薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (7) 769-774 (1984)

癌化学療法剤による、食細胞の殺癌効果の誘導と増強¹⁾

山崎正利,* 池並通裕, 来生 淳, 油井 聡, 安部 茂, 水野伝一
帝京大学薬学部

Induction and Potentiation of Phagocyte-Mediated Tumor Lysis by Chemotherapeutic Drugs for Cancer

MASATOSHI YAMAZAKI,* MICHIIHIRO IKENAMI, JUN KISUGI, SATORU YUI,
SHIGERU ABE, and DEN'ICHI MIZUNO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,
Sagamiko, Tsukuigun, Kanagawa, 199-01, Japan

(Received January 24, 1984)

The present study shows that some selected anti-cancer drugs induce tumor lysis *in vitro* in cooperation with phagocytic cells (drug-dependent cellular cytotoxicity; DDCC) and that chemotherapeutic drugs augment the mediator-dependent killing activity of macrophages. Tumor cells pretreated with the drugs were susceptible to phagocyte-mediated killing. Tumor necrosis serum can also cooperate with some drugs in killing tumor cells. Moreover, some selected drugs can induce cytotoxic macrophages and the quantitative changes of phagocytes such as polymorphonuclear leukocytes. These results suggest that some anti-cancer drugs have the activities of inactivation of tumor cells and/or activation of host cells. Thus, tumor cells may be killed effectively *in vivo* by anti-cancer drugs through these mechanisms.

Keywords—anti-cancer drug; macrophage; tumor necrosis factor; phagocyte

癌細胞は種々の環境下で immune lysis に対する感受性が異なることが知られている。^{2,3)} たとえば癌化学療法剤の処理により、抗体と補体に対する感受性が高まり、癌細胞はより破壊されやすくなる。⁴⁾ しかしながら、免疫細胞依存の系では、癌化学療法剤が癌細胞の感受性を高めるか否か調べられていない。

我々は食細胞群による癌排除機構研究の中で、glutaraldehyde が癌細胞を不活性化し、それら癌細胞は多形核白血球、マクロファージなどの食細胞群によって、容易に破壊を受けることを報告してきた。^{5,6)} したがって、本研究では、癌化学療法剤によって癌細胞が不活性化され、食細胞の攻撃に対し感受性が高まっているか否か、また癌化学療法剤が食細胞の質的、量的変化を引き起こすか否か調べることを目的とした。その結果、癌化学療法剤の存在により、食細胞群は癌細胞を効率良く殺すことが明らかとなった。

実 験 の 部

実験材料ならびに方法

実験動物 近交系 C3H/He マウスは 8—11 週令の雄性マウスを静岡実験動物より購入した。

癌細胞 C3H/He マウス乳癌由来 MM46 腫瘍細胞は腹水型で継代移植しているものを用いた。

マクロファージ 1% glycogen 0.4 ml または BCG 0.1 mg/0.2 ml を C3H/He マウス腹腔に接種し、glycogen では 1 日後、BCG では 4 日後の腹腔細胞を得る。それら腹腔細胞を 96 穴平底マイクロプレートで、37°C、5% CO₂ 下で 1.5 時間培養後、非吸着細胞を洗滌除去し吸着細胞を得、マクロファージとした。⁷⁾

多形核白血球 2% casein 2 ml を C3H/He マウス腹腔内に注射後、6 時間後に腹腔細胞を回収する。ナイロンメッシュを通した後、300 g、5 分間遠心で 3 回洗滌し用いた。この腹腔細胞は 90—98% が分葉した核をもつ多形核白血球である。^{8,9)}

抗腫瘍抗体 Mitomycin C 処理した MM46 腫瘍細胞を接種し、抵抗性を誘導した C3H/He マウスより抗腫瘍血清を得、ゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製したものを用いた。⁷⁾

腫瘍壊死血清 C3H/He マウス尾静脈内に生菌 BCG (100 µg/mouse) を接種後、14 日目に同マウス尾静脈

内に OK-432 (10 KE/mouse) を接種する。その2時間後に血液を採取し、血清を得た。

癌化学療法剤 Actinomycin D および adriamycin は Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo., U. S. A.), cyclophosphamide および vincristine は塩野義製薬株式会社, bleomycin は日本化薬株式会社, mitomycin C は協和醗酵工業株式会社, 5-fluorouracil は和光純薬工業株式会社より購入し, phosphate-buffered saline で希釈して用いた。OK-432 (ピシパニール) は中外製薬株式会社より分与されたものを生理食塩液で希釈して用いた。

試薬 乾燥 BCG ワクチンは日本ビーシー社製のものを生理食塩液で希釈して用いた。小麦胚レクチンは E-Y Laboratories (San Mateo, Calif, U. S. A.) より購入し, phosphate-buffered saline で希釈して用いた。

食細胞の腫瘍細胞破壊活性 マクロファージ (2×10^6) または多形核白血球 (2×10^6) と ^{51}Cr で標識した MM46 腫瘍細胞 (5×10^3) とを, 5% FCS を含む RPMI 1640 培地にて CO_2 incubator 中 37°C , 16 時間培養する。必要に応じ, 培養時に癌化学療法剤, 抗腫瘍抗体, 小麦胚レクチンを加える。培養後, 上清に遊離した ^{51}Cr のカウントを測定し, 破壊活性とした。¹⁰⁾

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental cpm} - \text{control cpm}}{\text{maximum cpm} - \text{control cpm}}$$

Maximum count は, ^{51}Cr で標識された標的細胞を3回凍結融解し, 上清に遊離されたカウントを用いた。取り込まれた総カウントの 80—90% が, maximum count として遊離する。

癌化学療法剤による腫瘍細胞の前処理 ^{51}Cr で標識した腫瘍細胞 (5×10^5) を各種癌化学療法剤で 37°C , 1 時間処理し, 5 分間遠心にて2回洗浄したものを用いた。

結 果

I 癌化学療法剤の存在による, 食細胞の殺癌活性誘導

Glycogen または BCG で誘導した腹腔マクロファージ, および casein で誘導した多形核白血球が, 各種癌化学療法剤の存在下で, 腫瘍細胞の破壊を示すか調べた。その結果, Table I に示すように actinomycin D, adriamycin, bleomycin, mitomycin C および vincristine の存在下で, BCG 誘導マクロファージ, または多形核白血球は腫瘍細胞の破壊を示した。調べた薬剤濃度では, 腫瘍細胞に対する直接破壊はみられなかった。次に有効な薬剤の dose response を食細胞の存在する群と, しない群で調べた (Fig. 1)。

Actinomycin D 存在下 ($1.5\text{--}25 \mu\text{g/ml}$), BCG 誘導マクロファージと多形核白血球は MM46 腫瘍細胞破壊を示し, bleomycin ($25\text{--}100 \mu\text{g/ml}$) は BCG 誘導マクロファージとの共存下, 破壊活性がみられた。これらの濃度内で, 腫瘍細胞や食細胞が, 薬剤によって直接破壊されることはなかった。また adriamycin, mitomycin C は高濃度域において腫瘍細胞に直接毒性を示したが, 直接毒性のあらわれない濃度において, BCG 誘導マクロファ

TABLE I. Drug-Dependent Cellular Cytotoxicity

Drug ($\mu\text{g/ml}$)		% of cytotoxicity ^{a)}		
		Glycogen-macrophages	BCG-macrophages	Polymorphonuclear leukocytes
Actinomycin D	(2.5)	14.1 ± 1.5^b	25.3 ± 0.4^b	49.6 ± 0.7^b
Adriamycin	(12)			17.7 ± 6.7^b
	(20)	-0.4 ± 2.5	57.3 ± 2.2^b	
Bleomycin	(25)	2.6 ± 5.4	10.9 ± 3.7^b	1.4 ± 1.6
Cyclophosphamide	(20)	-4.1 ± 2.7		5.6 ± 1.9
5-Fluorouracil	(100)	-2.1 ± 2.2		0.5 ± 1.0
Mitomycin C	(25)			-0.9 ± 0.7
	(50)	-0.1 ± 0.9	40.0 ± 1.9^b	8.4 ± 0.1
Vincristine	(5)			14.4 ± 4.4^b

a) Glycogen-, or BCG-induced macrophages, or polymorphonuclear leukocytes were cocultured with ^{51}Cr -labeled MM46 tumor cells for 16 h in the presence of various chemotherapeutic drugs.

b) Significant tumor lysis.

ージは腫瘍細胞破壊を示した。このように、薬剤依存により食細胞群が細胞破壊を示す現象を drug-dependent cellular cytotoxicity; DDCC と呼ぶことにする。

II 癌細胞に対する癌化学療法剤の前処理効果

癌化学療法剤の存在により、マクロファージ、多形核白血球が腫瘍細胞を破壊すること (DDCC) を示したが、その効果が、癌化学療法剤で癌細胞を前処理することによってもみられるか検討した。

Table II に示されるように、BCG 誘導マクロファージは actinomycin D (1, 5 $\mu\text{g/ml}$), adriamycin (10 $\mu\text{g/ml}$), mitomycin C (2 $\mu\text{g/ml}$) および bleomycin (5 $\mu\text{g/ml}$) で前処理された腫瘍細胞の破壊を示した。また多形核白血球は actinomycin D (1 $\mu\text{g/ml}$) 前処理腫瘍細胞の破壊を示したが、共存下で有効であった adriamycin, vincristine の前処理は無効であった。

我々は抗腫瘍抗体、レクチンの存在により、食細胞が効率良く腫瘍を破壊することを明らかにしているが、^{7,10)}その系においても、癌化学療法剤の前処理によって、感受性の上昇がみられるか調べた (Table III)。

レクチン依存のマクロファージによる腫瘍細胞破壊反応の系では、actinomycin D (1, 5 $\mu\text{g/ml}$) およ

び adriamycin (10 $\mu\text{g/ml}$) の癌細胞前処理により、未処理癌細胞の破壊に比べ、破壊の上昇がみられた。また抗腫瘍抗体依存のマクロファージ媒介腫瘍細胞破壊の系では、adriamycin (2, 10 $\mu\text{g/ml}$), vincristine (2 $\mu\text{g/ml}$), bleomycin (5 $\mu\text{g/ml}$) および mitomycin C (2 $\mu\text{g/ml}$) 前処理により、未処理細胞に比べ破壊の増強がみられた。

III 癌化学療法剤の宿主細胞に対する効果

癌化学療法剤による標的細胞に対する効果 (感受性の上昇) を調べてきたが、癌化学療法剤の宿主細胞に対する効果も考える必要がある。実際、mitomycin C, adriamycin などは *in vivo* において宿主マクロファージに作

Fig. 1. Drug-Dependent Cellular Cytotoxicity

Phagocytes and ^{51}Cr -labeled tumor cells were cultured with the indicated dose of anti-cancer drug for 16 h. Δ ; actinomycin D+tumor+macrophages, ∇ ; actinomycin D+tumor+polymorphonuclear leukocytes, $\blacktriangle$; actinomycin D+tumor, $\square$; bleomycin+tumor+macrophages, $\blacksquare$; bleomycin+tumor, $\circ$; adriamycin+tumor+macrophages, $\bullet$; adriamycin+tumor, $\diamond$; mitomycin C+tumor+macrophages, $\blacklozenge$; mitomycin C+tumor.

TABLE II. Effects of Drug-Pretreatment on Phagocyte-Mediated Tumor Lysis

Drug ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	% of cytotoxicity		
	BCG-macrophages		Polymorphonuclear leukocytes
	Exp. I	Exp. II	
None (0)	0 $\pm$ 1.1	10.5 $\pm$ 1.4	-6.0 $\pm$ 1.8
Actinomycin D (1)	15.8 $\pm$ 7.2 ^{b)}		13.7 $\pm$ 5.0 ^{b)}
(5)	32.3 $\pm$ 3.8 ^{b)}		
Adriamycin (2)	-6.6 $\pm$ 2.8		-5.7 $\pm$ 0.1
(10)	11.9 $\pm$ 4.2 ^{b)}		0.6 $\pm$ 2.4
Mitomycin C (2)		24.1 $\pm$ 0.8 ^{b)}	-6.2 $\pm$ 2.0
(10)		10.8 $\pm$ 3.5	
Bleomycin (5)		24.4 $\pm$ 1.5 ^{b)}	-5.9 $\pm$ 0.2
(25)		1.4 $\pm$ 1.8	
Vincristine (10)			0.4 $\pm$ 1.6

a) Tumor cells were pretreated with each drug and assayed for phagocyte-mediated tumor lysis.

b) Significant tumor lysis.

TABLE III. Effects of Drug-Pretreatment on Mediator-Dependent Phagocyte-Mediated Tumor Lysis

Drug ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)		% of cytotoxicity ^{b)}	
		Lectin-dependent cytotoxicity	Antibody-dependent cytotoxicity
None	(0)	45.0 $\pm$ 7.0	50.7 $\pm$ 2.2
Actinomycin D	(1)	61.0 $\pm$ 4.1 ^{c)}	59.7 $\pm$ 11.7
	(5)	70.5 $\pm$ 4.4 ^{c)}	70.0 $\pm$ 19.2
Adriamycin	(2)	44.4 $\pm$ 2.7	67.7 $\pm$ 7.2 ^{c)}
	(10)	60.4 $\pm$ 4.0 ^{c)}	71.1 $\pm$ 2.6 ^{c)}
Vincristine	(2)	51.6 $\pm$ 4.6	77.2 $\pm$ 2.0 ^{c)}
	(10)	49.8 $\pm$ 2.0	53.5 $\pm$ 1.1
Bleomycin	(5)	53.9 $\pm$ 6.1	72.4 $\pm$ 4.6 ^{c)}
Mitomycin C	(2)	53.2 $\pm$ 4.8	80.9 $\pm$ 2.4 ^{c)}
	(10)	34.4 $\pm$ 0.4	60.1 $\pm$ 14.0

a) Tumor cells were pretreated with each drug and washed before use.

b) Tumor lysis was determined in weat germ agglutinin (25 $\mu\text{g/ml}$)-dependent or antitumor antibody (10 $\mu\text{g/ml}$)-dependent macrophage-mediated system.

c) Significant tumor lysis.

用し、それらマクロファージは *in vitro* において腫瘍を殺す活性を有することが報告されている.^{11,12)} したがってここでは、*in vitro* において DDCC を示し、*in vivo* において宿主マクロファージとの相互作用が報告されていない bleomycin について検討した。

Fig. 2 に示されるように、正常腹腔細胞は腫瘍細胞を破壊することはなかったが、bleomycin 接種後、1 日で得た腹腔細胞には、腫瘍細胞を直接破壊する活性がみられた。さらに Table IV に示すように、actinomycin D, adriamycin 接種 1 日後の腹腔細胞には、多形核白血球の増加がみられ、量的にも食細胞が影響を受けていると思われる。

IV 癌化学療法剤と腫瘍壊死血清の共存による殺癌作用

食細胞の殺癌作用を担う攻撃因子の 1 つとして、腫瘍壊死因子が知られている.¹⁸⁾ したがって上述した食細胞と癌化学療法剤による有効な殺癌反応が、腫瘍壊死因子と癌化学療法剤の共存によっても再現されるのか否か調べた (Table V, VI)。

腫瘍壊死因子の誘導には、通常細菌糖脂質 (lipopolysaccharide) が使用されるが、¹⁸⁾ OK432 も同程度の腫瘍壊死活性を示すことから、本実験ではより毒性の低い OK432 を用いた。

Table V に示すように、腫瘍壊死因子を含むと考えられる腫瘍壊死血清と、actinomycin D, adriamycin, mi-

Fig. 2. Antitumor Activity of Bleomycin-Induced Peritoneal Cells

○; tumor+antitumor antibody (10 $\mu\text{g/ml}$)+bleomycin-induced peritoneal cells, ●; tumor+antitumor antibody+normal peritoneal cells, △; tumor+bleomycin-induced peritoneal cells, ▲; tumor+normal peritoneal cells.

TABLE IV. Effects of Anti-cancer Drugs on Peritoneal Cells

Drug ^{a)} (mg/kg)		Total cell number $\times 10^{-6}/\text{mouse}$	Cell composition (%)		
			Macrophages	Lymphocytes	Polymorphonuclear leukocyte
None	(0)	2.6 $\pm$ 0.3	55	43	2
Actinomycin D	(0.3)	2.3 $\pm$ 0.1	45	32	23 ^{b)}
Adriamycin	(10.0)	9.3 $\pm$ 1.8 ^{b)}	44	21	35 ^{b)}
Bleomycin	(3.5)	2.6 $\pm$ 0.7	42	55	3
Mitomycin C	(1.5)	1.8 $\pm$ 1.0	41	52	9
Vincristine	(0.1)	2.3 $\pm$ 0.4	42	58	1

a) Each drug was injected peritoneal cavities of C3H/He mice and peritoneal cells were obtained 24 h later.

b) Significant increase.

tomycin C などの癌化学療法剤の共存により、有効な殺癌活性がみられた。腫瘍壊死血清または癌化学療法剤単独では、癌細胞の破壊はみられなかった。Adriamycin (4, 20 $\mu\text{g/ml}$) の存在においては、腫瘍壊死血清は 12500 倍の希釈でも有効であった (Table VI)。

考 察

本論文において、食細胞とある種の癌化学療法剤が共存することによって、腫瘍細胞が *in vitro* において効率良く破壊されることを明らかにした。特に BCG で誘導したマクロファージは、glycogen で誘導したものより活性が強かった。通常 BCG で誘導されたマクロファージは活性化状態が高いことから、この系においてもより有効に働いたと思われる。

この薬剤依存による食細胞の腫瘍破壊 (DDCC) のメカニズムには、癌化学療法剤による腫瘍細胞の不活性化と、宿主細胞に対する活性化の 2 つの作用が考えられる。前者に対しては、本研究において明

らかにされたように、癌細胞の前処理効果、あるいは腫瘍壊死血清を用いた cell-free 系でも反応が進行することから理解される。癌細胞の不活性化、その結果としての感受性の上昇が何に起因するか、現時点では不明であるが、DNA, RNA, 蛋白合成とは直接関係がないと思われる。⁸⁾ 抗体と補体に対する感受性上昇の系では、癌細胞側の脂質代謝に関係することが報告されており、¹⁴⁾ 食細胞の系においてもその点の研究が必要と思われる。

先に述べたように、近年、adriamycin, mitomycin C などの癌化学療法剤は、宿主細胞、特にマクロファージなどの食細胞を *in vivo* において活性化し、腫瘍細胞を *in vitro* で破壊することが知られている。^{11,12)} 本研究においても、bleomycin 接種により腫瘍細胞を破壊する腹腔細胞が得られ、bleomycin も *in vivo* において食細胞系を活性化していると思われる。このような bleomycin による腹腔細胞の活性化は、細川らのラットの系の最近のデータと一致する。¹⁵⁾

また我々は、actinomycin D, adriamycin によって多形核白血球が一過性に上昇することを示した (Table III) が、癌化学療法剤 (抗生物質) も高等生物にとっては異物であり、その異物性に応じて食細胞が質的、量的に影響を受けることは想像に難くない。したがって異物性を認識した食細胞が局所に増加したり、活性化したりして、

TABLE V. Cooperation between Anti-cancer Drug and Tumor Necrosis Serum in Killing Tumor Cells

Drug ($\mu\text{g/ml}$)	Addition of tumor necrosis serum ^{a)}	Cytolysis (%) ^{b)}
None	—	0
None	+	0.8 $\pm$ 0.6
Actinomycin D (10)	—	-5.5 $\pm$ 3.5
Actinomycin D (10)	+	19.4 $\pm$ 3.1 ^{c)}
Adriamycin (20)	—	5.5 $\pm$ 4.7
Adriamycin (20)	+	57.8 $\pm$ 2.2 ^{c)}
Bleomycin (50)	—	1.4 $\pm$ 0.2
Bleomycin (50)	+	-4.6 $\pm$ 3.7
Mitomycin C (20)	—	1.2 $\pm$ 0.2
Mitomycin C (20)	+	10.6 $\pm$ 0.4 ^{c)}
Vincristine (20)	—	0 $\pm$ 0
Vincristine (20)	+	3.3 $\pm$ 1.4

a) Tumor necrosis serum was finally diluted to 1/400.

b) Cytolysis was determined by ⁵¹Cr-release after 16 h-incubation.

c) Significant tumor lysis.

TABLE VI. Cooperation between Adriamycin and Tumor Necrosis Serum in Killing Tumor Cells

Adriamycin ($\mu\text{g/ml}$)	% of cytolysis ^{a)}					None
	20	100	500	2500	12500	
20	100	100	94	94	84	<2
4	83	74	55	37	35	<2
0.8	29	23	10	15	<2	<2
0.16	7	<2	<2	<2	<2	<2
0.03	8	<2	<2	<2	<2	<2
0	<2	<2	<2	<2	<2	<2

a) Tumor cells were cocultured with adriamycin and tumor necrosis serum for 16 h. Cytolysis was determined by morphological changes of target tumor cells. Bubbles were observed with dead cells.

腫瘍細胞を非特異的に破壊する現象はあり得ることだと考えられる。さらに通常食細胞は DNA 合成をせず、癌化学療法剤に比較的抵抗性であるのも有利な点である。

別に我々が報告するように、宿主にとって異物とは、その生体にないもの、分解されにくいものがその必要条件である。¹⁶⁾ 癌化学療法剤もこのような異物と考える。また我々は、免疫調節剤と同じように、ある種の癌化学療法剤が血清 L_B 蛋白産生を促す異物性を有することを観察している。¹⁷⁾ このように、癌化学療法剤の *in vivo* での効果を考えるためには、従来の分裂毒という観点のみならず、宿主食細胞との関係を調べることも今後大切であると考えられる。

謝辞 実験の一部を担当した小林正児氏に感謝致します。

引用文献および注

- 1) 札幌国際がんセミナーにて一部発表, 札幌, 1983 年 7 月. E. Mihich, Y. Sakurai, H. Kobayashi, *Cancer Res.*, **43**, 6109 (1983).
- 2) S. H. Ohanian, M. Yamazaki, S. I. Schlager, M. Faibisch, *Cancer Res.*, **43**, 491 (1983).
- 3) S. I. Schlager, S. H. Ohanian, T. Borsos, *Cancer Res.*, **37**, 765 (1977).
- 4) M. Segerling, S. H. Ohanian, T. Borsos, *Science*, **188**, 55 (1975).
- 5) M. Ikenami, S. Tsunawaki, D. Mizuno, M. Yamazaki, *Gann*, in press.
- 6) N. Iwata-Dohi, M. Esumi-Kurusu, M. Ikenami, K. Sadatsune, D. Mizuno, M. Yamazaki, *Cancer Res.*, **42**, 3196 (1982).
- 7) M. Yamazaki, H. Shinoda, D. Mizuno, *Gann*, **67**, 651 (1976).
- 8) S. Tsunawaki, M. Ikenami, D. Mizuno, M. Yamazaki, *Gann*, **74**, 265 (1983).
- 9) 池並通裕, 山崎正利, 薬誌, **103**, 1298 (1983).
- 10) M. Kurisu, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Cancer Res.*, **40**, 3798 (1980).
- 11) T. Ogura, H. Shindo, M. Namba, Y. Yamamura, *Gann*, **71**, 920 (1980).
- 12) F. Martin, A. Caignard, O. Olsson, J. F. Jeannin, A. Leclerc, *Cancer Res.*, **42**, 3851 (1982).
- 13) E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3666 (1975).
- 14) S. I. Schlager, S. H. Ohanian, *J. Immunol.*, **125**, 508 (1980).
- 15) M. Hosokawa, K. Morikawa, M. Takimoto, Y. Suzuki, Y. Fujii, H. Kobayashi, *Sapporo Cancer Seminar*, **3**, 8 (1983).
- 16) K. Morikawa, Y. Kikuchi, S. Abe, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Gann*, **75**, 370 (1984).
- 17) O. Yoshioka, S. Abe, Y. Masuko, D. Mizuno, *Gann*, **72**, 471 (1981).