

# DAB 肝癌の免疫化学的解析

## 発癌過程の組織蛋白の転換について

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)

建 部 守 昭

(昭和35年11月8日受付)

(本論文の要旨は、昭和33年11月第17回日本癌学会総会において報告した。)

腫瘍と正常組織との生化学的差異は多数の研究者の努力にも拘らず、質的な点では何一つ明確なものが見出されていなかつたが、発癌性物質と体蛋白質との結合に関する研究<sup>22)23)</sup>、最近 Miller<sup>24)</sup> らが出した *deletion theory* は、腫瘍蛋白の特異性に関して暗示する所が大きいものであつた。その後 Sorof<sup>24)</sup>、Arcos<sup>30)</sup> も電気泳動、超遠心分析で発癌性物質投与肝から抽出した可溶性蛋白を分析し、Miller らの考えに裏づけを与えている。これらは組織蛋白の *h fraction* が腫瘍化とともに減少することを明らかにしたものであるが、もし腫瘍化による組織蛋白の正の変化、すなわち特異蛋白の出現が見いだされるならば、それは腫瘍の研究上は勿論、診断・治療上にも大きな意義がある筈である。

そこで、教室の石川・高柳<sup>2)</sup> はまず Ehrlich 腹水癌蛋白を物理化学および免疫化学的方法を駆使して解析を行い、特異蛋白の存在を確認し、その後ヒトの各種悪性腫瘍蛋白および担癌個体の体液における特異蛋白の存在を明らかにしつつある<sup>3)</sup>。

本報告では、*p-dimethylaminoazobenzene* (DAB) によるダイコクネズミの肝癌発癌過程における肝蛋白の転換過程を物理化学的および免疫化学的に解析した結果を詳細にのべることにする。

### DAB 肝癌の形態

#### 1. 実験材料ならびに実験方法

実験動物は体重 120~180 g (平均 160 g) の雑系ダイコクネズミを使用した。15匹を1群とし、これに屑米を砕きオリブ油に溶かした *p-dimethylaminoazobenzene* (DAB) を混合し、これを主食として飼養した。原田・水谷<sup>4)</sup> らの方法に準じ DAB 飼養の最初の

1週間は DAB を 0.02% の割に、次週は 0.04% にあげ第4週目より 0.06% に増加し、その後は DAB 0.06% 混合飼料を継続して投与した。DAB 投与後 30, 60, 90, 120, 150, 200, 230日目頃に2匹ずつ屠殺し、肝組織の一部を組織学的所見検索に使用し、大部分は後述する肝可溶性蛋白の抽出に使用した。実験には4群、60匹、それぞれの対照として屑米のみ投与したものの12匹、計72匹を使用した。

#### 2. 実験成績

DAB 投与後ネズミ肝は短日目で形態学的変化を起してくる。30日後 (No. 81) の肝では、低円柱状で肝細胞よりやや小さく、嗜塩基性の胞体とクロマチンに乏しい核をもつ小胆管上皮に類似する上皮性細胞がグリソン氏鞘を中心に増殖し、所によつては肝小葉中心にまで侵入している。このため肝小葉は狭められ、肝細胞の退行変性が起つている。

60日ごろ (No. 51) では上記増殖細胞は索状乃至腺状に集団して分布し、間質結合織増生、円形細胞浸潤がある。なおグリソン鞘周辺には最小胆管の増殖傾向が認められる。

90日ごろ (No. 32) に至ると、肉眼的にも肝表面は顆粒状を呈し、組織学的にも肝硬変像がみられる。すなわち、グリソン鞘の結合織増殖が著明となり、肝小葉は分割され、増殖した上皮細胞が腺腫様に配列して管腔をつくりその一部の壁は重層化している。管腔は結合織の増殖で次第に腔が狭められ、一部は *cholangiofibrosis* の像となつている。

130日前後 (No. 92) のものでは胆管増殖が著明となる。その一部は高円柱状の上皮細胞が密集して腺様となり、屢々不規則な形の管腔をつくる。またこれらが群集して多房性囊腫状となつた部分がある。これら

Immunochemical Analysis of DAB-Hepatoma (Studies on the Changes of the Tissue Proteins during the Experimental Carcinogenesis). Moriaki Kenbe, Department of Pathology (II) (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

の細胞増殖に強い間質結合織の増生が加わり、正常肝細胞は退行変性をおこし、一部は壊死に陥入つて粘液様物質に変化している所もある。また一部には肝細胞の強い異型増殖像もある。

150日ごろ (No. 33) のものでは肉眼的にも肝臓は著るしく大きくなり、各肝葉は表面顆粒状で黄褐色を呈す。剖面は全般に灰白帯黄色で、やや弾力性があり血量に乏しいが、一部は血量に富み、出血巣を有する。組織学的には細胞増殖は130日ごろのものより高度である。肝細胞は増殖した上皮性細胞群中に埋れて不規則な島状あるいは網状をなしている。増殖細胞は嗜塩基性で肝細胞よりやや大きな細胞など濃淡様々の細胞からなつていて結節状に分布する。結節細胞核には非定型性が現われている。結節の中心部は屢々壊死に陥入つて血液および粘膜様物質を入れていることがある。

200日前後を経過したもの (No. 24, No. 53, No. 63 ……など) では全例に *Cholangiom* 型, *Hepatom* 型あるいは両者共存の形の肝癌が完成している。*Hepatom* 型の中には *Solidacinöse Form*, *Trabeculäre Form*, あるいは *Aderomatöse Form* などが認められる。また数例において腹腔内転移を証明し、大網あるいは腸間膜に多数の結節形成をみとめた。

### 発癌過程における蛋白分画法による解析

#### 1. 塩析滴定法による解析

曾我美<sup>5)</sup>らによつて考案された塩析滴定法を用いて *DAB* 肝癌形成過程における蛋白組成の変化を解析した。

##### 1) 実験材料ならびに方法

実験材料: 肝可溶性蛋白液を用いた。

肝可溶性蛋白の抽出には、ネズミをエーテル麻醉し、心臓穿刺により採血し、その後心臓より生理的食塩水を注入して灌流する。肝を剔出し、0.15M-NaCl 溶液9容に0.1M-リン酸緩衝液を1容加えてpH 7.2に調整した buffered saline を肝組織重量の2倍量加える。これを氷冷しつつ glass homogenizer にかける。homogenate を氷室に1夜置き、次に19,000 R.P.M. で30分遠心する。得られた上清を肝可溶性蛋白原液とする。

実験方法は教室高柳<sup>7)</sup>の方法に従つた。すなわち、先に抽出した肝可溶性蛋白液を1.5%食塩水溶液を用いて蛋白濃度が2~3mg/mlになるようにする。この試料を正確に8mlとり、ビーカーに入れ、一定量の飽和硫酸液をピペットで滴加する。飽和硫酸液は硫酸アンモニウム (特級) を用い、使用の1週間前に作つ

ておく。硫酸滴加後2分間攪拌し、ベックマン型光電分光光度計で濁濁度を測定する (波長 480m $\mu$ )。測定後再び一定量の飽和硫酸液を滴加して飽和度を増し、次の測定に移る。このようにして硫酸 0.2~0.7 飽和の間を0.0125飽和ごとに測定する。得られた測定値につき体積補正を行い、 $\Delta T/\Delta S$  (すなわち、濁濁度変化を硫酸飽和度の変化で微分した値) を計算する。これを図に plot すると塩析滴定曲線が得られる。硫酸溶解度は温度影響をうけるので、実験にあつては温度条件に注意する必要がある。本実験はすべて 15~18°C で測定した。

#### 2) 実験成績

正常肝から肝癌に至る各期の肝組織蛋白の分析成績は図1に一括して示される。

正常肝 (No. 3L) の可溶性蛋白は硫酸 0.1~0.7 飽和の間で10数コの細かい分画にわかれる。その消長を追つてみると、硫酸飽和度の低い0.15および0.25飽和附近で山を形成しながら、しだいに蛋白分画の増加がみられ、0.43飽和附近で最高の峰となり、その後

図 1 (a)

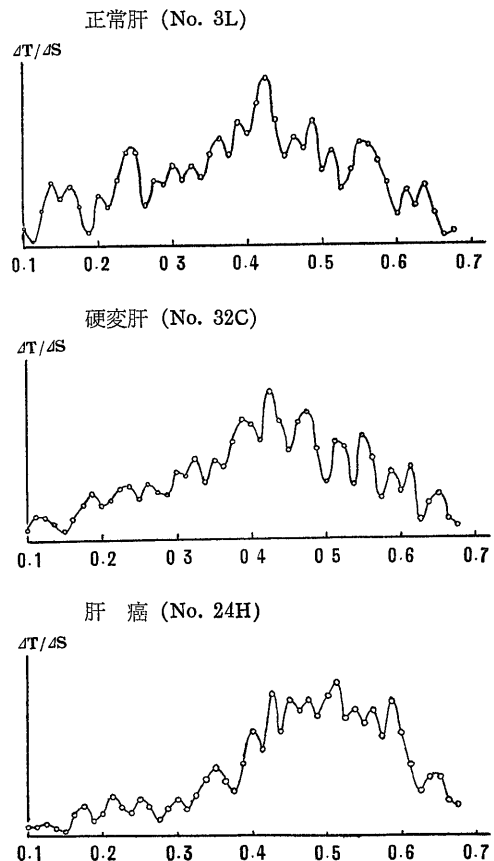
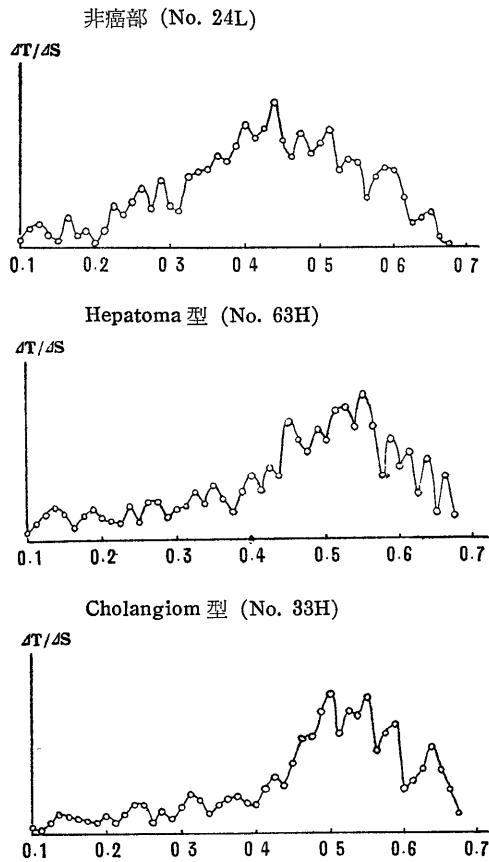


図 1 (b)



0.48, 0.55飽和附近で多少の増加をみるが、波をえがきつつ低下している。

DAB 飼養90日で肝硬変 および細胆管増殖をみとめた例 (No. 32C) では、正常肝でかなり著明にみられた 0.15, 0.25 飽和附近の分画が減少し、滴定曲線は 0.2 飽和から漸次上昇して 0.43飽和附近で最高のピークをつくる。以後は正常肝と略々同様に多少の起伏をもつて低下していく。

DAB 投与 200 日の大きな結節状の肝癌形成をみとめた例では、癌化していない肝部分と、癌の部分のそれぞれについて塩析滴定を行なった。肝癌の部分 (No. 24H) では極めて特徴的な曲線が得られた。すなわち、硫酸 0.1~0.4飽和域における蛋白分画は極度に減少しわずかに小さな凹凸がみられ、0.4 飽和附近より急激に上昇して波をえがきつつ、0.45~0.6 飽和で高台状の山をつくり、0.6~0.7飽和域で低下している。

他方、同一肝の非癌部 (No. 24L) を検索すると、硬変肝 (No. 32C) ときわめて類似した結果を示し、癌部の曲線のそれとは大いに異っている。

次に、組織学的に異つた肝癌を塩析滴定法と比較してみた。No. 63H は Hepatoma 型、No. 33H は Cholangioma 型の肝癌であるが、塩析滴定によると図 1 (b) のとおりである。両者とも 0.1~0.4飽和域の硫酸沈澱分画はきわめて少なく、0.45~0.6 飽和域で特異的に分画が増加していることが示されている。すなわち、この特異的な分画の増加は形態学的な差異に関係なく、肝癌に共通にみられる現象といえよう。

## 2. Zone electrophoresis (域電気泳動) 法による解析

肝可溶性蛋白を澱粉を支持体として域電気泳動法により分画し、その pattern の変化を検した。

### 1) 実験材料ならび方法

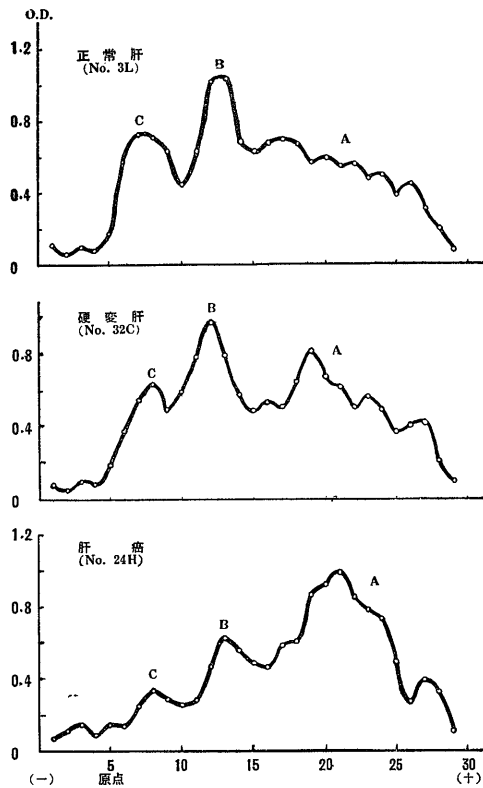
実験材料: 先に抽出した肝可溶性蛋白液を使用した。蛋白濃度は 30mg/ml に調製した。

実験方法: 装置はほぼ濾紙電気泳動法と同様で、濾紙のかわりに緩衝液で処置した澱粉をつめた holder を両極の緩衝液槽にわたす。Acrylite 板製の holder (30×7×1.3cm<sup>3</sup>の長方形箱) に澱粉をつめる。澱粉はジャガイモ澱粉を流水および蒸溜水で反覆洗滌し、乾燥させ、ついでペロナール緩衝液 (pH 8.6) に浸したものである。つめる時その両端に濾紙片 (東洋濾紙 No. 50) を挿入し、これを緩衝液槽に浸す。緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.05) を用い、左右の緩衝液槽を同一水平とする。電極は白金線を使用し、電極槽に入れ、寒天橋で緩衝液槽をつなぐ。澱粉をつめ終つた holder は余分の水分を濾紙で吸収除去する。次に陰極側より 9cm の位置に 0.7cm 幅に縦に澱粉を除去し、ここに試料 1.2ml と、既に乾燥した澱粉とを混合してつめる。電気泳動は 4°C の低温室で行い、電流 12~14mA, 電圧 360~400V の条件で12時間泳動した。泳動終了後 holder を装置よりはらずし、澱粉を 0.7cm 幅のブロックに切断し、おのおのを小試験管に入れ、蒸溜水 5ml を加えて澱粉中の蛋白質を抽出する。各フラクションについてベックマン型光電分光光度計を用いて、波長 280m $\mu$  における吸光度を読んで蛋白濃度の変化を測定した。

### 2) 実験成績

域電気泳動法により得られた蛋白分布曲線は、図 2 に一括して示す通りである。正常肝 (No. 3L) では原点より (+) 極側に向つて、数コの著明な分画が認められる。仮りに (+) 極側から分画を A, B, C の記号をもつて表わすと、最も (+) 極への易動度の大きい A 分画は、かなり広い範囲にわたつてなだらかな山を形成し、その中にさらに細かい分画を区別することができる。B 分画は最も高い sharp な峰をつくり、そ

図 2



れについてかなり著明な山を形成している。DAB 投与90日の硬変肝 (No. 32C) では、正常肝の分布曲線と傾向は同じであるが、C分画は最小で、B分画もやや減少し、A分画は増加している。DAB 肝癌 (No. 24H) になるとこの関係はさらに顕著にみとめられる。すなわち、A分画が最も大きく、正常肝では最大の分画であつたB分画が低下し、C分画が極度に減少している。

以上域電気泳動法による分析の結果を総合すると、正常肝ではB分画が最大で、硬変肝ではA分画の増加、C分画の減少、さらに肝癌になるとA分画が最大となる。

### 3. 濾紙電気泳動法による解析

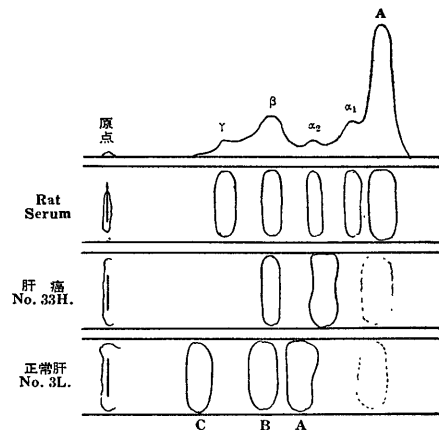
1) 実験方法: 泳動装置は小林式濾紙電気泳動装置を使用し、濾紙は東洋濾紙 No. 51 (12.5×23.5cm)、緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度0.1) を用いた。泳動は小林<sup>9)</sup>らの方法にしたがって行つた。まず濾紙を緩衝液にて湿らし、ついで2枚他の濾紙の間に挟んで余分の緩衝液を吸収してから、ペークライト製の支持枠に装着して濾紙を均一に緊張させた後に、緩衝液槽の上に水平におく。電極は銀-塩化

銀電極で5%塩化カリを入れた液槽に浸し、緩衝液槽との間は寒天橋で接続する。緩衝液槽間にわたした濾紙は、20~30分放置して緩衝液の分布が平衡状態になるのをまち、さらに10分位電流を通じ一旦電流を絶つて試料をつける。試料は肝可溶性蛋白 (濃度 40mg/ml) および正常ネズミ血清を用いた。原点にガラス毛细管を用いて試料 0.01 ml を直線上に塗り、電流 6 mA, 電圧 160~140V の条件で9時間泳動した。泳動終了後、濾紙を60°Cにて乾燥させ、0.05% bromphenolblue 溶液で蛋白染色し、ついで2%醋酸溶液数回で洗滌、脱色し室温で乾燥した。

### 2) 実験成績

DAB 肝癌及び正常肝抽出蛋白を正常ネズミ血清と同一濾紙上で泳動して、それぞれの各分画の電気泳動的な対応性を比較すると成績は図3のようになった。

図 3



ネズミ血清では (-) 極より (+) 極に向つて5つの spot が証明され、それぞれ、 $\gamma$ -、 $\beta$ -、 $\alpha_2$ -、 $\alpha_1$ -globulin および albumin を示している。これに対して正常肝抽出蛋白 (No. 3L) では  $\gamma$ -gl. よりやや (-) 側に1コ、 $\beta$ -gl. 寄りの位置に1コ、それに続いて  $\beta$ -gl. から  $\alpha_2$ -gl. 部位にかけて1コと3コの spot が形成されている。さらに albumin の位置に稀薄な spot がみられる。肝癌蛋白 (No. 33H) では  $\beta$ -gl. 部位に spot がみとめられ、 $\alpha_2$ -gl. 部位に濃厚な spot が出現している。また正常肝蛋白と同様 alb. の位置に稀薄な spot がみとめられる。

この濾紙電気泳動の結果を前記域電気泳動の成績と比較してみると、濾紙泳動で  $\gamma$ -gl. より (-) 側に出現した spot は域電気泳動でみられた電気的易動度の小さな蛋白分画Cに相当し、 $\beta$ -gl. 部位の spot は最大のピークを示した蛋白分画Bに、さらに  $\alpha$ -gl. 部位

の spot は電氣的易動度の大きい蛋白分画 A に相当するものと判断できる。

結局、濾紙電気泳動の成績も、正常肝では (+) 側への電氣的易動度の少ない蛋白分画 C, B が濃い spot をつくり、それについて蛋白分画 A もかなりの幅でやや薄い spot を形成している。一方肝癌になると (+) 側への電氣的易動度の小さな蛋白分画 C がほとんど消失し、蛋白分画 B も正常肝のそれと比較して少くなり、(+ ) 側への電氣的移動度の大きい蛋白分画 A のみが著明な spot を形成していて、先の域電気泳動の成績とよく一致していることがわかる。

### 発癌過程における組織蛋白の抗原分析

#### 1. Agar gel double diffusion 法 (Ouchterlony<sup>9)</sup>-<sup>15)</sup> 法) による解析

##### 1. 実験材料ならびに方法

###### a) 抗原液の調整

DAB 投与ネズミ肝、正常成熟ネズミ肝、幼若ネズミ肝、再生肝から前章に記載した方法にしたがつて可溶性蛋白を抽出し、これを抗原液とした。また随時これらのネズミの血液より血清を分離し抗原分析を行った。幼若ネズミ肝は生後第 1 日目の仔より得たものであり、再生肝は成熟ネズミの肝を部分切除し、術後 2 ~ 4 日に剔出したものである。

###### b) 抗血清の作製

DAB 投与より得た肝癌 3 例、硬変肝 3 例および正常肝 3 例について、それぞれの肝可溶性蛋白を抗原とし、Freund<sup>16)17)</sup> の adjuvant 法に従つて抗血清を作製した。すなわち、抗原蛋白 100mg (40mg/ml 濃度のもの 2.5ml) を Falba oil 1ml, 流動 paraffin 2ml 乾燥 B.C.G. 4mg と混合して乳剤とし、これを家兔の両肩甲下腔に注射し、一週間後に再び同乳剤を注射した。教室の三宅<sup>18)</sup>によれば、抗血清の作製には静注法、腹腔内注射法、adjuvant 法による一回胸腔内注射後、一回筋注法があげられるが、二回筋注法が抗体価の持続期が最もすぐれている。最終注射 4 週間後に

試験採血し、沈降反応重層法により抗血清の力価を測定し、その後必要に応じて心臓穿刺により採血する。分離した抗血清は 1000 倍マーズニン液を 1/10 容加えて氷室に保存する。この方法で得た抗血清は 7 カ月にわたつて使用したが、その間に得られた反応パターンは

何等変りがなかつた。

###### c) 沈降反応重層法

緒方<sup>19)</sup>の方法による。抗原は 40mg/ml 濃度液の 10 倍稀釈液より出発し倍々稀釈を行い、抗血清は 1000 倍マーズニン液を 1/10 容加えたものより倍々稀釈した。すべての組合せについて重層し、室温で 2 時間反応させ、その間各時間の陽性反応を記録し、2 時間値と比較し陽性反応を示した範囲を反応の場とした。陽性反応を示す抗血清の最終稀釈倍数  $2^n$  の n をもつて抗体価、抗原の稀釈倍数  $10 \times 2^n$  の n をもつて抗原価を示すことにした。

###### d) Ouchterlony 法

###### i) 寒天平板の作製

和光製寒天粉末を溶解し 4% 水溶液とし、加熱均一化した後固化させる。この固化した寒天を 1cm 角のサイコロ状に切り、24 時間流水、ついで 48 時間蒸溜水で透析し、氷室に保存する。寒天平板作製に際してはこの寒天より次の処法のメジウムを作る。

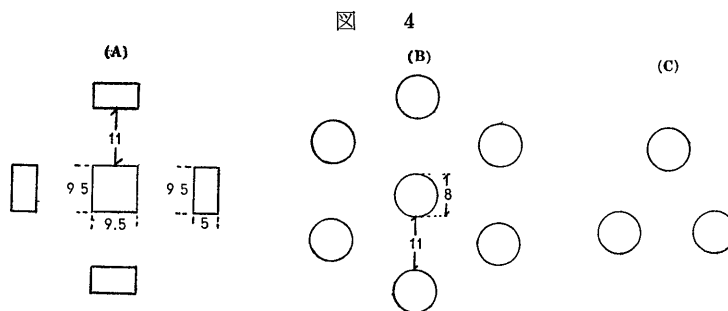
4% 精製寒天ブロック	500g
リン酸緩衝液 (pH 7.2, 0.1M)	50ml
マーズニン液 (1000 倍液)	100ml
メチル・オレンジ	0.02g
蒸溜水	350ml

これを加熱溶解し、木綿を用いて濾過する。

溶解した寒天メジウムをペトリ・シャーレに 10ml 宛分注し第 1 層を作る。固化した後再び同液を 15~18 ml 宛追加し、直ちに図 4 に示した位置に冷却した真チュウ製鑄型を立てる。ついでシャーレを冷温室におき充分冷えた後に鑄型を抜くと抗原、抗血清をいれる溜池 (Basins) が形成される。

###### ii) 抗原抗体反応

Basins の位置は種々のものを目的に応じて適当にえらんだ。標準型のものには中央の Basin に抗血清、周囲の 4 個の Basins に 4 種の抗原をおく。あるいは逆に中央に抗原、周囲に 4 種の抗血清をおいて比較することもできる。液量は中央の Basin に 40mg/ml



単位: mm

濃度の抗原液を 0.2ml, 周囲の Basins に抗血清 9 容に 1000倍マージン液 1 容を加えた抗血清 0.1ml 加えて, 20~25°C において反応させる。反応後 2~3 日より抗原池と抗血清池との中間に沈降帯が出現し始め, 次第にその数および濃度を増す。反応の現われ方を連日観察して所見を記録し, 日をきめて写真撮影をした。形成される沈降帯の判読の基準, 吟味の要点は教室の高柳<sup>8)</sup>の記載にしたがった。

2. 実験成績

1) 沈降反応重層法の成績

Ouchterlony 法および免疫電気泳動法による抗原分析の基礎実験として, 沈降反応重層法を行った。まず担癌ネズミ血清, 正常ネズミ血清と, それぞれの抗血清の組合せについて反応の場を記録すると図5の通りとなる。ここでは抗正常ネズミ血清に対する正常

ネズミ血清, 抗担癌ネズミ血清に対する担癌ネズミ血清の反応の場は, 抗担癌ネズミ血清に対する正常ネズミ血清および抗正常ネズミ血清に対する担癌ネズミ血清の反応の場より大きい。抗正常ネズミ血清に対する正常ネズミ血清の反応の場は一見, 抗原抗体反応の単一系反応のような型をとっているが, 他の反応の場と同じく複合系反応を示している。

また正常肝 (No. 7L), 硬変肝 (No. 83C: DAB 飼養130日), 肝癌 (No. 53H: DAB 飼養200日) およびそれぞれの抗血清のすべての組合せについて反応の場を記録すると図6の通りである。抗正常肝血清は, 正常肝ともつとも大きい反応の場を示すが, 硬変肝, 肝癌では反応の場は次第に縮少していく。抗硬変肝血清では正常肝, 硬変肝に強く反応し, 両者の差異は比較的少ないが, 肝癌とは反応の場が縮少している。抗癌血清では抗正常肝血清の場合と逆の関係を示している。

またいづれの反応の場もその型から複合系反応であることがわかる。

結局, 肝可溶性蛋白とその抗血清の沈降反応重層法では両者は複合反応系を示し, homologous な抗原抗血清間では反応がもつとも強く, 交叉反応の強さから, 肝癌組成の正常肝および硬変肝組成に対する差異は, 正常肝, 硬変肝組成間にみられる差異に比してはるかに大きいことが知られる。

2) Ouchterlony 法の成績

正常肝 (No. 3L), DAB 飼養90日 (No. 32C) および130日 (No. 92C) の硬変肝, DAB 飼養200日の肝癌結節 (No. 53H) をそれぞれ抗原として周囲の池に配置し, これに抗正常肝血清 (No. 401), 抗硬変肝血清 (No. 403), 抗肝癌血清 (No. 407) をそれぞれ中央の池に注加して反応した。その成績は図7に示され

図 5

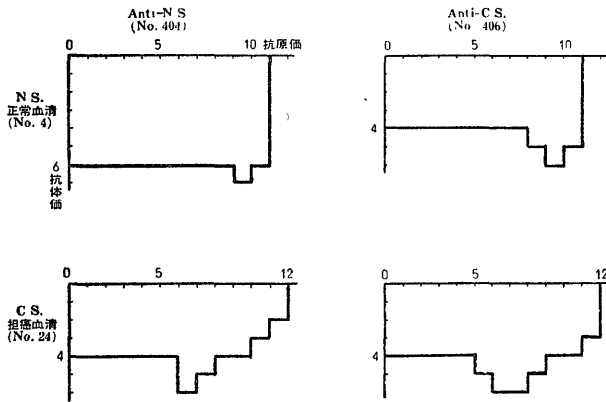


図 6

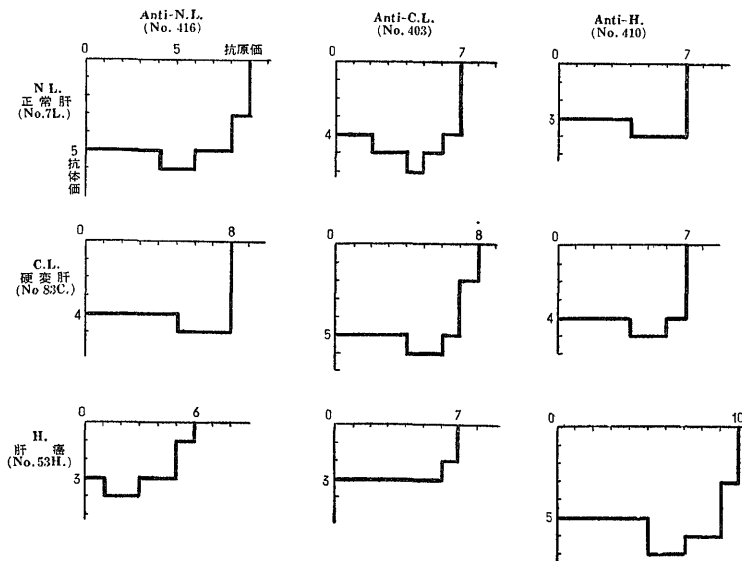
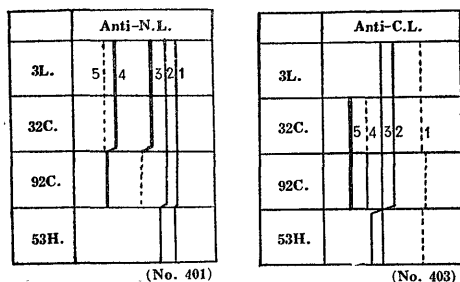
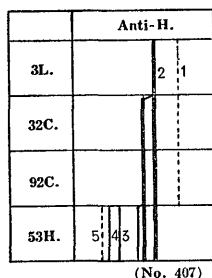


図 7



(a)

(b)



(c)

る。抗原と抗血清間に形成された沈降帯を抗血池からの距離により位置づけると図7のようなスペクトルに翻訳することができる。(図では、左方を抗原池側、右方を抗血清池側とする。)

抗正常肝血清 (Anti-N.L.) に対し正常肝では5コの沈降帯が現われる。もつとも抗血清側に近い2コの沈降帯1, 2は太く淡い帯をなし、中間の位置、それより抗原側に2コの沈降帯3, 4は鋭い強い線をえがいている。沈降帯4に近接して沈降帯5が抗原側にみられる。この沈降帯を Anti-N.L と硬変肝 (No. 32C) との間にもみられる沈降帯と比較してみると差異がないが、さらに進んだ硬変肝 (No. 92C, DAB 投与130日) との沈降帯を比べると差が認められる。すなわち、沈降帯は4コであるが、上記の沈降帯3が極度に減弱している。さらに Anti-N.L と肝癌 (No. 53H) とでは沈降線は2コで上記の沈降帯5, 4, 3がほとんど証明されない。

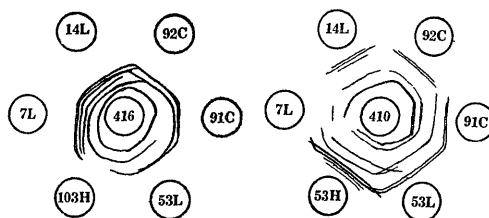
次に抗硬変肝血清を用いた場合、stage homologous な硬変肝 (No. 32C), (No. 92C) では5コの沈降帯が他の正常肝、肝癌のものより強く形成されている。正常肝との反応では沈降帯1, 2, 3が残つて4, 5が消失し、肝癌との反応では沈降帯3のみがやや著明に出現するが、他の沈降帯1, 2は微弱で、4, 5が消失している。

抗肝癌血清を用いた場合、正常肝、硬変肝との反応

では沈降帯2が鋭く強い線となつて出現し、その沈降帯の抗原池側に隣接して2'が、少し離れて沈降線1が微弱であるが出現している。肝癌との反応では、沈降帯3, 4, 5が新しく加わり、相隣れる抗原との間でspurを形成している。すなわち肝癌形成と同時に蛋白組成に新しい数個の成分の加わつたことが指摘される。

つぎに、抗正常肝血清、抗肝癌血清に対して DAB 飼養ネズミ肝蛋白を時間的な順序に配列して反応させてみた。その成績は図8の如くである。

図 8



まず抗正常肝血清 (No. 416) に対する反応をみると正常肝との間にもつとも強い沈降帯を形成しているが、癌化の経過をとるにしたがつて、正常肝の組成は漸次減弱してゆき、肝癌になると極めて微弱となる。一方抗肝癌血清 (No. 410) について同様な反応をおこさせてみるとこの関係は逆となる。すなわち、正常肝 (No. 7L) では微弱であつた沈降帯が DAB 飼養130の硬変肝 (No. 92C), DAB 飼養160日の硬変肝 (No. 91C) と進むにつれてやや増強し、肝癌 (No. 53H) が形成されると極度に強い特徴的な沈降帯が出現してくる。このもつとも強く現われる沈降帯2コのうち1コは No. 53L の非癌部に存在した組成が強化してきたものであるが、別の1コは非癌部に存在しない全く新しい組成といふことができる。

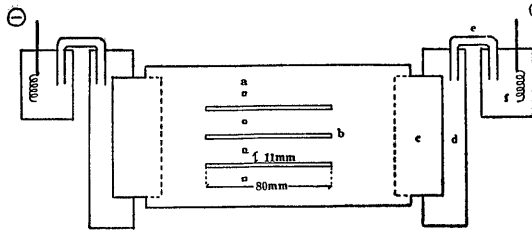
以上の如く、Ouchterlony 法によつて正常肝組成の一部は癌化が進行するに従つて減弱・消失してゆき、癌化が進むにつれて硬変肝の組成の一部が増強し、かつ正常肝組成、硬変肝組成にはみられなかつた新しい成分の出現することを指摘することができる。すなわち、癌化の経過中の肝臓蛋白組成の転換が明らかに証明されたわけである。

## 2. Immunoelectrophoresis (免疫電気泳動法) による解析

Williams & Grabar<sup>20)</sup> によつて始られた免疫電気泳動法<sup>21)</sup>には種々変法が考案されているが、著者は高柳<sup>7)</sup>の術式に準拠して行い、判定、吟味もまたその記載する所にしたがつた。

### 1) 実験方法

図 9



i) 寒天平板の作製

写真用ガラス乾板 (12×16.5cm) を支持台とし、その上に厚さ 5mm の寒天層をつくり、図 9 のように抗原池 (a) (2.5×6mm) と抗血清溝 (b) (3×80mm) (抗血清を容れる泳動方向と平行な細い溝) をつくる。抗原池、抗血清溝の作製には Ouchterlony 法と同様に真チュウ製鋳型を用いる。実験には抗原池と抗血清溝との距離を 11mm とした。同時に二種以上の抗原についての実験を同一寒天平板上で行えるように抗原抗血清の組合せを考慮して必要に応じて抗原池の数を変え、それぞれに應ずる抗血清溝をつくつた。

寒天メジウムは 4% 精製寒天 60g, リン酸緩衝液 (pH 7.5, μ=0.06) 90ml, 1000倍 マーゾニン液 20ml, 蒸留水 10ml (以上寒天平板 1 枚分) よりなる。

寒天平板の両端で、寒天二層中に濾紙片 (東洋濾紙 No. 50) をはさみ、その遊離端を緩衝液槽に浸して、寒天層と緩衝液とを接続する。

ii) 電気泳動

寒天平板を水平台上に支持し、濾紙電気泳動法におけると同様、定電流発生装置を用いて電気泳動を行う。電極は白金電極を使用し、電極槽に挿入し寒天橋により緩衝液槽につなぐ。緩衝液槽はプラスチック製容量 120ml, 中に寒天メジウムと同種の緩衝液をいれ、pH, イオン強度を同一とする。泳動部分は密閉箱中におさめ低温室 (4°C) においた。試料の抗原は 40 mg/ml, 0.05ml, 電流は 22mA, 電圧 150~220V, 8 時間泳動する。

iii) 抗原抗体反応

泳動終了後、直ちに寒天平板を泳動装置よりはずし、抗血清溝に抗血清 1ml をいれ、室温で反応させる。

電気泳動で分離された抗原および後で加えた抗血清は寒天層中を拡散して反応後 2 日目頃より弧状の沈降線が出現し始め、次第にその数、濃度を増してゆく。連日観察し、所見をとり、日をきめて写真撮影をする。

iv) 沈降帯糖蛋白染色

免疫電気泳動法で出現した沈降帯を過ヨード酸 Schiff 法により染色 (PAS 染色) し糖蛋白反応を検した。充分沈降帯の出現した寒天平板を生理的食塩水で 2~3 日洗い、沈降反応に関与しない蛋白を除去する。3% 過ヨード酸液で 2 時間処置——水洗 2 時間——Schiff 氏試薬で反応 30 分——亜硫酸水で洗滌して反応を観察する。陽性反応を示した沈降帯は紫紅色に染まる。

v) 吸収試験

反応の場より最適比を求め、相当量の抗原液を抗血清に加えたが、特に Ouchterlony 法、免疫電気泳動法に使用する場合は高濃度の抗原を少量加えることにより抗血清の稀釈効果の出現を防止した。抗原液を抗血清に加え、37°C 2 時間反応させ、氷室に 1 夜置き、遠心しその上清を吸収抗血清として使用した。

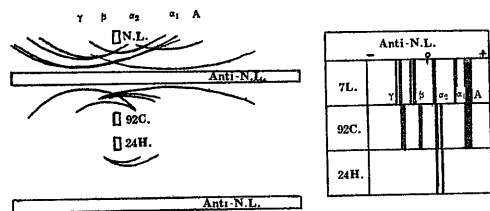
2) 実験成績

この方法の利点としてつぎの 2 点があげられる。i) 抗原をまず電気泳動でわけ、ついでそれと垂直方向に拡散による寒天層中沈降反応を行うので、抗原は二次元的に分離され、沈降帯の分別判定が明瞭で反応系指摘が比較的容易である。ii) 沈降帯の弧の頂点の位置によつてそれぞれの抗原組成が電気泳動的に何れの蛋白分面に属するものか決定することができる。

正常肝抽出蛋白 (No. 3L) を寒天中で電気泳動して、これに抗正常肝血清を反応させると図 10 のような pattern がえられる。

すなわち、(一) 側に大きな弧をえがく 1 コの沈降

図 10



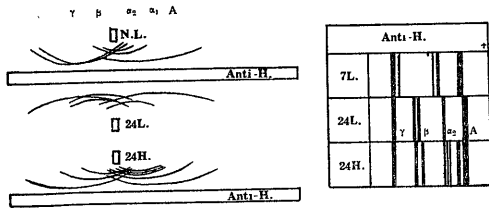
帯、抗原池の中央を原点とすると、その原点よりやや (一) 側によつて現われるかなり鮮鋭な弧をえがく 1 コの沈降帯、原点より少し (+) 側とやや離れた位置にそれぞれの頂点をもつた 2 コの沈降帯の略々 5 群より成る。これら沈降帯は血清の電気泳動分面に準じて (一) 側より γ-, β-, α<sub>2</sub>-, α<sub>1</sub>-globulin, albumin とすることができる。硬変肝 (No. 92C) では、沈降帯は (一) 極側より、鮮鋭な弧をえがく γ-gl., f-gl., 原点よりやや (+) 側に細くやや曲率半径の小さな弧をえがく 2 コの沈降帯 (α-gl.), (+) 側にみられる大きい



弧をえがく沈降帯の4群よりなる。肝癌 (No. 24H) と抗正常肝血清を反応させると、反応が微弱となり、写真ではほとんど沈降帯を証明しがたいが、 $\alpha$ -gl. 部位に小さな弧をえがく2コの沈降帯をみとめる。

正常肝抽出蛋白、非癌部抽出蛋白 (No. 24L), 肝癌抽出蛋白 (No. 24H) を抗肝癌血清と反応させると図11のようになる。すなわち、 $\gamma$ -gl. 部位にやや大きな

図 11



弧をえがく2コの沈降帯、 $\alpha$ -gl. 部位に1コの沈降帯、(+ )側に大きな弧をえがく alb. 部位の沈降帯がみられる。No. 24L とは、 $\gamma$ -gl. 部位に1コ、 $\beta$ -gl. 部位に2コ、 $\alpha$ -gl. 部位に1コ、alb. 部位に1コの4群がみられる。No. 24H と反応させると、 $\gamma$ -gl. 部位に1コ、 $\beta$ -gl. 部位に鮮鋭な2コの沈降帯、 $\alpha$ -gl. 部位に数コ重なった沈降帯、alb. 部位に1コの沈降帯がみられる。抗正常肝血清に対する非癌部蛋白と肝癌蛋白の沈降帯の増減の様子を比較すると、図12のようになる。すなわち、非癌部では  $\alpha$ -gl.,  $\beta$ -gl. および alb. 部位に強い沈降帯が出現し、とくに  $\beta$ -gl. 部位の組成が著明である。また抗肝癌血清に対する肝癌組成と非癌部組成の反応を比較すると、肝癌組成では  $\alpha$ -,  $\beta$ -gl. 部位の沈降帯が、非癌部のそれよりは強く出現して、とくに  $\alpha$ -gl. 部位に濃厚な数コの新しい沈降帯が出現しているのが目立つ。

また、肝癌と非癌部抽出蛋白とを抗硬変肝血清と反応させて比較すると肝癌組成では  $\alpha$ -gl. 部位の増強が著明であり、非癌部組成では  $\beta$ -gl. 部位の増強が著明である。

図 12

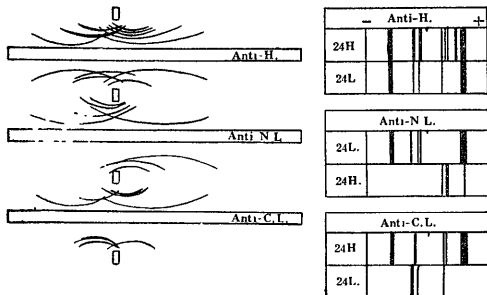
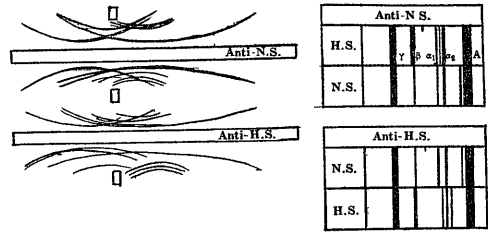


図 13



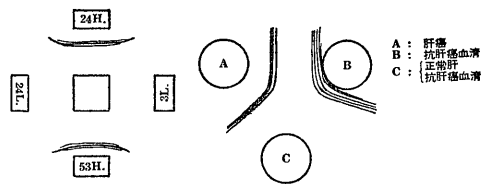
担癌ネズミ血清について免疫電気泳動法によつて解析すると図13の成績が得られる。正常ネズミ血清、担癌ネズミ血清をそれぞれ抗正常ネズミ血清、抗担癌ネズミ血清と反応させて比較したものである。担癌ネズミ血清では  $\alpha$ -gl. 部位に正常血清では証明されない新しい沈降帯の出現がみられる。

このように、発癌過程の各期における肝抽出蛋白とそれらの抗血清を交叉的に反応せしめ、比較検討することによつて、正常肝蛋白および肝癌蛋白の差異およびそれぞれの消長を追求することができる。

以上の成績で、癌化の経過に伴つて肝蛋白が転換し、肝癌になると正常肝ではみられなかつた異常抗原組成が出現することを証明したが、これが正常肝には存在しない特殊抗原組成かどうかを確かめる必要がある。そこでこれまでの実験と同様にして吸収抗血清を使用した実験を行った。

まず Ouchterlony 法によつて、正常肝で吸収した抗肝癌血清を中央の池におき、周囲に各種抗原を置いて反応させる。図14 (a) はその成績を示す。

図 14

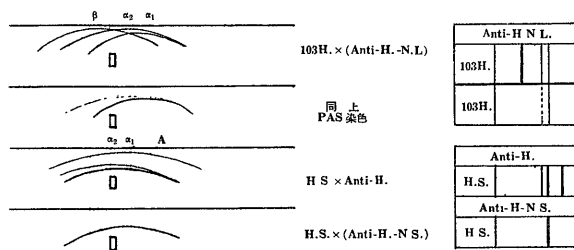


正常肝 (No. 3L) とでは反応が生じないが、肝癌 (No. 24H, No. 53H) とは抗原池よりかなり鋭く鮮鋭な沈降帯、それに隣接してやや淡い沈降帯が2コ出現している。担癌ネズミの非癌部 (No. 24L) は正常肝と同様に反応は陰性である。このことは肝癌のみに出現する特殊組成の存在を示している。

同じく Ouchterlony 法を利用して、抑制反応を生ぜしめるように図14 (b) の如く抗原、抗血清を配置して反応させてみた。すなわち、Aには肝癌抗原 (No. 63H), Bには抗肝癌血清 (No. 410), Cには抗肝血清

汚および過剰量の正常肝抗原 (No. 7L) をいれて反応させると、A-B間には肝癌の有するすべての抗原組成が現われ、A-C間には肝癌のみに含まれ正常肝に存在しない抗原組成が、B-C間には正常肝に共通な抗原組成が現われる筈である。A-B間をみると抗原池Aより強く鮮鋭な沈降線、少し離れてやや淡い沈降線、Bの周囲に数コ重なった淡い沈降線がみられ、A-C間には前の鮮鋭な沈降線と連続した沈降線がやや減弱し、相接していた沈降線も連続してみられる。B-C間には、Bの周囲に数コの重なった淡い沈降線をみるのである。結局、肝癌が有しているすべての因子群を、正常肝に共通なものと、肝癌に特異なものと

図 15



に区別できることになる。

次に免疫電気泳動法による吸収血清を使用した成績は図15(a)の示す如くである。

すなわち、抗肝癌血清を正常肝で吸収してつくった吸収抗肝癌血清と肝癌組成を反応させると、原点より(+)極側に向つて曲率半径の略々同大の3個の沈降帯が残る。これを血清の電気泳動像と対比することにより原点より(+)極側に向つてβ-, α<sub>2</sub>-, α<sub>1</sub>-gl. に相当する組成と判断できる。これらの因子群は正常肝には全く存在しないか、あるとしても極微量しか存在しないが、肝癌になると強く増量してくる特殊組成と考えられるであろう。

この3種の因子群は他の肝癌材料で吸収抗血清を反応させても常に沈降帯として残ることが証明された。

ついで寒天ゲル中に形成された沈降帯を過ヨード酸Schiff法(PAS法)によつて染色し、糖蛋白質の検出を行つた。その成績は図15(a)に示した如く、肝癌組成として残る3群の沈降帯のうち、もつとも(+)側のα<sub>1</sub>-gl. 部位の組成がきわめて強い陽性反応を呈し、α<sub>2</sub>-gl. 部位の沈降帯がわずかに染色されている。これより肝癌組成のうち、α-gl. 部位の組成には糖蛋白質が関与していることがわかつた。

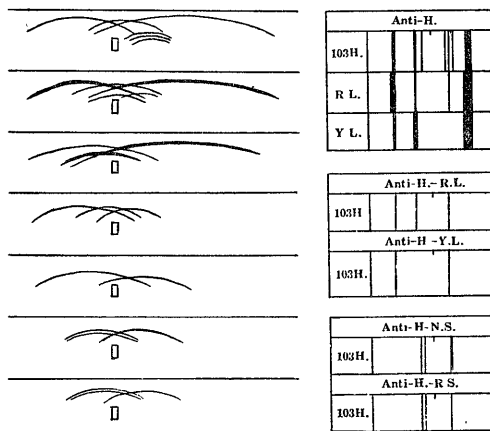
先に担癌ネズミ血清中にも特異組成の出現する結果を得たが、これを確かめるために、抗肝癌血清を正常

ネズミ血清で吸収した吸収抗肝癌血清を担癌ネズミ血清と反応させると、原点より少し(+)側に頂点をもつ弧が1コきれいに残存する。このことから、肝癌を形成した動物の血清中には、肝癌組成の一部が出現していることが明らかである。(図15(b))

発癌という現象は、組織の若返りあるいは成長と分化の平衡が破れた異常分化とみなすことができるので、他の細胞増殖の強い肝組織の抗原組成とを比較検討することが必要であろう。そこで幼若ネズミ肝と再生肝について抗原分析を試みた。

免疫電気泳動法によつて、抗肝癌血清に対し、幼若肝抽出蛋白および再生肝抽出蛋白を反応させた成績は図16に示される。再生肝抽出蛋白を電気泳動し、抗肝癌血清を作用させると(一)極より血清の電気泳動的分画に準じて、γ-, β-, α-gl., alb. の部位に沈降帯をみるが、肝癌組成にみられたものと比較すると、γ-gl., alb. 部位が著明である。幼若肝組成に抗肝癌血清を反応させると同様に、γ-, β-gl. alb. 部位に沈降帯をみるが肝癌組成パターンと比較すると、β-gl., alb. 部位の沈降帯が増強して明らかに肝癌組成パターンとは異つている。これ

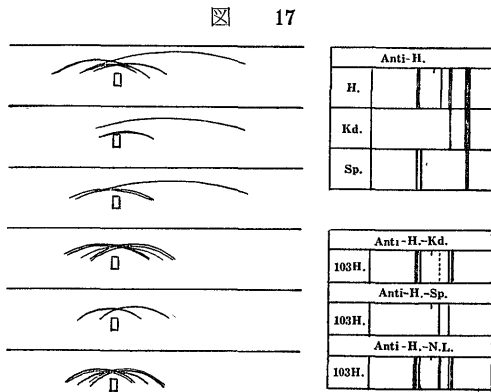
図 16



から肝癌組成と細胞増殖の強い幼若肝あるいは再生肝組成とを区別することができる。一方抗肝癌血清を幼若肝あるいは再生肝組成で処置した吸収血清と肝癌組成を電気泳動して反応させると、再生肝ではβ-gl., α-gl. 部位に、幼若肝はα-gl. 部位に沈降帯が残ることから、増殖の強い肝組織蛋白は肝癌組成の一部と共転する組成因子を含んでいることが明らかである。

つぎに肝癌組成と他臓器抽出蛋白との因子分析を行つてみる。まず成熟ネズミ腎出蛋白および脾抽出蛋白

を電気泳動し抗肝癌血清を反応させると、腎では alb. 部位と  $\alpha$ -gl. 部位に沈降帯を、脾では  $\beta$ -gl. 部位と alb. 部位に沈降帯が出現する。これを肝癌および非癌部組成と比較すると、腎の  $\alpha$ -gl. 部位に出現した沈降帯は肝癌組成の  $\alpha$ -gl. 部位にみられる沈降帯と一致しているが、それは著しく減弱している。脾にみられた  $\beta$ -gl. 部位の沈降帯は非癌部組成にみられた  $\beta$ -gl. 部位の沈降帯と一致していて、沈降帯の強さは略々同様である。つぎに肝癌組成を泳動して、抗肝癌血清を正常肝、腎、脾組成で吸収した抗血清を反応させて比較すると、脾組成を吸収したものでは  $\beta$ -gl. 部位の沈降帯が消失し、腎組成を吸収したものでは、 $\alpha$ -gl. 部位の沈降帯が減弱している (図17)。結局、肝癌組成には他臓器組成との共軛因子が含まれていることがわかる。



考 索

近年、癌組織蛋白の電気泳動的な研究に関してすぐれた報告がなされている。Miller<sup>22)23)</sup>らは発癌性物質 (DAB) と体内蛋白の結合について検索した。彼らは DAB 投与間および肝癌では、泳動の遅いいわゆる h 分画が正常肝の  $\frac{1}{2}$  に減少し、(+) 側に早く移動する A.N. 分画が増大していることを見出した。そしてこの h 部分に注目し、蛋白結合色素の定量成績より判断して癌原性アゾ色素が h 分画の特殊蛋白と結合し、この蛋白を deletion してゆき、肝癌ができあがるとこの蛋白が消失しているから結合色素もみられないとのべた。

一方 Sorof<sup>24)</sup>らは可溶性蛋白を電気泳動し、蛋白結合色素の70%以上が移動度の遅い h 分画に集まっていることを認め、h 分画の蛋白量は、肝癌では減少するが、再生肝では減少しないことをみている<sup>25)26)</sup>。また Sorof<sup>27)28)</sup>は h 分画がさらに細かく6つに分画され、slow-h<sub>2</sub>, h<sub>3</sub> 分画に蛋白結合色素が常にみられること

を明らかにし、h 分画を超速心分析法で分析している<sup>29)</sup>。最近、Arcos<sup>30)31)</sup>は DAB 投与ネズミ肝の肝ホジネートの上清蛋白を澱粉域電気泳動にかけて、陰極側へ移動する区分に二つの山があることをみいだした。陰極に早く泳動するものが、Sorof らのいう h 分画に一致するらしく、陽極に向つて泳動する蛋白成分には色素結合蛋白がみられなかつた。

寺山<sup>32)</sup>らは2, 3の発癌性物質および非発癌性物質投与ネズミ肝の上清について、澱粉域電気泳動を行い、上清には少くとも確実に色素と結合している3つの蛋白群が存在するが、色素と結合している特殊な蛋白は存在していないとした。

Hoffman<sup>33)</sup>らはアゾ肝癌について、可溶性蛋白を電気泳動にかけ、正常のものと比較して遅く泳動する分画が減少し、逆に早く動する分画が増加していることを報告している。彼によると、この現象は癌のみにもみられるものではなく、成長の早い幼若動組織や、蛋白合成のさかんな組織に共通なものであり、肝癌の電気泳動像は蛋白代謝様相が若い未分化組織に近いものを示ものであるという。Sorof<sup>25)</sup>らは、先に述べた DAB 肝癌のほか Jensen Sarcoma, Walker 256 carcinosarcoma, Flexner-Jobling carcinoma についても同様な傾向をみとめている。また、Eldredge<sup>34)</sup>は、ネズミの肝癌、Methylcholanthren 肉腫について、可溶性蛋白の電気泳動分析を試み、そのパターンを血清蛋白のそれと比較している。すなわち、肝癌で減少する成分は血清 albumin と同じもので増加する成分は血清  $\alpha$ -gl. に一致し、Methylcholanthren 肉腫で増加するのは血清中の  $\alpha$ -gl. に相当するものであると述べている。その他、Cruft<sup>35)</sup>らは正常ラット肝と肝癌の histone を抽出し、また Miller<sup>36)</sup>らはハツカネズミの Rhabdomyosarcoma よりミオジンを抽出し、それぞれ正常組織より得たものと、電気泳動的に差異をみとめたことを指摘している。

このように、従来の分析化学的方法でみいだされがたかつた癌蛋白の特性が、塩析法あるいは電気泳動法などの物理化学的方法でようやく指摘されるようになった。

筆者は塩析滴定法によつて、正常肝→DAB 硬変肝→DAB 肝癌の過程で、硫安低飽和沈澱分画が減少し、肝癌では高飽和沈澱分画の著しい増加を見出した。これは電気泳動的には泳動速度の遅い C 分画の減少、泳動速度の早い A 分画の増加で示される。教室の高柳は人の胃癌を塩析滴定法で分析し、癌部が正常胃部分に比して硫安 0.15~0.25 飽和域分画及び 0.3~0.45 飽和域分画が著しく減少し、0.5~0.6 飽和域

分画が著明に増加していることを見いだしている。筆者の DAB 肝癌の成績もこれによく一致しているから、癌化に伴う臓器蛋白の変動のパターンは、種属や臓器に無関係であるように思われる。

癌は組織の異常発生であり、正常発生と対比しての分析が望ましいわけであるが、教室の高柳<sup>7)</sup>によると、両棲類胚の発生では、分化の初期に硫酸高飽和沈澱分画（電気泳動では早く泳動する成分）が多く、分化の進むにつれてそれが減少し、低飽和沈澱分画が増加してくる。この関係は正常肝→肝癌の変化過程と丁度逆である。すなわち、癌は組織の幼弱化であるという考えが、その蛋白組成の点からも支持されることになる。

より一層の細かい蛋白分析には現在免疫化学的方法が最上と思われるから、筆者は Ouchterlony 法や免疫電気泳動法による抗原分析を DAB 肝癌について行つた。肝癌発生までの各時期の肝抽出蛋白とそれぞれの抗血清を交叉させて反応してみると stage homologous の抗原抗血清間において強い反応パターンを形成し、stage heterologous なもの間には微弱な反応を示すにすぎないことがわかつた。この点からも肝癌形成過程において、その蛋白組成がしだいに変転してゆくことをうかがい知ることができた。

腫瘍組織抽出蛋白についての免疫化学的な分析、特にゲル拡散法にもとづく実験は比較的少なく、Korn-gold<sup>37)</sup>らの卵巣癌、卵巣嚢腫、子宮癌などについての抗原分析があげられる。彼らは組織または腫瘍抽出蛋白について Ouchterlony 法を用いて分析し、これら腫瘍または組織蛋白では、 $\beta$ -gl. および  $\alpha_2$ -gl. 組成の抗原性の強いことを指摘している。

筆者の行つた免疫電気泳動法では、正常肝のつくる沈降帯パターンは比較的陰極側によつた分画、主として  $\beta$ -gl. 部位の組成が強くと、肝癌の沈降帯パターンでは陽極側、主として  $\alpha$ -gl. 部位において抗原組成の著明な増強があることを明らかにした。この点については、電気泳動で正常肝では泳動の遅い分画が大きく、癌化を伴うにしたがつて陽極へ早く泳動する分画が増大するという結果とよく平行している。

臓器特異性抗原が主としてミクロソーム中に含まれることは、Henle, Kabat, Furth ら (1941) によつて見出されている。著者が実験で使用した肝抽出蛋白は、抽出よりみて、細胞顆粒内容を含めた水溶性蛋白体であり、当然この中に臓器特異性抗原が含まれているものと考えられる。

肝の臓器特異性組成の消長は、抗正常肝血清を用いて分析することによつて追求しうる。正常肝でみられ

た強い沈降帯 4, 5 は癌化が進むにつれて減弱消失してゆく。この沈降帯は抗原池よりも位置し抗血清池に向つて凸の弧線を形成している (写真10)。Korn-gold<sup>38)</sup>の理論にしたがえば、この形状の沈降帯は抗血清  $\gamma$ -gl. に比較して拡散係数の小さな抗原蛋白にもとづくもので、まずこの場合  $\beta$ -gl. を主とした高分子量の組成が問題になると思われる。

癌化に伴つて臓器特異抗原が減弱ないし消失することについて Butenandt<sup>39)</sup>が報告している。彼は正常肝ミクロソームに対する抗血清をつくり、螢光標識抗体法によつて、DAB 投与ラッテ肝における肝臓特異抗原の消長を検索した。それによると、肝癌組織は全く抗肝血清と反応しない。しかし癌化していない肝組織においても、DAB 投与量に応じて肝特異抗体と結合しない非腫瘍性細胞集団をみとめる。このことは DAB 投与とともに、肝細胞における肝特異組成の消失がおこり、ついで形態学的な癌形成に移行することを物語るものであろう。

一方 Weiler<sup>40)</sup>は螢光抗体法を用いて肝特異性の証明を行つている。すなわち、肝特異性抗体を螢光標識したものは、肝組織を一樣に染め、DAB 投与によつて生じた肝癌組織を染めない。一定期間発癌性物質を投与して形態学的に癌化のみとめられない肝では、すでに免疫学的性質における変化が始まつていて、対肝特異性抗体は一部の細胞群しか染めることができない。この結果は免疫学的特異性の変化が、一般の形態学的方法によつて検出される変化に先行していることをよく示しているものである。

このように螢光抗体法あるいは本実験で行われた抗原分析の結果、正常肝の有する肝臓特異抗原は DAB 投与に伴つてしだいに失われ、遂に癌化することが追求できた。ゲル拡散法によれば肝癌形成と同時に新しい肝癌組成が出現する。DAB 投与ネズミで発癌した癌を癌結節と非癌部とにわけ、抗肝癌血清を用いて抗原分析すると、癌結節にのみ特殊組成が出現し、非癌部は正常肝とほとんど変化していない組成を示している。

Weiler<sup>41)</sup>らはさらに肝癌特異性について検索している。それによると、肝癌ミクロソームに対する抗血清を正常肝ミクロソームで吸収してつた肝癌特異血清は、正常動物の腎、脾、心などの臓器組成と反応する。すなわち、肝癌組成は肝臓組成に対して特異的であるが、他臓器と一部共通組成を獲得しているわけである。免疫学的に示される臓器特異性は、その蛋白組成の分化を表現しうるものとみなすことができ、上記の如き腫瘍発生において特異性が失われる過程を Bu-

tenandt は“Entdifferenzierung”とみなしている。著者の実験においても肝癌組成が腎、脾と共軛因子を有することは Weiler の成績とよく一致している。

ここで担癌動物の体液にみられる組成の変動に焦点をしばつてみたい。石川・高柳<sup>2)</sup>は Ehrlich 腹水癌をもつたハツカネズミ体液を免疫電気泳動法によつて解析している。それによると腹水中には 3 種の特異抗原因子が存在し、そのうち 2 因子は糖蛋白質が関与していることを吸収試験より確認した。さらに癌患者血清に関して検索がつづけられ、胃癌、子宮癌等各種癌について、特異性抗原組成の存在を明らかにしている。また Darcey<sup>4)</sup>は Walker 腫瘍の家兎血清と Walker 腫瘍にかかつたネズミ血清および正常ネズミ血清とをゲル拡散法による沈降反応で観察し、抗癌血清と担癌血清との間には正常ネズミ血清にみられなかつた一つの沈降帯(K-域)をみとめ、特異的抗原抗体反応であることを推察し、Campbell<sup>4)</sup>は担癌動物血しょう蛋白質を正常動物のそれと濾紙電気泳動、域電気泳動、免疫学的に比較し、 $\alpha_1$ -、 $\alpha_2$ -gl. にあたる蛋白質の増加をみとめ、これは癌に特有でなく、妊娠時、または肝切除を行つたのちにも同様の変化がみとめられたと述べている。

著者の実験でも DAB 肝癌ネズミ血清中に、 $\alpha$ -gl. に相当する新しい組成が現われることを証明できた。

## 総 括

ダイコクネズミに p-dimethylaminoazobenzene を投与して肝癌をつくり、経期的に肝可溶性蛋白質を抽出して、塩析滴定法、域電気泳動法、濾紙電気泳動法により分画し、その癌化過程におけるパターンの変化を追求めた。

また、肝可溶性蛋白質を Freund の adjuvant 法にて抗血清をつくり、沈降反応重層法、Agar gel double diffusion 法、Immunelectrophoresis 法により抗原分析を行つた。

得られた成績を要約すれば次の通りである。

1) 塩析滴定法によると、正常肝では硫酸 0.15~0.25 飽和域の低飽和沈澱分画が多い。DAB 投与とともにこれら分画が減少してゆき、癌化が進むにつれて、硫酸 0.45~0.6 飽和域の高飽和沈澱分画の著明な増加をみる。

2) 電気泳動法で分析すると、正常肝では(+)極側へ泳動の遅い分画が多いが、DAB 投与とともに漸次減少し、これに代つて(+)極へ早く泳動する分画が増加してくる。肝癌になるとの関係がさらに顕著

となつてくる。

3) 沈降反応重層法、Ouchterlony 法、免疫電気泳動法によつても、肝蛋白組成が DAB 投与の経過にしたがつて転換することを証明した。

4) Ouchterlony 法および免疫電気泳動法によつて、正常肝特異組成は DAB 投与とともに漸次弱体化減少し、肝癌特異組成は肝癌形成と同時に出現する。

5) 肝癌特異組成は  $\alpha$ -、および  $\beta$ -gl. 部位に一致した 3 コの因子群より成り、その一つは糖蛋白質である。また再生肝、幼若肝の組成と比較しさらに他臓器(腎、脾)組成とも比較してその特異性をたしかめた。

6) 担癌ネズミ血清中に、正常ネズミ血清にみられない新しい組成が出現する。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた恩師石川大刀雄教授に厚く感謝を捧げるとともに、多大の御教示と御協力をいただいた高柳尹立博士ならびに教室の諸兄に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Miller, E. C., Miller, J. A. : Cancer Res., 7, 468 (1947).
- 2) 石川大刀雄・高柳尹立 : 日新医学, 44, 361 (1957).
- 3) 高柳尹立・朝倉志良・建部守昭・石川大刀雄 : Gann, 50, Suppl., 232 (1959).
- 4) 原田三樹男・水谷太郎・丸谷八郎 : 大阪医会誌, 36, 783 (1937).
- 5) 曾我美勝・桃谷好英・井上康夫 : 化学, 10, 851 (1955).
- 6) 曾我美勝 : 日本生理誌, 17, 123 (1955).
- 7) 高柳尹立 : 十全医会誌, 60, 701 (1959).
- 8) 小林茂三郎・村井京子 : 濾紙電気泳動法の実際(森・小林編), 1 版, 105 頁, 東京, 南江堂, 1955.
- 9) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953).
- 10) Wilson, M. W., Pringle, B. H. : J. Immunol., 73, 4 (1954), 75, 460 (1955).
- 11) 鈴木 鑑・木戸義昭 : 日新医学, 43, 342 (1956), 45, 142 (1958), 45, 154 (1958), 45, 442 (1958).
- 12) 大原 達 : 日新医学, 44, 138 (1957).
- 13) 鈴木成美 : 日新医学, 45, 38 (1958).
- 14) 影山成章 : 日新医学, 45, 89 (1958).
- 15) 松橋 直 : 日新医学, 45, 162 (1958).
- 16) Freund, J. & Bonanto, M. V. : J. Immunol., 48, 325 (1944).
- 17) Freund, J. : Clin. Path., 21, 645 (1951).
- 18) 三宅康夫 : 倉敷中央病院年報, 第28年, 第1号, 38 (1959).
- 19) 緒方富雄 : 血清学実験法, 2 版, 69 頁, 東京, 南山堂, 1947.
- 20) Grabar, P., & Williams, C. A. : Biochem. et Biophys. acta,

- 17, 67 (1955). 21) Kaminski, M., & Durieux, J. : *Exp. CellRes.*, **10**, 590 (1956).  
 22) Miller, E. [C., Miller, J. A. : *Cancer Res.*, **12**, 282 (1952). 23) Miller, E. C., Miller, J. A. : *Cancer Res.*, **12**, 547 (1952).  
 24) Sorof, S., Cohen, P. P., Miller, E. C., Miller, J. A. : *Cancer Res.*, **11**, 383 (1951).  
 25) Sorof, S., Cohen, P. P. : *Cancer Res.*, **11**, 376 (1951). 26) Sorof, S., Clauss, B., Cohen, P. P. : *Cancer Res.*, **11**, 873 (1951).  
 27) Sorof, S., Golden, R. H., Ott, M. G. : *Cancer Res.*, **18**, 33 (1958). 28) Sorof, S., Young, E. M., Vogt, D. E. : *Cancer Res.*, **16**, 148 (1956).  
 29) Sorof, S., Golden, R. H., Ott, M. G. : *Cancer Res.*, **14**, 190 (1954). 30) Arcos, J. A., Arcos, M. : *Bioch. Biochys. acta*, **28**, 9 (1958).  
 31) Arcos, J. A. : *Naturwiss.*, **44**, 332 (1957).  
 32) Terayama, H., Otsuka, M. : *Gann*, **51**, 113 (1960). 33) Hoffman, H. E., Schechtman, A. M. : *Cancer Res.*, **12**, 129 (1952).  
 34) Eldredge, N. T., Luck, J. M. : *Cancer Res.*, **12**, 80 (1952). 35) Cruft, H. J., Mauritzen, C. M., Stedman, E. : *Natur*, **174**, 580 (1954).  
 36) Miller, G. : 中原和郎 (中原・吉田鑑集, 癌研究の進歩, 第1版, 9頁, 東京, 医学書院 1956.) による。 37) Korngold, L., Leeuwen, G. V. : *Cancer Res.*, **17**, 775 (1957).  
 38) Korngold, L., Leeuwen, G. V. : *J. Immunol.*, **78**, 172 (1957). 39) Budenandt, A. : 第14回医学会総会講演集 (1955).  
 40) Weiler, E. : *Z. Naturforsch.*, **116**, 31 (1956). 41) Weiler, E. : *Z. Naturforsch.*, **7**, 324 (1952).  
 42) Darcey, D. A. : *Brit. J. Cancer.*, **11**, 137 (1957) : *Natur*, **176**, 643 (1955). 43) Campbell, P. N., Kornot, B. A., Roitt, I. M. : *Biochem. J.*, **67**, 15 (1957), **71**, 155 (1959).

#### Abstract

The author has analyzed the water soluble proteins extracted from livers of adult rats and of those fed p-dimethylaminoazobenzene (DAB) by the salting out method, starch zone electrophoresis, and paper electrophoresis.

The antigen components of liver proteins extracted from livers of adult rats, of those fed DAB, regenerative liver and immature liver of rats, were analyzed by the ring test of precipitation, the agar gel double diffusion method, and immunoelectrophoretic method.

The results obtained are summarized as follows:

(1) In all series of experiment using 60 rats, the formation of hepatoma was seen in several rats survived for a long time more than 150 days, and the cirrhosis of liver were observed in rats lived for 60 days to 120 days.

(2) The protein fraction that precipitated by the lower degrees of ammonium sulfate saturation, were prominent in the normal liver and decreased gradually during the carcinogenesis. On the other hand, the protein fraction that precipitated by the higher degrees of ammonium sulfate saturation increased markedly in the DAB-induced hepatoma.

(3) The electrophoretic patterns of soluble proteins of the hepatoma and other preneoplastic livers showed a marked reduction of the slowly moving proteins and a great increasing of the more rapidly moving proteins.

(4) The water soluble proteins of livers consisted of complex antigen mixture and changed during the carcinogenesis.

(5) The antigen components of liver showed appreciable reduction in the DAB-induced preneoplastic liver and hepatoma. The tumor specific antigens which appeared in the DAB-induced hepatoma was not found in the preneoplastic liver of rats, but one of them appeared slightly.

(6) The tumor specific antigens consisted of 3 components which corresponded of  $\alpha$ - and  $\beta$ -gl. of normal serum. One of them was glycoprotein. These components were not found in the regenerative liver and the immature liver of rats, but one of them appeared in the serum of the tumor-bearing rats.

## 写真説明

1. 正常肝組織像.
2. DAB 飼養30日後 (No. 30) 肝組織像.
3. DAB 飼養60日後 (No. 51) 肝組織像.
4. DAB 飼養90日後 (No. 32) 肝組織像.
5. DAB 飼養130日後 (No. 92) 肝組織像.
6. DAB 飼養150日後 (No. 33) 非癌部肝組織像.
7. DAB 飼養150日後 (No. 53) 肝癌組織像 (Cholangioma 型).
8. DAB 飼養150日後 (No. 33) 肝癌組織像 (Hepatoma 型)
9. 濾紙電気泳動の成績 (図3).
10. Ouchterlong 法による成績 (図7, (a)).
11. Ouchterlony 法による成績 (図7, (b)).
12. Ouchterlony 法による成績 (図7, (c)).
13. Ouchterlony 法による正常肝組成の消長の追跡.
14. Ouchterlony 法による肝癌組成の消長追跡.
- 15a. 免疫電気泳動法により, 抗肝癌血清に対し, 非癌部蛋白との反応.
- 15b. 免疫電気泳動法により, 抗肝癌血清に対し, 肝癌抽出蛋白との反応.
- 16a. 抗正常肝血清に対し, 非癌部肝蛋白との反応.
- 16b. 抗正常肝血清に対し, 肝癌抽出蛋白との反応.
- 17a. 抗正常ネズミ血清に対し, 担ネズミ血清との反応.
- 17b. 抗正常ネズミ血清に対し, 正常ネズミ血清との反応.
- 18a. 抗肝癌ネズミ血清に対し, 正常ネズミ血清と

の反応.

- 18b. 抗肝癌ネズミ血清に対し, 担癌ネズミ血清との反応.
19. 吸収抗血清を用いた Ouchterlony 法の成績 (図14(a)).
20. 吸収抗血清を用いた Ouchterlony 法の成績. (図14(b)).
- 21(a). 吸収抗血清に対し肝癌蛋白との反応.
- 21(b). 吸収抗血清に対し, PAS 反応.
- 22(a). 肝癌抗血清に対し, 肝癌蛋白との反応.
- (b). 肝癌抗血清に対し, 再生肝蛋白との反応.
- (c). 肝癌抗血清に対し, 幼若肝蛋白との反応.
- (d). 再生肝組成吸収抗血清に対し 肝癌蛋白との反応.
- (e). 幼若肝組成吸収抗血清に対し 肝癌蛋白との反応.
- 23(a). 抗肝癌血清に対し, 肝癌蛋白との反応.
- (b). 抗肝癌血清に対し, 腎抽出蛋白との反応.
- (c). 抗肝癌血清に対し, 脾抽出蛋白との反応.
- (d). 腎組成吸収抗血清に対し, 肝癌蛋白との反応.
- (e). 脾組成吸収抗血清に対し, 肝癌蛋白との反応.
- 24(a). 抗肝癌血清に対し, 正常ネズミ血清との反応.
- (b). 抗肝癌血清に対し, 担癌ネズミ血清との反応.
- (c). 正常ネズミ血清吸収抗血清に対し, 担癌ネズミ血清との反応.

