

亜硝酸で不活性化された腫瘍細胞をもつての マウス Sarcoma 180 に対する免疫試験

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤亮教授）

吉 村 政 弘
 燕 城 外 枝 子
 岡 野 務

（受付：昭和37年9月4日）

緒 言

悪性腫瘍患者を免疫法によって治療しようとした試みは、癌研究史の早期においてすでに行われたのであるが⁽¹⁾、それらはすべて徒労に終っていて、その後この問題に関してはほとんど顧みるものがなかったという状態であった。しかるに近年、癌免疫に関する研究は純系動物を使用して種々の移植癌を対象として盛んに行われる様になり、なかんずくX線照射等^(2, 3, 4, 5)によって、その増殖性を喪失した腫瘍細胞を用いての active immunization が優秀な免疫効果を収めるようになって、ここに癌免疫研究は再び研究者の関心を集めるに至った。

著者らは前回の報告⁽⁶⁾において、Ehrlich 腹水癌細胞を種々の試薬で処理して、そのマウスに対する増殖性を消失せしめた後、これら不活性化癌細胞をもつて dd 系マウスを前処置して、Ehrlich 腹水癌に対する免疫性獲得のいかんを検索した結果、亜硝酸をもつて処置された癌細胞が最も顕著な免疫賦与効果を示すことを実証した。そこでその成果にもとづいて著者らは今回、マウスの Sarcoma 180（腹水型）を対象として、腫瘍細胞の免疫賦与能に対する亜硝酸の影響について検索を行った。ここにその成績を報告する。

実 験 方 法

1. 動物：実験に用いられた動物は体重 17gm 前後の dd 系雄マウスである。マウスは固型飼料（オリエンタルM）及び水の自由摂取によって飼育された。

2. 腫瘍：本研究に使用された腫瘍細胞は腹水型 Sarcoma 180（S-180と略記する）であつて、毎週1回罹患動物の腹水約 0.3ml を健康マウスの腹腔内に注射して腫瘍の継代移植を行った。

実験用の腫瘍細胞は、実験12日前に約 2×10^7 個の S-180 細胞を腹腔内に接種された数匹のマウスから、腹腔穿刺によって採った腹水から得られたものである。腹水の採取、並びにその後の処置はすべて無菌的操

作をもつて、しかも低温下（5°C以下）で行われた。腹水を遠心（1,500 rpm, 5分間）し、分離された S-180 細胞を Krebs 液をもつて3回洗浄し、最後に腫瘍細胞を原腹水の $\frac{1}{2}$ 容量に相当する Krebs 液に浮遊した。ここに得られた洗浄腫瘍細胞浮遊液（以下単に S-180液と称す）は通常 1 ml 中約 10^8 の S-180 細胞を含有しており、免疫実験においてマウスに腫瘍接種を行う場合には、この S-180液を Krebs 液をもつて、0.5ml 中約 10^6 個の細胞を含むように適当に希釈したものをを用いた。

3. 腫瘍細胞の亜硝酸処置：腫瘍細胞の亜硝酸処置

は氷冷下で前回報告⁽⁶⁾と同様にして行われた。滅菌フラスコに S-180液 1容量をとり、これに等量の 4 M NaNO₂ を加え、次いで 2 容量の 0.5M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) を滴下しながら攪拌混和する。試薬を加え終わったならば、フラスコ内容を別の容器に移し替えた後、そのままの状態で15分間放置して反応を行わせた。反応完了後、細胞を、洗液がヨード澱粉紙反応陰性となるまで洗浄し、最後に Krebs 液を加えて原容量とした。かくして得られた亜硝酸処置 S-180は、第 1 表の実験成績から明らかなように、マウスに対する増殖性を完全に喪失していた。すなわち対照の無処置 S-180 液 0.5ml を移植された 10匹のマウスは、移植後 30日以内に全部斃死したのに対し、亜硝酸処置 S-180液 0.5ml の腹腔内注射を受けた動物は全部 90日後においても健康であって、腫瘍発生の兆候は認められなかった。

4. 免疫試験：マウスを 1 群 10匹宛に区分し、各試験ごとに実験群と対照群とを準備した。実験群動物に

対しては、前処置として亜硝酸処置 S-180液 ワクチンの腹腔内注射を行ったのであるが、その際ワクチンの投与方法として、1 回注射法と、反復注射法の 2 種類を実施した。そして 1 回注射の場合には、ワクチン 0.5 ml (約 5×10^7 細胞) を、また反復注射の場合にはワクチンの 0.1ml を 1 回量として 3 日間隔で 4 回、それぞれマウスの腹腔内に注射した。最後のワクチン注射より 3 週間後に、実験群並びに対照群の全マウスに腫瘍細胞約 10^6 個を腹腔内に接種した。以後 90 日間にわたって連日各動物について健康状態を監視した。その間に斃死した動物、並びに実験終了時生存していたマウスについて、剖検を行ない、肉眼的腫瘍病変の有無を精査するとともに、腹腔内から取った塗抹標本について May-Grünwald Giemsa 法による染色を施して腫瘍細胞の存否を鏡検した。なお実験期間中、細菌感染や、その他腫瘍以外の原因で斃死した動物は実験成績から除いた。

実 験 成 績

第 2 表は上に述べたように、亜硝酸処置によってその増殖性を全く喪失した S-180 腫瘍細胞をもつての dd マウスにおける免疫試験の成績を示したものである。

第 1 実験は、前処置として亜硝酸処置細胞ワクチン 0.5ml を 1 回だけ注射を受けたマウス群についての実験であるが、この場合には無処置の対照群では、強毒腫瘍細胞接種後 30日以内に全動物 8 匹が斃死しており、また免疫群動物にあつては 9 匹中 8 匹までが 30 日以内に斃死したという結果であつて、この成績からは両群の平均生存日数の間には統計学的に有意な差異は認められなかったのである。ところが、免疫群動物に対して、1 回量 0.1ml のワクチンを 3 日間隔で 4 回 (従つて総量 0.4ml) 反復注射を行った第 2 実験では、免疫動物 10 匹中わずかに 3 匹が腫瘍によって斃死したのみであつて、他の 7 匹はすべて健康に生存し、腫瘍発生の徴候は全くなかつた。しかもこの場合の対照群では全動物 10 匹が 40 日以内に斃死しているのであつて、従つてワクチンの反復注射によって死亡

率は 100% から 30% に低下したわけである。

以上の実験成績は、亜硝酸処置によって生体内増殖能を完全に失つた S-180 腫瘍細胞が、dd マウスに対して強力な抗 S-180 免疫賦与能を有することを実証したものである。ここで特に注目されるのは、前回報告⁽⁶⁾の Ehrlich 腹水癌の免疫実験と異つて、今回の S-180 実験では、亜硝酸処置細胞を 1 回だけ注射したのでは免疫効果はほとんど期待できなかったが、これを反復注射することによって、死亡率を 100% から 30% へ低下させ得た程の高度の免疫効果が發揮できたという事実である。抗原の反復注射が 1 回注射より免疫効果が大きいことは、つとに免疫学において知られている事実であるが、癌免疫に関する実験的研究においても同様な結果が、たとえば X 線照射腫瘍細胞⁽³⁾ や、Nitrogen mustard 処置腫瘍細胞⁽⁵⁾ をもつての最近の研究において報告されている。著者らの今回の S-180 に関する成績もまた、免疫注射回数⁽⁴⁾の多少が癌免疫の成立に重大な影響を及

ぼすことを示したものである。

亜硝酸が細胞の抗原性に対してはなほだ特異な影響性を示すことは、亜硝酸で殺菌された強毒ヒト型結核菌がモルモットの結核感染に対して、BCG ワクチンに比して優るとも劣らない程の大きな免疫効果を示すという吉村⁽⁷⁾の研究によって初めて実証されたのであるが、前回報告⁽⁶⁾並びに今回の実験結果によって、亜硝酸は細菌のみならず、癌細胞に対してもまた

その抗原性に特異な影響を与えることが示されたわけである。亜硝酸とこれら細胞（主として蛋白質や核酸等の高分子生体物質）との間の反応機作には、きわめて複雑なものがあって、その真相は容易に知りうべくもないが、著者らが今までに開発した諸事実から考えて、亜硝酸によって生じた細胞内の理化学的变化が抗原性発現上はなほだ重要な生物学的意義をもつものであることは疑いのないところである。

結 論

1 Sarcoma 180 (腹水型) の腫瘍細胞を 1 M 亜硝酸をもって pH4.0, 0°C において 15 分間処置すると、そのマウス (dd 系) に対する増殖性は完全に失われた。

2 亜硝酸処置によって増殖性を失った腫瘍細胞の反復腹腔内注射を受けたマウスは、その

後の Sarcoma 180 細胞接種に対し強力な免疫性を獲得するに至り、その結果、死亡率は 100% から 30% に低下した。しかし亜硝酸処置細胞の 1 回注射を受けたマウスは腫瘍の増殖に対し何ら認むべき抵抗性を示さなかった。

本研究の遂行にあたっては、文部省科学研究費の補助をうけた。

文 献

1. Southman, C. M. : Cancer Research, 21, 1302, 1962.
2. Rêvész, L. : J. Nat. Cancer Inst., 20, 1157, 1958.
3. Donaldson, D. M. and Mitchell, JR. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 101, 204, 1959.
4. Larson, W. M. et al. : Ibid., 108, 140,

- 1961.
5. Donaldson, D. M. and North, J. A. : Fed. Proc., 19, 392, 1960.
6. Yoshimura, M. and Kaburaki, T. : 1962, (in Press)
7. Yoshimura, M. : Jap. J. Tuberc., 4, 145, 1956.

Table 1

Effect of nitrous acid on transplantability of sarcoma 180
in *dd* mice

Tumor cells	Cumulative mortality of mice at the following intervals after transplantation (days)				
	20	30	40	50	90
Treated with nitrous acid	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Non-treated (Controls)	9/10	10/10			

Table 2

Resistance to sarcoma 180 in *dd* mice immunized with nitrite
inactivated tumor cells

Exp.	Group	No. of injections of nitrite treated cells	Cumulative mortality of mice at the following intervals after challenge implant (days)					
			20	30	40	50	60	90
1	Immunized	1	3/9	8/9	8/9	8/9	8/9	8/9
	Control	•	2/8	8/8				
2	Immunized	4	0/10	2/10	3/10	3/10	3/10	3/10
	Control	•	2/10	9/10	10/10			