

主論文

本文 26枚  
附図 4枚  
附表 4枚

腫瘍細胞の発現する微生物抗原  
— 溶連菌製剤（OK-432）と腫瘍細胞との抗原解析 —

弘前大学医学部細菌学講座

村田 暁彦



①

腫瘍細胞の発現する微生物抗原  
— 溶連菌製剤（OK-432）と腫瘍  
細胞との抗原解析 —

弘前大学医学部細菌学講座

村田 暁彦

緒 言

現在、悪性腫瘍の治療法のひとつとして免疫療法が用いられている。この免疫療法において、広く用いられている微生物製剤として、溶血性連鎖球菌（溶連菌）製剤（OK-432）と *Bacille de Calmette et Guérin*（BCG）がある。

ヒト膀胱腫瘍の治療において、BCGは優れた治療効果を発揮している<sup>1),2)</sup>。BCGの細胞性免疫の賦活化は古くより知られているが<sup>3)</sup>、膀胱内注入によるBCG治癒機構は、現時点で十分に説明されていない。膀胱腫瘍とBCGの間に64kDaのタンパク質成分が共通抗原として存在する事を、弘前大学医学部細菌学講座では確認し、BCGの治癒機序の一つに、この共通抗原成分の関与する可能性を推測してきた<sup>4),5)</sup>。

一方、溶連菌製剤OK-432も臨床分野において、その抗腫瘍性が報告されてきた<sup>6),7)</sup>。治癒機序として、細胞性免疫の賦活化による抗腫瘍作用が主に論じられており<sup>8)</sup>、その効果



が認められている。しかし著者は、BCG同様の微生物製剤であるOK-432にも、腫瘍細胞との共通抗原性分が存在するのではないかと推測した。

生物は環境の変化に対応するため、ストレスに対してストレスタンパク質を産生する。微生物間もその例外ではなく、ストレスを付加した場合、ストレスタンパク質を産生し、それはまた各種微生物間に広く分布する骨格タンパク質でもあるとされている<sup>9)</sup>。同講座がこれまで報告してきたBCGと腫瘍細胞間に共通する64kDaタンパク質についても、ストレスタンパク質である事が、最近確認されている<sup>10), 11)</sup>。

そこで著者は溶連菌(OK-432)と腫瘍細胞間にも共通した抗原性が存在するのではないかと考え、免疫学的手法で解析したところ、両者間に共通する抗原性の存在を認めたので報告する。

## 実験材料および方法

### (1) 実験腫瘍、OK-432、BCGの抗原調製

使用した腫瘍は、マウスのMeth A腫瘍、Colon tumor 26 (CT 26)、Strain 2モルモットのLine 10で、Meth AはBALB/cマウスの腹腔内接種により、継代しているもの、CT 26は10%FBS-RPMI 1640 (GIBCO)で組織培養したもの、そしてLine 10は腹腔内で継代しているものである。また、これらの腫瘍を、3000rpm、30分間、滅菌生理的食塩水で遠心洗浄し、蒸留水に浮遊させてソニケーター(久保田製, Model 200M)で180W、20分間超音波処理したものを抗原材料として使用した。

BCGは、*Mycobacterium bovis* BCG strain (日本ビーシージー社由来株)をDubos液体培地(栄研)で培養させ、対数増殖期のものを集菌し、腫瘍細胞と同様に超音波処理したものを使用した。

溶連菌製剤OK-432 (中外製薬, 5KE/14mg/



vial)も同様の方法にて超音波処理したものを使用した。

## (2) 抗体

抗体はOK-432をBALB/cマウスに週一回0.5mg/匹を5週間連続腹腔内投与にて得られたポリクローナル抗体(Poly Ab)と市販のマウス抗ストレプトコッカス(A群)モノクローナル抗体(IgG 2a $\kappa$ , Chemicon社, MoAb)を使用した。

## (3) 共通抗原性の解析方法

### 1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

OK-432、BCGおよび各腫瘍細胞抗原にたいするPoly Abの反応性を測定した。

超音波処理した各抗原の濃度を0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)にて1mg/mlに希釈し、各wellに50 $\mu$ lずつ入れ、37℃、2時間放置し抗原の吸着を行った。5回蒸留水洗浄した後、

2% BSA (bovine serum albumin)-炭酸緩衝液を200 $\mu$ lずつ加え、4℃、12時間ブロッキングをした。蒸留水にて3回洗浄した後、Poly Abを0.05% Tween 20-PBS (phosphate buffered saline pH7.2) (T-PBS)にて8倍から1024倍まで倍数希釈し、各wellに希釈抗体を100 $\mu$ l加えた。同様に倍数希釈したOK-432に正常マウス血清を加えたものを、対照として用いた。その後、37℃、1時間インキュベートし、蒸留水で5回洗浄を行った。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識 anti-mouse IgG (SIGMA)をT-PBSにて400倍に希釈し、その200 $\mu$ lを各wellに加えた。室温に30分間放置し、蒸留水にて8回洗浄した後、o-phenylene-diamine (0.4mg/ml)の基質を加え、37℃、10分間インキュベートし発色させ、6N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>にて反応を止め、492nmの吸光度を測定した。測定には、BIO-RAD製 Model 2550のEIA READERを用いた。



## 2) Dot-blotting 法

Poly Ab の各抗原に対する反応性を ELISA 法に引き続き行った。

抗原として、OK-432、BCG、Meth A、Line 10、CT 26 を超音波処理したものを用い、対照に超音波処理した正常マウス肝細胞抗原を用いた。

1 cm 幅のニトロセルロース膜 (BIO-RAD) に PBS にて 1 mg/ml に溶解した各抗原を 10 倍、100 倍、1000 倍と希釈し、25  $\mu$ l ずつプロットし、計 4 ヶ所にそれぞれ行った。膜を十分乾燥させた後、5% スキンミルクで 12 時間ブロッキングをした。生理的食塩水にて 5 回洗浄し、Poly Ab を 100 倍に PBS で希釈した溶液内で、37°C、30 分間インキュベートした。生理的食塩水で洗浄を 2 回行い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識 anti-mouse IgG (PBS で 400 倍に希釈) を、室温 30 分間作用させた。洗浄した後、Diamino-benzidine (0.5 mg/1 ml 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6) を基質と

して、発色させた。

## 3) 間接蛍光抗体法 (Indirect Immunofluorescence analysis, IFA)

腫瘍細胞と Poly Ab の結合性および結合部位の解析を行った。

Meth A、Line 10、CT 26 腫瘍細胞をスライドガラス上に塗布し、100% アルコール固定した後、一次抗体として PBS にて 10 倍に希釈した Poly Ab を室温 30 分間反応させた。十分に洗浄した後、Fluorescence-isothiocyanate (FITC)-anti mouse IgG (Cappel) を PBS にて 100  $\mu$ l/ml に調整して室温 30 分間反応させた。洗浄した後 50% glycerol-PBS を滴下して、カバーガラスをかけ蛍光顕微鏡 (ZEISS, OXIOPHOT) で鏡検した。

## 4) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)

OK-432、BCG と各腫瘍抗原の共通抗原の分子量を推定するため、電気泳動を用いて解



析した。

OK-432、BCG、Meth A、Line 10、CT 26の超音波処理した抗原を使用した。

12%-Separating gel (0.37M Tris, pH8.8) を作成した後、4%-Stacking gel (0.125M Tris, pH6.8) を重層し、各抗原泳動用のレーンを作成した。各抗原の量は1mg/mlとし、その25 $\mu$ lを定電流20mAで約2時間の電気泳動を行った。

分子量の指標として、SDS-PAGE molecular weight standard mixture (SIGMA) をマーカーに用いた。

泳動終了後、Coomassie Blue染色にて各抗原の構成タンパク質バンド成分を染色し、泳動バンドの比較をした。

#### 5) Western-blot

SDS-PAGEで分離したのバンドをニトロセルロース膜に、Semi-Dry transfer (BIO-RAD 製, Model Trans-Blot<sup>®</sup> SD) 装置を用い、

100Vの定電圧で一時間転写し、2%-BSA-PBSにて12時間ブロッキングを行った。洗浄した後0.05% Tween20-TBS (20mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl) で2500倍に希釈したPoly Abと室温30分間反応させた。0.05% Tween20-TBSで洗浄し、二次抗体にはTBSで2500倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識 anti-mouse IgG (BIO-RAD) を使用し、室温30分間作用させた。十分に洗浄した後、発色には、Substrate Kit (BIO-RAD) を用い、Poly Abとの反応バンドの検索を行った。

#### 5) 抗体処理腫瘍細胞の生存率

腫瘍細胞にたいするPoly Abの抗腫瘍性を調べるため、腫瘍細胞に抗体を作用させて、トリパンブルーの色素排除試験にて経時的に腫瘍細胞の生存性を観察した。

腫瘍細胞には、Meth A、Line 10、CT 26を使用した。



各腫瘍細胞を10% FBS-RPMI 1640培地に加えて、抗溶連菌MoAbを50%希釈で、37℃、5%-CO<sub>2</sub>のもとに培養し1、2、4、6、12、18、24時間後の生存率を経時的に観察した。

対照には、同腫瘍細胞に正常マウス血清を作用させ、同条件下で培養したものをもってあてた。

#### (4) 共通抗原成分の酵素処理

腫瘍細胞の共通抗原成分を推測するため、Meth A、Line 10、CT 26各腫瘍細胞を3種類の酵素とメタ過ヨウ素酸ナトリウムで処理し、間接蛍光抗体法により抗原成分の分解性を検討した。

酵素は、0.2% Pronase-PBS (pH7.8, 科研化学)、0.2% Trypsin-PBS (pH7.8)、0.2% Pepsin-PBS (pH3.0)を用い37℃、10分間作用させ、またメタ過ヨウ素酸ナトリウムは、50 mM、37℃、10分間作用させた。その後、上述の蛍光抗体法を用い抗原性の脱落の有無を観察した。

## 結 果

### 1) ELISA 法

Table 1に示す如く、Poly AbはOK-432抗原に対し、1024倍の力価をもって反応した。また、BCGには512倍、Meth Aには1024倍、Line 10、CT 26には512倍の反応力価を示した。

対照として、OK-432抗原を正常マウス血清で処理したものの吸光度を測定し、その平均値を算出し、抗体処理実験群の吸光度と比較し、それ以上の吸光度値のものを陽性とした。

### 2) Dot-blotting 法

Poly Ab (×100)の各抗原の希釈濃度にたいする反応性は、OK-432には1000倍、BCGには10倍、Meth Aには100倍、Line 10は10倍、CT 26には10倍で反応が、陽性であった (Fig. 1)。

また、対照には正常マウス肝細胞を用いた



が、Poly Ab (×100)との反応性は確認されなかった。

### 3) 間接蛍光抗体法 (IFA)

OK-432抗原の腫瘍細胞における発現は、Fig. 2に提示した如く、細胞表面に強い蛍光を発していることから、腫瘍細胞表面にあるものと推測された。Line 10、CT 26腫瘍細胞においてもMeth Aと同様の像が観察された (Table 2)。

### 4) SDS-PAGE

OK-432のバンドは、70 kDa付近から30 kDa付近まで約10～20本認められた。また、BCG、腫瘍細胞抗原のバンドを比較してみると、64 kDa付近と30 kDa付近には全抗原間と同分子量と思われるバンドが形成された (Fig. 3)。

### 5) Western-blot 法

Poly Abと反応性を示すバンドが、BCGおよび各腫瘍細胞成分の64 kDaまた30 kDa付近に出現した (Fig. 4)。BCGおよび腫瘍細胞の30 kDaのバンドは、64 kDa付近の反応バンドよりも反応性が強く、OK-432とBCGおよび腫瘍細胞間との主共通抗原成分と考えられた。

### 6) 抗体処理腫瘍細胞の生存率

Table 3に示すように、MoAbを作用させた各腫瘍は、Meth A腫瘍細胞が6時間後を境に、Line 10、CT 26では12時間を境として死滅してくるのが観察された。また、細胞の死滅と同時に細胞成分の溶出を思わせるようなバックグラウンドの汚染も同時に確認された。

また、対照として正常マウス血清を作用させた各腫瘍は、経時的に生存率がやや低下したもののバックグラウンドの汚染は観察されなかった。



#### 7) 共通抗原成分の化学組成

腫瘍細胞をPronase処理した場合、Poly Abの結合は観察されず、抗原性の脱落がみられた(Table 4)。

また、Trypsin、Pepsin、メタ過ヨウ素酸を作用させた腫瘍細胞では、Poly Abが結合し、通常の蛍光パターンの像が確認された。

つまり、Pronaseのみが腫瘍細胞上の共通抗原基を脱落させ、その抗原成分がタンパク質成分であると考えられた。

#### 考 察

OK-432の抗腫瘍性に関しては、岡本肇らが、1966年に初めて報告して以来<sup>1,2)</sup>、その作用機序について様々な論証が唱えられてきた<sup>8)</sup>。また、臨床分野においてもかなりの治療効果を示す数多くの成績も、報告されてきた<sup>6),7)</sup>。

悪性腫瘍の治療については未だ確立されておらず、その中において第四の治療法のひとつとして免疫療法が注目され、様々な非特異的免疫賦活剤が広く用いられてきている。この免疫療法において最も頻繁に使用されているbiological response modifier(BRM)中に、微生物製剤である溶血性連鎖球菌製剤(OK-432)と結核菌製剤(BCG)が挙げられる。

BCGについては、ヒト膀胱腫瘍を中心に優れた治療効果をしめしており<sup>1),2)</sup>、またその作用機序については、以前より細胞性免疫の賦活化であるとされていた<sup>3)</sup>。しかし、その抗腫瘍性に関して、ヒト・メラノーマ細胞<sup>13)</sup>



のもつBCG抗原が治癒機構に関与している事が、すでに報告されており、弘前大学医学部細菌学講座でも、多種類にわたる動物腫瘍、更にはヒト膀胱腫瘍との間に、共通抗原が存在する事、更にこの成分は64kDaのタンパク質成分がである事が確認された<sup>4), 5), 14)-16)</sup>。また、ヒト肺癌、食道癌もBCG抗原を発現している事が報告されはじめた<sup>17)</sup>。この64kDaタンパク質の共通抗原成分はBCGの治癒機序の一つに関与し、動物腫瘍レベルからヒト腫瘍細胞まで広く分布している可能性が出てきた。

一方で溶連菌製剤OK-432もまた、胃腫瘍をはじめ、広い分野での抗腫瘍成績が報告されてきた<sup>6), 7)</sup>。治癒機序として報告されてきたのは、細胞性免疫の賦活化による抗腫瘍作用について主に論じられ、その効果が認められてきた。

生物は環境の変化に対応するため、個体レベル、細胞レベルでストレスに対する防御機構としてストレス応答をする。細胞レベルで

でのストレス応答の主役はストレスタンパク質の産生である<sup>9)</sup>。しかもこのストレスタンパク質はすべての生物に共通なものであり、数多くのものが発見され、その細胞内、外での役割、作用についても解明されてきている。微生物もその例外ではなく、ストレスを付加した場合、ストレスタンパク質を産生し、それはまた、各種微生物間に広く分布する骨格タンパク質であるとされている。また、細胞にとっては癌化という変化もストレスの一つであり、細胞はこのストレスに対して何らかのストレス応答、つまりストレスタンパク質の産生があるという予測がなされる。当講座がこれまで報告してきたBCGと腫瘍細胞間に共通する64kDaタンパク質についても、60kDa Familyに属するストレスタンパク質であることが最近確認されており、感染症や腫瘍免疫における免疫生物学的な役割が注目されてきている。

これらの事より、OK-432にもBCG同様に



ストレスタンパク質が存在すれば、癌との共通抗原性も考えられ、その液性抗体による抗腫瘍効果が期待されるため、免疫学的手法を用いて検討を行った結果、ELISA法、Dot-blotting法ではPoly Abが、BCGおよび動物腫瘍との間に高力価で反応した。また、間接蛍光抗体法で、その共通抗原成分の存在部位が、腫瘍細胞表面である事も判明した。更に、SDS-PAGEを用いて各抗原を分画し、Western-blot法にてPoly Abが、どのバンド成分と反応するかを解析したところ、BCGが腫瘍細胞間と共有する64kDaタンパク質バンドに対しても、Poly Abが反応を示した。しかし、BCG、Meth Aにはその64kDaよりも強い抗原性を思わせる30kDa付近の共通抗原成分が確認された。この30kDa成分がOK-432と腫瘍細胞間の主成分であると考えられた。この成分の化学的性質を知るため酵素処理したところ、タンパク質を主体にしたものであることが分かった。この30kDa成分

も、低分子のストレスタンパク質ファミリーに属するものであるかも知れない。この事は、BCGと腫瘍細胞の共通抗原成分は64kDaタンパク質であるが、溶連菌と腫瘍細胞との共通抗原成分は、30kDa付近のタンパク質成分であり、微生物と腫瘍細胞間の共通抗原成分は、微生物の種類により差違があることがわかった。しかし、溶連菌と腫瘍細胞間にも64kDa成分が副成分として存在することより、この30kDa付近のタンパク質成分についての詳細な検討が今後の課題である。

悪性腫瘍をOK-432で治療した場合、宿主側に抗OK-432抗体が産生されることは十分に考えられる。この抗体は、腫瘍細胞に溶連菌抗原基が存在していると、その抗原基と反応し、腫瘍細胞に致死的に働く事が考えられる。著者が腫瘍細胞とMoAbをin vitroで培養し、その致死活性を調べたところ、腫瘍細胞が経時的に死滅してくることからも、十分に抗体の殺腫瘍細胞の作用が推測される。



つまり、溶連菌の細胞性免疫の賦活化作用とともに、液性抗体による抗腫瘍性も治癒機構に関わってくることが *in vivo* 内でも考えられ、抗体の抗腫瘍作用を更に解析してゆくことが重要であると思われる。

## 結 語

OK-432の抗腫瘍性について、BCG、実験動物腫瘍Meth A、Line 10、CT 26を用いて、その共通抗原性と抗腫瘍効果について免疫学的な解析をしたところ、以下の知見を得た。

① OK-432は、3種類の動物実験腫瘍であるMeth A、Line 10、CT 26との間に共通抗原性があり、その抗原は腫瘍細胞表面に存在している事がわかった。

② 溶連菌と腫瘍細胞との共通抗原主成分は、30kDaタンパク質であった。

③ BCGと腫瘍細胞との共通抗原性示す主成分である64kDaタンパク質成分がOK-432においても存在していた。

④ *in vitro*テストにおき、Poly AbがOK-432抗原を発現する腫瘍細胞に致死的に



作用する事が分かった。

⑤ OK-432投与で、OK-432抗原を発現している担ガン動物（例；ヒト）を治療した場合に、OK-432抗体が *in vivo* で産生され、抗腫瘍性を発揮する事が十分に推測された。

#### 引用文献

- 1) Morares, A., Eidinger, D. and Bruce, A.: Intracavitary bacillus Calmette-Guérin treatment of superficial bladder tumors. J. Urol., 116:180-183, 1976.
- 2) 渡辺耕平, 鈴木唯司, 高橋信好, 他: 膀胱癌の免疫治療成績. 日泌尿会誌, 78:1092-1102, 1987.
- 3) 徳永 徹: BCGの抗腫瘍作用の機序. 結核, 55:351-357, 1980.
- 4) Ahsan, C. R. and Sasaki, J.: Isolation of a 64kD protein from BCG which has antitumor activity and is antigenically shared with different tumor cells. Proc. Jpn. Soc. Immunol., 18:519, 1988.
- 5) 美濃真成, 佐々木甚一, 成田 知, 他: ヒト膀胱腫瘍におけるBCG腫瘍抗原の検索.



Oncologia, 25:66-70, 1992.

- 6) 佃 守, 古川 滋, 吉田豊一, 他: 細胞障害活性からみたOK-432至適投与間隔の検討. 癌と化学療法, 16:423-425, 1989.
- 7) 近藤元治, 加藤治樹, 鳥巢要道, 他: OK-432腹腔内投与の効果と薬理作用. Biotherapy, 4:166-167, 1990.
- 8) 石田名香雄, 斎藤元男, 南条正季: OK-432の制癌性-LAK細胞の誘導. 癌と化学療法, 11:2681-2690, 1984.
- 9) 矢原一郎: ストレスタンパク質のはたらき. 癌と化学療法, 20:1281-1286, 1993.
- 10) 原 勲, 佐藤昇志, 菊池浩吉, 他: 膀胱癌BCG免疫療法患者におけるBCG 65kDa蛋白抗原に対する免疫応答. 日泌尿会誌, 82:24-32, 1991.
- 11) Ahsan, C. R., Sasaki, J. and Nomaguchi, H.: The 65kDa stress protein: is it related to the tumor specific antigen?. Immunology Letters, 35:291-

292, 1993.

- 12) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., et al: Experimental Anticancer Studies Part XXX. Factors Influencing the Streptolysin S-forming Ability of Streptococci Having Anticancer Activity. Jap.J.Exp.Med., 36:162-174, 1966.
- 13) Minden, P., Sharpton, T. R. and McClatchy, J.: Shared antigens between human malignant melanoma cells and *Mycobacterium bovis*(BCG). J. Natl. Cancer Inst., 51:1085-1086, 1973.
- 14) 佐々木甚一, 神田 進, 稲葉安正, 他: BCGと実験腫瘍細胞間の共通抗原. 医学のあゆみ, 129:455-456, 1984.
- 15) 佐々木甚一, 神田 進, 沢村大輔, 他: BCGと腫瘍細胞の共通抗原性. 癌と化学療法, 12:1432-1439, 1985.
- 16) Sasaki, J., Kitagawa, M., Tamagake, T.,



et al:Antigenic analysis between BCG  
and tumor cells by BCG monoclonal  
antibodies. Microbiol.Immunol.,  
116:1407-1414,1976.

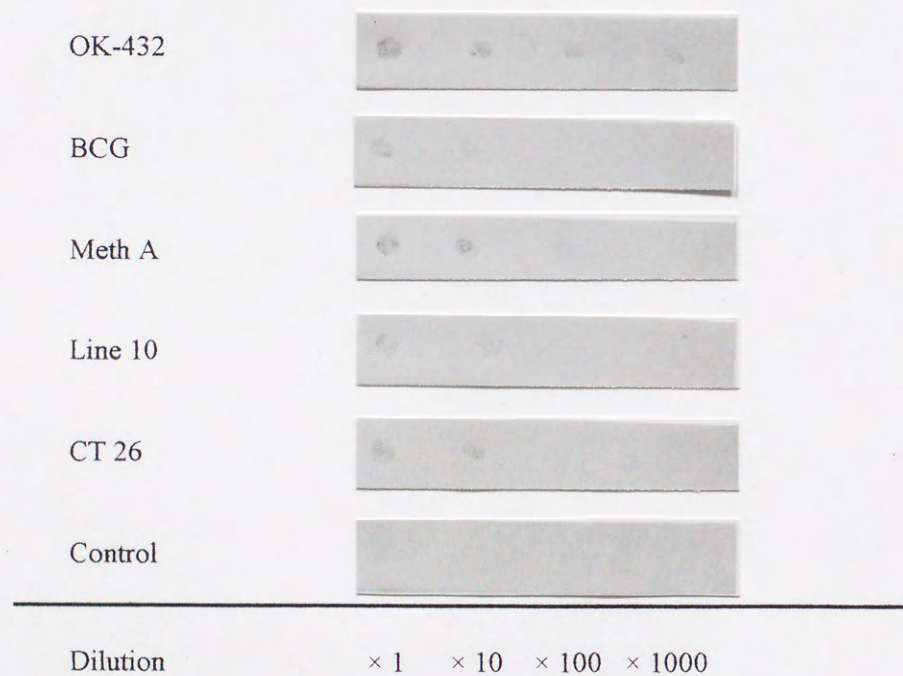
17) 工藤俊雄, 橘武彦, 小林俊介, 他: 腫瘍細胞と結核菌に共通する抗原の存在. 日本癌学会総会記事, 48:262,1989.

Table 1 Immunological reactivity of anti-Streptococcus antibody (Poly Ab) with BCG, Meth A, Line 10 and CT 26 sonicates

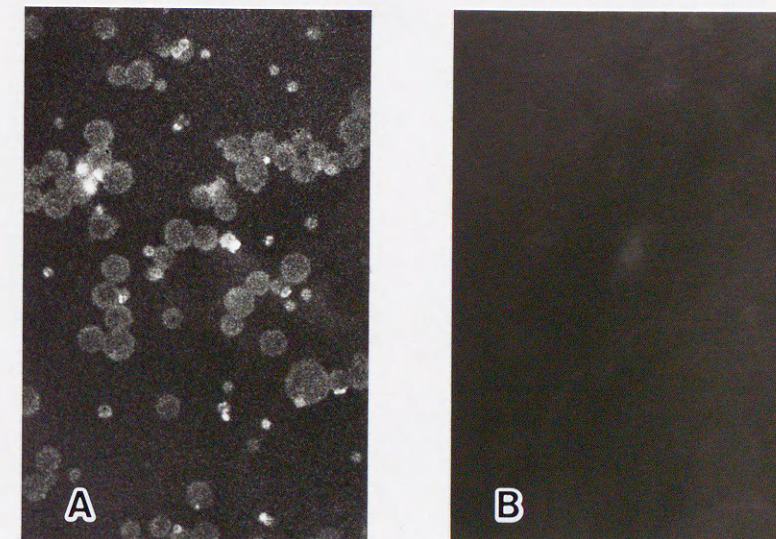
Ag \ Ab(x)	8	16	32	64	128	256	512	1024
OK-432	+	+	+	+	+	+	+	+
BCG	+	+	+	+	+	+	+	-
Meth A	+	+	+	+	+	+	+	+
Line 10	+	+	+	+	+	+	+	-
CT 26	+	+	+	+	+	+	+	-

Concentration of each antigen used for ELISA was 50µg / well





**Fig. 1 Dot blotting analysis of animal tumors and BCG with anti-Streptococcus antibody (Poly Ab).**  
Tumors and BCG sonicates reacted with 1% Poly Ab, but normal mouse liver as control did not react with 1% Poly Ab.



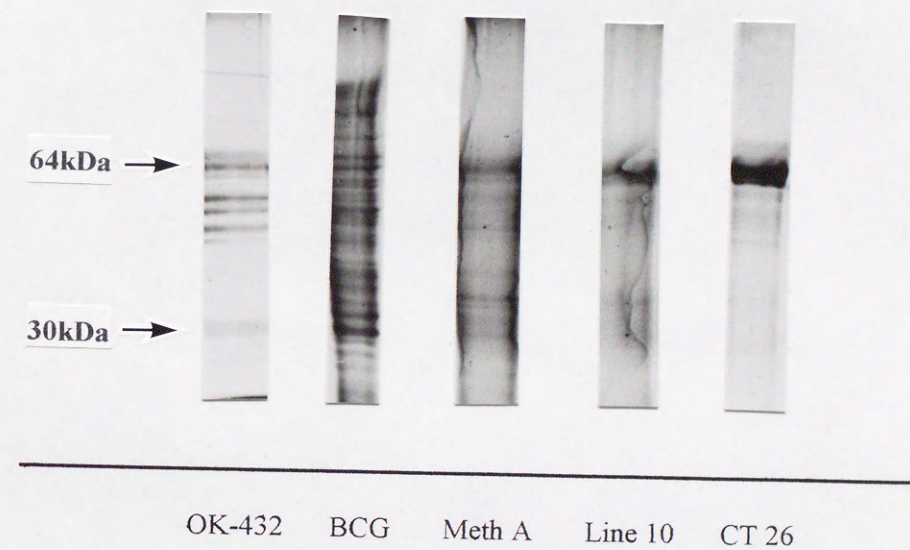
**Fig. 2 Indirect immunofluorescence analysis of Meth A tumor cells with anti-Streptococcus antibody (Poly Ab).**  
Micrographs of anti-Poly Ab treated Meth A tumor cells (A) and normal mouse serum treated Meth A tumor cells (B). Specific binding of antibody with tumor cells was observed. (  $\times 400$  )



**Table 2** The results of indirect immunofluorescence analysis between Meth A , Line 10 and CT 26 tumor cells and anti-Streptococcus antibody (Poly Ab)

Tumor	Antibody	Reactivity
Meth A	<u>Poly Ab</u>	+
	<u>NMS</u>	--
Line 10	<u>Poly Ab</u>	+
	<u>NMS</u>	--
CT 26	<u>Poly Ab</u>	+
	<u>NMS</u>	--

NMS , normal mouse serum as control



**Fig . 3** SDS-PAGE profile of OK-432 , BCG and tumor antigens.



Table 3 Viability (%) of Meth A, Line 10, CT 26 tumor cells incubated with anti-Streptococcus antibody (MoAb)

Antigen /	Time(hr)	0	1	2	4	6	12	18	24
Meth A	MoAb	95.4	93.4	93.2	94.0	82.1	67.2	30.0	16.2
	NMS	95.2	93.1	93.6	92.1	90.3	90.1	87.5	82.6
Line 10	MoAb	94.5	95.1	92.7	92.1	92.8	72.3	64.5	35.3
	NMS	94.2	95.1	93.1	94.2	90.2	89.4	81.2	82.4
CT 26	MoAb	93.4	92.5	93.1	90.1	93.0	81.6	71.2	38.3
	NMS	94.0	93.3	93.6	92.8	91.5	90.6	90.4	79.4

Tumor cells were incubated with 50% MoAb or 50 % normal mouse serum (NMS) – medium in 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C .

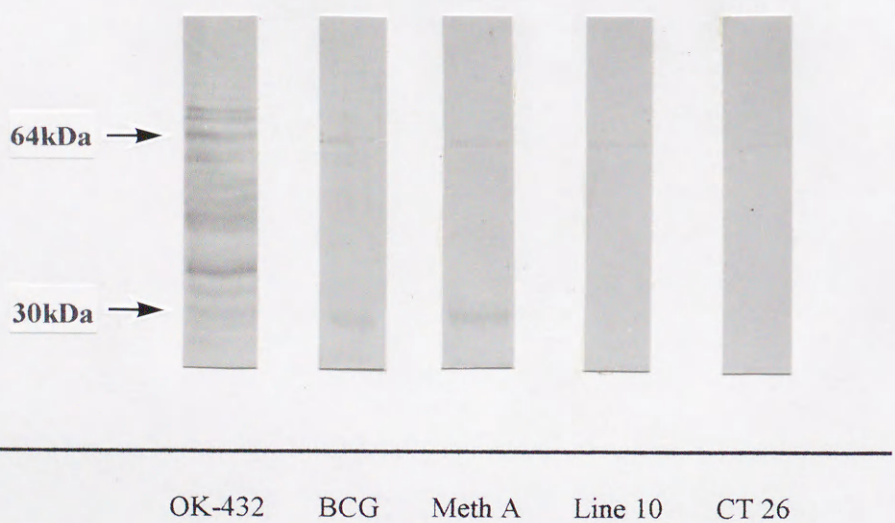


Fig . 4 Profile of Western blot analysis of OK-432 , BCG and tumor antigens treated with anti-Streptococcus antibody (Poly Ab). Sixty-four kDa antigen of OK-432 cross reacted with these of BCG , Meth A , Line 10 and CT 26 . Thirty Da protein of OK-432 was shared with BCG and Meth A tumor antigens.



**Table 4** Chemical characterization of shared antigen  
of Meth A , Line 10 and CT 26 tumor cells

Enzyme treatment	Shedding of antigenicity
Pronase ( 0.20% , 10min )	+
Trypsin ( 0.20% , 10min )	-
Pepsin (0.20% , 10min )	-
Na Metaperiodate ( 50mM , 15min )	-



