

マウス自然発生癌の腫瘍抗原の免疫原性に関する研究

宮野 敦志

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：1988年12月29日]

抄録：近交系 WHT/Ht マウス可移植性扁平上皮癌の腫瘍抗原に対する *in vivo* 免疫反応について検討を行った。同腫瘍細胞の可溶性抗原、放射線不活化腫瘍細胞及び腫瘍生細胞を抗原として同系マウスに接種しその免疫原性を Immunoprotection test で検索した。可溶性抗原では腫瘍の増殖抑制は認められなかったが、放射線不活化腫瘍細胞と、腫瘍生細胞を移植し後に、腫瘍を切除した免疫マウスで腫瘍の増殖抑制が認められ、腫瘍抵抗性が得られた。また、腫瘍切除による免疫マウスでは平均30%のマウスが腫瘍を拒絶した。さらに腫瘍切除によって得られた免疫マウスの脾細胞の抗腫瘍活性を Winn assay にて検討した。その結果、免疫マウスの脾細胞は腫瘍の増殖を抑制し抗腫瘍活性がみられた。この脾細胞を anti-Thy 1. 1. +C, anti-Lyt 1. 2. +C および anti-Lyt 2. 2. +C で処理すると抗腫瘍活性は消失した。一方、担癌マウスの脾細胞を用いて Winn assay を行った結果、担癌初期から後期にかけて腫瘍の増殖を促進する傾向がみられた。

以上により腫瘍抗原により正の免疫応答が誘導され、抗腫瘍免疫能を示す細胞は T cell で、その subset は Lyt-1⁺2⁺3⁺であることが示唆された。しかし担癌マウスでは担癌初期から後期にかけて徐々に負の免疫応答が優位になると考えられた。

Key words : Immunoprotection test, Winn assay, T cell.

緒 言

Burnet¹⁾によって生体防御反応は免疫学的監視機構の一つとして体系化されたが、腫瘍がこの監視機構を逃れて増殖し、生体を死に至らしめることは腫瘍の免疫学的回避機構の結果とも考えられるが、一方、腫瘍増殖に伴い担癌生体に免疫抑制機構が働き、相対的に免疫能が低下していくことによるものとも考えられる。

腫瘍免疫の成立に関しては、腫瘍抗原の存在が不可欠であり、実験腫瘍においてその腫瘍抗原の存在が種々の方法で証明されてきた^{2,3,4)}。このように腫瘍抗原に対する免疫反応を知ることが、腫瘍の抗原性や宿主免疫能の研究のため

には重要である。

腫瘍抗原の証明法は *in vitro* と *in vivo* に大きく分けられ、さらに液性免疫と細胞性免疫に分けられる⁵⁾。担癌生体において腫瘍免疫の主役となるのは細胞性免疫であり、これには種々の検索方法がある。当教室においては、先に Fukazawa⁶⁾、船木⁷⁾が *in vitro* でリンパ球-腫瘍細胞混合培養反応 (mixed lymphocyte-tumor culture reaction) を用いて、近交系 WHT/Ht マウスの可移植性自然発生扁平上皮癌の腫瘍抗原の抗原性の証明を行った。しかしながら、腫瘍免疫の成立は生体内での反応であり、*in vivo* での免疫の成否が問題となるが、これに関する研究は少ない^{4,8,9)}。

Immunogenicity of tumor antigen in murine spontaneous carcinoma.

Atsushi MIYANO

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

Dent. J. Iwate Med. Univ. 14 : 6-16, 1989

今回、近交系 WHT/Ht マウスの可移植性扁平上皮癌の免疫原性を検索するため、扁平上皮癌の可溶性抗原、放射線不活化腫瘍細胞、腫瘍生細胞を抗原として同系マウスに接種し、その免疫原性を Immunoprotection test で、また、腫瘍切除によって得られた腫瘍免疫マウス（以下免疫マウスとする）の脾細胞及び担癌マウスの脾細胞の活性を腫瘍中和試験（in vivo tumor neutralization test: Winn assay¹⁰⁾以下 Winn assay と表現する。）を用いて腫瘍細胞に対する細胞性免疫反応のメカニズムを検討した。

材料および方法

1. マウス

近交系 WHT/Ht マウス、8~12週齢、体重 25~27g のものを使用した。

2. 腫瘍

WHT/Ht マウスに自然発生した扁平上皮癌で、当教室で継代移植しているものを使用した。

3. 腫瘍細胞浮遊液の調整

WHT/Ht マウスに継代移植している担癌 13~15日目の腫瘍をマウスから無菌的に摘出し、ダルベッコ PBS（ニッスイ、以下 PBS と略す）で洗浄後、鋏刀で細切し 150 白金メッシュを通し、0.25% trypsin (DIFCO, U.S.A) と DNase (SIGMA, U.S.A.) 10 μ g/ml を加え攪拌し、細胞浮遊液とした後、PBS にて 1500rpm で 3 回遠心洗浄して使用した。細胞の viability はトリパンブルー色素排除法により行った。その結果、viability は各ロットで 90% 以上であった。

4. 可溶性抗原の作製は、LeGrue¹¹⁾らの方法に準じてブタノール処理により膜蛋白の抽出を行った。蛋白質定量は Lowry 法¹²⁾にて行い、スタンダードとして bovine serum albumin (GIBCO, U.S.A.) を使用した。また、抽出蛋白はすべて同一ロットを使用した。

5. 放射線不活化腫瘍細胞の作製

上記単離浮遊細胞を ice bath 上で⁶⁰Co を 80 Gy 照射し、PBS にて 1500rpm で 3 回遠心洗浄

し、トリパンブルーにて生細胞の算定を行い不活化腫瘍細胞として使用した。

6. 可溶性抗原、放射線不活化腫瘍細胞、腫瘍生細胞接種による Immunoprotection test.

可溶性抗原接種群は、可溶性抗原 200 μ g, 500 μ g を正常マウス背部皮下に adjuvant を使用しないで 10 日間隔で 2 回接種した。放射線不活化腫瘍細胞接種群は、 1×10^5 個、 5×10^5 個の放射線不活化腫瘍細胞を同様に接種した。腫瘍切除群は、腫瘍細胞 1×10^5 個を背部皮内に接種し、腫瘍径が 8~10mm になったところで腫瘍を切除して免疫マウスとした。可溶性抗原接種群と放射線不活化腫瘍細胞接種群は、最終接種後 10 日目に、腫瘍切除群は、腫瘍切除後 10 日目に、 1×10^3 個、 1×10^4 個、 1×10^5 個、 1×10^6 個の腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、以後は経日的に腫瘍径を測定した。実験はすべて 1 群 5 匹で行い、各群の平均腫瘍径と標準偏差を求め、推計学的検定は Student's t-test を用いた。Control として、PBS 0.1ml を 10 日間隔で 2 回接種し、腫瘍細胞を同様に移植した (Fig 1)。

7. Winn assay

上記腫瘍切除群において得られた腫瘍拒絶マウスを腫瘍免疫マウスとし、その脾細胞の抗腫瘍活性を Winn assay にて検討した。

腫瘍免疫マウスの脾臓を無菌的に摘出し、150 # 白金メッシュ上でピンセットを用いて分離し、メッシュを通したものを細胞浮遊液とし、PBS で 1500rpm で 3 回遠心洗浄した。脾細胞はトリパンブルー染色を行い、生細胞数を算して使用した。Control とし、正常マウスの脾細胞を使用した。

脾細胞 (effector cells) を 1×10^7 /ml に調整し、この脾細胞浮遊液 0.1ml と、腫瘍細胞 (target cells) 1×10^4 個の浮遊液 0.1ml を加え振盪しながら 37°C で、30 分間反応させた後、その混合液 0.2ml (E:T 比=1000:1) を 1 群 5 匹の正常マウス皮下に接種し、経日的に腫瘍径を測定した。各群の平均腫瘍径と標準偏差を求め、推計学的検定は Student's t-test を用いた

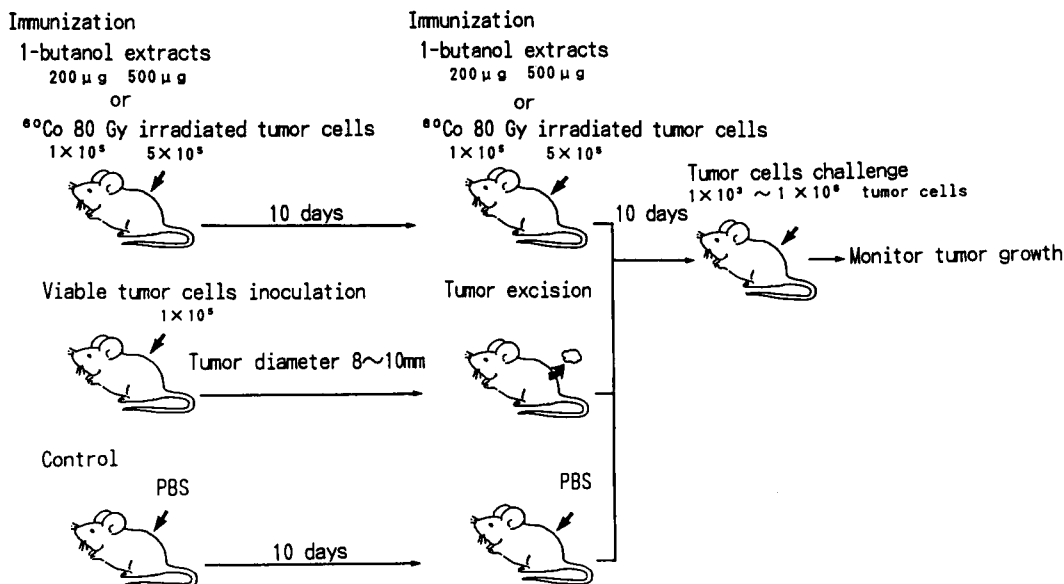


Fig.1 Method of immunoprotection test.

Immune mice
Tumor bearing mice
Normal mice

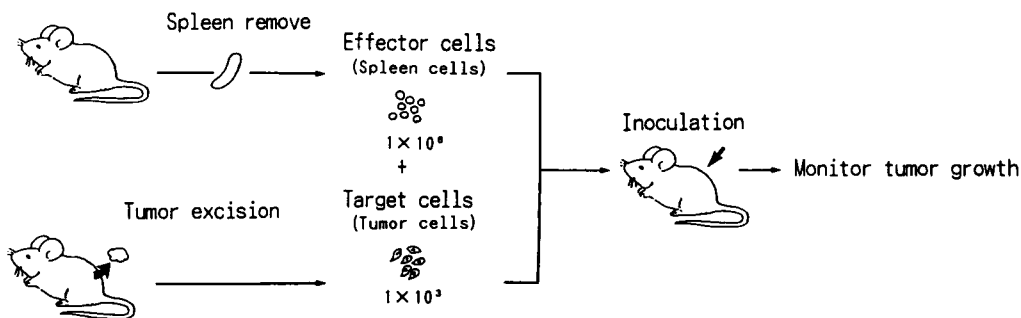


Fig.2 Method of Winn assay.

(Fig 2)。

8. Winn assay における effector cell の characterization

(1) Nylon wool column による脾細胞の処理

上記にて調整した脾細胞浮遊液を Julius らの方法¹³⁾に準じて T 細胞分離用ナイロンファイバー (和光純薬工業) を通過させ、非付着性の column 通過細胞を T cell rich population として採取した。

(2) anti-Thy 1.1 + complement (以下 C と

略す), anti-Lyt 1.2 + C, anti-Lyt 2.2 + C による脾細胞の処理

脾臓細胞浮遊液 ($6 \times 10^6 / \text{ml}$) 1 ml に anti-Thy 1.1 (モノクローナル抗体 IgM class, 明治乳業) を 1000 倍希釈となるように加え、軽く振盪し、ウサギ補体 (rabbit complement, Behring, W. Germany) 12 倍希釈液を 1 ml 加え、振盪しながら 37°C 45 分間 incubate した後、1500rpm で 3 回遠心洗浄し細胞数を調整した。

anti-Lyt 1.2, anti-Lyt 2.2 についても同

様の操作を行った。

(3) 担癌マウス脾細胞の抗腫瘍活性の推移

マウスに腫瘍細胞 5×10^4 個を移植し担癌 5 日目 (担癌初期), 10 日目 (担癌中期), 15 日目 (担癌後期) の脾細胞を用いて, Winn assay を行った。Winn assay 14 日目の腫瘍径を測定し control 群と比較検討した。

実験結果

1. 可溶性抗原, 放射線不活化腫瘍細胞, 腫瘍生細胞による Immunoprotection test

(1) 生着率

生着率は可溶性抗原接種群, 放射線不活化腫瘍細胞接種群とも 100% で完全な腫瘍抵抗性は獲得できなかった。腫瘍切除群ではチャレンジした細胞が 1×10^3 個のときは 40%, 1×10^4 個のときは 20% のマウスが腫瘍を拒絶した (Table 1)。

(2) 移植腫瘍生細胞数による腫瘍抵抗性

1×10^5 個, 1×10^6 個を移植した群では全群とも control 群に比較して腫瘍増殖に有意差は得られなかった (Table 1)。 1×10^4 個を移植した群では, 放射線不活化腫瘍細胞を 5×10^5 個接種した群と腫瘍切除群が有意に腫瘍増殖を抑制した (Table 2)。

(3) 各抗原による腫瘍抵抗性

可溶性抗原接種群では, 腫瘍増殖の抑制は認められなかった。放射線不活化腫瘍細胞接種群では 5×10^5 個を接種した群が有意に腫瘍増殖を抑制した。また, 腫瘍切除群にも有意差が得られた (Table 2)。

2. Winn assay

(1) E : T 比と, target cell 数の検討

最初に E : T 比の検討を行うため, 移植する脾細胞 (effector cells) を 1×10^7 /ml, 1×10^5 /ml に調整, 腫瘍細胞 (target cells) は 1×10^5 /ml に調整しそれぞれ 0.1ml を E : T 比 = 100 : 1, 1000 : 1 で混合し実験を行った。いずれの群においても免疫マウスの脾細胞を移植した群が control 群に比較して腫瘍増殖を抑制し, 推計学的に有意差が得られた (Table 3)。なかでも, target cell を 1×10^3 個にして実験を行った結果, control 群との間に $P < 0.02$ 以下の有意差が得られた。以上より, target cell 1×10^3 個, E:T 比 = 1000 : 1 で実験を行った。

(2) effector cell の抗腫瘍活性

免疫マウスの脾細胞を用いた Winn assay では上記に示した通り, control 群に比較して免疫マウスの脾細胞を接種した群が腫瘍径が小さく, 有意に腫瘍増殖の抑制がみられた (Table 4, Fig 3)。Nylon wool column 処理による T cell rich population を用いた Winn assay でも

Table 1 Growth of tumors following immunization.

Group ^a	Type of cells the mice were immunized with	Lethal growth in mice No. of tumor cells challenged ^b			
		10^3	10^4	10^5	10^6
A	CBE 200 μ g ^c	ND ^d	5/5	5/5	ND
B	CBE 500 μ g ^c	ND	5/5	5/5	ND
C	1×10^3 LI ^e cells ^c	ND	5/5	5/5	ND
D	5×10^3 LI cells ^c	ND	5/5	5/5	ND
E	Tumor excision	3/5	5/5	5/5	5/5
F	Control	5/5	5/5	5/5	5/5

^a Each experimental group contained 5 mice.

^b 10 day after the last immunization tumor cell were inoculated into the S.C. mid back of mice

^c Each experimental group was immunized 2 times at 10 day intervals.

^d Not done.

^e Lethally irradiated.

Table 2 Comparison of the immunoprotective effects of irradiated cells, 1-butanol extracts, and viable cells of WHT/Ht squamous cell carcinoma.

Group ^a	Type of cells the mice were immunized with	Tumor diameter(mm) at the following times after inoculation ^b		
		Day 9	Day 13	Day 17
A	CBE 200 μ g ^c	7.4 \pm 0.1 ^d (NS) ^e	11.7 \pm 0.41 (NS)	18.7 \pm 0.20 ^{**h}
B	CBE 500 μ g ^c	7.9 \pm 0.12 (NS)	13.3 \pm 0.76 (NS)	20.8 \pm 0.86 (NS)
C	1 \times 10 ⁵ LI ^f cells ^c	5.9 \pm 0.20 (NS)	10.6 \pm 0.15 (NS)	18.5 \pm 0.88 ^{**}
D	5 \times 10 ⁵ LI cells ^c ^g	5.0 \pm 0.94 [*]	11.9 \pm 1.33 ^{**}
E	Tumor excision	7.0 \pm 0.18 [*]	12.2 \pm 0.42 ^{**}
F	Control	7.9 \pm 0.20	11.1 \pm 0.39	15.2 \pm 0.80

^a Each experimental group contained 5 mice.

^b 10 days after the last immunization 1 \times 10⁴ viable tumor cells were transferred to the immunized mice.

^c Each experimental group was immunized 2 times at 10 day intervals.

^d Mean \pm SE.

^e Statistically insignificant.

^f LI=Lethally irradiated.

^g The tumor was not palpable.

^h Calculated by Student's t-test. (* : P<0.01 ** : P<0.02)

Table 3 Tumor neutralizing activity of immune spleen cells detected by the Winn assay.

Group ^a	spleen cells	E : T ratio ^d	Tumor diameter(mm) at the following time after inoculation			
			Day 14	Day 17	Day 20	Day 23
A	Tumor immune ^b	1000 : 1	6.7 \pm 0.97 ^{*f}	9.8 \pm 0.95 ^{**}	13.5 \pm 0.46 [*]	17.1 \pm 0.94 ^{***h}
B	Control ^c	1000 : 1	8.6 \pm 0.31	12.8 \pm 0.83	17.3 \pm 0.89	20.0 \pm 0.65
C	Tumor immune ^b	100 : 1	7.5 \pm 0.22 (NS) ^g	10.4 \pm 0.33 ^{***}	12.9 \pm 0.19 ^{***}	15.3 \pm 0.53 [*]
D	Control	100 : 1	8.8 \pm 0.83	12.6 \pm 0.89	17.8 \pm 1.24	20.3 \pm 0.80
E	Tumor immune	1000 : 1	4.3 \pm 0.39 [*]	7.6 \pm 0.51 [*]	10.2 \pm 0.71 ^{**}	12.6 \pm 0.83 [*]
F	Control	1000 : 1	7.6 \pm 0.44	11.2 \pm 0.74	14.9 \pm 1.27	19.5 \pm 1.51

^a Each experimental group contained 5 mice.

^b Tumor immune spleen cells were obtained by surgical excision method.

^c Control spleen cells were obtained from normal syngeneic mice.

^d 1 \times 10⁴ (group A~D) and 1 \times 10³ (group E,F) tumor cells were transferred to intact syngeneic mice together with immune and normal spleen cells.

^e Mean \pm S.E.

^f Calculated by Student's t-test. (* : P<0.01 ** : P<0.02 *** : P<0.05)

^g Statistically insignificant.

Table 4 Tumor neutralizing activity of immune spleen cells detected by the Winn assay.

Group ^a	Treatment of cells ^b	Tumor diameter(mm) at the following time after inoculation ^c			
		Day 14	Day 17	Day 20	Day 23
A	None	3.2±0.48* ^e	4.9±0.35*	5.8±0.92*	7.0±2.13*
B	Nylon wool column	2.9±0.35*	5.1±0.32*	4.6±0.91*	5.3±1.61*
C ^g	anti-Thy 1.1 + C ^f	6.9±0.27 (NS) ^h	11.3±0.16 (NS)	14.0±0.27 (NS)	19.1±0.63 (NS)
D ^g	anti-Lyt 1.2 + C	6.9±0.16	9.5±0.37	10.6±0.36	14.7±1.33
E ^g	anti-Lyt 2.2 + C	5.3±0.30	8.2±0.54	9.2±1.35	14.4±1.44
G	C alone	3.5±0.46*	5.4±0.44*	6.3±0.34*	8.2±0.47*
H	Control ⁱ	7.0±0.17	10.8±0.45	15.6±0.83	19.7±0.91

^a Each experimental group contained 5 mice.

^b Tumor immune spleen cells were obtained by surgical excision method.

^c Each group was transferred 1×10^6 spleen cells and 1×10^3 tumor cells to intact syngeneic mice (E : T ratio=1000 : 1)

^d Mean±S.E.

^e Calculated by Student's t-test. (* : P<0.01)

^f C=Complement.

^g Group C,D, and E vs Group A p<0.01 by Student's t-test.

^h NS, not statistically significant.

ⁱ Control splen cells were obtained from normal syngeneic mice.

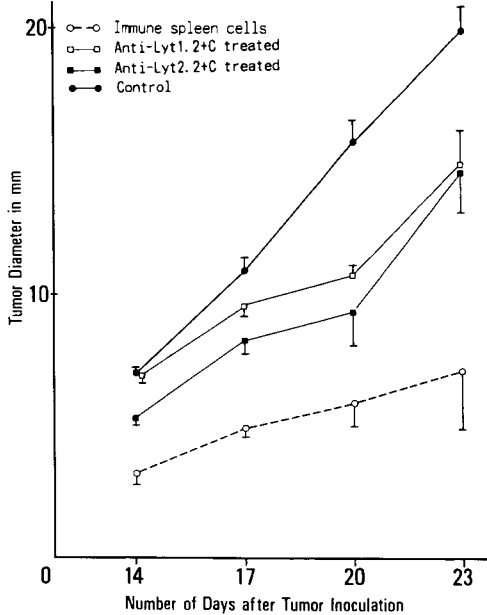


Fig.3 Tumor neutralizing activity of immune spleen cells detected by the Winn assay.

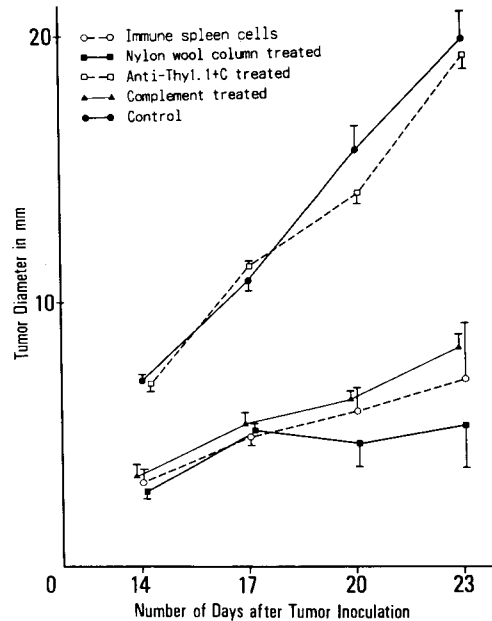


Fig.4 Effect of tumor neutralizing activity of subclasses of Lyt-1 or Lyt-2, 3 cells detected by the Winn assay.

Table 5 Tumor neutralizing activity of spleen cells of tumor bearing mice detected the by the Winn assay.

Group ^a	Spleen cells from ^b	Tumor diameter(mm) 14 days after inoculation ^c
A	Tumor bearing	12.0±0.28* ^d
B	Control	7.1±0.39
C	Tumor bearing	10.3±0.65*
D	Control	6.6±0.38
E	Tumor bearing	10.9±0.32*
F	Control	7.7±0.51

^a Each experimental group contained 5 mice.

^b Spleen cells of tumor bearing mice consisting of 5 (Group A), 10 (Group C) and 15 days (Group E) after 5×10^4 viable tumor cell inoculation were used.

^c Each group was transferred 1×10^6 spleen cells and 1×10^3 tumor cells to intact syngeneic (E : T ratio=1000 : 1).

^d Mean ± S.E.

* Calculated by Student's t-test. (* : $P < 0.01$)

同様に有意の抑制が得られた (Table 4, Fig 3)。anti-Thy 1.1 + C 処理による脾細胞集団を用いた Winn assay では、有意な腫瘍増殖の抑制は認められなかった。また、anti-Lyt 1.2, anti-Lyt 2.2 処理による脾細胞を用いた Winn assay では、免疫マウスの脾細胞を用いた群に比較して腫瘍増殖の抑制は認められなかったが、control 群に比較して腫瘍増殖の抑制がみられ、中間値を示した (Table 4, Fig 4)。

(3) 担癌マウス脾細胞の抗腫瘍活性

担癌マウスの脾細胞は、担癌 5 日目 (担癌初期), 10 日目 (担癌中期), 15 日目 (担癌後期) とも control 群に比較して、有意に腫瘍増殖を促進した (Table 5)。

考 察

実験腫瘍においては、Foley²⁾, Prehn と Main³⁾あるいは Klein らが近交系マウスの実験で特異的抗腫瘍性を誘導する腫瘍特異抗原の存在を証明して以来、多くの研究者によって、腫瘍免疫の研究が進められてきた。しかし、その腫瘍の多くはウイルス誘発腫瘍、化学誘発腫瘍のように抗原性の高いものがほとんどであり、Hewitt⁴⁾は実験室で飼育しているマウスから自然発生してきた腫瘍 27 系すべてが、また、

Middle と Embleton¹⁶⁾は WAB/Not ラットの腫瘍系に抗原性がなかったと報告しているように自然発生腫瘍には腫瘍抗原は存在しないか、たとえ存在してもきわめて弱いものとされてきた。一方、抗原の存在が証明されている実験腫瘍は主として誘発腫瘍であり、抗原性の高い実験腫瘍の結果をそのまま人の癌のモデルに当てはめるのは問題があり、人の癌のモデルとしての腫瘍を考えると、誘発腫瘍のような抗原性の高い実験腫瘍だけでなく、自然発生腫瘍のような抗原性が低いか、あるいは抗原性がないとされている腫瘍について検索することも必要であると考えられる。

教室の Fukazawa⁶⁾は、WHT/Ht マウスに自然発生した可移植性の扁平上皮癌を用いてその放射線不活化腫瘍細胞を抗原として、また船木⁷⁾は、腫瘍細胞より抽出した可溶化抗原を用いて、in vitro で mixed lymphocyte-tumor culture reaction によって、リンパ球の幼若化が起こることから、腫瘍抗原が存在することを証明した。そこで今回著者は、in vitro で証明された腫瘍抗原を in vivo で証明するためにその免疫原性を Immunoprotection test で、腫瘍免疫マウスと担癌マウスの脾細胞の活性を Winn assay を用いて検索を行った。自家免疫

反応を調べる Immunoprotection test では、抗原を接種された動物の腫瘍抵抗性の獲得の有無、あるいは腫瘍抵抗性の程度を直接的に知ることができる。また、Winn assay では腫瘍免疫動物あるいは担癌動物の免疫担当細胞の抗腫瘍活性の有無、また免疫担当細胞の種々の画分から有効な細胞画分を知ることができる。

抗原として、腫瘍細胞よりブタノール処理で抽出した可溶性抗原、放射線不活化腫瘍細胞および腫瘍生細胞の3種類を Immunoprotection test に用いたが、可溶性抗原接種群では腫瘍抵抗性は得られなかった。一般に、可溶性抗原の免疫原性は不活化腫瘍細胞や、腫瘍生細胞を抗原として用いた場合に比較して低いとされている。先に小野¹⁶⁾が報告した通り、in vitro では、immunogenic antigen に対する活性が認められたが、in vivo では suppressogenic antigen の働きが強くなるため、その免疫反応が抑えられるためと考えられた¹⁷⁾。Rao と Bonavida¹⁸⁾によると、可溶性抗原が腫瘍の増殖を抑制したりあるいは促進したりする現象の原因として、可溶性抗原の免疫活性が各腫瘍で異なること、投与量、投与経路、投与スケジュールなどにより宿主の免疫反応が異なること、可溶性の過程が抗原の性状を変化させることなどがあげられている。また、Pellis と Kahan¹⁹⁾は可溶性抗原投与で免疫反応が起こらない原因として、抗原投与により免疫不全の状態を引き起こすことや、細胞性免疫の量的および質的变化、さらに相対的に細胞性免疫を障害する抗原の量が多くなることなどをあげている。本研究で可溶性抗原で自家免疫マウスが得られにくかった原因は、上記のような理由が考えられる。

不活化腫瘍細胞による免疫方法については、先に Fukazawa⁶⁾が行った方法に基づいて放射線による不活化細胞を用いた。線量は in vivo での致死増殖を抑えるために80 Gy 照射して使用した。腫瘍生細胞による免疫方法については結紮開放法⁸⁾があるが、結紮開放法は深澤ら⁹⁾が報告したように、この方法では再発を起こしやすいため、本研究では完全に腫瘍を切除

する方法で行った。放射線不活化腫瘍細胞の接種および腫瘍切除による免疫操作で腫瘍抵抗性が得られたことより、in vivo での免疫操作は細胞そのものを抗原として用いる方法が、この実験系には適していると思われた。本研究では腫瘍切除による免疫方法で約30%のマウスが自家腫瘍のチャレンジで腫瘍を拒絶したのでこの動物を腫瘍免疫マウスとして Winn assay に用いた。したがって WHT/Ht マウスでは自家腫瘍による自家免疫マウスのできる率は、不活化腫瘍細胞の場合でも、また切除による場合でもほぼ同率であった。Winn assay では、腫瘍免疫マウスの effector cell が control 群に比較して有意に腫瘍の増殖を抑制したこと、腫瘍免疫マウスに抗腫瘍活性を持った免疫担当細胞が誘導されていることが示唆された。また、anti-Thy 1.1 + C 処理によりその活性が消失したこと、Nylon wool column 処理では活性が消失しなかったことなどから、この細胞は T cell 画分であることが示唆された。すなわち、腫瘍免疫操作によりマウスに細胞障害性 T cell が誘導されているものと考えられた。Lyt-1 subset には helper T cell²⁰⁾や delayed type hypersensitivity の effector cell が含まれ、Lyt-2, 3 subset には killer T cell とその precursor および suppressor T cell^{20,21)}が、Lyt-1, 2, 3 subset には T cell 前駆細胞²²⁾が含まれているので、この T cell の subset は Lyt-1⁺, 2⁺, 3⁺ であると推測された。Shimizu ら²³⁾は in vivo では Lyt-1, 2, 3 subset が killer T cell や、その前駆細胞として機能していると報告している。また、Leclerc ら²⁴⁾は Lyt-2, 3 subset とともに Lyt-1 subset が抗腫瘍免疫に関与していることを報告している。本実験結果でも、T cell subset には Lyt-1, 2, 3 subset とともに、Lyt-1, Lyt-2, 3 subset が含まれていると推測され T cell subset 間の抗腫瘍反応の相互作用については、今後さらに検討する必要があると思われた。

さらに担癌マウスの脾細胞による Winn assay の結果と比較してみると、担癌マウスの

脾細胞は、担癌早期より腫瘍の増殖を促進することから、担癌マウスと腫瘍免疫マウスでは免疫担当細胞の活性が異なると考えられる。すなわち、担癌マウスには担癌早期より suppressor T cell が誘導され、負の免疫応答が優位になり、腫瘍の増殖を促進していると考えられた。この結果は、Fukazawa⁶⁾や船木⁷⁾の報告と同様の傾向を示した。Yamauchi^ら²⁵⁾や藤本^ら^{26,27)}は腫瘍細胞膜上には cytotoxic T cell を誘導する抗原と、suppressor T cell を誘導する抗原の両者が存在すると報告している。また、Klein^ら¹⁷⁾も immunogenic antigen と suppressogenic antigen があることを報告している。これらの報告からもわかるように、腫瘍細胞には抗腫瘍免疫を誘導しうる抗原があるにもかかわらず、腫瘍が増殖するのは、抗腫瘍免疫を抑制する抗原によって誘導される suppressor T cell を主とした免疫抑制細胞や、腫瘍細胞の免疫学的回避機構²⁸⁾による負の免疫応答の関与によって宿主免疫能が低下していくため、相対的に負の免疫応答が優位になっているためと考えられる。また、著者の Immunoprotection test で100%の腫瘍抵抗性が得られなかったことや、Winn assay で、腫瘍免疫マウスの免疫担当細胞が腫瘍増殖を100%抑制できなかったことは、腫瘍抗原の抗原性が低いために腫瘍抗原が認識されずその結果、免疫担当細胞の攻撃を逃れた腫瘍が増殖したものとも考えられた。これらの原因によって、前述のように負の免疫応答が相対的に優位になっているものと思われた。しかしながら、低抗原性である自然発生腫瘍も腫瘍抗原によって抗腫瘍免疫能を持った細胞が誘導され、免疫応答が生じる可能性が示唆された。

以上のことにより、マウス自然発生癌の腫瘍抗原によって正の免疫応答が誘導され、腫瘍の増殖を抑制し、その抑制には killer T cell が関与していることが示唆された。さらに担癌マウスでは負の免疫応答が優位であり、suppressor T cell をはじめとした免疫抑制機構の関与が示唆された。

結 論

近交系 WHT/Ht マウス自然発生扁平上皮癌の腫瘍抗原によりマウスを免疫し、Immunoprotection test によりその抗原性の検索を行った。また腫瘍切除によって得られた腫瘍免疫マウスと、担癌マウスの脾細胞を用いて Winn assay を行ったところ、次のことが明らかになった。

1. Immunoprotection test では、可溶化抗原による免疫は腫瘍増殖を抑制しなかったが、放射線不活化腫瘍細胞と、腫瘍切除による免疫では有意に腫瘍増殖を抑制した。
2. 腫瘍切除による免疫で平均30%のマウスが腫瘍を完全に拒絶した。
3. Winn assay において腫瘍免疫マウスの脾細胞は有意に腫瘍増殖を抑制した。しかし、担癌マウスの脾細胞は腫瘍増殖を促進する傾向を示した。
4. 腫瘍抗原により正の免疫応答が誘導され、その抗腫瘍免疫能を示す細胞は T cell で、subset は Lyt-1⁺2⁺3⁺であることが示唆された。しかし、担癌マウスでは担癌初期から後期にかけて、徐々に負の免疫応答が優位になると考えられた。

謝 辞

御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座、関山三郎教授に深甚なる謝意を表します。終始御懇切なる御指導、御鞭撻を頂いた深澤肇講師に衷心より感謝の意を表します。また、本研究に際し、貴重な御助言を頂きました。北海道大学医学部癌研究施設病理部門小林博教授に深謝申し上げます。さらに研究の場を提供して頂きました、本学医学部細菌学講座川名林治教授、ならびに放射線医学講座柳沢融教授に深謝します。また、御助言を頂きました、当講座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に心より謝意を表します。

本論文の要旨は1988年9月30日第33回日本口腔外科学会総会において発表した。

Abstracts : The kinetics of in vivo immune response of tumor antigen in transplantable spontaneous squamous cell carcinoma from inbred strains of WHT/Ht mice was studied. Soluble tumor antigen, irradiated tumor cells, as well as viable tumor cells were used as tumor antigens with immunized syngeneic mice. The immunoprotective effect of each tumor antigen was studied using the immunoprotection test. Tumor growth could not be suppressed when using a soluble tumor antigen, but a group of immunized irradiated tumor cells and those immunized tumor cells that had been transplanted and then excised were found to reject tumor growth. An average of 30 % of the mice that underwent immunized tumor excision were found to completely reject tumor growth. Using the Winn assay method, tumor neutralizing activity was detected in immune spleen cells. Immune spleen cells suppressed tumor growth showing then to have antitumor immunity, but this was abrogated by the treatment of anti-Thy 1.1. + C, anti-Lyt1. 2. + C and anti-Lyt 2. 2. + C. On the other hand, tumor bearing spleen cells enhanced tumor growth during the tumorbearing period.

These studies showed positive tumor immunity to be induced by the tumor antigen, and that the T cells having subsets Lyt- 1⁺2⁺3⁺ were the effector cells. However, negative tumor immunity increased and was found to be the dominant trend during the tumor bearing period.

文 献

- 1) Burnet, M. : Immunological factors in the process of cartinogenesis, Brit. med. Bull. 20 : 154-158, 1964.
- 2) Foley, E. J. : Antigenic properties of Methlcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res. 13 : 835-837, 1953.
- 3) Prehn, R. T. and Main, J. M. : Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst. 18 : 769-778, 1957.
- 4) Klein, G., Sjögren, H. O., Klein, E. and Hellström, K. E. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcoma in the primary autochthonous host. Cancer Res. 20 : 1561-1572, 1960.
- 5) Old, L. J. and Boyes, E. A. : Immunology of experimental tumors. Ann. Med. Rev. 15 : 167-186, 1964.
- 6) Fukazawa, H. : Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. J. Iwate Med. Ass. 32 : 911-916, 1980.
- 7) 船木康博 : 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, 岩医大歯誌, 12 : 24-1987.
- 8) 武田勝男, 相沢 幹, 辻由生子, 山脇信也, 中村 恭二 : 発癌固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.
- 9) 深澤 肇, 関山三郎, 矢川寛一 : マウス自然発生癌における自家免疫に関する研究, 岩医大歯誌, 13 : 42-46, 1988.
- 10) Winn, H. J. : Immune mechanisms in homotransplantation II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. J. Immunol. 86 : 228-231, 1961.
- 11) LeGrue, S. J., Kahan, B. D. and Pellis, N. R. : Extraction of tumor-specific transplantation antigen with 1-butanol. I. Partial purification by isoelectric focusing. J. Natl. Cancer Inst. 65 : 191-196, 1980.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275, 1951.
- 13) Julius, M.H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A. : A rapid method for the isolation of functional E. J. Immunol. 3 : 645-649, 1973.
- 14) Hewitt, H. B., Blake, E. R. and Walder, A. S. : A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors spontaneous origin. Br. J. Cancer. 33 : 241-259, 1976.
- 15) Middle, J. G. and Embleton, M.J. : Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors. J. Natl. Cancer Inst. 67 : 637-643, 1981.
- 16) 小野 実 : マウス自然発生癌の可溶化抗原の性状に関する研究, 岩医大歯誌, 13 : 283-289, 1988.
- 17) Klein, B. V., Devens, B. and Deutsch, O., Ahituv, A., Frenkel, S., Korbrin, B. J., Naor, D. : Isolation of immunogenic and suppressogenic determinants of the nonimmunogenic YAC tumor and the change in its immunogenic repertoire after in vitro

- cultivation. *Transplantat. Proc.* 13 : 790-797, 1981.
- 18) Rao, V. S. and Bonavida, B. : Specific Enhancement of tumor growth and depression of cell-mediated immunity following sensitization to soluble tumor antigens. *Cancer Res.* 36 : 1384-1391, 1976.
- 19) Pellis, N. R. and Kahan, B. D. : Specific tumor immunity induced with soluble materials : Restricted range of antigen dose and of challenge tumor load for immunoprotection. *J. Immunol.* 115 : 1717-1722, 1975.
- 20) Cantor, H. and Boyse, E. A. : Functional subclasses of lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J. Exp. Med.* 141 : 1376-1389, 1975.
- 21) Kisielow, P., Hirst, J. A., Shiku, H. and Beverley, P. C. L., Hoffmann, M. K., Boyse, E. A., Oettgen, H. F. : Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature.* 253 : 219-220, 1975.
- 22) Huber, B., Devinsky, O., Gershon, R. K. and Cantor, H. : Cell-mediated immunity : delayed type hypersensitivity and cytotoxic responses are mediated by different T-cell subclasses. *J. Exp. Med.* 143 : 1534-1539, 1976.
- 23) Shimizu, K. and Shen, F. W. : Role of different T cell sets in the rejection of syngeneic chemically induced tumors. *J. Immunol.* 122 : 1162-1165, 1979.
- 24) Leclerc, J. C. and Cantor, H. : T cell-mediated immunity to oncornavirus-induced tumors. II. Ability of different T cell sets to prevent tumor growth in vivo. *J. Immunol.* 124 : 851-854, 1980.
- 25) Yamauchi, K., Fujimoto, S. and Tada, T. : Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. *J. Immunol.* 123 : 1653-1658, 1979.
- 26) Fujimoto, D., Greene, M. I. and Sehon, A. H. : Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116 : 791-799, 1976.
- 27) Fujimoto, S., Green, M. I. and Sehon, 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.
- 28) Currie, G. : Cancer and the immune response, Current topics in immunology series. 2nd ed., London, 73-87, 1980.