



Title	Wistar-Furth系ラット自然発生大腸癌の免疫学的研究：腫瘍抗原の解析と抗腫瘍抗体の検索
Author(s)	松尾, 敬志
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33921
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Wistar-Furth 系ラット自然発生大腸癌の免疫学的研究：腫瘍抗原の解析と抗腫瘍抗体の検索

松 尾 敬 志

(昭和59年 1月11日受付)

緒 言

Gold と Freedman は、ヒト大腸癌より腫瘍特異的と考えられる抗原を分離し、これは胎児組織にも存在することから carcinoembryonic antigen (CEA) と名づけて 1965 年に発表した¹⁾。以来、大腸癌より腫瘍特異抗原として colon mucoprotein antigen (CMA)²⁾³⁾⁴⁾、zinc glycinate marker (ZGM)⁵⁾⁶⁾、colon-specific antigen-protein (CSAp)⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ などが分離され報告されてきた。CEA は今日、正常大腸粘膜に局在する carcinoembryonic antigen in normal

colon mucosa(CEA-No)¹¹⁾、や肺・脾臓に局在する non specific cross-reacting antigen(NCA)¹²⁾、さらに胎便中の non specific cross-reacting antigen 2(NCA-2)¹³⁾、や成人糞便中の normal fecal antigen(NFA)¹⁴⁾などと交差することが知られており、腫瘍特異活性を有するかどうかは結論づけられていない¹⁵⁾¹⁶⁾。一方 ZGM、CSAp などは、その腫瘍特異性が否定されており¹⁶⁾、わずかに CMAにおいてその可能性が推測されているにすぎない¹⁵⁾。このように、現在腫瘍マーカーとして臨床的にも応用されている CEA についてでも、その抗原活性は多様であり、腫瘍特異抗原と規定するには未解決な問題を含んでいる。

一般にヒト腫瘍抗原の分離およびその腫瘍特異性の証明は、次の理由により極めて困難である。

- 1) ヒトは純系実験動物と異なり、その遺伝的背景が多様である。
- 2) 実験手法が主として *in vitro* 系に限られる。
- 3) 抗腫瘍血清は、ヒトにとって異種である実

実験動物に求めるため、それには正常細胞にも存在する種特異抗原や同種抗原に対する抗体も含まれており、特異性の解析が困難である。

そこで化学発癌物質および発癌ウイルスで人為的に誘発した実験腫瘍を用いて腫瘍特異抗原の解析が行われてきた。Gross¹⁹⁾や Foley²⁰⁾以来、実験腫瘍には移植による拒絶反応で証明される腫瘍特異性移植抗原 (tumor specific

transplantation antigen, 以下 TSTA) の存在することが、数多くの研究者により示されてきた²¹⁾²²⁾。

TSTAには、発癌ウイルスにより誘発された腫瘍に認められる交差反応性TSTAと、発癌物質により誘発された腫瘍に認められる個体反応性TSTAの二種類があり²³⁾、いずれも自然発生腫瘍には認められない強い免疫原性を有している²⁴⁾²⁵⁾。実際ヒト大腸癌には、実験腫瘍におけるTSTAのような免疫原性の強い腫瘍抗原は見つかっておらず、腫瘍特異抗原の解析に関しては、人為的な実験腫瘍はヒトのモデル

になりにくいものと考えられる。

そこで、実験動物に自然発生した腫瘍を用いて腫瘍特異抗原の解析が試みられてきた。自然発生腫瘍は発症率が極めて低く材料的に乏しいため、その腫瘍特異抗原は詳細には研究されていないが、実験腫瘍に存在するようなTSTAは検出されず、ヒトの腫瘍と同様に免疫原性の弱いことが知られている²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾。しかしマウス・ラットの自然発生腫瘍は、ほとんどの場合乳癌であり、大腸癌を用いて行われてきたヒト腫瘍特異抗原解析のモデルとしては不适当と考えられる。従って高頻度で大腸癌を自然発生する純系の動物系が得られれば、大腸癌における腫瘍特異抗原の解析が進展するものと期待される。

大阪大学医学部病理学教室の宮本らが継代飼育する Wistar-Furth 系ラットには、結腸部に腺癌が自然発生することが知られている²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。これは遺伝的素因により発症する例もあるヒト大腸癌に極めて近いモデル動物と考えら

れる。このラット系は広島大学原爆放射能医学研究所からの Wistar-Furth 系雄一匹、雌二匹に源を発しており、数家系はすでに交配世代が20代をこえ純系としての基準に達している³⁰⁾。その発癌率は交配19世代から20世代の雄について報告されており、54.1パーセントの発癌率であるが、興味深いことにそのうち32.4パーセントは癌が自然退縮しており、終生担癌であったものは2.7パーセントであった³¹⁾。

そこで、著者はヒト大腸癌の腫瘍特異抗原を検索する手段として、ヒト大腸癌のモデル動物と考えられる Wistar-Furth 系ラットに自然発生した大腸癌より、腫瘍抗原の抽出とその分離を試み、同系非担癌ラットで作製した大腸癌組織に対する免疫血清を用いて、その特異性を検討した。さらに担癌ラット血中における腫瘍特異抗体の検出を試みると共に、癌宿主に非自己と認識されうる腫瘍特異抗原を検索した。

実験材料と方法

1. 実験動物

大阪大学医学部第1病理学教室、宮本誠助教授より恵与された Wistar-Furth 大腸癌好発系ラット（担癌・非担癌，3-12月齢および胎児）の雌雄を用いた。

2. 大腸癌組織よりの抗原物質の抽出と分画

1) 腫瘍抗原の抽出

ラット大腸より癌組織を切除し、生理的食塩水（以下生食水）で糞便を洗い流した後、壊死部を除去し、残った組織の粘膜部をメスの背にてかき取った。ついで日立 VA 854 ミキサー（日立製作所，東京）にて、過熱を避けるため数回の間隔を置きながら合計30分間、生食水と共にホモジナイズした。このホモジネートを $5000 \times g$ ，30分画， $4^{\circ}C$ で遠心し、その上清を脱イオン水に対して2日間透析した後、凍結乾燥したものを癌組織粗抽出物

とした。

2) 癌抗原の分画法

癌組織粗抽出物を、Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia Fine Chemicals, AB Uppsala, Sweden) カラム (3 × 90 cm) を用いて分画した。すなわち癌組織粗抽出物 30 mg を 2 ml の 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解したものを、同緩衝液で平衡化したカラムに添加し、上記緩衝液を用いて 20 ml/hr の流速で展開、溶出した。溶出液は OD₂₈₀ にてモニターしつつ、98 ml ずつのフラクションに分離した。各フラクションを吸光度がピークを示す画分毎に集め、脱イオン水に対して 2 日間透析した後、凍結乾燥した。なお正常大腸粗抽出物も同様の方法で分画し、陰性対照材料とした。

癌組織粗抽出物から Sephacryl S-200 superfine カラムクロマトグラフィーにより分画された void volume 画分 (以下 P₀ と称す) をさらに

Sephacryl S-300 superfine (Pharmacia) カラムを用いて細分画した。P₀ 30 mg を 2 ml の トリス - 塩酸緩

衡液に溶解し、20 ml/hr の流速でカラムに展開した。溶出液は OD_{280} にてモニターしつつ、5.5 ml ずつのフラクションに分離し、吸光度に従って2つの画分を得た（先に溶出された画分をFr. A、後に溶出された画分をFr. Bと以下称する）。Fr. A および Fr. B は透析後凍結乾燥した。

各画分の分子量は、High molecular weight gel filtration caribration kit (Pharmacia) に含まれる異なる分子量の蛋白標準物質を癌組織抽出物と同様にゲルを通した時の溶出変量曲線から推定した。

3. 糞便抽出物の調製

非担癌ラット大腸より得た糞便を、適当量の生食水に溶解し、5000 × g, 30分間, 4°C で遠心して得た上清を、脱イオン水に針して2日間透析し、凍結乾燥したものを糞便抽出物として用いた。

4. 癌組織抽出抗原画分のホリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE と略す)

癌組織粗抽出物を、ゲル3過にて分離した腫瘍抗原活性を示す画分の精製度をPAGEにより検定した。PAGEはLaemmliの方法³²⁾に準じ、7.5%中性ポリアクリルアミドゲルスラブを支持体として、3%の同濃縮ゲルを通して試料を添加し、室温にて200 Volt/gelの条件で泳動を行った。泳動後、コマシーブリーリアントブルーR250(Pharmacia)を用いて蛋白染色を施した。

5. 免疫血清の作製

1) 癌組織粗抽出物に対する抗血清の作製

癌組織粗抽出物を生食水に溶解して2mg/mlの濃度とし、それにFreundの不完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Mi., USA)を等量混合して乳剤(water in oil)を調製した。被免疫動物には、同系の非担癌ラット(13週齢)13匹を用い、上記乳剤を1匹当たり1回0.5ml後肢皮下に注射した。免疫は2週間隔で3回行い、2週間後に最終免疫として、抗原溶液のみを0.5ml上記と同じ部位に注射した。最終免疫

の1週間後に頸動脈より採血した後、血清を分離し、これを抗癌組織抽出物血清（以下抗癌抽出物血清と略す）として用いた。なお抗血清は使用直前まで-70℃で凍結保存した。

2) 癌組織粗抽出物より精製した腫瘍抗原画分 (Fr. B) に対する抗血清の作製

癌組織粗抽出物をゲルろ過により細分画したFr. Bを免疫原として、上記と同様の方法で同系の非担癌ラット（13~20週齢、癌が自然退縮したラットを含む）6匹に免疫した。最終免疫の1週間後に採血し、分離した血清を抗Fr. B血清として用いた。

6. 免疫血清および癌組織抽出物の解析

1) ゲル内沈降反応による解析

オクタロニ-³³⁾法を用いた。すなわち抗原として用いた各画分（70mg/ml）を20μl，抗血清は希釈せず40μl，それぞれのウエルに添加し、1~2日間室温で静置後、沈降線の形成の有無を観察した。

2) 受身赤血球凝集阻止反応による解析

まず Abrameas らの方法³⁰⁾を参考に、 P_{10} を羊赤血球に感作した。すなわち羊赤血球を生食水で3回洗浄し、リニ酸緩衝生食水 (pH 7.2, 以下 PBS と略す) にて 50% (v/v) の浮遊液とした。次いで 6ml の PBS に溶解した P_{10} 4.8mg に、赤血球浮遊液 0.2ml を加え、さらに PBS で 10 倍に希釈したゲルタルアルデヒド (和光純薬, 大阪) 0.2ml を添加して 1 時間攪拌し、感作した。感作赤血球は PBS で 6 回洗浄した後、希釈用液 (1% 牛血清アルブミン加 PBS) にて 2.5% (v/v) 浮遊液とした。なお抗癌抽出物血清は 8 倍に希釈してもこの感作赤血球を凝集することが確認されている。

次に、 P_{10} より分画した Fr. A および Fr. B 140mg を上記希釈用液 5ml に溶解して凝集阻害抗原用液とした。そしてマイクロプレート (96 穴丸底, Becton and Dickinson, Oxnard, Ca., USA) に同抗原溶液の倍数希釈列 (最大濃度 28 mg/ml, 各ウェル 50 μ l) を作り、これに上記希釈用液で 8 倍に希釈した抗癌抽出物血清 50 μ l を加え 4℃ で

一晚反応させた後、感作赤血球浮遊液 50 μ l を加え、4°C で一晚静置して凝集阻止の有無を観察した。なお陽性対照として凝集阻害抗原 (Fr. A または Fr. B) を添加しないものを、陰性対照としては、感作していない羊赤血球を用いた。

3) 免疫血清の特異性に関する免疫組織学的検討

ラット大腸より切除した大腸癌を OCT コンパウンド (Miles, Naperville, Ill., USA) に包埋し、直ちに液体窒素にて急速凍結した後、クリオスタットにて 6-8 μ の凍結切片とし、スライドガラス上で融解後、室温にて風乾し固定を施さないまま蛍光抗体法に供した。一方、癌組織のホルマリン固定標本は、Leznoff³⁵⁾、

Morikawa³⁶⁾ らの方法を参考に、切除した癌組織を 10% (v/v) 中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋して 4 μ に薄切し、通常の方法により脱パラフィンした後、蛍光抗体法に供した。

免疫血清の特異性は間接蛍光抗体法で以下に述べる手順で検討した。癌組織切片上に免疫血清（原液）を適下して室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄して未反応血清を取り除いた。ついで二次抗体として20倍に希釈したFITC標識ウサギ抗ラットIgG抗体（Miles）を加え反応させ、洗浄後切片を緩衝化グリセロールで封入して、すみやかに落射型蛍光顕微鏡（ニコン：XE-EF型，東京）にて観察した。なお陰性対照として、正常大腸切片と免疫血清または癌組織切片と非免疫血清（正常ラット血清）の組み合わせで同様の操作を行い比較検討した。また本反応の特異性は、癌組織粗抽出物より細分画された各画分で免疫血清を吸収した後、上述した免疫組織学的手法で特異蛍光が消失することを確認した。吸収抗血清としては、5倍希釈した免疫血清に10 mg/mlの濃度の各画分を等量加え、4°Cで一晩反応させた後、5000 × g, 30分間遠心した上清を用いた。なおFr.AとFr.Bによる

吸収では免疫血清を25倍に希釈して行った。

7. 担癌宿主における抗腫瘍抗体の検索

担癌ラット血清中の抗腫瘍抗体を、オクタロニー法によるゲル内沈降反応および癌組織を用いた免疫組織学的手法により検索した。さらに抗腫瘍抗体の特異性を詳しく検討するため、担癌ラット血清よりIgG画分を

Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia) を用いたアフィニティークロマトグラフィー法²⁰⁾により分離し、それとFr.A・Fr.B および糞便抽出物との反応をオクタロニー法により解析した。アフィニティークロマトグラフィーの詳細は以下の通りである。ホウ酸緩衝生食水 (pH 8.0) で充分膨潤、洗浄した Protein A-Sepharose CL-4B ゲル 2 ml を、25 ml の注射筒に充填し、上記緩衝液で平衡化させた後、0.2 ml の血清を添加した。ついで25 ml の上記緩衝液で洗浄し非結合物を除去した後、1 M の酢酸で溶出してIgG画分を得た。溶出したIgG画分は、生食水に対し透析した後、Ultra-Thimbles UH 100/10 (Schleicher und Schüll,

Dassel, W. Germany) を用いて濃縮して、最終容積 0.2 ml とした。

8. 担癌ラット腎臓における IgG 沈着の検討

担癌ラットの腎臓を、ホルマリニ固定—パラフィン切片とし、FITC 標識ウサギ抗ラット IgG (20 倍希釈) を用いて、直接蛍光抗体法³⁰⁾ により糸球体の IgG 沈着を検索した。また非担癌ラット腎臓を陰性対照とした。

9. 腫瘍抗原と胎児組織抗原および糞便中の抗原との交差性の検討

胎児組織 (大腸・肝臓・腎臓) はホルマリニ固定後、パラフィン切片とした。そしてこの切片上で、大腸癌の腫瘍抗原と反応する免疫血清または担癌ラット血清を用いた間接蛍光抗体法により、癌抗原と胎児組織抗原との交差性を検討した。

また腫瘍抗原と糞便中の抗原との交差性は、糞便抽出物で吸収した免疫血清の抗腫瘍活性を、癌組織切片上で間接蛍光抗体法を用いて調べることにより検討した。また癌組織抽

出物画分 (H₂ または H₂B) と糞便抽出物との
交差性を、オクタロニー法によっても検討し
た。なお抗血清として、免疫血清、担癌ラッ
ト血清および同型G画分を用いた。

結 果

1、抗癌抽出物血清の腫瘍特異性について
非担癌ラット13匹に癌組織抽出物を免疫し
て作製した抗癌抽出物血清の特異性は、間接
蛍光抗体法により、大腸癌組織切片上で検討
した。癌組織は固定操作による抗原の変性お
よび溶出を避けるため未固定凍結切片とした
。なお同癌組織の一部をホルマリン固定パラ
フィン切片とし、H-E 重染色を施して観察
したところ、粘膜上皮部に発生したと考えら
れる癌は粘膜下組織に浸潤・増殖しており (図1.1 a)、癌細胞による管腔の形成が認めら
れた (図1.1 b)。

図 1.1 a

図 1.1 b

図 1.2 a

図 1.2 b

図 1.2 c

抗癌抽出物血清は癌組織と反応し、管腔を形成している癌細胞の内腔側に弥漫性に特異蛍光が認められた (図 1.2 a)。一方、正常大腸切片に抗癌抽出物血清を反応させた場合は特異蛍光が認められず、また同系の非免疫ラット血清で癌組織切片を処理した場合にも特異蛍光は認められなかった (図 1.2 b・c)。

これらの結果より、抗癌抽出物血清は、正常大腸組織には認められず管腔を形成した癌細胞の内腔側に局在する抗原と特異的に反応することが明らかとなった。また同時に同抗血清により認識される抗原は癌特異的である可能性が強く示唆された。

なお13の被検抗血清の中、腫瘍特異性を示すと判断されたものは4抗血清で、これらは全て同一の特異性を示したが、そのうち最も

特異蛍光が強いと判断された抗血清（以下 WF 7 抗血清と称す）を用いて、以後腫瘍抗原の解析を行った。

図 2 a

図 2 b

2. 腫瘍特異抗原の WF 7 抗血清による解析

1) 癌組織粗抽出画分の腫瘍抗原活性の検討

癌組織粗抽出物の Sephacryl S-200 superfine カ

ラムクロマトグラフィーにより5つの画分を

得た（図 2 a）。

それぞれの画分の腫瘍抗原活性をオクタロニ一法により検討した。その結果 P_{10} に対してのみ複数の沈降線が形成され、そのうち2本は明瞭であつたが、他の沈降線は不明瞭で幅が広く、結局本数を確認できなかった（図 3）。

一方、正常大腸粗抽出物を同様にゲル3過し P_{10} に相当する $N-1$ を分画した（図 2 b）。

そして WF 7 抗血清との反応をオクタロニ一法で検討したが、沈降線は認められなかった（図 3）。従つて P_{10} には、正常大腸抽出画

分には含まれず、且つ同系非担癌ラットに非自己と認識される腫瘍抗原の存在することが示唆された。

そこで癌組織切片上で、蛍光抗体法により局在が認められた腫瘍抗原と P_{10} との関連性を、免疫組織学的手法で吸収実験により検討した。すなわち P_{10} で吸収した WF γ 抗血清の癌組織切片との反応性を蛍光抗体法で検討した。その結果、未吸収の場合に認められていた癌細胞の内腔側の特異蛍光が、吸収操作により消失した(図4)。なお P_{12} , P_{11} , P_{13} , P_{14} による吸収では特異蛍光の消失は認められなかった。

以上のことから、 P_{10} には腫瘍抗原が含まれ、それは癌細胞の内腔側に特異的に局在することが示された。

2) P_{10} の細分画 (Fr. A, Fr. B) の腫瘍抗原活性の検討

P_{10} は Sephadryl S-200 superfine の void volume 画分であるため、さらに Sephadryl S-800 superfine カラムクロマトグラフィーにより分画し、Fr. A と Fr. B を得た (図 5)。Fr. A は分子量約 800,000 以上、Fr. B は分子量約 450,000 と推定された。

図 5

表 1

Fr. A, Fr. B の腫瘍抗原活性は、受身赤血球凝集阻止反応で検討した。すなわち、 P_{10} を感作した羊赤血球の WF7 抗血清による凝集が、Fr. A または Fr. B を加えることにより阻害されるかどうかによってそれらの抗原活性を検討した。その結果、Fr. A を WF7 抗血清に加えても凝集阻止が認められなかったのに対して、Fr. B では一定濃度以上を加えた場合に凝集阻止が認められた (表 1)。

図 6 a

図 6 b

さらに WF7 抗血清を Fr. B で吸収した場合、癌組織切片上での特異蛍光の消失が認められ

た (図 6 a)。しかし Fr. A で吸収した場合に
は、特異蛍光が消失することになった (図
6 b)。

以上の結果から、 P_{II} の腫瘍特異性を担う抗
原は、Fr. B に細分画されることが判明した。

3) Fr. B の PAGE 像

Fr. B は PAGE 像から最低 3 種類の蛋白成分が
含まれていることが判明した。そして、中央
のバンドは他の 2 本に比較して濃く、フェリ
チンの泳動位置に近似することから分子量約
440,000 と推定され、Fr. B の主要成分を構成す
るものと推察された。またこのバンドは太く
電気泳動的に多様性を示した (図 7)。

4) P_{II} と糞便との交差抗原性の検討

CEA においては前述したように胎便および
正常人の糞便中の抗原と交差することが報告
されており、腫瘍特異抗原と規定するためには
それと区別する必要性が論議されている。
そこで P_{II} についても成熟ラット (非担癌) の

糞便抽出物との交差性を検討した。その結果、糞便から抽出した抗原は WF7 抗血清と反応して数本の沈降線を形成し、しかもそのうちの 1 本は P_0 と同抗血清の間に形成された沈降線に融合した (図 8)。従って P_0 は糞便中の抗原と交差する抗原を含むことが示唆された。しかし P_0 に糞便中の抗原とは区別される腫瘍抗原が存在するかどうかは、両者に不明瞭な沈降線が存在するため解析は困難である。

図 9

他方、免疫組織学的検討において、糞便から抽出した抗原で吸収した WF7 抗血清では、管腔を形成する癌細胞の内腔側に特異蛍光を認めた (図 9)。この特異蛍光は、上記抗血清を P_0 で吸収した場合は完全に消失するのに対し、さらに吸収に大量の糞便抽出物を用いても観察された。

以上の結果より、 P_0 には糞便中の抗原と交

差する抗原が含まれるものの、腫瘍特異活性を担う抗原はそれとは異なることが明らかにされた。

3、Fr.Bの腫瘍特異活性の検討

同系の非担癌ラットにFr.Bを免疫して得た抗Fr.B血清は、オクタロニー法によりFr.Bと弱いながらも1本または2本の沈降線を形成した(図10)。

従って、Fr.Bには免疫原性は弱いものの、同系非担癌ラットに非自己と認識される抗原の存在することが示された。

図10

1-1-11

各抗Fr.B血清は癌組織と特異的に反応し、管腔を形成する癌細胞の内腔側に強い特異蛍光が認められた。しかし正常大腸組織とは反応せず、Fr.Bは癌細胞に特異的に局在する抗原成分を含んでいることが確認された。なお抗Fr.B血清による特異蛍光は、WFr抗血清のそれが瀰漫性であったのに対し、癌細胞の内

腔側に点の連続として、より限局して認められた（図11）。なお組織切片は固定したものをを用いた。

4. 胎児組織抗原との交差性の検討

CEAに代表されるように、ある種のヒト腫瘍抗原は胎児組織抗原と交差することが知られており、一般に oncofetal 抗原と呼ばれている。そこで今回、ラット大腸癌に検出された腫瘍抗原が oncofetal 抗原であるかどうかを、WF7抗血清または抗腫瘍活性の認められた担癌ラット血清（後述）を用いる間接蛍光抗体法で検討した。

図 12 a

図 12 b

図 12 c

その結果、両血清とも胎児大腸組織の粘膜上皮部と反応したが（図12 a）、胎児肝臓および腎臓とは反応しなかった（図12 b, c）。従って、この腫瘍抗原は胎児大腸抗原と交差することが示され、oncofetal 抗原であることが示唆された。

5. 担癌ラット血清中の抗腫瘍抗体の検索

1) 蛍光抗体法による検討

免疫血清と同様にして、担癌ラット血清中の癌組織に特異的に反応する抗体を間接蛍光抗体法により検索した。その結果、正常大腸組織には認められない特異蛍光が、管腔を形成する癌細胞の内腔側に認められ、その局在ハタニーは抗Fr.B血清の場合と類似していた(図13a)。従って癌宿主は、正常大腸組織に認められない腫瘍抗原を非自己と認識して免疫応答を行い、抗腫瘍抗体を産生していることが示唆された。

図13

またこの特異蛍光は、担癌ラット血清をFr.Bで吸収した場合に消失することより(図13b)、担癌ラット血清中の抗腫瘍抗体は、Fr.Bに含まれる抗原と特異的に反応することが判明した。なお組織切片は固定したものを用いた。

2) オクタロニー法による解析

担癌ラット血清と、 P_{10} および糞便抽出物との反応性を検討した。また同時に癌が自然退縮したラット血清および正常ラット血清も同様に検討した。

担癌ラット血清と P_{10} との間に形成された沈降線には、同血清と糞便抽出物との間の沈降線に融合するもののほか、 P_{10} とのみ反応していると考えられる沈降線(矢印)が観察された(図14a)。従って、 P_{10} には糞便中の抗原と交差する抗原のほか、腫瘍に特異的と考えられる抗原の存在が示された。癌退縮ラット血清は、 P_{10} および糞便抽出物の両者と沈降線を形成したが、 P_{10} との間にのみ存在するものは認められなかった。また正常ラット血清2検体は、 P_{10} および糞便抽出物と沈降線を形成しなかった(図14a)。

図14a 図14b
図14c

担癌ラット血清より ProteinA-Sepharose CL-4B
アフィニティークロマトグラフィーを用いて得

られた IgG 画分は、糞便抽出物とは反応せず P_{10} と 1 本の沈降線を形成し (矢印)、これは担癌ラット血清と P_{10} との間にも認められた沈降線 (矢印) と融合した (図 14b)。またこの IgG 画分は Fr. B と 1 本の沈降線 (矢印) を形成したが、Fr. A とは反応しなかった (図 14c)。

以上の結果より、担癌ラット血清中には癌組織抽出物と反応する IgG 抗体が存在し、この抗体に認識される抗原は Fr. B に含まれ、糞便中の抗原とは変異しないことが明らかにされた。

6、担癌ラット腎臓における免疫複合体の検索

担癌ラット血清中に抗腫瘍抗体が証明されたことにより、循環血中において腫瘍抗原—抗腫瘍抗体による免疫複合体 (以下 IC と略す) が形成され、これが腎糸球体に沈着している可能性が考えられた。

図 14

そこで FITC 標識抗ラット Ig G 血清による直接蛍光抗体法で、担癌ラットの腎系球体における Ig G の沈着を検討した結果、強い特異蛍光が同部に観察された (図 15)。しかし非担癌ラットの腎系球体では特異蛍光は認められなかった。これらの所見は担癌状態と強く関連した IC の系球体への沈着を強く示唆するものであり、癌宿主血中において腫瘍抗原—抗腫瘍抗体による IC 形成の可能性が示唆された。

考 察

生体の防御機構を担う免疫系が、生体にとって異物のひとつである腫瘍細胞を監視していることは想像に難くない。腫瘍細胞は、その由来する正常細胞とは異なる抗原を持っており、宿主免疫系はこの抗原を非自己と認識して腫瘍細胞を排除すると考えられている

39) 40)。このような腫瘍抗原の存在は、人為的に誘発した実験腫瘍では証明されているが、自然発生した腫瘍には、特異性が明確に証明された腫瘍抗原の存在は報告されていない^{29) 25) 26) 27)}

。そこで著者は、自然発生した腫瘍の場合、どのような腫瘍抗原を宿主が非自己と認識するのかを、Wistar-Furth 系ラットに自然発生した大腸癌を用いて検索した。

ラット大腸癌組織を、同系の非担癌ラットに免疫して得た抗血清を用いて検討したところ、同癌に腫瘍抗原が存在することが明らかとなった。この腫瘍抗原は、正常大腸組織には認められず、同系のラットに非自己と認識されることから、腫瘍特異的と考えられる。またこの腫瘍抗原は、今回実験に供した異なる個体由来の癌組織の全てに認められることから、個体特異的な腫瘍抗原ではなく、このラット系に発生した大腸癌に共通する腫瘍抗原と推測される。

ヒトの腫瘍抗原は一般に次のように分類さ

れている¹⁰⁾。

Class 1: 個々の腫瘍に特異的な腫瘍特異固有抗原

Class 2: 個体の異なる同種の腫瘍および異種の腫瘍の一部に共通する腫瘍特異的共通抗原

Class 3: 正常細胞にも検出される腫瘍関連抗原

本ラット大腸癌に認められた腫瘍抗原は、上記分類の Class 2 に相当するものと考えられる。一方、ヒト大腸癌に特異的な抗原 (Class 2) と考えられていた CEA は、感度の高い実験手法の普及に伴い、肺および肝臓に存在する NCA や正常人の糞便中に存在する NFA などと交差することが示され⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、腫瘍関連抗原と位置づけられている。従って本ラット大腸癌の腫瘍抗原と CEA は、その特異性が異なると考えられる。しかし近年、CEA 分子上の抗原決定基の解析が進むにつれて、CEA には NCA や NFA と共通する抗原決定基のほか、

(CEAに特異的な抗原決定基も存在することが示唆され²³⁾、腫瘍特異抗原(Class 2)である可能性が示されている。従って、本ラット腫瘍抗原が、ヒトCEAに相当する可能性も残されており、今後のCEAの腫瘍特異性の解析に注目される。

ラット大腸癌の腫瘍抗原は、ゲル3過した場合、分子量約450,000と推定される画分(Fr. B)に含まれることが明らかとなった。Fr. Bには、なお3種類の蛋白成分が含まれることがPAGEにより示されたが、この蛋白成分のどれが腫瘍抗原であるかは今後の解析を待たなければならぬ。PAGEで示された3本のバンドは、いずれも幅が広く分子の不均一性が認められ、いずれの成分が腫瘍抗原であっても、抗原分子は不均一であると考えられる。一方CEAは分子量180,000~200,000であり、その電気泳動像から分子は不均一であることが示されている²³⁾。そしてその不均一性は糖組成の相違に基づくものと推定されている²⁴⁾。電気泳

動像から類推すれば、ラット大腸癌の腫瘍抗原の不均一性もその糖組成に関連する可能性が充分考えられるが、詳細な解析が必要である。

ラット大腸癌は病理組織学的に高分化腺癌と診断されており、高円柱状の癌細胞による管腔の形成がその形態的特徴である。本腫瘍抗原は癌細胞の内腔側辺縁部に局在していることが証明された。これはCEAの局在パターンと類似している。CEAは電子顕微鏡により大腸癌細胞のとりわけglycocalyxに高濃度に分布することが明らかにされている⁴⁾。本ラット腫瘍抗原が癌細胞内腔側辺縁部のいずれの構造物に限局するかを検討すること、本腫瘍抗原とCEAとの異同を比較する上でも重要であり、今後の研究課題と考えられる。

今回ラット大腸癌の腫瘍抗原が、正常ラットの糞便中の抗原とは交差しないことが明らかとなった。従って本腫瘍抗原は、極めて腫瘍特異性が高いと考えられる。CEAは前述し

たように糞便中の抗原と交差することが知られ、とりわけ松岡らが正常人の糞便から分離した normal fecal antigen-2 とは3種類の抗原決定基が共通することが示されている⁴⁾。この点において、ラット大腸癌の腫瘍抗原はCEAと相違している。しかしCEAは抗血清を実験動物(異種)に求めるため、本来ヒト(同種)に対して抗原性を持たないCEA分子上の抗原決定基に対する抗体も抗血清には含まれ、これが糞便中の抗原と交差を示す原因となっている可能性が考えられる。従って、糞便中の抗原との交差性の相違から西腫瘍抗原の異同について結論づけることはできない。

ラット大腸癌の腫瘍抗原は、胎児大腸の粘膜上皮部にも存在することが示され、この腫瘍抗原が oncofetal 抗原の一種であることが示された。CEAはその名の通り oncofetal 抗原で、胎児の腸上皮にも存在することが知られており⁴⁶⁾、ラット腫瘍抗原はこの点でCEAと類

似している。Sjögren らは、Wistar-Furth 系ラットに 1,2-dimethyl-hydrazine または N-methyl-N-nitroguanidine を投与し誘発した2種の実験大腸癌には、それぞれ個々の TSTA の他に、共通する胎児抗原が存在することを見出した。そしてこの胎児抗原は、胎児大腸に認められるが、胎児肝・腎臓および成熟ラット正常大腸には認められなかったと報告している⁴⁾。今回のラット大腸癌に認められた腫瘍抗原も同様の特性を示しており、自然発癌・化学発癌を問わずラット大腸癌には共通の oncofetal 抗原の存在する可能性が示され興味深い。

本大腸癌好発系ラットにおいて、担癌ラット血清中に抗腫瘍特異活性を持つ IgG 抗体の存在していることが証明された。担癌ラットに認められる抗腫瘍 IgG 抗体が認識する腫瘍抗原と、同系非担癌ラットに免疫することにより得た抗血清が認識する腫瘍抗原とは、次の理由により同一であることが推定された。

①認識する腫瘍抗原の癌組織における局在が

一致していた。②両抗原活性は同一の癌組織抽出物画分 (Fr. B) に認められた。しかし、より微細な局在の比較検討は行っており、Fr. B の精製も充分でないため、更に詳細な検討が必要と考えられる。

ヒト大腸癌患者血清中においても抗腫瘍抗体の存在が Nairn らにより示されており、ある大腸癌患者より得た血清は、自己の大腸癌および他患者の大腸癌と反応したが、自己の正常粘膜とは反応しなかったと報告している⁴⁰⁾。担癌ラットの血清も同様の特異性を示しており興味深い。腫瘍抗原側の解析はなされておらず、CEA との関連も不明である。CEA については、大腸癌患者血清中に抗 CEA 抗体が存在すると言う報告^{41) 51)}と、それを否定する報告があり^{51) 52)}、CEA のヒトに対する抗原性は明らかではない。これに反して、ラット大腸癌に認められた腫瘍抗原は、明らかに宿主に対して抗原性を有しており、CEA とはこの点で異なる。

担癌ラットの血中に存在する抗腫瘍抗体の役割は、この抗体が細胞障害性を持つか否かによつて二つの可能性が考えられる。細胞障害性を持つ場合、癌の発育に対して抑制的に働くことは明白であるが、細胞障害性を持たない場合、抗腫瘍活性をもつた細胞の作用を妨げることが知られており⁵²⁾、癌の発育を増大させるものと考えられる。しかしいずれの場合も癌細胞上の腫瘍抗原に抗腫瘍抗体が結合することが前提となる。ラット大腸癌組織のIgGの存在をFITC標識抗ラットIgG抗体による蛍光抗体法で検索したところ、癌細胞上にはIgG抗体の局在は認められなかった(未発表)。従つて担癌ラット血中の抗腫瘍IgG抗体の免疫学的意義は不明である。この抗腫瘍IgG抗体がなぜ癌細胞に結合していないかも不明であるが次の理由が考えられる。①充実性の癌組織内には抗体が浸透しにくい。②癌細胞上の腫瘍抗原が遊離し、抗腫瘍抗体を途中でトラップする。ヒト大腸癌においても

癌細胞に結合したIgGは認められなか、たと報告されている³⁴⁾。一方ヒト白血病細胞にはIgGの局在が報告されている³⁵⁾。これらの所見は①の可能性を示唆している。また癌細胞は腫瘍抗原を含む膜成分を体液中に放出することから知られており³⁵⁾、②の可能性も充分考えられる。この場合、腫瘍抗原-抗腫瘍抗体複合体が形成されるが、今回本担癌ラット血中の免疫複合体の存在が示唆されたことよりも②の可能性が支持される。

担癌ラットで示唆された免疫複合体が、腫瘍抗原-抗腫瘍抗体によるものかどうかは今後の解析を持たねばならないが、担癌ラット血中に抗腫瘍抗体が存在することより、その可能性は高いと考えられる。ヒト大腸癌患者血中の免疫複合体量は、成常人のそれに比較して有意の差は認められていない³⁶⁾。しかし近年、大腸癌患者の血中にCEA-抗CEA複合体が存在する可能性が示され³⁷⁾興味深い。腫瘍抗原-抗腫瘍抗体複合体は、リンパ球の細

胎障害性を妨げることから⁵⁹⁾、担癌ラット血中における免疫複合体量と癌の発育との関係が注目される。本ラット系に発生した大腸癌は高率に退縮することが報告されており³¹⁾、癌の退縮と担癌ラット血中の免疫複合体量および抗腫瘍抗体量の相関は今後の重要な研究課題と考えられる。

結 論

Wistar-Furth 大腸癌好発系ラットを用いて、同ラットに自然発生した大腸癌における腫瘍抗原を解析し、以下の結論を得た。

1. ラット大腸癌には、同系の非担癌ラットに非自己と認識される抗原が存在した。この抗原は正常大腸には認められず、また糞便中の抗原とも交差しないことより、ラット大腸癌に特異的な腫瘍抗原と考えられた。さらにこの腫瘍抗原は、胎児大腸に存在する抗原と

交差することより oncofetal 抗原であると考えられた。

2、この腫瘍抗原は、管腔を形成する大腸癌細胞の内腔側に局在した。また大腸癌組織を生食水で抽出し、Sephacryl S200 superfine さらに

Sephacryl S300 superfine を用いてゲルろ過した場合、この腫瘍抗原は Fr.B (分子量約450,000) の画分に含まれた。

3、担癌ラット血清中には、IgG クラスの抗腫瘍抗体が存在し、Fr.Bに含まれる腫瘍抗原と特異的に結合した。従って担癌宿主には、この腫瘍抗原を非自己と認識する免疫応答が成立しているものと考えられた。また担癌ラット腎系球体には、非担癌ラットに認められない強いIgGの沈着が認められた。従って、担癌宿主循環血中において腫瘍抗原—抗腫瘍抗体複合物が形成されていると考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔治療学講座，岡田宏教授に深く感謝致します。また本研究課題を与えられ、終始懇切な御指導と御校閲を賜りました大阪大学医療技術短期大学部衛生技術学科，渡辺信一郎助教授に心より感謝致します。さらに貴重な実験動物を恵与して頂いた大阪大学医学部第1病理学講座，宮本誠助教授ならびに組織切片作製に御協力頂いた同講座，谷洋一先生に深く感謝致します。最後に、さまざまな御助言を賜った大阪大学歯学部口腔細菌学講座，小谷尚三教授ならびに本研究の遂行に御協力頂いた、大阪大学歯学部口腔治療学講座，恵比須繁之助教授，信田周一講師，木田友信助手をはじめとする同講座の皆様我心からの感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gold,P.and Freedman,S.O.(1965):Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J.Exp.Med.,122,467-481.
- 2) Gold,D.V.and Miller,F.(1974):Characterization of human colonic mucoprotein antigen. Immunochem.,11,369-375.
- 3) Gold,D.V.and Miller,F.(1975):Chemical and immunological differences between normal and tumoral colonic mucoprotein antigen. Nature,255,85-87.
- 4) Gold,D.V.and Miller,F.(1978):A mucoprotein with colon-specific determinants. Tissue Antigens,11,362-371.
- 5) Puztaszeri,G.,Saravis,C.A.and Zamcheck,N.(1976):The zinc glycinate marker in human colon carcinoma. J.Natl.Cancer Inst.,56,275-278.
- 6) Saravis,C.A.,Oh,S.K.,Puztaszeri,G.,Doos,W.and Zamcheck,N.(1978):Present status of the zinc glycinate marker(ZGM). Cancer,42,1621-1625.
- 7) Goldenberg,D.M.,Pant,K.D.and Dahlman,H.L.(1976):Antigens associated with normal and malignant gastrointestinal tissues. Cancer Res.,36,3455-3463.
- 8) Pant,K.D.,Dahlman,H.L.and Goldenberg,D.M.(1977):A putatively new antigen(CSAp) associated with gastrointestinal and ovarian neoplasia. Immunol.Comm.,6,411-421.
- 9) Pant,K.D.,Dahlman,H.L.and Goldenberg,D.M.(1978):Further characterization of CSAp, an antigen associated with gastrointestinal and ovarian tumors. Cancer,42,1626-1634.
- 10) Shochat,D.,Archev,R.L.,Pant,K.D.,Dahlman,H.L.,Gold,D.V.and Goldenberg,D.M.(1981):Characterization of colon-specific antigen-p and isolation of immunologically active tryptic peptides. J.Immunol.,126,2284-2289.
- 11) Fritsche,R.and Mach,J.P.(1977):Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen(CEA) extracted from normal human colon mucosa. Immunochem.,14,119-127.

- 12) von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P. (1972): Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2492-2494.
- 13) Burtin, P., Chavanel, G. and Hirsch-Marie, H. (1973): Characterization of a second normal antigen that cross-reacts with CEA. J. Immunol., 111, 1926-1928.
- 14) Matsuoka, Y., Hara, M., Takatsu, K. and Kitagawa, M. (1973): Presence of antigen related to the carcinoembryonic antigen in feces of normal adult. Gann, 64, 203-206.
- 15) 渡辺信一郎, 松尾敬志, 相良憲次, 福原毅 (1980):
特集: 癌の生化学的診断法 - Paraneoplastic syndromeとTumor marker-, 2. Tumor marker- 最近の進歩と 限界性 -,
Carcinoembryonic antigen (CEA) の最近の進歩と 限界性,
日本臨床, 38, 4567-4574. 昭和55.
- 16) Goldenberg, D. M. (1978): Immunodiagnosis and immunodetection of colorectal cancer. Cancer Bull., 30, 213-218.
- 17) Kuroki, M., Koga, Y. and Matsuoka, Y. (1981): Purification and characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. Cancer Res., 41, 713-720.
- 18) Gold, D. V. (1981): Immunoperoxidase localization of colonic mucoprotein antigen in neoplastic tissues. Cancer Res., 41, 767-772.
- 19) Gross, L. (1943): Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. Cancer Res., 3, 326-333.
- 20) Foley, E. J. (1953): Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res., 13, 835-837.
- 21) Haddow, A. (1965): Immunology of the cancer cell: Tumor-specific antigens. Brit. Med. Bull., 21, 133-139.
- 22) Old, L. J. and Boyse, E. A. (1964): Immunology of experimental tumors. Ann. Rev. Med., 15, 167-186.

- 23) Benacerraf, B. and Unanue, E. R. (1979): Textbook of immunology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 196-197.
- 24) Prehn, R. T. and Main, J. M. (1957): Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst., 18, 769-778.
- 25) Klein, G. and Klein, E. (1977): Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: Contrasting consequences of host versus tumor evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2121-2125.
- 26) Smith, R. T. (1968): Medical Progress. Tumor-specific immune mechanisms. N. Eng. J. Med., 278, 1207-1214.
- 27) Baldwin, R. W. and Embleton, M. J. (1969): Immunology of spontaneously arising rat mammary adenocarcinomas. Int. J. Cancer, 4, 430-439.
- 28) Miyamoto, M. and Takizawa, S. (1975): Brief communication: Colon carcinoma of highly inbred rats. J. Natl. Cancer Inst., 55, 1471-1472.
- 29) 宮本 誠 (1979): ラット 自然発生大腸癌.
遺伝, 33, 23-29. 昭和54.
- 30) 宮本 誠, 田所 規, 前浦 義一, 佐伯 和則 (1981):
実験動物の自然発生消化器癌.
癌と化学療法, 8, 640-650. 昭和56.
- 31) 佐伯 和則, 宮本 誠, 北村 旦, 広吉 寿樹 (1980):
自然発生結腸癌ラットに見られた癌の自然退縮
—遺伝統計学的考察—. 癌の臨床, 27, 1622-1626. 昭和55.
- 32) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

- 33) Ouchterlony, O. (1953): Antigen-antibody reactions in gels, IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 32, 231-240.
- 34) Abrameas, S., Taudou, B. and Chuilon, S. (1969): Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized *o*-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochem.*, 6, 67-76.
- 35) Leznoff, A., Fishman, J., Talbot, M., McGarry, E. E., Beck, J. C. and Rose, B. (1962): The cytological localization of ACTH in the human pituitary. *J. Clin. Invest.*, 41, 1720-1724.
- 36) Morikawa, S. (1967): Studies on alkaline and acid ribonucleases in mammalian tissues: Immunohistochemical localization and immunochemical properties. *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 662-673.
- 37) Hjelm, H., Hjelm, K. and Sjöquist, J. (1972): Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett.*, 28, 73-76.
- 38) Coons, A. H. and Kaplan, M. H. (1950): Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 91, 1-13.
- 39) Burnet, F. M. (1970): The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 13, 1-27.
- 40) Prehn, R. T. and Lappé, M. A. (1971): An immunostimulation. Theory of tumor development. *Transplant Rev.*, 7, 26-54.
- 41) Old, L. J. (1981): Cancer immunology: The search for specificity—G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.*, 41, 361-375.
- 42) Matsuoka, Y., Kuroki, M., Koga, Y., Kuniyama, H., Mori, T. and Kosaki, G. (1982): Immunochemical differences among carcinoembryonic antigen in tumor tissues and related antigens in meconium and adult feces. *Cancer Res.*, 42, 2012-2018.
- 43) Terry, W. D., Henkart, P. A., Coligan, J. E. and Todd, C. W. (1972): Structural studies of the major glycoprotein in preparations with carcinoembryonic antigen activity. *J. Exp. Med.*, 136, 200-204.

- 44) Krupey, J., Gold, P. and Freedman, S.O. (1968): Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, 128, 387-398.
- 45) Gold, P., Krupey, J. and Ansari, H. (1970): Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J. Natl. Cancer Inst.*, 45, 219-225.
- 46) Piessen, W.F. (1970): Evidence for human cancer immunity. A review. *Cancer*, 26, 1212-1220.
- 47) Steele, G. Jr. and Sjögren, H.O. (1974): Embryonic antigens associated with chemically induced colon carcinomas in rats. *Int. J. Cancer*, 14, 435-444.
- 48) Nairn, R.C., Nind, A.P.P., Guli, E.P.G., Davies, D.J., Rolland, J.M., McGiven, A.R. and Hughes, E.S.R. (1971): Immunological reactivity in patients with carcinoma of colon. *Brit. Med. J.*, 4, 706-709.
- 49) Gold, J.M., Freedman, S.O. and Gold, P. (1972): Human anti-CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nature*, 239, 60-62.
- 50) MacSween, J.M. (1975): The antigenicity of carcinoembryonic antigen in man. *Int. J. Cancer*, 15, 246-252.
- 51) Collatz, E., von Kleist, S. and Burtin, P. (1971): Further investigations of circulating antibodies in colon cancer patients: On the autoantigenicity of the carcinoembryonic antigen. *Int. J. Cancer*, 8, 298-303.
- 52) Lo Gerfo, P., Herter, F.P. and Bennett, S.J. (1972): Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. *Int. J. Cancer*, 9, 344-348.
- 53) Baldwin, R.W., Embleton, M.J. and Price, M.R. (1973): Inhibition of lymphocyte cytotoxicity for human colon carcinoma by treatment with solubilized tumor membrane fractions. *Int. J. Cancer*, 12, 84-92.
- 54) Gutterman, J.U., Rossen, R.D., Butler, W.T., McCredie, K.B., Bodey, G.P., Freireich, E.J. and Hersh, E.M. (1973): Immunoglobulin on tumor cells and tumor-induced lymphocyte blastogenesis in human acute leukemia. *New Engl. J. Med.*, 288, 169-173.
- 55) Currie, G.A. and Basham, C. (1972): Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumor: A possible role for circulating antigen. *Brit. J. Cancer*, 26, 427-438.

- 56) Ristow, S.S., Rossen, R.D., Fryd, D.S. and Mckhann, C.F. (1979):
Circulating immune complexes in colon cancer patient sera.
Cancer, 43, 1320-1327.
- 57) Mavligit, G.M. and Stuckey, S. (1983): Colorectal carcinoma. Evidence
for circulating CEA-anti-CEA complexes. Cancer, 52, 146-149.
- 58) Sjögren, H.O., Hellström, I., Bansal, S.C. and Hellström, K.E. (1971):
Suggestive evidence that the "Blocking Antibodies" of tumor-bearing
individuals may be antigen-antibody complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 1372-1375.

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON SPONTANEOUS COLON CARCINOMA
OF WISTAR-FURTH RATS : DEMONSTRATION OF THE TUMOR ANTIGEN
AND SYNGENEIC ANTI-TUMOR ANTIBODIES

Takashi MATSUO

Department of Periodontology and Endodontology
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565, Japan

A vast effort has been made to demonstrate antigens of human colon cancer. Several tumor antigens, including carcinoembryonic antigen, are not considered to be distinctly specific for cancer. It involves great difficulties to demonstrate the tumor specific antigen or tumor distincted reaction by means of humoral or cellular immune reaction in man. It has been wanted to analyze tumor antigens by using experimental model animals which spontaneously develop colon cancer similar to human colon cancer.

The rats of Wistar-Furth Osaka substrain, which have been maintained by Dr. Makoto Miyamoto at the Department of Pathology of Osaka Univ. School of Medicine, are chosen to the model animal of human colon cancer. These rats develop colon cancer spontaneously at a high rate which diagnosed as well-differentiated tubular adenocarcinoma by histological studies.

The results were as follows; Anti-tumor sera were obtained from the rats immunized with tumor extract. The tumor antigen was demonstrated immuno-histologically and immunochemically by anti-tumor sera and partially purified by gel filtration. The tumor antigen, estimated at about 450,000 dalton, was localized in the apical border of cancer cells which formed tubular glandules. This antigen was also detected in the colon of fetus, but not detected in normal adult colon. And this antigen did not cross-react with antigens in feces. These findings suggested that this antigen was tumor specific and was a kind of oncofetal antigen.

The anti-tumor antibodies were detected in the sera of tumor bearing rats. This indicated that the tumor bearing individuals recognized the tumor antigen as the not-self, and produced anti-tumor antibodies in the host as shown in human cancer patients.

図の説明

図 1.1 ラット大腸癌の病理組織 (H-E 重染色)

a: 癌細胞の大腸粘膜下組織への浸潤と増殖 ($\times 50$)

b: 癌細胞による管腔の形成 ($\times 125$)

図 1.2 WF7 抗血清によるラット大腸癌の腫瘍抗原の検出 (間接蛍光抗体法)

a: 大腸癌組織。管腔を形成する癌細胞内腔側に特異蛍光が認められる。 ($\times 250$)

b: 正常大腸組織。特異蛍光は認められない。 ($\times 125$)

c: 大腸癌組織。非免疫血清を使用。特異蛍光は認められない。 ($\times 125$)

図 2 大腸癌組織粗抽出物および正常大腸組織粗抽出物の Sephacryl S200 superfine カラム

クロマトグラフィー

a: 大腸癌組織粗抽出物の溶出曲線

b: 正常大腸組織粗抽出物の溶出曲線
(N-1: void volume 画分)

図3 WFG抗血清と癌組織抽出物画分 P_0 との
ゲル内沈降反応

P_0 : 癌組織抽出物画分

N-1: 正常大腸組織抽出物画分

WFG: WFG抗血清

WFG抗血清は P_0 と複数の沈降線を形成したが、N-1とは沈降線を形成しなかった。

図4 P_0 で吸収したWFG抗血清と癌組織との
反応 (間接蛍光抗体法)

P_0 による吸収操作で、吸収前の特異蛍光は
消失した。(x250)

図5 癌組織抽出物画分 P_0 の Sephadryl S300
superfine カラムクロマトグラフィー

図6 Fr.AまたはFr.Bで吸収したWFG抗血清

と大腸癌組織との反応 (間接蛍光抗体法)

a: Fr. B で吸収した WF7 抗血清による反応。
癌組織に特異蛍光は認められる。(x250)

b: Fr. A で吸収した WF7 抗血清による反応。
癌組織に特異蛍光が認められる。(x250)

図7 Fr. B のポリアクリルアミドゲル電気泳動像

左: Fr. B を 200 μ g 添加

右: Fr. B を 300 μ g 添加

図8 WF7 抗血清と P₀ および糞便抽出物とのゲル内沈降反応

P₀: 癌組織抽出物画分

Fec Ag: 糞便抽出物

WF7: WF7 抗血清

P₀ と WF7 抗血清とで形成された複数の沈降線の一部は、糞便抽出物と WF7 抗血清とで形成された沈降線に融合した。

図9 糞便抽出物で吸収した WFr 抗血清と大腸癌組織との反応 (間接蛍光抗体法)
癌組織に特異蛍光が認められる。(x250)

図10 抗Fr.B血清とFr.Bとのゲル内沈降反応
Fr.B : 10ゲル3過画分

a-B Se1, a-B Se2, a-B Se3, a-B Se4,
a-B Se5 : 正常ラット5匹に免疫して得た抗Fr.B血清

a-B Reg : 癌が自然退縮したラットに免疫して得た抗Fr.B血清

各抗Fr.B抗血清とFr.Bとの間に1本または2本の弱い沈降線が観察される。

図11 抗Fr.B血清による大腸癌の腫瘍抗原の検出 (間接蛍光抗体法)

管腔を形成する癌細胞の内腔側に特異蛍光が認められる。(x125)

図12 担癌ラット血清と胎児組織との反応 (

間接蛍光抗体法)

a: 胎児大腸組織。粘膜部に特異蛍光が認められる。(×125)

b: 胎児肝臓組織。特異蛍光は認められな
い。(×125)

c: 胎児腎臓組織。特異蛍光は認められな
い。(×125)

なお W/F₇ 抗血清を用いた場合も同様の結果が得られた。

図13 担癌ラット血清による大腸癌の腫瘍抗原の検出およびFr.Bで吸収した同血清と大腸癌組織との反応 (間接蛍光抗体法)

a: 腫瘍抗原の検出。管腔を形成する癌細胞内腔側に特異蛍光が認められる。(×125)

b: Fr.Bで吸収した担癌ラット血清と癌組織との反応。aで認められた特異蛍光は、Fr.Bの吸収操作で消失した。(×125)

図14 担癌ラット血清と大腸癌組織抽出物画

分 (P_{10} , Fr.A, Fr.B) とのゲル内沈降反応

a: 担癌ラット血清と P_{10} との反応

P_{10} : 癌組織抽出物画分

Fec Ag: 糞便抽出物

Can Ser: 担癌ラット血清

Reg Ser: 癌退縮ラット血清

Nor Ser: 正常ラット血清

矢印: 担癌ラット血清と P_{10} との間の特異的に認められた沈降線

b: 担癌ラット血清 IgG 画分と P_{10} との反応

P_{10} : a に同じ

Fec Ag: a に同じ

Can Ser: a に同じ

Can IgG: 担癌ラット血清 IgG 画分

矢印: 担癌ラット血清および同 IgG 画分と P_{10} との間の特異的に認められた沈降線

c: 担癌ラット血清 IgG 画分と Fr.B との反応

Fr.A: P_{10} ゲル 3 過画分

Fr. B: P₀ ゲル 3 過画分

Can IgG: b に 同い

矢印: 担癌ラット血清 IgG 画分と Fr. B と
の間に特異的に認められた沈降線

図 15 担癌ラットの腎糸球体に認められた Ig
G の沈着 (直接蛍光抗体法) (×250)

表の説明

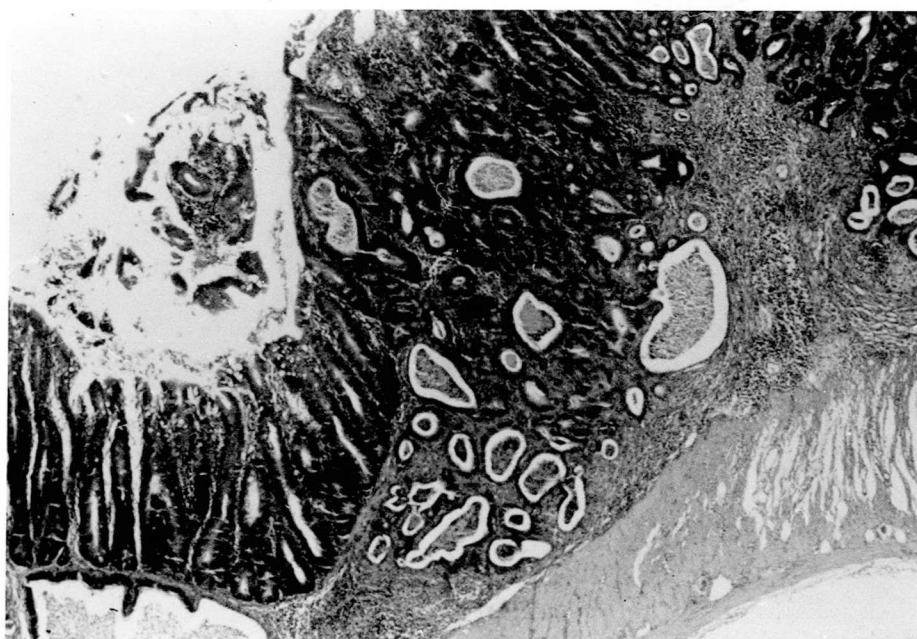
表1 Fr. A および Fr. B による受身赤血球凝集
阻止作用

Fr. A, Fr. B の各倍数希釈列に、8 倍希釈した WFr 抗血清を加え一晩反応させた後、陽感作赤血球浮遊液を加え、赤血球の凝集を観察した。

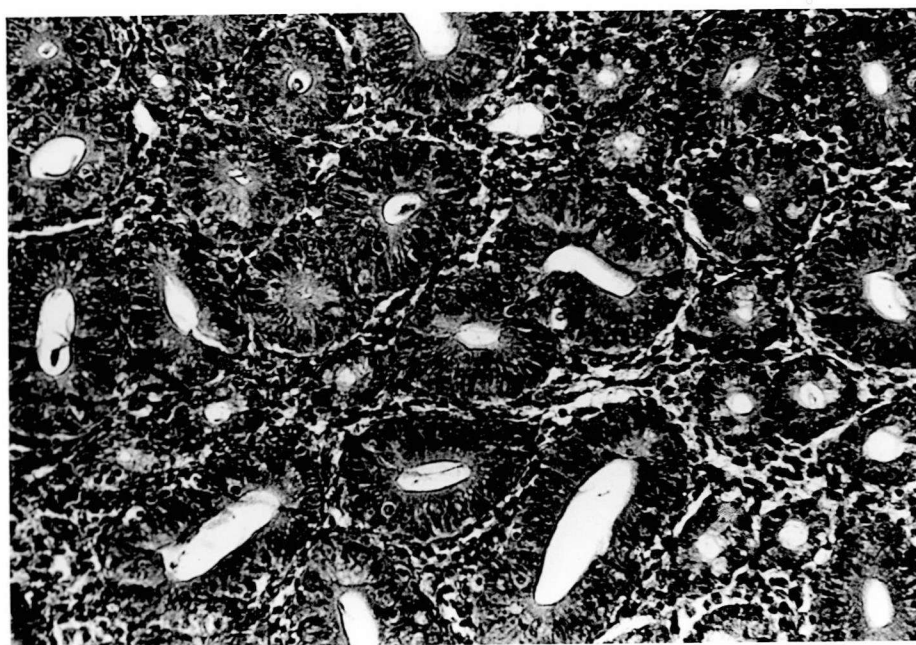
十：凝集が観察された。

一：凝集が観察されなかった。

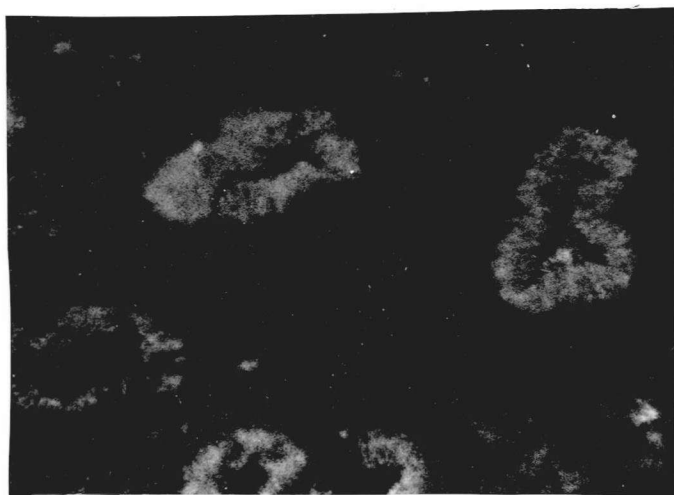
a)



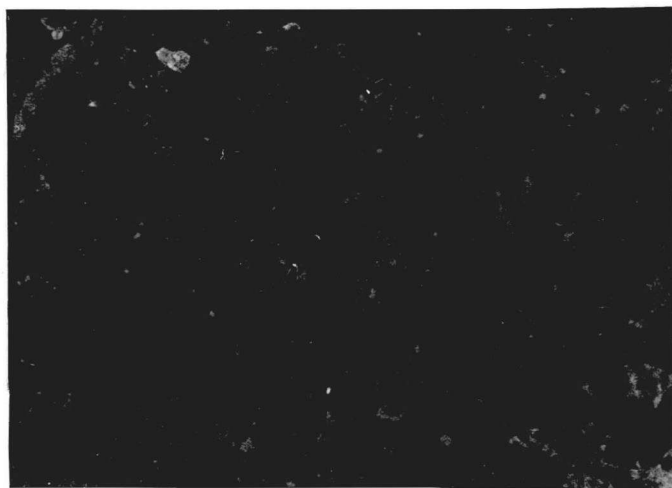
b)



a)



b)



c)

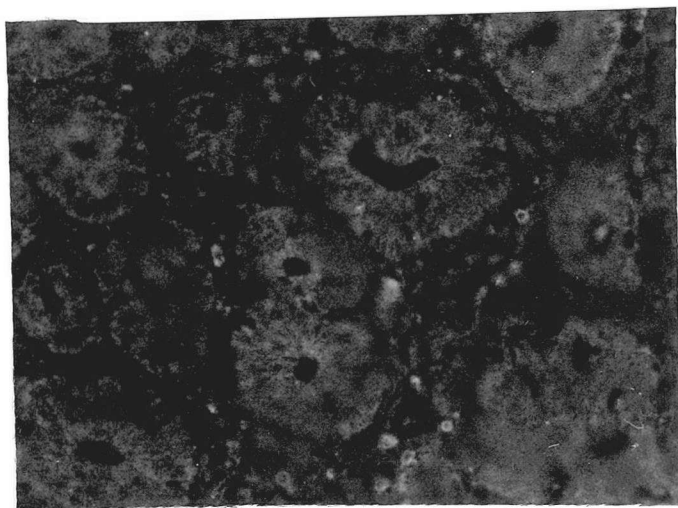


図 2-a

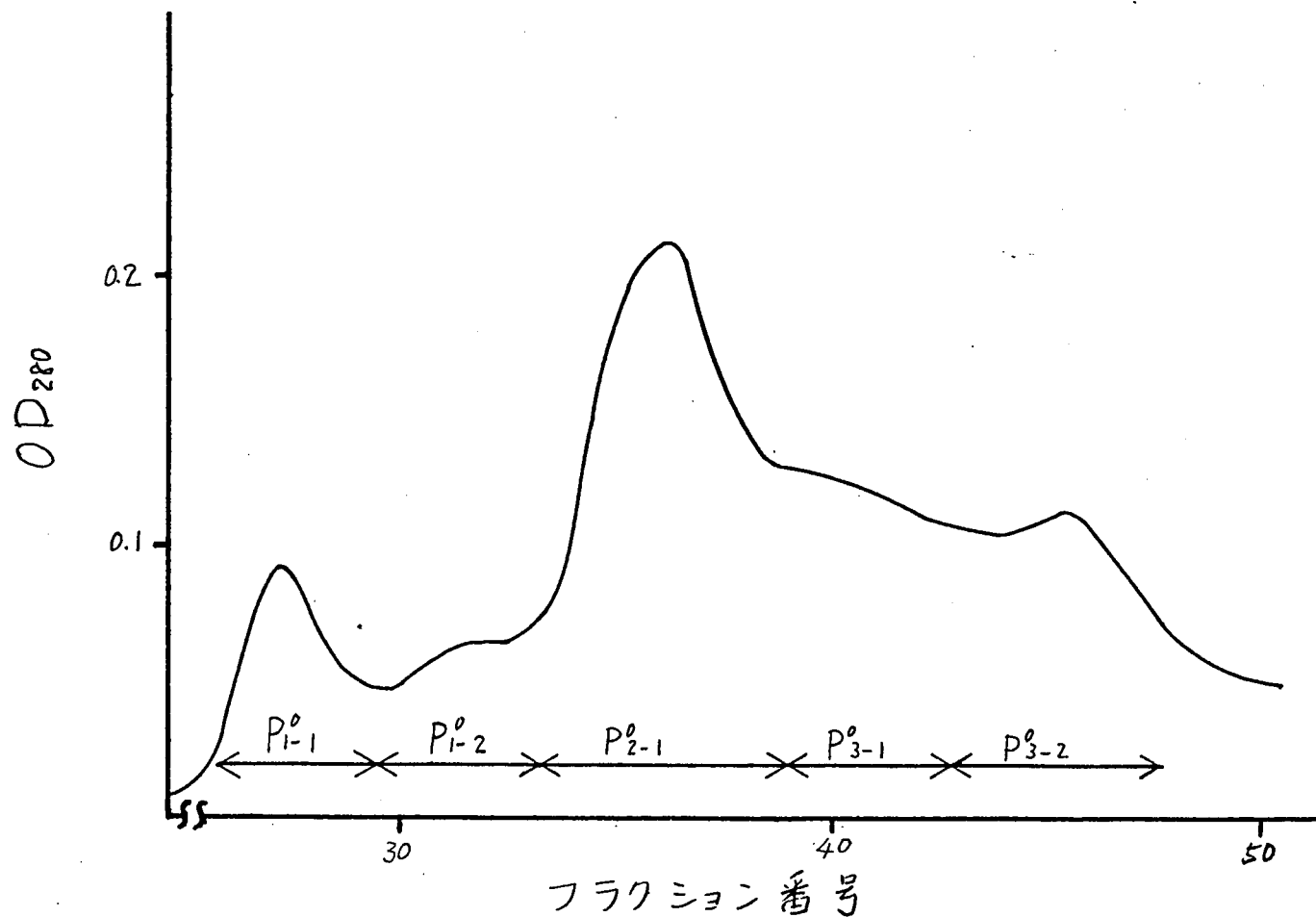
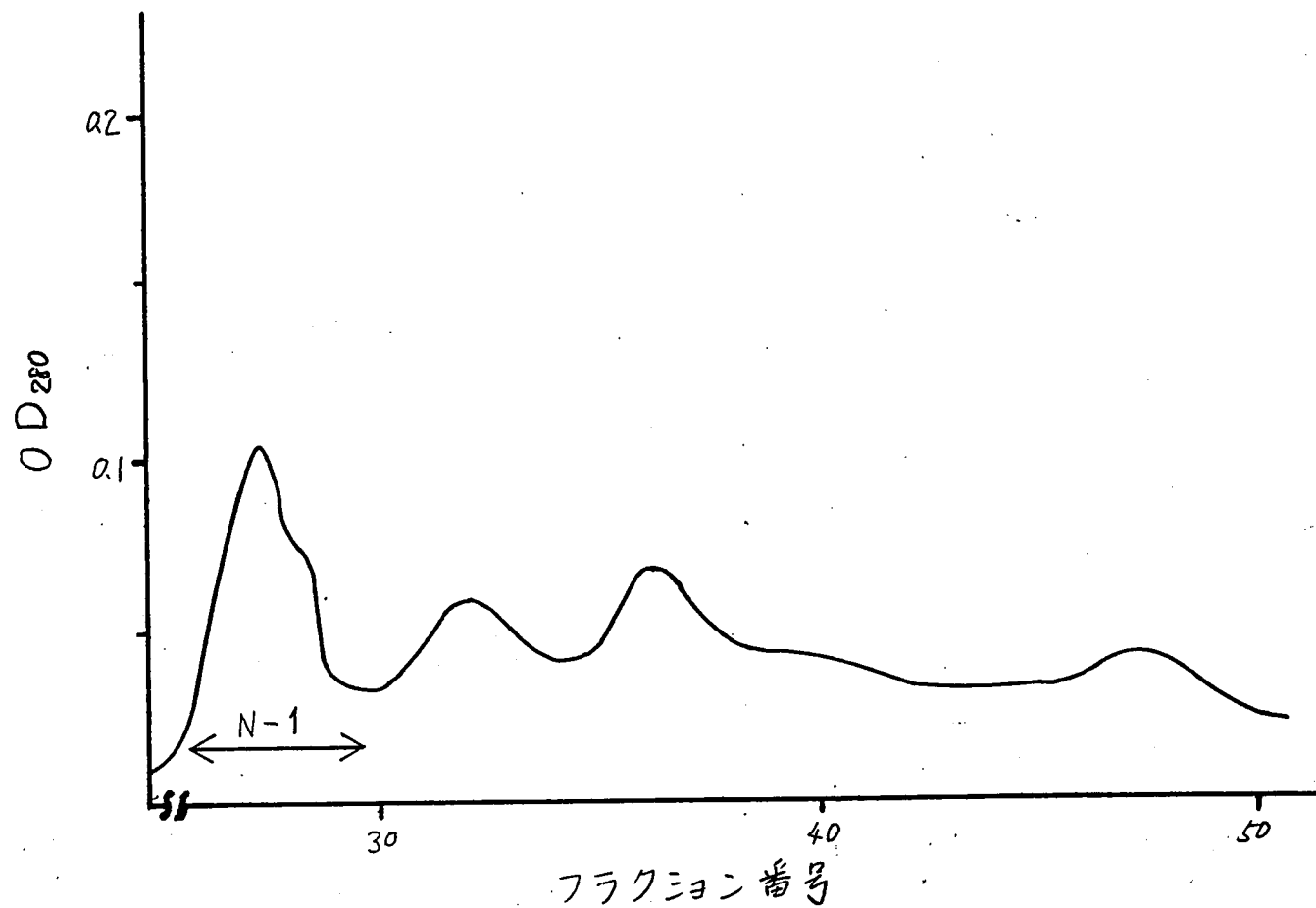
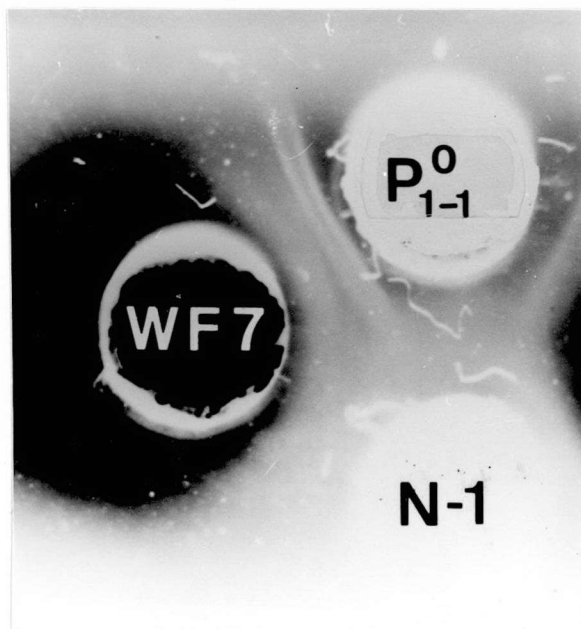


図 2-b





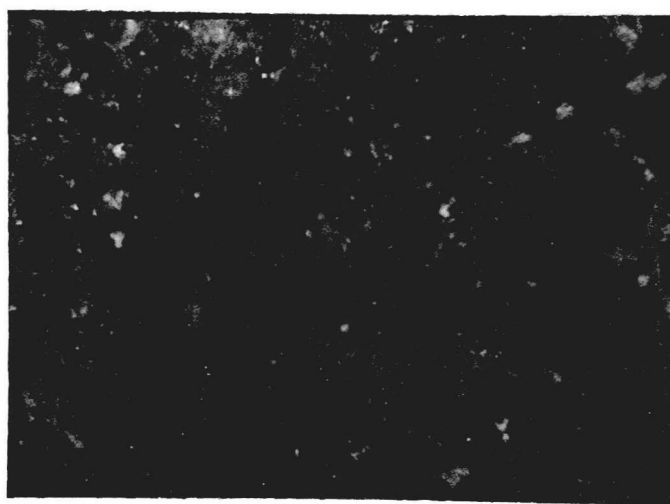
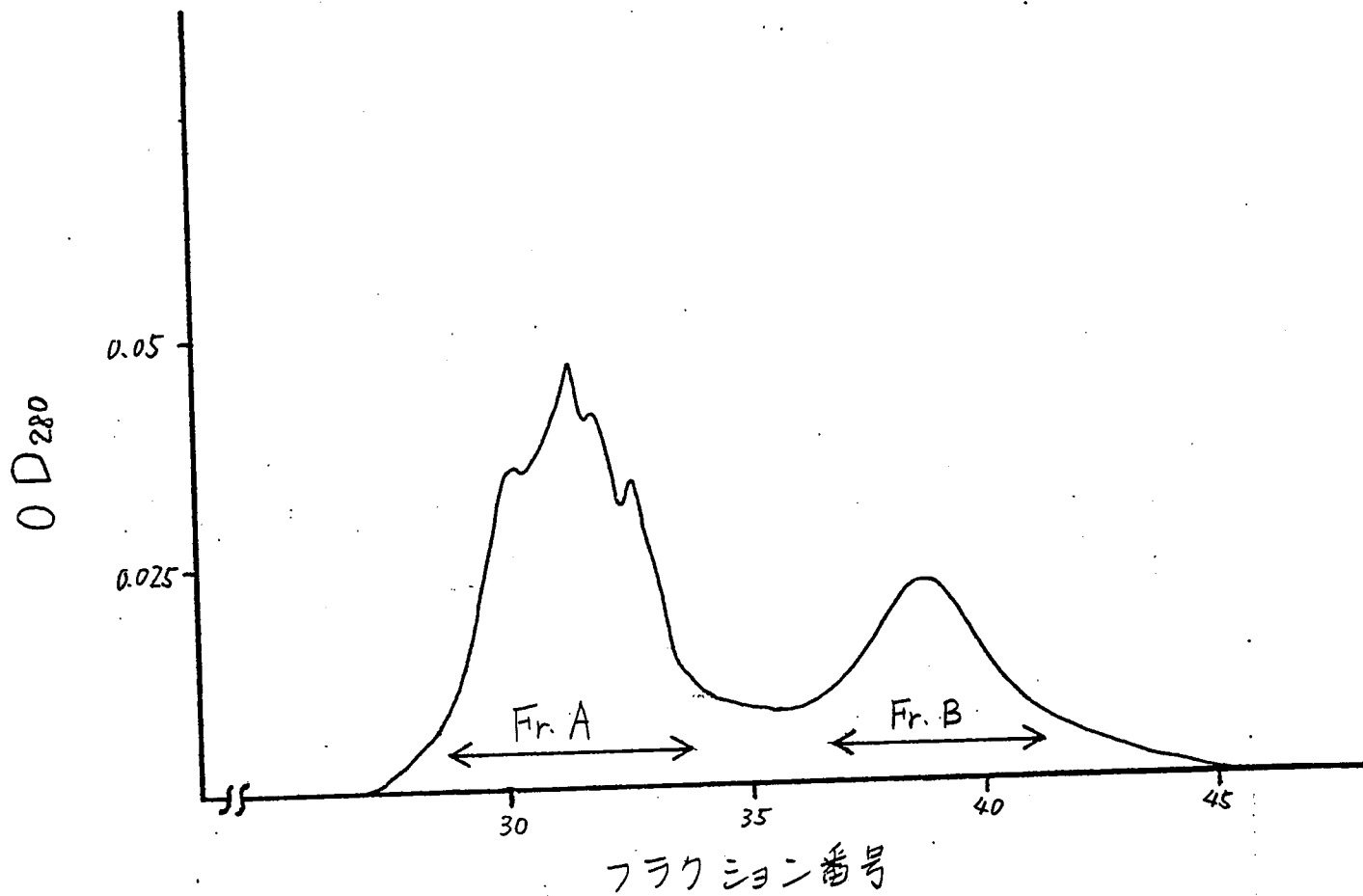


图4

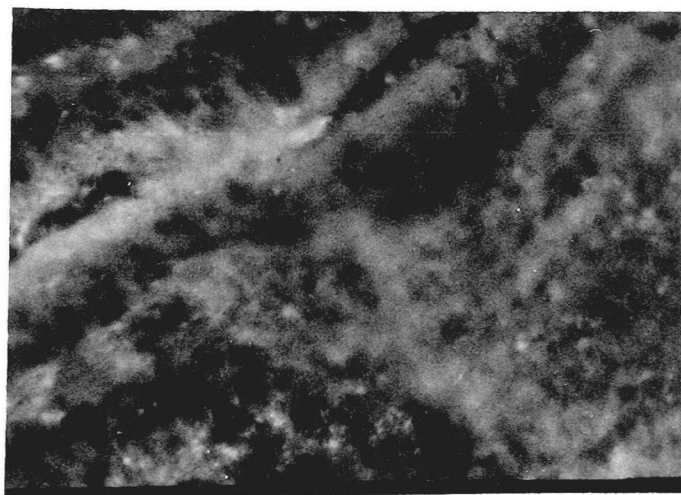
図 5

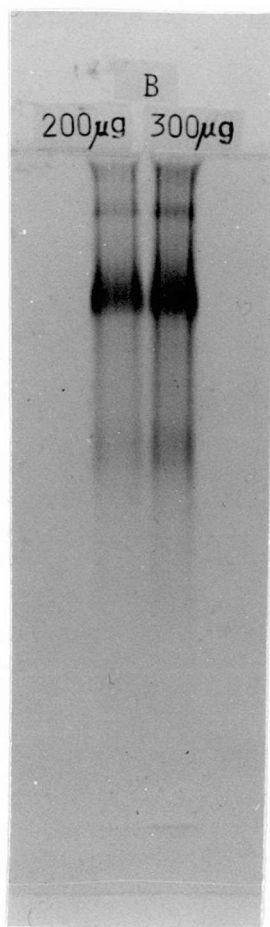


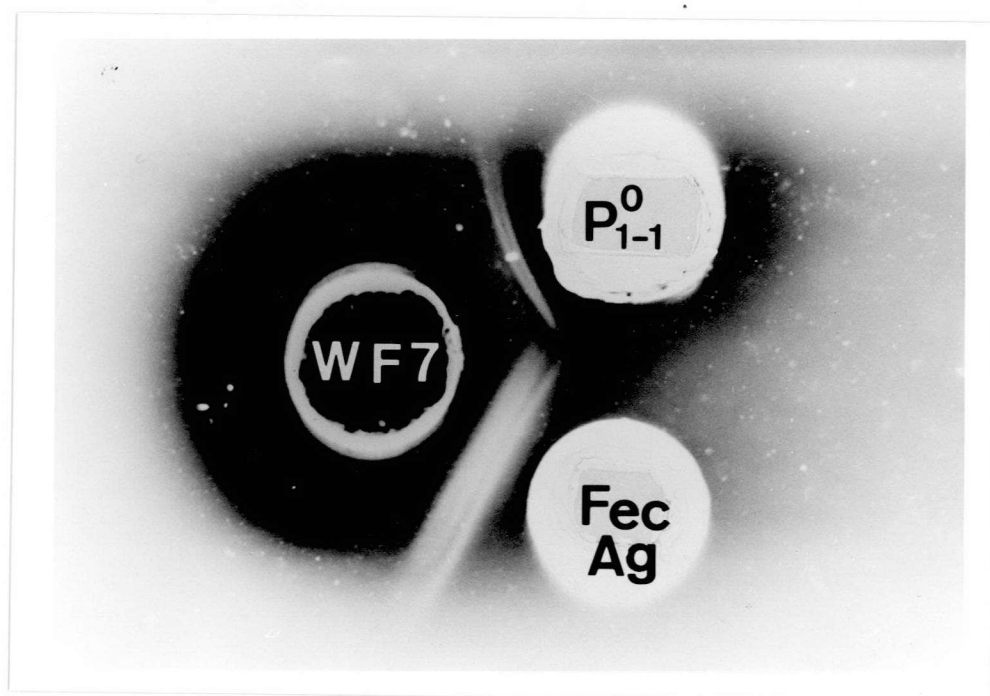
a)

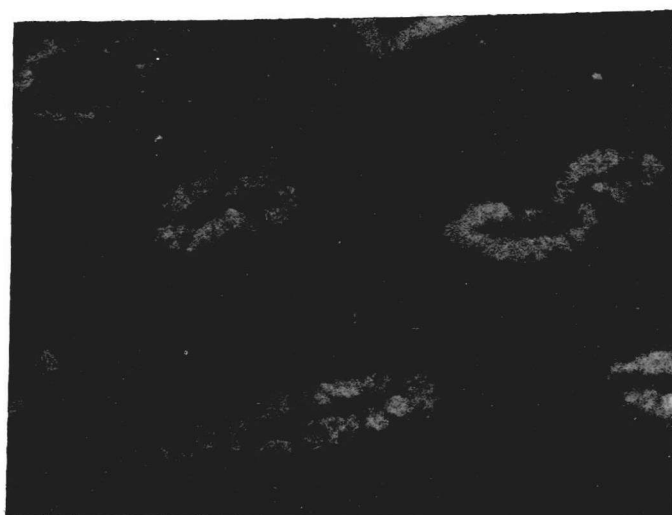


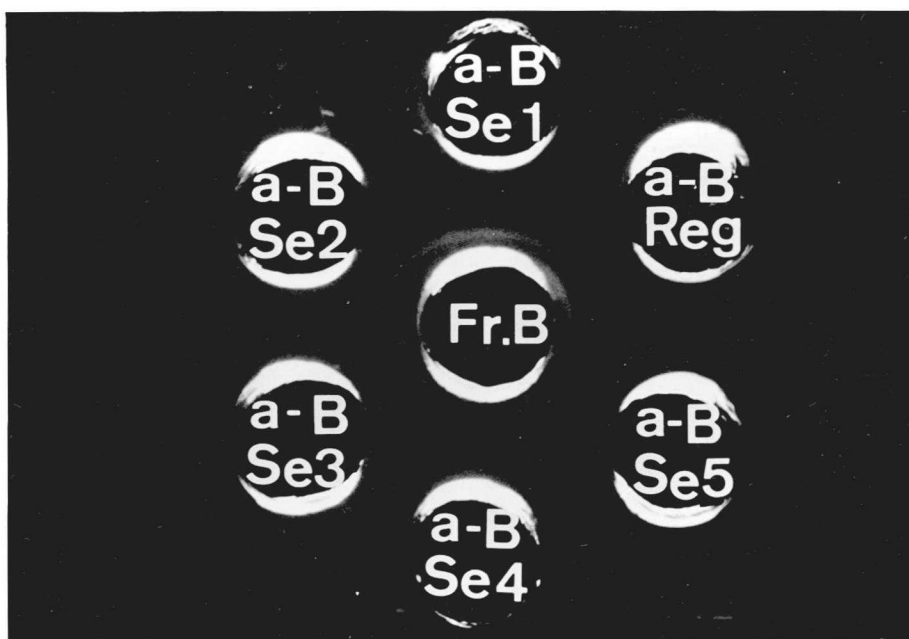
b)

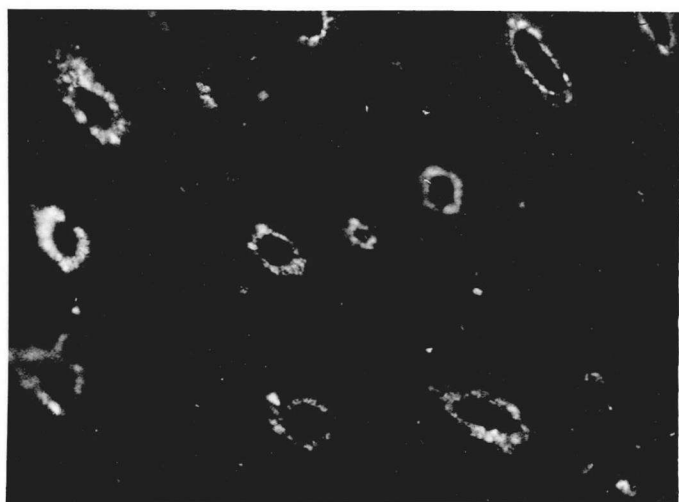




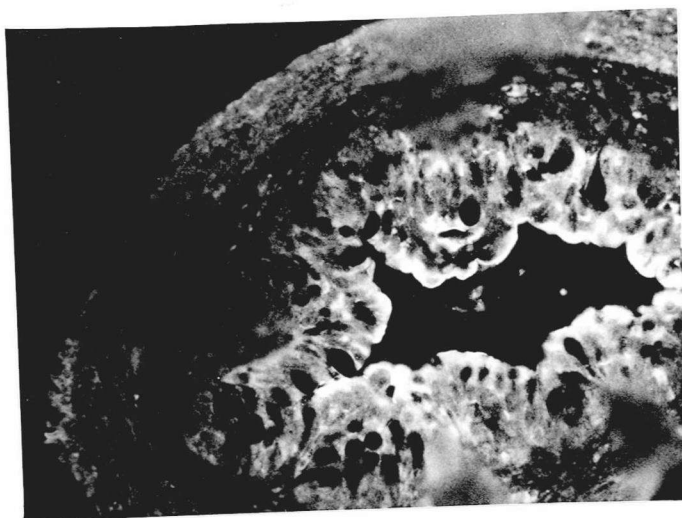




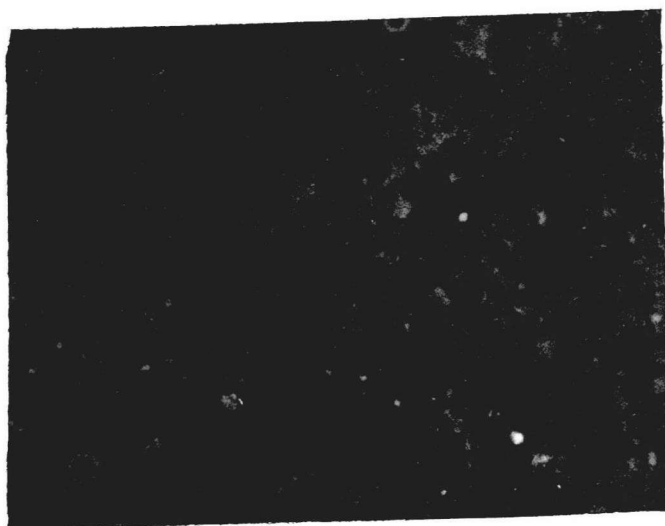




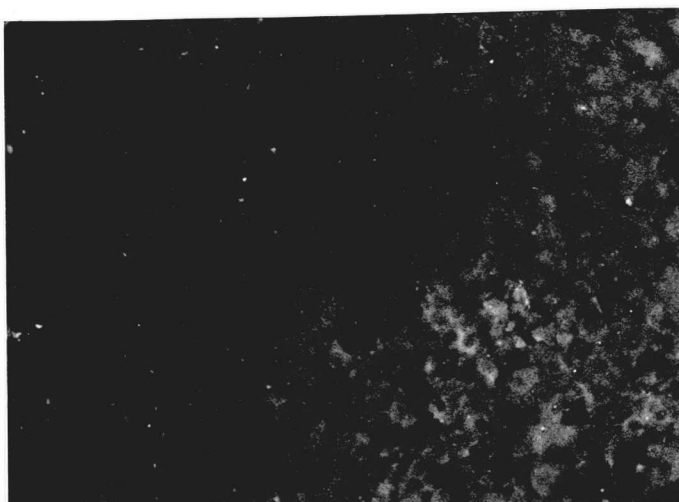
a)



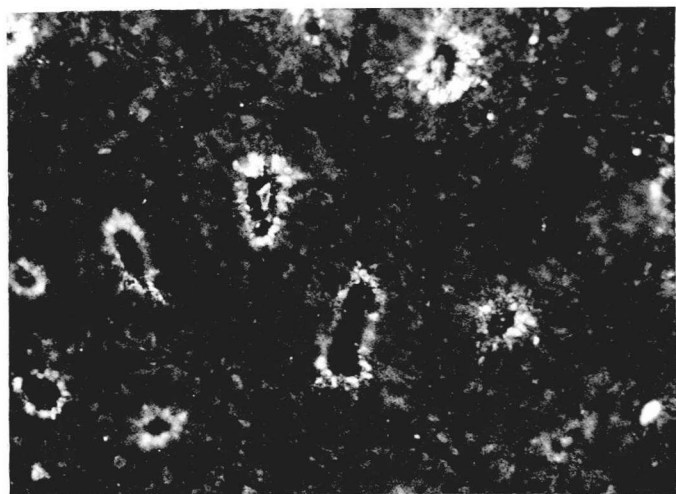
b)



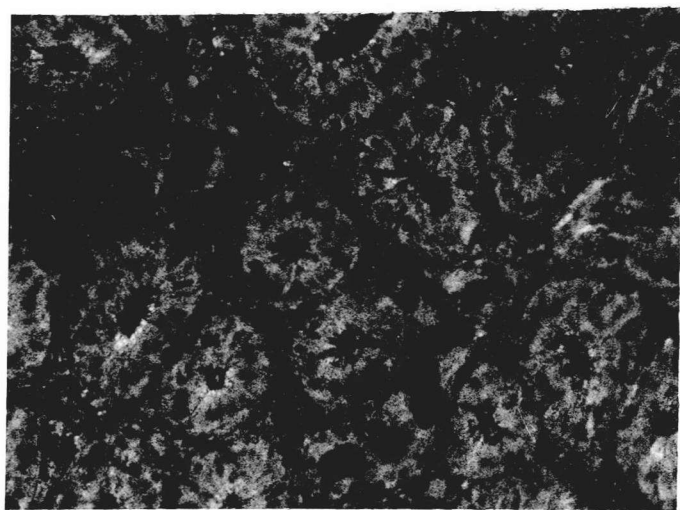
c)



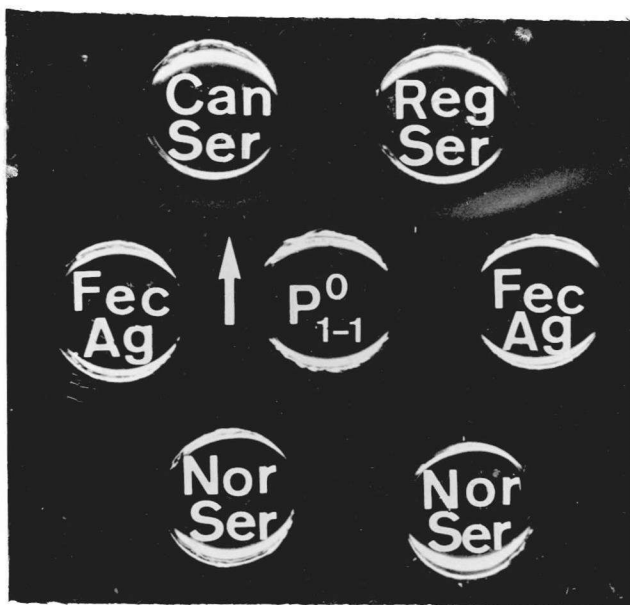
a)



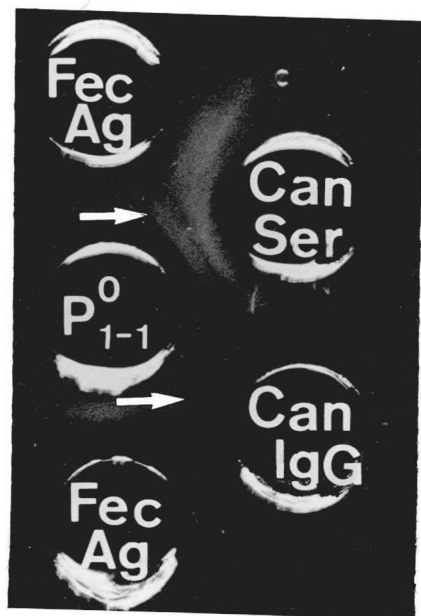
b)



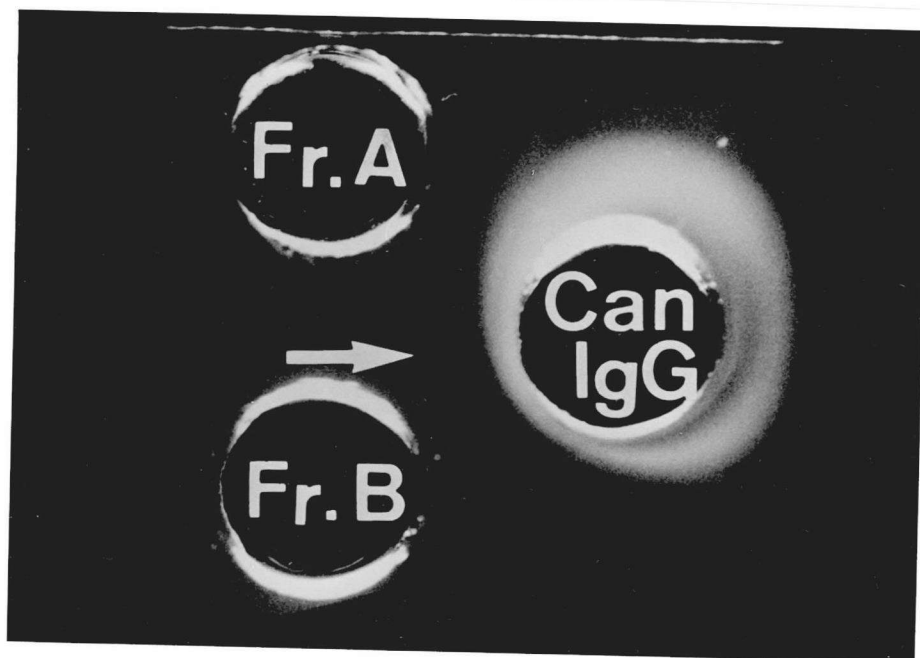
a)



b)



c)



I

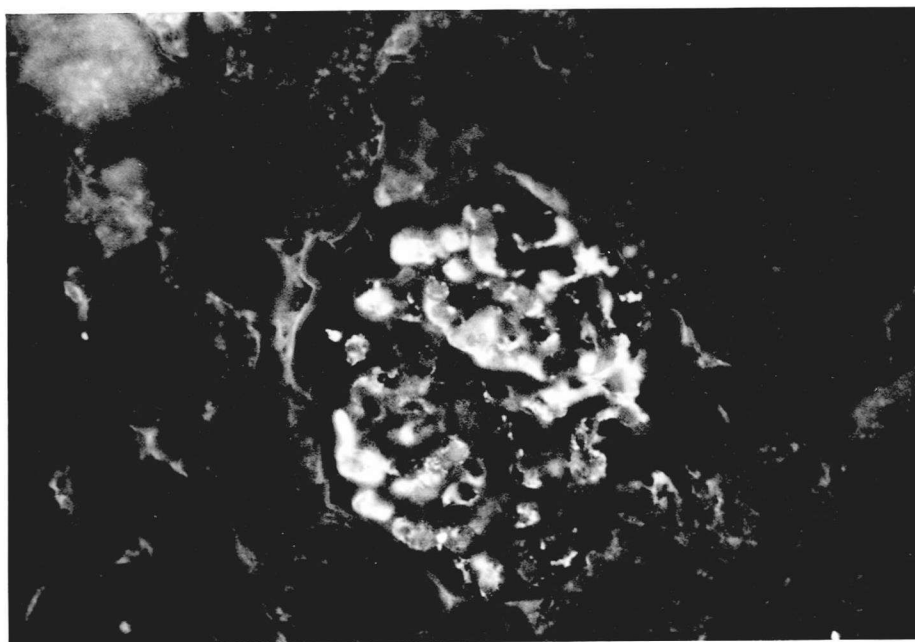


图 15

表 1

凝集阻害抗原	凝集阻害抗原溶液の希釈倍数						
	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶
Fr. A	+	+	+	+	+	+	+
Fr. B	—	—	—	±	+	+	+
阻害抗原なし	+	+	+	+	+	+	+