ng/ml、女性 1 例は 203.1 ng/ml および男性の肺癌 10 例は 125.7 ± 19.7 ng/ml であった。この結果、女性では乳癌、大腸癌において健常人女性に比較し、有意に c-myc 自己抗体価が低値を示した。しかし、女性の胃癌および男性のすべてのがん症例では、それぞれの健常人と比較しても有意な差を認めなかった。

以上の成績から、健常人の血中 c-myc 自己抗体価は女性が男性に比較して有意に高い傾向にあることが判明した。女性ではカットオフ値を 150 ng/ml に設定すると、健常人女性 11 例はすべて 150 ng/ml 以上の抗体価を示したが、乳癌 10 例では 150 ng/ml 以下を示す症例が 7 例存在し、70% の高い陰性率を示した。さらに乳癌の病期別陰性率は I 期が 66.7% (2/3)、II 期が 66.7% (4/6) であった。また、女性の大腸癌の陰性率は 83.3% (5/6)、胃癌は 66.6% (2/3) であった。一方、男性はカットオフ値を 100 ng/ml に設定すると、健常人 13 例中 1 例がカットオフ値以下を示し、その陰性率は 7.7% であり、がん症例の陰性率は大腸癌が 42.9% (3/7)、胃癌が 66.7% (2/3)、膵癌が 25% (1/4)、肺癌が 0% であった。

さらに、競合反応に基づく血中 c-myc 自己抗体の EIA を開発し、本法により健常人を含む 68 例の血中 c-myc 自己抗体を測定した。その結果、女性では乳癌、大腸癌の腫瘍

マーカーとして、血中 c-myc 自己抗体が役立つ可能性が示唆された。しかし、男性では役立つ成績が得られなかった。今後、がん症例数を増やすとともに、さらに早期がんの症例についても検討を行う必要があると考えられた。

- ②健常人 2 例、乳癌 7 例、胃癌 2 例、肺癌 1 例について被検血清 $2\mu\text{l}$ と c-myc 抗原 10ng を電解質溶液内で反応させ電気伝導率を測定し、被検血清 c-myc 蛋白自己抗体濃度を測定した。その結果、健常人に比較し乳癌、胃癌で経過時間ごとの電気伝導率はより低値を示し、健常人よりもがん患者血清では c-myc 抗原との反応性がより大きいことが判明した。この成績から、c-myc 蛋白自己抗体は健常人血中にも微量存在することが確認され、c-myc 抗原 10ng と標準 c-myc 抗体 2pg と 20pg との反応から、健常人血清中には約 1ng/ml 以下の c-myc 蛋白自己抗体が存在することがわかった。一方、がん患者血中 c-myc 蛋白自己抗体は乳癌では 1ng/ml 以上を示した検体が 7 例中 4 例 (57%) あり、その中の 1 例はほぼ 10ng/ml の高い抗体価を示した。また、胃癌では 2 例中 1 例 (50%) が 1ng/ml 以上を示したが、肺癌 1 例は健常人と差はなかった。これらの成績から、血中 c-myc 蛋白自己抗体は健常人にも微量存在するが、がん患者ではより多量に存在することが判明し、血中 c-myc 蛋白自己抗体がこれらの癌の検出に役立つ可能性が示唆された。
- ③電解質溶液内の抗原抗体反応を経時的に電気伝導率 (電気抵抗) の変化でとらえる新しい方法として電気伝導率を利用した免疫測定法の確立を試みた。電気伝導率測定に際し、電解質溶液内温度を同時に測定し免疫反応時の液温変化を測定したところ、免疫反応とともに液温が低下する現象を見いだした。それにより、電気伝導率計の温度補正機能を除去し、免疫反応本来の温度変化に伴う電気伝導率を測定した結果、従来に比べより大きな電気伝導率変化を測定することが出来、測定感度が向上した。従って、免疫反応を電気伝導率を利用して測定する方法は抗原と抗体による免疫複合物の産生に伴う電解質イオンの抵抗と抗原と抗体の結合エネルギー変化に伴う液温変化を電気伝導率変化で捕らえるという両方の原理に基づく測定方法と考えられた。

本測定法を用い、MDM2 合成ペプチド抗原とその抗原に特異的に反応する家兎ポリクローナル IgG 抗体を用い、MDM2 抗体の定量を試みた。その結果、各血清中の MDM2 自己抗体量は健常人血清が $3.125\mu\text{g/ml}$ 以下、胃癌患者は $6.25\mu\text{g/ml}$ および大腸癌患者は $12.5\mu\text{g/ml}$ の相当量が存在すると考えられた。

しかし、抗原と抗体反応のモル比からも抗体に対する抗原の反応が非常に悪く、または反応性は良いが解離しやすいなどの理由が考えられ、今後、さらに検討する必要があると考えられた。

3.

- ①HeLa・F、K562・F の H サブユニットが、MoAb 04231 で染色されたと同じ位置に HU/Ch2-7 でも染色された。(アルカリフォスターゼ標識抗マウス IgG、発色剤またはアマシヤム・ファルマシアバイオテック社の ECL 法)

HeLa・F、K562 には NGNA を含む糖鎖が存在することが明らかとなった。

- ②HeLa・F に対するモノクローナル抗体の認識するエピトープは NGNA を含む糖であることが Inhibition ELISA の成績からわかった。
- ③対照において正常人 20 例の OD 値の平均値 + 2SD 以上を陽性としたとき、その陽性率は 20%であった。

- ④TLC 免疫染色にて、白血病患者血清中にグリコルノイラミン酸を含む糖鎖に対する抗体が存在することが判明し、EIA による測定にて各種白血病 46 例中約 20%にその抗体が存在した。
- ⑤悪性血液疾患 46 例、急性骨髄性白血病 24 例、慢性骨髄性白血病 2 例、急性リンパ性白血病 6 例、急性白血病 3 例、骨髄異型症候群 (MDS) 6 例、悪性リンパ腫 4 例、多発性骨髄腫 1 例を対象とした。1 例の白血病患者血清は本法で GM3 (NeuGc)、GM3 (NeuAc) のいずれとも反応したが、多くの悪性腫瘍患者血清は GM3 (NeuGc) とのみ反応した。
- ⑥対象は各種悪性血液患者 46 例、各種固形癌 50 例であった。正常者 20 例の平均値+3SD 以上の値を抗体陽性とした。各種悪性血液疾患 46 例中 GM3 (NeuGc) に対する抗体陽性率は 21.7%、GM3 (NeuAc) の抗体陽性率は 8.7%であった。各種固形癌患者 50 例中 GM3 (NeuGc) に対する抗体陽性率は 32%、GM3 (NeuAc) 抗体陽性率は 4%であった。
- ⑦Inhibition ELISA の結果から各種悪性疾患患者血中に存在する K562 細胞抗体の対応抗原は GM3 (NeuGc) であり、各種固形癌のうち肝細胞患者の血中抗体の対応抗原は HeLa 細胞フェリチンに含まれる GM3 (NeuGc) と推定された。
- ⑧HL-60・F の H サブユニット、L サブユニットにともに Neu5Ac (N-アセチルノイラミン酸)、NeuGc のピークを認めた。HeLa・F の H サブユニットには Neu5Ac、Neu5Gc のピークを認めたが、L サブユニットには NeuAc は認めたが、NeuGc は認められなかった。1 例の白血病患者血清は TLC による免疫染色法で GM3 (NeuGc)、GM3 (NeuAc) のいずれとも反応し、ELISA 法の結果と一致した。また、大部分の症例は GM3 (NeuGc) とのみ反応した。
- ⑨質量分析 (NEG 測定) からは目的とするピーク (分子量 325) は得られなかった。
- 既に組織免疫染色法、Westernblot 法、Inhibition ELISA 法で各種悪性腫瘍細胞、組織中に NGNA の存在を報告したが、今回は HPLC 法でも同様の結果を得た。しかし、MS 法では NGNA の存在が決定できず現在なお研究を続行している。今後ヒトの悪性腫瘍細胞、組織中の糖鎖に NGNA を確認すると共に NGNA の生ずるメカニズムを是非明らかにしたい。

4.

- ①腫瘍組織および尿中脱落細胞における 9 番染色体の欠失は全膀胱癌のそれぞれ 67% (37/5 例)、67% (37/56 例) に認められ、初発表在性膀胱癌において 57% (13/23 例)、57% (13/23 例)、初発浸潤性膀胱癌において 89% (8/9 例)、78% (7/9 例)、再発表在性膀胱癌において 67% (16/24 例)、71% (17/24 例) であり、9 番染色体の欠失は腫瘍組織および尿中でほぼ同様の頻度で検出されることが明らかとなった。初発表在性膀胱癌で経尿道的切除術を施行しその後の経過観察が可能であった 20 例について予後を追跡したところ、初発時尿中脱落細胞で 9 番染色体の LOH を認めなかった 9 例の再発率 11%に対して、LOH を認めた 11 例における再発率は 72%と有意に高率であった ($p=0.002$)。従来表在性膀胱癌の予後因子として用いられている Stage、組織学的異型度および 17 番染色体短腕の欠失の有無、術後膀胱内 BCG 注入療法の施行の有無等を含めて Cox 回帰分析を行ったところ、9 番染色体の LOH は Hazard 比 15.83、 $p=0.048$ と圧倒的に有意な予後因子であることが明らかとなった。本法は腫瘍組織のみならず尿中からの解析も可能なことから、尿細胞診と併用することにより表在性膀胱癌の再発のリスクを推定するマーカーとして有用と考えられた。
- ②膀胱癌 27 例の検討で、各染色体に関して少なくとも一カ所以上の Locus でヘテロ接合性

が認められ、informative と判断された症例は、9p26 例 (96.3%)、17p25 例 (92.6%)、18q25 例 (92.6%) であり、各染色体座位における LOH の頻度は 9p58% (15/26 例)、17p72% (18/25 例)、18q76% (19/25 例) であった。

欠失群と非欠失群の術後 5 年生存率は 9p 20.0% vs. 40.0% ($p=0.683$)、17p 5.6% vs. 83.3% ($p=0.002$) および 18q 21.1% vs. 60.0% ($p=0.103$) であり、17p の欠失を認める膀胱癌では有意に予後不良であった。従来指摘されている予後因子であるステージ、腫瘍径、リンパ節転移、組織型等との比較でも、17p の欠失の有無は $p=0.002$ 、Hazard Ratio 11.4 (95% C.I. 1.76-12.37) と高値を示し、膀胱癌の予後因子として有用な指標と考えられた。

- ③Methylation Specific PCR 法による CDH1 プロモーター領域の解析では、メチル化は 47% (23/49) で認められた。メチル化は、病期・細胞異型度との相関は認められなかった。しかし、pTis 随伴例においてはメチル化の頻度は 89% (16/18) と非随伴例 23% (7/31) に対して有意に高率であった ($p<0.0001$)。また、E-cadherin タンパクの免疫組織化学的検討では、メチル化のある症例の 83% (19/23) で癌組織中の E-cadherin タンパクの発現低下を認めた。

E-cadherin の存在する 16 番染色体長腕の LOH 解析は、蛍光シーケンサーを用いた Blunt-End SSCP 法により行い、16q13-22.1 に局在する 4 種類のマイクロサテライトマーカー (D16S751、D16S752、D16S765、D16S2624) を使用した。98% (47/49) の症例が少なくとも 1 箇所の locus でヘテロ接合であり LOH 解析が可能であった。16qLOH は 34% (16/47) で認められ、細胞異型度との相関がみられたが ($p=0.0069$)。CIS の随伴との有意な関係は認めなかった ($p=0.156$)。以上の結果より、膀胱癌における E-cadherin 蛋白質の発現低下には E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が関与しており、腫瘍組織および尿等からの E-cadherin 遺伝子プロモーターのメチル化の検出は CIS の診断に有用な遺伝子検査として応用可能と考えられた。

V 研究成果の発表

(野澤志朗)

1. Suzuki, A., Umezawa, A., Sano, M., Nozawa, S., Hata, J. : Involvement of EAT/MCL-1, a BCL-2 related gene, in the apoptotic mechanisms underlying human placental development and maintenance. Placenta. 2000 Mar., 21(2):177-183, 2000
2. Kubushiro, K., Sakuma, Y., Yamashita, H., Fukuchi, T., Banno, K., Tsukazaki, K., Nozawa, S. : Biological characteristics of human uterine endometrial cancer variant cells selected for blood group H type 1 antigen : adhesion to vascular endothelial cells. Acta Histochem. Cytochem., 33(3):209-213, 2000
3. Ohie, S., Udagawa, Y., Kozu, A., Aoki, D., Nozawa, S., Moossa, A.R., Hoffman, R.M. : Cisplatin sensitivity of ovarian cancer in the histoculture drug response assay correlates to clinical response to combination chemotherapy with cisplatin, doxorubicin and cyclophosphamide. Anticancer Res., 20:2049-2054, 2000

4. Kaneta, Y., Tsukazaki, K., Kubushiro, K., Sakayori, M., Ueda, M., Nozawa, S. :Selective cytotoxicity of adriamycin immunoconjugate of monoclonal antibody MSN-1 to endometrial adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*, 7:1099-1106, 2000
5. Suzuki, T., Aoki, D., Susumu, N., Udagawa, Y., Nozawa, S. :Imbalanced expression of TAN-1 and human Notch4 in endometrial cancers. *Int. J. Oncology*, 17:1131-1139, 2000
6. Nozawa, S., Iwata, T., Yamashita, H., Banno, K., Kubushiro, K., Aoki, R., Tsukazaki, K. : Gonadotropin-releasing hormone analoge therapy for peritoneal inclusion cysts after gynecological surgery. *J.Obstet.Gynaecol.Res.*, 26(6):389-393, 2000
7. Saitoh, E., Aoki, D., Susumu, N., Suzuki, N., Kataoka, F., Nozawa, S. :The expression of β 1, 4-galactosyltransferase in human trophoblasts. *Acta Histochem. Cytochem.*, 34(1):62(A24), 2001
8. Susumu, N., Noda, T., Suzuki, N., Kanasugi, M., Aoki, D., Nozawa, S., Tsuda, H., Hirohashi, S. : Detection of chromosomal alterations in ovarian cancers using doubletargeted FISH. *Acta Histochem.Cytochem.*, 34(1):77(A39), 2001
9. Takamatsu, K. Ohta, H., Makita, K., Horiguchi, F., Nozawa, S. :Effects counseling on climacteric symptoms in Japanese postmenopausal women. *J.Obstet.Gynaecol. Res.*, 27(3):133-140, 2001
10. Xin, C.Y., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Onda, T., Nakagawa, S., Yamada, M., Nozawa, S., Sekiya, S., Hirai, Y., Shiromizu, K., Fujii, T., Taketani, Y. :Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Letters*, 170(2001):19-24, 2001
11. Tanabe, K., Susumu, N., Hand, K., Nishi, K., Ishikawa, I., Nozawa, S. :Prediction of the potentially fertile period by urinary hormone measurements using a new home-use monitor : compartion with laboratory hormone analyses. *Human Reproduction*, 16(8):1619-1624, 2001
12. Takehara, K., Kubushiro, K., Iwamori, Y., Tsukazaki, K., Nozawa, S., Iwamori, M. :Expression of an isoform of the testis-specific estrogen sulfotransferase in the murine placenta during the late gestational period. *Arch. Biochem. Biophys.*, 394(2):201-208, 2001
13. Komuro, Y., Udagawa, Y., Susumu, N., Aoki, D., Kubota, T., Nozawa, S. : Paclitaxel and SN-38 overcome cisplatin resistance of ovarian cancer cell lines by down-regulating the influx system of cisplatin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:1241-1250, 2001
14. Ohta, H., Nozawa, S. :Dr.Soju Kurihara :increased awareness of cytologic diagnosis. /Minireview series for the 50th volume, *The Keio Journal of*

- Medicine, 50(4):213-216, 2001
15. Susumu, N., Aoki, D., Suzuki, N., Nozawa, S. : Application of two-color FISH with liquid-based thin-layer cytologic preparations for uterine adenocarcinomas. Acta Histochem. Cytochem. (Abstract of The 42nd annual meeting of the Japan society of histochemistry and cytochemistry, S2-1, Dec. 6-7, 2001), 35(1):44(A6), 2002
 16. Tamada, Y., Aoki, D., Suzuki, N., Susumu, N., Irimura, T., Nozawa, S. :Significance of MUC1 mucin expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. Acta Histochem. Cytochem. (Abstract of The 42nd annual meeting of the Japan society of histochemistry and cytochemistry, W1-4, Dec. 6-7, 2001), 35(1):48(A-10), 2002
 17. Komiyama, S., Aoki, D., Susumu, N., Suzuki, N., Kataoka, F., Higashiguchi, A., Nozawa, S. :Significance of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. Acta Histochem. Cytochem. 32(2):143(A55), 2002
 18. 青木大輔, 進 伸幸, 野澤志朗 : I 腫瘍マーカーの臨床における意義と複合糖質関連マーカー. 和氣徳夫 (担当編集), 青野敏博, 麻生武志, 中野仁雄, 野澤志朗 (編集), 武谷雄二 (総編集) : 婦人科腫瘍の分子・細胞生物学. 新女性医学大系 41, 中山書店, 東京, p255 - 270, 2001
(石井 勝)
 19. Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Ishii, M., Kozu, T. :Association of MTG8 (ETO/CDR), a leukemia-related protein, with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human hematopoietic cell lines. Jpn. J. Cancer Res., 90:60-68, 1999.
 20. 山口研成, 清野祐子, 神田裕三, 松井武寿, 石井 勝 : 血中エストロゲンレセプター (ER) 自己抗体の腫瘍マーカーとしての臨床応用を目指した癌、非癌組織における ER ステータスの検討. 腫瘍マーカー研究会誌, 14:167-169, 1999.
 21. 石井 勝他. : 塩基性フェトプロテイン (BFP). 広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (4) —その数値をどう読むか—, 日本臨床, 57:442-444, 1999.
 22. 石井 勝 : 臓器非特異的腫瘍マーカー. 臨床検査ガイド 1999~2000 (Medical Practice 編集委員会編), p. 926-927, (株)文光堂, 1999.
 23. 石井 勝 : 主な腫瘍マーカーBFP. 腫瘍マーカー臨床マニュアル (大倉久直, 石井 勝 他編), p. 151-153, (株)医学書院, 1999.
 24. 石井 勝 : I. 主な腫瘍マーカーとその特徴 2) BFP・尿 BFP. 腫瘍マーカーハンドブック (石井 勝編), (株)医薬ジャーナル社, p. 15-17, 2001.
 25. 石井 勝 : 主な臓器別の腫瘍マーカー 5) 泌尿・生殖器③膀胱癌. 腫瘍マーカーハンドブック (石井 勝編), p. 180-185, (株)医薬ジャーナル社, 2001.
 26. 石井 勝 : 腫瘍マーカー検査, BFP (塩基性フェトプロテイン). 基準値と異常値の間 —その判定と対策—改訂 5 版 (河合 忠編), (株)中外医学社, p. 366-369, 2001.
(浅川英男)

27. Sakashita, C., Hiroswawa, S., Asaka, H. *et al.*: Two component in a single cell lineage in a patient with a dual isotype secretory B cell tumor. *British J. Haematology*, 102:7911-794, 1998
28. 山口 稽子, 浅川英男: 抗横紋筋抗体. *日本臨床*, 57 (1999 増刊): 486-488, 1999
29. 山口 稽子, 浅川英男: 抗心筋抗体. *広範囲血液・尿化学検査、免疫学*, *日本臨床*, 57 (1999 増刊): 489-494, 1999
30. 浅川英男, 松下 央, 李 康弘, 深井文雄, 松田治雄, 窪田哲朗, 森 亘: 各種固形癌および白血病における GM3 (NeuGc) に対する抗体. *医学のあゆみ*, 198:479-480, 2001
31. 宮坂信行, 烏山 一, 浅川英男, 戸沢秀樹 (編集): *臨床免疫学*. 講談社サイエンティフィック社, 2001
(菅野康吉)
32. Miyauchi, A., Futami, H., Hai, N., Yokozawa, T., Kuma, K., Aoki, N., Kosugi, S., Sugano, K. Yamaguchi, K. : Two germline missense mutations at codon 804 and 806 of the RET protooncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90:1-5, 1999
33. Kishi, M., Tsukada, T., Shimizu, S., Hosono, K., Ohkubo, T., Kosuge, T., Sugano, K., Kanbe, M., Ohara, T. Yamaguchi, K. :A novel splicing mutation (894-9 G→A) of the MEN1 gene responsible for multiple endocrine neoplasia type1. *Cancer Letters*, 142:105-110, 1999
34. Maekawa, M., Sugano, K., Kashiwabara, H., Ushiyama, M., Fujita, S., Yoshimori, M., Kakizoe, T. :DNA methylation analysis using bisulfite treatment and PCR-single-strand conformation polymorphism in colorectal cancer showing microsatellite instability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262:671-6, 1999
35. Sugano, K., Taniguchi, T., Saeki, M., Tsunematsu, Y., Tomaru, U., Shimoda, T. :Germline p53 mutation in a case of li-fraumeni syndrome presenting stomach cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 29:No.513-516, 1999
36. Nomura, S., Sugano, K., Kashiwabara, H., Taniguchi, T., Fukayama, N., Fujita, S., Akasu, T., Moriya, Y., Ohhigashi, S., Kakizoe, T., Sekiya, T. : Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of hMSH2 and hMLH1 in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271:120-129, 2000
37. Kanamori, M., Kon, H., Nobukuni, T., Nomura, S., Sugano, K., Mashiyama, S., Kumabe, T., Yoshimoto, T., Meuth, M., Sekiya, T., Murakami, Y. : Microsatellite instability and the PTEN1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the hMLH1 gene. *Oncogene*, 19:1564-1571, 2000
38. Sugano, K., Usiyama, M., Fukutomi, T., Tsuda, H., Kitoh, T., Ohkura, H. : Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissues and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse. *Int.*

- J. Cancer (Pred. Oncol.), 89:329-336, 2000
39. Ichikawa, A., Sugano, K., Fujita, S. : DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. Jpn. J. Clin. Oncol., 31(7):346-348, 2001
 40. Smith, W.M., Zhou, X-P., Kurose, K., Gao, X., Latif, F., Kroll, T., Sugano, K., Cannistra, S.A., Clinton, S.K., Maher, E.R., Prior, T.W., Eng, C. : Opposite association of two PPARG variants with cancer: overrepresentation of H449H in endometrial carcinoma cases and underrepresentation of P12A in renal cell carcinoma cases. Hum. Genet., 109:146-151, 2001
 41. Shigyo, M., Sugano, K., Tobisu, K., Tsukamoto, T., Sekiya, T., Kakizoe, T. :Molecular followup of newly diagnosed bladder cancer using urine samples. The Journal Urology, 166:1280-1285, 2001
 42. Miyakura, Y., Sugano, K., Konishi, F., Ichiikawa, A., Maekawa, M., Shitoh, K., Igarashi, S., Kotake, K., Koyama, Y., Nagai, H. : Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. Gastroenterology, 121:1300-1309, 2001
 43. Nomoto, K., Maekawa, M., Sugano, K., Ushiyama, M., Fukayama, N., Fujita, S., Kakizoe, T. : Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. Jpn. J. Clin. Oncol, 32(1):3-8, 2002
 44. Matsumura, Y., Haruyama, K., Hamaguchi, T., Shirao, K., Muro, K., Yamada, Y., Shimada, Y., Sugano, K. : Effect of a 3-hour interval between methotrexate and 5-fluorouracil in the treatment of metastatic colorectal cancer. Jpn. J. Clin. Oncol., 32(1):9-13, 2002
 45. 菅野康吉 : NCC-ST-439. Medicina, 36:659, 1999
 46. 菅野康吉 : 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査 4—その数値をどう読むか—NCC-ST-439. 日本臨床, 755 (増刊号) : 506-508, 1999
 47. 菅野康吉 : 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査 4—その数値をどう読むか—DNA 診断の適応となる病態・疾患および検査用試料とその保存法. 日本臨床, 755 (増刊号) : 651-654, 1999
 48. 菅野康吉 : 遺伝性非ポリポーシス性大腸癌の診断. 治療における新知見. G. I. リサーチ, 8:32-40, 2000
 49. 前川真人, 菅野康吉 : 癌の遺伝子診断, 形態診断との優位性(2), 遺伝子異常による癌発生と診断法. 臨床病理, 48(2):143-148, 2000
 50. 菅野康吉, 吉田輝彦, 児玉哲郎 : 遺伝性腫瘍症の臨床—診断, モニター, 治療—, 遺伝性腫瘍患者および家系構成員に対する遺伝カウンセリングの実際. 日本臨床, 58(6):86-93, 2000
 51. 木藤孝, 菅野康吉 : 技術講座 免疫, c-erbB-2 の測定と臨床病理学的意義. 検査と技術, 28(6):539-542, 2000

52. 菅野康吉：がんの遺伝カウンセリング．がん看護、5(6):495, 2000
53. 野村幸男, 谷口高広, 菅野康吉：遺伝子診断, 塩基配列決定法. 臨床検査, 44(12):1545-1551, 2000
54. 菅野康吉：癌遺伝カウンセリング．臨床消化器内科, 16(2):259-260, 2001
55. 菅野康吉：p53による癌の分子診断、実験医学（増刊）, 19(9):140(1176)-146(1182), 2001
56. 菅野康吉：Q&A 癌のスクリーニングとしての腫瘍マーカーの意義について教えてください．治療, 83(12):127-127, 2001
57. 藤田伸, 吉田輝彦, 菅野康吉, 赤須孝之, 森谷宜皓：親子で異なる表現型を示した Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (AFAP) の1家系．家族性腫瘍, 2(1):33-36, 2002
58. 菅野康吉：発症前遺伝子診断と遺伝カウンセリングー遺伝性腫瘍ー．ゲノム医学, (6):85-89, 2002
59. 菅野康吉：臨床検査におけるインフォームド・コンセントーがんのDNA診断と遺伝子診断ー．インフォームド・コンセントガイドンスーがん診療編ー, 森岡恭彦編, 先端医学社, 東京都, p120-127, 1999
60. 菅野康吉：腫瘍専門医の行う遺伝カウンセリング．家族性腫瘍遺伝カウンセリングー理論と実際ー, 金原出版, 東京都, p138-148, 2000
61. 菅野康吉：がんの遺伝相談．がん遺伝の生命倫理ー今何が、なぜ問題になるのか、その理念と現実ー, 財団法人 札幌がんセミナー, 札幌市, p6-15, 2000
62. 菅野康吉：網膜芽細胞腫の遺伝相談．眼科学大系 2001 2002 差し換え版, 中山書店, 東京都, p16-2 16-9, 2001
63. 大倉久直, 菅野康吉：シアリルルイス A グループの糖鎖抗原 (CA19-9, KM01, SPAN-1, DU-PAN-2)．臨床検査ガイド 2001-2002, 文光堂, 東京都, p936-940, 2001
64. 菅野康吉：癌遺伝子診断の実際と臨床的意義．腫瘍マーカーハンドブック, 医薬ジャーナル社, 大阪市, p207-219, 2001