

# 岡山医学会雑誌

第80巻1,2号(第878,879号)

昭和43年2月28日発行

616-006.6 : 576, 858 : 576.8.097

## C<sub>3</sub>H マウス乳癌におけるウイルス抗原の 蛍光抗体法による研究

第 1 編

C<sub>3</sub>H マウスにおける乳癌ウイルス抗原の精製とその  
蛍光抗体法直接法による検討

岡山大学医学部 平木内科

副 手 卷 幡 徹

〔昭和42年12月12日受稿〕

### 目 次

I 緒 言	清による染色
II 実験材料及び方法	B Fluorocarbon 処理法による抗血清による染色
A ウイルス抗原の精製	C 正常 Rf マウス肝脾に対する抗血清による染色
1. ウイルス材料	D 蛍光抗体直接法の手技に関する二、三の改良
2. ウイルス抗原の精製方法	1. 蛍光抗体の性状
B 抗血清の作製	2. 蛍光抗体の非特異反応の吸収
C 蛍光標識抗体の作製	3. 切片標本の固定及び染色法の改良
D 観察材料	4. 直接法改良法による抗体Ⅲの染色結果
E 蛍光抗体法直接法の染色及び非特異反応の除去	IV 総括及び考案
F 装置及び設備	V 結 語
III 実験成績	
A 濾過管通過法及び分画遠沈法による抗血	

### I 緒 言

Bittner<sup>1)</sup>によるマウス乳癌の milk factor の発見, Gross<sup>2)</sup>のマウス白血病ウイルスの証明とその vertical transmission 説の提唱以来, マウス腫瘍ウイルスは近代ウイルス学的手法を駆使して検討され

て来た。しかしながら腫瘍ウイルスの分離及び定量的検出法である *in vitro* での transformation (細胞腫瘍化) の試みがマウス腫瘍ウイルスでは成功せぬために家鶏肉腫ウイルス<sup>3)</sup>, ウサギ乳頭腫ウイルス<sup>4)</sup>, SV40 ウイルス<sup>5)</sup>, 等の研究に比して大幅な遅れが目立っている。一方乳癌ウイルスに対する

hetero の中和抗体を使用しての中和実験は常に可能であるが<sup>6)</sup>、中和抗体を利用しての赤血球凝集阻止、沈降反応、補体結合反応等ウイルスの定量的観察には失敗したものが多く<sup>7)8)9)10)</sup>、且つ成績の信頼度は甚だ低いと云う<sup>6)</sup>。従つて現状では乳癌ウイルスの存在を証明するものは bioassay のみであつて確実な定量的検出法はない。他方電子顕微鏡による観察では乳癌腫瘍の中には常に無数のウイルス粒子が認められ<sup>11)12)</sup>、これをマウス乳癌ウイルスと呼んでいるが、これらは乳癌ウイルスによる細胞癌化の問題、あるいはその抗原性とは全くの別の dimension での観察であつて、両者を直接に結びつけるものは今のところない。乳癌ウイルスに抗原性が存在し、而も hetero の中和抗体により発癌を阻止出来るのであるから、中和抗体を用いて蛍光抗体法を行えば、乳癌ウイルスの存在を組織細胞内で光学顕微鏡的に観察出来るはずであり、異なつた dimension での比較ではあるが電顕によるウイルス粒子の分布とも照合出来る。従来蛍光抗体法では抗原の嚴重な精製が要求され、従つて確実な分離精製法の知られていないマウス腫瘍ウイルスでは利用されていなかったが、教室の小塚<sup>13)14)15)</sup>、高橋<sup>16)</sup>らは Fluorocarbon を用いてマウス白血病ウイルスの分離精製に成功し、蛍光抗体法により各種マウス腫瘍ウイルスの抗原分布を明らかにした。また、市川<sup>17)</sup>は SL 白血病につき、Friend<sup>18)</sup>は Swiss マウス白血病を、最近では Fink<sup>19)</sup>が Rauscher 白血病のウイルス抗原を蛍光抗体法により明らかにしており、マウス白血病ウイルス抗原の追求が漸く活発になつて来た感がある。しかし、マウス乳癌ウイルスに関して蛍光抗体法により抗原の所在を観察したのは Brown & Bittner<sup>6)</sup>の記載があるのみで、しかもウイルス抗原との関係を明らかにし得たものは皆無である。

私は先づ乳癌ウイルスの分離精製法として Gessler の Fluorocarbon extraction<sup>20)</sup>を採用し、その精製効果を濾過管通過法、分画遠沈法と比較するため蛍光抗体法を用いた。本編では Fluorocarbon extraction の可否及び蛍光抗体法手技上の検討を行なつた結果を報告する。

## II 実験材料及び方法

### A. ウイルス抗原の精製

1. ウイルス材料：岡山大学マウスコロニーにて繁殖中の C<sub>3</sub>H 系マウスに自然発生せる乳癌腫瘍を無菌的に取出し、直ちに凍結して貯蔵した。対照材

料として乳癌、白血病嫌発系の Rf 系成熟マウスの肝脾を用いた。

### 2. ウイルス抗原の精製方法

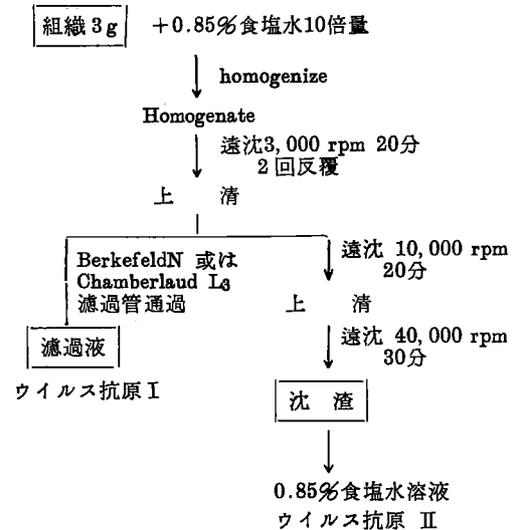
腫瘍又は対照材料を取り出して溶解後、以下の各操作を全く無菌的に 0°C~5°C に保ち乍ら行なつた。

#### a. 濾過管通過法

第1図の如く腫瘍 3g を生理食塩水 27g と共に 20分間 homogenize して 10% homogenate を作製し 3,000回転20分間の遠沈を 2 回反覆し、上清を Berkefeld N 又は Chamberland L<sub>3</sub> に通じて filtrate を得、これをウイルス抗原 I とした。

第1図

#### 1. 濾過管通過法



#### 2. 分画遠沈法

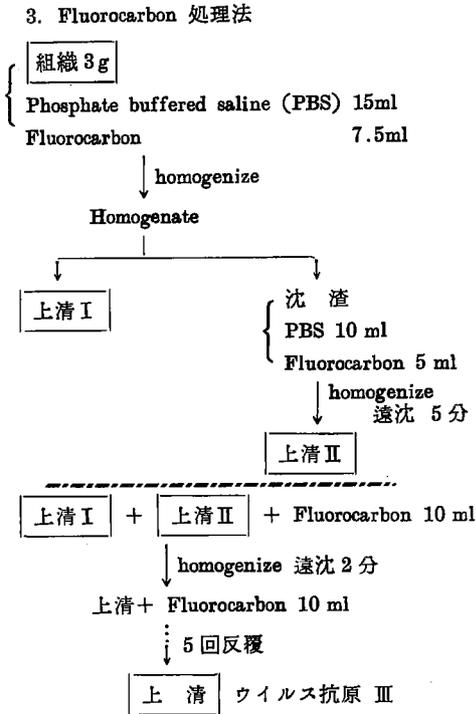
#### b. 分画遠沈法

第1図の如く homogenate の低速遠沈上清をとり、10,000回転20分の高速度遠沈を行ない、その上清につき40,000回転30分の超遠沈を行ない、沈渣を生理食塩水 5ml に浮遊し、これを抗原 II とした。

#### c. Fluorocarbon 処理法

第2図の如く組織 3g を pH 7.0 phosphate buffered saline (PBS) 15ml 及び Fluorocarbon 7.5ml と共に 20分間 homogenize し、homogenate を 1,500回転 5分間遠沈し、上清を一旦貯蔵し、沈渣に更に PBS 10ml 及び Fluorocarbon 5ml を加えて 10分間 homogenize し、homogenate を 1,500回転 5分間遠沈し、得られた上清を先程の上清と一緒にして以下の Fluorocarbon 処理を行なつた。即ち Fluorocarbon 10ml を加え 2分間 homogenize すると微細な泡沫

第2図



液となり、これを1,500回転で2分間遠沈すると下層に Fluorocarbon と蛋白の結合せる泥状の沈澱が生じ、上清は次第に脱色されて来る。かかる操作を5回反覆すると上清は殆んど無色透明となり斜光線によつて白く輝く液体となる。これをウイルス抗原Ⅲとした。

### B 抗血清の作製

上記各抗原液の少量を採り micro-Kjeldahl 法にて nitrogen 量を測定し、0.5mgN/ml となる様抗原液を稀釈した。但し Fluorocarbon extract については含有 nitrogen 量は0.1~0.2mgN/ml であつたため、そのまま用いた。家兎の免疫は complete Adjuvant 法によつて行ない、1回の免疫量は3mgNとし、一週間隔で3回背筋内に注射し、3週後試験採血を行なつた。但し Fluorocarbon extract については1回の免疫量は8ml (1mgN 前後)とした。

試験採血で得た抗血清は補体結合反応抗体稀釈により抗体価を測定し80倍以上であつたため、1週後全採血し、これを抗原Ⅰ、Ⅱに対して抗血清Ⅰ、Ⅱとした。抗原Ⅲに対する抗血清は試験採血時1:40の titer を示すのみであつたので、抗原液1mlの静注を5日間反覆し、更に1週後 titer が1:128となつた後採血した。

### C 螢光標識抗体の作製

抗血清30mlを0°Cに冷却してコルベンに入れ半飽和硫酸沈降法に従つて飽和硫酸30mlを用意し、magnetic stirrerにて血清を充分攪拌し乍ら硫酸を注ぎ2分間攪拌後、1,200回転15分で遠沈し、沈澱を生理食塩水10mlに充分溶解した後、溶解液量を正確に測り、等量の飽和硫酸を用意して同様の塩析を行ない、かかる操作を4回反覆し、沈澱を6mlの生理食塩水に溶解すると殆んど透明な globulin 溶液が得られた。これをセルローズチューブに入れ0°C~4°Cの生理食塩水を3l入れた鉢に浮かせ magnetic stirrer で攪拌し乍ら48時間透析し、透析液を4回交換した。最後の透析液中に塩化バリウム液を滴下しても SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> イオンは証明されなかつた。透析を完了したグロブリン溶液は Biuret 法により蛋白量を測定し、1.5%溶液となる様 PBS で稀釈した。次に pH 9.0炭酸緩衝液を準備し、グロブリン溶液の1/9溶を加えて pH を測定し、pH 9.0~9.2となる様炭酸ソーダ溶液で調整した。

Fluorocarbon は BBL 製の結晶性のものを用い、グロブリン40mg 当り1mgの Fluorescein isothiocyanate を型の如く conjugate した。6時間攪拌した後セルローズチューブに入れ、pH 7.0PBS 3lにて透析を行ない、毎日 PBS を交換し乍ら1週間透析を行なつた。最後の螢光抗体液は蛋白量を測定し、1%蛋白濃度とした後、少しづつ分注し貯蔵所に入れた。

### D 観察材料

C<sub>3</sub>H マウスに自然発生せる乳癌腫瘍及び肝、脾、腎、肺、脳、リンパ節及び骨髓を死後直ちに取出し、dryice-acetone で-72°Cとせる浴槽中に n-hexane の試験管を入れ、これに組織片を投入すると瞬間に凍結出来る。これを-18°Cの Cryostat 中で4μの切片として slide glass にとり、指先で溶解後 fan で速かに乾燥し、直ちに0°C~4°Cの acetone に入れて10分間固定し、再び乾燥して冷蔵庫に保存した。対照材料としては正常成熟 C<sub>3</sub>H マウスの各臓器を用い、乳腺組織は授乳期のマウスのものを用いた。

### E 螢光抗体法直接法の染色及び非特異反応の除去

前述の螢光抗体液はマウス肝粉により非特異的反応因子を除去することに務めた。即ち、予め雑系マウスの肝、脾を多量に集め、Coons に従つてアセトン沈降蛋白を生食水で洗い乾燥した後細粉末とし、これを螢光抗体液1mlに対し100mgの比率で加

え、室温で2時間攪拌し、又は冷蔵庫内に一昼夜放置し、遠沈上清に再び肝粉を加えて反覆した。吸着後の蛍光抗体は出来るだけ短時間の間に使用する必要があるため、吸着は染色の都度行なつた。直接法の染色は Coons<sup>21)</sup> に準じて室温で30分放置し、pH 7.0の Phosphate buffer で充分洗滌後10% buffered glycerol で封入した。

特異反応の判定は ① blocking test, ② 対照組織の染色, ③ 対照蛍光抗体による染色等により決定したが、最も重点をおいたのは blocking test であつた。即ち、非標識抗血清を用いて標本上で30分反応せしめた後、蛍光抗体により染色すると、特異的の反応因子は block されているため染色されない筈である。

#### F 装置及び設備

蛍光顕微鏡室は暗室とし、蛍光光源は千代田高輝度水銀燈を用い、主として BV 励起により時として UV 励起法により観察した。写真撮影は superansco ASA 200, 又は SSS を用い、1000倍では大体30~50分の露出を必要とした。

### III 実験成績

#### A 濾過管通過法 (抗原 I) 及び分画遠沈法 (抗原 II) による抗血清 (抗体 I 及び II) による染色

C<sub>3</sub>H 乳癌腫瘍の切片を抗体 I で染色すると特異蛍光は胞体、結合織及び細胞間隙に瀰漫性に強く認められ、核内には特異蛍光は認められなかつた (写真 1, 2)。抗体 I で正常マウス乳癌組織を染色すると腺細胞胞体に強い瀰漫性蛍光を、結合織には中等度の瀰漫性蛍光を認めるが、乳癌組織に比して遙かにその蛍光は弱かつた (写真 3, 4)。抗体 I で転移リンパ節の切片を染色すると癌細胞胞体に強い瀰漫性蛍光が見られ、細胞間隙及び結合織にも強い蛍光が観察されたが残存するリンパ濾胞には特異蛍光は見られなかつた (写真 5)。抗体 I で乳癌マウス脾を染色すると、結合織及び細網細胞胞体に強い瀰漫性蛍光が見られたが、細胞間隙及びリンパ系細胞には特異蛍光は見られなかつた。乳癌マウスの脾、腎、肝、脳等では抗体 I によつて星状細胞、細網細胞、貪喰球等の網内系細胞の胞体に中等度の瀰漫性蛍光を認め、結合織にも弱い特異蛍光がみられたが肝細胞、糸球体、肺胞上皮、神経細胞、グリア細胞等には特異蛍光を認めなかつた。正常 C<sub>3</sub>H マウスの肝、腎、肺においてもほぼ同様の結果が得られ、脾では細網細胞胞体の特異蛍光がやや少ない様であつ

たが有意の差とはし難かつた。

抗体 II を用いて乳癌組織を染色すると抗体 I によるものと同様に癌細胞胞体、細胞間隙に強いびまん性蛍光を認め、結合織の蛍光はやや弱かつた。抗体 II により転移リンパ節及び肝、脾、腎、肺、脳等を染色した結果は抗体 I によるものとはほぼ等しく、有意の差は認められなかつた。

#### B Fluorocarpon 処理法 (抗原 III) による抗血清 (抗体 III) による染色

抗体 III により乳癌組織を染色すると癌細胞胞体及び結合織のびまん性蛍光は微弱となり、細胞間隙及び腺腔内には一部粒子状で大半はびまん性の強い特異蛍光が認められた (写真 6, 7)。

正常乳腺では細胞間隙のかかる蛍光は認められず、腺細胞胞体に微弱なびまん性蛍光をみるのみであつた。転移リンパ節では癌細胞胞体には微弱なびまん性蛍光を見るのみであつたが、細胞間隙には粒子状蛍光の集合とみられる強い特異蛍光が散在し、細網細胞胞体内には粒子状蛍光が集合するものが見られた。

乳癌マウス脾では脾髄には特異蛍光はみられず脾柱及び結合織中に存在する細網細胞の一部に、胞体内にびまん性の特異蛍光を有するものがあつた。乳癌マウス肝では稀に星状細胞の胞体内に中等度のびまん性蛍光を認めたが粒子状蛍光は明らかでなかつた。乳癌マウスの腎、肺、脳切片では乳癌組織リンパ節、又は脾にみられた如き特異蛍光は認められず、正常 C<sub>3</sub>H マウス臓器切片の染色と全く異ならなかつた。乳癌マウス骨髄の塗抹標本を染色すると顆粒球就中好酸球の胞体に顆粒の非特異蛍光が出現し、その蛍光は blocking test によつても消失しなかつた。従つて骨髄においては乳癌腫瘍における如き特異蛍光は存在しなかつたが、脾細網細胞にみられる様な特異蛍光の存否については不明であつた。

#### C 正常 Rf マウス肝、脾に対する抗血清による染色

濾過管通過法による抗体で染色すると、乳癌組織の結合織が強いびまん性特異蛍光を呈し、癌細胞及び細胞間隙には甚だ微弱な蛍光がみられたにすぎない。正常乳腺においても同じ結果が得られたが、転移リンパ節では結合織及び浸潤円型細胞の胞体に強いびまん性蛍光がみられ癌細胞には特異蛍光を認めなかつた。肝では肝細胞胞体及び結合織に強いびまん性蛍光を認め、脾では脾髄、脾梁共にびまん性の蛍光に覆われた。分画遠沈法による抗体で染色した

場合もほぼ同様の結果が得られた。

Fluorocarbon 処理法による抗体を用いると、殆んど特異蛍光は認められず、僅かに脾の結合織に淡いびまん性の蛍光が認められた。

#### D 蛍光抗体直接法の手技に関する二、三の改良 (教室小塚による)

##### 1. 蛍光抗体の性状

蛍光抗体に関しては抗体グロブリン1分子に対して fluorescein isothiocyanate 何分子が結合しているかを測定することが行なわれている。色素F対蛋白Pの分子比即ち F/P ratio は1~2のものが望ましく、3以上では非特異蛍光を防ぎえないと云われている。単位蛋白量を Biuret 法で測定しておき 0.1 NNaOH にて pH 12.0 とせる蛍光抗体の色素濃度を、490 m $\mu$  における紫外線吸光度により測定すると標準吸光度曲線と比較して濃度を決定し得る。かかる方法により測定した F/P ratio は抗体Iは4.5、抗体IIは3.2、抗体IIIは4.1附近であつた。従つて色素過剰となつたことは明らかであり、この色素過剰結合の globulin を除くため、DEAE Cellulose 分画法を用いた。即ち、径10mm のColumn に pH7.0 PBS に浮遊せる DEAE Cellulose を約 2cm つめ、蛍光抗体を注いで滴下速度を 1ml 4分間とする様に調節した。かかる DEAE Cellulose 通過により蛍光抗体は比較的色素濃度が薄くなり、F/P ratio は抗体Iが2.4、抗体IIが2.0、抗体IIIが1.7 となつた。

##### 2. 蛍光抗体の非特異反応の吸収

マウス肝粉のみによる吸着では顆粒球の非特異蛍光を除去出来ないため、正常成熟雑系マウスの肝、脾、腎、骨髓を homogenize し acetone を加えて沈降せる蛋白を生理食塩水で5回洗浄し、12,000回転遠沈して沈渣を 1ml の蛍光抗体に約 200 mg の比で加えた。吸着は 0 $^{\circ}$ ~4 $^{\circ}$ C にて12時間行ない、引続いてマウス肝粉による吸着を反覆した後染色を行なつた。

上述の処理を行なつた抗体IIIで乳癌組織を染色すると癌細胞胞体及び細胞間隙の特異蛍光は弱くなつたが殆んどはびまん性蛍光で粒子状のものはつきりしなかつた。

##### 3. 切片標本の固定及び染色法の改良

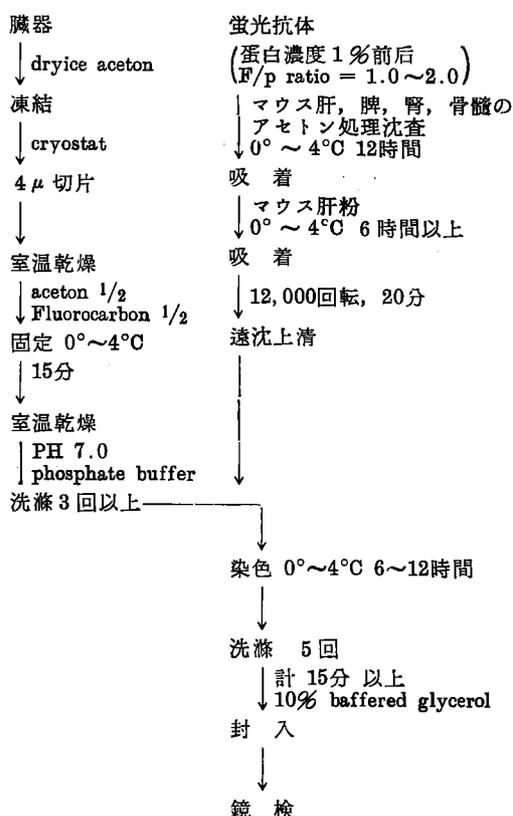
冷メタノール固定冷アセトン固定を行なつて比較したがメタノール固定、では組織全体にびまん性の蛍光が強く、ウイルス抗原の検索には不適であつた。アセトン固定での染色は前述の如くであつたが、固定液に Fluorocarbon を加えると細胞全体のびまん

性蛍光は甚しく減弱し、アセトン対 Fluorocarbon の比が1:1の際最もきれいな標本が得られ、抗体IIIで染色すると、細胞間隙のびまん性蛍光は全く認められなくなり、ウイルス抗原の存在を示す微細な粒子状蛍光が細胞間隙に散在するのが認められ、癌細胞胞体には弱いびまん性蛍光が残存した。但し骨髓塗抹標本では acetone 対 Fluorocarbon の比が1:1のものでは細胞が大半は剥離してしまうため2:1の比とせるものを用いた。上述の特異蛍光は非特異蛍光を極度に除去したものであるが、特異蛍光自体も非常に弱く紫外線照射を続けて行くうちに消滅するものが多かつた。そこで室温30分間染色と云うのを改めて 0 $^{\circ}$ ~4 $^{\circ}$ C にて6~12時間染色してみた。すると細胞間隙の粒子状蛍光はかなり強く鮮明となり蛍光粒子の数も30分染色のものに比し遙かに多数となつた。

##### 4. 直接法改良法による抗体IIIの染色結果

乳癌組織の凍結切片を第3図の如き方法で染色した。特異蛍光は大小の粒子状蛍光として認められ癌細胞周囲及び細胞間隙又は腺腔内に散在しており、癌細胞胞体内には弱いびまん性蛍光が見られ、かか

第3図 直接法染色改良法



る螢光は非癌細胞には認められなかった(写真8)。転移リンパ節では特異螢光粒子は癌腫に比して遙かに少なかったが、細網細胞胞体には粒子状螢光を含有するものが少なからず認められた。脾及び肝においては細網細胞内に粒子状螢光の集団として認められるものが存在した。骨髓においては顆粒球の非特異螢光はも早やみられず、ウイルス抗原の所在を示す特異螢光は認め得なかつた。

#### IV 総括及び考案

ウイルス粒子を宿主細胞構成成分より細胞破壊時に分離することは仲々に困難であつて、methylnalcohol<sup>22)</sup>、Protaminsulfate<sup>23)</sup>を用いたり、filtration又は分画遠沈法<sup>24)</sup>等により分離精製が試みられて来たが、動物ウイルスは植物ウイルスと異なつて甚だ精製しにくいものである。

又一旦ウイルス精製材料が得られても腫瘍ウイルスの如く感染 titer の標準が決め難い材料では超遠沈 Pellet の電顕観察<sup>25)</sup>により精製度を知るしかなく、これとても contaminating virus の混入に対しては全く対抗手段がない。現状では腫瘍ウイルスを最も効果的に分離精製するには分画遠沈法(moloney<sup>26)</sup>)が最良とされているが、本法によつてもウイルス粒子と同時に多量の非ウイルス性蛋白が混入し、後者をウイルス粒子から物理的に分離除去するのは不可能に近い。この非ウイルス性蛋白の除去法として登場したのが Gessler の Fluorocarbon extraction<sup>20)</sup>である。Gessler<sup>27)</sup>によると組織浮游液対 Fluorocarbon の比が1:1乃至1:2の範囲では3回の extraction 操作により3層に分離出来たという。最上層は可溶性非蛋白性物質と核蛋白体であり、中間層は細胞質蛋白と Fluorocarbon の emulsion であり、下層は遊離脂質を溶解せる残余の Fluorocarbon である。Gessler のいう核蛋白体とは形態上はリボソーム又はウイルスの性格を有していた。

以来 Fluorocarbon 法は組織のみではなく細胞浮游液<sup>27)</sup>(28)(29)や、細胞培養液<sup>30)</sup>からのウイルス分離に利用され、ウイルスと中和抗体の Complex からもウイルスを精製出来るという<sup>31)(32)</sup>。ウイルス感染価を extraction の各段階で調べると、3回目迄は上昇し、4回目以後は低下し始めたという<sup>28)(29)(30)</sup>。併し蛋白と Fluorocarbon の emulsion 中には完全な形のウイルスは発見できないから、4回目以後の extraction ではウイルス粒子が次第に核酸とウイルス蛋白とに分解されるらしい。即ち、細胞蛋白を

extraction によつて取除けば除く程ウイルス粒子は分解されて感染価の低下を来すものと思われる。但し、Hamperian<sup>34)</sup>によれば補体結合性ウイルス抗原又は抗補体活性の減少は頻回の Fluorocarbon extraction にも拘らず甚だ軽微であつたという。

Fluorocarbon を用いて腫瘍ウイルスの分離精製を行なつた文献は甚だ少なく、家鶏肉腫<sup>35)(30)</sup>RIII マウス乳癌ウイルス<sup>36)</sup>及び教室の岡田<sup>33)</sup>、小塚<sup>18)</sup>によるマウス白血病ウイルスに関するものがみられるにすぎない。従来マウス乳癌因子に対する抗体を作製し、抗体価を routine の titration で決定するのは非常に難しいとされ<sup>7)(8)(9)(10)</sup>、Brown & Bittner<sup>6)</sup>は中和抗体による発症阻止が最も確実であるが、6ヶ月乃至2年の観察が必要であるため、螢光抗体法により抗体価を測定し、中和実験の結果とよく一致したという。

私は C<sub>3</sub>H 乳癌の Fluorocarbon extract により家兎抗血清を作製し、補体結合反応による抗体価は1:128を示した。extract の蛋白量は micro-kyeldahl 法では測定不能の微量であり、一方電顕的検索の結果は径80~120 $\mu$ の球形粒子が多数認められており、この結果は Stone & Mosre<sup>36)</sup>が RIII マウス乳癌の Fluorocarbon extract の超遠沈ペレットに観察した粒子と同じ所見である。Stoneらは extract による bioassay に成功しており、本法によりウイルス蛋白が変性を来して膜構造等は不明瞭となるが核酸は存在し、感染能を残存すると述べている。

Fluorocarbon extract に含まれる非蛋白性物質の分析は De Carvalho<sup>38)</sup>らによつてなされ、本法でウイルスを含まない細胞を処理すると精製リボソームが得られたという<sup>39)(40)(41)(42)</sup>。更に extract を繰り返すと蛋白反応が陰性となり(即ち 280 m $\mu$ における吸光度が0に近くなる)257~260 m $\mu$ に極大、229~240 m $\mu$ に極小吸光値をもつ purine や pyrimidine 特有の吸収スペクトルが出現した。かかる吸収曲線は正常組織の extract では甚だ低濃度であり、白血病又は腫瘍組織からの extract では数倍の濃度に達したという<sup>40)</sup>。extract を Orcinol 及び diphenylamine 法<sup>43)</sup>で核酸を定量すると高濃度の核酸成分が検出され、RNA と DNA の存在を示す nitrogen 対 phosphorus の比は10:1であり、多量の RNA が存在するといつている<sup>40)</sup>。教室岡田<sup>37)</sup>は AKR 白血病組織の Fluorocarbon extract について吸光値、RNA 量を測定し、Carvalho と同じ結果を得ているし、教室高橋<sup>16)</sup>も C<sub>58</sub> 白血病について追試してい

る。

上述の諸成績は何れも Gessler の Fluorocarbon 法によつて RNA 型腫瘍ウイルスが分離精製出来ることを示しており、粒子の形態変化にも見られる如く extraction を繰り返す程、ウイルス蛋白は破壊され、感染能は低下し、抗原性も失なわれて行くものと考えられる。従つて extraction の回数は Rous sarcoma virus に於ける Epstein<sup>35)</sup> の 5 回、RⅢ マウス乳癌ウイルスにおける Stone & Moore<sup>36)</sup> が同じく 5 回で中止している処から、5 回処理をウイルス抗原を保存するための安全圏と考えた。

次に実験成績についてみると、filtrating method, differential centrifuging method 何れの方法によるものも螢光抗体の組織に対する反応は甚だ強く、且つ特異螢光の主体は臓器特異抗原によつて支配されていることが明瞭である。かかる抗原は正常の同じ組織により吸着せねば除去することは出来ない。従つて肝粉による吸着では種属特異性の一般抗原を除いたにとどまり乳腺組織に対する抗体成分は intact のまま残存する筈である。換言すれば正常乳腺組織により抗体Ⅰ及び抗体Ⅱを十分に吸着せぬ限りウイルス抗原の特異反応を観察することは出来ぬことになり、抗体Ⅰ、Ⅱを用いた私の実験は失敗したというべきである。

次に Fluorocarbon extract を用いた抗体Ⅲによる染色結果では乳腺組織の臓器特異抗原に対する反応は甚だ微弱であり negligible であつたがウイルス抗原の存在を示さねばならない特異螢光も又不明瞭なものであつた。補体結合反応により測定した抗原液対抗血清の titer は 1 : 128 を示したのであるから、Fluorocarbon extract 中に含まれる蛋白に対して充分量の抗体が存在することは確実である。標本上に充分な特異螢光が出現しないのは反応条件が不適当であるためとの考えの下に私は教室小塚<sup>15)</sup>に従つて固定、染色条件、染色法について吟味を行なつた。その結果は直接法改良法<sup>16)</sup>によりウイルス抗原の螢光を明瞭に出現せしめ得たし、又補体法の採用（第 2 編で詳述）によつて一層多数のウイルス抗原を観察し得た。

直接法について考察してみると acetone 固定による標本ではウイルス抗原性が損なわれるのではなく、宿主細胞蛋白がウイルス抗体を覆つてしまい、De Carvalho<sup>30)</sup>によれば Fluorocarbon extract にはリボゾーム蛋白が存在するからこれらの抗体成分によつて細胞抗原が染色される結果、ウイルス抗原の存在

を識別出来なくするものと考えられる。改良法において Fluorocarbon と acetone の等量混合液により固定した場合は Fluorocarbon の脂溶、除蛋白作用により細胞抗原成分は著明に減少し、その結果としてウイルス抗原が非常に反応し易い状態で露出して来るものと考えられる。かかる状態においても 4 $\mu$  の厚さの切片では深部に迄、抗体グロブリンが到達し難いことが考えられ、そのため 6~12 時間の反応時間を与えて充分なる抗原抗体結合を期したのである。直接法改良法において癌細胞胞体にびまん性の弱い特異螢光が見られたのは De Carvalho のリボゾーム蛋白に由来すると考えられ、彼のいう腫瘍特異抗原との関連を考慮せねばならない。即ち、Taylor<sup>42)</sup>、De Carvalho et al<sup>41)</sup>、Mc Kenna et al<sup>44)</sup>らはニワトリ腫瘍、ヒト腫瘍細胞等から Fluorocarbon により腫瘍特異抗原を抽出したといひ、Schwarz et al<sup>45)</sup>もヒト白血病組織より、Whitaker et al<sup>40)</sup>も同様の抗原を観察したといひ、何れもその理由として Fluorocarbon によりリボゾーム蛋白が抽出され、而も腫瘍におけるリボゾーム蛋白は核酸の異常を反射して正常とは異なつたもので腫瘍に特異的であるからというものである。C<sub>3</sub>H 乳癌細胞の胞体内に私の観察したびまん性の抗原は正常乳腺細胞にもみられ、転移リンパ節では少なかつた点より乳腺組織特異性のリボゾーム蛋白である可能性が強いと思われるが、腫瘍特異性抗原の存在を否定することは出来ない。

## V 結 語

C<sub>3</sub>H マウス乳癌のウイルス抗原を螢光抗体法により観察するため、ウイルス抗原の精製法及び螢光抗体法手技の改良を検討した。その結果

1. filtration 及び分画遠沈法によるウイルス抗原の精製は宿主細胞蛋白の混入が著しく、これにより得られた螢光抗体ではウイルス抗原の観察は出来なかつた。

2. Fluorocarbon extraction では宿主細胞蛋白を殆んど完全に除去したウイルス抗原が得られ、これにより得られた螢光抗体によりウイルス抗原の存在を示す特異螢光が観察された。

3. 螢光抗体法直接法では螢光抗体の精製を厳重にし、acetone-fluorocarbon 混合液により標本を固定し、6 時間以上の染色により粒子状のウイルス抗原の螢光が多数、かつ明瞭に観察出来た。

稿を終るに臨み御指導御校閲戴いた恩師平木教授、大藤真教授並びに直接御指導いただいた小塚堯講師に深く感謝致します。

(本論文の要旨は昭和37年10月第21回癌学会総会に於いて発表した)。

## 文

## 献

- 1) Bittner, J. J. : Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*, **84** : 162, 1936.
- 2) Gross, L. : "Spontaneous" leukemia developing in C<sub>3</sub>H mice following inoculation, in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76** : 27, 1951.
- 3) Rous, P. : A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. *J. Exp. Med.*, **14** : 397, 1911.
- 4) Shope, R. E. : *J. Exp. Med.*, **58** : 607, 1933.
- 5) Sweet, B. H. & Hilleman, M. R. : The vacuolating virus, SV 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105** : 420, 1960.
- 6) Brown, E. R. & Bittner, J. J. : Fluorescent antibody reactions against the mouse mammary tumor agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **106** : 303, 1961.
- 7) Hirsch, H. H. et al. : *Cancer Res.*, **18** : 344, 1958.
- 8) Imagawa, D. T. et al. : *Cancer Res.*, **14** : 1, 1954.
- 9) Bittner, J. J. et al. : *Cancer Res.*, **15** : 464, 1955.
- 10) Imagawa, D. T. et al. : *Cancer Res.*, **14** : 8, 1954.
- 11) Bernhard, W. : The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.*, **20** : 712, 1960.
- 12) Amano, S. : Host virus interrelationship in cancerogenesis as observed under the electron microscope. *Progr. Exp. Tumor Res.*, **2** : 36, 1961.
- 13) 小塚堯 : 蛍光抗体法による腫瘍の免疫学的研究。癌の臨床。12巻 6号。1966.
- 14) Hiraki, K. et al. : Immunohistochemical studies on malignant neoplasms by means of FAM. *Proc. 3rd Ann. Meeting Japan. Histochem. Assoc.*, 1960.
- 15) 小塚堯他 : 未刊.
- 16) 高橋喜亮 : 蛍光抗体法によるマウス白血病ウイルスの研究。岡医会誌。6 ; 73, 1966.
- 17) Ichikawa, Y. & Notake, K. : Studies on the intracellular location of SL leukemia virus antigen by fluorescent antibody. *Ann. Report Inst. Virus Res. Kyoto Univ.*, **5** : 103, 1962.
- 18) Friend, C. & Rapp, F. : Intracellular localization of Swiss mouse leukemia virus. *Fed. Proc.*, **21** : 454, 1962.
- 19) Fink, M. A. & Malmgren, R. A. : Fluorescent antibody studies of the viral antigen in a murine leukemia (Rauscher). *J. Nat. Cancer Inst.*, **31** : 1111, 1963.
- 20) Gessler, A. E. et al. : A new and rapid method for isolating viruses by selective Fluorocarbon deproteinization. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **218** : 701, 1956.
- 21) Coons, A. H. : Labeled antigens and antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.*, **8** : 333, 1954.
- 22) Fisher, R. G. : Methylalcohol purification of the rabbit papilloma virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **72** : 323, 1949.
- 23) Warren, J. et al. : Purification of certain viruses by use of Protamin sulphate. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **72** : 662, 1949.
- 24) Quigley, T. T. : Ultrafiltration and ultracentrifugation of Coxackie virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **72** : 434, 1949.
- 25) Palade, G. E. : A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **95** : 285, 1952.
- 26) Moloney, J. B. : Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from Sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J. Nat. Cancer Inst.*, **24** : 933, 1960.
- 27) Gessler, A. E. et al. : Animal viruses isolated by fluorocarbon emulsification. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **18** : 707, 1956.
- 28) Manson, L. A. et al. : Purification of polio virus with fluoro-carbon. *Science*, **125** : 546, 1957.

- 29) Halonen, P. & Huebner, R.J. : ECHO and poliomyelitis virus antisera prepared in guinea pigs with fluorocarbon treated culture antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 105: 46, 1960.
- 30) Bryan, W.R. & Moloney, J.B. : Rous sarcoma virus. The purification problem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 68: 441, 1957.
- 31) Girardi, A.J. : The use of fluorocarbon for unmasking polyoma-virus hemagglutination. *Virology*, 9: 488, 1959.
- 32) Hummeler, K. & Ketiler, A. : Dissociation of poliomyelitis virus from neutralizing antibody. *Virology*. 6: 297, 1958.
- 33) Hummeler, K. & Hamparian, V. : Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by fluorocarbon. *Science*, 125: 547, 1958.
- 34) Hamparian, V. et al. : Elimination of non-specific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 80: 468, 1958.
- 35) Epstein, M.A. : Observations of the Rous virus purification and identification of the particles from solid tumors. *Brit. J. Cancer*, 12: 363, 1958.
- 36) Stone, R.S. & Moore, D.H. : Purification of the mouse mammary carcinoma agent by means of a fluorocarbon. *Nature*, 183: 1275, 1959.
- 37) 岡田耕一: Fluorocarbon によるハツカネズミ白血病ウイルス分離に関する研究. *医学と生物学*. 64: 32, 1912.
- 38) De Carvalho, S. : Biological properties of a nucleic acid rich fraction from human leukemic and tumor cells. *Proc. Int. Congress Intern. Soc. Hematol.*, 7th, Rome, 1958, Pp 523.
- 39) De Carvalho, S. : Cytopathogenicity of RNA rich particles from human leukemic and tumor cells for primary culture of human amniotic cells. In "Canadian Cancer conference" Vol. 3, Pp 329, 1959, Academic Press, N. Y.
- 40) De Carvalho, S. et al. : Biologic properties of human leukemic and tumoral RNA. III. the effect of different media on the cytopathogenicity in tissue culture. *J. Lab. & Clin. Med.*, 55: 694, 1960.
- 41) De Carvalho, S. & Rand, H. J. : Comparative effects of liver and tumor RNA on the normal liver and the Novikoff hepatoma cells of the rat. *Nature*, 189: 815, 1962.
- 42) Taylor, A. : Fraction studies of tumor tissues from germ-free chickens. *Anu. N. Y. Acad. Sci.*, 78: 354, 1959.
- 43) Schneider, W.C. : Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis in Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., *Methods in enzymology*. New York, 1957, Academic Press, Vol. 3, Pp680.
- 44) Mc Kenna, J.H. et al. : Extraction of distinctive antigens from neoplastic tissue. *Science*, 135: 370, 1962.
- 45) Schwarz, O. et al. : Immunologically specific antigens in leukemic tissues. *Blood*, 21: 717, 1963.
- 46) Whitaker, J.A. et al. : *Cancer Res.*, 23: 519, 1967.

## Immunofluorescent Studies on Viral Antigens of the Mammary Cancer in C<sub>3</sub>H Mice.

### I. Purification Study of Viral Antigens in C<sub>3</sub>H Mouse Mammary Cancer and its Evaluation by Direct Immunofluorescent Staining.

By

Tōru. MAKIHATA

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School, Okayama, Japan (Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Virus preparations were obtained from mammary tumors which developed spontaneously in C<sub>3</sub>H mice by three different methods; 1) filtration through Berkefeld-N or Chamberland L<sub>3</sub> filters, 2) differential centrifugations, and 3) fluorocarbon extraction. Each virus preparation was used for immunizing rabbits, and was then evaluated for the degree of purification of the viral antigens by direct immunofluorescent staining. Following results were obtained:

1. The fluorocarbon extractin method was more excellent for the purification of mammary cancer virus than filtration or differential centrifugation method.

2. Staining procedure of the direct immunofluorescence was improved as follows; frozen sections were fixed with cold acetone-fluorocarbon mixture instead of cold acetone, and duration of staining was prolonged over six hours in a cold moist chamber. As a result it was possible to observe clearer and more numerous fluorescence than by the direct staining of Coons' original procedure.

---

巻 幀 論 文 附 図

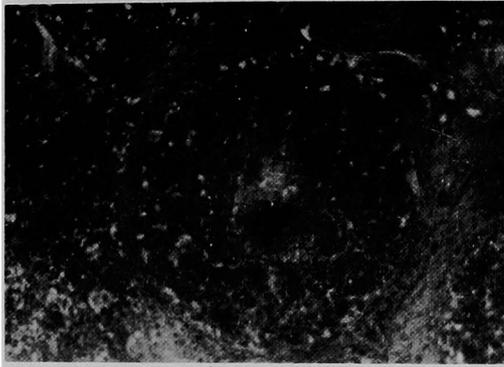


写真1 C<sub>3</sub>H 乳癌組織対抗体 I 100倍

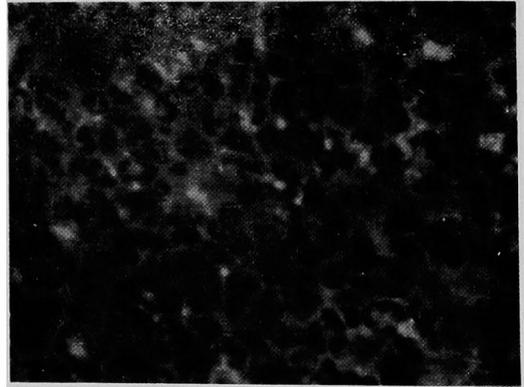


写真2 C<sub>3</sub>H 乳癌組織対抗体 I 400倍



写真3 C<sub>3</sub>H マウス正常乳腺組織対抗体 I  
100倍

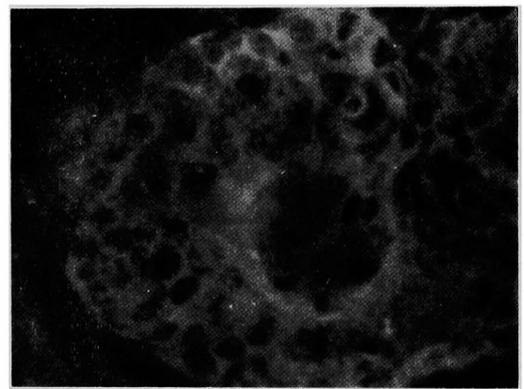


写真4 C<sub>3</sub>H マウス正常乳腺組織対抗体 I  
400倍



## 卷 幡 論 文 附 図

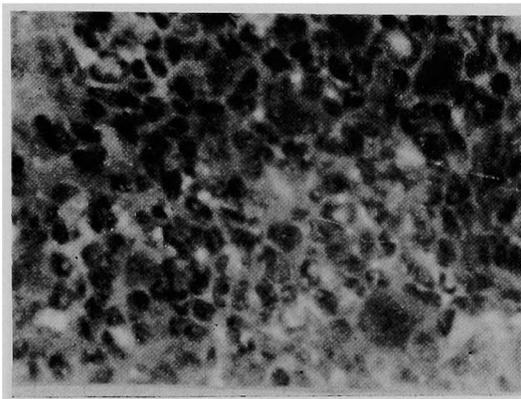


写真5 C<sub>3</sub>H 乳癌転移リンパ節対抗体Ⅲ  
400倍

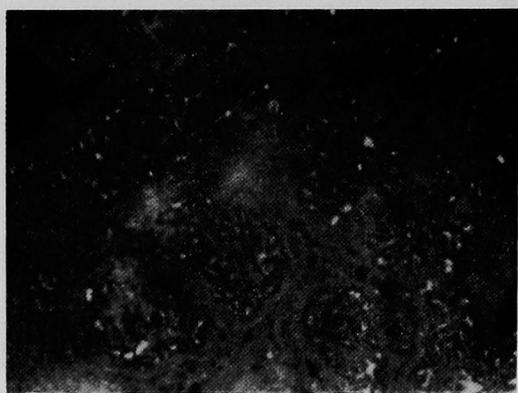


写真6 C<sub>3</sub>H 乳癌組織対抗体Ⅲ 100倍

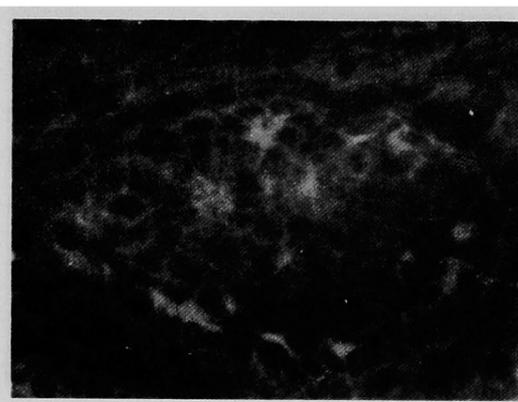


写真7 C<sub>3</sub>H 乳癌組織対抗体Ⅲ 400倍



写真8 C<sub>3</sub>H 乳癌組織対抗体Ⅲ 直接法  
改良法 400倍