

胃癌ヒストン分画の免疫化学的解析

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)

金沢大学医学部第二病理学教室(主任・研究指導 石川大刀雄教授)

吉 光 外 宏

(昭和42年1月27日受付)

癌細胞に特異的な組成を見い出そうとする努力は、近年来、種々の方法で精力的になされているが、細胞分画法の発達に伴い、細胞下構築レベルでの研究も盛んになった。細胞核に関しては、免疫学的にその成分中に癌特異抗原を証明したとする幾つかの報告がある。Maculla¹⁾²⁾はマウスの可移植性腫瘍の核蛋白分画に補体結合反応で正常マウス臓器と異なる抗原があり、そのあるものは胎児肝に共通であると報告した。Manoilov³⁾はラットの肉腫の核蛋白と正常臓器の核蛋白の抗原性の差異について報告しているし、Zilber⁴⁾は anaphylaxis technique を用いて、人の各腫瘍には、腫瘍間に共通な抗原とその腫瘍のみに存在する抗原があり、これらの腫瘍特異抗原は pH 4.5 で抽出し得る核蛋白に存在するとした。また、平井は吉田腹水癌 AH 49⁵⁾⁶⁾、人の胃癌および rhabdomyosarcoma⁷⁾の核分画の pH 4.8 抗出による蛋白に特異抗原を認めている。教室の佐原⁹⁾⁸⁾は人の胃癌、AH 66 F および AH 127 腹水肝癌の acidic nuclear globulin および nuclear sap の各分画中に癌特異抗原を認めている。

細胞核の中にあるヒストンに関しては、アミノ酸組成^{8)~16)}、電気泳動度^{8)9)18)~21)}、溶解度²¹⁾、放射性物質とり込み等^{22)~28)}の方法で癌特異的組成を発見しようとする多くの試みがある。Stedman ら¹⁶⁾¹⁷⁾はヒストンに“gene modifier”としての機能を示唆し、ヒストンの組織による構造上の差異を見い出そうとしたが、実験的には、とりたてて特異的なものを区別できなかった。Laurence ら⁸⁾や Hnilica ら²⁰⁾もデンブengel電気泳動法で、種々の動物組織細胞におけるヒストンの差異を見い出し得なかった。しかし、一方では、Busch ら²²⁾²³⁾²⁹⁾は Walker 腫瘍のヒストン分画にリジン U-¹⁴C を特異的にとり込む分画 (RP-2L) があることを認めた。ヒストンの免疫学的解析に

関しては、その抗原性が低いために、従来よりの報告が少ないが、教室の佐伯³⁰⁾は DAB 肝癌、AH66F および AH 127 腹水肝癌の細胞核分画から、硫酸法³¹⁾により抽出したヒストン II 分画に、正常肝に認められない特徴的な抗原組成を寒天内免疫二重拡散法によって証明している。

筆者は佐伯の実験の発展として、人の胃癌のヒストン分画を免疫化学的に解析することを試み、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験材料と実験方法

1. ヒストン分画の抽出材料:

外科手術または剖検による人の材料を使用した。

1) 胃癌: 外科手術による28例で、表1のようにA~Eの5群に分けてプールし、それぞれからヒストン分画を抽出した。

表I 人胃癌材料

例 数		A	B	C	D	E
群		15	3	3	5	2
血液型	A	3	0	3	0	0
	B	7	0	0	5	0
	AB	3	3	0	0	0
	O	2	0	0	0	2
肉眼的分類	Borrmann	I	0	0	0	0
		II	4	1	0	2
		III	7	0	3	3
		IV	4	2	0	1
組織学的分類	未分化髄様癌	4	1	0	3	2
	硬癌	2	0	0	0	0
	腺管状腺癌	5	1	2	2	0
	乳頭状腺管状腺癌	4	1	1	0	0

Immunochemical Analysis of Histone Fractions of Human Gastric Cancer
Sotohiro Yosimitu, Department of Surgery (II) (Director: Prof. T. Mizukami),
 Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Isikawa), School of Medicine,
 Kanazawa University.

表II 人正常胃粘膜材料

群		a	b	c	d	e
例数		15	5	5	2	2
疾患名	胃潰瘍	6	3	1	2	0
	十二指腸潰瘍	4	2	2	0	0
	慢性胃炎	5	0	2	0	2
血液型	A	6	5	0	0	0
	B	4	0	5	0	0
	AB	3	0	0	2	0
	O	2	0	0	0	2

2) 正常胃粘膜: 外科手術による29例で, 表IIのようにa~eの5群に分けてプールし, それぞれからヒストン分画を抽出した。

3) 胃癌肝転移腫瘍: 剖検により得たもの3例。

4) 原発性肝癌: 剖検により得たもの2例。

5) 肺癌肝転移腫瘍: 剖検により得たもの1例。

6) 人の正常肝: 剖検により得たもの1例 (死因は脳出血)。

7) 直腸癌: 外科手術によるもの3例。

8) S字状結腸癌: 外科手術によるもの2例。

2. ヒストン分画および核外性塩基性蛋白の抽出

法:

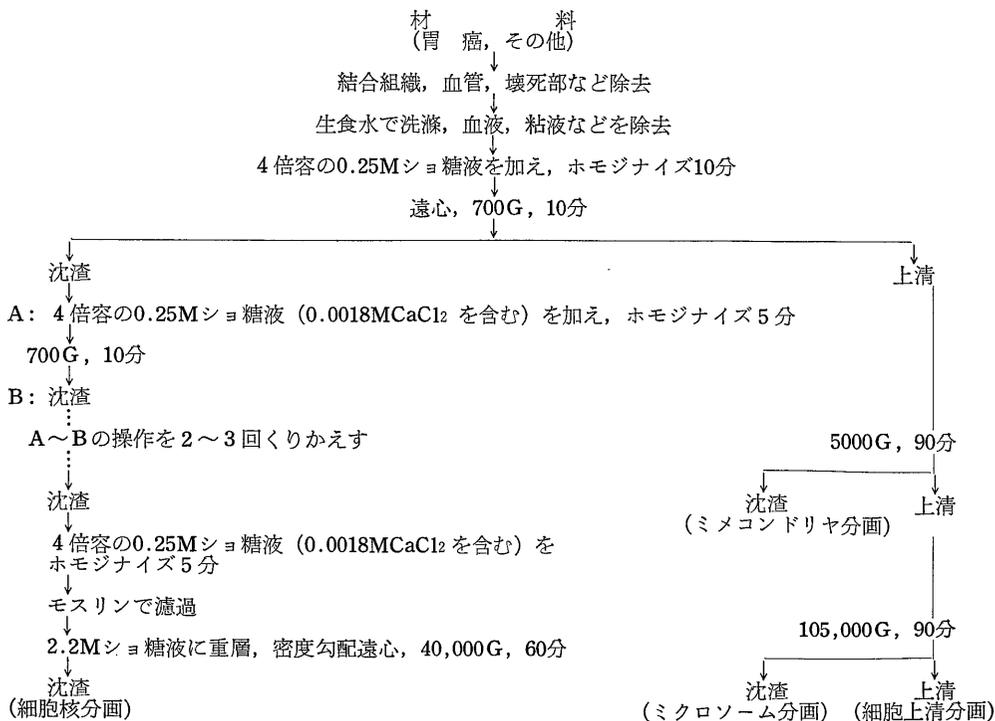
1) 細胞分画法: 手術材料または剖検材料は剔出後, 0°~4°Cのストッカー中に保存し, 剔出後12時間以内に分画操作を完了するようにした。

正常胃粘膜の採取には, 剔出胃の正常部の粘膜を粘膜筋板上で剝離してから, 結合組織および血管を十分に除き, 生理的食塩水で充分洗滌しつつ, 血液および粘液などを除いた。正常肝および癌材料は, 同様に結合組織および血管を除き, さらに細切しつつ, 壊死部などを除き, 生理的食塩水で充分に洗滌した。このようにして準備された材料は表IIIに示したように, Hogeboom-Schneider法³²⁾およびChauveau法³³⁾に準じて, 核をはじめとする各分画に分けられた。

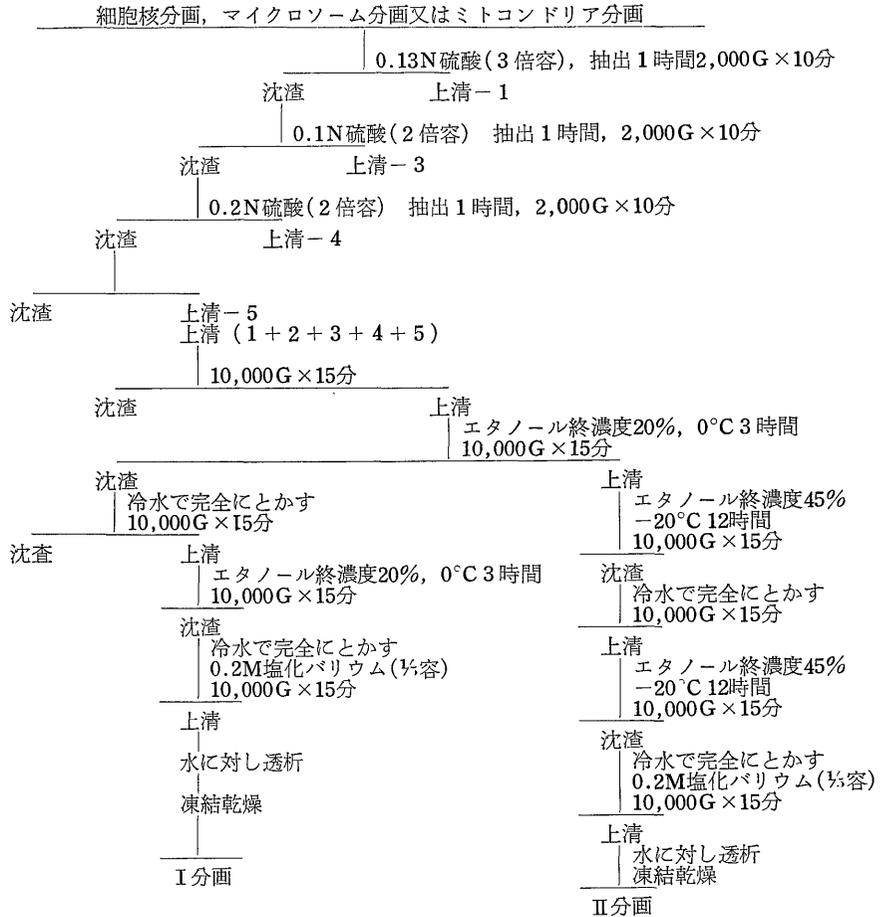
各操作はできる限り, 4°C以下で行なうようにした。得られた核分画はゲンチアナビオレット酸液で染色, 鏡検してみると, 純度85%程度であり, 多少の結合組織線維や細胞質の混入は防ぎ得なかった。

2) 硫酸法(Ui³¹⁾の方法: ヒストン分画および核外性塩基性蛋白の抽出には, 表IVに示すようにUiの方法に準じた方法を主として用いた。ただし, 細胞上清分画からの塩基性蛋白の抽出には, 終濃度0.5Nの硫酸で12時間抽出を行ない, 10,000G 15分遠心して沈澱部を除き, 以後エタノールによる分画は表IVと

表III 細胞分画法



表IV 硫酸法



同様に行なった。

また、ヒストン粗分画（ヒストン I および II を共に含む分画）として、硫酸抽出によって得られた分画のプール（上清 1～5）に終濃度 50% になるようにエタノールを加えて得た沈澱を用いた。

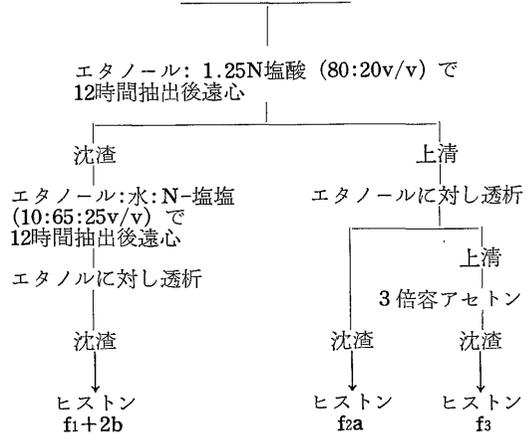
3) 塩酸法 John & Butler³⁴⁾ の方法): 胃癌材料および正常胃粘膜より、表 V に示したように John & Butler の方法に準じて、 f_{1+2b} , f_{2a} および f_3 の各ヒストン分画を抽出し、試験抗原として、硫酸法分画との比較に用いた。

3. 抗ヒストン血清の作製法:

1) 免疫抗原: 胃癌材料 A および正常胃粘膜材料 a より、硫酸法でヒストン粗分画を抽出して免疫抗原とした。

2) 免疫法および抗血清: 乾燥重量 15~20 mg のヒストン分画を蒸留水 2 ml に溶かし、これに Freund's complete adjuvant 液³⁵⁾³⁶⁾ (BCG 死菌

表V 塩酸法
細胞核分画



85 mg, 流動パラフィン 85 ml, アラセル A 15 ml) 2 ml を混じて乳剤を作り, 家兎の両肩胛下腔に等分に分けて注射した. 1 週間後に 1 回, 4 週間後にもう 1 回同様の注射を行なった. それより 4 週間後に追加免疫として, 乾燥重量 20 mg を 2 ml の水溶液として家兎の皮下 (背部) に注射した. この後, 時々, 耳静脈より部分採血を行ない, 寒天内免疫二重拡散法で抗体価を調べ, それが高まったところで, 全採血を行なった. 全採血は最終注射後, 1 週間目がほぼ適当であった. 全採血に際しては, 家兎を 24 時間絶食させてから, その頸動脈より行なった. 分離した抗血清は直ちに -20°C に保存した.

3) 吸収抗血清: 抗血清を吸収するに際しては試験管内吸収および寒天内吸収の二通りの場合に応じて行なった. 前者は常法に従って行なった. 即ち, 最適比量の試験抗原を抗血清に加え, 37°C に 2 時間反応させた後, 4°C 氷室内に一夜放置して, 生じた沈澱を遠心除去する. この操作を 3 回くり返したものを吸収抗血清とした. 吸収抗血清の抗体価が低い場合には, pervaporation を行なって濃縮した. 後者には Björklund³⁷⁾ による specific inhibition technique を用いた. 即ち, 抗体池に吸収すべき抗原を予め入れて, 一夜 4°C に放置した後, 抗体池を水洗してから抗血清を入れ, 抗原池に抗原を入れて反応を行なわせた.

4. 寒天内免疫二重拡散法:

透析精製³⁸⁾した 4% 寒天ブロック 15 gr, 1% 窒化ソーダ液 3.0 ml, 蒸溜水 12.0 ml を加えて, 全量 30 ml として, 加温溶解後, この 10 ml を $8 \times 12 \text{ cm}$ のガラス板上に流し, 室温で冷却固化させた寒天平板 (厚さ約 1 mm) を用いた. 金属円筒カッターで, 寒天平板に抗原および抗体池を作り, ミクロピペットで抗原および抗体を充たし, 4°C 湿潤状態で 3~4 日反応させて, 判定を行ない, その後, 平板を蒸溜水で 2 日間, 生理的食塩水で一昼夜洗った後, 2% 酢酸液で沈降線を固定し, 室温乾燥後, サイアジンレッド酢酸液で蛋白染色を行なった. 抗体池の大きさは直径 4 mm, 抗原池の大きさは直径 2~4 mm とし, 両者の距離は 5 mm とした.

5. ディスク電気泳動法:

ヒストン分画の電気泳動には Reisfeld ら³⁹⁾の方法に従い, ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動法を行なった. 即ち, 原法に従い, 細孔ゲル (pH 4.3, 15% モノマー液を固化させたもの), 粗孔ゲル (pH 6.7, 2.5% モノマーを固化させたもの) および電極槽用緩衝液 (pH 5.0, β -アラニン・氷酢酸

緩衝液) を作製した. 試料はゲル 1 本につき蛋白量約 0.1 mg とし, これを少量の 0.4 M ショ糖液に混じて, ゲルの上部に重ねた. 泳動電流量はゲル 1 本につき 4 mA とし, 泳動時間は 90 分とした. 泳動後, ゲルは BPB 染色液によって蛋白染色を行ない, 2% 酢酸液で脱色判別した.

6. カラムクロマトグラフィー:

硫酸法に従って抽出した胃癌および正常胃粘膜ヒストン II 分画を, CM セルロースを用いて, カラムクロマトグラフィーを行なった. NaOH と HCl で洗って活性化した CM セルロースを内径 1.3 cm のカラムに 22 cm の高さにつめ, pH 4.8, 0.03 M 酢酸緩衝液 2,000 ml で緩衝化してから, 150 mg の試料を 4 ml の蒸溜水に溶解して, カラムの上部に充填した. 溶出液として, はじめに pH 4.8, 0.03 M 酢酸緩衝液, 次いで pH 4.8, 0.1 M 酢酸緩衝液を用い, 以後, pH 4.8, 0.1 M 酢酸緩衝液に食塩を加えて, 階段的に 0.5 M ずつ塩濃度を上げたものを用いた. 溶出速度は 20 ml/hr とし, 流出液は 5 ml ずつ分画して, ベックマン型光電分光光度計を用いて波長 280 m μ における吸光度により蛋白濃度を測定した.

7. ディスク電気泳動法およびカラムクロマトグラフィーによる各分画の免疫二重拡散法による解析:

ディスク電気泳動法で試料を泳動した後, そのゲルを二分し, その一方を BPB 染色して泳動パターンを分別, 次いで 4°C に貯えておいた非染色ゲル片と合わせて, 各バンドを鋭利な剃刀によって切り出し, 非染色片の各バンドに相当する部より蛋白を抽出した. 即ち, 胃癌ヒストン II 分画および正常胃粘膜ヒストン II 分画をそれぞれ 5 本ずつ泳動して, 切り出された各バンドに相当するゲル片をそれぞれ集め, それぞれに 5 ml の蒸溜水を加え 48 時間, 4°C の氷室内で抽出を行ない, この抽出液を pH 6.7, 水酸化カリ・酢酸液 (1N 水酸化カリウム液 48 ml, 氷酢酸 2.87 ml に蒸溜水を加えて 100 ml にする) に対して 12 時間透析を行ない, pervaporation を行なって約 1/5 容になるまで濃縮して, これを二重拡散法の試験抗原とした.

CMC カラムクロマトグラフィーの各分画は蒸溜水に対して 24 時間透析してから, pervaporation によって濃縮して試験抗原とした.

8. 蛍光抗体法:

Marchall らが用いた方法を浜島ら⁴⁰⁾が改良した方法に従い, 塗抹およびパラフィン切片について直接法で行なった. 蛍光標識抗体の作製には, 抗血清の γ -グロブリン分画に fluorescein isothiocyanate を結合させてから, セファディックス G25 および DEAE

セルロースカラムに通して、遊離色素および非特異物質を除去した。なお、抗血清による blocking test は抗血清を5倍稀釈したもので、常法に従って行なった。

実験結果

1. 胃癌ヒストン分画中の特異抗原組成:

抗胃癌ヒストン家兎血清(抗Cと略する)および抗正常胃粘膜ヒストン家兎血清(抗Nと略する)を用いて、胃癌ヒストン分画および正常胃粘膜ヒストン分画の抗原組成の差異を寒天内免疫二重拡散法により調べた。その結果、胃癌ヒストン粗分画(C-Wと略する)には、正常胃粘膜ヒストン粗分画(N-Wと略する)にない二つの特徴的な抗原組成が認められた。これら二

つの特徴的組成の他に、C-WとN-Wに共通する4~5本の沈降線が認められた(図1)。

胃癌特徴的な二つの組成の中で、一つは胃癌ヒストンI分画(C-Iと略する)に認められず、胃癌ヒストンII分画(C-IIと略する)中のみ認められるもの(組成Aとした)で、他の一つはC-IとC-IIに共通するもの(組成Bとした)であった。抗CをN-Wによって吸収してから、二重拡散法を行なうと、共通組成が沈降線を示さず、組成AおよびBのみが沈降線を示した。なお、組成Aは胃癌材料の各群について認められ、組成Bは胃癌材料A、BおよびD群について認められたが、CおよびE群については認められなかった。また、正常胃粘膜材料a~eの各群よりヒストンIおよびII(N-IおよびN-IIと略する)を抽出して調べたが、いずれにも特異的組成は認められず、組成AおよびBも認められなかった(図1)。

C-IIおよびN-IIをCMCカラムクロマトグラフィーによって分画してみると、図2に示すような溶出パターンを示した。即ち、C-IIとN-IIではパターンに著しい差異はなく、0.15M分画(pH 4.8, 0.1M酢酸緩衝液に食塩を0.05M濃度になるように加えたもの)に最高のピークを示した。次いで、各溶出分画を試験抗原として、二重拡散法を行なってみると、C-IIの0.1~0.2M分画に癌特異組成AおよびBが存在することが明らかになった。特に、C-IIの0.15M分画に強く認められた(図3)。

C-IIおよびN-IIのディスク電気泳動法によるパターンは図4のようになった。両者とも8~9本のバンドを示すが、C-IIのNo. 3のバンドよりやや原点より(陽極側)に、1本のN-IIにないバンドが認められ(バンドX)、次いで各バンドより抽出した液を試験抗原として、二重拡散法を行なってみると、癌特徴性組成AはC-IIの泳動ゲルのNo. 2~3のバンド中に存在することが判った(図5)。ゲルを切る操作に難点があり、その局在については決定的でないが、おそらく組成AはバンドX中に存在するものと思われる。

塩酸法によって、胃癌材料Aおよび正常胃粘膜材料a群より、それぞれ、f_{1+2b}, f_{2a}, f₃分画を抽出し、硫酸法抽出分画のC-IIおよびN-IIと、二重拡散法により比較してみると、組成Aは胃癌ヒストン分画f_{1+2b}(C-f_{1+2b})に存在し、組成Bはいずれの塩酸法抽出分画にも認められなかった(図6)。

2. 細胞上清分画, ミクロソーム分画およびミトコンドリア分画中の塩基性蛋白とヒストン分画との比較:

図 1

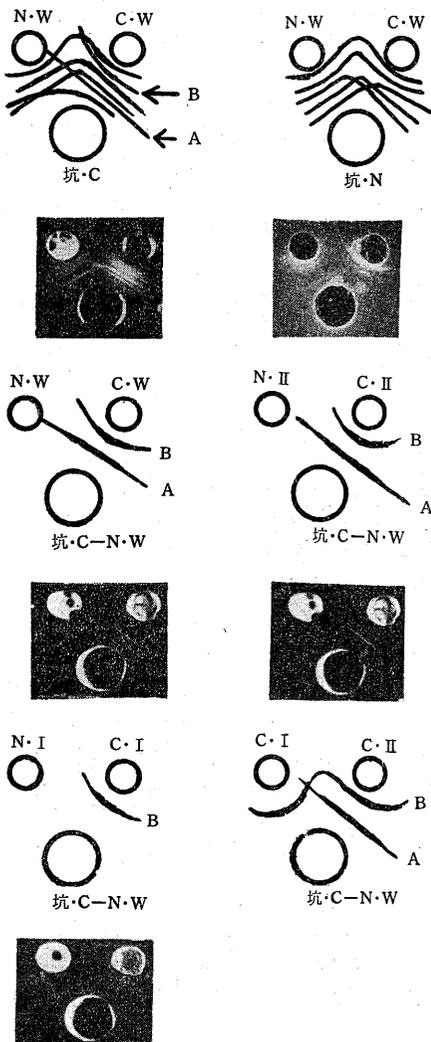


図 2

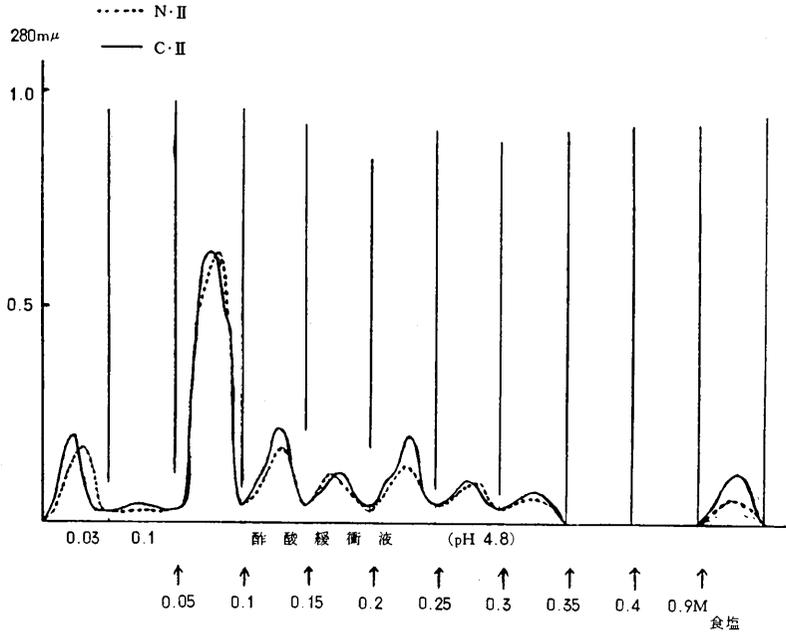


図 3

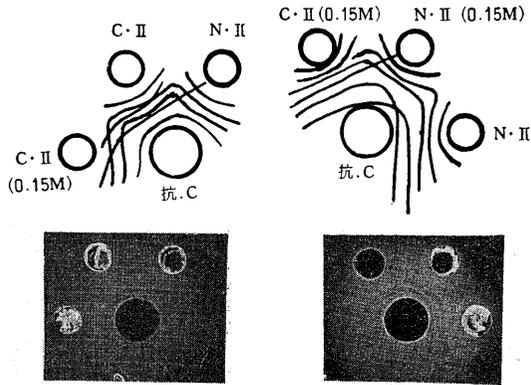
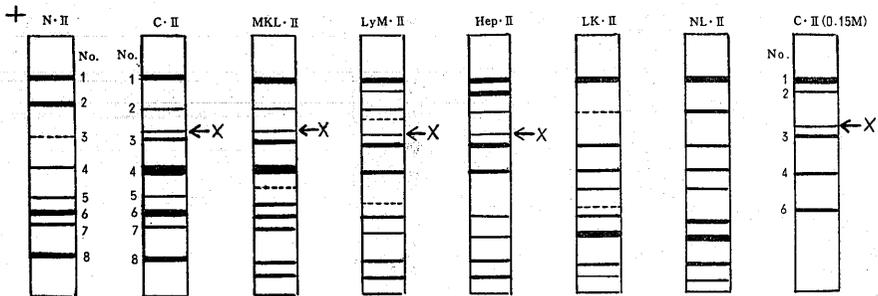
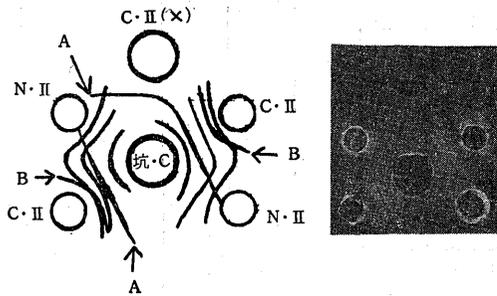


図 4



胃癌ヒストン分画特徴性の組成AおよびBが核内のみに存在するか、あるいは核外分画にも存在するかという点を確認する目的で、硫酸法抽出による核外分画の塩基性蛋白とヒストンII分画との二重拡散法による比較を行なった(図7)。

図 5



この結果、組成Aは胃癌の細胞上清分画およびミクロゾーム分画の塩基性蛋白II分画(C-sap-IIおよびC-mc-IIと略する)にも認められたが、ミトコンドリア分画の塩基性蛋白II(C-mit-IIと略する)には認められず、正常胃粘膜では核外分画の塩基性蛋白II(N-sap-II, N-mc-IIおよびN-mit-IIと略する)には認められなかった。組成Bはいずれの核外分画塩基性蛋白にも認められなかった。

3. 胃癌ヒストン分画と他臓器癌ヒストン分画との比較:

胃癌の他、胃癌リンパ節転移腫瘍、胃癌肝転移腫瘍、原発性肝癌、肺癌肝転移腫瘍、S字状結腸癌、直腸癌等の癌材料さらに正常肝から硫酸法によりヒストン分画を抽出し、これらを試験抗原として、二重拡散法により組成AおよびBとの共通性の有無を調べた(図8)。その結果、組成Aは胃癌リンパ節転移腫瘍

図 6

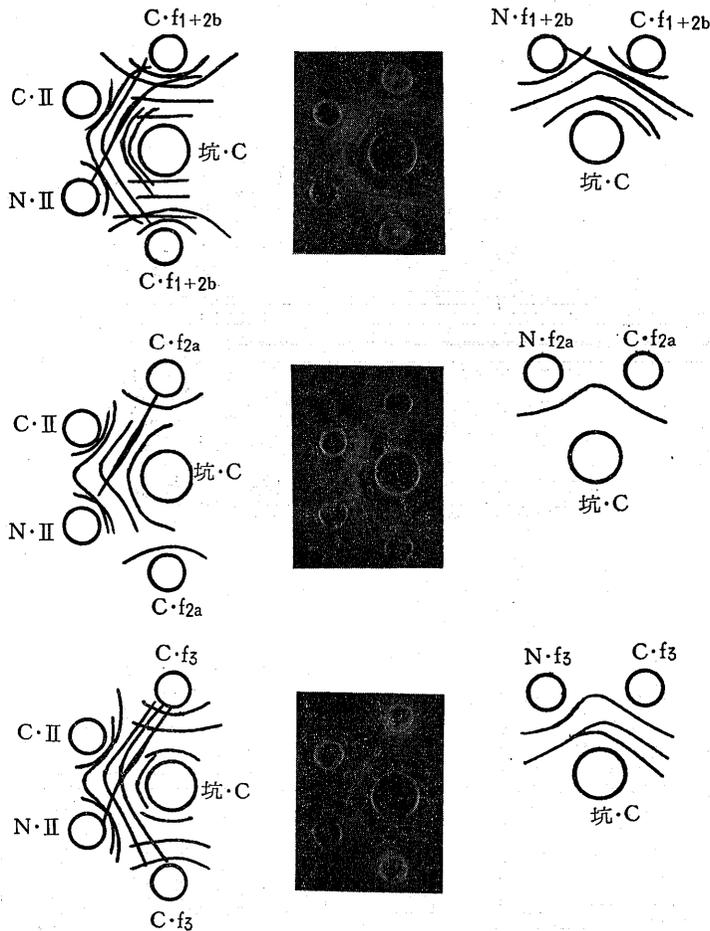


図 7

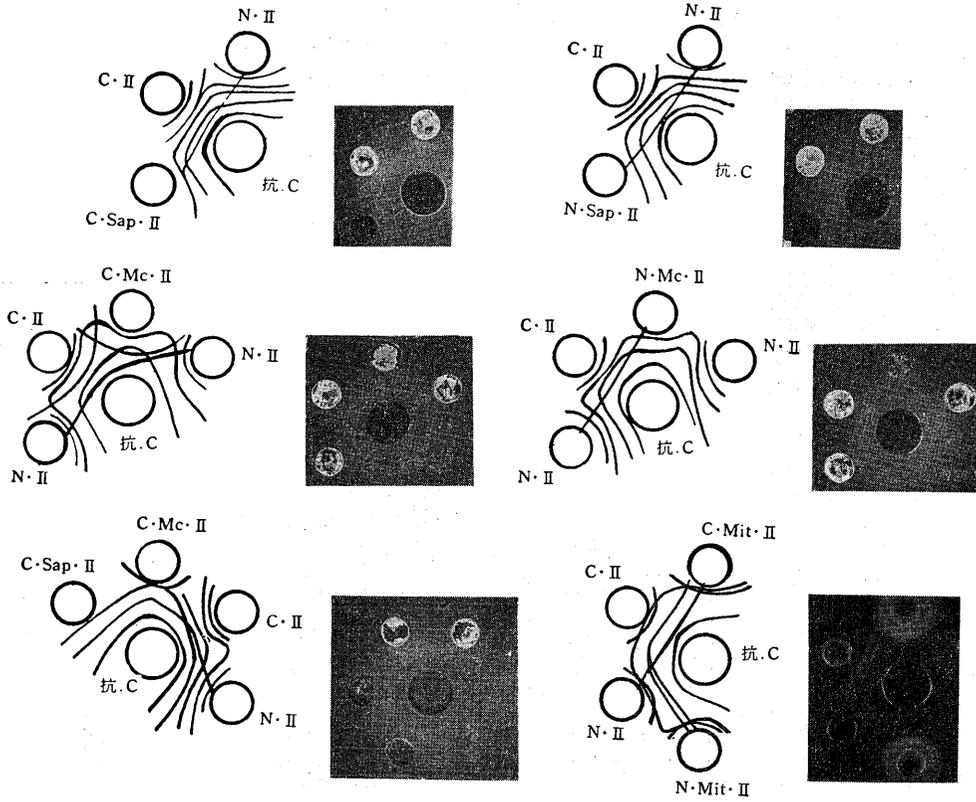
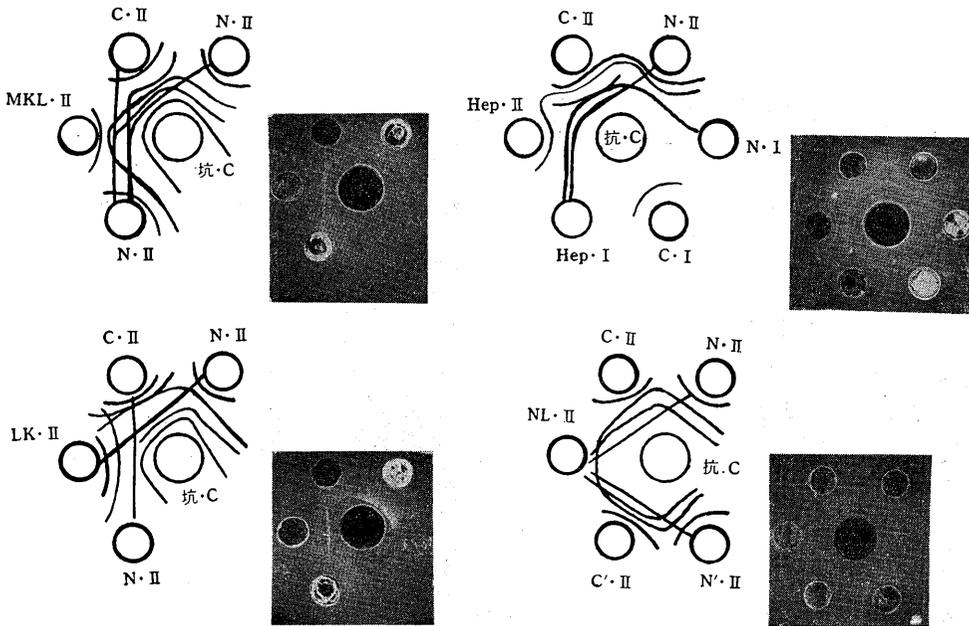


図 8



LyM), 胃癌肝転移腫瘍 (MKL), 原発性肝癌 (Hep) の全例に認められたが, 肺癌肝転移腫瘍 (LK), S 字状結腸癌, 直腸癌 および 正常肝 (NL) には認められなかった. 組成Bは胃癌肝転移腫瘍の1例に認められたが, その他の材料には認められなかった.

次に, これらの癌材料のヒストン II 分画のディスク電気泳動法によるパターンは図4に示すようになり, バンドXを認めるものと組成Aを認めるものが一致した.

4. 患者血清と胃癌ヒストン分画との比較 (表VI, 図9):

抗Cに対し, N-II, C-II, C-II および患者血清を試験抗原として, 二重拡散法を行なうと, C-II 中の組成Aに一致する因子が胃癌患者血清の半数以上に認められた. その他, 例数は少ないが, 胆道癌患者血清

表 VI

疾 患 名	症例数	血清中に組成Aを	
		認める	認めない
胃 癌	22	13	9
胆 道 癌	2	2	0
肺 癌	2	1	0
結 腸 癌	1	0	1
直 腸 癌	1	0	1
膀 胱 癌	1	0	1
口 腔 瘤	1	0	1
上 顎 瘤	1	0	1
S L E	1	1	0
ピ リ ン 中 毒 症	1	1	0
胃潰瘍・十二指腸潰瘍	15	0	15
胃 炎	5	0	5
胃 ポ リ プ	2	0	2
肝 炎	1	0	1
胆 石 症	1	0	1
肺 炎	1	0	1
乳 腺 炎	1	0	1

2例, 肺癌患者血清2例中1例にもそれが認められた. その他の直腸癌, 結腸癌, 膀胱癌, 口腔癌, 上顎癌および乳癌等の患者血清には認めていない. なお, 非癌患者血清中には組成Aはほとんど認められなかった. ただし, ピリン中毒症 および SLE の各1例に組成Aと共通する沈降線が認められた. いずれにしても, 血清中に組成Aを認めたのは極めて重篤ないし末期の癌患者例であった. 組成Bは患者血清中には認められなかった.

5. 蛍光抗体法による胃癌細胞および正常胃粘膜細胞の比較:

抗-C および抗-Nより蛍光標識抗体を作製して, 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を染めた.

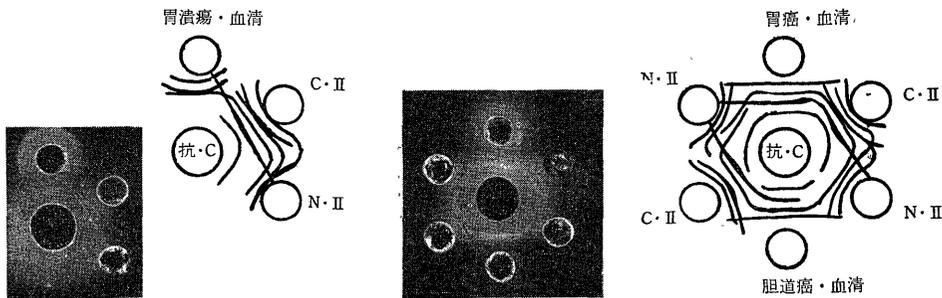
まず抗-N で blocking の後, 抗-C 蛍光標識抗体で染めてみると胃癌細胞の chromosome net が強く蛍光を發し, 中でも核小体が強く蛍光性を帯びた (写真1, 2). しかし, 胃癌細胞の細胞質もかなり蛍光性を帯びた. 一方, 正常胃粘膜細胞は極めてわずかに蛍光性を有するのみで, chromosome net や核小体が全く認められず, 核がぬけたようにみえた (写真3, 4). なお, 抗-C で blocking を行なってから, 抗-C 蛍光標識抗体で染めても, 癌細胞および正常細胞ともにほとんど染まらなかったし, 抗-C または抗-N で blocking した後, 抗-N 蛍光標識抗体で癌および正常細胞を強く光らせることはできなかった.

なお, blocking せずに染色を行なうと, 抗-N および抗-C 蛍光標識は, 同程度に. しかも非常に強く, 癌および正常細胞を光らせたが, 細胞内の構造が不明瞭で細胞全体が強く光り, 判別には不適當であった.

考 察

癌化に伴う正常組織抗原の そう失に関しては Weiler⁴¹⁾, Green⁴²⁾⁴³⁾, Hughes⁴⁴⁾, Nace・須山^{45)~47)}, 等の報告があり, 一方, 癌化に伴う癌特異抗原の獲得

図 9



に関しても、幾つかのものは本報告のはじめに記した通りであるが、他に、石川ら⁴⁸⁾、高柳・建部ら^{49)~51)}、森田⁵²⁾、Gelstein⁵³⁾、Abramoff⁵⁴⁾、Rapport⁵⁵⁾等多数の報告がある。

先に述べたが、佐伯³⁰⁾はDAB肝癌、AH66F腹水肝癌およびAH127腹水肝癌の細胞核の硫酸法抽出によるヒストンII分画にそれぞれ特異的抗原組成を認め、それらは各腫瘍間には共通性のないもので、しかも、塩酸法抽出のヒストン分画には認められないものであったと報告した。筆者はこれを発展させるものとして、人の癌、特に胃癌を主にして、各ヒストン分画の抗原組成の検討を行なってみた。

二重拡散法によって、胃癌の硫酸法抽出によるヒストンII分画に特徴的組成AおよびBを認めたが、この中、組成AはヒストンII分画のみに認められ、組成BはヒストンI分画にも共通して存在した。また、組成Aはいずれの胃癌材料にも認められ、塩酸法抽出によるf_{1+2b}分画にも存在した。一方、組成Bは胃癌材料によっては欠如することがあり、塩酸法抽出分画には見い出されなかった。従って、組成はA胃癌に共通する抗原因子であり、組成Bは個体差によって出現するものとしなないものがあることになる。また、組成Bが塩酸法で抽出した分画に認められないことはこの因子が非常に不安定なものであることを暗示する。ディスク電気泳動で組成AがバンドX中にあることをほぼ確かめ得たが、組成Bはこの方法では同定できなかった。なお、カラムクロマトグラフィーでは両者とも0.1~0.2M溶出分画中に存在することを認めた。

次に、ミクロリーム分画、ミトコンドリア分画および細胞上清分画から硫酸法に準じて、塩基性蛋白を抽出し、これらとヒストン分画を二重拡散法によって比較してみると、組成Aは胃癌のミクロソームおよび細胞上清分画中の塩基性蛋白に共通することが認められ、胃癌ミトコンドリア分画の塩基性蛋白とは共通しないことが判った。さらに、蛍光抗体法によっても、胃癌細胞が特異的に染め出され、**chromosome net**核小体が強く光ったが、しかし同時に細胞質もかなり蛍光を帯びることが認められた。

上原⁵⁶⁾は動物移植腫瘍および人の胃癌について、細胞分画を行ない、各分画別に蛍光抗体法によって癌特異抗原の有無を検討しているが、その中で、かなり精製した核分画に対する抗血清を蛍光標識抗体とした場合でも、癌特異的蛍光は細胞質に著明で、核内構造は顆粒状に光ったと報告している。教室の渡辺⁵⁷⁾もAH66F腹水肝癌およびAH127腹水肝癌について、それぞれ抗ヒストン分画血清により蛍光抗体法を行ない、

Chromosome net、核小体に特異的蛍光を認めると共に、細胞質もかなり蛍光を帯びることを認めている。

本実験において、蛍光抗体法により胃癌細胞核の**Chromosome net**および核小体が光ることからすれば、われわれの抽出したヒストン分画は、細胞核由来の塩基性蛋白を含むことは確実で、また、癌特異抗原が細胞核由来の塩基性蛋白中に存在することも確実らしいといえる。しかし、細胞質が癌特異的にかなりの蛍光を発したこと、および免疫二重拡散法で組成Aが細胞上清およびミクロソーム分画の塩基性蛋白に共通することはどのように解釈すべきであろうか。考えられる可能性として重要なことは(1)抽出されたヒストン分画への核外ことに細胞質の塩基性蛋白の混入、(2)核内のヒストン分画と核外の塩基性蛋白の類似性または共通性である。

われわれは、Hogeboom-Schneider法およびChauveau法に準じて、細胞核の抽出を行なったが、この方法では、若干ながら細胞質、結合組織繊維等の混入はまぬがれなかったが、85~90%は核成分で、残りの10~15%が核外成分であるにすぎない。従って、蛍光抗体法において、核の蛍光性と細胞質の蛍光性がほぼ同程度、時には後者がやや強いことさえある現象をこのcontaminationのみで説明することには無理がある。

諸家の報告中、ヒストンは核のみに存在するものでなく、核の外にも存在することを暗示するもの⁵⁸⁾が幾つかある。Lindsay⁵⁹⁾およびその他の^{60)~55)}報告によれば、電気泳動パターンではribosomal basic proteinsとchromosomal histonesとは極めて類似性があるとされ、アミノ酸組成^{66)~70)}およびクロマトグラフィーにおける態度⁷¹⁾でもそれらの類似性が報告されている。

ヒストンの細胞内での合成部位は明確でないが、Reidら⁷²⁾およびAllfreyら⁷³⁾は細胞核で行なわれるものと主張し、Flamら^{74)~76)}は核小体でのヒストン合成の可能性を示唆した。またクロマチンでヒストン合成が行なわれるとするもの^{77)~79)}もある。一方、ヒストンは細胞質で合成されて、核に移動する可能性を主張する報告⁸⁰⁾⁸¹⁾もある。

以上の事柄を総括すれば、蛍光抗体法で、核外の細胞質が蛍光性を帯びたことの一部はcontaminationをもって説明し得るが、他に、種々の因子が関係しているらしいということになる。いずれにしても、今後はまず胃癌細胞核の純粋な抽出法を検討しなければならないと思うが、ここで、免疫二重拡散法で認められ

た胃癌特徴的組成AおよびBが、蛍光抗体法で認められた胃癌細胞の特異的蛍光性に相当するものと仮定すれば、組成AおよびBは胃癌細胞の核の染色粒および核小体、さらに細胞質の塩基性蛋白に共通して存在する組成といえるであろう。

組成Aは胃癌材料、胃癌リンパ節転移腫瘍、胃癌肝転移腫瘍、等のヒストン分画に認められ、胃癌患者血清中にも共通するものを認めたことからすれば、極めて胃癌特徴的組成といえるが、しかし一方では、例数が少ないが、組成Aは肝臓癌ヒストン分画にも認められ、また、胆道癌、肺癌、SLE およびピリン中毒症の患者血清中にも認められたことからすれば、それは他の人癌にも共通する場合があり、癌以外の疾患でもそれと同様または交叉反応性物質が出現し得るといえる。

担癌患者血清中に出現する異常成分に関しては、Makari⁸²⁾はSchultz-Dale法により特異的水溶性蛋白を認め、高柳⁸¹⁾はゲル内沈降反応によって異常抗原因子を証明している。上述の通り、われわれも免疫二重拡散法により組成Aを末期癌患者の血清中に認め、さらにSLEおよびピリン中毒症の患者血清中にも認めた。これによって、細胞（ことに核）破壊の強い状態で細胞内の塩基性蛋白が循環血液中に出現する可能性が考えられるが、今後さらに検討を加える必要がある。

Stedmanら^{15)~17)21)}はデオキシリボ核蛋白の塩基性蛋白質に、抑制的な遺伝子調節機能を考え、ヌクレオヒストンとして常在するヒストンに構造上の差異を見い出そうとした。HuangおよびBonner⁸³⁾⁸⁴⁾の報告をはじめとして、DNA依存のDNAポリメラーゼやDNA依存のRNAポリメラーゼ活性にヒストンは抑制的に作用するという幾つかの報告^{85)~91)}がある。Hurwitzら⁹²⁾は遺伝子活性に関連して、ヒストンが非特異的にDNAと結合して、単なる複合体を作るとしても、機能的に遺伝子情報の発現を修飾する可能性があることを示唆した。Litauら⁹³⁾は核小体で合成されるRNAの塩基組成にヒストンが影響を及ぼすと報告している。このようにヒストンの遺伝子活性に対する作用が論ぜられている一方、ヒストンの構造上の差異の検討がおし進められている。

石川⁹⁴⁾⁹⁵⁾はエールリッヒ腹水肝癌細胞凝集阻害反応を用いて、癌細胞膜に対する作用の特異性を見い出そうと試みた際、たまたま、癌細胞からの“ヒストンI分画”が正常肝からのそれに比し、癌細胞に対して強く細胞障害性に働くことを観察している。

また、最近、ヒストン、とくに arginin-rich his-

toneにミトコンドリア膨化作用ならびに、oxidative phosphorylation に対する uncoupling 作用が知られ⁹⁶⁾、教室の小田島ら⁹⁷⁾によって、詳細な検討が加えられつつある。

筆者は人胃癌ヒストンの特異性を免疫化学的手段で認めたのであるが、今後ヒストンの質的ならびに機能的な解明がなされるにつれ、このことにも新しい意義が生れることになるであろう。

結 論

人の胃癌および正常胃粘膜より、硫酸法によって抽出されたそれぞれのヒストン粗分画を家兎に免疫して、抗胃癌ヒストン血清および抗正常胃粘膜ヒストン血清を作製した。

これらの抗血清を用いて寒天内免疫二重拡散法を行ない、さらに、ディスク電気泳動法およびCMCカラムクロマトグラフィーをも合わせ行なうことによって、人胃癌ヒストン分画の解析を試みた。次いで、人胃癌ヒストン分画と核外分画の塩基性蛋白、胃癌以外の人癌のヒストン分画、さらに、担癌患者血清との抗原組成の比較を行なった。また、蛍光抗体法によって胃癌細胞内の抗原分布の観察を行なった。

以上の実験結果を要約すると次の通りとなる。

(1) 胃癌ヒストン分画に二つの特徴的な組成を認めた。即ち、ヒストンI分画に認められず、ヒストンII分画のみに認められる組成AとヒストンIおよびIIに共通して認められる組成Bである。組成Aは取扱った全胃癌材料に認められたが、組成Bは材料によっては認められなかった。

(2) 組成Aは胃癌の塩酸法抽出分画のうちで、 f_{1+2b} にも認められたが、組成Bは塩酸法抽出分画には認められなかった。

(3) 胃癌ヒストンII分画をディスク電気泳動してみると、約9本のバンドを形成するが、組成Aが原点より3本目のバンドに存在することがほぼ確かめられた。

(4) CMCカラムクロマトグラフィーでは胃癌および正常胃粘膜ヒストンII分画はほぼ同様のパターンを示すが、組成AおよびBは胃癌ヒストンII分画の0.1M~0.2M分画中に存在した。

(5) 組成Aは胃癌のミクロソームおよび細胞上清分画中の塩基性蛋白中にも認められた。しかし、ミトコンドリア分画塩基性蛋白には組成Aは認められなかった。

(6) 組成Aは胃癌の他、胃癌肝転移腫瘍および原発性肝癌のヒストンII分画中にも認められたが、肺臓

癌肝転移腫瘍，S字状結腸癌および直腸癌には認められなかった。

(7) 組成Aは末期胃癌患者血清中に半数以上認められ，胆道癌患者血清2例および肺癌患者血清2例中1例にも認められた。非癌患者血清中にはほとんど組成Aは認められなかったが，例外的にピリン中毒症およびSLEの患者血清各1例に認められた。

(8) 螢光標識抗胃癌ヒストン血清で胃癌細胞が特異的に染め出され，細胞核中の染色粒，核小体が強く光ったが，同時に細胞質もかなり強く光った。

稿を終るにあたり，終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授ならびに恩師水上哲次教授に対し深く感謝致します。また，多大の御教示を戴きました倉田自章教授，須山忠和博士ならびに福田鎮雄助手，さらに組織学的所見に関して御指導戴きました武川昭夫博士に深く感謝致します。最後まで御協力，御援助下された佐伯良昭御学兄を始めとする教室員諸兄に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Maculla, E. S. : Yale J. Biol. Med., 20, 343 (1947).
- 2) Maculla, E. S. : Yale J. Biol. Med., 20, 465 (1948).
- 3) Manoilov, S. E., Nevler, A. I. & Presnov, M. A. : Vodrosy Onkol., 6, 42 (1953).
- 4) Zilber, L. A. : Advances in Cancer Research, 5, 291 (1958).
- 5) Hirai, H., Sekine, K., Iijima, A. & Warabioka, A. : J. Biochem., 49, 682 (1961).
- 6) Hirai, H., Taga, H., Satoh, H. & Warabioka, K. : Gann, 54, 177 (1963).
- 7) 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).
- 8) Laurence, D. J. R., Simson, P. & Butler, J. A. V. : Biochem. 87, 200 (1963).
- 9) Steele, W. J. & Bush, H. : Cancer Res., 23, 1153 (1963).
- 10) Hnilica, L. S., Taylor, C. W. & Bush, H. : Exptl. Cell Res. Suppl., 9, 367 (1963).
- 11) Davison, P. F. : Biochem. J., 66, 703 (1957).
- 12) Phillips, D. M. P. & Johns, E. W. : Biochem. J., 73, 538 (1956).
- 13) Johns, E. W., Phillips, D. M. P., Simson, P. & Butler, J. A. V. : Biochem. J., 77, 631 (1960).
- 14) Huang, R. C., Bonner, J. & Murray, K. : J. Mol. Biol. 8, 54 (1964).
- 15) Stedman, E. & Stedman, E. : Nature, 152, 556 (1943).
- 16) Stedman, E. & Stedman, E. : Nature, 166, 780 (1950).
- 17) Stedman, E. & Stedman, E. : Phil. Trans., B235, 265 (1951).
- 18) Neelin, J. M. & Coonel, G. E. : Biochim. Biophys. Acta. 31, 539 (1956).
- 19) Mc Alister, H. C., Wan, Y. C. & Loganirvin, J. : Analitical Biochem., 5, 321 (1963).
- 20) Hnilica, L. S. & Bush, H. : J. Biol. Chem., 238, 918 (1963).
- 21) Stedman, E. & Stedman, E. : Phil. Trans., B235, 545 (1951).
- 22) Davis, J. R. & Bush, H. : Cancer Res., 19, 1157 (1959).
- 23) Davis, J. R. & Bush, H. : Cancer Res., 20, 1208 (1960).
- 24) Zbarsky, I. B. & Perevoschikora, K. A. : Biokhimiya 22, 295 (1961).
- 25) Butler, A. V. & Cohn, P. : Biochem. J., 87, 330 (1965).
- 26) Evans, J. H., McAlister, H. C. & Stiles, E. P. : Exptl. Cell Res. Suppl., 9, 359 (1963).
- 27) Campbell, P. N. & Greengard, O. : Biochem. J., 71, 148 (1959).
- 28) Hempel, K., Lennartz, K. J. & Mauer, W. : Zigelers Beitrage., 126, 381 (1962).
- 29) Bush, Hnilica, L. S., Chine, S. C., Davis, J. R. & Tayler, C. W. : Cancer Res., 22, 637 (1962).
- 30) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 74 (1), 51 (1966).
- 31) Ui, N. : Biochem. Biophys. Acta, 25, 493 (1957).
- 32) Hogeboom, G. H. & Scheider, W. C. : The Nucleic Acid, 2, 105, N. Y. Acad. Press (1955).
- 33) Chauveau, J., Moule, Y. & Rouiller, G. H. : Exptl. Cell Res., 11, 313 (1956).
- 34) Johns, E. W. & Butler, J. A. V. : Biochem. J., 82, 15 (1962).
- 35) Freund, J. : J. Clin. Path., 29, 402 (1957).
- 36) Freund, J. & Bonato, M. V. : J. Immunol., 48, 325 (1944).
- 37) Björklund, B. : J. Immunol. 79, 319 (1952).
- 38) Wilson, M. & Pringle, B. H. : J. Immunol., 75, 460 (1955).
- 36) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. & Williams, D. E. : Nature, No. 4838, 281 (1962).
- 40) 浜島義博・京極方久 : 免疫組織学, 第1版, (1965).
- 41) Weiler, E. Z. : Naturforsch, 11b, 32 (1956).
- 42) Green, H. N. : Acta Unio Intern. Contra Cancrum, 17, 215 (1961).
- 43) Green, H. N. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 68, 168 (1957).
- 44) Hughes, P. E. :

- Cancer Res., 18, 426 (1958). 45) Nace, G. W., Suyama, T. & Smith, N. : SABCO Journal, 1, 1 (1965). 46) Nace, G. W., Suyama, T. & Iwata, T. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 126, 204 (1956). 47) Nace, G. W., Suyama, T. & Smith, N. : Symposium of 1-1, E.-Panza (1960). (S. Ranzi, Ed) 564 (1961). 48) 石川大刀雄・橋 武彦・高柳尹立 : 癌の臨床, 8, 593 (1962). 49) 高柳尹立・建部守昭 : 日新医学, 46, 419 (1959). 50) 高柳尹立・建部守昭 : 日新医学, 46, 351 (1959). 51) 高柳尹立 : 最新医学, 19, 900 (1964). 52) 森田弘之 : 十全医会誌, 71, 3 (1965). 53) Gelstein, V. I. : Vop. Onkol., 4, 526 (1958). 54) Abramoff, P. : J. nafl. Cancer Inst., 22, 919 (1959). 55) Rapport, M. M. & Grat, L. : Cancer Res., 21, 1225 (1961). 56) 上原洋一郎 : アレルギー, 14, 351 (1965). 57) 渡辺騏七郎 : 私信による. 58) Horn, E. C. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 257 (1962). 59) Lindsay, D. T. : Arch. Biophys., 113, 687 (1966). 60) Settefied, G., Neelin, J. M., Neelin, E. M. & Bayley, S. T. : J. Mol. Biol., 2, 416 (1960). 61) Waller, J. P. & Harris, J. I. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 47, 18 (1961). 62) Lindsay, D. T. : Science, 144, 420 (1964). 63) Neelin, J. M. & Butler, G. C. : Can. J. Biochem. Physiol. 39, 485 (1961). 64) Neelin, J. M. & Neelin, E. M. : Can. J. Biochem. Physiol. 38, 355 (1960). 65) Neidle, A. & Waelsch, H., Science, 145, 1059 (1964). 66) Butler, J. A. V., Cohn, P. & Simson, P. : Biochem. Biophys. Acta, 38, 386 (1960). 67) T'so, P. O. P., Bonner, J. & Dintzis, H. : Arch. Biochem. Biophys. 76, 225 (1958). 68) Crampton, C. F. & Peterman, M. L. : J. Biol. Chem. 234, 2642 (1959). 69) Phillips, D. M. P. : Prog. Biophys. Chem. 12, 211 (1962). 70) Bush, H., Steele, W. J., Hnilica, L. S., Taylor, C. & Mavioglu, H. : J. Cell Comp. Physiol. 62, Suppl. 1, 95 (1963). 71) Leslie, I. : Nature, 189, 260 (1961). 72) Reid, B. R. & Cole, R. D. : Pro., Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 104 4(1964). 73) Allfrey, V. G., Faulker, R. & Mirsky, A. E. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 51, 786 (1964). 74) Flamm, W. G. & Birnstiel, M. L. : "Nucleohistones" (Ed. J. Bonner. P. Ts'o) 230, Holden-Inc. (1964). 75) Bush, H., Steele, W. J., Hnilica, L. S. & Taylor, C. : "Nucleohistones" (Ed. J. Bonner, P. Ts'o) 242, Holden-Day Inc (1964). 76) Birnstiel, M. L. & Hyde, B. B. : J. Cell Biol., 18, 41 (1963). 77) Hornig, G. R. & Rabinovitz, M. : Fed. Proc., 23 (1), 268 (1964). 78) Bush, H. : "Histones and Other Nuclear Proteins" 173, Academic Press (1965). 79) Sirlin, J. L. & Knight, G. R. : Exptl. Cell Res. 19, 210 (1960). 80) Griffin, A. C., Ward, V. C., Wade, J. & Wade, D. N. : Biochim. Biophys. Acta, 72, 500 (1963). 81) Bloch, D. P. : "Nucleohistones" (Ed. J. Bonner, P. Ts'o) 335, Holden-Day Inc. (1964). 82) Makari, J. G. : Brit. Med. J., 2, 1291 (1955). 83) Huang, R. C. & Bonner, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 1216 (1962). 84) Huang, R. C., Bonner, J. & Murray, K. : J. Mol. Biol. 8, 54 (1964). 85) Bazill, G. W. & Philot, J. : Biophim. Biophys. Acta, 76, 223 (1963). 86) Gurley, L. R., Irvin, J. L. & Holbrook, D. J. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 14, 527 (1964). 87) Billen, D. & Hnilica, L. S. : "Nucleohistones" (Ed. J. Bonner, P. Ts'o) 289, Holden-Day Inc. (1964). 88) Hindley, J. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 12, 175 (1963). 89) Barr, G. C. & Butler, J. A. V. : Nature, 199, 1170 (1963). 90) Allfrey, V. G. & Mirsky, A. E. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVIII, 247 (1963). 91) Allfrey, V. G., Littau, V. C. & Mirsky, A. E. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 49, 414 (1963). 92) Hurwitz, J., Evans, A. Babinet, C. & Skalk, A. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 59 (1963). 93) Litau, M. C., Hnilica, L. S. & Hubert, R. B. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 626 (1965). 94) Ishikawa, T. : The Japanese Journal of Experimental Mor-

- phology, 17, 8 (1963). 95) Ishikawa, K. & Yamamoto, G. : Biochem. Biophys. T. & Inoue, K. : Japan Society for cell Acta, 100, 606 (1965). 97) 小田島肅夫 : Biology, Okayama (1956). 96) Utsumi, 私信による. 98) 佐原吉博 : 私信による.

Abstract

Immunochemical comparison of histone fractions from gastric cancer with those from the normal mucous membrane of stomach in human materials revealed the presence of two antigens characteristic of cancer.

The histone fractions were extracted by Ui's method and John & Butler's method, and the extranuclear basic proteins by Ui's method. The antisera against these histone fractions were produced in rabbits by Freund's adjuvant method. The following results were obtained by means of the agar gel double diffusion method, the disc electrophoresis, the CMC column chromatography and the fluorescein antibody technique.

1. Two antigens characteristic of cancer, designated "component A & B", were detected by the double diffusion method. "Component A", which was always recognized in the materials, was in the "histone II" and the "F1 & 2b" fractions, but not in other histone fractions, and "component B", which was not always recognized, was in both fractions by Ui's method, but in none of those by John & Butler's method.

2. These two characteristic antigens were eluted mainly from 0.5M NaCl-0.1 M acetate Saline buffer pH 4.8 on the CMC column chromatography.

3. "Component A" was identified by the double diffusion method with the specific protein band, designated "band X", which was recognized on the pattern by the disc electrophoresis.

4. "Component A" was common to the basic proteins of the microsome and the cell sap fractions, but not to those of the mitochondria fraction.

5. "Component A" was also detected in some other cancer-materials, such as metastatic tumors of gastric cancer, primary hepatoma, etc.

6. A particular antigen common to "Component A" was frequently observed in the sera of patients with cancer, such as gastric cancer, cancer of the bile duct, etc., but not in those of the patients of nonmalignant diseases with two exceptional cases: the SLE and the toxic disease by "pyrin-drugs".

7. By the fluorescein antibody technique each gastric cancer cell was characteristically stained in its chromosome net, nucleoli and cytoplasm with the fluorescein-labeled antibody against its histone fractions.

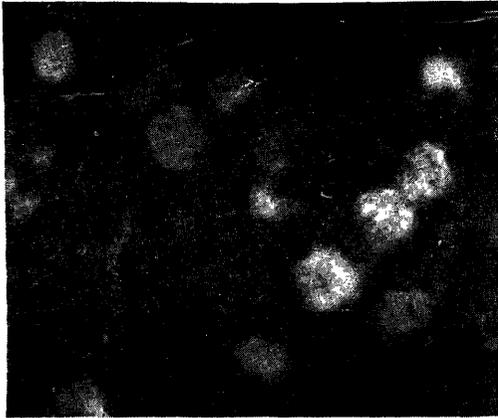


写真1：胃癌組織切片を抗正常ヒストン血清でブロックしてから、蛍光標識抗胃癌ヒストン抗体で染色した。細胞核（ことにクロモソーム・ネット）がすよく光っている。

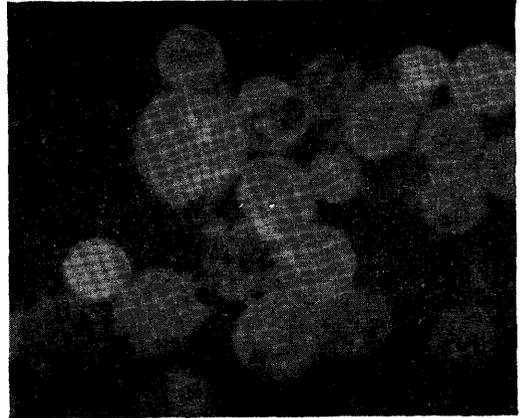


写真2：胃癌による癌性腹膜炎の患者の腹水内遊離癌細胞。写真1と同操作。クロモソーム・ネットおよび核小体が光っているが、細胞質もかなり光っている。

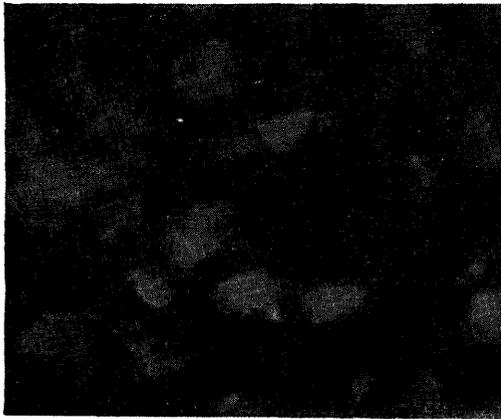


写真3：正常胃癌粘膜細胞。写真1と同操作。わずかに蛍光性を認めるのみである。

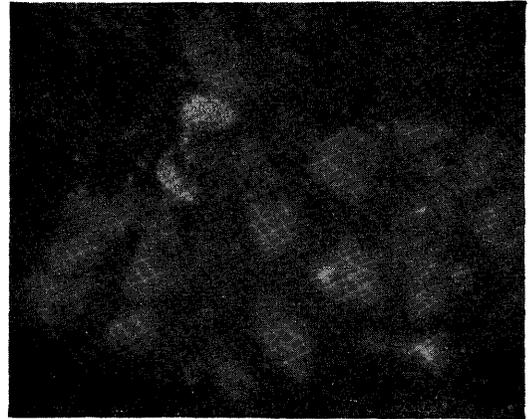


写真4：正常胃癌粘膜細胞。写真1と同操作。わずかに細胞質が光っているが、核はぬけてみえる。