

# 胃癌の免疫学的解析

## 癌化における組織糖蛋白の変化について

金沢大学大学院医学研究科第二病理学講座(主任 石川大刀雄教授)

荒 川 弥

(昭和39年2月24日受付)

癌細胞と正常細胞の組成蛋白の差異については、生化学的あるいは免疫化学的手段による解析が行なわれつつある。主に胃癌については、正宗、川崎ら<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>が、その水溶性蛋白についての特異性を生化学的に追求し、平井<sup>3)</sup>、板倉<sup>4)</sup>、Zilber<sup>5)</sup>、河村<sup>7)</sup>、大内<sup>8)</sup>、関根ら<sup>9)</sup>は、免疫化学的に特異蛋白の解析を行なっている。また松原<sup>10)</sup>、Makari<sup>11)</sup>は、皮内反応を応用し、癌特異蛋白による癌診断の可能性を主張した。

筆者は胃癌、その他2、3の癌と非癌胃の糖蛋白分画について免疫化学的解析を行ない、胃癌ないし癌に特異的と思われる蛋白の存在を認めたので、結果を報告する。

### 実験材料と方法

#### 1) 実験材料

人の非癌胃組織および胃癌組織を用いた。それらの材料の病理解剖学的<sup>12)</sup>および組織学的<sup>13)</sup>分類は表1のとおりである。

#### 2) 抽出方法

Fishkin<sup>14)</sup>の glycoprotein の抽出方法に準じ、つぎのような操作を行なった。術後すばやく  $-18^{\circ}\text{C}$  に凍結して保存された胃癌組織あるいは非胃癌組織を流水でよく洗い、壊死部を可及的に取り除き細切した後、10倍量の蒸留水と少量(約10滴)の10%チモール・エタノール溶液を加え、室温でホモジナイズする。このホモジネートを  $4^{\circ}\text{C}$  で8時間攪拌を行ない、celite を助剤として吸引濾過、濾液をセロハンチューブ (Visking) を用い、約12時間流水透析する。透析内液を  $35^{\circ}\text{C}$  で1/10容に減圧濃縮し、 $80^{\circ}\text{C}$  の温浴で振盪しながら30分間加熱する。生じた白黄色の沈澱を濾取して得た透明黄色の濾液に約1/10容の1%酢酸

ソーダ液を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  氷室内であらかじめ  $-18^{\circ}\text{C}$  に冷却した4倍容の無水エタノールを少量ずつまぜながら加え、同室内で一夜放置する。3,000 rpm で10分間遠心し、沈澱を冷却した少量の無水エタノールで洗い、つぎにエチルエーテルで洗って吸引乾燥すると、白色粉末状の物質を得る。この粉末を再び少量の冷却無水エタノールおよびエチルエーテルで洗う。得られた白色粉末状物質を胃癌および非癌胃の crude glycoprotein (それぞれ胃癌 CGP および非癌胃 CGP と略記) とする。

#### 3) 濾紙電気泳動法

泳動装置は小林式濾紙電気泳動装置、濾紙は東洋濾紙 No. 51、緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.3、イオン強度0.05) を用いた。泳動は小林ら<sup>15)</sup>の方法に従った。試料は胃癌 CGP および非癌胃 CGP とし、蒸留水に 20mg/ml になるように溶解したものを 0.02 ml ずつ原点にガラス毛细管で塗り、電流 7mA、電圧 130~150V で4時間泳動した。 $70^{\circ}\text{C}$  で乾燥後0.05% Bromphenol blue の酢酸溶液で蛋白染色し、2%酢酸水で数回脱色、風乾した。これをパラフィンで透明化し、小林<sup>16)</sup>の直接定量法に準じて定量を行なった。

#### 4) 寒天内電気泳動法

寒天メジウムによる電気泳動を行なった。方法、泳動装置は後述する Immuno-electrophoresis と同様である。寒天メジウムは寒天濃度 1.3%、ペロナール緩衝液 pH 8.3、イオン強度 0.025とした。これを  $8 \times 12$  cm の硝子板上に 30 ml 流し、冷却後  $0.2 \times 1.4$  cm の well を作り、胃癌 CGP および非癌胃 CGP を蒸留水で溶かし 20 mg/ml としたものを 0.08 ml 入れ、電流 15mA、電圧 45~55 V で4時間泳動した。泳動後直ちに2%酢酸溶液に浸して固定し、乾燥後 0.3% Thiazine red 酢酸溶液で染色した。染色乾燥後、小林<sup>16)</sup>の直接定量法に準じて定量を行なった。

This work was supported, in part, by grants from the National Institutes of Health, U. S. A. (grant CA-06133-02)

Immunochemical Analysis of Human Stomach Cancer. On the Changes of Tissue Glycoproteins during Carcinogenesis Wataru Arakawa, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

表 1

材料番号	性別	年齢	Borrmann <sup>12)</sup> 肉眼的分類	組織学的診断	Broders <sup>13)</sup> 細胞学的分 化度	* 癌浸潤 の範囲	** 組織反応 の程度	*** 免疫化学 的反応
1	♂	63	II, III	胃腺癌(管状)	I	IV	IV	+
2	♀	46	I	" (管状, ムチン産生性)	III	II	III	-
3	♀	56	II	" (ムチン産生性)	IV	IV	III	++
4	♂	64	II, III	" (管状)	II	IV	III	++
5	♀	57	II, III	" (管状)	III	IV	IV	++
6	♀	73	II, III	" (管状)	III	II~III	III	-
7	♀	49	IV	" (乳嘴状, 管状)	III	IV	II	++
8	♀	68	IV	" (管状)	III	IV	IV	++
9	♂	62	II, III	" (乳嘴状, 管状)	III	IV	I	++
10	♀	70	II, III	" (管状)	II	IV	II	+
11	♀	50	II, III	" (ムチン産生性)	IV	IV	I	++
12	♀	56	II, III	" (チチン産生性)	IV	IV	III	++
13	♂	57	II, III	" (管状)	II	V	IV	++
14	♀	46	II, III	" (ムチン産生性)	IV	IV	II	+
15	♂	72	II, III	" (ムチン産生性)	IV	IV	II	+
16	♂	52	II, III	" (ムチン産生性)	IV	IV	III	++
17	♀	64	II, III	" (ムチン産生性)	IV	III	I	++
18	♀	48	I	" (瀰漫性)	IV	IV	IV	++
19	♂	40	II, III	" (管状)	II	IV	II	++
20	♀	51	II, III	" (管状)	I	IV	II	++
21	♂	63	II, III	" (管状)	II	IV	III	+
22	♀	60	II, III	" (瀰漫性)	IV	IV	II	++
23	♀	62	II, III	" (管状)	III	III	IV	++
24	♂	45	II, III	" (ムチン産生性)	III	IV	II	++
25	♂	48	II, III	" (瀰漫性)	IV	IV	III	++
26	♂	55	I	" (乳嘴状, 管状)	IV	IV	IV	++
27	♂	59	II, III	" (管状, ムチン産生性)	III	III	II	++
28	♂	39	II, III	" (管状)	IV	IV	II	++
29	♀	26	II, III	" (瀰漫性)	IV	IV	I	++
30	♂	61	II, III	" (乳嘴状, 管状)	II~III	IV	IV	+
31	♂	56	IV	" (ムチン産生性)	IV	IV	II	+
32	♂	59	II, III	" (乳嘴状, 管状)	III	II~III	I	++
33	♂	56	II, III	" (乳嘴状, 管状)	II	II~III	III	+
34	♂	55	IV	" (管状)	IV	IV	III	++
35	♀	60	II, III	" (管状)	III	IV	I	++
36	♂	49	II, III	" (管状)	III	IV	II	++
37	♂	45	I	" (管状)	III	IV	II	++
38	♀	51	IV	" (乳嘴状, 管状)	II	II~III	III	++
39	♀	61	II, III	" (管状)	II	III~IV	II	++
40	♂	67	II, III	" (管状)	II	III	III	++
41	♂	56	II, III	" (管状)	II	III	I	++
42	♂	60	IV	" (乳嘴状, 管状)	IV	IV	II	++
43	♀	71	II, III	" (管状)	IV	IV	III	++
44	♀	55	II, III	" (管状)	IV	IV	0	++
45	♀	60	I	" (塊状)	IV	III~IV	I	++
46	♂	48	IV	" (管状)	IV	II~III	II	++

47	♂	27	慢性萎縮性胃炎				—
48	♂	38	慢性萎縮性胃炎				—
49	♂	33	chronic active peptic ulcer				++
50	♂	30	chronic active peptic ulcer				—
51	♂	53	chronic active peptic ulcer				—
52	♀	43	chronic active peptic ulcer				—
53	♂	45	慢性萎縮性胃炎 (cystic gastritis)				—
54	♀	49	慢性萎縮性胃炎 (cystic gastritis)				—
55	♂	72	chronic active peptic ulcer				—
56	♂	46	chronic active peptic ulcer				—
57	♂	32	慢性萎縮性胃炎				—
58	♂	59	慢性肥厚性胃炎				—
59	♀	32	慢性肥厚性胃炎				—
60	♀	39	chronic active peptic ulcer				—
61	♂	40	chronic active peptic ulcer				—
62	♀	34	慢性萎縮性胃炎				—

\* I : 粘膜, II : 粘膜下層, III : 筋層, IV : 漿膜下層, V : 漿膜

\*\* 腫瘍周辺リンパ濾胞の増減, 0 : なし, I : 減少, II : 正常, III : 増加, IV : 増加著明

\*\*\* — : 反応なし, + : 胃癌特異反応あり, ++ : 癌特異反応あり (後述 Ouchterlony 法, IEP の項参照)

5) DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィー  
DEAE-cellulose (Serva) を 0.005M, pH 7.6 磷酸緩衝液に懸濁し, 内径 1.3 cm, 長さ 22 cm のカラムに填めて, 上記磷酸緩衝液約 500ml で緩衝化を行ない, これに 100~200 mg の試料を 3~5 ml の 0.005 M pH 7.6 の磷酸緩衝液に溶解してチャージし, 磷酸緩衝液 0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M および 0.5M (0.1M の磷酸緩衝液を NaCl でモル濃度をあげる) で段階的溶出を行なった。5ml ずつの溶出液をとり, ベックマン型光電分光光度計を用いて, 波長 280m $\mu$  における吸収度により蛋白濃度を測定した。

#### 6) 抗原液および抗血清の作製

既述の抽出材料を蒸留水で 10~20 mg/ml に溶かし, 抗原液として用いた。

胃癌 9 例, 非癌胃 3 例の CGP それぞれについて Freund<sup>17)18)</sup> の complete adjuvant 法に準じて抗血清を作製した。実験動物は体重 2.5~3.0kg の成熟ウサギを使用した。10 mg/ml 濃度の抗原液 2.5 ml を流動パラフィン 8.5 Vol. Arlacel A 1.5 Vol. 乾燥 BCG 10mg の混合液 2.5ml にまぜて乳剤としたもの 4ml を, 1 週間々隔で 2 回ウサギの両肩甲下腔に注射する。2 回目注射後 4 週目に再び同様の注射を行ない, その後 7~10 日目の抗体価のあがったときに総頸動脈より全採血を行なった。抗血清は -18°C で凍結保存し, 使用時に融解しているが, 12 カ月間にわたってその反応に何ら変化は認められなかった。なお各例について 2 匹のウサギを使用した。

#### 7) 吸収抗血清の作製

抗血清に相当量の非癌胃 CGP 抗原液を加え, 37°C に 2 時間反応させ, 4°C 氷室内に一夜放置し, 生じた混濁を遠心除去し, 上清を吸収抗血清とした。なお希釈効果を防止するために, セロハンチューブ (Visking) に入れ 4°C で流気にあて, もとの抗血清量まで濃縮して使用した。

#### 8) Agar gel double diffusion 法 (Ouchterlony 法<sup>19)20)</sup>)

4% 精製寒天ブロック 30g, 1mg/ml の EDTA と 1.7% NaCl を含む磷酸緩衝液 (pH 7.6, イオン強度 0.12) 45ml, 1,000 倍マーズニ液 9 ml, 蒸留水 6 ml を加熱溶解し, この 10 ml を水平に保つた 8×12 cm のガラス板に流し, 冷却後使用した。well の大きさ, 位置は, 抗血清の抗体価, 反応の目的に応じて適当に選んだ。well に入れる液量は, 液面が寒天板面とほぼ同じになるように満した。抗原液, 抗血清を入れた寒天平板は 20°C 恒温・恒湿にして反応させ, 12 時間以後逐次観察し, 48 時間後に判定した。その後寒天平板を生理食塩水で充分洗い, 乾燥後 0.3% Thiazine red 酢酸溶液で染色し, 最終判定を行なった。

#### 9) Immunoelectrophoresis (IEP)

Grabar ら<sup>21)</sup> による免疫電気泳動法に従った。4% 精製寒天ブロック 30g, ベロナール緩衝液 (pH 8.3, イオン強度 0.1) 22.5ml, 1,000 倍マーズニ液 9 ml, 蒸留水 28.5 ml を加熱溶解し, 水平に保つた 8×12 cm のガラス板に 30 ml 流し, 冷却後中央部に抗原

well を作った。両端に東洋濾紙 No. 51 を載せ緩衝液槽に浸し、電極は白金線を、緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.3, イオン強度 0.05) を用いた。泳動条件は電流 15mA, 電圧 45~55V, 4 時間とした。抗原の泳動終了後、直ちに抗血清 well を作り、0.2~0.3 ml の抗血清を入れ、20°C 恒温・恒湿で反応させた。12 時間目頃より出現する弧状の沈降線を逐次観察し、48 時間後判定を行なった。その後生理食塩水で洗い、乾燥、0.3% Thiasine red 酢酸溶液で染色を行ない最終判定を行なった。

実験成績

1) CGP の定量

胃癌と非癌胃の CGP 中の polypeptide<sup>22)</sup>, 全炭水化物<sup>23)</sup>, hexosamine<sup>24)</sup> の定量結果は表 2 のようであった。

表 2

	Polypeptide (%)	全含水炭素 (%)	Hexosamine (%)
胃癌CGP	1	77	11.5
	2	76	9.9
	3	74	10.7
非癌胃CGP	1	66	10.4
	2	64	9.6
	3	63	11.5

2) 濾紙電気泳動法による分画

正常人血清, 非癌胃 CGP, 胃癌 CGP を同一濾紙上で電気泳動し、その泳動像を比較すると図 1, 写真 1 のようになった。非癌胃 CGP では (+) 側より albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - および  $\beta$ -globulin 位に相当する 4 成分, 胃癌 CGP では (+) 側より albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulin 位に相当する 5 成分を認めた。従つて濾紙電気泳動法による非癌胃 CGP と胃癌 CGP の泳

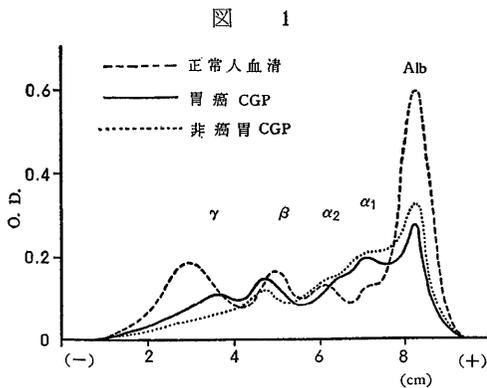


図 1

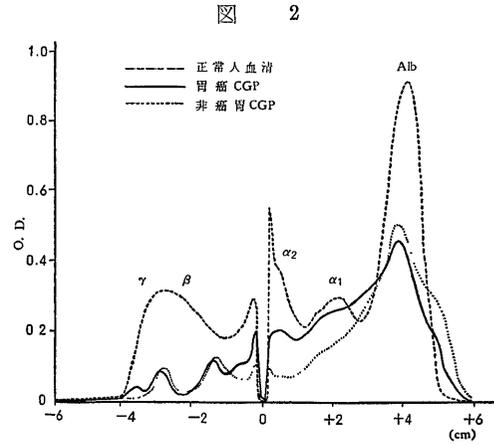


図 2

動像の差異は  $\gamma$ -globulin 位の成分にある。

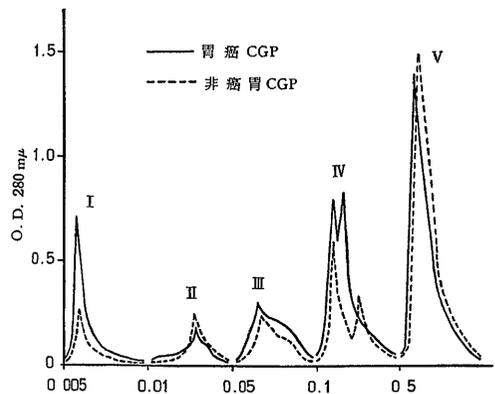
3) 寒天内電気泳動法による分画

正常人血清, 非癌胃 CGP, 胃癌 CGP を同一寒天板上で泳動すると、図 2, 写真 2 に示すような泳動像が観察される。非癌胃 CGP は (+) 側より albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -  $\beta$ - および  $\gamma$ -globulin 位に相当する成分を示し、胃癌 CGP は更に  $\gamma$ -globulin 位に 1 成分がある。従つて寒天内電気泳動法による泳動像の非癌胃 CGP と胃癌 CGP の相違は  $\gamma$ -globulin 位に認められることになる。

4) DEAE-セルローズ・カラム・クロマトグラフィーによる分画

非癌胃 CGP と胃癌 CGP とを全く同様に 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、図 3 のようなパターンが得られた。ここでは非癌胃 CGP と胃癌 CGP との量的差異が 0.005M 溶出の蛋白分画 (I-分画と略記) に認められる。後述するよ

図 3



註) 本図は胃癌 CGP, 非癌胃 CGP 共に 100 mg を使用した。

表 3

	Hexosamine Hexose
胃癌 CGP* I-分画	0.129
非癌胃 CGP** I-分画	0.125

\* 胃癌 CGP 13例の Pool  
 \*\* 非癌胃 CGP 5例の Pool

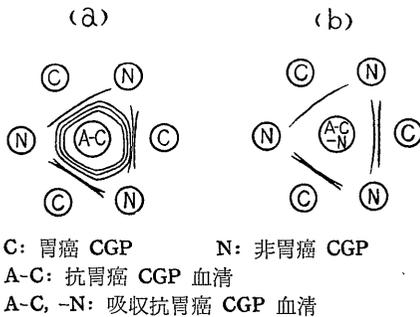
うに、この胃癌 CGP の I-分画は非癌胃 CGP には含まれない免疫化学的な胃癌特異抗原性蛋白を含んでいるので、この I-分画について hexosamine<sup>24)</sup>、全炭水化物<sup>25)</sup>の比を求めた(表3)。胃癌、非癌胃 CGP の I-分画に差は認められなかつた。

5) Ouchterlony 法による実験成績

抗非癌胃 CGP 血清に対して、非癌胃 CGP、胃癌 CGP は2~3本の沈降線を示す。同一抗血清については非癌胃 CGP、胃癌 CGP に差異は認められない。吸収抗血清については、当然のことながら非癌胃 CGP、胃癌 CGP とともに沈降線は消失する。

つぎに抗胃癌 CGP 血清に対して、非癌胃 CGP は2~3本の沈降線を示し、胃癌 CGP は4~6本の沈降線を示す。図4(a)、写真4にみるように抗血清 well に近い3~4本の胃癌 CGP に現われる沈降線は、非癌胃 CGP に現われる沈降線と完全につながる。しかし胃癌 CGP にのみ出現し、非癌胃 CGP には認められ

図 4

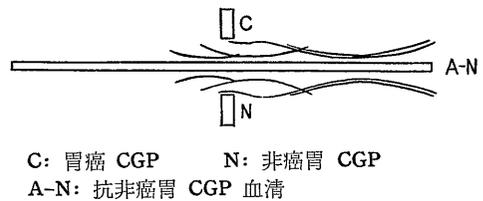


ない沈降線が抗原 well に近く1~2本現われた。吸収抗胃癌 CGP 血清では、抗血清 well に近い共通の沈降線は消失し、抗原 well に近い1~2本の沈降線が残った(図4(b)、写真5)。図4(b)に示すように用いる胃癌 CGP によつて沈降線の出現態度が異なり、完全に2本に分離しているもの、一部分で沈降線が融合しているもの、1本のものだけが認められた。Ouchterlony 法で吸収抗胃癌 CGP 血清を用いて全抽出材料について行なつた実験成績は表4に示すと

表 4

	例数	陽性	陰性
胃癌	46	44	2
非癌胃	16	1	15
直腸癌	2	1	1
結腸癌	1	1	0
肝癌	2	2	0
癌性腹水(肝癌)	1	1	0
正常癌胎盤	2	0	2
胎盤	6	0	6
D A B 肝癌	2	0	2
正常ラット肝	1	0	2

図 5

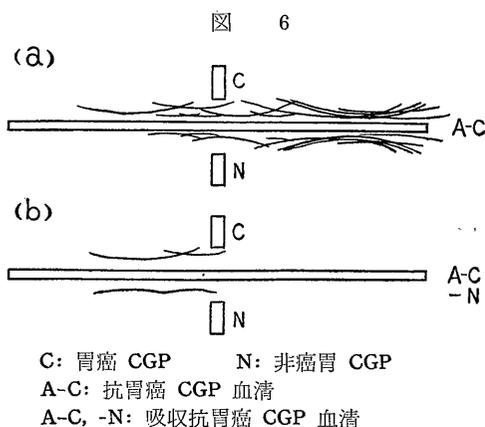


おりである。

6) Immunoelectrophoresis による実験成績

抗非癌胃 CGP 血清については図5、写真9に示すように5本の孤状の沈降線が得られた。即ち(-)側よりβ-globulin 位に1本、α-globulin 位に2本、albumin 位に2本の沈降線である。

抗胃癌 CGP 血清については、非癌胃 CGP は6~9本の孤状の沈降線、胃癌 CGP は8~11本の孤状の沈降線を得た。即ち非癌胃 CGP は(-)側よりβ-globulin 位に2本、α-globulin 位に2~3本、albumin 位に2~4本の沈降線を示したし、胃癌 CGP は(-)側よりβ-globulin 位に3~4本、α-globulin 位に2~3本、albumin 位に2~4本の沈降線を示した。両者の差異はβ<sub>2M</sub>- およびβ<sub>1</sub>-globulin 位に現われる沈降線である(図6(a)、写真10)。このβ<sub>2M</sub>-globulin 位の沈降線は、骨髓腫患者血清にあるβ<sub>2M</sub>-globulin と出現態度が似ているが、その質的な異同は検索していない。これらのβ<sub>2M</sub>- およびβ<sub>1</sub>-globulin 位に現われる沈降線が胃癌 CGP に特異なものかどうかを検討するために、吸収血清を使つて同様に IEP を行なつたが、やはりパターンの相違が認められた。吸収抗胃癌 CGP 血清と非癌胃 CGP では何ら沈降線を示さず、胃癌 CGP ではβ<sub>2M</sub>-、β<sub>1</sub>-globulin 位に2本の沈降線、時にはβ<sub>2M</sub>-globulin 位にだけ1本の沈降

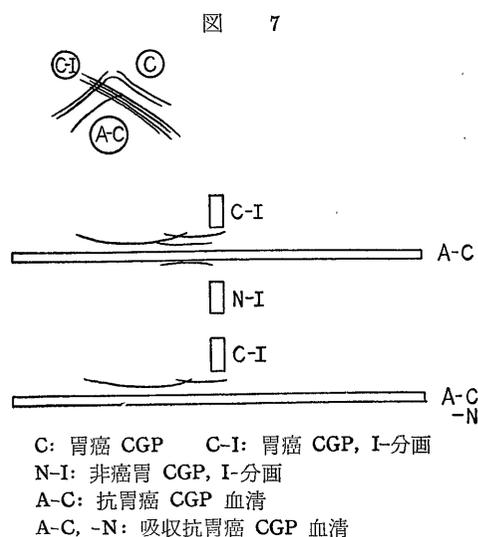


線が認められた。

Ouchterlony 法で 2 本の異癌特異沈降線を示す胃癌 CGP は、IEP では  $\beta_2$ -M-globulin 位に 1 本、 $\beta_1$ -globulin 位に 1 本の完全に交叉する孤状の沈降線を示し、Ouchterlony 法で 1 本の胃癌特異沈降線を示す胃癌 CGP は、IEP では  $\beta_2$ -M-globulin 位から  $\beta_1$ -globulin 位にかけての沈降線を示した (図 6(b), 写真 11)。

IEP の胃癌 CGP に特異的に現われる沈降線の位置と、前述の寒天内電気泳動法での各泳動蛋白とを比較すると、寒天内電気泳動法で胃癌 CGP にも出現する  $\gamma$ -globulin 位の成分は、IEP における  $\beta_2$ -M-globulin 位の特異沈降線とは一致せず、むしろ非胃癌 CGP にも出現する (+) 側の  $\gamma$ -globulin 位の成分に合致した。また  $\beta_1$ -globulin 位の特異沈降線は寒天内電気泳動法の  $\beta$ -globulin 位の成分に相当する。

以上のように免疫化学的に非胃癌 CGP と胃癌 CGP を比較すると、Ouchterlony 法では抗原 well に近い 1~2 本の沈降線、IEP では  $\beta_2$ -M- および  $\beta_1$ -globulin に相当する 1~2 本の沈降線とが胃癌 CGP に特異的であることになる。この因子群を単離するために、前述の DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーの各分画を抗原として Ouchterlony 法、IEP による検索を行なった。ただし、各分画は蒸溜水に対し充分透析した後、約 1/20 量に濃縮して用いた。非胃癌 CGP の I-分画は、Ouchterlony 法では抗胃癌 CGP 血清に対して抗血清 well に近い 1 本の沈降線を示し、これは癌、非癌に共通の沈降線につながる。また IEP では  $\beta_1$ -globulin 位の抗血清 well に近い小さい孤状の波降線を認めるが、これは癌、非癌共通に現われる沈降線に相当する (図 7, 一方胃癌 CGP の I-分画は、Ouchterlony 法では抗胃癌 CGP 血清に対し、3 本の沈降線を示す。この中の抗血清 well に近い 1 本

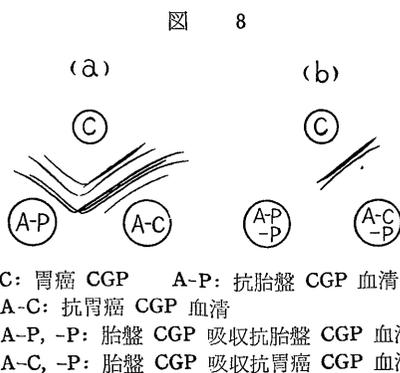


の沈降線は癌、非癌共通の沈降線につながる。また IEP では  $\beta_2$ -M-globulin 位に 1 本、 $\beta_1$ -globulin 位に 2 本の孤状の沈降線をつくる。吸収抗胃癌 CGP 血清について、胃癌 CGP の I-分画は Ouchterlony 法、IEP とともに胃癌 CGP に特異な沈降線と全く同一の出現態度を示した (図 7, 写真 6, 12)。

### 7) 胎盤 CGP の免疫化学的解析

胃 CGP の抽出方法に準じて、よく灌流して血液成分をできるだけ除いた新鮮胎盤より胎盤 CGP を抽出し、前記の免疫方法によつて抗血清を作製した。

Ouchterlony 法による抗胃癌 CGP 血清と胎盤 CGP との反応では、癌特異沈降線は認められず、吸収抗胃癌 CGP 血清と胎盤 CGP とは何ら沈降線を示さない。しかし、抗胎盤 CGP 血清と胃癌 CGP との間には既述の癌特異沈降線に類似した沈降線が出現したが、多少出現態度が異なり一部 cross reaction している (図 8(a), 写真 7)。この点を更に明確に解析するために、抗胃癌 CGP 血清と抗胎盤 CGP 血清とを



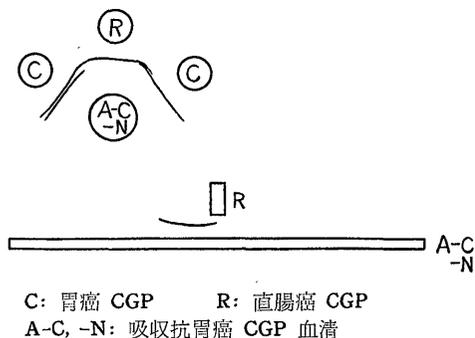
胎盤 CGP で吸収したものについて Ouchterlony 法を行なった。結果は図 8(b), 写真 8 に示すよう沈降吸収抗胎盤 CGP 血清と胃癌 CGP との間には何ら、沈降線は現われず、吸収抗胃癌 CGP 血清と胃癌 CGP の間には癌特異沈降線が認められた。

8) その他の正常、癌組織 CGP および癌患者血清の免疫学的解析

人直腸癌 2 例, 人結腸癌 1 例, 人肝癌 2 例, 人癌性腹水 (肝癌) 1 例, 人正常肝 2 例, DAB 肝癌 2 例, 正常ラット肝 1 例より既述抽出方法で CGP を得, 免疫化学的解析を行なった。吸収抗胃癌 CGP 血清に対し, 人直腸癌 1 例, 人結腸癌 1 例, 人肝癌 2 例, 癌性腹水 1 例に 1 本微弱な沈降線を認め, これは胃癌 CGP における 2 本の特異沈降線の抗原 well に近い 1 本とつながった。しかし, 胃癌 CGP で 1 本の特異沈降線を示すものとのつながりは明らかでなかつた (図 9)。IEP でこれらの CGP は, 吸収抗胃癌 CGP 血清に対し,  $\beta_1$ -globulin 位に微弱な小さい孤状の沈降線を示した。これは胃癌 CGP に現われる  $\beta_1$ -globulin 位の特異沈降線と出現態度が同一であつた (図 9)。

癌患者血清と抗胃癌 CGP 血清の反応は, Ouchterlony 法で 2 本の沈降線を示すが, いずれも癌特異沈降線と交叉し, 吸収抗胃癌 CGP 血清との反応は認められなかつた。

図 9



### 考 按

癌組織蛋白の免疫化学的研究は数多く報告されているが, 人癌組織ごとに胃癌についての報告は比較的少ない<sup>4)-9)</sup>。

Zilber<sup>9)</sup> は材料として主に胃癌を用い, pH 8.3~8.5 で水溶性蛋白を抽出し, 電気泳動的に  $\beta$  および  $\gamma$ -globulin 位の蛋白を分離し, これを用いて免疫化学的解析を行なった。この蛋白分画で抗血清を作り, Ouchterlony 法で検索すると, 胃癌特異沈降線 1~2本が

見出される。これは他臓器の癌組織抽出物では出現しないという。しかし Zilber の成績は Ouchterlony 法だけによるものであり, 抗原蛋白についてもそれ以上の解析は行なわれていない。

平井<sup>4)</sup>は胃癌組織の核分画より pH 4.8, 0.1M 酢酸緩衝液で抽出した蛋白で抗血清を作り, 胃癌と正常胃組織との差異を検索している。胃癌には 1~2 本の胃癌特異沈降線を認め, その沈降線の出現態度より株特異性をも暗示している。また他臓器の癌組織では, 食道癌にのみ癌特異沈降線を認めている。さらに平井<sup>4)</sup>は胃癌患者血清との反応を行なって, 時に沈降線の現われる例を認めたが, それも特異沈降線とは交叉を示し, 結局血清中における癌特異抗原性蛋白の存在は否定している。

板倉<sup>5)</sup>は胃癌を主とする人癌組織を正常部と癌部に分け, それらの全ホモジネートで抗血清を作り, 抗原にはホモジネートの 9,800 g, 60分間の遠心上清にトリプシン処置を加えたものを用い, 免疫化学的解析を行なって, 胃癌に特異な 1 本の沈降線を認めている。しかし胃正常部抽出物には胃癌にない沈降線があり, 発癌にともない simplification と complication が同時に起こるとのべている。また他臓器癌の抗血清に対しては, 胃癌は特異沈降線を示さなかつた。

松原<sup>10)</sup>は初期には胃癌組織より, 後には胎盤より抽出した糖蛋白を皮内反応の抗原として癌反応を行なっているが, その有効因子として多糖類およびヌクレオヒストンをあげている。

また Makari<sup>11)</sup>は癌組織よりミトコンドリア分画をとり, これを加水分解して tumor polysaccharide を抽出し, 癌患者血清と混合したものを抗原として皮内反応を行ない, 癌診断に役立てている。

筆者の抽出物は, 80°C 熱安定で, 表 1 に示したような分析値をもつ糖蛋白であるが, 胃癌 CGP と非癌胃 CGP とは, polypeptide の量にのみ差異が認められる。また寒天内電気泳動法では  $\gamma$ -globulin 位の蛋白に差異が認められた。この結果は DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィーの I-分画の蛋白量が胃癌 CGP に多いことに一致し, 癌特異抗原性蛋白がこの分画にあることにもよく合致する。しかし, 寒天内電気泳動法の泳動パターンと IEP での沈降線を比較した結果, 胃癌 CGP にのみ現われる  $\gamma$ -globulin 位の成分は免疫化学的には特異抗原性を示さない。胃癌 CGP と非癌胃 CGP の免疫化学的差異は, 電気泳動的には  $\gamma$ -および  $\beta$ -globulin 位にくる成分中にあることが示された。

Ouchterlony 法で, 抗胃癌 CGP 血清あるいは吸収

抗胃癌 CGP 血清に対して、胃癌 CGP は非癌胃 CGP とは明らかに差のある 1~2 本の沈降線を作る。この点は Zilber<sup>6)</sup>、平井<sup>4)</sup>、板倉<sup>5)</sup>らの成績と類似するけれども、他臓器癌組織との関係において異なる。筆者の場合 1 本の沈降線は他臓器の癌組織にも共通に出現する癌特異沈降線である。これは IEP における  $\beta_1$ -globulin 位の孤立沈降線に相当する。正常な他臓器 CGP では沈降線は全く認められない。ラットの DAB 肝癌は特異沈降線を全く示さなかつたが、これはおそらく種族特異性によるものと推測される。

吸収抗胃癌 CGP 血清と胃癌 CGP との間には Ouchterlony 法で、2 本の特異沈降線がみられるのであるが、沈降線を 1 本だけ示すものが胃癌 46 例中 8 例にあつた。しかしこれを IEP で検索すると、やはり  $\beta_1$ -globulin 位に沈降線があり、それが  $\beta_2$ -M-globulin 位の沈降線に連続している (図 6(b))。結局  $\beta_1$ -globulin 位の沈降線がないのではなく、量的に乏しい結果であると考えられる。他臓器の癌組織 CGP での Ouchterlony 法による癌特異沈降線は、IEP ではいずれも  $\beta_1$ -globulin 位に位置し、 $\beta_2$ -M-globulin 位に相当するものはない。

従つて筆者の扱つた材料に限るならば、 $\beta_1$ -globulin 位の沈降線は一般の癌に特異的な抗原性蛋白によるものと解されるし、 $\beta_2$ -M-globulin 位の沈降線は胃癌に特異的な抗原性蛋白によるものと判断できることになる。なおこの沈降線の出現態度と材料の病理組織学的分類との間に関連はみいだされなかつた (表 1)。

つきに胃癌 CGP より特異抗原性蛋白を精製する目的で、DEAE-セルローズによるカラムクロマトグラフィーを行なつてみると、抗胃癌 CGP 血清とは  $\beta_2$ -M-globulin 位で 1 本、 $\beta_1$ -globulin 位で 2 本の沈降線を示す抗原が I-分画 (0.005M 溶出) に含まれている (図 7)。 $\beta_2$ -M-globulin 位の 1 本と  $\beta_1$ -globulin 位の 1 本は特異沈降線であり、 $\beta_1$ -globulin 位の他の 1 本は非癌胃 CGP にも共通なものである。この精製段階の抗原を用いても、Makari<sup>11)</sup> の方法に準じて皮内反応を用いると、癌患者にかなり特異的な反応が起こるから、完全な特異抗原の単離が完成すれば、皮内反応による癌診断の道が開かれるだろう。

胎盤 CGP と抗胃癌 CGP 血清とは特異的反應はみいだされなかつたが、抗胎盤 CGP 血清と胃癌 CGP との間には、特異沈降線に類似した 2 本の沈降線が認められた。しかし筆者の行なつた吸収実験では、これは特異的な沈降線でないことが明らかとなつているから (図 8)、胎盤 CGP を抗原とした癌反応を、沈降抗体法を利用してやれる可能性はない。

血清中に癌特異抗原性蛋白が存在するか否かという問題については平井<sup>4)</sup> は、否定的見解を示しているが、筆者の行なつた抗胃癌 CGP 血清と癌患者血清との反応でも、沈降線は生じたが、いずれも特異沈降線と交叉した。しかし教室の松井<sup>10)</sup>は抗胃癌 CGP 血清と癌尿ムコ蛋白との間に特異沈降線と partial reaction する沈降線を証明しているから、血清中にも癌特異抗原性蛋白の存在を全く否定することはできないのではなからうか。より鋭敏な免疫化学的手段を用いれば、それを証明することが可能になるかもしれないからである。

## 総 括

人の胃癌組織、非癌胃組織、その他 2、3 の癌および正常組織より 80°C 熱安定の糖蛋白を抽出し、2、3 の定量、濾紙電気泳動法、寒天内電気泳動法、DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーにより、癌化における糖蛋白の推移を検索し、更に免疫抗血清を作り、寒天内二重拡散法、免疫電気泳動法により抗原分析を行なつた。その結果を要約するとつぎのようになる。

- 1) Polypeptide, 全炭水化物, hexosamine の定量結果では、胃癌の糖蛋白分画に polypeptide の増加が認められた。
- 2) 濾紙電気泳動法では、胃癌糖蛋白分画に  $r$ -globulin 位の蛋白の増加が認められた。
- 3) 寒天内電気泳動法では、胃癌糖蛋白分画にのみ認められる  $r$ -globulin 位の蛋白がみいだされた。
- 4) DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーによると、0.005M 溶出蛋白分画 (I-分画) が胃癌糖蛋白分画では著明に増加している。
- 5) Ouchterlony 法, IEP で胃癌特異抗原性蛋白を証明した。これは  $\beta_2$ -M-globulin, および  $\beta_1$ -globulin 位に相当する因子である。
- 6) 胃癌特異抗原性蛋白は DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーの I-分画に存在する。またそれは寒天内電気泳動法によつて胃癌糖蛋白中に特異的に存在する  $r$ -globulin 位の成分とは別個のものである。
- 7) 胃癌糖蛋白分画の特異抗原性蛋白のうち、 $\beta_1$ -globulin 位の因子は他臓器の癌組織糖蛋白中にも存在する。
- 8) 胎盤糖蛋白には胃癌糖蛋白中の特異抗原性蛋白に類似する蛋白は含まれるが、それが別個のものであることが証明された。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導を賜わつた恩師石川大刀雄教授に深く感謝するとともに、多大なる御教示をいただきました倉田自章助教ならびに教室の諸兄に厚く謝意を表します。なお材料の提供を仰ぎました国立金沢病院外科門馬良吉博士、石野病院々長石野琢二郎博士、佐伯病院々長佐伯善雄博士、木元病院々長木元正二博士、内田病院々長内田一博士に深甚なる謝意を表します。

### 文 献

- 1) Masamune, H., Kawasaki, H., Abe, S., Oyama, K. & Yamaguchi, Y. : *Tohoku J. Exptl. Med.*, **68**, 81 (1958).
- 2) Kawasaki, H. : *ibid.*, **68**, 119 (1958).
- 3) Masamune, H., Kawasaki, H., & Abe, S. : *ibid.*, **68**, 173 (1958).
- 4) 平井秀松・多賀弘子・中村浩一・吉原忠男・原 親夫・篠原将郎 : *最新医学*, **19**, 499 (1964).
- 5) 板倉克明 : *GANN*, **54**, 93 (1963).
- 6) Zilber, L. A. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **101**, 264 (1962).
- 7) 河村謙二・四方統男・上原洋一郎・小玉正智・中根佳宏ら : 第22回日本癌学会総会報告.
- 8) 大内清太・今 充・張間行直・小田桐充孝・田中隆夫・西川泰右・川嶋英典・児玉 要 : 第22回日本癌学会総会報告.
- 9) 関根幸成 : 第22回日本癌学会総会報告.
- 10) 松原正香 : *日本臨床*, **18**, 2791 (1960).
- 11) Makari, J. G. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101**, 274 (1962).
- 12) Henke, F. & Lubarsch, O. : *Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie*, IV/1, 864 (1926).
- 13) Broders, A. C. : *Arch. Path. Lab. Med.*, **2**, 376 (1926).
- 14) Fishkin, A. F. & Berenson, G. S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 130(1961).
- 15) 小林茂三郎・村井京子 : 濾紙電気泳動法の実際, 3版, 106頁, 東京, 南江堂, (1960).
- 16) 小林茂三郎 : 濾紙電気泳動法の実際, 3版, 182頁, 東京, 南江堂, (1960).
- 17) Freund, J. & Bonato, M. V. : *J. Immunol.*, **48**, 325 (1944).
- 18) Freund, J. : *Clin. Path.*, **21**, 645 (1951).
- 19) Ouchterlony, O. : *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**, 231 (1953).
- 20) Wilson, M. W. & Pringle, B. H. : *Immunol.*, **73**, 4 (1954).
- 21) Grabar, P. & Williams, C. A. : *Biochem. Biophys. Acta*, **17**, 67 (1955).
- 22) Gornall, A. G., Bardawill, C. S. & David, M. M. : *J. Biol. Chem.* **177**, 751 (1949).
- 23) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 24) Rondle, C. J. M. & Morgan, W. T. J. : *Biochem. J.*, **61**, 586 (1955).
- 25) 松井健二 : 十全医会誌, 未印刷.

### Abstract

The water extract of cancer tissue was heated at 80°C. From the supernatant glycoproteins were precipitated by means of 80% alcohol.

Immunization of rabbits with this fraction led to the formation of specific antibodies.

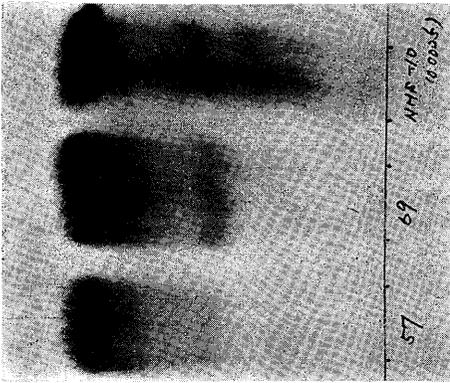
Immuno-electrophoresis with the absorbed antiserum showed two precipitation arcs with proteins of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -mobility. The glycoprotein of  $\beta_1$ -mobility proved to be specific for human cancer and the one of  $\beta_2$ -mobility highly specific for human stomach cancer.

### 写 真 説 明

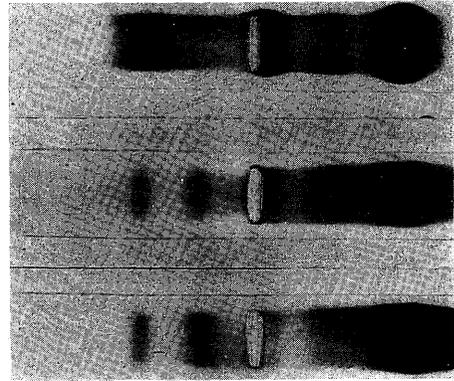
1. 濾紙電気泳動の成績 (図 1)  
(左側 (+), 上から正常人血清 CGP, 胃癌 CGP, 非癌胃 CGP)
2. 寒天内電気泳動の成績 (図 2)  
(右側 (+), 上から正常人血清 CGP, 胃癌 CGP, 非癌胃 CGP)
3. Ouchterlony 法による成績  
(中央 well 抗非癌胃 CGP 血清, 周囲 well 左上端

より交互に胃癌 CGP, 非癌胃 CGP)

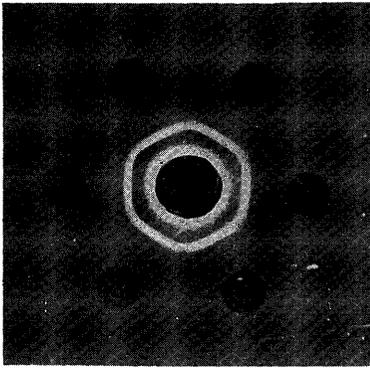
4. Ouchterlony 法による成績 (図 4(a))
5. Ouchterlony 法による成績 (図 4(b))
6. Ouchterlony 法による成績 (図 7)
7. Ouchterlony 法による成績 (図 8(a))
8. Ouchterlony 法による成績 (図 8(b))
9. IEP による成績 (図 5)
10. IEP による成績 (図 6(a))
11. IEP による成績 (図 6(b))
12. IEP による成績 (図 7)



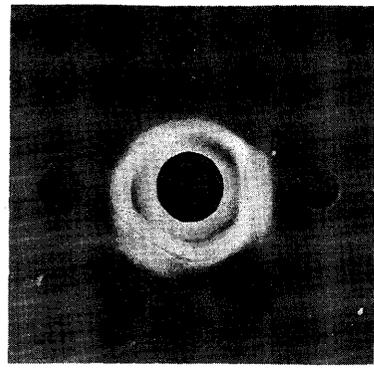
1



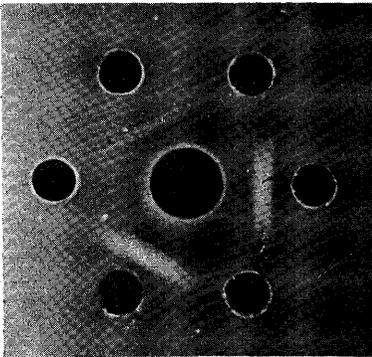
2



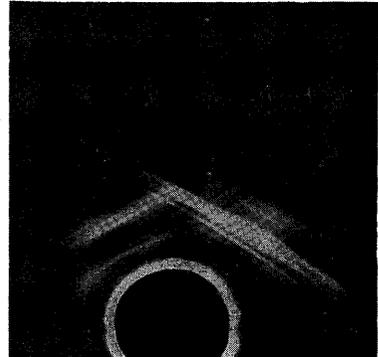
3



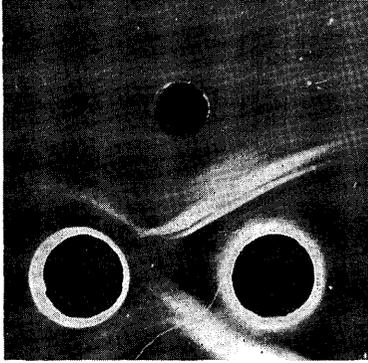
4



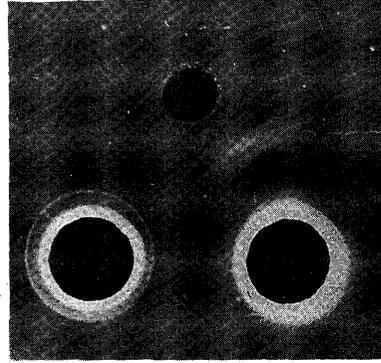
5



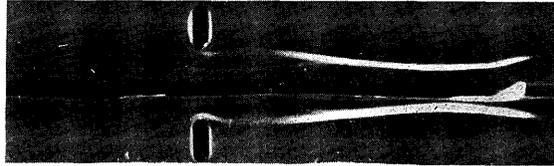
6



7



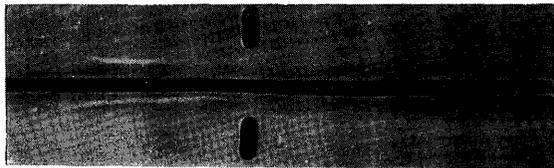
8



9



10



11



12