

Methylcholanthrene 投与後発癌過程における 宿主の免疫系ないしは生体防禦機構について

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 田中早苗教授)

寺 田 紀 彦

[昭和48年7月10日受稿]

緒 言

化学発癌剤によって誘発された腫瘍には腫瘍特異移植抗原(tumor specific transplantation antigen) があり syngeneic host¹⁻⁴⁾及び autochthonous host⁵⁾は腫瘍特異抗原によって免疫され得ることが知られている。しかし、宿主にない腫瘍特異移植抗原を有する腫瘍細胞が何故に宿主によつて拒絶されないで殖殖し癌腫に成長するのだろうか。

1963年 Prehn & Main⁶⁾は methylcholanthrene (MCA)の発癌性の大きな因子は、宿主の免疫反応を抑ええることにありと述べている。武谷、野本⁷⁾は新生児胸腺摘除マウスにおいては、MCA投与による腫瘍発生が正常マウスのそれより、より早期に、より高率に発生してくることを報告している。このように宿主の免疫の低下が発癌に関与していると考えられる多くの事実がある。¹⁰⁻¹⁵⁾

一方、最近 Burnet¹⁷⁾により免疫監視機構 (immunological surveillance system)を哺乳類は有しているという概念が提唱されている。体細胞の突然変異などで生じた体細胞とは異なる抗原構成をもった細胞 (たとえば腫瘍細胞)を認識し、これを拒絶・消去する哺乳類の具有する免疫学的機作であり、胸腺依存性のリンパ系が独占的にこの役割を演じているというものである。これら胸腺依存型のリンパ球 (thymus-dependent lymphocytes, T-cells)が同種移植免疫や腫瘍免疫において主役を演じていることは周知のところである。そこで、本論文においては、発癌過程における免疫監視機構がいかなる変動をきたすかをみるため、マウスに methylcholanthreneを投与し、その発癌過程における羊赤血球にたいする溶血斑形成細胞 (plaque forming cells, PFC)の数量的推移、リンパ節リン

球の phytohemagglutinin 付加下での allogeneic inhibition^{8) 9)}活性の推移を検討し興味ある知見をえたので報告する。

実験材料と方法

実験動物

岡山大学マウスコロニーよりえた純系 C₃H および Zb ♂ マウスの生後6~8週目のものを用いた。

発癌剤ならびに発癌方法

芳香族炭水化物20-methylcholanthrene (MCA 和光)をアラビアゴムに懸濁して、MCA 1.0mgをマウスの背部皮下に注入した。

1. MCA 投与の PFC 数に対する影響

a. 免疫法: MCA 背部皮下注入後、1週, 2週, 4週, 5週, 6週, 8週目の各マウスに、羊赤血球を生食にて3度洗い、約 8×10^8 個尾静脈より静注し、免疫した。

b. PFC 数の算出: Jerne¹⁶⁾の方法に準ずる。羊赤血球にて免疫後4日目に無菌的に脾臓を摘出する。摘出した脾臓を冷い Eagle 培地の中で細切し、30分間放置してから80メッシュにて濾過し、大きな塊を除き、2回遠沈し細胞を洗い、冷い Eagle 培地に浮遊させ、脾細胞浮遊液を作る。トリパン青にて生細胞数を数え、脾有核細胞数をもとめ、 $200 \sim 500 \times 10^4$ /ml に調製する。脾細胞浮遊液0.3ml と羊赤血球浮遊液0.3ml を前もって45℃に温め溶かしておいた0.7% Difco agar (DEAE-Dextran 加) 2.5ml に加え、ただちに静かに混和し、1.4% bottom layer agar 上に均等に広げる。37℃にて約1時間加温し、補体としてモルモット血清1.5ml をその上に静かに加え、更に37℃30分加温後2~3時間室温にて放置し、ブラックの数を肉眼的に数え、脾有核細胞 10^6 個あたりの PFC の数および PFC の絶対数を算

出した。

2. MCA 投与の allogeneic inhibition 活性にたいする影響。

a. 標的培養細胞：岡大癌源病理部よりえた Ehrlich 癌細胞を株化した JTC-11細胞を allogeneic cells として用いた。また heterogeneous cells の HeLa 株細胞をも標的細胞として使用した。培地は 20%牛血清加 YLE を、抗生物質は Cephalothin 100 μg/ml を用いた。

b. リンパ節細胞浮遊液の調製：MCA 注射後、経過的にマウス局所腋窩リンパ節細胞および無処置正常マウス（対照群）の局所腋窩リンパ節を無菌的に摘出し、YLE 培地の中で細切し、30分放置してから 80メッシュを通し、更に YLE にて 2 回遠沈洗滌し、冷い 20%牛血清加 YLE 培地に浮遊させリンパ節細胞浮遊液を作る。かかる細胞浮遊液は 95%以上の生細胞を含有している。

c. phytohemagglutinin (PHA) の調製：使用直前に phytohemagglutinin-M (Difco) 1バイアル (50mg) を YLE 5ml に溶解する。

d. allogeneic inhibition 活性の測定：教室の小長¹⁸⁾の方法に準ずる。リンパ節細胞と JTC-11

細胞とを 40:1, すなわち 80×10^4 個/ml と 20×10^4 個/ml に混合し、PHA を 2.0% (V/V) に加え、20%牛血清加 YLE 培養液を加えて全量 10ml とする。各群のリンパ節、JTC-11細胞混合液 1.5ml ずつを 6本の短試験管に分注し、Evans らの方法に従って 37°C で静置培養を行う。48時間培養後、各群 6本の短試験管を取り出し、培養液を捨て、1.5ml クリスタルバイオレット液 (2.1g クエン酸, 50mg のクリスタルバイオレットを 100ml の蒸留水に溶解したもの) を加え、37°C, 30分加温する。ついで、クリーナーで管壁より細胞を剝脱し、よく振盪したのち、Bürker-Türk 血球計算盤で核数計算を各短試験管につき数回行う。6本の平均核数を JTC-11細胞の増殖数とする。異種の HeLa 細胞を標的細胞にするさいには、HeLa 細胞数を 3.5×10^4 個/ml に調製し、1.5ml ずつを短試験管に分注して、37°C, 48時間培養後、数本を at random にとり出し、上述のように核数計算をなし均等に分注、増殖していることをたしかめ、1群 3~6本になるよう数群に分け、上清を捨てたのち腫瘍細胞数の 40倍量のリンパ球浮遊液 1.5ml を加え、さらに 37°C, 4日間培養する。培養終了後、JTC-11細胞の場合と同様に各群につき核数計算をなし、各群の HeLa 細胞数を算出する。

表 1 MCA 投与後の脾臓の PFC 発現率の推移
脾細胞 10^6 個に対する PFC 数

MCA 投与後週数	1週	2週	4週	5週	6週	8週
MCA 投与群	224	328	470	297	621	266
対照群	280	405	676	534	961	365
MCA 投与群 対照群 $\times 100\%$	80.0	81.0	69.5	55.6	64.6	72.9

表 2 MCA 投与の脾細胞数に及ぼす影響

	1週	2週	4週	5週	6週	8週
MCA 投与群	8389×10^4	6958×10^4	9660×10^4	12613×10^4	11132×10^4	11040×10^4
対照群	9020×10^4	7731×10^4	8944×10^4	10511×10^4	9085×10^4	8579×10^4
MCA 投与群 対照群	0.93	0.90	1.08	1.20	1.23	1.28

表 3 MCA 投与後の脾臓の PFC 発現率の推移
脾細胞 10^6 個に対する PFC 数

	1週	2週	4週	5週	6週	8週
MCA 投与群	18,791	22,822	45,402	36,461	69,130	29,366
対照群	25,256	31,311	60,461	56,129	87,307	31,313
MCA 投与群 対照群	74.3	72.8	75.9	64.9	79.1	93.7

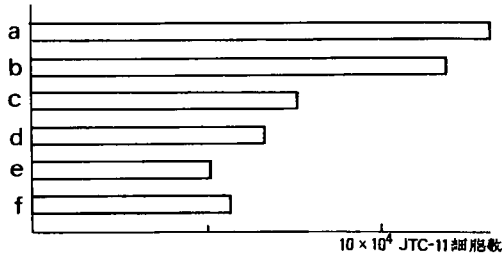
実験結果

1. MCA 投与の PFC 数におよぼす影響
MCA 投与後早期より脾細胞 10^6 個に対する PFC 数は対照群に比較して減少し、発癌し腫瘍が可視しうようになる時期まで PFC 数の減少は持続している。とくに肉眼

的発癌前と考えられる MCA 投与後 5週, 6週頃に最も PFC 数が少なく、5週目では対照群の 55.6% と最低値を示している。(表 1)

一方、MCA 投与後脾有核細胞数は 1, 2週では対照群より少ないが 4週以降では対照群より 20~30% の増加を

図1. MCA 投与によるマウスリンパ節細胞 (1週, 3週, 6週) の Ehrlich 癌株化 JTC-11細胞に対する allogeneic inhibition 活性の変動.



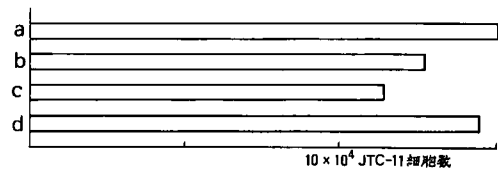
- JTC-11細胞のみを培養したもの.
- JTC-11細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と混合培養したもの.
- JTC-11細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.
- JTC-11細胞をMCA投与後1週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.
- JTC-11細胞をMCA投与後3週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.
- JTC-11細胞をMCA投与後6週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.

示している。(表2) PFCの絶対数はMCA投与後少なくとも発癌までは一環して対照群より低値を示している。(表3)

2. MCA投与の allogeneic inhibition 活性におよぼす影響

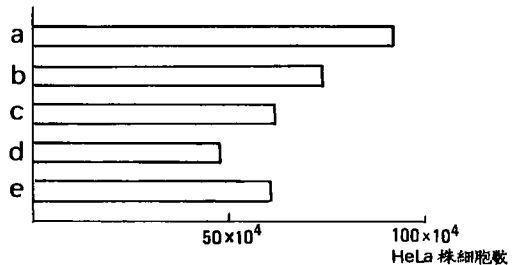
i). JTC-11細胞を標的細胞とした場合(図1, 2): JTC-11細胞をMCA投与後1, 3, 6週のマウス局所腋窩リンパ節細胞とPHA-M付加下で混合培養した場合はMCA非投与正常対照マウスの腋窩リンパ節細胞と混合培養した場合と同様, JTC-11細胞の増殖は抑えられている. しかし, MCA投与後腫瘍が肉眼的にはっきり認められる12週目のマウスリンパ節細胞とPHA-M付加下で混合培養した場合には, JTC-11細胞の増殖はほとんど抑制されていない. すなわち, MCA投与後発癌までは局所腋窩リンパ節細胞の allogeneic inhibition 活性は保持されている. 発癌以降腫瘍が可視しうようになる12週目になると局所リンパ節細胞の allogeneic

図2. MCA 投与によるマウスリンパ節細胞 (7週, 12週) の Ehrlich 癌株化 JTC-11細胞に対する allogeneic inhibition 活性の変動.



- JTC-11細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と混合培養したもの.
- JTC-11細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.
- JTC-11細胞をMCA投与後7週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.
- JTC-11細胞をMCA投与後12週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で混合培養したもの.

図3. MCA 投与によるマウスリンパ節細胞 (4週, 7週, 9週) の HeLa 株細胞に対する cytotoxic effect の変動.



- HeLa株細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と培養したもの.
- HeLa株細胞を無処置正常マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で培養したもの.
- HeLa株細胞をMCA投与後4週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で培養したもの.
- HeLa株細胞をMCA投与後7週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で培養したもの.
- HeLa株細胞をMCA投与後9週目マウスリンパ節細胞と2%PHA-M付加下で培養したもの.

inhibition 活性は低下ないしは消失してくる。

ii). HeLa 細胞を標的細胞とした場合 (図 3): MCA 投与後 4 週, 7 週, 8 週いずれの時期のリンパ節細胞も無処置正常マウスリンパ節細胞と同様, HeLa 株細胞の増殖を抑えている。

考 按

リンパ系組織が未発達であり, 免疫能力が低いと考えられている新生時マウスに化学発癌剤を投与すると, 成熟マウスに投与した場合より, 腫瘍の発生が早められることが知られている。^{19) 20)} 新生時に胸腺を摘出すれば, リンパ系とくに T 細胞の成熟が遅れ, immunological surveillance の低下した状態が持続するが, このようなマウスに MCA を投与すると, より早期に, より高率に発癌してくる。^{7) 17)} このように免疫系や網内系の機能低下が腫瘍の発生を容易にしていると考えられるいくつかの事実がある。人においても, 抗リンパ球血清その他で免疫抑制を必要とする臓器移植患者では, 正常人の 80 倍の高率に悪性腫瘍の発生がみられている。²¹⁾ すでに Stjernswärd¹²⁾ は MCA 投与により脾細胞中の PFC 数が早期から著しく低下し, 長期にわたることを示し, MCA は免疫反応を抑制し, そのため腫瘍特異抗原を有する腫瘍細胞の増殖をゆるすのだと述べている。最近, 羊赤血球を静注してマウスに PFC を産生させる場合, helper 細胞としての T 細胞の B 細胞への協力が必要であることが明らかにされている。²⁴⁾ そこで, 本論文では, まず MCA 投与後早期より発癌に至るまでの種々の時期における PFC 数の変動を観察したわけである。MCA 投与後, 1 週目よりすでに PFC 数の減少がみられ, 発癌し腫瘍が可視的となる時期まで持続している。特に肉眼的発癌前と考えられる MCA 投与後 5 週, 6 週頃に最も PFC 数が少なく, 5 週目では無処置対照群の 55.6% と最低値を示していることは興味深い。一方, MCA 投与後の脾有核細胞総数はむしろ増加の傾向を示しており, 柏原²⁵⁾ は MCA 投与後脾重量が増加し, 組織学的に脾リンパ濾胞の Hyperplasia がみられることを指摘している。これは MCA 投与後の PFC 数の減少と逆の関係にあり, あたかも PFC 数の質的減少を脾細胞総数の増加によって量的におぎなわんとしているように解釈できる。しかし, Stjernswärd は脾有核細胞総数, 脾重量はともに MCA 投与後 1 週, 8 週および 16 週において有意の差をもって対照群より減少していると述べている。

最近, 細胞性反応ないしは免疫前段階と考えられる生体が具有する immunological surveillance system の 1 つとしての allogeneic inhibition なる現象が知られるようになった。^{21) 22) 26)} さらに, この allogeneic inhibition の機作を研究するために, in vitro の実験が広く行われるようになり, Holm^{8) 9)} は PHA の付加下で非感作リンパ球様細胞が in vitro で allogeneic の細胞に破壊的に作用することをみだし, 小長¹⁰⁾ は Ehrlich 癌株化 JTC-11 細胞と C57BL マウスの非感作正常リンパ節細胞とを 1:40 の比で混合培養する際, 標的細胞に障害をおよぼさない 2% 最終濃度の PHA-M を付加しておく, 正常リンパ球があたかも感作されたように JTC-11 細胞に群集・接着して抗増殖性を示すことを標的細胞の核数計算でみている。PHA により活性化されるリンパ球もやはり T 細胞であることが明らかにされている。^{24) 27)} 前述したように免疫機能の低下が発癌に関与していると考えられる報告は多数みられるが, allogeneic inhibition 活性が発癌に際していかなる態度をとるかについては今だ報告をみない。そこで, 小長の方法に従って, MCA 投与後発癌に至るまでの種々の時期における局所腋窩リンパ節細胞の Ehrlich 癌株化 JTC-11 細胞を標的細胞とする allogeneic inhibition 活性について検討したわけである。MCA 投与後 6 週までのマウス局所腋窩リンパ節細胞は, 無処置正常マウスのそれと同様, JTC-11 細胞の増殖を抑えている。すなわち発癌までの局所腋窩リンパ節細胞には allogeneic inhibition 活性が保持されていると言える。しかし, MCA 投与後腫瘍が可視的となる 12 週目のマウス脾細胞は, JTC-11 細胞の増殖をほとんど抑制していない。すなわち発癌以降の担癌マウスにおいては, allogeneic inhibition 活性の低下がみとめられる。Möller 一派によると, allogeneic inhibition には胸腺由来のリンパ細胞が免疫学的に関与している以上に, 非特異的にリンパ細胞の膜面上のイソ抗原の差が, allogeneic の腫瘍細胞の増殖を抑える上で大いなる役割を果していると述べている。この Möller の考えにたつと, 本論文でえた allogeneic の JTC-11 細胞, 異種の HeLa 細胞を標的細胞としたさいのデータがある程度理解されよう。人子宮癌由来の HeLa-細胞とマウスのリンパ節細胞とでは, 抗原差が極めて大きいため, MCA 投与時期とは無関係にリンパ節細胞が HeLa 細胞の増殖を抑えるものと思われる。

いずれにしても、発癌剤の投与により胸腺由来のリンパ球が悪影響を受け、immunological surveillance systemが低下し、発癌を容易ならしめるものといえよう。T細胞の marker である θ 抗原を利用するなど、より詳細な検討が必要と思われる。

結 論

マウスに Methylcholanthrene を投与すれば、早期より PFC 数の減少がみられ、発癌前と考えられる MCA 投与後 5 週目では PFC 数の減少が最も著しく、無処置正常マウスの 55.6% と最低値を示している。すなわち MCA の投与はマウスの脾細胞中の PFC 数を減少させ、正常動物の免疫活性を強く阻害

する。この事実は発癌における免疫の関与を強く支持するものである。

一方、免疫前段階と考えられる allogeneic inhibition 活性は、MCA 投与後発癌までのいずれの時期においても保持されている。しかし発癌し、腫瘍が可視的となる 8 週以降では allogeneic inhibition 活性の低下がみとめられる。すなわち、allogeneic inhibition 活性は発癌よりはむしろ腫瘍の増殖と関係があるのではないかと考えられる。

(稿を終るにあたり恩師田中早苗教授、折田薫三講師、研究室の諸氏に深甚の謝意を表する。)

文 献

- 1) Foley, E.J. : Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, **13** : 835, 1953.
- 2) Prehn, R.T. & Main, J.M. : Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, **18** : 769, 1957.
- 3) Révész, L. : Detection of antigenic differences in isologous host-tumor systems by pretreatment with heavily irradiated tumor cells. *Cancer Res.*, **20** : 443, 1960.
- 4) Old, L.J., Boyes, E.A., Clarke, D.A. & Carwell, E.A. : Antigenic properties of chemically induced tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **101** : 80, 1962.
- 5) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E. & Hellström, K.E. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20** : 1561-1572, 1960.
- 6) Prehn, R.T. : Function of depressed immunologic reactivity during carcinogenesis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **31** : 791, 1963.
- 7) 武谷健二・野本亀久雄 : 新生時胸腺摘出マウスに発生したメチルコラントレン腫瘍の性状. 第26回日本癌学会総会記事, p. 250, 1967.
- 8) Holm, G., Perlmann, P. & Werner, B. : Phytohemagglutinin-induced cytotoxic action of normal lymphoid cells on cells in tissue culture. *Nature*, **203** : 841, 1964.
- 9) Holm, G. & Perlmann, P. : Quantitative studies on phytohemagglutinin-induced cytotoxicity by human lymphocytes against homologous cells in tissue culture. *Immunology*, **12** : 525, 1967.
- 10) Toth, B. & Shubik, P. : Toxic effects of 7, 12-dimethylbenz (a)-anthracene in new-born and adult Swiss mice. *Nature*, **211** : 428, 1966.
- 11) Sanford, K.K. : Malignant transformation of cells in vitro. *Intern. Rev. Cytol.*, **18** : 249, 1965.
- 12) Stjernswärd, J. : Immunodepressive effect of 3-methylcholanthrene. Antibody formation at the cellular level and reaction against weak antigenic homografts. *J. Nat. Cancer Inst.*, **35** : 885, 1965.
- 13) Stjernswärd, J. : Effect of non-carcinogenic and carcinogenic hydrocarbons on antibody-forming cells measured at the cellular level in vitro. *J. Nat. Cancer Inst.*, **36** : 1189, 1966.

- 14) Salaman, M.H. & Wedderburn, N. : The immunodepressive effect of Friend virus. *Immunology*, **10** : 445, 1966.
- 15) Bates, R.R. & Prehn, R.T. : Role of the fibrous capsule in carcinogenesis by plastic film. *Nature*, **205** : 303, 1965.
- 16) Jerne, N.K., Nordin, A.A., & Henry, C. : The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In: *Cell-Bound Antibodies* (Amos, B. & Koprowski, H. eds.) Wister Institute Press, Philadelphia, p. 109, 1963.
- 17) Burnet, M. : *Immunological Surveillance*. Pergamon Presse, Oxford, London. 1970.
- 18) Konaga, E. : Action mechanism in vitro of sensitized regional lymph node cells on target cells. *Acta Med Okayama*, **25** : 269, 1971.
- 19) Pietra, G., Spencer, K. & Shubik, P. : Response of newly born mice to a chemical carcinogen. *Nature*, **183** : 1689, 1959.
- 20) O'Gara, R.W., Kelly, M.G., Brown, J. & Mantel, N. : Induction of tumors in mice given a minute single dose of dibenz [a, h] anthracene or 3 -methylcholanthrene as newborns. A dose-response study. *J. Nat. Cancer Inst.*, **31** : 1027, 1965.
- 21) Hellström, K.E., Hellström, I. & Haughton, G. : Demonstration of syngeneic preference in vitro. *Nature*, **204** : 661, 1964.
- 22) Hellström, K.E. & Möller, G. : Immunological and immunogenetic aspects of tumor transplantation. *Progress in Allergy*, **9** : 158, 1965.
- 23) Penn, I. & Starzl, T.E. : Malignant tumors arising de novo in immunosuppressed organ transplant recipient. *Transplantation*, **14** : 407, 1972.
- 24) Dixon, F.J. & Kunkel, H.G. : *Advances in Immunology*, **15**. Academic Press, N.Y., p. 2, 1972.
- 25) Kashihara, E. : Inhibitory effect of isologous regional lymph node cells from the methylcholanthrene-induced sarcoma bearing mice on the tumor in vivo. *Acta Med. Okayama*, **24** : 161, 1969.
- 26) Lindholm, L., Lapp, W. & Möller, E. : Allogeneic inhibition in thymectomized animals lacking homograft reactivity. *Nature*, **228** : 1316, 1970.
- 27) Dixon, F.J. & Kunkel, H.G. : *Advanced in Immunology*, **13**. Academic Press, N.Y. p.101, 1971.

Immunological Surveillance System in the Course of Carcinogenesis after Administration of Methylcholanthrene to Mice

Norihiko Terada

Department of Surgery, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan (Director : Prof. Sanae Tanaka)

ABSTRACT

On the administration of methylcholanthrene (MCA) to mice there can be observed a decrease in the plaque forming cells (PFC) from early stage, and in the post-administration week 5, at the time considered to be of precancerous stage the decrease in PFC number is most marked, being at the minimal level of 55.6% as compared with that of the control (untreated mice). In other words, the administration of MCA reduces the PFC number of spleen cells in mice and it markedly suppresses the immunological activity of normal mice. This indicates that MCA is appreciably involved in the immunity to carcinogenesis.

On the other hand, the activity of allogeneic inhibition in the precancerous stage is maintained during the period between MCA administration and the time of cancer development. However, the allogeneic inhibition activity decreases by 8 weeks after MCA administration, the time when the tumor has grown to the size macroscopically visible. This finding suggests that the activity of the allogeneic inhibition is associated more with the proliferation rather than with oncogenesis.