

# 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 2 編

### DEAE Sephadex A-50 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, 精製

岡山大学医学部第一外科教室 (主任教授: 田中早苗)

岡 野 鷹

(昭和 43 年 3 月 21 日受稿)

#### 第 1 章 緒 言

最近の分子生物学, 蛋白質化学の著しい進歩とともに癌の免疫化学も, 急速な進歩をとげたが, しかしながらなお, 癌の抗体は確証をえず, また免疫療法へ希望もまだ遠い感が深い。

癌について, 免疫学的概念や細胞の surface recognition などの理論をもちいた仮説がかなりみられるが, その論理は, あくまでも仮定的なものであり, 根本問題からは, ほど遠い感が深い。細胞培養を用いてリンパ細胞や脾細胞の抗体を追求する研究や, 抗体グロブリンの証明などもおこなわれている<sup>1)-2)</sup>。また培養リンパ細胞が抗体を作ることも証明されており<sup>3)</sup>, リンパ細胞が抗体をもっているという考え方は正当化されているようである。

わたくしは, 第 1 編において Ehrlich 腹水癌移植マウスの局所リンパ節のなかに, 抗腫瘍性をもつ蛋白質が存在することを報告したが, この論文ではその蛋白質を分離し, その化学的性質について研究した。

#### 第 2 章 実験方法

##### 第 1 節 実験動物

dd 系雄マウス, 生後 40 日目のものをもちいた。Ehrlich 腹水癌細胞は, 岡大癌研佐藤により株化され, JTC-11 として日本培養学会に登録されているものを癌研の好意により, 提供をうけた。Ehrlich 腹水癌細胞  $5 \times 10^5$  コを背部皮下に移植し, 10 日後に腫瘍が小指頭大になったものをエーテル麻酔下に殺し, 腋窩および頸部リンパ節をとる。このリンパ

節を充分生理的食塩水で洗い, ロ紙の上で脱水して秤量, ホモジネートする。

##### 第 2 節 実験材料

DEAE Sephadex A-50, medium grade, Sweden, Pharmacia のものを日本生化学工業より購入した。透析膜は, Visking Seamless Cellulose tube をもちいた。その他の有機試薬はメルク, 和光純薬, 片山化学工業, 石津製薬より購入した試薬特級をもちいた。

##### 第 3 節 リンパ節上清の調製

剔出したリンパ節をマイクロバランスで秤量した後, 0.01M NaCl を含む 0.01M phosphate buffer pH 7.2, 20 倍量を加え, ガラスホモゲナイザー, ついでテフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズする。日立分離用超遠心器 40P 型にて 140,000×g, 50分超遠心し, 上清分画をとる。その上清分画をミニポアフィルター (HAWP 025 00 25ea, ha 0.45 $\mu$ ) にて浮遊している脂肪片や, 140,000×g で沈下しない小浮遊片をのぞき small size Visking tube に入れ Ultrafiltration にて濃縮する。約 5 ml に濃縮した試料を再び, 0.01M NaCl を含む 0.01M phosphate buffer pH 7.2 にて 1 昼夜透析する。

##### 第 4 節 蛋白質量, 窒素量の測定

窒素量はマイクロケルダール法によつてもとめた。蛋白質はこの窒素量に 6.73 を乗じ参考とした。また多くの場合は 280 m $\mu$  紫外吸収によつたが, Lowry 法<sup>4)</sup>の方法によつてもとめ, 参考とした。

##### 第 5 節 DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー<sup>5)</sup>

DEAE Sephadex A-50, medium grade をまづ蒸

留水につける。充分に洗つて、膨潤させる。ついで、1N NaOH で洗い磁製ロートで吸引脱水し、等量 1N HCl で洗う。この操作を2回くりかえし蒸留水で充分洗う。そして蒸留水中で、suspension として pH を 7.2 に調整しておく。使用前 0.01M NaCl をふくむ 0.01M phosphate buffer pH 7.2 (initial buffer) に suspend しておき、decantation をまつて上清をすて、この操作を数回くりかえす。この suspension を  $2 \times 30$  cm のカラムにつめる。カラムは  $2 \times 25$  cm とする。カラムを initial buffer で充分洗い、Conductive Meter, (CDM-2) で initial buffer とカラムより溶出される buffer のイオン強度が全く同一であることをたしかめる。東洋自動記録式フラクションコレクターにつなぎ、ついで、第4節で作つた試料をカラムにつける。充分吸着させ、カラム上端を数 ml の buffer で数回洗い、クロマトグラフィーを始める。クロマトグラフィーは、initial buffer 150ml~200ml 流せば充分であり、この間に 7 gl. 様蛋白が溶出する。この溶出をまつて 0.3 M NaCl を含む 0.01M phosphate buffer pH 7.2 で linear gradient elution をおこなう。mixing chamber には initial buffer を入れ 250ml である。このようにして  $\beta$ ,  $\alpha$ , albumin 様蛋白を分画溶出させる。albumin の溶出をまつて 0.5 M NaCl を含む 0.1N NaOH を加へ核酸分画 ( $260m\mu$  に吸収極大をもつ) を溶出させ、クロマトグラフィーを終る。

### 第7節 細胞培養

カラムクロマトグラフィーでえられた各分画を collodion bug を用い Ultrafiltration により濃縮し、さらに 0.15M NaCl をふくむ 0.01M phosphate buffer pH 7.2 で充分透析する。この操作によつて核酸分画の部分は、collodion bug を通過する小分子のものが相当存在し、また透析中にも Visking tube 外へ漏出している。この様にしてえた試料を紫外吸収  $280m\mu$  で蛋白量を同一にそろえ、対照として正常マウスリンパ節よりえた、total gl. 様蛋白 (硫酸沈澱によりえる) を加えて、細胞培養テストを行つた。細胞培養テストについては、第1編第2章、第7節に詳細に記した。

### 第8節 超遠心分析による抗腫瘍性蛋白の沈降系数測定<sup>5)</sup>

第7節でのべたように充分濃縮し、その 1ml をもちいて、日立超遠心分析器により有効分画の沈降系数を測定し、S 20 w を算定した。

### 第9節 電気泳動

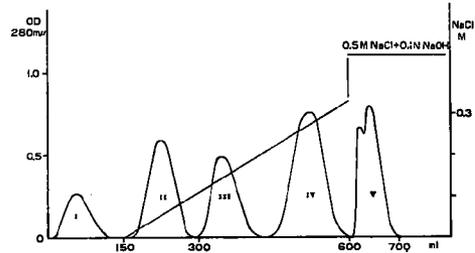
Kohn<sup>6)</sup> に従つて Cellulose acetate 膜 (oxid) 電気泳動をおこない Nigrosin 染色により単一に分離されていることをたしかめ、その電気泳動的性質を記した。

### 実験成績

#### 第1節 DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーと電気泳動

図1に示したような溶出曲線がえられた。各 peak は autorecorder により記されており、その部分を Ultrafiltration により全て濃縮した。その peak ごとに電気泳動的にたしかめたが、peak I は 7 gl. 様移動を、peak II は  $\beta$  gl. 様 peak III は  $\alpha$  gl. 様 peak IV は albumin 様移動を示した。peak V は原点にとどまり動かなかつた。

Fig. 1, DEAE-Sephadex A-50 Chromatography of Supernatant

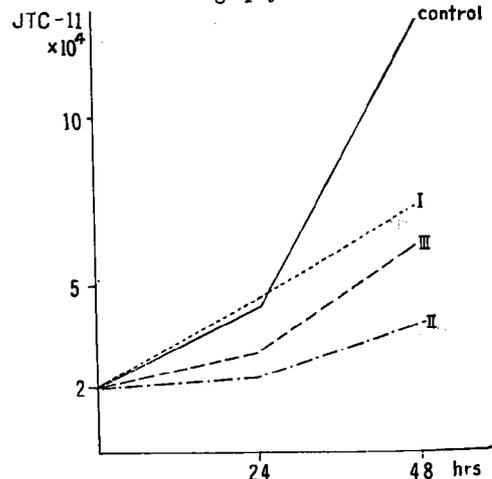


とに電気泳動的にたしかめたが、peak I は 7 gl. 様移動を、peak II は  $\beta$  gl. 様 peak III は  $\alpha$  gl. 様 peak IV は albumin 様移動を示した。peak V は原点にとどまり動かなかつた。

#### 第2節 各分画の細胞培養

図2 peak I, II, III, IV, V について細胞培養 test

Fig. 2, Anti-tumor Activity of I, II, III Fraction by DEAE-Sephadex A-50 Chromatography

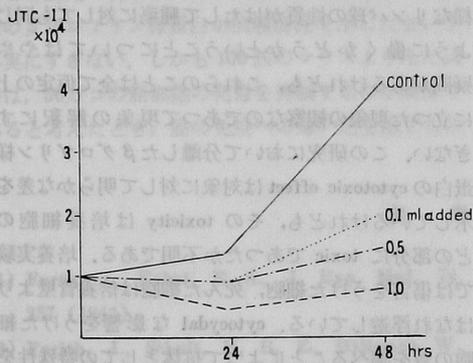


をおこなった結果、対照に比してII, IIIが有効であった。しかしIIが最も有効で、この peak の電気泳動は、 $\beta$  gl. 様移動を示し、1部  $\alpha$  にまたがっていた。IIIがやや有効として示されているゆえんであろう。peak IV, Vは全く無効であつたので、図中に示さない。各分画の蛋白量は1 ml 中、400  $\mu$ g である。

### 第3節 peak II の濃度変化による細胞培養 test

peak II を1 ml 中 500  $\mu$ g の濃度で加えたもの、その1/2の濃度にしたもの、その1/10にしたもので test をしたのが図3である。500  $\mu$ g のものが最も有効であるが、1/10の濃度でも相当に抑制している。また 500  $\mu$ g/ml の濃度は相当に高いものである。

Fig. 3. Anti-tumor Activity of Peak II



### 第4節 超遠心分析

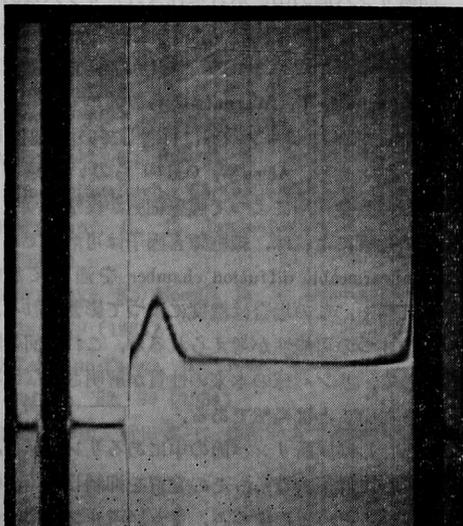
peak II, IIIの超遠心分析(の結果を写真で示した。図4に示すように超遠心分析)的には単一であり、peak II は、S20w 6.5, peak III は、S 20 w 7.4 である。

### 考 按

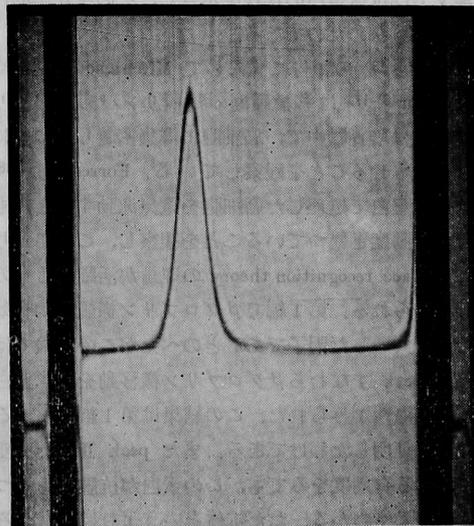
癌と免疫の関係は癌患者の中で数万人に1人位の割合で自然治癒するものや、血中に癌細胞が多数証明されるにもかかわらず、リンパ節転移のないもの、癌患者にワクチン療法を施して有効なものがあつた例などから、癌にも免疫機構があるのではなからうかと考えられてきた。しかし未だ自然発癌の免疫がたしかにあるという証明は恐らくないのではなからうか。

Hirszfeld ら<sup>7)</sup>, Witebsky<sup>8)</sup>, Morelli<sup>9)</sup>, Lehman<sup>10)</sup>らのリビドハプテンについて、癌特異抗原を証明しようとしたが、むしろ種特異抗原を含んだものとしてとり出し、その後、正常組織で吸収した結果癌特異性のある脂質抗原をえている。癌特異抗原が、膜に存在するか、細胞質に存在するか、核に存在するかについて多くの検索があるが、この実験では、移植発育した癌組織を1塊として抗原と考えてとりあつかつており、抗原因子の存在を癌組織としてみておこなつたものである。Ehrlich 腹水癌は JTC-11 として株化されているが発生の不確実な株化細胞であり、それを dd マウスに移植したものであつて

Fig. 4.



Peak II 6.5 S 20 w 60 min of 51, 200 rpm



Peak III 7.4 S 20 w 30 min of 51, 200 rpm

腫瘍と dd マウスは homologous な関係にある。したがって癌特異性ととも種特異性が含まれていることは否定しがたいことと前提としなければならない。

さて、田中ら<sup>11)</sup>はこの Ehrlich 腹水癌細胞を培養し、それに、移植癌の局所リンパ節よりえたリンパ球を加えると、リンパ球は培養腹水癌細胞に群集附着し、癌細胞の活動を止め、増殖、分裂を阻止し、時には死滅させる像を time-lapse cinematography で観察した。原は<sup>12)</sup>、局所リンパ球が移植10日目に最高の腫瘍増殖抑制能を示すことを明らかにし、cell-impermeable diffusion chamber 中の癌細胞の発育も抑制しうることを観察している。橋本らは、diffusion chamber 中ではリンパ球によつて影響をうけないと報告しているが、これは、加えたリンパ球の数によるものと考えられ、原は20万コでは無効、100万コで有効とのべている。

リンパ節や脾の抗体グロブリン分画については、Furth, Schuit, Hijmans<sup>2)</sup>, Dresser ら<sup>3)</sup>の報告で明らかであるが、彼らの実験では全て immunoglobulin としてあつかわれており、また 7S, という表現で片付けられている。リンパ球と癌免疫の関係は遅延型アレルギー反応であり、担癌体では、遅延型反応に参与するリンパ球の働きが障害されているのではないかと考えられている。移植癌や、Virus 性癌、MC 肉腫などには抗体が存在すると報告されており、それがただ非常に弱く治療に応用できる可能性がほとんどないという点に問題があるのであるが、この論文では抗体蛋白の存在を示査し、その生化学的性質をたしかめたのである。

田中ら<sup>13)</sup>の報告に先んじて Mitchinson<sup>14)-15)</sup> や Rosenau<sup>16)-17)</sup> は移植腫瘍の局所リンパ節にあるリンパ球は培養器中で、癌細胞に群集密着し、ついには死滅させることを観察している。Forrester ら<sup>18)</sup> は抗体蛋白で処理した癌細胞を電気泳動すると、もとの易動度と異つてゐることを観察し、このあたりに surface recognition theory の理論が活躍するものと考えられる。第1編でβグロブリン様蛋白が有効分画の共通した因子であるとのべたがこの実験では、第II peak すなわちβグロブリン様移動を示す蛋白に抗腫瘍性のみられた。この結果は第1編における推定を証明したわけである。また peak II の濃度変化による有効度をもみても、この蛋白が抗腫瘍性をもつことがよくわかる。ただ抗体というよりは、むしろ酵素的な働きに似ているように思われる。またこの

抗腫瘍蛋白の有効と考えられる最少量は、10000 コの JTC 細胞に対して、300 μg/ml であつてこれは抗体蛋白とか酵素としては非常に高濃度であると考えられる。Avogadro 数より推定してみると、癌細胞を死滅させるため相当多くの抗体蛋白を必要とするようである。従つて、βグロブリン様蛋白が全て抗体ではなく、何かが抗体の働きを示すものと考えたい。

Möller<sup>19)-20)</sup> らは cytotoxic effect に対する感受性は細胞表面の抗原性や抵抗性の上昇とともに高まるといい、リンパ細胞は、抗原をもつ細胞表面の性質を変えるだけでなくその細胞に密着することを示している。また彼らはリンパ球の細胞障害作用は非免疫性の過程においても発揮されることがあり、標的細胞を死に至らしめることを明らかにした。この様なリンパ球の性質がはたして腫瘍に対しても同じように働くかどうかということについてはやや疑問があるけれども、これらのことは全て仮定の上に立つた現象の観察なのであつて現象の解釈にすぎない。この研究において分離したβグロブリン様蛋白の cytotoxic effect は対象に対して明らかな差を示しているけれども、その toxicity は培養細胞のどの部分に toxic であつたか不明である。培養実験では傷害をうけた細胞、死んだ細胞は培養管壁よりはなれ浮遊している。cytocydal な影響をうけた細胞の数を調べることによつて抗体としての特殊性を検討する方法があるが、液性の物質を培養器に加えた場合の観察はどうであろうか。

局所リンパ節の中にある感作されたリンパ球のもつ蛋白質が、腫瘍細胞の発育を抑制するという事実を説明するのに次の3つの可能性が考えられる。花岡, Rosenau<sup>16)-17)</sup>, Warnatz<sup>21)</sup> らのべている様に cytotoxic な抗体がリンパ球に附着して腫瘍細胞を死滅させる。Amos<sup>22)</sup>, Ood<sup>23)</sup> らのいう感作リンパ球の貧食作用によつて腫瘍細胞が攻撃をうける。原<sup>12)</sup>の観察によれば、細胞障害因子は可溶性であり、cell-impermeable diffusion chamber を通して腫瘍細胞に働く。この場合は濃度によつて影響される。以上の3つの可能性が考えられるが、これ以前の問題として、リンパ球の本来の性質が解明されなければならないことは当然である。

わたくしは局所リンパ節の中にあるリンパ球が、腫瘍細胞に群集密着し、その発育を抑制し、時には死滅させるという現象をみ、また局所リンパ節ホモジネート上清にも腫瘍細胞の増殖を抑制する因子の

存在を知り、その因子が、 $\beta$ グロブリン様蛋白の中にあることをあきらかにした。この中には *gen* の問題も含まれており、癌特殊性を強調することにはやや危険があるかも知れない。癌抗原として過去に分離され、精製されたものの中には、 $\beta$ 、 $\alpha$ グロブリン様の蛋白が相当に報告されている。抗原がまた、はたして特殊であるかどうか、平井らの癌蛋白は結晶としてとり出されていてもなお、純粋性、特異性に疑問がもたれている。この様な状態をみるとき、この実験で分離した $\beta$ グロブリン様蛋白は1部 $\alpha$ にまたがっていて、抗原蛋白の易動度に非常によく似ていることは興味深い。しかもこの中ではたして何%が有効成分であるかを考えると、再び大きな障害を感じるのである。

この研究で明らかにしたことはただ局所リンパ節中の $\beta$ グロブリン様蛋白が抗腫瘍性を示したという事実すぎない。しかも100匹のマウスよりえた試料は、50万コの癌細胞の発育を抑制するのが限度であると考えたとき、癌の免疫への遠い道を感じるの

である。

## 結 語

DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーにより局所リンパ節上清を分画し、各分画の抗腫瘍性について検討した結果、 $\beta$ グロブリン様蛋白が抗腫瘍性を示すことを明らかにした。この蛋白は Ehrlich 腹水癌細胞 10000 コの増殖を抑制するのに最少 300  $\mu$ g/ml の濃度を必要とした。この蛋白の超遠心分析による沈降系数は 6.5 S 20w であつた。電気泳動的に $\beta$ 移動を示し $\alpha$ にまたがっていた。

(この研究の要旨は第25回癌学会総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彦彦博士に感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) Furth, J., Kabat, E. A., *J. Exp. Med.*, 74, 257 (1941)
- 2) Furth, J., Schuit, H. R. E., Hijmans, W., *Immunology*, 11, 9 (1966)
- 3) Dresser, A. M., *Immunology*, 9, 483 (1965)
- 4) Lowry, O. H., Rosebrongh, N. J., Farr, A. C., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 5) 実験化学講座, 2. 分離と精製, 丸善 (1967)
- 6) Kohn, J., *Clin. Chim. Acta*, 3, 450 (1958)
- 7) Hirsfeld, L., Halber, W., Laskowski, J., *Z. Immunitätsforsch.*, 64, 81 (1929)
- 8) Witebsky, E., *Z. Immunitätsforsch.*, 62, 35 (1929)
- 9) Witebsky, E., Morelli, E., *Z. Immunitätsforsch.*, 78, 179 (1933)
- 10) Lehmann-Facijs, H., Toda, T., *Z. Immunitätsforsch.*, 82, 99 (1934)
- 11) 田中早苗, 折田薫三, 武田淳志: 治療, 46, 1037 (1964)
- 12) Hara, S., *Acta Med. Okayama* 9, 91 (1960)
- 13) 田中早苗, 第65回日本外科学会総会 (1965)
- 14) Mitchinson, N. A., *Proc. Roy. Soc. (Condon)* 142, 72 (1959)
- 15) Mitchinson, N. A., *J. Exp. Med.*, 102, 157 (1955)
- 16) Rosenan, W., *Nature*, 198, 79 (1963)
- 17) Rosenan, W., *J. Natl. Cancer Inst.*, 27, 471 (1962)
- 18) Forrester, J. A., Ambrose, E. J., Macpherson, J. A., *Nature*, 196, 1068 (1962)
- 19) Möller, G., Möller, E., *J. Exp. Med.*, 115, 527 (1962)
- 20) Möller, G., Möller, E., *Nature*, 203, 260 (1965)
- 21) Warnatz, M., Schieffarth, F., *Nature*, 201, 403 (1964)
- 22) Amoo, D. B., *Ann. New York Acad. Sci.*, 87, 237 (1960)
- 23) Ood. J. L., Boyse, E. A., *Nature*, 198, 10 (1963)
- 24) 平井秀松, 生化学, 36, 241 (1964)

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

Part 2. Fractionation on DEAE Sephadex A-50 Column  
Chromatography

By

Yutaka OKANO

Department of Surgery Okayama University Medical School

The supernatant of the regional lymph node of mice transplanted with Ehrlich ascites tumor were fractionated on DEAE Sephadex A-50 column chromatography with linear gradient elution. The eluted peaks were examined electrophoretically. They were  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  and albumin.  $\beta$  and  $\alpha$  fractions were effective for suppression of Ehrlich ascites cell growth. Minimum effective  $\beta$  fraction was 300  $\mu\text{g/ml}$ . The sedimentation coefficient of  $\beta$  fraction was 6.5 S 20 w, and that of  $\alpha$  fraction was 7.4 S 20 w.

---