616.381-003.217-006.3:5768.097

移植動物癌腫瘍抗原に関する研究

第 2 編

Ehrlich 腹水癌腫瘍リボゾーム蛋白の抗原性について

岡山大学医学部第1（田中）外科教室（指導：田中早苗教授）

副手 只 友 康 雄

〔昭和43年5月31日受稿〕

第1章 緒 言

担癌生体の宿主防衛反応は，いままでに種々の方面より研究されてきたが，ことに，癌の免疫については，Gorer[1], Snell[2] らをはじめとする移植免疫より出発し，近年の腫瘍特異抗原の問題へと急速な進歩をみている．ことに，実験腫瘍については，抗原の質的ならびに量的な解析が次第に成功しつつあり，その主体をなすものとして蛋白，核酸，脂質などが重要視されている．

第1編において Ehrlich 腹水癌腫瘍低密度リポプロテイン，すなわち，脂質抗原について，その一構成分であるリン脂質のもつ重要性ならびに感作血清 γ-グロブリンの腫瘍細胞増殖抑制力について報告した[10]．

今回は同じ Ehrlich 腹水癌のリボゾームより，リボゾームの上で生合成されている蛋白質を分離し，その抗原性および感作血清グロブリンの抗腫瘍性について，細胞培養実験によつて検討をおこなつた．

第2章 実 験 方 法

第1節 実験動物

実験動物には dd-系マウス（♂）（藤井医化学試験動物取扱所より購入）生後3～4週で体重 15gr 前後のものを使用し，飼料はオリエンタル酵母工業株式会社より購入の実験用固形飼料を使用した．

第2節 実験腫瘍

実験にもちいた悪性腫瘍は岡山大学癌源研究所より分与された Ehrlich 腹水癌腫瘍である．この Ehrlich 腹水癌細胞を dd-系マウス（♂）約50匹の背部皮下に1匹あたり約500万個移植し，10日後に発生した癌腫瘤を摘出し，本実験に使用した．

第3節 リボゾーム上で生合成されている蛋白質分離

この摘出した Ehrlich 腹水癌腫瘤約 50 gr を細切後，0.25 M Sucrose, 0.005 M $MgCl_2$, 0.025 M KCl を含む Tris-HCl buffer (pH 7.6) を約5倍量（250 ml）加えて，ワーリングブレンダーで3分間均一化し，ガラスおよびテフロンホモゲナイザーをもちいてホモジネートした．このホモジネートを 13,000 ×g, 15分間遠心し上清を分離し，（以上の操作は0～2°C の冷室にておこなつた．）この上清を 40P 型日立分離用超遠心機をもちいて 100,000 × g, 2時間低温下で遠心，この沈澱に 0.001 M $MgCl_2$, 0.05 M Tris-HCl buffer を100ml 加え，ガラスホモゲナイザーで懸濁し，デオキシコール酸ソーダを 0.8% になるように加え，約20分間放置し懸濁した沈澱が完全に溶解するのをまつて 100,000 × g, 2時間低温下で遠心，ゼリー状の沈澱に 0.001 M $MgCl_2$, 0.05 M Tris-HCl buffer を約 40ml 加えガラスホモゲナイザーで再び懸濁し，これを粗リボゾーム溶液とした[3)4)]．この粗リボゾーム溶液に RN-ase 1.5 mg/ml, DN-ase 0.5mg/ml を加え 37°C, 90分間インキュベートしたのち，100,000×g, 1時間低温下で遠心，上清を Sephadex G-50 カラム（3.0×15cm）に吸着させ，Toyo Uvicon-540 Optical Unit, Toyo Fraction Collector SF-200 A（東洋科学産業株式会社）をもちい，0.001 M $MgCl_2$, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) で溶出し，280mμ，自動記録で，そのピークをリボゾーム上で生合成されている蛋白とした．この蛋白をリボゾーム蛋白と呼ぶことにする．（表1）

第4節 化学的分析

1) 蛋白定量

a) micro-Kjeldahl 法[5] にしたがい試料に濃硫酸 0.1 ml を加え，灰化ビンにて灰化し $(NH_4)_2SO_4$ の形で溶在する窒素を NaOH で中和して NH_3 に変え Nesseler 試薬にて発色[40]，ベツクマン型分光光

表 1 Isolation of Ribosomal Protein

Material (50 gr. Ehrlich Ascites Tumor)
| grind in Waring Blender (3 min.)
| add 0.25 M Sucrose, 0.005 M $MgCl_2$, 0.025 M KCl, 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6

Homogenate A
| homogenize in Glass and Teflon Homogenizer

Homogenate B
| centrifuge at 13,000 × g (15 min.)

Precipitate — Supernatant
| centrifuge at 100,000 × g (2 hr.)

Precipitate — Supernatant
| homogenize in Glass Homogenizer
| add 0.001 M $MgCl_2$, 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6, 0.8% Na-DOC

Allowed to stand for at 20 min.
| centrifuge at 100,000 × g (2 hr.)

Precipitate — Supernatant
| homogenize in Glass Homogenizer add 0.001 M $MgCl_2$, 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6

Homogenate C
|
incubate 37°C 90 min. add RN-ase 1.5 mg/ml, DN-ase 0.5 mg/ml
| centrifuge at 100,000 × g (1 hr.)

Precipitate — Supernatant
|
Sephadex G-50 Column Chromatography (280 mμ)
|
Ribosomal Protein

度計（島津光電分光光度計 QR-50型）で対照と比較し，波長 420mμ および 500mμ で測定，なお標準曲線は $(NH_4)_2SO_4$ を使用して作成した．

b) ベツクマン型分光光度計を使用し牛血清アルブミンをもちいて，波長 280 mμ で標準曲線を作成，血清試料の定量に使用した．

c) Lowryらの改良法[6]にしたがい試薬 A, B, C, D, を作成，試薬A：2% Na_2CO_3(0.1 N NaOH 水溶液中)．試薬B：0.5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$（1%酒石酸ソーダ水溶液中)．試薬 C：アルカリ性銅溶液，試薬 A 50ml と試薬 B 1.0ml とを混合して調製，これは調製してより 24 時間以内に使用した．試薬 D：フェノール試薬希釈液，市販のフェノール試薬をあらかじめ NaOH をもちいてフェノールフタレン指示薬で滴定し，酸濃度が1N になるように水で希釈．標準曲線には牛血清アルブミンをもちいて作成．試料 0.2ml を小型試験管にとり，試薬 C 1.0ml を加え，よく混合し，室温で10分間以上放置．0.1mlの試薬D をすばやく添加，1～2秒間のうちに混ぜ合せて，30分以上たつてからベックマン分光光度計にて吸光度を波長 750mμ および 500mμ で対照と比較し測定した．

2) 電気泳動

Kohn 改良型電気泳動装置（東洋科学産業株式会社の Power Supply for Paper Electrophoresis セルローズ電気泳動槽）を使用し，ベロナール緩衝液 pH 8.6（バルビタール酸 1.66gr，バルビタール酸ナトリウム 12.76gr，蒸溜水を加えて1000ml とす)．Separax（富士写真フィルム株式会社）セルローズアセテート膜にて泳動，泳動条件は室温で 0.8mA

/cm，塗付量は約 0.008 ml/cm 泳動後の染色はニグロシン染色液（ニグロシン 0.01 gr，酢酸 2.0 ml に蒸溜水を加えて 100 ml とす）を使用し，水洗後自然乾燥させた[7)39)].

第5節　腫瘍リボゾーム蛋白による感作方法

この可溶性リボゾーム蛋白溶液の蛋白量を測定し，1.0mg/0.5ml となるように希釈し，てこれに 1/2 量（v/v）の Freund's complete adjuvant を加えた[8)]．すなわち，リボゾーム蛋白 1.0mg にたいし 0.25ml の Freund's complete adjuvant を加え滅菌ホモゲナイザーで均一化し，10匹を1組として，1匹あたり 1.0 mg の蛋白量を有するものを dd-系マウス（♂）の腹腔内に注入，1週間後約半量を背部皮下に追加感作をおこなつた．それぞれ感染を防ぐ目的で抗生物質の投与を同時におこなつた．

第6節　細胞培養方法

第1編のごとく1系列につき無菌的に飼育した発育良好なる Ehrlich 腹水癌細胞株（JTC-11）3×10^5 または 2×10^5 個にたいし YLE 培地 7.0 ml，牛血清 2.0 ml，試料 1.0 ml を加えて，細胞培養用短試験管6本に各々 1.5 ml づつとり，密栓して電気孵卵器内で 38°C，24時間（3本），48時間（3本）を約15度の傾斜をつけ静置培養したのち，培養液をすて 1.5 ml のクリスタル紫を加え染色して顕微鏡下に核数計算をおこなつた．以上の操作は滅菌室において無菌的におこなつた．

第7節　細胞培養実験

1）感作血清グロブリン

蛋白量 1.0mg を有する上記の adjuvant 処理リボゾーム蛋白，adjuvant 無処理のリボゾーム蛋白および第1編でのべた蛋白量 1.0 mg を有する Ehrlich 腹水癌腫瘍低密度リポプロテイン，高密度リポプロテインについて前記および第1編の方法にて腹腔内に注入した dd-系マウス（♂）10匹より25日後にクロロホルム麻酔下に開胸，心臓穿刺にて採血し遠心分離により血清を採集，ice box 内で 50％飽和硫酸アンモニウム 0°C で沈澱（硫安沈澱法）させ，遠心分離にてグロブリン沈澱を作り[9)]，これに 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2）を約 2.0ml 添加し，再び溶解させた．

これにさきだち Sephadex G-25 を 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2）で十分膨潤させ，1×30cm のカラムに均一につめ，0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2）で十分洗い，上記の溶解したグロブリンを脱塩の目的で同緩衝液で溶出，Toyo Uvicon-540 Optical Unit をもちい，波長 280 mμ でそのピークを集め，精製グロブリンとして 0°C にて保存．また同様に飼育した Freund's complete adjuvant 0.25 ml のみを腹腔内に注入した dd-系マウス（♂）血清も同時に同様の処理を施行して対照とした．

このグロブリンをベックマン型分光光度計にて測定，前記標準曲線と比較対照し蛋白量を測定，各試料を 5.0 mg/ml になるように 0.01 M リン酸緩衝液で希釈して，あらかじめ滅菌処理をほどこした milipore-filter にて滅菌し，この試料 1.0ml を JTC-11 株化癌細胞 3×10^5 個/10ml に加え，YLE 培地でそれぞれ同一条件のもとで，38°C，静置培養し，24時間，48時間後にその効果をクリスタル紫にて染色，核数計算法にて判定した．なお対照試料としては Freund's complete adjuvant 注入群血清グロブリンおよび 0.01M リン酸緩衝液のみのものをもちいた．

2）感作脾およびリンパ節

第1編，第7節，2項におけるごとく，adjuvant 処理リボゾーム蛋白（蛋白量 1.0 mg）および adjuvant 無処理のリボゾーム蛋白にて，腹腔内注入感作した dd-系マウス（♂）10日後の脾およびリンパ節（腋窩および頸部）を摘出し，0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.2）にてガラスおよびテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズし，40P 型日立分離用超遠心機で低温下に 100,000×g 1時間遠心，その上清より硫酸アンモニウム沈澱法でグロブリンを分離し，上述のごとく脱塩，5.0 mg/ml に希釈調製し，同様に 1.0ml を JTC-11 細胞に加えて同一条件下に細胞培養して効果を判定した．対照には同様に処理した正常マウス脾，リンパ節グロブリンおよびリン酸緩衝液をもちいた．

3）感作量にたいする検討

リボゾーム蛋白を micro-Kjeldahl 法[5)], Lowry 法[6)] にしたがつて蛋白量を測定，1.0 mg，0.5 mg，0.25 mg を有する adjuvant 処理リボゾーム蛋白をそれぞれdd-系マウス（♂）腹腔内注入感作をおこない，25日後に採血，血清採集，硫安沈澱法でグロブリンを分離，脱塩，蛋白量を 5.0 mg/ml に調製し，1.0 ml をそれぞれ JTC-11 細胞 2×10^5 個/10 ml に加えて，同一条件下に細胞培養をおこない効果を判定した．

4）感作血清日数にたいする検討

同様に蛋白量 1.0 mg を有する adjuvant 処理リボゾーム蛋白にて腹腔内感作をおこなつた dd-系マウス（♂）より，第1編，第7節，3項のごとく，10日，15日，20日，25日，30日後に採血，血清を採集，

硫安沈澱法でグロブリンを分離，脱塩し蛋白量を5.0mg/ml に調製し，1.0ml をそれぞれ JTC-11 細胞 2×10^5 個/10 ml に加えて，同一条件下に細胞培養をおこない効果を判定した．

5) 感作α, β, γ-グロブリンおよび脾，リンパ節グロブリンに対する検討

蛋白量 1.0 mg を有する adjuvant 処理リボゾーム蛋白を約30匹（蛋白量1.0mg/匹）の dd-系マウス（♂）腹腔内注入感作をおこない，25日後に採血，血清より硫安沈澱法でグロブリンを分離，脱塩．また，同マウスの脾およびリンパ節を摘出，ガラスおよびテフロンホモゲイザーでホモジネートし，100,000 ×g 遠心分離，その上清より硫安沈澱法でグロブリンを分離，脱塩した．

この血清グロブリンを DEAE-Sephadex A-50 でカラムクロマトグラフイーにより α, β, γ-グロブリンの分画をおこなつた[11)12)10)]．

a) DEAE-Sephadex A-50 の調製：第1編，第2章，7節，5項，a) にのべたごとく 0.5 N NaOH, 0.5 N HCl および蒸溜水で洗い，pH 7.2 に調製[13)]した．

b) カラム：1.5×30 cm のカラムにこの調製活性化した DEAE-Sephadex A-50 を均一につめ，0.01 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で安定させたのち，血清試料を層が乱れない様に吸着させた．

c) 溶出：この DEAE-Sephadex A-50 カラムで 0.01M NaCl を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で第1ピークを溶出したのち，0.01 M より 0.3 M NaCl への linear gradient 法により Toyo Fraction Collector SF-200 A および Toyo Uvicon-540 Optical Unit をもちいて波長 280 mμ, 10 ml 分画で溶出した．

この分画した感作 α, β, γ-グロブリンをビスキングチューブをもちいて濃縮，0.01 M リン酸緩衝液(pH7.2)で透析したのち蛋白量を測定して，それぞれ 5.0mg/ml とし，その 1.0ml を JTC-11 細胞 3×10^5 個/10 ml に加えて同一条件下に細胞培養をおこなつた．また，同様に前記脾およびリンパ節グロブリン様物質も 5.0 mg/ml に調製，同様に細胞培養をおこなつた．

第3章 実 験 成 績

第1節 化学的分析

1) 蛋白定量

Ehrlich 腹水癌腫瘍より分離したリボゾーム蛋白の蛋白量は，micro-Kjeldahl 法，直接紫外線 (280 mμ) 吸収測定法，Lowry 法で測定した．実験により多少の相異はあつたが，5.0 mg/ml 程度の実験値を示した．

2) 電気泳動（セルローズアセテート膜）

リボゾーム蛋白の電気泳動では，マウス血清アルブミンよりも強い塩基性を示す部分に1本のバンドとして現れている．（図1） すなわち塩基性の強い単一化された蛋白質であることをしめしている．また DEAE-Sephadex A-50 による血清グロブリン分画は，正常血清α, β, γ-グロブリンに一致する位置にバンドをしめした．

第2節 細胞培養実験

1) 感作血清グロブリンによる増殖抑制

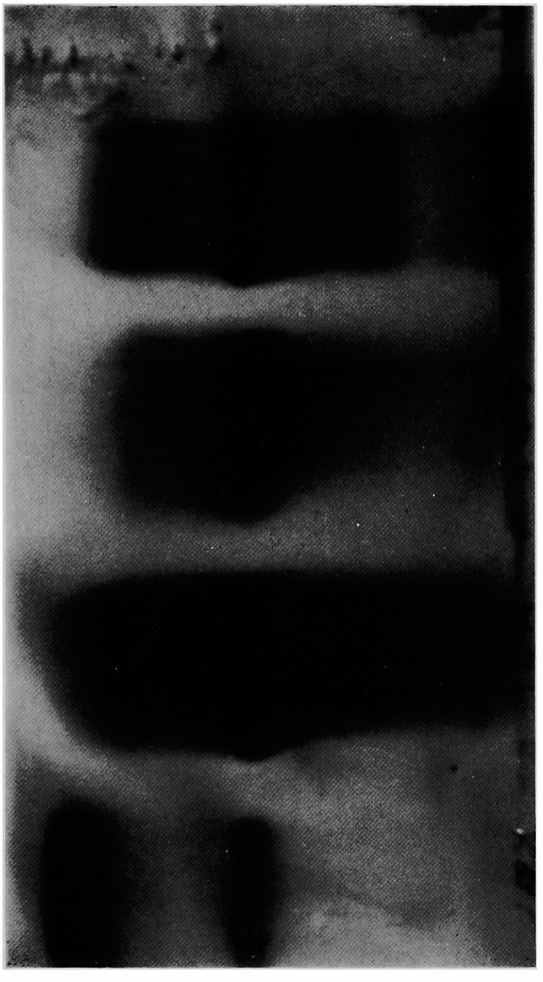
細胞培養後24時間，48時間で試験管内の JTC-11 細胞の核数計算をおこなつた．0.01 M リン酸緩衝液の対照では3×10^4個/mlにたいし24時間後 11.0×10^4個/ml, 48時間後 31.1×10^4 個/ml で腫瘍細胞の増殖が良好なことが観察される．また，adjuvantのみ腹腔内注入の正常 dd-系マウス血清グロブリンでは24時間後 7.1×10^4個/ml, 48時間 19.3×10^4個/ml, 高密度リポプロテイン感作血清グロブリンでは24時間後 6.7×10^4 個/ml, 48時間後 19.8×10^4個/ml でほとんど腫瘍細胞の増殖抑制をしめさない．これに反して低密度リポプロテイン感作血清グロブリンでは，24時間後 3.9×10^4個/ml, 48時間後 12.4×10^4個/ml, adjuvant 処理リボゾーム蛋白感作血清グロブリンでは，24時間後 4.1×10^4個/ml, 48時間後 5.6×10^4個/ml であり，強い増殖抑制力をしめした．adjuvant 処理をほどこしていないリボゾーム蛋白のみの感作血清グロブリンでは，24時間後 5.1×10^4個/ml, 48時間後 14.2×10^4個/ml でわずかに増殖抑制力をしめしたにすぎない．（図2）

2) 感作脾およびリンパ節による増殖抑制

感作後10日目の脾およびリンパ節グロブリン様物質分画を添加し，同様に細胞培養をおこない効果を判定した．対照では 3×10^4 個/mlにたいし，24時間後 12.1×10^4 個/ml, 48時間後 24.8×10^4 個/ml で腫瘍細胞の増殖は良好である．adjuvant 無処理リボゾーム蛋白感作グロブリン分画では，48時間後 14.5×10^4個/ml, これに反して adjuvant 処理リボゾーム蛋白感作グロブリン分画では，48時間後 8.2×10^4個/ml で増殖抑制をしめしている．（図3）

3) 感作蛋白量の増殖抑制能におよぼす影響

図1 Cellulose Acetate Membrane (Separax) Electrophoresis of Ribosomal Protein



リボゾーム蛋白の蛋白量を測定し，1.0mg, 0.5mg, 0.25mg の蛋白量を有する adjuvant 処理リボゾーム蛋白で感作した血清グロブリンについて細胞培養をおこない効果を判定した．対照では 2×10^4個/ml にたいし，24時間後 4.6×10^4個/ml，48時間後 13.5×10^4個/ml で増殖やや不良であるが，正常マウス血清グロブリンの48時間後 11.2×10^4個/ml にたいして，0.25mg では 6.9×10^4個/ml，0.5mg では 5.3×10^4個/ml，1.0mg では 4.2×10^4個/ml であり，蛋白量 1.0mg のものがもつとも強い増殖抑制力をしめしている．（図4）

4) 感作後日数と増殖抑制能の関係

adjuvant 処理をほどこしたリボゾーム蛋白で感作し，10日，15日，20日，25日，30日後の血清グロブリンについて細胞培養をおこない効果を判定した．対照では，2×10^4個/ml にたいし，24時間後 7.4×10^4個/ml，48時間後 19.5×10^4個/ml で増殖は比較的良好である．これにたいし，10日目では48時間後 16.5×10^4個/ml，15日目では 14.0×10^4個/ml，20日目では 12.0×10^4個/ml，25日目では 4.9×10^4個/ml，30日目では 7.4×10^4個/ml で25日目のものにもつとも強い増殖抑制力をしめしている（図5）．

5) α, β, γ- グロブリン，脾およびリンパ節グロブリンによる細胞培養テスト

感作血清グロブリンの DEAE-Sephadex A-50 をもちいた linear gradient 法によるカラムクロマトグラフィーでの溶出曲線は（図6）のごとく大きな3つのピークに分画される．

この α, β, γ- グロブリン，脾およびリンパ節グロブリン分画で細胞培養をおこない効果を判定した．対照では，24時間後 7.7×10^4個/ml，48時間後

図2 Anti-Tumor Activity of Immunoglobulin

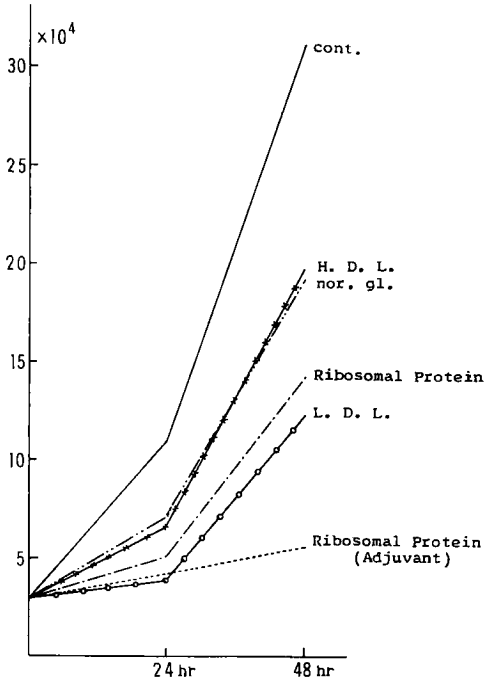


図3 Anti-Tumor Activity of Lymphnodes and spleens (Globulin)

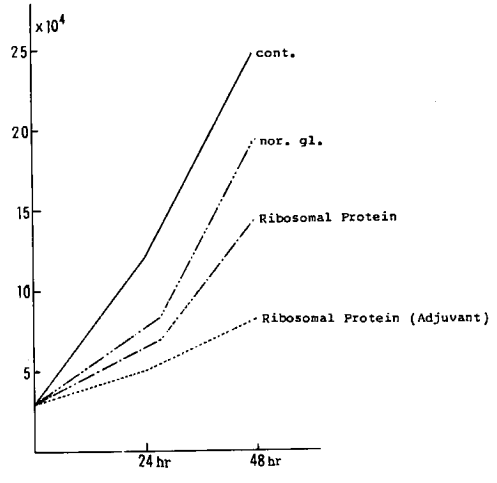


図4 Antigenicity of Ribosomal Protein

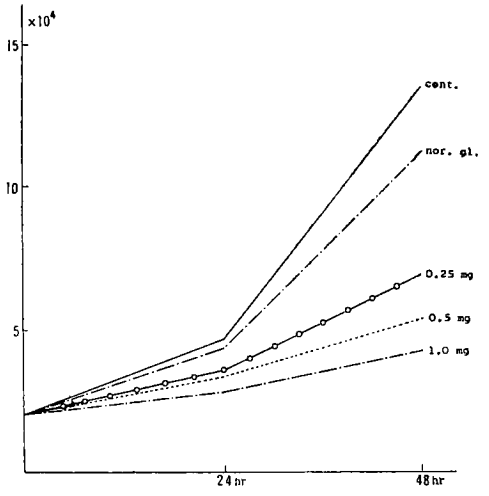
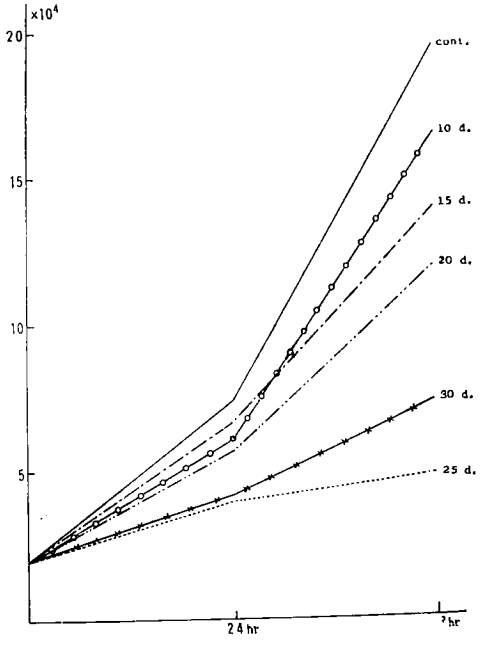


図5 Anti-Tumor Activity after Immunization



25.3×10⁴個/ml，正常マウス血清グロブリンでは，48時間後 21.6×10⁴個/ml，これにたいし α-グロブリンでは 20.5×10⁴個/ml，β-グロブリンでは 18.6×10⁴個/ml，γ-グロブリンでは 10.1×10⁴個/ml，脾およびリンパ節グロブリンでは 14.5×10⁴個/ml であり，γ-グロブリンがもつとも強い増殖抑制力をしめしている．(図7)

第4章 総括および考按

担癌生体の宿主防衛反応については，従来種々の角度より探究され，ことに従来の免疫学に加えて，正常組織の移植の拒否現象を取り扱う移植免疫学，腫瘍の拒否現象を扱う腫瘍免疫学など大巾に拡大され，その進歩にはめざましいものがあるが，現

図6 Fractionation of Immunized Globulin with Ribosomal Protein on DEAE-Sephadex A-50

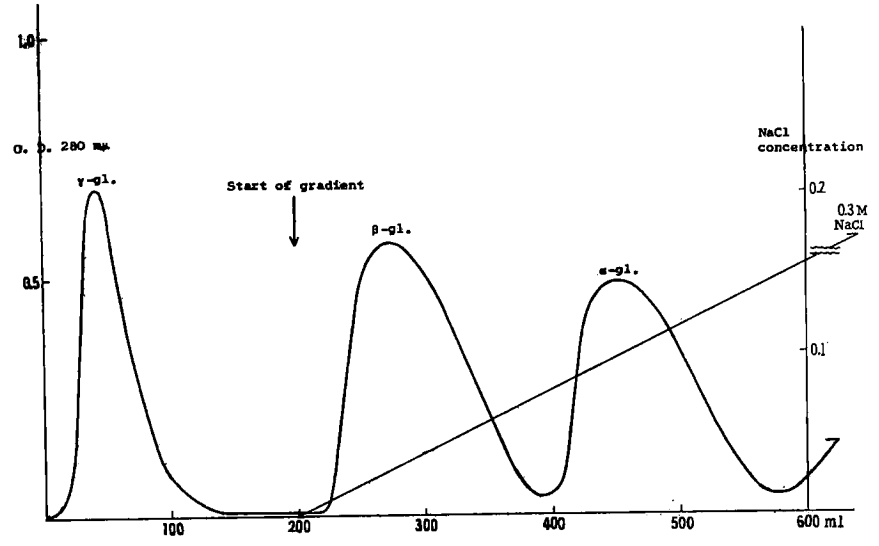
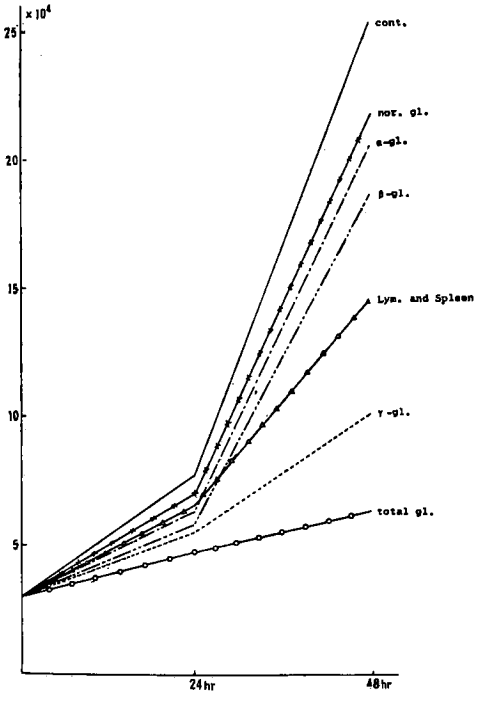


図7 Anti-Tumor Activity of Immunoglobulin (α, β, γ, and Lymphnodes, Spleens)



在のところまだかなり混沌とした状態にある．しかし Klein[14], 武田[15] らにより腫瘍免疫に関して正常組織とは異なる腫瘍細胞に特異的な抗原性が関与していると考えられるようになつた．腫瘍免疫の基本となる抗原については，蛋白，脂質，核酸，多糖体などがあげられるが，抗原となりうるものとしてもつともよく知られているのは蛋白質であり，本実験では特種な蛋白である Ehrlich 腹水癌腫瘍中のリボゾーム上で生合成されている蛋白の抗原性およびその抗血清の抗腫瘍性について，免疫化学的研究を試みた．

リボゾームは細胞質の電顕的研究の進歩と平行し，細胞質の顆粒を分離し，その組成あるいは，酵素活性を調べる細胞化学的研究が Claude, Schneider らによつてはじめられ，その結果，超顕的なミクロゾーム分画が分離され，この分画は RNA とリピドにとみ，かつ ^{14}C-アミノ酸のとりこみが早い事が判明し，蛋白質生合成過程で重要な役割を果していることが推定された[16]．1955年 Littlefield ら[17] は，ミクロゾームからリボ核タンパク粒子（リボゾーム）を単離することに成功し，アミノ酸はまずこのリボゾームにとりこまれることが明らかになつた．そしてこのリボゾームは Palade[18] らにより，ミクロゾームを超薄切片で観察し，ミクロゾームの大部分が膜様構造とその上に付着した顆粒構造とからなり，endoplasmic reticulum そのもの，あるいはそのフラグメントに由来することを明らかにした．その後の画期的研究により，リボゾームには大腸菌型と酵母型の二つの型があり，いずれも Mg イオン濃度によつて subunit への解離や会合体の成生が起り，また蛋白質生合成の主要の場であることが立証された[19][20][21][22]．

この研究では，Ehrlich 腹水癌腫瘍のリボゾーム上で合成されている蛋白（リボゾーム蛋白）を超遠心法およびカラムクロマトグラフイーにより抽出したのであるが，この蛋白は電気泳動では血清グロブ

リンよりもつよい塩基性をしめし図1のごとき一本のバンドとしてあらわれ，単一化した蛋白であることがしめされており，抗原としての純度が比較的大であるという点に意義がある．蛋白を抗原とした実験では，Pikovski ら[23] はマウス乳腺腫瘍の extract をもちいて抗腫瘍血清は抗正常乳腺血清と異つた沈降線を有すると報告し，また平井[24] はゲル内沈降反応および免疫電気泳動法で，ラット DAB 腹水肝癌 AH 49 に同種ラットの正常組織に見られない抗原を証明し，これが核の可溶性画分に存在し，核酸，多糖類，脂質を含まない simple protein であるなどの報告がある．また Pikovski[23], 平井[24], 板倉[25] など蛋白抗原をもちいて，その抗原性を沈降反応，凝集反応などにより認めているが，西岡ら[26]はEhrlich 癌および Sarcoma 180 の免疫血清は Ehrlich 癌および Sarcoma 180 に対して細胞毒性をしめし，マウス正常細胞にたいしては毒性をしめさない．また Ehrlich 細胞のミクロゾーム分画で免疫してえた血清は，Ehrlich 細胞および Sarcoma 180 にたいして in vitro で混合接種したとき発癌抑制を認めている．本実験においても JTC-11 株化細胞をもちいた細胞培養実験でその抗原性および抗腫瘍性を検討した．

リボゾーム蛋白で感作した dd-系マウス血清グロブリン，Ehrlich 癌腫瘍組織低密度リポプロテイン (L. D. L.) および高密度リポプロテイン (H. D. L.) で感作した dd-系マウス血清グロブリンについての細胞培養実験では図2のごとくリボゾーム蛋白および L. D. L. で感作したグロブリンにつよい増殖抑制力を認めているが，リボゾーム蛋白のものに，よりつよい抑制力を認める．これは同蛋白量にて感作した場合には，リボゾーム蛋白の方が抗原としてすぐれていることをしめしている．しかし，adjuvant 無処理のリボゾーム蛋白では，わずかに増殖抑制を認めているにすぎない．また，脾およびリンパ節においても同様の成績をえた．本実験におけるマウス腹腔内感作では，免疫効果を高める目的で Freund's complete adjuvant を使用した．一般にマウスでは抗体が出来がたいとされているが，Munoz[27][28] はマウスで抗体をえるため Freund's complete adjuvant の腹腔内注入をおこなつて抗体を含んだ大量の腹水をえたと報告，すなわち，Freund の adjuvant 0.25 ml を隔週2回腹腔内に注入して，3週間後に抗体を含んだ大量の腹水をえている．これは adjuvant が免疫効果を高めることをよくしめしている．また一方，遅発型過敏症などを得る実験にもちいられているが，これについては明確な実験成績をえていない．感作後日数の増殖抑制との関係については，感作血清グロブリンは25日目にもつとも強い増殖抑制力をしめし，30日目頃より減退の傾向にあり，脾およびリンパ節では10日頃にピークがあると考えられる．Wissler ら[29] の報告によれば，Ehrlich 癌細胞を家兎へ静注，筋注，腹腔内，皮下，などへ注入して感作したのち，4週目が抗体価が高いとし，谷垣[30] は免疫マウス抗血清を皮下に投与して，武田肉腫を標的細胞とし移入血清の障害性を判定し，免疫後15～27日の抗血清では細胞障害をしめすが，36～51日の抗血清は細胞障害をしめさなかつたとのべており本実験の結果とほぼ一致している．ついで抗原の量的な問題については，抗体をより多く産生せしめる適切な量をもちいることがのぞましいが，抗原の種類および強さによりその適量をあらかじめ定めることは困難であるが，第1編の L. D. L. の成績より蛋白量 1.0mg，0.5mg，0.25mg の3種について検討した結果，同様に 1.0mg 以上のものでは餌摂取がわるくなり，るいそうのため死亡する数が多く，実験に使用出来なく，1.0 mg のものにもつとも強い抗腫瘍性を認めた．

リボゾーム感作血清グロブリンをDEAE-Sephadex A-50 により α, β, γ-グロブリンに分画し，それぞれについて抗腫瘍性を検討した．α, β-グロブリンは抗腫瘍性をしめさないが，γ-グロブリンでは強い抗腫瘍性をしめす．しかし，グロブリン全体に比較して弱い．これは細胞培養条件の相異を考えにいれても対照の増殖状態よりみて相当の相異があり興味ある点である．γ-グロブリンについては，Flax[31]はマウス腹腔内に Ehrlich 腹水癌腫瘍を移植後，その腹腔内へ家兎抗 Ehrlich 腫瘍γ-グロブリンを注入し，対照マウスの2倍の生存日数をしめしたと報告，平井[32]は移植を take した癌ネズミのγ-グロブリンは，ほとんど例外なく減少し，治癒したネズミはほとんど例外なくγ-グロブリンの上昇をみせるなどの報告をしており，抗体の主要の役割をはたすと考えられるが，教室の山本[34]，岡野[35]は Ehrlich 癌細胞で感作したマウスの10日後のリンパ節のβ-グロブリン様物質に抗腫瘍性を認めており，γ-グロブリン単独のものよりグロブリン全体に抗腫瘍性物質としての関連性があると考えられ，興味ある点である．

細胞性障害の実験では補体をもちいた実験が多いが，谷垣[30]の実験のごとく本実験でも補体を使用しなかつた．抗原とそれに対応する抗体との反応は，

沈降物の形成，血球，細菌などの凝集，溶解，補体の抗原抗体複合体への結合，毒素やウイルスの中和，あるいは動物の皮内反応など発現の様式はさまざまであるが，Landsteiner[36] はこの解析に化学を導入し，簡単な有機原子団を共有結合で蛋白質に結合し，この複合体で動物を免疫すると，その血清中には，上の原子団またはそれとよく似た構造を含む化合物（ハプテン）とだけ反応するような抗体（抗ハプテン抗体）が作られる．このハプテンと抗体を混合すると，両者の結合がおこり，つぎのような平衡が成立する．

（ハプテン）＋（抗体活性部）⇌（ハプテン抗体結合物）

このような抗原抗体の結合にともなつておこる2次，3次の反応はもちろん生物学的に重要なものであり，複雑な生細胞あるいは補体など抗原，抗体以外の因子も関与すると考えられる．また，リンパ節を主とする細胞性抗体と血清グロブリン抗体の問題に関しては種々の見解がなされているが[37)38)]，本実験のごとく同種の関係については，リンパ節グロブリン様物質についてもγ-グロブリンを中心とする血清グロブリンについても，発現時期，効力についての相異はあるが，細胞培養実験において抗腫瘍性を認めた．

第5章 結　　語

Ehrlich 腹水癌 dd-系マウス（♂）背部皮下移植腫瘍のリボゾーム蛋白を抗原として，その感作血清グロブリンを中心に細胞培養実験で抗腫瘍性を追求し，その抗原性について検討した．

1) Ehrlich 腹水癌リボゾーム蛋白は，電気泳動的には強い塩基性の単一のバンドをしめす．

2) リボゾーム蛋白を抗原としてマウスを感作するには，蛋白量 1.0mg/匹 が適当である．

3) リボゾーム蛋白感作血清グロブリンは感作後25日頃にもつとも強い抗腫瘍性をしめし，脾およびリンパ節グロブリン様可溶性蛋白では，10日頃にそのピークがある．

4) 感作血清グロブリンではγ-グロブリンがその主体をなすが，α，および β-グロブリンにも抗腫瘍性について関連性があると考えられる．

稿を終るにのぞみ御指導，御校閲を賜わつた田中早苗教授，および山本泰久講師に深甚の謝意を表すとともに，細胞培養について多大の御協力をいただいた浜崎充彦博士に感謝する．

（本論文の要旨は第26回日本癌学会総会および第40回日本生化学学会において発表した）

文　　献

1) Gorer, P. A.: J. Path. Bact., 44, 691 (1937)
2) Snell, G. D.: Cancer Res., 17, 2 (1957)
3) 高浪満：蛋白質　核酸　酵素，11, 490 (1966)
4) Webb, T. E., Blobel, G. and Potter, V. R.: Cancer Res., 24, 1229 (1964)
5) 波多野博行，鴈野重威：生化学領域における光電比色法，各論 3, P. 29 南江堂東京 (1958)
6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
7) 島尾和男：電気泳動実験法，P. 343 文光堂，東京 (1963)
8) 浜島義博，京極方久：免疫組織学，P. 7 医学書院，東京 (1965)
9) Cohn, E. J. et al.: J. Am. Chem. Soc. 62, 3386 (1940)
10) 只友康雄：岡山医学会雑誌，投稿中
11) Bernier, G. M., Putnum, F. W.: Biochim. Biophys. Acta, 86, 295 (1964)
12) Goodfriend, L., Perelmutter, L., Rose, B.: Nature, 205, 718 (1965)
13) Baumstark, J. S., Laffin, R. J. and Bardawil, W. A.: Arch. Biochem. and Biophys., 108, 514 (1964)
14) Klein, G., Sjögern, H. O. and Klein, E.: Cancer Res., 22, 955 (1962)
15) 武田勝男，他：日癌会記事　23, 287 (1965)
16) 田代裕：蛋白質　核酸　酵素，6, 15 (1961)
17) Littelefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J., Zamecnik, P. C.: J. Biol. Chem., 217, 111 (1955)
18) Palade, G. E., Siekevitz, P.: J. Biophys. Bi-

ochem. Cytol., 2, 171 (1956)
19) Risebrough, R. W., Tissieres, A., Watson, J. D.: Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 430 (1962)
20) Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H., Jones, O. W.: Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 1588 (1961)
21) Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H., Jones, O. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 104 (1962)
22) 高浪満：生化学, 35, 293, (1963)
23) Pikovski, M. A. and Witz, I.: Acta Unio Int. Cancer., 17, 244 (1961)
24) 平井秀松, 他：癌の臨床, 8, 588, (1962)
25) Itakura, K.: Gann, 54, 93 (1963)
26) 西岡久寿弥, 吉田武彦, 衣川端水, 笠原孝郎：日本癌学会記事, 癌49, 6, (1956)
27) Munoz, J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95, 755 (1957)
28) Anacker, R. J., Munoz, J.: J. Immunol., 87, 426 (1961)
29) Wissler, R. W. et al.: Cancer Res., 16, 761 (1956)
30) 谷垣信行：癌の臨床, 8, 603, (1962)
31) Flax, M. H.: Cancer Res., 17, 48 (1957)
32) 平井秀松：生化学, 36, 241, (1964)
33) 平井秀松：医学のあゆみ, 61, 647, (1967)
34) Yamamoto, Y., Nakashima, Y., Okano, Y.,: Gann, 59, No. 2 (1968)
35) 岡野厖：岡山医学会雑誌 投稿中
36) Landsteiner, K.: The Speciticity of Serological Reactions, Revised Edition, Dover Publication, Inc., New York, N. Y. (1962)
37) 伊藤, 白井他：日本病理学会誌, 54: 総会号, (1966)
38) 花岡, 右田：癌の免疫病理, 1, 93, (1965)
39) 小川恕人：代謝, 2, 514, (1965)
40) Lang, C. A.: Anal. Chem., 30, 1692 (1958)

Antigenicity of Ehrlich Ascites Tumor

Part 2, Antigenicity of Ribosomal Protein in Ehrlich Ascites Tumor

By

Yasuo TADATOMO

Department of Surgery, Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Tanaka)

Antigenicity of ribosomal protein in Ehrlich ascites tumor and the biochemical characters were studied. The cytotoxic activity of immunized male dd-mice serum globulin was proved by cell culture test. Ribosomal protein was moved electrophoretically to basic side than that of serum γ-globulin, and the protein concentration was adequate for maximal antigenicity 1 mg per mouse. The antitumor activity of immunized serum globulin was most elevated at 25 th day after immunization, and that of lymph nodes and spleen were at 10 th day. The antitumor activity of immunized serum globulin was mainly existed in γ-globulin fraction, but also contained in α-and β-globulin fraction.