

人胃癌組織の 1 Glycolipopeptide について

金沢大学大学院医学研究科第二病理学教室(主任: 石川太刀雄教授)

峰 田 亮 介

(昭和38年1月14日受付)

従来より、動物癌あるいは人の癌組織及びその体液に、有機溶媒で抽出される癌特異物質の存在が主張され、その存在・特異性に関するかなり多くの論議が重ねられてきた。Rapport¹⁾ 等が動物癌組織よりクロロホルム・メタノール (2:1) 混液による抽出分画を硅胶カラムクロマトグラフィーにかけて精製単離した Cytolipin H は癌組織にかなり特徴的な物質で、免疫化学的にも一応その特異性が証明された haptogenic substance である。箱守²⁾ 等は AH 7974 癌細胞のクロロホルム・メタノール (2:1) 混液抽出残渣を更にエーテル抽出し、それを有機溶媒透析法によつて分画し、非透析部分に特異な赤外吸収を示す phosphatidyl-peptidyl-inosilide を単離して、これが癌特有であるとのべている。また正宗³⁾⁴⁾ 等は癌尿より、癌に特徴的な量的変動を示す低分子含糖ペプチド (90% エタノール可溶性) の存在を指摘すると共に、癌は低分子性ペプチドに特異な構造変化をきたすものと想像した。最近、川内⁵⁾ 等は同物質を癌尿のみならず、動物肝癌組織からも単離したと報告している。Hradec 等⁶⁾ は 90% エタノール-NaCl 混液による癌組織抽出液から、アルミナ・カラムクロマトグラフィーで1つの糖・磷含有脂質を結晶として単離した。この物質は腫瘍細胞のアミノ酸とりこみを促進する作用があり、正常組織中には微量存在するが、癌の際には特に増量するという。Hirsfeld⁷⁾, Witebsky⁸⁾, Facius⁹⁾, 小林¹⁰⁾ 等もエタノール抽出分画中に癌特異抗原の存在することを補体結合反応系を用いて認め、Facius 等はこの抗原が磷脂質であると推定し、小林等は糖脂質であると指摘している。神前¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ 等は動物癌及び人癌の組織と体液に共通して存在する癌特異磷脂質 (マリゲノリピン) の存在を主張し、これによる癌診断法の確立を企図している。そこで筆者は、有機溶媒による抽出可能な癌物質を主に神前法に準拠してとり出し、検討を加えた。

実験材料

手術的に切除した胃癌材料を -18°C で凍結保存し、用いたのぞんで水道水を加えて融解、細切し、ワーリング・ブレンダーでホモジナイズした。非癌材料としては胃潰瘍と潰瘍随伴胃炎をおこしている胃材料を用いた。なお被検材料は常に一部を病理組織標本として、所見を確認した。

実験方法

(I) 抽出方法

(i) 神前の熱エタノール抽出法に準ずる操作¹¹⁾: 胃癌、胃潰瘍組織約 5g をホモジナイズし、その湿重量の3倍容エタノールで各30分間毎3回の還流煮沸を行い、抽出液を合して放置し、室温まで冷やし、濾過後、 -4°C の冷室に一昼夜放置し、析出する白色沈澱物を濾過してのぞく。濾液をロータリー・エバポレーターを用いて、 35°C 以下の微温下で、減圧乾燥、更にシリカゲルデシケーター中で、減圧乾燥後、2.5 ml の無水エタノールで、還流煮沸抽出を行い、冷却後、2500 r.p.m., 5分間遠心して、エタノール不溶性物を除去し、エタノール部分に、2倍容のアセトンを加え、アセトン不溶成分を沈澱させる。沈澱をデシケーターで減圧乾燥後、アセトン 2.5 ml で2回洗滌し、減圧乾燥する (分画 I)。分画 I を 2.5 ml エーテルで2回抽出し、エーテル部分を2倍容に濃縮し、その2倍容のアセトンを加えて、2~3時間 -10°C の冷蔵庫におき、生じた沈澱を集めて減圧乾燥する (分画 II)。分画 II を 2.5 ml のクロロホルムに溶解すると、ほとんど全部溶解するが、時に不溶性物を含有することがある。その場合は遠心して不溶物をのぞく。クロロホルムの2倍容のアセトンを加えて、 -10°C におき、一昼夜後、遠心して沈澱をあつめ、減圧乾燥する (分画 III)。分画 III を 2.5 ml のベンゼンに溶解して、不溶物があれば遠心してのぞき、ベンゼン部分

A Glycolipopeptide of Human Gastric Cancers. Ryosuke Mineda, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

(1) 糖質の検出; アンモニア硝酸銀反応¹⁶⁾, Bial 反応¹⁷⁾, Elson-Morgan 反応¹⁸⁾, Morgan-Elson 反応¹⁹⁾による。

(2) ペプチド並びにアミノ酸の検出; ビュレット反応並びに 6N-HCl で 100°C, 8 時間加水分解後, 二次元ペーパークロマトグラフィーによる。

(3) 脂質の検出; 2N-HCl, 100°C, 14 時間加水分解物について, ローダミン 6G, 2'-7'-ジクロールフルオレスセンによる蛍光反応とプロトポルフィリン蛍光反応²⁰⁾によつた。後者の方法は, 試料を塗布した濾紙を, 0.05N-HCl プロトポルフィリン液に, 5 分間浸し, 10 分間水洗後, L-型蛍光灯による赤色蛍光の有無を, レシチン, コレステロール, カプリル酸, ステアリン酸, オクチルアルコール, アミノ酸を対照として検した。

(4) 燐酸の検出; Hanes 試薬による蛍光²¹⁾, 並びに Bartlett の微量定量法²²⁾による。

(5) コリンの検出; Chargaff 法²³⁾による。

(6) イノシットの検出; Fleury 等の方法²⁴⁾による。

(7) スフィンゴシンの検出; McKibbin & Taylor の方法²⁵⁾により窒素の測定を行い, ついてピリジンを溶媒として, 一次元ペーパークロマトグラフィーを行い, 0.25% ニンヒドリン・アセトン溶液で $R_f=0.9$ のスポットの有無を検した²⁶⁾。

(8) スペルミンの検出; F. Feigel 等²⁷⁾のスポットテスト法による。

(9) 不飽和結合の検出; ヨーソ反応による。

(10) 生物学的特性の検出; "Ehrlich 癌細胞凝集阻止法"²⁸⁾による。即ち使用数時間内に, dd 系マウスに接種後 7 日目の Ehrlich 腹癌細胞を無菌的にとり, 直ちに 4°C に冷やし, 0.14M 細胞を食塩水で 3 回洗い, 0.14M 食塩水 3% 浮遊液を作る。この間 4°C に保つ。正常人血清または人血清 γ -globulin 0.03ml を被検物質の 0.03ml 懸濁液に加えてよく混合し, 上記細胞浮遊液 0.02ml を加え, よくまぜて, 10°C 前後において, 20 分後細胞の凝集状態を顕微鏡的に観察する。

実験結果

(I) 各分面のペーパークロマトグラム

分面 I をクロロホルム 0.5ml に溶解, ブタノール:氷醋酸:水 (4:1:2), ピリジン:メチラール:水 (3.5:3:3.5) 混液を用いて, 二次元ペーパークロマトグラフィーで展開し, ニンヒドリンで発色させると, 図 1 の如く, 6 個のスポットが得られたが, 癌, 非癌の差

は認められなかった。

分面 II について, ジイソブチルケトン:氷醋酸:水 (8:1:5), ピリジン:メチラール:水 (3.5:3:3.5) 混液を用いて二次元ペーパークロマトグラフィーを行うと, 図 2 の如く 7 個のニンヒドリン反応陽性スポットが得られたが, この場合も癌, 非癌の差は認め得ない。

分面 III を 0.5ml のクロロホルムに溶解し, ピリジン:メチラール:水溶液を用いて, 一次元ペーパークロマトグラフィーを行つてみると癌及び非癌材料は, 図 3 の如く, ニンヒドリン反応陽性スポットが, 3 個宛認められた。癌の場合の多くは $R_f=0.38, 0.51, 0.6$, 非癌の場合, $R_f=0.35, 0.51, 0.6$ スポットである。

図 1 分面 I の二次元ペーパークロマトグラフィー

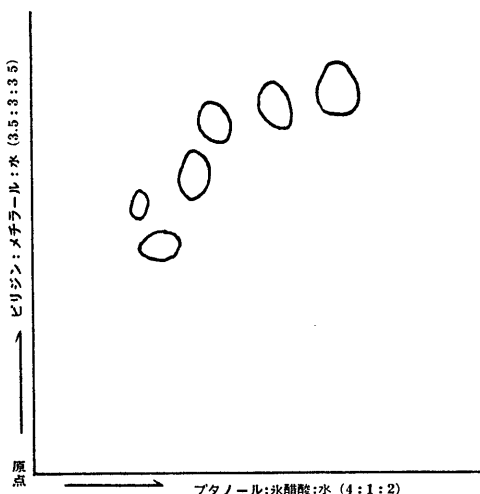
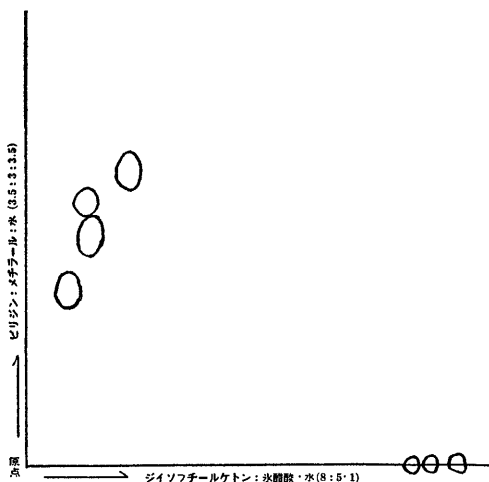


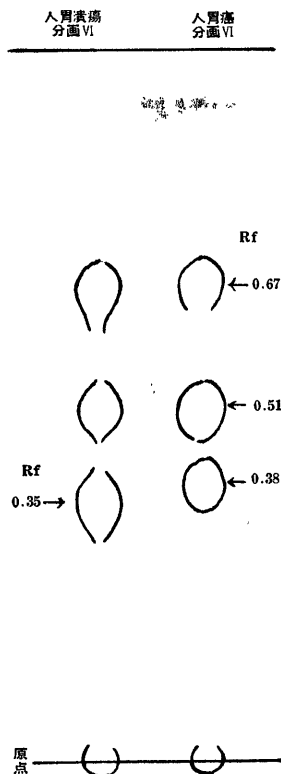
図 2 分面 II の二次元ペーパークロマトグラフィー



$R_f=0.6$ の物質は癌, 非癌の差がなく, $R_f=0.35\sim 0.38$ のスポットは, 技術的失敗のない限り, 癌では 0.38 , 非癌では 0.35 になる傾向が確かめられた. そこで胃癌30例を材料として, 種々の温度条件下で同物質の検出を行つてみると, 16°C 以下, 25°C 以上では, これらの物質の展開がうまくゆかず, 癌, 非癌の差も失われることが明らかになった.

つぎに分画VIについて, 同様にペーパークロマトグラフィによる分析を行つてみると, 図4のように,

図4 分画IVの一次元ペーパークロマトグラフィー



癌, 非癌ともにやはり3個宛のスポットが認められ, 原点にも発色した. この場合にも癌では多少 R_f が高く (0.38) 非癌では低く (0.35) に出る傾向をもつ物質の存在が認められた. $R_f=0.51, 0.67$ の物質には全く差が認められない(図4). なおエーリッヒ腹水癌についても, 分画IV, Vについてペーパークロマトグラフィを行うと, 図5のように, 分画5の方に, $R_f=0.35\sim 0.38$ 物質を含む4つのスポットが得られ ($R_f=0.51, 0.55, 0.71$), 分画IVには3つのスポット ($R_f=0.25, 0.43, 0.55$) がみられた.

(II) $R_f=0.35\sim 0.38$ 物質の化学的組成について
人胃癌組織(湿重量 10g) から得た分画IIIをピリジ

図5 分画IV, V, VIの一次元ペーパークロマトグラフィー

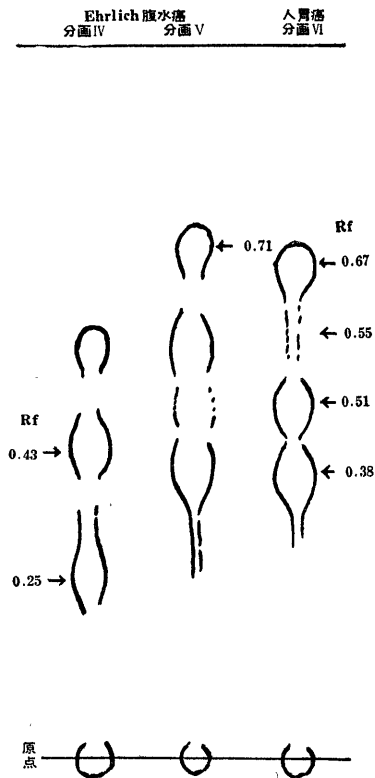


表2 定性反応

	$R_f=0.38$ 物質(癌)	$R_f=0.35$ 物質(非癌)
ビュレット反応	±	±
硝酸銀アンモニア反応	+	+
Elson-Morgan 反応	+	+
Bial 反応	-	-
Morgan-Elson 反応	-	-
ローダミン 6G 螢光	-	-
2'-7' ジクロロフルオ レスセン	-	-
プロトポルフィリン反応	+	+
ヨード反応	+	+
コリン反応	-	-
磷酸	+	+
イノシット	-	-
スベルミン反応	-	-

ン: メチラール: 水混液を用いて展開し, $R_f=0.38$ (癌) または 0.35 (非癌) 部位を切り出し, エタノールで, 3回連続加熱抽出を行い, ローターリー・エバポレーターで減圧乾燥した. この物質について種々の定

表 3 $R_f=0.38$ 物質の加水分解後の定性反応

	$R_f=0.38$ 物質(癌)	$R_f=0.35$ 物質(非癌)	
コリン	+	+	HCl 水解
磷 酸	+	+	総リン
スフィンゴシン	—	—	水酸化バリウム水解
脂質 (ローダミン 6G 反応)	+	+	HCl 水解

性反応を行つた結果は表 2 のようである。ついでこの物質を加水分解したのち、2, 3 の物質の定性反応を行つた結果は表 3 のようである。酸加水分解物を二次元ペーパークロマトグラフィーでしらべると図 6 左のように 9 個のスポットが得られた。これらはセリン、グリシン、スレオニン、アラニン、バリン、プロリン、フェニールアラニン、ロイシン (またはイソロイシン) と同定されたが、スポット (a) は不明である。非癌材料について同様処理すると、図 6 右のように、11 個のニンヒドリン・スポットが得られた。癌材料について同定された 8 個のアミノ酸はいずれも存在したが、それとは異なる 3 つのスポットが認められた (図 6 右; b, 9, 10)。 $R_f=0.38$ のニンヒドリン反応陽性物質を展開濾紙から切り出し、抽出し、加水分解を行つてから、再びペーパークロマトグラフィーで糖の分析を行つた。アンモニア硝酸銀による還元糖反応で 5 個のスポット、Elson-Morgan 反応で 3 個のスポットが認められた。しかし Morgan-Elson 反応は (—)

である。これらの糖は、ガラクトース・グルコース、マンノース、ガラクトースアミン、グルコースアミンと同定され、1 つが不明であつた。糖については癌と非癌の差は見出されなかつた。

(Ⅲ) $R_f=0.35\sim0.38$ 物質の透析、カラムクロマトグラフィー

この物質はセロファンチューブ (Visking) を用いた水→水透析では透析されず、 $R_f=0.6$ 物質のみが透析され、エタノール→エタノール透析ではいずれも透析可能である。分画Ⅲについて、Sephadex によるカラムクロマトグラフィーでは溶出液 30ml 以内に $R_f=0.38, 0.51, 0.6$ の物質が溶出され、原点にとどまる物質は除去された。

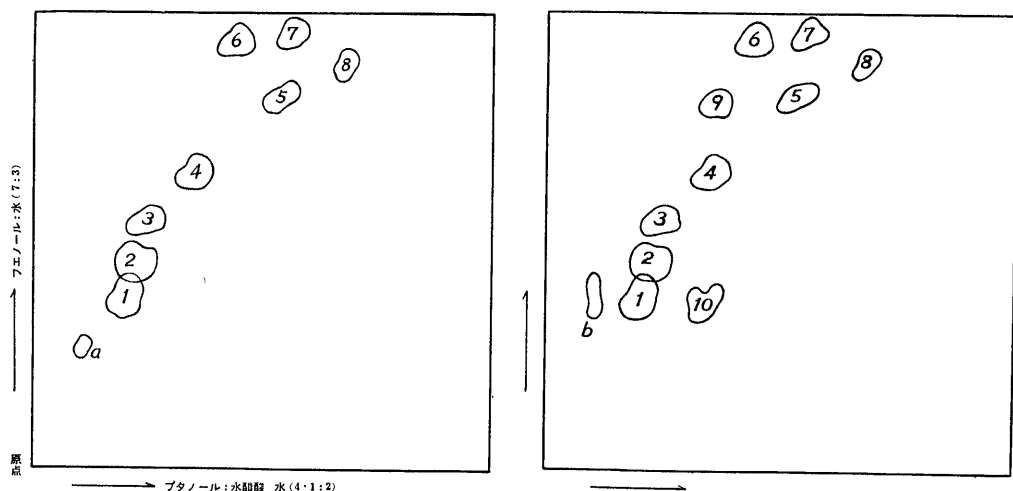
(Ⅳ) $R_f=0.35\sim0.38$ 物質の Ehrlich 癌細胞凝集阻止作用について

人非癌胃組織 (潰瘍または胃炎) より抽出された同物質を添加した Ehrlich 腹水細胞は図 7 のように、細胞の凝集がおこっており、対照無添加標本と差がないのに対し、癌材料より抽出した物質を添加したものでは、図 8 のように著明な癌細胞の分散、即ち細胞凝集反応阻止効果が認められた。

総 括 と 考 察

人胃癌あるいは非癌胃組織から神前のマリゲノリン抽出法にほぼ準じて抽出した分画Ⅲについて、ペーパークロマトグラフィーによる分析を行い、それぞれ 3 個のニンヒドリン反応陽性物質を認めた。このう

図 6 アミノ酸の二次元ペーパークロマトグラフィー (左: 人胃癌, 右: 人胃潰瘍)



(a), (b) は不明物質, (1) セリン, (2) グリシン, (3) スレオニン, (4) アラニン, (5) バリン, (6) プロリン, (7) フェニールアラニン, (8) ロイシン又はイソロイシン, (9), (10) は不明物質

ち、癌と非癌では、泳動度の最も低い物質に屢々わずかなが差が見ら出された。即ち癌では $Rf=0.38$, 非癌では $Rf=0.35$ に来たる傾向をもつ物質である。更に、血液型物質の抽出法に準じて分画Ⅱをわけてゆくと、これらの物質は型物質と行動をともにするが、最後の段階で後者と分離され、分画Ⅴに入る。

ついで、これらの化学的組成を調べてみると、磷酸、コリン、糖、脂質の反応が陽性であつた。加水分解して糖とニンヒドリン反応を調べてみると、糖ではガラクトース、グルコース、マンノース、ガラクトースアミン、グルコースアミン（不明 1 個）が同定でき、ニンヒドリン反応では、癌材料のものには 9 個（セリン、グリシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニールアラニン、ロイシン及び不明物質 a）、非癌材料のものには 11 個（セリン、グリシン、スレオニン、アラニン、バリン、プロリン、フェニールアラニン、ロイシン、不明物質 b、9、10）のスポットが認められた。8 つのアミノ酸は癌、非癌に共通するが、癌のスポット（a）は非癌になく、非癌のスポット（b）、（9）、（10）は癌には存在しない。

このような諸反応の結果からみると、これらの物質は Glycolipo-peptide らしく、癌と非癌では少なくともその peptide の部分に差があるものと考えられる。またこれらの物質は透析、超遠心分析、Sephadex カラムクロマトグラフィーの結果あるいは抗原性の微弱乃至欠如からみてもかなり低分子で haptogenic な複合脂質であると考えて矛盾がない。また抽出法の相似性から考えると、本物質は神前の所謂マリゲノリピンに近いものと考えられたが、マリゲノリピンとは、peptide・糖の存在、スベルミンの欠如から、一応それとは異なる物質と考えられる。

つぎに、この物質の注目すべき生物学的活性にふれよう。まず 7 日目の Ehrlich 癌細胞はオブジェクトガラス上において、 γ -グロブリンを混じて検鏡すると、癌細胞は常にかんりの凝集をおこしているが（図 7）、ここに人胃癌からの $Rf=0.38$ 物質の微量を添加すると著明に癌細胞の分散がおこつた（図 8）。同様な現象は癌患者血清を加えた場合にも、高率におこることが、石川教授によつて発見され、この機転の解析と癌診断法としての価値の検索が行われつつある²⁸⁾。このような反応は一般に 1-6- β 糖結合をもつ複糖類の添加によつておこるが、それと同様な立体構造、原子間隔、結合エネルギーなどをもつ物質でも同じ効果を示す可能性がある。即ち、癌細胞の凝集乃至分散を来す条件としては、実験の一般的条件が全く同一である以上、細胞表面物質の分子構造に変化を来させるよう

な物質の有無が問題になる。ファージ感染によるサルモネラの細胞壁物質の分子変換のような現象²⁹⁾が、この場合おこっているということの説明は未だ全くないけれども、少なくとも $Rf=0.35$, 0.38 物質が生物学的活性の上で大きな差をもつことは明らかであり、その差は極めて分子のわずかな構造差に求められるであろう。即ち、このことは癌が 1 つの分子病であることを示唆するものといえるかも知れない。この点では正宗、川崎等が癌はムコ蛋白、ムコ多糖体に起因する分子病であるとし³⁰⁾³¹⁾³²⁾、 κ -Mucopolypeptide⁴⁾ の癌における特徴的な増加を認めた報告が注目される。 $Rf=0.35\sim 0.38$ 物質は透析上の態度、分布からみて、 κ -Mucopolypeptide とは異なる物質と考えられるが、発癌に伴う Glycopeptide 乃至 Glycolipo-peptide の分子変換は、今後の精力的な研究を必要とする現象といわねばならないであろう。

結 論

(1) 人胃癌から磷脂質抽出法で抽出した分画中におけるニンヒドリン反応陽性物質をペーパークロマトグラフィーで検索し、非癌胃組織（胃潰瘍、胃炎）のものと比較した。癌では最も屢々 $Rf=0.38$ に来たる物質が、非癌の場合には多少低く、 $Rf=0.35$ の値を示す傾向がある。

(2) これらの物質は、磷酸、コリンを含有する Glycolipo-peptide であり、人胃癌からのものと、非癌胃組織からのものとは、peptide 組成の上に差が認められた。

(3) 人胃癌組織から抽出した同物質には、 γ -Globulin の存在下で Ehrlich 腹水癌細胞の凝集を阻止する生物学的活性があり、非癌材料からの同物質には、この作用が全く認められなかつた。

稿を終るにあたり御指導御鞭撻戴いた恩師石川教授に深謝する。なお本研究は NIH 科学奨励金による。

文 献

- 1) Rapport, M. M., Grat, C., Skipski, V. P. & Alonzo, N. F. : Cancer, 12, 438 (1959).
- 2) 箱守仙一郎・川内広明 : 第 20 回 日本癌学会総会(仙台, 1961, X)
- 3) Masamune, H., Hakomori, S., Kaketa, H. & Sugo, T. : Tohoku. J. Exp. Med., 69, 371 (1959).
- 4) Masamune, H., Hakomori, S. & Sugo, T. : Tohoku, J. Exp. Med., 69, 383 (1959).
- 5) 川内 明・箱守仙一郎・石母田泰子・中村喜吉 : 第 35 回 日本生化学会 (東京, 1962, X)
- 6) Hradec, J., Stroufova, A. : Biochim. Biophys.

- Acta, 40, 32, (1960). 7) Hirszfeld, L., Halber, W., Laskowski, T. : Z. Immunitätsforsch., 64, 81 (1929). 8) Witebsky, E. : Klin. Wochschr. 9, 58 (1930). 9) Facius, L. & Toda, T. : Z. Immunitätsforsch., 67, 373 (1930). 10) Kobayashi, K. : Tohoku J. Exp. Med., 63, 185 (1956). 11) Kosaki, T., Ikeda, T., Kotani, N., Nakagawa, N. & Saka, T. : Science, 127, 1176 (1958). 12) Kosaki, T., Saka, T. : Mie Med. J., 5, 29 (1955). 13) Kosaki, T., Nakagawa, N. : Proc. Jap. Acad., 34, 295 (1958). 14) 神前武和・池田忠夫・中川信哉・村木敬司・永易則子 : 第35回日本生化学会 (東京, 1962, X). 15) Hamasato, Y. : Tohoku J. Exp. Med., 52, 17 (1950). 16) Trevelyan, W. E., Procter, P. P. & Harrison, T. S. : Nature, 166, 444 (1950). 17) Bial, M. : Biochem. Z., 3, 323 (1906). 18) Partidge, S. M. : Biochem. J., 42, 238 (1948). 19) Morgan, W. T. J. & Elson, L. A. : Biochem. J., 28, 988 (1934). 20) Sulya, L. L., Smith, R. R. : Biochem. Biophys. Resear. Commun., 2, 59 (1960). 21) Hanes, G. S., Isherwood, F. A. : Nature, 164, 1107 (1949). 22) Bartlett, G. R. : J. Biol. Chem., 234, 466 (1959). 23) Levene, C., Chargaff, E. : J. Biol. Chem., 192, 465 (1951). 24) Fleury, P. F. Courtois, J. E. & Malangean, P. : Bull. Soc. chim. biol., 35, 537 (1953). 25) Mckibbin, J. M., Taylor, W. E. : J. Biol. Chem., 178, 27 (1949). 26) Brady, R. O., Koval, G. T. : J. Biol. Chem., 233, 26 (1961). 27) Feigel, F. Anger, V. : Microchem. Acta, 70, 138 (1937). 28) 石川太刀雄 : 未発表. 29) Robbins, P. W., Uchida, T. : Feder. Proc., 21, 702 (1962). 30) Masamune, H. : Gann, 48, 629 (1957). 31) Kawasaki, H. : Tohoku J. Exp. Med., 68, 119 (1958). 32) Kawasaki, H. : Tohoku T. Exp. Med., 69, 153 (1959).

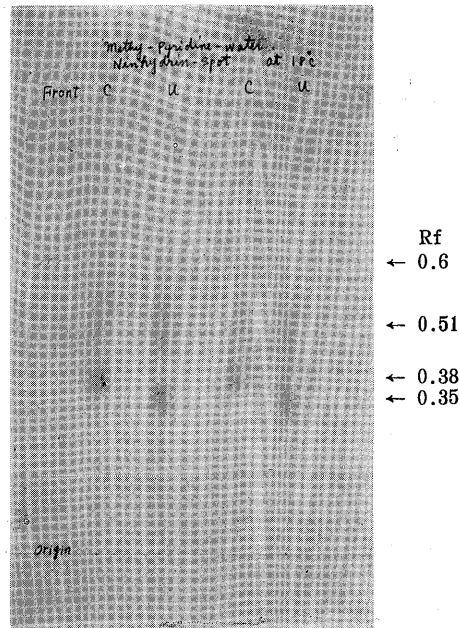
Abstract

(1) When examined by paperchromatography, a little difference was frequently observed between a glycolipopeptide in the phospholipid fraction of human gastric cancers and that of non-cancerous gastric tissues (cancer: $R_f=0.38$, non-cancer: $R_f=0.35$).

(2) The chemical differences in the peptideportion of these substances were found, when examined by paperchromatography after hydrolysis of the substances.

(3) When the substances of gastric cances was added to a suspension of Ehrlich ascites cells in the presence of γ -globulin, the inhibition of agglutination of ascites cells was microscopically observed, while that of non-cancerous tissues had no effect.

図 3：分画Ⅲの一次元ペーパークロマトグラフィー



C=人胃癌, U=人胃潰瘍

図 7：Ehrlich 腹水癌細胞の凝集；人非癌胃の Rf=0.35 物質添加

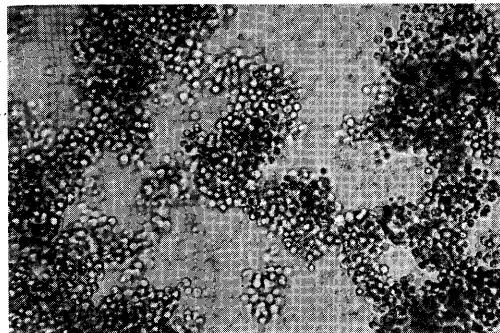


図 8：Ehrlich 腹水癌細胞の凝集阻止；人胃癌 Rf=0.38 物質添加

