In vitro において Diethylstilbestrol diphosphate (DES-P) および α 型 インターフェロンの natural killer 細胞活性に与える影響

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 田崎 寛教授)

上野 宗久 丸茂 健 村木 淳郎

馬場 志郎 村井 勝* 田崎 寛

川崎市立川崎病院泌尿器科 (主任: 山本泰秀部長)

山 本 泰 秀

EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL DIPHOSPHATE (DES-P) AND ALPHA-INTERFERON ON NATURAL KILLER CELL ACTIVITY IN VITRO

Munehisa Ueno, Ken Marumo, Junro Muraki,

Siro Baba, Masaru Murai and Hiroshi Tazaki

Department of Urology, School of Medicine, Keio University

(Director: Prof. H. Tazaki)

Yasuhide Yamamoto

Department of Urology, Kawasaki Municipal Hospital

(Chief: Dr. Y. Yamamoto)

Estrogens have been considered to affect several features of the immune system: Delayed hypersensitivity reaction, mitogen responsiveness, antibody production and natural killer (NK) cell activity. It has recently been shown that long term treatment with diethylstilbestrol diphosphate (DES-P), an estrogenic agent, reduces NK cell activity in mice. We examined if DES-P would suppress NK cell activity in patients with prostatic cancer on basis of earlier reports. Five hundred mg of intravenous DES-P treatment resulted in significant suppression of NK cell activity (from $67.4 \pm 9.4\%$ to $43.8 \pm 11.8\%$, $p < 0.001$) 4hr after administration with a return to normal activity 24hr after administration in nine patients with advanced prostatic cancer, accompanied by a reduction in the percentage of Leu 7⁺ cells. Venous concentrations of DES-P metabolites, measured using gas-chromatography, immediately decreased within 12hr, and the maximum concentration of total DES-P metabolites was approximately $100 \mu\text{g/ml}$, which was detected directly after treatment.

The present study was also carried out to evaluate the effects of DES-P and alpha-interferon (IFN- α) on NK cell activity in vitro and to investigate the mechanism of DES-P which suppressed NK cells, using the ⁵¹Cr-release assay method. The results showed that peripheral blood lymphocytes (PBL) from eight different healthy volunteers incubated with 0.1mg/ml of DES-P for 16hr at 37°C became less cytotoxic against the human leukemia cell line K562 ($p < 0.001$), and that the depression of NK cell activity due to DES-P was dependent on its concentrations (0.1~5.0mg/ml) and incubation period (4~16hr), and could be enhanced by incubation with 600IU/ml of IFN- α for 6hr ($p < 0.001$). However, incubation with IFN- α alone induced higher cytotoxicity compared with combined DES-P and IFN- α treatment ($p < 0.02$). It was also demonstrated that DES-P didn't alter the distribution of PBL subpopulations in vitro, using flow cytometry and a direct immunofluorescence technique with monoclonal antibodies against Leu 7 and Leu 11 which proved to be specific cell surface antigens on the NK cell.

It was concluded that NK cell activity which was reduced by DES-P in vitro could be enhanced by IFN- α exposure for a short time, and we would be able to compensate for DES-P induced suppression of

* 現在, 防衛医科大学校泌尿器科学教室

NK cell activity by additional treatment with biological response modifiers containing IFN in clinical cases.

要旨：リン酸ジエチルスチルベストロール (diethylstilbestrol diphosphate, DES-P) の *in vitro* における natural killer (NK) 細胞活性に与える影響を検討した。8 例の健康成人男子よりフィコール比重遠沈法を用いて分離した末梢血リンパ球を 0.1mg/ml の DES-P と 16 時間、37℃ 下にて培養したところ、NK 細胞活性はコントロール群 ($48.6 \pm 10.5\%$) と比較すると有意に低下し ($25.6 \pm 9.2\%$, $p < 0.001$)、更に DES-P による NK 細胞活性の抑制効果は濃度および培養時間に依存した。また、0.1mg/ml の DES-P と 16 時間の培養により低下した NK 細胞活性 ($25.0 \pm 13.3\%$) は、600IU/ml の α 型インターフェロン (IFN- α) の添加により増強された ($58.3 \pm 16.0\%$, $p < 0.001$)。

われわれは、DES-P により低下した NK 細胞活性が、IFN- α との混合培養により回復する結果を得た。今後、これら基礎的実験結果に基づき、エストロゲン療法時における IFN などの Biological Response Modifiers の併用投与により、宿主の免疫能の保持が期待される。

緒 言

末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) は *in vitro* においてアロ抗原や mitogen の刺激なしに様々な腫瘍細胞株に対する細胞障害能を有する。これらの細胞は natural killer (NK) 細胞と呼ばれ¹⁾²⁾、骨髄に依存し胸腺に影響されることなく活性化し、悪性腫瘍に対する免疫監視の役割を担っていると考えられている^{3)~5)}。一方、エストロゲン療法はそのアンドロゲン枯渇作用のために進行性前立腺癌に対して一般的に用いられているが、ヒトおよび実験動物においてその使用が免疫反応を低下させ⁷⁾⁸⁾、抗体産生能など各種の感染や腫瘍細胞に対する宿主の抵抗性を抑制する^{9)~11)}とも言われている。Kalland ら¹²⁾はジエチルスチルベストロール (diethylstilbestrol, DES) 使用中の前立腺癌患者において末梢血中の NK 細胞活性が低下していることを指摘し、Seaman ら¹³⁾¹⁴⁾の実験よりマウスにおける NK 抑制効果が骨髄障害を介したものであることが示唆された。また、DES はマウスの脾細胞中の T リンパ球およびそのサブセットである Lyt1⁺細胞を減少させ¹⁵⁾、その結果、リンパ球の活性化の抑制につながるものと思われた。In vivo に限らず *in vitro* においても、DES およびリン酸ジエチルスチルベストロール (diethylstilbestrol diphosphate, DES-P) とリンパ球の免疫反応との関係について検討がなされているが、未だ、NK 細胞に対する DES-P の直接効果については十分に解明されていない。本研究は、DES-P の NK 抑制機構を検討し、その副作用をインターフェロン (IFN) を含む biological response modifiers (BRM) の使用により代償する可能性を追求するものである。

実験材料と方法

(1) 進行性前立腺癌患者の NK 細胞活性に与える影響

9 例の進行性前立腺癌患者に 500mg の DES-P (ホンバン®, 杏林製薬) を 1 時間で点滴静注した後、4 時間 ⁵¹Cr 放出試験を用いて NK 細胞活性の変化を経時的に測定した。9 例の年齢分布は 67~78 歳 (平均 72.3 ± 4.1 歳) で、いずれも 1 カ月以内にホルモン製剤または抗癌化学療法剤を投与されていない。

(2) DES-P の血中濃度測定

操作法：DES-P およびその代謝産物の血中濃度をガスクロマトグラフィーを用いて測定した。内部標準にはフルラゼパム (住友化学) を使用し、そこに試料血清と酵素溶液を加え SEP-PAKC₁₈ (Waters) により前処理した。検体にクロロホルムを添加し溶解した後、ガスクロマトグラフ (GC-4B および GC-9A 型、島津製作所) に注入し内部標準とのピーク高比を求め (Fig. 1), 別に求めた検量線より測度を測定した。

酵素溶液として DES-グルクロン酸抱合体 (DES-Glucuronide, DES-G) 測定時には β -グルクロニダーゼ アリルスルファターゼ (ペーリンガー・マンハイム山の内) を、DES-P 測定時にはアルカリフォスファターゼ (ペーリンガー・マンハイム山の内) その他を使用した。DES 測定時には回収率改善のため 1M 酢酸塩緩液を加えて試料を酸性化した。

検量線作成法：投与前血清を用い、その 0.5ml に DES を 0.2, 0.5, 1.0, 2, 4, 8, 16 μ g 含むように調整し“操作法”に準じて操作し、内部標準とのピーク高比を求めて検量線を作成した (Fig. 1)。

(3) エフェクター細胞 (effector cells, EC)

Fig. 1 Gas-chromatogram and calibration curve. Sera isolated from four different patients with advanced prostatic cancer were added to some enzymes which were different in detection for each DES metabolites and added to flurazepam used as internal standard (I.S.), and introduced to chromatograph after dissolved by chloroform. 8mg/ml of DES led to delineate these chromatograms in the methods for DES (a), DES-G (b), and DES-P (c). Concentrations of DES metabolites were determined from peak heights' ratio between sera from patients and I.S. in calibration curves. For the final calculation of DES-P, the measured values, obtained by this standard curve, was subtracted with that for free DES.

a) Standard curve for DES, b) Standard curve for DES-glucuronide treated with β -glucuronidase, c) Standard curve for DES-diphosphate treated with alkalinephosphatase

健康成人男子より得た末梢血から Ficoll Rompacon (Lymphoprep[®], Nyegaard and Co. Oslo) を用いた比重遠沈法により PBL を分離した。PBL は 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 加の RPMI 1640 (Gibco, New York) (以下、これを complete medium とする) にて 3 回洗浄し、 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ -complete medium に調整した。これらの細胞は 37°C 炭酸ガスフラン器 (CO_2 5%, air 95%-以下で 37°C で培養する場合この条件を示す) 内にて各濃度 (0.1~5.0 mg/ml) の DES-P-complete medium と暴露時間を変えて (4~16 時間) 培養した後、 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ -complete medium に調整したものを EC として使用した。尚、DES-P-complete medium と培養した後、PBL の viability は 90% 以上であった。

(4) ターゲット細胞 (target cells, TC)

ヒト白血病細胞株, K562 を使用した。K562 は NK 細胞に対して感受性が高いことが知られており、com-

plete medium を用いた 37°C 、浮遊培養で継代維持されている。

(5) NK 細胞活性

1.0×10^6 の TC を $100 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (クロム酸ナトリウム注射液, 第 1 ラジオアイソトープ) にて 37°C 、60 分間標識し 3 回洗浄した後、 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ -complete medium に調整した。この浮遊液より $100 \mu\text{l}$ を U 字型マイクロプレート (Microtestplate, Sterilin) の各 well に分注し、EC を加えて反応させた。EC: TC 比を 50: 1 に設定し各 Well の総量を $200 \mu\text{l}$ に調節した。 37°C 下、4 時間培養した後、マイクロプレートを 4°C 下、 $500 \times G$ にて 10 分間遠心した。上澄み $100 \mu\text{l}$ をプラスチックチューブに分注し、ガンマカウンターにて放射能を測定した。すべての実験は triplicate で行われた。

%cytotoxicity は以下の公式を用いて算出した。

%cytotoxicity =

$$\frac{\text{Experimental release (cpm)}}{\text{Maximum release (MR) (cpm)}} \times 100$$

$$\frac{-\text{Spontaneous release (SR) (cpm)}}{-\text{Spontaneous release (SR) (cpm)}} \times 100$$

SR および MR の測定には EC の代わりにそれぞれ complete medium と 2% Triton-X100 μ l を使用し、SR はすべてにおいて MR の 20% を越えなかった。

(6) α 型インターフェロン (alpha-interferon, IFN- α) (HLBI, 1.0 $\times$ 10⁷ IU/mg タンパク, 住友製薬)

Burkitt リンパ腫由来のナマルバ株により産生される IFN- α を用いて、NK 細胞活性に与える DES-P との相互関係を検索した。予め、0.1mg/ml の DES-P-complete medium と 37℃ 下、16 時間培養した 1.0 $\times$ 10⁷/5ml の PBL に 3,000 IU の IFN- α を加えて、更に、6 時間培養した後、complete medium にて 3 回洗浄して IFN- α を除去したものを EC として使用した。また、22 時間 DES-P 単独培養群と 6 時間 IFN- α 単独培

養群を別に設定し、それぞれの NK 細胞活性を比較検討した。

(7) PBL サブセット

PBL 中の OKT3(panT), OKT4(helper), OKT-8 (cytotoxic/suppressor) (Ortho Co.) および Leu 7 (NK), Leu 11 (NK) (Becton Dickinson Immunocytometry Systems Co.) 陽性細胞についてそれぞれの fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識モノクローナル抗体を用いた直接免疫蛍光法と flow-cytometer (スペクトラム-3, Ortho Co.) を使用して測定した。

(8) Statistical analysis

実験は Student t-test を用いて検定し、p value 0.05 以下を有意として取り入れた。

結 果

(1) 進行性前立腺癌患者の NK 細胞活性に与える影響：進行性前立腺癌患者に DES-P を投与した後の NK 細胞活性および DES-P の血中濃度を経時的に調

Table 1 Venous concentrations of DES-P metabolites after 500mg of DES-P administered to four patients with advanced prostatic cancer. Venous concentrations of DES-P, DES and DES-G (DES-glucuronide) were measured directly, 4, 8, 12 and 24hr after DES-P treatment by using gas-chromatography.

Pt. No. - Age	Hours after administration	Venous concentrations (μ g/ml)			
		DES	DES-G	DES-P	Total DES
1. - 74	0	24.6	19.8	48.7	93.1
	4	1.7	8.7	0.9	11.3
	8	1.1	7.4	N.D.	8.5
	12	0.7	2.7	N.D.	3.4
	24	N.D.	2.7	—	2.7 *
2. - 71	0	14.1	33.8	35.7	83.6
	4	1.5	10.2	N.D.	11.7
	8	0.9	5.2	N.D.	6.1
	12	1.0	4.2	N.D.	5.2
	24	N.D.	1.5	0.3	1.8
3. - 62	0	24.3	55.3	54.8	134.4
	4	0.8	1.9	N.D.	2.7
	8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	12	N.D.	1.9	N.D.	1.9
	24	N.D.	0.5	0.3	0.8
4. - 67	0	—	86.5 **	—	86.5 *
	4	0.8	9.8	0.4	13.7
	8	N.D.	4.3	—	4.3 *
	12	N.D.	0.3	N.D.	0.3
	24	N.D.	2.4	N.D.	2.4

N.D. : not detected

* total concentrations of DES-P metabolites which were measured practically in this experiment.

** concentrations of DES-G and DES.

べ、DES-P の血中動態とNK 細胞との関係を検討した。500ml の生理食塩水に500mg の DES-P を混注し、患者に対して1 時間で点滴静注をした。血中 DES-P 濃度は点滴終了直後に最も高く、以後、急速に減少した。DES-P と DES は12 時間後にはほとんど検出できなかったが、DES-G は24 時間でも0.5~2.7 μ g/ml が残っていた (Table 1)。総 DES 濃度としても投与直後

には83.6~134.4 μ g/ml を呈したが4 時間後には2.7~11.3 μ g/ml と血中よりの速やかな消失を認めた。また、NK 細胞活性は DES-P 投与前の67.4 $\pm$ 9.4% から4 時間後には43.8 $\pm$ 11.8% に低下した ($p < 0.001$)。低下した NK 細胞活性は以後上昇傾向を示し、24 時間後には61.8 $\pm$ 13.6% とほぼ正常域に達した (Fig. 2)。この結果に基づいて *in vitro* における DES-P の培養濃度を決定した。

Fig. 2 Effects of DES-P on NK cell activity against K562 target cells *in vivo*. NK cell activity of peripheral blood lymphocytes was determined four and twenty four hours after five hundred mg of DES-P was administered to patients with advanced prostatic cancer. Effector/target cells ratio was 50 : 1.

NK 細胞活性と同時にリンパ球のサブセットの変化を調べた。Leu 7 と Leu 11 は NK 細胞に特異的な表面抗原と考えられており、Leu 7 において NK 細胞活性と同様に DES-P 投与4 時間後に投与前の24.1 $\pm$ 14.1% から15.1 $\pm$ 10.8% に減少したが、統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3)。

(2) *in vitro* における NK 細胞活性に与える DES-P および IFN- α の影響 : *in vitro* における DES-P の NK 細胞に対する直接効果を検索するために、0.1mg/ml の DES-P-complete medium を作成し、これを用いて健康成人男子より得た PBL を16 時間培養したところ、NK 細胞活性は Fig. 4 に示されるごとく、complete medium と培養したコントロール群が48.6 $\pm$ 10.5% であるのに対し、DES-P 培養群は25.6 $\pm$ 9.2% と明らかな低下を示した ($p < 0.001$)。また、DES-P-complete medium の濃度を0.1mg/ml に加えて、0.5, 1.0, 5.0mg/ml と設定し、DES-P の NK 細胞活性に対する濃度依存性を調べた。4 例について検討したが、コントロール、0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/ml の DES-P 培

Fig. 3 Effects of DES-P on lymphocyte subpopulations *in vivo*. The percentages of Leu 7⁺ cells and Leu 11⁺ cells were measured by a direct immunofluorescence technique using monoclonal antibodies against Leu 7 and Leu 11, and a flow cytometer, four and twenty four hours after five hundred mg of DES-P was administered to patients with advanced prostatic cancer.

Fig. 4 Effects of DES-P on NK cell activity against K562 target cells *in vitro*. Peripheral blood lymphocytes from eight different healthy male adult volunteers were incubated with 0.1 mg/ml of DES-P for 16hr at 37°C. Control indicated that lymphocytes were incubated with complete medium for 16hr. Effector/target cells ratio was 50 : 1.

養群はそれぞれ、 $53.9 \pm 9.0\%$ 、 $32.3 \pm 3.1\%$ 、 $26.9 \pm 8.5\%$ 、 $16.3 \pm 8.7\%$ および $10.0 \pm 9.1\%$ を呈し、 0.1 と 1.0mg/ml との間($p < 0.02$)および 0.5 と 5.0mg/ml との間($p < 0.05$)に有意差が認められた (Fig. 5)。

DES-P濃度を 0.1mg/ml に一定とし、培養時間を変えてNK細胞活性の変化を調べた。コントロールおよび4、8、12、16時間培養群を設けたところ、NK細胞活性はそれぞれ、 $54.6 \pm 7.2\%$ 、 $47.4 \pm 2.2\%$ 、 $42.8 \pm 0.9\%$ 、 $35.9 \pm 5.9\%$ および $27.3 \pm 3.1\%$ を呈した。

Fig. 5 Concentration effects of DES-P on NK cell activity against K562 target cells in vitro. Peripheral blood lymphocytes from four different healthy male adult volunteers were incubated with 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0mg/ml of DES-P for 16hr at 37°C. Control in the absence of any reagents but complete medium for 16hr. Effector/target cells ratio was 50 : 1.

Fig. 6 Time dependent effects of DES-P on NK cell activity against K562 target cell in vitro. Peripheral blood lymphocytes from five different healthy male adult volunteers were incubated with 0.1mg/ml for varying terms (4~16hr) at 37°C. Control in the absence of any reagents but complete medium for 16hr. Effector/target cell ratio was 50 : 1.

DES-PのNK細胞抑制効果は8時間以上の培養群においてその培養時間に依存して認められた (Fig. 6)。

DES-Pにより抑制されたNK細胞に対してIFN- α を投与してその影響を検討した。 0.1mg/ml のDES-P-complete mediumと16時間培養したPBLに600 IU/mlのIFN- α を加えて、更に6時間培養したところ、低下したNK細胞活性はDES-P単独培養群と比較して増強された($p < 0.001$)。IFN- α 単独培養群におけるNK細胞活性は $74.8 \pm 5.9\%$ を呈し、DES-PとIFN- α の混合培養群のNK細胞活性($58.3 \pm 16.0\%$)と比較して明らかに高く($p < 0.02$)、DES-PはIFN- α のNK細胞活性増強効果を抑制するとも考えられた (Fig. 7)。

in vitroにおけるDES-PのPBLのサブセットに与える影響を検討したが、 0.1mg/ml のDES-P-complete mediumはいずれの細胞に対しても影響せ

Fig. 7 Effects of IFN- α on NK cell activity depressed by DES-P against K562 target cells in vitro. Peripheral blood lymphocytes from nine different healthy male adult volunteers were incubated with 0.1mg/ml of DES-P for 22hr and/or 600IU/ml of IFN- α for 6hr at 37°C. Control in complete medium for 22hr. Effector/target cells ratio was 50 : 1.

Table 2 Effects of DES-P on lymphocytes subpopulations. Lymphocytes were incubated with 0.1mg/ml of DES-P for 22hr. Values represent mean $\pm$ SD of eight different donors.

MoAb ^{a)}	Subpopulation	
	Control ^{b)}	DES-P
OKT 3	66.3 ± 10.5	66.6 ± 11.6
OKT 4	37.8 ± 7.4	36.1 ± 8.7
OKT 8	29.7 ± 7.6	31.2 ± 9.6
Leu 7	23.8 ± 6.2	21.8 ± 5.0
Leu 11	12.6 ± 4.1	14.0 ± 6.1

a) Monoclonal antibodies.

b) Lymphocytes incubated with complete medium for 22hr.

ず (Table 2), *in vitro* において DES-P は Leu 7 あるいは Leu 11 陽性の NK 細胞を減少させることなく、その活性を抑制するものと思われた。

考 察

DES-P は非ステロイド・エストロゲン製剤で、1952 年, Druckrey らによって合成され¹⁶⁾, 今日まで長期にわたり使用され、有効性が認められているが、一方では毒性として、その心血管系への影響や発癌性¹⁷⁾¹⁸⁾などが知られている。また、1974 年, Ablin ら¹⁹⁾が *in vitro* において DES-P がフィトヘマグルチニン (PHA) によるリンパ球の幼若化を抑制することを報告して以来、DES-P あるいは DES と免疫機構との関係が注目されるようになった。

本研究は DES-P 使用例において、NK 細胞活性が低下していることに着目し、その抑制機構を解析すべく以上の実験を行った。DES-P の NK 細胞活性抑制の機序として、(1) NK 細胞の産生細胞への影響、(2) NK 細胞の前駆体または前 NK 細胞より成熟型 NK 細胞への分化の過程での抑制、(3) マクロファージ (Mφ) などの accessory 細胞を介した抑制、(4) NK 細胞への直接抑制作用、等が考えられる。NK 細胞は骨髄に対する依存性が強く²⁰⁾、抗癌剤など骨髄抑制作用を有する薬剤の使用によりその活性は低下する²¹⁾。また、マウスに対して DES を投与した場合、骨髄の骨化進行に伴い NK 細胞活性は低下する¹³⁾¹⁴⁾ ことから、NK 細胞の産生が骨髄細胞に由来し、DES の NK 細胞活性抑制作用は骨髄を介した二次的なものであることが暗示される。しかし一方では、骨髄を選択的に破壊することで知られている⁸⁾⁹⁾ ストロニウム²²⁾ を用いてラットを被爆した場合、骨髄抑制に十分量照射しても NK 細胞活性は低下せず²³⁾、NK 細胞の骨髄依存性は種により異なるものであり、必ずしもヒトにおいて DES-P による骨髄抑制が NK 細胞活性低下の直接原因であるとは言いがたいものと思われた。

Poly I: C は 2 本鎖 RNA のラセン構造を有し、*in vitro* および *in vivo* において、IFN を誘導し、NK 細胞の分化を促進すると考えられているが²⁴⁾、Kalland らの報告によると、DES 処理された neonatal mice に Poly I: C を投与しても低下した NK 細胞活性は回復せず²⁵⁾、少なくとも、マウスにおいて NK 細胞は DES-P により成熟型に分化する以前に障害されることが推測された。

Luster ら²⁶⁾は DES を投与した際、Mφ が活性化され Mφ 中の suppressor 細胞がリンパ球の増殖を抑制

すると考え、Jondal ら²⁷⁾は Mφ より放出された内因性プロスタグランジン (PG) が modulator として働き、NK 細胞活性を抑制することを唱えた。PG は NK 細胞の抑制物質として知られているが、Kalland らの実験²⁸⁾では、*in vitro* において、DES と培養した PBL にインドメサシン等 PG 阻害剤を添加したところ、NK 細胞活性は増強され、accessory 細胞としての Mφ の働きおよび PG の介在が示唆された。また、Danel ら²⁹⁾が示すように、ヒト PBL 中にエストロゲン特異的リセプターが存在するならば、末梢血中に DES-P が PBL と結合し直接作用する可能性も残されている。今回のわれわれの実験では、まず *in vivo* すなわち前立腺癌患者に DES-P を点滴静注した後の NK 細胞活性の変化および血中 DES-P 濃度との関係が検索された。NK 細胞活性は DES-P 投与後わずか 4 時間で有意に低下するものの、24 時間後には投与前値に回復した。また、血中 DES-P 濃度は投与直後に約 0.1mg/ml を示したが、数時間後には検出されなくなった。NK 細胞活性の変化は Onsrud ら³⁰⁾の報告に一致するが、DES-P に起因する NK 細胞活性低下の発現があまりにも速いことや、NK 産生細胞と考えられる骨髄細胞を介した抑制系ならば、DES-P が血中より消失した後も、骨髄における多少の蓄積効果が残る NK 細胞活性の抑制状態が持続するものと思われた。以上の結果から、われわれは次に DES-P の NK 細胞への直接抑制効果に注目し、臨床投与例を基に設定した DES-P 濃度下の *in vitro* における NK 細胞活性の変化を調べた。NK 細胞活性は 0.1mg/ml 以上の濃度の DES-P との培養により有意に低下し、その抑制効果は培養液中の濃度に依存した。また、中村ら³¹⁾は抗 DES 抗体を用いた RIA 法により、本実験と同様に 500mg の DES-P 投与後の血中 DES 濃度を測定しており、投与直後に 5.2μg/ml を示した。我々が得た測定は 14.1~24.6μg/ml と、両者の間に隔たりを認め、今後、DES-P の濃度設定を再度考慮し、*in vitro* における DES-P の NK 細胞活性抑制効果の特異性を追求する必要性が問われた。

DES-P との培養時間に関しても、*in vivo* において NK 細胞活性は 4 時間で低下するが、*in vitro* における検索では培養時間に依存性を示すものの、4 時間培養群とコントロールの間には有意差はなく疑問を残した。しかしながら、*in vivo* の実験系では DES-P を前立腺癌患者に投与しているのに対し、*in vitro* では健康成人男子より得た PBL を EC として使用しており

コントロール状態において既に、各々のリンパ球の薬剤に対する感受性が異なっていたとも推測される。また、DES-PのNK細胞活性への直接抑制効果により、NK細胞に特異的であるLeu 7およびLeu 11細胞の変化が予測されたが、*in vitro*ではこれらを含めT細胞のサブセットにも影響を与えなかった。Kallandら¹⁵⁾はマウスの脾細胞においてDESがヘルパーT細胞に属するLyt1⁺細胞を減少させることを報告しておりその結果、ヘルパーT細胞由来のインターロイキン2の活性低下によりNK細胞活性が抑制されたとも考えられよう。一方、本実験結果に示すよう、少なくとも*in vitro*にてDES-Pは表面抗原としてLeu 7およびLeu 11を有するNK細胞数には影響を与えなかったが、個々のNK細胞の細胞障害能を解析するには至らない。Kallandら²⁶⁾はsingle cell binding cytotoxicity assayを用いて、DES投与時の個々のNK細胞の状態を調べた。マウス²⁵⁾³²⁾に対してDESはTCに結合するNK細胞数を減少させるに対して、*in vitro*²⁸⁾ではNK細胞のTCへの認識能には影響せずNK細胞活性を低下させ、少くとも*in vivo*と*in vitro*ではDESのNK抑制機構は異なることが示唆された。DESにより抑制されたNK細胞活性の正常化にはマウスでは投与中止後1週間が必要とされているが³²⁾、*in vitro*においてはわずか18時間complete mediumにて培養することで回復が期待できる²⁸⁾。一方、IFN- α を使用した場合、本研究が示すように約6時間の培養によりNK細胞活性は増強された。DES-Pを前立腺癌患者に長期使用する際、宿主の免疫機能を考慮すればこれを補う必要があり、IFN- α の併用投与がNK細胞活性の低下を防ぎうるものと考えられる。著者らは現在までヒト前立腺癌細胞株に対するIFN- β のNK細胞活性増強効果を報告してきたが³³⁾、進行性前立腺癌に対する系統的なIFNの臨床投与の試みはなく、今後は*in vitro*における結果に基づき、ホルモン療法とIFNなどのBRMとの併用投与を考慮している。

結 論

⁵¹Cr放出試験を用いて、*in vitro*におけるDES-PのNK細胞活性に対する抑制効果およびその機序について検討した。また、IFN- α の併用投与によるその代償性を追求し、以下の結果を得た。

- 1) 進行性前立腺癌患者に500mgのDES-Pを1時間で点滴静注したところ、患者のNK細胞活性は4時間で有意に低下し、24時間後には投与前値に回復した。
- 2) DES-P投与後の患者血中におけるDES-Pおよ

びその代謝産物(DES, DES-G)の濃度の推移を求めた。血中濃度は投与直後、総DES濃度として約0.1mg/mlを示し、以後、経時的減少傾向を呈した。

3) *in vivo*の実験結果に基づいて*in vitro*におけるDES-PのヒトPBLとの培養濃度を決定した。健康成人男子より得たPBLは、*in vitro*にて0.1mg/mlのDES-Pと16時間、37℃下にて培養したところ、ヒト白血病細胞株、K562に対する細胞障害能(NK細胞活性)に抑制効果を認めた。また、DES-PのNK細胞活性抑制作用はその投与量および培養時間に比例した。

4) DES-Pにより抑制されたNK細胞活性は、600 IU/mlのIFN- α と6時間培養することにより増強されたが、IFN- α 単独培養群と比較すると有意に低いNK細胞活性を示した。

5) 直接免疫蛍光法とflow cytometryを組み合わせた方法を用いて、*in vitro*におけるDES-PのPBLのサブセットに与える影響を調べたが、OKT3, 4, 8およびLeu 7, 11細胞に対する抑制効果は認められなかった。

本論文の要旨は第73回日本泌尿器科学会総会および第44回日本癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H.: Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5, 112-117, 1975.
- 2) Herberman, R.B.: Significance of natural killer (NK) cells in cancer research. *Human Lymphocyte Differentiation*, 1, 63-75, 1981.
- 3) Haller, O., Hansen, M., Kiessling, R. and Wigzell, H.: Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngenic tumour cells *in vivo*. *Nature*, 270, 609-611, 1977.
- 4) Kasai, M., Laclerc, J.C., McVay-Bourdreau, L., Shen, F.W. and Cantor, H.: Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen cell populations prevent tumor growth *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 149, 1260-1264, 1979.
- 5) Karre, K., Klein, G.O., Kiessling, R., Klein, G. and Roder, J.C.: Low natural *in vivo* resistance to syngenic leukaemias in natural killer-deficient mice. *Nature*, 284, 624-626, 1980.
- 6) Scott, W.W.: *Carcinoma of the Prostate*. In *Urology*, Campbell M. and Harrison, J. (editors), p. 1143, W.B. Saunders, Philadelphia, 1970.

- 7) Ablin, R.J., Bruns, G.R., Guinan, P.D., Al-Sheik, H. and Bush, I.M.: Hormonal therapy and alteration of lymphocyte proliferation. *J. Lab. Clin. Med.*, 87, 227—231, 1976.
- 8) Ablin, R.J., Bhatti, R.A. and Guinan, P.D.: Effect of estrogen on tumor-associated immunity in patients with adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Res.*, 38, 3702—3706, 1978.
- 9) Kalland, T., Strand, ϕ . and Forsberg, J.G.: Long term effects of neonatal estrogen treatment on mitogen responsiveness of mouse spleen lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 413—421, 1979.
- 10) Kalland, T. and Forsberg, J.G.: Delayed hypersensitivity response to oxazolone in neonatally estrogenized mice. *Cancer Lett.*, 4, 141—146, 1978.
- 11) Luster, M.I., Faith, R.E., McLachlan, J.A. and Clark, G.C.: Effect of in vitro exposure to diethylstilbestrol on the immune response in mice. *Toxicol. Appo. Pharmacol.*, 47, 279—285, 1979.
- 12) Kalland, T. and Kaukaas, S.: Effect of treatment with diethylstilbestrol-polyestradiol phosphate or estramustine phosphate (Estracyt) on natural killer cell activity in patients with prostatic cancer. *Invest. Urol.*, 18, 437—439, 1981.
- 13) Seaman, W.E., Blackman, M.A., Gindhart, T.D., Roubinian, J.R., Loeb, J.M. and Talal, N.: β -estradiol reduced natural killer cells in mice. *J. Immunol.*, 121, 2193—2198, 1978.
- 14) Seaman, W.E., Gindhart, T.D., Greenspan, J.S., Blackman, M.A. and Talal, N.: Natural killer cells, bone, and the bone marrow: Studies in estrogen-treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. *J. Immunol.*, 122, 2514—2547, 1979.
- 15) Kalland, T.: Decreased and disproportionate T-cell population in adult mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Cell. Immunol.*, 51, 55—63, 1980.
- 16) Druckrey, H. and Brock, N.: Zum Wirkungsmechanismus von Stilboestrol diphosphat (Honvan) beim Prostata-Karzinom. *Munch Med. Wschr.*, 103, 777—779, 1961.
- 17) Forsberg, J.G.: The development of atypical epithelium in the mouse uterine cervix vaginal fornix after neonatal oestradiol treatment. *Br. J. Exp. Path.*, 50, 187—195, 1969.
- 18) Forsberg, J.G.: Adenosis and clear-cell carcinomas of vagina and cervix. *Am. J. Pathol.*, 84, 669—672, 1976.
- 19) Ablin, R.J., Bruns, G.R., Guinan, P. and Bush, I. M.: The effect of estrogen on the incorporation of ^3H -thymidine by PHA-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 113, 705—707, 1974.
- 20) Haller, O., Kiessling, R., Orn, A. and Wigzell, H.: Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 145, 1411—1416, 1977.
- 21) Hanna, N. and Schnieder, M.: Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by β -estradiol treatment. *J. Immunol.*, 130, 974—980, 1983.
- 22) Kumar, V., Ben-Ezra, J., Bennett, M. and Sonnenfeld, G.: Natural killer cells in mice treated with ^{89}Sr : Normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J. Immunol.*, 123, 1832—1838, 1979.
- 23) Zoller, M. and Matzku, S.: Rat natural killer (NK) cells are not bone marrow dependent. *Immunobiol.*, 165, 121—131, 1983.
- 24) Edwards, B.S., Borden, E.C. and Smith-Zaremba, K.: Divergence in activation by poli I: C of human natural killer and killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 13, 158—163, 1982.
- 25) Kalland, T.: Exposure of neonatal female mice to diethylstilbestrol persistently impairs NK activity through reduction of effector cells at the bone marrow level. *Immunopharmacology*, 7, 127—134, 1984.
- 26) Luster, M.I., Boorman, G.A., Dean, J.H., Luebke, R.W. and Lawson, L.D.: The effect of adult exposure to diethylstilberstrol in the mouse: Alteration in immunological functions. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 28, 561—569, 1980.
- 27) Jondal, M., Merrill, J. and Ullberg, M.: Monocyte-induced human natural killer cell suppression followed by increased cytotoxic activity during short-term in vitro culture in autologous serum. *Scand. J. Immunol.*, 14, 555—563, 1981.
- 28) Kalland, T. and Campbell, T.: Effects of diethylstilbestrol on human natural killer cell in vitro. *Immunopathology*, 8, 19—25, 1984.
- 29) Danel, L., Souweine, G., Monier, J.C. and Saez, S.: Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. *J. Steroid. Biochem.*, 18, 559—563, 1983.
- 30) Onsrud, M. and Sander, S.: Influence of in

- vivo diethylstilbestrol phosphate on some human blood lymphocyte sub-populations. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C*, **90**, 271—276, 1982.
- 31) 中村浩二, 大隅 泰, 碓井 亜, 石部知行, 神川明: 前立腺癌における合成エストロゲン剤の体内動態に関する研究. *日泌尿会誌*, **95**, 1843, 1984.
- 32) Kalland, T. and Haukaas, S.A.: Effects of diethylstilbestrol and estramustine phosphate (Estracyt®) on natural killer cell activity and tumor susceptibility in male mice. *The Prostate*, **5**, 649—660, 1984.
- 33) Marumo, K., Ueno, M., Hayakawa, M., Jitsukawa, S., Murai, M. and Tazaki, H.: Mechanism of augmentation of natural cytotoxicity by human beta-interferon. *Keio J. Med.*, **33**, 201—209, 1984.

(1987年3月17日受理)