

温度環境の担癌マウスに与える影響

山下 裕人, 鈴木 康子, 石井 三和子
千馬 正敬, 真田 文明, 寺尾 英夫
瀬戸口 智彦, 板倉 英世

長崎大学熱帯医学研究所病理学部門

The Effect of Ambient Temperature Conditions on the Mice Bearing Ehrlich Ascites Tumor
Hiroto YAMASHITA, Yasuko SUZUKI, Miwako ISHII, Masachika SENBA, Fumiaki SANADA,
Hideo TERA0, Tomohiko SETOGUCHI and Hideyo ITAKURA (Department of Pathology, In-
stitute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract : The effect of different ambient temperature conditions on the survival days of mice bearing Ehrlich ascites tumor was studied. The ddY strain mice were inoculated the tumor intraperitoneally and kept at different thermal conditions. The conditions were 4°C, 15°C and 30°C in Exp. 1 and 4°C for four days then 20°C and 20°C in Exp. 2. In Exp. 1, 5th-passaged-tumor and in Exp. 2, 22nd-passaged-tumor were used. In Exp. 1, the mice at low temperature conditions (4°C and 15°C) lived longer than those at high temperature one (30°C). It took more than 20 days after the treatment for the survival effect of the low temperature conditions to be observed. The tumor of the mice at low temperature conditions showed solidification i.e., loss of liquidity and the Fisher exact probability test revealed that low temperature conditions promoted the solidification of the tumor. In the same low temperature conditions, the mouse which lived longer showed more prominent solidification of the tumor. Histologically, the solid tumor showed aggregation of tumor cells with little ascitic fluid. Focally, the contact of tumor cells was seen. The tumor cells showed marked degenerative change and low mitotic rate. Therefore, it was concluded that the solidification of the tumor was one of the main causes of the survival effect of the low temperature conditions. In Exp. 2, no difference was seen in survival days of two groups. But the statistical test also showed that the low temperature condition (4°C) promoted solidification of the tumor more than the middle temperature condition (20°C), and the mice of two groups were dead within 15 days after the treatment. It was concluded that in Exp. 2, the increased lethal effect of the tumor which had been obtained during many passages surpassed the survival effect of the low temperature condition. These experiments suggest that the low temperature conditions such as 4°C and 15°C have the potentiality as anti-tumor agent. The relationship between the survival effect and solidification of the tumor in the low temperature conditions and cold adaptation mechanism was also discussed.

Tropical Medicine, 21(4), 179-186, December, 1979

はじめに

環境は生体に種々の影響を与える。マウスを被験動物とした場合、温度・湿度・体重・日令のうちで生理諸元にもっとも強い影響をおよぼすのは温度である(菅野, 1965)。気温が生体に与える影響のうちでよく知られているものは感染症の発生であり、最近では温度変化が免疫能に与える影響も調べられている(上村ら, 1979; 奥脇ら, 1979)。in vitro では温度が cell kinetics に与える影響も知られており培養細胞を使った実験では温度が 33°C から 38°C にまで上昇するにつれ細胞の generation time が短くなり(Altman and Dittmer, 1966)さらに高温では細胞の死が知られている(Gerner et al., 1975; Okumura, 1977)。低温では DNA の複製がおそくなり(佐藤ら, 1976)、15°C では細胞周期の進行が停止し、ついで細胞が死亡するとの報告もある(奥村, 松沢, 1972)。これらの報告は環境温度が抗腫瘍因子の一つとして作用する可能性を示唆しておりすでに高温による癌治療の研究が進められている(Suit and Shwayder, 1974; Baba et al., 1977)。低温も冷凍手術などに利用されているが、生体が耐えられる範囲内での低温環境が担癌生体ならびに生体内の癌細胞に与える影響についての研究は、上延・山本(1976)の報告があるが、少ない。我々も温度環境が担癌生体に与える影響を調べ上延・山本(1976)とは若干異なる成績を得たので報告する。

材料と方法

動物: 体重 15g 前後の ddY 系の雄のマウスを使用した。

腫瘍: エールリッヒ癌(西九州大学渡辺文友教授より提供された熊本系)を当研究室にて ddY 系のオスのマウスの腹腔内にて継代維持中のものを使用した。実験 1 では継代 5 代目の癌を、実験 2 では継代 22 代目を使用した。5 代目の担癌ラットの腹水は白く清澄であるのに対し 22 代目の腹水は血液を含んでおり混濁していた。

処理: 実験 1 では継代 5 代目のマウスのなかから多量の腹水癌を有する一匹をえらび、その腹水を 30 匹のマウスの腹腔内に 0.3ml/mouse ずつ移植した。これらを 1 群 10 匹ずつよりなる 3 群に分け移植翌日

より 4°C (市販冷蔵庫), 15°C (冷蔵庫), 30°C (夏期無空調室) 下にて飼育し死亡状況を観察した。マウスは通常のマウスケージにて飼育され 1 ケージあたり 5 匹のマウスを収容した。死亡したマウスを開腹し腹腔内の腫瘍の肉眼的変化を調べ、さらに腫瘍ならびに主要臓器の病理組織学的検索を行った。実験 2 では継代 22 代目のマウスのなかから一匹をえらび前回と同様に 30 匹のマウスに腫瘍を移植し、そのうちの 15 匹を 5 匹ずつ 3 群に分け 3 台の冷蔵庫 (4°C) にそれぞれ入れ 4 日間飼育し 5 日目に室温 (20°C) に戻して飼育した。他の 15 匹は対照として室温 (20°C) にて飼育し実験 1 と同様の検索を行った。

結 果

1. 延命効果

腫瘍を腹腔内に移植されたマウスは腹部がふくれあがり腫瘍死をとげる。腫瘍移植後マウスが死亡するまでの日数を横軸により、その日までのマウスの累積死亡数を縦軸にとってマウスの死亡状況を示したものが Fig. 1 (実験 1) および Fig. 2 (実験 2) である。

Fig. 1 にみられるように実験 1 では 30°C と 15°C とを比較すると腫瘍移植後 20 日位までは両者の累積死亡曲線はほぼ同じ傾きを有するが、その後差がでてくる。すなわち 30°C 群では移植後 23 日以内に全匹死亡し曲線の傾きは全経過を通じ一定であり急であるのに対し 15°C 群では 20 日から 30 日以後では、それまでの急な傾きが横ばいの状態となっており延

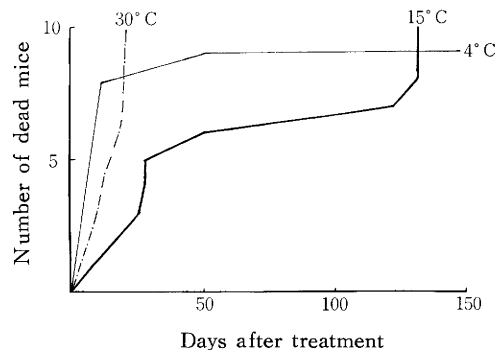


Fig. 1. Accumulated number of dead mice at different thermal conditions (4°C, 15°C and 30°C) after intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumor.

命効果が出現したものと思われる。4°C 群では移植11日目に6匹が死亡した。これは酸素欠乏（実験装置の不備による）によるものと思われる。このことを考慮にいれると4°C 群も15°C 群と同様の傾向にあるといえる。実験2では Fig. 2 に示す如く20°C 群と4°C 群との間では累積死亡曲線に差はない。両群とも移植後15日以内で死亡しており実験1と比較すると実験2では担癌マウスの生存日数は短縮している。

2. 腫瘍の固化化

死亡したマウスを開腹し腫瘍の性状を調べた。30°C 群では腹水癌はすべて液状（液状癌, non-solid）(Photo. 1) であったが他の群では程度の差、頻度の差はあるがゲル化した癌（固型癌, solid）(Photo. 2) をみとめた。ゲル化の著しいものは Photo. 5 に示す如くろ紙上にのせてもその形に変化がなかった。これらの腫瘍の組織像を調べると液状癌では癌細胞が空間的にゆったりと広がって存在しており細胞間には腹水や血球の混在をみとめる (Photo. 3)。固型癌では細胞同士が密に接近して存在しており混在する腹水や血球の量は少なく (Photo. 4) 一部では癌細胞同士が接触しているところもある (Photo. 6)。個々の癌細胞を調べると液状癌は細胞の変性壊死は軽度であり細胞分裂の頻度はより高く著明な核の多形性をみとめる (Photo. 7)。固型癌では細胞の変性壊死が著明であり細胞分裂の頻度は低い (Photo. 8)。この癌の固化化は実験1においては

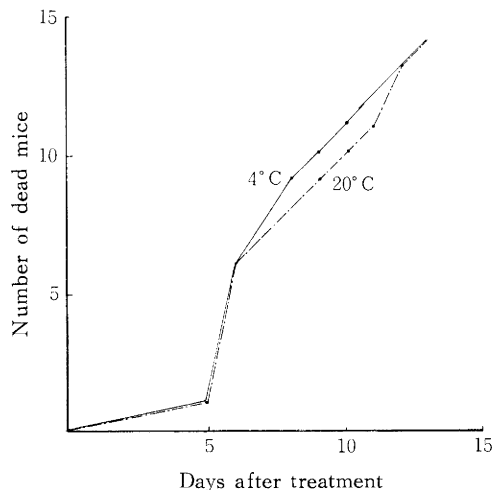


Fig. 2. Accumulated number of dead mice at different thermal conditions (4°C and 20°C) after intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites tumor.

4°C 群では10匹中6匹に、15°C 群では10匹中4匹にみられたが30°C 群ではみられず、実験2では20°C 群で15匹中2匹に、4°C 群で15匹中8匹にみられた。これらの異なった温度環境における固型化癌の出現頻度の有意差の有無を調べるため、その出現頻度の確率を Fisher の直接確率計算法にて求めた (Table 1)。Table 1 に示す如く有意水準を5%とおけば4°C群と30°C群、15°C群と30°C群、4°C群と20°C群との間に有意差は認められなかった。

Table 1. No. of mice which had non-solid tumor, solid tumor, and the probability of the observed occurrence in two different ambient temperatures

ambient temp.	No. of mice with non-solid tumor	No. of mice with solid tumor	probability
4°C	4	6	p=0.01
30°C	10	0	
15°C	6	4	p=0.04
30°C	10	0	
4°C	4	6	p>0.05
15°C	6	4	
4°C	7	8	p=0.03
20°C	13	2	

°C群とでは腫瘍の固型化に関して有意の差があり低温が固型化を促進するといえる。また同じ低温群内でも長命のものほど固型化が強い傾向にあった。

3. その他

その他の所見としては低温群のマウスの肝に脂肪変性がより多くみとめられた。

考 案

低温下(4°C, 15°C)で飼育された担癌マウスは高温下(30°C)のそれよりも長命である。低温下では腹水癌の固型化促進がみとめられる。この固型化癌はその組織像として強い細胞変性, 低い分裂頻度を示し, また移植率が低い(未発表)ことなどから, この癌の固型化が延命効果に結びつくものと思われる。実験2では4°C群と20°C群のマウスの間には生存日数に差は認められない。これは4°Cと20°Cでは延命効果上差がないことも考えられる。しかし腫瘍の固型化には有意の差があること, 両群とも腫瘍移植後15日以内で死亡していること, 腫瘍の世代が進めば進むほど腫瘍のマウスへの致死作用が強い(未発表)ことなどより, 実験2では腫瘍の致死作用が強く延命効果が発現する前に動物が死亡してしまったものと思われる。

上延・山本(1976)は ddY マウスに Sarcoma 180を移植した実験で低温下(5.0±0.5°C)飼育では適温下(22.0±1.0°C)飼育にくらべるとマウスの延命率にかなりの悪影響がみられたと述べている。しかし彼等の実験では平均生存日数に大差はなく, また1群が5匹よりなっているところから統計的には両群の平均生存日数に有意の差はないと思われる。さらにその実験では適温下飼育の最長命マウスでも腫瘍移植後18日で死亡している。したがって彼等の実験の結果は我々の実験2と同じ結果, すなわち腫瘍移植後20日以内にマウスが死亡してしまうような実験系では低温下飼育と適温下飼育との間には延命上差がみとめられないことを示しているものと思われる。

本実験でみとめられた延命効果はそれが15°Cでもみとめられたこと, 腫瘍は皮下ではなく腹腔内に移植されたことなどより低温の直接作用とは考えられず, 効果発現までに20日以上の日数を要するところから動物の寒冷適応と関係があるのではないかとと思われる。

寒冷に適応した動物は非ふるえによる熱産生を行うことが知られている(Sellers et al., 1954; Cottle and Carlson, 1956)。この非ふるえによる熱産生は主として brown adipose tissue でおこるが, その他の臓器でもおこる(Foster and Frydman, 1978)。そのメカニズムは Mitchel の化学浸透説(1961)に基づき説明され brown adipose tissue のミトコンドリアでは呼吸によって得られたエネルギーが ATP の合成には使用されず熱として発散されるとされている(Nicolls, 1977)。腫瘍細胞もそのエネルギーを解糖と呼吸より得ており分化度の高い腫瘍細胞もしくは増殖のおそい腫瘍細胞ほどそのエネルギーを呼吸からより多く得ている(Pederson, 1978)。したがって癌細胞でも非ふるえによる熱産生がおこるとすると, 呼吸によって得られるエネルギーの一部もしくは大部分が熱に変換される為に活動性の高い細胞すなわち癌細胞ほどエネルギー不足におちいり易く, そのために死亡すると考えられる。

非ふるえによる熱産生が腫瘍細胞ではおこらない場合でも担癌生体はそのエネルギーを熱産生に使用するために, いわば内的なエネルギー供給制限の状態にあり腫瘍の増殖が抑えられると思われる。桜田ら(1970)はカロリーの制限が担癌マウスの生存日数を延長させると報告している。

本実験でみられた癌の固型化は組織像で細胞の接触がみとめられ細胞の凝集を意味している。林ら(1975)も凍結から戻した腫瘍系のなかに自由細胞型から島型へ変化したものがあると報告している。分散している細胞が凝集するためには細胞間引力(主として Van der Waals の引力)の増加または細胞間反発力(主として静電反発力)の減少が必要である(Wallach, 1975)。本実験では後者の方が考え易い。すなわち寒冷適応した生体内では癌細胞は上述の如くエネルギー不足におちいり易く, それを補う為に自己構成成分である細胞膜の糖蛋白などをエネルギー源として分解し, その結果静電反発力が低下し細胞が凝集することが考えられる。Akhong et al. (1975)は細胞膜の脂質層の外表面をおおっている糖蛋白などが変化し脂質層がいわば裸になれば脂肪膜同士が融合し細胞融合がおこるとしている。いったん細胞の凝集がおこると凝集塊の内側に位置する細胞は毛細管の新生がないかぎり外界から



Photo. 1. Macroscopic appearance of non-solid tumor.
All mice kept at the high temperature condition had this type of ascites tumor.

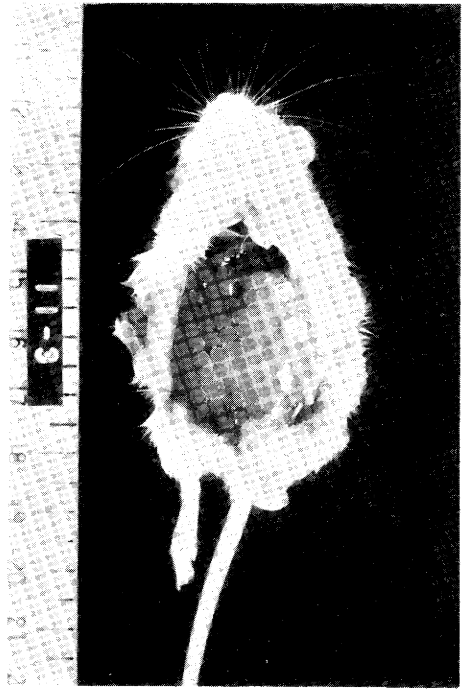


Photo. 2. Macroscopic appearance of solid tumor.
This type of ascites tumor was frequently seen in the mice kept at low temperature conditions.
Loss of liquidity is characteristic.

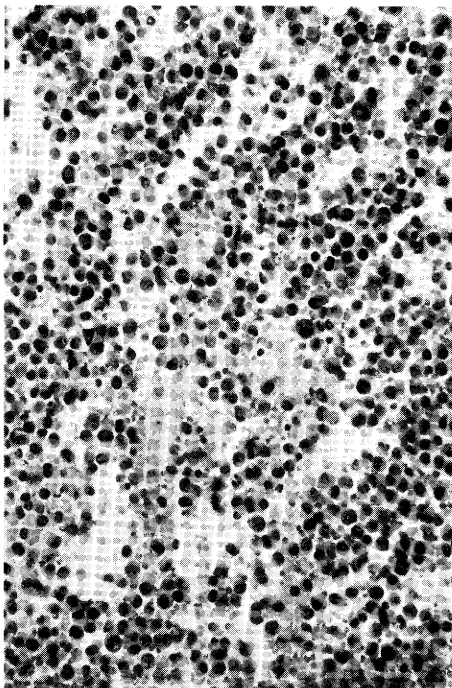


Photo. 3. Histological appearance of non-solid tumor.
Much ascitic fluid is seen. $\times 200$.

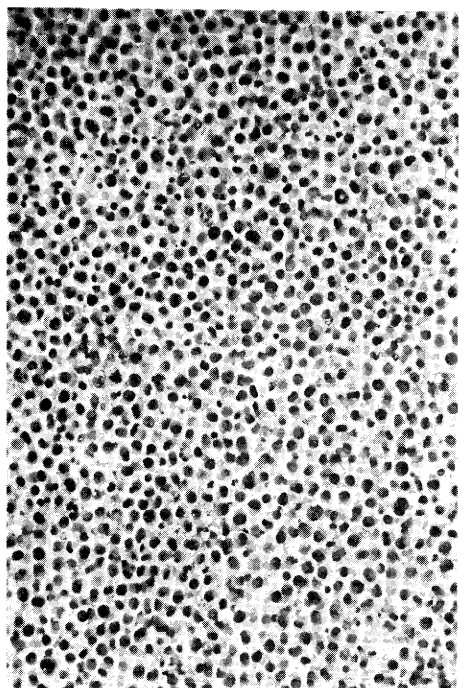


Photo. 4. Histological appearance of solid tumor.
Little ascitic fluid is seen. $\times 200$.

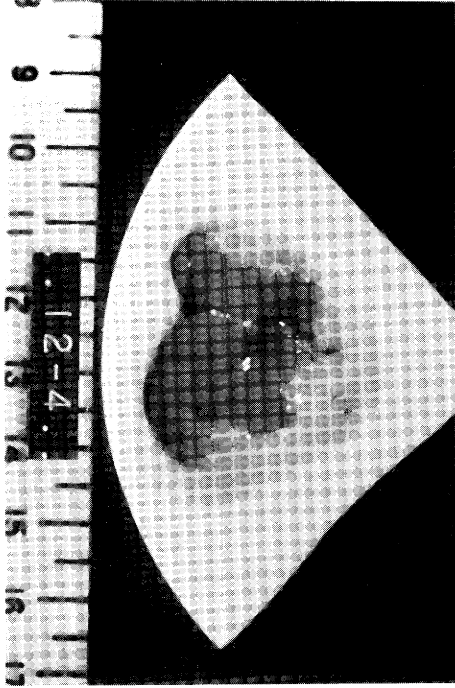


Photo. 5. Macroscopic appearance of solid tumor. Completely solidified ascites tumor.

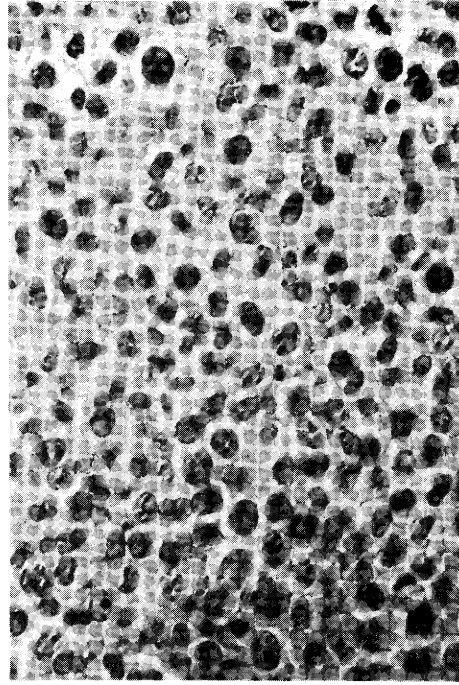


Photo. 6. Histological appearance of solid tumor. Contact of tumor cells is seen. $\times 400$.

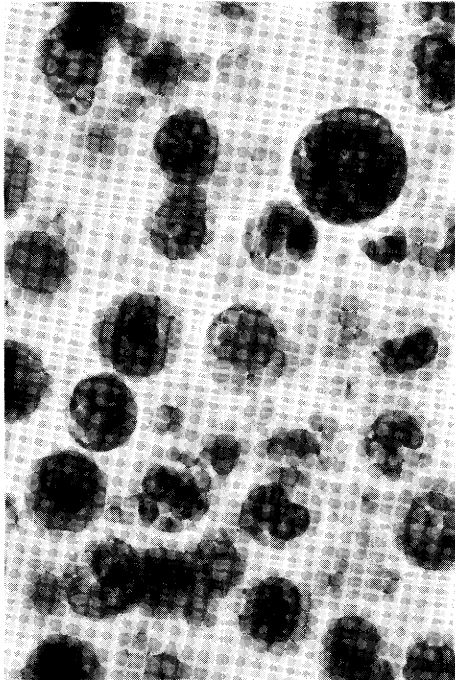


Photo. 7. Cytological appearance of non-solid tumor. Prominent nuclear pleomorphism with little degenerative change of cytoplasm is seen. $\times 1000$.

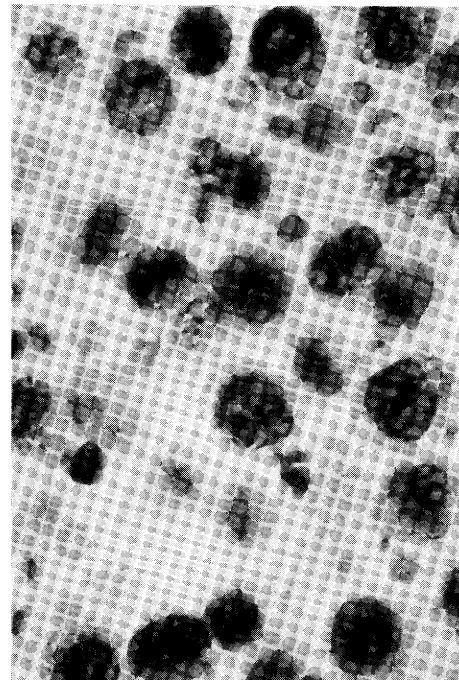


Photo. 8. Cytological appearance of solid tumor. Degeneration of cytoplasm is prominent. Nuclear pleomorphism is not apparent. $\times 1000$.

の物質の獲得が困難になり、自己崩壊がさらに早まるものと思われる。榊原ら(1977)はカエル卵凝集素をエールリッヒ癌を移植した動物の移植部に投与

したところ腫瘍重量の増加の抑制や延命効果がみとめられたと述べている。腫瘍細胞の凝集が腫瘍の増殖に不利に作用するものと思われる。

謝

辞

稿を終るに当り貴重な御助言を頂いた当研究所疫学部門小坂光男教授ならびに同部門の諸先生方に深謝します。なお本論文の要旨は第21回日本熱帯医学会総会において発表した。

文

献

- 1) Ahkong, C.M., Fisher, D. & Lucy, A. (1975): Mechanism of cell fusion. *Nature (London)*, 253, 194-195.
- 2) Altman, P. L. & Ditter, D. S. (1966): *Environmental Biology*. 55-56, Federation of American Societies for Experimental Biology. Bethesda, Maryland.
- 3) Baba, T., Kimura, N.T., Kanematsu, T., Aoki, K., Kidera, Y., Kamura, T., Taniguchi, T. & Kimura, M. (1977): Experiment on thermodifferential chemotherapy with thoracotomy for blood-borne pulmonary metastasis in rats. *Gann*, 68, 165-174.
- 4) Cottle, M. & Carlson, L.D. (1956): Regulation of heat production in cold-adapted rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92, 845-849.
- 5) Foster, D.O. & Frydman, M.L. (1978): Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of calorogenesis induced by noradrenaline. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 56, 110-122.
- 6) Gerner, E.W., Connor, W.G., Boone, M.L.M., Doss, J.D., Mayer, E.G. & Miller, R. (1975): The potential of localized heating as an adjunct to radiation therapy. *Radiology*, 116, 433-439.
- 7) 林 順子, 黒川雄二, 鈴木磨郎, 佐藤春郎 (1975): 凍結解凍により変化した腹水肝癌二腫瘍系. *抗酸菌病研究雑誌*, 27, 282-283.
- 8) Mitchell, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature (London)*, 191, 141-148.
- 9) 村上雅健, 垣本毅一, 矢永尚士 (1979): マウスの免疫能に及ぼす外気温の影響. *日生氣誌*, 16, 55.
- 10) Nicholls, D. G. (1977): Hormonal control of brown-adipose-tissue metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 908-912.
- 11) Okumura, Y. (1977): Kinetics of tumor cell death by hyperthermia treatment and X-ray irradiation. *Gann*, 68, 837-840.
- 12) 奥村 寛, 松沢大樹 (1972): 低温 (15°C) による培養細胞の致死障害. *日癌会記事*, 31, 272.
- 13) 奥脇義行, 石見恭子, 杉山雅俊, 菊地正一, 藤田紘一郎 (1979): 低温環境のマウス抗体産生能に及ぼす影響. *日生氣誌*, 16, 56.
- 14) Pedersen, P. L. (1978): Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cell. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 22, 190-274.
- 15) 榊原房夫, 川内広明, 高柳義一 (1977): カエル卵凝集素に対する癌細胞凝集原の分離と癌細胞の増殖に及ぼす凝集素の影響. *日癌会記事*, 36, 172.
- 16) 桜田知己, 布施幸子, 関田 潔 (1970): Ehrlich 腹水癌担癌マウス生存日数に及ぼす合成飼料組織の影響. *日癌会記事*, 29, 35.

- 17) 佐藤茂秋, 大可智子, 杉村 隆 (1976) : 培養エールリッヒ腹水腫瘍細胞の低温条件下での DNA 複製について. 日癌会記事, 35, 150.
- 18) Sellers, E. A., Scott, J. W. & Thomas, N. (1954) : Electrical activity of skeletal muscle of normal and acclimatized rats on exposure to cold. *Amer. J. Physiol.*, 177, 372-376.
- 19) 菅野 茂 (1965) : マウスを被験動物とした場合に於ける実験環境の吟味, とくに環境温度の影響について. 実験動物, 14, 115.
- 20) Suit, H.D. & Shwayder, M. (1974) : Hyperthermia : potential as anti-tumor agent. *Cancer*, 34, 122-129.
- 21) 上延富久治, 山本信弘 (1976) : 異常温度下における生体反応に関する実験的研究 (I). 大阪教育大学紀要, 25, 51-60.
- 22) Wallach, D. F. H. (1975) : *Membrane molecular biology of neoplastic cells*. 345-408, Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam.