



Title	抗癌性因子産生細胞の研究
Author(s)	仁尾, 裕
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1970, 30(6), p. 481-488
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/19938">https://hdl.handle.net/11094/19938</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

特別掲載

## 抗癌性因子産生細胞の研究

群馬大学医学部放射線医学教室 (主任 戸部龍夫教授)

仁 尾 裕

(昭和45年7月15日受付)

Studies on the cells producing an antitumor agent

Yutaka Nio

Department of Radiology, Gunma University, School of Medicine

(Director: Prof. Tatsuo Tobe)

An antitumor agent against Yoshida sarcoma was produced in vitro in macrophages which were cultivated with the medium containing the supernatant fluid of cultured Yoshida sarcoma cells after X-ray irradiation. And the antitumor agent was transferred from the sensitized macrophages to lymphoid cells when they were cultivated in the same culture bottle.

The possibility of producing an cellular antitumor agent against such a spontaneous tumor as C3H/He mouse mammary carcinoma was determined in vitro. At the same time, the therapeutic effect of the antitumor agent was studied.

The species specificity of macrophages participating in production of an antitumor agent against C3H/He mouse mammary carcinoma and cultured human cancer cells was studied and discussed immunologically about them.

現在癌治療法は外科的治療法、放射線治療法および化学療法より成り立っている。しかしそのいずれもが非特異的治療法であり、その根治的意義については尚多くの疑問を残している。そこで癌-宿主相関関係を考慮に入れた新しい治療法の確立が必要と思われる。

著者らの研究によると<sup>1)</sup>、癌患者のコバルト60照射治療の際に生ずる生体反応を腫瘍の消長との関連で観察したところ、細胞性免疫反応に変化が認められた。即ち細胞性抗体の関与する「ツ」反応および「DNCB」反応について見ると、病巣の好転した群では陽性又は陰性から陽性への陽転化が認められ、免疫反応の活性を示した。これに反し病巣の悪化した群では陰性又は陽性から陰性への陰転化を示し、免疫反応の不活性化を示し

た。この様な癌患者の細胞性免疫反応の低下については、従来多数報告があり<sup>2)</sup>、癌ワクチン療法等癌免疫治療法の壁となっていた<sup>3)</sup>。

そこで著者らは数年来、生体外培養系を利用して抗癌性因子を作り、adoptiveに投与することにより抗癌作用を担癌体に投与する方法を開発してきた。これまで得た結果、移植腫瘍である吉田肉腫に対する抗腫瘍因子は、X線照射された吉田肉腫細胞の組織培養上清を含んだ培養液でマクロファージを培養することにより得られ、更にその因子は、正常のリンパ球に伝達されることが判明した<sup>4)</sup>。

今回の実験の目的は次の2つである。

(1) 移植腫瘍である吉田肉腫の場合と同様に、自然発生腫瘍であるC3H/He系マウス乳癌

やヒト培養癌に対して *in vitro* で抗癌性因子が作られるかどうか、更にその抗癌性因子を担癌生体に投与した際の治療効果についても検討した。

(2) 抗癌性因子産生に関与する細胞の種属特異性を知る目的から、同種(同系)および異種のマクロファージで作られた因子が同種(同系)のリンパ球に伝達されるかどうかについて検討し、その免疫学的意義について考察した。

## I 実験材料及び実験方法

### 動物

**呑竜ラット** 北関東医学動物飼育所(以下北医動と略す)飼育の体重 100 g  $\pm$  10 g の近親交配ラットを性を問わず使用した。吉田肉腫細胞は東京・佐々木研究所より提供された吉田肉腫 $10^7$ 個を 0.1ml にして呑竜ラット腹腔中に注射することにより移植継代したものを使用した。

**C3H/He系マウス** 北医動飼育の体重15~20 g の近親交配マウスを性を問わず使用した。C3H/He系マウス乳癌は北医動で飼育中の C3H/He系マウスに自然発生した乳癌又は、それを同系マウスの大腿筋肉内に初代移植した担癌マウスを使用した。

**ゴールデンハムスター** 北医動飼育の体重80~100 g の近親交配ハムスターを性を問わず使用した。

### 抗腫瘍性因子産生細胞

#### マクロファージ

呑竜ラット、C3H/He系マウスおよびハムスターのマクロファージを誘導するために各動物の腹腔中に3%澱粉生食水を、マウスにはその1mlを、その他には5mlを注射した。4~5日後断頭により斃死させ、冷却したヘパリン加リン酸緩衝液(以下Hep-PBSと略す)を腹腔に注入した。そして腹部をマッサージした後、マクロファージを含む細胞浮遊液を注射器で採取した。この細胞浮遊液を1200 rpm, 5分間遠心洗滌後培養液で $1.5 \times 10^6$ /mlの濃度に調整して培養した。感作する際には、リンパ球を除く為に2日間培養した後マクロファージとして使用した。

#### リンパ球

呑竜ラット、C3H/He系マウスの腸間膜リンパ節、単径リンパ節および腋窩リンパ節を採取し、Hep-PBSに浸した茶こしの上で押しつぶし、細胞をばらばらにしてリンパ節細胞液を作り、Hep-PBSで遠心洗滌後培養液で $1 \sim 2 \times 10^7$ /mlの濃度に調整して培養した。

#### ヒトリンパ球

静脈より採血したヘパリン加血液に等量の3%デキストラン(分子量: 150,000)リン酸緩衝液を加えて攪拌後、試験管に分注して室温に40~60分放置した。赤血球が沈澱後その上層の白血球層を静かにとり、PBSで2回遠心洗滌後、テトロンファイバーカラムを通して培養液に $10^7$ /mlの濃度に調整して培養した。白血球層はテトロンファイバーカラムを通すことにより、リンパ球80%、顆粒白血球20%となつた<sup>14)</sup>。

#### 組織培養法

採取した癌細胞およびマクロファージを目的に従い、培養液で細胞浮遊液とし、培養角瓶に分注し5%CO<sub>2</sub>培養器中にて培養した。細胞を継代する際は0.05%トリプシンおよび0.02%EDTAを使用して細胞をはがし、培養液で適当な濃度に稀釈し培養した。培養液は日本製薬のEagle MEM培地に、20%の割合に牛血清を加えたものを使用した。

癌細胞に対する感作細胞の抗腫瘍性を判定する際には、吉田肉腫の場合は培養液で $10^5$ /mlの濃度に調整して小試験管に分注し、45度の傾斜をつけて培養した。又、C3H/He系マウス乳癌は培養液で $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ /ml、ヒト癌細胞の場合は $5 \times 10^4 \sim 10^5$ /mlの濃度に調整して、TD-15型培養瓶および培養角瓶に分注し培養した。培養細胞の状態および感作リンパ球の癌細胞に対する抗腫瘍性の状態を観察する為に、位相差顕微鏡を使用し形態学的変化を観察した。

#### 感作方法

##### X線照射による感作源の誘導

吉田肉腫 呑竜ラット腹腔に移植後4日目の吉田肉腫細胞を採取し、Hep-PBSで2回遠心洗滌後培養液で $10^5$ /mlの細胞浮遊液に調整して培養

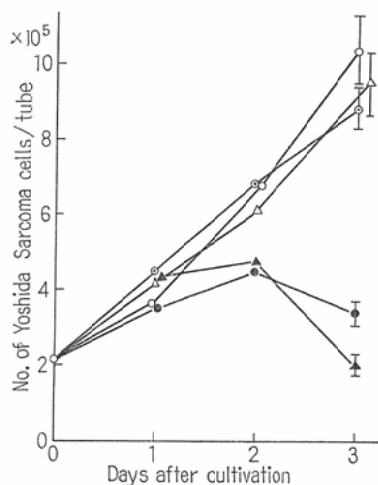


Fig. 1. Inhibition of growth of Yoshida sarcoma cells by rat abdominal macrophages and lymph node cells sensitized with supernatant fluid from irradiated Yoshida sarcoma.

- Yoshida sarcoma cells cultivated with normal macrophages.
- △ Yoshida sarcoma cells cultivated with normal lymph node cell.
- Yoshida sarcoma cells cultivated with macrophages sensitized with supernatant fluid from irradiated Yoshida sarcoma.
- ▲ Yoshida sarcoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with sensitized macrophages.
- Yoshida sarcoma cells cultivated with normal medium.

した。感作源を誘導するためにX線深部治療装置（東芝 KXC-18型深部照射，180 kVp，15 mA，2 mmAl，20cm，11 cmφ，329 R/min）を用い、培養した吉田肉腫細胞に 2,000 Rを照射した。24時間培養後その培養液を 3,000 rpm，5分間遠心しその上清を感作源として使用した。感作方法は上記の感作源に50%の割合に正常培養液を加え、予め培養中のマクロファージ，リンパ球に加えて3日間感作培養した。感作リンパ球を作るには、感作したマクロファージに10～100倍量の正常リンパ球を加えて24時間混合培養し、翌日そのリンパ球をとり感作リンパ球とした。

C3H/He 系マウス乳癌，原則的には前記吉田肉腫の場合とほぼ同様であるが，一部に変更を加

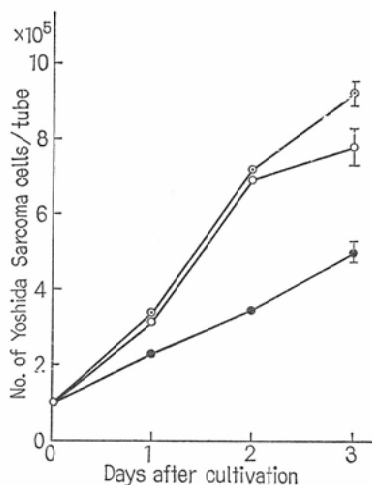


Fig. 2. Inhibition of growth of Yoshida sarcoma cells by lymph node cells sensitized with supernatant fluid from irradiated Yoshida sarcoma.

- Yoshida sarcoma cells cultivated with normal medium.
- Yoshida sarcoma cells cultivated with normal lymph node cells.
- Yoshida sarcoma cells cultivated with lymph node cells sensitized with supernatant fluid from irradiated Yoshida sarcoma.

えた。即ち，培養した乳癌細胞が増殖盛んな頃，2日おきに 3,000 RのX線を照射した。照射24時間後培養液を 1,500 rpm，5分間遠心し，その上清を感作源として用いた。感作方法は感作源に50%の割合に正常培養液を加えて，マクロファージを5～7日間培養し，それに100倍量の正常リンパ球を加えて24時間混合培養した。翌日そのリンパ球をとり感作リンパ球として用いた。この際マクロファージのリンパ球への混入は2%以下であつた。尚，培養した乳癌細胞 $10^7$ 個を同系マウス大腿筋肉内に移植すると，1ヵ月後直径約1cmの腫瘍が形成された。(Fig. 8, 9, 10)。

ヒト培養癌 胃癌原発の腹水癌患者より採取した腹水細胞を *in vitro* で2～3代継代培養したものを用いた。感作源の誘導方法および感作方法は C3H/He 系マウス乳癌の場合に準じて行なつた。尚，この培養細胞はPAS反応陽性であり，コーチゾン処置したハムスター頬袋に移植する

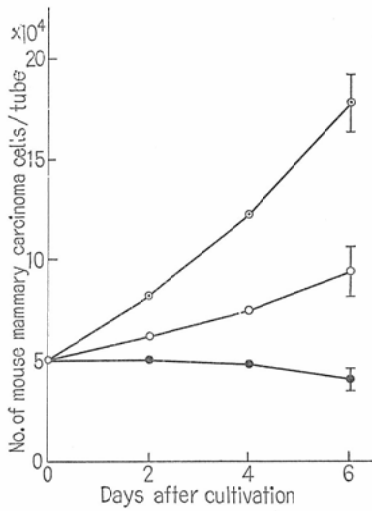


Fig. 3. Inhibition of growth of C3H/He mouse mammary carcinoma cells by isologous mouse peritoneal macrophages and lymph node cells sensitized with supernatant fluid from irradiated C3H/He mouse mammary carcinoma.

- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with normal medium.
- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with normal mouse peritoneal macrophages.
- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with sensitized mouse peritoneal macrophages.

と、直径約1 cmの腫瘤が形成された。組織学的にも腫瘍と考えられる。(Fig. 11, 12, 13).

#### 抗腫瘍性判定法

吉田肉腫 培養中の吉田肉腫に前記の方法で処理した10倍量の感作細胞、非感作細胞および対照として正常培養液を加えて培養し、毎日3本ずつの小試験管を取りその生細胞数を算定し、抗腫瘍性の有無について検討した。次にリンパ球の免疫学的役割を検討する目的から、感作マクロファージと混合培養したリンパ球についても上記と同様の方法で吉田肉腫に加え、その抗腫瘍性の有無について検討した。

C3H/He系マウス乳癌 培養中の乳癌細胞がガラス面で増殖始める際に30~50倍の感作リンパ球、非感作リンパ球および正常培養液を加え、2~3日毎に3本ずつの生細胞数を算定し、抗腫瘍

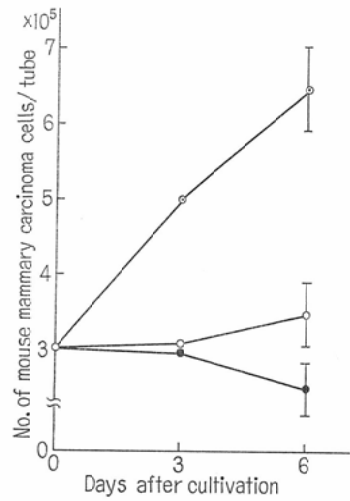


Fig. 4. Inhibition of growth of C3H/He mouse mammary carcinoma cells by isologous mouse lymph node cells and hamster peritoneal macrophages sensitized with supernatant fluid from irradiated C3H/He mouse mammary carcinoma.

- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with normal medium.
- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with normal hamster peritoneal macrophages.
- Mouse mammary carcinoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with sensitized hamster peritoneal macrophages.

性について検討した。

ヒト培養癌 前記 C3H/He系マウス乳癌の場合に準じ、培養1日後感作リンパ球、非感作リンパ球および正常培養液を加え、2~3日毎にその生細胞数を算定し、抗腫瘍性について検討した。

## II 結果

(1) 吉田肉腫細胞の *in vitro* 増殖に対するラットマクロファージおよびリンパ球の抑制作用 Fig. 1に示す様に感作ラットマクロファージと混合培養された吉田肉腫群は1日後より細胞数の増加を示さず、2日以後細胞数が次第に減少した。更に感作リンパ球と混合培養された吉田肉腫群もほぼ前と同様の推移を示した。その抗腫瘍性発現を形態学的に観察すると、感作リンパ球は吉

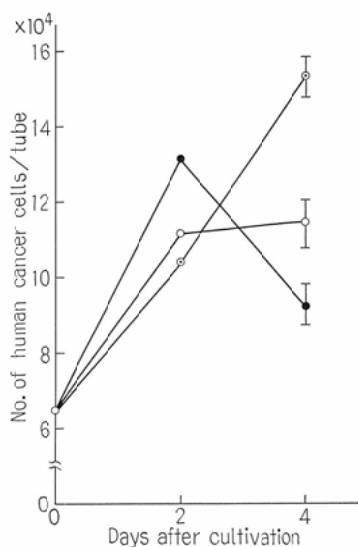


Fig. 5. Inhibition of growth of human cancer cells by hamster peritoneal macrophages and human peripheral lymphocytes sensitized with supernatant fluid from irradiated human cancer cells.

- Human cancer cells cultivated with normal medium.
- Human cancer cells cultivated with human peripheral lymphocytes from mixed culture with normal hamster peritoneal macrophages.
- Human cancer cells cultivated with human peripheral lymphocytes from mixed culture with sensitized hamster peritoneal macrophages.

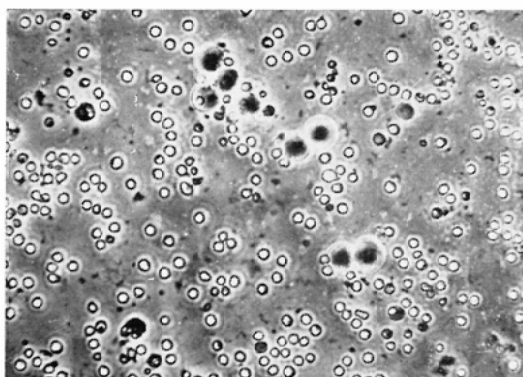


Fig. 6. Yoshida sarcoma cells cultivated with normal lymph node cells.

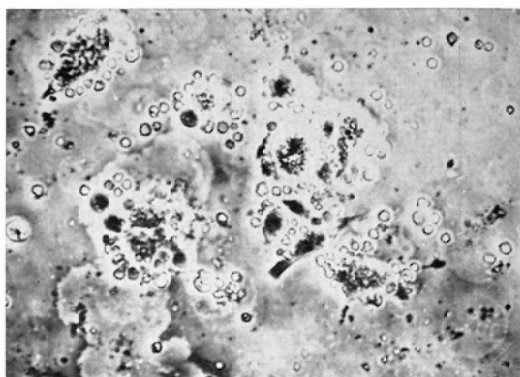


Fig. 7. Yoshida sarcoma cells cultivated with lymph node cells from mixed culture with sensitized macrophages.

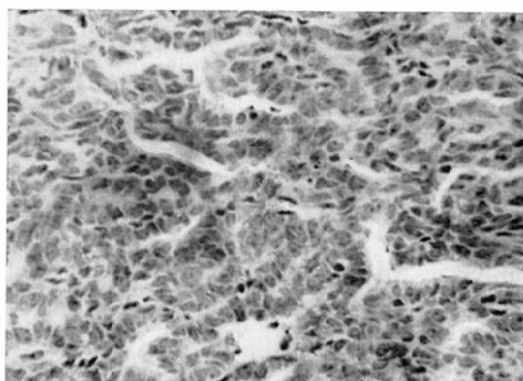


Fig. 8. C3H/He mouse mammary carcinoma grown in C3H/He mouse thigh.

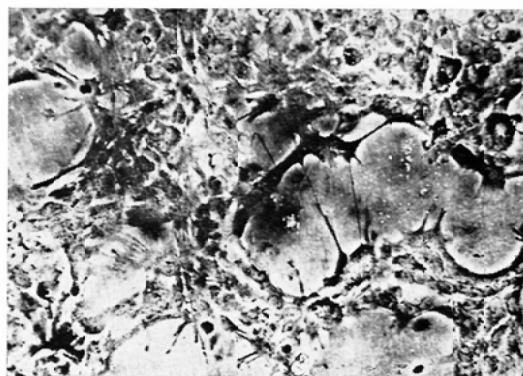


Fig. 9. Cultured C3H/He mouse mammary carcinoma cells growing in vitro.

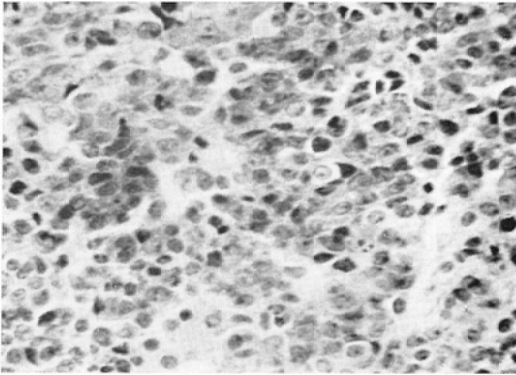


Fig. 10. Transplanted tumor from cultured C3H/He mouse mammary carcinoma cells.

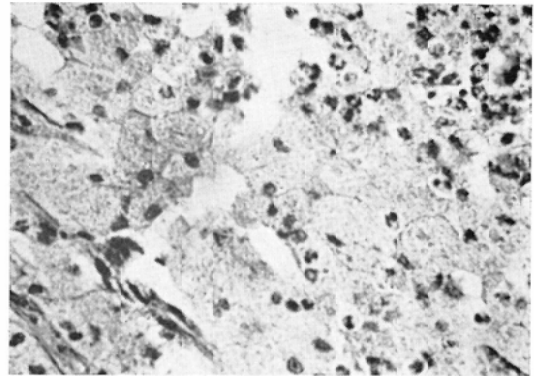


Fig. 13. Transplanted tumor from cultured human cancer cells (enlarged photo)

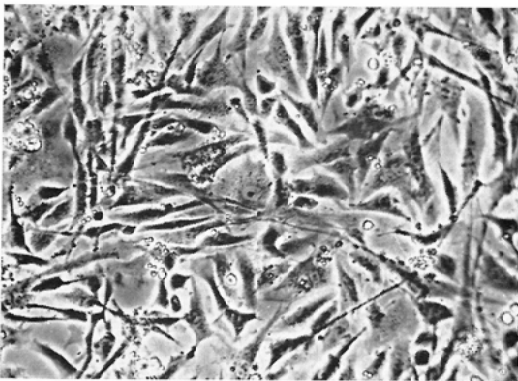


Fig. 11. Cultured human cancer cells growing in vitro.

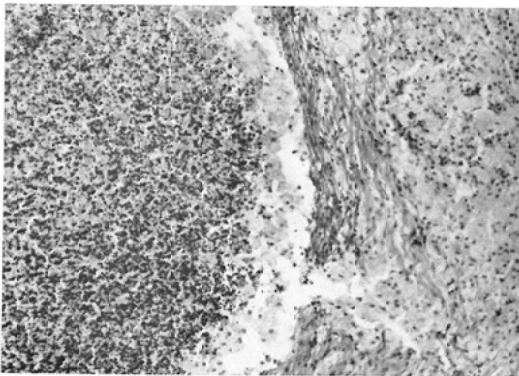


Fig. 12. Transplanted tumor from cultured human cancer cells.

田肉腫細胞の周囲に凝集し、吉田肉腫細胞の変性崩壊が認められた。(Fig. 6, 7).

正常マクロファージおよび正常リンパ球と混合培養された吉田肉腫群は、培養後それぞれほぼ一定の割合で細胞数を増加し、無処置対照群とほぼ同様の推移を示した。

(2) 吉田肉腫細胞の *in vitro* 増殖に対する感作源処理リンパ球の抑制作用

Fig. 2 に示す如く、感作源処理リンパ球と混合培養された吉田肉腫群は、培養後徐々に増殖した。しかし正常リンパ球と混合培養された群および無処置対照群に比較すると、細胞数の増加が軽度であった。

即ち、本培養法による観察の結果、リンパ球は感作源と直接接触培養された場合、抗癌性因子を作り難く、腫瘍細胞の *in vitro* 増殖を抑制することが出来ないことを示した。

(3) C3H/He 系マウス乳癌細胞の *in vitro* 増殖に対するマウスリンパ球の抑制作用

前記の方法に従い、感作マクロファージと混合培養して得られたリンパ球を感作リンパ球として用い、前記と同様の方法で抗腫瘍性の有無を検討した。

Fig. 3 に示す如く感作リンパ球と混合培養されたマウス乳癌細胞数は、培養後増加を示さず、培養4日以後はむしろ細胞数の減少を示した。正常リンパ球と混合培養された群は、培養後日を追

つて少しずつ増加を示したが無処置対照群に比較し細胞数の増加は軽度であつた。

即ち C3H/He 系マウス乳癌の *in vitro* 増殖に対して、同系感作リンパ球は抗癌性を示し、癌細胞の増殖を阻止することが判明した。

(4) C3H/He 系マウス、乳癌細胞の *in vitro* 増殖に対する異種マクロファージの抗癌性因子産生について

抗癌性因子産生細胞の種属特異性を知る目的から、マウス乳癌細胞由来の感作源を用いてハムスターマクロファージを培養し、これと混合培養して得られたマウスリンパ球のマウス乳癌細胞の増殖に対する抑制効果について検討した。

Fig. 4 に示す様に、無処置対照群は培養後ほぼ一定の割合で細胞数の増加を示したが、感作リンパ球と混合培養された群は、細胞数の増加を示さず、3日以後次第に細胞数の減少を示した。正常リンパ球と混合培養された群は培養後軽度の増加を示し、3日以後感作リンパ球添加群との間に差を示した。しかし対照群に見られる様な著明な増加は見られなかつた。

(5) ヒト新鮮分離培養癌に対する異種マクロファージの抗癌性因子産生について

前記と同じ目的から、胃癌患者の腹水より得た培養癌から感作源を作り、ハムスターマクロファージを培養し、これと混合培養して得られた人末梢血リンパ球の癌細胞増殖抑制効果について検討した。

Fig. 5 に示す如く、無処置対照群は培養後ほぼ一定の割合で増殖した。感作リンパ球と混合培養された群は、培養後2日迄は細胞数の増加を示したが、以後急激に細胞数の減少を示した。正常リンパ球と混合培養された群は、感作リンパ球添加群と培養後2日迄はほぼ同様の細胞数増加を示したが、以後対照群と比較すると増殖は軽度であつた。

即ち、ヒトの癌由来の感作源で感作されたハムスターマクロファージにおいても、抗癌性因子が産生され、ヒトの末梢血リンパ球に抗癌性作用を賦与することが判明した。

### III 考 察

担癌生体は癌細胞の弱い抗原性と生体における細胞性免疫反応の低下に基づき、免疫学的麻痺状態に陥つているという報告が多い<sup>10)</sup>。著者らの研究においても癌患者の細胞性免疫反応が低下していることは先に述べたとおりであるが、コンドロイチン硫酸鉄 (<sup>59</sup>Fe) により網内系機能を調べると血漿 <sup>59</sup>Fe 値は5分で50%減少を示し、60分で最小値となり病巣の推移による差異は認められなかつた。

これを生体反応の場で考察すると、癌患者の細胞性免疫反応の低下はマクロファージの段階でなく、マクロファージで形成された抗腫瘍性因子がリンパ球で完成される段階で阻害されているのではないかとも考えられる。しかし、ここに示された網内系機能はコンドロイチン硫酸鉄という可溶性物質についての成績であり、腫瘍細胞という細胞抗原による反応とは一致しないかも知れない。

生物活性のある抗原と変性した蛋白抗原との間にマクロファージをどの程度必要とするかについては既に研究され<sup>5)</sup>、免疫学的麻痺に陥つた動物のマクロファージのとりこみ機能が正常であつたという報告もある。

細胞性免疫におけるマクロファージの役割については佐藤、Fishman により精力的に研究され、マクロファージは抗原の消化のみでなく、抗体を産生し、その指令がRNAを介して正常細胞に伝達されるという重要な機能が解明され<sup>12)8)</sup>た<sup>9)</sup>。

今回の実験により、移植腫瘍である吉田肉腫のみでなく、自然発生腫瘍である C3H/He 系マウス乳癌についても、培養した腫瘍細胞に適量のX線照射を加えるとその培養上清に感作源物質が遊出し、それで同系動物のマクロファージを感作すると抗癌性因子が産生された。しかもその抗癌性因子は混合培養により正常リンパ球に伝達され、その感作リンパ球は C3H/He 系マウス乳癌の治療の実験において著明な延命効果を示した。<sup>7), 12)</sup>

一方、マクロファージを介さないリンパ球のみによる抗腫瘍効果は極めて弱く、抗腫瘍因子産生



におけるマクロファージの必要性が証明された。尚マクロファージで形成された抗腫瘍因子は赤血球には伝達されず、赤血球はリンパ球の代用としては利用できなかつた。<sup>16)</sup>

前記の方法を実際に患者の治療に応用する際、解決しなければならない問題の1つは抗癌性因子産生細胞の供給である。

この問題の解決には2つの方法が考えられる。その1つは *in vitro* で増殖維持させた細胞を利用する方法であり、他方は異種の細胞を利用する方法である。

先に前者の試みとして抗腫瘍因子産生細胞として線維芽細胞を使用した。抗腫瘍因子産生は見られなかつた<sup>15)</sup>。今回は後者の試みとして異種のマクロファージによる抗腫瘍因子産生について検討した所、C3H/He系マウス乳癌およびヒト培養癌に対する抗癌性因子が異種のハムスターマクロファージにより産生され、その因子が同種又は同系のリンパ球に伝達されることが判明した。混合培養時、問題となる異種マクロファージの同種(又は同系)リンパ球への混入は2%以下であつた。又、C3H/He系マウス乳癌の実験系で感作マクロファージにX線照射を加え、翌日得たその培養上清で正常リンパ球を培養すると、前記混合培養の際と同様にリンパ球は抗癌性を獲得した。以上のことから、異種マクロファージと同種(又は同系)リンパ球との間には細胞下レベルでの抗癌性因子伝達があつたと考えられる。その物質は種属特異性のないRNAの様なものかも知れず、この点は今後の課題である。

一方、抗癌性因子産生細胞として異種マクロファージを使用した場合には、癌細胞と感作細胞の接触後1~2日間無反応の時期が認められる。この様な細胞増殖抑制効果の現われない時期につい

ては、液性抗体が産生され、これが癌細胞を被覆して細胞性抗体の発動を抑制したのか<sup>13)</sup>、あるいは混合培養時にリンパ球が破壊され、癌細胞の増殖に有利に働いたのかは不明である。

いずれにせよ、この無反応時期を除くために今後感作源物質中の癌特異抗原と、組織適合抗原の分離精製および両者の抗癌性賦与における相互作用について研究しなければならない。一方、異種動物のマクロファージの抗癌性因子産生における異種因子の作用機構についても、研究を進めなければならない。

稿を終るにあたり、終始懇切なる御指導をいただいた戸部龍夫教授、佐藤一英博士に謹んで感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Fishman, M. et al.: *ibid*, 117, 1963, 595—602.
- 2) Fishman, M. et al.: *J. Exptl. Med.*, 114, 1961, 837—856.
- 3) Graham, J.B. et al.: *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 114, 1962, 1—4.
- 4) Levin, A.G. et al.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 120, 1964, 400—409.
- 5) Mitchison, N.A. et al.: *Immunology*, 16(1), 1969, 1—14.
- 6) Sato, I. et al.: *GANN*, 59, 1968, 273—280.
- 7) Sato, I. et al.: XII international congress of Radiology, Book of Abstracts, 1969, 113.
- 8) Sato, I. and Mitsuhashi, S.: *J. Bacteriol.*, 83, 1962, 1306—1312.
- 9) Sato, I. et al.: *ibid*, 90, 1965, 1194—1199.
- 10) Satoh, K.: *Acta, Med. Okayama*, 20, 1966, 261—268.
- 11) 佐藤他: 日本医学放射線学会雑誌, 27, 1967, 907—908.
- 12) 佐藤他: 第27回日本癌学会総会記事, 1969, 148.
- 13) 田中他: 治療, 48, 1966, 495—505, 1055—1063.
- 14) 辻他: 移植, 3(3), 1968, 92—95.
- 15) 仁尾他: 第26回日本癌学会総会記事, 1968, 248—249.
- 16) 仁尾他: 第30回日本血液学会総会記録 I, 1968, 431.