

岡山医学会雑誌

第95巻3, 4合併号 (第1060, 1061号)

昭和58年4月30日発行

腫瘍膜蛋白の抽出および免疫学的指標としての 抽出蛋白による皮内反応

第1編

DOC および 3 MKCL 抽出膜蛋白による
マクロファージ遊走阻止活性の比較
—特に抽出方法の違いによるマクロファージ
遊走阻止活性の差を中心として—

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 折田薫三教授)

黒 瀬 康 平

(昭和57年11月9日受稿)

Key words: DOC 3 MKCL MIF

エールリッヒ腹水癌細胞

MH 134細胞

結 言

この20数年間に免疫学は長足の進歩を遂げ細胞性免疫のしくみが徐々に解明されつつある。なかでも、癌細胞表面の特異抗原に対するリンパ球、マクロファージのかかわりにはじまる担癌宿主の抗腫瘍作用は、臨床面での診断、治療に結びつく可能性から精力的に研究がおしすすめられている。又、癌細胞表面にあるとされる、Tumor-Associated Antigen (以下 TAA) が動物、およびヒトで発見されて以来^{1) 2)}、種々の抽出方法を用いて TAA の可溶化が試みられている。なかでも、表面活性剤である Sodium deoxycholate³⁾ (以下 DOC), high ionic stren-

gth である 3 M Potassium chloride⁴⁾ (以下 3 MKCL), 蛋白分解酵素の papain⁵⁾ などが抽出方法として用いられている。又、抽出方法の違いによる膜蛋白の量的、質的差についての検討も加えられている⁶⁾。抽出された TAA は、中和試験³⁾、沈降反応⁷⁾、補体結合反応⁸⁾、細胞障害試験、マクロファージ遊走阻止試験^{9) 10) 13)}などを指標にして、抽出蛋白の Antigenicity の検討がおこなわれているが、腫瘍の細胞膜上の不溶性の脂蛋白といわれている特異的な抗原を活性のある状態で可溶化するのとは容易なことではなく、抽出方法により種々の難点を持ってい

る。表面活性剤である DOC は可溶化には良い方法であるが、多くの可溶化産物から特異な分画を分離するのが困難であるといわれている¹¹⁾。papain はペプチド鎖を切って抗原性を示す蛋白のみをとり出すことを目的としているが、ペプチド鎖を切離する部位及び程度のコントロールができないことが難点であるといわれている。3 MKCL は抽出方法として比較的良く、抗原性も安定なりボ蛋白が得られるという報告が多い¹⁵⁾。このように種々の異なった抽出方法による報告はあるが、同一の腫瘍細胞に対し異なる抽出方法を用いて、その抽出蛋白の Antigenicity の程度を比較した報告は少ない。そこで本研究においては、癌細胞として、Ehrlich 腹水癌細胞および MH134 肝癌細胞を抽出方法として、DOC と 3MKCL の 2 種の方法を採用し、それぞれの組み合わせによる抽出膜蛋白の Antigenicity をマクロファージ遊走阻止活性（以下 MI 活性）を指標に検討することとした。

実験方法

1. 膜蛋白の抽出

DDS マウス腹腔内から無菌的に Ehrlich 腹水癌細胞を、C₃H/He マウス腹腔内から MH 134 肝癌細胞を採取し、生食で十分洗浄する。入江の方法で DOC を用いて膜蛋白を抽出した³⁾¹²⁾。すなわち、十分洗浄した癌細胞ペレット 10 ml に対し DOC 0.08 g, 0.01 MVB, pH 7.5 28 ml 0.01M MgCl₂ 2 ml を加え 20 時間かく拌し、10000×g 60分遠沈、上清を PBS で 48時間透析後 105000×g 60分超遠沈し、上清下 1/3 を粗抗原とした。さらに、ダイヤフロー UM 10 メンブレンを用いて粗抗原を濃縮し、MI テストに用いた。3 MKCL による膜蛋白の抽出は、Reisfeld の方法によった¹⁴⁾。すなわち癌細胞 3×10⁸個あたり、3 MKCL 10mM PBpH 7.2 を 10 ml 加え 16 時間かく拌、136000×g で 60分遠沈、上清を PBS で透析、次いで、10000×g 30分遠沈し、この上清をダイヤフロー UM 10 メンブレンを用いて濃縮し、MI テストに使用した。なお DOC および 3 MKCL による抽出操作は全て 4°C の低温室で無菌的におこなった。抽出液の蛋白濃度の測

定は、Folin-Lowry 法によった。

2. ゲル濾過

抽出した粗抗原を、Sephadex G-200 (column 15×900 mm) を用いてゲル濾過を行い、分画をグループに分け、各々のグループの MI 活性を計測し、抗原性の局在を検討した。

3. マクロファージ遊走阻止試験¹⁶⁾ (MI テスト)

1) リンパ球浮遊液の調製

マウスをエーテル麻酔下で断頭脱血し、リンパ節を周囲の脂肪や結合組織を除いて摘出する。感作リンパ球として、Ehrlich 腹水癌細胞、MH 134 肝癌細胞 5×10⁶ 個をそれぞれ DDS マウス、および、C₃H/He マウス背部肩甲間皮下に移入し、5日目の腋窩リンパ節リンパ球を用いた¹⁷⁾¹⁸⁾。摘出したリンパ節に PBS を少量加え眼科用剪刀で細切し、さらに適量の PBS を加え 30分間放置し、ガラス壁に付着する細胞を除去し、150メッシュフィルターでろ過すると単細胞浮遊液となる。1000 rpm, 5分間遠沈洗浄、PBS で 3 回同様に洗浄する。以上の操作は、できるだけ迅速かつ冷却状態で行う。これによって得られる細胞の生存率は Trypanblue 染色で 90% 以上である。

2) 腹腔浸出細胞の調製

体重 300~500 g の正常モルモットの腹腔内に滅菌流動パラフィン 20 ml を注入する。4日ないし 5日後エーテル麻酔下で頸動脈切断、脱血後に腹腔を開き、生理的食塩水を注入し、先端を鈍にしたピペットで洗浄液を採取する。この際腹腔内を損傷して出血させないように注意する。繰り返し洗浄し約 200 ml の洗浄液を数本の遠沈管に採取する。1000 rpm 5分間遠沈し、上層の流動パラフィンおよび上清を除去する。沈渣の約 10倍量の TC-199 培養液を加えて腹腔浸出細胞浮遊液とする。この腹腔浸出細胞の 70%~80% はマクロファージである。

3) MI テスト (毛細管直接法)

リンパ球浮遊液より、正常リンパ球あるいは感作リンパ球 200×10⁴個、腹腔浸出細胞浮遊液より浸出細胞 800×10⁴個を短試験管に混合し、1000 rpm 5分間遠沈し、上清の 0.5 ml を残し、他の上清を捨てる。一端をガスバーナーで封鎖した 75×0.7 mm の毛細管の開口部を下に向け、

細胞混合液の入った短試験管内へ8本づつ入れる。短試験管の口を水流ポンプに連結して陰圧をかけ毛細管中の空気を除去する。最初は小さな気泡が出始め次第に大きな気泡となる。気泡が出なくなる頃、徐々に短試験管内へ空気を入れ常圧とする。混合液は毛細管内へ吸いこまれ上閉鎖端まで充填される。毛細管の開口端が上になるように別の短試験管内に移し、800 rpm (155 × g) 3分間遠沈する。毛細管を細胞層と上清の境でアンブルカッターで直角に切断する。容量1 mlのmackness型の極少シャーレの底に円型カバーガラスを敷き、その上の2ヶ所にシリコングリス (Silicon high vacuum grease) を少量付着せしめ、2本の毛細管の閉鎖端をそれぞれシリコングリスに固定する。極小シャーレ4個を1個のシャーレに入れ1検体とする。極小シャーレ内に種々の濃度に抗原を加えた10%仔牛血清加 TC-199培養液を注入し、空気が入らぬようにカバーガラスで密閉する。これを5% CO₂培養器で37°C 24時間培養する。遊走面積の測定は、遊走部位を顕微鏡で20倍に拡大し、ビューアー上に透影する。縦径と横径とを測定し、縦径×横径を遊走面積とした。各群8本の毛細管の遊走面積の平均値±SEをAverage Migrationとし、その群の遊走面積とした。又抗原を含まないコントロールの遊走面積に対する遊走阻止の程度を%で示し、Percent Inhibitionとし、抗原性の強さの示標とした。

4. DOC および 3MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の抗原性の比較 (実験 I)

Ehrlich 腹水癌細胞から DOC および 3 MKCL を用いて抽出した膜蛋白を種々の濃度になるように培養液に加え、MI テストを実施した。コントロールは、正常マウス腋窩リンパ節リンパ球を用い、これに等量の抗原を加えた。

5. DOC および 3 MKCL 抽出 MH 134細胞膜蛋白の抗原性の比較 (実験 II)

実験 I と同様に、MH134肝癌細胞を用い、DOC 及び 3 MKCL で膜蛋白を抽出し、各々の抗原性を MI テストを指標に比較した。

6. 各種抽出蛋白のゲル濾過 (実験 III)

DOC および 3 MKCL を用いて抽出した Ehrlich 腹水癌細胞の膜蛋白、DOC で抽出した MH 134肝癌細胞膜蛋白に対し、Sepadex G-200を用いてゲル濾過を行った。さらにダイヤフロー U M 10メンブレンで膜蛋白を濃縮し、各群に対し MI テストを実施し、抗原性の局在を検討した。

実験結果

1. DOC 及び 3 MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の抗原性 (実験 I) (表 1・表 2)

膜蛋白の抗原性の指標は培養液に含まれる膜蛋白濃度を種々の濃度に変えて、培養液に膜蛋白を含まないコントロールに対する Percent inhibition で示した。DOC 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白では、蛋白濃度 5.0 μg/ml で有意の

表 1 Macrophage Migration Inhibition Activity of Ehrlich Ascites Cancer Cell Membrane Protein Solubilized by DOC

Antigen μg/ml	Nonimmunized lymphocytes		Immunized lymphocytes		
	Average migration cm ² (±SE)	Percent inhibition	Average migration cm ² (±SE)	Percent inhibition	
0	12.5±0.2	0	12.5±0.7	0	
0.04	13.4±0.8	+7.2 ^a	11.5±0.5	8.0	
0.2	12.5±0.2	0	13.1±0.6	+4.8 ^a	
1.0	11.6±0.2	7.2	10.3±0.7	17.6	
5.0	13.5±0.2	+8.0 ^a	9.6±0.2	23.2	0.001 < P < 0.01
25	12.7±0.7	1.5	8.2±0.5	34.3	P < 0.001
150	12.1±0.3	3.2	6.5±0.6	48.0	P < 0.001

a : + indicates migration greater than Control migration

表 2 Macrophage Migration Inhibition Activity of Ehrlich Ascites
Cancer Cell Membrane Protein Solubilized by 3 MKCL

Antigen m μ g/ml	Nonimmunized lymphocytes		Immunized lymphocytes		
	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition	
0	31.4 \pm 1.5	0	30.0 \pm 0.8	0	
10	31.9 \pm 1.4	+ 1.6 ^a	31.8 \pm 1.6	+ 6.0 ^a	
50	30.9 \pm 0.7	1.6	29.5 \pm 0.8	1.7	
100	30.1 \pm 1.6	4.1	29.5 \pm 1.0	1.7	
250	30.2 \pm 1.5	3.8	24.7 \pm 1.0	17.3	0.01 < P < 0.02
500	27.5 \pm 1.3	2.4	24.5 \pm 1.2	19.3	0.1 < P < 0.2

表 3 Macrophage Migration Inhibition Activity of
MH-134 Cell Membrane Protein Solubilized by DOC

Antigen μ g/ml	Nonimmunized lymphocytes		Immunized lymphocytes		
	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition	
0	36.3 \pm 1.6	0	34.7 \pm 2.0	0	
10	33.3 \pm 3.6	8.3	30.3 \pm 1.5	12.7	
50	33.7 \pm 3.4	7.2	26.4 \pm 0.3	23.9	0.1 < P < 0.2
100	33.3 \pm 2.3	8.3	26.7 \pm 3.7	23.1	0.1 < P < 0.2
250	27.6 \pm 2.0	24.0	26.1 \pm 1.0	24.8	
500	28.8 \pm 1.8	20.7	17.3 \pm 2.5	50.1	0.001 < P < 0.01
000	23.0 \pm 1.2	36.6	17.6 \pm 2.3	49.3	0.02 < P < 0.05

表 4 Macrophage Migration Inhibition Activity of
MH-134 Cell Membrane Protein Solubilized by 3 MKCL

Antigen μ g/ml	Nonimmunized lymphocytes		Immunized lymphocytes	
	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition	Average migration cm ² (\pm SE)	Percent inhibition
0	54.2 \pm 2.7	0	54.6 \pm 1.6	0
50	51.1 \pm 4.6	5.7	49.0 \pm 1.6	10.3
100	48.6 \pm 5.5	10.3	47.1 \pm 2.9	13.7
250	48.6 \pm 2.9	10.3	47.4 \pm 3.3	13.2
500	33.7 \pm 0.7	37.8	35.1 \pm 1.4	35.7

inhibition を示し、蛋白濃度が25 μ g/ml 150 μ g/ml と高濃度になるに従って Percent inhibition も高値を示した。正常リンパ球を用いた群では、抗原濃度の変化によって有意の遊走阻止を示さなかった。3MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋

白では、蛋白濃度100 μ g/mlまで遊走阻止を示さず、250 μ g/ml で有意の遊走阻止を示した。500 μ g/ml では、正常リンパ球を用いた群でも遊走阻止がみられ非特異的な遊走阻止が出現した。

2. DOC および 3 MKCL 抽出 MH 134細胞膜蛋白の抗原性, (実験II) (表 3, 表 4)

DOC 抽出 MH 134細胞膜蛋白では, 蛋白濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から遊走阻止を示し, 蛋白濃度の上昇

に応じて Percent inhibition が高値を示したが, 有意の差を示すのは, 抗原濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり, この濃度では, 非特異的な遊走阻止もかなりみられた. 3 MKCL 抽出 MH 134細胞

Sephadex G-200

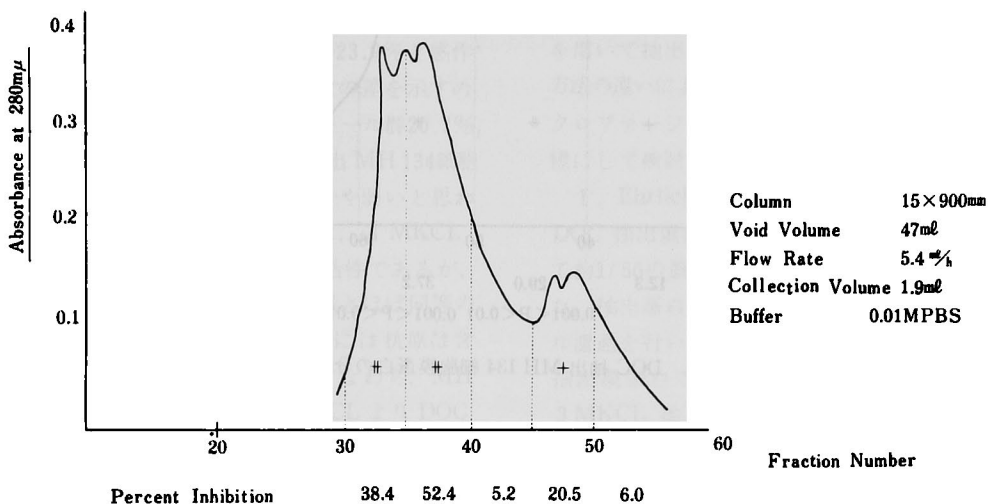


図1 DOC 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の分離

Sephadex G-200

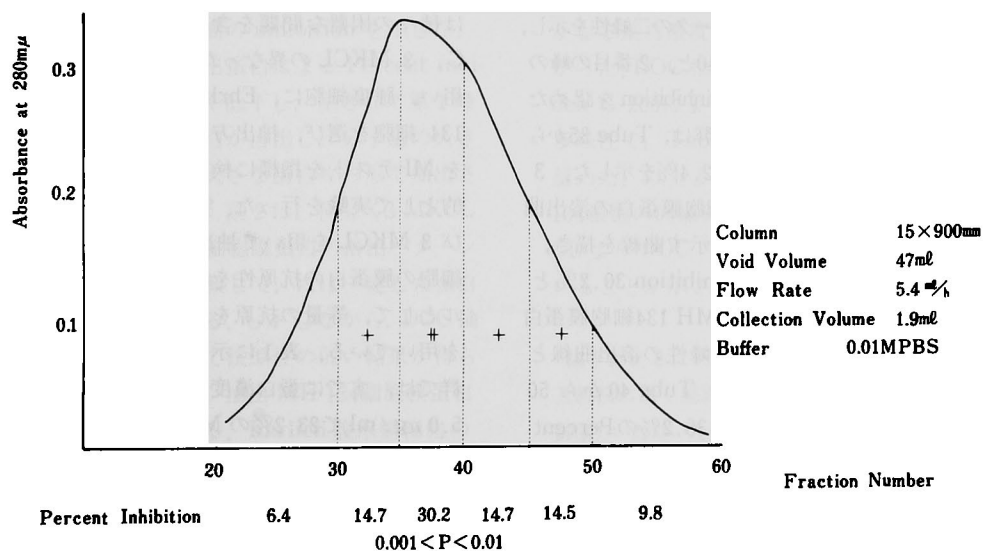


図2 3 MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の分離

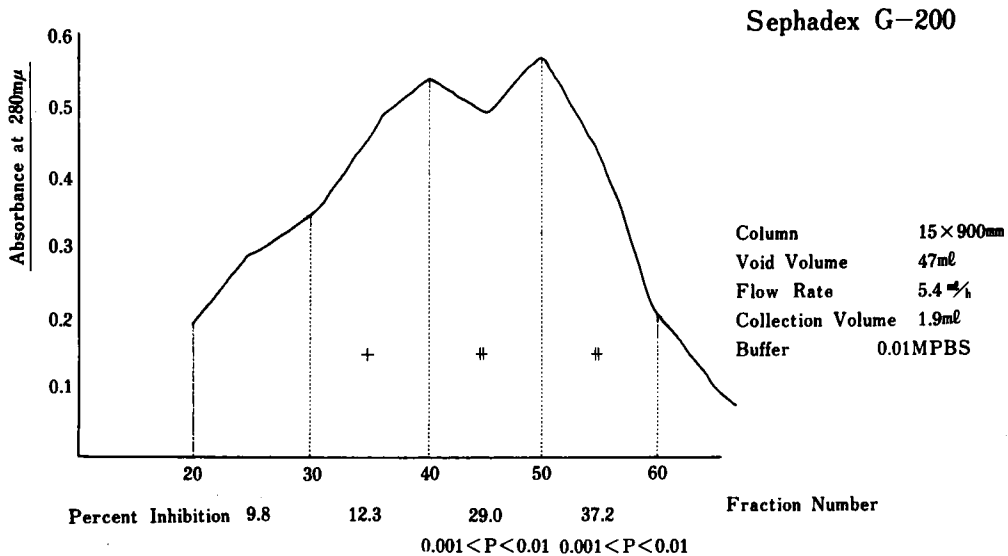


図3 DOC抽出MH 134細胞膜蛋白の分離

膜蛋白では、コントロールとの間に有意の差を示す遊走阻止はいかなる抗原濃度においてもみられなかった。

3. 各種抽出膜蛋白のゲル濾過と抗原性の局在、(実験Ⅲ) (図1, 図2, 図3)

DOC抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白を Sephadex G-200 を使用してゲル濾過すると、溶出曲線は、急峻なピークとそれにつづく低いピークの二峰性を示し、最初の峰にあたる Tube 30 から 40 と、2 番目の峰の Tube 40 から 45 に強い Percent inhibition を認めたが、最も強い抗原性を認めた群は、Tube 35 から 40 で、Percent inhibition は 52.4% を示した。3 MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の溶出曲線は比較的均一な蛋白分布を示す曲線を描き、Tube 35 から 40 で Percent inhibition 30.2% と有意差を認めた。DOC 抽出 MH 134 細胞膜蛋白の溶出曲線は、ゆるやかな三峰性の溶出曲線となった。MI テストの結果は、Tube 40 から 50 で 29.0%、Tube 50 から 60 で、38.2% の Percent inhibition を示し、この両群で有意差を認めた。

考 察

担癌生体が自己の癌細胞に対して細胞性免疫能を持っていることは種々の実験で示されているが、

これらの現象をとらえて癌の早期発見、あるいは、癌の発育程度の判定に利用する試みがなされている。特に共通抗原を有す悪性腫瘍の診断の目的に、腫瘍抗原を抽出し、特異的な免疫応答反応をとらえ臨床に応用することが可能になりつつある。しかしながら、生物学的活性を持つ抗原を、臨床応用可能な状態で抽出することは種々の困難な問題を含んでいる。今回は、DOC, 3 MKCL の異なった代表的な抽出方法を用い、腫瘍細胞に、Ehrlich 腹水癌細胞、MH 134 細胞を選び、抽出方法の違いによる抗原差を MI テストを指標に検討することを主たる目的として実験を行った。実験 I では、DOC および 3 MKCL を用いて抽出した Ehrlich 腹水癌細胞の膜蛋白の抗原性を検討した。コントロールとして、等量の抗原を加えた非感性リンパ球を用いている。表 1 に示す通り感作リンパ球の群では、すでに蛋白濃度 1.0 μg/ml で 17.6%、5.0 μg/ml で 23.2% の MI 活性を示し、かなり高濃度の抗原を含む膜蛋白が抽出できているものと思われる。しかしながら、3 MKCL を用いて抽出すると、表 2 に示すごとく、250 μg/ml の高濃度ではじめて有意の MI 活性を示した。ここで、MI テストの抗原認識に関する精密度

を除外して考えるならば、Ehrlich 腹水癌細胞の膜抗原の抽出には、DOC は 3 MKCL に比較して、よりすぐれた抽出方法であるといえる。実験 II は、同じく、DOC および 3 MKCL 抽出 MH134 細胞の膜蛋白の MI 活性をみたものであるが、DOC 抽出 MH 134 細胞膜蛋白は、表 3 に示すごとく、蛋白濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、コントロール群 8.3%、感作群 12.7%、蛋白濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、コントロール群 7.2%、感作群 23.9% と感作群に高い MI 活性を示すが、有意の差を示すのは、蛋白濃度 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、コントロール群 20.7%、感作群 50.1% を示した。DOC 抽出 MH 134 細胞膜蛋白は、抗原としての活性がやや弱いと思われる実験データである。表 4 は、3 MKCL 抽出 MH 134 細胞膜蛋白の MI 活性であるが、いかなる抗原濃度においても対照とほぼ同等の MI 活性しか示さず、抽出蛋白中には抗原は含まれていないものと思われる。すなわち、MH 134 細胞の抗原抽出には、3 MKCL より DOC の方がより適した抽出方法であるといえる。次に抽出した膜蛋白を、Sephadex G-200 を用いて、ゲル濾過を行い、含まれる蛋白の大きさによって分け、抗原の局在を検討した。図 1 に示す DOC 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞のパターンは、二峰性の溶出曲線を描き、最初の峰の Tube 30 から 35 の Percent inhibition が 38.4%、Tube 35 から 40 が 52.4% と最高の inhibition を示した。第 2 の峰にあたる抽出蛋白による Percent inhibition は 20.5% とやや低下し、主として第 1 峰に抗原性が高い膜蛋白が溶出し、分子量の大きな蛋白、あるいは、大きな蛋白片の形で抽出されるものと思われる。図 2 は、同じく 3 MKCL 抽出 Ehrlich 腹水癌細胞膜蛋白の溶出パターンであるが、DOC と比較して、ほぼ一定した蛋白分子が溶出されている。しかしながら、DOC 抽出の膜蛋白に比較して抗原性の弱い結果が得られた。図 3 は、DOC 抽出 MH 134 細胞膜蛋白の溶出パターンである。Ehrlich 腹水癌細胞の溶出パターンと同様に数種の異なった大きさの膜蛋白を含んでいる。しかしながら、Ehrlich 腹水癌細胞と異なり、Tube 50 から 60 に強い抗原性を持つ蛋白が溶出され、より小さな膜蛋白に強い抗原性が示された。以上より、本実験に

使用した癌細胞の抽出方法に関し、DOC、3 MKCL の両抽出方法を比較してみると、DOC は 3 MKCL に比較して、より抗原力価の高い膜蛋白を抽出し、しかも単一の蛋白でなく、数種の異なった膜蛋白を同時に抽出するといえる。

結 論

DOC、3 MKCL の代表的な 2 種類の抽出方法を用いて抽出した癌細胞の膜蛋白に関し、抽出方法の違いによる抽出膜蛋白の抗原力価の差をマクロファージ遊走阻止試験 (MI テスト) を指標にして検討し以下の結論をえた。

1. Ehrlich 腹水癌細胞を用いた実験では、DOC 抽出蛋白は、3 MKCL 抽出蛋白に比較して約 $1/50$ の蛋白濃度で有意の腫瘍抗原活性を示した。抽出蛋白を、Sephadex G-200 を用いてゲル濾過を行い、抗原活性の局在をみると、DOC 抽出膜蛋白では、2 峰性の溶出パターンを、3 MKCL 抽出膜蛋白では、単峰性の溶出パターンを示し、いずれも、Tube 35 から 40 に最高の抗原性の局在を示した。すなわち、生物学的活性をもった腫瘍抗原は、大きな蛋白片の形で抽出されているものと思われた。

2. MH 134 細胞を用いた実験では、DOC 抽出膜蛋白は、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白濃度で有意の抗原活性を示したが、3 MKCL 抽出膜蛋白はいかなる蛋白濃度においても有意の活性を示さなかった。DOC 抽出 MH 134 細胞膜蛋白の Sephadex G-200 によるゲル濾過の溶出パターンは、多峰性で、Tube 50 から 60 で最高の抗原活性を認めた。以上より、Ehrlich 腹水癌細胞、MH 134 細胞の両癌細胞の膜抗原の抽出には、3 MKCL より DOC の方がより抽出方法として適していることが示された。

稿を終えるにあたり、御校閲いただいた恩師折田薫三教授に深く感謝の意を表します。また、本研究に御協力いただいた教室の諸先生、研究室の諸嬢に心から感謝いたします。なお本論文の要旨は、昭和 53 年 11 月、第 37 回日本癌学会総会において発表した。

文 献

1. Hell ström, I., Hellström, K. E., Pierce, G. E. and Young, J. P. S.: Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature* **220**, 1352—1354, 1968.
2. Odili, J.L.: Transience of immune responses to tumour antigens in man. *Br. Med. J.* **4**, 584—586, 1971.
3. Reiko, F. I., Kusuya, N., Takehiko, T. and Shoshichi, T.: Immunological studies on mouse mammary tumors. IV. Extraction and solubilization of transplantation antigen of mousemammary tumor. *Int. J. Cancer* **4**, 150—158, 1969.
4. Chue-shue, L., Shin-hon, C. and Tienyu, L.: Inhibition of leukocyte migration by tumor-associated antigen in soluble extracts of human hepatoma. *Cancer Res.* **37**, 918—921, 1977.
5. Maurer, B.A., Dean, J.H., Dean, J., McCoy, J. L., Appella, E., and Law, L.W.: Brief Communication: Cell mediated immunity in mice against papain-solubilized histocompatibility and tumor-specific antigen by a macrophage migration inhibition microassay.
6. Part, M., Tarone, G., and Comoglio, P. M.: Antigenic and Immunogenic properties of membrane proteins solubilized, by sodium desoxycholate, papain digestion or high ionic strength. *Int. J. Cancer*, **4**, 150—158, 1969.
7. Bhattacharya, M., Barlow, J.J., Chu, T.M. and Piver, M.S.: Tumor-associated antigen from granulosa cell carcinomas of the ovary. *Cancer Res*, **34**, 818—822, 1974.
8. Akesson, R., Human lung organ-specific antigens on normal lung, lung tumors, and lung tumor cell line. *J. Natl.cancer Inst* **58**, 863—869, 1977.
9. Vaage, J., Jones, R. D. and Brown, B. W.: Tumor-specific resistance in mice detected by inhibition of macrophage migration. *Cancer Res.* **32**, 680—687, 1972.
10. Kyriazis, A. P., Wissler, R. W. and Dzoga, K.: Migratory inhibition of sensitized peritoneal macrophages by tumor specific transplantation antigen in Morris hepatoma 5123. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 75—79, 1971.
11. Reisfeld, R.A. and Kahan, B.D.: Biological and chemical characterization of human Histocompatibility Antigen. *Fed. Proc.* **29**, 2034—2040, 1970.
12. Irie, R.F.: Antigenic cross-reactivity between primary spontaneous mouse mammary tumors and their transplantable ascites tumors. *Cancer Res.* **31**, 2771, 1971.
13. Blasecki J. W and Tevethia, S.S.: *In Vitro* assay of cellular immunity to tumor-specific antigen of virus-induced tumors by macrophage migration inhibition. *J.Immunol.***110**, 590—594, 1973.
14. Reisfeld, R.A.: Salt extraction of soluble HL—A antigen. *Science* **172**, 1134, 1971.
15. Meltzer, M.S., Leonard, E.J., and Borsos, T.: Tumor specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**, 703—709, 1971.
15. 湯村正仁, : MIF 活性測定法, 臨床免疫, **5**, 643 1973.
17. 内田善夫: 癌進展性と担癌生体リンパ球の有する活性の相関, 岡山医学会雑誌, **89** : 865—874, 1977.
18. 湯村正仁: 癌移植の MIF 活性の経時的変化, 医学のあゆみ, **87**, 309—310, 1973.

**Extraction of tumor membrane protein and it's use in a
skin test for immunological monitoring**

**Part 1, Comparison of macrophage migration inhibition
activity between DOC— and 3MKCL—solubilized—
tumor membrane extract**

Yasuhei KUROSE

First Department of Surgery, Okayama University Medical School.

(Director : Prof. K. Orita)

Ehrlich ascites cancer cells and MHI34 cells were extracted with Deoxycholate(DOC) or 3MKCL. The antigenicity of these extracts was studied with the macrophage migration inhibitory test (MI-test), and the results can be presented briefly as follows:

1. The extract from DOC solubilized Ehrlich ascites cancer cells had about 50 times the antigenic titer of the extract from 3MKCL solubilized cells.
2. The extract from DOC solubilized MHI34 cells had an antigenic effect at 500ug/ml but the extract from 3MKCL solubilized cells had no effect at any concentration.
3. These extracts were fractionated with Sephadex G-200 and the antigenic sites were determined with the MI-test.