

原 著

実験的誘発腫瘍の脾内移植に関する形態学的検討

—とくにリンパ球と腫瘍細胞との関連について—

畠山 節子 武田 泰典

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座* (主任: 鈴木鍾美教授)

〔受付: 1982年8月28日〕

抄録: C3H/HeN マウスにMCを用いて誘発した肉腫を同系マウスの脾臓漿膜下に移植し, その形態的推移を経日的に検索した。受容マウスには若年群(生後2ヶ月)12匹, 老年群(生後13ヶ月)6匹を用いた。移植腫瘍組織はすべてのマウスに生着した。移植2日目以降より移植腫瘍組織の増殖がみられ, 7日目には腫瘍組織は脾臓表面に丘状に膨隆するとともに脾臓組織内にも浸潤増殖し, 53日目には宿主の脾臓は分葉状を呈する腫瘍塊にはば置換していた。また移植腫瘍組織の増殖の程度は老年群に比べ若年群でより顕著であった。組織学的に移植腫瘍組織と脾臓実質との境界は経日的に明瞭となったが被膜の形成はみられず, 53日目の電顕所見では腫瘍細胞には主として形質細胞およびリンパ球が接していた。しかし両者間に特殊な構造の形成はなかった。組織学的には若年群と老年群間に明瞭な相違は認められなかった。

はじめに

移植免疫や腫瘍免疫の成立には, 細胞性因子と液性因子の両者が関与すると考えられているが, なかでも細胞性因子, すなわち移植抗原あるいは腫瘍抗原を特異的に認識し活性化する宿主リンパ球が重要な役割を演ずる。次いで, この抗原を認識した宿主リンパ球あるいはその影響を受けたTリンパ球が cytotoxic Tリンパ球となり標的細胞に対して特異的な障害を示すと考えられる。細胞障害作用を持つ細胞性因子には, Tリンパ球以外にもTリンパ球のもとに特異抗体を産生するBリンパ球, 特異抗体の存在のもとで標的細胞を障害する ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 活性を持つK細胞, 腫瘍細胞に遭遇したことの

ない未処置動物および正常ヒトに存在し細胞障害性を持つNK細胞, 細胞親和性抗体により特異的障害性を有するマクロファージなどがあげられる。さらに液性因子としてTリンパ球により産生されるリンフォカインが関与する標的細胞障害作用もある¹⁾²⁾。これらの細胞性ならびに液性因子がどのような機序により標的細胞を障害するのことはいまだ明らかではないが, 活性化細胞と標的細胞の膜の相互作用による直接破壊や化学的仲介物質の存在が想定されている。したがってリンパ性細胞の豊富に存在する組織に直接腫瘍組織を移植し, 移植腫瘍とリンパ性細胞の関連について形態学的な検索を試みることも有意義なことと考える。今回著者らは実験的に誘発した腫瘍組織を脾臓に直接移植し, 移植腫瘍組織の増殖態度および脾臓の構成細胞と

Morphological study on syngeneically transplanted sarcoma in murine spleen —It's behavior in splenic parenchyma—

Setsuko HATAKEYAMA Yasunori TAKEDA

(Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

19-1 Uchimarui Morioka (020) Japan

*岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7 : 178-187, 1982

腫瘍細胞との関連について形態学的に検索した。なお脾臓の局所反応が宿主の加齢によって相違があるか否かについても検討した。

材料および方法

動物は近交系の C3H/HeN 雄マウスを用いた。生後 2 ヶ月齢のマウスの左側咬筋組織内に 20-メチルコラントレン (以下 MC) 0.20mg を

直接埋入する方法³⁾を用いて肉腫を誘発した。MC 埋入後 4 ヶ月目の誘発肉腫を無菌的に摘出し、メスにて約 0.5mm 角の組織片に細切しこれを生後 2 ヶ月齢および生後 13 ヶ月齢の両群マウスの脾臓漿膜下に無菌的に移植した。移植方法は、マウスの左側後腹部の皮膚を切開し脾臓を露出させ先鋭のピンセットにて漿膜に微小な切開を加え移植片を漿膜下に挿入した。その後

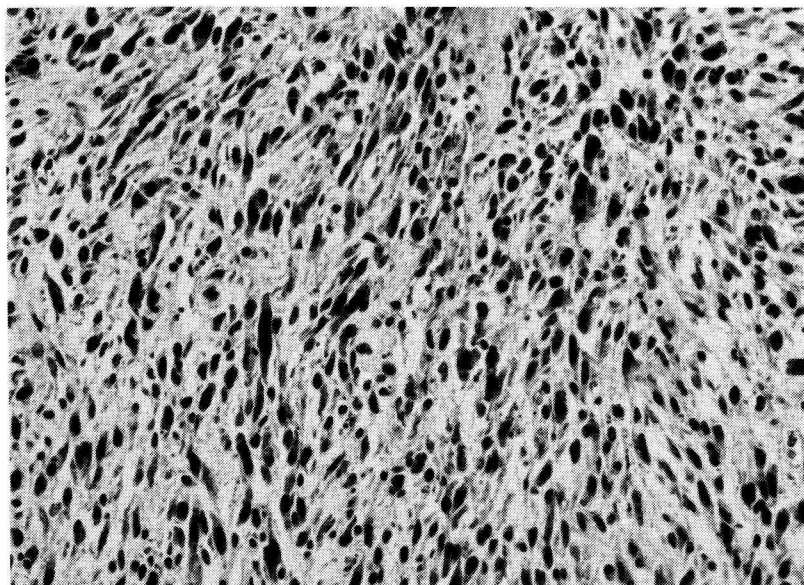


Fig. 1. Graft tissue of sarcoma induced by MC (four months after embedding of MC in the masseter of C3H/HeN male mice). Tumor cells show marked atypia with hyperchromatic and large nuclei. H·E stain $\times 600$.



Fig. 2. Macroscopic finding of transplanted graft (one day after transplantation). Transplanted tissue is found as a small white patch under the serosa of the spleen. $\times 30$.

脾臓を後腹部に戻し腹膜ならびに皮膚を縫合した。移植後, 1, 2, 7, 15, 30, 53日目に動物を屠殺し, 摘出した脾臓を肉眼的に観察し, 次いで光顕および一部は凍結切片とし, 酸フォスファターゼの組織化学的検出を行いさらに一部は電顕標本とし, 腫瘍組織と脾臓組織の境界部を中心に検索した。なお受容マウスは生後2ヶ月齢(若年群)12匹および生後13ヶ月齢(老年群)6匹を用いた。

結 果

MC埋入4ヶ月後における咬筋部の誘発肉腫は錯走する紡錘形あるいは卵円形の細胞よりなり, 個々の腫瘍細胞はヘマトキシリンに濃染する大型・卵円形の核を有し異型性が顕著であった(Fig. 1)。脾臓への移植組織片は18匹のすべてのマウスに生着した。

1. 移植腫瘍組織と脾臓の経日的変化

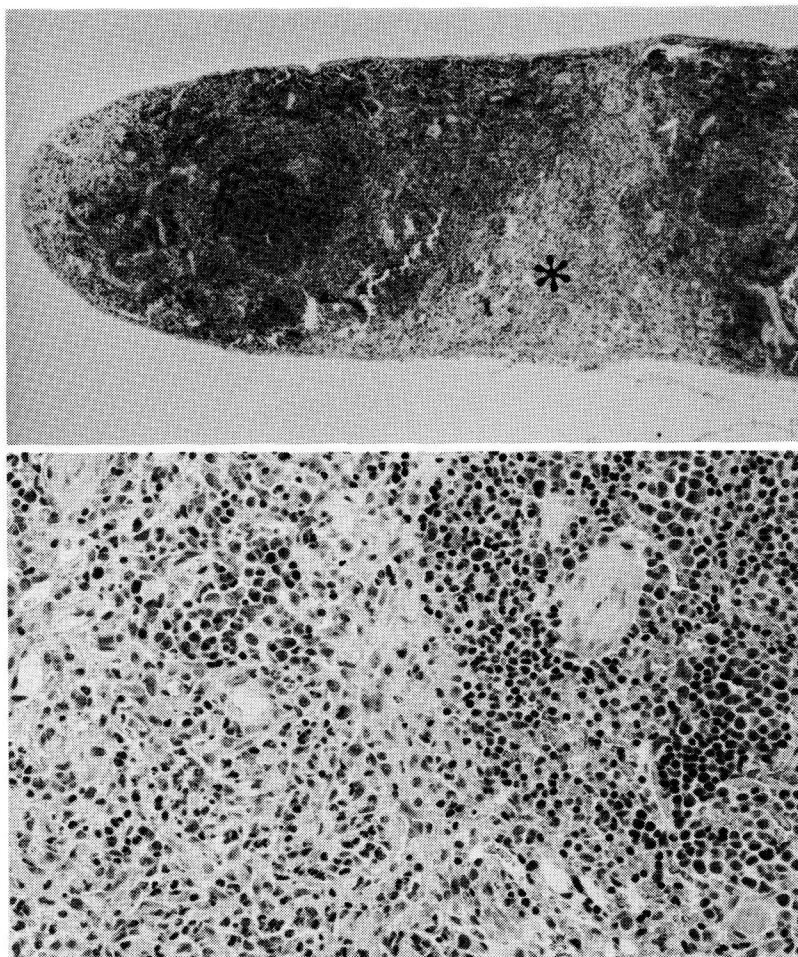


Fig. 3. Light micrograph by low magnification of the spleen, two days after transplantation. Splenic parenchyma is destructed and replaced by granulation tissue(*). H•E, $\times 120$.

Fig. 4. Light micrograph by high magnification of the same sample shown in Fig. 3. Tumor cells are scattered and are surrounded by thin zone of granulation tissue. The host splenic tissue is seen in the right side. H•E, $\times 600$.

1) 移植後1, 2日目の所見

生着した腫瘍組織は移植後1~2日目には脾臓漿膜を通して微小な白斑として認められた (Fig. 2)。組織学的に、腫瘍細胞は小型で類円形を呈し脾臓組織内に浸潤増殖していた。腫瘍組織内には少数のリンパ球浸潤がみられた (Fig. 3, 4)。なお腫瘍組織と周囲の脾臓組織との間に壊死巣が僅かに認められるものもあった。

2) 移植後7, 15日目の所見

腫瘍組織は移植後7~15日目には肉眼的に白色を呈し脾臓表面に半球状に膨隆していた (Fig. 5)。また膨隆部には、腫瘍の原発巣に多くみられる有臍状所見はなかった。組織学的に腫瘍は赤脾髄および胚中心を圧排して増殖し腫瘍組織と脾臓実質との境界は比較的明瞭であり、腫瘍組織内のリンパ球浸潤はごく軽度に見られるにすぎなかった (Fig. 6, 7)。また腫瘍組織と脾臓実質の間には被膜の形成はなかった。

3) 移植後30, 53日目の所見

この時期には、移植腫瘍は著明に増大し、肉眼的に灰白色、表面滑沢で塊状あるいは分葉状を呈し (Fig. 8)、本来の脾臓はごく僅かに残存するのみであった。組織学的に、腫瘍組織に

接してリンパ球および形質細胞が認められ、残存する脾臓実質とは明瞭に境されるものの被膜の形成はなかった (Fig. 9)。電顕的には、腫瘍細胞に接する細胞の多くは形質細胞であり、その他少数ではあるがリンパ球、組織球なども認められた (Fig. 10, 11)。また粗面小胞体が膨化している necrobiotic な形質細胞も散見された。これら腫瘍細胞と、隣接する形質細胞あるいはリンパ球の間には interdigitation などの特別な構造や膜様成分あるいは結合組織成分の介在はなかった (Fig. 12)。しかし Fig. 13に示す如く浸潤リンパ球に密接した腫瘍細胞の細胞膜が不明瞭化している所見も一部にみられた。

酸フォスファターゼの組織化学的検索では腫瘍辺縁部に陽性細胞が比較的多く検出され、腫瘍組織内にも散見された。

2. 腫瘍の増殖態度に関する若年群と老年群との比較

受容マウスの若年群と老年群における移植腫瘍組織の増殖態度を比較したのが Table. 1 である。すなわち、老年群に比べて若年群では移植2日目以降で腫瘍の増殖が早く、30日目にはるいそうがより顕著であった。しかし組織学的には両群間に明瞭な相違を見出すことはできなかった。

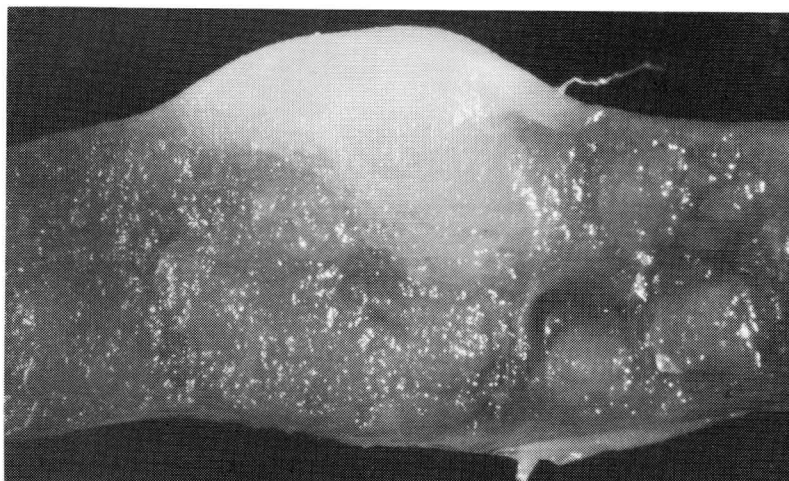


Fig. 5. Macroscopic finding of the spleen, seven days after transplantation. Nodular tumor tissue grows with protuberant appearance. $\times 30$.

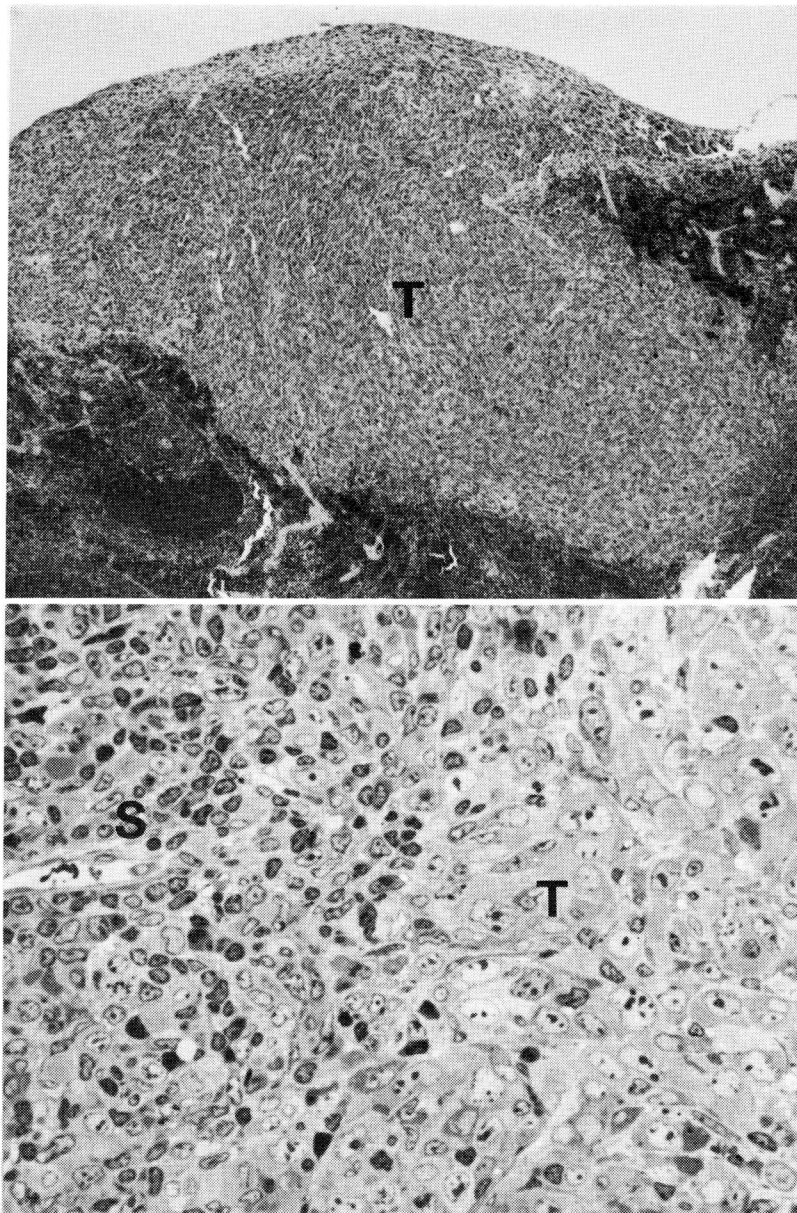


Fig. 6. Light micrograph by low magnification of the spleen, seven (上) days after transplantation. Splenic germ centers and red pulps are pressed by proliferated tumor tissue(T). H·E, $\times 120$.

Fig. 7. Semi-ultrathin section of the boundary between the splenic parenchyma(S) and proliferated tumor tissue(T), the same sample shown in Fig. 6. Toluidine blue stain, $\times 1200$.

考 察

癌細胞の移植免疫は癌に対する免疫学的抵抗性の最も直接的な反応であり、種々の研究が試

みられてきた。同系移植あるいは自家癌系の実験で、担癌生体には移植腫瘍あるいは自家癌に対する免疫の成立することが明らかにされ⁹⁾、癌細胞の免疫的破壊に直接関与するのは cyto-

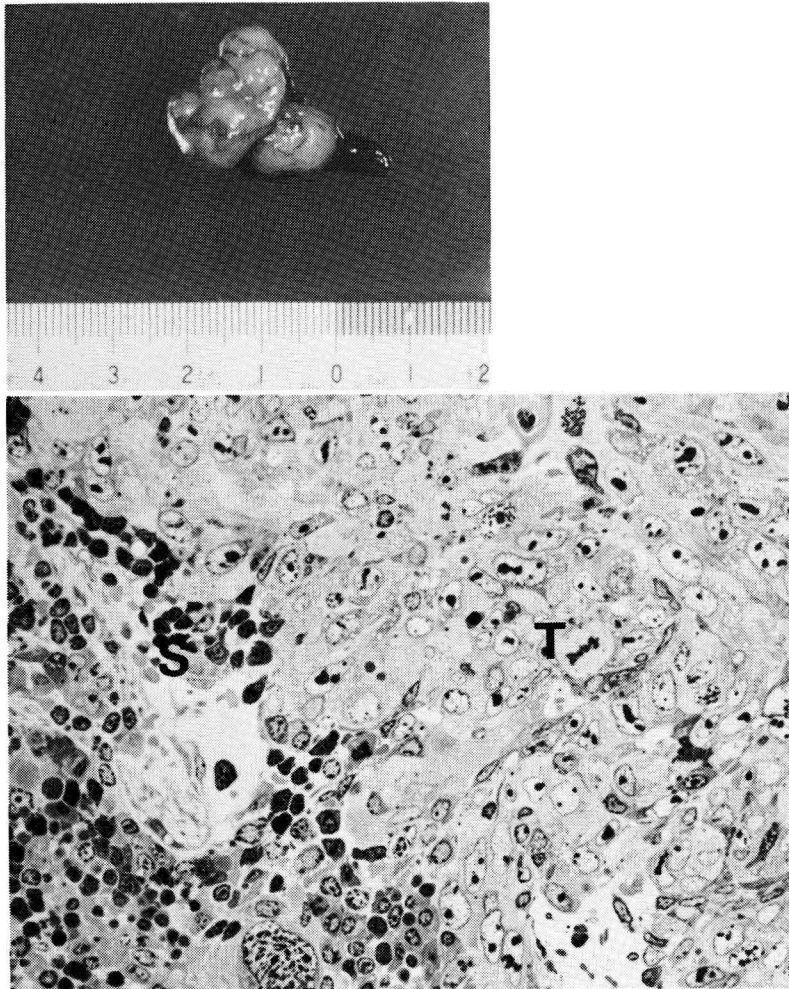


Fig. 8. Macroscopic finding of conglomerated tumor mass, fifty three days after transplantation.
(上)

Fig. 9. Semi-ultrathin section of the boundary between the splenic parenchyma(S) and transplanted tumor tissue(T). Tumor tissue is well circumscribed and peripheral tumor cells and lymphoid cells are in direct contact. Toluidine blue stain, $\times 1200$.
(下)

toxic Tリンパ球と考えられた^{7,8)}。今回の実験においても腫瘍辺縁部および腫瘍組織内に核周囲に酸性フォスファターゼ陽性部をもつ細胞を認め⁹⁾、それらは T-cell と考えられた。さらに標的腫瘍細胞に対する感作リンパ球の作用機序は、以前には免疫細胞と標的細胞の接触または付着が前提とされ¹⁰⁾、両者の細胞膜の嵌合や融合がみられるとの報告がなされたが¹¹⁾、その

後標的細胞破壊には両者の直接接触は必須のものではなく、免疫担当細胞から産生される cytotoxic substance も重要な役割りを担っていることが確認された¹²⁾。今回の実験では腫瘍細胞と形質細胞あるいはリンパ球との間に特別な構造の形成はなかったが、一部でリンパ球に接する腫瘍細胞の細胞膜が不明瞭なものが認められた。形態学的にはこれ以上の所見を期待する

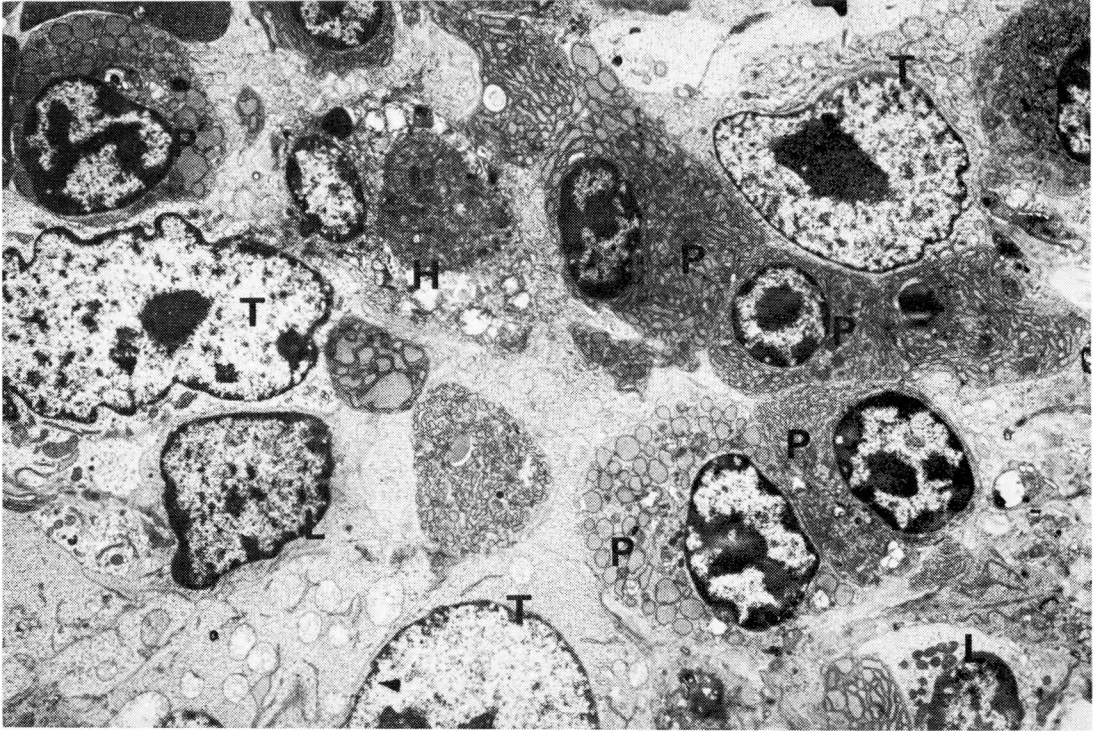


Fig. 10. Electron micrograph of the boundary between the splenic parenchyma and transplanted tumor tissue of young mouse. Many plasma cells(P) and lymphocytes(L) contact with tumor cells(T). A few necrobiotic plasma cells(P') and a histiocyte (H) are also seen. Uranyl acetate and lead citrate stain, $\times 5000$.

ことは困難であろうが、両者間にみられる何ら

Table 1. Comparison of tumor growth(mm) between young group and old one

Days after transplantation	Young	Old
1	1 >	1 >
2	2 × 1.5 × 1	1 × 1 × 1 2 × 1 × 1
7	4 × 4 × 3 2 × 1 × 1 subserosa	2 × 1.5 × 1 2 × 1.5 × 1
15	4 × 4 × 3 2 × 2 × 1.5	
30	3 × (14 × 15 × 10) lobular 10 × 8 × 8 30 × 30 × 20	
53	20 × 10 × 3 23 × 24 × 10	16 × 8 × 7

かの相互作用に関しては免疫学的手法による新たな実験系でさらに興味ある結果が得られると考える。

生体の免疫能は加齢とともに低下することが知られているが、この加齢に伴う免疫能の変化は抗原の種類、動物の種属や系統あるいは実験方法などによって差異がみられきわめて多様性に富んでいる¹³⁾¹⁴⁾。加齢に伴う免疫能の低下と発癌との関連についてもいくつかの実験がなされている。すなわち Teller¹⁵⁾は Swiss 系マウスにヒト由来の移植腫瘍株 H. Ep #3 を皮下移植すると、生着率は新生仔(ほぼ100%)、6ヶ月までの間(0.65%)、10ヶ月(31.5%)で異っており、10ヶ月以降は加齢とともに腫瘍生着率が増加することをみだし、このことは異種腫瘍移植に対する免疫能が加齢に伴って低下したため

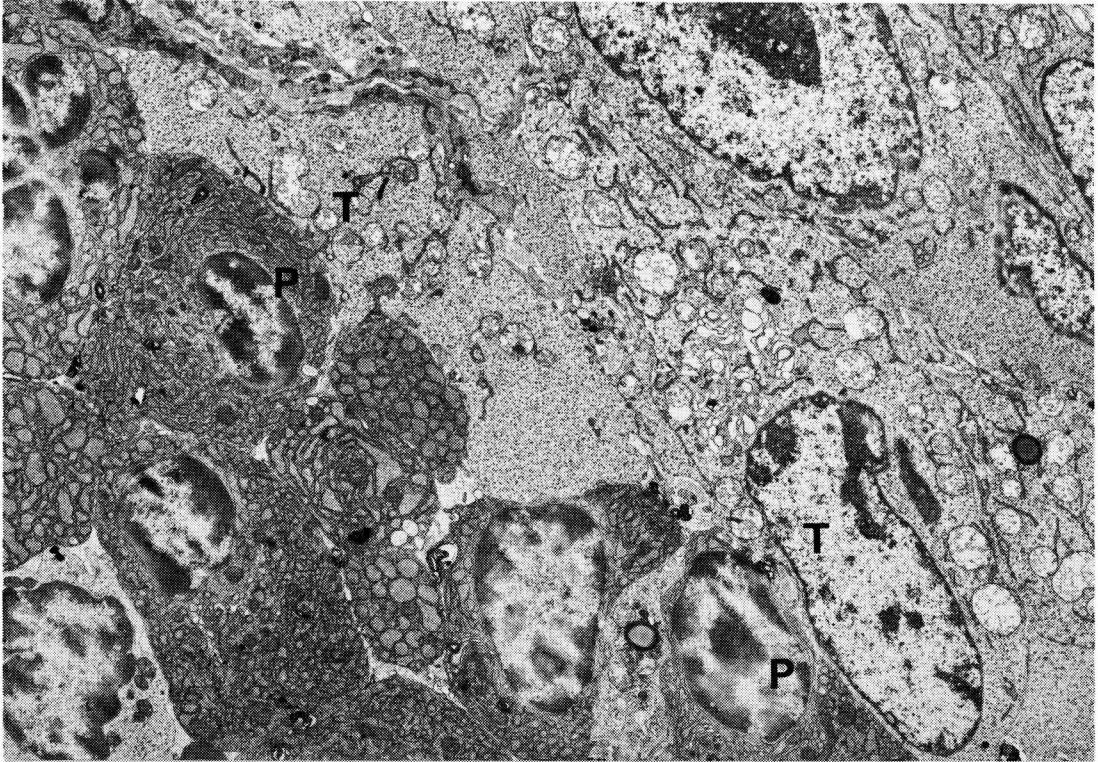


Fig. 11. Electron micrograph of the boundary between transplanted tumor tissue and splenic parenchyma. Plasma cells(P) and tumor cells(T) are in direct contact. (old mouse) Uranyl acetate and lead citrate, $\times 5400$.

と考えた。しかしこれらの事実は雌マウスでみられたもので、雄マウスでは10ヶ月以降においても腫瘍生着率は増加しないことも同時に報告された¹⁵⁾。また同じ Swiss 系マウスの自然発生腫瘍の発生率も雌マウスで大で雄マウスでは腫瘍発生の初発時期も遅いことが認められ¹⁶⁾、腫瘍免疫の発現においては加齢の他に性差も大きな要因となることが示唆されている。今回の実験では、加齢による免疫能の低下がみられない雄を用いており、しかも同系移植であることから、若年マウスと老年マウス間に腫瘍生着率の差がみられなかったものと考えられた。

結 語

C3H/HeN 雄マウスにMCを用いて肉腫を誘

発し、この組織細片(約 0.5mm^3)を同系雄マウスの脾臓漿膜下に移植し以下の所見を得た。

1. 移植腫瘍組織は移植後7~15日目頃には脾臓組織内に浸潤増殖し、53日目には脾臓はうずら卵大の腫瘍塊に置換していた。移植片を拒絶したマウスはなかった。

2. 移植腫瘍組織と宿主マウスの脾臓組織との境界には結合組織の介在はなかったが、移植後30日目には両者の境界は明瞭となり、53日目の電顕所見では主として形質細胞およびリンパ球が腫瘍細胞に接していた。両者間に特殊な構造の形成はなかった。

3. 老年群に比べ若年群の方が腫瘍の増殖が速く、るいそうも顕著であったが、組織学的に両者間に明瞭な相違は見い出せなかった。

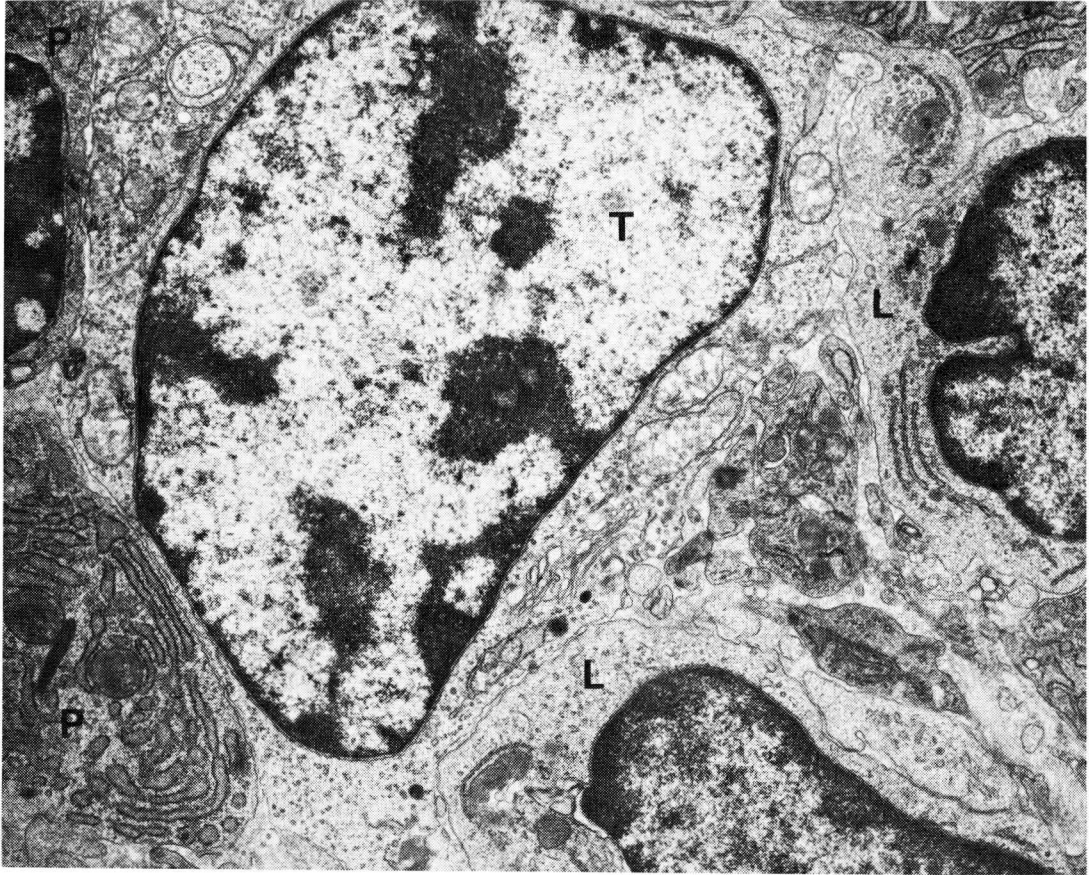


Fig. 12. Electron micrograph of tumor cell(T), lymphocytes(L) and plasma cells(P). They have no specialized surface structure. Uranyl acetate and lead citrate, $\times 15000$.

本論文の要旨は第20回日本口腔科学会北日本
地方会（新潟市，1982年6月30日）において、
発表した。

本研究は昭和56年度文部省科学研究費奨励研
究A（課題番号56770827）の補助を受けた。

Abstract : The small explants (0.5mm^3 cuboid) of sarcoma induced by MC in C3H/HeN mouse were transplanted syngeneically under the serosa of the spleen. The recipient mice were divided into two groups. One was young group (two-month-old) and the other was old one (eleven-month-old). Transplanted tumor tissue survived in all recipient mice. Seven days after transplantation tumor tissue grew protruding from splenic surface and also infiltrated deeply into splenic parenchyma. Fifty three days after transplantation, the whole spleen was replaced by conglomerated tumor mass. Tumor growth was more conspicuous in young group of mice than in old one. Histologically, the boundary between transplanted tumor tissue and splenic parenchyma was progressively cleared, but any membranous structure was not ultimately formed. Many plasma cells and lymphocytes were directly contact with tumor cell and no specialized cellular structure was formed between them. In part which showed tumor cells and lymphocytes were in direct contact, simultaneously plasma membrane of tumor cell became unclear. There were no prominent histological difference between young group of mice and old one.



Fig. 13. Electron micrograph of infiltrated lymphocyte in tumor tissue. (arrows indicate disappearance of plasma membrane of tumor cell). Uranyl acetate and lead citrate, $\times 8000$.

文 献

- 1) 菊地浩吉 : 細胞性免疫の発現機序, 菊地浩吉編, 医科免疫学, 第2版, 南山堂, 東京, 175-199, 1981.
- 2) 千原呉郎 : 癌と免疫増強—新しい宿主抵抗増強抗癌物質の開拓— 講談社サイエンティフィック, 東京, 20-43, 1980.
- 3) Hatakeyama, S. : Morphological changes of myofibril in the carcinogenic course of 20-methylcholanthrene-induced rhabdomyosarcoma, *Acta Pathol. Jpn.* 31 : 1029-1043, 1981.
- 4) 神山隆一, 清水一枝 : リンパ節の病理組織検査法, 東京臨技会誌, 1-5, 1978.
- 5) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E., and Helistom, E. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, 20 : 1561-1572, 1960.
- 6) 武田勝男 : 癌の免疫, 第17回日本医学会総会学術講演集Ⅱ, 日本医書出版協会, 東京, Ⅱ 935-Ⅱ 949, 1967.
- 7) 菊地浩吉, 橋本嘉幸 : 癌細胞に対する特異的な細胞性免疫, 図説癌免疫のしくみ, 新宿書房, 東京, 30-42, 1979.
- 8) 橋本嘉幸, 北川恒代 : 感作リンパ球による標的細胞破壊反応, 蛋白質, 核酸, 酵素, 19 : 907-915,

- 1974.
- 9) Kamiyama, R. and Shimokawa, R. : An enzyme histochemical study of non-Hodgkin's lymphoma and allied disease, *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 24 : 239-247, 1977.
- 10) 菊地浩吉 : 細胞性免疫, 小林博, 橋武彦編腫瘍免疫学, 朝倉書店, 東京, 193-206, 1977.
- 11) 井川洋二, 橋本嘉幸 : 感作リンパ球と標的細胞の接触面の電顕的解析, 第26回日本癌学会総会記事, 241, 1967.
- 12) Kikuchi, K., Reiner, J., Southam, C.M. : Diffusible-cytotoxic substances and cell-mediated resistance to syngeneic tumors in vitro demonstration, *Science*, 165 : 77-79, 1969.
- 13) 岸本 進 : 加齢と免疫, 医学のあゆみ, 97 : 506-510, 1976.
- 14) Teller, M. N., Marion, E. : Aging and carcinogenesis. IV. Interrelationship among age, immune response and tumor incidence in several strains of mice, *J Nat. Cancer Inst.* 39 : 231-239, 1967.
- 15) Teller, M. N., Stohr, G., Curlett, W., Kubisek, M. L. : Aging and carcinogenesis. I. Immunity to tumor and skin grafts, *J. Nat. Cancer Inst.* 33 : 649-656, 1964.