

ウイルス性マウス白血病の免疫学的研究

第 2 篇

Ouchterlony 法並びに免疫電気泳動法による検討

岡山大学医学部平木内科 (主任: 平木 潔教授)

副 手 高 木 健 作

〔昭和 39 年 4 月 17 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	第 2 節 C ₅₈ 白血病 マウス 肝脾 Fluorocarbon 処理液の免疫電気泳動法による検討
第 2 章 実験材料並びに実験方法	第 3 節 C ₅₈ 白血病 マウス 肝脾 Fluorocarbon 処理液 特異蛋白分層の Ouchterlony 法による検討
第 1 節 実験材料	第 4 節 特異沈降線の各種染色法による検討
第 2 節 実験方法	第 4 章 総括並びに考按
第 1 項 Ouchterlony 法	第 5 章 結語
第 2 項 免疫電気泳動法	第 6 章 全篇の総括
第 3 項 沈降線染色法	
第 3 章 実験成績	
第 1 節 C ₅₈ 正常 マウス 肝脾 Fluorocarbon 処理液の免疫電気泳動法による検討	

第 1 章 緒 言

1948年 Ö. Ouchterlony⁶³⁾⁶⁴⁾ によつて始められた Agar gel double diffusion 法は単に抗原蛋白組成の分析だけでなく Wilson 及び Pringle⁷¹⁾ によると相隣る試料間の異同の判定を可能とし, Darcy⁸³⁾ により特異な抗原蛋白の検出にも使われ, 又 1953年 Pasteur 研究所の Grabar & Williams⁶⁵⁾⁶⁶⁾ によつて始められた免疫電気泳動法 Immunoelectrophoresis はまず寒天ゲル中で抗原蛋白を電気泳動的に分離し, ついでこれに対応抗血清を作用させ, 寒天層中の沈降反応によつて抗原を解析する事を可能とした。

これらの方法は沈降反応を使用するために右田⁶⁷⁾ によると非常に鋭敏であり, 極めて微量の蛋白, 即ち 1~4 μ g の蛋白をも識別しうる特徴がある。更に出現した沈降線を各種染色法で染色する事により化学的同定をも可能とする。

これらの利点により, Clausen⁷²⁾ らはマウスの Plasma Cell-Leukemias の血清, 三宅³²⁾ 高柳⁶⁸⁾⁻⁷⁰⁾ らは人各種疾患の血清蛋白, なかでも癌, 骨髄腫, 白血病などの血清蛋白や癌患者の腹水, 更に建部⁷³⁾, 平井⁷⁴⁾, 石川⁷⁵⁾, 板倉⁷⁶⁾, らは動物癌, 人癌の抽出

液などを抗原として抗原蛋白の解明に大いに利用し, 役立てている。

これらの事より私は第 1 篇で述べた C₅₈ 白血病 マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液及び対照として C₅₈ 正常マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液を使用し, これを抗原とし, 特異な抗原の有無, 更に又特異な抗原が存在すれば, それがいかなるものであるかについての検討のため, Ouchterlony 法及び免疫電気泳動法による解析を試み, 更に現れた沈降線について, いくつかの染色を行ない興味ある知見を得たので報告する。

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

まず抗原並びに抗血清は 1 篇で述べたものと同じものを使用した。

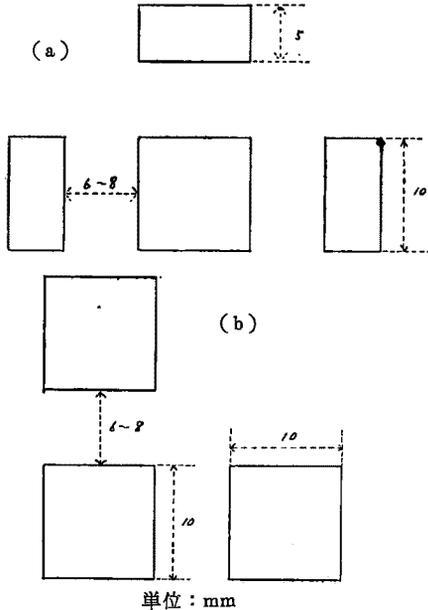
次に吸収抗血清については, 緒方⁴⁰⁾ の方法により 1 篇で使用した抗白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兔血清に正常 マウス抗原を大体 Dean-Webb の最適比の割に加えて, 37°C に 3 時間, 4°C に 1 夜放置し, 生じた沈降物を強く遠心沈澱して除き血清を吸収抗血清とした。

第2節 実験方法

第1項 Ouchterlony 法

大体 Wilson & Pringle⁷⁷⁾ の術式に従い、松橋⁷⁸⁾、鈴木⁷⁹⁾、高柳⁸⁰⁾ の方法を参考にして行なつた。すなわちシャーレに1.3%精製寒天液を 10 ml 入れて固ませ、その上に図1の如く真鍮製鑄型を置いて、さらに上記寒天液を約 15ml 加えて固ませ、充分固まつた後に鑄型を抜くと池ができる。

図1 Ouchterlony 法の寒天シャーレ



この池に抗原、抗血清あるいは吸収抗血清を入れて 4~7°C の冷蔵庫中の恒湿箱に入れて放置し、沈降線の出揃つた時に (5~15日) 写真撮影して記録した。

第2項 免疫電気泳動法

高柳⁸⁰⁾、Kohn⁸¹⁾、Wunderly⁸²⁾ の方法に従つた。

1) 寒天板の作製

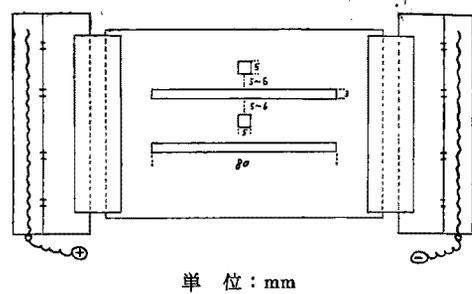
ガラス板 (16.5×13cm) を支持台として厚さ 1.5~2mm の寒天層をつくる。この寒天は 4% 精製寒天に燐酸緩衝液 (pH 7.5, $\mu=0.12$)、蒸溜水、マーズニンを加えて 1.3% の濃度とした。

尚、寒天は Difco の寒天を使用した。

次に図2のように寒天板の両端に濾紙片 (東洋 No. 51) をのせ、中央部には鑄型を置いて、さらに上記寒天液を加え、厚さ 5mm の寒天層とする。

寒天が充分固まつた後に鑄型を抜きとれば抗原池と抗血清溝ができる。

図2 免疫電気泳動法



2) 電気泳動法

上記の寒天板を Grassmann 型泳動函の濾紙枠に置き、両端の濾紙片を燐酸緩衝槽にひたし電極槽には 5% 塩化カリを入れ、抗原池に Fluorocarbon 処理液を 0.04ml 入れて電圧 140~160V、電流 7~11 mA で 12~15時間泳動した。

3) 抗原抗体反応

泳動終了後、寒天板を泳動装置からはずし、抗血清溝に抗血清あるいは吸収抗血清を 0.6~0.8ml 入れて 4°C~7°C の湿室中に放置し、沈降線の出揃つたときに (5~15日) 写真撮影して記録した。

第3項 沈降線染色法

1) 固定法

右田⁸⁷⁾ の方法に従つた。沈降線の出現した寒天板を生理的食塩水 (0.9%) の中に浸して反応にあづからない余分の蛋白を洗い流す事により反応をとめる。

尚、生理的食塩水は十分に使い、3時間毎に生理的食塩水を 3回換え、最後に 10~15分間蒸溜水に浸して食塩を除く。

次に濾紙を寒天板の大きさに切り、寒天板の上面にあてて 37°C で乾燥する。

2) 染色法

a) 蛋白染色

森、小林⁸⁴⁾ の方法による。固定した寒天板を Amidochwarz 10 B 液に 20分浸した後、5% 酢酸水にて 10分、10分、30分、10時間脱色した後、風乾する。

b) リボ蛋白染色

森、小林⁸⁴⁾ により述べられている Sudan Black B による。つまり 60% エタノールに飽和にとかし、沸騰させ冷却後濾過、濾液を 60% エタノールで 2倍に稀釈し、この中に寒天板を 30分~3時間浸して染色し、50~60% あるいはそれ以下のエタノールで洗うか、流水で短時間洗つて余分の色素を除く。

c) ムコ蛋白染色

佐藤⁸⁵⁾の述べている方法による。まずヒドロキシルアミン塩酸塩溶液の中に15分、固定した寒天板を入れ、次いで15分間流水中で水洗の後、過沃度酸水溶液中に10分間浸し、ついで又10分間流水中で水洗の後 Schiff の試薬を使用直前に2倍に稀釈したものの中に3分間浸した後、亜硫酸水溶液中に2分間ずつ3回入れた後、グリセリン亜硫酸水に60分間、3回入れた後、乾燥器内にて乾燥する。

d) 糖蛋白染色

森、小林⁸⁴⁾の述べている方法による。まず固定した寒天板を0.5%過沃度酸水溶液に5分間浸し、次いで蒸留水で30分間洗い、Schiff の試薬にて15分間染色した後、亜硫酸水(1N-HCl 10cc, メタ重亜硫酸カリ 1g に水を加えて 200cc とする)にて数分~数十分宛3回洗う。次いでこのまま乾燥さす。

e) Feulgen 反応

青木、小林⁸⁶⁾が述べている方法による。固定した寒天板を 60°C に温めた 1N-HCl の中に4~10分入れる。次いで水洗した後 Schiff の試薬に30分~1時間入れて発色させる。次いで亜硫酸水で3回、各3分宛分別した後、水洗乾燥する。

第3章 実験成績

まず第1節では免疫電気泳動法を使用して C₅₈ 正常マウス抗原を泳動分析し、それと抗正常マウス家兎血清の間に反応を行なわせ、抗原稀釈、抗血清稀釈、そして出現する沈降線について検討を行ない、第2節では免疫電気泳動法を使用して、C₅₈ 白血病マウス抗原と C₅₈ 正常マウス抗原を泳動分析し、これらと各抗白血病血清あるいは吸収抗白血病血清と反応させて正常抗原にみられない白血病抗原の沈降線の検索を試み、第3節では第2節で見出された特異と思われる沈降線について両白血病抗原に於ける特異性及び共通性についての検討を Ouchterlony 法を使用して試み、第4節ではそれら白血病抗原に特異的に現れる沈降線について各種染色を行ない、その染色性によりその性質を検討した。

これを以下に順次のべる。

第1節 C₅₈ 正常マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液 (N と略す) について免疫電気泳動法による検討

N を抗原とし、抗 C₅₈ 正常マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兎血清 (Anti N と略す) と反応させて抗原稀釈、抗血清稀釈、出現沈降線につき検討し

た。

尚、泳動位は正常血清をあらかじめ同じ条件で泳動分析し、その後、染色して出来た分画位に従った。

第1項 N の稀釈についての検討

寒天板の抗原池に N の 0.04 ml の原液、2倍、3倍、4倍、8倍稀釈液を入れて泳動分析した後、同時に Anti N を反応させると N の濃度が次第に減少するにつれて沈降線の数及び濃度が減少する。従つて抗原原液を抗原とする必要がある事が判明した。

第2項 Anti N の稀釈についての検討

N を 0.04 ml 泳動分析した後に、Anti N の 0.6 ml の抗血清原液、2倍、3倍、4倍、8倍稀釈液を同時に反応させると、抗原稀釈の場合と同様に沈降線の数及び濃度が抗血清の稀釈につれて減少する。従つて抗家兎血清は原液のまま用いる必要がある事が判明した。

第3項 免疫電気泳動法により、N に出現する沈降線についての検討

第1項、及び第2項の結果より反応には抗原、抗血清とも原液を使用した。

まず寒天板の抗原池に、N を 0.04 ml 入れて電気泳動した後、抗血清溝に N で免疫した抗家兎血清、Anti N を 0.6 ml 入れて反応させると最低 2本、最高 5本の沈降線が認められた (写真1)。

この沈降線に陽極側から順に①~⑤の番号を附し、正常血清の電気泳動分層と対比すると、(図3)、

Albumin 位……………①
α-Globulin 位……………②
β-Globulin 位……………③④⑤

となる。

尚、この各沈降線についての出現頻度について述べると全30例中に於いて、①は22例、②は8例、③は11例、④は25例、⑤は30例全例に認められた。

第2節 C₅₈ 白血病 マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液の免疫電気泳動法による検討

第1項 C₅₈ 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液とこれに対応する抗血清及び吸収抗血清との反応

本項では正常マウス抗原に存在しない異常蛋白因子の検索を主眼としたが、免疫電気泳動法では通常、泳動分析した抗原とこれに対応する抗血清とが反応して生ずるパターンによつて抗原を解析する。従つて抗白血病マウス家兎血清に対して泳動分析した対

写 真 1

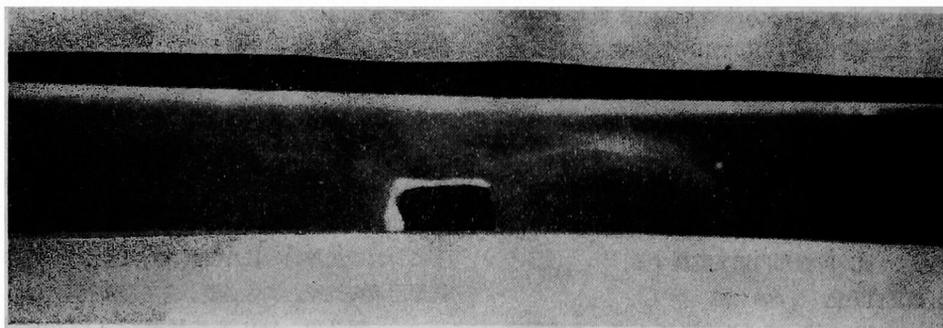
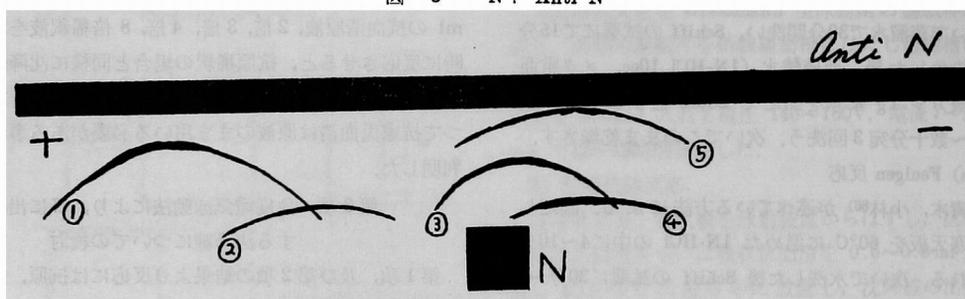


図 3 N + Anti N

N: C₅₈ 正常マウス抗原Anti N: 抗 C₅₈正常マウス血清

照としての正常マウス抗原と白血病マウス抗原を同時に反応させて、両者の沈降線を比較すれば、量的あるいは質的な色々の相違を指摘することが出来る。更に、抗白血病マウス家兎血清から正常マウス抗原に対応する抗体を除去した吸収抗血清に対して、泳動分析した対照としての正常マウス抗原と白血病マウス抗原を同時に反応させて、両者の沈降線を対比すれば正常マウス抗原にはみられない沈降線をもつとも明確にする事が出来る。

1) C₅₈ リンパ性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液 (Lと略す) とそれに対応する抗家兎血清及び吸収抗家兎血清との間の反応

NとLを泳動分析し同時に抗リンパ性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兎血清 (Anti L と略す) を反応させて対比すると、N側は対照と同じであつたがL側に於いては (写真2, 図4) 対照に加うるに α -Globulin 位に1本 (L_① と名づける), 又 β -Globulin 位の対照の④と⑤の線の間にも1本の沈降線 (L_② と名づける) が認められた。このL_① 及び L_② がNに存しない事を確認するために、更に吸収抗リンパ性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兎血清 (Anti L-N と略す) に対して泳動

分析したNとLとを同時に反応させて対比すると図5にみられるように、L_① 及び L_② はL側だけに存在し、Nには存しないことを確認した (写真3)。

又、これらのNにみられない沈降線はLの全例である14例のうち L_① は4例に、L_② は8例に認められた。

2) C₅₈ 骨髄性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液 (Mと略す) とこれに対応する抗家兎血清及び吸収抗家兎血清との間の反応

NとMを泳動分析し、同時に抗骨髄性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兎血清 (Anti M と略す) を反応させて対比するとN側は対照と同様であつたがM側においては図6の如く対照の沈降線④と⑤の間に2本の沈降線 (M_① 及び M_② と名づける) を認めた。

このM_① 及び M_② がNに存しない事を更に確実にみるためにNとMを泳動分析した後に吸収抗骨髄性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理家兎血清 (Anti M-Nと略す) を同時に反応させて対比すると、図7にみられる如くN側には沈降線はみられずM側のみ M_① 及び M_② が認められた (写真4)。

又、これら M_① 及び M_② はMの全例、16例のう

写真 2

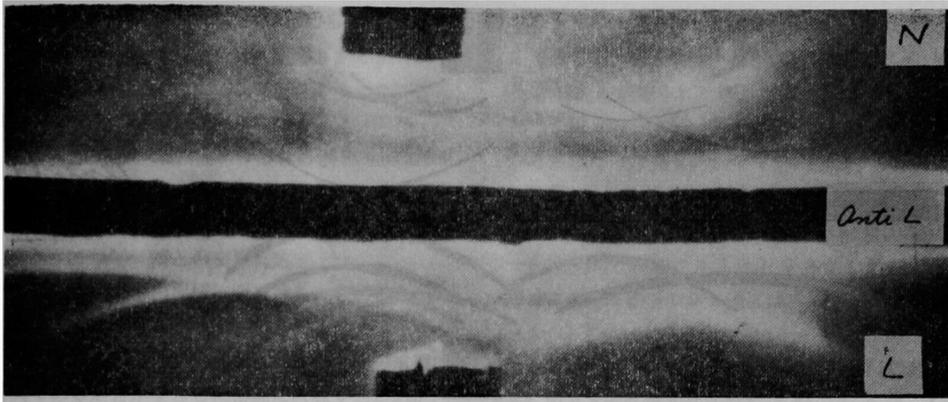
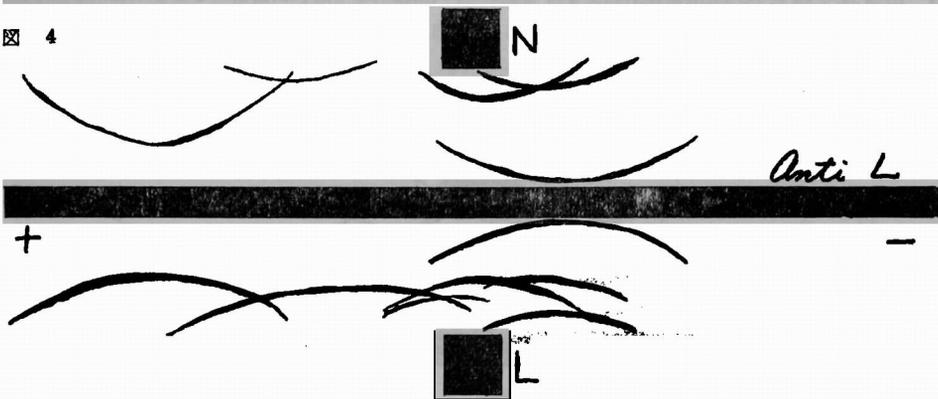


図 4



N: C₅₈ 正常マウス抗原 L: C₅₈ マウスリンパ性白血病抗原 Anti L: 抗 C₅₈ マウスリンパ性白血病血清

図 5

N: C₅₈ 正常マウス抗原

L: C₅₈ マウスリンパ性白血病抗原

Anti L-N: 吸収抗 C₅₈ マウスリンパ性白血病血清

Anti L-N

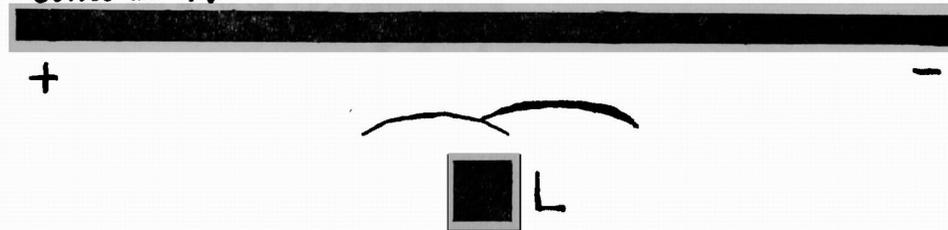
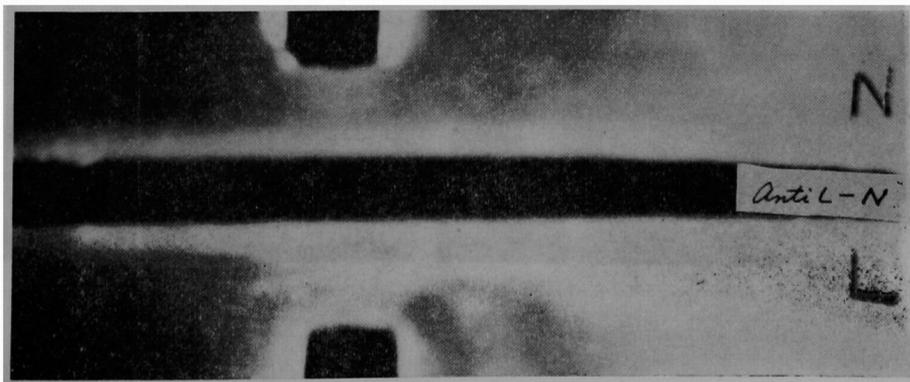
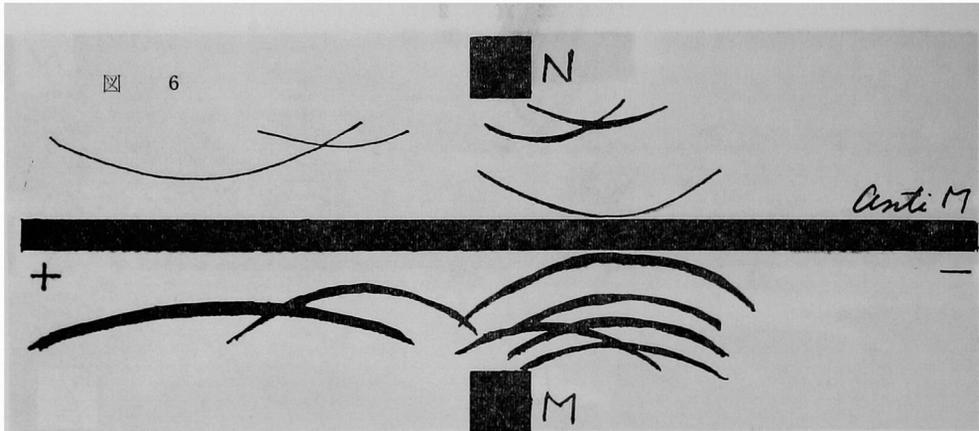
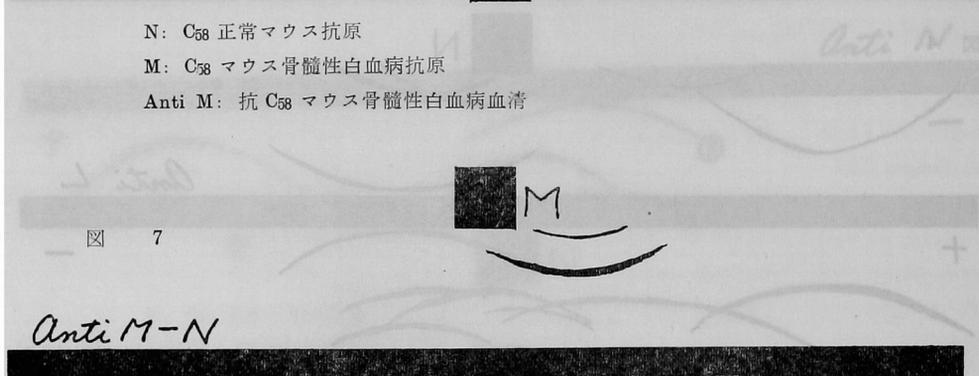


写真 3



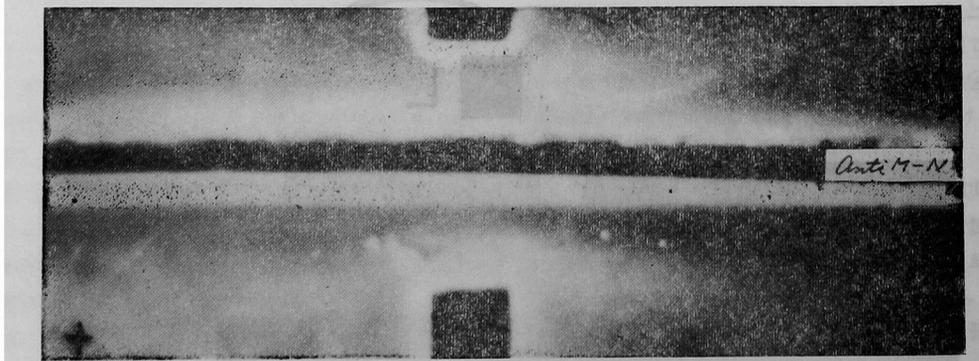


N: C₅₈ 正常マウス抗原
 M: C₅₈ マウス骨髄性白血病抗原
 Anti M: 抗 C₅₈ マウス骨髄性白血病血清



M: C₅₈ マウス骨髄性白血病抗原
 N: C₅₈ 正常マウス抗原
 Anti M-N: 吸収抗 C₅₈ マウス骨髄性白血病血清

写真 4



ち M₀ は 8 例に, M₁ は 11 例に認められた。

尚, M と Anti M で M₀ 及び M₁ がわかりにくい場合があるが, 対照の④及び⑤におおわれている事があるためである。

第 2 項 C₅₈ 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液とこれに非対応である他病型の抗家兎血清及び吸収抗家兎血清との交叉反応

前項において各白血病抗原にはそれぞれ N にみられない沈降線の存在する事を記した。

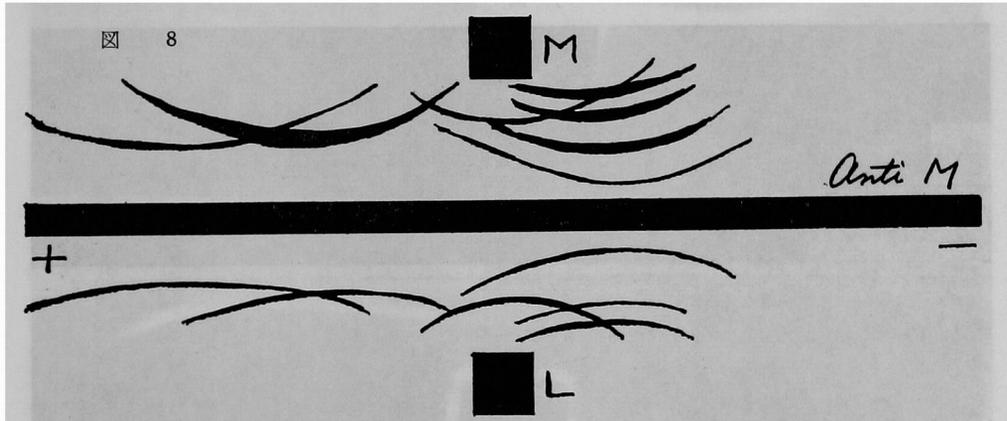
しかし, これらの沈降線が各病型の白血病抗原に特異であるか否かをさらに精細に吟味するために, 白血病抗原と他病型の抗家兎血清及び吸収抗家兎血清との交叉反応を行なった。

1) L と Anti M 及び Anti M-N の交叉反応

L と M を泳動分析した後に, 同時に Anti M を反応させると, 図 8 の如く M 側は前項と同じく M₀ 及び M₁ が認められたが, L 側においても対照に加うるに L₀ と同じ位置に沈降線 (L₀ と呼ぶ) がみられた (写真 5)。

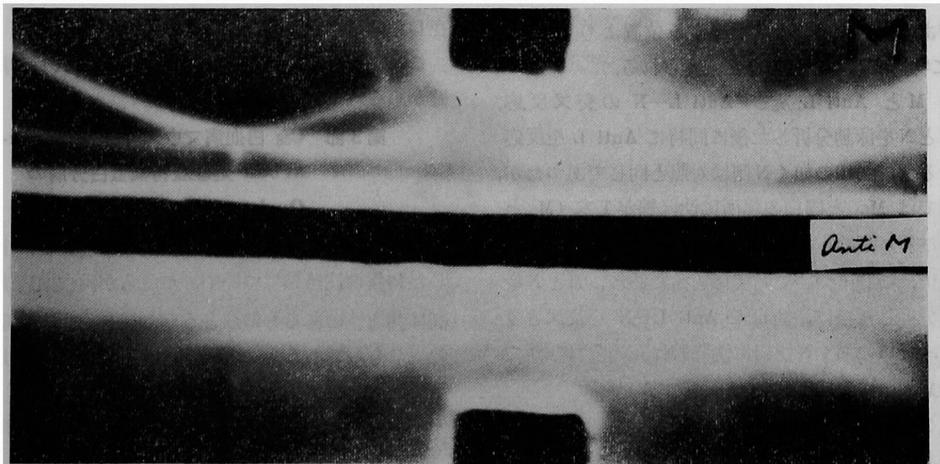
この L₀ は M₀ と略対照的に現れたが, 更に確実にするために N と L を泳動分析した後, Anti M-N を同時に反応させると図 9 の如く N 側では沈降線は現れなかつたが L 側には L₀ が現れた (写真 6)。

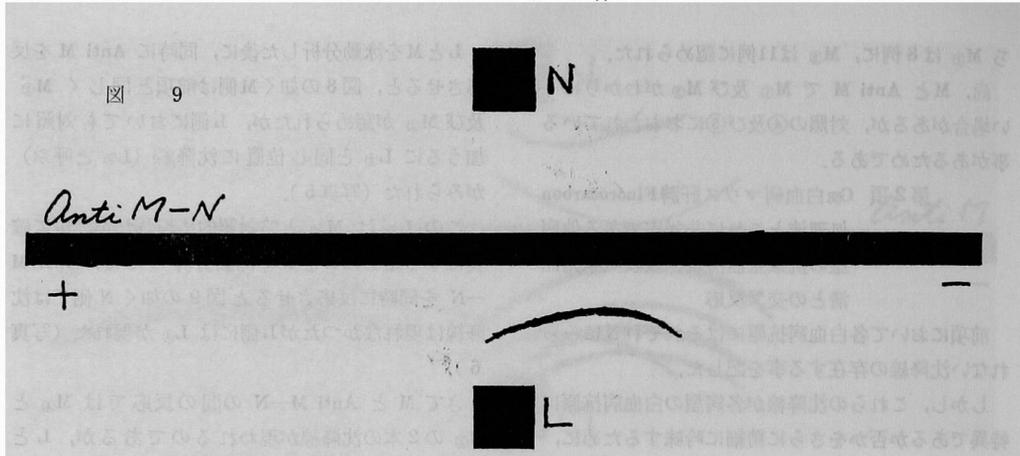
さて M と Anti M-N の間の反応では M₀ と M₁ の 2 本の沈降線が現われるのであるが, L と Anti M-N の間には L₀ 1 本しか認められない。これは Anti M-N の中には M₀ 及び M₁ に対応する抗体が存在するのであるから L の中には M₀ が



M: C₅₈ マウス骨髄性白血病抗原
L: C₅₈ マウスリンパ性白血病抗原
Anti M: 抗 C₅₈ マウス骨髄性白血病血清

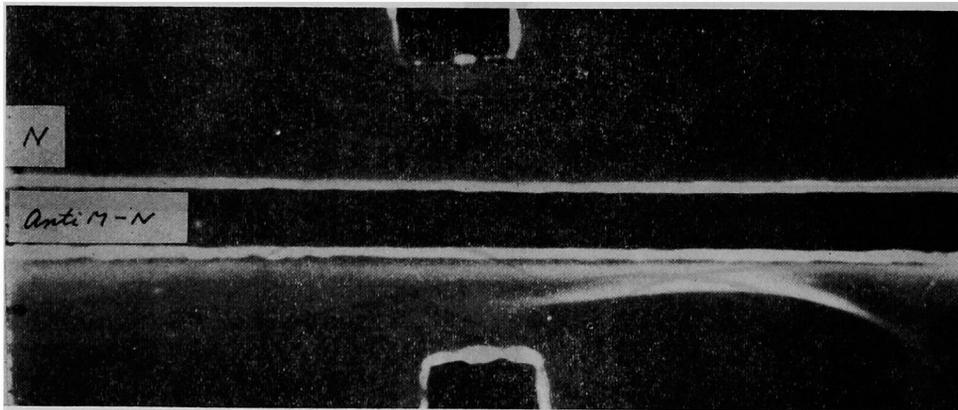
写真 5





N: C₅₈ 正常マウス抗原
 L: C₅₈ マウスリンパ性白血病抗原
 Anti M-N: 吸収抗 C₅₈ マウス骨髄性白血病血清

写真 6



M₂ のどちらかに対応する抗原蛋白分層が存しない証明となる。

こうして M₁ 若しくは M₂ のどちらかは M に特異であると考えられるが出現する位置より M₁ が M に特異なものであろうと考えられる。

2) M と Anti L 及び Anti L-N の交叉反応

M と N を泳動分析した後に同時に Anti L を反応させると、図10の如く N 側は対照と同じであつたが、M 側では M₂ と同様の場所に沈降線が1本 (M₂ と名づける) 認められた (写真7)。

更に、これについて確実にするために、M と N を泳動分析した後に、同時に Anti L-N を交叉させると、図11の如く N 側には沈降線は認められなかつたが M 側には M₂ を認めた (写真8)。

ここで L と Anti L-N の間には、L₁ 及び L₂ の2本の沈降線をみることにより、Anti L-N の

中には L₁ 及び L₂ に対応する抗体が存在するのであるから、M には L₁ の出現位置に沈降線がみられない事より、L₁ に対応する抗原蛋白分層が存在しない事がわかる。

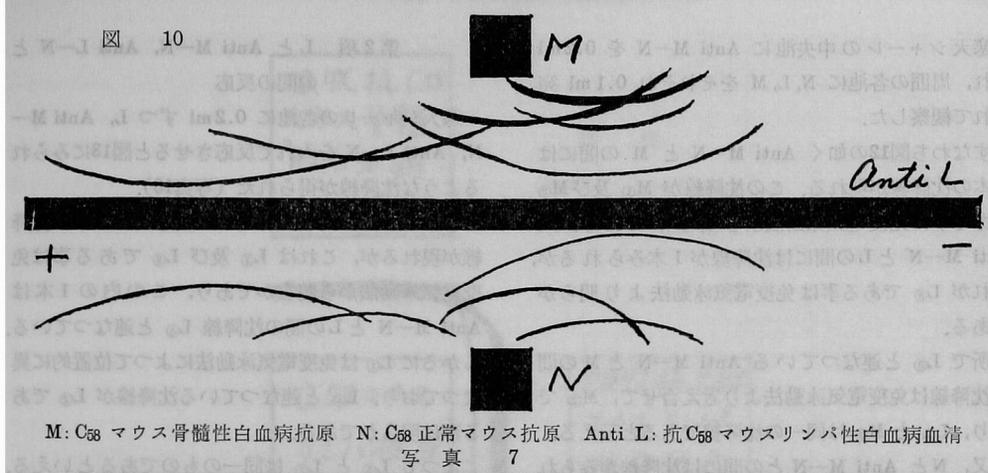
これにより、L₁ は L に特異な沈降線である事が確かめられた。

第3節 C₅₈ 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液特異蛋白分層の Ouchterlony 法による検討

免疫電気泳動法による各種の実験に於いて、出現した特異な沈降線について、これらが両白血病抗原間に共通性のあるものかどうか、又各白血病抗原に特異なものであるかについて Ouchterlony 法により更に検討した。

第1項 N, L, M と Anti M-N との間の反応

図 10



M: C₅₈ マウス骨髄性白血病抗原 N: C₅₈ 正常マウス抗原 Anti L: 抗 C₅₈ マウスリンパ性白血病血清
写真 7

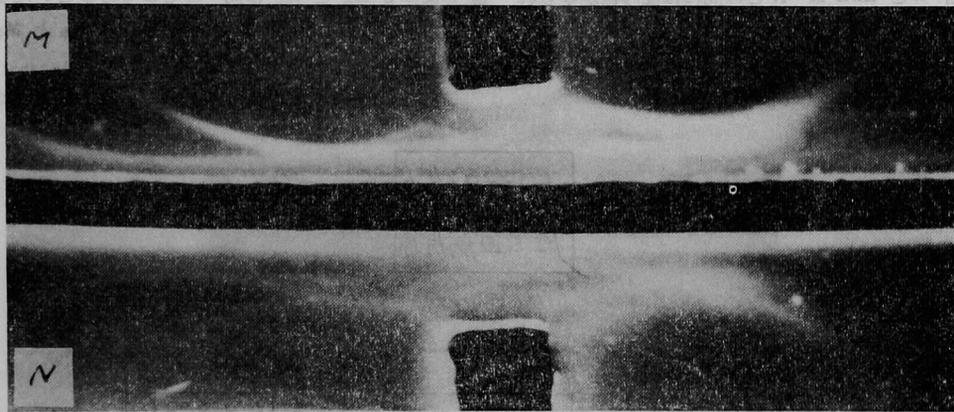


図 11

N: C₅₈ 正常マウス抗原
M: C₅₈ マウス骨髄性白血病抗原
Anti L-N: 吸収抗 C₅₈ マウスリンパ性白血病血清

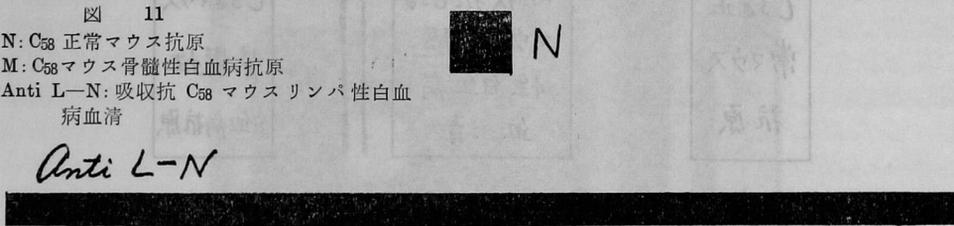
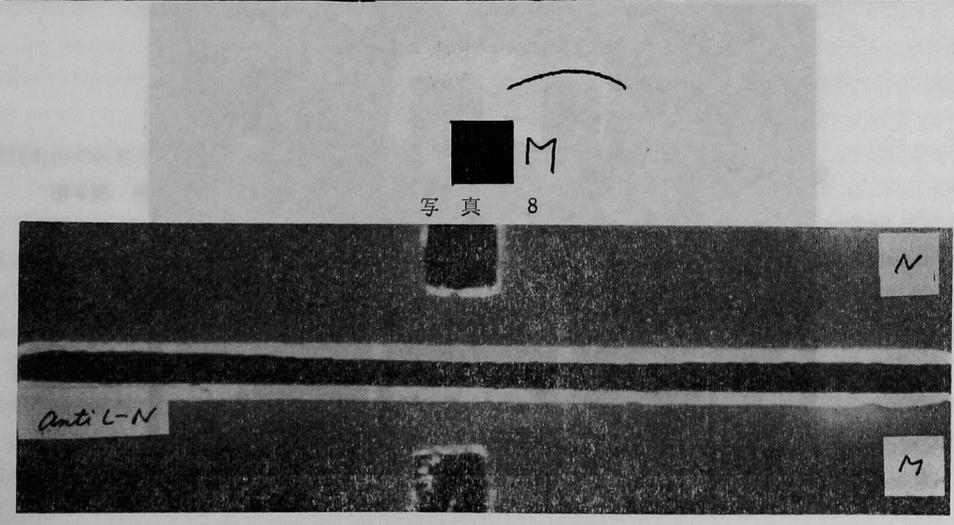


写真 8



寒天シャーレの中央池に Anti M-N を 0.2ml 入れ、周囲の各池に N, L, M をそれぞれ 0.1ml 宛入れて観察した。

すなわち図12の如く Anti M-N と M の間には 2本の沈降線が現れる。この沈降線が M_② 及び M_③ である事は免疫電気泳動法より明らかであり、又 Anti M-N と L の間には沈降線が 1本みられるが、これが L_② である事は免疫電気泳動法より明らかである。

所で L_② と連なっている Anti M-N と M の間の沈降線は免疫電気泳動法より考え合せて、M_② であり、L_② と M_② は同一の沈降線であると云える。

又、N と Anti M-N との間には沈降線がみられない事より M_① 及び M_③ は N に存しない沈降線である事が Ouchterlony 法によつても再確認された(写真9)。

第2項 L と Anti M-N, Anti L-N との間の反応

寒天シャーレの各池に 0.2ml ずつ L, Anti M-N, Anti L-N を入れて反応させると図13にみられるような沈降線が得られた(写真10)。

すなわち、Anti L-N と L の間には 2本の沈降線が現れるが、これは L_① 及び L_② である事は免疫電気泳動法から明らかであり、この内の 1本は Anti M-N と L の間の沈降線 L_② と連なっている。しかるに L_① は免疫電気泳動法によつて位置的に異なっており、L_① と連なっている沈降線が L_② である事は明らかである。

よつて L_② と L_③ は同一のものであるといえる。この事から第1項と第2項の実験より L_② と M_② は免疫学的に同一であると云える。

又 L_① は L に特異なものであり、M_① は M に特

図 12

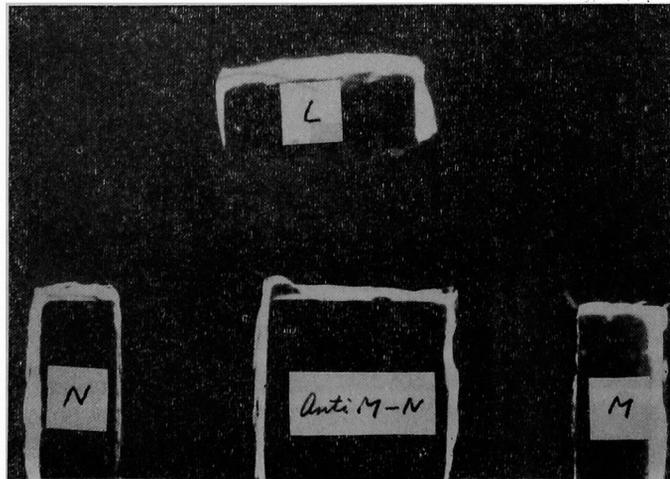
C58マウスリンパ
性白血病抗原

C58正
常マウス
抗原

吸収抗C58
マウス骨髓
性白血病
血清

C58マウス
骨髓性
白血病抗原

写真 9



吸収抗 C58
マウス骨髄
性白血病
血清

図 13

C58マウス
リンパ性白
血病抗原

吸収抗 C58
マウスリンパ
性白血病
血清

写真 10



異なるものであると云える。

第4節 特異沈降線の各種染色法による検討

まず Amidoschwarz 10 B による蛋白染色では良染した。次に Sudan Black B による脂蛋白染色及び Feulgen 反応に於ける DNA をしらべたが沈降線の染色性はみられなかつた。

更にムコ蛋白染色、糖蛋白染色を行なつたが、この染色では僅かに染色性がみられた。

両染色の比較ではムコ蛋白染色の方が僅かに強く染つた。

第4章 総括並びに考按

免疫電気泳動法ならびに Ouchterlony 法による解析により、C58 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液には、正常マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液にみられない両白血病間に共通な沈降線が電気泳動的に β -Globulin 域に存在し、骨髄性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液には β -Globulin 域にその病型特異の沈降線が存在し、又リンパ性白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液には α -Globulin 域にその

病型に特異な沈降線が認められた。

これにより両白血病マウス抗原には、正常マウス抗原に存在しない共通な抗原因子が電気泳動的に β -Globulin 域に存在している事が証明され、更に骨髓性白血病マウス抗原には電気泳動的に β -Globulin 域に、リンパ性白血病マウス抗原には電気泳動的に α -Globulin 域に特異な抗原因子が存在することが証明された。

三宅³²⁾ は人の骨髓性白血病、リンパ性白血病、単球性白血病の患者血清をそれぞれ家兎に Freund の Adjuvant 法により抗家兎血清を作製し、免疫電気泳動法及び Ouchterlony 法により患者血清を検討し、白血病患者血清には正常人血清にみられない2つの特異な蛋白分層、すなわち my-Globulin と l-Globulin が存在し、この2つの蛋白分層は、いずれも電気泳動的には大体 β_2 -Globulin の位置にあり、骨髓性白血病患者血清では7例全例に my-Globulin が存在し、その中の3例には my-Globulin とともに l-Globulin 存在する事を証明した。しかもこの my-globulin は骨髓性白血病に特異的であり、リンパ性、単球性白血病患者血清にはまったく証明されなかつたと述べている。

一方リンパ性白血病では急性型の3例において l-Globulin の存在を証明し、慢性型では正常血清と異なつた蛋白分層を証明する事はできなく、単球性白血病血清では5例全例に l-Globulin の存在を証明し得たと述べている。

私はこの報告により C₅₈ 白血病マウスの血清を分離し、C₅₈ 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液で免疫した抗家兎血清と反応させたが沈降線はまったく認められなかつた。

これにより、少なくとも私の認めた特異な抗原蛋白分層は、三宅³²⁾ の云う血清中の特異な蛋白分層とは異なつたものであらうと考えられる。

さて、これらの特異蛋白分層が認められたり、認められなかつたりする事であるが Klein⁶⁷⁾ は Methylcholanthren によつて同じ系統のマウスに生ぜしめた腫瘍抗原の間に個体によつて差のある事を報告しており Graham⁷⁶⁾ らの人癌についての研究でも同様である。これらの報告によると同じく、私の実験動物たる C₅₈ 白血病マウスにおいても、個々の例においては抗原に差異があり、つまり個体差もある程度に考えられ、又それと共にマウス個々の一時期しかみていない事、つまり個々のマウスの経過を追つた動的な観察でなしに静的な観察しか出来ない

事によるための差異も充分考えられる。

第5章 結語

C₅₈ 正常マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液及び C₅₈ 白血病マウス肝脾 Fluorocarbon 処理液について、それ等を抗原とし、その抗原で免疫した各抗家兎血清及び各吸収抗家兎血清を組合せて、免疫電気泳動法、Ouchterlony 法、沈降線の染色を行ない検討したが、得られた結論は以下の如くである。

1) 正常マウス抗原には Albumin 域に1本 α -Globulin 域に1本、 β -Globulin 域に3本の沈降線があらわれる。但し、この沈降線は必ずしも全例に現れるというのではない。

2) リンパ性白血病抗原には α -Globulin 域に1本の特異な沈降線を、 β -Globulin 域に骨髓性白血病抗原と共通な正常抗原にない特異な沈降線が存在する。

3) 骨髓性白血病抗原には β -Globulin 域に1本の特異な沈降線を認め、 β -Globulin 域にリンパ性白血病抗原と共通な正常抗原にみられないもう1本の沈降線を認めた。

4) 特異な沈降線は、一般蛋白染色ではよく染まり、ムコ蛋白染色、糖蛋白染色では僅かに染色され、脂蛋白染色、Feulgen 反応では染まらなかつた。

第6章 全篇の総括

白血病ウイルス純化の方法として Fluorocarbon 処理した C₅₈ 白血病マウス肝脾を抗原として行なつた、第1篇及び第2篇の実験について総括すると、対照実験として正常マウス抗原に対する同抗血清に対しての重層法沈降反応では単一系反応の形を示すが、免疫電気泳動法では5本の沈降線を認め、5つの反応系の集合したものであり、又正常マウス抗原と白血病マウス抗原の間には共通した抗原が存在する事が重層法及び免疫電気泳動法に於いて確認された。

次に白血病マウス抗原においては重層法沈降反応においても正常マウス抗原と比較して複雑な多種反応系を示す事から正常マウスにない抗原の存在が考えられたが、免疫電気泳動法及び Ouchterlony 法により両白血病マウス抗原に共通であり、且つ正常マウス抗原にない抗原因子は電気泳動的に β -Globulin 域にあり、又骨髓性白血病マウス抗原に特異な抗原因子は電気泳動的に β -Globulin 域に、リンパ性白血病マウス抗原には α -Globulin 域に、特異な抗原因子が存在する。

又この特異な抗原因子である沈降線は DNA, Lipoprotein は殆んどないか或は微量であり, 糖蛋白及び Mucoprotein は僅かに存在する.

又, Fluorocarbon 処理液中には電顕的にウイルス粒子を認め, 又その液を C₅₈ 新生マウスに注射して白血病の発生をみておる事などより, この液はウイルスに深い関係があると考えられ, 両白血病に存在する特異な蛋白分層はウイルス蛋白ではないかと推測される.

文

- 1) 武田勝男, 相沢 幹: 癌と免疫. 癌研究の進歩, 医学書院 2 版: 563, 1960.
- 2) Hauschka, T. S.: Immunologic Aspects of Cancer, A Review. *Cancer Res.* 12: 615, 1952.
- 3) 武田勝男: 癌の免疫学的研究の最近の動向. 癌の臨床, 8: 573, 1962.
- 4) Zilber, L. A.: Specific Tumor Antigens. *Advances in Cancer Research*, 5: 291, 1958.
- 5) Southam, C. M.: Relationships of Immunology to Cancer; A Review. *Cancer Res.* 20: 271, 1960.
- 6) Symposium sponsored by the American Cancer Society: The Possible Role of Immunology in Cancer. *Cancer Res.* 21: 1165, 1961.
- 7) Gorer, P. A.: The antigenic structure of tumors. *Adv. in Immunology*, 1: 345, 1961.
- 8) Kidd, J. G.: Suppression of growth of Brown-Pearce Tumor cells by a specific Antibody. *J. Exp. med.*, 83: 227, 1946.
- 9) Graham, J. B. and Graham, R. M.: The Effect of Vaccine on Cancer Patients.: *Surg. Gyn. & Obst.*, 109: 131, 1959.
- 10) Zilber, L. A.: A Study of Tumor Antigens. *Unio Int. contra Cancrum Acta*, 15: 933, 1959.
- 11) Calvalho, S. D.: Segregation of antigens from human leukemic and tumoral cells by fluorocarbon extraction. I, Detection by a gel diffusion method. *J. Lab. Clin. med.*, 56: 333, 1960.
- 12) Bjorklund, B.: Antigenicity of malignant and normal human tissue by diffusion technique. *Int. Arch. Allergy* 8: 179, 1956.
- 13) Korngold, L.: The antigens of Human Leuko-

cytes. I. Introduction. *J. Nat. Cancer Inst.*, 26: 547, 1961.

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わつた恩師平木潔教授並びに角南宏講師, 又実験に際し多大の御教示を戴いた倉敷中央病院内科医長三宅康夫博士, 同病院研究室主任高柳尹立博士に深く感謝する.

尚, 本稿の要旨は昭和38年10月第22回日本癌学会総会において発表した.

献

- 14) Moeschlin, S.: Phasenkontrastuntersuchungen in der Hämatologie. *Acta. haemat.* 2: 399, 1949.
- 15) Brausil, B.: Diagnostic differences between atypical myeloblasts and lymphoblasts in the phase Contrast microscope, a morphologie study of 32 cases. *Acta. haemat.* 12: 276, 1954.
- 16) 恒松徳五郎・深瀬政市: 位相差顕微鏡による血液及び骨髓の細胞学的研究——白血病細胞及びその核分裂像を中心として, 日血会誌, 21: 452, 1958.
- 17) 渡辺陽三浦: 血球の電子顕微鏡的観察, 日血会誌, 19: 327, 1956.
- 18) 伊藤 享: 骨髓性白血病細胞の電子顕微鏡的観察. 日血会誌, 21: 631, 1958.
- 19) 平木 潔・大藤 真他: 単球性白血病論——私達考案の骨髓組織培養法による診断を中心として. *最新医学*, 10: 1582, 1955.
- 20) 平木 潔: 諸種白血病の鑑別診断——組織培養による新知見と分類. *綜合臨床*, 5: 1324, 1956.
- 21) 平木 潔: 白血病について——白血病の診断と治療における進歩, 癌の臨床, 3: 613, 1957.
- 22) Burdette, W. J.: Etiology and treatment of leukemia. *Proc. First. Louis. Cancer Conf.* 1958.
- 23) 滝川清治・加藤順吉郎: 白血病細胞の細胞化学. *日本臨床*, 16: 1607, 1958.
- 24) 豊田成樹: 白血病における白血球アルカリフォスファターゼ活性度の生化学的測定. 日血会誌, 21: 438, 1958.

- 25) 緒方知三郎：白血病の本態に関する理論的考察。癌, 31 : 525, 1937.
- 26) Amano, S. : Statistisch pathologisch-anatomische sowie hämatologische Untersuchungen über das Wesen der Leukämie (1. Hauptteil der Pathologie der Leukämie). Jap. jour. med. Sci. V. Pathology, 5 : 331, 1940.
- 27) 渡辺 漸：急性白血病の病理——血液細胞及び腫瘍細胞としての白血病細胞・日血会誌, 5 : 663, 1941.
- 28) 三好和夫・熊取敏之・他：白血病と血漿蛋白。日血会誌, 14, 補冊 : 90, 1951.
- 29) Wuhrmann, F. & Wunderly, C. : Die Bluteiweisskörper des Menschen. Benno-Schwabe, Basel. 1952.
- 30) Bennhold, H., Ott, H. & Roth, E. : Des Eiweisspektrum und seine klinische Bedeutung. Klinik d. Gegenwart 1 : 603, 1955.
- 31) Wall, R. L. : The use of serum protein electrophoresis in clinical medicine. A. M. A. Arch. Intern. Med., 102 : 618, 1958.
- 32) 三宅康夫：白血病血清に関する研究。倉敷中央病院年報, 28 : 79, 1959.
- 33) Gross, L. : "Spontaneous" Leukemia Developing in C₃H mice Following Inoculation, In Infancy, with AK-Leukemic Extracts, or AK Embryos. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 76 : 27, 1951; Ann. N. Y. Acad. Sci. 54 : 1184, 1952.
- 34) Friend, C. : Cell-free transmission in adult swiss mice of a disease having the character of a leukemia. J. Exper. med. 105 : 307, 1957.
- 35) Graffi, Bielka & Fey : Leukämieerzeugung durch ein filtrierbares Agens aus malignen Tumoren. Acta Haemat. 15 : 145, 1958.
- 36) Schwarz, S. O., Schoolman, H. M., and Szanto, P. B. : Studies in Leukemia IV. The Acceleration of the Development of AKR Lymphoma by Means of Cell-free Filtrates. Cancer Research, 16 : 559, 1956.
- 37) Rowe, W. P., Hartley, J. W., Brodsky, I., and Huebner, R. J., : Reports complement fixation with a mouse tumor Virus (S. E. Polyoma). Science, 128 : 1339, 1958.
- 38) Imagawa, D. T., Green, R. G., and Halvorson, H. O. : A Precipitin Test for Antigens Present in Mouse Tissues-Containing. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 68 : 162, 1948.
- 39) 平木 深・大藤真：ウイルス性白血病の病型変異について。癌の臨床, 8 : 212, 1962.
- 40) 平木 深：ウイルス性腫瘍の免疫的研究。癌の臨床, 8 : 663, 1962.
- 41) 平木 深・大藤 真・他：マウスウイルス性白血病の病型変異とその機転——特にその免疫学的研究。最新医学, 17 : 2982, 1962.
- 42) 小塚 堯・他：蛍光抗体法による腫瘍の免疫学的研究。第1報 C 58マウス白血病におけるウイルス抗原の分布について。癌の臨床, 9 : 302, 1963.
- 43) Epstein, M. A. : An investigation into the purifying effect of a fluorocarbon on Vaccinia virus. J. Exp. Path., 39 : 436, 1956.
- 44) 緒方富雄：血清学実験法——その手ほどきから。南山堂, 2版, 1947.
- 45) Freund, J. & Bonanto, M. V. : The effect of paraffin oil, lanolin-like substance and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheria toxoid and Bact. typhosum. J. Immunol., 48 : 325, 1944.
- 46) Freund, J. : The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. Am. J. Clin. Path., 21 : 645, 1951.
- 47) 伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要。全訂改版, : 244, 1959.
- 48) Gessler, A. E. et al. : A new and rapid method for isolating viruses by selective Fluorocarbon deproteinization. Trans. N. Y. Acad. Sci., 2, 18 : 701, 1956.
- 49) Epstein, M. A. : Observations on the Rous virus. Fine structure and relation to cytoplasmic vacuoles., Brit. J. Cancer, 11 : 268, 1957.
- 50) Hummeler, K., Hamparian, V. : Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by Fluorocarbon. Science, 125 : 547, 1957.
- 51) Okada K., Miyoshi, I. : A study on the isolation of leukemia virus of AKR mouse by fluorocarbon. Acta Med. Okayama 16 : 232, 1962.
- 52) 高橋喜亮・高木健作・他：未発表。

- 53) Ellermann, V., O. Bang: Experimentelle Laukämie bei Hühnern. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig., 46: 595, 1908.
- 54) Barnes, W. A., I. E. Sisman: Myeloid leukemia and non-malignant extramedullary myelopoiesis in mice. Am. J. Cancer, 37: 1, 1939.
- 55) Kirschbaum, A., L. C. Strong: Leukemia in the F strain of mice. Observations on cytology, general morphology, and transmission. Am. J. Cancer, 37: 400, 1939.
- 56) Simonds, J. P.: Leukemia, pseudoleukemia, and related conditions in the Slye stock of mice. J. Cancer Res., 9: 329, 1925.
- 57) Burmester, B. R., M. A. Gross, W. G. Walter and A. K. Fontes: Pathogenicity of a viral strain (RPL 12) causing avian visceral lymphomatosis and related neoplasms. II. Host-virus interrelations affecting response. J. Nat. Canc. Inst. 22: 103, 1959.
- 58) Burmester, B. R., W. G. Walter, M. A. Cross and A. K. Fontes: The oncogenic spectrum of two "pure" strains of avian leukosis. J. Nat. Canc. Inst., 23: 277, 1959.
- 59) Gross, L.: Development of myeloid (chloro-) leukemia in thymectomized C3H mice following inoculation of lymphatic leukemia virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 103: 509, 1960.
- 60) Gross, L.: Biological and pathogenic properties of a mouse leukemic virus. Act. Haemat., 23: 259, 1960.
- 61) Fusth, J.: Prolongation of life with prevention of leukemia by thymectomy in mice. J. Gerontology, 1: 46, 1946.
- 62) Beard, D., G. S. Beaudreau, R. A. Bonar, D. G. Sharp, and J. W. Beard: Virus of avian erythroblastosis. III. Antigenic constitution and relation to the of avian myeloblastosis, J. Nat. Cancer Inst., 18: 231, 1957.
- 63) Ouchterlony, Ö.: In vitro method for testing the toxinproducing capacity of diphtheria bacteria. Acta. path. et microbiol. scandinav., 25: 186, 1948.
- 64) Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. Act. path. et microbiol. scandinav., 32: 231, 1952.
- 65) Grabar, P. & Williams, C. A.: Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de Substances Antigéniques. Biochim. et biophys. acta., 17: 67, 1955.
- 66) Williams, C. A. & Grabar, P.: Immuno-electrophoretic studies on serum protein. 1 The antigens of human serum. J. Immunol., 74: 158, 1955.
- 67) 右田俊介: 免疫電気泳動法の手技と応用. 日本臨床, 17: 574, 1959.
- 68) 高柳尹立・他: 発癌過程における組織蛋白の転換について, その2. 日新医学, 46: 416, 1959.
- 69) 高柳尹立・他: 免疫電気泳動法による悪性腫瘍患者体液に関する血清学的研究, 第1報. 倉敷中央病院年報, 29: 237, 1960.
- 70) 高柳尹立: 免疫電気泳動法による悪性腫瘍患者体液に関する血清学的研究, 第2報. 胸腹水蛋白の解析. 倉敷中央病院年報, 30: 189, 1961.
- 71) Wilson, M. W. & Pringle, B. H.: Experimental studies of the agar plate precipitin test of Ouchterlony. J. Immunol., 73: 232, 1954.
- 72) J. Clausen, J. Heremans, M. T. Heremans, and R. Rask-Nielsen: Immuno-electrophoretic Studies of Serums from Mice Carrying Two Transplantable Plasma-Cell Leukemias. J. Nat. Cancer Inst. 22: 57, 1959.
- 73) 建部守昭: 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. 十全医会誌, 66: 249, 1960.
- 74) 平井秀松・他: 白ネズミ腹水肝癌の特異抗原について. 癌の臨床, 8: 588, 1962.
- 75) 石川太刀雄・他: 癌の抗原分析. 癌の臨床, 8: 593, 1962.
- 76) 板倉克明: ゲル内沈降法による人癌組織抗原の検討. 癌の臨床, 8: 599, 1962.
- 77) Wilson, M. W. & Pringle, B. H.: Interpretation of the Ouchterlony precipitin test. J. Immunol., 75: 460, 1955.
- 78) 松橋 直: 寒天ゲル中の抗原抗体反応. 臨床病理, 特集II: 203, 1955.
- 79) 鈴木 鑑・木戸義昭: 寒天中における抗原抗体反応の研究——1. Ouchterlony 法に関する基礎的実験. 日新医学, 43: 342, 1956.

- 80) 高柳尹立：分化の免疫化学的解析，十全医会誌，60：701，1958.
- 81) Kohn, J.: An immunoelectrophoretic technique. *Nature*, 180：986，1957.
- 82) Wunderly, Ch.: Die Immunelektrophorese. (Erfahrungen mit der Immunelektrophorese in Agar-gel.) *Dtsch. med. Wchnshr.*, 83：407，1958.
- 83) Darcy, D. A.: Immunological discrimination between the blood of normal of tumor-bearing rats. *Nature*, 176：643，1955.
- 84) 森 五彦・小林茂三郎：濾紙電気泳動法の実際：南江堂：178，1961.
- 85) 佐藤氏雄：寒天電気泳動法におけるムコ蛋白の染色，*生物物理化学*，7：249，1961.
- 86) 青木貞章・小林 忠義：病理組織標本の作り方——その実際と要領——，*医学書院*：150，1957.
- 87) Klein, G.: Demonstration of resistance against M C induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 20：1561，1960.

Immunological studies on viral mouse leukemias

II. A study by Ouchterlony's immunodiffusion method and immunoelectrophoresis

by

Kensaku Takaki

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Author's Abstract

By means of Ouchterlony's immunodiffusion method and immunoelectrophoresis the author analyzed fluorocarbon-extracted antigens from spleens and livers from 30 C 58 leukemic mice (16 myelogenous, 14 lymphocytic) and obtained the following results.

1) Immunoelectrophoresis of normal antigens showed the presence of at least 2~5 precipitate components in the region of albumin, α - and β -globulin of normal serum.

2) The precipitate line specific to lymphocytic leukemic antigen was observed in the region of α -globulin of normal serum.

This line was found in 4 of 14 cases.

3) The precipitate line specific to myelogenous leukemic antigen was observed in the region of β -globulin of normal serum. It was found in 8 of 16 cases.

4) The precipitate line common to both lymphocytic and myelogenous leukemic antigens but absent in normal antigen was found in the region of β -globulin of normal serum. It was detected in 8 of 14 lymphocytic leukemic cases and in 11 of myelogenous leukemic cases.

5) Staining of these lines specific to viral mouse antigens revealed that these precipitate lines contained proteins consisted of mucoprotein, glycoprotein and a trace of lipoprotein. The amount of DNA, however, was considered very small or entirely absent.
