

# マウス移植腫瘍の増殖, 転移および免疫能に及ぼす 施灸刺激の影響についての研究

宇都宮由美子

明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学

要旨 : C57BL/6マウスの右足趾部に Lewis 肺癌細胞に移植し, 施灸開始後15日目の腫瘍重量と肺癌転移結節数を観察した。さらにマウスの免疫能への影響を見るために脾臓および胸腺の重量, リンパ球芽球化反応, NK細胞活性および抗体産生能を観察した。施灸刺激は, 両側腎俞穴相当部位に重さ0.6mgの艾を連日, 隔日, 毎4日のタイミングで施灸した。その結果, ①施灸刺激は移植腫瘍細胞数の少ない場合には腫瘍増殖に対し促進的に, 多い場合は抑制的に作用すること, ②連日施灸は腫瘍増殖を促進させ, 隔日または毎4日施灸は抑制する可能性のあること, ③施灸刺激によりリンパ球芽球化反応, NK活性は低下するが, 抗体産生細胞数(PFC)は増加する傾向が観察された。

## I 緒 言

灸治療の起源は鍼よりも古いと言われており生体の恒常性の維持を調整し, 自然治癒力を高める作用があると考えられている。現在でも各種疾患に対する治療または予防の目的で用いられており健康灸あるいは養生灸として広く普及している。近年, 灸治療の臨床的効果の検討と共に基礎的な研究も数多く行なわれ, 施灸が宿主の免疫応答を活性化させることなども報告されているが<sup>1)</sup>, そのメカニズムについては十分明らかにされていない。

また, 須藤ら<sup>2)</sup>, 野間ら<sup>3)</sup>, Sternfeldら<sup>4)</sup>, そして篠原ら<sup>5)</sup>は灸刺激によりマウス移植腫瘍の増殖が抑制されることを報告している。このような移植腫瘍の増殖抑制は, 施灸の物理的な非特異的的刺激による宿主免疫能の賦活を介したものと考えられているが, これらのことが事実であるならば, 灸刺激は腫瘍の免疫療法の一部を担う可能性

が示唆され非常に興味深い。また, 前述の篠原らは灸刺激により腫瘍増殖と共にリンパ節転移が抑制されたとしているが, その際, 灸の刺激量や刺激間隔等の条件も重要な因子であったと報告している。

そこで著者は, 血行性転移を起しやすいとされる Lewis 肺癌細胞を用い, 種々の間隔で施灸した場合における原病巣の増殖抑制効果と共に, 血行性転移形成に対する影響を観察した。さらにこれらのマウスの免疫能への影響をみるために PHA, Con-A などのマイトジェンに対するリンパ球芽球化反応, NK細胞活性, 抗体産生能などの免疫学的指標を用いて検討を行った。

## II 実験材料および方法

### 1. 実験動物および実験腫瘍

4週～5週令の C57BL/6 雄性マウス (体重約 15～18g, 日本エスエルシー-K.K) を用い, SPF

Key Words : Lewis 肺癌細胞 Lewis Lung Carcinoma, 施灸刺激 Stimulation By Moxibustion, 芽球化反応 Lymphocyte Blastogenic Activities, NK細胞活性 Natural Killer (NK) Activities, 抗体産生能 Plaque-Forming Cell (PFC) Response

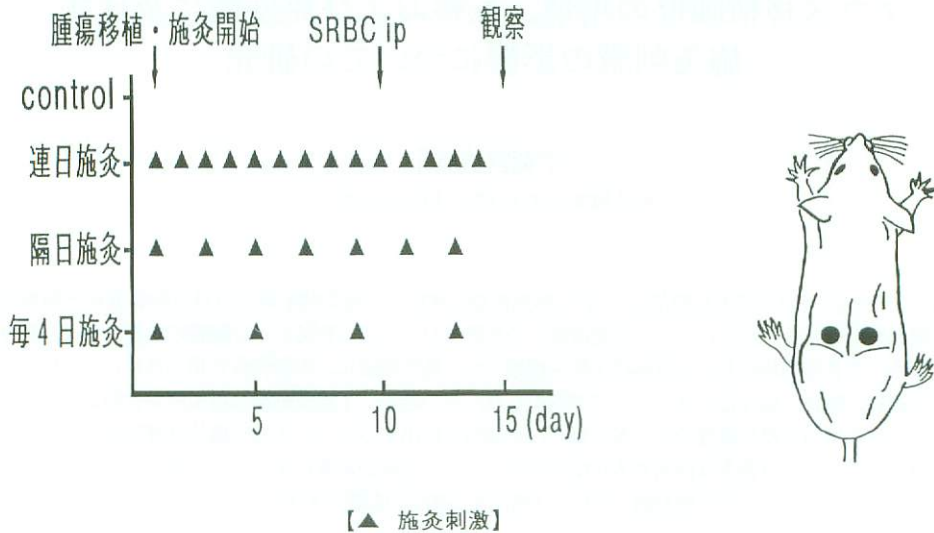


Fig.1 施灸スケジュールと施灸部位

条件下に飼育したものを使用した。また実験腫瘍は血行性肺転移形成能の高い Lewis 肺癌（森下ルセル K.K 研究所から分与）を用いた。腫瘍は trocar を用いて腫瘍細片をマウス右腰部に継代移植したのものを使用した。

## 2. 実験方法

実験群は施灸スケジュールにより、連日施灸群、隔日施灸群、毎4日施灸群、対照群の4群（各群6匹）とした（Fig. 1）。マウス右足趾部に Lewis 肺癌細胞を  $5 \times 10^4$  cells/0.05ml あるいは  $5 \times 10^5$  cells/0.05ml 移植し、各々を便宜上、small tumor 群および large tumor 群と命名した。腫瘍移植直後から、それぞれの施灸スケジュールに従って、両側腎俞穴相当部位に半米粒大艾（0.6mg）を各1壮ずつ施灸した。14日間の施灸スケジュールに従った治療を行った後、15日目にマウスを処死し、以下の検討を行った。

## 3. 検討項目

### (1) 腫瘍重量および胸腺・脾臓重量の測定

腫瘍移植後15日目に、マウスを cervical dislocation で処死し、腫瘍移植右下肢を大腿中央部で切断し、腫瘍を含めた右下肢重量を、FX-300 電子

天秤（A & D）にて計測した。次にマウスの死体を70%エタノールに浸し、脾臓はクリーンベンチ内で無菌的に摘出して、tissue culture dish（Corning）に入れ、電子天秤でその重量を計測した。胸腺はそのまま摘出して重量を計測した。

### (2) 肺転移結節数の測定

Waxler らの方法<sup>6)</sup>に準じ、腫瘍移植15日目に処死したマウスを仰向けにし、胸部を正中切開した。気管と胸腔を露出し、頸部直下部で気管を切断し、その切断端より鈍針を挿入し、これより黒インク約0.5~1mlを気管内に注入して肺を膨張させた。鈍針を気管より抜去後すばやく気管を絹糸で結紮し、インクがもれないようにした。膨張した肺を胸腔内から取出し、水の入ったビーカーに入れて肺の余分なインクを取り除いた。その後、Feketes solution（70%エタノール100ml、ホルマリン10ml、酢酸5ml）で固定した。24時間後に白く漂白された腫瘍結節の個数を肉眼的に計測した。

### (3) 脾細胞浮遊液の作製

(1)で無菌的に摘出されたマウス脾臓を RPMI 1640 培養液中で micro slide grass（Iwaki）を用

いてすり潰し, wire meshで濾過した。濾液を遠心分離(1000r.p.m., 5min.)し, 上清を取り除いた後, Tris-NH<sub>4</sub>Cl緩衝液(PH7.65)を加えて遠心分離(1000r.p.m., 5min)して赤血球を溶血除去した。さらにRPMI 1640培養液(和光純薬)で3回洗浄した。次に, 脾細胞数が $1 \times 10^7$  cells/ml (PFC測定の場合は $1 \times 10^5$  cells/ml)になるようRPMI 1640培養液(芽球化反応およびNK細胞活性の測定は非動化10%FCS加RPMI 1640培養液)に浮遊させ細胞数を調整した。

#### (4) 脾リンパ球芽球化反応の測定

96穴平底マイクロプレート(Nunc)に1wellあたり脾リンパ球 $5 \times 10^5$  cells/10%FCS加RPMI 1640培養液200  $\mu$ lを分注し, 各wellに予備実験で至適濃度を確認したPHA-P(Difco) 0.1  $\mu$ g/50  $\mu$ lあるいはCon-A 0.1  $\mu$ g/20  $\mu$ lを添加後, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で72時間培養した。また対照としてPHA, Con-Aを添加しないWellを作製した。培養終了24時間前に[methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine(Amersham) 0.5  $\mu$ ci/wellを添加し, 培養終了後, セルハーベスター(Skatron)にて細胞をフィルターマット(Skatron)に回収し, シンチレーターカクテル(シンチゾールEX-H, 和光純薬)を添加後, <sup>3</sup>H-thymidineのとりこみを液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-3500)で測定した。各検体をtriplicateとし, 平均cpmを算出した。

#### (5) NK細胞活性の測定

NK細胞活性は, 菊地らの<sup>61</sup>Cr標識細胞障害試験を用いて測定した<sup>7)</sup>。target細胞にはBalb/c由来RL male 1細胞を用いた。 $1 \times 10^7$  cells/ml以上のRL male 1細胞を遠心分離(1000r.p.m., 5min.)して, その上清を除いた沈渣にクロム酸ナトリウム(Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, Amersham)を0.1ml加え, 37°Cの恒温槽にて振とうしながら60分間標識した。標識終了後, 細胞を3回洗浄した。96穴平底マイクロプレート(Nunc)にeffector cell: target cellの比率が25:1となるように1wellあたり $5 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ lの脾細胞と $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ lのRL male 1細胞を混合した。

maximum releaseにはtarget cell  $2 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ lに2%ドデシル硫酸ナトリウム(和光純薬)100  $\mu$ lを, spontaneous releaseには10%FCS加RPMI 1640培養液100  $\mu$ lを加え, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で6時間の培養を行った。培養終了後, 遠心分離(1500r.p.m., 10min.)し, 各Wellから上清をマイクロピペットで100  $\mu$ lずつチューブ(Falcon)にとり, target cellから浮遊した<sup>51</sup>Crを $\gamma$ カウンター(Aloka ARC-605)で測定した。NK細胞活性(%)は以下の式より計算した。

$$\frac{(\text{experimental release} - \text{spontaneous release})}{(\text{maximum release} - \text{spontaneous release})} \times 100$$

(6) PFCの測定

羊赤血球(SRBC)に対するマウス脾細胞のPlaque forming cell (PFC)形成能の測定を行った。腫瘍移植後10日目に $2.5 \times 10^3$  cells/mlのSRBC(日研生物医学)0.2mlをマウスの腹腔内に投与した。その5日後にCunninghamの方法<sup>8)</sup>に準じ, (3)で作製した $1 \times 10^6$  cells/mlの脾細胞浮遊液から $4 \times 10^5$  cells/0.4mlとったものに50%SRBC 0.05mlと3倍希釈したモルモット補体(極東製薬)を混合し, その0.1mlをCunningham Chamber(Takahashi giken)にパラフィン封入して37°Cの条件下で60分間の静置後, Chamber内の抗体産生細胞(Plaque forming cell)数を肉眼的にカウントし, これを脾細胞 $10^6$ 個あたりの抗体産生細胞数に換算して表現した。

#### 4. 統計

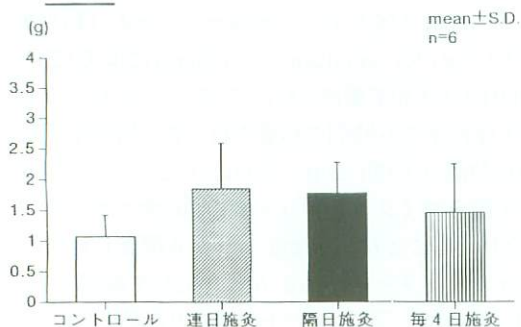
すべての統計処理には統計ソフトStat View 4.02 (Abacus Concepts, Inc.) 多重比較のBonferroni法を用いた。

### III. 結果

#### (1) 腫瘍増殖に及ぼす施灸刺激の影響

Lewis肺癌腫瘍の移植は $5 \times 10^4$ 個と $5 \times 10^5$ 個の2通り, すなわち, 移植細胞数の少ない小さな腫瘍(small tumor群)と移植細胞数のやや多い大きな腫瘍(large tumor群)に対する施灸刺激の影響を見ることとし, 各2回ずつの実験結果を示した。Fig.2はsmall tumor群の腫瘍重量

## Exp. 1



## Exp. 2

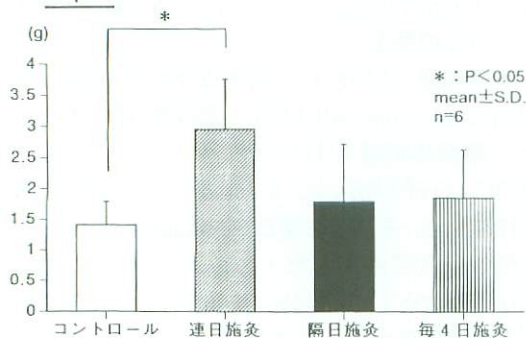


Fig. 2 small tumor 群の腫瘍重量

の平均値と標準偏差を示したものである。Exp. 1ではコントロール群 ( $1.07 \pm 0.35$  g) と比較して連日施灸群 ( $1.85 \pm 0.74$  g) では腫瘍の増殖傾向を示し、Exp. 2においても、コントロール群 ( $1.41 \pm 0.38$  g) と比較して、連日施灸群 ( $2.96 \pm 0.80$  g) で有意 ( $P < 0.05$ ) な腫瘍増殖が認められた。また、Exp. 1 及び Exp. 2 において、隔日施灸群および毎4日施灸群でも連日施灸群のように有意差はないが、コントロール群に比べて、腫瘍の増殖傾向が認められた。Photo. 1 は small tumor 群のExp. 2 の切除された担癌足である。連日施灸群で明らかな腫瘍の増殖が認められた ( $P < 0.05$ )。

一方、large tumor 群 (Fig. 3) のExp. 1では、コントロール群 ( $4.64 \pm 0.29$  g) と比較して毎4日施灸群 ( $3.07 \pm 0.53$  g) で有意 ( $P < 0.01$ ) な腫瘍の増殖抑制が認められた。また連日施灸群

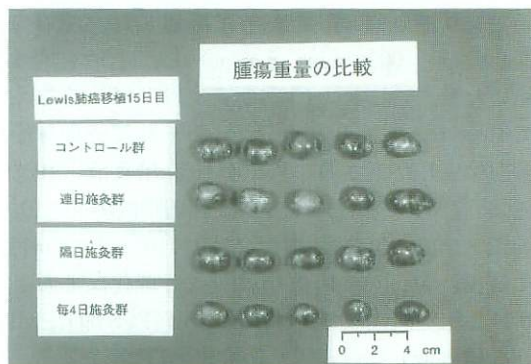
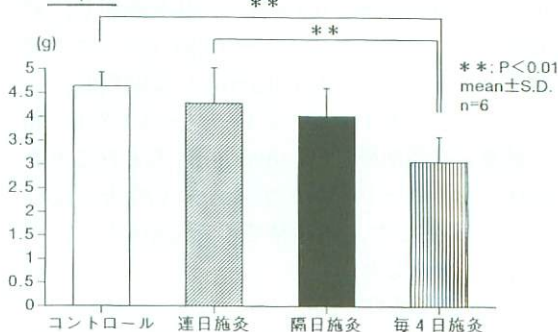


Photo. 1 small tumor 群の切除された担癌足

( $4.29 \pm 0.74$  g) と毎4日施灸群 ( $3.07 \pm 0.53$  g) を比較しても毎4日施灸群で有意 ( $P < 0.01$ ) な腫瘍増殖抑制が認められた。また、Exp. 2においてもコントロール群 ( $3.83 \pm 0.72$  g) と比較して毎4日施灸群 ( $3.58 \pm 0.37$  g) でやはりやや増

## Exp. 1



## Exp. 2

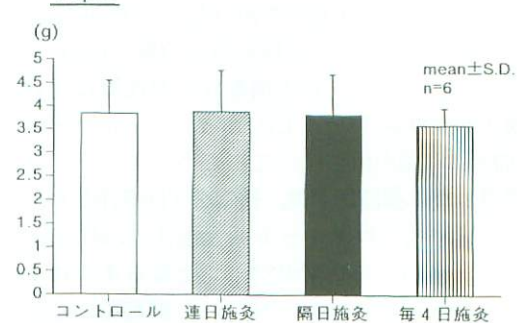


Fig. 3 large tumor 群の腫瘍重量

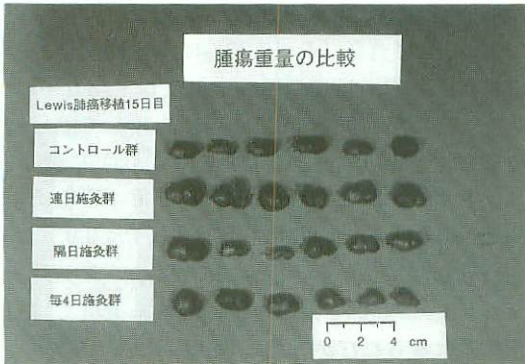


Photo. 2 large tumor 群の切除された担癌足

殖抑制が認められたが、有意差は認められなかった。また、large tumor 群では、前述の small tumor 群のように連日施灸群で腫瘍増殖が促進されることはなかった。Photo. 2 は large tumor 群 Exp. 1 の切除された担癌足である。コントロール群と比較して各施灸群で腫瘍重量は減少したが、特に毎4日施灸群では著しい減少が認められた ( $P < 0.01$ )。

以上、Small tumor 群では施灸により腫瘍増

殖が促進される傾向にあり、それは連日施灸群で最も顕著であった。一方、large tumor 群では施灸により腫瘍増殖が抑制される傾向があり、それは毎4日施灸群で最も明らかであった。すなわち、移植腫瘍細胞数および、刺激頻度により、腫瘍増殖に対する施灸刺激の影響に差異を生ずることがわかった。

(2) 血行性転移に及ぼす施灸刺激の影響

Table. 1 は移植15日目の肺転移結節数の平均値と標準偏差を示したものである。small tumor 群の肺転移結節数は Exp. 1 でコントロール群 ( $0.33 \pm 0.82$ 個) と比較して連日施灸群 ( $0.50 \pm 1.22$ 個) ではわずかに増加し、毎4日施灸群では全く転移結節を観察できなかった。Exp. 2 においてはコントロール群および毎4日施灸群では全く転移を認められなかったが、連日施灸群、隔日施灸群共に、平均0.5個の転移結節を認めた。

一方、large tumor 群の Exp. 1 ではコントロール群 ( $0.50 \pm 0.84$ 個) と比較して連日施灸群 ( $3.83 \pm 7.22$ 個) では明らかに転移結節が増加した。しかし、コントロール群と隔日施灸群 ( $0.33 \pm 0.82$

Table. 1 small tumor 群, large tumor 群の肺転移結節数

(a) Small tumor

		mean $\pm$ S.D. (n=6)			
	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸	
Exp. 1	$0.33 \pm 0.82$	$0.50 \pm 1.22$	$0.33 \pm 0.52$	(—)	
Exp. 2	(—)	$0.50 \pm 0.84$	$0.50 \pm 1.23$	(—)	

(b) Large tumor

		mean $\pm$ S.D. (n=6)			
	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸	
Exp. 1	$0.50 \pm 0.84$	$3.83 \pm 7.22$	$0.33 \pm 0.82$	$1.00 \pm 1.27$	
Exp. 2	$10.50 \pm 7.66$	$7.17 \pm 5.74$	$6.33 \pm 5.05$	$7.50 \pm 5.61$	

個)及び毎4日施灸群(1.00±1.27個)とは大きな差は認められなかった。Exp.2においてはコントロール群(10.5±7.66個)と比較して連日施灸群(7.17±5.74個)、隔日施灸群(6.33±5.05個)、毎4日施灸群(7.50±5.61個)ではやや転移が少なかった。

以上、肺転移結節数については各実験とも、明らかな傾向はなかったが、small tumor群の毎4日施灸群で全く転移結節のなかったこと、large tumor群のExp.2で、コントロール群に比して施灸群で転移結節が少なかったことが注目された。

### (3) 各施灸群の胸腺および脾臓重量

small tumor群、large tumor群共に胸腺重量はExp.1,2のいずれにおいてもコントロール群と各施灸群間には有意差は認められなかった(Table.2)。

なお、正常、同週令のマウスの胸腺重量は0.04gで各実験群の平均胸腺重量と大差はなかった。

一方、small tumor群の脾臓重量は、Exp.1ではコントロール群と比較して各施灸群間に有意差はみられなかったが、Exp.2ではコントロー

ル群(0.14±0.02g)と比較して連日施灸群(0.21±0.04g)で有意(P<0.05)に重い傾向が認められた。一方、large tumor群ではExp.1のコントロール群(0.38±0.04g)と比較して隔日施灸群(0.30±0.03g)で有意(P<0.05)に軽く、コントロール群(0.38±0.04g)と毎4日施灸群(0.31±0.04g)との間にも有意差(P<0.05)が認められた。しかし、Exp.2では、コントロール群(0.28±0.04g)と比較して各施灸群では有意な差はみられなかった(Table.3)。

正常、同週令のマウスの脾臓重量は平均0.11gで各実験群の脾臓重量はこれより重く、またsmall tumor群よりlarge tumor群で全体に明らかに重く、腫瘍が大きくなればなるほど脾臓重量が重くなる傾向がみられた。

### (4) リンパ球芽球化反応に及ぼす施灸刺激の影響

Fig.4, Fig.5, Fig.6は脾リンパ球のPHAおよびCon-A芽球化反応の平均cpmと標準偏差を示したものである。small tumor群のPHA反応(Fig.4)Exp.1ではコントロール群(30956±14148cpm)と比較して各施灸群共に低下がみら

Table.2 small tumor群、large tumor群の胸腺重量(g)

#### (a) Small tumor

mean±S.D. (n=6)				
	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸
Exp.1	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01
Exp.2	0.05±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01

#### (b) Large tumor

mean±S.D. (n=6)				
	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸
Exp.1	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.02	0.05±0.01
Exp.2	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01

Table.3 small tumor 群, large tumor 群の脾臓重量 (g)

(a) Small tumor

\* : コントロール VS P<0.05

mean±S.D. (n=6)

	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸
Exp.1	0.14±0.02	0.18±0.05	0.19±0.05	0.15±0.04
Exp.2	0.14±0.02	0.21±0.04 *	0.18±0.05	0.19±0.04

(b) Large tumor

\* : コントロール VS P<0.05

mean±S.D. (n=6)

	コントロール	連日施灸	隔日施灸	毎4日施灸
Exp.1	0.38±0.04	0.32±0.05	0.30±0.03 *	0.31±0.04*
Exp.2	0.28±0.04	0.29±0.11	0.33±0.08	0.28±0.05

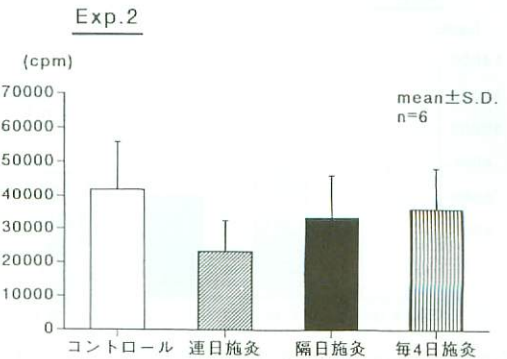
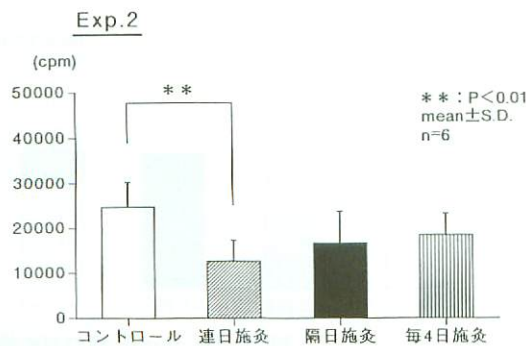
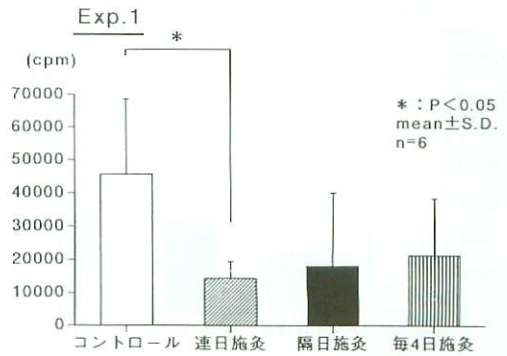
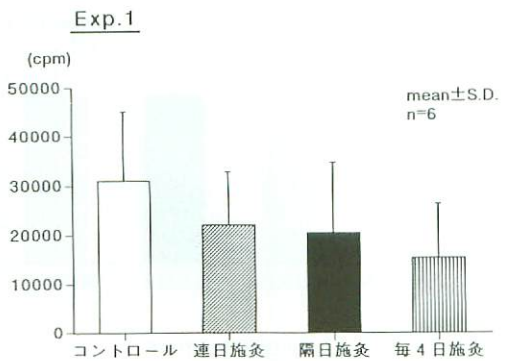


Fig.4 small tumor 群のリンパ球芽球化反応 (PHA)

Fig.5 small tumor 群のリンパ球芽球化反応 (Con-A)

れたが、特に毎4日施灸群 (15391 ± 10925 cpm) で著しい低下が認められた。Exp. 2 においても、同様の傾向がみられたが、この実験ではコントロール群 (24695 ± 5638 cpm) に比し、連日施灸群 (12572 ± 4692 cpm) で有意な ( $P < 0.01$ ) 低下が観察された。また、Con-A 反応 (Fig. 5) は Exp. 1 ではコントロール群 (45590 ± 23015 cpm) と比較して各施灸群共に低下が観察されたが、特に連日施灸群 (14352 ± 5197 cpm) で有意な ( $P < 0.05$ ) 低下が認められた。Exp. 2 においても、コントロール群 (41853 ± 14013 cpm) と比較して各施灸群で低下がみられ、特に連日施灸群での低下が大きかったが有意差は認められなかった。

一方、large tumor 群の PHA, Con-A 反応 (Fig. 6) 共に  $^3\text{H}$ -thymidine の up take が全体に低く、また、各施灸群間で有意な差はみられなかつ

た。しかし、各施灸群で small tumor 群のように明らかに芽球化反応が低下する傾向はなく、PHA, Con-A 反応共にコントロール群に比してやや高い傾向が認められた。

以上、small tumor 群では PHA, Con-A 反応共にコントロール群に比して施灸群で明らかな反応の低下が認められたが、large tumor 群では逆に PHA, Con-A 反応共にコントロールに比して施灸群でやや高い傾向が認められたことが注目された。

#### (5) NK 細胞活性に及ぼす施灸刺激の影響

Fig. 7 はNK細胞活性 (%) の平均値と標準偏差を示したものである。small tumor 群の Exp. 2 ではコントロール群 (15.44 ± 1.15%) と比較して、各施灸群のNK活性はやや低下がみられた。また、同時に行われた同週令の正常マウスのNK

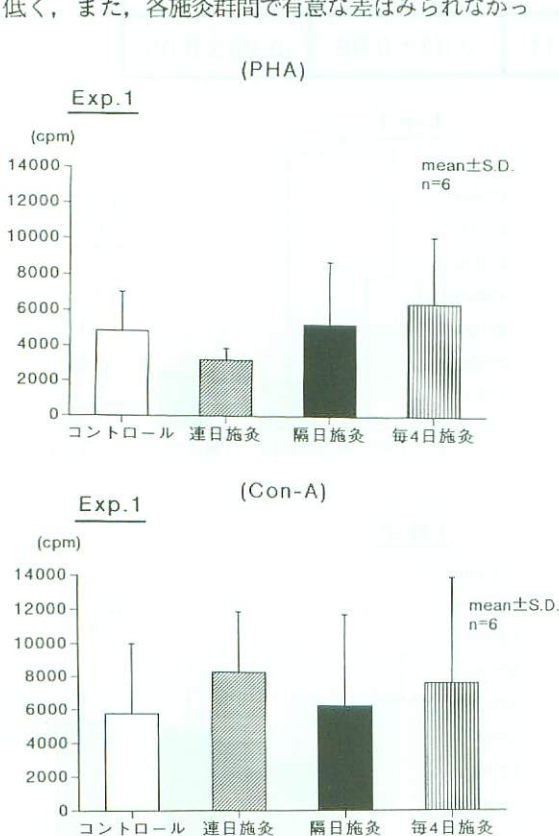


Fig. 6 large tumor 群のリンパ球芽球化反応 (PHA, Con-A)

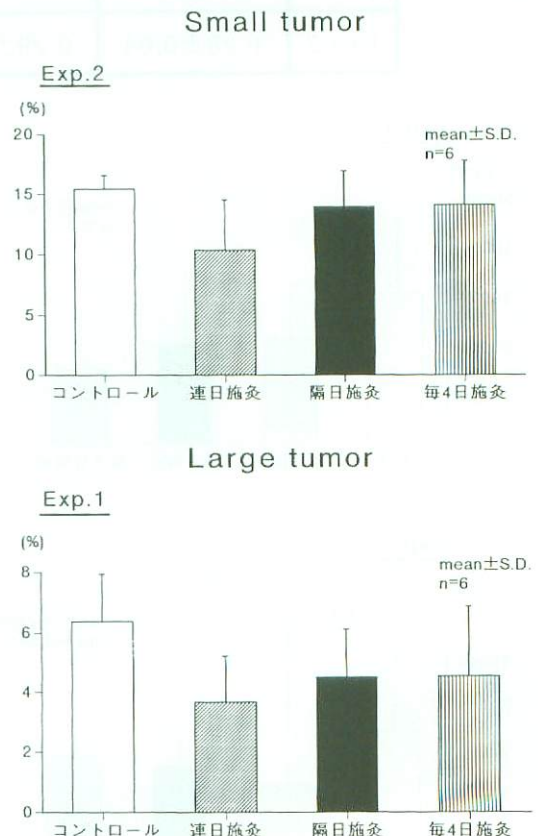


Fig. 7 small tumor 群, large tumor 群のNK細胞活性



活性は25%前後であり、担癌マウスのNK活性は正常マウスに比して明らかに低下していることがわかった。また、large tumor群ではコントロール群(6.38±1.56%)と比較して各施灸群でNK活性の低下傾向が認められた。large tumor群ではこのようにNK活性の値が極端に低いが、これが担癌腫瘍が大きく、そのためのNK活性の低下か否か検討する必要があると思われた。

(6) PFC形成能に及ぼす施灸刺激の影響

Fig.8は脾リンパ球(1×10<sup>6</sup> cells)のPFC数の平均値と標準偏差を示したものである。small tumor群のExp.1ではコントロール群(2306±557 PFC/10<sup>6</sup>)と比較して各施灸群共にPFC数の増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。同様にExp.2でもコントロール群(2448±

1297 PFC/10<sup>6</sup>)と比較して各施灸群で増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。また、同週令、正常マウスの脾細胞PFC数は5312±2033(PFC/10<sup>6</sup>)で担癌マウスではやはり全体に、正常マウスに比べてPFC形成能が低下していることがわかった。large tumor群のExp.2でもコントロール群(1553±172 PFC/10<sup>6</sup>)と比較して各施灸群でPFC数の増加傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。

以上、PFC形成能はコントロール群に比べて施灸群で全体にやや高い傾向が認められたことが注目された。

IV. 考 察

本研究で用いられたLewis肺癌はC57BL/6マウスの肺に自然発生したEpidermoid tumorであるが、皮下に移植すると高率に肺転移を形成することから、現在、血行性転移モデルとして実験的に多く用いられている<sup>9)</sup>。また、Lewis肺癌は、移植後10日目頃から肺転移を形成し、14日目頃から肉眼的に転移結節が観察されるが、この腫瘍の増殖や転移形成とNK細胞、T細胞あるいはマクロファージなどの動きとの関連も種々の論文で論じられており<sup>10-12)</sup>、本研究の目的に適した実験腫瘍と考え使用した。

施灸による直接的な抗腫瘍性の機序に関する報告は少ないが、西谷ら<sup>13)</sup>はエールリッヒ腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、移植局所または腫瘍の周囲に大量に施灸して腫瘍の増殖に対する影響を調べたところ、大量施灸によって20~50%の生存率が得られた。この結果から、施灸は皮膚の過酸化脂質を低下させて腫瘍細胞の増殖に適さない環境を作る可能性があると報告している。

一方、癌の増殖に宿主免疫能が大きく関与していることは広く知られていることであり、現在の癌治療においても免疫細胞を活性化せしめ宿主免疫能を高める非特異的な免疫療法が多く試みられている。また、鍼灸刺激は古くより宿主免疫能を賦活する作用のあることが指摘されており、施灸刺激により移植腫瘍の増殖抑制が認められたと

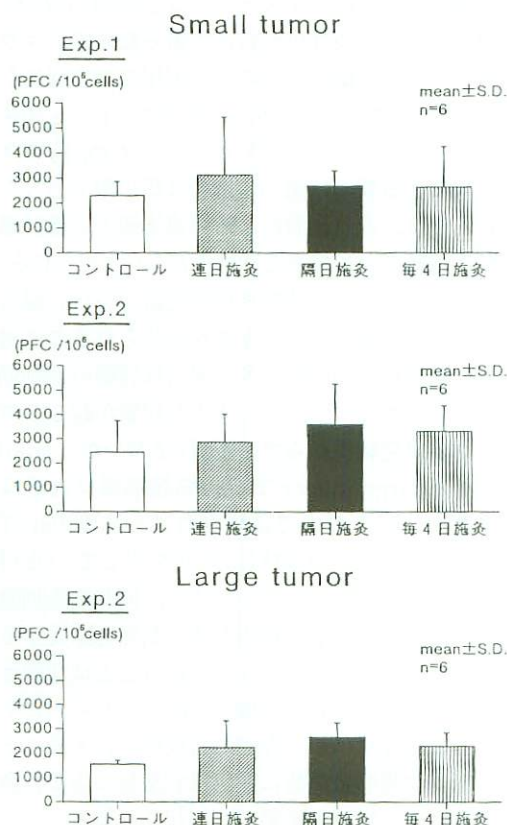


Fig.8 small tumor群, large tumor群のPFC産生細胞数

の報告もなされている<sup>14)</sup>。そこで筆者は、血行性肺転移を起こしやすい Lewis 肺癌を用いて施灸刺激が原発巣と肺転移巣に如何なる影響を及ぼすのかを検討した。その結果、移植腫瘍細胞数の少ない場合は、各施灸群でむしろ腫瘍の増殖促進傾向が認められ、その中でも特に連日施灸群で有意な ( $P < 0.05$ ) 腫瘍の増殖促進が観察された。しかし、移植腫瘍細胞数の多い場合には逆に、コントロール群や連日施灸群に比して毎 4 日施灸群で有意な ( $P < 0.01$ ) 腫瘍の増殖抑制が認められた。

悪性腫瘍の増殖や転移をコントロールする宿主防御因子として、細胞障害性 T 細胞、NK 細胞、活性化マクロファージ、LAK 細胞などがあり、これらの細胞は直接、腫瘍細胞を破壊したり、あるいは他の細胞の抗腫瘍活性を調節するとされており<sup>15)</sup>、NK 細胞は特に、血行性転移を抑制するとの報告もある<sup>16)</sup>。また、担癌動物においては一般に免疫不全状態に陥っていると考えられている。特に細胞性免疫能の低下が著しく、同種皮膚移植片の生着の延長や、遅延型アレルギー反応の弱化、担癌宿主リンパ球の PHA や Con-A に対する反応性の低下、または同種リンパ球との混合培養時における反応性の低下、マクロファージ機能の低下などが観察されている<sup>17)</sup>。また、Budzynski ら<sup>18)</sup> は Lewis 肺癌移植マウスの移植後の NK 細胞活性の推移を観察した結果、移植後の日数が経過するにつれて、NK 細胞活性が低下することを、また、Young ら<sup>19)</sup> は C57BL/6 マウスに、Lewis 肺癌の転移株と非転移株を移植して、リンパ球芽球化反応と NK 細胞活性を観察した結果、転移・非転移株に関係なく担癌マウスでは正常マウスより、リンパ球芽球化反応、NK 細胞活性共に低下し、特に、転移株移植マウスでは著しく低下したと報告している。一方、Kennedy ら<sup>20)</sup> は SaD2-AG 線維肉腫を移植したマウスに羊赤血球を静脈内注射し液性免疫能を PFC 値より調べてみると、担癌状態が進むにつれてそれが著しく抑制されてくることを示している。

本研究でのリンパ球芽球化反応、NK 活性、PFC 値の動きなどは、上記の報告と類似した動

きを示している。しかし、small tumor 群の特に連日施灸群では、隔日あるいは毎 4 日施灸群に比して腫瘍の増殖促進と共に、リンパ球芽球化反応、NK 細胞活性が明らかに低下したが、マウスに対する灸刺激量が大きすぎた可能性も考えられる。五十嵐ら<sup>21)</sup>、丹野ら<sup>22)</sup>、奥野ら<sup>23)</sup> は、適量の施灸刺激では細胞性免疫の増強が起こるが、過量の刺激量や刺激間隔が短い場合には、逆に細胞性免疫能を低下させ、刺激量により免疫応答に差が認められたと報告している。また、Shavit ら<sup>24)</sup> はストレスはラットやマウスの実験腫瘍の増殖を促進することやストレスの種類によって免疫機能が高められたり、腫瘍増殖が抑制されたりすることも報告している。本研究の場合、腫瘍増殖と免疫機能に関するストレスとして、施灸量、施灸頻度や施灸のための拘束ストレスなどが挙げられる。本研究では、施灸部位が背部であったので、マウスをゲージの金網の上にのせ、尻尾のみを保持して、手早く灸をのせて点火し、拘束ストレスを出来る限り少なくするように努めた。このため、拘束ストレスによる腫瘍増殖への影響は最小限であったと考えられ、連日刺激による腫瘍増殖の促進は過大な灸刺激のためである可能性が高いと思われる。

一方、本研究で、腫瘍移植細胞数が少ない場合は、施灸群で腫瘍増殖の促進が認められるのに対して、腫瘍移植細胞数の多い場合は腫瘍の抑制効果がみられた。なぜ、このような現象が起こるのか今回の研究結果からでは説明できないが、small tumor と large tumor では担癌腫瘍量に大きな差があり、宿主の中で誘導されてくる Killer T 細胞や、Suppressor 細胞に差異を生じている可能性は十分考えられる。それゆえ、同じ施灸刺激であっても、如何なる細胞がその刺激を受感するかによりその結果起こる反応が違うことは想像される。今回は、これらの機序に関して明らかにすることはできないが、今回の結果から言えることは、適当な腫瘍量の時に適当な刺激量の施灸刺激を加えれば、腫瘍の増殖抑制が起こり得るということである。また、不適当に刺激すると逆に腫瘍増殖を促進するということである。

以上の結果から、施灸刺激により、腫瘍の増殖抑制も起こり得ることが示唆されたが、その条件に関する多くの考察が必要であり、また、その機序に関する基礎的な研究が今後必要と思われる。

### V. 結 語

施灸刺激が移植腫瘍の増殖動態、肺転移形成、宿主免疫能へ及ぼす影響について検討した。その結果、施灸刺激は移植細胞数の少ない場合には腫瘍増殖や転移に対し促進的に作用するが、移植細胞数が多い場合は腫瘍の増殖抑制的に作用したこと、また、施灸刺激は連日施灸群で腫瘍増殖を促進させ、隔日あるいは毎4日施灸群の場合に抑制効果を示す可能性のあることが示唆された。また、施灸刺激によりリンパ球芽球化反応、NK細胞活性は低下するが、羊赤血球に対する抗体産生細胞数(PFC)は増加する傾向が観察された。このことから、移植腫瘍細胞数や施灸刺激間隔の違いにより、腫瘍の増殖、転移、宿主免疫応答に差異を生じることがわかり、条件によっては、施灸刺激により腫瘍の増殖抑制も起こり得ることが示唆された。

### VI. 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました明治鍼灸大学外科学教室の恩師咲田雅一教授に心から深謝申し上げます。

また、実験に際し、終始御助言ならびにご協力・ご援助を賜りました明治鍼灸大学鍼灸診断学教室の篠原昭二助教授に心から感謝いたします。また、この研究に際し貴重なLewis肺癌を分与していただいた森下ルセルK.KならびにRL male 1細胞を供与していただいた明治鍼灸大学免疫・微生物学教室の雨貝孝教授に厚く御礼申し上げます。

### 参 考 文 献

1) Okazaki M, Furuya E, Kasahara T : Effects of single moxibustion on phagocytic activity in mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 11 : 112~122, 1983.

2) 須藤 実, 大里和久ら : 鍼灸の抗癌効果に関する基礎研究 (第1報), *医道の日本*, 35 : 49~54, 1976.

3) 野間重任, 八木与志男, 山内利則ら : エールリッヒ固型癌の灸治療効果に関する研究 (第2報), *日本東洋医学雑誌*, 35(3) : 243~247, 1985.

4) Sternfeld M, Hod I, Yegana Y : Bimodal effect of moxibustion on mammary carcinoma transplanted in BALB/c mice. *American Journal of Acupuncture*, 16 : 358 ~361, 1988.

5) 篠原昭二, 石丸圭荘, 渡辺勝之ら : 灸刺激によるマウス移植腫瘍の増殖およびリンパ節転移の抑制効果について, *明治鍼灸医学*, 5 : 113~119, 1989.

6) Wexler H : Accurate identification of experimental pulmonary metastases. *Journal of The National Cancer Institute*, 36 : 641~645, 1966.

7) 菊地浩吉 :  $^{51}\text{Cr}$  標識細胞障害試験, 免疫実験操作法A : 349~351, 1978.

8) Cunningham A J, Szeberg A : Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *immunology*, 14 : 599~600, 1968.

9) 初瀬一夫 : Lewis 肺腫瘍の血管侵襲と肺転移に関する研究 (第1報), *防医大誌*, 8(1) : 35~42, 1983.

10) Young M R, Wheeler E, Newby M : Macrophage-mediated suppression of natural killer cell activity in mice bearing lewis lung carcinoma. *Journal of The National Cancer Institute*, 76 : 745~750, 1986.

11) Boom M, Pollock R E, Shenk R R : Tumor burden impairment of murine natural killer cell cytotoxicity. *Invasion Metastasis*, 8 : 118~132, 1988.

12) Budzynski W, Janiak M, Radzikowski C : Suppression of the activity of natural killer-like cells by peritoneal macrophages obtained from lewis lung tumor-bearing, propionibacterium granulosum KP-45 treated, or normal, untreated mice. *Immunobiol* 176 : 73~84, 1987.

13) 西谷郁子, 植田伸夫 : 灸の抗腫瘍作用の検討, *帝京医学雑誌*, 6(1) : 95~99, 1983.

14) 楊 友泌 : 艾灸対小鼠移植性腫瘍S-180 抑制作用的研究, *中国鍼灸*, 3 : 32~33, 1989.

15) Duffie G P, Rita M, Young I : Tumoricidal activity of alveolar and peritoneal macrophages of C57BL/6 mice bearing metastatic

- or nonmetastatic variants of lewis lung carcinoma. *Journal of Leukocyte Biology*, **49**: 8~14, 1991.
- 16) Wiltrot R H, Herberman R B, Zhang S-R : Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *Journal of Immunology*, **134**: 4267~4275, 1985.
- 17) 北川正保 : 腫瘍免疫学, 小林 博, 橋武彦編, 朝倉書店 : 278~288, 1975.
- 18) Budzynski W : Changes in natural killer cells activity in mice bearing subcutaneously implanted lewis lung carcinoma. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, **32**: 185~189, 1984.
- 19) Young MR, Newby M : Differential induction of suppressor macrophages by cloned lewis lung carcinoma variants in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, **77**: 1255~1260, 1986.
- 20) Kennedy J C : Host defense against cancer and its potentiation. Univ. Tokyo Press, Tokyo : 67~82, 1975.
- 21) 五十嵐宏, 丹野恭夫, 光藤英彦ら : 免疫機構におよぼす鍼灸の効果, *日本東洋医学会誌*, **26**: 117~121, 1975.
- 22) 丹野恭夫 : 灸の家兎末梢リンパ球幼若化現象に及ぼす影響, *日本東洋医学会誌*, **28**(1) : 18~22, 1977.
- 23) 奥野英子, 篠原昭二, 宇都宮由美子ら : マウス抗体産生能 (PFC) に及ぼす施灸刺激の効果について, 第43回全日本鍼灸学術大会抄録集, **44**(1) : 52, 1994.
- 24) Shavit Y, Terman G W, Martin F C : Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *Journal of Immunology*, **135**: 834~837, 1985.

### Effect of Moxibustion on The Growth of Primary Tumor, Pulmonary Metastases and Immune Responses in C57BL/6 mice Bearing Lewis Lung Carcinoma(LLC).

UTSUNOMIYA Yumiko

*Department of Surgery, Meiji College of Oriental Medicine.*

**Summary:** C57BL/6 mice were inoculated with  $5 \times 10^4$  or  $5 \times 10^5$  LLC cells into the right foot pad and moxibustion (0.6mg weight) was applied to the bilateral Shenshu (B23) points daily, every other day or every four 14 days after tumor inoculation. Weight of the tumor-bearing right leg and the number of metastatic nodules in the lungs were examined on the 15th day after tumor cell inoculation. Weights of the spleen and thymus were measured, and lymphocyte blastogenic activities, natural killer (NK) activities and plaque-forming cell (PFC) response to SRBC in the spleen cells of tumor-bearing mice were assayed on the same day.

The following results were obtained; 1) When  $5 \times 10^4$  LLC cell were used for inoculation, the tumor growth was enhanced by moxibustion treatment, but it was suppressed when  $5 \times 10^5$  LLC cells were used for inoculation, 2) It was also suggested that the tumor growth was enhanced by daily moxibustion treatment, but suppressed by moxibustion treatment on every other day or every four days, and 3) Lymphocyte blastogenic activities and NK activities were suppressed, but PFC responses were enhanced by application of moxibustion.

From these results, it was considered that growth of the tumor and the host immune response might be affected by the numbers of inoculated tumor cells and timing of moxibustion application.