

Ehrlich 腹水癌移植腫瘍の局所リンパ節に 存在する抗腫瘍性に関する研究

第 1 編

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー による抗腫瘍性蛋白質の分離

岡山大学医学部第一外科教室（主任教授：田中早苗）

岡 野 彦

〔昭和 43 年 3 月 21 日受稿〕

第 1 章 緒 言

Virus 性腫瘍や methylcholanthrene 肉腫に抗原性があつて、弱いけれども抗腫瘍能を作りうることが知られている。(Klein¹⁾ 武田²⁾)

Ehrlich 腹水癌腫瘍をマウスの背部皮下に移植しその腋下および頸部のリンパ節よりとり出したリンパ球が、培養中の Ehrlich 腹水癌細胞、JTC 11 の表面に群集密着しその増殖を抑制すること(田中³⁾)、また、その抗腫瘍性は移植10日後に最高になること(原⁴⁾)、そのリンパ節ホモジネートの上清中にも増殖抑制作用があること(中島⁵⁾)、明らかにされており、また、この抗腫瘍性は腫瘍特異性を示す。このように癌のある時期には癌に対する抗体が存在すると考えられており、それがリンパ球の中にあることも推察されているのである。この実験は、そのリンパ節ホモジネート上清中の抗腫瘍性成分の分離、および生化学的性質を明らかにするためにおこなわれたものである。

第 2 章 実験方法

第 1 節 実験動物

dd 系雄マウス、生後 40 日のものを持ちいた。Ehrlich 腹水癌細胞は岡大癌研佐藤⁶⁾により、株化され JTC-11 として日本培養学会に登録されているものを dd マウス背部皮下に 50 万個移植し、10 日後に腫瘍が小指頭大となつているものをエーテル麻醉下に殺し、腋下および頸部よりリンパ節を摘出した。両腋下より 4 コ、頸部より 4 コのリンパ節がえられる。

また、この実験のため、1 回に 100 匹の dd マウスをもちい、それよりえたりんパ節は正常マウスで湿重量 4~5 g、Ehrlich 腹水癌移植マウスで 5~6 g であつた。このリンパ節はその被膜、附着した血管軟組織を可及的にのぞき、生理的食塩水で 2 回洗滌したのち、口紙の上へのせ水分をのぞき、湿重量をマイクロバランス上で測定しホモジネートとした。

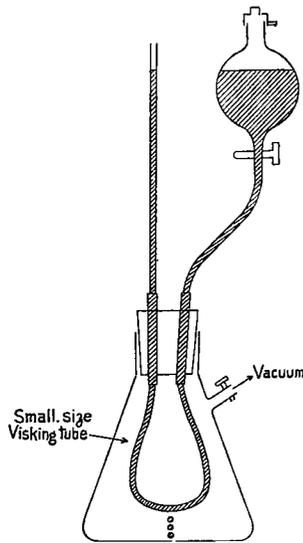
第 2 節 実験材料および試薬

Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) は日本生化学工業より購入した。³²P-Na₂HPO₄ はダイナボット RI 研究所より購入した。透折膜には Visking Seamless Cellulose Tube をもちいた。ミニポアフィルターは、(HAWP 025 00 25 ea, ha 0.45 μ) のものを三光純薬より、その他の有機、無機試薬はすべて試薬特級をもちい、メルク、片山化学、和光純薬、石津製薬より購入した。

第 3 節 リンパ節上清の調整

第 1 節のようにしてえたりんパ節に 0.01M NaCl を含む 0.01M phosphate buffer PH 7.2, 20 倍容(重量に対して)を加え、ガラスホモゲナイザーにてホモゲナイズする。ついでテフロンホモゲナイザーにて充分ホモジネートし、日立 40 p 型分離用超遠心機にて 140,000×g 50 分超遠心し、上清分画をえる。その上清をミニポアフィルター、(HAWP 025 00 25 ea, ha 0.45 μ) にて浮遊している脂肪片などをのぞき、Visking tube に入れ、Ultrafiltration にて濃縮する。すなわち、図 1 のような装置をつくり 2°C の部屋にて、水流ポンプで吸引し、吸引ビン内を充分陰圧にして約 12 時間おくと、内容水分および電解

図 1



質は速やかに透折膜より溶出して、内容はほとんど塩濃度を上昇させずに濃縮することができる。この水分透折量は、透折膜の長さによつてことなり、また陰圧によつても異なるので、直径 1 cm の Visking tube 内に 100 ml の抽出液が約 5 ml 位になるように充分注意して濃縮した。溶出液の中には $260\text{m}\mu$ に吸収をもつ恐らく核酸成分の小破片と考えられるものが相当量出た。このようにして濃縮した約 5 ml の Sample を再び 1 l の 0.5 M NaCl を含む 0.01 M phosphate buffer pH 7.2 にて 12 時間透折した。この際 Visking tube を気密にして両端をしぼり、内容に水分が増加しないようにした。

第 4 節 リン酸化合物の測定

phosphorous compounds は Schneider⁷⁾ の方法によつておこなつた。マウス屠殺の 24 時間前に $^{32}\text{P-Na}_2\text{HPO}_4$ $50\mu\text{c}$ を腹腔内に注射しておく。前述のようにしてえたリンパ節をホモジネートし、超遠心分離により上清をとる。10% 過塩素酸を加え、沈澱をとり、その上清を acid-soluble とする。ついで沈澱を ether-ethanol で 3 回洗い、ether-ethanol を lipids 分画とする。さらに沈澱を 5% 過塩素酸で 90°C , 15 分、2 回抽出し nucleic acids とする。その沈澱に 1N NaOH を加へ溶解し、phosphoprotein とする。おのおのを Davidson, Feigelson⁸⁾ に従つて dioxan, anisol, dimethoxyethan (6:1:1) に POPOP, POP を含む溶媒に 0.1 ml づつ加へ液体シンチレーションカウンターにより cpm を求めた。

第 5 節 蛋白量、窒素量の測定

窒素量は、マイクロキエルダール法によつて求めた。

蛋白量は、 $280\text{m}\mu$ 紫外吸収 Lowry⁹⁾ らの方法により求めた。また窒素量に 6.73¹⁰⁾ を乗じて参考とした。この実験では蛋白と核酸が混じている部分があり、これらによつて求めた値を参考として、蛋白量を同一にした。

第 6 節 Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィ-1)

Sephadex G-200 を蒸留水につけ懸濁し、数時間後上清をすて、再び、水を加へ、懸濁することをくりかえし、数日後充分膨潤するのをまつて、0.5 M NaCl を含む、0.01 M phosphate buffer に懸濁し、カラムを作る。カラムは $1 \times 200\text{cm}$, $2.5 \times 150\text{cm}$ のものもちいた。Sephadex G-200 を充填して、カラム bed volume の 3 倍量の buffer を流し、カラムを安定させる。カラムの上端には gel の層をいためないように、口紙をおく。その口紙の下へ第 3 節でえられた試料を $1 \times 200\text{cm}$ のものへは 1 ml, $2.5 \times 150\text{cm}$ のものへは 3 ml, 吸着させ、同じ buffer で展開する。溶出液は、自動記録式ユビコン-540(東洋)につなぎ、2 ml 分間で展開してゆく。自記分光光度計に peak が出るので、その peak の部分を 2 本おきに口紙電気泳動でたしかめながら溶出を終る。また、1 本おきに溶出分画より 0.1 ml をとり、その中に含まれる ^{32}P の活性を前述の方法によつてしらべた。

クロマトグラフィ-終了後、bed volume 10 倍量の buffer で充分にカラムを洗い、再び使用することができる。先端に残渣が残るような場合は、先端の部分の gel を 5 cm 位とりかえてから充分に洗つて再使用した。

第 7 節 口紙電気泳動

Kohn¹²⁾ に従つてセルローズアセテート膜、口紙電気泳動を用いた。泳動条件は 0.6mA/cm , 40 分、Nigrosin で染色した。

第 8 節 細胞培養

JTC-11 細胞 10,000 コを 20% 牛血清を含む YLE 液 10 ml 中で 37°C 静置培養する。

Sephadex G-200 より溶出した peak の中心 6 ml をとり、collodion bag をもちいた Ultrafiltration により濃縮し、0.15 M NaCl を含む、0.01 M phosphate buffer pH 7.2 で充分透折する。そのうち紫外吸収により吸光度をあわせ、すでに滅菌してあるミニポアフィルターをろ過し、その 1 ml を細胞の中に加える。対照には、正常マウスよりえたリンパ節ホモジネート上清の吸光度を同一にし、ミニポアフィル

ターをろ過してもちいた。細胞数計算は24時間、および48時間後におこなった。まず、培養管壁に附着して増殖している JTC-11 細胞をラパークリーナーでかきおとし、勝田¹³⁾に従ってクリスタルバイオレットを加へ染色し、Bürger-Turk 計算盤で染色された核を数える。

第3章 実験成績

第1節 燐化合物の定量

表1のごとき結果をえた。正常リンパ節と担癌局所リンパ節のあいだには、核酸分画が担癌の方に多い以外にほとんど有意の差はみられない。

Table 1 Phosphorous Compounds in Lymph Node

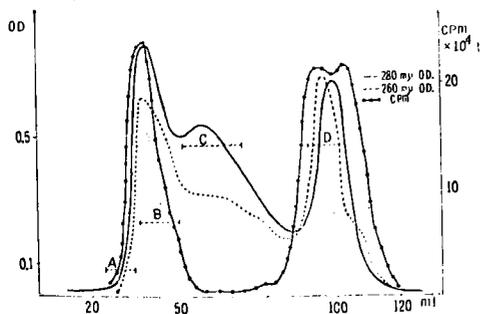
	normal	regional
Acid-soluble	420 cpm	445 cpm
Lipids	12	10
DNA+RNA	174	226
Phosphoprotein	10	14

100 mg 湿重量のリンパ節ホモジネート上清よりもとめた価である。

第2節 Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィ

図2のごとき溶出曲線をえた。280 μ m, 260 μ m, および cpm の曲線を示した。1 \times 200cm のカラムでも、2.5 \times 150cm のカラムでもほぼ同様な溶出曲線がえられた。しかも再現性が非常にすぐれている。先づ 20ml の付近より 50ml 付近まで1つの peak が現われ、(A, B)ついで第2の peak(C)が溶出し、最後に高い peak(D)が溶出する。これをセルローズアセテートでたしかめるとAの部分には原点に止つて動かない物質が溶出している。また、この

Fig. 2. Gel Filtration of Supernatant on Sephadex G-200

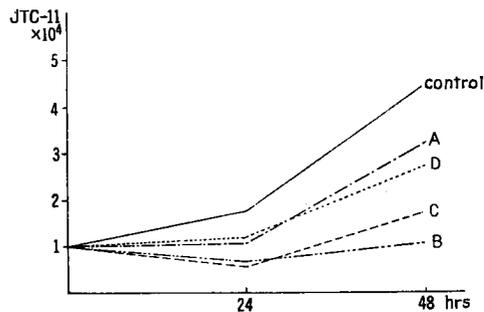


部分は、³²P の cpm も多く、核酸を含んでいると考えられる。Bの部分には原点より動かない物質と、 γ globulin, β gl. と考えられる物質をふくんでいる。Cの部分には β gl. α gl. と、albumin を含んでいる。Dの部分には、原点に止る物質と、ニグロシンで染色されないものが溶出している。この部分は核酸分画の小破片と考えられる。Bの中部よりCの中部までは 260 μ m : 280 μ m の価がほぼ1定であり、ほとんどが蛋白質からなつていると考えられる。このことは ³²P の cpm の価からも考えられることで電気泳動の結果と同じ結果を示している。

第3節 細胞培養

第2節の A, B, C, D 各分画の中央部より 6 ml をとり、それを Ultrafiltration で濃縮し、280 μ m の OD で濃度を一定にし、ついですでに滅菌してあるミニポアフィルターでろ過してその 1 ml を細胞培養に加えて、JTC-11 細胞の増殖抑制状態を観察した。図3にみられるごとく、分画Bが最も強く増殖を抑制し、ついでCが細胞増殖を阻害している。AおよびDはほとんど抑制を示さない。48時間の価でみるとBは 10000 コ、Cは 18000 コとなつている。

Fig. 3. Anti-tumor Activity of A, B, C, D Fraction by Gel Filtration



考 察

悪性腫瘍に対する免疫学的な試みは、Weiler¹⁴⁾が 4-methylaminoazobenzene で肝癌を発癌させると肝の特異抗原が消失するという報告をして以来急速に進展したようである。Vogt¹⁵⁾は Weiler の肝特異抗原は endoplasmic reticulum に存在することを発見し、ついで Nairn¹⁶⁾らはその antigen は, immunodiffusion test により特異抗血清で検出しようと報告した。Friedrich-Freksa¹⁷⁾は Sephadex G-200 column をもちいて、この antigen を分離し、それ

が 9 S protein であると報告した。そして発癌とともにこの 9 S の antigen は消失し、それに代つて癌特異抗原らしきものが出現すると考えられたのであるが、抗原抗体反応、double diffusion test などでも、明瞭に証明されたわけではない。Klein¹⁾、武田²⁾は、Virus 性移植腫瘍や化学物質で発生させた腫瘍には新しい細胞性の抗体が出来ると報告しており、Maisin¹⁶⁾もまた肝癌の microsome 分画中に特異抗原らしきものを見出している。Weiler の報告は癌に対する免疫化学の進歩に刺激を与えるに充分であつたが彼のおこなつた抗原検出法は Coons 螢光抗体法および補体結合反応をこれに加えた組織補体結合反応を考察して癌化に伴う、抗原性変化を確かめたという。しかしこの螢光抗体法において正常うさぎグロブリンに螢光を標識して観察している点に抗原喪失が正しいかどうかについて疑問がもたれた。その後 Khrankova^ら (19)-20) によつて Weiler の実験が正しかつたことが証明された。すなわち、C₃H マウス肝癌の 6 型をえらび、抗血清をそれぞれ作成、腎、脾、肺、血清など正常組織で吸収したものと肝癌のグロブリン分画を電気泳動法で 5 つに分かつたものとの間で寒天ゲル沈降反応をおこない抗体抽出による定量法で調べたところ正常肝を 100% とした場合肝癌では各分画において抗原量の減少欠如がみられた。しかしながらこの抗原性は、あくまでも抗原性で終つており強い抗体を作るには致つていない、弱い抗体で発癌に対しては少しの抵抗を示すようであるが発癌してしまつたものには何の影響もあたえない。癌の免疫をはばむ何らかの因子が存在するのであろう。Weiler の実験についてのべたようにこの一連の研究に用いた Ehrlich 腹水癌細胞と dd マウスは homologous の関係にあるので、その局所リンパ節中にある何らかの因子を考慮しなければならぬかも知れない。

教室、原⁴⁾は Ehrlich 腹水癌移植マウスの局所リンパ節中に培養器中で発育を抑制するリンパ球が存在することを見出し、その抗腫瘍能は腫瘍移植後 10 日目であることを報告した。このリンパ球は腫瘍細胞に群集密着し腫瘍細胞の運動発育を阻止するが、これは surface recognition theory によつて説明しうる現象でもある。その後教室、中島⁵⁾はこのリンパ球の膜に抗腫瘍能が存在するのがあるいはリンパ球細胞内にあるのかに興味をもち、まづ、リンパ球のホモジネートを作り、それを培養細胞に加え、やはり、増殖が抑制されること、またホモジネート上

清でも同じように増殖を抑制する事を見出した。すなわち、所謂、細胞性抗体は可溶性のものであるらしいことを知つたのである。わたくしは、この抗腫瘍能がどのような種類のものかを知るために本実験をおこない、Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーによりある程度分画し、電気泳動により恐らく蛋白質であることを確かめた。

正常と癌局所リンパ節上清のリン酸化合物を定量し表 1 に示したが、その間にはほとんど有意の差はない。ただ核酸分画が担癌の方に多くなつている。担癌マウスの局所リンパ節は正常に比してやや大きく肥大している。この現象は、炎症の場合でも同じことが観察され、移植ということが、感作としての 1 つの因子としてなりたつたことをものがたつている。

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーは、Flodin^らによれば、Tris-HCl buffer を用い、NaCl を 0.1 M しか含まない状態で血清の分画を行つている。しかし、この原理は分子篩作用であるので、NaCl の濃度が少いと protein-protein interaction があつて分離しないで大きな状態で溶出されることがあると言われる。そこで、0.1 M NaCl を 0.5 M NaCl として実験をおこない、Tris-HCl でも全く同じような溶出曲線がえられるが、Tris-HCl は、培養条件にあまりふさわしい物質とは考えがたく培養テストに加える前に透析操作を必要とする。ところがこのさい、Tris-HCl であると、透析中に蛋白質の沈澱を生じてくる。

このことは、リンパ節より抽出した蛋白が、2 価の金属イオンによつて不安定になる性質があるのではないかということを想像させる。Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーは、分子篩の原理によつて分子重量 20 万以上のものは分画されずに混合状態で溶出される。第 1 の peak はそれで A と B に分けたがそのわけ方は電気泳動によつている。B 分画の中にも核酸が混じていることは 260 m μ の吸収 ³²P-cpm から容易に想像できるがこの中には γ および β gl. 様移動を示す蛋白が含まれている。また C の中央部よりのものは β 、 α および albumin を含んでいる。この中には ³²P、260 m μ よりみて核酸は含まれていないと考えてよからう。両分画ともに細胞増殖を抑制しているが、両分画に共通したものは、 β グロブリン様蛋白の存在である。しかし、 γ や α に全く抗腫瘍作用がないとは断定できない。

ここで癌特異抗原の免疫化学的なものについて考察してみると、培養器中の Ehrlich 癌細胞は先祖の不明瞭なマウスに発生した乳癌由来のものといわれており、株化されてはいるけれども、移植腫瘍であり、dd マウスのリンパ節中のリンパ球が移植癌によつて感作されたという考え方からしても、明らかに homologous の関係にある。このリンパ節の中より取り出した蛋白の中に癌特異性があるかどうかということはやゝ問題があるかも知れない。しかし現在の免疫化学的証明法の中で免疫化学的活性細胞や血清を組織培養法を応用してその細胞増殖抑制や、cytotoxic test によつて証明することは1つの方法としてみとめられている²¹⁾。抗原と抗体とは、癌細胞を抗原とすれば抗腫瘍蛋白は抗体であろうが、抗腫瘍蛋白は癌細胞の側からは抗原となるわけである。移植癌という en masse の状態を感作と考え、その局所リンパ節中のリンパ球が、感作されたという考え方にも抗原の特異性と抗体の検出純化に際して問題となりうるのであろう。しかしこの実験では、抗

腫瘍性が、リンパ節の中にできるといういくつかの業績を再確認し、しかもリンパ節の中から可溶性の状態に抽出しえ、gl. 分画で、おそらくそれは、 β gl. 様蛋白であろうことを証明したものである。

結 語

1) Ehrlich 腹水癌腫瘍移植マウスの局所リンパ節中に、抗腫瘍性に働く蛋白質が存在する。

2) その蛋白質は可溶性であり、おそらく、 β gl. 様蛋白と考えられる。

3) 細胞培養実験の結果からこの抗腫瘍性蛋白はおそらく癌特異性があると考えられる。

(この論文の要旨は昭和41年中四国生化学会において発表した)

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜つた、田中早苗教授、山本泰久講師に深謝する。また細胞培養に始終御協力下さつた浜崎允彦博士に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Klein, G., *Cancer Res.*, 20, 1561 (1960)
- 2) 武田勝男, 最新医学, 20, 2826 (1965)
- 3) 田中早苗, 第65回日本外科学会総会 (1965)
- 4) Hara, S., *Acta Med. Okayama* 9, 91 (1965)
- 5) Nakashima, Y., *Acta Med. Okayama*, 投稿中
- 6) Sato, J., *Bull. Cancer Inst., Okayama Univ. Med. Sur.* 1, 42 (1961)
- 7) Schneider, W. C., *J. Biol. Chem.*, 161, 293 (1945)
- 8) Davidson, J. D., Feigelson, P., *J. Intern. Appl. Radiation and Isotopes.*, 2, 1 (1957)
- 9) Lowry, O. H., Rosebrongh, N. J., Farr, A. C., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 10) Pearsall, H. R., Chanutin, A. Z., *Am. J. Med.*, 9, 297 (1949)
- 11) Flodin, P., Killander, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 404 (1962)
- 12) Kohn, J., *Clin. Chim. Acta*, 3, 450 (1958)
- 13) Katauta, H., *Tissue Culture Technic*, 107 (1955)
- 14) Weiler, E., *Z. Naturforsch.*, 7, 324 (1952)
Weiler, E., *Z. Naturforsch.*, 11, 31 (1956)
- 15) Vogt, P. K., *Z. Naturforsch.*, 15, 213 (1960)
- 16) Nairn, R. C., *Brit. Med. J.*, 1335, 1341 (1960)
- 17) Friedrich-Freksa, H., Süs, R., Lanka, E., Börner, P., "Cellular Control Mechanisms and Cancer" P 272 (1964) Elsevier Pub. Co. Amsterdam
- 18) Maisin, J., *Arch. Sci. Med.*, (tor.) 113, 3 (1962)
- 19) Khramkova, N. I., Abelev, G. I., *Nesplasma*, 10, 121 (1963)
- 20) Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., Abelev, G. I., *Nesplasma*, 10, 127 (1963)
- 21) 病気の生化学, 癌 17, P 71, (1967)

Antitumor Activity of the Regional Lymph Node Protein of
Mice Transplanted with Ehrlich Ascites Tumor

Part 1. Fractionation on Sephadex G-200 Column
Chromatography

By

Yutaka OKANO

Department of Surgery Okayama University Medical School

The regional lymph nodes of mice transplanted with Ehrlich ascites tumor have an inhibitory effect for cultured Ehrlich ascites tumor. The supernatant of homogenized regional lymph nodes were fractionated on Sephadex G-200 column chromatography. The elution curve was fractionated in main three peaks, and the later half of the first peak and second peak were effective for the suppression of Ehrlich ascites cell growth. These two fractions were agreed electrophoretically protein.
