

N-Nitrosobutylurea による淋巴肉種の 発生および進展に関する研究

第 2 編

免疫能におよぼす影響について

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木潔教授）

丹 治 爲 世

[昭和48年7月12日受稿]

内 容 目 次

I 緒 言	forming cell (PFC) の推移
II 実験材料および実験方法	4. 溶血素価の推移
III 実験成績	5. 凝集素価の推移
1. 血清蛋白像の推移	IV 総括並びに考按
2. 免疫電気泳動所見	V 結 論
3. 胸腺および脾の Plaque	

I 緒 言

担癌生体における癌の発生および進展には免疫学的立場より腫瘍抗原と宿主側のそれに対する反応との相互関係が重要視されている。特に宿主の免疫能との間に密接な関係が存在することは、臨床的にも実験的にも注目されており、今日これに関する実験的研究の報告は決して少なくない。また、化学物質による発癌においても発癌物質の免疫能抑制作用が著しいことは一般に認められている。しかし、その抑制機序および発癌における意義については未だ明確にされたとは云えない。

今日の免疫学的知見によれば、免疫反応としておもに血清中に検出できる抗体に基づいておこる反応と、細胞の介在によっておこると推測されている反応に大別される。前者は血清蛋白像（免疫グロブリンを含む）、Plaque forming cell (PFC)、溶血素価、凝集素価等で検査される体液性免疫であり、後者はツベルクリン反応、DNCB（2-4-Dinitrochlorbenzene）テスト、マクロファージ遊走阻止試

験、皮膚移植試験、Graft-Versus-Host (GVH) 反応等で検査される細胞性免疫であるが、私は発癌機序を検討する目的で、第1編では主として細胞および組織の形態学的立場より詳細な報告をしたので、第2編ではマウス発癌実験において体液性免疫反応の指標として広く行なわれている血清蛋白像、PFC、溶血素価および凝集素価について観察を行ない興味ある知見を得たので報告する。

II 実験材料および実験方法

1. 実験動物

第1編と同じ RF系マウスを用いた。

2. 投与材料および投与方法

第1編におけると同じ N-Nitrosobutylurea (N-BU) を同様の方法で連日経口投与した。

3. 採血方法

経時的に毛細管あるいはヘマトクリット用毛細管でマウスの眼窩静脈叢から採血し、遠心沈殿により血清を分離後採取した。

4. 血清蛋白定量および血清蛋白電気泳動法

血清蛋白量の測定には HITACHI Protein Refractometer を用い、血清蛋白分画の測定にはセルローズアセテート膜電気泳動法を行った。泳動には ATAGO 泳動槽、SEPARAX 膜およびペロナール緩衝液 (PH 8.6, 0.06~0.07 M) を用い、血清を電気泳動後ボンソー 3 R で染色した。その後デカリンで透明化し、OZUMOR 82 デンシトメーターで 500 μ の干渉フィルターと 0.5 \times 8.0mm のスリットを用いデンシトメトリーを行った。

5. 免疫電気泳動法

Scheidegger¹⁾ の方法に準じて行った。泳動標本は ATAGO 泳動槽内で寒天板に定電流を通じ、血清を電気泳動後、抗血清を溝の中に分注し免疫沈降反応を行なわせ作製した。抗血清には正常マウス血清と Complete adjuvant で感作された家兎血清を用いた。

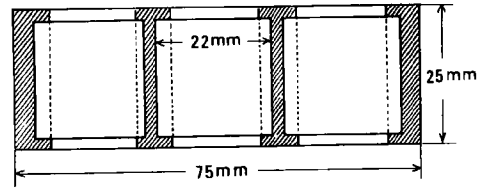
6. 羊赤血球に対する抗体産生細胞 Plaque forming cell (PFC) の検出法

感作抗原としての羊赤血球には、日本バイオテスト研究所作製のものを使用し、生理食塩水を加え 30% 赤血球浮遊液とし 0.2ml を RF 系マウスの腹腔内に注入し感作した。

抗体産生細胞を含む脾および胸腺の細胞浮遊液は最も PFC の多く認められる感作 4 日目^{2)~7)} にマウスを脱血後、速やかに脾および胸腺を摘出し、眼科用ハサミでイーグル培養液を加えながら細切、溶血操作後 110 Stainlessmiremesh を通して作製した。

異種動物赤血球で免疫された動物に生じる異種赤血球に対する抗体産生細胞の検出方法としては、Jerne⁸⁾ の方法があるが、この原法を改良したより鋭敏で簡便な Cunningham and Szenberg⁹⁾ の slide monolayer Technique を本実験では使用した。図 1 の如くスライドガラス (25 \times 75mm) を巾 1/4 イン

チの double sided tape (Scotch Brand No. 410) によって 3 分画し、その上にカバーガラスを密着させ両ガラス間に極めて薄い chamber を作製し、この中に抗原としての 10% 羊赤血球浮遊液 0.1ml、抗体産生細胞を含む胸腺 (あるいは脾) 細胞浮遊液 (最終濃度 2 \times 10⁶ コ/ml) および 10% モルモット補体血清 0.1ml の比で混和後注入し、両端を加熱パラフィンにより封じ 37 $^{\circ}$ C の孵卵器で 30 分静置後鏡検した。約 5 分後 Plaque が出始め、20 分位で明瞭になった。PFC 数を測定後 chamber の容積により注入した有核細胞数を計算し、10⁶ コ当りの PFC 数を計算した。



PFC 検出用培養盤 (Cunningham and Szenberg) 図 1

7. 溶血素価

Metcalf, D. and Moulds, R.⁴⁾ の方法に準じて行った。前述の脱血採取した血清の倍数希釈序列 (pH 7.4 PBS で希釈) を作製、同量 (0.1ml) の 0.5% 羊赤血球浮遊液を加え 37 $^{\circ}$ C 30 分間孵卵器で反応させた。その後試験管に同量 (0.1ml) の 10% モルモット補体血清を追加し、更に 37 $^{\circ}$ C 30 分間孵卵器に入れ溶血反応を起こさせた。溶血素価は軽く試験管を振盪後 2 時間室温に放置し、肉眼的に 50% 溶血をもって判定した。

8. 凝集素価

溶血素価と同様 Metcalf, D. and Moulds, R.⁴⁾ の方法に準じて行った。臨床検査室で赤血球凝集反応に一般に使用されている富士臓器の Plastic tray を使用し、溶血素価測定で用いた同じ血清 (0.25ml) の pH 7.4 PBS 倍数希釈序列を作り、同量 (0.25ml) の 0.25% 羊赤血球浮遊液を加え充分混和後室温に 2 時間放置した。凝集素価は肉眼的最終凝集をもって判定した。

III 実験成績

1. 血清蛋白像の推移 (表 1~5)

1) 正常マウス群 (表 1)

雄マウス 3 匹、雌マウス 3 匹の平

表 1 正常マウス群の血清蛋白像の推移

血清蛋白	実験月数	開始時	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
総蛋白量		5.1 g/dl	5.2 g/dl	5.3 g/dl	5.4 g/dl
アルブミン		3.1	2.9	2.9	3.0
α_1 -グロブリン		0.2	0.4	0.3	0.3
α_2 "		0.5 } 0.9	0.5 } 1.1	0.5 } 1.0	0.6 } 1.1
α_3 "		0.2	0.2	0.2	0.2
β_1 "		0.2	0.3	0.3	0.3
β_2 "		0.6 } 0.8	0.6 } 0.9	0.7 } 1.0	0.6 } 0.9
γ "		0.3	0.3	0.4	0.4
A/G 比		1.55	1.26	1.21	1.25

均値の推移をみると両性間に殆んど有意の差がないため、計6匹の平均値の推移を表1にまとめた。血清蛋白量は実験開始時5.1g/dlとやや低いが、その後マウスの発育と共に軽度であるが上昇していた。然し、各分画濃度では殆んど差は認められず、Albumin (Alb.)は2.9~3.1g/dl, α_1 -Globulin (Glob.)は0.2~0.4g/dl, α_2 -Glob.は0.5~0.6g/dl, α_3 -Glob.は0.2g/dl, 総 α -Glob.は0.9~1.1g/dl, β_1 -Glob. 0.2~0.3g/dl, β_2 -Glob.は0.6~0.7g/dl, 総 β -Glob.は0.8~1.0g/dl, γ -Glob.は0.3

~0.4g/dlで、A/G比は1.55~1.21と多少の変動を示していた。

2) NBU投与群(表2~5)

正常マウス群と同様両性間に有意の差がみられず発症群と非発症群にわけ々々計6匹の平均値の推移を表にまとめた。

表2に示す如く発症群の血清総蛋白量は実験開始時5.0g/dlであったが、NBU投与により1ヶ月後4.4g/dl, 2ヶ月後も4.4g/dlと低下したが、3ヶ月後では腫瘍発生にもかかわらず4.8g/dlと回復傾向を示した。Alb.も3.0g/dlから2.7g/dlと減少後、3ヶ月後2.9g/dlに回復していた。他のGlob.分画の変動は表2に示す如く軽度でありA/G比も殆んど変動しなかった。

これらの成績を正常マウス群と比較すると表3に示す如く、総蛋白量はNBU投与と共に軽度低下し、3ヶ月後88.8%と軽度ながら回復していた。Alb.も同様の傾向を示し、Glob.分画では α_1 、 α_2 、 β_1 -および γ -Glob.の減少が認められた。

特に γ -Glob.はNBU投与と共に急激に低下し、前発症に対照の50.0%、発症期でも50.0%であった。A/G比は対照に比しAlb.の減少が総蛋白量の減少に比較して低値であった

表2 発症群の血清蛋白像の推移

実験月数 血清蛋白	開始時	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
総蛋白量	5.0 g/dl	4.4 g/dl	4.4 g/dl	4.8 g/dl
アルブミン	3.0	2.7	2.7	2.9
α_1 -グロブリン	0.2 ↓	0.2 ↓	0.1 ↓	0.2 ↓
α_2 - "	0.5 ↓ 0.9	0.4 ↓ 0.8	0.4 ↓ 0.7	0.4 ↓ 0.8
α_3 - "	0.2 ↓	0.2 ↓	0.2 ↓	0.2 ↓
β_1 - "	0.2 ↓	0.2 ↓	0.2 ↓	0.7 ↓
β_2 - "	0.6 ↓ 0.8	0.5 ↓ 0.7	0.6 ↓ 0.8	0.2 ↓ 0.9
γ - "	0.3	0.2	0.2	0.2
A/G 比	1.50	0.59	1.59	1.53

表3 発症群血清蛋白量の正常群に対する百分率

実験月数 血清蛋白	開始時	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
総蛋白量	98.0%	84.6%	83.0%	88.8%

2. 免疫電気泳動所見 (写真1~3)

自家製抗マウス家兔血清による免疫電気泳動所見は、NBU投与マウスNo.8の如き胸腺腫が著明な型では Transferrin の増加を認めしたが、IgG には著明な変化を認めなかった (写真1)。またマウスNo.9の如き肝腫腫合併例では Transferrin の著明な増加と共に、IgG の軽度減少傾向を認めた (写真2)。マウスNo.13の如き胸腺腫および肝脾の腫脹を認めない非発症例では Transferrin は不変ないし減少を示し、IgG は対照マウスとほぼ同様であった (写真3)。IgA, IgM の変化については自家製抗血清と抗原である RF 系マウス血清との間に十分な沈降線が得られず、結論を出すことができなかった。

3. 胸腺および脾の PFC の推移

臓器別にみた羊赤血球に対する抗体産生細胞の分布に関しては、Friedmann¹⁰⁾ の報告によると脾が最

表7 脾の PFC/10⁶ コ有核細胞の推移

血球感作日	(1)正常群	(2)NBU投与群	(2)/(1)×100
-2 日	799.0	842.0	106.0%
0 日	763.0	692.0	91.0
3 日	740.0	654.0	90.0
1 週後	501.0	422.0	84.0
2 "	539.5	411.3	76.2
4 "	687.5	454.0	66.2
6 "	574.5	266.0	46.2
9 "	669.5	197.3	29.4
13 "	816.5	53.3	6.5
17 "	693.0	14.9	2.1

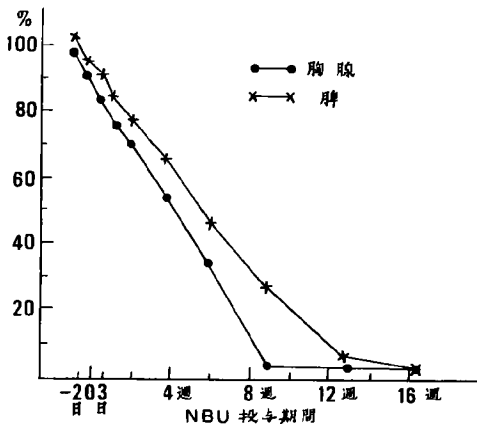


図2 胸腺および脾 PFC の正常群に対する百分率

表5 非発症群血清蛋白質量の正常群に対する百分率

血清蛋白質	開始時	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
総蛋白質量	98.8%	84.6%	86.8%	88.9
アルブミン	96.8	93.1	93.1	93.3
α ₁ -グロブリン	100.0	50.0	66.7	66.7
α ₂ - "	100.0	80.0	80.0	83.3
α ₃ - "	100.0	100.0	100.0	100.0
β ₁ - "	100.0	66.7	100.0	66.7
β ₂ - "	100.0	83.4	85.7	100.0
γ-	100.0	66.7	50.0	75.0
A/G 比	96.8	126.2	117.4	112.0

表6 胸腺の PFC/10⁶ コ有核細胞の推移

血球感作日	(1)正常群	(2)NBU投与群	(2)/(1)×100
-2 日	190.0	186.0	98.0%
0 日	176.0	160.0	91.0
3 日	128.0	106.5	83.0
1 週後	131.0	101.0	77.0
2 "	111.0	78.7	71.0
4 "	90.5	48.8	54.0
6 "	46.0	16.0	34.9
9 "	60.5	2.8	4.6
13 "	58.8	2.5	4.3
17 "	96.0	3.7	3.8

も多く、リンパ腺がこれにつき、胸腺でも認められていた。従って胸腺および脾の有核細胞 10⁶ コ当りの PFC を正常群、NBU 投与群で求め、更に PFC は同じ方法で行っても感作に使用した赤血球浮遊液、感作されたマウス、培養条件等によりバラツキが多いため、同時期同一条件で行った正常群に対する、NBU 投与群の百分率の推移を調べた。

まず胸腺についてみると、NBU が抗体産生系のどの時期に、どの程度有効に働くかを見るため、羊赤血球感作は NBU 投与 2 日前より開始した。その成績は表 6、図 2 に示す如く NBU 投与 2 日前は対照の 98% であったが、同時では 91%、3 日後では 83% と早期より低下し、リンパ球系細胞浸潤が、尚軽度である 4 週後で既に 54% と半減、髄質への細胞浸潤が著明となるが、尚正常構造が保持されている 9 週後では実に 4.6% と激減し、リンパ肉腫が著明となる 13 週後では 4.3%、一部変性壊死の認められる進展期の 17 週後は 3.8% と低値を示していた。

次に脾についてみると表 7、図 2 に示す如く胸腺より高値を示すが、胸腺同様 NBU 投与初期より減

少し、形態学的に脾小節のリン巴球が軽度増生を認める程度の6週後46.2%と略半減し、脾小節の腫大、増生が著明となる9週後更に29.4%に減少、胸腺リン巴肉腫が著明となり、脾においても一部ではリン巴肉腫像の認められる13週後では6.5%と著明に低下していた。脾のリン巴肉腫が進行した17週後では2.1%であった。

4. 溶血素価の推移

溶血素価の推移は PFC と同様、正常群マウス溶血素価の対数に対する NBU 投与群マウス溶血素価の対数の百分率で調べた。この成績は表 8、図 3 に示す如く、PFC と略同一傾向を認めた。すなわち、NBU 投与 2 日前は94%、同時期も94%、3 月後では90%と早期より減少し、胸腺および脾に組織学的には殆んど変化を認めぬ4 週後62.5%に減少、胸腺髄質への細胞浸潤、脾小節リン巴球の軽度増生を認める6 週後では30.7%に減少していた。胸腺の細胞浸潤

表 9 凝集素価の推移

血球感作日	(1)正常群	(2)NBU投与群	(2)の対数/(1)の対数×100
-2 日	2 ^{5.0}	2 ^{5.3}	106.0%
0 日	2 ^{5.5}	2 ^{5.3}	96.4
3 日	2 ^{5.5}	2 ^{5.0}	90.9
1 週後	2 ^{5.0}	2 ^{4.7}	86.0
2 "	2 ^{5.0}	2 ^{4.0}	80.0
4 "	2 ^{5.5}	2 ^{3.7}	67.3
6 "	2 ^{5.0}	2 ^{3.3}	55.0
9 "	2 ^{5.0}	2 ²	33.3
13 "	2 ^{5.5}	2 ²	36.4
17 "	2 ^{5.0}	2 ¹	20.0

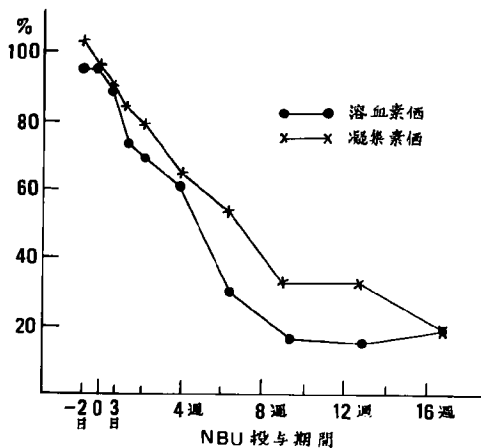


図 3 溶血素価および凝集素価の正常群に対する百分率

表 8 溶血素価の推移

血球感作日	(1)正常群	(2)NBU投与群	(2)の対数/(1)の対数×100
-2 日	2 ^{5.0}	2 ^{4.7}	94.0%
0 日	2 ^{5.0}	2 ^{4.7}	94.0
3 日	2 ^{5.0}	2 ^{4.5}	90.0
1 週後	2 ^{5.0}	2 ^{3.7}	74.0
2 "	2 ^{7.5}	2 ^{5.3}	70.5
4 "	2 ^{7.5}	2 ^{4.7}	62.5
6 "	2 ^{7.5}	2 ^{2.3}	30.7
9 "	2 ^{7.0}	2 ^{1.3}	18.6
13 "	2 ^{5.5}	2 ¹	18.2
17 "	2 ^{5.0}	2 ¹	20.0

が著明となり、脾小節の腫大、増生の認められる9 週後では18.6%に減少し、胸腺の著明なリン巴肉腫および脾においても一部肉腫像を認める13 週後では2¹で18.2%であった。更に胸腺および脾のリン巴肉腫が進行し、正常構造が全く破壊された進展期の17 週では同じ2¹であったが、百分率では正常群が2⁵であったため20%を示した。

5. 凝集素価の推移

溶血素価と同様、正常マウス群に対する百分率の推移をみると、表 9、図 3 に示す如く溶血素価より軽度高値を示すが、NBU 投与と早期より低下し、胸腺髄質へのリン巴球系細胞浸潤、脾小節の軽度リン巴球増生を認める6 週後では55%と略半減し、前発症期の9 週では2²で33.3%、胸腺および脾の一部でリン巴肉腫を認める13 週では2²で36.4%を示し、進展期の17 週では2¹で20%であった。

IV 総括並びに考按

本実験での免疫能は第 1 編に述べた如く、RF 系マウスに NBU の連日経口投与により胸腺腫型リン巴肉腫を発生せしめ、第 2 編では血清蛋白各分画、免疫 Glob. の他、羊赤血球により感作した PFC の最も多く認められる4 日後²¹⁻²²の脾および胸腺の PFC、溶血素価および凝集素価の検査成績を第 1 編における腫瘍発生過程の細胞組織学的所見と関連せしめ検討した。

1. 血清蛋白像および免疫 Globulin (Glob.)

発症群では正常群に比較し総蛋白量、Alb., α₁-Glob. は軽度減少後、進展期には軽度回復した。α₂-Glob. は減少し、進展期では正常群の66.7%となり、α₃-Glob. は不変、β₁-Glob. は中等度減少、β₂-Glob. は進展期では増加した。γ-Glob. は比較的早

期より減少し、進展期では50%に低下した。A/G比は正常群に比し、Alb.の減少以上にGlob.が減少したため、全経過を通じ増加していた。

非発症群では発症群に比較し総蛋白量が早期より回復、Alb.は93.1-93.3%と殆んど不変、 α -および β -Glob.は軽度減少するが発症群と同様の傾向を示した。 γ -Glob.はNBU投与により減少したが、発症群の進展期に相当する時期では発症群より高値を示した。A/G比はGlob.が軽度増加したため発症群より軽度低値を示した。

免疫電気泳動所見は著明に腫大した胸腺腫の発症例ではTransferrinの増加を認めたが、IgGは著明な変化を認めなかった。また肝脾腫合併例では著明なTransferrinの増加と共にIgGの軽度減少傾向を認め、非発症例ではTransferrinの不変乃至減少を示し、IgGは正常群と略同じであった。

血清蛋白像は各成分に特有の代謝過程を持ち、各各独立した合成、分解、体内における分布および体外への喪失という4つの因子の総合されたものであり、担癌動物および担癌患者の血清蛋白の変動については多くの優れた報告がある。然し、その成績は必ずしも一定でなく、意義についても未だ明確にされたとは云えない。

白血病マウスの血清蛋白に関する報告は、1952年にRask-Nielsen¹¹⁾はPlasma cell白血病マウスの血清蛋白中に β -Glob.の増加と β -paraproteinを認め、移植された腫瘍に対する宿主の反応であろうと述べ、本邦では瀬崎¹²⁾がRauscher白血病マウスの血清蛋白の変動を経時的に検査し、Alb.および α_1 -Glob.は進展と共に減少し、 α_2 -Glob.は発症時に軽度減少するが以後正常に復し、 γ -Glob.は発症時に一過性に軽度増加し、以後進展と共に減少することを報告し、この一過性増加はRauscher白血病に対する生体側の反応であろうと推論している。淋巴球系腫瘍ではFletcher¹³⁾がAlb.の低下と β_2 -Glob.の著明な増加を認め、 β_2 -Glob.の増加はTransferrinによるものであると同定し、腫瘍細胞自体の産生によるものか、あるいは生体の二次的反応であろうと述べている。

化学発癌における血清蛋白の変動に関する報告はNBU発癌だけでなく他の化学発癌についても見当たらないようである。

次にこれら担癌動物の血清蛋白の変動を担癌患者の変動と比較してみると、多くの報告¹⁴⁻²²⁾によれば、両者においてAlb.の減少する点は同様であるが、

α -Glob.は動物の場合とは逆に増加する 경우가多く γ -Glob.は必ずしも成績が一定していない。蛋白特にAlb.合成能はある時期にはむしろ亢進しているが、その後進展と共に合成能は低下している。 α -Glob.の増加は一般には非特異的変化と理解されているが、haptoglobin, glycoproteinを問題とした報告^{17) 18)}があり、特に白血病、悪性リンパ肉腫では腫瘍に対する宿主側の反応としての肝での合成の亢進と考えられ、これには更に担癌生体における赤血球代謝および網内系機能が関係する事を報告している。 β -Glob.の増加は α -Glob.ほど恒常的な変化ではないが、疾患の重症度と略平行し非特異的変化と考えられている。 γ -Glob.はMiller¹⁹⁾によれば、325人の白血病および悪性リンパ腫患者について調べ、慢性淋巴性白血病、リンパ肉腫では正常乃至減少し、他の白血病、悪性リンパ腫では正常乃至増加する 경우가多く、教室の瀬崎²⁰⁾も同様の報告をしている。 γ -Glob.の減少は、その代謝面よりArends²¹⁾は淋巴性白血病では γ -Glob.の産生が減少しているため、骨髄性白血病の血清 γ -Glob.の増加は、その産生の亢進によると報告している。RF系マウスにリンパ肉腫を発生せしめた本実験では、Alb.の減少は他の報告と同様であり、肝および腎への腫瘍細胞浸潤を認める所見から合成能の低下、異化の亢進、胃腸管および腎からの喪失等が考えられる。 α -Glob.の低下は他の報告と必ずしも一致せず、またhaptoglobinおよびglycoproteinの測定も行っていないため十分な考察はできなかった。 β -Glob.特に β_2 -Glob.の増加は他の報告と一致し、Fletcher¹³⁾が示したと同様にTransferrinの増加によるものであった。Transferrinの増加は腫瘍細胞の産生、腫瘍に対する生体側の反応および貧血等が考えられているが、貧血は第1編において述べた如く殆んど認められず、また非発症例では増加を認めぬ事実よりして、前二者が考えられる。 γ -Glob.の減少は前述の担癌動物および淋巴性白血病およびリンパ肉腫患者の成績と一致し、動物および人間の血清蛋白の変動は、その本質においてかなり類似していると考えられる。

次に免疫Globulin (Ig) に関してまず担癌動物では長瀬^{23) 24)}が数系の腹水肝癌を移植し、IgGは末期には減少、IgAおよびIgMはあまり変化はないと報告し、瀬崎²⁵⁾もRauscher白血病マウスにおいて同様の報告をしている。悪性リンパ腫および化学発癌におけるIgに関する報告は見当たらないようである。

一方、担癌患者のIgについてはMckelvey, Ko-

rngold, Miller 等が多くの白血病患者について報告しているが、成績が一定せず結論的なことは云えない。本邦では今村²⁶⁾はリン肉腫患者では IgM の減少が特徴的であり、IgG, IgA も減少している症例が多いと報告し、教室の瀬崎²⁷⁾も悪性リン腫患者では IgA, IgM の減少が著明であり、白血病患者では IgA は減少し、他の Ig は骨髄性で増加、リン球性で減少していると述べている。

本実験で発生せしめた胸腺リン肉腫のみの IgG は特に著明な低下を認めず、肝脾腫合併例では他の報告と同様の減少を認め、抗体産生能の低下が考えられた。IgA, IgM は検討していないが、IgM については羊赤血球感作 4 日目の PFC および血清抗体(溶血素および凝集素)は殆んど IgM であるという報告^{21) 29)}より、他の担癌動物およびリン肉腫患者の成績同様、早期より低下を認め、NBU の連日経口投与による腫瘍の発生および進展に重要な意義を持つと考えられた。

2. 胸腺, 脾の PFC および

溶血素価, 凝集素価の変動

羊赤血球感作は、NBU の抗体産生の段階における抑制の場所および程度を検討するため、NBU 投与 2 日前より開始した。

1) 胸腺有核細胞 10^6 コ当りの PFC は、NBU 投与 2 日前感作では対照の 98% であるが、同時、3 日後では低下し、軽度リン球系細胞浸潤しか認めぬ 4 週後で既に半減、前発症期では著明に減少し、発症期および進展期では更に低値を示した。胸腺に比し非常に多くの PFC が認められる脾でも胸腺と同様の傾向を示した。即ち早期より漸次低下し、脾小節リン球の軽度増生しか認めぬ 6 週後で半減、脾小等の腫大、増生が著明となる前発症期では更に低下し、発症期および進展期では著明に減少した。

2) 溶血素価および凝集素価も PFC 同様、NBU 投与初期より低下していた。溶血素価は 2 日前感作で対照の 94%、同時、3 日後の早期より軽度低下、胸腺および脾等に殆んど形態学的変化を認めぬ 4 週後対照の 62.5% となり、前発症期では更に低下、発症期および進展期では著明に低下した。凝集素価も早期より漸次低下し、6 週後対照に比し半減、前発症期更に低下、発症期および進展期では著明に低下した。

羊赤血球に対する脾および胸腺の PFC, 溶血素価および凝集素価で検出される抗体産生の機序は、Mitchell²⁸⁾等の詳細な研究によって(1)抗原処理細胞としての Macrophage → (2)抗原反応性細胞として

の胸腺由来の細胞 (T-cell) → (3)抗体産生前駆細胞としての骨髄由来の細胞 (B-cell) が働いて抗体産生細胞が生じると考えられている。Ceglowski⁶⁾によれば非感作群の脾, 胸腺, リン腺 (腸間膜, 膝窩, 腋窩) 各臓器の 10^6 コ有核細胞当りの PFC は 0.1 以下であり、羊赤血球感作による PFC は正常群マウスの脾は 4 日後が最高であり、胸腺は 4 日後も 6 日後も大差なく、2~4 週前に Friend 白血病 Virus を感染させたハウスでは脾, 胸腺共に著明な低下を認めた。

これら PFC, 凝集素価, 溶血素価の間に若干の差はあるが、NBU 投与 2 日前感作では低下しないが、同時感作、3 日感作では軽度低下し、NBU が抗体産生系の初期の段階、即ち NBU が Macrophage, Immunoblast の様な抗原処理および伝達細胞、抗体産生前駆細胞等に干渉し、免疫反応を抑制していると考えられる。更に胸腺において軽度リン球系細胞浸潤しか認めぬ 4 週で PFC が対照に比し半減、脾の PFC は脾小節リン球の軽度増生しか認めぬ 6 週後半減、血清抗体も略同様の傾向を示し、前発症期では更に抗体産生能が低下していた。これらの時期では第 1 編に述べた如く、本実験では Virus の関与を積極的に支持する所見は得られなかったが、NBU 発癌においても Virus が関与していると言う報告もあり、NBU および Virus が直接に抗体分泌抑制をしていると考えられる。更に NBU 発癌では前述の如く胸腺腫型の発生および免疫能の著明な低下が認められたが、胸腺の免疫能については 1961 年 Miller²⁹⁾によって免疫機構の中樞器官であることが明らかにされて以来多数の研究があり、更に近年胸腺依存性リン球の免疫反応における役割が重要視されている。本実験においても上述の体液性免疫能の抑制と共に胸腺リン球の果す細胞性免疫能の低下が NBU の発癌および進展に密接な関連を有する事が推定せられる。

さてこれら宿主の細胞性または体液性免疫能の、低下が発癌特にその Promotion の過程において重要な役割を演じている事が臨床的にも実験的にも認められている。また一方、多くの発癌剤が免疫抑制作用を示す事も周知の事であるが、その作用機序および発癌過程における意義は未だ明確にはされていない。

まず化学発癌では、Malmgren³⁰⁾が種々の発癌性化学物質および抗癌性化学物質をマウスに投与し、免疫抑制を報告したのに始まり、その後 Prehn³¹⁾

Linder³²⁾等も Methylcholanthrene (MC) を投与し同様の報告をし、本邦では妹尾³³⁾が 7-12-dimethylbenzanthracene (DMBA) をマウスに投与し、強い免疫抑制を認め、DMBA が免疫担当細胞の細胞分裂に抑制的に働いていると報告している。また小川³⁴⁾は成熟ハムスターにウシ・アデノウィルス 3 型接種後の免疫抑制操作の影響に関する検討を行ない腫瘍発生頻度は Virus 単独接種と略同率であったが、各種操作群では進行性に増殖する頻度が高く、個体の非特異的免疫能を低下させ、抗原性を有する腫瘍細胞の増殖を促進させるであろうと報告している。

NBU 発癌に関しては、菊地³⁵⁾がラットおよびマウスに NBU を皮下および経口投与し、NBU による宿主の細胞性免疫能の強い低下を認め、渡辺³⁶⁾もラットに NBU を投与し発癌における細胞性免疫の低下を強調している。一方体液性免疫能の低下に関しては、今村³⁷⁾が本実験同様マウスに NBU 連日経口投与し、早期より羊赤血球に対する脾の PFC、溶血素価および凝集素価の低下、肉腫の発生時期に一致した急激な低下を認めている。

化学物質による発癌においても Virus の関与が考えられているが、Old³⁸⁾は Friend Virus に感染した SWISS マウスは羊赤血球に対する抗体産生能の低下を報告し、その後 Peterson³⁹⁾、Dent⁴⁰⁾等は Gross passage A Virus の免疫抑制を、Friedman⁴¹⁾、Mc Coy⁴²⁾、前述の Ceglowski⁵¹⁾等は Friend および Rauscher Virus の免疫抑制を報告している。これらの成績はマウス白血病 Virus が体液性および細胞性免疫のいずれも抑制する所見である。

以上発癌実験における免疫能の低下を述べてきたが、人間の場合発癌前の免疫能の低下を調べる事は

困難である。然し、担癌患者の免疫能低下に関しては Geller, Larson, Scheier, Miller 等多くの報告があり、Gross⁴³⁾は加齢による免疫能の低下と癌化の関係につき報告している。これらの論文はいずれも発癌実験と同様に、癌の進展と免疫能の低下との間に密接な関係がある事を示唆している。

V 結 論

NBU による胸腺腫型リンパ肉腫の発生および進展と免疫能との間に密接な関係が存在する事を証明するため、経時的に血清蛋白像、PFC、溶血素価および凝集素価を調べた。

1. 血清総蛋白量、Albumin、 α_1 -Globulin (Glob.) は軽度減少後、進展期には軽度回復、 α_2 -Glob. は減少、 β_2 -Glob. は進展期では増加、 γ -Glob. は比較的早期より減少し、生体免疫能の低下が示唆された。
2. 免疫電気泳動所見は発症例で Transferrin の増加を認めたが、IgG は著明な変化を認めず、肝脾腫合併例で軽度減少傾向を認めた。非発症例では、Transferrin は不変乃至減少を示し、IgG は正常群と略同じであった。
3. 羊赤血球に対する PFC、溶血素価および凝集素価は NBU 投与早期より低下し、発症前には更に低下、発症期および進展期では抗体産生は殆んど認められなかった。

本論文を終わるに臨み、ご指導ご校閲を賜った恩師平木潔教授、入野昭三講師、瀬崎達雄講師に深謝致します。

(尚本論文の要旨は第32回日本血液学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Scheidegger, J.J. : Une micro-methode de l'immunoelectrophorese. Internat. Arch. Allergy, 7 : 103~110, 1955.
- 2) Chaperon, E.A., Selner, J.C. and Claman, H.N. : Migration of antibody-forming cells and antigen-sensitive precursors between spleen, thymus and bone marrow. Immunology, 14 : 553~561, 1968.
- 3) Takeya, K. and Nomoto, K. : Characteristics of antibody response in young or thymectomized mice. J. Immun., 99 : 831~836, 1967.
- 4) Metcalf, D. and Moulds, R. : Immune response in preleukaemic and leukaemic AKR mice. Int. J. Cancer, 2 : 53~58, 1967.

- 5) Ceglowski, W.S. and Friedman, H. : Immunosuppression by leukemia Viruses. *J. Immun.*, **101** : 594~604, 1968.
- 6) ———— : Immunosuppressive effects of Friend and Rauscher leukaemia disease viruses on cellular and humoral antibody formation. *J. Nat. Cancer Inst.*, **40** : 983~995, 1968.
- 7) Irimajiri, K., Horiochi, A., Okamoto, Y. and Amaki, I. : Studies on antibody-producing cells by hemolytic plaque method and phase contrast microscopy. *Blood*, **33** : 149~158, 1969.
- 8) Jerne, N.K. and Nordin, A.A. : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, **140** : 405, 1963.
- 9) Cunningham, A.J. and Szenberg, A. : Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, **14** : 599~601, 1968.
- 10) Friedman, H. : Distribution of antibody plaque forming cells in various tissues of several strains of mice injected with sheep erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117** : 526~530, 1964.
- 11) Rask-Nielsen, R., Gormsen, H. and Clausen, J. : A transplantable plasma cell leukemia in mice associated with the production of β -protein. *J. Nat. Cancer Inst.*, **22** : 509~541, 1959.
- 12) 瀬崎達雄, 田中茂人, 水川市郎, 福家隆, 河西浩一, 木畑正義, 入野昭三, 平木潔 : Rauscher 白血病における血清蛋白の変動に関する研究. *日本癌学会第26回総会記事* 219頁, 1967.
- 13) Fletcher, O.J. and Olson, C. : Alteration of serum proteins in chickens with a lymphoid tumor. *J. Nat. Cancer Inst.*, **43** : 1005~1011, 1969.
- 14) Petermann, M. and Hogness, K.R. : Electrophoretic studies on the plasma protein of patients with neoplastic disease. *Cancer*, **1** : 104~119, 1948.
- 15) Boggs, D.R. and Fahey, J.L. : Serum protein changes in malignant disease. *J. Nat. Cancer Inst.*, **25** : 1381~1390, 1960.
- 16) 田口鉄男 : がん—悪液質. *日本臨床*, **24** : 140~146, 1966.
- 17) Owen, J.A., De Grucky, G.C. and Smith, H. : Serum haptoglobins in haemolytic states. *J. Clin. Path.*, **13** : 478~482, 1960.
- 18) Whitmore, D.N. and Kok, D.A. : Plasma glycoproteins in the lymphomas. *Clin. Chem. Acta.*, **8** : 522~527, 1963.
- 19) Miller, D.G. : Patterns of immunological deficiency in lymphoma and leukemias. *Ann. Int. Med.*, **57** : 703~716, 1962.
- 20) 瀬崎達雄, 大塚泰亮, 田中茂人, 入野昭三 : 白血病および悪性リンパ腫における血清蛋白の変動について. *日血会誌*, **31** : 464, 1968.
- 21) Onat, A. and Cooper, T. : Relation of bone marrow findings to serum protein changes in lymphosarcoma, chronic lymphocytic leukemia and Hodgkin's disease. *Blood*, **15** : 114~129, 1960.
- 22) Arends, T., Coonrad, E.V. and Rundles, R.W. : Serum proteins in Hodgkin's disease and malignant lymphoma. *Am. J. Med.*, **16** : 833~841, 1954.
- 23) 長瀬すみ, 多賀弘子, 佐藤博 : 担癌動物の免疫学的研究. *日本癌学会第29回総会記事*, 110頁, 1970.
- 24) ———— : 担癌動物の血清蛋白について. *日本癌学会第30回総会記事*, 110頁, 1971.
- 25) 瀬崎達雄, 岡瞭, 宇野潤一郎, 入野昭三, 平木潔 : Rauscher Virus 性白血病における溶血性貧血の免疫学的研究. *日本癌学会第30回総会記事*, 121頁, 1971.
- 26) 今村幸雄 : 現代内科学大系, 補遺, 第3号, リンパ腺腫と血清蛋白異常, 中山書店, 東京, 220~244, 1965.
- 27) 瀬崎達雄 : 白血病および悪性リンパ腫. *臨床血液*, **13** : 518~526, 1972.
- 28) Mitchell, G.F. and Miller, J. F. : Immunological activity of thymus and thoracic-duct lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **59** : 296~303, 1968.

- 29) Miller, J.F.A.P. : Immunological function of the thymus. *Lancet*, **2** : 748~749, 1961.
- 30) Malmgren, R.A., Bennison, B.E. and Mc Kinely, T.W. : Reduced antibody titers in mice treated with carcinogenic and cancer chemotherapeutic agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **79** : 484~488, 1952.
- 31) Prehn, R.T. and Main, J.M. : Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, **18** : 769~778, 1957.
- 32) Linder, O.E. : Survival of skin homografts in methylcholanthrene-treated mice and in mice with spontaneous mammary cancers. *Cancer Res.*, **22** : 380~383, 1962.
- 33) 妹尾八郎, 浜岡利之, 湯徳正道, 北川正保 : 発癌過程における免疫機能. 日本癌学会第29回総会記事, 106頁, 1970.
- 34) 小川勝士, 福井秀明, 野村敏継, 元井信 : 発癌過程における個体の免疫抑制. 日本癌学会第31回総会記事, 200頁, 1972.
- 35) 菊地浩吉, 石井良文, 上野洋男 : 発癌過程における細胞性免疫能の変化. 日本癌学会第31回総会記事, 205頁, 1972.
- 36) 渡辺漸, 片岡一, 池田久実 : N-ニトロソ-N-ブチル尿素による Graft versus Host 反応の抑制. 日本癌学会第29回総会記事, 106頁, 1970.
- 37) 今村展隆, 山崎孝男, 西原法味, 横路謙次郎 : N-Nitrosobutylurea 及び N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine による免疫抑制作用について. 日本癌学会第29回総会記事, 106頁, 1970.
- 38) Old, L.J., Clarke, D.A., Benacerraf, B. and Goldsmith, M. : The reticuloendothelial system and the neoplastic progress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88** : 264~280, 1960.
- 39) Peterson, R.D., Henricksen, R. and Good, R.A. : Reduced antibody forming capacity during the incubation period by passage A leukemia in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biolog. Med.*, **114** : 517~520, 1963.
- 40) Dent, R.B., Peterson, R.D.A. and Good, R.A. : A defect in cellular immunity during the incubation period of passage A leukemia in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biolog. Med.*, **119** : 869~871, 1965.
- 41) Friedman, H. and Ceglowski, W.S., Leukemia virus-induced immunosuppression. *J. Immunology*, **107** : 1673~1681, 1971.
- 42) Mc Coy, J.L., Fefer, A., Ting, R.C. and Glynn, J.P. : The development of specific cellular and humoral immunity in mice infected with Rauscher leukemia virus as neonates or adults. *Cancer Res.*, **32** : 1671~1678, 1972.
- 43) Gross, L. : Immunological defect in aged population and its relationship to cancer. *Cancer*, **18** : 201~204, 1965.

**Studies on the induction and development of lymphosarcoma
by N-Nitrosobutylurea in RF Mice.**

2. Immunological observations

By

Tameyo TANZI

Department of Internal Medicine, Okayama University
Medical School (Director : Prof. K. Hiraki)

The induction and development of tumors by chemical carcinogens are explained by the correlation of the tumor antigen and host. Especially the immunity of the host is regarded as important. Therefore, the immunological effect on the host was studied.

1. The serum protein analysis showed an increase of β_2 -globulin due to an increase of transferrin and decrease of γ -globulin suggesting a decline of immunity.

2. The plaque forming cells of the spleen and thymus four days after a single i.p. injection of 0.2ml of 20 percent sheep red cells were decreased from the early stage of administration of NBU and markedly decreased already before the induction of tumors and were very rare during the tumor growth.

3. The hemolysin and hemagglutinin titers four days after a single i.p. injection of 0.2ml of 20 - percent sheep red cells also showed similar changes.

丹治論文附図

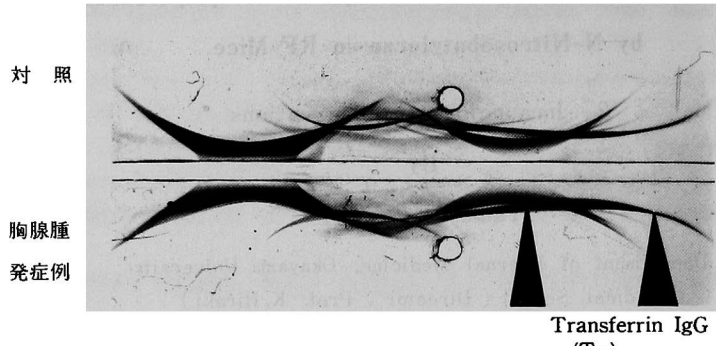


写真1. 胸腺腫型淋巴肉腫発症例(No.8 マウス)の免疫電気泳動像

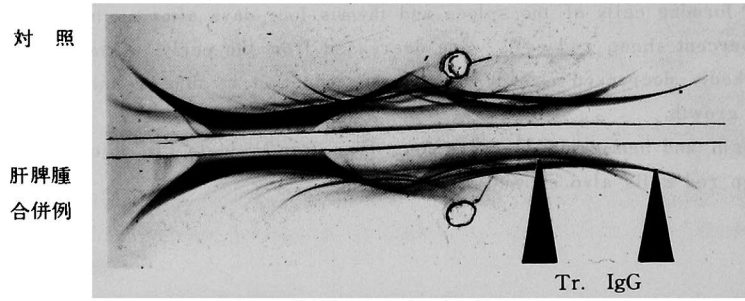


写真2. 肝脾腫合併例(No.9 マウス)の免疫電気泳動像

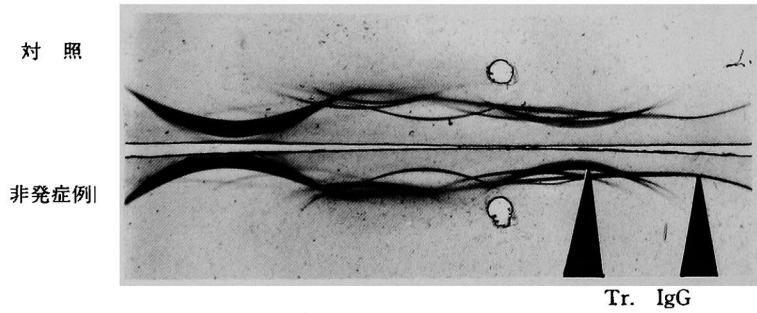


写真3. 非発症例(No.13マウス)の免疫電気泳動像