

癌 と 結 核 の 関 係

第 1 報 結核菌感染がマウス移植癌の発育増殖 に及ぼす影響について

服 部 正 次*
松 田 実**

* 大阪大学医学部第三内科 (指導 堂野前維摩郷教授)

** 大阪府立成人病センター (所長 今村 荒男博士)

受付 昭和 36 年 10 月 14 日

結核と癌との関係については、同一個体内でこれが拮抗的に働くか、あるいはその逆であるかはまだ明確な結論は得られず、現在なお種々論議されているが、わが国において、活動性結核に癌が合併することは、結核患者数が多い割合からみれば非常に少ないようである。著者はこの関係を明らかにする目的で、種々の方法によりマウスに結核菌を接種し、それが腫瘍の発育にいかなる影響を及ぼすかを検討した。

著者が本実験にとりかかったとき、ちょうど Nature 誌上に Old ら¹⁾ があらかじめマウスに BCG を接種し、2 週間以上を経た後、固型癌または腹水癌を移植した場合、前者においては腫瘍の消失を、後者においては生命の延長を認めることを発表し、さらに最近 Weiss ら²⁾ が、BCG 生菌のみでなく、phenol 加死菌や methanol 抽出物でも移植癌発育を抑制ないしは阻止する作用があることを報告した。

以下著者の成績を報告する。

I 腫瘍細胞に対する結核菌の直接作用の検討

1) マウス腫瘍内に直接結核菌を注入した場合、腫瘍の増殖がいかに影響されるかを検討した。

実験材料および実験方法：

移植腫瘍はエールリッヒ腹水癌を用いた。

使用菌株は、竹尾結核研究所保存の強毒結核菌 H₃₇Rv、および弱毒結核菌 H₃₇Ra のグリセリン寒天 2 週間培養のもので、これを用いて 1 mg/cc 生理的食塩水の菌液を作製し、同時にその菌数の測定を行なった

が、H₃₇Rv は 18×10⁶、H₃₇Ra は 10×10⁴ であった。マウスは体重 20 g 前後の dd 系 ♀ マウスを、1 群 12 匹ずつ使用した。

エールリッヒ腹水癌 (細胞数 540×10⁴) を各マウス背部皮下に接種し、2 週間後腫瘍の形成をみてから、それぞれの結核菌液 0.3 cc を腫瘍内に 2~3 カ所に分けて注入した。なお対照には生理的食塩水を同量用いた。腫瘍細胞接種後 35 日間観察を行ない、死亡せるマウスは死亡日を記録し、生存せるマウスは 35 日後に屠殺剖検し、各マウスの腫瘍を摘出してその重量を測定した。

実験成績：

各群の生存率は図 1 に示し、腫瘍重量の平均値は表 1 に示す。両者とも 3 者間にはほとんど差を認めない。

Fig. 1. Effect on Tumor Growth by Tubercle Bacilli Directly Injected into Solid Tumor of Mice

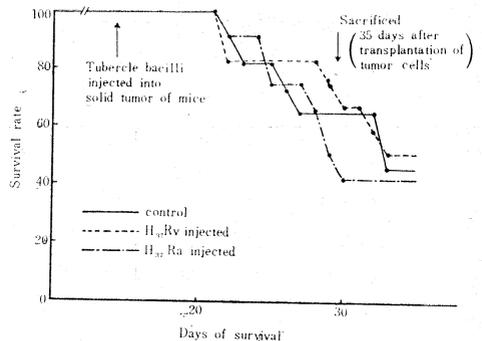


Table 1. Weights of Ehrlich Ascites Solid Tumor 35 Days after Transplantation
Living tubercle bacilli were directly injected into tumor 2 weeks after transplantation

Group	Weight of solid tumor
Control	9.7 g
Living H ₃₇ Rv injected	8.5
Living H ₃₇ Ra injected	11.2

2) あらかじめ結核菌を注入して得た、エールリッヒ腹水癌細胞を用いて腫瘤を作成した場合、すなわちエールリッヒ腹水癌マウスの腹腔内に結核菌を接種し、3日後にその腹水をマウス背部皮下に接種して、腫瘤増殖に及ぼす結核菌の影響を観察した。

実験材料および実験方法：

移植腫瘤はエールリッヒ腹水癌を用いた。

使用菌株は H₃₇Rv (生菌数 48×10⁴) および H₃₇Ra (生菌数 13×10⁴) である。

使用マウスは体重 20 g 前後の dd 系 ♀ マウスで、1 群 9 匹ずつを使用した。

エールリッヒ腹水癌マウスの腹腔内に、それぞれの結核菌を 2 mg/0.5 cc 接種し、3 日後腹水を採取、生理的食塩水にて 2 回洗滌し、しかるのち同液に浮遊せしめ、細胞数 710×10⁴ をマウス背部皮下に接種し、3 週間観察を行ない、その腫瘤径を計測した。腫瘤径の計測には、腫瘤の長径と、これと直角に交わる径を測定し、その平均値をもって示した。

Table 2. Diameter of Subcutaneous Solid Tumor of Mice Inoculated with Ascites Tumor Cells Which were Taken from Ehrlich's Ascites Tumor Bearing Mice 3 Day's after Intraperitoneal Injection with Living Tubercle Bacilli

Group	No. of inoculated tumor	Average dia. of solid tumor
Control	614×10 ⁴	20.1 mm
H ₃₇ Rv	710×10 ⁴	18.5
H ₃₇ Ra	710×10 ⁴	16.6

実験成績：

表 2 に示すごとく、菌接種群のほうが若干その腫瘤は小さいが、あまり著明な差は認められない。

3) エールリッヒ腹水癌と、結核菌を混合してマウス背部皮下に接種した場合の腫瘍の増殖について検討した。

実験材料および実験方法：

移植腫瘍はエールリッヒ腹水癌である。

結核菌は H₃₇Rv (生菌数 48×10⁴) および H₃₇Ra (生菌数 13×10⁴) を用い、30 匹の体重 20 g 前後の C F₁ ♀ マウスを 3 群に分ち、a 群はエールリッヒ腹水癌 0.1 cc (細胞数 350×10⁴) と、結核菌 0.1 mg/0.1 cc を混合して、ただちにマウス背部皮下に接種、b 群は混合後 37°C 1.5 時間静置してからマウス背部皮下に接種し、c 群はエールリッヒ腹水癌細胞のみを接種した。

実験成績：

図 2, 3 にその成績を示す。結核菌液と腹水癌細胞とをただちに接種したものでは、H₃₇Rv 接種群、H₃₇Ra 接種群ともに若干の生命の延長がみられ、37°C 1.5 時間放置後接種したものでは、H₃₇Rv 接種群に比較的著明な生命の延長が認められる。

Fig. 2. Survival Rate of Mice Simultaneously Inoculated with Ehrlich's Ascites Tumor Cells and Living Tubercle Bacilli

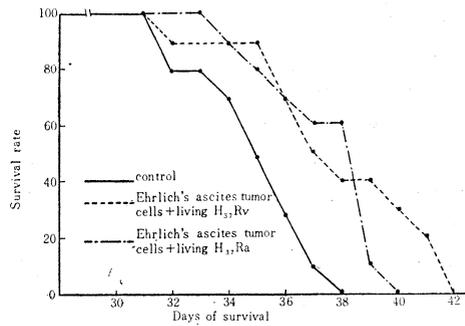
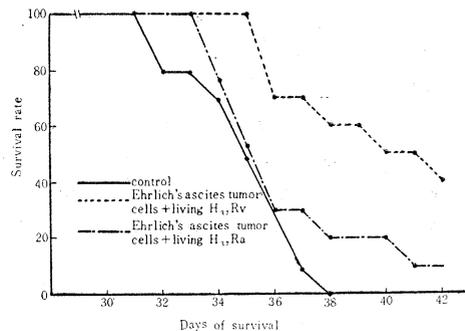


Fig. 3. Survival Rates of Mice Inoculated with Ehrlich's Ascites Tumor Cells and Living Tubercle Bacilli Which Were Kept at 37°C During 1.5 Hrs. after Mixing



II 結核菌感染が間接的に移植癌の増殖に及ぼす作用の検討

以上のごとく、結核菌は直接癌細胞の増殖を阻止する

作用はないが、前項 3) の実験において、結核菌と腫瘍細胞を同時に接種した場合に、 $H_{37}Rv$ 接種群に生命の延長が認められたごとく、なんらかの間接的な作用を有することが分かったので、著者は以下のごとき実験を行なった。

1) あらかじめ結核菌 $H_{37}Rv$ を感染せしめたマウスに腫瘍を移植した場合、その腫瘍の増殖がいかなる変化を受けるかを検討した。

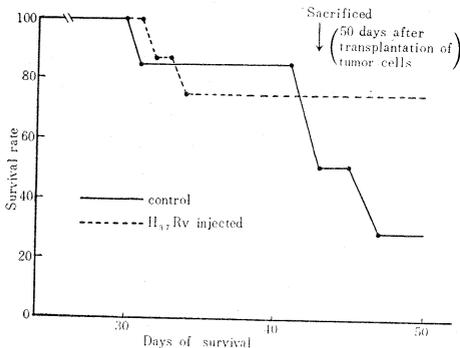
実験材料および実験方法：

体重 20 gm 前後の CF₁ ♀ マウス、対照群 7 匹、菌接種群 8 匹を用い、 $H_{37}Rv$ 0.1 mg/0.2 cc (生菌数 48×10^4) 生理的食塩水をマウス尾静脈より接種し、2 週間後エールリッヒ腹水癌 (細胞数 820×10^4) をマウス背部皮下に移植し、その生存日数の観察を行なった。生存せるマウスは 50 日後屠殺剖検し、感染マウスについては脾重量を測定するとともに、肺および脾について 1% 小川培地を用いて法のごとく定量培養を行ない、6 週後に判定を行なつて集落数を計算した。

実験成績：

図 4 に示すごとく、 $H_{37}Rv$ 感染群においては、マウス生存率が著しく延長される。生存マウスは 50 日後屠殺したが、感染群 8 匹中 6 匹が生存し、そのうち 33 匹は一時腫瘍が増大したものの、30 日をすぎるところより漸次腫瘍は出血壊死に陥り、屠殺時には全く腫瘍を認めえなかつた。臓器定量培養成績は表 3 に示す。

Fig. 4. Survival Rates of Mice Inoculated Subcutaneously with Ehrlich's Ascites Tumor Cells on the Left Back, Two Weeks after Injection of Living $H_{37}Rv$



2) 前項の実験でみられるごとく、 $H_{37}Rv$ 感染 2 週後に腫瘍を移植した場合、腫瘍の増殖が著しく阻止されるが、 $H_{37}Rv$ 以外の抗酸性菌でも同様な成績が得られるか否かを知る目的で、次のごとき実験を行なった。

実験材料および実験方法：

竹尾結核研究所

保存の $H_{37}Rv$ (生菌数 28×10^6)、BCG (生菌数 11

Table 3. Weights of Solid Tumors and Spleens of $H_{37}Rv$ Injected Mice, at the Time of Autopsy, and Results of Tubercle Bacilli in Organs by Culture

No.	Weight of tumors	Weight of spleens	Number of colonies in lung	Number of colonies in spleen
1	3.1 gm	0.6 gm	++	+
2	2.0	0.8	++	+
3	1.6	0.5	++	+
4	0	0.6	++	+
5	0	0.6	###	++
6	0	0.5	###	++

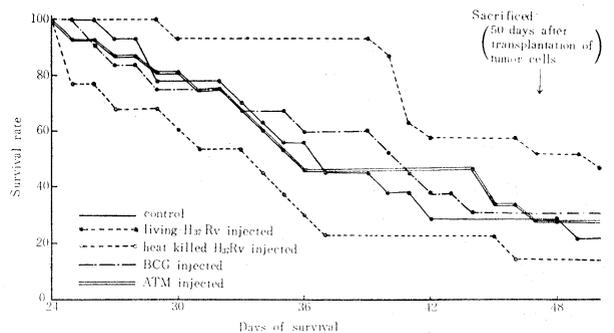
+ : 100~200 colonies of tubercle bacilli per 10 mg organs.
 ++ : 200~300 colonies.
 ### : more than 300 colonies.

$\times 10^5$)、非定型抗酸性菌 No.8 (以下 ATM と略) (生菌数 5×10^6) より 0.1 mg/0.2 cc 生理的食塩水の菌液を作製し、一方体重 20 g 前後の dd 系 ♀ マウスを 5 群に分ち (1 群 13~17 匹)、各菌液をマウス尾静脈より感染せしめ、2 週間後エールリッヒ腹水癌 (細胞数 620×10^4) をマウス背部皮下に移植した。また他の 1 群には、 $H_{37}Rv$ 加熱死菌を流動パラフィンとともにマウス背部皮下に注入し、2 週間後腫瘍細胞を移植した。対照群は癌細胞のみ接種し、各群の生存日数を比較した。生存マウスは 50 日後に屠殺剖検し、腫瘍重量を測定するとともに、菌感染群においては脾重量の測定、肺および脾の定量培養も行なつた。

実験成績：

図 5 に示すごとく、 $H_{37}Rv$ 感染群は対照群に比べて

Fig. 5. Survival Rates of Mice Inoculated Subcutaneously with Ehrlich's Ascites Tumor Cells on the Left Back, Two Weeks after Injection of Living $H_{37}Rv$, BCG, ATM and Beat Killed $H_{37}Rv$



かなり著明な生存日数の延長がみられる。これに対して、BCG および ATM 感染群はほとんど対照と同様であり、 $H_{37}Rv$ 加熱死菌感染群ではむしろ生存日数は短縮するようである。

50 日以上生存せるマウスについて屠殺剖検を行ない、腫瘍重量を測定したが、その成績は表 4 に示すごとくであり、H₃₇Rv 感染群では、4 週をすぎるところまでは対照に比較して腫瘍の大きさに差はないが、それ以後に

なると漸次壊死に陥り、7 週になると腫瘍は癒痕消失をきたす。H₃₇Rv 加熱死菌、BCG、ATM 感染群ではほとんど対照群と変りがない。臓器定量培養は表 5 に示す。

Table 4. Weight of Solid Tumors of the Tubercle Bacilli Injected Mice at the Time of Autopsy

	Control	Living H ₃₇ Rv injected	Heat killed H ₃₇ Rv injected	Living BCG injected	Living ATM injected
Total Mice	13	17	13	13	17
Dead Mice	10	9	11	9	12
Weight of solid tumors	9.5 gm 0 0	0 0 0 0 0 0 0	9.0 gm 7.0	15.0 gm 14.0 3.0 0	15.0 14.5 9.0 7.0 5.5

Table 5. Weights of Spleens of Tubercle Bacilli Injected Mice, at the Time of Autopsy, and Results of Tubercle Bacilli in Organs by Culture

Living H ₃₇ Rv injected			Living BCG injected			Living ATM injected		
Weight of spleens	Number of colonies in lung	Number of colonies in spleens	Weight of spleens	Number of colonies in lung	Number of colonies in spleen	Weight of spleens	Number of colonies in lung	Number of colonies in spleens
350 mg	24	+	520 mg	—	—	900 mg	卅	卅
350	+	65	330	—	2.5	800	卅	卅
320	43	+	320	—	—	600	卅	卅
320	99	+	280	—	0.5	500	卅	卅
300	67	7				300	卅	卅
300	卅	+						
300	24	+						
300	+	卅						

III 結核菌感染がマウス移植癌増殖に及ぼす影響に対する種々の条件について

以上の実験では、すべて固型癌を用いて腫瘍の増殖の如何を検討してきたので、次に、a) 腹水癌では生存日数に影響を及ぼすか否か、b) 接種菌量により差があるか否か、c) 移植細胞数により差があるかどうか、について実験を行なった。

実験材料および実験方法：

使用菌株は H₃₇Rv (生菌数 80×10⁶) および BCG (生菌数 5×10³)、使用マウスはすべて体重 20 g 前後

の dd 系 ♀ マウスで、1 群 10 匹ずつとした。

まず上記各菌株 0.1 mg/0.2 cc 生理的食塩水および 0.001 mg/0.2 cc 生理的食塩水をマウス尾静脈より感染せしめ、2 週後 エールリッヒ腹水癌 (細胞数 540×10⁴) をマウス腹腔内に移植し、生存日数の観察を行なった。ついで移植細胞数を 100 倍に稀釈し同様の実験を行なった。

実験成績：

菌量 0.1 mg を接種した場合を図 6 に、菌量 0.001 mg を接種した場合を図 7 に示す。本実験では両者とも対照群、H₃₇Rv 感染群、BCG 感染群に差を認めない。

Fig. 6. Survival Rates of Mice Inoculated Intraperitoneally with Ehrlich's Ascites Cells, Two Weeks after Injection of Living Tubercle Bacilli

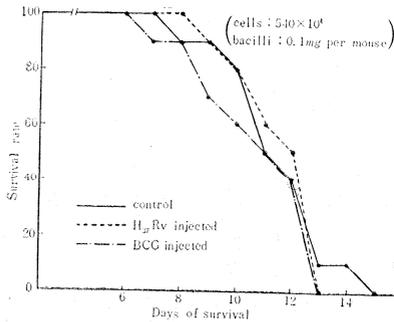


Fig. 7. Survival Rates of Mice Inoculated Intraperitoneally with Ehrlich's Ascites Cells, Two Weeks after Injection of Living Tubercle Bacilli

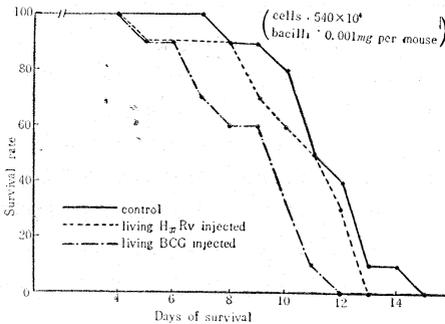
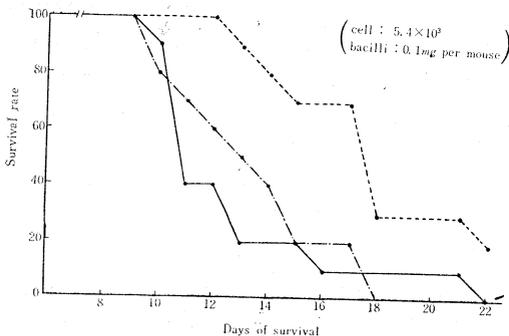


Fig. 8. Survival Rates of Mice Inoculated Intraperitoneally with Ehrlich's Ascites Cells, Two Weeks after Injection of Living Tubercle Bacilli



次に移植細胞数を 100 倍稀釈した場合の成績を 図 8 に示す。図に示すように、腹水癌の場合においても移植細胞数の少ない場合には固型癌移植実験と同様に、H₃₇Rv 接種群では明らかに対照群に比較して生存日数の延長を認めた。

総括および考案

以上の結果を総合すると、まず結核菌自体が腫瘍細胞を破壊したり、腫瘍の発育を強く阻害することは認められない。岡本³⁾の実験において、溶連菌では生菌浮游液を腫瘍内に 1 回注射しただけで腫瘍は軟化崩壊し、癥痕治癒をきたすこと、溶連菌と癌細胞を混じてマウス腹腔内に移植しても癌細胞は増殖しないことが報告されているが、著者の実験から、結核菌においてはこのような強い制癌効果は得られなかつた。

しかしながら、結核菌 H₃₇Rv, H₃₇Ra, BCG, ATMなどをあらかじめ接種して、2 週後に癌細胞を移植した場合には、H₃₇Rv 感染群のみに生存日数の著明な延長および腫瘍の縮小ないし消失を認めた。Old ら¹⁾は、BCG を用いて同様な結果を得ているにもかかわらず、著者の実験において BCG が全く無効であつたのは、感染菌量の差 (Old らは 1 mg 静注、著者は 0.1 mg 静注)、および動物の BCG に対する感受性の差によるものではなからうかと考えられる。

固型癌作成の場合と同じ細胞数を用いた腹水癌の実験では、生存日数に全く差が認められないが、移植細胞数を減少することにより、腹水癌でも固型癌と同様に生存日数の延長が認められたことから、結核菌感染によつて身体の防衛力が増加し、癌細胞の増殖を阻止するものと考えられる。これが生体の抗体産生の増加によるものか、あるいは網内皮系の貪食能の増加によるものか、あるいはもつと他の作用によるものかは不明である¹⁾²⁾⁴⁾。

結核菌感染後腹水癌細胞を移植したマウスでは、屠殺剖検時の腫瘍の大きさ、肺および脾を培養して得た結核菌集落数を比較したが、(表 3, 5) 両者の間にはとくに密接な関係を見出だしえなかつた。

結 び

結核菌感染マウス皮下に腫瘍を移植した場合、腫瘍の増殖は阻止され、腫瘍の消失をきたすものがあることを認めた。この現象は、移植固型癌と同様移植腹水癌においても認められ、移植細胞数を少なくした場合には明らかに菌接種群において生命の延長を認めた。

稿を終るにのぞみ、御指導および御校閲を賜つた堂野前教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨の一部は、第 21 回日本結核病学会近畿地方会 (昭和 35 年 6 月) および第 1 回肺癌研究会総

会 (昭和 35 年 12 月) において発表した。

文 献

- 1) Old, L. J. et al. : Nature, 4682 : 291, 1959.
- 2) Weiss, D.W. et al. : Nature, 4779 : 889, 1961.

- 3) 岡本肇 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 4 (臨時増刊) : 47, 昭34.
- 4) Old, L. J. et al. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 88 : 264, 1960.

Relationship between Cancer and Tuberculosis. 1) Effect of tubercle bacilli infection on transplanted tumors in the mouse.

The relationship between cancer and tuberculosis is still obscure inspite of many efforts about this problem. In this report we performed several experiments as follows:

1) A: The living tubercle bacilli were directly injected into the subcutaneous solid tumors of mice in order to know the direct effect of tubercle bacilli for Ehrlich's ascites tumor cells, but we could not find any special direct effect.

B: First, the living tubercle bacilli were intraperitoneally injected to Ehrlich's ascites tumor bearing mice. Then these tumor cells were collected three days after tubercle bacilli injection, and these collected cells were subcutaneously inoculated to the other mice. However, we could not find any difference in size of tumors between the tubercle bacilli pre-treated group and the control group. Because of this, it does not seem that tubercle bacilli have any direct effect for the Ehrlich's ascites tumor cells.

2) The living H₃₇Rv were intravenously injected beforehand to the mice and, two weeks after, Ehrlich's ascites tumor cells were subcutaneously inoculated to these mice. The inoculated tumor cells increased and made a subcutaneous solid tumor up to thirty days after inoculation, but after that the size of solid tumors in the H₃₇Rv injected group gradually decrease and finally became undetectable. It

seems to us that some anti-cancerous response or ability will be produced in vivo due to pre-inoculation with living tubercle bacilli to the mice. However in the experiments using heat-killed H₃₇Rv, H₃₇Ra, BCG and ATM No. 8 we could not observe such a specific effect like the living H₃₇Rv experiment. This discrepancy about experiment might be derived from the differences of experimental methods and conditions.

3) The living H₃₇Rv were intravenously injected to the mice and, two weeks after, Ehrlich's ascites tumor cells were intraperitoneally inoculated to these pre-treated mice. The survival time of the treated mice was definitely prolonged as compared to the non-treated control animals. In this case, we had to use about 1/100 tumor cells of solid tumor experiment in order to know the definite prolongation of survival time. Therefore, it is the obvious matter that the living tubercle bacilli H₃₇Rv have some indirect anti-cancerous effect on transplanted solid and ascites tumors in the mice.

4) No relationship was observed between numbers of tubercle bacilli colonies in the mice organs by culture and, the sizes or weights of solid tumors and spleens.

5) It is still obscure that the indirect anti-cancerous effect of tubercle bacilli will be due to the enhanced activity of reticulo-endothelial system or the enhanced capacity for antibody production. Experiments about this are now in progress.