酵母細胞壁の抗腫瘍作用の免疫学的解析 (第2報¹⁾) マウスリンパ球
におよぼす酵母細胞壁の影響²⁾清水忠順,³⁾ 原口惣一,^{3a)} 三沢一二³⁾
静岡薬科大学³⁾Immunological Studies on Antitumor Activity of Yeast Cell Wall. II.¹⁾
Effects of Yeast Cell Wall on Lymphoid Cells in Mice²⁾TADAYORI SHIMIZU,³⁾ SOICHI HARAGUCHI^{3a)} and ICHIJI MIFUCHI³⁾
Shizuoka College of Pharmacy³⁾

(Received January 17, 1978)

To investigate the role of lymphocytes on the antitumor activity of yeast cell wall (YCW) in mice, functional analysis of lymphocytes was made on the basis of the mitogenic response (³H-thymidine uptake) of mouse spleen cells to bacterial lipopolysaccharide (LPS; a B cell mitogen) and Concanavalin A (Con A; a T-cell mitogen).

When normal mice and "tumor suppressed mice" (the mice in which tumor growth had been suppressed by the mixed injection of YCW and Ehrlich ascites tumor cells: EATC) were administered anti-thymocyte serum (ATS) or irradiated with X-rays, the tumor suppressive effect of YCW and their acquired resistance against tumor transplantation decreased. By the administration of ATS into these mice, the response of their spleen cells to Con A was reduced, but the response to LPS was not. X-Ray irradiation resulted in the reduction of mitogenic responses to both Con A and LPS. These results suggest that the tumor suppressive effect of YCW is mediated by T-cell function in mice and the acquired tumor resistance is also dependent on their T-cell function.

The mitogenic activity of YCW was confirmed on cultured spleen cells *in vitro*. The spleen cells from the mice 2 days after the administration of YCW showed a marked enhancement of the mitogenic response to LPS. This fact indicates that YCW is capable of increasing B-cell population and/or the mitogenic responsiveness of B-cells in mouse spleen.

The change of mitogenic response of spleen cells to LPS, Con A and Mitomycin-C treated EATC (MMC-EATC) during process of tumor suppression after the injection of mixture of YCW and EATC were investigated. Two days after the injection, the enhancement of mitogenic responses to LPS and MMC-EATC were observed. On 28 days, when the growth of tumor was mostly suppressed, the mitogenic response of their spleen cells to Con A was increased. These findings suggest that YCW stimulates the B-cell at the early stage after the injection, and then converts its stimulation into T-cell in the advanced stage.

The enhancement of T-cell function in the advanced stage by YCW may relate to its ability on anti-tumor activity.

Keywords—yeast cell wall; antitumor activity; mitogenic response; Concanavalin A; lipopolysaccharide; T-cell; B-cell; mixed lymphocyte-tumor cell reaction

緒 言

前報で,¹⁾ 酵母細胞壁の腫瘍増殖抑制作用,ならびに細胞壁・腫瘍細胞混液接種で獲得される腫瘍移植抵抗性が,抗マウス胸腺細胞血清 (anti-thymocyte serum: ATS) の投与,または X 線照射により低下することから,宿主の免疫系ときわめて密接な関連のあることを報告した。

1) 第1報: 清水忠順, 原口惣一, 三沢一二, 中野昌康, 薬誌, 98, 1028 (1978).

2) 日本薬学会東海支部 6 月例会にて一部発表, 岐阜, 1976 年 6 月.

3) Location: 2-2-1, Oshika, Shizuoka; a) Present address: Hamamatsu University School of Medicine, Handa-cho, Hama-matsu.

菌体成分等による宿主免疫機能の非特異的な活性化が、その抗腫瘍作用の発現に重要であることは知られているが、酵母細胞壁によるリンパ球の非特異的な活性化については、まだ十分な検討が行なわれていない。

本研究は、胸腺由来細胞 (thymus-derived cell: T 細胞) と骨髄由来細胞 (bone marrow-derived cell: B 細胞) に、それぞれ特異的な mitogen 刺激によるマウス脾細胞の幼若化反応 (^3H -thymidine の取り込み) を指標として、酵母細胞壁による宿主の T 細胞, B 細胞の非特異的な活性化を調べることに、その抗腫瘍作用発現との関連性の解明を意図して、一連の実験を行なった。

まず、(1) ATS 投与や X 線照射を受けたマウスの脾臓内の T, B 細胞の活性を幼若化反応で調べ、酵母細胞壁の抗腫瘍作用における T, B 細胞の機能を検討した。次に、(2) 細胞壁自体の *in vitro* におけるマウス脾細胞の幼若化惹起能 (mitogenicity) を検討するとともに、(3) 酵母細胞壁の *in vivo* での作用を調べるため、あらかじめ細胞壁を投与したマウスの脾細胞について、*in vitro* での mitogen による幼若化能の変動を検討した。さらに、(4) 酵母細胞壁・腫瘍細胞を混合皮下接種した場合の、マウス脾臓内の T, B 細胞の幼若化反応性の変化を調べ、酵母細胞壁の抗腫瘍作用における宿主リンパ球の役割を検討した。

実 験 の 部

酵母細胞壁 第 1 報¹⁾ と同様に調製したものを使用した。

実験動物および腫瘍細胞 実験動物としては、6—8 週令 (25 ± 2 g) の ddY 系雄性マウス (静岡県実験動物農業協同組合) を用いた。腫瘍細胞はエールリッヒ腹水腫瘍細胞 (Ehrlich ascites tumor cell: EATC) を使用した。

免疫抑制法 ウサギ抗マウス胸腺細胞血清 (anti-thymocyte serum: ATS) 投与、ならびに X 線照射は第 1 報¹⁾ に準じた。

マウス脾細胞の幼若化試験 マウス脾細胞の幼若化の判定は、脾細胞の *in vitro* での ^3H -thymidine の取り込みを指標とした。

(1) 細胞培養液——RPMI-1640 (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, U.S.A.: GIBCO 製) の粉末培地 10.4 g を再蒸留水 980 ml に溶解し、ペニシリン (東洋醸造製) 10 万単位/l とストレプトマイシン (三共製薬製) 100 mg/l を加えた。溶解後、ミリポアフィルター (pore size 0.45μ) でろ過滅菌し、これを -20° にて凍結保存した。実験に際しては一晚 4° にて溶解し、使用直前に 10% 炭酸水素ナトリウムで pH 7.2 に調製した。

(2) 血清——胎児牛血清 (fetal calf serum: FCS; GIBCO 製) を 56° , 30 min 非働化して用いた。

(3) Mitogen——a) Concanavalin A (Con A): Con A (Boehringer Mannheim 製) を T 細胞 mitogen⁴⁾ として使用した。

b) Lipopolysaccharide (LPS): *Salmonella typhimurium* LT-2 株から Westphal の方法⁵⁾ で抽出、凍結乾燥した LPS (自治医科大学、中野昌康教授より分与) を B 細胞 mitogen⁶⁾ として用いた。

(4) ^3H -Thymidine (^3H -TdR)——Thymidine 6- ^3H (New England Nuclear 製) を用いた。

(5) 脾細胞幼若化試験——実験には一群 3 匹のマウスを使用した。それぞれのマウスの脾臓を無菌的に摘出し、10% 仔牛血清を含む冷 Eagle 液 (日水製薬, pH 7.2) 入りのシャーレ中でピンセットを用いて十分ほぐし、その後、ピペettingにより細胞を単離した。次に、中試験管に脾細胞浮遊液を 10 min, 静置後、沈下した細胞凝塊を含まないように上部の浮遊細胞に採取、これをさらに Eagle 液で $200 \times g$, 10 min, 3 回遠心洗浄した。次に、血球計算盤で細胞数を算定し、20% FCS を含む RPMI-1640 培養液に細胞数 8×10^6 個/ml になるように再浮遊させた。中試験管にこの浮遊液の 0.25 ml (細胞数 2×10^6 個) と、これに mitogen を添加した後、RPMI-1640 培地 (20% FCS 含有) を加え全量 3 ml とし、空気 95%, 炭酸ガス 5% を通じた炭酸ガス細胞培養器 (トキワ科学製, CO-MINI, A-1 型) 中で 37° , 48 hr, 前培養を行なった。前培養後に ^3H -TdR を $1 \mu\text{Ci}/\text{tube}$ 加え、さらに 18 hr 培養した。培養終了後、脾細胞をガラス繊維ろ紙上 (Whatman, GF/C) に集め、Hanks 液 (日水製薬, pH 7.2) と 5% トリクロロ酢酸で洗浄した。ろ紙は 37° , 一晚乾燥した後、これをバイアルビンに入れ、トルエンシンチレーター (PPO 5 g, POPOP 0.1 g, トルエン 1000 ml) を 10 ml 加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka, SLC 602) により ^3H -TdR の取り込みを測定した。対照には、mitogen を加えずに脾細胞のみを培養したものを用いた。結果は試験管 3 本の値を平均した cpm で表わした。

Mitomycin-C 処理腫瘍細胞に対する脾細胞の反応性 腫瘍細胞に対して特異的に反応を示す脾細胞の存在を調べるため、マウス脾細胞 (2×10^6 個) を responder cell として、Mitomycin-C 処理エールリッヒ腫瘍細胞 (MMC-EATC) の 1×10^6 個を stimulant cell とする one way mixed lymphocyte-tumor cell reaction⁷⁾ を行

4) a) M. Greaves, G. Janossy, *Transplant. Rev.*, **11**, 87 (1972); b) J.D. Stobo, *ibid.*, **11**, 60 (1972).

5) O. Westphal, O. Lüderitz, F. Bister, *Z. Naturforsch.*, **7b**, 148 (1952).

6) J. Andersson, G. Möller, O. Sjöberg, *Cell. Immunol.*, **4**, 381 (1972).

7) S.P. Kanner, M.R. Mardiney, Jr., R.J. Mangi, *J. Immunol.*, **105**, 1052 (1970).

なった。MMC-EATC 細胞は、腫瘍細胞 2×10^6 個を 4.5 ml の Eagle 液に懸濁、Mitomycin-C (三共製薬製) 250 μ g を含む 0.5 ml の Eagle 液を加え、37°, 45 min 作用させた後、4 回、Eagle 液で遠心洗浄して調製した。MMC-EATC とリンパ球を混合培養し、 ^3H -TdR の取り込み実験は前項の幼若化反応と同一条件で行なった。

結 果

免疫抑制処置によるマウス脾細胞の Con A, LPS に対する反応性の変動

正常マウスと腫瘍抑制マウス (酵母細胞壁 500 μ g と腫瘍細胞 2×10^6 個を含む混液をマウス左ソケイ部皮下に接種し、28 日後に腫瘍の増殖が全く認められないマウス) に ATS 投与、または X 線照射し、ATS の場合は 0.5 ml 腹腔投与 72 hr 後、X 線の場合は 400 R 照射 2—3 hr 後にマウスから脾臓を摘出して、*in vitro* でそれぞれ Con A, LPS 刺激に対する脾細胞の反応性を無処置対照群と比較検討した (Table I)。

正常マウスに ATS を投与した場合の脾細胞の Con A 刺激による ^3H -TdR の取り込みは 836 cpm で、対照の無処置正常マウス脾細胞の Con A による取り込みの 6763 cpm と比べ著しく低下しており、ATS 投与が Con A 反応性である T 細胞に著しい障害を与えていることが認められた。しかし、この ATS 投与されたマウス脾細胞も LPS 刺激では ^3H -TdR の取り込みは 2029 cpm で、無処置正常マウスの LPS 刺激による 1855 cpm と変らない値を示し、ATS は LPS 反応性である B 細胞に障害をおよぼさない。

X 線を照射した正常マウスの脾細胞では、Con A, あるいは LPS 刺激による ^3H -TdR の取り込みは、それぞれ 1191 cpm, 710 cpm で、無処置の正常マウス脾細胞の Con A, あるいは LPS 刺激による取り込み 6763, 1855 cpm と比べいずれも低い値を示し、X 線照射は脾臓の T, B 両細胞に著しく障害を与えていることが認められた。

次に、腫瘍抑制マウスに ATS 投与、X 線照射した場合の脾細胞への影響を調べた。ATS を投与した腫瘍抑制マウスの脾細胞は、Con A 刺激での ^3H -TdR の取り込みは 556 cpm で、無処置腫瘍抑制マウス脾細胞の Con A 刺激による 4946 cpm と比べ著しく低く、ATS により腫瘍抑制マウスの T 細胞は明らかに障害されている。しかし、LPS 刺激の場合には取り込みは 3044 cpm を示し、無処置マウス脾細胞の LPS 刺激による取り込みの 2875 cpm と変らない。

X 線照射した腫瘍抑制マウスの脾細胞の、Con A, ならびに LPS 刺激での取り込みは、それぞれ、845, 536 cpm を示し、無処置対照群の Con A, または LPS 刺激による取り込みの 4946, 2875 cpm と比べて著しい低下を認めた。すなわち、腫瘍抑制マウスにおいても ATS 投与ならびに X 線照射による脾細胞への影響は正常マウスと同様な傾向が認められる。

TABLE I. Effects of ATS-administration and X-ray Irradiation on Mitogenic Responses of Mouse Spleen Cells to Con A or LPS *in Vitro*

Pre-treatment ^{a)}	Incorporation of ^3H -TdR ^{b)} (mean cpm $\pm$ S.E.)		
	Con A (5 μ g/ml)	LPS (10 μ g/ml)	No added
Normal mice			
ATS (0.5 ml)	836 $\pm$ 380 (1.2) ^{c)}	2029 $\pm$ 124 (2.9)	716 $\pm$ 294 (1.0)
X-ray (400R)	1191 $\pm$ 263 (1.7)	710 $\pm$ 322 (1.0)	653 $\pm$ 41 (0.9)
None (control)	6763 $\pm$ 973 (9.5)	1855 $\pm$ 407 (2.6)	714 $\pm$ 220 (1.0)
"Tumor suppression mice"			
ATS (0.5 ml)	550 $\pm$ 57 (0.7)	3044 $\pm$ 536 (5.1)	445 $\pm$ 57 (0.7)
X-ray (400R)	845 $\pm$ 149 (1.4)	576 $\pm$ 205 (1.0)	508 $\pm$ 184 (0.9)
None (control)	4946 $\pm$ 912 (8.3)	2875 $\pm$ 389 (4.8)	597 $\pm$ 163 (1.0)

a) ATS was injected intraperitoneally (*i.p.*) 72 hr before the culture *in vitro* X-ray irradiation was carried out 2—3 hr before the culture.

b) Spleen cells (2×10^6) were cultured with or without mitogens for 48 hr, and ^3H -TdR (1.0 μ Ci) was added to each tube. After the additional 18 hr culture, the incorporation of ^3H -TdR into cells was measured. Each results represents the average of three culture tubes.

c) Stimulation ratio = mean cpm in the experimental cultures / mean cpm in the control cultures.

TABLE II. Mitogenic Activity of Yeast Cell Wall (YCW) on Spleen Cells of Mice

Spleen cells were cultured with ^{a)} ;		Incorporation of ³ H-TdR (mean cpm $\pm$ S.E.)	Stimulation ratio ^{b)}
YCW	1 μ g/ml	887 $\pm$ 398	1.7
	2 μ g/ml	1826 $\pm$ 145	3.6
	5 μ g/ml	1246 $\pm$ 471	2.4
	10 μ g/ml	1468 $\pm$ 347	2.9
	20 μ g/ml	845 $\pm$ 214	1.7
	50 μ g/ml	628 $\pm$ 222	1.2
	100 μ g/ml	491 $\pm$ 46	1.0
LPS	10 μ g/ml	4867 $\pm$ 1791	9.5
Con A	5 μ g/ml	12606 $\pm$ 4741	24.7
No added (control)		511 $\pm$ 171	1.0

a) The culture conditions were same in Table I. b) See legend c) in Table I.

TABLE III. Effects of YCW on Responses of Mouse Spleen Cells to Mitogen

Cultured spleen cells from mice injected with ^{a)} ;	Incorporation of ³ H-TdR ^{b)} (mean cpm $\pm$ S.E.)		
	LPS (10 μ g/ml)	Con A (5 μ g/ml)	No added
YCW 1000 μ g <i>i.p.</i>	10581 $\pm$ 2858 (21.3) ^{c)}	17139 $\pm$ 5625 (34.5)	931 $\pm$ 422 (1.9)
YCW 1000 μ g <i>s.c.</i>	7164 $\pm$ 3720 (14.4)	19583 $\pm$ 7509 (39.4)	865 $\pm$ 274 (1.7)
None (control)	2527 $\pm$ 989 (5.1)	22863 $\pm$ 8172 (46.0)	497 $\pm$ 118 (1.0)

a) Mice were injected *i.p.* or *s.c.* (subcutaneously) with YCW (1000 μ g) 2 days before the excision of their spleens for *in vitro* culture.

b) The culture conditions were same in Table I.

c) See legend c) in Table I.

TABLE IV. Effects of YCW on Responses of Mouse Spleen Cells to Mitogen

Cultured spleen cells from mice injected with ^{a)} ;	Incorporation of ³ H-TdR ^{b)} (mean cpm $\pm$ S.E.)		
	LPS (10 μ g/ml)	Con A (5 μ g/ml)	No added
YCW 1000 μ g <i>i.p.</i>	9216 $\pm$ 354 (9.6) ^{c)}	7226 $\pm$ 421 (7.5)	948 $\pm$ 289 (1.0)
500 μ g	3858 $\pm$ 956 (4.0)	8584 $\pm$ 1807 (9.0)	2144 $\pm$ 776 (2.2)
100 μ g	2942 $\pm$ 136 (3.1)	7704 $\pm$ 360 (8.0)	1608 $\pm$ 268 (1.7)
None (control)	2578 $\pm$ 330 (2.7)	6674 $\pm$ 424 (7.0)	958 $\pm$ 178 (1.0)

a) See legend a) in Table III. b), c), See legend b), c) in Table I.

酵母細胞壁の腫瘍増殖抑制作用ならびに腫瘍移植抵抗性が ATS 投与や X 線照射で低下することは、すでに前報で報告したが、以上の結果から ATS 投与が T 細胞の障害を、また X 線照射が T, B 両細胞に障害を与えることが mitogen に対する応答性からも明確に示された。このうち、ATS 投与や X 線照射にともない T 細胞の障害が見られることから、酵母細胞壁による腫瘍増殖抑制作用ならびに腫瘍移植抵抗性が T 細胞の機能に依存していることを示唆している。

酵母細胞壁の *in Vitro* 脾細胞幼若化能の検討

酵母細胞壁の抗腫瘍作用は宿主リンパ球機能と密接に関連していることが認められたので、次に、酵母細胞壁自体のマウスリンパ球におよぼす直接的な影響を調べるため、細胞壁(1—100 μ g/ml)をマウス脾細胞と混合培養し、細胞壁の *in vitro* における脾細胞の幼若化能を検討した。

Table II に示したように 2—10 μ g/ml の細胞壁添加の場合、活性が明らかに認められ、細胞壁 2 μ g/ml の微

量を加えた場合に最も強い幼若化能を示し、対照の 3.6 倍の上昇が認められた。混和量を 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上に増量した場合は、かえって活性の低下の傾向が認められた。以上のことから、酵母細胞壁は Con A や LPS に比べると脾細胞幼若化能は弱い、若干の幼若化能を有することが明らかになった。

酵母細胞壁を投与されたマウスの脾細胞の Con A, LPS に対する *in Vitro* での反応性

酵母細胞壁をマウスに投与し、そのリンパ球活性化への影響を *in vitro* での mitogen に対する反応性を調べることにより検討した。すなわち、あらかじめ細胞壁 1000 μg をマウスの腹腔あるいは皮下に投与し、2 日後に摘出したマウス脾細胞の Con A, LPS 刺激に対する反応性を調べた結果を Table III に示した。

その結果、あらかじめ細胞壁を腹腔または皮下に投与されたマウスの脾細胞の LPS 刺激による $^3\text{H-TdR}$ の取り込みは、それぞれ、10581 cpm, 7164 cpm で、細胞壁非投与の対照群マウス脾細胞の LPS 刺激による取り込み 2527 cpm と比べ著しく高い値を示し、細胞壁投与により LPS への反応性が高まる事実が認められた。これに対して、Con A 刺激による $^3\text{H-TdR}$ の取り込みは非投与対照群と比べ顕著な変動は認められなかった。

次に、酵母細胞壁の腹腔投与量により脾細胞の mitogen に対する反応性がどのように変化するか調べた (Table IV)。

細胞壁の 1000 μg を投与した場合が LPS 刺激に対して最も高い反応性を示し、500 μg , 100 μg , と投与量の少なくなるにしたがい LPS に対する反応性は低下した。一方、Con A 刺激に対しては細胞壁 500 μg 投与の場合に反応性のやや上昇が認められたが、非投与対照群の Con A 刺激に比べると著しい上昇は見られない。これらの事実から、酵母細胞壁の投与によりマウス脾細胞中の LPS 反応性の B 細胞の増殖、分化が促進されることが推察される。

酵母細胞壁・腫瘍細胞混合皮下接種マウスの脾細胞の Con A, LPS, MMC-EATC に対する *in Vitro* での反応性

酵母細胞壁が宿主リンパ球におよぼす影響をマウス脾細胞幼若化反応により調べたが、次に、酵母細胞壁による腫瘍増殖抑制の過程でマウス脾臓内 T 細胞、B 細胞の mitogen に対する反応性がどのように変動するかを調べた。すなわち、酵母細胞壁・腫瘍細胞を混合接種した後、2 日、14 日、28 日目のマウス脾細胞の Con A, LPS に対する反応性を調べ、また、同時に Mitomycin-C 処理 EATC (MMC-EATC) 混和による幼若化細胞 (EATC 反応性細胞) の変動も検討した (Fig. 1)。

細胞壁・腫瘍細胞を混合皮下接種したマウスの脾臓では接種後 2 日目に LPS 反応性細胞 (B 細胞)、ならびに EATC 反応性細胞の増加が認められる。接種後 14 日目の脾細胞では LPS, MMC-EATC に対する反応性は対照の非接種群の脾細胞と同じレベルに減じる。14 日目のマウスの混合接種部位では約 $3 \times 3 \text{ mm}$ の硬結を残すのみで、腫瘍増殖はほとんど抑制され、接種後 28 日目では混合投与群の腫瘍増殖は完全に抑制される。この場合の脾細胞では Con A 反応性細胞と EATC 反応性細胞のやや増加が認められるが、LPS 反応性細胞は対照群と差はほとんど見られなかった。

以上の結果から、酵母細胞壁・腫瘍細胞混合接種で、はじめに B 細胞が増加し、次に、腫瘍増殖抑制発現とともに T 細胞の増加がおこることが示唆された。

考 察

酵母細胞壁による抗腫瘍作用は、ATS あるいは X 線照射などの免疫抑制法で前処置したマウスでは、明らか

Fig. 1. Mitogenic Responses of Cultured Spleen Cells from Mice inoculated s.c. with a Mixture YCW (500 μg) and EATC (2×10^6) at Indicated Times in Advance

LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), Con A (5 $\mu\text{g/ml}$) and MMC-EATC (1×10^5) were added to cultured spleen cells (2×10^6). Culture conditions were the same as shown in Table I. Mean cpm of normal mice (control) for each protocol for days 2, 14, 28, respectively were as follows: LPS; 1068, 1670, 3988, Con A; 5646, 10308, 8443, MMC-EATC; 2751, 2501, 3670.

*Ratio of incorporation of $^3\text{H-TdR}$

$$= \frac{\text{cpm of } ^3\text{H-TdR of spleen cells from mice inoculated}}{\text{cpm of } ^3\text{H-TdR of spleen cells from normal mice}}$$

に低下することを先きに報告した。¹⁾ 本報では、ATS 投与や X 線照射した正常マウス、ならびに細胞壁による腫瘍抑制マウスの脾臓内リンパ球の、mitogen に対する反応性を調べると、ATS 前処置では Con A に対する反応性の減少が認められ、LPS に対する反応性は影響されない。一方、X 線照射では Con A, LPS 両方の反応性が減少することが認められた。これらの事実は、ATS や X 線による酵母細胞壁の腫瘍増殖抑制作用、ならびに腫瘍移植抵抗性の低下は主としてリンパ球、特に T 細胞の障害、もしくは減少によることが示唆された。さらに、ATS は腫瘍移植抵抗性を低下させるが、B 細胞をほとんど障害しないことから、B 細胞自体が腫瘍移植抵抗性細胞である可能性は少ないものと思われる。

抗腫瘍作用を持ち、アジュバント活性を有する菌体成分の多くのものはリンパ球を幼若化させる。⁸⁾ 使用した酵母細胞壁についてリンパ球幼若化能を調べると、細胞壁は *in vitro* で脾細胞の ³H-TdR の取り込みを増加させ、Con A や LPS に比べると弱いながら幼若化能を有することを明らかにした。生体内での酵母細胞壁の作用を検討するため、あらかじめ 2 日前に細胞壁を腹腔、あるいは皮下に投与されたマウスの脾細胞が *in vitro* で、LPS に強く反応するようになることは、細胞壁が B 細胞の増殖、分化を促進することを示唆するものと思われる。この脾細胞集団からマクロファージを除くと、酵母細胞壁による LPS に対する反応性の増強が消失することから、細胞壁がマクロファージを介して B 細胞に働くことが考えられる (未発表)。さらに、酵母細胞壁を異種赤血球抗原と同時にマウス腹腔に投与すると、抗体産生細胞を増加させること、⁹⁾ 酵母細胞壁を含め種々の真菌細胞壁が卵白アルブミン抗原に対するアジュバント活性を示すこと¹⁰⁾ を報告している。本研究での酵母細胞壁の幼若化能、脾細胞の LPS 反応性増強作用と、これらアジュバント活性との関連性は、今後追求されるべき問題と思われる。

最後に、酵母細胞壁・腫瘍細胞を混合皮下接種し、マウス脾細胞の mitogen に対する反応性の変動、ならびに Mitomycin-C 処理腫瘍細胞に対する応答を検討した。腫瘍増殖抑制に重要な時期と思われる接種後 2 日目では、B 細胞の反応性の顕著な増加と、腫瘍細胞への反応性の上昇が認められる。B 細胞の反応性の増加は Table III から示唆されるように酵母細胞壁の直接作用と思われる。リンパ球混合培養 (mixed lymphocyte culture) における反応細胞は、T 細胞であることが知られている。¹¹⁾ 本実験での MMC-EATC に対する反応細胞が T, B, いずれの細胞集団に属するかは Table III の結果から判定することはできない。しかし、2 日目の EATC 反応細胞の増加は、腫瘍増殖抑制作用となんらかの関係があるものと推察される。さらに、腫瘍増殖抑制が発現する 28 日目では Con A 反応性と MMC-EATC に対する反応のやや上昇が認められ、腫瘍移植抵抗性と T 細胞の幼若化反応の上昇との関連性が示唆された。

以上、本報では酵母細胞壁が *in vitro* ではマウスリンパ球幼若化能を有することを明らかにし、さらに、*in vivo* では投与初期には B 細胞、EATC 反応性細胞の増殖、分化を促進し、つづいて、T 細胞を活性化することを認め、酵母細胞壁により免疫応答発現が促進されることを明らかにした。

謝辞 本研究にあたり、有益な御助言と試料を御提供下さった自治医科大学、中野昌康教授に深甚の謝意を表します。

8) P.A. Campbell, *Bacteriol. Rev.*, **40**, 284 (1976).

9) 清水忠順, 三沢一二, 中野昌康, 医学と生物学, **87**, 281 (1973).

10) S. Kotani, Y. Watanabe, T. Narita, T. Shimono, D.E.S. Stewart-Tull, S. Iwata, H. Yamaguchi, K. Iwata, T. Shimizu, I. Mifuchi, Y. Nozawa, Y. Ito, F. Kanetsuna, K. Yano, A. Misaki, T. Matsuoka, K. Fukui, *Biken J.*, **18**, 135 (1975).

11) a) F.H. Bach, M.L. Bach, P.M. Sondel, G. Sundharadas, *Transplant. Rev.*, **12**, 30 (1972); b) H.P. Lohrmann, J. Whang-Peng, *J. Exptl. Med.*, **140**, 54 (1974).