

移植動物癌の抗腫瘍性抗体産生に関する研究

第 2 編

癌細胞感作家兎吸着血清中の抗腫瘍性抗体の消長について

(本論文の要旨は第21回日本癌学会総会において発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内傳之助教授)

大学院 武 田 淳 志

[昭和37年12月25日受稿]

目 次

第1章 緒 言	
第2章 実験方法	
第1節 実験動物	
第2節 実験腫瘍	
第3節 実験材料	
第1項 正常マウス肝末	
第2項 補 体	
第4節 採血方法	
第5節 抗血清の種特異抗体吸着法	
第6節 抗血清の腫瘍特異抗体吸着法	
第7節 血清蛋白分層および蛋白濃度測定法	
第8節 腫瘍細胞の嫌気性解糖実験	
第9節 腫瘍細胞の中和実験	
第10節 感作方法	
第11節 実 験 群	
第1項 種特異抗体吸着血清群	
第2項 腫瘍特異抗体吸着血清群	
第3章 実験成績	
第1節 肝末吸着血清の蛋白分層と蛋白濃度	
第1項 静 注 群	
第2項 Adjuvant 群	
第3項 小 括	
第2節 肝末吸着血清の腫瘍細胞嫌気性解糖実験	
第1項 静 注 群	
第2項 Adjuvant 群	
第3項 小 括	
第3節 肝末吸着血清による中和実験	
第1項 静 注 群	
第2項 Adjuvant 群	
第3項 小 括	
第4節 腫瘍細胞吸着血清による嫌気性解糖実験	
第1項 静 注 群	
第2項 Adjuvant 群	
第3項 小 括	
第5節 腫瘍細胞吸着血清による中和実験	
第1項 静 注 群	
第2項 Adjuvant 群	
第3項 小 括	
第4章 総括ならびに考按	
第5章 結 論	

第1章 緒 言

第1編において移植癌細胞で異種動物を感作することによって、異種動物血清中に γ -Globulinの上昇がおり、この血清は抗原に用いた移植癌細胞に対して cytotoxic action を有することを嫌気性解糖実験と中和実験とから証明しえた。

しかし、この感作血清中の腫瘍細胞障害物質が移植癌細胞に特異的なものかどうかは証明しなかつた。

この感作血清中には動物が異種であるための種特異抗体を含んでいる。そこでこの障害物質(抗体)から種特異抗体を除いたり、あるいは抗原と作用させて腫瘍特異抗体を除いたりすることによつてこの抗血清の腫瘍特異性の有無を追究しようと試みた。すなわち、

1. 抗血清は種特異抗体も含むので、正常マウス肝末¹⁾によつて種特異抗体を吸着せしめた後、この

抗血清の蛋白分層測定を行なつて吸着された分層をみ、さらに嫌気性解糖実験と中和実験とを施行してこの血清がなお抗腫瘍性を有するか否かを検討した。

2. 抗血清を腫瘍細胞(抗原)で吸着することによつて、腫瘍細胞障害物質(抗体)が消失するか否かを同じく嫌気性解糖実験と中和実験とで検討することとした。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物は市販雑系家兎および C57 Black マウスである。マウスは岡山大学医学部マウスコロニーで育成されたもので、雌雄の生後4~5週のものを購入し、体重20g.前後に飼育して使用した。飼料はオリエンタル酵母製の実験用飼料 MF と新鮮野菜とを用いた。家兎は体重2kg.以上の雄を用い、飼料としては市販豆腐粕と人参などの野菜を与えた。

第2節 実験腫瘍

実験に供した腫瘍は岡山大学癌源研究所より分与された Ehrlich 腹水腫瘍である。

腫瘍の使用にあたっては C57 BL. マウス腹腔内に継代移植し、移植後1週から10日以内の非血性のものを供した。使用に際して腫瘍細胞は生理食塩水で数回洗浄³⁾し、なるべく癌細胞のみにして使用した。

第3節 実験材料

第1項 正常マウス肝末

マウス肝末は Coons, Leduc and Connolly¹⁾の方法による acetone-dried liver powder 調製法により作製したものを4°Cに保存して、用に応じ取出して実験に供した。

第2項 補 体

補体としてモルモット血清を使用した。モルモット血清は新鮮なものを使用直前に Ehrlich 腫瘍細胞であらかじめ吸着させたものを用いた。

第4節 採血方法

家兎血清の採血方法は心臓穿刺法により、室温にて血餅を分離し血清を-40°C¹⁰⁾に氷結保存し、用に応じて室温にて融解して実験に供した。血清はすべて56°C30分間加熱し非働化した。採血時は早朝空腹時を選んだ。

補体を採取するためのモルモット血清の採血も心臓穿刺法によつた。

第5節 抗血清の種特異抗体吸着法

種特異抗体の吸着のためには前掲の正常マウス肝末を用いた。

吸着法は抗血清(第1編で作製したもの、後述)に肝末¹⁾²⁴⁾²⁶⁾を100mg/1.の比で加え、37°C1時間孵卵器内でよく混和しながら吸着させた後、遠心沈澱させて肝末を除いた。

第6節 抗血清の腫瘍特異抗体吸着法

腫瘍特異抗体の吸着には抗原である Ehrlich 腹水腫瘍細胞を用いた。

吸着法は抗血清0.6ml.に、遠沈して pack した Ehrlich 腫瘍細胞 2.4×10^7 個を加え、37°C1時間 incubate した後、遠沈して腫瘍細胞と血清とを分離した。

第7節 血清蛋白分層および蛋白濃度測定法

血清蛋白分層の測定には濾紙電気泳動法を採用した。泳動装置、実験薬剤および器具、泳動条件、実験条件、濃度計使用方法等に関する実験方法は第1編と同じである。

血清蛋白濃度測定には日立屈折計を使用した。

第8節 腫瘍細胞の嫌気性解糖実験

Warburg 検圧計を使用し¹⁴⁻¹⁸⁾、実験条件、実験方法は第1編と同様である。

第9節 腫瘍細胞の中和実験

中和実験に使用した動物は C57 BL. マウスで、実験条件、実験方法は第1編と同様である。血清1つにつき6匹のマウスを使用し、半数生存日数を調べた。

第10節 感作方法

感作方法についてはすでに第1編において述べたので省略する。

第11節 実験群

第1項 種特異抗体吸着血清群

第1編で作った抗血清を第5節で述べた吸着法により、種特異抗体を吸着し、静注群・Adjuvant 群の各々について、吸着後抗血清の血清蛋白分層を測定し、さらに嫌気性解糖実験と中和実験とを施行した。

第2項 腫瘍特異抗体吸着血清群

第1編で作った抗血清を第6節で述べた吸着法により腫瘍特異抗体を吸着し、静注群・Adjuvant 群のおのおのについて、吸着後における抗血清の嫌気性解糖実験と中和実験とを施行した。

第3章 実験成績

第1節 肝末吸着血清の蛋白分層と蛋白濃度

第1項 静注群

a) 1回感作群

正常マウス肝末によつて吸着される蛋白分層はほぼ全分層にわたるが、吸着される率からみると γ -Globulin が最も多い。吸着後の γ -Globulin 量は感作前の γ -Globulin 量とあまり差のないものが多く、感作前の γ -Globulin 値 0.90 g/dl より高いのは感作後 2・3・4 週のみで、それも最高 0.11 g/dl 多い程度に過ぎない。吸着によつて蛋白濃度はいずれも減少し、その減少の幅は 0.3~0.5 g/dl である。Albumin も多少吸着されるが比較的少量である(表1)。

b) 3回感作群

3回感作群では、Albumin 分層の吸着よりも γ -Globulin 分層の吸着が比較的多い。蛋白濃度の吸着による減少は 0.2~0.6 g/dl となっている。吸着後の γ -Globulin 値についてみると、3週の 23.2

% (1.70 g/dl) が最も高く、感作前の 1.01 g/dl と比べると 0.69 g/dl 増加している。吸着後でも γ -Globulin は13週まで感作前より高い値を示している。

γ -Globulin の吸着量に注目してみると、1・2・3 週の初期に吸着量が多く、4 週以後は少なくなつている。表2をみればこのことは一目瞭然である。

c) 6回感作群

表3にみるように、血清蛋白量は吸着によつて 0.3~0.9 g/dl 減少している。 γ -Globulin 値の高い 6~12週に蛋白量も多くなつている。

γ -Globulin 値は感作前の 1.18 g/dl に 対し、36 週まですべて感作前値より高く、 γ -Globulin の上昇は長期にわたつて持続することがわかる。4 週には最高の 37.1% (2.37 g/dl) となり9週までは 2g/dl 程度の高い値を持続し、16週以後は 1.4 g/dl 程度の値を示した。 γ -Globulin の吸着量は、6 週までに比較的多く、9 週以後は非常に少ない。

第2項 Adjuvant 群

詳細は表4に示すごとくである。すなわち血清蛋

表1 肝末吸着後抗血清蛋白分層
1回感作群

	Albumin			Globulin									蛋白濃度	
				α			β			γ				
	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl
第1週	60.0	3.30	-1.0	9.9	0.54	-0.08	14.2	0.78	-0.12	15.9	0.88	-0.02	5.5	-0.5
第2週	60.3	3.38	-0.06	8.6	0.48	-0.27	13.1	0.73	-0.05	18.0	1.01	-0.13	5.6	-0.4
第3週	57.8	3.29	0	11.4	0.65	-0.05	13.2	0.74	-0.11	17.6	1.00	-0.26	5.7	-0.4
第4週	60.9	3.65	0	10.1	0.60	-0.04	13.9	0.83	-0.01	15.1	0.91	-0.31	6.0	-0.4
第7週	60.9	3.53	0	10.3	0.60	-0.04	13.5	0.80	0	15.3	0.89	-0.33	5.8	-0.3
第9週	60.2	3.43	-0.15	10.1	0.58	-0.10	14.1	0.80	-0.05	15.6	0.89	0	5.7	-0.3

表2 肝末吸着後抗血清蛋白分層
3回感作群

	Albumin			Globulin									蛋白濃度	
				α			β			γ				
	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl
第1週	56.4	3.61	-0.02	12.0	0.77	-0.16	14.2	0.94	0	17.4	1.11	-0.34	6.4	-0.6
第2週	55.5	3.66	-0.18	11.5	0.76	-0.03	15.1	0.99	-0.01	17.9	1.18	-0.29	6.6	-0.5
第3週	50.6	3.64	-0.06	9.6	0.76	0	13.6	0.98	-0.06	23.2	1.70	-0.36	7.2	-0.4
第4週	57.2	4.00	-0.38	8.5	0.60	-0.01	11.8	0.83	0	22.5	1.58	-0.10	7.0	-0.3
第6週	56.8	3.63	-0.30	9.1	0.60	0	12.3	0.81	-0.08	21.8	1.43	0	6.6	-0.3
第7週	58.3	3.73	-0.20	8.8	0.56	-0.05	12.4	0.79	-0.05	20.5	1.31	-0.11	6.4	-0.4
第11週	56.3	3.77	-0.25	10.2	0.68	-0.01	11.1	0.74	0	22.4	1.50	-0.04	6.7	-0.2
第13週	55.5	3.67	-0.27	9.0	0.59	-0.02	11.9	0.78	0	23.6	1.55	-0.02	6.6	-0.3

表 3 肝末吸着後抗血清蛋白分層
6回感作群

	Albumin			Globulin						蛋白濃度				
	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	g/dl	吸着量
第2週	45.8	2.99	-0.01	9.0	0.57	-0.10	13.6	0.86	-0.05	31.6	1.99	-0.04	6.3	-0.3
第4週	41.7	2.67	-0.75	6.9	0.44	-0.08	14.3	0.91	-0.03	37.1	2.37	-0.10	6.4	-0.9
第6週	52.0	3.58	-0.03	7.4	0.47	-0.04	12.8	0.63	-0.30	27.8	1.92	-0.23	6.9	-0.3
第9週	51.6	3.77	-0.29	8.0	0.56	-0.03	11.5	0.83	-0.01	28.9	2.10	-0.01	7.3	-0.3
第12週	56.5	4.01	-0.10	7.8	0.55	-0.07	11.6	0.82	-0.09	24.1	1.71	-0.03	7.1	-0.3
第16週	56.4	3.61	-0.23	8.1	0.52	-0.02	12.9	0.83	-0.09	22.6	1.45	-0.05	6.4	-0.4
第20週	55.1	3.58	-0.41	8.9	0.58	0	14.2	0.92	-0.05	21.8	1.42	-0.04	6.5	-0.5
第24週	51.4	2.98	-0.72	9.9	0.57	-0.01	14.0	0.81	-0.04	24.7	1.43	0	5.8	-0.8
第28週	53.4	2.88	-0.51	9.2	0.45	-0.08	11.3	0.61	-0.12	26.1	1.41	-0.06	5.4	-0.6
第32週	52.3	2.93	-0.37	10.5	0.59	-0.02	13.6	0.76	0	23.6	1.32	-0.02	5.6	-0.4
第36週	55.1	3.25	-0.24	10.3	0.60	0	12.1	0.71	-0.08	22.5	1.32	-0.01	5.9	-0.3

表 4 肝末吸着後抗血清蛋白分層
Adjuvant 群

	Albumin			Globulin						蛋白濃度				
	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	%	g/dl	吸着量	g/dl	吸着量
第2週	59.5	3.33	-0.34	10.8	0.60	-0.13	12.9	0.72	-0.04	16.8	0.94	-0.10	5.6	-0.6
第4週	57.3	3.43	-0.41	9.6	0.58	-0.15	12.6	0.76	-0.12	20.5	1.23	-0.02	6.0	-0.6
第6週	51.7	3.41	-0.16	9.0	0.60	-0.01	13.4	0.88	0	25.9	1.71	-0.03	6.6	-0.2
第8週	50.8	3.45	-0.06	9.4	0.64	-0.04	11.2	0.76	-0.14	28.6	1.94	-0.17	6.8	-0.4
第12週	50.4	3.72	-0.31	8.5	0.63	-0.06	9.5	0.70	-0.21	31.6	2.34	-0.03	7.4	-0.6
第16週	49.9	3.79	-0.10	8.8	0.66	0	11.6	0.88	0	29.7	2.26	-0.31	7.6	-0.4
第20週	50.8	3.56	-0.30	7.0	0.49	-0.17	12.2	0.85	-0.01	30.0	2.10	-0.12	7.0	-0.6

白量は吸着後も12・16週に多く、 γ -Globulin が最高値を示している時期と一致している。 γ -Globulin 値は感作前の 0.91 g/dl に対し、2週ではほとんど増加しておらず、6週から著明に増加し、12週に最高値の31.6% (2.34g/dl) になっている。Adjuvant 群では γ -Globulin の増加傾向が遅く始まり、しかも着実に増加することは、第1編における吸着前の成績と平行している。 γ -Globulin の吸着量は静注群と異なり、初期にも後期にも特別な傾向はみられない。

吸着される量からいえば、Albumin の方が γ -Globulin よりも多い。蛋白量の吸着による減少は 0.2~0.6 g/dl で比較的少なかつた。

第3項 小括

肝末により血清を吸着しても、 γ -Globulin 値は感作前よりも明らかに高い。なお静注群では初期に γ -

Globulin の吸着が多いので、この吸着されたものを除いた γ -Globulin の量は初期を過ぎてあまり減少せずかなりの高さを保っている。

Adjuvant 群では γ -Globulin の吸着量に初期、後期等の時期的な差は少ない。Adjuvant 群では Adjuvant 剤の特長として12週頃に γ -Globulin 値が最高となり、20週になつてもあまり減少していない。

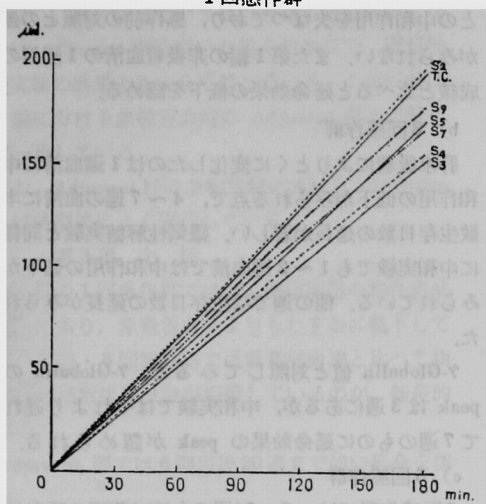
第2節 肝末吸着血清の腫瘍細胞嫌気性解糖実験

第1項 静注群

a) 1回感作群

180分値の成績で比較すると図1のように、腫瘍対照(血清の代りに両側室へ Krebs Ringer Bicarbonate 緩衝液を加えて腫瘍のみの嫌気性解糖をみたもの。図の中のSは血清、数字は週を示す)より

図1 肝末吸着血清の腫瘍細胞嫌気性解糖に及ぼす影響



も高い値を示す2週のものがあり、一番低い値となつた4週でも嫌気性解糖抑制作用はない。吸着前には抑制作用があるかと思われたものもすべて高い値を示した。

とにかく、1回感作群では、前節で多少 γ -Globulin 値は高くなつているが、抑制作用はほとんどみられなかつた。

b) 3回感作群

肝末吸着前と比べて著しい特長は、1・2週血清の嫌気性解糖抑制力の低下がみられるが、他の週では吸着前と変わらないことである。すなわち初期には低下していることを示している。 γ -Globulin 値のあまり高くない11~13週でも初期血清よりはるかに抑制作用が強く、6週血清でもつとも抑制作用が強いが、 γ -Globulin 値は4週の方が高い。すなわち、静注群では、 γ -Globulin 値の高い時期よりも嫌気性解糖抑制作用の顕著な時期は常に遅れている(図2)。

c) 6回感作群

6回感作群では図3にみるように、2週血清の嫌気性解糖抑制力が吸着前よりも著しく低下している。6週以後の抑制力は3回感作群よりやや強くなつている。4週でも吸着前より抑制作用がやや低下している。抑制の強い順にあげると12, 6・9, 16・20, 24・28, 32・36, 4, 2週で、 γ -Globulin 値とは一致していない。 γ -Globulin 値がたとえ低くても(16週以後)2・4週より強い抑制作用をもつていること

図2 肝末吸着血清の嫌気性解糖に及ぼす影響
3回感作群

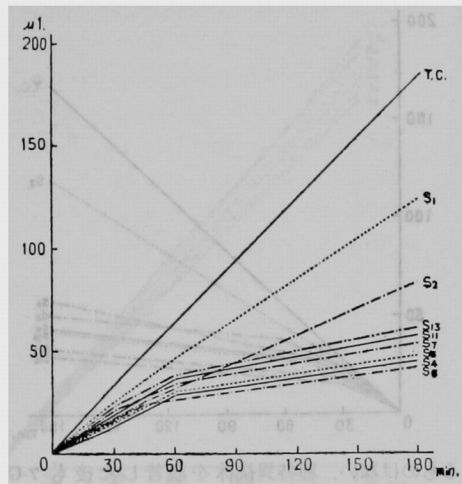
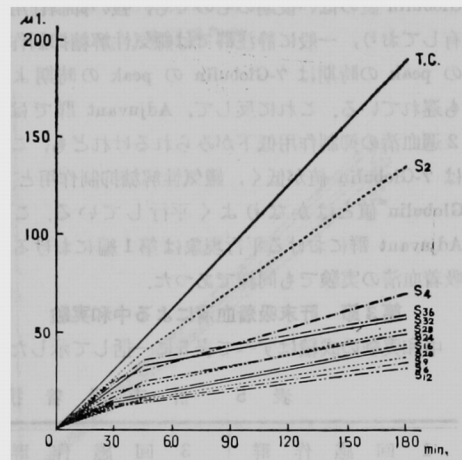


図3 肝末吸着血清の嫌気性解糖に及ぼす影響
6回感作群



も注目される。

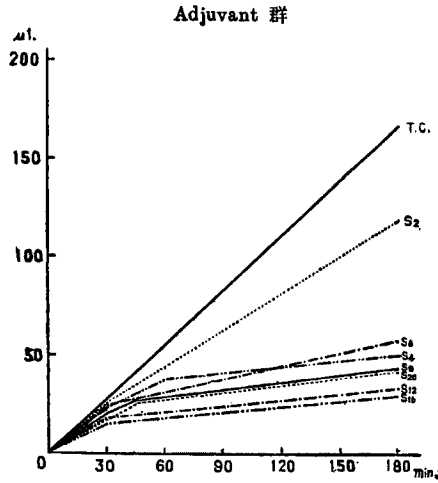
第2項 Adjuvant 群

成績は図4に示すごとくである。すなわち16週がもつとも強い抑制効果をみせ、ついで12週, 20週, 8週の順で後期の方が抑制力が強い。 γ -Globulin 値も12週にもつとも高く、Adjuvant 群では抑制力と比較的よく平行している。静注群と同様に2週血清の抑制力の低下が著しいが、これは γ -Globulin 値も低く、そして γ -Globulin 値の高い他の週の水清では抑制作用はあまり低下していない。

第3項 小括

静注群では肝末吸着血清は初期のものにおける嫌気性解糖抑制作用の低下が著しい。後期では低下す

図4 肝末吸着血清の嫌気性解糖に及ぼす影響



るものはない。種特異抗体を吸着した後も γ -Globulin の多い血清が初期のものにみられるが、このようなものは抑制作用をあまり示していないで、 γ -Globulin 値の低い後期のものでも、強い抑制作用を有しており、一般に静注群では嫌気性解糖抑制作用の peak の時期は γ -Globulin の peak の時期よりも遅れている。これに反して、Adjuvant 群では、2週血清の抑制作用低下がみられるけれども、これは γ -Globulin 値が低く、嫌気性解糖抑制作用と γ -Globulin 値とはかなりよく平行している。この Adjuvant 群における平行現象は第1編における非吸着血清の実験でも同様であった。

第3節 肝末吸着血清による中和実験

中和実験の成績はすべて表5に一括して示した。

表5 肝末吸着抗血清による中和実験

1 回 感 作 群		3 回 感 作 群		6 回 感 作 群		Adjuvant 群	
週	半数生存日数	週	半数生存日数	週	半数生存日数	週	半数生存日数
感作前	15日	感作前	13日	感作前	14日	感作前	14日
第2週	15	第1週	20	第2週	20	第2週	18
3	16	2	26	4	32	4	22
4	16	3	27	6	38	6	27
5	15	4	31	9	38	8	32
		7	36	12	100日以上	16	39
		13	29	16	34	20	39
				20	31		
				24	40		
				28	28		
				32	27		
				36	29		

第1項 静注群

a) 1回感作群

1回感作群では吸着後のすべての血清が腫瘍細胞との中和作用を失なっており、感作前の対照との差がみられない。また第1編の非吸着血清の1回群の成績と比べると延命効果の低下を認める。

b) 3回感作群

肝末吸着によりとくに変化したのは1週血清に中和作用の低下がみられる点で、4~7週血清に半数生存日数の延長が著しい。嫌気性解糖実験と同様に中和実験でも1~2週血清では中和作用の低下がみられている。他の週では生存日数の延長がみられた。

γ -Globulin 値と対照してみると、 γ -Globulin の peak は3週にあるが、中和実験ではそれより遅れて7週のものに延命効果の peak が認められる。

c) 6回感作群

6回感作群では、6~24週血清に著明の延命効果を認め、とくに12週では100日の観察期間中1例も腫瘍死しなかつた。初期の2週では感作前の対照よりは生存日数が僅かに延長しているけれども、第1編の非吸着血清における6回感作群の成績と比較すると短縮がみられる。これは3回感作群でも同様である。また γ -Globulin 値の比較的高い4週血清と低い値を示す20週以後とがほぼ等しい延命効果を示している。この成績も嫌気性解糖実験のそれと平行している。なお、中和実験において著明の延命効果の出現する時期は γ -Globulin 値の peak よりも遅れている。

第2項 Adjuvant 群

Adjuvant 群では6週以後20週まで強い半数生存日数の延長がみられ、2週、4週ではその延長が著しくない。16・20週という遅い時期に延長が強くなるのは Adjuvant 剤を用いた場合の特長で、嫌気性解糖実験の結果ともよく平行している。この成績は第1編における非吸着血清の Adjuvant 群の成績とほぼ一致している。

なお、Adjuvant 群の中和実験の成績と γ -Globulin 値とは時期的によく平行している。

第3項 小 括

静注群の1回感作群では全く腫瘍細胞中和作用を失っており、非吸着血清よりもわずかに低下している。3回・6回感作群では吸着前血清と比べて初期血清の半数生存日数が短縮しているのが、特長である。

Adjuvant 群では6週以後20週まで強い延命を認めた。

一般に静注群では、 γ -Globulin 値が最高を示す時期よりも遅い時期に中和実験での延命効果が強くなっている。これに反し、Adjuvant 群では、 γ -Globulin の高い時期と中和実験で強い延命効果がみられる時期とがほぼ一致している。

第4節 腫瘍細胞吸着血清による嫌気性解糖実験

第1項 静注群

抗血清を Ehrlich 腹水腫瘍で吸着した後の抗血清について腫瘍細胞の嫌気性解糖を調べると、

a) 1回感作群は、肝末吸着血清でもすでに嫌気性解糖実験で無効であることから、腫瘍細胞で吸着しても無効なのは明白なので省略した。

b) 3回感作群

3回感作群では、2・3・4・5週血清のみについて施行したが、いずれも嫌気性解糖を全く抑制しない(図5)。

c) 6回感作群

図6に示すように、2・4・6・12・20週のものでも施行したが、4週では腫瘍対照よりも高い値を示し、他の週でも腫瘍対照に比して大差なく、肝末吸着血清と比較すれば明らかに嫌気性解糖抑制作用は失われている。

第2項 Adjuvant 群

4・8・12・20週の各血清を選んで実験に供したが、20週では腫瘍対照よりも高い値を示し、他のものも腫瘍対照とほとんど差がない。嫌気性解糖抑制力

図5 Ehrlich 腫瘍細胞吸着抗血清の腫瘍細胞嫌気性解糖に及ぼす影響 (1)
3回感作群

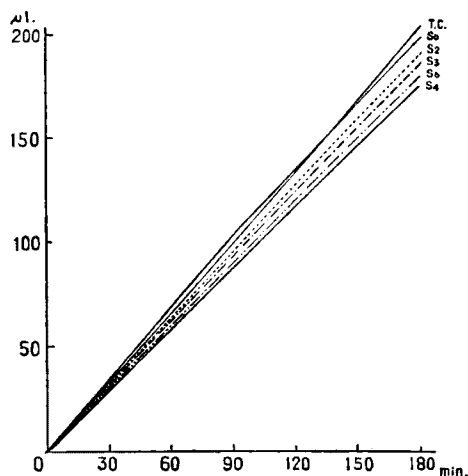
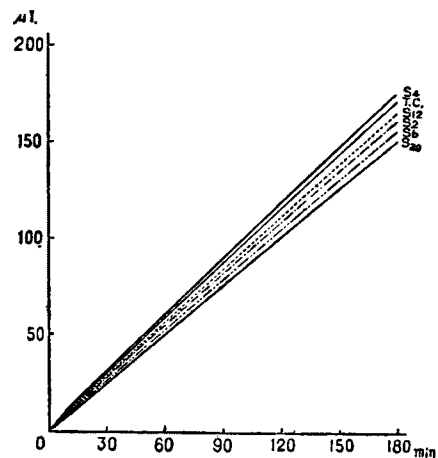


図6 Ehrlich 腫瘍細胞吸着抗血清の腫瘍細胞嫌気性解糖に及ぼす影響 (2)
6回感作群



は完全に消失していることがわかる(図7)。

第3項 小 括

Ehrlich 腫瘍細胞で家兔を感作してえた抗血清を腫瘍細胞(抗原)で吸着して嫌気性解糖実験を行なってみたところ、すべての群で腫瘍細胞の嫌気性解糖を抑制しなかつた。

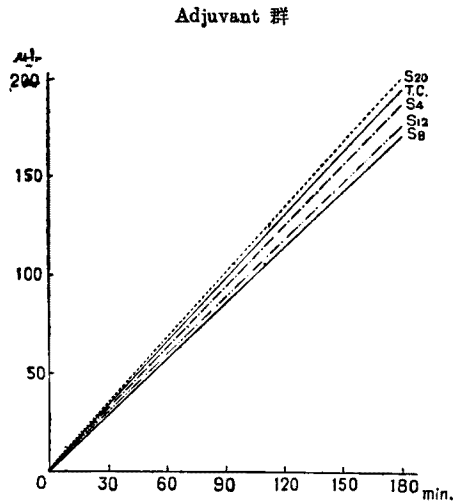
第5節 腫瘍細胞吸着血清による中和実験

第1項 静注群

a) 1回感作群

1回感作群については嫌気性解糖実験と同じ理由

図7 Ehrlich 腫瘍細胞吸着抗血清の腫瘍細胞
嫌気性解糖に及ぼす影響 (3)



で実験を省略した。

b) 3回感作群

3回感作群では、表6にみられるように、各週とも肝末吸着血清でみられた腫瘍細胞中和力を消失し、なかには対照よりも早期に死亡するものもあつた。すなわち対照の半数生存日数14日に対し、2・4週では13日に半数が死亡している。

表6 Ehrlich 腫瘍細胞吸着血清による中和実験

3回感作群		6回感作群		Adjuvant 群	
週	半数生存日数	週	半数生存日数	週	半数生存日数
感作前	14日	感作前	15日	感作前	14日
第2週	13	第2週	14	第2週	14
4	13	4	16	4	15
6	15	6	18	6	13
11	14	9	13	12	17
13	16	12	15	20	15
		20	15		
		32	17		

c) 6回感作群

6回感作群も前者と同じく対照が15日であるのに対し、6週が僅かに18日と長いのみで、肝末吸着血清に比し明らかに腫瘍細胞を中和する力を失なつて

第2項 Adjuvant 群

Adjuvant 群でも静注群と同じ傾向を示し、すべての血清が腫瘍細胞との中和作用を消失している、

第3項 小括

家兔を Ehrlich 腫瘍細胞で感作してえた血清を抗原である腫瘍細胞で吸着すると、その血清は腫瘍細胞を中和する能力を全く失なつてしまうことがわかつた。

第4章 総括ならびに考按

第1編において Ehrlich 腫瘍細胞を抗原として家兔を感作して作つた抗血清が Ehrlich 腫瘍細胞に対し、嫌気性解糖実験と中和実験とで強い抑制効果を示すことを知りえた。しかしこの作用が種特異抗体の作用である可能性も残されていた。そこで本編において肝末で種特異抗体を吸着し、Ehrlich 腫瘍細胞で腫瘍特異抗体を吸着するという2つの操作を行なつたところ、抗血清の腫瘍細胞障害作用の大部分が腫瘍特異抗体によるものであることを証明しえた。

すなわち、肝末吸着血清は感作後初期血清を除き、吸着前の血清と同程度の腫瘍細胞抑制作用を有することがわかり、また腫瘍細胞で吸着すると腫瘍細胞抑制作用が全くなくなることがわかつた。このことから、肝末吸着血清の腫瘍細胞抑制作用は癌特有のすなわち腫瘍細胞特異抗体によるものであると考えられる。

3回以上静注感作群や Adjuvant 群の肝末吸着血清の γ -Globulin 分層は、吸着により減少するが、感作前より依然多く、静注群では感作初期の血清に γ -Globulin の吸着量が多かつた。この事実と、嫌気性解糖実験と中和実験との成績とを考え合わせると、初期血清で吸着されたのは種特異抗体であると考えられる。

静注3回、6回感作群で後期の肝末吸着血清は、 γ -Globulin があまり高くないのに、十分強い腫瘍抑制力を有している。これは腫瘍特異抗体が減量しながらも永続する傾向を有することを示すものであると考えられる。

一方、初期血清が γ -Globulin が多いのに拘らず、肝末で吸着すると腫瘍細胞抑制作用がかなり失なわれながら多少残つているのは、肝末の吸着能が十分とはいえず完全には吸着しえないこともその一因と思われる。しかしまた一方、腫瘍特異抗体が少しずつ産生し始めているのもその一因であろう。Adjuvant 群では、 γ -Globulin 値の上昇時期と嫌気性解糖実験および中和実験における腫瘍細胞抑制作用の上昇時期とが肝末吸着血清でも一致している。

これは、Adjuvant 剤の特長として、抗原が徐々に吸収されるため、種特異抗体も腫瘍特異抗体が出現しはじめる頃にもなお作られているためと考えられる。そのために肝末吸着血清の蛋白分層で γ -Globulin が初期から後期に至るまで同じ程度に吸着されているものと思われる。すなわち Adjuvant 群では種特異抗体も腫瘍特異抗体も徐々に出来、少量の抗原で十分強い腫瘍抑制作用をもつに至り、しかも長く持続することがわかった。

以上のことから、3回または6回静注群では感作後4週頃から腫瘍特異抗体がその作用をあらわしはじめ、Adjuvant 群では6週以後に著明になつてくることがわかった。すなわち、静注群では種特異抗体は早期にできるために、肝末によつてよく吸着され、後期になると種特異抗体が減少して、腫瘍特異抗体が出現して来て、しかもその腫瘍抗体は比較的持続性を有するものであると解釈できる。

一方、免疫血清学の領域では、単一抗原で異種動物を免疫する場合、その抗原中には数種の決定群が含まれているから、その中の主な決定群 (major or dominant determinant group) に対する抗体は早く大量に産生され、免疫操作が長引くと従属的決定群 (minor determinant group) に対する抗体が後から産生せられることがわかつている⁷⁾。

かかる観点から本実験を眺めると、より一層解釈が容易となる。すなわち、Ehrlich 癌細胞中の腫瘍特異抗原はおそらく minor group に属し、種特異抗原は major group に属するであろう。かかる癌細胞で家兎を強力に感作すれば、家兎血清中に初期には大量に種特異抗体が出現するであろうし、後期血清中には腫瘍特異抗体が出現してくるであろう。逆がもし真であるとすれば、本実験の成績から癌細胞中の腫瘍特異抗原は minor group に属し、種特異抗原は major group に入ると推論できることになる。このことは新しい移植癌の多くが、元の宿主と同一の純系動物にのみ移植可能であるという事実、すなわち histocompatibility gene とも関連して興味ある事実である。

Korngold⁹⁾ らは抗血清の腫瘍に特異的な α_2 および γ -Globulin を用いて癌の治療に役立つ可能性を示したが、McCredie²²⁾ らは Walker 256 癌細胞で異種動物を免疫し、その抗血清を吸着して正常組織抗体を除いた α_2 および γ -Globulin を用いて中和実験を施行し、90日間の観察で20匹中12匹に腫瘍移植を抑制することを観察している。感作血清を正常

組織で吸着した後の α_2 および γ -Globulin が癌細胞に対して抑制的に作用するというのは興味ある事実である。

異種動物組織によつて免疫された動物は多種の抗原によつて免疫されており²⁵⁾、あるものは血清蛋白に対する抗体であり、あるものは臓器抗体であり、またあるものは血液型抗原に対する抗体であり、Forsman や Wassermann 抗原に対する抗体である。しかも、その反応の pattern は個々の抗体産生動物により異なるわけである。一方かかる抗血清は臓器特有抗体を探るには役立つとされている²⁵⁾。本実験においては Ehrlich 腫瘍細胞をよく洗浄してから抗原に使用したので、抗原として入つたものは腫瘍特異抗原の他、臓器特異抗原および混入した恐れのある血球などが考えられる。しかし、洗浄により前二者以外は無視しうるものと考えている。

Witebsky ら²⁶⁻²⁸⁾ および Hirsfeld ら²⁹⁻³⁰⁾ は、人悪性腫瘍の家兎抗血清中に Ethanol 可溶性の腫瘍特異抗体が存在している可能性を示唆している。

Rapport ら³¹⁾ は補体結合反応によつて、家兎免疫血清を用いて人間と動物の悪性腫瘍組織を研究した。彼の実験では厳密な意味の腫瘍特異抗原は証明しえなかつたが、癌組織の Lipid が正常組織と違い、これが抗原性を有するのではないかといつている。

Björklund ら³²⁾ は、人癌組織で免疫した馬血清は、培養せる人癌細胞に cytotoxicity を有することを確認している。しかも、その作用は正常人組織で吸着できず、癌組織によつてのみ失なわれたという。この仕事は Goldstein and Hiramoto³³⁾ によつて、正常人組織による免疫血清を対照として用いなかつたことを批判されはしたが、本編における実験を裏付けるものと考えられる。

さらに、吸着実験に関しては、癌組織を用いて異種動物を感作した場合、正常組織抗体も癌細胞に対し cytotoxic action を及ぼすことから、吸着実験の必要性が認められている²³⁾。Pressman ら³⁴⁻³⁶⁾ は放射物質を label した抗体の局在を、抗血清と抗原とが選択的に結合することで観察している。

本編および第1編において実験法に採用した Warburg 検圧計による腫瘍細胞の呼吸や嫌気性解糖に及ぼす影響をみた実験は1926年 Warburg⁽¹¹⁾¹⁶⁻¹⁸⁾ に始まる。その後免疫学的方面に用いた文献としては、Flax⁴⁾ の、抗血清中の γ -Globulin のみを取り出して補体とともに作用させると腫瘍細胞の呼吸抑制を

みること、また Ehrlich 腹水癌細胞から分離した Ribonucleoprotein で感作した抗血清は、Ehrlich 腫瘍細胞の Glycine-2-C¹⁴ の利用を抑制する¹²⁾ というような分析の実験がある。Bickis¹³⁾ も Glycine-1-C¹⁴ を用いて Ehrlich 腫瘍の抗血清が同腫瘍の呼吸と解糖を抑制することを認め、正常血清や非働化血清はむしろ促進的に働くとのべた。このような実験はあるものの、正常組織で吸着して嫌気性解糖実験を試みた実験は見当らない。

抗腫瘍血清による中和実験を検討した文献は数多いが¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾、*in vitro* で腫瘍細胞を incubate することなく腹腔内へ注入して効果をえたという Horn⁶⁾ は Ehrlich 癌の Mitochondria と核に対する抗血清が中和実験で有効であつたといひ、Kalfayan¹⁸⁾、Kidd^ら²⁰⁾ は Brown-Pearce 腫瘍を用いて有効としている。本編におけるごとき cytotoxic effect の腫瘍特異性についてみた実験としては、Imagawa^ら²¹⁾ は mouse mammary tumor に対して調製した抗血清を正常乳腺組織で吸着したのちも中和実験で cytotoxic action があるといつた。Easty³⁾ は Ehrlich 癌細胞に対する抗血清をマウス正常組織で吸着したのちも *in vitro* で強い cytotoxic action を保有するが、吸着前よりも長時間を要し、しかもやや低下しているといつている。Nungester and Fischer⁵⁾ は 6 C₃HED マウスリンパ腺腫の抗体をマウス赤血球で吸着して中和実験を施行し、吸着前と変らぬ効果をえている。

ここに一つ問題となるのは種特異抗体を吸着するための正常組織の選び方であるが、Flax⁴⁾ は Ehrlich 癌に対する家兎血清を凍結乾燥した肝・腎・筋で吸着しており、腎がもつともよく吸着し、肝がこれにつき、筋肉はほとんど吸着能がないといつている。本実験においても、多種の正常組織で完全に種特異抗体・臓器特有抗体を除くための手段を行なうべきであつたと考える。そうすれば、さらに新しい事実が判明したかも知れない。

次に、抗原である Ehrlich 腹水腫瘍細胞で抗血清中の腫瘍特異抗体を吸着した血清では、本実験では腫瘍細胞に対する cytotoxic action を全く認めえなかつた。この際正常組織に対する抗体もある程度吸着されている筈であり、腫瘍細胞に対して全く cytotoxic でなくなるのは当然であろう。以上の事実から、家兎抗血清中に Ehrlich 腫瘍細胞に対する抗体ができていたものといつてよからう。

Miller と Hsu²⁾ は家兎とラットを HeLa 細胞

で感作した抗血清に HeLa 細胞を加えて吸着実験を行ない、吸着後には Precipitin test が陰性となるが、HeLa 細胞に対する cytotoxic action は残っているという。また、Flax⁴⁾ は Ehrlich 癌抗血清の γ -Globulin 分層は凍結乾燥せる Ehrlich 細胞の場合にもつとも強い吸着力を示し、 γ -Globulin の約 60% を吸着するといつている。Ross and Lepow⁸⁾ も、人羊膜細胞で感作して作った抗血清を抗原である羊膜細胞で吸着すると補体結合反応と細胞抑制作用が完全に失なわれることを確認した。これらの事実からみても、本実験において施行した腫瘍細胞吸着実験では腫瘍抗体が腫瘍細胞でよく吸着されたものと考えてよからう。

第5章 結 論

Ehrlich 腹水腫瘍細胞で家兎を感作してえた抗血清を正常マウス肝末または Ehrlich 腹水腫瘍細胞で吸着したものについて、その血清蛋白分層、腫瘍細胞の嫌気性解糖抑制作用および腫瘍細胞との中和実験を施行した結果、次の結論をえた。

1) 肝末吸着による γ -Globulin の吸着量は静注感作後初期血清に多く、後期では少ない。しかも、吸着後の抗血清の γ -Globulin 値は、長期に亘り感作前より高くなつている。

2) 肝末吸着により、嫌気性解糖抑制作用は初期血清では低下するが、その後の血清では低下しない。

3) 肝末吸着血清の中和実験では、初期血清において吸着により延命効果が低下したのを除き、吸着前と変らぬ強い延命効果をみた。

4) Ehrlich 腫瘍細胞で吸着すると、その抗血清は腫瘍細胞の嫌気性解糖抑制作用も、中和実験での延命効果も全く失なわれる。

5) 種特異抗体を吸着する目的で、肝末で吸着した血清は腫瘍細胞に対して、強い抑制効果を有していること、腫瘍特異抗体を吸着する目的で Ehrlich 腫瘍細胞で吸着した血清では、全く腫瘍細胞抑制作用が失なわれることから、腫瘍細胞感作家兎血清は腫瘍特異抗体を含んでいることがわかる。

6) 静注感作の場合では、肝末によつて吸着される γ -Globulin 量は、初期に多く後期に少ないこと、および嫌気性解糖抑制作用と中和実験で初期血清の効力が低下していることから、異種動物を静注感作してえた血清は初期には種特異抗体を多く含み、後期になると腫瘍特異抗体を多く含むものと考えられる。

稿を終るにのぞみ御指導，御校閲を賜わつた陣内教授，および田中助教授に深甚の謝意を表すると

もに，本実験について種々御指導，御援助を賜わつた折田博士に感謝する。

文 献

- 1) Everson Pearce, A. G.: *Histochemistry, theoretical and applied*, 2nd Edition, London, J. and A. Churchill, Ltd.
- 2) Miller, D. G. and Hsu, T. C.: *Cancer Res.*, 16, 306~312, 1956.
- 3) Easty, G. C. and Ambrose, E. J.: *British J. of Cancer*, 11, 287~295, 1957.
- 4) Flax, M. H.: *Cancer Res.*, 16, 774~783, 1956.
- 5) Nungester, W. J. and Fischer, H.: *Cancer Res.*, 14, 284~288, 1954.
- 6) Horn, E. C.: *Cancer Res.*, 16, 595~599, 1956.
- 7) 進藤: *日新医学*, 46, 625~638, 1959.
- 8) Ross, A. and Lepow, I. H.: *J. Exp. Med.* 112, 1085~1106, 1960.
- 9) Korngold, L. and Leewen, G. V.: *Cancer Res.*, 17, 775~779, 1957.
- 10) Björklund, B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 103, 1~4, 1960.
- 11) Warburg, O.: *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, 1926.
- 12) Colton, J. S. et al.: *Cancer Res.*, 17, 272~276, 1957.
- 13) Bickis, I. J. et al.: *Cancer Res.*, 19, 602~607, 1959.
- 14) Umbeit, W. W. et al.: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, 1949.
- 15) Froese, G.: *Biochemica et Biophysica acta*, 57, 509, 1962.
- 16) Warburg, O. and Kubowitz, F.: *Biochem. Z.*, 214, 5~18, 1929.
- 17) Warburg, O.: *Science*, 123, 109~114, 1956.
- 18) Warburg, O.: *Science*, 124, 269~270, 1956.
- 19) Kalfayan, B.: *J. Exp. Med.*, 97, 145~161, 1953.
- 20) Kidd, J. G.: *J. Exp. Med.*, 83, 227~250, 1946.
- 21) Imagawa, D. T. et al.: *Cancer Res.*, 14, 8~11, 1954.
- 22) McCredie, J. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 100, 31, 1959.
- 23) Milgrom, F.: *Cancer Res.*, 21, 862~868, 1961.
- 24) Coons, A. H. et al.: *J. Exp. Med.*, 102, 49~61, 1955.
- 25) Brown, E. R. and Bittner, J. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 106, 303~306, 1961.
- 26) Witebsky, E.: *Klin. Wehnschr.*, 9, 58~63, 1930.
- 27) Witebsky, E. and Morelli, E.: *Ztschr. Immunitäts*, 78, 180~196, 1933.
- 28) Witebsky, E. and Pöplan, P.: *Ztschr. Immunitäts*, 76, 82~109, 1932.
- 29) Hirsfeld, L. et al.: *Ztschr. Immunitäts*, 64, 61~80, 1929.
- 30) Hirsfeld, L. et al.: *Ztschr. Immunitäts*, 64, 81~113, 1929.
- 31) Graf, L. and Rapport, M. H.: *Cancer Res.*, 20, 546~550, 1960.
- 32) Björklund B. et al.: *Intern. Arch. Appl. Immunology*, 12, 241~261, 1958.
- 33) Goldstein, M. N. and Hiramoto, R.: *J. Nat. Cancer. Inst.*, 27, 487~498, 1961.
- 34) Pressman, D. et al.: *Cancer Res.*, 17, 1135~1137, 1957.
- 35) Pressman, D. and Korngold, L.: *Cancer Res.*, 13, 619~623, 1953.
- 36) Pressman, D. et al.: *Intern. Arch. Aller. Appl. Immunology*, 12, 125~136, 1958.

Immunogenic Study in Antitumor Antibody Production against Transplantable Tumors

Part II. Antitumor Antibody in Adsorbed Immunized Rabbit Sera

By

Kiyoshi Takeda

1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Jinnai, D. M.D.)

Rabbits were immunized with Ehrlich ascitic tumor cells and then bled periodically. Following adsorption of the antisera with normal mice liver powder or packed Ehrlich tumor cells, the antisera was examined by electrophoresis, by anaerobic glycolysis by Warburg's manometry and for life prolongation study by neutralization.

1. In case of intravenously immunized rabbits sera, adsorbed γ -Globulin titre was comparably greater in the earlier stage with normal mice liver powder. Furthermore, the titre of γ -Globulin was greater and prolonged than the titre of preimmunization.

2. After adsorption with liver powder, the inhibitory action of antisera on anaerobic glycolysis of tumor cells was weak in the earlier stage, but still retained its former effectiveness in the later stage.

3. In the neutralization tests of adsorbed antisera, life prolongation was noted equally in the initial and later stages, with a decrease in the early period following adsorption.

4. Following adsorption of the antisera with the packed Ehrlich tumor cells, an ineffectiveness was revealed in both anaerobic glycolysis and neutralization.

5. It was deduced through points 2-4, that, the antisera produced in Part-1, immunized with Ehrlich tumor cells, contained antitumor antibody.

6. a) In IV immunized rabbits sera, adsorbed γ -Globulin titre was greater in the early stage.

b) In anaerobic glycolysis and neutralization, the inhibitory action was weaker in the earlier stage.

In supposition, the unadsorbed antisera produced from heterogenically and intravenously immunized animals contains species specific antibody chiefly in the earlier stage with tumor specific antibody chiefly in the later stage.
