OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Wistar-Furth 系ラット自然発生大腸癌の腫瘍誘発因子の検索に関する研究
Author(s)	中川, 芳樹
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37109
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【26】

氏名・(本籍)	中川芳樹（なかがわよしき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第9090号
学位授与の日付	平成2年3月24日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Wistar-Furth系ラット自然発生大腸癌の腫瘍誘発因子の検索に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 北村幸彦 (副査) 教授 松本圭史　教授 森武貞

論文内容の要旨

〔目　的〕

本学病理学教室にて兄妹交配により継代維持されているWistar-Furth（WF）系ラットは，高率に大腸癌を自然発生し，発生した大腸癌の約40%に自然退縮が観察されている。さらに担癌ラット血清を，新生児ACI，Long Evans（LE）及びWistar-Shionogi（WF/Shi）の各ラットに腹腔内投与したところ，高率に同様の発癌を認め，WF担癌ラット血清中には，伝播性の腫瘍誘発因子の存在をうかがわせた。これをさらに検討するため，以下の実験を行った。

〔方法ならびに成績〕

1. ゲル濾過による担癌ラット血清と大腸癌組織の蛋白の分離及びELISAによる分析

生後2カ月の担癌（初期大腸癌）ラット血清の25,000rpm高速遠心Pelletと，初期大腸癌組織ホモジュネートをFPLCシステムを利用したSuperose 6カラムによるゲル濾過により蛋白を分離した。血清Pellet由来の蛋白は3峰性のカーブとして認められ，計69分画を採取した。一方癌組織由来の蛋白は凸型の2つのカーブとして認められ，計77分画を採取した。抗血清として自然退縮ラット血清を使用し，ゲル濾過で得られた各々の各分画（0.5ml）を，ELISAにて分析した。血清Pelletと癌組織のいずれにも陽性の分画が得られた。しかも両者に共通の陽性分画が認められ，初期大腸癌組織と担癌ラット血清中に，自然退縮ラット血清中の抗体によって認識される共通の抗原の存在が推定された。

2. 蛍光抗体法による抗原の検索

WF系大腸癌自然退縮ラット血清より，硫安塩析法にて免疫グロブリンを採取し，非特異的反応を除外するため，正常Sprauge-Dauly（SD）系ラット組織による吸収を行った。この自然退縮ラット血

清免疫グロブリン（ＳＰ）を用いて，抗原の検索を行った。

自然発生大腸癌（早期癌及び進行癌）と移植大腸癌（ＣＩ）の組織の新鮮凍結切片，及びカバーガラス上に培養された大腸癌細胞を，冷アセトンにて固定，ＳＰ（100倍希釈）を反応させ，ＦＩＴＣ標識抗ラットＩｇＧ及びＩｇＭを反応後，蛍光顕微鏡にて検鏡した。初期大腸癌組織の腺上皮細胞に蛍光が観察され，進行癌でも腺上皮の一部に蛍光が認められた。移植大腸癌（Ｃ１）では胞体全体に蛍光が観察された。大腸癌培養細胞では，主として胞体に，小顆粒状に蛍光が観察された。大腸癌組織と培養細胞のいずれもＦＩＴＣ標識抗ラットＩｇＧで蛍光が観察された。ＳＰで認識される抗原は，癌組織では腺上皮細胞に認められ，培養細胞では胞体に多数の小顆粒として存在することが示された。

3. Immuno-Affinity chromatographyによる抗原の分離

ＳＰを，CNBr-activated Sepharose 4B（Pharmacia社）にカップリングし，ＳＰ-Sepharose 4Bカラムを作成した。初期大腸癌組織抽出物及び担癌ラット血清をこのカラムに通し，各々のＳＰで共通に認識される蛋白を結合した。0.3％Tween 20入り0.2Mグリシン Buffer（pH2.5）で溶出させ，50％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）による濃縮を行った。得られたそれぞれの蛋白（抗原）は，10％ＳＤＳ ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ ＰＡＧＥ）により，いずれも分子量65kd，63kd，60kd の共通の３本のポリペプタイドに分離された。

4. Western Blottingによる抗原の確認

初期大腸癌組織抽出物と，Immuno-Affinity chromatographyで得られた担癌ラット血清中の蛋白（抗原）を，５～15％濃度勾配電気泳動にて分離し，ニトロセルロース膜に転写す。10％ＦＢＳ にてBlocking後，ＳＰを４℃overnightで反応させ，Alkaline phosphatase（ＡＬＰ）標識抗ラットＩｇＧ及びＩｇＭを室温で60分反応，Bromochloroindolyl Phosphate-Nitro blue tetrazolium（ＢＣＩＰ／ＮＢＴ）substrate にて発色（黒紫色）させた。初期大腸癌組織抽出物とImmuno-Affinity chromatographyで分離された担癌ラット血清中の蛋白のいずれも，分子量65kd と60kd の共通の２本のポリペプタイドが特異的に認識されていることが確認された。

〔総 括〕

1. Wistar-Furth系ラットの初期大腸癌組織と担癌（初期癌）ラット血清中に，大腸癌自然退縮ラット血清中の抗体により認識される共通の抗原の存在が示された。
2. この抗原は，腫瘍関連抗原と考えられ，大腸癌組織では腺上皮細胞に存在し，大腸癌培養細胞では，胞体の多数の小顆粒として存在することが示され，ＳＤＳ ＰＡＧＥ上分子量65kd と60kdの２本のポリペプタイドとして確認された。
3. また担癌ラット血清を投与することにより，同様に腫瘍を誘発した結果及び担癌ラット血清中より分離されたウイルス様粒子の存在は，以上得られた結果と何らかの因果関係を持つと思われ，現在検討中である。

論文の審査結果の要旨

宮本の樹立したWistar-Furth(WF)系ラットは,高率に大腸癌を自然発生し，発生した大腸癌の約40%に腫瘍自然退縮が観察されている。さらに担癌ラット血清を，ACI，Long Evans(LE) 及びWistar-Shionogi(WF/Shi) 各系のラットの新生児に腹腔内投与したところ，高率に同様の発癌を認め，WF担癌ラット血清中には，伝播性の腫瘍誘発因子の存在が推定されている。

本研究では，この因子についての検索を進めるため，腫瘍に関連する何らかの抗体が存在すると考えられる大腸癌自然退縮ラット血清を用いて，担癌ラット血清，大腸癌組織及び大腸癌培養細胞につき検索した。WFラットの初期大腸癌組織と担癌ラット血清中に，大腸癌自然退縮ラット血清中の抗体により認識される共通の抗原の存在が示された。またこの抗原は，腫瘍関連抗原と考えられ，大腸癌組織では腺上皮細胞に存在し，大腸癌培養細胞では胞体内に多数の小顆粒として表現されることが示された。SDS PAGE上分子量65kdと60kdの2本のポリペプタイドとして確認された。自然退縮ラット血清を用いて検索されたこの腫瘍関連抗原の存在は，担癌ラット血清を投与することにより腫瘍を誘発した結果と考え合わせるとき興味深く，大学院医学研究科博士課程の学位論文に該当すると思われる。