

## マウス自然発生癌における自家免疫に関する研究

深澤 肇 関山三郎 矢川寛一\*

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)

\*岩手医科大学歯学部病理学第一講座

(主任：矢川寛一教授)

抄録：著者らは、1980年に WHT/Ht マウスを使用して、MLTR により腫瘍の増大にともない、担癌リンパ球の腫瘍抗原の認識力が低下することを示した。さらに、癌細胞の免疫学的特異性を証明するには、発癌個体の自家癌に対する免疫の成立を証明する事が必要であると考え、自家腫瘍細胞を用いて作成した免疫マウスに、同系の自家腫瘍細胞を再移植し、その増殖状態を観察した。

武田式結紮開放法、Klein 法、ホルマリン処理、同マウスの継代培養腫瘍細胞、<sup>60</sup>Co 照射処理細胞により免疫マウスを作り、自家腫瘍細胞を再移植した。結果：結紮開放法においては、免疫マウスは作り得なかった。それ以外の免疫方法においては、対照に比していずれも再移植した自家腫瘍の出現時期は遅延し、更に生存期間も延長した。特に Klein 法らの方法においては、実験群の1/3に自家腫瘍の出現がみられなかった。しかし、その他のマウスには、いずれも再移植した自家腫瘍の出現をみた。

以上より自然発生癌に対する自家免疫の存在が想定された。

さらに FITC 標識抗マウス C3 を使用し、腫瘍移植後 7, 14, 20日の3時点で、癌先進部位について蛍光抗体法にて観察した。7および14日目では蛍光を認めたが、20日目では認めなかった。これにより癌に対する宿主の免疫反応は、初期に惹起されるが、腫瘍の増大に伴って担癌生体は免疫寛容の状態に陥るものと考えられた。

**Key words :** tumor autoimmunity, WHT/Ht mice, spontaneous carcinoma.

### 緒 言

癌の発生およびその増殖に関して、宿主免疫能の抑制状態が不可欠であるのか、あるいは発癌における免疫監視機構は存在するのかなどの古くて新しい研究課題はいまだ十分に解明されていない。

著者らは、先に自然発生扁平上皮癌を担う WHT/Ht マウスを使用して、*in vitro* におけるリンパ球腫瘍細胞混合培養反応〔MLTR〕から、腫瘍の増大にともない担癌リンパ球の腫瘍抗原性の認識力が低下することを示した<sup>1)</sup>。しかし、癌細胞に対する宿主の免疫応答を証明するには、発癌個体の自家癌に対する免疫の成

立を証明することが必要と考え、自家腫瘍細胞を用いて作成した免疫マウスに、同腫瘍細胞を再移植し、その増殖状態を観察し、更に、組織学的レベルで腫瘍免疫の成立を観察したところ、興味ある知見を得たので報告する。

### 材 料 と 方 法

動物：6～7週齢の雌 WHT/Ht マウス、体重24～26gを用いた。

腫瘍細胞：WHT/Ht マウスに自然発生し、継代移植によって維持されている扁平上皮癌を用いた。また、移植細胞数は、1カ所  $4.5 \times 10^4$  個とした。なお、各実験群に関して少なくとも4匹以上のマウスを用いることにした。

Study on the tumor autoimmunity against spontaneous carcinomas in mice.

Hajime FUKAZAWA, Saburo SEKIYAMA and Kanichi YAGAWA\*.

(The 2nd Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery, Iwate Medical University, School of Dentistry, and 1st Department of Pathology, Iwate Medical University, School of Medicine\* Morioka 020)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 13 : 42-46, 1988

免疫マウスの作成 : (1)武田式結紮開放法<sup>2)</sup>により, 腫瘍移植後14日目に, 輪ゴムで腫瘍を結紮し, 24時間後にこの輪ゴムを切って, 開放し腫瘍の壊死脱落を待った (Fig.1)。

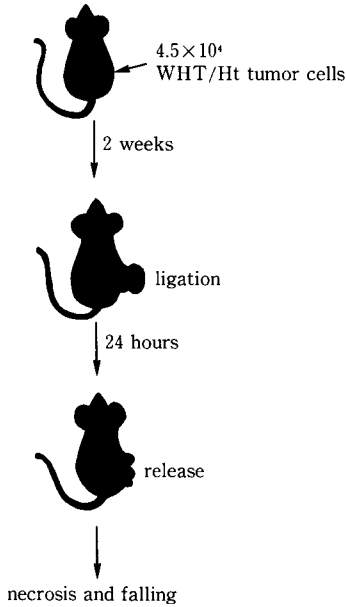


Fig.1 Takeda's method.  
Ligation-release method.

(2) Klein らの方法<sup>3)</sup>により, 同マウスを用いて腫瘍を移植した左脚を切断し, この腫瘍細胞の浮遊液を作り, <sup>60</sup>Co40Gy を照射した。こうして不活化した腫瘍細胞を, 脚を切断したマウスの反対側の脚に再接種した。接種の間隔は, 7日間として3回行って, 最終接種後少なくとも25日目まで待って腫瘍発生の無いものを免疫マウスとした。なお, 7日目毎の照射腫瘍細胞は, 腫瘍を継代移植しているマウスから採取した (Fig.2)。

(3) 小林<sup>4)</sup>および Hirsch と Iversen<sup>5)</sup>の異物化腫瘍細胞による免疫方法により, 0.2%ホルマリン液にて腫瘍細胞を処理したものと, 同マウスの継代培養腫瘍細胞と, <sup>60</sup>Co40Gy を照射した腫瘍細胞とを, 10<sup>5</sup>個ずつ7日おきに3回再接種し, 接種後少なくとも25日たつて腫瘍発生を見ないものを免疫マウスとした (Fig.3)。

自家腫瘍のチャレンジ (自家腫瘍再植試験):

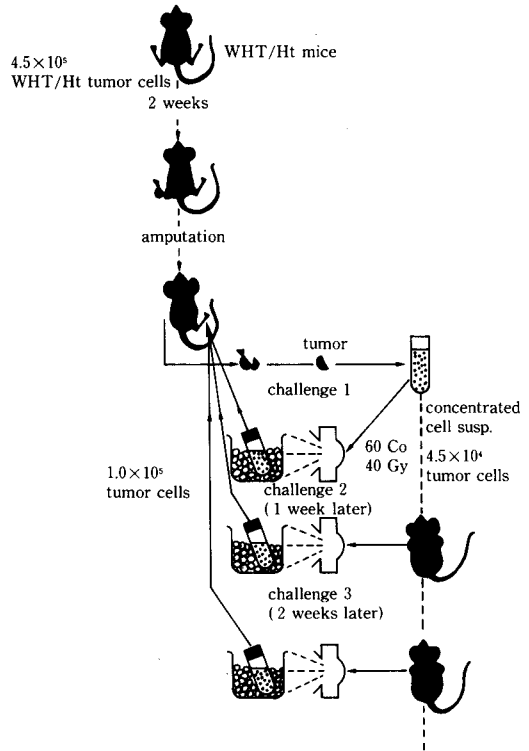


Fig.2 Klein's method.  
Preimmunization procedure by irradiated tumor cells.

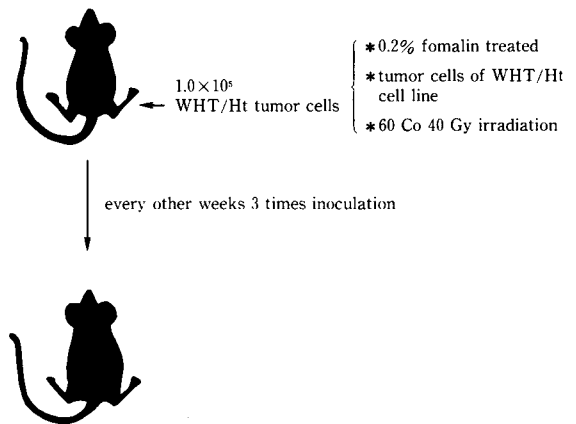


Fig.3 Other method.  
Kobayashi<sup>4)</sup> and Hirsch & Iversen's<sup>5)</sup> method ; Xenogenization of tumor cells.

上記の方法で作成した免疫マウスに、腫瘍細胞を再移植して腫瘍の出現時期と出現率、ならびに腫瘍死までの生存期間について調べた。また、対照は、健康 WHT/Ht マウスを用い上記の条件にしたがい実験に供した。

組織学的腫瘍免疫反応の検索：補体として FITC 標識抗マウス C3 を使用し、以下の直接法により蛍光抗体法を行なった。腫瘍移植後 7 日目、14 日目、20 日目の 3 時点で、癌先進部位について蛍光顕微鏡で観察した。顕鏡までの方法は 7 日、14 日、20 日において腫瘍を摘出し、凍結させクリオスタットにて  $4\mu$  に薄切し、スライドガラスにマウントし、 $4^{\circ}\text{C}$  5 分間アセトン固定を行った。ついで PBS で 15 分間濡らし、洗浄した。同切片に FITC 標識抗マウス C3 を加え、室温で 60 分間モイスチャーチャンバー内でインキュベートした。さらに、同切片を PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察した。

## 結 果

免疫マウス作成に関してみると、武田式結紮開放法では、いずれも一度は移植腫瘍が壊死脱落をきたすが、再発を起こし、この方法によっては免疫マウスは作ることができなかった。自家腫瘍のチャレンジの結果は、Table 1 のごとく対照に比して各免疫マウスはいずれも、出現時期は遅延し、さらに生存期間も延長していた (Fig.4)。また Klein らの方法により、作成した免疫マウスでは、移植後 60 日目で 12 匹中 8 匹に腫瘍発生をみたが、残りの 4 匹にはみられなかった。しかし、他の免疫マウスには、いずれ

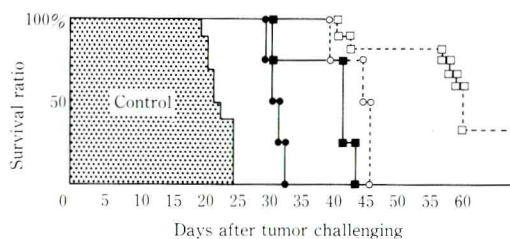


Fig.4 Survival ratio after challenging tumor cells.

- $^{60}\text{Co}$  irradiated tumor cells,
- 0.2% formalin treated tumor cells,
- culture tumor cells of WHT/Ht cell line and
- Klein's method.

も自家腫瘍のチャレンジで腫瘍発生をみた。

組織学的腫瘍免疫反応の検索を蛍光抗体法で行ってみたところ、担癌 7 日目の癌先進部位の癌細胞の周囲に、黄色蛍光が認められ、FITC 標識抗マウス C3 の著明な沈着をみた (Fig.5)。

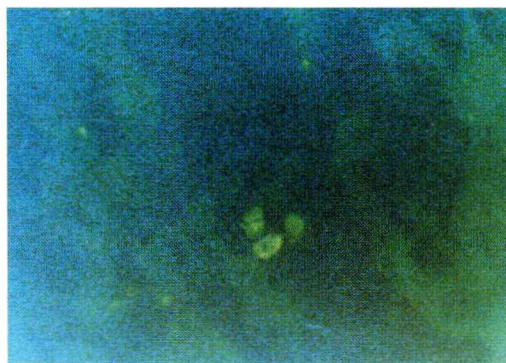


Fig.5 Specific fluorescence, anti C3 was observed as a ring around the tumor cell or in the cytoplasm of tumor cell on 7 days of tumor-bearing mice.

Table 1. Summary of a direct challenging experiment.

Immunized method	Growth time (day)	Growth rate (%)	Survival time (day)
$^{60}\text{Co}$ irradiated tumor cells	$17.0 \pm 0.82$	4/4 (100)	$31.0 \pm 0.58$
0.2% formalin treated tumor cells	$20.5 \pm 1.00$	4/4 (100)	$41.5 \pm 6.68$
Culture tumor cells of WHT/Ht cell line	$28.0 \pm 0.82$	4/4 (100)	$42.0 \pm 0.82$
Klein's method	$31.1 \pm 7.20$	8/12 (67)	$54.7 \pm 1.41$
Takeda's method	could not make immunized mice		
Control	$10.0 \pm 0.47$	10/10(100)	$22.9 \pm 1.97$

担癌14日目の癌先進部位には7日目と同様腫瘍細胞の周囲に著明な黄色蛍光が認められた (Fig.6)。しかし、腫瘍死直前の担癌20日目では、ほとんど蛍光を認めず FITC 標識抗マウス C3 の沈着は認められなかった (Fig.7)。

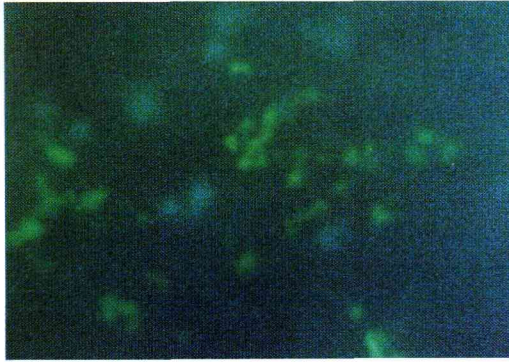


Fig.6 Specific fluorescence, anti C3 was observed in the cytoplasm of tumor cells on 14 days of tumor-bearing mice.



Fig.7 No fluorescence, anti C3 was recognized in the cytoplasm of tumor cells on 20 days of tumor-bearing mice.

### 考 察

著者らは、口腔癌の90%以上は、種々の程度の分化傾向を示す扁平上皮癌からなるため、扁平上皮癌を担う WHT/Ht マウスを用い、担癌生体の免疫動態について1978年以来研究を続けている。

1980年に、MLTR を用い WHT/Ht マウスの担癌初期には、癌細胞に対する宿主の免疫応答が惹起されるが腫瘍の増大とともに免疫応答の低下していくことを報告した<sup>1)</sup>。1987年には

船木<sup>6)</sup>が、1-butanol による抽出抗原を用い、腫瘍を移植してから生着増殖にいたるまでの過程の動態を研究し、移植直後から強い宿主の免疫応答の抑制状態を招来することを確認した。以上のことから、担癌という免疫抑制状態にありながらも、in vitro においては、初期には、宿主の癌細胞に対する免疫応答の存在することが証明された。しかし、in vivo においては、その実態は明確ではないため、今回、自家腫瘍細胞を<sup>60</sup>Co 照射、ホルマリン処理などにより異物化したものを用いて、免疫マウスを作成し、この免疫マウスに自家腫瘍細胞を再移植するといったチャレンジを行い、腫瘍の生着増殖の状態および、腫瘍の出現の状態を調べた。その結果、<sup>60</sup>Co 照射により異物化した細胞では、Klein らの方法により、免疫したマウスについては、33.3%が自家腫瘍の生着を免れた。この結果より、免疫抑制状態にありながらも担癌生体は自家腫瘍細胞に対する自家免疫応答を惹起させることが証明されたものと考えられる。さらに、本研究においては、担癌生体における補体反応の特性を応用<sup>7)</sup>し、組織学的レベルで腫瘍関連抗原の抗原抗体複合体の存在を FITC 標識抗マウス C3 の蛍光で確認した。しかしながら、この FITC 抗マウス C3 の蛍光は腫瘍死直前の担癌末期には消失した。河村ら<sup>8)</sup>の研究成績を参考にして推察すれば、腫瘍移植初期には細胞性免疫、補体活性が正常範囲にあったものが、腫瘍の増殖とともに細胞性免疫能の低下や補体活性の上昇(液性免疫の補償)を示すが腫瘍増殖がピークに達する末期状態では、ともに低下するものと考えられる。組織学的に腫瘍関連抗原の存在が、間接的に証明されたが、その腫瘍細胞膜上の局在については、単クローン抗体などによる証明が必要であると思われる。

### 結 語

- (1) WHT/Ht マウスの可移植性自然発生癌を異物化し、免疫したところ、免疫マウスを作成し得た。さらに、自家腫瘍再移植によるチャレンジを行ったところ、Klein らの方法によ



てつくられた33.3%の免疫マウスは、自家腫瘍の生着を免れた。

- (2) FITC 標識抗マウス C3 により、組織学的に腫瘍関連抗原の存在を間接的に証明した。

WHT/Ht マウスを分与して戴きました東北大学医学部放射線基礎医学教室、坂本澄彦教授

に深甚の感謝を捧げます。また、本研究に御協力戴きました、本学医学部放射線医学講座、柳澤融教授に深謝申し上げます。

本論文の要旨は、第38回日本癌学会総会(1979年9月東京)にて発表した。

**Abstract :** We have previously described a tumor-bearing host that may be should be due to a decrease in the capability of lymphoid cells to recognize antigen according to tumor growth. Then in order to prove tumor specific immunity, it is necessary also to give the proof on the tumor autoimmunity against spontaneous carcinoma in WHT/Ht mice. Therefore in this study we observed tumor growth by a direct challenging experiment against tumor immunized mice.

Using the Takeda ligation-release method, the preimmunization procedure with irradiated tumor cells by Klein, as well as other immunization methods by xenogenization which use formalin treated tumor cells, serial passage culture tumor cells and <sup>60</sup>Co irradiated tumor cells, mice were immunized and then challenged with viable tumor cells.

Mice could not be immunized using Takeda's method. The others showed a delay in development of cancer and their survival time was lengthened. Especially in Klein's method an increased resistance of tumor cells was demonstrated with four out of twelve tumors in the autochthonous hosts. But in all of the other immunization methods such resistance could not be demonstrated.

Therefore it seems that tumor immunity may be shown in spontaneous carcinoma host. Furthermore we could detect surface staining of tumor cells with C3 components by labeling FITC in 7 and 14 day tumor-bearing mice. But we could not detect stained tumor cells in the last 20 days of the tumor-bearing mice.

Thus, the tumor immune reaction has been brought on in the early days of tumor-bearing hosts. However, the immunological tolerance seems to decrease as the tumor grows.

#### 文 献

- 1) Fukazawa, H : Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. J. Iwate Med. Ass. 32 : 911-916, 1980.
- 2) 武田勝男, 相沢 幹, 辻油生子, 山脇真也, 中村恭二 : 発癌個体における自家免疫(第1編) MC発癌ラットの抗移植性, 最新医学, 20 : 2826-2835, 1965.
- 3) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E., and Hellström, K.E., : Demonstration of resistance methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. Cancer Res. 20 : 1561-1572, 1960.
- 4) 小林 博 : 癌細胞の異物化, 北海道医学雑誌, 46 : 532-534, 1971.
- 5) Hirsch, H.M., and Iversen, I. : Accelerated development of spontaneous mammary tumors in mice pretreated with mammary tumor tissue and adjuvant. Cancer Res. 21 : 752-760, 1961.
- 6) 船木康博 : マウス自然発生癌可溶性抗原に対するリンパ球の免疫応答に関する研究, 岩医大歯誌, 12 : 24-34, 1987.
- 7) 河村一太, 辻 啓次郎, 熊坂俊郎, 小川一平, 早田義博 : 癌疾患と補体, 臨床免疫, 3 : 576-581, 1971.
- 8) 河村一太, 西岡久寿弥, 河島敏夫, 小暮美津子, 嶋田孝吉 : 補体の臨床, 臨床免疫, 7 : 937-944, 1975.