

マウスのコーチゾン抵抗性リンパ球に対する溶連菌 およびアジエバントの作用

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9086 |

マウスのコーチゾン抵抗性リンパ球に対する 溶連菌およびアジュバントの作用

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

福井医科大学薬理学教室 (主任: 木越 茂教授)

西 尾 真 友

(昭和58年9月12日受付)

溶連菌またはアジュバントで処理したマウスおよび非処理マウスから得られたコーチゾン抵抗性リンパ球 (CR リンパ球) の, エールリッヒがん細胞およびザルコーマ 180 細胞に対する傷害作用について検討した。7-8週令の ddY 系雌マウスの皮下に, A 群溶連菌 Su 株, Freund の完全アジュバント (CFA) または大腸菌のリポポリサッカテライド (LPS) を注射して 14 日後に屠殺した。CR リンパ球を得るために, 屠殺 2 日前に酢酸ヒドロコーチゾン (125 mg/kg) をマウスの腹腔内に注射した。CR リンパ球の浮遊液は, 2% 牛血清アルブミン加ハanks 緩衝液 (pH7.4) を用いて, マウスの胸腺, 脾臓および腸間膜リンパ節から作製した。腫瘍細胞に対する CR リンパ球の作用を調べるために, 腫瘍細胞と CR リンパ球の混液 (腫瘍細胞/リンパ球: 1/10) を 37°C で 120 分間インキュベートしたのち, マウスの皮下に接種し (10⁶個腫瘍細胞/マウス), 接種マウスにおける固型腫瘍の増殖を 5 週間観察した。エールリッヒがん細胞と非処理または LPS 処理マウスの腸間膜リンパ節 CR リンパ球の混液を接種したとき, 20 匹中 9 匹のマウスに腫瘍の増殖がみられた。しかし, エールリッヒがん細胞と溶連菌または CFA 処理マウスの腸間膜リンパ節 CR リンパ球の混液を接種した 20 匹のマウスには, 腫瘍の増殖はみられなかった。さらに, ザルコーマ 180 細胞に対する CR リンパ球の作用を検討した。溶連菌または CFA 処理マウスあるいは非処理マウスの腸間膜リンパ節 CR リンパ球とザルコーマ 180 細胞の混液をマウスに接種した。非処理マウスの CR リンパ球を用いたとき, 20 匹中 17 匹のマウスにおいて腫瘍が増殖したが, 溶連菌または CFA 処理マウスの CR リンパ球を用いたとき腫瘍の増殖がみられたのは 20 匹中 9 匹であった。胸腺 CR リンパ球のエールリッヒがん細胞に対する傷害作用は, 溶連菌または CFA によって増強されたが, LPS によっては増強されなかった。また, 脾臓の CR リンパ球の腫瘍細胞傷害作用は, 溶連菌, CFA または LPS によって増強されなかった。さらに, 細胞の acid α -naphthyl acetate esterase 活性を指標として, 各リンパ組織の CR リンパ球中の T 細胞の比率を調べたところ, この比率は, 処理マウスの CR リンパ球と非処理マウスの CR リンパ球とで, ほとんど同じであることが示された。これらの成績は, 溶連菌または CFA で処理したマウスの腸間膜リンパ節 CR リンパ球は, 非処理または LPS 処理マウスの腸間膜リンパ節 CR リンパ球よりも, エールリッヒがん細胞やザルコーマ 180 細胞に対して, より細胞傷害性であることを示している。

Key words Cortisone-resistant lymphoid cells, Streptococcus, Adjuvants, Cytotoxicity, T cell proportion

Effect of Streptococcus and Adjuvants on the Cortisone-resistant Lymphoid Cells of Mice
Matomo Nishio, Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 and Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Kigoshi), Fukui Medical School, Matsuoka, Fukui 910-11

近年抗腫瘍性溶連菌製剤 OK-432 (Picibanil)の抗腫瘍作用、特に宿主介在作用については多くの研究が行われているが、その詳細はまだ明らかでない。また、グラム陰性桿菌のリポポリサッカライドや結核菌などのアジュバントは、マウスの脾臓やリンパ節を肥大させ、組織のリンパ球数を増加させることが報告されている¹²⁾。さらに、ある種の細菌(結核菌、溶連菌など)およびその菌体成分は、脾臓やリンパ節の肥大や細胞数の増加をもたらすと同時に、腫瘍に対する宿主の抵抗性を増大させることが報告されており²¹⁻²³⁾、これらの細菌と腫瘍免疫との関係が大いに注目されている。

一方、マウスにコーチゾンなどのグルココルチコイドを投与すると、リンパ組織が萎縮し、リンパ組織のリンパ球数が著しく減少することが知られている⁷¹⁻¹⁰⁾。このコーチゾンを投与したマウスに残存しているリンパ球は、コーチゾン抵抗性リンパ球といわれ、その比率は、胸腺では5-7%、脾臓やリンパ節では20%前後である⁹¹⁻¹¹⁾。このコーチゾン抵抗性リンパ球は、腫瘍細胞や allogeneic な細胞に対して強い傷害作用を示すとされており、腫瘍免疫や移植免疫に重要な役割を演じていることが示唆されている¹⁰¹⁻¹²⁾。しかしながら、強い細胞傷害作用を示すコーチゾン抵抗性リンパ球に対する溶連菌やアジュバントの影響については、詳細な報告はまだなされていない。著者は、この点を明らかにするために、溶連菌または各種のアジュバントを投与したマウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節から得られるコーチゾン抵抗性リンパ球について、その腫瘍細胞傷害作用を Winn の方法¹³⁾で調べ、溶連菌やアジュバントを投与しないマウスのリンパ球の作用と比較すると共に、溶連菌と各種アジュバントの作用を比較検討した。また同時に、各リンパ組織での、コーチゾン抵抗性リンパ球数と、その中のT細胞の比率を求め、腫瘍細胞傷害作用との関連性を検討した。

材料および方法

1. 溶連菌

実験にはA群溶連菌 Su 株(3型)を用いた。溶連菌は Wood と Gunsalus の合成培地¹⁴⁾に37°Cで12時間培養したのち、菌量の30倍量のアセトン(和光純薬、試薬特級)で処置(室温、24時間)して乾燥したものをを用いた¹⁵¹⁶⁾。

2. アジュバント

実験には、*E. coli* (0111, B 4) の lipopolysaccharide (Difco, 以下 LPS と略) および結核菌 H₃₇Ra を含む complete Freund's adjuvant (Difco, 以下 CFA と略) をアジュバントとして用いた。

3. 投与エマルジョンの作製

マウスに投与するために、溶連菌の生理食塩水浮遊液(10 mg/ml)あるいはLPSの生理食塩水溶液(100 μg/ml)の10 mlを、同量の incomplete Freund's adjuvant (Difco)と混和し、2 mlの注射筒でエマルジョンを作製した。CFAは同量の生理食塩水と混和して、同様にエマルジョン化したものを用いた。

4. 実験動物

実験には、ddY系の雌マウス(7-8週齢)を使用した。

5. マウスの処置

マウスの右側腹部皮下に0.2 mlのエマルジョンを注射し(処理マウス)、注射後14日目にリンパ組織を摘出した。また、生理食塩水0.2 mlを投与したマウス(非処理マウス)からもリンパ組織を摘出した。

コーチゾン抵抗性リンパ球を得るために、Cohenらの方法¹⁰⁾によりリンパ組織を摘出する2日前に、処理マウスまたは非処理マウスの腹腔内に酢酸ヒドロコーチゾン(Schering AG, 125 mg/kg)を注射した(コーチゾン投与マウス)。

6. リンパ球浮遊液の作製

一群50匹のコーチゾン投与マウスあるいは一群20匹のコーチゾン非投与マウスから胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節を摘出し、ハンクスの緩衝液(pH 7.4, 以下ハンクス液と略)中で細切して細胞浮遊液を作製した¹⁷⁾。この細胞浮遊液中に混在している赤血球を除くために、遠心(1000 rpm, 10分間)して沈殿した細胞を0.83%の塩化アンモニウム溶液に浮遊させて、25°Cで15分間インキュベートした。塩化アンモニウムで処置した細胞をハンクス液で2回遠心・洗浄してから、適量のハンクス液を加えて約10⁷個/mlの細胞浮遊液を調整し、遠心管に入れて4°Cで90分間静置した。静置後、管底に沈んだ凝集片を除去した細胞浮遊液を、リンパ球浮遊液として使用した。胸腺および腸間膜リンパ節から作製したリンパ球浮遊液では、95-98%の細胞がリンパ球であり、2-4%の細胞がマクロファージであった。また、脾臓から作製したリンパ球浮遊液では、ほぼ90%の細胞がリンパ球であり、残りの細胞はマクロファージであった。なお、トリハンブル・テストで調べた細胞の生存率は、いずれのリンパ球浮遊液でも97%以上であった。

本論文では、コーチゾン投与マウスから得られたリンパ球をコーチゾン抵抗性リンパ球と記載し、コーチゾン非投与マウスから得られたリンパ球を総リンパ球と記載した。

7. 腫瘍細胞浮遊液の調整

腫瘍細胞浮遊液は、速度沈降法(Verocity sedimentation)¹⁹¹⁻²¹⁾によって調整した。すなわち、エールリッ

ヒガン細胞を腹腔内に移植して9-10日目のマウスまたは、ザルコーマ180細胞を腹腔内に移植して7-8日目のマウスから10mlの腹水を採取し、腹水に40mlのハンクス液を混和してから遠心(1000rpm, 5分間)した。得られた腫瘍細胞を40mlのハンクス液に浮遊させたのち、500mlのフラスコに入れた2層のショ糖溶液(上層:1.0%ショ糖ハンクス液, 下層:1.5%ショ糖ハンクス液)の上に静かに重層した。4°Cで90分間静置したのち、フラスコの底に沈んだ腫瘍細胞を集めて洗浄し、 10^7 個/mlの細胞浮遊液になるようにハンクス液に浮遊させた。トリパンブルー・テストで調べた腫瘍細胞の生存率は、エールリッヒがん細胞ではほぼ85%, ザルコーマ180細胞では82%前後であった。

8. リンパ球の腫瘍細胞傷害試験

マウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節のリンパ球について、エールリッヒがん細胞あるいはザルコーマ180細胞に対する傷害作用を、Winnの方法⁽¹³⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾(腫瘍細胞中和試験)によって調べた。すなわち、2%の牛血清アルブミン(和光純薬)を含むハンクス液(pH 7.4)に浮遊させたリンパ球(5×10^6 個/ml)と腫瘍細胞の混液を37°Cで120分間インキュベートした。混液中のリンパ球と腫瘍細胞の比率は3:1, 10:1または30:1であった。インキュベート後、洗浄した腫瘍細胞をハンクス液に再浮遊し(腫瘍細胞: 2×10^6 個/ml)、この腫瘍細胞浮遊液の0.5mlをマウスの側腹部皮下に接種した(腫瘍細胞: 10^6 個/マウス)。腫瘍細胞浮遊液を接種したマウスについて、腫瘍増殖の有無を5週間観察し、腫瘍の大きさは(長径+短径) $\times 1/2$ によって測定した。なお、リンパ球を加えずにインキュベートした腫瘍細胞を投与したマウスについても、腫瘍の増殖を観察した。

9. Tリンパ球の同定

マウスのリンパ球において、非特異的酸性 α -ナフチルアセテートエステラーゼ(acid α -naphthyl acetate esterase, 以下ANAEと略)の活性を組織化学的に証明できる細胞はTリンパ球であることが報告されている⁽²³⁾⁽²⁴⁾。このことに基づいて、マウスの各リンパ組織におけるTリンパ球の比率を調べるために、胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節から得られたリンパ球について、ANAE活性の有無をMuellerらの方法⁽²³⁾を一部変更して検索した。すなわち、リンパ球を2%のホルマリンを含むハンクス液(pH 7.4)中で4°Cで10分間固定したのち、自動細胞収集装置(サクラ精機)を用いてスライドガラス上に遠心塗沫(1200rpm, 10分間)した。ついで、精製水中で20分間洗浄した塗沫細胞をパラローザニリンを含む混液中で室温で16時

間処理した。

パラローザニリンを含む混液の組成は以下のとおりである。0.067Mリン酸緩衝液(pH 5.0) 40ml, パラローザニリン溶液[A液:1gの塩酸パラローザニリン(Sigma)を20mlの精製水中に溶解し、5mlの塩酸を加えて加温溶解後、冷却し、濾過したもの。B液:使用のつど調整した4%亜硝酸ナトリウム(和光純薬, 試薬特級)水溶液。同量のA液とB液を混和し、こはく色となるまで数秒間攪拌。] 2.4ml, および10mgの α -ナフチルアセテート(Sigma)を含むアセトン(和光純薬, 試薬特級)0.4mlの混液を、1規定の水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 5.8に調整したもの。

パラローザニリンを含む混液で処置した塗沫細胞を精製水中で10分間洗浄したのち、1%メチルグリーン(E. Merck)を含む0.1M酢酸緩衝液(pH 4.2)で10分間対比染色した。染色後、細胞質中に1個から数個の赤褐色のスポットを持つリンパ球をANAE陽性細胞とし、総細胞数に対するANAE陽性細胞数の比率を求めて、Tリンパ球の比率とした。

成 績

1. マウスリンパ組織の重量

はじめに、溶連菌およびアジュバントのエマルジョン処理マウスおよび非処理マウスの屠殺時の各リンパ組織の重量を測定し、その成績を表1に示した。リンパ組織のなかで、とくに脾臓の重量が処理マウスと非処理マウスとは異なっていた。すなわち、非処理マウスの脾臓の重量が97.3mgであったのに対して、処理マウスの脾臓の重量は、使用エマルジョンの種類にかかわらず140mg前後で、ほぼ1.5倍と著しく増大していた($p < 0.01$)。しかし、腸間膜リンパ節は、溶連菌とLPSによってのみ有意に重量が増加し(43.2mgと54.4-65.0mg, $p < 0.05$)、CFAによっては増加しなかった。胸腺の重量は、溶連菌およびアジュバントによって減少する傾向を示した。

つぎに、溶連菌またはアジュバント処理マウスおよび非処理マウスのリンパ組織重量に対するハイドロコーチゾン(以下コーチゾンと略)の影響を調べた成績を表2に示した。コーチゾン投与によって、非処理マウスのみでなく処理マウスにおいてもリンパ組織の重量が減少したが、とくに胸腺において重量の減少が著明であった。コーチゾンを投与したマウスの胸腺の重量は、非処理マウスでは15.5mg, 処理マウスでは14mg前後で、コーチゾン非投与マウスの胸腺(57.2mgと47.4-50.4mg)に比較して、ほぼ1/3になっていた。同様に処理マウスおよび非処理マウスの脾臓と腸間膜リンパ節の重量は、コーチゾン非投与マウスに比較し

て、ほぼ 1/2 になっていた。したがって、マウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節の重量は、溶連菌またはアジュバント処理の有無にかかわらず、コーチゾンの投与によって明らかに減少していた。

2. マウスリンパ組織のリンパ球数

溶連菌またはアジュバント処理マウスと非処理マウスとでは、リンパ組織の重量が異なっていたので、それぞれのマウスについて、コーチゾンを投与しなかったマウスのリンパ組織のリンパ球数（以下総リンパ球数と略）とコーチゾンを投与したマウスのリンパ球数（以下コーチゾン抵抗性リンパ球数と略）を調べた成績を表 3 に示した。処理マウスの脾臓および腸間膜リンパ節の総リンパ球数は、非処理マウスと比較して著しく多く、リンパ節では 2-3 倍 (76×10^6 個から $176-229 \times 10^6$ 個, $p < 0.01$), 脾臓では 2 倍前後 (373×10^6 個から $645-812 \times 10^6$ 個, $p < 0.01$) になっていた。しかし、胸腺の総リンパ球数は、LPS 処理マウスで若干増加する以外は、それぞれのマウスの間に有意な差はみられなかった。コーチゾン抵抗性リンパ球数は、総リンパ球の場合と同様に、処理マウスの脾臓と腸間

膜リンパ節では、非処理マウスと比較して増加し、1.5-2 倍になっていた。すなわち、非処理マウスおよび処理マウスのそれぞれのリンパ組織のコーチゾン抵抗性リンパ球数は、脾臓では 91×10^6 個と $156-231 \times 10^6$ 個 ($p < 0.01$), 腸間膜リンパ節では 19×10^6 個と $33-40 \times 10^6$ 個 ($p < 0.01$) であった。一方、胸腺では、処理マウスと非処理マウスのコーチゾン抵抗性リンパ球数の間に大きな差異は認められなかった。したがって、溶連菌およびアジュバントは、マウスの脾臓や腸間膜リンパ節の総リンパ球およびコーチゾン抵抗性リンパ球を増加させるが、胸腺においてはほとんど影響を与えなかった。

以上のように、マウスの脾臓および腸間膜リンパ節の総リンパ球数およびコーチゾン抵抗性リンパ球数が溶連菌やアジュバント処理によって変化した。そこで、これらのリンパ組織のコーチゾン抵抗性リンパ球の、総リンパ球に対する比率を求めたところ、処理マウスの場合には、脾臓では 23.1-28.4%、腸間膜リンパ節では 17.5-19.9%、胸腺では 6.3-7.7% であり、非処理マウス脾臓での 24.4%、腸間膜リンパ節での 25.0%、

Table 1. Effect of cocci and adjuvants on the weight of lymphoid tissue of mice

| Experimental animals | Tissues | Tissue weight (mg/tissue) |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Untreated mice | Thymus | 57.2 ± 1.6 |
| Mice treated with cocci | | 47.4 ± 2.6** |
| Mice treated with CFA | | 48.4 ± 2.6** |
| Mice treated with LPS | | 50.4 ± 2.4* |
| Untreated mice | Spleen | 97.3 ± 9.1 |
| Mice treated with cocci | | 149.4 ± 2.1** |
| Mice treated with CFA | | 138.8 ± 2.1** |
| Mice treated with LPS | | 144.6 ± 1.6** |
| Untreated mice | Mesenteric lymph node | 43.2 ± 1.7 |
| Mice treated with cocci | | 65.0 ± 3.5** |
| Mice treated with CFA | | 46.4 ± 4.0 |
| Mice treated with LPS | | 54.4 ± 4.6* |

Ten ml of the physiological saline containing hemolytic streptococci Su strain (cocci) (10mg/ml) or lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* (100μg/ml) was emulsified with 10ml of incomplete Freund's adjuvant. Ten ml of complete Freund's adjuvant (CFA) was also emulsified with the same volume of physiological saline. Mice were injected s. c. with these cocci or adjuvants and killed 14days later.

Each value represents the mean ± SE of 10 experiments.

Significantly different from the corresponding untreated mice at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by t test.

胸腺での7.1%と同程度であり、各リンパ組織において、溶連菌やアジュバントにより、コーチゾン抵抗性リンパ球と総リンパ球がほぼ同程度に増加することを認めた(表3)。これらの関係を図示したのが図1である。図では、縦軸に各リンパ組織ごとのコーチゾン抵抗性リンパ球数を、横軸に対応する各組織の総リンパ球数をとってプロットした。図には incomplete Freund's adjuvant を同量の生理食塩水と混和して作製したエマルジョン、溶連菌の生理食塩水浮遊液(5 mg/ml)あるいはLPSの生理食塩水溶液(50 μ g/ml)の0.2 mlを皮下に注射して14日目のマウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節の、組織ごとのコーチゾン抵抗性リンパ球数と総リンパ球数についても示した。図で明らかなように、それぞれのリンパ組織において、コーチゾン抵抗性リンパ球数と総リンパ球数との間に直線関係が認められ、相関係数(r)は、胸腺では $r = 0.98$ ($n = 7$)、脾臓と腸間膜リンパ節では $r = 0.95$ ($n = 7$)であった。

3. マウスリンパ球の腫瘍細胞傷害作用

マウスの皮下にエールリッヒがん細胞またはザル

コーマ180細胞の 10^6 個を接種すると、接種マウスのすべてに固型腫瘍の増殖がみられ、腫瘍の径は接種後の日数に比例してほぼ直線的に増大する(図2 A, B, \circ 印)ことが認められた。そこで、コーチゾン抵抗性リンパ球の、エールリッヒがん細胞またはザルコーマ180細胞に対する傷害作用を検討するため、腫瘍細胞とリンパ球の混液(37°Cで120分間インキュベートしたもの)をマウスの皮下に接種して(腫瘍細胞: 10^6 個/マウス)5週間観察し、固型腫瘍増殖の有無によって傷害作用を判定した。

1) エールリッヒがん細胞に対するリンパ球の作用
処理および非処理マウスで、コーチゾンを投与しなかったマウスのリンパ球、すなわち総リンパ球の、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用の成績は、表4に示した如くである。胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節の総リンパ球は、溶連菌またはアジュバント処理の有無にかかわらず、エールリッヒがん細胞に対して傷害作用を示さなかった。すなわち、リンパ球と腫瘍細胞の比が30:1のときにも、胸腺または脾臓の総リンパ球で処理した腫瘍細胞を接種したすべてのマウスに腫

Table 2. Effect of hydrocortisone on the weight of lymphoid tissues of mice treated with cocci or adjuvants

| Experimental animals | Tissues | Tissue weight ^a (mg/tissue) | Ratio ^b |
|-------------------------|-----------------------|---|--------------------|
| Untreated mice | Thymus | 15.5 \pm 0.5 | 27.1% |
| Mice treated with cocci | | 14.3 \pm 0.5 | 30.2% |
| Mice treated with CFA | | 14.0 \pm 0.9 | 28.9% |
| Mice treated with LPS | | 13.9 \pm 1.2 | 27.6% |
| Untreated mice | Spleen | 58.6 \pm 2.7 | 60.2% |
| Mice treated with cocci | | 68.9 \pm 2.5* | 46.1% |
| Mice treated with CFA | | 72.7 \pm 3.2** | 52.4% |
| Mice treated with LPS | | 71.7 \pm 1.6** | 50.0% |
| Untreated mice | Mesenteric lymph node | 24.0 \pm 0.9 | 55.6% |
| Mice treated with cocci | | 25.5 \pm 1.7 | 39.2% |
| Mice treated with CFA | | 24.3 \pm 2.0 | 52.4% |
| Mice treated with LPS | | 20.4 \pm 3.2 | 37.6% |

Mice treated with cocci or adjuvants were injected i. p. with hydrocortisone acetate (125mg/kg) 2days before killing.

a: Each value represents the mean \pm SE of 10 experiments.

b: The ratio of the tissue weight of mice injected with hydrocortisone to that of mice injected without hydrocortisone.

Significantly different from the corresponding untreated mice at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by t test.

Table 3. Number of total and cortisone-resistant lymphoid cells in thymus, spleen or mesenteric lymph node of mice treated with cocci or adjuvants

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Number of lymphoid cells in tissues ($\times 10^5$ cells/tissue) | | | |
|--------------------------|------------------|--|---|---------------------------|------|
| | | Total cells (A) ^a | Cortisone- resistant cells (B) ^a | Ratio of B to A (%) | |
| Untreated mice | Thymic cells | 408 \pm 22 | 29 \pm 2 | 7.1 | |
| | | Mice treated with cocci | 363 \pm 13 | 28 \pm 3 | 7.7 |
| | | Mice treated with CFA | 471 \pm 37 | 36 \pm 4 | 7.6 |
| | | Mice treated with LPS | 637 \pm 30* | 40 \pm 4* | 6.3 |
| Untreated mice | Splenic cells | 373 \pm 13 | 91 \pm 5 | 24.4 | |
| | | Mice treated with cocci | 674 \pm 36** | 156 \pm 9** | 23.1 |
| | | Mice treated with CFA | 645 \pm 34** | 163 \pm 7** | 25.3 |
| | | Mice treated with LPS | 812 \pm 54** | 231 \pm 22** | 28.4 |
| Untreated mice | Mesenteric cells | 76 \pm 5 | 19 \pm 2 | 25.0 | |
| | | Mice treated with cocci | 186 \pm 7** | 37 \pm 2** | 19.9 |
| | | Mice treated with CFA | 229 \pm 11** | 40 \pm 4* | 17.5 |
| | | Mice treated with LPS | 176 \pm 12** | 33 \pm 2** | 18.8 |

Mice were injected s. c. with cocci or adjuvants and killed 14 days later. To obtain the cortisone-resistant lymphoid cells, the mice were injected i. p. with hydrocortisone acetate (125mg/kg) 2 days before killing. The total lymphoid cells were obtained from the mice without the treatment of hydrocortisone.

a: Each value represents the mean \pm SE of 10 experiments.

Significantly different from the corresponding untreated mice at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by t test.

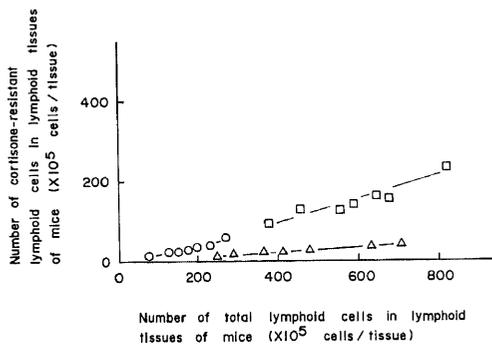


Fig. 1. Relationship between the number of cortisone-resistant and total lymphoid cells within thymus, spleen or mesenteric lymph node of mice. Each number of the cortisone-resistant lymphoid cells was plotted against the corresponding number of the total lymphoid cells within each of the lymphoid tissues of mice.

Symbols: Δ , thymic lymphoid cells; \square , splenic lymphoid cells; \circ , mesenteric lymphoid cells.

瘍の増殖が認められた。また、腸間膜リンパ節の総リンパ球で処理した腫瘍細胞を接種したマウスでも、接種5週目で固型腫瘍を認めたマウス（以下担がんマウスと記す）の接種マウスに対する割合は9-10/10であった。

これに対し、処理および非処理マウスで、コーチゾン投与したマウスのリンパ球、すなわちコーチゾン抵抗性リンパ球の、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用を調べた成績は、表5の如くである。表には、細胞混液中のリンパ球と腫瘍細胞の比が10:1および3:1のときの成績を示した。腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球と腫瘍細胞の比が10:1のとき、非処理マウスのリンパ節細胞で処理した腫瘍細胞を接種したマウスでは、担がんマウスの接種マウスに対する割合は9/20であったが、溶連菌またはCFAで処理した腫瘍細胞を接種したマウスには、腫瘍の増殖がみられなかった(担がんマウス/接種マウス: 0/20, $p < 0.01$)。すなわち、溶連菌またはCFAで処理

したマウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マウスのリンパ節細胞に比較して、エールリッヒがん細胞に対して強い細胞傷害作用を示すことを認めた。同様に、溶連菌またはCFAで処理したマウスの胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マウスのコーチゾン抵抗性胸腺リンパ球よりも、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用が強かった。すなわち、リンパ球とエールリッヒがん細胞の比が10:1のとき、溶連菌やCFA処理マウスのコーチゾン抵抗性胸腺リンパ球で処理した腫瘍細胞、および非処理マウスのコーチゾン抵抗性胸腺リンパ球で処理した腫瘍細胞を接種したマウスでは、担がんマウスの割合は、それぞれ6-7/20および15/20であった ($p < 0.05$)。一方、LPS処理マウスの腸間膜リンパ節または胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球の、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用は、非処理マウスの各組織のコーチゾン抵抗性リンパ球の傷害作用と変わらなかった。なお、脾臓のコーチゾン抵抗性リンパ球は、溶連菌また

はアジュバント処理の有無にかかわらず、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用が著しく弱かった。

図2 A ●印は、非処理マウスのコーチゾン抵抗性脾リンパ球で処理したエールリッヒがん細胞を皮下に接種したマウスでの、腫瘍増殖の経過を示した。

2) ギルコーマ180細胞に対するリンパ球の作用

溶連菌またはCFAで処理したマウスの腸間膜リンパ節や胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球の、ギルコーマ180細胞に対する傷害作用についての実験成績は表6に示した如くである。コーチゾン抵抗性リンパ球とギルコーマ180細胞の比が10:1のとき、非処理マウスの腸間膜リンパ節細胞で処理した腫瘍細胞を接種したマウスのほとんどに、腫瘍の増殖が認められた(担がんマウス/接種マウス:17/20)。これに対して、溶連菌またはCFA処理マウスのリンパ節細胞で処理した腫瘍細胞を接種したマウスでは、担がんマウスの割合は9/20であった ($p < 0.01$)。すなわち、溶連菌またはCFAで処理したマウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マウスのリンパ節のリンパ球よりも、ギルコーマ180細胞に対して細胞傷害性であることが認められた。しかしながら、LPS処理マウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球と、非処理マウスのコーチゾン抵抗性リンパ球との間には、ギルコーマ180細胞に対する傷害作用に差が認められなかった。また、胸腺および脾臓のコーチゾン抵抗性リンパ球では、アジュバント処理の有無にかかわらず、ギルコーマ180細胞に対する傷害作用が弱かった。

図2 B ●印は、非処理マウスの脾臓リンパ球で処理したギルコーマ180細胞を皮下接種したマウスでの腫瘍増殖の経過を示したものであり、その経過は、リンパ球で処理しなかったギルコーマ180細胞を接種した場合(○印)と変わらなかった。また、コーチゾン非投与マウスの各リンパ組織の総リンパ球の、ギルコーマ180細胞に対する傷害作用は、リンパ球と腫瘍細胞の比が30:1の場合にも認められなかった。

4. リンパ球中のANAE陽性細胞に関する実験

前述の如く、溶連菌やCFAで処理したマウスの腸間膜リンパ節または胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球は、強い腫瘍細胞傷害作用を示したので、各リンパ組織のコーチゾン抵抗性リンパ球中のT細胞の比率について、処理マウスと非処理マウスとで比較検討を行った。

マウスのリンパ節や脾臓ではacid α -naphthyl acetate esterase (以下ANAEと略)が陽性のリンパ球はT細胞であり、胸腺では、ANAE陽性のリンパ球は成熟T細胞であり、ANAE陰性のリンパ球は未熟な

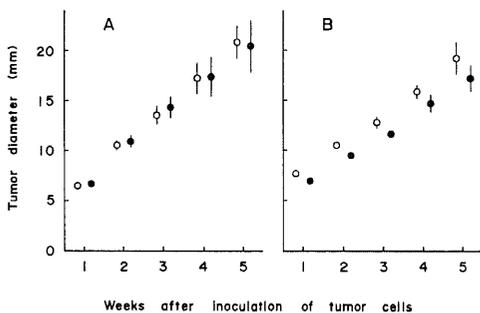


Fig. 2. Tumor diameter of mice after s. c. inoculation with tumor cells alone or with the mixture of tumor cells and cortisone-resistant splenic lymphoid cells of untreated mice.

Tumor cells suspended in Hanks balanced salt solution (pH 7.4) supplemented with 2% bovine albumin (5×10^5 tumor cells/ml) were incubated at 37°C for 120 min with cortisone-resistant splenic lymphoid cells of untreated mice (tumor cells/lymphoid cells: 1/10). After incubation, the cell mixture was inoculated s. c. into mice (10^6 tumor cells/mouse) (●). The tumor cells incubated for 120 min without the lymphoid cells were also inoculated into mice (○). Tumor diameter was calculated as follows: Tumor diameter (mm) = (long diameter + short diameter)/2. Each value represents the mean \pm SE of 10 mice bearing with solid tumor.

A: tumor diameter of mice given Ehrlich carcinoma cells.

B: tumor diameter of mice given sarcoma-180 cells.

T細胞であることが報告されている。そこで、材料および方法の項で記した如くにして、処理マウスならびに非処理マウスの各リンパ組織の、コーチゾン抵抗性リンパ球中の ANAE 陽性細胞数を算定し、これのコーチゾン抵抗性リンパ球数に対する比率を示したのが表 7 である。溶連菌またはアジュバント処理マウスおよび非処理マウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率は 59.2-68.3%と 63.5%で、両者の間には有意な差は認められなかった。また、処理マウスの胸腺および脾臓のコーチゾン抵抗性リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率 (66.8-81.2%と 55.0-57.3%) は、LPS 処理マウスの胸腺でわずかに増加するのを除いては、非処理マウスのリンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率 (63.6%と 49.8%) とほぼ同程度であった。したがって、マウスの腸間膜リンパ節、胸腺および脾臓のコーチゾン抵抗性リンパ球中の T 細胞の比率は、溶連菌や CFA に

よってほとんど変化しないことが示された。

表 8 は、処理マウスおよび非処理マウスにコーチゾンを投与しなかった時の、各リンパ組織のリンパ球 (総リンパ球) 中の ANAE 陽性細胞の比率を示したものである。総リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率は、溶連菌処理マウスの胸腺では 83.7%、脾臓では 59.0%、腸間膜リンパ節では 75.7%で、非処理マウスの総リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率 (59.0%、49.8%および 55.0%) よりも多くなっていた ($p < 0.05$)。しかし CFA や LPS で処理したマウスの総リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率は、非処理マウスの総リンパ球中の ANAE 陽性細胞の比率にくらべて、若干多かったか、ほぼ同じ程度であった。

考 察

溶連菌または CFA を用いて処理したマウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マ

Table 4. Effect of total lymphoid cells of mice treated with cocci or adjuvants on Ehrlich carcinoma cells

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Number of solid tumor bearing mice at 5th week after inoculation | |
|--------------------------|------------------|--|--------|
| | | Lymphoid cells: ϕ :or cells ^a | |
| | | 30 : 1 | 10 : 1 |
| Untreated mice | Thymic cells | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with CFA | | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 10/10 | 10/10 |
| Untreated mice | Splenic cells | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with CFA | | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 10/10 | 10/10 |
| Untreated mice | Mesenteric cells | 10/10 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 9/10 | 10/10 |
| Mice treated with CFA | | 9/10 | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 10/10 | 10/10 |

The mixture of tumor cells and lymphoid cells (10^5 tumor cells/ml) in Hanks balanced salt solution supplemented with 2% bovine serum albumin (pH 7.4) was incubated at 37°C for 120 min. After incubation, the cell mixture was inoculated s. c. into mice (10^6 tumor cells/mouse).

a: The ratio of the lymphoid cells to the tumor cells in the cell mixture was 30 : 1 or 10 : 1.

ウスの腸間膜リンパ節コーチゾン抵抗性リンパ球に比較して、エールリッヒがん細胞やザルコーマ 180 細胞に対して強い細胞傷害作用を示し、また、胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球もエールリッヒがん細胞に対して、非処理マウスのコーチゾン抵抗性リンパ球よりも強い傷害作用を示した。しかしながら、LPS 処理マウスでは、胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節の各コーチゾン抵抗性リンパ球の細胞傷害作用増強はみられず、非処理マウスの各リンパ球の作用とほぼ同程度であった。したがってコーチゾン抵抗性リンパ球の腫瘍細胞傷害作用は、溶連菌および CFA によってのみ増強され、LPS によっては増強されないことが本実験で証明された。

また、脾臓のコーチゾン抵抗性リンパ球の、溶連菌や CFA による細胞傷害作用の増強は微弱であった。このことは、リンパ球の細胞傷害作用の溶連菌や CFA による増強は、胸腺および腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球にのみ起こり、臓器によって異なることを示唆している。

近年がん免疫療法において、マクロファージや各種

リンパ球が重要な役割を果たすことが報告され、OK-432 や BCG などの免疫賦活薬がこれらの細胞を賦活化する報告が多く出されている。本研究では、溶連菌や CFA がリンパ球の腫瘍細胞傷害作用を増強すると共に、溶連菌やアジュバントがリンパ球数をも増加させることが実証された。このうち、細胞傷害作用の増強は溶連菌および CFA によってみられ、LPS にはみられないこと、また、胸腺および腸間膜リンパ節細胞では著しく増強されるが、脾リンパ球では増強効果がほとんどみられなかったことは、各組織によってリンパ球の性状が異なること、ならびに賦活薬の種類によって活性化の程度がそれぞれ異なることを示唆している。これらを明らかにするためには、更に研究が必要であると考えられた。

リンパ球は二つの種類、すなわち T 細胞と B 細胞とに大別されており、腫瘍免疫や移植免疫などの細胞性免疫に関与するのは、主として T リンパ球であることが明らかにされている。また、リンパ球のうちでも、細胞傷害性はコーチゾン抵抗性リンパ球において強いとされている。このことから、細胞の acid α -

Table 5. Effect of cortisone-resistant lymphoid cells of mice treated with cocci or adjuvants on Ehrlich carcinoma cells

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Number of solid tumor bearing mice at 5th week after inoculation | |
|--------------------------|------------------|--|---------|
| | | Lymphoid cells: tumor cells | |
| | | 10 : 1 | 3 : 1 |
| Untreated mice | Thymic cells | 15/20 | 20/20 |
| Mice treated with cocci | | 7/20* | 19/20 |
| Mice treated with CFA | | 6/20* | 18/20 |
| Mice treated with LPS | | 12/20 | 20/20 |
| Untreated mice | Splenic cells | 20/20 | 20/20 |
| Mice treated with cocci | | 16/20 | 20/20 |
| Mice treated with CFA | | 16/20 | 20/20 |
| Mice treated with LPS | | 17/20 | 20/20 |
| Untreated mice | Mesenteric cells | 9/20 | 20/20 |
| Mice treated with cocci | | 0/20** | 15/20* |
| Mice treated with CFA | | 0/20** | 12/20** |
| Mice treated with LPS | | 9/20 | 20/20 |

Significantly different from the corresponding untreated mice at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ by χ^2 test.

naphthyl acetate esterase (ANAE)活性を指標として、コーチゾン抵抗性リンパ球中のTリンパ球の算出を行った。その結果、溶連菌、CFAあるいはLPS処理によってリンパ球数はいずれも増加したが、コーチゾン抵抗性リンパ球中のANAE陽性のリンパ球(T細胞)の比率は腸間膜リンパ節で59.2-68.3%、脾臓では55.0-57.3%、胸腺では63.6-72.8%と、いずれも溶連菌やアジュバントで処理しなかったマウスの各リンパ組織での比率と変わらなかった。しかし前述の如く、溶連菌やアジュバント処理により各リンパ組織の総リンパ球数が増加していることから、コーチゾン抵抗性でANAE陽性のリンパ球数は、処理マウスでは非処理マウスに比較して増加している。したがってこの増加は総リンパ球数の増加に伴うもので、溶連菌やアジュバントが選択的にコーチゾン抵抗性ANAE陽性細胞を増加させるものではない。一方、溶連菌やCFAによって脾臓のコーチゾン抵抗性ANAE陽性リンパ球数も増加するが、腫瘍細胞に対する傷害作用の増強がみられなかったこと、ならびにLPSでも各リンパ組織のコーチゾン抵抗性ANAE陽性リンパ球数

が増加するが、腫瘍細胞傷害作用が増強されなかったことは、コーチゾン抵抗性ANAE陽性リンパ球にもリンパ組織によって差異があることを示唆している。また、溶連菌やCFAによって胸腺や腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球の腫瘍細胞傷害性が増強されたが、これらのコーチゾン抵抗性リンパ球中のANAE陽性リンパ球の比率が変化しなかったことから、溶連菌やCFAがT細胞数に対して影響を与えるだけでなく、T細胞の細胞傷害活性に対しても影響を与えるものと考えられる。また、LPSが溶連菌やCFAと同様にコーチゾン抵抗性ANAE陽性リンパ球数を増加させても細胞傷害性を増強しないのは、LPSの作用が溶連菌やCFAの作用と異なっていることを示唆するものと言えよう。これについてはさらに検討が必要である。

最近の研究によれば、Tリンパ球は、helper T cell, suppressor T cell, killer T cellをはじめとするeffector T cellなどのsubpopulationに分類され、これらのリンパ球のうち、腫瘍細胞やallogeneicな細胞に対して傷害作用を示すのはeffector T cellである

Table 6. Effect of cortisone-resistant lymphoid cells of mice treated with cocci or adjuvants on sarcoma-180 cells

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Number of solid tumor bearing mice at 5th week after inoculation | |
|--------------------------|------------------|--|-------|
| | | Lymphoid cells: tumor cells | |
| | | 10 : 1 | 3 : 1 |
| Untreated mice | Thymic cells | 15/20 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 18/20 | 10/10 |
| Mice treated with CFA | | 15/20 | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 16/20 | 10/10 |
| Untreated mice | Splenic cells | 18/20 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 18/20 | 10/10 |
| Mice treated with CFA | | 18/20 | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 16/20 | 10/10 |
| Untreated mice | Mesenteric cells | 17/20 | 10/10 |
| Mice treated with cocci | | 9/20* | 9/10 |
| Mice treated with CFA | | 9/20* | 10/10 |
| Mice treated with LPS | | 8/10 | 10/10 |

Significantly different from the corresponding untreated mice at * $p < 0.01$ by χ^2 test.

とされている²⁵⁾。実験に使用した腸間膜リンパ節や胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球に含まれるT細胞のsubpopulationの割合、とくにeffector T cellの割合は、本実験では明らかにすることができなかったが、溶連菌やCFAで処理したマウスと非処理マウスとでは、腸間膜リンパ節や胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球に含まれているT細胞のsubpopulationの割合が異なっているか、あるいは個々のeffector T cellの活性が異なっているために、腫瘍細胞に対する傷害作用の差が現われていると考えられるが、これについてはさらに研究が必要である。しかし、細胞傷害作用の違いについては、T細胞以外の因子（例えばnatural killer cellなど）の違いが関与していることも、本実験では否定できない。

結 論

コーチゾン抵抗性リンパ球に対する溶連菌およびアジュバントの作用を比較検討する目的で、溶連菌、CFAまたはLPSを投与したマウスの胸腺、脾臓および腸間膜リンパ節から得たコーチゾン抵抗性リンパ球の、エールリッヒがん細胞またはザルコーマ180細胞に対する傷害作用を調べて、溶連菌またはアジュバントを投与しなかったマウス（非処理マウス）のリンパ球の作用と比較した。また同時に、各組織におけるコーチゾン抵抗性リンパ球の割合と、リンパ球中のT細胞の割合を求めて以下の成績を得た。

1. マウスの脾臓および腸間膜リンパ節の総リンパ球とコーチゾン抵抗性リンパ球は、溶連菌またはアジュバント処理によって著しく増加し、非処理マウス

Table 7. Proportion of ANAE-positive cells in cortisone-resistant lymphoid cells of thymus, spleen or mesenteric lymph node

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Proportion of ANAE-positive cells in cortisone-resistant lymphoid cells(%) ^a |
|--------------------------|----------------|---|
| Untreated mice | Thymic | 63.6±6.3 |
| Mice treated with cocci | cells | 72.8±2.5 |
| Mice treated with CFA | | 66.8±5.4 |
| Mice treated with LPS | | 81.2±2.9 * |
| Untreated mice | Splenic | 49.8±4.6 |
| Mice treated with cocci | cells | 56.0±3.0 |
| Mice treated with CFA | | 57.3±1.5 |
| Mice treated with LPS | | 55.0±2.9 |
| Untreated mice | Mesenteric | 63.5±4.1 |
| Mice treated with cocci | cells | 68.3±2.9 |
| Mice treated with CFA | | 59.2±3.4 |
| Mice treated with LPS | | 59.4±2.2 |

Lymphoid cells were fixed in 2% formaldehyde in Hanks balanced salt solution (pH 7.4) at 4°C for 10 min. Cell smears were then prepared by cytocentrifuged procedure and they were washed in distilled water for 20 min. Activity of ANAE (acid α -naphthyl acetate esterase) was demonstrated by incubating the cell smears at room temperature for 16 hrs in a medium (pH 5.8) consisting of 40ml of 0.067 M phosphate buffer, 10mg of α -naphthyl acetate in 2.4ml of acetone and 2.4ml of hexazotized pararosaniline. After incubation, the cell smears were washed in distilled water for 10 min and counterstained with 1% methyl green in 0.1ml acetate buffer (pH 4.2) for 10 min.

a: Each value represents the mean \pm SE of 5 experiments.

*: Significantly different from the corresponding untreated mice at $p < 0.05$ by t test.

のそれぞれのリンパ球数のおよそ2倍になっていた。しかし、これらのリンパ組織におけるコーチゾン抵抗性リンパ球の比率には、処理マウスと非処理マウスとの間に差がみられなかった（脾臓では23-28%、リンパ節では18-25%）。

2. マウス胸腺の総リンパ球数とコーチゾン抵抗性リンパ球数の溶連菌やアジュバントによる変化は、脾臓や腸間膜リンパ節でみられるほどには著しくなかった。また、胸腺においてもコーチゾン抵抗性リンパ球の比率はおよそ7%と、溶連菌やアジュバントによって変化しなかった。

3. 溶連菌またはCFAで処理したマウスの腸間膜リンパ節のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マウスの腸間膜リンパ節コーチゾン抵抗性リンパ球に比較して、エールリッヒがん細胞やザルコーマ180細胞に対して、より強い細胞傷害作用を示した。

4. 溶連菌またはCFAで処理したマウスの胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球は、非処理マウスの胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球よりも、エールリッヒがん細胞に対する傷害作用が強かった。

5. LPS処理マウスの腸間膜リンパ節や胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球と、非処理マウスの各リン

パ組織のコーチゾン抵抗性リンパ球との間には、腫瘍細胞傷害作用に差がみられなかった。

6. マウスの脾臓、腸間膜リンパ節および胸腺のコーチゾン抵抗性リンパ球中のT細胞の割合は、溶連菌またはCFA処理によって変化しなかった（脾臓では50-57%、リンパ節では59-68%、胸腺では64-73%）。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました正印達教授および現福井医科大学薬理学木越茂教授に深い感謝の意を表します。

文 献

- 1) Westphal, O.: Bacterial endotoxins. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, **49**, 1-43 (1975).
- 2) Allison, A. C.: Mode of action of immunological adjuvants. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **26** (suppl.), 619-630 (1979).
- 3) Morrison, D. C. & Ryan, J. L.: Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.*, **28**, 293-450 (1979).

Table 8. Proportion of ANAE-positive cells in total lymphoid cells of thymus, spleen or mesenteric lymph node of mice

| Source of lymphoid cells | Lymphoid cells | Proportion of ANAE-positive cells in total lymphoid cells(%) ^a |
|--------------------------|----------------|---|
| Untreated mice | Thymic | 59.0±4.0 |
| Mice treated with cocci | cells | 83.7±2.0** |
| Mice treated with CFA | | 59.8±5.0 |
| Mice treated with LPS | | 75.4±2.6** |
| Untreated mice | Splenic | 49.8±2.8 |
| Mice treated with cocci | cells | 59.0±2.5* |
| Mice treated with CFA | | 50.2±2.8 |
| Mice treated with LPS | | 55.0±2.9 |
| Untreated mice | Mesenteric | 55.0±2.9 |
| Mice treated with cocci | cells | 75.7±1.2** |
| Mice treated with CFA | | 56.5±2.3 |
| Mice treated with LPS | | 64.8±1.7* |

a: Each value represents the mean±SE of 5 experiments.
Significantly different from the corresponding untreated mice at *p<0.05 and **p<0.01 by t test.

- 4) **Jordan, G. W. & Merigan, T. C.**: Enhancement of host defence mechanisms by pharmacological agents. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **15**, 157-175 (1975).
- 5) **Woods, W. A.**: Mechanisms of action of immunopotentiating agents in cancer therapy. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, **14**, 143-162 (1977).
- 6) **Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.**: Streptolysin S-forming and antitumour activities of group A streptococci, p. 259-289.
In J. Jeljaszewicz & T. Wadström (ed.), *Bacterial toxins and cell membranes*, Academic Press, London, 1978.
- 7) **Claman, H. N.**: Corticosteroids and lymphoid cells. *New Engl. J. Med.*, **287**, 388-397 (1972).
- 8) **Parrillo, J. E. & Fauci, A. S.**: Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 179-201 (1979).
- 9) **Dracott, B. N. & Smith, C. E. T.**: Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology*, **38**, 429-435 (1979).
- 10) **Cohen, J. J., Fischbach, M. & Claman, H. N.**: Hydrocortisone resistance of graft *vs* host activity in mouse thymus, spleen and bone marrow. *J. Immunol.*, **105**, 1146-1150 (1970).
- 11) **Blomgren, H. & Andersson, B.**: Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus. *Exp. Cell Res.*, **57**, 185-192 (1969).
- 12) **Tigelaar, R. E. & Asofsky, R.**: Graft-*vs* -host reactivity of mouse thymocytes: Effect of cortisone pretreatment of donors. *J. Immunol.*, **110**, 567-574 (1973).
- 13) **Winn, H. J.**: Immune mechanisms in homo-transplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J. Immunol.*, **86**, 228-239 (1961).
- 14) **Woods, A. J. & Gunsalus, I. G.**: The production of active resting cells of streptococci. *J. Bact.*, **44**, 333-341 (1942).
- 15) **Kigoshi, S. & Kitajima, K.**: Effect of streptococcal lipids on Ehrlich ascites tumor cells. *Japan. J. Pharmacol.*, **31**, 201-209 (1981).
- 16) **Chedid, L., Lamensans, A., Parant, F., Parant, M., Adam, A., Petit, J. F. & Lederer, E.**: Protective effect of delipidated mycobacterial cells and purified cell walls against Ehrlich carcinoma and a syngeneic lymphoid leukemia in mice. *Cancer Res.*, **33**, 2187-2195 (1973).
- 17) 木越 茂・北島耕作・川尻博男・小久保護・河野照茂・西尾真友: マウスの胸腺リンパ球, 脾リンパ球およびリンパ節細胞の脂質組成と脂質の脂肪酸構成. *十全医誌*, **89**, 731-739 (1980).
- 18) **Dannenberg, A. M., Burstone, M. S., Walter, P. C. & Kinsley, J. W.**: A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages. I. Survey and quantitation of enzymes, and states of cellular activation. *J. cell. Biol.*, **17**, 465-486 (1963).
- 19) **Miller, R. G. & Phillips, R. A.**: Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.*, **73**, 191-202 (1969).
- 20) **Tulp, A. & Welagen, J. J. M. N.**: Fractionation of ascites tumour cells at 1g: Separation of cells in specific stages of the life cycle. *Europ. J. Cancer*, **12**, 519-526 (1976).
- 21) **Kigoshi, S.**: Decrease of cholesterol and free fatty acid in cortisone-resistant lymphoid cells incubated with allogeneic tumor cells. *Experientia*, **35**, 836-838 (1979).
- 22) **Howell, S. B., Dean, J. H., Esber, E.C. & Law, L. W.**: Cell interactions in adoptive immune rejection of a syngeneic tumor. *Int. J. Cancer*, **14**, 662-674 (1974).
- 23) **Mueller, J., Brun del Re, G., Buerki, H., Keller, H. U., Hess, M. W. & Cottier, H.**: Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Europ. J. Immunol.*, **5**, 270-274 (1975).
- 24) **Ranki, A., Tötterman, T. H. & Häyry, P.**: Identification of mouse T and B lymphocytes from cytocentrifuged cell smears. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 632-640 (1976).
- 25) **Beverly, P. C. L.**: Lymphocyte heterogeneity, p. 35-57. *In* F. Loor & G. E. Roelants (ed.), *B and T cells in immune recognition*, John Wiley & Sons Ltd., London, 1977.

Effect of Streptococcus and Adjuvants on the Cortisone-resistant Lymphoid Cells of Mice
Matomo Nishio, Department of Pharmacology, School of Medicine (Director: Prof. S. Shoin), Kanazawa University, Kanazawa 920 and Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Kigoshi), Fukui Medical School, Matsuoka, Fukui 910-11 — J. Juzen Med. Soc., 92, 631–644 (1983)

Key words: Cortisone-resistant lymphoid cells, Streptococcus, Adjuvants, Cytotoxicity, T cell proportion

Abstract

The cortisone-resistant lymphoid cells (CR cells) of mice treated with streptococcus or adjuvants were examined for their cytotoxicity on Ehrlich carcinoma cells or sarcoma-180 cells. Female mice of ddY strain, 7-8 weeks old, were injected s.c. with a group A hemolytic streptococcus Su strain, complete Freund's adjuvant (CFA) or lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* and killed 14 days later. Hydrocortisone acetate (125 mg/kg) was injected i.p. into mice to obtain CR cells 2 days before killing. The CR cell suspension was prepared from thymus, spleen or mesenteric lymph node of mice, using Hanks' balanced salt solution (pH 7.4) supplemented with 2% bovine serum albumin. To examine the effect of CR cells on tumor cells, the mixture of tumor cells and CR cells (tumor cells/lymphoid cells: 1/10) in HBSS was inoculated s.c. into mice (10^6 tumor cells/mouse) after incubation of the mixture at 37°C for 120 min, and the growth of solid tumor in the animals was observed for 5 weeks. When the mixture of Ehrlich carcinoma cells and the mesenteric CR cells of untreated or LPS-treated mice was injected, tumor growth was observed in 9 of 20 animals. However, no tumor growth was observed in the group of 20 mice inoculated with the mixture of Ehrlich cells and the mesenteric CR cells of animals treated with streptococcus or CFA. Further study was performed using sarcoma-180 cells. The mixture of sarcoma-180 cells and the mesenteric CR cells of mice treated with streptococcus or CFA or those of untreated mice were inoculated into mice. Tumor growth occurred in 17 of 20 mice when CR cells of untreated mice were used, whereas it occurred in 9 out of 20 mice when those of treated mice were used. The cytotoxicity of thymic cells on Ehrlich carcinoma cells was enhanced by the treatment of streptococcus or CFA, but not by LPS. The cytotoxicity of splenic CR cells was not enhanced by streptococcus, CFA or LPS. Furthermore, when the ratio of T cells to the CR cells in each lymphoid tissue were examined by testing the acid α -naphthyl acetate esterase activity in the cells, T cell proportion in the CR cells of treated mice was demonstrated to be almost the same as that of untreated mice in each lymphoid tissue. These results indicate that the mesenteric CR cells of mice treated with streptococcus or CFA are more cytotoxic to Ehrlich carcinoma cells and sarcoma-180 cells than the CR cells of untreated or LPS-treated mice.