

移植動物癌の抗腫瘍性抗体産生に関する研究

第 3 編

制癌剤投与担癌マウスおよびX線照射癌細胞感作マウスの 抗体産生機序について

(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 生 武 田 淳 志

[昭和37年12月25日受稿]

目 次

第1章 緒 言	
第2章 実験方法	
第1節 実験動物	
第2節 実験腫瘍	
第3節 採血および各種臓器採取法	
第4節 血清蛋白分層測定法	
第5節 腫瘍細胞の嫌気性解糖測定方法	
第6節 血清あるいは各種臓器と腫瘍細胞の中 と実験	
第7節 実験群	
第1項 担癌マウスに制癌剤を投与せる群	
第2項 X線照射腫瘍細胞で感作せるマウス 群	
第3章 実験成績	

第1節 担癌マウスに制癌剤を投与せる群	
第1項 血清蛋白分層と蛋白濃度	
第2項 マウス血清の腫瘍細胞嫌気性解糖に 及ぼす影響	
第3項 マウス血清による腫瘍細胞中和実験	
第2節 X線照射腫瘍細胞で感作せるマウス群	
第1項 予備実験 1(X線照射細胞の赤染率)	
第2項 予備実験 2(X線照射細胞の移植能)	
第3項 10000r. X線照射腫瘍細胞感作マウ ス	
第3節 小 括	
第4章 総括および考按	
第5章 結 論	

第1章 緒 言

宿主が自己に発生した腫瘍に対して抗体を産生するか否かについては、未だ問題のあるところであるが、この問題を抗原の側すなわち腫瘍細胞の側よりみると、この腫瘍細胞成分が十分な抗原量に達しがたいため、これに対する抗体が十分に産生せられないのではないかと考えられる。また癌に対する抗体は血中抗体ではなく、組織抗体である可能性もある。一方抗体自体にも癌細胞自体および癌細胞破壊産物に対する抗体の2種が産生される可能性がある。これらの考えは1種の自己免疫の存在の想定のもとに成立するわけであるが、自己免疫を追究する前段階として、同種免疫(マウス腫瘍をマウスに移植)を用いてこの間の事情を明らかにしようと試

みた。

同種移植により腫瘍の抗原性を問題にする際には使用する腫瘍と被移植動物の吟味が極めて重要なことはいままでもない。自然発生腫瘍、あるいは発癌剤により誘発された腫瘍を同種同系統の動物に移植すれば、腫瘍はもちろん specific tumor である上、腫瘍原発動物と被移植動物間に genetic の差を考える必要がなく極めて好都合であるが、時間と経費の上施行上困難があつたので、できるだけこの条件に近ずけるため、後述のごとく MH 134 腫瘍と C₃H × dd 系の F₁ マウスを選択した。すなわち佐藤¹⁴⁻¹⁶⁾の詳細な研究によると、MH 134 は C₃H マウスに原発した肝癌であり、C₃H 系マウスおよび C₃H の F₁ マウスにのみ可移植性であり、かなり specificity

の高い tumor である。また、被移植マウスが C₃H の F₁ マウスであるため、この F₁ マウスが MH 134 腫瘍に含有される MH 134 原発マウスの histocompatibility gene に対して抗原抗体反応を起す可能性は極めて少ないものと思われる。したがって、F₁ を用いる際には MH 134 腫瘍の腫瘍特異抗原に対する抗原抗体反応が前面に出ることとなり、腫瘍の抗原分析には極めて好都合であると思われる。

まず、担癌マウスに抗癌剤を投与して、腫瘍破壊を促して、その流血中に抗体が増量してくるかどうかを検索し、ついでレントゲン照射により移植能を失った腫瘍細胞⁶⁾¹⁰⁻¹¹⁾で F₁ マウスを強力に感作¹⁻⁵⁾⁷⁻⁹⁾したのち、無処理腫瘍細胞を移植—“attack”—し、その移植性—“take”—を観察するとともに take せざるマウスの血液、臓器をとり、それぞれにつき抗腫瘍性の有無を調べた。

血液や臓器の抗腫瘍性を何を用いて調べるかということは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³¹⁻³²⁾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。したがって、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。

以上の理由から抗腫瘍性につき中和実験および嫌気性解糖能に及ぼす影響の 2 点につき検索するとともに、血清についてはその抗腫瘍性抗体が含まれている可能性の強い γ -Globulin に、焦点を合わせて蛋白分層をも検討することとした。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物は C₃H/HeN (♂) × dd (♀): F₁ マウスで生後 4 週のものを経東京・大沢飼育所より購入し、体重 20g 前後になるまで飼育したものを使用した。飼料はオリエンタル酵母製の実験用固形飼料 MF および新鮮野菜を与えた。

第2節 実験腫瘍

実験に使用した悪性腫瘍は、東北大学抗酸菌研究

所、佐藤春男教授より分与された MH134¹⁴⁾¹⁵⁾で、F₁ の腹腔内移植後 7 日前後の MH 134 細胞を用いた。

第3節 採血および各種臓器採取法

採血にあたっては、実験に大量の血清を必要とするため、剪刀にて断頭し、断端より出る血液を滅菌試験管に集め、室温にて血清を分離した。実験によつては、直ちに使用することもあつたが、一般には -40°C に保存し早期に使用した。

臓器を採取するには、断頭採血して虚血せしめた後、直ちに胸腔および腹腔を開き、脾・肝・腎・肺を取り出し、あらかじめ氷冷せる試験管に入れた。

1. Homogenate 調整法: 各臓器の重量を測定し、重量の 3 倍量の氷冷せる生理食塩水を加えて、氷冷下にホモジナイザーにかけ 25% homogenate を作つた。homogenate は氷冷のまま直ちに実験に供した。

2. 臓器浮游液調整法: 各臓器の重量を測定し、重量の 2 倍量の氷冷せる生理食塩水を加え、氷冷下に臓器被膜を破り、臓器細胞を浮游させた。これも保存することなく直ちに実験に供した。

第4節 血清蛋白分層測定法

濾紙電気泳動法により血清蛋白を分劃した。泳動器は小林式濾紙電気泳動装置で、整流器は SB 型、泳動箱は直列式のもので、泳動条件は 5mA, 250V. で 5.5 時間泳動した。緩衝液はペロナール緩衝液、濾紙は東洋濾紙 No. 51 で、試料は血清 0.04 ml. を使用し泳動後直ちに電気定温乾燥器にて、110°C、10 分間乾燥し、Amidoschwartz 10B 染色液で 20 分染色、2% 酢酸液で脱色した。脱色後 110°C 10 分間乾燥し、パラフィンにて透明化した後、アタゴ自記積分計付濃度計にて記録した。蛋白分層と同時に蛋白濃度を日立製蛋白屈折計にて測定した。

第5節 腫瘍細胞の嫌気性解糖測定方法

嫌気性解糖測定には、Warburg 検圧計を使用した。主室と側室 2 個を有する容器の主室に生理食塩水にて洗浄せる Ehrlich 癌細胞 4×10^6 個 (0.5ml), Ca⁺⁺ ぬきの Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液 (pH 7.4) 0.5 ml., 1/10 M ブドウ糖溶液 0.5 ml. を入れ、側室 2 に MH 134 細胞で吸着せる補体 (新鮮モルモット血清) 0.5 ml. を入れた。

側室 1 にはマウス血清 0.5 ml. または、臓器ホモジネート 0.5 ml. または、臓器浮游液 0.5 ml. を入れた。

検圧計は 37°C に保ち、最初に実験開始とともに、

側室1を主室に混じ、30分振盪後側室2を加えて、180分間観察した。

第6節 血清あるいは各種臓器と腫瘍細胞の中和実験

実験により、マウス血清 0.5 ml. または臓器 homogenate 0.5 ml. または臓器浮游液 0.5 ml. と補体 0.5 ml. (新鮮モルモット血清を MH 134 細胞であらかじめ吸着せるもの) および MH 134 細胞 2400 万個 (0.5 ml) を 37°C 1時間 incubate し、遠沈して細胞のみを取り出して、F₁ 1匹につき400万個の MH 134 細胞を F₁ 腹腔内または皮下に移植し、その移植能と半数生存日数をみ、皮下固形腫瘍では、腫瘍の大きさを計測した。

腫瘍の大きさは縦径×横径の平均を mm. であらわした。

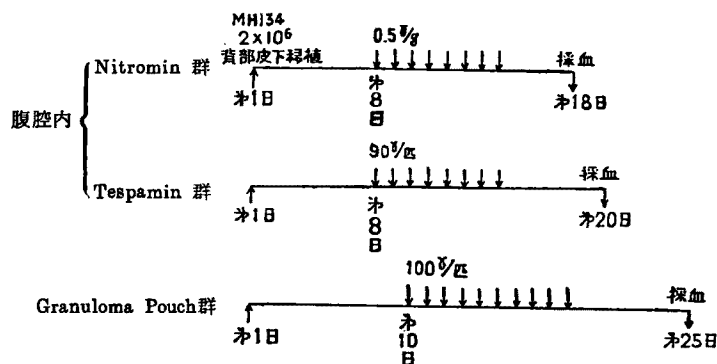
第7節 実験群

本実験における各実験群は大別して2種に分けられる。すなわち、制癌剤投与群とX線照射腫瘍細胞による感作群とである。これら両群につき、採血あるいは各種臓器をとり、血清蛋白分層、血清または各種臓器の腫瘍細胞嫌気性解糖に対する影響および中和実験を施行した。

第1項 担癌マウスに制癌剤を投与せる群

制癌剤としては Nitromin と Tespamin で、マウスに1日1回投与した (図1)。

図1 実験方法



a) Nitromin 群: F₁ マウス背部皮下に MH 134 (2×10⁶個)を移植し、移植後8日目より Nitromin 5%を8日間連続腹腔内投与し、移植後18日目に採血した群 (10匹)。

b) Tespamin 群: a) と同時に移植し、移植後8日目より Tespamin 90%を8日間連続腹腔内投与し、移植後20日目に採血した群 (10匹)。

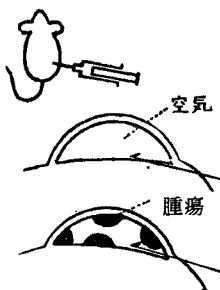
c) Granuloma Pouch 群: F₁ 背部皮下に Selye⁽²²⁴⁾ の "Granuloma Pouch" technic により約 4~5 ml. の空気を注入し (図2), この pouch 内に MH 134, 2×10⁶個を移植し、移植後10日目よりこの pouch 内に Tespamin 100%を10日間連続投与し、移植後25日目に採血した群 (10匹)。

図2 Granuloma Pouch 法 (Selye)

1. 背部皮下へ
空気 4~5ml. 注入

2. 腫瘍細胞
(2×10⁶個) 注入

3. 制癌剤注入
(Tespamin)



d) 対照群: F₁ マウス背部皮下に 2×10⁶ 個の MH 134 を a), b), c) 群と同時に移植し、移植後14日目と21日目の2回に分けて採血した群 (10匹)。

e) 正常マウス群: 腫瘍を移植せず、直ちに採血せる群 (10匹)。

第2項 X線照射腫瘍細胞で感作せるマウス群

X線を in vitro で、いかほどの量を照射すれば MH 134 細胞が移植能を失なうかを、まず検討するため、以下に述べる予備実験 a), b) を施行し、つ

いで移植能を失なつた腫瘍細胞で感作し、感作マウスに抗腫瘍性ができるか否かをみるため本実験 c) を施行した。

X線照射条件: 2次電圧 200 KV. 25 mA.

Filter: 0.5 Cu. + 0.5 Al.

Distance 20 cm. で 468r/min. の線量で照射した。

a) 予備実験 1

MH 134 細胞を採取し、生理食塩水で数回洗滌した後、生理食塩水 1 ml. 中に1億個含むように浮游させたもの 2 ml. を合成樹脂製容器に入れ、氷冷下にX線を照射した。照射量は 2000 r. ずつで区切り、2000, 4000, 6000, 8000, 10000 r. 照射毎に0.3 ml. ずつ取り出し、直ちに 2.5% Eosin 加 Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液 (Ca⁺⁺ぬき, pH 7.4) で Eosin

赤染率を調べた。これにより 8000 r. 以上の照射で完全に Eosin 赤染率が100%になることを確かめ、さらに次の予備実験を施行した。

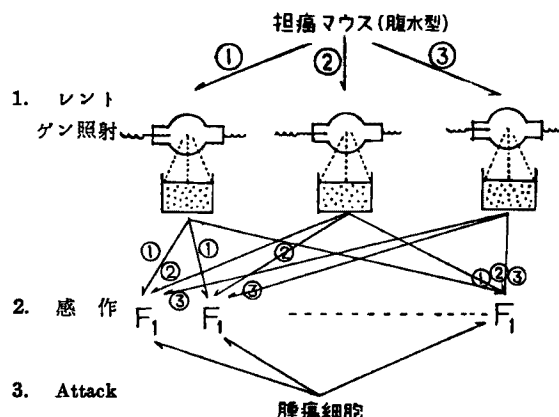
b) 予備実験 2

予備実験 1 で 2000 r. 毎に採取した X 線照射 MH 134 細胞をそれぞれ 0.1 ml. 中に 500 万個含むように調整して F₁ マウス各 6 匹の背部皮下に移植してその移植能をみた。その結果 MH 134 では 6000 r. 以下では移植能が残るので、8000 r. 以上を以後の実験に用いることにした。

c) 10000 r. X 線照射腫瘍細胞による感作マウス群 (30匹)。

感作方法は、a), b) から 8000 r. 以上照射すると移植能を失なうことがわかったので、10000 r. 照射した MH 134 細胞を F₁ 1 匹あたり 5×10^7 個づつを 1 週おきに 3 回背部皮下に移植した。感作終了 7 日目にこれらマウスを 7 群に分ち、感作マウスに抗腫瘍性ができたか否かを知る目的で、非照射 MH 134 細胞を 1×10^3 個から 64×10^4 個まで段階的に、すなわち、 1×10^3 , 1×10^4 , 8×10^4 , 10×10^4 , 16×10^4 , 32×10^4 , 64×10^4 個と各群 5 匹づつそれぞれの皮下に“attack”し、その移植能 (take) をみた (図 3)。

図 3 実験方法



d) c)の抗腫瘍性獲得群に対する対照群

非感作 F₁ マウスに無処置 MH 134 細胞を“attack”してその移植能を調べた。移植細胞数は 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 , 16×10^4 , 32×10^4 個の 6 段階で各群 5 匹の F₁ マウスを使用した。c), d) とも“attack”後 5 週間その腫瘍増殖の状態を観測した。

e) c)と同様に感作したマウスより感作終了後 7

日目に屠殺して採血および各種臓器を採取した群

採血した血液は、血清蛋白分層と蛋白濃度測定、腫瘍細胞の嫌気性解糖測定、中和実験に供した。

各種臓器については先に述べた方法により臓器 homogenate と臓器浮游液 (suspension) を作り、嫌気性解糖測定と中和実験とを施行した。

採血・臓器採取に用いたマウスは 6 匹でこれを集めて実験に供した。

血液については、別に 1 回感作後 7 日目、2 回感作後 7 日目、3 回感作後 14 日目にも 3 匹ずつ採血し、血清を集めて、血清蛋白濃度と血清蛋白分層を測定した。

f) 正常マウスより採血および各種臓器を採取せる群、すなわち e) に対する対照群

正常マウス 5 匹より採血および各種臓器を採取し、それぞれを集めて血清、臓器 homogenate および臓器浮游液を作り、実験に供した。

第 3 章 実験成績

第 1 節 拒絶マウスに制癌剤を投与せる群

第 1 項 血清蛋白分層と蛋白濃度

a), b), c), d), e) の各群マウスの血清蛋白分層を一括すれば表 1 に示すごとくである。すなわち正常マウスでは 10 匹の平均値で Albumin 51.6%, α -Globulin 16.4%, β -Globulin 21.8%, γ -Globulin 10.2% であった。d) の対照群では腫瘍移植後 14 日目には Albumin の著明な減少と、 γ -Globulin の著明な上昇がみられるが、21 日目には絶対量でみると Albumin 値は不変であるが、 γ -Globulin は著しく低下して正常マウスに近い値を示している。

これに対し、a) の Nitromin 投与群では、 γ -Globulin は対照 d) とほぼ同程度であるが、Albumin の減少は著しくない。すなわち、Albumin は 2.60 g/dl あり、対照の 2 g/dl 程度ほどは減っていない。

b) の Trespamin 群では、Albumin の減少は対照 d) と同程度だが、 γ -Globulin は対照 d) の 21 日目より多い。

c) の Granuloma Pouch 群では、Granuloma Pouch 内の腫瘍に直接 Trespamin を作用させたのであるが、Albumin は 44.6% (2.14 g/dl) あり、対照 d) の 21

表 1 制癌剤投与担癌マウスの血清蛋白分層

		Albumin		Globulin						蛋白
				α		β		γ		濃度
		%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	g/dl
正 常 マ ウ ス		51.6	3.15	16.4	1.00	21.8	1.33	10.2	0.62	6.1
担癌マウス	移植後 14日	34.6	2.01	17.2	1.00	20.5	1.19	27.7	1.61	5.8
	移植後 21日	41.6	2.08	19.4	0.97	23.4	1.17	15.6	0.78	5.0
Nitromin群 (移植後18日)		40.6	2.60	14.9	0.95	21.3	1.36	23.2	1.48	6.4
Tespamin群 (移植後20日)		35.1	1.90	20.6	1.11	24.7	1.33	19.6	1.06	5.4
Granuloma Pouch群(25日)		44.6	2.14	15.2	0.73	22.3	1.07	17.9	0.86	4.8

註 腫瘍は背部皮下へ 2×10^6 個移植

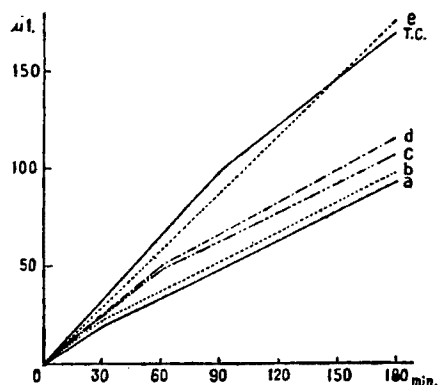
日目よりかなり多く、Tespamin 群に比して正常マウスに対する減少度は少なく、また γ -Globulin もやや多くなっている。

a), b), c) いずれについても、 α -Globulin の変動は少なく、 β -Globulin の絶対量は a), b) で対照 d) より多く正常マウス群 e) とは変らない。

第2項 マウス血清の腫瘍細胞嫌気性解糖に及ぼす影響

図4からわかるように、腫瘍対照ではほぼ直線的に上昇し、180分値 $170 \mu\text{l}$ で、e) の正常血清はほぼこれと同値をとり、対照 d) が180分値 $115 \mu\text{l}$ であった。これらに対し、実験群の a), b), c) は180分値 $93 \mu\text{l}$ から $107 \mu\text{l}$ で対照 d) より低いけれどもあまり差がない。すなわち、目的とした制癌剤投与群と非投与群との間にそれほど有意の差はみられなかった。

図4 各血清の嫌気性解糖抑制作用



(註) a: Nitromin 群 d: 対照 (担癌マウス群)
b: Tespamin 群 e: 正常マウス群
c: Granuloma Pouch 群 T.C.: 腫瘍対照

第3項 マウス血清による腫瘍細胞中和実験

表2のように腫瘍対照、すなわち腫瘍細胞を全く処置せずそのまま腹腔内へ移植した場合、半数生存日数は17日であった。次に、担癌マウス群、すなわち担癌マウス血清と中和させた場合 d) と、正常マウス群、すなわち正常マウス血清と作用させた場合 e) のいずれも、18日で無処置の腫瘍対照の場合と変りがない。次いで a) の Nitromin 投与マウス血清と中和させた場合は18日で d), e) と同じであり、b) の Tespamin の場合が21日で実験群中最も長かつた。c) の Granuloma Pouch 群も19日にとどまつた。このように b) で半数生存日数が対照群 d) より3日長かつたものの、実験群 a), b), c) のいずれも中和実験においては対照に比して有意の差は見出されなかつた。

表2 中和実験

	半数生存日数
腫 瘍 対 照	17日
a) Nitromin 群	18
b) Tespamin 群	21
c) Granuloma Pouch 群	19
d) 担 癌 マ ウ ス 群	18
e) 正 常 マ ウ ス 群	18

第2節 X線照射腫瘍細胞で感作せるマウス群

第1項 予備実験1 (X線照射細胞の赤染率)

表3aにみるように、2000r. では Eosin 赤染率が17.0%であつたものが、4000r. になると92.1%と急激に増加し、6000r. になると98.3%となり、

表 3 MH₁₃₄ 細胞に対する X 線の影響
(in vitro)

照 射 X 線 量	a	b		
	Eosin	移 植 能		
	赤 染 率	移植後 7 日	14 日	30 日
2000r.	17.0%	6/6+	6/6	3/3*
4000	92.1	1/6	3/6	5/5*
6000	98.3	2/6	3/6	4/6
8000	100.0	0/6	0/6	0/6
10000	100.0	0/6	0/6	0/6

註 + : 腫瘍可觸匹数/被移植匹数

* : 腫瘍死により減少

8000 r. では非赤染腫瘍細胞は全くみられなくなる。

第 2 項 予備実験 2 (X 線照射細胞の移植能)

表 3b に示すように、2000 r. 照射では 7 日目すでに 6 匹全部に固形腫瘍を触れ始める。4000r. では 7 日目では 6 匹中 1 匹しか触れなかつたが、30 日には 100% 触れるようになる。6000r. になると、30 日経過しても 6 匹中 4 匹にしか腫瘍がみられず、2 匹では全く腫瘍が発生しなかつた。8000r. 以上照射した腫瘍細胞では 1 例も腫瘍が発生せず、移植能を完全に失っていることがわかつた。

第 3 項 10000r. X 線照射腫瘍細胞感作マウス群

a) 感作マウス群の段階別腫瘍移植に対する抵抗性

1000 個の腫瘍細胞を attack する群から、64 万個を attack する群までいろいろな段階にわけて検討した成績を表示すると表 4 のようになる。すなわち、1000 個、1 万個、8 万個移植したものでは、5 週間の観察期間中 1 例も腫瘍が発生しなかつた。16 万個の attack では 2 週目に 5 例中 1 例、5 週目に 5 例

表 4 X 線照射腫瘍細胞感作マウスの腫瘍移植に対する抵抗性

移植細胞数	腫瘍移植率		
	感作マウス群		非感作群
	2 週	5 週	5 週
1×10 ³	0/5	0/5	—
1×10 ⁴	0/5	0/5	2/4
2×10 ⁴	—	—	4/4
4×10 ⁴	—	—	5/5
8×10 ⁴	0/5	0/5	5/5
16×10 ⁴	1/5	2/5	5/5
32×10 ⁴	2/5	5/5	5/5
64×10 ⁴	3/5	5/5	—

中 2 例に腫瘍がみられ、32 万個になると 5 週目には 100% 腫瘍がみられるに至る。すなわち、8 万個以下では移植を完全に抑制し、16 万個でもかなり抑制力がみられる。

一方、対照群では 5 週後には 1 万個の腫瘍細胞でも 50% 移植可能で、2 万個以上になると 100% 腫瘍が出来る。同程度の移植率をみるのは感作群で 16 万個、対照群で 1 万個であつた。

b) 血清蛋白分屑と蛋白濃度

感作後 2 週 (1 回感作) の血清でも表 5 のように、γ-Globulin が僅かに増加しはじめている。第 3 週 (2 回感作) になると、γ-Globulin は急激に増加し、蛋白濃度も増加している。Albumin 絶対値は 2 週、3 週とも正常マウス血清におけるよりやや多くなっている。3 回感作後 7 日目の第 4 週では Albumin の減少が著しく、γ-Globulin はさらに上昇した。第 5 週では第 4 週と同じ傾向であつた。感作回数が多くなるほど、γ-Globulin の増加と Albumin の減少が強くなってくる。

このような傾向は、無処置腫瘍細胞を移植した担

表 5 X 線照射腫瘍細胞感作マウス血清蛋白分屑

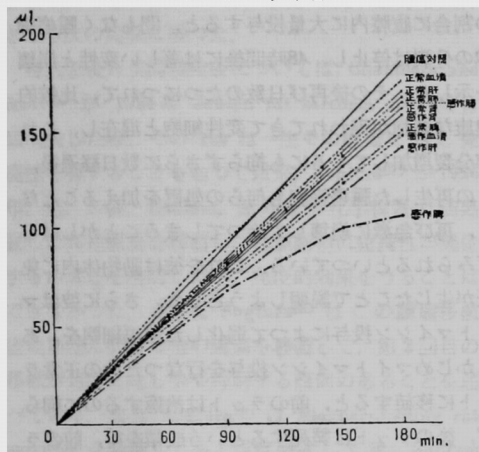
		Albumin		Globulin						蛋 白
				α		β		γ		濃 度
		%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	g/dl
正 常 マウス		51.6	3.15	16.4	1.00	21.8	1.33	10.2	0.62	6.1
感 作 マウス	第 2 週	56.3	3.38	9.1	0.55	22.7	1.36	11.9	0.71	6.0
	第 3 週	50.5	3.23	13.1	0.84	18.0	1.15	18.4	1.18	6.4
	第 4 週	37.9	2.43	15.9	1.02	23.3	1.49	22.9	1.47	6.4
	第 5 週	38.7	2.40	13.9	0.86	22.9	1.41	24.5	1.52	6.2

癌マウスの初期に似ている。

c) 血清および臓器の腫瘍細胞嫌気性解糖に及ぼす影響

まず、血清の場合は、正常血清を加えた時には、腫瘍対照の180分値 185 μ l. に近い 175 μ l. を示し、感作マウス血清は 147 μ l. で、感作血清が低い値を示した (図5)。

図5 感作マウス血清・臓器ホモジネートの嫌気性解糖に及ぼす影響



第2に臓器 homogenate についてみると、対照の脾 homogenate では180分値 150 μ l. で、感作脾は106 μ l. と大きな差を生じた。肝では対照が170 μ l. に対し感作肝が 141 μ l. で、脾と同様に感作した方に強い抑制作用があらわれた。これらに対して、腎では対照が 161 μ l., 感作腎が 158 μ l. と差がなく、肺でも同様であつた。

homogenate では、対照も感作臓器も腫瘍対照よりは抑制効果がみられた。

第3に、臓器浮游液の場合でも、homogenate と同じような傾向がみられた (図6)。すなわち、脾は対照でも低い値を示し、感作脾では、さらにこれより22 μ l. 低い値となつた。

d) 血清および各種臓器による腫瘍細胞中和実験

無処置腫瘍細胞を腹腔内に移植した際の半数生存日数 (10匹で観察) は16日であつた。感作血清では21日、対照血清で中和した場合には17日である (表6)。

表6に示すように臓器 homogenate の中、感作マウスの臓器では脾が24日と最も半数生存日数が長く、後は肝、腎の17日、肺の16日で、これらは無処置腫瘍細胞を移植した場合とほぼ変りない。対照群 homogenate と中和した際も脾にやや長い 半数生存

図6 感作マウス臓器浮游液の嫌気性解糖に及ぼす影響

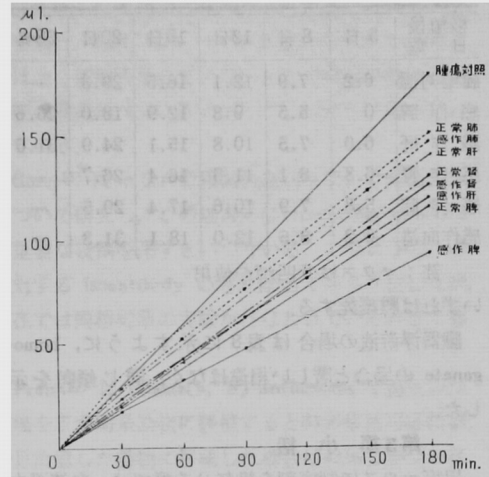


表6 中和実験 (腹腔内移植)
臓器ホモジネートの場合

	感 作 群*	対 照 群*
腫瘍対照	—	16日
血 清	21日	17
肝	17	15
脾	24	18
腎	17	16
肺	16	15

* 半数生存日数。マウスは6匹づつ使用

表7 中和実験 (背部皮下移植)
臓器ホモジネートの場合

移植後 日 数	5 日	8 日	12 日	16 日	20 日	28 日
腫瘍対照	6.2	7.7	11.7	15.6	28.5	—
感 作 脾	0	5.7	10.2	13.1	18.6	27.7
感 作 肝	6.1	7.4	11.0	14.8	25.8	33.3
感 作 腎	6.4	8.0	12.0	16.1	27.8	—
感 作 肺	5.6	7.8	10.9	16.3	27.3	—
感作血清	6.0	8.1	11.6	15.9	29.1	—

注：マウスは6匹づつ使用

日数が認められたが、定量的に実験を行なっていないため、有意の差があるとは直ちにいい難い。

臓器 homogenate と血清とで中和した後、マウス背部皮下に移植した際の腫瘍の発育をその大きさでみると、表7にみられるように、他臓器では無処置腫瘍細胞を移植した際と同じように腫瘍は発育するのに対し、脾の場合5日目では腫瘍を触れず、その後でも発育が極めて遅い。しかし、脾の場合でも

表 8 中和実験（背部皮下移植）
臓器浮游液の場合

移植後 日 数	5 日	8 日	12 日	16 日	20 日	28 日
腫瘍対照	6.2	7.9	12.1	16.5	29.3	—
感 作 脾	0	5.5	9.8	12.9	18.0	26.6
感 作 肝	6.0	7.5	10.8	15.1	24.9	31.6
感 作 腎	6.3	8.1	11.5	16.4	26.7	—
感 作 肺	5.8	7.9	10.6	17.4	29.5	—
感作血清	6.2	8.5	12.0	18.1	31.3	—

註：マウスは6匹づつ使用

いずれは腫瘍死する。

臓器浮游液の場合は表8に示すように、homogenate の場合と著しい相違はなく、同じ傾向を示した。

第3節 小 括

担瘤マウスに制癌剤を投与せる群では、血清蛋白分層に γ -Globulin が対照より多いものもあるが、ほぼ同程度であり、腫瘍細胞の嫌気性解糖抑制作用は対照と比べて著しい相違はなく、中和実験でもとくに著明の効果はみられなかつた。

これに対し、X線照射腫瘍細胞で感作したマウスでは、対照群が1万個の腫瘍細胞で50%固形腫瘍を作るのに対し、16万個で初めて40%腫瘍ができてくる。すなわち、感作によつて少数の腫瘍細胞に対しては抗移植性が生ずることがわかつた。この抗移植性が血中にあるか、臓器にあるかをみるため、血清蛋白分層をみると γ -Globulin が増加しており、嫌気性解糖では感作血清は正常血清より抑制作用が強い。しかし、脾 homogenate では正常脾でもかなりの抑制をみせ、感作脾ではさらに強いことがわかつた。肝でも感作した方に強い抑制効果があるが、肺・腎では差がなく、どちらも抑制効果はほとんどみられなかつた。臓器浮游液でも同様であつた。

さらに、中和実験でも、血清よりも脾に強い効果をみた。これらの事実から、X線照射腫瘍細胞で感作したマウスの抗腫瘍性因子は血清にも認められるが、脾にとくに強いと考えられる。

第4章 総括および考按

1937年 Hirschfeld and Halber¹⁶⁾ が、悪性腫瘍は結核乾酪化組織、膿および梗塞組織の抗原と似た抗原を含有すると述べ、彼らはこれを necrotic antigen と呼んだ。壊死物質が抗原となるという考えは、後に異種移植に対する免疫に導入された¹⁷⁾。

1942年 Spencer³⁰⁾ は癌に対する抵抗性は生きてい

る癌細胞によつて生ずるのではなく、死んだ細胞によつて生ずると信じていた。

最近臼淵²⁹⁾ は、移植率がほとんど100%に達するという吉田肉腫、弘前肉腫、肝癌130等の腹水腫瘍を移植した雑系ラットに大量の制癌剤を間歇投与して治癒した後は、同一腫瘍を移植しても移植に成功せず、さらに他の腫瘍にも交叉免疫があるといっている。また、弘前肉腫を雑系ラット腹腔内に移植して、2日から5日後にマイトマイシン1~2mg/kgの割合に腹腔内に大量投与すると、問もなく腫瘍細胞の分裂は停止し、48時間後には著しい変性と崩壊を示した。その後再び日数のたつにつれて、比較的健康な細胞が現われてきて変性細胞と混在し、これが分裂増加してくるにも拘らずさらに数日経過後、この再生した腫瘍細胞も何らの処置を加えることなく、再び急激に崩壊して治つてしまうことがしばしばみられるといっている。これを彼は動物体内に免疫が生じたことで説明しようとした。さらに彼はマイトマイシン投与によつて弱化した腫瘍細胞を、あらかじめマイトマイシン投与を行なつた他の正常ラットに移植すると、前のラットは治癒するのに拘らず、後のラットは斃死するという成績を得、前のラットは免疫が生ずると解釈した。

以上のような考えに基き、制癌剤によつて腫瘍組織を破壊し、その破壊産物に対する抗体を自己体内に産生させることによつて、癌に対する抵抗性を強めようという意図で実験を試みたのであるが、この試みは投与した制癌剤の量が腫瘍組織を壊死化せしめるに十分でなかつたためか、あるいは MH 134 が制癌剤に対し抵抗性の強い腫瘍株であつたためか、成功しなかつた。すなわち、 γ -Globulin の増量はみられたが、対照と比べてとくに著しいとはいえず、嫌気性解糖でもその血清は著明に抑制しえず中和実験でも大きい差をうることはできなかつた。

前述のごとく、MH 134 は一般に制癌剤は無効とされており、僅かに教室の柳原²³⁾ は Nitromin のみが、移植後初期においてのみ、MH 134 に対し制癌作用を有することを明らかにし、腫瘍細胞が一定数以上に達するとNitrominも無効になることを示した。そこでかかる点を除き、さらに制癌剤による腫瘍破壊を促進するために、Selye¹²⁾²⁴⁾ の Granuloma Pouch 法を利用して、皮下の空気嚢内に腫瘍を作り、この嚢内に制癌剤を投与して直接制癌剤を作用させ、腫瘍破壊を促進するとともに副作用を低下させようとしたところ、この実験では、マウスの生存日数は

やや延長することができ、腫瘍の発育も遅くある程度効果を認めることができた。しかし血清 γ -Globulin は期待したほど上昇せず、嫌気性解糖実験でも中和実験でも対照に比してとくに有意義の差はみられなかった。

MH 134 に対し制癌剤が無効であつても、大量の X 線であれば腫瘍細胞の移植性を失なわすことができるという考えから、in vitro で X 線を照射して移植能を失なわせた MH 134 細胞で純系動物を感作させる次の実験に移つた。

自己免疫乃至同種免疫については、Chambers and Scott¹⁹⁾ が 1924 年 Jensen rat sarcoma が一旦自然消失した際、その rat は一生その腫瘍に対し免疫性を有することを知つて以来、Sugiura³⁷⁾ が 1926 年、熱、X 線、Radium、紫外線や化学物質で前処置した同種腫瘍を移植し、移植動物に免疫性が発生するか否かを検討したが、免疫的効果をうることはできなかった。さらに Sugiura³⁸⁾ はこの腫瘍移植後短期間に同種の他の腫瘍を移植して、第 2 回目の移植が対照に比しやや抑制する傾向のあることを述べている。また Sugiura¹⁸⁾ は Flexner-Jobling rat sarcoma を移植してある程度増殖した後、Radium 治療して腫瘍が消失した際には次回移植を抑制することはできないが、腫瘍が縮小しつつある時には抑制力があると述べた。Russ and Scott²⁰⁾ は Jensen rat sarcoma が一旦消失した rat は同種の他の腫瘍は移植可能なこともあるが、Jensen rat sarcoma は再移植できないといっている。しかし、Jensen rat sarcoma は自然治癒の多い腫瘍であることからこれらの実験はその根拠を薄くした。これ以前に、Contamin²¹⁾、Mottram and Russ²²⁾ によつて、腫瘍を X 線または Radium の照射によつて消失せしめた後には、このような免疫状態がえられることを確認している。1931 年 Sugiura²⁵⁾ は Flexner-Jobling rat sarcoma を熱で不活化して移植した後同じ腫瘍の無処置腫瘍を移植したが移植は全く抑制されなかった。Sugiura rat sarcoma では僅かに抑制効果を認めた。このように同種免疫を証明しようという試みは多くなされて来たが、その成績も一様でなく、その当時は腫瘍や実験動物に対する吟味が足らず今日ではこれらの成績の意義は少ないとされている。

これに対し、1955 年 Mitchison²⁶⁾ は 6 C₃HED lymphoma を同系正常マウス血清および同種免疫マウス血清で incubate してマウスに移植すると、正常マウス血清と作用させたものは 9.4 日の潜伏期

の後、100%腫瘍に触れるに至るが、C57 BL. マウスに免疫した血清では 15.3 日の潜伏期の後 70%に腫瘍に触れ、C₃H/JAX マウスに感作して作つた血清では全く腫瘍に触れていない。この実験で彼は同種免疫は同系の C₃H 系マウスにしち成立し難いといっている。

Gorer¹³⁾ はマウスの移植白血病を用いて同種抗体について研究し、この場合には circulating antibody が重要な役割を果すといっている。このように、癌に対する isoantibody の考えは古くから存在したが、現在では同種同系の実験が行なわれているわけである。

Prehn²⁷⁾ は dibenz[a, h] anthracene で発生した腫瘍を正常同系動物に移植すると 81%移植可能だが、一旦治癒した動物に移植した場合は 43%しかつかなかったといつた。Révész⁸⁾ は純系動物に Methylcholanthrene で腫瘍を作り、その腫瘍を X 線で照射したものをを用いて 2 回感作した同系動物に非照射腫瘍を移植してみると、非感作動物よりも移植率ははるかに低いことを認めた。これらはいずれも同種腫瘍に腫瘍特異抗原の存在することを示唆したものである。

本実験の後半の実験では、これらの事実を基礎として始めたもので、まず、いかなる X 線量を照射すれば MH 134 細胞が移植能を失なうかをみたが、8000r. 以上照射すれば MH 134 は移植能を失なうことを知りえた。MH 134 に関するこの種の文献はみられないが、Révész⁸⁻⁹⁾ は Ehrlich 癌細胞では 4000r. で腫瘍細胞が移植性を失なうことを示している。しかし、このように X 線を照射した腫瘍細胞が無処置腫瘍細胞と抗原性を異にするとすれば問題である。この点に関しては Kaliss²⁸⁾ は大量 X 線照射腫瘍細胞は腫瘍を作る能力は失なうが、免疫原性は保有しているといっている。さらに、Hsu⁷⁾、Révész⁸⁾ の文献からも免疫原性を有することは明らかである。

McKee et al⁴⁾ は、2000~4000 r. X 線照射した Ehrlich 腹水癌細胞を 5~10 回腹腔内に注射し、0.05 ml. の Ehrlich 癌細胞を腹腔内に何回も attack したが、1 回の attack で 70 匹中 60 匹が生存し、8 回攻撃後も 35 匹が生存したことを報告した。X 線照射細胞であらかじめ感作しておく、無処置 Ehrlich 癌細胞に抵抗性を有するようになるわけである。また、Donaldson and Mitchell¹⁾ は Swiss マウスに 2500r. X 線照射した Ehrlich 癌細胞を腹腔内に注

入後1~3週後に無処置 Ehrlich 癌細胞を attack するとマウスの死亡率が対照に比べて低く、比較的長く生存するのを確認しているが、500r., 1000r. 照射腫瘍細胞では延命効果は少なかったという。これらの実験は nonspecific tumor を用いた点で同種免疫としての意義は少ない。ただ、X線照射腫瘍細胞により癌に対する抵抗性を高める点に興味をもたれたが、これらは抵抗因子が生体のどこに存するかは明らかにしてはいない。そこで本実験においては、純系動物に specific な腫瘍を用いて腫瘍抗体が血中抗体であるか組織抗体であるかを知らんとして実験を行なった。

まず、大量 X 線照射 MH 134 細胞で感作した F₁ マウスの血清蛋白分層値を調べたところ、感作マウスでは腫瘍細胞を移植した担癌マウスとはほぼ同じように、正常マウスに比し Albumin の減少と γ -Globulin の増加がみられたが、感作マウスでは担癌マウスに比べ、Albumin の減少は少なく、一方 γ -Globulin は感作回数の増加とともに増量してくる。感作マウスでは担癌マウスのように一定時期まで増量した後急激に γ -Globulin が減少してくるような現象は認められなかった。これは MH 134 腫瘍細胞が F₁ マウスに対して抗原性を有していたために、 γ -Globulin が増加したものと考えられる。

多くの同様の実験が示したように、感作マウスに無処置 MH 134 細胞を攻撃してみたところ、対照の無処置マウスではすでに 2×10^4 個で 100% 固形腫瘍を作り、 1×10^4 個でも 50% 発生したのに対して、他方感作マウスでは、5 週間の観察期間中、 8×10^4 個まで移植が成立せず、 16×10^4 個になつて初めて 40% の移植をみた。このことから、感作マウスが少数腫瘍細胞に対し、抵抗性を有することは明らかである。

次に、この抵抗性因子—抗体—が感作マウス内のどの組織に最も強いのか、すなわち、血中抗体か組織抗体かを見るために、血液、脾、肝、腎、肺の各臓器を取り出して腫瘍細胞に対する cytotoxic effect をみた。その結果、臓器ホモジネートでは、感作脾にもつとも強い抑制効果をみたが、ついで感作肝、血清の順であつた。しかし、肝・血清の抑制力は正常の脾とあまり差がなかった。但し、いずれにしても血清、脾、肝では感作群は非感作群に比し強い抑制作用をみた。臓器浮游液でも同様の成績であつた。このことから直ちに MH 134 腫瘍に対する腫瘍特異抗体の存在、ひいてはそれが血中抗体か組織抗体

かを速断することは困難であるが、本実験では、感作脾の抑制作用が最も強く、次いで血清、肝の順であり、このことから同種免疫では組織抗体が主な役割を果し、血中抗体もある程度干与しているものと思われる。

臓器と腫瘍増殖に関しては、古来種々の文献があるが、正常脾の Brown-Pearce 腫瘍に対する効果については、辻村³⁰⁾によつて検討されたところによると、家兎の脾ホモジネートを担癌家兎に投与すると腫瘍抑制効果と転移抑制効果が認められ、マウス脾抽出物質の作用は脾よりも弱いとした。正常脾が悪性腫瘍の発育に抑制作用を示すことは、Osler and Pribram⁴⁰⁾, Sugiura³⁶⁾ らが確認している。とくに Sugiura は移植前にあらかじめ、Sarcoma 180, Flexner-Jobling sarcoma 細胞浮游液をマウスの心、腎、脾、大腿筋、睾丸、胎児、胎盤等の水溶性抽出液に加えて incubate して移植し、その腫瘍の発育状態を観察し、脾抽出液が著明に腫瘍発育を抑制したといい、脾抽出液のみについて正常脾と担癌動物脾と癌の免疫後の脾の3者を比較したが、差を認めなかったといっている。同じく Potter³³⁾ は異種感作動物の脾と肝を移植することによつて免疫状態を受動的に移すことができるといっている。この2つの実験はいずれも免疫法が異種免疫という点で本実験とは異なるので同一には取扱えない。Ellis³⁶⁾ は Brown-Pearce 腫瘍で免疫した家兎の脾、リンパ節浮游液を B-P 腫瘍細胞と 37°C 2 時間 incubate して感受性家兎に移植して（中和実験）腫瘍発育抑制効果があるとしている。かかる実験は、腫瘍が non-specific であることや実験条件などから批判的な立場に立つ人もおり³⁴⁾、本実験における成績と同一には扱い難い。

いずれにせよ、本実験が示すように、移植能を失なつた同系癌細胞で強力にはほぼ同系とみなされる動物を感作することは、少なくとも癌の転移抑制に有意義なことと思われ、癌治療に一つの打開策を提供するものと考えられる。

第5章 結 論

純系動物を用いて同種免疫の成立を証明する目的で担癌マウスに制癌剤を投与したものと X 線照射腫瘍細胞で感作したものと2種の実験を施行して、次の成績をえた。

1) 担癌マウスに制癌剤を投与して腫瘍破壊を促すと、その流血中に γ -Globulin が多少増量するが、

腫瘍増大とともに減少し、同種腫瘍細胞の嫌気性解糖の抑制作用はあまり増強せず、中和実験でも延命効果は少なく、明らかな腫瘍抗体の出現を証明しえなかつた。

2) *in vitro* における MH 134 腫瘍細胞に対する X 線照射の影響をみたところ、8000 r. 以上照射すれば腫瘍細胞の Eosin 赤染率は 100% 陽性となり、感受性動物に対する移植能も失なわれる。

3) MH 134 細胞に *in vitro* で大量 X 線照射して移植能を失なつた腫瘍細胞で感受性マウスを感作す

ると、その動物は少数 MH 134 細胞に対して、抵抗性をもつにいたる。

4) 少数 MH 134 細胞に抵抗性を有する感作マウスの臓器と血液とについて、抗腫瘍性の有無を検したところ、脾の抗腫瘍性が最も強く、ついで血清・肝の順であつた。

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、御援助を賜つた折田博士に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Donaldson, D.M. and Mitchell, J.R.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 101, 204~207, 1959.
- 2) Contamin, A.: Compt. rend. Acad. d. Sc., 150, 128, 1910.
- 3) Goldfeder, A.: Radiology, 37, 705, 1941.
- 4) McKee, R. W. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 102, 591~593, 1959.
- 5) Révész, L.: J. Nat. Cancer Inst., 20, 1157~1186, 1958.
- 6) Schrek, M.R. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 94, 250~253, 1957.
- 7) Hsu, T.C.: J. Nat. Cancer Inst., 25, 927~935, 1960.
- 8) Révész, L.: Cancer Res., 20, 443~451, 1960.
- 9) Révész, L.: Nature, 178, 1391~1392, 1956.
- 10) Freymann, J. G.: Cancer Res., 16, 930~936, 1956.
- 11) Schreck, M. R.: Radiology, 46, 395~416, 1946.
- 12) Selye, H.: Cancer Res., 15, 26~30, 1955.
- 13) Gorer, P.A. and Amos, D.B.: Cancer Res., 16, 338~343, 1956.
- 14) Sato, H. et al.: J. Nat. Cancer Inst., 17, 1~21, 1956.
- 15) Sato, H. et al.: Fukushima J. Med. Sci., 5, 155~173, 1958.
- 16) Hirschfeld, L. and Halber, W.: Klin. Wchnschr., 16, 878~882, 1937.
- 17) Milgrom, F. et al.: Schweiz. Ztschr. Allg. Path. Bact., 18, 240~253, 1955.
- 18) Sugiura, K.: J. Cancer Res., 10, 481, 1926.
- 19) Chambers, H. and Scott, G.M.: Brit. J. Exp. Path., 1, 1924.
- 20) Russ, S. and Scott, G.M.: J. Path. Bact., 30, 1927. British J. Radiology, 18, 173~175, 1945.
- 21) Contamin, M.: Bull. de L'Assoc. Française pour L'Etude du Cancer., 3, 160, 1910.
- 22) Mottram, J.C. and Russ, S.: Proc. Roy. Soc., 1, 90, 1917.
- 23) 榊原: 岡山医学会誌, 73, 470~495, 1961.
- 24) Selye, H.: Z. Krebsforsch., 60, 316~333, 1955.
- 25) Sugiura, K. and Benedict, S.R.: American J. Cancer, 15, 2727~2744, 1931.
- 26) Mitchison, N.A.: Transplantation Bulletin, 2, 93~94, 1955.
- 27) Prehn, R.T.: Cancer Res., 20, 1614~1617, 1960.
- 28) Kaliss, N.: Cancer Res., 21, 1203~1208, 1961.
- 29) 臼淵: 第2回及び第3回マイトマイシン協議会発表, 1961. 第9回日本化学療法学会発表, 1961.
- 30) Spencer, R.R.: J. Nat. Cancer Inst., 2, 317~332, 1942.
- 31) Warburg, O.: Science, 123, 309~314, 1955.
- 32) Warburg, O.: Warburg Theorie der Krebsentstehung, Dtsch. Med. Wchnschr., 81, 857~858, 1956.
- 33) Potter, J.S. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol.

- and Med., 37, 655~656, 1938.
- 34) Molnäl et al.: Archiv für Geschwulstforschung, B. 5. Heft 1.
- 35) Ellis, J. T. and Kidd, J. G.: Cancer Res., 12, 259, 1952.
- 36) Sugiura, K.: Am. J. Cancer, 32, 126, 1938.
- 37) Sugiura, K. and Benedict, S. R.: J. Cancer Res., 10, 194, 1926.
- 38) Sugiura, K.: J. Cancer Res., 10, 481, 1926.
- 39) 辻村: 名古屋医学, 80, 504~516, 1959.
- 40) Osler, E. G. and Pribram, E. E.: Ztschr. f. Exper. Path. u. Therap., 12, 295~302, 1912-1913.

Immunogenic Study in Antitumor Antibody Production against Transplantable Tumors

Part III. Immunogenic Study in Tumor-bearing Mice Treated with Anticancer Drugs and in Mice Immunized with Heavily Irradiated Tumor Cells

By

Kiyoshi Takeda

1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

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

Tumor isoimmunity has been questionable; thus, two experiments were carried out using mice of isogenic lines ($C_3H \times dd: F_1$).

Experiments were with tumor-bearing mice treated with anticancer drugs, and with mice immunized with heavily irradiated tumor cells (MH 134).

1. By treating the tumor-bearing mice with anticancer drugs, the γ -Globulin titre increased in the subject serum, followed by a marked decrease as the tumor increased. With anaerobic glycolysis and with neutralization test of tumor cells, the inhibitory action of sera were ineffective.

2. The result of x-ray irradiation on MH 134 tumor cells in vitro, produced total stain using Eosin when irradiated with more than 8000 r. With the same dose of irradiation, tumor cells lost their transplantability in sensitive F_1 mice.

3. F_1 mice, immunized with heavily irradiated MH 134 tumor cells which lost their transplantability, became resistant to the transplantation of relatively few, fresh MH 134 tumor cells.

4. F_1 mice immunized with heavily irradiated MH 134 tumor cells, were bled and their organs excised. These sera, organ homogenates and organ suspensions on being tested for anticancer activity, revealed greatest antitumor activity in the spleen followed by serum and liver.