

癌細胞ミトコンドリア分画の免疫化学的解析

—DAB 肝癌・腹水肝癌を用いての実験的研究—

金沢大学大学院医学研究科第二病理学講座 (主任 石川大刀雄教授)

法 幸 多 良 雄

(昭和41年2月9日受付)

癌細胞の高分子組成に正常細胞のそれとは異なる特異性を見出そうとする試みは、生化学的あるいは免疫化学的方法を用いて多くの研究者により追求されてきた。

われわれの教室においても、人癌および実験癌において癌を特徴づける蛋白組成を見出し得るとする石川・高柳ら¹⁾²⁾³⁾の成績を始めとしここ数年来、癌特異抗原の解析、とくに各細胞分画についての系統的な解析が試みられている。⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾

癌および発癌過程における酵素パターンの変化については、有名な Greenstein⁸⁾や Potter⁹⁾らの業績などがあり、またミトコンドリアの変化に関しては、生化学的立場から Hogeboom, Schneider¹⁰⁾らは、癌ミトコンドリアの蛋白質の超遠心分析によつて蛋白組成の一部分がそう失することを主張している。一方免疫学的に癌のミトコンドリアに特徴的な抗原因子の獲得を暗示するかなりの報告も近年みられるようになった。たとえば、ラットのリンパ肉腫を用いた Rapport, Graft¹¹⁾, Ehrlich 腹水癌での Horn¹²⁾, DAB 肝癌における武田¹³⁾, ラット腹水肝癌による菊地¹⁴⁾ C3HA マウス肝癌を用いての Zilber¹⁵⁾ などの報告があげられるが、まだ解決されるべき多くの問題を残している。

著者は DAB 肝癌および腹水肝癌のミトコンドリアとくにそのデオキシコール酸塩可溶分画を中心に免疫化学的解析を進め、若干の興味ある知見を得たのでここに報告する。

実験材料および実験方法

1. 使用動物：

DAB 肝癌の作製法は原田・水谷法¹⁶⁾に準じた。すなわち、3'メチル・4ジメチルアミノアゾベンゼン(以下DABと略す)を濃度30%になるようにオリブ油にとかし、これを屑米とまぜ合わせてDABの終濃

度が0.06%となるようにしたものを飼料として、体重約150grのWister系ラットに与えそれ以外は水のみを充分与えるようにした。

各種の腹水肝癌移植には雑系ラットを用いた。

抗血清作製にあつては体重約2.5kgの成熟家兎を使用した。

再生肝の作製には体重約150gr.のWister系ラットを用いた。

2. 組織材料ならびに細胞分画法：

DAB投与後4～5カ月以後の肉眼的・組織学的所見で癌と診断されたものをDAB肝癌材料とした。なおDAB投与後10, 20, 30, 60, 90, 150, 180日目の癌化過程にある肝についても検索を行なつた。

腹水肝癌は、佐々木研より分与されたAH127, AH66Fを用いた。

その他、正常ラットの諸臓器(肝, 腎, 心, 脾, 肺, 脳, 血清)を対照材料として用いた。

臓器剔出に際しては、ラットを24時間絶食させ、エーテルまたはクロロホルムで麻酔下に開胸し、胸腔大動脈より冷却した生食水を点滴注入して血液の灌流を行なつた。灌流後剔出臓器は結合織を取り除き、Hogeboom, Schneider法¹⁷⁾に従い、4倍量の冷0.2Mシヨ糖液を加えながらPotter-Elvehjem型のガラスホモジナイザーに10分かけて20%ホモジネートをつくつた。なお、DAB肝癌の場合はできるだけ壊死部分および硬変部分はとりのぞき、癌結節部分のみを材料とするようにした。

腹水肝癌の場合は、採取した腹水を700～1,000×g, 10分遠心し、沈澱した細胞成分に同量の蒸留水を加え、すみやかに攪拌して血球成分を溶血させた後、直ちに同量の1.7%食塩水を加えて遠心、同様な操作を2～3回くりかえして癌細胞だけを集め、上述のように0.25Mシヨ糖液で20%ホモジネートをつくつた。

Immunochemical Analysis of Mitochondrial Fraction from Cancer Cells.
—Experimental Studies on DAB-hepatoma and Rat Ascites Hepatoma Tarao Hoko
Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

再生肝は Anderson¹⁸⁾の方法に従い、術前約20時間絶食したラットをエーテル麻酔し、肝の外側左葉および尾状葉を基部で結紮切除し内側右葉を残した(全肝重量の約50%切除)。切断面より出血のないことを確かめてから腹壁を縫合し、保温保護を充分にした。術後48時間目にエーテル麻酔下で開腹し、生食水で下部大静脈より灌流後肝剔出を行ないホモジネートをつくった。

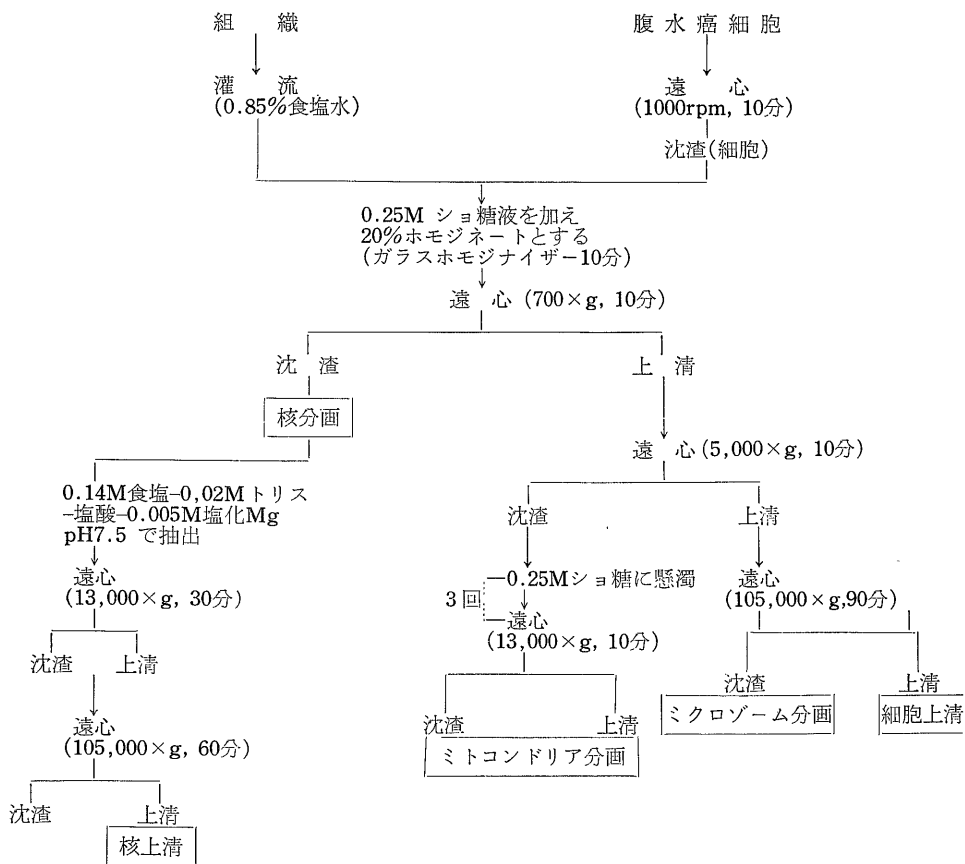
なお各ホモジネートは毎回ゲンチアナバイオレット酢

3. 抗原の調製：

(1) ミトコンドリア全分画： 上記ミトコンドリア分画を0.25M ショ糖液で5~10%に懸濁し、ビウレット法¹⁹⁾で蛋白量を測定して、20~30mg/mlの蛋白濃度に調製した。

(2) デオキシコール酸可溶分画： 表2に示すごとく、ミトコンドリア分画にデオキシコール酸ソーダ(以下DOCと略記)を含む0.35M トリス緩衝液 pH8.2を終濃度0.5%になるように加え、直ちによく攪拌

表 1： ミトコンドリア分画法



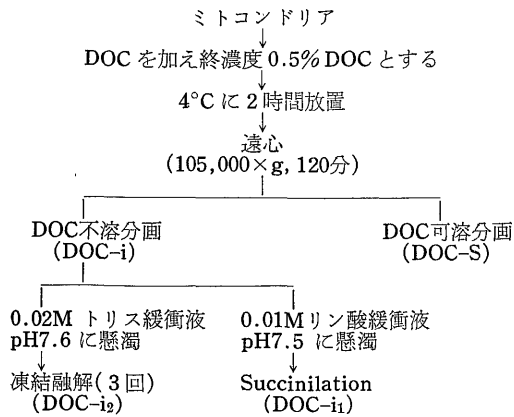
酸液で核染色し、充分ホモジナイズされていることを確かめた。

各組織材料のホモジネートは700×g, 10分遠心して核成分を落とし、その上清を5,000×g, 20分遠心した。沈渣を0.25M ショ糖液に浮遊させ、13,000×g, 10分遠心する操作を3回行なつて充分洗つた沈渣をミトコンドリア分画とした(表1)。この際沈渣上層の“fluuffy layer”は注意深く除くようにした。

し、2°C 30分氷室で放置した後、105,000×g, 90分間 Spinco L型超遠機を用いて遠心し、その上清の上部1/3を静かにすいとつてこれを DOC 可溶分画(DOC-S分画り略記)とした。蛋白量を20~30mg/mlに調製し、使用時まで-20°Cに凍結保存した。

(3) DOC不溶分画： 上記DOC処理後の沈渣部分をDOC不溶分画(DOC-i分画と略記)とし、これを0.01Mリン酸緩衝液 pH7.5で蛋白量5~20mgになるように浮遊させる。この浮遊液に無水コハク酸の

表 2 : 抗原の調製
(DOC 可溶分画および不溶分画)



結晶を少量ずつ水冷攪拌しながら加えて液を清澄化する。なお、結晶添加に際しては、たえず 4.0M 苛性ソーダを加えて液の pH を 7~8 に保つように努めた (David H., McClennin の方法)²⁹⁾。Succinilation 後、蒸溜水で一夜氷室で透析し、沈澱物を 15,000×g, 30分遠心して除いた上清を蛋白量 10~20mg/ml に調製した。

また、DOC-i 分画は終濃度 0.005M 塩化マグネシウムを含む 0.02M トリス緩衝液 pH7.6 に均一に懸濁してから凍結融解を 3 回くりかえした後、蛋白量を 20~30mg/ml に調製した。

(4) DOC 可溶分画のカラムクロマトグラフィー諸分画 : DOC-S 分画を DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにかけて得た諸分画を氷室で一夜 0.005M トリス緩衝液 pH7.8 に対して透析後濃縮し、蛋白量を 10~20mg/ml に調製し、試験抗原とした。

(5) その他の細胞分画 : ミクロゾーム分画 (Hogeboom, Schneider 法¹⁷⁾ による 105,000×g, 90分遠心沈澱部分) の DOC 可溶分画, 細胞可溶分画 (105,000×g, 90分遠心上清) および核上清 (Patel 法²¹⁾ により抽出した核可溶分画 : 105,000×g, 60分遠心上清) も比較抗原として用いた。

4. 抗血清の調製 :

上記の各種抗原のうち、ミトコンドリア全分画、およびミトコンドリア DOC-S 分画について抗血清をつくった。すなわち Freund's complete adjuvant 法²²⁾²³⁾ にもとづき抗原液 3ml と adjuvant 液 (BCG 死菌 85mg, 流動パラフィン 85ml, アラセル A オイル 15ml) の等量を混合、乳剤としたものを体重約 2.5kg の成熟家兎の肩甲下腔に 1 週間おきに 3 回注射した。初回免疫後約 6 週目に第 1 回の追加免疫 (adjuvant 液

を用いず初回免疫量と同蛋白量の抗原を肩甲下腔に注射) を行ない、1 週間後に耳静脈より部分採血をして重層沈降反応により抗体価を調べ、充分の抗体価があれば直ちに、抗体の産生が低い場合は同日 2 回目の追加免疫を行なつてから 1 週間後に全採血を行なつた。全採血は 24 時間絶食させた免疫家兎の頸動脈より行ない、分離した血清は -18°C に保存した。なお免疫抗原量は、ミトコンドリア全分画の場合は 1 回の免疫量を 50mg (蛋白量) とした。DOC-S 分画の場合は 30mg とし、蒸溜水で充分透析して DOC を除去してから用いた。

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つた。

試験管内吸収法は、予備実験で確かめておいた最適吸収抗原量 (おおむね 1 : 1) を 3~4 回にわけて行なつた。まず抗原を抗血清に加え、37°C, 2 時間反応させ、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く。その上清について同様な操作を 2~3 回くりかえし、最終吸収操作後は 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 technique²⁴⁾ を用いて行なつた。吸収すべき抗原をあらかじめ抗体孔に入れ、24 時間に 4°C 放置後抗体孔を洗い、そこへ抗血清を入れて抗原と反応を行なつた。

また、吸収抗血清の抗体価が低いときは、氷室内での pervaporation によるかあるいは 50% 硫酸飽和によつて血清グロブリン分画をとり、濃厚液とした。

6. 寒天内二重免疫拡散法 (Ouchterlony 法)²⁵⁾ :

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, 1.5ml, 1N NaNs 3.0ml, 蒸溜水 10.5ml 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膜をつくつておいた 8×12cm 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 2mm の寒天板をつくつた。

予備実験で抗原・抗体比の最適条件を求めておき、その条件に従つて金属円筒カッターで抗原、抗体孔をあけ、それぞれ抗原、抗血清をみだし、20°C 湿潤状態で 48 時間反応させて沈降線の判定を行なつた。ついで、生食水で約 2 時間、つづいて蒸溜水で充分洗浄してから室温乾燥した後、0.3% Thiazine red 酢酸溶液による蛋白染色²⁶⁾、Sudan black B によるリピド染色²⁷⁾、および α -naphthol-P-phenyldiamine 法²⁸⁾ による糖染色を行なつた。

7. 免疫電気泳動法 (Graber法²⁹⁾):

4%寒天 ブロック 10gr, ペロナール緩衝液 (pH 8.3 μ =0.1) 7.5ml, 10³倍マゾニン3ml, 蒸溜水 9.5ml を加え全量 30ml とし, 加温溶解後, 8 \times 12cm のガラス板上に 10ml 流して冷却固化した寒天平板に 1 \times 3cm の抗原池をあげ, 抗原を入れペロナール緩衝液 (pH 8.3, μ 0.05) を用い, 平板 1 枚につき 16mA の定電流で 60 分泳動した. 泳動後すみやかに抗原池より 7mm の距離に抗体溝をあげ, 抗血清を入れて 20 $^{\circ}$ C 湿潤状態で 48 時間反応させた. 以後の処理は寒天内二重免疫拡散法の場合と同様にした.

8. DEAEセルローズカラムクロマトグラフィ³⁰⁾:

0.035M トリス緩衝液 pH 7.8 で 24 時間氷室で緩衝化した DEAEセルローズを内径 1.7cm のカラムに約 20cm の高さにつめ, 上記緩衝液約 1 l 通過させた後, ミトコンドリア DOC-S 試料 (蛋白量約 150mg) を充填し, DOC-K Cl-トリス緩衝液 (0.035M トリス緩衝液 pH 7.8 に KCl を 0.1~0.6M, DOC を 0.1% に加えたもの) で stepwise に溶出を行なった. 溶出速度は 20ml/hr とし, フラクシオンコレクターで 5ml 宛溶出液を採取した. 各ステップの溶出液は 200ml とした. 各溶出液の 280m μ の吸光度を測定し蛋白濃度を求めた. 各分画は約 1 l の 0.005M トリス緩衝液 pH 7.8 で 24 時間透析した後, 氷室内で pervaporation を行ない約 1/10 量に濃縮し, 蛋白濃度を 15~20mg/ml とした.

9. 細胞分画の化学的分析:

DAB 肝癌および正常肝組織の 20% ホモジネート 100ml について核, ミトコンドリア, ミクロゾーム, 細胞上清を分離し, 各分画についてそれぞれ DNA, RNA は Schmidt³¹⁾, Thanhauser, Shneider³²⁾ の方法に従って抽出し, 前者はオルシノール反応³³⁾, 後者はジフェニールアミン反応により測定した.

10. ミトコンドリアの酵素系に及ぼす抗体の阻害効果:

DAB 肝癌および正常肝ミトコンドリア分画の酵素系に対する阻害効果を調べるために, ミトコンドリア全分画を氷冷しつつ 30 分超音波処理 (大岳式 Sonic Oscillator, 周波数 10KC, 高圧電圧 1,000V, 出力電力 1mA) し, 粗大顆粒を 37,000 \times g, 10 分遠心で除いた上清すなわちミトコンドリア超音波処理分画 (Mt. Sc 分画と略記する) を用いた. また場合によつて, ミトコンドリア全分画も用いた. なおこれら測定に用いた材料はいずれも新鮮なものをを用い, 操作は 0 $^{\circ}$ C でできるだけ敏速に行なうように留意した.

抗血清は抗 DAB ミトコンドリア血清, および抗正

常肝ミトコンドリア血清を用いた. また対照血清には成熟家兎正常血清を用い, 補体として新鮮モルモット血清を使用した. 吸光度の測定は HITACHI Perkin-Elmer 139 UV-Vis Spectrophotometer を用いて行なつた.

なお, 酵素活性阻害効果の測定実験は Davis³³⁾ の方法に準じて行なつた.

(1) NADH oxidase 活性: 蛋白濃度 1mg/ml の Mt-Sc 0.4ml に同量の抗血清を加え, 室温 30 分保温した後, 生食水にとかした 5% ウシ血清 0.4ml を加え, 氷室で 4~5 時間放置する. 生じた沈澱を 37,000 \times g, 10 分遠心して除きその上清 0.1ml を 2.8m の 0.05M リン酸緩衝液 pH 7.6 に加え, キュベットに入れておく, ついで 0.1ml の 3×10^{-3} M NADH をピペットですばやく吹き込み直ちに 340m μ における吸光度を測定し, 以後 1 分間隔で 10 分間測定を行なう. 反応温度は 25 $^{\circ}$ C で行なつた.

(2) NADH cytochrome C reductase および Succinate cytochrome C reductase 活性: Mt-Sc 0.1mg/ml 蛋白量の稀釈液を 0.1ml とり, 抗血清およびモルモット血清をそれぞれ 0.1ml 宛加えてキュベットに入れ室温 10 分間放置する. つぎに 0.045M リン酸緩衝液 pH 7.6, 1×10^{-3} M KCN, 2.6×10^{-5} M Cytochrome C, 1.0×10^{-4} M NADH または 1.7×10^{-2} M コハク酸ソーダの混合液 2.7ml をすばやく上記キュベットに入れ, 550m μ における吸光度の上昇を 1 分間隔で約 10 分間測定した. 測定温度は 25 $^{\circ}$ C とした.

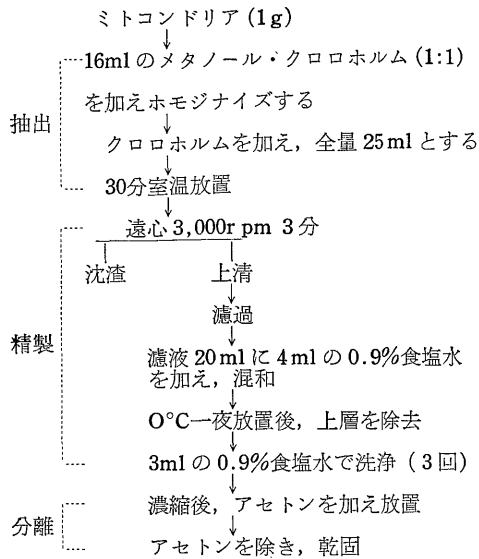
(3) NADH dehydrogenase 活性: Mt-Sc 0.1ml (蛋白量 1mg/ml) に抗血清, モルモット血清を各 0.1ml を加え, さらに電子受容体として 3.3×10^{-4} M K₃Fe(CN)₆ を 0.1ml 加え室温で 10 分間放置する. つぎに 1×10^{-4} M NADH, 1×10^{-3} M KCN, 0.045 M リン酸緩衝液 pH 7.6 の混合液を 3ml 加えた後, 直ちに 340m μ における吸光度を 1 分間隔で 10 分測定した. 測定温度は室温 25 $^{\circ}$ C とした.

(4) Succinic dehydrogenase 活性: 蛋白濃度 0.1mg/ml に稀釈したミトコンドリア全分画 Mt-w を 0.1ml とり, これに抗血清, およびモルモット血清を各 0.1ml 加え, 室温に 10 分放置後, 1.3×10^{-2} M succinate, 1.0×10^{-3} M K₃Fe(CN)₆, 1.0×10^{-2} M KCN, 0.045M リン酸緩衝液 pH 7.6 の混合液を 3ml 加えて, 直ちに室温 25 $^{\circ}$ C で 10 分間, 1 分間隔で 400m μ における吸光度を測定した.

10. 組織学的検索:

組織学的検索にはホルマリン固定, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色を行なつた.

表3 : リン脂質(ミトコンドリア分画)の抽出法



電子顕微鏡の検索には、2%オスミウム酸緩衝液³⁴⁾に2時間固定し、エタノール段階濃度列で各10分ずつ脱水後、ステレンまたはエポン包埋³⁵⁾を行ないPb染色を施し、日立HU-II型電子顕微鏡で撮影した。

11. ミトコンドリアのリン脂質分画の定量：

正常肝、DAB投与後3カ月肝、およびDAB肝癌組織のミトコンドリアからリン脂質を抽出し、各分画の定量を行なつて比較した。

(1) リン脂質抽出：抽出には、Sperry³⁶⁾の変法(表3)を用いた。すなわち1gのミトコンドリアに8mlのメタノールと同量のクロロホルムを加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて全量を25mlとしてよく混和し、30分間室温で放置後、3,000回転3分間遠心、濾過する。この濾液20mlに0.9%食塩水4mlを加えてよく混和する。0°C一夜放置後上層をピペットで除き、3mlの0.9%食塩水(あらかじめ4~5倍量のクロロホルム：エタノール2：1で飽和しておく)で3回洗浄する。この精製下層液を減圧濃縮し、5倍以上のアセトンを加えてしばらく放置後、アセトンを傾斜して除去し完全に乾固してからクロロホルム1mlを加え、リン脂質をとかし、薄層クロマトグラフィーにかける試料とした。

(2) 薄層クロマトグラフィー：Skipski³⁷⁾の方法に準じて行なつた。Wako-gel B-O, 20gを0.001M Na₂CO₃45mlと混和し、20×20cmのガラス板に0.5mmの厚さにのぼし、1時間室温放置後、110°C 1時間活性化し、冷却後試料をスポットする。展開溶媒は

クロロホルム：メタノール：酢酸：水=50：25：7：3を用いた。原点から約10cm展開後(45~60分)、ヨウ素の蒸気にさらした。

(3) リン脂質の定量：薄層クロマトグラフ上の各リン脂質の位置を検出し、各部分のシリカゲルを注意してかきとつて分解瓶にうつし、70%過塩素酸0.4mlを加え、30分加熱し灰化する。冷却後2mlの水を加え、沸騰水浴中で10分加熱した後再び冷却し、Wagner³⁸⁾法でリン酸の定量を行なつた。

なお、P量を計算するに先立ち、盲値値に補正を加えた。正しい盲値値 Eber は次式で与えられる³⁹⁾。

$$Eber = \frac{E_1 \times g_x}{g_1}$$

E₁：リン脂質を含まないシリカゲルについて得られた吸光度。

g_x：リン脂質の部分のシリカゲルの量。

g₁：リン脂質を含まない部分のシリカゲルの量。

検体の真の吸光度 Eabs は測定値 Egem から Eber を引いて得られる。

$$Eabs = Egem - Eber$$

実験結果

1. DAB 肝癌の組織学的検索：

ラット正常肝、DAB 肝癌および発癌過程における肝の組織学的変化を光学顕微鏡と電子顕微鏡で検討した。

DAB 肝癌組織についての検索は、正常肝組織と対比して、すでに森田⁴⁰⁾が報告しているので、ここではとくにDAB 肝癌の非腫瘍部分の肝(DAB投与後3カ月のラット肝の非腫瘍部)についての検索所見を補遺する。

(1) 光顕所見：肝小葉はグリッソン氏鞘より発する不規則な太さの線維化によつて細分改築されている。その線維組織は線維芽球に富み、比較的若い線維組織であることを示す。ごく軽度のリンパ球および形質細胞の浸潤がそれに伴う。グリッソン氏鞘内の細胆管は軽度の増生を示す。門脈枝は拡張・充血するものが多い。肝小葉内に多数の小島状の壊死巣が散在しその大きさは割面において肝細胞の20~30個に相当する。小壊死数の大部分は網状に融解し、一部に初期の線維化を示し、軽度の好中球ならびにリンパ球の浸潤を伴う。小壊死巣に接する肝細胞は胞体がエオジンに好染する変性を示す。またそれ以外の部分の肝細胞でも胞体のエオジンに好染するもの、およびそれに核の濃縮・融解・淡染などを伴うものが散在する。このような細胞よ残りの比較的变化の少ない肝細胞との比はおよそ1:50以上である。残りの肝細胞は胞体の腫大

したものが多く、一部は明らかな小泡状変性を示す。そのため附近の類洞は狭窄し、他方腫脹の著るしくない所は拡張している。このため肝細胞の排列は一見乱れているように見えるが、肝細胞相互間の粘着性は失われていない。Kupffer 星細胞についてはとくに著変を認めない。

肝細胞核はかなりの大小不同を示し、著明な核小体と軽度の核膜肥厚を示し、まれに2核のものを含んでいる。特記すべきことは肝細胞核の分裂が比較的多いえとで、その頻度は対物鏡10倍の1視野中1~2個である。Disse 腔、類洞の血管内皮、肝細胞基底膜および類洞内赤血球には著変を認めない。

以上、この時期における DAB 担癌肝の非腫瘍部分の特徴的所見は DAB による巣状壊死を頂点とし、散在性の細胞体の好酸性変性等を伴う変性効果とそれの修復機転としての線維増生および肝細胞核の著明な分裂像の増加によつて代表される再生現象として把握できる。

(2) 電顕所見：DAB 投与後3カ月の肝および DAB 肝癌のミトコンドリアの変化を正常肝ミトコンドリアとの対比において検索した。DAB 投与後3カ月の肝のミトコンドリアには正常肝ミトコンドリアと比較して著明な変化はみられなかつた。しかし注意してみると軽度の膨化を示すものがあり、DAB 肝癌では明らかな膨化、変形がみられた。その数も減少する傾向がみられ、Cristae は漸次減少し辺縁に不整な配列をとる傾向が認められた。これらの所見を光顕写真と共に写真(1,2,3)に示す。

2. ミトコンドリア分画の吟味：

ミトコンドリア分画の抗原分析を行なう場合、まず問題となるのはミトコンドリア分画における他の細胞構成成分の contamination である。著者の用いた Hogeboom-Schneider 法はラッテ正常肝についての

分画法であるから、同様な操作がそのまま癌組織の分画に適用され得るか否かを確かめる必要があつた。

そこで著者は DAB 肝癌と正常肝から上記分画に従つて核、ミトコンドリア、ミクロゾームおよび細胞上清を分離し、各分画の化学的分析、電子顕微鏡の検索およびヤースグリーン・ミトコンドリア染色等を行なつた。

細胞分画の化学的分析結果は表4に示した。細胞の全DNAの95~97%が核分画(700×g, 10分沈渣)にあり、0.6~0.4%がミトコンドリア分画(5,000×g, 20分遠心沈渣)にみられた。RNAについては、11~13%が核分画に、7~5%がミトコンドリア分画、54~52%がミクロゾーム分画(105,000×g, 90分遠心沈渣)に、23~28%細胞上清分画にみられた。

つぎに、5,000×g, 20分遠心沈渣と8,000×g, 20分の沈渣について電顕の検索を行なつてみると両分画ともに大型ミトコンドリアがみられ他の細胞成分の混入はほとんど認められなかつた。10,000×g, 20分および13,000×g, 20分沈渣では、大型および小型ミトコンドリアが混在し、粗面小胞体や遊離のリボゾーム、細線維などの混入がわずかにみられた。15,000×g, 20分沈渣分画は、ほとんど小型ミトコンドリアによつてしめられ、また他の分画成分の混入が著明に認められた。以上の結果は5,000×g~8,000×g, 20分遠心沈渣部分をミトコンドリア分画として使用することが最も適当であることを物語つているので、以後の実験にはこの分画を使用することにした(写真4)。

3. DAB肝癌ミトコンドリアの抗原分析：

使用した試験抗原は次のように略記する。

D·Mt……DAB肝癌ミトコンドリア分画。

D·Mt·S…D·Mt の DOC の可溶分画。

D·Mt·ir…D·Mt の DOC 不溶分画(succinilationにより溶解)

表 4：細胞分画の化学的分析
(ホモジネート各分画に対する%)

細胞分画	蛋白質量(%)		DNA (%)		RNA (%)	
	N	D	N	D	N	D
核：700×g, 10分沈渣	15.4	13.7	97.3	95.8	13.4	11.7
ミトコンドリア：5000×g, 20分沈渣	16.3	15.6	0.4	0.6	5.2	7.1
ミクロゾーム：105,000×g, 90分沈渣	28.4	35.1	0.6	1.3	52.3	53.8
上清：105,000×g, 90分上清	31.9	28.6	0.9	1.8	28.8	24.6

N：正常ラッテ肝，D：DAB肝癌

D・Mt・i₂…D・Mt の DOC 不溶分画 (凍結融解して可溶化).

D・P₁-I…D・Mt・S を DEAE カラムクロマトにかけ、0.1MKCl-0.035M トリス緩衝液で溶出される分画のピーク I.

D・P₁-II II…前記溶出分画のピーク II.

N・Mt ……正常肝ミトコンドリア分画.

N・Mt・S ……N・Mt の DOC 可溶分画.

N・Mt・i₁…N・Mt の DOC 不溶分画 (succinilation により溶解).

N・Mt・i₂…N・Mt の DOC 不溶分画 (凍結融解により可溶化).

N・P₁ ……N・Mt・S の DEAE カラムクロマトによる 0.1M KCl-0.035M トリス緩衝液で溶出される分画.

使用した抗血清は次のように略記する.

抗D・Mt…D・Mt に対する抗血清.

抗D・Mt・S…D・Mt・S に対する抗血清.

抗D・Mt-N…抗D・Mt を N・Mt・S で吸収した吸収抗血清.

抗D・Mt・S-N…抗D・Mt・S を N・Mt・S で吸収した吸収抗血清.

(1) 寒天内免疫二重拡散法 : Ouchterlony法を行ない、D・Mt・S と N・Mt・S の抗原組成の差異を比較した結果、注目すべき点は癌抗原 (D・Mt・S) に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 D・Mt に対して D・Mt・S とを反応させると N・Mt・S 両者の間に 4~5本の共通沈降線がみられるが、それ以外にD・Mt・Sに2~3本の非癌にない沈降線が得られた (図1e)。抗D・Mt-Nを用いれば D・Mt・S は特徴的な2本の沈降線のみを示す (図1f)。さらに抗D・Mt・Sおよび抗D・Mt・S-Nを用い同様な実験を行なったが、結果はまったく同様であった (図1a,b,c,d)。この癌に特徴的な抗原をそれぞれ "a-抗原", "b-抗原" と仮称する。

(2) 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による各抗原蛋白の分画パターンは図2に示すとおり、0.1M KCl-トリス緩衝液で溶出すると、D・Mt・S, N・Mt・S ともに2つのピークを示したが、P₁-IIのピークにおいてD・P₁-IIがN・P₁-IIより著しい増量を示した。以後の各溶出段階のピークを図2のようにそれぞれ P₂~P₅ と名付けると、それらは癌、非癌との間に差を示さず、P₆ 分画 (260 mμ吸光度) は D・P₆ が N・P₆ にくらべ高いピークを示した。この分画はオルシノール反応陽性、ジフェニールアミン反応陰性である。

図1: DOC 肝癌ミトコンドリア DOC 可溶分画のゲル内沈降反応

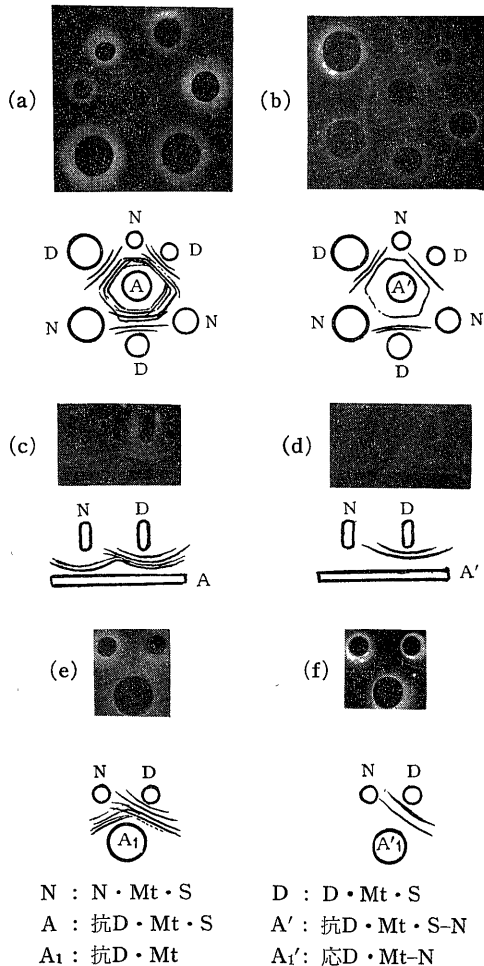


図2: DAB 肝癌および正常ラット肝ミトコンドリア DOC 可溶分画の DEAE カラムクロマトグラフィーによる分画

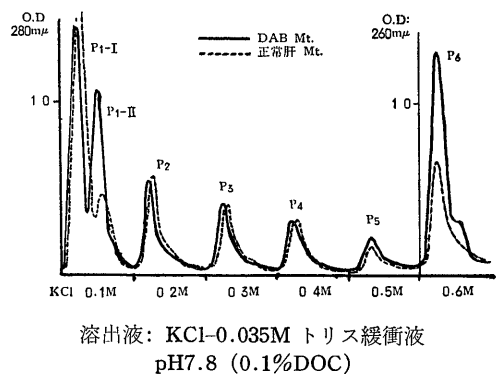
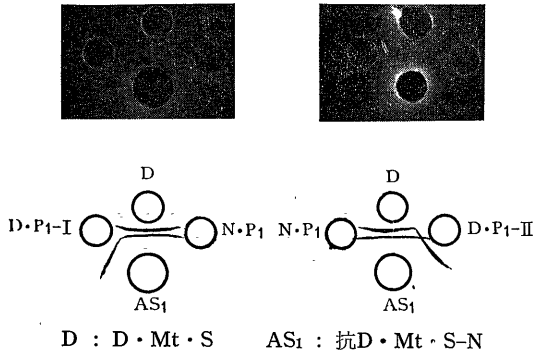


図3: DEAE カラムクロマトグラフィーによる
DAB 肝癌ミトコンドリア DOC 可溶分画

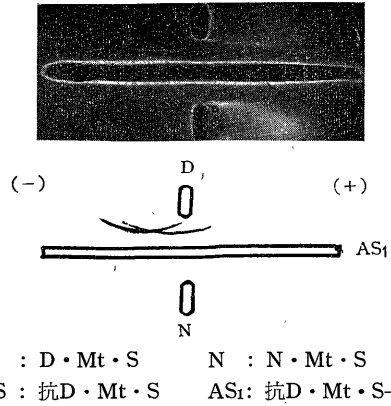
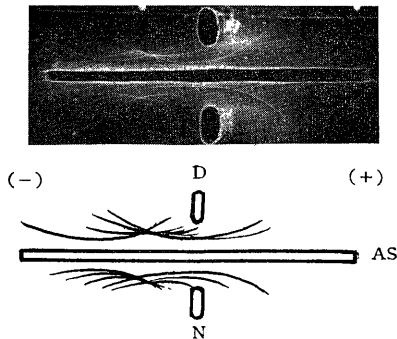


各分画を抗原として免疫二重拡散法により抗 D·Mt·S と反応させると、D·P₁ 分画 (D·P₁-I および II) に 3 本の沈降線を示し、N·P₁ 分画は 2 本の沈降線を示したが、そのうち 1 本は共通沈降線であり前者の 2 本と後者の 1 本は無関係であった。抗 D·Mt·S-N を用いると、共通沈降線と N·P₁ の 1 本は消失し、癌抗原の方に 2 本の沈降線が残ったが、そのうち 1 本は D·P₁-I 分画に、他の 1 本は D·P₁-II 分画に、存在するものであった (図 3)。また D·P₂, D·P₃ および N·P₂, N·P₃ 分画を抗 D·Mt·S と反応させても 1~2 本の沈降線が得られたが、抗 D·Mt·S-N を用いるとこれらの沈降線は認められなかった。

この結果、癌特徴的抗原は DEAE カラムクロマトグラフィーによる P₁ 分画に存在し、前記“a-抗原”は D·P₁-I 分画に、“b-抗原”は D·P₁-II 分画に存在することが明らかとなった。

(3) 免疫電気泳動 (IEP) : D·Mt·S と N·Mt·S について IEP を行なった。その結果 “a-抗原” および抗 “b-原” は、それぞれ血清の β₁-グロブリン位、β₂-グロブリン位に相当する泳動度を示した (図 4)。

図 4 : DAB 肝癌ミトコンドリア DOC 可溶分画の免疫電気泳動

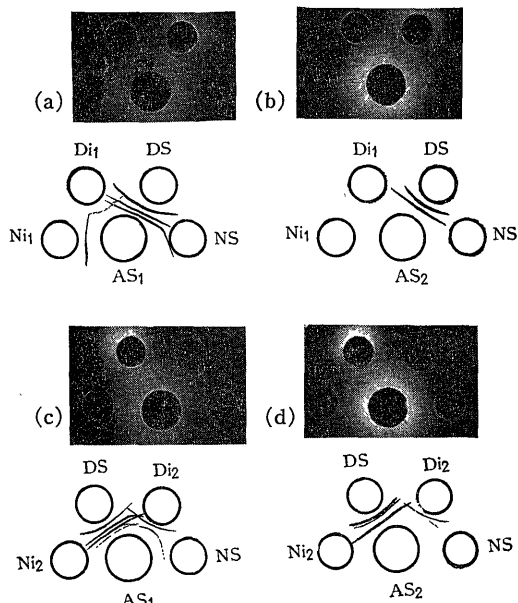


(4) “a-抗原” および “b-抗原” の性格 : この癌特徴的因子と思われる 2 つの抗原について、pH, 熱安定性および染色性などの検討を行なった。“a-抗原”は pH 5.4 附近で沈澱する蛋白で、50°C, 10 分の加熱で抗原性を失なつて沈降反応を示さなくなり、また α-naphthol-p-phenyldiamine 染色²⁶⁾ は陽性であったが Sudan black B 染色²⁷⁾ は陰性であった。一方 “b-抗原” は pH 5.6 附近で沈澱し、70°C, 10 分の加熱により抗原性を示さなくなつた。また上記糖染色およびリピン染色共に陽性を示した。

つぎに DOC 可溶分画に見出された “a-抗原” および “b-抗原” が DOC 不溶分画に存在するか否かを検討するために、DOC 不溶分画に succinilation および凍結融解処理を施した。Succinilation による D·Mt·i₁ 分画に対して抗 D·Mt-N を反応させると 1 本の hase な沈降線がみられた (図 5a) しかし 抗 D·Mt-N を N·Mt·i₁ で吸収するとこれらの沈降線は消失し (図 5b), “a-抗原”, “b-抗原” に相当するものは認めなかった。凍結融解による D·Mt·i₂ 分画を用いると、D·Mt·S と共通な沈降線以外に D·Mt·i₂ に特徴的な 1 本の沈降線が認められた (図 5c)。抗血清を N·Mt·i₂ で吸収すると D·Mt·i₂ に D·Mt·S, N·Mt·i₂ にみられない 1 本の沈降線が得られたが、“a-抗原” および “b-抗原” とはいずれも関係がなかつた。以上の結果からみると、DOC 可溶分画に認められた “a-抗原” “b-抗原” は DOC 不溶分画には存在せず、一方、DOC 不溶分画には抗原組成上異なる癌特徴因子の存在が示されたことになる。(図 5d)

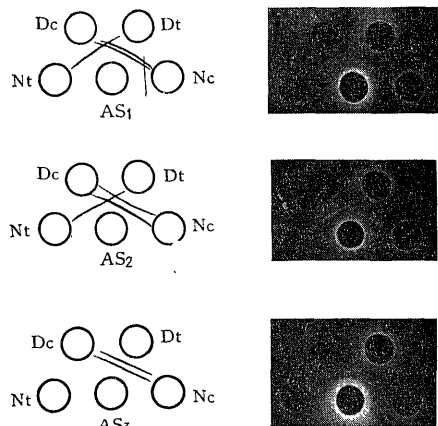
(5) “a-抗原” および “b-抗原” の細胞内分布 : DAB 肝癌および正常肝のマイクロゾーム DOC 可溶分画、核上清、細胞上清中における “a-抗原”, “b-抗原” の存否を検討した。各分画を蛋白量 17mg/ml とし、抗血清は抗 D·Mt·S および抗 D·Mt·S-N を用

図5: DAB肝癌ミトコンドリア DOC 可溶分画と不溶分画の比較



Ds : D·Mt·S Ns : N·Mt·S
 Di₂ : D·Mt·i の凍結融解による可溶化
 Ni₂ : N·Mt·i の凍結融解による可溶化
 Di₁ : D·Mt·i の succinilation による可溶化
 Ni₁ : N·Mt·i の succinilation による可溶化
 AS₁ : 抗D·Mt·S-N
 AS₂ : AS₁ を Ni₁ で吸収
 AS₁' : AS₁ を Ni₂ で吸収

図6: DAB肝癌ミトコンドリア分画とDAB肝癌マイクロゾーム分画の比較

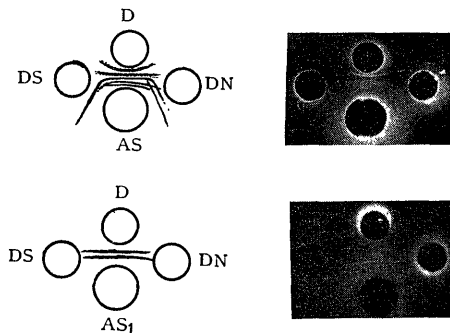


Dt : D·Mt·S Nt : N·Mt·S
 Dc : DAB肝癌マイクロゾーム DOC 可溶分画
 Nc : 正常肝マイクロゾーム DOC 可溶分画
 AS₁ : 抗D·Mt·S-N AS₂ : AS₁ を Nc で吸収
 AS₂ : AS₁ を Nc および Dc で吸収

い、寒天内免疫二重拡散法を行なった。DAB肝癌マイクロゾーム DOC可溶分画は抗D·Mt·S-Nとの反応で1本の正常(ミトコンドリアおよびマイクロゾーム)にない沈降線を示すが、“a-抗原”および“b-抗原”の沈降線とはいずれも同定または交叉反応を示さず、吸収実験によつて両者の関係のないことが確かめられた(図6)。また抗DAB肝癌マイクロゾーム血清およびその吸収抗血清を用いて同様な実験を行なったが、肝癌マイクロゾーム DOC 可溶分画に特徴的な抗原因子は“a-抗原”、“b-抗原”と共通性が認められなかった。

DAB肝癌の核上清と細胞上清は抗D·Mt·Sに対してD·Mt·Sと共通な1~2本の沈降線を示したが、“a-抗原”、“b-抗原”は含んでいないことが明らかとなった(図7)。

図7: DAB肝癌ミトコンドリア分画とDAB肝癌核上清および細胞上清との比較

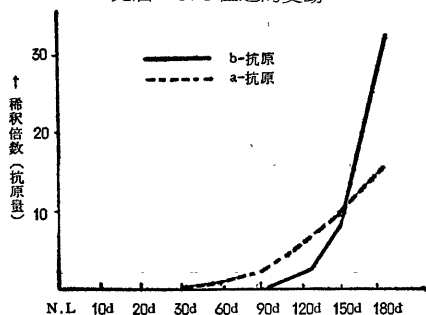


D : D·Mt·S
 DS : DAB肝癌細胞上清
 DN : DAB肝癌核上清
 AS : 抗D·Mt·S
 AS₁ : 抗D·Mt·S-NをDSおよびDNで吸収

以上の実験結果より、“a-抗原”および“b-抗原”はミトコンドリア以外のいずれの分画にも存在が認められず、D·Mt·S分画に特徴的な抗原因子であることが確かめられた。

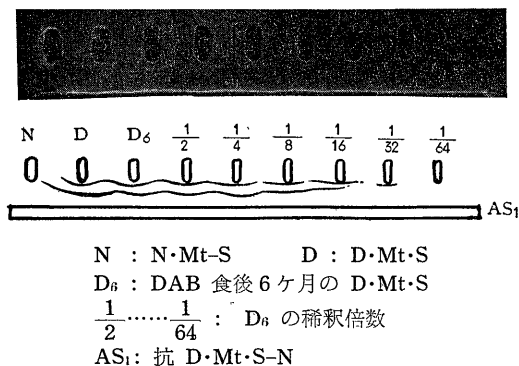
(6) 発癌過程における特異抗原の消長 : DAB投与後10, 20, 60, 90, 120, 150, 180日目のラット肝のMt·S分画を試験抗原とし、抗D·Mt·S-Nを用い“a-抗原”、“b-抗原”の発癌過程における消長を寒天内二重拡散法で半定量的に検討した。抗原蛋白量を15mg/mlとし、これの2倍希釈抗原と上記抗血清を反応させ“a-抗原”、“b-抗原”による特異沈降線を認め得る最高の希釈倍数をもつて抗原量とした(図8a, 8b)定型的な実験列で“a-抗原”は30日頃より出現し(沈降価1), 60日で2, 90日で4, 150日で

図8a: “a-抗原”, “b-抗原” の DAB 発癌による経過的変動



N.L. : N・Mt・S
10d, 20d : DAB 食後10日, 20日……の D・Mt・S

図8b: “a-抗原”, “b-抗原” のゲル内拡散法による定量



8, 180日目に16倍となつた。“b-抗原”は90日目頃現われ, 150日目頃より急激に増加し16倍, 180日で32倍となつた。

以上の結果より, “a-抗原”は DAB食後1カ月頃より現われ時期的経過に従い漸次増量を示すのに対して, “b-抗原”は3カ月前後すなわち発癌時期より癌化の進む5カ月後半にかけて急激に増加するらしいことが判つた。

(7) 再生肝ミトコンドリアにおける特異抗原: 再生肝ミトコンドリア DOC 可溶分画における “a-抗原”, “b-抗原” の有無を検討した。抗 D・Mt との反応では再生肝に正常と共通な3~4本の沈降線以外に1本の正常にない沈降線が認められた。この沈降線は “a-抗原” による沈降線と交叉反応を示し, 共通抗原決定基の存在を示唆したが, “b-抗原” とは無関係であつた(図9)。

(8) 正常臓器ミトコンドリアにおける特異抗の検討: 正常成熟ラットの腎, 脾, 肺, 心, 脳, 骨格筋より分画したミトコンドリア DOC 可溶分画, および正

常ラット血清, DABラット血清を試験抗原とし, “a-抗原”, “b-抗原” と共通因子の存在を調べた結果, 脾, 肺にはわずかに “a-抗原” と交叉反応を示す因子が存在したが, その他の臓器および血清中には全く共通因子は認められなかつた。また “b-抗原” との共通因子はいずれの臓器分画にも存在しなかつた。

(9) 腹水肝癌の抗原組成との比較: ラット腹水肝癌のうち AH127, AH66F のミトコンドリア DOC 可溶分画の抗原組成を “a-抗原”, “b-抗原” と比較検討した。AH127には “a-抗原” とわずかに交叉反応を示し, 共通の抗原決定基の存在を示唆したが, AH66F には存在せず, “b-抗原” はAH127, AH66F のミトコンドリア分画のいずれにも存在しなかつた(図10)。

4. DAB肝癌および正常肝ミトコンドリア酵素系におよぼす抗体の影響:

ミトコンドリアの酵素系のうち以下のものについて癌および正常肝ミトコンドリア血清を用いて抗原・抗体反応を起させ, 各酵素活性におよぼす抗体の阻害

図9: DAB 肝癌ミトコンドリア分画と再生肝ミトコンドリア分画の比較

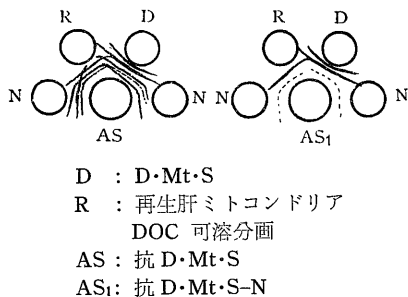


図10: DAB 肝癌ミトコンドリアと AH127, AH66F ミトコンドリア抗原組成の比較

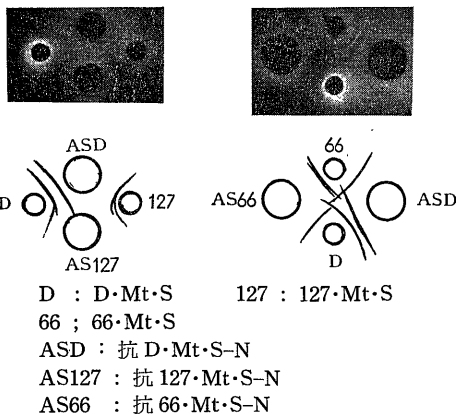


図11： ミトコンドリア酵素活性に及ぼす抗体の影響

(a) NADH oxidase 活性
 正常肝ミトコンドリア SC 分画 DAB 肝癌ミトコンドリア SC 分画
 —●—●— 抗 DAB・Mt 血清添加 …×…×… 抗正常・Mt 血清添加 —○—○— 正常家兎血清添加

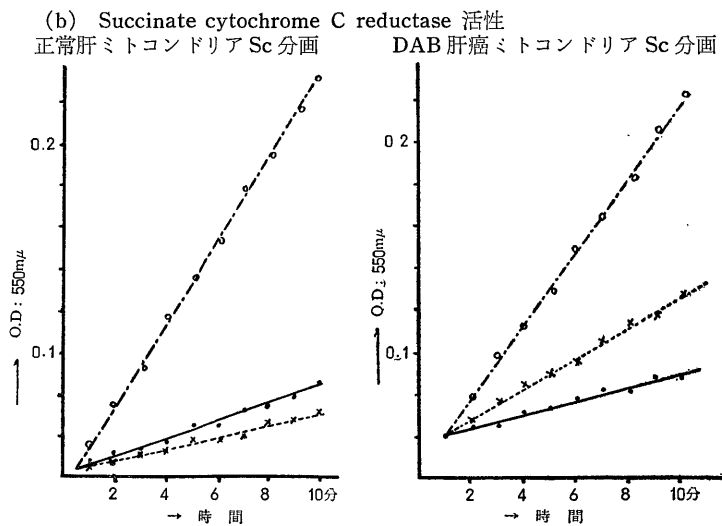
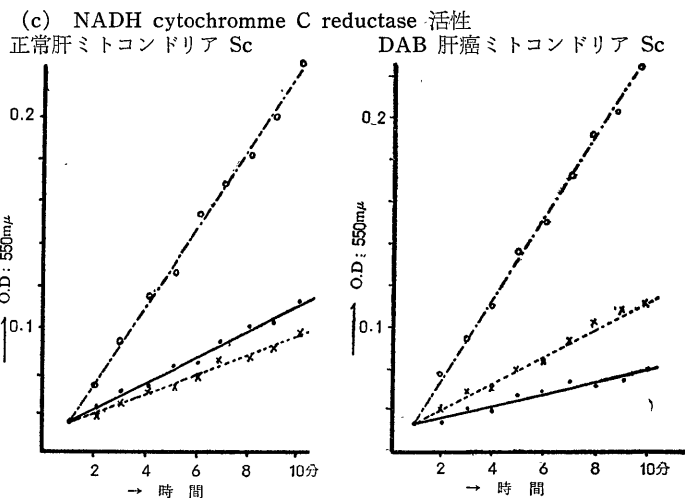
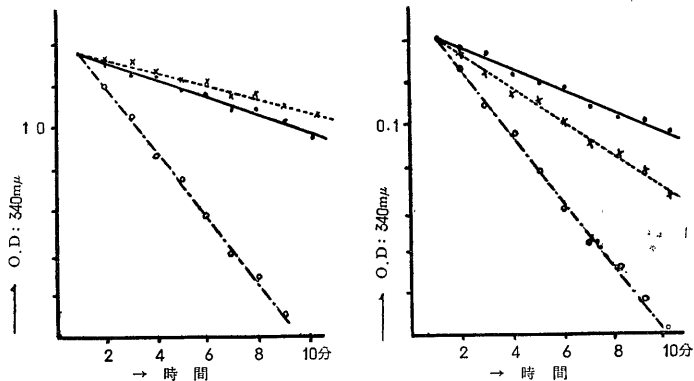


表 5 : DAB 肝癌および正常肝ミトコンドリア酵素活性に及ぼす抗体の阻害効果

酵 素 系		阻 害 率 (%)							
		抗 血 清							
		抗DABミトコンドリア血清				抗正常ミトコンドリア血清			
	1	2	3	平均	1	2	3	平均	
NADH oxidase	D・Sc	80	75	68	74	49	52	43	48
	N・Sc	71	67	66	68	74	74	68	72
NADH cytochrome C reductase	D・Sc	84	91	89	88	69	66	63	66
	N・Sc	64	69	68	67	70	74	69	72
Succinate cytochrome C reductase	D・Sc	86	82	81	83	66	66	62	64
	N・Sc	80	81	74	78	83	85	78	82
NADH dehydrogenase	D・Sc	6	4	2	4	5	3	1	3
	N・Sc	13	9	14	12	18	13	17	16
Succinic dehydrogenase	D・W	12	10	8	10	9	6	6	7
	N・W	13	12	10	11	22	24	25	23

D・SC: DAB 肝癌ミトコンドリア超音波処理顆粒 D・W: DAB 肝癌ミトコンドリア顆粒
 N・SC: 正常肝ミトコンドリア超音波処理顆粒 N・W: 正常肝ミトコンドリア顆粒

表 6 : 発癌過程におけるミトコンドリア・リン脂質各分画の比較

分 画	Rf	N (%)			C (%)			D (%)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
lysophosphatidyl choline	0.09	3.22	2.98	3.40	3.13	2.99	3.34	7.00	9.45	11.23
sphingomyelin	0.18	3.61	3.24	3.16	4.52	3.32	3.84	8.64	11.33	11.94
phosphatidyl choline	0.33	52.20	51.00	50.80	53.90	51.50	55.00	51.40	49.70	48.00
phosphatidyl serine	0.47	8.47	8.71	9.12	9.60	10.03	8.00	11.46	10.62	11.94
phosphatidyl ethanolamine	0.76	32.50	33.80	33.60	28.80	31.90	29.70	21.50	18.90	16.90

N: 正常ミトコンドリア C: 肝硬変ミトコンドリア D: DAB 肝癌ミトコンドリア

効果を検討した。すなわちミトコンドリア (D・Mt, N・Mt) およびミトコンドリア超音波処理を加えたもの (D・Mt・SC および N・Mt・SC) に対して抗D・Mt, 抗N・Mtを加え酵素活性を測定した。なお正常家兎血清を加えたものを対照とした。

阻害効果は吸光度の変化 (反応開始時の吸光度と反応停止時の O.Dとの差) を正常血清添加液と抗ミトコンドリア血清添加液とで比較した。すなわち、

$$\text{阻害効果率(\%)} = \frac{|A-N|}{N}$$

N : 正常血清添加液の吸光度の変化。
 A : 抗血清添加液の O.D の変化。
 なお測定はいずれも異なったミトコンドリア標本を

用い3回くりかえした。その結果は表5および図11a,b,c のとおりである。

すなわち、D・Mt・S分画の NADH oxidase活性、NADH cytochrome C reductase 活性および succinate cytochrome C reductase 活性についてみると、抗D・Mtは一般に抗N・Mtより強い阻害度を示すが、N・Mt・SCの上記酵素に対しては抗血清は全般に高い阻害率を示すにもかかわらず抗D・Mtと抗N・Mtの間にあまり差が認められなかった。また NADH dehydrogenase 活性と succinic dehydrogenase 活性については、抗血清による阻害効果は微弱であり、抗 D・Mt と抗N・Mt の間にも有意の差はみられなかった。

5. DAB発癌過程におけるミトコンドリアのリン脂質の比較.

正常ラット肝, DAB 投与後3カ月目ラット肝およびDAB肝癌組織のミトコンドリアからリン脂質を抽出し, 薄層クロマトグラフィーで展開分離しそれぞれのリン脂質を定量して百分率を求め, 比較検討を加えた. その結果は表6に示すごとく, lysophosphatidyl cholineは漸次増量を示し, sphingomyelineでは発癌経過と共に増し, phosphatidyl cholineはあまり変動を示さず, phosphatidyl serineは漸次増加を示すが phosphatidyl ethanolamineでは逆に発癌に伴い減少の傾向を示した.

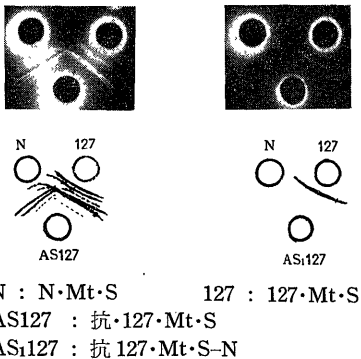
6. 腹水肝癌ミトコンドリア分画の抗原分析: 腹水肝癌としてAH127, AH66Fを用い, そのミトコンドリアDOC可溶分画について免疫化学的方法で検討を加えた. ここで用いた試験抗原および抗血清はDAB肝癌ミトコンドリアにおける場合と同様に以下のように略記した. 例えば, 66・Mt (AH66Fミトコンドリア分画), 抗66・Mt・S (66・Mt・Sに対する抗血清)のごとくである.

(1) 抗原組成の特徴: ゲル拡散法では, 抗127・Mt・Sに対し127・Mt・SとN・Mt・Sとは3~4本の共通沈降線をつくるが, そのほかに127・Mt・Sに1~2本の正常にみられない沈降線が認められた. 抗127・Mt・S-Nで共通沈降線を除くと, 127・Mt・S側に1本の吸収されない特異的な沈降線が残った(図12).

66・Mt・Sに関しても同様な反応を行ない, 図13に示すように抗66・Mt・S-Nに対して66・Mt・Sに2本の正常にない特異沈降線が得られた.

免疫電気泳動による検索では, 127・Mt・Sの特異沈降線は陰極側にみられ, また66・Mt・Sの2本の特異沈降線のうち1本は原点付近でほとんど泳動を示さず1本陰極側に泳動した(図14).

図12: AH127ミトコンドリアDOC可溶分画のゲル内沈降反応



DEAE 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, 127・Mt・Sでは図15にみられるようにP₀分画は1つのピークを示し, P₁分画ではN・P₁が1峰性であるのに対して127・P₁-I, 127・P₁-II

図13: AH66FミトコンドリアDOC可溶分画のゲル内沈降反応

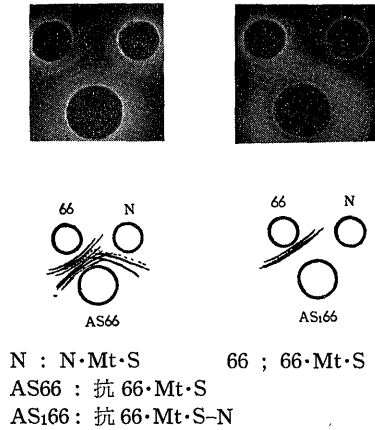


図14: AH127およびAH66FミトコンドリアDOC可溶分画の免疫電気泳動

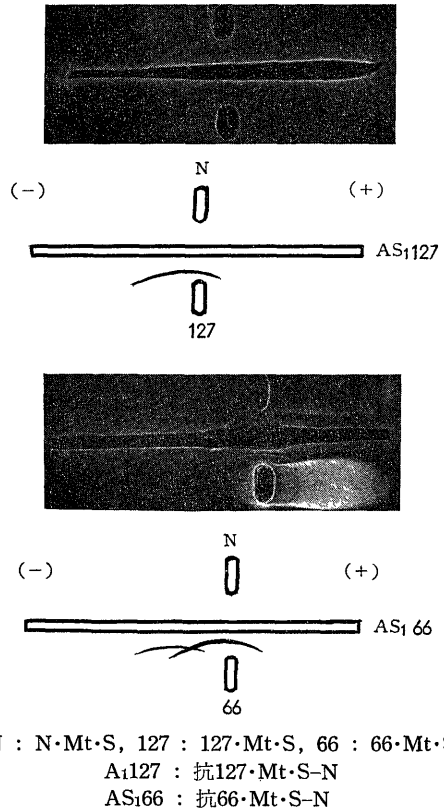
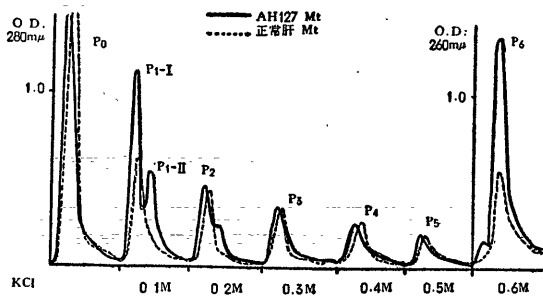
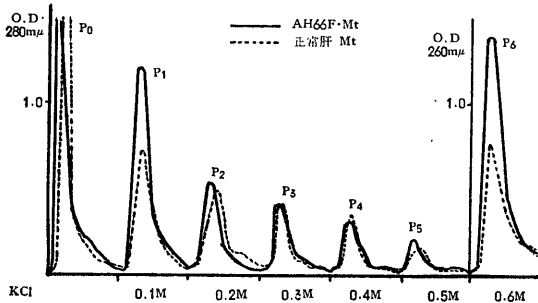


図15: AH127 および正常ラット肝ミトコンドリア DOC 可溶分画の DEAE カラムクロマトグラフィー分画



溶出液: KCl-0.035M トリス緩衝液 pH7.8 (0.1%DOC)

図16: AH66F, および正常ラット肝ミトコンドリア DOC 可溶分画の DEAE カラムクロマトグラフィ分画パターン



溶出液: KCl-トリス緩衝液 pH7.8 (0.1%DOC)

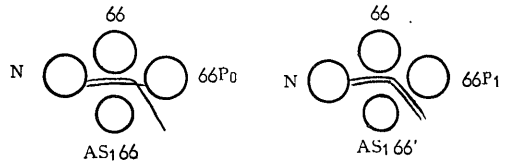
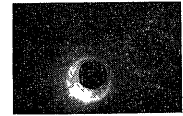
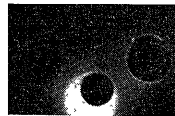
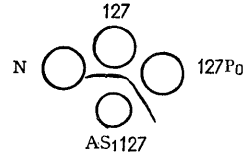
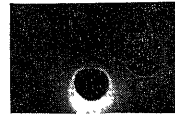
の2峰性で且つ N・P₁より著しく高いピークを示した。以下P₂…P₆分画では正常パターンと差はなく、P₆分画は 127・Mt・SがN・Mt・Sよりも著しく高い吸光値を示した。

66・Mt・Sの分画パターン(図16)ではいずれの分画も1峰性で、66・P₁、66・P₆の2分画において正常にくらべて著明に高いピークがみられた。

そこで各分画を試験抗原として、ゲル内拡散法で吸収抗血清と反応させると、127・Mt・S特異的抗原は P₀分画にみられ、66・Mt・S特異抗原のうち1つはP₆分画に、1つはP₁分画に存在した(図17)。

(2) 127・Mt および 66・Mt の特異抗原の性格: 各特異抗原組成の pH, 耐熱性, 染色性について検討した結果、127・Mt・S特異抗原は pH5.4可溶性で40°C, 10分, pH7.8では60°C, 10分の加熱で抗原性を失う。66・Mt・S特異抗原のうち1つはpH5.0可溶性で50°C, 10分加熱により抗原性を失い、1つはpH5.6可溶性、熱に対しては70°C 10分で抗原性を失う蛋白であつ

図17: DEAE カラムクロマトグラフィーによる AH127 および AH66F ミトコンドリア DOC 可溶分画



127: 127・Mt・S 66: 66・Mt・S N: N・Mt・S
AS127: 抗127・Mt・S-N AS166: 抗66・Mt・S-N

た。また、染色性では27・Mt・Sおよび66・Mt・S特異沈降線ともに α-naphthol-p-phenyldiamine 糖蛋白染色²⁸⁾に陽性であり、Sudan black²⁷⁾ Bリピン染色ではB127・Mt・S特異抗原は陽性を示し、66・Mt・S特異抗原のうち1つは陽性、他方は陰性であつた。

考 察

癌の変異、とくにその抗原特異性をゲル内免疫二重拡散法、免疫電気泳動法、補体結合反応、蛍光抗体法などの免疫化学的分析法を用いて検索しようとする試みが最近きわめて盛んになつてきた。これらはいずれも発癌に伴う特異蛋白の loss あるいはgainを問題としている。実験癌に関しては例えば、Green⁴⁰⁾、Butenandt⁴¹⁾、Weiler^{42) 43)}らは発癌による正常臓器特異抗原の減弱、または消失に意義を認め、癌細胞に特異な抗原の存在は疑わしいとの見解をとっている。また須山、Nace^{44) 45) 46)}はLuckie腎癌を使用してリゾチーム活性のある塩基性蛋白の消失を指摘している。

これらはいずれも癌化に伴い正常細胞中に含まれるある種の抗原がそう失する、すなわち細胞内の抗原構造の **simplification** を意味するものと考えられる。一方、特異抗原の存在を主張する研究者も多い。Revesz⁴⁷⁾, Prehn⁴⁸⁾, Klein⁴⁹⁾ らは人為発生癌に新しい抗原の獲得があることを認めているし、Zilber⁵⁰⁾, Gelstein⁵¹⁾ らもアナフィラキシー反応を利用して **o-aminoozotoluene** で発生させた肝癌に正常肝その他正常臓器にはない抗原があることを指摘している。また教室の石川・高柳⁵²⁾⁵³⁾ らは DAB 肝癌について発癌過程の進行と共に肝組織蛋白が転換して正常組織にない異常抗原があらわれ、担癌ラットの流血中にもその一部がみられることを示唆している。武田⁵⁴⁾ は腫瘍特異抗原の存在をラット腫瘍について示し、Rapport⁵⁵⁾ はラット肉腫を、Gusev⁵⁶⁾ はビールス性腫瘍である Rous-Sarcoma を用いてそれぞれ癌特異抗原の存在を指摘している。

また人癌に関しては、Korngold⁵⁷⁾⁵⁸⁾, Messineo⁵⁹⁾, Calvalho⁶⁰⁾, 平井⁶¹⁾, 板倉⁶²⁾ らの報告があり、いずれも癌特異抗原の存在を暗示する結果を得ている。教室においても、石川⁶³⁾ らは癌患者の血清中に正常と異なる α_2 -gl. 位の糖蛋白の出現を示し、荒川⁶⁴⁾ は胃癌組織中に正常にない耐熱性の一糖蛋白の存在を明らかにした。また松井⁶⁵⁾ は癌尿中に特異蛋白の存在を認めている。

これら特異抗原の細胞内局在性に関しては、細胞分画法の進歩により、近年さかんに検討されるようになってきた。例えば、Horn¹²⁾ は Ehrlich 腹水癌の最も抗原性の高い分画は核、およびミトコンドリア分画であることを主張し、Rapport, Graf¹¹⁾ もラットのリンパ肉腫のミトコンドリア中に特異抗原があることを指摘した。武田¹³⁾ は DAB 肝癌の細胞膜、核膜、ミトコンドリア、核内不溶成分に強い抗移植性を見出し、菊地¹⁴⁾ もラット腹水癌について同様な事実を報告している。教室でも、最近森田⁶⁶⁾ は DAB 肝癌、腹水肝癌の細胞可溶性上清に癌特徴的な β_2 -gl. 位、 α_1 -gl. 位抗原の存在を明らかにし、本田も人胃癌組織および DAB 肝癌ミクロゾーム不溶分画に特異抗原を見出している。また佐伯⁶⁴⁾ は“硫酸抽出法”によるヒストンの lysine rich 分画に DAB 肝癌を特徴づける因子の存在を指摘している。

ミトコンドリアに関しては、これまで生化学的分野ことに酵素レベルでの追究はかなり活潑に行なわれているが、免疫学的立場から論じた報告はあまりみられない。そこで著者は DAB 肝癌および腹水肝癌のミトコンドリア DOC 可溶分画を中心に、免疫化学的方法

を用いて抗原分析を行なった結果、ゲル内二重拡散法で DAB 肝癌に 2 個 (“a-抗原”, “b-抗原”), AH 127 に 1 個, AH66F に 2 個の癌に特徴的な抗原因子を認めた。電気泳動法では共に β_1 -gl. 位, β_2 -gl. 位に相当する泳動度を示し、これらによる特異沈降線は Sudan-black B リビン染色および α -naphthol-p-phenyldiamine 糖蛋白染色に陽性であつた。このことはおそらく特異抗原がミトコンドリア内において「糖ーリポー蛋白」の結合様式で存在するものように思われる。特異抗原の細胞内分布については、既述のように、Horn, Zilber, 武田らをはじめミトコンドリア分画にその局在を主張するものも多く、またいずれもその膜様構造に強い特異性を認めている。しかし Robertson⁶⁵⁾ の膜様構造に関する“unit membrane”説⁶⁶⁾ を始めとして、細胞膜系は構造的に類似しており、しかも膜を構成する proteolipid が蛋白合成能に関与し、且つ細胞の特異性に関与することを主張する者がある⁶⁷⁾⁶⁸⁾。このような考え方に従えば当然各顆粒の膜構造(構造リポ蛋白)が共通の抗原構造を持つ可能性がある。確かに著者の実験結果でも、contamination によるものとは別に細胞分画相互間に共通組成の存在することが確かめられている。しかし癌ミトコンドリアの特異抗原 (“a-抗原”, “b-抗原”) に関しては他の分画には共通因子の存在しないことが十分に確認された。このことはミトコンドリア、とくにその膜成分にミトコンドリア独自の癌特異抗原が存在することを示唆したものであろう。なお DAB 肝癌ミトコンドリアに特徴的な 2 つの因子のうち “a-抗原” に関しては、正常脾、肺および再生肝のミトコンドリアに交叉反応性を持った抗原組成の存在が認められたが、“b-抗原” はいずれの正常臓器にもまた、再生肝にも存在しなかつた。このことは “a-抗原” が発癌過程において徐々に増量するに反し、“b-抗原” が癌化に伴い急激な増量を示したことと考え合せて興味深いものがある。

また腹水肝癌 AH127, AH66F ミトコンドリア DOC 可溶分画にも癌特異抗原が証明されたが、DAB 肝癌と発生起原を同じくするこれらの特異抗原が DAB 肝癌の特異抗原と共通性を示さないことは、発生腫瘍と可移植性腫瘍の差とも考えられようし、また可移植性腫瘍の場合には何らかの genetic な変化が起つているのかもしれない。いずれにせよ同じ発生源であるこれら肝腫瘍の抗原の差異は分化の過程における抗原構造の修飾に関与した問題であるように思われる。

ミトコンドリア分画に癌特異抗原が局在とするならば、ミトコンドリアの酵素系にも癌化に伴うなん

らかの変化があるということは充分予想できることである。そこで著者は抗原・抗体反応によるミトコンドリア酵素系の阻害効果を示標として、癌の高分子組織の機能的変化を追究しようとした。その結果、DAB 肝癌ミトコンドリアの NADH oxidase, NADH cytochrome C reductase および succinate cytochrome C reductase の各活性に対し、抗癌ミトコンドリア血清が、抗正常肝ミトコンドリア血清よりも強い阻害効果を示した。この阻害機構は抗原・抗体反応によるミトコンドリア顆粒の物理的な包覆あるいは凝集によるか、電子伝達系の全部または一部のブロックによるかは速断できないが、たとえば NADH 酸化においては、ferricyanide を電子受容体とすると抗体の阻害効果がみられなくなるから、抗体は ferricyanide で代行できる電子伝達系をブロックしているように思われる。とすると癌ミトコンドリアと非癌ミトコンドリアの電子伝達系にかなりの差異があるように思われる。

ミトコンドリアの酵素系とくに電子伝達系はミトコンドリアの膜上に配列し、その空間配列や機能は脂質、とくにリン脂質との関連が深い。そこで著者はミトコンドリアのリン脂質に関し、薄層クロマトグラフィーによる若干の解析を行ない、リン脂質成分の量的変化を見出した。

ミトコンドリアの機能とくに呼吸とリン酸化およびミトコンドリアの形態変化（膨化、収縮）に関しての癌と非癌との比較は教室の小田島・久藤⁶⁾らによつて現在行なわれつつあるが、この場合も抗癌ミトコンドリア抗体の効果はかなり特異的なものがあるようである。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生装置であるから、常識的には細胞の変異によつてここに著明な変化が起るとは考え難い。しかし著者らの実験はミトコンドリアの高分子組成・酵素系・リン脂質等にかんがりの癌特異性があるらしいことを示した。これは今後の発癌機構の解析にミトコンドリアをもとりあげなければならぬことを暗示する。

結 論

DAB 肝癌ミトコンドリア分画について、発癌に伴う高分子変化をゲル内免疫二重拡散法、免疫電気泳動法、DEAE カラムクロマトグラフィー等の方法で解析し、さらに電子伝達系諸酵素活性のミトコンドリア抗体による阻害現象、およびミトコンドリア・リン脂質の分析を行なった。これらは正常、再生肝、正常臓器および腹水肝癌 (AH127, AH66F) のミトコンドリア分画との対比において検討された。得られた実験結

果を要約すれば次の通りである。

1. DAB肝癌ミトコンドリア分画に癌性変化を特徴づける3つの抗原因子を見出した。このうち2つはDOC可溶分画にあり(“a-抗原”, “b-抗原”)1つはDOC不溶部分に存在した。

2. “a-抗原”, “b-抗原”は免疫電気泳動法でそれぞれ β_1 -g1位, β_2 -g1位に相当する泳動度を示した。

3. DEAEカラムクロマトグラフィーでは, “a-抗原”は0.1M KCl-0.035M トリス緩衝液 pH7.8 で溶出される最初のピークにあり, “b-抗原”は第2のピークに存在した。

4. “a-抗原”は糖蛋白染色に陽性, リピン染色では陰性であり, pH5.4附近で沈澱し50°C, 10分加熱により抗原性を失う, “b-抗原”は糖蛋白染色, リピン染色いずれも陽性を示し, pH5.6 で沈澱, 70°C, 10分の加熱で抗原性を失った。

5. “a-抗原”はDAB 投与後30日目頃のラット肝に出現し, 以後漸次増量するのに対して “b-抗原”は比較的末期(4カ月後半)に現われ, 癌化と共に急激な増量を示した。

6. 正常ラット臓器中, 脾, 肺および再生肝ミトコンドリア分画に “a-抗原” と交叉反応性を示す抗原因子が存在したが, “b-抗原”はいずれにも認められなかった。

7. ミトコンドリアの酵素活性のうち, NADH oxidase, NADH cytochrome C reductase および succinate cytochrome C reductase 各活性について, 抗ミトコンドリア抗体による強い阻害効果がみられた。癌ミトコンドリア上記酵素系に対しては, 抗癌ミトコンドリア血清が正常ミトコンドリア血清よりも強い阻害効果を示すのにくらべ, 正常ミトコンドリアに対しては両血清の阻害効果に著明な差異が認められなかった。また癌および正常のミトコンドリアの NADH dehydrogenase および succinic dehydrogenase 活性に対しては両血清はいずれも有意な阻害効果を示さなかった。

8. DAB 発癌過程における肝ミトコンドリアのリン脂質を薄層クロマトグラフィで展開分離し, それぞれのリン脂質を定量した。phosphatidyl choline は変化がなかったが lysophosphatidyl choline, sphingomyeline, phosphatidyl serine は発癌と共に漸次増量し, phosphatidyl ethanolamineは逆に減量した。

9. ラット腹水肝癌中, AH127 ミトコンドリア分画に1つ, AH66F ミトコンドリア分画に2つの癌に特徴的な抗原因子を見出した。免疫電気泳動では共に陰極側に泳動し, DEAE カラムクロマトグラフィーを行なうと, 癌特異抗原はそれぞれ 0.035M トリス緩衝

液pH7.8の溶出部分, および0.1MKCl-0.035 Mトリス緩衝液の溶出成分に存在した。糖蛋白, リボ蛋白染色いづれも陽性で, pH5.4附近まで可溶性であり, AH127 は 60°C, 10分加熱, AH66F は 70°C, 10分の加熱でそれぞれ抗原性を失った。

10. ラット腹水肝癌ミトコンドリア特異抗原のうちAH127ミトコンドリア特異抗原は, “a-抗原”と交叉反応性を示すが“b-抗原”とは無関係であった。またAH66Fの特異抗原は“a-抗原”, “b-抗原”のいづれとも共通性が認められなかつた。

稿を始るにあたり, 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助教, 須山忠和博士, 武川昭男講師, 福田鎮雄助手, 高沢ますみ助手, 河村守一氏, ならびに教室の諸兄に厚く謝意を表します。さらに電子顕微鏡に関して御指導を仰ぎました第一病理堀川欽一郎助教に感謝いたします。

文 献

- 1) 石川大刀雄・高柳尹立 : 日新医学, 44,361 (1957).
- 2) 石川大刀雄・橋 武彦・高柳尹立 : 癌の臨床, 8,593 (1962).
- 3) 石川大刀雄・高柳尹立・朝倉志良・建部守昭 : Gann, 50, Suppl. 232 (1959).
- 4) 荒川 弥 : 十全医会誌, 70, 354 (964).
- 5) 松井健二 : 十全医会誌, 71, (1965).
- 6) 森田弘之 : 十全医会誌, 71, (1965).
- 7) 本田雄治 : 十全医会誌, 71, (1965).
- 13) 8) Greenstein J.P. : Cancer Res., 16, 641 (1956).
- 9) Potter, V.R. Pitot, H. C. Ono T. & Morris, H.P. : Cancer Res., 20, 1255 (1960).
- 10) Hogeboom, G. M. & Schneider, W.C. : Science., 113, 355 (1951).
- 11) Rapport, M.M. & Graf, L. : Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 1, 39 (1954)
- 12) Harn, E.C. : Cancer Res., 16, 595 (1956).
- 13) 武田勝男・吉尾 久・坂田義晴 : Gann., 47, 549 (1956).
- 14) 菊地浩吉 : 癌の臨床, 8, 639 (1962).
- 15) Zilber, L.A. : Acta Unio Intern. Contra Cancrum., 15, 933 (1960).
- 16) 原田三樹男・水谷太郎・九谷八郎 : 大阪医会 36, 738 (1937).
- 17) Hogeboom, G.H. & Schneider, W.C. : The nucleic Acid., 2, 105, N.Y. Acad. Press. (1955).
- 18) Higgins, G. M. & Anderson R.M. : Arch. Path., 12, 186 (1931).
- 19) Cornall, A.G.& Bardawill, C.S.& David, M.M. : J. Biol. Chem. 177, 751 (1949).
- 20) David, H., Tzagoloff, M.A. & Rieske, J. S. : Arch. Bioch. and Bioph., 109, 383 (1965).
- 21) Dattel, G.& Wang, T. : Exptl. Cell Res., 34, 120 (1964).
- 22) Freund, J. & Bonato, M.W. : J. Immunol, 48, 325 (1944).
- 23) Freund, J. : Clin. Path., 21, 645 (1951).
- 24) Björklund, B. : J. Immunol., 79, 319 (1952).
- 25) Ouchterlony, Ö. : Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953).
- 26) Crowle, A.J. : J. Lab. Clin. Med., 52, 784 (1958).
- 27) Uriel, J. : Bull. Soc. Clin. Biol., 40, 277 (1958).
- 28) Kohn, J. : Clin. Chim. Acta., 3, 450 (1958).
- 29) Graber P. & Williams, C.A. : Bioch Biophys. Acta, 17,67 (1955).
- 30) Perlmann, P.& Winfield, S. : Proceedings of the first IUB/IUBS. International Symposium stockholm. (1960).
- 31) Schmidt, G. & Thannhauser, S.J. : J. Biol. Chem., 161, 83 (1945).
- 32) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem. 161, 293 (1945).
- 33) Meijbaum, W. : Z. physiol. Chem., 258, 177 (1939).
- 34) Palade, G.E. : J. exp. Med, 95, 285 (1952).
- 35) Luft, J.H. : J.B.B.C., 9, 409 (1961).
- 36) Sperry, W.M. : Method of Bioch. Analysis, II, 83, Int. Publ. N. Y. (1955).
- 37) Skipski, V.P. Peterson, R.F.& Barclay, M. : J. Lipid Res., 3, 227 (1962).
- 38) Wagner, H. : Fette, Seifen, Anstrich mittel., 63, 1119 (1961).
- 39) 石川正幸・原 昭二・古谷力・中沢泰男 : 薄層クロマトグラフィ (基礎と応用) 第2版, 130頁, 南山堂, (1965)
- 40) Green, H.N. : Immunol. Aspects. of Cancer III, 1 (1958).
- 41) Butenandt, A. : 第14回日本医学会総会誌, 102 (1955).
- 42) Weiler, E. Z. : Naturforsch., 116, 32 (1956).
- 43) Weiler, E.Z. : Brit. J. Cancer., 10, 553 (1956)
- 44) Nace, G.W. Suyama, T.& Smith. N. : Symposium of I.I.E.-pallanya (1960). (S.Ranzi, Ed.) 564 (1961).
- 45) Nace, G.W. & Suyama, T. : SABCO J. 1, 1 (1965).
- 46) Nace, G.W. Suyama, T.& Iwata, T. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 126, 204 (1965).
- 47) Revesz, L. : Cancer Res., 20, 444 (1960).
- 48) Prehn, R.T. : Cancer Res., 20, 1614 (1960).
- 49) Klein, E.& Hellström, K. E. : Cancer Res., 20, 1561 (1960).
- 50) Zilber, L.A. : Advances in Cancer Res., 5, 291 (1958).
- 51) Gelstein, V.I. : Vop. Onkol., 4, 526 (1958).

52) 高柳尹立・建部守昭 : 日新医学, 46, 416(1959). 53) 高柳尹立・建部守昭 : 日新医学, 46, 351 (1959) 54) 武田勝男 : Acta Unio Intern, contra cancrum., 15, 986 (1959). 56) Gusev, A.I.: In Press, Antigenic structure of Rous-sarcoma., (1960). 57) Korngold, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 69, 681 (1957). 58) Karngold, L.& Leeuwen, G.V. : Cancer Res., 17, 775 (1957). 59) Messineo, L. : Nature (Lond.) 190, 1122 (1961). 60) Calvalho, S.D.: J. Lab. Clin. Med., 56, 333 (1960). 61) 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). 62) 板倉克明 : Gann, 54, 193 (1963). 63) 石川大乃雄・橘武彦・高柳尹立 : 癌の臨床, 8, 593 (1962). 64) 佐伯良昭 : 十全医会誌, 印刷中. 65) Robertson, J.D. : Scientific American., 206, No. 4 64 (1962). 66) Fernandez-Morgan, H.: Rev. Mod. Phys., 31, 319 (1959). 67) Roodyn, D.B. : Biochem. J., 85, 177 (1962). 68) Klee, C.B.& Sokoloff, L. : Science., 144, 564 (1964). 69) 小田島肅夫・久藤豊治 : 私信による.

写真説明

写真 1 : 正常ラット肝細胞

- A : 正常肝組織 (光顕倍率×100).
 B : 正常肝細胞体 (電顕倍率×24,000).
 Mt : ミトコンドリア
 rER: 粗面小胞体
 L : リゾゾーム

写真 2 : DABラット肝細胞(3カ月)

- A : 著明な肝細胞分裂像(光顕倍率×300)
 B : 著明な肝の線維化(光顕, ×100)
 C : DABラット(3カ月)肝細胞体(電顕, ×24,000)

Mt : 正常肝 Mt に比し軽度の膨化, および Cristae の配列の不規則化.

rER : やや減少し配列がみだれる.
 sER : 滑面小胞体

写真 3 : DABラット肝癌組織(6カ月)

- A : DABラット肝癌細胞(光顕, ×300).
 B : 同電顕像(倍率, ×24,000).

Mtの膨化, Cristae の減少および配列がみだれる. rER の減少および sERの増加.

写真 4 : DAB肝癌ミトコンドリア分画の電顕像(×24,000)
 (5,000×g, 20分遠心沈渣分画)

Abstract

Immunochemical comparison of mitochondria from DAB hepatoma with those from the normal rat liver revealed the gain of three antigenic constituents, of which two were in DOC-soluble fraction and the other was in DOC-insoluble fraction. These data were obtained mainly by means of immunological procedures such as agar gel double diffusion technique and immunoelectrophoresis. Furthermore, biochemical data were obtained utilizing various methods such as DEAE cellulose column chromatography, thin layer chromatography, inhibitory assay of mitochondrial enzymic activities with their specific antisera.

The results were summarized as follows :

(1) Mitochondria from DAB hepatoma showed three cancer characteristic precipitating lines on the agar gel double diffusion, of which two antigenic components (designated as "a-antigen" and "b-antigen", respectively) existed in DOC-soluble fraction, the other was in DOC-insoluble fraction.

(2) These "a-antigen" and "b-antigen" had electrophoretic mobilities similar to those of β_1 -globulin and β_2 -globulin. Both these antigens were eluted in 0.1 M KCl-tris buffer pH 8.3 on DEAE cellulose column chromatography.

(3) The "a-antigen" showed cross-reactivity to mitochondria from the normal lung, spleen and regenerating liver of a rat, suggesting common antigenic determinant groups. However, "b-antigen" was virtually absent in these tissues and

also absent in nuclei, microsomes, nuclear sap and cell sap from the normal and DAB rat liver,

(4) During the carcinogenetic process of DAB hepatoma, "a-antigen" increased gradually on the 30th day to the 6th month after DAB feeding, rapidly increased on the 120th day (the initial stage of the hepatoma) and reached a maximum level on the final stage of the hepatoma.

(5) Effects of anti-mitochondrial sera on mitochondrial enzymic activity led to the following results; NADH oxidase, NADH cytochrome C reductase and succinic cytochrome c reductase in DAB mitochondria were inhibited in their activities much more by anti-DAB mitochondria sera than by anti-normal mitochondria sera.

(6) It was also shown by thin layer chromatography that phospholipid sub fractions from mitochondria were changed in their contents during the DAB carcinogenesis. Phosphatidyl serine, sphingomyelin and lysophosphatidyl choline were increased, but phosphatidyl ethanolamine was decreased, while phosphatidyl choline was not changed during carcinogenesis.

(7) Rat ascites hepatoma AH 127 and AH 66F also showed one or two specific precipitating lines on agar gel diffusion. A antigen of AH 127 showed cross reaction to "b-antigen" from DAB hepatoma and antigens of AH 66F showed neither identity nor partial identity reaction to DAB specific antigens.

写真 1

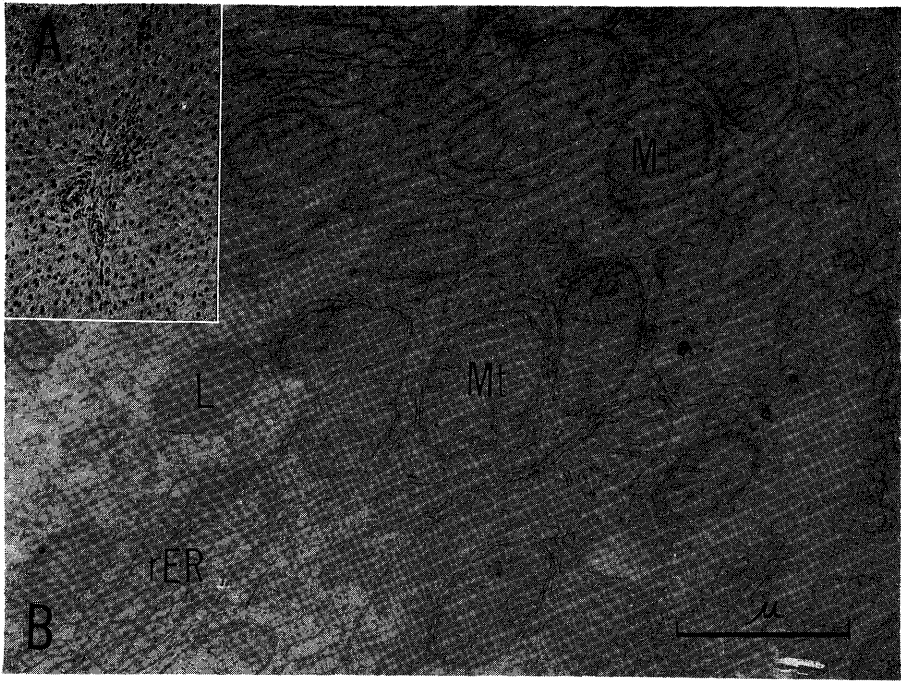


写真 2

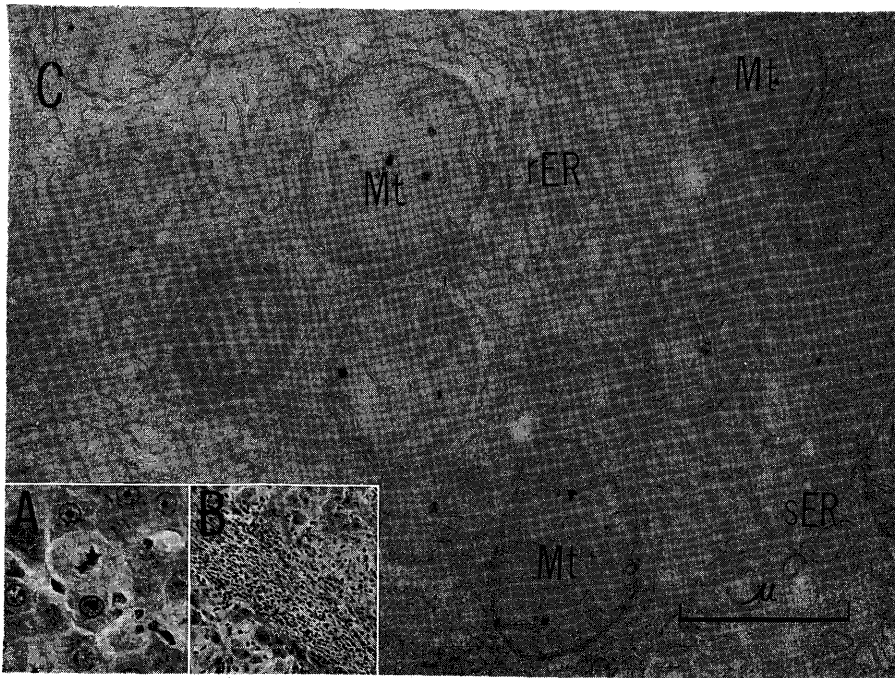


写真 3

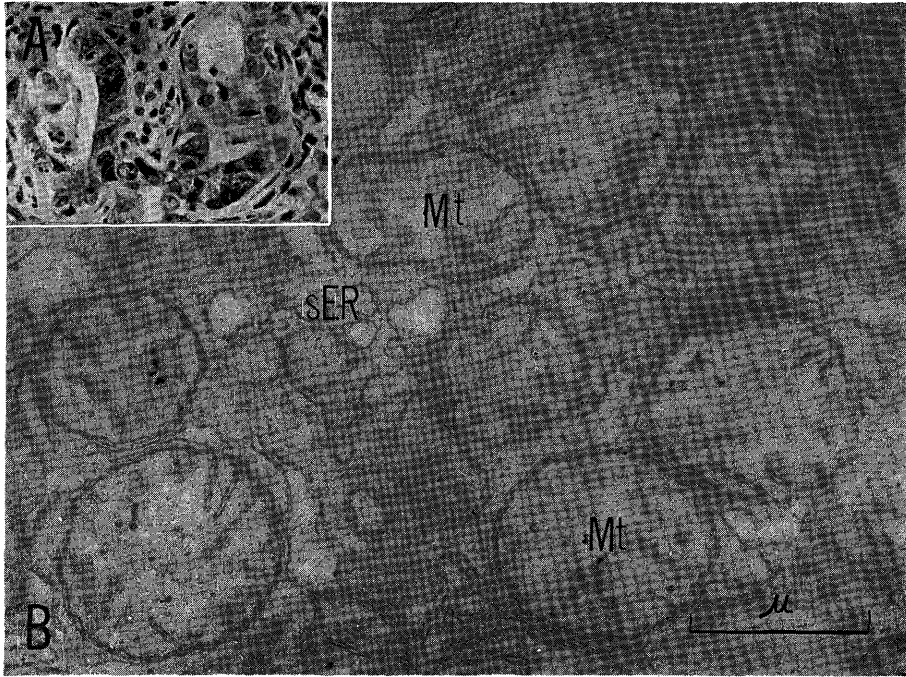


写真 4

