

原 著

## 移植癌に対する組織内マクロファージの動態

津田 富康・鬼塚 徹・青木 隆幸・岡嶋 透

大分医科大学医学部第三内科

受付 昭和 57 年 10 月 26 日

MONONUCLEAR CELL TURNOVER IN THE TUMOR TISSUES  
TRANSLATED

Tomiyasu TSUDA\*, Osamu ONIZUKA, Takayuki AOKI and Toru OKAJIMA

(Received for publication October 26, 1982)

In the rabbits transplanted intradermally with Brown Pearse sarcoma cells (B-P cells), the mononuclear cell turnover in the skin lesions was studied periodically. The mononuclear cells (MNs), that were positive for  $\beta$ -galactosidase, made defense walls in the periphery of the tumor lesions from 4 to 16 days after B-P cells transplantation. During the days, the intradermal growth of B-P cells was enhanced more prominently in the rabbits with BCG inoculation on the day of the tumor transplantation than in the rabbits without BCG inoculation, while thereafter, the defense walls of the MNs became gradually loose and then disappeared in both groups.

Thereupon, a number of the MNs in  $1\text{ mm}^2$  of the peripheral lesion was counted periodically. The accumulation of the MNs in a tumor lesion of the rabbits without BCG lesions at the 7th day was about 2 fold higher than that with BCG lesions.

These results suggest that the MNs have a inhibitory capacity depending on a number of the accumulated MNs in the tumor lesions, and the inhibitory capacity of the MNs is reduced if the supply of the MNs is divided into the BCG lesions and the tumor lesions, thus causes the enhanced tumor growth.

**Keywords:** Macrophage, Tumor immunity, BCG,  $\beta$ -galactosidase, lysosomal enzyme.

**キーワードズ:** マクロファージ, 腫瘍免疫, BCG,  $\beta$ -ギャラクトシダーゼ, ライソゾーム酵素

## はじめに

癌が体内に発生し、増殖していく過程で、液性免疫や細胞性免疫などの免疫学的異常が起こることはよく知られている。また、手術で摘出された組織で、間質反応<sup>1)~3)</sup>の強弱はその癌の予後と密接な関係があるとも報告されている。これらの報告を考えると担癌体の免疫の主役はリンパ球および単核食細胞系 (Macro-

phages 以後… M $\phi$  と記す) であることは明らかである。しかし、*in vivo* で癌細胞とこれらの細胞の相互反応を追跡し、その防禦機構を解析することは非常に困難で、あまり多くの報告をみない。

今回は今までに Dannenberg<sup>4)~8)</sup> 等の報告してきた BCG 病巣を使用しての Macrophage Kinetics の基礎知識を基にして、移植性担癌動物の腫瘍病巣に集まる M $\phi$  を  $\beta$ -galactosidase<sup>9)</sup> を markerenzyme として使用

\* From the third Department of Internal Medicine Medical College of Oita  
1506-1, Idaigaoka, Hazama-Machi, Oita 879-56 Japan.

染色し、その分布状態およびその経時的変動について検討した。また、同時に BCG を Mφ の Traps として使用して、腫瘍の移植と同時に BCG を多数の箇所接種した場合の腫瘍増殖に及ぼす影響と腫瘍病巣局所の Mφ の変動についても検討したので報告する。

### 実験方法

〈BCG接種と腫瘍Brown Pearse Sarcoma病巣の作成〉

家兔の背部皮下に BCG (日本ビーシー製造株式会社) および Brown Pearse Sarcoma Cells (以下 BP-Cells という) を下記の方法で接種し、病巣を観察した。

A 群 (5 匹) : 一側背部皮下に  $2.5 \times 10^5$  個の BP-Cells を 4 カ所に移植、同時に他側の背部皮下に 0.8mg の BCG を 8 カ所に注射。

B 群 (5 匹) : 一側背部皮下に  $2.5 \times 10^5$  個の BP-Cells を 4 カ所に移植。

C 群 (5 匹) : 一側背部皮下に 0.8mg の BCG を 8 カ所に注射。

以上の処置後、BCG 接種局所および移植腫瘍病巣を BCG 接種および腫瘍移植後 2, 4, 7, 16, 21, 28, 35 日に体積を測定し、同時にその病巣の一つを生検した。生検した病巣は acetone dryice 法で凍結保存し、cryostat で  $8\mu$  の切片とし、Mφ の marker enzyme である  $\beta$ -galactosidase の染色を施した。その後染色標本は顕微鏡下に観察し、病巣中の Mφ の分布状態およびその総数の経時変化について検討を加えた。今回の実験では BCG 接種は Mφ の分散を企てる為の Trap として使用したので Mφ の組織内での検討はなされていない。

〈Tuberculin reaction の作製〉

本実験では、old tuberculin (化血研製) の 0.1ml を健康な家兔の背部皮下に、組織を生検する日の 48 時間前に注射し、生検日に測定した。

〈その他の検査〉

BCG 病巣の測定と BP-Cells 病巣の生検日にあわせて、末梢白血球数および末梢リンパ球、単核球数も測定し、その変動と組織変化との関係について検討した。

### 実験結果

#### BCG 病巣の体積の推移 (A 群 : C 群)

A 群 (BCG 病巣 + BP-Cells 病巣) と C 群 (BCG 単独) で比較すると Fig 1 に示すようになる。即ち、7 病日以前の病巣ではわずかではあるが A 群の体積 (2 日…  $3.4 \pm 1.1$ , 4 日…  $72.2 \pm 7.2$ , 7 日…  $93.1 \pm 5.6$ ) の増加が C 群 (2 日…  $22.3 \pm 1.2$ , 4 日…  $41.2 \pm 1.6$ , 7 日…  $61.5 \pm 2.9$ ) に比し、優位を示した。しかし、それ以後の病日では明らかに A 群の体積 (16 日…  $155.2 \pm 15.6$ , 21 日…  $112.5 \pm 10.7$ , 28 日…  $97.8 \pm 14.7$ , 35 日…  $69.6 \pm 10.8$ , 49 日…  $10.9 \pm 3.0$ ) の増加は C 群のそれ (16 日…

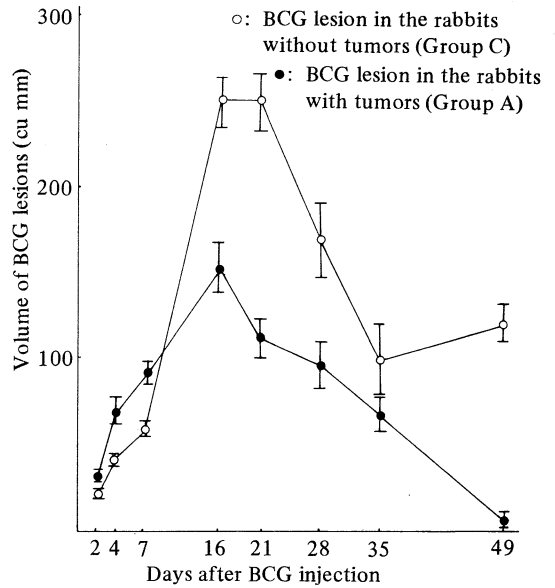


Fig. 1. Comparison of Volumes of BCG Lesions in the Rabbits with and without Tumors.

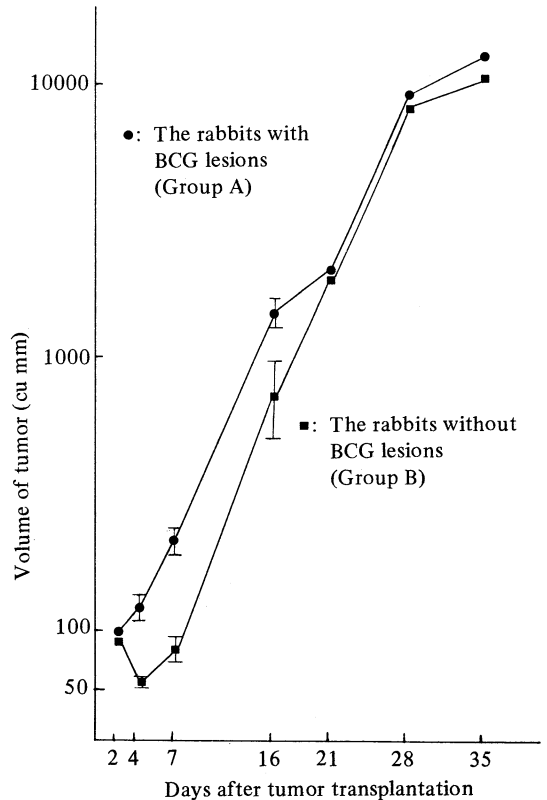


Fig. 2. Comparison of Tumor-Volumes in the Rabbits with and without BCG Lesions.

Table 1. Volumes of OT-Reaction (mm<sup>3</sup>)

Days after injection of BCG	The rabbits with Tumors and BCG lesions (Group A)	The rabbits with BCG lesions (Group C)
Pre.	0	0
2	0	0
7	80.6 ± 27.0	23.4 ± 41.6
16	423.3 ± 19.5	449.3 ± 26.6
21	595.6 ± 98.0	424.5 ± 47.9
28	992.4 ± 109.1	754.0 ± 49.3
35	717.8 ± 103.1	785.0 ± 165.8

250.1 ± 14.2, 21日…251.8 ± 18.2, 28日…170.3 ± 22.4, 35日…100.0 ± 22.9, 49日…123.0 ± 10.6) に比較し、低値を示した。そしてこの結果は、Dannenbergrらの今までのBCG病巣での多くの報告から考え、Mφの病巣への集積の差を示していると考えられた。

#### 移植腫瘍の体積(増殖)の推移(A群:B群)

A群とB群(BP-Cells病巣単独)で比較すると、Fig 2に示すようになる。即ち、4病日より16病日までの前期病巣ではA群の腫瘍病巣の体積は、(2日…100 ± 8, 4日…120 ± 12, 7日…210 ± 20, 16日…1500 ± 170), B群のそれ(2日…95 ± 4, 4日…64 ± 5, 7日…84 ± 8, 16日…750 ± 250)に比し、2倍から2.5倍の差でenhancementされていた。この事を逆に考えるとB群の腫瘍病巣は、A群の腫瘍病巣よりも腫瘍の発育が抑制されたことになる。しかし、21日病日以後では腫瘍病巣はA群(21日…2100 ± 300, 28日…9500 ± 2100, 35日…13600 ± 2800), B群(21日…1900 ± 600, 28日…8500 ± 2900, 35日…11000 ± 3500)ともにその差を認めなくなった。

#### Tuberculin 反応の推移(A群:C群)

A群, C群ともに2, 4, 7, 16, 21, 28, 35病日に測定されたがTable 1に示すごとく両者間に特別な差を認めなかった。即ち、16病日より急速に反応が増大し、その後継続して高い反応を示していた。

#### 末梢白血球の変動(A群:B群:C群)

三群について全経過を通し、末梢白血球数および末梢リンパ球一単核細胞数に分け比較検討した。その結果、Table 2に示すように総白血球数では7病日よりA群, B群, C群それぞれ増加し、その全過程の平均はA群11400 ± 2000, B群15000 ± 2000, C群9000 ± 900であった。末梢リンパ球一単核細胞数では担癌体であるA群, B群で4500 ± 500, 5300 ± 1000と軽度の増加に止まり、C群では3000 ± 200と殆んど増加せず、腫瘍やBCG感染の影響は数的には認められなかった。

#### Macrophagesの分布形式と数の変動

以上BCG病巣と移植腫瘍の大きさの推移について論じてきたが、ここでは腫瘍病巣内でのMφと腫瘍細胞の相互関係を調べる目的でMφの病巣内分布の形式(腫瘍細胞増殖の抑制作用、即ち防禦壁形成能)と防禦壁に集まるMφの単位面積での数の変動について検討し

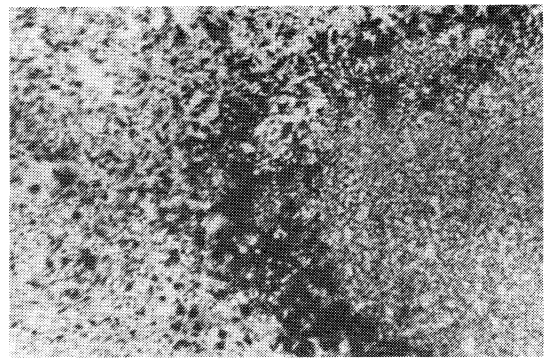


Photo. 1. The tumor was circumscribed by MN-defence wall that were composed of  $\beta$ -Galactosidase positive cells (Type I). A 7 day tumor lesion in Group B rabbit. HE: 400 ×

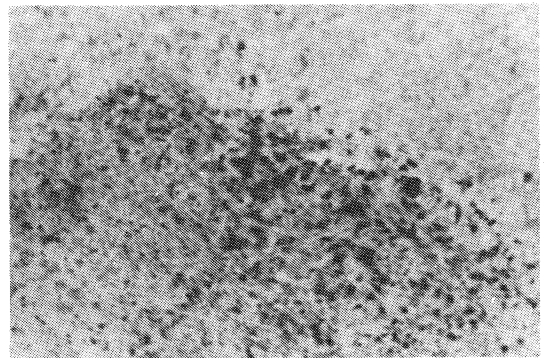


Photo. 2. The tumor cells infiltrated in MN-defence wall (Type II). A 16 day tumor lesion in Group A rabbit. HE: 400 ×

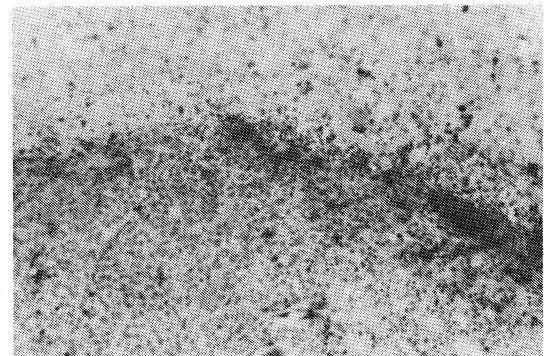


Photo. 3. The defence wall disappeared and MNs scattered in the tumor mass (Type III). A 21 day tumor lesion in Group B rabbit. HE: 100 ×

た。

#### i) Macrophages 分布の形式

まず、腫瘍細胞集団を取り囲むMφの分布形式から

Table 2. Leukocyte Counts through the Experimental Courses in Three Groups

	The rabbits with tumors and BCG lesions (Group A)		The rabbits with tumors (Group B)		The rabbits with BCG lesions (Group C)	
	Total	MN	Total	MN	Total	MN
Pre	7900 ± 100	4300 ± 100	8000 ± 200	3600 ± 200	8100 ± 500	3000 ± 200
7	12000 ± 900	6600 ± 200	16000 ± 800	4200 ± 200	10000 ± 1000	3400 ± 300
16	8500 ± 300	3500 ± 300	9600 ± 300	3400 ± 200	7400 ± 500	3300 ± 100
21	16000 ± 300	5400 ± 2200	17000 ± 1000	5100 ± 500	5800 ± 300	2600 ± 800
28	14000 ± 1000	3800 ± 900	24000 ± 300	10100 ± 2400	11000 ± 1000	3700 ± 500
35	9700 ± 300	3300 ± 500	14000 ± 1800	4900 ± 1200	11000 ± 1200	4000 ± 800
Ave. (7 to 35)	11400 ± 2000	4500 ± 500	15000 ± 2000	5300 ± 1000	9000 ± 900	3000 ± 200

Table 3. Relationship between Development of Tumors and MN-Defense Walls

Days after tumor transplantation	The rabbits with tumors and BCG lesions (Group A) (%)			The rabbits with tumors (Group B) (%)		
	Type I*	Type II <sup>o</sup>	Type III <sup>#</sup>	Type I	Type II	Type III
7	50	50	0	50	50	0
16	0	60	40	25	50	25
21	0	50	50	0	34	66

## Classification of defense walls

- \* : Type I The tumors were circumscribed by MN defense wall that were composed of  $\beta$ -galactosidase positive cells.
- o : Type II MN defense walls become loose.
- # : Type III MN defense walls disappeared.

Table 4. Number of MNs that Were Positive for  $\beta$ -Galactosidase in Unit Area (1mm<sup>2</sup>)

Days after tumor transplantation	The rabbits with tumors and BCG lesions (Group A)	The rabbits with tumors (Group B)
7	281 ± 46	411 ± 60
16	266 ± 51	258 ± 23
21	217 ± 34	178 ± 45

3つの Type に分けた。Type 1 (photo 1) は $\beta$ -Galactosidase 陽性の M $\phi$  が腫瘍細胞集団を幾重にも取り囲んで defense wall が強く形成されているもの。Type II (photo 2) は腫瘍細胞集団を取り囲む M $\phi$  の defense wall に腫瘍細胞の侵入が起こり一部が粗になっているもの。Type III (photo 3) は M $\phi$  の defense wall が消失し、M $\phi$  は腫瘍細胞集団の外側に少数散見されるも

の。このように分けてその Type 間の推移を A 群、B 群で比較すると Table 3 に示すようになる。即ち、7 病日では A 群、B 群ともに Type I、Type II の defense wall が認められるが 16 病日、21 病日となると B 群が A 群に比し、Type I、Type II の defense wall の継続が認められ、逆に A 群では defense wall が早く消失していく傾向にあった。そして全体的にこの Type

の推移を検討すると、Type I から Type II へ、Type II から Type III へと変化していく過程が認められた。

#### ii) 単位面積あたりの Macrophages の数

defence wall 形成域の Mφ の数を 1 mm<sup>2</sup> の単位面積内の細胞数として計算したのが Table 4 に示した値である。ここに示されるように 7 病日では Type 間で差を示さなかった A 群、B 群であったが、細胞数では A 群 281 ± 46、B 群 411 ± 60 と約 2 倍の Mφ が A 群に比し、B 群に集積していた。しかし、16 病日、21 病日となると殆んど両群の間に数的には差を示さなくなっていた。

そこで、両群を通して数的に Mφ の増減の推移を観察すると、両群とも時間の経過とともに Mφ は、腫瘍病巣から減少していくことが認められた。

### 考 案

以上、家兎に移植された Brown Pearse Sarcoma Cells に対する生体の防禦機構の一端を Mφ を中心に証明しようと考えた。即ち、実験を通じて 1) BCG 病巣への Mφ の集積が担癌動物と正常動物でどのように異なるか。2) 腫瘍病巣の増大(腫瘍増殖)に及ぼす BCG 病巣の存在意義。即ち、腫瘍病巣内での Mφ の動態解析。3) 末梢白血球およびリンパ球—単核細胞の実験経過を通しての変動について検討を加えた。

1) BCG 病巣への Mφ の集積を論じる場合、Ando<sup>5)</sup> の報告しているように、BCG 病巣の体積は Mφ の侵入量とほぼ平衡関係にあるとの考えに基づき検討した。BCG 単独病巣に比し、担癌体の BCG 病巣は 7 病日までの初期病巣で体積が優位を示していたが、16 病日以後の病巣では低値を示していた。この事は非特異的異物反応としての Mφ の遊走は初期の段階では BP-Cells の病巣をもつことによって、なおさらに刺激され、骨髄からの Mφ の供給が増加する結果によるものと考えられた。しかし、2 週以後遅延型過敏反応が BCG に特異的に発現してくると BCG 病巣への Mφ の集積が強くなり起こる。しかし、担癌動物では BCG 病巣への Mφ の集積が BCG 単独群 (C 群) に比し、低下している。そしてこの時期、BCG 病巣 (2 週以後) の Mφ の集積が担癌動物で低下している原因には二つの推論が考えられる。第一は腫瘍細胞から Mφ 遊走阻止物質<sup>10)</sup> が分泌されることにより起こる可能性である。第二には非特異的反応であれ、腫瘍病巣へも多くの Mφ が侵入している本実験結果より考えて、両病巣への Mφ の分散現象が BCG 病巣への Mφ の集積を低下させる結果となっているものと考えられる。

2) 次に腫瘍病巣の大きさの推移と Mφ の関係进行分析したが、BCG に対する特異的免疫の発現しない 16 病日以前では、BCG 病巣を持たない腫瘍単独群 (B 群) の腫瘍が BCG 病巣と腫瘍病巣をともに持つ群 (A 群) の腫瘍に比し、増大が抑制されていることがわかった。言い替えると、A 群ではエンハンスされたことにな

る。そこで両群の腫瘍病巣局所を調べてみたところ、7 病日では B 群病巣は A 群病巣に比し、2 倍~2.5 倍の Mφ の集積 (Type I の防禦壁形成) が認められ、Mφ の集積が多いほど腫瘍の増大を抑えていることがわかった。即ち、非特異的な Mφ の集積は免疫に関係なく抗腫瘍性に働くことが理解できた。しかし、このような Mφ の集積は 16 病日を境に減少し、その後は両群の間に殆んど差を認めなくなり、両群の腫瘍病巣からは Mφ が漸時減少し、姿を消していくことがわかった。(Type II, Type III)

そこで、これらの実験結果を従来報告されている Mφ の抗腫瘍作用と比較して考えると、病巣前期に認められる Mφ 作用は Mφ の本来持っている異物反応性に基づく作用で、Mφ の非特異的抗腫瘍作用と考えてよいものと思われ、BCG などを腫瘍内に注射した際に起こる Mφ の浸潤が抗腫瘍性を示す現象<sup>11)~14)</sup> などと同様 Mφ の lysosomal enzyme が Antitumoricidal effect を示すものと考えられる。そしてこの作用は、Mφ の数的関係で維持されており、A 群のように同時に Mφ を必要とする病変が多発した場合は Mφ の分散が起こり、抗腫瘍作用も減少するものと理解された。

3) 次に各群の末梢白血球数と末梢リンパ球—単核細胞の経時的变化を調べたところ、担癌体 (A 群・B 群) と BCG 単独群 (C 群) では明らかな差が認められた。即ち、担癌体では腫瘍移植後 7 病日で既に末梢白血球数は急速に増加してきたが、BCG 単独群では殆んど増加は認められなかった。また、腫瘍免疫と特に関係の深い末梢リンパ球—単核細胞系について調べてみると担癌体ではやはり増加は認められたが、BCG 単独群では増加は認められなかった。以上の結果から考えて腫瘍細胞は生体内では何らかの骨髄刺激物質を分泌している可能性がある。

以上の 3 つの問題について検討してきたが第 1、2 の問題と第 3 の問題は非常に合理的に解釈される点と矛盾した点を含んでいる。即ち、初期病巣では腫瘍細胞の分泌する骨髄刺激物質は骨髄を刺激し、多核白血球はもとより多数のリンパ球や Mφ を腫瘍病巣に送り出し抗腫瘍作用を発揮する。しかし、同時に BCG 病巣が存在すると Mφ は BCG 病巣へも集まり、その結果は Mφ の分散を招くことになり、抗腫瘍作用の抑制という現象を導いているようである。ところが 16 病日以後の後期病巣では末梢白血球数や末梢リンパ球—単核球系の細胞はいまだ血中に多く存在するにもかかわらず、次第に腫瘍局所からは姿を消してしまう。即ち、新しい Mφ の供給が途絶えてしまうのである。この相反する二つの現象は同時に生体内で進行し、担癌動物は増殖する腫瘍細胞の為に死に至っていくことが今回の実験を通し理解された。しかし、今回の実験では Mφ がなぜ腫瘍病巣から減少し、新しい供給が血中から起こりえないかについては何ら情報を得ることができなかった。