

移植動物癌の抗腫瘍性抗体産生に関する研究

第 1 編

癌細胞感作家兎非吸着血清中の抗腫瘍性抗体の消長について

(本論文の要旨は第21回日本癌学会総会において発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内傳之助教授)

大学院 武 田 淳 志
学 生

〔昭和37年12月25日受稿〕

目 次

第1章 緒 言	第3項 対 照 群
第2章 実験方法	第3章 実験成績
第1節 実験動物	第1節 血清の蛋白分層と蛋白濃度
第2節 実験腫瘍	第1項 静注群
第3節 採血法	第2項 Adjuvant 群
第4節 血清蛋白分層測定法	第2節 血清の腫瘍細胞嫌気性解糖抑制作用
第5節 腫瘍細胞の嫌気性解糖測定法	第1項 予備実験
第1項 予備実験	第2項 実験群
第2項 本実験	第3項 小 括
第6節 中和実験	第3節 腫瘍細胞との中和実験
第7節 腫瘍細胞による家兎の感作方法	第1項 実験群
第8節 実験群	第2項 小 括
第1項 静注群	第4章 総括ならびに考按
第2項 Adjuvant 群	第5章 結 論

第1章 緒 言

癌細胞中に特異抗原が存在するか否かについては、これまで議論の多々あるところである。生体が癌に対する抵抗力を有するものと仮定し、これを助長促進することによって癌をある程度阻止できないであろうかという考えの基礎となつているのが癌免疫の問題である。癌にも免疫があるとの考えは移植癌に始まり、20世紀初期、すでに移植癌が一旦消失した後ではその動物は同一癌の再移植に抵抗性をもつことが知られた。1910年 Rous はこのような免疫は癌細胞と同様に胎児細胞の増殖も阻止することを知り、また Haaland⁵⁹⁾ は癌の自家移植免疫は成立しないとした。1929年 Woglom⁴²⁾ は綜説を書き、免疫による癌治療の見通しは極めて暗いと結論した、かか

る状況下で Gorer⁶⁰⁾ は移植免疫において抗原の存在を確認し、ついで Snell⁵⁷⁾ は多くの isogenic line のマウスを用いて移植組織の運命を決定する抗原の存否が histocompatibility gene によつて決定されることを明らかにした。その後移植癌に対する免疫は、delayed type の hypersensitivity で知られるように、細胞の移入による adoptive immunization が可能なこと、すなわち、リンパ細胞が関与していることがわかったが、さらに体液性因子も協同的に働くことが知られた。こうして移植癌に対する宿主の抵抗性は正常組織の移植と同様おそらく宿主動物のすべての細胞に存在する組織適合抗原によるものであるとされた。

このような癌の特異抗原の証明を企てた実験は次の3群に分かたれる、

1. 癌患者あるいは担癌動物の血清と腫瘍組織抽出液との間の免疫反応を証明しようとする方法。
2. 癌細胞で異種動物を免疫して、そこに正常組織に対する抗体とは異なる抗体を発見しようというもの。
3. 動物を癌組織で免疫し、その動物の癌移植に対する抵抗性の増強と免疫反応との関連を調べようという方法。

本実験ではこの中から第2の方法を選んだ。すなわち、癌組織を用いて異種動物を感作し、感作動物血清中に癌の抗体が出現するか、また存在するとすればその抗体が時間的経過によつていかに変化するかを検討した。

異種動物を癌組織で感作して腫瘍特異抗体を作る試みは多くの研究者によつてなされている(1-13)(18-19)(22-23)(26-29)(35)(39-44)(57)(69-80)。古く1910年代には Lambert⁶⁻⁷⁾、Phelps⁸⁾、Pybus 及び Whitehead⁹⁾らは抗血清は *in vitro* では無効だとしたが、Lumsden¹¹⁻¹³⁾以来腫瘍特異抗体は存在するものとされた。これら多くの文献中、異種動物を感作した場合、その抗体の消長について時間を追つて観察した文献はない。卵白アルブミンを抗原として家兎を感作した三宅¹⁴⁾は、約6ヶ月間その抗体を追究している。彼によれば、卵白に対する家兎血清中の抗体価は Adjuvant 法で感作後、8~20週が極期であるという。一般に異種動物を癌組織で感作した後の腫瘍抗体は感作後数週間が高いとされている(15-17)(20)(22-23)(27-28)が、明らかな根拠はない。

血清などの抗腫瘍性を何を用いて調べるかということ、重要な問題であるが、1つは生物学的に *in vitro* でこれら検体と腫瘍細胞とを incubate し、その後感受性動物に移植して、その移植能や増殖能にいかなる変動が出るかをみる、いわゆる中和実験がもつとも良い方法であろう。何となれば、腫瘍細胞は感受性動物に移植されて初めて、正常細胞とは異なる悪性の態度を示すものであるからである。次に生化学的な癌細胞の特長は、Warburg の発癌説³³⁻³⁴⁾の基礎にもなっているごとく、嫌気性解糖能が異常に亢進していることである。従つて、*in vitro* で検体たる血清や臓器が、腫瘍細胞の嫌気性解糖能にいかなる影響を与えるかを調べることも意義が大きいと思われる。

以上の理由から、本実験では Ehrlich 腹水癌細胞で家兎を感作し、感作前と感作後の経時的变化を血清蛋白分層、抗血清の嫌気性解糖実験、抗血清の

腫瘍細胞との中和実験とを用いて検討してみた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物には市販雑系家兎および岡山大学医学部マウスコロニーにて育成された雌雄の C57 Black マウスで、生後4~5週のものを購入し、体重20g前後にしたものを使用した。マウスの飼料はオリエンタル酵母製の実験用固形飼料 MF および新鮮野菜を用いた。家兎は体重2kg以上の雄を用い、飼料には市販豆腐粕と人参などの野菜を与えた。

第2節 実験腫瘍

実験に使用した悪性腫瘍は岡山大学癌源研究所より分与された Ehrlich 腹水腫瘍である。

実験にあつては C57 BL₁ マウスの腹腔内に継代移植を行ない、移植後1週から10日以内の非血性ものを供した。使用時、Ehrlich 癌は生理食塩水で数回洗浄し³⁵⁾、できるだけ癌細胞のみにするよう心がけた。

第3節 採血法

家兎を仰臥位に固定し、胸部胸骨左縁部より、心臓穿刺を施行し、左室より約10mlの血液を吸引し、室温にて凝血させて血清を分離した。分離した血清は岡山大学中央研究室の冷凍室にて-40°Cに保存し²¹⁾、用に応じて以下の実験に供した。

採血は早朝空腹時を選び、実験に際し血清は56°C30分加熱して非働化したものを用いた。

モルモットの採血は、動物を両手で保持し、術者が胸骨左縁で心臓穿刺によつて採血し、血清を分離採取した。モルモット血清は補体として供し、抗腫瘍性を検する以下の実験には、Ehrlich 腹水癌細胞で吸着した新鮮血清を使用した。

第4節 血清蛋白分層測定法

濾紙電気泳動法⁶¹⁾により血清蛋白を分劃し、同時に血清蛋白濃度も測定した。

濾紙電気泳動器は夏目製作所製の小林式濾紙電気泳動装置を用い、整流器はSB型、泳動箱は直列式のものを使用した。

緩衝液はペロナール緩衝液で、電極槽には2%塩化カルシウム溶液を入れ、ブリッジは2%塩化カリ溶液に3%の割合で寒天末を加えたものを入れて使用した。

濾紙は東洋濾紙 No. 51 を用い、血清試料としては新鮮血清 0.04 ml. を置いた。

泳動条件は 5 mA, 250 Volt. で 5~5.5 時間泳

動し、泳動後直ちにタイヨー電気定温乾燥器にて110°C, 10分間乾燥し, Amidosewartz 10B 染色液で20分間染色, 以後2%酢酸液を用いて脱色した。

脱色後110°C, 10分間再乾燥し, パラフィンにて透明化したのち, アタゴ自積積分計付濾紙泳動用濃度計 AG-4 型で記録して百分比を求めた。同時に蛋白濃度を日立蛋白屈折計を用いて測定し, 各分層の蛋白濃度も計算した。

以上の実験条件は厳格に守り, 誤差を少なくするよう心がけた。

第5節 腫瘍細胞の嫌気性解糖測定法

後で述べる実験群の抗血清の腫瘍細胞の嫌気性解糖に対する抑制効果をみるために施行した。

柳本製作所製の Warburg 検圧計を用い, 容器は主室と側室2個を有する容器を使った。

実験方法³¹⁻³⁴⁾³⁸⁾は, 主室に生理食塩水で洗浄した腫瘍細胞 4×10⁶個 (0.5ml), Ca⁺⁺を除いた Krebs

Ringer Bicarbonate 緩衝液³⁵⁾ (pH 7.4) 0.5 ml., 1/10M. ブドウ糖溶液 0.5 ml. を入れ, 側室1に非働化する抗血清, 側室2に補体⁴⁰⁾を加えた。

容器をセットし, 窒素ガスを容器1つにつき, 毎分1.5 l., 3分間通して嫌気性とした。

検圧計は 37.5°C に保ち実験開始と同時に側室1を主室に加え, 30分後側室2の補体を加えた。観察時間は180分で打切った。

第1項 予備実験

第4節の血清蛋白分層測定により, γ-Globulin 上昇の確認された3回感作群第1例第3週目の血清を用いて, 腫瘍細胞4×10⁶個に対していか程の血清と補体を加えれば, 嫌気性解糖を最も強く抑制するかをみるために, 側室1・2に加える血清と補体の量を変えて実験した。

血清と補体の量については, 次のような組合せで施行した。

容器番号	主室	側室1	側室2
I	{ M/10 Glucose 0.5ml. Tumor cells 400万, 0.5ml. K. R. B. 0.5ml.	{ 血清 0.2ml. K. R. B. 0.3ml.	{ 補体 0.2ml. K. R. B. 0.3ml.
II	"	"	補体 0.5ml.
III	{ M/10 Glucose 0.5ml. Tumor cells 400万, 0.5ml.	"	補体 1.0ml.
IV	{ M/10 Glucose 0.5ml. Tumor cells 400万 0.5ml. K. R. B. 0.5ml.	{ 血清 0.1ml. K. R. B. 0.4ml.	補体 0.5ml.
V	"	{ 血清 0.3ml. K. R. B. 0.2ml.	{ 補体 0.3ml. K. R. B. 0.2ml.
VI	"	{ 血清 0.2ml. K. R. B. 0.3ml.	K. R. B. 0.5ml.
VII	"	K. R. B. 0.5ml.	補体 0.5ml.
VIII	"	"	K. R. B. 0.5ml
IX	"	感作前血清0.5ml.	補体 0.5ml.

第2項 本実験

予備実験より側室1に血清0.3ml., Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液 0.2 ml., 側室2に補体 0.3ml., Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液 0.2ml. を加えたものに最も好成績をえたので, 本実験はこの方法を採用した。

第6節 中和実験

次に述べる腫瘍細胞感作家兎血清と腫瘍細胞との中和実験を施行した。

実験方法はあらかじめ in vitro で中和したのち, マウスに移植して腫瘍細胞の移植能をみる方法を採

用した。

腫瘍細胞 2400 万個, 抗血清 0.6 ml. 補体 0.6 ml. を混じ, 37°C 1 時間孵卵器内で時々攪拌しながら incubate した。incubate した腫瘍細胞をマウス1匹につき4×10⁶個マウス腹腔内に移植し, その移植能と生存日数を検索した³⁶⁻³⁷⁾。

マウスは1血清につき6匹づつ使用し, 半数生存日数であらわし, 対照として正常血清を作用させたものを設けた。

第7節 腫瘍細胞による家兎の感作方法

a) 静注感作法

感作1回量として腫瘍細胞約 3×10^8 個を生理食塩水5 ml.に浮遊させて家兎の耳静脈より静注した²²⁾²⁵⁾²⁷⁻²⁸⁾³⁵⁾。前述のごとく、腫瘍細胞は生理食塩水で洗浄して、赤血球、腹水を除いた。

b) Freund の Adjuvant 法

(1) Freund の Adjuvant 調製法

Freund の Adjuvant 剤は流動パラフィン2 ml.に乾燥 B. C. G. 4 mg.を加えてよく混和しておき、別に Falva oil 1 ml.に、Ehrlich 腫瘍細胞 3×10^8 個を生理食塩水に pack したものの1~2 ml.を加えて乳剤とし、この乳剤を結核死菌加流動パラフィンに加えて充分混和した。

結核死菌は倉敷中央病院病理研究部より分譲されたものである。

(2) Adjuvant 法による感作法

(1)で作った Adjuvant 剤¹⁴⁾²⁴⁾²⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁷⁻⁴⁹⁾を1回量として、家兎肩胛骨間筋肉内に注入した。

第8節 実験群

家兎を静注法と Adjuvant 剤による筋注法の2方法で感作した。

第1項 静注群

a) 1回感作群：Ehrlich 腫瘍細胞 3×10^8 個を1回静注したもの。

b) 3回感作群：同量を3日間隔で3回静注したもの。

c) 6回感作群：同量を同間隔で6回静注したもの。

1群に2匹の家兎を供した。2回目以後の感作に際して、急速に静注すると shock 症状を呈するため、約15分を費し、脱感作しつつ徐々に注入した。

第2項 Adjuvant 群

前述の Adjuvant 剤を7日間隔2回筋注した。本

法には2匹の家兎を供した。

第3項 対照群

各群家兎の感作前血清(正常血清)を対照とした。家兎は個体差が大きいため、それぞれ同一家兎につき感作前のものを対照として、感作後の値と比較した。

以上1・2・3項の各群につき、血清蛋白分屑測定、嫌気性解糖実験、中和実験を施行した。

なお、嫌気性解糖実験と中和実験は最も長く生存した家兎を各群から1匹ずつ選んで実験した。

第3章 実験成績

第1節 血清の蛋白分屑と蛋白濃度

第1項 静注群

a) 1回感作群

1回感作群では、 γ -Globulin 値は第1例・第2例の最高値はそれぞれ20.6%, 18.1%で(表1)、その最高値はいずれも3週にあり、9週では対照とほとんど同じ値を示した。しかも γ -Globulin の変動はすべて正常範囲内にとどまっている。

Albumin は γ -Globulin が増加するにしたがつて相対的に減少し、週を追って γ -Globulin が減少するにつれて再び回復してくる。Albumin の絶対値には減少傾向は少ない。

血清蛋白濃度は多少増加する。

b) 3回感作群

表2に示すように、 γ -Globulin 値は第1例では3週で最高に達し、27.1%で、感作後6~9週にやや減少したのち、11週以後再び軽度上昇した。13週の経過観察中 γ -Globulin 値はすべて感作前より高くなった。

第2例では急激に蛋白濃度が増加し、 γ -Globulin

表 1 1回感作群家兎血清蛋白分屑

第 1 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
			α		β		γ		
	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	
感作前	59.1	3.40	10.6	0.62	14.8	0.86	15.5	0.90	5.8
第1週	55.4	3.32	10.9	0.65	14.6	0.88	19.1	1.14	6.0
第2週	56.9	3.53	10.8	0.65	13.2	0.79	19.2	1.15	6.0
第3週	54.0	3.29	11.5	0.70	13.9	0.85	20.6	1.26	6.1
第4週	57.8	3.65	10.0	0.64	13.1	0.84	19.1	1.22	6.4
第7週	57.9	3.53	10.5	0.64	13.2	0.80	19.4	1.18	6.1
第9週	59.6	3.58	11.4	0.68	14.2	0.85	14.8	0.89	6.0

第 2 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
	%	g/dl	α		β		γ		
感作前	59.8	3.38	10.7	0.61	15.1	0.76	14.4	0.82	5.7
第1週	58.4	3.50	10.6	0.64	14.7	0.88	16.3	1.00	6.0
第2週	55.1	3.42	12.2	0.76	15.3	0.95	17.3	1.07	6.2
第3週	57.6	3.69	10.2	0.65	14.1	0.90	18.1	1.16	6.4
第4週	57.9	3.71	10.1	0.65	14.3	0.92	17.7	1.13	6.4
第7週	58.1	3.60	10.6	0.66	14.7	0.91	16.6	1.03	6.2

表 2 3回感作群家兎血清蛋白分層

第 1 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
	%	g/dl	α		β		γ		
感作前	58.7	3.64	9.0	0.56	15.9	0.99	16.4	1.01	6.2
第1週	51.9	3.63	13.4	0.93	14.0	0.94	20.7	1.45	7.0
第2週	54.1	3.84	11.1	0.79	14.1	1.00	20.7	1.47	7.1
第3週	50.0	3.80	9.1	0.69	13.8	1.04	27.1	2.06	7.6
第4週	57.2	4.18	8.4	0.61	11.4	0.83	23.0	1.68	7.3
第6週	57.5	3.99	8.7	0.60	12.9	0.89	20.9	1.43	6.9
第7週	57.9	3.93	8.9	0.61	12.3	0.84	20.9	1.42	6.8
第9週	57.8	3.93	10.1	0.68	12.1	0.83	20.0	1.36	6.8
第11週	56.9	4.01	10.1	0.69	10.7	0.74	22.3	1.54	6.9
第13週	57.0	3.93	8.8	0.61	11.4	0.78	22.8	1.57	6.9

第 2 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
	%	g/dl	α		β		γ		
感作前	58.6	3.69	13.7	0.86	14.9	0.94	12.6	0.79	6.3
第1週	56.5	3.50	12.8	0.79	14.0	0.87	16.7	1.04	6.2
第2週	39.6	3.01	10.8	0.82	12.5	0.95	37.1	2.82	7.6
第3週	44.2	3.45	10.3	0.80	10.3	0.80	36.6	2.86	7.8
第4週	48.7	3.80	11.1	0.87	10.4	0.81	29.8	2.32	7.8
第5週	50.2	3.81	10.9	0.83	11.2	0.85	29.7	2.10	7.6

値も2週より著明な上昇をみ、2週に37.1%、3週に36.6%となった。6週採血前に死亡したため6週以上の観察ができなかつた。

Albumin は1週目より減少傾向をみせ、両例とも、Albumin と γ-Globulin は反比例の関係にある。

血清蛋白濃度は感作後急激に増加し、3~4週に7.6~7.8 g/dl と感作前とくらべ1.4~1.5 g/dl も増加しているがその後は漸減する。

c) 6回感作群

成績は表3に一括した。すなわち両例とも、4週にγ-Globulin が最高値に達し、それぞれ33.9%、31.3%となった。7~9週以後漸減し、第1例では24週以後再び相対的上昇をみたが、絶対量では漸減傾向を示す。第1例では36週間観察できたが、γ-Globulin 値は36週でも感作前より少し高くなっている。

表 3 6回感作群家兎血清蛋白分層

第 1 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
	%	g/dl	α		β		γ		
	%	g/dl	%	g/dl	%	g/d	%	g/dl	g/dl
感作前	58.1	3.78	10.1	0.66	13.7	0.89	18.1	1.18	6.5
第2週	45.3	3.00	10.2	0.67	13.8	0.91	30.7	2.03	6.6
第4週	46.9	3.42	7.1	0.52	12.1	0.88	33.9	2.47	7.3
第6週	50.2	3.61	7.1	0.51	12.9	0.93	29.8	2.15	7.2
第9週	53.4	4.06	7.8	0.59	11.0	0.84	27.8	2.11	7.6
第12週	55.6	4.11	8.5	0.62	12.3	0.91	23.6	1.74	7.4
第16週	56.5	3.84	8.0	0.54	12.5	0.92	22.0	1.50	6.8
第20週	57.0	3.99	8.3	0.58	13.9	0.97	20.8	1.46	7.0
第24週	56.1	3.70	8.8	0.58	13.1	0.85	22.0	1.43	6.6
第28週	56.5	3.39	8.9	0.53	12.1	0.73	22.5	1.35	6.0
第32週	54.9	3.30	10.1	0.61	12.6	0.76	22.4	1.34	6.0
第36週	56.3	3.49	9.6	0.60	12.7	0.79	21.4	1.33	6.2

第 2 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度 g/dl
	%	g/dl	α		β		γ		
	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	g/dl
感作前	60.4	3.99	9.5	0.63	13.1	0.86	17.0	1.12	6.6
第2週	51.2	3.39	9.3	0.71	11.6	0.88	28.9	2.20	7.6
第4週	48.4	3.87	9.9	0.79	11.4	0.91	31.3	2.50	8.0
第5週	48.6	3.50	9.9	0.71	10.7	0.77	30.8	2.22	7.2
第7週	56.8	3.86	10.2	0.69	11.8	0.80	21.2	1.44	6.8
第9週	57.7	3.81	9.2	0.61	13.6	0.90	19.5	1.29	6.6
第14週	56.8	3.75	9.2	0.61	14.1	0.93	19.9	1.31	6.6
第16週	56.7	3.74	10.4	0.69	13.7	0.90	19.4	1.28	6.6

本群においても γ -Globulin 値と Albumin 値は反比例する傾向が強く認められた。

血清蛋白濃度は感作とともに増加し、 γ -Globulin の上昇がその大部分を占めるが、第1例では9週より、第2例では24週よりほぼ感作前に復している。

第2項 Adjuvant 群

一般に Adjuvant 群では静注群に比し γ -Globulin の上昇が緩慢で、しかも長く持続するのが、表4をみて最も特長的である。第1例では4週に18.9%であつた γ -Globulin は16週まで徐々に上昇し、第2例では6週に31.5%を示してから、16週まで30%前後を持続している。絶対量でみると両例ともほぼ16週まで漸増している。

血清蛋白濃度も γ -Globulin 値の増加とともに増し、第1例では12~16週に高い傾向があり、第2例

でも16週まで感作前よりも高い値を持続している。

Albumin は相対的に減少し、第2例では絶対値の減少も著しいが、 α -および β -Globulin には特長的な変化はみられない。

第2節 血清の腫瘍細胞嫌気性解糖抑制作用

第1項 予備実験

表5に示すように、血清のみで補体を加えないもの(VI)でも対照に比してかなりの抑制効果はあるが、補体のみで血清を加えない場合(VII)には全く対照(VIII・IX)と変わらない。正常血清と補体を加えた(IX)も腫瘍細胞と緩衝液のみの対照(VIII)と同程度である。

感作後の血清と補体を加えたものは、いずれも対照(VIII・IX)に比し抑制効果を見るが、その中でも抗血清 0.3 ml. 補体 0.3 ml. の組合せが最もすぐれ

表 4 Adjuvant 群家兔血清蛋白分層

第 1 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度
			α		β		γ		
	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	g/dl
感作前	60.9	3.65	10.5	0.63	13.4	0.80	15.2	0.91	6.0
第2週	59.2	3.67	11.7	0.73	12.3	0.76	16.8	1.04	6.2
第4週	56.8	3.74	11.0	0.73	13.3	0.88	18.9	1.25	6.6
第6週	52.5	3.57	8.9	0.61	13.0	0.88	25.6	1.74	6.8
第8週	48.7	3.51	9.4	0.68	12.6	0.90	29.3	2.11	7.2
第12週	50.4	4.03	8.6	0.69	11.4	0.91	29.6	2.37	8.0
第16週	48.6	3.89	8.3	0.66	11.0	0.88	32.1	2.57	8.0
第20週	50.8	3.86	8.7	0.66	11.3	0.86	29.2	2.22	7.6

第 2 例

	Albumin		Globulin						蛋白濃度
			α		β		γ		
	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	g/dl
感作前	58.9	3.77	10.5	0.67	15.4	0.99	15.2	0.97	6.4
第2週	55.0	3.96	10.8	0.78	16.0	1.16	18.2	1.31	7.2
第4週	44.7	3.13	11.3	0.79	17.0	1.09	26.0	1.62	7.0
第6週	40.8	2.86	10.7	0.75	17.0	1.19	31.5	2.21	7.0
第8週	43.3	2.95	10.7	0.73	15.1	1.03	30.5	2.03	6.8
第12週	42.9	2.92	10.0	0.68	14.1	0.96	32.0	2.18	6.8
第16週	43.8	2.98	9.4	0.64	15.4	1.05	31.4	2.14	6.8

表 5 嫌気性解糖抑制実験 (予備実験)

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
主室	M/10 Glucose	0.5ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Ehrlich腫瘍細胞	0.5ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Krebs R. B.	0.5ml	0.5	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
側室1	抗血清	0.2ml	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	—	—	*0.5
	K. R. B.	0.3ml	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.5	0.5	—
側室2	補体	0.2ml	0.5	1.0	0.5	0.3	—	0.5	—	0.5
	K. R. B.	0.3ml	—	—	—	0.2	0.5	—	0.5	—
10'	側室2加	22 μ l.	16 μ l.	21 μ l.	18 μ l.	15 μ l.	17 μ l.	18 μ l.	18 μ l.	20 μ l.
20'		31	28	33	30	21	29	26	27	28
30'		44	41	46	43	30	40	34	33	34
45'		54	53	57	55	35	48	51	52	53
60'		57	58	63	64	40	57	68	67	66
75'		60	62	68	69	43	65	85	84	83
90'		62	65	72	74	45	71	102	103	104
120'		65	69	79	81	48	80	135	133	130
150'		74	71	82	85	50	85	169	170	166
180'	77	72	85	90	51	90	199	201	190	

(註) VIは補体を加えないもの

VIIは抗血清も補体も加えず腫瘍細胞のみの対照

VIIIは抗血清を加えず補体のみのもの

*: 抗血清の代りに正常血清使用

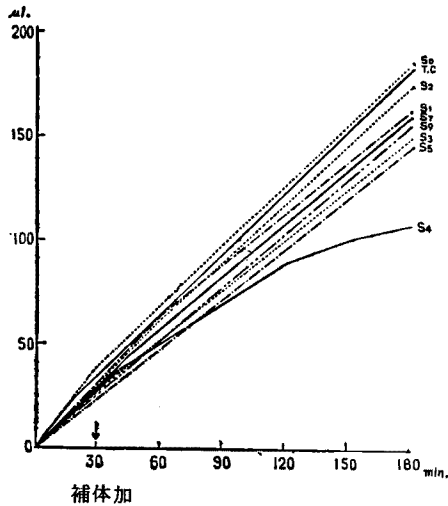
ている。

第2項 実験群

a) 1回感作群

対照が2つあり、1つは正常家兎血清(感作前)を加えたもの、今1つは緩衝液のみで血清・補体のいずれも加えないもので、これを腫瘍対照(TC)と呼び、前者を単に対照(S₀)と呼ぶ。

図1 1回感作群家兎血清の嫌気性解糖抑制作用

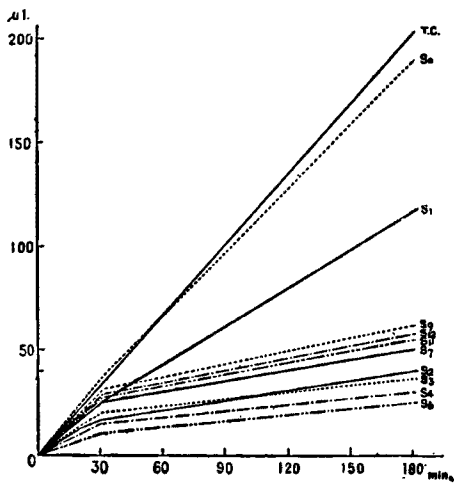


1回感作群では腫瘍対照は180分値183 μ l.で感作群では4週(S₄)を除き、1~9週いずれも146~175 μ l.で抑制力は弱い(図1)。4週では180分値180 μ l.でやや抑制力を有している。

b) 3回感作群

3回感作群では図2のごとく、腫瘍対照の180分

図2 3回感作群家兎血清の嫌気性解糖抑制作用

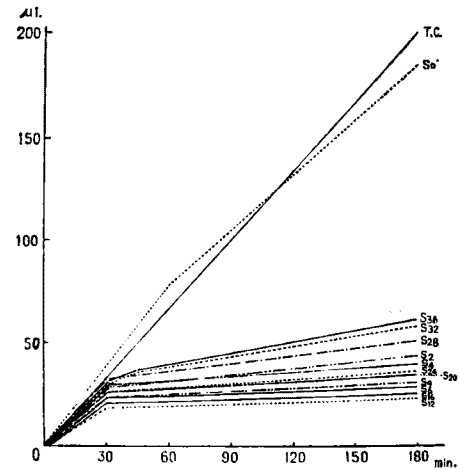


値201 μ l.に対し、6週では25 μ l.しか上昇しなかつたのを始め、2・3・4週で38 μ l.以下の強い抑制効果を示した。7週から13週までは50 μ l.前後で腫瘍対照と対照のほぼ1/4に当る。1週のみは116 μ l.で抑制は少なかつた。対照では180分値187 μ l.で腫瘍対照とほぼ一致している。

c) 6回感作群

本群では、180分値で腫瘍対照が199 μ l.で各週の値は、最も抑制力の強かつた12週の22 μ l.と、最も抑制力の弱かつた36週の61 μ l.の間に入っている。これは腫瘍対照の1/9から3/10に相当する。実験群の抑制作用は12・16週が最も強く、6・9週がこれに次ぎ、32・36週が最も弱くなっている(図3)。

図3 6回感作群家兎血清の嫌気性解糖抑制作用



d) Adjuvant 群

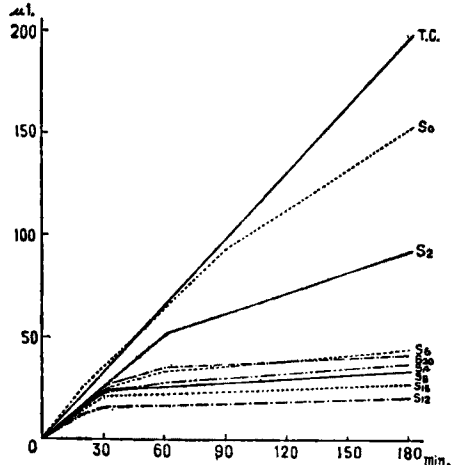
Adjuvant 群では静注群と異なり、2週では強い抑制効果なく4週以後になつて抑制効果をみせており、12~16週で最も強い抑制効果を示している。すなわち、図4に示すように180分値で腫瘍対照が198 μ l.を示し、2週は93 μ l.と約1/2で、4週以後20週までは腫瘍対照の1/5から1/10、対照と比べても大体1/4から1/7と強い抑制がみられる。

第3項 小括

1回感作群では4週以外には嫌気性解糖抑制力はほとんどなく、1回感作のみでは腫瘍細胞抑制力は甚だ弱いことを示している。

3回感作群では、1週では作用は弱い、2週以後7週までかなりの抑制力を見せるが7週以後やや抑制力が落ちる。補体を加えた後カーブがゆるやか

図4 Adjuvant 群家兎血清の嫌気性解糖抑制作用



になつて上昇傾向が落ちるのが特長的である。
 6回感作群では2週以後36週まで抑制力を見せる。12週が最も強くその前後はやや弱まるが、6回感作を反覆しておく、その感作家兎血清が長期にわたつて腫瘍細胞の嫌気性解糖を抑制することがわかる。本群でも、補体を加えると作用が強化され解糖は停止状態になる。

いま血清蛋白分層の γ -Globulin の成績と関連してみると、 γ -Globulin が最高値よりかなり下つた12週に嫌気性解糖抑制力が最も強く、感作前に近づく36週でもかなりの抑制力をみていることは興味深い。

Adjuvant 群では12・16週に最高の抑制力をみせ20週までその作用があまり変わらない点が注目され

る。Adjuvant の特長として抗原が徐々に吸収されることと関連があるものと考えられる。

第3節 腫瘍細胞との中和実験

第1項 実験群

a) 1回感作群

中和実験の結果をすべて表にまとめれば、表6の通りで、1回感作群では、感作前の血清ではその半数生存日数は15日であつた。実験群の感作血清では3週のもの、18日となつたのを始め、すべて感作前とほとんど変らぬ半数生存日数であつて、中和実験では有意の差は認められない。

b) 3回感作群

感作前の半数生存日数は13日で比較的短かいが、感作すると2週以後9週まではほぼ30日以上を示し、この間の血清の腫瘍細胞中和能は高いことが確認された。とくに3週では40日間観察中6例中1例も腫瘍死しなかつた。1週では21日であり延長しなかつた。13週にはやや短かい生存日数となつている。

c) 6回感作群

感作前は14日で半数死亡し、これに対し2週が21日となつた他、32週まで30日以上であり、4週から32週までは強い中和能を有することが示されている。なかでも12・16週では40日以上で、20週に至つては60日間の観察期間中1例も腫瘍死しなかつた。

d) Adjuvant 群

感作前が14日であり、4週から20週まで30日以上を示し、ほぼ一定のかなり強い腫瘍細胞中和能のあることがわかる。16週では60日間観察中1例も腫瘍死していない。

表6 中和実験(半数生存日数)

1回感作群		3回感作群		6回感作群		Adjuvant 群	
感作前	15日	感作前	13日	感作前	14日	感作前	14日
1 週	15"	1 週	21"	2 週	21"	2 週	20"
2 "	15"	2 "	30"	4 "	30"	4 "	30"
3 "	18"	3 "	40日以上	6 "	34"	6 "	31"
4 "	16"	4 "	30日	9 "	33"	8 "	36"
7 "	17"	6 "	28"	12 "	47"	12 "	37"
9 "	17"	9 "	31"	16 "	45"	16 "	60日以上
		13 "	26"	20 "	60日以上	20 "	34日
				24 "	31日		
				28 "	37"		
				32 "	30"		
				36 "	28"		

第2項 小 括

1回感作群では中和実験で半数生存日数の延長はほとんど認められないが、3回感作群では2週から9週まで強い延長がみられた。

6回感作群では4週から32週まではほぼ一定の強い生存日数延長がみられ、感作血清と腫瘍細胞を中和することによつて強く腫瘍の移植能を低下させることが知られた。

Adjuvant 群では16週まで徐々に生存日数の延長がみられ20週でもほぼ同等の延長がある。いま γ -Globulin 値および嫌気性解糖抑制力と比較して考察すると、 γ -Globulin 値が一番高いのは12・16週で、嫌気性解糖抑制力の強いのも12・16週、また中和実験で最も長い生存日数を示すのも12・16週で、Adjuvant 群では3つの実験でほぼ平行する成績をえた。これに対し6回感作群では γ -Globulin 値が最高値からやや低下した12・16週に嫌気性解糖抑制力が強く、中和実験でも12・16・20週が最もよい成績であり、 γ -Globulin 値とは平行していないのが注目される。

第4章 総括ならびに考按

本実験により、Ehrlich 腹水腫瘍細胞で家兔を感作すると、感作家兔血清中の γ -Globulin が上昇し Albumin の減少することが確認された。この変化は1回静注感作のみでは軽度で、静注3回以上または Freund の Adjuvant 2回筋注では著明である。感作を繰り返すことによつて血清蛋白濃度も上昇する。 γ -Globulin の上昇する時期と蛋白濃度の上昇する時期はすべての例でほぼ一致する。静注3回・6回感作群、Adjuvant 群では Albumin の減少と γ -Globulin の増加とはとくによく反比例の傾向がみられた。Adjuvant 群で特長的であつたのは抗原の吸収が徐々であるためか、 γ -Globulin の上昇時期が静注群に比して遅いことで、静注群で最高値を示す3～4週頃には未だ γ -Globulin 値は低い。Adjuvant 群で γ -Globulin が最高となるのは12～16週である。Adjuvant 剤では抗原量が少ないにも拘らず、抗原の吸収が緩徐でその持続も長く¹⁴⁾⁴⁷⁻⁵³⁾、しかも γ -Globulin の最高値は静注群の最高値と変らぬ高い値を示すのが特長である。

従来、腫瘍細胞で異種動物を感作する場合、多くの人^{22)28,29)}は、1乃至数回感作後大量の抗原で再感作した後の secondary reaction の時期に採血すると、高い血中抗体価がえられるとして、抗腫瘍性抗体の場合でもこの時期に採血している。本実験にお

いても1回のみ感作では不十分で、3乃至6回静注感作を反覆すると感作後3乃至4週に γ -Globulin 値がかなり高くなっている。腫瘍抗体が γ -Globulin に含まれていることの証明は本実験では確認しなかつたが、Wissler²⁹⁾らは、Ehrlich 癌細胞を家兔へ静注、筋注、腹腔内、皮下、皮内へ注入して感作したのち4週目が抗体価が高いといつており、本実験の成績に一致している。

腫瘍細胞に対する異種免疫血清の蛋白分層を測定した実験は非常に少ないが、教室の三村⁵⁴⁾は同種腫瘍である Brown-Pearce 腫瘍上清を用いて家兔を免疫し、免疫後1週では、Albumin は変化なく、 γ -Globulin が僅かに増加していることを報告しているが、その後の追究はなされていない。腫瘍細胞以外の抗原による異種動物感作血清の蛋白分層をみたものとして、山根³⁰⁾はチフス菌凝集素、山羊溶血素、馬沈降素などを抗原としていづれも γ -Globulin の増加と Albumin の減少をみており、本実験における癌細胞抗原の場合と同じような態度をみせている。三宅¹⁴⁾は卵白 Albumin を抗原として家兔を感作しているが、1週2回3週連続静注例の血清蛋白分層は、4週に Albumin が13.3%減少で最低値を示し、同じ週に γ -Globulin は15.4%増加して最高値となつている。同時に抗体価は4週に29倍となり最高値を示したといひ、腫瘍細胞における本実験と平行した関係にあるのは注目される。30週で γ -Globulin 値が感作前より高いことも共通している。Adjuvant 剤2回筋注家兔では、三宅¹⁴⁾によれば、Albumin の減少は絶対量では12週に最も多く減少し、 γ -Globulin も同じく12週に最も増加しており、抗体価は9週から20週まで29倍を示したという。本実験における腫瘍細胞感作による γ -Globulin の変化とまたよく似ている。

つぎに嫌気性解糖実験であるが、1回感作群では4週に僅かに抑制作用をみたほか無効であつた。1回静注感作のみでは γ -Globulin の上昇も少なく、嫌気性解糖実験でも抑制効果は少なかつた。この事実から静注群では、抗原量が少ない場合には追加免疫により secondary reaction を起させなくては無効であることがわかつた。3回感作群になると2週以後にかなり強い抑制作用がみられ、血清の γ -Globulin 値にほぼ平行するような結果をみた。しかし γ -Globulin の最高値を示す血清の嫌気性解糖抑制力が最も強いとは限らない。6回感作群では静注群中最も強い抑制効果があり、 γ -Globulin のあまり上昇していない2週を除き、強い抑制作用がある

ことを知った。とくに興味あることは γ -Globulin が感作前のものより僅かに高い32週以後の血清でも2週よりはるかに強い抑制力を有していることである。このことは6回感作すれば長期にわたって嫌気性解糖を抑制しうることを物語っている。Adjuvant 剤で感作した場合には、4週以後20週まで強い抑制効果が認められた。抗原量は少ないにも拘らず、6回静注群と同程度の抑制力をみせているのは特記すべきことである。Adjuvant 法では γ -Globulin 値が4週以後漸増し、大体 γ -Globulin の高い時期に抑制力が強い傾向を示している。

Flax²²⁾は Ehrlich 腹水腫瘍細胞の5%浮游液5 ml.を加えた Adjuvant 剤1回筋注に、5%浮游液1 ml.づつ5つの multiple portal injection を3回繰り返した家兎抗血清を用いて、嫌気性解糖を調べている。採血は3週間の免疫期間後4乃至6週で施行しているが、これによる抗血清に補体を加えた時にもみ180分値が腫瘍対照の1/2の値で抑制効果のあることを示している。

Bickis ら²⁰⁾は Ehrlich 腹水癌細胞でラットを免疫して作ったラット抗血清の Ehrlich 腫瘍細胞に対する嫌気性解糖抑制作用をみているが、非働化抗血清を用いた場合には + 80.0 μ l. となつたのに対して、同量の抗血清では僅かに + 4.4 μ l. で著しい抑制作用をみせたことを報じている。一方非働化した抗血清に補体を加えると、組織呼吸の抑制と Glycine の利用が著しく低下することも確認している。

腫瘍細胞の嫌気性解糖抑制には抗血清の他に、補体が必要なことは多くの人が認めている。Flax²²⁾, Bickis ら²⁰⁾の例でも補体を加えた時には抗血清のみよりはるかに有効であるといっている。Easty and Ambrose³⁵⁾も補体はその作用を失えば、抗血清は腫瘍細胞に対する細胞障害作用を失なうことを認めた。補体の必要性についてはさらに Kalfayan³⁶⁾, Winn²¹⁾も認めており、Winn は 6C₃HED 腫瘍細胞抗血清に種々の割合で補体を加えたところ、補体を0.5 ml.以上加えた場合は全く腫瘍死せず、補体を加えないと全例腫瘍死することをみている。Ross and Lepow⁴⁵⁻⁴⁶⁾は、正常人羊膜細胞に対する免疫学的細胞抑制作用には補体の C'1, C'2, C'3, C'4 成分と同時に Ca⁺⁺ と Mg⁺⁺ が必要であるといっている。Ca⁺⁺ については、Ca⁺⁺ が癌細胞に抑制的に働くとされているので、本実験で腫瘍細胞障害作用をみる際には Ca⁺⁺ を抜いた Krebs Ringer

Bicarbonate 緩衝液を使用している。本実験においては、予備実験にて補体のみでは全く抑制作用なく、抗血清のみでも作用弱く、抗血清と補体を加えて初めて強い抑制を認めたので補体を加えて実験を施行した。

本実験において、対照すなわち感作前の正常家兎血清では、腫瘍の嫌気性解糖抑制作用を認めなかつた。Horn²⁸⁾も正常家兎血清には Ehrlich 癌細胞に対する抑制作用はないといひ、Nungester and Fischer²⁶⁾も mouse lymphosarcoma 6C₃HED を用いてこのことを確認している。Imagawa ら¹⁵⁾, Lumsden¹²⁾, Werder ら⁵⁵⁾はこれに反する結果を出しており、正常家兎血清には易熱性細胞抑制物質があるといっている。本実験に用いた家兎血清は56°C 30分間非働化の操作を加えているので、正常血清に嫌気性解糖抑制作用がみられぬのは当然といえよう。Kalfayan³⁶⁾は家兎正常血清と incubate された B-P 腫瘍は家兎に移植性を有するが、抗血清と incubate した場合には移植不能であつたことを確認しており、正常血清には細胞抑制物質を含むとしてもそれは抗血清の力と比べると看過できるものと考えてよからう。

中和実験においては、あらかじめ抗血清と *in vitro* で補体とともに腫瘍細胞に作用させて、しかるのち移植したのであるが、1回感作群では腫瘍細胞の移植能は落ちず、抗血清は無効であつた。一方、3回・6回感作群では初期の血清を除き、腫瘍の移植性の低下は著しく、全く発癌しないものもあつた。このように中和実験では嫌気性解糖実験とはほぼ平行した結果をえており、まだ3回感作群では13週にやや半数生存日数延長効果の低下がみられるけれども、6回感作群になると4週以後36週まですべて有効であつたのは注目される点である。Adjuvant 群では2週では延命効果は少なかつたが、4週以後20週まで大体均一的な延命効果をえた。中和実験においては、中和したことによつて全く腫瘍の移植能を失なつたものも多くあり、抗血清中に腫瘍細胞障害作用がかなりあることが明らかとなつた。

Burmester⁵⁸⁾は Avian lymphoid tumor antiserum で37°C 24時間腫瘍細胞を incubate すると、腫瘍の増殖を抑制する(正常血清では93.5%増殖、抗血清では15.7%)ことによつて、その中和効果を認めている。異種免疫実験ではないが、Kid⁵⁶⁾は Brown-Pearce 腫瘍細胞を抗血清と37°C、2~3時間 incubate する中和実験で完全に腫瘍増殖を阻止するの

を認めており、Kalfayan³⁶⁾も B-F 腫瘍細胞を特異抗体と 37°C 2 時間 incubate して後、家兎筋肉内に移植すると移植不能になったと報告している。

以上のごとく、Ehrlich 腫瘍細胞で異種動物である家兎を感作すると、静注感作法では 1 回量 3×10^8 、すなわち 3 億個の腫瘍細胞を 3 回以上静注することによつて家兎の血清中に Ehrlich 細胞に対する cytotoxic action が現われることを知った。その出現の時期については、静注感作群では 2 週より現われ、その peak は 3 回感作群で 4~9 週、6 回感作群では 4~20 週であつた。Adjuvant 群では 3 億個の腫瘍細胞を 2 回筋注すると 4 週より強い cytotoxic action を示し、その peak は 8~16 週で、20 週になつてもその作用は殆んど低下しないことを知った。すなわち Adjuvant 法は少量の抗原により静注大量感作と変らぬ強い cytotoxic action をもたらし、その発現時期は遅れるけれども、その有効性は全く同等で少しも劣らぬことがわかつた。

かくのごとく、腫瘍細胞で感作した家兎血清にはこのような cytotoxic action があるけれども、正常家兎血清は、非働化すると補体を加えても cytotoxic action を有しないのは極めて意義ある事実といわねばならない。

以上、本実験により、 γ -Globulin 値と嫌気性解糖抑制効果と中和実験の結果から、腫瘍細胞で感作された家兎の血清中には腫瘍の発育を抑制する何らか

の因子が存在していることが明らかとなつた。

第 5 章 結 論

Ehrlich 腹水腫瘍細胞を用いて家兎を感作してえた血清につき、その γ -Globulin 値と腫瘍細胞の嫌気性解糖実験、さらに中和実験とを用いて抗腫瘍性抗体の有無を検討した結果、次の成績をえた。

1) 感作によつて γ -Globulin 値は増加し Albumin 値は減少する。静注群では 1 回感作群は変化が少なく、3 回・6 回感作群になると著しい。Adjuvant 群では 2 回感作で著しい変化がみられる。

2) 腫瘍細胞の嫌気性解糖抑制作用は、静注群では 1 回感作群ではほとんどみられず、3 回・6 回感作群では強く認められる。Adjuvant 群は長期にわたつて強い抑制作用を有する。

3) 中和実験では静注群の中、1 回感作群は無効であるが、3 回・6 回感作群および Adjuvant 群では著しく延命効果がみられる。

4) γ -Globulin 値の上昇時期と、嫌気性解糖および中和実験でとくに抑制効果を有する時期とは、静注 6 回感作群では γ -Globulin 値の上昇に遅れて抑制効果の最高値が現われるが、他の群では大体一致している。

稿を終るにのぞみ御指導、御校閲を賜つた陣内教授、および田中助教授に深甚の謝意を表するとともに、本実験について種々御指導、御援助を賜つた 博士に感謝する。

文

- 1) Morgan-Mountain, I.: J. Immunol., 75, 478, 1955.
- 2) Goldberg, B. and Green, H.: J. Exp. Med., 109, 505~510, 1959.
- 3) Björklund, B.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 103, 1~4, 1960.
- 4) Goldstein, M.N.: J. Immunol., 77, 113~117, 1957.
- 5) Lindner, A.: Fed. Proc., 19, Pt. 1, 141, 1960.
- 6) Lambert, R. A. and Hanes, F.M.: J. Exp. Med., 14, 453~461, 1911.
- 7) Lambert, R. A.: J. Exp. Med., 19, 277~282, 1914.
- 8) Phelps, H. A.: Am. J. Cancer, 31, 441~445, 1937.
- 9) Pybus, F.C. and Whitehead, R.H.: J.

献

- Path. and Bact., 32, 195, 1929.
- 10) Niven, J.S.F.: J. Path. and Bact., 32, 527~550, 1929.
- 11) Lumsden, T.: Lancet, 214, 260~261, 1928.
- 12) Lumsden, T.: Am. J. Cancer, 15, 563~640, 1931.
- 13) Lumsden, T.: Lancet, 1, 383~384, 1925.
- 14) 三宅: 倉敷中央病院年報, 28, 38~70, 1959.
- 15) Imagawa, D.T. et al.: Cancer Research, 14, 1~7, 1954.
- 16) Imagawa, D.T. et al.: Cancer Research, 14, 8~11, 1954.
- 17) Green, R.G.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 61, 113~114, 1946.
- 18) Imagawa, D.T. et al.: Cancer Research, 10, 226~227, 1950.
- 19) Imagawa, D.T. et al.: Cancer Research, 11,

- 259, 1951.
- 20) Bickis, I. J. et al.: *Cancer Research*, 19, 602~607, 1959.
- 21) Winn, H. J.: *J. Immunology*, 84, 530~538, 1960.
- 22) Flax, M. H.: *Cancer Research*, 16, 774~783, 1956.
- 23) Horn, E. C.: *Cancer Research*, 16, 595~599, 1956.
- 24) Hiramoto, R. et al.: *Cancer Research*, 19, 824~830, 1959.
- 25) Rajam, P. C.: *Cancer Research*, 19, 393~396, 1959.
- 26) Nungester, W. J. and Fischer, H.: *Cancer Research*, 14, 284~288, 1954.
- 27) Miller, D. G. and Hsu, T. C.: *Cancer Research*, 16, 306~315, 1956.
- 28) Horn, E. C.: *Cancer Research*, 16, 595~599, 1956.
- 29) Wissler, R. W. et al.: *Cancer Research*, 16, 761~773, 1956.
- 30) 山根: *日本細菌誌*, 10, 19~27, 1955.
- 31) Froese, G.: *Biochemica et Biophysica acta*, 57, 509, 1962.
- 32) Warburg, O. and Kubowitz, F.: *Biochem. Z.*, 214, 5~18, 1929.
- 33) Warburg, O.: *Science*, 123, 109~114, 1956.
- 34) Warburg, O.: *Science*, 124, 269~270, 1956.
- 35) Easty, G. C. and Ambrose, E. J.: *Brit. J. Cancer*, 11, 287~295, 1957.
- 36) Kalfayan, B.: *J. Exp. Med.*, 97, 145~161, 1953.
- 37) Kidd, J. G.: *J. Exp. Med.*, 83, 227~250, 1946.
- 38) Umbeit, W. W. et al.: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, 1949.
- 39) Arnesen, K. et al.: *Cancer Research*, 9, 669~671, 1949.
- 40) Dulaney, A. D. and Arnesen, K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 72, 665~668, 1949.
- 41) Dulaney, A. D. et al.: *Cancer Research*, 9, 217~221, 1949.
- 42) Woglom, W. H.: *Cancer Rev.*, 4, 129~214, 1929.
- 43) Brown, E. R. and Bittner, J. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 106, 303~306, 1961.
- 44) Yagi, Y. and Pressman, D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 106, 164~168, 1961.
- 45) Lepow, I. H. and Ross, A.: *J. Exp. Med.* 112, 1107~1120, 1960.
- 46) Ross, A. and Lepow, I. H.: *ibid.*, 112, 1085~1106, 1960.
- 47) Freund, J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 1, 291, 1947.
- 48) Freund, J. et al.: *J. Immunol.*, 60, 383, 1948.
- 49) Freund, J.: *Am. J. Clin. Path.*, 21, 645, 1951.
- 50) Raffel, S. et al.: *J. Exp. Med.*, 90, 53~71, 1949.
- 51) Talmage, D. W. and Dixon, F. J.: *J. Infect. Dis.*, 93, 176, 1953.
- 52) White, R. G. et al.: *J. Exp. Med.*, 102, 83~91, 1955.
- 53) 長田: *日血会誌*, 19, 698~710, 1956.
- 54) 三村: *岡山医学会誌*, 72, 1061~1089, 1960.
- 55) Werder A. A. et al.: *Cancer Research*, 12, 886~889, 1952.
- 56) Kidd, J. G.: *Science*, 99, 348~350, 1944.
- 57) Snell, G. D.: *Cancer Res.*, 17, 2, 1957.
- 58) Burmester, B. R.: *Cancer Res.*, 7, 459~467, 1946.
- 59) Haaland, M.: *Fourth Sci. Report Imperial Cancer Res. Fund.* 1, 1911.
- 60) Gorer, P. A.: *J. Path. Bact.*, 44, 691, 1937; 47, 231, 1938.
- 61) Ribeiro, I. P. et al.: *Paper Electrophoresis, A Review of Methods and Results*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1961.

**Immunogenic Study in Antitumor Antibody Production
against Transplantable Tumors.**

Part I. Antitumor Antibody in Unadsorbed Immunized Rabbit Sera

By

Kiyoshi Takeda

1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Jinnai, D. M.D.)

Rabbits were immunized with Ehrlich ascitic tumor cells by intravenous injections or intramuscular injections of Freund's adjuvant. Rabbits were bled periodically, with the antisera being separated from the blood. Using these sera, the γ -Globulin titre was examined by paper-electrophoresis, anaerobic glycolysis with Warburg's manometry, and for life prolongation studies by neutralization. I wanted to know whether the antisera contained the antitumor antibody or not.

1. After immunization, the γ -Globulin titre in rabbits sera increased, with the Albumin titre decreasing. In the once intravenously injected group, such change was insignificant, but remarkable in the groups injected 3 or 6 times. In the adjuvant group, almost identical change occurred as in the latter two groups.

2. The inhibitory action of antisera on anaerobic glycolysis of tumor cells was weak in the groups injected 3 or 6 times. The antisera of the adjuvant group also had strong inhibitory action for a long duration following slow initiation.

3. Antisera of the once intravenously injected group were ineffective in the neutralization test. But in the groups injected 3 or 6 times and in the adjuvant group, it was very effective, resulting in life prolongation of the mice.

4. The peak of the γ -Globulin titre preceded the peak of glycolysis and neutralization in the group injected 6 times, whereas in the adjuvant group, peaks of the three coincided.
