

# 摘脾の腫瘍増殖と細胞性免疫に及ぼす 影響に関する実験的研究

岡山大学医学部第1外科教室（主任：折田薫三教授）

岡 田 剛

（昭和54年11月27日受稿）

**Key words**：摘脾と腫瘍，摘脾と細胞性免疫，  
摘脾の抗腫瘍効果，摘脾とマウス腫瘍，  
摘脾と MIF

## 緒 言

免疫学の進歩と共に、免疫発現の仕組みが複雑にして巧妙につくられていることが次第に明らかとされている。その中で癌の免疫も漸く明らかとされ、人癌をも含めて癌細胞の膜面にはその発生母地にはない腫瘍特異移植抗原 (TS-TA) をはじめ各種の腫瘍関連抗原があって、癌の免疫は同種移植免疫の場で考えられる面の大きいことが知られてきた。癌の場合には、その担癌宿主が自己に発生した癌をある時期までは非自己と認識して細胞性免疫を発動し、腫瘍に抵抗をしめす各種の免疫反応が生ずる。comcomitant immunity として一括されている。しかし、同種正常組織移植の場合とは異なり、癌の場合の comcomitant immunity は進行癌では低下消失し、癌は拒絶されることなく無限に増悪して宿主を腫瘍死に至らしめる<sup>1)2)</sup>。癌が宿主の comcomitant immunity を回避する機構は、癌の免疫学的逃避として研究され、この機構の解明が癌制御の決め手とさえ考えられている。

教室の原<sup>3)</sup>は、すでに十余年前 Ehrlich 腹水癌細胞  $5 \times 10^6$  コをマウスの背部皮下に移植し、経日的に局所腋窩リンパ節、脾、遠隔の腸間膜リンパ節のリンパ球の殺腫瘍効果を *in vitro* の lymphocytotoxicity test で検索している。移植5日目頃より局所腋窩リンパ節や脾に抗腫瘍性が生じ、次第に増強して10~14日目に最強に達し、癌の進行した3日目よりは減弱消失することをはじめて明らかとし、つづいて湯村<sup>4)</sup>は上述のように Ehrlich 癌を移植した後、経日的に

リンパ節、脾の Ehrlich 癌抗原に対するマクロファージ遊走阻止活性を測定している。局所腋窩リンパ節と脾の阻止活性は、同部のリンパ球の殺腫瘍活性よりも出現が速く、移植3日目より生じて5~7日目に最強となり、移植2週目には消失する。すなわち、comcomitant immunity は、Ehrlich 癌移植の場合、リンパ球の殺腫瘍活性からみても、マクロファージ遊走阻止活性からみても、進行癌では消失することがしめされている。こういった免疫学的逃避の理由として多くのものが考えられているが、その中の主要因子として腫瘍抗原に対してつくられた液性抗体 IgG および IgG と可溶性腫瘍抗原の結合物である免疫阻止因子 (blocking factor) および suppressor T 細胞が挙げられよう。動物種によって差異があるようであるが、少なくともマウスでは脾が主要なる IgG 抗体産生の場であり<sup>5)</sup>、suppressor T 細胞の常在する臓器といわれている<sup>6)</sup>。こういった視点から、担癌生体で摘脾を行なえば免疫学的逃避の機構がくずれ、ひいては腫瘍の増殖が抑制される可能性が出てこよう。文献的にみると immunological enhancement 現象の立場から、腫瘍移植前に摘脾して腫瘍の生着率や増殖速度を検討した報告が多いが<sup>7-9)</sup>、癌の免疫学的逃避の打破を企図して腫瘍の生着後に摘脾し、その影響をみた報告はほとんどみあたらない。本研究では Ehrlich 癌をマウスに移植する前後で摘脾し、腫瘍の増殖状態の観察と、局所腋窩リンパ節細胞のマクロファージ遊走阻止活性の推移の検討より、担癌マウスにおける摘脾の意義を明らかにしようとした。比較

的早期の癌には摘脾が制癌性に作用する可能性のあるという興味ある知見を得たので報告する。

#### 実験材料ならびに実験方法

実験動物：生後4～6週令の体重20g前後のDDS系マウス270匹を藤井動物社（神戸）より購入し、水と固型飼料MF（東洋醸造KK）で飼育した。モルモットは雑系で市販のものをを用い、モルモット用の固型飼料で飼育した。

実験腫瘍：Cb系マウスの腹腔に継代移植されたEhrlich腹水癌細胞を岡山大学癌源施設病理部門より分与され、DDS系マウスに継代して使用した。

腫瘍移植：DDS系マウスの腹腔にEhrlich腹水癌細胞 $5 \times 10^6$ コ移植5日後の無血性の純培養状態の癌性腹水を採取し、DDS系マウスの背部肩甲骨甲に $5 \times 10^6$ コ/マウス皮下移植し、移植7日前にマウスを任意に4群に分けた（第I～IV群）。次に移植7日前任意に2群（第V, VI群）のマウスをつくり、Ehrlich癌細胞 $5 \times 10^5$ コ/マウスを同様に移植した。

摘脾：第II, III, IV群ではそれぞれ移植7日前、移植後5日目、移植後10日目、第VI群では移植後10日目にそれぞれ開腹摘脾した。摘脾はエーテル吸入麻酔下に左側腹部に斜切開を加えて開腹、脾門部を絹糸で結紮の後切離して摘脾、出血なきを確かめ、腹壁を絹糸にて全層一層縫合して手術を終了、第1, 第V群はそれぞれ偽摘脾対照群とし、移植7日前に摘脾群と同様な方法により摘脾することなく開腹と閉腹を行った。

マクロファージ遊走阻止活性の測定：毛細管直接法に依った<sup>10)</sup>。

(1)リンパ球浮遊液の調整：各群より平均的な大きさをもつマウス3匹づつを選び、エーテル麻酔下に腋窩リンパ節を摘出し、シャーレに入れ、生理的食塩水を少量加えて細切する。30分放置後ガラス壁に付着した細胞を除去する。浮遊細胞を80メッシュ・フィルターで濾過し、0.35%の低張食塩水を加えて混入している赤血球を溶解し、ついで3.65%の高張食塩水を加えて等張としHanks液を加えて1,500rpm, 10分遠心洗浄する。洗浄リンパ球にセファロチン加20%仔牛血清TC-199培養液を加えてリンパ球浮遊液( $5 \times 10^6$ /ml)とする。

(2)腫瘍抗原の作製：Ehrlich腹水癌細胞 $5 \times$

$10^6$ コDDSマウスの腹腔内に移植5～10日目の純培養状態の癌性腹水を遠心し、腫瘍沈渣1gあたりHanks液5mlを加え、超音波20kc, 7φチップ, 150mAで5分破壊する。3000rpm, 30分遠心して、その上清を抗原液とする。ガラス・アンプルに分注封入して $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結保存しておく、予備実験より実際にMIF測定に用いる至適添加抗原量は蛋白量にして10～100mcg/mlであり、用に臨みこの濃度に培養液でアンサンブル内の抗原原液を稀釈する。

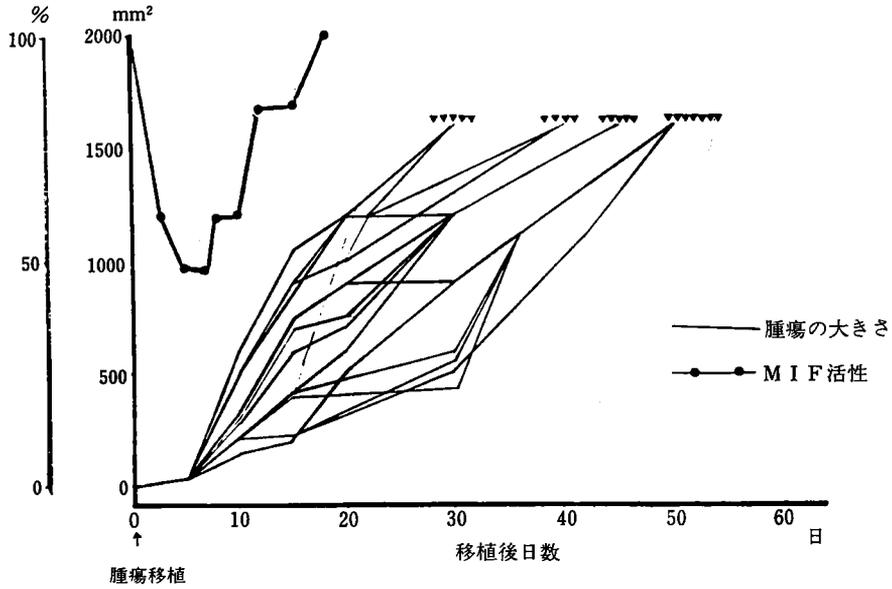
(3)モルモット腹腔内浸出細胞の採取：体重300～500gの大きいモルモットの腹腔内に滅菌流動パラフィン20mlを注入し、4～6日後にエーテル麻酔下に頸動脈切断により脱血、無菌的に腹腔を開き冷Hanks液150mlで洗浄する。洗浄液を集め800rpm,  $250 \times G$ , 5分で遠心して上層のパラフィンを吸引除去する。下層の腹腔内浸出細胞をHanks液で2～3回洗浄する。60%以上が大食細胞である。培養液中に $2 \sim 5 \times 10^8$ /mlに浮遊させる。

(4)マクロファージ遊走阻止試験の手技（MIFテスト）：被検リンパ球浮遊液と腹腔内浸出細胞浮遊液を1：4（V/V）の割合に混合し、一端を閉じたヘマトクリット管に陰圧法により吸い上げる。開口端を上にして800rpm,  $250 \times G$ , 5分遠心し、ヘマトクリット管を細胞層と液層の境で切断、ついで容量1mlのMackness型の極小ミヤールの底に円形カバーグラスを敷き、細胞層の切断端を内方に向け閉鎖端をシリコン・グリスで固定する。腫瘍抗原含有の培養液1mlを静かに加え、気泡の入らぬ様注意してカバーグラスで蓋をする。抗原非含有の培養液のみを加えたものを対照とする。ついで $37^{\circ}\text{C}$ , 24時間静置培養する。培養終了後極小ミヤールをビューア上に透影し、毛細管開口端より遊走してくるマクロファージの扇形陰影の縦径×横径を計測し、その積を遊走面積とする。

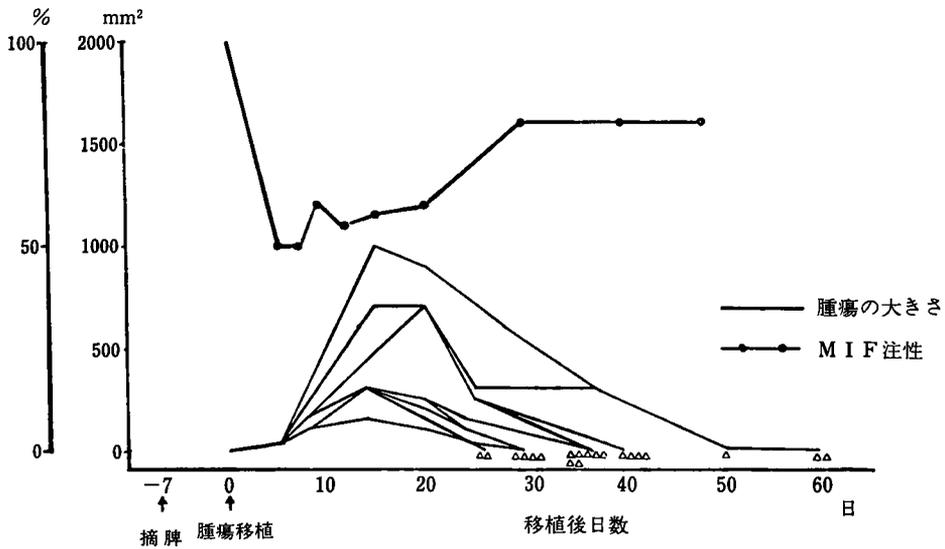
$$\frac{\text{抗原添加時の遊走面積}}{\text{抗原非添加時の遊走面積}} \times 100 (\%)$$
を遊走指数とする。1被検体につき4本の細胞封入ヘマトクリット管をつくり、それらの遊走面積の平均値を抗原添加時、非添加時の遊走面積として、遊走指数が85%以下を陽性とする。

図1 摘脾の腫瘍増殖および担癌マウスの生存期間に及ぼす影響  
(Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^6$  コ/マウス移植群)

1-a 移植7日前偽摘脾群 (第I群)



1-b 移植7日前摘脾群 (第II群)



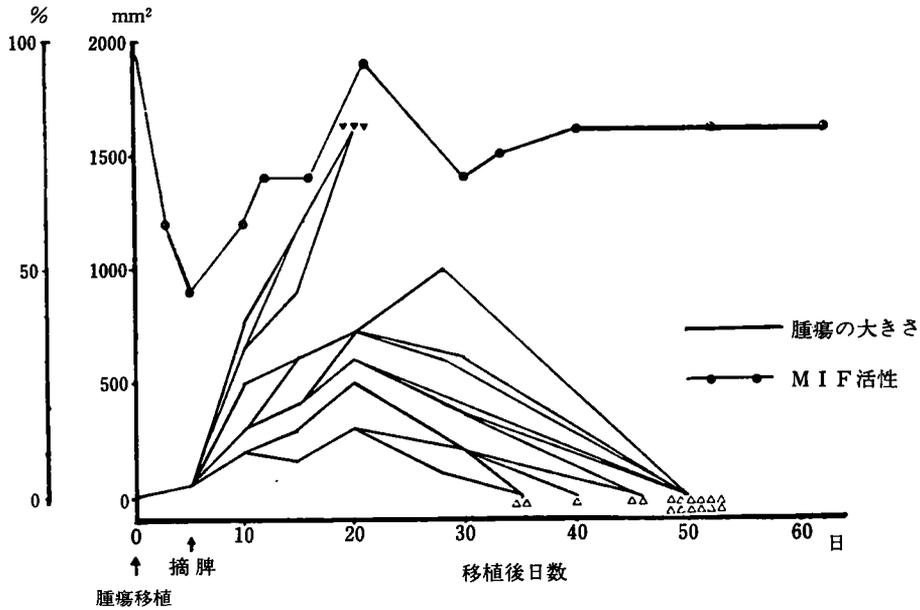
実験結果

1. 摘脾の腫瘍増殖および担癌マウスの生存期間に及ぼす影響

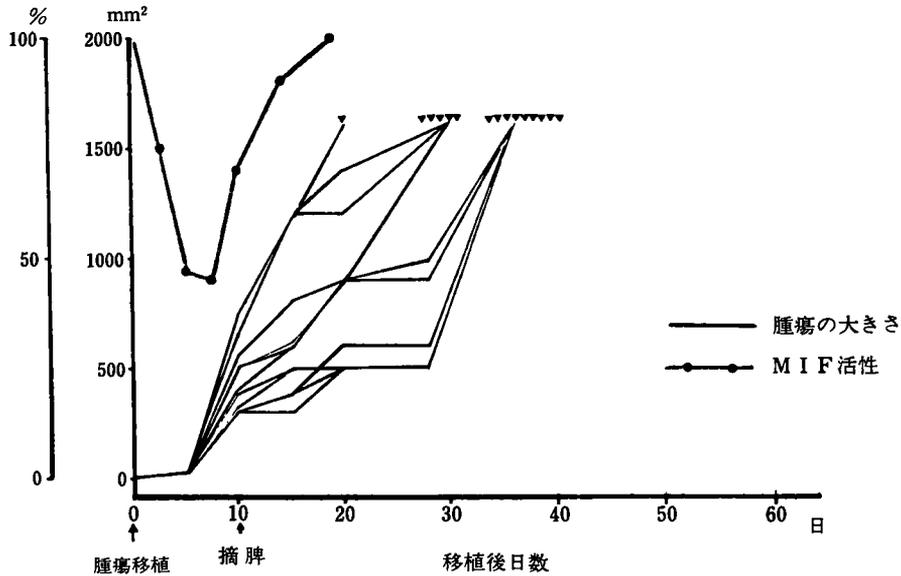
Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^6$  コ/マウス移植群

(1)腫瘍移植7日前に偽摘脾手術を受けた第I群: 21匹のマウスでfollow upしている. 図1-aのごとく, 腫瘍移植全例において腫瘍が増殖し

1-c 移植5日後摘脾群 (第III群)



1-d 移植10日後摘脾群 (第IV群)



つづけ、腫瘍移植5～7日目に腫瘤触知可能となり30～50日で全例腫瘍死する。平均生存日数は40日である。

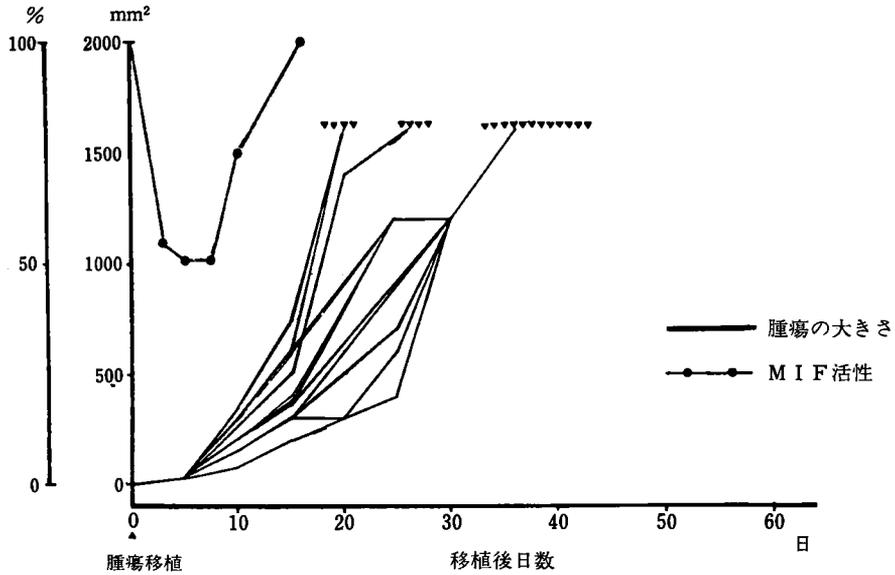
(2)腫瘍移植7日前摘脾手術を受けた第II群：追跡のできたもの20匹であるが、図1-bのごとく、腫瘍移植7日前後で腫瘤触知可能となり、

15日～20日目に最高の700～1000mm<sup>2</sup>増殖後、30～60日目にほぼ完全に退縮するものが10例、移植後増殖することなく硬結様に触知し、30日以内に完全退縮するものが10例であり、いずれも全例が完全退縮して全例とも生存する。

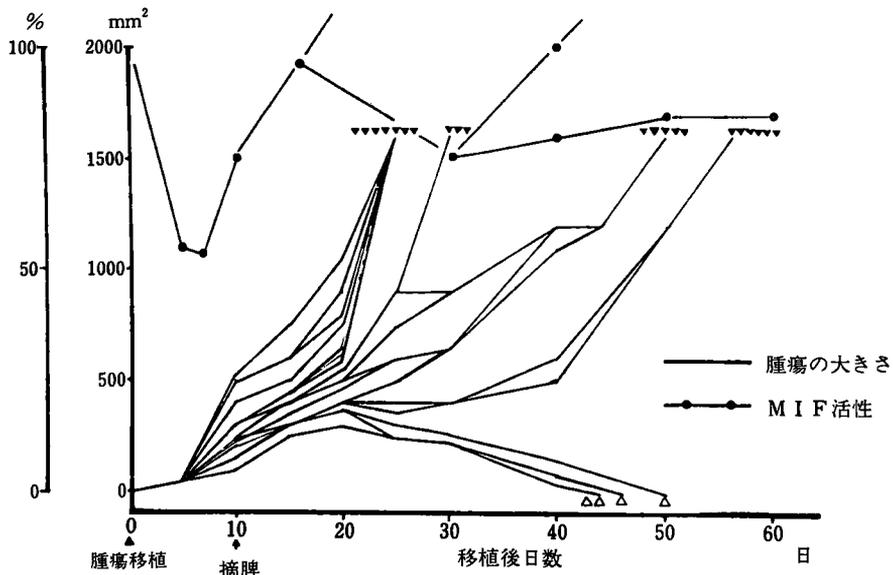
(3)腫瘍移植5日目摘脾手術を受けた第III群：

図2 摘脾の腫瘍増殖および担癌マウスの生存期間に及ぼす影響  
(Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^5$  コ/マウス移植群)

2-a 移植7日前偽摘脾群 (第V群)



2-b 移植10日後摘脾群 (第VI群)

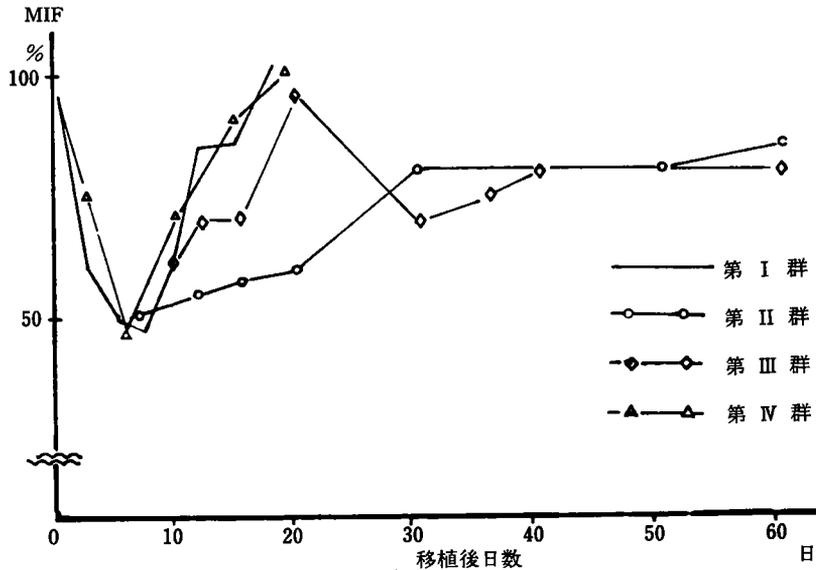


腫瘍移植7日目、摘脾後2日目には全例で腫瘍触知可能となり、3例では対照群(第1群)に比し摘脾後の腫瘍の増殖速度が大きく、移植20日目に1600mm<sup>2</sup>大の腫瘍になり腫瘍死している。残りの17例は第II群の移植7日前摘脾群と似た

腫瘍増殖・退縮曲線をえがき移植34日から50日目に完全退縮している(図1-c)。

(4)腫瘍移植10日目摘脾手術を受けた第IV群: 移植10日目、摘脾当日には背部皮下腫瘍は小指頭大に増殖している。摘脾後の腫瘍の増殖速度

図3 摘脾の担癌マウス・マクロファージ遊走阻止活性に及ぼす影響  
(Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^6$  コ/マウス移植群)



は対照群 (第 I 群) のそれよりも速く、1 例は移植 20 日目に、19 例は 28 日から 40 日目に大きな腫瘍を形成して腫瘍死している。平均生存日数は 34 日であり、第 I 群のそれに比較して、T-検定で  $0.02 > P > 0.01$  と有意に早期に腫瘍死している (図 1-d)。

Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^5$  コ/マウス移植群

(1)腫瘍移植 7 日前に偽摘脾手術を受けた第 V 群: 20 匹のマウスで follow up している。図 2-a のごとく腫瘍移植後全例において急速に腫瘍が増殖しつづけ 20~44 日で全例腫瘍死している。4 例は 20.4 日、4 例は 26.6 日、12 例は 36.6 日の 3 群に大別され、平均 32.4 日で腫瘍死する。

(2)腫瘍移植 10 日目摘脾手術を受けた第 VI 群: 25 匹で follow up が出来ている。図 2-b のように 3 群に区別される。10 例は第 V 群の対照群と同様摘脾後も急速に腫瘍が増大し平均 25.4 日で腫瘍死している。11 例は腫瘍増殖が緩徐であり 54.5 日で腫瘍死。残余の 4 例は移植 20 日目までは腫瘍増大の傾向をしめすものの 42 日から 50 日目には完全退縮している。

2. 摘脾の局所腋窩リンパ節細胞のマクロファージ遊走阻止活性に及ぼす影響

Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^6$  コ/マウス移植群 (図 3)

(1)腫瘍移植 7 日前に偽摘脾手術を受けた第 I

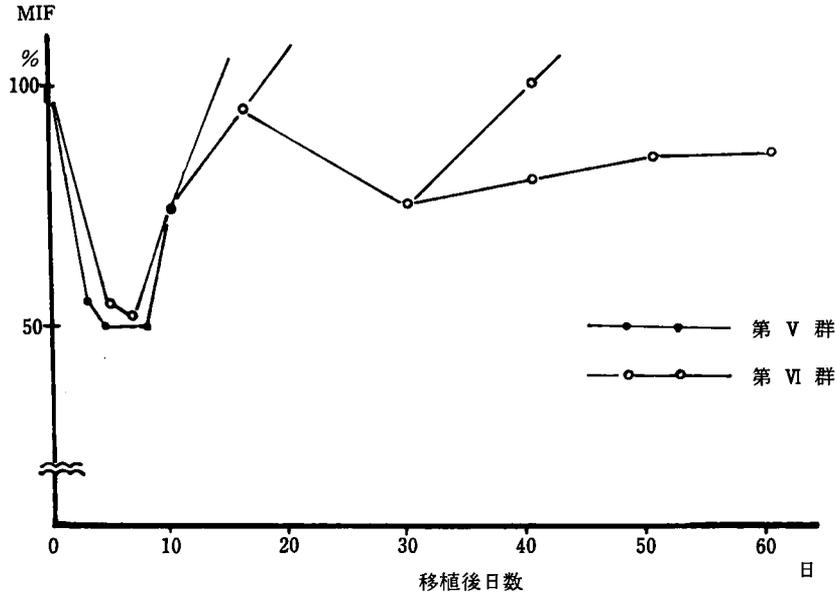
群: 腫瘍移植 3 日目には遊走指数 60% と MIF 陽性となり、腫瘍触知可能となる 5 日前後に最強となる。以後腫瘍の増殖と共に急速に MIF は減弱し、移植 2 週後には完全に消失している。

(2)腫瘍移植 7 日前摘脾手術を受けた第 II 群: 移植後 7 日目までは第 I 群とほぼ同一の推移を MIF はしめすが、移植 12 日目には平均  $300 \text{mm}^2$  大の腫瘍をもっているにもかかわらず MIF は 55% と強陽性となり、腫瘍の退縮しはじめる移植後 20 日以降も 80% と陽性である。完全退縮したマウスにおいても腫瘍の退縮後 10~20 日間は少なくとも MIF は陽性に止まっている。

(3)腫瘍移植 5 日目摘脾手術を受けた第 III 群: 摘脾後腫瘍の増殖速度の遅いグループでは、移植 10 日目に MIF 60% と強陽性をしめし、平均  $500 \text{mm}^2$  大の腫瘍をしめす移植 20 日目には一度 MIF 95% と陰転するも、腫瘍の退縮と共に MIF は陽性となる。完全退縮したマウスでは、退縮後も MIF は 10~20 日間弱陽性に維持されている。

(4)腫瘍移植 10 日目摘脾手術を受けた第 IV 群: MIF は対照群とほぼ同様の推移をしめし、移植 10 日目には MIF 70% と陽性をしめすものの、腫瘍が  $500 \text{mm}^2$  大を超える移植 14 日目にはすでに 90% と陰転する。腫瘍死しはじめる 19 日目には、MIF は完全に消失する。

図4 摘脾の担癌マウス・マクロファージ遊走阻止活性に及ぼす影響  
(Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^5$  コ/マウス移植群)



Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^5$  コ/マウス移植群(図4)

(1)腫瘍移植7日前に偽摘脾手術を受けた第V群: 腫瘍解知の出来ない移植3日目に MIF は 55%と陽性となり, 移植1週前後に最強をしめす。以降急速なる腫瘍の増殖と共に MIF は急速に減弱して10日目には75%, 16日目には 100%と MIF は完全に消失する。

(2)腫瘍移植10日目摘脾手術を受けた第VI群: 腫瘍の触知可能となる移植5-7日目にはMIF 55%と強陽性をしめすが, 10日目には75%と減弱傾向を示している。摘脾後の MIF の推移は腫瘍の増殖と同様3グループに大別される。早期に腫瘍死するものでは摘脾10日目には MIF は完全に消失し, 腫瘍増殖の緩徐なものでは摘脾20日目に MIF 75%と陽性であるが, 30日目には消失してくる。摘脾後わずかに増殖して完全退縮をしめすグループでは, 退縮後も MIF は弱陽性をしめす。

考 按

担癌生体は癌細胞の癌持異移植抗原(TSTA)や癌関連抗原に対して種々の免疫反応を呈している<sup>12)</sup>。その中抗腫瘍性に働くものは, 癌細胞に接着してこれを破壊する cytotoxic T 細胞

(Tc 細胞)であり, 癌抗原に接して種々の生物学的活性をもった lymphokines を産出放出する delayed hypersensitivity initiation T細胞(T<sub>D</sub>細胞)である。Lymphokines の中にはマクロファージの遊走を阻止する因子(MIF)やマクロファージを活性化させて癌細胞に障害性に働かせる因子も報告されている。Tc 細胞や T<sub>D</sub> 細胞の分化増殖の過程には種々の T-subset の協同が知られ, その中の1つ helper T 細胞(T<sub>H</sub>細胞)はB細胞の抗原認識から成熟過程に作用して, B細胞が形質細胞となり抗体産生を開始する。抗体 IgG は Tc receptor 活性をもつ K 細胞やマクロファージに結合し, これら細胞を Tc 細胞と同様に癌細胞に接着させてこれを破壊することも知られてきた。すなわち宿主の癌に対する comcomitant immunity としては Tc, T<sub>D</sub>, K, マクロファージが主要なものである。Tc 活性については原<sup>3)</sup>が報告したごとく Ehrlich 癌背部皮下移植3週目より, T<sub>D</sub>活性(MIF)は本実験でみたごとく移植5-7日目を最強として以後腫瘍の増悪と共に移植2週以降には完全に消失する。この comcomitant immunity の低下は癌の免疫学的逃避をしめすものであるが, その機構は癌細胞自体の特性と担癌宿主側の要

因の二方面から検討されている。

1 腫瘍側の要因：まず第1に TSTA や腫瘍関連抗原の免疫原性が弱いということである<sup>2)</sup>。さらにシアル酸で腫瘍細胞の表面が被覆されているために腫瘍抗原の決定基がかくされ、リンパ球による抗原認識はもとより、central arc, efferent arc いずれも宿主の免疫反応が阻害されると考えられている。癌細胞表面の sialomucin を除く Neuraminidase で腫瘍細胞を処理しておけば、免疫原性がたかまり、Tc 細胞への感受性もたかまることが報告されている<sup>11)12)</sup>。今一つは過剰の腫瘍抗原による脱感作あるいは免疫学的寛容状態が考えられる。遅延型過敏性反応の場合にも、喘息などの即時型過敏症の場合と同様、対応の抗原を大量に投与すると脱感作のおこることが知られている。Koldovsky<sup>13)</sup> は変量の X 線照射メチル・コラントレン腫瘍でマウスを免疫するさい、ある一定量までは抗腫瘍性が増強するが 500mg 以上と過剰量で免疫すると抗腫瘍性が減弱して消失するという。パバインで可溶化した腫瘍抗原が Tc 細胞の活性を阻害することも報告されている<sup>14)</sup>。腫瘍細胞膜から腫瘍抗原が離脱して流血中に放出されていると考えられているが、腫瘍があるレベルを越えて増大すると宿主の処理能力を上廻る過剰の腫瘍抗原が遊離して Tc 細胞や T<sub>D</sub> 細胞に結合し、免疫応答の efferent arc を阻害するものといえよう。また、宿主により拒絶はされないが、宿主の抵抗にあって抗原性を変えたり失って宿主の免疫監視機構をくぐり抜けることも知られている。抗体の結合により癌細胞の膜面から抗原が消失し、抗体が除去されない限り抗原の発現が抑えられる現象があり antigenic modulation として知られている<sup>15)</sup>。

2 宿主側の要因：癌抗原に関連した特異的要因と非特異的要因がある。前者には癌抗原に対してつくられた抗体 IgG、抗体と癌抗原の結合物である阻止因子 (blocking factor)<sup>16)</sup>、および特異的な suppressor T 細胞<sup>17)</sup> が挙げられよう。抗体は K 細胞やマクロファージと共にある時は殺腫瘍細胞性に働くことが報告されているが、古くより癌の増殖をかえって促進させる immunological enhancement の主役として周知である。抗体に比し阻止因子の方が細胞性免疫に対する阻止活性が何倍も強く、増殖中の担

癌生体の血清は in vitro で Tc 活性を特異的に阻害する。教室の太田<sup>18)</sup>らは人の大腸癌患者の血清中には、癌が進展するにつれて阻止因子の増量してくること、手術により完全に腫瘍を除去すれば1ヶ月以内に消失することをまず明らかとし、吸収試験によって阻止因子は癌抗原-抗体の複合物であることをしめしている。In vitro で検出される阻止因子が in vivo においても作動していると考えられる。増殖中の polyoma 腫瘍をもったラット血清は in vitro で Tc 活性を阻害するし、in vivo に投与すると腫瘍の増殖を促進する。Rolyoma 腫瘍の同系移植後、腫瘍摘出群と非摘出群をつくると、両群ともに Tc 活性があるのに、阻止因子のない摘出群では阻止因子陽性の非摘出群に比して抗腫瘍性が高く、再移植腫瘍を拒絶する<sup>19)</sup>。この阻止因子は免疫の Tc 活性を含めた efferent arc に強く作用するのみでなく、central arc へも作用してリンパ球自体の分裂増殖を阻害するといわれている。

Suppressor T 細胞 (T<sub>s</sub> 細胞) については藤本ら<sup>20)</sup>の報告が最初であろう。彼らは A/Jax マウスにメチルコラントレン誘発肉腫 10<sup>6</sup> コを皮下移植して7日後に腫瘍を摘出しておくと、抗腫瘍性を獲得して再移植してもこれを15日以内に拒絶されることをまず明らかとしている。この抵抗マウスに移植後7日目の担癌同系マウスの胸腺か脾細胞 (10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> コ) を静注しておくと、抵抗性が消失して両移植腫瘍が生着増殖してくる。腫瘍組織をみても円形細胞浸潤が減少し腫瘍の破壊が阻止されている。前もって胸腺細胞や脾細胞を抗θ血清と補体で処理しておくとも阻止効果が完全に消失することから、これら suppressor 細胞は T 細胞であると同定している。しかも、担癌7日目のマウス血清中には阻止因子が証明されていない。さらに腫瘍移植7日目に摘脾してやると以後の腫瘍増殖が有意に抑制されることもみている。以上から脾に存在する特異的な T<sub>s</sub> 細胞が Tc 活性を阻止するものと結論している。この実験系では T<sub>s</sub> 細胞は腫瘍移植24時間以内に出現し、腫瘍が増悪しつづける限り存続するという。T<sub>s</sub> 細胞は胸腺、脾、局所リンパ節、骨髓細胞中にみられるが、末梢血中には検出されない<sup>21)</sup>。ラット同系メチルコラントレン腫瘍移植でも、担癌ラットの胸腺および脾細胞には特異的な T<sub>s</sub> 細胞の存在

が報告されている。しかし、抗T血清により完全には免疫阻止作用が失われないので、T<sub>s</sub>細胞以外の suppressor 細胞の存在が想定される<sup>22)</sup>。

宿主の非特異的要因としては、その多くが血清因子に求められている。Tリンパ球の最も基本的な活性であるPHA幼若化反応を阻止する多くの物質が報告されているが、主要なものは癌組織に由来する toxohormone や  $\alpha$ ,  $\beta$ -グロブリン分画に含まれる  $\alpha_2$ -globulin, glycoprotein, carcinoembryonic protein など多くのものが報告され、これらはPHA幼若化反応のみならずT細胞の種々の活性を非特異的に抑制することが次第に明らかとされている。また、非特異的に免疫を抑える細胞が担癌生体に存在することも知られている。たとえば、Glaserら<sup>23)</sup>はMoloney肉腫誘発マウスの脾細胞中に *in vitro* でT<sub>c</sub>活性を阻止する免疫抑制細胞の発生することを見ていて、この細胞は $\theta$ 血清にもX線照射にも抵抗性であるという。管壁に付着しカラゲナンで非活性化される点から大食細胞と想定される<sup>24)</sup>。このMoloney肉腫の系では血清中により強い免疫抑制因子が存在し、suppressor マクロファージとあいまって comcomitant immunity を低下させていると思われ。Poupenら<sup>25)</sup>はメチルールコラントレン誘発肉腫担癌マウスの脾細胞中に非特異的な免疫抑制細胞の出現することを見ていて、*In vitro* で正常マウスのT、Bリンパ球のレクチンに対する反応を抑えるという。腫瘍除去後数日以内にこの細胞は消失する。管壁に付着性で non-T 細胞と考えられている。

以上、多くの特異的、非特異的免疫学的逃避機構の中、脾に関連の深いものは脾に多く存在しているB細胞による液性抗体IgG、これに可溶性癌抗原の結合した blocking factor、T<sub>s</sub>細胞、およびマクロファージであろう。ことにマウスでは脾が主要な抗体産生の臓器であり、T<sub>s</sub>細胞も脾に豊富に局在しているという。したがって、摘脾を行えばこれら免疫学的逃避を来す要因の大半が担癌生体より失われることとなり、comcomitant immunity の中心であるT<sub>c</sub>、T<sub>D</sub>を中心とした細胞性免疫が十二分に活性化し、全体として腫瘍の増殖の阻止が起こるものと期待されよう。摘脾と腫瘍増殖についてみると、脾は少なくともマウスでは二重の役割をもつか

のようである。少量のメラノームをマウスに移植するさいには、脾の存在する方が抗腫瘍性に作用して腫瘍増殖を抑えるが、比較的大量の腫瘍を移植するさいには脾の存在がかえって腫瘍の増殖を促進させる<sup>26)</sup>。摘脾の時期も極めて重要な因子のごとくであって、sarcoma I の同種移植のさい、移植3週間前に摘脾しておくで最強の抗腫瘍効果がえられるが、2、4週間前の摘脾ではその効果は減弱する。1週間前の摘脾ではむしろ腫瘍の増殖を促進させるという<sup>27)</sup>。本実験においては、Ehrlich癌という non-specific tumor でどの系統のマウスにも容易に生着して腫瘍死せしめる比較的抗原性の低く増殖性の強い腫瘍を用いて、移植後の摘脾においても抗腫瘍増殖性に働くことをみた点は強調されてよい。Ehrlich癌 $500 \times 10^4$ コ移植の場合、移植1週間前に摘脾しておくで最強の抗腫瘍増殖性がえられ一度増殖するものの全例において完全退縮がみられる。腫瘍が生着増殖しはじめる時期の移植後5日目に摘脾しても強い抗腫瘍性がえられる。20匹中3匹は非摘脾対照群と同様に急峻なる腫瘍増殖曲線をえがいて腫瘍死するが、17匹は完全退縮して腫瘍死を遁れる。退縮に至るマウスでは comcomitant immunity の1つの指標である局所腋窩リンパ節のT<sub>D</sub>活性も強く長期間陽性に維持されている。しかし、T<sub>D</sub>活性の減弱・消失しはじめる移植10日目、腫瘍が小指頭大となった時期に摘脾すると以後の腫瘍増殖はむしろ促進され対照に比しむしろ早期に腫瘍死する。T<sub>D</sub>活性も対照群のそれと同様急速に消失してくる。移植5日目の摘脾は極めて有効、10日目の摘脾では無効ないしむしろ、adverse effect のあることの説明は容易ではない。Ehrlich癌細胞 $50 \times 10^4$ コ移植の場合には、移植10日目の摘脾でも約半数に抗腫瘍効果があり、T<sub>D</sub>活性も弱陽性に保たれている。摘脾時の腫瘍量、換言すれば摘脾時の comcomitant immunity の状態と摘脾の抗腫瘍効果が関連するかも知れない。 $500 \times 10^4$ コ移植でT<sub>D</sub>活性の低下しはじめた10日目の摘脾群では、宿主にとり手術侵襲が過大であって手術侵襲により免疫の術後低下が大きいという可能性がある。今1つ比較的早期の癌にはT<sub>c</sub>活性やT<sub>D</sub>活性が抗腫瘍増殖性に働き、進行癌ではIgGの関与しているK細胞やマクロファージによるADCC活性が抗腫瘍性の

主体をなしている可能性である。今後の腫瘍免疫学の進歩にまたなくてはならない。

摘脾の抗腫瘍効果は動物種により差があるようである。たとえば Jessup ら<sup>28)</sup>は近交系モルモットに line-10 肝癌を同系移植する腫瘍系で摘脾の効果をみている。離乳時のモルモットに摘脾しておき2ヶ月後に腫瘍移植しているが、偽摘脾対照群との間に腫瘍増殖の差をみていない。生後3ヶ月の成熟モルモットに腫瘍移植して4日目に摘脾しても腫瘍増殖に変化はみられないが、移植11日目に摘脾するとかえって腫瘍の増殖が促進されるという。マウスの腫瘍系では摘脾により血清中の阻止因子の低下することすなわち脾が阻止因子に関与する主要な臓器であることが知られているが、この line-10 肝癌の系では血清中に阻止因子が証明されず抗腫瘍性はリンパ球よりもむしろマクロファージに強いという。したがって、摘脾の抗腫瘍効果がみられなかったものと思われる。ところが人の場合はどうであろうか。教室の太田ら<sup>18)</sup>の研究からみると、進行癌では血清中に高濃度の阻止因子の出現すること、腫瘍の切除により早急に消失することが解っているが、脾がその成分である IgG 産生の主要な場であるかどうか結論されない。ただ脾機能亢進症や悪性リンパ腫などで摘脾を受けた患者が統計学的にみて致命的な販血症に罹患し易いことを考えると脾が IgG 産生の主要な場として良さそうである。摘脾の人癌に及ぼす影響に関する報告はほとんどみあたらないが、教室の湯村ら<sup>29)</sup>が集めた胃癌症例によると、症例数の少ないため有意差はないが胃癌 Stage I, II の治癒切除症例で出血のために摘脾を受けた群の生存率が非摘脾群のそれを上回っている。人の腫瘍免疫とマウスのそれとの異同がより詳細に明らかとなれば、人癌においても癌制圧を意図しての摘脾が本格的に臨床に組み込まれる場合があるものと考えられる。

## 結 語

摘脾しておいて後から腫瘍移植して、摘脾が抗腫瘍増殖性に働くという報告は比較的多くみられるが、腫瘍の生着・増殖後に摘脾した報告はほとんどみられない。本研究では、担癌マウスにおける摘脾の意義を明らかとするために、マウスへ Ehrlich 癌を移植する前後で摘脾を行

い次の結果をえた。DDS 系成熟マウスの皮下に Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^6$  コ/マウス、 $5 \times 5$  コ/マウスを移植し、移植前後で摘脾し、腫瘍の大きさの経日的計測および局所腋窩リンパ節細胞のマクロファージ遊走阻止活性の経日的推移を検討した。マクロファージ遊走阻止活性は Ehrlich 癌細胞の超音波破壊遠心上清を抗原とし、指示細胞をモルモットの腹腔内浸出細胞とする毛細管直接法で測定した。

1 摘脾の腫瘍増殖および担癌マウスの生存期間に及ぼす影響

Ehrlich 癌  $5 \times 10^6$  コ/マウス移植群

(1)腫瘍移植7日前偽摘脾手術群(第I群)：全例とも腫瘍移植5～7日目より腫瘍触知可能となり30～50日で全例腫瘍死する。

(2)腫瘍移植7日前摘脾手術群(第II群)：腫瘍移植7日前後で腫瘍の触知可能となり、一度生着・増殖するものの全例とも移植60日以内に完全退縮する。

(3)腫瘍移植5日後摘脾手術群(第III群)：腫瘍移植7日目で腫瘍触知可能となり、15%の症例では第I群と同様の腫瘍増殖曲線をとり腫瘍死するが残余の85%のマウスは第II群と似た経過をとり完全退縮する。

(4)腫瘍移植10日後摘脾手術群(第IV群)：第I群よりもかえって腫瘍の増殖が速く、第I群に比して早期に腫瘍死する。

Ehrlich 癌細胞  $5 \times 10^5$  コ/マウス移植群

(5)腫瘍移植7日前偽摘脾手術群(第V群)：第I群と同様に急速に腫瘍が増殖して、全例腫瘍死する。

(6)腫瘍移植10日後摘脾手術群(第VI群)：25例中10例は第V群と同様に腫瘍死する。11例には著明なる腫瘍増殖の遅延があるが終局的には腫瘍死する。4例は一度腫瘍増殖があるものの完全退縮している。

2 摘脾の局所腋窩リンパ節細胞のマクロファージ遊走阻止活性に及ぼす影響

いずれの群においてもマクロファージ遊走阻止活性は腫瘍増殖と密接な関係があつて、移植後急速に腫瘍が増殖の一路をとる第I, 第V群では腫瘍触知可能となる移植5日目頃に遊走阻止活性が最強となり2週間前後で減弱・消失している。摘脾により腫瘍の完全退縮する例では、腫瘍の増殖中も弱いながらも遊走阻止活性は陽

性で、完全退縮後も2退間は陽性に止まる。腫瘍増殖の遅延する例では遊走阻止活性は弱陽性であるが、腫瘍が大きくなると消失してくる。

以上より、比較的抗原性の低い増殖性の強い Ehrlich 癌において、移植前のみならず移植後も比較的早期、すなわち腫瘍のあまり大きくない時期に摘脾を行えば以後の腫瘍の増殖が抑えられるが、進行癌になって摘脾するとかえって腫瘍の増殖が促進されることをみた。comcomitant immunity の1つマクロファージ遊走阻止

活性も摘脾の有効例では陽性に保たれている。早期癌には摘脾は有意義と考えられる。

#### 謝 辞

稿を終るにあたり御指導を受けた岡山大学医学部第一外科教授 折田薫三先生、東研究室の諸兄に深甚の謝意を表する。

本論文の要旨は、第33回日本癌学会総会にて発表した。

#### 参 考 文 献

1. 折田薫三：消化器癌の免疫能。消化器外科，2，51-58，1979.
2. 折田薫三：癌と細胞性免疫。臨床免疫，4，823-832，1972.
3. Hara, S.: Cellular antibody in mice bearing Ehrlich cancer, 1. A quantitative study on antitumor activity of cellular antibody *in vitro*. *Acta Med. Okayama* 19, 91-98, 1965.
4. Yumura, M.: Macrophage migration inhibition- activity after implantation of methylcholanthrene induced sarcoma, Ehrlich ascites cancer or mouse ascites hepatoma-134 cancer cells in mice. *Acta Med. Okayama* 30, 37-48, 1976.
5. Adler, F.L.: Studies on mouse antibodies I. The response to sheep red cells. *J. Immunol.* 95, 26-38, 1965.
6. Sampson, D., Glotueschen, C. and Kauffman, H.M.Jr.: The human splenic suppressor cell, *Transplantation* 20, 362-367, 1975.
7. Ferrer, J.F. and Mihich, E.: Effect of splenectomy on the regression of transplantable tumors. *Cancer Res.* 28, 1116-1120, 1968.
8. Check, J.H., Brady, L.W., Leipold, P.L. and O'Neill, E.A.: Protection against transplanted and spontaneous lymphoma by inoculation of altered syngenic tumor cells in splenectomized mice. *Cancer* 34, 197-203, 1975.
9. Akamatsu, Y.: Neoplasms in strains of splenectomized mice after a single 7, 12- dimethylbenz [a]-anthracene treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 893-897, 1975.
10. 折田薫三：マクロファージ遊走阻止試験。癌と化学療法，2，699-704，1975.
11. Currie, G.A. and Bagshawe, K.D.: The role of sialic acid in antigenic expression: Further studies of the Laudschus ascites tumor. *Br. J. Cancer* 22, 843-853, 1968.
12. Currie, G.A. and Bagshawe, K.D.: Tumor-specific immunogenicity of methylcholanthreneinduced sarcoma cells after incubation in neuraminidase. *Br. J. Cancer* 23, 141-149, 1969.
13. Koldovsky, P.: *Tumor Specific Transplantation Antigen*, Springer-Verlag, N. Y. p. 46, 1969.
14. Baldwin, R.W., Price, M.R. and Robins, R.A.: Inhibition of hepatoma-immune lymph-node cell cytotoxicity by tumor-bearing serum, and solubilized hepatoma antigen. *Int. J. Cancer* 11, 527-535, 1973.
15. Old, L.J., Stockert, E., Boyce, E.A. and Kim, J.H.: Antigenic modulation: Loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon *in vitro*. *J. Exp. Med.* 127, 523-539, 1968.
16. Sjögren, H.O., Hellström, I., Banasal, S., Warner, G.A. and Hellström, K.E.: Elution of "Blocking factors" from human tumors, capable of abrogating tumor-cell destruction by specifically immune lym-

- phocytes. *Int. J. Cancer* 9, 274-283, 1972.
17. Mikulski, S.M. and Muggia, F.M.: The suppressor mechanisms and their significance in tumor immunology. *Cancer Immunol. Immunother.* 4, 139-142, 1978.
  18. 太田 保, 小長英二, 浜崎啓介: 癌細胞に対する細胞性抗体 (第23報): 大腸癌患者の細胞性免疫並びに阻止抗体について. 第35回癌学会総会記事, p. 71, 1976.
  19. Sjögren, H.O. and Bansal, S.C.: Antigens in virally induced tumors. In *Progress in Immunology*, ed. B. Amos Academic Press, London and New York pp. 921-938, 1971.
  20. Fujimoto, S., Green, M.I. and Sehon, A.H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. I. Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts. *J. Immunol.* 116, 791-799, 1976.
  21. Fujimoto, S., Green, M.I. and Sehon, A.H.: Regulation of the immune response to tumor antigens. II. The nature of immunosuppressor cells in tumors-bearing hosts. *J. Immunol.* 116, 800-806, 1976.
  22. 山岡 博, 石井良文, 上野洋男, 内沢公伸, 菊地浩吉: 腫瘍持異免疫反応における免疫細胞の解析. 第35回日本癌学会総会記事, p. 174, 1976.
  23. Glaser, M., Kirchner, H., Holden, H.T. and Herberman, R.B.: Inhibition of cell-mediated cytotoxicity against tumor-associated antigens by suppressor cells from tumor-bearing mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 56, 865-867, 1976.
  24. Fernbach, B.R., Kirchner, H., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: Suppression of mixed lymphocyte response in mice bearing primary tumor induced by murine sarcoma virus. *Transplantation* 21, 381-386, 1976.
  25. Poupan, M.F., Kolb, J.P. and Lespinats, G.: Evidence for splenic suppressor cells in C3H/He, T cell-deprived C3H/He, and nude mice bearing a 3-Methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1241-1247, 1976.
  26. Nordlund, J.J., Gershon, R.K.: Splenic regulation of the clinical appearance of small tumors. *J. Immunol.* 114, 1486-1490, 1975.
  27. Van Wyck, D. B., Witte, M. H., Witte, C. L., Strunk, R. C.: Immunologic effects of partial and total splenectomy, In *Immuno-Aspects of the Spleen* ed. J. R. Battisto and J. W. Streilein, North-Holland, p.239, 1976.
  28. Jessup, J.M. Brandhorst, J.A., Peters, L.C. and Hanna, M.G.Jr.: The splenic influence on BCG-mediated therapy in syngeneic guinea pig tumor model., In *Immuno-Aspects of the Spleen*, ed. J.R. Battisto, and J.W. Streilein, North-Holland, p. 391, 1976.
  29. 湯村正仁, 林 茂夫, 岡田 剛他: 癌免疫療法 (2) 脾合併切除を併用した癌免疫療法の可能性について. 日外会誌, 76, 1076-1078, 1975.

## Effect of splenectomy on tumor growth and cell-mediated immunity

Tsuyoshi OKADA

First Department of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

There are a few reports about the effect of splenectomy done after tumor transplantation on tumor growth and cell-mediated immunity. In this study, splenectomy was performed in PDS mice transplanted s.c. with Erlich ascites tumor cells before and after the transplantation to clarify the significance of splenectomy in tumor-bearing bodies. The tumor size and macrophage migration inhibitory activity (MIF) were measured as parameters of cell-mediated immunity with the lapse of days after the transplantation.

1. Effect of splenectomy on tumor growth and the survival period of mice transplanted with  $5 \times 10^6$  tumor cells/mouse.

(1) In the first group undergoing sham operation 7 days before transplantation, all mice died of tumor within 30–50 days after the transplantation.

(2) In the second group undergoing splenectomy 7 days before transplantation, the tumor propagated temporarily then regressed completely in each mouse.

(3) In the third group that underwent splenectomy 5 days after transplantation when the tumor had become palpable, the tumor regressed completely in 85% of mice. The rest of the mice died of growing tumor.

(4) In the fourth group undergoing operation 10 days after transplantation, all mice died of the rapidly growing tumor and died earlier than the first group.

2. Effect of splenectomy on tumor growth and the survival period of mice transplanted with  $5 \times 10^5$  tumor cells/mouse.

(1) In the fifth group undergoing sham operation 7 days before transplantation, all mice died of tumor similar to the first group.

(2) In the sixth group undergoing splenectomy 10 days after transplantation, 40% of mice died of tumor growth similar to the fifth group. The remaining 44% of mice survived 2 times longer than the fifth group and the tumor regressed completely in 16% of the mice.

3. Effect of splenectomy on the MIF of regional axillary lymph node cells.

In every group, the MIF has a close relationship with the tumor growth. The MIF reached its maximum level on about 5 days after transplantation by which time the tumor had become palpable in the first and the fifth group. Thereafter, MIF decreased and had disappeared by 2 weeks after transplantation. In the mice in which the tumor regressed completely, a weak MIF was found during tumor growth and this was still moderate 2 weeks after the complete tumor regression.

Splenectomy seems to be useful in the relatively early cancer as it inhibits relapse after the radical operation.