— 原 著 —

Poly I : C 活性化肺 NK 細胞の微少 肺転移巣に及ぼす実験的検討

村田 朗

日本医科大学臨床病理学教室 (主任: 仁井谷久暢教授)

The effect of activated pulmonary natural killer (NK) cells by poly I : C on the established pulmonary metastasis

Akira Murata

Department of Clinical Pathology (Director: Prof. Hisanobu Niitani), Nippon Medical School

The author took interest in the existence of effector cells which had natural killer (NK) activity on the lung, in other words organ-associated NK cells, compared the augmented effect of pulmonary NK activity by poly I : C with that of spleen NK activity, and also investigated the effect of activated pulmonary NK cells on established pulmonary metastasis.

It was shown that pulmonary NK cells in C57BL/6 mice had significant cytotoxicity against YAC-1 target cells in a $4\text{ h-}^{51}\text{Cr}$ release assay, although their cytotoxicity was remarkably low as compared with that of spleen cells. However, by treatment with poly I : C, pulmonary NK activity was significantly augmented compared with spleen NK activity. This cytotoxicity was abrogated by treatment with anti-asialo GM_1 antibody. From these results, it was considered that the effector cell was a NK cell.

When poly I : C was administrated intraperitoneally from 3 days after intravenous inoculation of B16-F10 melanoma cells, the number of the pulmonary metastatic nodules was significantly decreased. The number of pulmonary metastatic nodules was not suppressed by a combination treatment of poly I : C and anti-asialo GM_1 antibody to the same degree as in treatment by anti-asialo GM_1 antibody alone.

The experimental group which underwent a combination treatment of poly I : C and carrageenan showed a suppression of the number of pulmonary metastatic nodules to the same degree as the group treated with poly I : C alone. Therefore it was shown that the effect of pulmonary metastatic suppression with poly I : C was caused not by macrophages but by pulmonary NK cells.

In this study, the NK activity of the pulmonary cells in C57BL/6 mice was found to be lower than that of spleen, but the pulmonary NK activity was remarkably augmented by poly I : C. Also the activated pulmonary NK cells suppressed the established pulmonary metastasis.

Key words: organ-associated NK cell, pulmonary metastasis, poly I : C

緒 言

natural killer (NK) 細胞は, cytotoxic T cell, macrophage, killer (K) cell, 顆粒球などとともに, 癌の増殖や進展に対する生体の抵抗の一翼を担うと考えられている. NK 細胞は前感作なしに異種, 同種および同系腫瘍細胞に対し障害を及ぼすリンパ球系細胞で

あり, *in vivo* で腫瘍増殖抑制に関与していることを示唆する成績は, すでに数多く報告されている.

著者らも, マウス NK 細胞の表面マーカーとして知られている asialo GM_1 に対する抗体を C57 BL/6 マウスに静脈内投与することにより, 同系黒色腫 B16 細胞の自然発生, および実験的転移が増加することから, NK 細胞に転移抑制効果のあることを明らかにしてきた¹⁾.

最近, 末梢血, 脾臓, 骨髄のほか, 肝, 肺, 腸管にも広く NK 細胞が存在することが明らかにされ²⁾,

Correspondence to Akira Murata, Department of Clinical Pathology, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

臓器関連 NK 細胞 (organ-associated NK cell) と呼ばれている^{3,4)}。しかし、末梢血や脾に比べ、臓器関連 NK 細胞に関する報告は少ない^{5,6)}。

以上のことから、C 57 BL/6 マウスを用い臓器関連 NK 細胞、特に肺における NK 活性を示す effector 細胞の存在を明らかにするとともに、biological response modifier (BRM) としての polyinosinic-polycytidylic acid (poly I: C)⁷⁾ 投与による肺 NK 活性に及ぼす増強効果を、脾 NK 活性に対するそれと比較検討した。また腫瘍細胞静注移植後の微小肺転移巣に及ぼす poly I: C 投与による活性化肺 NK 細胞の影響についても検討を加えた。

実験材料および方法

(1) 動物

動物は、7～8 週齢の C 57 BL/6 マウス (チャールスリバー、東京) を用いた。

(2) 腫瘍細胞

NK 活性の測定には標的細胞として、A/Sn マウス由来の NK 細胞高感受性細胞株である Moloney virus induced YAC-1 lymphoma⁸⁾ 細胞を用いた。

移植腫瘍細胞には、C 57 BL/6 マウスの自然発生 B 16 melanoma の高転移株である F 10 細胞 (癌研、鶴尾隆博士より分与) を用いた。両腫瘍細胞は、ともに 10% 非働化ウシ胎児血清 (FCS) (Gibco, U.S.A.) を含む RPMI-1640 (Gibco, U.S.A.)、すなわち RPMI-FCS 培養液 (streptomycin 100 mg/ml, penicillin 100 U/ml を含む) の中で各々 3～5 日間隔で継代培養されているものを用いた。

(3) 細胞障害活性 (NK 活性) の測定

1) 肺および脾からの effector 細胞の調整

肺からの effector 細胞の調整は、C 57 BL/6 マウス (7～8 W) から肺を摘出して、小手術用鉗で細切した後、80 号ステンレススチールメッシュ (177 μ m) 上で圧挫ろ過し、遠心分離 (2,000 r.p.m., 10 分間) をした。細胞を含む沈渣に酵素処理 (DNase (Sigma Chemical Co.) 0.2 mg/ml と collagenase (Cooper Biochemicals Co.) 0.2 mg/ml を各 1 ml 添加し、37°C, 10 分間攪拌) を加え、得られた細胞を, Eagles' minimal essential medium (MEM: 100 mg/ml の streptomycin および 100 U/ml の penicillin を含む) (日本製薬) で 3 回洗浄した後、RPMI-FCS 培養液で 2×10^7 /ml に調整した。この細胞浮遊液を Falcon 3003 plastic dish (Falcon Scientific Co., U.S.A.) に 5～6 ml 添加し、

5% CO₂, 37°C 下で 90 分間培養した。

培養後、上清中に含まれる非付着細胞を、駒込ピペットで分離採取、遠沈 (2,000 r.p.m., 15 分間) 後、上清を除去し、沈渣に 0.2% NaCl 5 ml を加え 30 秒間混和静置後、1.8% NaCl 5 ml を添加する osmotic shock により赤血球を溶血除去した。そして、MEM で 3 回洗浄して得られた細胞を、RPMI-FCS 培養液にて 1×10^7 /ml に浮遊させ肺 effector 細胞 (以下肺細胞と略す) として使用した。

脾 effector 細胞の調整は、脾を摘出し、細切後 60 号ステンレススチールメッシュ (250 μ m) 上で圧挫ろ過し、酵素処理を施行しないで得られた細胞浮遊液を、肺細胞の場合と同様に plastic dish 内で培養後 (5% CO₂, 37°C, 90 分間)、非付着細胞を採取し、続いて osmotic shock にて赤血球を除去した後の細胞を脾 effector 細胞 (以下脾細胞と略す) とした。

なお、肺のしゃ血操作は、しゃ血の有無が NK 活性に何ら影響を与えなかったという Stein-Streilein ら⁹⁾ の報告により、肺細胞採取に際して肺摘出の前にしゃ血を行わなかった。

2) 標的腫瘍細胞の標識

1×10^7 /ml (RPMI-FCS) YAC-1 細胞 0.25 ml に、125 μ Ci の Na⁵¹CrO₄ (日本アイソトープ協会) を含む RPMI-FCS 培養液 0.25 ml を加え、5% CO₂, 37°C にて 1 時間培養することにより腫瘍細胞の標識を行った。標識細胞を 40 ml の RPMI-FCS 培養液で 3 回洗浄後、RPMI-FCS 培養液で 1×10^5 /ml に調整した。この⁵¹Cr 標識腫瘍細胞を NK 活性測定のための標的細胞 (target 細胞) として実験に使用した。

3) 細胞障害試験

NK 活性測定には、まず 96 well の V 底マイクロプレート (Limbro Scientific Co., Hamden CT) に、⁵¹Cr 標識 YAC-1 細胞 1×10^5 /ml を 0.1 ml と、種々の濃度に調整した肺細胞もしくは脾細胞リンパ球浮遊液 $2.5 \sim 10 \times 10^6$ /ml を 0.1 ml 加えて混合 (E/T ratio = 25～100 : 1) し、総量 0.2 ml として 5% CO₂, 37°C にて 4 時間培養を行った。培養後、マイクロプレート を 1,500 r.p.m., 10 分間の遠沈を行い、上清 0.1 ml に含まれる放射活性をオート γ カウンター (ARC-305, Aloka, 東京) で測定した。

effector 細胞であるリンパ球を含まない標識細胞のみの培養上清 0.1 ml 中の放射活性を標的細胞である標識腫瘍細胞からの⁵¹Cr の spontaneous release とした。

標識腫瘍細胞からの maximum release は、ドライアイス・アルコールによる凍結と熱湯による融解を5回繰り返して、標的細胞を破壊することにより求めた。maximum release の 15~20% が spontaneous release であった。

なお、肺の NK 活性測定は、7匹のマウスの肺細胞を全部合わせたものを、脾の NK 活性測定は、5匹のマウスの脾細胞を全部合わせたものをそれぞれ effector 細胞とした。そして、すべての実験は triplicate culture で行い、細胞障害能は下記の計算式にて算定した。

%cytotoxicity =

$$\frac{\text{experimental release (c.p.m.)} - \text{spontaneous release (c.p.m.)}}{\text{maximum release (c.p.m.)} - \text{spontaneous release (c.p.m.)}} \times 100$$

(4) 肺転移の判定

7~8 週齢の C 57 BL/6 マウス尾静脈より、 5×10^4 / ml もしくは 1×10^5 / ml の B 16-F 10 melanoma 細胞浮遊液 0.5 ml を静注移植し、14 日後もしくは 21 日後にマウスを屠殺し、肉眼で全肺表面の黒色結節数を算定した。なお、この黒色結節は B 16-F 10 細胞の転移巣と組織学的に確認された。

(5) 薬剤とその投与法

1) poly I : C の投与法

C 57 BL/6 マウス腹腔内に interferon inducer である polyinosinic-polycytidylic acid (poly I : C) (Sigma Chemical Co.) を 50, 100, 200, 300 μ g/マウス投与し、3 日後の肺および脾細胞の YAC-1 細胞に対する細胞障害活性を測定した。また、poly I : C 200 μ g/マウスを腹腔内に投与して、1~5 日後の肺および脾細胞の細胞障害活性を測定した。

2) 抗 asialo GM₁ 抗体の投与法

NK 活性を抑制するために、抗 asialo GM₁ 抗体 (Sigma Chemical Co.) を用いた。抗 asialo GM₁ 抗体は、ウシ脳組織より精製した asialo GM₁ メチル化 BSA (bovine serum albumin) を、FCA (Freund's complete adjuvant) とともにウサギに免疫し、その血清を 50% 硫酸アンモニウム塩析後、燐酸緩衝液を含む生理食塩水で透析し凍結乾燥したものである。

これを生理食塩水 6 ml に溶解し、0.3 ml/ (蛋白量約 500 μ g) を C 57 BL/6 マウスの腹腔内に、単独あるいは poly I : C と同時に投与し、3 日後の肺および脾細胞の細胞障害活性を測定した。

さらに腫瘍細胞 (B 16-F 10 細胞) 静注 3 日後に、抗

asialo GM₁ 抗体を単独もしくは poly I : C とともに腹腔内投与し、腫瘍細胞静注 14 日後に肺転移結節数を測定した。

3) carrageenan の投与法

マクロファージの活性を抑制するために、carrageenan⁹⁻¹¹⁾ (Sigma Chemical Co.) 500 μ g/マウスを、腫瘍移植 3 日後から隔日に 4 回、腹腔内に単独あるいは poly I : C とともに投与し、14 日もしくは 21 日後の肺転移結節数を測定した。

結 果

1. 肺および脾の NK 活性に及ぼす種々の濃度の poly I : C の効果 (Table 1)

YAC-1 細胞を標的細胞として、4 h-⁵¹Cr release assay にて細胞障害能を測定したところ、無処置マウス肺細胞の NK 活性は 4.9% と、脾細胞の NK 活性の 16.4% に比べ、著しく低値を示した。

また、50~300 μ g までの種々の濃度の poly I : C を腹腔内に投与し、3 日後の肺と脾の NK 活性を測定した結果、肺と脾の NK 活性は、ともに 100 μ g までほぼ濃度依存的に増強効果を示し、肺の NK 活性は、100 μ g でプラトーに達した。しかし、300 μ g から低下傾向が認められたため、以下の実験は 200 μ g を投与することとした。

Table 1 Effect of dose escalation of poly I : C on NK activity in pulmonary and spleen effector cells

Effectors ^{a)}	Poly I : C ^{b)} (μ g/mouse, i.p.)	% cytotoxicity ^{c)} (E : T 100 : 1)
Pulmonary cells	0	4.9
	50	15.8
	100	24.7
	200	23.0
	300	22.6
Spleen cells	0	16.4
	50	39.2
	100	43.7
	200	35.7
	300	29.8

a) Pulmonary and spleen effector cells were prepared from C 57 BL/6 mice as described in materials and methods.

b) C 57 BL/6 mice were injected i.p. with various doses of poly I : C at 3 days before NK assay.

c) NK activity was measured by the 4 h-⁵¹Cr release assay against YAC-1 cells at an effector to target ratio of 100 : 1.

2. poly I: C 投与による肺および脾の NK 活性の経時的変化 (Fig. 1)

poly I: C 200 μ g を腹腔内に投与し, 1 日後~5 日後まで肺と脾の NK 活性を測定した結果, 肺 NK 活性

Fig. 1 NK activity in the various times after administration of poly I: C in pulmonary and spleen effector cells
C 57 BL/6 mice received 200 μ g poly I: C intraperitoneally at various times before assay of NK activity on day 0. NK activity was measured by the 4 h- 51 Cr release assay against YAC-1 cells at an effector to target ratio of 100:1.
●: pulmonary effector cells, ○: spleen effector cells

は前値が2.8%と低値であったが, 1 日後から21.6%と増強し, 3 日後で最高値38.7%となり, 5 日後17.4%に低下した。

なお脾細胞の NK 活性は, 投与2 日後に最高値を示した。

3. poly I: C 投与による肺および脾の NK 活性の増強効果 (Table 2)

Table 2 は poly I: C 200 μ g を腹腔内に投与し, 3 日後の肺と脾の NK 活性を5 回実験して得られた平

Table 2 Augmentation of NK activity in pulmonary and spleen effector cells by administration of poly I: C

Effectors	Treatment ^{a)}	% cytotoxicity $\pm$ SE ^{b)} (E: T 100:1)
Pulmonary cells	None	2.9 $\pm$ 1.3
	Poly I: C	24.0 $\pm$ 3.6 ^{c)}
Spleen cells	None	17.6 $\pm$ 2.1
	Poly I: C	29.4 $\pm$ 3.8 ^{c)}

a) Poly I: C (200 μ g) was administered i.p. into C 57 BL/6 mice 3 days before NK assay.

b) 4 h- 51 Cr release assay was performed using YAC-1 cells as target cells at E: T ratio of 100:1.

c) Statistically significant augmentation of NK activity occurred following i.p. injection of poly I: C in both pulmonary cells ($p < 0.001$) and spleen cells ($p < 0.05$).

Table 3 Effect of anti-asialo GM₁ antibody on NK activity of pulmonary and spleen effector cells

Effectors ^{a)}	Treatment ^{b)}	% cytotoxicity ^{c)} E: T ratio			
		100:1	50:1	25:1	12.5:1
Pulmonary cells	None	8.1	8.2	6.8	5.3
	Poly I: C	30.2	21.7	17.1	11.8
	Anti-asialo GM ₁	0.0	0.0	3.6	—
	Poly I: C + Anti-asialo GM ₁	7.3	5.2	6.3	—
Spleen cells	None	20.7	15.6	7.8	4.3
	Poly I: C	29.4	23.2	17.5	8.9
	Anti-asialo GM ₁	2.9	0.0	0.4	0.0
	Poly I: C + Anti-asialo GM ₁	0.1	0.9	1.0	0.1

a) Pulmonary and spleen effector cells were prepared from C 57 BL/6 mice as described in materials and methods.

b) C 57 BL/6 mice were injected i.p. with poly I: C (200 μ g) and/or anti-asialo GM₁ antibody (500 μ g) at 3 days before NK assay.

c) 4 h- 51 Cr release assay was performed using YAC-1 cells as target cells at various E: T ratio (12.5~100:1).

均 NK 活性で示したものである。

肺細胞においては, poly I: C 投与により $2.9 \pm 1.3\%$ から $24.0 \pm 3.6\%$ に NK 活性が増加した。脾細胞においても $17.6 \pm 2.1\%$ から $29.4 \pm 3.8\%$ に増加した。

以上より肺細胞には, 脾細胞に比べて低活性ながら NK 細胞が存在し, poly I: C による NK 活性の増加率は, 脾細胞に比べて著しく高いことが示された。

4. 肺および脾細胞の細胞障害活性に及ぼす抗 asialo GM₁ 抗体投与の影響 (Table 3)

poly I: C 投与により増強された肺と脾細胞の細胞障害能が, NK 細胞によるか否かを検討するために,

poly I: C のみを投与した場合, および poly I: C と抗 asialo GM₁ 抗体を併用した場合の肺細胞と脾細胞の細胞障害活性を測定した。

poly I: C 単独投与群に比べて, 抗 asialo GM₁ 抗体と poly I: C の併用群は, 細胞障害活性の著しい消失が認められた。

5. poly I: C の微少肺転移巣に及ぼす影響 (Table 4, Photo 1)

B 16-F 10 細胞 1×10^5 個を静脈内投与し, すでに微少肺転移巣が形成されたと考えられる 3 日後から, poly I: C の隔日 3 回投与を開始した群 (7 匹) におい

Table 4 Effect of poly I: C administration on the established pulmonary metastases in C 57 BL/6 mice

Treatment ^{a)}	No. of mice	Median no. of metastases in lungs(range)	
		Group 1 1×10^5 B 16-F 10	Group 2 5×10^4 B 16-F 10
None	7	65(35~88)	30(18~51)
Poly I: C	7	26(13~51) ^{b)}	15(11~29) ^{b)}
Anti-asialo GM ₁	7	70(33~95)	N.T.
Poly I: C+Anti-asialo GM ₁	7	68(30~81)	N.T.

a) C 57 BL/6 mice were inoculated i.v. with 1×10^5 (group 1) or 5×10^4 (group 2) B 16-F 10 cells. Pulmonary metastases were counted at 14 days (group 1) or 21 days (group 2) after i.v. inoculation of B 16-F 10 cells. Poly I: C (200 μ g) was administered i.p. into C 57 BL/6 mice at 3, 5 and 7 days after B 16-F 10 cells inoculation. Anti-asialo GM₁ antibody was administered i.p. into C 57 BL/6 mice at 3 days after B 16-F 10 cells inoculation.

b) Poly I: C group differed significantly from nontreatment group. (group 1: $p < 0.001$, group 2: $p < 0.005$)

N.T.: Not-tested.

Photo 1 Photographs of pulmonary metastatic nodules in C 57 BL/6 mice with or without the treatment of poly I: C
C 57 BL/6 mice were inoculated i.v. with 1×10^5 B 16-F 10 cells. Poly I: C (200 μ g) was administered i.p. at 3, 5 and 7 days after B 16-F 10 cells inoculation. Pulmonary metastases were macroscopically counted at 14 days after i.v. inoculation of B 16-F 10 cells.

Table 5 Effect of carrageenan administration on the established pulmonary metastases in C 57 BL/6 mice

Group no.	Treatment ^{a)}	No. of mice	Median no. of metastases in lungs(range)	
			Exp. 1 (14 days)	Exp. 2 (21 days)
1	Control	7	100(68~172)	167(144~234)
2	Carrageenan	7	115(58~167) ^{b)}	175(129~220) ^{b)}
3	Poly I: C	7	76(44~114)	103(86~136)
4	Carrageenan + Poly I: C	7	73(38~ 89) ^{b,c)}	112(102~123) ^{b,d)}

a) C 57 BL/6 mice were inoculated i.v. with 1×10^5 B 16-F 10 cells (▲). Mice of group 2 and 4 were treated i.p. with carrageenan (500 μ g) at day 3, 5, 7 and 9 (↓). Mice of group 3 and 4 were treated i.p. with poly I: C (200 μ g) at day 3, 5 and 7 (↑). Pulmonary metastases were counted at 14 (Exp. 1) or 21 (Exp. 2) days after i.v. inoculation of B 16-F 10 cells (Δ).

b) Differences between group 1 and 2, and group 3 and 4 were not significant.

c,d) Group 3 and group 4 differed significantly from group 1. (c; $p < 0.025$, d; $p < 0.0005$)

て、中間肺転移結節数は26個(測定値幅13~51)と、対照群(7匹)の65個(35~88)に比べて有意に低下を示した。

B 16-F 10 細胞 5×10^4 個を、静脈内投与した群においても同様な結果が得られた。すなわち、対照群(7匹)の30個(18~51)に比べて、poly I: C 投与群(7匹)は15個(11~29)と、有意に肺転移結節数を抑制した。

以上より poly I: C は、微少転移巣がすでに形成された腫瘍細胞静注3日後の時期からの投与でも有意に肺転移結節数を抑制することが示された。

さらに、poly I: C による肺転移の抑制が、活性化された肺 NK 細胞によるものか否かを確かめるために、腫瘍細胞(B 16-F 10 細胞)静注3日後に、抗 asialo GM₁ 抗体を1回投与した群(7匹)と、腫瘍細胞静注3日後に、抗 asialo GM₁ 抗体の1回投与と、さらに同日より poly I: C の隔日3回投与を開始した併用群(7匹)を加え検討した。

その結果、poly I: C と抗 asialo GM₁ 抗体を併用した群の中間肺転移結節数は68個(30~81)と、poly I: C 単独投与群の26個(13~51)に比べて有意に増加した。この結果は、抗 asialo GM₁ 抗体単独投与群の中間肺転移結節数70個(33~95)と比較すると、ほとんど変化がなかった。

6. マクロファージの肺転移に及ぼす影響 (Table 5)

poly I: C によってマクロファージも活性化され、転移の抑制に関与している可能性も考えられる¹²⁾ので、

carrageenan を投与することによって、マクロファージを抑制した状態で poly I: C の肺転移抑制効果を検討した。

すなわち、腫瘍細胞(B 16-F 10 細胞)静注3日後から、carrageenan 500 μ g を隔日に4回腹腔内に投与した場合、poly I: C 200 μ g を隔日に3回腹腔内投与した場合、および両者を併用した場合のそれぞれの群(各7匹)について、14日後の肺転移結節数を測定した。

実験1(腫瘍細胞静注14日後に肺転移結節数を算定した群)では、carrageenan 単独投与群の中間肺転移結節数115個(測定値幅58~167)に比べて poly I: C と carrageenan の併用投与群の中間肺転移結節数は73個(38~89)と、有意に抑制されたが、poly I: C 単独投与群の肺転移結節数と比較するとほとんど変化がなかった。実験2(腫瘍細胞静注21日後に肺転移結節数を算定した群)においても同様の結果が得られた。

考 察

臓器関連 NK 細胞 (organ-associated natural killer cell) に関する報告は、末梢血や脾細胞に関する NK 活性の報告に比べて少ないが、最近いくつかのグループによりラットのモデルで臓器関連 NK 細胞の存在が報告されてきている¹³⁾。Cohen ら¹³⁾は、正常ラットの肝臓から細胞障害活性をもつ細胞を分離した。Lukomska ら¹⁴⁾は NK 活性を示す OX-8⁺LGL 様の細胞がラットの肝臓に存在することを示した。さらに Kaneda ら¹⁵⁾はラットの肝臓で発見された、以前に pit cell として特徴づけられた細胞^{16,17)}は、NK 細胞に相

当する large granular lymphocyte (LGL) であったことを報告している。

また, biological response modifier (BRM) が, 肺 NK 活性を著明に増強させることを示していくつかの報告がなされてきている。Wilttrout ら³⁾は MVE-2 (maleic anhydride divinyl ether) が, 小野ら¹⁸⁾は cephalanthin が, Talmadge ら¹⁹⁾は liposomes incorporating MTP-PE (muramyl tripeptide-phosphatidylethanolamine) が, 岩田ら²⁰⁾は poly I:C と IL-2 が, Nolibé ら²¹⁾, Hurme ら²²⁾は poly I:C が, Farrell ら²³⁾は indomethacin と interferon が, そして Puccetti ら⁵⁾は Pyran copolymer, poly I:C と *C. parvum* が, 肺の NK 活性を脾や末梢血の NK 活性に比べて著明に増強させることを報告している。

今回の実験において, C57 BL/6 マウスの肺細胞にも, 脾細胞と比較して低値ではあるものの細胞障害活性を示す effector 細胞が存在すること, および poly I:C 腹腔内投与により, 細胞障害活性が脾細胞に比べて著しく増強されることが示された (Table 1, 2)。この細胞障害活性を示す effector 細胞の中には肺胞マクロファージ等も考えられるが, 本実験では, plastic dish 付着細胞を除いていることや, 4 h-⁵¹Cr release assay を用いていることより, マクロファージによる影響はほとんどないと考えられる²⁴⁾。また, 抗 asialo GM₁ 抗体投与により無処置マウスおよび poly I:C が投与されたマウスにおける effector 細胞の細胞障害性が消失したことより, effector 細胞は NK 細胞であることが証明された^{25,26)} (Table 3)。

以上より, YAC-1 細胞に対する肺細胞の細胞障害活性は, 肺組織に存在する臓器関連 NK 細胞によるものと考えられた。

NK 細胞は, 形態学的にはやや大型のアズール顆粒に富むリンパ球で large granular lymphocyte (LGL) と呼ばれており, 明らかな特異的抗原感作なしに, ウイルス感染細胞や継代培養されている株化腫瘍細胞を傷害することができる細胞群である²⁷⁾。一般的には, NK 細胞は骨髄由来と考えられているが, 今回われわれが測定した肺の臓器関連 NK 細胞の活性は血液や脾に比べて低いレベルであるが, poly I:C により著明に活性化されるように, その性質は血中や脾臓の NK 細胞とは異なっていた。これは組織ごとの NK 細胞の調整因子, 修飾因子により, その性質に変化を来しているものと考えられるが, その機構や因子に関してはいまだ解明されていない。

NK 細胞が, 主に血液循環中の腫瘍細胞を破壊除去することにより, 癌の転移形成を抑制するという報告は数多くある。しかし臓器関連 NK 細胞の転移巣に及ぼす影響を検討した報告は数少ない。

癌転移の成立過程は, ①原発巣からの癌細胞の遊離, ②脈管内進入, ③脈管内移動, ④標的臓器脈管壁付着, 定着(着床), ⑤脈管外浸潤, 増殖のいくつかの段階に分けて考えられている。実験的には, 血管内に侵入した腫瘍細胞が標的臓器の血管床に着床するまでには 6 ~ 9 時間を要し, 24 時間までには血管外に浸潤し, 標的臓器で増殖を始めると考えられている。

抗 asialo GM₁ 抗体を腫瘍細胞移植前および移植後の種々の時期に投与して NK 活性を抑制した結果, 腫瘍細胞移植前日, ならびに腫瘍細胞移植直後に抗 asialo GM₁ 抗体を投与したのものには, 肺転移数の著明な増加を認めた。しかもわれわれがすでに検討してきた結果では, 腫瘍細胞移植後 24 時間以上経て, 抗 asialo GM₁ 抗体を投与した場合には, 対照として腫瘍細胞のみを移植した対照群と比較し, 肺転移結節数に差を認めなかったことが明らかにされている¹⁾。これらの事実は, 無処置マウス肺 NK 細胞は, 微少肺転移巣に対して何ら影響を持たないことを推察させる。

今回われわれは微少肺転移巣に及ぼす肺 NK 細胞の影響を検討した。B 16-F 10 細胞のみを静注移植した対照群と, 腫瘍細胞静注 3 日後に抗 asialo GM₁ 抗体を投与した群の間には, 腫瘍細胞静注 14 日および 21 日後の肺転移結節数に差がなかったことから (Table 4), 対照としたマウスの肺に存在する NK 細胞は, 微少肺転移巣に影響を及ぼしていないことが示された。しかし, 腫瘍細胞静注 3 日後から poly I:C を投与した群では, 肺転移が有意に抑制されていることから (Table 4), poly I:C によって活性化された肺 NK 細胞は, 肺転移の形成に抑制的に働いているものと思われる。一方, poly I:C 投与とともに抗 asialo GM₁ 抗体を腫瘍細胞静注 3 日後に併用投与した場合には, 肺転移抑制効果の消失がもたらされている (Table 4)。このことは, poly I:C によって活性化された肺 NK 細胞による転移抑制効果が, 同時に投与された抗 asialo GM₁ 抗体によって, NK 活性の喪失を来したことによることを示している。すなわち, 活性化肺 NK 細胞には, 微少肺転移巣を抑制する可能性のあることを示しているものと思われる。

しかし poly I:C によってマクロファージが活性化されるという報告¹²⁾があり, 肺転移の抑制にはマクロ

ファージが関与している可能性も考えられるため、carrageenan を投与することにより、マクロファージを抑制した状態での poly I: C の微小肺転移巣に及ぼす効果を検討した。carrageenan でマクロファージを抑制した状態においても、poly I: C 投与にて肺転移結節数が抑制されること、さらに poly I: C 単独投与群と同程度に肺転移結節数が減少することより、poly I: C 投与による肺転移の抑制にはマクロファージの直接的な関与よりも、むしろ poly I: C で活性化された肺 NK 細胞が働いていることが示された (Table 5)。

また Wiltout ら⁹⁾が示したように、BRM 投与による NK 細胞の活性化が癌転移を抑制するというだけでなく、ウイルス感染においても臓器 NK 細胞の関与していることが報告されている。すなわち Stein-Streilein ら⁹⁾はインフルエンザウイルスによって肺 NK 活性が増強されること、ウイルスにより活性化された NK 細胞は標的細胞を広く傷害することを報告している^{28,29)}。

以上より、肺の臓器関連 NK 細胞は、無処置状態では細胞障害活性は低値である。しかしこの NK 細胞は、ある種の BRM により、脾の NK 細胞の細胞障害活性レベルまで活性が増強する。したがって肺の臓器関連 NK 細胞を BRM で活性化することは、肺転移巣に対する治療として有効であると考えられる。

結 論

- 1) C57 BL/6 マウス肺には、脾と比較して低活性ではあるが NK 細胞が存在した。
- 2) 肺 NK 細胞は脾 NK 細胞に比較して poly I: C 投与による活性化率が著しく高値であった。
- 3) poly I: C によって活性化された肺 NK 細胞は、すでに形成された肺転移を抑制した。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました臨床病理学教室渋谷昌彦博士に深謝申し上げます。また御協力を頂きました教職員各位に感謝致します。

なお、本論文の要旨は第 15 回日本臨床免疫学会総会(1987 年 7 月)、第 46 回日本癌学会総会(1987 年 10 月)、第 28 回日本胸部疾患学会総会(1988 年 4 月)において発表した。

文 献

- 1) 渋谷昌彦, 西條長宏, 尾崎彰, 別府保男, 清水英治, 滝沢妙子, 星昭夫: 癌の転移形成における asialo GM₁陽性細胞の役割。癌と化療, 10, 1781~1786, 1983.
- 2) Herberman, R.B. and Holden, H.T.: Natural cell-mediated immunity. Adv. Cancer Res., 27, 305~377, 1978.
- 3) Wiltout, R.H., Herberman, R.B., Zhang, S.-R., Chirigos,

- M.A., Ortaldo, J.R., Green, K.M., Jr. and Talmadge, J.E.: Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. J. Immunol., 134, 4267~4275, 1985.
- 4) Wiltout, R.H., Mathieson, B.J., Talmadge, J.E., Reynolds, C.W., Zhang, S.-R., Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.: Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers; Isolation and characterization of large granular lymphocytes from the liver. J. Exp. Med., 160, 1431~1449, 1984.
- 5) Puccetti, P., Santonio, A., Riccardi, C. and Herberman, R.B.: Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. Int. J. Cancer, 25, 153~158, 1980.
- 6) Stein-Streilein, J., Bennett, M., Mann, D. and Kumar, V.: Natural killer cells in mouse lung; Surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection. J. Immunol., 131, 2699~2704, 1983.
- 7) Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.P. and Hilleman, H.R.: Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1004~1010, 1967.
- 8) Klein, G., Klein, E. and Haughton, G.: Variation of antigenic characteristics between different mouse lymphomas induced by the moloney virus. JNCI, 36, 607~621, 1966.
- 9) Fidler, I.J., Barnes, Z., Fogler, W.E., Kirsh, R., Bugelski, P. and Poste, G.: Involvement of macrophages in the eradication of established metastases following intravenous injection of liposomes containing macrophage activators. Cancer Res., 42, 496~501, 1982.
- 10) Sakurai, M., Iigo, M., Tamura, T., Otsu, A., Sasaki, Y., Nakano, H., Nakagawa, K., Minato, K., Ohe, Y. and Saijo, N.: Comparative study of the antitumor effect of two types of murine recombinant interferons, (β) and (γ), against B16-F10 melanoma. Cancer Immunol. Immunother., 26, 109~113, 1988.
- 11) Herberman, R.B. and Ortaldo, J.R.: Natural killer cells; Their role in defenses against disease. Science, 214, 24, 1981.
- 12) Taniyama, T. and Holden, H.T.: Cytolytic activity against tumor cells by macrophage cell line and augmentation by macrophage stimulants. Int. J. Cancer, 26, 61~69, 1980.
- 13) Cohen, S.A., Salazar, D. and Nolan, J.P.: Natural cytotoxicity of isolated rat liver cells. J. Immunol., 129, 495~501, 1982.
- 14) Lukomska, B., Olzewski, W.L. and Engeset, A.: Rat liver contains a distinct blood-borne population of NK cells resistant to anti-asialo GM₁ antiserum. Immunol. Lett., 6, 277, 1983.
- 15) Kaneda, K., Dan, C. and Wake, K.: Pit cells as natural killer cells. Biomed. Res., 4, 567~576, 1983.
- 16) Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J. and Daems, W.Th.: The pit cell; Description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoid and peripheral blood. Cell Tissue Res., 173, 423~435, 1976.
- 17) Kaneda, K. and Wake, K.: Distribution and morphological characteristics of the pit cells in the liver of

- the rat. *Cell Tissue Res.*, 233, 485~505, 1983.
- 18) 小野稔, ト部貴光, 岡本康久, 村上仁, 立本昭彦, 大野聡, 山本浩史, 渡辺良平, 日伝晶夫, 田中紀章, 折田薫三: Cepharanthin による Organ-associated 免疫細胞の活性化. 癌と化療, 15, 127~133, 1988.
 - 19) Talmadge, J.E., Schneider, M., Collins, M., Phillips, H., Herberman, R.B. and Wiltout, R.H.: Augmentation of NK cell activity in tissue specific sites by liposomes incorporating MTP-PE. *J. Immunol.*, 135, 1477~1483, 1985.
 - 20) 岩田正徳, 佐藤雅樹, 丸山宗治, 水島豊, 杉山英二, 山下直宏, 鈴木英彦, 矢野三郎: マウス肺 NK 活性と Poly I:C, IL-2 によるその増強. 日胸疾患会誌, 24, 213~217, 1986.
 - 21) Nolibé, D. and Poupon, M.F.: Enhancement of pulmonary metastases induced by decreased lung natural killer cell activity. *JNCI*, 77, 99~103, 1986.
 - 22) Hurme, M., Silvennoinen, O. and Renkonen, R.: Highly increased natural killer cell number and lytic activity the murine peripheral blood and lung after interferon induction in vivo. *Scand. J. Immunol.*, 20, 371~376, 1984.
 - 23) Farrell, H.E., Holt, P.G. and Shellam, G.R.: Regulation of natural killer cell activity and interferon production in the rat lung following aerosol challenge. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 78, 318~325, 1985.
 - 24) 山本三郎, 徳永徹: 活性化マクロファージによる細胞障害試験. "免疫実験操作法 VIII", p. 2583~2587, 日本免疫学会, 1979.
 - 25) Kasai, M., Iwamori, M., Nagi, Y., Okumura, F. and Tada, T.: A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*, 10, 175~180, 1980.
 - 26) Kumagai, K., Itoh, K., Suzuki, R., Hinuma, S. and Saitoh, F.: Studies of murine large granular lymphocytes; Identification as effector cells in NK and K cytotoxicities. *J. Immunol.*, 129, 388~394, 1982.
 - 27) 安保徹, 菅原俊二, 熊谷勝男: ヒト NK 細胞の分化と活性化機序. "Annual Review 免疫 1987" (菊地浩吉, 矢田純一, 奥村康 編), p. 251~256, 中外医学社, 東京, 1987.
 - 28) Welsh, R.M.: Cytotoxic cells induced during lymphocyte choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J. Exp. Med.*, 148, 163~181, 1978.
 - 29) Biron, C.A. and Welsh, R.M.: Proliferation and role of natural killer cells during viral infection. "NK Cells and Other Natural Effector Cells" (Herberman, R.B. ed.), p. 493, Academic Press, New York, 1982.

(受付 : 1988年12月12日)