DIVEMA-ADM 結合体によるマクロファージ および NK 細胞の抗腫瘍活性の増強

河合勇一・轟 健^{*1)}, 平野 隆^{*2)}, 小林隆弘^{*3)},
加藤修志・深尾 立^{*1)}, 大箸信一^{*2)}

Enhancement of macrophage and natural killer cell antitumor activity by DIVEMA-adriamycin conjugate

Divinyl ether and maleic anhydride (DIVEMA) is a synthetic polyanion known to stimulate antitumor activity in macrophages (M ϕ) and natural killer cells (NK). This compound is used as a carrier of anticancer drugs because of its efficient covalent binding and release of anti-cancer drugs. Recently, the conjugate of DIVEMA with adriamycin (ADM) was reported to have higher tumor control activity in mice-bearing intraperitoneal dissemination of fibrosarcoma (FSaI) cells than either DIVEMA or ADM alone. We here report on the effects of intraperitoneal (ip) injection of this conjugate on the cytotoxicity of peritoneal M ϕ and splenic NK against FSaI cells. The conjugate clearly enhanced M ϕ cytotoxicity, the maximum cytotoxicity being observed 7 days after ip. This cytotoxicity enhancement was similar to the activation by DIVEMA, but it was stronger than that by ADM alone. On the other hand no activation of splenic NK by administration of either the conjugate or ADM was observed, despite remarkable NK activation by DIVEMA. These findings indicate that a part of the immunostimulatory activity of DIVEMA remains in the conjugate when DIVEMA is used as a carrier for ADM. Consequently the data also suggest that the antitumor effects of the conjugate resulted from combined effects of the host-mediated activity and the direct cytotoxicity of ADM itself.

Yuichi Kawai・Takeshi Todoroki^{*1)},
Takashi Hirano^{*2)}, Takahiro Kobayashi^{*3)},
Syuji Kato・Katashi Fukao^{*1)},
Shinichi Ohashi^{*2)}

key words : DIVEMA, copolymer,
DIVEMA-adriamycin conjugate,
macrophage, natural killer cell,
antitumor activity

抗癌剤の抗腫瘍効果の増強と副作用の軽減をめざして、高分子化合物を抗癌剤の担体(carrier)として用いる試みがある^{1,2)}。これらの多くは、薬剤の徐放化や受動的標的化による抗腫瘍効果の改善を目的としているが、十分な効果は得られていない。そこで、筆者らは担体である高分子化合物そのもののもつ生理活性³⁾に注目し、宿主介在的に抗腫瘍活性を発揮するジビニルエーテル無水マレイン酸共重体(DIVEMA: divinyl ether maleic anhydride copolymer)^{4~6)}を抗癌剤のcarrierとして用いた。

抗腫瘍活性をもつ高分子に抗癌剤を結合させて徐放化することにより、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強すると同時に、抗癌剤の副作用を軽減できると考え一連の実験を行い報告した^{7~9)}。マウス腹膜播種モデルを用いた筆者らの実験⁸⁾では、DIVEMA-アドリアマイシン(DIVEMA-adriamycin)結合体がDIVEMAと同様にマクロファージ(M ϕ)やNK細胞の抗腫瘍活性を増強している可能性が考えられる。本論文では、その結合体を腹腔内に投与したときの腹腔M ϕ やNK細胞の抗腫瘍活性の増強について検討した。

^{*1)} Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba 筑波大学臨床医学系外科

^{*2)} National Institute of Bioscience and Human Technology, AIST, MITI 通産省工業技術院生命工学工業技術研究所

^{*3)} National Institute of Environmental Studies 国立環境研究所

Offprint requests to : Yuichi Kawai, M. D., Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaragi 305

図1 Time response of cytotoxicity of peritoneal macrophages against FSaI cells after ip injection of drugs

C3H/He mice were treated by intraperitoneal(ip) injection of DIVEMA (30 mg/kg), ADM (8 mg/kg), DIVEMA-ADM conjugate (4.3 mg/kg) at Day 0. DIVEMA-ADM conjugate contained 29 wt% ADM. Cytotoxicities at various effector/target ratios(E/T) were determined by 24-hour ^3H -UdR release assay. The target was fibrosarcoma (FSaI) cells derived from C3H mouse.

Cont.: control, $\circ$ —: E/T=20, $\triangle$ —: E/T=10, $\square$ —: E/T=5

材料と方法

(1) 材料

① 動物

C3H/H 雄性マウスを日本チャールスリバー(株)より購入し、滅菌飼料にて飼育した。M ϕ およびNK細胞の障害活性測定には8~12週齢のマウスを使用した。

② 標的細胞

C3H マウス由来の線維肉腫(FSaI)を、炭酸ガスインキュベーターにて(5%CO₂, 37°C)培養し、標的細胞とした。細胞培養には10%ウシ胎児血清(FBS)加RPMI-1640液を用いた。

③ 薬品

アドリアマイシン(ADM)塩酸塩(和光純薬工業、生化学用)を購入して使用し、DIVEMAおよびDIVEMA-ADM結合体は平野らの方法⁷⁾で合成した。平均分子量3万($\overline{M}_w/\overline{M}_n=1.2$)のDIVEMAを用い、アルカリ加水分解、脱塩凍結乾燥したものを腹腔内投与に供した。DIVEMA-ADM結合体におけるADM結合率は29重量%である。DIVEMAおよびDIVEMA-ADM結合体は生理食塩水に溶解し、ADMは蒸留水に溶解

して腹腔内に投与した。

標的細胞の標識には ^3H -Uridine(^3H -UdR, 37 Mbq/ml, Dupont, USA)または ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム生食液(^{51}Cr , 37 Mbq/ml, 第一アイソトープ研究所, 東京)を使用した。赤血球の溶血には0.21%-tris hydroxy-methyl amino methane加0.75%-塩化アンモニウム緩衝液(tris-NH₄Cl)を用いた。

(2) 方法

腹腔M ϕ とNK細胞の障害活性の測定法はすでに報告⁶⁾したのでここでは簡単に述べる。

① NK活性の測定

マウス脾臓をDulbeccoリン酸緩衝液(PBS)中で細切圧挫し、tris-NH₄Clで溶血した後洗浄した。この沈渣に培養液を加え、NK細胞浮遊液を得た。 ^{51}Cr で標識(1.5時間)したFSaI細胞 2.0×10^4 個とNK細胞をそれぞれ 2.5×10^5 , 5.0×10^5 および 1.0×10^6 個 [effector/target ratio(E/T)=12.5, 25, 50]を0.2mlの培養液とともに4時間培養し、培養上清中の放射活性をガンマカウンターCobra Auto-Gamma Model 5010(Packard Inst. USA)で測定した。

図2 Time response of cytotoxicity of NK cells against FSAI cells after ip injection of drugs

C3H/He mice were treated by intraperitoneal(ip) injection of DIVEMA (100 mg/kg), ADM (8 mg/kg), or DIVEMA-ADM conjugate (4.3 mg/kg) at Day 0. DIVEMA-ADM conjugate contained 29 wt% ADM. Cytotoxicities at various effector/target ratios(E/T) were determined by 4-hour ^{51}Cr release assay. The target was fibrosarcoma(FSAI) cells derived from C3H mouse.

Cont.: control, $\circ$ —: E/T=50, $\triangle$ —: E/T=25, $\square$ —: E/T=12.5

② 腹腔 Mφ 活性の測定

マウス腹腔内を氷冷 PBS で洗浄し、この洗浄液の沈渣に tris- NH_4Cl を加え溶血洗浄した後、培養液を加え腹腔浸出細胞(PEC)浮遊液とした。PEC をライト染色し、PEC 中の Mφ 比率を形態学的に計測した。1.0, 2.0, 4.0×10^5 個の Mφ を含む PEC 浮遊液を、ポリスチレン 96 穴平底マイクロタイタープレートの各 well で 2 時間培養した後、Mφ 以外の非接着細胞を洗浄除去した。この Mφ に ^3H -UdR にて 2 時間標識した FSAI 細胞 2.0×10^4 個を加え(E/T=5, 10, 20)、培養液 0.2 ml 中で 24 時間混合培養した。この後、破壊された FSAI 細胞より放出された ^3H を含む培養上清に、シンチレーター Aquasol-2(Dupont)を 5 ml 加え、液体シンチレーションカウンター Tri-Card 2500TR(Packard Inst.)にて放射活性を測定した。

なお、各実験は各群 4 well で行い、細胞障害活性は以下の式で求めた。

$$\text{Cytotoxicity} = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$$

ER: experimental release cpm

SR: spontaneous release cpm

TR: total release cpm

(3) 実験プロトコール

① Mφ および NK 細胞の障害活性の経時変化

ADM を 8 mg/kg あるいは DIVEMA-ADM 結合体を 4.3 mg/kg 腹腔内に投与した後、1, 3, 7, 14 日目に Mφ および NK 細胞の FSAI 細胞に対する障害活性を測定した。DIVEMA 投与時の Mφ 活性の測定では 30 mg/kg を腹腔内投与後、1, 3, 7, 14 日目に測定した。NK 細胞の障害活性の測定では DIVEMA を 100 mg/kg 腹腔内投与して、1, 3, 5, 7, 14 日目に測定した。

② 各薬剤の Mφ および NK 細胞における障害活性増強効果の比較

DIVEMA 20.1 mg/kg, ADM 0.7 mg/kg, DIVEMA-ADM 結合体 4.3 mg/kg を腹腔内投与した。薬剤投与後、Mφ および NK 細胞の障害活

図 3 The cytotoxicity of peritoneal macrophages 7 days after ip injection of drugs

C3H/He mice were treated by intraperitoneal(ip) injection of DIVEMA (20.1 mg/kg), ADM (0.7 mg/kg), or DIVEMA-ADM conjugate (4.3 mg/kg). Seven days after ip injection, the cytotoxicities of peritoneal macrophage were determined by 24-hour ^3H -UdR release assay. The target was fibrosarcoma (FSaI) cells derived from C3H mouse. Effector target ratio was 20.

* $p < 0.001$. ** $p < 0.01$

図 4 The cytotoxicity of NK cells 3 days after ip injection of drugs

C3H/He mice were treated by intraperitoneal(ip) injection of DIVEMA (20.1 mg/kg), ADM (0.7 mg/kg), or DIVEMA-ADM conjugate (4.3 mg/kg). Three days after ip injection, the cytotoxicities of NK cells were determined by 4-hour ^{51}Cr release assay. The target was fibrosarcoma (FSaI) cells derived from C3H mouse. The effector target ratio was 50.

* $p < 0.0001$

性がピークを示した時期に、各薬剤の活性増強効果を比較した。すなわち、 $\text{M}\phi$ の活性増強効果は投与後 7 日目に、NK 細胞については投与後 3 日目に比較した。なお、DIVEMA および ADM の薬剤投与量は、腹膜播種モデル実験での 50% tumor control dose (TCD_{50})⁹⁾ (半数のマウスを治すのに必要な投与量) より決定した。

結 果

(1) 腹腔 $\text{M}\phi$ の障害活性の経時変化

ADM, DIVEMA および DIVEMA-ADM 結合体の投与後、いずれの投与群においても $\text{M}\phi$ の障害活性は上昇した(図 1)。しかし、もっとも強い活性を示す時期が薬剤によって異なる。ADM では投与後 3 日目に 24% ($\text{E}/\text{T}=20$) のピークを示した後、漸減した(図 1A)。これに対し、DIVEMA は投与後 7 日目に 44% ($\text{E}/\text{T}=20$) の最高値を示した(図 1B)。

DIVEMA-ADM 結合体の投与では投与翌日には 29%と、すでに障害活性の増強がみられ、7 日目には 44%のピークを示した(図 1C)。

(2) NK 細胞の障害活性の経時変化

NK 細胞の FSaI 細胞に対する障害活性は、DIVEMA 投与時にきわめて顕著に出現し、投与後 3 日目に 22% ($\text{E}/\text{T}=50$) を示した(図 2B)。これに対し、ADM および DIVEMA-ADM 投与では投与後 1~14 日までの全測定時点で NK 活性の上昇を認めなかった(図 2A, C)。

(3) 各薬剤の $\text{M}\phi$ および NK 細胞の障害活性増強効果の比較

薬剤投与後、 $\text{M}\phi$ 活性では 7 日目、NK 活性では 3 日目に障害活性の上昇が認められたので、DIVEMA, ADM および DIVEMA-ADM 結合体の $\text{M}\phi$ 、および NK 細胞の障害活性の増強効果をそれぞれ 7 日目および 3 日目で比較した。

$\text{M}\phi$ の細胞障害活性は、ADM 投与では 2% にすぎないが、DIVEMA および DIVEMA-ADM 結合体投与ではそれぞれ 41%、44%と有意に活性の増強を認めた(図 3)。NK 細胞の活性は、DIVEMA 投与によってのみ 19%と増強されたが、ADM および結合体投与では NK 細胞の障害活性の増強は認めなかった(図 4)。

以上の結果から、DIVEMA-ADM 結合体の腹腔内投与により、腹腔 Mφ の障害活性は DIVEMA の投与と同等以上に増強するが、NK 細胞活性については DIVEMA 投与とは異なり、その活性をほとんど増強しないことが明らかとなった。

考 察

DIVEMA-ADM 結合体の Mφ 細胞障害活性増強作用は DIVEMA と同程度で、Mφ 活性化の最大ピークは結合体投与後 7 日目に観察された。DIVEMA 単独投与でも、すでに報告したように 6 日目前後に Mφ 活性化がピークを示している^{6,10)}。このことから Mφ 活性化の機序は、DIVEMA と DIVEMA-ADM 結合体の両者に共通していると予想される。ADM 投与による Mφ の活性化については、他の報告¹¹⁻¹³⁾においても本実験と同様に活性の増強を認めている。しかし、DIVEMA と DIVEMA-ADM 結合体にくらべて ADM による Mφ の活性化は持続期間は短く、活性の程度も有意に微弱であった。したがって、DIVEMA-ADM 結合体の Mφ 活性増強は ADM 由来ではなく、DIVEMA に起因すると考えられる。

また、マウス腹膜播種モデルを用いた筆者らの実験で得られた ADM の TCD₅₀ に相当する 0.7 mg/kg の ADM 投与では、Mφ の活性化は認めていない。したがって、本実験での DIVEMA-ADM 結合体投与量においては、結合体が徐放した ADM が Mφ を活性化して抗腫瘍効果を発現しているとは考えられない。DIVEMA の腹腔内投与では NK 細胞の活性化は明らかであったが、DIVEMA-ADM 結合体および ADM 投与では、NK 細胞の活性化はまったく認めなかった。

Talmadge らは、DIVEMA(MVE-2)を NK 細胞の培養液中 (*in vitro*) に投与しても NK 細胞の活性化を認めないが、DIVEMA を *in vivo* に投与すると NK 細胞が活性化することを報告している¹⁰⁾。これに対し、ADM には NK 細胞の活性を減弱する作用^{11,14)}やインターロイキン-2 に対する NK 細胞の反応性を弱める作用が報告されてい

る¹⁵⁾。これらの報告を考慮すると、DIVEMA-ADM 結合体の投与で NK 細胞の活性化を認めなかったのは、DIVEMA の効果が ADM の NK 活性阻害作用の影響を受けた可能性があると考えられる。

すなわち、DIVEMA-ADM 結合体は DIVEMA 単独と同様に、Mφ の抗腫瘍効果を増強する BRM の作用があるといえる。このため、DIVEMA-ADM 結合体の投与では結合体の BRM 作用のほかに、結合体から徐放した ADM の殺腫瘍細胞作用とが共同して働くので、ADM あるいは DIVEMA それぞれの単独投与にくらべて抗腫瘍効果は増強するが、副作用は増強しないと考えられる。

文 献

- 1) 大江泰雄, 棟近公司, 上田泰生, 大谷貴美子, 三崎 旭: アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体の構造. DDS 9: 351-356, 1994.
- 2) 田中章平, 沼崎洋三, 前田 浩: ジノスタチンスチラマー(YM881)作用機序. 癌と化学療法 18: 2295-2300, 1991.
- 3) Schultz RM, Papamatheakis JD, Leutzler J, Chirigos MA: Association of macrophage activation with antitumor activity by synthetic and biological agents. Cancer Res. 37: 3338-3343, 1977.
- 4) 轟 健, 平野 隆, 小林隆弘, 河合勇一, 上田 廣・他: 合成ポリアニオン(DIVEMA)のマウス腹膜播種に対する抗腫瘍効果. 腫瘍と感染 1: 187-191, 1988.
- 5) Kaplan AM, Morahan PS: Macrophage mediated tumor cell cytotoxicity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 276: 134-145, 1976.
- 6) 河合勇一, 小林隆弘, 轟 健, 平野 隆, 上田 廣・他: ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体(DIVEMA)の抗腫瘍活性の発現における NK 細胞とマクロファージの役割. Biotherapy 7: 937-944, 1993.
- 7) Hirano T, Ohashi S, Moritomo S, Tsuda K, Kobayashi T et al.: Synthesis of antitumor-active conjugates of adriamycin or daunorubicin with the copolymer of divinyl ether and maleic anhydride. Makromol. Chem. 187: 2815-2824, 1986.
- 8) 平野 隆, 大箸信一, 轟 健, 稲葉 実, 塚越 茂: 合成高分子-抗癌剤結合体の癌指向性. 日本臨床 47: 1412-1416, 1989.
- 9) 轟 健, 平野 隆, 加藤修志, 阿竹 茂, 河合勇一・他: 高分子(DIVEMA)結合によるアドリアマイシン(ADR)腫瘍内投与のマウス腹膜播種転移に対する治療率向上と副作用軽減. 第 52 回日本癌学会総会記事 609, 1993.
- 10) Talmadge JE, Maluish AE, Collins M, Schneider M, Herbermann RB et al.: Immuno-modulation and antitumor effects of MVE-2 in mice. J. Biol.

- Response Mod. 3 : 634-652, 1984.
- 11) Mace K, Meyhew E, Mihich E, Ehrke MJ : Alterations in murine host defense function by adriamycin or liposome-encapsulated adriamycin. *Cancer Res.* 48 : 130-136, 1988.
 - 12) 森岡 栄 : Adriamycin による腹腔渗出細胞(主にマクロファージ)の抗腫瘍性について, 日外会誌 87 : 278-284, 1986.
 - 13) Salazar D, Cohen SA : Multiple tumoricidal effector mechanisms induced by Adriamycin. *Cancer Res.* 44 : 2561-2566, 1984.
 - 14) Santoni A, Riccardi C, Sorci V, Herverman RB : Effects of Adriamycin on the activity of mouse Natural Killer cells. *J. Immunol.* 124 : 2329-2335, 1980.
 - 15) Maccubbin D, Cohen SA, Ehrke MJ : Indomethacin modulation of Adriamycin-induced effects on multiple cytolytic effector functions. *Cancer Immunol. Immunother.* 31 : 373-380, 1990.