金沢大学十全医学雑誌 第71巻 第1号 180−191 (1965)

癌尿ムコ蛋白の免疫学的解析並びにその診断的応用

金沢大学医学部第二病理学教室(主任　石川大刀雄教授)
松　井　健　二

(昭和39年12月25日受付)

Winzler[1)2)] が炎症・悪性腫瘍等に血清ムコ蛋白の増量があると報告して以来，高血圧・リウマチ・腎疾患・肝疾患等の血清ムコ蛋白について，その量的変動・化学的組成・生物学的性状・免疫学的解析等，数多くの研究がなされて来た[3)~14)].

また，Anderson 及び Maclagan[11)] が尿ムコ蛋白の抽出法を発表してから，血清ムコ蛋白と尿ムコ蛋白との比較研究がなされ始め，両者は近似な物質であり[15)]，悪性腫瘍では，両者の間にある程度の量的平衡関係のあることも明らかにされた[16)17)].

人癌尿について，癌特異蛋白を見いだそうという試みには，高橋[18)]の癌尿中 Toxohormone，掛田[19)]の K.I.K 因子，正宗ら[20)]の k-Mucopolypeptide，鶴見[21)]の Acidglycoprotein，永井[22)23)]の癌特異ムコ蛋白などの研究がある.

その間，Krebs[25)] や Ruffo[26)] は，人癌尿中に trophoblastic factor の存在することを明らかにし，Navarro[27)] は，それを癌の診断に応用している.

そこで筆者は，癌尿中の trophoblastic factor に質的な癌特異性があるか否かについて，生物学的方法・免疫学的方法での検討を試みたところ，質的な特異性はみいだされず，それとは異なつた癌に特徴的な1糖蛋白を得た．そこで，それについての種々の検討を行ない，つぎに癌診断への応用の可能性をしらべ，知見を得たのでここに結果を報告する.

実験材料と方法

I. Trophoblastic factor を含む尿ムコ蛋白の抽出

1. 抽出材料

健康人尿群，妊娠3カ月婦人尿群及び癌(主に胃癌)尿群を作り，おのおのの24時間尿をプールして使用した.

健康人尿は当教室健康者より，妊娠尿は正常妊娠3カ月婦人より，癌尿は試験的開腹に終つた患者及び手術後再発が明らかにあると診断された患者よりの尿をプールした.

2. 抽 出 法

1) 安息香酸ソーダ法 (Anderson 法[11)]) に準ずる方法 (表1)

各群の24時間尿をろ紙でろ過し，尿 1000 ml につき 125 ml の 2 モル安息香酸ソーダ溶液を攪拌しつつ加え，続いて 2N-HCl を 100 ml の割で徐々に攪拌しつつ加える．これを 4°C で2時間放置後吸引ろ過し，その残渣を充分にアセトンで洗滌し，遠心分離して得た沈澱を室温で減圧乾燥する． 得られたものを A-1 とする．つぎに A-1 を 1 gr につき蒸溜水 (2N-NaOH 溶液で pH 9~9.5 に補正したもの) 30 ml の割

表1　ムコ蛋白抽出法 (その1)

尿　1000ml
　2M−安息香酸ソーダ　125ml
　2N−塩酸　100ml
上清　沈渣
　沈渣 → アセトンを加え安息香酸除去
上清　沈渣 (A-1)
　沈渣 (A-1) → PH.9~9.5 の蒸溜水で抽出
上清　沈渣
　上清 → 蒸溜水に透析
上清　沈渣
　上清 → 5倍容のアセトン中に注入
上清　沈渣 (A-2)
　沈渣 (A-2) → 蒸溜水で抽出
上清　沈渣
　上清 → 蒸溜水に透析
上清　沈渣
　上清 → 5倍容アセトン中に注入
上清　沈渣 (A-3)

Immunological Analysis of Mucoprotein in Urine of Patients with Cancer and Its Diagnostic Application. **Kenji Matsui**, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

で加え，4°C 以下に冷却しつつ4時間攪拌する．遠心後，上清をセロファンチューブに入れ，蒸溜水に対し4°C において24時間透析後，再び遠心して上清を取り，その量の1/5容の7％食塩水を加えて攪拌し，これを5倍容のアセトン中に徐々に攪拌しながら加え，4°C で24時間静置後生じた沈澱物を遠心分離する．この沈澱を A-2 とする．続いてこれを，30 ml の蒸溜水にとかし，A-2 を抽出した操作をもう一度くり返す．得られた沈澱を A-3 とする．これをアセトンで洗い，減圧乾燥して 4°C に保存する．以後，癌尿よりの抽出物はそれぞれ，AC-1・AC-2・AC-3．妊娠尿の場合，AP-1・AP-2・AP-3．健康尿の場合は，AN-1・AN-2・AN-3，とする．

2）安息香酸法（Katzman & Gnrin 法[28) 29)]）に準ずる方法[?]（表2）

各群の24時間尿をろ過し，氷酢酸で PH 4～4.5 に補正し，安息香酸飽和アセトンを，尿 1000ml に対し

表2　ムコ蛋白抽出液（その2）

尿(1000ml) 氷酢酸で PH 4～5 に補正
安息香酸飽和アセトン　50ml
上清　沈渣
アセトンを加え安息香酸を除去
上清　沈渣（B-1）
PH 6.0 の 50% エタノールで抽出
上清　沈渣
2倍容のエタノール中へ注入
上清　沈渣（B-2）
PH 4.8 の 50% エタノールで抽出
上清　沈渣
同量のエタノール中へ注入
上清　沈渣（B-3）

50ml の割で徐々に攪拌しながら加え，4°C で24時間放置後沈澱物をろ取し，これをアセトンで充分洗滌したのち，減圧乾燥したものを B-1 とする．B-1 の 1 gr に対し，冷却した50％エタノールを 50 ml の割で加え，これを2％アムモニアを含む50％エタノール溶液で PH 6 に補正し，4°C で4時間攪拌後その遠心上清を取り，2倍容の冷エタノール中へ徐々に攪拌しながら加え，4°C に1夜放置後，遠心して沈澱物をあつめ，85％冷エタノールで洗つたものを B-2 とする．続いて，これにエタノールと 0.3 モル酢酸緩衝液（PH 4.8）の等量混液 50ml を加え，4°C で4時間攪拌後，遠心上清を取り，同量の冷エタノール中に徐々に攪拌しながら注入し，4°C に12時間放置後，遠心して沈澱を取り，75％冷エタノール，ついで95％冷エタノールで洗い，更にアセトンで洗つたものを B-3 とする．

これも A-3と同じように，各群別々に 4°C に減圧状態で保存した．以後，癌尿により抽出したものを，BC-1・BC-2・BC-3．妊娠尿よりのものを，BP-1・BP-2・BP-3．健康人尿のものを，BN-1・BN-2・BN-3 とする．

3. 蛋白量及び蛋白結合糖量

1）蛋 白 量

各群の A-3・B-3 の乾燥重量当りの可溶性蛋白量を測定した．即ち，抽出物を蒸溜水に溶解し，その遠心上清即ち可溶性分画について，280mμ の吸光値を，ベックマン型光電分光々度計にて測定し，人血清アルブミンによる規準曲線より算出した．

2）蛋白結合糖量

可溶性分画について，硫酸チモール法[30)]により蛋白結合糖量を測定した．マンノース・ガラクトース等量混液によつて作つた規準曲線より糖量を算出した．

Ⅱ．抽出物の生物学的活性（gonadotropic activity）

1. 実験動物

生後 19～20 日目の雑系幼若雌マウスで，平均体重 7gr のものを使用した．

2. 試　料

BC-3・AC-3・BP-3・AP-3・BN-3・AN-3 を使用した．

3. 生物学的活性度測定法[28)]

各群の試料を，生理的食塩水で溶解し，一定量をマウスの腹部皮内に注射し，4日目にマウス膣開口の有無をもつて判定した．

即ち，マウス1匹1回注射量を 0.2 ml として試料の一定稀釈列を作り，基礎実験により反応の陰性，陽性量の閾値を出し，本実験では両閾値間を更に10段階に細分した稀釈列を作つてその閾値を求めた．1群1稀釈液あたり3匹のマウスを使用した．1日2回，3日間注射し，4日目を判定日とした．

基礎実験では，Katzman ら[28)] の bioassay の方法を再確認するために，コントロール群が成熟するまで観察を続けた．マウスは実験中1匹ずつ隔離飼育した．

コントロール群は，生食水注射群と未処理群の2群を作つた．

また判定を再確認するために任意に開腹し，その肉

眼的所見及び組織学的所見を検索した.

Ⅲ. 免疫化学的解析

1. 抗原の調製

寒天内拡散法用の試験抗原としては, BC–3・AC–3, BP–3・AP–3, BN–3・AN–3 を 5 mg〜60 mg・1 ml の蒸溜水にとかし, その遠心上清を使用した. 家兎の免疫抗原としては, 1回注射量として, 30mg の各試料を 3 ml の蒸溜水にとかし使用した.

2. 抗血清の調製

前記の免疫抗原を, Freund の complete adjuvant 法[31,32]で家兎の面側大腿部肉または両側肩胛骨下腔に投与した. 家兎1匹1回あたり 30mg の試料を含む液 6 ml を2個所に注射した. 1週間々隔で3回免疫後, 5週目に第1回の, 6週目に第2回目の追加免疫を行ない, その翌日より毎日空腹時耳朶静脈より 2 ml ずつ採血し, 血清分離後, 後述の Ouchterlony[3]法を用い, 簡易吸収法[33]で癌特異成分の有無をチェックし, 最適時に総頸動脈より全採血を行ない, 血清を分離して, 使用時まで−18°C で凍結保存した. 以後, BC–3 を投与して作つた抗血清を抗癌血清, BP–3 を投与して作つた抗血清を抗妊娠血清とする.

3. 吸収抗血清の調製

抗血清に, 予備実験でチェックした最適量の正常群試料を二,三度に分けて加え, それぞれ 37°C に24時間, 4°C に1夜放置した後, 遠心上清を取り, 凍結乾燥して保存し, 使用時に生食水を加えもとの抗血清量にした. 以後, 正常尿試料で吸収した抗癌血清並びに抗妊娠血清を, それぞれ吸収抗癌血清及び吸収抗妊娠血清とよぶ.

4. Ouchterlony 法[34] (寒天ゲル内二重拡散法)

4%寒天塊 10gr, 燐酸緩衝液 (0.1M, pH 7.2) 15 ml, 0.1%窒化ソーダ溶液 3ml, 蒸溜水 2ml を温浴槽で溶解し, 15 ml を 9×13 cm のガラス板上に流して固まらせ, 寒天板を作る. 目的に応じて, 抗原孔の直径 4mm, 抗体孔の直径 8mm, 両者の距離を 5mm, とするか, あるいは抗原及び抗体孔の直径をそれぞれ 2mm, 4mm, 距離を 5mm, とした.

抗原, 抗体孔を掘り, その中にそれぞれ抗原及び抗体を入れ, 20°C の湿潤状態下で反応を行なわせ, 約12時間後に第1回の観察を行ない, 続いてその後24時間ごとに反応を観察し, 必要に応じスケッチまたは写真撮影を行なつた.

5. 免疫電気泳動法[35] (Immunoelectrophoresis.)

4% 寒天塊 10 gr, ベロナール・塩酸緩衝液 (pH 8.3, μ : 0.1) 7.5ml, 0.1% マーゾニン溶液 3ml, 蒸溜水 9.5ml を溶解し, 9×13cm のガラス板に 15ml 流して固まらせ, 抗原孔を作り抗原を入れる.

寒天板の両端にはろ紙片を置き, その遊離端を電極槽に浸す. 電極は白金線を使用し, 電極槽にはベロナール・塩酸緩衝液 (pH 8.3, μ=0.05) を入れる. 1枚につき 17mA, 45V で60〜90分の泳動を行なつた.

抗原を泳動させた後, 抗体溝を掘り, 抗血清または吸収抗血清を入れ, 20°C で湿潤状態下で反応させた. 観察法は, Ouchterlony 法と同じである.

6. 反応後の処置

観察を終えた寒天板は, 蒸溜水または水道水で洗つた後, 再びガラス板にはりつけ, 自然乾燥した.

全蛋白染色には, 0.3% サイアジンレッド・酢酸溶液を用い, 2%酢酸溶液で分別した.

Ⅳ. 抽出物の精製分画

試料を DEAE セルローズ・カラムクロマイトグラフィーにより精製した.

DEAE セルローズ (Serva) 2 gr を 2000 ml の 0.005M, pH 7.2 の酢酸緩衝液で緩衝化し, 内径 1.3 cm, 長さ 22cm のカラムに填め, 更に 2000ml の同じ酢酸緩衝液を通し, これに 100mg の試料を同じ緩衝液 4 ml に溶解し, その遠心上清をチャージする. 0.005 M から 0.5 M までの酢酸緩衝液で, 階段的溶出を行ない, 1 ml/min. の速度とした. フラクションコレクターを用いて 5 ml 宛の溶出液を取り, ベックマン型光電分光々度計で, 波長 280mμ における吸収度から蛋白濃度を測定した.

各ピークの分画を集め, セロファンチューブに入れ, 蒸溜水に対して透析したのち, 凍結乾燥し, 蛋白濃度がほぼ同一になるように生食水に溶解して, 反応用抗原とした.

Ⅴ. 癌診断への応用方法

1. 診断用抗原の調製

抗原として, 患者尿を 1 ml 取り, これに 0.01 ml の氷酢酸を加え, 更に5倍容のアセトンを加え攪拌する. 1夜 4°C に放置後, 遠心して得た沈澱物を再び一度アセトンで洗い, 室温で減圧乾燥し, これに0.25 ml の生食水を加え, 溶解したものを使用した.

2. 診断用抗血清の調製

BC–3・20 mg, AC–3・20 mg を1回量として, 前述の抗血清調製法で抗血清を採り, これを正常尿5倍容アセトン沈澱粗蛋白で吸収して診断用抗血清を作つた. しかし診断確率の高い抗血清は免疫家兎12匹に対し1〜2匹の割でしか得られなかつた.

3. 反応方法

反応方法には, Ouchterlony 法を用いた. 抗原孔の直径 2 mm, 抗体孔の直径 6 mm, その間隔 5 mm

とし，抗体孔のまわりに6個の抗原孔を作つた．判定日は2日後に行なつた．

実 験 成 績

Ⅰ．抗原の分析

1．抗原の抽出収量

安息香酸法に準ずる方法及び安息香酸ソーダ法に準ずる方法による抽出収量は第3表のようである．

2．抽出物の蛋白・糖量

各群最終産物 100mg に対する蛋白量及び蛋白結合糖量の定量結果は第4表の通りである．

3．Bioassay

試料の雑系幼若マウスに対する生物学的活性は第5表のようである．

4．DEAE・セルローズ・カラムクロマトグラフィーによる分画

BN-3, BP-3, BC-3, をそれぞれ DEAE セルローズによるカラムクロマトグラフィーにかけると第1図のようなパターンが得られた．

0.005M で溶出された蛋白量を比較すると，BC-3 が一番多く，次いで BN-3, BP-3 の順で減少している．

0.01M 及び 0.05M の部分は3者共に変化がない，殆んど溶出されていない．

0.1M の部分は，大体3つのピークからなり，第1のピークは3者共に溶出され，BC-3, BP-3, BN-3 の順で溶出量が減少する．第2，第3のピークは BC-3 と BN-3 の部分であり，BP-3 の溶出はない．

0.2M の部分は，BP-3 がその50%以上溶出されている．次いで BC-3, BN-3 の順となる．この部分は Batt [40] らによると，ゴナドトロピンの溶出される部分である．

0.5M の分画では，BN-3, BC-3, BP-3 の順で溶

表3　抗原収量（平均乾燥重量）
尿 1000ml 当り（mg）

	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3
C	323	54	36	304	44	10
P	420	290	185	400	270	120
N	237	40	22	220	26	6

C：癌尿　P＝妊娠尿　N＝正常尿

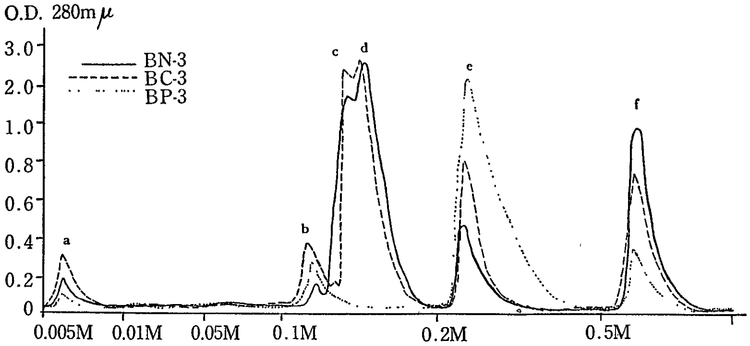
表4　抽出物の蛋白量及び蛋白結合糖量

乾燥重量 100mg 当り		A-3	B-3
		(%)	(%)
C	蛋白量	66	65
	糖量	9.4	9.8
P	蛋白量	66	64
	糖量	6.4	7.4
N	蛋白量	75	72
	糖量	5.4	6.6

表5　生物学的活性（ゴナドトロピン活性）

	4日目	5日目	6日目	7日目	総量 (mg)	m.e.d. mg
BC-3	−	−	＋	＋	6×10^{-2}	1.6
AC-3	−	−	＋	＋	15×10^{-2}	0.4
BP-3	＋	＋	＋	＋	75×10^{-5}	1333
AP-3	＋	＋	＋	＋	15×10^{-4}	400
BN-3	−	−	−	＋	3	0.33
AN-3	−	−	−	＋	4	0.25
Cont. Ⅰ	−	−	−	−	0	0
Cont. Ⅱ	−	−	−	−	0	0

図1　BC-3, BN-3 及び BP-3 の DEAE セルローズカラムクロマトグラム



溶出液：酢酸緩衝液（PH 7.2）

出蛋白量が減少している．そして，後述のように，免疫化学的方法で判定された，癌に特徴的な蛋白中の一因子は，この分画に含まれている．

5．免疫学的解析

1）抗妊娠血清を中心にした解析

i）Ouchterlony 法による成績

抗妊娠血清に対して，BP-3 及びゴナドトロピン（帝国臓器製品，以後Gと略す．）は4本の沈降線を作り，BN-3 は2本，BC-3 は3本の沈降線を作つた，BN-3 の2本は，BP-3・G・BC-3 の沈線降のうち2本と共通している．BC-3 の線で BN-3 の2本と共通しない残りの1本は，BP-3 の1本と共通である．これを第2図a）及び写真1で示す．

吸収抗妊娠血清を用いると，第2図 b）及び写真2のように，BP-3 とGに共通な1本の線のみが残る．

この線は，AP-3 を抗原とした場合に生ずる1本の線とも共通である．これを第3図及び写真3で示す．

ii）I.E.P 法による成績

BP-3 を泳動後，抗妊娠血清を反応させると泳動図上，albumin 位（以後 alb. 位と略す．）に一致する部位に1本，α-globulin 位（以後 α-位と略す．）に一致する部分に2～3本の孤状沈降線が得られる．BN-3 では4本の沈降線（alb. 位に1本，α_1-位に1本，α_2-位に2本．）が得られた．BC-3 では6本の沈降線（alb. 位に1本，α_1-位に2本，α_2-位に3本．）が認められた．これを第4図 a）及び写真4で示す．

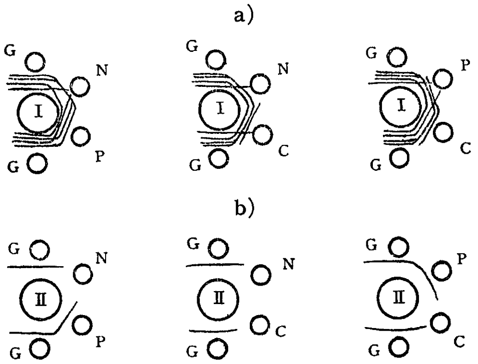
吸収抗妊娠血清を用いると，第4図 b）及び写真5に示すように，BP-3 に1本の沈降線が α_2-位に残つた，

2）抗癌血清を中心にした解析

i）Ouchterlony 法による成績

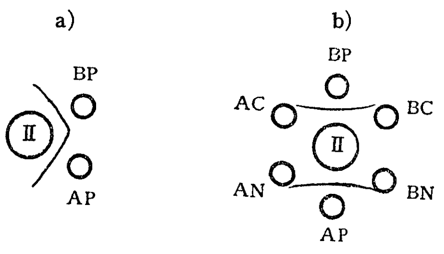
抗癌血清に対し，BC-3・AC-3 は5～6本の沈降線を作り，BP-3・AP-3 は4本．BN-3・AN-3 は2本の沈降線を作る．BN-3・AN-3 の2本は互いに共通し，更に BP-3・AP-3・BC-3・AC-3 の中の2本の沈降線にも共通している．またそれ以外の線で，BP-3 と BC-3 の2本が互いに共通している．そして，AC-3 には2本，BC-3 には3本の，他のいずれ

図2 抗妊娠血清と各抗原との寒天二重拡散法による沈降線



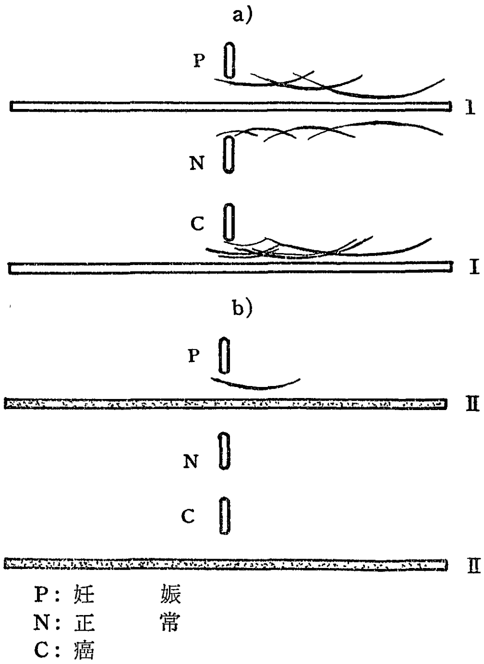
P：妊　娠
G：胎盤性ゴナドトロピン（帝臓）
N：正　常
C：癌
I：抗妊娠血清
II：吸収抗妊娠血清

図3 第1法及び第2法抗原の比較



BP, AP：妊娠　BC, AC：癌
BN, AN：正常　II：吸収抗妊娠血清

図4 抗妊娠血清と各抗原の免疫電気泳動による沈降線



P：妊　娠
N：正　常
C：癌
I：抗妊娠血清
II：吸収抗妊娠血清

にも共通しない線が残る．（これを第5図 a）及び写真6にて示す.） このことは，吸収抗癌血清を用いると更に明瞭になる．これを第5図 b）及び写真6に示す．

ii）I.E.P 法による成績

BP–3 を電気泳動させて，抗癌血清と反応させると，第6図 a）及び写真7で示すように，alb. 位に2本，α_1–位に2本，α_2–位に1本．BN–3 ではそれぞれ1本，2本，1本．BC–3 では，原点附近より alb. 位にかけて大きく弧を画く1本の沈降線と，α_1–位に小さい1本の，α_2–位に2本，β–位に2本の沈降線が得られた．

吸収抗癌血清を用いると，BC–3 では β–位に小さい2本の，α_1–位にそれよりやや大きい1本の沈降線が残る．これを第6図 b）及び写真8で示す．

3）BC–3 の妊娠因子と癌因子との関係

BC–3 を吸収抗癌血清と反応すると3本の沈降線が出来る．BC–3 を 30mg/ml の濃度にすると，吸収抗妊娠血清との間に1本の沈降線で出来る．この線は，BP–3 が吸収吸収抗妊娠血清との間で作つた沈降線と連絡する．しかし，BC–3 が作つた，両吸収抗血清に対する沈降線は交叉した．これを第7図及び写真9に示す．

4）キモトリプシン処理・BC–3, BP–3 について[27]

30 mg/ml の BC–3, BP–3, 各々 1 ml に対し，キモトリプシン25単位を 37°C 24時間作用させたものを抗原として Ouchterlony 法による解析を行なつた．

この操作を加えた BP–3 は，吸収抗妊娠血清と沈降線を生ぜず，BC–3 は吸収抗妊娠血清との沈降線に多少の減弱があつたのみで，また吸収抗癌血清に対する沈降線の変化は示さなかつた．これを第8図 a）・b）で示す．

5）BC–3 と下垂体性ゴナドトロピンの関係

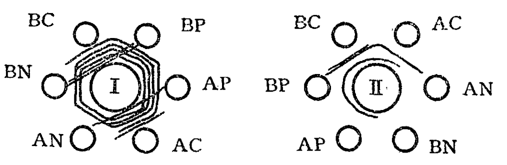
BC–3 と下垂体性ゴナドトロピンの関係を Ouchterlony 法で解析してみると，第9図，写真10に示す如く，BC–3 と下垂体性ゴナドトロピンの間に関係は認められなかつた．

6）他の抗原との関係について

著者の抽出した BC–3 は，荒川[38]が癌組織より抽出した糖蛋白とは一部共通した因子を持つている．(図10)

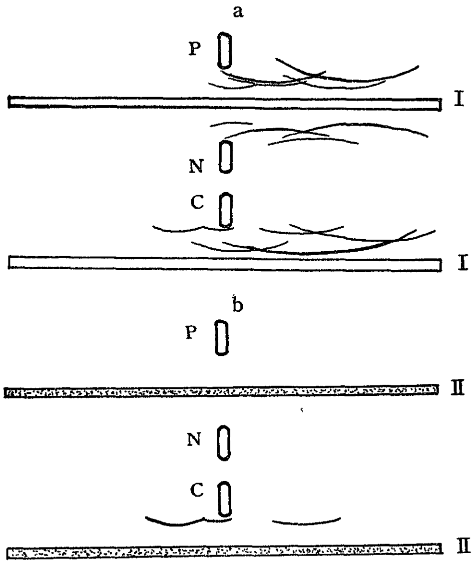
癌尿から本田氏法[42]，Tamm 氏法[43]で抽出した

図5　第1法及び第2法抗原の比較



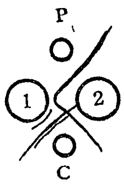
BC, AC: 癌　BP, AP: 妊娠
BN, AN: 正常　I: 抗癌血清
II: 吸収抗癌血清

図6　抗癌血清と各抗原の免疫電気泳動による沈降線



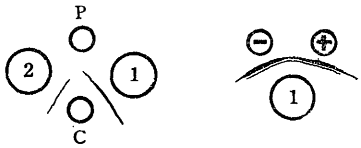
P: 妊娠　N: 正常　C: 癌
I: 抗癌血清　II: 吸収抗血清

図7　癌抗原と抗癌血清及び抗妊娠血清との反応態度



P: 妊　娠
C: 癌
1: 吸収抗癌血清
2: 吸収抗妊娠血清

図8　癌及び妊娠抗原のキモトリプシンに対する抵抗性



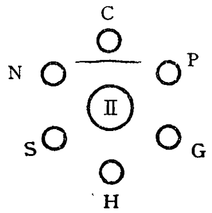
P: 妊娠　C: 癌　1: 吸収抗癌血清
2: 吸収抗妊娠血清
−: キモトリプシン無処理癌抗原
+: キモトリプシン処理癌抗原

それぞれの抗原を比較してみると，共通する成分がなかつた．これを第11図に示す．

Ⅱ．癌診断への応用結果

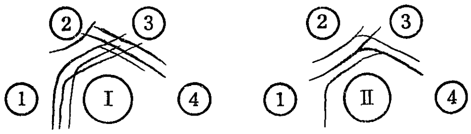
多数の癌性，非癌性患者の尿から前述のように粗蛋白を作り，診断用抗血清と反応させて得た結果は，表

図9　癌抗原と脳下垂体性ゴナドトロピンとの関係



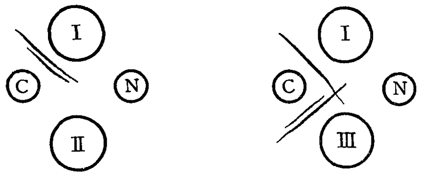
C：癌　N：正常　S：生食水
H：下垂体性ゴナドトロピン
G：胎盤性ゴナドトロピン　P：妊娠
Ⅱ：吸収抗癌血清

図10　癌組織ムコ蛋白との比較



Ⅰ：吸収抗癌組織血清　Ⅱ：吸収抗癌尿血清
1：正常組織ムコ蛋白　2：癌組織ムコ蛋白
3：癌尿ムコ蛋白　4：正常尿ムコ蛋白

図11　他の抗原との関係



Ⅰ：吸収抗癌血清　Ⅱ：抗 Tamm 血清
Ⅲ：抗本田法血清　C：癌　N：正常

表6　臨床的応用成績

癌症例

	術前		術後 1週		術後 2週		術後 3−5週		計
	＋	−	＋	−	＋	−	＋	−	
胃	63	5	8	0	7	5	20	1	109
腸	11	0	3	1	2	1	3	4	25
肝	8	0	0	0	2	0	2	3	15
肺	5	0	0	0	1	0	0	0	6
乳腺	2	0	0	0	0	0	1	3	6
他臓器	21	4	0	0	0	0	2	1	28
計	110	9	11	1	12	6	28	12	188

6のとおりである．

表中の術前，術後の数字はすべて異なつた患者についてのものであり，同一患者についての術前，術後の

子宮癌症例

	術前		術後 1-5週		計
	＋	−	＋	−	
0—1 期	4	3	3	5	15
2 期	6	3	7	0	16
3—4 期	2	0	1	0	3
体部癌	2	0	3	0	5
計	14	6	14	5	39

非癌症例

	−	＋	計
胃			
慢性胃炎	9	2	11
急性胃炎	1	0	1
ポリープ	0	1	1
潰瘍	11	2	13
他疾患	0	0	0
肺			
肺炎	2	2	4
慢性気管支炎	3	1	4
急性気管支炎	1	0	1
喘息	0	1	1
結核	6	1	7
他疾患	1	0	1
肝			
肝炎	24	3	27
肝硬変	6	2	8
腎			
慢性腎炎	46	2	48
急性腎炎	11	3	14
ネフローゼ	7	2	9
腸疾患	15	0	15
子宮疾患	1	0	1
ロイマ	16	2	18
心疾患	18	2	20
高血圧	23	3	26
糖尿病	29	2	31
妊娠	3	0	3
他疾患	39	6	45
計	272	37	309

検索は行なわなかつた．写真11で実例を示す．

考　　按

Krebs[24),24)]，Ruffo[26)]が人癌尿中に，trophoblastic factor の存在することを述べ，Navarro[27)]がそれを癌診断に応用した．

そこで著者は，癌患者尿から Anderson 法[11)]または Katzman & Gurin 法[28,29)]で得た糖蛋白について，まず trophoblastic activity の有無を検討した．

その結果，癌尿からのものに僅かの，正常尿のものには痕跡的な活性を認めた．結局，生物学的活性るいう点からの解析では，癌尿には量的な差があるということになる．

つぎに，妊娠尿の trophoblastic factor をもつ糖蛋白は，キモトリプシンで消化されやすい[27)]．著者もその点を確認したので，続いて癌尿糖蛋白の trophoblastic factor についてキモトリプシン処理を行なつていた．

その結果は，妊娠尿糖蛋白のものよりも抵抗性の強いことが明らかにされた．但し，抗妊娠血清との反応は多少弱化したから，この因子には，妊娠尿蛋白と抗原的な共通部分があるかもしれない．

私どもの教室では，ここ数年来，免疫化学的方法を用い，血清及び織調蛋白の抗原分析を行ない，それぞれの組成持異性を検索し，悪性腫瘍に関しては，石川・高柳[36)]は，マウスの Ehrlich 腹水癌について，担癌マウスの腹水中に，3種の特異抗原因子が存在し，そのうち2因子は糖蛋白であることを明らかにした．

続いて，癌患者血清では，正常とは異なつた α_2-位の糖蛋白が恒常的に出現することを示した[37)]．

また荒川[38)]は，胃癌組織中に，正常組織には認められない耐熱性の一糖蛋白の存在を明らかにしている．

尿蛋白については，高井[8)]が癌尿より Anderson 法[11)]で糖蛋白を抽出し，正常とは異質な α_2-位のコム蛋白の存在する可能性を示唆した．しかし，船木[9)]は同じく Anderson 法[11)]で抽出した尿ムコ蛋白分画について検索し，癌尿では非癌尿に比べて，α_1 または α_2-位のムコ蛋白が量的な増加を示すが，質的な差は見出されなかつた．

著者は，正常抗原の吸収によつて消失しない沈降線を，Katzman & Gurin[28,29)]法抽出の糖蛋白については3本，Anderson 法[11)]のものでは2本見いだした．つぎに，免疫電気泳動法[35)]でしらべると，前法のものでは3本の1つは，α-位に，2つは β-位に相当した．この糖蛋白は，DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで分画すると，1本の沈降線に相当するものは，0.5M の緩衝液（酢酸緩衝液，pH 7.2）で溶出される部分にあり，他の2本に相当する蛋白は，ピークを作らなかつた．

尿中の糖蛋白は，尿路系由来（Tamm[43)]）のものを別として，血清内ムコ蛋白に由来するものであろう．ところで，その血清ムコ蛋白には，癌細胞から放出された癌細胞由来性のものと，担癌という状態のもとで，肝臓で生成されたものがあると考えられる．著者の癌尿糖蛋白と教室の荒川[38)]が胃癌組織より抽出した癌に特異性の高い糖蛋白との間には，一部共通因子のあることが証明されたので，癌組織の糖蛋白因子が血中に放出され，しかる後尿として排泄されるものがあるという経過が説明された．しかし，癌患者血清中に著者の因子と共通抗原性をもつているものは現在の段階では未だみいだされていない．

以上の記載のように，癌尿糖蛋白中には，正常尿にみられない1つ以上の癌特徴的な蛋白がみいだされたので，この尿糖蛋白を用いて癌診断の可能性をつぎに検討してみた．

癌性患者尿は，術前または術後に組織診断で癌と診断された患者のものを用いた．

癌を癌と診断できた確率は88.6％であり，非癌を非癌と診断できた率は88.0％であつた．

一般に癌患者は，手術後3週までは，反応が陽性のままに残ることが多く，それがすぎると陰性例が目立つてくる．再発すると，反応は再び陽性化するものが大部分であるが，陰性例も少数ある．

子宮癌については未だ検索症例が少ないが，陽性率は0～I期で約57％でかなり低率である．これは早期癌のため或いは抗血清を胃癌患者の尿成分で調製したためなのかもしれない．ちなみに，胃癌患者の陽性率は約92％である．従つて子宮癌患者の尿成分で調製した抗血清を用いれば，その診断確率を高めうる可能性がある．

胃癌で陰性に出た症例で，1例は非常に早期のものであつたが，他の症例は Borrmann の肉眼的分類でII～III度のものであつた．

悪性腫瘍で本反応陰性を示したものは，110例中9例，そのうち5例は胃癌（63例中5例），4例は分類上その他の悪性腫瘍をしたもの（21例中4例）であつた．そしてこのものは，Lymphosarcoma の1例，Reticulosarcoma の1例，Leucemia の1例及び Wilms の先天的腎腫瘍の1例で，これを除くと他の3例は，非上皮性のものであるのが興味深い．

非癌性疾患の場合，反応陽性例がある．例えば，ネ

フローゼ，腎炎，アレルギー疾患，肝硬変のものである．しかし，これは同疾患の陰性例に比してその発現率は極めて低い．例えば，ネフローゼ尿では高度の蛋白尿を伴うが，その大部分は，著者の抽出した癌尿糖蛋白と抗原組成を同じくするものではない．試みに，診断用抗原の倍々稀釈列を作り，その反応に対する影響をしらべてみると疑陽性例及び陽性例両者とも，反応態度に差はなかつたことからもそれを充分に証明しうる．疑陽性例はネフローゼ患者尿の粗蛋白で吸収すると，癌陽性には影響なく陰性化することが出来る．但し，この操作を行なつても急性腎炎，胃潰瘍，ネフローゼ等の一部は陰性化しないものがあつた． 従つて，適当な尿糖蛋白での吸収を工夫することは，将来の問題であろう．

以上の成績はいずれも原尿の5倍容アセトン沈澱物を検査抗原としたものである．この操作は簡単で，臨床検査室向きに取扱いやすい．アセトン沈澱を用いたのは，その目的のためである．仮に，原尿そのもので反応を行なつてみると，前記癌性疾患の陽性数の75～80%，疑陽性数の40～50%の割で反応した．但し，沈降線出現態度は両方とも差はなかつた．

いずれにしても，尿を用いての癌診断の可能性については，従来1つの限界が示され，まず不可能とされていたが，癌尿から比較的癌に特徴的な糖蛋白を分離して抗原とすることにより，一応上記の如く，かなりな診断成績をあげうるようになつた．従つて，免疫抗原の質に更に検討を加えることによつては，癌診断確率の向上を望みうるかもしれない．

結 論

各種癌患者の1日尿をプールし，Katzman & Gurin 変法で糖蛋白を抽出した．

健康人尿及び妊娠3カ月婦人尿を対照とすると，癌尿抽出物には，蛋白結合糖量が多く（100mg 乾燥重量当り，癌 9.8mg，妊娠 7.4mg，健康人 6.6mg），また痕跡的なゴナドトロピン活性を示した．

抽出物を，Freund の complete adjuvant 法で多数の家兎に投与し抗血清を作り，免疫学的解析を行なつた．

癌抗原は，寒天ゲル内拡散法で吸収抗癌血清に対し3本の沈降線を作り，免疫電気泳動法では2本が，β-位に，1本が α-位に位置するが，妊娠材料ではこの吸収抗癌血清に対し何らの沈降線も作らなかつた．

吸収抗妊娠血清に対し癌抗原は，1本の沈降線を作るが，それは同抗原が対癌血清との間に作る沈降線とは関係がない．

妊娠抗原は，キモトリプシン処理により，吸収抗妊娠血清に対する反応が消失したが，癌抗原はキモトリプシン作用に対し抵抗性を有している．

癌抗原について DEAE セルローズによるカラムクロマトグラフィーを行なうと（酢酸緩衝液，pH 7.2），0.2M でゴナドトロピン作用物質を，0.5M で癌に特徴的な因子の1つが分離された．

この癌抗原は，癌の組織糖蛋白抗原（荒川[38]）と一部共通性を有している．

この癌抗原を家兎に免疫して得た抗血清を用い，患者尿 1ml に5倍容アセトンを加えて得た粗蛋白を試験抗原として行なつた臨床的癌診に応用した成績は，癌陽性率88.6%，非癌陰性率88.0%であつた．

稿を終えるに当り，御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授に深く感謝します．また多大なる御教示をいただいた倉田自章助教授，橘武彦博士，高柳尹立博士ならびに須山忠和博士に厚く謝意を表します．更に御協力いただきました教室員の各位，材料の提供を仰ぎまた結核研究所附属病院々長水上哲次教授，大学病院各科，内田病院々長内田一博士，佐伯病院々長佐伯善雄博士，国立金沢病院各科，済生会病院々長吉野彦助博士に深甚なる謝意を表します．

文 献

1) **Winzler, R. J.** : J. Clin. Invest., **27**, 609 (1948). 2) **Winzler, R. J.** : J. Clin. Invest., **27**, 617 (1948). 3) **Shertler, M. R.** : J. clin. Invest., **32**, 1208 (1953). 4) **Greenspan, E. M.** : Arch. Intern. Med., **91**, 414 (1953). 5) **鶴見膠一** : 最新医学, **13**, 962 (1958). 6) **和田武雄** : 綜合臨床, **6**. 1473 (1957). 7) **塩川優一** : 最新医学, **9**, 1466 (1954). 8) **高井寛一** : 十全医会誌, **64**, 414 (1960). 9) **船木悦郎** : 十全医会誌, **68**, 1 (1962). 10) **Weimer, H. E.** : J. Biol. Chem., **185**, 561 (1950). 11) **Anderson, A. J.** : Biochem. J., **59**. 638 (1955). 12) **Schmid, K.** : J. Am. Chem. Soc., **75**, 60 (1953). 13) **Schmid, K.** : J. Am. Chem. Soc., **77**, 742 (1955). 14) **Boyce, W. H.** : J. Clin. Invest., **34**, 1581 (1955). 15) **山添三郎** : 医学と生物学, **35**, 202 (1955). 16) **塩川優一** : 内科, **3**, 165 (1959). 17) **Eunice, L.** : British J. of Cancer, **10**, 209 (1956). 18) **高橋良子** : 札幌医誌, **11**, 373 (1956). 19) **Kaketa, H.** : Tohoku J. Exptl. Med., **67**, 319 (1958). 20) **Masamune, H.** : Tohoku J. Exptl. Med., **69**, 383 (1959). 21) **Turumi, K.** : Fukushima

J. Med. Sci., **3**, 31 (1956). 22) **Nagai, Y.** : Fukushima J. Med. Sci., **2**, 135 (1955). 23) **Nagai, Y.** : Fukushima J. Med. Sci., **3**, 13 (1956). 24) **Krebs, T. E.** : J. Biol. Chem., **148**, 501 (1943). 25) **Krebs, T. E.** : Science, **104**, 302 (1946). 26) **Ruffo, A. H.** : Bol. Inst. Med. Exptl. Estud Cancer, **21**, 419 (1944). 27) **Navarro, M. D.** : A.U.I.C.C., **16**, 1482 (1960). 28) **Katzman, P. A. & Doisy, E. A.** : J. Biol. Chem., **98**, 739 (1932). 29) **Gurin, S., Bachman, C. & Wilson, D. W.** : J. Biol. Chem., **128**, 525 (1938). 30) **Shertler, M. R. & Masters. Y. F.** : Analytical Chem., **29**, 402 (1957). 31) **Freund, J.** : J. Clin. Path., **21**, 645 (1951). 32) **Frend, J. & Bonato, M. V.** : J. Immunol., 48, 325 (1944). 33) **Bjorklund, B.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **79**, 319 (1952). 34) **Ouchterlony, O.** : Acta Path. Microbiol. Scand., **32**, 231 (1953). 35) **Grabar, P. & Williams, C. A.** : Biochem. Biophys. Acta, **17**, 67 (1955). 36) **石川太刀雄・高柳尹立** : 日新医学, **44**, 361 (1957). 37) **高柳尹立・内田一** : 日産婦会誌, **11**, 135 (1959), 38) **荒川 弥** : 十全医会誌, **70**, 354 (1964). 39) **松原正香** : 日本臨床, **18**, 271 (1960). 40) **Butt, W. R., Crooke, A. C. & Cunningham, F. J.** : Biochem. J., **81**, 596 (1961). 41) **Butt, W. R., Creoke, A. C. & Cunningham, F. J.** : Biochem. J., **81**, 596 (1961). 42) **本田良行** : 体力科学, **1**, 161 (1952). 43) **Tamm, I., & Frank, L. H.** : J. Exptl. Med., **95**, 71 (1952).

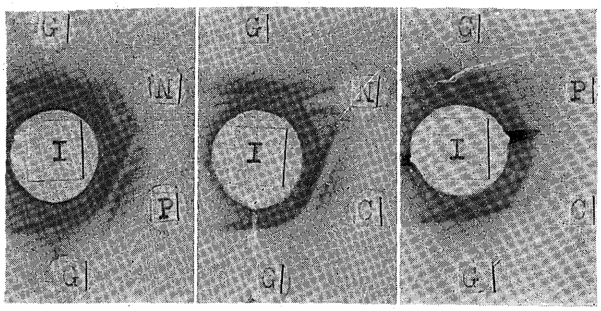
Abstract

Mucoprotein was extracted by the Katzman & Gurin's method from the cancerous urine. The rabbit antisera against the mucoprotein was prepared by administration of the mucoprotein in Freund's complete adjuvant.

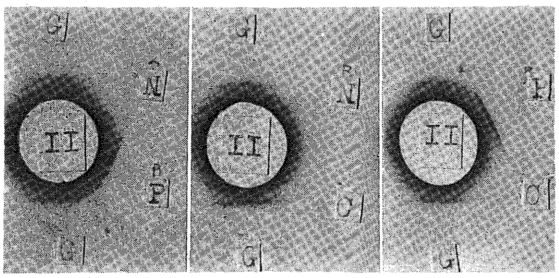
The protein from cancerous urine showed three precipitating lines against the absorbed antisera by the agar gel double diffusion method. Immunoelectrophoresis showed three precipitating arcs with the protein from cancerous urine. These three precipitating lines were characteristic of cancerous urine.

The results of clinical diagnostic application of the antisera using the crude urinary proteins from patients were as follows: the positive reaction 88.6% in the cases of cancer, the negative reaction 88.0% in the cases of noncancer.

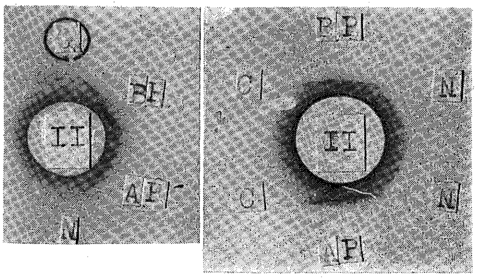
写 真 1



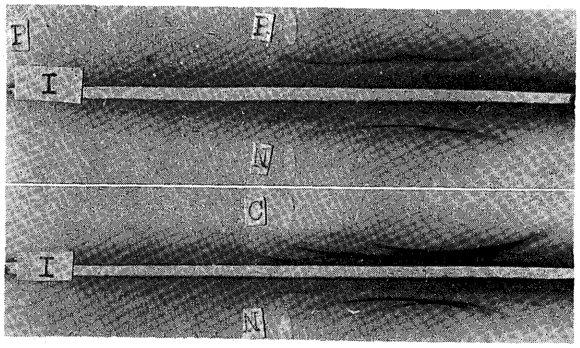
写 真 2



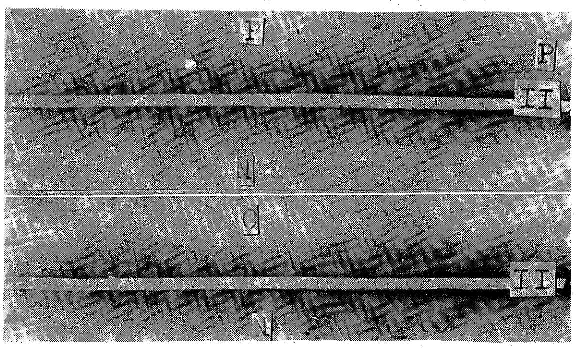
写 真 3



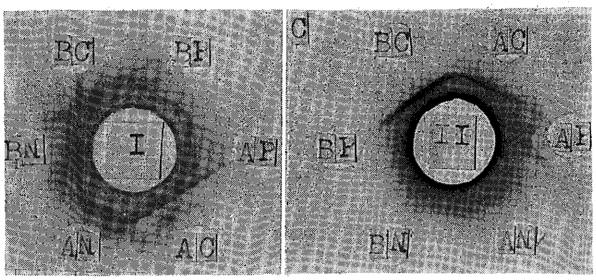
写 真 4



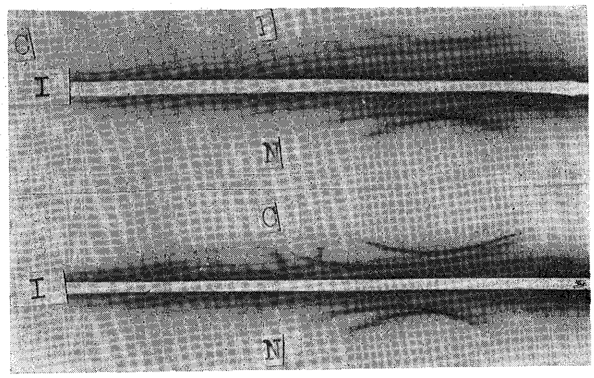
写 真 5



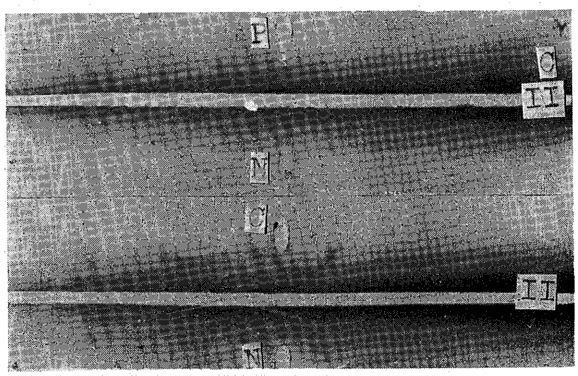
写 真 6



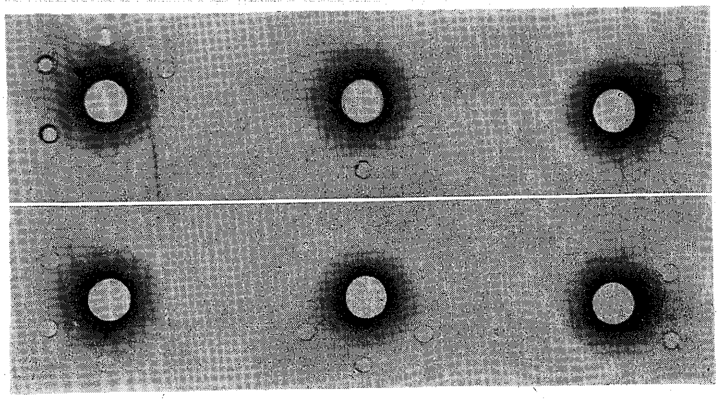
写 真 7



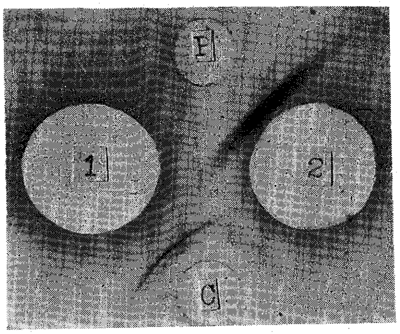
写 真 8



写 真 9



写 真 10



写 真 11