

氏名(本籍)	こまの野肇 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,261号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	実験的マウス大腸腫瘍の発生に関する研究 —特に腫瘍発生過程における細胞性免疫の関与について—
主査	筑波大学教授 歯学博士 吉田 廣
副査	筑波大学教授 医学博士 小磯 謙吉
副査	筑波大学教授 医学博士 中内 啓光
副査	筑波大学教授 医学博士 林 英生
副査	筑波大学助教授 医学博士 三井 清文

論文の要旨

〈目的〉

腫瘍に対する生体側の防御機構は、NK細胞やT細胞による細胞性免疫が重要であると考えられている。その防御機構の存在を示唆する実験の多くは、すでに樹立された腫瘍の細胞株を用いて行われている。したがって、それらの実験より得られた結果が、原発腫瘍の場合にそのまま当てはまるか否かについては不明である。本研究では、生体の防御機構が原発腫瘍に対しても成立しているのか、さらに、もし成立しているならば、腫瘍の発生過程のどの時期に関与しているのか、という問題に関してNK細胞と上皮間に多く存在する $\gamma\delta$ T細胞に焦点をあてて検討することを目的とした。

〈材料および方法〉

実験動物は、ICRマウス、Balb/cマウスおよびジーン・ターゲッティング法によって作製された $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスを用いた。発癌物質としては、大腸に親和性の高い1,2-Dimethylhydrazine(DMH)を用いた。DMHは生理食塩水に溶解し、pHを6.4に調整したものを20mg/kg体重の割合で、1週間に1回計12回あるいは20回腹腔内に投与した。対照群マウスには、生理的食塩水のみを投与した。大腸組織は5mm間隔に切り出し、ホルマリン固定パラフィン包埋後、厚さ3 μ mで薄切しHE染色した切片を病理組織学的に検討した。脾臓中NK細胞活性は、4時間の ^{51}Cr 遊離試験にてYAC-1白血病細胞を標的細胞として測定した。また、生体内でNK細胞を除去するために、抗アシアロGM1抗体150 μ gを1週間に1回の割合で腹腔内に投与した。対照群には正常ウサギIgG(NRIgG)を投与した。

〈結果〉

DMH をマウスに投与することによって、大腸に軽度異型腺管巢と高度異型腺管巢（腫瘍）が発生した。DMH 投与12回の時点では軽度異型腺管巢のみが観察され、DMH20回投与後3カ月の時点では高度異型腺管巢のみが観察された。一方、DMH12回投与の時点におけるNK細胞活性について、DMH投与群と対照群との間に差を認めなかった。また、DMH20回投与後3カ月の時点で、大腸腫瘍を有するマウスのNK細胞活性は29%であり対照群マウスの10%と比較して有意の差を認めた。さらに、マウスを腫瘍発生数が平均腫瘍発生数5個以上の群（第1群）と5個以下の群（第2群）に大別したところ、腫瘍の発生数は第1群が9.6個、第2群が1.4個であった。また、第1群のNK細胞活性は24%、第2群は34%であった。次に、上記の結果が大腸腫瘍に対する生体の防御反応であることを確認するために、抗アシアロGM1抗体を腹腔内投与することにより生体内からNK細胞活性を除去する実験を行った。抗アシアロGM1抗体投与によりNK細胞活性は消失し、回復するまでに14日間が必要であった。抗アシアロGM1抗体複数回投与マウスにおける胸腺内の各T細胞サブセットの占める割合、脾臓中のT細胞数、CD4陽性細胞とCD8陽性細胞の構成比率について検討したが、抗アシアロGM1抗体投与マウスとNRIgG投与マウスとの間に有意の差を認めなかった。したがって、抗アシアロGM1抗体は、胸腺や脾臓のリンパ球サブpopulationに影響を与えず、NK細胞活性を特異的に除去するものと考えられた。そこで、DMH12回投与後にNK細胞活性を除去する実験を行った。腫瘍発生の初期の段階でNK細胞活性を除去したマウスの腫瘍の発生数は10個であり、NK細胞活性を除去しなかったマウスの腫瘍発生数は3個であった。さらに、発生した腫瘍の増殖の指標として個々の腫瘍の面積、最大径および最大幅について形態計測学的に検討したが、いずれの指標に関してもNK細胞活性を除去したマウスと除去しなかったマウスの間に有意の差はなかった。

さらに、 $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスを用いて、上皮間に多く存在する $\gamma\delta$ T細胞の生理的な役割および腫瘍との関係について検討した。正常マウスとの比較から、 $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスにおいて、小腸陰窩の細胞数の減少、物質の透過性の亢進および小腸上皮細胞間に入り組んだ構造に関して差が認められた。また、大腸発癌に関する組織学的な検討から、DMH投与Balb/cマウスに発生した大腸腫瘍58例全例が粘膜内癌であったのに対して、 $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスに発生した大腸腫瘍では、17例中5例（約30%）が浸潤癌であった。

〈考察〉

大腸腫瘍を有するマウスのNK細胞活性は、対照群と比較して約3倍の高い活性を示すことが判明した。さらに、腫瘍の発生数とNK細胞活性は、逆の関係にあることが明らかとなった。また、抗アシアロGM1抗体によるNK細胞活性の除去実験の結果から、腫瘍の発生過程の初期の段階において、生体には腫瘍の発生そのものを抑制する機構が存在し、その主要な担い手はNK細胞であると考えられた。しかしながら、移植腫瘍細胞の実験系で示唆されているNK細胞による腫瘍の増殖抑制効果に関して、原発腫瘍を用いた本研究の結果では、腫瘍の増殖抑制を裏付ける知見は得られなかった。

さらに、 $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスの検討結果から、 $\gamma\delta$ T細胞が生理的な条件下において上皮細胞の分化に関与していること、また $\gamma\delta$ T細胞は原発腫瘍の浸潤を抑制するような機能を担っていることを示唆しているものと考えられた。

審 査 の 要 旨

樹立された細胞株を用いた実験系でみられる腫瘍に対する細胞性免疫の重要性が原発腫瘍においても適合するか否かは不明であった。本研究ではDMH投与により発生させた原発大腸腫瘍に対して生体側の防御機構を検討し、まずNK細胞が腫瘍の発生を抑制するような役割を担い、その防御機構をすり抜けて発生した腫瘍に対しては $\gamma\delta$ T細胞が腫瘍の浸潤に抑制的に作用していることを示唆する結果を得た。この結果は今後、腫瘍に対する細胞性免疫の研究の進歩に貢献するものであると高く評価される。したがって、本論文は博士（医学）論文としてふさわしいと考える。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。