

## 發癌劑 3-Methylcholanthrene 投與 마우스에 對한 免疫生物學的 研究 : I. 足蹠腫脹反應 및 血中抗體價

宋 熹 鍾 · 金 鍾 冕  
全北大學校 農科大學 獸醫學科  
(1986. 2. 28 接受)

### Immunobiological Studies in Mice Treated with Chemical Carcinogen, 3-Methylcholanthrene: I. Footpad Swelling Reaction and Antibody Titer in Serum

Hee-jong Song and Jong-myeon Kim

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chonbuk National University

(Received February 28th, 1986)

**Abstract:** Experiments were performed on mice to investigate the effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon, 3-methylcholanthrene (MCA) on Arthus reaction, delayed-type hypersensitivity (DTH) and antibody production to sheep red blood cells (SRBC). Mice were sensitized *iv* with 0.1ml of 1% SRBC suspension were treated with a single *ip* injection of olive oil alone or with different doses of MCA in oil (0.5~50mg/Kg) at various time before (-) or after (+) sensitization (day 0) and were challenged at 4 days after SRBC. Arthus reaction was measured at 3 hours after challenge and other responses at 24 hours.

Treatment with MCA inhibited Arthus reaction and DTH to SRBC, measured by footpad swelling reaction, and this immunosuppressing effect was dependent on the dose and time of MCA treatment in relation to SRBC sensitization.

Humoral immune responses as measured by serum hemagglutinin-and hemolysin-titers to SRBC were significantly depressed when MCA was injected before or at the same time of sensitization. However, the response was slightly depressed when injected after SRBC.

These results indicate that MCA suppress the function of the cells involved in immune responses.

### 緒 論

發癌劑로 알려진 3-methylcholanthrene(MCA)는自然界에 널리 分布하고 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)에 屬하는 物質로서 腫瘍發生機轉을 밝히기 위한 實驗材料로 자주 利用되고 있다.<sup>18,38,40</sup> MCA에 의한 發癌機轉은 大部分의 PAH에서와 마찬가지로 microsome의 mixed-function oxidases, 即 cytochrome P-450 系列의 同位酵素 등에 의해 MCA가 水溶性物質

로 轉換되어 細胞外로 遊離되는 過程中에<sup>8,22,25,27,35</sup> 그 酸化過程의 中間代謝產物과 細胞內의 巨大分子들이 結合하여 이들 毒性物質이 標的細胞의 genome에 作用,<sup>12,13,16,28,30</sup> 本來의 遺傳的 特徵을 變化시킴으로써 初期의 腫瘍細胞가 誘導되고,<sup>2,6,7,19,43</sup> 生體의 數 많은 因子들의 影響下에서 이의 分裂增殖이 이루어진다고 알려져 있다.

腫瘍細胞의 發生 및 增殖에 있어서 宿主의 免疫能은 個體內部에 發生되는 腫瘍細胞가 여러 點에서 正常組

織細胞와 相異함이 밝혀지고, <sup>5,34)</sup> 또한 腫瘍特異移植抗原이 發見된 以來, <sup>15,17,22,34)</sup> 腫瘍細胞가 一種의 抗原으로 免疫系에 의해 認識되는 異物質임이 確實視되면서부터 腫瘍과 宿主의 免疫能과의 相互關係를 究明키 위한 研究가 活潑히 進行되어 왔다. <sup>8,9,11,14,24,31,37,38,41,42,44,45,47)</sup> 發癌劑 MCA가 宿主免疫能에 미치는 影響에 대한 研究는 랫트와 마우스에 MCA를 筋注하면 體液性 免疫反應이 抑制된다고 1956년에 Davidsohn 등<sup>11)</sup>이 報告한 以來, MCA가 抗體合成能, <sup>37,38,42)</sup> 組織移植片 拒否 <sup>31,41,42)</sup> 그리고 syngeneic tumor에 대한 細胞毒性, T淋巴球의 活性 등 <sup>1,2,11,38)</sup>과 같은 免疫反應을 抑制하므로써 MCA의 發癌能이 促進된다는 보고가 있는 반면, MCA에 耐性을 갖는 實驗動物의 新生期 또는 發育初期에 胸腺을 摘出한 후 MCA를 投與하여도 腫瘍이 誘發되지 않으며, 先天的으로 胸腺이 缺乏된 nude 마우스(nu/nu) 및 正常的인 免疫能을 갖는 nude 마우스(nu/+) 共히 MCA에 의한 oncogenesis에 차이가 없다는 보고 등 <sup>43,45)</sup>, MCA에 의한 發癌能과 宿主의 免疫能과는 無關하다는 相反된 보고가 있어 MCA의 發癌能에 있어서 宿主의 免疫系의 役割에 대해서는 아직까지도 論難의 대상이 되고 있다. <sup>41,44)</sup>

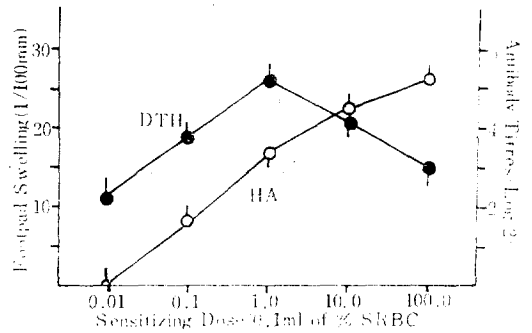
따라서 著者들은 이를 究明하기 위한 試圖의 一環으로 마우스에 MCA를 投與하고 足趾腫脹反應으로 發見되는 Arthus 反應 및 遲延型過敏反應과 血清內 緬羊赤血球(SRBC)에 대한 凝集素(HA) 및 溶血素(HE)價를 MCA의 投與時期 및 投與量에 따라 測定하여 MCA가 生體의 免疫反應에 미치는 影響을 평가하였던 바 그 結果를 報告하고자 한다.

### 材料 및 方法

**實驗動物 및 實驗群:** 實驗動物은 本 大學校 動物飼育場에서 繁殖飼育한 生後 8~10週齡의 體重 18~20g의 健康한 ICR마우스를 사용하였다.

實驗群은 發癌劑의 投與日程에 따라 SRBC感作前 28日, 14日, 7日, 1日과 感作과 同時(0) 및 感作後 4日群으로 大別하고, 各群을 發癌劑의 投與量에 따라 다시 3個 亞群으로 細分하였다.

**發癌物質 및 處理:** 腫瘍發生 初期過程에서의 生體 免疫反應의 變化像을 計測하기 위하여 사용한 發癌劑는 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)에 屬하는 3-methylcholanthrene(MCA, Eastman®, Kodak, NY)이다. 이 MCA를 olive oil(Junsei Chemical Co., Japan)에 混合 重湯溶解하고, 實驗群에 따라 體重 kg當 各各 50mg, 5mg 또는 0.5mg의 濃度로 腹腔內에 注入하였으며, 對照群에는 同量의 olive oil만을 注入하였다.



**Fig. 1.** Delayed-type hypersensitivity and antibody production to varying doses of SRBC in mice

Mice were sensitized *iv* with indicating doses of SRBC(0.1mg/mouse), and challenged 4 days later. The results were obtained at 24 hrs after challenge and expressed as mean±S.E. values from at least 5 animals.

**抗原 및 感作:** 發癌劑 投與에 따른 生體의 免疫反應 增減을 測定하기 위한 抗原으로는 SRBC를 사용하였다.

SRBC는 雌性緬羊의 頸靜脈에서 採血한 후 同量의 Alsever's液(pH 6.1)을 加하여 4°C에 保存하면서 採血 후 2週 以內의 것을 使用直前에 Dulbecco phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)으로 3回 遠心洗滌(400g, 20分)하였다.

한편 正常 ICR 마우스에서의 最適感作 抗原濃度를 구하기 위하여 Fig.1에서와 같이 여러 濃度의 SRBC 浮遊液을 마우스의 尾靜脈內로 注入시키고, 4日 후에 左側後肢足趾 皮內에 20% SRBC浮遊液 0.05ml를, 右側後肢足趾 皮內에는 同量의 PBS를 注入하여 惹起注射하고, 24時間 후에 左右 後肢足趾의 腫脹程度를 測定 比較함과 아울러 血清內 HA 價를 測定하였다.

그 結果, 遲延型過敏反應(delayed-type hypersensitivity, DTH)은 1% SRBC浮遊液 0.1ml( $1 \times 10^7$  SRBC/mouse)感作群에서 最高(0.26±0.021mm)에 達하였고, HA價는 感作抗原量이 增加될수록 높았다. 따라서 本 實驗에 使用한 MCA가 強力한 發癌劑이며, 癌腫에 있어서는 體液性免疫보다는 細胞性免疫反應에 主로 關與한다는 點을 勘索하여 以後의 實驗에서는 DTH의 發現에 最適感作抗原量인 1% SRBC 浮遊液으로 感作하였다.

**足趾腫脹反應 測定:** 抗原(SRBC)에 대한 Arthus 및 DTH反應은 MacDonald와 Carter,<sup>28)</sup> Yoshikai 등<sup>48)</sup>의 方法에 따라 足趾腫脹反應(footpad swelling test, FST)程度를 計測하였다. 要約하면, SRBC感作 4日 後에 따

우스의 左側後肢足蹠의 皮內에 PBS에 浮遊한 20% SRBC浮遊液 0.05ml( $1 \times 10^8$  SRBC/mouse)를 惹起注射 하였으며, 右側後肢足蹠의 皮內에는 同量의 PBS를 注射하여 對照로 삼았다. 그리고 惹起注射 3時間 후에 Arthus反應을, 24時間 후에 DTH反應을 microcaliper (0.01mm)로 測定하고, 對照足蹠과의 腫脹度差를 比較하였다.

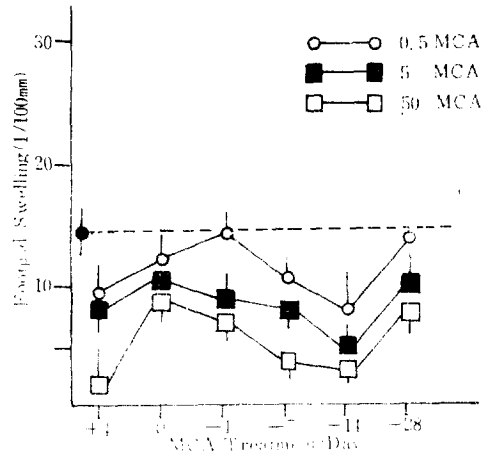
**赤血球凝集素 및 溶血素價 測定:** 抗原에 대한 赤血球凝集素(hemagglutinin, HA)價는 Coombs와 Fiset<sup>10)</sup> 및 Stavitsky<sup>40)</sup>의 方法에 따라 microtitration tray(Limbo Chemical Co., New Haven)를 利用하여 microtitration 方法으로 實施하였다. 要約하면, 各 마우스로 부터 分離한 個個의 非動化시킨 血清 0.025ml를 生理食鹽水로 2倍 系列稀釋하고, 여기에 生理食鹽水에 浮遊한 0.5% SRBC 浮遊液 0.025ml를 잘 混合하여 37°C에 18~24時間 放置한 다음 赤血球의 凝集與否를 觀察하여 HA價를 判讀하였으며, 凝集을 일으킨 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 HA價로 하였다.

한편 溶血素(hemolysin, HE)價의 測定은 SRBC 및 血清의 稀釋은 HA價測定時와 同一하게 實施하였으며, 여기에 SRBC로 非特異의 因子를 吸着 除去시키고 生理食鹽水로 20倍 稀釋한 補體<sup>29)</sup>(guinea pig 血清) 0.025 ml를 各 well에 加한 다음, 37°C에 1時間 放置하여 溶血與否를 觀察하고, 이를 4°C에 하룻밤 放置하여 最終 判讀하였으며, 이 때 完全溶血을 일으킨 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 HE價로 하였다.

## 結 果

**Arthus 反應:** MCA가 arthus反應에 미치는 影響을 評價하기 위하여 여러 濃度의 MCA를 SRBC로 感作하기 前, 感作과 同時 또는 感作 후에 投與한 후, 感作 4日에 惹起注射하고 惹起注射 3時間 後에 足蹠腫脹度를 測定하였던 바 그 結果는 Fig. 2에서와 같다. 즉, 對照마우스에서의 足蹠腫脹度는  $14.5 \pm 1.9$ 인데 比하여 MCA處理群에서는 投與濃度 및 投與時期에 따라 多少의 差異는 보였으나 全般的으로 對照群보다 減少되었다.

投與濃度別에 따른 足蹠腫脹度의 減少는 0.5mg MCA 投與群에서  $8.0 \pm 1.6 \sim 14.2 \pm 1.5$ 의 範圍를 보여 對照群의 成績과 別다른 差異를 認定할 수 없었으나, 2중 感作 14日 前에 MCA를 處理한 群에서는 對照群에 比해 44.8%의 減少를 보였으며, 5mg MCA 投與群의 腫脹度는  $5.6 \pm 1.6 \sim 10.8 \pm 1.6$ 의 範圍를 보였고, 50mg MCA 投與群에서는  $2.0 \pm 0.5 \sim 8.3 \pm 1.4$ 의 腫脹度를 보여 結果적으로 5mg 以上の MCA 投與群에서는 對照



**Fig. 2.** Effect of MCA on Arthus reaction in mice. Mice were injected IP with varying doses of MCA on indicated day, sensitized IV with 0.1ml of SRBC suspension on day 0, and challenged 4 days later. Footpad swelling was measured at 3 hours after challenge. Responses are expressed as mean  $\pm$  S.E. values from at least five animals. Horizontal dotted line indicates the mean values of control group.

群에 比하여 顯著한 減少를 보였다.

한편 投與 時期別에 따른 足蹠腫脹度는 對照群에 比하여 感作前 28日 및 1日, 感作과 同時에 MCA를 投與한 群에서 緩慢한 減少를 보였으나, 感作前 7日 및 14日, 感作後 4日에 MCA를 投與한 群에서는 그 減少가 顯著하였다.

**DTH反應:** 發癌劑 MCA의 投與時期 또는 投與量에 따른 細胞性免疫反應을 評價하기 위한 方法의 하나로 SRBC感作後 4日에 足蹠皮內에 惹起注射하고 그 後 24時間에 DTH를 測定하였던 바 그 結果는 Fig. 3과 같다.

即 DTH에 있어서 對照마우스의 足蹠腫脹度(mm)는  $0.26 \pm 0.021$ 인데 比하여 MCA投與群中 0.5mg 投與群에서는  $0.14 \pm 0.033 \sim 0.24 \pm 0.032$ , 5mg MCA 投與群에서는  $0.11 \pm 0.025 \sim 0.16 \pm 0.022$ , 그리고 50mg MCA 投與群에서는  $0.05 \pm 0.003 \sim 0.15 \pm 0.019$ 로서 모두 對照群에 比하여 減少되었고, 또한 投與한 MCA의 濃度가 높을수록 그 減少의 程度가 甚하였다. 그러나 投與時期에 따라서는 대체적으로 큰 差異를 보이지 않았다.

**HA價:** MCA投與 마우스로 부터 SRBC感作 5日後에 眼窩靜脈叢을 穿刺하여 採血한 다음 血清을 分離하고, 血清內 SRBC에 對한 HA價를 測定. 이를 MCA의 投與時期 및 投與量에 따라 比較하였던 바 그 結果는

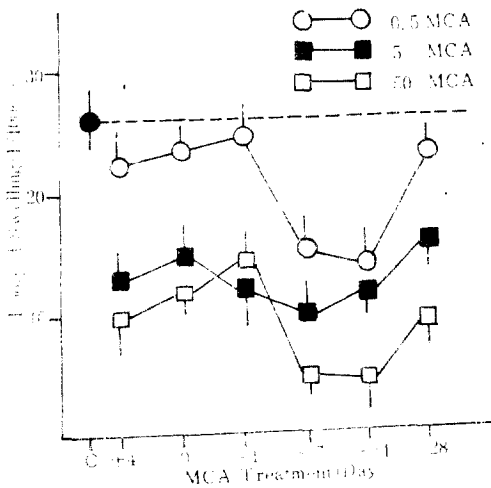


Fig. 3. Effect of MCA on DTH in mice

Mice were treated IP with varying doses of MCA on indicated day, sensitized IV with 0.1ml of 1% SRBC suspension. Footpad swelling was measured at 24 hours after challenge. Responses are expressed as mean  $\pm$  S.E. values from at least 5 mice. Horizontal dotted line indicates the mean values of control group.

Fig. 1과 같다. 즉, MCA投與群에서의 HA價는 對照群( $0.4 \pm 0.4$ )에 비하여 모두 減少되었는데, 그 정도는 0.5mg MCA로 處理한 群에서는 대체로 緩慢하였는데, 5 또는 50mg의 MCA로 處理한 群에서는 그 減少가 顯著하였으나( $p < 0.05$ ), 投與時期에 따른 抗體價의 變動은 多少의 程度差異를 보였을 뿐 各 群間에 有意性은 없었다.

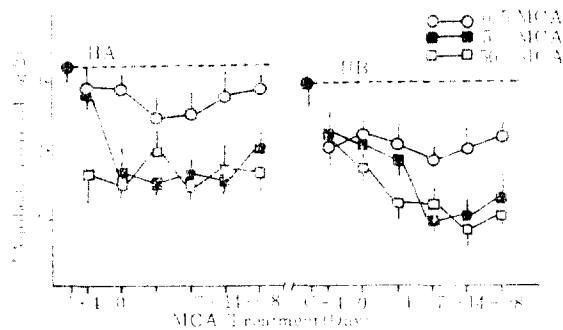


Fig. 4. Effect of MCA on antibody production in mice

Mice were injected IP on indicated day before (-) or after (+) SRBC sensitization (day 0). Serum were obtained at 5 day after SRBC sensitization. Titres are expressed as mean  $\pm$  S.E. values from at least 5 animals. Horizontal dotted line indicates the mean values of control group.

HE價: 血清內 SRBC에 對한 溶血素價는 對照群( $2.8 \pm 0.3$ )에 비하여 MCA投與群에서는 모두 減少하였는데(Fig. 4), 그 減少의 程度는 0.5mg MCA投與群에서는 投與時期에 關係없이 減少를 보였다( $p < 0.05$ ). 그러나 5mg 以上の MCA를 投與할 경우에는 抗原의 感作과 同時 또는 後에 投與하면 低濃度의 MCA를 投與한 群과 有意한 減少의 差異를 보이지 않았으나( $p > 0.05$ ), 抗原感作 以前에 MCA를 投與한 경우에는 對照에 비해 顯著히 減少되었다( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

### 考 察

Tumor-bearing host에 있어서 免疫能이 低下 또는 抑制된다는 報告<sup>1, 2, 8, 9, 14, 18, 19, 24, 31, 34, 41, 44, 47</sup>가 蓄積되고 있으나, 腫瘍發生直前의 宿主 免疫系의 動態에 관한 研究는 數編에 不遇하며 이들 報告에 있어서도 단지 部分的인 免疫現像의 觀察에 그치고 있는 實情이다.<sup>11, 29, 38, 42, 43</sup> 이에 著者들은 腫瘍發生直前의 宿主 免疫系의 動態를 把握하고자 가장 強力한 發癌劑로 알려진 MCA를 마우스에 投與하고 免疫能이 變化를 投與時期 및 投與量에 따라 測定 比較하였다.

宿主의 免疫能을 評價하는 데는 여러 方法이 考案되어 있으며, 이들 中 實驗動物에서의 細胞性免疫 및 體液性免疫反應을 同時에 評價할 수 있는 方法으로는 Raffel과 Newel<sup>39</sup>이 開發報告한 SRBC를 抗原으로 使用한 手技가 그 簡便性과 銳敏性 때문에 자주 利用되고 있다. 그러나 SRBC에 의한 免疫能의 發現程度는 實驗動物의 株(strains), 抗原의 投與經路 및 投與量에 따라 相異한 結果가 招來된다.<sup>4, 23, 28, 30, 33</sup> 따라서 著者들은 本 實驗에 앞서 供試한 正常 ICR 마우스株에서의 投與抗原의 最適濃度를 求하기 위하여 여러 濃度의 SRBC를 마우스의 尾靜脈內로 注入 感作하고, 足蹠腫脹으로 發現되는 DTH와 血中 HA抗體價를 測定하였던 바 Fig. 1과 같은 成績을 얻었으며, 本 實驗에서는 이를 基礎로 DTH發現에 있어서 最適感作抗原濃度인 1% SRBC浮遊液을 全 實驗을 通하여 使用하였다.

Arthus 反應은 感作宿主에 있어서 惹起注射 部圍로 移走해 온 多型核白血球가 抗原-抗體 複合體와 補體 등이 結合된 巨大分子들을 貪食하므로써 遊離되는 lysosomal enzymes에 의해 末梢血管壁에서 脈管炎이 誘發되어 出血性壞死, 點狀出血 등이 나타나는 抗體媒介性 過敏反應 現像으로 惹起注射 後 早期(30分~6時間)에 發現된다. 한편, DTH는 afferent limb과 efferent limb에 있어서 T淋巴球와 大食細胞 등이 關與하며, 惹起注射 後 18~48時間에 紅斑, 硬結 등이 나타나는 現像이다.<sup>30</sup>

本實驗에서 實施한 Arthus反應과 DTH는 生體內 免疫反應을 評價하는데 널리 이용되고 있는 方法이지만 MCA가 免疫反應에 미치는 影響을 이 方法에 의해서 測定한 報告는 찾아볼 수 없다. 따라서 著者들은 MCA가 Arthus反應 및 DTH에 미치는 影響을 評價하기 위하여 足趾腫脹反應 檢査를 實施하였던 바 腫脹度가 MCA投與群에서 對照에 비해 減少되었으며, 그 減少의 程度는 Arthus反應보다 DTH反應이, 低濃度の MCA에서 보다는 高濃度の MCA投與群에서 더욱 甚하였다. 특히 이러한 減少는 低濃度の MCA投與群에서는 投與時間이 經過되므로써 거의 正常으로 回復되었으나 高濃度の MCA投與群에서는 投與 後 約 5週까지도 回復되지 않았다. 이와같은 結果는 MCA에 感受성이 있는 마우스(C<sub>57</sub>BL 및 C<sub>3</sub>H)株 및 感受성이 없는 DBA마우스株의 淋巴球가 共히 MCA를 試驗管內에 添加하면 blastogenesis가 抑制된다고 한 Alfred 등<sup>1)</sup>의 報告로 미루어 MCA의 腫瘍原성에 의한 足趾腫脹度の 減少라기보다는 오히려 MCA가 直接 免疫反應에 關與하는 細胞들의 機能을 低下시킴으로써 이와같은 結果가 招來되었으리라라고 思料된다.

HA와 HE 反應은 感作抗原에 對한 特異抗體와 抗原과의 直接 또는 間接的인 反應으로 凝集 또는 溶血을 일으키는 現象이며, 抗原-抗體反應을 쉽게 判讀할 수 있는 간편한 方法으로서 血中 免疫抗體의 消長을 測定하는데 널리 利用되고 있다.

本實驗結果 HA 및 HE抗體價는 對照에 比하여 減少되었는데, MCA의 投與濃도가 높을수록 그 程度는 더욱 甚하였으며, HA價보다 HE價가 더욱 減少되었다. 또한 MCA의 投與時期에 따른 減少는 投與初期에서 부터 急激하여 感作前 28日群에 이르기까지 回復되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 本實驗의 成績은 數種의 C<sub>57</sub>BL마우스株에 MCA를 單回 投與한 後 溶血斑形成 脾臟細胞(PFC)數를 一定 間隔으로 20週間 測定한 結果 MCA投與 直後인 2日에 50% 以上이 減少되고 이러한 減少는 MCA投與 後 20週에 이르기까지 維持되었다는 Stjernswärd의 報告<sup>4)</sup> 및 MCA를 包含한 數種의 發癌物質과 抗癌療法劑를 投與했던 마우스에서 抗體生産能이 顯著히 減少되었다고 한 Davidsohn 등<sup>1)</sup>과 Malmgren 등<sup>2)</sup>의 成績과 符合되었다. 이와같은 免疫抑制作用은 高濃度の MCA處理에 의하여 Ts細胞의 增加, 또는 PAH化合物들이 T-cell subsets에 immunocytotoxicity를 보인다고 言及한 Alfred 등<sup>1)</sup>의 報告, Ts細胞에 의해 分泌되는 DNA合成抑制物質에 의해 宿主의 免疫能이 抑制된다는 Elgert와 Farrar<sup>10)</sup>의 報告, 癌患者에 있어서 IgM抗體價가 顯著히 減少했다는 Jones

등<sup>11)</sup>의 報告 등으로 미루어 MCA가 抗體生産細胞의 機能에 直接 또는 間接的으로 關與하여 抗體生産能이 抑制되었으리라 類推된다.

## 結 論

腫瘍과 宿主免疫能과의 關係를 究明하기 위하여 腫瘍發生直前の 마우스에 대한 免疫能을 測定하여 아래 의 結果를 얻었다.

Arthus反應, 赤血球凝集素價 및 溶血素價 등의 體液性免疫反應과 遲延型過敏反應이 MCA의 投與에 의해 全般的으로 抑制되었는데, 抑制의 程度는 대체로 投與한 MCA의 濃도에 比例하여 顯著하였다.

以上の 結果로 미루어 MCA가 免疫反應에 關與하는 細胞들의 機能을 直接 또는 間接的으로 抑制하고 있음을 알 수 있었다.

## 參 考 文 獻

1. Alfred, L.J., Wojdani, A., Nieto, M., Perez, R. and Yoshida, G.: A chemical carcinogen, 3-methylcholanthrene, alters T-cell function and induces T-suppressor cells in a mouse model system. *Immunol.* (1983) 50:207.
2. Argov, S., Cochran, A.J., Kärre, K., Klein, G.O. and Glein, G.: Incidence and type of tumors induced in C57BL bg/bg mice and +/bg littermates by oral administration of DMBA. *Int. J. Cancer* (1981) 28:739.
3. Baron, J., Redick, J.A. and Guengerich, F.P.: Effects of 3-methylcholanthrene,  $\beta$ -naphthoflavone, and phenobarbital on the 3-methylcholanthrene-inducible isoenzyme of cytochrome P-450 within centrilobular, midzonal, and periportal hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (1982) 257:953.
4. Biozzi, G., Stiefel, C., Mouton, S., Bouthillier, Y. and Deceusefond, C.: A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. *J. Immunol.* (1968) 14:7.
5. Bodansky, O.: *Enzymes in health and disease.* Thomas Springfield Illinois (1960) p.269.
6. Boyd, M.R. and Burka, L.T.: *In vivo* studies on the relationship between target organ alkylation and the pulmonary toxicity of a chemically reactive metabolite of 4-ipomeanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1978) 207:687.

7. Boyd, M.R., Burka, L.T., Wilson, B.J. and Sasame, H.A. : *In vitro* studies on the metabolic activation of the pulmonary toxin, 4-ipomeanol, by rat lung and liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1978) 207:677.
8. Broder, S., Muul, L. and Waldmann, T.A. : Suppressor cells in neoplastic disease *J. N.C.I.* (1978) 61:5.
9. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. : An endotoxin-induced serum factor that caused necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1975) 72:3666.
10. Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L. : Detection of complete and incomplete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell-egg albumin antigen unit. *Brit. J. exp. Path.* (1954) 35:472.
11. Davidsohn, I., Stern, K. and Sabet, L. : Immune response in mice and rats exposed to carcinogens. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* (1956) 2: 102.
12. Dipple, A. and Hayes, M.E. : Differential excision of carcinogenic hydrocarbon-DNA adducts in mouse embryo cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1979) 91:1225.
13. Eastman, A. and Bresnick, E. : Metabolism and DNA binding of 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* (1979) 39:4316.
14. Elgert, K.D. and Farrar, W.L. : Suppressor cell activity in tumor-bearing mice I. Dualistic inhibition by suppressor T lymphocytes and macrophages. *J. Immunol.* (1978) 120:1345.
15. Embleton, M.J. and Heidelberger, C. : Neoantigens on chemically transformed cloned C3H mouse embryo cells. *Cancer Res.* (1975) 35:2049.
16. Eva, A. and Aaronson, S.A. : Frequent activation of c-kis as a transforming gene in fibrosarcomas induced by methylcholanthrene. *Science* (1983) 220:955.
17. Foley, E.J. : Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* (1953) 13:835.
18. Friedewald, W.F. and Rous, P. : The initiating and promoting elements in tumor production An analysis of the effects of tar, benzpyrene, and methylcholanthrene on rabbit skin. *J. Exp. Med.* (1944) 80:101.
19. Griffin, A.C., Holland, B.H. and Canning, L. : Developmental and metabolic control mechanisms and neoplasia. Williams & Wilkins Baltimore Maryland (1965) p.475.
20. Henry, C. : Hemolytic plaque assays. In Mishell, B.B., and Shiigi, S.M. ed. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman Co. San Francisco (1980) p.69.
21. Jones, S.L., Pihl, E., Cuthbertson, A.M., Hughes, E.S.R., Johnson, W.R. and Rollo, A. : Immunoglobulins intrinsic to colorectal carcinoma: An unfavorable prognostic association with IgM. *J.N.C.I.* (1983) 71:469.
22. Klippert, P.J.M., Littel, R.J.J. and Noordhoek, J. : *In vivo* O-deethylation of phenacetin in 3-methylcholanthrene-pretreated rats: Gut wall and liver first-pass metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1983) 225:153.
23. Lagrange, P.H., Mackaness, G.B. and Miller, T.E. : Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells *J. Exp. Med.* (1974) 139:528.
24. Lagrange, P.H. and Thickstun, P.M. : *In vivo* antitumor activity of various forms of delayed-type hypersensitivity in mice. *J.N.C.I.* (1979) 62:429.
25. Limbosch, S. : Benzo(a) pyrene-and aldria-metabolizing activities in cultured human and rat hepatoma cell line. *J.N.C.I.* (1983) 71:281.
26. Lubet, R.A., Kiss, E., Gallagher, M.M., Dively, C., Kouri, R.E. and Schechtman, L.M. : Induction of neoplastic transformation and DNA single-strand breaks in C3H/10T $\frac{1}{2}$  clone 8 cells by polycyclic hydrocarbons and alkylating agents. *J.N.C.I.* (1983) 71:991.
27. Luster, M.I., Lawson, L.D., Linko, P. and Goldstein, J.A. : Immunochemical evidence for two 3-methylcholanthrene-inducible forms of cytochrome P-448 in rat liver microsomes using a double-antibody radioimmunoassay procedure. *Mol. Pharmacol.* (1983) 23:252.
28. MacDonald, T.T. and Carter, P.B. : Requirement for a bacterial flora before mice generate

- cells capable of mediating the delayed hypersensitivity reaction to sheep red blood cells. *J. Immunol.* (1979) 122:2624.
29. Malmgren, R.A., Bennison, B.E. and McKinley, T.W. Jr. : Reduced antibody titers in mice treated with carcinogenic and cancer chemotherapeutic agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1952) 79:484.
  30. Mitsuoka, A., Teramatsu, T., Baba, M., Morikawa, S. and Yasuhira, K. : Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes: evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction. *Immunol.* (1978) 34:363.
  31. Möller, G. and Möller, E. : Immunological surveillance revisited. *Transplant. Proc.* (1979) 11:1041.
  32. Mondal, S., Embleton, M.J., Marquardt, H. and Heidelberger, C. : Production of variants of decreased malignancy and antigenicity from clones transformed *in vitro* by methylcholanthrene. *Int. J. Cancer* (1971) 8:410.
  33. Nelson, D.S. and Midenhall, P. : studies on cytophilic antibodies I. The production by mice of macrophage cytophilic antibodies to sheep erythrocytes: relationship to the production of other antibodies and the development of delayed-type hypersensitivity. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* (1967) 45:113.
  34. Olsen, R.G. and Krakowka, S. (ed.) : *Immunology and immunopathology of domestic animals.* Charles C Thomas Publisher Springfield Illinois U.S.A. (1979) p.270.
  35. Parkinson, A., Copp, L. and Safe, S. : The utility of the microsomal 4-chlorobiphenyl hydrolase enzyme assay in distinguishing between phenobarbitone and 3-methylcholanthrene-induced microsomal monooxygenases. *Anal. Biochem.* (1980) 105:65.
  36. Pickett, C.B., Telakowski-Hopkins, C.A., Donohue, A.M. and Lu, A.Y.H. : Differential induction of rat hepatic cytochrome P-448 and glutathione S-transferase B messenger RNAs by 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1982) 104:611.
  37. Prehn, R.T. : Immunostimulation of chemical oncogenesis in the mouse. *Int. J. Cancer* (1977) 20:918.
  38. Prehn, R.T. and Main, J.M. : Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.N.C.I.* (1957) 18:769.
  39. Raffel, S. and Newel, J.M. : The delayed hypersensitivity induced by antigen-antibody complexes. *J. Exp. Med.* (1958) 132:823.
  40. Stavitsky, A.B. : Micromethods for the study of proteins and antibodies I. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells. *J. Immunol.* (1954) 72:360.
  41. Stjernswärd, J. : Immunodepression by carcinogens. *Antibiot. Chemother.* (1969) 15:213.
  42. Stjernswärd, J. : Immunodepressive effect of 3-methylcholanthrene. Antibody formation at the cellular level and reaction against weak antigenic homografts. *J.N.C.I.* (1965) 35:885.
  43. Stutman, O. : Chemical carcinogenesis in nude mice: Comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J.N.C.I.* (1979) 62:353.
  44. Stutman, O. : Immunodepression and malignancy. *Adv. Cancer Res.* (1975) 22:261.
  45. Stutman, O. : Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* (1974) 183:534.
  46. Tanooka, H., Tanaka, K. and Arimoto, H. : Dose response and growth rates of subcutaneous tumors induced with 3-methylcholanthrene in mice and timing of tumor origin. *Cancer Res.* (1982) 42:4740.
  47. Whittney, R.B., Levy, J.G. and Smith, A.G. : Influence of tumor size and surgical resection on cell-mediated immunity in mice. *J.N.C.I.* (1974) 53:111.
  48. Yoshikai, Y., Miake, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. : Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunol.* (1979) 38:577.