
原 著

脳腫瘍の細胞免疫学的研究：グリオーマの
腫瘍-胎児抗原および血清阻止因子

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：半田 肇教授）

織 田 祥 史

（原稿受付：昭和49年1月11日）

Studies on Cellular Immunity of Brain Tumors ;
Glial Carcinofetal Antigens and Serum
Blocking Factors in Gliomas

by

YOSHIFUMI ODA

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School

(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

The glial carcinofetal antigen was advocated by Trouillas (1971) and later affirmed by Wahlström (1973), but denied by Brooks (1972) and Delpech (1972) with Ouchterlony and microcytotoxicity tests.

Kornblith (1969) stated that the serum blocking factor has an effect on tumor cells and protects them from cytotoxic lymphocytes. Gutterman and Prager (1973) reported that it is a humoral antibody. And Ambrus (1973) exploited the method to remove it from the serum. On the other hand, Brooks (1972), Belehradec (1972) and Baldwin (1973) insisted that it has an effect on the lymphocyte and it is a free antigen.

In our preliminary paper (1972), it was reported that most intracranial tumors have tumor specific antigens which can be detected by leukocyte migration inhibition test (LMT, Sjøborg and Bendixen, (1967)). Further investigations on the immunological aspects of the intracranial tumors were carried out with the use of LMT, microcytotoxicity test and lymphocyte blastogenesis.

Results and Discussion

Gliomas (all of 8 cases), meningiomas (all of 5 cases), medulloblastoma (one of 3 cases) and ependymoma (one of 2 cases) had tumor specific antigens.

Negative results were obtained in medulloblastomas (2 of 3 cases), pinealoma

(one case), ependymoma (one of 2 cases), neurinoma (one case) and cerebellar hemangioblastoma (one case).

The tumor specific antigen was found to be mainly in the endoplasmic reticulum and microsomal fractions of the tumor cells. The cell membrane consists in these fractions. The antigenicity was reinforced by neuraminidase treatment for 30 minutes at 37 C and disappeared by subsequent trypsin treatment. Gliomas and meningiomas had a common specific antigen for each group.

In five among 7 cases of gliomas, a common antigen was demonstrated by LMT with the human fetal brain cells which were obtained from Flow Laboratory. Lymphocytes from all examined cases (two cases of gliomas and each one case of pinealoma, pituitary adenoma and cerebellar hemangioblastoma) were cytotoxic to the human fetal brain cells in vitro, while the serum blocking effect to them was noted in only two cases of astrocytoma. We had expected that the fetal brain cells had a specific responsibility to gliomas. This error might be depending on our culture conditions.

The serum blocking effect to the autochthonous tumor cells was noted in each one case of astrocytoma, glioblastoma and ependymoma with the percent inhibition of cytotoxicity of 48.5 %, 51.3 % and 46.5 % respectively. It was thought to be a free antigen which originates from tumor cell membrane.

These blocking factors appeared to have no effect on the tumor cells but to work directly on the lymphocytes. The binding of the serum blocking factor with the lymphocytes was not so firm and readily lost by washing 4 to 6 times.

According to the literatures, some trials of vaccination with autochthonous tumor extracts have been reported but failed in the cases of brain tumors. The immunotherapy with lymphocyte transfusion and BCG administration appears to be effective to some extent. These two methods utilize non-specific potentiation of the immune system of the patient. It is expected that the specific immune response could also be used in the actual immunotherapy in the future.

Summary

- 1) Gliomas, meningiomas and some of ependymomas, pinealomas and medulloblastomas have the tumor specific antigens.
- 2) There are specific antigens mainly in the protein layer of the cell membrane, and markedly potentiated by neuraminidase treatment.
- 3) Gliomas have common antigenicity with human fetal brain cells, which may be called "glial carcino-fetal antigen".
- 4) Patients with gliomas have a serum blocking factor in their serum. It has an effect directly on the lymphocytes and protects tumor cells from their cytotoxic effect.
- 5) Some aspects of potential immunotherapy were discussed.

緒 言

腫瘍の治療法には早くから、手術療法、放射線療法、化学療法が三つの大きな柱として存在した。手術療法では、後遺症を残さずいかに安全に、かつ完全に腫瘍を摘出するかの方法が指向され、発展して来た。放射線療法では表皮や造血器などを犯さず腫瘍を attack するかという点で、照射法や線源の選択などが考えられてきた。さらに化学療法では無差別、長期間、大量投与の古典的方法を反省し、いかにすれば腫瘍細胞のみを特異的に破壊することができるかに²⁷⁾。焦点が絞られる段階に至った。しかし、他の胃癌や子宮癌などと異なり、たとえ腫瘍早期であっても、正常組織をも含めて腫瘍を廓清根治することは、脳腫瘍ことに glioma においては臓器特異性より不可能であり、また放射線療法や化学療法も、細胞分裂の速度差に依存して抗癌作用を発揮するため、regenerating cell group (生殖器、骨髓、消化管上皮など)に対する副作用を無視することはできなかった。

近年、第4の治療法として注目されて来たのは免疫療法である。免疫は感染、細菌微生物学では早くから発達した分野であるが、腫瘍の分野では利用されることが少なかった。これは、一般に免疫不全とは思われない人に、何らかの原因で腫瘍が発生し、自然淘汰されずにどんどん発育していくことから、免疫学的に腫瘍と正常組織には差異がないと長い間考えられていたからである。しかし、免疫学の長足の進歩につれ抗原抗体反応を鋭敏に感知する方法が種々発見開発されるにつれ、腫瘍にも正常組織と異なった特異的な抗原が存在することが見出されて来た。化学発癌剤による腫瘍では Smith⁴⁶⁾、Fisher²⁰⁾ らが、ウイルスによる腫瘍では Sjögren⁴⁵⁾ らが特異的抗原の存在を報告し、近年になっては人間の腫瘍の多くにも腫瘍特異的抗原の存在することがほぼ是認されるところとなって来た。

脳腫瘍における免疫学的研究も、この数年来飛躍的な発展をとげ、Febvre¹⁹⁾、Jagaramoody²⁸⁾、Eggers¹⁸⁾、Levy³³⁾ などにいくつかの報告を見ることが出来る。私達もこの数年来、Sjborg と Bendixen⁴⁸⁾ が1967年に提唱した白血球遊走阻止試験を用いて、脳腫瘍の特異抗原について検索を加え、その臨床的意義などを検討してきたが、今回さらに、高杉⁵¹⁾の microcytotoxicity test およびリンパ球芽球形成試験などを用いて、これらを更確認、更評価するとと

もこれらの抗原の由来、さらには血清成分によるリンパ球の腫瘍破壊阻止などについて知見を得たので、その結果と今後への指針を述べたいと思う。

実験材料および方法

I 実験材料および器具

- ① May-Grünwald 染色液, Giemsa 染色液, ヘパリン, trypsin, neuraminidase (Sigma type V)
- ② Bacto-Latex 0.81, Difco. Detroit. (No. 3102-56)
- ③ Micropipet, 注射器, ピンセット, ペアン, 二方活栓, 目盛付スピッツグラス, 大角培養ビン, screw cap 培養管, デッキグラス (26mm×76mm), カバーグラス (22mm×22mm).
- ④ 毛細管 (75mm×1.1mm) Sherwood, St. Louis, (No. 21115)
- ⑤ 1ml容の culture chamber (図1)

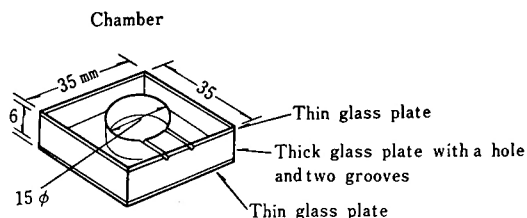


図 1

- ④⑤にはシリコン処理を施す
- ⑥ Falcon 3040 マイクロプレート
Falcon 3044 pressure sensitive film
- ⑦ 数取器, チュルク計算盤, silicon wax
- ⑧ 引伸機 (Fuji A69)
- ⑨ 真空ポンプ (山本製作所: 京都)
- ⑩ 炭酸ガス培養器 (中川製作所: 京都)
- ⑪ 分離用超遠心機 (日立55 p-2型)
- その他一般細胞培養器具
- ⑫ 腫瘍細胞は手術時摘出した標本を 0.1 % trypsin + 0.02% EDTA で処理し, 20% Calf serum-Eagle MEM にて monolayer に primary culture した。

II 白血球遊走阻止試験

- 1) 方法, 材料(抗原の調整など)については別記³⁹⁾に詳述したので参照されたい
- 2) Neuraminidase による処理法

- ① Bovine submaxillary mucin より得た Neuraminidase (Sigma 製 type V) 1 単位を 10ml の 0.85% NaCl にとかす。
- ② NMase は pH 7.2 以上になると活性が激減するので 50mM 酢酸緩衝液で pH5.5 に調整する。
- ③ Eagle MEM に 5×10^7 個/ml 個濃度で suspend した細胞に、等量の NMase 液を加える。
- ④ これを 37°C , 30 分間 incubate する。
- ⑤ 4 回 Eagle MEM 液で反復洗滌する。

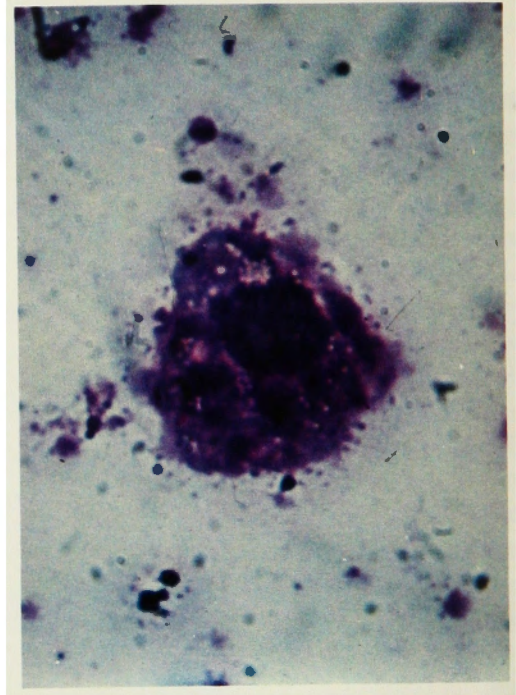
III Microcytotoxicity test⁵¹⁾

- 1) Falcon 3040 microplate に target cell を (50~200* cells/well) うえる。
- 2) 24 時間後培養液を除去
- 3) 細胞/リンパ球 = 1/400 となるように $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ /well のリンパ球を重畳する。血清の影響をみるのには 25~100 μg /well の血清を追加する。
- 4) 37°C , 45 分間炭酸ガス培養器で振盪培養する。
- 5) 50% calf serum-Eagle MEM を加える。
- 6) 37°C , 48 時間炭酸ガス培養器で incubate する。
- 7) May-Grünwald-Giemsa 染色を行なう。
- 8) cell count より %cytotoxicity, %inhibition of cytotoxicity を計算する。

この形態的判定に加え, ^{51}Cr releasing technique⁵⁵⁾³⁷⁾を利用して cytotoxicity を計算することもできる。

IV リンパ球芽球形成試験

- 1) ヘパリンで管壁を濡らした注射器で末梢血 20 ml を採血する。(終末ヘパリン濃度 20iu/ml)
- 2) 37°C , 90 分間静置して上清をとる。(これで不十分なときには残りを $50 \times \text{G}$, 5 分間遠沈して plasma-leucocyte を得る。)
- 3) この plasma-leucocyte suspension に等量の Eagle-MEM を加える。
- 4) 10ml ずつを大角培養ビンに入れ, 37°C , 90~120 分静置する。
- 5) 軽く振盪して non-adherent cell を集める。(glass wool を使うと monocyte も除去されるのでこの試験には不適當である)
- 6) $150 \times \text{G}$, 12 分間室温で遠沈して leucocyte pellet を得る。
- 7) これを 15% calf serum-Eagle MEM にとか



a) Lymphoblastic cell

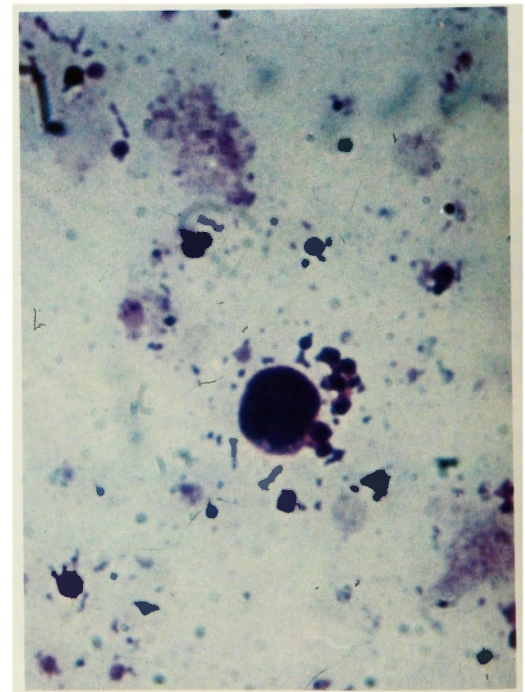


図2 b) Normal lymphocyte

* 太字の部は本研究に用いた数値を示す。

す。この際20ml採血したときには 3ml 程度にとかずと cell count が容易である。

8) チュルク計算盤で cell count を行なう。

9) 同じ calf serum-Eagle MEM でリンパ球を 250,000~50,000/ml に調整する。(1×10⁶/ml を越えると pH, 栄養などの面で成績不良となるので注意を要する)

10) この4mlずつを16×125mm screw cap culture tube に分注する。

11) 適当な antigen を加え、よく混合してから 37°C water bath で温度調整の後、炭酸ガス培養器で5~6日培養する。(細胞を抗原として用いる場合には 600~1,000/ml, cell fraction を用いる場合には蛋白濃度 1~100μg(50μg) として用いる。)

12) 反応を終了させる前日(4日~5日目)に1/100に希釈した0.81μのポリスチレン粒子(Bacto-Latex)を0.1ml ずつtubeに加える。

13) 翌日検査日に、各 tubeの細胞を200×G, 5分の遠沈で集める。

14) この cell pellet を一滴のplasmaにとかし塗抹標本を作る。

15) 急速乾燥, 固定後 May-Grünwald-Giemsa 染色する。

16) 1,000個の lymphoid cell を数え、この中で blast cell の占める割合を求める。blast cell は図2のように large size で複数の核小体を持ち、核は濃染し、原形質は好塩基性で、perinuclear clear zone が存在する。Macrophage はポリスチレン粒子を貪食するので除外できる。

Table 1 LMT to autochthonous tumor cells

Case	Histological diagnosis	Migration index
S.T.	Glioblastoma	0.76±0.037
T.M.	Glioblastoma	0.55±0.047
I.S.	Glioblastoma	0.68±0.014
Y.S.	Glioblastoma	0.53±0.028
M.Y.	Astrocytoma grade 3	0.69±0.017
C.K.	Mixed glioma	0.76±0.045
Y.T.	Astrocytoma grade 1	0.63±0.020
M.K.	Astrocytoma grade 1 (same patient to normal adult brain)	0.76±0.025 (0.99±0.072)
E.O.	Meningioma	0.76±0.044
F.M.	Meningioma	0.67±0.062
S.S.	Meningioma	0.38±0.018
Y.M.	Meningioma	0.77±0.011
K.S.	Meningioma	0.72±0.037
N.Y.	Medulloblastoma	0.85±0.100
I.K.	Medulloblastoma	1.07±0.021
K.A.	Medulloblastoma	0.77±0.005
S.M.	Pinealoma	0.68±0.038
A.N.	Pinealoma	0.93±0.055
S.K.	Ependymoma	0.81±0.037
T.O.	Ependymoma	0.68±0.354
M.K.	Neurinoma	0.98±0.058
T.K.	Cerebellar hemoangioblastoma	1.01±0.124

Blast formation

Y.S.	Blast cell ;	20.3±1.3%
	(control ;	3.0±1.1%)

結 果

図3は実際の遊走像を抗原の添加群と無添加群にわけて示した。

LMTでは control の遊走面積を Mo とし抗原添加例のそれを Mx として Migration index(Mi)=Mx/Mo を求めた。Mi が0.8~1.2は正常域と考えられる。

表1に今まで autochthonous tumor cell に対して白血遊走阻止試験を施行した脳腫瘍患者の結果を示した。*glioma 8例, meningioma 5例ではすべて0.8 以下であり、患者の免疫球が腫瘍細胞によって感

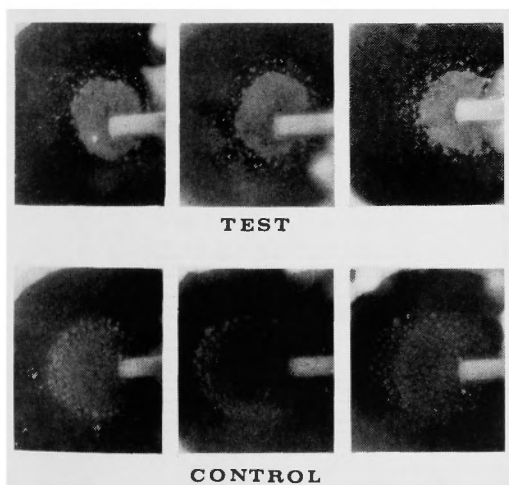


図 3

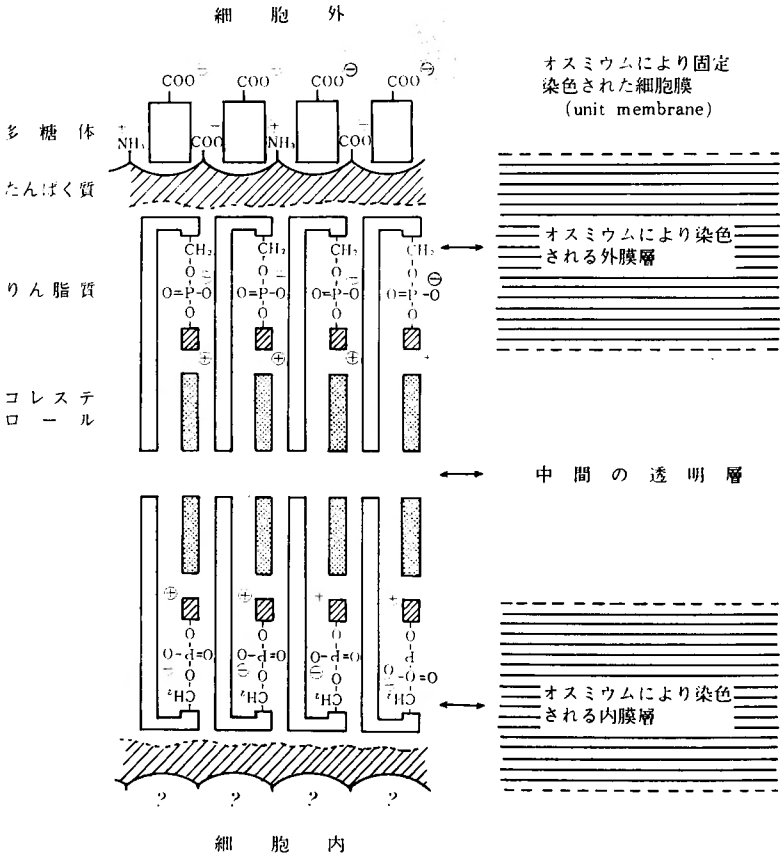
* 本文に述べる glioma は Zülch による狭義の glioma を意味し, ependymoma は除外した。

Table 2 LMT to subcellular fractions of autochthonous tumor cells

	M. Y.	I. S.	M. M.
	Astrocytoma 3	Glioblastoma	Glioblastoma
Intact cell	0.51±0.047	0.68±0.014	
Nucleus & mitochondria	0.89±0.014		
Heavy microsome	0.52±0.007		
Nucleus		0.78±0.034	0.80±0.184
Mitochondria		0.85±0.032	0.97±0.078
Microsome		0.69±0.023	0.65±0.064
Endoplasmic reticulum		0.52±0.036	0.81±0.022

Table 3 LMT to autochthonous tumor cells

		intact cell	NMase treated cell	Trypsin treated cell
S. K.	Ependymoma	0.81±0.037	0.52±0.047	1.01±0.028
T. O.	Ependymoma	0.68±0.354	0.53±0.028	1.12±0.021
S. T.	Glioblastoma	0.76±0.037	0.58±0.054	0.98±0.017
T. M.	Glioblastoma	0.55±0.047	0.53±0.124	0.80±0.124



作されていることを示した。また medulloblastoma, pinealoma, ependymoma 各 1 例では陽性反応を認めた。しかし medulloblastoma 2 例, pinealoma, ependymoma, neurinoma, cerebellar hemangioblastoma 各 1 例では陰性であった。当然正常人の白血球が腫瘍細胞に反応することがなかったし、反応陽性腫瘍患者の白血球が正常成人脳組織に反応することもなかった。また glioblastoma の 1 例で行なった芽球形成試験でも control 3.0% に比べ 20.3% と陽性所見であった。

これらの細胞を homogenate し、分画遠沈すると、表 2 のように heavy microsome fraction に、さらに蔗糖勾配で分画すると endoplasmic reticulum および microsome fraction に最も強い反応が認められ、我々の見て来た抗原は主に、この両部に存在する細胞膜に存在するものと推測された。

そこで培養細胞を Neuraminidase で 37°C, 30 分間 incubate した後に、白血球遊走阻止試験を行なうと(表 3), intact cell 0.81, 0.68 などから、treated cell 0.52, 0.53 などと著明に反応が増強された。この Neuraminidase で処理した細胞を、さらに 0.3% trypsin で 37°C, 30 分間 incubate すると、今まで見られた抗原抗体反応は全く消失してしまった。細胞膜を構式的に示すと図 4 のように示されるが、以上の結果よりこの抗原は細胞膜の蛋白層にあると考えられた。

前回の実験で glioma と meningioma には各々群共通抗原性のあることを認めた³⁹⁾ため、その原因を追求し、胎児脳細胞抗原との関係を調べた。人胎児脳細胞は trypsin 処理を加えていない 1 代目のもので Flow Lab., U. S. A. より入手した。この脳細胞は脳膜を除く、全脳組織から得たものである。白血球遊走阻止反応では表 4 の如く、glioma では 7 例中 5 例に陽性であった。一方 meningioma, pinealoma,

Table 4 LMT to human foetal brain cells

Case	Histological diagnosis	Migration index
I. S.	Glioblastoma	0.68±0.014
Y. S.	Glioblastoma	0.70±0.007
M. M.	Glioblastoma	0.95±0.086
Y. T.	Astrocytoma 1	0.40±0.156
N. E.	Astrocytoma 1	0.75±0.022
H. I.	Oligodendroglioma	0.76±0.010
K. K.	Cerebellar astrocytoma	0.99±0.022
F. O.	Meningioma	1.00±0.060
A. O.	Pinealoma	0.86±0.031
R. E.	Cerebellar hemoangioblastoma	1.04±0.005
T. H.	Normal	0.93±0.022

Blast formation

Y. S. Blast cell ;	23.6±3.5%
(Control ;	3.2±2.2%)

cerebellar hemangioblastoma 各 1 例では陰性であった。また芽球形成試験でも glioblastoma の 1 例で 23.6% と陽性が確認できた。microcytotoxicity test では用いた脳腫瘍患者のリンパ球は、程度の差はあるが全例胎児脳細胞に対して cytotoxic に作用した。しかし後述するような serum blocking factor は

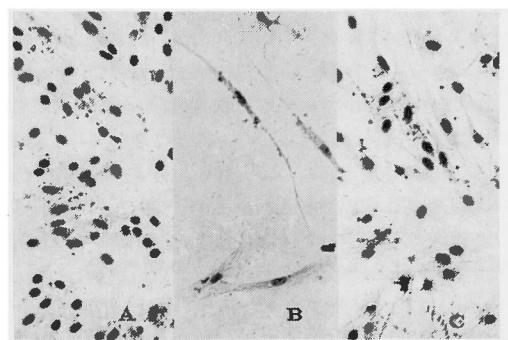


図 5

Table 5 Microcytotoxicity test to human fetal brain cells

Lymphocyte donor		lymphocyte % cytotoxicity	serum % inhibition of cytotoxicity
Y. T.	Astrocytoma	92.0± 5.5%	52.7± 7.3%
N. E.	Astrocytoma	85.0± 10.3%	42.6± 5.8%
A. O.	Pinealoma	62.2± 2.6%	5.3± 5.2%
H. Y.	Pituitary adenoma	51.3± 5.1%	10.2± 3.4%
R. E.	Cerebellar hemangioblastoma	50.2± 4.4%	11.3± 2.3%
Y. O.	Normal	20.1± 3.8%	

Table 6 Microcytotoxicity test to autochthonous tumor cells

		% cytotoxicity	% inhibition of cytotoxicity	
			untreated serum	preincubated serum with lymphocyte
S. K.	Ependymoma	93.3± 5.9%	46.5± 6.0%	0.3±10.2% 38.2± 6.6%
Y. T.	Astrocytoma	97.0± 6.6%	48.5± 7.2%	
T. O.	Ependymoma	12.3± 5.6%	5.5± 5.3%	
T. M.	Glioblastoma	78.2± 4.4%	51.3± 2.0%	
Y. O.	Normal *	15.8± 2.6%		

(* target cell : S. K. ependymoma)

2例のastrocytomaにしか観察できなかった。(表5)
つぎに腫瘍細胞に対する患者リンパ球及び血清因子の作用を、高杉らの Microcytotoxicity test を用いて観察した。図5は1例の ependymoma に行なった microcytotoxicity test の結果である。左端Aはコントロール、中央Bは autochthonous lymphocyteを tumor: lymphocyte=1:400の割に添加したものである。著明な細胞破壊があり、% cytotoxicity は93.3%である。右端Cはリンパ球の他に25μlのautochthonous serum を付加したものであり、リンパ球によるcytotoxicityが、% inhibition of cytotoxicity 46.5%と著明に抑制されている。glioblastoma, astrocytoma, ependymoma で行なった結果を表6に示した。ependymoma の1例を除いて、すべての例でリンパ球による腫瘍細胞の破壊と、serum blocking effect が観察された。この blocking effectは腫瘍細胞を血清で前処理した後にリンパ球を作用させたのでは認められず、血清とリンパ球を同時に作用させるか、リンパ球を血清で前処理して始めて観察された。以上より観察しえた serum enhancement は Hellström²⁴⁾ らの云う central type に属するものと考えられた。この血清成分とリンパ球の結合は表7のように反復洗滌操作によって容易に除去することができ、ほぼ4回の洗滌で一定値に

Table 7 Washing effect on leucocyte migration test.

T. M. Glioblastoma	Mi
without irrigation	0.89±0.037
single irrigation	0.82±0.058
2times 〃	0.68±0.124
4 〃	0.55±0.047
6 〃	0.54±0.047

落着いた。このような洗滌効果は白血球遊走阻止試験の他、microcytotoxicity test の際にも観察することができた。このように血清の blocking factor はリンパ球との接触によって結合消費されるものと予想されるが、 3.2×10^7 個のリンパ球で 1 ml の血清を37℃45分間結合させた後にも、尚この血清中には blocking factor の残存が考えられた。(表6)

また(表8) diffusion chamber などを用いて

Table 8 LMT to autochthonous tumor "products"

		autochthonous cell	cell "products"?
I. S.	Glioblastoma	0.68±0.014	0.88±0.028
M. Y.	Astrocytoma 3	0.75±0.047	0.75±0.027
M. K.	Astrocytoma 1	0.76±0.025	0.68±0.027
I. K.	Medulloblastoma	1.07±0.021	1.20±0.022
O. H.	Normal *		0.96±0.029

(* to the products of M.K. Astrocytoma 1)

tumor "products" を抗原として用いても白血球遊走阻止現象のみられることがあることなどと考えあわせると、serum factorは腫瘍細胞から血清中へ剝脱遊離して存在する抗原基に由来するものではないかと考えられる。ちなみに0.01M potassium phosphate buffer(pH8.0)、DEAE セルローズカラムを用いて得た患者IgGでのmicrocytotoxicity test では現在までのところ serum blocking effect は観察することができなかった。

考 按

脳腫瘍における免疫学的研究報告はこの数年になって急激に増加し、今まで日陰におかれていた腫瘍免疫ようやく朝日が当って来たという感じがする。脳腫

瘍に腫瘍に特異的な抗原が存在するか否かという最も基本的な問題について、Jagaramoody²⁸⁾ (1971) らは否定的な報告をしているが、その後の Febvre¹⁹⁾ (1971) Eggers¹⁸⁾ (1972), Levy³³⁾ (1972), Trouillas⁵³⁾ (1971), Kumar³²⁾ (1973), Day¹⁴⁾ (1973), Delpech¹⁶⁾ (1972) ら多くの研究者は、各々をとればまだ問題点を残してはいるものの、脳腫瘍とくにグリオーマにおいては特異的な抗原が存在するという点で一致した結論を述べている。臨床組織学的にも Trouillas⁵⁴⁾ は antologous tumor (glioma) で免疫した患者では、tumor extracts に対する皮膚反応が陽性化するとともに、腫瘍内にも、リンパ球浸潤が有意に増加すると述べている。これらの抗原は MCA induced sarcoma で Holmes²⁶⁾ が、肝癌で Baldiwm²⁾ が、また Methyl-nitrosourea で作った astrocytoma で Lim³⁴⁾ が報告したように、細胞膜成分に存在し、部分的にシアル酸によって mask されるため、neuraminidase 処理によって増強されることが普通である。^{43,)22), 25)}

前回の実験で我々は Glioma 及び Meningioma に各々群共通抗原性の認められることを報告した³⁹⁾。sarcoma を使って mesenchymal origin の tumor に共通抗原性を報告した Drewinko¹⁷⁾ の例とあわせて、meningioma の共通抗原性は興味のある点でもあるが、meningioma の多くは手術的根治が可能であるし、また一方、脳腫瘍として最も高頻度の glioma はたとえ組織学的に良性であってもその浸潤性性格より手術的根治を期待することが非常に困難である。以上より今回は glioma の抗原を中心に追求した。

一般に腫瘍が共通抗原性をもつ原因として、ウイルスの関与または胎児性抗原との関係がその代表としてあげられる。Brooks⁹⁾, Delpech¹⁶⁾ はそれぞれリンパ球芽球形成試験、Ouchterlony 法で胎児脳細胞とグリオーマには共通抗原反応は存在しないと述べ、また電顕で virus like particle を認めた⁵²⁾ などの報告は前者を支持し、Cuatico¹²⁾ は malignant glioma の 90.4% に RNA-directed DNA polymerase in association with a high molecule weight RNA を証明し、glioma の RNA virus 発生説を主張している。しかし Burtin¹⁰⁾ は彼の review で、胎児抗原と関連して記載された腫瘍抗原を 1) α -Fetoprotein (1944: Pedersen) 2) CEA of digestive system (1965: Gold) 3) Sulphoglycoprotein (1969: Häkkinen) 4) glial carcinofoetal antigen (1972: Trouillas) の 4 つに分類して詳述しており、ここに引

用された Trouillas⁵⁴⁾ の他 Wahlström⁵⁵⁾, Reynoso⁴²⁾ らも我々と同様に glioma における carcinofoetal antigen の存在に肯定的である。これは ethylnitrosourea を経胎盤的に投与された rat が成長して始めて、brain tumor を高率に発生して来ることと、関連²¹⁾ して興味深く、この ENU induced brain tumor を免疫学的に追求することの必要性を痛感されられる。しかし厳密に云うなら、この fetal antigen およびその腫瘍性発現機構に virus の関与がないという保証は何もないのであって、将来、何らかの virus にすべて帰せられてしまうのかもしれない。またこの胎児性抗原の腫瘍性発現に関して Hannon²²⁾ は、fetal antigen がもともと存在し、正常ではシアル酸などで coating されているために detect されず、腫瘍化し、細胞膜の変化につれて発現して来るという推論をしている。これは遺伝子型の変化を否定し、発現型の相異のみによって腫瘍の可逆性を仮定、説明しようとする様々の報告⁷⁾ と、また一步違った観点からの考え方で興味をひくものである。

このように細菌などと違って非常に弱力ではあるけれども、明らかに腫瘍に特異的と思われる抗原の存在が示唆されるにもかかわらず、脳腫瘍は自然治療することが非常に少ないし、また remission をみることもない。この原因には ① 抗原が弱力のため免疫力が cytotoxic な水準にまで上昇しないこと、② sneaking through mechanism で一旦腫瘍ができてしまうと脳がリンパ組織を欠いた immunologic privilege site であるために増大の一途を辿ること、③ 血清内の何らかの成分が細胞免疫力を阻害するように働く、等々があげられる。我々の in vitro の成績から ①② は明らかに否定され、血清成分の関与が最も有力と考えられた。この成分の性格については、tumor cell に直接作用して (いわゆる efferent type enhancement: 1970 Hellström²⁴⁾) リンパ球の攻撃から守るとする Kornblith³⁰⁾ の報告があり、Gutterman²¹⁾, Prager⁴¹⁾ らはこれを humoral antibody と考えている。そして Ambrus¹⁾ らは bromoacetyl cellulose に吸着され agar gel でカラムとした anti-mouse gamma globulin (AMgG) を用いてこの blocking antibody を除去する方法を発表している。しかし他方 attacker であるリンパ球へ作用して (いわゆる central type) この cytotoxicity を弱めるとする考えも多く、Brooks⁹⁾ は α -globulin がリンパ球に toxic に働くといひ、Currie¹³⁾, Belehradek⁵⁾ らは soluble antigen

によってリンパ球の反応基が block されるものと考え、またこの結合は割に loose であるので、反復洗滌することにより除去しうるものだ¹²⁾と考えている。Baldwin⁴⁾も直腸癌の papain soluble fraction を用いて 1) tumor regression のとき急激に blocking effect の消失すること、2) rat hepatoma では complement dependent cytotoxic antibody が blocking activity を示さないの2点から、この central type の enhancement は antigen によるものであろうと推論している。そしてまた別の論文で³⁾彼は target cell に働く blocking factor の存在をも認め、それは non-specific なものであろうと述べている。我々の今回のデータからは glioma における serum blocking は central type のものと考えられるが、Deckers¹⁵⁾らもまだ確定した結論を出していないように、まだ一層の検討を要するものと思われる。更に近年、腫瘍が regression stage にある

患者の血清や、正常人の血清によって、この serum blocking effect が減弱させられることも観察されており、Baldwin³⁾らは“unblocking”と表現している。これに関しては Pearson⁴⁰⁾らも Moloney sarcoma virus によって作られた実験 sarcoma, lymphoma でその存在を証明し、また一方 Hells-tröm²³⁾らは melanoma など、患者の血清がリンパ球の cytotoxicity を増強させる(“potentiate”)ことを、non-reactive donor からのリンパ球に cytotoxicity をもたせること(“armed”)を見つけており、immune sera を腫瘍阻止に使用しうる可能性を述べた。(blocking, unblocking factor の関係は図6に示した。)

このような様々の免疫反応が病期によってどのような推移をたどるかを知らることは、腫瘍におけるこれらの免疫反応の意義を間接的に知るための手だてとなる。しかし実際の症例では、化学療法や放射線療法などの影響が複雑に加わってくるために、単純に1対1の結論づけることは非常に困難である。脳腫瘍においても病期がすすむと細胞免疫力は低下するといわれ⁸⁾、Mavligit³⁶⁾も「脳腫瘍以外の solid tumor では blocking factor は病期と平行しない」と述べて、いかにも脳腫瘍では推移が平行するかのようになっているが、Kumar³²⁾などは glioma ではリンパ球の cytotoxicity や serum blocking effect はとくに一定した傾向を示さないと結論している。一般にある種の栄養不良では細胞免疫力は増強され、重症の栄養不良では腫瘍発生率が低下したり、腫瘍発育の緩減化がみられるというし、実験的にも²⁹⁾5~10%カゼインによる食餌では抗体反応は減ずるが、細胞性免疫は正常であり、食餌蛋白量が全カロリーの4%以下になるとようやく液性、細胞性免疫力の低下が来て、致死的になるといわれ、表面的な免疫反応の解釈が非常に困難なことを示している。

生体に優利な免疫反応を促進増強させて腫瘍の治療に利用する手段として、初期には autochthonous tumor extract を用いての vaccination がよく試みられたが特別な効果はなく、Bloom⁶⁾なども irradiated glioblastoma を用いて行なっているが有効例は得ていない。これは患者のリンパ球の機能的活性にも問題があると考えられ、近頃では BCG を腫瘍内に注入したり^{38), 56)}、免疫担当球を移入したり⁵⁰⁾、また網内系細胞刺激剤(pokeweed mitogen, concanavalin A)の使用、BCG の全身的应用³⁵⁾などといった非特異的な

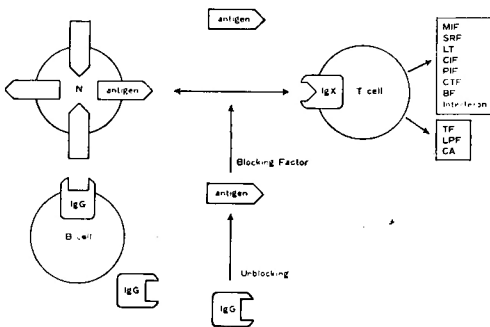


図 6

Mediators of Cellular Immunity

Factors released upon interaction with antigen

- Migration Inhibition Factor
- Skin Reactive Factor
- Lymphotoxin
- Cloning Inhibitory Factor
- Proliferation Inhibition Factor
- Inhibitor of DNA Synthesis
- Chemotactic Factor
- Blastogenic Factor
- Interferon

Factors pre-existent in cells

- Transfer Factor
- Lymphnode Permeability Factor
- Cytophilic Antibody

Direct lymphocyte-target cell cytotoxicity

免疫力増進が意図されている。このうち BCG の効果は(1)全身的、非特異的に宿主の防御機能を高める効果(2)局所での BCG の特異炎症反応が腫瘍を非特異的に巻き込み破壊する効果(巻き込み効果)(3)その過程で腫瘍特異抗原を生体に増幅認識させる「アジュバント効果」の三者が条件に応じて、種々変化しながらそれぞれ主役を演じるものと考えられ、ここに1—2年世界での注目のまよになっている。しかしここでも BCG を局所投与したところ、むしろ cancer が増大したという Sparks⁴⁹⁾ の報告もあるので今後十分注意していかなければならない。また他方 Carter¹¹⁾ は¹⁰B 硼素に抗体を結合させる方法を開発し、その性格などについて研究をすすめているので、もし glioma に対する抗体が、更に純粋に、そして十分に得られるならば、今後、熱中性子と組み合わせた意味での免疫療法が進展を遂げるであろうと予想される。

総 括

1. Sjøborg and Bendixen(1967)の白血球遊走阻止試験、高杉(1971)の microcytotoxicity test およびリンパ球芽球形成試験を利用して、脳腫瘍の特異的抗原の検索と、脳腫瘍患者の免疫反応、(主に細胞免疫)を調べた。

2. glioma, meningioma および一部の ependymoma, pinealoma, medulloblastoma において腫瘍特異的抗原の存在を間接的に証明した。

3. この抗原性は主に細胞膜の蛋白層に存在し、neuraminidase 処理によって著明に増強された。

4. glioma は胎児脳細胞と共通抗原性をもち、glial carcinofoetal antigen と呼ぶことができる。

5. glioma 患者の血清中には serum blocking factor が存在し、これは腫瘍細胞から遊離した抗原基に由来するものと考えられ、リンパ球に直接作用して、この cytotoxicity を block する。

本研究の要旨は第32回日本脳神経外科学会において報告した。

本研究の一部は昭和48年度厚生省がん研究助成金によった。

参 考 文 献

1) Ambrus, J. L. and Ambrus, C. M.: Effect of removal of blocking antibodies by immunoadsorption on the growth of ascites

tumors, Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 14; 119, 1973.

- 2) Baldwin, R. W., Embleton, M. J. and Robins R. A.: Cellular and humoral immunity to rat hepatoma-specific antigens correlated with tumor status, Int. J. Cancer, 11; 1-10, 1973.
- 3) Baldwin, R. W., Price, M. R. and Robins, R. A.: Inhibition of hepatoma-immune lymphnode cell cytotoxicity by tumor-bearer serum, and solubilized hepatoma antigen, Int. J. Cancer, 11; 527-535, 1973.
- 4) Baldwin, R. W., Embleton, M. J. and Price, M. R.: Inhibition of lymphocyte cytotoxicity for human colon carcinoma by treatment with solubilized tumor membrane fractions, Int. J. Cancer, 12; 84-92, 1973.
- 5) Belehradsek, J., Barski, G. and Thonier, M.: Evolution of cell-mediated antitumor immunity in mice bearing a syngeneic chemically induced tumor. Influence of tumor growth, surgical removal, and treatment with irradiated tumor cells, Int. J. Cancer, 9; 461-469, 1972.
- 6) Bloom, H. J. G., Peckham, M. J., Richardson, A. D., Alexander, P. A. et al.: Glioblastoma multiforme; A controlled trial to assess the value of specific active immunotherapy in patients treated by radical surgical and radiotherapy, Brit. J. Cancer, 27; 253-267, 1973.
- 7) Braun, A. C.: On the origin of the cancer cells, Amer. Sci., 58; 307-320, 1970.
- 8) Brawn, R. J.: Recovery from in vitro unresponsiveness of sensitized murine lymph node cells, Cell Immunol., 5; 221-227, 1972.
- 9) Brooks, W. H., Netsky, M. G., Formansell, D. E. and Horwitz, D. A.: Depressed cell mediated immunity in patients with primary intracranial tumors, J. Exp. Med., 136; 1631-1647, 1972.
- 10) Burtin, P., Buffe, D. and Von Kleist, S.: The carcinoembryonic antigens of human tumors, Triangle, 11; 123-129, 1972.
- 11) Carter, J. C., Jozwiak, E. L. and Mallinger, A. G.: Boron-containing antibodies; Their properties and uses for slow neutron therapy of tumors, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 14; 100, 1973.
- 12) Cuatrecasas, W. and Spiegelman, S.: Are human CNS neoplasms caused by virus? In 5th international congress of neurological

- surgery, Amsterdam, Excerpta Med., 1973, 34-35.
- 13) Currie, G. A. and Basham, C. : Serum mediated inhibition of the immunological reactions of the patient to his own tumor ; A possible role for circulating antigen, Brit. J. Cancer, 26 ; 427-438, 1972.
 - 14) Day, E. D. and Bigner, D. D. : Analysis of ¹²⁵I-labeled antiglioma antibodies adsorbed by intact monolayers of cultured glioma cells, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 14 ; 7, 1973.
 - 15) Deckers, P. J., Davis, R. C., Parker, G. A. and Mannick, J. A. : The effect of tumor size on concomitant tumor immunity, Cancer Res., 33 ; 33-39, 1973.
 - 16) Delpech, B., Clément, J. and Laumonier, R. : Immunochemical and immunological studies of human brain tumors, Int. J. Cancer, 9 ; 374-382, 1972.
 - 17) Drewinko, B., Montgomery, C. T. and Trujillo, J. M. : Demonstration of common sarcoma-associated antigens in an established human neurogenic sarcoma cell line, Cancer Res., 33 ; 601-605, 1973.
 - 18) Eggers, A. E. : Autoradiographic and fluorescence antibody studies of the human host immune response to gliomas, Neurol., 22 ; 246-250, 1972.
 - 19) Febvre, H., Maunoury, R. and Constans, J. P. : Etude immunologique de tumeurs cérébrales, Neuro-Chir., Paris 17 ; 203-207, 1971.
 - 20) Fisher, B., Saffer, E. A. and Fisher, E. R. : Experiences with lymphocyte immunotherapy in experimental tumor system, Cancer, 27 ; 771-781, 1971.
 - 21) Gutterman, J. U., Hersh, E. M., McCredie, K. B., Bodey, G. P. et al. : Lymphocyte blastogenesis to human leukemia cells and their relationship to serum factor, immunocompetence and prognosis, Cancer Res., 32 ; 2524-2529, 1972.
 - 22) Hannon, W. H., Anderson, N. G. and Coggin, J. H. : Sialic acid and the "Masking" of fetal antigens, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 14 ; 99, 1973.
 - 23) Hellström, I., Hellström, K. E. and Warner, G. A. : Increase of lymphocyte-mediated tumor-cell destruction by certain patient sera, Int. J. Cancer, 12 ; 348-353, 1973.
 - 24) Hellström, K. E. and Hellström, I. : Immunological enhancement as studied by cell culture technique, Ann. Rev. Microbiol., 24 ; 373-398, 1970.
 - 25) Hershman, H. R., Breeding, J. and Nadrud, J. : Sialic acid masked membrane antigens of clonal functional glial cells, J. Cell Physiol., 79 ; 249-258, 1972.
 - 26) Holmes, E. C., Reisfeld, R. A. and Morton, D. L. : Delayed cutaneous hypersensitivity to cell-free antigens, Cancer Res., 33 ; 199-202, 1973.
 - 27) 星野孝夫 : 脳腫瘍の Cell Kinetics, 脳神経外科, 1 ; 453-459, 1973.
 - 28) Jagarlamoodu, S. M., Aust, J. C., Tew, J. C. and McKhann, C. F. : In vitro detection of cytotoxic cellular immunity against tumor specific antigens by a radioisotope technique, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 68 ; 1346-1350, 1971.
 - 29) Jose, D. G., Cooper, W. C. and Good, R. A. : How protein deficiency enhances cellular immunity, JAMA, 218 ; 1428-1429, 1971.
 - 30) Kornblith, P. L., Prieto, A. and Pollen, D. A. : Alterations in glial and mesenchymal tumor cell membrane resistance with heteroimmune and autologous sera, Ann. N. Y. Acad. Sci., 159 ; 585-590, 1969.
 - 31) 小山素麿, 半田謙二, 半田峯, 松本悟 : Ethylnitrosourea を胎盤經由で投与した SD-JCL ratの実験脳腫瘍, 臨床神経学, 12 ; 95-104, 1972.
 - 32) Kumar, S., Taylor, G., Steward, J. K., Waghe, M. A. et al. : Cell-mediated immunity and blocking factors in patients with tumors of the central nervous system, Int. J. Cancer, 12 ; 194-205, 1973.
 - 33) Levy, N. L., Mahaley, M. S. and Day, E. D. : In vitro demonstration of cell mediated immunity to human brain tumors, Cancer Res., 32 ; 477-482, 1972.
 - 34) Lim, R. and Kluskens, L. : Immunological specificity of astrocytoma antigens, Cancer Res., 32 ; 1667-1670, 1972.
 - 35) Mathé, G. : Immunological treatment of leukemias, Brit. Med. J., 4 ; 487-488, 1970.
 - 36) Mavligit, G. M., Gutterman, J. U. and Hersh, E. M. : Primary brain tumors ; Tumor immunity and immunocompetence, Surg. Neurol., 1 ; 261-263, 1973.
 - 37) Ménard, S., Colnaghi, M. I. and Porta, G. D. : In vitro demonstration of tumor specific common antigens and embryonal antigens in murine fibrosarcoma induced by 7, 12-dimethyl-benzanthracene, Cancer Res., 33 ; 478-481, 1973.
 - 38) Morton, D. L., Eilber, F. R., Joseph, W. L., Wood, W. C. et al. : Immunological factors

- in human sarcomas ; A rational basis for immunotherapy, *Ann. Surg.*, **172** ; 740-749, 1970.
- 39) 織田祥史, 武内重二, 半田肇 : 脳腫瘍の腫瘍特異抗原, *脳神経外科*, **1** ; 27-35, 1973.
 - 40) Pearson, G. R., Redmon, L. W. and Bass, L. R. : Protective effect of immune sera against transplantable Moloney virus-induced sarcoma and lymphoma, *Cancer Res.*, **33** ; 171-178, 1973.
 - 41) Prager, M. D. and Ribble, J. : Correlation of immune response to progressive tumor and protective vaccination, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, **14** ; 74, 1973.
 - 42) Reynoso, G., Chu, T.M., Holyoke, D., Cohen, E. et al. : Carcino-embryonic antigen in patients with different cancers, *JAMA*, **220** ; 361-365, 1972.
 - 43) Simmons, R. L. and Rios, A. : Increasing the immunogenicity of "Private" mammary tumor antigens with neuraminidase, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, **14** ; 70, 1973.
 - 44) Sjögren, H.O., Hellström, I. and Klein, G. : Resistance of polyoma virus immunized mice to transplantation of established polyoma virus, *Exptl. Cell Res.* **21** ; 204-208, 1961.
 - 45) Sjögren, H. O., Hellström, I. and Klein, G. : Transplantation of polyoma virus-induced tumors in mice, *Cancer Res.*, **21** ; 329-337, 1961.
 - 46) Smith, R. T. : Tumor-specific immune mechanisms, *New Engl. J. Med.*, **278** ; 1207-1214, 1268-1275, 1326-1331, 1968.
 - 47) Smith, R. T. and Landy, M. : Immune surveillance, New York, Academic Press, 1970, 1-83.
 - 48) Sjøborg, M. and Bendixen, G. Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity, *Acta Med. Scand.*, **181** ; 247-256, 1967.
 - 49) Sparks, F.C. and Breedings, J.H. : Facilitation of tumor growth by intra-tumor injection of BCG and vibrio cholerae neuraminidase, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, **14** ; 86, 1973.
 - 50) 高倉公明, 三木啓全, 久保長生, 小川信子他 : 脳腫瘍の免疫学的治療法に関する研究 ; 骨髄血輸血の役割, *脳神経外科*, **1** ; 135-142, 1973.
 - 51) Takasugi, M. and Klein, E. : The methodology of microassay for cell-mediated immunity (MCI), *In vitro methods in cell-mediated immunity*, edited by Bloom, B.R. and Glade, P.R. New York, Academic Press, 1971, 415-422.
 - 52) Tani, E., Takeuchi, J. and Ametani, T. : Virus like particles in cultured human glioma, *Acta Neuropath.*, **16** ; 266-270, 1970.
 - 53) Trouillas, P. : Carcinofetal antigen in glial tumors, *Lancet* **2** ; 552, 1971.
 - 54) Trouillas, P. : Immunologie des tumeurs cérébrales ; L'antigène carcino-fetal glial, *Ann. Inst. Pasteur.*, **122** ; 819-828, 1972.
 - 55) Wahlström, T., Saksela, E. and Troupp, H. : Cell-bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of the brain, *Cell. Immunol.*, **6** ; 161-170, 1973.
 - 56) Zbar, B., Bernstein, I.D. and Rapp, H.J. : Suppression of tumor growth at the site of infections with living *Bacillus Calmette-Guérin*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **46** ; 831-839, 1971.