

リンパ腫症及びマレック病腫瘍細胞に対する テストステロンほか各種ステロイドホルモンの効果

近藤康博・塩田雅彦・田辺 昭・鳥海 徹・佐藤孝二^{a)}
(家畜衛生学研究室)

Received October 27, 1979

The Effect of Testosterone and Other Steroid Hormones on the Tumor Lymphocyte Lines Isolated from Chickens

Yasuhiro KONDO, Masahiko SHIOTA, Akira
TANABE, Tooru TORIUMI and Koji SATO^{a)}
(Laboratory of Animal Hygiene)

The proliferation of tumor lymphocyte lines (LL 1104B and BMC L1) isolated from the chicken infected with Marek's disease or lymphoid leukosis after addition of several steroid hormones, and the binding capacity of these cell lines for ³H-testosterone were examined. The effect of testosterone on bursocyte and thymocyte, and the binding capacity for ³H-testosterone were also examined.

The results were as follows :

- 1) The proliferation of LL 1104B and BMC L1 was inhibited with testosterone, estrogen and glucocorticoids. The inhibition increased with hormone concentrations.
- 2) The death rate of bursocyte increased after incubation with testosterone under chilled condition. On the contrary, thymocyte was not affected with testosterone.
- 3) The scintillation count of LL 1104B, BMC L1 and bursocyte incubated with ³H-testosterone was specifically higher than that of thymocyte.

These observations suggests that the inhibitory effect of testosterone, probably of other steroid hormones as well, on lymphocyte is attributed to its binding capacity to the lymphocyte.

結 言

リンパ球は、大別して、Bリンパ球とTリンパ球の2集団にわけられる。鳥類では、Bリンパ球はファブリシウス嚢 (BF) で、Tリンパ球は胸腺において分化成熟する。ニワトリにおいて、リンパ腫症 (LL) ウィルスは、Bリンパ球^{1,2)}を、マレック病 (MD) ウィルスは、Tリンパ球³⁾をそれぞれ侵し、リンパ腫症あるいはマレック病が発症することが知られている。

Bリンパ球がテストステロンに対して高い感受性を有ることについては、すでに、多くの報告^{2,3,9,10)}がある。また、Tリンパ球を含めて、リンパ球は、エストロジェン⁵⁾やグルココルチコイド^{1,3)}に対する感受性を有していることも知られている。これらの性ホルモン¹¹⁾およびグルココルチコイド⁸⁾は、リンパ球のステロイドホルモンリセプターを介して作用することが知られている。

リンパ球系腫瘍細胞に対するテストステロン等ステロイドホルモンの効果を検討すること

a) 名古屋大学農学部, Nagoya University

は、細胞レベルにおけるテストステロンの作用機序の解明とともに、腫瘍の発症対策に有用と考えられる。本試験では、ステロイドホルモンの腫瘍細胞に対する増殖抑制効果および、テストステロンの結合量を調べた。

材 料 と 方 法

1. 腫瘍細胞の培養およびステロイド添加

供試腫瘍細胞として、日本獣医畜産大学の木大教授より供与されたBリンパ球由来のLL 1104B株およびTリンパ球由来のBMC L1株を用いた。培養時、LL 1104BにはイーグルMEM(大五栄養)を、BMC L1にはRPMI-1640(日水製薬)を用い、それぞれに牛胎児血清(GIBCO)を5%の割合に加えた。これらの培養液8mlに、 $1\sim 2 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度の腫瘍細胞浮遊液2mlを加え、さらに、テストステロン(SIGMA)ほか、 β -エストラジオール、コルチコステロン、デキサメサゾンおよびコレステロールを、アルコール又は蒸留水に溶解し、その0.02mlを最終濃度 $1\mu\text{M}$ あるいは $10\mu\text{M}$ となるように添加した。ついで、LL 1104Bは 38°C で、BMC L1は 41°C で72時間密栓培養し、添加後24・48および72時間目における細胞数をかぞえ、数回試験をくり返して、平均値を求めた。

2. リンパ球の採取とテストステロン添加

供試鶏として、10週令の白色レグホーン雄ヒナを用い、BFと胸腺から、それぞれ、Bリンパ球とTリンパ球を無菌的に採取し、ハンクス液に浮遊させ、培養細胞におけると同様にテストステロンを添加し、添加後24・48および72時間目に、トリパンブルー染色法により、生細胞数をかぞえた。

3. テストステロン結合量の測定

腫瘍細胞およびリンパ球浮遊液0.2mlに、 $0.8\mu\text{Ci}$ ($8 \times 10^{-8}\text{M}$)の ^3H -テストステロン0.2mlを加え、 4°C で60分間インキュベートした後、ハンクス液で3回洗滌し、液体シンチレーションカウンター(アロカLSC-653型)で細胞 10^6 個あたりのDPMを測定した。

結 果

腫瘍細胞の増殖におよぼすテストステロンほか各種ステロイドホルモンおよびコレステロールの効果は、Fig. 1ならびにTable 1～3に示す通りであった。

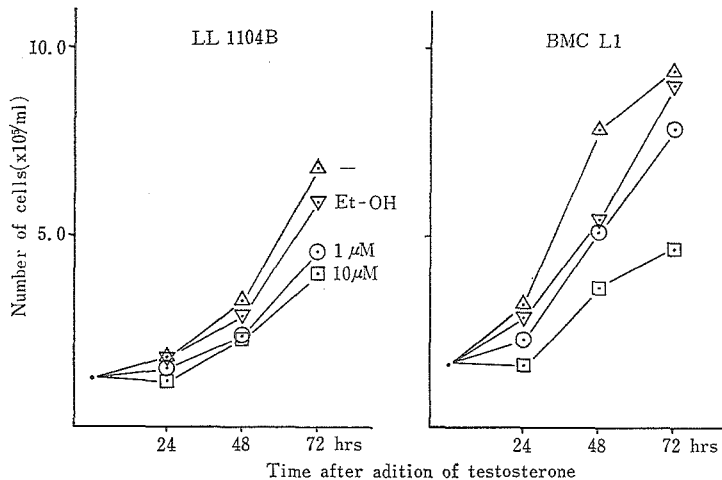


Fig. 1 The proliferation of tumor cells (LL 1104B and BMC L1) incubated with testosterone.

テストステロン添加試験では、Fig. 1 に示す如く、添加後24・48および72時間目で、いずれの添加区においても、細胞数は増加したが、増殖速度は、両細胞株ともに、無添加区で最大で、以下、アルコール、1 μ M、10 μ M添加区の順に減少した。腫瘍細胞の増殖は、アルコールにより軽度に抑制されたが、さらに、テストステロン添加により、濃度に依存して抑制が強まり、テストステロンによる増殖抑制効果が明らかに観察された。この抑制効果は、LL 1104B株よりもBMC L1株でより顕著であった。

Table 1 The proliferation of tumor cells (LL 1104B and BMC L1) incubated with estradiol

Hours after addition	Concentration	Cell counts (x10 ⁵ /ml)	
		LL 1104B	BMC L1
24	—	2.10	2.67
	Et-OH	2.18	2.45
	1 μ M	1.54	1.62
	10 μ M	1.39	1.71
48	—	5.10	4.82
	Et-OH	3.87	4.48
	1 μ M	3.19	3.69
	10 μ M	2.80	2.48
72	—	7.57	7.98
	Et-OH	5.78	7.50
	1 μ M	5.26	6.09
	10 μ M	3.40	2.05

エストラジオールを添加すると、細胞の増殖速度は Table 1 に示す如く、テストステロン添加時におけると同様、無添加区で最大であり、以下、アルコール、1 μ M、10 μ M添加区の順に減少し、増殖抑制効果が認められた。エストラジオールによる増殖抑制効果は、両細胞株ともに、テストステロンとほぼ同程度であり、またLL 1104BよりもBMC L1株でより顕著であった。

グルココルチコイドの腫瘍細胞におよぼす効果は、Table 2 に示す如くであった。コルチコステロン添加により、LL 1104B株では、特に10 μ M添加区で、添加後のいずれの時期においても、アルコール添加対照区に比べ細胞数が少なく、細胞増殖抑制効果が認められた。一方、BMC L1株では、いずれの時期においても、細胞数は対照区のそれとほとんど変わりが見られず、細胞増殖抑制効果は認められなかった。デキサメサゾン添加の効果は、コルチコステロンのそれとは対照的であった。すなわち、LL 1104Bでは、添加後のいずれの時期においても、蒸留水添加対照区の細胞数との間に、差はまったく見られず、抑制効果が認められなかったのに対し、BMC L1では、特に10 μ M添加区で、添加後のいずれの時期においても、対照区に比し、細胞数は明らかに少なかった。以上のように、上記2種のグルココルチコイドに対する2つの腫瘍細胞の感受性は、非常に異なるものであった。

Table 3 に示す如く、コレステロールを添加しても、いずれの時期においても、細胞数は、対照区と変わりがなかった。ホルモン活性を有さないステロイドに対しては、両腫瘍細胞ともに、感受性を有さなかった。

Table 2 The proliferation of tumor cells (LL 1104B and BMC L 1) incubated with glucocorticoids

Hours after addition	Concentration	Cell counts ($\times 10^5$ /ml)			
		Corticosterone		Dexamethasone	
		LL 1104B	BMC L 1	LL 1104B	BMC L 1
24	—	2.10	3.74	2.15	4.23
	Et-OH, DW*	2.07	3.33	1.77	4.03
	1 μ M	1.96	3.24	1.85	3.43
	10 μ M	1.58	2.44	1.78	1.91
48	—	4.31	8.42	3.92	8.45
	Et-OH, DW	3.97	7.95	3.02	9.08
	1 μ M	3.26	6.67	2.73	8.24
	10 μ M	2.75	6.58	3.20	2.71
72	—	6.56	10.84	4.88	11.07
	Et-OH, DW	6.36	10.24	4.42	11.14
	1 μ M	4.84	9.65	4.60	9.21
	10 μ M	4.61	9.41	4.56	4.30

* Distilled water

Table 3 The proliferation of tumor cells (LL 1104B and BMC L 1) incubated with cholesterol

Hours after addition	Concentration	Cell counts ($\times 10^5$ /ml)	
		LL 1104B	BMC L 1
24	—	1.53	2.42
	Et-OH	1.82	2.34
	1 μ M	1.50	1.85
	10 μ M	1.58	2.34
48	—	3.82	5.45
	Et-OH	3.85	4.97
	1 μ M	4.14	4.82
	10 μ M	4.37	4.71
72	—	5.99	7.77
	Et-OH	5.90	7.67
	1 μ M	5.73	7.29
	10 μ M	5.93	6.87

Table 4 は、テストステロン添加時のBリンパ球およびTリンパ球の生存率として、テストステロン添加時の生細胞数に対する添加後各時期の生細胞数のパーセントを示したものである。4°Cの条件におくことにより、Bリンパ球・Tリンパ球ともに、対照区を含むすべての添加区で、24時間以降72時間目まで、生細胞数は徐々に低下した。Bリンパ球では、テストステロン添加により、添加後48時間および72時間目において、生存率は、対照区よりもさらに約10~20%程度低下し、テストステロンの効果が認められた。一方、Tリンパ球では、生存率は、いずれの時期においても、対照とまったく異ならず、Tリンパ球では、テ

テストステロン添加の効果は認められなかった。

Table 4 The percents of survived lymphocytes following 24-72 hours incubation with testosterone in HBSS under chilled condition

Hours after addition	Concentration	Survival rate (%)	
		Bursocyte	Thymocyte
24	—	67.4	74.2
	Et-OH	71.4	73.9
	1 μ M	63.8	68.5
	10 μ M	61.0	70.4
48	—	64.1	61.7
	Et-OH	62.6	62.1
	1 μ M	54.4	63.0
	10 μ M	49.5	63.6
72	—	57.4	56.3
	Et-OH	60.9	56.4
	1 μ M	47.2	57.3
	10 μ M	41.6	56.1

Table 5 The sintillation counts in thymocyte, bursocyte, LL 1104B and BMC L1. Each of cells were incubated with 8×10^{-8} M 3 H-testosterone for 60 minutes under chilled condition

	D P M / 10^6 cells			
	Thymocyte	Bursocyte	BMC L1	LL 1104B
	964	1700	6238	7756
	969	1560	4739	5181
	978	1661	5243	9182
	1147	2147	7620	8166
Mean \pm SD	1015 \pm 88.5	1767 \pm 260.1	5960 \pm 1269.9	7571 \pm 1702.5

Table 5は、LL 1104B, BMC L1 両腫瘍細胞とTおよびBリンパ球に対する 3 H-テストステロンの結合量を示したものである。それぞれの細胞におけるDPMすなわち結合量は、生細胞 10^6 個あたり、Tリンパ球で1015、Bリンパ球で1767、BMC L1で5960そしてLL 1104Bで7571であり、Bリンパ球では、Tリンパ球の2倍弱、さらに、LL 1104BおよびBMC L1では、Bリンパ球の4倍程度という大量のテストステロンが結合することがわかった。

考 察

テストステロンのほか、エストラジオール、コルチコステロンおよびデキサメサゾンに対して、マレック病ならびにリンパ腫症の腫瘍リンパ球が感受性を有していることが明らかとなった。さらに、コレステロールでは、両腫瘍細胞ともに影響を受けなかったことから、これらの腫瘍細胞に対する抑制効果は、ステロイドホルモンの薬理作用に基づくものであり、Bリンパ球やTリンパ球を含めたステロイドホルモンの標的細胞と同様に、これらの腫瘍細

胞は、ステロイドホルモンに対するリセプターを有することが想像される。なお、本試験で用いた2種のグルココルチコイドが、2種の腫瘍細胞に対して、相反する抑制効果を有することについては、その理由は不明であった。

著者らは^{6,7)}、すでに、Bリンパ球がTリンパ球に比較し、テストステロンと特異的に結合することを観察しているが、今回の試験においても、それが確認された。腫瘍細胞では、さらに大量のテストステロンが結合すること、一方、テストステロンによる抑制効果は、Bリンパ球および両腫瘍細胞には認められるが、Tリンパ球には認められないことから、腫瘍細胞における増殖の抑制ならびにBリンパ球のテストステロンに対する選択的な感受性は、大量のテストステロンが細胞に結合することに伴うものであると考えられる。他のステロイドホルモンの効果も、テストステロンと同様の機序によるものと考えられる。

鳥類では、リンパ球は、BFおよび胸腺で、数回分裂をくり返したのち、成熟リンパ球として、末梢に放出されるものとされている。腫瘍リンパ球であるLL 1104BおよびBMC L1は、未分化の幼若型リンパ球であると考えられる。Tリンパ球由来のBMC L1では、大量のテストステロンが結合すると同時に、テストステロンに対する高い感受性が認められる一方、Tリンパ球では、テストステロンの結合量は少なく、感受性も持たないことから、リンパ球のうち、Tリンパ球は、未分化の時期にはテストステロンに対する感受性を有しているが、胸腺で分化成熟する段階のいずれかの時期に、テストステロンに対する感受性を失なうものと考えられる。対照的に、Bリンパ球は、分化成熟する間にも、テストステロンに対する結合能力および感受性を保持し続けるものと思われる。

今後、ステロイドホルモンの腫瘍細胞に対する効果をさらに調査するにあたり、増殖抑制の機序、すなわち、細胞数の減少が、ステロイドホルモンによる細胞分裂の阻害によるものか、あるいは、細胞に対する直接的な障害作用に基づくものかが検討される必要がある。

摘 要

ニワトリのマレック病およびリンパ腫症の腫瘍リンパ球増殖に及ぼすテストステロンほか各種ステロイドホルモンの効果ならびに³H-テストステロンに対するそれらの細胞の結合量を調べた。さらに、正常リンパ球におけるテストステロンの効果およびその結合量を調べた。

テストステロンのほか、エストロゲンおよびグルココルチコイドにおいて、両腫瘍細胞あるいは一方の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果が観察された。正常リンパ球では、テストステロンは、Bリンパ球の生存率を減少させたが、Tリンパ球に対する効果はなかった。³H-テストステロンに対する結合量は、腫瘍細胞では多量で、Bリンパ球でも比較的多かったが、Tリンパ球では少なかった。

以上の結果から、腫瘍細胞を含めたリンパ球におけるステロイドホルモンの効果は、多量のステロイドホルモンが細胞に結合することに基づくものと結論された。さらに、リンパ球の分化に関して、Tリンパ球は成熟のある時期にテストステロンに対する感受性を失なう一方、Bリンパ球は、その感受性を保持し続けることが示唆された。

文 献

- 1) DIETER, M. P. and R. P. BREITENBACH : Proc. Soc. Biol. 133, 357-364 (1970)
- 2) GLICK, B. : Endocrinology 69, 984-985 (1961)
- 3) GLICK, B. : Poultry Sci. 36, 18-23 (1957)
- 4) 加藤四郎 : 日獣会誌 30, 666-673 (1977)

- 5) KIRKPATRICK, C. M. and F. N. ANDREWS : *Endocrinology* 134, 340-345 (1944)
- 6) 近藤康博・佐藤孝二・江口敬子 : *日本免疫学会記録* 8, 400 (1978)
- 7) KONDO, Y., K. EGUCHI and K. SATO : *Gen. Comp. Endocrinol.* (投稿中)
- 8) MURAKAMI, T., D. BRANDON, D. ROBBARD, D. L. LORIAUX and M. B. LIPSETT : *Endocrinology* 104, 500-505 (1979)
- 9) RIDDLE, O. : *Amer. J. Physiol.* 86, 248-252 (1928)
- 10) ROLAND, K., M. MEYER, R. APPASMAMY and R. L. ASPINALL : *Endocrinology* 64, 890-897 (1957)
- 11) SULLIVAN, D. A. and C. R. WIRA : *Endocrinology* 122, 2617-2623 (1979)
- 12) 渡辺守松 : *畜産の研究* 30, 35-40 (1976)