

マウス自然発生癌可溶化抗原に対する リンパ球の免疫応答に関する研究

船 木 康 博

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 関山三郎教授)

[受付: 1986年12月27日]

抄録: 可移植性自然発生扁平上皮癌を担った近交系 WHT/Ht マウスの担癌早期における細胞性免疫動態について検討を行った。ブタノール処理により同癌細胞から膜蛋白質の抽出を試み可溶化抗原の作製を行った。非担癌マウス脾リンパ系細胞と抽出液とのあいだで、リンパ球-腫瘍細胞混合培養反応 (Mixed lymphocyte-tumor culture reaction, 以下 MLTR と略す) を行い、リンパ球反応が認められたことから抽出液には腫瘍関連抗原の存在が示された。そこで MLTR における至適条件の検索を行い、培養日数は3日、脾リンパ系細胞数は 1×10^6 個/ml、可溶化抗原蛋白質濃度は $0.13 \mu\text{g/ml}$ と設定された。同条件下で担癌1日目から腫瘍が触知可能となる担癌9日目にかけ連日リンパ球反応の推移を観察した。免疫応答は担癌1日目で一時低下したが、担癌4日目にかけ亢進し、以降は漸次低下傾向を示した。以上より、自然発生癌を担った WHT/Ht マウスにおいて担癌早期より負の免疫応答が出現することが示唆された。

Key words: mixed lymphocyte reaction, soluble tumor antigen.

緒 言

癌に対する免疫応答の成立には癌細胞に存在する抗原が問題になる。1960年代、実験腫瘍から Klein¹⁾らによって癌特異抗原の存在が示唆されて以来、特異的な抗腫瘍免疫の成立が明らかにされてきた。さらに、きわめて多様な性状を示す個々の癌細胞と、それに基づくとされる癌-宿主の複雑多様な関係が免疫学的監視機構 (immunological surveillance) の概念として Burnet²⁾により体系化された。しかしながら担癌生体ではこの監視機構に対する種々の逃避機構 (escape mechanism³⁾) が働き、腫瘍は宿主の免疫応答にもかかわらず、致死的に増殖を続

ける。担癌生体の腫瘍抵抗性をみるときは、細胞性免疫が主体であり、リンパ球-腫瘍細胞混合培養反応 (Mixed lymphocyte-tumor culture reaction, 以下 MLTR と略す⁴⁾) は細胞性免疫を検討するうえで有用な一つの方法である。

今回、可移植性自然発生扁平上皮癌を担った近交系 WHT/Ht マウス^{5,6)}の腫瘍細胞からブタノール処理⁷⁾により膜蛋白質を抽出し可溶化抗原とし、この抗原を用いて非担癌マウスの脾リンパ系細胞とのあいだで MLTR を行った。MLTR を行うに際しては至適条件をもとめ、それをもとに腫瘍移植直後より早期間の担癌マウスにおけるリンパ球応答の推移を観察し検討を行った。

Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma soluble antigen of mice.

Yasuhiro FUNAKI

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 12: 24-34, 1987

材料および方法

1. マウス

近交系 WHT/Ht マウス, 8-10週齢, 雌, 25-27gのものを使用し, 固型飼料(オリエンタル酵母工業)で飼育した。

2. 腫瘍細胞

WHT/Ht マウスに自然発生し, その後皮下に継代移植されている扁平上皮癌を用いた。

3. 担癌マウスの作製

腫瘍は継代移植されている近交系 WHT/Ht マウスからエーテル麻酔下で無菌的に摘出し, ダルベッコの PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} free, pH7.4, ニッスイ, 以下 PBS と略す) で洗浄後, 剪刀で細切した。ついで150白金メッシュを通し, 0.05%トリプシンを添加攪拌して, 細胞浮遊液とした。同浮遊液を3回遠心洗浄の後, 腫瘍細胞を健康マウスの左右胸部皮下にそれぞれ 5×10^4 個/0.1ml ずつ移植した。なお腫瘍細胞は0.2%トリパンブルー染色を行い, 生細胞を算定した。腫瘍移植後, 腫瘍死にいたるまで経日的に腫瘍の縦径と横径をそれぞれ計測し, その平均値を腫瘍径とした。

4. 可溶性抗原の作製および蛋白質定量

可溶性抗原の作製は, LeGrue⁷⁾らの方法に準じてブタノール処理により膜蛋白質の抽出を行った。すなわち担癌13日目の WHT/Ht マウス 15-20匹の腫瘍をエーテル麻酔下で摘出し, PBS で細切洗浄後, 150白金メッシュを通し, 0.25%トリプシンおよび DNase $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) を添加し, 低速マグネチックスターラーを用い室温で攪拌して細胞浮遊液とした。同浮遊液を PBS で3回遠心洗浄の後, PBS で2.5%に調整した1-ブタノール溶液, pH7.4 (関東化学) で, 5分間室温で震盪反応させた。以後の操作はすべて 4°C で行った。まず同細胞浮遊液を遠心 (500g, 10分間) し, 上清を再遠心 (2,000g, 10分間) した。得られた上清をセルロースチューブ (Union Carbide Co.) に入れ, その容量の100倍量の PBS で24時間透析した後, 50%ショ糖溶液 (weight/vol., 関東

化学) で12時間濃縮し, PBS で24時間再透析を行った。同溶液を超遠心 (200,000g, 1時間, Beckman LS-65, SW60) し, その上清を粗抽出液 (crude butanol extracts, 以下 CBE と略す) とした。CBE は濾過滅菌 (Millex, ミリポアー, $0.22 \mu\text{m}$) ののち, セラムチューブ (Corning) に分注し -80°C で凍結保存した (Fig. 1)。

蛋白質定量は色素結合法により行い, 波長 595nm のときの吸光度を測定し, BIO-RAD プロテイン・アッセイキット, ウシガンマグロブリン (スタンダード I) を用いて作製した標準曲線より CBE の蛋白質量を算定した。

5. 培養液

培養液は RPMI1640 (Flow Labo) に, 56°C 30分間加熱処理し非働化したウシ胎児血清 (Flow Labo) を最終濃度10%となるように添加した。またペニシリン $100\text{IU}/\text{ml}$, ストレプトマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, L-グルタミン $0.3\text{mg}/\text{ml}$ を添加し, pH7.4に調整した。なお血清は同一ロットを使用した。

6. 脾リンパ系細胞の採取

1群4-5匹のマウスを頸椎脱臼させ, 無菌的に脾臓を摘出し, 150白金メッシュ上でピンセットを用いて分離し, 単細胞として培養液中に浮遊させた。脾リンパ系細胞は0.2%トリパンブルー染色を行い, 生細胞を算定し, 一定数に調整した。

7. リンパ球-腫瘍抗原混合培養 (MLTR)

マイクロプレート (96well, flat bottom, Nunclon) を用い, 一定数に調整された脾リンパ系細胞浮遊液を 1 well につき $200 \mu\text{l}$ ずつ分注した。これに CBE $10 \mu\text{l}$ を添加した群を刺激群とした。一方 CBE を添加せず等量の PBS を添加した脾リンパ系細胞単独培養群をコントロールとした。いずれも 37°C , CO_2 培養器で一定期間培養を行った (Fig. 2)。実験は Pentaplicate で行った。なお CBE はすべて同一ロットを使用した。

8. リンパ球幼若化反応の測定

一定期間培養の後, 培養液で40倍稀釈した

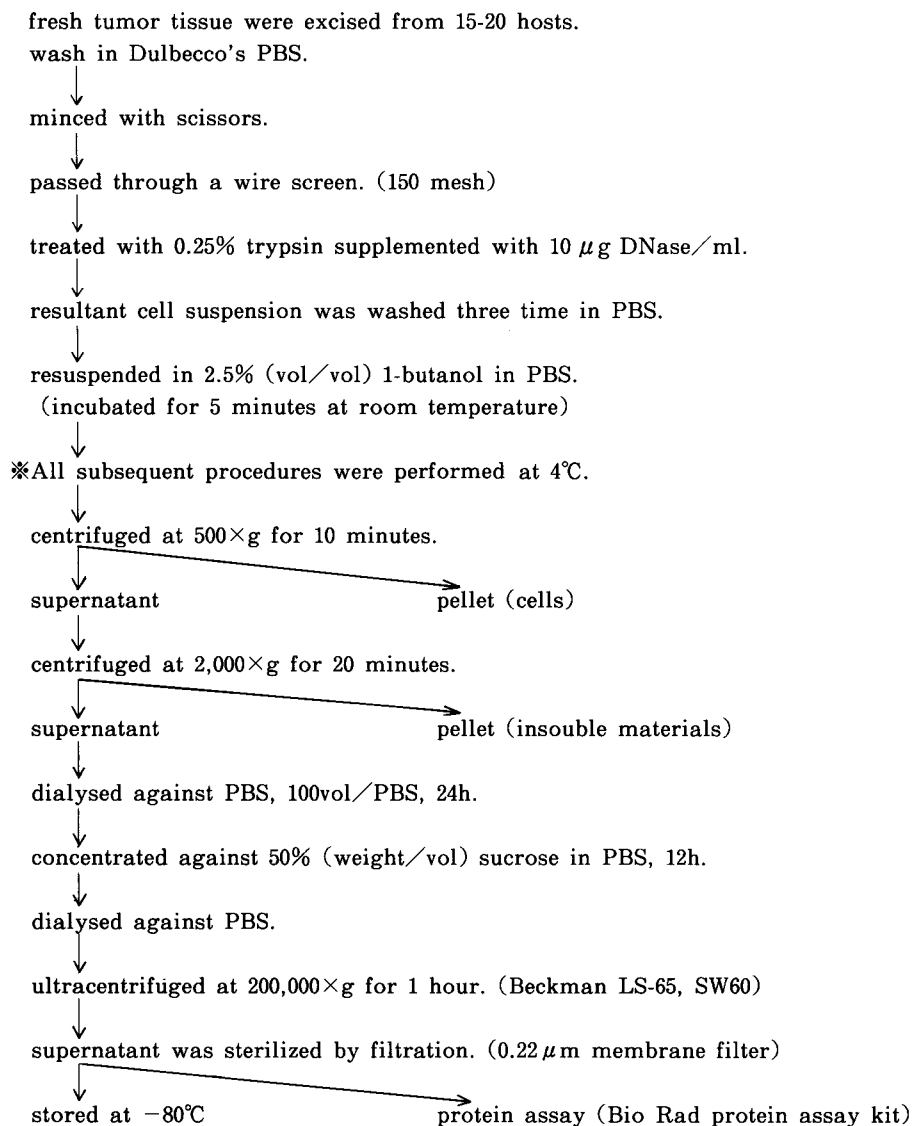


Fig. 1 The procedures of separation and purification of carcinoma soluble antigen.
(by LeGrue²⁾)

³H-thymidine (specific activity 15 Ci/mM, NEN 社, 以下³H-TdR と略す) を40 μ l 添加 (1 μ Ci/well) し, さらに3時間培養後, オートマチックセルハーベスター (LM101, Labo Mash) を用い, 蒸留水でグラスファイバーフィルター (Labo Mash) 上に回収した。フィルターを十分に乾燥させた後, シンチレーションバイアル (Pyrex, 岩城硝子) に入れシンチレーター (ACS II, Amersham Japan) 4 ml

を注入し, 液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-3155T, Aloka LSC-1050) で放射活性を測定した (Fig. 2)。

表示は cpm (count per minute) で行い, well ごとのカウントの平均した値を測定値とし, mean \pm SE で示した。またリンパ球幼若化反応の程度を判定する指標として, CBE 添加刺激群 cpm を PBS 添加非刺激群 cpm で除した値を刺激指数 (stimulation index, SI 値) と

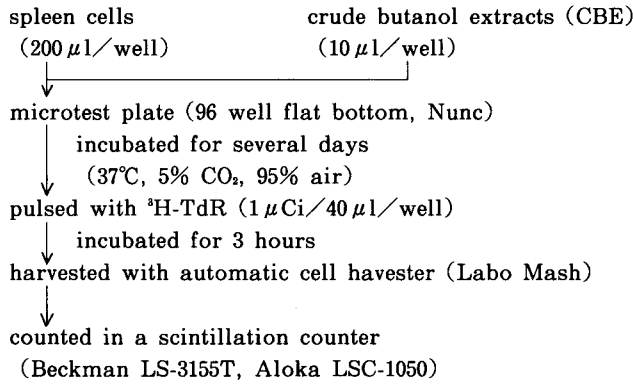


Fig. 2 Methods of mixed lymphocyte-tumor culture reaction.

して表した。以上の操作で、培養日数、CBE濃度、脾リンパ系細胞数等の至適条件についてそれぞれ検索を行った。

9. 担癌マウスにおける MLTR の推移

実験に先立って得られた至適条件をもとに、腫瘍細胞を移植してから、腫瘍が触知可能となる9日目および10日目までの期間について観察を行った。すなわち、経日的に担癌および非担癌マウスにおける脾リンパ系細胞のCBE反応を³H-TdRの取り込みにより測定し、それぞれのSI値を算定した。また担癌マウスと非担癌マウスとのリンパ球反応性を比較するためにその比率(担癌マウス/非担癌マウス×100)を求めた。

実験結果

1. 腫瘍の増殖度と担癌マウスの生存率

腫瘍細胞移植後のマウス腫瘍径の経日的変化は腫瘍移植後9日目より触知可能となり、15日

目には径15.47±0.64mmと腫瘍は急激に増大した。20日目には20.50±0.47mmとなり、9日目のおよそ5倍の径に達したが、以後はあまり大きな変化は認められなかった(Table 1)。

一方、腫瘍細胞移植後のマウスの生存率は、腫瘍移植後19日目より腫瘍死が出現し、21日目には生存率30%となり、24日目には全例腫瘍死に至った(Table 2)。なお腫瘍移植率は100%であった。

2. CBE 蛋白質定量

腫瘍湿重量約20gから粗抽出液として約15ml得られた。CBEの吸光度は0.427で、標準曲線からその蛋白質濃度は779μg/mlであった。

3. MLTR の至適条件

(1) 培養日数

脾リンパ系細胞数を1×10⁶個/mlと一定にし、CBE濃度を0.1μg/mlから1.5μg/mlまで5段階に分け、7日間経日的に培養を行った。このうち最大の反応を示したCBE濃度のとき

Table 1 Tumor growth in the mice.

Days after the inoculation of tumor	9 ^a	11	13	15	17	20	23
Tumor diameter ^b	4.37±0.26	7.29±0.41	12.10±0.56	15.47±0.64	17.95±0.67	20.50±0.47	21.0±0.41

a : Five×10⁴ tumor cells were inoculated into s.c. chest wall of 30 mice bilateral and the tumor was become palpable on 9th day and mesured until the tumor death.

b : Tumor size were considered to be approximately equal to the product of the lateral and vertical diameters of the tumors, their mean values were used as tumor diameters and the results were expressed in mm, as the mean of diameter ± S.E.

Table 2 Survival ratio after inoculating tumor cells^a.

Days after tumor inoculation	1~18	19	20	21	22	23	24
Tumor death	0 (0) ^b	2 (2)	9 (11)	10 (21)	5 (26)	3 (29)	1 (30)
Total number of survival	30	28	19	9	4	1	0
Survival ratio (%)	100	93.3	63.3	30.0	13.3	3.3	0

a : Five \times 10⁴ tumor cells were inoculated into s.c. chest wall of 30 mice bilateral.

b : Total number of tumor death.

の³H-TdR 取り込み, ならびに SI 値の経日的変化を Table 3 に示した。すなわち CBE 濃度 0.19 μ g/ml としたとき, ³H-TdR の取り込みは培養 3 日で 757.3 \pm 51.1cpm, SI 値 8.6, 培養 4 日目では 702.0 \pm 157.0cpm, SI 値 8.5 と, その他の培養日数のときの取り込みに比べ著しく高い値を示した。そこで cpm 値, SI 値とも最も高く, また幼若化反応の亢進期と考えられた培養 3 日を至適培養日数とした。コントロール群の³H-TdR 取り込みは 7 日間を通じ, 最高 128.0 \pm 1.3cpm から最低 79.2 \pm 3.6cpm の間で変動は少なかった。なお培養 1 日目と 7 日目を除き, t-検定にて刺激群とコントロール群との間に有

意差が認められた ($p < 0.05$)。

(2) CBE 濃度

培養日数を 3 日, 脾リンパ系細胞数を 1 \times 10⁶個/ml として CBE 濃度を 0.08 μ g/ml から 0.39 μ g/ml の 5 段階に分け, それぞれの濃度の場合の³H-TdR 取り込みの変化について検討した (Table 4)。CBE 濃度が 0.08 μ g/ml のときは³H-TdR の取り込みは, コントロール群と刺激群の間に有意差は認められなかったが, CBE 濃度が高くなるにつれて刺激群での³H-TdR の取り込みが亢進し, 0.13 μ g/ml のときには 1091.1 \pm 93.0cpm, SI 値 8.8 と最高値を示した。しかし同濃度のときの取り込みをピーク

Table 3 ³H-TdR incorporation stimulated by CBE in cultures of normal spleen cells^a from WHT/Ht mice.

Days in cultures	³ H-TdR incorporation ^b		S.I. ^e
	control ^c	CBE added ^d	
1	128.0 \pm 1.3	208.3 \pm 36.4	1.6
2	85.8 \pm 18.4	491.5 \pm 125.1	5.7
3	101.2 \pm 16.2	757.3 \pm 51.1	8.6
4	82.7 \pm 17.9	702.0 \pm 157.0	8.5
5	83.3 \pm 12.1	271.3 \pm 35.8	3.2
6	95.8 \pm 14.2	381.5 \pm 38.5	3.9
7	79.2 \pm 3.6	99.5 \pm 31.0	1.3

a : One \times 10⁶ spleen cells per ml.

b : Mean cpm \pm S.E.

c : Spleen cells alone (PBS added).

d : CBE concentration was 0.19 μ g/ml.

e : Stimulation index.

Table 4 Dose-response study of blastogenic response of normal spleen cells to CBE.

CBE ^a	³ H-TdR incorporation ^b	S.I. ^c
control ^d	123.3 \pm 18.4	
CBE ^a		
0.08	144.4 \pm 39.8	1.2
0.10	519.5 \pm 94.5	4.2
0.13	1091.1 \pm 93.0	8.8
0.19	691.7 \pm 89.5	5.6
0.39	437.6 \pm 78.7	3.5

a : CBE concentration expressed in μ g/ml.

b : Mean cpm \pm S.E.

c : Stimulation index.

d : Spleen cells alone (PBS added).

Table 5 Effect of cell concentration on the incorporation of ^3H -TdR by normal spleen cells and stimulated cells by CBE.

Spleen cell concentration (cells/ml)	^3H -TdR incorporation ^a		S.I. ^d
	control ^b	CBE added ^c	
5×10^6	113.9 ± 26.2	883.4 ± 161.6	7.8
1×10^6	122.1 ± 22.8	1216.7 ± 192.6	10.0
2×10^6	272.6 ± 24.7	1781.5 ± 86.9	6.5

a : Mean cpm ± S.E.

b : Spleen cells alone (PBS added).

c : CBE concentration was $0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$.

d : Stimulation index.

に、CBE濃度が高くなるにつれて刺激群での取り込みは低下傾向を示した。そこで最も高い取り込みを示した $0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ を至適CBE濃度とし、以降の培養を行った。またCBE濃度が $0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ のときを除き、刺激群とコントロール群との間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

(3) 脾リンパ系細胞数

培養日数を3日、CBE濃度を $0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ とし、脾リンパ系細胞数を変化させたときの ^3H -TdR取り込みの変化をTable 5に示した。その結果、wellあたりの細胞数が増加するにつれて刺激群、コントロール群ともに、 ^3H -TdR取り込みの増加がみられた。しかしながら、その増加はコントロール群に比較して刺激群で著しく、 1×10^6 個/mlではSI値10.0の高値を示した。

以上よりMLTRの至適培養条件は、培養日数は3日、CBE濃度は $0.13 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、また脾リンパ系細胞数は 1×10^6 個/mlと設定した。

(4) 担癌マウスにおけるMLTRの推移

先に得られたMLTRの至適条件をもとに、腫瘍を移植してから触知可能となるまでの期間の、CBE刺激に対する ^3H -TdR取り込みの変化を、正常マウスと担癌マウスとのCBE反応値を対比しながら観察を行った。担癌1日目

はその比率は80.3%と担癌マウスにおいて低かったが、担癌2日目および3日目では、正常マウスとほぼ同率であった。担癌4日目では164.5%と全経過中で最高の比率を示した。その後の正常マウスに対する比率は、担癌5日目では139.4%、担癌6日目では111.7%、担癌7日目では121.3%、担癌8日目では75.0%と漸次低下傾向を示し、腫瘍が触知可能となる担癌9日目では57.1%と最も低い比率を示した。しかし担癌10日目では82.7%と前2日に比べ高値を示した (Table 6), (Fig. 3)。

考 察

近代腫瘍免疫学は近交系マウスの実験系の確立により発展し、それにとまって腫瘍と担癌宿主の間に免疫応答の存在することが実証されてきた。Klein⁹⁾, Foley⁹⁾, Prehn⁹⁾, らは、化学発癌剤で誘発した実験腫瘍を用いて、自己由来の腫瘍に特異的な抗腫瘍抵抗性が成立することを示し、腫瘍自体に生体に抗腫瘍免疫を誘導しうる抗原が存在することを明らかにした。その後、化学発癌剤誘発腫瘍とならんでウイルス誘発腫瘍を用いた実験が行われるようになり、発癌方法によってその抗原性に違いのあることが明らかにされてきた。従来から腫瘍免疫機構の解析に用いられてきた多くの腫瘍細胞は、ウイルスや化学発癌剤により誘発されたもので、比較的免疫原性の高いものであった。しかし、ヒトの癌の大部分が低抗原性であることを考慮すると、免疫原性が低いか、あるいは認められないとされる自然発生癌を対象とした今回の検討も必要であると考えられる。

先にFukazawa¹⁰⁾は、自然発生癌を担った近交系WHT/Htマウスを用い、腫瘍が触知されてからの宿主免疫応答について、放射線照射腫瘍細胞を用いたMLTRの検討の結果、腫瘍の増殖に伴い担癌生体の細胞性免疫能が低下していくことを報告した。そこで今回は、WHT/Htマウスに腫瘍を移植し、可溶性抗原を用いて腫瘍が触知可能となるまでの、早期の宿主細胞性免疫能の推移について観察を行った。

Table 6 Blastogenic response of spleen cells^a to CBE at various time in normal and tumor-bearing mice.

Days after tumor inoculation ^b	control ^c cpm	CBE added ^d				$\frac{(B)}{(A)} \times 100^f$
		normal mice		tumor-bearing mice		
		cpm (A)	S.I. ^e	cpm (B)	S.I. ^e	
1	125.9 ± 15.2 ^g	769.0 ± 96.6	6.1	616.7 ± 60.1	4.9	80.3
2	130.4 ± 21.1	727.0 ± 102.3	5.6	730.4 ± 135.9	5.6	100.0
3	100.5 ± 18.0	794.8 ± 177.5	7.9	803.6 ± 188.0	8.0	101.3
4	106.5 ± 19.7	662.8 ± 55.8	6.2	1086.3 ± 188.6	10.2	164.5
5	119.1 ± 21.0	788.0 ± 66.7	6.6	1096.0 ± 150.3	9.2	139.4
6	127.3 ± 20.1	764.4 ± 211.0	6.0	853.0 ± 88.9	6.7	111.7
7	139.5 ± 18.4	651.0 ± 147.5	4.7	795.1 ± 93.3	5.7	121.3
8	128.0 ± 15.0	765.0 ± 159.5	6.0	579.4 ± 100.6	4.5	75.0
9	109.1 ± 26.1	845.2 ± 179.8	7.7	477.7 ± 67.7	4.4	57.1
10	133.8 ± 18.4	695.6 ± 40.9	5.2	574.3 ± 93.3	4.3	82.7

a : One × 10⁶ spleen cells per ml.

b : Five × 10⁴ tumor cells were inoculated into s.c. chest wall of 30 mice bilateral.

c : Spleen cells alone (PBS added).

d : CBE concentration was 0.13 μg/ml.

e : Stimulation index.

f : The ratio (B) to (A).

g : Mean ± S.E.

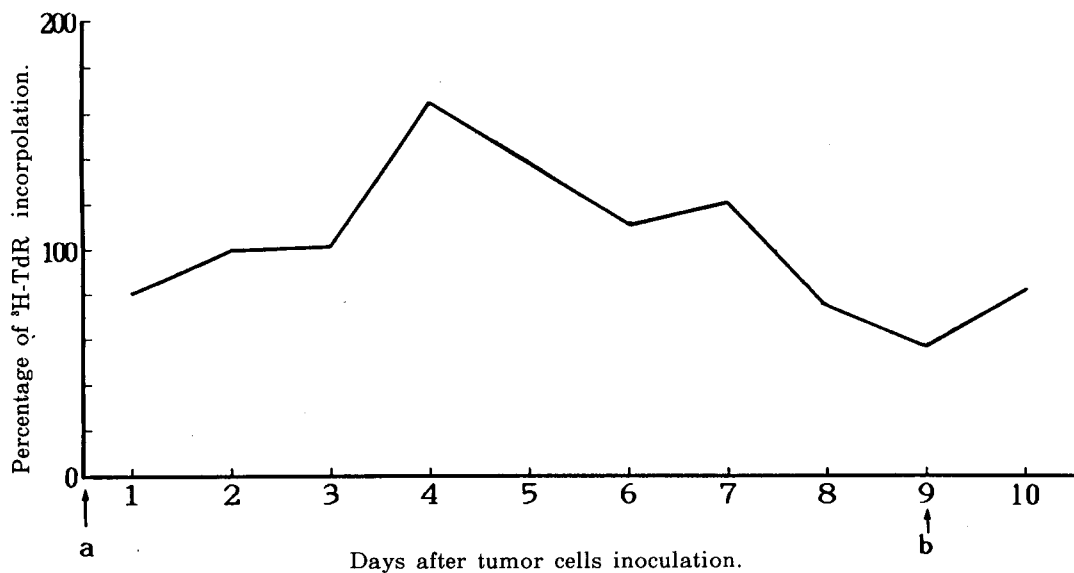


Fig. 3 Responses of the MLTR at various times after inoculating 5 × 10⁴ tumor cells into s.c. of WHT/Ht mice bilateral.

a : Tumor inoculation.

b : Tumor palpation.

MLTRを行うに先立ち可溶性抗原の作製を行った。動物腫瘍を用いた可溶性抗原の作製はOettgenら¹¹⁾によりはじめて行われて以来、3 M-KCl, 低張食塩水, 表面滑性剤, 超音波処理などを用いた多くの抽出方法が考案された¹²⁾。特に組織適合抗原抽出のために開発された3 M-KCl抽出方法¹³⁾は、各種免疫反応の抗原溶液作製のため広く用いられてきた。可溶性抗原はその抽出方法の違いなどにより膜抗原の量的、質的差がみられ、また放射線照射などで得られた不活化腫瘍細胞に比べ活性が低下するといった指摘もなされている。しかしながら、可溶性抗原は不活化腫瘍細胞の抗原に比べ、保存が容易であることから経時的観察に都合が良くまたその安全性、均一性の面で優れていると考えられている。本研究で採用したブタノールによる抽出法は、腫瘍細胞膜に存在する蛋白質、すなわち腫瘍関連抗原 (Tumor associated antigen¹⁴⁾) を細胞膜に障害を与えずに抽出することができ、したがって細胞質の異種蛋白質の混入も少なく、従来の抽出法に比べて有用な方法と考えられている。

腫瘍関連抗原の証明は、これまで *in vivo*, *in vitro* の両法で、多くの検出方法が考案されてきたが^{12,15)}、とくにヒトについては *in vivo* での実験は強く制限されていることから、生体の状態を忠実に反映する *in vitro* の検出方法が求められてきた。MLTR を用いたリンパ球幼若化反応はその一つの方法である。この反応はリンパ球の腫瘍抗原の認識によって生じる初期の免疫反応と考えられている。その反応はDNA合成時にリンパ球に取り込まれる³H-TdRの相対量を指標として、測定することができる。この方法から、臨床的にも担癌生体に対する特異的な免疫反応を定量的に知ることが可能になり、その宿主の病態、すなわち免疫不全の程度や予後の予知などに関する宿主免疫能の評価に応用されてきた^{16,17)}。

MLTRを行うに際しての、培養日数、抗原の量、リンパ球数などについては報告者により異なる場合が多い。今回の培養日数については、

最大の³H-TdR取り込みを示し、かつリンパ球反応の亢進期にあたる3日目を至適培養日数とした。この培養日数は正常マウス脾リンパ球と可溶性抗原を用いてMLTRを行ったPoon¹⁸⁾やKrueger¹⁹⁾らの培養日数と同じであった。一方、先のFukazawa¹⁰⁾の報告では、至適培養日数は7日と本実験の培養日数との間に差が認められた。また不活化腫瘍細胞を抗原として正常マウス脾リンパ球とMLTRを行った場合には、培養7日目でSI値が14.0と高値を示した。これに対し、本研究ではTable 3に示す如く、CBEの濃度が0.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき培養7日目でSI値は1.3とコントロール群と比べ有意差が認められなかった。本法でのSI値の高値は培養3日でみられ、細胞数 1×10^6 個でSI値は10.0であった (Table 3, 4, 5)。これらの差は検索に用いたリンパ球が担癌マウスのリンパ球であったことや、抗原として放射線照射により不活化した腫瘍細胞を用いたことなどによって生じたと考えられる。一般に可溶性された抗原の免疫原性は不活化腫瘍細胞を抗原として用いた場合に比べ低いとされているが、今回の結果ではあまり大きな差は認められなかった。

抗原濃度については、CBE抗原濃度が過剰でも、あるいは過小でもリンパ球の幼若化反応は起こりにくく、今回の結果では0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という至適抗原濃度の存在することが明らかになった。

今回、至適条件検索時のSI値は8.8から10.0であったが6ヶ月経過時のSI値は、6.2前後と低下しており、長期実験ではとくに抗原の活性について充分留意しなければならないことを示している。

脾リンパ系細胞数についてみると、CBE添加群および非添加群の両群で脾細胞数の増加とともに³H-TdR取り込みの亢進がみられたが、SI値は逆に低下の傾向がみられ、 1×10^6 個/ ml のときが効率のよいことが判明した (Table 5)。また脾細胞を分画しないで用いたが、これはリンパ球分離操作による物理的損傷が少なく、簡便であり有用な手段と思われた。

担癌マウスの経日的な免疫反応の推移をみると、癌細胞移植後1日目では正常マウスのSI値よりも低値を示した。このことは、移植直後の腫瘍細胞より遊離、放出されたTumor associated antigenがエフェクター細胞を刺激しうるにはまだ不十分な量ではあるがサプレッサー細胞を短時間のうちに誘導させたものと考えられた^{20,21,22})。担癌2日目、3日目のリンパ球は正常マウスとはほぼ同率のリンパ球反応を示し、担癌4日目では最も高い反応を示した。これは、担癌マウスにおいて移植腫瘍細胞が生着、増殖していく過程のなかで、遊離する抗原量も増加していくことを示しており、in vivoにおいては抑制作用をうけながらもTumor associated antigenとしての認識反応は濃度反応性に遂行されていくものと推測された。担癌4日目をピークに以降のリンパ球反応は漸次低下傾向を示したが、これは腫瘍増殖に伴い抗原量がさらに増大し、至適とされる濃度を越えた時点で正の免疫反応を司る機構と拮抗するサプレッサー細胞や、さらには血清抑制因子²³)などを含めたエスケープメカニズム³)の関与により免疫応答が低下していくものと推察された。

また、担癌10日目のリンパ球反応は担癌8日目、9日目の値に比べ多少の上昇がみられるものの、以降の経緯についてはFukazawa¹⁰)の報告例のごとく宿主細胞性免疫動態はしだいに低下していくものと考えられた。同様にMLTRを用いた実験で、浜崎²⁴)らは5日目をピークに、またBurk²⁵)らは7日目をピークに宿主免疫能が低下していくことを示した。

本研究でもこれらの報告例に類似した推移をとり、担癌5日目からリンパ球反応は低下を示した。このことから、腫瘍として触知される以前の早い時期からすでに宿主免疫能は低下していくことが示唆された。臨床において、癌の性質によっては早期の症例であっても局所再発や、後発転移例もみられることから、本研究により示されたごとく担癌早期においても少なからず負の免疫応答が関与していることが考えられた。

結 論

近交系WHT/Htマウスの自然発生扁平上皮癌細胞よりブタノール抽出法を用い、可溶性抗原の作製を行った。

MLTRにおける至適条件の検索を正常マウスを用いたリンパ球反応により行ったのち、同条件下で、担癌マウスの初期免疫動態について観察を行い、以下の事項が明らかになった。

- (1) CBEを用いたMLTRにより、正常マウス脾リンパ系細胞に反応が認められたことから腫瘍関連抗原の存在が示された。
- (2) MLTRを行うにあたっての至適条件は、培養日数は3日、脾リンパ系細胞数は 1×10^6 個/ml、CBE濃度は $0.13 \mu\text{g/ml}$ であった。
- (3) 経日的に行った自然発生癌移植マウスのリンパ球反応は、担癌1日目で低下を示したのち担癌4日目までは免疫応答の亢進が認められたが、腫瘍が触知可能となる担癌9日目にかけその反応は漸次低下傾向を示した。このことから自然発生癌移植マウスにおいて、リンパ球は腫瘍関連抗原を認識するものの腫瘍の移植、生着増殖に伴ない、早期よりその機能低下が認められた。それにはサプレッサー細胞などの負の免疫応答の関与が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に際し直接御懇切なる御指導御教示を頂いた深澤肇講師に衷心より感謝の意を表わします。

更に、WHT/Htマウスを提供して下さいました、東北大学医学部放射線基礎医学講座坂本澄彦教授、また研究の場を提供して頂きました、本学医学部細菌学教室川名林治教授に深謝します。併せて本研究の遂行に際し、御助言下さいました結城勝彦助教授に深く感謝するとともに、口腔外科学第二講座医局員各位、ならびに各教

室の皆様の御理解と御協力に謝意を表わします。

回日本口腔科学会総会（福岡市）において発表した。

なお、本論文の要旨は昭和61年5月16日第40

Abstract : Kinetics of the cellular immune response in inbred WHT/Ht mice with spontaneous growing transplantable cell carcinoma, was studied in its early stage. Soluble tumor antigen prepared by treatment with butanol appeared to release the contents of the plasma membrane selectively. In a micro mixed lymphocyte-tumor culture reaction (MLTR) test it was shown that crude butanol extracts (CBE) evoked a lymphocyte blastogenesis in normal mice, revealing that CBE contained a tumor associated antigen (TAA). In addition, optimal conditions in the MLTR were investigated. The maximum lymphocyte blastogenesis was observed on the 3rd day after culturing. Maximum stimulation was shown to occur when 1×10^6 /ml spleen cells were incubated with 0.13 μ g/ml CBE. Tumor cells, inoculated under these conditions, and spleen cells, of tumor-bearing mice, were serially tested on each alternate day for 9 to 10 days by which time tumor palpation was possible. These studies showed that cellular immunity was suppressed on the first day but was much enhanced 2-4 days later, and was again greatly suppressed 5-10 days later. These findings show that negative cellular immunity is present in the early stages of spontaneous tumor-bearing WHT/Ht mice.

文 献

- 1) Klein, G., Sjögren, H.O., Klin, E., Hellström, K.E. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcoma in the primary autochthonous host. *Cancer Res.* 20 : 1561-1572, 1960.
- 2) Burnet, M. : Immunological factor in the process of carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 20 : 154-158, 1964.
- 3) Currie, G. : Cancer and the immune response, Current topics in immunology series. 2nd ed., London, 73-87, 1980.
- 4) 藤井源七郎：免疫，大星章一，菅野晴夫編集：人癌細胞の培養，第一版，朝倉書店，東京，465-470ページ，1975。
- 5) Hewitt, H.B., Chan, D.P.S., Blake, E.R. : Survival curves for clonogenic cells of a murine keratinizing squamous carcinoma irradiated in vivo or under hypoxic conditions. *Int. J. Radiat. Biol.* 12 : 535-549, 1967.
- 6) Staats, J. : Standardized nomenclature for inbred strains of mice : Eighth listing. *Cancer Res.* 45 : 945-977, 1985.
- 7) LeGrue, S.J., Kahan, B.D., Pellis, N.R. : Extraction of a murine tumor-specific transplantation antigen with 1-butanol. I. Purification by isoelectric focusing. *J. Natl. Cancer Inst.* 65 : 191-196, 1980.
- 8) Foley, E.J. : Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13 : 835-837, 1953.
- 9) Prehn, R.T., Main, J.M. : Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18 : 769-778, 1957.
- 10) Fukazawa, H. : Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. *J. Iwate Med. Ass.* 32 : 911-916, 1980.
- 11) Oettgen, H.F., Old, L.J., McLean, E.P., Carswell, E.A. : Delayed hypersensitivity and transplantation immunity elicited by soluble antigens of chemically induced tumors in inbred guinea-pig. *Nature.* 220 : 295-297, 1968.
- 12) 塚田 裕：腫瘍抗原，畔柳武雄，大高裕一，松橋直編集：臨床免疫学叢書10，第一版，医学書院，東京，1-24ページ，1975。
- 13) Reisfeld, R.A., Pellegrino, M.A., Kahan, B.D. : Salt extraction of soluble HL-A antigens. *Science.* 172 : 1134-1136, 1971.
- 14) 守内哲也，小林 博：腫瘍関連抗原，臨床免疫，11 : 482-490, 1979.
- 15) 菊地浩吉：癌と免疫，医科免疫学，第二版，南江堂，東京，294-295ページ，1984。
- 16) 関山三郎，小島 誠，深沢 肇，矢川寛一：リンパ球-腫瘍細胞混合培養による口腔癌の免疫応答について，日口科誌，28 : 141-146, 1979.
- 17) 深沢 肇，小野寺 満，小島 誠，関山三郎，矢川寛一：PHA に対する口腔癌患者のリンパ球幼弱化現象の観察，日口外誌，23 : 637-642, 1980.
- 18) Poon, S.P., Cauchi, M.N. : Blastogenic

- response of lymphoid cells to tumor cells or tumor membrane extracts in vitro. *Cancer Res.* 33 : 2677—2682, 1973.
- 19) Krueger, J.K., Segal, R.A., Moyer, R.C. : Differences in the responsiveness of splenic, lymph node, and peripheral blood lymphoid cells to tumor membrane extracts. *Cancer Res.* 37 : 320—322, 1977.
- 20) Fujimoto, S., Greene, M.I., Schon, A.H. : Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116 : 791—799, 1976.
- 21) Fujimoto, S., Greene, M.I., Schon, A.H. : Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116 : 800—806, 1976.
- 22) Stumpf, R., Heuer, J., Kölsch, E. : Suppressor T cells in low zone tolerance. I. Mode of action of suppressor cells. *Eur. J. Immunol.* 7 : 74—80, 1977.
- 23) Hellström, I., Hellström, K, E., Evans, C., Heppner, G.H., Pierce, G.E., Yang, J.P.S. : Serum-mediated protection of neoplastic cells from inhibition by lymphocytes immune to their tumor-specific antigens. *Applied Biology.* 62 : 362—368. 1969.
- 24) 浜崎啓介, 岩藤知義, 吉原久司, 井上 徹, 橋本修, 三村 久, 折田薫三 : 可溶化腫瘍抗原によるリンパ球幼若化反応の Rapid Assay 法, 臨床免疫, 13 (Suppl.2) : 83—90, 1981.
- 25) Burk, M.W., Yu, S., Ristow, S.S., Mckhann, C.F. : Refractoriness of lymph-node cells from tumor bearing animals. *Int. J. Cancer.* 15 : 99—108, 1975.