膀胱移行上皮癌細胞株抗原の免疫学的研究

金沢大学医学部泌尿器科学教室 塚 原 健 治
(主任: 久住治男教授)IMMUNOLOGICAL DETECTION OF AN ANTIGEN ASSOCIATED WITH
HUMAN BLADDER CARCINOMA CELL LINES

Kenji Tsukahara

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

The cellular insoluble lipoprotein extract was prepared from a bladder transitional cell carcinoma (TCC). This extract was solubilized by the aid of deoxycholate and the solubilized fraction was chromatographed on Sepharose 4B. With the retained fraction, antisera were produced by the immunization of guinea pig. After suitable absorptions, the immune sera allowed the characterization of an antigen closely associated with TCC by double gel diffusion. Indirect viable cell immunofluorescence studies with the immune sera rendered TCC-specific after absorptions revealed tumor-associated antigens on the plasma membrane of all 5 human TCC cell lines including T24 and RT4, but not of 4 non-TCC cell lines tested. Antibody-induced redistribution experiments showed that the TCC-associated antigen and β_2 -microglobulin exist as separate molecules on the cell surface.

要旨: 膀胱移行上皮癌より細胞膜不溶性リポ蛋白を抽出した。この抽出物をデオキシコール酸にて可溶化しセファローズ4Bのカラムに通した。得られた分画を用いてモルモットに抗血清を作製した。適当な吸収のあとで、免疫抗血清はゲル内2重拡散法にて、移行上皮癌抗原に酷似した性質の抗原と反応した。吸収後の移行上皮癌に特異的であろうと思える免疫抗血清を用いた生細胞膜間接蛍光抗体法にて T24, RT4 を含む移行上皮癌由来細胞株5株に細胞膜に腫瘍関連抗原が認められたが非移行上皮癌由来細胞株4株には認められなかった。細胞表面で移行上皮癌関連抗原と β_2 -microglobulin は異なつた分子上に存在するのが判明した。

泌尿器科領域における悪性腫瘍のうち、膀胱癌の発生頻度は近年増加の傾向にある。本症は高頻度に多中心性再発を示す特徴があり、また決定的に有効な化学療法薬剤がないため、その早期診断と治療とが泌尿器科領域の重要な問題の一つになっている。最近では CTscan や超音波断層法が本症の診断に大きな貢献を示しているとはいえ、描出可能な腫瘍の大きさには限界があり、その診断能力と応用範囲にはおのずと制限がある。そこで早期癌診断に対する免疫学的アプローチに大きな期待が寄せられるのであるが、 α -fetoprotein, 癌胎児抗原 (carcinoembryonic antigen: CEA), ferritin などのような腫瘍関連抗原の血中検出は膀胱癌については診断的価値が高くない。

これまで膀胱癌に特異的な抗原の存在を求めた各種細胞性免疫反応による分析あるいは患者血中抗体の分析は

早くから繰り返されてはきたが、その成績には混乱があって一定の成績が得られるまでには至っていない。そのことの原因は膀胱癌特異マーカーそれ自体の研究が不十分で、その精製も十分にできず、物質としての性質が良く判っていないことによるであろう。

そこで筆者は膀胱癌手術材料から膀胱癌特異抗原を含む分画を抽出し、異種抗血清を作製し、適当な吸収を行なつて operationally monospecific な抗血清を得た。同血清を用い、ゲル内拡散法と免疫蛍光法で膀胱癌特異抗原の分析を行なつた。免疫蛍光法の target cell としては培養膀胱移行上皮癌由来細胞株5株、腎細胞癌由来細胞株2株、非悪性膀胱上皮由来細胞株 HCV-29, HaLa 細胞を使用した。膀胱癌由来細胞株に腫瘍特異マーカーを証明することは細胞生物学的に重要な意義があるばかりでなく、それらの細胞を使った癌診断に基礎的な根拠

を提供することになるであろう。

材料および方法

1. 材料：膀胱移行上皮癌 (Grade II, Stage T₂) の70歳男子より得られた手術標本から腫瘍部分のみを約10g 切除し使用時まで-20℃に凍結保存した。

2. 抗原の抽出法：Table 1 のごとく Smith らの方法¹⁾の変法²⁾によつてまず細胞膜不溶性リポタンパク分画を抽出した。すなわち、凍結材料を細切し、「溶液Ⅰ」(KCl 11.93g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ナトリウム5g/l)を約2倍量加え、氷冷しながらワーリングブレンダーでホモジナイズし、その溶液を順次ガーゼ1, 2, 4, 8枚で濾過して粗大組織片を除去する。10,000×G30分遠心し、沈渣に「溶液Ⅱ」(KCl 74.5g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ナトリウム10g/l, pH 4.7)を10倍量以上加え、テフロンホモジナイザー

Table 1 Materials and methods

Bladder tumor (10g): transitional cell ca.
↓
Mince and blend with solution I
KCl: 0.16M
Monoiodoacetic acid: 0.001M
Sodium citrate: 0.017M
↓
Filtration with 8 layers of gauze
↓
Centrifugation (10,000×G. 30min.)
↓
Residue
↓
Homogenization with solution II
KCl: 1.0M
Monoiodoacetic acid: 0.001M
Sodium citrate: 0.034M
↓
Centrifugation and homogenization 8 times repeated
↓
Residue
↓
Stirring with 0.2% deoxycholate for 2~3days at cold room
↓
Centrifugation (10,000×G. 30min.)
↓
supernatant
↓
Precipitation with cold acetone (-20℃)
↓
Precipitate (LP soluble) 23mg

で氷冷しながらよくホモジナイズした後に10,000×G30分遠心して沈渣を得る。さらに溶液Ⅱによる沈渣のホモジナイズと遠心を7回繰り返して不溶性沈渣を得る。同沈渣は使用時まで-20℃に密栓して凍結保存する。ついで、倉田・岡田の方法²⁾に従つて同沈渣から可溶画分を作る。すなわち、不溶性沈渣に約5倍容の0.2%デオキシコール酸ナトリウム溶液を加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした後、小フラスコに移し4~8℃で3日間マグネットスターラーを用い攪拌し、10,000×G30分遠心して得た上清に10倍容の冷アセトンを加え、-20℃に一夜放置する。生じた白色沈澱 (LPsol.)を遠心して集め、少量の蒸留水に溶かし、Sephrose 4B カラム (1.6×25cm)を用い、蒸留水を溶出液としてゲル濾過を行なう。Fig. 1 のようなパターンが得られるが、その retain する分画 (LPfr.)を集め、透析用セルロースチューブに入れ、冷室で扇風機の前に吊して pervaporation を行ない濃縮した。タンパク量は Lowry 法⁴⁾により測定した。遠心には冷却遠心器 (0~4℃)を用いゲル濾過は冷室 (4~8℃)で行なつた。

Fig. 1 Gel filtration of the DOC-solublized fraction from the insoluble extract of TCC on a column of Sepharose 4B (1.6×25cm) eluted with distilled water at 4℃. Fraction volume: 4 ml
Void volume: 8 ml/h Column capacity: 45ml

なお、腎細胞癌、前立腺癌、子宮頸部扁平上皮癌の抗原分画も同様の方法により抽出されたものを、本学がん研究所病態生理部より分与され、実験に供した。なお Wilms 腫瘍、正常膀胱粘膜は20% (w/v) 生理食塩水ホモジネートを作り抗原として用いた。CEA 標品は大腸癌肝転移巣から Gold らの方法⁵⁾により抽出したものを、本学がん研究所病態生理部より分与された。

3. 培養細胞：ヒト膀胱移行上皮癌由来細胞株として

は当教室で樹立された KK-47⁶⁾ (316継代), KW-103⁷⁾ (198継代) の2株と Dr. V.P. Collins (Karolinska Institute, Stockholm) の御好意により分与された T24⁸⁾, J82⁹⁾ と RT4¹⁰⁾ の3株を使用した。対照細胞株としてはヒト腎細胞癌由来細胞株 (当教室樹立株) KN-41 (165継代), KH-39 (136継代) の2株⁷⁾, HeLa 細胞1株¹¹⁾, Dr. V.P. Collins の分与によるヒト非悪性膀胱上皮由来細胞株 HCV-29¹²⁾ を使用した。日沼型培養角瓶 (32×44×110mm) で継代されている培養細胞株の培養液を除き、0.02% EDTA 1ml と 0.1% Pronase 溶液を 0.5ml とを加え軽くピペettingを行ない single cell にする。次に20% 牛血清を含む Ham F12 培地数 ml に再浮遊させ、1,000回転、10分遠心を行ない沈渣を 2×10⁴/ml に培養液で調整する。2ml を Lab Tek chamber (Lab-Tek Products, USA) に加え、5% CO₂ 95% air で 37°C 2日間インキュベートし、細胞が付着しているのを確認して実験に供した。

4. 抗血清の作製: 抗原 (LPfr.) 4mg タンパク/0.5ml に等量の Freund complete adjuvant を加えて乳化し、雄モルモットの肩甲下腔に週1回の注射で4週間、さらに2週後に1回注射計5回注射を行なった。最終注射後1週目に心臓採血をして血清を分離した。正常ヒト肝、腎、脾、膀胱粘膜を各々 0.1g 細切し、O型血清 0.2ml を加えてホモジナイズしたものに抗血清 1ml 加え、回転ドラムを用い冷室内で一晩低速回転させ、10,000×G 20分遠心して上清を得て、それに再び正常ヒト膀胱粘膜 0.1g を加えてホモジナイズし一夜同様に回転ドラムにて回転して吸収を行なった後、上清を分離し、-20°C に凍結保存した。以後可及的融解・凍結の操作を繰り返さないようにして実験に供した。

5. 免疫学的検討: a) ゲル内二重拡散法。4% 寒天板を作製し直径4mm の孔を6mm 間隔にあげ、それぞれの孔の中にサンプルを入れ湿潤箱内に 4°C で静置し、1週間観察を行なった。

b) 免疫電気泳動法。1% アガロース層に直径4mm の孔をあけ抗原を入れ、20mA 2時間泳動後、抗原孔より8mm の距離に抗血清溝を作つて 4°C 湿潤状態に静置して1週間観察を行なった。

c) 間接蛍光抗体法。標的細胞として KK-47, KW-103, T24, J82 および RT4 を使用し、対照として KH-39, KN-41, HeLa 細胞および HCV-29 を使用した。前記のごとく Lab Tek chamber に付着させた細胞を倒立顕微鏡で確認した後、培養液を除き合成樹脂製の

chamber とゴム製のパッキンを取り除きスライドグラスだけにした。PBS (pH 7.2) で3回細胞を洗浄し、6倍希釈抗血清を1滴加え室温で20分静置した。再びPBSにて3回洗浄した後で、3倍希釈 FITC 標識抗モルモット IgG 免血清 (MBL, Japan) を1滴加え室温で20分染色し、PBS で十分に洗浄した後、50% glycerin buffer で封入し、落射型蛍光顕微鏡 (BH-RFL, オリンパス光学) を使用して鏡検した励起フィルターには干渉フィルター、IF 490 2枚を使用した。

d) 蛍光抗体二重染色法¹³⁾。標的細胞として KK-47 および T24 の2株を使用した。培養細胞を 0.02% EDTA 溶液で処理して細胞懸沈液を作り、希釈抗血清 (終濃度 1/6) を 0°C 1時間作用させ、PBS で洗浄後に3倍希釈 FITC 標識抗モルモット IgG 免血清 (MBL) を 0°C 30分反応させた。PBC で洗浄した後 37°C に2時間静置し、細胞膜表面の蛍光が patching を起こすことを確認した。次に抗ヒト β_2 -microglobulin 免血清 (DAKO, Denmark) (終濃度 1/8) を 0°C 1時間作用させ、0°C に冷却した PBS で洗浄後、ローダミン標識抗免 IgG ヤギ血清 (E.Y. Laboratories Inc. USA) (終濃度 1/10) で 0°C 30分染色し、PBS 0°C で洗浄後、50% glycerin buffer で封入して FITC とローダミンの各蛍光を前者は前記のフィルター、後者は励起に IF 545+BG 36 のフィルター、吸収に R610 のフィルターを使用した。ダイクロイックミラーはそれぞれのものに交換して観察、撮影を行なった。

結 果

膀胱移行上皮癌より得られた LPsol. の Sepharose 4B カラムによるゲル濾過パターンは Fig. 1 のごとくである。同ピーク分画に対するモルモット抗血清は吸収操作後、ゲル内二重拡散法で膀胱移行上皮癌 LPfr. と1本の沈降線を示したが、腎細胞癌、前立腺癌、子宮頸癌より得られた LPfr. や CEA 標品、Wilms 腫瘍のホモジネート、正常膀胱粘膜のホモジネートとの間には反応を示さなかった。なお、同抗血清は免疫抗原の移行上皮癌 LPfr. のみならず、他の個体の膀胱移行上皮癌から抽出された LPfr. あるいはホモジネートとの間にも1本の沈降線を示し、その沈降線は免疫抗原のそれと一致を示した (Fig. 2)。膀胱癌 LPfr. は市販の抗 α -fetoprotein 血清 (DAKO, Denmark), 抗 β_2 -microglobulin 血清 (DAKO, Denmark), 抗 ferritin 血清 (Behling Werke AG, Germany), Forssman 抗血清 (Difco, USA), 抗 A および抗 B 血液型判定用血清 (Ortho Diagnostic Inc. USA)

Fig. 2 Examples of Ouchterlony reaction patterns developed between absorbed anti-TCC LPfr. antiserum and various tissue extracts. Center well: absorbed anti-TCC LPfr. antiserum, peripheral wells: (1) TCC homogenate, (2) TCC homogenate, (3) TCC LP, (4) TCC LPfr., (5) RCC LP, (6) CEA.

Fig. 3 Immunoelectrophoresis: well: TCC LPfr. Trough: anti-TCC LPfr. antiserum.

などの抗血清との間に沈降線を生じなかった。

免疫電気泳動法を行なうと、膀胱移行上皮癌 LPfr. は β_2 -globulin 位に1本のアークを示した (Fig. 3)。

間接蛍光抗体法では Table 2 のように、抗ヒト膀胱移行上皮癌モルモット血清はヒト膀胱移行上皮癌由来細胞株の5株すべてに、細胞膜に一致してリング状染色を示したが、ヒト腎細胞癌由来の細胞株2株、HeLa 細胞、HCV-29 の対照細胞株のいずれもが陰性であつた (Fig. 4~12)。本学がん研究所、病態生理部より譲与された抗ヒト腎細胞癌モルモット血清 (非特異成分吸収済) や抗ヒト結腸癌モルモット血清 (非特異成分吸収済) で同

Table 2 Results of living cell membrane immuno-fluorescence.

Antisera	Anti-TCC ¹⁾	Anti-RCC ²⁾	Anti-CC ³⁾
Target cells			
TCC origine			
KK-47	+	—	—
KW-103	+	—	—
T-24	+	* ⁴⁾	*
J-82	+	*	*
RT-4	+	*	*
Others			
KH-39	—	+	—
KN-41	—	+	—
HeLa	—	—	*
HCV-29	—	*	*

1) TCC: transitional cell carcinoma
2) RCC: renal cell cancer, 3) CC: colon cancer
4) *: not tested

じように細胞株に対する反応を調べると、抗ヒト腎細胞癌モルモット血清はヒト腎細胞癌由来細胞株2株に対し蛍光染色陽性を示したが、ヒト膀胱移行上皮癌由来細胞株 KK-47、KW-103 や HeLa 細胞には反応を示さなかつた。また抗ヒト結腸癌モルモット血清は KK-47、KW-103、KH-39 や KN-41 の細胞株とに反応を示さなかつた。以上の成績から、ヒト膀胱移行上皮癌由来細胞株5株の細胞膜表面に共通して、移行上皮癌特異あるいは高度関連抗原の存在することが示され、それは腎細胞癌や結腸癌抗原とは異なることが明らかとなつた。

癌抗原と組織適合抗原との関連性は重要な問題点であるので、筆者は二重染色法を行なつてその関連性を調べた。移行上皮癌抗原を 0℃ で FITC 標識抗血清で染めた後、37℃ に2時間おいて Fig. 13a のように patching を起こさせた後、再び 0℃ に冷して抗ヒト β_2 -microglobulin 兔血清とローダミン標識抗兔 IgG ヤギ血清で、0℃ で染色すると、ローダミンによるリング状染色が認められた (Fig. 13b)。このことは両抗原が生細胞膜上で異なった動きを示すことの証明であり、従つて両抗原が異なつた分子であることを物語っている。

考 察

ヒト膀胱移行上皮癌 (TCC) に腫瘍特異抗原の存在をはじめて示唆した研究は Bubenik¹⁴⁾¹⁵⁾ らのもので、患者リンパ球の自己または他の患者からの primary culture

Fig. 4 KK-47 cells showing cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 7 J28 cells showing cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 5 KW-103 cells showing cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 8 RT4 cells showing cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 6 T24 cells showing cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 9 KH-39 showing no cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 10 KN-41 cells showing no cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 11 HeLa cells showing no cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 12 HCV-29 cells showing no cell surface fluorescence after an indirect immunofluorescent test using absorbed anti-TCC LPfr. antiserum.

Fig. 13 Two color immunofluorescence on T24. (a) patching of TCC antigen: FITC-anti-guinea pig Ig antiserum.

(b) the same field as in (a), staining with anti- β_2 -micro-globulin antiserum: rhodamin-anti-rabbit Ig antiserum.

の TCC cell に対する microcytotoxicity test, すなわち autologous あるいは allogeneic な組合せの免疫生物学的反応系による成績であつた。その結果は患者リンパ球が TCC cell の選択的破壊をおこし、正常組織由来細胞や他の癌由来の細胞を障害しなかつた。Bubenik⁶⁾ らはついで TCC の細胞株 T24 の樹立に成功し、以後この株が cytotoxicity test の target cell として世界的に用いられるようになった。O'Toole ら¹⁶⁾ は同細胞株と RT 4 株および primary culture 細胞を用い、Bubenik とほぼ同様の成績をあげている。Bean¹⁷⁾, Hakala¹⁸⁾, Bloom ら¹⁹⁾ も T24 を用い、Elhilali²⁰⁾ は primary culture cell を用い、患者リンパ球の高い細胞障害性を観察しているが、いずれも対照群は陰性というわけではなく、false positive の例が実験者により異なるとはいへ無視できない率に見られている。TCC の cytotoxicity test に関する国際ワークショップ (1974)²¹⁾ でも、T24 および RT4 株による立合い実験の成績は TCC 患者リンパ球の相対的な障害特異性を認めたが、データのばらつきは少なかつた。一方 Catalona ら²²⁾ は T24 株に対する TCC 患者リンパ球の cytotoxicity test の二重盲検テストを行ない、TCC 患者リンパ球の特異性を認め得なかつた。それ以後も TCC 患者リンパ球の特異 cytotoxicity を認める報告 (Elhilali : 1976²³⁾, O' Toole : 1977²⁴⁾, Troye ら : 1976²⁵⁾, Jones ら : 1977²⁶⁾, Vilien and Wolf : 1978²⁷⁾) と特異性を否定する報告 (Catalone : 1977²⁸⁾) とに分かれている。このような矛盾は、多くの因子に関連している患者リンパ球の免疫反応を扱っている限りむし

る当然と考えねばならない。Vilien and Wolf²⁷⁾ も指摘した様に、この反応のばらつきの主原因はいくつかの非特異的 cytotoxicity の上にスーパーインポーズされて TCC cytotoxicity が発揮されることにあるであろう。従つて TCC の特異抗原を明らかにするためには異なつた免疫反応系を用いる必要がある。

Gozzo ら²⁹⁾³⁰⁾ は TCC 抽出液に対する異種抗血清を作製し、補体結合反応とゲル拡散法で、TCC 患者尿中に TCC 特異抗原の存在を暗示するデータを得ている。ただし非癌感染尿も false positive の成績を示した。彼らはその後も TCC 膜成分に対する異種抗血清を用い、TCC の特異抗体をゲル拡散で証明しようとしたが成功せず、補体結合反応で尿中の抗原を追跡し、TCC 患者尿に高い陽性率を認めたが、やはり感染尿も陽性率が高く、吸収抗血清を使用してもなお60%の例が陽性であつた。Bowen³¹⁾ は TCC 患者血中の特異抗原を白血球遊走阻止試験で認めているが、以後詳しい報告を行なっていない。Bloom³²⁾ は 24 株その他に対する異種抗血清を作り、適当な吸収を行なうと、TCC 株に対してのみ cytotoxicity あるいは特異蛍光を示す抗血清の得られることを明らかにしたが、抗原を精製する試みは行なっていない。Guinan³³⁾ ら、新家³⁴⁾、西尾ら³⁵⁾ は膀胱移行上皮癌 3 MKCl 抽出液を用い白血球付着阻止反応 (LAI テスト) を行なつて、特異抗原の存在を示したが、他の癌の抽出液でも強い反応を示す例があつた。Okada ら³⁶⁾ は剖検材料から得た TCC の細胞性不溶成分をデスオキシコール酸塩溶液で可溶化した分画で hyperimmune の異種抗血清を作つてゲル拡散法を行ない、正常臓器、胎児臓器、他の腫瘍の分画にはない 1 抗原の存在を認め、蛍光抗体法で TCC 細胞膜に同抗原の局在することを示している。この方法は他のヒト癌についても一応癌特異と考え得る抗原の同定に有効であるように見える³⁷⁾³⁸⁾。そこで筆者は同法に従つて TCC 抗原分画を作製し、同分画に対し hyperimmune による異種抗血清を作り、ゲル拡散法で抗血清の特異性を確めた後、種々の cell line を target cell として、生細胞膜蛍光抗体法によつて、TCC 特異抗原の有無に関する検討を行なつた。このことは、ゲル拡散のような低感度の方法によつて monospecificity が認められる抗血清が、より鋭敏な方法によつても特異性を示すか否かを検討することであり、もし特異性が認められるならば、TCC 特異抗原の存在はより確実なものになると同時に、TCC 由来の培養細胞株における最も重要な腫瘍マーカーとして、それ

が使用できることを示すことになる。筆者の作製した異種抗血清はゲル内拡散法で一応 TCC に特異的と思われる 1 沈降線を示し、それを用いた生細胞膜蛍光抗体法では、国際的に知名度の高い TCC 株 T24, RT4, J82 株のみならず、当教室で樹立された KK-47, KW-103 の TCC 株のいずれも細胞膜が陽性に染まり、対照としての腎細胞癌由来細胞株 KH-39 および KN-41 や HeLa 細胞、非悪性膀胱上皮由来細胞株 HCV-29 はすべて陰性であつた。なお、ヒト腎細胞癌や結腸癌から同様な方法で作製した抗原分画に対するモルモット抗血清で TCC 細胞株を染めても結果は陰性であつた。癌細胞膜における腫瘍抗原と組織適合抗原の関連性がしばしば問題となるので³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾、筆者は二重染色によつて TCC 細胞株細胞膜上の腫瘍抗原と主組織適合抗原の必在成分である β_2 -microglobulin の膜流動性を調べ、両者が別の分子であることを明らかにした。 β_2 -microglobulin を小成分としない HLA 抗原は存在しないから、TCC 細胞膜上で腫瘍抗原が HLA 抗原と結合していないことは明らかである。以上のような成績は筆者の吸収抗血清が鋭敏度の高い生細胞膜蛍光抗体法レベルで TCC cell line に共通する特異抗原を認識していることを物語り、その抗原が TCC 組織あるいは TCC cell line の腫瘍特異マーカーとして役立つことを示している。この様な腫瘍細胞膜所在の腫瘍抗原ががんの診断に役立つ可能性を Yamada ら³⁸⁾ が肺癌について報告しているが、TCC についてはまだこれからの検討を必要とする問題である。将来ここで述べたような TCC 特異と思われる抗原に対して monoclonal な抗体を作製できるようになれば、それを使つて RIA あるいは Enzyme immunoassay で血中微量抗原を高い精度でチェックすることが可能になり、TCC の臨床診断に大いに役立つであろう。そのためにも抗原の一層の精製が望まれる。その努力は本学がん研究所病態生理部および当教室においてなされつつあるが、材料的な制約から完全な精製にはまだ日時が必要である。

結 語

膀胱移行上皮癌患者の手術材料から不溶性分画を抽出し、デオキシコール酸で可溶化した分画を Freund complete adjuvant と共にモルモットに頻回注射して抗血清を作製した。同抗血清は適当な吸収操作を行なうとゲル拡散法で移行上皮癌抗原分画とのみ 1 本の沈降線を生じ、他の泌尿器由来悪性腫瘍や子宮頸癌、CEA 標品などは反応を示さない。抗原分画はゲル拡散法で α -fetop-

rotein, ferritin, β_2 -microglobulin, 血液型抗原や Forsmann 抗原などとは関係のないことが示された。免疫電気泳動法では、この抗原は β_2 -globulin 位の泳動度を示した。

抗血清は適当な吸収後、生細胞膜蛍光抗体法で膀胱癌由来の細胞株 T24, RT4, J82, ならびに当教室で樹立された KK-47, KW-103 の各細胞の表面をリング状に染め、HeLa 細胞や非悪性膀胱上皮由来細胞株 HCV-29, 教室で樹立された腎細胞癌由来細胞株 KH-39, KN-41 などの細胞については陰性の成績を示した。

生細胞膜蛍光抗体二重染色法で移行上皮癌抗原と β_2 -microglobulin とが膀胱癌細胞膜上別の分子であることが明らかにされた。

以上の成績は、ヒト膀胱移行上皮癌には少なくとも 1 つの腫瘍特異と思われる抗原分子が細胞膜上にあり、同抗原分子はヒト膀胱癌由来細胞株の各細胞表面にも同定され得ることを示したものである。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師黒田恭一名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また数々の御助言を頂いた久住治男教授、膀胱腫瘍班の各位ならびに懇切かつ適切な御助言、技術的援助ならびに貴重な材料、抗血清類の御分与を頂いた本学がん研究所病態生理部倉田自章教授、岡田収司助教授、教室員の各位に厚く感謝申し上げます。

なお本論文の要旨は第69回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Smith, J.T., Funckes, A.J., Barak, A.J. and Thomas, L.E.: Cellular lipoproteins. *Exp. Cell Research*, **13**, 96—102, 1957.
- 2) Kurata, Y. and Okada, S.: Immunological studies of insoluble lipoproteins. I. Antigen analysis of thyroid lipoproteins. *Int. Arch. Allergy*, **29**, 495—509, 1966.
- 3) 倉田自章, 岡田収司: 組織特異抗原の抽出法。免疫実験操作法 A, p. 390—393, 日本免疫学会, 金沢, 1971.
- 4) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1951.
- 5) Gold, P. and Freedman, S.O.: Demonstration tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, **121**, 439—462, 1965.
- 6) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養。日泌尿会誌, **68**, 1003—1010, 1977.
- 7) 内藤克輔, 久住治男, 越田 潔, 西野昭夫, 西東康夫, 中嶋和喜, 三崎俊光, 黒田恭一: 当教室における泌尿器悪性腫瘍の組織培養成績と樹立細胞株 (KK-47, KW-103, KH-39, KN-41) について。第69回日泌尿学会総会, 特別示説, 前橋, 1981.
- 8) Bubenik, J., Beresova M., Viklicky, J., Jakoubkova, J., Sainerova, H. and Donner, J.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int. J. Cancer*, **11**, 765—773, 1973.
- 9) O'Toole, C., Price, Z.H., Ohnuki, Y. and Unsgaard, B.: Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional cell carcinoma. *Brit. J. Cancer*, **38**, 64, 1978.
- 10) Rigby, C.C. and Franks, L.M.: A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *Brit. J. Cancer*, **24**, 746—754, 1970.
- 11) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, **12**, 264—265, 1952.
- 12) Melamed, M.R., Darzynkiewicz, Z., Traganos, F. and Sharpless, T.: Nucleic acid content and nuclear chromatin structure of human bladder cell culture lines as studies by flow cytofluorometry. *Cancer Research*, **37**, 1227—1231, 1977.
- 13) Rood, J.J., Leeuwen, A. and Ploem, J.S.: Simultaneous detection of two cell populations by two-colour fluorescence and application to the recognition of B-cell determinants. *Nature*, **262**, 795—797, 1976.
- 14) Bubenik, J., Perlmann, P., Helmstein, K. and Moberger, G.: Immune response to urinary bladder tumours in man. *Int. J. Cancer*, **5**, 39—46, 1970.
- 15) Bubenik, J., Perlmann, P., Helmstein, K. and Moberger, G.: Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *Int. J. Cancer*, **5**, 310—319, 1970.
- 16) O'Toole, C., Perlmann, P., Unsgaard, B., Moberger, G. and Edsmyr, F.: Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy. *Int. J. Cancer*, **10**, 77—91, 1972.
- 17) Bean, M.A., Pees, H., Fogh, J.E., Grabstald, H. and Oettgen, H.E.: Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of urinary

- bladder: Detection by a ^3H -proline microcytotoxicity test. *Int. J. Cancer*, **14**, 186—197, 1974.
- 18) Hakala, T.R., Lange, P.H., Castro, A., Elliott, A. and Fraley, E.E.: Cell mediated cytotoxicity against human transitional cell carcinomas of the genitourinary tract. *Cancer*, **34**, 1929—1934, 1974.
 - 19) Bloom, E.T., Ossorio, R.C. and Brosman, S.A.: Cell-mediated cytotoxicity against human bladder cancer. *Int. J. Cancer*, **14**, 326—334, 1974.
 - 20) Elhilali, M.M. and Nayak, S.K.: Immunologic evaluation of human bladder cancer: In vitro studies. *Cancer*, **35**, 419—431, 1975.
 - 21) Bean, M.A., Bloom, B.R., Herberman, R.B., Old, L.J., Oettgen, A.F., Klein, G. and Terry, W.D.: Cell-mediated cytotoxicity for bladder carcinoma: Evaluation of a workshop. *Cancer Research*, **35**, 2902—2913, 1975.
 - 22) Catalona, W.J., Oldham, R.K., Djeu, J.Y., Herberman, R.B. and Cannon, G.B.: Specificity of in vitro cellular cytotoxicity against transitional cell carcinoma cell line T-24. *Surg. Forum*, **26**, 122—124, 1975.
 - 23) Elhilali, M.M. and Nayak, S.K.: In vitro cytotoxicity studies in bladder and renal cell cancer. *Urology*, **7**, 488—491, 1976.
 - 24) O'Toole, C.: A ^{51}Cr Chromium isotope release assay for detecting cytotoxicity to human bladder carcinoma. *Int. J. Cancer*, **19**, 324—331, 1977.
 - 25) Troye, M., Perlmann, P., Larsson, A., Blomgren, H. and Johansson, B.: Cellular cytotoxicity in vitro in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: Cr-release assay. *Int. J. Cancer*, **20**, 188—198, 1977.
 - 26) Jones, L.W. and Otoole, C.: Lymphocyte response to transitional cell carcinoma: Peripheral cytotoxicity and local tumor infiltration. *J. Urol.*, **118**, 974—977, 1977.
 - 27) Vilien, M. and Wolf, H.: The specificity of the microcytotoxicity assay for cell-mediated immunity in human bladder cancer. *J. Urol.*, **119**, 338—342, 1978.
 - 28) Catalona, W.J., Oldham, R.K., Herberman, R.B., Djeu, J.Y. and Cannon, G.B.: Lack of specificity of lymphocyte-mediated cytotoxicity against the bladder cancer cell line, T24. *J. Urol.*, **118**, 254—257, 1977.
 - 29) Gozzo, J.J., Schlesinger, R.M. and Monaco, A.P.: Detection of bladder-cancer-associated antigens in urine by micro-complement fixation. *Surg. Forum*, **25**, 117—121, 1974.
 - 30) Monaco, A.P., Gozzo, J.J., Schlesinger, R.M. and Codish, S.D.: Immunological detection of human bladder carcinoma. *Ann. Surg.*, **182**, 325—333, 1975.
 - 31) Bowen, J.G.: Tumour antigen in human cancer patients' sera. *Brit. J. Cancer*, **32**, 242, 1975.
 - 32) Bloom, E.T.: Antigen(s) on human transitional cell carcinoma detected by a xenogeneic antiserum. *Urol. Research*, **5**, 141—148, 1977.
 - 33) Guinan, P., Mikiel, C., Flanagan, M., Bhatti, R., Pessis, D. and Ablin, R.: Cellular immunity in bladder cancer patients. *J. Urol.*, **119**, 747—749, 1978.
 - 34) 新家俊明: 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究—ことに LAI test について—. *日泌尿会誌*, **70**, 495—503, 1979.
 - 35) 西尾正一, 和田誠次, 堀井明範, 森川洋二, 川喜多順二, 西島高明, 前川正信: 膀胱癌患者の細胞性免疫能に関する研究. 第5報: LAI test における患者血清の blocking, unblocking 効果について. *泌尿紀要*, **25**, 897—904, 1979.
 - 36) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. and Ookawa, M.: Demonstration and preliminary characterization an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Europ. J. Cancer*, **16**, 1451—1458, 1980.
 - 37) Okada, S., Itaya, K. and Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. (Preliminary communication). *Europ. J. Cancer*, **15**, 1085—1093, 1979.
 - 38) Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y. and Okada, S.: Extraction and preliminary characterization of tumor antigens in human bronchogenic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Europ. J. Cancer*, **16**, 781—792, 1980.
 - 39) Thomson, D.M., Gold, P., Freedman, S.O. and Shuster, J.: The isolation and characterization of tumor-specific antigens of rodent and human tumors. *Cancer Research*, **36**, 3518—3525, 1976.
 - 40) Thomson, D.M., Tataryn, D.N., O'Connor, R., Rauch, J., Friedlander, P., Gold, P. and Shuster, J.: Evidence for the expression of human tumor-specific antigens associated with β_2 -microglobulin in human cancer and in some colon adenomas and benign breast lesions. *Cancer Research*, **39**, 604—611, 1979.
 - 41) Natori, T., Law, L.W. and Appella, E.: Immunohistochemical evidence of a tumor-specific surface

antigen obtained by detergent solubilization of the membranes of a chemically induced sarcoma, Meth-A. *Cancer Research*, **38**, 359—364, 1978.

- 42) Leong, S.P., Cooperband, S.R., Deckers, P.J., Sutherland, C.M., Cesare, J.F. and Krementz,

E.T.: Antibody-induced movement of common melanoma membrane antigens on the surface of unfixed human melanoma cells. *Cancer Research*, **39**, 2125—2131, 1979.

(1981年10月16日受付, 特別掲載)