

癌細胞核上清分画の免疫学的解析

—AH 腹水肝癌・ヒト胃癌を用いての実験的研究—

金沢大学医学部病理学第二講座(主任 石川大刀雄教授)

佐 原 吉 博

(昭和45年1月12日受付)

癌細胞組成の特異性を明らかにしようとする試みは、近年、細胞分画法の発達に伴い、細胞下構築レベルで、免疫学的あるいは生物物理化学的方法を用いて多くの研究がなされてきた。

われわれの教室においても、実験癌およびヒトの癌について癌特異抗原を見出した石川ら¹⁾²⁾の成績を始めとし、ここ数年来より系統的に細胞上清、ミトコンドリア、マイクロソーム、細胞膜、ヒストンらの細胞下レベルで免疫学的解析を行なってきた。

細胞核蛋白については、最近その重要性が注目され、生化学的ならびに免疫学的な解析が盛んに行なわれている。たとえば、ウイルス腫瘍については、1962年 Huebner ら³⁾が補体結合反応を用いて、アデノウイルス12型を幼若ハムスターに接種して出来た腫瘍中に、担腫瘍ハムスター血清と特異的に反応するいわゆるT抗原が存在することを報告して以来、アデノウイルス、SV40 およびポリオマウイルス腫瘍中のいわゆるT抗原についての報告⁴⁾⁷⁾があいついで出され、螢光抗体法によりこの抗原組成が核に存在すること、さらにアルカリ可溶性の核上清分画に存在することが明らかにされた⁸⁾。また Rous sarcoma および Shope papilloma については、Zilber⁹⁾¹⁰⁾は pH 4.5 不溶核蛋白分画に腫瘍特異抗原を見出し、ヒトの腫瘍についても同様の報告を行なっている。また平井ら¹¹⁾¹²⁾は AH49 腹水肝癌およびヒト胃癌の pH4.8 可溶核蛋白分画に癌特異抗原を見出し、Busch¹³⁾は、Walker 腫瘍の核ヒストン分画に癌特異性のつよい RP-2L 抗原があることを報告している。

著者はラットの AH127 および AH66F 腹水肝癌ならびにヒト胃癌の核上清およびその subfraction の抗原分析を主として寒天内免疫二重拡散法を用いて行ない、若干の興味ある知見を得たのでここに報告する。

実験材料ならびに実験方法

I. 実験材料

1. AH127 および AH66F 腹水肝癌

佐々木研究所より分与を受けた株を雑系ラットに移植し、AH127腹水肝癌は10~14日後に、AH66F 腹水肝癌は5~7日後に腹水癌細胞を採取した。対照材料として、正常ラットの諸臓器(肝、腎、脾、心、肺、胎児肝、血清)を用いた。

2. ヒト胃癌

手術的に切除した癌組織を用い、材料は常に一部を病理組織標本として所見を確認した。対照の非癌材料

表1 実験材料

組 織 材 料	例 数
1. 胃 癌 組 織	51*
未分化髓様癌	22
硬 癌	2
腺管状腺癌	16
乳頭状腺管状癌	11
2. 非胃癌組織	33
胃潰瘍	18
慢性胃炎	15
3. その他の癌組織	
乳 癌	5
直腸癌	3
回盲部癌	2
胃癌肝転移腫瘍(剖検)	2

※剔出材料は5~6例分をプールして抗原の抽出を行なった。

Immunological Analysis of Nuclear Sap of AH Ascitic Hepatoma Cells and Human Gastric Cancer Cells. Yoshihiro Sahara, Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

としては、胃潰瘍、慢性胃炎を用いた。本実験に使用した組織材料を表1に示す。

II. 実験方法

1. 細胞分画法

AH127 および AH66F 腹水肝癌細胞は採取後、生理的食塩水で数回洗浄し、血液や腹水成分を除いた。

ヒト胃癌および非胃癌材料は手術的に剔出後、直ちに0~4°Cのストッカー中に保存し、剔出後12時間以内に分画操作を完了するようにした。癌組織および粘膜筋板上に剝離した正常胃粘膜は、壊死部、結合組織、血管を十分に除き、細片し、生理的食塩水で十分に洗浄しつつ血液および粘液などを除いた。

このように準備された材料は Hogeboom・Schneider 法¹⁴⁾および Chauveau 法¹⁵⁾に準じ、材料に4倍量の冷0.25Mシヨ糖液を加え、水冷しながら Potter・Elvehjem 型ガラスホモゲナイザーで約10分間ホモゲナイズした。ホモゲナイズする時間は材料により異なり、毎回ゲンチアナビオレット 酢酸液で染色、検鏡し、材料が核と細胞成分とによく分離されるまで行なった。ホモジネートは 700×g・10分遠心して核成分を沈澱させた。(ヒト胃癌および胃組織の場合は同様の操作を2~3回行なった。) 沈澱物にその4~5倍量の0.25M冷シヨ糖液を加え、懸濁し、一重のモスリンで濾過した。さらに700×g・10分遠心し、その沈澱部分に0.0018MのCaCl₂を含む冷0.25Mシヨ糖液を加えて一様に懸濁した後、0.0018M CaCl₂を含

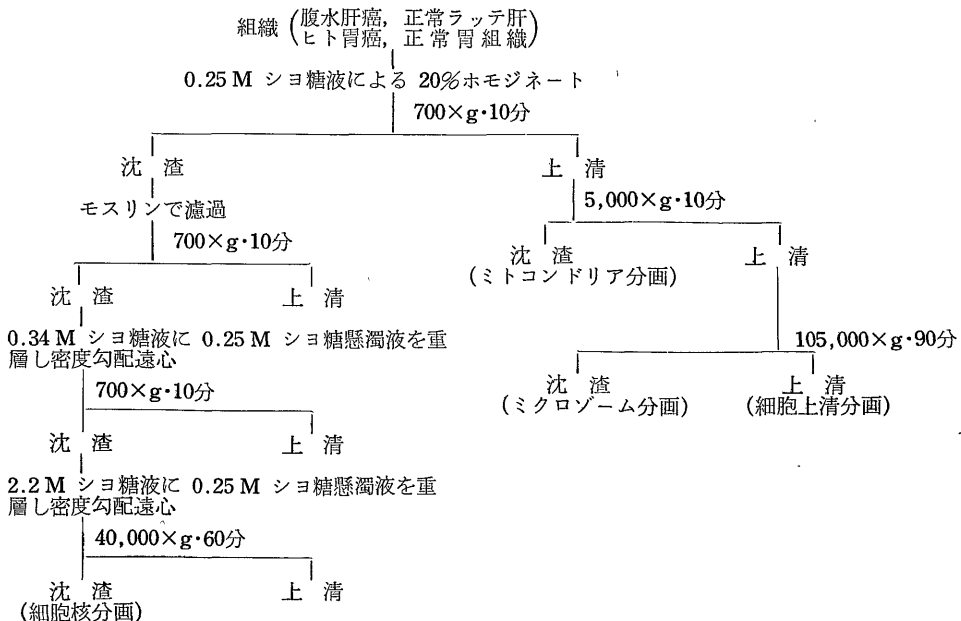
む0.34Mシヨ糖液に注意深く重層して、密度勾配遠心操作を700×g・10分行ない、粗核分画を分離した。次に粗核分画を0.25Mシヨ糖液で一様に懸濁した後、2.2Mシヨ糖液に重層して、密度勾配遠心操作を40,000×g・60分行ない、核分画を集めた。分離した核は使用時まで-20°Cに貯えた。

2. 核上清分画の抽出

核上清分画の抽出は Patel ら¹⁶⁾の方法に準じ、分離した凍結核分画に10倍量の0.14M NaCl-0.005M MgCl₂-0.02M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.5)を加え、Potter・Elvehjem 型ガラスホモゲナイザーで10分間ホモゲナイズし、氷室で30分間攪拌した。その後13,000×g・30分遠心して上清を取り、沈澱を同様の操作で再抽出し、両方の上清を105,000×g・90分間 Spinco L 型超遠心機を用いて遠心した。この上清成分(核上清分画)を風乾にて濃縮し、抽出緩衝液に対して12~24時間透析した。

一方、核上清分画を50%硫酸飽和とし、この上清成分(50%硫酸飽和上清分画とする)を抽出緩衝液に対して12~24時間透析し、風乾にて濃縮した。沈澱成分(核グロブリン分画とする)は抽出緩衝液で再溶解して上清成分と同様に透析し、IN HCl でpH 4.8に調整した後、等量の0.4M 酢酸緩衝液(pH 4.8)を加え、氷室で30分間攪拌した。不溶成分(核グロブリン・I分画とする)に抽出緩衝液を加え、IN NaOH でpH 7.5に再調整し、可溶成分(核グロブリン・II分

表2 細胞核の調製法と細胞分画



画とする)と共に抽出緩衝液に対して12~24時間透析し、風乾にて濃縮した。これらの抽出操作はすべて氷冷しながら 4°C 以下で行なった。

3. 抗原

1) 免疫抗原

AH127 および AH66F 腹水肝癌およびヒト胃癌組織より抽出した核上清分画および核グロブリン・I分画を免疫抗原とした。各分画の蛋白量は 10mg/ml とし、蛋白の定量は biuret 法¹⁷⁾を用いた。

2) 試験抗原

上記各組織および対照の正常組織より抽出した核上清分画 および その subfraction を試験抗原とし、各分画の蛋白量は 10mg/ml とした。

4. 抗血清の調製

Freund の complete adjuvant 法¹⁸⁾に準じ、蛋白量 10mg/ml の抗原懸濁液 3ml を adjuvant 液 (BCG 死菌 85mg, 流動パラフィン 85ml, アラセルA オイル 15ml) の等量と混合して乳剤を作り、体重 2.0~2.5 kg の家兎の肩甲下腔に1週間間隔で3回注射し、最終免疫注射後3週目に蛋白量約 30ml の抗原液のみの第1回追加免疫を行ない、それ以後時々耳静脈より部分採血を行なって、寒天内免疫二重拡散法で抗体価をしらべ、抗体価が高まったところで、全採

血を行なった。多くの場合、最終注射後1週間に全採血を行なった。抗体の産生が低い場合は、さらに第2回目の追加免疫を行なってから1週間後に全採血を行なった。分離した血清は -20°C に保存した。

5. 吸収抗血清の調製

抗血清の吸収には、試験管内吸収法と寒天内吸収法を行なった。

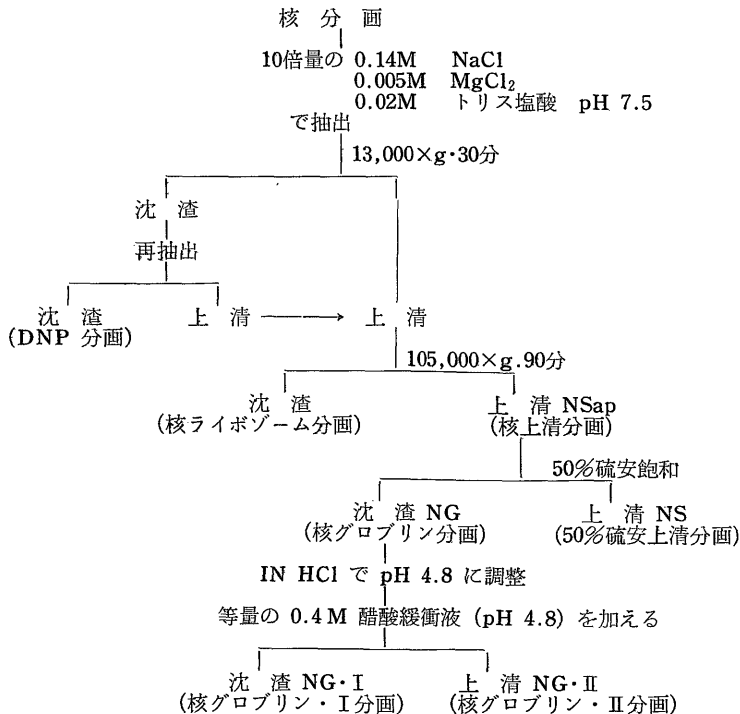
試験管内吸収法は、予備実験で確めておいた最適吸収抗原量(おおむね1:1)を3~4回にわけて行なった。まず抗原の適量を抗血清に加え、37°C, 2時間振盪反応させ、4°C 氷室に2時間放置した後、10,000 ×g・10分遠心して沈澱を除いた。その上清について同様な採作を2~3回くりかえし、最終吸収採作後は4°C 氷室に一夜放置し、遠心後その上清を吸収抗血清とした。

寒天内吸収法は、Björklund による specific inhibition technique¹⁹⁾を用いて行なった。吸収すべき抗原をあらかじめ抗体孔に入れ、24時間、4°C に放置後抗体孔を洗い、そこへ抗血清を入れて、抗原との反応を行なった。

6. 寒天内免疫二重拡散法 (Ouchterlony 法²⁰⁾)

透析精製した4%寒天ブロック 15g, 0.01% に EDTA を含む 0.1N リン酸緩衝液 (pH 7.2) 1.5

表3 核上清分画の抽出



ml, 1 N NaN₃ 3.0 ml, 蒸留水 10.5 ml を加え, 全量 30ml とし, 加温溶解する. あらかじめ 1% 寒天溶液で表面に薄層膜をつくっておいた 8×12 cm のガラス板上にこの混合液 15ml を流し, 冷却固化させ厚さ約 2 mm の寒天板をつくった. 抗体孔および抗原孔の直径 0.6 cm, 間隔 0.6 cm とし, 抗体孔を中心として 60°C の角度に抗体孔と抗原孔の位置を定めた. 20°C の湿室内で反応させ, 沈降線が出そろうたとき (3~4 日後) に写真撮影を行ない, 洗浄, 乾燥後, thiazine red で蛋白染色²¹⁾して保存した. 必要に応じ Sudan blak B を用いて脂肪染色²²⁾, α-naphthol-p-phenyldiamine を用いて糖染色²³⁾を行なった.

7. 免疫電気泳動法 (Graber 法²⁴⁾)

寒天濃度 1.3%, ペロナール緩衝液 (pH8.3, $\mu=0.1$), 厚さ 0.1 cm の 8×12 cm の寒天板を使用した. 抗原孔は 0.2×0.7 cm とし, 抗原孔と抗体溝の距離は 0.5 cm とした. 泳動条件は室温, 湿室内で平板 1 枚当り 16mA, 250 volt, 定電流, 定電圧, 90分泳動を行ない, 以後の処理は寒天内二重拡散法と同様にした.

8. DEAE セルローズカラムによる抗原の分画

0.035M トリス緩衝液 (pH7.8) で充分緩衝化した DEAE セルローズカラム (1.5×20 cm) に上記緩衝液に透析した核グロブリン・I 分画 100mg をチャージし, NaCl 濃度による段階的溶出を行なった. 各段階は 0.035M トリス緩衝液に, NaCl をそれぞれ 0M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M の濃度に溶解して用いた. 溶出速度は約 20ml/h とし, フラクションコレクターで 5 ml ずつ採取した. 280 m μ および 260 m μ の紫外部吸収度を測定し, 各蛋白分画を集め, 風乾により濃縮し, 前記抽出緩衝液に対して透析し, 蛋白量を 10 mg/ml に調整し, -20°C に保存した.

9. ペーパークロマトグラフィ

赤堀らの方法²⁵⁾に従い, DEAE カラムクロマトグラフィで分離した蛋白分画を塩酸加水分解し, 東洋濾紙 No. 50 (ペーパークロマト用) を用いて, 上行法により二次元展開を行なった. 溶媒は(1)ブタノール:氷醋酸:水 (4:1:2), (2)フェノール:水 (7:3) を用い, 展開終了した濾紙は風乾後, 0.2% ニンヒドリン水飽和ブタノール液を噴霧し, 100°C, 5分で発色させた.

10. 螢光抗体法

Marshall 法に基づいた浜島²⁶⁾の方法に従いがい, 抗血清の r グロブリン分画に fluorescein isothiocya-

nate をラベルした後, Sephadex G25 および DEAE セルローズカラムに通して, 遊離色素を除いた. さらに非癌核グロブリン・I 分画の充分量と 37°C, 1時間インキュベートし, ついで氷室内に一夜放置後遠心し, 上清を使用した. 標本は組織の場合は, 剔出後直ちに -70°C ドライアイス・アセトンで迅速に凍結し, cryostat で 6 μ の薄切片を作製した. また腹水肝癌の場合は塗抹標本を用いた. 標本は螢光抗体液で室温, 湿室内で 30~60分間直接法で染色し, 緩衝液で洗浄して検鏡した.

11. 超遠心分析

超遠心分析には, Spinco E, ロータ AND および合成界面セルを使用し, 59,780 rpm, 4°C の条件で行なった. 蛋白量は 30~40 mg/ml を用い分析に供した.

12. 組織学的検索

組織学的検索には, 各組織を 10%ホルマリン固定し包埋, hematoxylin-eosin 染色を行なった.

実験結果

I. 核上清分画の吟味

核上清分画の抗原分析を行なう場合, まず問題となるのは, 分離核の精製度である. 著者は Shneider 法¹⁴⁾にしたがい, 検鏡しながら分離した粗核成分を, Chauveau 法¹⁵⁾により精製するようにつとめたが, 数%の細胞成分の混入は防ぎ得なかった. 従って, 105,000×g・90分遠心の上清である細胞質上清分画との対比, さらにはその他の subcellular fraction との比較が必要である.

II. 核上清分画の抗原分析

使用した試験抗原および免疫血清は次のように略記する.

- NSap ; 核の 105,000×g・90分遠心の上清である核上清分画
- NS ; NSap の 50%硫酸飽和上清分画
- NG ; NSap の 50%硫酸飽和で沈澱する核グロブリン分画
- NG・I ; NG の pH4.8 不溶成分である核グロブリン・I 分画
- NG・II ; NG の pH4.8 可溶成分である核グロブリン・II 分画
- NG・I・P₁, NG・I・P₂, NG・I・P₃………
; NG・I の DEAE カラムクロマトグラフィによる各ピーク
- CSap ; 細胞質の 105,000×g・90分遠心の上清である細胞質上清分画

抗・NSap ; NSap の免疫血清

抗・NSap-N

； 抗・NSap を正常ラッテ肝 NSap で吸収したもの

抗・NG・I ; NG・I の免疫血清

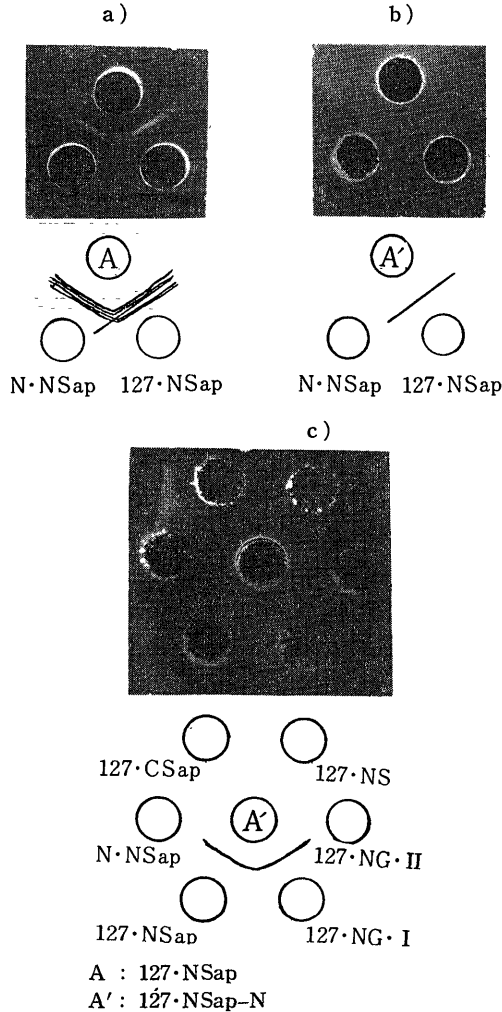
抗・NG・I-N

； 抗・NG・I を正常ラッテ肝 NG・I で吸収したもの

なお AH127 腹水肝癌, AH66F 腹水肝癌, 正常ラッテ肝, ヒト胃癌 および 正常胃粘膜の NG・I の場合は, それぞれ 127・NG・I, 66・NG・I, N・NG・I, HC・NG・I および HN・NG・I と略記することにする。

1. 寒天内免疫二重拡散法

図1. AH127 腹水肝癌核上清分画の寒天内免疫二重拡散法抗

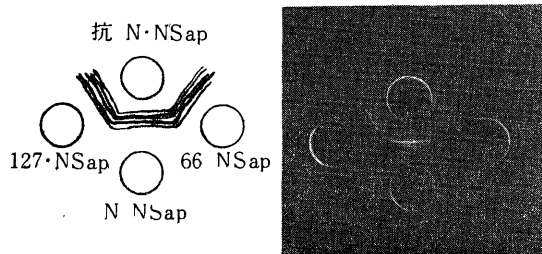


127・NSap と N・NSap の相互の抗原組成の差異を抗 127・NSap, 抗 N・NSap を用いて, 寒天内免疫二重拡散法で調べた. その結果, 最も注目される点は, 癌抗原には正常にみられない抗原組成があらわれてくることである. すなわち抗 127・NSap に対して 127・NSap と N・NSap とを反応させると, 6~7本の共通沈降線がみられる他に, 127・NSap に1本の非癌材料にない沈降線が得られた (図1 a). 共通成分を吸収により取り除くと, 127・NSap に1本の沈降線が残った (図1 b). 次に 127・NSap について, さらに分画を進め, この癌特異的な沈降線がいずれの分画に存在するかを調べたところ, 127・NS, 127・NG・II および 127・CSap には存在せず, 127・NG・I に存在することが認められた (図1 c).

そこで抗 127・NG・I を作り, 127・NG・I 分画の抗原分析を進めることとした。

一方抗 N・NSap を用いて, N・NSap と 127・NSap を反応させると, 6本の共通した沈降線がみられたが, N・NSap に特徴的な沈降線は得られなかった (図2). 共通成分を 127・NSap で吸収すると, 沈降線はすべて消失し, 癌化による正常組織抗原の消失は認められなかった。

図2. 正常ラッテ肝核上清分画の免疫と AH127 および AH66F 腹水肝癌核上清分画との比較



III. AH127 および AH66F 腹水肝癌核グロブリン・I 分画 (127・NG・I, 66・NG・I) の抗原分析

1. 核グロブリン・I 分画の収量および化学的組成
 AH127腹水肝癌核より抽出された 127・NG・I の収量は表4の如く平均 4.8%, N・NG・I は 4.5%であった. NG・I の蛋白量, RNA および DNA 量をそれぞれ biuret 反応¹⁷⁾, orcinol 反応²⁷⁾, diphenilamine 反応²⁸⁾により測定すると表4の如く, 127・NG・I には RNA が 3.9%, DNA が 0.4%, N・NG・I には RNA が 4.1%, DNA が 0.3%の割合で含まれている. 66・NG・I, HC・NG・I および HN・NG・I についてもほぼ同様の成績であった. なお DEAE カラムクロマトグラフィーで 0.2M NaCl (0.035M

表4 核グロブリン・I分画の収量および化学的組成

	核蛋白中に占める割合%	蛋白 %	RNA %	DNA %
127・NG・I	4.8	95.5	3.9	0.4
66・NG・I	4.7	94.6	4.8	0.5
N・NG・I	4.5	95.0	4.1	0.3
HC・NG・I	4.6	95.2	4.1	0.6
HN・NG・I	4.5	94.0	4.6	0.6
127・NG・I・P ₄ *	0.35	100	0	0
N・NG・I・P ₄	0.3	100	0	0

* DEAE セルローズカラムで 0.2 M NaCl 濃度 (0.035 M トリス緩衝液 pH 7.8) で溶出される蛋白分画

トリス緩衝液 pH 7.8) で溶出してくる 127・NG・I・P₄ には RNA および DNA は含まれていない。その収量はチャージした 127・NG・I の 7% で、全核蛋白量の 0.35% であった。

2. 寒天内免疫二重拡散法

抗 127・NSap および 吸収抗血清を用いての 127・NSap と N・NSap の相互の抗原分析の結果、癌に特徴的な抗原が 127・NG・I に存在することが確かめられたので、この癌特徴的な抗原の分析をさらに進めるため、127・NG・I を家兎に免疫して抗 127・NG・I を作り、これを用いて検討を行なった。

抗 127・NG・I に対して 127・NG・I と N・NG・I とを反応させると、5~6本の共通抗原がみられる他に、127・NG・I に1本の非癌にない沈降線が得られた(図3 a)。共通抗原を吸収により取り除くと、非癌にない沈降線1本だけ残った(図3 b)。ここでこの抗原を仮に 127C 抗原と呼ぶことにする。127C 抗原は前述の抗 127・NSap-N に対して残った癌に特徴的な抗原と一致した(図3 c)。127C 抗原の抗原価は抗 127・NG・I に対しては32倍、抗 127・NG・I-N に対しては8倍であった(図4 a, b)。正常ラットの種々の臓器の NG・I をしらべてみると、127C 抗原は腎、脾、心、肺、胎児肝および血清にはみられなかった(図5)。また AH127 腹水肝癌細胞の他の分画と対比してみたが、127・CSap, 127・NS, 127NG・II および 127・histone (硫酸抽出) 中にも認められなかった(図6 a, b)。各種AH腹水肝癌 (39, 42, 66F, 108, 109, 205, 311, 414, 7974) の NG・I との比較を行なってみると(図7 a, b), 127C 抗原は他の AH 腹水肝癌には認められず、AH127 腹水肝癌特異性のものと判断された。

図3. AH127 腹水肝癌核グロブリン I分画の寒天内免疫二重拡散法

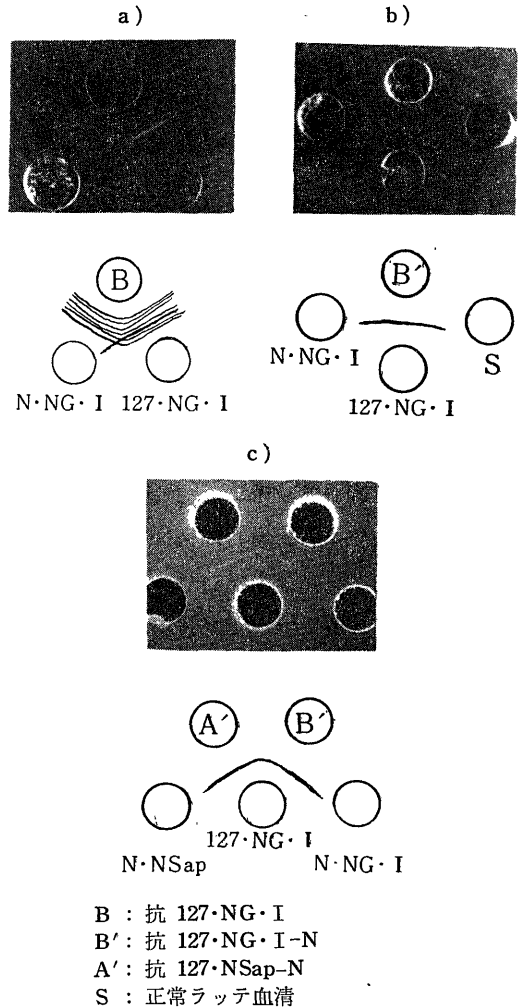
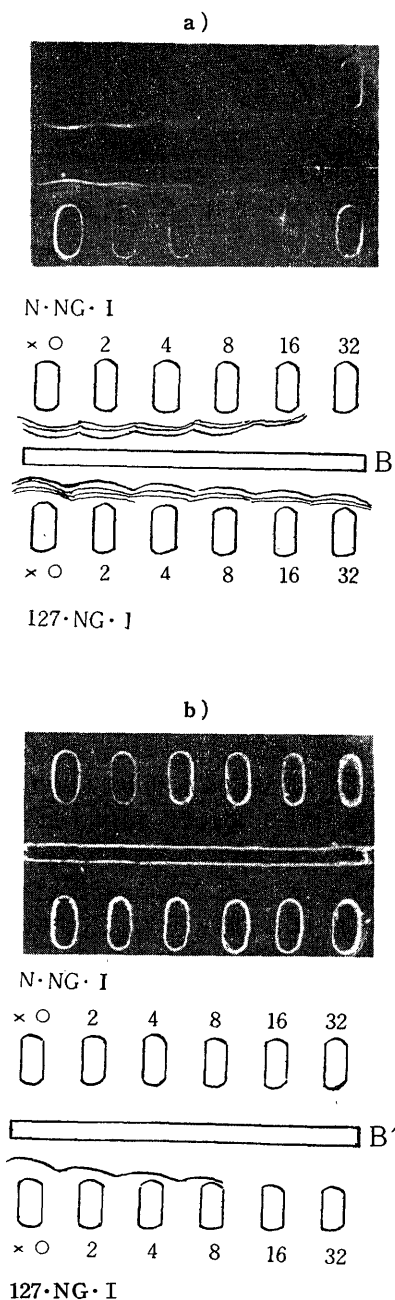


図4. 127C 抗原の寒天内免疫二重拡散法による定量



B : 抗 127·NG·I
B' : 抗 127·NG·I-N

図5. AH127 腹水肝癌核グロブリン·I 分画と正常ラッテ肝, 腎, 脾, 心, 肺, 胎児肝との比較

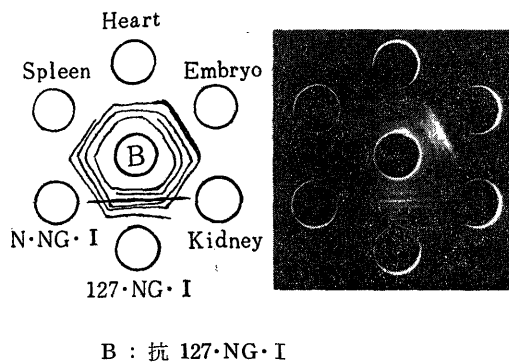


図6. AH127 腹水肝癌核グロブリン·I 分画と他分画との比較

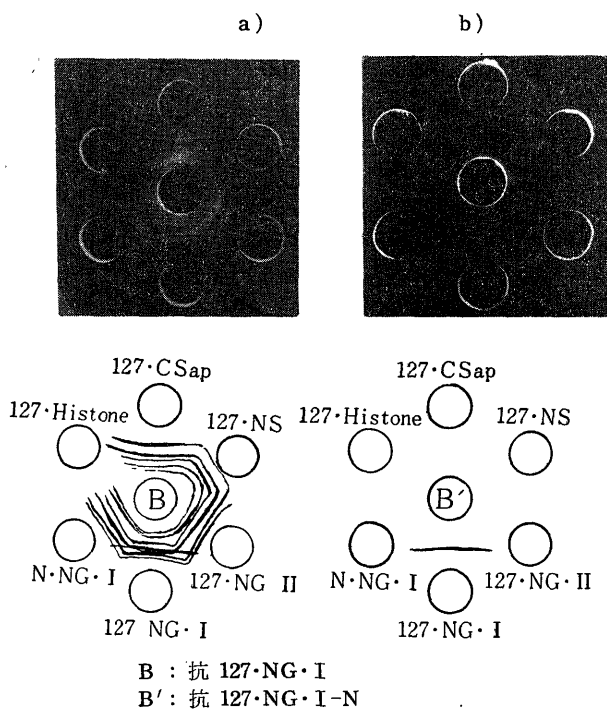
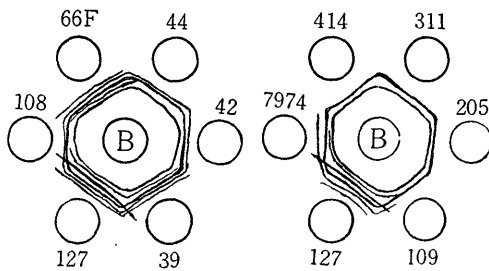
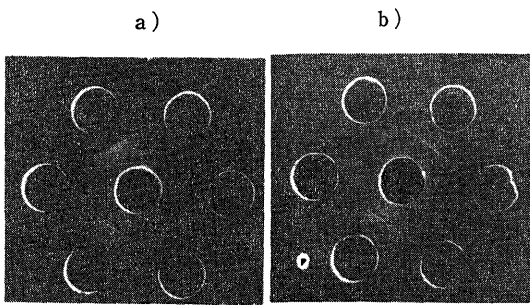
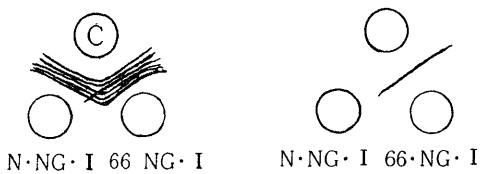
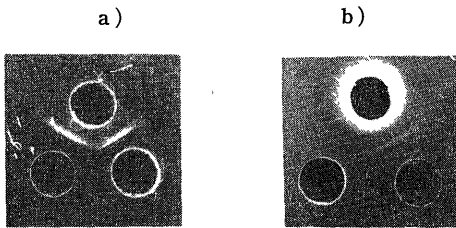


図7. AH127 腹水肝癌核グロブリン・I分画と各種AH 腹水肝癌核グロブリン・I分画との比較



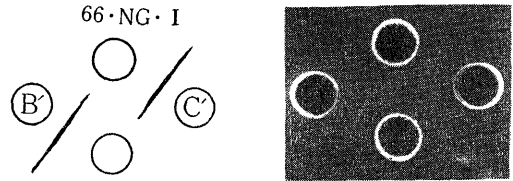
B : 抗 127·NG·I

図8. AH66F腹水肝癌核グロブリン・I分画の寒天内免疫二重拡散法



C : 抗 66·NG·I
C' : 抗 66·NG·I-N

図9. 127C 抗原と 66C 抗原の比較



B' : 抗 127·NG·I-N C' : 抗 66·NG·I-N

そこで、対照として AH66F 腹水肝癌について、抗 66·NG·I を作り、127·NG·I と同様に抗原分析を行なった。抗 66·NG·I に 66·NG·I と N·NG·I とを反応させると、共通沈降線の他に、1本の 66·NG·I に特徴的な沈降線が得られた(図8 a, b)。ここでこの抗原を仮に 66C 抗原と呼ぶことにする。66C 抗原は正常ラット諸臓器(腎、脾、心、肺、胎児肝)の NG·I および正常ラット血清中には認められず、AH66F 腹水肝癌細胞の NG·I 以外の分画にも認められなかった。また 127C 抗原と 66C 抗原は互いに交叉し、それぞれ異なったものであった(図9)。

3. 免疫電気泳動法 (IEP)

抗 127·NG·I と 127·NG·I および N·NG·I との IEP では、抗原孔を中心にそれぞれ5~6本の沈降線が認められ(図10 a)、抗 127·NG·I-N に対しては、127·NG·I に血清の β グロブリン位に相当する泳動度を示す沈降線のみが残った(図10 b)。つぎに IEP と寒天内免疫二重拡散法を併用してみるとこの沈降線は 127C 抗原と一致した(図10 c)。同様に 66C 抗原は抗 66·NG·I-N に対して、血清の β グロブリン位に相当する泳動度を示した(図11)。

4. DEAE カラムクロマトグラフィー

DEAE カラムクロマトグラフィー(0.035M トリス緩衝液 pH7.8)で 127C 抗原の精製を試みた。溶出パターンは図12のようなものである。それぞれの塩濃度で溶出されるピークを P₁, P₂, …, P₈ と呼ぶと、P₁~P₇ は O·D 280m μ に紫外部吸収極大を示し、biuret 反応陽性であった。また P₈ は O·D 260m μ に紫外部吸収極大を示し、orcinol 反応陽性であった。各ピークの蛋白分画を抗 127·NG·I および抗 127·NG·I-N と反応させてみると、127C 抗原は塩濃度 0.2M で溶出される P₄ (127·NG·I·P₄) に存在した(図12 b, c)。他のピークの蛋白分画はすべて N·NG·I との共通抗原であった。127·NG·I·P₄ の収量は前述のようにチャージした 127·NG·I 蛋白量の7%で

図10. AH127 腹水肝癌核グロブリン・I分画の免疫電気泳動

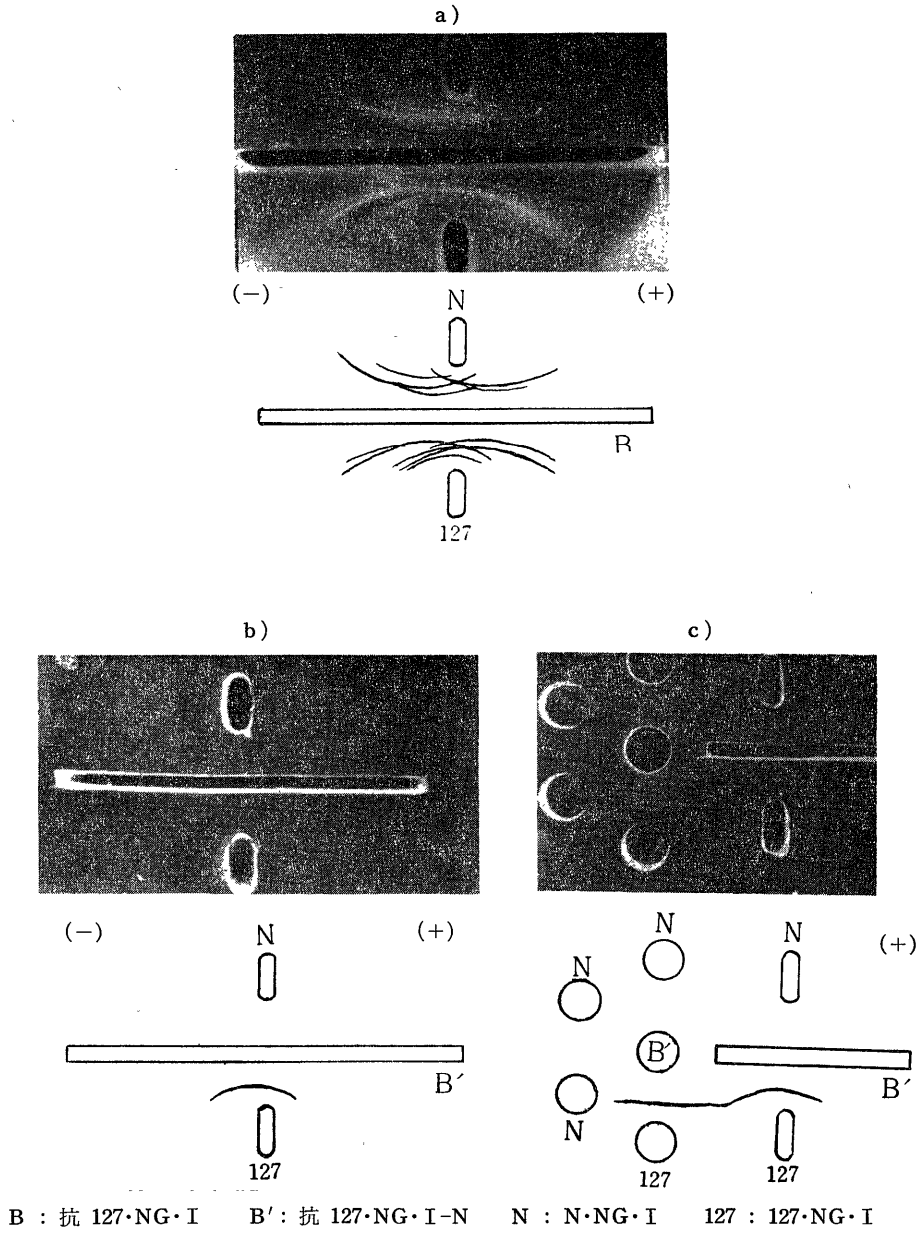


図11. AH66F 腹水肝癌核グロブリン・I 分画の免疫電気泳動

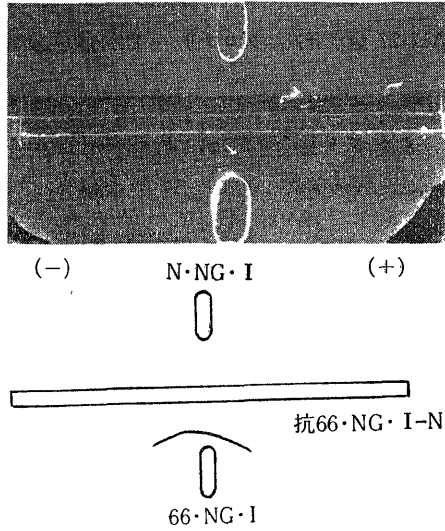
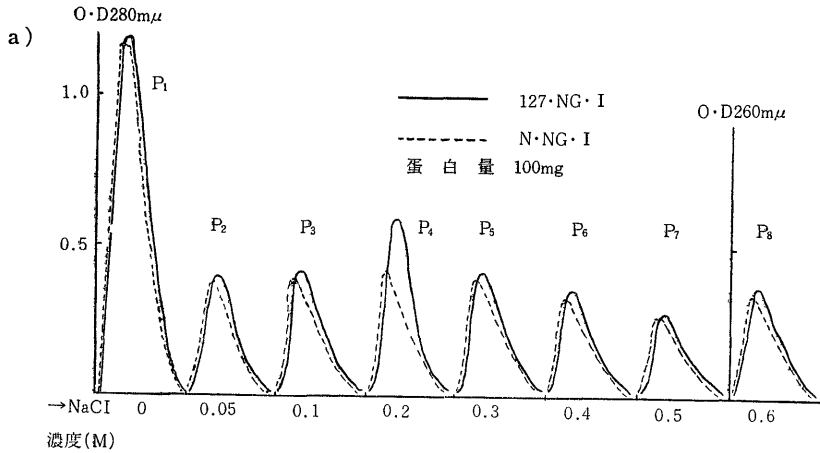
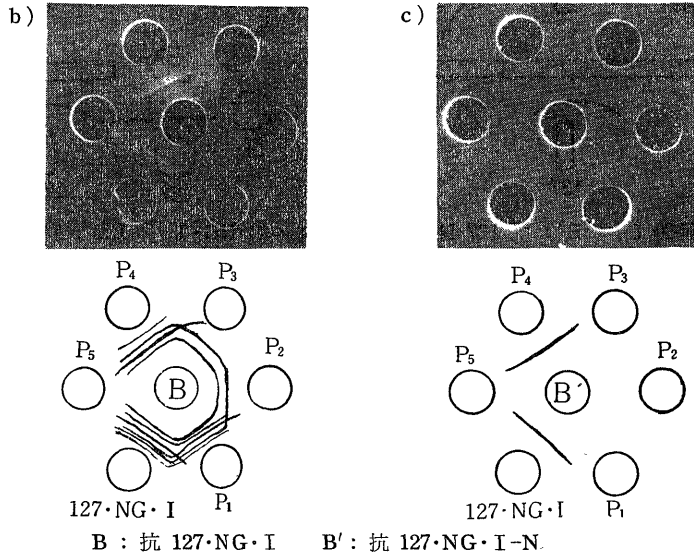


図12. AH127 腹水肝癌核グロブリン・I 分画の DEAE カラムクロマトグラムと寒天内免疫二重拡散法



溶出液: NaCl-0.035M トリス緩衝液 pH 7.8



あり、総核蛋白量の0.35%であった。127·NG·I·P₄は弱いながらもN·NG·Iとの共通抗原を含むので再クロマトグラフィーを行なって精製した(図13)。塩濃度0.2Mで再溶出される分画(127·NG·I·P₄'とする)の収量はチャージした127·NG·I·P₄の40%であった。沈降定数の測定を行なってみると、図14のように127·NG·I·P₄は4Sの主成分と18Sの副成分の2つの成分を含むが、127·NG·P₄'は4Sの成分のみであった。

66·NG·Iについても、同様にDEAEカラムクロマトグラフィーを行なった。66C抗原は塩濃度0.2Mで溶出されるP₄に存在した(図15)。

5. 127C 抗原および 66C 抗原の性格

127C 抗原および 66C 抗原について、pH、熱安定性、染色性およびペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸分析などの検討を行なった。127C 抗原および 66C 抗原はpH 5.4 附近以下で沈殿する蛋白であり(図16 a)、70°C・10分の加熱で抗原性を失なって沈降反応を示さなくなった(図16 b)。また 127C 抗原は trypsin (37°C・2時間作用)で消化され、thiazine red による蛋白染色は陽性であるが、脂肪染色、糖染色共に陰性であった。127·NG·I·P₄'を酸加水分解し、

二次元ペーパークロマトグラフィーを行なうと、図17のように8~9個のスポットが得られた。酸性アミノ酸であるグルタミン酸とアスパラギン酸が最も多く、以下アラニン、ロイシン、バリンの順に少なく、グリシン(セリン)含量は最も少なかった。塩基性アミノ酸(リジン、アルギニン)はグリシンと同程度の含量であった。66·NG·I·P₄'およびN·NG·I·P₄'についても同様にペーパークロマトグラフィーを行なったが、癌と非癌との間には著明な差はみられなかった。

図13. 127·NG·I·P₄の再クロマトグラム

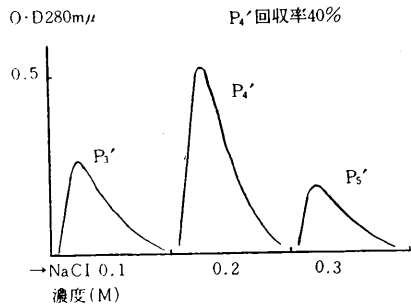


図14. 127·NG·I·P₄および P₄'の沈降定数の測定

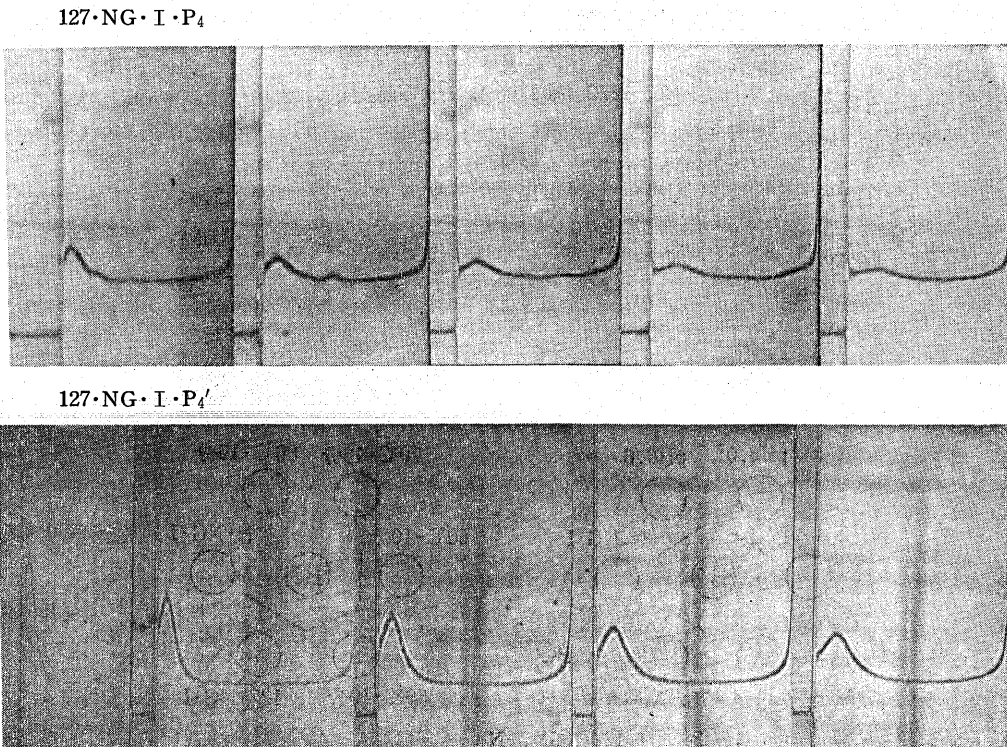
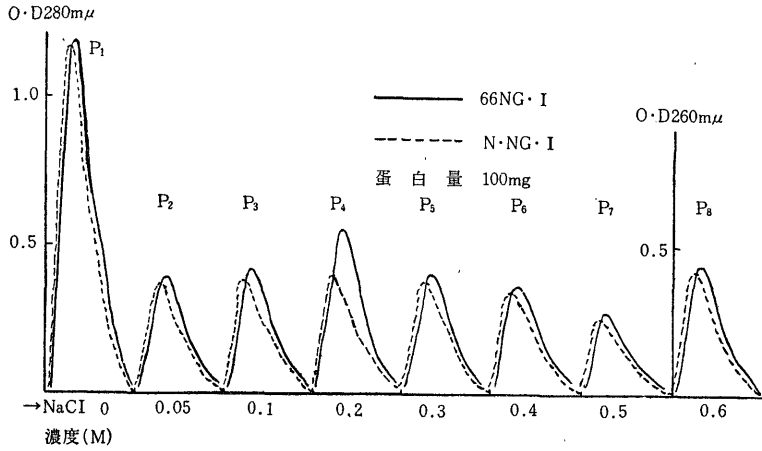


図15. AH66F 腹水肝癌核グロブリン・I分画の DEAE カラムクロマトグラムと寒天内免疫二重拡散法



溶出液: NaCl-0.035M トリス緩衝液 pH 7.8

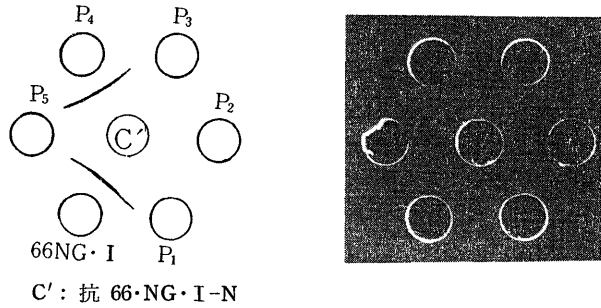


図16. 127C 抗原の pH および熱安定性

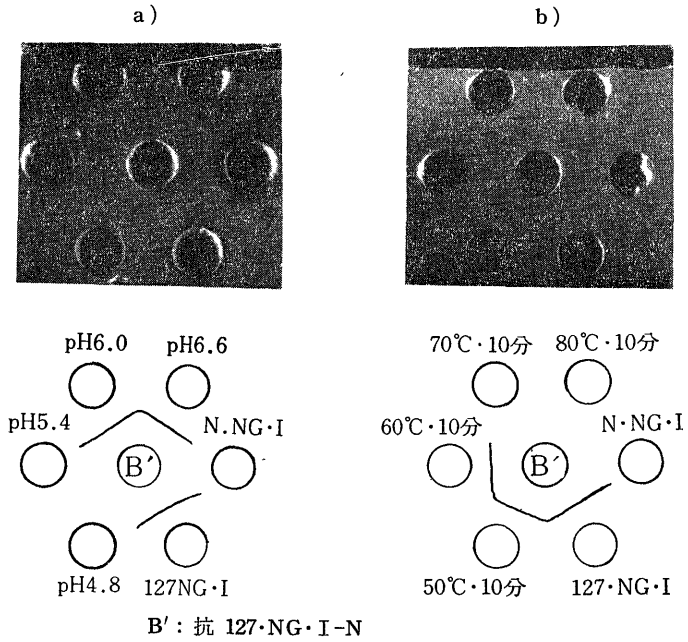
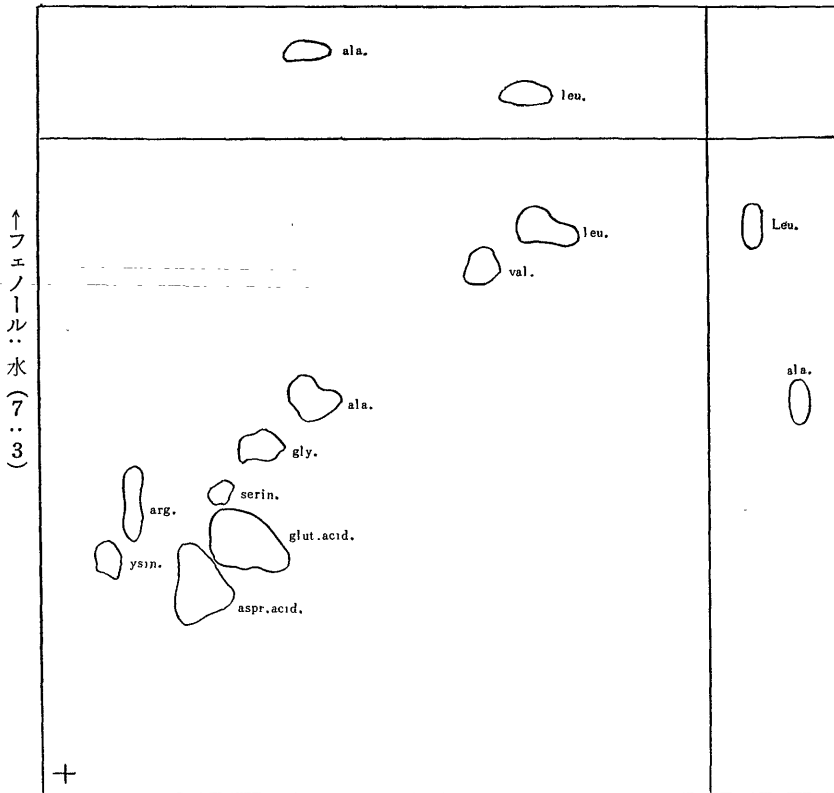


図17. 127・NG・I・P₄' のペーパークロマトグラム



→ブタノール:氷醋酸:水(4:1:2)

6. 蛍光抗体法

AH127 および AH66F 腹水肝癌細胞および正常肝細胞について蛍光染色を行なった。AH127 腹水肝癌細胞を抗 N・NG・I でブロックした後、127・NG・I 蛍光標識抗体で染色すると(写真1)、核は瀰漫性に強く染色され、chromatin に特に多いようには認められなかった。細胞質も若干の蛍光を発するがその程度はきわめて弱く、一方正常肝細胞は核、細胞質とも全く蛍光を示さなかった。同様に 66・NG・I 蛍光標識抗体で AH66F 腹水肝癌細胞を染色すると(写真2)、核が瀰漫性に染色された。つぎに AH127 腹水肝癌と AH66F 腹水肝癌について、相互の交叉染色*は非常に弱く、それぞれの癌の特異性が確かめられた。

IV. ヒト胃癌核グロブリン・I 分画の抗原分析

* 脚注

127・NG・I 蛍光標識抗体で AH66F 腹水肝癌細胞を染色、同様に 66・NG・I 蛍光標識抗体で AH127 腹水肝癌細胞を染色した。

1. 寒天内免疫二重拡散法

抗 HC・NG・I に対して HC・NG・I と HN・NG・I を反応させると5~6本の共通抗原がみられる他に、HC・NG・I に1本の非癌でない沈降線が得られた(図18a)。共通抗原を吸収すると非癌でない沈降線1本だけ残った(図18b)。ここでこの抗原を仮にHC抗原とする。HC抗原はヒト胃癌の8抽出グループすべてに認められた。HC抗原はヒト胃癌細胞の他の分画および血清中には認められなかった(図18c)。またヒト胃癌以外の他臓器癌 NG・I について比較検討を行なった。乳癌(5例)、直腸癌(3例)、回盲部癌(2例)にはHC抗原は認められなかったが、胃癌肝転移腫瘍2例中1例に共通成分を認めた(図19ab)。

2. 免疫電気泳動法 (IEP)

抗 HC・NG・I-N と HC・NG・I および HN・NG・I との IEP では HC・NG・I に血清のβグロブリン位に相当する泳動度を示す沈降線のみが残った(図20a, b)。寒天内二重拡散法と併用すると、この

図18. ヒト胃癌核グロブリン・I分画の寒天内免疫二重拡散法

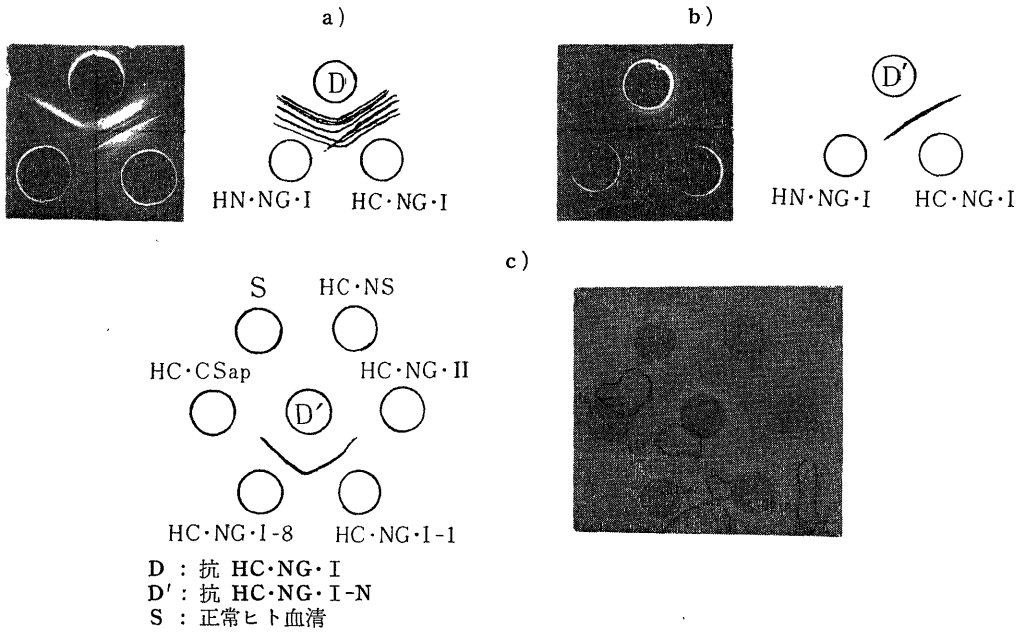


図19. ヒト胃癌核グロブリン・I分画と各種臓器癌核グロブリン・I分画の比較

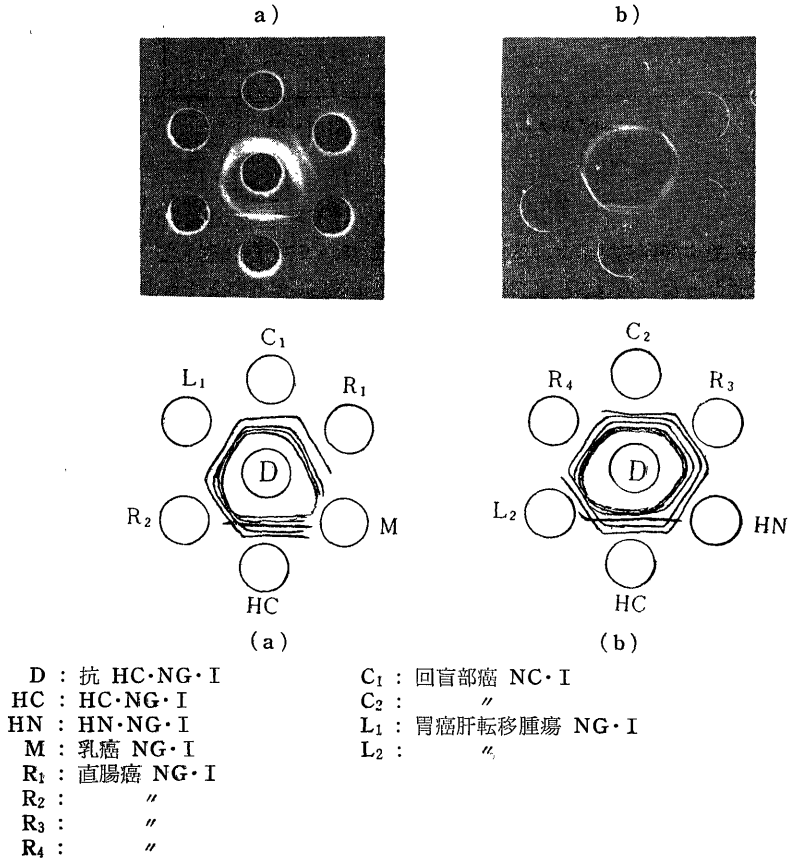
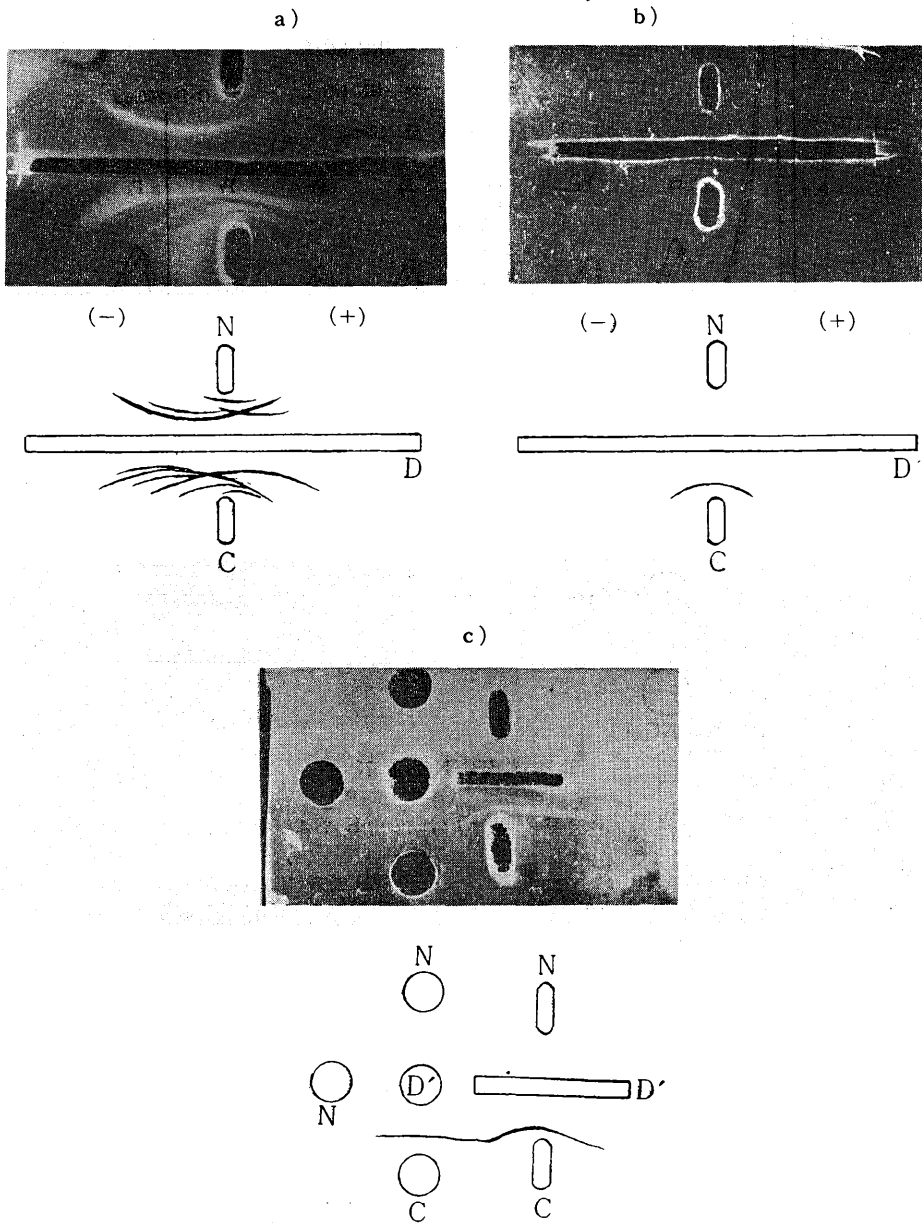
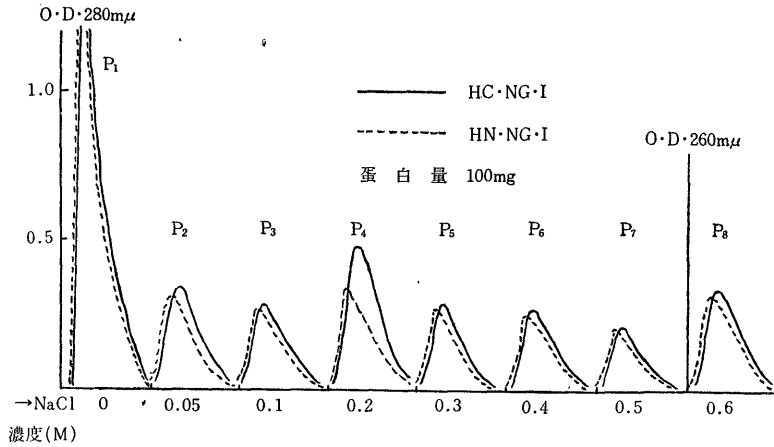


図20. ヒト胃癌核グロブリン・I分画の免疫電気泳動

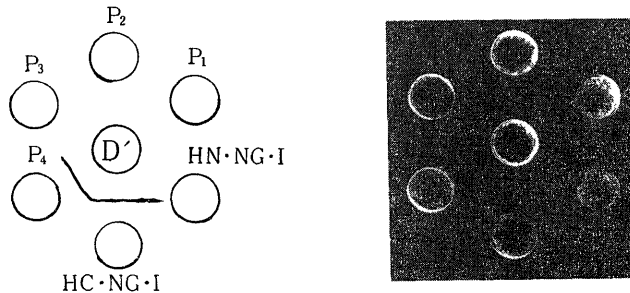


D : 抗 HC·NG·I
 D' : 抗 HC·NG·I-N
 N : HN·NG·I
 C : HC·NG·I

図21. ヒト胃癌核グロブリン・I分画の DEAE カラムクロマトグラムと寒天内免疫二重拡散法

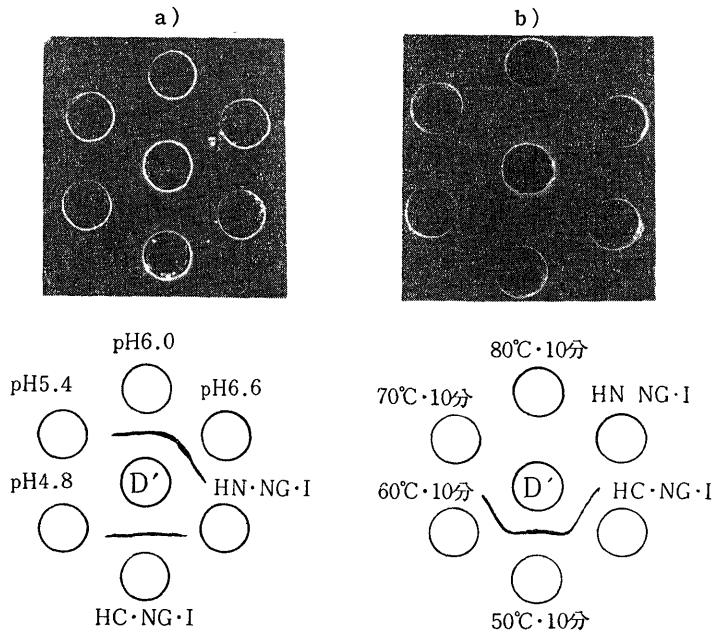


溶出液: NaCl-0.035M トリス緩衝液 pH 7.8



D : 抗 HC·NG·I-N

図22. ヒト胃癌核グロブリン・I分画の pH および熱安定性



D' : 抗 HC·NG·I-N

沈降線は HC 抗原と一致した (図20c)。

3. DEAE カラムクロマトグラフィー

DEAE カラムクロマトグラフィー (0.035M トリス緩衝液 pH7.8) で HC 抗原の精製を行なった。溶出パターンは図21のようであり、HC 抗原は塩濃度 0.2 M で溶出されるピークの蛋白分画に含まれ、他のピークの蛋白分画は HN・NG・I との共通抗原であった。

4. HC 抗原の性格

HC 抗原の生化学的性格を検討するため、pH、熱安定性、染色性およびペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸分析などを行なった。HC 抗原は pH 5.4 附近以下で沈澱し (図22a)、70°C・10分の加熱で抗原性を失なった (図22b)。また蛋白染色は陽性であるが、脂肪染色および糖染色は陰性であった。HC 抗原の二次元ペーパークロマトグラフィーではグルタミン酸およびアスパラギン酸が多く、その他アラニン、ロイシン、バリン、グリシン、リジン、アルギニンが認められたが、非癌との差は著明ではなかった。

5. 蛍光抗体法

胃癌組織、胃癌患者腹水中の遊離癌細胞および正常胃粘膜組織について、蛍光染色を行なった。弱拡大 (写真3) では正常胃粘膜は蛍光を認めないのに反し、癌細胞の浸潤に一致して癌細胞が強く蛍光を発した。これを強拡大でみると、核が瀰漫性に強い蛍光を発し、細胞質の染色性はきわめて弱く、腹水癌細胞についても、同様に核が瀰漫性に強く染色された (写真4 5, 6)。

考 察

癌化に伴う臓器抗原の消失ならびに癌特異抗原の獲得についての検索は、最近、寒天内免疫二重拡散法、免疫電気泳動法、補体結合反応、蛍光抗体法などの免疫学的手段により多くの研究がなされてきた。

癌化に伴う臓器抗原の消失については、Green²⁹⁾、Miller ら³⁰⁾、Sorof ら³¹⁾ の報告があり、Nace・須山³²⁾は Lucké 腎癌について、リゾチーム活性のある因子の消失を指摘している。

そこで、著者はラッテ腹水肝癌核上清分画について、正常抗原の有無を検討した。抗 N・NSap に対し N・NSap は 6 本の沈降線を生じたが、これらは癌抗原との共通成分であり、癌抗原で吸収すると、沈降線はすべて消失した。すなわち、核上清分画については癌化による正常抗原の消失は認められなかった。

一方、癌化に伴う癌特異抗原の獲得についての報告は多く、石川ら²⁾は DAB 肝癌上清分画に r_1 , r_2 , α_1 グロブリン位の泳動度をもつ癌特異抗原を見出し、高柳・建部³³⁾³⁴⁾は同じく DAB 肝癌に癌特異抗原を認め、担瘤ラッテ血清中にもそれを証明した。さらに実験癌については、Révész³⁵⁾、Prehn³⁶⁾、Klein ら³⁷⁾が、またヒトの癌については、Korngold³⁸⁾、Messineo³⁹⁾、Calvalho⁴⁰⁾、荒川⁴¹⁾などの報告があり、いずれも癌特異抗原を証明しているが、それらの抗原の細胞内分布は明らかでない。

ところで、最近、細胞分画法の発達により、細胞下レベルで癌特異抗原をとらえようとする試みが多く、研究者によって行なわれている。我々の教室でも数年来より、ラッテ腹水肝癌、DAB 肝癌およびヒト胃癌などについて、系統的な検索が行なわれてきた。すなわち、森田⁴²⁾、安念⁴³⁾は細胞上清分画に、法幸⁴⁴⁾、素谷⁴⁵⁾はミトコンドリア分画に、本田⁴⁶⁾、田村⁴⁷⁾はミクロゾーム分画に、福田⁴⁸⁾は細胞膜成分に、佐伯⁴⁹⁾、吉光⁵⁰⁾はヒストン分画にそれぞれ癌特異抗原を証明している。

核上清分画に関しては、平井ら¹¹⁾¹²⁾は AH49 腹水肝癌を用いて、pH 4.8 可溶蛋白に癌特異抗原を証明し、Zilber⁹⁾¹⁰⁾は pH 4.5 不溶蛋白に癌特異抗原を認めたと報告している。さらに興味ある報告はウイルス腫瘍における所謂 T 抗原である。Huebner ら³⁾はアデノウイルス 12 型を幼若ハムスターに接種して出来た腫瘍中に、担腫瘍ハムスター血清と補体結合反応で特異的に反応する所謂 T 抗原 (以下 T 抗原とする) を見出した。続いて Gilden ら⁸⁾は蛍光抗体法により、この抗原組成が核に存在することを明らかにし、さらにそれは 10% whole cell homogenate の 105,000 × g・60 分上清分画にあり、硫酸半飽和にて沈澱、pH 4.5 で沈澱することを報告している。

さて、著者が AH127 腹水肝癌核上清分画について行なった寒天内二重拡散法で、核グロブリン・I 分画に癌特異抗原が認められたが、この分画は核蛋白の、105,000 × g・90 分上清、硫酸半飽和沈澱、pH 4.8 沈澱成分であり、T 抗原と生化学的に類似していることは非常に興味深い。そこで著者は AH127 および AH 66F 腹水肝癌ならびにヒト胃癌の核グロブリン・I 分画の抗原分析を進める一方、ポリオーマ腫瘍* についても若干の検討を行なった。

AH127 および AH66F 腹水肝癌核グロブリン・I

* 脚注 本学癌研究所ウイルス部より提供を受けた腫瘍 (幼若ハムスターにポリオーマウイルスを接種し、心臓に出来た腫瘍を組織培養し、ハムスター皮下に移植して腫瘍を作った。この腫瘍にはウイルスを認めない。)を用いて同ウイルス部波多野教授の指導を受けながら、同部田中助手と共に組織培養、腫瘍細胞の移植を行なった。

分画に寒天内二重拡散法で正常肝に認められない、それぞれの癌に特異的な抗原 (127C 抗原, 66C 抗原) が見い出された。これらの特異抗原は正常ラットの諸臓器 (腎, 脾, 心, 肺, 脳, 胎児肝, 血清) には認められなかった。またそれぞれの癌細胞の他の分画にも存在しなかった。それらは免疫電気泳動法で血清の β グロブリン位に泳動し, thiazine red 染色陽性であるが, Sudan black および α -naphthol-p-phenylenediamine 染色陰性であった。抗原性は $70^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分の加熱で消失し, pH 5.4 附近以下で沈澱するなどの点で互に類似しているにもかかわらず, 各特異抗原間には関係がなく, それぞれの癌に固有であった。

ヒト胃癌核グロブリン・I 分画にも, 正常胃組織に認められない特異抗原 (HC 抗原) が見い出された。HC 抗原は胃癌よりの抽出例すべてに認められるが, ヒトの他臓器癌には認められない胃癌に特異的なものであった。HC 抗原は AH 腹水肝癌特異抗原と同様に免疫電気泳動法で β グロブリン位に泳動し, thiazine red 染色陽性であり, $70^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分の加熱で抗原性を失ない, pH 5.4 附近以下で沈澱するが, 胃癌に固有であった。

さて平井ら¹¹⁾¹²⁾は AH49 腹水肝癌について, pH 4.8 可溶核蛋白に癌特異抗原を認めており, それは著者の分画法では核グロブリン・II 分画 (NG・II) に相当する。そこで, 127・NG・II を家兎に免疫して, 寒天内二重拡散法で検討してみると, 127・NG・II にも 127C 抗原とは異なる癌に特徴的な抗原が見い出された (図23a, b)。これらの結果から, 核上清分画の免疫実験では, 127・NG・I にのみ癌特異抗原が認められ, 127・NG・II に認められなかったのは, 127・NG・II に対する十分な抗体が出来ていなかったためと思われる。ついで50%硫酸飽和上清分画についても, 同様に検討を行なったが, この分画には癌特異抗原は認められなかった。

つぎに蛍光抗体法 (直接法) により, AH127 および AH66F 腹水肝癌ならびにヒト胃癌の特異性および細胞内分布をしらべた。蛍光抗体法による腫瘍の抗原性に関しては, 以前は正常臓器抗原の消失を認める報告が多かったが⁵¹⁾⁵²⁾, 最近では癌特異抗原の獲得を証明する報告も増えてきた。たとえばウイルス腫瘍については, 前述のように Gilden ら⁸⁾の報告があり, エールリヒ腹水肝癌, AH130 腹水肝癌およびヒト胃癌については, 上原⁵³⁾はその核分画とマイクロゾーム分画に強い癌特異抗原を認めている。また教室の田村⁴⁷⁾, 素谷⁴⁵⁾, 吉光⁵⁰⁾はそれぞれマイクロゾーム分画, ミトコンドリア分画, ヒストン分画に癌特異性を証明してい

る。著者の蛍光抗体法による成績では, AH127 および AH66F 腹水肝癌ならびにヒト胃癌の細胞核がそれぞれの NG・I 蛍光標識抗体により, 瀰漫性に強く染色されたが, 細胞質の染色性は弱く, 対照の正常肝ならびに正常胃粘膜はほとんど染色されず, それぞれの癌が特異的な抗原組成を持っていることが示された。またこれらの異なった癌相互の交叉染色は非常に弱く, それぞれの癌の特異性が確かめられた。

つぎにこれらの癌特異抗原を DEAE セルロースカラムにかけて, 抗原の精製を行ない, 沈降定数の測定およびアミノ酸分析を行なった。Bailey ら⁵⁴⁾はラット肝核上清分画に 2S, 4S, 6S, 8S, 14S, 18S, 41S の成分を認め, DAB 肝癌では 2S および 4S 成分が増加し, 前癌状態では 4S 成分が増加することを認め, 癌特異成分は 4S であると報告している。また平井ら¹²⁾は沈降定数 4S の pH4.8 可溶蛋白に癌特異抗原を認めている。著者が精製を試みた 127・NG・I・P₄ 分画は 4S の主成分と 18S の副成分より成り, 再クロマトグラフィーで得られた精製抗原は 4S の単一峰を示した。この精製 4S 抗原 (127C 抗原, 66C 抗原, HC 抗原) のアミノ酸分析では, いずれも酸性アミノ酸が多く, 中でもグルタミン酸, アスパラギン酸含量が多いのが特徴的で, 塩基性アミノ酸含量は少なく, 酸性核蛋白であることを示している。アミノ酸分析の結果からは癌, 非癌の差はあまり著明ではなかった。核上清分画のアミノ酸分析については, Patel ら¹⁶⁾, Bemjamin ら⁵⁵⁾, Busch ら⁵⁶⁾の報告があり, いずれもグルタミン酸およびアスパラギン酸含有量の多いことを認めているが, 癌と非癌の差は著明ではない。

さて, 上記のように AH 腹水肝癌およびヒト胃癌核グロブリン・I 分画に癌特異抗原が見い出されたが, ウイルス腫瘍の同分画にも癌特異抗原が認められるであろうか, また同分画に T 抗原が存在するであろうかという問題を次に検討してみよう。

まずポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分画 (PC・NG・I) について, AH 腹水肝癌と同様に抗原分析を行なった。抗 PC・NG・I に対し PC・NG・I は6本の沈降線を生じ, このうち5本は正常ハムスター心核グロブリン・I 分画 (HH・NG・I) との共通成分であり, 吸収により PC・NG・I に1本の沈降線が残った (図24a, b)。これを PC 抗原と呼ぶことにする。PC 抗原は正常ハムスター諸臓器 (肝, 腎, 脾, 新生児心, 血清) にはなく (図24c), ポリオーマ腫瘍細胞の他の分画にも認められなかった。Berman ら⁵⁷⁾はアデノウイルス腫瘍の T 抗原が担腫瘍ハムスター血清

と寒天内二重拡散法で沈降線を生じたと報告しているが、PC 抗原は胆腫瘍ハムスター血清との間には沈降線を生じなかった。PC 抗原は免疫電気泳動法で血清の β グロブリン位に泳動し(25図 a, b), 70°C・10分の加熱で抗原性を失ない、pH5.4 付近で沈澱した。PC・NG・I 蛍光標識抗体でポリオーマ腫瘍細胞を染色すると、細胞核が瀰漫性に強く染色された。一方、正常ハムスター心の染色性はきわめて弱かった(写真7)。

PC・NG・I は胆腫瘍ハムスター血清とは、寒天内二重拡散法で沈降線を生じなかったが、補体結合反応では5例中3例が陽性であった。しかし、HH・NG・I およびポリオーマウイルス自身(titer: 2048倍)はいずれも補体結合反応陰性であった(表5)。ただ titer が弱く、陽性率が低いのは、Habel⁷⁾ が指摘しているように、組織培養を続けているうちに T 抗原が消失していくポリオーマ腫瘍細胞の特性であるかも知れない。

胆腫瘍ハムスター血清との蛍光抗体法(間接法)については、Rope^ら⁵⁸⁾、Gilden^ら⁸⁾の報告があり、T 抗原が核に存在することを証明しているが、Takemoto^ら⁵⁹⁾はポリオーマウイルス系の場合、lytic infection cell については陽性、Polyoma tumor cell では陰性であったと報告している。著者が行なった胆腫瘍ハムスター血清との蛍光抗体法(間接法)でも染色度が弱く陰性と判断せざるを得なかった。

これらの結果からは、T 抗原がポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分画に存在するとの確証はえられなかったが、それを示唆するものであり、今後さらに検索を続けることにより、明らかにされるであろう。また PC 抗原と T 抗原の関係あるいは両者が同一なものかどうかの問題が今後に残された課題であり、それにはポリオーマ腫瘍のみならず、アデノウイルス腫瘍および SV40 腫瘍についての検索も必要となる。

つぎに AH 腹水肝癌 NG・I についても胆癌ラット血清と補体結合反応を行なったが、全例陰性であった(表5)。ヒト胃癌 NG・I と胃癌患者血清では10例中3例が陽性であった(表5)。この陽性率はかならずしも高くはないが、今後の検索によってはヒト胃癌の発生原因追求の一助となりうるであろう。

さて、核可溶性蛋白のうち 105.000×g・90分上清成分である核上清分画は、核グロブリン、リボゾーム由来の蛋白(主として RNP) およびクロモゾーム由来の蛋白が含まれていることが知られている⁵⁰⁾。著者が癌特異抗原を見出した核グロブリン・I 分画には、少量ながら RNA および DNA が含まれているので、これら蛋白の mixture と考えられるが、精製さ

れた癌特異抗原は RNA および DNA を含まず、沈降定数の測定で 4S の単一峰を示している。一般に核グロブリンはアミノ酸のみからなる単一蛋白であるとされているが、実際に核グロブリンとして抽出された分画はいずれもリボゾーム由来の RNP との mixture であるとの報告が多い¹⁶⁾⁵⁶⁾⁶⁰⁾。したがって、核グロブリンは RNP との関係でリボゾームの蛋白合成に関与する一因子ではないかとの推定⁵⁶⁾や、クロモゾーム由来の蛋白との mixture として、クロモゾームの機能および形態を決定する一因子ではないかとの推定⁶¹⁾がなされている。また核グロブリンがヒストンと insoluble complex を形成することが報告され⁶²⁾、一方ヒストンが遺伝子の represser として働らくことが明らかにされてきた⁶³⁾ことを考え合せば、ヒストンの抑制作用の解放因子としての位置づけも推察され、このような解放因子の増加が細胞の無限の分裂と増殖をもたらすのではないかという考え方もなされている⁶⁴⁾が、現在の所、多くの研究にもかかわらず核グロブリンの機能は十分に解明されていない。ただ、その生合成能が比較的高いことが知られており、細胞質蛋白およびヒストンよりも labeling rate が高いことなどが報告⁶⁴⁾⁶⁵⁾されている。

癌細胞の特徴は生体の homeostasis を無視した無限の分裂と増殖を続ける異常発生とうけとられており、DNA→RNA→蛋白合成の過程とその周辺における何らかの異常が発癌の原因と密接な関係があると考えられる。このような機構の中で、著者の見出した癌特異抗原がいかなる役割を行なうものであるかは今後の検索に待たねばならないが、AH 腹水肝癌のみならずヒト胃癌およびポリオーマ腫瘍の核グロブリン・I 分画にそれぞれ癌特異抗原が認められたことは、その発生原因にかかわらず癌細胞一般に認められる癌の特徴的变化が核グロブリン分画におきていることを示し、今後の発癌機構の解析には核グロブリンをも取り上げなければならないことを暗示している。またポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分画に T 抗原が存在することを示唆した著者の実験成績は、核グロブリンの機能の解明に一つの手がかりを与えるものといえよう。特にウイルス腫瘍においては、実験に用いたウイルスと生じた腫瘍細胞との間の因果関係を明瞭に示ることから、最近、この方面での検索も盛んに行なわれており、発癌機構およびその中の核グロブリンの役割について、新生面が切り開かれるであろう。それには著者が行なった免疫学的解析が有力な手段となるであろう。

図23. AH127 腹水肝癌核グロブリン・II 分面の寒天内免疫二重拡散法

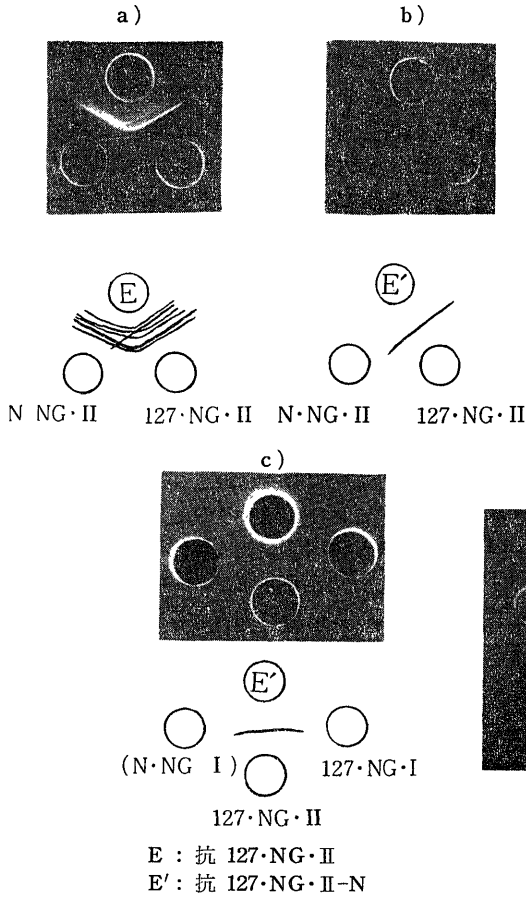


図24. ポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分面の寒天内免疫二重拡散法

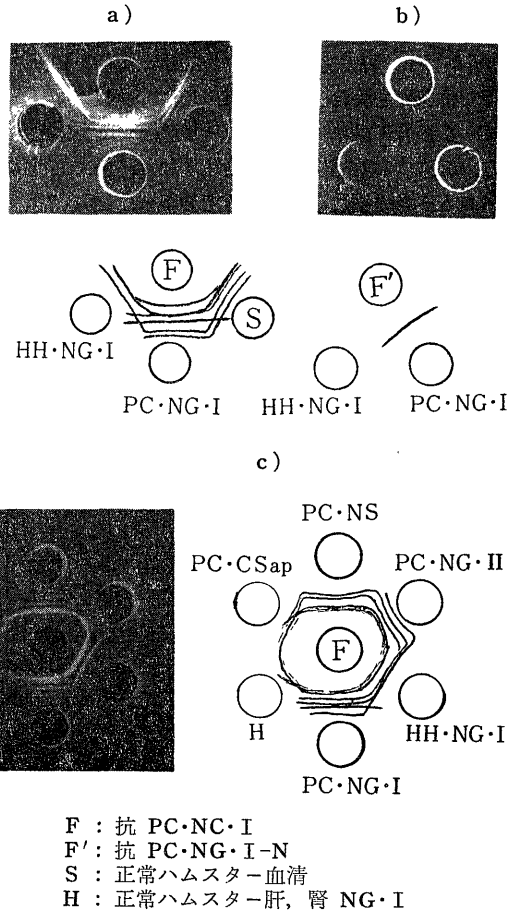


図25. ポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分面の免疫電気泳動

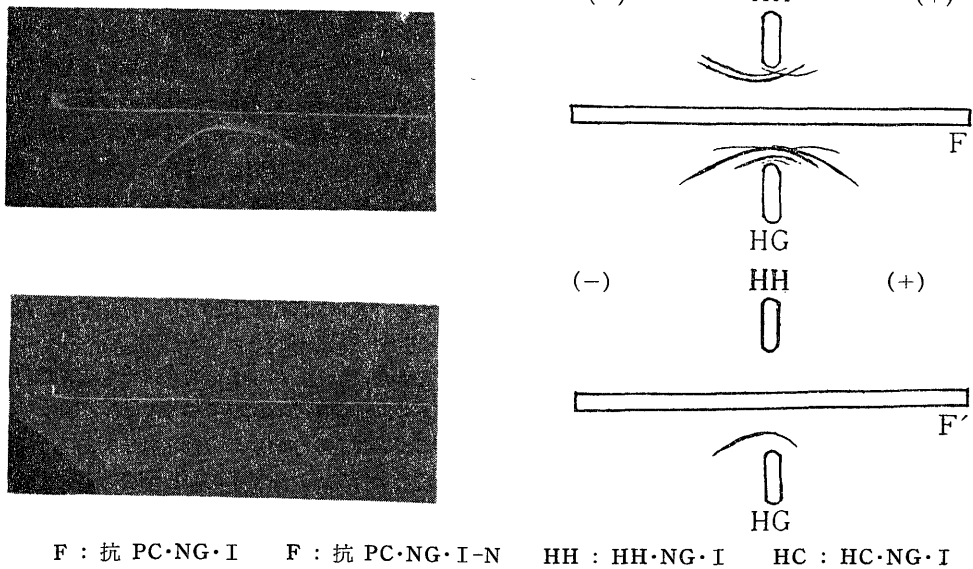


表5 ポリオーマ腫瘍核グロブリン・I分画と担癌ハムスター血清との補体結合反応 (Kolmer 変法) と各種癌との比較

担癌 (ポリオーマ腫瘍) ハムスター血清 (10倍希釈)	抗原 10mg/ml	抗原 希 釈 倍 数								判定*7
		0	2	4	8	16	32	64	128	
No. 1	PC・NG・I*1	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	HH・NG・I*2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V*3	-	-	-	-	-	-	-	-	
No. 2	PC・NG・I	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	HH・NG・I	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V	-	-	-	-	-	-	-	-	
No. 3	PC・NG・I	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	HH・NG・I	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V	-	-	-	-	-	-	-	-	
No. 4	PC・NG・I	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	HH・NG・I	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V	-	-	-	-	-	-	-	-	
No. 5	PC・NG・I	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	HH・NG・I	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V	-	-	-	-	-	-	-	-	
抗原対照	PC・NG・I	+	+	+	+	±	-	-	-	
	HH・NG・I	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P・V	-	-	-	-	-	-	-	-	

担癌血清 (15倍希釈)	抗原 10m/ml	例 数	陽性例	陰性例
担癌(ポリオーマ腫瘍)ハムスター血清	PC・NG・I	5	3	2
担癌 (AH127) ラッテ血清	127・NG・I*4	2	0	2
担癌 (AH66F) ラッテ血清	66・NG・I*5	2	0	2
ヒト胃癌血清	HC・NG・I*6	10	3	7

*1: PC・NG・I : ポリオーマ腫瘍核グロブリン・I分画
 *2: HH・NG・I : 正常ハムスター心核グロブリン・I分画
 *3: P・V : ポリオーマウイルス (titer: 2048倍)
 *4: 127・NG・I : AH127 腹水肝癌核グロブリン・I分画
 *5: 66・NG・I : AH66F 腹水肝癌核グロブリン・I分画
 *6: HC・NG・I : ヒト胃癌核グロブリン・I分画
 *7: 判 定 : 50%溶血阻止までの倍数を O・D 545 mμ で測定 (抗体対照を 100%とす) し, 抗原対照より高い倍数で (+) のものを陽性とした。

結 論

AH127 および AH66F 腹水肝癌細胞核分画から得られた核上清分画 およびその subfraction である核グロブリン・I 分画の抗原組成の変化を寒天内免疫二重拡散法, 免疫電気泳動法, カラムクロマトグラフィー, ペーパークロマトグラフィー, 蛍光抗体法らにより検討した。

ついでヒト胃癌およびポリオーマ腫瘍についても, 同様に検討を行なった。

得られた実験結果を要約すれば次の通りである。

1. 寒天内免疫二重拡散法と免疫電気泳動法により, AH127 腹水肝癌核上清分画に 特異的な抗原が認められた。この抗原 (127C 抗原) は核グロブリン・I 分画に存在した。

2. AH 66F 腹水肝癌核グロブリン・I 分画にも 特異的な抗原 (66C 抗原) が認められた。127C 抗原および 66C 抗原はそれぞれの癌に固有のものであった。

3. 127C 抗原 および 66C 抗原は 正常ラッテ諸臓器, ラッテ血清および癌細胞の他の分画には認められなかった。

4. 127C 抗原および 66C 抗原は免疫電気泳動法で血清の β グロブリン位に相当する泳動度を示し, DE AE カラムクロマトグラフィーで 0.2M NaCl (0.035 M トリス緩衝液 pH7.8) で溶出される分画に含まれ, 沈降定数 4S の単一峰を示した。

5. アミノ酸分析により 127C 抗原および 66C 抗原はグルタミン酸およびアスパラギン酸含量の多い酸性核蛋白であったが, 非癌との差は 著明ではなかった。

6. 127C 抗原 および 66C 抗原は蛋白染色陽性, 脂肪および糖染色陰性で, 抗原性は $70^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分 で失なわれ, pH5.4 附近以下で沈澱した。また DNA および RNA を含まず, trypsin で消化された。

7. AH127 および AH66F 腹水肝癌細胞核はそれぞれの核グロブリン・I 蛍光標識抗体により 瀰漫性に強く染色された。一方細胞質および正常ラッテ肝細胞はほとんど染色されなかった。またこれらの異なった癌相互の交叉染色は非常に弱く, それぞれの癌に特異的であった。

8. ヒト胃癌核グロブリン・I 分画にも 特異的な抗原 (HC 抗原) が認められた。HC 抗原は正常胃粘膜および各種臓器癌に認められない胃癌に特異的な抗原であった。HC 抗原は免疫電気泳動法で血清の β グロブリン位に泳動し, DEAE カラムクロマトグラフィーで 0.2M NaCl (0.035M トリス緩衝液 pH7.8) で

溶出される分画に含まれ, グルタミン酸およびアスパラギン酸含量の多い酸性核蛋白であった。その抗原性は $70^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分の加熱で失なわれ, pH5.4 附近以下で沈澱した。核グロブリン・I 蛍光標識抗体で胃癌細胞は瀰漫性に強く染色された。

9. ポリオーマ腫瘍核グロブリン・I 分画にも 癌特異抗原 (PC 抗原) が認められ, 免疫電気泳動法で血清の β グロブリン位に泳動した。核グロブリン・I 蛍光標識抗体でポリオーマ腫瘍細胞核は瀰漫性に強く染色された。

担腫瘍ハムスター血清との補体結合反応でこの分画に T 抗原が存在することが示唆されたが, この担腫瘍ハムスター血清を用いての間接蛍光抗体法ではポリオーマ腫瘍細胞核の染色度はきわめて弱く陰性であった。

終りに臨み, 終始御懇篤なる御指導と御快問を賜りました 恩師 石川大刀雄教授に, 衷心より感謝の意を捧げます。また組織培養について種々と御教示, 御指導戴きました 癌研究所波多野教授に 深謝致します。さらに小田島肅夫助教授をはじめ 教室の諸学兄の御援助に謝意を表します。

文 献

- 1) 石川大刀雄・高柳伊立 : 日新医学, 44, 361 (1957).
- 2) 石川大刀雄・橋 武彦・高柳伊立 : 癌の臨床, 8, 593 (1962).
- 3) Huebner, R. J., Rowe, W. P. & Lane, W. T. : Proc. N. A. S., 48, 2051 (1962).
- 4) Huebner, R. J. et al. : Proc. N. A. S., 50, 379 (1963).
- 5) Sabin, A. B. & Koch, M. A. : Proc. N. A. S., 50, 407 (1963).
- 6) Sabin, A. B. & Koch, M. A. : Proc. N. A. S., 52, 1131 (1964).
- 7) Habel, K. : Virology, 25, 55 (1965).
- 8) Gilden, R. V. et al. : Proc. N. A. S., 53, 684 (1965).
- 9) Zilber, L. A. : Cancer Res. 5, 291 (1958).
- 10) Zilber, L. A. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 101, 264 (1962).
- 11) 平井秀松他 : 癌の臨床, 8, 588 (1962).
- 12) 平井秀松他 : 最新医学, 19, 495 (1964).
- 13) Davis, J. R. & Busch, H. : Cancer Res., 19, 1157 (1959).
- 14) Hogeboom, G. H. & Schneider, W. C. : The nucleic acid, 2, 105, N.Y. Acad. Press, 1955.
- 15) Chauveau, J., Moule, Y. & Rouiller, G. H. : Exp. Cell. Res., 11, 313 (1956).
- 16) Patel, G. & Wang, T. Y. : Exp. Cell. Res., 34, 120 (1964).
- 17) Gornall, A. G.,

- Bardawill, G. S. & David, M. M. : J. Biol. Chem., 177, 751 (1949). 18) Freund, J. & Bonato, M. W. : J. Immunol., 48, 325 (1944). 19) Björklund, B. : J. Immunol. 79, 319 (1952). 20) Ouchterlony, O. : Acta. Path. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953). 21) Crowle, A. J. : J. Lab. Clin. Med., 52, 784 (1958). 22) Uriel, J. : Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 277 (1958). 23) Kohn, J. : Clin. Chim. Acta., 3, 450 (1958). 24) Graber, P. & Williams, C. A. : Biochem. Biophys. Acta., 17, 69 (1955). 25) 赤堀 四郎他 : 蛋白質化学, 1, 142 (1954). 26) 浜島義博・京極方久 : 免疫組織学, 第1版, 64頁, 医学書院, 1965. 27) Brown, H. A. : Arch. Biochem. Biophys., 11, 269 (1946). 28) Burton, K. : Biochem. J., 62, 315 (1956). 29) Green, H. N. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 68, 268 (1957). 30) Miller, E. C. & Miller, J. A. : Cancer Res., 7, 468 (1947). 31) Sorof, S. & Cohen, P. P. : Cancer Res., 11, 376 (1951). 32) Nace, G. W. & Suyama, T. : SABCO Journal., 1, 1 (1965). 33) 高柳伊立・建部守昭 : 日新医学, 46, 351 (1959). 34) 等柳伊立・建部守昭 : 日新医学, 46, 419 (1959). 35) Révész, L. : Cancer Res., 20, 443 (1960). 36) Prehn, R. T. : Cancer Res., 20, 1614 (1960). 37) Klein, E. & Hellström, K. E. : Cancer Res., 20, 1561 (1960). 38) Korngold, L. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 69, 681 (1957). 39) Messineo, L. : Nature, 190, 1122 (1961). 40) Calvalho, S. D. : J. Lab. Clin. Med., 56, 33 (1960). 41) 荒川 弥 : 十全医会誌, 70, 354 (1964). 42) 森田弘之 : 十全医会誌, 71(3), 1 (1965). 43) 安念有聲 : 十全医会誌 (未印刷). 44) 法幸多良雄 : 十全医会誌, 74(1), 30 (1966). 45) 素谷 宏 : 十全医会誌, 75(1), 04-1 (1967). 46) 本田雄治 : 十全医会誌, 73(3), 8 (1965). 47) 田村 充 : 十全医会誌, 75(1), 02-1 (1967). 48) 福田鎮雄 : 十全医会誌, 76(2), 342 (1968). 49) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 74(1), 51 (1966). 50) 吉光外宏 : 十全医会誌, 75(1), 03-1 (1967). 51) Weiler, D. : Brit. J. Cancer., 10(3), 560 (1956). 52) Nairn, R. C. et al. : Brit. Med. J., 2, 1335 (1960). 53) 上原洋一郎 : アレルギー, 14, 351 (1965). 54) Bakey, B. & Sorof, S. : Cancer Res., 24, 1814 (1964). 55) Benjamin, W. & Gellhorn, A. : Proc. N. A. S. 59, 262 (1968). 56) Busch, H. : Histone and other nuclear proteins, N. Y. Acad. press, 197 (1965). 57) Berman, L. D. & Rowe, W. P. : J. Exp. Med., 121, 955 (1965). 58) Rope, J. H. & Rowe, W. P. : J. Exp. Med., 120, 121 (1964). 59) Takemoto, K. K., Malmgen, R. A. & Habel, K. : Virology, 28, 485 (1966). 60) Frenster, H. J., Allfrey, G. V. & Mirsky, A. E. : Proc. N. A. S., 46, 432 (1960). 61) Mirsky, A. E. & Pollister, A. W. : J. Gen. Physiol., 30, 117 (1946). 62) Dounce, A. L. & Umana, R. : Biochemistry, 1, 811 (1962). 63) Stedman, E. & Stedman, E. : Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser., B235, 565 (1951). 64) Busch, H. et al. : J. Cell. Comp. Phys., 62, 95 (1963). 65) Smellie, R. M., McIndoe, W. M. & Davidson, J. N. : Biochim. Biophys. Acta., 11, 559 (1953).

写真説明

1. AH127 腹水肝癌細胞
2. AH66F 腹水肝癌細胞
3. ヒト胃癌組織 (弱拡大)
4. 同上 (強拡大)
5. 同上
6. 腹水遊離胃癌細胞
7. ポリオーマ腫瘍の組織培養細胞

Abstract

Immunological antigen analyses of the nuclear sap fraction and nuclear globulin I fraction of AH ascitic hepatoma (AH 127, AH 66F) of rats were carried out mainly by the agar gel double diffusion method.

Furthermore, the analyses of the nuclear globulin I fraction of the human gastric cancer and polyoma virus-induced hamster tumor were investigated by the same method.

The nuclear globulin fraction was separated from the nuclear sap fraction (after Patel¹⁶⁾) by ammonium sulfate precipitation at half saturation. The nuclear globulin I fraction was precipitated from the eluate at pH 4.8 with acetate buffer.

The results were summarized as follows.

1) One specific antigen characteristic of the nuclear sap fraction of AH 127 ascitic hepatoma (designated as "127 C antigen") was detected by the double diffusion method, and "127 C antigen" was present in the nuclear globulin I fraction of AH 127 ascitic hepatoma.

2) Another specific antigen characteristic of the nuclear globulin I fraction of AH 66F ascitic hepatoma (designated as "66 C antigen") was detected by the double diffusion method.

3) These "127 C antigen" and "66 C antigen" showed electrophoretic mobilities similar to those of serum β globulin. Both these antigens were eluted in 0.2M NaCl-Tris buffer, pH 7.8, chromatographically on DEAE cellulose column, and showed a single sharp peak (sedimentation constant being 4S) on ultracentrifugation. These contained relatively a large amount of glutamic acid and aspartic acid on amino acid analysis by paperchromatography, but these were found different from each other by the double diffusion method.

4) Each AH ascitic hepatoma cell was characteristically stained in the nuclei by the direct fluorescein antibody technique with the fluorescein-labeled antibody against the nuclear globulin I fraction.

5) One specific antigen was found in the human gastric cancer (designated as "HC antigen"). Although biochemical properties of "HC antigen" were similar to the "127C antigen", these antigens were proved to be different from each other by the double diffusion method. Direct fluorescein antibody staining of the nuclei was positive in the human gastric cancer cells.

6) One specific antigen was found in the polyoma virus-induced tumor (designated as "PC antigen"). Biochemical properties of "PC antigen" were similar to the "127C antigen", but these were not found identical by the double diffusion method.

7) By the complement fixation test, it was demonstrated that so-called "T antigen" was present in the nuclear globulin I fraction of the polyoma virus-induced tumor, but indirect fluorescein antibody staining of the nuclei was negative with the tumor bearing hamster serum.

写真 2

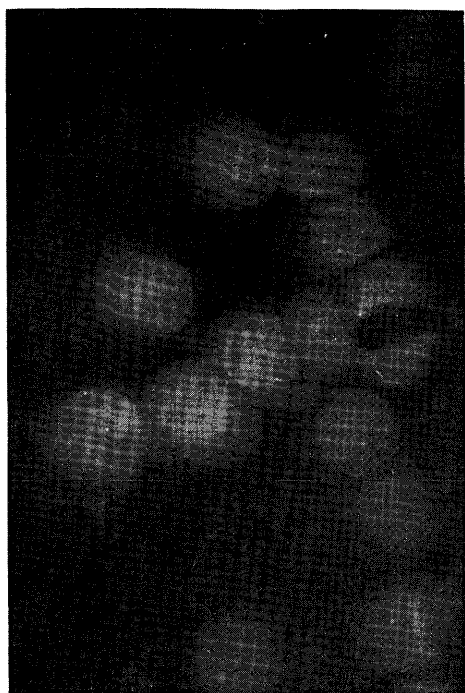


写真 4



写真 1

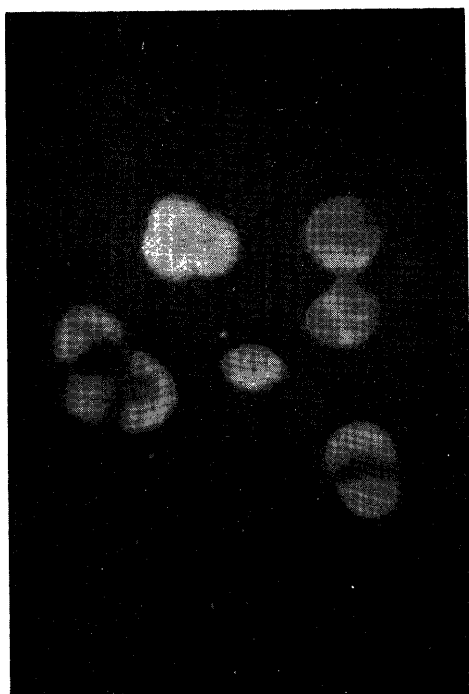


写真 3

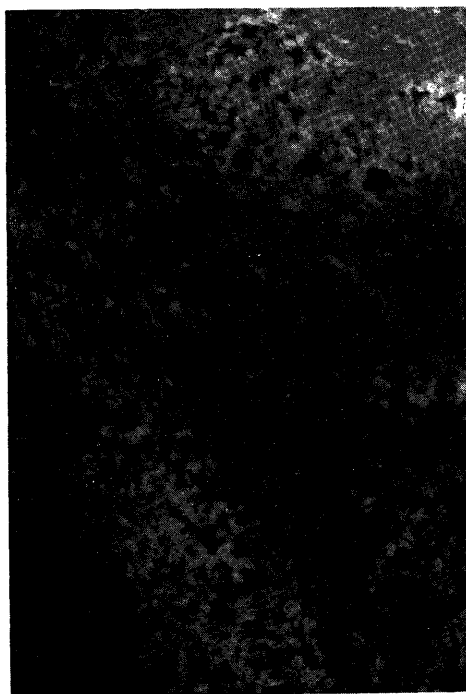


写真 6

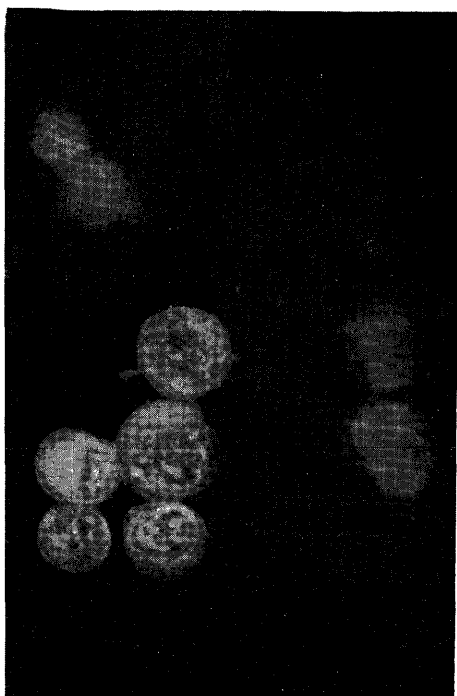


写真 5

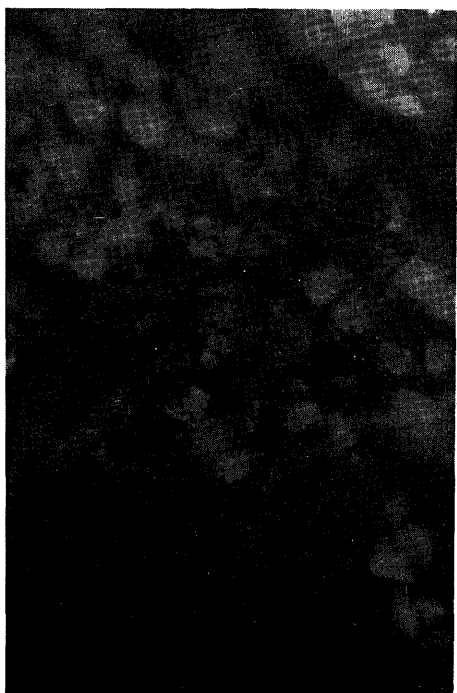


写真 7

