

博士 (人間科学) 学位論文

予防的見知から見たラット腫瘍細胞の進展に及ぼすライフスタイルの影響

**Effect of life style on the development of tumor cells in
rats from a preventive point of view**

2003 年 1 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

西尾 尚美

Nishio Naomi

研究指導教員：町田 和彦 教授

目次

| | |
|-------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1-1 生活習慣病とは | 2 |
| 1-1-1 がんとは | 2 |
| 1-1-2 がんの発生要因 | 4 |
| 1-2 免疫機能 | 5 |
| 1-2-1 リンパ球 | 5 |
| 1-2-2 NK細胞 | 5 |
| 1-2-3 好中球 | 6 |
| 1-3 がんと生体防御 | 6 |
| 1-3-1 リンパ球 | 7 |
| 1-3-2 NK細胞 | 7 |
| 1-3-3 好中球 | 7 |
| 1-4 ライフスタイルと免疫 | 8 |
| 1-4-1 ストレスと免疫 | 8 |
| 1-4-2 運動と免疫 | 9 |
| 1-5 本研究の目的 | 9 |
| 第2章 腫瘍接種がラットの免疫機能に及ぼす影響 | 11 |
| 2-1 目的 | 12 |
| 2-2 実験方法 | 13 |
| 2-2-1 実験動物及び飼育方法 | 13 |
| 2-2-2 SST-2細胞接種 | 13 |
| 2-2-3 群の設定 | 13 |
| 2-2-4 測定項目 | 14 |
| 2-2-5 統計解析 | 16 |
| 2-3 結果 | 17 |
| 2-3-1 腫瘍の生長 | 17 |
| 2-3-2 末梢白血球 | 18 |
| 2-3-3 リンパ球幼若化 | 18 |
| 2-3-4 NK細胞活性 | 20 |
| 2-3-5 好中球機能 | 21 |
| 2-4 考察 | 25 |

| | | |
|-------|-------------------------|----|
| 第 3 章 | ストレスが腫瘍接種ラットの免疫機能に及ぼす影響 | 28 |
| 3-1 | 目的 | 29 |
| 3-2 | 実験方法 | 30 |
| 3-2-1 | 実験動物及び飼育法 | 30 |
| 3-2-2 | SST-2 細胞接種 | 30 |
| 3-2-3 | ストレス負荷 | 31 |
| 3-2-4 | 群の設定 | 32 |
| 3-2-5 | 測定項目 | 34 |
| 3-2-6 | 統計解析 | 34 |
| 3-3 | 結果 | 35 |
| 3-3-1 | 各ストレスが腫瘍重量に及ぼす影響 | 35 |
| 3-3-2 | 各ストレス群における幼若化 | 36 |
| 3-3-3 | 各ストレス群における NK 細胞活性 | 37 |
| 3-3-4 | 各ストレスが好中球機能に及ぼす影響 | 39 |
| 3-4 | 考察 | 45 |
| 第 4 章 | 運動が腫瘍接種ラットの免疫機能に及ぼす影響 | 51 |
| 4-1 | 目的 | 52 |
| 4-2 | 実験方法 | 53 |
| 4-2-1 | 実験動物及び飼育法 | 53 |
| 4-2-2 | SST-2 細胞接種 | 53 |
| 4-2-3 | 運動条件 | 53 |
| 4-2-4 | 群の設定 | 53 |
| 4-2-5 | 測定項目 | 55 |
| 4-2-6 | 統計解析 | 55 |
| 4-3 | 結果 | 56 |
| 4-3-1 | 各運動群における腫瘍重量 | 56 |
| 4-3-2 | 体重の変化 | 57 |
| 4-3-3 | 分核による白血球の分類 | 58 |
| 4-3-4 | 各運動群における NK 細胞活性 | 59 |
| 4-3-5 | 各運動群における好中球機能 | 62 |
| 4-4 | 考察 | 67 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 第 5 章 総括 | 70 |
| 5-1 SST-2 細胞および SHR を腫瘍実験に用いた意義 | 71 |
| 5-2 各測定法について | 72 |
| 5-3 ストレスが腫瘍接種に及ぼす影響 | 73 |
| 5-4 運動が腫瘍接種に及ぼす影響 | 73 |
| 5-5 ライフスタイルによるがん予防の可能性 | 74 |
| 参考文献 | 76 |

第 1 章 序論

1-1 生活習慣病とは

超高齢化社会を迎えようとしている現代人にとって、健康は最も大切な問題である。時代の変遷とともに人を取り囲む衛生状態がよくなり、ちょっとしたケガや風レルギー、そして生活習慣病と呼ばれる病気である。

生活習慣病は飽食の時代の生活環境がもたらした病気であると言われ、脳血管疾患、心臓、高血圧、糖尿病、肥満が代表的な病気である。これらの病気は現代の先端医療において、その発生メカニズムや治療法が次々と解明されつつあり、生活習慣によって病気の発症や促進が左右されるため、その予防が可能であると考えられる。予防するためには、第一に病気のメカニズムを知ることが重要であるが、近年のめざましい科学の発展によりそれも可能となりつつある。このなかでも特に死亡率がたかく、早期発見が難しいと言われてきた「がん」は生活習慣病であり、また、近代化した環境内にその発生要因があると言われている病である。そこで、本研究では「がん」をとりあげて予防を目的に研究することとした。

1-1-1 がんとは

生活習慣病の一角を担っている「がん」の死亡率は増加し続けている。しかし、これはあくまで絶対値としての死亡率であり、年齢構成にあてはめて訂正したがん死亡率では、男は横這い、女はむしろ減少している。このことは、人の寿命がのびたため「がん」を患う人が増えたことを示しており（Doll R., 1978. 長与健夫、富永祐民編, 1980）、「がん」は高齢化社会とともに、今後ますます増加する可能性のある病気であることを示している。現在、細胞のがん化のメカニズムは遺伝子レベルまでの解明が進んでおり、「がん」とは、人体を構成している細胞のがん遺伝子やがん抑制遺伝子に異常が生じてがん細胞となり、この細胞が分裂を繰り返してがん組織を作る病気であることがわかっている。遺伝子に異常が生じる過程において、なんらかの“作用”つまりがん要因が働くものと考えられている。がん遺伝子とは、その遺伝子の働きが過剰になったり、異常になったりすると細胞をがん化させる遺伝子であり、一方がん抑制

遺伝子とは、細胞のがん化を抑制する作用をもつ遺伝子で、これが何らかの障害により働きが失われた場合に、その細胞をがん化させる。しかし、一つのがん遺伝子、がん抑制遺伝子に傷がついたからといってすぐにがんができるわけではなく、一般に正常な細胞は、何年もかかって悪性の細胞に変わっていく。その間に複数のがん遺伝子、がん抑制遺伝子に異常が起こり、その異常が細胞の中に蓄積されて、最終的にがん細胞になると考えられている（青樹元治, 1998, 谷口直之、杉山治夫、松浦成昭編, 1996）。こうしたがん化の原因であるがん遺伝子は最先端の遺伝子レベルの研究において30種ほどその存在が証明されているが、これらのいずれもがん化の防止やがん細胞の正常化に直結するものではなさそうといった見解が出されている（黒木登志夫, 1989）。

1-1-2 がんの発生要因

「がん」の発生要因としてはタバコ、食事、感染症、アルコール、食生活、疲労等様々なものがあげられる。また、年齢とともに「がん」の発症しやすくなる。従って、今後私たちは高齢化社会を迎え、「がん」を患う高いリスクをかかえていくことは避けられない。また、長くなった余生を過ごす生活環境も「がん」を患う高いリスク環境となってきたといわれている（森本兼曩, 1991）。こうして、二重に「がん」のリスクを背負って生きていかなければならない以上、一つでもそのリスクの度合いを知り、リスクの改善及び回避をすることが必要である。

がんの早期発見やがん治療の研究がめざましく発展しているが、研究の発展とともにがんの完治が難しいことがあきらかとなり、現在では、がんにならない、つまりがん予防の研究があらたに始まりつつある（小林博, 1999）。

本研究では、がんの要因としてあげられている疲労に注目し、これらがライフスタイルとしてがんにどのような影響を及ぼすかを検討することとした。疲労には精神的な疲労と肉体的な疲労が存在する。精神的な疲労としてストレスを、肉体的な疲労は運動を取り上げて研究を行った。

1-2 免疫機能

免疫とは自己と非自己を認識し、非自己が体内に侵入したときの防御機能をはたすものである。もともとは感染症に対する生体防御から研究が進められたが、現在では、感染症以外の免疫反応の研究もなされ、そのメカニズムは次々と解明されつつある。免疫には抗原の暴露に関わらず常に存在する自然免疫応答（非特異免疫）と抗原によって誘導され、長期的に持続する感染防御をもたらす特異的適応免疫応答（特異免疫）の2つのカテゴリーに分けることができる。免疫応答は単球、マクロファージ、好中球、リンパ球といった白血球系の細胞によって行われる。本研究ではリンパ球と好中球の機能に注目し、さらに生体防御の最前線である非特異免疫応答を取り上げて論じたいと思う。

1-2-1 リンパ球

リンパ球は主に特異免疫として働く細胞であるが、その機能は複雑で、非特異免疫応答と特異免疫応答の間をつなぐ重要な免疫細胞であり、特異免疫を誘導する第一の細胞である。リンパ球には非特異免疫応答である食細胞から抗原の提示を認識するT細胞、抗体を産生するB細胞、そして細胞障害として機能する大型顆粒リンパ球（LGL）がある。さらにT細胞には、B細胞と相互作用し、B細胞の分裂、分化、抗体産生を助けるT細胞（Helper T cell：T_H細胞）、単核性食細胞に働きかけ、それが病原体を破壊するのをたすけるT細胞（Helper T cell：T_H細胞）、そしてウィルスや細胞内寄生病原体を直接破壊するT細胞（Cytotoxic T cell：T_C細胞）の3種類が働きをもつものが存在する。非特異免疫機能に注目するという主旨からも特異免疫であると考えられているリンパ球だが、T細胞とLGLについては特に取り上げたいと思う。

1-2-2 NK細胞

NK（ナチュラルキラー）細胞は末梢リンパ球の15%以下で、LGLと呼ばれる細胞群である。さまざまながん細胞や感染細胞の表面抗原の変化を認識して、それらを傷害する能力をもち、

この機能がナチュラルキラー活性（NK 活性）と呼ばれる。この細胞の特徴は外部からの異物ではない自己の異常細胞を攻撃することである。

1-2-3 好中球

好中球は循環多核球の 90% 以上をしめる細胞で、生体内に侵入した異物に対して遊走し、貪食そして殺菌をおこなう非特異免疫の代表的な免疫細胞である。感染防御では最前線で機能するが、アレルギーに関与するとの報告もある。

1-3 がんと生体防御

生体は外からの侵入物に対して、きわめて巧妙かつ高い防御機能を持っている。一方、体内で生じる異常に対しても防御機能を発揮し、細胞が増殖する過程において様々な障害によって遺伝子に異常が生じた変異細胞にたいしては異物と認識し排除する機構も備わっている。しかし、がん細胞は他の異物とは異なり元々自己の細胞ががん化したものであるから、異物性や抗原性は外来のものに比べて低いものと考えられる（徳永徹, 1994）。従って、自己、非自己を認識して生体防御機能として働く免疫細胞にとっては、がん細胞の認識が通常に比べて困難である。がんが外来の異物に比べて排除が困難なもう一つの理由は、がんが発生して促進される過程は非常に長い時間を要し、この間に生体防御側も徐々にダメージを受けることである。外来の異物の侵入は突発的なものであり、その時点で生体は良好の状態にある。しかし、がんの場合は生体のがんとの攻防によって少しずつ弱っていくとともに、がんはますます増強していくという悪循環の状態になってしまうこともがんの治癒の面では問題となっている。がん細胞をターゲットとしてその破壊を目指し治療を行う場合、正常細胞も破壊してしまうため、生体防御機構ががん細胞を破壊することが理想的なことである。本研究ではがんに対する生体防御を学ぶとともに、がんに対する生体防御を向上させる可能性を探っていきたい。

1-3-1 リンパ球

がん細胞破壊は一部のTリンパ球によって行われるが、このTリンパ球をキラーTリンパ球（T_C細胞）という。ウィルス感染のような外来の異物によるT_C細胞の誘導とは異なり、自己がん細胞による誘導は容易ではないが、がん化に伴い細胞表面に発現するMHCクラス 分子を認識しがん細胞に対する細胞障害性を発揮する機構が解明されてきた（Tanaka K., Yoshikawa T., Bieberich C., *et al.*, 1988）。また、乳がん細胞上に存在する抗原に特異的に認識し細胞障害することもわかってきている（Traversari C. & Bruggen der P., 1992）。従って、がん細胞にたいする生体防御機能を研究する上でTリンパ球を検討することは重要なことであると思われる。そこで、本研究では種類によって分類するまでには至らなかったが、Tリンパ球全体として腫瘍接種ラットの生体内においての変化を検討することとした。

本研究でリンパ球の機能として用いたのは、リンパ球の幼若化を測定する方法である。T細胞は刺激を受けると分裂する前にリンパ芽球に変型する。いわゆる細胞分裂の中期にあたる訳だが、このときの細胞状態から分裂機能を評価する。また、刺激する抗原の種類によって、刺激する細胞をT細胞とB細胞を区別することもできる。従ってこの方法によってリンパ球の増殖能とも言うべきものを評価した。

1-3-2 NK細胞

NK細胞は腫瘍と最も関連の強い抗腫瘍免疫細胞であり、全てのほ乳類の正常個体には、機能的な細胞として存在していると言う点で、免疫応答の過程で分化するT_C細胞とは大きく異なる。Tリンパ球の場合は抗原提示作用を介して異物に対して応答するが、NK細胞はその必要がなくMHCクラス 分子にも非拘束性で、直接がん細胞にたいして傷害性を発揮することができる。むしろMHCクラス 分子の発現がNK活性を抑制するとの報告がある（Korzeniewski C. & Callewaert P.M., 1983）。さらに、NK細胞は正常細胞に対しても作用することがわかっており、この機能ががん細胞の認識力の高さにつながっているものと考えられている。また、1つのNK細胞で複数の癌細胞を攻撃することができることでも優れた免疫細胞で

ある。以上のことから、がんと免疫機能を研究する上で、NK細胞活性を検討することは重要であり、本研究でも特に注目した。

NK細胞の機能を評価するための活性を測定する一般的な測定法としては、ターゲット細胞に Cr^{51} を取り込ませ、NK細胞とともに培養し破壊されたターゲット細胞から放出された Cr^{51} の量を測定する法がある。しかし、 Cr^{51} の放射線量は高く、使用不可能な実験環境があるため、本研究では Cr^{51} 測定法を応用した、LDH法を用いて検討した。LDH法は細胞内に存在するLDH量を測定する方法で、NK細胞とともに培養し破壊されたターゲット細胞から放出された量によって細胞障害性を測定する方法である。

1-3-3 好中球

好中球とがんと関連についての報告はほとんど見られない。しかし、好中球は外来の異物を除去する手段として活性酸素を使用する。そして、この活性酸素が遺伝子に作用して突然変異に関与するイニシエーションとして働き、さらに細胞のがん化に向けてプロモーションとしては主役として働くことがわかっている。従って、活性酸素との関連が深い好中球ががんに影響しないはずはないのである。実際、慢性炎症はがんになる可能性が高いと言われ、この炎症反応に関与しているのが好中球やサイトカインなのである。一方でがんの間接的に関与するという考え方がある。好中球は免疫細胞として単独で機能するわけではなく、その他の免疫細胞からの情報伝達物質によって刺激されて生体防御として働く機構があるので、他の免疫細胞ががんによって変動すれば、好中球も変動すると考えるのが自然である。そして、がんのステージによってこの好中球がどのように変化するかを明らかにすることができれば、がんの予防に大いなる役割を果たす可能性が考えられる。そこで本研究では、他のがんの研究ではほとんど注目されていない好中球機能にも注目していくこととした。

好中球機能を測定している研究のほとんどは、好中球の活性酸素産生能や貪食能、遊走能をそれぞれ単独で測定を行っているが、本研究では、活性酸素産生能と貪食能を同時に評価す

る方法によって測定を行うことで、発生した活性酸素の有用性を考慮することが可能となった。

1-4 ライフスタイルと免疫

ライフスタイルが健康に及ぼす影響は計り知れない。一言にライフスタイルと言っても、喫煙習慣や食事といった自らコントロールのできるものから、住居環境、気候といった不可避なものまでさまざまなものがあげられる。これら全てが外的要因として生体、特に免疫といった生体防御機能に影響を及ぼしている。また、免疫機能を高めるものから、免疫機能の低下をもたらすものまで多数の要因が混在している。生体にとって最も重要な物は食事のように直接生体内にとりこむ物理的要因であろう。さらに、最近では精神面の重要さも問われており、近代化が進んだ社会において、物理的にも精神的にもストレスが問題となっている。また、生活が便利になるにつれて、運動不足といった問題も生じており本研究では多数のライフスタイルの中から精神的そして肉体的疲労というものに注目するため、ストレスと運動を取り上げた。本研究におけるライフスタイルとは、ラットにストレスを負荷することで生じるストレス条件下の生活環境、そして運動を負荷することによって生じる運動を行う生活環境の2つを意味する。

1-4-1 ストレスと免疫

ストレスを起こすストレスには、気温、騒音といった物理的、化学的なもの、飢餓、最近、労働、妊娠といった生物学的なもの、人間関係、興奮といった社会的、心理的なものと広い分野にわたって存在する。さらに、ストレスの研究において難しい点は、ある人にとってはとてもストレスフルな条件でも、同様の条件にストレスを全く感じない人もいるといったように、どんなストレスにおいても、暴露される側の主観によってストレス度が異なることである。ストレスの度合いの定義ができない以上、ストレスによって生体にどのような影響が及ぼすかについての検討は難しい。一般的にはストレスは免疫機能を低下させるといった報告が多

く見受けられが、一方で、よい緊張感をもつことで風邪が引きにくいといった例もあるように、有益に働くストレスも存在し、このときの免疫機能はストレスによって向上していたと考えられる。

このような様々なストレスと様々な個体の存在がある以上ストレスが免疫機能に及ぼす影響も様々な結果が生じる。そこで本研究では、所属研究室において長年ストレスについて動物実験を用いて研究を行ってきた結果をもとに、それらと同条件の動物を用い、同条件のストレスを負荷することによって、ストレスに対して比較的統一された見解を得られるので、先行研究をベースに研究を進めることとした。

1-4-2 運動と免疫

運動によって免疫が変化することは、近年における研究の発展によって知られてきた。しかしその見解は様々で、運動の方法や負荷度によって様々である。一般的な見解としては強度な運動は免疫機能の低下を招き、適度な運動は免疫機能を活性化する。また、スポーツ選手のようにトレーニングを行うことで、免疫機能も発達する可能性があることも示唆されている[文献]。運動と免疫機能とは非常に密接な関係にあると考えられる。本研究では免疫機能の向上をもたらす運動というものが重要であり、その点に注目して検討を行った。

1-5 本研究の目的

前述をふまえ、本研究では腫瘍を接種したラットにストレスと運動を負荷し、免疫機能を検討することによって、ストレスと運動が生体にどのような影響を及ぼすかを明らかにしたいと考えた。そこで免疫機能の中から、先行研究によってライフスタイルの条件に影響されやすく、かつ腫瘍免疫に重要な役割を果たしているリンパ球機能、特にNK細胞活性を取り上げることとした。また、好中球はがんに関与はしないものと考えられているが、ライフスタイルによる免疫応答としては重要な役割を示していることを先行研究によって立証されていること

から、本研究ではあえて取り上げた。これらの免疫細胞が腫瘍接種時にストレスや運動条件下におかれることにより、どのような変化を示すかを明らかにすることで、ストレスや運動の種類や量によってはがんの要因、またはがん予防になるのではないかと考え、本研究を行うこととした。

第1章ではライフスタイルの実験を始めるにあたって、実験に用いるラットの種類、そのラットに接種する腫瘍の種類、腫瘍の接種条件、そしてこれらの腫瘍接種条件下での免疫応答の基礎を検討するために実験を行った。

第2章では第1章において検討した条件を用いて、実際にラットに数種類のストレスを暴露してストレスが腫瘍に及ぼす影響を腫瘍の重量によって評価し、さらに、免疫機能の変動を分析した。

第3章ではラットに2種類の運動負荷を行い、運動の種類や負荷条件が腫瘍に及ぼす影響と、そのときの免疫機能の変動を分析した。

第 2 章

腫瘍接種がラットの免疫機能に及ぼす影響

2-1 目的

一般的に腫瘍の増殖に伴って免疫防御機能の前線である白血球の数や機能の減少がおこることはよく知られている。特に NK 細胞は抗腫瘍免疫機能のなかで、腫瘍抑制に重要な役割を果たしていると考えられている。こうした研究の多くは最小可移植細胞数以上の腫瘍細胞を

接種し、その免疫機構に対する影響を検討している (T. Namieno , N. Takeichi , Y. Hata , J. Uchino & H. Kobayashi , 1991)。しかし、最小可移植細胞数以下の移植における報告はほとんどない。この少数接種時における腫瘍細胞移植によって引き起こされる免疫応答は、腫瘍増殖の方向性を決定する上で非常に重要であると考えられる。また、抗腫瘍免疫機能の研究では、これまでに報告された大部分の報告において、接種する腫瘍細胞は接種される動物に由来するものを用いて行われている (N. Hosokawa & H. Kobayashi , 1982) ので、同一系統の腫瘍細胞の接種による免疫機能の変化を研究することは、抗腫瘍免疫機構の全貌を解明する上で非常に重要であると考えられる。

そこで我々は、SHR (Spontaneous Hypertensive Rat) に SHR 乳ガン由来細胞である SST-2 細胞を様々な細胞数で接種した。さらに SST-2 細胞を *in vivo* でも用いて基礎実験を行い、腫瘍細胞数によって腫瘍増殖はどのように変化するのか、そしてその時に免疫機能はどのように変化するのかを知りたいと考えた。この研究の目的は SHR における移植細胞数と非特異免疫機能であるリンパ球幼若化及び NK 細胞活性の関連を検討することである。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物及び飼育方法

日本 SLC 社より購入した 4 ヶ月齢の雄性高血圧自然発症ラット (Spontaneous Hypertensive Rat : 以降 SHR) をラット用プラスチックケージで馴化のための予備飼育を 1 週間行った後 7

群 (n=8) に分け、各群ラットの平均体重 210 ± 10 g とした。飼育環境は、外部の騒音を遮断し感染を制御し、室温 25 ± 3 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、さらに 9時から 21 時間での 12 時間照明による明暗周期を設定したセミバリア室内で、水は蒸留水を、餌は高圧蒸気滅菌済固形飼料 (EQ#5L65 ; Japan SLC., Inc.) を自由摂取で与えて飼育した。

2-2-2 SST-2 細胞接種

腫瘍細胞には、山口県立大学の森口覚教授より譲渡して頂いた SHR の乳ガン由来細胞である SST-2 細胞(K. Okamoto & K. Aoki, 1963)を使用した。SST-2 細胞は、7.4% Fetal Bovine Serum (FBS: MBL Co., Ltd., Japan) 加 RPMI-1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) CO₂ Incubator (MODEL s-5020: SHOWA KAGAKU, CO₂ = 5%) にて継代培養し、細胞接種時には 0.25% trypsin / 0.02% EDTA で処理し回収した。細胞浮遊液は最終濃度が 2×10^7 cells/ml, 1×10^7 cells/ml, 5×10^6 cells/ml, 2×10^6 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, and 5×10^5 cells/ml となるよう 0.9% 生理食塩水で希釈し調整した。エーテル麻酔下にて、これらの SST-2 細胞浮遊液 100 μ l と Control 群には 0.9% 生理食塩水をラットの背部皮下に接種し、接種 2 週間後に解剖を行った。

2-2-3 群の設定

接種された腫瘍細胞数によって下記のように群を設定した。

Control : 0.9% 生理食塩水 100 μ l

Group 1 : 5×10^5 cells/ml = 5×10^4 cells/rat

Group 2 : 1×10^6 cells/ml = 1×10^5 cells/rat

Group 3 : 2×10^6 cells/ml = 2×10^5 cells/rat

Group 4 : 5×10^6 cells/ml = 5×10^5 cells/rat

Group 5 : 1×10^7 cells/ml = 1×10^6 cells/rat

Group 6 : 2×10^7 cells/ml = 2×10^6 cells/rat

2-2-4 測定項目

腫瘍重量

接種した腫瘍細胞は腫瘍塊に成長し、この腫瘍塊を解剖後に背部の皮下より摘出し湿重量を測定し、体重 100g あたりの腫瘍重量とした。

分核による白血球分類

血液は Nembutal (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) 麻酔下にてラットの尾静脈より採血した。白血球数は自動血球計算機 (Sysmex F-820, Toa Medical Electron Inc., Japan) によって count し、白血球の分類は May-Giemsa 法によって行なった。

リンパ球幼若化

解剖時にラットより無菌的に脾臓を取り出し、単一細胞に分離したものを 7.4%FBS 加 RPMI 細胞浮遊液にし、この浮遊液を Lympholyte Rat (Cedarlane Lab., Ltd., Canada) 比重密度勾配遠心法 (1000~1500 G, 20 min) によってリンパ球層を分離した。そして、PBS (日水製薬) を用いてリンパ球を洗浄・遠沈 (800 G, 10 min) し、10%FBS 加 RPMI を用いて最終的に 3×10^6 cells/ml の濃度の細胞浮遊液とした。それを 96 well micro plate に 100ul ずつ分注して各刺激剤を加え、37°C, 5% CO₂ incubator にて 72 時間培養した。

Mitogen として、concanavalin A (ConA; 0.125µg/ml), phytohemagglutinin (PHA; 1µg/ml), lipopolysaccharide (LPS; 0.53µg/ml), そして pokeweed mitogen (PWM; 0.26µg/ml) を使用した。72 時間の培養後 Cell Counting Kit (Dojindo Lab., Japan) を用いて吸光度を測定し、幼若化能を下記の計算式によって算出した。

$$(\%) = [(Stimulation\ Test - Spontaneous) / Spontaneous] \times 100.$$

NK 細胞活性

解剖時にラットより無菌的に脾臓を取り出し、単一細胞に分離したものを 7.4%FBS 加 RPMI 細胞浮遊液にし、この浮遊液を Lympholyte Rat (Cedarlane Lab., Ltd., Canada) 比重密度勾配遠心法 (1000~1500 G, 20 min) によってリンパ球層を分離した。そして、PBS (日水製薬) を用いてリンパ球を洗浄・遠沈 (800 G, 10 min) し、5%FBS 加 RPMI を用いて最終的に 5×10^6

cells/mlの濃度に細胞調整を行い、Effector Cells とした。Target Cells は、一般的に NK 細胞活性測定に用いられている YAC-1 細胞と、本実験の接種細胞である SST-2 細胞の 2 種類を、7.4% FBS 加 RPMI を用いて最終的に 5×10^5 cells/ml の濃度に細胞調整をし、Target Cells とした。Effector Cells と Target Cells はそれぞれ $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 穴 micro plate に分注した。

NK 細胞活性は CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社) を用いて、LDH 定量法(G. Konjevic , V. Jurisic & I. Spuzic , 1997)によって測定し、%Cytotoxicity は下記の式で求めた。LDH 定量法は、細胞の破壊に伴い放出されてくる安定な細胞質性酵素である LDH を定量する方法であり、その原理は ^{51}Cr 放出細胞性試験とほとんど同じである(T. Matsuoka , 1989)。%Cytotoxicity はキットに従って、下記の式で求めた。

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{(\text{Sample} - \text{Effector} - \text{Spontaneous} - \text{Target Spontaneous})}{(\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous})} \times 100.$$

又、E : T ratio は腫瘍細胞接種実験後に、検討をした結果 100 : 1 とした。

好中球機能の測定

本研究室の先行研究(鈴木克彦, 町田和彦, 関根美枝 & 村山留美子, 1993)において用いられている、松田の毛細管法に準じた NBT 還元法により好中球機能を評価した。好中球の貪食用に用いられる黄色ブドウ球菌 209P は、ブドウ球菌用液体培地 (日水製薬) で 15 時間培養された後、0.2 % NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 溶液と混合し-40 で保存した。このブドウ球菌を刺激粒子として用いる刺激試験と、ブドウ球菌を加えない非刺激試験を同時に実施した。両試験とも 1 標本 100 個の好中球を検鏡し、 O_2 が NBT 還元反応によって形成される formazan と好中球内に取り込まれたブドウ球菌数を観察した。その際、朝永の組織科学的半定量法 (朝永万佐男, 1976) に準ずる当研究室作成の分析パネルを参照しながら formazan 形成をスコア化し活性酸素産生能とし、ブドウ球菌の貪食数を貪食能とした。非刺激試験の NBT 還元能を通常の好中球の O_2 産生能として評価し、刺激試験では貪食時の好中球の O_2 産

生能及び食能を評価した。これらの測定は腫瘍接種前かつストレス負荷前と腫瘍接種 2 週間後解剖直前にラットの尾静脈より採取した末梢血を用いて行われた。その際に前述した 6 群に加えて、腫瘍接種前の非腫瘍接種物物理的ストレス群 (Ph., n=12) および非腫瘍接種心理的ストレス群 (Ps., n=12) の 2 群についても NBT の測定を行なった。

2-2-5 統計解析

各群間における測定結果の多重比較には一元配置分散分析による多重比較検定 (posthoc テスト): ANOVA 法 (5% 有意水準) を用いた。

2-3 結果

2-3-1 腫瘍の生長

全てのラットは実験期間中生存し、最少可移植数以上の細胞数を接種した Group3? Group6 のすべてのラットに腫瘍は発生した。さらに、グループ間での体重差はほとんど見られなかったが、7 つのグループの腫瘍湿重量は接種された腫瘍細胞数に伴って増加した (Fig.1)。腫瘍は最少可移植数が接種された Group3 までは小さかったが、Group4 より急激に増加した。

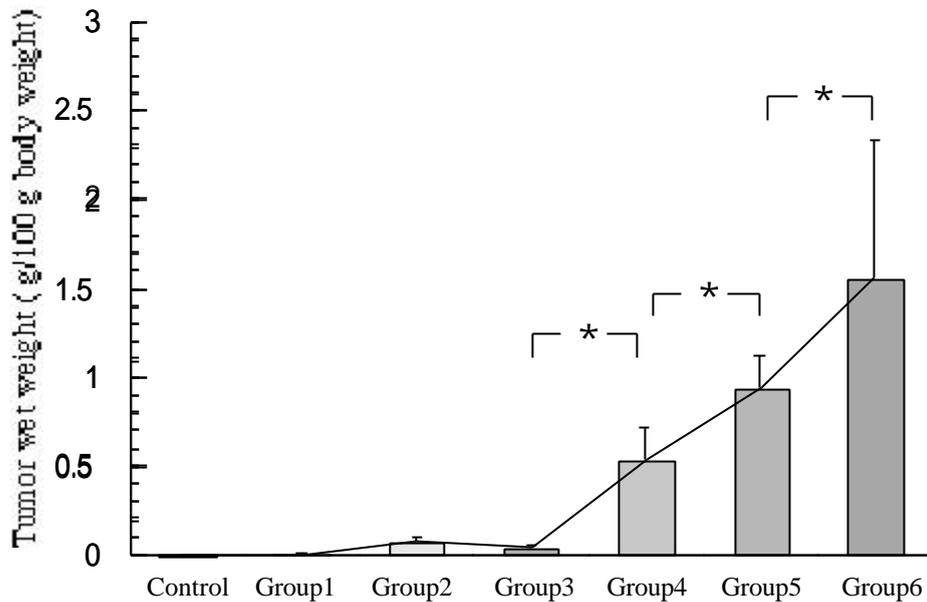


Fig. 1 Dose effect of SST-2 inoculation on the tumor growth in SHR rats.

Rats were subcutaneously inoculated 5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , and 2×10^6 of SST-2 tumor cells, in Group 1, Group 2, Group 3, Group 4, Group 5, and Group 6, respectively. After 2 weeks, the fixed tumor was weighted, and the weight was expressed per 100 g body weight of rat. Wet weight of the tumor was expressed as mean \pm SE. *Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.05$).

2-3-2 末梢白血球

Table-1 に示したように、リンパ球は移植腫瘍細胞数に伴って減少し、好中球は増加した。リンパ球と好中球の比率は、Group4 の時点から大きく変化した。

Table-1 Haematological parameters of SHR rats inoculated with SST-2 tumor cells

| Group | Control | Group1 | Group2 | Group3 | Group4 | Group5 | Group6 |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| Total leukocytes (10 ² /μl) | 54.0 ± 20.8 | 59.0 ± 24.7 | 69.0 ± 20.6 | 45.0 ± 14.1 | 69.0 ± 18.4 | 77.0 ± 18.1* | 72.0 ± 45.0 |
| Lymphocytes (10 ² /μl) | 32.0 ± 13.9 | 36.4 ± 12.4 | 40.8 ± 15.1 | 24.8 ± 7.8* | 35.0 ± 12.6 | 29.7 ± 8.4 | 22.9 ± 7.9 |
| Neutrophils (10 ² /μl) | 12.2 ± 4.2 | 12.5 ± 9.9 | 20.1 ± 10.3 | 13.3 ± 6.7 | 35.7 ± 19.8 † | 40.4 ± 14.0 † | 40.8 ± 30.7 † |
| Monocytes (10 ² /μl) | 8.3 ± 4.2 | 9.0 ± 2.9 | 8.3 ± 1.9 | 6.1 ± 2.6 | 10.4 ± 4.9* | 9.3 ± 3.7 | 6.3 ± 3.3 |
| Eosinophils (10 ² /μl) | 1.2 ± 0.7 | 1.2 ± 0.8 | 0.5 ± 0.5 | 0.8 ± 0.6 | 1.5 ± 1.0 | 1.6 ± 1.6 | 0.5 ± 0.7 |

Values are means ± SE. Significant difference was observed in lymphocyte numbers between Group 2 and Group 3. In other cases, significant differences compared with the value of control group are indicated as * p < 0.05, † p < 0.01 (Fisher's post hoc test).

2-3-3 リンパ球の幼若化

本実験では刺激剤は4種類用いた。刺激剤を加えたときのリンパ球活性率を Fig.2に示した。全ての刺激剤で Group1 においてリンパ球の増殖が認められた。Con. AとPWMは Group1 でピークを示し、その後 Group2 から Group6 まで移植腫瘍細胞数の増加にともなって減少した。PHA と LPS は Group1 あるいは Group2 で最も高い値を示し、Group3 または Group4 に向けて減少し、そこから低い値のままであった。

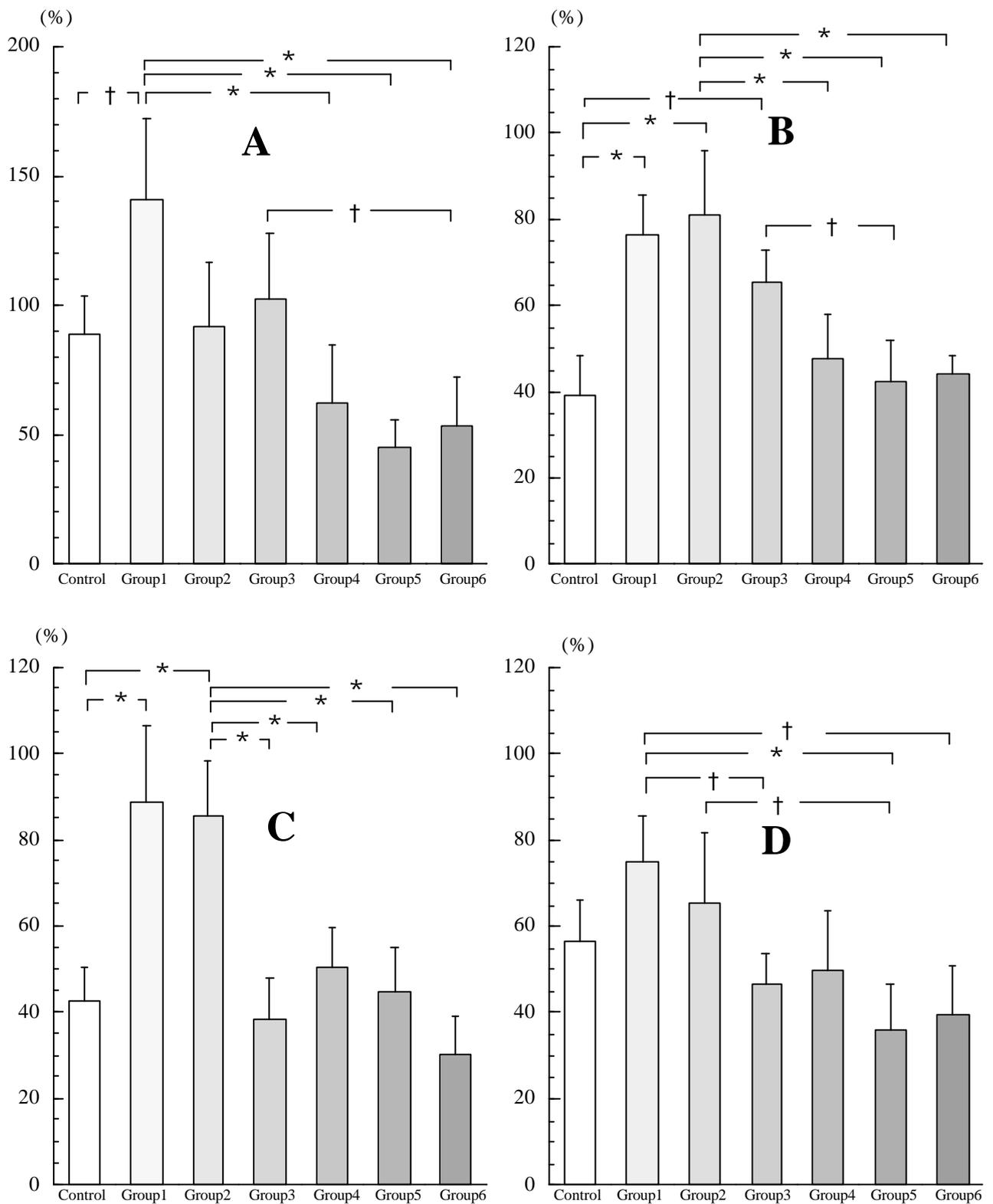


Fig. 2 Lymphocyte blastogenic response is enhanced by the small dose of SST-2 inoculation to SHR rats. Splenic lymphocytes were stimulated by Con A; 0.125 μ g/ml (A), PHA; 1 μ g/ml (B), LPS; 0.53 μ g/ml (C), and PWM; 0.26 μ g/ml (D) for 72 hours. Blastogenic response was expressed as mean \pm SE. *Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.05$). † Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.1$).

2-3-4 NK 細胞活性

2種類のターゲット細胞とも同様のパターンを示した (Fig.3)。YAC-1 細胞をターゲットとした活性においては有意水準を伴った差は認められなかったが、SST-2 細胞をターゲットとした活性では有意差が各ステージに於いて認められた。接種された腫瘍細胞数が少ないと、NK 細胞活性は高い値を示した後 Group3 まで減少し、Group4 において再び増加し Group6 で減少した。

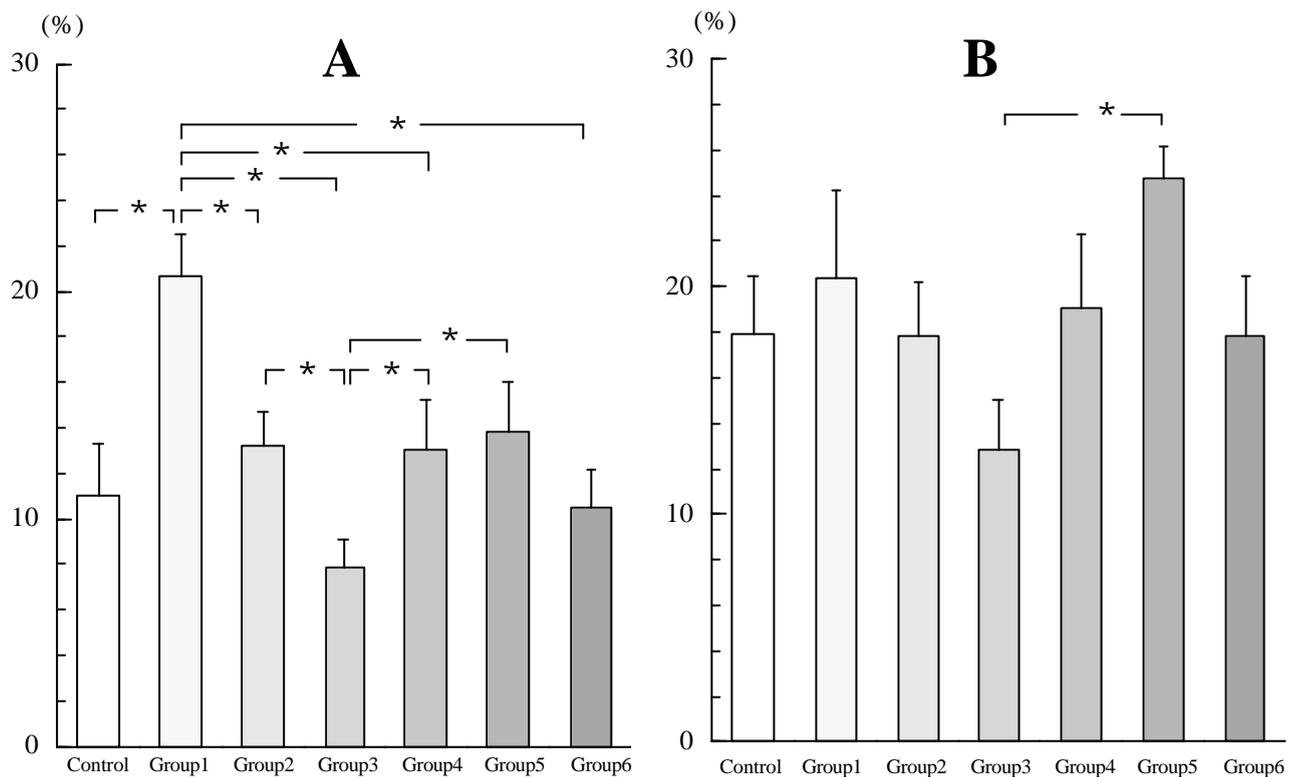


Fig. 3 Small dose of SST-2 inoculation enhances NK cell activity against SST-2 cells but not against YAC-1 cells.

In vitro killing activity of splenic NK cells against SST-2 cells (A) and YAC-1 cells (B) was measured by LDH release assay. In both target cells, the activity was lowest in Group 3 that was the minimum dose required for the tumor growth (Fig. 1), and the activity was increased in Group 5 compared with the Group 3. In small doses of the inoculation (Group 1), the activity was enhanced only against the SST-2 but not against the YAC-1. NK cell activity was expressed as mean \pm SE. *Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.05$). † Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.1$).

2-3-5 好中球機能

各ストレス群における非刺激試験による O_2^- 産生能

非刺激試験の結果を Fig.4 に示した。本実験においてもっとも少ない細胞数を接種した Group1 で O_2^- の産生が Control 群に対して有意に上昇した ($p < 0.05$)。そして Group2 では若干低下したが、最少可移植細胞数を接種した Group3 では有意に増加を示し ($p < 0.05$)。腫瘍が顕著に発生した Group4 以降では O_2^- 産生能は低下した。

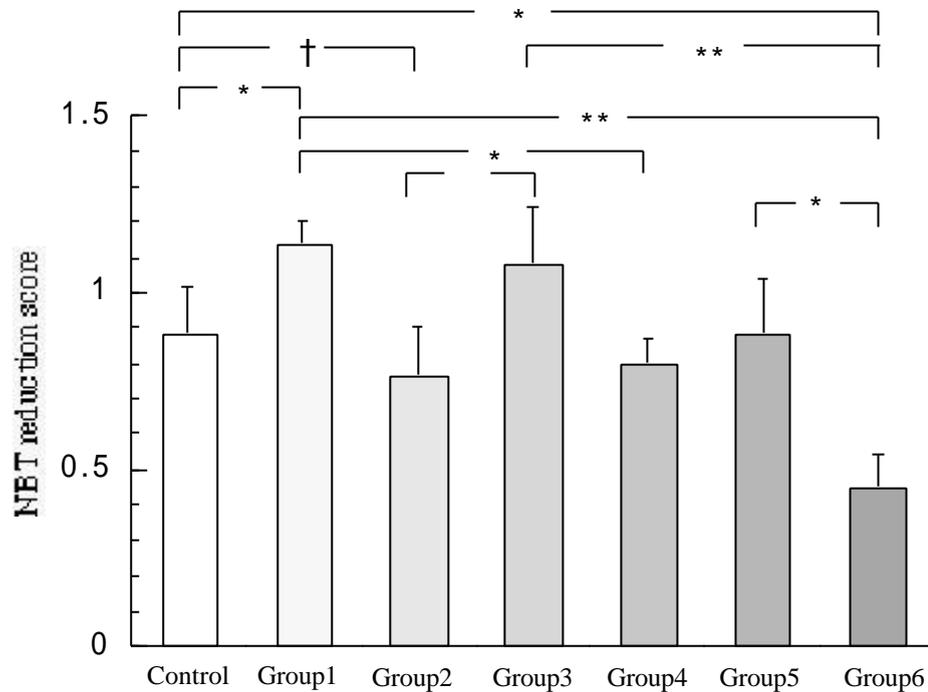


Fig.4 Dose effect of SST-2 inoculation on O_2^- production of neutrophil in SHR by the rest test.

NBT was reduced by O_2^- that was generated from neutrophils, and it formed the blue-black formazan deposits in cytoplasm. NBT score as measured by the sum of formazan deposits was evaluated as O_2^- production of neutrophil in case of non-stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; $p < 0.01$; *; $p < 0.05$; † $p < 0.1$).

各ストレス群における刺激試験による好中球貪食能及び O_2^- 産生能

黄色ブドウ球菌を用いた刺激試験において、 O_2^- 産生能 (Fig.5) は Control 群と Group1 の間には有意な差は認められなかったが、Group1 に対してその他の腫瘍接種群が低値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.1$)。Group4 では腫瘍が顕著に増大したが、 O_2^- 産生能はもっとも低値の Group2 に比べて若干上昇の傾向が認められた ($p < 0.1$)。この O_2^- 産生能の結果は貪食能とほぼ同様であった (Fig.6)。

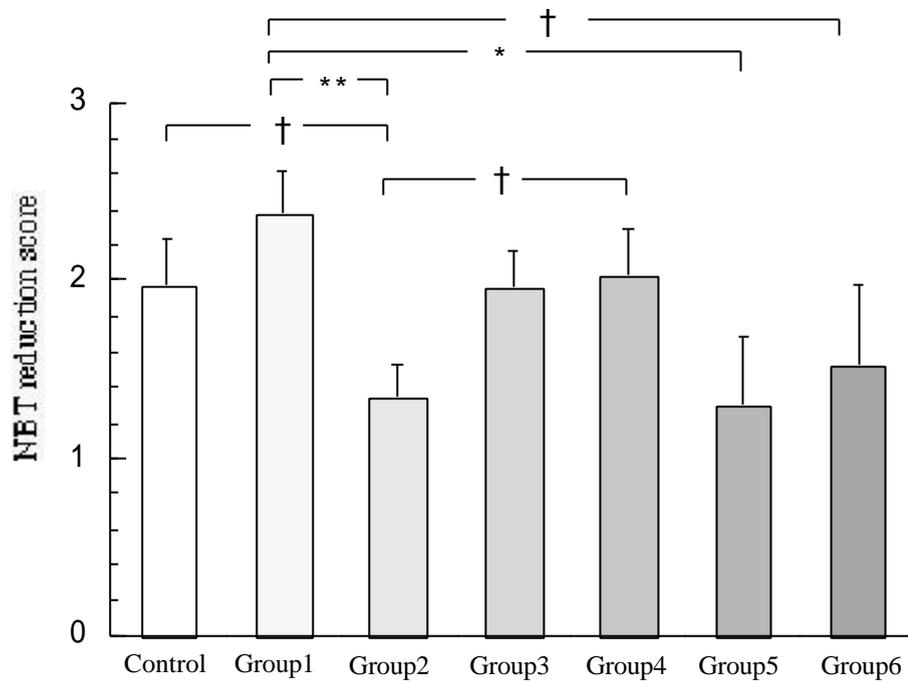


Fig.5 Effect of SST-2 tumor cells inoculation on O_2^- production of neutrophil in SHR by the stimulation test.

Twenty-five μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the *Staphylococcus aureus* 209P (2×10^9 cfu/ml) were mixed and reacted. NBT score as measured by the sum of formazan deposits was evaluated as O_2^- production of neutrophil in case of stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **, $p < 0.01$ *; $p < 0.05$; † $p < 0.1$).

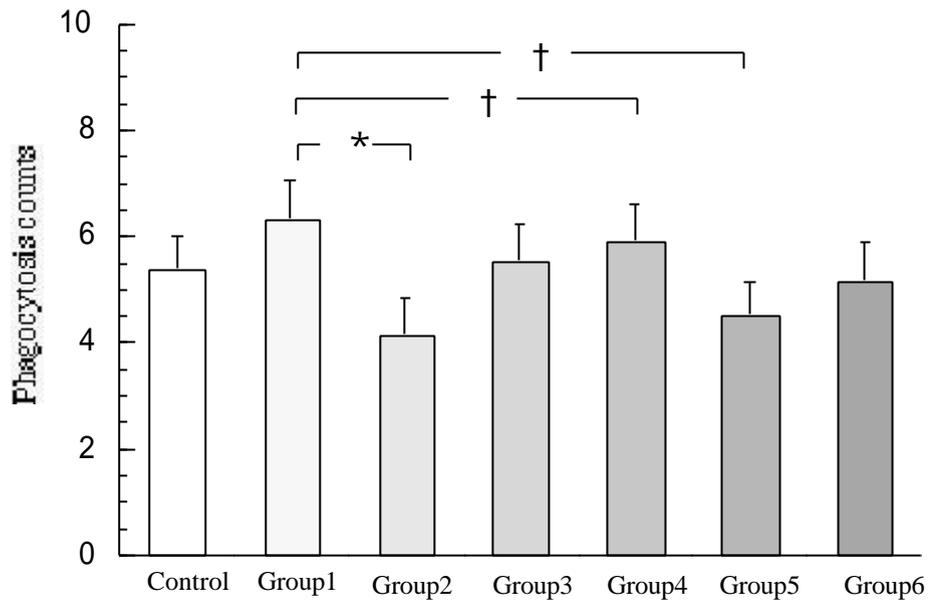


Fig.6 Effects of inoculation of SST-2 tumor cells on phagocytosis of the neutrophil in SHR by the stimulation test.

Staphylococcus aureus 209P (2×10^9 cfu/ml) was used as microbes. Twenty-five μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the foreign agent were mixed and incubated. Microbe particles were counted in 100 neutrophils under microscope and, it was evaluated as phagocytotic ability of neutrophil. Average number of the particles in a cell was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **: $p < 0.01$ *; $p < 0.05$; † $p < 0.1$).

好中球貪食能及び O_2 産生能の相関

本研究室においてその有用性が確認されている(T.Kuriyama, K. Machida & K. Suzuki, 1996)、 O_2 産生能及び貪食能の相関関係を検討し Fig.7 に示した。Control群で正の相関関係を示し($r = 0.832, p < 0.01$) Group1 においてもっとも強い相関が認められた($r = 0.952, p < 0.01$) Group2 ではかろうじて正の相関が見られたものの、最少可移植数を接種した Group3 では相関関係は認められなくなり、腫瘍が顕著に増大した Group4 では相関係数が小さいものの負をしめした($r = -0.3$)。

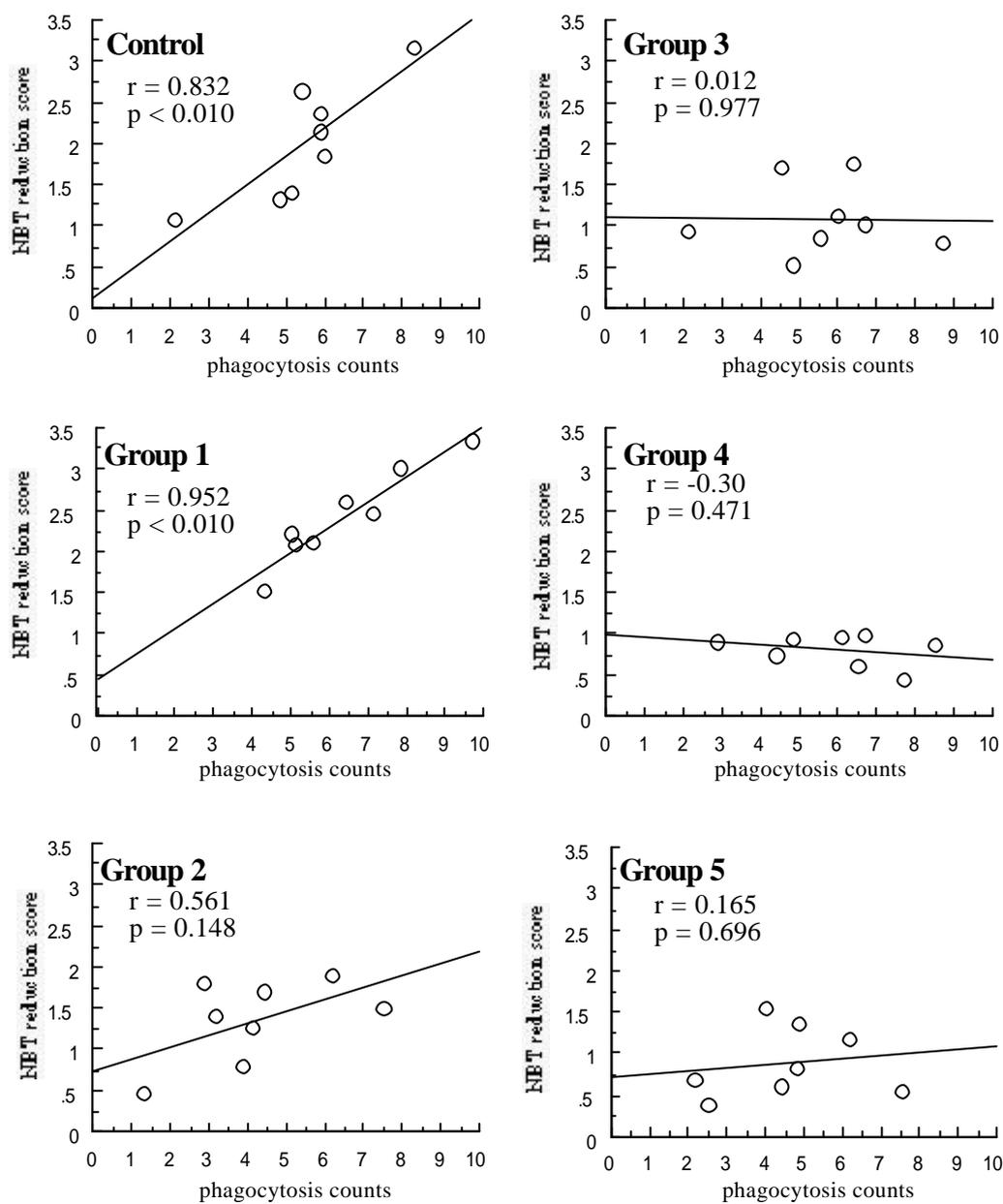


Fig. 7 Correlation between O_2^- production and phagocytosis of the neutrophil function in SHR rats inoculated SST-2 in 6 groups.

2-4 考察

本研究において、接種細胞数に伴い腫瘍が伸展する現象が認められた (Fig.1)。特に、最小可移植数である 2×10^5 cells/rat 以上の腫瘍細胞を接種することにより腫瘍定着率が 100% となり、 2×10^5 cells/rat 以下の接種量では腫瘍の定着が認められなかった。この事は、一般的に報告されてきた腫瘍細胞の最小可移植数 (T. Matsuoka, N. Takeichi & H. Kobayashi, 1987) が、今回我々が用いた SST-2 に関しても当てはまることを示している。さらにこの結果は、 2×10^5 cells/rat は SST-2 腫瘍における Critical point であり、このステージ前後の生体防御メカニズムが SST-2 腫瘍伸展に重要であることが示唆された。

一般的には、腫瘍細胞数の少ない腫瘍初期の段階では、MHC クラス I 分子を介した細胞障害性 T 細胞による攻撃が抗腫瘍免疫機能の中心を担っていると考えられている (K. Tonaka, T. Yoshikawa, C. Bieberich & G. Jay, 1988)。そして、腫瘍の進行に伴って MHC クラス I 分子の発現量が低下し、T 細胞による攻撃を回避するようになるものと考えられている (RS. Goodenow, JM Vogel & RL. Links, 1985)。これに対して、松岡等は T 細胞機能の高い時に SST-2 の増殖は抑制されず、低い時に抑制されたことから SST-2 腫瘍細胞に対する T 細胞の関与が低いことを報告している (佐藤昇志 & 菊地浩吉, 1991)。実際、我々の実験においても、最小可移植細胞数以上の SST-2 細胞を接種した群では、どの刺激剤を用いた場合でも有意な幼若化の誘導が認められなかった。しかしながら、critical point 未満のステージにおいては、Con. A や PHA、PWM によって有意な幼若化の誘導が認められた (Fig. 2)。この結果から SST-2 細胞においても、腫瘍細胞数が少ない段階においては、他の cell line (P. Hoglund, C. Ohlen, E. Carbone, L. Franksson, H.G. Ljunggren, A. Latour, B. Koller & K. Kaarre, 1991) と同様に MHC クラス I 分子を介した T 細胞による抗腫瘍作用が働いている可能性が示された。また、 2×10^5 cells/rat においては幼若化の応答減少に加え、リンパ球の数の減少も起こった (Table-1)。このことは、おそらくリンパ球の総合的な機能の低下を示していると考えられ、その結果、T 細胞による抗腫瘍作用の衰え

が予測される。加えて、腫瘍細胞数が多くなるに従って、MHC クラス I 分子の発現が低下し、刺激による幼若化の誘導が認められなくなるものと思われる。

一方、腫瘍の伸展とともに MHC クラス I 分子が減少し、MHC クラス I 分子により阻害されていた NK 活性が抗腫瘍免疫として誘導されると考えられている(K. Karre, H. Ljunggren, G. Piontek & R. Kiessling, 1986)。また、NK 活性誘導によって腫瘍は抑制されることも知られており(K. Zeze, T. Saito & M. Kobayashi, 1989)、SST-2 細胞においても NK 活性が高いと腫瘍が抑制されるとの報告がある(N. Takeichi, X. Li, J. Hamada, and H. Kobayashi, 1990)。我々の研究結果においても、NK 細胞の活性を測定する際の標的として有用であると考えられてきた、YAC-1 細胞を用いて NK 活性を測定した場合においては腫瘍の伸展が認められた 2×10^5 cells/rat 以上において NK 細胞の活性化が認められた。しかし、この結果も 2×10^5 cells/rat 以下においては活性の誘導は有意に示されず、この結果からは NK 細胞活性が腫瘍の急激な増殖によって活性化されたが、少数接種段階において腫瘍増殖抑制に効率的に働いたとは考えにくい。

注目すべき結果は、 2×10^5 cells/rat 以下では SST-2 細胞を標的とした NK 活性において有意な活性化が認められたことである。この NK 活性においては既知の事実とは異なり、T 細胞とともに腫瘍初期において活性化が起こった。この現象が少数接種段階における腫瘍抑制効果を示したと考えられる。

NK 活性におけるこうした現象は、SST-2 細胞と YAC-1 細胞の性質の違いによるものかも知れない。なぜならば、YAC-1 細胞は他の cell line に比べ、NK 細胞の活性誘導能に優れていることが知られており、NK 活性を測定する際に、その標的としてよく用いられているからである(R.M. Welsh Jr. & R.W. Kiessling, 1980, S.C. Wright & B. Bonavida, 1983)。実際今回の実験結果でも、腫瘍接種を行っていない対照ラット群の NK 活性を、SST-2 細胞と YAC-1 細胞のそれぞれに対して測定した場合で比較すると、YAC-1 細胞を用いた場合の方が、NK 活性が顕著に高値を示していた (Fig. 3)。これらの知見から、NK 活性を測定する際には、その活性誘導能に

優れている YAC-1 細胞のみならず、SST-2 細胞のように活性誘導能は低い自己癌である細胞を標的として用いることによって、black box となっていた免疫誘導機能の部分が明らかになることが考えられる。

好中球機能を検討したところ、O₂ 産生能と貪食能をそれぞれ検討した結果は、腫瘍の顕著な増大に対する反応しか認められなかったが、相関関係によって評価をすることによって、腫瘍との関連性が認められた。好中球は抗腫瘍免疫としての報告がなく、他の免疫機能の変動に誘因されることも考えられたが、Group4 において腫瘍の増大とともにリンパ球機能が一時的な上昇を示しているにも関わらず、好中球機能は低下したままであったことから、他の免疫機能の変動に影響されない、好中球機能独自の関連性が示唆され、このことは注目すべき結果であると思われる。NBT 試験の相関関係による評価では正の相関を示すときは好中球機能は効率的に機能し、負の相関のときは効率的に機能していないと評価する。したがって、腫瘍の接種を行っていない Control 群では好中球機能は高く、腫瘍が顕著に増大した Group4 では好中球機能は低いと評価できる。Group1 での好中球機能の上昇は、ごくわずかな腫瘍細胞接種によって好中球機能が誘導されたことによるものと思われる。

本実験では、腫瘍実験において好中球機能を検討することに意義を見いだしたが、腫瘍との関連性を明確にすることはできなかった。しかし、腫瘍免疫において好中球は無視できない免疫機能の一つであることが明らかとなったため、今後、他の免疫機能との関係をサイトカイン等の中継物質を検討することによってさらに明らかにしていく必要がある。

以上より、非常に少量の腫瘍細胞接種における非特異免疫機能の検討を行うことは、抗腫瘍免疫機能を解明する上で重要であると考えられ、特に NK 細胞活性においては YAC-1 細胞のみならず、接種細胞を標的として活性測定を行い、そのメカニズムを開明することが重要であることが示唆された。

第3章

ストレスが腫瘍接種ラットの免疫機能に及ぼす影響

3-1 目的

ストレスは、腫瘍発生においてイニシエータ? として、また腫瘍伸展においてプロモーターとして二つの面から腫瘍に関与していると考えられている。ストレスが腫瘍に及ぼす影響についての報告はいくつかあるが、ストレスの種類や負荷時期が腫瘍に及ぼす影響を詳細に検討した報告はほとんどない。我々はこれまで先行研究において、ストレスの種類や負荷時期を詳細に設定して検討してきた。その結果、慢性ストレスにおける生体機能の低下に加え、身体に直接刺激が加えられる物理的ストレスや視覚や聴覚によってストレスを認識する心理的ストレスにおける生体機能の低下を確認している(塚本和正 & 町田和彦, 1994, 塚本和正、有倉恵子、鈴木克彦、町田和彦, 1996)。そこで本研究では、こうしたデータをもとに腫瘍接種ラットにストレス負荷を行って、ストレスが腫瘍に及ぼす影響を検討した。

ストレスが生体に及ぼす影響については数多くの研究がなされている。そうした研究において、急性ストレスは生体機能を活性化し、慢性的ストレスは生体機能を低下させることが報告されている (V. Stefanski & H. Engler, 1998)。また、ストレスに影響されやすい免疫細胞としてリンパ球、好中球およびマクロファージなどが知られており (M. Tuchscherer, E. Kanitz, W. Otten & A. Tuchscherer, 2002)、腫瘍増殖抑制に働く主な免疫細胞としては、マクロファージと NK 細胞であると言われている (R.B. Herberman, 1982, N. Kawarabayasu, S. Seki, K. Jatsuse, T. Ohkawa, Y. Koike, T. Aihara, Y. Habu, R. Nakagawa, K. Ami, H. Hiraide & H. Mochizuki, 2000)。特に NK 細胞は、腫瘍に対する免疫監視機構の一役を担い増殖・転移に関する初期防御の役割を果たしていると考えられており、さらにストレスにも影響されるとの報告がある (AS. Gauchez, J. Riondel, T. Fernandes-Carlos, M. Jacrot, P. Guiuhiko Machida, 2003)。

本研究では腫瘍接種ラットを用いて特に慢性的ストレスの負荷時期を検討し、非特異免疫機能に及ぼす影響を検討した。

3-2 実験方法

3-2-1 実験動物及び飼育方法

日本 SLC 社より購入した 12 週齢の雄性高血圧自然発症ラット (Spontaneous Hypertensive Rat : 以降 SHR) をラット用代謝ケージ (高 20×幅 20×奥行き 25 cm, KN-646B; 夏目製作所) で馴化のための予備飼育を 1 週間行った後、各群ラットの平均体重 286 ± 10 g になるよう群別けをし実験を行った。飼育環境は、外部の騒音を遮断し感染を制御し、室温 25 ± 3 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、さらに 9 時から 21 時間での 12 時間照明による明暗周期を設定したセミバリア室内で、水は蒸留水を、餌は高圧蒸気滅菌済固形飼料 (EQ#5L65; Japan SLC, Inc.) を自由摂取で与えて飼育した。

3-2-2 SST-2 細胞接種

腫瘍細胞には、山口県立大学の森口覚教授より譲渡して頂いた SHR の乳ガン由来細胞である SST-2 細胞(K. Okamoto, *et al.*, 1963)を使用した。SST-2 細胞は、7.4% Fetal Bovine Serum (FBS: MBL Co., Ltd., Japan) 加 RPMI-1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) CO₂ Incubator (MODEL s-5020: SHOWA KAGAKU, CO₂ = 5%) にて継代培養し、細胞接種時には Trypsin / EDTA で処理し回収した。細胞浮遊液は 0.9% 生理食塩水で希釈し、最終濃度を 10^7 cells/ml に調整した。この SST-2 細胞浮遊液 100 μ l を、エーテル麻酔下のラットの背部皮下に接種し、接種 2 週間後に解剖を行った。

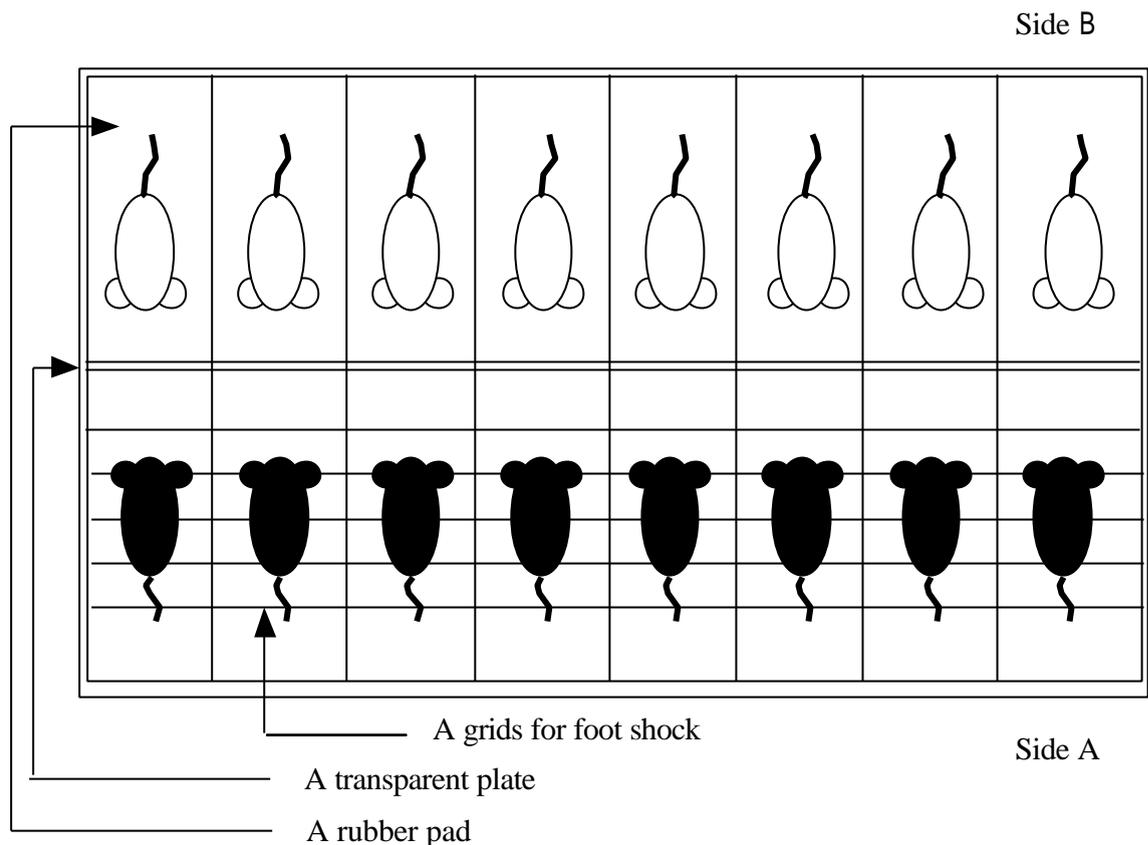


Fig. 1 Design of a communication box.

Rats of the physical stress group (Ph.) in the side A were exposed to foot shock stress 10 sets (1set: stress; 2.5V / 5sec., rest; 55 sec.). Rats of the psychological stress group (Ps.) were put in the side B separated by a transparent plate. They were not given a direct foot shock but in saw the physically distress rats that receives a foot shock. These stress sessions were loaded 7 times during the 2 week experimental period.

2-2-3 ストレス負荷

ストレス負荷には Communication Box(小川暢也 & 桑原寛, 1963 ,朴信正 , 1984)を想定して、改良したラット用トレッドミル(夏目製作所)を使用した(Fig.1)。この装置には、透明のプラスチック板で高さ 13.5×幅 13.5 ×奥行き 15 cmの小区画が 20 区画作られており、片側の 10 区画にはラットの足下に電気刺激を与える grid が敷かれ (A 区画) 対面の透明のプラスチック板を隔てた向かい側の 10 区画には足下にゴムが敷かれている (B 区画)。従って、A 区画

の電気刺激は B 区画には伝わらない。本実験では、A・B 両区画とも外側の 2 区画を除いた 8 区画を使用した。A 区画に入れられたラットは、足から直接電気刺激を受けるストレス(1 set : 2? 3 V, 5 秒間 / rest, 55 秒間)を 10 セット負荷されこれを身体的(物理的)ストレス負荷群(Ph.)とした。これら物理的ストレス負荷群ラットの情動反応を対面の B 区画で視覚、聴覚、嗅覚で認識することにより刺激を受けるラットを心理的ストレス負荷群(Ps.)とした。

3-2-4 群の設定

ストレス負荷群は物理的ストレス及び心理的ストレスの 2 種類に加え、さらにストレス負荷の期間を腫瘍接種前後に設けて多様なストレス条件を設定した。腫瘍接種前ストレス群には腫瘍の接種を行う 2 週間前から Communication Box によって物理ストレスと心理ストレスをそれぞれ負荷し、腫瘍接種後はストレス負荷を行わなかった。腫瘍接種後ストレス負荷群には腫瘍接種前の 2 週間は通常的生活環境下におき、腫瘍細胞接種後より腫瘍接種前ストレス群と同様量のストレスを 2 週間負荷した。従って本実験では、腫瘍接種前物理的ストレス負荷群(A.Ph、n=12)、腫瘍接種前心理的ストレス負荷群(A.Ps、n=12)、腫瘍接種後物理的ストレス負荷群(B.Ph、n=12)、腫瘍接種後心理的ストレス群(B.Ps、n=12)、及び、ストレス負荷を行わない腫瘍接種対照群(Control、n=12)とストレス負荷を行わない非腫瘍接種対照群(Normal、n=12)の計 6 群を設定した(Fig.2)。

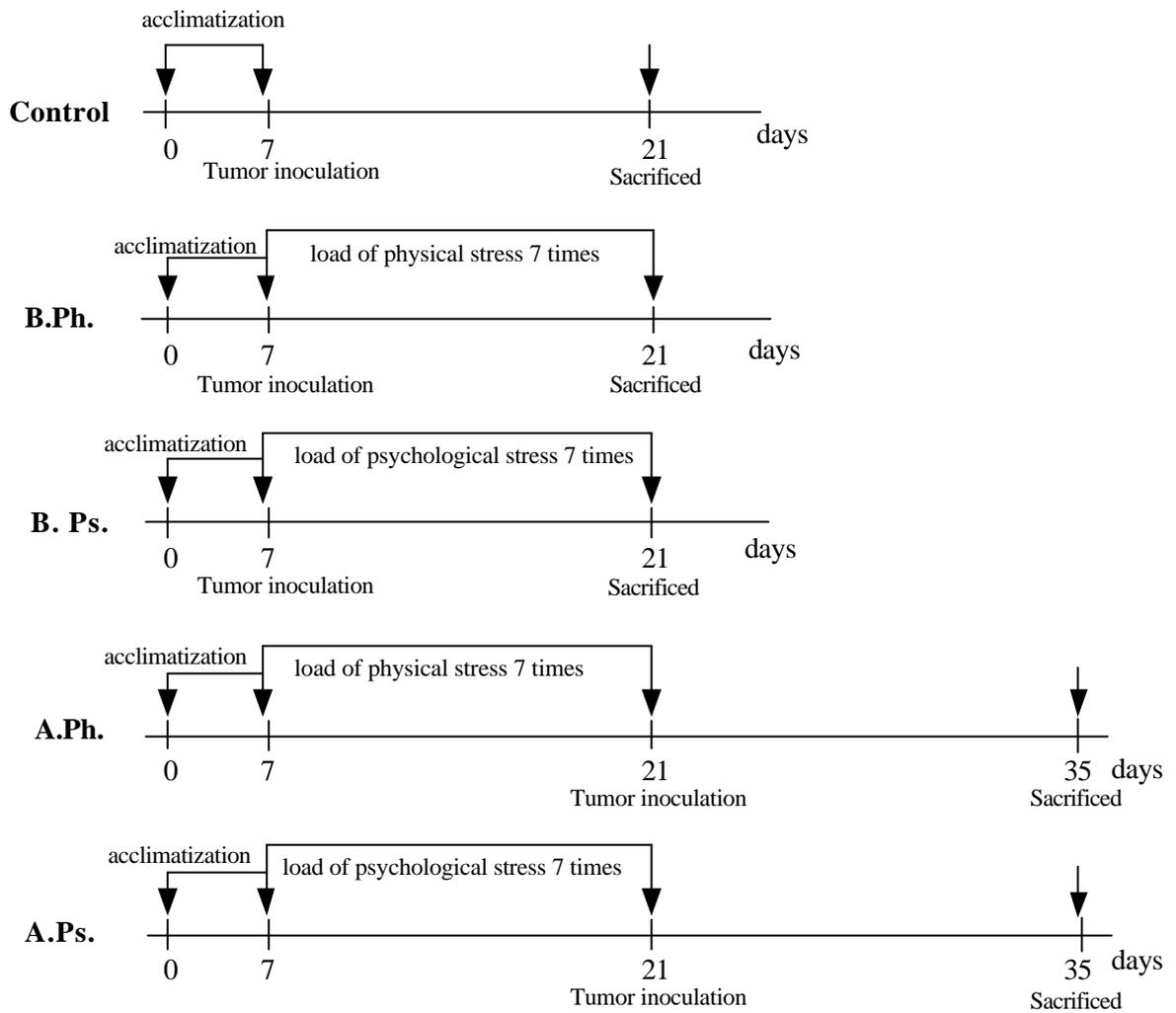


Fig.2 Schedule of conditioned physical and psychological stimuli in combination of tumor inoculation.

Communication box was used for stress loading, and stimuli were repeated 7 times during the two-week experimental period. Rats exposed to electric foot shock were the physical stress group (Ph.), whereas rats in the psychological stress group (Ps.) were in the conditions seeing Ph. rats distressed by the shock. The groups, B.Ph. and B.Ps., were tumor inoculated before the stress exposure, whereas the groups, A.Ph. and A.Ps., were tumor inoculated after the stress exposure.

3-2-5 測定項目

腫瘍重量

接種した腫瘍細胞は腫瘍塊に成長し、この腫瘍塊を解剖後に背部の皮下より摘出し湿重量を測定し、体重 100g あたりの腫瘍重量とした。

リンパ球幼若化

第 2 章と同様の方法にて測定を行なった。(p14 参照)

NK 細胞活性

第 2 章と同様の方法にて測定を行なった。(p15 参照)

好中球機能の測定

第 2 章と同様の方法にて測定を行なった。(p15 参照)

3-2-6 統計解析

各群間における測定結果の多重比較には一元配置分散分析による多重比較検定 (posthoc テスト) : ANOVA 法 (5% 有意水準) を用いた。

3-3 結果

3-3-1 各ストレスが腫瘍重量に及ぼす影響

各ストレス群における腫瘍重量を Fig.3 に示した。腫瘍接種後ストレス群では、B.Ph.群が Control 群に対して有意な高値 ($p < 0.05$) を示し、B.Ps.群は B.Ph.群より低値 ($p < 0.05$) であった。一方、接種前にストレスを負荷され接種後はストレスを与えられなかった群は、A.Ph.群と A.Ps.群の間では差が認められなかったが、A.Ph.群、A.Ps.群ともに Control 群に対しては有意 ($p < 0.01$) に低下した。ストレス負荷を接種前後で比較すると、A.Ph.群は B.Ph.群より低く ($p < 0.05$)、A.Ps.群は B.Ps.群より有意に低値 ($p < 0.05$) を示した。

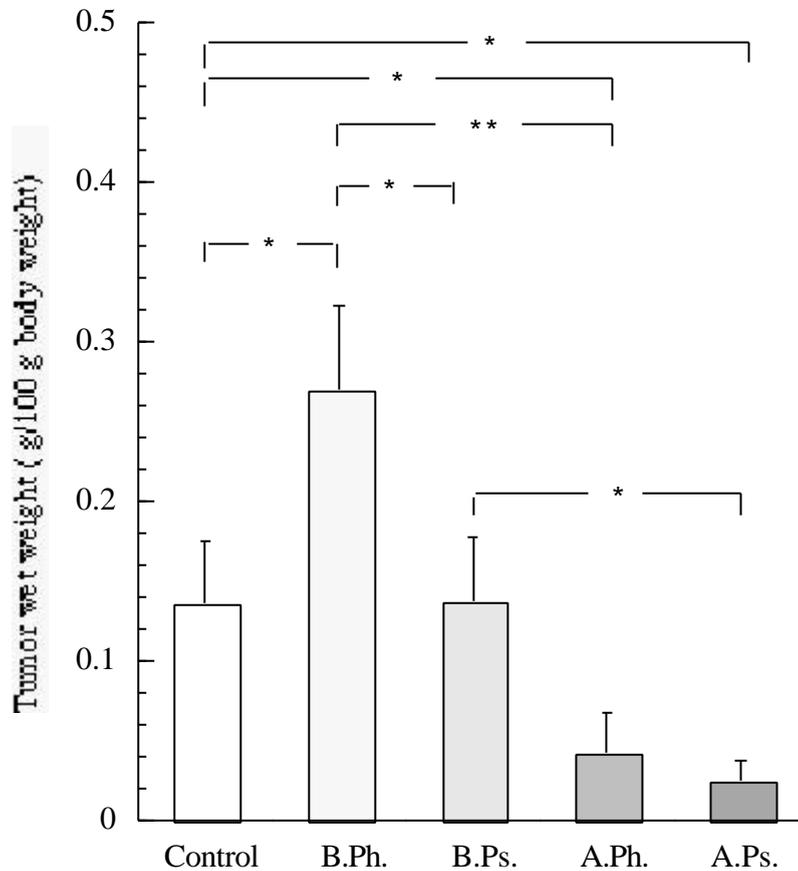


Fig. 3 Effects of physical and psychological stress on SST-2 tumor growth in SHR.

All rats were subcutaneously inoculated with 1×10^6 SST-2 tumor cells. After 2 weeks of inoculation, the fixed tumor was weighted, and the weight was expressed per 100 g body weight of rat. Wet weight of the tumor was expressed as mean \pm SE. **and * indicate significant difference between the groups (Fisher's post hoc test, **: $p < 0.01$ *; $p < 0.05$).

3-3-2 各ストレス群における幼若化試験

腫瘍接種を行なったラットの脾臓リンパ球の幼若化を4種類の mitogen ごとに Fig.4に示した。Control 群よりも腫瘍が小さかった A 群 の Con. A 刺激では Control 群との差が認められなかった (Fig4, A)。一方、腫瘍が Control 群よりも大きかった B 群の幼若化は Con. A 刺激において B.Ph.および B.Ps.両群とも Control 群に対して有意な高値を示した ($p<0.05$, $p<0.01$)。特に、B.Ps.群での上昇が著しく、B.Ph.群に対する有意な高値 ($p<0.01$)に加えて、A.Ps.群に対しても有意な高値を示した ($p<0.01$)。PHA 刺激における幼若化では A.Ps.群が Control 群および B.Ps.群に比べて低値を示した (Fig.4, B, $p<0.05$)。その他の刺激群については各群間における差は認められなかった。

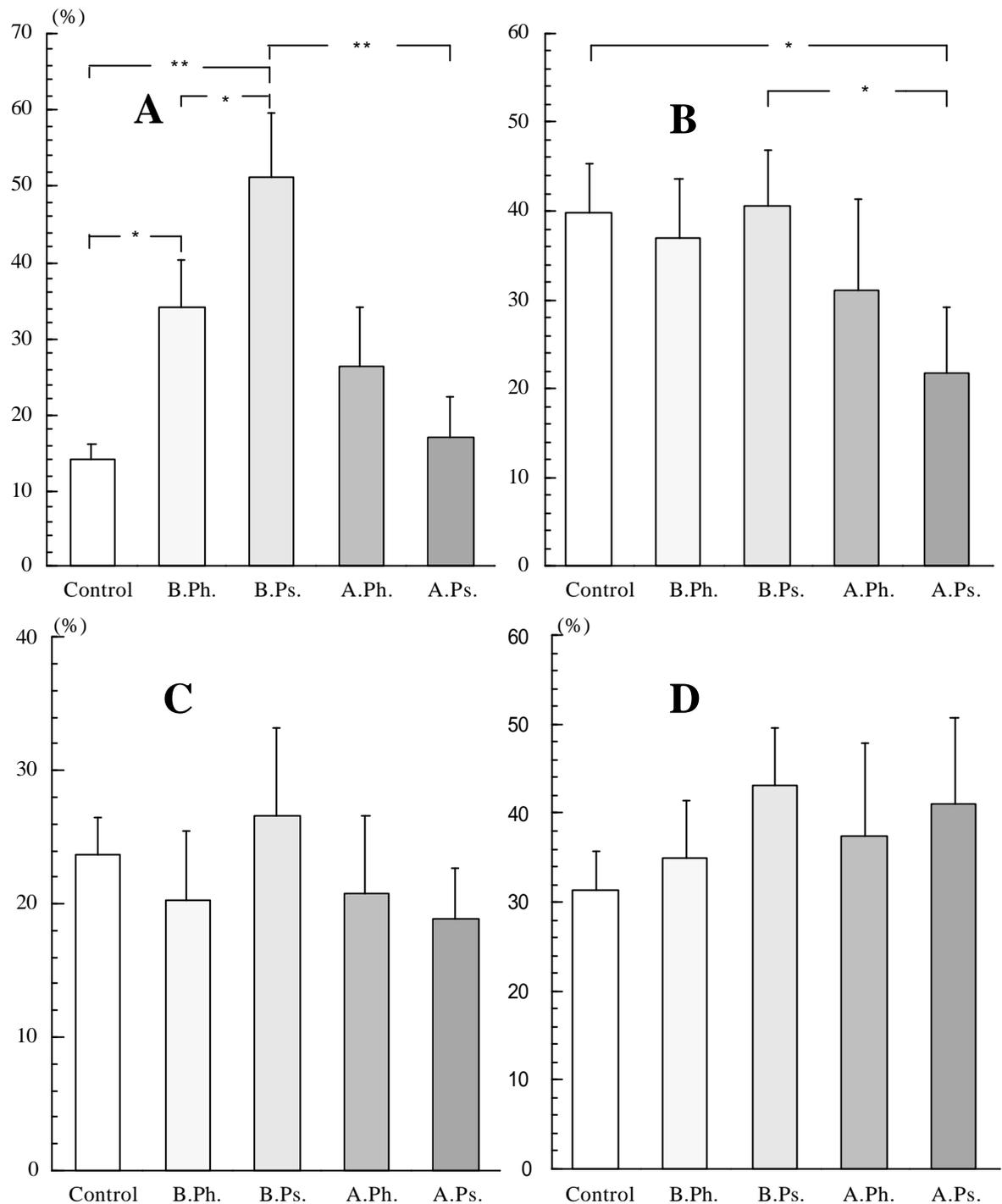


Fig. 4 Effects of physical and psychological stress on lymphocyte blastogenic response in SHR.

Splenic lymphocytes were stimulated by Con A; 0.125 μ g/ml (A), PHA; 1 μ g/ml (B), LPS; 0.53 μ g/ml (C), and PWM; 0.26 μ g/ml (D) for 72 hours. Data were expressed as mean \pm SE. **and * indicate significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; $p < 0.01$ *; $p < 0.05$).

3-3-3 各ストレス群における NK 細胞活性

非接種対照群に対して接種対照群は有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。又、接種対照群に対して接種前ストレス負荷群は物理群において有意な高値 ($p < 0.01$) を示し、接種後ストレス負荷群は物理・心理両群とも有意な低下 ($p < 0.01$) が認められた。さらに、物理群・心理群ともストレス負荷は接種前に比べて接種後の方が NK 細胞活性を低下 ($p < 0.01$) させることも示唆された。本実験では、FACS の測定結果を用いて NK 細胞数の訂正を試みたが、標準偏差値は小さくなるものの、群の間での差は訂正前後でその傾向に変化は見られなかった。注目すべきことに、腫瘍重量と NK 細胞活性の間には反比例の関係が見られた (Fig.3, Fig.5)。

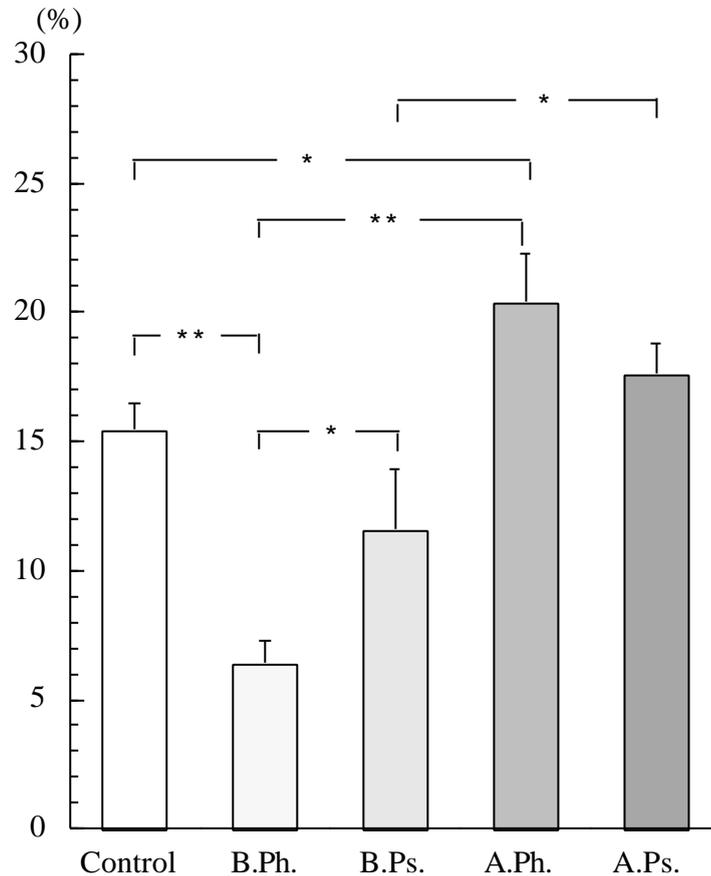


Fig.5 Effects of physical and psychological stress on NK cell activity against SST-2.

In vitro killing activity of splenic NK cells against SST-2 cells was measured by LDH release assay. Data were expressed as mean \pm SE. *indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.05$). †indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, $p < 0.1$).

3-3-4 各ストレスが好中球機能および影響

非刺激試験による好中球機能

非刺激試験において腫瘍非接種群において、Ph 群及び Ps 群が Normal 群に対して有意な高値 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) を示したが、腫瘍接種群においては各ストレス群間に有意な差は認められなかった (Fig.6)。

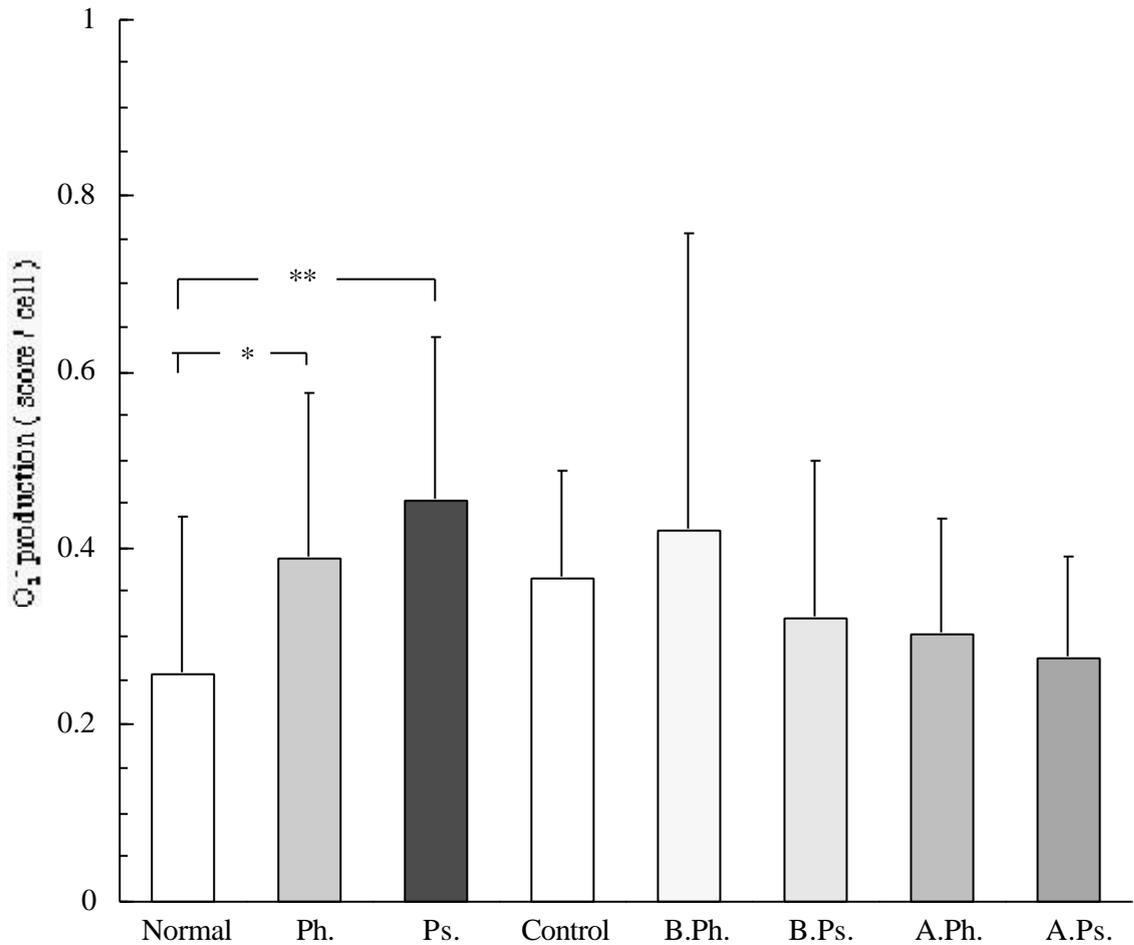


Fig.6 Stress effects on O₂⁻ production of neutrophil in SHR by the rest test.

NBT was reduced by O₂⁻ that was generated from neutrophils, and it formed the blue-black formazan deposits in cytoplasm. NBT score as measured by the sum of formazan deposits was evaluated as O₂⁻ production of neutrophil in case of non-stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **: $p < 0.01$ *; $p < 0.05$).

刺激試験による好中球貪食能及び O₂ 産生能

黄色ブドウ球菌を用いた刺激試験において、ブドウ球菌の貪食数 (Fig.7) は Normal 群に対して Control 群が有意に低下した ($p < 0.01$)。しかし、ストレス負荷の異なる群の間において差が認められなかった。O₂ 産生能 (Fig.8) は Normal 群に対して Control 群が有意に低値を示し ($p < 0.01$)。この結果は貪食能と一致するものであった。その他の群間における O₂ 産生能は、腫瘍接種が行なわれなかったストレス群では Ph 群・Ps 群ともに Normal 群に対して有意に低下 ($p < 0.01$) し、Ps 群より Ph 群の方が低かった ($p < 0.05$)。これら 2 群は腫瘍を接種した Control 群に対しても有意な低値 ($p < 0.05$) を示した。一方、腫瘍接種を行なったストレス群では B.Ph. 群、B.Ps. 群、A.Ps. 群、及び A.Ph. 群の 4 群とも Control 群に対して有意に低下 ($p < 0.01$) した。さらにストレス負荷群では腫瘍接種前後に関係なくそれぞれ物理群が心理群よりも低下し、B.Ph. 群は B.Ps. 群より低く ($p < 0.05$)、A.Ph. 群は A.Ps. 群より低値 ($p < 0.05$) であった。ストレス負荷の時期による比較では、B.Ph. 群は A.Ph. 群より低下し、B.Ps. 群は A.Ps. 群より低下し、接種後にストレス負荷された群が、接種前ストレス負荷群より物理・心理両群とも低下することが示された ($p < 0.01$)。これらの腫瘍接種群に対して、腫瘍接種が行われていない Ph 群と Ps 群は有意な差が認められなかった。

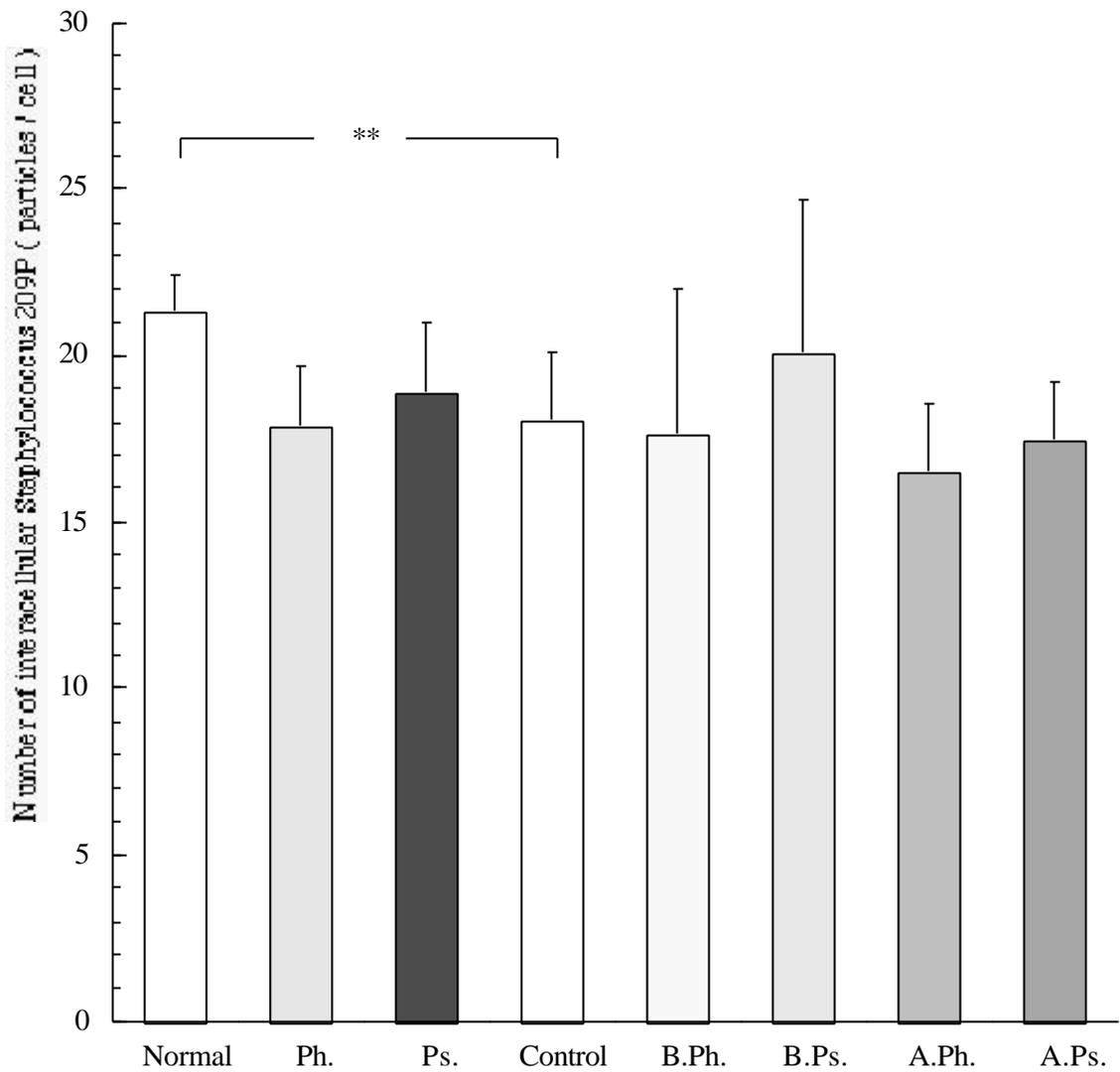


Fig.7 Effect of stress and inoculation of SST-2 tumor cells on phagocytosis of the neutrophil in SHR by the stimulation test.

Staphylococcus aureus 209P (2×10^9 cfu/ml) was used as microbes. Twenty-five μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the foreign agent were mixed and incubated. Microbe particles were counted in 100 neutrophils under microscope and, it was evaluated as phagocytotic ability of neutrophil. Average number of the particles in a cell was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; $p < 0.01$ *; $p < 0.05$).

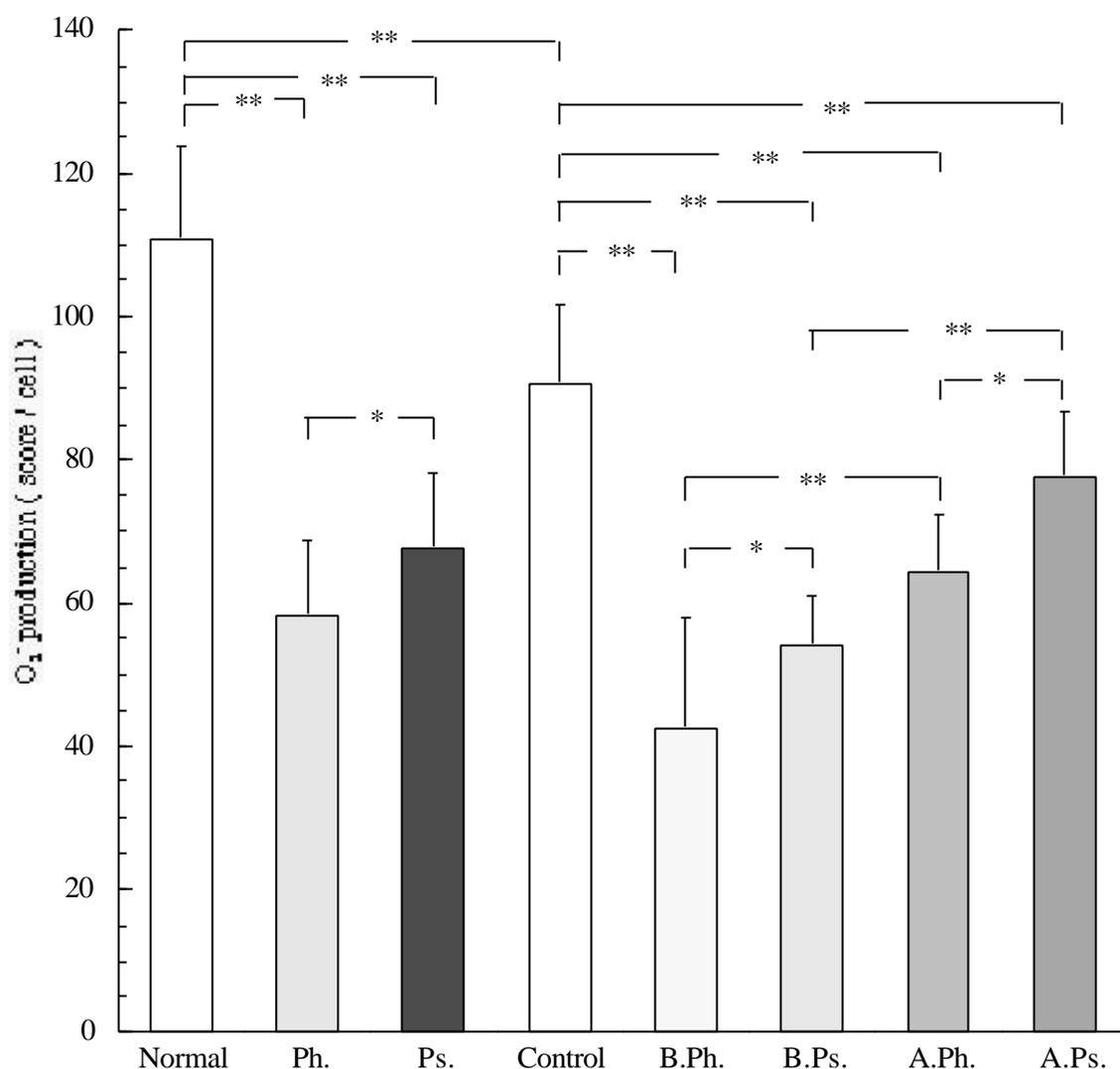


Fig.8 Effect of stress and inoculation of SST-2 tumor cells on O₂⁻ production of neutrophil in SHR by the stimulation test.

Twenty-five μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the *Staphylococcus aureus* 209P (2×10^9 cfu/ml) were mixed and reacted. NBT score as measured by the sum of formazan deposits was evaluated as O₂⁻ production of neutrophil in case of stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; p < 0.01 *; p < 0.05).

好中球貪食能及び O₂ 産生能の相関

本研究室においてその有用性が確認されている (T.Kuriyama, *et al* ,1996) O₂ 産生能及び貪食能の相関関係を検討し Fig.9 に示した。腫瘍がもっとも生長した B.Ph.群においてのみ、有意な相関関係が認められた。しかし、各データの分散に注目すると、B.Ph.群でもっとも低い位置における分散が認められ、その他の各 Ph.群でも比較的低値での分散であった。腫瘍接種もストレス負荷も行っていない Normal 群は高い値での分散が認められた。

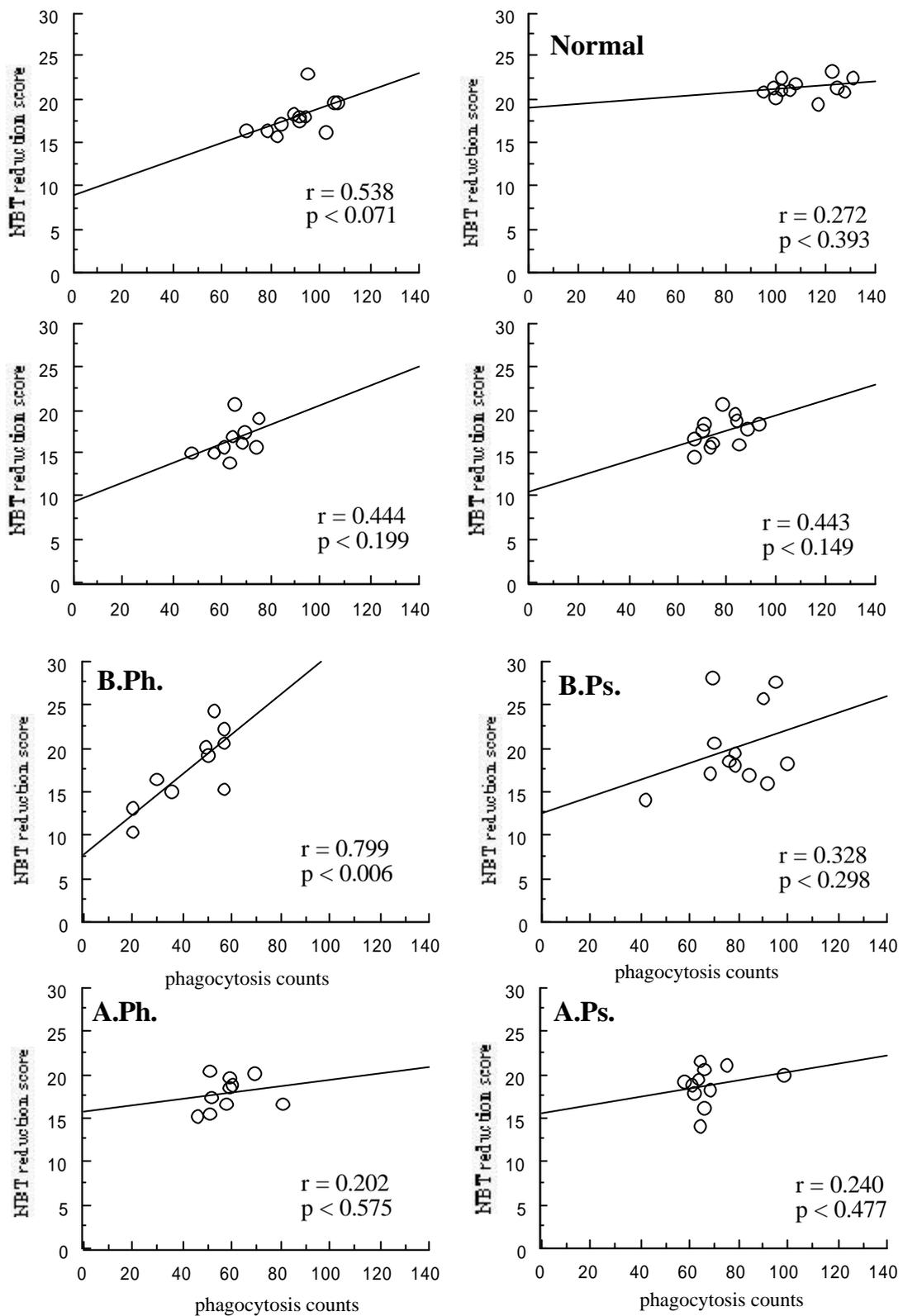


Fig. 9 Correlation between O_2^- production and phagocytosis of the neutrophil function

3-4 考察

本研究において腫瘍接種ラットに物理及び心理ストレス負荷を行なったところ、腫瘍接種前の2週間にわたってストレスを負荷した A-Stress 群において物理群も心理群も Control 群よりも腫瘍増大が抑制された。一方、腫瘍接種後にストレス負荷を行なった B-Stress 群においては物理群のみが Control 群に対して有意に腫瘍が増大した。この結果からストレス条件下における腫瘍増大はストレスの種類やストレス負荷を行なう時期に影響され、腫瘍接種と同時にストレスを負荷すると腫瘍増殖が促進されるが、予めストレスを負荷することによって腫瘍抑制効果が誘導される可能性が示唆された。

その理由として考えられることは2つある。慢性ストレスによって免疫機能が活性化されることは報告されており(V.Stefanski & H. Engler, 1998), 腫瘍接種前にストレスを負荷することによってNK細胞等の免疫機能がプライミングされ、抗腫瘍免疫機能が活性化している生体に腫瘍細胞が接種されたため腫瘍に対して高い抑制効果を示したと考えられる。もう一つはNK細胞活性が心理状況を反映するという報告もあることから(RJ. Benschop, EE. Nieuwenhuis, EA. Tromp, GL. Godaert, RE. Ballieux, & LJ. Doornen, 1994)、ストレスを予め負荷してその後ストレスを除去することでストレスからの解放による高揚感がNK細胞を活性化させ、腫瘍の抑制効果が促進されたことが考えられる。また安静によって腫瘍に対する免疫応答が適切に誘導された可能性も考えられる。しかしながら、腫瘍接種ラットにストレス負荷を行なうと腫瘍増大が促進されるとの報告はある(H. Hasegawa & I. Saiki, 2002)が、ストレス負荷により腫瘍増大が抑制されたという報告はないことから、本研究において予めストレス負荷を行なった A-Stress 群で腫瘍増大が抑制されたことは興味ある結果であると考えられる。

次に、ストレスの種類について検討したところ、B-Stress 群において、心理ストレスでは腫瘍増殖に影響がなかったものの、物理ストレスで Control 群に対して顕著な腫瘍の増大が認められた。

各免疫機能について検討したところリンパ球の幼若化では、B.-Stress 群において Con. A に刺激される T 細胞の反応が腫瘍移植によって亢進したが、物理群よりも心理群の方が高値であった。A.-Stress 群では、PHA に刺激される T 細胞が心理群においてのみ Control 群 に対する有意な低値が認められたが、その他の刺激剤においては Control 群 に対する有意な変化は認められなかった。ストレス負荷によって リンパ球の幼若化は低下すると言われており、上昇するとの報告はない。従って、この幼若化の上昇はストレスにたいする幼若化反応としては新たな所見と思われる。

リンパ球の幼若化反応は、PHA 刺激において A.Ps.群で低下したが、A.-Stress 群では腫瘍増大が Control 群より少なく腫瘍に影響を受けなかったため、先行研究(K. Oishi, N. Nishio, K. Konishi, M. Shimokawa, T. Okuda, T. Kuriyama & K.Machida, 2002)で確認されているように心理群で低値が認められたものと考えられる。SST-2 細胞は抗原性が非常に低く(N. Takeichi, Y. Koga, T. Fujii and H. Kobayashi, 1985)、その増殖抑制に T 細胞の関与はきわめて少ないと報告(T. Matsuoka, 1989)がある。従って、腫瘍の増大が顕著に認められた B.-Stress 群における幼若化が高値であったことは腫瘍増殖抑制に T 細胞の関与が少ないこと示しているものと思われる。一方で、T 細胞は腫瘍増殖抑制に働かないが、腫瘍の増大に誘発され T 細胞が増殖する可能性も考えられた。T 細胞には抗腫瘍免疫を担う Cytotoxic T cell が含まれており、この細胞が腫瘍接種に対して反応を示した可能性も無視できない。また Cytotoxic T cell はストレスにも影響されるという報告があることから、今後、同様の実験において各種 T 細胞ごとに活性を検討することで、T 細胞の関与が明らかになるであろうと考えている。本結果はその足掛かりとなる重要な知見であると思われる。

NK 活性は、B.-Stress 群において物理ストレス群が低く、心理ストレス群では Control 群との有意な差は認められなかった。A.-Stress 群では物理群において Control 群より高値を示し、物理心理ともにそれぞれの B.-Stress 群よりも有意に高値を示した。また、腫瘍の重量と NK 活性

の値が非常によく相関している。このことから NK 活性が腫瘍の重量に大きく関わっていることが示された。A.-Stress 群では特に NK 活性の上昇が腫瘍の抑制効果を促進したものと考えられる。物理群の NK 活性は Control 群にたいして有意に高値を示しているが、この物理群における NK 活性の上昇は注目すべき結果である。

NK 細胞は抗腫瘍免疫機能において主要な役割を果たしている細胞であることが知られている(N. Kawarabayasgu, *et al.*, 2000)。また、ストレスによる NK 細胞活性の低下も数多く報告されている(M.Jurkowski, W. Trojnar, A. Borman, Z. Ciepielewski, D. Siemion, J. Tokarski, 2001)。従って、B.-Stress 群ではストレス負荷によって NK 活性が低下し腫瘍増殖が促進されたと考えられる。A.-Stress 群でも腫瘍接種時には NK 活性はストレスによって低下していたと考えられるが、その後ストレスを除去したことによって NK 活性は回復し、さらにストレス負荷によって、何らかのストレスに対抗する機構（防衛体力のようなもの）が獲得され、Control 群より高値を示し、腫瘍抑制効果を促進した可能性が示唆された。従って、本結果では腫瘍接種ラットにおいて慢性ストレスを負荷すると NK 活性が低下し腫瘍増殖を促進するが、予め慢性ストレスを負荷しその後ストレスを除去することによって NK 活性は上昇し、腫瘍抑制効果を生じる可能性が示された。我々の先行研究において慢性ストレス負荷においては心理ストレス群が物理ストレスより NK 活性が低下することが確認されているが(K. Oishi, *et al.*, 2002)、本研究で B.-Stress 物理群では心理群より低値であったことは腫瘍接種の影響であると考えられ、このメカニズム解明はストレスと腫瘍の関係を明らかにする上で、今後の重要な検討課題であると思われる。

以上より、腫瘍増大の要因はこれらの免疫機能の低下であると考えられる。一般的には、慢性ストレスはリンパ球の幼若化および NK 細胞活性を低下させると言われている(H. Salman, M. Bergman, A. Weizman, H. Bessler, J. Weiss, R. Straussberg, M. Djaldetti, 2000, WJ. Wu, SB. Pruett, 1999)。本研究の先行研究においても、慢性ストレスにおける免疫機能の低下を確認しているが、慢性ストレスでは心理群で、急性ストレスでは物理群でこれらの免疫機能を低下させた。

本研究では慢性ストレス負荷に腫瘍接種を同時に行なったところ、心理ストレスではなく物理ストレス群における顕著な腫瘍の増大が認められたが、急性の物理的ストレスが繰り返されたことにより、免疫細胞機能の低下が回復できず、腫瘍の増殖につながったものと考えられる。このことは、腫瘍の非接種時の免疫応答と腫瘍接種時の免疫応答が異なることを示していると考えられる。また、ストレス負荷を前もって行なうことで腫瘍増大が抑制されることが本研究では明らかとなった。今後はさらに詳細な検討を行ない、ストレスによる腫瘍抑制のメカニズムや腫瘍接種に対する T 細胞の関与を解明することが重要であると考えられる。

好中球機能を検討した NBT 試験では、非刺激試験における変化は認められなかったものの、刺激試験における好中球の活性酸素産生能の低下が認められ、特に物理的ストレス群において著しい低下が認められた。

一方、あらかじめストレス負荷を行った後ストレス負荷をやめて腫瘍接種を行った A.-Stress 群では、腫瘍接種後ストレス負荷を与えられた群のみならず Control 群と比べても、物理、心理といったストレスの種類を問わず腫瘍重量が低下した。この群のラットも今までの知見から、慢性負荷が通常に行なわれている間は腫瘍接種直前の時点まで生体防御機能が低下していることが推測され、実際に腫瘍接種直前のストレス負荷群の好中球機能が、非刺激試験及び刺激試験において機能の低下を示していることから確認することができる。慢性ストレス負荷終了後における免疫の回復といった報告はあるものの、慢性ストレス負荷による免疫機能の活性の報告はなく、本実験結果は大変興味ある結果であると思われる。この時の好中球機能は、刺激試験において腫瘍接種前ストレス負荷群は物理、心理ともにそれぞれ腫瘍接種後ストレス群に対して O_2 産生能の上昇が認められた。好中球機能の活性化には感染の可能性が考えられるので、腫瘍接種による免疫機能の低下が感染を引き起こしたことによる O_2 産生能の上昇の可能性を考え検討したところ、Control 群に対しては O_2 産生能が低下しており、腫瘍接種を行っていない Normal 群と比較しても O_2 産生能は低いことが認められた。従って、腫瘍接種による

感染が原因で好中球機能が活性化したことは否定できる。これらのことから、好中球機能の活性化は予めストレスを負荷することによって引き起こされたことが示唆された。

本研究で用いた NBT 還元試験では非刺激試験は通常時における好中球の O_2 産生能の指標であり、細菌等の異物の侵入がないにもかかわらずこの値が高いということは、全身の生体防御機能の低下を意味し腫瘍細胞の発育・伸展に有利に働いていると考えられる。一方、刺激試験は異物侵入時の好中球の O_2 産生能指標であり、異物除去に大きなはたらきを持つことを意味し、腫瘍細胞の細胞障害性に有利に働くものと考えられる。刺激試験においては貪食能に変化は認められなかったが、腫瘍接種前ストレス負荷群は物理、心理共にそれぞれ腫瘍接種後ストレス群に対して O_2 産生能の上昇が認められた。一方、非刺激試験においては、腫瘍非接種群でストレス負荷による O_2 の過剰産生が認められたが、腫瘍接種群におけるストレス負荷の影響は認められなかった。非刺激試験における O_2 産生能は腫瘍接種がおこなわれた生体ではストレス負荷の影響を強く受けないものと考えられる。

さらに刺激試験においては、貪食能と O_2 産生能の相関関係を検討することによって、好中球機能が有意義に働いているかどうかを評価した。相関関係が負であると貪食数に対して O_2 産生能が過剰産生もしくは産生不十分であることを示し、正であると貪食数に対して O_2 産生能がバランス良く産生されていることを示す。しかし、本結果はではもっとも腫瘍が増大した B.Ph. 群において有意な正の相関が認められた。さらに、腫瘍接種群においても非接種群より正の相関が顕著であった。好中球機能におけるこの結果は、本実験において、あらかじめストレス負荷を行うことで免疫機能の活性化が誘導されたことと同様に、生体に何らかの負荷を与えられることによって、好中球機能の活性化が生じたと考えられる。従って、各群間においてもっとも負荷が著しかった群は B.Ph. 群であったことも予測された。

好中球の腫瘍免疫への関与に対し、我々は先行研究において腫瘍の初期段階における好中球機能の活性化を確認している(N. Nishio, *et al.*, 2003)。この結果と本研究結果をあわせて考える

と、好中球機能は腫瘍発生時、腫瘍発生初期あるいは腫瘍少量段階において腫瘍抑制に関与していることは否定できないものと思われた。

以上の結果から、免疫機能が低下すると言われている慢性ストレスでもストレスが予め負荷された後にやめることによってストレス負荷中に低下した生体機能は逆に賦活化され腫瘍抑制効果が促進する可能性が示唆された。これはストレスという生体にとって好ましくない状態が続いた後、急にそのストレスから解放され一種の多幸福感を感じて、通常の状態（Control群）より、より良い生体防御機能を獲得した可能性を示しているのかもしれない。さらに好中球機能は腫瘍発生時もしくは腫瘍発生初期に重要な役割を担っている可能性が考えられ、今後、他の抗腫瘍免疫細胞との関連を含めてさらに検討をしていく必要があると考えている。

第 4 章

運動が腫瘍接種ラットの免疫機能に及ぼす影響

4-1 目的

先行研究においてライフスタイルと生体防御機能の関係の研究は行われており、ストレスや運動習慣が非特異生体防御機能に及ぼす影響については、すでに先行研究によって報告してい

る (Suzuki K. & Machida K., 1995, Suzuki K., Machida K.& Kuriyama T., 1992, Ina Y., Machida K., Suzuki K. & Tukamoto K., 1994)。そうした報告の中で運動習慣については、強制ではなく自由な意志による適度な運動が生体防御機能を高め、又 NK 細胞活性や好中球機能の向上による疾病の予防の可能性を示唆してきた。一方で、強制的に運動を行うことはストレスと同様の影響を与え、生体防御機能の低下を招く可能性があることも、先行研究において示唆されている。

そこで我々は、生活習慣病とも言われているがん注目し、がん予防のための運動といった観点より研究を行うことを目的として、腫瘍接種ラットに運動を負荷し、がんの初期段階における生体防御機能の検討を行った。本章では運動習慣の条件の異なったラットに、腫瘍を接種し、腫瘍接種ラットの腫瘍の伸展状況及び生体防御機能がどのように変化するか検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 実験動物及び飼育方法

日本 SLC 社より購入した 4 週齢の雄性高血圧自然発症ラット (Spontaneous Hypertensive Rat :以降 SHR) をラット用代謝ケージ (高 20×幅 20×奥行 25 cm, KN-646B ; 夏目製作所) で馴化のための予備飼育を 1 週間行った後、各群ラットの平均体重 140 ± 5 g になるよう

群別けをし実験を行った。

飼育環境は、外部の騒音を遮断し感染を制御し、室温 25 ± 3 、湿度 55 ± 10 %、さらに9時から21時間での12時間照明による明暗周期を設定したセミバリア室内で、水は蒸留水を、餌は高圧蒸気滅菌済固形飼料 (EQ#5L65; Japan SLC, Inc.) を自由摂取で与えて飼育した。

4-2-2 SST-2 細胞接種

第3章と同様に調整した。(p30 参照)

4-2-3 運動条件

自由運動群は1週1mの回転輪が設置されたケージ内で固定部と回転輪を自由に行き来し、自発的な運動を行わせた。一方、強制運動群のラットは、自由運動群のラットのケージの固定部の同じ広さの代謝ケージ内で飼育し、強制運動群運動を行う時のみケージから出して、ラット用トレッドミルを用いて一定量 (20m/sec., 30min.) の運動負荷を強制的に行わせた。これら運動群に対して非運動群は、ラット用代謝ケージ内において飼育されるのみであった。

4-2-4 群の設定

ラットは1群12匹として運動条件によって非運動群、強制運動群、自由運動群の3群を設定し、さらに各群に対して腫瘍細胞接種対照群を設け、腫瘍接種自由運動群、腫瘍接種強制運動群、腫瘍接種非運動群の3群を加えて、計6群とした。(Fig.1)

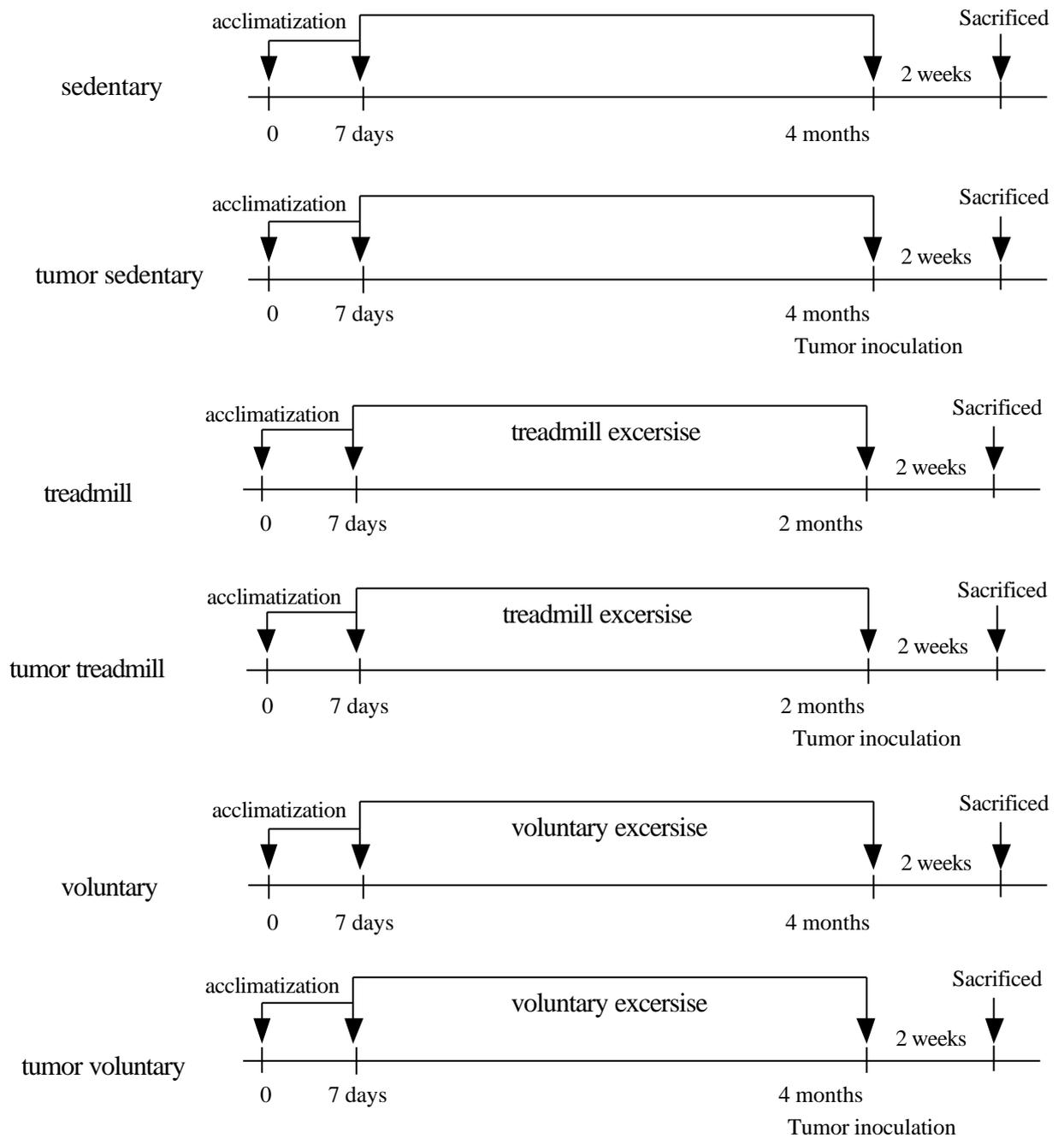


Fig.1 Schedule of conditioned exercise and tumor inoculation.

Sedentary groups could not do exercise because of living in a small room. Treadmill groups lived in a small room, and they had just got out the room when doing exercise by treadmill machine for rat. Treadmill exercise was exposed 30min./day for two month. Voluntary exercise groups lived in a small room with rotation cage (1m/1round). Rats could do exercise whenever they want to. We record the distance 2 days in a week.

4-2-5 測定項目

ラットの解剖はネンブタール（ダイナボット(株)）麻酔下にて行った。

腫瘍重量

接種した腫瘍細胞は腫瘍塊に成長し、この腫瘍塊を解剖後に背部の皮下より摘出し湿重量を測定し、体重 100 g あたりの腫瘍重量とした。

分核による白血球分類

血液は Nembutal (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) 麻酔下にてラットの尾静脈より採血した。白血球数は自動血球計算機 (Sysmex F-820, Toa Medical Electron Inc., Japan) によって count し、白血球の分類は May- Giemsa 法によって行なった。

NK 細胞活性

第 2、3 章と同様の方法にて測定を行なった。(p15 参照)

好中球機能の測定

第 2、3 章と同様の方法にて測定を行なった。(p15 参照)

4-2-6 統計解析

各群間における測定結果の多重比較には一元配置分散分析による多重比較検定 (posthoc テスト) : ANOVA 法 (5% 有意水準) を用いた。

4-3 結果

4-3-1 各運動群における腫瘍重量

腫瘍重量においては自由運動群が強制運動群及び非運動群に対して有意な低値を示した ($p<0.01$)。しかし、強制運動群と非運動群の間に差は認められなかった。

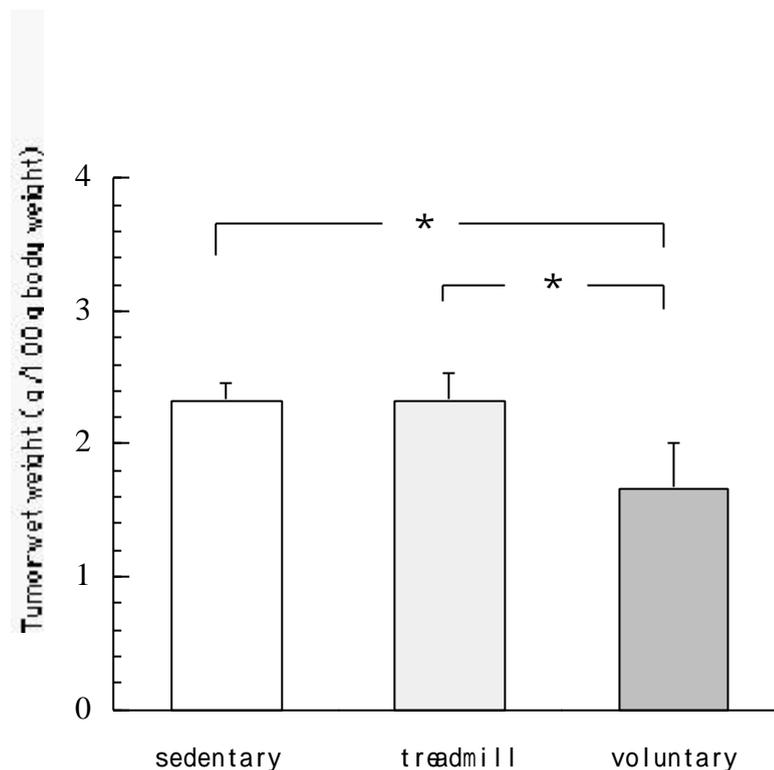


Fig.2 Effect of exercise on growth of SS-2 tumor in SHR rats.

All rats were inoculated s.c. with 1×10^6 SST-2 tumor cells/rat. After two weeks tumor cells inoculation, the tumor fixed on rats were weighted and calculated as

$$\text{Tumor (g)} = \frac{\text{Tumor wet weight}}{100\text{g body weight}}$$

Wet weight of tumor is expressed as mean \pm SD and statistically significant between each groups are represented as follows; *; $p<0.05$, ** $p<0.01$.

4-3-2 体重の変化

各群間における差は認められなかった。

Table 1 Body mass in all rats before and after tumor inoculation

| Group | sedentary | treadmill | voluntary | tumor sedentary | tumor treadmill | tumor voluntary |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Initial body mass (g) | 350.9 ± 24.9 | 334.6 ± 23.1 | 332.2 ± 33.3 | 353.9 ± 18.6 | 331.0 ± 16.1 | 335.2 ± 26.8 |
| Final body mass (g) | 344.5 ± 26.4 | 327.8 ± 25.4 | 347.9 ± 22.3 | 352.7 ± 19.6 | 332.3 ± 15.8 | 356.9 ± 16.3 |

Body mass was expressed as mean ± SD. There are no significant differences in all groups.

4-3-3 分核による白血球分類

運動条件にかかわらず、腫瘍接種群では白血球が増加した ($p<0.01$)。これは特に好中球の増加 ($p<0.01$) を反映したものである。運動群では強制、自由ともに、増加が非運動群に比べて少なかった ($p<0.05$)。また、非接種群において、自由運動で NK 細胞を含めたリンパ球の増加が認められた ($p<0.05$)。腫瘍非接種群では運動群で好中球が増加し、特に自由運動で有意であった ($p<0.05$)。

Table 2 Haematological parameters of SHR rats inoculated with SST-2 tumor cells

| Group | sedentary | treadmill | voluntary | tumor sedentary | tumor treadmill | tumor voluntary |
|--|------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Total leukocytes ($10^2/\mu\text{l}$) | 43.75 \pm 3.77 | 44.20 \pm 8.54 | 59.00 \pm 8.94 | 124.83 \pm 8.87 | 93.42 \pm 9.45 | 96.45 \pm 8.62 |
| Lymphocytes ($10^2/\mu\text{l}$) | 18.99 \pm 3.46 | 16.82 \pm 3.78 | 24.16 \pm 4.33 | 27.41 \pm 3.31 | 23.81 \pm 4.71 | 21.78 \pm 2.49 |
| NK cells ($10^2/\mu\text{l}$) | 2.92 \pm 0.46 | 2.55 \pm 0.52 | 4.01 \pm 0.77 | 4.01 \pm 0.46 | 3.46 \pm 0.74 | 3.49 \pm 0.49 |
| CD8+ T cells ($10^2/\mu\text{l}$) | 3.99 \pm 0.85 | 2.55 \pm 0.74 | 3.88 \pm 0.87 | 4.52 \pm 0.85 | 3.52 \pm 1.00 | 3.63 \pm 0.67 |
| Neutrophils ($10^2/\mu\text{l}$) | 19.73 \pm 1.60 | 22.40 \pm 4.62 | 27.40 \pm 4.51 | 77.41 \pm 5.92 | 60.75 \pm 6.55 | 58.74 \pm 7.93 |
| Monocytes ($10^2/\mu\text{l}$) | 4.33 \pm 0.48 | 4.82 \pm 0.91 | 6.86 \pm 1.24 | 14.41 \pm 2.16 | 8.18 \pm 1.20 | 11.28 \pm 2.47 |

Values are means \pm SE. Significant difference was observed in lymphocyte numbers between tumor inoculation group and normal group each condition.

4-3-4 NK 細胞活性

腫瘍接種群における NK 細胞活性は非運動群が低値を示し、自由・強制両運動群ともに有意に高値を示した。(Fig.3)

一方、非腫瘍接種群における NK 細胞活性では、腫瘍接種群の同様に非運動群のみが低い傾向が見られたが、有意差な差は認められなかった。(Fig.4)

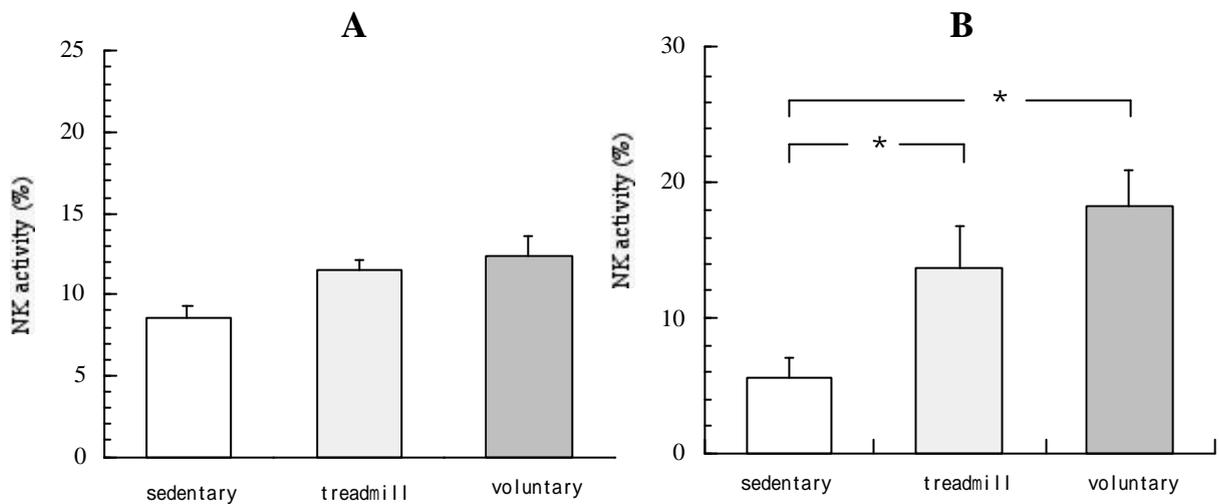


Fig.3 Effect of exercise on NK cell activity against SST-2 cells in SHR tumor inoculated.

After two weeks tumor cells inoculation, the in vitro killing activity of spleen NK cells against SST-2 cells was measured by means of 4 hours LDH release assay. Effector: target ratio was 100: 1. % of NK cell activity is expressed as mean \pm SD and statistically significant between each groups are represented as follows; *; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

運動の種類別に腫瘍細胞接種の有無によって NK 細胞活性を比較検討したところ、非運動群においては腫瘍の接種によって NK 細胞活性はやや低下の傾向が見られたが、逆に運動群では自由・強制にかかわらず、腫瘍接種による NK 細胞活性の上昇傾向が認められ、とくに自由運動群においては腫瘍接種群が非腫瘍接種群に対して有意差をもって高値を示した。より有意に低値 ($p < 0.05$) を示した。(Fig.4)

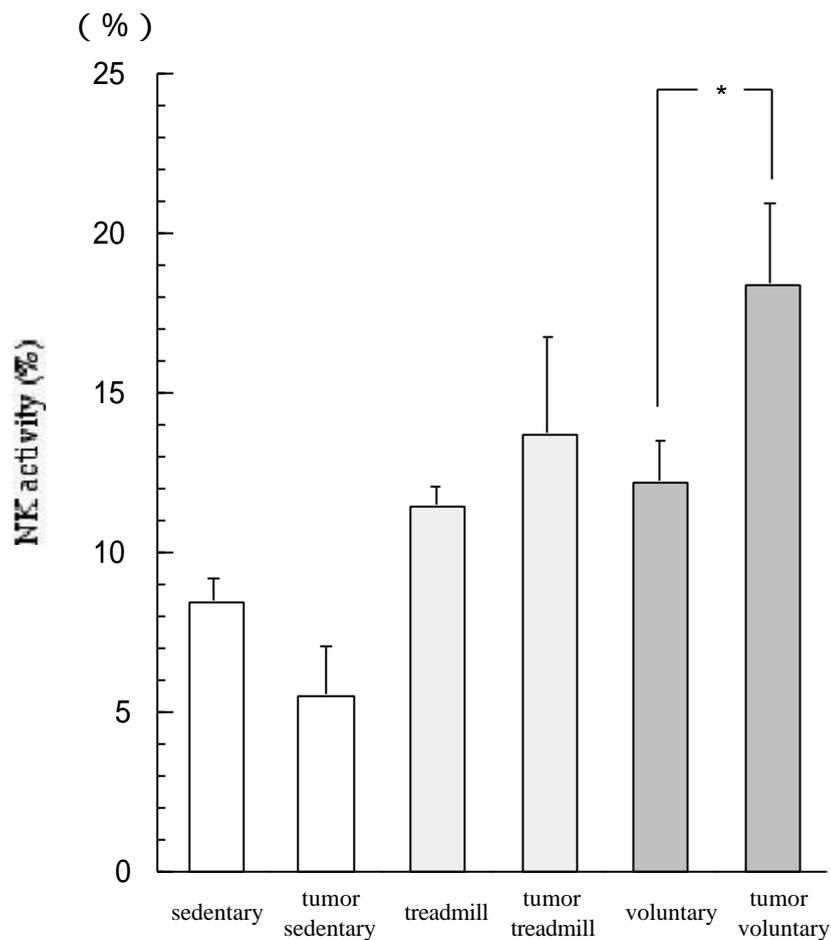


Fig.4 Effect of tumor growth on NK cell activity against SST-2 in SHR was different in kind of exercises.

% of NK cell activity is expressed as mean \pm SD and statistically significant between tumor inoculated group and without tumor group are represented as follows; † $p < 0.1$, * ; $p < 0.05$.

さらに腫瘍の大きさと NK 細胞活性との関係を群ごとに検討したところ、非運動群では腫瘍重量に大きな差は認められず、強制運動群では非運動群と比較して腫瘍重量が大の方向にややばらつきが現れ、自由運動群では腫瘍重量は小の方向にばらつきが生じた。(Fig.5)。

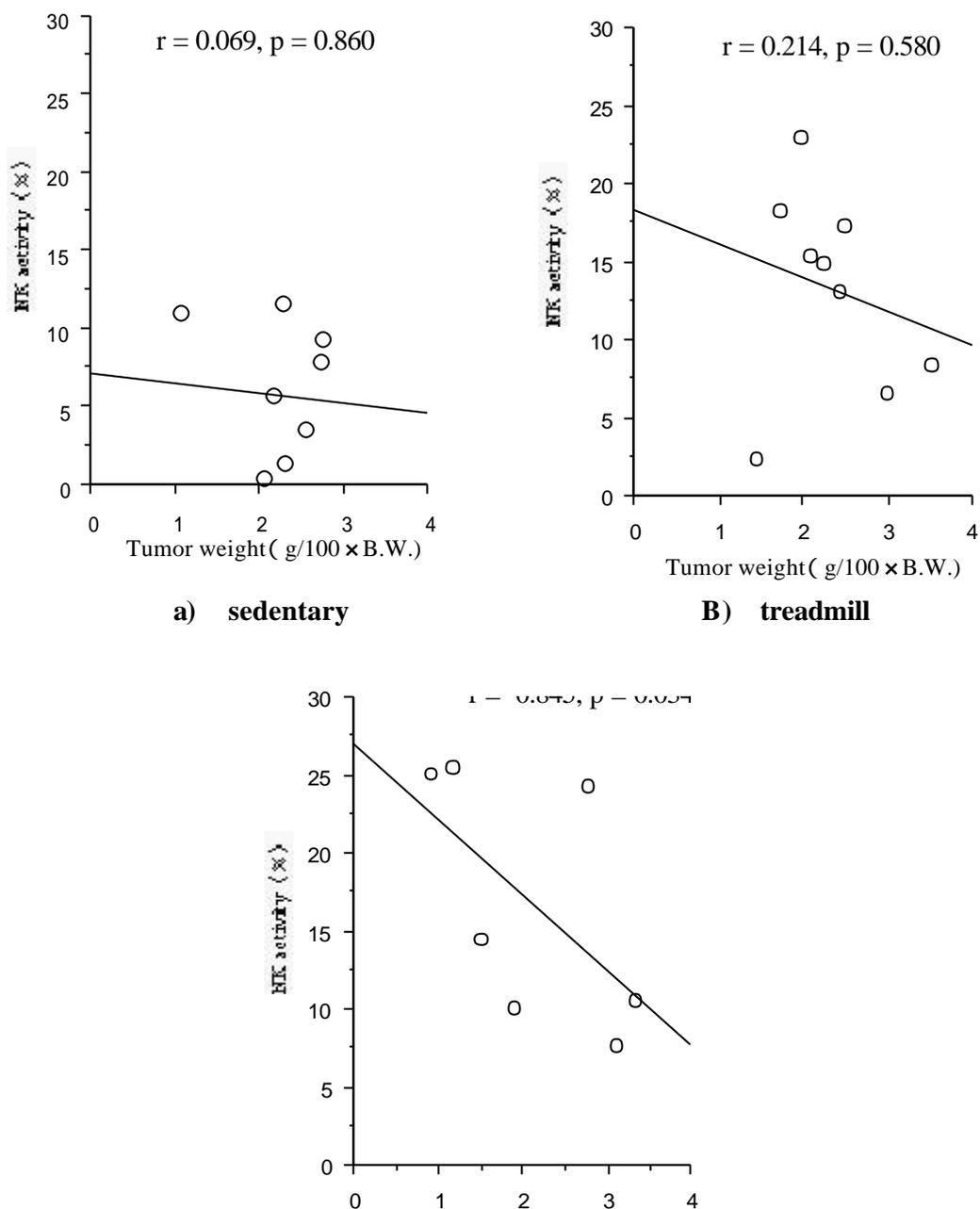


Fig. 5 Correlation between the tumor growth and NK activity against SST-2 in SHR inoculated SST-2 groups.

4-3-5 好中球機能

非刺激試験による好中球機能

非刺激試験においては運動条件にかかわらず、腫瘍接種群において高値の傾向であったが、ばらつきが大きく、各群間における有意な差は認められなかった (Fig.6)。

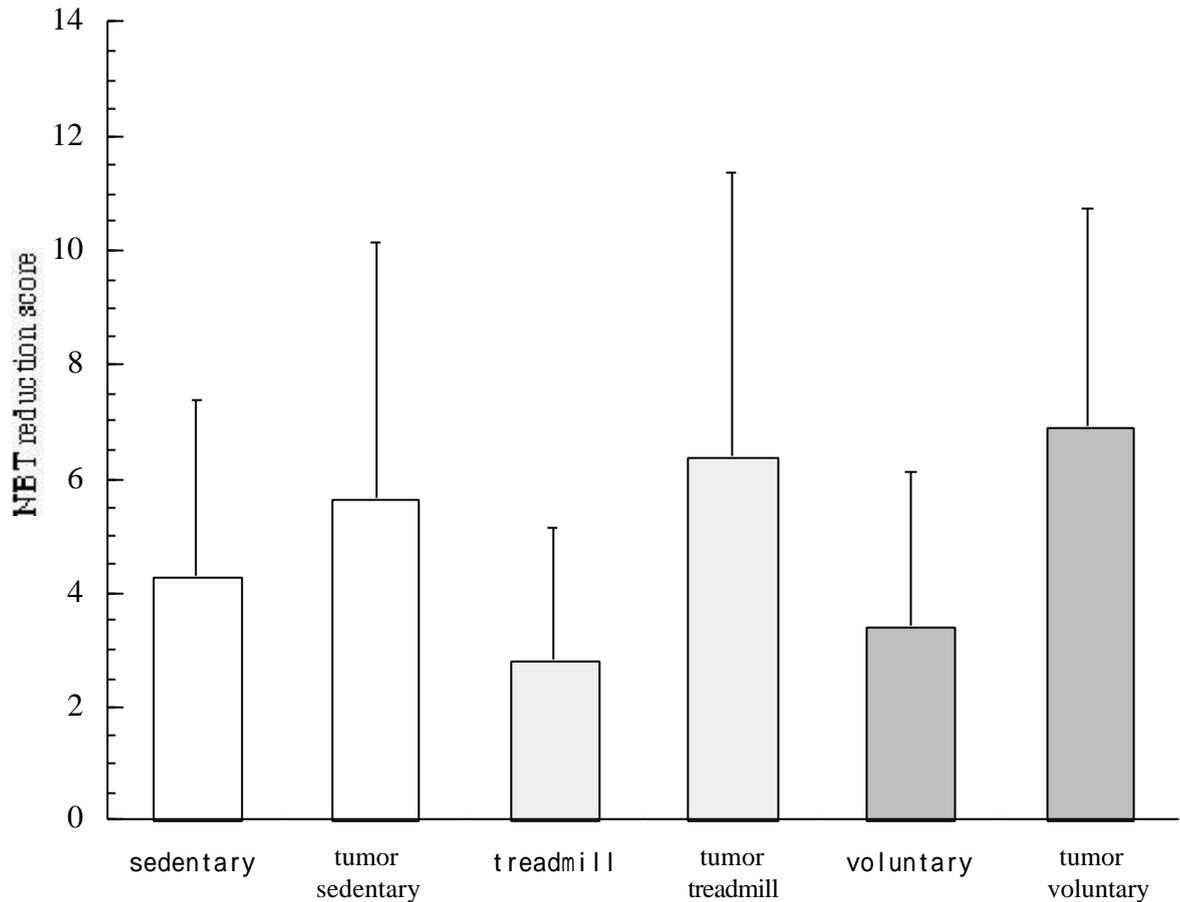


Fig.6 Exercise and inoculation of SST-2 tumor cells effect on O_2^- production of neutrophil in SHR by the rest test.

NBT was reduced by O_2^- that was generated from neutrophils, and it formed the blue-black formazan deposits in cytoplasm. NBT score as measured by the sum of the degree of formazan deposits was evaluated as O_2^- production ability of neutrophil in case of non- stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$).

刺激試験による好中球貪食能及び O_2^- 産生能

黄色ブドウ球菌を用いた刺激試験において、 O_2^- 産生能はどの群も腫瘍接種によって低下する傾向が認められた (Fig.7)。とくに、非運動群及び自由運動群では、非接種群に対して接種群が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。しかし、強制運動群の非接種群、接種群および各群間における有意な差は認められなかった。一方、ブドウ球菌の貪食数も O_2^- 産生能と同様に運動条件にかかわらず、非接種群に対して接種群が有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

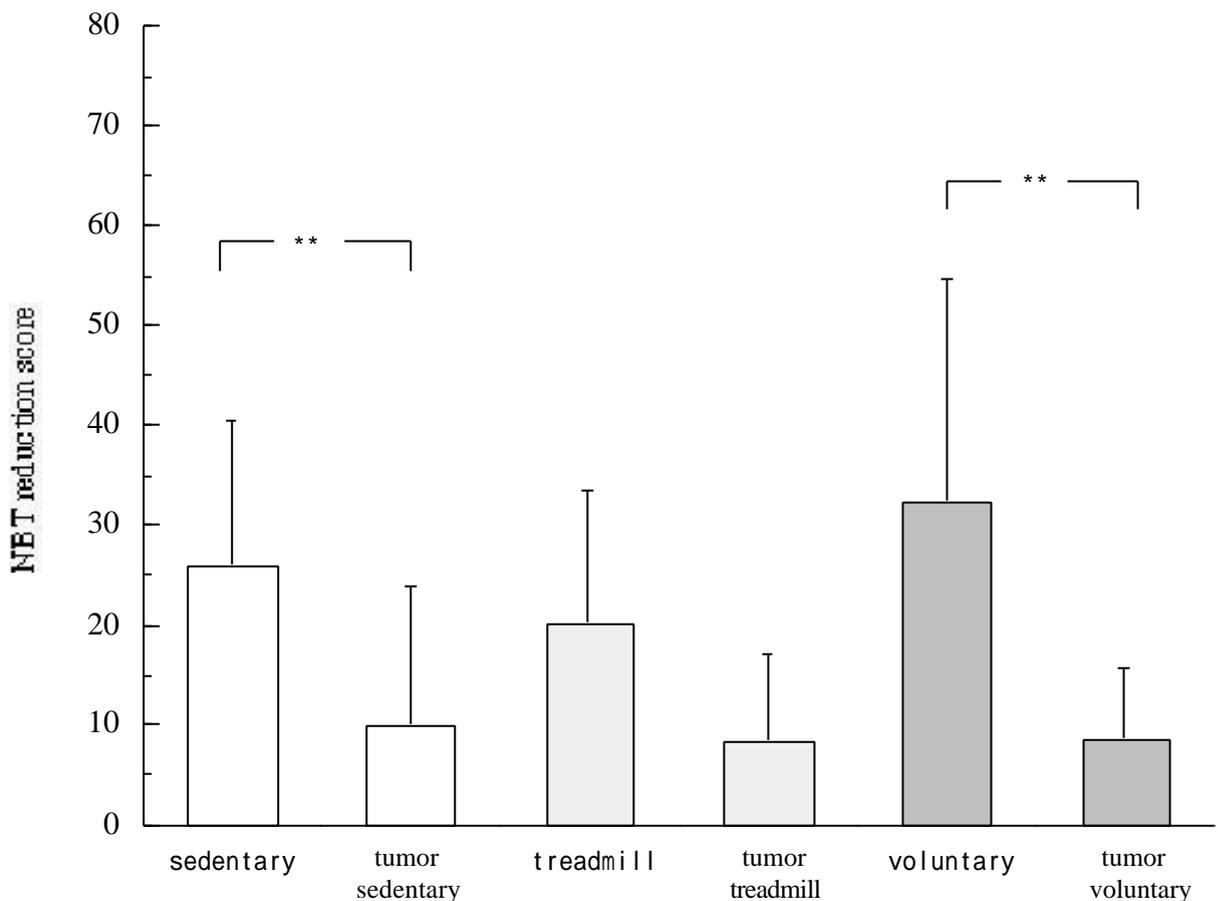


Fig.7 Exercise and inoculation of SST-2 tumor cells effect on O_2^- production of neutrophil in SHR by the stimulate test.

25 μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the *Staphylococcus aureus* 209P (2×10^9 cfu/ml) were mixed and reacted. NBT score as measured by the sum of the degree of formazan deposits was evaluated as O_2^- production ability of neutrophil in case of stimulation. The score was expressed as mean \pm SD. **and * Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; $p < 0.01$; *; $p < 0.05$).

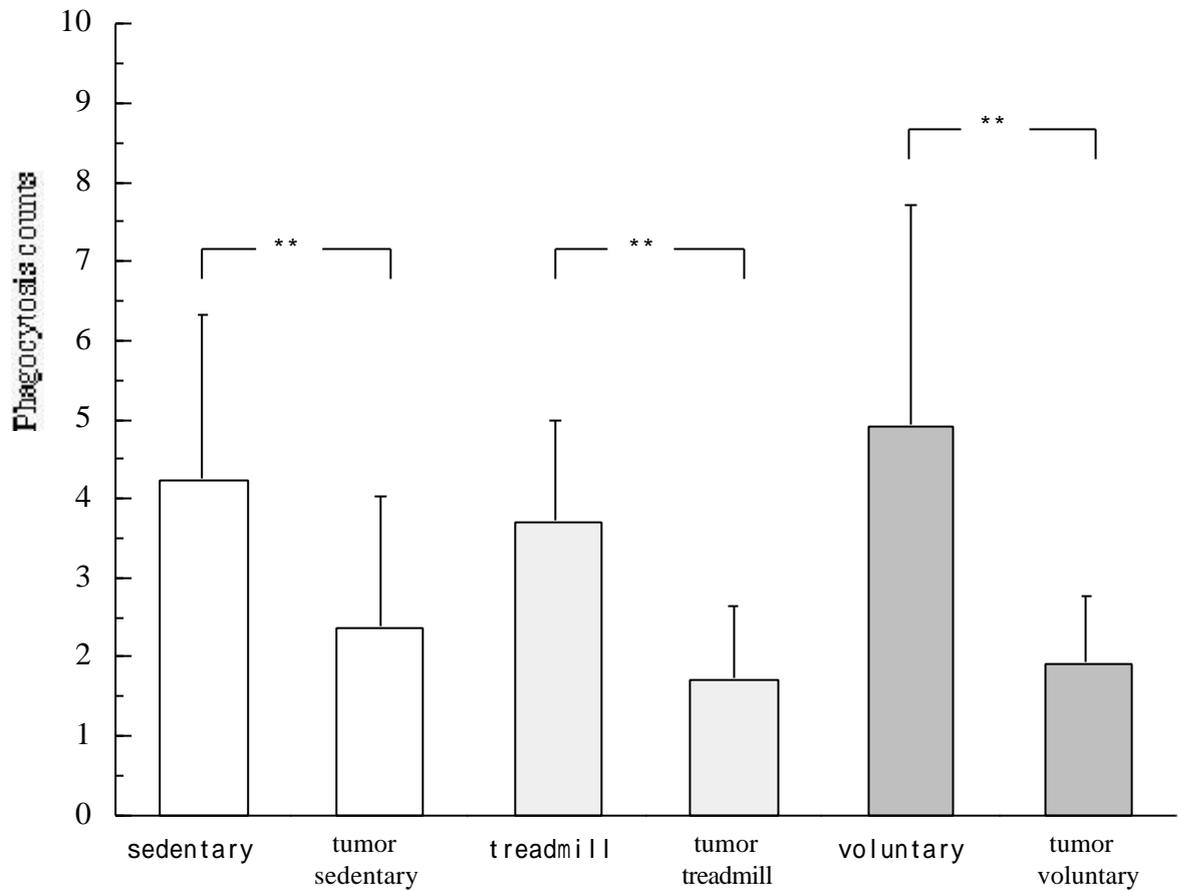


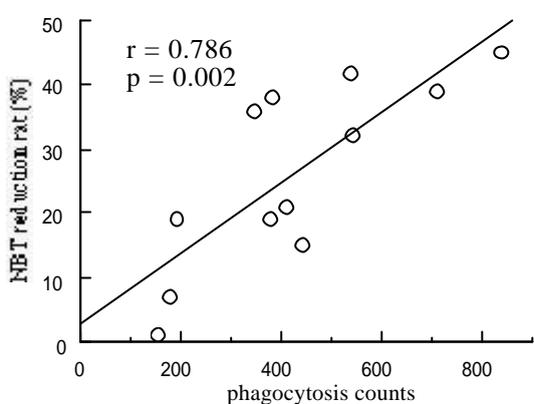
Fig.8 Exercise and inoculation of SST-2 tumor cells effect on phagocytosis of neutrophil in SHR by the stimulate test.

Staphylococcus aureus 209P (2×10^9 cfu/ml) was used as the foreign agent. 25 μ l of blood and an equal volume of NBT in PBS with the foreign agent were mixed and reacted. It counted foreign agents which were captured in a cell about 100 neutrophils and, it was evaluated as the ability of phagocytosis of neutrophil. The particles in a cell was expressed as mean \pm SD. **and * Indicates significant difference between groups (Fisher's post hoc test, **; $p < 0.01$ *; $p < 0.05$).

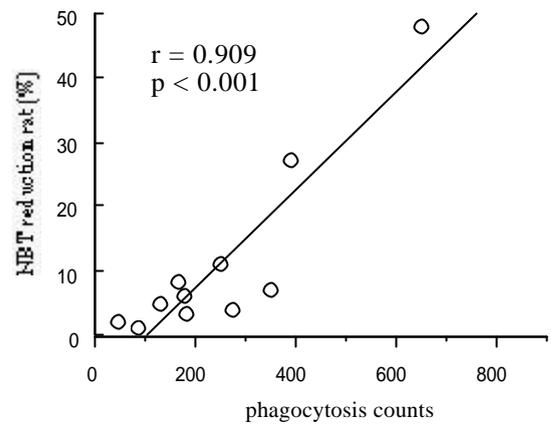
好中球貪食能及び O₂ 産生能の相関

好中球機能の効率性を評価するため相関関係を検討した (Fig.9)。

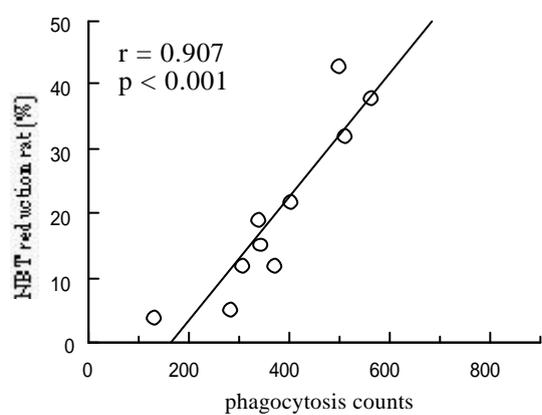
非運動群では腫瘍接種群 ($r=0.909, p<0.001$) 非接種群 ($r=0.786, p<0.002$) とともに正の相関関係が認められ、好中球機能が効率的に機能していることは示された。しかし、腫瘍接種群では低値での分散で、好中球機能は効率的ではあるが、その機能は腫瘍接種によって低下していることが示された。強制運動群でも同様に腫瘍接種群 ($r=0.907, p<0.001$) 非接種群 ($r=0.936, p<0.002$) とともに正の相関関係が認められたが、腫瘍接種群では低値での分散であった。自由運動群では、腫瘍非接種群では強い相関 ($r=0.972, p<0.001$) であったが、腫瘍接種群では相関が弱かった ($r=0.688, p<0.001$)。



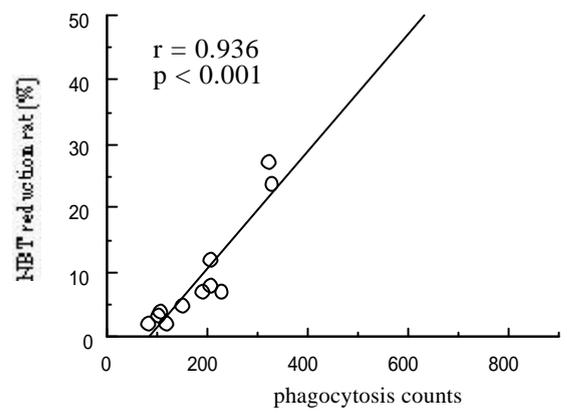
Sedentary



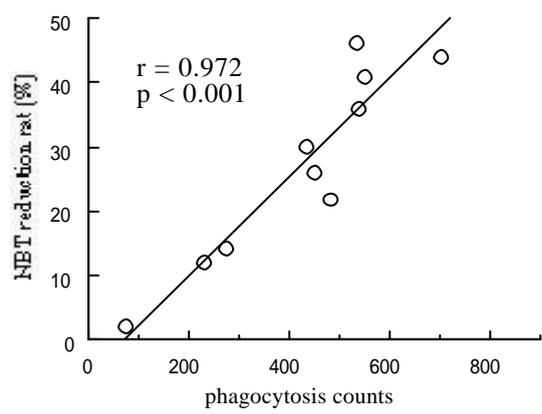
Tumor Sedentary



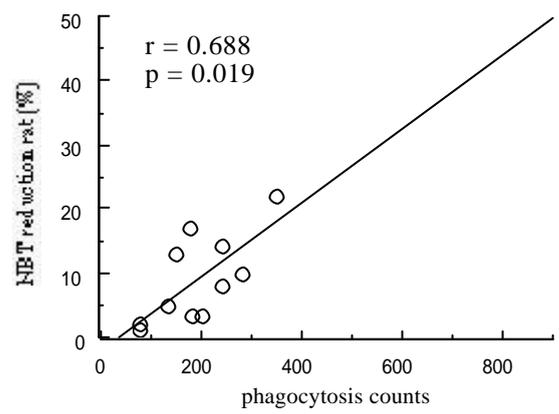
Treadmill



Tumor Treadmill



Voluntary



Tumor Voluntary

Fig. 9 Correlation between on O_2^- production and phagocytosis of the neutrophil function in SHR rats.

4-4 考察

腫瘍の増殖は自由運動において抑制されたが、強制運動群では抑制されなかった。運動と腫瘍の実験においては、運動において腫瘍が抑制されるという報告[文献]や腫瘍が促進されるとの報告(Welsch MA., Cohen LA. & Welsch CW., 1995)があり、一般的な見解が一致していない。特に強制運動においては、腫瘍が抑制されるとの報告が多い(Nemet D., Oh Y., Kim HS., Hill M. & Cooper DM., 2002, Westerlind KC., McCarty HL., Gibson KJ. & Strange R., 2002)。運動量、運動の種類、運動条件の違いがこれらの見解の相違を生じさせていると考えられる。我々は以前より強制運動は生体にとってストレスであり、自由運動のような効果は得られないと考えてきた。本結果はこのことを指示する結果であった。

腫瘍接種によって白血球数は増加したが、腫瘍による白血球の増加は知られており、このことは本研究の第2章の実験でも実証されている。本実験において特に注目すべきことは、運動を負荷することによって白血球の増加が非運動群に比べて抑制されたことである。この白血球増加は好中球の増加が主なので炎症反応と考えられ、運動により緩和されることが示唆された。運動によって好中球が増加することは報告されているが、ここでは運動を行った群で好中球増加が抑制されている。好中球の増加は発熱等生体に負荷を与えるため、増加が抑制されたことは運動による効果であると考えられる。特に自由運動群においては抗腫瘍免疫細胞であるNK細胞数や単球(マクロファージ)数が上昇した。従って、自由運動を行うことによって抗腫瘍を担う免疫細胞が増殖し、腫瘍接種を行った時に腫瘍増大の抑制に影響を及ぼした可能性が示唆された。

腫瘍の増大について、NK細胞活性に注目して検討を行ったところ、腫瘍が最も抑制された自由運動ではNK細胞活性の値が高値であった。また、運動によるNK細胞活性の上昇は多くの報告があり(Woods JA., Evans JK., Wolters BW., Ceddia MA. & McAuley E., 1998)、本実験でも自由運動によってNK細胞が活性化され、腫瘍増大の抑制が生じたものと考えられる。しかし、

全く腫瘍が抑制されなかった強制運動においても、自由運動と同様の NK 細胞活性の高値が認められている。このことは注目すべきポイントで、強制運動においても運動の効果があったことが予測される。しかし、その効果は NK 細胞を活性化するに止まり、自由運動のように腫瘍抑制効果にまでは至らなかったと考えられる。表には示さなかったが、非腫瘍接種群の NK 細胞活性においても Fig.3 と同様に両運動群での高値が認められており、このことから強制運動が NK 細胞活性を上昇させたことが考えられる。さらに、Fig.4 において腫瘍の増大が抑制された自由運動群では非接種群に対しても接種群で有意に NK 活性が高かったことが示されている。また、Fig.5 に示したように、腫瘍の大きさに比例して NK 細胞活性が変化した。従って、自由運動は抗腫瘍免疫機能である NK 細胞活性を高めるだけでなく、腫瘍に対して効果的な免疫応答を誘導する可能性が示唆された。NK 細胞活性と腫瘍に関する報告では、腫瘍の大きさ、もしくは転移度合いと NK 細胞活性の値について述べているものばかりであるが、本研究で運動条件と腫瘍接種を組み合わせることによって、「NK 細胞活性が高い=腫瘍が小さい」という単純な法則ではなく、NK 細胞活性の高め方によっては「NK 細胞活性が高い=腫瘍が小さい」が成立しないこともあるという新たな知見が得られた。この法則が成立しなかった条件が、本実験における強制運動であり、このとき、生体内で何が起こっていたかを明らかにすることで、運動による腫瘍抑制効果が明確になると考えられ、今後さらに研究を深める必要性があると考えている。

NBT 還元法による非刺激試験は、平常時の好中球 O_2 産生能を評価するものである。この時の O_2 産生が過剰であると、遺伝子を傷つけることによって発がんの可能性が高くなると考えられる。本実験においては有意差は認められないものの腫瘍接種群において非接種群に比べて高い傾向があり、このことは、生体内環境の悪化を示唆しているものである。一方刺激試験は、生体内に異物が侵入した時の好中球機能を評価したものであが、腫瘍接種時は O_2 産生能と貪食能ともに非接種群に対して高値を示し、腫瘍接種によって好中球機能が活性化したことを示

している。このことは実験 1 においても立証されているように、腫瘍接種によって他の免疫細胞が誘導され、それら免疫細胞の誘導が好中球活性化に繋がった可能性と、腫瘍は自然発生したのではなく、体外から移植されたものであり、異物としての認識から好中球活性化が生じた可能性の 2 つが考えられる。しかし、本実験では生体全体の防御機能を検討することが目的であり、好中球にクローズアップをしていないため、その詳細は今後の検討課題であり、この点が明らかになることで、今までは直接関係がないと思われた腫瘍にたいする好中球による防御機構が明確になるものと考えられる。

また、腫瘍が抑制されなかった強制運動群において好中球が最も有意義な機能を示した (Fig.9) ことも注目すべき結果である。強制運動群では、NK 細胞活性も高値を示し、有意義な好中球機能も認められたにもかかわらず、腫瘍抑制は起こらなかった。このことは数々の報告 (Moraska A., Deak T., Spencer RL., Roth D. & Fleshner M., 2000) にあるように強制運動によって免疫機能の向上は得られたが、腫瘍免疫として機能しなかったことを示している。このような報告は新たな知見である。運動量や方法が原因とも考えられるが、この点は今後の重要な検討課題である。

第 5 章 総括

5-1 SST-2 細胞および SHR を腫瘍実験に用いた意義

腫瘍増殖を観察するために、皮下に接種し、視覚によって観察が可能な SST-2 細胞を実験に用いたことは、ストレスや運動負荷中にも腫瘍の状況を観察することができ、この腫瘍細胞は腫瘍塊として生長するため、腫瘍重量の比較検討にも有利であった。さらに、現在の腫瘍に関する研究において、動物を用いて個体全体における免疫機能を検討する研究は非常に少なく、ほとんどが *in vitro* において研究なされているのみであるが、本実験結果から *in vivo* な実験の有用性が確認された。

SST-2 細胞を使用する上で、自家がん接種が目的であり、SHR を用いることとなった。自家がんを移植しても移植抵抗性の免疫機能は生じる。しかし、発がん物質による発がんを行わない腫瘍実験としては最も自然に近いものと考え、自家がん接種を行ったところ、腫瘍は拒絶されることなく生長したことから、本実験の有用性が示唆された。

また、SST-2 細胞については最少可移植細胞数が報告されており、これ以下での腫瘍細胞接種実験はほとんどない。この実験では腫瘍を発生させることが目的ではなく、腫瘍の発生過程を各細胞数ステージにおきかえて、腫瘍の生長過程を観察することが目的であったため、あえて最少可移植細胞数の腫瘍接種も行った。その結果、最少可移植細胞数での免疫機能の誘導が認められ、少数移植細胞数の段階、つまり、腫瘍初期段階と思われる段階が免疫機能にとって重要であることが示唆された。

今後の研究において、腫瘍初期段階における *in vivo* な実験を組み立てた上で、*in vitro* な検討を行うことが出来れば、腫瘍初期段階における各免疫機能のメカニズムの解明も不可能ではないと考えている。

5-2 各測定法について

NK 細胞活性の測定については、問題点が提示された。本研究においては、NK 細胞活性の SST-2 細胞に対する細胞障害性を検討することが目的であったため、ターゲット細胞に SST-2 細胞を用いたが、この時、リンパ球細胞群から NK 細胞を分離しなかったため、NK 細胞としての評価が難しくなってしまったことである。実際は、腫瘍細胞に対して機能するリンパ球はほとんど NK 細胞だと言って過言ではないが、リンパ球の中には Cytotoxic T cell のようにわずかなではあるものの NK 細胞以外の細胞傷害性免疫細胞が存在し、本実験法ではこれらも評価の中に含まれてしまう。

通常 NK 細胞活性のターゲット細胞としてもちいられる YAC-1 細胞は、NK 細胞のみを特異的に誘導することが定義されており、それ以外の細胞障害性免疫細胞を誘導する可能性は低いものとされているが、SST-2 細胞についてはその定義がなされていない。従って、NK 細胞としての評価ではなく細胞障害性の評価になってしまう問題点が残され、今後は NK 細胞を単離する技術を取得し、Cytotoxic T cell の細胞障害性測定も行ってさらに細かく分析することで、より確実な結果が得られると考えている。

しかし本実験において、YAC-1 細胞をターゲットとした測定との比較も行っており、SST-2 細胞の結果と同様の傾向を得ている。従って、現象を論じる上では本実験は十分有意義であったと考えられるが、さらに現象を解明する上では、詳細な検討が今後の課題である。

好中球機能の測定については、非常に有意義な結果を得られたと考えている。一般的な報告にあるように活性酸素と貪食能を単独で評価するのではなく、好中球全体の機能評価として、本研究室で行っている NBT 還元法の測定による相関関係の評価によって腫瘍と好中球の間に何らかの関係があることが示唆され、腫瘍接種実験においても有意義であることが示された。

5-3 ストレスが腫瘍接種に及ぼす影響

ストレスには有用なストレスと有害なストレスが存在することは序論においても述べたが、腫瘍に対しても同様にストレスが腫瘍促進と腫瘍抑制の両面から作用することが本実験において示された（第3章）。また、ストレスの種類においては、直接身体に刺激を与える物理的ストレスが、心理的ストレスよりも腫瘍生長を促進することが示された（第3章）。腫瘍接種が行われた生体に対してストレスを負荷することによって腫瘍生長は促進された一方で、ストレスを予め負荷し、腫瘍接種後にストレス負荷を行わなかった時、腫瘍生長は抑制された。このことから、ストレスそのものは腫瘍接種に対してプロモーションとして作用するが、ストレスの負荷時期をコントロールすることによって、腫瘍に対する抵抗性を獲得するのを助ける働きをも担うことが示唆された。本研究のように腫瘍生長抑制にストレスが有利に働く可能性が示唆されたことは新たな見解であると思われる。この研究によって、ストレスの種類や負荷時期を詳細に検討することで、どの程度のストレスが腫瘍にとって不利であり、どの程度が有利であるのかが明らかにできる可能性が見いだされた。さらに、本研究で測定した免疫機能に加えて、腫瘍に直接関与するサイトカイン等の測定をすることでより詳細が明らかとなるとも考えており、今後の検討課題である。

5-4 運動が腫瘍接種に及ぼす影響

本研究では自由運動の腫瘍抑制効果が示されたが、強制運動については免疫機能の向上は得られたものの、腫瘍に対する有利な効果は認められなかった。しかし強制運動群では、非運動群に対して有意な免疫機能の増加が認められたため、強制運動条件によっては腫瘍が抑制される可能性は否定できない。

運動には散歩のような軽いものから、運動選手のトレーニングのような強度のものまで存在する。さらに、自由運動の場合は個体自身がその個体にあった運動法、運動量を行うが、強制運動の場合は運動法、運動量が問題となる。本研究における強制運動は、様々な運動に関

する文献を検討したところ、負荷量も負荷期間も平均より若干少なめに行われた。

今後は、強制運動の期間や量を詳細に検討することが、運動における腫瘍抑制効果を指示する上で重要な課題であると考えられる。

5-5 ライフスタイルによるがん予防の可能性

本研究において、ストレスと運動を腫瘍接種ラットに負荷したところ、どちらの負荷においても腫瘍を抑制する群が生じた。ストレスについては予めストレスを負荷し、その後ストレスを除去した群に、そして運動では自由運動群について腫瘍抑制の可能性が示唆された。

ストレスが負荷されることによって腫瘍増大が促進されるが、それを除去すれば腫瘍抑制効果が生じる。つまり、例え腫瘍に悪影響であるストレスに暴露をされていても、除去することで腫瘍抑制されるのだから、ストレスに暴露されたときにはそれを除去するような生活環境をもてば、がんの予防になると考えられる。ストレスに長期間暴露されることはがんの予防面から非常に好ましくないが、少しのストレスに暴露され、そしてそのストレスから解放されるといった生活の循環は、生体内の免疫活性を刺激して、全くストレスのない条件下よりも抗がん機能が高まる可能性が本研究において示唆された。

一方で、運動負荷を行うときには、強制運動のような運動より、自由にその個体にあった運動法や運動量を負荷することで抗がん機能が高まる可能性が考えられた。しかし、強制運動も免疫機能に悪影響を与えるわけではなく、全く運動を行わないよりは、強制でも運動を行った方が免疫機能を高めることが示された。従って、健康状態にある生体が強制運動を行うことでがん発症の予防にはなるが、この場合自由運動のような抗がん機能の向上は認められないため、すでにがんを発症している可能性の高い個体に対しての強制運動によるがん抑制の効果は少ないものと考えられた。

参考文献

青樹元治 「がんはどのように悪化するのか」-がん治療へのアプローチ- 細胞工学 Vol.17 No4

1998

- 朝永万佐男 .好中球のNitroblue-Tetrazolium(NBT)還元能に関する研究 . , 組織化学的半定量化
の試み .臨床血液 17 (1976) 1266-1275 .
- Benschop RJ., Nieuwenhuis EE., Tromp EA., Godaert GL., Ballieux RE. and Doornen LJ., Effects of
beta-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress.
Circulation 1994 Feb;89(2):762-9
- 朴信正, Communication Box 法によるラットの急性実験潰瘍, 日本薬理学雑誌 83 (1984) 467-478.
- Doll R :An Epidemiological perspective of the biology of cancer. Cancer Reserch 35, 3573-3583, 1978
- Doll R :Starategy for detection of cancer hazard to man. Nature 265, 589-596, 1977
- Gauche AS., Riondel J., Fernandes-Carlos T., Jacrot M., Guiraud P., Coudray C., Calop J. and Favier A.,
Effect of oestrone on the natural killer (NK) cell activity, antioxidant status and tumour growth
in athymic mice xenografted with human tumours. Anticancer Res 1996 Mar-Apr;16(2):853-9
- Goodenow RS., Vogel JM. and Links RL., Histocompatibility antigens on murinetumors, Science 230
(1985) 777-783.
- Hasegawa H. and Saiki I. Psychosocial Stress Augments Tumor Development through beta-Adrenergic
Activation in Mice. Jpn J Cancer Res 2002 Jul;93(7):729-35
- Herberman R B, Nunn M E, Lavrin D H, et. al Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells
against syngeneic and allogeneic tumors. , Distribution of reactivity and specificity. Int. J.
Cancer, 16, 216, 1975
- Herberman R.B., NK cells and ather natural effector cells, Academic press, New york (1982)
- Hoglund P., Ohlen C., Carbone E., Franksson L., Ljunggren H.G., Latour A., Koller B. and Kaarre K.,
Recognition β_2 -microglobulin⁰negatibe (β_2m^-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but
not from β_2m^- mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 10332-10336.
- Hosokawa N. and Kobayashi H., (1982) Allogeneic cell immunity. "Tumor Markers", in: H. Busch

and L.C. Yeoman (Eds.) *Methods in Cancer Res.* 20, Academic Press, New York, 1982 pp. 85-106.

稲恭宏、町田和彦、鈴木克彦、塚本和正. 習慣的な自発運動が炎症負荷ラットの健康指標に及ぼす影響. *日本衛生学会誌.* (1994) Feb 48(6) 1077-89.

Jurkowski M, Trojnar W., Borman A., Ciepielewski Z, Siemion D. and Tokarski J, Peripheral blood natural killer cell cytotoxicity after damage to the limbic system in the rat. *Brain Behav Immun* 2001 Mar;15(1):93-113

Karre K., Ljunggren H., Piontek G. and Kiessling R., Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy, *Nature* 319 (1986) 675-678.

Kawarabayasgu N., Seki S., Jatsuse K., Ohkawa T., Koike Y., Aihara T., Habu Y., Nakagawa R., Ami K., Hiraide H. and Mochizuki H., Decrease of CD 56 (+) T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 32 (2000) 962-969.

小林 博 *がんの予防 新版 岩波新書* 1999

Konjevic G., Jurisic V., Spuzic I., Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity, *J. Immunol. Methods* (1997) 199-200.

Korzeniewski C., Callewaert P.M., An enzyme-release assay for natural cytotoxicity, *J. Immunol. Methods* 64 (1983) 313-320.

Kuriyama T., Machida K. and Suzuki K., Importance of correlations between phagocytic activity and superoxide production of neutrophils under conditions of voluntary exercise and stress. *J Clin Lab Anal.* (1996) 10(6) 458-464.

黒木登志夫 編集 *図説 発癌と癌細胞*」メジカルビュー社 1985

黒木登志夫 *がん細胞の誕生*」朝日選書 1989

松岡隆夫. 高血圧自然発症ラット(SHR)の加齢に伴う免疫機能変動と抗腫瘍抵抗性. 北海道医学雑誌 64 (1989) 551-557.

Matsuoka T., Takeichi N. and Kobayashi H., Age-related changes of natural antitumor resistance in spontaneously hypertensive rats with T-cell depression, *Cancer Res.* 47 (1987) 3410-3413.

Moraska A., Deak T., Spencer RL., Roth D. and Fleshner M., Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2000) 279(4) R1321-1329.

森本兼曩 「ライフスタイルと健康」 医学書院 1991

長与健夫、富永祐民編 「がん・日本と世界」 篠原出版 1980

Namieno T., Takeichi N., Hata Y., Uchino J., and Kobayashi H., Kinetic changes of liver regeneration and hepatocellular carcinoma cells after partial hepatectomy in rats. *Gastroenterol. Jpn.* 26-1 (1991) 29-36.

Nishio N., Oishi K. and Machida K. : SST-2 tumor inoculation is a useful model for studying the anti-tumor immune response in SHR rats. 2003 *Environmental Health and Preventive Medicine* 8 (1).

小川暢也、桑原寛, *精神医* 6 (1963), 651.

Oishi K., Nishio N., Konishi K., Shimokawa M., Okuda T., Kuriyama T. and Machida K. : Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats 2002 *Stress* Vol. not known. (in print)

Okamoto K. and Aoki K., Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27 (1963) 282-293.

Salman H., Bergman M, Weizman A, Bessler H, Weiss J, Straussberg R and Djaldetti M., Effect of diazepam on the immune response of rats exposed to acute and chronic swim stress. *Biomed Pharmacother* 2000 Jul; 54(6):311-5

佐藤春郎 「がん細胞の営み」 朝日選書 1987

佐藤昇志、菊地浩吉 :自家腫瘍に対する CTLs の誘導と解析, 日本臨床免疫学会誌 14 (1991)
533-536

Stefanski V, and Engler H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats.
Physiol Behav 1998 Jul;64(5):733-41

鈴木克彦, 町田和彦, 関根美枝, 村山留美子 .NBT 還元試験による食細胞活性酸素産生能の分
析 評価法及びその応用性 .体力・栄養免疫学雑誌 3 (1993) 31-39 .

Takeichi N., Koga Y., Fujii T. and Kobayashi H., Restoration of Tcell function and induction of
antitumor immune response in Tcell-depressed spontaneously hypertensive rats by treatment
with thymosin fraction 5. Cancer Res 1985 Feb;45(2):487-91

Takeichi N., Li X., Hamada J., and Kobayashi H., Age-related decrease of pulmonary metastasis of rat
mammary carcinoma by activated natural resistance, Cancer Immunol. Immunother. 31-2 (1990) 81-85.

谷口直之、杉山治夫、松浦成昭編 「がんはなぜできるのか」中山書店 1996

徳永徹 「がんと生体防御」 東京大学出版 1994

Tonaka K., Yoshikawa T., Bieberich C. and Jay G., Role of the major histocompatibility complex class I
antigens in tumor growth and metastasis, Annu. Rev. Immunol. 6 (1988) 359-380.

Traversari C., Bruggen van der P., Luescher I.F., Lurquin C., Chomez P., A. Van Pel, Plaen De E., A.
Amar-Costesec, T. Boon, A nonpeptid encoded by human gene MAGE-1 is recognized on
HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E, J. Exp. Med 176
(1992) 1453-1457.

塚本和正、町田和彦 :マウスの過密 孤立飼育が白血球及びその他の血液成分に及ぼす影響 ヒ
ーマンサイエンスリサーチ Vol.3 (1994) 143-145.

塚本和正、有倉恵子、鈴木克彦、町田和彦 :ストレスがラット生体諸機能に及ぼす影響-身体的スト
レスと心理的ストレス 体力・栄養免疫学雑誌 Vol.6 (1996) No.2.

- Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W. and Tuchscherer A, Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002 Jul;86(3-4):195-203
- Turochko A.D., Nagarkatti P.S. and Elgert K.D., Tumor-induced alteration in macrophage accessory cell activity on autoreactive T cells, *Cancer Immunol. Immunother.* 30 (1989) 170-176.
- Welsh Jr. R.M. and Kiessling R.W., Natural killer cell response to lymphocytic choriomeningitis virus in beige mice, *Scand. J. Immunol.* 11 (1980) 363-367.
- Wright S.C. and Bonavida B., Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. IV. Interferon-induced inhibition of NK target cell susceptibility to lysis is due to a defect in their ability to stimulate release of natural killer cytotoxic factors (NKCF), *J. Immunol.* 130 (1983) 2965-2968
- Wu WJ. and Pruett SB., Ethanol decreases host resistance to pulmonary metastases in a mouse model: role of natural killer cells and the ethanol-induced stress response. *Int J Cancer* 1999 Sep 9;82(6):886-92
- 膳所憲二、斉藤貴生、小林迪. 食道癌患者における Natural killer (NK) 活性低下の要因と対策. *日本外科学会雑誌.* 90 (1989) 22-33.