

氏 名 (本籍)	さい 齋	とう 藤	もと 元	お 男
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1826	号
学位授与年月日	昭和61年9月10日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最 終 学 歴	昭和43年3月 明治大学農学部農芸化学科卒業			

学位論文題目 Pronounced antitumor effect of LAK cells induced in peritoneal cavity of mice after intraperitoneal injection of OK-432, a killed Streptococcal preparation.
(溶連菌裂剤OK-432投与により誘導されるLAK細胞とそのLAK細胞の抗腫瘍効果)

(主 査)

論文審査委員 教授 菅 村 和 夫 教授 橋 武 彦

教授 京 極 方 久

論文内容要旨

〔目 的〕

生物学的BRM (Biological Response Modifier) である溶連菌製剤OK-432は癌免疫療法剤として広く臨床にて使用されており、有効例が多数報告されている。OK-432の抗腫瘍効果はOK-432が直接あるいはOK-432により誘起されたIFN γ あるいはIL2等のメディエーターを介し活性化されたEffector細胞により発揮されることが既に明らかにされている。しかし腫瘍部位から自己腫瘍を傷害するKiller細胞が得られたとする報告は少ない。自己腫瘍を傷害するKiller細胞の腫瘍部位からの誘導を、BALB/cマウスとその同系腫瘍BAMC-1を用いて試みた。

〔材料と方法〕

マウスおよび腫瘍系：BALB/Cマウスは6～8週齢、雌（日本チャールスリバー）を用い、BALB/c nu/nu (ヌード) マウスは10～12週齢（日本クレア）を使用した。腫瘍はBALB/cマウスにメチルコラントレンで誘発したBAMC-1をマウス腹腔内にて継代維持し使用した。

in vivo抗腫瘍実験：BALB/cマウスにBAMC-1, 1×10^5 個をip移植し、その2, 4, 6, 8および10日後にOK-432をip投与し、生存率により抗腫瘍効果を検討した。

winn assayおよびadoptive transfer：BAMC-1移植後、OK-432を隔日5回投与した12日目の腹腔渗出細胞(PEC)を採取しeffector細胞とした。このPEC, 1×10^7 個BAMC-1, 1×10^5 個を混合した後BALB/Cマウスの腹腔内へ移植し、生存率よりその効果を判定した(winn assay)。またBAMC-1, 1×10^5 個 ip移植1日後に、前記PEC 1×10^7 を ip 移入し、その抗腫瘍性を検討した(adoptive transfer)。

in vitro細胞傷害試験：4時間の ^{51}Cr 遊離試験を行った。target細胞としてBAMC-1, Meth-A, EL-4, B16, P815 (以上NK抵抗性) およびYAC-1, RL81 (以上NK感受性) さらにヒト由来細胞のK562, T24, KATO3を用いた。

〔結果および考察〕

OK-432の抗腫瘍効果はBALB/CマウスにBAMC-1, 1×10^5 個ip移植後、OK-432を隔日5回投与し検討した。その結果無処置対照群は移植15日後までに全例腫瘍死した。一方OK-432, 0.1mg投与群は移植50日後でも80%以上のマウスが腫瘍死を免れ、

著しい抗腫瘍効果が認められた。投与量が 0.1 mg 以上あるいはそれ以下では効果が減少した。次に T 細胞機能欠損のヌードマウスまたは抗 Thymocyte 血清投与により T 細胞機能を低下させたマウスを用い、OK-432 の抗腫瘍効果を検討した。その結果、OK-432 投与群は無処置対象群に比較し有意な延命効果が認められたが全例腫瘍死した。以上の結果から OK-432 の抗腫瘍効果の発現には T 細胞の関与が重要であると推察された。

引き続き OK-432 投与マウスの腫瘍局所から同系腫瘍 BAMC-1 を傷害する effector 細胞の分離を試みた。前記スケジュールに従い OK-432 を ip 投与し、移植 12 日後のマウスから PEC を採取し、その抗腫瘍性について検討した。まず PEC と BAMC-1 を混合し BALB/c マウスの腹腔内へ移入する winn 中和テストを行った。無処置対照群は全例腫瘍死したが、PEC と腫瘍細胞を混合し移入した群は癌の生着が全く認められなかった。この効果は Plastic nonadherent cell (PNA cell) に認められ、Plastic adherent cell (PA cell) の活性はかなり低下していた。さらに、この 12 日目の PEC は BAMC-1 移植 1 日後に腹腔内へ adoptive transfer しても著しい抗腫瘍効果を示し、全例腫瘍死を免れた。この効果も PNA cell に認められ、抗腫瘍活性の非常に強い effector 細胞が OK-432 により腫瘍局所に誘導されることが明らかとなった。

次いで in vivo において抗腫瘍効果を示した PEC の in vitro における killer 活性を 4 時間の ^{51}Cr 遊離試験にて測定した。その結果、PEC は同系腫瘍 BAMC-1 を傷害すると共に NK 抵抗性の B16 メラノーマ、EL4 および NK 感受性の YAC-1、RL61、さらにヒト由来の K562、T24、PLC、KATO3 をも傷害した。以上の結果から 12 日目の PEC は NK 抵抗性および感受性細胞を含む広範囲な killer spectrum を有した LAK 様活性を示すことが明らかとなった。この LAK 様活性を示す 12 日目の PEC の characterization を行った結果、同系腫瘍 BAMC-1 を傷害する killer 細胞は Thy1^+ 、 AsGM1^+ であり、YAC-1 を傷害する Killer 細胞は AsGM1^+ 、 Thy1^- であった。さらに cold target inhibition テストの結果からも、この PEC には 2 種類以上の killer population の存在が示唆された。

正常マウスに OK-432 を投与しても adoptive transfer によって抗腫瘍効果を示す killer 細胞は得られず、胆癌マウス、つまり癌抗原存在下に OK-432 を投与することによってのみ有効な細胞が誘導可能であった。

審査結果の要旨

溶連菌製剤のOK-432はBCG生菌と共に菌体由来のBRM (biological response modifier) として癌免疫療法に広く使用されている。OK-432は初めそれ自身に直接的抗腫瘍効果があることで注目されたが、現在その抗腫瘍効果の主体は生体免疫賦活作用によるものであると考えられている。これまでヒトおよび実験動物を用いた研究からOK-432の免疫系に対する作用として、IFN- γ 、IL-1、IL-2の産生増強、natural killer (NK) の活性増強、細胞障害性マクロファージ・多核白血球の誘導、さらにキラーT細胞の誘導促進などが明らかにされている。このようにOK-432には免疫賦活作用が知られているが、実際に腫瘍部位において活動する effector cells に関する報告は殆どない。著者はOK-432で誘発される抗腫瘍 effector cells を直接腫瘍部位から採り出し、その性状の解析を試みた。

実験系としてマウスに同系腫瘍 (BAMC-1) を ip 移植したものをを用いている。OK-432投与によってこれらマウスは腫瘍死から免れるが、マウスに抗 thymocyte 血清を投与したり、あるいはヌードマウスを用いるとOK-432の抗腫瘍効果が見られない。従って、OK-432の抗腫瘍効果発現にはT細胞が深く関与していることが分かった。さらに、OK-432投与後に腫瘍移植した腹腔浸出液中に、移植腫瘍細胞に対する effector cells が存在することを in vivo (Winn 中和テスト) 並びに in vitro (細胞障害試験) で証明した。これら effector cells の中にはその標的細胞特異性からLAK (lymphocyte-activated killer) 様細胞が含まれていることも明らかにされた。また、effector cells がThy 1⁺ AsGM 1⁺ とThy 1⁻ AsGM 1⁺ の少なくとも2種類の細胞群から構成されていることも証明された。

以上のように著者はBRMの1つとして注目されているOK-432の抗腫瘍作用機序の解析を行ない、その最終的 effector cells の存在を直接的に証明し、かつそれらの性状をも明らかにした。これらの研究成果はOK-432に留まらず他のBRMの抗腫瘍作用機序を理解する上で重要な知見となり得るものであり医学博士の授与に値するものと判定された。