

# 「吉田腫瘍細胞内ビールス中和実験」

## 第 二 篇

### 機械的に傷害された腫瘍細胞内ビールス中和実験

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎幸雄教授)

助 手 村 上 育 郎

〔昭和 28 年 3 月 9 日受稿〕

#### 緒 言

第一篇にて述べた様に、家兎免疫血清によつて不活化された吉田腫瘍細胞を Virus HST (Hamazaki) の添加によつて活性化し得た事により、この V. HST の吉田腫瘍に占める意義が明確にされたが、その実験方法は稍々複雑であり又間接的な嫌いがある。そこで今回は簡明直截に腫瘍細胞内の Virus を中和する実験を企て之に成功した。

可移植性腫瘍の血清学的研究は腫瘍組織の生理的食塩水抽出液やその均等化液の分割遠沈々渣、殊に Microsome を抗原として多方面にわたつて多数の実験がなされたが、Virus 性腫瘍を除外すると特殊な腫瘍性抗原の分離が間然するところなく成功したためしはない (Hauschka)<sup>1, 2, 3, 4)</sup>。腫瘍の血清学的研究法のうち沈降反応は価値に乏しい。たとへば Barrett<sup>5)</sup> は家鶏肉腫の抽出物と孵化 8 日の鶏胎の抽出物を抗原として作ったそれぞれの兎抗血清は沈降反応では区別がつかなく、補体結合反応が陽性の場合には信頼がおけるが、本反応を起さず十分な抗原を腫瘍組織から取り出すことの困難な場合がある (Dmochowski<sup>6)</sup>)。結局のところは中和反応であつて、これが腫瘍の血清反応中最も重要視されている。

前篇に於て吉田腫瘍腹水を抗原とし兎の免疫血清を作り、これで吉田腫瘍細胞を短時間中和するとその移植性が失はれる。併しこれは血清中に特殊な病毒に対する抗体があるためか、非特異性の細胞毒性抗体に因るものか

いづれともわからない。そこで浜崎教授の指示に従い移植性が失はれた腫瘍細胞に V. HST を添加して改めて移植を試みた。その結果腫瘍細胞の移植性が恢復することが明確にされた。そこで短時間の中和処理によつて腫瘍細胞が移植性を失うのは細胞毒性抗体が細胞質を傷害し Virus 抗体が易く細胞内に侵入してそこに潜む Virus を中和するためであるかと結論した。

この実験によつて吉田腫瘍細胞中に特殊ビールスの存在することは確実となつたが、この実験法は一種の間接証明法で幾分迫力に乏しい。元々細胞内に寄生した Virus が中和され難いのは原形質によつて保護されているためと考えられるから之に細胞の移植性が失はれぬ程度に機械的に傷害を先き与えておき、然る後に Virus 抗血清を加えて中和を行えば成功する可能性がある。そこで再び浜崎教授の独創的の考えに従い Homogenizer (乳化器) で腫瘍細胞に一定の傷害を与え、その後 V. HST で感作してつくつた兎の血清で中和を行つて見事目的を達したのである。

#### 第 一 實 験

##### 実験材料及び其の調製法

##### 1. Homogenizer による機械的傷害法

吉田腫瘍塊及び吉田腫瘍腹水に約 10 倍容の生理的食塩水を加え Homogenizer (乳化器—後藤風雲堂製中型—最高回転速度 25000 R. P. M.) を使用し、約 12000 R. P. M. 10' にて乳化する。この際熱が発生するので容器周囲に充分の寒剤を予め充填しておき、被乳化物並

に被乳化液を冷却することに十分の努力を払う。

次に乳化が終つたならば、3本のスピッツグラスに 2cc 宛分注して遠心沈澱 (2500 R. P. M. × 5) しその上澄をすて、沈澱を実験に使用する。以上に要する時間は大約 30 分間である。

尙乳化の度合ひは、数度の予備実験によつて凡そ上記の回旋速度と回旋時間をもつてすれば適當である事を予知しているが、本実験の実施に際しては後述の如く更に詳細な観察によつて腫瘍細胞の傷害の確實を期した。

2. 抗 V. HST 免疫血清の作り方

回数	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	採血	⑨	⑩	⑪	⑫	採血
免疫日	16/I	19/I	23/I	30/I	11/II	19/II	23/II	29/II		28/III	18/IV	25/IV	1/V	
注射量	3.0	1.5	4.0	3.0	3.0	5.0	6.0	7.0	13/III	4.0	5.0	6.0	6.0	14/V
使用脳塊	1	3/8	3	1	1 1/2	2	2	2 1/2		1 1/2	1 3/8	2	2	

註 1. V. HST 浮游液は前篇と同様にして調製した。

註 2. 使用脳塊とは V. HST 浮游液調製に要した脳塊を、V. HST 脳内接種マウス 1 匹分の全脳塊を 1 とした時の倍数値で示したものである。

3. 正常家兎血清

抗 V. HST 免疫血清と共に原液のまま使用した。

4. 使用白鼠

前篇の実験に使用したものと同一の種類並に同一の条件で撰択した。

前篇において抗腫瘍免疫血清を調製した際と全く同一の法式で行う。

動物には成熟家兎を用いその静脈内に V. HST 浮游液毎回 1.5~7.0cc, 約 1 週目毎に数回耳静脈内に注射し、最後の注射から約 10 日後に血清を採集した。再度同一動物から採血する場合も前篇の実験と同様に、再び数回の V. HST 浮游液を静脈内に注射して更に 10 日を経た後に之を行つた。

本実験には H<sub>1</sub> 号を使用した。その免疫経過を示すと次の通りである。H<sub>1</sub> 号は第 1・第 2 両実験に使用した。

実験法及び実験成績

Homogenizer 沈澱に夫々 2cc 宛の抗 V. HST 免疫血清・正常家兎血清・ブイオンを添加し火焰滅菌したエーゼでよく攪拌して 10 分間室温で放置する。放置後抗 V. HST 免疫血清を添加したのに対しては 3 匹、他は各々 2 匹宛、0.5cc づゝ白鼠腹腔に注入した。

第 1 回 実験 (昭 27. 3. 22)

	処 置	所 要 時 間	生存日数	剖 検 所 見		
				大 網 にお ける 腫 瘍 形 成	腹 水 量	腫 瘍 及 び 腹 水 形 成 度
805	Homo. 沈澱+抗血清	血清添加後 10'	13日後殺			(-)
806	"	"	"			(-)
807	"	"	"			(-)
808	Homo. 沈澱+正常血清	"	"			(-)
809	"	"	"	2.0×1.5×1.7cm <sup>3</sup>	2cc	(卅)
810	Homo. 沈澱+ブイオン	ブイオン添加後 10'	13日後死	2.5×1.5×2.0cm <sup>3</sup>	5//	(卅)
811	"	"	"	3.0×1.0×1.0cm <sup>3</sup>	3//	(卅)

(註) 腫瘍及び腹水形成度の判定は凡そ前篇のものに準じて記録した。以上の外に 809・810・811 号には腸間膜並に骨盤腔に腫瘍の形成が著明に存在し又 810・811 号には後腹膜に腫瘍の浸潤増殖が著明に認められた。

## 第二 實驗

## 實驗材料及び其の調製法

前回のものゝ外、V. HST ブイオン浮游液及び正常廿日鼠腦乳劑を準備する。之等の調製法は前篇のものと同である。

## 實驗法及び實驗成績

前回同様にして作った乳化液を2本のスピッツグラスに夫々 2cc・6cc とり遠心沈澱 (2500 R.P.M. × 5') してその上澄はすて去り Homo. 沈渣を得、夫々正常家兎血清 2cc・抗 V. HST 免疫血清 6cc を添加して火焰滅菌したエーゼでよく攪拌後、室温で 10 分間放置する。

抗 V. HST 免疫血清を添加して中和操作を

行つたものは、更に 3 等分してスピッツグラスに分け、その 2 つは 10 分間放置にひきつき遠心沈澱 (2500 R.P.M. × 5') して上澄をすて過剰ブイオンを加えて火焰滅菌したエーゼでよく攪拌し、更に遠心沈澱 (同上) を行ひ上澄をすてる事によつて中和に用いた抗血清を洗い去つた。この 2 本のスピッツグラスの 1 つには正常廿日鼠腦乳劑 2cc を 1 つには V. HST 浮游液 2cc を添加し火焰滅菌したエーゼでよく攪拌して、白鼠各 3 匹宛に 0.5cc づつ腹腔内注入を行つた。所要時間は中和操作后 35 分間を費した。

先に抗血清で中和操作して 3 等分したものゝ残りの 1 つは正常家兎血清を添加したものと同一経過時間即ち添加後 20 分間で、白鼠各 3 匹宛に 0.5cc づつ腹腔内注入を行つた。

## 第 2 回 実 験 (昭 27. 5. 14)

	処 置 (1)	所要時間	処 置 (2)	合計所要時間	生存日数	腫瘍及び腹水形成度
878	Homo 沈渣 + 正常血清	20'	/	20'	12日後死	(-)
879	"	"	/	"	11日後死	(-)
880	"	"	/	"	13日後殺	(-)
881	Homo. 沈渣 + 抗血清	10'	ブイオンにて洗滌後 + 正常廿日鼠腦乳劑	35'	"	(-)
882	"	"	"	"	"	(-)
883	"	"	"	"	"	(-)
884	"	"	全上後 + V. HST (腦)	"	"	(-)
885	"	"	"	"	"	(-)
886	"	"	"	"	"	(-)
887	"	20'	/	20'	"	(-)
888	"	"	/	"	"	(-)
889	"	"	/	"	"	(-)

(註) 878. 879 号の死因は不明であつた。

## 考 按

一般ビールス性疾患に当該抗ビールス血清が奏効し難いことは周知の事実である。これは病原細菌が細胞体内に入る時は食うか食はれるかの運命にあるが、ビールスの場合はビールスと宿主細胞は或程度共生現象が行はれ、その細胞は肥大巨態細胞となり或は分裂増殖することもできる。かような状態にあるビールスは宿主細胞を殺傷することなくビールスを殺傷することは至難の業である。従つ

て単に抗ビールス血清を用いて細胞内のビールスを中和することは非常に困難である。そこで浜崎教授の独創的の考按により未だ曾て試みられなかつた細胞に移植性の全く損われない程度に軽い機械的の傷害を与えたのちに抗ビールス血清で細胞内のビールスを中和することに成功した。このように細胞が移植性を失わず且血清が進入出来得る程度細胞を傷害することは相当技術的に熟練を要することである。

浜崎教授は細胞核の研究<sup>7)</sup>において、細胞

核は細胞が生理的状態、病理的状態の何れの場合でも常に細胞機能の中核としての役割を演ずるもので、殊に蛋白合成に密接な関係を有することを強調された。本実験では特にこの細胞核に対する概念が大切に取扱はれねばならない。即ち吉田腫瘍細胞を Homogenizer で傷害する際、その程度を細胞核を破壊乃至裸の状態に迄至らしめなくて、細胞質の軽度の破壊に止めるならば、細胞核は細胞質を再生して移植を成立せしめうるものであらうと言う想定がなりたつ。そこでこの想定に基づき、Homogenizer を使用して核は無傷でしかも胞体外形質の破壊された細胞を得るよう加減し、胞体辺縁の鋭利に境された無傷の腫瘍細胞を残さぬ様乳化液を顕微鏡下に綿密に観察しつつ調製した。

以上の基底の上に本実験はなされ、抗 V. HST 血清は傷害された腫瘍細胞内の V. HST を中和して白鼠腹腔内に腫瘍の形成をみなかつた。それに反して Homogenizer で傷害しただけでは腫瘍細胞の移植性は失はれていないことを確めた。

今回は前回の実験と違って純粋な抗ビールス血清で中和が成立したのであるから、これだけで V. HST の特殊性が直接明瞭に証明せられたのである。

尙今回は抗ビールス血清で中和された傷害腫瘍細胞に新に V. HST を添加して、第一篇で経験したように腫瘍細胞の移植性が恢復す

るか否かを検査したが、今回は之に成功しなかつた。これは中和時間が長かつたためと考えられるが、又抗ビールス血清が純粋でありその力価が高かつたためかも知れない。この点については教室の佐藤(博)がひきつゞき実験中である。

## 結 論

1. 吉田腫瘍細胞を Homogenizer に掛けて移植性を失わない程度に傷害したのち、抗 Virus HST 血清で之を中和すると中和がなりたち移植性が全く失われる。

2. この目的を達するためには Homogenizer をかけながら度々顕微鏡検査を行い、腫瘍細胞の外形質が傷害せられ核は無傷である細胞を得ることに努めると同時に全く無傷の腫瘍細胞を残さぬことが肝要である。

3. 以上の実験によつて吉田腫瘍細胞内には Virus HST の寄生があり、このビールスを欠如して吉田腫瘍の増殖はあり得ないことが確認された。

4. 第1及び第2篇を通じ一定の方法で細胞質を傷害して抗血清の奏効を促す方法並に第一篇における当該ビールスを添加して抗血清の作用を払拭する方法は将来免疫血清学的に寄与するところが多いだろう。

摺筆にあたり終始御懇篤な御指導並に御校閲を賜つた恩師浜崎教授に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Hauschka, T.S. Cancer Research, 12 : 269, (1952)
- 2) ————. Proc. 2d Nat. Cancer Congress, Cincinnati, (1952)
- 3) Hauschka, T.S., and Levan, A. Anat. Rec., 111 : 467, (1951)

- 4) ————. J. Exper. Cell Research.
- 5) Barrett, M. K. Cancer Research, 1 : 543-44, (1941)
- 6) Dmochowski, L. J. Nat. Cancer Inst., 9 : 57-67, (1948)
- 7) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 (1952)