

岡山医学会雑誌

第85巻 7, 8合併号 (第 944, 945号)

昭和48年 8月30日発行

人癌由来初代培養細胞に対する 人リンパ節細胞の抗増殖性に関する研究

岡山大学第一外科 (主任: 田中早苗教授)

小林 雅 己

[昭和48年 7月10日受稿]

緒 言

1953年 Foley¹⁾ が C3H/He マウスに methylcholanthrene 誘発肉腫を皮下に同系移植して、腫瘤形成後にこれを結紮してやると、このマウスが本腫瘍の再移植に抗腫瘍性をしめすことから、methylcholanthrene 誘発腫瘍に腫瘍特異移植抗原のあることを強く示唆し、その後、Baldwin & Barker²⁾ はラットの aminoazo 色素で誘発した肝癌で、Prehn & Main³⁾ も種々のマウスを用いて methylcholanthrene 誘発肉腫に腫瘍特異抗原のあることを報告した。その後 Klein ら⁴⁾ がマウスの methylcholanthrene 誘発肉腫で、強化免疫することにより自家発生マウスに特異的抗腫瘍性の成立することを明らかとし、次第に化学発癌剤誘発腫瘍には発生動物にない特異的腫瘍移植抗原の存在することが普遍的なる事実として承認されるに至っている。本邦においては武田一門⁵⁾ のラットでの methylcholanthrene 誘発腫瘍の結紮開放による詳細なる研究がある。単に化学発癌剤に止まることなく、ウイルス

による誘発癌においても、自然発生癌においても、発生動物が強化免疫によって特異的抗移植性を獲得しうるということが明らかとされている。Morton⁶⁾ や Riggins & Pilch⁷⁾ はマウス自然発生乳癌を同系移植して摘出すると、弱いながらも特異的抗移植性を獲得してくることを報告し、Weiss⁸⁾ や Attia⁹⁾ も自然発生乳癌細胞で充分免疫しておく高い抗腫瘍性のえられることを明らかにしている。

以上は、いずれも担癌宿主を自家腫瘍あるいは同系移植腫瘍で強化免疫することによってはじめて抗移植性を証明したものであるが、このような方法は人体には応用しがたい。癌患者の場合には癌にかかったありのままの姿で、その患者に腫瘍特異免疫あるいは特異的抗腫瘍性の存在していることを *in vitro* で明らかにする必要がある。すなわち *concomitant immunity* の成立をみいだす必要がある。かかる立場から教室では10年来同種移植癌から自然発生癌に至るまで、種々の担癌マウスにおいて、何ら処置することなく腫瘍死に至る過程のマウスの有する抗腫瘍性を *in vitro* で明らかにし、担癌生体にも *con-*

comitant immunity の存在する時期のあることを報告してきた。癌患者においても、最近漸く concomitant immunity の成立が報告されはじめているが、消化器癌、就中、胃癌についての報告はみられない。著者は、胃癌を含む人癌より初代培養し、これに癌患者あるいは他人のリンパ球を加えて培養することにより concomitant immunity の成立することがみられることを明らかにしつつあるので報告する。

I. 実験材料ならびに実験方法

(1) 実験材料

初代培養に用いた材料は、当外科および関連病院に入院した患者より得られた癌性胸水、癌性腹水ならびに手術時に摘出された乳癌、甲状腺癌、転移性肝癌、胃癌で、これらを出るだけすみやかに処理して下記にのべる方法で初代培養を試みた。

(2) 人癌由来細胞浮遊液の調製

1) 癌性胸水および腹水：操作はすべて無菌的に行われ、穿刺液採取後ただちにスピッツ遠沈管を用いて1,000~1,500rpmで5分間遠沈し上清をすててHanks液に集めた。なおこのさい、血性の胸水・腹水はできるだけ用いないようにした。

2) 固形腫瘍：できるかぎり無菌操作を行うが、乳癌で中心壊死を伴ったものや胃癌などは、材料採取後多量の無菌的生理食塩水で充分洗滌し、そのうちHanks液で再び洗ったのちシャーレに移し壊死部および正常組織をとりのぞき、できるだけ癌組織片をとり出すように努めた。これらの組織片はもう一度Hanks液でよく洗い、眼科用剪鉗で3~5mm²に細切したのち可動子の入ったナスコルベンに移し、0.25%のPBS-trypsin液を入れて、癌組織1gに10cc以上のPBS-trypsinと混合液10ccにつきDNAase 0.3ccを加えてときどき振りながら1時間放置する。この上清はそのまますてて、上にのべたと同じ量のtrypsinとDNaseを加えてmagnetic stirrerで震蕩する。15分後に細胞浮遊液をとり出し、あらかじめ用意した氷室に保存しておき、同じ操作を15分毎に、1.5時間~2時間続ける。このようにして得られた細胞浮遊液は80mesh濾過器を通過させて遠沈管に集められ1000~1500rpm 5分間遠沈し上清をすててHanks液を加えて固形癌由来細胞とする。

このようにして得られた胸水、腹水、固形腫瘍由来の細胞に、一定量のHanks液を加えて均一な細胞浮遊液とし、trypan blueで超生体染色して癌細胞と思われる生細胞のみを血球計算盤で算定し、1000

~1500rpm, 5分遠沈し各種の培養液に移し、静置培養、タンザク培養に用いられ、あるものは位相差顕微鏡映画をとるのに供された。

(3) リンパ節細胞浮遊液の調製

実験に用いる各種のリンパ節は、大部分のものは手術時に摘出したリンパ節をそのままHanks液または培養液の中に入れ、約4℃で2日間保存した。あるものは実験当日に摘出したものもある。これらのリンパ節をHanks液に浸しながらピンセットで被膜を鈍的に剝離し、リンパ節細胞を遊離させたのち80mesh濾過器を通過させてtrypan blueで生細胞数を算定した。癌患者より摘出した局所リンパ節を用いるさいには、肉眼的に無転移と思われるものを使用した。これらからのリンパ節細胞を顕鏡しても癌細胞と思われるものは極めて少ない。

(4) 培養液の選択

予備実験で検討した培養液は次のもので、血清はすべて非動化したものを使用した。

- 1) 40% Bovine serum + 0.4% Lactoalbumin + D. sol.
- 2) 20% " + " + "
- 3) 40% Calf serum + " + "
- 4) 20% " + " + "
- 5) 50% " + TC199.
- 6) 20% " + "
- 7) 20% " + 0.4% Lactoalbumin + E. sol

これらの培養液を検討した結果、胸水あるいは腹水よりの細胞は20% Calf serum. 固形腫瘍よりの細胞には50% Calf serum に0.4% Lactoalbumin hydrolysate + D. solution. またはTC medium 199が最もよく、これらのものが主に用いられた。

(5) 添加抗生物質

初代培養および実験のさいにはすべて抗生物質を添加する。ペニシリン(100単位/cc)、ストレプトマイシン(200μg/cc)が主として使用されたが、カナマイシン(100μg/cc)、マイコスタチンも時に用いられることがあった。

II. 培養実験方法

実験はEvans¹⁰⁾らの同型培養(replicate culture)の変法で行われた。20~100×10⁴/短試験管に癌性浮遊細胞を短試験管に分注し、2日間37℃で静置培養したのち、任意に3本とり出して培養液をすて、crystal violet液を加えてrubber cleanerで管壁に附着している細胞を落し、shakerで充分震蕩したのち各短試につき3回以上計測してその平均値

を出し、実験開始時の腫瘍細胞数とした。対照群には、培養液を捨てたのち培養液と抗生物質のみを加え、実験群には、用意したリンパ節細胞を腫瘍細胞1に対して40倍の割合に加えて、37℃で、1～4日、主として24時間、48時間、培養し、培養終了時に各々3本の短試をとりだし、腫瘍細胞の核数計算を行い、実験群と対照群とでの数値をStudent's t-testで有意差検定した。リンパ節細胞の付加培養により、対照に比して $P < 0.05$ で腫瘍細胞数の減少しているものを抑制効果(+)とし、逆に $P < 0.05$ で腫瘍細胞数の増加しているものを促進効果(+)とした。

III. 実験結果

初代培養を行った症例は、胃癌42例、乳癌12例、癌性胸水8例、癌性腹水5例、肝癌2例、甲状腺癌2例、悪性黒色腫1例、仮性粘液腫2例、他の良性腫瘍4例である。このうち十二分に遊離細胞がとれ、ガラス管壁に充分の腫瘍細胞が生着して、実験可能であったものは29例であった。

(1) 人癌由来細胞に対するリンパ節細胞の影響と培養時間の関係：

培養時間は症例によって異っているが、これは、収獲細胞数の多少と実験系列の数により、全例に1～4日間観察することが出来なかったため、最初の実験ではリンパ節細胞の影響が最もよく表現される時間をみるために出来るだけ24、48、72時間にわたって培養するようにした。10例についてみると、表1のようになり、24～72時間とも効果が同じであるものは10例中4例、24時間で抑制作用があって48、72時間ではみられないものが10例中4例、48ないし72時間に効果のみられるものが10例中2例となり、24～48時間で90%にリンパ節細胞の影響が出ているため、その後の実験では収獲数の少ないとき、または同時に他の系列の実験を行う場合は主として24、48時間培養で核数計算するようにした(表1)。

(2) 人癌由来細胞に対する自家リンパ節細胞の影響：

検討した症例は、胃癌9例、乳癌6例、転移性肝癌2例、甲状腺癌1例、癌性胸水2例、癌性腹水2例の計22例で実験系列は30系である。これらの癌由来初代培養細胞を用いて、種々の部位により採取したリンパ

表1 人癌由来細胞にたいするリンパ節細胞の影響と培養時間の関係

| 材 料 | リンパ節の種類 | 培 養 時 間 | | |
|-----------|---------|---------|----|----|
| | | 24時間 | 48 | 72 |
| (1) 胸 水 | 自家リンパ節 | — | — | + |
| (2) 乳 癌 | ” ” | + | — | — |
| (3) 胃 癌 | 他家リンパ節 | — | — | — |
| (4) 乳 癌 | ” ” | + | — | — |
| (5) 転移性肝癌 | 自家 ” | — | + | + |
| (6) 胃 癌 | 他家 ” | ± | — | — |
| (7) 胃 癌 | 自家 ” | + | — | — |
| (8) 胃 癌 | 他家 ” | + | — | — |
| (9) 腹 水 | 自家 ” | + | + | + |
| (10) 腹 水 | 他家 ” | + | + | + |

+は増殖抑制効果のあるもの
—は ” のないもの

節細胞を附加し混合培養した群と、培養液の交換のみを行った対照群との差を比較してみると表2のようになる。即ち、24例中15例(62.5%)は24時間の培養でリンパ節細胞が自家の癌由来細胞に対して抑制的に作用し、その後の培養経過中に抑制効果の認められた6例を加えると30例中21例(70%)に増殖抑制の発現がみられている。リンパ節細胞附加にもかかわらずその影響がみられないものは30例中1例のみで3.3%、増殖が促進されたものが30例中3例で10%、残りの5例は危険率0.05以上のため誤差範囲とした(表2)。

(3) リンパ節の部位による増殖抑制作用の比較：

実験に用いられたリンパ節の部位によって癌由来細胞に及ぼす影響に差異があるか否かをみるために、局所と遠隔に分けて検討してみた。ここで局所リンパ節というのは甲状腺癌では頸部リンパ節、乳癌では同側の腋窩リンパ節、胃癌では胃周囲のみでなく肝十二指腸韧带内リンパ節のようにリンパ流の途中にあるリンパ節を意味しており、遠隔リンパ節とは

表2 人癌由来細胞に対する自家リンパ節細胞の影響

| リンパ節細胞の効果 | 培 養 時 間 | | | | |
|-------------------------------|---------|------|-----|-------|------|
| | 24h | 48h | 72h | 計 | % |
| 増殖抑制 ($P < 0.05$) (+) | 15/24 | 6/16 | 3/7 | 21/30 | 70.0 |
| 増殖抑制 ($0.2 > P > 0.05$) (±) | 5/24 | 0/16 | 0/7 | 5/30 | 16.7 |
| 不 変 ($P > 0.2$) | 2/24 | 7/16 | 3/7 | 1/30 | 3.3 |
| 増殖促進 ($P < 0.05$) (+) | 2/24 | 3/16 | 1/7 | 3/30 | 10.0 |

これらのリンパ流とは関係のない部位のリンパ節をさしている。したがって癌性腹水、胸水の場合は局所リンパ節を用いることが困難で、鼠径部リンパ節を遠隔リンパ節とし、胃癌で腸間膜リンパ節を用いた外は、いずれも鼠径部リンパ節を遠隔リンパ節とした。また、局所リンパ節を用いるにあたっては、摘出時、肉眼的に無転移と思われるリンパ節を使用した。

実験成績は表3のように局所リンパ節細胞使用群では13例中7例(54%)、遠隔リンパ節細胞使用群では17例中14例(82.4%)と遠隔リンパ節細胞の、癌由来細胞に対する増殖阻止作用は明らかにすぐれている。また、局所リンパ節を使用した症例では13例中3例(23%)に増殖促進効果が認められたが、遠隔群では1例もみられなかった。これら症例のうち代表的なものを挙げると表4~6のごとくである。表4は、78才♂で胃癌占居部位は噴門から胃体部に及ぶ Borrmann III型 の腺癌であり、胃癌取扱い規約によると、胃癌進行度はIV (HoPoS₃N₂)である。幽門下リンパ節、腹腔動脈周囲リンパ節、総肝動脈幹リンパ節はいずれも局所リンパ節に入るが、遠隔の腸間膜リンパ節と共に自家腫瘍細胞に抗腫瘍性をしめしている。

表5は、60才♂で胃癌占居部位は胃体部から幽門部にあつて、Borrmann II型 の腺癌である。進行度は HoPoS₂N₂ の Stage III である。局所リンパ節のうち最も癌腫に近い小彎リンパ節(N₁)には抗腫瘍性がみられないが、やや遠位の左動脈幹リンパ節(N₂)および遠隔の腸間膜リンパ節には強い抗腫瘍性がみられる。他家胃ポリープ患者の大彎リンパ節には全く抗腫瘍性がみられていない。

表3 人癌由来細胞に対する局所および遠隔リンパ節細胞の影響

(1) 局所リンパ節使用群

| | | | |
|------|------------------|--------|-----|
| 増殖抑制 | (P < 0.05) | 7 / 13 | 54% |
| 増殖抑制 | (0.2 > P > 0.05) | 3 / 13 | 23% |
| 不変 | (P > 0.2) | 0 / 13 | 0% |
| 増殖促進 | (P < 0.05) | 0 / 13 | 23% |

(2) 遠隔リンパ節使用群

| | | | |
|------|------------------|---------|-------|
| 増殖抑制 | (P < 0.05) | 14 / 17 | 82.4% |
| 増殖抑制 | (0.2 > P > 0.05) | 2 / 17 | 11.8% |
| 不変 | (P > 0.2) | 1 / 17 | 5.8% |
| 増殖促進 | (P < 0.05) | 0 / 17 | 0% |

表4 胃癌初代培養細胞にたいする部位別リンパ節細胞の影響

※リンパ球非付加対照群の培養腫瘍細胞数を100%とする

| | |
|------------|------|
| 対 照 | 100% |
| 付加幽門下リンパ節 | 65.6 |
| 腹腔動脈周囲リンパ節 | 80 |
| 総肝動脈幹リンパ節 | 75 |
| 腸間膜リンパ節 | 75 |

表5

胃癌初代培養細胞にたいする部位別リンパ節細胞および他家リンパ節細胞の影響。

※リンパ球非付加対照群の培養腫瘍細胞数を100%とする。

| | |
|-------------|------|
| 対 照 | 100% |
| 小彎リンパ節 | 95 |
| 胃動脈幹リンパ節 | 71.3 |
| 腸間膜リンパ節 | 74.7 |
| 他家胃ポリープリンパ節 | 95 |

表6

甲状腺癌初代培養細胞にたいする部位別リンパ節細胞および他家リンパ節細胞の影響

※リンパ球非付加対照群の培養腫瘍細胞数を100%とする

| | |
|--------------|------|
| 対 照 | 100% |
| 深頸部リンパ節 | 86 |
| 頸骨上窩リンパ節 | 83.3 |
| ソ径部リンパ節 | 83.3 |
| 他家良性甲状腺腫リンパ節 | 108 |

表6は55才♀で甲状腺の乳頭腺癌である。他家の良性甲状腺腫の頸部リンパ節には抗腫瘍性はみられないが、局所の頸部リンパ節および遠隔の鼠径部リンパ節には、わずかながら抗腫瘍性の傾向がみられる。

(4) 人癌由来細胞にたいする他家リンパ節細胞の影響:

人癌由来初代培養細胞に他家リンパ節細胞を加えたものは30系列であり、そのうち11/30(36.7%)に

抗増殖性がみられ、これを他家癌患者、非癌患者別にしてみると、癌患者では 8/16(50%) に、非癌患者では 3/14(21.4%) に抗増殖性がみられる(表 7)。

表 7 人癌由来細胞にたいする他家リンパ節細胞の影響

| リンパ節細胞の効果 | リンパ節 | | |
|-----------------------|------|------|-------|
| 増殖抑制 (P < 0.05) | 癌患者 | 8/16 | 50.0% |
| | 非癌患者 | 3/14 | 21.4% |
| 増殖抑制 (0.2 > P > 0.05) | 癌患者 | 2/16 | 12.5% |
| | 非癌患者 | 1/14 | 7.1% |
| 不変 (P > 0.2) | 癌患者 | 5/16 | 31.3% |
| | 非癌患者 | 9/14 | 64.4% |
| 増殖促進 (P < 0.05) | 癌患者 | 1/16 | 6.3% |
| | 非癌患者 | 1/14 | 7.1% |

他家癌患者の多くは胃癌患者であり、胃癌初代培養細胞に他家胃癌リンパ節を付加したものである。非癌患者としては胃潰瘍、胃ポリープ、胆石症などの手術時にえたリンパ節である。代表的な 1 例を挙げると、表 8のごとくであって、44才♂で胃全体に占居する大きな胃癌で Stage IV (HoP₂S₃N₂) であり、この初代培養細胞に自家遠隔腸間膜リンパ節が抗増殖性をしめす以上に、他家胃癌のリンパ節、および他家胃潰瘍のリンパ節が強い抗増殖性をしめしている。

表 8 胃癌初代培養細胞にたいする自家および他家リンパ節細胞の影響：

| | |
|------------|------|
| 対 照 | 100% |
| 自家 腸間膜リンパ節 | 60 |
| 他家胃癌リンパ節 | 50 |
| 他家胃潰瘍リンパ節 | 27 |

考 察

Foley¹¹ が Methylcholanthrene 誘発肉腫を用いて抗増殖性の中で腫瘍特異抗原の存在を示唆することではじまった癌の免疫学的研究は、Klein ら¹² や武田ら¹³ によって、各種の誘発腫瘍やウィルス性の腫瘍に癌特異抗原の存在することが証明せられるに至った。動物の自然発生腫瘍においても特異抗原の探索が試みられ、Morton¹⁴ をはじめとして Riggins

& Pilch¹⁵, Weiss¹⁶, Attia ら¹⁷ や Baldwin ら¹⁸ が in vivo においてその存在を示唆しており、人癌にあっても Makari¹² や Zilber¹⁹ らの報告がみられている。

これらの腫瘍特異抗原を not-self として認識し宿主の抵抗性に主要な役割を演ずるものは、主としてリンパ球の働きによるものであることが in vivo の抗移植性実験によって示されており、人癌においても in vivo の研究で、Southam²⁰が concomitant immunity の成立をしめしている。彼らは進行癌患者に別自家腫瘍を移植して 36 例中 6 例に生着をみており、癌患者が自家癌の転移にたいして抵抗力をもっていることを示唆している。また、摘出自家腫瘍細胞に患者自身の末梢白血球を混合して自家移植する中和実験では非混合移植に比して腫瘍の生着率がさらに低下する。又、同種移植片の拒絶に長時間を要する移植免疫反応の低下している患者では、少数の自家腫瘍細胞移植が生着するという²¹。

以上は、主として強化免疫を用いて、抗移植性を証明する in vivo の研究であるが、in vivo の研究としては Rosenau 一派¹⁶ や花岡¹⁷ が先鞭をつけ、concomitant immunity については教室の原にはじまるといえよう。Hanaoka & Notake¹⁷ は、リンパ性白血病に罹った S 系マウス由来の SC 1 細胞で A/Jax マウスを感作し、1 週後の局所リンパ節細胞に増殖抑制効果のあることを混合培養法でみている。

Hara¹⁹ は雑系マウス由来の Ehrlich 腹水癌細胞 500×10⁴個を同種の Cb 系マウスの背部皮下に移植し、1, 2, 3, 4 週後に腋窩、頸部リンパ節および脾よりリンパ球様細胞をとりだし、20~100 倍の割合で Ehrlich 腹水癌より株化した JTC-11 細胞と混合培養した結果、感作リンパ球様細胞に増殖抑制作用のあることをみだし、しかも局所リンパ節細胞の、JTC-11 細胞増殖抑制作用には、用いる時期によって差異のあることを認めている。更に JTC-11 細胞を同様に皮下移植してえた局所腋窩の感作リンパ球様細胞にも、混合培養 24 時間後に JTC-11 細胞の増殖抑制効果のみられることを報告している。

これらの同種移植腫瘍を用いた実験では、感作リンパ球様細胞の作用が腫瘍中の不適合移植抗原に向けられている可能性がある。この疑問に対して Satoh²⁰ は同系の継代移植癌を用いて解明している。即ち、C₃H マウス由来の乳癌より株化された A 株細胞を用いて同系移植し、10 日後の感作リンパ節細胞に抗増殖性が最も強く認められることを示し、腫瘍

の増大とともに抗増殖性の低下してくることを報告するとともにシネマを用いた形態学的観察により、感作リンパ球様細胞が腫瘍細胞に特異的に群集接着して破壊する像を観察している。

大杉も C₃H系マウスに誘発した methylcholanthrene 腫瘍を同系移植すると、局所の腋窩リンパ節細胞に抗腫瘍性の生じることを同様な組織培養法で明らかにしている²¹⁾。つづいて、C₃H系マウスやRⅢ系において自然発生した乳癌担癌マウスの脾にも自家腫瘍細胞にたいする抗腫瘍性があることをしめしている²²⁾。以上、腫瘍死する運命にある過程で、担癌動物は同種移植癌であれ、同系移植癌であれ自然発生癌であれ、いずれも concomitant immunity を cell-mediated immunity 形でもっていることを明らかにしてきたわけである。

人癌の場合、in vitro で concomitant immunity が明らかにされはじめたのは最近のことであり、本報告を予報的に学会²³⁾で報告した時点においてはこの種の報告はほとんど皆無であった。Hellström²⁴⁾が1967年神経芽腫を用いて腫瘍細胞のコロニー形成阻止テスト (colony inhibition) 行ったのが最初であろう。手術時摘出した腫瘍塊をトリプシン処理して遊離腫瘍細胞を調整し、20-100個のコロニーを形成するよう、800-1,000個の腫瘍細胞を時計皿に植え込み、6-24時間後に10⁷/ccの自家あるいは他家癌患者リンパ球を加えてさらに3-5日間培養し、非混合対照群と比較している。最近は、われわれと同様の腫瘍細胞の核数計算による Takasugi & Klein²⁵⁾の方法でリンパ球の腫瘍細胞にたいする抗増殖性効果をも検討している。悪性メラノーマ、結腸癌、乳癌、肺癌、肉腫など373例の癌患者の末梢血リンパ球につき、59例中51例(88%)が自家腫瘍細胞のコロニー形成を阻止し、87例中78例(89%)はリンパ球 donor と同一組織像を有する他家腫瘍細胞に抗腫瘍性をしめしているとのべている²⁶⁾。この点、われわれは組織像につき十分なる吟味ができていないが、胃癌同志の間、乳癌同志の間には交叉反応が高い傾向をみていることと軌を一にしているように思われる。Hellströmの方法と類似の方法で、Wilms 腫瘍²⁷⁾や膀胱癌患者²⁸⁾の末梢血リンパ球にも自家腫瘍細胞にたいする抗腫瘍性が証明されている。われわれと類似の核数計算による方法で、悪性メラノーム²⁹⁾、乳癌³⁰⁾、脳腫瘍³¹⁾の患者の末梢血リンパ球にそれぞれ抗腫瘍性がみられている。しかし、リンパ節細胞の抗腫瘍性を検討した報告はほとんどみ

られず、ただ Hewetson ら³²⁾がコロニー形成阻止テストを用いて、パーキットリンパ腫の患者の末梢血リンパ球とリンパ節細胞の抗腫瘍性を調べ、リンパ節細胞の方に強い抗腫瘍性のあることをみているにすぎない。われわれの報告においては、27系列中13系列(48.2%)にリンパ節に抗腫瘍性がみられたわけである。

腫瘍の進行度と担癌宿主リンパ球の抗腫瘍性の推移に関する報告も少なく、腫瘍が大きくなった末期の癌では末梢血リンパ球の抗腫瘍性が低下するとするもの²⁹⁾、また癌の進行度とリンパ球の抗腫瘍性の間にはあまり相関がみられないとするもの²⁹⁾³⁰⁾など区々である。われわれの教室では、腫瘍の増殖につれ担癌生体の部位別リンパ組織の抗腫瘍性がいかに変化するのか検索しているが、原¹⁹⁾は Ehrlich 癌細胞の同種移植において、佐藤²⁰⁾は乳癌由来の株化細胞の同系移植において、移植10-14日すると局所リンパ節に最も強い抗腫瘍性が生じるが、14日以降となると腫瘍の増大と伴ってリンパ節細胞の抗腫瘍性の低下することをみている。大杉²¹⁾は自然発生乳癌マウスで、脾細胞の抗腫瘍性は乳癌が体重の10%を越えると低下することを明らかにしている。また、折田、友保ら³³⁾は Ehrlich 癌細胞 500×10⁴コをマウスの背部皮下に移植し、経日的に局所の腋窩リンパ節細胞、脾細胞、遠隔の腸間膜リンパ節細胞を採り出し、Ehrlich 癌株化 JTC-11細胞に加えて培養して、腫瘍増殖と各部位リンパ球の抗腫瘍性との相関を検索している。移植1週目に局所腋窩リンパ節に抗腫瘍性が生じているが、脾や腸間膜リンパ節には全くみとめられない。移植3週目と比較の末期に近づくとも局所リンパ節や脾の抗腫瘍性は低下しているが、遠隔の腸間膜には強い抗腫瘍性がみられている。

同様な知見は、教室の大西ら³⁴⁾が methylcholanthrene 誘発肉腫の同系移植マウスにおいてもえており、柏原³⁵⁾は methylcholanthrene 誘発肉腫をマウスの背部皮下に同系移植後、日を追って局所腋窩リンパ節細胞を採り、腫瘍細胞の10倍に混合して無処理正常マウスの背部皮下に移植する抗移植中和実験で、移植早期の1、2週の局所リンパ節には明らかな抗腫瘍性があるが、中期から末期の3、4週のリンパ節には抗腫瘍性が消失することを報告している。このような動物癌での結果からみると、人癌でえられた結果、すなわち局所リンパ節に抗腫瘍性が54%であるのに比し、遠隔のリンパ節に82.4%と高いことは、肉眼的に大きな腫瘤を形成している癌

患者の多くが動物癌でいう末期癌に相当することをしめすものと考えられる。

以上より、人癌においても教室で従来、動物癌でみてきたと同じように、癌が発生してある程度大きくなると癌の領域あるいは局所リンパ節に抗腫瘍性が生じ、癌腫の増悪とともにある一定期間はしだいに抗腫瘍性が増加し、癌腫がある限度を越えて大きくなると領域リンパ節の抗腫瘍性が低下し、より遠隔のリンパ節に抗腫瘍性が生じ、癌末期になると遠隔のリンパ組織の抗腫瘍性さえも低下消失してくるといえよう。局所リンパ節を前もって切除しておく、無処置正常マウスに腫瘍を移植した場合に比して、抗移植性の発現が遅く、その程度も弱いという Fisher ら³⁰⁾の報告から考えて、腫瘍が発生すると局所リンパ節に腫瘍抗原が流入し、ここで対応のリンパ球が抗原認識を行い免疫リンパ球へと成熟し、cell-mediated immunity が成立するものといえよう。したがって、腫瘍がある限度を越えて増大すると、流入する腫瘍抗原も過剰となり、いわゆる high zone paralysis のような機作で局所リンパ節の抗腫瘍性がまず最初に低下しはじめるものといえよう。このことは、マウスに X 線照射腫瘍細胞を少量から始めて次第に増量して免疫してやると、ある量までは抗原量の増加に比例して抗腫瘍移植性が増強してくるが、更に増量すると低下消失して paralysis の状態となるという Koldovsky³¹⁾の報告からも支持されよう。

今回の人癌用いての初代培養細胞においては、一応形態学的に腫瘍細胞とみなして実験を進めたものであるが、異論の大きいところであろう。In vitro の組織培養法を用いての癌の免疫学的研究には、もちろんすべての初代培養細胞が癌細胞であるという同定が行われるべきであるが、未だこれという決め手が無いのが現況である。しかし、大星ら³²⁾は胃癌患者の転移リンパ節を初代培養してガラス壁に附着増殖した線維芽様細胞にみえる細胞でも継代により上皮性配列を示して増殖し、電顕的にも胃癌細胞が培養されたものであるとしている。また、in vitro の、このような一連の研究を通じて、動物癌にみられた現象が人癌由来細胞を用いて行った今回の実験結果と極めて類似していること、さらに、今回の手技と同様の手技で固型腫瘍塊から遊離して調整した細胞が、同系移植において極めて高率に生着、増殖し宿主を腫瘍死せしめるということ³³⁾、in vitro の実験においても腫瘍細胞と思われる初代培養細胞に

免疫リンパ球が群集・接着することなどから³⁴⁾、人癌よりの初代培養細胞中に実験結果を左右しうるに足る十分なる腫瘍細胞が存在しているものと考えられよう。この点は、組織培養学の進歩、免疫学の進歩により、より詳細に解決されるものと思われる。

結 論

癌患者における concomitant immunity としてのリンパ節細胞の人癌由来初代培養細胞にたいする in vitro での抗増殖性を殺細胞試験で検討し次の結果をえた。

1. 初代培養を試みた症例は、胃癌42例、乳癌12例、癌性胸水8例、癌性腹水5例、転移性肝癌2例、甲状腺癌2例、その他7例である。そのうち、十二分に遊離細胞が採取でき、同型培養によりガラス管壁に充分の腫瘍細胞が生着したものは29例である。

2. 人癌由来初代培養細胞にたいする自家リンパ節の影響：胃癌9例、乳癌6例、転移性肝癌2例、甲状腺癌1例、癌性胸水2例、癌性腹水2例の計22例に、主として手術時にえた自家リンパ節細胞を加えて30系列の殺細胞試験を行った。混合培養24時間から72時間の間に自家リンパ節細胞が初代培養細胞に抗増殖性をしめしたものは21/30(70%)であり、リンパ節細胞を加えたためにかえって増殖を呈したものは1/30(3.3%)であった。

3. 人癌由来初代培養細胞にたいする部位別の自家リンパ節細胞の影響：腫瘍の存在位置からみて、採取したリンパ節を局所リンパ節、遠隔リンパ節に大別して、その抗増殖性をみると、局所リンパ節細胞では7/13(54%)、遠隔リンパ節では14/17(82.4%)に抗増殖性がみられた。

4. 人癌由来細胞にたいする他家リンパ節細胞の影響：人癌由来初代培養細胞に他家リンパ節細胞を加えて培養したものは30系列であり、そのうち11/30(36.7%)に抗増殖性がみられた。リンパ節を癌患者と非癌患者に分けてみると、前者では8/16(50%)に後者では3/14(21.4%)に抗増殖性がみられた。

以上より、人癌には concomitant immunity が成立していて、リンパ球が抗腫瘍性に作用しているものといえよう。しかも、大きな腫瘤を形成している症例には末期癌に近いものが多く局所リンパ節の免疫の低下消失がみられる。

稿を終るにあたり田中早苗教授、折田薫三講師、東研諸兄に厚く御礼申し上げる。

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) Baldwin, R. W. & Barker, C. R.: Tumor specific antigenicity of aminoazo-dye-induced rat hepatoma. *Int. J. Cancer* **2** :355, 1967
- 3) Prehn, R. T. & Main, J. M.: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J. Nat. Cancer Inst.* **18** :769, 1957
- 4) 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, 1960
- 5) 武田勝男, 相沢幹, 辻由生子, 山脇慎也, 中村恭二: 発癌個体における自家免疫, I MC発癌ラットの抗移植性, *最新医学*, **20** :2826, 1965.
- 6) Morton, D. L.: Successful isoimmunization against a spontaneous mammary tumor in C₃H/HeN mice *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **3** :346, 1962
- 7) Riggins, R. S. & Pilch, Y. H.: Immunity to spontaneous and methylcholanthrene-induced tumours in inbred mice. *Cancer Res.* **24** :1994, 1964
- 8) Weiss, D. W., Faulkin, L. J., Jr., & DeOme, K. B.: Acquisition of heightened resistance and susceptibility to spontaneous mouse mammary carcinomas in the original host. *Cancer Res.* **24** :732, 1964
- 9) Attia, M. A., DeOme, K. B. & Weiss, D. W.: Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. II. Resistance to a rapidly and a slowly developing tumor. *Cancer Res.* **25** :451, 1965.
- 10) Evans, V. J., Earle, W. R., Sanford, K. K., Shannon, J. E. & Waltz, H. K.: The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies. *J. Nat. Cancer Inst.* **11** :907, 1951.
- 11) Baldwin, R. W., Barker, C. R. & Emberton, M. J.: Immunology of carcinogen-induced and spontaneous rat tumors. In: *Advances in Transplantation.* (Dausset, J., Hamburger, J. & Mathe, G. eds.) Munksgaard, Copenhagen, Denmark, p.503, 1968.
- 12) Makari, J. G.: Determination of tumour antigens and antibodies by the Schultz-Dale reaction and of cutaneous autohypersensitivity in subjects with tumours. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101** :274, 1962.
- 13) Zilber, L. A.: Study of the tumour specificity of gastric cancer tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101** :264, 1962.
- 14) Southam, C. M. & Brunschwig, A.: Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer* **14** :971, 1961.
- 15) Brunschwig, A., Southam, C. M. & Levin, A. G.: Host resistance to cancer, clinical experiments by hemotransplants, autotransplants, and admixture of autologous leucocytes. *Ann. Surg.* **162** :416, 1965.
- 16) Rosenau, W.: Interaction of lymphoid cells with target cells in tissue culture. In: *Cell-bound antibodies.* (Amos, D. B. & Koprowski, H. eds.), Philadelphia, Wistar Inst pp. 75, 1963.
- 17) Hanaoka, M. & Notake, K.: Quantitative studies on the cellular antibody in vitro. I. Inhibitory effect of sensitized homologous lymph node cells on strain SCI of cultured leucemic cells. *Ann. Rep. Inst. Virus Res.* **5** :134, 1962.
- 19) Hara, S.: Cellular antibody in mice bearing Ehrlich cancer. I. A quantitative study on antitumor activity of cellular antibody in vitro., *Acta Med. Okayama*, **19** :91, 1965.
- 20) 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.

- 21) Ohsugi, M.: In vitro studies on the inhibitory effect of lymph-node cells. I. Antitumor activity of regional lymph node cells from methylcholanthrene-induced sarcoma-bearing mice on the same primary culture sarcoma cells. *Acta Med. Okayama* **24** : 447, 1970.
- 22) Ohsugi, M.: In vitro studies on the inhibitory effect of lymphoid cells. II. Antitumor activity of lymphoid cells from spontaneous mammary tumor-bearing mice on the autochthonous primary culture tumor cells. *Acta Med. Okayama*, **25** : 229, 1971.
- 23) 小林雅己：人リンパ節細胞の人癌由来初代培養細胞に対する抗増殖性。第27回日本癌学会総会記事P138, 1968.
- 24) Hellström, I.: A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro. *Int. J. Cancer*, **2** : 265, 1967.
- 25) Takasugi, M. & Klein, E.: A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation*, **9** : 219, 1970.
- 26) Hellström, I., Hellström, K. E., Sjögren, H. O. & Warner, G. A.: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer*, **7** : 1, 1971.
- 27) Kumar, S., Taylor, G., Steward, J. K., Waghe, M. A. & Pearson, D.: Cellular immunity in Wilms tumor and neuroblastoma. *Int. J. Cancer*, **10** : 36, 1972.
- 28) O'Toole, C., Perlmann, P., Unsgaard, B., Moberger, G. & Edsmyr, F.: Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma I. Correlation to clinical stage and radiotherapy *Int. J. Cancer*, **10** : 97, 1972.
- 29) DeVries, J. E., Rümke, P.N. & Bernheim, J. L.: Cytotoxic lymphocytes in melanoma patients. *Int. J. Cancer*, **9** : 567, 1970.
- 30) Fossati, G., Canevari, S., Porta, G. D. & Balzarini, G. P.: Cellular immunity to human breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, **10** : 391, 1972.
- 31) Levy, N. L., Mahaley, M. S., Jr. & Day, E. D.: In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumor. *Cancer Res.*, **32** : 477, 1972.
- 32) Hewetson, J. F., Golub, S. H, Klein, G, & Singh, S.: Cellular reactions against Burkitt lymphoma cells. I. Colony inhibition with effector cells from patients with Burkitt's lymphoma. *Int. J. Cancer*, **10** : 142, 1972.
- 33) Orita, K., Tomoyasu, S., Kaneda, S., Miwa, H. & Konaga, E.: Time-lapse changes in the concomitant immunity of by lymphoid cells from different regions of Ehrlich tumor-bearing mice and alterations in blastformation rate by PHA-stimulation. *Acta Med. Okayama*, **26** (3.4) : 1972.
- 34) 大西信行：担癌宿主リンパ球の抗腫瘍性および allogeneic inhibition 活性と癌の進展との相関について。第29回日本癌学会総会記事, P117, 1970.
- 35) Kashihara, E.: Inhibitory effect of isologous regional lymph node cells from the methylcholanthrene-induced sarcoma bearing mice on the tumor in vitro. *Acta Med. Okayama*, **24** : 161, 1970.
- 36) Fisher, B. & Fisher, E. R.: Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Induction of immunity. *Cancer* **27** : 1001, 1971.
- 37) Koldovsky, P.: Tumor specific transplantation antigen. Springer-Verlag, New York. P, **46**, 1969.
- 38) 大星章一. 清藤勉：人胃癌細胞の培養と化学療法。第27回日本癌学会総会記事, P276, 1968.

Anticancer Activity of Lymph Node Cells on Primary Cultured Tumor Cells Derived from Human Cancers

Masami Kobayashi

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

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the concomitant immunity in cancer patients by culturing lymph node cells obtained from various cancer patients with the primary cultured tumor cells derived from human cancer and the following results were obtained.

1. The primary cultures were conducted with 42 cases of gastric cancer, 12 of mammary cancer, 8 of cancerous thoracic fluid, 5 of cancerous ascites, 2 of metastatic hepatoma, 2 of thyroid cancer and 7 others. Among them there were 29 cases where the sufficient number of free cells were obtained by the same type of culture so that there were enough viable tumor cells attached on the culture vessel wall to harvest.

2. Effects of autochthonous lymph nodes on human primary cultured cancer cells : From the total of 22 cases comprising 9 cases of gastric cancer, 6 of mammary cancer, 2 of metastatic hepatoma, one of thyroid cancer, 2 of cancerous thoracic fluid and 2 of cancerous ascites, 30 series of cytotoxicity tests were conducted by mixing each of them with autochthonous lymph node cells mainly prepared with lymph nodes obtained at surgical operation. During the mixed culture for the period of 24 hours to 72 hours the cases where the autochthonous lymph node cells had shown anti-proliferative effect on the primary cultured cells amounted to 12/30 cases (70%), and those that showed a proliferative effect instead amounted to 1/30 cases (3.3%).

3. Effects of autochthonous lymph nodes according to their sites on human primary cultured cancer cells : Considering the sites of tumors, the lymph nodes collected were roughly divided into the regional lymph nodes and distant lymph nodes, and looking at their anti-proliferative effect 7/13 cases (54%) of the regional lymph nodes and 14/17 cases (82.4%) of the distant lymph nodes had shown the anti-proliferative effect.

4. Effect of allogeneic lymph nodes on the primary cancer cells derived from human patients : There were 30 lines of mixed cultures of allogeneic lymph node cells and the human primary cultured cancer cells, and of them 11/30 cases (36.7%) showed anti-proliferative effect. By dividing lymph nodes according to cancer patients and non-cancer patients 8/16 cases (50%) in the former had anti-proliferative effect while 3/14 cases (21.4%) in the latter group.

From these findings it may be said that there is concomitant immunity established in human cancer and lymph nodes act inhibitorily on tumor. Moreover, most cases having larger tumors are in the terminal stage of cancer, and there can be observed a decrease-disappearance of immunity of regional lymph nodes in such cases.