生ニンニク抽出液に含まれるアリシンで処理された 腫瘍細胞による腫瘍移植免疫の誘導

Tumor Transplantation Immunity induced with Tumor Cells treated
with Allicin contained in Fresh Garlic Extract.

京都大学医学部衛生学教室

中 田 利 一

Toshikazu Nakata

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto.

Animals immunized with tumor cells treated with allicin contained in fresh garlic extract showed resistance to subsequently injected corresponding tumor cells: DDD mice to Ehrlich ascites tumor, DDD male mice to 20-methylcholanthrene-induced tumor from a male DDD mouse, Donryu rats to Yoshida sarcoma, and C3H mice to Spontaneous mammary tumor from a C3H mouse.

I 緒 言

筆者は前報¹⁾で、 $2.77 \times 10^{-3}M$ 濃度以上のアリシン (Allicin) を含有する溶液で処理されたエールリッヒ腹水癌 (Ehrlich Ascites Tumor=EAT), 吉田肉腫 (Yoshida Sarcoma=YS), C3H マウス自然発生乳癌 (Spontaneous Mammary Tumor of a C3H Mouse=SMT), 雄 DDD マウスの 20-メチルコラントレン (20-Methylcholanthrene=20-MC) 誘発腫瘍 (20-Methylcholanthrene-induced Tumor of a male DDD mouse=MCT-DDD), 雄 C3H マウスの 20-MC 誘発腫瘍 (20-Methylcholanthrene-induced Tumor of a male C3H mouse=MCT-C3H) は、増殖能力を失う事を報告した。

この様な腫瘍細胞を注射された動物の体内に、無処理の virulent な腫瘍細胞を注射した場合、腫瘍細胞が、対照動物の体内に於けるのと同じ様に増殖出来るか否かは、興味深いが、筆者は EAT と DDD マウスを用いて、免疫マウスの体内に、対照マウスに比較して、腫瘍細胞の増殖を抑制する能力が賦与されている事を証明し既に報告した²⁾。

今回は、更に YS とドンリュウ・ラット、MCT-DDD と雄 DDD マウス、SMT と C3H マウスの組合わせで同様な実験を行ない、これ等についても EAT の時と同様の現象・腫瘍移植抵抗が現われる事を発見したので報

告する。

II 実験材料並びに方法

1. 腫瘍

1) EAT

DDDマウスに1週1回腹腔内注射して維持した。

2) YS

ドンリュウ・ラットに4～5日に1回腹腔内注射して維持した。

3) SMT

交配中の C3H 雌マウスに自然発生した乳癌を C3Hマウスに1月1回皮下注射して維持した。この腫瘍は、固形癌であるので、腫瘍細胞浮遊液を得る為、大きく成った皮下腫瘍を摘出、細切した。壊死部は出来る限り除去した。細切した腫瘍を 0.9% NaCl 溶液で2回洗い、ステンレス製網 (50-mesh) を通した。その際ストレプトマイシン (Streptomycin=SM) 1mg/ml 並びにペニシリン (Penicillin=PC) 1000単位/ml を含有する 0.9%NaCl 溶液を注ぎながら網を通した。

4) MCT-DDD

雄 DDD マウスの左鼠径部の皮下に胡麻油 (山桂, 精製) 0.1ml に溶かした 1mg の 20-MC (和光特級) を注射して得た。このものは固形癌であるので、SMT と同様の方法で腫瘍細胞浮遊液を作り、

それを処理して使用した。

2. 実験動物

雄或いは雌の DDD 或いは C3H マウス (これ等のマウスは京都大学純系動物センターから供給された)。あるいは YS の実験では、雄或いは雌のドンリュウ・ラットを使用した (これ等のラットは、最初、武田薬品工業から分与され、兄妹交配で繁殖させた)。

これ等の動物は1~5匹/籠ずつ金属籠 (又はプラスチック籠) の中に入れ、室温20~25℃の環境で、固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社製 MF) と水とを自由に摂取させつつ飼育した。

3. 試薬

1) SM 並びに PC 含有 0.9%NaCl 溶液

細菌感染を防ぐ為、SM 1mg/ml, PC 1000単位/ml を含有する 0.9%NaCl 溶液を必要に応じて用いた。

2) 生ニンニク抽出液

生ニンニク磨砕物 5g に全量 25ml に成る迄蒸留水を加えた。良く混和し、濾紙で濾過した。この濾液中のアリシンの平均濃度は、 $5.5 \times 10^{-8}M$ であった。これらは、使用直前に作った。

3) メチル・アリシン ($CH_3-SO-S-CH_3$)

メチル・アリシン (Methylallicin) は、キャベツから抽出されたメチル・アリーン (S-methyl-L-cysteine sulfoxide) ($CH_3-SO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$)³⁾ をニンニクから得たアリナーゼ (Alliinase)⁴⁾ の作用で分解して得た。反応液中のメチル・アリシンは、反応液と等容のエーテル (Ethyl Ether) で2度抽出し、エーテル層を合わせた。このエーテル中のメチル・アリシン量は、その都度筆者等の定量法⁵⁾ で測定した。冷蔵庫に貯蔵。

4) メチル・アリシン含有 0.9%NaCl 溶液。

上述のエーテルに抽出されたメチル・アリシン溶液のエーテルをドラフト (Draft) の中で蒸発させ、エーテル臭が消えた点において適当量の 0.9%NaCl 溶液を加え、混和して使用した。

5) Freund's Complete Adjuvant⁶⁾ (FCA) IAT-RON LABORATORIES 製。

東京、千代田、東神田、1~11(4)。

4. 腫瘍細胞の処理方法

1) EAT

腹水注射後約10日の動物を開腹して採取した腹水1容と生ニンニク抽出液 (又は、メチル・アリシン含有 0.9%NaCl 溶液) の1容とを混合し、37℃で

1時間反応させた。混合液は反応後、2000rpm (=800×g) で5分間遠心沈澱し、沈澱に全量2容に成る迄 0.9%NaCl 溶液を加え1度遠沈洗滌、その後沈澱に全量1容に成る迄 SM & PC 含有 0.9%NaCl 溶液を加え、混和し細胞を浮遊させた。この腫瘍細胞浮遊液 (0.1ml) を動物に注射した。

2) YS

腫瘍細胞の凝集を防ぐ為、使用するガラス器具をヘパリン (Heparin) 処理した。その他は EAT の場合と同じ方法で処理し、投与した。

3) SMT 並びに MCT-DDD

これ等の腫瘍細胞の浮遊液を上述の方法で処理し投与した。

5. 方法

上記の如く処理した各々の腫瘍細胞をそれぞれ適当な動物にあらかじめ注射しておき、適当な期間が過ぎた後、無処理の生きた腫瘍細胞をそれぞれ対応する動物に注射し、適当な期間以下の如き観察をした。

すなわち、無処理腫瘍細胞注射後、注射局所に腫瘍が発生するか否か、腫瘍の大きさを計測⁷⁾、或いは動物が腫瘍死するか否か、そして腫瘍注射後腫瘍死する迄の期間等を記録した。そして、これらの結果を、前処理をほどこさなかった動物に無処理の生きた腫瘍細胞を注射したものと比較検討した。

III 結 果

前報¹⁾で明らかにしたように、 $2.77 \times 10^{-8}M$ 以上の濃度のアリシンで処理された腫瘍細胞 (EAT, YS, SMT, MCT-DDD) は増殖能力を喪失した。そこで、 $2.77 \times 10^{-8}M$ 濃度のアリシンで処理した腫瘍細胞を動物を免疫する為の抗原として試用した。

1) EATについて

EAT に関しては、アリシンで処理された腫瘍細胞で免疫された動物は、無処理腫瘍細胞の接種に対する抵抗力を獲得した。この様にして得られる抵抗力は免疫を繰り返す事により増強された (Table 1 の Experiment 1)

2) YSについて

YS に関しても、アリシンで処理された腫瘍細胞で免疫された動物は、無処理腫瘍細胞の接種に対する抵抗力を獲得した (Table 1 の Experiment 2)

3) SMTについて

SMT に関しては、アリシンで処理した腫瘍細胞で免疫された C3H マウスは、無処理腫瘍細胞の接種に対する抵抗力を獲得する事は出来なかった (Table 1 の Ex-

Table 1. Resistances of animals immunized with tumor cells treated with alliecin* ($2.77 \times 10^{-3}M$) against challenge with viable tumor cells.

No. of experiment	Tumor	Animals	Treatment given to animals	No. of immunization	Intervals between the last immunization and challenge (in days)	No. of survival or mean survival time (in days) $\pm$ S.E.	Significance of difference with respect to controls
1 ^b	EAT	female DDD (3 months old)	Experimental	1	7	10/40	$X^2=3.3$, $0.05 < P < 0.10$
			Experimental	1	14	5/40	$X^2=0.139$, $0.5 < P < 0.75$
			Experimental	2	7	32/38	$X^2=43.2$, $P < 0.001$
			Experimental	2	14	27/40	$X^2=28.2$, $P < 0.001$
			Experimental	3	7	32/40	$X^2=39.9$, $P < 0.001$
			Experimental	3	14	33/40	$X^2=42.5$, $P < 0.001$
2 ^c	YS	female Donryu (6 months old)	Control			3/40	
			Experimental	1	14	3/10	$X^2=0.31$, $0.50 < P < 0.750$
			Experimental	2	14	3/10	
			Experimental	3	14	7/10	$X^2=5.2$, $P < 0.025$
			Control			1/10	
			Experimental	2	14	43.1 $\pm$ 4.5 (n=10)	$t=1.12$, $0.2 < P < 0.3$
3 ^d (A)	SMT	male C3H (one month old)	Control			50.6 $\pm$ 4.9 (n=9*)	
		male C3H (2 months old)	Experimental	2	14	38.9 $\pm$ 2.8 (n=10)	$t=0.530$, $0.5 < P$
3 ^f (B)	SMT	male C3H (2 months old)	Control			36.3 $\pm$ 4.0 (n=10)	
		male C3H (2 months old)	Experimental	2	14	54.7 $\pm$ 4.5 (n=10)	$t=2.675$, $0.01 < P < 0.02$
3 ^g (C)	SMT	male C3H (2 months old)	Control			42.1 $\pm$ 1.6 (n=10)	
		male C3H (2 months old)	Experimental	2	14	54.7 $\pm$ 4.5 (n=10)	$t=2.675$, $0.01 < P < 0.02$

- ^a Allicin which was contained in fresh garlic extract.
- ^b Treated tumor cells (3.8×10^6 — 1.3×10^7) were injected i.p. into experimental mice at 7-day intervals. Viable tumor cells (10^6) were injected i.p. for challenge. Number of survival 100 days after challenge was shown in Table 1. No tumor development was observed on mice 100 days after challenge.
- ^c Treated tumor cells (4.2×10^6 — 1.8×10^7) were injected s.c. into experimental rats at 7-day intervals. Viable tumor cells (10^6) were injected i.p. for challenge. Number of survival 81 days after challenge was shown in Table 1. No tumor development was observed on rats 81 days after challenge.
- ^d Treated tumor cells ($2 \times 10^7/0.1\text{ml}$) were injected s.c. in the right groin of each experimental mouse twice at 14-day intervals. Suspension (0.5ml) of viable tumor cells were injected s.c. in the left groin of each mouse for challenge. SMT of the second and third transplant generations was used.
- ^e One of ten control mice was alive without tumor 100 days after challenge.
- ^f Freund's complete adjuvant (1.5ml) and 0.9% NaCl solution containing SM & PC (1.5ml) was mixed well. This emulsion (0.2ml) was injected twice at 14-day intervals s.c. in the right groin of each experimental mouse. Suspension (0.2ml) of viable tumor cells were injected s.c. in the left groin of each mouse for challenge. SMT of the eleventh transplant generation was used.
- ^g Treated tumor cells suspended in 0.9% NaCl solution containing SM & PC (1.5ml) were mixed with Freund's complete adjuvant (1.5ml). This emulsion (0.2ml) was injected s.c. in the right groin of each experimental mouse twice at 14-day intervals. Suspension (0.2ml) of viable tumor cells were injected s.c. in the left groin of each mouse for challenge. SMT of the tenth to eleventh transplant generations was used.

periment 3(A))。

しかし、処理した腫瘍細胞を FCA に浮遊させて動物に投与すると、動物は無処理腫瘍細胞の接種に対する抵抗力を獲得した (Table 1 の Experiment 3(C))。

SM & PC 含有 0.9%NaCl 溶液だけを FCA に浮遊させたもので前処置した動物では、この様な抵抗力を獲得する事が出来なかった (Table 1 の Experiment 3(B))。

従って、腫瘍細胞をアリシンを含有する溶液によって処理したものを注射する事が、動物に腫瘍移植抵抗を賦与する為に役立っていると考えられる。

4) MCT-DDD について。

MCT-DDD に関しては、アリシンを含有する溶液で処理された腫瘍細胞を SM & PC 含有 0.9%NaCl 溶液に浮遊したもので免疫された DDD マウスは、無処理腫瘍細胞の接種に対する抵抗力を獲得する事が出来た (Table 2 の Group B)。

IV 考 察

腫瘍移植抵抗を検討する場合、腫瘍細胞とそれを移植される動物との関係が同種異系である場合 (この報告では EAT と DDD マウス及び YS とドンリュウ・ラット) には、惹起される抵抗力は、違う系統の動物の組織の移植に対して生ずる反応 (Homograft-type reaction) が主であって、腫瘍特異移植抵抗は顕われにくく、腫瘍細胞とそれを移植される動物との関係が同種同系である場合 (この報告では SMT と C3H マウス及び MCT-DDD と DDD マウス) には、腫瘍特異移植抵抗が主に

顕われると言われている。

筆者の方法では、上述の如く同種異系の場合にも、同種同系の場合にも動物の腫瘍移植に対する抵抗力を惹起せしめる事が出来たと思われるが、今後更に他の種類の腫瘍についても実験してみる必要があろう。

筆者の方法で腫瘍細胞処理方法は上述の如くアリシンを含有する溶液を反応させた後 0.9%NaCl 溶液で洗滌してから投与しているが、処理された腫瘍細胞と一緒に極微量のアリシンが混入する事が考えられる。従ってその様な微量のアリシンによってこの様な抵抗力が誘導されるかも知れぬと言う疑いが出る可能性もある。しかし、Table 3 の Experiment 6 の如く、アリシンを含有する溶液のみを注射したのでは、この様な抵抗力を誘導出来なかったことからこの事は否定出来よう。

又、腫瘍組織以外の正常組織をアリシンで処理して投与してもこの様な抵抗力を動物に賦与できるかも知れぬと言う疑問があるので、正常組織 (全血球) をアリシンを含有する溶液で処理して動物に注射したが、Table 3 の Experiment 5 の如く、動物にこの様な抵抗力を賦与する事は出来なかった。従って、アリシンで処理した腫瘍細胞を投与する事が必要であって、アリシンで処理した正常組織を投与してもこの様な抵抗力を動物に賦与する事は出来ないと思われる。

筆者は、この腫瘍に関係する抗原の安定性を見る為、腫瘍細胞の分裂能力を喪失せしめ得ない程度の Osmotic shock による処理の後、アリシンを含有する溶液で処理された EAT 或いはアリシンを含有する溶液で処理した後、超音波で破壊された腫瘍細胞を、動物に接種して

Table 2. Resistances of male DDD mice (3 months old) immunized^a with tumor cells (MCT-DDD)^b treated with allixin^c (2.77×10⁻⁴M) against challenge with the corresponding viable tumor cells^d.

Group	15 days after challenge				30 days after challenge				92 days after challenge	
	No. of mice without tumor	No. of mice with tumor	No. of mice which died of tumor	Means of calculated tumor volumes ± its S. E. (mm ³)	No. of mice without tumor	No. of mice with tumor	No. of mice which died of tumor	Means of calculated tumor volumes ± its S. E. (mm ³)	No. of surviving mice without tumor	Mean survival time after challenge ± its S. E. (days)
(A) 0.9% NaCl solution containing SM & PC ^e (10 mice)	1	9	0	364.7±107.0 (9 mice)	0	7	3	2276.7±662.8 (7 mice)	0	39.6±6.5 (10 mice)
(B) Treated tumor cells which were suspended in 0.9% NaCl solution containing SM & PC ^f (10 mice)	8*	2	0	156.8±0 (2 mice)	7**	3	0	1868.7±995.9 (3 mice)	7**	45.3±5.2 (3 mice)
(C) Freund's complete adjuvant and Treated tumor cells which were suspended in 0.9% NaCl solution containing SM & PC ^g (10 mice)	2	8 ^h	0	215.3±53.4 (7 mice)	2	5	3	2265.0±470.6 (5 mice)	2	36.1±4.7 (8 mice)
(D) Freund's complete adjuvant and 0.9% NaCl solution containing SM & PC ⁱ (10 mice)	0	10	0	316.4±64.1 (10 mice)	0	9	1	3089.5±399.5 (9 mice)	0	36.4±1.0 (10 mice)

^a Twice immunized s.c. in the right groin at 14-day intervals. Challenged s.c. in the left groin 14 days after the second immunization.

^b MCT-DDD of the sixth to seventh transplant generations was used.

^c Allixin which was contained in fresh garlic extract.

^d The tumor cells suspension were centrifuged at 2000 rpm (=800×g) for 5 min. The supernatant was discarded and 0.9% NaCl solution containing SM & PC was added to equal 100 times the volume of the cell pellet. The resuspended viable cells (0.1 ml) was injected s.c. in the left groin of each mouse.

^e 0.9% NaCl solution containing SM & PC (0.1 ml) was injected s.c. in the right groin of each mouse.

^f The tumor cells suspension were centrifuged at 2000 rpm (=800×g) for 5 min. The supernatant was discarded and 0.9% NaCl solution was added to equal 10 times the volume of the cell pellet. The resuspended cells were treated with 2.77×10⁻⁴M allixin as shown in Materials and Methods. Treated tumor cells suspension (0.1 ml) was injected s.c. in the right groin of each mouse.

^g The treated tumor cells suspended in 0.9% NaCl solution containing SM & PC (1.5 ml) were mixed with Freund's complete adjuvant (1.5 ml). This emulsion (0.2 ml) was injected s.c. in the right groin of each mouse.

^h A mouse showed only abdominal swelling.

ⁱ Freund's complete adjuvant (1.5 ml) and 0.9% NaCl solution containing SM & PC (1.5 ml) was mixed well. This emulsion (0.2 ml) was injected s.c. in the right groin of each mouse.

* 0.005<P<0.01, ** 0.001<P<0.005, (Significance of difference with respect to control).

Table 3. Effects of injection^a of various materials which have some relations to the tumor cells treated with fresh garlic extract.

No. of experiment	Injected materials (/0.1ml)	Rate of survival after injection	Rate of survival after challenge	No. of viable tumor cells for challenge (/0.1ml)
1 ^b	(A) Tumor cells treated with fresh garlic extract after osmotic shock (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10 ^c	2/10	10 ⁵
	(B) Tumor cells treated only with osmotic shock	2/10	1/2	
	(C) Tumor cells treated only with fresh garlic extract (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10	6/10	
	(D) 0.9% NaCl solution containing SM & PC	10/10	1/10	
2 ^d	(A) Tumor cells destroyed by ultrasonic waves after treatment with fresh garlic extract (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10	3/10	2×10^5
	(B) Tumor cells treated only with fresh garlic extract (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10	7/10	
	(C) Nothing	10/10	2/10	
3 ^e	(A) Tumor cells treated with methylallicin (1.1×10^{-4} M)	0/10	9/10***	10 ⁵
	(B) Tumor cells treated with methylallicin (1.1×10^{-3} M)	0/10		
	(C) Tumor cells treated with methylallicin (1.1×10^{-2} M)	10/10		
	(D) 0.9% NaCl solution containing SM & PC	10/10		
4 ^f	(A) Tumor cells treated with methylallicin (2.77×10^{-4} M)	0/10	4/6**	2×10^5
	(B) Tumor cells treated with methylallicin (2.77×10^{-3} M)	6/10		
	(C) Tumor cells treated with methylallicin (2.77×10^{-2} M)	10/10		
	(D) Nothing	10/10		
5 ^g	(A) Blood cells treated with fresh garlic extract (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10	0/10	10 ⁵
	(B) Nothing	10/10	0/10	
6 ^h	(A) Tumor cells treated with fresh garlic extract (Allicin, 2.77×10^{-3} M)	10/10	8/10****	10 ⁵
	(B) 0.9% NaCl solution containing SM & PC	10/10	0/10	
	(C) Fresh garlic extract (Allicin, 5.5×10^{-3} M)	10/10	0/10	

^a Tumor cells used, EAT. Number of injection, twice (Number of treated tumor cells which were injected ranged from 4.3×10^6 to 1.4×10^7). Interval of injection, 2 weeks. Route of injection, i.p.. Challenge, 2 weeks after the second injection. Route of challenge, i.p..

^b Female DDD mice (2 months old). Experiment finished 166 days after challenge. Osmotic shock used in this experiment was as follows. Ascites (1.5ml) was mixed with 1.5ml distilled water and centrifuged at 2000rpm for 5 min. 0.9% NaCl solution to a total volume of 1.5ml was added to the sediment and mixed. This mixture was treated with fresh garlic extract (1.5ml) or injected i.p. into mice.

^c Number of survival/Number of mice tested.

^d Female DDD mice (2 months old). The completion of destruction of tumor cells by ultrasonic waves was made certain microscopically.

^e Female DDD mice (2 months old). Experiment finished 78 days after challenge.

^f Male DDD mice (2 months old).

* The whole blood (1ml) was acquired from a female DDD mouse (3 months old) and put in heparinized glass and treated with fresh garlic extract and washed with 0.9% NaCl solution and suspended in 0.9% NaCl solution containing SM & PC (Total volume, 2ml). This suspension (0.2ml) was injected i.p. into each mouse. Female DDD mice (3 months old). Experiment finished 22 days after challenge.

^a Female DDD mice (8 months old).

** P<0.025, *** P<0.01, **** P<0.005,

Table 4. The fate of tumor cells injected into the peritoneal cavity of the mouse immunized with tumor cells treated with fresh garlic extract^a.

		one day after challenge	3 days "	7 " "	14 " "	21 " "	28 " "	Survival time after challenge (days)
Experimental	E1 ^b	+	+	+	-	-	-*	
	E2	+	+	-	-	-	±*	
	E3	+	+	++	+	++	++	34
	E4	+	+	++	+	++		28
	E5	-	-	-	-	-	-*	
	E6	+	++	+	-	-	-*	
	E7	-	-	-	-	-	-*	
	E8	++	++	-	+	-	-*	
	E9	++	++	-	+	-	+	
	E10	++	++	+	-	-	-*	
Control	C1 ^c	+	+	+	+	++	+++	28
	C2	+	++	+++				10
	C3	++	+	++	+	++	+++	33
	C4	++	++	+++				12
	C5	+	-	++	±	++		28
	C6	+	+	++	++	++		24
	C7	++	++	++				13
	C8	++	++	+++				12
	C9	++	++	+++				14
	C10	++	++	++	+++			15

^a EAT was used. Female DDD mice were used. At start of experiment, the mice were 8 months old. Experimental mice were immunized i.p. twice at 14-day intervals with freshly prepared, treated cells (7.2×10^6 and 8.7×10^6). Fourteen days after the second immunization, all experimental mice plus virgin controls were challenged with 10^6 live, fresh EAT cells. Cytological research of ascites was as follows. Ascites for cytological research was collected with sterilized glass capillary from peritoneal cavity. This collected ascites was smeared on the slide glass and stained with Giemsa solution, and examined microscopically for tumor cells.

^b Each experimental mouse is put into E1-E10.

^c Each control mouse is put into C1-C10.

(*) alive 100 days after challenge.

(-) No tumor cell was observed in ascites.

(±) A cell similar to tumor cell was observed in ascites.

(+) One or two tumor cells were observed in ascites.

(++) A lot of tumor cells were observed in ascites.

(+++) A lot of tumor cells were observed in ascites. It is very difficult to find out other kinds of cells.

みた。その結果は、Table 3 の Experiment 1 と 2 に示す如く、その抗原性がかなり減少していると考えられる成績を得た。従って、この抗原は比較的不安定なもののように思われる。このような事から考えると、癌の移植免疫を研究する際には、抗原の安定性について充分に考慮を払う必要があると考える。

免疫マウス或いは対照マウスの腹腔内へ注射された腫瘍細胞の運命を明らかにする為に、生きた腫瘍細胞の接種後時間の経過に従って、腹水を採取し、染色し、顕微鏡的に検査した。その結果、次の2つの事実が明らかになった。

第1に、Table 4 に示す如く、腫瘍細胞は、免疫マウスの腹腔内から徐々に消失した。しかし、対照マウスの腹腔内では徐々に増加した。従って、免疫の為にマウスの腹腔内に投与された腫瘍細胞は勿論の事、後に接種した生きた腫瘍細胞も、次第に腹腔内から消失してゆくものと考えられる。

第2に、免疫後のマウスに接種された腫瘍細胞は、対照群に比して、Figure 1 の如く、腹腔内細胞に囲まれている像が、よりしばしば見られた。この事実は、筆者の方法で免疫されたマウスの体内では細胞性免疫が増強されていると言う事実を示していると思われる。

腫瘍移植抵抗を誘導する研究としては、現在の所、次の様なものが報告されている。すなわち、放射線処理腫瘍細胞使用⁸⁾、ヨード酢酸処理腫瘍細胞使用⁹⁾、Nitrogen mustard N-oxide 処理腫瘍細胞使用¹⁰⁾、組織培養処理細胞使用¹¹⁾等である。その他、腫瘍細胞にウィルス感染を起させることによって腫瘍細胞の抗原性を高め、それにより癌細胞が宿主内で増殖出来なくなり、更に進んでウィルス未感染の腫瘍細胞に対する抵抗力も惹起さ

Figure 1. Ehrlich's ascites tumor cell surrounded by the intraperitoneal lymphoid cells. Giemsa stain.

せようとする試みもある。それには、フレンド・ウィルス¹²⁾とインフルエンザ・ウィルス¹³⁾とが今迄利用されている。この内、腫瘍細胞の SH 基の障害が作用機構と考えられるものは Apffel 等のヨード酢酸処理方法であるが、筆者のアリシンを含有する溶液による方法は、これに属するものと言えよう。しかし、筆者の方法は、ニンニクと言う食品に含有される物質を使用して居り、人体に対しても無害であり、しかも、アリシンには抗菌作用¹⁴⁾があることなどから無菌操作も容易になる可能性もあり、今後この方面の研究は更に進めるに価するものと思う。

V 結 論

$2.77 \times 10^{-3} M$ のアリシンを含有する生ニンニク抽出液で処理された各種腫瘍細胞で免疫された動物が、それぞれ対応する無処理の腫瘍の Challenge に対する抵抗力を獲得するか否かを検討した。その結果、

1) EAT と DDD マウスとの間では、DDD マウスは抵抗力を獲得した。

2) YS とドンリュウ・ラットとの間でも、ドンリュウ・ラットは抵抗力を獲得した。

3) SMT と C3H マウスとの間では、FCA を使用することにより C3H マウスは抵抗力を獲得した。

4) MCT-DDD と DDD マウスとの間でも、DDD マウスは抵抗力を獲得した。

終わりに本研究を、御指導、御鞭撻ならびに御校閲賜りました京都大学医学部衛生学教室の藤原元典教授、研究を進めて行く過程で種々御指導下さいました京都大学医学部病理学教室の翠川修教授、武田薬品工業研究所梶原彊先生、京都大学結核胸部疾患研究所伊藤彦彦博士に感謝致します。また、あらゆる面で骨身をおします御指導、御援助下さいました笹川祐成助教授、動物飼育に援助されました村岸阿紀良、中村千代の両氏に感謝致します。

なお、本研究の一部は、昭和42年4月第37回日本衛生学会総会、昭和44年4月第39回日本衛生学会総会、昭和45年10月第29回日本癌学会総会において発表した。

本研究に使用された研究費の一部は、藤原記念財団よりの研究費により賄われた。

文 献

- 1) 中田利一：腫瘍増殖に及ぼす生ニンニク抽出液の影響：日本衛生学雑誌，27巻6号(印刷中)。

- 2) Fujiwara, M. and Nakata, T.: Induction of Tumour Immunity with Tumour Cells treated with Extract of Garlic (*Allium sativum*): *Nature*, 216, 83-84 (1967).
- 3) Synge, R. L. M. and Wood, J. C.: A new free amino acid in cabbage: *Biochem. J.*, 60, XV (1955).
- 4) Stoll, A. and Seebeck, E., Ueber den enzymatischen Abbau des Alliins und die Eigenschaften der Alliinase: *Helv. Chim. Acta*, XXXII, 197-205 (1949).
- 5) Nakata, C., Nakata, T. and Hishikawa, A.: An improved colorimetric determination of thiol-sulfinate: *Analytical Biochemistry*, 37, 92-97 (1970).
- 6) 山村雄一・石坂公成：免疫化学，73頁，朝倉書店，東京（1965）。
- 7) Attia, M. A. M. and Weiss, D. W.: Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus: *Cancer Res.*, 26, 1787-1800 (1966).
- 8) Révész, L.: Detection of antigenic differences in isologous host-tumor systems by pretreatment with heavily irradiated tumor cells: *Cancer Res.*, 20, 443-451 (1960).
- 9) Apffel, C. A., Arnason, B. G. and Peters, J. H.: Induction of tumour immunity with tumour cells treated with iodoacetate: *Nature*, 209, 694-696 (1966).
- 10) Ishidate, M.: Recognition of the individuality of tumour strain by sensitized peritoneal lymphoid cells: *Nature*, 215, 184-185 (1967).
- 11) 足達敏博，翠川 修：試験管内発癌機構の研究(Ⅲ) 試験管内発癌細胞の腫瘍形成能喪失現象—免疫学的解析：日本癌学会総会記事，第27回総会，103頁（1968）。
- 12) 小林 博，仙道富士郎，加地 浩，白井俊一，小玉孝郎，斎藤 弘，武市紀年，細川真澄男：Friend virus 感染によるラット腫瘍の特異的移植抗原の修飾：日本癌学会総会記事，第27回総会，136～137（1968）。
- 13) Boone, C. W. and Blackman, K.: Augmented immunogenicity of tumor cells homogenates infected with Influenza virus: *Cancer Res.*, 32, 1018-1022 (1972).
- 14) Cavallito, C. J. and Bailey, J. H.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical properties and Antibacterial Action: *J. Amer. Chem. Soc.*, 66, 1950-1951 (1944).

(受付1973年4月13日)