

BRM (OK-432およびGe-132) による メチルコラントレン誘発肉腫の発症抑制に関する研究

第 2 編

OK-432およびGe-132による肉腫の発症抑制における 免疫担当細胞の関与

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

玉 井 守

(平成4年8月3日受稿)

Key words: Methylcholanthrene-induced sarcoma, NK cell, T cell, Macrophage

緒 言

発癌の過程において、生体内に発生した変異細胞あるいは腫瘍細胞を排除し生体の恒常性を維持するために、生体は種々の免疫監視機構を発動させて宿主の防御を演じていると考えられている¹⁾²⁾。宿主の免疫能を免疫賦活剤(Biological response modifiers, BRM)により賦活することにより、発癌の抑制が可能であり、またその機序としてNK細胞が大きな役割を果たしていることを認めた³⁾。腫瘍監視機構においてエフェクター細胞としてその役割を担っている免疫担当細胞はNK細胞の他にT細胞やマクロファージがある。マウスを用いて、OK-432, Ge-132によるmethylcholanthrene (MC) 誘発肉腫の発症抑制におけるこれら免疫担当細胞の役割について解析した。

材 料 と 方 法

1. 実験動物および腫瘍の作製

実験には、C3H/HeJ 6週齢雄性マウスを用い、3-methylcholanthrene(和光純薬) 1mg/bodyをマウスの背部に皮下注射し肉腫を作成した⁴⁾。また実験には1群30匹のマウスを用いた。腫瘍は経時的に観察し、腫瘍径が5mm以上になった時点を腫瘍の発症とした。

2. 薬剤の投与方法

OK-432(中外製薬)およびGe-132(浅井ケルミニウム研究所)はMC注射前2週間と注射後8週間投与する前後投与にて行った³⁾。また生理的食塩水のみ投与する群を対照群とした。NK細胞、T細胞およびマクロファージ機能をそれぞれ抑制する目的で、抗アシアロ GM₁抗体(AGM₁)⁵⁾⁶⁾(和光純薬)、抗マウス胸腺細胞抗体(Thy)⁷⁾(和光純薬)およびcarrageenan(CAR)⁸⁾(Sigma)を下記のごとく、腹腔内へ投与した。

AGM₁およびThyは滅菌蒸留水に溶解し、1回0.1ml(1mg/ml)をMC注射前のOK-432, Ge-132前投与時(2週間)に計4回腹腔内へ投与した。またCARは1mg/bodyを生理的食塩水0.2mlに溶解し、同様に計4回腹腔内へ投与した(図1)。

3. 末梢血LGL比率の測定

AGM₁, Thy処理による影響をみるため、OK-432, Ge-132前投与の前後(それぞれ2週間投与)において、末梢血のlarge granular lymphocyte(LGL)の比率を測定した。LGL比率はMay-Giemsa染色した塗抹標本にて200個分類し求めた。

4. 脾細胞のNK活性の測定

AGM₁, ThyおよびCAR処理によるNK活性への影響をみるため、LGL比率と同様にOK-

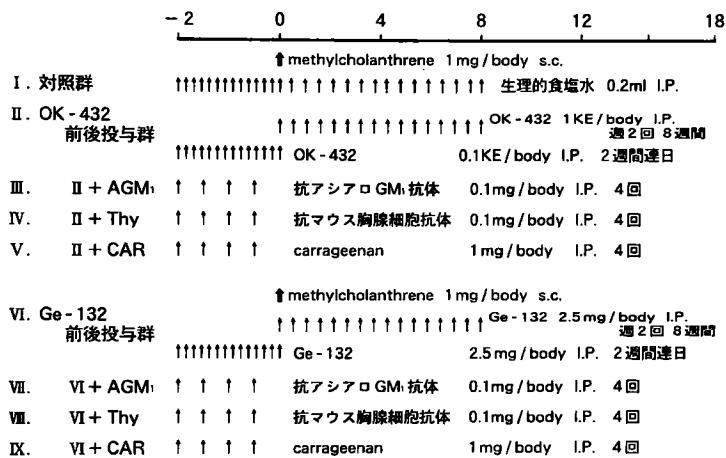


図1 OK-432, Ge-132の前後投与群における抗アシアロ GM₁抗体, 抗マウス胸腺細胞抗体および carrageenan の投与方法

432, Ge-132前投与の前後において、脾細胞の NK 活性を測定した。NK 活性の測定は、K562 を target cell とする ⁵¹Cr release assay にて行った³⁾。

5. 検定方法

それぞれの実験結果は、student's t test または Mann-Whitney test および χ^2 test にて検定した。

結 果

1. OK-432前後投与群における肉腫発症に対する抗アシアロ GM₁抗体, 抗マウス胸腺細胞抗体および carrageenan の影響 (図2)

OK-432前後投与群に対して、NK 細胞, T 細

胞およびマクロファージ機能を抑制するために、それぞれ抗アシアロ GM₁抗体 (AGM₁), 抗マウス胸腺細胞抗体 (Thy) あるいは carrageenan (CAR) を MC 注射前に投与して、各群の腫瘍発症率を経時的に観察した。

AGM₁の投与にて、MC 注射後10, 12, 14週の時点での腫瘍発生率が 58.8%, 88.2%, 94.1% と OK-432前後投与群の同時期の腫瘍発生率 5.6%, 5.6%, 43.8% に比して有意に ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$) 腫瘍発生は促進していた。また CAR の投与にても、8, 10, 12週の腫瘍発生率が 33.3%, 86.7%, 100% であり、OK-432 前後投与群の同時期の腫瘍発生率 5.0%, 5.6%, 5.6% に比して有意の ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p <$

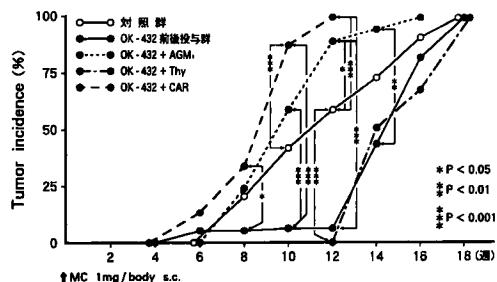


図2 OK-432前後投与群における肉腫発症に対する抗アシアロ GM₁抗体, 抗マウス胸腺細胞抗体および carrageenan の影響

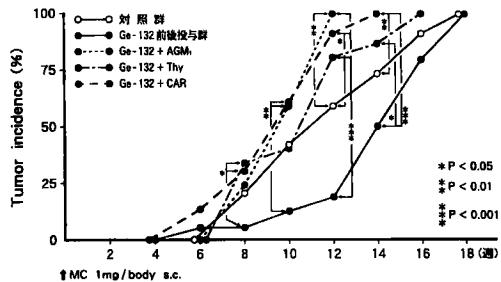


図3 Ge-132前後投与群における肉腫発症に対する抗アシアロ GM₁抗体, 抗マウス胸腺細胞抗体および carrageenan の影響

0.001)腫瘍発生の促進が認められた。しかし Thy 投与では、12, 14, 16, 18週の腫瘍発生率が0%, 50.0%, 66.7%, 100%と、OK-432前後投与群と同程度の腫瘍発症の抑制が認められた。

さらに腫瘍発生の促進が認められた AGM₁および CAR 投与群と対照群とを比較すると、AGM₁の投与では10週で有意に($p<0.05$)腫瘍発生率が高く、CAR の投与でも10, 12週で有意に($p<0.001$, $p<0.001$)腫瘍発生率が高値を示していた。

2. Ge-132前後投与群における肉腫発症に対する抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体および carrageenan の影響(図3)

AGM₁の投与にて、MC 注射後10, 12週の時点での腫瘍発生率が58.8%, 100%と Ge-132前後投与群の同時期の腫瘍発生率12.5%, 18.8%に比して有意に($p<0.01$, $p<0.001$)腫瘍発生は促進していた。また Thy 投与群では、8, 12, 14週の腫瘍発生率が33.3%, 80.0%, 86.7%であり、CAR 投与群では8, 10, 12, 14週の腫瘍

発生率は30.0%, 60.0%, 90.0%, 100%と、Ge-132前後投与群の同時期の腫瘍発生率5.6%, 12.5%, 18.8%, 50.0%と比較すると Thy 投与群では各時期で有意の($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.05$)腫瘍発生の促進が認められ、また CAR 投与群でも同様に有意に($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.001$)腫瘍発生は促進していた。

また対照群と比較しても、AGM₁投与群では12週($p<0.01$)で、CAR 投与群では12, 14週で有意の($p<0.05$, $p<0.01$)腫瘍発生の促進が認められた。

3. MC 投与後12週目における各群の腫瘍発生率(図4)

OK-432および Ge-132の前後投与群において AGM₁, Thy あるいは CAR の投与による影響は、図2, 3のごとく MC 注射後12週目に最も顕著に認められた。

Ge-132前後投与群の腫瘍発生率は18.8%であったが、同時に AGM₁, Thy あるいは CAR にて処理すると腫瘍発生率はそれぞれ100%, 80.0%, 90.0%と有意に肉腫発症の促進が認められた。また対照群の腫瘍発生率58.3%と比較しても AGM₁あるいは CAR の投与にて肉腫発症がさらに促進していた。OK-432前後投与群の腫瘍発生率5.6%に対して、AGM₁あるいは CAR にて処理すると腫瘍発生率はそれぞれ88.2%, 100%と有意の促進が認められ、さらに対照群と比較しても肉腫発症が促進していた。しかし Thy により処理すると OK-432前後投与と同様に対照群に比し、腫瘍発症は抑制されたままであった。

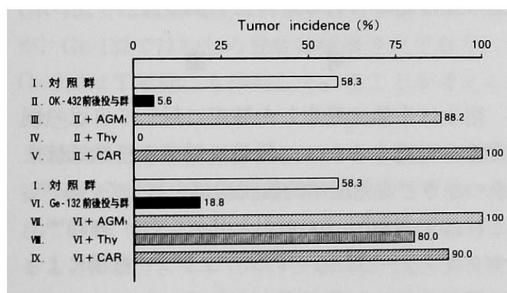


図4 MC 投与後12週目における各群の腫瘍発生率

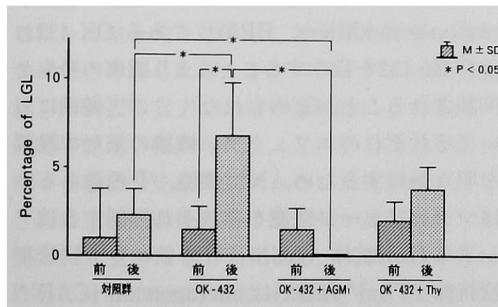


図5 OK-432投与マウスにおける末梢血 LGL 比率に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体の影響

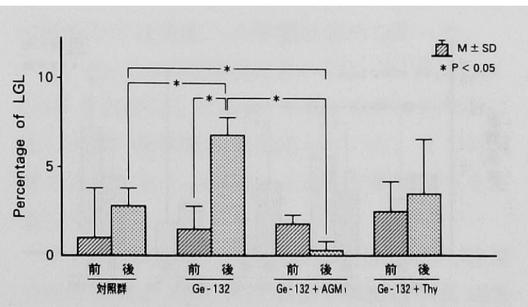


図6 Ge-132投与マウスにおける末梢血 LGL 比率に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体の影響

4. OK-432およびGe-132投与正常マウスにおける末梢血 LGL 比率に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体の影響

OK-432を2週間投与した場合、末梢血 LGL 比率は $1.5 \pm 1.3\%$ より $6.8 \pm 3.0\%$ と有意の上昇が認められた ($p < 0.05$)。また対照群の $2.8 \pm 1.0\%$ に比しても有意に高値を示していた ($p < 0.05$)。OK-432投与マウスを AGM₁で処理すると LGL 比率は 0% と OK-432投与群および対照群に比し有意に低値を示していた ($p < 0.05$)。しかし Thy 処理では $3.8 \pm 1.3\%$ と対照群、OK-432投与群と比較しても有意の差は認められなかった (図 5)。Ge-132投与した場合も LGL 比率は $1.5 \pm 1.3\%$ より $6.8 \pm 1.0\%$ と有意の上昇が認められた ($p < 0.05$)。また対照群に比しても有意に上昇していた ($p < 0.05$)。Ge-132投与マウスを AGM₁で処理すると LGL 比率は $0.3 \pm 0.5\%$ と Ge-132投与群および対照群に比して有意に低値を示していた ($p < 0.05$)。しかし Thy 処理では OK-432の場合と同様に $3.5 \pm 3.1\%$ と対照群、Ge-132投与群と差は認められなかった (図 6)。

5. OK-432およびGe-132投与正常マウスにおける脾細胞 NK 活性に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体および carageenan の影響

OK-432 2週間投与により NK 活性は対照群の $3.1 \pm 1.2\%$ に比して $5.5 \pm 0.8\%$ と有意の活性の上昇が認められた ($p < 0.05$)。OK-432投与マウスをそれぞれ AGM₁、Thy、CAR にて処理すると 2週間後には AGM₁処理では $0.9 \pm 1.0\%$

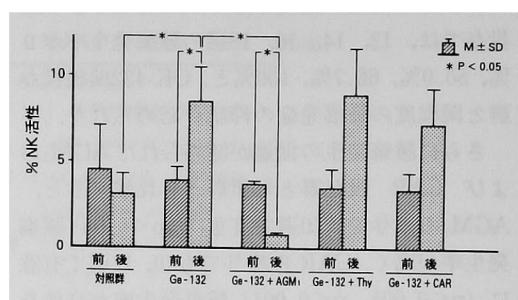


図 8 Ge-132投与マウスにおける脾細胞 NK 活性に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体、carrageenan の影響

% と有意の低下が認められ ($p < 0.05$)、Thy 処理では $17.1 \pm 8.9\%$ 、CAR 処理では $6.9 \pm 2.6\%$ と OK-432投与群に比し有意の差は認められなかった (図 7)。Ge-132を投与した場合、NK 活性は対照群の $3.1 \pm 1.2\%$ に比して $8.5 \pm 2.0\%$ と有意の上昇が認められた ($p < 0.05$)。AGM₁で処理すると $1.3 \pm 0.1\%$ と有意の低下が認められ ($p < 0.05$)、Thy 処理では $8.9 \pm 2.7\%$ 、CAR 処理では $7.2 \pm 2.1\%$ と Ge-132投与群に比し有意の差は認められなかった (図 8)。

考 察

宿主は生体に発生した腫瘍に対して自己の恒常性を維持するため、腫瘍に対する自然抵抗性をつかさどる免疫学的監視機構を有している^{1,2)}。これは T 細胞³⁾、natural killer (NK) 細胞¹⁰⁾、マクロファージ¹¹⁾などのエフェクター機構によって遂行されていると考えられている。

マウスに methylcholanthrene (MC) により化学誘発癌を作製し、免疫賦活剤 (Biological response modifiers, BRM) である OK-432 および Ge-132 を投与することにより腫瘍の発生が抑制されることが認められた³⁾。この実験系においてそれぞれのエフェクター機構の果たす役割を明らかにするため、NK 細胞、T 細胞あるいはマクロファージ機能をそれぞれ抑制する抗アシアロ GM₁抗体 (AGM₁)^{5,6)}、抗マウス胸腺細胞抗体 (Thy)⁷⁾あるいは carrageenan (CAR)⁸⁾を OK-432 および Ge-132 の前投与時に同時に投与し、その腫瘍発生に及ぼす影響と機序を検討した。

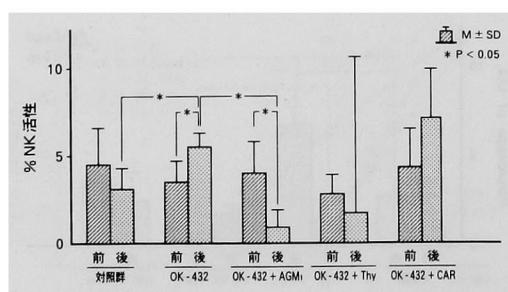


図 7 OK-432投与マウスにおける脾細胞 NK 活性に及ぼす抗アシアロ GM₁抗体、抗マウス胸腺細胞抗体、carrageenan の影響

Ge-132前後投与群に比し AGM₁, Thy, CAR を同時に前投与すると、これらのすべての群において有意の腫瘍発生の促進が認められた。また対照群と比較しても AGM₁, CAR では腫瘍の発生がさらに促進していた。しかし OK-432においては、AGM₁, CAR を前投与した場合のみ、OK-432前後投与群および対照群と比較して腫瘍発生の促進が認められ、Thy の前投与では腫瘍発生は抑制されたままであった。

以上より本実験系では OK-432を投与した場合は NK 細胞、マクロファージが、Ge-132を投与した場合は NK 細胞、T 細胞、マクロファージがそれぞれ腫瘍発症の抑制に働いたと考えられる。OK-432およびGe-132の作用機序として移植腫瘍を用いた系では主にマクロファージとT 細胞が抗腫瘍効果を果たしているといわれている^{12~16)}、今回行った C3H/HeJ マウスを用いた MC 誘発肉腫の抑制には OK-432, Ge-132とともにマクロファージとともに NK 細胞が重要な働きを担っていることが明らかになった。OK-432 と Ge-132が異なる点は T 細胞機能を抑制しても、OK-432では腫瘍発症は抑制されたままであったが、Ge-132ではむしろ発症は促進されており、Ge-132は T 細胞にも作用していることが考えられた。

MC は変異原性を有するばかりでなく¹⁷⁾、MC 投与後一過性に免疫抑制作用がある^{18~21)}といわれている。OK-432, Ge-132はこれらを前投与することにより、エフェクター細胞を賦活させ発癌の過程において生じた変異細胞の排除に働くばかりでなく、後投与により MC にて低下した免疫能の回復にも働いていることが考えられた。これらの総合的な結果として発癌を抑制、遅延させたと考えられる。またエフェクター細胞機能を抑制して宿主を免疫不全状態にした場合、発癌の促進が認められた。このことは先天性免疫不全患者や免疫抑制剤あるいは抗癌剤を投与された患者に悪性腫瘍の発生率が高いという事実^{22~24)}を支持するものである。すなわち生体には癌に対して免疫学的監視機構を有しており¹²⁾、これらが破綻あるいは機能が低下した場合、癌が容易に発症することが考えられる。また高齢者における免疫能の低下は、年齢が進むほど癌

の発生率が高くなる一因とも考えられている²⁵⁾。高齢者は癌が発症した場合、手術、化学療法、放射線療法等の治療に困難が伴う。このような困難を打破するには、まず癌を予防することが重要なことと思われる。癌の予防には発癌を促進する環境因子の除去や食物、生活習慣の改善等、種々考えられる²⁶⁾が、最近では前癌状態より癌への移行を予防するためレチノイド等による chemoprevention が試みられている²⁷⁾。今回の実験から BRM により宿主の免疫能を賦活することで癌を予防できる可能性がある。大久野島の毒ガス傷害者に対して Nocardia rubra Cell Wall Skelton (N-CWS) を投与した群では悪性腫瘍の発生数が少なかったという報告²⁸⁾や、慢性肝炎、肝硬変患者に小柴胡湯を投与した場合、肝癌の発生が有意に低かったという報告²⁹⁾があり、既に少数ながらヒトにも応用されつつある。BRM は現在癌患者に免疫療法剤として投与されているが、期待されたほどの臨床効果は得られていない。しかし BRM は今後さらに増加傾向にある悪性腫瘍の予防に十分応用できることが期待できる。

結論

マウス methylcholanthrene (MC) 誘発肉腫の発症抑制を認めた OK-432および Ge-132の前後投与において、NK 細胞、T 細胞あるいはマクロファージ機能をそれぞれ抑制することにより、腫瘍発生に及ぼす影響と機序を検討した。

1. OK-432とともに、AGM₁, CAR を前投与すると前後投与群さらに対照群と比較して有意の腫瘍発生の促進が認められた。しかし Thy の前投与では発症への影響は認めなかった。

2. Ge-132前後投与においては、AGM₁, Thy, CAR を前投与した場合、3 者とも前後投与群に比し有意の腫瘍発生を促進していた。また対照群と比較すると AGM₁, CAR が腫瘍発生を促進していた。

3. OK-432および Ge-132の前投与にて、正常マウス末梢血 LGL 比率および脾細胞 NK 活性的有意の上昇を認め、AGM₁を同時に投与するとこれらは有意に低下したが、Thy, CAR の投与では変動は認めなかった。

以上より MC 誘発肉腫の発症抑制に対して, OK-432では NK 細胞とマクロファージが, Ge-132では NK 細胞, T 細胞およびマクロファージの関与が考えられた。

稿を終えるにあたり御指導, 御校閲を賜った木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また御指導いただいた片岡幹男講師に深謝致します。(尚, 本論文の要旨は第1回 JBRM 学術集会総会(大阪)にて発表した。)

文 献

- 1) Herberman RB : Possible role of natural killer cells and other effector cells in immune surveillance against cancer. *J Invest Dermatol* (1984) **83**, 137-140.
- 2) 新保敏和 : 免疫パラメーター : 癌患者における臨床的意義とその方法 1. 肿瘍に対する免疫監視機構. *Biotherapy* (1988) **2**, 449-460.
- 3) 玉井 守 : BRM(OK-432およびGe-132)によるメチルコラントレン誘発肉腫の発症の抑制に関する研究 第1編 OK-432およびGe-132の投与時期による肉腫の発症に対する抑制効果およびnatural killer (NK) 細胞の関与. *岡山医誌* (1992) **104**, 1007-1014.
- 4) 安原尚蔵, 大熨泰亮, 占部康雄, 町田健一, 藤井昌史, 木村郁郎 : メチルコラントレン誘発ハツカネズミ肉腫に対する溶連菌製剤(OK-432)の効果. *医と生物* (1975) **91**, 415-419.
- 5) Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K and Tada T : A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* (1980) **10**, 175-180.
- 6) Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai M, Okumura K and Tamaoki N : In vivo effects of anti-asialo GM1 1. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* (1981) **127**, 34-38.
- 7) Kataoka T, Oh-hashi F, Sakurai Y, Usuki K and Ida N : Relative contribution of antiproliferative and host immunity-associated activity of mouse interferon in murine tumor therapy. *Cancer Res* (1984) **44**, 5661-5665.
- 8) Catanzaro PJ, Schwartz HJ and Graham RC : Spectrum and possible mechanism of carrageenan cytotoxicity. *Am J Pathol* (1971) **64**, 387-404.
- 9) 藤本重義 : 肿瘍に対するT細胞応答. *Biotherapy* (1989) **3**, 612-619.
- 10) Herberman RB and Holden HT : Natural killer cells as antitumor effector cells. *J Natl Cancer Inst* (1979) **62**, 441-445.
- 11) Fidler IJ : Macrophages and metastasis -A biological approach to cancer therapy : Presidential address. *Cancer Res* (1985) **45**, 4714-4726.
- 12) 斎藤元男, 青沼悦子, 野田哲生, 中館一郎, 南篠正季, 海老名卓三郎, 石田名香雄 : OK-432の抗腫瘍効果(2) -OK-432誘起活性化Mφの抗腫瘍性-。癌と化療 (1983) **10**, 1363-1371。
- 13) 南篠正季, 斎藤元男, 青沼悦子, 藤村浩子, 中村武彦, 麻生 久, 義江 修, 海老名卓三郎, 石田名香雄 : OK-432の抗腫瘍効果(3) - 抗腫瘍性マクロファージの作用機序 -。癌と化療 (1985) **12**, 887-893。
- 14) 石田名香雄, 斎藤元男 : OK-432の作用機序をわれわれはいかに解明してきたか? - Effector cell と Cytokine の誘導順序を中心にして。 *Biotherapy* (1990) **4**, 155-165.
- 15) 鈴木富士夫 : Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) 投与マウス由来マクロファージの抗腫瘍活性。癌と化療 (1985) **12**, 2122-2128。
- 16) 鈴木富士夫 : Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) の抗腫瘍効果発現におけるマクロファージとガンマイナーフェロンの相互作用。癌と化療 (1987) **14**, 127-134。
- 17) Heidelberger C : Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem* (1975) **44**, 79-121.
- 18) Ghoneum M, Gill G, Wojdani A, Payne C and Alfred LJ : Suppression of basal and corynebacterium

- parvum-augmented NK activity during chemically induced tumor development. *Int J Immunopharmacol* (1987) **9**, 71-78.
- 19) Alfred LJ, Wojdani A, Nieto M, Perez R and Yosida G: A chemical carcinogen, 3-methylcholanthrene, alters T-cell function and induces T-suppressor cells in a mouse model system. *Immunology* (1983) **50**, 207-213.
- 20) Wojdani A, Attarzadeh M, Wolde-Tsadik G and Alfred LJ: Immunocytotoxicity effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on mouse lymphocytes. *Toxicology* (1984) **31**, 181-189.
- 21) Wojdani A and Alfred LJ: Alterations in cell-mediated immune functions induced in mouse splenic lymphocytes by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* (1984) **44**, 942-945.
- 22) Gatti RA and Good RA: Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* (1971) **28**, 89-98.
- 23) Penn I and Starzl TE: A summary of the status of de novo cancer in transplant recipients. *Transplant Proc* (1972) **4**, 719-732.
- 24) 林 裕造, 高橋道人, 吉村博之: 抗癌剤の発癌性について. *癌と化療* (1990) **17**, 2293-2298.
- 25) 佐藤秩子, 宮石 理: 老化と癌. *癌と化療* (1991) **18**, 1-6.
- 26) 平山 雄: がんの第一次予防. *Oncologia* (1985) **12**, 30-44.
- 27) Lippman SM, Kessler JF and Meyskens FL: Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (part II). *Cancer Treat Rep* (1987) **71**, 493-515.
- 28) 山木戸道朗, 松坂 広, 石岡伸一, 保澤総一朗, 大崎幹雄: N-CWS の抗腫瘍活性増強作用と発癌予防効果の検討. *Biotherapy* (1989) **3**, 408-411.
- 29) 山本祐夫, 岡 博子, 貫野 徹, 溝口靖紘, 小林絢三: 肝細胞癌の発癌に及ぼす小柴胡湯の予防効果. *癌と化療* (1989) **16**, 1519-1523.

**Studies on immunoprophylactic effects of OK-432 and
Ge-132 on methylcholanthrene-induced mouse sarcoma**

**Part 2. The role of effector cells in antitumor activity
of OK-432 and Ge-132**

Mamoru TAMAI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The suppressive effects of OK-432 and Ge-132 on 3-methylcholanthrene (MC) carcinogenesis have been confirmed. To clarify the mechanism of this suppression, we investigated the effects of anti-asialo GM1 antibody (AGM1), anti-thymocyte antibody (Thy) and carrageenan (CAR), which eliminate NK cells, T cells and macrophages, respectively, on the growth of MC induced sarcoma. The suppressive effect of Ge-132 in mice was abolished by prior AGM1, Thy or CAR treatment ; moreover, these compounds enhanced the development of tumors. In mice treated with OK-432, AGM1 or CAR enhanced the development of tumors, as well ; however, Thy treatment did not alter tumor incidence.

Prior treatment with AGM1 reduced the percentage of large granular lymphocytes and NK activity, which were increased by OK-432 or Ge-132 treatment ; however Thy or CAR did not alter these parameters.

These results indicate that NK cells and macrophages play an important role in the defense against MC induced sarcoma in OK-432-treated mice, while T cells as well as NK cells and macrophages do so in Ge-132-treated mice.