

Methylcholanthrene 誘発肉腫増殖過程における担癌宿主の免疫系ないし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49年10月7日受稿）

緒 言

われわれの研究室では数年来、主として *in vitro* の組織培養法によって、担癌宿主のリンパ球が自己の癌細胞に特異的に群集、接着して抗腫瘍性を示すことを同種継代移植癌、発癌剤による誘発癌、自然発生癌さらには人癌について検討してきた¹⁻⁵⁾ 腫瘍が増殖してある時期に達するまでは、担癌宿主は自己の癌細胞に対して抗腫瘍性に働いている。しかし、腫瘍がある一定程度以上に進行してくると担癌宿主の抗腫瘍性が失われてくる。また進行癌では抗体産生能や移植免疫反応や遅延型反応などの非特異的免疫能も低下してくることが知られている⁶⁻⁸⁾ すなわち、癌の進展により宿主の免疫系ないしは網内系の機能が抑制されるのだと考えられる。著者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 (MCA) を投与し、その発癌過程において脾の溶血斑産生細胞 (PFC) の発現率を調べ、発癌剤投与早期より著明に溶血斑産生細胞の減少することを明らかにするとともに、免疫前段階と考えられている 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ことを報告した⁹⁾

本論文では、MCA投与後の発癌以降腫瘍死するまでの間に、担癌宿主の非特異的免疫系としてのPFCの発現率、更には生体の免疫監視機構と考えられるリンパ節細胞の allogeneic inhibition 活性がどのように推移をとるか、検討を加えたので報告する。

実験材料と方法

実験動物

岡山大学マウスコロニーより得た純系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, 和光純薬) をアラビアゴムに懸濁して、1.0mgをマウスの背部皮下に注射した。MCA投与後8週以降にな

ると腫瘍が触知できるようになってくるが、本実験ではMCA投与後8週以降の場合は腫瘍触知可能なマウスのみ用いた。

1. MCA肉腫の増殖過程におけるPFC数の変動

a. 免疫法：MCA背部皮下注射後、6週、8週、10週、14週、16週目の各マウスの尾静脈に、生食にて3回洗滌した羊赤血球約 8×10^8 個を静注し、免疫した¹⁰⁾

b. PFC数の算出：すでに前編で詳述したが、羊赤血球にて免疫後4日目に脾臓を摘出し、冷いEagle培地の中で細切し、30分間静置し、80メッシュにて濾過し大きな塊を除く、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を数え、脾有核細胞数を算定する。この脾有核細胞中のPFC数をJerne⁹⁾の方法によってもとめる。略記すると、脾細胞浮遊液と羊赤血球浮遊液を前もって45℃に温め溶かしておいたDifco agarに加えて混和し、bottom layer agar上に均等に拡げ、37℃、1時間加温する。モルモット血清補体を加えてさらに37℃30分加温後2～3時間室温に放置し、溶血斑の数を肉眼的に算定し、脾有核細胞10⁶個あたりのPFC数と、PFC数の絶対数を算定する。

2. MCA肉腫増殖過程における allogeneic inhibition 活性の変動

a. 標的培養細胞：岡大癌源病理部より得たEhrlich癌を株化したJTC-11細胞をallogeneic cellとして用いた。また、heterogeneous cellとして、岡大婦人科で継代維持されているHela株細胞を使用した。培地は20%牛血清加YLEを、抗生物質として、Cephalotin100 μ g/mlを添加した。

b. リンパ節細胞浮遊液の調製：MCA注射後、経週的に局所腋窩リンパ節細胞および無処置正常マウスの腋窩リンパ節細胞を無菌的に摘出し、YLE培地の中で細切し、30分間静置後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：使用前直前に phytohemagglutinin-M (Difco) 1 ヴァイアル (50mg) をYLE 5 ml に溶解する。

d. Allogeneic inhibition 活性の測定：教室の小長¹¹⁾の方法に準ずる。略記すると、次の如くである。被検マウスのリンパ節細胞とJTC-11細胞とを40:1に混合し、PHA加培養液中で48時間培養する。培養後短試験管壁に生着している腫瘍細胞の核数をクリスタルバイオレット液を加えて算定する。He-La細胞を標的細胞とするさいは、HeLa細胞を均等に分注して48時間、37℃で培養後40倍量のリンパ球をあとから加えて、PHA付加下で37℃、4日間さらに培養し HeLa細胞の核数を算定する。

実験結果

1. MCA肉腫の増殖過程におけるPFC数の変動

MCA投与によるマウス脾細胞中のPFC数が著明に減少することはすでに報告したが¹⁰⁾このPFC数の減少は発癌以降の担癌マウスの脾細胞においても引き続きみられる(表1)。

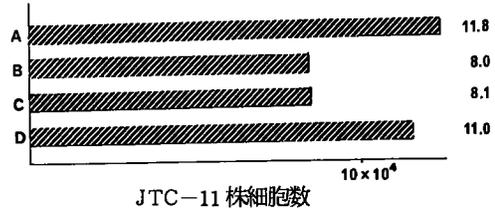
表1. MCA誘発肉腫の増殖過程におけるPFC発現率の推移
脾細胞 10^6 個に対するPFC数

MCA投与後週数	8 週	10 週	14 週	16 週
MCA肉腫担癌群	266	294	229	269
対 照 群	365	453	280	316
担癌群 対照群 $\times 100$ (%)	72.9	64.9	81.7	85.0

2. MCA肉腫増殖過程におけるallogeneic inhibition 活性の変動

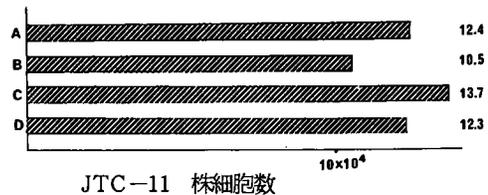
JTC-11細胞をMAC投与後6週目の担癌マウスの局所腋窩リンパ節細胞とPHA-M付加下で混合培養すると、無処置正常マウスの腋窩リンパ節細胞と混合培養した場合と同様にJTC-11細胞の増殖は抑制されている。MCA投与後18週目の末期担癌マウスの局所腋窩リンパ節細胞付加群は無処置正常マウス腋窩リンパ節細胞付加の場合と比較して、JTC-11細胞の増殖をほとんど抑制していない(図1)。また、MCA投与後10週、16週目の担癌マウスの局所腋窩リンパ節細胞は、無処置正常マウスの腋窩リンパ節細胞と比較して、JTC-11細胞の増殖をほとんど抑

図1 MCA誘発肉腫増殖過程におけるマウスリンパ節細胞(MCA投与後6週, 8週)のEhrlich癌株化JTC-11細胞に対するallogeneic inhibition 活性の変動



- A. JTC-11細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを混合培養したもの。
 B. JTC-11細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。
 C. JTC-11細胞とMCA投与後6週目マウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。
 D. JTC-11細胞とMCA投与後8週目マウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。

図2 MCA誘発肉腫増殖過程におけるマウスリンパ節細胞(MCA投与後10週, 16週)のEhrlich癌株化JTC-11細胞に対するallogeneic inhibition 活性の変動

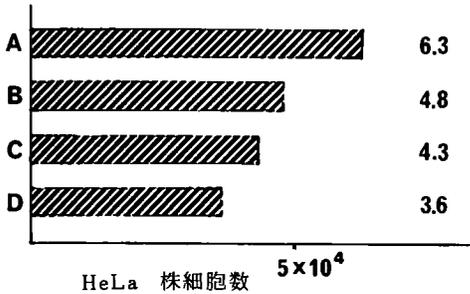


- A. JTC-11細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを混合培養したもの。
 B. JTC-11細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。
 C. JTC-11細胞とMCA投与後10週目のマウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。
 D. JTC-11細胞とMCA投与後16週目のマウスリンパ節細胞とを2%PHA-M付加下で混合培養したもの。

ていない(図2)。すなわち、担癌マウスの局所腋窩リンパ節細胞のallogeneic inhibition 活性は腫瘍が増殖するにしたがって低下ないしは消失している。

HeLa株細胞を標的細胞とした場合、MCA投与後10週、13週目の担癌マウスリンパ節細胞は無処置正常マウスと同様、HeLa株細胞の増殖を抑えている。

図3 MCA 誘発肉腫増殖過程におけるマウスリンパ節細胞 (MCA 投与後10週, 13週) の HeLa 株細胞に対する cytotoxic effect の変動



- A. HeLa 株細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを培養したもの。
 B. HeLa 株細胞と無処置正常マウスリンパ節細胞とを 2% PHA-M 付加下で培養したもの。
 C. HeLa 株細胞と MCA 投与後10週目マウスリンパ節細胞とを 2% PHA-M 付加下で培養したもの。
 D. HeLa 株細胞を MCA 投与後13週目マウスリンパ節細胞とを 2% PHA-M 付加下で培養したもの。

考 按

最近、人癌においても腫瘍がある限界を越えて増殖すると、リンパ球ことにT-リンパ球の機能が特異的、非特異的に低下することが知られ、その機作についても種々論ぜられている。¹²⁻¹⁴⁾ 特異的リンパ球機能としては、*in vitro* でのTSTA (腫瘍特異移植抗原) にたいする細胞性免疫である lymphocytotoxicity 活性や、macrophage migration inhibition 活性の低下消失が明らかにされ、非特異的T-リンパ球機能としては *in vitro* でPHAなどの mitogenic substance に対する幼若化反応の度合、*in vivo* ではツベルクリン反応やDNCB反応の低下がみられている。特異的免疫機能の低下は、可溶性抗原そのもの、抗体あるいは抗原 (TSTA) -抗体複合物と異論があり、性状は明らかでないが、癌患者血清中のいわゆる blocking factor が腫瘍細胞表面のTSTAを被覆して感作リンパ球の作用を阻止するというものである。¹⁵⁻¹⁶⁾ しかも、この factor には特異性がある。われわれは別個に腫瘍より抽出したトキソホルモンが非特異的に *in vivo*, *in vitro* においてT-リンパ球の特異的、非特異的機能を阻害することを明らかにしている。もちろん、この実験に用いたトキソホルモン量は腫瘍細胞にも、リンパ球にも、

全く毒性のない濃度で用いたものである。¹⁷⁾

このT-リンパ球の非特異的機能として、本論文ではすでに述べた様にMCA注射後発癌に至る過程でみた羊赤血球にたいする溶血斑形成細胞数 (PFC数) とリンパ球の allogeneic inhibition 活性¹⁸⁾ を腫瘍の増殖過程で測定したわけである。いずれもT-リンパ球が関与する反応と考えられている。発癌過程ではPFC数がMCA投与後早期より低下するが、腫瘍の増殖過程においても担癌マウスの脾細胞中のPFC数は減少している。他方、リンパ球の Ehrlich 癌細胞由来JTC-11細胞にたいする allogeneic inhibition 活性は発癌過程において低下していないが、発癌後の腫瘍増殖の過程では腫瘍が明らかに可視的となるMCA投与10週以降では低下してくる。Allogeneic inhibition 活性は体細胞とは異なった細胞表面構造を有する変異細胞や、癌細胞が発生した場合、その発生した *in situ* でこれら細胞の増殖を阻止するいわゆる免疫制禦機構 (immunological surveillance system) に属するものと考えられている。¹⁴⁾ すなわち、リンパ球の表面構造と標的細胞表面の構造との差異の度合で標的細胞が破壊され、増殖が抑制されるものと考えられている。腫瘍増殖過程での腫瘍増殖にまつわる、たとえば血清抗体、blocking factor あるいはトキソホルモンのごとき液性因子がリンパ球の表面を被覆することにより、標的細胞への群集、接着 (aggregation) が阻止され、allogeneic inhibition 活性が低下するものと考えられよう。他方、異種の子宮癌由来の HeLa 細胞を標的細胞としたさい、発癌から増殖の両過程を通して、すべて HeLa 細胞の増殖が抑えられる。このことは、マウスと人との間の抗原差、すなわち細胞表面抗原あるいは細胞表面構造の差が大きいこと、allogeneic inhibition 活性が強くおこったものであることをしめしているといえよう。本実験に用いた小長¹³⁾ の allogeneic inhibition の研究では、リンパ球の標的細胞への aggregation を高めるためにPHAを使用しているが、このPHAにたいするT-リンパ球の幼若化が進行癌では低下しているため、進行癌マウスでのリンパ球の allogeneic inhibition の低下は、PHAに、たいするT-リンパ球の反応の低下とも関連していると考えられる。

PFC数の低下は、MCA投与後早期よりみられるが、少なくとも一般的に進行癌においてもB-リンパ球の活性の低下はないという見解からするとPFC数の低下はB-リンパ球に協同するT-リンパ球の hel-

per cell としての機能低下にその原因が求められよう。

また、今一つ、進行癌患者では末梢血中のT-リンパ球数のB-リンパ球にたいする比率が低下することが知られているが、担癌マウスにおいてもT-リンパ球数やその頻度についての検討が必要である。これらは、腫瘍免疫学の今後の発展にまたなくてはならないが、少くとも進行癌では allogeneic inhibition 活性を含めたT-リンパ球の機能がすべて低下しているといえよう。

結 論

Methylcholanthrene (MCA) 投与によりマウス脾細胞中の溶血斑産生細胞 (PFC) 数は著明に減少する、このPFC数の減少が発癌以降の担癌マウスの脾細胞においても引き続きみられ、癌末期まで持

続している。担癌マウスにおけるPFC数の減少は、MCAの影響が発癌以降も続いているためか、あるいは腫瘍組織より出る免疫阻害物質によるものかは明らかでない。

一方、担癌マウスの局所腋窩リンパ節細胞の allogeneic inhibition 活性は、腫瘍が増殖するにしたがって低下ないし消失してくる。Allogeneic inhibition 活性の低下がMCA投与後発癌までの時期には全くみとめられず、担癌マウスにおいてみとめられることから、allogeneic inhibition 活性の低下は発癌と関係なく、むしろ腫瘍の増殖と関係があり進行癌を難治性に行っている1つの因子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) Hara, S.: Cellular antibody in mice bearing Ehrlich cancer. I. A quantitative study on anti-tumor activity of cellular antibody in vitro. *Acta Med. Okayama*, **19**: 91, 1965.
- 2) Satoh, K.: In vitro studies on tumor-specific immunity by using C3H mammary cancer-A cells. I. Inhibitory effect of lymph node cells from the tumor bearing isologous C3H mouse on the proliferation of the tumor cells. *Acta Med. Okayama*, **20**: 261, 1966.
- 3) Kashiwara, E.: Inhibitory effect of isologous regional lymphnode cells from the methylcholanthrene induced sarcoma bearing mice on the tumor in vitro. *Acta Med. Okayama*, **24**: 161, 1970.
- 4) 大西信行: 癌と細胞性免疫, 1編, Methylcholanthrene-誘発肉腫の同系移植マウスの部位別リンパ組織の抗腫瘍性, *岡山医会誌*, **86**: 527, 1974.
- 5) Mannami, T.: Electron microscopic study of contact interaction of sensitized with homologous target cells. *Acta Med. Okayama*, **22**: 263, 1968.
- 6) Grace, J. T. & Kondo, T.: Investigations of host resistance in cancer patients. *Ann. Surg.*, **148**: 633, 1958.
- 7) Logan, J.: The delayed type of allergic reaction in cancer: Altered response to tuberculin and mumps virus. *N. Z. Med. J.*, **55**: 408, 1956.
- 8) Sokal, J. E. & Primikiri, N.: The delayed skin test response in Hodgkin's disease and lymphosarcoma. *Cancer*, **14**: 597, 1961.
- 9) 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, 1963. p. 109.
- 10) 寺田紀彦: 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, *岡山医会誌*, **85**: 241, 1973.
- 11) Konaga, E.: Action mechanism in vitro of sensitized regional lymph node cells on target cells. *Acta Med. Okayama*, **25**: 269, 1971.
- 12) 折田薫三: 癌患者の免疫機能, *臨床科学*, **8**: 477, 1972.
- 13) 折田薫三: 癌と細胞性免疫, *臨床免疫*, **4**: 823, 1972.

- 14) 折田薫三：がん患者におけるリンパ球の機能テスト，総合臨床，22：2121，1973.
- 15) Sjögren, H. O., Hellström, I., Banasal, S., Warner, G. A. & Hellström, K. E.: Elution of "blocking factors" from human tumors, capable of abrogating tumor-cells destruction by specifically immune lymphocytes. *Int. J. Cancer* 9 : 274, 1972.
- 16) Cohen, A. M., Ketcham, A. S. & Morton, D. L.: Specific inhibition of sarcoma-specific cellular immunity by sera from patients with growing sarcomas. *Int. J. Cancer* 11 : 273, 1973.
- 17) 鈴木紘一，内田善夫，林 茂夫，小長英二，三輪恕昭，折田薫三，田中早苗，免疫リンパ球に対するトキシホルモンの影響について，才32回日本癌学会総会記事，P, 254, 1973.

**Immunological Surveillance System
in the Proliferation Course of Methyl-
cholanthrene-induced Tumor**

Norihiko Terada

Department of Surgery

Okayama University Medical School

Okayama, Japan

[Director : Prof. Sanae Tanaka]

ABSTRACT

By injecting 1 mg of methylcholanthrene (MCA) subcutaneously on the back of C3H and Zb mice the immunological state in the host was studied in the course of tumor growth thus induced by MCA, from the following two aspects. One point the plaque forming cell number (PFC number) of the spleen against sheep blood red cells (SBRC), and the other is the allogeneic inhibitory activity of regional axillary lymph node cells in mixed culture with JTC-11 cells (a strain derived from Ehrlich) or HeLa cells as target cells.

Our observations have revealed that PFC number of spleen cells of the cancer-bearing mice decreases continuously from the time immediately after MCA injection up to the time of tumor death. The allogeneic inhibitory activity of regional lymph node, in the case with JTC-11 cells as target cell, is marked just before the tumor onset and shortly after the tumor onset, but such an activity is lost with time lapse of over 10 weeks when tumor grows bigger. However, when HeLa cell strain (derived from human cancer of uterus) with a great histoincompatibility is used as target cells, the allogeneic inhibitory activity is maintained persistently up to the terminal stage of cancer.

In other words, it can safely be said that there occurs continuous decrease in the PFC, number during the entire course up to tumor death, and the allogeneic inhibitory activity, which is considered to be one of the immunological surveillance system, also decreases in a progressive cancer irrespective of carcinogenic processes.