

# 人胃癌ミトコンドリア分画の免疫化学的解析

—とくに蛍光抗体法による胃癌の細胞診への応用について—

金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川大刀雄教授)

金沢大学大学院医学研究科第二外科学講座(主任 水上哲次教授)

素 谷 宏

(昭和42年1月28日受付)

癌細胞の特徴を癌化に伴って起る抗原組成の変化でとらえようとする試みが多数の研究者によって手がけられてきた。著者の属する教室においても免疫化学的方法をつかって実験癌および人癌について細胞下構築レベルでの抗原分析がおこなわれ、かなりの成績が得られている<sup>1)~4)</sup>。

近年癌特異抗原が細胞の膜構築において把握され、その意義について明らかにされつつあるが、膜構築の1つであるミトコンドリアについて、教室の法幸<sup>3)</sup>はラットDAB肝癌および腹水肝癌で癌特異性の高い抗原があることを確かめている。

そこで著者は、いまだ報告が見られない人胃癌ミトコンドリアの抗原分析を試みた。その結果癌特異抗原(cancer-distinctive antigen)を見いだすことができた。さらにその癌抗原を指標とした蛍光抗体法によ

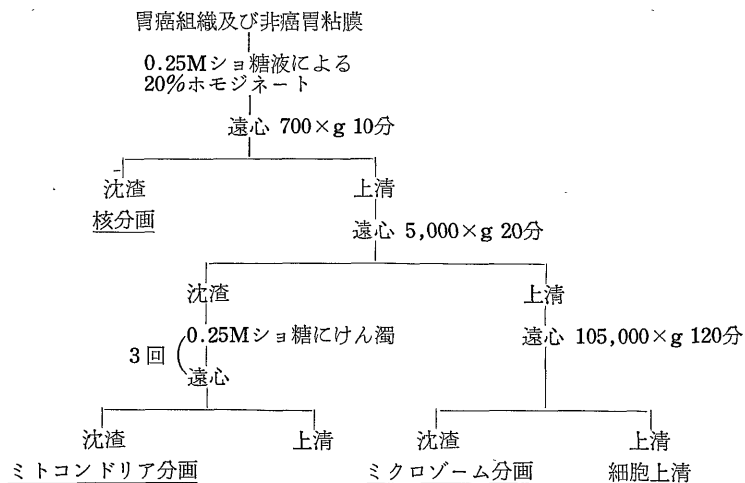
る胃癌の細胞診について検討したので、結果を報告する。

## 実験材料と実験方法

### 1 組織材料

手術によって切除された人胃癌および対照として胃十二指腸潰瘍、慢性胃炎を材料とした。胃癌材料は剥出後なるべく早く壊死部および非癌部を肉眼的に識別して取りのぞき、筋層に浸潤した癌組織を含めて刀でこまかくきざみ、Hogeboom-Schneider<sup>5)</sup>法にしたがい、4倍量の冷0.25Mシヨ糖液を加え、Potter-Elvehjem型のガラスホモジナイザー(約10分間)で20%ホモジネートをつくった。対照としてもちいた慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍は粘膜筋板と粘膜上皮との間で剝離し、粘膜上皮のみを材料とした。ついでミトコ

図1 ミトコンドリア分画法



Immunological Analysis of Mitochondria from Human Stomach Cancer—On the Cell Diagnosis of Stomach Cancer by Fluorescent Antibody Technique. **Hiroshi Sodani**, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), Department of Surgery (Director: Prof. T. Mizukami), School of Medicine, Kanazawa University,

ンドリア分画を図1の方法で調製した。すなわち 700×g, 10分遠心上清を 5,000~6,000×g, 20分遠心で落とした沈渣をミトコンドリア分画とした。ただし共存する粘液を取りのぞくために沈渣を 0.25 M ショ糖液で2~3回洗浄した。なお沈渣の表層の flfaly layer と Bottom layer は取りのぞいた。このようにして得られた分画は contamination の少ないミトコンドリア分画であることが電子顕微鏡によって確認された(写真17)。その収量は胃癌組織または非癌胃粘膜 50 g あたり 150-200 mg (蛋白量-biuret 法)であった。

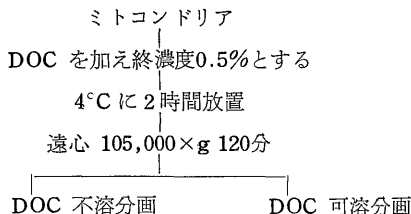
螢光抗体法の被検組織は手術によって剔出された直後の胃癌材料の癌部と非癌部の小片を試験管に入れ、-70°C (ドライアイス-アセトンによる)ですみやかに凍結させ、48時間以内にクリオスタットで切片にしたものを使用した。やむを得ない場合は再融解しないように -20°C に保存したものを使用した。なお剝離癌細胞は癌の主病巣から擦過法によって、腹水中の癌細胞は腹水の遠心沈渣を塗抹して標本をつかった。非癌人諸臓器(食道・小腸・大腸・肝・脾・淋巴節・腎・膵・甲状腺・下垂体・肺・前立腺)は死後6時間以内の剖検材料を使用した。

## 2. 抗原

免疫抗原として胃癌組織および非胃癌粘膜のミトコンドリア分画を使用した。1つの剔出胃癌組織から得られる抗原の収量が少ないため、個体の異なった胃癌ミトコンドリアをプールして免疫抗原とした。

試験抗原としては図2のように調製したミトコンドリアデオキシコール酸可溶分画(以下 DOC 可溶分画と略す)を使用した。

図2 試験抗原の調整(DOC 可溶分画)



## 3 抗血清

蛋白量 50 mg の抗原溶液を Freund's complete adjuvant 液 (BCG 死菌 85 mg, 流動パラフィン 85 ml, アラセル A 15 ml) と 1:1 で混合して乳剤を作り、成熟家兎の両肩胛下腔に等分に注射した。これを1週間間隔で合計3回注射し、それ以後2週目と3週目に追加免疫として adjuvant なしで、抗原 40 mg

ずつを筋注した。最終注射後7~10日目で全採血した。全採血は24時間絶食させた家兎の頸動脈よりおこない、分離した抗血清は約1 ml ずつにわけて -18°C に保存した。

## 4 吸収抗血清

最適比量の抗原 1/4 量を抗血清に加え、37°C で2時間反応させた後、生じた沈でんを遠心によってのぞき、もう一度この操作をくり返してから 1/2 量の抗原を同じ条件で反応させ、4°C 氷室内に一夜放置して生じた沈でんを遠心除去したものを吸収抗血清とした。

## 5 寒天内二重免疫拡散法

透析した 4% 寒天ブロック 10 g, 0.01% の EDTA を含む pH 7.2, 0.1 M 磷酸緩衝液 15 ml, Na<sub>3</sub>N 3.0 ml, 蒸留水 2 ml を加え全量 30 ml とし、加温溶解後この 15 ml を 8×12 cm<sup>2</sup> のガラス板に流し厚さ約 1.5 mm の寒天板をもちいた。抗原および抗体孔は直径 6 mm, 間隔 5 mm とした。20°C の湿潤状態で反応させ、多くは72時間後に判定をおこなった。乾燥後、必要に応じ 0.3% サイアジンレッド酢酸溶液による蛋白染色、ズダンブラック B によるリピン染色、および α-ナフトール P-フェニレンジアミンによる糖染色をおこなった。

## 6 免疫電気泳動法

透析した 4% 寒天ブロック 10 g, 0.1 M ベロナール緩衝液 (pH 8.2 μ=1) 7.5 ml, 1,000 倍マーズン液 3 ml, 蒸留水 9.5 ml を加えて、全量 30 ml とし、加温溶解後 8×12 cm<sup>2</sup> のガラス板に 15 ml ずつ流し冷却固化後、1×2 mm<sup>2</sup> の抗原孔をつくり抗原を入れて泳動した。緩衝液はベロナール緩衝液 (pH 8.3 μ=0.05) をもちい 2 mA/cm の定電流で60分間泳動した。泳動後はすみやかに幅 1 mm の抗体溝を抗原孔から 5 mm のところにあげ、抗血清を入れ、20°C 湿潤状態で反応させた。

## 7 カラムクロマトグラフィー

DEAE セルロース (Serva または Brown 社) を 0.035 M トリス緩衝液 (pH 7.8) にけん濁し、内径 1.7 cm のカラムに 20 cm の高さにつめ上記緩衝液で一夜緩衝化をおこない、これにあらかじめ緩衝液で透析しておいた約 10 ml の試料を静かに充てんし、0.005 M から 0.6 M までの食塩-緩衝液で stepwise elution をおこなった。溶出速度は 20 ml/hr とし 5 ml ずつに分画した。280 mμ における吸光度により蛋白濃度を測定し、各ピークの溶出液数本を集めて、pervaporation によって、それぞれ10倍程度に濃縮した後、0.035 M トリス緩衝液 (pH 7.8) で透析した。

8 螢光抗体法

1) 螢光標識抗体: Marshall 法を改良した 浜島<sup>6)</sup>の方法に従った. Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC) 標識抗体の精製には, セファデックス G-25 および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーをもちいた. 後者のカラムから 0.05 M pH 6.4 の 燐酸緩衝液で 溶出される 第 I 分画液のみをとり, pervaporation によって濃縮し, 蛋白量を 3-4 mg/ml にした.

2) 螢光標識抗体による染色と観察: すべて直接法によって染色した. 癌特異抗原の細胞内分布を調べるために, 抗非癌ミトコンドリア家兔血清による阻止法をもちいた. 胃癌組織を染めるとき必ず対照として同一標本の非癌部も同時に染めて比較した.

9 組織学的検索

組織標本は10%ホルマリン固定, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色をおこなった. とくに螢光抗体法の被検組織は, 連続凍結切片にヘマトキシリン・エオジン染色をほどこした. 胃癌の組織学的診断は胃癌取扱い規約<sup>7)</sup>を基準にして記載した.

実験結果

1 ミトコンドリア分画の吟味

人胃癌および非癌胃粘膜からミトコンドリアをとり出すために, Hogeboom-Schneider<sup>8)</sup>法をもちいたが, これはラット正常肝についての分画法であるから, 同じ操作で人胃粘膜からとりだされたものが正確にミトコンドリア分画であるか否かを吟味した. 形態的には電子顕微鏡により, 機能的には酸素電極法<sup>9)</sup>をもちいて実際に酸素消費がおこなわれるかどうかで調べた.

まず胃癌組織からの分画をステレンで包埋して電顕的に調べてみると, 写真17のごとく一部破かいしたミトコンドリアとわずかの他の顆粒成分の混入があったが, 視野のほとんどは大型および小型ミトコンドリアによってしめられていた. さらに即述の条件でとり出した非癌胃粘膜のミトコンドリア分画に, コハク酸を基質として与えると酸素を消費して呼吸をいとなむことが酸素電極法によって確かめられた (図3). ただし ADP, DNP を加えてもその呼吸曲線に変化がおこらなかったが, このことはとり出されたミトコンドリアが機能的に完全ではないことを意味する. これはおそらく分画をとり出すために要した時間 (5~6時間) が長くならざるを得なかったためであろう. いずれにせよ著者のとり出した分画は, 形態的にも機能的にも充分ミトコンドリアとして使用し得る分画である

といえるであろう.

2 人胃癌ミトコンドリアの抗原分析

試験抗原をとり出した人胃癌および非胃癌材料は図4に示した. 試験抗原に次のような略記号をつけた. 例えば, C<sub>6</sub> は Iot 6 の胃癌ミトコンドリア分画の意

図3 非癌胃粘膜ミトコンドリア呼吸曲線 (酸素電極法)

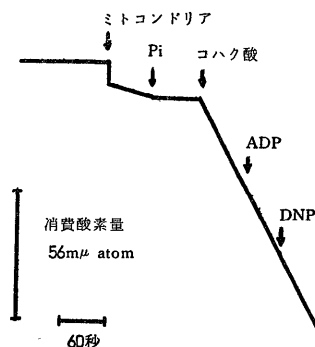


図4 試験抗原をとりだした胃癌および非癌胃組織

組織診断		組織診断	
N5	消化性胃潰瘍	C16	腺 癌
N6	慢性胃炎	C17	腺 癌
N10	慢性胃炎	C21	腺 癌
N11	消化性胃潰瘍	C26	単純充実癌
N12	慢性胃炎	C29	単純充実癌
C6	腺 癌	C31	単純充実癌
C7	単純充実癌	C38	単純充実癌
C13	腺 癌		

図5 抗血清および免疫抗原

血清番号	抗原	組織診断
A/N 1383	N1	消化性胃潰瘍
	N2	慢性胃炎
A/C 1404	C5	腺 癌
	C10	単純充実癌
	C7	単純充実癌
A/C 1405	C6	腺 癌
	C11	単純充実癌
A/C 1407	C11	単純充実癌
	C17	腺 癌
A/C 1426	C16	腺 癌
A/C 1475	C19	単純充実癌

味であり、Nは非癌胃ミトコンドリア分画を意味する。免疫抗原をとり出した胃癌および非癌胃材料は図5に示した。抗血清には次のような略記号をつけた。例えば A/C 1405 は家兎番号 No. 1405 の抗胃癌ミトコンドリア家兎血清、A/C 1405-N<sub>6</sub> は非癌抗原 N<sub>6</sub> で吸収した吸収同上抗血清、A/N 1383 は抗非癌ミトコンドリア No. 1383 家兎血清をそれぞれ意味する。

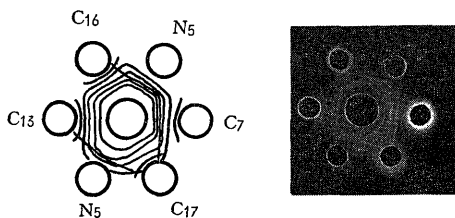
1) 寒天内二重拡散法：ミトコンドリア DOC 可溶分画についてのみおこなった。その結果、胃癌ミトコンドリアには非癌ミトコンドリアに見られない抗原因子が存在した。すなわち対照の N<sub>5</sub> と癌の C<sub>7</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub> とで A/C 1404 に対する沈降線を比較してみると、N と C に共通した沈降線は 4~5 本あり、N

はなく C にだけ見られる沈降線が常に抗原孔に接近して 1 本現われた (図 6)。

N<sub>10</sub> と C<sub>6</sub>, C<sub>29</sub> とを比較するとやはり N<sub>10</sub> に見いだされない抗原因子が C<sub>6</sub> と C<sub>29</sub> に存在する。すなわち N<sub>10</sub> と C<sub>6</sub>, C<sub>29</sub> との A/C 1405 に対する共通沈降線は 4~5 本あり、C<sub>6</sub>, C<sub>29</sub> のみに見いだされる沈降線が 1 本ある。この沈降線のパターンは A/C 1475 を使用しても変らなかった (図 7)。

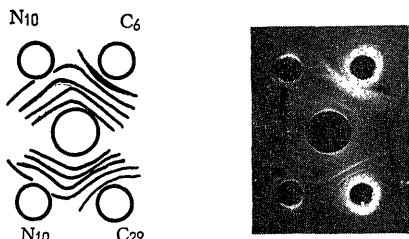
N<sub>6</sub> と C<sub>6</sub> について吸収抗血清 A/C 1405-N<sub>6</sub> で調べてみると、C<sub>6</sub> の抗原孔に接近して 1 本の沈降線のみが残った。同じ配列で C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>38</sub> について調べ

図 6 胃癌ミトコンドリア DOC 可溶分画のゲル内沈降反応

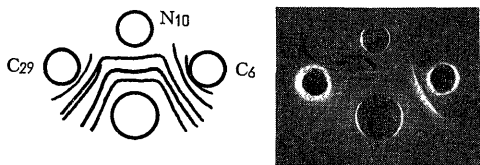


C: 癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
N: 非癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
抗血清 (中央) A/C1404

図 7 胃癌ミトコンドリア DOC 可溶分画のゲル内沈降反応

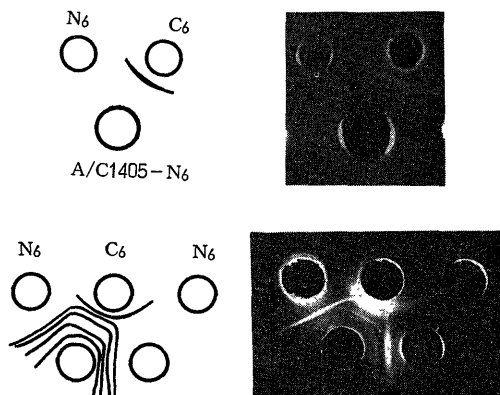


C: 癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
N: 非癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
抗血清 (中央) A/C1405



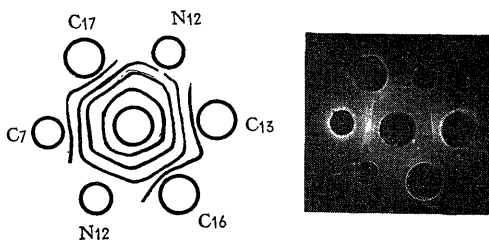
C: 癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
N: 非癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
抗血清 (中央) A/C1475

図 8



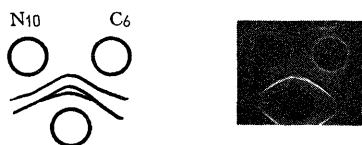
抗血清 (下段左): A/C1405  
抗血清 (下段右): A/C1405-N<sub>6</sub>

図 9



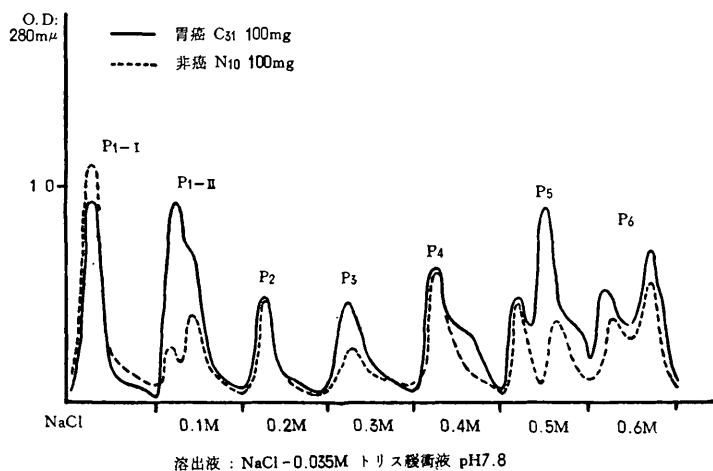
C: 癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
N: 非癌ミトコンドリア DOC 不溶分画  
抗血清 (中央): A/C1405

図 10



抗血清 (中央): A/N1383

図11 胃癌および非胃癌ミトコンドリア DOC 可溶分画の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー



てみるとやはり N<sub>6</sub>に見られない沈降線が1本残った(図8).

N<sub>12</sub>とC<sub>7</sub>.C<sub>16</sub>.C<sub>17</sub>.C<sub>13</sub>について、A/C 1405に対する沈降線を比較するとN<sub>12</sub>に見られない沈降線がC<sub>7</sub>.C<sub>16</sub>.C<sub>17</sub>.C<sub>13</sub>に見いられ、その沈降線はC<sub>13</sub>とC<sub>16</sub>.C<sub>7</sub>とC<sub>17</sub>において連続していた(図9).

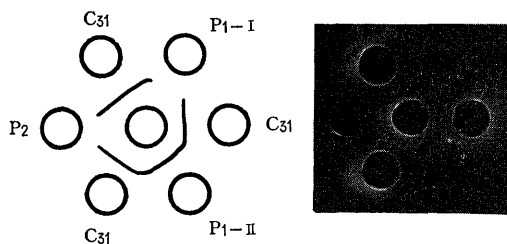
N<sub>10</sub>とC<sub>6</sub>についてA/N 1383で沈降線をつくらせると、4本の共通沈降線のみが見られた(図10).

2) カラムクロマトグラフィー: DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる抗原蛋白の分画パターンは図11のとおりである. 各溶出段階のピークを図のようにP<sub>1</sub>-P<sub>6</sub>と名付けると、0.1 M NaCl-トリス緩衝液で溶出してくる P<sub>1</sub>-II 分画は、非癌 N<sub>10</sub> とくらべて胃癌 C<sub>31</sub> にいちじるしい増量を示している. なお P<sub>5</sub> および P<sub>6</sub> 分画は紫外外部吸収スペクトルの極大が 260 mμ にあった. 各分画を試験抗原として二重

拡散法により A/C 1405-N<sub>6</sub> で沈降線をつくらせると、P<sub>1</sub>-II 分画に1本の沈降線が見られ、この沈降線は C<sub>31</sub> に見られる癌特異沈降線と連続した(図12). その他の分画には全く沈降線が出なかった. この結果、癌特異抗原は DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで 0.1 M NaCl-トリス緩衝液で溶出してくる分画に存在することが明らかになった.

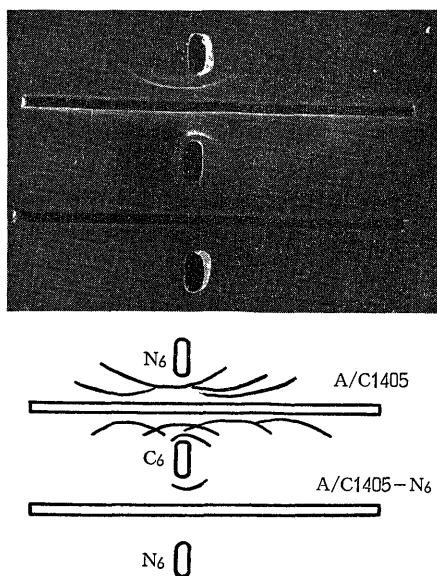
3) 免疫電気泳動法: N<sub>6</sub>とC<sub>6</sub>について免疫電気泳動法をおこなった. 抗血清は A/C 1405 と A/C

図12 DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる胃癌ミトコンドリア DOC 可溶分画



C: 癌ミトコンドリア DOC 可溶分画  
P: クロマトグラフィーの各分画  
抗血清(中央): A/C1405-N<sub>6</sub>

図13 胃癌ミトコンドリア DOC 可溶分画の免疫電気泳動



1405-N<sub>6</sub> をもちいた。その結果、癌特異抗原は血清の  $\beta_1$ -グロブリンに相当する泳動度を示した (図13)。

4) 癌特異沈降線の糖染色およびリピン染色: 癌特異沈降線は  $\alpha$ -ナフトール P-フェニレンジアミン染色に陽性であり、ズダンブラック B 染色には弱陽性であった。

### 3 癌患者血清中の異常抗原の検索

胃癌ミトコンドリアの癌特異抗原が血清中に存在しているかどうかを胃癌 8 例, 食道癌 1 例, 結腸癌 1 例, 直腸癌 1 例, 子宮癌 1 例について二重拡散法で検討したが, A/C 1405 および A/C 1405-N<sub>6</sub> に対して癌特異沈降線を示すものはなかった。なお対照としてもちいた非癌患者血清においても同様である。

### 4 蛍光抗体による胃癌の組織および遊離細胞の染色

二重拡散法で癌特異抗原がミトコンドリア分画に存在することが確かめられたので, その抗原の局在を蛍光抗体法によって調べた。使用した蛍光抗体は A/C 1405 に FITC を標識し, セファデックス G-25, ついで DEAE セルロースカラムを通して得た第 I 分画のみである (図14)。染色は非癌との共通抗原をあらかじめ A/N 1383 でブロックしてからおこなっている。被検材料は図15に示したが, 二重拡散法の材料とは別個のものである。結果は以下のとおりである。

1) 胃癌組織 No. 1 は粘膜内および筋層に浸潤した癌細胞, および胃の領域リン巴節に転移した癌細胞の細胞質に強い特異蛍光が見られた。核はほとんど染まらない (写真1~6)。同一標本の癌でない粘膜上皮は A/N 1383 でブロックされ, ほとんど蛍光を示さなかった (写真7, 8)。ただ胃癌組織 No. 2 の非胃粘膜の表層細胞がわずかに蛍光を発していた (写真16)。胃癌組織 No. 3, No. 4 は癌細胞に蛍光が全く認められず, 非癌粘膜上皮にわずかの蛍光が見られた。

結局胃癌組織12例について, 癌細胞のみに強い蛍光が見られたのは, そのうちの10例であった (図15)。

2) 胃癌手術後, 癌性腹膜炎を起した患者の腹水中に遊離していた癌細胞を染めてみたところ, 胃癌組織の場合と同じように細胞質のみ強い蛍光があり, とくにそれらは点状に染まっていた。核は全く染まらなかった (写真9, 10)。

3) 胃癌の癌性潰瘍の表面から擦過法によって得た剝離癌細胞を染めてみた。3例についておこなった結果, 3例ともに細胞質だけに蛍光を示す大型細胞が見られ, 癌細胞として識別できた。混在する血球成分等の非癌細胞に蛍光性は全く見られなかった (写真11~

図14 DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる蛍光抗体の精製

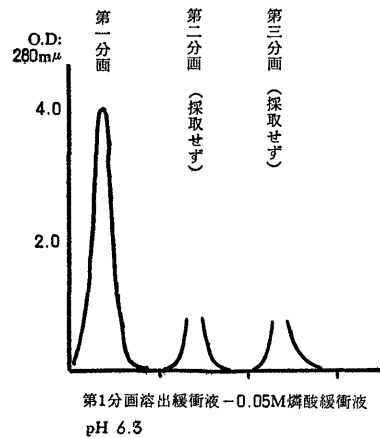


図15 胃癌組織および遊離胃癌細胞の蛍光抗体法

	組 織 診 断	特異蛍光
No. 1	単 純 充 実 癌	(+)
No. 2	腺 癌	(+)
No. 3	腺 癌	(-)
No. 4	腺 癌	(-)
No. 5	単 純 充 実 癌	(+)
No. 6	腺 癌	(+)
No. 7	腺 癌	(+)
No. 8	類 表 皮 癌	(+)
No. 9	腺 癌	(+)
No. 10	単 純 充 実 癌	(+)
No. 11	腺 癌	(+)
No. 12	腺 癌	(+)
No. 13	胃 ポ リ ー プ	一部に (+)
No. 14	腹水中遊離癌細胞	(+)
No. 15	剝離癌細胞	(+)
No. 16	剝離癌細胞	(+)
No. 17	剝離癌細胞	(+)

14)。

4) 胃ポリープ No. 13 は非癌細胞でありながら, 一部の上皮細胞の細胞質にかなり強い蛍光が見られた。ただし胃潰瘍の辺縁に発生した強い異型性を示す再生粘膜上皮には蛍光が全く見られない。

5) 2体の剖検例から得た諸臓器の組織切片を染めてみた結果, 食道・小腸・大腸・肝・腎・脾・リン巴節・肺・膵・下垂体・甲状腺・前立腺などには全く蛍光がなかった。

## 考 察

癌化に伴う正常組織抗原の消失については、かなり以前から多数の報告がおこなわれているが、<sup>9)-12)</sup> ミトコンドリアについて **Hogeboom, Schneider**<sup>13)</sup> が **C3H Mouse hepatoma 98/15** のミトコンドリア蛋白を超遠心分析によって調べ、ある種の蛋白成分がそう失することを認めた。胃癌（とくに人胃癌）については、**Aronson**<sup>14)</sup> がホモジネートの **15,000×g** 遠心上清の抗原組成が正常胃粘膜と比較して減少または消失しており、同時に蛋白融解酵素と炭酸脱水素酵素の活性が消失あるいは減少していることを免疫電気泳動法で証明している。

癌化に伴う特異抗原の獲得に関する報告も多く<sup>15)-21)</sup>、**Rapport**<sup>22)</sup> は補体結合反応でラット淋巴肉腫のミトコンドリア分画のリピド抗原に癌特異性があることを認め、**板倉**<sup>23)</sup> は胃癌ホモジネートの **9,600×g** 遠心上清に、**平井**<sup>24)</sup> は胃癌および横紋筋肉腫の核分画より **pH 4.8** で抽出した蛋白にそれぞれ癌特異性を認めた。近年癌特異抗原が細胞の膜構築と関係しているとする報告が多く<sup>25)-30)</sup>、**石川**<sup>31)32)3)</sup> はエールリッヒ腹水癌細胞凝集阻止反応をもちい細胞膜に癌特異性を見だし、**教室の法幸**<sup>3)</sup> は細胞分画法により **DAB** 肝癌のミトコンドリアに癌特異性の高い抗原因子を認めている。さらに**武田**<sup>33)</sup>、**菊地**<sup>34)</sup>、**Toolan**<sup>35)</sup> らは移植癌においてマイクロゾーム、ミトコンドリア、細胞膜、核膜に抗移植性を認め、**Vogt**<sup>36)</sup> は腫瘍ウィルス感染細胞の表面に変化が起るとのべている。著者は胃癌ミトコンドリアの **DOC** 可溶分画について検討したところ、 $\beta_1$ -グロブリンと泳動度の等しい癌特異抗原を見いだすことができた。しかもそれは糖リポ蛋白の形でミトコンドリアの膜構築に関与するものであるらしい。リン脂質を主成分としたミトコンドリアのようなエネルギー供給器官が、組織あるいは細胞特異性をもつということは、一見考えにくいことのように思われるが、**Robertson**<sup>37)</sup> が細胞内器官は形態学的にはすべて共通の起源をもつ「単位膜」(unit membrane)から成っているとのべていることから推察すれば、各顆粒のリポ蛋白膜構造が共通あるいは交叉反応性の強い抗原組成をもっている可能性もあり、ミトコンドリアにも多少の修飾をうけているとしても細胞特異性抗原が存在するということは必ずしも奇異なことではないように思われる。

ところで胃癌ミトコンドリアの癌特異抗原に対する抗体をもちいて蛍光抗体法で調べてみると、癌細胞の細胞質に強い蛍光が見られたので、著者は蛍光抗体法

の臨床面への応用として胃癌の細胞診についてその可能性を検討した。3例の剥離癌細胞および1例の腹水中の遊離癌細胞は強い蛍光を発生し、容易に癌細胞を識別することができた。剥離癌細胞は擦過法によって得たため血球成分が混入したが、癌細胞以外の細胞に蛍光は全く見られなかった。

このような方法で癌の細胞診をおこなうためには、準備された抗血清に高い癌特異性と個体差を越えた共通性が要求される。著者の抗癌ミトコンドリア血清 **A/C 1405** では、10例中8例に癌特異性降線を認め、12例中10例の胃癌組織の癌細胞を染めることができた。大内<sup>38)39)</sup> は胃癌組織から **Fluorocarbon** 処理で抽出した核蛋白に対する蛍光標識抗体で、癌の形態の差違に関係なく共通抗原性を認めたが、胃ポリープの一部にも蛍光があったとのべている。著者の場合も胃癌でありながら染まらなかった2例と、一部腺細胞が染まった胃ポリープ（易癌化組織であるが、ヘマトキシリン・エオジン染色標本ではその徴候がなかった）の1例については、今後さらに検討しなければならないが、ミトコンドリア分画の癌特異抗原を指標にして、癌の細胞診がおこなえる可能性はあるように思われる。

## 結 論

人胃癌ミトコンドリアの **DOC** 可溶分画について抗原分析をおこない癌特異抗原 (cancer-distinctive antigen) を見だし得た。さらに蛍光抗体法をつかってその癌特異抗原の細胞内局在と胃癌の細胞診について検討した結果を要約すると次のとおりである。

1) 胃癌ミトコンドリアの **DOC** 可溶分画に1つの癌特異的な抗原因子を見いだした。その抗原因子は免疫電気泳動法で  $\beta_1$ -グロブリンに等しい泳動度を示す糖リポ蛋白である。

2) その特異抗原因子は **DEAE** セルロースカラムクロマトグラフィーでは、**0.1 M NaCl**-トリス緩衝液で溶出される分画に含まれていた。

3) 検討した限りでは癌患者血清中には、その抗原は見いだされなかった。

4) 蛍光標識抗体で同一個体の胃癌組織および非癌胃粘膜を染めたところ、12例中10例の癌細胞が強い蛍光を示し、塗抹遊離細胞標本では4例中4例とも細胞質の特異蛍光により癌細胞として識別できた。

胃ポリープの一部にも蛍光が見られたが、強い異型性を示す再生胃粘膜上皮には蛍光が認められなかった。

食道・小腸・大腸・肝・脾・淋巴節・膵・甲状腺・

下垂体・前立腺などの非癌諸臓器に癌抗原との交叉性を示す蛍光はなかった。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導・御校閲を賜りました恩師石川大刀雄教授、水上哲次教授に深く感謝いたします。また多大なる御教示をいただきました倉田自章教授に深謝いたします。さらに適切な助言をいただきました福田鎮雄助手と教室の諸兄、ならびに材料を提供して下さいました村彦病院院長・村義夫博士、佐伯病院院長・佐伯善雄博士に厚く謝意を表します。

## 文 献

- 1) 森田弘之 : 十全医会誌, 71, 1 (1965).
- 2) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 74, 51 (1966).
- 3) 法幸多良雄 : 十全医会誌, 74, 30 (1966).
- 4) 本田雄治 : 十全医会誌, 73, 146 (1965).
- 5) Hogeboom, G. H. & Schneider, W. C. : The Nucleic Acid 2, 105, N. Y. Acad. Press. (1955).
- 8) 浜島義博・京極方久 : 免疫組織学第1版, 64頁, 東京, 医学書院 (1965).
- 7) 胃癌研究会編 : 胃癌取扱い規約, 第5版・32頁, 東京, 金原出版株式会社.
- 8) Hagihara, B. : Biochim. Biophys. Acta, (1961).
- 9) Miller, E. C., & Miller, J. A. : Cancer Res, 12, 547 (1952).
- 10) Weiler, E. C. W. : Z, Naturforsch., 11b, 31 (1956).
- 11) Nairn, R. C., Richmond, H. G., McEntegart, M. G., Fothergill, J. E. : Brit. Med. J., II, 1335 (1960).
- 12) Nairn, R. C., Richmond, H. G., Fothergill, J. E. : Brit. Med. J., II, 1341 (1960).
- 13) Hogeboom, G. H. & Schneider, W. C. : Science, 113, 355 (1951).
- 14) Aronson, S. B., Rapp, W., Kushner, I., Burtin, P. : Int. Arch. Allergy., 26, 327 (1965).
- 15) 荒川 弥 : 十全医会誌, 70, 354 (1964).
- 16) 平井秀松他 : 癌の臨床, 8, 588 (1962).
- 17) Korngold, L. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 69, 681 (1957).
- 18) Korngold, L., & Leeuwen, G. V. : Cancer. Res., 17, 775 (1957).
- 19) Calvalho, S. D. : J. Lab. Clin. Med., 56, 333 (1960).
- 20) 小林勝太郎 : The Tohoku. of Exptl. Med., 63, 185 (1956).
- 21) Zilber, L. A. : Advances in Cancer. Res. 5, 291 (1958).
- 22) Rapport, M. M., & Graf, L. : Cancer Res. 1, 39 (1954).
- 23) Itakura, Katsuaki : Gann 54, 93 (1963).
- 24) 平井秀松他 : 最新医学, 19, 499 (1964).
- 25) Horn, E. C. : Cancer Res, 16, 595 (1956).
- 26) Kidd, J. G. : J. Exptl. Med., 83, 227 (1946).
- 27) Bjorklund, B. & Bjorklund, V. : Int. Arch. Allergy, 10, 153 (1957).
- 28) Bjorklund, B. et al. : Int. Arch. Allergy. 12, 241 (1958).
- 29) Mackenzie, I. & Kidd, J. G. : J. Exptl. Med., 82, 41 (1945).
- 30) 田村 充 : 十全医会誌, 未印刷.
- 31) 石川大刀雄・橋 武彦・高柳尹立 : 癌の臨床, 8, 593 (1962).
- 32) Ishikawa, T. & Inoue, K. : Intracellular Membraneous Structure. P.P. 435 (1965).
- 33) 武田勝男・吉尾 久・坂田義晴 : Gann, 47 (1956).
- 34) 菊地浩吉 : 癌の臨床, 8, 639 (1962).
- 35) Toolan, H. W. & Wallace, R. A. : Cancer Res., 18, 698 (1958).
- 36) Vogt, R. K. : Cancer Res., 23, 1519 (1963).
- 37) Robertson, J. D. : Biochemical Society Symposia No. 16, 3, Cambridge Univ. press. Nairn<sup>11)</sup> より引用.
- 38) 太内清太他 : 外科, 26, 787 (1964).
- 39) 太内清太他 : 日外会誌, 66, 1075 (1965).

## Abstract

Antigen analysis of mitochondria from human stomach cancer showed the presence of a cancer-distinctive antigen in DOC-soluble fraction. Furthermore, intracellular distribution of the antigen was investigated by fluorescent antibody technique.

These results were summarized as follow:

1) The antigen had electrophoretic mobility similar to that of  $\beta_1$ -globulin. It was eluted in 0.1M NaCl-tris buffer pH 7.8 on DEAE cellulose column chromatography and was deemed to be related to the membrane components of mitochondria.

2) Frozen sections of the stomach cancer tissue stained intensely with fluore-



scent anti cancer mitochondria rabbit sera, and compared with the adjacent normal mucosa obtained from the same materials. (10 out of 12 cases)

Free cancer cells of stomach obtained from ascites and from the surface of main tumors also showed strong staining in the cytoplasm. (all of 4 cases)

These findings suggest the technique can be regarded as a useful practical test for the cell diagnosis of stomach cancer.

---

### 写 真 説 明

写真1: 粘膜内の浸潤癌細胞の螢光像.

写真2: 上記組織へマトキシリン・エオジン染色像  
(以下H・E染色像と略す.)

写真3: 筋層への浸潤癌細胞の螢光像.

写真4: 上記組織H・E染色像.

写真5: 淋巴節転移癌細胞の螢光像.

写真6: 上記組織H・E染色像.

写真7: 上記胃癌標本の非癌胃粘膜—螢光が見られない.

写真8: 上記H・E染色像.

写真9: 腹水中の遊離癌細胞の螢光像.

写真10: 上記ギームザ染色像.

写真11: 擦過法による剝離癌細胞の螢光像.

写真12: 剝離癌細胞の螢光像.

写真13: 剝離癌細胞の螢光像.

写真14: 剝離癌細胞のギームザ染色像.

写真15: 粘膜内の浸潤癌細胞の螢光像.

写真16: 上記組織の非癌胃粘膜—やや螢光が見られる.

写真17: 胃癌ミトコンドリア分画の電顕像(×5000)  
(5000×g 20分遠心沈渣分画)

写真 1

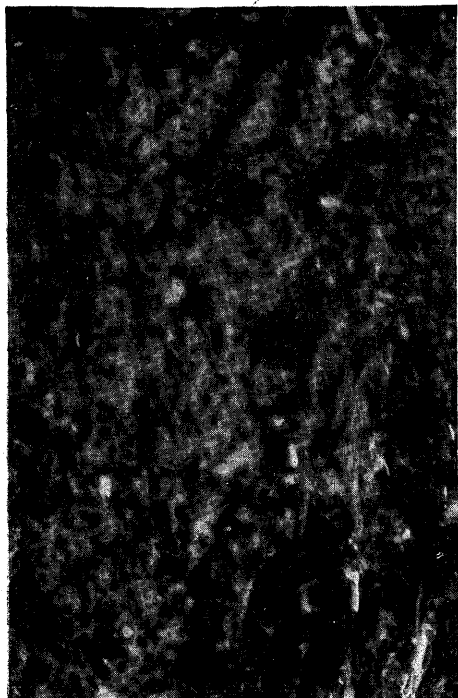


写真 2

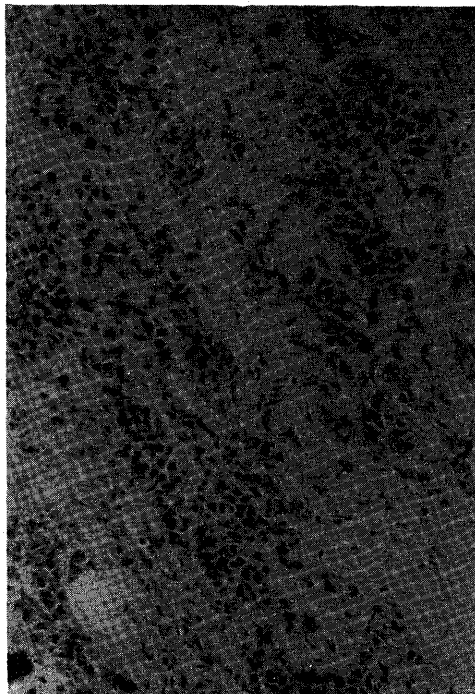


写真 3

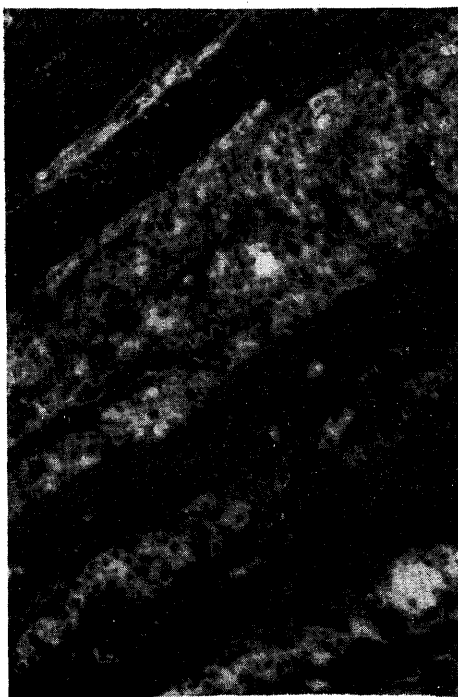


写真 4

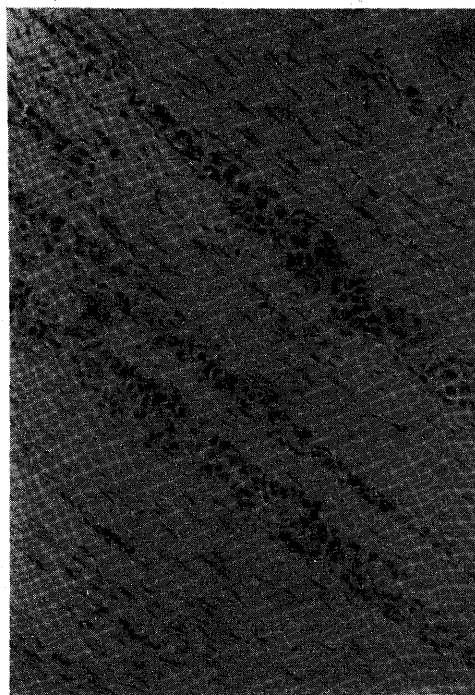


写真 5

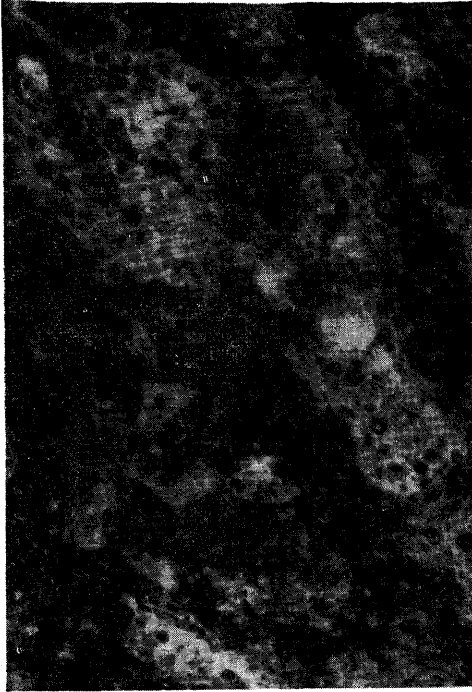


写真 6

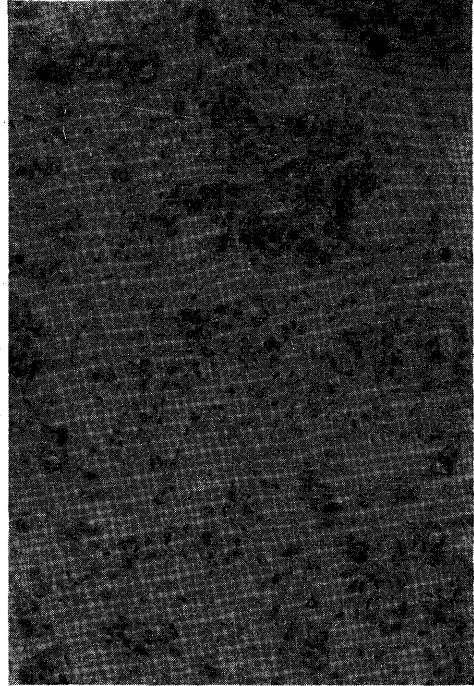


写真 7

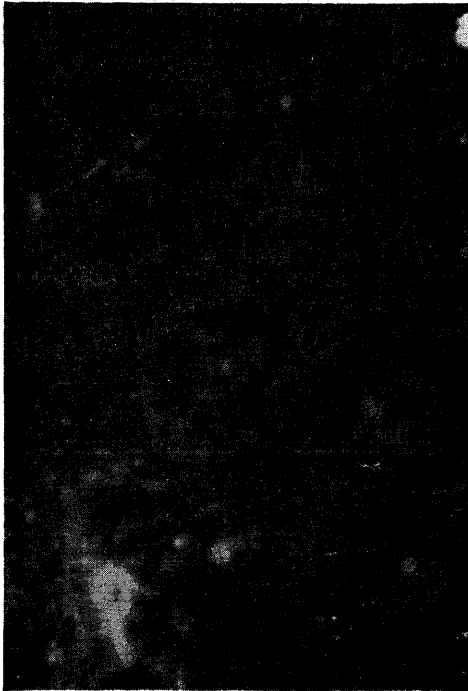


写真 8

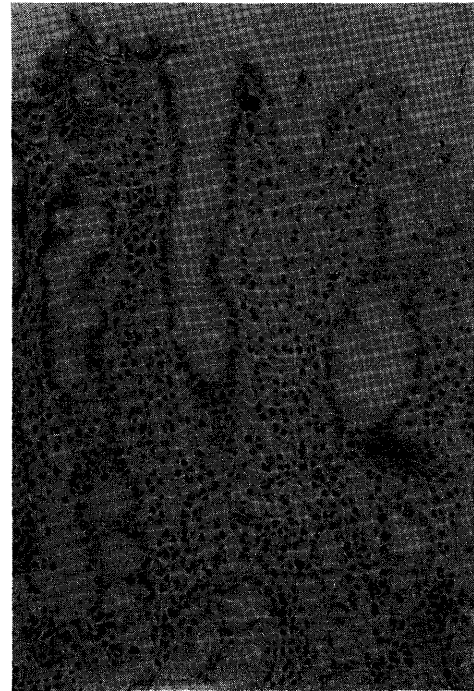


写真 9

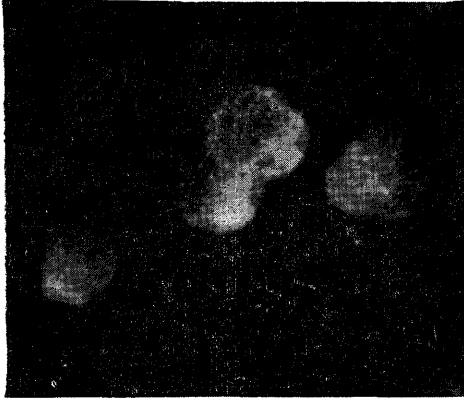


写真 10

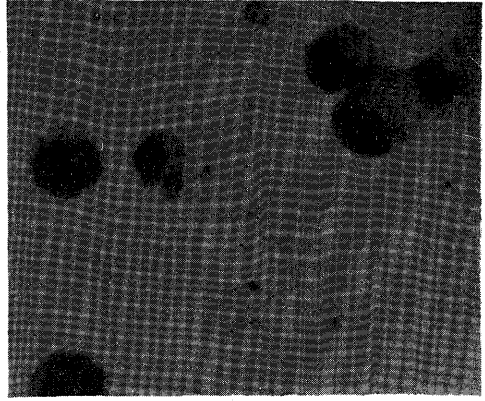


写真 11



写真 12



写真 13

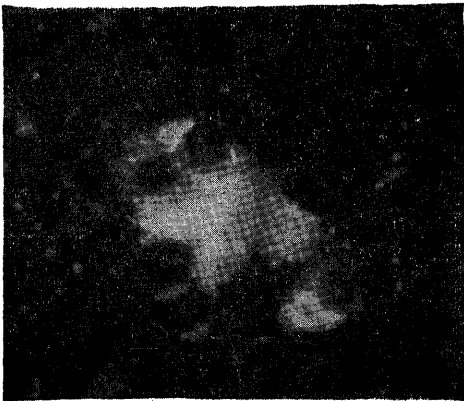


写真 14

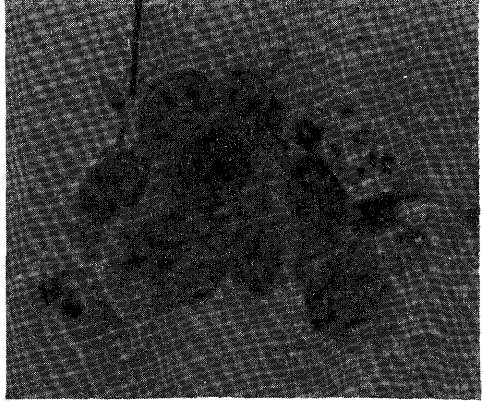


写真 15



写真 16

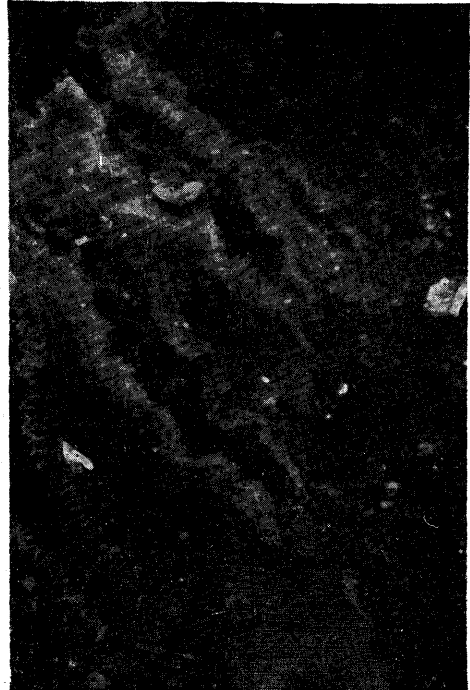


写真 17

