

人血清中に存在する動物癌細胞凝集素について

金沢大学大学院医学研究科外科学第二講座(主任 水上哲次教授)

金沢大学医学部病理学第二講座(研究主任 石川大刀雄教授)

中 川 正

(昭和44年2月10日受付)

本論文の一部要旨は、1966年12月第4回日本癌治療学会において発表した。

正常細胞が、癌化によって臓器特異性抗原を喪失または減弱する¹⁾⁻³⁾にしろ、あるいは新しい獲得性抗原を得る⁴⁾⁻⁶⁾にしろ、癌細胞の表面形質は正常細胞のそれとは、かなり異なっているものと考えられる。私どもの教室では、癌の種々の免疫学的研究によって、癌細胞各分画中に癌特異性物質の存在することを証明している⁷⁾⁻¹¹⁾、一方、石川¹²⁾、および石川ら¹³⁾¹⁴⁾はヒト血清 γ グロブリン中に、ある種の実験動物癌細胞、例えばマウス Ehrlich 腹水癌細胞(以下 EA 細胞という)や MM₂細胞を凝集する先天性因子が存在することを発見したが、彼らはこの凝集素を利用して癌細胞凝集阻止試験を行なうことにより癌細胞表面抗原を追求し、人胃癌組織より、癌特異性物質 kanalipin を抽出している。

また Hakomori¹⁵⁾ および Hakomori ら¹⁶⁾¹⁷⁾も、私どもと同様の見解に基づいて、植物性の癌細胞凝集素、すなわち wheat germ agglutinin を用いて、癌細胞より抽出した物質による癌細胞凝集阻止試験により、癌細胞表面抗原を追求している。

このように凝集阻止反応を利用して抗原の決定群をきめる方法は、血液型物質の構造決定に駆使されてきたところである¹⁸⁾¹⁹⁾。

さらに、石川¹²⁾および石川ら¹³⁾¹⁴⁾は癌患者血清に、Ehrlich 腹水癌細胞凝集を阻止する物質が、あらたに出現してくることを認めた。この阻止物質は、癌細胞の代謝過程に癌物質の一部が、細胞より遊離して、血清中に出現してくるものであろうとしている。したがって、血清中に、この種凝集素の存否をたしかめることにより、癌の臨床診断への応用が可能であると考えられる。この可能性を検討するために、著者は、まず、石川らのいうヒト血清 γ グロブリン中の凝集素を

とりあげ、癌および非癌患者血清で、その凝集素にどのような差違があるかを追求し、ついで、この凝集反応および凝集阻止反応を用いて、Ehrlich 腹水癌細胞表面に、凝集素と反応する物質が存在するかどうかを検索した。さらに癌患者血清中の凝集阻止物質を、より精製することによって、臨床検査への応用を試み、興味ある所見を得たので、ここに報告する。

〔I〕 ヒト血清 γ グロブリンに存在する 腹水癌細胞凝集素について

石川¹²⁾および石川ら¹³⁾¹⁴⁾はヒトの血清 γ グロブリン中に癌細胞を凝集させる物質の存在することを見出し、この凝集素には、健康人血清に存在する先天性因子によるものと、末期の癌患者の血清中に出現してくる獲得性免疫に由来するらしい因子とがあることを示唆した。この凝集因子を究明するために、本実験においては、ヒト血清の γ グロブリンを細分画し、実験癌としてマウスの Ehrlich 腹水癌細胞を用いて、癌細胞凝集素を追求した。

I. 実験材料および実験方法

1. 実験材料

Ehrlich 腹水癌細胞を主として dd 系マウスに移植したものをを用いたが、宿主による影響も考慮し、宿主マウスは dd 系以外に、A 系、C3H/He 系、RF 系、BALB/c 系、Swiss 系マウスを使用し比較した。

EA 細胞をマウスに接種後、7～8 日目の細胞を採集し、滅菌生食水で十分に洗滌して腹水を除去した後、凝集反応に用いた。

使用したヒト血清は、病理組織学的検査または、病理解剖にて診断の確定したもの、および健康成人血清、その他の臨床検査にて確実な診断のつけられたも

Studies on the Agglutinin of Human Serum against Some Animal Cancer Cells.
Tadashi Nakagawa, Department of Surgery (II) (Director: Prof. T. Mizukami),
Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine,
Kanazawa University.

のをを用いた (表 1 および 2)。

2. 実験方法

1) EA 細胞凝集反応¹²⁾⁻¹⁴⁾

生食水で充分洗滌した EA 細胞を、 $15 \times 10^6/\text{ml}$ の生食水浮遊液に調製する。厚手のホールガラス上に被検血清または分画した血清成分液 (各分画成分は蛋白濃度 10 mg/ml に調製) の 1 滴をおき、その上に上記細胞浮遊液の 1 滴を加えてよく混和し、経時的に観察する。反応温度は $15 \sim 25^\circ\text{C}$ とし、混和後、30 分、1 時間、3 時間後に顕微鏡下で判定した。

判定基準は数十個の細胞の塊が集って完全な凝集塊を作るものを、凝集度 (卅) とし、全く凝集のみとめられないもの、すなわち凝集度 (一) に至るまでを (卅), (卅), (+), (±) に分類した。

2) ヒト血清 7S r グロブリン (とくに IgG) 分画の調製

健康人血清、非癌患者血清、癌患者血清より、Yoon ら²⁰⁾, Abelson²¹⁾ ら、支倉²²⁾ らの方法に準じて、7S r グロブリンを調製した。

すなわち、血清の硫酸アンモニウム 40% 飽和沈澱物を生食水に溶解し、 0.015 M , $\text{pH } 6.3$ のリン酸緩衝液で透析後、その 5 ml を、パッチ法により、上記緩衝液で緩衝化した $2.5 \times 20 \text{ cm}$ の DEAE セルローズ・カラムにかけ、 0.015 M , $\text{pH } 6.3$; 0.04 M , $\text{pH } 6.0$; 0.1 M , $\text{pH } 5.8$, 0.3 M , $\text{pH } 5.5$ のリン酸緩衝液を用いて、stepwise elution し、フラクションコレクターに分画採集した。Beckmann 吸光度計で、 $280 \text{ m}\mu$ で吸光度を測定し、蛋白濃度を測定した。

0.015 M , $\text{pH } 6.3$ により溶出されたものを、IgG 分画として使用した。

各分画は水で透析後、凍結乾燥または生食水で透析後、 -20°C で氷結保存し、使用時には生食水で蛋白濃度 10 mg/ml に調製した。

3) ヒト血清 19S r グロブリン分画の調製

Arnason ら²³⁾, Flodin ら²⁴⁾, 右田²⁵⁾, Fay ら²⁶⁾の方法に準じて、次のように調製した。

血清 25 ml を 0.001 M 酢酸緩衝液 $\text{pH } 5.5$ で、 4°C にて 48 時間透析し、生じた沈澱物を遠心して集め、生食水 2 ml に再溶解する。これを生食水で 4°C , 24 時間透析、ついで、 1.0 M NaCl を含む 0.1 M tris-HCl 緩衝液、 $\text{pH } 8.0$ にてさらに 24 時間透析を施行した。この溶液または、蒸留水法で作った euglobulin 分画を Sephadex G-200 のカラム ($3 \times 75 \text{ cm}$) に通し、 Tris-NaCl 緩衝液 $\text{pH } 8.0$ を用いて溶出分画する。 $280 \text{ m}\mu$ で吸光度を測定すると、溶出曲線は 2 頂

点を示す。この第 1 頂点が 19S-r グロブリンで、これを集めて、生食水で透析後、 10 mg/ml の蛋白濃度液として使用した。

4) 血清および血清分画成分中の正常成分の吸収

上記によって得られた血清分画成分 (IgG, IgM) 中に存在する正常細胞成分に対する凝集素を除去するために、この吸収血清を作製した。

正常細胞としては、ヒト A 型 および B 型赤血球、Dausset²⁷⁾ および Payne²⁸⁾ らの方法で分離したヒト A および B 型白血球、マウス赤血球、ヒツジ赤血球を用いた。吸収検査は、進藤²⁹⁾の方法にしたがって施行した。

5) EA 細胞凝集素の採集

血清に、等量の EA 細胞 pellet を混和し、 37°C 2 時間 incubate 後、 4°C にて overnight し、遠心して凝集塊を集める。この細胞凝集塊を生食水で充分洗滌した後、 6 N HCl を用いて、 $\text{pH } 3.15$ とし、細胞より凝集素を遊離させる。遠心後上清を集め $\text{pH } 7.2$ に調製して凝集素液として使用した。

6) 寒天内二重拡散法 (Ouchterlony 法³⁰⁾)

4% 精製寒天ブロック 10 g ; 0.1 M リン酸緩衝液、 $\text{pH } 7.6$ (EDTA 0.01% , および $\text{NaCl } 1.7\%$ を含む) 15 ml ; 1% NaN_3 3 ml ; 蒸留水 2 ml の割合に混じ加熱融解し、その 15 ml を $8 \times 12 \text{ cm}$ のガラス板に流し、寒天板を作り使用した。抗原抗体孔は直径 $3 \sim 6 \text{ mm}$, 間隔 5 mm のものを使用した。 20°C の温室で反応させ 2~5 日観察し、写真撮影を行なった。

7) 濾紙電気泳動法

電気泳動学会の標準検査法にてセルローズアセテート膜に流し、蛋白泳動曲線は磁気式デンシトメーターによった。

II. 実験結果

1. EA 細胞凝集反応と宿主の関係

dd 系, A 系, C3H/He 系, RF 系, BALB/c 系, Swiss 系マウスに移植した EA 細胞を採集し、各々について、凝集反応を行なったが、宿主による影響は殆んど認められなかった。

2. 血清分画成分と寒天内二重拡散法

DEAE-セルロースあるいは Sephadex G-200 カラムによる血清のクロマトグラムは図 1 および図 2 のようになる。DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーによって分離した第 1 頂点および Sephadex G-200 によって分離した第 1 頂点の抗ヒト IgG, IgA, IgM ウサギ血清による寒天内二重拡散法を施行すると、図 3 のように、DEAE-セルロースにより分離した第 1 頂点は、抗 IgG 血清とのみ、また Sephadex

G-200 によって分離した第1頂点は抗 IgM 血清とのみ沈降線を形成した。

3. 7S r グロブリンと EA 細胞凝集素について.

上記のようにして分離した血清の 7S r グロブリン (とくに IgG 分画) について EA 細胞凝集反応を施行すると表1, 表2のようになる. すなわち健康成人 (pool したもの) では凝集程度は (卅) を示し, 非癌患者血清 (15例) より分離したものについては, (卅) を示すものが4例, (++) を示すものが5例, (+) 5例, (±) 1例あり, 凝集しなかったものは15例中全くなかった。

図1 血清40%飽和硫酸沈降物の
DEAE-Cellulose Column Chromatography

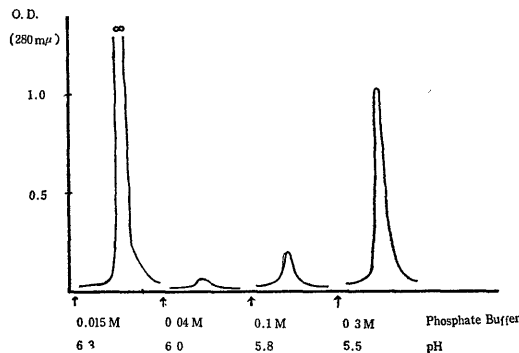


図2 血清 pH 5.5 沈降物の Sephadex
G-200 Column Chromatography

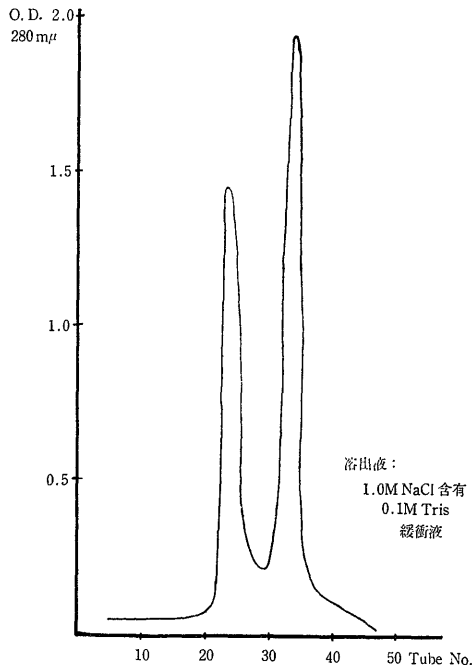
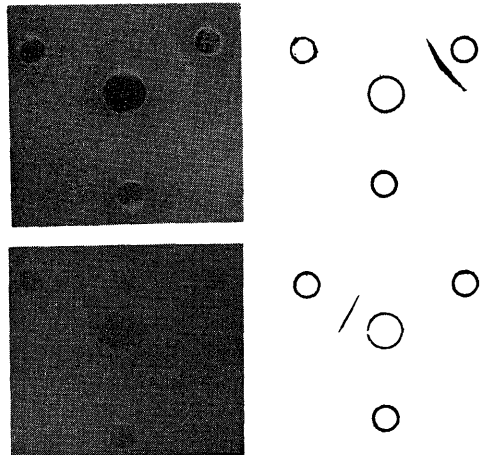


図3 血清クロマトグラフィーで分離した
r-Glob. 分画の抗 IgG, IgA, IgM 血清による判定



- 1: 抗 IgM 血清
- 2: 抗 IgG 血清
- 3: 抗 IgA 血清
- 4: DEAE-Cellulose クロマトグラフィーの第1頂点
- 5: Sephadex G-200 クロマトグラフィーの第1頂点

表1 非癌血清 7S-r Glob., 19S-r Glob.
と EA 細胞凝集素

診 断 名	19S-r Glob.	7S-r Glob.
健康成人血清 (pooled)	—	卅
慢 性 胃 炎	—	卅
慢 性 胃 炎	—	+
慢 性 胃 炎	—	卅
胃 潰 瘍	—	卅
イ レ ウ ス	±	+
イ レ ウ ス	+	卅
慢 性 肝 炎	—	卅
肝 硬 変(壊死後生)	—	卅
リウマチ様関節炎	±	±
多発性嚢胞腎	—	+
心 筋 硬 塞	+	卅
進行性脊髄性筋萎縮症	—	卅
フェロー四徴 (左半球脳腫瘍・化膿性髄膜炎)	—	+
動 脈 瘤(破裂)	—	卅
動 脈 瘤	—	+

一方癌患者血清の 7S γ グロブリンでは、19例について行なった所、(卅)を示すものは2例、(+)を示すもの6例、(±)を示すもの4例が存在し、19例中7例には凝集は認められなかった。

4. 19S γ グロブリンと凝集素について

Sephadex G-200 により分離した血清 19S γ グロブリンを使用して、EA 細胞凝集反応を施行し、癌および非癌について比較した結果を表1および表2に示した。

pool した健康成人血清には凝集素はなく、非癌患者血清では、15例中11例に凝集素が存在しなかったが、15例中1例が(+)、2例が(±)を示した。(+)を示した例は、心筋硬塞で、(±)を示したものはイレウス1例、リウマチ様関節炎1例であった。

他方癌患者血清より分離したものでは、19例中(卅)を示すもの1例、(卅)を示すもの8例、(卅)3例、(+)5例、凝集素の存在しなかったものは、19例中2例存在した。これは食道癌1例、膀胱癌1例であ

る。

5. 2-メルカプトエタノールおよび熱の凝集素に及ぼす影響。

19S γ グロブリンを2メルカプトエタノールで加水分解すると EA 細胞凝集現象はみられなくなるが、7S γ グロブリンはその影響を若干うける程度であった。

19S γ グロブリン、7S γ グロブリンを 70°C、10分間加熱すると 19S γ グロブリンは EA 細胞を凝集しなくなるが、一方 7S γ グロブリンも加熱前に比し、凝集程度はかなり弱くなった。

6. 血清分画の各種正常細胞による吸収と EA 細胞凝集反応

ヒトA型・B型赤血球および白血球、マウス、ヒツジ赤血球を用いて、癌患者血清 19S γ グロブリンおよび 7S γ グロブリン、非癌血清 7S γ グロブリンを吸収し、EA 細胞凝集反応を行なった。

すなわち表3に示す如く、ヒト赤血球および白血

表2 癌血清 19S- γ Glob. 7S- γ Glob. と EA 細胞凝集素

診 断 名	19S- γ Glob.	7S- γ Glob.	備 考
胃 癌 (幽門部・腺 癌)	卅	+	(転) 肺・肝
胃 癌 (噴門部・腺 癌)	+	—	(転) 小彎・脾頭部リンパ節
胃 癌 (幽門部・腺 癌)	卅	+	(転) 結腸・腹膜
胃 癌 (幽門部・腺 癌)	+	+	
肝 癌 (肝 細 胞 癌)	卅	+	(転) 骨
肝 癌 (肝細胞癌・左葉)	卅	—	(転) 肺・横隔膜
肝 癌 (肝細胞癌・右葉)	卅	+	(転) 肺・胃・十二指腸・脾
右 腎 グ ラ ヴ ィ ッ ツ 腫 瘍	+	±	(転) 右肺下野
右 副 腎 皮 質 癌	卅	±	(転) 右肺
再発性甲状腺癌 (扁平上皮)	卅	+	(転) 脳: 脳出血合併
結 腸 癌	卅	卅	
骨 肉 腫	卅	±	(転) 肺
節骨洞癌 (嚢胞腺腫状未分化 髄様)	+	—	
悪 性 黒 色 腫	卅	—	(転) 右腎・副腎・肺
肺 癌 (右気管支癌)	+	+	
乳 癌 再 発 (硬 癌)	卅	+	
多 発 性 骨 髄 腫	卅	—	(転) 皮膚・肋骨・心内膜甲状腺 ・胸膜・肝・横隔膜
食 道 癌	—	—	
膀 胱 癌	—	—	

注: (転) は転移を示す。

球、マウス赤血球で吸収するとその凝集能は半減し、ヒツジ赤血球で吸収すると、さらに凝集能が減弱したが、なおかつ EA 細胞を凝集し得た。勿論 EA 細胞で吸収すれば、もはや EA 細胞を凝集しなくなる。すなわち EA 細胞表面には、これらの細胞とかなりの部におよぶ共通抗原が存在するが、その共通抗原のすべてを除去してもなお癌細胞のみに存在する抗原が存在していることを示している。

一方 AB 型血清は EA 細胞を凝集し、他方市販の ABO 式血液型判定血清は抗 A および抗 B 血清とも、EA 細胞を凝集しない。

表3 癌および非癌血清 r-Glob. の各種正常細胞吸収後の EA 細胞凝集

使用凝集素 使用細胞		癌		非 癌
		19S-r Glob.	7S-r Glob.	7S-r Glob.
ヒ ト	A型赤血球	++	++	++
	B型赤血球	++	++	++
	A型白血球	++	++	++
	B型白血球	++	++	++
マウス赤血球		++	++	++
ヒツジ赤血球		+	+	+
E A 細胞		—	—	—
対照(吸収前)		+++	+++	+++

注：ヒト A 型血球で吸収するときは B 型の血清を、B 型血球を使用するときは A 型血清の材料を使用した。

7. EA 細胞凝集素について。

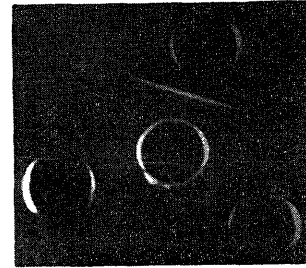
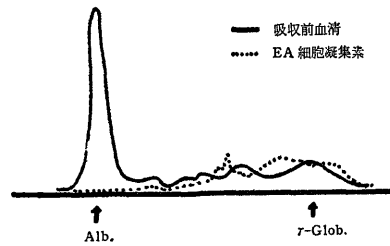
一旦血清で凝集させた EA 細胞塊を pH 3.15 に落して分離させた EA 細胞凝集素をセルローズアセート膜で電気泳動を行なうと図4の如く主として r グロブリンであり、癌・非癌血清で差違は認められない。このものを抗 IgG, IgA および IgM ウサギ血清で寒天内二重拡散法を行なうと、癌・非癌例とも抗 IgG, IgA 血清と沈降線を形成するが、抗 IgM 血清とは反応しなかった。

Ⅲ. 小 括

血清 r グロブリンを 19S r グロブリン, 7S r グロブリン (IgG) に細分画し、EA 細胞凝集素の分布をしらべたところ、健康人および非癌患者は、15例中全例に 7S r グロブリンに存在し、19S r グロブリンには、15例中3例に認められたが凝集能は弱かった。

一方癌例19例については、7S r グロブリンには11

図4 EA 細胞凝集素の電気泳動図及び寒天内二重拡散法



例に存在するが、逆に 19S r グロブリンに存在するものが17例あった。そしてその 7S r, 19S r グロブリンともに凝集素の存在しないものが食道癌1例、膀胱癌1例計2例にすぎなかった。

吸収実験では、この凝集素は、人の ABO 式血液型凝集素とは無関係であり、マウスやヒツジの赤血球と共通する部を吸収し去っても独自に凝集しうる EA 細胞特有の凝集素の存在を認め得た。

〔Ⅱ〕 Ehrlich 腹水癌細胞表面抗原の分析

赤血球細胞表面に存在する1種の特異抗原である血液型物質の構造は、特異凝集素αおよびβを用いることによって解明されてきた¹⁸⁾¹⁹⁾³¹⁾。すなわち、赤血球と凝集素との反応系に、凝集阻止物質を挿入することによって、凝集素の活性基封鎖の度合いから型物質の構造を決定し得たのである。第1編において検討したヒト血清中の EA 細胞凝集素は、癌細胞表面と特異的に反応するのであるから、この凝集反応系に、阻止物質を挿入することによって、すなわちその凝集反応阻止実験成績から、EA 細胞の癌性表面抗原の構造を追求しうるのであろう。私どもの教室において諸種の癌細胞から抽出されている癌性物質の抽出方法を EA 細胞に適用して得た物質についての抗原性を検討するとともに、凝集反応阻止実験を行なって、EA 細胞の表面抗原に関する分析を行なった。

I. 実験材料および実験方法

1. 実験材料

癌細胞としてマウス EA 細胞を使用した (第 1 編参照)。凝集素としては、ヒト γ グロブリン (ミドリ十字製: 殆んどが IgG 分画で若干の IgA, IgM 分画を含む) および癌血清 19S γ ならびに 7S γ グロブリン (IgG), 非癌 7S γ グロブリン (IgG) を使用した。

2. 実験方法

1) EA 細胞凝集阻止反応

石川¹²⁾および石川¹³⁾¹⁴⁾の方法にしたがって以下のように行なった。

EA 細胞凝集素と、目的とする被検材料を等量混和し、25°C 以下で 1 時間 incubate した後、この混和物と EA 細胞浮遊液をホールグラス上で反応させる。温度は 25°C 以下にし、1 時間後、3 時間後、顕微鏡下にその阻止度を測定した。

2) EA 細胞表面の抗原物質抽出法

i) EA 細胞 ghost cell より、Triton 可溶・生食水可溶部分の抽出。

福田¹¹⁾の方法にしたがって、下記のように行なった。

生食水で充分洗滌したマウス EA 細胞を、5 倍容の 0.4M NaCl 液に懸濁し、4°C で 10~12 時間攪拌後遠心する (700g, 10分)。沈渣に 0.7M NaCl 液を加える 3~4 時間攪拌・遠心する。

この沈渣はさらに pH 7.0 および pH 4.0 の 1.0 M NaCl 液で交互に 3~4 時間攪拌・遠心する。この操作を 15 回以上繰り返して、上清に核酸および蛋白反応が陰性であることを確めた後沈渣物 (EA 細胞 ghost cell) 20 g (湿重量) を 100 ml の 5% Triton X-100 溶液に懸濁し、Tris 緩衝液で pH 7.8 に調製し、時々攪拌しながら 4°C に 2 日間放置する。10000 ×g, 30 分遠心して上清をとる。残渣はさらに 5% Triton 溶液で抽出した。

抽出液を合して Triton 可溶分画とする。この分画に 5 倍容アセトン (-20°C) を加え、生じた沈渣物を遠心して集め、アセトンおよび冷エーテルで各 2 回洗滌後、急速に乾燥させて得た粉末を 10 ml の生食水で 2 回抽出した。

得られた抽出液を生食水可溶分画 (Ss 分画) とし、残渣は生食水不溶分画 (Si 分画) とした。

ii) 峰田³²⁾の方法に基づく EA 細胞の glycoprotein 抽出法

峰田の方法により、EA 細胞の glycoprotein を下記のように抽出した (表 4)。

生食水で洗滌した EA 細胞を、熱エタノールで抽出し、4°C にて一晩放置後濾過する。

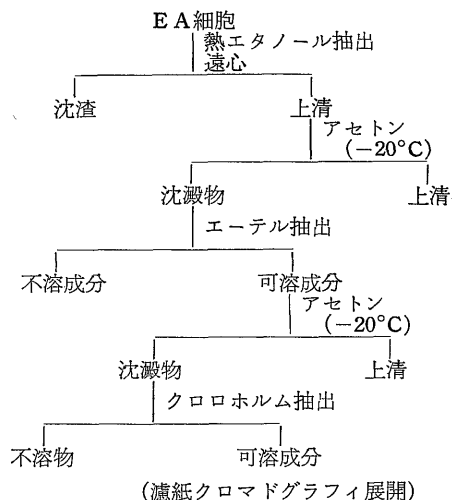
濾液をロータリー・エバポレーターを用いて、35°C 以下の微温下で減圧乾燥し、ついで無水エタノールで還流煮沸抽出を行なう。

抽出液を遠心し、不溶成分を除去した後、アセトンを加え、生じた沈渣物をデシケーターで減圧乾燥する。このエタノール可溶部分をさらにエーテルで抽出し、遠心にて不溶成分をのぞく。これにアセトンを加え、できた沈渣物を集め、乾燥した後、少量のクロロホルムに溶解する。

このクロロホルム溶液をペーパー・クロマトグラフィーで、18~28°C にて一次元展開を行なった。溶媒はピリジン: メチアルコール: 水 (3.5:3:3.5) を使用した。

展開終了した濾紙は風乾後、ニンヒドリンで発色させた。ニンヒドリン反応陽性部分を生食水で抽出し、風乾により濃縮した。

表 4 0.38 物質の抽出・分画法



3) Ss 分画付加タンニン酸処理ヒツジ赤血球とヒト γ グロブリン (主として 7S γ グロブリン) の passive hemagglutination

西岡³³⁾, Boyden³⁴⁾ らの方法に準じて、下記のように施行した。

i) タンニン酸処理ヒツジ赤血球 (TRC) の調製

アルサーバー液中に保存してあるヒツジ赤血球 (ShE) を、3000 rpm, 10 分間遠心して上清を除き、緩衝液 (NaCl, 20.4g; NaHPO₄, 4.45g; KH₂PO₄, 1.30 g; 蒸溜水にて 3 l にする。pH は 7.2) にて 2 回洗滌後、緩衝液で 1×10⁹/ml の濃度に浮遊する。

ShE 浮遊液 および 40000 倍稀釈タンニン酸溶液を等量混合して、37°C の恒温槽中で 1 時間振とうし、

表5 糖類の凝集阻止能

	19S- γ Glob.	7S- γ Glob.
A	melibiose D-galactose D-fucose	melibiose D-galactose
B	glucuronic acid aldobiouronic acid N-acetylglucosamine raffinose N-acetylgalactosamine β -glucose	D-fucose aldobiouronic acid raffinose N-acetylglucosamine N-acetylgalactosamine gentiobiose β -glucose
C	gentiobiose L-fucose	L-fucose

A: 最も強く阻止する B: 中等度阻止する C: 弱く阻止する

緩衝液で3回洗滌しタンニン酸をのぞき、 $5 \times 10^8/\text{ml}$ の濃度に緩衝液に浮遊する (TRC)。

ii) Ss 分画付加 TRC

上記の TRC および Ss 分画溶液 (5mg/ml 緩衝液) を等量混合して氷室 (2~5°C) に一晩放置後、37°C にて20分間振とうし、2000 rpm、5分間の遠心で上清をのぞき、0.5% 正常ウサギ血清加緩衝液にて3回洗滌する。その後0.5% 正常ウサギ血清加 EDTA (0.01M) 緩衝液にて $5 \times 10^8/\text{ml}$ の濃度に浮液する (TRC-Ss)。

ウサギ血清はヒツジ、マウス、ヒト AB 型赤血球および EA 細胞で吸収したものを使用した。なお正常ウサギ血清付加 TRC (TRC-RaS) も別に作製した。

iii) passive hemagglutination

凝集素として、人 γ グロブリン (市販: ミドリ十字製・100 mg/ml) を使用した。なお、あらかじめヒト AB 型、ヒツジ、マウス赤血球で吸収検査を行なった。反応は凝集素希釈液 (倍々希釈) 0.8 ml に、TRC-Ss 浮遊液 0.2 ml を混合し 37°C にて1時間振とう後、数時間静置し、血球の凝集像を管底の所見および顕微鏡下にみて判定した。判定基準は伝染病研究所学会編細菌学実習提要³⁵⁾によった。

4) 糖類による EA 細胞凝集阻止試験

表5の如き糖類を用いて、EA 細胞凝集阻止試験を行ない、その阻止能を調べた。

糖類は 0.02M の濃度に生食水に溶解したものを使用し、凝集素はヒト癌血清の 19S γ グロブリン、ヒト非癌血清の 7S γ グロブリン (いずれも 10mg/ml) を使用した。

II. 実験結果

1. Ss 分画の passive hemagglutination

Ss 分画を TRC に付加して行なった PHA では、ミドリ十字製 γ グロブリン (7S- γ グロブリン・100 mg/ml) の4倍希釈まで凝集反応陽性であった。ただし対照としたウサギ血清付加 TRC を使用したものでは凝集反応陰性であった (表6, 写真1)。

2. 峰田³²⁾の方法にて抽出した物質による凝集阻止試験

EA 細胞より抽出したエタノール・エーテル・クロロホルム可溶部分をペーパークロマトグラフィーでー

表6 TRC-Ss とヒト γ -Glob. の PHA 試験

		ヒト γ -Glob. 希釈率 量	TRC-Ss	TRC-RaS	生食水	判定
本 試 験	1	1: 1, 0.8ml	ml 0.2	—	—	+
	2	1: 2, 0.8	0.2	—	—	+
	3	1: 2 ² , 0.8	0.2	—	—	+
	4	1: 2 ³ , 0.8	0.2	—	—	—
	5	1: 2 ⁴ , 0.8	0.2	—	—	—
	6	1: 2 ⁵ , 0.8	0.2	—	—	—
	7	1: 2 ⁶ , 0.8	0.2	—	—	—
	8	1: 2 ⁷ , 0.8	0.2	—	—	—
	9	1: 2 ⁸ , 0.8	0.2	—	—	—
	10	1: 2 ⁹ , 0.8	0.2	—	—	—
対 照	11	—	ml 0.2	—	ml 0.8	—
	12	1: 1, 0.8	—	ml 0.2	—	—

TRC-Ss: Ss 分画, 附加 TRC

TRC-RaS: ウサギ正常血清付 TRC

次元展開を行なうと、ニンヒドリン反応陽性スポットは Rf 0.38 および Rf 0.51 の2つが得られる。各々の分画の生食水抽出液の凝集阻止能を調べたところ、Rf 0.38 物質は凝集阻止能を示すが、Rf 0.51 物質は凝集阻止能をもたなかった(写真2)。

3. 糖類の凝集阻止能

糖類による EA 細胞凝集阻止能によって、最も強く阻止するもの (A級)、それにつぐもの (B級)、弱いもの (C級) の3段階に分類すると表5のようになる。

7S γ グロブリンに対しては、A級は melibiose, D-galactose, D-fucose であり、B級は glucuronic acid, aldobiouronic acid, N-acetylglucosamin, raffinose, N-acetylglactosamin, β -glucose, であり、C級は L-fucose であった。19S γ グロブリンに対しては、A級は melibiose および D-galactose で、B級を示すものは D-fucose 以下、7S γ グロブリンに対するものと大差なく、C級は gentiobiose, L-fucose であった。

Ⅲ. 小 括

福田¹¹⁾の方法で EA 細胞より抽出した Triton 可溶・生食水可溶部分は、ヒト 7S γ グロブリンと passive hemagglutination をおこした、また峰田の方法にて EA 細胞より抽出したエタノール・エーテル・クロロホルム可溶部分のペーパークロマトグラフィーで Rf 0.38に相当する物質は、EA 細胞凝集を阻止する能力を有した。

糖による EA 細胞凝集阻止試験では 7S γ グロブリンでは melibiose, D-galactose, D-fucose が最っとも阻止し、19S γ グロブリンでは melibiose, D-galactose が最っとも強く阻止した。

血液型物質では重要である L-fucose は阻止能力が弱かった。

〔Ⅲ〕 担癌ヒト血清中に出現する、

腹水癌細胞凝集阻止物質 (癌細胞拡散因子)

およびその臨床診断への応用

担癌状態に入ると、癌細胞由来の物質が、血液中に流出するらしく、癌患者血清中に、EA 細胞凝集阻止物質が出現してくる^{12)~14)}。

石川らは、この凝集阻止物質が、癌細胞の遊離性を保持させる結果になることから、このものを癌細胞拡散因子と名づけ、癌細胞に転移性を与える要因の一つになるものと考えている。

流血中に癌細胞拡散因子が出現することが、担癌状態にのみ起因するものであれば、血清中の拡散因子の

有無によって、癌の臨床診断を行なうことができる。この試みは石川らによって1959年以来試みられ、門馬³⁶⁾によれば胃癌の診断率 88.1%、非癌(胃潰瘍、胃炎、胃ポリープ、胃下垂等)を非癌とする診断率は 90.9%であると報告し、大野³⁷⁾もまた同様な成績をあげている。

私どもの教室では、臨床検査例はすでに 15000例に及んでいるが、これには10%内外の不合理陽性および不合理陰性の結果が含まれるので、その原因を追求することが肝要である。

それには、まず担癌流血中に存在する癌細胞拡散因子の分画分離をなし、石川らの全血清を用いる原法を改良し、拡散因子分画を抽出して診断する方法を考案した。これを臨床診断に適用させるためには、所要血清量は、なるべく少量とし、かつその操作はできるだけ簡潔であることが望ましい。

I. 実験材料および実験方法

1. 実験材料

EA 細胞は、第1編の方法で採集したものをを用いた。宿主マウスは、dd 系マウスを使用した。癌細胞拡散因子を分画するための被検血清としては、病理組織学的検査、または病理解剖にて診断の確定したものをを使用した。

ただし非癌血清中には、一般臨床検査にて診断の確定したものも含まれる。

被検血清の例数は、癌11例、および非癌9例を用いた。

この時用いた EA 細胞凝集素はマウス、ヒツジおよびヒト AB 型赤血球で充分吸収したヒト γ グロブリン(市販: ミドリ十字製、主として 7Sr, 濃度 100 mg/ml)を使用した。

一方、臨床診断への応用の開発には非癌陰性例、非癌不合理陽性例、癌陽性例、癌不合理陰性例(末期癌)について、表7の如き例、それぞれ10例ずつの血清を用いた。

この際用いた EA 細胞凝集素は市販ヒト γ グロブリン(ミドリ十字製)である。

2. 実験方法

1) 血清分画法

i) DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーによる分画法

Sober³⁸⁾、福田³⁹⁾の方法に準じて、下記の方法にて施行した。

a. 全血清を用いる方法

全血清 5 ml をあらかじめ準備した 3×20 cm の DEAE-セルローズカラムへ注入し、下記の溶出液で

表7 臨床検査材料

	非 癌		癌	末 期 癌
	陰 性 例	不 合 理 陽 性 例		
診 断 名	胃・十二指腸潰瘍 7	胃・十二指腸潰瘍 3	胃 癌 3	胃 癌 8
	関 節 炎 1	胃 炎 2	乳 癌 2	食 道 癌 1
	糖 尿 病 1	肺 結 核 1	結 腸 癌 1	乳 癌 1
	慢 性 腎 炎 1	肝 硬 変 1	肺 癌 1	
		肝 炎 1	肝 癌 1	
		癌 疑 (胃) 2	右上顎癌 1	
			口 蓋 癌 1	
計	10 例	10 例	10 例	10 例

stepwise elution を行なった。

溶出液は、以下のものである。

- 0.01M, pH 8.0 リン酸緩衝液
- 0.025M, pH 7.6 リン酸緩衝液
- 0.05M, pH 7.4 リン酸緩衝液
- 0.075M, pH 7.2 リン酸緩衝液
- 0.1M, pH 7.0 リン酸緩衝液
- 0.1M NaCl 含有 0.1M, pH 6.6 リン酸緩衝液
- 0.2M NaCl 含有 0.1M, pH 6.2 リン酸緩衝液
- 0.3M NaCl 含有 0.1M, pH 5.8 リン酸緩衝液

b. 血清の40%飽和硫酸上清を用いる方法

血清を40%飽和硫酸で沈澱させた上清を、充分脱塩した後、血清 5ml 相当量を 3×20 cm の DEAE-セルローズ・カラムへ注入し、下記溶出液を用いて stepwise elution を行なった。

溶出液は

- 0.01M, pH 8.0 リン酸緩衝液
- 0.05M, pH 7.4 リン酸緩衝液
- 0.1M, pH 7.0 リン酸緩衝液
- 0.1M NaCl 含有 0.1M, pH 6.6 リン酸緩衝液

を用いた。

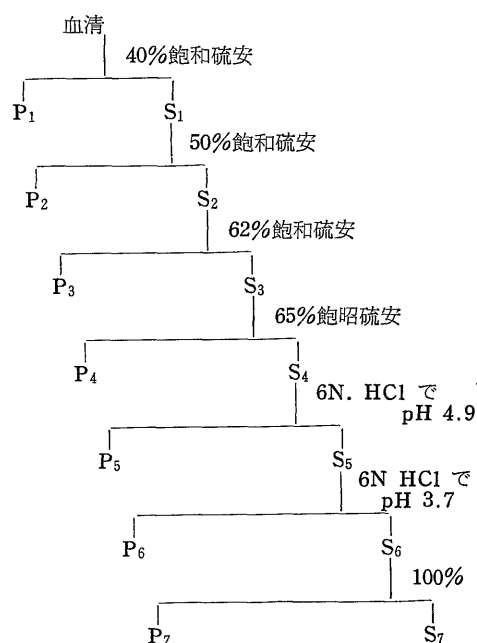
a および b の方法とも、各分画は 5ml ずつ採集し蛋白濃度はベックマン吸光度計で、280 mμ にて測定し、集めた分画は水で透析後、凍結乾燥し保存した。使用に際しては、生食水にて蛋白濃度 10 mg/ml に溶解して用いた。

ii) 硫酸アンモニウム塩析法による血清分画

安藤⁴⁰⁾, 尾上⁴¹⁾, Weimer⁴²⁾, Berzkorovainy⁴³⁾ら

の⁴³⁾の方法に準じて表8のように行なった。

表8 血清蛋白硫酸分画法



癌血清を等量の水で希釈し、飽和硫酸液を攪拌しつつ加え、4°C にて40%、50%、62%、65%飽和でそれぞれ分画し、65%飽和上清を 6N-HCl で pH 4.9、さらに3.7で沈澱さし、最後に100%飽和になるべき量の固形硫酸を加えて沈澱物を集めた。沈澱物は生食水で再溶解し、上記の分画法を2～3回繰り返えし、水で充分透析後、凍結乾燥し保存した。使用時に生食水にて蛋白濃度 10 mg/ml に調整した。

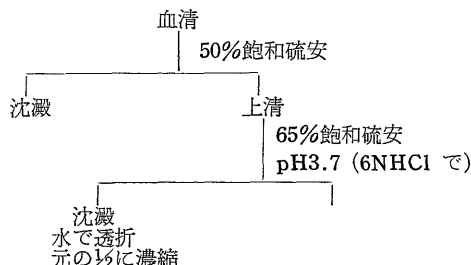
2) 濾紙電気泳動法

電気泳動学会の標準操作法にて、濾紙(東洋濾紙 No.51)に流した。

3) 臨床診断用血清分画法

諸種の条件を勘案し、表9の如き簡易法を考案した。すなわち、血清を等量の蒸留水で稀釈後、攪拌しつつ、飽和硫安液を加えて、50%飽和として遠心後、その上清にさらに硫安を加えて65%飽和となし、pH 3.7にして、生じた沈澱物を集める。これを生食水で充分に透析し、原血清量の1/2量に濃縮して使用する。

表9 臨床検査用血清分画法



II. 実験結果

1. DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーによる癌細胞拡散因子分画

DEAE-セルロースによる血清分画曲線は図5（全血清）および図6（血清40%硫安飽和上清）のようになる。

癌患者11例（うち胃癌5例、肝癌3例、肺癌、副腎皮質腫、多発性骨髄腫各1例）および非癌例（うち胃潰瘍、心筋硬塞、肝硬変、血清肝炎、リウマチ様関節炎、動脈瘤、進行性脊髄性筋萎縮症、ファロー四徴、多発性嚢胞腎各1例づつ）について、DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーによって分離した各分画成分をEA細胞凝集阻止試験を行なった。

癌血清11例については、全例とも、全血清および血清の40%飽和硫安上清成分ともに、0.1M NaCl 含有0.1M, pH 6.6 リン酸緩衝液による溶出分画に、EA細胞凝集阻止物質が存在した。しかし非癌例9例中、動脈瘤の1例に認められた以外はどの分画にも認められなかった。

濾紙電気泳動法でしらべると、この分画はアルブミン、 α_1 、 α_2 、 β グロブリンを含むものであった(図7)。

2. 硫安塩析法による癌細胞拡散因子分画

表8にしたがって、癌患者10例（結腸癌、胃癌再発、骨肉腫、節骨洞癌、肝癌、乳癌、直腸癌、悪性リンパ腫各1例づつ）の血清について、それぞれ塩析法を行なった。得られた各分画について、EA細胞凝集阻止試験を行なったところ、各例とも65%飽和上清、pH 3.7 沈澱物が最も強く阻止し、ついで65%飽和上清、pH 4.9 沈澱物であった。他の分画は、全部

阻止能を示さなかった。

この分画について、濾紙電気泳動を行なうとアルブミン、 α_1 、 α_2 グロブリンと若干の β グロブリン位に相当するものであった(図7)。

3. 臨床診断用血清分画による拡散因子分画のEA細胞凝集阻止度

石川・井上の検診で、陰性、陽性、不合理陰性、不合理陽性を示したものを、10例づつ抽出した。確定診断名は表7に示した。

これら血清より、上記臨床診断用血清分画法にしたがって、拡散因子を抽出し、EA細胞凝集阻止試験を行なった(図8a)。

対照実験として生食水を用いたものは γ グロブリン(ミドリ十字製: 100 mg/ml)の 2^6 倍稀釈まで凝集するが、陰性例では平均 $2^{6.2}$ 倍、癌例より分画した成分を加えたものでは、平均 $2^{2.2}$ 倍まで凝集した。一方末期癌では平均 $2^{3.3}$ 倍、不合理陽性例では $2^{5.4}$ 倍まで凝集した。

ここで拡散因子の代わりに生食水を添加した対照実験で、凝集反応陽性を示す γ グロブリンの最終稀釈率を基準にして、各々の血清拡散因子分画の凝集阻止度

図5 癌患者血清中の拡散因子の抽出

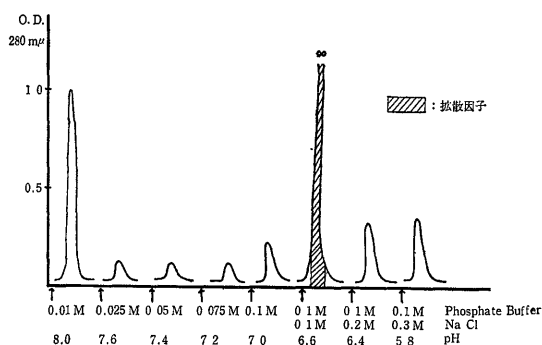


図6 癌患者血清血清中の拡散因子の抽出

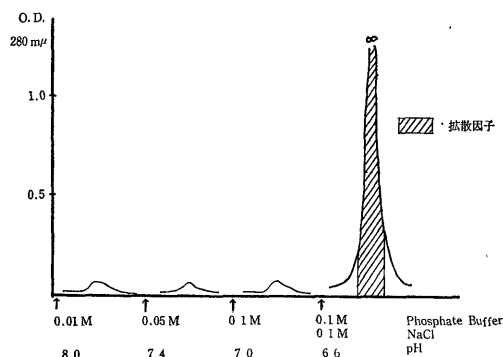


図7 濾紙電気泳動

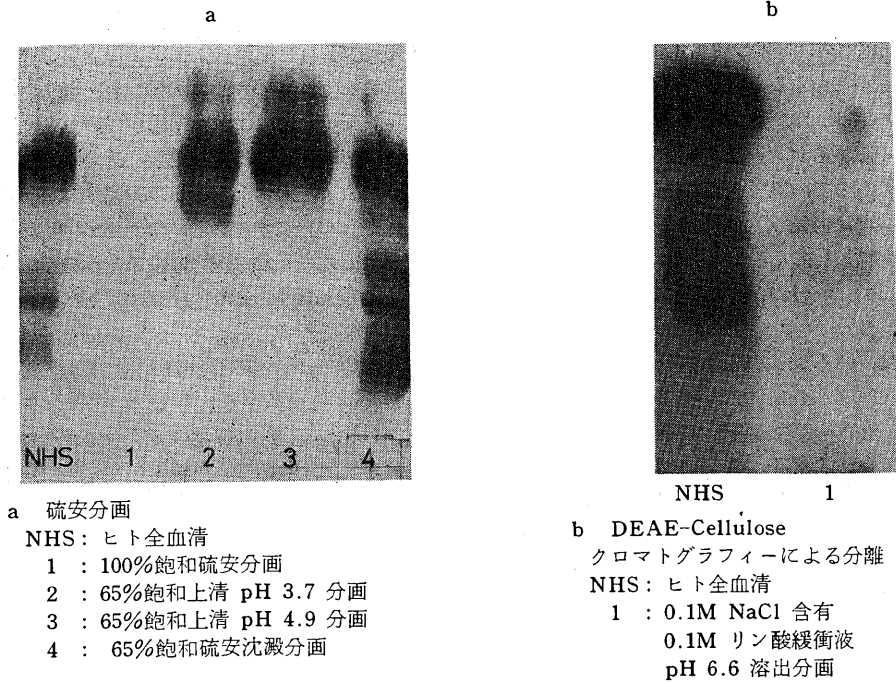
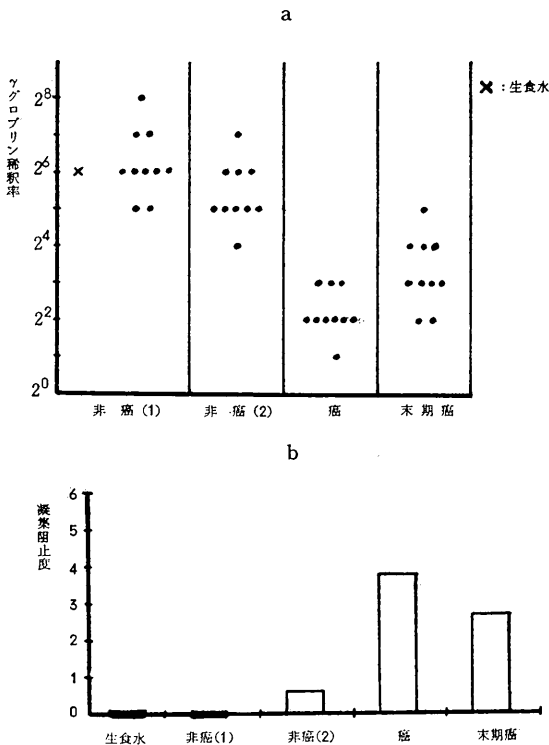


図8 癌臨床検査用分画のEA細胞凝集阻止能



をみると図8 bのようになる。すなわち癌例が最っとも阻止し得、次いで末期癌例が続く、不合理陽性の同分画〔非癌(2)〕は阻止能が低かった。

Ⅲ. 小 括

血清蛋白中のEA細胞凝集阻止因子は、癌例11例中全例に、非癌例中1例においてみられ、DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーで0.1M NaCl含有0.1M, pH 6.6 リン酸緩衝液で溶出される分画に存在した。この分画中にはアルブミン、 α_1 、 α_2 、 β -グロブリンが存在することが電気泳動的に示された。

硫酸塩析法で癌患者血清を分画したものについては、拡散因子は、65%上清、pH 3.7 分画に一番多く、次いで65%上清、pH 4.9分画であった。電気泳動により、前者には α_1 、 α_2 、 β -グロブリンおよびアルブミンが存在し、後者にはアルブミン、 β グロブリンと少量の α_1 および少量の α_2 グロブリンが存在することを認めた。

これらの結果から、癌細胞拡散因子の臨床診断への応用方法を試みたところ、診断血清に、全血清をそのまま用いるよりも、遙かに確率の高い成績を得た。

考 察

かつて教室の石川ら¹³⁾は、癌患者血清を用いての臨床臨断法を工夫、検討していた際に、たまたまマウス

のEA細胞が、正常人または非癌患者血清で凝集するが、癌患者血清では、このような現象がみられず、かつ、その凝集は血清内 γ グロブリン(以下 γ -glob.と記載)によるものであることを見出した。

ところで、 γ -glob. は、7S γ と19S γ -glob. とにわけられるものであるが、正常人血清での凝集は7S γ -glob. によるもので、担癌状態になるとともに、その力価は減少または消失し、それに代って、19S γ -glob. 凝集素が増加してくることから、癌患者血清での凝集は主に19S γ -glob. によるものであると考えられる(表1, 2)。

以上の事実は、いくつかの問題点を含んでいる。すなわち、1) この γ -glob. による凝集は免疫反応とみてよいのか。2) 特異な凝集素がみつかり、それに対する凝集阻止反応を用いて、EA細胞の表面抗原構造が定められないか。3) 担癌患者血清に19S γ -glob. 凝集素が増加してくる。その意義は何か。4) 癌患者血清中には、7S γ -glob. 凝集素による凝集反応を阻止する因子がある。それは何か、などである。以下これらの問題点について逐次吟味しよう。

まず、7S γ - または19S γ -glob. による凝集に関する問題であるが、 γ -glob. による細胞凝集については、ブドウ糖液中で赤血球が、その細胞膜の特定なlipoproteinと γ -glob. が結合することによって、可逆的に凝集塊を作ること三浦⁴⁴⁾が記載しており、Marinetti⁴⁵⁾は、cardiolipinなど特定なlipidが γ -glob. と結合して、不溶性な複合体をつくることを報告している。

また癌細胞膜表面に多い、シアール酸や磷酸根と γ -glob. の塩基根とのelectrostaticな結合も考えられる。事実、EA細胞とpolylysineの強い結合がみとめられている⁴⁶⁾。

しかし、この静電結合による凝集反応は、かならずしも免疫反応ということができない。免疫反応であるという証明のためには、Nelson⁴⁷⁾、西岡⁴⁸⁾らのいう、immuno-adherence (IA) testを必要とするが、石川¹³⁾は、この凝集反応系にIA-testを行なうとIAが認められ、あるいは一度EA細胞に吸着した γ -glob. を遊離させて得た凝集素を用いても、IAが認められると報告している。したがって、私どもの凝集反応は免疫反応と理解することができるだろう。

一方、文献的には、正常人血清の中に、マウスのEA細胞、HeLa細胞などに対してcytotoxicに、あるいはcytotoxicに作用する抗体または系を報告したものが少ない。

例えば、Hotham-Iglewski^ら⁴⁹⁾⁵⁰⁾は正常人血清中

にHeLa細胞、Ehrlich-Letteré癌細胞に対するnatural cytotoxic systemが存在し、それは蛍光抗体法によって、細胞膜と β -グロブリンと結合することを明らかにし、かつマウスの肺、腎、精巣細胞で吸収しても、cytotoxicな効果に変わりはないとしている。またBolande⁵¹⁾は、正常人血清中に、補体の存在下に、EA細胞やSarcoma 180細胞にcytotoxicに働く物質の存在すること、Stambuk^ら⁵²⁾はこれらcytotoxicな効果は細胞の呼吸系や解糖系の阻害にあること、Landschütz⁵³⁾は正常人血清中にEA細胞の成長抑制因子のあること、Ginsburg^ら⁵⁴⁾は正常人血清中のcytotoxic factorは熱安定性で、かつheterologousな抗体が癌細胞に作用するのを阻止すること、Landy^ら⁵⁵⁾は正常人血清中にマウス腫瘍細胞に対する抗体、補体系の存在すること、Laskov^ら⁵⁶⁾⁵⁸⁾は19S免疫グロブリンにcytotoxicな効果のあることを報告している。

次に第2の問題点として、EA細胞に対する特異な凝集素がみつかり、その凝集阻止反応を利用して、EA細胞膜表面の抗原構造を吟味しうることについて述べよう。

赤血球膜の抗原構造、いわゆる血液型物質の解析は、特異な凝集素、すなわち α 、 β 凝集素による凝集反応を、特定な物質による席のうばい合い反応で阻止する方法で行なわれたものである。井関³¹⁾によると、ヒト抗原血球にN-acetylgalactosamineがつくと、肺炎双球菌XIV型物質と共通の末端構造となり、これにfucoseが結合するとLe型物質となり、 β -D-galactoseおよびL-fucoseがつくとO(H)型質となり、その末端にN-acetylgalactosamine(A型物質)、または α -D-galactose(B型物質)がつくとそれぞれの血液型物質に分化するものとされているが、それらは凝集阻止反応によって、確かめられるものである。

具体的には、赤血球凝集には血清凝集素によるものの外に、いわゆる植物性凝集素phytoagglutininが見出され⁵⁹⁾、後者はことに純化されるから、それらの凝集反応系を用いて、丹念に血液型物質が吟味、検定されてきた。

したがって癌細胞についても同様に、凝集反応に基づき、細胞表面の抗原構造、すなわち癌型物質を吟味しうることになる。その可能性を著者の7S γ -glob. 凝集素が実現してくれるものと期待される。

私どもの教室で、この一連の血清凝集素に関する実験を行なっている間に、Aub^ら⁵⁹⁾によりヒト癌細胞に対する植物性凝集素が見出され、ここに図らずも、

赤血球型物質が血清凝集素と植物性凝集素で吟味されたと同じ方法で、癌細胞型物質が吟味される可能性が生れてくるが、まず血清凝集素、すなわち私どもの 7S *r-glob.* 凝集素を用いての成績を検討し、つづいて、最近発見された植物性凝集素、すなわち小麦胚芽凝集素を用いての、Hakomori¹⁵⁾ および Hakomori¹⁶⁾¹⁷⁾ の成績について考察したい。

表 5 に示すように、7S *r-glob.* 凝集素を阻止するものとして、諸種の糖のうち、まず、melibiose があげられる。これは、galactose, glucose の 1-6 結合した二糖類である。つづいて、D-galactose とともに、aldobiouronic acid (glu. A 1-6 gala.), raffinose (gala. 1-6 glu., 1-2 fur.) に凝集阻止反応が強い。このことは、EA 細胞表面抗原構造に、gala. 1-6 glu. など、正常では有意ではない 1-6 結合の糖が最っとも有義であることを示すものであろう。ついで fucose が問題であるが、血液型物質では L-fucose が H (O) 型質末端基と認められているが EA 細胞凝集素末端基としては、D-fucose の方がより有効であると考えられる。

また、EA 細胞抗原構造には D-galactose も有意義という成績が得られたが、これは EA 細胞の血液型が [B_{II}・B_{III}] [O_{II}・O_{III}] [F₂・F₃] [X] である¹⁸⁾ ことにもとづくものであろう。石川¹²⁾ および石川¹³⁾ ¹⁴⁾ はさらに EA 細胞表面抗原として、通常の α 型の糖より、 β 型の糖がより有効であると報告している。Laskov⁵⁸⁾ もヒト血清中のマウス癌細胞に対する細胞傷害性抗体の反応系において、D-galactose や melibiose, raffinose が有効に反応系を阻止する成績をあげている。

次に癌細胞膜そのものから、7S *r-glob.* 凝集素を阻止する物質が抽出されることが望ましいのであるが、恐らく、確実にその物質は癌型質に相当するものであろう。かつて教室の峰田³²⁾ は、ヒト胃癌材料から Rf 0.38 物質を単離し、これに強い凝集阻止能を見出したが、他方、対照として用いた胃潰瘍材料からの同様な物質には、凝集阻止が見出せなかったと報告し、癌材料からのこの種 Rf 0.38 物質を kanalipin と名づけ、これを癌型質とみなしている。

私どもの 7S *r-glob.* 凝集反応系に峰田の胃癌 0.38 物質、すなわち kanalipin を適用すると、強い凝集阻止が認められている¹²⁾⁻¹⁴⁾ が、峰田の方法にしたがって、EA 細胞から抽出した 0.38 物質を用いても、明らかな凝集阻止がもたらされ、この物質は癌型質に相当するものと理解される。峰田によると、この kanalipin は燐酸、コリンを含む 7 種の単糖類と、9 種

(またはそれ以上) のアミノ酸よりなる glyco-lipo-peptide であるが、その糖成分に上記の 1-6 結合、その他の特長が存在するものであろう。私どもは、EA 癌細胞型質を以上のように解釈した。

ところで、いつれの細胞も膜表面に固有な isoantigen をもつものであろうが、赤血球にあっては、それは、糖の参加とともに $Le^a \rightarrow O \rightarrow A, B$ 型質と分化するものである。癌細胞は分化の異常であるから、その特異な形質形成に、上記に指摘した、特徴のある糖類が干渉するものと解釈されるのである。

以上は、7S *r-glob.* 凝集素系の成績であるが、19S *r-glob.* 凝集素を用いた凝集阻止実験の結果でも、大した相違を示さなかった。

今一つ、癌細胞特異性組成としての、福田のいう癌特異性抗原が、著者の反応系で吟味された。すなわち、教室の福田は AH 腹水肝癌について細胞膜系の免疫学的解析を行ない、腫瘍特異抗原を Triton 可溶・生食水可溶部分と Triton 可溶・生食水可溶部分に見出している。そのうち前者分画を、EA 細胞より、福田の方法で抽出し、タンニン酸処理法によりヒツジ赤血球を被覆し、私どもの 7S *r-glob.* と反応させたところ、赤血球凝集反応が惹起された。このことは、ヒト癌を含むすべての癌細胞について、その癌特異性な膜抗原を、この PHA 法で吟味しうることを示唆している。

一方、Hakomori¹⁵⁾ および Hakomori¹⁶⁾¹⁷⁾ は小麦胚芽凝集素を精製し、その反応系は、彼の方法で抽出した腫瘍組織からの ganglioside で阻止されることを指摘しており、この凝集阻止実験の結果から、腫瘍性 ganglioside を、腫瘍抗原を形づくるものと考えている。正常細胞からの glycolipid は hematoside が主体で、lactosylceramide が少いの、悪性腫瘍のそれでは、逆に後者が増加してくるという組成上の相違が認められる。また、ヒト腺癌から抽出した fucose 含有 glycolipid は血液型 A, B 物質を失い、むしろ Le^a 型質と、若干の H (O) 型質をもつものとされている。

いわば、癌型質を血液型分化のレベルで解釈している点に興味があろう。

次に第 3 の問題としての、担癌状態における 19S *r-glob.* 凝集素の出現についてであるが、表 2 に示すように、担癌状態に入ると、7S *r-glob.* 凝集素の力価が減少または消失し、19S *r-glob.* 凝集素の出現が認められた。この傾向は末期癌患者血清に強く、末期癌血清による EA 細胞凝集は、殆んどがこの 19S *r-glob.* 凝集素によるものである。したがって、担癌

状態、ことに癌末期に出現するこの特異な凝集素を、一つの獲得性免疫抗体とみなすことができないだろうか。従来、とくにヒト癌患者血清に、癌免疫抗体の確実なものが証明されていないが、私どもの 19S *r-glob.* 凝集素が、今後その一つの有力な指標となるものであろう。

一方赤井ら⁶⁰⁾は癌患者血清に *r-glob.* の増加を報告し、教室の一連の統計的観察⁶¹⁾もこのことを述べている。また、癌に対する抗移植性を獲得したマウス血清に、著明な *r-glob.* の増加が現われ、そこに癌抗体が認められるとしている⁶²⁾。

このような *r-glob.* の変化に対し、とりわけ 19S *r-glob.* 凝集素が有意義と考える。

井上⁶¹⁾によると、すべての末期癌血清に 19S *r-glob.* 凝集素が増加あるいは出現するとは限らない。このことは、すべての免疫反応に抗体生産無力症のみられることと一致している。また 19S *r-glob.* 凝集素に対して、正常ヒト血清にみられる 7S *r-glob.* 凝集素は 1 つの癌の先天性癌免疫抗体とみなされよう。

井上の統計的観察⁶¹⁾によると、集団検診の数%にこの 7S *r-glob.* 凝集素を欠く個体あるいは家系が見出されるという。その意義については、とくに癌家系を考慮して長期間、広範囲な検討がのぞまれる。

最後に第 4 の問題点としての、癌患者血清中に見出される、ヒト 7S *r-glob.* 凝集素阻止物質について述べる。すでに述べたように、癌患者血清は、正常ヒト血清と異なり、EA 細胞を凝集しない。これは癌患者血清中に出現する 7S *r-glob.* 凝集素阻止因子によるものであると考えられる。ところで細胞膜は決して固定静止したものでなく、絶えず崩壊と新生をくりかえしている。赤井ら⁶⁰⁾は腫瘍の崩壊により組織中にふくまれていた糖蛋白、脂蛋白が放出されると述べ、Molnar ら⁶³⁾、Kornfeld ら⁶⁴⁾、および McGarrahn ら⁶⁵⁾等は、EA 細胞、培養細胞など ¹⁴C-labelled hexosamine を用いて、膜の代謝を追求し、膜成分に極めて速やかに崩壊するものと、除々に崩壊する 2 成分が認められると報告している。いずれにしろ、細胞膜抗原をふくめて膜組成は、代謝の間に細胞膜より離れ、周囲組織あるいは血流中に放出されるものである。放出された表面抗原または同軌的な構造をもった物質は、元来の性質から、凝集素と結合し、癌細胞膜表面の凝集の席をうばうことになる。すなわち、この物質は癌細胞の凝集を阻止することになる、いわばこれを拡散させる。

石川¹²⁾は、これを癌細胞拡散因子（以下単に拡散因子と記載）と名付けた。

事実、この拡散因子は、癌患者血清より、DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーや硫酸分画法により、分画抽出しうるが、正常人を含む非癌患者血清では、同じ分画中にまずみつからない。

このようにして抽出した拡散因子は α グロブリン〜アルブミン領域に相当するものが主体であった。

文献的にも、 α グロブリン位に癌特異的な蛋白の出現することが報告されている¹⁴⁾⁶⁶⁾し、癌患者血清では α グロブリン、糖蛋白の増加が認められ⁶⁰⁾、これら血清蛋白の増加は癌の増悪を示すものと推察されている⁶⁷⁾。

Elgaffer ら⁶⁸⁾は、担癌ラットでは、癌が増殖するにつれ、血清糖蛋白が増加し、その後癌の進行とともに減少する所見を得ており、著者も拡散因子の阻止能を EA 細胞凝集阻止試験で調べたところ、図 8 に示すように、同様な傾向を示す成績が得られた。

それでは、この拡散因子の生物学的意義は何であろうか。一つには *r-glob.* の凝集活性基を封じ、癌細胞の凝集を阻止するものであって、換言すれば、癌細胞を遊離させる。すなわち転移をおこしやすくするもので、いわば転移因子とも考えられよう。

以上の見地から、血清中の癌細胞拡散因子は、癌に特有な物質ではないだろうか、少なくともその可能性が期待される。石川ら¹⁴⁾が癌、非癌患者血清について、いわゆる癌細胞凝集阻止試験で調べてみると、このものの癌患者血清の陽性率は約 88% であった。したがって、これは癌診断法として利用価値があり、門馬ら³⁶⁾、大野³⁷⁾らがその臨床成績を報告している。しかしこの原法による不合理陽性、不合理陰性率は約 12% で、その改良がのぞましい。

そこで著者は硫酸分画法により、まず拡散因子を抽出し、これを原法に組合せると結果として図 8 のように、上記の不合理率が改善されうる成績を得たが、今後さらに改良、検討することによって、一層有用な癌血清診断法の開発が期待される。

結 論

1. ヒト血清 γ グロブリンは、マウス Ehrlich 腹水癌細胞を凝集し、健康人および非癌患者血清中の Ehrlich 細胞凝集素は 7S γ グロブリン (IgG, IgA)、癌患者血清中の Ehrlich 細胞凝集素は 19S γ グロブリン (IgM) を主体とする。

2. Ehrlich 細胞凝集素は吸収実験により、ヒトの ABO 式血液型凝集素、マウスおよびヒツジ赤血球凝集素とは関係がない。また、凝集阻止実験により抗原構造を決定することができる。例えば、galactose を

含む 1-6 結合の糖の関与が深い。

3. この凝集反応に 関与する Ehrlich 細胞の癌特異性物質は, Ehrlich 細胞膜より Triton 可溶・生食水可溶成分として抽出でき, また胃癌より抽出した kanalipin と同規物質としても 分画することができた。

4. 癌細胞の代謝の過程で, これら癌特異性物質が血清中に遊離出現するので, これを Ehrlich 細胞凝集阻止物質として check することができる。このものは, DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーにより, 0.1M NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 pH 6.6 溶出分画として分離しうる。また 硫酸塩析法では, 65%飽和硫酸上清・pH 3.7 の沈澱物に集まる。この物質は電気泳動的にはアルブミン $\sim\alpha$ グロブリン位に現われる物質が主体であって, 凝集阻止物質, つまり癌細胞拡散因子とみなされる。

5. 以上の方法を簡易化し, ヒト血清の少量で癌の臨床診断法を考案し, 癌血清と非癌血清との間に有意の差を認めた。

稿を終るにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授ならびに恩師水上哲次教授に対し深く感謝いたします。併せて, γ グロブリン分画法に関して, 御親切な御教示をいただきました本学癌研, 右田俊介教授に厚く感謝いたします。

また, 実験に御協力いただきました教員の方々に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Miller, E. C. & Miller, J. A. : Cancer Res., 14, 96 (1954).
- 2) Weiler, E. : Brit. J. Cancer, 10, 553 (1965).
- 3) Green, H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 68, 268 (1957).
- 4) Björklund, B. : Int. Arch. Allergy, 8, 179 (1959).
- 5) Prehn, R. T. : Cancer Res., 20, 1614 (1960).
- 6) Klein, G., Sjögren, H. O., Klein, E. & Hellström, K. E. : Cancer Res., 20, 1561 (1960).
- 7) 森田弘之 : 十全医会誌, 71, 537 (1965).
- 8) 法幸多良雄 : 十全医会誌, 74, 30 (1966).
- 9) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 74, 51 (1966).
- 10) 田村 充 : 十全医会誌, 75, 187 (1967).
- 11) 福田鎮雄 : 十全医会誌, 76, 342 (1968).
- 12) 石川大刀雄 : 第16回日本医学会総会学術講演集Ⅲ (日本医学会総会編集), 82頁, 東京, 日本医書出版協会, 1963.
- 13) 石川大刀雄・井上和子 : 細胞化学シンポジウム, 14, 123 (1964).
- 14) 石川大刀雄・高柳尹立 : 腫瘍生化学 (久留・三浦編), 第1版, 389頁, 東京, 朝倉書店, 1960.
- 15) Hakomori, S. : J. Lipid Res., 7, 789 (1966).
- 16) Hakomori, S. & Murakami, W. T. : Proc. Natl. Acad. Sci., 59, 254 (1967).
- 17) Hakomori, S., Kocielack, J., Block, K. J. & Jeanlos, R. W. : J. Immunol., 98, 31 (1967).
- 18) 古畑種基 : 血液型学, 第1版, 東京, 医学書院, 1957.
- 19) 正宗 一・箱守仙一郎 : 生化学講座 (赤堀他編), 12, 第1版, 405頁, 東京, 共立出版, 1960.
- 20) Yoon, B. K., Bradley, S. G. & Watson, D. W. : J. Immunol., 91, 484 (1963).
- 21) Abelson, N. M. & Rawson, A. J. : J. Immunol., 85, 636 (1966).
- 22) 支倉逸夫 : 医学のあゆみ, 63, 42 (1967).
- 23) Arnason, B. G., St-Cyr, C. V. & Relyveld, E. H. : Int. Arch. Allergy, 25, 206 (1964).
- 24) Flodin, P. & Killander, J. : Biochem. Biophys. Acta, 63, 403 (1962).
- 25) 右田俊介 : 代謝, 1, 599 (1964).
- 26) Fay, J. L. & McLaughlin, C. : J. Immunol., 91, 484 (1963).
- 27) Dausset, J. : Histocompatibility Testing, 1st ed., p. 147, Washington, National Academy of Science-National Research Council, 1965.
- 28) Payne, R. : Ibid, p. 149, 1965.
- 29) 進藤宙二 : 血清反応とその実際, 第1版, 58頁, 東京, 医学書院, 1956.
- 30) Ouchterlony, O. : Acta Pathol. Microbiol., Scand., 26, 507 (1949).
- 31) 井関尚栄 : 第16回日本医学会総会学術講演集・Ⅱ (日本医学会総会編), 31頁, 東京, 日本医書出版協会, 1963.
- 32) 峰田亮介 : 十全医会誌, 69, 1 (1963).
- 33) 西岡久寿弥・岡田英親 : 蛋 核 酵, 11, 1506 (1966).
- 34) Boyden, S. V. : J. Exptl. Med., 93, 107 (1951).
- 35) 東京大学伝染病研究所学友会 : 細菌学実習提要, 全改訂版第1版, 221頁, 東京, 丸善, 1958.
- 36) 門馬良吉・寺畑善朔・阿地知哲夫・津田宏信・荒川弥 : 日外医誌, 64, 891 (1963).
- 37) 大野幸治 : 十全医会誌, 73, 159 (1966).
- 38) Sober, H. A. & Peterson, F. A. : Fed. Proc., 17, 1116 (1968).
- 39) 福田鎮雄 : 未発表.
- 40) 安藤鋭郎・宇井信生 : 蛋白質化学2 (水島・赤堀編), 第1版, 54頁, 東京, 朝倉書店, 1954.
- 41) 尾上 薫 : 免疫化学 (山村・石坂編), 第2

- 版, 469, 東京, 朝倉書店, 1959. 42) Weimer, H. E., Mehl, J. W. & Winzler, R. J. : J. Biol. Chem., 185, 561 (1950).
- 43) Berzkorovainy, A., Rafelson, J. R. & Likhite, V. : Arch. Biochem. Biophys., 103, 371 (1963). 44) 三浦 健 : 医学のあゆみ, 65, 343 (1968). 45) Marinetti, G. V. & Pettit, D. : Chem. Phys. Lipids, 2, 17 (1968). 46) Kornguth, S. E., Stahmann, M. A. & Anderson, J. W. : Exp. Cell Res., 24, 484 (1961). 47) Nelson, R. A. : Science, 118, 733 (1953). 48) 西岡久寿弥・岡田英親 : 蛋. 核. 酵, 11, 1109 (1966).
- 49) Hotham-Iglewski, B. & Ludwig, E. H. : Cancer Res., 27, 181 (1967). 50) Hotham-Iglewski, B. & Ludwig, E. H. : Cancer Res., 27, 185 (1967). 51) Bolande, R. P. : Lab. Investigation, 2, 475 (1961). 52) Stambuk, B. & Burk, D. : J. Natl. Cancer Inst., 26, 681 (1961). 53) Landschütz, V. C. : Z. Naturforsch., 9b, 406 (1954). 54) Ginsburk, I., Dishon, T., Cloch, M. & Gross, J. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Mee., 107, 1279 (1961). 55) Landy, M., Michael, J. G., Trapani, R. J., Achinstein, B., Woods, M. W. & Shear, M. : Cancer Res., 20, 1279 (1960). 56) Laskov, R., Simon, E. & Gross, J. : Int. J. Cancer, 3, 96 (1968). 57) Laskov, R., Simon, E., Ram, D. & Gross, J. : Int. J. Cancer, 3, 107 (1968). 58) Laskov, R., Simon, E. & Gross, J. : Int. J. Cancer, 3, 511 (1968). 59) Aub, J. C. & Tieslau, C. & Lankster, A. : Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 613 (1963). 60) 赤井貞彦・吉田奎介 : 最新医学, 23, 1709 (1968). 61) 井上和子 : 未発表. 62) 平井秀松・保理寛子・藤岡小太郎 : 生物物理化学, 11, 56 (1965). 63) Molnar, J., Lutes, R. A. & Winzler, R. A. & Winzler, R. J. : Cancer Res., 25, 1438 (1965). 64) Kornfeld, S. & Ginsburk, V. : Exp. Cell Res., 41, 592 (1966). 65) McGarrahan, J. F. & Maley, F. : J. Biol. Chem., 237, 2458 (1962). 66) 石川大刀雄・橘武彦・高柳尹立 : 癌の臨, 8, 593 (1962). 67) Catchpole, H. R. : Proc. Soc. Exp. Biol., 75, 221 (1950). 68) El-Gaffer, Y. A. & Assad, S. : Brit. J. Cancer, 21, 600 (1967).

A b s t r a c t

Agglutination between the Mouse ascites tumor cells and the human gamma globulin is an immunological phenomenon. Agglutinin exists in 7S gamma globulin (IgG dna IgA) of the normal subjects and patients without any cancer, and in 19S gamma globulin (IgM) of the cancer patients.

Agglutination occurs even after the absorbtion of the agglutinin solution with the red blood cells of human (A and B type), mouse and sheep. The antigen determinants of agglutino-gen, it is proved by the agglutination inhibition tests, have probably to do with the galactose and sugars with 1-6 binding.

The substance extracted from Ehrlich cells, soluble in Triton and the saline solution, has an effect on agglutination, and seems to be cancer specific. The component isolated from Ehrlich cells by an extraction method of kanalipin inhibits agglutination.

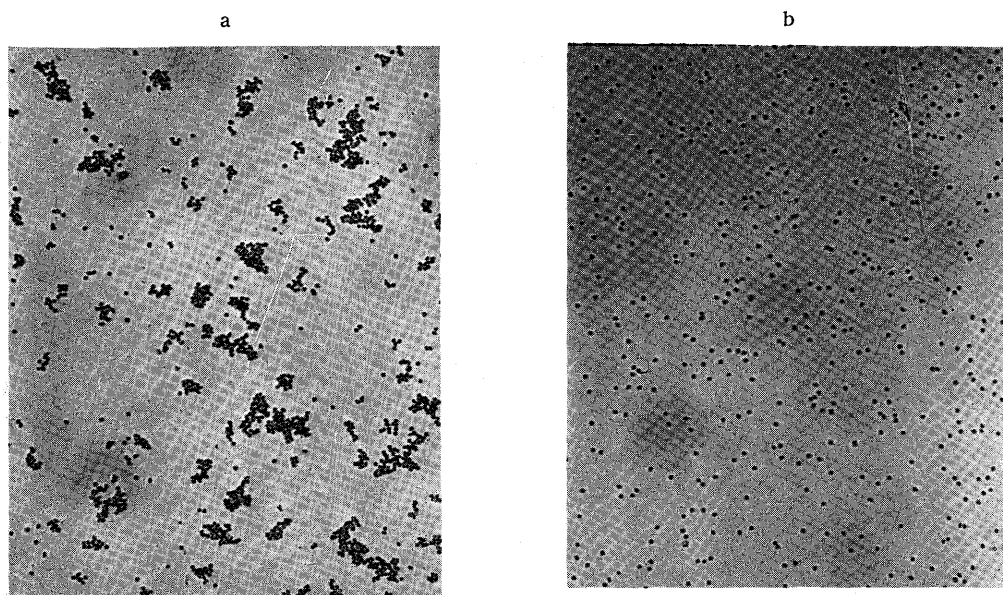
Provided that the cancer specific substance appears in the serum of the cancer patient during the metabolism of cancer cells, it is able to be checked by the agglutination inhibition test.

It is eluated through DEAE-cellulose column with 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl, pH 6.6, and precipitated at pH 3.7 in the supernatant of 65% saturated ammonium sulfate solution. The electrophoretic pattern of this material shows that it is located in the region of albumin to alpha globulin.

In order to check the cancer specific substance, we demonstrated a modified

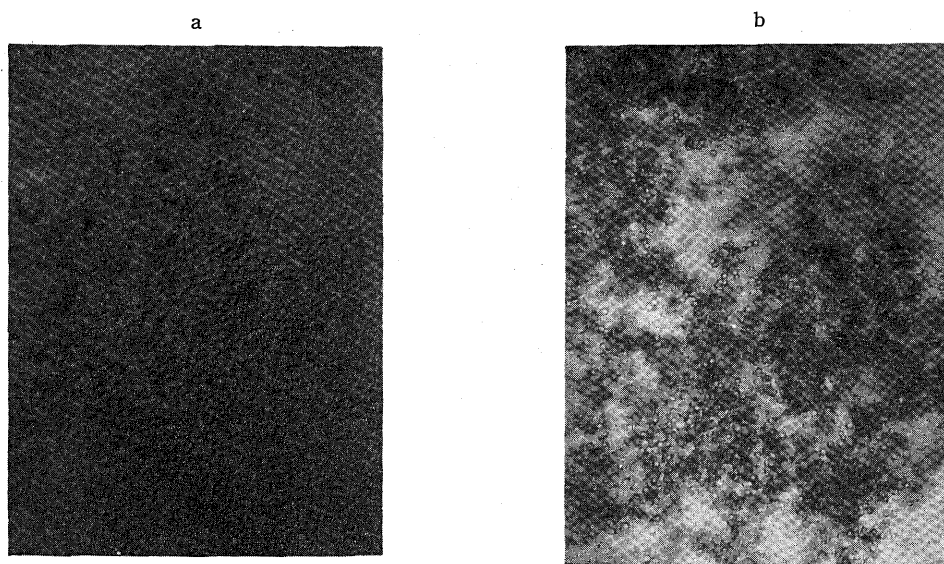
method for the clinical diagnosis of the cancer and observed a difference between the sera of the patients with cancers and those of the patients with other diseases.

写 真 1



a : TRC-Ss とヒト γ グロブリンとの間の凝集
b : 対照実験

写 真 2



a : Ehrlich cells より抽出した Rf 0.38 物質添加により凝集阻止をおこしたものの
b : 対照実験