● 原 著

ビタミンE経口投与の細胞性免疫能と腫瘍増殖に及ぼす影響

加藤 治樹・金 龍起
谷川 真理・上田 正博・近藤 依子
吉川 敏一・杉野 成・近藤 元治

Jpn. J. Clin. Immun., 9 (2) : 74~80, 1986.

Effect of vitamin E on cellular immunity and tumor growth in mouse

Haruki Kato, Ryuki Kin, Mari Tanigawa, Masahiro Ueda, Yoriko Kondo, Toshikazu Yoshikawa, Shigeru Sugino and Motoharu Kondo

The First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine

【Summary】

It is experimentally known that antioxidants such as vitamin E (VE), selenium or ascorbic acid prevent chemical carcinogenesis in animals. Inhibitory effect of tumor growth was also reported by administration of VE into mouse whose serum level was maintained 2 to 3 times higher than normal value. The present study aimed to demonstrate the effect of VE at sufficient or deficient on tumor growth and host immune response, since host immunity is an important factor on tumor development.

CDF_1 mice were fed with VE deficient (d-α-tocopherol 0.16 mg/100 g diet, VE-D group) or normal diet (dl-α-tocopheryl acetate 20 mg/100 g diet) for their life-span since the animal was 4-week-old. VE sufficient diet (dl-α-tocopheryl nicotinate 585 mg/100 g diet, VE-S group) was also given for the same period. Serum VE level measured by HPLC was maintained 1.5 to 2.4 times higher than that of normal level in VE-S group. However those in VE-D group was found to be lower than 0.1 μg/m*l*. Low responses of *in vitro* lymphocyte proliferation to PHA and LPS were found in VE-D group. After 1×10^5 cells/head of Meth A fibrosarcoma were s.c. transplanted in 12-week-old mice, tumor size was measured every week. Rapid growth of tumor was observed in both VE-D and VE-S groups, and there was no significant difference between the two groups. Their survival time was shorter in VE-D group. Based on these data, it was concluded that supplement of VE in this system had no tumor inhibitory effect, but VE deficient state was rather disadvantageous in tumor bearing host.

京都府立医科大学第1内科 (61・1・7 受付)

Key words: vitamin E,
Meth A fibrosarcoma,
tumor growth,
proliferation of lymphocytes to mytogen

【概　要】

ビタミン E (VE) の非特異的免疫反応に及ぼす影響と腫瘍抑制効果との関係を，VE を経口投与することによってとくに VE 低下状態の場合と比較検討した．雄の CDF_1 マウスを3群に分け，VE 欠乏食，コントロール食あるいは VE 過剰を4週齢より投与開始し，観察期間中継続した．それぞれの群の血清 VE 値を経時的に測定すると，VE 欠乏食群では投与開始から6週間以後に測定の限界以下に低下したが，VE 過剰食群ではコントロール食群の1.5〜2.4倍で14週間後まで推移した．脾細胞を用いた ConA に対する *in vitro* リンパ球幼若化反応は，3群間に差はみられなかった．PHA および LPS に対する反応では，VE 欠乏食群でコントロール食群に比べて低下 ($p<0.01$) がみられたが，VE 過剰食群とコントロール食群との間には差がなかった．VE の腫瘍への影響については，食餌開始後9週目 (12週齢) に 1×10^5 個/匹の Meth A を各群マウスの足蹠に皮下移植した．VE 欠乏食群と VE 過剰食群の腫瘍はともにコントロール食群に比べて増大 ($p<0.01$) したが，VE 欠乏食群と VE 過剰食群間には差はみられなかった．しかし，生存日数は VE 欠乏食群がコントロール食群に比べて短縮 ($p<0.05$) したが，VE 過剰食群とコントロール食群間には差はなかった．このことから，VE 低下状態は担癌生体に対して悪影響を及ぼす傾向が認められたが，逆に VE 過剰食投与によっても担癌状態の改善はみられなかった．

I. はじめに

セレニウム[1,2]，ビタミン E[3] (VE, dl-α-tocopherol)，アスコルビン酸[4]などのいわゆる抗酸化剤が，化学発癌物質による発癌を軽減させることがよく知られている．この発癌機序の1つとしてフリーラジカルによる DNA 損傷があり，VE をはじめとする抗酸化剤がこのフリーラジカルによる DNA 損傷を防ぎ，その結果として，これらの抗酸化剤で処理することにより化学発癌物質による発癌を軽減できる[5]．しかし，逆に VE を大量に投与すると，VE はむしろ発癌プロモーターとして作用すること，すなわち抗酸化剤も過剰では pro-oxidant になりうる[6]．これらの報告から，発癌を抑える目的に使用する VE には至適量があるのではないかと思われる．

一方，VE は免疫能にも種々の影響を与える．すなわち，抗体産生能[7,8]，好中球の貪食能[9,10]，*in vitro* リンパ球幼若化反応の増強[11,12]などがあげられるが，これらのテストでも VE の至適量の存在が示されている[12]．

ところで，VE が腫瘍に対して抑制的に作用するかどうか，とくに VE が種々の免疫反応を増強する作用を有することから，VE に抗腫瘍作用があるかという点に興味がもたれる．事実，腫瘍移植前あるいは腫瘍移植と同時に適量の VE を投与すると，腫瘍の増殖が抑制されたという報告がある[12]．そこで，われわれは VE を前もって長期間経口投与して血清中の VE 量を上昇させた状態で腫瘍を移植し，その抑制効果と非特異的な細胞性免疫反応としての *in vitro* リンパ球幼若化反応に対する影響を，VE 低下状態の場合と比較検討した．

II. 材料および方法

1. 動　物

4週齢の CDF_1 (BALB/C×DBA/2) 雄マウス (日本チャールスリバー) を使用した．

2. ビタミン E (VE)

基本となる VE 欠乏食 (オリエンタル酵母精製飼料) は，その 100 g 中に 0.16 mg の d-α-tocopherol (0.23 I.U.) を含む．VE 欠乏食の組成は表1に示す．コントロール食は，この VE 欠乏食 100 g 中に dl-α-tocopheryl acetate 20 mg (20 I.U.)，VE 過剰食は dl-α-tocopheryl nicotinate 585 mg (500 I.U.) をそれぞれ含む．これらの VE 欠乏食，コントロール食あるいは VE 過剰食を CDF_1 マウスに4週齢より与え始め，観察期間中継続した．

3. 血清 VE の測定

マウスから断頭法で採血し，血清を分離後 −70°C に保存した．血清中の VE は，高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した[13]．

4. *in vitro* リンパ球幼若化反応

マウスを断頭で屠殺した後，開腹して無菌的に脾臓を取り出し，10% 新生ウシ血清（阪大微研），50 μg/ml ストレプトマイシン，50 U/ml ペニシリンおよび 0.25 μg/ml ファンギゾン（MAB）を含む RPMI 1640（日水製薬）培養液（以下培養液と略す）で洗い，細切後 #60 ステンレスメッシュを通し単離細胞を得た．Lysing buffer (NH_4Cl 8,290 g, $KHCO_3$ 1.0 g, EDTA 0.0372 g/1,000 ml 蒸留水）で赤血球を溶血させ，培養液で2回洗浄し細胞数を 5×10^6/ml に調整した．96穴U底マイクロプレート（Nunc）に上記細胞浮遊液 0.1 ml を入れ，さらに concanavalin A (Con A, Pharmacia) 10 μg/ml, phytohemagglutinin (PHA, Pharmacia) 50 μg/ml あるいは lipopolysaccharide (LPS, S. typhosa 0901, Difco) 200 μg/ml を 0.1 ml 加え，37°C, 5% CO_2 の条件下で48時間培養した．その後 ^{3}H-thymidine (New England Nuclear) 1 μCi を加え，さらに18時間培養後 automatic cell harvester で細胞を回収し，液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した．実験はすべて triplicate で行った．

5. 腫　瘍

BALB/C マウスに syngeneic である fibrosarcoma Meth A を CDF_1 マウス腹腔内で数代継代したものを使用した．RPMI 1640 で洗浄後，それに浮遊させた Meth A 1×10^5 個/匹をマウスの右後足蹠に皮下移植し，足蹠の厚さを計測し mm で表し腫瘍径とした．

6. 統計学的解析[14]

VE 欠乏食群，コントロール食群および VE 過剰食群間相互の血清 VE 値，ConA, PHA および LPS に対する *in vitro* リンパ球幼若化反応，腫瘍径の動きは，2元配置分散分析法により解析した．血清 VE 値と腫瘍径については Scheffe の方法により，*in vitro* リンパ球幼若化反応については Turkey の方法により多重比較を行い有意差を検定した．また，3群間の生存日数に関しては Kruskal-Wallis の方法を用いて群間比較を行い，有意差検定には Scheffe の方法を用いた．

表 1　VE 欠乏食の組織

corn starch	38.0%
alpha-maltstarch	10.0%
granuled sugar	5.0%
vitamin-free casein	25.0%
purified lard	6.0%
vitamin E mixture	2.0%
mineral mixture	6.0%
powdered filter paper	8.0%

III. 結　果

1. 血清 VE 値

VE 欠乏食，コントロール食あるいは VE 過剰食をマウスに投与し，2週，4週，6週，8週，11週および14週後に各群4匹ずつより血清を採取し，血清 VE 値を測定した．食餌投与前の血清 VE 値は 2.11±0.55 μg/ml で，統計処理方法の都合上2週目以後の各群の血清 VE 値の最小自乗推定値の動きを図1に示した．VE 欠乏食群の血清 VE 値は，食餌投与開始4週以後急速に低下し，6

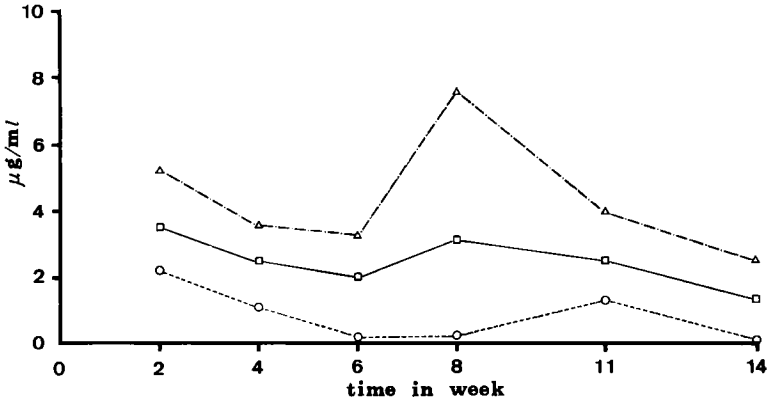

図 1　血清 VE 値の経時的変化

○……○：VE 欠乏食，□———□：コントロール食，
△—·—·—△：VE 過剰食．

これらの記号は，図2～図5に共通である．

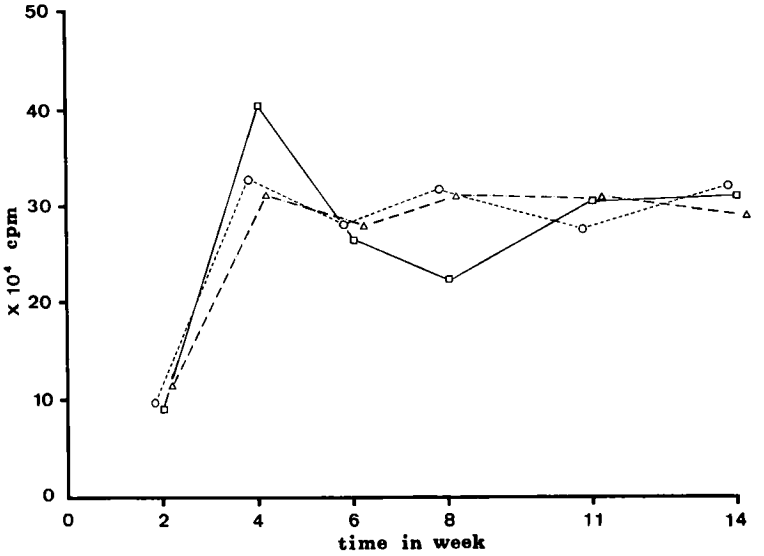

図 2 Con A 刺激による *in vitro* リンパ球幼若化反応の経時的変化

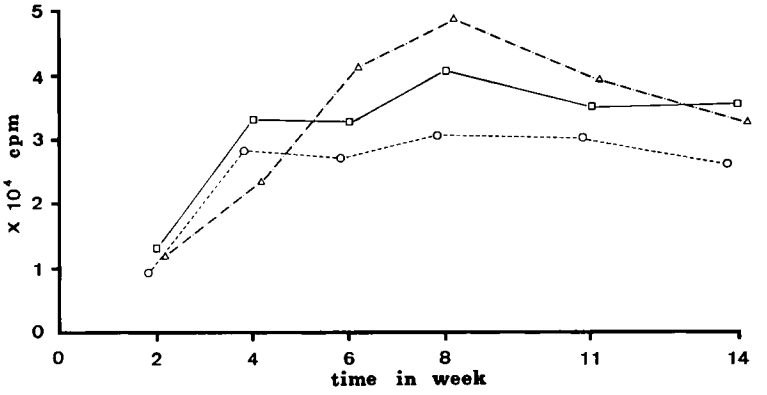

図 3 PHA 刺激による *in vitro* リンパ球幼若化反応の経時的変化

週間後には 0.1 μg/m*l* と著明な低値を示し，その後も低値を持続した（$p<0.01$）．コントロール食群の血清 VE 値は，14 週間後まで投与前値の前後で推移した．VE 過剰食群の血清 VE 値は，投与前値の 1.5～2.4 倍の値で推移した（$p<0.01$）．

2. *in vitro* リンパ球幼若化反応

1) ConA に対する反応

VE 欠乏食，コントロール食あるいは VE 過剰食を投与開始後，血清 VE 測定と同じときに各群 4 匹ずつそれぞれの個体ごとに単離脾細胞を調整して実験した．*in vitro* で ConA 刺激後取り込まれた ^{3}H-thymidine のカウントを各群間で 2 元配置分散分析を行い，その最小自乗推定値を経過時間を追って示した（図 2）．VE 欠乏食群，コントロール食群および VE 過剰食群間には，ConA 刺激による *in vitro* リンパ球幼若化反応には差はみられなかった．

2) PHA に対する反応

ConA の場合と同様，PHA 刺激後の ^{3}H-thymidine のカウントを図 3 に示した．多重比較の結果，コントロール食群と VE 欠乏食群，VE 過剰食群と VE 欠乏食群間にそれぞれ $p<0.01$ で有意差がみられたが，VE 過剰食群とコントロール食群間には有意差はみられなかった．

3) LPS に対する反応

図 4 に LPS 刺激後統計処理をしたカウントを示した．コントロール食群と VE 欠乏食群（$p<0.01$），VE 過剰食群と VE 欠乏食群（$p<0.05$）との間に有意差がみられたが，VE 過剰食群とコントロール食群との間には差

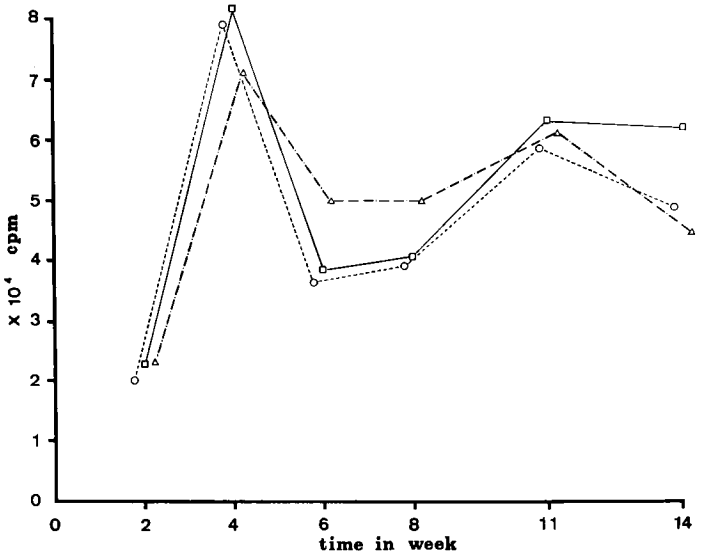

図 4 LPS 刺激による *in vitro* リンパ球幼若変化反応の経時的変化

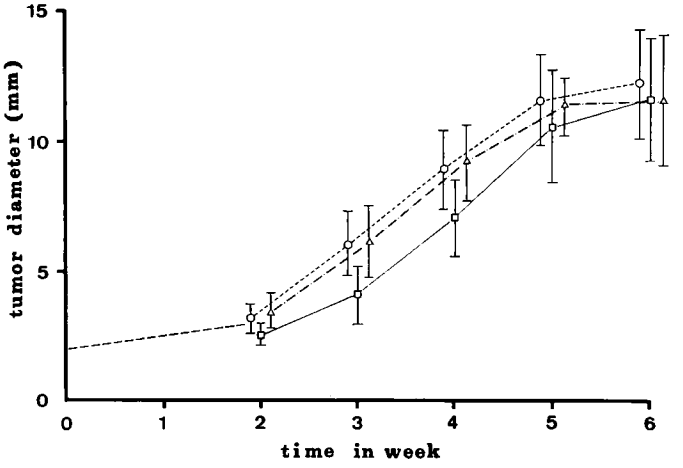

図 5 VE の腫瘍増殖に対する影響

はみられなかった.

3. 腫瘍の増殖

4週齢より VE 欠乏食, コントロール食あるいは VE 過剰食を投与し始めた CDF_1 マウスに, 食餌投与開始8週間後に右後足蹠に Meth A 1×10^5 個を皮下移植して, 足蹠の厚さを毎週計測した. 図5に示すように, 腫瘍移植後2週間を過ぎたころより各群の腫瘍径は直線的な増大を示した. VE 欠乏食群と VE 過剰食群の腫瘍はともにコントロール食群のそれに比べ有意 ($p<0.01$) に増大したが, VE 欠乏食群と VE 過剰食群との間には差は認めなかった.

4. 生存日数

VE 欠乏食群, コントロール食群および VE 過剰食群に腫瘍を移植してから死亡するまでの日数に差があるかどうかを検討した. VE 欠乏食群はコントロール食群に比べ生存日数が短縮していたが ($p<0.05$), VE 欠乏食群と VE 過剰食群, コントロール食群と VE 過剰食群との間には生存日数に差はなかった (図6).

IV. 考 案

VE は免疫能にいろいろな影響を与える. VE の経口投与により体液性免疫反応が賦活され[7,8], *E. coli* 感染に対する抵抗性が増強する[15]. さらには, 抗体 (hemoag-

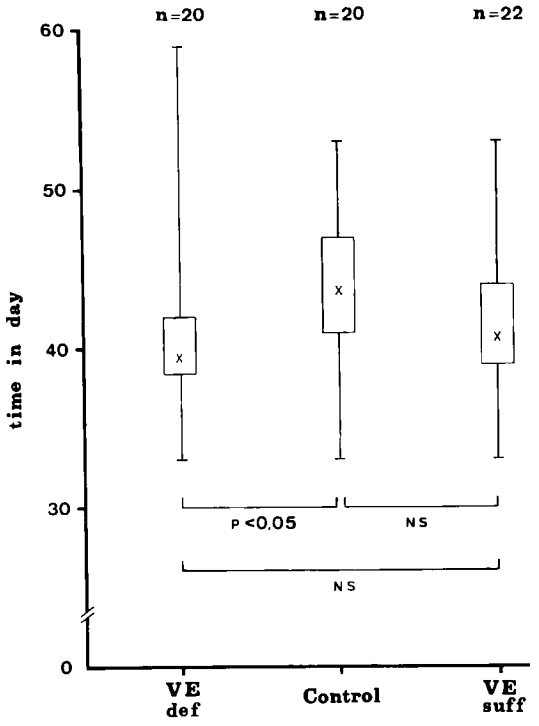

図 6 VE の担癌動物の生存日数に対する影響

glutinin）の産生増強と helper T 細胞の活性化[16]が示唆されている．また VE 投与による ADCC の増強[17]，好中球の貪食能の増強効果[9,10]も報告されている．PHA, ConA あるいは LPS 刺激による *in vitro* リンパ球幼若化反応の増強[11,12]が報告されているが，結果は必ずしも一致したものではない．ここで問題となるのは，VE が経口または注射によって投与されているかという投与経路に関する問題と経口投与される場合の VE の投与量の問題である．いずれの投与法でも，VE の血中あるいは組織中の濃度が明らかでないことが多いが，安永ら[12]は VE の投与量と血清中の VE 量の関係を明らかにし，その血清濃度が正常の 2 倍程度のとき *in vitro* リンパ球幼若化反応がもっとも増強されることを示した．われわれは VE 過剰食を投与することによって，マウスの血清 VE 値が投与期間中正常の 1.5 倍から 2.4 倍の間で推移することを確かめると同時に，VE 欠乏食投与 6 週目以後血清 VE 値はほとんど 0.1 μg/ml 以下となることを確かめたうえで本実験を行った．

マウス脾細胞を用いた *in vitro* リンパ球幼若化反応を，VE 過剰食，コントロール食あるいは VE 欠乏食投与開始後経時的にみてみると，ConA, PHA あるいは LPS の刺激によって 2 週目から 4 週目に ^{3}H-thymidine のカウントの上昇がみられたが，これらは各個体の免疫系の成熟度に伴う変化と考えられる．ConA 刺激による *in vitro* リンパ球幼若化反応をみると，各測定点での多少の変動があるものの全経過を通じて血清 VE 値の動きと相関するような差はみられなかった．PHA に対する *in vitro* リンパ球幼若化反応は，VE 欠乏食群では全経過を通して有意に低下していたが，VE 過剰食群では増強されなかった．LPS に対する反応も VE 欠乏食群で有意な低下がみられたが，VE 過剰食投与によって増強されることはなかった．ただ，腫瘍を移植した 8 週目では VE 過剰食群の PHA と LPS に対する反応は増強していた．以上の結果から，限られた期間中血清 VE 値を適当な値に上昇させるよう VE を投与すれば，*in vitro* リンパ球幼若化反応でみた非特異的な細胞性免疫能はある時期には増強されるが，その増強された状態を非較的長期間持続させるのは困難ではないかと考えられた．逆に，血清 VE 値が極端に低い状態が持続すれば，*in vitro* リンパ球幼若化反応は低下することが明らかとなった．

VE 過剰食，コントロール食あるいは VE 欠乏食投与開始 8 週後（12 週齢）のマウスに Meth A 1×10^5 個を皮下移植し，腫瘍増殖と生存日数を検討した．腫瘍の増殖は，VE 過剰食群と VE 欠乏食群がともにコントロール食群と比較して有意に早かった．生存日数でみると，VE 欠乏食群がコントロール食群に比べてやや短縮したのみで，VE 過剰食群の生存日数がとくに延長したという結果は得られなかった．これらの結果より，VE 欠乏食投与による VE 低下状態は，担癌生体に対して悪影響を及ぼすと考えられた．しかし，逆に VE 500 I.U./100 g の過剰食投与によっても担癌状態の改善はみられなかった．本実験では，VE として DL-α-tocopheryl nicotinate を使用したが，今後 VE の他の derivertives による検討も必要と考えられる．それと同時に，有効な投与量，投与方法に関するより詳細な検討も今後の課題の 1 つであると思われる．

謝辞　統計解析について御助言いただきました阿部公夫氏に深謝いたします．

文　献

1) Shamberger, R.J., Rudolph, G. : Protection against carcinogenesis by antioxidants. Experientia, 22 : 116, 1966.

2) Shamberger, R.J. : Relationship of selenium to

cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. JNCI, 44 : 931～936, 1970.

3) Cook, M.G., McNamara, P. : Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. Cancer Res., 40 : 1329～1331, 1980.

4) Shamberger, R.J. : Increase of peroxidation in carcinogenesis. JNCI, 48 : 1491～1497, 1972.

5) Shamberger, R.J., Baughman, F.F., Kalchert, L.S., et al. : Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 : 1461～1463, 1973.

6) Toth, B., Patil, K. : Enhancing effect of vitamin E on murine intestinal tumorigenesis by 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride. JNCI, 70 : 1107～1111, 1983.

7) Tengerdy, R.P., Heinzerling, R.H., Nockels, C.F. : The effect of vitamin E on the immune response of hypoxic and normal chickens. Infect. Immunuity, 5 : 987～989, 1972.

8) Tengerdy, R.P., Heinzerling, R.H., Brown, G. L., et al. : Enhancement of humoral immune response by vitamin E. Int. Arch. Allergy, 44 : 221～232, 1973.

9) Baehner, R.L., Boxer, L.A., Ingraham, L.M., et al. : The influence of vitamin E on human polymorphonuclear cell metabolism and function. Ann. N.Y. Acad. Sci., 393 : 237～250, 1982.

10) Chirico, G., Marconi, M., Colombo, A., et al. : Deficiency of neutrophil phagocytosis in premature infants : Effect of vitamin E supplementation. Acta Paediatr. Scand., 72 : 521～524, 1983.

11) Corwin, L.M., Schloss, J. : Influence of vitamin E on the mitogenic response of murine lymphoid cells. J. Nutr., 110 : 916～923, 1980.

12) Yasunaga, T., Ohgaki, K., Inamoto, T., et al. : Effect of vitamin E as an immunopotentiation agent and its influence on tumor growth in mice. Arch. Jpn. Chir., 53 : 312～323, 1984.

13) Abe, K., Kusube, K., Mukasa, K., et al. : Determination of vitamins A, E and K and ubiquinones in plasma by very high speed liquid chromatography. Bunseki Kagaku, 33 : E309～E314, 1984.

14) Snedecor, G.W., Cochran, W.G. : Statistical methods, sixth edition, The Iowa State University Press, Ames, 1967.

15) Heinzerling, R.H., Nockels, C.F., Quarles, C.L., et al. : Protection of chicks against *E. coli* infection by dietary supplementation with vitamin E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 146 : 279～283, 1974.

16) Tanaka, H., Fujiwara, H., Torisu, M. : Vitamin E and immune response. I. Enhancement of helper T cell activity by dietary supplementation of vitamin E in mice. Immunology, 38 : 727～734, 1979.

17) Lim, T.S., Putt, N., Safranski, D., et al. : Effect of vitamin E on cell-mediated immune responses and serum corticosterone in young and maturing mice. Immunology, 44 : 289～295, 1981.