

3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene ラット肝癌 形成過程における血清蛋白の変動解析

II. 胎児性蛋白 α_2 -Acute Phase Protein (Weimer) に関する研究

小池 容 史 谷 内 昭

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 和田武雄教授)

Studies on Serum Protein Changes during 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene Hepatocarcinogenesis in Rats

II. Studies on α_2 -Acute Phase Protein (Weimer) as a Fetoprotein

Masashi KOIKE and Akira YACHI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)

During the hepatocarcinogenesis of Wistar strain male rats fed with 3'-Me-DAB, changes of Weimer's serum α_2 -acute phase protein (α_2 -AP) and the mechanism involved were investigated in comparison with alpha-fetoprotein (AFP). The results obtained were as follows:

1) The biochemical properties of α_2 -AP purified in this study coincided with those reported by other authors. The specific anti- α_2 -AP serum was prepared and the specificity was identified with reference anti- α_2 -AP serum donated from H. E. Weimer. Determinations of serum α_2 -AP and AFP levels were carried out by Mancini's single radial immunodiffusion technique.

2) Serum α_2 -AP levels were found to increase transiently in parallel with the initial elevation of AFP, and increased gradually again after 8th week of feeding and was elevated markedly after the liver carcinoma appeared. In the latter stage, α_2 -AP levels were correlated significantly with AFP levels in rat sera and with the tumor size.

3) In immunohistological studies, α_2 -AP was detected in the cytoplasm of part of the oval cells and many small or mature hepatocytes. Findings in carcinomatous regions revealed that α_2 -AP was localized in the cytoplasm of hepatoma cells in various histological aspects of the tumor.

4) When the synthesis of α_2 -AP was examined by the *in vitro* culture method of Hochwald, it was found that hepatoma tissues produced much larger amounts of α_2 -AP than the non-carcinomatous counterparts of the liver. Experiments with nude mice transplanted with rat hepatoma showed an occurrence of both rat α_2 -AP and AFP in their sera.

These results indicated that serum α_2 -AP was derived from multiple sources of tissues but more largely from hepatoma tissues than non-carcinomatous regions. It was considered that the mechanism of increased serum level may be different to some extent between α_2 -AP and AFP.

(Received December 26, 1979 and accepted February 4, 1980)

1 緒 言

ラットの血清中には炎症に際してあるいは腫瘍の移植によって増加する α_2 -globulin 成分がある^{1,2)} ことが注目されていたが、Weimer and Benjamin³⁾ はこれを α_2 -acute phase protein (以下 α_2 -AP) と呼んだ。これは正常成熟ラットにはごく微量含まれるに過ぎず、胎児ラットの血清

中にも検出され、分子量が大きいことから α -macrofetoprotein (α -MFP) と呼ばれ、胎児性蛋白の1つとも考えられている⁴⁾。しかしヒトの妊娠時に見出される α_2 -AP (Bohn)⁵⁾ とは異質のものである。

血中 α_2 -AP の変動については、すでに化学発癌や移植癌においての報告⁶⁾ はあるが、その産生起源との関係についての報告はみられない。

小谷ら⁷⁾は 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) による肝癌形成過程における血清蛋白成分の変動の意義を検討しているが、その研究の一環として α_2 -AP と、代表的な胎児性蛋白である α -fetoprotein (AFP) とを対比しつつ検討したので成績を報告する。

2 実験方法

2.1 ラット肝癌の作製と血清および肝組織の処理

Wistar 系雄ラット (体重 243 ± 30 g) を 0.06% 3'-Me-DAB 含有固形飼料 (オリエンタル酵母社, 東京) で 20 週間飼育して肝癌を作製した。その間 3'-Me-DAB 投与前の群も含めて、毎週 4~12 匹を 1 群としてそれぞれ体重測定後、エーテル麻酔下に頸静脈および腹部大動脈より採血し、同時に肝臓を摘出した。血清を分離して使用時まで -20°C に凍結保存した。

また、肝臓は摘出後直ちに重量を測定し、厚さ 1 mm の切片をつくって 10% 冷ホルマリン固定、冷アセトン固定および冷 95% エタノール固定を行い、その後脱水してそれぞれ低融点パラフィンに包埋して組織学的および免疫組織学的検査に供した。

2.2 抗 α_2 -AP 血清および抗 AFP 血清の作製

Wistar 系雄ラット (体重 $180 \sim 220$ g) 5 匹の腹腔内にテレピン油 0.2 ml を生理食塩水 (生食水) 0.8 ml と混じて注射して腹膜炎を起こさせ、48 時間後にエーテル麻酔下に頸静脈および腹部大動脈より採血して血清を分離した。

本血清 10 ml を 0.15 M NaCl 加 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で一夜透析し、Sephadex G-200 カラム (3.2 \times 130 cm) を用いてゲル濾過し、同じ緩衝液で溶出して 2.5 ml ずつを分画した。それぞれについて溶出曲線 (O.D. 280 m μ) を作成し、後述のごとく α_2 -AP の局在を追究し α_2 -AP の存在する第 1 峰 (P-I と仮称) を脱イオン水で 72 時間透析した後凍結乾燥した。

この P-I 乾燥粉末 2 mg を生食水 0.5 ml に溶解し、等量の完全 Freund's adjuvant と混合して乳化し、家兎に初回は foot pad 法で、その後は 2 週ごとに同量を筋注射し、1 週ごとに試験採血して力価を検定しながら 3~4 回追加免疫を行い、最終免疫施行後 7 日目に全採血を行い、粗抗 α_2 -AP 血清を得た。

この抗 α_2 -AP 血清 1 ml について正常ラット血清乾燥粉末 40 mg を混じり、 37°C 、90 分間反応させた後、 4°C 下にゆるやかに撹拌しながら 48 時間反応させ、17,000 r.p.m. 30 分間遠心して吸収抗 α_2 -AP 血清を得た。この抗血清は主に α_2 -AP の免疫化学的分析に使用した。

一方これとは別に Avrameas and Ternynck⁸⁾ に準じて immunoadsorbent を作り、抗血清の吸収を行った。す

なわち、正常ラット血清 10 ml に 2.5% glutaraldehyde を加えて不溶化したものを抗血清 3 ml に加え、ゆるやかに撹拌しながら 4°C で 24 時間反応させた後、6,000 r.p.m. 30 分間遠心して吸収抗 α_2 -AP 血清を得た。これは主として免疫組織学的検査に使用した。

抗 AFP 血清は北大医学部第 1 生化学講座より供与を受けた。

なお家兎に腹膜炎催起ラット血清を前述同様に免疫してラット全血清に対する抗血清を作製した。

2.3 抗血清の検討

抗 α_2 -AP 血清の特異性ならびに力価の検定は、Dr. H. E. Weimer より供与された特異抗 α_2 -AP 血清の反応と対比しつつ micro-Ouchterlony 法 (MO 法)⁹⁾、および免疫電気泳動法 (IEP 法)¹⁰⁾ により行った。

2.4 α_2 -AP の精製とその純度の検討

前述のテレピン油腹膜炎ラット血清のゲル濾過分画 P-I について、特異抗 α_2 -AP 血清を用いて α_2 -AP を含む分画を分け、これをプールした。その 25 ml を 0.03 M NaCl 加 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で一夜透析し、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (0.03~0.2 M NaCl, pH 8.0) を用いて linear concentration gradient による DEAE Cellulose Chromatography (2.2 \times 10 cm) を施し、分画 2 ml ずつについて溶出曲線 (O.D. 280 m μ) を求めて α_2 -AP を単離した。

単離した α_2 -AP は、MO 法、IEP 法、さらに高感度二次元交叉免疫電気泳動法 (Laurell 法)¹¹⁾ によって純度を検討すると共に、Lowry 法¹²⁾ により蛋白量を測定し、これを Mancini 法¹³⁾ 用の標準 α_2 -AP 溶液として用いた。

Laurell 法による分析に際しては 50 \times 75 \times 1.3 mm の agarose gel 板を用いて一次元では 60 V, 8 mA の条件下で 70 分間泳動し、二次元では抗ラット全血清を 3% (v/v) に含んだ agarose gel 板を用いて 60 V, 12 mA の条件下で 70 分間泳動した。

2.5 α_2 -AP の生化学的分析

2.5.1 分子量の測定

Gel filtration calibration Kits (Pharmacia Co., Uppsala, Sweden) を用いて高速液体クロマトグラフィー (TOYO SODA HLC-803) により測定した。すなわち分子量既知の ferritin dimer (m.w. 880,000), ferritin monomer (m.w. 440,000), γ -globulin (m.w. 160,000), ovalbumin (m.w. 45,000) の溶出部位と比較して α_2 -AP の分子量を定めた。

2.5.2 化学的組成

アミノ酸組成分析は北大薬学部薬品生物化学講座の協力を得て行った。なお hexose 含量は Orcinol 硫酸法¹⁴⁾ に

より測定した。

2.6 血中 α_2 -AP および AFP の定量法

α_2 -AP の測定は特異抗 α_2 -AP 血清を 2% (v/v) に含む 1.2% agarose gel 板に直径 2.0 mm の well を作り、検体 2.5 μ l を注入して Mancini 法¹³⁾ で測定した。検量線は前述の標準 α_2 -AP 溶液 (138~1,104 μ g/ml) を用いて作成した。

AFP については、agarose gel 板の特異抗 AFP 血清濃度を 0.7% (v/v) とし、well の直径は 2.5 mm、注入検体量は 4 μ l として同様に測定した。この検量線は北大第 1 生化学講座より供与された標準ラット AFP を用いて作成した。

2.7 免疫組織学的方法

低融点パラフィンに包埋後 4 μ m に薄切した肝組織切片をキシロルで脱パラフィンし、 α_2 -AP の局在をみるため horseradish peroxidase 標識抗体法ならびに蛍光抗体間接法を行った。前者では組織切片を 0.075% HCl 含有無水アルコールで 40 分処理後洗浄し、室温で一次抗血清 (抗 α_2 -AP ウサギ血清) を 60 分間反応させ、冷 PBS で 20 分ずつ 3 回洗い、次いで二次抗血清 (horseradish peroxidase 標識抗ウサギ γ -グロブリン・ヤギ血清) を室温において 60 分間反応させた。その後冷 PBS で 3 回洗い、Nakane and Pierce¹⁵⁾ に準じて 0.005% H₂O₂ および diaminobenzidine (0.3 mg/ml) を含有した 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で約 3 分間発色させ、1% OsO₄ 溶液で反応を停止させて光学顕微鏡下で観察した。後者は一次抗血清として抗 α_2 -AP ウサギ血清、二次抗血清として FITC 標識抗ウサギ γ -グロブリン・ヤギ血清を用いた。同時にそれぞれの吸収試験を行った。

2.8 組織培養による合成実験

2.8.1 組織材料および培養方法

3'-Me-DAB 肝癌ラット肝を癌部と非癌部とに分けて培養に供した。組織の処理は 4°C 下で行い、PBS で十分に洗浄し、その 500 mg を用いた。

培養は Hochwald 法¹⁶⁾ に従って 6 時間行ったが、培養液は指定の処方¹⁷⁾ に ¹⁴C-L-leucine を加えたものを用いた。培養方法ならびに免疫電気泳動法による autoradiography などの詳細は渡辺¹⁸⁾ の報告に準じた。

2.8.2 培養上清中の α_2 -AP および AFP の検出方法ならびに autoradiography

前項の培養上清について MO 法と autoradiography を併用して α_2 -AP と AFP を検出した。 α_2 -AP については、沈降線を明瞭にするために α_2 -AP 陽性血清を carrier 血清として用い、癌部・非癌部各 7 試料の培養上清をそれぞれ 5 回ずつ well に満たし、抗 α_2 -AP 血清と反応させ

た。AFP については、AFP 含有血清を carrier 血清として用い、同様に各培養上清を抗 AFP 血清と反応させた。

α_2 -AP の検出には培養上清の蛋白濃度が低いので念のために radioimmuno-electrophoresis も併用した。すなわち、同様にまず carrier 血清を well に添加してから培養上清を 5 回 well に満たし、60 V、4 mA で 70 分間電気泳動した。泳動後室温下に抗 α_2 -AP 血清および抗ラット全血清に対して湿潤箱中で 48 時間反応させ、水洗、乾燥後に 10% amido black 染色を行った。

なお、¹⁴C-L-leucine の血清蛋白成分への非特異的吸着能について渡辺¹⁸⁾ に準じて検討したが、アルブミンに相当して微弱な autoradiography 陽性の沈降線を認めたと、抗 α_2 -AP および抗 AFP についてはそれを認めなかった。

Autoradiography は MO スライドおよび IEP スライドに Kodak Royal-X pan film (ASA 1,250) を密着させ、冷暗所に 3 週間保った後 Kodak DK-50 で現像し、染色スライドと対比して判定した。なお、autoradiogram による半定量的観察は van Furth¹⁹⁾ に従った。

2.9 スードマウス移植実験

ラット肝癌組織を約 5 mm 立方に切り、これを雄スードマウス (体重約 20 g) の背部の皮下に移植し、移植後 1 週から 4 週まで毎週 1~2 匹ずつ採血すると共に、移植肝癌組織を摘出した。また対照群として正常ラット肝をスードマウスに同様に移植し、毎週同様に採血すると共に移植肝癌組織を摘出した。血液は 24 時間冷蔵庫内に保存し、2,000 r.p.m. 10 分間遠心して分離した血清について α_2 -AP および AFP 値を Mancini 法により定量した。また移植した肝癌ならびに肝組織についても組織学的検討を行った。なお、この場合抗ラット α_2 -AP および抗ラット AFP 血清と対照スードマウス血清との間には、MO 法および Mancini 法において交叉反応が認められないことを確認した。

3 成績

3.1 抗血清および精製 α_2 -AP の特異性の吟味

3.1.1 抗 α_2 -AP 血清の特異性の検討

P-I 乾燥粉末によって得られたウサギ抗血清を用いて IEP 法で吟味した。Fig. 1 のごとく、腹膜炎ラット血清との間には α 領域に 2 本と γ 領域に 1 本の沈降線を認めた。正常ラット血清で吸収すると、図の下段のごとく α 領域の 1 本のみが残った。

この吸収抗血清と特異抗 α_2 -AP 血清 (Dr. Weimer より供与する) を腹膜炎ラット血清に反応させると、Fig. 2 のごとく共通・単一の沈降線が得られた。

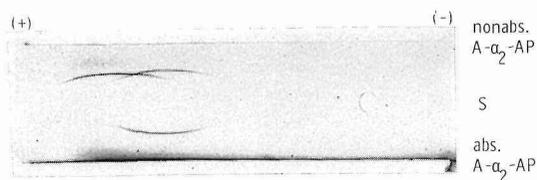


Fig. 1 Immunoelectrophoretic identification of α_2 -AP. (Anode to the left.)
S: Serum of inflammatory rat.

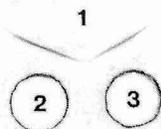


Fig. 2 Specificity of absorbed A- α_2 -AP serum. Comparison to reference A- α_2 -AP serum supplied from Dr. H. E. Weimer.
(1): Serum of inflammatory rat,
(2): absorbed A- α_2 -AP serum,
(3): A- α_2 -AP serum (Weimer).

3.1.2 α_2 -AP の単離

腹膜炎ラット血清より単離純化を行った α_2 -AP について MO 法, IEP 法, さらに Laurell 法による吟味を行った。

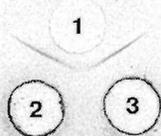


Fig. 3 Micro-Ouchterlony reaction of purified α_2 -AP.
(1): purified α_2 -AP,
(2): A-RWS (A-rat whole serum),
(3): A- α_2 -AP.

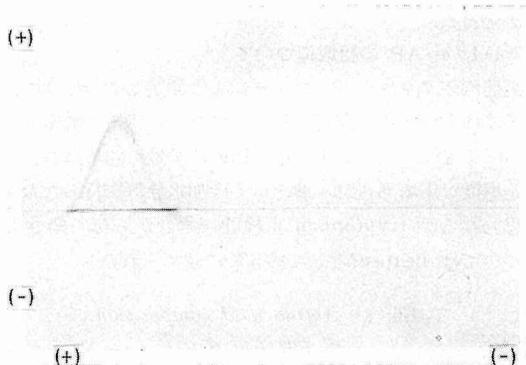


Fig. 4 Identification of purified α_2 -AP by two dimensional Laurell's crossed immunoelectrophoresis. (First dimension electrophoresis with anode to the left, second dimension electrophoresis with anode to the top.)

Fig. 3 のごとく, これは特異抗 α_2 -AP 血清および抗ラット全血清に対して MO 法の上で単一・共通の沈降線を示した。これは IEP 法においても同様で, 二次元 Laurell 法による抗ラット全血清との間の反応を Fig. 4 に示したが, 以上よりこの α_2 -AP は抗原的に単一成分と認められた。

3.1.3 Mancini 法による単離 α_2 -AP の定量

単離 α_2 -AP 2,208 $\mu\text{g/ml}$ を用いて倍数希釈液を作り, それにより形成される沈降輪と, その検量線を Fig. 5 に示した。すなわち 138~1,104 $\mu\text{g/ml}$ の間において直線関

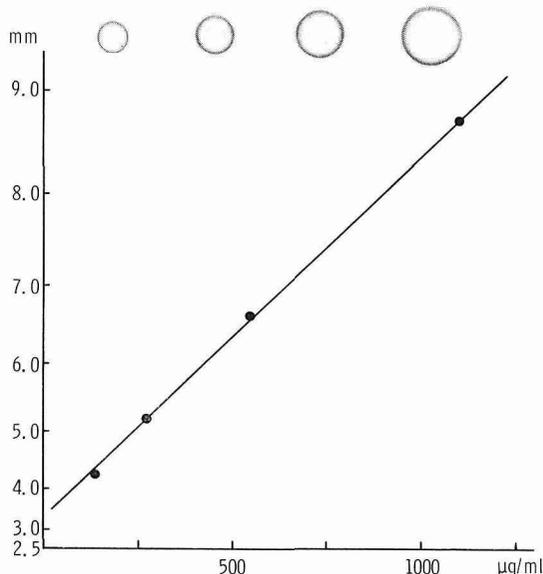


Fig. 5 Calibration curve of α_2 -AP determined by Mancini's single radial immunodiffusion.

係が得られた。

3・1・4 α_2 -AP の組成について

高速液体クロマトグラフィーにより測定した α_2 -AP の分子量は 76×10^4 と推定された。またそのアミノ酸組成は Table 1 のごとくで、1/2 cystine は微量に認められたが測定感度以下であった。おそらくは加水分解を行ったためと思われるが tryptophan も検出できなかった。糖含量については hexose として約 3% に認められた。

Table 1 Amino acid composition of purified α_2 -AP

Amino acid	mol/100 mol
Lysine	5.90
Histidine	2.15
Arginine	3.92
Aspartic acid	8.96
Threonine	6.80
Serine	6.73
Glutamic acid	14.58
Proline	5.76
Glycine	6.11
Alanine	6.94
1/2 Cystine	—
Valine	8.61
Methionine	1.98
Isoleucine	4.13
Leucine	9.82
Tyrosine	3.33
Phenylalanine	4.27
Tryptophan	—

3・2 3'-Me-DAB 投与ラット血清中の α_2 -AP および AFP の変動

3'-Me-DAB 肝癌形成過程における血清中 α_2 -AP および AFP の変動は、Fig. 6, Fig. 7 および Table 2 に示すごとくで、3'-Me-DAB 投与後 3, 4 および 5 週における α_2 -AP の平均値はそれぞれ 181, 133 および 239 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と次第に増加し、ほぼ AFP の一次反応に平行して変動した。その後やや減少するが、8 週ころより再び増加し 16 週以後肝癌発生に伴い著増した。

一方、AFP の 3, 4, 5 週における各週の平均値は 2.0, 3.6 および 5.0 mg/dl で、5 週目にはいわゆる一次反応 peak を示し、以後は比較的低値に止まり、肝癌発生期の 18 週より著増を示した。

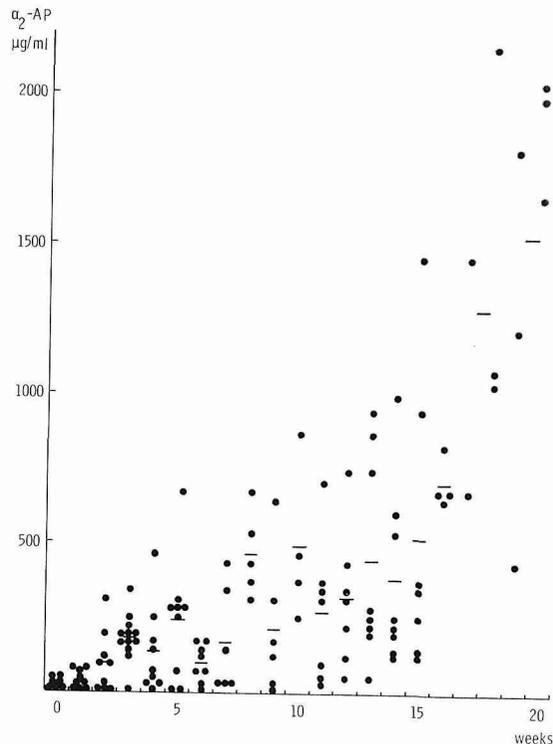


Fig. 6 Changes of α_2 -AP in rat sera during hepatocarcinogenesis with 3'-Me-DAB.

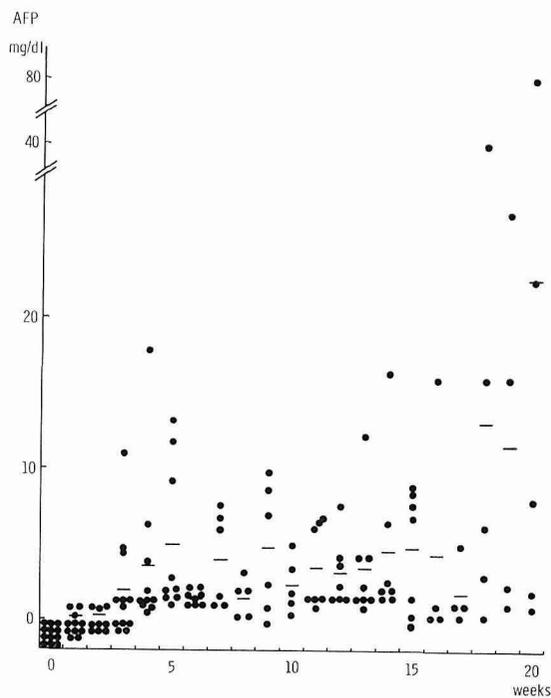


Fig. 7 Changes of AFP in rat sera during hepatocarcinogenesis with 3'-Me-DAB.

Table 2 Changes of mean values of α_2 -AP and AFP in rat sera during hepatocarcinogenesis with 3'-Me-DAB

weeks	α_2 -AP ($\mu\text{g/ml}$)	AFP (mg/dl)
0	13 \pm 4.2*	0
1	28 \pm 9.0	0.2 \pm 0.1
2	96 \pm 32.5	0.3 \pm 0.1
3	181 \pm 21.7	2.0 \pm 0.9
4	133 \pm 46.0	3.6 \pm 1.6
5	239 \pm 64.2	5.0 \pm 1.6
6	97 \pm 20.4	1.4 \pm 0.1
7	166 \pm 65.9	4.0 \pm 1.2
8	462 \pm 56.7	1.5 \pm 0.5
9	213 \pm 88.0	4.8 \pm 1.6
10	486 \pm 115.5	2.3 \pm 0.8
11	271 \pm 83.0	3.5 \pm 1.0
12	316 \pm 79.8	3.2 \pm 0.7
13	442 \pm 114.8	3.5 \pm 1.2
14	380 \pm 100.5	4.6 \pm 1.9
15	515 \pm 173.5	4.8 \pm 1.4
16	701 \pm 36.2	4.4 \pm 3.4
17	1275 \pm 224.7	1.8 \pm 0.9
18		13.1 \pm 6.5
19	1518 \pm 227.1	11.6 \pm 5.3
20		22.6 \pm 13.3

* mean \pm S.E.

次に α_2 -AP と AFP との相関性を一次反応期の 3 週から 5 週についてみると相関を認めない ($r = -0.04$, $p > 0.1$). しかし肝癌発生期の 16 週から 20 週についてみると有意の相関性がみられた ($r = 0.63$, $p < 0.01$).

血中 α_2 -AP レベルと tumor size との関係を見るために、16 週以後の tumor が割面で肝の 1/3 を越えないもの (+), 1/3 以上を占めるもの (++) の 2 群に分けて両群の平均値を比較すると、Fig. 8 のように (+) 群は $815 \pm 366 \mu\text{g/ml}$, (++) 群は $1,488 \pm 554 \mu\text{g/ml}$ で、tumor size の大きい場合の α_2 -AP はより高値を示した ($p < 0.05$).

3.3 免疫組織学的検討

Peroxidase 標識抗体法により α_2 -AP の組織内局在を検さくしたが、正常対照ラットの肝細胞には検出されず、小葉間胆管の上皮細胞の一部に見出された。しかし 3'-Me-DAB 投与群では、その 1 週目ですでに肝細胞に α_2 -AP

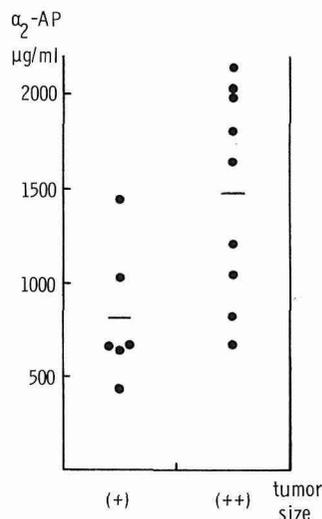
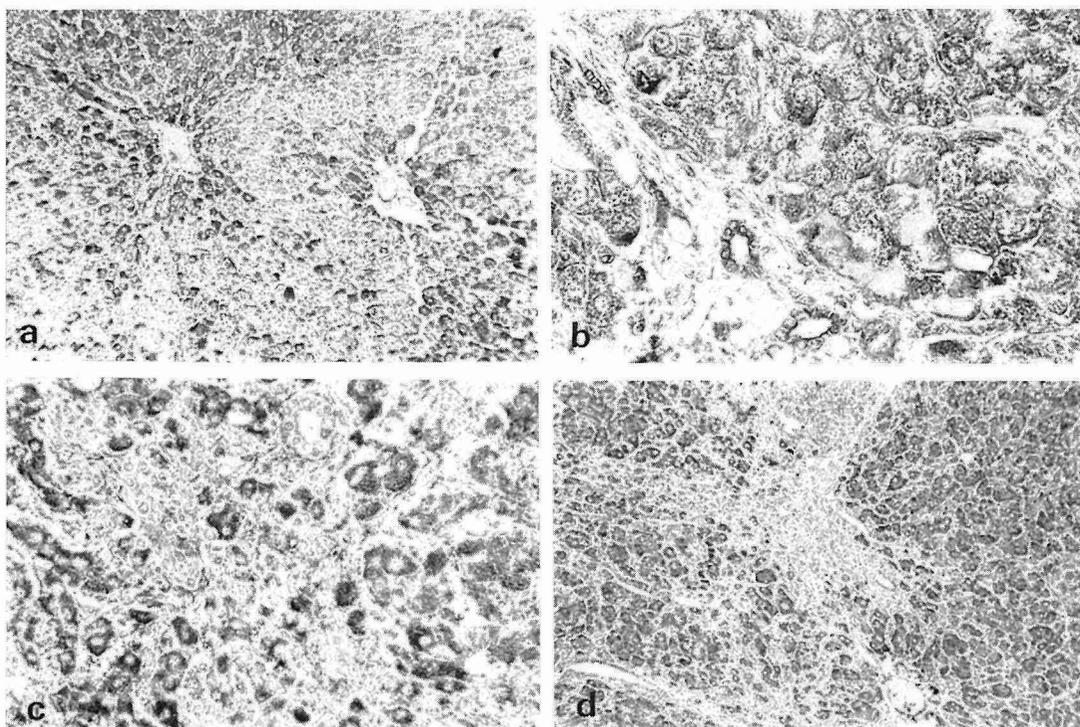


Fig. 8 Relationship between serum α_2 -AP level and tumor size. Tumor size is expressed as (+) or (++) ((+): less than one-third of transitional cut-surface of liver, (++) : more than one-third of it.)

を認めた。Fig. 9 a は 2 週目の所見であるが、小葉構造の保たれている部位では中心帯および門脈 triad 周辺に α_2 -AP 陽性細胞がモザイク状に認められた。中間帯には少い傾向を示した。肝細胞質内の α_2 -AP はびまん性に、あるいは顆粒状に認められた。小葉間胆管の上皮細胞の細胞質にみられる α_2 -AP は正常肝とほぼ同様であった (Fig. 9 b)。なお α_2 -AP 陽性ならびに陰性胆管上皮の間には明らかな形態学的差異は認められなかった。

Fig. 9 c および Fig. 9 d に見られるように、oval cell の細胞質にも少数ではあるが α_2 -AP が認められたが、その周囲の小型肝細胞および成熟肝細胞の細胞質内にも α_2 -AP が見出された。この肝細胞の α_2 -AP 陽性所見は発癌後においても観察された。

肝細胞癌については、Fig. 10 a および Fig. 10 b のごとく、その一部の癌細胞の細胞質にも α_2 -AP が認められ、これらの α_2 -AP 陽性細胞は集団状あるいはモザイク状に観察された。すなわち、びまん性増殖を示す部分 (Fig. 10 a)、島状配列を示す部分 (Fig. 10 b)、索状配列を示す部分、それぞれに α_2 -AP は観察された。また cholangiocarcinoma 様の部位でも一部の管腔を形成する上皮細胞の細胞質に α_2 -AP が認められた (Fig. 10 a, Fig. 10 c および Fig. 10 d)。さらに非癌部をみると、その成熟肝細胞群にびまん性あるいはモザイク状に α_2 -AP 陽性細胞を認めた (Fig. 10 a, Fig. 10 c および Fig. 10 d)。



- Fig. 9 a** Distribution of α_2 -AP positive hepatocytes in well-preserved lobules from a rat at the 2nd week of 3'-Me-DAB administration. The hepatocytes bearing α_2 -AP in their cytoplasm are scattered in a mosaic appearance both in a central zone and around the portal triad of the lobules. Immunoperoxidase method, $\times 60$.
- 9 b** At the 3rd week of 3'-Me-DAB administration. In cytoplasm of mature hepatocytes, α_2 -AP positive granules are found. The reaction products of α_2 -AP are also seen in cytoplasm of epithelial cells of interlobular bile ductules. In this figure, oval cells are not seen. Immunoperoxidase method, $\times 260$.
- 9 c** An area of the proliferation of oval cells at the 3rd week of 3'-Me-DAB administration. α_2 -AP is found in cytoplasm of some oval cells, and also of many small hepatocytes and mature hepatocytes surrounding the proliferating oval cells. Immunoperoxidase method, $\times 160$.
- 9 d** At the 7th week of 3'-Me-DAB administration. The reaction products of α_2 -AP are found in cytoplasm of almost all the small and mature hepatocytes. In cytoplasm of some oval cells around the portal triad, α_2 -AP is also detected. Immunoperoxidase method, $\times 60$.

3・4 組織培養による α_2 -AP および AFP の合成実験

成績を一括して autoradiogram 上の沈降線の放射活性の強度別に Table 3 に示した. 同一個体よりそれぞれの癌部 (No. 1~7) と非癌部 (No. 1'~7') をとり α_2 -AP および AFP の合成能を比較すると, 両成分とも癌部における沈降線の強度が非癌部に比較して強く, 合成能が大きいものと推定された.

Autoradiogram を例示すると, 試料 No. 1, 2, 1', 2', 3 および 4 の α_2 -AP の MO パターンと autoradiogram は Fig. 11 のごとく, また同一試料の AFP の autoradiogram は Fig. 12 のごとくである.

なお Fig. 13 には, IEP 上の α_2 -AP を autoradiography により同定した結果を示している.

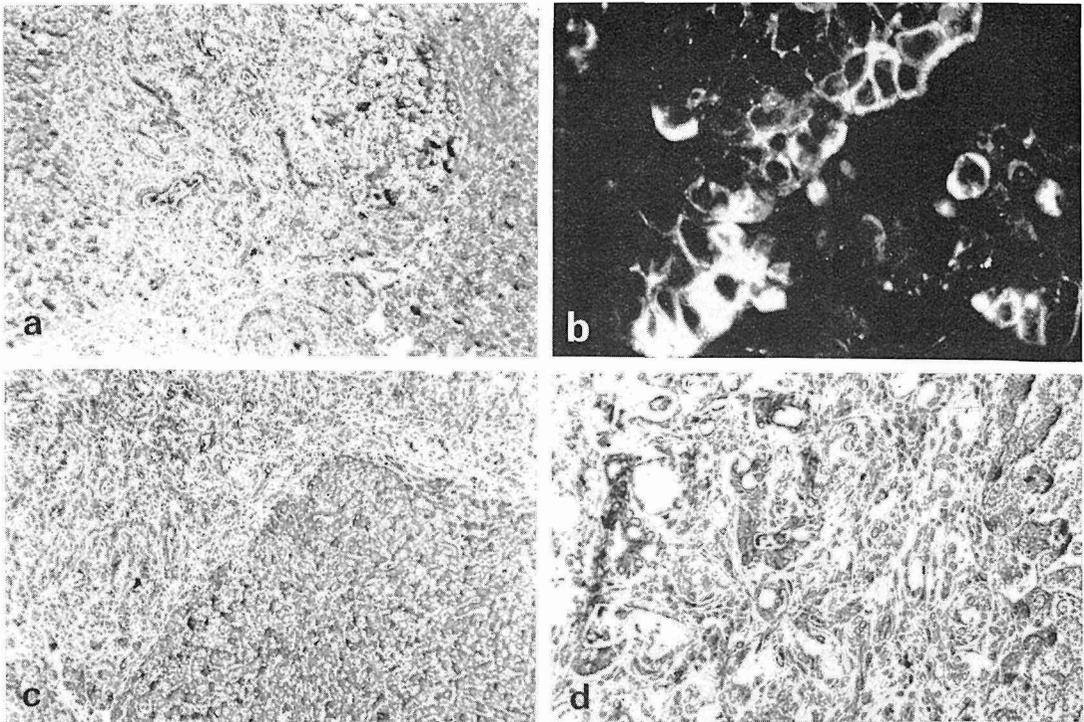


Fig. 10 a The localization of α_2 -AP in a rat liver at the 20th week of 3'-Me-DAB administration. On the right side of the central portion, α_2 -AP is seen in cytoplasm of many of the hepatoma cells. On the left side of the central portion, α_2 -AP is seen in some epithelial cells of cholangiocarcinoma-like ductules, and also detected in cytoplasm of non-malignant hepatocytes surrounding the cancer region. Immunoperoxidase method, $\times 60$.

10 b At the same time as Fig. 10 a. In cytoplasm of hepatoma cells in two island-like structures, the specific fluorescence of α_2 -AP is observed. Immunofluorescence method, $\times 400$.

10 c At the same time as Fig. 10 a. The right-lower quarter part of this figure shows a non-cancerous portion of the liver and the remaining part is a cancerous portion with a cholangiocarcinoma-like appearance. α_2 -AP is seen in almost all the non-malignant hepatocytes and some epithelial cells in ductular structures in the cancerous portion. Immunoperoxidase method, $\times 60$.

10 d At the same time as Fig. 10 a. Along the right margin of this figure, a non-cancerous part with α_2 -AP positive hepatocytes is seen. The remaining part shows a cholangiocarcinoma-like appearance. In cytoplasm of the epithelial cells of some ductular structures, α_2 -AP is seen. Immunoperoxidase method, $\times 160$.

3・5 ノードマウスへの移植実験について

ラット肝癌組織および正常ラット肝組織をヌードマウスに移植して経時的に α_2 -AP および AFP の血中への出現を検討した。成績は Table 4 のごとく、肝癌移植群でその生着・増殖をきたした3例においては、1例が3週目で血中 α_2 -AP レベル $194 \mu\text{g}/\text{ml}$ を示し、他の2例は4週目

においてそれぞれ 138 および $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。これらの例は3および4週目の2匹において AFP の検出を認めた。この点、正常肝移植群の血中からは全くこれらの検出を認めなかった。また正常肝は移植後長期間の生着を認めず、ほぼ1週間で壊死をきたしたが、その時点でも α_2 -AP の血中上昇はみられなかった。

Table 3 Intensity of the autoradiographic image of α_2 -AP and AFP in the culture medium

	No.	α_2 -AP	AFP
Hepatoma tissues	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	-
	7	-	-
Non-carcinomatous counterparts	1'	+	+
	2'	-	+
	3'	+	-
	4'	+	+
	5'	+	-
	6'	-	-
	7'	-	-

Intensity of the autoradiogram:
 - : negative, + : just visible, + : clearly visible.

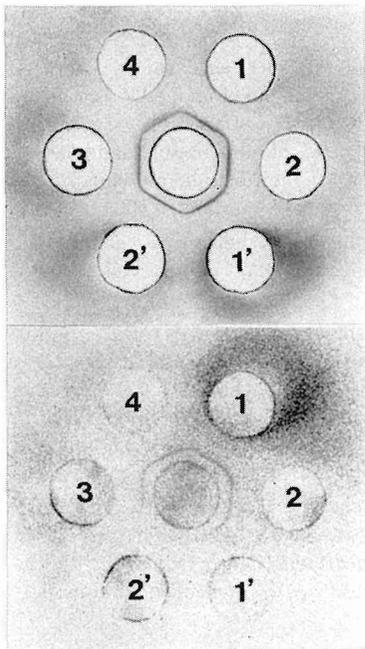


Fig. 11 Autoradiogram of α_2 -AP synthesized by tissue culture. Top: Ouchterlony's plate stained with amido black 10 B. Bottom: Autoradiogram of the same plate. (1), (2), (3) & (4): Hepatoma tissues. (1') & (2'): Non-carcinomatous counterparts of (1) & (2).

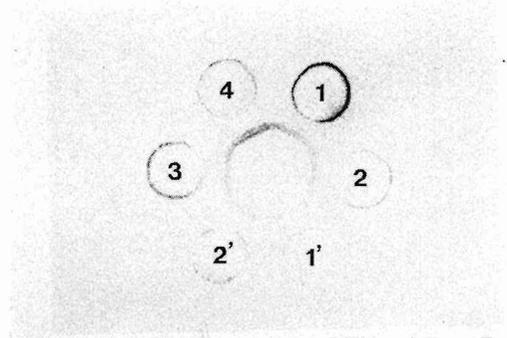


Fig. 12 Autoradiogram of AFP synthesized by tissue culture. (1), (2), (3) & (4): Hepatoma tissues. (1') & (2'): Non-carcinomatous counterparts of (1) & (2).

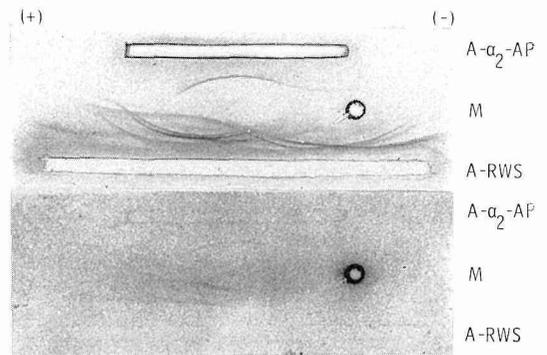


Fig. 13 Immunoelectrophoresis of culture medium of a hepatoma tissue mixed with tracer rat serum. (Anode to the left.) Top: IEP pattern stained with amido black 10 B. Bottom: Autoradiogram of the same pattern. M: Culture medium.

Table 4 Appearance of α_2 -AP and AFP in sera of nude mice after the transplantation of rat hepatoma and normal liver tissues

weeks	Hepatoma tissues		Normal liver tissues	
	α_2 -AP (μ g/ml)	AFP (mg/dl)	α_2 -AP (μ g/ml)	AFP (mg/dl)
1	0	0	0	0
	0	0	N.D.*	N.D.
2	0	0	0	0
	0	0	N.D.	N.D.
3	194	1.4	0	0
4	138	0.2	N.D.	N.D.
	70	0	N.D.	N.D.

* not done

4 考 按

α_2 -AP は Weimer and Benjamin³⁾ により炎症ラット血清中に発見された acute phase protein の1つであるが、その後の研究により胎児性蛋白の性格を有することが明らかにされた⁴⁾。本研究は代表的な胎児性蛋白である AFP と対比しつつ、ラットの実験的肝癌における α_2 -AP の出現態度とその機序を明らかにしようとして進められた。

まず抗 α_2 -AP 血清の作製法として、テレピン油によるラットの腹膜炎を発生せしめて α_2 -AP の血中上昇を図り、その血清の Sephadex G-200 ゲル濾過第1分画を用いて家兎を免疫して特異抗 α_2 -AP 血清を得ることに成功した。

一方、これを用いて血中 α_2 -AP の定量化を図るためには、 α_2 -AP そのものの精製が必要であるため、その単離精製を行って抗原的に単一成分の抽出に成功した。

その分子量は 76×10^4 でこれまでの報告^{20~22)} にほぼ一致するし、アミノ酸組成の上では比較的 glutamic acid, leucine, aspartic acid, valine などが多く Gordon²¹⁾, Gauthier and Mouray²²⁾ の報告に一致する。しかし糖含量については報告者によりかなりの差が認められ、hexose として Jamieson *et al.*²⁰⁾ は 9.3%, Gordon²¹⁾ は 6.26%, Gauthier and Mouray²²⁾ は 4.25% としており、いずれも今回の測定値よりも高い。その組成については今回は分析しなかったが、これまでのところでは主として galactose, mannose, glucosamine が含まれ、sialic acid は約 2.0% 前後 (Gauthier and Mouray²²⁾) と報告され、発表者による差が大きい。

本研究はラットの 3'-Me-DAB による肝癌形成過程での血清 α_2 -AP および AFP の出現態度の観察がその目的であるが、研究に先立ち正常ラット群について α_2 -AP レベルを吟味すると、その血清レベルは平均 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ を示した。

これまで α_2 -AP は胎児ならびに新生児ラット血清中、および妊娠・炎症および担癌などのラット血清中には出現するが、正常成熟ラット血清中には検出できないとされていた。しかし Eddington *et al.*²³⁾ の報告以後 Ganrot²⁴⁾, Gordon²¹⁾, Bosanquet *et al.*²⁵⁾ および Hudig *et al.*⁶⁾ により正常成熟ラット血清中にも $14 \sim 68 \mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の少量の α_2 -AP が存在することが報告され、今回の成績はこれらの報告に一致する。つまり正常成熟ラット血清中にも少量の α_2 -AP が存在することを再確認した。

次いで 3'-Me-DAB 肝癌形成過程での α_2 -AP および AFP の変動を比較検討すると、 α_2 -AP は AFP の一次反

応²⁶⁾ の時期に一致して軽度ではあるが増加反応を示した。しかしこの時期における両成分の上昇レベルの間には相関性を認めなかった。この点は両成分の産生時期、その機序の上に差異があるためであろう。

その後は、肝の組織学的変化は小野江らによって詳細に追究^{27,28)} された報告によく一致するが、この間 α_2 -AP は発癌をみるまでの間波動を示しつつ比較的高値を保ち、AFP とは趣きを異にする。この態度は小谷ら⁷⁾ の seromucoid, haptoglobin についての研究成績に類似する。

これに対して肝癌の発生は 16 週目から認められたが、このころから α_2 -AP は AFP とほとんど平行して著増を示し、この場合の両者の間には有意の相関性が認められた。しかも腫瘍の大きさとの関係を見ると、その大きい群での血中 α_2 -AP 値はより高く、一見この場合の α_2 -AP は肝癌自体の産生機序によるのではないかと推測された。

しかし Hudig *et al.*⁶⁾ は Morris 肝癌をラットに移植して、10 週まではラット血清 AFP は上昇するが α_2 -AP には変化を認めないとし、また N-2-fluorenylacetylacetamide (2-FAA) 投与ラットでも血中 AFP は 3 週目から著明に上昇するが、 α_2 -AP はむしろ減少傾向を示すとし、 α_2 -AP には発癌や腫瘍の増殖との関連性を認めないとしている。Kitagawa *et al.*²⁹⁾ は 3'-Me-DAB および 2-FAA 投与により発生した肝癌においては、前者の方がより多量の AFP 産生を示し、組織学的にも後者との間に、AFP の一次反応期および肝癌発生期に相当して差異が認められることを述べている。この点から考えると、 α_2 -AP についても発癌剤の種類や移植腫瘍の違いにより、 α_2 -AP の産生および血中への出現に差異があるのは当然とみてよからう。

そこで α_2 -AP の産生機序を検討する目的で免疫組織学的検査を試みた。3'-Me-DAB 投与に伴う肝組織像の変化と AFP の出現との関係については Onoé *et al.*²⁷⁾, Dempo *et al.*²⁸⁾ の詳細な報告があり、oval cell から transitional cell を経て成熟肝細胞へと分化する過程で、AFP は transitional cell の時期に相当して産生されることが述べられている。小谷ら⁷⁾ もこれと同時に seromucoid および haptoglobin との関連性をめぐってその点を比較検討しているが、本研究においてはその一環として α_2 -AP の観察を行ったものである。今回は主として peroxidase 標識抗体法により検査したが、3'-Me-DAB 投与 1 週目よりすでに成熟肝細胞の細胞質内に α_2 -AP が認められ、小葉構造の保たれている部分では α_2 -AP 陽性肝細胞は小葉中心帯および小葉の門脈 triad 周囲に観察された。つまり α_2 -AP は小谷ら⁷⁾ がみた seromucoid や haptoglobin の知見と同様に成熟肝細胞内において産生

されるものと考えられる。しかし 3'-Me-DAB 投与後 2 週目より oval cell が次第に増加すると、その一部にも α_2 -AP 陽性細胞を認めたが、今回は電顕的あるいは酵素組織化学的検査を行っていないから、その transitional cell との関係は不明である。しかし oval cell から成ると考えられる小型肝細胞群に α_2 -AP がかなり多く観察されたことは注目してよからう。つまりは AFP とはその点で態度を異にするわけで、少なくとも 3'-Me-DAB 投与初期における血中 α_2 -AP 上昇機序の主体は成熟肝細胞由来のものであり、それに oval cell による産生も加わると考えるべきであろう。つまり AFP 産生の点で一次反応と言われるものとの間には、肝組織にみられる細胞レベルでの所見との対比では差異があるとみるべきであろう。

続いてその後にみられる 3'-Me-DAB 投与ラット群での α_2 -AP 血中レベルの消長と肝での産生機序との関係をみると、成熟肝細胞のみならず、小型肝細胞から成熟過程にある移行型肝細胞も部分的には α_2 -AP 産生にあずかることが判明したから、それに対応して血中 α_2 -AP も比較的高値を保つものと推測される。

なお、 α_2 -AP 陽性肝細胞の小葉内の局在様式にかたよりをみたり、モザイク状分布を示した点については、本実験における組織固定法の影響を無視し得ないと考えられ、今後灌流固定による確認が必要と思われる。

肝癌発生期についてみると、 α_2 -AP は明らかに肝癌細胞の一部に陽性であることを認めた。しかし今回の実験では、同一癌細胞が α_2 -AP と AFP とを同時に産生するか否かの点は不明であるが、連続切片による検討では少なくとも同一癌巣内に両成分の産生が推測される知見が得られている。また α_2 -AP は肝癌がびまん性増殖を示す部分、島状配列を示す部分、索状部あるいは cholangiocarcinoma 様構造を呈する部分のいずれにも検出され、癌組織型の違いと α_2 -AP 産生能との間には特異的な関係を見出せなかった。さらに α_2 -AP の局在が非癌部の成熟肝細胞にもみられた点は、これまで小谷ら⁷⁾ が得ている AFP についての成績とは大きく異なる現象で、肝癌期における α_2 -AP の産生起源は癌部および非癌部の両方に求められるのである。

α_2 -AP は胎児ラット血清中に多量に含まれており胎児性蛋白の性格を有する³⁰⁾ とされているが、一面においては炎症催起によって血中への動員が速やかに起こるから CRP に似た急性相反応因子の性格をかね備えた蛋白であり、AFP とはその点でもかなり性格を異にすると言えよう。Sarcione and Bogden³¹⁾ は炎症催起によって α_2 -AP の肝での合成能が高まる事実をみ、それが血中に増量する機序を推論している。

今回は肝癌部と非癌部別に Hochwald 法¹⁶⁾ を応用して α_2 -AP の合成をみたが、AFP についてはすでに Gitlin and Boesman³²⁾ によりラット胎児肝での合成が確かめられている。本研究においては van Furth¹⁹⁾ の半定量的観察法に基づいて判定したが、癌部の方が非癌部に比較して多量の α_2 -AP を合成する結果を得た。

さらにヌードマウスにラット 3'-Me-DAB 肝癌を移植して α_2 -AP、AFP 両者の血中出現を比較した結果、移植癌が発育をきたした 3 および 4 週目において、 α_2 -AP の血中証明が可能となり、AFP にも同様に血中上昇がみられた。しかし対照として正常肝を移植した群には長期間の生着を認められず、壊死をきたした際にも血中 α_2 -AP は検出し得なかった。

ヌードマウスへの異種移植は Rygaard³³⁾ および Rygaard and Povlsen³⁴⁾ によっではじめられたが、腫瘍の産生する血清蛋白がヌードマウス血清内に出現することは Yoshimura *et al.*³⁵⁾ により報告されている。しかし α_2 -AP についての知見はこれまでになく、これを *in vitro* の研究およびヌードマウス移植実験を通じて調べた報告は今回が初めてである。この肝癌での血中 α_2 -AP の上昇には、癌そのものに由来する部分も加わることを明らかにしたと言えよう。

一方、非癌部組織にみられた α_2 -AP 合成については、むろんその中に実験上癌細胞の混在する可能性は否定できないにしても、免疫組織学的に非癌部肝細胞内に α_2 -AP の局在が認められた点と共に、 α_2 -AP が正常肝細胞から産生される事実を再確認させるものである。

なお一次反応期において α_2 -AP の増量をみる現象については、3'-Me-DAB 投与により肝細胞がうける変性壊死によるものか、他の反応機序を介してその産生が増加するものかは、この実験段階では不詳と言わざるを得ない。Hudig *et al.*³⁶⁾ によると 2-FAA 投与実験において血中 α_2 -AP が増加するのは、炎症反応や腫瘍壊死によるものと考えているし、van Gool *et al.*³⁷⁾ は α_2 -AP には carageenin による炎症性浮腫を抑制する作用があると報告しているが、 α_2 -AP の病態生理学的意義を考える上に示唆を与えるものであろう。

なお免疫組織学的検査の点に触れると、正常ラット肝および 3'-Me-DAB 投与ラットのいわゆる一次反応期ならびに肝癌期の非癌部において、胆管上皮細胞の一部にも α_2 -AP を認めたが、それがその部位での産生を意味するのか、あるいは他の糖蛋白にみられるように代謝過程との関連性を表わすのかは不明である。その他の所見を含めて、 α_2 -AP の産生代謝などについては少なくとも AFP のそれとは異なってやや多様とみざるを得ない。

5 結 論

文 献

3'-Me-DAB 投与によるラット肝癌形成過程における α_2 -AP の血中変動を AFP と対比検討して次の成績を得た。

1) 今回単離した α_2 -AP はそのアミノ酸組成を検討した結果既報の成績によく一致した。かつ、 α_2 -AP 研究の指導的役割を果たした Weimer の特異抗血清との間にも一致した反応を示し、これによって特異的抗 α_2 -AP 血清の作製が可能となり、Mancini 法による定量法を確立することができた。

2) これを 3'-Me-DAB 投与ラットでの血中 α_2 -AP 変動の吟味に応用し、同時に AFP の消長と対比した結果、AFP の一次反応に大体一致して増加し、その後やや低下するが 8 週より軽度の増加がみられ、16 週以後肝癌の発生に伴い著しい増加を示した。

3) AFP の変動との間には、その一次反応期の両者の変動には相関性を認めなかったが、肝癌期においては明らかに有意の相関性を認めた。さらに発生した腫瘍の占める大きさで大・小 2 群を分けて比較すると、より大きい腫瘍群の血清 α_2 -AP が有意の高値を示した。

4) 免疫組織学的検討の結果によると、 α_2 -AP は oval cell の一部にも見出されたが、小型肝細胞および成熟肝細胞により多く検出され、肝癌期には種々の組織型を呈する癌巣内に認められた。つまり癌部・非癌部を問わず、その分布は多様であった。

5) これらの点は Hochwald 法による *in vitro* の合成実験でも同様で、肝の癌部・非癌部共にこれを産生したが、癌部組織の方がより多量の α_2 -AP 合成を示した。ヌードマウスに肝癌組織と非癌のそれを移植した結果においてもこの現象を裏づけることができた。

以上より、3'-Me-DAB 肝癌時に血中に増加する α_2 -AP はその大部分が肝癌細胞に由来すると考えられるが、非癌部の細胞からの産生もこれに加わり、したがってその産生起源は多様であると考えられた。この点 AFP の場合とはかなり相違する面があることを明らかにし、両者の増量機序について推論を加えた。

(本研究は文部省がん特 I (和田) の補助により行われた。)

(本研究にあたり、抗 α_2 -AP 血清を供与された Prof. H. E. Weimer, University of California, Los Angeles, 抗 AFP 血清を供与された北大医学部第 1 生化学平井秀松教授、アミノ酸分析に御協力をいただいた北大薬学部石井信一教授、さらに本実験を通して懇切な御指導をたまわった本学第 2 病理学小野江為則教授に深く謝意を表します。

また、本講座坂本真一講師、北海道老年医学研究振興会川原田信博士の御協力に深謝します。)

1. Heim, W. G. and Lane, P. H.: Appearance of slow α_2 -globulin during the inflammatory response of the rat. *Nature* **203**, 1077-1078 (1964).
2. Darcy, D. A.: Response of a serum glycoprotein to tissue injury and necrosis. 1. The response to necrosis, hyperplasia and tumour growth. *Br. J. Exp. Pathol.* **45**, 281-293 (1964).
3. Weimer, H. E. and Benjamin, D. C.: Immunological detection of an acute-phase protein in rat serum. *Am. J. Physiol.* **209**, 736-744 (1965).
4. Weimer, H. E., Roberts, D. M. and Comb, J. C.: The α -macroglobulin response to an inflammatory stimulus in fasted rats. *J. Nutr.* **102**, 873-878 (1972).
5. Bohn, H.: Charakterisierung der schwangerschafts-assoziierten Glykoproteine als akute Phase-Proteine. Ihr Nachweis im Serum von Patienten mit Tumoren und anderen Erkrankungen. *Arch. Gynaekol.* **213**, 54-72 (1972).
6. Hudig, D., Sell, S., Newell, L. and Becker, F.: Experimental serum acute phase α_2 macroglobulin and AFP elevations in rats. In: Fishman, W. H. and Sell, S.: *Onco-developmental gene expression*. 701-706, Academic Press, New York, San Francisco, London (1976).
7. 小谷俊一, 坂本真一, 谷内 昭: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene ラット肝癌形成過程における血清蛋白の変動解析. I. 血清蛋白とくに seromuroid および haptoglobin と α -fetoprotein の対比研究. *札幌医誌* **49**, 187-203 (1980).
8. Avrameas, S. and Ternynck, T.: The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* **6**, 53-66 (1969).
9. Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* **5**, 1-78 (1958).
10. Scheidegger, J. J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy* **7**, 103-110 (1955).
11. Laurell, C. B.: Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* **10**, 358-361 (1965).
12. Hartree, E. F.: Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427 (1972).
13. Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.: Immunological quantitation of antigens

- by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254 (1965).
14. Winzler, R. J.: Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochem. Anal.* **2**, 279-311 (1955).
 15. Nakane, P. K. and Pierce, G. B. Jr.: Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 929-931 (1966).
 16. Hochwald, G. M., Thorbecke, G. J. and Asofsky, R.: Sites of formation of immune globulins and of a component of C₃. I. A new technique for the demonstration of the synthesis of individual serum proteins by tissues *in vitro*. *J. Exp. Med.* **114**, 459-470 (1961).
 17. Neuman, R. E. and McCoy, T. A.: Growth-promoting properties of pyruvate, oxalacetate, and α -ketoglutarate for isolated Walker carcinoma 256 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**, 303-306 (1958).
 18. 渡辺邦彦: 悪性腫瘍における血清 haptoglobin および seromucoid の増量機序に関する研究. *札幌医誌* **40**, 188-198 (1971).
 19. van Furth, R.: The formation of immunoglobulins by human tissues *in vitro*. II. Quantitative studies. *Immunology* **11**, 13-18 (1966).
 20. Jamieson, J. C., Friesen, A. D., Ashton, F. E. and Chou, B.: Studies on acute phase proteins of rat serum. I. Isolation and partial characterization of an α_1 -acid glycoprotein and an α_2 -macroglobulin. *Can. J. Biochem.* **50**, 856-870 (1972).
 21. Gordon, A. H.: The α macroglobulins of rat serum. *Biochem. J.* **159**, 643-650 (1976).
 22. Gauthier, F. and Mouray, H.: Rat α_2 acute-phase macroglobulin. Isolation and physicochemical properties. *Biochem. J.* **159**, 661-665 (1976).
 23. Eddington, C. L., Upchurch, H. F. and Kampschmidt, R. F.: Quantitation of plasma α_2 -AP globulin before and after stimulation with leukocytic extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **139**, 565-569 (1972).
 24. Ganrot, K.: α_2 -acute phase globulin in rat serum. Purification, determination and interaction with trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **295**, 245-251 (1973).
 25. Bosanquet, A. G., Chandler, A. M. and Gordon, A. H.: Effects of injury on the concentration of α_1 -macroglobulin and α_2 -macroglobulin in the plasmas of male and female rats. *Experientia* **32**, 1348-1349 (1976).
 26. Watabe, H.: Early appearance of embryonic α -globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **31**, 1192-1194 (1971).
 27. Onoé, T., Dempo, K., Kaneko, A. and Watabe, H.: Significance of α -fetoprotein appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis. *Gann Monogr. Cancer Res.* **14**, 233-247 (1973).
 28. Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A. and Onoé, T.: Immunofluorescent study on α -fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res.* **35**, 1282-1287 (1975).
 29. Kitagawa, T., Yokochi, T. and Sugano, H.: α -fetoprotein and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene or N-2-fluorenylacetamide. *Int. J. Cancer* **10**, 368-381 (1972).
 30. Weimer, H. E., Humelbaugh, C. and Roberts, D. M.: The α_2 -AP globulin of maternal and neonatal rat serums. *Am. J. Physiol.* **213**, 418-424 (1967).
 31. Sarcione, E. J. and Bogden, A. E.: Hepatic synthesis of α_2 (acute phase)-globulin of rat plasma. *Science* **153**, 547-548 (1966).
 32. Gitlin, D. and Boesman, M.: Sites of serum α -fetoprotein synthesis in the human and in the rat. *J. Clin. Invest.* **46**, 1010-1016 (1967).
 33. Rygaard, J.: Immunobiology of the mouse mutant "nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 761-762 (1969).
 34. Rygaard, J. and Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 758-760 (1969).
 35. Yoshimura, S., Tamaoki, N., Ueyama, Y. and Hata, J.: Plasma protein production by human tumors xenotransplanted in nude mice. *Cancer Res.* **38**, 3474-3478 (1978).
 36. Hudig, D., Sell, S., Newell, L. and Becker, F. F.: Rat α -macrofetoprotein (acute-phase α_2 -macroglobulin) during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **39**, 3715-3719 (1979).
 37. van Gool, J., Schreuder, J. and Ladiges, N. C. J. J.: Inhibitory effect of foetal α_2 globulin, an acute phase protein, on carrageenin oedema in the rat. *J. Pathol.* **112**, 245-262 (1974).