

マウス自然発生癌の可溶化抗原の性状に関する研究

小野 実

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：関山三郎教授)

[受付：1988年10月22日]

抄録：近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した可移植性扁平上皮癌のブタノールによる粗抽出液 (crude butanol extract) の性状について検索を行った。DEAE-Sephacel column chromatography により粗抽出抗原を部分精製すると NaCl の濃度により 4 つの画分に分離溶出された。各画分は、リンパ球-腫瘍抗原混合培養反応 (Mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction) では、PⅢ画分で、蛋白量が $10^{-1} \mu\text{g}$ の時、有意に $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みが高値を示した。PⅢは、pH 約 6.6 で弱酸性の蛋白であることが示唆され、かつ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析した結果その蛋白は、約 18K であった。また、PⅠ、PⅣで $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みが抑制されたことより PⅢには immunogenic antigen PⅠ、PⅣには suppressogenic antigen の存在が示唆された。

Key words : partially purified, immunogenic antigen, suppressogenic antigen.

緒 言

今日、癌治療において免疫療法が第四の療法とも呼ばれ重要な位置を占めてきているが、この場合癌細胞の保有する抗原性が問題となってくる。すなわち、宿主免疫の介在を考える上で重要な問題は、免疫を成立させるために癌抗原の存在が必要であるということである。かつその腫瘍抗原は、複雑多様な癌と宿主関係に大きな役割を果たしていると考えられており様々な解析がなされてきた。

Klein ら¹⁾により基礎づけられた腫瘍免疫学は、ウイルスや各種誘発剤による高抗原性の誘発癌を使用して展開されてきたが、人癌に近いとされている動物の自然発生癌を用いた免疫学的アプローチは比較的少なく、また、腫瘍抗原の物質レベル、分子レベルでの検索は、現在まだ十分に行われていない。

本教室では、近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した扁平上皮癌を用い、その放射線照射腫瘍細胞と脾リンパ系細胞との混合培養反応にて癌抗原の存在を証明し、また、腫瘍の増殖にともない担癌生体の細胞性免疫能が低下していくことを報告した²⁾。さらに、ブタノールにて同種癌細胞より抽出した粗抽出液 (crude butanol extract) を使用しリンパ球-腫瘍抗原混合培養反応 (Mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction) により粗抽出液中にも癌抗原の存在を示した。

本研究では、このマウス自然発生癌の粗抽出液中の癌抗原の性質について検討を加えるために DEAE-Sephacel column chromatography にて部分精製し、溶出した各画分について、リンパ球-腫瘍抗原混合培養反応を試みて検索したところ、腫瘍疫学的にきわめて興味ある知見が得られたので報告する。

Characteristics of solubilized tumor antigen of murine spontaneous tumor.

Minoru Ono.

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, School of Dentistry, Iwate Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 13 : 283-289, 1988

実験材料および方法

1) 腫瘍細胞

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生し、胸部皮下に継代移植されている扁平上皮癌を用いた。

2) 可溶性抗原の抽出法

可溶性抗原の抽出は、LeGrueら⁴⁾の方法に準じ、最終透析は、0.02M リン酸緩衝液を (pH7.0, 以下 PB と略す) 用いた。蛋白量は Lowry 法⁵⁾にて測定した。

3) DEAE-Sephacel column chromatography

DEAE-Sephacel (Pharmacia, Sweden) を蒸留水で洗浄し、さらに、0.02MPB で平衡化後 pH7.0, 120°C, 30分オートクレーブにて滅菌し、内径2.5cm, 高さ20cm の column (Econo-column BIO. RAD) に充填した。次に、粗抽出液を DEAE-Sephacel に吸着させ、stepwise elution による chromatography を施行した。すなわち、0.02M BP (pH7.0) 400 ml, 0.02M PB (pH6.7, 0.3M NaCl 含有) 400ml, 0.02M PB (pH6.6, 0.5M NaCl 含有) 400ml, 最後に 0.02M PB (pH6.4, 1.0M NaCl 含有) 400ml により段階的に溶出させた。

操作はすべて 4°C で行い、流速は 50~60ml/h とし 10ml ずつ試験管に採取した。蛋白量の測定は 280nm の紫外線吸収法で行った。

4) リンパ球-腫瘍抗原混合培養反応

① 培養液

培養液は、RPMI 1640 (Flow Labo) に 56°C 30分間加熱処理し非働化した 10% ウシ胎児血清 (Flow Labo) および、ペニシリン 100IU/ml, ストレプトマイシン 100 μg/ml, L-グルタミン 0.3mg/ml を添加し、pH7.4 となるように調製した。

② 脾リンパ系細胞浮遊液

マウスを頸椎脱臼させ、無菌的に脾臓を摘出し、PBS にて細胞浮遊液を作製した。5-6分間静置して細胞塊を沈澱させ、上清の細胞浮遊部分を採取し、200×g で10分間遠心後、上記培養液にて 1×10^6 個/ml に調製した。

③ 混合培養法

マイクロプレート (96well, Flatbottom NUNCLON) を用い、上記脾リンパ系細胞浮遊液を 1 well につき 200 μl ずつ分注した。これに各画分の蛋白量を 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 10, 10^2 μg の 6 段階に調整して添加し、37°C, 72時間, CO₂ 培養器で培養を行った。培養終了 3 時間前に 1 μCi の [³H]-thymidine (specific activity 15 Ci/mM NEN 社) (LM 101 Labo MAHS) を用い蒸留水でガラスファイバーフィルター (Labo MASH) 上に回収した。フィルターを十分に乾燥させた後、シンチレーションバイアル (PYREX, 岩城硝子) に入れシンチレーター (Scintisol AM-1, 和光純薬工業 K.K.) 4ml を注入し、液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-3255T, Aloka LSC-1050) で放射活性を測定した。

④ リンパ球幼若化率の算出

リンパ球幼若化率は精製画分添加群と非添加群の放射活性の比率であらわした。

Stimulation index (S.I.)

$$= \frac{\text{精製画分添加群 cpm}}{\text{非添加群 cpm}}$$

5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁶⁾

泳動用ゲルは 12.5% ポリアクリルアミド、濃縮用ゲルは 5% ポリアクリルアミドをそれぞれ用いた。泳動用緩衝液はグリシン緩衝液を用い染色は 0.2% クマシーブリリアントブルー R-250 でおこなった。また、分子量マーカーとして電気泳動用カリブレーションキット (Pharmacia) を用いた。

実験結果

1) 可溶性抗原の部分精製

粗抽出液は NaCl の濃度により 4 画分に分離溶出された。これを溶出 pH の高い順に P I, P II, P III, P IV とした (Fig.1)。粗抽出液 220 mg よりの各画分の収量は、P I は 3 mg, P II は 40 mg, P III は 25 mg, P IV は 4 mg であった。

2) 各画分の抗原性の検索

① リンパ球-腫瘍抗原混合培養反応による

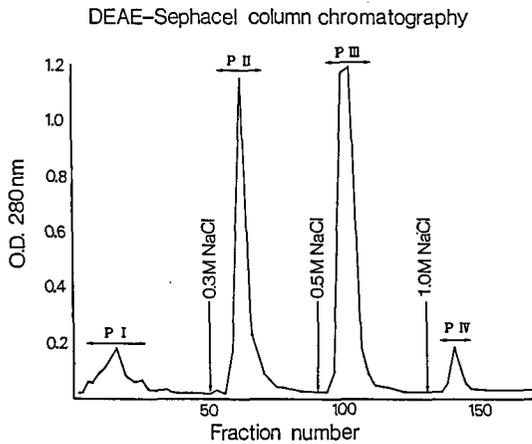


Fig.1 DEAE-Sephacel column chromatogram of crude butanol extract of WHT/Ht tumor.

[³H]-thymidine の取り込みについて

リンパ球—腫瘍抗原混合培養反応による [³H]-thymidine の取り込みの各画分での最大値は、Table 1 に示すように P I は2675 ± 834cpm, P II は3947 ± 796cpm, P III は9580 ± 3118cpm, PIV は2381 ± 499cpm, であった。これらのうち t-検定で有意差 (p<0.05) を認められたものは、P III の蛋白量が10⁻¹ μg のときのみであり、他の画分では有意差を認めなかった。

しかし、 [³H]-thymidine の取り込みの推移をみると、P I と PIV は、ほぼ同じパターンを示しました、10⁻² μg では P I ~ PIV とも cpm 約 2500前後であった。同様に 10 μg では、P II を除く P I, P III, PIV 画分は、control とほぼ同じ値を示した。しかし、10⁻¹ μg においては P

III の値は極めて高く、P I と PIV は control 値よりも低く、P II がその中間の値で control とほぼ同じ値を示す結果であった。(Fig.2)

Stimulation index についてみると Table 2 のごとく P III の10⁻¹ μg が5.1で最大値を示しその他には有意差が認められなかった。

② SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

P III を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析すると Fig.3 のごとく約18K のバンドが最も濃染した。

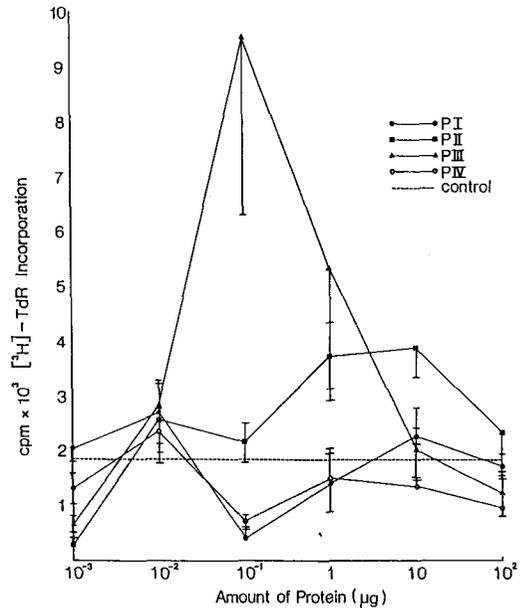


Fig.2 Blastogenic response of spleen cells to four peaks after purification from crude butanol extract of WHT/Ht tumor.

Table 1 Blastogenic response of spleen cells to four peaks after purification from crude butanol extract of WHT/Ht tumor in cpm.

a \ b	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10	10 ²
P I	2054 ± 222	2675 ± 834	429 ± 199	1530 ± 646	2300 ± 62	1699 ± 441
P II	299 ± 77	2584 ± 1011	2202 ± 314	3764 ± 844	3947 ± 796	2345 ± 645
P III	680 ± 135	2868 ± 775	9580 ± 3118	5351 ± 2778	2072 ± 598	1261 ± 532
PIV	1318 ± 489	2381 ± 499	738 ± 46	1521 ± 577	1362 ± 168	974 ± 511

* control (spleen cell alone), 1873 ± 1028.

a Each experimental group contained over 5 wells.

b Dose, μg.

Table 2 Blastogenic response of spleen cells to four peaks after purification from crude butanol extract of WHT/Ht tumor in stimulation index.

a \ b	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10	10 ²
P I	1.1	1.4	0.2	0.8	1.2	0.9
P II	0.2	1.4	1.2	2.0	2.1	1.3
P III	0.4	1.5	5.1	2.9	1.1	0.7
P IV	0.7	1.3	0.4	0.8	0.7	0.5

a Each experimental group contained over 5 wells.

b Dose, μg.

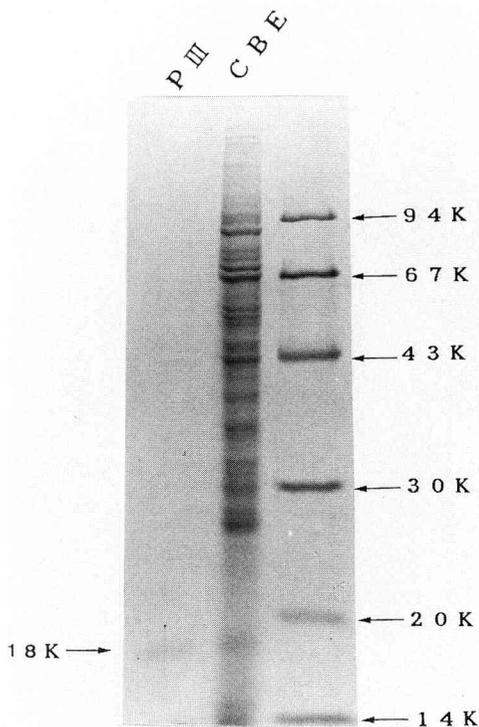


Fig.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of crude butanol extract and partially purified P III by DEAE-Sephacel column chromatography.

考 察

腫瘍抗原に関する研究は、1950年代より多数の研究者によって報告されてきた^{1,7,8)}が、これらの研究に際し、使用された腫瘍細胞の多くはウイルスや化学発癌剤により誘発された比較的抗原性の高いものであった。これに対し

自然発生癌における抗原性は一般に低く、Hewitt ら⁹⁾は27系のマウス自然発生癌を用いて、その抗原性について移植免疫の手法で検討し、自然発生癌は抗原が無いか低抗原性であり殆ど免疫原性が無かったと報告している。しかし、今日では、自然発生癌細胞に対して宿主生体が、免疫学的に反応している証拠は、数多く上げられており¹⁰⁻¹²⁾、教室ではWHT/Htマウスの自然発生癌の分与を受けリンパ球-腫瘍抗原混合培養反応にて癌抗原の検索を行ってきた^{2,3)}。

癌抗原の検出法には種々あるが、腫瘍免疫の主役である細胞性免疫能を *in vitro* で検出するものとして、⁵¹Crの遊出を指標とする細胞障害試験¹³⁾、増殖阻止試験の colony inhibition test¹⁴⁾、microcytotoxicity test¹⁵⁾がある。また癌抗原刺激によるリンパ球幼若化現象¹⁶⁾あるいは感作リンパ球から放出されるマクロファージ遊走阻止因子によるマクロファージ遊走阻止試験¹⁷⁾がある。リンパ球-腫瘍抗原混合培養反応は抗原の認識ばかりでなく抗原に対応したT細胞クローンの増殖をリンパ球の幼若化現象として把握することができ、かつ、応答するリンパ球はヘルパーT細胞で正の免疫応答を反映しているといわれている¹⁸⁾。

細胞表面の抗原抽出法は、3M-KC1¹⁹⁾、低張食塩水²⁰⁾、超音波処理²¹⁾などの方法がある。

本研究に用いたLeGrue ら⁴⁾のブタノールによる抽出法は、ブタノールが細胞膜に障害を与えること無く、十分量の蛋白を抽出でき、従来

の方法よりも優れたものと評価されている。粗抽出液の精製法は、塩析法、イオン交換クロマトグラフィー電気泳動法、免疫学的方法など、一般の蛋白質の精製法と異なることはないが、抗原性を失わせるような操作を避けることが肝要である。本研究で用いた DEAE-Sephacel column chromatography は、DEAE-セルロースの一種でより純化するための精製能を高めるために、高度に精製された微結晶セルロースから調整されている DEAE-Sephacel を用いている。これは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における SDS 化に伴う蛋白質の失活や等電点電気泳動時のアンフォライトなどの両性担体の影響²²⁾が無く最も一般的な精製法である。

癌細胞の可溶性抗原は、その成分、性状について種々検討されている。Klein ら²³⁾は A マウス起源の YAC 細胞を可溶化し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画したところ、分子量約 11K の画分に抗腫瘍抵抗性が、また約 150K の画分に腫瘍増殖促進性が誘導されそれぞれを immunogenic antigen, suppressogenic antigen としている。

Yamagishi ら²⁴⁾は、C3H/He マウスメチルコラントレン誘発肉腫の 3M KCl 抽出粗抗原液を等電点電気泳動にて精製し、pI 5.7~6.0 の画分は腫瘍増殖を抑制し pI 2.6~3.5 の酸性画分がサプレッサー細胞を誘導し腫瘍細胞の増殖を促進したと述べている。

本研究においては、WHT/Ht マウス自然発生癌の可溶性抗原を、DEAE-Sephacel column chromatography により精製したところ 4 画分が得られた。この 4 画分について抗原活性をリンパ球-腫瘍抗原混合培養反応で検討すると、P I と P IV は、Fig.2 にみる如く同じパターンで推移していることから、その抗原性については、等電点が異なるものの、同様な性質を有するものと思われた。また、蛋白量が、 10^{-2} μ g では P I ~ P IV とともに control とほぼ同じ値であり、同じく 10μ g では、P II を除く P I, P III, P IV が、control とほぼ同じ値を示したことから、 10^{-3} μ g における cpm 値のばらつきは、

これが十分な抗原量とならなかったことを示すものと思われた。

P III は、 10^{-1} μ g で極めて高い cpm 値を示したが、これに対し P I, P IV は control よりも低い値となったことは、明らかに、抗原性の差を示すものと思われる。さらに P III は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では約 18K が染され、前述の Klein ら²³⁾の抗腫瘍性を示す 11 K 画分に近似するものである。また、倉持ら²⁵⁾の [³H]-thymidine の取り込みが、サプレッサー T 細胞で抑制される、との報告などを総合すると P I, P IV は腫瘍増殖を促進させる画分に相当するものと思われた。

これらの結果から、今回抽出された粗抽出液には、抗原として認識されて腫瘍増殖を促進させる画分と、これを抑制する画分が含まれていることが示唆され、極めて興味のある結果となった。このことは、生体が癌細胞を拒絶するという目的にとっては、必ずしも正の免疫応答ばかりでなく、癌細胞の増殖を促進する負の免疫応答²⁶⁾を生ずることの立証につながることを示唆するものであった。

結 論

近交系 WHT/Ht マウスの自然発生扁平上皮癌細胞よりブタノールにて抽出した粗抽出液の性状を解析するため、これを DEAE-Sephacel column chromatography にて部分精製し、リンパ球腫瘍抗原混合培養反応 (Mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction) による検索にて以下の結論を得た。

1. 粗抽出液を DEAE-Sephacel column chromatography にて部分精製すると、NaCl の濃度により P I, P II, P III, P IV の 4 画分に分離溶出された。
2. 各画分についてリンパ球-腫瘍抗原混合培養反応にて検索した結果、P III で蛋白量が 10^{-1} μ g の時 [³H]-thymidine の取り込みが有意に高値を示し、その等電点が弱酸性であることが示された。
3. P III 画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動したところ、約18Kのバンドが最も濃染した。

4. P I, P IVにて [³H]-thymidineの取り込みが抑制されたことよりP IIIには immunogenic antigen P I, P IVには suppressogenic antigenの存在が示唆された。

謝 辞

稿を終わるに当たり、御懇篤なご指導と御校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御懇切な御指導を頂いた当講座深澤 肇講師に衷心より感謝の意を表

します。更に研究の場を提供して頂きました本学医学部細菌学教室川名林治教授、ならびに歯学部口腔生化学教室太田 稔教授に深謝します。また貴重な御助言を賜りました東北大学医学部細菌学教室田村敬二講師に謝意を表します。併せて本研究の遂行に際し、御助言を頂きました当講座結城勝彦教授に深く感謝するとともに、口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は1987年4月6日第41回日本口腔科学会総会において発表した。

Abstract : Crude butanol extract of syngenic spontaneous squamous cell carcinoma of WHT/Ht mice demonstrated a lymphocyte blastogenesis in mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction and contained tumor associated antigen. In this paper, characteristics of crude butanol extract of WHT/Ht tumor were studied. Crude butanol extract was partially purified using DEAE-Sephacel column chromatography and four peaks were obtained. These peaks were called P I ~ P IV and measured in mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction. P III (0.02M phosphate buffer, pH 6.6, 0.5M NaCl eluents) showed a significant reactivity and the content of protein was 10⁻¹ μg. This protein was estimated to have a molecular weight of approximately 18K daltons by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

However P I and P IV had a negative reactivity in mixed lymphocyte-tumor antigen culture reaction. These results suggested that P III had an immunogenic, and P I and P IV had a suppressogenic antigen.

文 献

- 1) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E., Hellström, K.E. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 20 : 1561-1572, 1960.
- 2) Fukazawa, H. : Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. *J. Iwate med. Ass.* 32 : 911-916, 1980.
- 3) 船木康博 : マウス自然発生癌可溶性抗原に対するリンパ球の免疫応答に関する研究, 岩大歯誌12 : 24-34, 1987.
- 4) LeGrue, S.J., Kahan, B.D., Pellis, N.R. : Extraction of a murine tumor-specific transplantation antigen with 1-butanol. I. Partial purification by isoelectric focusing. *J. Natl. Cancer Inst.* 65 : 191-196, 1980.
- 5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 6) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685, 1970.
- 7) Foley, E.J. : Antigen properties of Methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13 : 835-837, 1953.
- 8) Takeda, K., Aizawa, M., Kikuchi, Y., Yamawaki and Nakamura, K. : Tumor autoimmunity against methylcholanthrene-induced sarcoma of the rat. *Gann.* 57 : 221-240, 1966.
- 9) Hewitt, H.B., Blake, E.R., and Walder, A. S. : A critique of the evidence for active host defence against, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer.* 33 : 241-259, 1976.
- 10) Morton, D.L., Miller, G.F. and Wood, R. A. : Demonstration of tumor-specific immunity against antigens unrelated to the mammary tumor virus in spontaneous mammary adenocarcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 42 : 289-301, 1969.

- 11) Natori, T., Law, L.W. and Appella, E. : Biological and biochemical properties of nonident P40-solubilized and transplantation type from plasma membranes of a methylcholanthrene-induced sarcoma. *Cancer Res.* 37 : 3406-3413, 1977.
- 12) 内沢公伸 : 癌患者における腫瘍特異的細胞性免疫能の研究—3M KCl extract を用いた Mixed Lymphocyte Tumor Cell Interaction について—*札幌医誌*, 48 : 289-303, 1979.
- 13) 菊地浩吉 : ^{51}Cr 標識細胞障害試験 : 免疫実験操作法IV, 日本免疫学会編, 前田印刷 : 349-351, 1972.
- 14) 塚田 裕 : 腫瘍抗原, 畔柳武雄, 大高裕一, 松橋直編集 : 臨床免疫学叢書10, 第1版, 医学書院, 東京, 2-9, 1975.
- 15) 菊地浩吉 : Microplate による Microcytotoxicity Test : 免疫実験操作法IV, 日本免疫学会編, 前田印刷 : 360-361, 1972.
- 16) 伊藤喜久, 笠原 忠, 河合 忠 : 培養法と芽球化反応, *臨床病理*, 45 : 5-14, 1981.
- 17) 杉山知行, 中川 潤, 井村裕夫 : マクロファージ遊走阻止実験 (MIT), *臨床病理*, 45 : 22-33, 1981.
- 18) 菊地浩吉 : 癌と免疫, 菊地浩吉編 : 医科免疫学第2版, 南江堂, 東京 : 293-331, 1984.
- 19) Meltzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J. and Borsos, T. : Tumor-specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride. *J. Nat. Cancer Inst.* 47 : 703-709, 1971.
- 20) Reisfeld, R.A., Pellegrino, M.A., and Kahan, B.D. : Salt extraction of soluble HLA antigens. *Science.* 172 : 1134-1136, 1971.
- 21) 浜崎啓介, 黒瀬康平, 橋本俊明, 渡辺哲夫, 田頭良章, 藤原良一, 三輪恕昭, 万波徹也, 小長英二, 三村 久, 折田薫三 : 3M KCl, sodium desoxycholate, sonication による抽出抗原の検討, *最新医学*, 36 : 616-621, 1979.
- 22) 田村啓二, 柴田芳実, 松田真人, 宮内雄二, 石田名香雄 : 等電点電気泳動による免疫抑制酸性蛋白 (IAP) の分析, *臨床化学*, 11 : 1-12, 1982.
- 23) Klein, B.V., Sharon, R., Tarcic, N., and Naor, D. : Induction of antitumor reactive cells or suppressor cells by different molecular species isolated from the same nonimmunogenic tumor. *Immunobiol.* 163 : 7-21, 1982.
- 24) Vamagishi, H., Pellis, N.R. and Kahan, B. D. : Tumor-protective and-facilitating antigens from 3M KCl-solubilized tumor extracts. *J. surgical Res.* 26 : 392-399, 1979.
- 25) 倉持恒夫, 河井俊幸, 緒方利郎 : ヒトの免疫応答機能の測定 ^3H -thymidine を用いたヒト suppressor T 細胞機能測定法の作用機序, *臨床免疫*, 13 (Suppl.2) : 44-59, 1981.
- 26) Yamauchi, K., Fujimoto, S. and Tada, T. : Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse, *J. Immunol.* 123 : 1653-1658, 1979.