

癌と細胞性免疫

第 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

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 田中早苗教授)

大 西 信 行

[昭和49年7月26日受稿]

動物癌においても人癌においても、腫瘍には腫瘍特異移植抗原 (Tumor specific transplantation antigen, TSTA) が証明され、¹⁻⁵⁾これが担癌宿主に細胞性免疫を惹起することが漸次明らかにされてきている。教室では、何等処置を受けることなく放置しておけば腫瘍死する運命にある担癌生体のいわゆる concomitant immunity を主として in vitro の組織培養法で検討している。すなわち、原⁶⁾は Ehrlich 腹水癌を同種移植されたマウスにおいて、佐藤⁷⁾は C₃H 系マウス乳癌より株化された A 細胞の同系移植マウスにおいて、大杉^{8,9)}は C₃H 系マウスに Methylcholanthrene 誘発肉腫の同系移植、および自然発生乳癌担癌マウスで、それぞれ concomitant immunity の成立することをその標的癌細胞に対応の宿主リンパ球を混合して培養する cytotoxicity test により証明してきた。しかし、腫瘍がある限度を越えて大きくなるとリンパ球の抗腫瘍性が低下消失することをみてきた。本論文ではこの点を詳細に検索するため、Methylcholanthrene 誘発腫瘍を同系移植後、経日的に各部位別のリンパ組織リンパ球の抗腫瘍性を測定し従来の報告を裏付ける結果をえたので報告する。

実験材料と方法

実験動物：

岡山大学マウスコロニーより得た純系 C₃H 雄マウスの生後 6～10 週目のものを使用した。

発癌方法および腫瘍の継代維持：

芳香族炭水化物、20-Methylcholanthrene (MC) (和光純薬) をアラビアゴムに懸濁し、その 1 mg を

マウス背部皮下に注入する。約 3 ヶ月後注射局所に、1 cm × 2 cm 径大に腫瘍が発育してくる。この腫瘍を無菌的に摘出し、1 × 1 × 1 mm 大に細切し、同系 C₃H マウス背部皮下に約 3 週間々隔で継代移植を行い腫瘍保持する。実験には、これら継代移植を行った 5～12 代目の腫瘍を用いる。

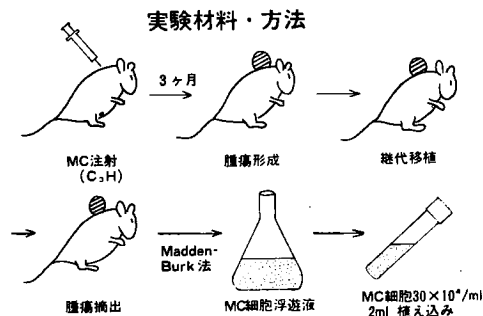
腫瘍細胞の初代培養：

腫瘍移植後、1～2 cm 径となった腫瘍を無菌的に摘出する。腫瘍を Hanks 液にて数回洗浄し、この腫瘍をふたたび Hanks 液中にて細切数回洗浄を行い、大約 Madden-Burk 法に準じて細胞浮遊液をつくる。細切した腫瘍片約 1 g に対して Hanks 液 8 ml, 0.2% Trypsin 10 ml, 0.04% DNase 0.3 ml を加え 90 分放置する。上清をすて、再び同量の Hanks 液, Trypsin, DNase を加え, magnetic stirrer にて 60 分間攪拌する。150 メツシュにて濾過し、濾液を 1000 rpm, 10 分間遠沈する。上清をすて、洗浄の目的で、TC-199 液 30 ml を加え、再び 1000 rpm, 10 分間遠沈する。上清をすて、20% 牛血清加 TC-199 液 (Cephalotin 30 µg/ml を含む) を加え、1 ml 中 30 × 10⁴ 個の腫瘍細胞を含む腫瘍細胞浮遊液を作製する。大きな核鮮明な核小体を有し、淡い核構造の細胞を腫瘍細胞として算定する。この浮遊液を 60 本短試験管に、2 ml づつ分注を均等に行い、37℃ で 3 日間 replicate culture を行う。(図 1)

リンパ球浮遊液の調製：

担癌マウスおよび対照の正常マウスより無菌的に剔出したリンパ節および脾を、それぞれシャーレ内にて Hanks 液で数回洗浄後、細切し室温で 30 分間放置する。よく攪拌後 150 メツシュにて濾過し、濾液

図1. MC誘発腫瘍の初代培養法



を1000 rpm, 10分間遠沈する. 上清を除去し, 再び Hanks 液を加え1000 rpm, 10分間遠沈する. 上清を除去し20%牛血清加 TC-199液 (Cephalotin $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む)を加え, リンパ球数が replicate culture 完了時の腫瘍細胞数の20倍となるように調製する.

MC誘発腫瘍の経過的同系移植:

C₃H系マウス80匹に1 mm²大の腫瘍片を肩胛骨間背部皮下に移植し, 1群20匹の4群に分ち, 移植1週目, 2週目, 3週目, 4週目に1群ずつのマウスよりエーテル麻酔下に局所腋窩リンパ節, 遠隔腸間膜リンパ節および脾臓を無菌的に摘出し, それぞれよりリンパ球浮遊液をつくり, 部位別リンパ球の抗腫瘍性を測定する.

初代培養腫瘍細胞とリンパ球の付加混合培養:

腫瘍細胞を3日間 replicate culture したのち, 60本の短試験管中より数本の短試験管を任意に抽出し, 上清を捨て, 2.0mlのクリスタルヴィオレット液 (100ml 蒸留水+2.1g クエン酸+50 mg クリスタルヴィオレット)を加え, 37℃で30分間加温する. 管壁に接着している細胞を静かに剝離し, よく振って均一の細胞浮遊液をつくる. この1滴を血球計算盤にとり各試験管につき数回核数計算をなし平均腫瘍細胞数を出すとともに各試験管に均等に増殖していることを確かめる. 残余の短試験管を10本ずつの5群に分ち, その1群をリンパ球非付加単独培養群とし, 1群を正常マウスリンパ球付加対照群とし, 残りの3群に局所腋窩リンパ節細胞, 腸間膜リンパ節細胞, 脾細胞を付加する. すなわち, 5群いずれも上清を静かに捨てた後, 単独培養群では培養液のみ2.0ml, 対照群では当日調製した正常マウスの腋窩リンパ節細胞浮遊液を, 残りの3群にはそれぞれのリンパ球浮遊液を2.0ml ずつ加え, さらに37℃, 48時間, 72時間培養する. 48時間, 72時間培養終了後

に, 各群よりそれぞれ5本の短試験管を取り出し, 前述のように上清を捨て, クリスタルヴィオレット液を入れて管壁に付着していた腫瘍細胞を核数計算し, 5本の平均値をもって各群のその時の腫瘍増殖数とする. (図2)

実験結果

1) 腫瘍移植後1週目の抗腫瘍性

前述の方法により replicate culture 72時間後のガラス管壁には付着している腫瘍細胞数は $9.9 \times 10^4/\text{ml}$ であり, これに対してリンパ球数は約20倍として $200 \times 10^4/\text{ml}$ を2 ml 付加混合培養を行い, 48時間後, 72時間後の核数計算による判定は表1のごとくである. 局所腋窩リンパ節に最も強い抗腫瘍性を認め, 遠隔腸間膜リンパ節, 脾臓にはみるべき抗腫瘍性の出現は認められない.

2) 腫瘍移植後2週目の抗腫瘍性

図2. 初代腫瘍培養細胞とリンパ球混合培養法

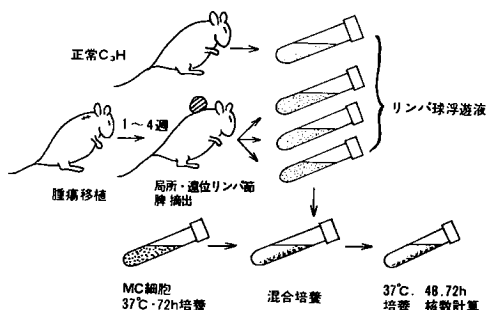


表1. 移植1週目の部位別リンパ球の抗腫瘍性

リンパ球細胞	培養後腫瘍細胞数 (平均値±標準誤差※)		t-検定
	48時間	72時間	
局所腋窩リンパ節	14.4±1.44	12.2±1.25	P<0.001
遠隔腸間膜リンパ節	17.8±2.40	20.9±1.77	P>0.9
脾臓	15.0±1.47	18.3±1.62	0.4>P>0.3
正常リンパ節 (対照群)	16.2±1.96	21.1±1.66	
腫瘍細胞単独培養	20.4±1.62	22.8±1.77	

※×10⁴

混合培養時腫瘍細胞数 $9.9 \times 10^4/\text{ml}$

混合培養時リンパ球数 $200 \times 10^4/\text{ml}$

局所腋窩リンパ節に最も強い抗腫瘍性を認め、遠隔腸間膜リンパ節にはわずかに抗腫瘍性の出現を認めるが、腫臓にはみるべき抗腫瘍性の出現は認められない。(表2)

表2. 移植2週目の部位別リンパ球の抗腫瘍性

リンパ球細胞	培養後腫瘍細胞数 (平均値±標準誤差※)		t-検定
	48時間	72時間	
局所腋窩リンパ節	17.2±2.38	19.0±2.13	0.5> P>0.4
遠隔腸間膜リンパ節	20.9±1.47	21.7±1.72	0.9> P>0.8
脾臓	23.5±1.51	24.4±1.47	P>0.9
正常リンパ節 (対照群)	18.7±2.10	24.8±2.18	
腫瘍細胞 単独培養	21.6±1.48	26.2±4.78	

※×10⁴混合培養時腫瘍細胞数 14.8×10⁴/ml混合培養時リンパ球数 300×10⁴/ml

3) 腫瘍移植後3週目の抗腫瘍性

脾臓に最も強く抗腫瘍性が出現し、遠隔腸間膜リンパ節には2週間と同様わずかに抗腫瘍性が認められるが、局所腋窩リンパ節では抗腫瘍性は全く消失している。(表3)

表3. 移植3週目の部位別リンパ球の抗腫瘍性

リンパ球細胞	培養後腫瘍細胞数 (平均値±標準誤差※)		t-検定
	48時間	72時間	
局所腋窩リンパ節	16.9±1.56	21.4±1.88	P>0.9
遠隔腸間膜リンパ節	17.5±2.50	18.8±1.47	0.6> P>0.5
脾臓	14.1±1.32	13.0±1.39	P<0.001
正常リンパ節 (対照群)	17.1±1.45	20.9±1.70	
腫瘍細胞 単独培養	18.1±1.28	23.0±2.61	

※×10⁴混合培養時腫瘍細胞数 12.9×10⁴/ml混合培養時リンパ球数 250×10⁴/ml

4) 腫瘍移植後4週目の抗腫瘍性

移植後4週目となり、担癌マウスの腫瘍が大きくなり増悪した時期では局所腋窩リンパ節、脾臓ともにわずかに抗腫瘍性が認められ、最も強く抗腫瘍

性の認められるのは、遠隔腸間膜リンパ節であった。(表4)

総括ならびに考案

Methylcholanthrene 誘発腫瘍には、腫瘍発生宿主の有していない TSTA のあることが、Foley¹⁾ 以来明らかにされ、宿主を X 線照射 MC 腫瘍細胞の注射や²⁾ 増殖途中の腫瘍の結紮開放といった手段で過

表4. 移植4週目の部位別リンパ球の抗腫瘍性

リンパ球細胞	培養後腫瘍細胞数 (平均値±標準誤差※)		t-検定
	48時間	72時間	
局所腋窩リンパ節	11.5±1.55	12.3±1.75	0.3> P>0.2
遠隔腸間膜リンパ節	11.0±1.61	9.1±1.56	0.01> P>0.001
脾臓	6.2±1.29	13.1±1.37	0.4> P>0.3
正常リンパ節 (対照群)	12.8±1.34	15.4±1.40	
腫瘍細胞 単独培養	13.5±1.69	17.6±1.69	

※×10⁴混合培養時腫瘍細胞数 8.6×10⁴/ml混合培養時リンパ球数 200×10⁴/ml

免疫することにより、in vivo の移植実験で特異的抗腫瘍性の成立することを明らかにして来たが、これらはいずれもいわゆる sinecomitant immunity である。MC 腫瘍担癌宿主で concomitant immunity を in vitro で証明したのは教室の大杉⁸⁾⁹⁾ によるものが最初といえよう。大杉は MC 腫瘍の同系移植マウスの局所腋窩リンパ節細胞を、MC 腫瘍細胞に加えて培養することにより、concomitant immunity の成立をみたものであり、in vivo においては教室の柏原¹²⁾ の研究が最初であるといえよう。柏原は大杉と同様、MC 腫瘍同系移植マウスの局所腋窩リンパ節細胞を MC 腫瘍細胞の10倍に加えて、別の同系マウスに移植するいわゆる中和移植実験で移植後1、2週目の局所リンパ節に強い抗腫瘍性のあることを明らかにしている。

この柏原の in vivo の中和実験でも、腫瘍移植後3、4週目のリンパ節には抗腫瘍性がなく、in vitro の lymphocytotoxicity test においても同様の知見がえられる。すでに Ehrlich 癌の同種移植において原⁶⁾ が、株化腫瘍細胞の同系移植において佐藤⁷⁾ が、局所リンパ節の抗腫瘍性は、癌が大きくなる末期に

においては低下消失することを示し、折田ら¹³⁾は Ehrlich 癌細胞の同種移植において、腫瘍の発育と共に部位別リンパ組織リンパ球の抗腫瘍性が変化することを明らかにしている。この傾向は人癌¹⁴⁾においてもみられるところであり、一般に腫瘍の発生あるいは移植後、まず最初に近位のリンパ節に抗腫瘍性が生じ、腫瘍の増大と共に次第に増強し、ある限度を越えて大きくなると近位リンパ節の抗腫瘍性が低下し、さらに遠位のリンパ組織に抗腫瘍性が生じてくるものと思われる。本実験では、一応組織適合性差を無視する近交系の C₃H マウスに TSTA の証明されている MC 誘発腫瘍を同系移植し、TSTA にたいしてのみおこっていると思われる concomitant immunity を、リンパ組織の部位別に分けて検索し、先人のえた結果をほぼ立証することができたわけである。局所リンパ節を前もって除去しておいて、腫瘍を移植すると無処理健常マウスに移植した場合に比し、抗腫瘍性の発現が遅く、その程度も弱いという Fisher & Fisher¹⁵⁾の報告、あるいは同種移植免疫の知見からすれば、腫瘍の発生、移植後、まず近位リンパ節に抗腫瘍性の生ずることは容易に理解されるが、腫瘍が大きくなると、抗腫瘍性が低下消失するという点になると、high zone paralysis を中心として多くの機作が考えられている。¹⁶⁾この抗腫瘍性の低下、消失の防止が癌の免疫療法につながる

ものといえる。

結 論

Methylcholanthrene-誘発腫瘍 (MC 腫瘍) を同系 C₃H マウスの背部皮下に移植後、1, 2, 3, 4 週目の局所腋窩リンパ節、脾、遠隔腸間膜リンパ節を摘出し、前述の MC 腫瘍より初代培養した腫瘍細胞にこれらリンパ組織よりのリンパ球を 20 倍に加えて、24, 48 時間培養し、リンパ球の殺腫瘍細胞効果を測定した。

腫瘍移植後早期の 1 週目では局所腋窩リンパ節にのみ強い抗腫瘍性が出現し、次第に以後抗腫瘍性が減弱し、3, 4 週間と進行してくると消失する。脾では移植 3 週目に強い抗腫瘍性があるが、4 週目には消失している。遠隔の腸間膜リンパ節では移植後日を追って抗腫瘍性が増強し、4 週目に最強となる。

以上、部位別リンパ球の抗腫瘍性はまず局所リンパ節に最も早期に、最も強い抗腫瘍性が出現し、進行癌になると減弱消失し、さらに遠位のリンパ組織に抗腫瘍性が出現してくる。

(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。

参 考 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) 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.
- 3) Hellström, I.: A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro. *Int. J. Cancer*, **2**: 65, 1967.
- 4) Hughes, L.E. & Lytton, B.: Antigenic properties of human tumors, delayed cutaneous hypersensitivity reactions. *Brit. Med. J.* **1**: 209, 1964.
- 5) Stewart, T.H. M. & Orizaga, M.: The resistance of delayed hypersensitivity reaction in patients toward cellular extracts of their malignant tumors. *Cancer*, **28**: 1472, 1971.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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 cells. *Acta Med. Okayama*, **25**: 229, 1971.
- 10) Madden, R.E. & Burk, D.: Production of viable single cell suspensions from solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, **27**: 841, 1961.
- 11) 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, 第1編, MC発癌ラットの抗移植性, *最新医学*, **20**: 2826, 1965.
- 12) Kashiara, E.: Inhibitory effect of isologous regional lymph-node cells from the methylcholanthrene-induced sarcoma bearing mice on the tumor in vivo. *Acta Med. Okayama*, **24**: 161, 1970.
- 13) Orita, K., Tomoyasu, T., 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 due to PHA-stimulation. *Acta Med. Okayama*. **26**: 81, 1972.
- 14) 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, *岡山医学会雑誌*, **85**: 231, 1973.
- 15) Fisher, B. & Fisher, E.R.: Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Induction of immunity. *Cancer*. **27**: 1001, 1971.
- 16) 折田薫三: 癌と細胞性免疫, *臨床免疫*, **4**: 823, 1972.

Cancer and Cellular Immunity
Anti-tumor activity of lymphatic tissues at different sites
in the mouse isografted with methylcholanthrene-induced tumor

Nobuyuki OHNISHI

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

ABSTRACT

Regional axillary lymph nodes, spleen and distant mesenterial lymph nodes were taken out one, two, three and four weeks after isografting methycolanthrene-induced tumor (MC-tumor) on the back under the skin of C₃H mice and lymphocytes were prepared from these lymph nodes and spleen. These lymphocytes were then mixed with the primary cultured tumor cells of MC-tumor in the 20:1 ratio, and cultured for 24 and 48 hours in order to determine antitumor activity of the lymphocytes.

As a result it has been shown that at an early stage of one week after tumor transplantation a strong antitumor activity appears only in the regional axillary lymph nodes, which weakens gradually thereafter, and as the time elapses two to three weeks, it disappears.

In the spleen, a strong antitumor activity can be observed in the third week after tumor transplantation, but the activity disappears by the fourth week. In the distant mesenterial lymph nodes, the antitumor activity grows stronger along with lapse of time after the transplantation, which reaches its peak by the fourth week.

These findings indicate that antitumor activity of lymphocytes in different sites appears earliest and strongest in the regional lymph nodes, which weakens and disappears as the cancer progresses, which an antitumor activity makes its appearance in further distant lymphatic tissues.