

担癌宿主の免疫能に関する研究

第 1 編

マウスFoot Pad Reaction に およぼす免疫賦活剤の影響

岡山大学医学部第二内科学教室(主任：木村郁郎教授)

金 川 修 身

(昭和53年 3月29日受稿)

内 容 目 次

第 I 章 諸言

第 II 章 実験材料と方法

第 III 章 実験成績

第 1 節：正常Foot Pad Reaction の検討

- i) Foot Pad Reaction の経時的变化
- ii) Foot Pad Reaction 局所の組織学的変化
- iii) Foot Pad Reaction の特異性の検討

第 2 節：正常Foot Pat Reaction に及ぼす免疫賦活剤の影響

第 3 節：薬剤によるFoot Pad Reaction の抑制

- i) Cyclophosphamide によるFoot Pad Reaction の抑制
- ii) Carragheenan によるFoot Pad Reaction の抑制

第 4 節：抑制Foot Pad Reaction に及ぼす免疫賦活剤の影響

- i) Cyclophosphamide による抑制に及ぼす影響
- ii) Carragheenan による抑制に及ぼす影響

第 VI 章 孝按

第 V 章 結語

第 I 章 諸 言

近年悪性腫瘍に対する治療法として、手術療法、

放射線療法、化学療法に次いで第 4 の療法として免疫療法が導入されて来つつある。

免疫療法は、元来悪性腫瘍細胞の抗原性の存在を前提とし、それに対する担癌生体の免疫反応を増強させることにより腫瘍の退縮を計ろうとする治療法であるが、現在使用されている多くの薬剤は腫瘍に対する免疫反応を特異的に増強させるのではなく、非特異的に生体の免疫反応を増強させることにより、腫瘍に対する免疫反応をも増強させようとするものである。

現在このような目的で臨床に供されている免疫賦活剤としては、BCG (Bacillus Calmett-Guerin)¹⁾ BCG-Cell Wall SKelton²⁾ OK-432³⁾ 嫌気性コリネ⁴⁾ 等の菌体成分、さらにLentinan⁵⁾ PS-K⁶⁾ などの植物多糖体、Levamisole⁷⁾ 等があげられる。しかし、これらの免疫療法単独では、進行した悪性腫瘍に対して効果をあげる事は不可能であり、他の療法との併用が必要であり、一般的には免疫化学療法という形で免疫療法が行なわれる事が多く、その場合には免疫療法の理念と相反する化学療法による生体の免疫反応の抑制という問題が関与してくる。

このような条件のもとで、種々の免疫賦活剤がどのような役割を果しているかという事については、主として治療効果から検討した、木村⁸⁾ 塚越⁹⁾ 笹尾⁹⁾ らの報告があり、また非特異的免疫反応を指標として検討した中野¹⁰⁾ 木村⁹⁾ 椎尾¹¹⁾ らの報告がある。しかし、腫瘍特異的な反応を用いて検討したものは少ない。腫瘍特異的な反応としては、腫瘍抗原を用いた

macrophage migration inhibition test¹²⁾,¹³⁾ leucocyte migration inhibition test¹⁴⁾, 腫瘍抗原による遅延型皮つ反応¹⁵⁾, mixed lymphocyte tumor culture¹⁶⁾, 細胞障害試験¹⁷⁾, antibody dependent cytotoxicity¹⁸⁾等が知られている。これらの腫瘍特異的の反応を用いて、免疫賦活剤の効果を検討することは、非特異的免疫賦活剤の腫瘍に対する免疫反応の増強効果を判定するためには有意義であると考えられる。

著者は、この二点に注目し、生細胞を用いたFoot Pad Reaction を宿主の免疫反応の指標とし、OK-432, PS-K 及び Levamisole の効果を検討し、さらに免疫抑制剤として cyclophosphamide, macrophage 阻害剤として carrageenan を使用し、両薬剤のFoot Pad Reaction に及ぼす抑制効果に対し、上記の免疫賦活剤を用いることにより、これらの免疫賦活剤の効果について興味ある知見を得たので報告する。

第Ⅱ章 実験材料と方法

C₃H/He マウスと同系のMH-134腹水肝癌を静脈内移植し、移植成立後同じMH-134生細胞をマウス後肢足掌に注入することによって生じる腫脹(Foot Pad Reaction)をMitomycin C処理細胞注入の場合と同様、腫瘍に対する宿主の特異的遅延型反応の指標として以下の検討を行なった。まず静脈内移植後経時的にFoot Pad Reactionを行ない、至適条件を設定し、次いでC₃H/He マウスと同種の関係にあるSarcoma-180およびLewis lung cancerをchallengeすることによって本反応の特異性を検討した。続いて臨床で用いられたOK-432, PS-K, Levamisoleの本反応におよぼす影響について検討を加えると同時に、免疫抑制下におけるこれらの薬剤の効果をj知るために、実験マウスに抗腫瘍剤であるcyclophosphamide, macrophage 阻害剤である carrageenanを投与し、同様の検討を行なった。またこれらの薬剤の作用機作検討の一環として、免疫脾細胞あるいは腹腔内浸出細胞移入の本反応におよぼす効果を検討した。また移植成立後のマウスの運命は3~4週後に死亡するため、この反応の判定には何等影響を及ぼさなかった。

なお、名実験では原則として一群5匹のマウスを用い推計学的検討を加えた。

以下実験材料および方法の詳細を述べる。

1. 実験動物：岡山大学マウスコロニーおよび静

岡県実験動物株式会社より購入した14~20週令C₃H/He マウスを使用した。

2. 実験腫瘍および腫瘍細胞浮遊液の作製：MH-134腹水肝癌, Sarcoma-180 および Lewis lung cancer を用いた。MH-134はC₃H/He マウス腹内に, Sarcoma-180はICR マウス腹腔内に, またLewis lung cancer はC57BL マウス後肢筋肉内に教室において継代移植しているものである。

実験に供する腫瘍細胞浮遊液は、MH-134, Sarcoma-180では移植後7~8日目の腹水を無菌的に採取し、氷冷下で0.84%NH₄Clにて赤血球を溶血除却後、PH 7.4のphosphate buffer saline (PBS)で3回洗滌し蛋白成分を除却し、目的密度に調整した。なおMitomycin C 処理の場合は50 μg/mlの濃度で37℃30分間処理後PBSにて3回洗滌して使用した。またLewis lung cancer では移植2週後の腫瘍を無菌的に細切し、25% trypsinにて37℃5分間処理したのち、#400の金属性メッシュ通して得られた細胞を氷冷下でPBSにて3回洗滌後、trypan blue 染色にて生細胞を算出し、目的の細胞密度に調整した。

3. Foot Pad Reaction の測定：5×10⁶個のMH-134細胞をC₃H/He マウスに静脈内移植し、本実験では4日後に4×10⁷/mlに調整された腫瘍細胞浮遊液 0.025ml (腫瘍細胞数10⁶個)をマウス後肢足掌に注入し、48時間後の足掌の厚さをthickness gauge (Citizen KG-1)で測定、注入前の足掌の厚さをさし引いた値を、Foot Pad Reaction の値とした。免疫賦活剤として、OK-432, PS-K, Levamisoleをそれぞれ50KE/Kg, 300mg/Kg, 2mg/Kgを0.5mlに調整し、これを腹腔内に投与したが、実験プログラムの詳細は成績の項で述べることにする。

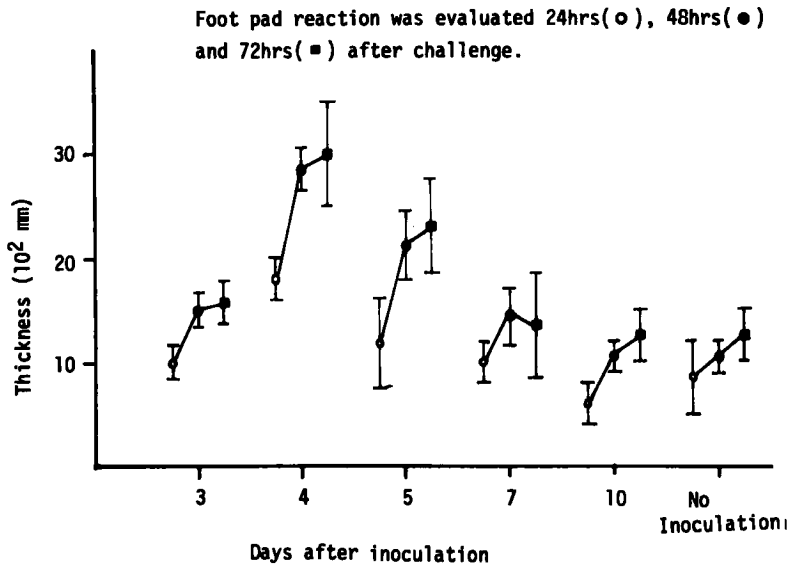
4. 免疫脾細胞および腹腔浸出細胞浮遊液の作製：10⁷個のMH-134腹水肝癌細胞をC₃H/He マウス背部皮下に移植後10日目にマウスを屠殺し、脾を無菌的に採取し、5%牛胎児血清加RPMI-1640を加え細切後、18から27gaugeまで順次注射針を通過せしめ脾細胞浮遊液を得た。さらに、0.84%NH₄Clにて赤血球を除却し、冷PBSにて3回洗滌後目的の細胞密度に調整した。また腹腔内の細胞は同じくMH-134皮下移植後10日目にマウス腹腔内にPBS 3mlを注入し、腹部をよくマッサージして5分間放置後マウスを開腹しこれ採取した。冷PBSにて3回洗滌後目的の細胞密度に調整して実験に供した。

第三章 実験成績

1. Foot Pad Reaction の腫瘍移植後の時間的推移: C₃H/He マウスにMH-134細胞 5 × 10⁶個を静脈内移植後, 3日, 4日, 5日, 7日, 10日後1群5匹に10⁶個のMH-134細胞を両側足掌皮下に注入し, 注入後それぞれ24時間後, 48時間後, 72時間後のFoot Pad Reaction を計測した. 図1に示す

以上述べたごとく静脈内移植第4日目に無処置癌細胞を足掌に注入し, 48および72時間後に測定することにより有意の反応を得ることができたが, これを非分裂生細胞であるMitomycin 処理の同数のMH-134細胞をchallenge した場合の反応性と比較した. その結果表1に示すごとく, 静脈内移植後第4日目の48時間後の反応性は, 無処置細胞の場合37.9 ± 7.5, Mitomycin C 処置細胞の場合33.2 ± 4.0とほ

図1. Foot Pad Reaction の時間的推移



ごとく, 静脈内移植後3日目に実施したFoot Pad Reaction を, 24時間後10.0 ± 1.5, 48時間後15.0 ± 1.8, 72時間後15.8 ± 2.0(単位は1/100mm)であった. 4日目実施群ではそれぞれ, 18.2 ± 2.5, 28.5 ± 2.1, 30.0 ± 3.9であり, 5日目ではそれぞれ11.9 ± 4.3, 21.2 ± 3.4, 21.9 ± 4.4, さらに7日目ではそれぞれ10.0 ± 1.9, 14.4 ± 2.9, 13.4 ± 4.7となり, 10日目実施群ではそれぞれ6.2 ± 1.9, 10.4 ± 1.5, 12.5 ± 2.3という値を示した. また静脈内移植を行なわなかった対照群の反応値は, 24時間後8.4 ± 3.7, 48時間後8.9 ± 2.2, 72時間後13.3 ± 1.7であった. すなわち, 腫瘍移植後4日目に実施された場合, 本反応は最も強い反応性を示し, 48時間後および72時間後の測定値が大きな値を呈した.

ぼ等しい値を呈した. 従って実験操作を簡便とするため以後の実験においては, 5 × 10⁶個のMH-134細胞を静脈内移植(第0日)後, 4日目(第4日)に無処置MH-134細胞10⁶をchallengeし, 48時間後に反応を測定することにした.

2. Foot Pad Reaction の特異性の検討:

C₃H/He マウスに5 × 10⁶個のMH-134細胞を静脈内移植しその後MH-134 10⁶個および他家腫瘍である, Sarcoma-180, Lewis lung cancer をそれぞれ10⁶個足掌に challenge し, 48時間後の Foot Pad Reaction を計測すると, 表2に示すように, MH-134 challenge 群は34.6 ± 3.8, Sarcoma-180 群では16.6 ± 4.0, Lewis lung cancer 群は13.4 ± 4.2であり, MH-134 challenge 群は有意の高値

表 1. Mitomycin 処理MH-134と無処置MH-134とのFoot Pad challenge の比較

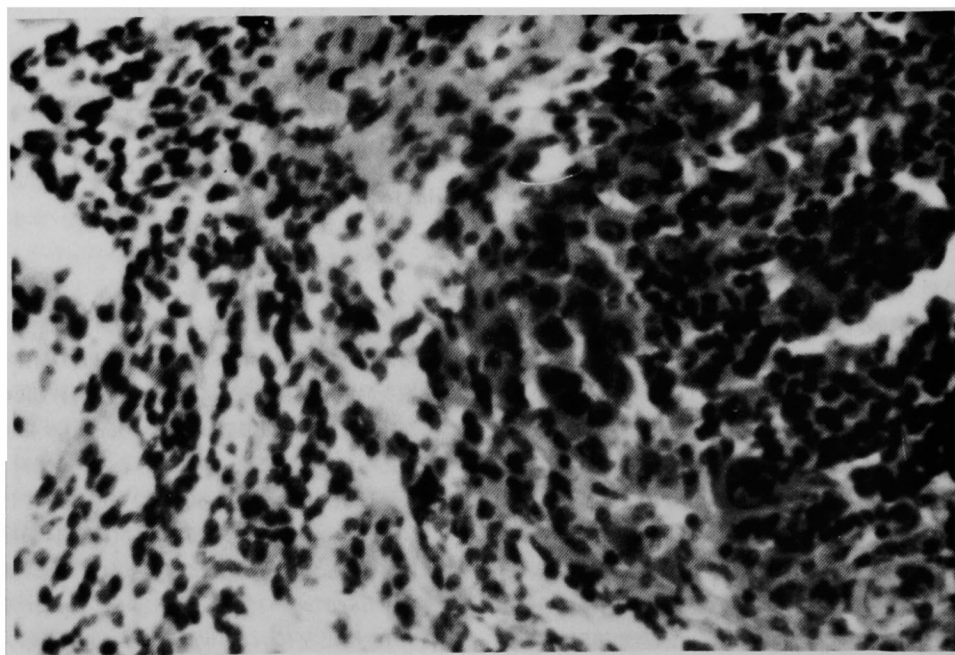
| Cells for inoculation | Cells for challenge | Thickness (10 ² mm) |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| MH-134 5x10 ⁶ | normal MH-134 1x10 ⁶ | 37.9 ± 7.5 |
| MH-134 5x10 ⁶ | MMC treated MH-134 1x10 ⁶ | 33.4 ± 4.0 |
| None | normal MH-134 1x10 ⁶ | 8.9 ± 2.2 |

表 2. Foot Pad Reaction の特異性

| Cells for inoculation | Cells for challenge | Thickness (10 ² mm) |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| MH-134 5x10 ⁶ | MH-134 10 ⁶ | 34.6 ± 3.8 a) |
| MH-134 5x10 ⁶ | Lewis lung 10 ⁶ | 16.6 ± 4.0 b) |
| MH-134 5x10 ⁶ | S-180 10 ⁶ | 13.4 ± 4.2 c) |

Significant difference ($p < 0.01$) between a) and b), c)

図 2.



MH-134 5 × 10⁶個静脈内移植後第 4 日に
MH-134 10⁶個をFoot Pad にchallenge し
48時間後のFoot Pad の組織像

を示した。また組織学的検索を加えた結果、図2に示すように、MH-134静脈内移植後第4日目にMH-134を足掌にchallengeした場合、48時間後の局所の変化は腫瘍の増殖は殆んどなく、腫瘍細胞周辺部および腫瘍細胞集簇内に単核球、多核球の浸潤像が認められた。

3. Foot Pad Reaction の脾細胞および腹腔浸出細胞による受身移入：

10⁷個のMH-134細胞をC₃H/He マウスの背側皮下に移植後10日目に、マウスの脾細胞、腹腔浸出細胞を採取し、脾細胞5×10⁶個あるいは腹腔浸出細胞10⁶個を尾静脈よりC₃H/He マウスに移入し、それと同時に足掌に10⁶個MH-134細胞をchallengeした。また対照として正常マウスの脾細胞および腹腔浸出細胞を用いて同様の操作を行なった。48時間のFoot Pad Reaction の値は表3に示すように、無処置マウス脾細胞移入群の10.1±4.6に対し、免疫脾細胞移入群は17.0±5.0であり、また無処置マウス腹腔浸出細胞移入群の9.9±5.0に対し、免疫腹腔浸出細胞移入群は18.5±4.5であり、これらの結果は本反応の受身伝達が可能なことを示したが、静脈移植後に同一個体でFoot Pad Reaction を行なった

場合(23.1±5.1)ほどの反応性は得られなかった。

4. 各種免疫賦活剤のFoot Pad Reaction におよぼす影響。

まず静脈内移植前に各種薬剤を投与し、その影響を検討した。すなわち移植4日前から2日前まで3日間連日OK-432 50KE/Kg, PS-K 300mg/Kg, Levamisole 2mg/Kg を腹腔内に投与し、移植後、第4日に10⁶個MH-134細胞を足掌にchallengeし、Foot Pad Reaction を計測すると、図3に示すように無処置群31.6±2.7, OK-432投与群33.8±4.2, PS-K投与群では26.2±4.4, Levamisole投与群は27.6±3.4と、いずれも有意の差を認めなかった。

次に静脈内移植後にこれらの薬剤を投与し同様の検討を加えた。移植後第1日から第3日までの3日間上記の免疫賦活剤を投与し、Foot Pad Reaction を計測すると図4に示すように、OK-432投与群36.4±4.1およびLevamisole投与群37.0±3.2は無処置群34.0±3.5に比べて反応性の有意の増強は認められなかったが、PS-K投与群では50.8±4.3と有意に反応の増強が認められた。

5. Foot Pad Reaction におよぼす cyclo-

表3. 脾細胞および腹腔浸出細胞によるFoot Pad Reaction の移入

| Procedures | | Thickness (10 ² mm) |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| Day 0 | Day 4 | |
| MH-134 5x10 ⁶ iv | MH-134 1x10 ⁶ into FP | 23.1±5.1 |
| none | MH-134 1x10 ⁶ into FP immune spleen cell 5x10 ⁶ iv | 17.0±5.0 a) |
| none | MH-134 1x10 ⁶ into FP normal spleen cell 5x10 ⁶ iv | 10.1±4.6 b) |
| none | MH-134 1x10 ⁶ into FP immune PEC 1x10 ⁶ iv | 18.5±4.5 c) |
| none | MH-134 1x10 ⁶ into FP normal PEC 1x10 ⁶ iv | 9.9±5.0 d) |

FP: foot pad
significant difference (p<0.05) between a) and b)
significant difference (p<0.05) between c) and d)

図 3. 静脈移植前免疫賦活剤投与のFoot Pad Reaction に及ぼす影響

| Immuno-potentiators | Dose/kg | Thickness (10 ² mm) |
|---------------------|---------|--------------------------------|
| Control | | 31.6 ± 2.7 |
| OK-432 | 50u. | 33.8 ± 4.2 |
| PS-K | 300mg | 26.2 ± 4.4 |
| Levamisole | 2mg | 27.6 ± 3.4 |

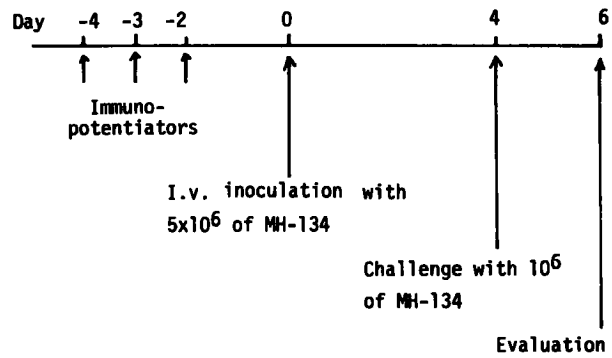
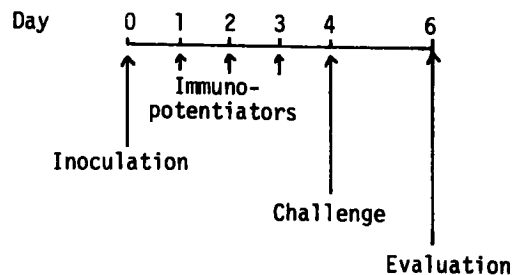


図 4. 静脈移植後免疫賦活剤投与のFoot Poo Reaction に及ぼす影響

| Immuno-potentiators | Dose/kg | Thickness (10 ² mm) |
|---------------------|---------|--------------------------------|
| Control | | 34.0 ± 3.5 |
| OK-432 | 50u. | 36.3 ± 4.1 |
| PS-K | 300mg | 50.8 ± 4.3* |
| Levamisole | 2mg | 37.0 ± 3.2 |

* Statistically significant at $p < 0.001$ 

phosphamideおよびcarragheenanの影響:

まず静脈内移植の前後にわたりcyclophosphamideを投与し、本反応におよぼす影響の経時的変動について検討を加えた。すなわちcyclophosphamide 200mg/Kg 1回の腹腔内投与を、移植前21日、14日、7日、3日および1日と、移植後1日および3日の7点で行ない、型のごとくFoot Pad Reactionを計測した。その結果は図5に示すように、21日前投与では48.1±4.2 14日前の投与では35.3±6.4、7日前の投与で23.5±10.1、以下3日前19.0±4.9、1日前12.2±3.5、であり、また移植後1日後13.2±4.6、3日後11.5±3.8であり、cyclophos-

phamideを腫瘍移植前7日から移植後3日の間に投与された時に本反応を抑制する成績が示された。

次にmacrophageの阻害剤であるcarragheenanの100mg/Kgを移植前1日前と移植後3日後に投与した群について本反応をみると、表4に示されるように、1日前投与群13.0±3.2、3日後投与群16.7±4.4と無処置群に比べ明らかな抑制が認められた。

6. cyclophosphamide およびcarragheenanの抑制に対する免疫賦活剤の効果:

まずcyclophosphamide投与前に3種の免疫賦活剤を投与してその効果を検討した。図6に示すようにMH-134細胞静脈移植4日前から2日前までの3

図5. Foot Pad Reactionにおよぼすcyclophosphamideの影響—その経時的変動—

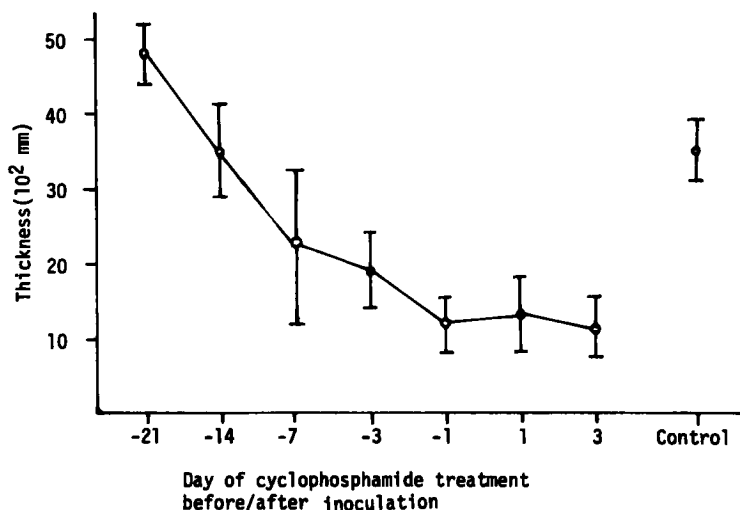


表4. Foot Pad ReactionにおよぼすCarragheenanの影響

| Day -1 carragheenan 100mg/kg | Day 0 MH-134 5x10 ⁶ iv | Day 3 carragheenan 100mg/kg | Thickness (10 ² mm) |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| (+) | (+) | (-) | 13.0 ± 3.2* |
| (-) | (+) | (+) | 16.7 ± 4.3 |
| (-) | (+) | (-) | 23.1 ± 5.1* |

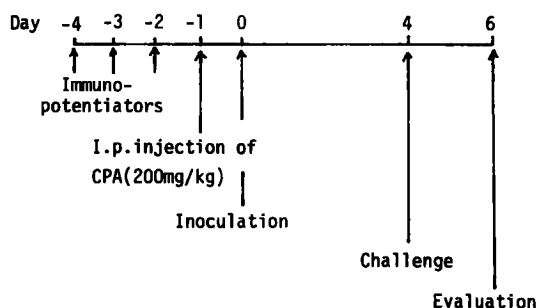
* Statistically significant at p < 0.001

図6. Cyclophosphamide 抑制Foot Pad Reaction におよぼす免疫賦活剤の影響
(I) 移植前投与

| Immuno-potentiators | Dose/kg | Suppression by CPA | Thickness (10^2 mm) |
|---------------------|---------|--------------------|------------------------|
| Control I | | No | 31.6 ± 2.7 a) |
| Control II | | Yes | 14.9 ± 3.1 b) |
| OK-432 | 50u. | Yes | 25.5 ± 5.3 c) |
| PS-K | 300mg | Yes | 25.3 ± 5.5 d) |
| Levamisole | 2mg | Yes | 21.5 ± 4.4 e) |

Significant difference ($p < 0.001$) between a) and b)

Significant difference ($p < 0.01$) between b) and c), d), e)



日間前述の免疫賦活剤を腹腔内投与し、移植1日前にcyclophosphamideの200mg/Kgを腹腔内投与し、Foot Pad Reactionを計測すると、無処置群 31.6 ± 2.7 に対し、cyclophosphamideのみ投与群は 14.9 ± 3.1 と明らかな反応の低下が示されたが、OK-432併用投与群では 25.5 ± 5.3 、PS-K併用投与群では 25.3 ± 5.5 、であり、Levamisole併用投与群では 21.5 ± 4.4 とcyclophosphamideのみ投与群と比べ反応の増強は認められたが、無処置群の値にまでは回復しえなかった。

次にcyclophosphamide投与後に免疫賦活剤を投与し同様の検討を行なった。図7に示すように移植1日前にcyclophosphamide 200mg/Kgを腹腔内投与し、移植1日後から3日後まで前述の免疫賦活剤を腹腔内投与し、Foot Pad Reactionを計測すると、cyclophosphamideのみ投与群では 14.9 ± 3.1 と明らかに反応は抑制されたが、OK-432併用投

与群では 31.8 ± 6.4 、PS-K併用投与群では 32.8 ± 5.9 と無処置群とほぼ同じ移度にまで反応性の回復が認められたが、Levamisole併用投与群では 18.6 ± 5.5 と、cyclophosphamideによる抑制からの回復は認められなかった。

続いて、carrageenanの抑制に対する免疫賦活剤の効果を検討した。図8に示すようにMH-134移植1日前にcarrageenan 100mg/Kgを腹腔内投与し、移植1日後から3日後まで3日間前述の免疫賦活剤を投与し、Foot Pad Reactionを計測した。その結果無処置群 23.1 ± 5.1 に対しcarrageenan投与群は 13.0 ± 3.2 であり、明らかな抑制が示された。またOK-432併用投与群は 4.8 ± 3.3 、Levamisole併用投与群では 7.4 ± 4.2 とかわって抑制の増強が示された。一方PS-K併用投与群は 17.4 ± 11.5 であり、carrageenan単独投与群との差は認められなかった。

図7. Cyclophosphamide 抑制Foot Pad Reaction におよぼす免疫賦活剤の影響 (II) 移植後投与

| Immuno-potentiators | Dose/kg | Suppression by CPA | Thickness (10 ² mm) |
|---------------------|---------|--------------------|--------------------------------|
| Control I | | No | 34.0 ± 3.5 |
| Control II | | Yes | 14.9 ± 3.1 a) |
| OK-432 | 50u. | Yes | 31.8 ± 6.4 b) |
| PS-K | 300mg | Yes | 32.8 ± 5.9 c) |
| Levamisol | 2mg | Yes | 18.6 ± 5.5 |

Significant difference (p<0.001) between a) and b), c)

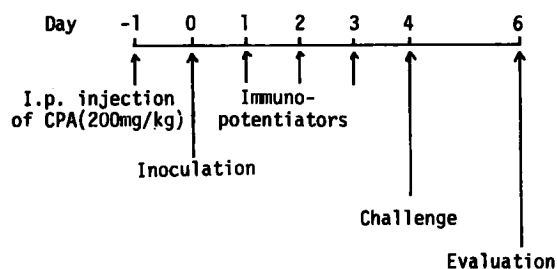
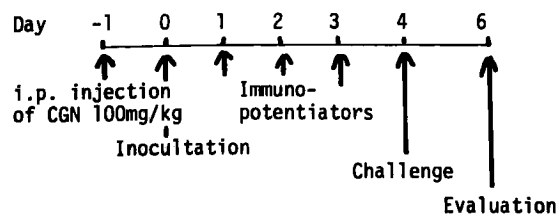


図8. Carrageenan 抑制Foot Pad Reaction におよぼす免疫賦活剤の影響

| Immuno-potentiators | Dose/KG | Suppression by CGN | Thickness (10 ² mm) |
|---------------------|---------|--------------------|--------------------------------|
| control I | | No | 23.1 ± 5.1 |
| control II | | Yes | 13.0 ± 3.2 a) |
| OK-432 | 50u. | Yes | 4.8 ± 3.3 b) |
| PS-K | 300mg | Yes | 17.4 ± 11.5 c) |
| Levamisole | 2mg | Yes | 7.4 ± 4.2 c) |

Significant difference (p<0.05) between a) and b)c)



第IV章 考 按

腫瘍抗原に対する生体の反応としての遅延型皮フ反応は、Meltzer¹⁵⁾Holmes¹⁹⁾らによって報告されている。

著者の行なった、C₃H/He マウスと自家腫瘍MH-134を用いたFoot Pad Reaction においても、前もってマウスを担瘤状態にしてあれば、一般の遅延型皮フ反応と同様に腫瘍足掌注入後48時間で著明な足掌の肥厚が認められた。本実験では主に足掌に生細胞を注入したため、腫瘍の増殖という事も考慮しなければならないが、足掌の組織学的検索において、多核球 単核球の浸潤が著明に認められること、また非増殖性のMitomycin C処理細胞と正常腫瘍細胞との間に足掌注入48時間後では差は認められないことなどから、このFoot Pad Reaction は一応担瘤宿主の自己の腫瘍に対する特異的な免疫反応によるものであると考えられる。そしてFoot Pad Reaction の経時的推移では、移植後4日目に足掌に腫瘍をchallenge した場合が最大であり、以後次第に反応は低下し10日目の場合は非移植群との差は認められない。このことは、C₃H/He, MH-134の系において、静脈内に腫瘍を移植した場合、生体の腫瘍に対する反応が第4日目に最大となり以後次第に低下してゆくことを示している。またこの実験系において移植された腫瘍以外の腫瘍をchallenge してFoot Pad Reaction を行なった場合は、有意に反応性が乏しいことより、この反応は移植した腫瘍に特異的であるということが出来る。螺良ら²⁰⁾もこの実験とはほぼ同様の見解を示している。

遅延型皮フ反応が免疫担当細胞であるリンパ球だけでなくmacrophage によっても担われていることは Schwartz²¹⁾らによって報告されているが、本実験においても、免疫脾細胞および免疫腹腔浸出細胞移入により、正常脾細胞、腹腔浸出細胞移入群よりもFoot Pad Reaction の増強が認められ、Foot Pad Reaction が恐らくリンパ球、macrophage により担われていることが示唆された。

次に免疫賦活剤の本反応に及ぼす影響についての検討を行なうと、マウスに静脈内移植を行なう前にこれらの免疫賦活剤を投与しても非投与群との差はなく、静脈内移植後の投与の場合は、PS-K 投与群のみに反応の増強が認められた。この結果は、非特異的反応による木村ら⁸⁾のOK-432, Lichtenfeld²²⁾のLevamisole の成績とは異なっている。

これは非特異的反応が担瘤の状態では次第に低下してゆくのに対し、著者の実験系では生体の腫瘍に対する反応が最大となる条件下、すなわち移植後4日目の反応を測定していることによるものと思われる。そしてPS-K は抗原存在下に投与すれば生体の反応をその正常最大値以上に促進させるということが示された。

一般に免疫化学療法を実施する場合には、化学療法による免疫抑制、担瘤による免疫反応の低下という条件が存在する。そのような条件下でこれらの免疫賦活剤がいかなる効果を有するかということを検討することは重要な課題である。著者は、cyclophosphamide, carragheenan を用い、免疫抑制、macrophage の阻害という条件を設定し検討した。

cyclophosphamide のFoot Pad Reaction におよぼす影響は静脈移植前3週および2週投与では認められず、7日前投与より抑制効果が出現し1日前投与でその抑制効果は最大となり、移植後3日投与の場合にもその抑制効果は持続した。この変化は、マウスの脾細胞有核細胞数、Thy¹⁻²陽性細胞数で検討したKolb ら²³⁾の成績とはほぼ同様の結果を示している。

cyclophosphamide のFoot Pad Reaction の抑制に対する免疫賦活剤の効果は、cyclophosphamide 投与前にこれらを投与した場合、OK-432, PS-K, Levamisole ともある程度の抑制よりの回復は認められたが、cyclophosphamide 非投与群のレベルにまでは回復しえなかった。このことは3剤ともcyclophosphamide の抑制に対してある程度の予防効果を持っていることを示している。またcyclophosphamide 投与後に免疫賦活剤を投与した場合には、OK-432, PS-K, 投与群はcyclophosphamide 非投与群と同程度にまで回復しており、この実験結果は臨床的に免疫化学療法を行なう場合、免疫賦活剤により、化学療法による免疫抑制に対抗できるという可能性を示唆している。しかしLevamisole 投与群では全く抑制からの回復は認められなかった。このことは、本実験では生体の反応が最大の場合にLevamisole を用いているのに対し、折田ら²⁴⁾はLevamisole は腫瘍が十分生着増殖した場合に効果が認められるといい、投与時期の差が大きな要因であるかもしれない。

一方腫瘍免疫におけるmacrophage の働きはその特異性、非特異性を問わず、非常に重要視されて来つつあるが²⁵⁾そのmacrophage 阻害剤としてのca-

rragheenan の働きについては、Allison²⁶⁾らの報告に詳しく述べられ、またcarragheenan の免疫反応におよぼす影響には、Schwartz ら²¹⁾の遅延型皮膚反応の抑制効果についての報告、Lotzove ら²⁷⁾の実験腫瘍において、腫瘍の増殖の促進効果等の報告がある。本実験においても、静脈内移植1日前および3日後の Carragheenan 投与により Foot Pad Reaction の抑制が認められた。

carragheenan による Foot Pad Reaction の抑制に対する免疫賦活剤の効果は、carragheenan 投与後にこれらの薬剤を投与した場合、PS-K 投与群では carragheenan 単独投与の場合と差は認められず、この抑制に対しては無効であった。また OK-432, Levamisole 投与群ではかえって抑制の増強作用が認められた。このことは、OK-432 については木村ら²⁸⁾の報告のごとく、OK-432 投与後早期に macrophage が出現するという事実、また Levamisole については Schmidt²⁹⁾の報告のごとく、本剤が非特異的な macrophage に対する作用を有するため、macrophage が阻害された状態にあって、これら薬剤を投与することにより、一種の Antigenic competition の状態となり、阻害された macrophage の Foot Pad Reaction への関与をさらに低下させているのかもしれない。PS-K はそのような作用を持たないため、carragheenan による抑制には何ら影響をおよぼさないと考えられる。

以上、ここで得られた免疫賦活剤の効果に関する成績は、臨床的に用いられているいわゆる非特異的免疫賦活剤が、担癌動物の腫瘍特異的免疫反応を賦活する効果の一端を示すものであろう。また cyclophosphamide に代表される抗癌化学療法剤の免疫抑制作用に拮抗する作用を有することも示されている。しかし、一方では macrophage の特異的な阻害という特殊な条件下では、これらの免疫賦活剤が免疫反応の低下を更に増強することが示され、抗癌剤によって抑制を受ける免疫担当細胞の種類によっては、これら非特異的免疫賦活剤の投与によって抑制をさらに増強する可能性も示唆するものであり、今後かかる薬剤の投与の Timing が化学療法との関連のもとに、さらに詳細に検討される必要がある。

第V章 結 論

C₃H/He マウスにおいて同系の腫瘍である MH-134 を用い、Foot Pad Reaction を指標として各種免疫賦活剤のおよぼす影響を種々の条件のもとで検

討し次のような結果を得た。

1), 5 × 10⁶個の MH-134 腫瘍細胞を静脈内移植後おなじ腫瘍細胞 10⁶個を足掌に challenge した場合は、Mitomycin C により不活化を行なった場合と全く同様で、第4日目の反応が最大となり、以後次第に減少した。その場合足掌 challenge 後48時間における組織像では、腫瘍の増殖は認められず、宿主の細胞の腫瘍周辺への侵潤が認められた。

2), 他の腫瘍を足掌に challenge した場合には MH-134 challenge の場合と比較して反応の程度は明らかに弱く、このような点から本反応は特異的免疫反応と考えられた。

3), この Foot Pad Reaction は、担癌10日目のマウスの脾細胞および腹腔浸出細胞により受身移入することが可能であった。

4), OK-432, PS-K, Levamisole を静脈内移植前に使用した場合には、Foot Pad Reaction に対する影響は認められなかったが、移植後に使用した場合は、PS-K のみに反応の増強が認められた。

5), Foot Pad Reaction は、静脈内移植1日前に免疫抑制剤である cyclophosphamide および macrophage 阻害剤である carragheenan を投与することにより著明に抑制された。

6), cyclophosphamide による Foot Pad Reaction の抑制条件のもとで OK-432, PS-K, Levamisole を cyclophosphamide 投与前に使用すると、各薬剤ともにある程度の抑制からの回復を促進する効果が認められたが、cyclophosphamide 非投与群と同程度までの回復は認められなかった。しかし、cyclophosphamide 投与後に使用した場合には、PS-K, OK-432, 投与群は、cyclophosphamide 非投与群と同程度にまで抑制からの回復が認められた。それに反して、Levamisole 投与群では抑制からの回復は全く認められなかった。

7), carragheenan による Foot Pad Reaction の抑制条件のもとで、carragheenan 投与後に OK-432, PS-K, Levamisole を投与した場合、PS-K 投与群では何ら変化を認めなかったが、OK-432, Levamisole 投与群では逆に抑制の増強が認められた。

本論文の要旨は第36回日本癌学会総会（昭和52年、東京）において報告した。稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲

を賜った恩師木村郁郎教授並びに大慰泰亮講師に深 謝致します。

文 献

- 1) Mathe, G., Oouillart, P. and Lapeytaque, F. Approches to the immunological treatment of cancer in man. *Brit. Med. J.*, **4**:7-10, 1969.
- 2) Azuma, I., Ribí, E. E., Meyer, T. J. and Zbar, B. Biological active component from mycobacterium cell wall. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**:95-101, 1974.
- 3) Okamoto, H., Shioin, S., Koshimura, S. and Shimizu, R. Studies on the anticancer and storeptolysin S-forming abilities of hemolytic storeptococci. *Jap. J. Microbiol.*, **11**:323-326, 1967.
- 4) Woodruff, M. F. A. and Boak, J. L. Inhibitory effect of injection of corynebacterium parvum on the growth of tumor transplant in isogenic hosts. *Brit. J. Cancer*, **20**:345-355, 1966.
- 5) Chihara, G., Naeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuda, F. Inhibition of mouse sarcoma -180 by polysacchrides from *Lentinus edodes*. *Nature (London)*, **222**:687-688, 1969.
- 6) 塚越 茂:多糖類の担癌動物に対する宿主効果, 特にカワラタケ由来P S -K の作用. *癌と化学療法*, **1**:251-258, 1974.
- 7) Renoux, G. and Renoux, M. Levanisole inhibits and cures a solid malignant tumor and its pulmonary metases. *Nature (New Biol.)*, **240**:217-218, 1972.
- 8) 木村郁郎, 大慰泰亮, 高野純行, 大沢 汎, 安原尚蔵, 渡辺達夫, 杉山元治. 溶連菌製剤 (P C -B -45) と各種制癌剤併用の試み. *癌の臨床*, **18**:886-891, 1972.
- 9) 笹尾哲郎, 新本稔, 山縣目政, 服部考雄. 担癌宿主抵抗性におよぼす嫌気性コリネバクテリウムの影響 *癌と化学療法*.
- 10) 中野陽典, 田口鉄男, 前田利信, 荒川佳弘, 斎藤健一, 担癌マウスの遅延型皮フ反応に, およぼす蛋白多糖体 (P S -K) の影響 *癌と化学療法*, **1**:285-292, 1974.
- 11) 推尾剛, 吉浜隆, 弓狩康三, 抗腫瘍多糖体レンチナンの生体免疫機能に対する効果および化学療法との併用. *癌と化学療法*, **2**:45-51, 1975.
- 12) Kronmann, B. S., Wepsic, H. T., Churchill, W. H. Jr., Zbar, B., Borsos, T. and Rapp, H. T. Tumor specific antigens detected by inhibition of macrophage migration. *Science*, **165**:296-297, 1969.
- 13) Bloom B. R., Benett, B., Oettgen, H. F., Mclean, E. P. and Old, L. D. Demonstration of delayed hypersensitivity of soluble antigens of chemically induced tumor by inhibition of macrophage migration. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **164**:1176-1180, 1969.
- 14) Andersen, V., Bendixen, G. and Shiodt, T. An in vitro demonstration of cellular immunity against autologous mammary carcinoma in man. *Acta. Med. Scand.*, **186**:101-103, 1969.
- 15) Meltzer, M. S., Oppenheim, J. J., Littman, B. H., Leonard, E. J. and Rapp, H. J. Cell -mediated tumor immunity measured in vitro and in vivo with soluble tumor specific antigens. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**:727-734, 1972.
- 16) Burk, M. W., Yu, S., Ristow, S. S. and Mckhann, C. F. Refractoriness of lymph -node cell from tumor bearing mice. *Int. J. Cancer*, **15**:99-108, 1975.
- 17) Cerottini, J. C., Nordin, A. A. and Brunner, K. T. In vitro cytotoxic activity of thymus cells sensitized to alloantigens. *Nature (London)*, **227**:72, 1970.

- 18) Møller, E. Contact - induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigen. *Science*, **147** : 873-879, 1965.
- 19) Holmes, E. C., Reisfeld, R. A. and Morton, P. L. Delayed cutaneous hypersensitivity to cell free tumor antigen. *Cancer res.*, **33** : 199-202, 1973.
- 20) 螺良英郎, 久野悟郎, 矢田健太郎. Syngeneic Tumor に対する Foot Pad Reaction の検討 日本癌学会第35回総会記事, 71, 1976.
- 21) Schwarz, H. J. and Leskowitz, S. The effect of carrageenan on delayed hypersensitivity reactions. *J. Immunol.*, **103** : 87-91, 1969.
- 21) Lichtenfeld, J. L., Desner, M. R., Wiernik, P. H. and Mardiney, M. R. Jr. Modulating effect of Levamisole on human lymphocyte response in vitro. *Cancer Treat. Rep.*, **60** : 571-574, 1976.
- 23) Kolb, J.-P. B., Poupon, M.-F. M., Lespinats, G. M. Sabolovic, D. and Loisillier, F. Splenic modifications induced by cyclophosphamide in C3H/He, nude and "B" mice. *J. Immunol.* **118** : 1596-1599, 1977.
- 24) 柘田薫三, 三輪怒昭, 大江新野, 中原東亜, 阪上賢一, 万波徹也, 田中早苗, Levamisole による癌患者細胞性免疫能の賦活 第14回日本癌治療学会総会抄録集, 165, 1976.
- 25) Amos, B. B. Plussible relationship between cytotoxic effect of isoantibody and host cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **87** : 273-292, 1960.
- 26) Allison, A. C., Harriogton, J. S. and Birbeck, M. An examination of the cytotoxic effect of silica on macrophage. *J. Exp. Med.*, **124** : 141-153, 1966.
- 27) Lotzova, E. and Richie, E. R. Promotion of incidence of adenovirus Type 12 transplantable tumors by carrageenens, a specific anti-macrophage agent. *J. Natl. Cancer Inst.*, **58** : 1171-1172, 1977.
- 28) 木村郁郎 溶連菌剤OK-432と癌の免疫化学療法の可能性. 癌と化学療法, **2** : 21-33, 1975.
- 29) Schmidt, M. F. and Douglas, S. D. Effect of Levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors. *Clin. Immunol. Immunopat.*, **6** : 299-305, 1976.

Studies on the host immune response in cancer
Part I. Effect on immunopotentiators on mouse foot pad reaction
against syngeneic tumor cell

By

Osami KANAGAWA

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

Okayama, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

The immuno-modulating effect of three immunopotentiators (OK-432, PS-K, Levamisole) was studied in MH-134 bearing C3H/He mice using foot pad reaction. When tumor bearing mice were injected their own tumor cells in foot pad, foot pad thickening was observed. Microscopic examination revealed that this thickening was not due to tumor growth but caused by polymorphonuclear and mononuclear cell infiltrations. This reaction was specific to their own tumor cells and was able to be transferred by spleen cells and peritoneal exudate cells. Immunopotentiators, when administered prior to tumor inoculation, these three agents had no effects on foot pad reaction, but when administered after tumor inoculation PS-K enhanced the foot pad reaction. Although cyclophosphamide had a significant suppressive effects on foot pad reaction, the reaction was restored by the concomitant use of these three immunopotentiators. This findings suggested that these immunopotentiators might restore the patient's immunity against one's own tumor when used concomitantly with cytotoxic agents in the management of cancer patient. On the other hand, concomitant use of carrageenan with OK-432 or Levamisole resulted in enhancing the suppressive effect caused by carrageenan alone.