

移植性培養細胞 (THEL) のパラミキソウイルス・HVJ 持続感染化による移植能および細胞膜抗原性の変換

金沢大学大学院医学研究科ウイルス学講座(主任：波田野基一教授)

山 田 燦

(昭和48年1月22日受付)

本論文の要旨は、昭和44年8月第17回、昭和46年10月第19回日本ウイルス学会総会、および昭和45年10月第29回、昭和47年10月第31回日本がん学会総会において報告された。

腫瘍ウイルスたとえば、ポリオーマ、アデノ、SV₄₀などのウイルスによりがん化された細胞では、対応ウイルスで免疫された動物への移植拒否により、ウイルス性腫瘍細胞としての移植抗原が、周知のごとく見出されている¹⁾²⁾。さらに、ある移植性がん細胞にあるウイルスが感染すると、細胞変性効果(CPE)を伴うことなしに、その移植性の低下する場合が数多く知られて来た^{3)~9)}。この場合、がん細胞が腫瘍ウイルスによるがん化で生じても^{3)~6)9)}その他、化学発がん剤によるもの、あるいは、自然発がんによるもの⁷⁾⁸⁾でも全く同様で、また感染に使用するウイルスが非腫瘍⁵⁾あるいは腫瘍ウイルス^{3)4)6)~9)}であっても、その移植性の低下現象に本質的な大きな差はない。但し、移植される生体(がん細胞と同系な動物)が、予め感染に使用するウイルスにより免疫されていることがこの場合は必要とされ、ウイルス性腫瘍細胞における移植抗原検出過程に含まれる機作によく類似しているといえよう。しかしながら、近年、小林ら^{10)~14)}は、マウス白血病ウイルスの一つである Friend ウイルスに感染した移植性ラットがん細胞が、細胞変性効果を示さないのに、非免疫の正常ラットに移植性を消失または一過性の増殖後退縮することを報告している。この免疫していない生体における移植性拒否の問題は、前述の Habel らのウイルス性腫瘍移植抗原¹⁾²⁾または、Svet-Moldavsky ら^{3)~9)}のウイルス感染がん細胞のウイルス免疫生体における移植性の低下と相通じるものがあるとはいえ、移植を受けた生体内部の反応(恐らく免疫反応)が、量的にも質的にも移植前と異ってきたためと考えられる。

我々は、先に樹立化しえたハムスター胎児肺細胞由来の移植性培養細胞 (THEL)¹⁵⁾ およびそのパラミキソウイルス：HVJ持続感染細胞 (THEL-HVJ) の生物学的諸性質の差を比較検索中、両者の最も大きな差が細胞膜にあることを確めた¹⁶⁾。しかも、両者の移植性の比較において、HVJ持続感染細胞 (THEL-HVJ) は、ウイルスによる細胞変性効果を全く欠くにもかかわらず、正常ハムスターにおいて、親細胞 (THEL) よりはるかに低い移植性と、時に腫瘍が退縮することを知った¹⁷⁾。そこで、前述のウイルス性腫瘍移植抗原の産生機作を考察しつつ、ウイルス持続感染がん細胞における移植性低下現象の本態として、その細胞膜変換現象²⁾¹⁴⁾¹⁸⁾ (生物学的にも血清学的にも) のもつ重要な役割を、これら THEL, THEL-HVJ 細胞系で以下のごとく追求した。

実験材料および方法

I. 試験管内がん化ハムスター胎児肺細胞 (THEL=TL) およびそのパラミキソウイルス：HVJ持続感染細胞 (THEL-HVJ=TH)

TLは、さきに矢吹¹⁵⁾が樹立化した細胞で、THは、後述のごとくして得られた。これらは、いずれも単層静置培養され、継代の際には0.02%EDTAと0.1%プロナーゼの等量混合液で、通常のトリプシナイゼーション法¹⁹⁾によりはがし、洗滌後適当な細胞数に新鮮培養液で再浮遊して継代培養された。培養液はいずれの細胞も (Eagle MEM+10%非働化牛血清+0.07~0.14%重曹) を用いた。なお、TL, TH両細胞とも必要に応じて、既述の滅菌濾紙小片法²⁰⁾²¹⁾で、クローニ

Conversion of Transplantability and Cell Membrane Antigenicity in Cultured Tumor Cells by Persistent Infection with Paramyxovirus : HVJ. Tsubara Yamada, Department of Virology (Director : Prof. M. Hatano), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

ングを行い、得られたクローンについても実験が行われた。

II. ウイルス

パラミキソウイルス：HVJ (Hemagglutinating virus of Japan) 名古屋-1-60株を発育鶏卵で増殖させたもの(通常、血球凝集価=HAU, 1:2048前後, $TCID_{50}/0.2ml=10^{7.8}$)を適宜希釈して用いた。また、抗血清中のウイルス抗体の吸収およびブロッキングの際には、30,000r. p. m. 60~120分遠心後、10~20倍に濃縮半精製されたウイルスが使われた。

III. 腫瘍形成能(移植能)試験

市販のゴールデンハムスター雌雄(6~12週令)を用いた。動物への接種には、トリプシニゼーション法ではがされた両細胞とも、洗滌後、Hanks液に再浮遊された。血球計算盤で細胞数を測定後、 $10^3\sim 10^6/0.2ml$ の細胞数をハムスター背部皮下に接種した。接種後、経日的に触知しうる腫瘍の長径と短径を測定し、その平均径(mm)を腫瘍径とした。

IV. X線照射

東芝製 Type S54-D4 装置を用い、ハムスター全身照射は75cm、浮遊細胞照射は30cmの距離で、出力は180kv(2次電圧)、15mA、フィルター(0.5Cu, 0.5Al)の条件で行われた。

V. 培養細胞膜系 cell ghost (cg) および不溶性リポ蛋白(I. L. P.)抽出法。

Thomas & Smith²²⁾²³⁾の方法を改良して行った。すなわち、ラバーポリスマンで集めた培養細胞(TLまたはTH)に、KCl, モノヨード酢酸, クエン酸ソーダを加え、waring blenderで碎き、(10,000r. p. m. 20分)遠心し、その沈渣に、さらに同様の操作を5~7回繰返した。最終回の上清にDNA, RNA, 可溶性の蛋白が、ジフェニルアミン法, オルシノール反応そしてトリクロール酢酸法で、それぞれが検出されなくなるのを確めた沈渣を、細胞膜成分 cell ghost (TLcg, THcg)として用いた。この操作はすべて低温(0~4°C)にて行った。I. L. P. 抽出は、倉田²⁴⁾の方法に準じ、これらのcgを1% Deoxycholate-Na 塩(DOC)で溶かし、遠心上清(10,000r. p. m. 30分, 4°C)中のリポ蛋白を5倍量の冷アセトンで沈澱させ、えられた遠心(3000r. p. m. 30分, 4°C)沈渣を冷生水でさらに浮遊させて、I. L. P. 溶液とした。

VI. TL, TH細胞膜成分(cgおよびI. L. P.), HVJに対する抗血清の作製

細かくホモナイズしたそれぞれのcg液を3kgの健康な家兎の耳静脈よりゆっくり、70mg(湿重量と

して)1回接種し、あと2回、隔週毎にフロインド不完全アジュバントと共に100mgあて筋注した。さらに、1回のブースター接種を筋肉内に行った後、7~14日目に全採血して抗cg血清がえられた。抗I. L. P. 血清はすべて耳静脈より、同様の過度免疫計画で、1回10mgあて接種してつくられた。また、HVJ抗血清は、発育鶏卵増殖ウイルスを5mlあて家兎腹腔に、隔週毎10回免疫した後えられた。なお、これら各抗血清中のウイルス抗体価測定は、通常血球凝集抑制試験(HAI)²⁵⁾で行い、HAI価で示された。

VII. Cytotoxic test (CT)

段階希釈した非働化抗血清0.1mlに、標的細胞(TLまたはTH)0.1ml(10^6 個/ml)を混合し、時々振盪しながら37°Cの恒温槽内で30分反応後、あらかじめHVJ抗体のないことを確認した人血清を補体として0.1mlを加え、さらに、37°C30分反応させた。かくて(0.5%)トリパンブルー染色を行い、その染色性出現で、細胞膜障害の有無を顕微鏡下(10×10倍)で判定した。反応につき300個の細胞を観察し、次のごとく cytotoxic index (CI)を算出した。CI = [コントロール血清での非染色細胞(%) - 免疫血清での非染色細胞(%)] ÷ コントロール血清での非染色細胞(%)

Warren²⁵⁾に準じ、かかる cytotoxic index (CI) = 0.15以上を有意な値とみなし、それを示す希釈倍数をCT価とした。このCTの際、各抗血清中のウイルス抗体のブロッキングおよび吸収については各実験毎に述べる。

VIII. Ouchterloney 法による寒天ゲル内沈降反応²⁷⁾

抽出細胞膜成分の抗原性の差をみるために行った。寒天内拡散法としては、4%精製寒天ブロックを30g, 1.7% NaCl加0.05M PBS (pH7.6イオン強度0.12) 45ml, 蒸留水を6ml加え加熱し、0.1% マーゾニン液9mlを加え、8×12cmのガラス板上に流し、寒天ガラス板とした。抗原抗体孔は、直径8mm, 間隔は4mmとし、20°Cで、2~3日反応させながら観察し、適当な時期に写真にとった。

IX. 蛍光抗体(FA)法

上述の各抗血清および抗HVJ血清よりの粗γ-グロブリンに、通常のごとく²⁸⁾、蛍光色素をラベルして調整し、TLおよびTHを直接染色した。後述のブロッキング操作後のFAは、ラベルしていない各抗血清またはそのγ-グロブリンと細胞を反応させ、未反応のものを洗滌除去後、ラベル抗血清で染色して行われた。

X. Colony inhibition test (C. I. T)

Hellstrom²⁹⁾, Möller³⁰⁾らの法に準じて行った。す

なわち、正常または担TL, TH腫瘍ハムスター脾を別出し、軽くホモゲナイズして、2~3重のガーゼで濾過し、さらに低張生食水処理で赤血球を破壊した後、培養液に再浮遊し、脾細胞液（主としてリンホイド細胞）とした。この脾細胞液と各TL, TH浮遊液の細胞比を決めてシャーレ内で混合し、37°C、炭酸ガスインキュベーターで、6日培養後、形成されたコロニーをクリスタルバイオレット（0.1%）で染色して数えた。脾細胞を加えない場合の形成コロニーとの差を（%）で表わし、C. I. T. の index とした。

その他の問題は各実験項目毎にふれることにする。

実験結果

I. TL細胞におけるHVJ持続感染 (THEL-HVJ) の成立

Table 1 に示すごとく、 2×10^6 個のTL細胞を(5.0 × 5.0 × 3.5 cm)の角びんでほぼ一杯の状態に培養し、血球凝集価(HA)=2048unit/0.5ml, TCID₅₀/0.2 ml=10^{7.5}のウイルスを感染させた。その結果、TLは著明な細胞変性効果(CPE)を起したが、その生残細

胞を継代していくとCPEは次第に消失し、継代11代以降、それらはほとんど認められなくなった。しかし、HVJ感染サインの一つであるモルモット赤血球吸着現象(HAD)を示す細胞は、継代毎に変動しながらも (Table 1) 常に認められた。その外に、かかる細胞の発育鶏卵内への直接接種による感染性HVJの検出、抗HVJ血清の細胞培養液への添加および除去による細胞上のHADの消失と復活、抗HVJ抗体による直接蛍光抗体染色法での細胞質および細胞膜表面における点あるいは顆粒状のウイルス抗原の検出 (Photo 1) などから、HVJ持続感染の成立が確認された。かかるHVJ持続感染細胞 (THEL-HVJ=TH) は、もとのTHEL (=TL) 細胞と in vitro での培養で形態および増殖速度にほとんど有意の差がなく、かつ細胞変性効果(CPE)を示すこともなかった。

II. THEL, THEL-HVJ細胞のハムスター移植性について

この両細胞で、ハムスターへの移植性すなわち腫瘍形成能について検討したのがFig. 1, Fig. 2である。

Fig. 1では、同一ハムスターの皮下へそれぞれ生細

Table 1. Passage History of THEL-HVJ cells

| THEL-117 (EC-10) + HVJ infection: HVJ (HA titer: 2048/ml) 10 ⁻¹ | | | |
|--|---------|-----|--|
| ↓ | | | |
| Passage No. (DAYS) | HAD (%) | CPE | EXPERIMENT |
| 1 (2D) | 83.0 | + | |
| 2 (7D) | 9.8 | + | |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | |
| 6 (26D) | 1.5 | - | |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | |
| 10 (39D) | 56.0 | + | CIR by Y-27-FD |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | |
| 24 (82D) | 32.0 | - | CIR by Y-30-CDC |
| 25 (85D) | 36.0 | - | Hamster inoculation |
| 26 (95D) | 36.0 | - | Egg inoculation : HVJ (+)(64, 1024/ml) |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | |
| 28 (101D) | 20.0 | - | Anti-HVJ serum treatment |
| ⋮ | ⋮ | ⋮ | |
| 54 (189D) | 49.0 | - | Hamster inoculation |
| 55 (191D) | 17.0 | - | Resting potential Current-voltage characteristics |
| 56 (206D) | 8.0 | - | FA staining |

Fig. 1. Tumor Formation in Hamsters after Transplantation with a Small Number of THEL or THEL-HVJ Cells (3×10^4)

THEL, 3 day's Cells : HAD=0% ; (○) and THEL-HVJ, 3 day's Cells : HAD=90% ; (●)
Died by Tumor Growth ; (+)

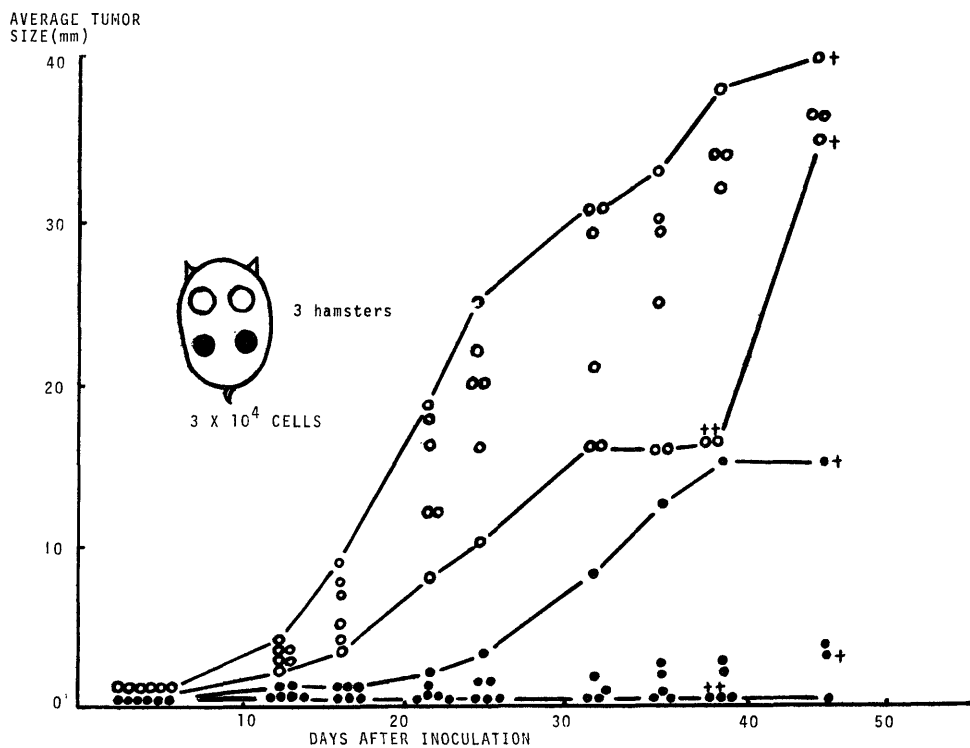
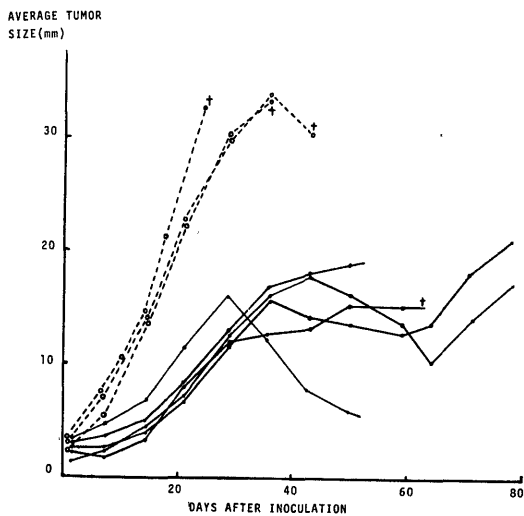


Fig. 2. Tumor Formation in Hamsters after Transplantation with a Large Number of THEL or THEL-HVJ Cells (1×10^6)

THEL, 3 day's Cells : HAD=0% ; (○) and THEL-HVJ, 3 day's Cells : HAD=90% ; (●)
Died by Tumor Growth ; (+)



胞を 3×10^4 個あて2ヵ所ずつ接種し、その後触知しうるに至った腫瘍の平均直径が示されている。これをみると、THEL-HVJ (TH) 形成腫瘍は、親のTHEL (TL)のそれに比べて、触知しうるまでの潜伏期間がはるかに長く、その腫瘍は小さいか、時に、45日間の観察終了期間まで全く認めえなかった。しかも、たとえ一旦増大しはじめても、その増大速度はTLのそれよりも遅かった。

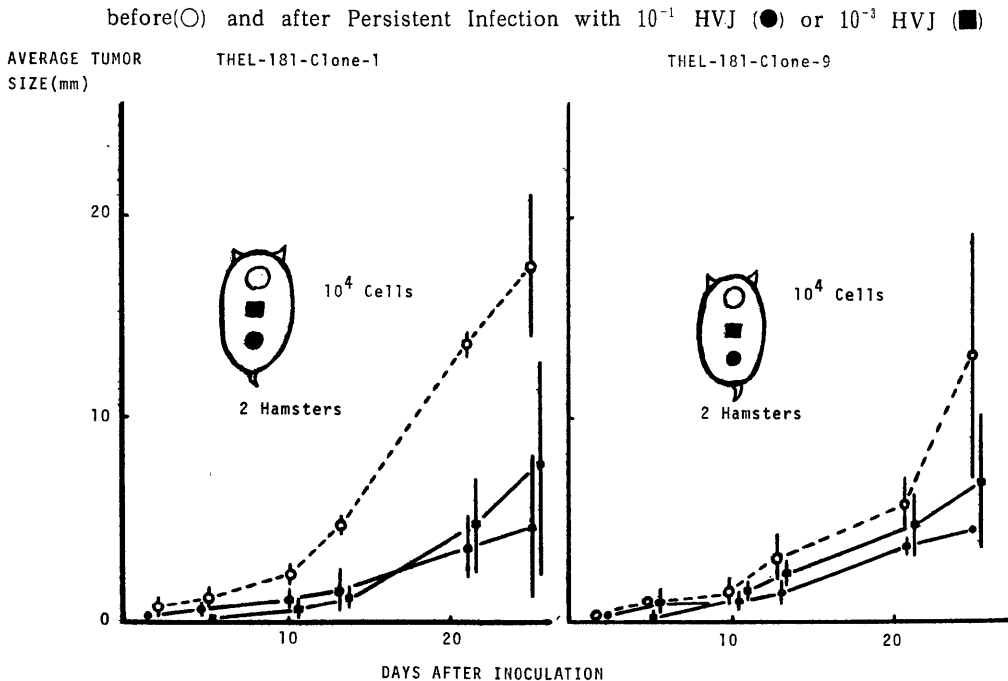
また、Fig. 2のように、別々の個体に大量(1×10^6 個)のTLとTHを接種した場合には、TL腫瘍の潜伏期は、2~3日と短く、その増大は急速で、全例が接種後30~40日前後で、ハムスターを腫瘍死させた。これに比し、同様のTH接種では、TL腫瘍より明らかに小さい腫瘍が生じたが、その増大はFig. 1のそれと同じくゆるやかで、ほとんどが、80日以上生存しえた。この場合、一旦大きくなった腫瘍が、自然に退縮する例が時には見出された。Fig. 1, Fig. 2に用いられた接種量の間例えば、 10^5 個の両細胞の接種では、Fig. 1とほぼ同じ結果がえられ、このTH腫瘍の自然退縮現象は、常に 10^6 個以上のTH接種でのみ認められた。

かかる移植性の低下、消失、または腫瘍の自然退縮

は、HVJ持続感染細胞 (TH) でのみ、ユニークに見出された。しかし、これらの一連の現象が、親細胞 (TL) 中の低移植性のある細胞にたまたまHVJが持続感染して生じたのか、あるいは、HVJ持続感染成立が常に惹起せしめるかどうか、次に問題になる。そこで、TLをクローニングし、いくつかのクローンをえた。その中、クローニング前の親TLとほぼ同じ移植能 (腫瘍形成能) を持つクローンTL-181-C1-1と、それより低い移植能をもつクローンTL-181-C1-9にHVJを感染させ、持続感染化を計った。

すなわち、HA価2048 unit/0.5mlのHVJ液の 10^{-1} と 10^{-3} 希釈液を両クローン細胞に全く同じ条件で感染させたところ、これらHVJ 10^{-1} 感染TL両クローン細胞は軽いCPEを示したが、 10^{-3} 感染TL両クローン細胞は全くCPEを認めないにもかかわらず、ともに著明なHADが認められた。しかし、いずれのHVJ感染細胞も損失されることなく継代され、容易に持続感染細胞をうることができた。これらの新しくえられたHVJ感染後14代継代の持続感染細胞と、その親であるTLのクローン (TL-181-C1-1, TL-181-C1-9) とで、ハムスターへの移植性を同一条件で検討したのがFig. 3である。その結果、いずれの持続感染細胞も親クローン

Fig. 3. Transplantability of cloned THEL Cells (C1-1 and C1-9) before and after Persistent Infection with Paramyxovirus : HVJ

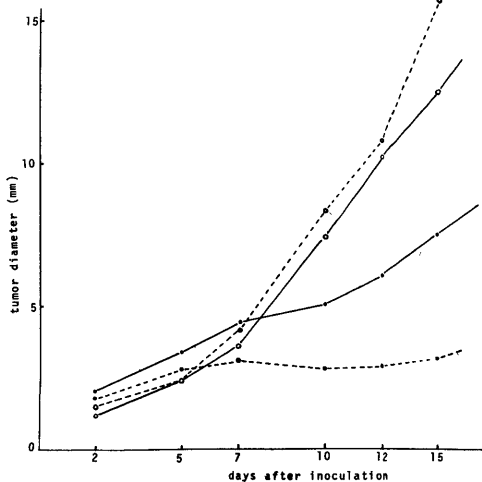


細胞にくらべて、腫瘍出現の遅れ、およびその増大速度の低下がみられ、Fig. 1 に示された結果と類似していた。このことより、TLにHVJが持続感染化すると、ある特定の低移植性の細胞のみが選択されてさらに移植性が低下するのではなく、このTL細胞は、かかる持続感染化ですべて移植性が低下するものといえよう。

Ⅲ. X線照射ハムスターにおける移植性の比較

上述のTL, TH両細胞の移植性成立、低下ないし腫瘍退縮などには、生体側のハムスター個体の免疫反応が関与しているであろうことは、特に腫瘍の自然退縮する例 (Fig. 2) から容易に推察された。そこでこの生体免疫反応の関与をより明らかにするため、Fig. 4 に示すように、550R全身照射したハムスター群と非照射群をつくり、それぞれの群にTLとTHを接種した。かくて、形成腫瘍の平均径の推移をみると、TL接種では、X線照射群と未照射対照群の間に、殆んど差が認められなかった。これに対し、THを接種したグループでは、照射群の腫瘍は、非照射対照群にくらべて明らかに増大し、その増大速度も若干促進された。これはX線照射により、ハムスター個体の免疫反応が抑制されたため、TL細胞とは異なるTH細胞のハムスターに与える免疫的刺激に対し、X線照射ハムスターでは非照射ハムスターと異った弱い応答しか出来なくなった結果と考えられる。

Fig. 4. Tumor Formation after Transplantation of THEL and THEL-HVJ Cells in X-irradiated (550 R) Hamsters
Average size of six THEL (○) or THEL-HVJ (●) tumors is shown in non-irradiated (.....) and X-irradiated (—) hamsters. Three hamsters of each group received two transplantations of THEL cells (9×10^5) or THEL-HVJ cells (9×10^5 of HAD=80%).



Ⅳ. HVJ持続感染によるTHEL細胞膜の変化—特に、移植免疫と関連して—

HVJ持続感染細胞 (TH) がもとの親TL細胞と異なることは明らかであるが、その異なる部分の部分がハムスターの免疫誘起に関与するのであろうか。特に、移植性低下、消失などを惹起せしめる免疫の関与するものとしては、一般に細胞膜に存在するといわれている移植免疫抗原⁽¹²⁾⁽¹⁸⁾が我々の場合にも該当するであろう。特に、ウイルス感染移植性がん細胞では、ウイルス抗原以外に、ウイルスゲノムによって誘導されたと考えられるウイルス特異的な細胞膜表面抗原が、ボックス³¹⁾、ヘルペスシンプレックス³²⁾、アデノ³³⁾、SV₄₀^{34) 35)}、ポリオーマ³⁶⁾、EB³⁷⁾、Friend¹⁴⁾各ウイルスなど多くのウイルス感染でみ出されている。特に、小林らは、かかる細胞膜抗原をもつに至った Friend ウイルス感染ラット移植腫瘍の移植性消失を明らかにしている^{(10)~(13)}。小林らは、これを細胞表層膜の Friend ウイルス感染による変換¹⁴⁾、およびかかる変換された抗原を個体は"異物"と認識し、免疫学的に排除する方向に反応する、すなわち、"異物化現象 (Xenogenization)⁽¹⁸⁾"としてとらえている。我々は、以前にTHおよびTL両細胞膜の生物学的差をいくつか明らかにして来た。特に、CIR assay 法^{38) 39)}によるTHの高CIR感受性¹⁶⁾、電気生理学的膜抵抗性の著差¹⁶⁾、抽出TH細胞膜よりなる cell ghost のHADないし、HVJ 蛍光抗体染色性¹⁵⁾などがいずれも両者の細胞膜の変化としてとらえられた。そこでかかる細胞膜変化が、上述のウイルスゲノム誘導の細胞膜表面抗原または移植性免疫抗原そのものによるかどうか、あるいは、それが小林らの唱える"異物化現象"として生体に働きうるかどうかを次に検討した。

1. Cytotoxic test (C. T.)

まず、Smith & Thomas 法^{22)~24)}によりえられた TL および TH cell ghost (TLcg, THcg), さらにそれらより不溶性リポ蛋白 (TH-ILP), ないしHVJでそれぞれ免疫した家兎抗TLcg, THcg, THILP, HVJ血清などを用い、両細胞を標的細胞として、cytotoxic test (C. T.) を行った。結果は、Table 2, Fig 5, Fig 6, に示されている。

これをみると、Table 2 に示すごとく、抗 cell ghost 血清すなわち抗TLcgおよびTHcg血清は、TLまたはTH両標的細胞と、交差的にC. T. 価で(1:32~1:64) 逆反応した。これは、TLをHVJ持続感染化しても、大部分のTL細胞膜成分の抗原性が変わらず残存していることを示している。しかし、血球凝集抑制試験 (HAI) で見出されるウイルス抗体は、抗T

Hcg血清にのみ含まれ、抗TLcg血清には見出されなかった。そこで、これらの血清より、TLとTHのそれぞれ生細胞（ 4×10^6 個）で Table 2 に示されるごとく交差的吸収操作を行い、CT価およびウイルス抗体価（HAI価）の変動を追求した。その結果、抗TLcg血清では、TL細胞による吸収3回で両細胞に対するCT価は陰性化し、CT関与抗体の吸収が明らかにされた。それに対し、抗THcg血清では、TH細胞による吸収と同様に両細胞に対するCT価が平行して低下陰性化した。しかしながら、TL細胞による吸収では、TL細胞に対するCT価のみが陰性化し、TH細胞に対するCT価およびウイルス抗体価は、全く変動しなかった。これらより、TLがもともと保有する両細胞に共通な抗原性と、HVJ持続感染によってTHのみに見出されるに至ったHVJ自身およびそれに関連した新抗原の存在が、かかる cell ghost 抗血清を用いた本実験で表現されたものと考えられる。

そこで、HVJ自身に対する抗体、あるいはHVJゲノムの存在（すなわち持続感染）により、THに誘導されたと思われるウイルス自身とは異なるが、HVJ関連新抗原に対する抗体が、かかるC. T. にかかに関与しているのかを次に検討した。そのために、TL、TH両細胞の共通抗原に対する抗体を含ませるように処理または選んだ抗血清を用い、その中のHVJ抗体（HAI抗体）を過剰の半精製ウイルスにより、ブロック（Fig.

5）または吸収（Fig.6）して、TH細胞を標的細胞とするC. T. を行った。

まず、ブロックには、TL細胞で共通抗体を完全に吸収した抗THcg血清（HAI 1 : 64）、未吸収の抗TH-ILP血清（HAI 1 : 64）および本来、細胞共通抗体を含ませHVJ過度免疫血清（HAI=1 : 2048）の3者を、Fig.5のごとくえらんだ。この場合、抗TH-ILP血清は、TL細胞で何回か吸収を試みたが、共通抗体の吸収は不成功に終り、そのまま使用せざるをえなかった。かくて、16~2048 HAU/0.5mlの数段階に希釈したウイルスを、1 : 8~1 : 2048に希釈した各抗血清のそれぞれに組合せて加え、HAI抗体のブロッキングを行った。ブロッキングの成立は、ウイルス・血清混液にニワトリ血球（0.25%）浮遊生食水を1滴加え、赤血球凝集反応が明らかに出現すれば、ウイルス過剰のための反応出現とみて、ウイルス抗体はブロックされたと考えた。その結果、高HAI価を示す抗HVJ血清では、2048HA価のウイルスで、比較的低HAI価を示す他の2血清（TL吸収抗THcgおよび未吸収抗TH-ILP血清）では、128~512HA価以上のウイルスを用いれば、低希釈（高濃度）の各抗血清でもHAI抗体のブロックされることが判明した（Fig.5の曲線の+）がブロッキングの完全に生じた組合せを示す）。かくてブロッキング成立を確認後、調べられたC. T. の変動をみると、TL吸収抗THcg血清およびHVJ過度免疫血

Table2. Cross Cytotoxic Test by Anti-THcg and Anti-TLcg Rabbit Serum before and after Absorption with THEL or THEL-HVJ Cells

| | TL | TH | HVJ antibody (HAI titer) |
|---------------------------|----------|--------|--------------------------|
| anti-THcgRS original | 1 : 32 * | 1 : 64 | 1 : 64 |
| * absorbed w. TL cells 1α | 1 : 16 | 1 : 64 | 1 : 64 |
| " " 2α | <1 : 8 | — | — |
| " " 3α | <1 : 8 | 1 : 64 | 1 : 64 |
| absorbed w. TH cells 1α | 1 : 16 | 1 : 16 | — |
| " " 2α | <1 : 8 | <1 : 8 | — |
| " " 3α | <1 : 8 | <1 : 8 | — |
| anti-TLcgRS original | 1 : 64 | 1 : 64 | <1 : 2 |
| absorbed w. TL cells 1α | 1 : 64 | 1 : 64 | <1 : 2 |
| " " 2α | <1 : 8 | 1 : 16 | <1 : 2 |
| " " 3α | <1 : 8 | <1 : 8 | <1 : 2 |

* serum dilution giving above 0.15 cytotoxic index

* 30 minutes at 37 °C and overnight at 4 °C with TL or TH cells (4×10^6 /ml)

清では、1 : 8 ~ 1 : 32迄に有意のCT価の存在を認めた。しかしながら、抗TH-ILP血清では、1 : 128迄有意のCT価を認めた。この抗TH-ILP血清の場合、各力価ウイルスによる HAI 抗体ブロッキング後でも、TH細胞でのC. I. ないしCT価の変動が、他の2つの使用抗血清におけるものより遥かに少いこと、また、その有意な終末点が高いことなどは、前述のTLを用いて吸収不能であった両細胞への共通抗体による反応の結果と解釈された。さらに、ここでウイルス抗体を完全にブロックした後に、HVJ過度免疫血清中になお残存する抗体がTH細胞に有意のCT価を示したことは、後に論ずることく、意義深いといわねばならぬであろう。

ついで、抗THcg血清より、TL細胞による共通抗体の吸収、HVJによるウイルス抗体の吸収を行ってえられた結果がFig.6である。ウイルス抗体吸収は、Fig.6に示すごとく、50 μ m径の membrane filter 濾過で、HVJを除いて行われ、最終濾過液に、HVJの存在のないことも血球凝集能陰性により確かめられた。かかる最終段階の吸収血清では、上述の共通抗体およびウイルス抗体はそれぞれ見出されないのに、TH細胞には1:4 ~ 1:16迄、有意の反応を示すCT抗体の残存が認められた。しかし、これらの有意の抗体量は、そのC. I. の低いこと(0.15~0.50)からみても、大量

とは考えられなかったが、その抗血清作製に用いられたTHcgに、共通抗原、ウイルス抗原以外の新抗原が含まれるに至ったことはほぼ誤りないといえよう。

2. 抗細胞膜抗体による蛍光抗体染色性

上述のC. T. で、観察しえたTH細胞膜におけるウイルスとは異なる新抗原の存在を、同じ抗血清を用いた蛍光抗体法(FA)で更に追求した。結果は Table 3, Photo.1~3 に示されている。

まず、HVJ過度免疫血清によるFAで、TH細胞は、典型的な点または顆粒状の染色性を主として細胞質内に、一部は細胞膜に強く示したが、核はほとんど染色されていなかった(Photo.1)。これらの染色性は、アセトン固定で何ら影響をうけないことから(Table 3)も、ウイルス抗原が染色されているのであろう。この場合、TH細胞膜に弱いながらも環状蛍光が、未固定の場合にのみ時に認められたが、これは上述のC. T. の際、HVJ抗血清中に認められたと同じ様なTH特異的抗体によるものと思われる。同じFAで、TL細胞は勿論何等蛍光染色されなかった。

つぎに、抗THcg血清によるFAを行うと、未固定の生TH細胞は、前述のHVJ抗血清による蛍光とは明らかに異なる穏和な細胞膜のみの染色性を示した(Photo. 2)。この細胞膜染色性は、アセトン固定またはトリプシン処理で完全に消失し(Table 3)、いくつかの

Fig.5. Effect of HVJ-antibody Blocking by semi-purified Viruses on Cytotoxic Test of T HEL-HVJ Cells

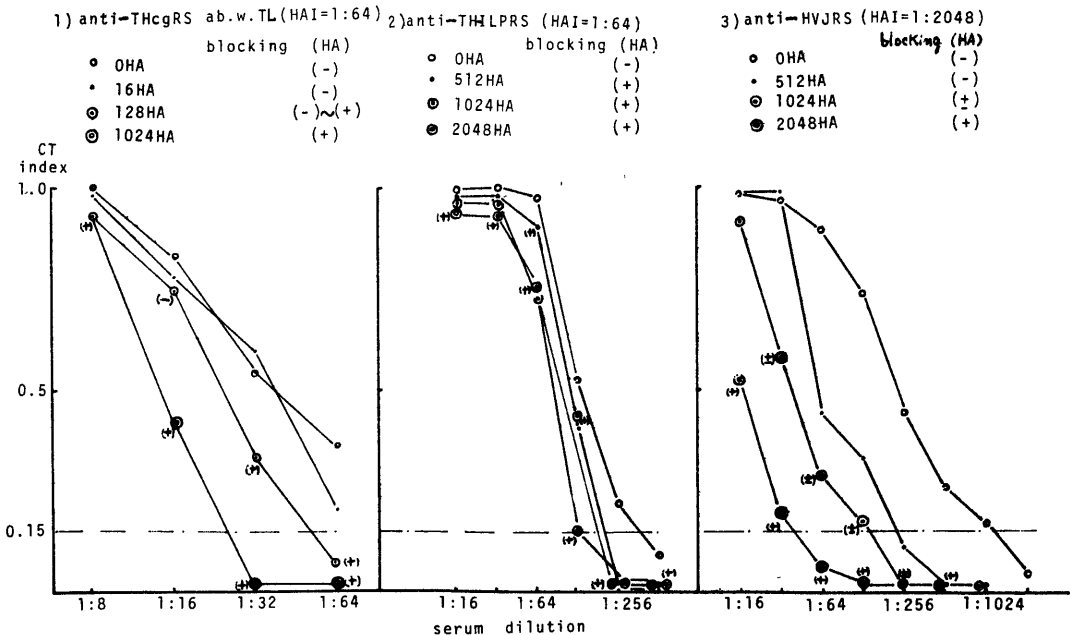
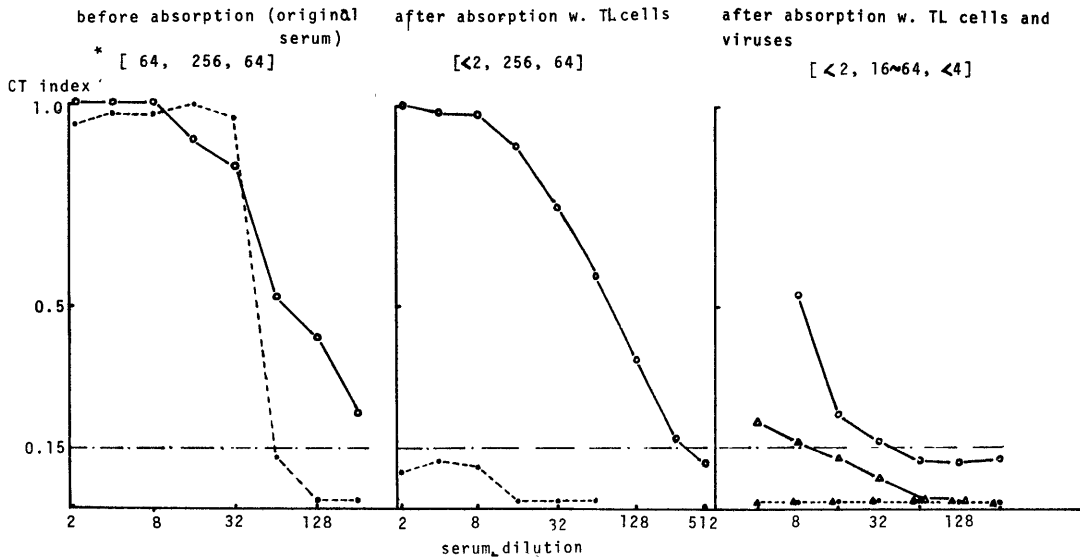


Fig. 6. Cytotoxic Test of THEL and THEL-HVJ Cells by anti-THcg Serum before and after Absorption with THEL Cells and Viruses

Anti-THcg serum was reacted with an equal volume of TL cells (5×10^6 /ml) for overnight at 4°C following a reaction for 30 m. at 37°C. This absorption cycle with TL cells was repeated 4 times on the supernatant after centrifugation (1,500 r. p. m. for 20 m. at 4°C).

Antiserum thus obtained was further reacted with a half volume of semi-purified viruses (HAU=4096/0.5 ml) for 30 m. at room temperature. After further standing for overnight at 4°C, serum-virus mixtures were filtrated by membrane filter (pore diameter, 50 μ). Cytotoxic index on TL (●,▲) and TH (○,△) cells was determined in respective steps.

* [TL-CT-titer, TH-CT-titer, HAI-titer]



ウイルス感染で知られている細胞膜における surface antigen (S-ag)^{(31)~(37)} としての特徴を示していた。同様の細胞膜蛍光染色は、抗TLcg血清とTL細胞を含めた交差的組合せでも、前述のCTでえられた交差的反応の結果と同様に観察された。

そこで、CTにおけるブロッキングと同じ考えで、TH細胞におけるTL細胞との共通抗原およびウイルス抗原を適当な抗血清でブロックした後、TH特異的抗原のFAによる検出を試みた。いくつかの予備実験で、抗TLcg血清および抗HVJ血清の γ -globulin 濃度、作用時間を Table. 3 のごとく求め、TL細胞の抗TLcg血清による細胞膜FA染色が、また、TH細胞の抗HVJ血清によるウイルスFAが完全に消失することで、これらのブロッキングの成立を確認した。かかる条件でブロック後、TH細胞を抗THcg血清でFA染色すると、Photo. 2 に認められた細胞膜蛍光染色は、それよりはるかに弱まるが (Photo. 3, Table

3), 明らかに残存して認めることが出来た。かかる弱い環状蛍光は、未固定の生TH細胞にブロック操作をした時のみ見出され、トリプシン処理後のTH細胞を同様に処理しても認められなかった (Table 3)。さらに、前述の未固定生TH細胞に抗HVJ血清でFAを行った時、時に散見される細胞膜の弱い環状蛍光とこれは甚だよく似ていた。この様な抗HVJ血清を一定条件とはいえ、TH細胞のブロッキングに用いたが故に、Photo. 3 に示されるTH特異的抗原の蛍光染色は、甚しく弱くなったものと思われる。しかし、陰性対照 (TL細胞を抗TLcg血清と抗HVJ血清でブロッキング後、抗THcg血清でFA染色したもの) よりは、明らかに有意の染色性を示した。

3. Ouchterloney 法 (寒天ゲル内沈降反応法) による分析。

かくて、CT, FA法で見出されてきたTH細胞特異的なHVJ関連新抗原をさらに、Ouchterloney 法に

Table 3. Stainability of THEL and THEL-HVJ Cells by Fluorescent Antibody Staining Method

| Fixation or Treatment | None | | Acetone ^{a)} + + | | Trypsin ^{b)} | | |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|--|------------|-------------------------|
| | | | | | - | + | - |
| Blocking ^{c)} Antibody | - | - | - | - | Anti-TLcg(3 mg/ml) and Anti-HVJ(5 mg/ml) ^{d)} + + + | | |
| Staining Antibody (dilution) | Anti- THcg (1 : 16) | Anti- HVJ (1 : 2) | Anti- THcg (1 : 16) | Anti- HVJ (1 : 2) | Anti-THcg (1 : 16) | | Anti- HVJ (1 : 2) |
| THEL THEL-HVJ | (++) ^{e)} (++) | (-) (++) | (-) (-) | (-) (++) | (-) (+) | (-) (-) | (-) (-) |

a) 10m. at room temperature

b) 20m. at room temperature with 0.05% trypsin in phosphate buffer

c) 2hr. at 37°C

d) Concentration of γ -globulin/ml was determined as the minimum essential conditions to make the respective stainability negative.

e) (++) , strongly positive; (+) , weakly positive; (-) , negative

よる寒天ゲル内沈降反応で検討した。これには、各抗血清と各 cell ghost 抗原ないしその DOC 抽出抗原、ウイルス抗原が、Photo.4~6のごとく、組合せて用いられた。Photo.4は通常法に従ったが、Photo.5では、寒天内での抗体簡易吸収法⁴⁾を施した。すなわち、TLcg抗原(蛋白量で0.3mg/ml)を予めカップに入れ、一晚20°Cに放置して充分寒天内に拡散させ、生食水でカップを充分洗滌後、抗THcg血清(CT価でTLに1:64, THに1:256)を入れてゲル内沈降反応を行った。またPhoto.6では、試験管内でTLcg抗原(蛋白量として1.0mg/ml)により、同じ抗血清を3回予め吸収し、さらにカップ内に同じ濃度のTLcg抗原を入れ、上述の寒天内簡易吸収法を施した後使用した。

未吸収の抗THcg血清に対しては(Photo.4), THcg, TLcg抗原は共通の2~3本の強い沈降線をつくり、この共通沈降線は、THおよびTL細胞培養上清(血清無添加培養液で35°C 24時間培養) THmem, T Lmemに含まれる抗原物質との反応にも共通であった。さらに、TLcg抗原との間には認めることが出来なかったTH特異的と思われる2本の沈降線が、THcg抗原との間に明らかに観察された。また、THcgよりDOCで抽出されたTHDOC抗原との間にも、上述のものと性状がやや異なる、幅広く強い沈降線が見出

された。しかし、それは同様に抽出されたTLDOC抗原との間には、認められなかった(Photo.4)。

次に、これらと全く同一の反応系をPhoto.5のごとく、寒天内でTLcg抗原による簡易吸収を施した抗THcg血清について行った。その結果、Photo.4にみられた共通の2~3本の沈降線はほとんど消失し、THcg抗原、THDOC抗原との間に、Photo.4で認められた沈降線のみが、残存した。この残存したものが特異的抗原およびHVJ抗原による沈降線と考えられた。

そこで、TLcg抗原による共通抗体吸収をさらにin vitroと寒天内で徹底的に行った抗THcg血清、および抗HVJ血清(HAI価1:8192/ml)を用い、各抗原濃度も適量に調整し、HVJ(HA価1:40,000/ml)抗原も加えた反応系をPhoto.6のごとく検討した。その結果、THcg抗原(4.0mg/ml)は、抗THcg血清(TLcg抗原による吸収済み)およびHVJ血清の間で、互に完全にfuseする明瞭なる一本の沈降線をつくった。さらに、濃度を1mg/mlに下げたTHcg抗原は、同じ抗THcg血清との間に、弱いながらも同様の一本の沈降線を示した。この抗THcg血清は、THDOC抗原濃度を4mg/mlに合わせたもの間にも、類似した一本の沈降線を示したが、その沈降線は、前記THcg抗原(1.0mg/ml)による沈降線と完全には

fuseせず、両者間の同一性は少ない様に考えられた。しかしながら、この条件の抗THcg血清との反応で、ウイルス抗原による沈降線が全く認められない所からみると、これら上述の各沈降線は、それぞれのTH由来抗原に特異的で、ウイルス抗原によるものではないと解釈された。ここで使用された抗HVJ血清は、同じ使用ウイルス抗原(HVJ)との間で、常にウイルス抗原側にカップを横切って認められる沈降線をつくる事が確かめられている。これから考えると、このPhoto. 6においてみられたTHcg抗原(4.0mg/ml)のカップを横切る沈降線は、この4.0mg/mlという過剰のTHcg抗原に含まれるに至ったウイルス抗原特異的なものであろう。かくて、ウイルス抗原と異なるTH細胞特異抗原が、抗THcg(TL抗原吸収ずみ)血清のみならず、抗HVJ過度免疫血清を用いても検出出来たわけで、前述のCT, FA法と全く同一の結論が、このゲル内沈降反応でも得られることになった。

V. 担TLまたはTH腫瘍ハムスター脾細胞によるTLまたはTH細胞のコロニー形成抑制試験 (C. I. T.)

この様なHVJ持続感染化による細胞膜表面の抗原変換が、生体での移植性の低下をもたらすであろうことは、容易に推定できる。しかし、その生体側に与える免疫学的本態は、何であろうか。最近、多くの研究者により、移植性の低下および退縮に関与するものとして、細胞性免疫が一つの大きな役割を担っているものと考えられつつある^{(41)~(43)}。我々もその問題に一步近づき意味で、正常および担TLまたはTH腫瘍ハムスターの脾細胞と、TL, TH両細胞の *in vitro* での反応を行った。その結果、これら脾細胞は、TH細胞により多く速やかに吸着し、TL細胞へのそれに比べて、4~5倍高い吸着率を示すことが判明した⁽¹⁷⁾。しかも、担TH腫瘍ハムスターの脾細胞は、TH細胞に特によく吸着するが、TL細胞にも反応初期には、正常脾細胞より吸着し易いことが明らかにされた。そこで、吸着後、*in vitro* での増殖抑制すなわち結果的には細胞コロニー形成抑制がみられるかどうかをさらに追求した。結果は Table 4 に示されている。

かかるコロニー形成抑制試験(C. I. T.)で、担TH腫瘍ハムスター脾細胞によるTHコロニー形成抑制率は、65%前後と高いが、TLのコロニーも約40%抑制された。また、担TL腫瘍ハムスター脾細胞は、TH, TLをそれぞれ約42%, 17%抑制した。さらに、正常ハムスター脾細胞も、TH細胞コロニー形成抑制(約40%)を示すが、TL細胞にはほとんど効果がなかった。これらの事より、TH細胞はTL細胞に較べて、生体

内に接種された場合に、免疫担当細胞を刺激し易い上に、強く、速やかに免疫学的作用も受け易いことが想像された。かくて、それが、ハムスターへの移植性の低下および退縮という形で表現されるのではないかと解釈される。特に、担TH腫瘍ハムスター脾細胞が、THのみならず、TL細胞にもよく吸着し、コロニー形成をある程度抑制することは、ハムスターの個体にTLとTHを同時に接種した場合、TH腫瘍の退縮と共にTL腫瘍の増大が止ったり、極めて稀に多少とも一時的に縮少することがあるのを裏書きしているといえよう。

VI. 移植拒否性免疫誘導の試みについて

上述の同時接種実験で認められた現象は、小林らのFriendウイルス感染ラット腫瘍細胞と未感染腫瘍細胞を同時に接種すると、Friend感染腫瘍の退縮につれて、非感染腫瘍も退縮するといういわゆる免疫の“まきこみ”現象⁽¹⁰⁾⁽¹⁸⁾とよく類似している。そこで、我々も移植性の高いTL細胞接種による腫瘍形成を、細胞膜変換をうけているTH細胞での免疫操作により、かかる“まきこみ”現象を通して抑制出来ないであろうかと考えて次の実験を行った。

1. 免疫期間と腫瘍細胞接種(チャレンジ)の関係
免疫原として使用する細胞は、生に近い程、移植免疫効果が強いと一般にいわれている⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾ので、我々も出来るだけ生の状態で免疫することを心がけた。しかも免疫原として接種した細胞そのものが、腫瘍として増大しないようにするために、X線照射が妥当⁽⁴²⁾⁽⁴⁶⁾と考えられたので、この方法を用いることにした。かくて、確実に免疫原細胞としてのX線照射TL, TH細胞が腫瘍を作らない照射量として、5,000~10,000R照射がえらばれた。このX線照射をうけたTHとTL細胞を用いて、Fig. 7. 8.に示すごとく、ハムスターを3回免疫し、最終免疫より日をかえて(0, 7, 14, 21日目)TL細胞をチャレンジし、その有効性をみた。この際、腫瘍形成抑制(移植性拒否免疫の成立)は、非免疫ハムスターに同様にチャレンジしたものと比較して判定した。

その結果、免疫原としてのX線照射TH, TL細胞はいずれも軽微な腫瘍をつくるが、2~3週以内に完全に消失した。かかる条件下で、まず、X線照射TH免疫群でみると、最終免疫後3週を経て、TLチャレンジをうけたハムスターで弱いながらも腫瘍形成の抑制をみた。しかし、2週, 1週, 0日(同時)にチャレンジしたものは、その抑制もより軽微で、またバラツキと、時に、腫瘍形成の増強が若干出現した(Fig. 7). X線照射TL免疫群では、一般にいずれの時期

にチャレンジしても、非免疫ハムスターにおけるものより、かなりの腫瘍増強がみられ (Fig. 8), かかるものは我々の初期の目的には不適と判断された。

かくて、免疫後3週前後のチャレンジが最も有効と認められた。しかし、特に、X線照射TL免疫群にみられた様な腫瘍形成の増強は、腫瘍細胞による免疫の際、往々に認められることが古くより報告⁽⁴²⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾されているので、この有効チャレンジ時期の決定は、かかる実験では慎重に選ぶ必要があると思われた。

2. 免疫原への有効X線照射量の決定

前項の実験では、免疫原としてのX線照射THまたはTL細胞の腫瘍形成が確実でない条件として、大量照射 (5,000~10,000R) が選ばれたが、目的とする移植拒否性免疫誘導に最適かどうかは、別に検討される必要がある。何となれば、過剰のX線照射で抗原性の破壊のあらわれる場合も知られている⁽⁴²⁾⁽⁴⁹⁾ からであ

る。そこで、この問題が Fig. 9 のごとく追求された。

その結果、免疫原としての0R-THは、ゆるやかに増大する腫瘍 (白丸点線で示す) をつくったが、接種後約40日頃より、次第に退縮しはじめ、約15mm径のまま約90日間存在し、ハムスターも健全に生存した。(これは前述のTH細胞の移植性の低下、退縮の事実を示すものである。) これに比し、黒丸点線で示す1,000R-THは、よりゆるやかに増大する腫瘍となったが、他の黒三角、黒四角で示す2,000R-および3,000R-THの腫瘍は、2~3mm径の腫瘍というよりは腫瘤を7日までに形成したが、以後3週すなわちTLのチャレンジ時期には全く消失していた。(前述の5,000R~10,000R-THまたは-TL免疫の場合と全く同じ。)

かくて、0R-, 2,000R-THで免疫されたハムスターへの10⁴TLチャレンジでは、チャレンジ後、約70日間

Table 4. Colony Inhibition Test of THEL and THEL-HVJ Cells by Co-culture with Spleen Cells

| Target cells | THEL | | | | THEL-HVJ | | | |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|---------------|----------------|------|
| | THEL-HVJ-tu. ^{a)} | THEL-tu. ^{a)} | Nor-mal ^{a)} | None ^{b)} | THEL-HVJ-tu. | THEL-tu. | Normal | None |
| Exp. 1. C. N. ^{c)} | 98 | 142 | | 132 | 47 | 72 | | 132 |
| | 136 | 152 | | 133 | 55 | 82 | | 136 |
| C. R. ^{d)} | (0) | (0) | | | 64.7 ±8.1* | 43.6 ±9.3* | | |
| Exp. 2. C. N. | 23 | | 34 | 23 | 23 | | 36 | 60 |
| | 33 | | 35 | 25 | 28 | | 42 | 73 |
| C. R. | (0) | | (0) | | 63.2 ±10.3* | | 39.7 ±10.7* | |
| Exp. 3. ^{e)} (C.N.) | (21) | (33) | | (40) | (14) | (23) | | (40) |
| | (C.R.) (47.5) | (17.5) | | | (65.0) | (42.5) | | |

Target cells (100-200 cells/dish) pre-cultured for 1 day were co-cultured with 1,000×10⁴ hamster spleen cells per dish. Spleen cells from tumor-bearing hamsters were prepared 2 weeks after the transplantation of TL or TH cells (5×10⁵).

- a) THEL-HVJ or THEL tumor-bearing and normal hamster
 b) Control culture without spleen cells
 c) Number of colonies per dish
 d) Mean of colony reduction ratio (%) ± standard deviation and significant difference (P<0.05) is indicated by an asterisk. No statistically significant reduction was taken as 0.
 e) Colonies developing after the co-cultivation with spleen cells among total (40) small colonies. Small colonies were randomly selected and marked before the co-cultivation.

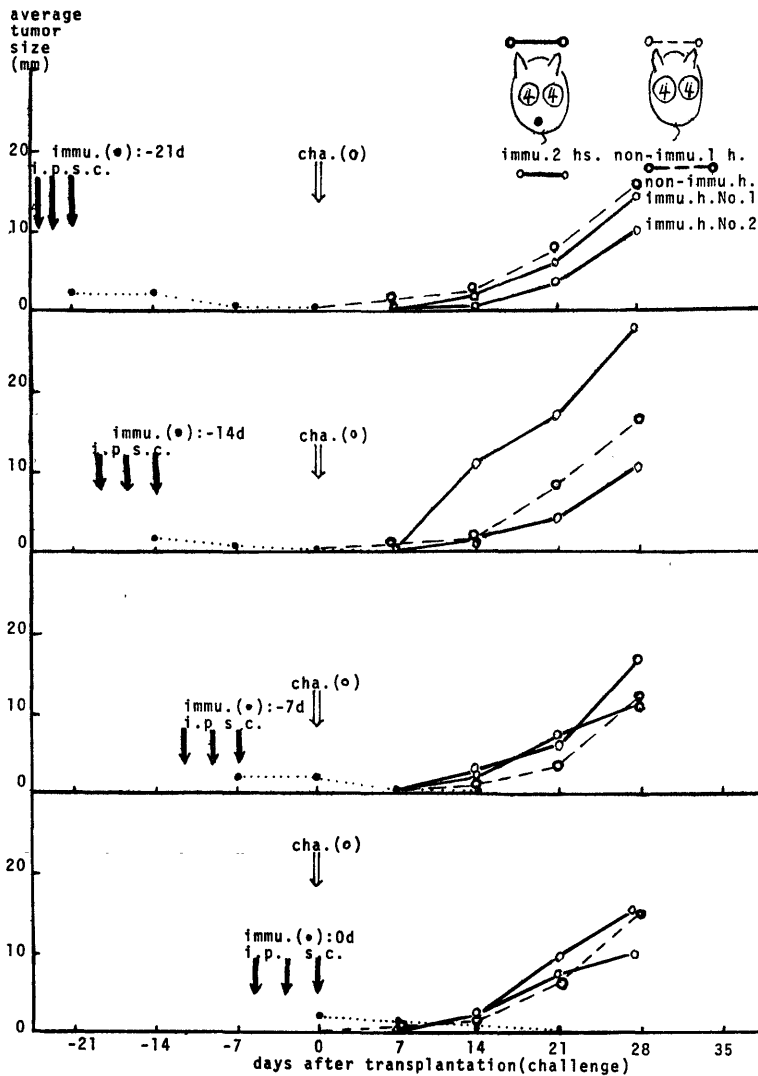
全くTL腫瘍形成を認めなかった。1,000R-3,000R-THで免疫されたハムスターでは約2~3週間腫瘍を触知しえなかったが、その後次第に漸増する腫瘍を形成した。非免疫対照ハムスターでは、約10日間の潜伏期後、急激に増大する腫瘍を形成し、約4週で動物は腫瘍死した。10³TLチャレンジでもほぼ同様の傾向を示し、腫瘍出現の全くないもの(0R-TH免疫ハムスター)、対照に比し約30日間の潜伏期(腫瘍形成の抑

制)のみられたもの(2,000Rおよび3,000R-TH免疫ハムスター)、抑制が1週間みられたもの(1,000R-TH免疫ハムスター)などであった。

これらの結果より、X線照射THを免疫原とする場合には、免疫原細胞の作る腫瘍が必ず退縮し、かつ有効な免疫効果を招来することからみて、2,000R~3,000R照射がより適当で、前項の5,000~10,000R照射は必要でないことが判明した。これと対比して、X線照

Fig.7. Effect of Interval between Immunization and Challenge on THEL Tumor-formation in Hamsters immunized with X-irradiated THEL-HVJ Cells

Immunization: 5,000-10,000 R irradiated THEL-HVJ, 5×10⁶ cells/hamster (.....)
 Challenge : THEL, 10⁴ cells×2/hamster (====)



射TLを免疫原として使用する場合には、免疫原としてのX線照射TLのつくる腫瘍が必ず消失するには8,000R以上の照射が必要な事が判った。

かくて、X線照射TH細胞が移植拒否性免疫誘導のための免疫原として、条件(照射量、免疫期間など)さえ考えれば、有効であることが判明したので、さらに、動物数を増して検討を行うことにした。これらと平行して、単一細胞レベルでの持続感染細胞(ウイル

スゲノムの保持)の分離を計るため、TH細胞のクローニングが行われた。いくつかのえられたTHクローン中で、ハムスターに接種しても、親THよりさらに移植性(腫瘍形成能)が低く、接種後20~40日までに常に完全に自然退縮するクローン、TH-Cl-1がえられた³⁰⁾。このTH-Cl-1は、HVJ持続感染のサインであるHAD、HVJ蛍光抗体染色共に100%陽性であった。この細胞を免疫原にするならば、あらかじめX

Fig.8. Effect of Interval between Immunization and Challenge on THEL Tumor-formation in Hamsters immunized with X-irradiated THEL Cells

Immunization: 5,000-10,000 R irradiated THEL, 5×10^6 cells/hamster (.....)
 Challenge : THEL, 10^4 cells $\times 2$ /hamster (====)

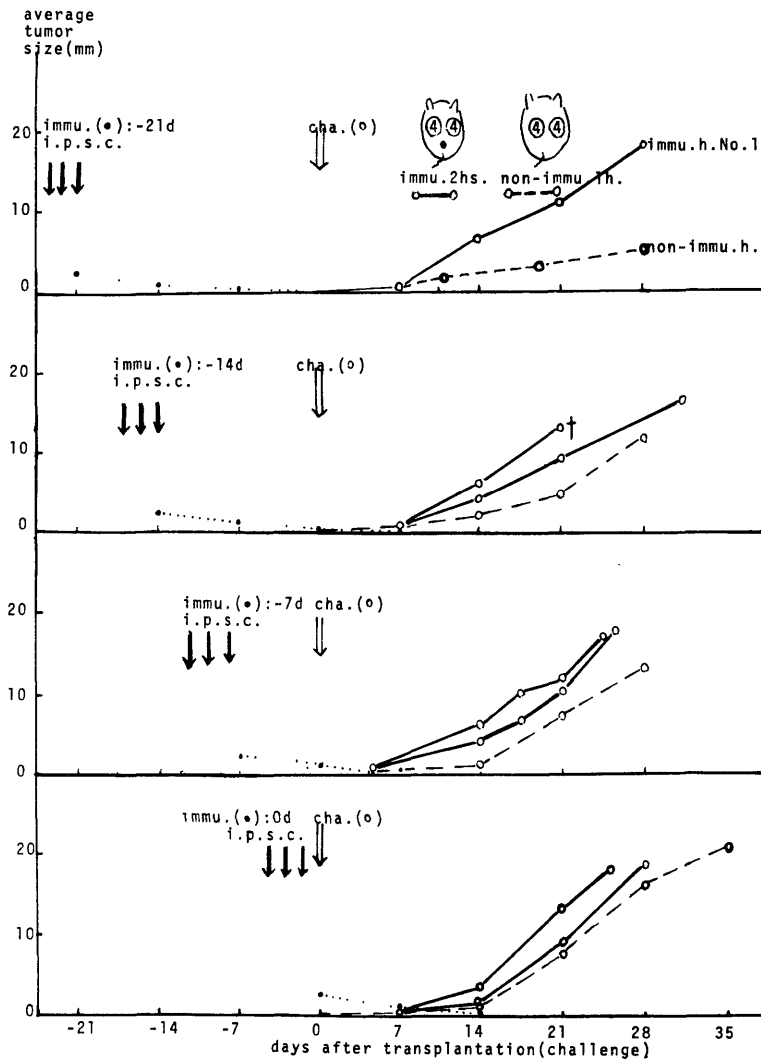
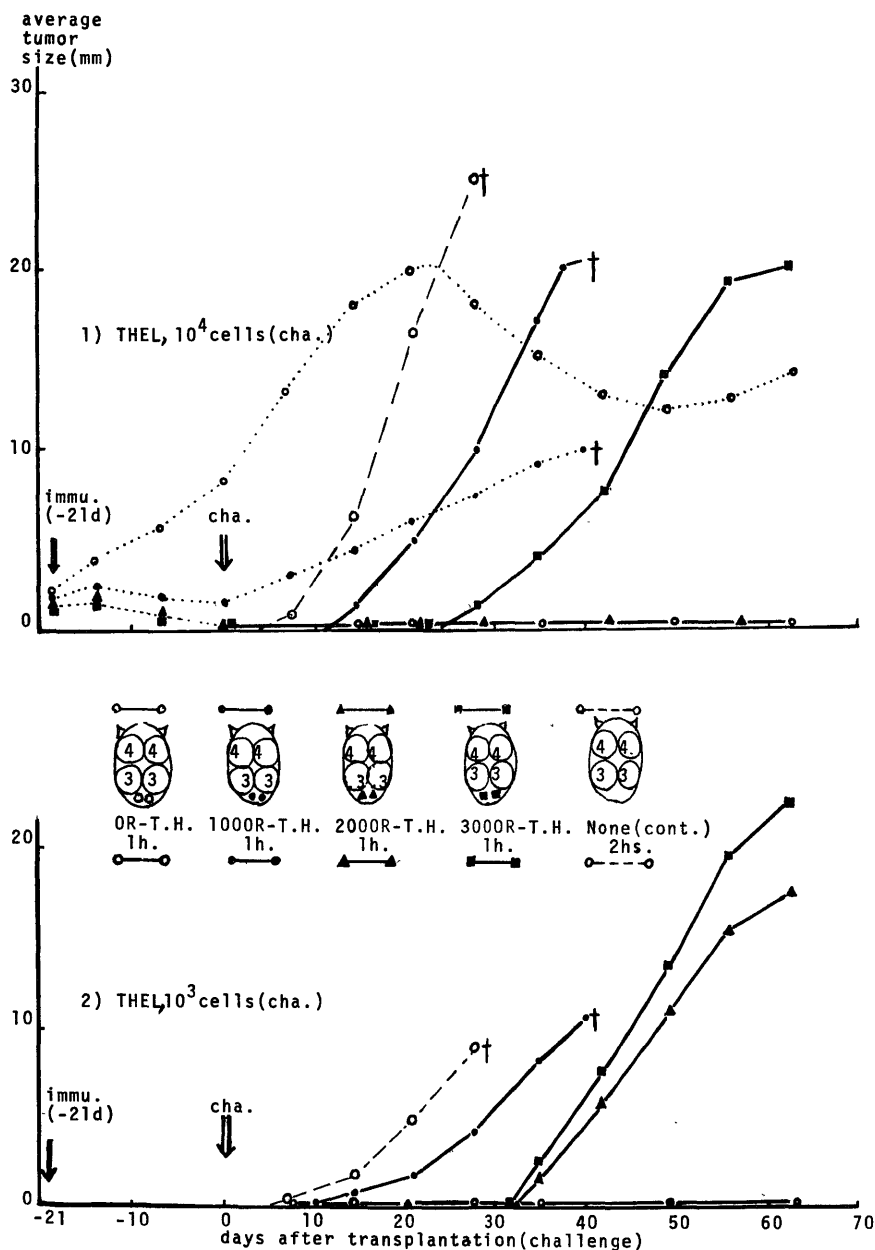


Fig.9. Dosis of X-ray-irradiation for Immunization of Hamsters with X-irradiated THEL-HVJ Cells

Immunization : X-irradiated THEL-HVJ, 4×10^6 cells \times 2/hamster (.....)
 Challenge : THEL, 10^4 or 10^3 cells \times 2/hamster (==)



線照射の必要もなく、全く生の細胞の状態で免疫出来ることが期待され、このTH-CI-1細胞も含めて以下の実験が行われた。

3. X線照射細胞免疫ハムスターにおけるTL腫瘍形成(移植)抑制実験

すなわち、免疫原としてTL(8,000R)、親TH(3,000R)そして未照射TH-CI-1(0R)を、1匹あて 10^6 個、1ヶ所皮下に免疫後21日目に、TL細胞を 1×10^4 /0.2ml チャレンジした。各免疫1群5匹あてTL腫瘍

の出来方を非免疫対照ハムスター群と比較した(Table 5)。各群の形成腫瘍径の平均とその標準偏差をみると、TH-CI-1(0R)免疫群では、チャレンジ後約21日間(免疫後44日間)、TH(3,000R)免疫群では、同じく17日間(免疫後39日間)は、非免疫群に比して、推計学的にも有意な腫瘍形成の抑制が認められた。以後も若干の抑制傾向がみられたが、個体差によるバラツキが大きくなった。TL(8,000R)免疫群では、抑制は全くみられず、かえって前述の腫瘍増強傾

Table 5. THEL Tumors formed in Hamsters immunized with X-irradiated THEL, THEL-HVJ or non-irradiated THEL-HVJ-CI-1 Cells
Average tumor size(mm)±Standard deviation(5 hamsters)
* statistically significant($P < 0.05$)

| days after challenge imm. w. | 4 D | 1 0 D | 1 7 D | 2 3 D | 2 6 D |
|---------------------------------------|-----------|------------|------------|-------------|-------------|
| NONE (control) | 0 | 0.65±0.09 | 5.10±3.16 | 10.80±7.90 | 14.00±10.12 |
| THEL-HVJ CI-1, irra. w. 0 R | 0 | 0.16±0.01* | 1.53±1.20* | 4.60±2.10* | 6.10±21.09 |
| THEL-HVJ parent, ir. w. 3,000 R | 0 | 0.40±0.04* | 2.20±1.60* | 8.95±7.11 | 13.50±11.40 |
| THEL parent, ir. w. 8,000 R | 0.05±0.01 | 0.54±0.02 | 4.80±6.30 | 11.84±13.50 | 16.00±13.00 |

Immunization : 1×10^6 cells/hamster, subcutaneously

Challenge : 1×10^4 cells/hamster, subcutaneously,
21 day after immunization

Table 6. THEL Tumor formed in Hamsters immunized with X-irradiated THEL-HVJ or THEL Cells
Average tumor size(mm) ±Standard deviation(8 hamsters)
* statistically significant($P < 0.05$)

| days after challenge imm. w. | 4 D | 1 0 D | 1 7 D | 2 3 D | 2 6 D |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| NONE (control) | 0.16±0.04 | 1.40±0.54 | 4.60±3.32 | 8.80±6.80 | 11.50±8.48 |
| THEL-HVJ parent irr. w. 3,000 R | 0.04±0.05* | 0.53±0.28* | 1.88±0.95* | 5.90±3.255* | 9.10±4.80 |
| THEL parent irr. w. 8,000 R | 0.11±0.07 | 1.18±0.47 | 5.90±2.30 | 11.20±4.80 | 14.60±5.60 |

Immunization : 5×10^6 cells/hamster. 6 times (14, 10, 6 day before and 9, 11, 15 day after challenge) subcutaneously

Challenge : 1×10^4 cells/hamster, 14 day after the first immunization, subcutaneously

向が認められた。

そこで、次に、TH (3,000R), TL(8,000R) を免疫原として、より大量の免疫原でしかも頻りに免疫した場合の有効性が検討された。すなわち、TH (3,000R), TL (8,000R)の両細胞を一回に 5×10^6 個/0.2ml あて皮下に、チャレンジ前14日、10日、6日、に3回免疫し、TL 10^4 個/0.2ml ずつ1ヶ所皮下にチャレンジした後、さらに9日、11日、15日に 5×10^6 個あて追加免疫した結果が(一群8匹) Table 6 である。

これをみると、TH (3,000R) 免疫群は前実験 (Table 5) で示された移植抑制度よりさらに強くしかも、やや長期間(チャレンジ後26日~30日まで)にわたる抑制傾向が認められた。(推計学的には23日迄の抑制が有意)。TL (8,000R) 免疫群は、前述の結果と同じく、抑制よりもむしろ、腫瘍増強傾向を示した。

これら実験結果より、免疫原の質、その量の問題、さらに免疫回数と時期が、移植抑制度(移植拒否免疫の成立)に大きく影響することが推察された。

考 察

以上、我々は、移植性培養がん細胞に nononcogenic virus であるパラミキソウイルス: HVJが持続感染することにより、誘導されるウイルス粒子以外の関連新抗原と、その生体に与える免疫学的影響について実験を行って来た。先ず、かかる新抗原は、一般に、ウイルスが種々の細胞に感染した過程で、宿主細胞がその蛋白合成機構をつかって、感染ウイルスゲノムの誘導で作出す Surface antigen^{31)~37)} と同一と想像される。このウイルス抗原と異なるという点については、ウイルス粒子を人工的にこわし、粒子の蛋白被膜のサブユニット⁵¹⁾としたものと、さらに比較検討する必要があると思われる。しかしながら、自然変性などで生じたサブユニット抗原を若干含むと思われる使用ウイルス抗原は、本実験のHVJ抗血清とゲル内沈降反応で常に、一本の沈降線を、新抗原のそれとは異なる位置に示した。

さらに、この細胞膜の新抗原性物質は、トリプシン処理、アセトン固定で不活化されるリポ蛋白であろうということが、蛍光抗体法により推測された。かかる細胞膜表層の物質的変化(抗原としての)およびそれに付随した変化が、既述¹⁶⁾³⁸⁾³⁹⁾の CIR assay での高感受性への変換ないし、膜電位特性として表現されたと考えてもよいであろう。ただ、cell ghosts をさらにDOC、アセトンで抽出処理した膜成分 (I. L. P.)

は、分子が小さくなり、大きさがそろう反面、リピッドの部分が消失している可能性がある。従って、このTH-ILPで免疫されて出来た抗体中には、TH-cgで免疫して来た抗体とは多少性状が異っているものがあると考えられる。この相異から、抗TH-ILP血清は、生のTLで何回吸収してもTL抗体価が消失せず、また寒天ゲル内沈降反応で、DOC 抽出抗原とは、もとのcg抗原とやや趣を異にした沈降線を示したのであろう。この点も、今後さらに検討する余地がある。

また、この新抗原が、前述の多くの研究者^{31)~37)}のいうウイルス特異的細胞表面抗原 (Surface antigen, S-ag) と全く同一のものかどうかは、持続感染成立ずみの細胞のみならず、ウイルス感染初期のウイルス抗原合成出現と比較しながら、ウイルス性細胞変性に陥る前の感染細胞で決定されるべきであろう。さきに、Haller⁵²⁾は Ehrlich 腹水がん細胞にインフルエンザウイルス: WSA株を感染させると、感染後2時間という初期に、ウイルス抗原とは考えられぬ新抗原の出現を蛍光抗体法で見出している。しかも、この新抗原は、ウイルス感染耐動物血清でのみ認められ、死滅化ウイルス免疫血清では検出できぬことを明らかにした。その生物学的意義は未だ明らかではないが、かかる、新抗原と同様のものが、HVJ感染によりTL細胞にも誘導されるであろうことは、同様の性質を示すパラミキソウイルスなる故に、容易に推定できる。

同じく、感染ウイルスゲノム誘導による合成出現としても、真に de novo 合成なのか、あるいは Burger ら⁵³⁾⁵⁴⁾ および Sachs ら⁵⁵⁾のいうごとく、"cryptic form"として既存のものがウイルス感染により "exposed form"として現われたのかどうかは、我々の場合にも更に検討されねばならない。しかしながら、ブロッキングまたは吸収しきれない (CT, FA, ゲル内沈降反応など) 形で、検出されたことは、"exposure"よりもむしろ de novo 合成を示唆するものといえよう。

これら新抗原について得られた多くの性状ないし結果は、我々の持続感染細胞においても、諸家のみている細胞表面抗原 (S-ag)^{31)~37)}と、ほとんど両者が一致することを示した。とくに、細胞膜抗原としての性格が、抗THcg血清のみならず、抗HVJ過度免疫血清を用いても、CT, FA, ゲル内沈降反応すべてで明らかにされたことは、前述の S-ag 検出と全く軌を一にして、さらにその一致性を裏付けるものといえよう。

かかる細胞膜の抗原性変換をしたTHは、親細胞で

あるTLとくらべてハムスターに対する移植性が非常に低下し、時には腫瘍の退縮さえみられた。かかる現象は、先に述べた Svet-Moldavsky ら⁴⁾のみたHVJ免疫マウスでのHVJ感染移植がん細胞の移植性低下と一見類似していた。我々も当初の実験⁵⁾で、ハムスターをHVJで免疫しておく、TH腫瘍形成が、多少ともさらに抑制される傾向のあることを見た。しかしながら、HVJ免疫をしない、正常ハムスターそれ自身への移植性低下ないし自然退縮現象の解明こそ急務と考えられた。かくて、生体側の免疫の関与が推定されて、その免疫能を抑えたX線照射ハムスターでの実験結果および担TH腫瘍ハムスター脾細胞による細胞コロニー形成抑制試験(C. I. T.)の結果から、THにおける上述の細胞膜抗原性の変換が、次のごとく結びつけられた。すなわち、この変換細胞膜新抗原およびウイルス抗原が、ハムスターの免疫能を強く刺激し、賦活すること、さらに、かかる変換細胞膜をもつTH細胞自身が、活性化された免疫担当細胞の作用を受け易くなって、生体(正常ハムスター)内では、増殖(腫瘍形成=移植性)が抑制され、または腫瘍退縮をみたものと考えられた。これが先述したごとく、小林らのいう“異物化現象(Xenogenization)¹⁸⁾”の本態であろう。この場合“異物化”としての認識および反応過程に、上述の変換新抗原のみならず、TH細胞自身に含まれるに至ったウイルス抗原も、ある程度関与しているであろうことも、充分推察される。

TH細胞に保有されるHVJゲノムの活性化により、その *in vitro* 培養での、ウイルス性細胞変性効果(CPE)は全く認められないが、*in vivo* に接種された場合には、生体側の条件でCPEが起り、そのために移植性の低下や退縮が起るのではないかと懸念も全く否定はできない。しかしながら、X線照射ハムスターでの実験結果は、かかる懸念をほとんど除外しうるであろう。また、Svet-Moldavsky タイプのウイルス免疫動物における実験^{3)~9)}と同じ様な機作が、たまたま、HVJ不顕性感染ハムスターへのTH接種により表現されて、その移植性低下などが生じたのではないかという疑問もありうるであろう。しかしながら、TH接種前にHAIでHVJ不顕性感染の有無をチェックしてみると、HAI価が1:1以下であったハムスター群(不顕性感染なきもの)も、HAI価が上昇しているハムスター群(不顕性感染陽性のもの)も同じようにTH腫瘍形成の抑制ないし退縮を示した。このことから、不顕性感染がとくに、これらの現象に主役を演じているとは考えられなかった。また、ハムスター接種後、経時的に採血し、TH、TLおよびHVJに

対する抗体価の推移をCT、HAIで追跡したが、TH、TL接種ハムスターともにCT価は陰性で、TH接種ハムスターのHAI価のみ上昇していた。このことと、担TH腫瘍ハムスターの脾細胞によるC. I. T.の結果を考え合わせると、移植性の低下や形成腫瘍の退縮の原因は、流血抗体との反応ではなく、細胞性免疫の関与していることが充分考えられる。とくに、細胞性免疫の強力なる惹起を欠く程度のHVJ不顕性感染ハムスターでは、移植性低下ないし自然退縮に、かかる不顕性感染がさらに強く影響するはずはないと思われた。

一方、この様な抗原変換した細胞(TH)は、親のTLに比べて、免疫担当細胞に吸着破壊され易く、しかも、免疫系を賦活化し易いことが、C. I. T.などでわかったが、その賦活化の程度は、より大量接種をうけた時の方がより著しいであろう。TH接種腫瘍の退縮が、 10^6 個以上接種した時のみ起り、 10^5 以下の接種例でみられないことは、それを意味していると思われる。すなわち、接種TH細胞が先ず、賦活化した生体側の免疫反応で早期に吸着破壊され、それがまた刺激原となってさらに次の免疫反応をひき起すというサイクルを通しての移植拒否免疫力(生体側の免疫反応能力に個体差はあるが)と、一方の接種細胞自身の生体内での増殖とのバランスの問題が関与していると思われる。このことに関連して、³H-サイミジンをを用いたオートラジオグラフィにより、TL、TH両細胞のcell life cycleを検討した小西の結果⁵⁷⁾では、THは、*in vitro*でTLより増殖サイクル(T. C)が長いのに、*in vivo*では逆にTLのそれより短縮する(すなわち、分裂時間が短い)ことが明らかにされた。このことは、接種THの*in vivo*における形成腫瘍がTLのそれより小さい(移植性の低下)ということと、一見矛盾を感じる。しかし、Steel⁵⁸⁾の“cell loss factor”という概念を導入して、前述のごとき生体における免疫力惹起と細胞増殖力のバランスと考えれば、解釈されうるとしている。本実験のC. I. T.で見出された担THハムスター脾細胞のTHに対する態度は、まさにこのことを示しているものと思われた。

かかるTHによる免疫力の惹起は、先述の“Xenogenization¹⁸⁾”に通じるものであるが、それがさらに、THと共通抗原を持つTLに対する移植拒否性免疫の誘導ないし成立を示すことは、いわゆる免疫の“まきこみ”¹²⁾¹⁸⁾現象にあてはまるといえるであろう。そのためは、生体側の細胞性免疫力賦活が、強力に、しかも長時間つづくようにすればよいと推定され、我々もそれをX線照射細胞による免疫で試みた。

その結果、免疫の量的、質的問題、免疫回数、チャレンジ時期などにより、かかるHVJ持続感染細胞を免疫原とする“まきこみ”は、大いに期待出来ると考えられた。

さきに Lindenmann ら⁴⁵⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾、近くは Boone ら⁶¹⁾⁶²⁾、さらに Axler ら⁶³⁾ は、同じく非がんウイルス（ミクソウイルス：インフルエンザウイルス）感染腫瘍細胞ホモジネートのもつ同様の移植拒否免疫誘導能力（非感染腫瘍細胞のホモジネートでは全くみられない）を明らかにして、それを、かかる免疫における“myxovirus effect”⁶¹⁾⁶²⁾ と唱えている。その効果は、感染ウイルス抗原自身よりも、むしろウイルス感染により出来た新細胞膜抗原に、移植拒否性免疫の誘導作用があることによるのであろうと推定⁶¹⁾⁶²⁾している。そして、腫瘍の免疫学的治療または診断に応用しようするとき、腫瘍特異的移植抗原の精製濃縮への一般的方法が、かかる“effect”より期待出来るであろうとも述べている。この Boone らのいう“myxovirus effect”は、我々の今回観察しえた paramyxovirus：HVJ持続感染細胞の示す同様の活性とおそらく同一で、人への応用から考えれば、HVJの方が病原性が少ないと思われるので、将来への発展性はより大きいといえよう。

ただ、小林らの Friend ウイルスによる同様の実験^{10)~14)}に比較すると、えられる免疫力に未だ若干およばぬ所があるので、その点の改善（例えば免疫法、量など）が、次にとりかかるべき大きな問題となる。

結 論

ハムスター胎児肺細胞由来の移植性培養細胞（TL）と比較して、そのパラミクソウイルス：HVJ持続感染細胞（TH）における抗原変換（特に、細胞膜表面の抗原性の変換）および、ハムスターへの移植能ならびに移植拒否性免疫誘導能について検討した。

1. ハムスター胎児肺細胞由来の培養がん細胞（THEL=TL）に、HVJを感染後、生残細胞の継代培養により、細胞変性効果（CPE）を欠くにもかかわらず、血球吸着現象（HAD）、抗HVJ血清による蛍光抗体染色（FA）などが陽性で、親細胞（TL）と形態的にも増殖速度もほとんど同じのHVJ持続感染細胞（THEL-HVJ = TH）が得られた。

2. かかるTL、THのハムスターへの移植性をみると、THはTLに比べて、明らかに移植性が低下していた。特に、TH 10^6 個以上の接種腫瘍の自然退縮、消失の現象およびTH腫瘍のX線（550R）照射ハムスター

における腫瘍形成増強現象すなわち、低下移植性の回復などより、THの移植性の低下には、生体側（ハムスター側）の免疫機構が強く関与していると考えられた。

3. かかる免疫機構の賦活化に重要な役割をもつものとして、TH細胞のHVJ持続感染化による細胞表層膜の抗原性変換に着目し、その追求を行った。すなわち、両細胞より調製した細胞膜成分より成る cell ghost、そのDOC抽出による不溶性リボ蛋白（ILP）およびHVJに対する各抗血清をつくり、これらを用いて、両細胞に対する cytotoxic test（CTT）、蛍光抗体染色（FA）さらに、寒天ゲル内沈降反応を行った。かくて、両細胞共通抗体を完全に吸収し、ウイルス抗体をブロックまたは吸収した抗THcg血清に、non-viralの新抗原に対する抗体の存在が、CTT、FA、ゲル内沈降反応いづれでも証明された。同様の抗体は、HVJ過度免疫血清（TL由来抗原に対する抗体は全く含まない）にも、弱いながら存在することをこの3つの手技で認めることが出来た。

4. かかるTH特異的抗体産生をもたらしたTH細胞表層の変換抗原が、ウイルス抗原と相まって、THを接種された生体の免疫系特に細胞性免疫（脾細胞に代表されるリンホイド細胞系）を賦活化し、その結果、上述の移植性の低下、ないし自然退縮を来すのであろう。このことは、担TL、TH腫瘍ハムスター脾細胞によるTL、TH細胞のコロニー形成抑制試験により確められた。

5. そこで、TH細胞を免疫原として、TL細胞に対する移植拒否免疫誘導を試みた。まず、免疫原としてのTH細胞は、2,000R~3,000R照射後、 1×10^6 個以上を用いて免疫し、3週間後に、TL細胞をチャレンジするスケジュールが有効であった。この場合、対照として、TL細胞（5,000~10,000R）で、同じ免疫法を行うと、移植拒否性免疫の誘導が全くみられず、かえって腫瘍形成の増強効果が出現した。また、TH細胞のクローニングでえられたTH-Cl-1細胞は、移植性がさらに低く、かつハムスターに 10^6 接種しても形成腫瘍は、2~3週以内に全例が退縮した。このTH-Cl-1細胞は、X線照射をしなくとも常に退縮するので、免疫原としては好適で、TH親（3,000R）、TL（8,000R）細胞免疫と同様の免疫に用いて、それらの効果を比較した。その結果、生TH-Cl-1免疫群が最も強力に、しかも長期間（約3~4週）TL細胞に対する移植拒否免疫を示し、次いで、TH（3,000R）群に有意の効果が認められた。しかしこの場合も、TL（8,000R）細胞免疫では、移植拒否よりむしろ前と

同じく、TL腫瘍形成増強がみられた。さらに、免疫量(約5倍)と免疫回数(6回)を増すことにより、移植拒否性免疫誘導を、より強力にしかも長期間継続させることが確められた。

稿を終えるに当り、温かく御指導、御協力をいただきましたがん研ウイルス部の皆様、さらに倉田教授、西東教授はじめ、がん研病態生理、免疫生物部の方々に心から謝意を表します。

文 献

- 1) Habel, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 106, 722 (1961).
- 2) Habel, K. : Malignant Transformation by Viruses, (Recent Results in Cancer Research, 6), edit. by W. H. Kirstein, p.60, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1966.
- 3) Stuck, B., Old, L. J. & Boyse, E. A. : Nature, 202, 1016 (1964).
- 4) Svet-Moldavsky, G. J. & Hamburg, V. P. : Nature, 202, 363 (1964).
- 5) Hamburg, V. P., Loizner, A. L. & Svet-Moldavsky, G. J. : Nature, 203, 772 (1964).
- 6) Sjögren, H. O. & Hellström, I. : Exptl. Cell Res., 40, 208 (1965).
- 7) Hamburg, V. P., Loizner, A. L. & Svet-Moldavsky, G. J. : Nature, 212, 1495 (1966).
- 8) Hamburg, V. P. & Svet-Moldavsky, G. J. : Nature, 215, 1300 (1967).
- 9) Sjogren, H. O. & Hellström, I. : Specific Tumor Antigen, Symposium of the U. I. C. C., p.163, Copenhagen, Munksgaard Co., 1967.
- 10) Kobayashi, H., Sendo, F., Shirai, T., Kaji, H., Kodama, T. & Saito, H. : J. Natl. Cancer Inst., 42, 413 (1969).
- 11) Kobayashi, H., Hosokawa, M., Takeichi, N., Sendo, F. & Kodama, T. : Cancer Res., 29, 1385 (1969).
- 12) Kobayashi, H., Sendo, F., Kaji, H., Shirai, T., Saito, H., Takeichi, N., Hosokawa, M. & Kodama, T. : J. Natl. Cancer Inst., 44, 11 (1970).
- 13) Sendo, F., Kaji, H., Saito, H. & Kobayashi, H. : GANN, 61, 223 (1970).
- 14) Shirai, T., Kaji, H., Takeichi, N., Sendo, F., Saito, H., Hosokawa, M. & Kobayashi, H. : J. Natl. Cancer Inst., 46, 449 (1971).
- 15) 矢吹朗彦 : 金沢大学がん研年報, 2, 113 (1968).
- 16) 山田 燦・田中淳之・清水隆作・波多野基一・小田島庸夫 : Symposia Cell Biol., 21, 339 (1970).
- 17) Yamada, T. & Hatano, M. : GANN, 63, 647 (1972).
- 18) 小林 博 : 代謝, 8, 20 (1971).
- 19) 中井準之助 : 組織培養—基礎と応用, p.70, 東京, 朝倉書店, 1964.
- 20) 奥村秀夫 : 第18回組織培養学会 (1964) 発表.
- 21) 波多野基一 : 医学のあゆみ, 67, 174 (1968).
- 22) Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E. : Exptl. Cell Res., 13, 96 (1957).
- 23) Bruenmmer, N. C. & Thomas, L. E. : Exptl. Cell Res., 13, 103 (1957).
- 24) Kurata, Y. & Okada, S. : Int. Arch. Allergy, 29, 499 (1966).
- 25) Robinson, R. Q. & Dowdle, W. R. : Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections, edit. by Lennette, E. H. and Schmidt, N. J., P.414, New York, American Public Health Assoc., Inc., 1969.
- 26) Warren, B. : J. Natl. Cancer Inst., 31, 411 (1963).
- 27) Ouchterlony, O. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953).
- 28) McDevitt, H. O., Peters, J. H., Pollard, L. W., Harter, J. G. & Coons, A. H. : J. Immunol., 90, 634 (1963).
- 29) Hellström, I. : Int. J. Cancer, 2, 65 (1967).
- 30) Möller, E. : Science, 147, 873 (1965).
- 31) Ueda, Y., Ito, M. & Tagaya, I. : Virology, 38, 180 (1969).
- 32) Geder, L. & Skinner, G. R. B. : J. Gen. Virol., 12, 179 (1971).
- 33) 浜田忠彌・植竹久雄 : 医学のあゆみ, 68, 361 (1969).
- 34) Girardi, A. J. & Defendi, V. : Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 10, 29 (1969).
- 35) Kluchreva, T. E., Shachnina, K. L., Belova, S., Chibisova, V. & Deichman, G. I. : J. Natl. Cancer Inst., 39, 825 (1967).
- 36) Irlin, I. S. : Virology, 32, 725 (1967).
- 37) Osunkoya, B. O., Mottram, F. G. & Lsoun, M. J. : Int. J. Cancer, 4, 159 (1969).

- 38) Tanaka, J., Shimizu, R. & Hatano, M. : Japan. J. Med. Sci. Biol., **23**, 336 (1970).
- 39) Tanaka, J., Shimizu, R. & Hatano, M. : Japan. J. Med. Sci. Biol., **24**, 77 (1971).
- 40) Björklund, J. : J. Immunol., **79**, 319 (1952).
- 41) Klein, E. : Cancer Res., **20**, 452 (1960).
- 42) Koldovsky, P. : Tumor Specific Transplantation Antigen, (Recent Results in Cancer Research, 22), P.3, P.6, P.27, and P.49, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1969.
- 43) Woodruff, M. F. & Symes, M. : Brit. J. Cancer, **16**, 484 (1962).
- 44) Harris, J. E. & Sinkovics, J. G. : The Immunology of Malignant Diseases, P.79, St-Louis, Mosby, C. V. Co., 1970.
- 45) Lindenmann, J. & Klein, P. A. : Immunological Aspects of Viral Oncolysis, (Recent Results in Cancer Research, 9), P.1-75, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1967.
- 46) Revesz, L. : Cancer Res., **20**, 443 (1960).
- 47) Flexner, S. & Jobling, J. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **5** (1910).
- 48) Kaliss, N. : Fed. Proc., **24**, 1024 (1965).
- 49) Sjögren, H. O. : J. Natl. Cancer Inst., **32**, 361 (1962).
- 50) 山田 燦・波多野基一 : 第31回日本癌学会総会記事, P.275 (1972).
- 51) 戸沢秀樹・渡辺元裕 : 第20回日本ウイルス学会総会抄録, 1052 (1972).
- 52) Haller, O. : Path. Microbiol., **36**, 1 (1970).
- 53) Burger, M. M. : Proc. Natl. Acad. Sci., **62**, 994 (1969).
- 54) Fox, T. O., Sheppard, J. R. & Burger, M. M. : Proc. Natl. Acad. Sci., **68**, 244 (1971).
- 55) Fogel, M. & Sachs, L. : Devel. Biol., **10**, 411 (1964).
- 56) 山田 燦・波多野基一 : 第17回日本ウイルス学会総会抄録, II-5 (1969).
- 57) 小西二三男 : 十全医会誌, **80**, 380 (1971).
- 58) Steel, G. G. : Cell Tissue Kinet., **1**, 193 (1968).
- 59) Lindenmann, J. & Klein, P. A. : J. Immunol., **92**, 912 (1964).
- 60) Lindenmann, J. & Klein, P. A. : J. Immunol., **94**, 46 (1965).
- 61) Boone, C. W. & Blackman, K. : Cancer Res., **32**, 1018 (1972).
- 62) Boone, C. W. : 第31回日本癌学会総会記事, P.215 (1972).
- 63) Axler, D. A. & Girardi, A. : Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **11**, 4 (1970).

Abstract

The establishment of persistent infection with paramyxovirus, HVJ (hemagglutinating virus of Japan), made cultured tumor cells (THEL=TL) less transplantable without viral cytopathic effect. Parent TL cells derived from embryonal hamster lung cells and its HVJ-carrier cells (THEL-HVJ=TH) showed in vitro similar properties of growth and morphology. When a large number of TH cells (more than 10^6 cells) were transplanted into hamsters, occasional regression of TH tumors occurred. This transplantability of TH cells was clearly enhanced in X-ray irradiated (550 R) hamsters. These results suggested that immunological responses happening to hamsters might play important roles in the lowered transplantability of TH cells.

Using several antisera against cell ghosts (cg), which were prepared from the TL or TH cell membrane insoluble lipoproteins extracted from cg, and HVJ, the antigenicity of both TL and TH cell membrane was examined. The following evidences on the TH cell membrane were obtained by the cytotoxic test, fluorescent antibody staining and double-gel-diffusion method after an appropriate blocking or absorption of cell common antibody and virus antibody in antisera employed. Namely, the TH cell membrane has not only both HVJ and TL :

TH cell common antigen, but also newly induced TH specific antigen. From its characteristics obtained in these tests, this new antigen on HVJ-carrier cell membrane seemed to be similar to the surface-antigen usually observed on virus-infected cells.

Thus, newly converted antigen on the cell membrane together with viral antigen appeared to cause strong xenogenic immune responses in hamsters transplanted with TH cells, resulting in the lowered transplantability observed above. TH cell-colony inhibition test in vitro clearly proved a strong adsorption of TH tumor-bearing or normal hamster spleen cells on TH cells, and destruction (inhibition) of TH cells by the same spleen cells. These might be results of stimulation of cell-mediated immune systems and seemed to be identical with the above assumption.

Therefore, the induction of transplantation immunity, which rejects or inhibits TL tumor formation, was attempted by the immunization with X-ray-irradiated TH cells. X-ray-irradiation with 3,000 R, numbers of immunizing cells (more than 10^6 cells) and of immunization (more than 2-6 times), intervals between immunization and challenge (usually 3 weeks), suitable selection of TH clone, which showed reproducible tumor regression without X-ray-irradiation, etc. were the essential factors for our purposes. Under these experimental conditions, hamsters showed statistically significant immunity against TL tumor formation for about one month, in contrast to the enhancement of TL tumor formation rather than its inhibition after the same immunization with X-ray-irradiated (8,000 R) TL cells.

Photo.1-3. Fluorescent Antibody Staining (FA) of THEL-HV J Cells

Photo.1. by Anti-HVJ FA (unfixed)

Photo.2. by Anti-THcg FA (unfixed)

Photo.3. by Anti-THcg FA after blocking with Anti-Anti-TLcg and-HVJ serum (unfixed)

Photo. 1

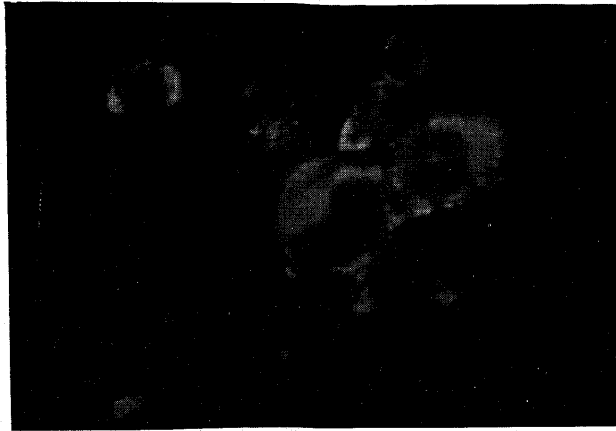


Photo. 2

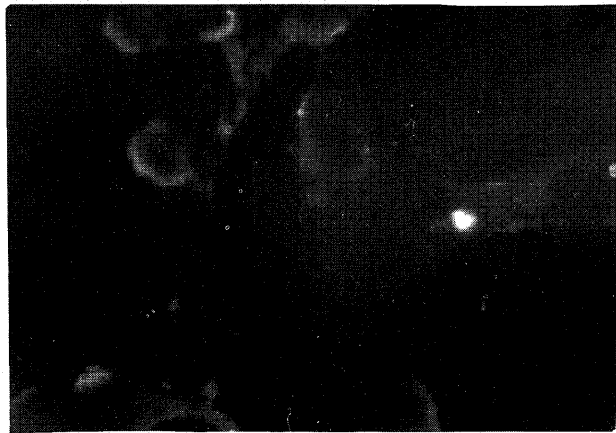


Photo. 3



Photo.4-6. Double Immunodiffusion Pattern

Numbers described in respective antigens mean concentrations (mg/ml) of antigen as protein mg.

- a) Anti-THcg serum absorbed with TLcg antigen (0.3 mg/ml) in agar
- b) Anti-THcg serum absorbed with TLcg antigen (1.0 mg/ml) in vitro 3 times and with TLcg antigen (1.0 mg/ml) in agar
- c) HVJ, HAU/ml=40.000
- d) Anti-HVJ serum, HAI/ml=8192

Photo. 4

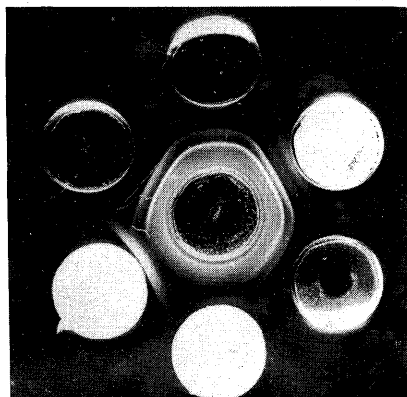
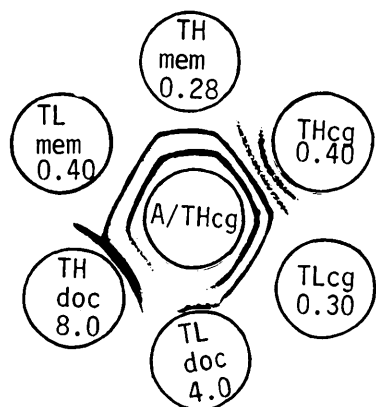


Photo. 5

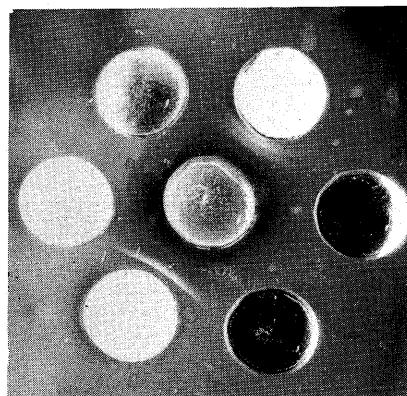
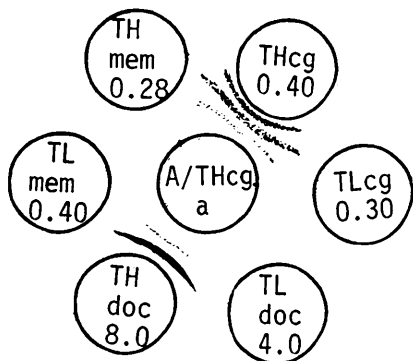


Photo. 6

