

20-Methylcholanthrene の経口投与による RF 系マウス 白血病の発生機構に関する研究

第 2 編

20-Methylcholanthrene 経口投与による白血病の発生における croton 油の co-leukemogenic 作用について

岡山大学大学院医学研究科 (主任: 大平昌彦教授
主任: 平木 潔教授)

康 逸 雄

[昭和 39 年 2 月 29 日受稿]

I. 緒 言

Berenblum (1941)¹⁾ は発癌性炭化水素の、そのみでは発癌に至らない程度の量をマウスの皮膚に塗布し、その後ある期間をおいてクロトン油を反覆局所に塗布すると、同所に癌が発生するという実験から、前者の作用を創始作用または誘発作用 (Initiation)、後者を促進作用 (Promotion) と名づけ、発癌過程における 2 段階説を提唱し²⁾³⁾、その後この考えは Rous⁴⁾、Mottram⁵⁾⁶⁾、Rusch & Kline⁷⁾⁻⁹⁾ らの実験によつて支持されている。この発癌における 2 段階説の根拠は、従来主として皮膚癌についての実験に基づくものであるが、同様の機序が他の発癌形態、例えば白血病の発生にも適用されるかどうかということは、単に理論上のみならず実際的にも極めて重要な興味深い問題である。

X 線照射による白血病の発生率が、X 線照射時ウレタン麻酔をすると高められるという実験的観察 (Kawamoto et al¹⁰⁾) から、ウレタンは co-leukemogenic な作用をもつということが言われ、Berenblum & Trainin¹¹⁾¹²⁾ は更に詳細な研究によつて、ウレタンは X 線による白血病の発生に対して co-leukemogenic 作用をもつことを確認し、発癌の 2 段階説は白血病の発生過程にも適用される可能性のあることを提唱した。

しかしながら近年にいたり、ウレタン自身に白血病誘発作用のあることが認められ¹³⁾⁻¹⁵⁾、入野¹⁶⁾ からも RF マウスにおいてこれを確認しているので、ウレタンと X 線の併用による Berenblum の実験およびその解釈は新たに再検討されなければならない。

著者は¹⁷⁾ 先に RF マウスにおいて、20-methylcholanthrene の経口投与によつて極めて高率に白血病が発生することを認めたので、発癌性化学物質による白血病発生における発癌 2 段階説の適用の問題を検討する目的で、20-methylcholanthrene の経口投与と、それ単独では白血病誘発作用をもたないクロトン油の皮膚塗布の併用による白血病の発生について観察を行ない 20-methylcholanthrene 単独経口投与による白血病の発生が、クロトン油の皮膚塗布の併用によつてかなり促進されるという興味ある知見を得たので報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物: 第 1 編において述べた如く、生後 4~6 週の RF 系マウスを使用した。

2. 投与材料および投与方法

a 20-Methylcholanthrene については第 1 編に述べたと同じで、0.8% 20-methylcholanthrene の olive 油溶液の 0.1~0.15cc を週 3 回、自家製カテテル用注射筒を用いて、白血病が発生するまで継続して経口投与を行なった。

b Croton oil: 片山化学工業 KK 製のクロトン油を benzene に 5% の濃度に溶解した溶液を用いた。

0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液の経口投与と共に、5% croton 油 benzene 溶液を毎週 2 回白血病が発生するまで RF マウス背部皮膚に毛筆で 1~2 筆塗布した。

c 対照マウスに対しては、5% croton 油 benzene 溶液のみを上記 20-methylcholanthrene とクロ

トン油の併用投与実験動物群の投与時期と合せて、同一方法で毎週2回背部皮膚に塗布した。

3. 末梢血の検査法

Mélangeur, Sahli 氏血色素計および Neubauer 新 型血球計算盤はすべて日本血液学会検定済みのものを用いた。検血方法は RF 系マウスの尾部をアルコールで充分消毒乾燥後、尾静脈を鋭利な刺刀で傷つけて採血した。このようにして採血した末梢血液についての諸検査方法は第1編において詳述したので省略する。

4. 骨髓, 脾, リンパ腺の検査法

屠殺または死後なるべく早く大腿骨骨髓, 脾およびリンパ腺を摘出し, stamp 標本を作製してこれに May-Giemsa 染色を施し観察した。

5. 組織検査法

屠殺または死後なるべく早く10% formalin 溶液にて固定後切片標本を作製し, Haematoxylin-eosin 染色を施し観察した。

6. 臨床組織培養法による検索

平木式臨床組織培養法により, 無菌的に取り出した骨髓, 脾, リンパ腺, 胸腺の組織を平木式組織培養盤 No. 1 を用いて組織培養を行ないその増生帯を観察して白血病の確定診断を行なった。

III. 実験成績

1. 骨髓性白血病およびリンパ球性白血病の発生

18匹の RF 系マウス (♂ 8 匹, ♀ 10 匹) に 0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液 0.1~0.15 cc ずつ週3回注入による経口投与を行なうと共に, 5% croton 油 benzene 溶液を週2回 RF 系マウス背部皮膚に塗布して, 11例の骨髓性白血病, 1例のリンパ球性白血病が発生した。

a. 発生率, 潜伏期, 生存日数

骨髓性白血病ならびにリンパ球性白血病の発生率は, 骨髓性白血病 61.1%, リンパ球性白血病 5.5% であつた。

0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液の経口投与と 5% croton 油 benzene 溶液の塗布開始より白血病発病までの日数 (潜伏期) は 29~71 日であり, その平均潜伏日数は 47.4 日であつた。

発病より死亡するまでの生存日数

は, 発病後死亡するまでの間に屠殺したものを除き 3~61日で, 平均生存日数は 35.5 日であつた。

b. 20-Methylcholanthrene 単独投与の場合の発生率と潜伏日数との関係

第1編において詳述したように, 0.4%, 0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液の単独投与による発生率および潜伏日数の関係は, 0.4%の濃度では白血病発生率17%, 潜伏日数112日, 0.8%の濃度では白血病発生率62.5% (骨髓性白血病+リンパ球性白血病), 潜伏日数は 72.4 日であつた。0.8% 20-methylcholanthrene olive油溶液の経口投与と, 5% croton 油 benzene 溶液塗布の場合は, 前述したように白血病発生率 66.6%, 潜伏日数は平均 47.4 日であつた。この関係を表およびグラフにて示すと, 表1および図1の如くである。従つてこの表1からもわかるように, 0.8% 20-methylcholanthreneの経

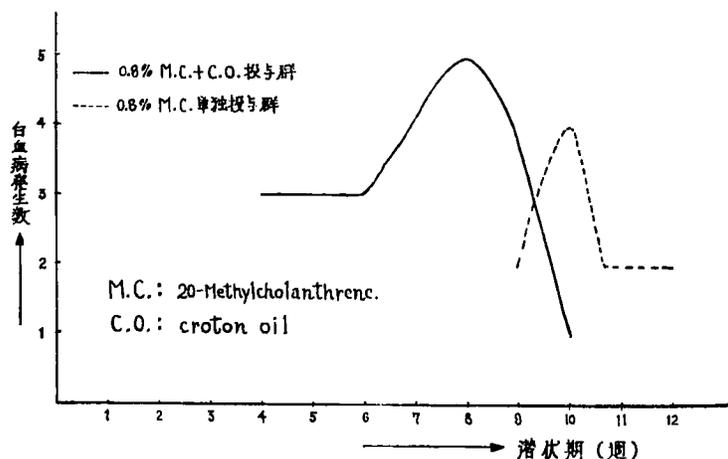
表1. RF系マウスにおける 20-Methylcholanthrene の単独経口投与群と croton oil 併用群の白血病発生率

	投 与 剤	例数	平均潜伏期数	発生数	発生率
骨髓性白血病	0.4%M. C.	6	112日	1	17%
	0.8%M. C.	16	72.3日	8	50%
	0.8%M. C. + C. O.	18	46.5日	11	61.1%
リンパ球性白血病	0.4%M. C.	6		0	0
	0.8%M. C.	16	73日	2	12.5%
	0.8%M. C. + C. O.	18	57日	1	5.5%

M. C. : 20-Methylcholanthrene

C. O. : Croton oil

図 1. 20-Methylcholanthrene 単独投与群と croton oil 併用投与群間の白血病発生数及び発生時期の比較。



口投与により発生する白血病発生は、その発生率の上ではあまり差はないが、潜伏日数に関しては、5% croton 油を併用することにより明らかに差があると云える。即ち croton 油を併用することにより、20-methylcholanthrene 単独投与の場合よりも、白血病発生の時期が図1にも示す如く、平均で約4週間促進されたものと解される。

2. 臨床症状

20-Methylcholanthrene 単独投与の場合は脱毛症状は見られなかったが(第1編)、5%クロトン油をRFマウス背部皮膚に塗布した場合は、塗布開始後3~5日して脱毛症状がみられ、且つRFマウス背部皮膚は発赤し、少数の例では、脱毛および発赤症状がマウスの殆んど全身におよんだ。また6~8週間経過後約半数の例に粟粒大の乳嘴腫が少数または多数認められた。白血病発生の時期には衰弱が甚だしく、少数の例では肝および脾の腫脹した形がマウス腹部の皮膚を透して肉眼で認められた。また出血傾向は発病より死亡するまでの全期間を通して認め

られなかった。

3. 対照実験動物群

対照実験動物にはRF系マウス6匹(♂3匹、♀3匹)を用い、5% croton 油 benzene 溶液のみを週2回、本実験動物群と同じくマウス背部皮膚に塗布した。croton 油塗布後3~5日して脱毛、発赤症状を呈したのは、本実験動物群の場合と同様であったが、衰弱の度合は本実験動物群に比して遙かに軽度であった。対照実験動物群に5% croton 油 benzene 溶液の塗布実験を8ヶ月以上にわたって行ない、その経過および末梢血液について観察したが、白血病の発生は認められなかった。なお末梢血液の白血球数は croton 油塗布開始前に比べて、croton 油塗布開始以後は、対照実験動物群全体について約1.4~3.8倍程度の増加を示し、常に croton 油塗布前に比して増加している状態が認められた。なお末梢血中の白血球数は croton 油塗布開始後17,000~37,000の間を変動したが、その末梢血液像において骨髓性またはリンパ球性の幼若細胞の出現は認めら

表 2. RF No. 104 の末梢血液像 (骨髓性白血病)

実験日数		1	15	29	43	57	71	88†
赤血球数(万)		945	805	850	885	960	905	
白血球数		20,400	27,300	67,100	20,000	20,400	36,500	
血色素量(%)		108		102		102	97	
血色素係数		1.14		1.20		1.06	1.08	
栓球数(万)		41.58		48.24		56.64	119.46	
網状赤血球(‰)		56		48		45	50	
骨髓芽球				1%	1%	1%	2%	
好中球	前骨髓球			3%	2%	1%	3%	
	骨髓球			5%	4%	5%	9%	
	後骨髓球	5%	3%	7%	7%	9%	13%	
	桿状球	28%	48%	49%	36%	38%	43%	
	II~V	2%	33%	22%	35%	13%	15%	
合計		35%	84%	86%	84%	67%	83%	
リンパ球	小リンパ球	49%	9%	9%	10%	21%	9%	
	大リンパ球	6%	2%	1%	1%	4%	1%	
	合計	55%	11%	10%	11%	25%	10%	
好単形核	酸球	7%	2%	2%	3%	6%	4%	
	質細胞影	3%	3%	1%	1%	2%	1%	
備考			脱毛 発赤 症状		背 面 に 乳 嘴 腫		脾 腫 衰 弱	死 亡

れなかつた。末梢血液像における好中球，リンパ球等の動きは，好中球11~59%，リンパ球37~82%，好酸球0~10%，単球1~9%の間を変動した。そして croton 油塗布開始後，時日の経過とともに，白血球百分比の中で好中球の占める割合が増加する傾向がみられた。

4. 骨髓性白血病症例

以下に述べる症例は全て0.8%20-methylcholanthrene olive 油溶液の注入による経口投与と，5% croton 油 benzene 溶液を RF マウス背部皮膚に塗布して発生せしめた例である。なお本実験において発生した白血病の症例は，全てその末梢血中の白血球数の動きが，実験開始前に比して増加傾向を示し，前白血病期における一時的白血球減少傾向は捉えることができなかった。これは先の対照実験動物群の項でふれたが，croton 油塗布による影響のためと考えられる。

a. RF No. 104 ♂ (表2)

本例は 20-methylcholanthrene の経口投与およ

び croton 油の塗布開始後 29 日目に発病した例である。末梢血液の変化は表 2 に示してあるが，発病時の赤血球数は 850 万，血色素係数は 1.20 で高色素性貧血を呈し，白血球数は 67,100 であつた。網状赤血球は 48%，栓球数は 48.24 万であつた。また発病時の末梢血液像は骨髓芽球 1%，好中球 86%，リンパ球 10%，好酸球 2%，単球 1% であつた。発病後赤血球数は 885~960 万，白血球数は 20,000~36,500，血色素係数は 1.06~1.08，網状赤血球は 45~50%，栓球数は 56.64~119.46 万の間を変動し，末梢血液像においては，骨髓芽球は 1~2%，好中球 65~86%，リンパ球 10~25%，好酸球 2~7%，単球 1~2% の間を変動した。本例は発病後 88 日目に死亡した。剖検所見は，肝臓の軽度腫脹と，脾およびリンパ腺，胸腺の腫脹が著しく，特に胸腺の腫脹は著明であつた。

b. RF No. 106 ♂ (表3)

本例は 20-methylcholanthrene の経口投与，croton 油の塗布開始後 57 日の潜伏期を経て発病した例であ

表 3. RF No. 106 ♂ 末梢血液像 (骨髓性白血病)

実験日数		1	15	29	43	57	71†
赤血球数(万)		975	970	870	670	570	505
白血球数		9,800	15,800	22,300	22,500	45,400	44,800
血色素量(%)		104		88		78	65
血色素係数		1.07		1.01		1.37	1.28
栓球数(万)		92.63		120.93		125.4	77.27
網状赤血球(‰)		46		40		46	170
骨髓芽球						1%	2%
好中球	前骨髓球			1%	1%	1%	3%
	骨髓球		2%	2%	3%	6%	10%
	後骨髓球	6%	5%	8%	15%	11%	16%
	桿状球	28%	34%	41%	42%	46%	38%
	II ~ V	10%	24%	16%	18%	24%	17%
合計		44%	65%	78%	79%	88%	84%
リンパ球	小リンパ球	37%	22%	15%	5%	8%	8%
	大リンパ球	7%	4%	3%	3%	1%	1%
	合計	44%	26%	18%	8%	9%	9%
好単形核	好酸球	4%	6%	3%	12%	1%	4%
	質細胞影	8%	3%	1%	1%	1%	1%
備考			脱毛症状				屠殺

る。発病時の末梢血液所見は、赤血球数 570 万、血色素係数 1.37 で高度の高色素性貧血を呈しており、白血球数は 45,400 であつた。出血傾向は認められなかつた。なお本例は発病に至るまでの一般状態は他の例に比べてよく、脱毛症状も少なく、また乳嘴腫も見られなかつた。発病時の末梢血液像は、骨髓芽球 1%、単球 1% であつた。発病後 2 週間して屠殺したが、その時の白血球数は 44,800、赤血球数 505 万、血色素係数は 1.28 で高度の高色素性貧血の状態を呈しており、網状赤血球は 170% で著しい増加を示していた。末梢血液像における骨髓芽球は 2%、好中球 84%、リンパ球 9%、好酸球 4%、単球 1% で、白血球百分比の中でリンパ球の占める割合は小さくなつていた。剖検所見は、肝および脾の軽度腫脹が認められ、胸腺およびリンパ腺の腫脹は見られなかつた。

c. RF No. 36 ♀ (表 4)

本例は 20-methylcholanthrene の経口投与と croton 油の塗布開始後 41 日を経て発病した例である。croton 油塗布による脱毛、発赤症状は見られたが、乳嘴腫の出現は見られなかつた。発病時の末梢血液所見は、白血球数 53,500 で、本例においても他の例と同様前白血病期における白血球減少傾向は認められなかつた。これは前述したように矢張り croton 油塗布による影響と考えられる。本例は発病後 56 日経過して死亡したが末梢血液所見は表 4 に示す如く、白血球数は 18,000~37,000 の間を変動し、死亡する 4 日前の検血では白血球数が 18,000 と多少減少傾向を示していた。末梢血液像についてみると、発病時骨髓芽球 2%、好中球 75%、リンパ球 13%、好酸球 7%、単球 3% であつた。発病後死亡するまでの末梢血液像は表 4 に示す通り、骨髓芽球 1~3%、好中球 56~80%、リンパ球 11~26%、好酸球 1~14%、単球 1~2% の間を変動した。死後の剖検所見

表 4. RF No. 36 ♀ 末梢血液像 (骨髓性白血病)

実験日数	1	15	25	41	49	58	79	93	97†
赤血球数(万)									
白血球数	13,600	17,000	17,400	53,500	23,800	37,380	30,250	18,000	
血色素量(%)									
血色素係数									
粒球数(万)									
網状赤血球(%)									
骨髓芽球				2%	3%	3%	1%	2%	
好中球	前骨髓球				3%	3%	3%	4%	3%
	骨髓球		3%	2%	4%	3%	5%	7%	8%
	後骨髓球	2%	5%	3%	8%	9%	12%	16%	13%
	桿状球	24%	24%	54%	50%	33%	30%	34%	45%
	II~V	6%	15%	12%	10%	8%	19%	19%	9%
合計	32%	47%	71%	75%	56%	69%	80%	78%	
リンパ球	小リンパ球	50%	39%	17%	7%	19%	12%	10%	13%
	大リンパ球	6%	5%	4%	6%	7%	3%	1%	4%
	合計	56%	44%	21%	13%	26%	15%	11%	17%
好酸球	好酸球	9%	3%	6%	7%	14%	12%	7%	1%
	単球	3%	6%	2%	3%	1%	1%	1%	2%
形質細胞核	形質細胞核								
	影※				1ヶ			1ヶ	1ヶ
備考		脱発毛赤症症状					脾腫		死亡

(註) ※: 白血球 100ヶ計算中の値

では、リンパ腺の軽度腫脹と、脾および胸腺の著明な腫脹が認められたが、特に胸腺の腫脹は著しかった。大腿骨骨髓および脾臓のスタンプ標本では、白血球細胞の浸潤が著明に認められた。

d. RF No. 114 ♀ (表 5)

本例は 20-methylcholanthrene の経口投与、croton 油の塗布開始後 71 日経過して発病した例である。発病するまでの臨床症状は他の症例と同じく、脱毛、発赤症状は認められたが、乳嘴腫の発生はなく、衰弱も軽度であつた。発病時の末梢血液所見は、白血

球数 40,400、赤血球数 750 万、血色素係数は 1.24 で高色素性貧血であつた。栓球数は 79.5 万で出血傾向はみられなかつた。網状赤血球は 90% で増加傾向がみられた。末梢血液像は骨髓芽球 3%、好中球 86%、リンパ球 7%、好酸球 3%、単球 1% であつた。なお本例は発病後すぐに屠殺したので、発病後死亡に至るまでの経過を観察することはできなかった。本例の剖検所見では肝、脾、リンパ腺の軽度の腫脹がみられたが、胸腺の腫脹は見られなかつた。

表 5. RF No. 114 ♀ 末梢血液像 (骨髓性白血病)

実験日数	1	15	29	43	57	71†
赤血球数(万)	1,100	1,200	950	860	800	750
白血球数	19,800	16,000	30,000	33,000	38,000	40,400
血色素量(%)	90		90		91	93
血色素係数	0.82		0.95		1.14	1.24
栓球数(万)	62.7		93.1		44.8	79.5
網状赤血球(%)	32		30		45	90
骨髓芽球						3%
好中球	前骨髓球					6%
	骨髓球		1%	1%	2%	3%
	後骨髓球	1%	3%	7%	16%	12%
	桿状球	15%	38%	45%	35%	48%
	II ~ V	4%	25%	25%	27%	20%
合計	20%	67%	78%	80%	83%	86%
リンパ球	小リンパ球	65%	21%	16%	13%	13%
	大リンパ球	8%	7%	3%	1%	2%
	合計	73%	28%	19%	14%	15%
好酸球	3%	1%	1%	5%	1%	3%
単球	4%	4%	2%	1%	1%	1%
形質細胞核影						
備考			脱毛症状	発赤症状		屠殺

e. RF No. 115 ♀ (表 6)

本例は 0.8% 20-methylcholanthrene の経口投与、5% croton 油の塗布開始後 57 日の潜伏期を経て発病した。本例が発病するまでの臨床症状は他の症例の場合において述べた如く、脱毛、発赤症状がみられ、乳嘴腫の発生は実験開始後約 7 週間経過して現われ、その数は 5~7 個であつた。衰弱の度合は他の症例に比して著しく、発病後在側下肢のみの高度

の浮腫が認められた。なお腹部皮膚を透して肝および脾の腫大した形が肉眼で認められた。発病時の末梢血液所見では、赤血球数 690 万、血色素係数 1.26 で高色素性貧血を呈しており、白血球数は 68,800 であつた。網状赤血球は 55%、栓球数は 108.33 万であつた。末梢血液像は表 6 に示してあるが、骨髓芽球 2%、好中球 85%、リンパ球 10%、好酸球 2%、単球 1% であつた。発病後 2 週間経過して衰弱が高

表 6. RF No. 115 ♀ 末梢血液像 (骨髄性白血病)

実験日数	1	15	29	43	57	71†	
赤血球数(万)	1,040	1,075	850	765	690	335	
白血球数	16,600	17,500	27,300	21,500	68,800	116,800	
血色素量(%)	88		84		87	80	
血色素係数	0.85		0.99		1.26	2.39	
栓球数(万)	156.0		157.25		108.33	27.81	
網状赤血球(%)	36		32		55	50	
骨髄芽球					2%	15%	
好中球	前骨髄球				3%	30%	
	骨髄球			2%	4%	33%	
	後骨髄球	2%	6%	5%	14%	18%	5%
	桿状球	17%	45%	46%	41%	41%	11%
	II ~ V	1%	16%	19%	19%	18%	3%
合計	20%	67%	72%	78%	85%	82%	
リンパ球	小リンパ球	64%	23%	20%	9%	7%	3%
	大リンパ球	8%	5%	3%	2%	3%	0
	合計	72%	28%	23%	11%	10%	3%
好酸球	球	6%	3%	2%	10%	2%	0
	球	2%	2%	3%	1%	1%	0
形質細胞核	質細胞※						4ケ
	影※						6ケ
備考	脱発赤毛症状					背に乳	左浮腫、側弱、下高、屠度腫殺

(註) ※：白血球100ケ計算中の値

度になり一般状態も悪化し、しばしば側臥位で呼吸困難を伴ない体動が鈍化したので屠殺した。その時の末梢血液所見は、赤血球数 335 万、血色素係数 2.39 で高度の高色素性貧血であった。白血球数は 116,800、網状赤血球 50%、栓球数は 27.81 万であった。末梢血液像は骨髄芽球 15%、好中球 82%、リンパ球はわずかに 3%であった。好酸球および単球は 0 で、形質細胞が少数認められた。本例の剖検所見では、肝臓は貧血性に褐色を呈して腫大しており、脾臓は暗褐色を呈し、その腫脹は著しく、腹腔前面の全域を覆っているかの感があつた。リンパ腺の腫脹は軽度で、胸腺の腫脹はみられなかつた。大腿骨骨髄および脾の stamp 標本では、白血病細胞の著明な浸潤像が認められた。

f. その他の骨髄性白血病症例 (表 7)

以上述べた 5 例の骨髄性白血病症例以外に骨髄性白血病を惹起した 6 例について、骨髄性白血病が発

生した時期における末梢血液所見、発病後屠殺または死亡するに至るまでの末梢血液所見ならびに剖検所見について総括的に検討し、その結果を表 7 にまとめて記載した。白血球数は RF No. 37 ♀ が発病後約 6 週間経過して死亡したが、その死亡する 3 日前の値 13,500 から RF No. 113 ♀ の 47,500 の間を変動した。赤血球数は 650 万~1,010 万の間を、血色素係数は 1.03~1.38 の間を変動し、RF No. 113 ♀ は高度の高色素性貧血であった。網状赤血球は 36~65% で、20-methylcholanthrene の経口投与と eroton 油の塗布開始前に比してやや増加する傾向が認められた。栓球数は 53.46 万~128.74 万の間を変動した。末梢血液像においては、骨髄芽球 1~4%、好中球 60~87%、リンパ球 7~26%、好酸球 1~14%、単球 1~3% の間を変動した。剖検所見では脾臓は腫脹のなかつたものと軽度腫脹を示したものと、以下肝臓、リンパ腺についても同様のことがいえる

表 7. その他の骨髄性白血病症例

a. 白血病発病時と後の末梢血液像

番号, 性別	No. 37 ♀	No. 38 ♀	No. 102 ♂	No. 103 ♂	No. 113 ♀	No. 116 ♀
潜伏日数	41	57	43	57	29	29
生存日数	41	21日後屠殺	36	8	42日後屠殺	3
赤血球数(万)			905~1,010	990	650~955	760
血色素係数			1.04~1.07	1.03	1.10~1.382	1.34
白血球数	13,500~36,000	26,000~44,000	20,500~31,500	31,800	7,000~47,500	44,300
栓球数(万)			53.46~110.0	118.8	69.55~128.74	116.28
網状赤血球(%)			50~60	60	40~65	36
骨髓芽球	1~3%	3~4%	1~2%	2%	1~3%	2%
好中球	60~73%	64~78%	73~82%	82%	74~87%	78%
リンパ球	11~26%	15~24%	13~20%	14%	7~17%	13%
好酸球	1~14%	2~7%	2~7%	1%	2~6%	5%
単球	1~3%	1~2%	1~2%	1%	1~2%	2%
核影						
その他					背面に乳嘴腫	

(註) 脱毛発赤症状は全例に認められた。

表7. その他の骨髄性白血病症例

b. 解剖所見

番号, 性別	No. 37 ♀	No. 38 ♀	No. 102 ♂	No. 113 ♀	No. 116 ♀
臓器					
肝臓	±	±	±	±	±
脾臓	±	±	±	+	+
リンパ腺	±	±	++	+	+
胸腺	±	±	++	±	±
その他					

±~++；腫脹の程度，±；腫脹のないもの，
+；軽度腫脹，++~+++；高度腫脹

が，胸腺は腫脹のなかつたものと，RF No.102 ♂のようにやや著しい腫脹を示したものがあつた。

5. リンパ球性白血病症例 (表 8)

0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液の注入による経口投与と，5% croton 油 benzene 溶液を RF 系マウス背部皮膚に塗布した本実験では，先にも述べたようにリンパ球性白血病発生は1例しか認めることができなかつた。その末梢血液所見は表 8 (RF No. 111 ♀) に示してある。発病に至るまでの臨床症状は他の骨髄性白血病症例と同じく脱毛，発赤症状がみられ，衰弱もやや著明であつたが，脱毛症状は小範囲にとどまつた。白血病発病後の経過を観察中，同一函内のマウスにより噛み殺されてしまつたので，末梢血液像の発病後の経時的所見ならび

に剖検所見は得ることができなかつた。本例の潜伏期は57日であり，発病時の末梢血液所見は，赤血球数 675 万，血色素係数 1.26 で高色素性貧血であつた。白血球数は 44,300，網状赤血球は 40%，栓球数は 53.6 万であつた。末梢血液像は，リンパ芽球 11%，リンパ球 69%，好中球 15%，好酸球 3%，単球 2%であつた。また核影が多数散見され，核分裂像も認められた。

6. 臨床組織培養

平木式臨床組織培養法に基づき，骨髄性白血病を発病した RF 系マウスの大腿骨髄，脾およびリンパ腺を無菌的に取り出し，平木式臨床組織培養盤 No. 1 を用いて組織培養を行なつたところ，その増生帯辺縁の境界がいずれも鋭利になるのが認められた。

7. 組織像

0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液の経口投与と共に，5% croton 油 benzene 溶液の塗布により発生した白血病 RF 系マウスの骨髓，脾，リンパ腺，胸腺，肝，肺の各組織を型の如く Haematoxylin-eosin 染色を施し観察したところ，第 1 編で述べた 20-methylcholanthrene 単独投与の場合の組織像と同じく，各組織に白血病細胞の浸潤が著明で，20-methylcholanthrene 単独投与群と croton 油併用群との間に組織学的所見の相違はみられなかつたので，ここでは省略する。

表 8. R.F No.111 ♀ 末梢血液像 (リンパ球性白血病)

実験日数		1	15	29	43	57	63†
赤血球数(万)		1,160	920	775	830	675	
血色素量(%)		98		83		85	
血色素係数		0.84		1.07		1.26	
白血球数		17,500	16,600	27,100	16,000	44,300	
粒球数(万)						53.6	
網状赤血球(‰)		33		60		40	
リンパ球	リンパ芽球					11%	
	小リンパ球	57%	26%	22%	25%	56%	
	大リンパ球	9%	7%	2%	5%	13%	
	合計	66%	33%	24%	30%	80%	
好中球	後骨髄球	2%	5%	7%	7%	2%	
	桿状球	21%	41%	51%	36%	13%	
	II ~ V	2%	15%	13%	12%	0	
	合計	25%	61%	71%	55%	15%	
好単形核	酸球	5%	2%	1%	7%	3%	
	球	4%	4%	4%	8%	2%	
	質細胞影※					12ヶ	
備考		脱毛症状	発赤症状			衰弱核 高分3 度裂ヶ	同マ嚙れ一ウみる 函ス殺内にさ

(註) ※: 白血球100ヶ計算中の値

IV. 考 按

今回の実験成績は、それ単独では白血病誘発作用をもたない croton 油が、20-methylcholanthrene の経口投与による白血病の発生を促進することを示している。

所謂 co-carcinogen という言葉は、発癌性炭化水素である 3-4-Benzpyrene の皮膚癌発生に対して creosote の或る分割が促進的に作用するという Shear¹⁸⁾・20) ら (1938~1940) の観察に始まる。その後、この言葉は広く腫瘍形成促進作用を有するすべての物質、或は諸因子を包括する意味に用いられる様になった。Berenblum¹⁾ は週1回、8週間に互つて 3-4-Benzpyrene を塗布し、続いて croton 油を週1回継続投与することによつて腫瘍形成の促進を観察し、その過程を、1) pre-neoplastic phase 2) benign wart stage 3) malignant transformation の3期に分け、その作用をそれぞれ、1) preneoplastic action 2) epiacinogenic action 3) metacarcinogenic action と名づけ、本来の発癌物質は、これらのすべ

での作用をもち、croton 油は第2および第3の作用をもっているが、それ自身では腫瘍形成能をもたず、前者の作用を創始作用または誘起作用 (Initiation)、後者を促進作用 (Promotion) と名付けた。Mottram⁶⁾ は発癌物質を1回のみ投与し、その後 croton 油を週2回継続投与することによつて腫瘍形成に成功し、後者の作用を“developing factor”と名付け、更に Rous⁴⁾ は兎についての類似の実験から、tumor promotion の概念を進展させ、同じ概念のもとにその後数多くの研究がなされ、発癌の2段階説は広く支持されるに至つたのである (Salaman²¹⁾ 1958)。

この発癌における2段階説を支持する実験的根拠は、皮膚癌についての研究が主なものであるが、同様の機序が他の発癌形態、例えば白血病の発生にも適用されるかどうかということは興味ある問題であり、今回の実験成績はこの適用の可能性を強く示唆するものである。入野²²⁾ らは R.F マウスを用いて各種線量のレントゲン単独1回照射と croton 油の併用による白血病の発生率を比較し、1) 2507 照射

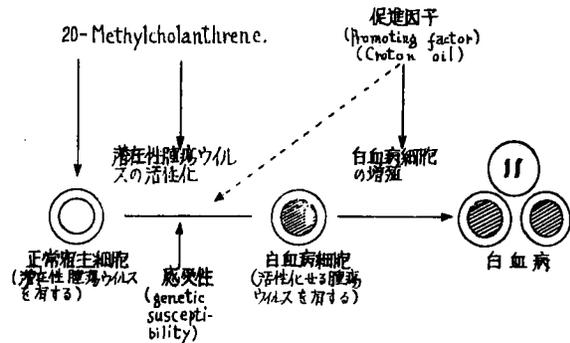
群では croton 油の併用によつて白血病発生率の明らかな増加がみとめられたこと、2) 1507 照射群では白血病が 1 例も発生しなかつたのに対し、croton 油を併用すると 36.7 % に白血病が発生したこと、3) croton 油単独投与では白血病は 1 例も発生しなかつたこと、等より croton 油は X 線による白血病の発生に対して促進作用をもついわゆる Promoting agent (促進物質) と考えられると述べている。

白血病の発生における croton 油のかかる co-leukemogenic 作用は如何なる機序によるものであろうか。発癌における従来の実験の多くは、発癌物質と croton 油を同一局所、例えば皮膚に投与するものが大部分であつたため、当然その局所における croton 油の非特異性組織障害ということを考慮しなければならない。しかしながら、Graffi²³⁾ ら (1955) は発癌物質を静脈内、腹腔内、或いは経口的に投与し、croton 油を皮膚に塗布することによつても皮膚腫瘍形成の促進がみられることを報告し、かかる現象はその後多数の研究者によつて確認されている²⁴⁾⁻²⁹⁾。更に Tannenbaum & Silverstone³⁰⁾ は発癌物質を皮膚に塗布した場合に、ある食餌性因子が腫瘍形成促進効果をもつということを観察しており、著者の実験でも、20-methylcholanthrene を経口的に投与し、croton 油を皮膚に塗布した場合の白血病の発生であるので、croton 油そのものの局所作用が重要な役割を演じているとは考えにくい。

次に、皮膚に投与された croton 油が、細胞障害その他の作用によつて或物質が遊離乃至産生され、このものが co-leukemogenic に作用するのではないかということが考えられる。Menkin³¹⁾ は発癌における炎症の役割に関する極めて広汎、且つ詳細な研究によつて、炎症性浸出液中に発育促進因子の存在を指摘し、このものが所謂 co-carcinogenic としての役割をもつていと述べているが、RF マウスにおいても、その皮膚に croton 油を反覆塗布することによつて、種々の程度に皮膚の炎症がみとめられているので、この解釈は著者の実験成績を説明するのにかなり妥当性をもつている様に思われる。

平木、入野³²⁾⁻³⁵⁾ らはすでに 20-methylcholanthrene により惹起される RF マウス白血病の発生にウイルスが関与していることを示唆する所見を報告しているが、今回の実験成績と考え合せて、著者は 20-methylcholanthrene による白血病の発生並びに croton 油の co-leukemogenic 作用を図 2 に示す如く解してよいものと考えている。即ち、RF マウスに

図 2. 20-Methylcholanthrene の経口投与による白血病の発生における、クロトン油の co-leukemogenic 作用機序に関する推定模型図。(2段階説)



20-methylcholanthrene を投与すると、もともと潜在していた不活性ウイルスが活性化されることによつて、正常の宿主細胞は白血病細胞化し、さらにその分裂増殖によつて白血病が惹起されるのであるが、これに croton 油が所謂 promotor として作用して、白血病の発生を促進せしめるものであろう。

V. 結 論

1) RF 系マウスに 0.8% 20-methylcholanthrene olive 油溶液 0.1~0.15cc を週 3 回、自家製カテーテル用注射筒を用い経口投与を行なうとともに、5% croton 油 benzene 溶液を背部皮膚に週 2 回塗布することによつて、骨髄性白血病ならびにリンパ球性白血病を発生させ得た。

2) 白血病発生率は骨髄性白血病 61.6%, リンパ球性白血病 5.5% で、合計 66.6% の発生率であつた。また croton 油単独投与では白血病は 1 例も発生しなかつた。

3) 20-Methylcholanthrene と croton 油の併用投与によつて白血病発生に至るまでの潜伏期間は、同濃度の 20-methylcholanthrene olive 油溶液単独投与の場合 (平均潜伏期 72.4 日) よりも、平均で約 4 週間短縮された。

4) 以上のことより、croton 油は 20-methylcholanthrene による白血病の発生に対して所謂 promotor として作用する。即ち co-leukemogenic 作用をもつものと推論した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木 潔教授、大平昌彦教授、並びに本研究中多大の御援助をいただいた平木内科入野昭三講師、瀬崎達雄先生、平木内科教室員各位およ

び衛生学教室教室員各位に深甚の謝意を表します。
(本論文要旨は昭和 37 年 5 月第 24 回日本血液学

会総会, 昭和 37 年 10 月第 21 回日本癌学会総会に
おいて発表した)

文 献

- 1) Berenblum, I.: The mechanism of cacinogenesis. A study of the significance of co-carcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res.*, 1, 807~814, 1941.
- 2) Berenblum, I.: Carcinogenesis and tumor pathogenesis. *Advances in Cancer Research*, 2, 129~175, 1954.
- 3) Berenblum, I., and Haran, N.: The significance of the Sequence of initiating and promoting actions in the process of skin carcinogenesis in the mouse. *Brit. J. Cancer*, 9, 208~271, 1955.
- 4) Rous, P., and Kidd, J. G.: Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic state: A study of the tar tumors of rabbits. *J. Exp. Med.*, 73, 365~390, 1941.
- 5) Mottram, J. C.: A developing factor in experimental blastogenesis. *J. Path. & Bact.*, 56, 181~187, 1944.
- 6) Mottram, J. C.: A sensitizing factor in experimental blastogenesis. *J. Path. & Bact.*, 56, 391~402, 1944.
- 7) Kline, B. E., and Rusch, H. P.: Some factors that influence the growth of neoplastic cells. *Cancer Res.*, 4, 762~769, 1944.
- 8) Rusch, H. P., and Kline, B. E.: Further evidence for successive stage in the formation of neoplasms. *Arch. Path.*, 42, 445~454, 1946.
- 9) Rusch, H. P., and Kline, B. E.: Influence of interrupted cacinogenic treatment on tumor formation. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 69, 90~95, 1948.
- 10) Kawamoto, S., Ida, N., Kirschbaum, A., and Taylor, G.: Urethane and leukemogenesis in mice. *Cancer Res.*, 18, 725~729, 1958.
- 11) Berenblum, I., and Trainin, N.: A possible two-stage mechanism in experimental leukemogenesis. *Science*, 132, 40~41, 1960.
- 12) Berenblum, I., and Trainin, N.: Application of the two-stage mechanism of carcinogenesis to leukemogenesis with low doses of x-rays as initiating factor. Third Australian Conf. Sydney, Australia, *Radiobiol.* 98~101, 1961.
- 13) Toth, B., Della Porta, G., and Shubik, P.: The occurrence of malignant lymphomas in urethane-treated swiss mice. *Brit. J. Cancer*. 15, 322~326, 1961.
- 14) Klein, M.: Induction of lymphocytic neoplasms, hepatomas and other tumors after oral administration of urethane to infant mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, 29, 1035~1046, 1962.
- 15) Tannenbaum, A., and Maltoni, C.: Neoplastic response of various tissues to the administration of urethane. *Cancer Res.*, 22, 1105~1112, 1962.
- 16) 入野昭三, 池尻孝治, 宗田 範: 未発表.
- 17) 康 逸雄: 20-Methylcholanthrene の経口投与による RF 系マウス白血病の発生機構に関する研究, 第 1 編, 20-Methylcholanthrene の単独経口投与による白血病の発生について. *岡山医学誌*, 76, 79~94, 1964.
- 18) Shear, M. J.: Studies in cacinogenesis, V. Methyl derivatives of 1,2-benzanthracene. *Amer. J. Cancer*, 33, 499~537, 1938.
- 19) Cabot, S., Shear, N., and Shear, M. J.: Studies in cacinogenesis. XI. Development of skin tumors in mice painted with 3,4 benzpyrene and creosote oil fractions. *Amer. J. Path.*, 16, 301~312, 1940.
- 20) Sall, R. D., and Shear, M. J.: Studies in carcinogenesis. XII. Effect of the basic fraction of creosote oil on the production of tumors in mice by chemical carcinogens. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1, 45~55, 1940.
- 21) Salaman, M. H.: Cocarcinogenesis. *Brit. Med. Bull.*, 14, 116~120, 1958.
- 22) 入野昭三, 瀬崎達雄, 池尻孝治, 宗田 範, 須崎正則: X線照射による白血病の発生におけるクロトン油の (Co-leukemogenic 作用, X線による白血病の発生における 2 段階説の適用, *医学と生物学*, 67, 218~223, 1963.

- 23) Graffi, A., Scharsach, F., und Heyer, E.: Zur Frage der Initialwirkung carcinogener Kohlenwasserstoffe auf die Mäusehaut nach intravenöser, intraperitonealer und oraler Applikation. *Naturwissenschaften*, 42, 184, 1955.
- 24) Ritchie, A. C., and Saffiotti, U.: Orally administered 2-acethylaminofluorene as an initiator and as promotor in epidermal carcinogenesis. *Cancer Res.*, 15, 84~88, 1955.
- 25) Ritchie, A. C.: Epidermal carcinogenesis in the mouse by intraperitoneally administered urethane followed by repeated applications of croton oil. *Brit. J. Cancer*, 11, 206~211, 1957.
- 26) Berenblum, I., and Haran-Ghera, N.: A quantitative study of the systemic initiating action of urethane (ethyl carbamate) in mouse skin carcinogenesis, *Brit. J. Cancer*, 11, 77~84, 1957.
- 27) Esch, G. J. Van, Genderen, H. Van, and Vink, H. H.: The production of skin tumors in mice by oral treatment with urethane, isopropyl-N-phenyl carbamate or isopropyl-N-chlorophenyl carbamate in combination with skin painting with croton oil and tween 60. *Brit. J. Cancer*, 12, 355~362, 1958.
- 28) Niskanen, E. E., and Merenmies, L.: Morphological effect on mouse skin of orally administered carcinogens. *Naturwissenschaften*, 46, 583, 1959.
- 29) Niskanen, E. E., and Merenmies, L.: The determining influence of the dose and nature of orally administered carcinogens on mouse skin tumors promoted with tween 40. *Naturwissenschaften*, 47, 46, 1960.
- 30) Tannenbaum, A., and Silverstone, H.: Nutrition and the genesis of tumors; in *Raven's Cancer*, 1, 306~334, Butterworth, London, 1957.
- 31) Menkin, V.: Biologic cocarcinogen S; *Progr. Exp. Tumor Res.*, 1, 279~310, 1960. Karger, Basel/Newyork.
- 32) 平木 潔, 入野昭三, 瀬崎達雄, 須崎正則: 20-Methylcholanthrene により惹起せしめたRF系マウス白血病の無細胞濾液移植に関する研究. *日血会誌*, 25, 822~3830, 1962.
- 33) 平木 潔, 入野昭三, 太田善介, 浅野健夫, 品川晃二, 瀬崎達雄, 三好勇夫: 発癌性化学物質による白血病の発生について. *綜合臨床*, 12, 1757~1765, 1963.
- 34) 入野昭三: 化学物質による白血病の発生, とくにウイルスとの関係, *日新医学*, 50, 74~84, 1963.
- 35) Irino, S., Ota, Z., Sezaki, T., Suzaki, M., and Hiraki, K.: Cell-free transmission of 20-methylcholanthrene-induced RFmouse leukemia and electron microscopic demonstration of virus particles in its leukemic tissue. *GANN*, 54, 225~237, 1963.

Studies on Leukemogenesis in RF Mice by Oral Administration
of 20-methylcholanthrene. I. Co-leukemogenic Action of Croton
Oil in the Induction of Leukemia by Oral Administration of
20-methylcholanthrene

By

Itsuo Ko

Okayama University Postgraduate School of Medicine.

1) Myelogenous and lymphocytic leukemias were observed among mice given orally three times a week 0.1—0.15 cc of 0.8% 20-methylcholanthrene in olive oil by means of a needle catheter and concurrently painted in the back two times a week with 5% croton oil in benzene.

2) The incidence of leukemias was 61.6% for myelogenous and 5.5% for lymphocytic leukemia with a total of 66.6%. On the other hand, mice receiving croton oil alone developed no leukemia.

3) Concurrent administration of 20-methylcholanthrene and croton oil reduced the average latent period required for the development of leukemia by about four weeks in comparison with that of 20-methylcholanthrene treatment alone.

4) From these results, it is concluded that croton oil is co-leukemogenic, acting as a promoter in the 20-methylcholanthrene leukemogenesis in mice.
