

人肺癌特異抗原の研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8764

人肺癌特異抗原の研究

金沢大学大学院医学研究科外科学第一講座(主任: 岩 橋教授)

山 田 哲 司

(昭和54年1月13日受付)

悪性腫瘍細胞が特異的な抗原成分を持つか否かを明らかにすることは、腫瘍の診断と治療の上に重要な意義を持っている。実験動物癌の特異抗原の発見に続いて、人癌についても特異抗原の同定をめざして古くから多くの研究が行われ、 α -fetoprotein (AFP)¹⁾, carcinoembryonic antigen (CEA)²⁾³⁾, hepatoma ferritin⁴⁾⁵⁾などが発見されるに至り、肝癌あるいは大腸癌患者血中におけるそれらの存在が診断あるいは治療の指標となることは周知のことである。しかしこれらの抗原はいずれも正常人胎児組織にも分布する「腫瘍・胎児抗原」であって、真の意味における腫瘍特異抗原(Tumor specific antigen: TSA)ではなく、腫瘍結合抗原(Tumor-associated antigen: TAA)に属するものである。人の悪性腫瘍における TSA の存在を証明しようとする試みは、癌患者のリンパ球による colony inhibition test や cytotoxicity test あるいは患者血清による membrane immunofluorescence や gel diffusion などによって行なわれているが、これまで Burkitt リンパ腫⁶⁾, 黒色腫⁷⁾, 神経芽細胞腫⁸⁾など若干の腫瘍において成功しているにすぎない現状である。肺癌については、Oat cell carcinoma の形質膜に特異抗原の存在が見い出され(Bell⁹⁾), また肺胞上皮癌にも腫瘍抗原が見い出されているが、後者はウイルス起源で、ウイルス感染培養細胞や Hodgkin 氏病にも抗原の存在が認められている。肺腺癌、扁平上皮癌については両癌に共通し、少量は正常肺あるいは胎児肺にも存在するような比較的特異性の低い抗原が同定されているに過ぎない。

著者は細胞膜系組織特異抗原抽出法¹⁰⁾によって肺腺癌及び肺扁平上皮癌から得た抗原分画について免疫学的検討を行ない、両組織型癌に特異的な TSA の存在することを明らかにした。また抗原の精製・性状について知見を得たので、ここにその結果を報告する。

材料と方法

1. 組織材料

肺癌組織(腺癌6例: 中等度分化腺癌5例・低分化腺癌1例, 扁平上皮癌7例: 中等度分化扁平上皮癌4例・低分化扁平上皮癌3例)は手術時切除肺部分より採取した。組織の一部は病理検査用としてホルマリン固定し、残りを肉眼的に癌部分と非癌部分に分けて保存した。肺以外の癌材料は手術または剖検時に採取したものである。正常臓器は死后6時間以内の数例の非癌患者からのもので病変のないものを選んだ。食道粘膜、膀胱粘膜は上述患者の病変のない粘膜部分を粘膜下層から剥離して保存した。胎児臓器は6ヶ月の胎児数例から得た。材料はすべて抗原分画抽出時まで-20℃に保存した。

肺癌の抗原分画抽出は採取し1週以内に行った。

切除肺の癌部分と非癌部分の一部は間接蛍光抗体法のため-80℃で瞬間的に凍結し、以後使用時まで-80℃に保存した。Living cell membrane immunofluorescenceの実施には手術時切除した肺材料を直ちに使用した。

なお、CEA抽出の材料として大腸癌の肝転移巣(剖検材料)を使用した。

2. 抗原の作製

Smithらの方法¹⁰⁾の倉田・岡田変法^{11)~14)}に準じて不溶性リポタンパク画分を抽出した。即ち凍結組織を細切し、約2倍容量の溶液I(塩化カリウム11.93g/ℓ, モノヨード酢酸186mg/ℓ, クエン酸ナトリウム5g/ℓ)を加え、ユニバーサルホモジナイザー(日本精機)で約5分間ホモジナイズする。順にガーゼ1, 2, 4, 8枚を通し、濾液を10,000×G, 30分遠心して得た沈査に溶液II(塩化カリウム74.5g/ℓ, モノヨード酢酸186mg/ℓ, クエン酸ナトリウム10g/ℓ, pH

4.7)を約10倍容量加えテフロンホモジナイザーで約5分磨砕した後,上記同様に遠心して沈査を得る.溶液Ⅱによる磨砕,遠心を8回繰り返す,沈査(LP)を得る.LPは密閉容器に入れ-20℃に保存する.

LPの可溶性にはその湿量の約5倍量の0.2%デオキシコール酸ナトリウム溶液を加え,テフロンホモジナイザーで5分間磨砕した後,48時間冷室中(4~7℃)にてマグネチックスターで攪拌する.10,000×G,30分遠心して上清をとりわけ,沈査について再び同様な抽出操作を2回繰り返す.3回の抽出上清を集め,約10倍容量の冷アセトンを加え,-20℃で一夜放置する.生じた白色沈殿(LPsol)を2,000×G,10分遠心して集め,少量の蒸留水にとかして遠心し,上清をSephrose4B(2.5×40cm)のカラムでゲル濾過を行い,高分子分画(pass分画)と低分子分画(LPfr)とに分ける.

LPfr分画をpervaporation(透折用セルロースチューブに入れ冷室で気流中におく)によって濃縮し,蛋白濃度測定後,使用時まで-20℃に凍結保存した.抽出操作は約4℃で行なった.肺癌組織1g(湿量)あたり約1mg蛋白量のLPfrが得られた.

LPfrの量はLowry法¹⁵⁾による蛋白量で示した.以后肺腺癌のLPfrをALPfr,肺扁平上皮癌のLPfrをSLPfrと略称する.

胎児臓器は20%(w/v)生理食塩水ホモジネートを作製して抗原とした.

CEAはKrupeyの方法¹⁶⁾に従い粗標品を作り,CEA測定キット(Roche,U.S.A)により間接法で含有量を測定して使用した.

3. 肺癌特異抗原の分離(アフィニティクロマトグラフィー法)

岡田らの方法¹⁷⁾に従い,アフィニティクロマトグラフィーを用いる逆免疫吸収法により肺癌TSAの分離を行った.まず成人の正常肺,肝,腎,脾より上記と同様な方法で作った各LP(湿量各100mg,合計400mg)と正常人血清1mlにFreund complete adjuvant 1mlを加えて乳化し,ウサギ肩甲下腔に5回注射(毎週1回計4回注射後2週おいて1回注射)し,最終注射後7日目に全採血して抗血清を得る.抗血清に同量の生理食塩水を加え4℃以下で攪拌しながら,抗血清の2倍量の飽和硫酸溶液(pH7.2)を滴下し,30分後に遠心し沈査を集め,少量の生理食塩水にとかし,Sephadex G-100によるゲル濾過を行ってIgG画分をとる.

70gのSephrose4B懸濁液に,用時調製した3%ブロムシアン水溶液70mlを加え,攪拌しながら2N水

酸化ナトリウム液を滴下し,pH11~11.5に5分間維持した後,ガラスフィルター(粒子番号No.3)上に移し,2分以内に0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液2ℓ(pH8.2)を通して洗滌し,前記の1gG画分(700mg蛋白)を加え,24時間回転攪拌する.ゲルをガラスフィルター上におき,1M食塩加酢酸緩衝液(pH4.0)1ℓ,次に0.1M重炭酸ナトリウム溶液(pH8.2)1ℓによる洗滌を交互に5回行う.ゲルを後者の液に懸濁してカラム(1.5×40cm)につめ,IgG量の50分の1蛋白量の肺癌LPfrを負荷し,0.1M重炭酸ナトリウム液で溶出する.溶出液のピーク(O.D280μm)をめ,再度同一カラムへの負荷,溶出を2度繰り返す3度目の溶出液のピーク部分を集めて濃縮する.以上の操作はすべて冷室(4~7℃)内で行った.

4. 物理化学的分析方法

ディスク電気泳動:LPfrおよびアフィニティクロマトグラフィーによる精製画分について,10%ポリアクリルアミドゲル(pH8.9)による分析用ディスク電気泳動を行った.0.5×10cmのガラス管を用い,各管4mAで約1時間泳動し,1%アミド黒10B-7%酢酸液で30分間染色し,7%酢酸で脱色を行なった.

分子量測定:アフィニティクロマトグラフィーによる精製画分にダンシル蛍光標識を行い,SDSゲル電気泳動による分子量測定¹⁸⁾を行った.架橋比は1:37,15%及び7.5%アクリルアミド,0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2),0.2%SDSを使用した.0.3%ダンシルクロライド・アセトン溶液で試料のダンシル化を行った.0.5×10cmのガラス管を用い,管6mAで約6時間泳動し,360μmの紫外線下で移動距離を計り,分子量を計算した.標準試料は分子量標準蛋白質キット(SDS・ポリアクリルアミド電気泳動用)(Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, Germany)を用いた.

5. 抗血清の作製と免疫学的分析法

免疫方法:腺癌は7mg/ml,扁平上皮癌は,11mg/mlのLPfrの1mlにFreund complete adjuvant 1mlを加えて乳化し,健全成熟雄モルモット(体重400~500g)の肩甲下腔に4回注射(毎週1回計3回注射後,2週おいて1回注射)し,最終注射後7日目に心臓採血し,分離した血清を使用時まで-80℃に保存した.

抗血清の吸収:寒天板内吸収はBjörklundの法¹⁹⁾にしたがった.吸収抗原として肺,肝,腎,脾のLPfr,凍結乾燥人血清,CEA標品(純粋CEAにして4.3mg/ml),胎児生理食塩水20%(w/v)ホモジネートを用いた.試験管内吸収は抗血清1mlにつき,肺,肝,腎,脾のLP各100mg(湿量),凍結乾燥人血清20mg,

CEA 粗標品 (CEA として 1 mg) を加え磨碎后, 37 °C 1 時間静置后, 約 4 °C 1 夜ゆるく撈拌した后, 2,000 × G, 10 分遠心した上清に同様の吸収操作を更に 2 回繰り返して行った. 吸収に用いた正常肺 LP あるいは LPfr は免疫抗原を得た患者の非癌肺部分からのものを使用した.

ゲル内拡散法: 二重拡散法を用いた. 寒天板の厚さ 1.5 ~ 2.0 mm, 抗原・抗体孔の直径 8 mm, 孔の間隔 4 - 5 mm, 抗原は蛋白濃度 3 mg/ml 以上, 抗血清は稀釈せずに用いた. 4 °C 湿潤状態におき約 1 週間毎日観察を行った. プレートの一部は乾燥して, サイアジン赤による蛋白染色, スタン黒 B 及びオイル赤による脂肪染色, パラフェニールジアミン酸化法²⁰⁾とアルシャン青による糖染色を行った.

免疫電気泳動: 8 × 12 cm のガラス板上の厚さ 1.0 ~ 1.5 mm の寒天板に, 直径 3 mm の抗原孔を作り, 抗原を加えて 1.5 mA, 2 時間泳動后, 抗原孔より 4 mm の場所に抗血清を置き, 4 °C 湿潤状態におき約 1 週間毎日観察を行った.

間接蛍光抗体法: 64 倍稀釈の抗血清と Fluorescein 標識抗モルモット γ-globulin 兎血清 (Hoechst 社, Germany) を用い, 標本として未固定肺癌のクリオシユタット切片を使用した. 1 次, 2 次染色ともに室温 1 時間反応させた. 非特異染色防止には, Burtin らの方法²¹⁾を行った.

Living cell membrane immunofluorescence 法 (LCMI): Möller らの方法²²⁾の岡田らの変法²³⁾に従った. 切除直後の肺癌組織の薄片を 20 % 牛胎児血清を加えた Medium - 199 培養液 (CSM) 中でガラス板にはさんでつぶし, 30 × G, 3 分遠心して沈査を集めた. その 0.2 ml に 0.1 ml の吸収抗血清を加え, 37 °C 20 分間反応させた后, CSM による洗滌を 3 度行ない, 沈査に Fluorescein 標識抗モルモット γ-globulin 兎血清 (Hoechst 社, Germany) を 0.1 ml 加え, 37 °C 20 分間反応させた. CSM による洗滌を 2 度行ない, リン酸塩緩衝生理食塩水 (pH 7.2): グリセリン (1:1) で封入して検鏡した. FITC 干渉フィルターを装備した落射型蛍光顕微鏡 (BH - RFL, オリパス光学) を使用した.

成 績

1. 肺癌特異抗原の同定と分布

人肺腺癌 LPsol を Sepharose 4B カラムでゲル濾過した場合, 280 μm の吸収で得られる定型的溶出パターンは図 1 のようである. 肺扁平上皮癌の場合もほぼ同様なパターンが得られる (図 1). これらの LPfr

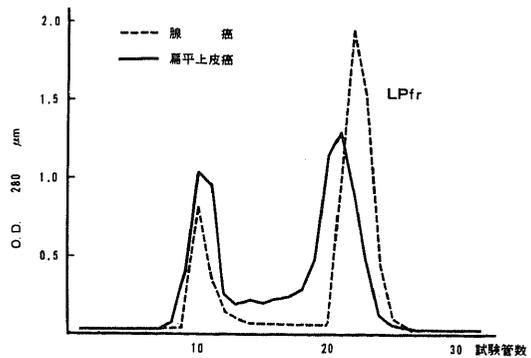


図 1 肺癌 (腺癌, 扁平上皮癌) LPsol の Sepharose 4B ゲル濾過パターン

添加 LPsol: 30 mg カラム 2.5 × 30 cm
 流速: 7 ml/時間 採取液量: 7 ml/試験管
 溶出液: 蒸留水

(ALPfr, SLPfr) に対するモルモット抗血清 (抗 ALPfr 及び抗 SLPfr) を用い, ゲル内二重拡散法を行うと, 抗 ALPfr は ALPfr は勿論, 肺 LPfr, 肝 LPfr, 腎 LPfr, 脾 LPfr, 人血清, CEA, 胎児臓器生理食塩水ホモジネートに対しても多数の沈降線を生じた. 抗 SLPfr も同様に上記抗原に対し多数の沈降線を生じた.

そこで上述のように肺, 肝, 腎, 脾の各 LP 及び人血清で吸収を行った抗 ALPfr を用い, 再度ゲル内二重拡散法を行うと ALPfr には強い 1 本と弱い 2 本の沈降線が生じたが, 肺 LPfr (同一個体の非癌部分) をはじめ他の正常臓器の LPfr と人血清には沈降線を生じなかった. CEA 標品に対しては沈降線が生じ, それは ALPfr に生じた弱い 1 本の沈降線と完全一致を示した. また吸収抗血清は胎児肺, 胎児腎, 胎児脾の生理食塩水ホモジネートに対し 1 本の弱い沈降線を, 胎児肝, 胎児腸管生理食塩水ホモジネートに対し 2 本の弱い沈降線を生じたが, これらは ALPfr に対して生じた弱い沈降線と完全一致を示した. 正常肺, 肝, 腎, 脾 LPfr 及び人血清で吸収を行った抗 SLPfr は SLPfr と 3 本の沈降線を生じ, 2 本の沈降線は CEA 及び胎児臓器生理食塩水ホモジネートに対する沈降線と完全一致した.

そこで CEA 標品 (純粋 CEA 1 mg), 胎児肝生理食塩水ホモジネート 0.5 ml で上記吸収抗 ALPfr, 抗 SLPfr を更に 3 度試験管内吸収し, 吸収前の血清量にまで濃縮したものについてゲル内二重拡散法を行った. それぞれの血清は ALPfr, SLPfr とのみ 1 本の沈

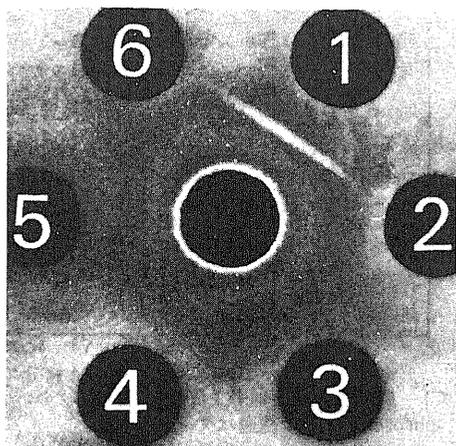


図2 吸収抗 ALPfr と正常臓器 LPfr とのゲル内二重拡散

中心孔：吸収抗 ALPfr

- 1 : ALPfr
- 2 : 肺 (自己肺) LPfr
- 3 : 肝 LPfr
- 4 : 腎 LPfr
- 5 : 脾 LPfr
- 6 : 正常人血清

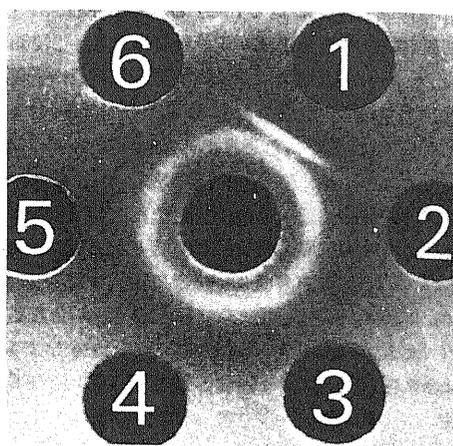


図4 吸収抗 ALPfr と胎児臓器生食ホモジネート (20%) とのゲル内二重拡散

中心孔：吸収抗 ALPfr

- 1 : ALPfr
- 2 : 胎児肺
- 3 : 胎児肝
- 4 : 胎児腎
- 5 : 胎児脾
- 6 : 胎児腸管

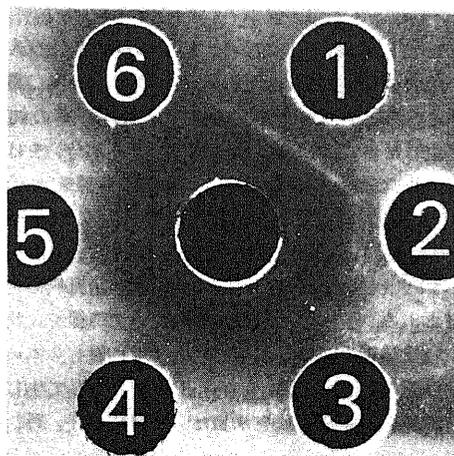


図3 吸収抗 SLPfr と正常臓器 LPfr とのゲル内二重拡散

中心孔：吸収抗 SLPfr

- 1 : SLPfr
- 2 : 肺 (自己肺) LPfr
- 3 : 肝 LPfr
- 4 : 腎 LPfr
- 5 : 脾 LPfr
- 6 : 正常人血清

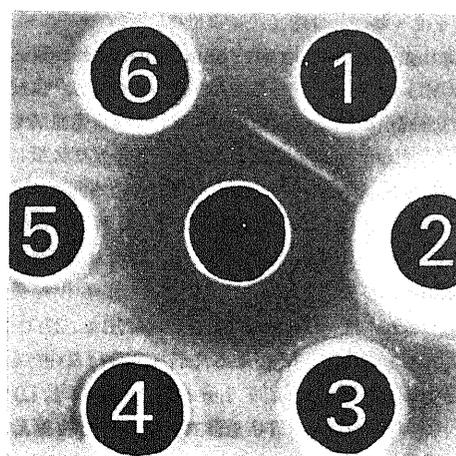


図5 吸収抗 SLPfr と胎児臓器生食ホモジネート (20 W/V) とのゲル内二重拡散

中心孔：吸収抗 SLPfr

- 1 : SLPfr
- 2 : 胎児肺
- 3 : 胎児肝
- 4 : 胎児腎
- 5 : 胎児脾
- 6 : 胎児腸管

降線（特異沈降線）を生じ他の正常臓器 LPfr, 胎児臓器生理食塩水ホモジネート及び CEA とは沈降線を生じなかった。（図 2, 図 3, 図 4, 図 5）。

この結果に従い、以後の実験では肺, 肝, 腎, 脾の LPfr, 胎児肝生理食塩水ホモジネート及び CEA 標品で吸収した抗 ALPfr 血清, 抗 SLPfr 血清(以下吸収抗 ALPfr, 吸収抗 SLPfr と略称する)を使用した。

正常肺 LPfr 100 mg/ml で寒天板内吸収を行った後, 吸収抗 ALPfr と ALPfr, 吸収抗 ALPfr と ALPfr, 吸収抗 SLPfr と SLPfr の反応を行ったが, 特異沈降線出現パターンには何等の変化もみられなかった。

表 1 吸収抗肺癌 LPfr 血清と正常人臓器 LPfr とのゲル内二重抗散*

	吸収抗ALPfr	吸収抗SLPfr		吸収抗ALPfr	吸収抗SLPfr
肺	—	—	胃	—	—
肝	—	—	小腸	—	—
腎	—	—	大腸	—	—
脾	—	—	膀胱**	—	—
脳	—	—	食道**	—	—
心	—	—	睾丸	—	—
甲状腺	—	—	筋肉	—	—
胸腺	—	—	前立腺	—	—

* LPfr 濃度は約 3mg/ml

** 粘膜層のみ

表 2 吸収抗肺癌 LPfr 血清と正常胎児（6ヶ月）臓器ホモジネート*とのゲル内二重抗散

	吸収抗ALPfr	吸収抗SLPfr
肺	—	—
肝	—	—
腎	—	—
脾	—	—
脳	—	—
胃	—	—
腸管	—	—
筋肉	—	—
副腎	—	—

* 20% (w/v) 生理食塩水ホモジネート

吸収抗 ALPfr, 吸収抗 SLPfr に対する各正常臓器 LPfr, 胎児臓器生理食塩水ホモジネートの反応を検査した結果は表 1, 2 のようである。それらはすべて沈降線を生じなかった。

吸収抗 ALPfr 及び吸収抗 SLPfr と各種人癌 LPfr との反応結果は表 3 である。吸収抗 ALPfr, 吸収抗 SLPfr とともに 11 種類, 20 例の他臓器癌 LPfr とは沈降線を生じなかった。

個体及び組織型の異なる肺癌 LPfr 間の反応を見ると、吸収抗 ALPfr は被検例 6 例全例の肺腺癌 LPfr と反応し、それらの沈降線は完全一致を示したが(図 6)、7 例の SLPfr, 2 例の肺大細胞癌, 3 例の肺小細胞癌の各 LPfr とは沈降線を生じなかった。吸収抗 SLPfr は被検 7 例全例の SLPfr と反応し、それらの沈降線は完全一致を示したが(図 7)、6 例の ALPfr, 2 例の肺大細胞癌 LPfr, 3 例の肺小細胞癌 LPfr とは沈降線を生じなかった。

吸収抗血清を用い、特異抗原の泳動度を調べた成績

表 3 吸収抗肺癌血清と各種悪性腫瘍 LPfr*とのゲル内拡散

	陽性数/試験例数	
	吸収抗ALPfr	吸収抗SLPfr
肺癌		
腺癌	6/6	0/6
扁平上皮癌	0/7	7/7
大細胞癌	0/2	0/2
小細胞癌	0/3	0/3
胃癌	0/3	0/2
大腸癌	0/5	0/3
膵癌	0/1	0/1
肝癌	0/1	0/1
腎上皮癌	0/4	0/5
子宮扁平上皮癌	0/1	0/1
卵巢腺癌	0/1	0/1
前立腺癌	0/1	0/1
横紋筋肉腫	0/1	0/1
平滑筋肉腫	0/1	0/1
淋巴肉腫	0/1	0/1
網内肉腫	0/1	0/1

* 悪性腫瘍 LPfr は約 3mg/ml

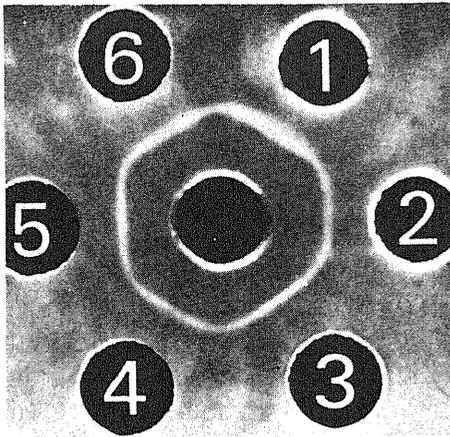


図6 肺癌（腺癌）各例の特異抗原の一致性
中心孔：吸収抗 ALPfr

- 1 : ALPfr-1 (mod. diff. adeno ca.)
- 2 : ALPfr-2 (mod. diff. adeno ca.)
- 3 : ALPfr-3 (mod. diff. adeno ca.)
- 4 : ALPfr-4 (mod. diff. adeno ca.)
- 5 : ALPfr-5 (mod. diff. adeno ca.)
- 6 : ALPfr-6 (por. diff. adeno ca.)

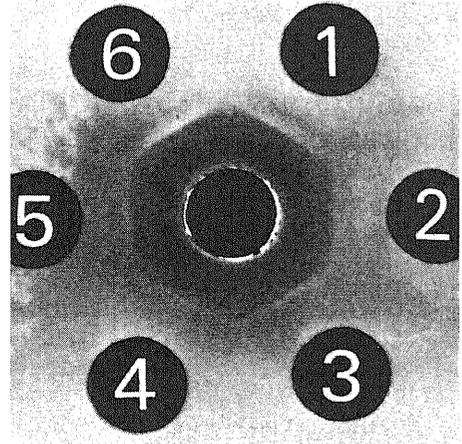


図7 肺癌（扁平上皮癌）各例の特異抗原の一致性
中心孔：吸収抗 SLPfr

- 1 : SLPfr-1 (poor. dif. sq. ca.)
- 2 : SLPfr-2 (poor. dif. sq. ca.)
- 3 : SLPfr-3 (poor. dif. sq. ca.)
- 4 : SLPfr-4 (mod. dif. sq. ca.)
- 5 : SLPfr-5 (mod. dif. sq. ca.)
- 6 : SLPfr-6 (mod. dif. sq. ca.)

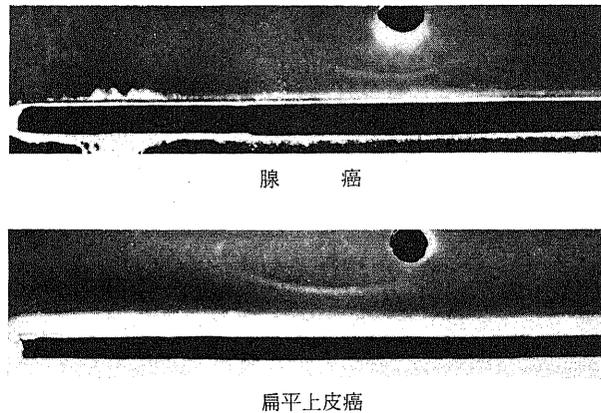


図8 肺腺癌（上）及び扁平上皮癌（下）の特異抗原の泳動度

は図8のようである。腺癌では β_2 領域に、扁平上皮癌では β_1 領域に1本の沈降線が認められる。

2. 抗原の生化学的分析

上述の特異沈降線を生じた寒天板を洗濯乾燥后、染色を行った。腺癌、扁平上皮癌のいずれの場合も沈降線は、糖、脂肪染色で染色されず、サイアジン赤のみで染色され、この抗原抗体反応にあずかる抗原には糖、脂肪が乏しいことが暗示された。そこで

ALPfr, SLPfrの1標品についてオルシン-硫酸法による糖定量を行ってみたが、ALPfrはFolin蛋白量値の約5%、SLPfrでは約7%の糖が検出されただけであった。

3. 血液型抗原、胎児抗原などとの関係.

ALPfr, SLPfrの1標品について抗A、抗B血液型判定用血清 (Ortho. Diagnostics Inc. U.S.A.) の1~10倍濃縮液、抗CRP血清 (日本凍結乾燥研究所, 日

本) と抗 Forssman 抗血清 (hemolysin)(DIFCO Laboratories, U.S.A. 及び極東製薬工業, 日本) 1 ~ 2 倍液との反応ではいずれにも沈降線は生じなかった。

ALPfr, SLPfr とともに抗 α - fetoprotein (Hoechst pharmaceuticals Inc. Germany) と沈降線を生じなかった。また、吸収抗 ALPfr, 吸収抗 SLPfr はともに CEA 粗標品 (CEA 濃度にして 10 mg / ml ~ 0.5 mg / ml) に対して沈降線を生じなかった。

ALPfr, SLPfr とともに抗人 Lactoferrin 抗血清 (Behringwerke AG, Marburg / Lahn, Germany) に対して沈降線を生じなかった。

4. 肺癌特異抗原の性質

ALPfr, SLPfr のアフィニティクロマトグラフィーの溶出パターンは図9のように単一ピークを示す。これらの精製画分が吸収用兔抗血清及び抗人全血ヤギ血清 (Oxford, Laboratories U.S.A.) とゲル内二重拡散法で沈降線を生じないことを確かめた後、10% アクリルアミドゲルディスク電気泳動を行ったところ両者とも1本のバンドを形成した (図10)。このバンド部分を切り出し、抗原孔に入れ抗 ALPfr, 抗 SLPfr とゲル内二重拡散法を行い、沈降線を生じることを確かめた。ついで特異抗原の分子量を測定するため、Pharmacia Columns PD - 10 (Pharmacia Fine Chemicals, U.S.A.) で精製 ALPfr, SLPfr を脱塩後、ダンシル化蛍光標識 SDS 電気泳動を行い、精製 ALPfr のバンドは 62,000 ~ 63,000 ダルトン、精製 SLPfr のバンドは 63,000 ~ 64,000 ダルトンであることを明らかにした。

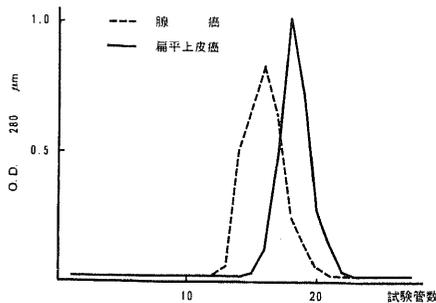


図9 肺癌 (腺癌, 扁平上皮癌) LPfr のブロムシアン Sepharose 4B によるアフィニティクロマトグラフィー溶出パターン

添加 LPfr : 10mg カラム : 1.5 × 45cm
 流速 : 4ml/時間 採取液量 : 4ml/試験管数
 温度 : 4℃ 溶出液 : BCS

5. 肺癌特異抗原の局在.

吸収抗 ALPfr による肺腺癌生細胞について living cell membrane immunofluorescence (LCMI) 法を行った結果は、腺癌細胞膜に陽性反応が認められ (図11), 同一個体の正常肺由来の細胞は陰性であった (図12). 吸収抗 SLPfr による扁平上皮癌生細胞の LCMI でも扁平上皮癌細胞膜の陽性反応が認められ (図13). 同一個体正常肺由来細胞は陰性であった。

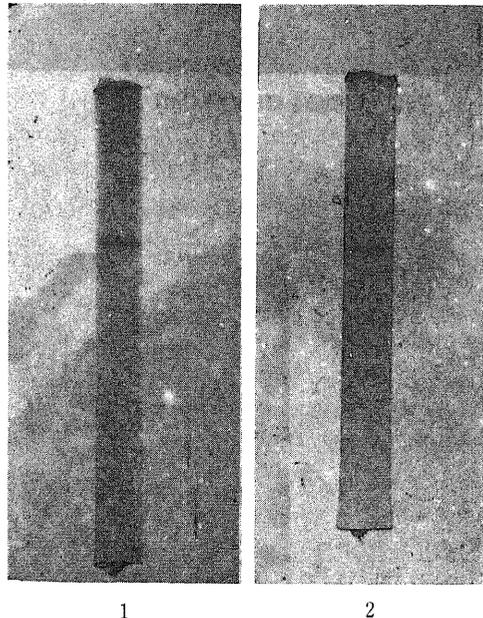


図10 アフィニティクロマトグラフィー後の精製 ALPfr(1), SLPfr(2) の10%アクリルアミドゲルディスク電気泳動

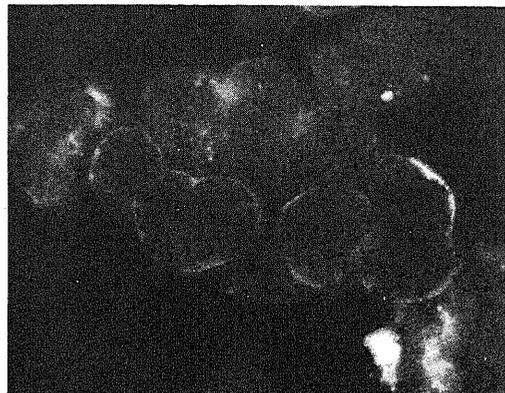


図11 肺腺癌生細胞による LCMI (細胞膜陽性)

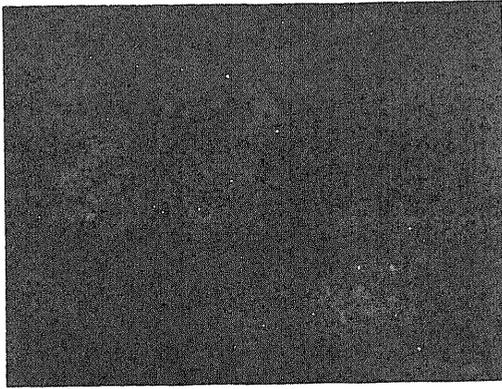


図12 対照肺生細胞の LCMI (陰性)

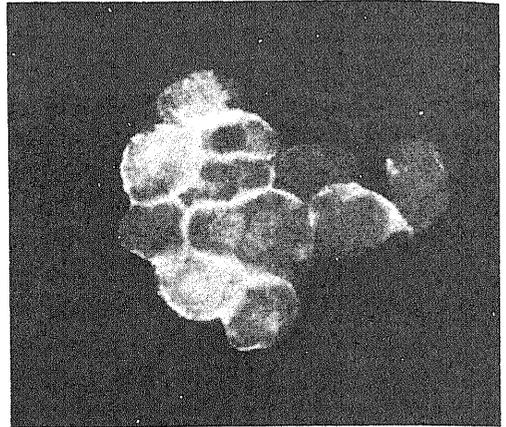


図13 肺扁平上皮癌生細胞による LCMI
(細胞膜陽性)

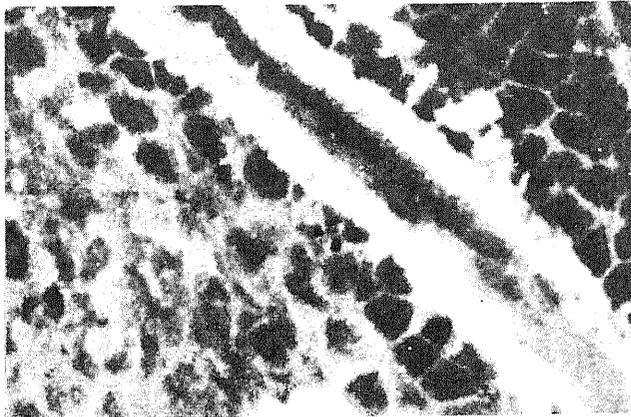


図14 肺腺癌切片の間接蛍光抗体染色

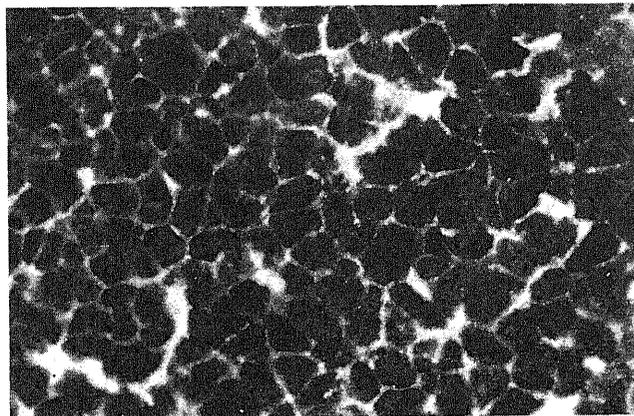


図15 肺扁平上皮癌切片の間接蛍光抗体染色

未固定クリオシュタット切片について吸収抗 ALPfr 及び、抗 SLPfr により間蛍光抗体法を行ったところでも癌細胞表面膜の染色が認められたが(図 14)、分化型扁平上皮癌細胞などにはびまん性の細胞染色のみみられることがあった(図 15)

考 察

人肺腺癌及び、人肺扁平上皮癌の細胞膜系不溶性画分を可溶性・部分精製して得た LPfr とそれに対する抗血清を用い、ゲル内拡散法による分析を行った結果、腺癌及び扁平上皮癌のそれぞれに少くとも 1 つの特異的な抗原があり、吸収実験によってそれは正常成人の重層扁平上皮や移行上皮を含む諸臓器あるいは肺を含む胎児諸臓器の抗原とは異なるものであることが示された。

それらはまた α -fetoprotein や CEA とは一致しないし、主な血液型抗原、Forssman 抗原、CRP 蛋白、あるいは lactoferrin とも交叉反応性がない。また大量の正常肺 LPfr で吸収を行っても、各特異沈降線のパターンには変化がおこらないことは、これらの抗原が正常肺抗原であって肺癌では単に増量しているに過ぎないという考えを否定する。

吸収抗 ALPfr、吸収抗 SLPfr は LPfr を作製した肺癌に付属している同一個体の正常肺部分から作製した LPfr ち沈降線を生じることがなかったし、同血清での LCMI 試験でも同一個体の肺癌部分のみが膜蛍光を示したことから、これらの特異抗原における組織適合抗原の介在は否定される。腺癌特異抗原は被検 6 例の腺癌全例に、扁平上皮癌特異抗原は被検 7 例の扁平上皮癌全例に証明された点もそれらの抗原が個体特異性の抗原であることを否定するであろう。

肺癌以外の種の人癌標品をしらべた結果では、これらの特異抗原の存在はどの癌にも全く認められなかった。以上のような成績は腺癌及び扁平上皮癌にはそれぞれ少くとも 1 つの癌特異抗原の存在することを示している。

ただし、この成績は主にゲル内拡散法という鋭敏度の低い方法の限界内の結論であるから、今后たとえば radioimmunoassay のようなより鋭敏な方法による追証が望ましい。

肺癌特異抗原を証明しようとした過去の研究では Bell が oat cell carcinoma の形質膜抗原が同癌特異抗原を持つことを示している³⁾が、腺癌または扁平上皮癌については Yachi²⁴⁾、Watson²⁵⁾、Frost²⁶⁾、Viza²⁷⁾、Kelly²⁸⁾、Veltri²⁹⁾、池田^{30)~32)}らが両者の癌に共通しているかあるいは正常肺、胎児肺及び、他の癌にも多

少分布する抗原を見だしている。

Viza は扁平上皮癌及び anaplastic な癌の膜画分をペパイン消化によって可溶化し、抗原分析を行って、それらの癌及び扁平上皮癌にも共通する腫瘍同腫抗原 "B1" を見だした²⁷⁾が、それぞれの癌に特異なものは発見していない。

Veltri らは扁平上皮癌の可溶画分及び膜画分不溶画分について分析を行ない、3 つの腫瘍同種抗原 TAA1, 2, 3 を発見し、TAA2 及び 3 が肺癌の可溶画分及び膜可溶画分に出現することを示した²⁹⁾が、これらも扁平上皮癌特異性はなく、肝癌にも出現し得ることを示した。なお TAA3 は lactoferrin と交叉反応性がある。

Yachi²⁴⁾、Watson²⁵⁾、Frost²⁶⁾、Bell³³⁾、Kelly²⁸⁾、池田^{30)~32)}らはいずれも肺癌の可溶画分について分析を行っているが、同定した抗原はいずれも肺癌各型に特異的ではなく、正常肺、胎児肺あるいは他臓器癌などにも分布しており、真の癌特異抗原を扱っているか否かに疑問がある。

肺癌には一般に CEA が豊富で、癌特異抗原の分析に際してはその混在を常に意識しなければならない。著者の用いた肺癌不溶画分(LP)標品にも全例 CEA は混在しており、その抗血清はすべて CEA と沈降線を作るので、特異抗原の分析には常に CEA による吸収を行った抗血清を使用しなければならなかったことからみて、上記諸研究においてその点の考慮がなかったことが、十分な特異性の発見に至らなかった原因ではないかと考えられる。

著者の得た腺癌、扁平上皮癌の特異抗原はゲル内拡散法による特異沈降線が糖染色や脂肪染色陰性であることからみて、蛋白質性の抗原であり、蛍光抗体法特に LCMI 試験の成績からみて、膜抗原であると考えられる。SDS ディスク電気泳動による結果では分子量が 62,000 ~ 64,000 ダルトンと計算され、この点でも CEA とは異っている。

著者の方法と同一の方法によって得られた人 Wilms 腫瘍画分に見つけられている約 60,000 ダルトンの主特異抗原の分子量³⁴⁾に近い。同一方法による正常組織特異抗原の分子量はいずれも約 47,000 ダルトンであるから^{35)~37)}、悪性腫瘍化に伴い細胞膜蛋白に変異が起ったものと考えられよう。免疫電気泳動によると、正常組織特異抗原は α_2 の泳動度を示す^{36)~38)}が、Wilms 腫瘍特異抗原は γ より (-) 極へ¹⁷⁾、移行上皮癌特異抗原は $\beta_2 - \gamma$ ³⁹⁾、腎上皮癌特異抗原は β_2 の泳動度を示すという。著者の腫瘍特異抗原は β_2 、扁平上皮癌特異抗原は β_1 の泳動度を示しており、共に癌化に伴

う特異抗原膜蛋白の (+) 荷電上昇を示すデータである。

肺癌特異抗原の精製は、共通抗原に対する異種抗血清をブロムシアン Sepharose 4B に結合させ、そのカラムに抗原画分を通す「アフィニティクロマトグラフィーによる逆免疫吸収」を行えば可能であることを示したが、この場合大量の吸収用抗血清が必要なこと、収量が必ずしも良くないために大量の抗原画分が必要なことなどの欠点があるので、今後一層の改良が望ましい。特異抗原の精製が容易に行なえるようになれば、それによって作った特異抗血清による患者血中抗原の追跡、あるいは特異抗原を認識させた異種動物の immune RNA, あるいは transfer factor による肺癌特異免疫療法の展望が開けるであろう。現在、著者は肺癌患者血中の特異抗原の存在を予備実験で認めているが、その詳細は今后報告する予定でいる。

結 論

外科手術によって得た肺腺癌 6 例、肺扁平上皮癌 7 例について抗原分析を行って以下の結果を得た。

1. 各癌の不溶性画分をデスオキシコール酸で可溶化し、ゲル濾過で 1 分画 (LPfr) を得た。肺腺癌 LPfr 及び肺扁平上皮癌 LPfr に対する各モルモット抗血清を作製した。これらの抗血清について適当な吸収操作を行い、monospecific な抗血清を得た。吸収抗肺腺癌 LPfr 抗血清は肺腺癌に特異的な一抗原、吸収抗肺扁平上皮癌 LPfr 抗血清は肺扁平上皮癌に特異的な一抗原の存在をゲル内二重拡散法で示した。それぞれの抗原は正常人諸臓器、胎児諸臓器、各種癌には存在が認められなかった。

2. 肺腺癌特異抗原及び肺扁平上皮癌特異抗原は α - fetoprotein, CEA, forssman 抗原, CRP 蛋白, 血液型抗原, Lactoferrin, 組織適合抗原とは無関係であった。

3. 免疫電気泳動で、腺癌特異抗原は β_2 , 扁平上皮癌特異抗原は β_1 領域への泳動度を示した。

4. 共通抗原に対する異種抗血清を結合した Sepharose 4B カラムに抗原画分を通す「逆免疫吸収アフィニティクロマトグラフィー」で精製抗原画分を作製した。ダンシル化 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で腺癌特異抗原も扁平上皮癌特異抗原も分子量が 62,000 ~ 64,000 ダルトンであることを認めた。

5. 蛍光抗体法特に living cell membrane immunofluorescence 法で特異抗原はいずれも細胞膜抗原であることが示された。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師岩 喬教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を頂いた金沢大学がん研病態生理部倉田自章教授、岡田収司助教授、病理検査に御教示いただいた富山医科薬科大学病理学北川正信教授に心から感謝致します。併せて本研究遂行に際し御協力いただいた渡辺洋字博士、本学第 1 外科諸兄およびがん研病態生理部諸兄に感謝致します。

文 献

- 1) Abelev, G.I., Perova, S.D., Khramkova, Z.A. & Irlin, S.I. : Production of embryonal α - globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplantation, 1, 174 - 180 (1963)
- 2) Gold, P. & Freedman, S.O. : Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med., 121, 439 - 462 (1965)
- 3) Gold, P. & Freedman, S. O. : Specific carcino-embryonic antigens of the human digestive system. J. Exp. Med., 122, 467 - 481 (1965)
- 4) Alpert, E., Coston, R.L., & Drysdale, J.W. : Carcino-foetal human liver ferritins. Nature, 242, 194 - 196 (1973).
- 5) Drysdale, J.W. & Alpert, E. : Carcinofoetal human isoferritins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 259, 427 - 434 (1975).
- 6) Klein, G., Clifford, P., Klein, E. & Stjernswärd, J. : Search for tumor specific immune reactions in Bürkit lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. Proc. Nat. Acad. Sci., 55, 1628 - 1635 (1966).
- 7) de Vries, J.E., Rümke, P. & Bernheim, J.L. : Cytotoxic lymphocytes in melanoma patients. Int. J. Cancer, 9, 567 - 576 (1972).
- 8) Hellström, I.E., Hellstrom, K.E., Pierce, G.E. & Bill, A.H. : Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1231 - 1238 (1968).
- 9) Bell, C.E. & Seetharam, S. : A plasma membrane antigen highly associated with Oat-cell carcinoma of the lung and undetectable in normal adult tissue. Int. J. Cancer, 18, 605 - 611 (1976).
- 10) Smith, J.T., Funckes, A.J., Barak, A.J. & Thomas, L.E. : Cellular lipoproteins 1. The

- insoluble lipoprotein of whole liver cells. *Exp. Cell Research*, **13**, 96-102 (1957).
- 11) Kurata, Y. & Okada, S. : Immunological studies of insoluble lipoproteins. 1. Autigen analysis of thyroid lipoproteins. *Int. Arch. Allergy*, **29**, 495-509 (1966).
- 12) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y. : Immunological studies of insoluble lipoproteins. 2. Oh the salivary gland-characteristic antigens. *Int. Arch. Allergy*, **35**, 392-401 (1969).
- 13) Okada, S., Kurata, Y., Konishi, K. & Matsuda, T. : Immunological studies of insoluble lipoproteins. 3. Characterization of the lipoprotein-bound thyroid gland-specific antigen. *Int. Arch. Allergy*, **39**, 6-15 (1970).
- 14) 倉田自章・岡田収司：組織特異抗原の抽出法，免疫実験操作法 A（日本免疫学会編），390-393頁，金沢，日本免疫学会（1971）。
- 15) Lowry, O.H. & Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 16) Krupcy, J., Wilson, T., Freedman, S.O. & Gold, P. : The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry*, **9**, 617-622 (1972).
- 17) Axen, R., Porath, J. & Ernback, S. : Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, **214**, 1302-1304 (1967).
- 18) Talbot, D. N. & Yphantis, D. A. : Fluorescent monitoring of SDS gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **44**, 246-253 (1971).
- 19) Björklund, B. : Antigenicity of malignant and normal human tissues by gel diffusion techniques. *Int. Arch. Allergy*, **8**, 179-192 (1956).
- 20) Grabal, P. : Immuno-electrophoretic analysis. In *Methods of Biochemical Analysis* (Edited by Glick, P.), Vol. 7., Pl. New York, John Wiley & Sons (1959).
- 21) Burtin, P. & Sabine, M.C. : Inhibition of the non-specific fixation of fluorescent globulins. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.*, **17**, 76-77 (1972).
- 22) Möller, G. : Demonstration of mouse isoantigens at the cellular level by the fluorescent antibody technique. *J. Exp. Med.*, **114**, 415-434 (1961).
- 23) Okada, S., Inaba, F., Kurata, Y. & Katsumi, T. : (unpublished)
- 24) Yachi, A., Matsuura, Y., Carpenter, C.M. & Hyle, L. : Immunochemical studies on human lung cancer antigens soluble in 50% saturated ammonium sulfate. *J. Nat. Cancer Inst.*, **40**, 663-682 (1968).
- 25) Watson, R.D., Smith, A.G. & Levy, J.G. : The detection by immunodiffusion of tumor-associated antigenic components in extracts of human bronchogenic carcinoma. *Br. J. Cancer*, **32**, 300-309 (1975).
- 26) Frost, M.J., Rogers, G.J. & Bagshawe, K.D. : Extraction and preliminary characterization of a human bronchogenic carcinoma antigen. *Br. J. Cancer*, **31**, 379-386 (1975).
- 27) Viza, D., Louvier, M., Phillips, J., Boucheix, Cl. & Guerin, R.A. : Solubilization of an antigen associated with certain bronchial tumors. *Europ. J. Cancer*, **11**, 765-770 (1975).
- 28) Kelly, A. & Levy, J.G. : Evidence for a common tumor-associated antigen in extracts of human bronchogenic carcinoma. *Br. J. Cancer*, **35**, 828-833 (1977).
- 29) Veltri, R. W., Mongoli, F. M., Maxim, P. E., Westfall, S., GoPo, J.M., Huang, C. & Sprinkle, P.M. : Isolation and identification of human lung tumor-associated antigens. *Cancer Res.*, **37**, 1313-1322 (1977).
- 30) 池田貞雄・岡田慶夫：肺癌における腫瘍免疫の検索，日本癌学会総会記事，**29**, 124 (1970)。
- 31) 池田貞雄・岡田慶夫：肺癌組織中の腫瘍特異抗原の検索ならびに蛍光抗体染色によるその肝臓内分布，日本癌学会総会記事，**30**, 122 (1971)。
- 32) 池田貞雄・松原義人・岡田慶夫：肺癌組織中の腫瘍特異抗原の検索，2 酵素抗体法による抗原の局在部位の検討，日本癌学会総会記事，**31**, 204 (1972)。
- 33) Bell, C.E. Jr. : A normal adult and fetal lung antigen present at different quantitative levels in different histologic type of human lung cancer. *Cancer*, **37**, 706-713 (1976)
- 34) 岡田収司・倉田自章：人腎癌の腫瘍特異抗原につ

いて, 日本癌学会総会記事, 35, 156 (1976).

35) **Okada, S.** : Studies on tissue-specific antigens and cellular membranes. Acta. Path. Jap., 23, 249-251 (1973).

36) 神本正憲: 細胞膜系副腎特異抗原の分離・精製とその性質に関する研究, 十全医会誌, 84, 1 ~ 15 (1975).

3) 郷倉満: 辜丸の細胞膜系組織特異抗原について, 十全医会誌, 83, 268 - 273 (1974).

38) 小西奎子: 肝の細胞膜系組織特異抗原について, 臨床免疫, 3, 345 - 403 (1971).

39) **Okada, S., Kitagawa, K., Kadoya, M. & Kurata, Y.** : (unpublished).

Studies on specific antigens of human lung cancer. Tetsuji Yamada, First Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. J. J. Z.*, 88, 155-167 (1979).

Abstract

Guinea pig antisera were prepared against the fractions (LPfr) made from insoluble fractions of human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. The antisera were tested by immunodiffusion against LPfr from normal adult organs, fetal organ homogenates, and LPfr of a variety of other cancers. After suitable absorption, the anti-adenocarcinoma LPfr sera and anti-squamous cell carcinoma LPfr sera were found to be reactive only with fractions of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. These antigens were found to be distinct from carcinoembryonic antigen, alpha-fetoprotein, blood group-specific antigens, Forssman antigen, and histocompatibility antigens. When tested by viable cell membrane immunofluorescence, these antigens were found to be localized in the cell membranes of tumor cells. Thus it seems that at least one adenocarcinoma-specific antigen and one squamous cell carcinoma-specific antigen exist in human lung cancers.