

学 位 論 文 題 名

サイクロフォスファミドにより抑制される
抗腫瘍エフェクター活性に対するレンチナン
およびクレスチン前投与の効果

学位論文内容の要旨

I はじめに

癌化学療法剤の持つ免疫抑制作用は癌化学療法を施行された宿主生体の微生物感染に対する抵抗性を弱め、さらに化学療法の癌に対する治療効果そのものを減弱させることが指摘されている。従って、化学療法による免疫抑制はできる限り軽減する必要がある。このため、臨床的には多くの場合 Biological Response Modifiers (BRM) が抗癌剤と併用される。本研究では抗癌剤で抑制された抗腫瘍免疫エフェクターの変動に対する LTN, PSK (以下, BRM) の影響を検討し, BRM の抗癌剤との併用意義を検討した。

II 材料と方法

1) 動物と薬剤投与

7 週齢の雌性 C57BL/6 マウスを使用した。サイクロフォスファミド (CY) は 150mg/kg を尾静脈より 1 回投与し, レンチナン (LTN: 1 又は 3mg/kg/day) およびクレスチン (PSK: 150 又は 300mg/kg/day) は CY 投与前 7 日間腹腔内投与した。

2) 脾細胞の採取と脾細胞総数の算出

CY 投与後 1, 3, 5, 7 及び 9 日目にマウスを屠殺し, 無菌的に摘出した脾臓をルーズフィッティングガラスホモジナイザーを用いて浮遊細胞とした。一定重量の脾臓から回収される細胞数を数え, 脾重量を積算して脾 1 個当りの細胞総数とした。

3) Natural killer (NK) 細胞活性の測定

96 穴 microplate の各 well に脾細胞を 2×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 個/well に分注し, 標的細胞として ^{51}Cr Sodium Chromate (NEN) にて標識した ($100\mu\text{Ci}/10^6$) YAC. 1 細胞を 1×10^4 個/well 加え 37°C , 6 時間培養後の上清 0.1ml 中に遊離する放射活性を γ -counter に

て測定した。また、標的細胞の30%cytolysisを得るのに必要な脾細胞を1 lytic unit (LU_{30})として算定し、一定細胞数当りの活性 ($LU_{30}/10^6$) とともに、上述の脾細胞総数よりマウス脾臓1個当りの活性 ($LU_{30}/spleen$) を算出した。

4) Lymphokine activated killer (LAK) 前駆細胞活性の測定

脾細胞を 1×10^6 個/ ml に調整し培地(RPMI1640+10%FCS)にヒトリコンビナントインターロイキン2 (rhIL-2) 1000JU/ ml を加え5%CO₂, 37°Cにて5日間培養後の細胞をエフェクター細胞とした。NK細胞に非感受性の同系BMT-11細胞を標的細胞とした障害性を上記の⁵¹Cr-release assayで測定した。NK細胞活性と同様に LU_{30} を算出した。

5) IL-2産生能の測定

マウス脾細胞 (5×10^6 / ml) を Concanavalin A $5 \mu g$ / ml 添加した RPMI1640+10% FCS 培地にて24時間培養後の上清をサンプルとし IL-2 活性測定に供した。IL-2 活性は IL-2 依存性 CTLL-2 細胞 1×10^4 /well を96穴 microplate に分注し、上記サンプルを2倍階段希釈し、加えて24時間培養後 MTT assay にて CTLL-2 細胞の増殖曲線を描き、rhIL-2 標準液による Standard Curve より検体の IL-2 活性を算出した。

6) IL-3産生能の測定

IL-3 活性は IL-3 依存性 FDCP 2 細胞 1×10^4 /well を96穴 microplate に分注し、上記のような24時間上清培養液をサンプルとし、2倍階段希釈し加えて24時間培養後 MTT assay にて FDCP 2 細胞の増殖曲線を描いた。IL-3 産生株 WEHI 3 B 細胞培養上清の FDCP 2 細胞増殖支持能を Standard Curve として、FDCP 2 細胞の増殖最大値の50%支持の WEHI 3 B 細胞培養上清液の濃度を1 Unit とし、検体の希釈倍数より Unit を計算した。

Ⅲ 結 果

1) 脾細胞総数に対する影響：

PSK150, 300mg/kg 単独投与マウスを正常マウスと比較すると、いずれも脾細胞総数が有意に増加した。LTN 投与でも増加傾向が認められた。また、これらの BRM 前投与で CY 投与3日後の脾細胞総数の減少が有意に予防された。また7日後の脾細胞総数の回復は LTN, PSK 投与のいずれにおいても著しく促進された。

2) NK細胞活性に対する影響：

脾臓1個当りの LU_{30} で表される NK 細胞活性に対して、LTN あるいは PSK 単独投与では有意な影響が見られなかった。しかしこれらの BRM 投与により、CY 投与3日後に見られる NK 細胞活性の抑制が有意に軽減され、CY 投与7日目に認められる活性の回復も促進される傾

向を示した。

3) LAK 前駆細胞活性に対する影響：

脾臓 1 個当りの LAK 前駆細胞活性はこれらの BRM 単独投与により増加した。CY 投与 3 日後に見られる LAK 前駆細胞活性の抑制に対して、LTN あるいは PSK 前投与では改善効果を示さなかったが、CY 投与 7 日後の活性回復はこれらの BRM 前投与により促進された。

4) Interleukin-2 産生能に対する影響：

IL-2 産生能は LTN 単独投与により増加し、CY 投与後に見られる抑制に対しても LTN 前投与は有意な予防効果を示したが、PSK 投与では顕著な影響は見られなかった。CY 投与 7 日後の IL-2 産生能の回復は LTN あるいは PSK 前投与のいずれにおいても有意に促進された。

5) Interleukin-3 産生能に対する影響：

IL-3 産生能は CY 投与で、翌日より一時的に抑制されたが、その後急速に回復し、5 日目からリバウンド的に増強された。LTN, PSK 前投与 CY 投与群での IL-3 産生能は低下せず、ほぼ正常レベルに維持された。

IV 考 察

BRM 前投与により抗癌剤 CY で起こる宿主抗腫瘍エフェクターである NK 細胞, LAK 前駆細胞活性の抑制が改善されることを示した。この BRM 投与の改善効果は「抑制に対する予防効果」と「回復に対する促進効果」とに分けることができる。即ち、BRM は脾細胞総数に対して抑制予防と回復促進の両方の作用を示し、NK 細胞活性に対しては回復促進より抑制予防が、LAK 前駆細胞に対しては抑制予防より回復促進が顕著であった。正常マウスにおける抗腫瘍エフェクター活性の CY 投与による変動には、種々の内因性サイトカイン産生の変動が関与していると考えられるが、一般的に IL-2, -3 は Th 細胞から産生されるとされており、これが NK 細胞, LAK 前駆細胞活性に影響すると推察される。本実験で示した CY による抗腫瘍エフェクター活性の抑制に対する BRM 前投与の改善効果にも IL-2 産生能の改善が関与していると考えられる。また CY で惹起した IL-3 産生能低下に対する BRM の改善効果は抗癌剤による骨髓細胞抑制を減弱し、各種血球の成熟分化機能に有利に働くと考えられた。

V 結 語

抗癌剤 CY による抗腫瘍増エフェクター活性の抑制が BRM 前投与によって改善されることを示した。この BRM の作用の一部は内因性サイトカイン産生能の改善によるものと推察された。以上のような結果は、BRM の化学療法剤との併用が宿主免疫機能の正常維持をもたらすこ

とにより化学療法の効果の増強に寄与しうる可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 武 市 紀 年

副 査 教 授 皆 川 知 紀

癌化学療法剤（以下、抗癌剤）の免疫抑制作用は、癌化学療法を施行された宿主の微生物感染に対する抵抗性を弱めるばかりでなく、化学療法の治療効果そのものを減弱してしまうことが指摘されている。一方、レンチナン（以下、LTN）、クレスチン（以下、PSK）などの Biological Response Modifiers (BRM) は単独では効果が弱く、ほとんどの場合に抗癌剤と併用されている。そこで、申請者は、抗癌剤に併用される BRM の意義を明らかにするために、抗癌剤投与により抑制される抗腫瘍エフェクター活性に対する BRM 投与の影響を検討した。

実験は7週齢の正常雌C57BL/6マウスを用いて行なわれた。マウスに cyclophosphamide (CY) 150mg/kgを尾静脈より1回投与し、経日的に脾細胞の総数、ナチュラルキラー (NK) 細胞活性、リンホカイン活性化キラー (LAK) 前駆細胞活性、インターロイキン2および3 (IL-2, IL-3) 産生能を検討した。NK 細胞活性は新鮮脾細胞を、LAK 前駆細胞活性はヒトリコンビナント IL-2 (1000JRU/ml) 添加培地で5日間培養した脾細胞をエフェクターとして、それぞれ YAC-1 細胞あるいは BMT-11細胞を標的としたクロム遊離試験で測定した。IL-2, IL-3 産生能は脾細胞を concanavalin A (5μg/ml) 添加培地で培養した上清中の IL-2, IL-3 活性をそれぞれのサイトカイン依存細胞を用いて測定し、判定した。BRM 投与は LTN 1ないし3mg/kg/day, PSK150ないし300mg/kg/day を CY 投与前7日間腹腔内投与した。その結果、CY 単独投与マウスでは、脾細胞総数、脾臓当りの NK 細胞活性、LAK 前駆細胞活性が強く抑制され、3日目には最低値を示すが、5日目以降回復し、7日目には正常レベル以上の値を示すリバウンド現象が観られた。しかし、単位細胞数当りのエフェクター活性では NK 細胞活性は全経過を通して、ほぼ正常レベルを維持したのに対し、LAK 前駆細胞活性は脾臓当りのそれと同様な変動を示し両者への CY の影響に違いがみられた。また、IL-2, IL-3 産生能におぼす CY 投与の影響にも違いがみられ、IL-2 産生能は CY 投与後3日目を最低値として抑制され、その後徐々に回復するが、9日目にも正常レベルには復帰しないが、IL-

3 産生能はIL-2 産生能ほど強くは抑制されず、また、急速に正常レベル以上に回復した。

以上のエフェクター活性あるいはサイトカイン産生能の変動に対する BRM 投与の影響は、CY 非投与マウスの正常免疫能への増強作用、CY 投与後 3 日目の抑制への軽減作用あるいは 7 日目の回復への促進作用に分けて観察される。すなわち、正常免疫能に対しては LTN が LAK 前駆細胞活性を PSK が脾細胞総数、LAK 前駆細胞活性を増強するが、それらはいずれも顕著ではなかった。一方、両 BRM 投与は CY 投与後 3 日目に抑制される細胞総数、NK 細胞活性に対しては有意な軽減作用を示したが、LAK 前駆細胞活性に対して全く軽減作用が観察されなかった。しかし、両 BRM とも CY 投与後 7 日目の回復に対しては、著明な促進作用を示した。また、サイトカイン産生能の回復も両 BRM 投与により促進され、時期的に早くなった。このことにより、脾細胞総数、抗腫瘍エフェクター活性の回復が BRM 投与により促進される機序の一部に内因性サイトカインの関与していることが示唆された。

以上の研究成果は、化学療法後の抗腫瘍エフェクター活性の変動を経時的に詳細に検討した結果、LTN、PSK などの BRM は正常免疫能に対する影響だけでは評価しがたい場合にも、化学療法後に抑制される抗腫瘍エフェクター活性の回復促進効果を検討することにより、評価しうることを示したものである。本研究で、担癌マウスを用いずに、あえて正常マウスを用いたのは、担癌マウスのエフェクター活性は癌細胞の増殖に影響され、化学療法、BRM 投与を施行すると癌細胞の増殖の変動による影響が強く表面に出て、純粋に化学療法、BRM の影響を解析できないと考えたからである。

口頭発表に際し、武市、皆川、小林の 3 教授から、CY 投与後 3 日目の抑制に対する BRM の影響が大きくないのをどう考えるか、LTN と PSK との BRM 作用の違いはなにか。サイトカイン産生能を *in vitro* で検討しているが、内因性サイトカイン産生を癌細胞を移植したマウスで調べたか。BRM による回復促進の機序はなにか。腹腔内投与された LTN、PSK は血中に検出されるのかなどの質問があった。申請者は、これらの質問に適切な応答をなしえなかったが、これは申請者が日本語による応答に不慣れのためであり、個別に審査いただいた武市教授、皆川教授に改めて質問をいただき、申請者は正しい返答をなしたので、合格と判定された。

以上、本研究は現在臨床的にも用いられている LTN、PSK などが癌化学療法により抑制される抗腫瘍エフェクター活性の回復促進作用で評価されることを示したものであり、今後、新しい BRM を評価する際に大きな示唆を与えるのもとして、博士（医学）の学位に相当するものと判定した。