放射線による癌抗原様因子の誘導とその感作 リンパ球による抗癌作用について

阿 部 政 雄

群馬大学医学部放射線医学教室 (主任 戸部龍夫教授)

I 緒 言

ガン患者の治療は外科的、放射線の及び化学療法的治療法が用いられ、それ等の組合せ等の工夫により少しずつ進歩してきている¹⁻³⁾。しかし、一部のガンを除いては手術不能ガンに対する根治療法は尚多くの困難さを思わせる。

放射線による治療法は種々の高エネルギー療法の導入、及び照射法の改良により最近かなりの効果が期待されるようになったが⁴⁾、治療中におけるガンの転移巣の発現を含めて、全身性のガンに対しては期待される効果はない。

我々は放射線によるガンの局所的治療法とともに、免疫活性を賦与することにより、宿主に抗ガン力を誘起させる方法を併用し、ガンに対する治療法を改善しようとして、この研究を企画した。ガンの免疫学的研究には、多くの優れたものがあるが⁵⁻⁹⁾、ヒトのガンに対する免疫反応の応用には尚多くの疑問が残されている¹⁰⁻¹⁷⁾。

従来ガン組織を用いてガン患者にワクチン療法を試みた研究はことごとく失敗した。その原因の一つは、感染症の場合と異なり、ガン患者の生体反応の欠落の一つに、ガン抗原又はガン組織に対する免疫担当細胞の認識反応が低下していることによる、と考えられる¹⁸⁾。

著者等は生体外において、ガン感作球をつくり、それを患者に投与することにより、この問題を解決しようとした。種々の検討の結果、*in vitro*においてX線を照射されたガンの組織培養液中に感作源因子が遊離されること、及びそれを用いて異種、同種又は同系宿主のマクロファージを試験管内で感作することが出来、更にこの感作マクロファージと正常リンパ節細胞を混合培養することにより、正常リンパ節細胞にガン細胞の*in vitro*増殖を抑制する抗ガン力を獲得させることに成功した¹⁸⁾²⁶⁾。

ここでは、放射線によって誘起される抗原様因子の誘発条件、及びその特異性について記述し、併せてそれによって感作されたリンパ節細胞とX線照射を用いたC3H/Heマウス乳ガンに対する治療効果について報告する。

II 実験材料及び実験方法

動 物

呑竜ラット：関東医学動物飼育所（以下関医動と略す）飼育の体重 100 ± 10 gの近親交配ラットを性を問わず使用した。吉田肉腫細胞は、東京・佐々木研究所より提供された吉田肉腫 10^7 個を 0.1 ml にして呑竜ラット腹腔中に注射することにより、移植継代したものを使用した。

C3H/He系マウス：関医動飼育生後6～7週令の体重 $15 \sim 20$ gの近親交配マウスを性を問わず使用した。C3H/He系マウス乳癌は、関医動で飼育中のC3H/He系マウスに自然発生した乳癌又は、それを同系マウスの大腿筋肉に初代移植した担癌マウスより得たものを使用した。

培養腫瘍細胞

吉田肉腫：吉田肉腫を移植されているラットを断頭により斃死させ、その腹腔を冷却したヘパリン加リン酸緩衝液（以下Hep-PBSと略す）の入った注射器で洗い、細胞浮遊液を得た。その細胞浮遊液を $1,500$ rpm 5分間遠心洗浄後、培養液で 10^5 / ml の濃度に調整して培養した。12時間培養後、細胞増殖をはじめたものを実験に使用した。

C3H/He系マウス乳癌：自然発生した乳癌を採取し、冷却したリン酸緩衝液（以下PBSと略す）に浸した茶こしの上で押しつぶし、細胞浮遊液を得た。その細胞浮遊液を $1,200$ rpm, 5分間遠心し細胞を集め、培養液で 10^7 / ml の濃度に調整して培養した。培養後ほぼ7日で単層に増殖したものを実験に使用した。

C3H/He系マウス腎細胞：6週令のC3H/He系

マウスより腎を採り、冷 PBS 中にてハサミで細片にし、トリプシンで消化し、細胞浮遊液を得た。7 日間培養液の交換を行わずに、培養し、増殖して来た細胞を 3 日毎に継代し実験に使用した。この細胞は、培養により増殖細胞に変わったものと考えられる。

抗腫瘍性因子産生細胞

骨髓細胞：呑竜ラットを断頭により斃死させ、四肢を露出し、骨を採り、冷 PBS 中にて骨より筋、腱をとり除き、冷 Hep-PBS 中にて骨をくだき、数回洗浄しその液中に骨髓細胞を得た。骨髓細胞を含む細胞浮遊液を 1,500rpm, 5 分間遠心洗浄後、培養液で $10^7/ml$ の濃度に調整し培養した。1 日培養後、培養液を交換し、末梢血球をすて去り、実験に使用した。

マクロファージ：C3H/He 系マウスの腹腔中に、3%濃粉生食水を 1 ml 注射した。4~5 日後、そのマウスを斃死させ、冷 Hep-PBS を腹腔内に注入した。腹部をマッサージした後、マクロファージを含む細胞浮遊液を注射器で採取した。この細胞浮遊液を 1,500rpm, 5 分間遠心洗浄後、培養液で $1.5 \times 10^6/ml$ の濃度に調整して培養した。感作する際には、リンパ球を除くために、2 日間培養後、培養液を交換し、マクロファージとして使用した。

リンパ球：C3H/He 系マウスの腸間膜リンパ節、鼠径リンパ節及び腋窩リンパ節を採取し、冷 Hep-PBS に浸した茶こしの上で押しつぶし、細胞をばらばらにしてリンパ節細胞浮遊液を作り、冷 Hep-PBS で遠心洗浄後、培養液で $2 \times 10^7/ml$ の濃度に調整して培養した。

組織培養法

採取した細胞の培養は、佐藤¹⁸⁾、仁尾²⁶⁾の報告と同じ方法で行なった。すなわち、培養液は日水製薬の Eagle MEM 培地に、20%の割合に、牛血清を加えたものを使用し、5%CO₂培養器中にて培養した。細胞を継代する際には、0.05%トリプシン (NBC) を使用し、組織の消化には、0.2%トリプシンを使用した。

感作方法

感作源を得るために、 $10^5/ml$ の濃度で、あらかじめ培養された吉田肉腫細胞を、X線深部治療装置 (東芝 KXC-18 型深部照射装置, 180KVP, 15mA, 2mmAl, 距離18cm, 10cmφ, 324R/min) を用いて照射した。照射線量は、250R, 500R, 1,000R, 2,000R, 4,000R, 6,000R, 10,000R の各線量である。照射16時間培養後、3,000rpm., 5分間遠心し、

その上清を感作源として用いた。感作方法は、上記の感作源に50%の割合の正常培養液を加え、あらかじめ培養中の骨髓細胞に加え、3日間培養した。

培養中のC3H/He 系マウス乳癌細胞を2日おきに3,000R ずつ2回照射し、照射24時間後、1,500rpm, 5分遠心し、その上清を感作源として用いた。感作方法は、前記と同様、感作源に50%の割合で正常培養液を加え、マクロファージに添加し7日間培養した。リンパ球の感作方法は、前記により感作されたマクロファージに10~20倍量の正常リンパ球を加えて24時間培養した。腎由来の細胞より感作源を得る方法も全く同様である。

抗腫瘍性判定法

前記の方法で感作した骨髓細胞をトリプシン処理により集め、感作細胞、非感作細胞、正常液を培養吉田肉腫細胞に加え、それぞれの吉田肉腫に対する影響を検討した。24時間ごとに、培養時、培養1日、2日、3日の各日3本の培養ビンを取り、細胞数を血算盤にて算定し判定した。C3H/He 系マウス乳癌の場合もほぼ同様な方法で行なった。一定の増殖をしている培養細胞に、感作リンパ球、非感作リンパ球及び正常培養液を加え培養した。培養4日、7日、10日後に3本の培養ビンを取り、トリプシン処理により細胞を集め血算盤にて細胞数を算定し、リンパ球の効果を判定した。

C3H/He 系マウス乳癌腫瘍に対する放射線および感作リンパ球の効果判定法

原発乳癌を C3H/He 系マウス大腿に 5×10^6 個を移植し、約1カ月後、その腫瘍径がほぼ10mmに達したとき実験に使用した。1群を10匹とし、無処理群：200R, 5回照射群：200R, 5回照射と非感作リンパ球併用群：200R, 5回照射と感作リンパ球併用群の4群にわけ、実験を行なった。照射法は、上記の深部治療装置(180KVP, 20mA, 0.5mmCu+0.5mmAl, 330R/min)を用い、マウスの全身を鉛で保護し、腫瘍を有する大腿のみ露出して行なった。照射群には、連日200R, 5回照射を行ない、リンパ球併用群では上記リンパ球を1匹に対し、 10^7 個ずつ、1週間おきに2回経静脈にて投与した。腫瘍に対する効果は、定期的に腫瘍の径を測定し、腫瘍径の増加の平均をもって判定した。

Ⅲ 結 果

(1) 吉田肉腫細胞のin vitro における線量効果曲線：

$10^5/ml$ の濃度で吉田肉腫細胞を培養しておき、250R, 500R照射し、24時間ごとにその細胞数を測定した。細胞増殖が半対数グラフ上でほぼ直線になったとき、照射時点まで外挿し照射時点の生存細胞数を取り、その感受性を検討した。図1に示すごとく、ヒット数 $m=6.2$, $D_0=106R$ であった。

図1 吉田肉腫のin vitro における線量効果曲線
 $m=6.2$ $D_0=106R$

(2) 腫瘍抗原を得るための照射適量の検討：

500R, 1,000R, 2,000R, 4,000R, 6,000R, 10,000Rの各線量で吉田肉腫を照射し、それぞれの培養上清に遊離する抗原様活性の有無について検討した。図2に示すごとく、500R, 1,000R照射上清で感作された骨髄細胞は、吉田肉腫細胞の増殖に対し、影響を与えなかったが、2,000R照射上清で感作された骨髄細胞は、吉田肉腫細胞の増殖を強く抑制した。6,000R, 10,000Rの線量で処理された吉田肉腫細胞の培養上清の抗原性は認められず、かえってその感作

作用は減少した(図3)。

吉田肉腫細胞より、抗原を得るための最適線量は、2,000R~4,000Rであった。

図2 吉田肉腫増殖曲線
各線量照射上清で感作された骨髄細胞の吉田肉腫細胞増殖に対する影響

図3 吉田肉腫増殖曲線
各線量照射上清で感作された骨髄細胞の吉田肉腫細胞増殖に対する影響

(3) 吉田肉腫細胞より腫瘍抗原を得るための培養条件:

無蛋白培地の培養下で腫瘍抗原が得られるや否やについて検討した。培養吉田肉腫細胞に対し、適線量である 2,000R 照射を用いた。無血清、無蛋白 MEM 培地で吉田肉腫を培養すると、細胞増加はみられず、24 時間以内に、ほとんどの細胞が崩壊した。その条件下で照射し、16 時間培養後、その上清をとり、骨髓細胞を感作したが、吉田肉腫細胞の増殖に対する抑制効果はみられなかった (図 4)。

図4 吉田肉腫増殖曲線

吉田肉腫細胞増殖に対する感作細胞の影響

- 対照
- 無血清、無蛋白培地で培養中の吉田肉腫照射により得た上清で感作された骨髓細胞と共に培養した吉田肉腫の増殖
- 血清を含む培地中で培養中の吉田肉腫照射により得られた上清で感作された骨髓細胞と共に培養した吉田肉腫の増殖

1%仔牛血清アルブミン (Diffco) と0.5%デキストランを加えたMEM培地では、吉田肉腫は増殖せず、数日間の生存を見たのみであった。その条件下で吉田肉腫を照射し、16時間培養後、その上清を得たが前記と同様に効果を示さなかった (図5)。

図5 吉田肉腫増殖曲線

吉田肉腫細胞増殖に対する感作細胞の影響

- 対照
- × 無血清、1%アルブミンを含む培地で培養中の吉田肉腫照射により得た上清で感作された骨髓細胞と共に培養した吉田肉腫の増殖
- 血清を含む培地で培養中の吉田肉腫照射により得られた上清で感作された骨髓細胞と共に培養した吉田肉腫の増殖

(4) 照射により得られた上清の特異的活性について:

前記の方法を用いて得られた細胞照射上清の特異性について、C3H/He マウス自然発生乳癌および、マウス腎由来の細胞を用いて検討した。培養乳癌の照射上清で感作されたリンパ球、腎由来の細胞の照射上清で感作されたリンパ球および、非感作リンパ球を用い標的細胞として培養乳癌細胞を用いて、その特異的作用の有無を検討した。図6に示すごとく、非感作リンパ球および、腎由来の細胞の照射上清で感作されたリンパ球を加えられた細胞群は、対照と全く同様の増殖線をたどった。これに反し、乳癌細胞の照射上清で感作したリンパ球を加えられた細胞群は、培養後、日を追って細胞数が減少した。すなわち、マウス乳癌細胞上清で感作されたリンパ球は標的細胞の *in vitro* 増殖

図6 乳癌細胞増殖曲線

乳癌細胞に対する感作リンパ球の影響

- 対照
- 無処理リンパ球使用群
- 照射乳癌細胞の培養上清により感作されたリンパ球使用群
- × 照射乳癌細胞の培養上清により感作されたリンパ球使用群

を抑制したが、同系の腎由来細胞の上清で感作したリンパ球はマウス乳癌細胞の *in vitro* 増殖を抑制しないことを示した。更に、乳癌細胞に対し抑制効果のあったリンパ球の腎由来細胞に対する抑制効果の有無について検討した。図7に示すごとく、乳癌細胞上清で感作されたリンパ球は腎由来細胞の *in vitro* 増殖に影響を与えず、培養後、対照とほぼ同様の増殖を示した。すなわち、同系均一系の動物においては、腫瘍細胞と正常細胞の間には、X線で誘導される抗原様因子に特異性が存在すると思われる。

(5) 担癌動物における人工感作リンパ球とX線照射の併用による治療効果について：

C3H/He マウスに移植した乳癌の腫瘍に対し、X線照射を局所的に用い、同時に *in vitro* にて得た人工感作リンパ球を尾静脈より投与し、その併用効果について検討した。図8に示すごとく、200R、5回照射単独療法では、腫瘍の一時的縮少がみられたが、6

図7 C3H/He 系マウス腎由来細胞の増殖曲線

- 対照
- 照射乳癌細胞の培養上清により感作されたリンパ球使用群

図8 乳癌腫瘍径の増加

- 対照
- × 200R 5回照射群
- 200R 5回照射、非感作リンパ球併用群
- 200R 5回照射、感作リンパ球併用群

日後より腫瘍は増大し、62日後 100%死亡した。照射処理を受けた腫瘍を持ったマウスに、感作リンパ球を1週間おきに2回投与した群では、腫瘍の増大は著しく抑制され、10匹中3匹が90日間以上生存し、腫瘍の消失を認めた。無処理群では62日で 100%死亡し、200R、5回照射と非感作リンパ球併用治療群では、腫瘍の消失したものは無く、90日後 100%死亡した。

Ⅳ 考 按

従来ガン細胞に放射線を照射し、免疫源として用いた報告は古くより見られるが、その移植免疫の成立するに必要な照射線量に適応線量のあることも知られている^{11)19)~23)}しかし、これらの報告は担ガン生体、または既存の腫瘍に対する効果を指標としたものでなく、放射線処置を施した腫瘍細胞をワクチンとして動物に投与し、一定期間後に腫瘍細胞で攻撃し、その移植の成否により効果を判定した成績によっている。著者等はヒトのガン治療を対象として免疫療法を導入する際には、自然発生した腫瘍に対する効果を期待せねばならないと考え、そのためには抗腫瘍細胞の産生系を *in vitro* に選ばざるを得ないと考えた。

すでに述べたごとく、培養された可移植性ガン細胞自然発生動物ガン、およびヒトの新鮮分離ガンの細胞にX線を照射すると、ガン抗原として働く因子が培養液中に得られ、その誘発に必要な線量は細胞により異なることを知った。

このことは、放射線に対する細胞の感受性は細胞の分裂時間によって規定されるので²⁴⁾、*in vitro* におけるダブリングタイムの相違に基づくものと解釈される。

In vitro 感作源は、照射細胞を含まない培養液に存在する結果を得たが、このような物質は、照射後徐々に進行する細胞の変化に基づくものと思われ、照射後16時間位が最適に得られることがわかった。その化学的性状については目下検討中であるが、致死線量以下の放射線照射により、細胞質のライソゾームが破壊される事実²⁵⁾から考えて、おそらく細胞質の膜様成分の変化によって細胞質性の複合体が遊離されてくるものと思われる。神前等は、照射細胞のワクチン活性は、細胞を破壊すると失われることを報告しているが¹¹⁾、著者の実験において、照射細胞の培養液中に血清が必要であること、および細胞が破壊されると得られないことから、放射線によって誘起される細胞抗原様因子は蛋白により保護された状態で活性を示すものと推察

される。

均一系動物の腫瘍の際における照射細胞のワクチンの効果には、正常組織と腫瘍組織間に、免疫学的特異性が認められているが²³⁾、著者の方法による感作源因子にも同様の結果が得られた。しかし、ヒトのガンの場合は同種間において自然に発生するものであり、これを用いて他人の免疫担当細胞で抗ガン細胞を作った際には、同様抗原認識の結果、ガン特異抗体とともに組織適合抗原に対する組織適合抗体をつくる可能性を配慮しなければならない。今後免疫担当細胞の選択方法として組織適合抗原の合致した人を選ぶことが必要と考えられる。

C3H/He マウス乳ガンに対する治療効果が感作リンパ球を放射線療法と併用して用いると、それぞれ単独療法によるものより著明な効果を示すことが得られたが、その原因として考えられることは、治療として用いた線量により照射局所の腫瘍細胞から感作源が生体内に遊離し、抗原として働き、体外より与えられた感作リンパ球による免疫活性の賦与と相乗的に働いて生体の抗ガン力を高める結果によると思われる。

今後、これらの作用機序を解明し、その効果について放射線生物学的に分析するとともに、臨床応用への道を免疫学的に解決する必要があると考えられる。

稿を終るにあたり、終始懇切なる御指導をいただいた戸部龍夫教授、佐藤一英博士に謹んで感謝いたします。

文 献

- 1) 山田雅宏：癌，放射線療法，石川七郎他編集 医歯薬出版 昭和44年，90—95。
- 2) 橋本省三他：同上，96—102。
- 3) 梅垣洋一郎他：同上，125—197。
- 4) 塚本憲甫，梅垣洋一郎：癌の放射線治療の実際，外科治療，12(5)：555—570，昭和40年。
- 5) Klein, G. et al. : Demonstration of resistance against methyl-choranthren-induced sarcoma in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, 20: 1561—1572, 1960.
- 6) 武田勝男：癌細胞の型特異抗原性，日本臨床，18: 93—103, 1960.
- 7) 武田勝男他：ラッテ腹水腫瘍のマウス異種移植に関する基礎的研究，日本臨床，19: 2362—2372, 1961.

- 8) 傍島行雄, 白淵勇 : C3H/He マウス乳癌の同系移植における免疫現象. 癌の免疫病理, 2 : 120—122, 1966.
- 9) 菊地浩吉, 武田勝男 : 腫瘍特異移植抗原の性状について. 癌の免疫病理, 1 : 29—38, 1965.
- 10) 石橋幸雄 : 癌の免疫療法をはばむもの. 外科治療, 17 : 515—521, 1967.
- 11) 神前五郎他 : 癌の補助的免疫療法. 外科治療, 17 : 545—553, 1967.
- 12) Woodruff, M.F.A. : Brit. J. Cancer, 17 : 482, 1963.
- 13) Sautham, C.M. et al. : Effect of leucocytes on transplantability of human cancer. Cancer, 19 : 1743—1753, 1966.
- 14) Graham, J. B. and Graham, R. M. : Autogenous vaccine in cancer patient. Surg. Gyn. & Obst., 114 : 1—4, 1962.
- 15) Gross L. : Immunological defect in agent population and its relationship to cancer. Cancer, 18 : 201—204, 1965.
- 16) Ziegler, L. J. et al : Immunological studies in patients with malignant mw melanoma in Uganda. Brit. J. Cancer, 27 : 729—734, 1969.
- 17) Joho, G. K. : Does the host react against his own cancer cells? Cancer Res., 21 : 1170—1183, 1961.
- 18) Sato, I. et al. : In vitro production of an antitumor agent by reticuloendothelial cells. GANN, 59 : 273—280, 1968.
- 19) Contamin, A. : Immunisation contre le cancer de la souris inoculée avec des tumeurs modifiées par les rayons X. Comptes rend. Acad. Sc., 150 : 128—129, 1910.
- 20) Wedd, B. H. : On the immunity conferred upon mice by radium irradiated mouse sarcoma. Arch. Middlesex Hosp., 33 : 71, 1914.
- 21) Chambers, H., Scot, G. M. and Russ, S. : Lancet, 212, 1922.
- 22) Suit, H. et al. : Tumor-specific antigens in a spontaneous mammary carcinoma of C3H mice. II Active immunization of mammary-tumor-free mice. J. Nat. Cancer Inst., 39 : 1121—1128, 1967.
- 23) Rèvész, L. : Detection of antigenic differences in isologous host-tumor system by pretreatment with heavily irradiated tumor cells. Cancer Res., 20 : 443—451, 1960.
- 24) 中泉正徳 : 癌の放射線療法. 金原出版, 昭和41年, 80.
- 25) Roth, J. S. et al. : The effect of whole-body X-irradiation on the activity of some acid hydrolases in homogenates and subcellular fractions of rat spleen. Radiation Res., 16 : 27—36, 1962.
- 26) 仁尾裕 : 抗癌性因子産生細胞の研究. 日本医学放射線学会雑誌, 30 : 481—488, 1970.

IN VITRO PRODUCTION OF TUMOR ANTIGENIC AGENT BY
X-IRRADIATION AND ANTITUMOR ACTIVITY OF SENSITIZED
LYMPHOCYTE

MASAO ABE

Department of Radiology, School of Medicine,
Gunma University, Maebashi, Japan

(Director : Prof. T. Tobe)

An antitumor agent against Yoshida Sarcoma was produced in rat bone marrow cells which were sensitized in vitro with the medium containing the supernatant fluid of medium of X-irradiated Yoshida sarcoma cells.

From 2,000R to 4,000R were optimal doses to release an antigenic cellular agent from irradiated Yoshida Sarcoma cells. And a small amount of serum component was necessary in culture medium of the tumor cells to obtain the antigenic agent.

Specific activity of antigenic activity was determined between tumor cells and normal tissue cells using C3H/He mouse mammary carcinoma and C3H/He mouse kidney cells.

Lymph node cells sensitized with the tumor cell-antigenic-agent did not inhibit the cell growth of normal kidney cells while inhibit the cell growth of target mouse mammary carcinoma cells.

Effect of sensitized lymph node cells and X-Ray irradiation against tumor growth of C3H/He mouse mammary carcinoma which were inoculated into thigh muscle determined.

The tumors were reduced remarkably when they were treated with sensitized lymph node cells and X-Ray irradiation.