ラット遊離有茎皮下埋没脾臓を用いた 内因性抗腫瘍活性誘導の試み

Jpn. J. Clin. Immun., 9 (3): 236~239, 1986.

藤井 昌彦・今 充・山中 祐治
森田 隆幸・佐々木 睦男・小野 慶一

Induction of endogenous Antitumor Activities by using a subcutaneously-imbaded pediculated spleen in the rat

Masahiko Fujii, Misturu Konn, Yuji Yamanaka,
Takayuki Morita, Mutsuo Sasaki and Keiichi Ono

The second department of surgery, Hirosaki university school of medicine

【Summary】

For the purpose of inducing the anti-tumor effect in the portal vein, the intrasplenic serial Biological Response Modifier (BRM) administration was performed by using our original morbilized spleen subcutaneous locating rats. In a view point of endogenous Tumor Necrosis Factor (TNF) production, lipopolysaccharide, BCG, and OK 432 were chosen as administrating BRM and injected into the spleen frequently.

The study of the portal blood serum revealed that BRM administration group gained higher cytotoxic activity against L 929 cells significantly ($p < 0.05$) than control group, which is possibly concerned with TNF. And interferon production in portal vein increased significantly ($p < 0.05$) in BRM administration groups.

On the other hand, the study of the mononuclear cells in the portal vein and spleen after intrasplenic serial BRM administration showed higher cytotoxic activity against YAC-1 cells than control group significantly ($p < 0.05$).

According to the result of our study, the activation of the latent immunological function of the spleen, which is the largest lymphoid system *in vivo*, could induce many-sided anti-tumor effect in the portal vein. Therefore, it is prospective that intrasplenic serial BRM administration could be new process for suppression of the portal venous implantation.

Key words : antitumor activity,
spleen,
BRM,
macrophage

【概 要】

脾臓のもつ潜在的な免疫活性機能を賦活させ門脈血中への抗腫瘍効果を誘導する目的において遊離有茎皮下埋没脾臓ラットを作製し、Biological Response Modifier (BRM) を脾臓内へ連続的に投与した。BRM として lipopolysaccharide (LPS : Sigma *E. coli* 026 : B 26), BCG および OK 432 を用いた。

BRM 連続脾内投与群では Control 群に比して門脈血血清中の L 929 に対する細胞傷害活性も有意 ($p < 0.05$) の上昇がみられ同時に interferon (IFN) 活性も有意に上昇した。さらに門脈血中および脾臓内単核細胞の抗腫瘍活性も有意の活性上昇が認められた。また病理組織学的にも T cell zone リンパ球および組織球の著明な増生が認められた。以上の所見より BRM の新しい投与経路としての脾臓内連続投与は種々の免疫機能賦活作用を有しており多面的な抗腫瘍効果を十分期待しうる方法であることが示唆された。

I. 緒 言

脾臓のもつ腫瘍免疫学的な意義はいまだ不明な点が多いが、われわれは生体最大のリンパ系臓器ともいえる脾臓の潜在的免疫能に注目し、その機能賦活により門脈血中抗腫瘍効果を増強する目的において脾臓内 BRM 連続投与を可能とする遊離有茎皮下埋没脾臓ラットを創意工夫し紹介してきた¹⁾。今回 endogenous な抗腫瘍効果誘導の観点より BRM として LPS, OK 432, BCG を選択し脾臓内連続投与を施行後、門脈血および脾細胞につきその抗腫瘍活性を測定し効果増強の検討を加えたので報告する。

II. 実験材料および方法

1) Donryu rat (♀) 8~10 週に対し遊離有茎脾臓皮下埋没術¹⁾を施行した。術後 5 日目より Control 群として phosphate buffered saline (PBS) を 0.1 ml を 7 日ごとに計 3 回脾臓内へ投与した。これに対し BRM 脾臓内投与群として BCG-LPS 群および OK 432-LPS 群を設定した。BCG-LPS 群では BCG 1 mg を 7 日ごとに計 2 回脾臓内へ投与し最終投与として LPS 100 μ g をさらに 7 日後に投与した。OK 432-LPS 群では OK 432 0.5 KE を 7 日間連続的に投与したのちにさらに 7 日後に最終投与として LPS 100 μ g を投与した。

2) 最終投与 2 時間後に前腸間膜静脈より門脈内カニューレーションを施行し門脈血を採取した。血清を分離したのち L 929 に対する細胞傷害活性を Actinomycin-D 最終濃度 1 μ g/ml とし単層 microplate 添加 20 時間培養後 crystal violet にて染色し Dilution Factor を求め

る L assay にて測定した。同時に L 929 および VSV を用いた 50% プラック抑制法にて IFN 活性を測定した。

3) 門脈血および脾細胞中単核細胞の抗腫瘍活性測定 : 門脈血を PBS にて 3 倍に希釈し、脾臓は細切してメッシュを通過させて比重分離にて単核細胞を回収した。E : T ratio を 40 : 1 とし YAC-1 を target cell とした 16 時間 ⁵¹Cr release assay にてその細胞傷害活性を比較した。

4) 脱血後脾臓および肝臓の一部をホルマリン固定後病理組織学的検討を加えた。

III. 結 果

門脈血血清中の L 929 に対する細胞傷害活性は Control 群では検出されなかったが BRM 脾臓内連続投与群では BCG-LPS 群 7.4 ± 2.6 OK 432-LPS 群 6.4 ± 2.6 と著明な活性上昇がみられた。また、同時に測定した IFN 活性も Control 群に比して BCG-LPS 群 9.3 ± 1.0 , OK 432-LPS 群 8.3 ± 0.5 ($\log_2$) と有意の活性上昇を示した (図 1)。さらに門脈血中および脾細胞中の単核細胞の抗腫瘍活性は Control 群に比べ BCG-LPS 群では $68.2 \pm 14.4\%$ および $89.7 \pm 8.4\%$ OK 432-LPS 群では $59.8 \pm 12.8\%$ および $82.5 \pm 8.4\%$ といずれも有意の活性上昇がみられた。脾臓の病理組織学的な検討では、両群ともに Control 群に比して著明なリンパ球増生が認められ組織球増生も著明であった。なお、B cell zone である lymph follicle には著変がないのにもかかわらず PALS すなわち中心動脈周囲リンパ球鞘でのリンパ球増生が著明であることが両群でともに特徴的であった。また、肝細胞は腫大しグリソン鞘へのリンパ球浸潤は著

図1 L 929 cytotoxic activity and IFN activity in PV serum after 2 hrs. from last injection

明であり細網内皮系の賦活化が観察された。

IV. 考 案

近年、種々の BRM が開発されエフェクター機構の活性化により抗腫瘍効果を誘導するためのさまざまな解析がなされている²⁾。

一方、脾臓のもつ腫瘍免疫学的な意義についても、Hyde³⁾, Mokyr ら⁴⁾によりことにマクロファージの特性の面から脾臓の機能につき詳細な検討が加えられている。

今回、われわれは脾臓のもつマクロファージを含めての潜在的免疫活性機能を引き出すことによって門脈血中への抗腫瘍効果を誘導する可能性を検討するために脾臓内への BRM 連続投与を施行した。ことに endogenous な Tumor Necrosis Factor (TNF) の産生の観点⁵⁾より BRM として種々の免疫学的作用を有する LPS⁶⁾および BCG OK 432 を選択し、門脈血中での種々の因子につき検討を加えた。その結果門脈血中での可溶成分の L 929 に対する有意の活性上昇が認められ同時に IFN 活性も有意に増強していた。一方、門脈血中および脾臓内単核細胞は Control 群に比して BRM 投与群ではともに抗腫瘍活性が増強していた。また同一個体における活性の比較ではどの群においても脾細胞中の単核細胞が有意に高いことが特徴的であった。著者らは、その抗腫瘍効果発現の本態は活性化マクロファージが主体であろうと推測しているが、いずれにしても BRM 脾臓内連続投与により種々の抗腫瘍効果を誘導することが可能であり新しい投

図2 Cytotoxic activity of mononuclear cells ⁵¹Cr release assay (16 hrs.)
E : T ratio = 40 : 1 Target : YAC-1

与経路として多面的な抗腫瘍効果を十分に期待しうる方法であることが示唆された。

また、病理組織学的な所見として中心動脈周囲リンパ球鞘におけるリンパ球の著明な増生およびマクロファージを含む組織球の著しい増生が BRM 投与群でみられたことは細網内皮系を含む免疫機構の賦活が発現したと考えられた。Gray⁷⁾, MacLennan ら⁸⁾は脾臓内リンパ球の動向と所在の特性について述べているが、T 細胞は B 細胞に比して短時間で血流中に流出することは明らかでありその意味からも T cell 帯のリンパ球増生は抗腫瘍効果増強に何らかの論拠を与えるものと考えられた。また、Chen ら⁹⁾は脾臓の microcirculation について、脾臓内へ流入する血液の 90% はいったん赤脾髄に至り脾臓内を循環する open route を通り、残りが閉鎖循環を巡ると述べている。このことは脾臓内での物質停滞が長時間であることの可能性を示唆するものであって、脾臓内 BRM 投与による長期の賦活作用を期待しうるものと考えられた。

今後さらに詳細な検討を加え門脈血中へのより強い抗腫瘍効果を発現させることにより消化器癌、ことに門脈血行性転移再発の抑制に対する BRM 脾臓内投与の有用性がさらに高まると考えられた。

V. 結 語

1) 遊離有茎脾臓皮下埋没ラットに対し BRM 脾臓内連続投与を施行し門脈血中への L 929 細胞傷害活性物質

および IFN の活性上昇, 放出が認められた。

- 2) 同時に門脈血および脾細胞中単核細胞の有意の抗

腫瘍効果増強がみられ新しい投与経路としての BRM 脾臓内連続投与の有用性が示唆された。

文 献

- 1) 藤井昌彦・今 充・山中祐治・他 4 名: ラット遊離有茎脾臓内 LPS 連続投与における門脈血中抗腫瘍活性物質誘導の試み. 日外会誌, 87: 354, 1986.
- 2) 小倉 剛・林 清二: Biological Response Modifier による抗腫瘍免疫療法. 免疫薬理, 2: 281~290, 1984.
- 3) Hyde, A.M., Siagg, R.B., McEachron, R., Nutter, R.L.: Effect of the removal of adherent and phagocytic cells on the spleen cell lymphoproliferative response of tumor-bearing mice. Cancer Immunol. Immunother., 20: 97~102, 1985.
- 4) Mokyr, M.B., Colvin, M., Dray, s.: Cyclophosphamidemediated enhancement of antitumor immune potential of immunosuppressed spleen cells from mice bearing a large MOPC-315 tumor. Int. J. Immunopharmac., 7: 111~122, 1985.
- 5) 田村啓二・石田名香雄: Tumor Necrosis Factor (TNF) の担癌生体内誘導効果. 癌と化学療法, 11: 1369~1378, 1984.
- 6) 中野昌康: リポ多糖に対する細胞応答と免疫学的反応. 最新医学, 35: 466~468, 1980.
- 7) Gray, D., MacLennan, I.C.M., Bazin, H., Khan, M.: Migrant $\mu^+\sigma^+$ and static $\mu^+\sigma^-$ B lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. Cel. Immunol, 12: 564~569, 1982.
- 8) MacLennan, I.C.M., Gray, D., Kumaraathe, D.S., Bazin, H.: The lymphocyt of splenic marginal zones: A distinct B-cell lineage. Immunol. Today, 3: 305~307, 1982.
- 9) Chen, L.T.: Microcirculation of the spleen: An open or closed circulation? Science, 201: 157~159, 1978.