

原著

## ラット肝化学発癌過程における cyclophilin B の発現変化

細井一広<sup>1)</sup> 照井一史<sup>1)</sup> 中川潤一<sup>1)</sup> 下山律子<sup>1)</sup>  
津山博匡<sup>1)</sup> 板垣史郎<sup>1)</sup> 土田成紀<sup>2)</sup> 早狩誠<sup>1,3)</sup>

**抄録** Solt-Farber 法にて発現誘導したラット肝前がん病変での cyclophilin B (CyPB) の発現変化について CyPB に対するペプチド抗体を用いて解析した。Diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与後、2-acetylaminofluorene (FAA) を経口投与し部分切除を行った群において、部分切除3週より特異的な腫瘍マーカーである GST-P の強力な発現誘導が認められ、前がん病変の形成を確認した。抗N末端抗体は正常ラットおよび化学発癌を施行した肝臓および精巣に分子量約20 kDa のバンドを認め、そのバンドは CyPB であることが推定された。前がん病変での CyPB の発現は肝切除後1週から上昇し、6週まで発現量は約2倍であった。また、血清での CyPB の発現は肝での発現から遅れて4週より徐々に上昇し7週で約1.6倍であった。以上から、CyPB は肝臓の腫瘍マーカーの候補の可能性が示唆された。

弘前医学 65 : 164—172, 2014

**キーワード** : ラット肝化学発癌 ; GST-P ; CyPB ; ペプチド抗体.

ORIGINAL ARTICLE

## ALTERATION OF EXPRESSION OF CYCLOPHILIN B IN THE RAT CHEMICAL HEPATOCARCINOGENESIS

Kazuhiro Hosoi<sup>1)</sup>, Kazufumi Terui<sup>1)</sup>, Junichi Nakagawa<sup>1)</sup>, Ritsuko Shimoyama<sup>1)</sup>,  
Hiromasa Tsuyama<sup>1)</sup>, Shiro Itagaki<sup>1)</sup>, Shigeki Tsuchida<sup>2)</sup>, and Makoto Hayakari<sup>1,3)</sup>

**Abstract** Altered expression of cyclophilin B (CyPB) in chemically induced hepatocarcinogenesis of rat, which was subjected to the Solt-Farber protocol, was analyzed by anti-N-terminal peptide antibody for CyPB. In a group of the partially hepatectomized rats after administration of diethylnitrosamine (DEN) interperitoneally followed by the oral administration of 2-acetylaminofluorene (FAA), marked induction of a tumor-specific marker GST-P and the formation of the precancerous lesion in rat liver were observed. A band of approximately 20 kDa molecular weight was detected by anti-N-terminal peptide antibody in the normal liver and testis. This band was estimated as a CyPB protein. The levels of CyPB in the precancerous lesion were increased from 1 week after hepatectomy, and the increase was approximately 2-fold up to 6 weeks. In addition, the levels of CyPB in serum were gradually increased from 4 to 7 week with delayed kinetics in the liver. The levels of CyPB were increased approximately 1.6-fold at the point of 7 week after the hepatectomy. These results suggested the possible role of CyPB as a tumor marker of the hepatocellular carcinoma.

Hirosaki Med. J. 65 : 164—172, 2014

**Key words**: rat chemical hepatocarcinogenesis; GST-P; CyPB; anti-peptide antibody.

<sup>1)</sup> 弘前大学医学部附属病院薬剤部

<sup>2)</sup> 弘前大学大学院医学研究科ゲノム生化学講座

<sup>3)</sup> 弘前大学大学院医学研究科薬剤学講座

別刷請求先：早狩 誠

平成25年12月19日受付

平成25年12月26日受理

<sup>1)</sup> Department of Pharmacy, Hirosaki University School of Medicine & Hospital

<sup>2)</sup> Department of Biochemistry and Genome Biology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

<sup>3)</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Correspondence: M. Hayakari

Received for publication, December 19, 2013

Accepted for publication, December 26, 2013

## 結 言

サイクロフィリン(cyclophilin: CyP)は免疫抑制剤であるシクロスポリンに結合するタンパクとして発見された酵素タンパクファミリーである<sup>1)</sup>。ラットCyPBはアミノ酸216残基からなる分子量23,803のタンパクであり、他の種(ウシおよびヒト)と高い相同性(約93%)を有し、1番から33番の配列はシグナル配列である(図1)。

その機能としてポリペプチドにおけるプロリンのアミド結合の cis-trans 異性化を触媒する peptidylproline cis-trans isomerase (PPIase) 活性の他、グリコシル基の転移、N末端の修飾やリン酸化など多くの機能を持ち、さらに変性タンパク、糖質コルチコイドレセプターやイオンチャネルなどを含む分子複合体の共調節ユニットとしての機能を有するものも知られている。CyPはまた、細胞内に豊富に含まれるタンパクであり、CyPA、CyPB、CyPCなど多数の分子種の存在が知られている。それらは、タンパクのリフォーリング、シクロスポリン以外のタクロリムスやラパマイシンなどの免疫抑制剤への結合タンパクとして、さらにはCD抗原のシグナリングタンパクとしての機能を持つことも明らかにされている<sup>2-4)</sup>。中でもCyPBはヒトC型肝炎ウイルス(HCV)複製の促進に関与しているため、肝がんや肝硬変などの肝疾患に関連することが示唆され

ている<sup>5)</sup>。近年ヒト肝細胞癌(HCC)および結腸癌組織の78%および91%においてCyPBが過剰発現し、その過剰発現は患者の生存を減少することが示された<sup>6)</sup>。このように、CyPは生命活動の維持、保全に重要な役割を果たすと考えられているタンパクにも係わらず、その生理学的な役割の詳細は不明な点が多い<sup>7)</sup>。

今回、我々はラット CyPB のN末端ペプチドおよびC末端ペプチドを抗原として抗 CyPB ペプチド抗体を作製し、Solt-Farber 法<sup>8)</sup>によりラット肝臓に前がん病変(Hyperplastic nodule: HN)を発現誘導し、これらの肝臓における CyPB の発現変化を解析した。

## 材料および方法

### 1. 試薬

ペプチド合成にはFmocアミノ酸を用いた。その他合成用試薬(トリフルオロ酢酸:TFA, エーテル, HPLC用アセトニトリル)は和光純薬(株)(東京)から購入した。抗GST-P抗体および抗GADPH抗体はMBL社より、シグマ-アルドリッチ社よりそれぞれ購入した。ECL検出用ニトロセルロース膜, HRP結合二次抗体および発色試薬はBio-Rad社(株)(東京)より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

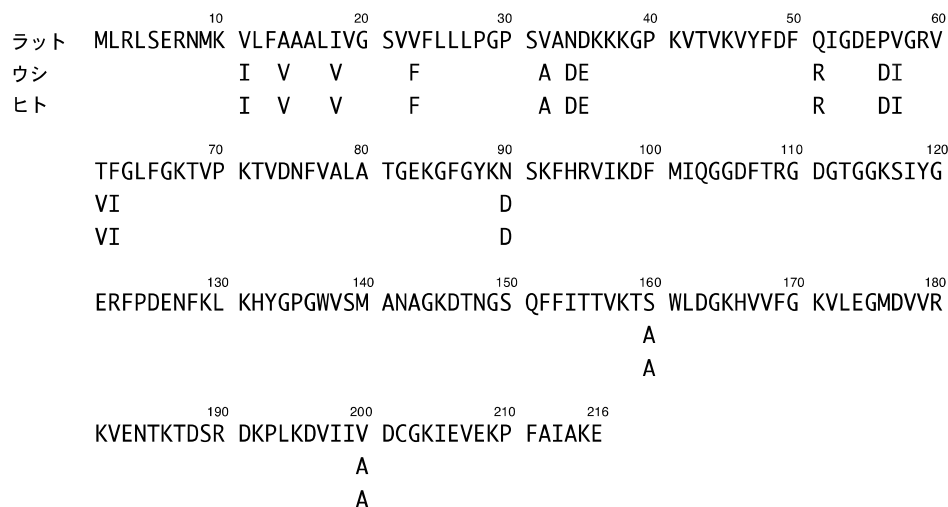


図1 ラット, ウシ, ヒトにおける CyPB のアミノ酸配列。

## 2. ラットの前がん病変肝およびその他の肝臓サンプルの調製

ラットの前癌病変肝臓は Solt-Farber 法<sup>8)</sup>により作製した。Sprague-Dawley ラット(雄, 体重250 g, 日本クレア株式会社より購入)に diethylnitrosamine (DEN: 200 mg/kg) を腹腔内投与した後, 基礎食(日本クレア株式会社より購入)を2週間自由摂食させた。次に0.02% 2-acetylaminofluorene (FAA) を含む粉餌(日本クレア株式会社より購入)を与え, 1週間後に部分肝切除を行った(図2A)。その後7週間飼育し経過期日ごとにラットを安楽死させ肝臓および血液を採取した。なお, 動物実験については弘前大学医学部動物実験委員会の承認(承認番号: M13014-1)を得て実施した。

## 3. 抗原ペプチドの合成および抗体の作成

CyPBのN末端(NDKKKGPKVTVKVYF, MW=1,854)およびC末端(GKIEVEKPFAlAKE, MW=1,662)の配列はFmocアミノ酸を用いて合成した。なお, 両ペプチドの非抗原末端にはキャリアー蛋白と結合のためにCysを導入した。合成後常法によりペプチドを回収し, HPLCによって精製後, 質量分析にてそれぞれの質量数を確認した。その後MBS(*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxyl-succinimide ester)<sup>9)</sup>にて化学修飾したKLH(keyhole limpet hemocyanin)に結合させ免疫まで冷凍保存した。KLH結合ペプチドをアジュバンドと供に10日間隔で5回家兎の背部に皮下注射しN末端およびC末端抗体を作製した。

## 4. SDS-PAGE およびイムノブロット法

試料の分離はLaemmliの方法<sup>10)</sup>によりアクリルアミド濃度(12.5%)ゲルを用いて行った。

また, 電気泳動ゲルよりECL用ニトロセルロース膜への転写はタンク式転写装置(Bio-Rad社製)を用いた<sup>11)</sup>。ニトロセルロース膜は3%スキムミルク/TBS溶液でブロッキングし, 上記抗CyPB抗体(x1,000, 3時間), 次いで二次抗体(x1,000, 90分間)と反応後, ECL法<sup>12-14)</sup>によってタンパクを検出した。検出したCyPBはNIH Image画像解析用ソフトを用いて解析した。

## 5. タンパク質の定量

タンパクはBradford<sup>15)</sup>によって定量したウシ血清アルブミンを標準物質として検量線を作製し, 発色液はプロテインアッセイキット(Bio-Rad社)を用いた。反応はマイクロタイタープレートで行い, 吸光度はプレートリーダー(Model 680, Bio-Rad社)を用い595 nmで測定した。

## 結 果

### 1. ラット肝化学発癌における抗CyPB抗体反応陽性タンパクの検出

作製した抗体の適正を検定するために弘前大学大学院保健学研究科佐藤公彦前教授よりラット肝前がん病変試料の提供を受け, 我々が作製した試料とともに両抗体でのCyPBの検出を行った。なお, 提供を受けた試料は, Solt-Farber法<sup>8)</sup>によりラット肝に前がん病変を誘導し, 5週間後に採取した試料である。また, 我々が作製した試料は同法において6週間後に採取したものである。ラット肝の10%ホモジネートの遠心上清をSDS-PAGEで分離後, N末端およびC末端によってCyPBを検出した結果, 提供試料および自作試料の双方に, 両抗体が認識する分子量約20 kDaのバンドが正常およびHNにおいて検出された(図2B)。ラットCyPBの全アミノ酸数は216残基であるが, シグナル配列はアミノ酸残基1番から33番までであることから, 生体内ではアミノ酸残基数は183個と考えられ, その分子量は約20 kDaに相当することから, 今回両抗体で検出された分子量約20 kDaのバンドはCyPBであると考えられた。

なお, HNにおけるCyPBの発現量は画像解析により正常肝に比較して約1.2~2.9倍であった(図2B)。

また, C末端を抗原として作成した抗体による検出では, 佐藤氏より提供されたHNにおいて20 kDaより小さい分子量を示すバンド(CARP: CyPB-antibody reacting protein)が特異的に検出された。本研究では, このCARPの構造解析を行い, CyPBも含めた肝化学発癌での役割について検討を試みたが, CARPは純度が増すにつれて不溶性を示し構造解析にまでは至らなかった。

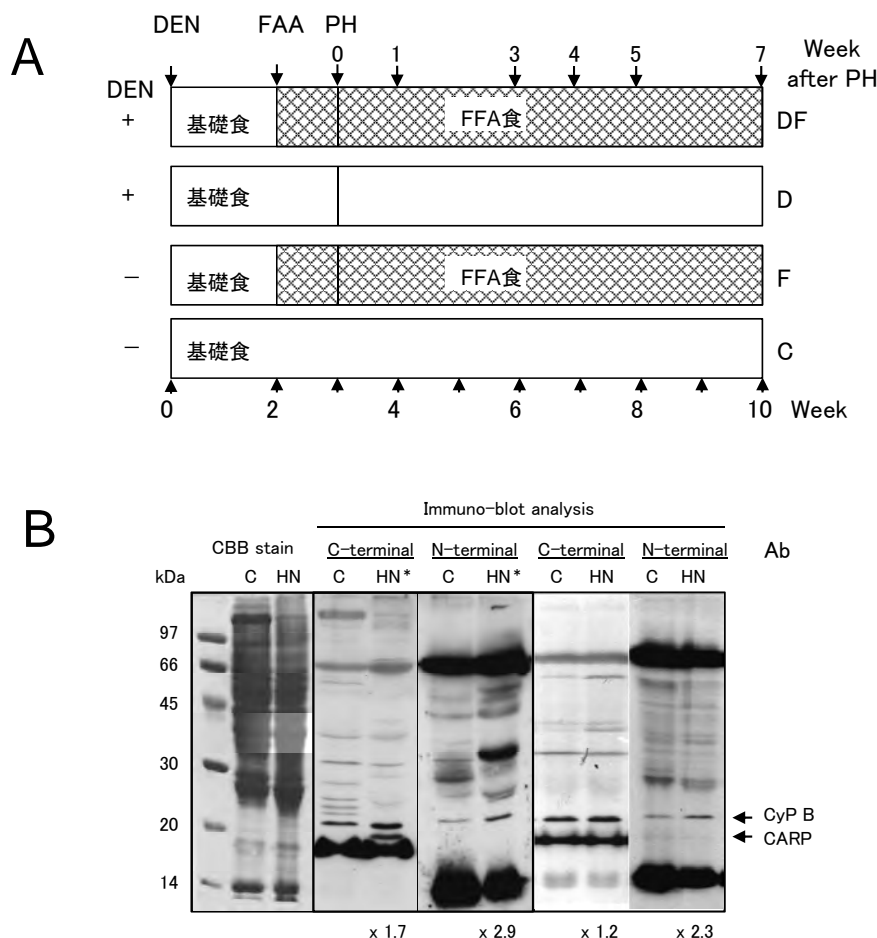


図2 Solt-Farber肝化学発癌過程(A)および前がん病変でのCyPBの検出(B).  
PH: 部分肝切除施行, C: 対象, HN: 肝前がん病変. 図中倍率: 各試料におけるバンドの density の比率 (HN/C).

なお、以下の検討では抗体との交差反応を示す物質が近接しない(図2B) N末端抗体を用いて行った。

## 2. GST-Pによるラット肝化学発癌による前がん病変の確認

GST-Pはラット肝化学発癌による前がん病変の優れたマーカーであることが確認されている<sup>16-19)</sup>。我々が作製した試料に前がん病変が形成されているかについて抗 GST-P 抗体を用いて確認した。内部標準物質は抗 GADPH 抗体を用いて検出した。試料は部分肝切除後からの試料を用いた。なお、前がん病変作製時死亡例が生じラットの例数の確保が困難となり今回の検討はすべて2例で行った。その結果、部分肝切除時に採取した肝においてすでに僅かながら GST-P の発現が認

められ、その発現は日数の経過とともに増加し、その発現量は最終的に約17倍となった(図3A)。

なお、GST-Pは正常肝臓ではごく僅かしか発現せず、化学発癌のイニシエーターである DEN により発現が誘導され、さらにプロモーターである FAA の投与により発現が飛躍的に増幅される<sup>16)</sup>。今回得られた結果で部分肝切除時にすでに GST-P の発現が認められたのは、DEN により誘導され、さらに術後投与された FAA により GST-P の発現が強力に誘導されたものと考えられた。

## 3. CyPBの臓器分布

正常ラットの各臓器(肝臓, 脳, 肺, 心臓, 脾臓, 腎臓, 精巣)における CyPB の発現を検討した。その結果、CyPBは正常ラット肝臓および精

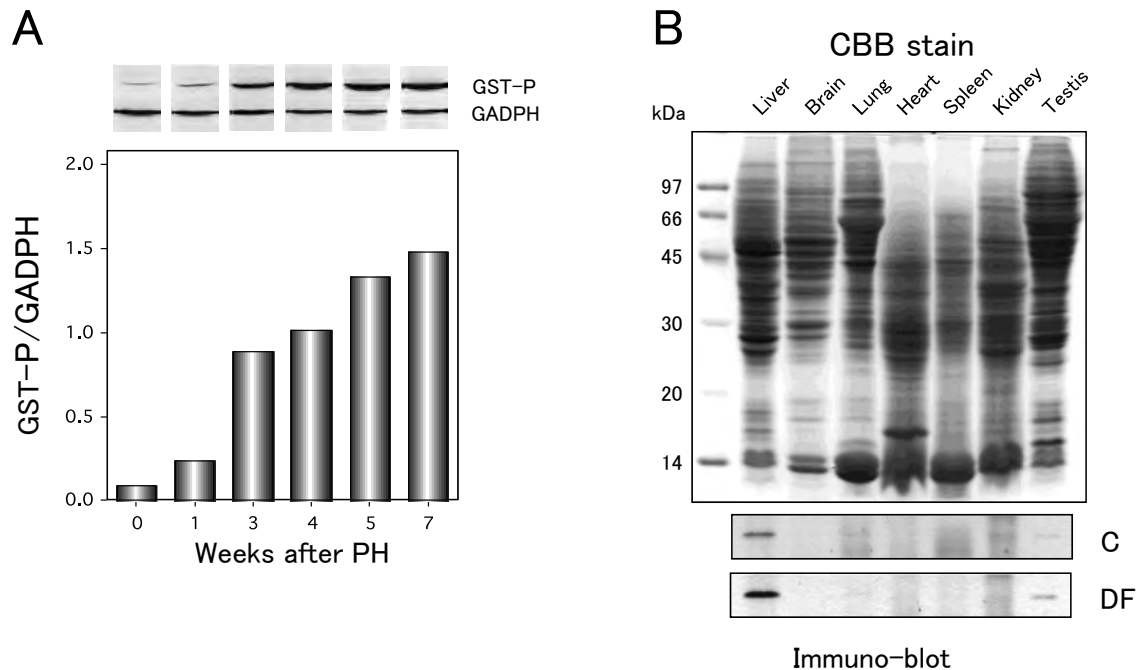


図3 前がん病変での GST-P の検出(A)およびラット各臓器での CyPB の検出(B).  
C : 対象, DF : DEN 腹腔内投与後 FAA を摂食させた後, 部分肝切除を行った試料(切除後3週).

巢に発現し, しかも肝臓で発現が高かった. また, DEN および FAA 投与後部分切除した群(DF 群)では, CyPB は正常ラットと同様の臓器と分布を示したが, その発現量は正常ラットに比べ増加していた(図3C).

#### 4. ラット肝前がん病変での CyPB の発現変化

上記検討において今回我々が作製したラット肝(HN)に前がん病変の形成が確認されたことから, これらの試料を用いて CyPB の発現変化を解析した. 内部標準物質は GST-P の検出と同様に GADPH を用いた. なお, 部分肝切除時に採取したC群の平均値を基準に各試料の値を標準化した( $n = 2$ ).

まず, 予備検討を行った結果, 各群の試料でいずれも CyPB の発現が認められた(図4A). 従って, 各群の試料について定量化を行った. その結果, 部分肝切除時ではD群, F群, そしてDF群のいずれもC群と同程度の発現量を示した(図4B). また, C群は日数が経過してもほぼ一定の発現量を示し, D群でも同様の傾向を示した.

一方, DF 群では部分肝切除後1週から5週ま

で発現が増加し, その時の発現量は2倍以上を示した. しかしながら7週ではC群と同様の発現量を示した. また, F群はC群に比べ3週より比較的高い発現量を示したが, 3週以降では発現量は減少傾向を示した(図4B).

#### 5. ラット血清中 CyPB 濃度変化

肝化学発癌を誘導したラット血清中 CyPB の濃度変化を解析し, 腫瘍マーカーとしての可能性について検討した. 対象は前がん病変が形成されていた時期でのラット血清(タンパク量: 100  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )について検討を行った( $n = 2$ ). また, 部分肝切除3週に採取したC群の平均値を基準に各試料の値を標準化した. その結果, DF 群は部分肝切除4週より他群と比較して上昇し, 7週では約1.7倍の値を示した(図5).

## 考 察

近年ヒト肝細胞癌(HCC)の78%において peptidyl-proline cis-trans isomerase (PPIase) 活性を有する CyPB が過剰発現し, その過剰発現

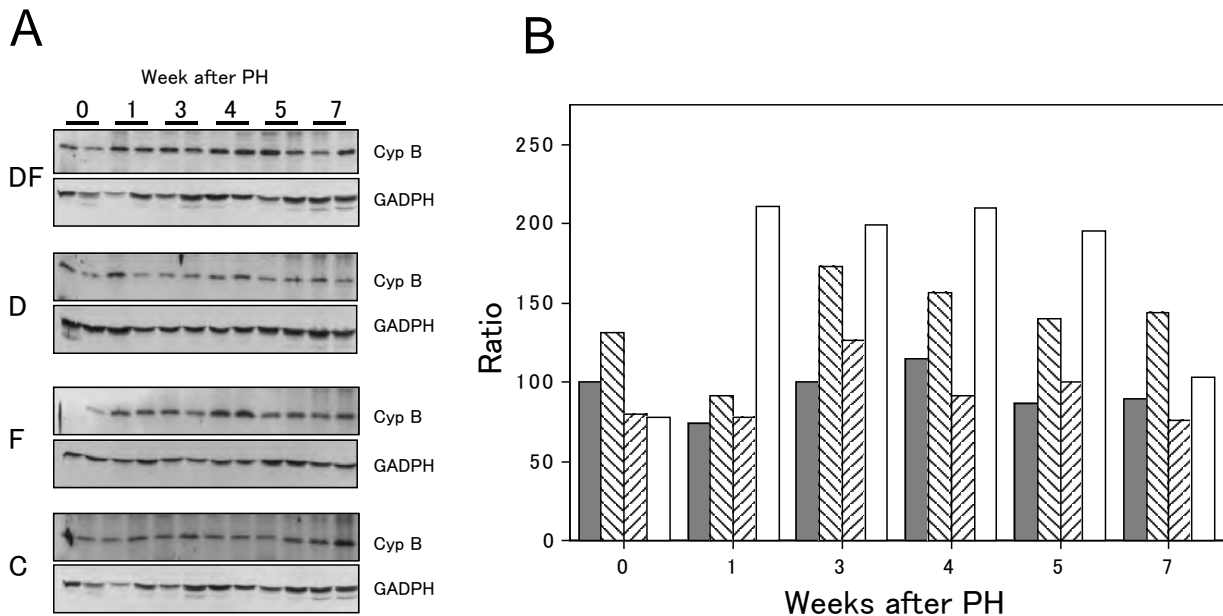


図4 前がん病変試料での CyPB の検出。  
 A：部分肝切除後に採取した各試料のイムノブロットによる CyPB の検出例。使用した抗体は抗N末端抗体。  
 B：前がん病変試料での CyPB の発現量 (n = 2)。  
 ■：C群, ▨：F群, ▩：D群, □：DF群。

は患者の生存に大きく影響を及ぼすことが報告された<sup>6)</sup>。本研究では、CyPBの機能解析を目的としラット肝前がん病変モデルでのCyPBの発現変化について基礎的検討を行った。

まず、本検討を行うにあたって抗体の作製を行った。一般にペプチド抗体の作製は目的タンパク質のNまたはC末端、あるいは構造内の親水性部分の配列を用いることが常法となっている。CyPBは比較的分子量を示すタンパク質であることから、本検討ではNおよびC末端領域(それぞれアミノ酸15残基)の配列を抗原として選択し、その非抗原部位にCysを導入したペプチドを合成した。また、キャリアー蛋白として哺乳類には存在しないKLHを選択した。このKLHをSH基と反応性が高い官能基を有するMBSで化学修飾した後<sup>9)</sup>、合成した抗原ペプチドに導入したCys残基のSH基と反応させた抱合体をウサギに免疫して抗体を作製した。

次に、すでに前がん病変の形成が確認されているラット肝(佐藤公彦博士より提供された)および今回我々が作製したラット肝を用いて、各抗体によるCyPBの検出を行った。その結果、提供試料

および新規作製試料ともに分子量約20 kDaの位置にバンドを確認することができた(図2B)。ラットにおける成熟CyPBのアミノ酸数(183個)から想定された分子量は約20 kDaであり、検出された約20 kDaの蛋白はCyPBと考えられた。この結果から両抗体ともラットCyPBを認識する抗体であることが明らかとなった。なお、提供試料および自作試料でのCyPBの発現量は正常肝に比べ高い傾向を示した(図2B)。

一方提供を受けた試料において抗C末端抗体は、CyPBより低分子のバンドを認識した。この物質は抗N末端抗体とは反応しないことから、CyPBの代謝物(C末端部分)である可能性が想定されるが、肝がんでのマーカー蛋白としての有用性や生理的役割の解明の必要性から、構造解析を目的とし、抗C末端抗体カラムやHPLC等による単離を試みたが、この物質は精製度が増すにつれて不溶性を示したため単離を断念した。この物質は肝前がん病変において出現する物質であることから、その発現機序等の解析が切望される。

なお、正常およびDF群(部分肝切除3週)の各臓器でのCyPBの発現について抗N末端抗体を

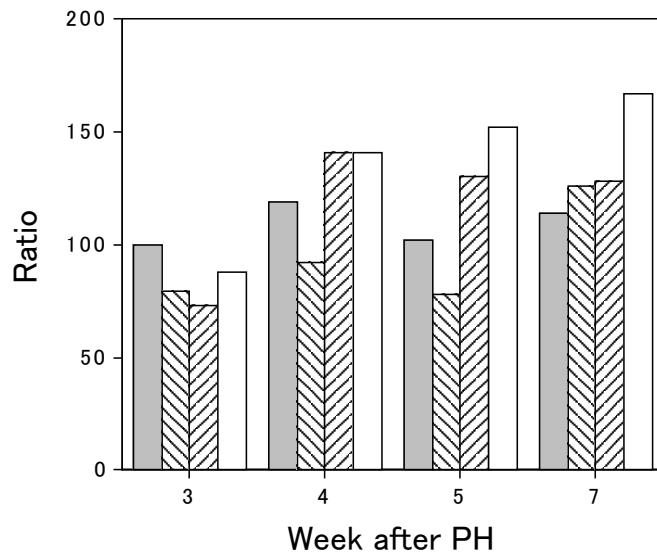


図5 血清中 CyPB の発現変化。  
部分肝切除後 3 週から 7 週までの試料(各週n = 2)を用いた。  
■ : C群, ▨ : F群, ▩ : D群, □ : DF群.

用いて検討した結果, CyPB は肝臓および精巣において発現が認められ, その発現は DF 群で高い傾向を示した(図3B, C). しかしながら, 正常ラットにおける他の臓器では CyPB の発現は認められず, また DF 群においても発現誘導は認められなかった.

次に今回作製したラット肝前がん病変では, DF 群の部分肝切除後の試料においてすでに僅かながら GST-P が発現していた. さらにその発現は部分肝切除 3 週より急激に増加し, その発現量は 7 週で約 17 倍であった(図3A). この結果は, 肝臓に前がん病変が形成されたことを示す結果と考えられ, これらの肝臓での CyPB の発現変化について検討を行った.

DF 群での CyPB の発現は部分肝切除 1 週より増加し, 肝前がん病変のマーカーである GST-P より早い時期に上昇し, 病変が生じる早期に CyPB の発現が誘導されることが明らかとなった. しかしながら, その発現誘導は, GST-P とは異なり約 2 倍程度で, しかも 7 週で正常値に回復した. ヒト HCC における CyPB の発現は, 正常部位ではほとんど認められず, 腫瘍部位では過剰となったとされている<sup>6)</sup>, 一方ラット正常肝では, ヒトの報告とは異なり CyPB の発現が認

められたが, 前がん病変での発現量は過剰までは至らなかった(約 2 倍)(図3B, 図4B).

さらに, 腫瘍マーカーとしての可能性について血清中 CyPB の発現変化を解析した結果, 血清中 CyPB の発現は部分肝切除後 7 週で 3 週の C 群に比べ約 1.6 倍の発現上昇を示したが(図 5), 肝での発現パターン(図4B)とは一致しなかった.

一般にヒトでの腫瘍マーカー酵素である GST P1-1 の血清中レベルは, 食道癌, 大腸癌, 肺癌そして口腔癌などの病期の進んだ患者で高い値を示すが<sup>20-22)</sup>, 肝癌では高い血清レベルを示す患者の割合は少ないことが報告されている<sup>19)</sup>. また, GST P1-1 は細胞内に局在する酵素であることから, 各種癌疾患における血清 GST P1-1 は癌細胞由来である可能性が考えられている. しかしながら, 早期では正常組織からの漏出の影響により血清 GST P1-1 レベルは比較的高い値を示し, 早期の病期ではその変動を検出することは困難とされている<sup>19)</sup>.

今回検討した試料は病期の進んだ HCC とは異なり, 重症度が低い前がん状態であったことから, CyPB の発現が十分でなかった可能性や, 血清中での CyPB の変動も十分でなかった可能性が考えられる. CyPB の発現や機能の抑制はヒト

肝癌において生存率の向上につながる可能性が示唆されている<sup>6)</sup>。さらに癌治療に向けたペプチドワクチンの抗原としての有用性が検討され<sup>23,24)</sup>、CyPB 関連抗原は前立腺癌治療へのペプチドワクチンとして利用され、現在臨床試験が行われている。従って、CyPB の機能解析は必須と考えられ、今後化学発癌が進行した試料での発現変化の解析を行い、ラット肝病変での CyPB の機能および有用性についての検討が必要と考えられた。

## 謝 辞

本研究は科学研究費助成事業(奨励研究: 研究番号: 24929016)によって行われた。また試料を提供して下さった弘前大学大学院保健学研究科前教授佐藤公彦博士に深謝致します。

## 引 用 文 献

- 1) Galat A. Peptidylproline cis-trans isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* 1993;216:689-707.
- 2) Schönbrunner ER, Mayer S, Tropschug M, Fischer G, Takahashi N, Schmid FX. Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J Biol Chem* 1991;266:3630-5.
- 3) Yurchenko V, O'Connor M, Dai WW, Guo H, Toole B, Sherry B, Bukrinsky M. CD147 is a signaling receptor for Cyclophilin B. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:786-8.
- 4) Bose S, Mücke M, Freedman RB. The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans-isomerase from the endoplasmic-reticulum lumen. *Biochem J* 1994;300:871-5.
- 5) Heitman J, Cullen BR. Cyclophilin B escorts the hepatitis C virus RNA polymerase: a viral Achilles heel? *Mol Cell* 2005;19:145-6.
- 6) Kim Y, Jang M, Lim S, Won H, Yoon KS, Park JH, Kim HJ, et al. Role of cyclophilin B in tumorigenesis and cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma in humans. *Hepatology* 2011;54:1661-78.
- 7) Bukrinsky MI. Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications. *Trends Immunol* 2002;23:323-4.
- 8) Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976;263:701-3.
- 9) Liu FT, Zinnecker M, Hamaoka T, Katz DH. New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids and immunochemical characterization of such conjugates. *Biochemistry* 1979;18:690-3.
- 10) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 11) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- 12) Lauriere M. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal Biochem* 1993;212:206-11.
- 13) Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory *Clin Chem* 1979;25:1531-46.
- 14) Fu XY: A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon  $\alpha$ -induced cytoplasmic protein tyrosine kinase. *Cell* 1992;70:323-35.
- 15) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 16) Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase. a new marker enzyme for preneoplastic cells in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3964-8.
- 17) Satoh K, Takahashi G, Miura T, Hayakari M, Hatayama I. Enzymatic detection of precursor cell populations of preneoplastic foci positive for  $\gamma$ -glutamyltrans-peptidase in rat liver. *Int J Cancer* 2005;115:711-6.



- 18) Satoh K, Yamakawa D, Sugio H, Kida K, Sato T, Hosoi K, Hayakari M. Bile duct-bound growth of precursor cells of preneoplastic foci inducible in the initiation stage of rat chemical hepatocarcinogenesis by 2-acetylaminofluorene. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:604-10.
- 19) 土田成紀, 木村淳也, 早狩 誠, 石川 孝. 腫瘍マーカーとしてのGlutathion S-transferaseの有用性. *臨床病理* 1997;45:1125-32.
- 20) Tsuchida S, Sekine Y, Shineha R, Nishihira T, Sato K. Elevation of the placental glutathione S-transferase form in tumor tissues and the levels in sera of patients with cancer. *Cancer Res* 1989;49:5225-9.
- 21) 松本 貴. 産婦人科領域及び各種悪性腫瘍患者における血清胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ量の変動. *弘前医学* 1996;48:164-74.
- 22) Beckett GJ, Hayes JD. Glutathion S-transferase: biomedical applications. *Adv Clin Chem* 1993;30:281-380.
- 23) Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, et al. Phase 1 clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for patients with lung cancer. *J Immunother* 2002;25:439-44.
- 24) Yamada A, Yano H, Takao Y, Ono T, Matsumoto T, Itoh K. Nonmutated self-antigen-derived cancer vaccine peptides elicit an IgE-independent but mast cell-dependent immediate-type skin reaction without systemic anaphylaxis. *J Immunol* 2006;176:857-63.