

氏 名（本籍）	い 石 川 慶 子
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 第 2 3 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 2 月 26 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
最 終 学 歴	昭 和 58 年 3 月 29 日 東 京 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科 修 士 課 程 修 了
学 位 論 文 題 目	ANTITUMOR EFFCT OF PSK, A CORIO- LUS PREPARATION : INDUCTION OF MACROPHAGE CHEMOTACTIC FACTOR (MCF) IN TUMOR - BEARING MOUSE SPLEEN (PSK の 抗 腫 瘍 作 用 : 担 癌 マ ウ ス 脾 臓 に お け る , マ ク ロ フ ェ ー ジ 走 化 因 子 の 誘 導 )
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 菅 村 和 夫 教 授 橋 武 彦 教 授 金 丸 龍 之 介

# 論文内容要旨

## 【緒言】

BALB/c マウスを用いた, Double grafted tumor system による実験において, PSK を腫瘍内に投与した結果, 遠隔部の腫瘍も消失, 或いは縮小することが, すでに報告されている。さらに, PSK 投与後, 腫瘍内に Mac-1陽性細胞の浸潤が起こることが認められている。本研究では, このメカニズムの解析を目的として, 脾細胞の産生するマクロファージ走化因子 (MCF) に注目して解析を行った。

## 【実験材料および方法】

- マウス : BALB/c, メス, 6 - 9 週令
- 腫瘍細胞 : Syngeneic Meth A 腫瘍細胞
- 薬剤 : PSK (呉羽化学工業より分与)
- マウス脾細胞培養上清の採取 : 正常 (N), 担癌無処置 (M), PSK 投与正常 (PN), 及び PSK 投与担癌 (PM) マウスの脾細胞  $2 \times 10^6$  個を 10% FCS-RPMI 1640,  $2 \mu\text{g/ml}$  Concanavarin A 1ml にて  $37^\circ\text{C}$ , 24時間培養後, 脾細胞を洗い, FCS free RPMI 1640 1ml を加えてさらに 24時間培養した。培養後, 遠心して上清を採取し, これを Con A Supernatant (CS) とした。
- MCF 活性の測定 : 3% チオグリコレート 1ml を腹腔内投与後, 72時間後に採取した。マウス腹腔内浸出細胞を, 20% 脾細胞培養上清を下層に満たした Boyden Chamber 上層に加え,  $37^\circ\text{C}$ , 4時間培養後, 上下層間のポリカーボネート膜をギムザ染色し, 膜穴から遊走したマクロファージを, 1000倍顕微鏡下にて 10視野算定した。
- 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) : Warters Model 510 (Warters) を, Synchropac G C 300カラム (Synchrom, Inc) に接続し,  $0.1\text{M KH}_2\text{PO}_4$  (PH 7.2), 流速  $0.5\text{ml/min}$  により溶出させた CS を,  $254\text{nm}$  における吸光度を測定し, グラフに描出した。
- SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) : 10%ポリアクリルアミド含有の平板ゲルを用いて, HPLC 分画後の CS の精製度を測定した。
- In vivo における Meth A 腫瘍に対する PSK, 及び CS の抗腫瘍効果 : BALB/c マウスの側腹皮内に  $1 \times 10^6$  個の Meth A 肉腫細胞を移植し, PSK ( $5 \text{mg/ml/mouse}$ ), 又は CS ( $0.1 \text{ml/mouse}$ ) を 3日目より 5日目まで (治癒の time course 実験では 6 - 8日目および 10 - 12日目) 連日 3回腫瘍内投与し, 経日的に抗腫瘍効果を観察した。

### 【実験結果及び考察】

マウス皮下に Meth A 移植後、経日的に PSK を腫瘍内に投与した結果、移植後 3 - 6 日までに PSK 投与を開始したマウスでは腫瘍が消失し、同時に Con A 刺激脾細胞からの MCF 産生が認められた。

Meth A 移植後、3 - 5 日まで 3 回 PSK を i.t. 投与したマウス脾細胞を 10 日目に採取した結果、MCF の産生は PM マウスのみで観察され、N, M, PN マウスでは検出されなかった。さらに、脾細胞の CS 1ml をマウス腹腔内に投与した結果、PM-CS は 24 時間、及び 96 時間において著しくマウス腹腔内の遊走細胞を増加させた。また、PM-CS 自体が微力ながら抗腫瘍効果を有することが認められた。

次に、補体を用いた Negative Selection を行った結果、MCF 産生細胞は、Lyt-1+, L3T4+, Lyt-2- 細胞であった。

PM マウスにおける MCF 産生のメカニズムを解析するために、インドメタシン  $1 \times 10^{-6}$  M を脾細胞培養時に加え、Suppressor Macrophage を抑制した結果、PM マウスではインドメタシンの有無に拘らず MCF が産生され、N マウスではいずれも MCF 産生は認められなかった。しかし、M マウスではインドメタシン無添加では MCF 産生が認められなかったのに対し、添加時には PM マウス同様に MCF 産生が観察された。このことから、PSK 投与により、Suppressor Macrophage が抑制され、その結果として MCF 産生が誘発され、腫瘍治癒の引き金となることが示唆された。

PM-CS 内に存在する MCF の分離、精製を目的として、HPLC を行った結果、分子量 300,000 以上 (Fr.1) 及び、分子量約 100,000 (Fr.2) の 2 つの分画に MCF 活性が認められた。さらに SDS-PAGE により分子量を確認した結果、Fr.2 は分子量約 100,000 の単一のバンドとして示された。

最後に Fr.2 の in vivo 抗腫瘍効果を調べた結果、Fr.2 は PM-CS と同程度の弱い抗腫瘍活性を示した。

以上の結果より、PSK は担癌状態における Suppressor Macrophage の誘導を阻害し、その結果、Helper T Cell から MCF が産生されることにより、PSK 投与部、及び遠隔部の腫瘍局所にマクロファージが集積し、抗腫瘍効果の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

## 審査結果の要旨

BALB/c マウスを用いた Double grafted tumor system による実験において、PSK を腫瘍内に投与した結果、処置部のみならず、遠隔部の腫瘍も消失、あるいは縮小することがすでに報告されている。さらに、PSK 投与後、腫瘍内に Mac-1陽性細胞の浸潤が起こることが認められている。本研究はマクロファージの集積が PSK の作用機作発現の引き金であると推定し、PSK 処置とマクロファージ走化因子産生機構の関係を解析したものである。

マウス皮下に Meth A 腫瘍細胞を移植後、経日的に PSK を腫瘍内に投与した結果、移植後 3～6 日までに PSK 投与を開始したマウスでは腫瘍が消失し、同時に Con A で刺激した脾細胞からの MCF 産生が認められた。Meth A 移植後、3～5 日まで連日 3 回 PSK を i.t. 投与したマウス脾細胞を 10 日目に採取した結果、MCF の産生は PSK 投与担癌 (PM) マウスのみで観察され、正常 (N)、担癌 (M)、及び PSK 投与正常 (PN) マウスでは認められなかった。さらに、脾細胞培養上清 (CS) 1 ml を正常マウス腹腔内に投与した結果、PM-CS は 24 時間、及び 96 時間において著しくマウス腹腔内の遊走細胞を増加させた。また、PM-CS 自体が微弱ながら抗腫瘍作用を有することが確認された。次に、補体を用いた Negative Selection を行った結果、MCF 産生細胞は Lyt-1<sup>+</sup>、L3T4<sup>+</sup>、Lyt-2<sup>-</sup> 細胞であった。

PM マウスにおける MCF 産生のメカニズムを解明するために、インドメタシン  $1 \times 10^6$  M を脾細胞培養時に加え、抑制性 Macrophage を抑制した結果、PM マウスではインドメタシンの有無に拘らず MCF が産生され、N マウスではいずれも MCF 産生は認められなかった。しかし、M マウスではインドメタシン無添加には MCF 産生が認められなかったのに対し、添加時には PM マウス同様に MCF 産生が観察された。このことから、PSK 投与により、担癌状態において出現する抑制性 Macrophage が抑制され、その結果として MCF 産生が誘発され、腫瘍治癒の引き金となっていることが示唆された。

PM-CS 内に存在する MCF の分離、精製を目的として、HPLC を行った結果、分子量 300kD 以上 (Fr.1) 及び、分子量約 100kD (Fr.2) の 2 つの分画に MCF 活性が認められ、さらに SDS-PAGE により Fr.2 は分子量約 100kD の単一のバンドであることが確認された。精製後の Fr.2 も、PM-CS と同程度の弱い抗腫瘍作用を有しており、Fr.2 が PM-CS 内の MCF であると考えられる。

以上の結果より、PSK は担癌状態における抑制性 Macrophage の誘導を阻害し、その結果、Helper T cell から MCF が産生されることにより腫瘍局部にマクロファージが集積し、抗腫瘍効果の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は癌治療における MCF の作用を明らかにしたものであり、抗癌剤の作用機作の解明において重要な知見を与えた。よって、本論文は博士号授与に値する。