ラット膀胱腫瘍抽出物質 LPS, LPI の抗原性について

(培養細胞を用いた細胞障害性試験による検索)

岡山大学泌尿器科学教室 池 紀 征
(主任 新島端夫教授)

TISSUE CULTURE OF BBN INDUCED RAT BLADDER TUMOR AND ANTIGENICITY OF LIPOPROTEINS FROM THE TUMOR

Noriyuki Ike

Department of Urology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. T. Nijima)

Cell lines from BBN induced rat bladder tumor were established and antigenicity of LPS (tumor lipoprotein solubilized in sodium desoxycholate solution and solubilized in NaCl solution) and LPI (NaCl insoluble) was examined by means of the cytotoxicity of sensitized rat lymphoid cells to the tumor cells.

Two cell lines were obtained and named RBC-1 and RBC-11 respectively. Both cell lines showed epithelial growth. Though backtransplantation to the rat was not successful, the cell lines were supposed to have tumorigenicity because they revealed marked pile up and were not contact-inhibited. In this series RBC-1 was used because single cell rate by trypsinization was higher in RBC-1 than in RBC-11.

LPS and LPI were extracted from pooled tumor tissues of several rats and refrigerated at -80°C until use. Immunization to the rat by LPS and LPI with or without Freund's complete adjuvant was done 3 times as a rule, and 10 days after immunization sensitized lymphoid cells were obtained from the spleen and microcytotoxicity test was performed. At the end of the test viable cell number in well was counted and reduction rate was calculated.

The result were: (1) fairly strong cytotoxic effect appeared by the use of adjuvant, (2) cytotoxicity was weak in the single use of LPS and LPI, (3) LPI revealed almost constant cytotoxic effect but LPS not constantly, (4) lymphoid cells from a tumor bearing rat or a rat injected tumor cells intraperitoneally showed significant cytotoxicity, (5) lymphoid cells from tumor bearing ACI/N rat could not reveal cytotoxicity.

In the present study I suppose that both LPS and LPI may have slight antigenicity but more LPS and LPI are needed in order to exhibit cytotoxic effect to the tumor cells. And we must consider the use of inbred animals, the use of transplantable tumor and effect of immunization by the complex of LPS and LPI.

緒 言

腫瘍免疫学は Foley¹⁾ による近交系マウスを使用した Methylcholanthrene 誘発肉腫の同系マウスへの移植実験によつて確立されたと言える²⁾³⁾⁴⁾. Klein らは⁵⁾ 自家系の MC 肉腫で移植能動免疫の成立を証明した. この様な移植実験を用いた腫瘍免疫の研究は数多くなされている.

また In Vitro の実験系も急速に進歩, 増大しつつある.

腫瘍免疫において, 宿主のリンパ系細胞による細胞性免疫が重要であることは動物腫瘍およびヒト腫瘍でも明らかにされている⁶⁾⁷⁾. また抗原刺激を受けた正常リンパ球が, 抗原となつた細胞に対して障害性を持つ感作リンパ球に変換することも証明されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾. この障害

性の機序としてリンパ球の特異的な接着と腫瘍細胞直接破壊作用、エフェクター細胞からの液性抗体の産生、非特異的な細胞障害因子の産生(リンフォトキシン¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾) が考えられている¹³⁾¹⁴⁾。いつばうこれらの免疫反応に関与する腫瘍抗原は腫瘍特異移植抗原として実験腫瘍およびヒトの悪性腫瘍でも In Vitro の検出法で見いだされている¹⁵⁾。

教室では1969年頃から膀胱癌の腫瘍免疫に関する研究に着手し¹⁶⁾、これまでヒトおよびラットの膀胱腫瘍組織から抽出した種々の分画について Ouchterlony 法、蛍光抗体法などを通じて抗原性の有無を検索し学会発表を行つて来たが¹⁷⁾¹⁸⁾、今回はこれらのうち DOC acetone 抽出生理食塩水可溶性リポ蛋白様分画(以下 LPS と略す)および同様抽出生食水不溶性リポ蛋白様分画(以下 LPI と略す)について細胞障害性を用いて抗原性を検討したので報告する。

実験方法

(1) 材料 動物は100~120gの雄 Wistar 系のラットを用い、これに0.05% N-butyl-N-butanol(4)-nitrosamine (BBN)を飲料水に混ぜて17~25週投与し、25~43週に屠殺して得た膀胱腫瘍組織より LPS, LPI を分画し凍結保存して用事融解使用した。

感作リンパ球は、この LPS, LPI で同系のラットを免疫して脾臓より採取した。

標的細胞としては BBN 誘発膀胱腫瘍を組織培養して腫瘍由来細胞を得て実験に供した。

(2) 抗原としての LPS, LPI の分画法¹⁸⁾¹⁹⁾(Fig. 1)

この分画の抽出にあたり、収量を増す為に摘出した腫瘍組織を壊死部分、脂肪などはできるだけ取り去つて-80℃のディープフリーザーに貯蔵し、十分な組織量が得られてからまとめて分画抽出を行つた。抽出方法は倉田氏法の古元変法¹⁹⁾に準じて行つた。まず凍結から融解した腫瘍組織を、ハサミで粥状になるまで細切し、それに等量の蒸留水を加え、グラスホモジナイザーで十分に均一化し、蒸留水を再び等量追加し4℃下に24時間静置し、超遠心分離器で4℃、3000rpm、10分間遠沈する。得られた沈渣に約5倍量の0.5% Sodium desoxycholateを加えてマグネティックスターラーで4℃下24時間攪拌したのち4℃、3000rpm、10分間遠沈する。得られた上清に約10倍量の cold acetone を加え、4℃下12時間静置する。その後5,000rpm、10分間遠沈し、得られた沈渣に0.85%食塩水を約10倍量加えて4℃、10,000rpm、30分間遠沈する。この上清が LPS、沈渣が LPI である。

Fig. 1 Fractionation of LPS and LPI

LPS は蛋白量を蛋白計(日立 PRP-B)で測定し、LPI は重量を測定し生食水浮遊液にして凍結保存した。LPS, LPI の性状については教室の城仙が学会発表¹⁷⁾¹⁸⁾しているが、それによるとヒト膀胱腫瘍からの抽出であるが、(i) LPS は3.12mg/dlの無機燐を、又 LPI は1.2mg/dlのそれを有する脂質性蛋白である。(ii) ultracentrifugation analysis では LPS の沈降係数は2~3 S, LPI は8 Sである。(iii)熱安定性については LPS は60℃30分間の熱処理で特異性を失わない。次にラット膀胱腫瘍からの LPS の免疫学的性状については(i)寒天内反応で正常他臓器に共通性のない対応抗原と1本の沈降線を認める。(ii) LPS について蛍光抗体法を間接法で行うと基底膜およびその間質に蛍光の局在を認めた(Fig. 2)。

(3) 免疫方法

抗原物質で動物を免疫する場合 adjuvant に混ぜて足跡に行うのが最も強い免疫を得られるが²⁰⁾、今回は次の様な免疫方法を取つた。(i) LPS 10mg, LPI 15mg を Freund's complete adjuvant と混ぜて週1回で合計3回免疫する。(ii) adjuvant を加えずに LPS 10mg, LPI 15mg を各々単独で3回免疫する。(iii) adjuvant 病を避ける為にはじめの2回は adjuvant を加え最後1回は

Fig. 3 Preparation of lymphoid cells from spleen

LPS あるいは LPI 単独で3回免疫する。注射部位は背部皮下で左右交互に行つた。LPS は adjuvant との混和は比較的容易であつたが、LPI は混和し難く正確な目的量の注射は困難であつた。

(4) 感作リンパ球 (Fig. 3)

免疫したラットより感作リンパ球として脾細胞を採取して使用した。赤血球の除去とその際にリンパ球に障害を与えないことが重要で Boyle²¹⁾の方法に従つた。まずラットから脾臓を無菌的に切り出し pH 7.2 の PBS (Ca, Mg を含まない)の中でピンセットで圧出し細胞浮遊液を作る。これを #100 のステンレススチールメッシュを通した後、2,000rpm で10分間遠沈し上清を捨て pellet のほぼ9倍容の Tris buffered NH_4Cl を加えて攪拌し室温に約10分間静置する。それを2,000rpm 10分間遠沈し赤血球を除いたあと PBS による洗浄を2回行い再度 #100 のメッシュを通し数を計算し1,000rpm で10分間遠沈したのち数を調整する。この方法で得られる脾細胞は90%以上が単核細胞であり生存率も95%以上であつた。なお培養液は Eagle's MEM に fetal calf serum を20%に添加し streptomycin 100r/ml, peniciline 100units/ml を加えた。

(5) 標的細胞

厳密な意味で腫瘍特異抗原を検索する場合は自家系の実験でなければならない²²⁾。我々の実験系では抗原、標的細胞、感作リンパ球の提供動物が異なり自家系ではない。今回は準備の都合上自家系での実験は施行し得なかつた。標的細胞として同系ラット膀胱腫瘍細胞を用いる

こととして実験を始めた。教室では以前から BBN によるラット膀胱癌の発癌実験を行つているが、この0.05% BBN 飲料水飼育ラットに発生した膀胱腫瘍を組織培養に移して用いた。実験に当り培養の可能性に関して予備実験を行つた。まず初代培養を回転培養管を用いた回転培養と TD-15型培養瓶を使つた静置培養で比較すると組織片の管壁への接着性についても、又遊走して来る細胞の上皮性如何についても特に差はなく、従つて観察に適した TD-15型培養瓶を用いた静置培養を初代培養法として選んだ。培養液に関しては Eagle's MEM と YLE とを比較し MEM で良い増殖を認めた。添加する血清は calf serum と fetal calf serum とを比較し fetal calf serum の方が良く増殖するので、初代培養ではまず calf serum を使い遊走を認めて細胞が広がつて来たら fetal calf serum に変更した。継代に関しては trypsin のみで行う場合と、はじめ EDTA を短時間作用させてから trypsin を用いる場合、それにはじめから trypsin EDTA 混合液を用いる場合を検討し trypsin EDTA 混合液で最も single cell rate が高く viability の点でも特に差はなく継代にはこの混合液を使用することとした。予備実験の培養では、腫瘍がある程度大きく、培養瓶に入れる組織片数が相当ないと成功し難いこと、又初代の遊走がみられて十分 confluent になれば数回の継代は十分可能であることが判明した。又培養の成功をみた例はいづれも上皮性の細胞の遊走および増殖を認め、線維性の増殖は殆んどみられなかつた。

(6) 感作リンパ球の標的細胞障害性試験

Takasugi & Klein²³⁾の microassay 法を用いた。Takasugi らによると感作動物の腹腔細胞、脾細胞、末梢血リンパ球で強い反応を得、リンパ節細胞では弱い反応しか得られなかつたという。そこで我々は比較的容易に大量に集められる脾細胞を選んだのである。勿論脾細胞には T-Cell も多く免疫学的な意義は十分満足させると判断した。

まず標的細胞を micro test plate (Falcon 3034, 1枚の plate に60個の well があり各 well は10 μ l より少し多目の容量を持つ)に well 宛400~500個の細胞を10 μ l マイクロピペット (DADE 社)を使つて植込み5% CO_2 in air の炭酸ガス培養器 (池本製)で37°Cで培養24時間後各 well に細胞が付着していることを確認してリンパ球浮遊液を well に入れ更に72時間培養して、well を洗浄し、無水メタノール固定、Giemsa 染色を施し減少率(%)を求めた。なお減少率は

Fig. 2 免疫蛍光抗体法

a) ラット LPS 免疫家兎抗血清での染色

q) ヒト LPI 免疫家兎抗血清での染色

Fig. 4 (a-d)

a) RBC-I 初代培養 位相差顕微鏡写真10×10

b) 同10×20

c) 同10×10

d) 同10×20

Fig. 5 (a-f)

a) BBN 誘発ラット膀胱腫瘍 (RBC-I の原腫瘍)
H-E 染色10×10

b) 同左10×40

c) RBC-I 2代継代細胞 Giemsa 染色10×10

d) 同左10×40

e) 同上10×40

f) 同上10×40

Fig. 6 (a-f)

a) RBC-I 3代継代細胞 Giemsa 染色 10×10 b) 同左 10×10 c) 同上 10×40 d) 同上 10×40 e) RBC-I 5代継代細胞 Giemsa 染色 10×10 f) 同左 10×40

Fig. 7 (a-h)

a) RBC-I 10代継代細胞 Giemsa 染色10×10

b) 同左10×40

c) RBC-I 11代継代細胞 Giemsa 染色10×10

d) 同左10×40

e) RBC-I 13代継代細胞 H-E 染色10×10

f) 同左10×40

g) PBC-I 14代継代細胞 H.E 染色10×10

h) 同左10×40

$\frac{\text{コントロール生細胞数}-\text{テスト生細胞数}}{\text{コントロール生細胞数}} \times 100$ で計算した、標的細胞植込みに際して注意すべきことは細胞の single cell rate であり、これが低いと植込みにバラつきが生じるので数ヶ以上の細胞塊の多いものなどは実験から除いた。なお1検体につき10 replicates で行つた。

結 果

(1) ラット膀胱腫瘍の組織培養

ヒトおよび実験的膀胱腫瘍の組織培養に関する研究はあまり報告例をみないがヒトでは矢島²⁴⁾ 25) の培養株の樹立の報告、尾関²⁶⁾ 27) の器官培養を用いた観察がある。実験腫瘍では岡島の²⁸⁾ 29) 27-methylcholanthrene および4 Nitroquinoline-N-oxide による発癌と組織培養の研究、Lavin³⁰⁾ らによる N-2-fluorenylacetylamide と pyridoxine 欠乏食による発癌と組織培養の研究があり BBN を用いた報告では Toyoshima³¹⁾ らの報告と移植系、培養系の樹立とそれを用いた抗癌剤スクリーニングの検討を行つた北川³²⁾ の報告をみる。免疫学的な実験としては Daly³³⁾ らは FANFT 誘発の Fischer 系ラット膀胱癌で immunodiffusion と移植実験から、腫瘍特異移植抗原の存在を証明し、また担癌ラットリンパ球が腫瘍細胞に障害性を持つてゐることを示した。そして Bubenik³⁴⁾ らは株細胞を用いて腫瘍特異抗原の検索を行つた。

我々も今回、標的細胞として用いる為にラット膀胱腫瘍の組織培養を行つた。今回の目的は初代培養細胞を実験に供することであるが、将来は cloning によつてできるだけ腫瘍細胞のみを獲得し、LPS, LPI についても大量培養細胞から得る目的をもつて組織培養を開始した。

摘出した腫瘍を約 2 mm³ 大に細切し、培養液(Eagle's MEM, calf serum 10%, streptomycin & penicilline)中

に浮遊させ TD-15型培養瓶に入れ37°Cのフラン器中で静置培養を行う。はじめ浮遊状態であつた腫瘍組織片は瓶底に沈み、付着した一部のものから細胞の遊走が始まる。遊走ははじめ泡沫状の丸い突出部から起り偽足様の突起を出して来て細胞の形に拡がつて来る(Fig. 4-a,b)。遊走が続き広い cell sheet を作るにつれて辺縁部には大型の細胞がならび中心部には大型、小型の細胞が混在している。細胞形は類円形の小型のものから polygonal な大型のものまであり uniform ではなく数種類の細胞の混入を思わせる所見である。しかしいわゆる線維細胞様のものは殆んどなく上皮性の遊走を示している(Fig. 4-c, d)。位相差顕微鏡で細胞質内、特に核の周囲に顆粒を多く認める。2核の細胞も所々にみられる。核小体は2個以上の複数のものが多い。このような細胞の遊走と増殖は続き次第に confluent の状態となる。しかし confluent になる前に死滅するものも多く1回の継代で、また4~5回の継代でなくなることもある。培養液の更新は pH をみながら行う。細胞の増殖によつて異なるが、普通2~3日に1回施行した。細胞障害性試験の為の細胞は、初代培養が適当に増えた時点で継代操作を行つたが、株化の為に十分に、confluent となるのを待つて継代を行う様にした。

現在は我々はもとの腫瘍を異にする2系の細胞株を維持しそれぞれ RBC-I, RBC-II としている。現在 RBC-I は19代 RBC-II は20代継代している。今回の実験には初代培養で増殖の良かった RBC-I を使用した。

RBC-I のもとの腫瘍は transitional cell carcinoma である(Fig. 5-a, b)。これを original とした RBC-I の2代の細胞は中型の polygonal な細胞が主体を成し、小円形で胞体の少ない細胞が混在し、胞体の大きな大型細

胞も少数認める．核小体は2〜3個が主で所々に pile up 像を認める．紡錘型の細胞は殆んどみられない (Fig-5-c,d,e,f)．3代の細胞ではやはり中型のものが主であるがこれに大型の細胞が混在し，小円形のは pile up 部や，密集部分に限られる．核小体は1〜2個が主である (Fig. 6-a,b,c,d)．5代の細胞を confluent 以上に培養すると小形の細胞が密に増殖し著明な pile up を認める (Fig. 6-e,f)．継代を進めるにつれて中型細胞が主となり培養を続けると次第に密に重なり合つて細胞は小形となる． (Fig. 7-a-h)．増殖曲線は1代の細胞では変動を認めるが，11代，21代の細胞では比較的緩徐とはいえ，かなり安定してきている (Fig. 8) 以上形態学的観察について述べた．培養細胞の腫瘍性については検索中である．

(2) 感作リンパ球標的細胞障害性試験

免疫方法，回数などの差により4群に分けて述べる．

i) 第1群 Freund's complete adjuvant 加 LPS 2.4 mg で週1回，合計2回免疫したラットの感作リンパ球の障害性試験 (Table 1)．コントロールとして非処理ラット adjuvant のみ注射したラット，担癌ラットのリンパ球を使用した．

effector cell/target cell 比は250：1である．結果は非処理ラットで15.8%，LPS 免疫ラットで49.0%，adjuvant 注射ラットで53.1%，担癌ラットで81.8%の減少率を得た．P検定では LPS 免疫，adjuvant 注射および担癌ラットに有意差を認めている．しかし LPS と adjuvant の間には有意差は認められなかつた．

ii) 第2群 LPS 10mg, LPI 15mg を各々単独で週1回合計3回免疫したラットリンパ球の障害性試験 (Table 2)．コントロールとして非処理ラット，Wistar 系担癌ラット，ACI/N 系担癌ラットのリンパ球を使用した．effector cell/target cell 比は 250：1である．

Fig. 8 Growth Curve of RBC-I

Fig 8

結果は非処理ラットで7.1%，LPS 単独免疫ラットで18.6%，LPI 単独免疫ラットで16.7%，Wistar 系担癌ラットで52.2%，ACI/N 系担癌ラットで1.9%の減少率を得た．P検定では担癌ラットにおいて有意差を認めた．しかし LPS, LPI では有意差は示し得なかつた．

iii) 第3群は第2群で effector cell/target cell 比を50：1とした場合である (Table 3)．コントロールは同じである．結果は正常ラットで−15%，LPS 免疫ラットで−20%，LPI 免疫ラットで−19.3%，担癌ラットで5.9%，ACI/N 系担癌ラットで−5.3%を得た．しかし P検定では有意差は認められなかつた．

iv) 第4群 LPS 10mg, LPI 15mg をはじめ2回はAdj.を加え，最終回はAdj.を加えずに免疫したラットリンパ球の障害性試験 (Table 4)．コントロールとして

Table 1

	Viable cell number	SD	Reduction Rate
Control	485	283	
Non-immunized rat	408	101	15.8 NS
Immunized by LPS + Adj 3 times	247	82	49.0 P< 0.01
Adj injected	227	47	53.1 P< 0.01
Tumor bearing rat	88	22	88.1 P< 0.01

(Effector cell : target cell = 250:1)

Table 2

	Viable cell number	SD	Reduction Rate
Control	519	86	
Non-immunized rat	482	74	7.1 NS
Immunized by LPS only 3 times	422	66	18.6 NS
Immunized by LPI only 3 times	432	86	16.7 NS
Tumor bearing rat	248	55	52.2 P<0.01
Tumor bearing ACI/N rat	509	70	1.9 NS

(Effector cell: Target cell = 250:1)

Table 3

	Viable cell number	SD	Reduction Rate
Control	336	78	
Non-immunized rat	387	59	- 15.0 NS
Immunized by LPS only 3 times	406	69	- 20.0 NS
Immunized by LPI only 3 times	401	94	- 19.3 NS
Tumor bearing rat	316	74	5.9 NS
Tumor bearing ACI/N rat	354	53	- 5.3 NS

(Effector cell: Target cell = 50:1)

正常ラット, Adj. のみ注射したラット, 標的細胞と同じ株細胞を 10^8 個単独無処理で1回腹腔内に注入したラットのリンパ球を【使用した. effector cell/target cell 比は50:1である. 結果は正常ラットで3.0%, LPS 免疫ラットで-2.3%, LPI 免疫ラットで25.8%, Adj. のみ注射したラットで18.1%, 10^8 個生細胞注入ラットで47.4%の減少率を得た. なお生細胞腹腔内注入ラットに腫瘍形成はみとめられてない. P検定では LPI 免疫ラットおよび腫瘍細胞注入ラットに有意差を認めた. しかし LPI と Adj. 及び LPI と正常ラットの間には検定上は有意差を認めなかつた.

考 察

腫瘍免疫学の発端として, 宿主-腫瘍関係について Foley¹⁾は近交系マウスの Methylcholanthrene 誘発腫瘍を用いて, 腫瘍特異的移植抵抗性を立証し, Klein⁵⁾らは近交系マウスの MC 腫瘍で, 発癌個体が自家癌に移植抵抗性を持つこと, その反応が individually specific であること, その抵抗性がリンパ球にあることを明らかにしている. また武田ら^{35)~37)}, 山脇³⁸⁾は近交系ラットの MC 肉腫を使つて移植抵抗性, 抗原性の強さの多様性, 抗原特異性が共通性を示し難いことを明らかにした. こ

Table 4

	Viable cell number	SD	Reduction Rate
Control	732	119	
Non-immunized rat	710	62	3.0 NS
Immunized by LPS + Adj 2 times LPS only 1 time	749	118	- 2.3 NS
Immunized by LPI + Adj 2 times LPI only 1 time	543	97	25.8 P<0.05
Adj injected	599	50	18.1 NS
Non-treated tumor cell injected	385	48	47.4 P<0.01

(Effector cell: Target cell = 50:1)

の様に宿主-腫瘍の関係から腫瘍特異移植抗原 (TSTA) の存在が明らかにされた^{2) 39)~43)}.

宿主に対して自家又は同系移植された腫瘍が拒絶された場合, これに関与する抗原は TSTA であるが, この抗腫瘍抵抗性には細胞性免疫が関与している. そして特異的免疫による腫瘍細胞の破壊が最も大きな要因として考えられ, その最も直接的な機序は effector 細胞としての T細胞による target 細胞の破壊であると言われる^{22) 37) 44)}.

膀胱腫瘍についての腫瘍免疫学的研究は, 我々の教室

においてその研究の緒についた¹⁶⁾ 1969年頃までは殆んど皆無であつたが、その後 Bubenik^{(45) (46)}ら、O'Toole⁽⁴⁷⁾は膀胱癌患者のリンパ球が自家腫瘍細胞に対して障害性を示すといい、Taranger⁽⁴⁸⁾らは MC 誘発のラットおよびマウス膀胱癌でこれを認めて報告した。これらリンパ球の示す細胞障害性試験には Takasugi⁽²³⁾らによつて報告された Microassay 法が用いられている。

次に正常なリンパ球が抗原刺激を受けて感作リンパ球となり細胞破壊作用を持つことは Govaerts⁽⁹⁾, Koprowski & Fernandes⁽⁵⁰⁾, Rosenau⁽⁵¹⁾らによつて示され in vitro でも正常リンパ球の感作リンパ球への変換が証明されている^{7) (9)}。TSTA に対する感作リンパ球も同種移植抗原の場合と同様に in vitro で正常リンパ球から出現させることが証明されている⁵²⁾。

感作リンパ球の標的細胞障害性は直接的には化学的媒介因子が予想され⁵²⁾、その因子として Mackler によると (1) Transfer factor (2) Mitogenic factor (3) Migration inhibition factor (4) Lymphotoxin (5) Inflammatory factor が想定されている。しかし Lymphotoxin については否定的意見^{(54) (55)}もあり現在のところ不明である⁵⁶⁾。

著者の教室では膀胱癌における腫瘍抗原性の検索を 1968年以来続けて来たが、特に腫瘍組織を細分し、LPS, LPI, ミトコンドリア分画, B₅, B₆ 分画に分け、それぞれの分画について検討中である。著者は LPS, LPI に関して広義の腫瘍特異抗原に関与するか否かを検索する方法として感作リンパ球の標的細胞障害試験を取り上げ検討した訳である。免疫方法、回数などを変えて現在まで上記 4 群の試験を行つた。まず Adj. 加, LPS, LPI 免疫群の第 1 群では担癌ラットリンパ球に最も強い障害性を認め、Adj. および Adj.+LPS にもこれを認めた。ここで Adj. と Adj.+LPS に差がないこと、しかも Adj. の方が有意ではないがむしろ高いことは LPS に免疫原性がないか極めて弱いことを示唆していると解される。

次に LPS, LPI 単独免疫群の第 2 群では、やはり担癌ラットリンパ球に最も強い障害性を認め、次いで LPS, LPI となつている。第一群との差は軽度ながら LPS に免疫原性を認めたことである。また LPI にも LPS と同程度の障害性が認められた。しかし P 検定では、担癌ラット以外は有意差とならず、誤差範囲という結果であつた。従つてテクニカルな問題、非特異的な免疫反応の問題を考慮しなければならない。

effector cell/target cell 比が 50 : 1 の第 3 群では

LPS, LPI の免疫で全く障害性を認めていない。この比に関しては、mastocytoma⁽⁵⁷⁾、白血病細胞^{(58) (59)}、吉田肉腫⁽⁶⁰⁾などは 1 : 1 でも 24 時間で完全破壊がみられ 5 : 1 以上になると数時間で終結する場合もあるという。しかし肝細胞、MC 肉腫などは感受性が低⁽⁵²⁾いという。橋本⁽⁶¹⁾はラット膀胱癌で 100 : 1 の比で十分な障害性を得ている。しかし Taranger⁽⁴⁸⁾らはラットおよびマウスの膀胱癌で 2000 : 1 でも障害性を表わさないこともあると指摘している。実験系の相違、抗原性の強さで十分変り得る点を考慮する必要がある。

第 4 群では LPI+Adj. に障害性を認め、しかも、P 検定では有意差がないとはいえ、Adj. 単独の場合よりも高い障害性を示している。この実験では effector cell/target cell 比は 50 : 1 であるが Adj. 加である点が第 3 群と異なる。第 3 群では障害性を示さなかつたのに今回出現した点については、Adj. の添加の影響とみるか、target cell の感受性が同一細胞を用いても実験系が異なれば、変化する為に定量的に比較することが困難である⁽⁶²⁾という点に帰するか考慮すべき点である。次に第 4 群では 10⁸個の無処理生細胞の注入で最も強い障害性を得ている。

以上の 4 群の成績から、抗原性が低いと言われる腫瘍抗原で免疫しようとする場合、やはり、whole cell 又は分画物質複合体を用いた場合が、抽出物質を使うよりも強い免疫原性を示す事を予想し得たが LPS に反応を殆んど認めなかつた点が effector cell/target cell 比の問題であるが、テクニカルな問題であるか、速断はし得ない。

以上より LPS, LPI に関して次のことが指摘できると思う。LPS の抗原性については腫瘍関連抗原である可能性は認め得るが、免疫学的な活性については、ないか極めて弱い。LPI は感作リンパ球に軽度ながら細胞障害性を持たせ得る抗原性を有していると予想できる。但し免疫量、回数に関して、腫瘍細胞やホモジネートによる免疫効果と同等の効果を得る為には今回の免疫量では不十分と考えられる。従つて投与法の再検討が必要である。

前述した様に腫瘍特異抗原という場合は、自家癌について考えなければならないが、これを用いた免疫療法となると実際にはあまりにも問題が多く、非常に困難である。我々の終局的な目的は腫瘍をバラバラにし癌細胞としては意味のない幾つかの分画に抽出しそれらの中から活性物質を求めるか、又は分画を混合したものにそれを

求めるかして臨床に結びつけんとする事である。本実験はその為の動物実験の初歩の段階であるが、既に抽出分画を得る為に多数のラットが必要であり従つて多数のラットの抗原物質が混入するという問題をかかえている。一般に化学誘発癌の抗原性は individually specific で共通抗原性がないとされている^{6) 39) 42)}。ヒト腫瘍の場合、同じ組織から発生するものは cross react するが組織が異れば cross react しないという^{15) 63) 64)}。Bubenik^{45) 46)}ら、O'Toole⁴⁷⁾らは、ヒト膀胱癌で広く腫瘍間に共通抗原の存在を指摘している。しかし Lewis⁶⁵⁾らは malignant Lymphoma で cytotoxic antibody が自家腫瘍としか反応しないと云っている。そして橋本⁶¹⁾は BBN 誘発ラット膀胱癌で同系ラット間に腫瘍特異抗原が、腫瘍拒否関連抗原としては認められなかつたと結論している。逆に Taranger らは MC 誘発ラット、マウスの膀胱腫瘍で共通抗原性を認めている。この様に実験的膀胱腫瘍では共通抗原の存在に関しては定説のない状態である。

我々の実験は autochthonous な実験系ではなく、しかも免疫に用いたのは抽出分画である。一般に癌細胞の抗原性は非常に弱く、抽出などの操作で容易に消失する可能性があることを考えれば、癌特異抗原による免疫成立の結果生ずる障害性の有無、共通抗原の存在の有無、組織適合抗原の関与などの判断は非常に難しい。しかし Wistar 系ラットと ACI/N 系ラットの間には cross react していないと言える。共通抗原の探索には、個々の単独の実験系を組み合せて cross react させなければならないから、以後考慮しなければならないが、著者の成績は少くもこれらの問題点を越えて明らかな活性をもたらす程の抗原活性を LPS, LPI 個々の分画に見出し得なかつたという事になる。

今回我々は動物として in bred でない Wistar 系ラットを使用し、標的細胞には初代培養細胞を用いたが、今後の課題として免疫量の検討 in bred 動物の使用、株細胞できれば cloning による細胞を用いること、移植系腫瘍の使用など条件を改良して更に検討したい。

結 語

我々はこれまで学会で報告して来た膀胱腫瘍抽出分画である LPS (DOC-Acetone 抽出、生食可溶性リボプロティン)、LPI (DOC-Acetone 抽出、生食不溶性リボプロティン) の抗原性に関して、組織培養で得られた膀胱癌由来細胞を用いて、LPS, LPI 感作リンパ球の細胞障害性試験を行つた。

まず腫瘍由来細胞として BBN 誘発 Wistar 系ラット

膀胱癌より RBC-I, RBC-II の 2 系の細胞が得られ、trypsin EDTA 混合液で single cell rate の高い RBC-I を実験に用いた。この細胞は培養初期には大中小型の 3 種の大きさの上皮性細胞の混合せる単層を形成していたが 14 代継代のものでは中型の胞体が小さく核の大きな細胞が密な単層を作る。腫瘍性については現在検索中であるが contact inhibition がわからず著明な pile up を示す点、又継代時細胞の生着が良いなど悪性細胞の性質を持つていると思われる。

LPS, LPI で免疫を行い、得られた感作リンパ球の標的細胞障害性試験では Adjuvant 加の免疫において最も強い細胞障害性がみられたが、単独の免疫でも軽度ながら障害性を認めた。LPI は割に安定した障害性を示すが LPS は不安定である。同系担癌ラット、10⁸個細胞注入ラットでは常に有意差をもつて障害性を示したが、ACI/N 系担癌ラットでは認められなかつた。

LPS, LPI は単独ではいずれも免疫原性は弱く、現在の免疫量では十分でなく、もつと大量を必要とするか、更には混合物質として検討してみる要があり、いうまでもなく今後も近交系動物を得、又移植系腫瘍を用いるなど条件を変更して検索を進めねばならない。

(稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜つた新島端夫教授に深謝致します。また組織培養の指導を頂いた本学癌源病理佐藤二郎教授に厚く御礼申し上げます。)

文 献

- 1) Foley, E.J.: Cancer Res., **13**, 835, 1953.
- 2) Old, L.J. and Boyse, E.A.: Ann. Rev. Med., **15**, 167, 1964.
- 3) Klein, G.: Cancer Res, **28**, 625, 1968.
- 4) 青木忠夫, 橋本嘉幸: 腫瘍免疫学 P 14, 新宿書房, 東京, 1972.
- 5) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E. and Hellström, K.E.: Cancer Res., **20**, 1561, 1960.
- 6) Hellström, K.E. and Hellström, I.: Adv. Cancer Res., **12**, 167, 1969.
- 7) Wagner, H., Feldmann, M., Boyle, W. and Scradar, J.W.: J. Exp. Med., **136**, 331, 1972.
- 8) Wagner, H. and Feldmann, M.: Cell. Immunol., **3**, 405, 1972.
- 9) Wagner, H., Harris, A.W. and Feldmann, M.: Cell. Immunol., **4**, 39, 1972.
- 10) Granger, G.A. and Kolb, W.P.: J. Immunol., **101**, 111, 1968.
- 11) Kikuchi, K., Reiner, J. and Southam, C.M.: Science, **165**, 77, 1969.
- 12) Kikuchi, K., Reiner, J. and Southam, C.M.:

- Acta. Path. Jap., **19**, 433, 1969.
- 13) 菊池浩吉：腫瘍免疫学 P 193, 朝倉書店, 東京, 1974.
 - 14) 菊池浩吉：総合臨床, **22**, 2146, 1973.
 - 15) Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E. and Yang, J.P.S.: Nature, **220**, 1352, 1968.
 - 16) 新島端夫：西日泌尿, **31**, 154, 1969.
 - 17) 城仙泰一郎, 花房捷夫, 新島端夫：日泌尿会誌, **60**, 874, 1969.
 - 18) 城仙泰一郎, 新島端夫：日泌尿会誌, **61**, 890, 1970.
 - 19) Komoto, A.: Jap. J. Dermatol., Series B, **157**, 1970.
 - 20) 秋山竹久, 山浦 昇, 内山竹彦：臨床免疫, **4**, 293, 1972.
 - 21) Boyle, W.: Transplantation, **6**, 761, 1968.
 - 22) 菊池浩吉, 石井良文：臨床免疫, **6**, 913, 1974.
 - 23) Takasugi, M. and Klein, E.: Transplantation, **9**, 219, 1970.
 - 24) 矢島暎夫：日泌尿会誌, **59**, 128, 1968.
 - 25) 矢島暎夫：日泌尿会誌, **61**, 805, 1970.
 - 26) 尾関全彦：日泌尿会誌, **59**, 425, 1968.
 - 27) 尾関全彦：日泌尿会誌, **61**, 551, 1970.
 - 28) 岡島英五郎：奈良医誌, **15**, 1, 1964.
 - 29) 岡島英五郎：奈良医誌, **15**, 21, 1964.
 - 30) Lavin, P. and Koss, L.G.: J. Nat. Cancer Inst., **46**, 597, 1971.
 - 31) Toyoshima, K., Ito, N., Hiasa, Y., Kamamoto, Y. and Makiura, S.: J. Nat. Cancer Inst., **47**, 979, 1971.
 - 32) 北川恒代：癌と化学療法, **2**, 985, 1975.
 - 33) Daly, J.J., Prout, G.G. Jr. and Ahl, C.A.: J. Urol., **109**, 253, 1973.
 - 34) Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkoba, J., Sainerova, H. and Donner, J.: Int. J. Cancer, **11**, 765, 1973.
 - 35) 武田勝男：日本臨床, **18**, 2369, 1960.
 - 36) Takeda, K., Aizawa, M., Kikuchi, Y., Yamazaki, S. and Nakamura, K.: Gann, **57**, 221, 1966.
 - 37) Takeda, K. and Aizawa, M.: Specific Tumor Antigens, **2**, 172, Munksgaard, Copenhagen, 1967.
 - 38) 山脇慎也：癌の免疫病理, **3**, 17, 1967.
 - 39) Klein, G.: Ann. Rev. Microbiol., **20**, 223, 1966.
 - 40) Southam, C.M.: Cancer Res., **20**, 271, 1960.
 - 41) Southam, C.M.: Progr. Exp. Tumor. Res., **9**, 1, 1967.
 - 42) Sjögren, H.O.: Progr. Exp. Tumor. Res., **6**, 289, 1965.
 - 43) Prehn, R.T. and Main, J.M.: J. Nat. Cancer Inst., **18**, 769, 1957.
 - 44) Plata, F., Gomard, E., Leclerc, J.C. and Levy, J.P.: J. Immunol., **111**, 667, 1973.
 - 45) Bubenik, J., Perlmann, P., Helmstein, K. and Moberger, G.: Int. J. Cancer, **5**, 39, 1970.
 - 46) Bubenik, J., Perlmann, P., Helmstein, K. and Moberger, G.: Int. J. Cancer, **5**, 310, 1970.
 - 47) O'Toole, C. and Perlmann, P.: Lancet, **1**, 1085, 1973.
 - 48) Taranger, L.A., Chapman, W.H., Hellström, I. and Hellström, K.E.: Science, **176**, 1337, 1972.
 - 49) Govaerts, A.: J. Immunol., **85**, 516, 1960.
 - 50) Koprowski, H. and Fernandes, M.V.: J. Exp. Med., **116**, 467, 1962.
 - 51) Rosenau, W. and Moon, H.D.: J. Nat. Cancer Inst., **27**, 471, 1961.
 - 52) 橋本嘉幸：蛋白質, 核酸, 酵素, **18**, 308, 1973.
 - 53) Mackler, B.F.: Lancet, **2**, 297, 1971.
 - 54) Peter, J.B., Stratton, J.A., Stempel, K.E., Yu, D. and Cardin, C.: J. Immunol., **111**, 770, 1973.
 - 55) Liske, R.: Nature New Biol., **244**, 133, 1973.
 - 56) 橋本嘉幸, 北川恒代：蛋白質, 核酸, 酵素, **19**, 907, 1974.
 - 57) Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.-C. and Chapius, B.: Immunology, **14**, 181, 1968.
 - 58) Canty, T.G. and Wunderlich, J.R.: J. Nat. Cancer Inst., **45**, 761, 1970.
 - 59) Hashimoto, Y. and Sudo, H.: Gann, **62**, 139, 1971.
 - 60) Hashimoto, Y. and Sudo, H.: Gann, **59**, 7, 1968.
 - 61) 橋本嘉幸：医学のあゆみ, **91**, 378, 1974.
 - 62) Perlmann, P. and Holm, G.: Adv. Immunol., **11**, 117, 1969.
 - 63) Klein, G., Clifford, P., Klein, E. and Stjernsward, J.: Proc. N.A.S., **55**, 1628, 1966.
 - 64) Morton, D.: Science, **162**, 1279, 1968.
 - 65) Lewis, M.G., Ikonopisov, R.L., Nairn, R.C., Phillips, T.M., Fairley, G.H., Bodenham, D.C. and Alexander, P.: Brit. Med. J., **6**, 547, 1966.

(1976年3月29日受付)