



Title	Vaccinia virusを用いた腫瘍特異免疫の誘導法：増強されたeffector機構の解析
Author(s)	清水, 敬生
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33306">https://hdl.handle.net/11094/33306</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	清	水	敬	生
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	5990	号	
学位授与の日付	昭和	58年	3月	25日
学位授与の要件	医学研究科	病理系専攻		
	学位規則	第5条第1項該当		
学位論文題目	<b>Vaccinia virusを用いた腫瘍特異免疫の誘導法：増強されたeffector機構の解析</b>			
論文審査委員	(主査) 教 授 加藤 四郎			
	(副査) 教 授 高橋 理明 教 授 濱岡 利之			

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

腫瘍特異免疫の増強法の一つに、腫瘍細胞をある抗原決定基で修飾して免疫する方法がある。この時宿主が予め修飾抗原に感作されると、in vivoに於ける強い抗腫瘍免疫が誘導されることが明らかにされている。我々は修飾抗原としてVaccinia virusを用いた腫瘍特異免疫の増強法を開発した。即、Vaccinia virusで免疫したマウスにVaccinia virus感染同系腫瘍細胞を3回免疫することにより、その後の腫瘍生細胞の攻撃接種に耐える強力な抗腫瘍免疫が誘導出来た。本研究の目的は、Vaccinia virusを用いてin vivoに於ける抗腫瘍抵抗性を獲得した免疫マウスのeffector機構をin vitroで解析することである。

#### 〔方法及び成績〕

##### ① 動物及び腫瘍：

C3H/HeNマウス(6～8週齢、♀)を使用。腫瘍はC3H/He系マウスに自然発生し同系マウスの腹腔内に継代移植されてきたX5563骨髄腫及びC3H/He系由来の四塩化炭素誘発腫瘍MH134腹水肝癌を用いた。

##### ② virus及びvirusによる腫瘍細胞の修飾：

Vaccinia virus池田株を使用。腹腔内に継代移植したX5563及びMH134腫瘍細胞を採取し、赤血球を溶解除去した後にMOI(multiplicity of infection)10でvirusと混合、37℃、4時間incubateすることにより腫瘍細胞の感染を行った。この際蛍光抗体間接法で腫瘍細胞表面にVaccinia virus特異抗原が出現することを確認している。

### ③ 免疫マウスの作成

C 3 H/HeNマウスに150 RX線照射後, *Vaccinia virus*  $10^7$  PFUを接種 (priming) し, 3週後に virus 感染腫瘍細胞 (X5563又はMH134)  $10^7$  個を腹腔内に1週間隔で3回免疫することにより免疫マウスを作成。このようなマウスはその後の腫瘍生細胞  $10^6$  個の背部皮内攻撃に対して強い抵抗性を示すことを昨年教室の呉が既に発表している。この免疫マウスの脾細胞及び血清を用いて, *in vitro* に於ける effector 機構の解析を行った。

### ④ $^{51}\text{Cr}$ -release assay

免疫マウスより採取した脾細胞  $5 \times 10^6$  個を腫瘍細胞  $1 \sim 3 \times 10^5$  個で *in vitro* に於いて感作し5日後に生じた effector を,  $^{51}\text{Cr}$  をラベルした腫瘍細胞 (target) と種々の比率で4時間培養し上清に遊離した  $^{51}\text{Cr}$  をカウントし, キラー活性を測定した。

### ⑤ cold target inhibition assay

上記の  $^{51}\text{Cr}$  release 法で生じた effector を,  $^{51}\text{Cr}$  でラベルしていない腫瘍 (cold target) と20分間 incubate した後に,  $^{51}\text{Cr}$  ラベルした腫瘍細胞と4時間 incubate する方法で, effector の腫瘍に対する特異性を調べた。

### ⑥ 補体依存性殺細胞試験 (CDC)

免疫マウスの血清を腫瘍生細胞及び補体源 (ウサギ新鮮血清) と  $37^\circ\text{C}$ , 45分間 incubate した後に, trypan blue で死細胞を染色して腫瘍細胞の死亡率をカウントし, 血清中の抗腫瘍抗体価を測定した。

### ⑦ 抗 X5563 免疫マウスに於ける effector 機構 :

X5563腫瘍系に於いては, virus で免疫した後に virus 感染 X5563腫瘍細胞で免疫した, いわゆる免疫マウスの脾細胞中に強い抗 X5563 killer 活性が認められた。免疫を virus 感染腫瘍細胞で行っても, virus による priming を行わないと十分な killer 活性は認められない。また virus 非感染 X5563細胞で免疫した場合は virus による priming の有無にかかわらず, killer 活性は認められなかった。次にこの killer 活性を示す effector を抗 Thy-1, 2+C で処理したところ killer 活性は完全に消去され, これが T cell であることが判明した。さらにこの抗 X5563 killer T cell の特異性を調べるために cold target inhibition assay を行ったところ, 抗 X5563 killer 活性は, X5563細胞を cold target とした場合にのみ消去されたため, 抗 X5563 killer T cell は X5563 に対して特異的であるといえる。一方 CDC, 及び蛍光抗体法の結果, 抗 X5563 免疫マウスの血清中には抗腫瘍抗体は検出されなかった。

### ⑧ 抗 MH134 免疫マウスに於ける effector 機構 :

X5563腫瘍系の場合と同様に  $^{51}\text{Cr}$  release 法を行ったところ, E/T 比を高くしても抗 MH134 免疫マウスの脾細胞中には抗 MH134 killer 活性は認められなかった。一方 CDC の結果, 血清中には高い抗 MH134 抗体価が検出された。さらに C 3 H の同系腫瘍 X5563 及び MM102 乳癌細胞を target にして CDC を行ったところ killing は認められず, 抗 MH134 抗体は, MH134 に対して特異的であることが証明された。

## 〔総括〕

腫瘍抗原はそれぞれの腫瘍系で性格が異なる為, それに対する免疫応答も異なってくる。effector

機構を互に異にする二つの腫瘍系で共に強い抗腫瘍免疫誘導の増強を認めたことは、*Vaccinia virus*を用いたこの腫瘍特異免疫増強法が原理的に種々の腫瘍系に対してあてはまる方法であることを示唆する。

### 論文の審査結果の要旨

予めX線照射し、種痘ウイルス（VV）を接種したマウス（C3H）を、同系可移植性腫瘍細胞であるMH134（M）又は、X5563（X）にVVを感染させたもので免疫すると、それぞれの腫瘍細胞の移植攻撃に対して、明瞭な抑制効果のあることが示されている。本研究は、このような処理をしたマウスにおける免疫反応をしらべ、VV感染M免疫マウスと、VV感染X免疫マウスにおいて、それぞれの腫瘍細胞に対する免疫反応が、異っており、前者では、抗M抗体が、後者では、抗XキラーT細胞活性が、特異的に、誘導されていることを見出したものである。腫瘍免疫学の立場から、価値ある論文と認める。