

# 発癌剤および制癌剤によって誘導される代謝障害特に免疫不全状態に対する牛乳投与の効果および発癌予防効果の研究 第一報

群馬大学医学部保健学科 教授 倉 茂 達 徳

## I. 目的

我々は、これまでに可移植癌をマウスの皮下に移植して担癌にしたマウスに市販の無調整牛乳を連日のませ続けると癌の増殖が抑制されること、その際癌細胞の増殖に伴ってマウスのマクロファージおよびリンパ球機能は低下し、免疫不全状態になるが、牛乳を飲ませ続けたマウスでは、これらの免疫担当細胞の障害を防止し、免疫機能を正常レベルに近い状態に保てることを確認してきた。これらの実験結果より、牛乳には、免疫賦活作用があることが示唆された。そこで、今回は、マウスに発癌剤を投与し、発癌に至る課程での免疫担当細胞の機能の推移とそれに及ぼす牛乳の影響およびその結果としての発癌予防効果の有無について検討することを本研究の目的とした。発癌が確認されるまでには6カ月以上の期間を必要とするので、本年度は、マクロファージおよびリンパ球機能をサイトカイン産生能で検討した。

## II. 実験材料および方法

### 動物および発癌剤

実験動物として、日本チャールスリバー社から購入した6～8週齢のBalb/C系雌マウスを使用した。発癌剤としてN-butyl-N'-butanolnitrosoamine (BBN)を0.2mg/mlの濃度に蒸留水に溶解し、マウスに連日8週間に亘って飲料水代わりに自由摂取させた。その後は飲料水を水道水に切り替えた。

牛乳の投与 BBNを8週間連続投与した後、牛乳を毎日1回0.2 mlずつ経口ゾンデを用いて強制投与した。BBN投与後蒸留水を0.2 mlずつ経口ゾンデを用いて強制投与した群を正常対照とした。牛乳は、大学生協で購入した成分無調整牛乳を用いた。

### マクロファージ機能の測定

BBN投与開始から8週、12週、16週、20週後に各群5匹のマウスを屠殺し、マク

マクロファージおよびリンパ球を採取した。マクロファージは、腹腔浸出細胞を採取して用いた。5匹の腹腔より採取したマクロファージをプールし、RPMI 1640メジウムで遠心・洗浄後細胞培養用メジウムに  $2 \times 10^6$  cells/mlになるよう調整した。マクロファージ活性は、インターロイキン1 $\alpha$  (IL-1)および腫瘍壊死因子 (TNF)の産生で測定した。すなわち、各群のマクロファージ浮遊液は1 mlずつ3本の試験管に分けて加え、Escherichia coli由来のリポ多糖体 (Lipopolysaccharide; LPS) 50  $\mu$ g/mlを加えて24時間培養した後、上清を採取し、上清中のIL-1およびTNF濃度を測定した。IL-1およびTNF濃度は、モノクロナル抗体を用いた間接酵素抗体法 (ELISA)で測定した。

#### リンパ球機能の測定

リンパ球は、屠殺したマウスの脾臓より採取した。リンパ球は、RPMI 1640メジウムで3回遠心・洗浄した後、培養用メジウムに  $1 \times 10^6$  cells/mlになるよう調整浮遊させた。リンパ球機能は、コンカナバリン-A (Con A) 5  $\mu$ g/mlで刺激した後のインターロイキン-2 (IL-2)および $\gamma$ -インターフェロン (IFN- $\gamma$ )の産生で測定した。IL-2およびIFN- $\gamma$ は、リンパ球を48時間刺激培養した後に上清を採取して、モノクロナル抗体を用いた間接ELISA法で定量した。各群とも培養は、3本ずつおこなった。

#### 細胞培養用メジウム

全ての細胞は、10%牛胎児血清加 RPMI 1640メジウムにペニシリンG 50 units/ml、ストレプトマイシン 50  $\mu$ g/mlを加えたメジウムで培養した。

#### 実験結果の有意差の検定

統計学的な有意性については、Student T-testによって行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

### III. 実験成績

#### マクロファージのIL-1 $\alpha$ 産生能に与える影響

腹腔由来のマクロファージを試験管内でLPSで刺激したさいのIL-1産生能を、BN投与を終了した8週後から4週間間隔で20週まで観察した。その結果は、Table 1に示した通りであった。BBN処理8週後のマクロファージでは正常のマウ

ス由来のマクロファージに比してやや低い傾向は見られたが、有意の差は認められなかった。しかし、12週後には正常群に比して有意に低下しており、16週以降のマクロファージのIL-1産生能の障害は著しかった。それに反して、BBN投与後牛乳を飲ませ続けたマウスのマクロファージは、16週以降も正常マクロファージと差が見られず、牛乳には発癌剤によるマクロファージのIL-1産生障害を防ぐ作用があることが確かめられ、マクロファージの抗原提示細胞としてヘルパーT活性化能は発癌剤の存在下でも正常であることが示唆された (Table 1)。

Table 1. Effect of milk administration on IL-1 production by macrophages in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IL-1 (pg/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	464.1 ± 12.5	427.3 ± 15.9	
12	471.4 ± 23.5	387.2 ± 13.6	436.1 ± 28.4
16	513.1 ± 18.9	238.1 ± 11.0	481.4 ± 30.7
20	483.9 ± 20.4	223.6 ± 15.2	493.7 ± 19.6

#### マクロファージのTNF- $\alpha$ 産生能に及ぼす影響

IL-1産生を検討した同じマクロファージ培養上清を用いてTNF産生能を検討した結果をTable 2に示した。正常マウス由来のマクロファージの培養上清中のTNF量に比して、BBN投与マウスでは測定を開始した8週後に既に有意に低い値を示し、エフェクターとして働くマクロファージの機能は、抗原提示細胞として働くマクロファージの機能よりも早い時期から発癌剤によって障害を受けることが確認された。それに対して、牛乳を飲ませ続けたマウス由来のマクロファージでは、12

週目では、正常マクロファージより低いTNF産生を示したが、16週以降は、正常マウスのそれとほとんど変わらない値を示しており、牛乳を投与することで発癌剤によって障害を受けていたマクロファージのエフェクターとしての活性を回復させることができることが示唆された (Table 2)。

Table 2. Effect of milk administration on TNF production by macrophages in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of TNF (pg/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	221.5 ± 35.2	103.3 ± 14.4	
12	230.8 ± 29.2	128.6 ± 13.7	189.7 ± 19.4
16	210.7 ± 18.6	111.5 ± 12.8	205.3 ± 16.8
20	197.6 ± 23.1	110.7 ± 11.9	236.4 ± 25.6

#### ヘルパー T細胞のIL-2産生能に及ぼす影響

正常マウス、発癌剤BBN処置マウスおよびBBNと牛乳を投与したマウスの3群のマウスより経時的に採取したリンパ球をT細胞刺激剤であるCon Aで刺激して48時間後の培養上清中のIL-2濃度を測定した。その結果をTable 3に示した。

BBNを8週間投与した直後のリンパ球のIL-2産生能は、統計学的に有意ではなかったが、正常マウス由来リンパ球に比して低い傾向は認められた。12週以降は有意な低下が認められ、20週では正常リンパ球のその1/3にまで下がっており、発癌剤によって1型ヘルパー T細胞の機能が著しい障害を受けることが確認された。

それに対して、BBN投与後牛乳を投与したマウスでは12週以降検討したどの時期でもほぼ正常レベルのIL-2産生能を保持していた。牛乳が発癌剤によってもたらさ

れる1型ヘルパーTのIL-2産生能を保護する働きがあることが示唆された (Table 3)。また、20週目のマウスのリンパ球について予備的にCD3 (T細胞) マーカーおよびNK細胞マーカーの割合を検討したところ3群の間で差が認められなかった。

Table 3. Effect of milk administration on IL-2 production by lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IL-2 (ng/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	4.8 ± 1.2	3.7 ± 0.9	
12	4.2 ± 2.2	1.9 ± 0.8	3.5 ± 0.4
16	5.5 ± 1.6	1.3 ± 0.2	5.0 ± 2.1
20	5.1 ± 1.4	1.4 ± 0.4	5.8 ± 1.6

#### ヘルパーT細胞のIFN- $\gamma$ 産生能に及ぼす影響

次に、IL-2産生能を検討した同じリンパ球培養上清を対象として1型ヘルパーT細胞の産生するIFN- $\gamma$ 濃度を測定した。Table 4に示したように、IL-2産生の結果とほぼ同じ結果が得られた。すなわち、BBN8週投与直後のIFN- $\gamma$ 産生能は、やや低い値を示したものの正常リンパ球のそれと有意差は認められなかったが、12週以降明らかに低い値を示し、20週後には正常リンパ球のそれに比して1/4以下と著しい障害を受けていることが確かめられた。それに対して、BBN投与後に牛乳を飲ませ続けたマウス由来のリンパ球は、Con A刺激に正常リンパ球と同じように反応し、正常レベルのIFN- $\gamma$ 産生能が保持されていた (Table 4)。

Table 4. Effect of milk administration on IFN- $\gamma$  production by lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IFN- $\gamma$ (ng/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	2.2 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3	
12	1.9 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.2
16	1.8 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1
20	2.4 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.2

#### IV. 結論

発癌剤BBNの連続8週間の投与により、マクロファージのAPC活性の一つの指標となるIL-1産生およびエフェクター機能の指標となるTNF- $\alpha$ 産生は、8週目あるいは12週目以降に障害が出現したが、BBN投与後牛乳1日0.2 mlずつ飲ませ続けることでその障害が解除されることが確認された。

同様にBBN投与により、細胞性免疫を誘導する1型ヘルパーT細胞活性の指標となるIL-2およびIFN- $\gamma$ の産生が12週目以降著しい障害を受けていたが、BBN投与後に牛乳を飲ませ続けたマウスではその障害が認められなかった。

今回は検討期間が短かったため、BBN投与群においても明瞭な腫瘍形成は認められなかったが、牛乳を飲み続けることで発癌物質による免疫不全を防ぐことができることが示唆された。

## V. 考察

我々は、種々の形で発癌剤性をもった物質を体内に摂取しているものと考えられる。今回我々が使用した発癌剤はニトロソアミン系の発癌剤で食品中にも含まれているかあるいは摂取した食品の代謝の結果体内で出現する可能性のある物質で、動物実験では膀胱癌を誘発する。今回の実験では、観察期間が20週と短かったため膀胱粘膜の肥厚は認められたもののはっきりとした腫瘍形成は認められなかった。しかし、ニトロソグアニジンなどの一般的な発癌剤と同様にBBN投与が癌細胞の誘導のみならず癌細胞を破壊する細胞性免疫系の担当細胞の活性を抑制することが確認された。本研究において、その免疫抑制を牛乳摂取で防げることが示唆される成績を得ており、牛乳を飲むことで発癌物質摂取によって誘導される癌細胞を免疫学的に破壊することで発癌予防効果をあげる可能性は高いと考えられ、次年度以降の実験で証明していく予定である。

我々の飲ませた牛乳の量は0.2 mlであるが、マウスの体重はほぼ20 gなので、体重1 kgあたりに換算すると10 mlで、体重60 kgの成人では600 mlに相当する。この量は1日に飲める量であり、カルシウムを補充しながら、発癌予防効果も期待できることになる。

# 発癌剤および制癌剤によって誘導される代謝障害特に免疫不全状態に対する牛乳投与の効果および発癌予防効果の研究 第二報

## I. 目的

我々は、昨年度ニトロソアミン系の発癌剤、N-butyl-N'-butanolnitrosoamine (BBN)を飲料水代わりに8週間連続経口投与した後 BBN を除いた飲料水を飲ませたマウスでは、時間の経過とともにマクロファージのインターロイキン-1 (IL-1) 及び腫瘍壊死因子 (TNF) 産生能の障害が引き起こされること、さらにTリンパ球のインターロイキン-2 (IL-2) 及びγ-インターフェロン (IFN-γ) 産生能の障害が引き起こされるのに対し、BBN投与後に牛乳を1日1回経口投与し続けたマウスでは、それらの障害が抑制されており、牛乳には発癌剤による免疫系の障害を防御する作用があることを突き止めた。今年度は、発癌剤投与後に、牛乳を連続投与することで、癌の発生にどのような影響を与えるか、すなわち、牛乳に発癌予防効果が期待されるのかどうかについて検討した。

## II. 材料及び方法

### 1) 動物

実験動物として、日本チャールスリバー社から購入した Balb/c 系の雌マウスを用いた。5週齢で購入し、6週齢から実験を開始した。

### 2) 発癌剤

発癌剤として、膀胱癌を誘発することが証明されているニトロソアミン系の N-butyl-N'-butanolnitrosoamine (BBN)を、蒸留水に 0.2 mg/ml の濃度に溶解し、飲料水代わりに8週間連続して自由摂取させた。その後、飲料水を通常の水道水に切り代えた。

### 3) 牛乳

牛乳は、市販の無調整牛乳（高温殺菌）を購入し、発癌剤を8週間投与した後、実験終了時まで1日1回、0.2 ml ずつを経口ゾンデで強制投与した。



#### 4)発癌の確認

実験開始より8ヶ月後(32週後)に、マウスを頸髓脱臼により屠殺し、腹腔浸出細胞及び脾臓を採取した後、膀胱を摘出した。膀胱は、縦半分に切開し、腫瘍の有無を肉眼的に観察した。観察の済んだ膀胱は、10%ホルマリン液にて固定した後パラフィン包埋した。各膀胱の連続切片を作成しヘマトキシリンエオシン溶液で染色した後、病理組織学的に悪性腫瘍の有無を観察した。

#### 5)マクロファージのサイトカイン産生能の測定

BBN投与開始から8週、16週、24週及び32週にマウスを屠殺し、マクロファージ及びリンパ球を採取した。マクロファージは腹腔浸出細胞を用いた。腹腔浸出細胞は、屠殺したマウスの腹腔内に4 mlのRPMI1640メジウムを注入して、腹部をよくもんだ後に、メジウムを回収し、遠心洗浄した。マクロファージは培養用メジウムに $2 \times 10^6$  cells/mlの濃度に調整し、Escherichia coli由来のlipopolysaccharide (LPS)  $50 \mu\text{g/ml}$ で試験管内刺激をした。24時間の培養後の培養上清を採取し、上清中のインターロイキン-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )及び腫瘍壊死因子(TNF- $\beta$ )をモノクロナル抗体を用いた間接酵素抗体法(ELISA法)によって測定した。

#### 6)リンパ球のサイトカイン産生能の測定

リンパ球は、脾臓より分離した。脾細胞を培養用メジウムで遠心洗浄後 $1 \times 10^6$  cells/mlの濃度に培養用メジウムに調整し、コンカナバリンA (Con-A)  $5 \mu\text{g/ml}$ を混合して培養した。培養48時間後に培養上清を採取し、上清中のインターロイキン-2 (IL-2)及び $\gamma$ -インターフェロン (IFN- $\gamma$ )をモノクロナル抗体を用いた間接酵素抗体法(ELISA法)によって測定した。

#### 7)細胞傷害活性の測定

細胞障害活性のエフェクター細胞として、マウスの脾臓由来のリンパ球を使用した。標的細胞としては、Natural killer (NK) cell活性の測定にはYAC-1細胞を、Lymphokine-activated killer (LAK) cell活性の測定にはP-815細胞を用いた。標的細胞はEuropiumで標識し、Europium release assay法によって細胞

障害活性を測定した。すなわち、NK細胞活性は、Eu標識YAC-1細胞 $1 \times 10^4$  cellsとエフェクター細胞 $1 \times 10^6$  cellsとを混合培養し (E/T=100), 4時間後に遠心上清を採取して細胞溶解の結果上清中放出されたEu量をArcus Fluorometerで測定した。LAK細胞活性は、Eu標識P-815細胞 $1 \times 10^4$  cellsを標的としてエフェクター細胞 $5 \times 10^5$  cellsとを混合培養し (E/T=50), 4時間培養後の上清中への放出Eu量を測定した。Maximum releaseは、エフェクター細胞の代わりに同量のTriton X-100を加えて全標的細胞を溶解したさいの上清中のEu量で測定した。

細胞傷害率は次の計算式で求めた。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{[(\text{Eu release in experimental group}) - (\text{Spontaneous release})]}{[(\text{Maximum release}) - (\text{Spontaneous release})]} \times 100$$

#### 8) 細胞培養用メジウム

全ての細胞は、10%牛胎児血清加 RPMI 1640 メジウムに、ペニシリン-G 50 units/ml 及びストレプトマイシン  $50 \mu\text{g/ml}$  を添加したメジウムで培養した。

#### 9) 統計学的処理

有意差の検定は Student t-test あるいは  $\chi^2$  検定を行い、 $P < 0.05$  を、有意とした。

### III. 実験成績

#### 1) 発癌予防効果

発癌剤を8週連続投与した後2-4週間に亘って牛乳を毎日0.2 mlずつ経口的に投与したさいの発癌予防効果を検討した結果を Table 1 に示した。

発癌剤投与終了後牛乳を投与しなかった群では、膀胱腫瘍が20匹のマウス中20匹 (100%) に肉眼的に観察できた。しかし、組織標本の顕微鏡的観察では2匹の膀胱腫瘍は良性像を示し、癌と診断されたのは18匹 (90%)

であった。病理組織学的には、15匹が移行上皮癌であり、残る3匹は扁平上皮癌であった。それに対して、発癌剤投与後に牛乳を飲ませ続けた群では、

20匹中8匹 (40%) の膀胱にのみ、肉眼的にも病理組織学的にも癌が確認された。しかも、牛乳投与群の腫瘍は牛乳非投与群の膀胱腫瘍に比して明らか

に小さく膀胱癌発生が遅れていることを示唆する結果だった。

これらの成績より、牛乳の経口摂取には、少なくとも我々の用いた発癌剤による膀胱癌の発生を予防する効果があることが確認された。

Table 1. Effect of milk administration on cancer outbreak in BBN-treated mice

Mice treated with	No. of cancer positive mice in total mice
BBN alone	18/20
BBN + Milk	8/20

## 2) マクロファージの IL-1 産生に対する影響

マクロファージの IL-1 産生能に対する発癌剤の影響とそれに対する牛乳投与の効果について検討した結果を Table 2 に示した。1996 年度の実験結果とほぼ同じ結果が得られた。すなわち、発癌剤投与終了時の 8 週目ですでに IL-1 産生能の障害が認められ、時間の経過とともにその障害は増大していき、3 2 週後には無処置正常群の IL-1 産生能に比して約 3 分の 1 に低下していた。それに対して、発癌剤投与後に牛乳を投与し続けた群では、1 6 週目でもそれ以降でも全く障害が認められず、正常群と変わらない IL-1 産生能を維持していた。マクロファージの IL-1 産生能は、抗原提示能と関係が深いので、これらの成績は発癌剤はマクロファージが抗原を摂取してその抗原情報をヘルパー T あるいは細胞傷害性 T や骨髄由来 (B) 細胞への提示能を障害することまたその抗原提示能障害を牛乳が短期間で回復させることができることさらにその後の障害発生を予防することを示唆している。

Table 2. Effect of milk administration on IL-1 production by macrophages  
in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IL-1 (pg/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	403.8 ± 21.7	326.7 ± 21.1	
16	394.3 ± 31.6	210.9 ± 19.3	406.3 ± 38.2
24	420.4 ± 40.9	187.6 ± 34.9	399.2 ± 40.3
32	383.7 ± 13.4	163.5 ± 113.8	418.3 ± 61.1

### 3) マクロファージの TNF 産生能に対する影響

マクロファージがヘルパー T 細胞の産生する γ-インターフェロンに刺激されて活性化し、エフェクター細胞として作用する際に産生することが知られている腫瘍壊死因子(TNF)の産生能に対する発癌剤の影響と牛乳投与の効果について検討した結果を Table 3 に示した。マクロファージの TNF 産生能は、発癌剤投与終了時の 8 週目ですでに有意に低下していた。その後時間の経過とともに障害は増大しており、発癌剤はマクロファージのエフェクター細胞としての活性も障害することが確認された。それに対して発癌剤投与終了後から牛乳を毎日のませ続けた群では、牛乳投与開始 8 週目（実験開始から 16 週目）ですでに正常無処置群と同じレベルの活性に戻っており、その後も正常無処置群と全く変わりのない活性を示した。これらの成績より、牛乳には発癌剤によるマクロファージのエフェクター細胞機能の障害を短期間に回復させる能力があり、その後の障害の予防にも役立っていることが示唆された。

Table 3. Effect of milk administration on TNF production by macrophages  
in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of TNF (pg/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	187.3 ± 21.4	106.1 ± 10.4	
16	206.1 ± 14.8	93.4 ± 10.8	212.3 ± 31.6
24	190.9 ± 21.6	96.8 ± 12.1	186.3 ± 17.2
32	218.6 ± 24.4	80.1 ± 12.2	246.5 ± 28.3

#### 4) リンパ球の IL-2 産生能に対する影響

マクロファージからの抗原提示を受けて細胞性免疫を促すために反応する 1 型ヘルパー T (Th1) が細胞傷害性 T 細胞や NK あるいは LAK 細胞を刺激するために産生するインターロイキン-2 (IL-2) の産生能に対する発癌剤の影響とそれに対する牛乳の効果を検討した結果を Table 4 に示した。T 細胞の IL-2 産生能は発癌剤投与終了の 8 週目にすでに障害を受けて低下していたが、時間の経過とともに障害は増大し、32 週後には無処置正常群の IL-2 産生量の約 3.5 分の 1 に低下しており、発癌剤がヘルパー T 細胞の機能を阻害することが確認された。

それに対して、発癌剤投与後に連日牛乳を投与し続けた群では、牛乳投与開始 8 週目 (実験開始から 16 週目) には既にほぼ正常値を示しており、それ以降も低下することなく正常群と同じレベルの IL-2 産生能を保っていた。

これらの成績は、牛乳が発癌剤によって障害を受けたヘルパー T 細胞の IL-2 産生能を速やかに回復する効果を有すること、さらには以後の障害を防止する効果を発揮していることを示唆している。

Table 4. Effect of milk administration on IL-2 production by lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IL-2 (ng/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	6.2 ± 0.8	4.3 ± 0.4	
16	5.8 ± 1.9	3.1 ± 0.4	5.4 ± 0.7
24	5.5 ± 0.9	2.1 ± 0.1	6.1 ± 1.8
32	6.1 ± 1.3	1.7 ± 0.3	6.5 ± 1.7

#### 5) リンパ球の IFN- $\gamma$ 産生能に対する影響

1型ヘルパーT(Th1)がマクロファージを刺激するために産生するインターフェロナー $\gamma$ 産生能に対する発癌剤の影響とそれに対する牛乳の効果を検討した結果を Table 5 に示した。発癌剤投与終了時の8週目のリンパ球のインターフェロナー $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )産生能は、正常群のそれが2.0 ± 0.3 ng/mlであるのに対して1.3 ± 0.2 ng/mlと有意に低下しており、時間の経過とともにその差は顕著となり、実験開始32週目ではT細胞のIFN- $\gamma$ 産生能(0.4 ng/ml)は無処置正常群(2.5 ng/ml)に比して5分の1以下と著明な障害を受けることが確認された。

それに対して、発癌剤投与後に牛乳を飲ませ続けた群では、牛乳投与開始8週目(実験開始後16週目)で既に1.9 ± 0.3 ng/mlと正常群と差が無く牛乳投与によって、障害を受けていたヘルパーTのIFN- $\gamma$ 産生能を速やかに回復させる効果があることが示唆された。さらに、24週以降牛乳非投与群ではどんどん低下する産生能が、牛乳投与群では全く低下せず正常レベルを保っており、障害を予防する効果もあることが確認された。

Table 5. Effect of milk administration on IFN- $\gamma$  production by lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	Concentration of IFN- $\gamma$ (ng/ml)		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	2.0 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	
16	2.3 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3
24	2.6 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2
32	2.5 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.4

#### 6) NK細胞活性に対する影響

癌発生の初期にガン細胞排除のために重要な役割を担っている Natural killer (NK) 細胞活性に対する発癌剤の影響とそれに対する牛乳投与の効果について検討した結果を Table 6 に示した。発癌剤投与終了直後の 8 週目の YAC-1 細胞を標的とした細胞傷害活性は、正常群と有意差はないものの、低下傾向にあり、16 週目以降は明らかに有意の低下が認められ、32 週目では正常群の 3 分の 1 以下の活性しか認められなかった。

それに対して、発癌剤投与後牛乳を飲ませた群では、牛乳投与開始 8 週目（実験開始 16 週目）の細胞障害活性は既に正常と同じレベルであった。また、それ以降も活性の低下はまったく認められなかった。

これらの成績により、牛乳の経口摂取が、発癌剤によって障害を受けた NK 細胞活性を速やかに回復させる効果を示すこと、さらに時間の経過とともに増大する NK 細胞活性の障害を防止できる可能性があることが示唆された。

Table 6. Effect of milk administration on natural killer cell activity of lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	% Cytolysis		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	31.8 ± 4.9	18.6 ± 3.1	
16	27.9 ± 6.3	13.8 ± 0.7	30.7 ± 5.6
24	34.8 ± 8.7	15.2 ± 3.1	32.8 ± 5.2
32	36.5 ± 6.6	10.1 ± 0.9	32.9 ± 2.7

#### 7) LAK 細胞活性に対する影響

1型ヘルパーT (Th1) の産生する IL-2 によって活性を獲得する LAK 細胞活性を Eu-標識 P-815 細胞を標的とした細胞傷害活性で測定した。Table 7 に示したように無処置正常マウス由来のリンパ球には P-815 細胞を標的とした細胞傷害活性はほとんど認められず、同様に発癌剤投与マウス群でも細胞傷害活性は認められなかった。すなわち、何れの群でも LAK 細胞活性はほとんど認められなかった。それに比して、発癌剤投与後に牛乳を飲ませ続けた群では、牛乳投与から8週目(実験開始から16週目)から、低いながらも有意な細胞傷害活性が認められ、24週以降では有意に高い活性が認められた。これらの成績は、牛乳を飲ませることによって発癌剤処理を受けているにもかかわらず非特異的に LAK 細胞が刺激されていることが示唆された。



Table 7. Effect of milk administration on LAK cell activity of lymphocytes in BBN-treated mice

Weeks	% Cytolysis		
	None	BBN alone	BBN + Milk
8	3.5 ± 0.2	2.8 ± 0.3	
16	4.1 ± 0.3	4.5 ± 0.2	10.7 ± 0.9
24	2.4 ± 0.3	1.8 ± 0.1	18.3 ± 2.1
32	5.1 ± 0.8	2.6 ± 0.7	25.8 ± 1.7

#### IV. 結論

ニトロソアミン系の発癌剤N-butyl-N'-butanolnitrosoamine(BBN)を8週間飲料水に混合して連日飲ませた後、通常の水道水に切り替えて24週目(実験開始後32週目)には、20匹中18匹(95%)のマウスの膀胱に癌が発生しており、BBNのマウスでの膀胱癌発癌性が確かめられた。それに対して、発癌剤投与後に24週間毎日0.2mlの市販の無調整牛乳を飲ませ続けたマウスでは実験開始32週目でも20匹中9匹(45%)にのみ発癌が認められ、しかも癌腫瘍も明らかに小さく、牛乳摂取によって発癌が予防できることが確認された。

マクロファージの抗原提示能を示すIL-1産生能及びエフェクター機能を示すTNF産生能は発癌剤によって障害を受けたが牛乳を飲ませることでその障害から速やかに回復し、しかもその後発生する障害を予防できた。

抗腫瘍効果の主役となる細胞性免疫を誘導するヘルパーT(Th1)機能を示すIL-2及びIFN- $\gamma$ 産生能も発癌剤投与によって著明な障害を受けたが牛乳を飲ませることで速やかに回復し、しかもその後発生する障害を予防できた。

非特異的でしかも癌細胞発生の初期に重要な役割を果たすNK細胞活性は、発癌剤によって著しい障害を受けたが、牛乳摂取によって速やかに回復し、その後の障害を予防することが出来た。

Th1の産生するIL-2によって刺激されて活性化するLAK細胞活性は、発癌剤投与にも関わらず、増強された。

以上の成績より、牛乳による発癌予防効果は、発癌剤投与にも関わらず、牛乳を長期間飲ませ続けることで細胞性免疫を主体とした免疫反応の増強が起こり、癌細胞を排除することによるものと結論された。

## V. 考察

我々は、これまでに牛乳を飲ませ続けることで移植癌の増殖抑制や発癌剤による免疫系の障害を予防できることを報告し、発癌予防効果の可能性を述べてきたが、今回の発癌実験により、牛乳には発癌予防効果があることが確かめられた。

牛乳による発癌予防効果が、どのようなメカニズムによるかは不明であるが、1つの可能性として発癌剤による発癌遺伝子系の形質発現を牛乳に含まれるある成分がブロックする可能性が考えられるが、我々の実験系では発癌剤を8週間継続投与した後で牛乳の投与を開始することから、この可能性は低いと考えられる。他の1つの可能性は、癌細胞が発生しても牛乳によって免疫監視機構が強化されているために、いち早く癌細胞を破壊してしまい、癌細胞の増殖を防いでいる可能性である。我々の昨年度及び今回の実験で、発癌剤により明らかに免疫監視機構が障害を受けているマウスに牛乳を投与することでその障害からの回復が著しく早まることが明らかにされ、後者の可能性すなわち牛乳が免疫監視機構を強化することで発生した癌細胞を破壊し、癌細胞の増殖を許さないことが発癌予防の機序であろうと考えられる。

牛乳がどのようにして発癌剤によって障害を受けた免疫監視機構の活性を回復させるのか、またそのような機能を持つ成分は牛乳中の何であるか等については、今後の課題として残される。しかし、可能性としては、1)免疫系細胞の血液幹細胞からの補充を促進することで回復を高めている可能性と、2)直接機能障害を起こしている細胞の機能回復を促す可能性とが考えられ、細胞表面マーカーを使った解析をする予定であったが、本年度は十分な成果を上げることが出来ず、今後の課題として残した。

作用機作は何であれ、マウスに1日に0.2 mlずつを飲ませることで発癌予防効果が認められたことは、体重あたりに直すとヒトでは毎日600 ml前後となり、日常飲むことの出来る量で発癌予防効果が期待されることは意義深い結果が得られたと考えられる。