

Sr89発現骨肉腫の細胞膜腫瘍特異抗原について

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/2297/8706

Sr⁸⁹発現骨肉腫の細胞膜腫瘍特異抗原について

金沢大学医学部整形外科教室 (主任: 野村 進教授)

船 木 清 忠

(昭和53年2月6日受付)

悪性腫瘍細胞の腫瘍特異抗原 (tumor specific antigen, TSA) とそれに対する生体の免疫応答に関する研究は、近年、著しく増加しており、実験腫瘍についても、人体腫瘍についても検討が行われている。がんの免疫学的な診断及び治療を考える上でも、第一の問題点が、がん細胞の腫瘍特異抗原性であるからである。しかし、従来、腫瘍特異抗原と呼ばれて来たものは、必ずしも単一なものではなく、腫瘍特異移植抗原・ウィルス抗原・胎児抗原・正常細胞抗原・分化抗原などを含んだ抗原群であることが明らかになり、それぞれの抗原が、別個に分析される様になった。腫瘍特異抗原は、多くが腫瘍特異性表面抗原として見出され、抗原物質の精製や性状の分析も、一部は行われているが、まだ未知の点が多い。実験動物腫瘍については、一般に、化学的及び物理的刺激による腫瘍は、ウィルス性腫瘍に比して抗原性が弱く、特異抗原の存在は同定されつつあるが、抗原の精製・分析に関する実験は2, 3の化学発がん剤による腫瘍について試みられているだけで^{1)~5)}、物理的刺激により誘発された腫瘍については、殆んど行われていない。著者は、教室で継代移植されている Sr⁸⁹ 発現マウス骨肉腫⁶⁾ について、腫瘍特異抗原の同定・部分精製を行った。同腫瘍については、真鍋⁷⁾ や加藤⁸⁾ が、ミトコンドリア・ミクロソーム・上清分画に分布する特異抗原を同定し、抗原の部分精製を行っているが、著者は、更に、腫瘍細胞表面抗原としての特異抗原の有無と、特異性の検討を行い、抗原の性質についても、一、二の知見を得たので、その結果を報告する。

実験材料と方法

1) 抗原材料

生後3~4週目の ddN 系雄マウス (体重約20g) を使用し、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫を作製した。即ち、Sr⁸⁹Cl を体重1g 当り 0.3μCi あて週2回、5週連続、計10回

にわたり、腹腔内に注射した (真鍋の方法⁹⁾)。Sr⁸⁹ 投与開始後9ヶ月より15ヶ月にわたり、約20%の発生率で、管状骨の metaphysis に、母指頭大の骨肉腫の発生を見た。これを初代腫瘍とし、無菌的に剔出して、その腫瘍の一部を、同じく生後3~4週 ddN 系雄マウスの左大腿骨々髓内に移植した。なお、移植に先立ち、被移植マウスに対する前処置として、移植4日前にマウス1匹当り X線 100r 照射、移植前日に cortisone acetate 2.5mg の皮下注射を行った。移植後2~3週で腫瘍は触知可能となるが、4~5週で母指頭大となった時に、上記と同様の操作で、次のマウスに移植した。移植率は70~80%であり、7~8週で腫瘍死する。長期継代移植し得たマウスの Sr⁸⁹ 発現骨肉腫1系統のうち、154代から158代までの骨肉腫 (合計湿重量約100g) をプールして、摘出腫瘍は壊死部を出来るだけ除去し、使用時まで -20°C に保存し、本実験材料として使用した。また、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の154代及び156代の腫瘍を、20% calf serum-Medium 199 の培養液で primary cultured cell として、約48時間後に実験に供した。

2) 対照細胞

吸収用の材料として正常 ddN 雄マウスの諸臓器及び同系マウスの胎児を使用した。また蛍光抗体用の対照細胞として、同系雄マウスの脳・心・肺・肝・腎・睪丸・大腿骨々髓及び20匹の同マウス脾臓の未固定クリオスタット切片及び塗抹標本を使用した。対照の腫瘍細胞としては、マウス腫瘍の L1210 (金大がん研化学療法部)、S-180 (金大がん研化学療法部)、Ehrlich がん (金大がん研化学療法部)、SC-42 (塩野義研究所)、NF 肉腫 (塩野義研究所) の各細胞、ラット腹水腫瘍の AH7974 (佐々木研究所) 及び AH13 (佐々木研究所)、ヒト由来腫瘍の OST 細胞 (ヒト骨肉腫由来培養細胞、金大整形外科) の新鮮塗抹標本を使用した。

A Tumor-Specific Antigen in Sr⁸⁹-induced Osteogenic Sarcoma of Mice. Funaki Kiyotada, Department of Orthopedic Surgery (Director: Prof. S. Nomura), School of Medicine, Kanazawa University.

3) 抗原分画の作製

Sr⁸⁹ 発現骨肉腫膜成分の抽出法は、まず、不溶性リポ蛋白分画を、Smith ら⁹⁾ の方法に準じた倉田・岡田ら^{10)~13)} の方法によって作製した。凍結保存の腫瘍塊を融解後細切し、得られた量の約3倍容量の Solution I を加え、ユニバーサルホモジナイザー（日本精機）でホモジネートとし、ガーゼ2・4・8枚を順に通してから、遠心して沈渣を集めた。次に、再度同量の Solution I を加え、テフロンホモジナイザーに約5分かけ、遠心した。その沈渣に Solution II を加え、テフロンホモジナイザーで約5分間磨砕した後、遠心して沈渣を得た。Solution II による磨砕と遠心を、さらに7回くりかえして、沈渣“LP”を得た。全操作は、0~4℃で行った。遠心は、すべて冷凍遠心器により、10000×g・30分行った。次に、この不溶分画“LP”を、倉田・岡田法¹³⁾ によって可溶化した。即ち、得られた湿重量約10gのLPに、0.2% デスオキシコール酸ソーダ (Difco) 溶液を約30ml 加え、ホモジナイズした後、1昼夜冷室で、マグネチックスターラーを用い、急速にしかも泡立てないように攪拌した。10000×g・20分冷遠心して上清を集め、その沈渣を、デスオキシコール酸溶液による同様な抽出操作で処理した。抽出操作は3回行い、3回の抽出上清を合せ、約10倍容量の冷アセトンを加え、1昼夜-20℃の冷室で放置した。生じた沈澱を、低速冷却遠心で集め、少量の蒸留水に溶かし、“LPsol”を得た。ついで、セファローズ 4B によるゲル濾過を行い、第2のピーク (retain する分画“LPfr”) を得た。

3) 抗血清の作製

プールの LPfr を pervaporation (セロファンチューブに入れ、冷室で気流中におく) によって濃縮し、10mg 蛋白/ml 溶液とし、免疫抗原とした。その抗原溶液に、同容量の Freund¹⁴⁾ の完全アジュバンド(パラフィン油 8.5 ml, Arlacel A 1.5 ml, BCG 乾燥死菌 10mg) を加えてエルクジョンとし、1回につきその2ml を健康成熟モルモット (ハートレイ系、体重 400~500g) の肩甲下腔に注射した。2週間隔、4回注射し、最終注射後7日目に心臓採血して、血清を分離し、使用するまで-20℃で保存した。なお、蛋白定量は、Lowry 法¹⁵⁾ の方法によった。

4) 吸収抗血清グロブリンの作製

0℃付近で、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LPfr の抗モルモット血清と等量の生理食塩水、ついで飽和硫酸溶液を加え、マグネチックスターラーで約30分攪拌した後、1500×g で30分低温遠心し、その沈渣を、はじめの抗血清量と等量の生理食塩水に溶かし、冷室で生理食塩水に

対して、1昼夜透析した。ついで透析したグロブリン液 20 ml に対し、ddN 系正常マウス脾・肝・肺・心・腎・大腿骨髄 10 匹分及び同マウス胎児 3 匹の生理食塩水ホモジネート (20% ホモジネート) を約 20 ml 加え、室温 1 時間放置後、4℃で1夜置いた後、遠心上清をとり、同様吸収操作をさらに3回くりかえした。4回吸収終了後、上清をセファデックス G-100 のカラムに通して得られた pass 分画をプールして、吸収抗体グロブリン分画 (Ig-abs) とした。

5) 寒天内二重免疫拡散法

Ouchterlony 法¹⁶⁾¹⁷⁾ によった。透析精製した 4% 寒天ブロック 15g、0.01% EDTA を含む 0.1N リン酸緩衝液 (pH7.2) 15 ml、1N NaNO₃ 3 ml、蒸留水 2 ml を加え、全量 30 ml とし、加温溶解し、8×12cm のガラス板上にこの混合液 15 ml を流し、冷却固化させ、厚さ約 2mm の寒天板をつくり使用した。4℃の湿潤状態で抗血清及び吸収抗血清と正常臓器ホモジネートを反応させ、連日観察し、沈降線が出そろった時、写真撮影を行った。

6) 免疫電気泳動法

1% Agarose (BIO・RAD Laboratories, Calfo., USA) による電気泳動法を行った。緩衝液は Veronal 緩衝液 (pH8.3, $\mu = 0.05$) を用い、2mA/cm の定電流のもとに、抗原孔に Sr⁸⁹ 発現骨肉腫膜成分 LPfr を入れ 90 分間泳動した。泳動後、すみやかに抗体溝に抗 LPfr モルモット血清を入れ、4℃湿潤状態で反応させ、48 時間後判定を行った。

7) ディスク電気泳動法

LPfr 標品について、7.5% 及び 15% のポリアクリルアミドゲルによる分析用ディスク電気泳動を行った。各管 4mA で約 1 時間泳動し、7% 酢酸で 10 分間固定後、1% アミド黒 10B・7% 酢酸液で 30 分間染色し、ついで 7% 酢酸で脱色を行った。

8) 分子量測定法

Davison 法¹⁸⁾ によるセファローズ 6B ゲル濾過で、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LPfr 2 の分子量測定を行った。標準試料として、非酵素分子量マーカーキット (Schwarz/Mann, Division of Becton Dickinson and Co., Orangeburg, N. Y. USA) を使用した。

9) 蛍光抗体法

ddN 系雄マウス正常臓器、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の腫瘍塊は、-80℃で凍結し、未固定クリオスタット切片を作製した。また同マウス正常骨髄や脾臓、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫、その他の実験腫瘍の塗抹標本 (冷アセトン 3 分固定) を使用した。原血清の 16 倍稀釈に相当する Ig-abs (約 0.1mg 蛋白/ml) を標本上に乗せ、37℃の湿潤状

態で60分間反応させて、staining bufferで洗浄後、Burtinら¹⁹⁾の方法に従い、非特異染色の防止操作を行った。即ち、正確に1分間1%亜硝酸ソーダ・2%酢酸液に浸し、3%酢酸液で1分間洗浄後、staining bufferで十分に酢酸を除去し、Fluorescein 標識抗モルモット Ig G 免血清(医学生物学研究所,名古屋)で、室温60分間反応させた。staining bufferで充分洗浄後、グリセリン緩衝液で封入し、FITC 干涉フィルターを装備した落射型蛍光顕微鏡(BH-RFL, オリンパス光学)で観察した。なお、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫生細胞についての蛍光抗体染色法は、野本の紹介した方法²⁰⁾²¹⁾に準じて行った。

10) 組織学的検索

組織学的検索には、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫を、10%ホルマリン固定、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って鏡検した。

実験結果

1) Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の形態

著者が使用した Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の継代移植 154 代から 158 代までのレ線所見及び形態学的所見は、以下の如くである。

レ線所見では、大腿骨移植部骨梁は不規則で一部破壊消失があり、骨硬化像が同時に混在し、時として虫喰い状変化を来しているものもあった。この部を中心に骨形成を伴わない腫瘍が周囲に増殖していた。時々、骨新生を伴う腫瘍もあるが、骨形成性肉腫に見られる所謂 spicula は認められなかった。この様な所見が、154 代から 158 代までほぼ共通して見られた(図 1)。

肉眼的所見では、移植後約 4 週目で、腫瘍は母指頭大から小指頭大で、被膜につつまれ弾性軟であった。周囲への浸潤は認められず、容易に摘出出来た。腫瘍断面は、大部分桃白色の腫瘍部分からなり、中心部は壊死に陥り、所々に出血部分が認められた。

組織学的には、中心部壊死層を除いた腫瘍組織は、全体に一樣な腫瘍細胞が密に配列し、その腫瘍細胞は大部分が紡錘形で、一部、円形細胞、多核巨細胞を含む異型細胞も認められた。核は大小不同で、紡錘形、円形、楕円形等の形をとり、クロマチンに富み、しばしば核分裂があった(図 2)。

2) 抗原分画 LPfr の免疫学的分析

Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の不溶分画(LP)を、デスオキシコール酸処理で可溶化したもの(LP sol)についてセファローズ 4B ゲル濾過を行うと図 3 のようなパターンが得られる。このパターンは、正常臓器 LP sol のゲル

濾過パターンと良く一致している。この LPfr について、抗 LPfr モルモット血清を用い、ゲル内二重拡散法を行うと 4~5 本の沈降線が生じる(図 4)。その多くは、肝・脾・腎との共通の沈降線である。ついで、Ig-abs を正常臓器及び Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の LPfr と反応させると、LPfr との間にやや broad ではあるが、1 本の沈降線のみが残った(図 5)。免疫電気泳動を行うと、特異沈降線は、 β_2 グロブリン領域の 1 本のアークとして認められた(図 6)。しかし、ゲル内拡散法は一般に感度が低く、特異抗原分布の検索上有利ではない。そこで、吸収抗体を用い、蛍光抗体法による検索を行った。Ig-abs による間接蛍光抗体法を行った結果は表 1. の如くである。Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の腫瘍細胞は、クリオスタット切片でも、塗抹標本でも、あるいは同腫瘍の培養細胞でも、常に細胞質に強いびまん性染色が認められ、核は陰性であった(図 8, 9, 11)。一方、正常臓器の各細胞は、細胞質・核ともまったく蛍光を示さなかった(図 7a)。更に 20 匹の正常 ddN 雄マウスの脾臓の塗抹標本を検索した結果、全例陰性であった(図 7b)。

3) LPfr の物理化学的分析

Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LPfr のディスク電気泳動のポリアクリルアミドゲル 7.5% では、buffer front に近い 1 本の強いバンドと、遅い 4~5 本の微弱なバンドが生じた。15%ゲルでは、2 本の強いバンド及び多数の微

表 1 正常細胞及び各種腫瘍細胞の Ig-abs による間接蛍光法

分類	被検細胞	染色成績	付図番号
正常組織	脳, 心, 肺, 肝, 脾, 腎, 睾丸, 骨髄	(-)	7 a, b
腫瘍細胞	Sr ⁸⁹ 発現骨肉腫	(+)	8, 9, 10,
	Sr ⁸⁹ 発現骨肉腫培養細胞	(+)	11
	L 1210	(-)	12
	S-180	(-)	13
	Ehrlich がん	(-)	14
	S-C 42	(-)	15
	NF 肉腫	(-)	16
ラット腫瘍	AH 7974	(-)	17
	AH 13	(-)	18
	ヒト腫瘍	OST 培養細胞	(-)

弱なバンドが生じた(図20)。ついで、Davison¹⁸⁾に従い、4M塩酸グアニジン存在下におけるセファローズ6Bゲル濾過による分子量測定を行った。図21のような溶出曲線を得た3つのピークは、それぞれ分子量48000、120000、220000に相当した。

考 察

腫瘍の特異性に関与する多くの抗原は、細胞表面抗原として存在している。これらの中、マウスの主要組織適合抗原H-2や、ヒトの主要組織適合抗原HLAなど、量的に多い抗原については、抗原の分離・精製がかなりの段階まで進められているが、量的に少ない腫瘍抗原を、その生物活性を損うことなく分離・精製する研究は、まだその緒についたばかりである。現在までに用いられた分離法には、Aizawaら²²⁾による生理的濃度の塩類による抽出・超遠心分離法、Shimadaら²³⁾による蛋白分解酵素(パパイン等)での不溶性膜分画の消化法、Kahanら²⁴⁾による音波破砕法sonication、Meltzerら²⁵⁾による3M KCl抽出法、Bystryrら⁵⁾やIrieら²⁶⁾による界面活性剤での可溶化法等がある。動物腫瘍(化学発がん腫瘍や自発腫瘍)については、これらの方法を組合せて腫瘍特異抗原の抽出が試みられているが、これらの方法で分離された抗原は、腫瘍関連移植抗原(tumor associated transplantation antigens, TATA)としての活性が調べられてはいるが、狭義の腫瘍特異抗原としての同定には、問題が残っている。主として組織特異抗原あるいは腫瘍特異抗原が、リポ蛋白分画に存在することは良く知られており²⁷⁾⁻³⁰⁾、同分画の可溶化・精製が、倉田・岡田らによって進められ、2、3の腫瘍について腫瘍特異抗原の同定・精製が行われている。得られた特異抗原分子は、数%の糖を含む蛋白で、抗原活性は蛋白部分にある。分子量は、正常臓器の場合は種属をこえて47000~48000ダルトンの値が得られているが、ヒト悪性腫瘍の場合には、60000ダルトンまたはそれ以上の値が示された。また、腫瘍化に伴い、粒子の荷電の変異することが、電気泳動的に認められている。著者は、倉田・岡田法¹³⁾を用い、マウスのSr⁸⁹発現骨肉腫の不溶分画を可溶化して、特異抗原を含む可溶分画(LPfr)の得られることを明らかにした。同分画には、いくつかの正常臓器との共通抗原も含まれているから、同分画に対する抗血清はmonospecificではない。そこで正常臓器及び胎児ホモジネートによる反復吸収をほどこして、monospecificと見なし得る抗体を作製できた。このことは逆に、同分画にSr⁸⁹発現腫瘍特異抗原が存在することを証明するものであって、同抗

体の使用によって、当該抗原の性質にアプローチできることを暗示している。このような吸収抗体で、Sr⁸⁹発現骨肉腫の生細胞を染色した場合、細胞膜が染色される(図10)。抗原粒子は、細胞不溶分画をdetergent処理することによって始めて可溶化されるから、細胞膜のintegral protein(またはintrinsic protein)³¹⁾³²⁾に相当する蛋白粒子と考えられよう。岡田ら³³⁾も、Wilms腫瘍の特異抗原粒子が、スピンラベルしたリン脂質liposome膜内に入ることを電子スピン共鳴実験から明らかにし、それらが膜内粒子であることを推定している。問題になることは、固定・薄切片なり、塗抹・固定切片なりについて染色すると、びまん性の細胞質染色が起ってくることである。このことは、特異抗原粒子が、細胞膜とともに細胞内膜(小胞体膜、ミトコンドリア膜)にも多少なりとも分布していることによるのかもしれない。教室の真鍋⁷⁾や加藤⁸⁾は、特異抗原の細胞内分布を調べ、小胞体分画のみならずミトコンドリア分画にも、それが分布していることを示している。特異抗原それ自体の単離・精製は、共通抗原に対する抗体を使用して、reverse immunosorptionを行えば可能であることが既に示されているが³³⁾³⁴⁾、小動物移植腫瘍の場合には、材料の量的限界から実際には著しく困難であって、著者もまだ試みるに致っていない。そこで、吸収以前のLPfrの段階で、抗原の性状に関する2、3の検討を行ってみた。LPfrはディスク電気泳動でも単一ではなく、Davison法による分子量測定でも、48000、120000及び220000ダルトンのピークが認められた。ヒト・牛などの正常臓器LPfr中の組織特異抗原は、いずれも47000ダルトン前後であることが知られているから¹³⁾³⁴⁾³⁶⁾、恐らくこの場合、48000のピークは正常成分由来と考えてよいであろう。ヒト悪性腫瘍の腫瘍特異抗原分子の分子量は、60000またはそれ以上であるが²³⁾、本腫瘍の場合も、120000及び220000の分子量が腫瘍特異抗原に関与するものと推定される。Sr⁸⁹発現骨肉腫の特異抗原が、個体特異的な抗原ではなくて、同組織型腫瘍共通の腫瘍特異抗原であるか否かを決定するには、多数のSr⁸⁹発現骨肉腫株について検討する必要があるが、組織適合抗原である可能性は、多数のddN正常マウス脾臓が、著者の得た抗体で全く染色されないことから、一応否定できるであろう。また、この抗原が、腫瘍特異抗原であるとしても、腫瘍特異拒絶抗原活性があるか否かはまだ判っていない。従って、この様な抗原を利用する免疫療法の実験へ発展させ得る可能性も不明である。しかし、腫瘍細胞膜のsheddingがある以上、担腫瘍動物の血中にこの抗原

を証明することによる腫瘍診断は可能になるであろう。また、腫瘍特異的な monospecific な抗体が比較的容易に得られることは、この抗体を使用することによって、腫瘍の発生病理に関する形態学的検索が可能になることも意味している。

結 語

Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の腫瘍特異抗原について、免疫化学的な検索を行い、以下の成績を得た。

1. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の不溶性リポ蛋白分画を、デオキシコール酸塩で処理し、可溶化分画 (LPfr) を得た。つぎに、同分画に対する異種抗血清 (抗 LPfr モルトット血清) を作製した。同抗血清を使用して、LPfr 分画に少くとも1つの腫瘍特異抗原並びに幾つかの正常諸臓器との共通の抗原が存在することを、ゲル内拡散法で認めた。

2. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫特異抗原は免疫電気泳動上、 β_2 グロブリン部位の泳動度を示した。

3. LPfr 分画は、ディスク電気泳動で主バンドの外に、幾つかの弱いバンドが示された。ゲアニジン塩酸存在下の Sepharose 6 B カラムクロマトグラフィーでは、48000, 120000, 220000 ダルトンのピークが得られた。後二者が腫瘍特異抗原と推定される。

4. 抗 LPfr 分画モルトット血清グロブリンを、正常マウス臓器及び胎児のホモジネートで反復吸収し、腫瘍特異性の高い抗体グロブリン分画を得た。

5. 同分画による蛍光抗体間接法で、Sr⁸⁹ 発現骨肉腫生細胞の細胞膜に特異蛍光が認められ、この抗原が細胞膜にあることを示した。

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導、御校閲を戴いた恩師野村進教授、御指導を戴いた整形外科教室真鍋昌平講師、島嶽講師、教室各位、安田俊久文部技官に心から謝意を表します。更に種々御教示を賜りました本学がん研倉田自章教授・岡田収司助教授に深甚な感謝を致します。また、心よく資料を御恵与下さった本学がん研化学療法部、塩野義製薬研究所並びに佐々木研究所にあわせて厚くお礼申し上げます。

文 献

1) Price, M. R. & Baldwin, R. W. : Brit. J. Cancer, 30, 394 (1974).
 2) McColester, D. L. : Cancer Res., 30, 2832 (1970).
 3) Baldwin, R. W., Harris, J. R. & Price, M. R. : Int. J. Cancer, 11, 385 (1973).
 4) Price, M. R. & Baldwin, R. W. : Brit. J. Cancer, 30, 382 (1973).

5) Bystry, J. -C., Schenkein, I., Baur, S. & Uhr, J. W. : J. Nat. Cancer Inst., 52, 1263 (1974).
 6) 真鍋昌平 : 十全医会誌, 69, 117 (1967).
 7) 真鍋昌平・加藤日出治 : 中部整災誌, 10, 266 (1967).
 8) 加藤日出治 : 中部整災誌, 10, 376 (1967).
 9) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E. : Exp. Cell Res., 13, 96 (1957).
 10) Kurata, Y. & Okada, S. : Int. Arch. Allergy, 29, 495 (1966).
 11) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y. : Int. Arch. Allergy, 35, 392 (1969).
 12) Okada, S., Kurata, Y., Konishi, K. & Matsuda, T. : Int. Arch. Allergy, 39, 6 (1970).
 13) 倉田自章・岡田収司 : 免疫実験操作法(日本免疫学会編), 390, 金沢, 1971.
 14) Freund, J. & Bonanto, M. V. : J. Immunol., 48, 325 (1943).
 15) Lowry, O. H. & Rosebrough, N. J. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
 16) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 321 (1953).
 17) 島 巖 : 日整会誌, 46, 575 (1972).
 18) Davison, P. F. : Science, 161, 906 (1968).
 19) Burtin, P. & Sabine, M. -C. : Rev. Europ. Études Clin. et Biol., 17, 76 (1972).
 20) 野本亀久雄 : 免疫実験操作法(日本免疫学会編), 239, 1971.
 21) Moller, G. : J. Exp. Med., 114, 415 (1961).
 22) Aizawa, M. & Southam, C. M. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 87, 293 (1960).
 23) Shimada, A. & Nathanson, S. G. : Biochemistry, 8, 4048 (1969).
 24) Kahan, B. D. & Reisfeld, R. A. : Science, 164, 514 (1969).
 25) Meltzer, M. S., Oppenheim, J. J., Littman, B. H., Leonard, E. J. & Rapp, H. J. : J. Nat. Cancer Inst., 43, 703 (1971).
 26) Irie, R. F., Nishioka, K., Tachibana, T. & Takeuchi, S. : Int. J. Cancer, 4, 150 (1969).
 27) Abelev, G. I. : In "Immunopathology IV", ed. P. Graber and P. Miescher, p. 41, Schwabe Co., Basel, 1965.
 28) Houghton, G. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 101, 131 (1965).

- 29) 菊地浩吉・武田勝男：癌の免疫病理，1，37 (1965).
30) 倉田自章：細胞化学シンポジウム，18，61 (1967).
31) Singer, S. J. & Nicolson, G. L. : Science, 175, 720 (1972).
32) Singer, S. J. : Adv. Immunol., 19, 1 (1974).
33) 岡田収司・倉田自章：第35回日本癌学会総会記事，東京，昭和51年，52頁。
34) 神本正憲：十全医会誌，84，1 (1975).
35) 小西奎子：臨床免疫，3，395 (1971).
36) 郷倉 満：十全医会誌，83，268 (1974).

A b s t r a c t

An insoluble lipoprotein fraction was prepared from approximately 100g (wet weight) of the osteogenic sarcomas induced by Sr⁸⁹ in ddN mice and maintained in our laboratory. The fraction was solubilized with a desoxycholate solution and the included fractions (LPfr) on Sepharose 4B column chromatography were pooled.

Guinea pigs were immunized with LPfr incorporated into Freund's complete adjuvant. After absorption with homogenates of normal adult and fetal organs, the antiserum was able to recognize at least one tumor-specific antigen in immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

The antigen was not detectable in normal cells and a variety of tumor cells tested by immunofluorescence. Unfixed cryostat sections or smear preparations of the osteogenic sarcoma cells showed the diffuse cytoplasmic staining of tumor cells while living tumor cells showed only membrane staining by the membrane immunofluorescent technique.



図1. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 (154代) のレ線像

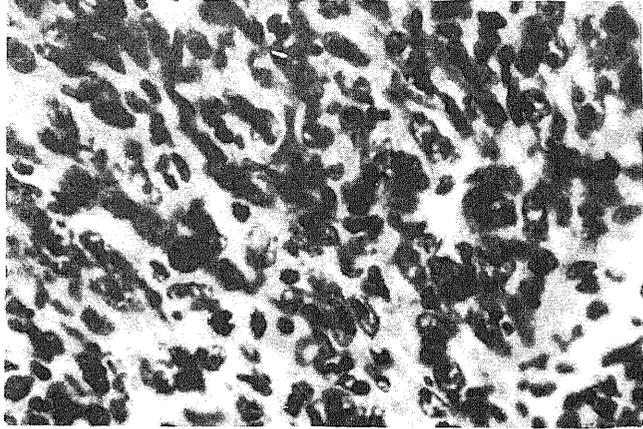
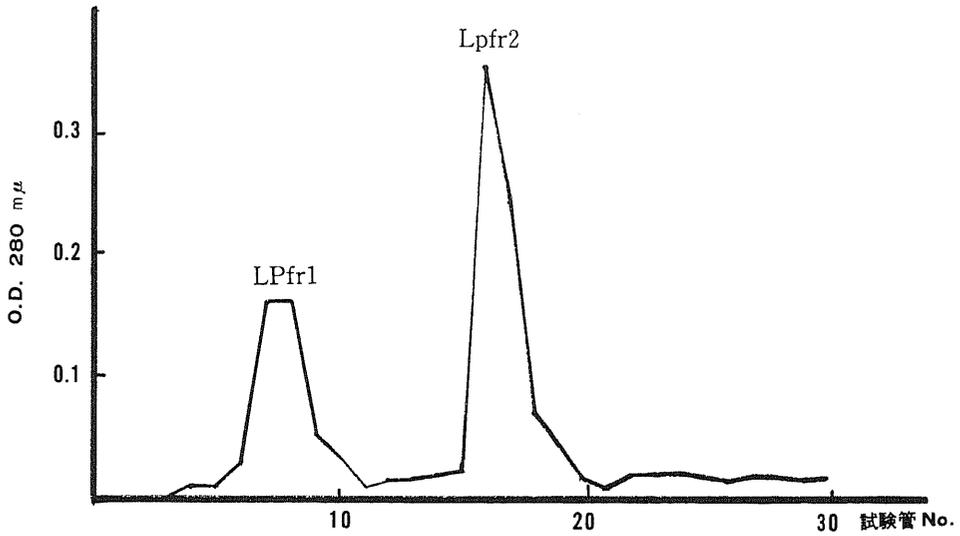


図2. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 (154代) の H-E 染色 ×200



セファローズ 4Bカラム: 1.5×40cm, 負荷量: Sr⁸⁹ 発現骨肉腫可溶 LPsol 10mg,
分画量: 4ml/管, 流速: 11ml/時間, 温度: 7℃, 再検率: 98%

図3. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP sol のセファローズ 4Bゲル濾過パターン

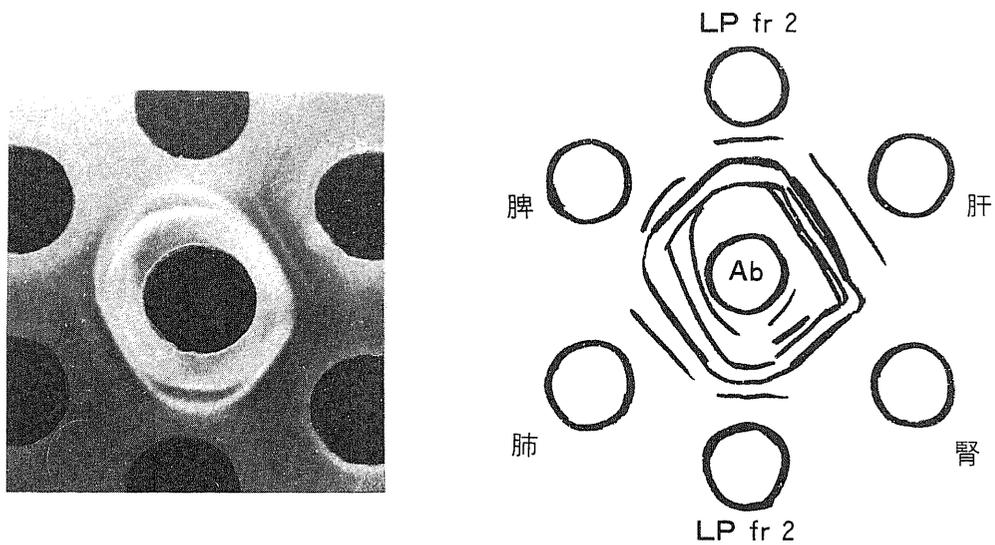


図4. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2 のゲル内二重拡散

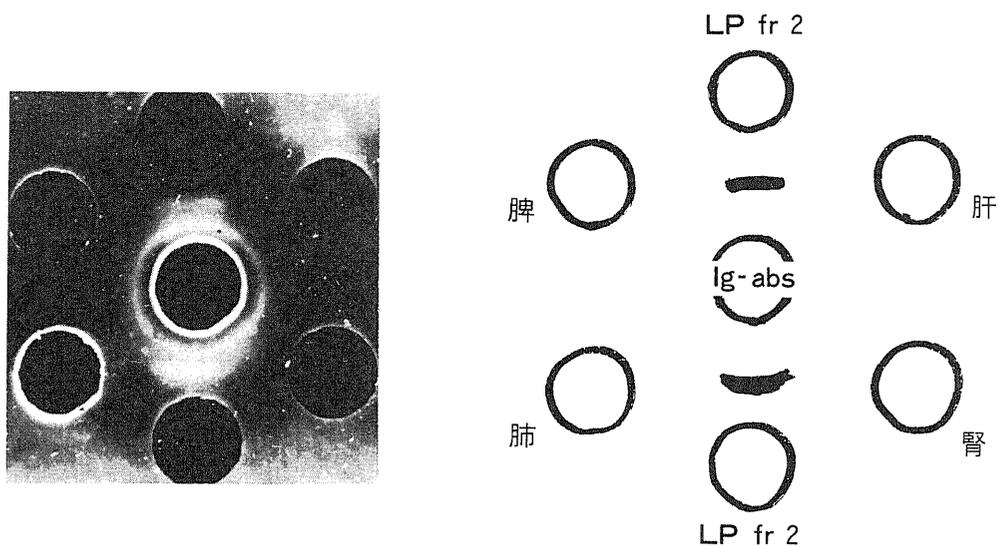
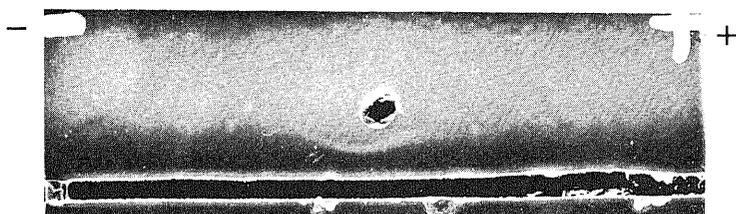


図5. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2 の特異沈降線



抗原孔 : Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2
 下 槽 : Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2 抗血清

図6. 免疫電気泳動における Sr⁸⁹ 発現骨肉腫の特異抗原

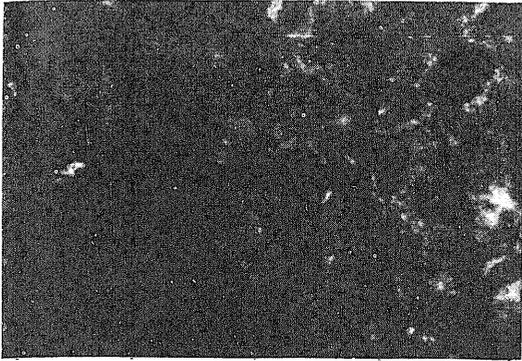


図 7a. 正常マウス大腿骨髄の免疫蛍光染色

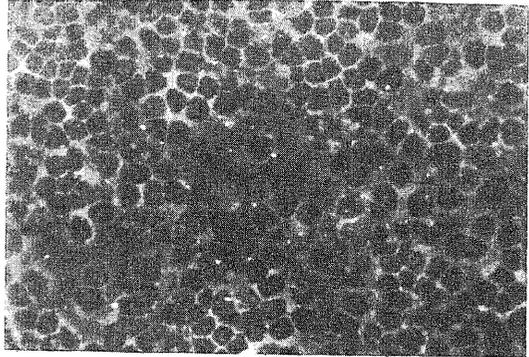


図 7b. 正常マウス脾臓の免疫蛍光染色

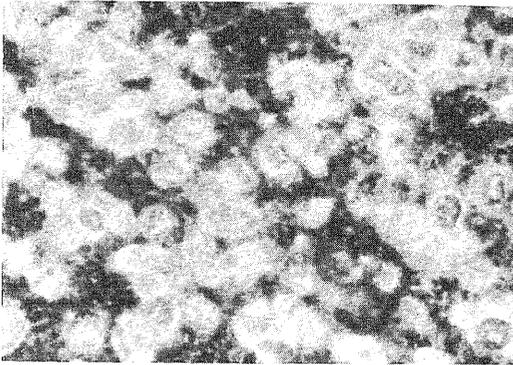


図 8. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫(クリオスタット)の蛍光染色

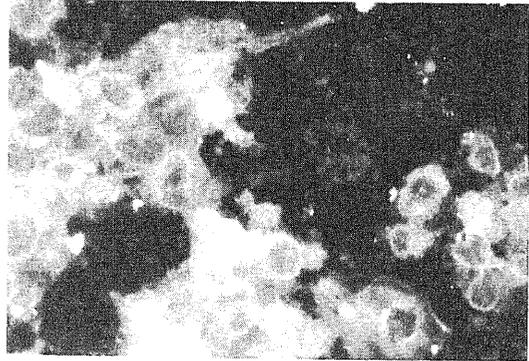


図 9. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫塗抹標本の蛍光染色

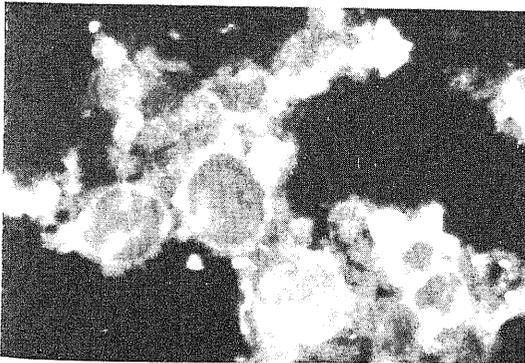


図 10. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫生細胞の蛍光染色

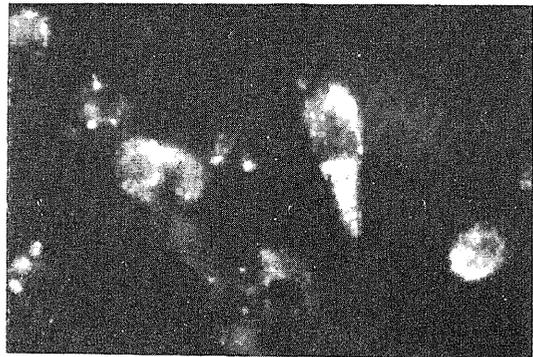


図 11. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 primary cultured cell の
蛍光染色

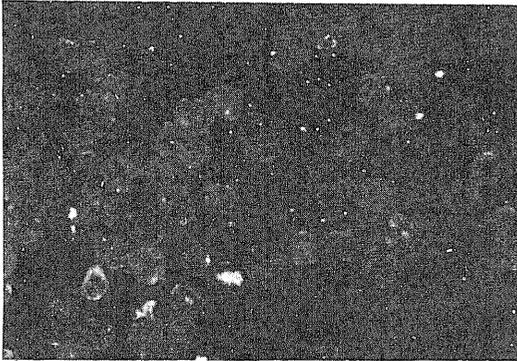


図 12. L 1210 細胞の蛍光染色

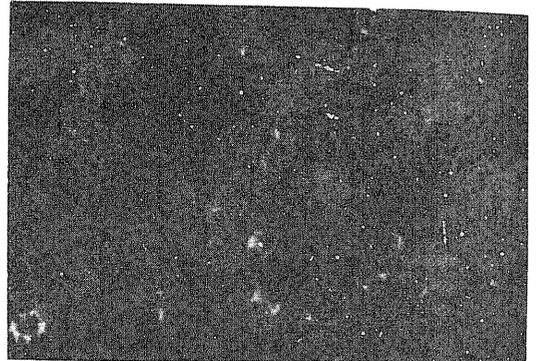


図 13. S-180 細胞の蛍光染色

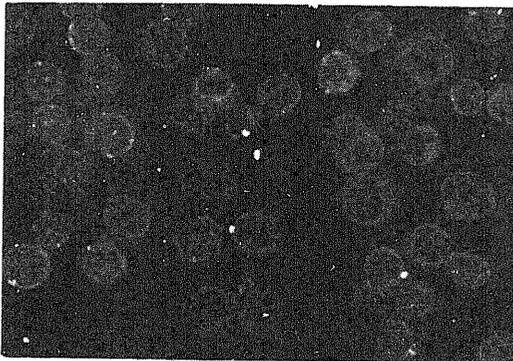


図 14. Ehrlich がん細胞の蛍光染色

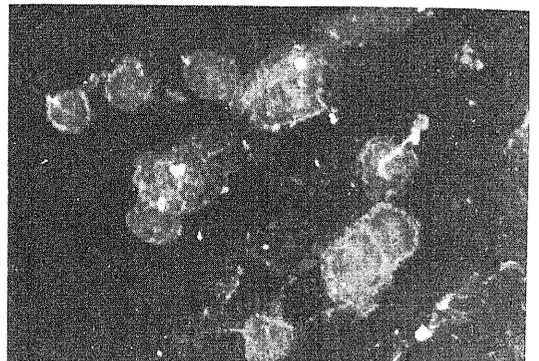


図 15. SC-42 腫瘍の蛍光染色



図 16. NF 肉腫の蛍光染色

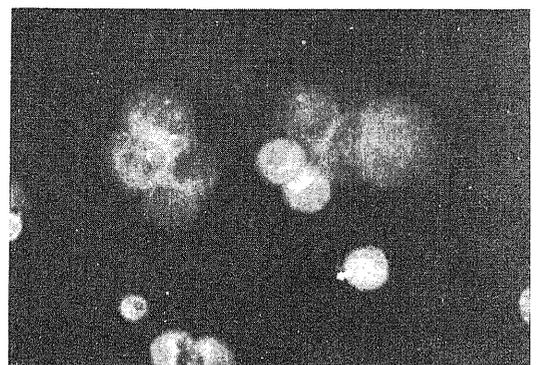


図 17. AH7974 細胞の蛍光染色

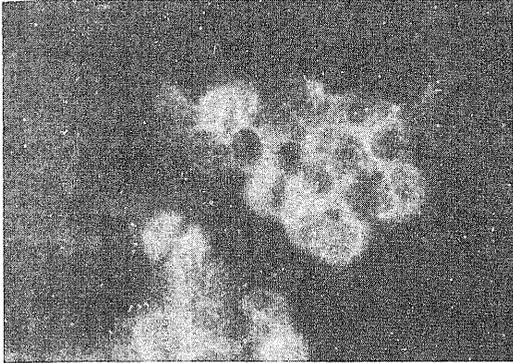


図 18. AH13 細胞の蛍光染色

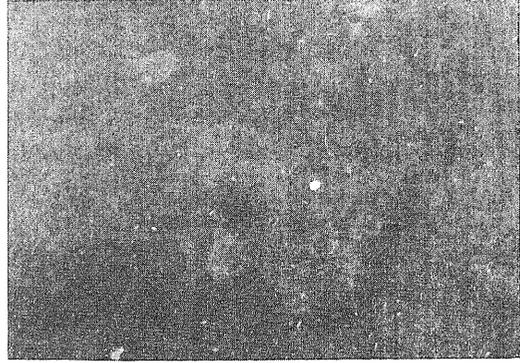


図 19. OST 培養細胞の蛍光染色

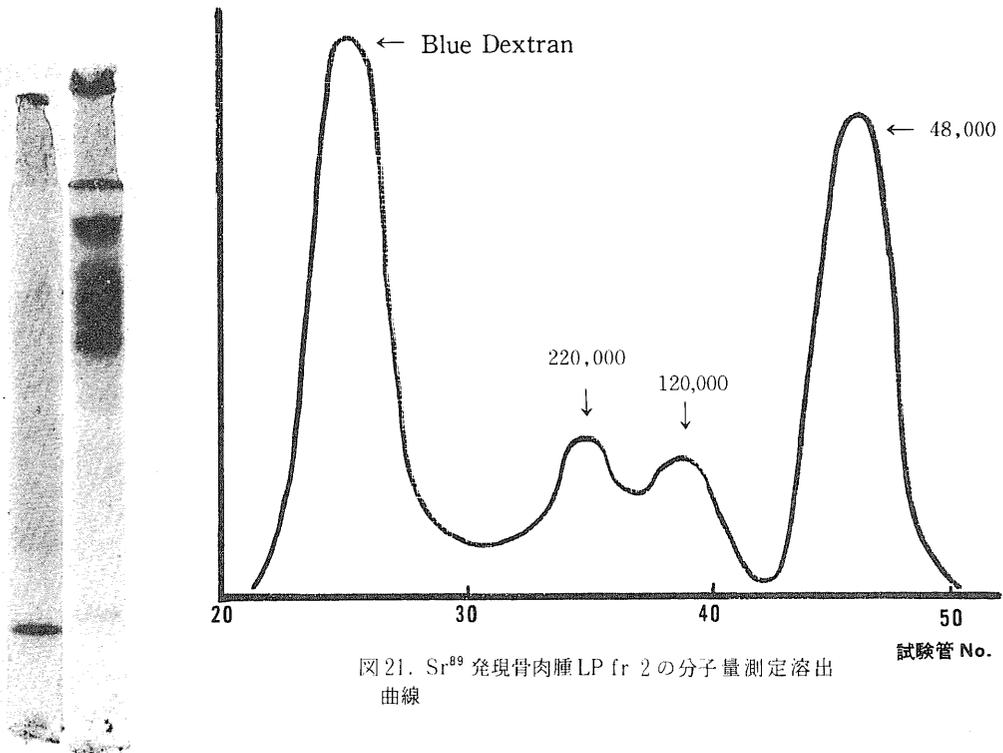


図 21. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2 の分子量測定溶出曲線

Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2

左：7.5%ポリアクリルアミドゲル

右：15%ポリアクリルアミドゲル

図 20. Sr⁸⁹ 発現骨肉腫 LP fr 2 のディスク電気泳動図