酵素阻害活性を指標として得られた免疫修飾物質

大 倉 彬

(萬有製薬株式会社探索研究所)

1972 年、微生物化学研究所の梅沢らは制癌物質 di-ketocoriorin B がマウス脾細胞の抗体産生を増強し、また膜酵素 Na-K-ATPase を阻害することを明らかにした。その後梅沢は膜酵素阻害物質のなかには免疫調節物質が存在すると想定し、膜酵素阻害物質を微生物代謝産物中に求め、数種の低分子免疫調節物質を得た^(1,2)。それらは bestatin, amastatin, forphenicine, esterastin, ebelactone A, B, arphamenine A, B 等である(図 1)。さらにこの研究は、担癌生体における抑制因子の生成を阻害する作用を持つ制癌抗生物質の探索へと発展し、数種の物質が見出された^(3,4)。

本稿では forphenicine の誘導体 forphenicinol (フォルフェニンノール) の腫瘍および感染に対する効果とその免疫調節機構に関する新田和男、石塚雅章、大倉彬らの研究の概略を述べる。なお bestatin は詳細な基礎研究とともに臨床開発が進められ、1987 年 2 月現在抗悪性腫瘍剤として厚生省中央薬事審議会特別部会の審議を終了している。その免疫調節機構、抗腫瘍作用等については文献⁽¹⁻⁷⁾を参照していただきたい。

1. Forphenicine と Forphenicinol

Forphenicine は放線菌 *Actinomyces fulvoviridis* var *acarhodicus* の培養濾液より得た chicken alkaline phosphatase の阻害剤である。注射によりマウスの免疫能を賦活し、抗腫瘍効果を示したが、経口投与では無効であった⁽¹⁾。経口投与で有効な物質を得るべく誘導体の合成が進められ forphenicinol (FPL) が得られた⁽⁸⁾。FPL は alkaline phosphatase の活性を阻害しなかったが、経口投与で免疫調節作用を示した。天然よりリードを得、化学修飾により目的物質に到達するアプローチの一例である。

2. 抗腫瘍効果⁽⁹⁻¹³⁾

FPL は経口投与により IMC 癌、自然発生乳癌、B 16 等をはじめ、種々の増殖の遅いマウス同系固型腫瘍の増殖を抑制し、マウスに延命を与えた。投与による毒

性、副作用は何ら認められなかった。有効投与量域は広く、至適投与量は経口で 0.1~0.5 mg/kg、と推定された。その効果は投与時期に依存した。腫瘍で免疫しない限り EL 4 リンパ腫等のいわゆる F₁ 効果の出やすい腫瘍を除き、腫瘍移植前投与は無効であり、移植後 1 週間前後に数日間投与することで多くの場合良好な結果を得た。免疫調節機構の項に記すように、FPL の作用は生体の免疫系が腫瘍で感作されたとき顕著となり、また腫瘍移植後 1 週間前後に強まるサプレッサー活性を本物質が抑制することから至適投与時期が存在するものと考えられる。通常の実験条件下では本物質が有効な Meth A 繊維肉腫に対してもその移植量が大量の場合には無効であった。増殖の速い P 388 や L 1210 白血病等の腫水腫瘍に対しては FPL がいかに宿主の免疫能を高めようと本剤単独では無効であったが、L 1210 に対してはワクチンを併用することにより相乗効果を示した。6-メルカプトブリン、アクラシノマイシン、サイクロホスファミド、マイトマイシン等の化学療法剤との併用では化学療法剤単独では十分な抗腫瘍効果を示さない場合にも併用による治療効果が認められた。これらの化学療法剤はその細胞毒性に加えてサプレッサー細胞に対する選択毒性が近年報告されており、FPL を始めとする免疫制癌物質と化学療法剤の効率的な併用方法をこれらの実験結果は示唆している。とくに Meth A、3 LL 肺癌等の転移性の腫瘍に対しては、移植部位を外科的に除去する手術を併用することによりマウスは延命した。Colon 26、B 16 では実際に肺転移数が減少することが確かめられ、この効果はマウスをあらかじめ腫瘍細胞で免疫することにより強められた。

3. 感染防御効果^(9,14)

緑膿菌 No. 12 株の腹腔内、静脈内、さらに経気道感染は FPL を経口投与することにより抑制された。投与時期は感染の直前、直後が有効であった。後投与が必ずしも有効でないのは感染後死亡までの日数が短く本物質

図 1 Immunomodulators of Microbial Origin

による防御能の強化が間に合わないためと考えられる。FPL の感染防御効果はコーチゾンやサイクロホスファミドで免疫能を抑制したマウスにおいても健常マウス同様認められ、また抗生物質（アミカシン）との併用も有効であった。

4. 腫瘍および感染に対する免疫調節機構^(4,10,12-15)

FPL の投与はマウスの遅延型過敏症を亢進し腹腔マクロファージ (Mφ) の食能を促進するが脾細胞の幼若化には作用しない。また、本剤には細胞毒性、抗菌作用はない。FPL およびその代謝物が直接 Mφ を活性化し食食細胞の比率を高めることから、FPL の作用は第一に Mφ の活性化に基づくものと思われた。その免疫調節機構の詳細を明確にすべく、EL 4, L 1210, 緑膿菌を標的細胞にしてその解析を行った。

EL 4 を標的に用いた試験管内腫瘍中和実験により、抗腫瘍エフェクターとしての Mφ を FPL が活性化するには腫瘍抗原により Mφ が感作されることを必要とした。また、FPL により活性化された抗原感作 Mφ は同じく FPL により活性化された脾 T 細胞または ALK (activated lymphocyte killer) 細胞とともに抗腫瘍エ

フェクターとして機能することが示された。この事実は抗原に対する Mφ の応答に FPL が作用することを意味する。そこで抗原刺激に応答する Ia⁺Mφ に対する FPL の作用を検討したところ本剤は健常マウスの Ia⁺Mφ を増加させた。L 1210 担癌マウスでは腫瘍移植による Ia⁺Mφ の一過性の増加後の減少を阻止し、免疫マウスでは健常マウス同様 Ia⁺Mφ を増加させた。したがって、EL 4 に対する Mφ の活性に及ぼす本剤の作用の特徴と合わせ考察すれば、腫瘍抗原でまだ感作されていない Ia⁺Mφ 自体抗腫瘍エフェクターとしての活性は低い。しかし Ia⁺Mφ は腫瘍に対する T 細胞や ALK 細胞等の細胞性免疫応答の引金を引く細胞であり、その細胞を増やし免疫系を抗腫瘍の方向へ向けさせることは、本剤の非常に重要な作用である。また、FPL はサブレッサー T 細胞の作用を抑制した。

感染防御における FPL の作用についても緑膿菌を対象に検討したところ、その作用は Mφ、好中球の活性化によるものであった。そこでその好中球活性化機構を検討したところ、本剤が直接好中球を活性化する結果は得られず、FPL による好中球の活性化は何らかのメデ

エーターを介した間接的な現象であることが示唆された。本剤の顕著な作用は Mφ に対するものであることから、そのメディエーターとして Mφ が考えられ、FPL 投与マウスより得た腹腔 Mφ の好中球活性化能を

表 1 Effect of Macrophages Treated with Forphenicicol (FPL) on BCG-Induced Interferon Production

BCG iv	Silica gel 1 mg, iv	Macrophage transfer, iv	Interferon in serum	
			IU/ml	T/C%
-	-	-	0	
+	-	-	302	
+	+	-	8	100
+	+	+(control)	53	663
+	+	+(forphenicicol- treated)	115	1,438

Mice: ICR female, 6 W, $n=6$

Interferon assay: inhibition of cytopathic effect of VSV in LY cells

表 2 Effect of Forphenicicol on the Production of LPS-Induced TNF in Mice Primed with BCG^a

Forphenicicol, po		LPS, iv μg/mouse	TNF in serum ^b	
mg/kg/day	schedule		U/ml	T/C(%)
-	-	1.0	20	100
0.1	day 1~4	"	690* ^c	3,470
-	-	10.0	390	100
0.05	day 1~4	"	800	208
0.1	"	"	1,023	266
0.5	"	"	1,175	305
1.0	"	"	1,207* ^c	314
0.05	day 10~13	"	1,073	279
0.1	"	"	785	204
0.5	"	"	1,265* ^c	329
1.0	"	"	1,392	362
0.1	day 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13	"	663	172
0.1	day -4~-1	"	1,460	320

^a CDF₁ mice (female, 5 W, $n=6$) were injected intravenously with 10^7 BCG cells on day 0 and 1.0 or 10.0 μg LPS on day 14. They were bled 2 hr after the LPS injection.

^b TNF assay: cytotoxicity toward L 929 cells

^c * $p<0.01$ by Mann-Whitney's U-test

実験した。その結果 FPL 投与マウスより得た Mφ とともに培養した無処理マウスより得た好中球の殺緑膿菌活性は対照群よりも高値であった。

5. サイトカイン産生に対する作用^(16,17)

FPL は Mφ の種々の機能を活性化する。そして Mφ はインターフェロン (IFN), TNF といった種々のサイトカインの産生に関与する。そこで IFN, TNF 産生に及ぼす本剤の作用を検討した。

IFN 産生、とくに γ -IFN 産生には免疫系が関与するが、マウスに FPL の各量を投与し、投与後 24 時間までの血中 IFN 活性を測定したところ IFN 活性は見出されなかった。一方 BCG 免疫マウスは BCG の注射により IFN を産生するが、FPL 投与はこの産生を増強し、サイクロフォスファミドによりマウスの免疫能を低下させた場合にも産生を回復させた。また FPL 投与 BCG 免疫マウスの Mφ を他のマウスへ移入し、移入されたマウスでの IFN 産生を測定することにより、FPL の γ -IFN 産生促進能がその Mφ 活性化能に基づくものであることが明らかとなった (表 1)。

FPL は LPS 誘発 IFN 産生も促進し、この効果は本剤投与後少なくとも 10 日間持続した。BCG 感作マウスに LPS を注射すると、IFN とほぼ同時期に TNF も血中に出現し、FPL はその産生も増強した (表 2)。しかし、これらサイトカイン産生に効果的な FPL の投与時期は必ずしも同一ではなく、BCG/LPS 誘発 IFN 産生

では誘発直前の投与は無効だった。FPL の望ましい投与スケジュールは対象とするサイトカインにより異なると理解される。Meth A 腫瘍の増殖に対し本剤は BCG と LPS の抗腫瘍効果を強めた。したがって FPL の抗腫瘍効果の一部が、ある種のサイトカイン産生促進によることもありえよう。

以上 FPL は癌細胞や細菌または高分子物質で感作されたマウスのそれら抗原に対するエフェクター細胞の活性化、サイトカイン産生などの反応を特異的に増強することが明らかになった。また生体の免疫反応は種々のサイトカインのネットワークにより調節されている。これらのことは免疫調節物質としての FPL の意義、すなわち生体の免疫機構を理解した使用法で本物質を用いることにより、その免疫反応を特異的に調節しえること、を示唆するものである。

終りに、本稿の執筆に際しご助言を賜りました(財)微生物化学研究会化学療法研究所副所長、石塚雅章博士に深謝いたします。

- (1) H. Umezawa(ed): "Small Molecular Immunomodifiers of Microbial Origin—Fundamental and Clinical Studies of Bestatin," Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981.
- (2) 梅沢浜夫: 癌と化学療法, **10**, 1071 (1983).
- (3) 石塚雅章: 癌と化学療法, **11**, 2709 (1984).
- (4) 石塚雅章: 「抗生物質—新しい領域への展開」, 日本農芸化学会編, 朝倉書店, 1985, p.105.
- (5) M. Ishizuka, J. Sato, Y. Sugiyama, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **33**, 653 (1980).
- (6) M. Ishizuka, T. Masuda, N. Kanbayashi, S. Fukasawa, T. Takeuchi, T. Aoyagi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **33**, 642 (1980).
- (7) W.E.G. Müller, R.K. Zahn, J. Arendes, N. Munsch and H. Umezawa: *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3131 (1979).
- (8) H. Morishima, J. Yoshizawa, R. Ushijima, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **35**, 1500 (1982).
- (9) M. Ishizuka, T. Masuda, N. Kanbayashi, Y. Watanabe, M. Matsuzaki, Y. Sawazaki, A. Okura, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **35**, 1049 (1982).
- (10) K. Nitta, T. Tanaka and M. Takeuchi: *Cancer Treat. Rep.*, **69**, 285 (1985).
- (11) A. Okura, Y. Sawazaki, K. Naito, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **39**, 564 (1986).
- (12) A. Okura, H. Arakawa, T. Yoshinari, K. Naito, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **39**, 575 (1986).
- (13) A. Okura, K. Naito, H. Iizuka, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Biol. Resp. Modif.*, **6**, 35 (1987).
- (14) K. Naito, H. Arakawa, Y. Watanabe, A. Okura, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **40**, 547 (1987).
- (15) M. Ishizuka, S. Ishizeki, T. Masuda, A. Momose, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **35**, 1042 (1982).
- (16) A. Okura, M. Nakadaira, K. Naito, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **39**, 569 (1986).
- (17) A. Okura, M. Nakadaira, K. Naito, H. Arakawa, M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Biol. Resp. Modif.*, **6**, 28 (1987).