

癌と細胞性免疫

第 2 編

Methylcholanthrene-誘発肉腫の同系移植マウスの局所リンパ節 リンパ球の allogeneic inhibition 活性

岡山大学医学部オ一外科教室

大 西 信 行

(指導 田中早苗教授)

(昭和49年 8月30日受稿)

動物癌、人癌においても腫瘍が発生すると、まず局所のリンパ節に抗腫瘍性が生じ、腫瘍の増殖につれて強くなってゆくが、腫瘍がある一定限度を越えて大きくなると、その抗腫瘍性は低下、減弱してくる。¹⁻³⁾ その頃になると、より遠位のリンパ組織に抗腫瘍性が生じてくる。このことは Ehrlich 腹水癌の同種移植においても⁴⁾ 前編⁵⁾ で報告したごとく Methylcholanthrene 誘発肉腫の同系移植においても同様に明らかにされたところである。

腫瘍発生後にみられるリンパ球の抗腫瘍性は、腫瘍特異移植抗原 (TSTA) にたいして宿主の対応胸腺依存性リンパ球 (T-細胞) が特異的におこした細胞性免疫であるが、T-細胞は広い意味では Burnet⁶⁾ の提唱した免疫監視機構 (immunological surveillance system) の中枢をなすものであるが、進行癌においては、その機能低下がみられるというのである。⁷⁾ T細胞の基本的な非特異的機能の一つとして、allogeneic inhibition がある。

すでに教室の寺田⁸⁾ は発癌後の腫瘍の増殖期においてリンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性が低下することを報告している。本論文では第1編で使用した Methylcholanthrene 誘発肉腫 (MC-腫瘍) をマウスの背部皮下に同系移植した後、局所リンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性を経目的に測定して興味ある所見を得たので報告する。

実験材料と方法

実験材料については第1編で詳細に述べたので略記する。

実験動物：岡山大学マウスコロニーより得た C₃H 系雄マウスの生後 6～8 週目のものを用いた。

発癌方法および腫瘍の継代維持：20-Methylcholanthrene をアラビアゴムに懸濁し、その 1mg をマウス背部皮下に注射して発生してくる MC-腫瘍を C₃Hマウスの背部皮下に継代移植して腫瘍を維持する。実験には継代移植を行った 6～8 代目の MC-腫瘍を用いる。

標的培養細胞：岡大癌源病理部で株化維持されている Ehrlich 癌細胞由来 JTC-11細胞を同種標的細胞とした。培地には 20% 牛血清加 YLE 培養液 (Cephalothin 30μg/ml を含む) を用いる。

リンパ球浮遊液の調製：MC-腫瘍担癌マウスおよび対照の正常マウスより無菌的にリンパ節を摘出し、細切後 150メッシュで濾過して、濾液を 1000 rpm, 10 分間遠沈し、20% 牛血清加 YLE 培養液に浮遊させリンパ節リンパ球浮遊液をつくる。

Phytohemagglutinin (PHA) の調製：使用直前に phytohemagglutinin-M (Difco) I バイアル (50mg) を YLE 5 ml に溶解し、これを 100% (v/v) PHA 液とする。

MC-腫瘍の経過的同系移植：C₃Hマウス 40匹を 4 群に分ち、各群 10匹に 1 週間隔で MC-腫瘍片 1 mm³ を肩胛骨間背部皮下に移植し、最後の移植から 1 週経った日、すなわち、MC-腫瘍移植後、1, 2, 3, 4 週目の 4 群がそろったところで、各群の中から腫瘍の大きさの良くそろったものを 5 匹ずつ選び出し、各群ごとにエーテル麻酔下に局所腋窩リンパ節を無菌的に摘出・採集しそれぞれのリンパ球浮遊液をつくる。同時に正常 C₃Hマウスの腋窩リンパ球浮遊液も同様に調整する。

Allogeneic inhibition 活性の測定：教室の小長⁹⁾ の方法に準ずる。リンパ節細胞と JTC-11細胞とを

40 : 1, すなわち $80 \times 10^4 : 2 \times 10^4$ /mlに混合し, PHAを2.0% (v/v)に加え, 10mlの混合液をつくる. 各群のリンパ節, JTC-11細胞混合液1.5mlづつを6本の短試験管に分注し, Evans らの方法に従って37℃で静置培養を行う. 24, 48時間培養後任意に3本づつの短試験管を各群より取り出し, 培養液を捨て, 1.5mlクリスタルバイオレット液 (2.1gクエン酸, 50mgのクリスタルバイオレットを100mlの蒸留水に溶解したもの)を加え, 37℃, 30分加温する. クリーナで管壁より静かに細胞を剝離し, よく振盪したのち, Bürker-Türk 血球計算盤で腫瘍細胞の核数計算を各短試験管につき数回行う. 各群3本づ

つの平均核数をJTC-11細胞のそれぞれの培養時間の増殖数とする. JTC-11細胞の核とリンパ節リンパ球の核との識別は, その形状, 核小体より容易である. (図1)

図1 同系移植 MC 腫瘍担癌マウスの局所リンパ節細胞の Ehrlich 癌株化 JTC-11 細胞に対する Allogeneic inhibition 活性に及ぼす影響 (材料並びに方法)

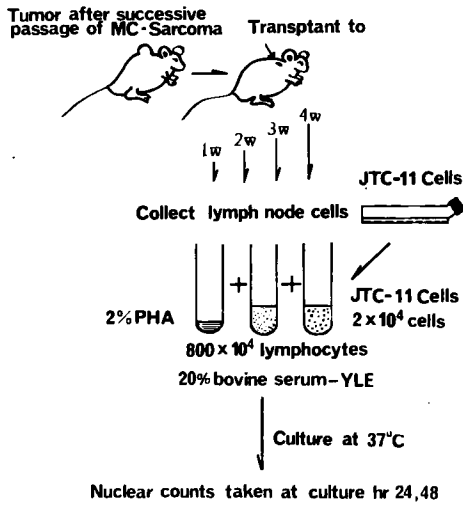
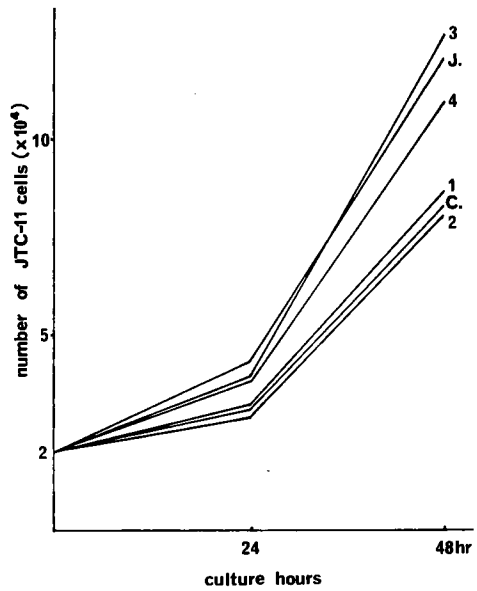


図2 同系移植 MC 腫瘍担癌マウスの JTC-11細胞に対する Allogeneic inhibition 活性に及ぼす影響 (結果)



- 1. JTC-11細胞 + 移植1週目リンパ節細胞 + PHA (2%)
- 2. JTC-11細胞 + 移植2週目リンパ節細胞 + PHA (2%)
- 3. JTC-11細胞 + 移植3週目リンパ節細胞 + PHA (2%)
- 4. JTC-11細胞 + 移植4週目リンパ節細胞 + PHA (2%)
- J. JTC-11細胞単独培養
- C. JTC-11細胞 + 正常リンパ節細胞 + PHA (2%)

表1 同系移植MC腫瘍担癌マウスJTC-11細胞に対する Allogeneic inhibition 活性に及ぼす影響

付加リンパ節細胞	PHA濃度	生存 JTC-11細胞数 (平均値 ± 標準誤差) ※		t-検定
		24時間	48時間	
移植1週目	2.0% (v/v)	3.17 ± 0.40	8.63 ± 0.66	0.7 < P < 0.8
移植2週目	2.0	2.97 ± 0.32	7.96 ± 0.83	0.6 < P < 0.7
移植3週目	2.0	3.93 ± 0.51	12.69 ± 1.19	P < 0.001
移植4週目	2.0	3.90 ± 0.29	11.12 ± 1.03	P < 0.001
正常リンパ節 (対照群)	2.0	3.13 ± 0.28	8.25 ± 0.59	
JTC-11細胞単独培養		4.31 ± 0.35	11.94 ± 0.64	

※ $\times 10^4$

実験結果

同系移植MC-腫瘍増殖の allogeneic inhibition 活性におよぼす影響は、図2のごとくであり、その平均核数は、表1のごとくである。すなわち、MC-腫瘍を背部皮下に同系移植後、1、2週目の局所腋窩リンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性は正常リンパ球の活性と同様であって、allogeneic の Ehrlich 癌株化JTC-11細胞の増殖を強く抑制している。しかし、同系移植後3、4週目の局所リンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性は強く障害されていて、JTC-11単独培養あるいはPHA非付加正常リンパ節リンパ球とJTC-11細胞の混合培養にみられる対照群と同等の腫瘍増殖がみられ、allogeneic inhibition 活性は全く消失している。

考案

担癌生体のT-リンパ球の非特異的機能としては、in vivo においてはツベルクリン反応、DNCB反応、Candida albicans などによる皮内反応など、in vitro においては同種細胞にたいするリンパ球の幼若化率、PHAにたいする幼若化率あるいはリンパ組織などの検索が行われているが、いずれも進行癌になると in vivo の反応も、in vitro の反応も低下することが報告されている。¹⁰⁻¹³⁾しかし、T-リンパ球の今一つの重要な機能である allogeneic inhibition 活性に関する報告はみられない。他方、T-リンパ球の特異的反応として広く行われているものが担癌生体リンパ球の自家腫瘍細胞に対する直接作用（殺細胞作用）であり、自家腫瘍抗原に対する末梢血リンパ球の幼若化率（mixed lymphocyte-tumor reaction）であり、マクロファージ遊走阻止試験（macrophage migration inhibition test）などである。¹¹⁻¹²⁾オ1編でしめたごとく担癌生体リンパ球の特異的機能も進行癌では低下・消失してくる。⁵⁾MC-腫瘍をC₃Hマウスの背部皮下に移植して1、2、3、4週と日を追って局所腋窩リンパ節を摘出し、自家MC-腫瘍細胞にたいする抗腫瘍性（殺細胞作用）を in vitro のリンパ球混合培養法でみると、移植1、2週目の局所リンパ節リンパ球には強い抗腫瘍性が見られるのに、3、4週と腫瘍の増殖が進行してくると抗腫瘍性が低下・消失してくる。この特異的免疫機能と今回みた局所腋窩リンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性は大約軌を一にするものであって、移植後1、2週目の局所リンパ節には健常

マウスと同時の強い allogeneic inhibition 活性があるのに3、4週と進行した担癌マウスの局所リンパ節には活性が完全に消失している。T-リンパ球の特異的免疫反応が、進行癌で低下する背景にはT-リンパ球の非特異的機能の低下が存在するものと考えられる。進行癌でのT-リンパ球の有する allogeneic inhibition 活性低下の機作は全く不詳であるが、教室の小川がマウスの抗胸腺同種あるいは異種血清を用いて示しているが如くPHAにたいして幼若化反応を起こしたり、腫瘍細胞に殺細胞性に作用したり、マクロファージ遊走阻止因子を放出するマウスリンパ球がT-細胞であること、¹⁴⁻¹⁵⁾しかもこれらリンパ球の機能が腫瘍より放出されるトキソホルモンにより障害されることから考えて、allogeneic inhibition 活性の進行癌における低下、消失はこのトキソホルモンに負うところが大きいと思われる。⁶⁾また、Hellström ら¹⁷⁾のいう blocking factor や immunoregulatory globulin である α -グロブリン¹⁸⁾の進行癌における増量などもまた allogeneic inhibition の活性低下に関連があるといえよう。いずれにしても哺乳動物や人類の免疫監視機構であるT-細胞が、進行癌において機能低下あるいは機能不全を来たしていることが明らかにされたわけである。しかも、allogeneic inhibition はT-細胞のみならず、すべての体細胞が共有しているいわゆる癌細胞などの正常より逸脱した細胞を拒絶しようとする活性であり、¹⁹⁾この allogeneic inhibition 活性の低下はホメオスタシスの破綻を意味するものであり、進行癌の難治性を示唆するものである。

結論

哺乳動物を発癌より守っていると思われる immunological surveillance system の中枢をなしているT-リンパ球の allogeneic inhibition activity を担癌マウスで測定し、次の結果を得た。

Methylcholanthrene-induced sarcoma (MC-tumor) をC₃Hマウスの背部皮下の肩胛骨間に同系移植し、1、2、3、4週目の局所腋窩リンパ節リンパ球を採り、PHA2.0% (v/v) 付加のもとに allogeneic JTC-11 tumor cells derived from Ehrlich cancer cells の40倍に加えて24、48時間培養しJTC-11細胞の増殖数をもって、各週の局所腋窩リンパ節リンパ球の allogeneic inhibition 活性とした。

腫瘍移植後早期の1、2週目では局所腋窩リンパ節リンパ球に健常マウスリンパ球と同等の強い all-

ogeneic inhibition 活性があるが, 3, 4 週目の局所腋窩リンパ節リンパ球には allogeneic inhibition 活性が完全に消失している. すなわち, 進行癌では allogeneic inhibition 活性が低下, 消失してく

るものと思われる.

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** :26, 1966.
- 3) 小林雅己：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. 岡山医学会誌, **85** : 231, 1974.
- 4) Orita, K., Tomoyasu, S., Kaneda, S., Miwa, H. & Konaga, E. : Time lapse changes in the concomitant immunity of lymphoid cells from different regions of Ehrlich tumor bearing mice and alterations in blastformation rate by PHA-stimulation. *Acta Med. Okayama*, **26** :81, 1972.
- 5) 大西信行：癌と細胞性免疫. 1編. Methylcholanthrene-誘発腫瘍の同系移植マウスの部位別リンパ組織の抗腫瘍性. 岡山医学会誌. (投稿中)
- 6) Burnet, M. : *Immunological Surveillance*. Pergamon Press, Oxford, London. 1970.
- 7) Orita, K. Miwa, H., Shinoda, K. & Tanaka, S. : Suppressed blastformation of lymphocyte in cancer bearing patients, with special reference to the cancers of digestive tract. *Acta Med. Okayama*, **27** : 37, 1973.
- 8) 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. 岡山医学会誌, **85** : 241, 1973.
- 9) Konaga, E. : Action mechanism in vitro of sensitized regional lymph node cells on target cells. I. Anti-growth effect of regional lymph node cells of Ehrlich cancer transplanted mouse and that of normal lymph node cells induced PHA, on Ehrlich cancer cell line. *Acta Med. Okayama*, **25** : 269, 1971.
- 10) 折田薫三：癌患者の免疫機能. *臨床科学*, **8** : 477, 1972.
- 11) 折田薫三：がん患者におけるリンパ球の機能テスト. *綜合臨牀*, **22** : 2121, 1973.
- 12) 折田薫三：癌患者におけるT-細胞の機能テストとその診断的意義, *臨床科学*, **10**, 268, 1974.
- 13) 三輪恕昭, 小川 潔, 折田薫三, 田中早苗：リンパ球幼若化率による癌進行度, 治癒切除可能度, 予後の判定. 第11回日癌治総会記録, p.194, 1973.
- 14) 小川 潔, 折田薫三, 田中早苗：溶血斑形成細胞に対する抗胸腺細胞血清 (ATS) の影響について. 第23回日本アレルギー学会総会記録, p.57, 1973.
- 15) 湯村正仁, 小川 潔, 鈴木絃一, 折田薫三, 田中早苗：担癌生体リンパ球の抗腫瘍効果について. 第3回日本免疫学会総会記録, p. 210, 1973.
- 16) 鈴木絃一, 折田薫三, 田中早苗：免疫リンパ球に対するトキソホルモンの影響について. 第32回日本癌学会総会記録, p.254, 1973.
- 17) Hellström, I., Sjögren, H. O., Wagner, G. A. & Hellström, K. E. : Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms. *Int. J. Cancer*, **7** :226, 1971.
- 18) Glasgow, A. H., Cooperband, S. R., Schmid, K., Parker J. T., Occhino, J. C. & Mannick, J. A. : Inhibition of secondary immune responses by immunoregulatory alphaglobulin. *Transplantation Today*, (Balner, H. et al. eds.) Grune & Stratton, New York & London. p. 835, 1971.
- 19) Möller, E.: Contact induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science*, **147** : 873, 1965.

Cancer and Cellular Immunity**II Allogeneic inhibitory activity of regional lymph node cells in the mouse isografted with methylcholanthrene-induced tumor****Nobuyuki OHNISHI**

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

ABSTRACT

With cancer-bearing mice as the subjects of our study, we studied allogeneic inhibitory activity of lymphocytes which constitutes the center of the immunological surveillance system believed to be protecting mammals from cancer, and obtained the following results.

At first, methylcholanthrene-induced sarcoma (MC-sarcoma) was isografted to C₃H mice subcutaneously on the back between scapulae.

Then the regional axillary lymph nodes were taken out and lymph node cells were isolated from these nodes. These lymph node cells were mixed with JTC-11 cells derived from Ehrlich cancer cells in the ratio of 40:1, and the mixed cells were cultured for 24 or 48 hours. During this culture the increase in the number proliferating JTC-11 cells, counted every week, was taken as the allogeneic inhibitory activity of the regional lymph node cells. As a result it has been found that in the early stage of one to two weeks after tumor transplantation there can be observed an allogeneic inhibitory activity as strong as that of normal mouse lymph node cells, but by the third or fourth week such an allogeneic inhibitory activity of the regional axillary lymph node cells has been completely lost. In other words, it seems that in the case of progressive cancer the allogeneic inhibitory activity decreases along with time.