

吉田腫瘍より分離した Virus HST (Hamazaki) の 免疫学的研究

第1篇 中和実験並に補体結合反応について

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

青 木 徹

(本研究に対し文部省科学研究費の補助を受けたことを感謝する。)

{昭和 27 年 10 月 10 日受稿}

緒 言

ビールスに起因する疾患の研究は最近著しい進境を見せ、幾多の新知見の発見と共にビールスそのものの本態に関しても漸次明かになりつつある。ビールスを原因とするビールス性疾患に於て、その罹患動物血清及び免疫血清中には勿論その間種々の量的消長はあるが当該ビールスを不活性化する特異抗体の産生を見ることは既に周知の事実であつて、このことはビールス性腫瘍についてもあてはまるものである。ビールス性腫瘍として現在知られているものには Sanarelli によつて発見された家兎粘液腫 (1898), Raus, 藤浪の家鶏肉腫 (1910 年) Shope によつて発見された Cotton tail rabbit の乳嘴腫 (1922) 等がそれであるが、哺乳動物に於てビールス性悪性腫瘍と決定されているものは今日までに未だその発表を見ない。Brown 及び Pierce の家兎癌腫は一時はビールス性因子の存在を考へられたが、今日知られている腫瘍ビールスの如き因子が与つていると解するだけの確証がない。最近に到り Gye の 37 号マウス癌がビールス性腫瘍として注目を惹きつつある。

現在核酸化学の教へるところに従へば細胞質内に高重合性 DNA は存在しない。これに対する唯一の例外はビールスの寄生がある場合である。曩に浜崎教授¹⁾は吉田腫瘍の細胞学的検索に際しその細胞原形質内には微細な高重合性 DNA 顆粒の出現する所見から本腫瘍にはビールスの寄生がなければならないことを理論的に主張した。その後昭和 25 年 10

月遂に吉田腫瘍復水からビールスの分離に成功し²⁾、現在マウスの脳内累代接種を継続し約 70 代に及んでいる。

ビールス性疾患に於ける免疫血清の中和抗体の力価は型の如く中和反応の行はれたビールス乳剤を動物に接種したのち、病理組織学的並に臨床学的観察により実験動物の罹患するやによつて定められる。而しながら一般にビールスを原因とする悪性腫瘍はビールス単独では腫瘍の形式を見ない。そこに一定の第二因子の協同作用が必要である³⁾。家鶏肉腫はビールス性腫瘍の代表的なものと思はれて腫瘍研究には便利な材料ではあるが、この腫瘍成能のすぐれたビールスですら第二因子が必要である⁴⁾。吉田腫瘍から分離された Virus HST も亦単独では腫瘍を形成しない。それには第二因子を必要とするが而し Virus HST. は吉田腫瘍の移植成立には缺くべからざる要素である。本実験では主として Virus HST. に起因する病理組織学的変化を指標として中和抗体の検定を行ひ、一方補体結合性抗体の検出を行つた。

家兎免疫血清による中和実験実験方法

I. 使用ビールス

当教室に於て吉田腫瘍から分離しマウス累代接種によつて固定された Virus HST. を用ひた。毎回マウス脳内接種 1 週間後の脳症状を呈した 3~4 匹の罹患マウス脳を混合して生理的食塩水の 10% 乳剤とし、3000r, p, m. 5 分間遠沈した上清を 10⁻¹ 稀釈液として実験に供した。吉田腫瘍細胞より分離した当初

の Virus HST. による接種例では殆ど常に脳膜炎様の刺戟症状を呈したが、接種 30 代頃よりこの脳症状は幾分軽くなりそれに代つて向臓性が強くなつた。この 10 倍乳剤は正常マウス脳に対し 10^{-7} まで感染能がある。

I. 使用血清

(1) 家兎ビールス血清：Virus HST. 10^{-1} 食塩水乳剤を成熟家兎の静脈内に 1 週間々隔で 6 回 (1.5c.c., 2.0c.c., 2.5c.c., 3.0c.c., 4.0c.c., 5.0c.c.) 注射し最終回注射後 12 日に採血した。

(2) 家兎対照血清：正常マウス脳の 10^{-1} 食塩水乳剤を (1) 同様に注射したのち採血した。

(3) 家兎抗腫瘍腹水血清：吉田腫瘍腹水を 3000r, p, m. 5 分間遠沈し、その上清を成熟家兎静脈内に 6 回 (3.0c.c., 4.0c.c., 4.0c.c., 5.0c.c., 5.0c.c., 6.c.c.) 注射し最終回注射後 12 日に採血した。

第 2 節 実験成績

I. 家兎抗ビールス血清による中和実験

Virus HST. の能動免疫を受けた家兎血清中に抗ビールス性物質の産生されるや呈やを検定した。先づ生理的食塩水を以て発症マウス脳を 10% 乳剤 (10^{-1} 稀釈液) とし遠沈、その上清をとり 10 倍稀釈法により 10^{-4} まで稀釈列を作る。各段のビールス稀釈液に夫々等量の免疫血清 (原液) を加へてよく混合したのち室温に暫時放置、それを各稀釈度に 3 匹づつのマウス脳内に 0.03c.c. 宛接種、3 週間後まで動物を観察したのち屠殺し脳の病理組織学的変化を鏡検した。別にビールス免疫血清の代りに正常マウス脳乳剤で免疫した家兎血清を対照血清とした。

臨床所見は主として脳内接種を受けたマウスの過敏性、跳躍、蹠蹠、啼鳴等の発現状況及びその強弱を指標とし、脳 Q 組織所見は脳膜炎、線維グリヤ増殖、脳室上皮の増殖等を指標とした。尙これらの組織所見は Virus HST. 接種を受けたマウスに特有な組織像であつて、その詳細に関しては既に浜崎等⁵⁾の報告がある。

第 1 表 家兎抗ビールス血清を用いた場合

| ビールス 稀釈度 | 血清ビールス 混合液接種量 | 動物番号 | 臨床所見 | 脳 組織所見 |
|-------------|------------------|------------------|------|-----------|
| 10^{-1} | 0.03cc | KV ₁ | ± | + |
| | | KV ₂ | + | + |
| 10^{-2} | 0.03cc | KV ₃ | - | T |
| | | KV ₄ | + | ± |
| | | KV ₅ | + | - |
| 10^{-3} | 0.03cc | KV ₆ | + | ± |
| | | KV ₇ | + | - |
| | | KV ₈ | - | T |
| 10^{-4} | 0.03cc | KV ₉ | - | - |
| | | KV ₁₀ | - | - |
| | | KV ₁₁ | ± | - |

第 2 表 家兎対照血清を用いた場合

| ビールス 稀釈度 | 血清ビールス 混合液接種量 | 動物番号 | 臨床所見 | 脳 組織所見 |
|-------------|------------------|------------------|------|-----------|
| 10^{-1} | 0.03cc | KK ₁ | - | + |
| | | KK ₂ | T | + |
| 10^{-2} | 0.03cc | KK ₃ | + | + |
| | | KK ₄ | + | + |
| | | KK ₅ | T | + |
| 10^{-3} | 0.03cc | KK ₆ | T | + |
| | | KK ₇ | T | T |
| | | KK ₈ | + | T |
| 10^{-4} | 0.03cc | KK ₉ | ± | ± |
| | | KK ₁₀ | T | T |
| | | KK ₁₁ | ± | T |

上記の成績を見ると対照列は 10^{-4} 稀釈でも特異な組織変化が認められる。これに対し免疫血清群は 10^{-4} 稀釈列を完全に中和していることが分る。尙臨床所見では実験群が必ずしも対照群に比し軽症であるとは限らないが、これはマウスの個体差によるものと思はれる。尙この場合中和抗体の力価の余り高くないのはビールス自身の毒性が余り強くないためと考へられる。最終注射量 10c.c. に及べば凡そ最高の力価に達するものと想像されるので、この量に達せしめんと努力したが毎常家兎の死亡を起して成功しなかつた。

I. 家兎抗腫瘍腹水血清による中和実験

抗腫瘍腹水血清は抗ビールス血清同様原液を使用し、抗原としては 10 倍稀釈法により

ビールス乳剤を 10^{-2} ~ 10^{-4} 稀釈となし、各列夫々血清ビールス乳剤等量を混合して 37°C 1時間孵卵器にて反応せしめ各列3匹づつマウス脳内に接種した。実験Iと同様接種後臨床観察を3週間とし屠殺した。尙実験Iの際には Virus HST. は分離当初であり脳所見がよく現はれたので、主として臨床症状並びに脳の病理組織学的所見に重点を置いたが、その後脳症状が段々弱まり Virus HST. 累代接種約30代頃より内臓の変化が強くなったために本実験では脳所見の代わりに肝、肺の病理組織学的変化を指標として中和実験を試みた。対照として正常家兎血清を使用した。

第3表 家兎抗腫瘍腹水血清を用いた場合

| ビールス 稀釈度 | 血清ビールス 混合液接種量 | 動物 番号 | 臨床 所見 | 組織所見 | |
|-------------|------------------|-----------------|----------|------|---|
| | | | | 肝 | 肺 |
| 10^{-2} | 0.03cc | KT ₁ | ± | + | + |
| | | KT ₂ | ± | + | - |
| | | KT ₃ | - | ± | + |
| 10^{-3} | 0.03cc | KT ₄ | + | + | ± |
| | | KT ₅ | - | + | - |
| | | KT ₆ | ± | - | - |
| 10^{-4} | 0.03cc | KT ₇ | - | - | - |
| | | KT ₈ | ± | - | - |
| | | KT ₉ | ± | - | - |

第4表 正常家兎血清を用いた場合

| ビールス 稀釈度 | 血清ビールス 混合液接種量 | 動物 番号 | 臨床 所見 | 組織所見 | |
|-------------|------------------|-----------------|----------|------|---|
| | | | | 肝 | 肺 |
| 10^{-2} | 0.03cc | KN ₁ | + | + | + |
| | | KN ₂ | + | + | ± |
| | | KN ₃ | + | + | + |
| 10^{-3} | 0.03cc | KN ₄ | + | + | + |
| | | KN ₅ | + | + | + |
| | | KN ₆ | ± | + | ± |
| 10^{-4} | 0.03cc | KN ₇ | ± | + | - |
| | | KN ₈ | + | + | ± |
| | | KN ₉ | ± | + | ± |

免疫血清による補体結合反応

I. 家兎免疫血清による場合

抗原：Virus HST. 累代接種マウスの頸動脈を切断して捨血し、この脳を2%正常モルモット血清加食塩水を加へて10%脳乳剤とし、之を一夜冷蔵庫に放置した後2500r, P, m. 30分遠心その上清をドライアイス・アルコールの寒剤と 37°C 恒温槽を使用して数回凍結融解を行つた後8000r, p, m. 遠心する。(V抗原) 同様にして健康マウス脳より対照抗原(N抗原)及び吉田腫瘍腹水よりA抗原を作る。

被検血清：家兎抗ビールス血清中には健康マウス脳に対するN抗体を多量に含むため本多⁶⁾の方法によりN抗体の吸収を行つた。即ち被検血清1に対し7量のN抗原(50%正常マウス脳乳剤を3000r, p, m. 遠心した上清)を加へこれを18時間氷室に放置した後遠沈し、その上清に等量のアミールアルコールを加へ更に3倍量の四塩化炭素を加へてよく混合し3000r, p, m. 15分行いその上清について同様の処置を3回反覆しその上清を使用した。

第5表 家兎抗ビールス血清の補体結合反応

| 試験管 番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 対照 | |
|--------------|------|------|------|------|-------|------|---|
| 血清稀釈 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:8 | |
| 稀釈血清量 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | |
| 補体 (2充単位) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | |
| 抗 | V. | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0 |
| 原 | N. | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0 |
| | A. | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0 |
| 食塩水 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.25 | |
| — 夜 永 室 | | | | | | | |
| 溶血系 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | |
| 370C 30分 | | | | | | | |
| 判 | V | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 定 | N | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | |
| | A | 3 | 2 | 2 | ± | 0 | |

〔備考〕 V抗原：ビールス脳乳剤
N抗原：正常マウス脳乳剤
A抗原：吉田腫瘍腹水

II. マウス免疫血清による場合

抗原： I に同じ。

被検血清： 家兎免疫血清を使用する際には正常マウス脳に対する N 抗体を含みこれが完全に吸収し得ないために次でマウスの抗ビールス血清を使用した。実験方法は I に同じ。

第 6 表 マウス抗ビールス血清の補体結合反応

| 血清稀釈 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 対照 |
|------|-----|-----|-----|------|------|----|
| 抗 | V | 2- | 1 | 1- | ± | 0 |
| 原 | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | A | 2- | 1 | ± | 0 | 0 |

〔備考〕 V.N.A. は上記同様

総括及び考按

Virus HST. は 1950 年 10 月吉田腫瘍から分離されたもので現在大阪系と東京系の 2 系列ありマウス脳内に累代接種を行ひ夫々 71 代と 69 代に及んでいる。吉田腫瘍は発見当初より既にビールス性腫瘍を疑はれ、吉田⁷⁾、木下⁸⁾、寺田⁹⁾等の諸学者によつて無細胞とした腫瘍復水についてビールス性因子の探究が行はれたが、その結果はすべて陰性に終つている。一方安田は腫瘍復水の遠沈上清をラッテに接種し吉田腫瘍の発生を見ているが、単一腫瘍細胞の移植によつても腫瘍形成が可能であることから吉田、石橋等は安田の主張を否定している。

Virus HST. は現在既にその生物学的性状は当教室に於てあらゆる方面から研究され、その性格の大要が明かにされた。免疫血清学的研究はこのうちでも最も重要な一環をなすものであつて殊に本ビールスの特殊性を定めるためには缺くことの出来ない存在である。次に今回行つた実験成績について総括考按を試みる。

(1) Virus HST. による中和抗体産生について

中和試験には現在生体内中和試験及び試験管内中和試験の二法があるが、前者については既に浜崎¹¹⁾、谷等によつて陽性の成績が挙

げられている。本実験では後者の方法を選び免疫家兎血清中に実験的に Virus HST. に対する中和抗体の産生せられることを明かにした。即ち Virus HST. 浮遊液と家兎免疫血清とを一定の条件で試験管内で中和反応を行はせ、これを正常マウス脳内に接種して臨床症状を観察し、3 週間後に屠殺その大脳の病理組織学的変化を鏡検した。その結果は臨床上の所見では Virus HST. 浮遊液の 10^{-1} ~ 10^{-3} 中和液接種例では対照に比し殆ど差をつけ難く反つて強く発症しているやうに思はれるものもあるが、このことは注意すべき事実であつて既に先人によつて経験せられたところである¹²⁾。次に 10^{-4} 稀釈例では対照群は尙軽度に発症しているのに対し実験群は殆ど発症が阻止され、而も大脳の鏡検所見では中和抗体の効果が見られ脳膜脳炎、線維グリウムの増殖、脳室上皮の増殖等の病理組織学的変化は全く現れていない。

(2) 吉田腫瘍復水による中和抗体産生について

上記の如く Virus HST. で免疫した家兎血清中には明かに中和抗体の産生せられることを知つたが、次に吉田腫瘍復水による免疫家兎血清中にも Virus HST. と抗原抗体反応を起す特異的な中和抗体の産生あることを確めた。即ち血清とビールスの試験管内中和法は実験 (1) と同様に行つたが、結果の判定には家兎抗血清・ビールス混合液を接種したマウスの肝臓並びに肺臓の病理組織学的変化の有無及びその強さを以て判定の基準とした。臨床所見では各稀釈列とも大差なく 10^{-4} 稀釈液接種例でも極く軽度の脳膜刺戟症状を呈し単に之のみを以てしては中和の判定は不可能であつた。従つて成績の判定は組織所見で行はれ 10^{-2} 、 10^{-3} 稀釈列は肝、肺共に弱陽性乃至陽性の Virus HST. に特異な肉芽性炎症を呈し中和抗体の効果は尙不充分であるが、 10^{-4} 稀釈列に於ては肝、肺共に組織変化は認められない。因に正常家兎血清を以てする本ビールスの稀釈実験は 10^{-7} まで陽性である。

尙吉田腫瘍免疫家兎の血清が抗腫瘍性物質

を有することは、その血清の治療効果に於ても、生体外腫瘍細胞に対する作用に於ても又受動免疫に於ても既に明かにされているところであるが北大で実証されていることと同じ方法で行った私の実験に於ても家兎血清中に含有せられる抗腫瘍性抗体の中には Virus HST. に対する特異的な中和抗体の含有せられることが明かとなつた。

尙本ビールスが免疫学的に吉田腫瘍に特異であることは浜崎¹⁴⁾、佐藤、谷等の行つた実験に於ても明かである。即ちビールス中和抗体で腫瘍細胞内のビールスを特異な方法で中和するとこの腫瘍細胞は移植性が全く失はれる。しかるにこの細胞に Virus HST. を加へると再び移植性を獲得するのである。

上記 Virus HST. の向臓性については既に佐々木¹⁵⁾の報告がある。即ち組織学的所見として肝臓の主病変は主に門脈血管、殊に胆管周囲の著しい間葉性細胞の増殖及び円形細胞浸潤、並に肝細胞内に同種細胞集簇による結節形成である。又肝臓では気管枝及び血管周囲の上記同様の肉芽性炎症並に胞隔性肺炎が認められる。

(3) Virus HST. による補体結合性抗体の産生について

家兎ビールス血清中には Virus HST. に対する中和抗体の産生せられることは明かとなつた。然らば補体結合性抗体は如何であらうか。抗原材料として罹患マウス脳及び吉田腫瘍腹水をとり、対照として健康マウス脳を使用し凍結融解を行つた。尙免疫血清中の正常マウス脳に対する抗体 (N) を除去するためにアミールアルコール、四塩化炭素法を採用した。この成績は第5表の通りで正常マウス脳乳剤抗原で吸収を行つても抗体 (N) の吸収は完全に行はれないやうであるが、補体結合性抗体に対しては殆ど影響がないから比較検討することによつて抗体量の測定が可能である。

即ち 1:32 までは V 抗原列及び A 抗原列は N 抗原列より僅かに強く、1:64 以降では N 抗原列は陰性であるが V 抗原列は弱陽性の成

績を示している。尙 A 抗原列に於て成績弱陽性に現はれることは Virus HST が吉田腫瘍に密接な関係を有することを物語るものである。

次で抗原は同じものを使用し、免疫血清として家兎血清の代りにマウスの抗ビールス血清を使用して補体結合反応を行つた。この際には家兎免疫血清の如く抗体 (N) の吸収を行はなくとも第6表に示すやうに N 抗原列はすべて陰性であるが、V 抗原及び A 抗原列では陽性の成績を示した。

尙腫瘍腹水をマウスに接種すると Virus HST. に対する中和抗体を生産することが生体内中和実験によつて明かにされている¹⁶⁾。即ち腫瘍腹水をマウス腹腔内接種を行つた免疫群には Virus HST. を脳内に接種しても脳膜脳炎症状は著明でなく、又腫瘍細胞は早期に変性崩壊して消失する。以上の本篇で報告した実験成績は浜崎、佐藤、谷等の行つた生体内免疫学的研究と共に吉田腫瘍がビールス性因子に起因するものであることの確証の一環をなすものと信じる。

結 語

吉田腫瘍腹水より分離した Virus HST (Hamazaki) の特殊性を知る目的で免疫学的研究を行つた。

(1) Virus HST. で免疫した家兎の血清中には Virus HST. に対し特異的な中和抗体の産生せられることが証明された。

(2) 吉田腫瘍腹水で免疫した家兎血清中にも Virus HST. に対する特異的な中和抗体の出現することを確めた。このことは Virus HST. が吉田腫瘍と特種な關聯性を有する確証である。

(3) Virus HST. で免疫した家兎及びマウスの血清中に補体結合性抗体をも証明することが出来た。

擧筆に際し恩師浜崎教授の御指導並に御校閲に対し衷心より感謝致します。

文 献

- 1) 浜崎 : 癌. 41 ; 109. (1950)
- 2) 浜崎, 他 : 癌. 42 ; 237. (1951)
- 3) 浜崎, 他 : 癌. 42 ; 238. (1951)
- 4) 大島 : 第 10 回日本癌学会 (昭. 26)
- 5) 浜崎, 他 : Folia Psych. et Neurol Jap. 5 ; 40 (1951)
- 6) 本多 : 北里実験医学. 23 ; 120. (1950)
- 7) 吉田 : 吉田肉腫. 61. 寧学書房. (昭. 24)
- 8) 木下, 釜洞 : 癌. 40 ; 139. (1949)
- 9) 寺田 : 東京医事雑誌. 67 ; 16. (1949)
- 10) 吉田, 石橋 : 癌. 40 ; 131. (1949)
- 11) 浜崎, 他 : 癌. 42 ; 237. (1951)
- 12) 川喜田 : 濾過性病原体. 117. 学術書院(1949)
- 13) 白淵, 相沢 : 新臨床. 4 ; 149. (1950)
- 14) 浜崎 : 細胞核の生理と病理. 508. 永井書店 (昭. 27)
- 15) 佐々木 : 日病会誌 (地方会号) 40 ; 203. (昭. 26)
- 16) 谷 : 投稿中.

吉田腫瘍より分離した Virus HST (Hamazski) の 免疫学的研究

第Ⅰ篇 白鼠抗血清による中和実験

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

青 木 徹

(本研究に対し文部省科学研究費の補助を受けたことを感謝する.)

〔昭和 27 年 10 月 10 日受稿〕

緒 言

Virus HST. (Hamazaki) は吉田腫瘍腹水より分離されたものである¹⁾。その免疫血清学的性状については既に第 1 篇に於て家兎の抗ビールス血清及び抗腫瘍腹水血清中に Virus HST. に特異的に作用し之を不活性化する中和抗体の産生せられること及び家兎, マウスの抗ビールス血清中に補体結合性抗体の出現することを明かにした。その後当教室に於て Virus HST. による免疫実験に際して雑系白鼠が Virus HST. に対する免疫性を獲得し難いことから, 本ビールスが正常白鼠の潜在性ビールスではないかとの疑いをもち分離を企てた所, 遂に雑系白鼠腹腔より Virus HST. と類似の病毒 (正常白鼠病毒) を分離し得たので, 本実験では Virus HST. と正常白鼠病毒との免疫血清学的関係を追求し又雑系白鼠

並に Wistar 系 (W系) 白鼠の抗ビールス血清, 吉田腫瘍罹患白鼠の血清等についても中和実験を試みた。

實 験 方 法

I. 使用ビールス

第 1 篇に於て述べたと同様

II. 使用血清

1. (1) 雑系正常白鼠血清

(2) マウスより得た抗正常白鼠病毒血清 : 谷, 有木²⁾ が正常白鼠腹腔液から分離した Virus HST. に類似の病毒を抗原に使用した。即ちこの病毒は潜伏性に感染していると思はれるので免疫血清を得るには他種動物を用ふべきである。そこでこの病毒の脳内接種を受けたマウスから 10 倍生理食塩水脳乳剤をつくり, 之を正常マウスの腹腔内に 1 週間々隔で 7 回 (0.15c.c., 0.2c.c., 0.25c.c., 0.3c.c.,