

# 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 2 編

### C<sub>3</sub>H マウスにおける乳癌ウイルス抗原の蛍光抗体法補体法による観察

岡山大学医学部 平木内科

副 手 巻 幡 徹

〔昭和42年12月12日受稿〕

## 目 次

I 緒 言	較
II 実験材料及び実験方法	B 補体法による乳癌ウイルス抗原の C <sub>3</sub> H 原発乳癌マウスにおける分布の観察
A 実験材料	1. 乳癌組織
B 抗ウイルス血清の作製	2. 転移リンパ節
C 補体法の準備	3. その他の臓器
1. 補体の採取	C C <sub>3</sub> H 正常授乳期マウスにおけるウイルス 抗原の検索
2. 抗補体家兎血清の作製	D 移植乳癌マウスにおけるウイルス抗原の 検索
3. 抗補体蛍光抗体の調整	E C <sub>3</sub> H マウスの乳癌ウイルス抗原と C <sub>58</sub> 及 び AKR マウスの白血病ウイルス抗原 との交叉反応の有無について
D 補体法の実施	IV 総括及び考案
E 特異蛍光の判定	V 結 語
F 蛍光装置	VI 全編の総括
III 実験成績	
A 蛍光抗体法直接法及び補体法による特異 蛍光の比較	
1. 直接法による特異蛍光	
2. 補体法による特異蛍光	
3. 直接法及び補体法による特異蛍光の比	

## I 緒 言

C<sub>3</sub>H マウス乳癌は 1936年 Bittner<sup>1)</sup> によつて母乳による乳癌発生因子の伝達が明らかにされ、爾来ニワトリ肉腫<sup>2)</sup>、ウサグ乳頭腫<sup>3)</sup>、と共に動物腫瘍ウイルスの1つとして知られて来た。併し乍らウイルス感染と腫瘍発生、或いは抗体産生の問題は未だ充分には明らかにされていない。

一般に近代腫瘍ウイルス学においては腫瘍より直接にウイルスを分離し、その癌源性を証明する方法として組織培養細胞への感染による transformation の事実が要求されるが、マウス乳癌ウイルスについてのかかる試みは全て失敗している。更に間接

的にウイルスによる発癌を確める方法として hetero の中和抗体による中和実験は、C<sub>3</sub>H 乳癌においても常に成功するかが6~24ヶ月の長い観察期間を必要とする<sup>4)</sup>。又 auto の中和抗体の存在は未だ認められていない<sup>5)</sup> ため、ウイルスの増殖と発癌の関係は全く不明である。最近アデノ 12, 18型ウイルス<sup>6)</sup>、SV40 ウイルス<sup>7)</sup>及びニワトリ肉腫ウイルス<sup>8)</sup>による腫瘍において、感染性ウイルスが出現する以前に腫瘍細胞に入りこんだウイルスゲノムの影響によつて補体結合抗原が形成され、その結果血清中に補体結合抗体が証明されることが明らかとなつた。この現象はマウス乳癌ウイルスについては知られていないが、発癌以前のウイルス感染の事実を知るために有

望な1方法と思われる。

前述の如く hetero の抗乳癌ウイルス血清による中和実験は可能であるが、抗血清の作製は容易ではなく抗体価の決定には失敗した報告が多い (Hirsch et al. 1958<sup>9)</sup>, Imagawa et al. 1954<sup>10)</sup>, Bittner et al. 1954<sup>11)</sup>). 私は第1編において腫瘍の Fluorocarbon extract に対する抗体を作つて螢光抗体法によりウイルス抗原の所在を明らかにしたが本編では Goldwasser<sup>12)</sup> の螢光抗体法補体法により一層鋭敏にウイルス抗原を捕捉し、原発乳癌、又は移植乳癌におけるウイルス抗原の比較を行なつたのでその結果を報告する。

II 実験材料及び実験方法

A 実験材料

ウイルス材料は第1編II A に用いたものと同様、C<sub>3</sub>H マウスに原発せる乳癌腫瘍を用いた。

B 抗ウイルス血清の精製

第1編II, A に詳述せる如く、Fluorocarbon 処理法によりウイルス抗原を精製し、これを家兔に免疫して抗血清を採取した。

C 補体法の準備

1. 補体の採取

補体活性の最も高いモルモット血清グロブリンを使用した。即ち、成熟モルモット 10 匹より血清 50 ml を採取し、第1編II, C で述べた半飽和硫安沈降法によりグロブリン分画を粗製し、生食水で充分透析を行なつた。

2. 抗補体家兔血清の作製

石田ら<sup>13)</sup>の記述に従つて、モルモットグロブリン液を 2~4% とし、合計 80mg 蛋白量を静注により免疫した。即ち、1週間 4 回の静注とし、1 回の注射蛋白量は第1週 8mg, 第2週 4mg, 第3週 10mg とし、最終注射から 5 日目に試験採血し、抗体価を測定すると補体結合反応で 1:64 以上を示したので 7 日目に全採血し、約 40ml の抗補体血清を得た。

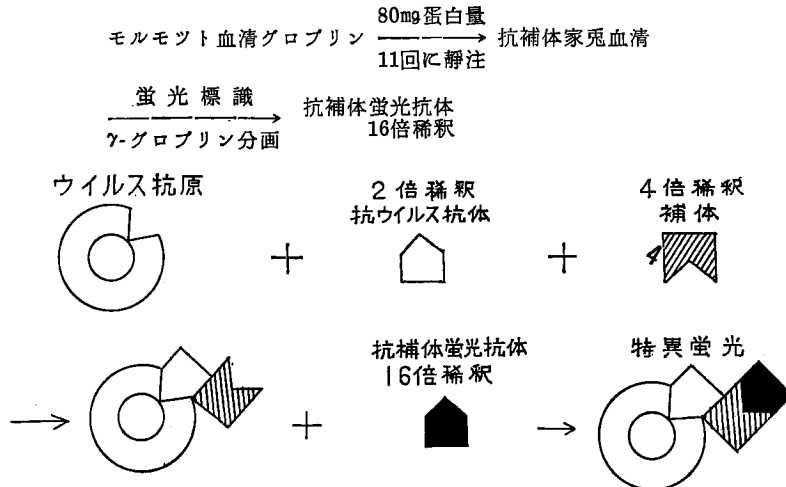
3. 抗補体螢光抗体の調整

免疫家兔血清における抗補体成分は  $\gamma$ -グロブリン分画に存在することが知られている (石田<sup>13)</sup>)。このため抗補体血清より 1/3 飽和硫安沈降法により  $\gamma$ -グロブリンを粗製した。本法が第1編II, C に述べた半飽和硫安法と異なる点は血清量の 1/2 の飽和硫安を加えることであり、他は全く同様の操作により  $\gamma$ -グロブリン分画を得た。 $\gamma$ -グロブリンへの螢光標識は第1編II, C と全く同様にして行ない、遊離色素の透析及び DEAE-Cellulose 通過も同様にして行なつた。

D 補体法の実施

家兔  $\gamma$ -グロブリンの抗補体価は前述の如く 64 倍以上であつたから、4 単位において反応せしめることを目的し、最終稀釈度 16 倍として染色を行なつた。先づ抗補体螢光抗体を pH 7.2 磷酸緩衝生食液にて 4 倍に稀釈し、蛋白 10mg 当り 100mg のマウス肝粉を加えて室温で 2 時間吸着し、12,000 rpm 20 分の遠沈上清を更に 4 倍に稀釈した。抗ウイルス血清は 2 倍に稀釈し、モルモット血清は 4 倍に稀釈し、同様にしてマウス肝粉による吸着を行なつた。染色

第 1 図



は先づ2倍稀釈の抗ウイルス血清及び8倍稀釈のモルモット血清を等量混合して標本上に滴下し、30分放置せる後緩衝液で充分洗滌し、16倍稀釈の抗補体蛍光抗体にて30分染色し、而る後充分な洗滌を行なつた。

**E 特異蛍光の判定**

抗ウイルス血清の替りに正常家兎血清を使用し、又はモルモット血清を使用しないで染色を行ない、その結果を比較して特異蛍光を判定した。

**F 蛍光装置**

千代田高輝水銀燈を使用し、暗視野コンデンサーを装着し、主としてBV励起法により観察した。

**III 実験成績**

**A 蛍光抗体法直接法及び補体法による特異蛍光の比較**

**1. 直接法 (抗ウイルス蛍光抗体) による特異蛍光**

C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織を抗ウイルス蛍光抗体で染色した際の特異蛍光は、第1編で詳述した如く、癌組織の細胞間隙及び腺腔内に強い粒子状蛍光となつて出現し、癌細胞内には粒子状のものはみられないが、胞体は弱いびまん性の特異蛍光を呈した (写真1)。上記蛍光は蛍光抗体を予めウイルス抗原液で block することにより全く出現しなくなり、従つてウイルス抗原の所在を示すものであると思われた。

**2. 補体法 (抗ウイルス血清+補体+抗補体蛍光抗体) による特異蛍光 (第1図)**

補体法で染色した C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織の切片においては特異蛍光は非常に弱く、弱拡大の観察では細胞間隙に微弱な蛍光を認めるにすぎなかつた。しかしながら強拡大で観察すると癌細胞の細胞膜内面及び外面、細胞間隙及び腺腔内に夥しい数の微細粒子状蛍光が観察され、癌細胞胞体内の核に近い部分には全く蛍光を認めなかつた (写真2)。

**3. 直接法及び補体法による特異蛍光の比較**

Fluorocarbon 処理法によるウイルス抗原に対する抗血清を用いて、直接法により C<sub>3</sub>H 乳癌組織を染色した結果、細胞間隙及び腺腔内に微細な粒子状蛍光が多数出現し、癌細胞胞体にはびまん性の弱い特異蛍光が認められた。補体法により染色すると癌細胞の細胞膜内外に微細な蛍光粒子が配列し、更に細胞間隙及び腺腔内には無数の粒子状特異蛍光が出現したが、癌細胞胞体内の瀰漫性蛍光は認められなかつた。

上記直接法による特異蛍光は予め蛍光抗体を乳癌の Fluorocarbon extract で吸着することにより完全に block され、正常マウス肝、脾の Fluorocarbon extract によつては block されないところから乳癌組織に特異的に含まれる抗原であることは明らかであり、蛍光粒子の分布及び形態よりしてウイルス抗原であると考えてよい。又補体法においても、対照標本にはかかる粒子状蛍光はみられず、更に直接法における特異蛍光の分布に大体一致している事より、上記特異蛍光はウイルス抗原の所在を示すものと考えてよさそうである。但し両者を比較すると粒子の数に相当な差がみられたが、この点は補体法の反応が非常に鋭敏であることで説明出来る。

**B 補体法による乳癌ウイルス抗原の C<sub>3</sub>H 原発乳癌マウスに於ける分布の観察 (第1表)**

第1表 C<sub>3</sub>H マウス乳癌ウイルス抗原の臓器分布 (補体法による)

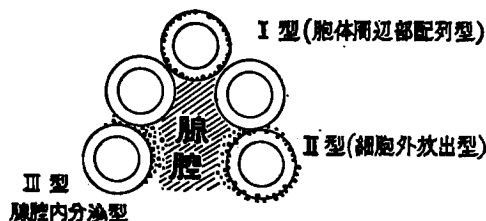
	乳癌マウス	正常マウス
乳 腺 腫 瘍	I型+, II型++, III型++,	
転移リンパ腺	I型+, II型±, III型±,	
脾	+ Inclusion body	—
肝	—	—
骨 髄	—	—
腎	—	—
肺	—	—
脳	—	—
正 常 乳 腺	—	—

注. (—): 非特異的の蛍光のみ, (±): 腫瘍細胞の0.1%以下, (+): 同1%以下, (++) : 同1~5%, (+++): 同5%以上.

**1. 乳癌組織**

乳癌組織におけるウウイルス抗原の分布を癌細胞及び腺腔との関連から次の如き3型に大別した (第2図)。即ち第1型は少数のウイルス抗原が癌細胞

第2図 C<sub>3</sub>H マウス乳癌ウイルス抗原の細胞内分布



の細胞膜内側に連っているもので胞体周辺部配列型と名付けた(写真2)。第II型は多数のウイルス抗原が癌細胞の細胞膜内外に群がっているもので細胞外放出型と名付けた(写真3)。第III型は夥しい数のウイルス抗原が細胞膜に附着し、更に細胞間隙及び腺腔内にあたかも秋空に天の河をみる如く認められるもので分泌型と名付けた(写真3)。更に乳癌組織内で残存する乳腺組織や結合織においては細胞間隙に極少数のウイルス抗原が認められ、細網細胞胞体内では大小の塊状となつてウイルス抗原が充満するのが認められた(写真4)。

## 2. 転移リンパ節

癌転移リンパ節内において癌細胞集団が腺腔を形成するものは少なく、又細胞間隙及び腺腔内のウイルス抗原量も原発腫瘍に比して非常に少量であつた。従つてII型及びIII型は極く稀に認められたにすぎない。組織の大半は圧迫されたリンパ組織とこの中に結合織を伴つてびまん性に浸潤する癌細胞胞体内においてI型の配列を示すウイルス抗原含有細胞が少数認められた(写真5)。リンパ節における細網細胞内には稀に Inclusion 様の特異蛍光がみられたが原発腫瘍におけるが如き多量のウイルスの抗原を含有するものはみられなかつた。

## 3. その他の臓器

脾においては結合織内の細網細胞胞体に Inclusion 様の特異蛍光を有するものが稀に認められ、他の部分には特異蛍光を認められなかつた。肝について検索した組織では癌転移は認められず、又星状細胞、円形細胞等にも特異蛍光は認められなかつた。骨髄、腎、肺、脳においても組織学的な変化はみられず、又特異蛍光は認められなかつた。

## C C<sub>3</sub>H 正常授乳期マウスにおけるウイルス抗原の検索

授乳期 C<sub>3</sub>H マウスの乳腺組織を補体法で検索したが、特異蛍光は全く認められなかつた。肝、脾、腎、肺、脳及び骨髄においても特異蛍光はみられなかつた。

## D 移植乳癌マウスにおけるウイルス抗原の検索

C<sub>3</sub>H 原発乳癌腫瘍の小片を同系成熟マウスの背部皮下に移植し、移植後24時間より30日までの各臓器について、蛍光抗体法補体法によりウイルス抗原の分布を検索した(第2表)。

1. 移植部腫瘍は移植後4日目まで触知し得るが、それ以後は触知し得ず、ウイルス抗原は移植後24時間の移植された組織内に主として細胞間隙に少数認

められたが、48時間以後ではウイルス抗原の所在を示す特異蛍光は認められなかつた。

2. 移植後4日目より7日目までの乳腺、肝、脾、後腹膜リンパ節には特異蛍光を認めなかつたが、第8日目となつてやや腫大せる後腹膜リンパ節の組織において、第I型の分布を示すウイルス抗原を含有する細胞が少数認められた。連続切片により組織学的検索を行なうと、多数の異型細胞が異所性増殖をせる部分が認められ、癌細胞が確認された。

3. 乳腺においては移植後15日迄は特異蛍光は認められず、20日に検索した乳腺はすでに腫瘍を形成し、その組織には主として第I型、第II型の分布を示すウイルス抗原が全細胞の0.5~1%において認められた。移植後20日目の後腹膜リンパ節は大きく腫大せるもウイルス抗原は主にI型のものが0.5%程度みられたにすぎず、肝、脾においては特異蛍光を認められなかつた。

4. 第25日目には乳腺腫瘍は大きく発達し、組織内には原発腫瘍にみられたのと同じ分布を示すウイルス抗原が認められたが、その量は著しく少なく細胞膜内外に特異蛍光を有する細胞は全細胞の1~5%にすぎなかつた。

5. 移植25日目では鼠径リンパ節の腫大がみられ、この部の組織では第I型の分布を示すウイルス抗原が極く稀に認められた。

6. 移植後30日目には乳癌は径1cm以上に腫大し、後腹膜リンパ節、腋窩リンパ節等の転移巣と共に各型の分布状態のウイルス抗原がみられたが、何れも原発乳癌におけるものより著明なウイルス抗原の減少がみられた。

## E C<sub>3</sub>H マウスの乳癌ウイルス抗原と C<sub>58</sub> 及び AKR マウスの白血病ウイルス抗原との交叉反応の有無について

C<sub>3</sub>H 原発乳癌の Fluorocarbon 法による抗乳癌ウイルス血清を用いて蛍光抗体法補体法により C<sub>58</sub> 及び AKR の自然発生リンパ性白血病マウスの白血病組織及び C<sub>58</sub> マウスの継代移植骨髄性白血病株の白血病組織を染色した。その結果何れの組織においても特異蛍光を認めなかつた。

次に教室高橋の作製せる抗 AKR 白血病ウイルス血清、抗 C<sub>58</sub> 白血病ウイルス血清を用いて C<sub>3</sub>H 原発乳癌組織を補体法により染色した。

その結果、何れの抗血清を用いてもウイルス抗原の所在を示す特異蛍光は得られなかつた。以上の結果、C<sub>3</sub>H 乳癌ウイルス抗原と、AKR 白血病ウイル

第2表 C<sub>3</sub>H 乳癌細胞移植による発症と  
ウイルス抗原の関係  
(蛍光抗体法補体法による)

経過日数	正常 マウス	移植 後 24 時間	同 48 時 間	同 4 日	同 10 日	同 15 日	同 20 日	同 25 日	同 30 日
背部皮下 移植部位	/	±	-	-	/	/	/	/	/
乳腺→腫瘍	-	-	-	-	-	-	+	+	+
後腹膜 淋巴節	-	-	-	-	+	+	+	+	+
全身淋巴節	/	/	/	/	/	/	/	±	+
脾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝	-	-	-	-	-	-	-	-	-

/ : 検索し得ず      - : 非特異蛍光のみ  
± : 0.1% 以下      + : 1% 以下  
+ : 1~5%

ス抗原及び C<sub>58</sub> 白血病ウイルス抗原とは全く交叉反応を示さず異種のウイルスであることが明らかとなつた。

#### IV 総括及び考按

Coons による蛍光抗体法<sup>14)</sup>は抗原と蛍光標識抗体を直接に反応させる直接法と抗原抗体の結合体に蛍光標識抗体を反応させる間接法とが従来広く用いられて来た。間接法は不完全抗体の証明に使う Coombs 法を蛍光抗体法に応用したもので、Coons<sup>14)</sup>によればその反応感度は直接法の約30倍以上にも達するという。一方補体法は Goldwasser<sup>12)</sup>により初め補体染色法として発表されたが、その蛍光抗体法への応用には否定的な意見もあり、Beutner<sup>15)</sup>も綜説中に非特異的反応が強いと述べている。しかしながら日沼<sup>16)17)</sup>によればウイルス抗原対  $\gamma$ -globulin 系の反応においては適当に抗体稀釈を行なえば、間接法と補体法の間で反応の特異性に関しては全く差がないという。而も抗ウイルス血清の要求量は間接法が補体法の16倍にも達し、又蛍光標識抗体の量も間接法では補体法の4倍を要するという。同じく日沼<sup>18)</sup>によれば Sendai virus 抗原のL細胞内検出数は、補体法の方が間接法の約2倍に達し、遙かに抗原検出感度が高いと考えられ、ニワトリ赤血球に吸着した Sendaivirus 抗原の蛍光粒子数は電顕観察による物理的粒子数に殆んど一致したという。

即ち、補体結合抗体が主役をなすウイルス抗原に関しては補体法は非常に高感度で以て抗原検出が出来るし、その反応特異性にも異議がない様に思われる。

以上の特性を利用して、私はマウス乳癌ウイルス抗原に対して補体染色法を応用した結果、第1編で行なつた直接法染色と比較して遙かに鋭敏な抗原検出能が得られ、結果は満足すべきものであつた。C<sub>3</sub>H 乳癌ウイルス抗原と抗ウイルス血清との反応における直接法、補体法の染色結果の差は、先づ第一に補体法では抗ウイルス血清を4倍に稀釈したにもかかわらず抗原検出能は甚だ高く直接法より遙かに多数の蛍光粒子が観察されたことであり、而も1ヶ1ヶの蛍光粒子が明瞭に区別出来るため、その存在場所と細胞との関係を明確にし得たことである。第二の点は直接法で観察された癌細胞胞体のびまん性特異蛍光は補体法では観察されなかつたことである。上記特異蛍光の内、細胞間隙及び細胞膜内外にみられた粒子状蛍光はその存在場所及び形態が教室太田が電顕により観察したウイルス粒子の分布とよく一致しており、粒子としてのウイルス抗原の所在を示すものと考えてよさそうである。

次にびまん性特異蛍光を呈した抗原については二通りの解釈が挙げられる。即ち第一はこの抗原はウイルス抗原のうち、抗補体活性をもたない抗原ではないかということであり、第二に Fluorocarbon 処理液に非ウイルス性の腫瘍特異抗原が含まれ、補体結合に関与しないのではないかという点である。第一の疑問に対しては Influenza virus におけるS抗原の如きものに analogy が求められるが、マウス乳癌ウイルスにおいてかかる抗原の存在は確認されていない。但し、Brown 及び Bittner<sup>19)</sup>によればマウス乳癌因子に対する抗体の抗補体価は甚だ不安定であつて、中和実験による抗体量の測定値と決して一致しないと述べており、非補体結合性抗体の存在を示唆するものともいえよう。

第二の疑問に対しては既に第1編において考察せる如く、リボゾーム蛋白に由来するものである可能性があり、De Carvalho<sup>20)</sup> Taylor<sup>21)</sup> McKenna et al<sup>22)</sup> 及び Schwarz et al<sup>23)</sup> らのいう腫瘍特異抗原との関連を考慮せねばならない。併し乍ら、これら腫瘍特異抗原の多くは補体結合活性であつて私の実験結果はやや合致しない。結局私の実験結果から断定は許されないが、補体結合非活性の乳癌ウイルス抗原の存在が疑われる様であり、リボゾーム蛋白と密接な

関連を有するものかも知れない。

次に C<sub>3</sub>H 乳癌マウスにおける乳癌ウイルス抗原の分布に関する実験結果は、粒子状蛍光に関する限り、従来電子顕微鏡により観察された乳癌ウイルス粒子の分布とよく合致しており、天野<sup>26)</sup>のいう膜面増殖説をも裏付ける結果となつた。他の腫瘍ウイルス抗原の細胞内分布をみると Shope の Papilloma<sup>25)</sup> Polyoma<sup>26)</sup> SV<sub>40</sub><sup>27)</sup> 等の DNA ウイルス抗原は核内に認められており、RNA ウイルスである Rous 肉腫ウイルス<sup>28)</sup>では胞体内にびまん性に存在し、一部は核内に核小体様の蛍光として捉えられている。マウス由来の RNA 腫瘍ウイルスである乳癌ウイルス及び白血病ウイルスではウイルス抗原の所在を明確にしし得たものはなかつたが、最近教室の小塚<sup>29)</sup>及び高橋<sup>30)</sup>は AKR 及び C<sub>58</sub> マウス白血病ウイルス抗原を蛍光抗体法により細胞間隙及び白血病細胞内に捉えており、又 Fink & Malmgren<sup>31)</sup>は Rauscher 白血病ウイルス抗原を白血病細胞の核及び胞体内に認めたという。Fink らの観察では電顕で無数に観察される細胞間隙のウイルス粒子には特異蛍光を認めておらず、従つてウイルス蛋白に由来する特異抗原であるか否かは疑わしく、むしろ腫瘍特異抗原としての性格を有する如く思われる。Friend ら<sup>32)</sup>も Swiss マウス白血病ウイルス抗原を核内に認めたというが、ウイルス粒子との関係は全く明らかにされていない。これに対し、教室小塚<sup>29)</sup>及び高橋<sup>30)</sup>の観察した白血病ウイルス抗原の蛍光は粒子状であつて、細胞間隙における分布は電顕によるウイルス粒子の分布とよく一致していた。彼らの用いた抗白血病ウイルス蛍光抗体を用いて C<sub>3</sub>H 乳癌組織を染色した結果は全く特異蛍光を認めず、白血病ウイルスと乳癌ウイルスとは全く抗原性の異なることが明らかとなつた。

教室小塚<sup>29)</sup>はマウス腫瘍ウイルスを抗原性によつて乳癌ウイルス群と白血病ウイルス群とに分ち、前者は形態上 B 型粒子に属し、後者は O 型粒子であり、かつ両群の間に共通抗原性は認められないというが、私の実験結果もこれを支持するものであつた。

## V 結 語

C<sub>3</sub>H マウス乳癌のウイルス抗原を蛍光抗体法補体法により観察し、直接法による染色結果と比較し、かつ C<sub>3</sub>H 乳癌マウスにおけるウイルス抗原の分布を明らかにした。

1. 乳癌ウイルス抗原の所在を示す粒子状蛍光は

補体法によつて直接法より一層明瞭、かつ多数検出可能であつた。

2. 直接法による染色では乳癌細胞胞体にびまん性特異蛍光がみられ、補体法ではかかる蛍光は見られず、これは補体結合非活性の抗原の存在によるものと考えられた。

3. 乳癌組織ではウイルス抗原は主に細胞間隙及び腺腔内に存在し、癌細胞の細胞膜内外に多数配列するものが認められ、核内及び核周には認められなかつた。

4. 乳癌マウスの転移リンパ節ではウイルス抗原は少数で主に細胞間隙及び細網細胞内に認められ、脾細網細胞内にも Inclusion としての特異蛍光がみられた。腎・肺・脳及び骨髄では特異蛍光を認められなかつた。

5. 正常 C<sub>3</sub>H マウスの各臓器及び授乳期 C<sub>3</sub>H マウスの乳腺組織には特異蛍光は見られなかつた。

6. 移植乳癌におけるウイルス抗原量は原発乳癌に比し非常に少なく、細胞移植後48時間してウイルス抗原は移植部位より消失し、10日目に後腹膜リンパ節に出現し、乳腺においては20日目に初めてウイルス抗原が出現した。

7. C<sub>3</sub>H 乳癌ウイルス抗原と AKR 白血病ウイルス抗原、又は C<sub>58</sub> 白血病ウイルス抗原との交叉免疫反応は認められなかつた。

## VI 全 編 の 総 括

C<sub>3</sub>H マウスに自然発生する乳癌は milk を介して伝播するウイルス性腫瘍であることが早くから知られているが、ウイルスの感染、増殖及び発病、更には抗体産生の諸機構については殆んど知られていない。これは乳癌ウイルスの培養増殖が困難であつて感染ウイルス量の正確な定量法がないこと、及び中和抗体の測定が routine の沈降反応補体結合反応等では正確を期し難いこと等の理由による。マウス乳癌のウイルス抗原を蛍光抗体法によつて観察した記録はなく、僅かに Brown & Bittner が中和抗体量の測定法として蛍光抗体法を利用したにすぎず、ウイルス抗原の分布を明らかにした者はいない。

私は乳癌ウイルス抗原の分布を蛍光抗体法によつて明らかにせんとし、先づウイルス抗原の精製法を検討し、蛍光標識抗体の染色結果によつてウイルス精製効果を吟味した。その結果、Chamberland 及び Berkefeld-N 濾過管通過法及び分画遠沈法で得られたウイルス抗原液には多量の宿主細胞蛋白が混入し、

このため蛍光抗体法では細胞蛋白による蛍光に覆われてウイルス抗原の蛍光は識別出来なかつた。これに対し Fluorocarbon 処理法によるウイルス抗原液では細胞蛋白成分は充分除去される結果、蛍光抗体法ではウイルス抗原の所在を示す蛍光が認め得る様になつた。更に蛍光抗体の精製を充分に行ない標本の固定染色条件を改良した結果、ウイルス抗原は粒子状の蛍光として乳癌組織の細胞間隙に無数に出現した。

第2編では乳癌ウイルスの補体結合性を利用して蛍光抗体抗補体法によりウイルス抗原の分布を詳細に観察し、更に移植乳癌におけるウイルス抗原の消長と乳癌発生との関係を追求した。その結果、抗ウイルス血清補体及び蛍光標識抗補体の系において充分、且つ適当な稀釈を行なつた際は蛍光抗体法における非特異蛍光は殆んど除去出来るのに対し、ウイルス抗原の検出感度は直接法より遙かに高く、その特異蛍光は明瞭に観察出来るものであつた。本法により自然発生乳癌マウスにおける乳癌ウイルス抗原の分布をみると乳癌組織においては細胞間隙及び腺腔内に最も多く、次いで癌細胞表面に多数みられ、

細胞膜内部にも認められた。

転移リンパ節では細胞間隙には少数であつて癌細胞膜内外にやや多く、脾では細網細胞内に認められたが、肝、腎、肺、脳等ではウイルス抗原と断定し得るものは認められなかつた。更に正常授乳期マウスの乳腺及び諸臓器においてもウイルス抗原は認め得なかつた。同系マウスに細胞移植せる際はウイルス抗原は一旦消失した後、10日目に後腹膜リンパ節に出現し、乳腺においては20日目に初めて認められ、且つ腫瘍発育後もウイルス抗原量は自然発生乳癌に比し甚だ少数であつた。次に他系統マウスの腫瘍ウイルスとの間の交叉免疫反応を検するに AKR 及び C<sub>57</sub> マウスの白血病ウイルスとは交叉反応を示さず、全く異種のウイルスであることが判明した。

稿を終るに臨み御指導御校閲戴いた恩師平木潔教授、大藤真教授並びに直接御指導いただいた小塚堯前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) Rous, P. : A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. *J. Exp. Med.*, **14** : 397, 1911.
- 3) Shope, R. E. : *J. Exp. Med.*, **58** : 607, 1933.
- 4) Brown, E. R. & Bittner, J. J. : Fluorescent antibody reactions against the mouse mammary tumor agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **106** : 303, 1961.
- 5) Rowe, R. P. : A survey of the tumor virus problem from an epidemiologic stand point. *Cancer Res.*, **25** : 1277, 1963.
- 6) Heubner, R. J. et al. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50** : 397, 1963.
- 7) Black, P. H. et al. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50** : 1148, 1963.
- 8) Huebner, R. J. et al. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51** : 742, 1964.
- 9) Hirsch, H. H. et al. : *Cancer Res.*, **18** : 344, 1958.
- 10) Imagawa, D. T. et al. : *Cancer Res.*, **14** : 1, 1954.
- 11) Bittner, J. J. et al. : *Cancer Res.*, **15** : 464, 1955.
- 12) Goldwasser, R. A. & Shepard, C. C. : Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedure. *J. Immunol.*, **80** : 120, 1958.
- 13) 石田名香雄 : 蛍光抗体法の実際一補体法を中心として一, *臨床病理*, **9** : 470, 1961.
- 14) Coons, A. H. : Labeled antigens and antibodies. *Anu. Rve. Microbiol.*, **8** : 333, 1954.
- 15) Beutner, E. H. : Immunofluorescent staining. The fluorescent antibody method. *Bakt. Rev.*, **26** : 49, 1916.
- 16) Hinuma, Y. & Hummeler, K. : Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis. III. Intracellular development of specific antigen. *J. Immunol.*, **87** : 367, 1961.
- 17) Hinuma Y. et al. : Evaluation of the com-

- plement method of fluorescent antibody procedure with myxovirus. *J. Immunol.*, in print.
- 18) 日沼頼夫, 他: 蛍光抗体法補体法による *Dara-influenzavirus type I (HVJ)* の粒子数の計算, 第9回日本ウイルス学会抄録, 1961.
- 19) Brown, E. R. & Bittner, J. J. : Fluorescent antibody reactions against the mouse mammary tumor agent. *Proc. Soc. Exp Biol. & Med.*, 106 : 303, 1961.
- 20) 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.
- 21) Taylor, A. : Fraction studies of tumor tissues from germ-free chickens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 78 : 354, 1959.
- 22) Mc Kenna, J. H. et al. : Extraction of distinctive antigens from neoplastic tissues. *Science*, 135 : 370, 1962.
- 23) Schwarz, O. et al. : Immunologically specific antigens in leukemic tissues, *Blood*, 21 : 717, 1963.
- 24) 天野重安: 癌ウイルスの増殖様式の特徴について, *細胞化学シンポジウム*, 10 : 263, 1960.
- 25) Noyes, W. F. & Mellors, R. C. : Fluorescent antibody detection of the antigens of the Shope papilloma virus in papillomas of the wild and domestic rabbit. *J. Exp. Med.*, 106 : 555, 1957.
- 26) Malmgren, R. A. et al. : Intracellular localization of polioma virus antigen demonstrated with fluorescein labeled antisera. *Virology*, 11 : 722, 1960.
- 27) Rabson, A. S. et al. : Simian vacuolating virus (SV40) infection in cell cultures derived from adult human thyroid tissues. *J. Nat. Cancer Inst.*, 29 : 1123, 1962.
- 28) Mellors, R. C. & Munroe, J. B. : Cellular localization of Rous sarcoma virus as studied with fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 112 : 963, 1960.
- 29) 小塚堯, 他: 癌の臨床, 12巻 6号 1966.
- 30) 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 *岡山医学会雑誌*, 78巻 6号1966.
- 31) 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.
- 32) Friend, C. & Rapp, F. : Intracellular localization of Swiss mouse leukemia virus. *Fed. Proc.*, 21 : 454, 1962.

---

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

### II. Demonstration of Viral Antigens in C<sub>3</sub>H Mouse Mammary Cancer as Studied with Anti-Complementary Fluorescent Serum.

By

Tōru. MAKIHATA

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

As mentioned in the author's previous study, the complement method of immunofluorescence allowed to observe clearer fluorescence of the viral antigen than by the direct and indirect method. In this study, therefore, localization of viral antigens of C<sub>3</sub>H mammary cancer was pursued with the fluorescent serum that reacted immunologically with the complement.



1. The viral antigen was observed in tumor cells and intercellular spaces and particularly rich in perivascular portions.
  2. In the metastastatic lymph nodes viral antigens were observed in some tumor cells, and in the spleen of tumorbearing mice they were observed within reticulum cells on rare occasions.
  3. Intracellular localization of viral antigens was spread in the peripheral portions of the cytoplasm of tumor cells, and no specific fluorescence was observed in the nucleus of tumor cells.
  4. No specific fluorescence was seen in the liver, kidney, lung, bone marrow and brain of the tumor-bearing C<sub>3</sub>H mice and in tissues of normal mice.
  5. In mice with spontaneous mammary cancer, viral antigens were encountered more frequently than in mice with transplanted tumors.
-

図 文 論 幡 卷



写真1 C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織 直接法改良法 100倍

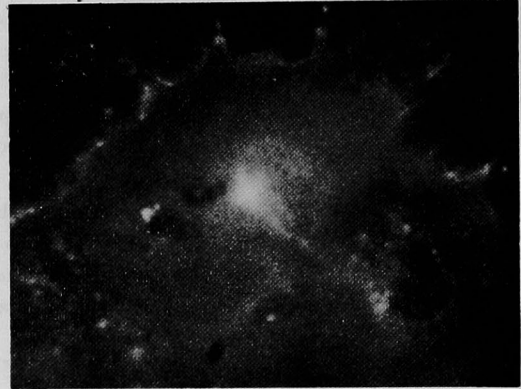


写真2 C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織 補体法 1,000倍

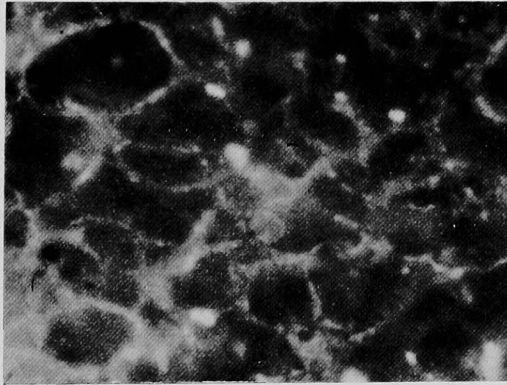


写真3 C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織 補体法 1,000倍

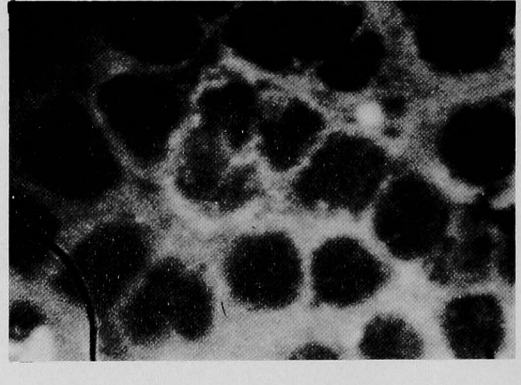


写真4 C<sub>3</sub>H マウス乳癌組織 補体法 1,000倍



写真5 C<sub>3</sub>H 乳癌マウス転移リンパ節 補体法 1,000倍