



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 乳酸菌菌体外酵素により合成される抗腫瘍性多糖SPR-901の作用メカニズムに関する研究                                       |
| Author(s)           | 竹田, 保之                                                                            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                            |
| Dissertation Number | 乙第4835号                                                                           |
| Issue Date          | 1995-09-29                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3083800">https://doi.org/10.11501/3083800</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/51291">https://hdl.handle.net/2115/51291</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 000000291417.pdf                                                                  |





乳酸菌菌体外酵素により合成される抗腫瘍性多糖  
SPR-901の作用メカニズムに関する研究

竹田 保之



①

目次

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 第1章 序論                  | 1  |
| 第1節 乳酸菌とがん              | 2  |
| 第2節 乳酸菌由来の抗腫瘍性多糖        | 3  |
| 第3節 SPR-901の概要          | 4  |
| 第2章 SPR-901の抗腫瘍作用       | 5  |
| 第1節 動物実験による抗腫瘍作用        | 6  |
| 第2節 細胞実験による抗腫瘍作用        | 7  |
| 第3章 SPR-901の抗腫瘍作用のメカニズム | 8  |
| 第1節 免疫調節作用              | 9  |
| 第2節 細胞増殖抑制作用            | 10 |
| 第3節 細胞死誘起作用             | 11 |
| 第4章 結論                  | 12 |
| 参考文献                    | 13 |
| 索引                      | 14 |
| 謝辞                      | 15 |
| 略称                      | 16 |
| 英文要約                    | 17 |
| 英文目次                    | 18 |

竹田 保之



# 目次

|                                              | ページ   |
|----------------------------------------------|-------|
| 第1章 序論                                       | 1-13  |
| 第1節 B R M (Biological Response Modifiers) とは | 1     |
| 第2節 B R Mと生体防御機構との関わり                        | 5     |
| 第3節 乳酸菌由来抗腫瘍性多糖 S P R-901の特徴                 | 8     |
| 第4節 リステリア菌およびM e t h A腫瘍に対する宿主防御系            | 11    |
| 第5節 本研究の目的                                   | 13    |
| 第2章 S P R-901によるマウスにおけるリステリア菌<br>感染防御効果の増強   | 14-27 |
| 第1節 試薬、材料ならびに実験方法                            | 15    |
| 第2節 結果                                       | 18    |
| 第3節 考察                                       | 24    |
| 第4節 要約                                       | 27    |
| 第3章 S P R-901によるマクロファージの機能に及ぼす影響             | 28-52 |
| 第1節 試薬、材料ならびに実験方法                            | 30    |
| 第2節 結果                                       | 37    |
| 第3節 考察                                       | 48    |
| 第4節 要約                                       | 52    |
| 第4章 S P R-901の抗腫瘍効果におけるメカニズムの解析              | 53-77 |
| 第1節 試薬、材料ならびに実験方法                            | 55    |
| 第2節 結果                                       | 61    |
| 第3節 考察                                       | 73    |
| 第4節 要約                                       | 77    |
| 第5章 総括                                       | 78-88 |
| 第1節 S P R-901の多糖体としての特徴                      | 78    |
| 第2節 S P R-901の免疫賦活作用のメカニズム                   | 80    |
| 第3節 本研究の意義                                   | 85    |
| 第4節 これからの課題                                  | 87    |
| 謝辞                                           | 89    |
| 参考文献                                         | 90    |



# 本論文で使用した略記号

BCG ; *Bacillus Calmette-Guerin*

BRM ; Biological Response Modifiers (生物学的応答修飾物)

CFU ; Colony Forming Units

DFR ; Delayed Footpad Reaction (遅延型足跡反応)

IFN ; Interferon

i. d. ; intradermal(ly)

i. p. ; intraperitoneal(ly)

Ig ; Immunoglobulin

IL ; Interleukin

LAK ; Lymphokine Activated Killer

LN ; Lymph Node (リンパ節)

LPS ; Lipopolysaccharide

LYM ; Lymphocytes (リンパ球)

mAb ; Monoclonal Antibody

MHC ; Major Histocompatibility Antigen (主要組織適合性抗原)

MON ; Monocytes (単球)

mRNA ; Messenger Ribonucleic Acid

Mφ ; Macrophages

NK ; Natural Killer

PEC ; Peritoneal Exudate Cells

PMN ; Polymorphonuclear Leukocytes (多形核白血球)

S. D. ; Standard Deviation

TdR ; Thymidine

TNF ; Tumor Necrosis Factor



## 第1章 序論

### 第1節 B R M (Biological Response Modifiers) とは

生体は外界からの侵入物はもとより、生体内で生じた異常産物に対して生体の恒常性を維持するために、それ进行处理・排除する反応力を有している。この生体の持つ防御機能を賦活させることにより抗腫瘍効果を示す物質についての研究は古くからなされている。現在、それらの物質は総称して生物学的反応修飾物 (BRM ; Biological Response Modifiers) と呼ばれており、菌体とその成分、植物多糖体、種々のサイトカイン類、さらに免疫細胞そのものによる治療も含め、Table 1-1に示すよう多岐にわたっている。

B R Mは生体防御機構を支える液性、細胞性の諸因子に影響を及ぼし、結果的に制癌作用を示す物質である。生体防御機構のバランスは防御能の強さと排除されるべき異物量との比として表すことができる (Fig. 1-1)。従来の抗生物質や抗腫瘍薬はFig. 1-1の分母を減少させバランス値を大きくする薬剤ととらえることができる。一方、B R Mは分子の値を大きくすることによりバランス値を大きくさせる薬剤と考えられる。

現在、シイタケ由来の多糖体であるレンチナンやスエヒロタケ由



Table 1-1 A list of major BRM

|                      |                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 免疫増強剤                | <p>細菌類 : BCG、<i>Corynebacteri parvum</i>、OK-432<br/> <i>Lactobacillus casei</i>、N-CWS</p> <p>菌体成分 : リポ多糖体 (LPS)、MDP誘導体</p> <p>多糖類 : レンチナン、シゾフィラン、グリフォラン<br/>         酵母グルカン・マンナン、キチン・キトサン</p> <p>糖タンパク : PSK</p> <p>低分子物質 : ベスタチン、レバミゾール</p> |
| インターフェロン<br>およびその誘起剤 | <p>IFN-<math>\alpha</math>、IFN-<math>\beta</math>、IFN-<math>\gamma</math>、<br/>         Poly IC、Pyran copolymer</p>                                                                                                                          |
| サイトカイン               | <p>IL-1、IL-2、IL-3<br/>         コロニー刺激因子 (CSFs)<br/>         腫瘍壊死因子 (TNF)</p>                                                                                                                                                                 |
| 胸腺ホルモン               | <p>サイモシン Fr5、サイモシン Fr<math>\alpha</math></p>                                                                                                                                                                                                 |
| 抗腫瘍性免疫細胞             | <p>マクロファージ、NK細胞、LAK細胞</p>                                                                                                                                                                                                                    |
| その他                  | <p>モノクローナル抗体、腫瘍抗原、骨髄移植</p>                                                                                                                                                                                                                   |

文献 1) より引用、一部改変



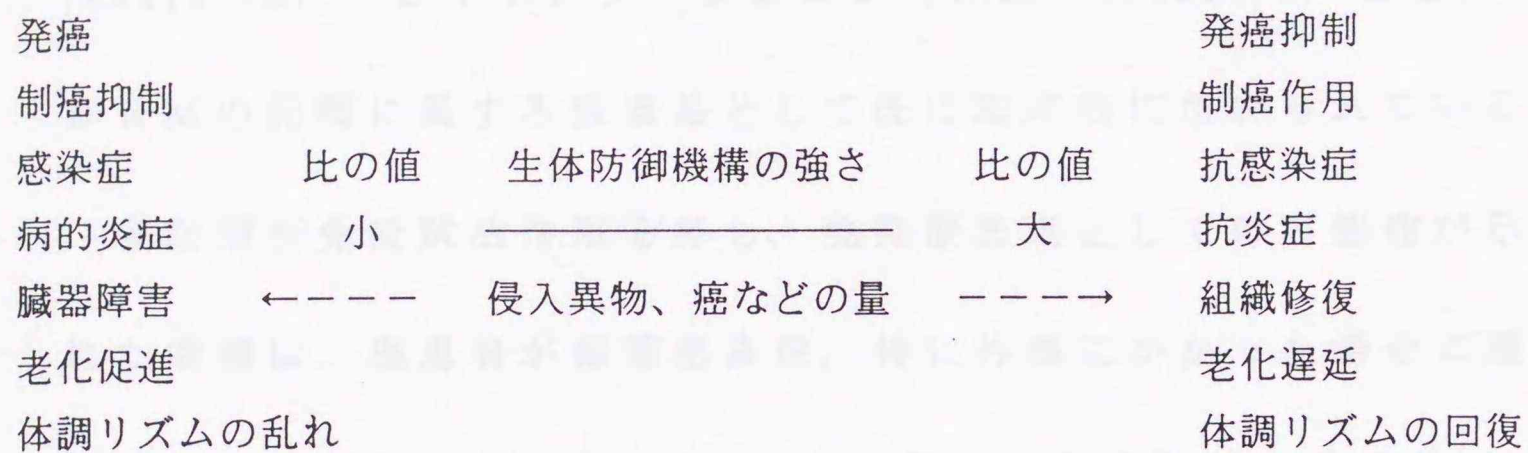


Fig. 1-1 生体防御機構のバランス（文献 2）より引用）



来のシゾフィラン、タンパク質と多糖の複合体であるカワラタケ由来のPSK、溶連菌製剤であるOK-432、放線菌由来の低分子物質ベスタチン、サイトカインであるインターロイキン (Interleukin; IL) -2 やインターフェロン (Interferon; IFN) などがBRMの範疇に属する医薬品として既に臨床的に用いられている。

多糖類が免疫賦活作用を持ち、免疫療法剤としての可能性が示された端緒は、癌患者が細菌感染症、特に丹毒にかかった場合に腫瘍の退縮が見られたというColeyによる報告である<sup>3, 4)</sup>。その後、Shearらは霊菌の培養濾液を用いて、Coley toxinの活性は多糖体画分にあることを報告したため<sup>5)</sup>、抗腫瘍性成分の研究は多糖体とそれ以外の物質との二方向に関して行われるようになった。その後、宿主の細網内皮系の機能亢進作用をもつ酵母細胞壁成分、ザイモザンの抗腫瘍性に関して多くの研究がなされてきた<sup>6-10)</sup>。わが国では、高等植物であるササの多糖体成分が宿主介在性の抗腫瘍性を有することがNakaharaら<sup>11)</sup>、Sakaiら<sup>12)</sup>により明らかにされて以来、1960年代後半から、ササのアルカリ抽出体<sup>13)</sup>、バガス多糖体<sup>14)</sup>、ヘミセルロース<sup>15)</sup>、地衣類多糖体<sup>16)</sup>などについて、宿主介在性抗腫瘍活性の検討が盛んに行われてきた。そのなかでも特に担子菌由来の多糖体に関しての研究が多くなされてきた。Chiharaらはシイタケから<sup>17)</sup>、またKomatsuらはスエヒロタケから<sup>18)</sup>強い抗腫瘍活性を



有する $\beta$ -グルカン（それぞれレンチナン、シゾフィランン）を見  
いだしている。また、マイタケやチョレイマイタケ由来のグリフォ  
ラン<sup>19, 20)</sup>や菌核菌由来のSSG<sup>21)</sup>、チャヒラタケ由来の $\beta$ -グル  
カン<sup>22)</sup>などが単離されており、その抗腫瘍活性についても報告がな  
されている。酵母からはグルカンのみならずマンナンなどにも強い  
抗腫瘍活性があることをHashimotoらが報告している<sup>23)</sup>。また  
Tokoroらは多糖体だけでなくキチンやキトサンの水溶性オリゴ糖が  
抗腫瘍活性を示すことを報告している<sup>24)</sup>。このような背景のもと、  
多糖体の免疫賦活作用の研究は、わが国が他国に先んじた形となっ  
て今日に至っている。

## 第2節 B R Mと生体防御機構との関わり

近年の免疫学およびバイオテクノロジーの発展に伴い、B R Mの  
作用機序の解明が進んでいる。免疫反応を司る細胞は主に骨髄幹細  
胞に由来し、分化・成熟の後それぞれの細胞として機能を獲得する。  
免疫担当細胞の分化・成熟あるいは活性化はこれらの細胞から産生  
されるサイトカインと呼ばれるタンパク質因子と細胞同士の接着に  
よる相互作用とにより調節されており、いわゆる免疫カスケードを  
形成し、活性化と抑制とのバランスをとりながらさまざまな異物、  
種々の抗原に対して免疫応答を繰り返している（Fig. 1-2）。免疫



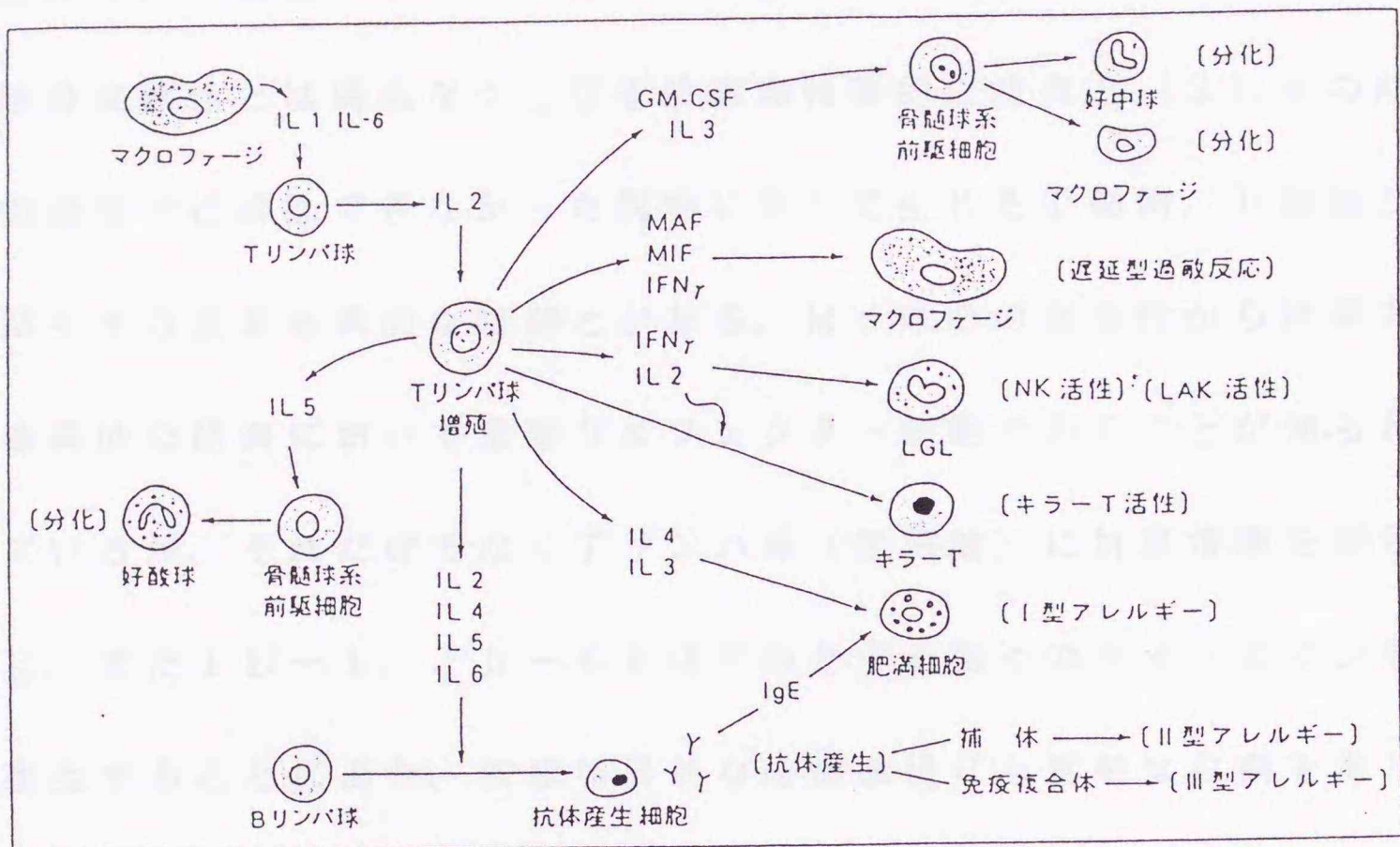


Fig. 1-2 A scheme of immune cell and cytokine interaction  
(文献 95)より引用, 一部改変)

- GM-CSF : Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
- IFN : Interferon
- Ig : Immunoglobulin
- IL : Interleukin
- LAK : Lymphokine Activating Killer
- MAF : Macrophage Activating Factor
- MIF : Migration Inhibition Factor
- NK : Natural Killer



賦活作用を持つ多くの多糖体は、これらの免疫担当細胞の中でもマクロファージ（Mφ）の機能を活性化させることが知られている。生体の防御機構には1）異物の貪食性、殺菌性の強い細胞による異物の抗原性とは関係なく生じる抗原非特異的な防御と、2）その防御機構では排除できなかった異物に対して生じるT細胞、B細胞が関与する抗原特異的な防御とがある。Mφはその貪食性から抗原非特異的な防御において重要なエフェクター細胞であることが知られているが、それだけでなくTリンパ球（T細胞）に抗原情報を提示し、またIL-1、IL-6をはじめとする種々のサイトカインを産生することにより、抗原特異的な防御機構にも重要な役割を演じていることが明かとなってきた。従って、Mφの機能に及ぼすBRMの影響を検討する場合、この二つの防御機構それぞれに関係するMφの機能変化を調べる必要があると思われる。

生体防御系に働くBRMのメカニズムとしては、1）免疫担当細胞であるMφ、T細胞などに直接作用し活性化させ、腫瘍細胞障害活性や感染防御作用などを増強させる直接作用と、2）ある免疫担当細胞に働き種々のサイトカインの産生やそのレセプターの発現を促すことにより、免疫カスケードに沿って他の免疫担当細胞を順次活性化させ、最終的に効果を示す間接作用とが考えられる。シイタケ由来の多糖体レンチナンはMφに働きサイトカインの一種である



IL-1の産生を促し、さらにリンパ系細胞に対してはT細胞からのIL-2、IFN $\gamma$ の産生を促し、T細胞、NK細胞、M $\phi$ を活性化させ抗腫瘍性を発揮する<sup>28, 29)</sup>。さらにレンチナンは補体を活性化させ、炎症性の反応を引き起こし腫瘍周辺への免疫細胞の浸潤を高めることも報告されている<sup>30)</sup>。カワラタケ由来のシゾフィランもレンチナンと同様な作用機序により効果を発揮すると考えられている<sup>31-33)</sup>。OK-432やBCGの様な菌体由来のBRMはそれ自体が起炎性物質となり炎症性の免疫細胞を腫瘍周辺に集め活性化し、好中球からM $\phi$ そしてT細胞にいたる一連の免疫応答を動かし抗腫瘍性を発揮することが報告されている<sup>34)</sup>。これまでの各種BRMの作用機序に関する研究から、BRMを単に抗腫瘍剤だけとして考えるのではなく、このような免疫機能に及ぼす効果をより広く捉え、担癌状態における免疫機能の低下回復や、癌化学療法剤使用時の副作用の低減、あるいは自己免疫疾患への応用など免疫調節剤として考えられつつある。

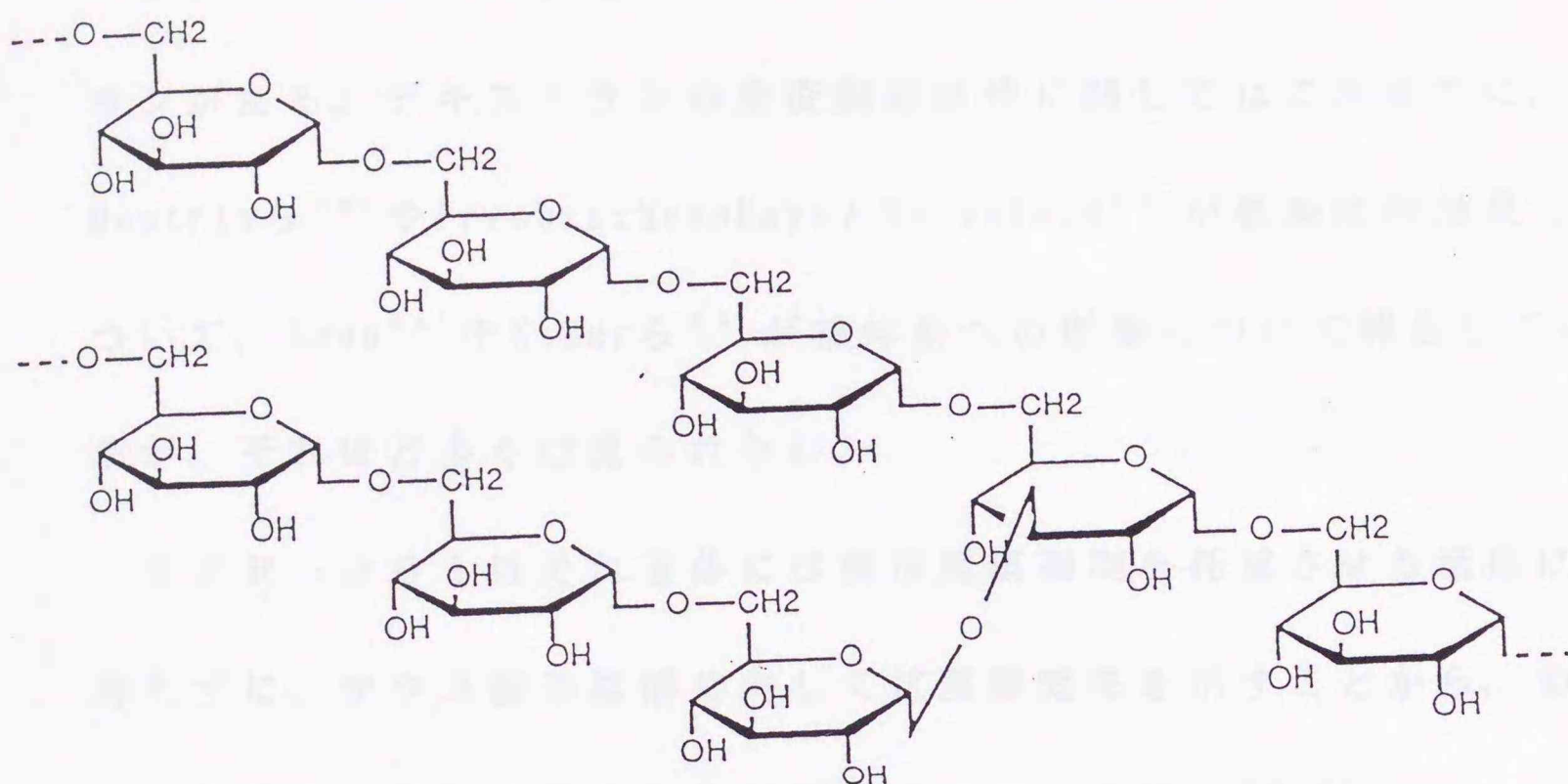
### 第3節 乳酸菌由来抗腫瘍性多糖SPR-901の特徴

これまで報告されてきた宿主介在性抗腫瘍多糖体は全て $\beta$ -グルカンである。しかし、本研究で用いた多糖体はこれまで知られている免疫賦活性の多糖体とは異なり、グルコースのみを構成糖とし $\alpha$ -



1, 6 結合からなる直鎖に約 5 % の  $\alpha$  - 1, 3 結合の分岐を有するデキストランと良く似た  $\alpha$  - グルカンで (Fig. 1-3), 平均分子量約 1 千万、糖含量 97 % 以上の白色無晶性、無味無臭の物質である。この物質は当初、米糠の熱水抽出物中より発見された抗腫瘍性多糖として R B S (Rice Bran Saccharide) と命名された<sup>25)</sup>。その後、陰イオン交換樹脂非吸着性のフラクションに主要活性物質が分画されることが分かり、この画分は R O N と命名された<sup>26)</sup>。この多糖体 R B S および R O N はマウスにおいて腹腔内投与だけでなく、純粋多糖体としてほとんど例がない経口投与においてもマウスの同種腫瘍 s a r c o m a - 1 8 0 や、同系腫瘍である M e t h A、L e w i s 肺癌に対して抗腫瘍効果を持つことが示された<sup>26)</sup>。しかしながら、本多糖体の米糠中の含有量は少なく、大量に調製するには多大な労力が必要とされていた。しかし近年、本物質は米糠中に存在している乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*) により生成されたもので、その菌が培養液中に分泌する酵素 (dextran sucrase) により無細胞的に合成できることが判明し、均一な物質の大量生産が可能となった<sup>27)</sup>。このように多糖体 R O N はタンパク質などを含まない純粋多糖であり、また経口投与でも免疫調節作用を示し、かつ毒性も少ないという利点から、新しいタイプの B R M としての開発を目的に、S P R - 9 0 1 というコー





M.W. ; ca.  $1 \times 10^7$  Da (only  $\alpha$ -D-glucose)  
 Branching ; ca. 5% of  $\alpha$ -1,3 linkage

Fig. 1-3 Structure of SPR-901



ドネームで臨床試験が行なわれた（以下この多糖体をSPR-901と呼ぶ）。

SPR-901と構造的に類似している $\alpha$ -グルカンにデキストランがある。デキストランの免疫調節活性に関してはこれまでに、Hestrinら<sup>52)</sup>やPreobrazhenskayaとRosenfeld<sup>53)</sup>が感染防御効果について、Leon<sup>54)</sup>やKiserら<sup>55)</sup>が補体系への影響について報告しているが、それほど多くは見られない。

SPR-901はそれ自体には直接腫瘍細胞を死滅させる活性は持たずに、マウス固形腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことから、宿主介在性のBRMであることが証明されているほか<sup>26, 27)</sup>、N-ethyl-N-nitro-N-guanidineによる発癌を抑制すること<sup>47)</sup>、また現在最もよく使用されている抗癌剤の一つである5-FU投与による末梢血白血球減少をマウスにおいて抑制することも分かっている<sup>48)</sup>。免疫薬理学的にはSPR-901を投与することにより、脾臓細胞からのサイトカインの一種であるIL-2の産生が正常および担癌マウスにおいて上昇することや<sup>49)</sup>、担癌マウスにおける脾臓細胞のIL-2反応性低下の回復すること<sup>50)</sup>、M $\phi$ の腫瘍細胞増殖抑制作用を増強させること<sup>51)</sup>などが明らかにされている。

#### 第4節 リステリア菌およびMeth A腫瘍に対する宿主防御系



B R M の作用メカニズムの解析には、*in vivo*における抗腫瘍効果や感染防御効果などと、*in vitro*における免疫担当細胞の機能変化の測定との両面からのアプローチが必要とされる。B R M は生体の免疫機能を賦活することから抗腫瘍効果だけでなく感染防御効果も示すものが多い。感染実験には、リステリア菌、大腸菌、緑膿菌などがよく用いられている。中でもリステリア菌の感染防御においてはMφとT細胞が重要な役割を担っていることが知られている。リステリア菌感染初期には貪食能や殺菌性の強いMφが、後期にはT細胞による免疫応答とT細胞由来のMφ活性化因子により活性化されたMφがエフェクター細胞として働いている<sup>35-38)</sup>。従って、B R M の投与によるリステリア菌に対する感染防御効果を解析することは、そのB R M の作用機序の解明の一端と成りうるため、多くのB R M においてリステリア菌に対する感染防御作用が報告されている<sup>39-42)</sup>。

一方、抗腫瘍効果においては使用される実験腫瘍の種類や担癌時期により関与するエフェクター細胞は異なるが、その中でもT細胞は抗腫瘍免疫応答において中心的役割を果たしているものと考えられている<sup>43)</sup>。B A L B / c マウスの同系腫瘍であるM e t h A はメチルコランズレンにより誘導された繊維肉腫で、B R M の抗腫瘍効果の判定によく用いられている実験腫瘍の一つである。本腫瘍に



対するエフェクター細胞としてはMφとT細胞が重要であることが報告されており<sup>44-46)</sup>、細胞レベルでの解析はBRMの抗腫瘍効果におけるメカニズム解明に有用な情報を与えるものと思われる。

## 第5節 本研究の目的

SPR-901の作用メカニズムにおいて現在まで、他のβ-グルカンタイプの抗腫瘍性多糖体と同様に、生体中の免疫担当細胞の中でもMφを活性化させている可能性が示唆されている<sup>49, 51)</sup>。しかしながら、抗腫瘍免疫応答に中心的な役割を果たしていると考えられるT細胞を含めた免疫応答をSPR-901がどのように増強させ、そして抗腫瘍活性を示すのか、またその流れの中でMφのどのような機能に変化があるのか、など、その詳細はまだ良く分かっていない。

そこで本研究は、乳酸菌の酵素により合成された抗腫瘍性多糖SPR-901のリステリア菌に対する感染防御効果とMeth A腫瘍に対する抗腫瘍効果について免疫学的および生化学的手法を用いて解析することにより、SPR-901の免疫賦活作用メカニズムを明らかにするだけでなく、今後臨床開発を進める上で有用な情報を提供することを目的として行った。



## 第2章 SPR-901によるマウスにおけるリステリア菌感染防御効果の増強

多くのBRMにおいて細菌に対する感染防御効果を増強することが報告されている<sup>39-42)</sup>。*Listeria monocytogenes* (リステリア菌) はBRMの感染防御作用の検討によく用いられる細菌の一つである。リステリア菌の感染防御において、リステリア菌感染早期には抗原非特異的に殺菌作用を示すMφの集積が重要な防御因子となる<sup>35, 36)</sup>。一方、感染後期になるとその非特異的な防御を逃れたリステリア菌を排除するためにT細胞を中心とした免疫応答が起こるため、T細胞とT細胞から産生されるサイトカインにより活性化されたMφがその防御に重要であることが知られている<sup>37, 38)</sup>。従って、Mφに作用するBRMであればリステリア菌に対する感染防御効果を調べることにより、その特徴をより明確にできると考えられる。

SPR-901の作用機序解明のため、まずSPR-901のリステリア菌に対する感染防御効果に及ぼす影響をマウスを用いて *in vivo* において検討した。



## 第1節 試薬、材料ならびに実験方法

### 1-1 動物

7-12週齢の雌性BALB/Cマウス（SLCより購入）を用いた。  
購入後最低1週間予備飼育を行い実験に使用した。

### 1-2 微生物

九州大学生体防御医学研究所免疫学教室にて保存している  
*Listeria monocytogenes* EGD株を用いた。本菌をBALB/cマウス腹腔内に接種した後、3～5日目に脾臓を取り出し、ガラスホモジナイザーによりリン酸緩衝食塩液（PBS、pH 7.1～7.2）とともにホモジナイズして、その懸濁液を再度マウス腹腔内に接種した。  
このサイクルを3度繰り返した後、同様にして得た生菌をtryptic soy 液体培地（Difco）にて37℃で1晩培養し、菌体をPBSに懸濁し使用するまで-70℃で保存した。リステリア死菌は生菌を100℃で30分間加熱して調製した。

### 1-3 SPR-901の調製

SPR-901（RBS）はサッポロビール（株）医薬開発研究所生産技術研究部において、Takeoらの報告<sup>26)</sup>による方法によって



調製されたものを用いた。すなわち、米糠の熱水抽出物をDEAE-Sephrose CL6Bカラムに通して、その非吸着画分として得られたもので、グルコースを単一の構成糖とし、 $\alpha$ -1,6結合からなる直鎖に約5%の $\alpha$ -1,3結合の分岐を有する分子量約1千万、糖含量97%以上の多糖体である。本物質は米糠より分離された乳酸菌(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*)の菌体外酵素(dextran suclase)により生成されることが明らかにされており、物理化学的性質ならびに生物活性も同等であることが分かっている<sup>27)</sup>。LPSは1 pg/mg以下しか含まれていないものを使用した。

#### 1-4 SPR-901の投与

SPR-901を蒸留水に溶解し、経口用ゾンデを用いて経口投与した。投与量は特に言及しない限り30 mg/kg/dayとし、10日間連続投与した。これは抗腫瘍効果を示す投与条件に合わせた<sup>26)</sup>。

#### 1-5 リステリア菌の接種および接種後の生死判定

所定量のリステリア菌をPBSに懸濁し、マウスの腹腔内に接種した。接種後8日間その生死を確認した。50%致死量(LD<sub>50</sub>)の計算はReedとMuenchの方法に従って算出した<sup>56)</sup>。



#### 1-6 肝臓、脾臓および腹腔中の生存リステリア菌数の測定

リステリア菌を接種後所定の日マウスを頸動脈を切断して屠殺し、腹腔内にPBSを10 ml注入してよく揉んだ後回収した。次に開腹して肝臓と脾臓を摘出し、それらの臓器を10 mlのPBSとともにガラスホモジネーターにより機械的に破碎した。腹腔回収液および臓器ホモジネートを適当倍に希釈し、その0.1 mlをプラスチックシャーレに作製した0.4%グルコースを含む肉汁寒天培地（栄研）プレートに塗布し、37℃で20時間培養した。培養後生じたコロニー数を計測して生菌ユニット数（CFU ; colony forming unit）とした。

#### 1-7 遅延型足蹠反応

致死量以下のリステリア菌（ $10^3$  CFU）を腹腔内に接種してから5～10日目に片方の後肢足蹠にリステリア死菌（ $5 \times 10^7$  CFU）を皮下接種した。反対側の後肢足蹠はコントロールとしてPBSを皮下投与した。24時間後に足蹠の厚さをダイヤルゲージにて測定しコントロールとの差を反応値とした。

#### 1-8 統計学的手法

統計学的有意差はStudentのt-検定によって求めた。危険率（P値）5%未満を有意差ありとした。



## 第2節 結果

### 2-1 SPR-901投与によるリステリア菌に対する抵抗性の 増強

#### 1) リステリア菌接種後の生存率

リステリア菌接種後の生存率に及ぼすSPR-901の影響を検討した。SPR-901を10日間経口投与後、リステリア菌 ( $1.8 \times 10^5$  CFU) を腹腔内に接種し経時的に生死判定した。コントロール群では接種4日目に半数以上が死亡したが、SPR-901投与群では全数生存していた (Fig. 2-1)。

#### 2) リステリア菌接種後の腹腔内および肝臓、脾臓でのリステリア菌の増殖に及ぼすSPR-901の影響

リステリア菌接種後の腹腔内および肝臓、脾臓でのリステリア菌増殖の経時変化を調べた。コントロール群は接種後腹腔内、肝臓、脾臓においてリステリア菌は増殖を続け、7日目には全て死亡した。SPR-901投与群では腹腔内中の生菌数は接種後3日目より減少していた。また、肝臓内および脾臓内では接種後3日目まではリステリア菌の増殖が見られるが、それ以降減少した (Fig. 2-2)。



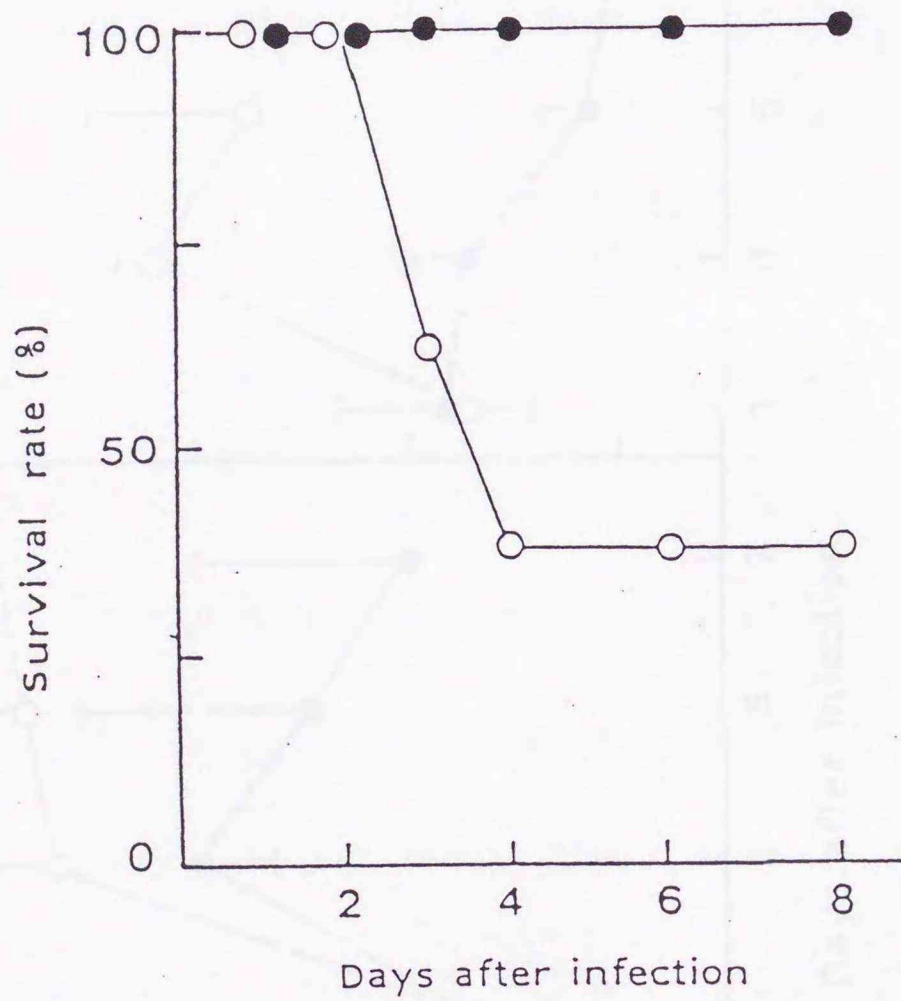


Fig. 2-1 Survival rate of untreated(○) and SPR-901-treated(●) mice inoculated i.p. with  $1.8 \times 10^5$  CFU *L. monocytogenes*



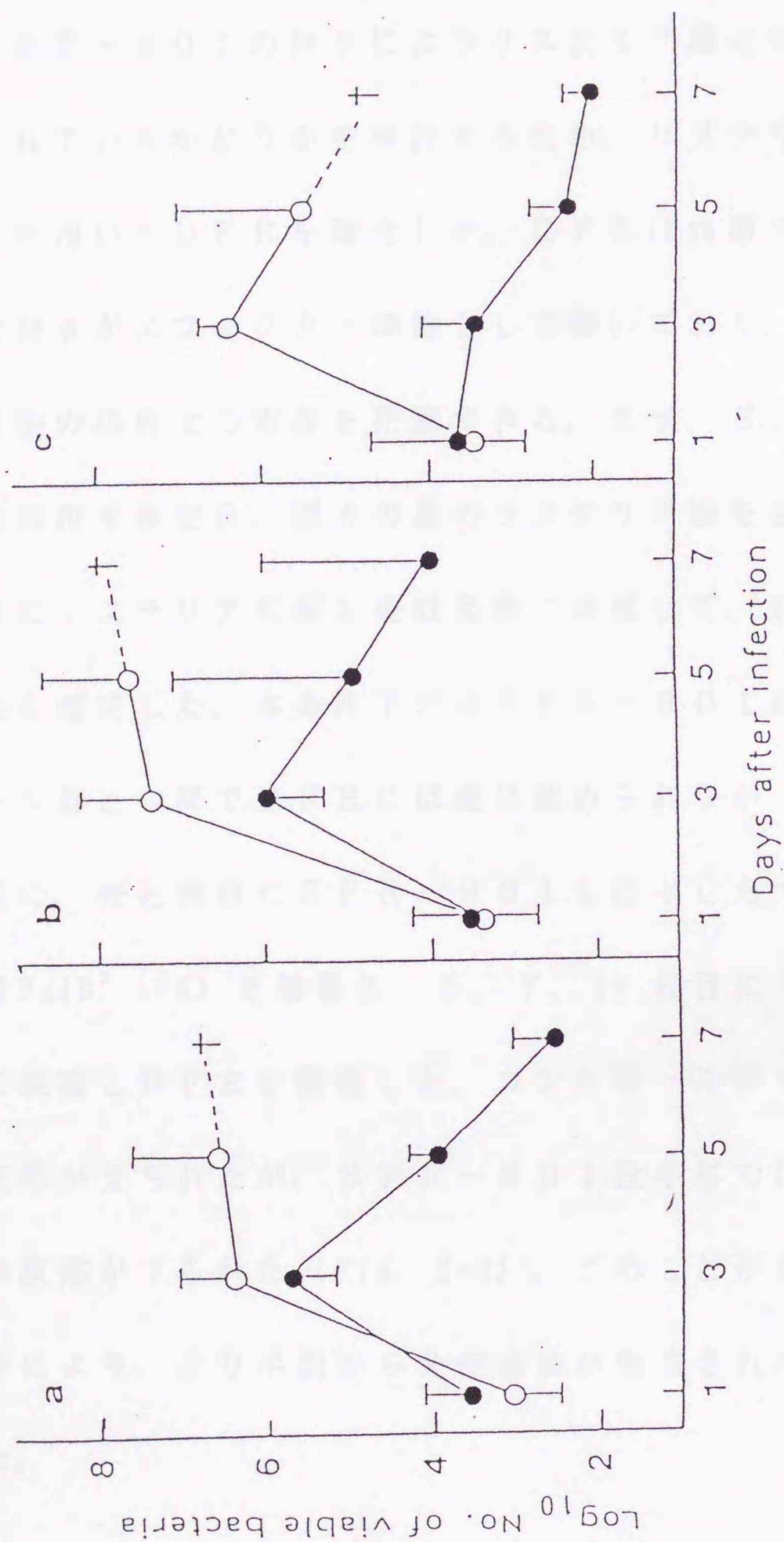


Fig. 2-2 Kinetics of the bacteria growth in the spleen(a), liver(b) and peritoneal cavity of untreated mice(○) and SPR-901-treated mice(●) after i.p. inoculation with *L. monocytogenes* ( $2.5 \times 10^5$  CFU). Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. (Standard Deviation) of five mice.



## 2-2 SPR-901投与によるリステリア感作マウスにおける

### 遅延型足蹠反応 (DFR) への影響

SPR-901の投与によりリステリア菌に対する免疫応答が増強されているかどうかを検討するため、リステリア菌を接種したマウスを用いてDFRを測定した。DFRは抗原で感作を受けたT細胞とMφがエフェクター細胞として働いており、DFRの強さからT細胞の活性化の程度を把握できる。まず、SPR-901を10日間経口投与後翌日、種々の量のリステリア菌を接種した。接種後10日目にリステリア死菌を後肢足蹠に接種して、20~24時間後にその腫脹を測定した。本条件下ではSPR-901経口投与群とコントロール群との間でDFRには差は認められなかった (Fig. 2-3)。

次に、先と同様にSPR-901を投与したマウスにリステリア菌 ( $3 \times 10^3$  CFU) を接種後、5、7、10日目にリステリア死菌を足蹠に接種しDFRを測定した。コントロール群では10日目に最も強い反応が見られたが、SPR-901投与群では7日目ですでに極大の反応が見られた (Fig. 2-4)。このことからSPR-901の投与により、より早期から免疫応答が増強されていることが示唆された。



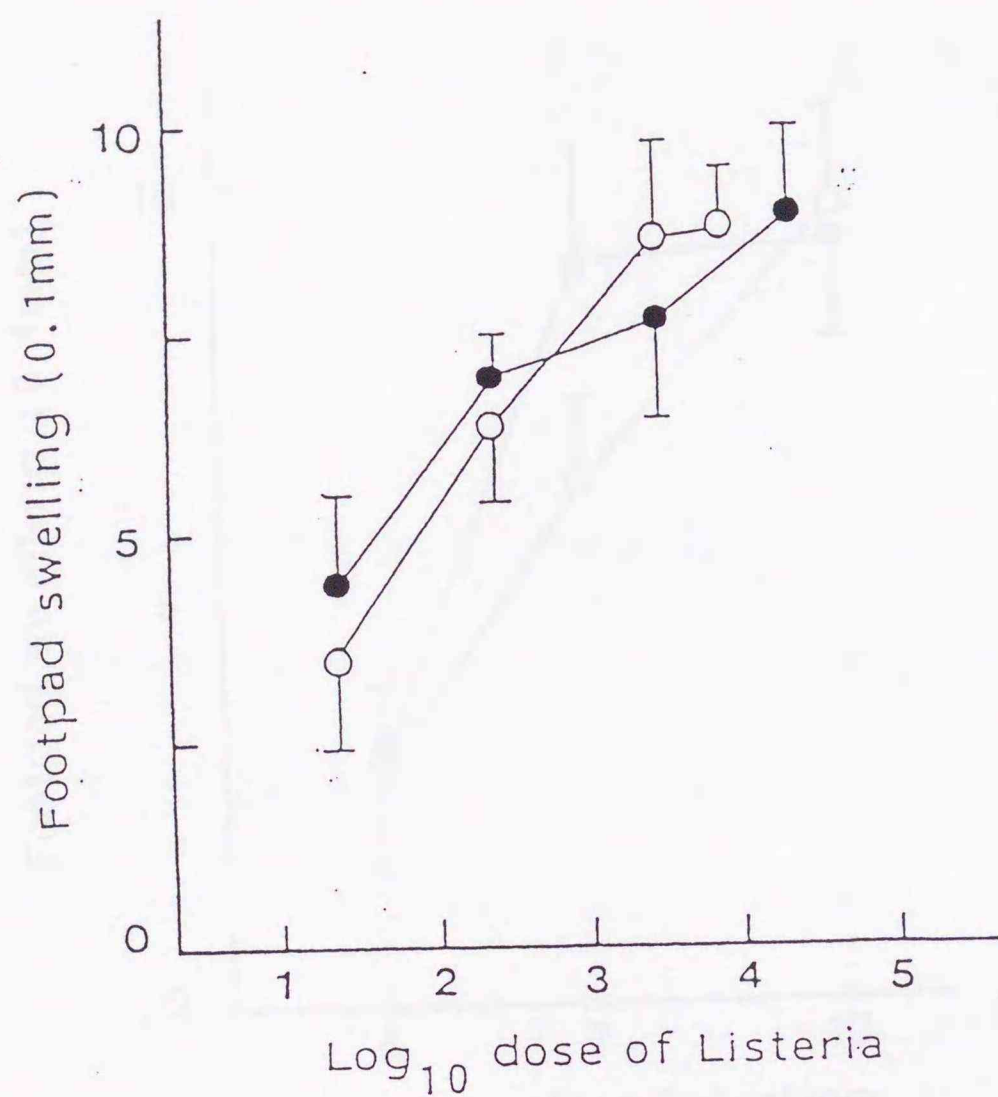


Fig. 2-3 Antigen dose-response curve of DFR to *L. monocytogenes* in untreated(○) and SPR-901-treated(●) mice. Mice were inoculated i.p. with various doses of *L. monocytogenes* on day 0 and DFR was measured on day 10. Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. of five mice.



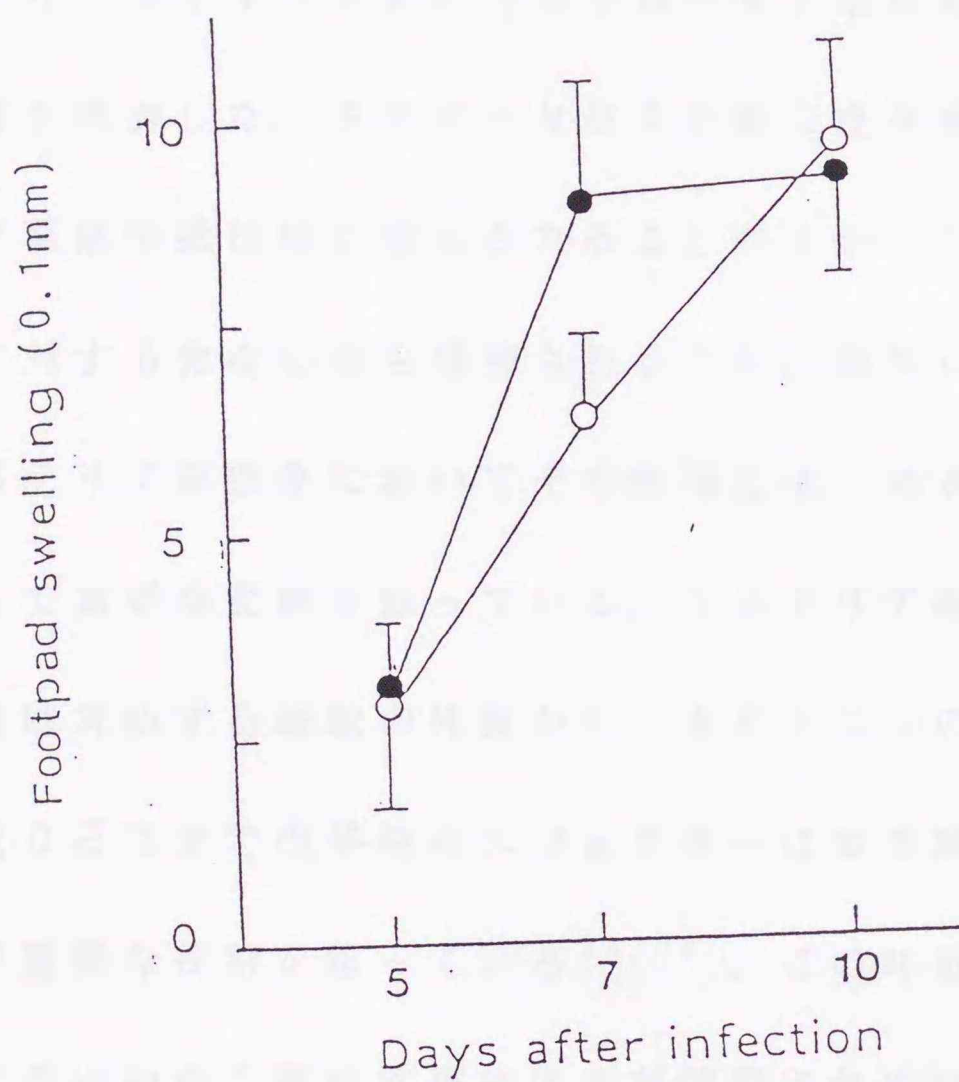


Fig. 2-4 Time course curve of DFR to *L. monocytogenes* in untreated(○) and SPR-901-treated(●) mice. Mice were inoculated i.p. with  $3 \times 10^3$  CFU of *L. monocytogenes* on day 0 and DFR was measured on day 5, 7 and 10. Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. of five mice.



### 第3節 考察

S P R - 9 0 1 の宿主免疫機能賦活作用のメカニズムを解析するにあたり、まずマウスにおけるリステリア菌に対する感染抵抗性への影響を検討した。S P R - 9 0 1 を経口投与することによりリステリア菌感染抵抗性が増強されることが分かった。また、リステリア菌に対する免疫応答も増強されることが判明した。

リステリア菌感染においてその防御には、Mφがエフェクター細胞として重要な役割を担っている。リステリア菌感染後の宿主の防御応答は対応する細胞の性質から、大きく二つの時期に分けられる。感染後3日目までの早期のエフェクターは貪食能や殺菌能に優れたMφが重要な役割を担っている<sup>35, 36)</sup>。この時期はまだT細胞を中心とするいわゆる細胞性免疫はまだ誘導されていないため、抗原非特異的な防御相と呼ばれる。感染後4-5日目以降になると抗原特異的な免疫応答が始まり、抗原感作されたT細胞により活性化されたMφがリステリア菌の排除に働く<sup>37, 38)</sup>。生体内でのリステリア菌の増殖を肝臓および脾臓で見ると、S P R - 9 0 1 を経口投与したマウスではリステリア菌は接種後3日目まではコントロールマウスと同程度の増殖が見られるがそれ以降の増殖は抑えられていた。従って、S P R - 9 0 1 の経口投与は非特異的防御期に働くMφの



機能を亢進させるのではなく、抗原特異的な免疫応答を増強させることによりリステリア菌に対する防御効果を増強させていることが示唆される。

このことはリステリア菌感作マウスにおける遅延型足蹠反応 (D F R) の結果からも支持される。ある抗原を接種し感作が成立すると個体はその抗原に対する反応性を獲得する。次に同じ抗原が接種された場合、最初の抗原刺激の時よりも早い免疫応答を起こすことができる。D F Rはその応答の一つで接種20~24時間後をピークとする腫脹反応である。反応の程度はエフェクター細胞の一つであるT細胞の活性、機能に左右されることから、反応の大きさを測定することにより免疫応答に及ぼすT細胞の状態をある程度推定することが可能である。抗原特異的な免疫応答を促進して感染防御効果を示すB C G菌体を投与した場合、D F Rがコントロール群に比べて感作後早期に極大となることが報告されている<sup>40)</sup>。S P R - 9 0 1を経口投与したマウスにおいても、コントロールと比較してD F Rが一次感作後早期に増強されていることから、抗原特異的な免疫応答が亢進しているものと思われる。

生体内における抗原特異的な免疫応答はT細胞とそれに抗原を提示する抗原提示細胞との相互作用の上に成り立っている。Mφは異物貪食能や殺菌能による抗原非特異的な防御作用だけでなく、抗原提



示細胞としても働き抗原特異的な免疫応答を調節する作用も持つことが近年明らかになってきた<sup>57)</sup>。SPR-901は抗原特異的な免疫応答を亢進させることが示唆されたが、この抗原提示細胞としてのMφ機能を高めているのか、またT細胞の機能を直接高めているのかまだ不明である。そこで次の章ではこのメカニズムをMφの機能面からさらに詳しく検討し、SPR-901の免疫賦活作用のメカニズムについて考察していくこととする。



#### 第4節 要約

$\alpha$ -グルカンタイプの多糖体であるSPR-901は経口投与することによりマウスにおける*Listeria monocytogenes*（リステリア菌）に対する感染抵抗性を増強させた。

リステリア菌感染後の肝臓および脾臓のリステリア菌の増殖を測定したところ、SPR-901を投与されたマウスでは感染後3日目以降に急速に減少していること、またリステリア菌に対する遅延型足蹠反応がSPR-901の投与により亢進されることから、SPR-901は抗原特異的な免疫応答を増強させることによりリステリア菌に対する感染抵抗性を高めていることが示唆された。



### 第3章 SPR-901のマクロファージの機能に及ぼす影響

マクロファージ (Mφ) とは細胞質に富む大型の単核細胞のことをその特徴である食作用から Metchnikoff が命名したものである<sup>58)</sup>。1969年に van Furth らが単核食細胞系の概念 (Mononuclear phagocytic system ; MPS) を提唱し、Mφ に関する統一的な見解が体系化された<sup>59, 60)</sup>。この概念の基本は、単核食細胞を粘着性の貪食細胞と定義し、炎症性のみならず全身に存在する組織固定性あるいは遊離性 Mφ が、すべて骨髓内の前駆細胞から成熟・分化した血中単球に由来するものであるとした点である。MPS に含まれる細胞としては、肺、脾臓、リンパ節、骨髓、腹腔、胸腔の固定性および遊離性の Mφ、肝のクッパー細胞、脳のミクログリア、骨の破骨細胞などがある。

Mφ の機能は

1. 細胞表面の糖鎖や Fc レセプター、補体レセプターを介して生体内の異物、細菌、腫瘍細胞を貪食したり殺傷する能力 (Phagocytosis)。
2. 貪食した物質を分解、消化しその抗原情報をリンパ球に伝達する能力 (Antigen presentation)。



3. 免疫応答遺伝子の機能により免疫担当細胞間の相互作用における遺伝的拘束を決定する能力 (Genetic regulation)。
4. 免疫反応の誘導および発現期に影響を及ぼす多くのタンパク質、サイトカイン、生理活性物質を分泌する能力 (Secretion)。

にまとめられる。これらの機能を介してMφは生体内で生じた異物の処理や侵入微生物に対する抗原非特異的防御作用とT細胞、B細胞との相互作用により免疫応答を調節する、抗原特異的防御作用の両方に深く関与している。

免疫賦活性の多糖体のほとんどは、Mφに作用しその機能を亢進させ非特異的防御作用および抗原特異的な免疫応答の増強により抗腫瘍効果、感染防御効果を発揮することが知られている<sup>61)</sup>。

第2章において抗腫瘍性多糖体SPR-901は経口投与により宿主の免疫応答を高め感染抵抗性を亢進させることを示した。本章ではこの作用を細胞レベルで解析するためSPR-901によるMφの機能変化を中心に検討した。



## 第1節 試薬、材料ならびに実験方法

### 1-1 動物

7-12週齢の雌性BALB/cおよびC3H/HeJマウス

(SLCより購入)を用いた。購入後最低1週間予備飼育を行い実験に使用した。

### 1-2 微生物

*Listeria monocytogenes* (リステリア菌) は第2章で記載した方法と同様な方法で調製したものを使用した。*Corynebacterium parvum*のホルマリンおよび熱処理菌体の懸濁液(コリネ死菌懸濁液)はMerieux研究所(Lyon, France)より供与されたものを用いた。

### 1-3 SPR-901の調製

SPR-901はサッポロビール(株)医薬開発研究所生産技術研究部において、Takeoらの報告<sup>26)</sup>による方法によって調製されたものを用いた。LPSは1 pg/mg以下しか含まれていないものを使用した。



#### 1-4 SPR-901の投与

SPR-901を蒸留水に溶解し、経口用ゾンデを用いて経口投与した。投与量は特に言及しない限り30 mg/kg/dayとし、10日間連続投与した。これは抗腫瘍効果を示す投与条件に合わせた<sup>26)</sup>。

#### 1-5 白血球細胞用培地

細胞培養用培地にはRPMI-1640培地(GIBCO社)に $5 \times 10^{-5}$ Mの2-メルカプトエタノール、10% NaHCO<sub>3</sub>(いずれも和光純薬)、100 U/mlのペニシリンG、0.1 mg/mlのストレプトマイシン(いずれも明治製菓)を添加して使用した。また必要な場合にはNU-SERUM(Collaborative Research)を添加して使用した(完全RPMI培地)。

#### 1-6 末梢血白血球数の測定

眼窩静脈叢よりヘパリン処理ヘマトクリット毛細管(テルモ社)にて採血し、チュルク液(和光純薬)で1/10に希釈して血球計算板にて測定した。また血液塗抹標本をスライドガラスを用いて作製し、ギムザ染色後顕微鏡下にてリンパ球、好中球、単球/Mφの割合を形態学的に判別した。



#### 1-7 腹腔内細胞の調製

マウス腹腔内に冷RPMI-1640培地を6～8 ml注入し、よく揉んだ後回収した。回収した腹腔内洗浄液を遠心分離（110g、5分）し細胞を集め、同培地により細胞を懸濁後再度遠心分離を行うことにより細胞を洗浄した（1回目の遠心分離操作により得た上清を腹腔内洗浄液とした）。この洗浄操作を2～3度行い、最後に完全RPMI培地に懸濁してトリパンプルー色素排除法により生細胞数を測定した。得られた腹腔内細胞の塗抹標本をスライドガラスを用いて作製し、ギムザ染色後顕微鏡下にてリンパ球、好中球、単球/Mφの割合を形態学的に判別した。この腹腔内細胞よりMφを得る場合は、プラスチックシャーレー（直径10 cm）に $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlの濃度に調整した細胞懸濁液を5～10 ml分注して、5%CO<sub>2</sub>下、37℃で1.5～2時間静置させた後、非付着細胞を除去し付着細胞を腹腔Mφとして用いた。

#### 1-8 Ia抗原陽性Mφの測定

カバーガラスを置いたプラスチックシャーレーに腹腔内細胞懸濁液を分注し、Mφをカバーガラスに付着させた。このカバーガラスを抗マウスIa抗体（Becton Dickinson社、5 μg/ml）を含む完全RPMI培地中で30分間、0℃で静置させた後、カバーガラスを同培地で



洗浄した。次にそのカバーガラスをFITC(fluorescein isothiocyanate)結合抗マウスIgG-F(ab')抗体 (Cappel社、1/100希釈) を含む完全RPMI培地中に30分間、0℃で静置した後洗浄し、-20℃に冷やした95%エタノールで固定した後、蛍光顕微鏡下で陽性細胞数を測定した。

#### 1-9 腹腔Mφの細菌貪食能と細胞内殺菌能の測定

*In vivo*における腹腔Mφの細菌貪食能と*in vitro*での細胞内殺菌能をリステリア菌を用いてVan FurthとVan Zwetの方法に従って測定した<sup>62)</sup>。すなわち、*L. monocytogenes*を0.1%ゼラチン(Difco社)、10% NU-SERUM含有のハンクス液に $10^6$  CFU/mlの濃度で懸濁し、その1 mlをマウス腹腔内に投与した。投与3分後にマウスを屠殺し、ヘパリン含有(10 U/ml) PBSを5 ml腹腔内に注入してよく揉んだ後回収した。遠心分離により得た細胞をPBSによる懸濁と遠心分離を3回繰り返し、細胞表面に付着しているリステリア菌を除去した。細胞を $2 \times 10^6$  個/mlに調整し、15分間37℃で完全RPMI培地中で培養した後、遠心分離により培地を除き、蒸留水を1 ml加え凍結融解を3回繰り返し細胞を破壊した。細胞破壊後の蒸留水中の生菌数を寒天プレートにて測定し細胞内細菌数とした。培養前の細胞内の細菌数を*in vivo*貪食能、培養15分後の細胞内細菌数の減少から以下の式



で計算した値を *in vitro*細胞内殺菌能とした。

細胞内殺菌能 (%) =

$$100 \times (0 \text{ 分時の細菌数} - 15 \text{ 分後の細菌数}) / 0 \text{ 分時の細菌数}$$

#### 1-10 腹腔内細胞の活性酸素産生能の測定

PMA (phorbol myristate acetate, Sigma社) を刺激剤として、ferricytochrome c還元法にて活性酸素 ( $O_2^-$ ) を測定した。腹腔内細胞をクレブスーリンガーリン酸緩衝液に  $10^6$  個/ml の濃度で懸濁した。この細胞懸濁液 1 ml を分光光度計用キュベットに入れ  $37^\circ\text{C}$  で 5 分間保温した後、7.5 mM の ferricytochrome c (FC-C, type VI Sigma 社) を  $10 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  の PMA を  $10 \mu\text{l}$  加え攪拌後、波長を 550 および 540 nm にセットした二波長分光光度計 (日立 200-20 型) のホルダーにキュベットを入れ  $37^\circ\text{C}$  で維持した。還元された FC-C の量を刺激剤添加後の吸光度の立ち上がり直線部分より求めた。FC-C の 540-550 nm での molar extinction coefficient は  $19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $O_2^-$  とは量比 1 : 1 の対応としてその産生量を測定した。

#### 1-11 mRNA 発現の測定 (ノザン法)

腹腔 Mφ よりグアニジンチオシアネート・CsCl 密度勾配遠心法<sup>63)</sup>



により (100,000g、20時間) RNA を調製した。10 $\mu$ g の RNA を 0.8% アガロースゲルにおいて電気泳動後、ナイロン性フィルター (Gene Screen Plus, NEN社) にブロッティングした。 [ $^{32}$ P]-ATP を用いて標識した IL- $\alpha$ <sup>64)</sup>、IL-1 $\beta$ <sup>65)</sup>、IL-6<sup>66)</sup>、TNF $\alpha$ <sup>67)</sup> の各プローブによりハイブリダイゼーション (65 $^{\circ}$ C、24時間) を行なった後、そのフィルターを X 線フィルム上で露光し (-70 $^{\circ}$ C) mRNA の発現の程度を調べた。これらのプローブはそれぞれ Dr. Lomedico、Dr. Gray、Dr. Van Snick そして Dr. Pennica より供与されたものを用いた。

#### 1-12 IL-1 活性の測定

腹腔内洗浄液中の IL-1 活性を C3H/HeJ マウス胸腺細胞の増殖により測定した。すなわち、 $1.5 \times 10^6$  個の胸腺細胞を 1000~2000 倍に希釈した phytohemagglutinin (Difco 社)、および希釈したサンプルとともに 96 穴平底マイクロプレート (Falcon 社) を用いて 5% CO<sub>2</sub> 下、37 $^{\circ}$ C で完全 RPMI-1640 培地中にて 72 時間培養した。培養終了 16 時間前に 18.5 KBq の [ $^3$ H]-Thymidine ([ $^3$ H]-TdR) を添加した。培養終了後セルハーベスターにて細胞をペーパーフィルターに回収し、液体シンチレーションカウンターにて細胞中に取り込まれた [ $^3$ H]-TdR 量を測定し増殖の指標とした。



#### 1-13 Mφの抗原提示能の測定

Mφの抗原提示能はFarrとUnanueの方法を用いた<sup>68)</sup>。すなわち、ある抗原を含む培地中でMφとその抗原に反応するT細胞を培養することによりT細胞の増殖を引き起こし、その増殖の程度をMφの抗原提示能とした。反応するT細胞はリステリア菌反応性のものをすなわち、 $10^3$  CFUのリステリア菌をマウス腹腔内に接種後7日目に腹腔内細胞を回収して、ナイロンウール（和光純薬）カラム非付着性の細胞を回収して、リステリア菌反応性T細胞とした。96穴平底マイクロプレート（Falcon社）を用いて、このT細胞（ $2 \times 10^5$ 個）を種々の細胞数のMφとともに、5% CO<sub>2</sub>下、37℃で熱処理したリステリア菌 $10^7$  CFU/mlを含む完全RPMI培地（計0.2 ml）中で4日間培養した。培養終了18時間前に37 KBqの [<sup>3</sup>H]-TdRを加え、培養終了後細胞ハーベスターを用いてペーパーフィルター上に細胞を回収し、T細胞に取り込まれた<sup>3</sup>H-TdRの放射活性をその増殖の指標とした。

#### 1-14 統計学的手法

統計学的有意差はStudentのt-検定によって行った。危険率（P値）5%未満を有意差ありとした。



## 第2節 結果

### 2-1 SPR-901投与による腹腔内細胞および血液内白血球 に及ぼす影響

SPR-901の経口投与によるマウス腹腔内および血液中の白血球数の変化と、ギムザ染色後の形態学的観察による白血球分画への影響について検討した。経口投与は測定日前日まで10日間行った。

SPR-901は腹腔内細胞に対して細胞数およびMφ/単球(MON)、リンパ球(LYM)および好中球(PMN)の白血球分画には影響を及ぼさなかった(Table 3-1)。

末梢血白血球に対しては細胞数には有意な差は認められなかったが、白血球分画においては好中球の割合が減少し、リンパ球の割合が上昇していた。単球/Mφの割合には変化はなかった(Table 3-1)。

### 2-2 SPR-901投与による腹腔MφのIa抗原発現に及ぼす影響

Mφによる外来性抗原の提示は細胞表面に存在する主要組織適合抗原(H-2)クラスII分子であるIa抗原に結合して行われる。従って、T細胞に抗原提示できるMφはIa抗原陽性である。そこ



Table 3-1 Characteristics of peritoneal exudate cells(PEC) and peripheral blood leucocytes(PBL) from untreated and SPR-901-treated mice

| Group     | No. of cell <sup>a</sup><br>(x10 <sup>6</sup> ) | Percentage of each<br>cell type |           |          | Percentage of<br>Ia positive Mφ |
|-----------|-------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|----------|---------------------------------|
|           |                                                 | PMN                             | LYM       | MON      |                                 |
| PEC       |                                                 |                                 |           |          |                                 |
| Untreated | 3.14±0.83                                       | 4.3±1.5                         | 49.6±3.8  | 46.2±4.3 | 2.7±1.1                         |
| SPR-901   | 4.25±1.63                                       | 4.0±3.7                         | 44.2±5.7  | 51.8±9.3 | 4.7±1.1                         |
| PBL       |                                                 |                                 |           |          |                                 |
| Untreated | 5.63±1.69                                       | 25.0±2.7                        | 73.0±2.2  | 2.0±0.7  |                                 |
| SPR-901   | 6.78±1.90                                       | 14.0±5.5*                       | 84.2±5.9* | 1.8±1.1  |                                 |

Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days. PEC and peripheral blood were recovered 24 hours after the final administration of SPR-901.

Each value represents the mean and S.D. of five mice.

PMN; polymorphonuclear leucocytes, LYM; lymphocytes, MON; monocytes/Mφ.

a; cells/mouse for PEC, cells/ml for PBL.

\*; P<0.05 significantly different from untreated group by Student's t-test.



で I a 抗原の発現に及ぼす S P R - 9 0 1 の影響を検討した。蛍光染色により I a 陽性の M φ 数を測定したが、S P R - 9 0 1 投与による影響は認められなかった (Table 3-1)。

### 2-3 S P R - 9 0 1 投与による M φ の貪食能と細胞内殺菌能に及ぼす影響

マウス腹腔内 M φ を用いて、M φ の異物処理機能に及ぼす S P R - 9 0 1 の影響を検討した。S P R - 9 0 1 の投与は 2-1 と同じとした。まずリステリア菌の貪食能と細胞内殺菌能を測定した。

S P R - 9 0 1 を経口投与したマウスの腹腔内細胞では、これらの機能に若干の増強傾向は見られるものの有意な差はなかった (Table 3-2)。

### 2-4 S P R - 9 0 1 投与による M φ の活性酸素産生能に及ぼす影響

M φ の非特異的な殺菌能を担う重要な因子として活性酸素 ( $O_2^-$ ) がある。そこでこの活性酸素の産生に及ぼす S P R - 9 0 1 の影響について検討した。S P R - 9 0 1 の投与は 2-1 と同じとした。

細胞内殺菌能の変化と同様に、S P R - 9 0 1 の経口投与は腹腔 M φ の活性酸素産生能に大きな影響を与えなかった (Table 3-3)。



Table 3-2 Effects of SPR-901 on *in vivo* phagocytosis and *in vitro* intracellular killing activity of macrophages

| Group     | No. of listeria/10 <sup>6</sup> PEC<br>after incubation(CFU) |                            | Intracellular<br>killing(%) |
|-----------|--------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|           | 0 min                                                        | (x10 <sup>6</sup> ) 15 min |                             |
| Untreated | 5.48±0.32                                                    | 2.82±0.23                  | 48.4±6.5                    |
| SPR-901   | 7.17±1.85                                                    | 2.97±0.18                  | 57.2±8.3                    |

Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days. The mice were i.p. inoculated with viable *L. monocytogenes* (10<sup>6</sup> CFU) 24 hours after the final administration of SPR-901. PEC of the mice were recovered 3 min after *L. monocytogenes* inoculation and incubated at 37°C for 15 min.  
PEC ; Peritoneal exudate cells.



Table 3-3 Effects of SPR-901 on generation of superoxide anion from PEC

| Group     | Superoxide anion<br>generation<br>(nmol of $O_2^-$ /min/ $10^6$ PEC) |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| Untreated | $0.08 \pm 0.08$                                                      |
| SPR-901   | $0.18 \pm 0.07$                                                      |

Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days. The peritoneal exudate cells were recovered 24 hours after final administration. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments.



## 2-5 SPR-901投与によるMφのサイトカインmRNAの 発現に及ぼす影響

Mφは生体の免疫応答の調節に関わる種々のサイトカインを分泌することが知られている。そこでマウス腹腔Mφのサイトカイン発現に及ぼすSPR-901の影響をノーザンブロット解析によりmRNAレベルで検討した。SPR-901の投与は2-1と同じとした。

IL-1 $\alpha$ のmRNA発現はSPR-901の経口投与により顕著に上昇していた (Fig. 3-1)。また、IL-1 $\beta$ およびIL-6のmRNA発現もSPR-901の経口投与により顕著に上昇していた (Fig. 3-2)。TNF $\alpha$ は無処置群のものに比べて若干の発現が見られるがIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびIL-6と比較するとその上昇は低かった (Fig. 3-2)。Mφ活性化剤として知られているコリネ死菌懸濁液を腹腔内投与し、4日後に得たMφのmRNAを陽性コントロールとして用いた。また、フィルター上のmRNA量を比較するため $\beta$ -actinの発現を測定して、mRNA量には差がないことを確認した。

## 2-6 SPR-901投与による腹腔内洗浄液中のIL-1活性 に及ぼす影響



RNA of macrophages from mice  
treated by

None SPR-901

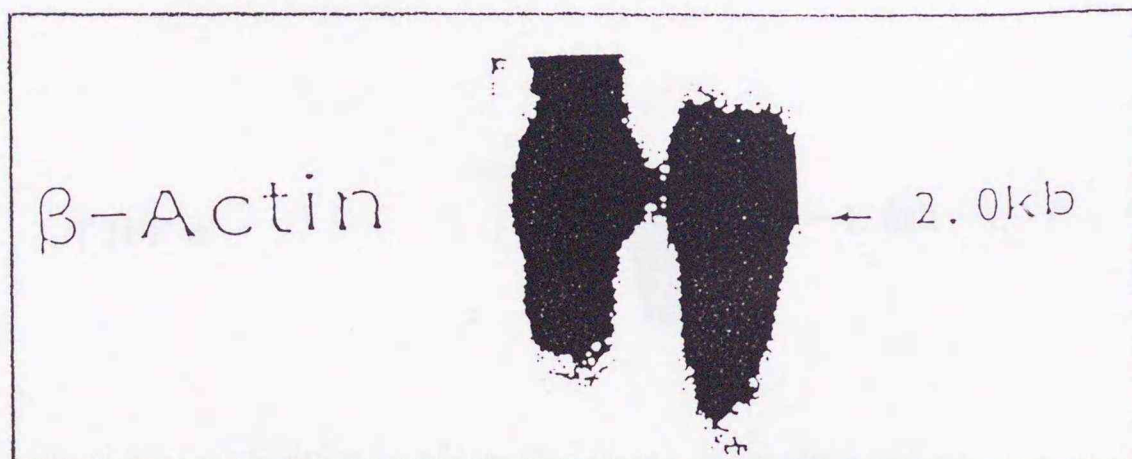
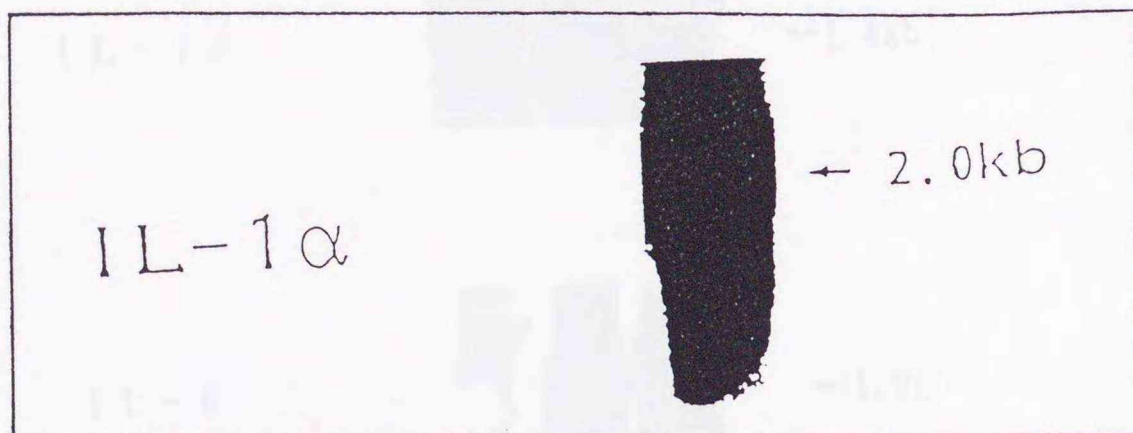


Fig. 3-1 Expression of IL-1 $\alpha$  gene in peritoneal macrophages  
Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days.  
The RNA of peritoneal macrophages were prepared 24 hours after  
final administration of SPR-901.



RNA of macrophages from mice  
treated by

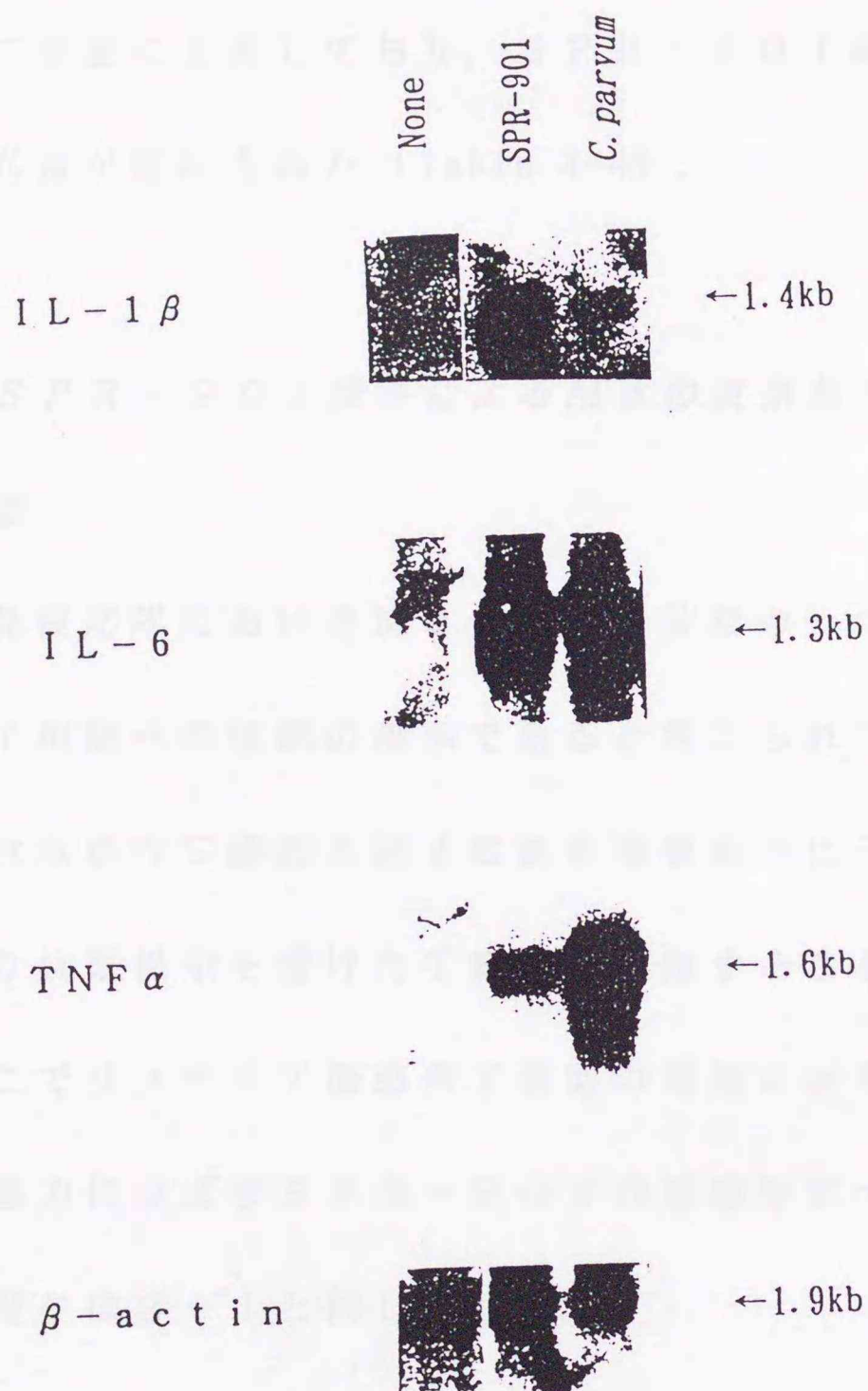


Fig. 3-2 Expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  genes  
in peritoneal macrophages

Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days.

The RNA of peritoneal macrophages were prepared 24 hours after  
final administration of SPR-901.



S P R - 9 0 1 を投与したマウスにおいてサイトカインの産生が上昇しているかどうか検討した。S P R - 9 0 1 を10日間経口投与したマウスの腹腔内洗浄液中の I L - 1 活性はコントロールマウスと比較して有意に上昇しており、S P R - 9 0 1 の投与により I L - 1 の産生亢進が認められた (Table 3-4)。

## 2 - 7 S P R - 9 0 1 投与による M $\phi$ の抗原提示能力に及ぼす影響

特異的免疫応答における M  $\phi$  の重要な役割の一つは、応答の初期における T 細胞への抗原の提示であると考えられている。 *In vitro* において抗原感作 T 細胞と M  $\phi$  の混合培養液中にその抗原を加えることにより抗原提示を受けた T 細胞が増殖することが見いだされている。そこでリステリア菌感作 T 細胞の増殖により測定した M  $\phi$  の抗原提示能力に及ぼす S P R - 9 0 1 の影響を調べた。S P R - 9 0 1 の投与は 2 - 1 と同じとした。

M  $\phi$  の細胞数を変化させリステリア感作 T 細胞の増殖を測定したところ、S P R - 9 0 1 を経口投与したマウスの M  $\phi$  は今回測定した細胞数 ( $10^2$  個から  $10^4$  個) の範囲において一様に T 細胞の増殖を高めた (Fig. 3-3)。



Table 3-4 IL-1 activity of supernatants from peritoneal exudates determined by C3H/HeJ thymocytes proliferation

| Group     | <sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm) |
|-----------|----------------------------------------|
| Untreated | 6,320 ± 570                            |
| SPR-901   | 10,940 ± 2,160*                        |

Mice were orally administered with SPR-901 for 10 days. Peritoneal exudates were collected 24 hours after the final administration of SPR-901. The diluted supernatants (1/32) and C3H/HeJ thymocytes were cultured for 3 days with PHA in complete RPMI-1640 medium. <sup>3</sup>H-TdR was added into the medium for last 16 hours.

Each value represents the mean ± S.D. of triplicate wells.

\*; P < 0.05 significantly different by Student's t-test.



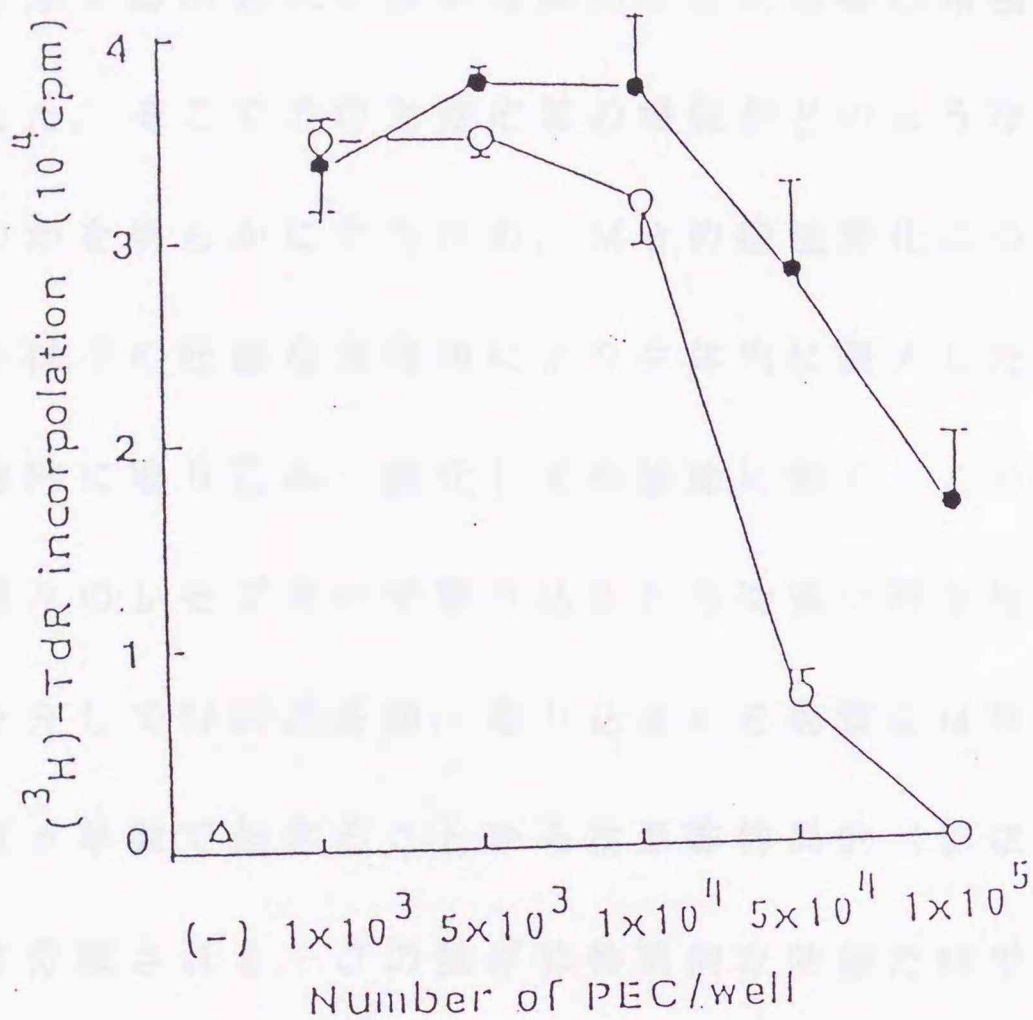


Fig. 3-3 The antigen presenting activity of adherent peritoneal exudate cells determined by *Listeria*-immunized T cell proliferation.

Varying number of adherent PEC from untreated mice (○) and SPR-901-treated mice (●) were cultured with *Listeria*-immunized T cells and heat-killed *L. monocytogenes* for 4 days in complete RPMI-1640 medium.

$^3\text{H}$ -TdR was added into the medium for last 18 hours.

Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. of triplicate wells.



### 第3節 考察

第2章においてSPR-901の経口投与によるリステリア菌に対する感染防御効果が抗原特異的な免疫応答の増強によることが示唆された。そこでこの免疫応答の増強がどのようなメカニズムで起きるのかを明らかにするため、Mφの機能変化について検討した。

Mφはその旺盛な食作用により生体内に侵入した細菌などの異物を細胞内に取り込み、消化しその排除に働く。この防御作用はMφ上の種々のレセプターや取り込まれる物質の疎水性と膜成分の相互作用を介して行われるが、取り込まれる物質には特異性がないこと、またMφ単独で起きることから抗原非特異的（非依存的）防御作用として分類される。この抗原非特異的な防御だけでは処理しきれない異物に対して、T細胞やB細胞などの免疫担当細胞も関与した防御作用が誘導される。これが抗原特異的な防御、いわゆる免疫応答と呼ばれるもので、抗原に対応できるTおよびB細胞のみの増殖を特徴とする。Mφのリステリア菌に対する貪食・殺菌能は、SPR-901の経口投与により影響を受けなかった。このことは第2章で示した感染後3日目までの抗原非特異的な防御時期におけるリステリア菌の増殖が、SPR-901投与群とコントロール群で差がなかった結果とも一致するものである。



抗原特異的な免疫応答においてはT細胞が中心的な役割を担っている。MφはこのT細胞に抗原を提示する作用を介して、抗原特異的な免疫応答の調節に関与している。抗原特異的な免疫応答におけるMφとT細胞との相互作用をFig. 3-4に示した。Mφによる抗原提示には大きく3段階のステップがある。1) 抗原を細胞内に取り込み、断片化する、2) 断片化した抗原分子をMHCクラスII分子と共に膜上に提示する、3) ヘルパーT細胞がこのMHC分子と抗原を認識し、活性化される。

S P R - 9 0 1 を投与したマウスのMφの抗原提示能力をリステリア菌抗原に特異的に反応するT細胞の増殖で測定したところ、その増殖は顕著に促進され、抗原提示能が亢進していることが判明した。S P R - 9 0 1 の投与はMφにおけるリステリア菌の貪食能、殺菌能には影響を及ぼさなかった。またMHCクラスII分子であるI a 抗原分子の発現にも影響を及ぼさなかった。従って、S P R - 9 0 1 によるMφの抗原提示能力の亢進は、I a 抗原分子とともに発現する抗原提示量を増加させているのではないと考えられた。

T細胞の増殖を実際に引き起こす因子はI L - 2 と呼ばれるT細胞自身から産生されるサイトカインである。S P R - 9 0 1 の投与によりI L - 1  $\alpha$ 、 $\beta$ およびI L - 6 などのサイトカインのm R N A の発現や産生を増強させていた。これらのサイトカインは



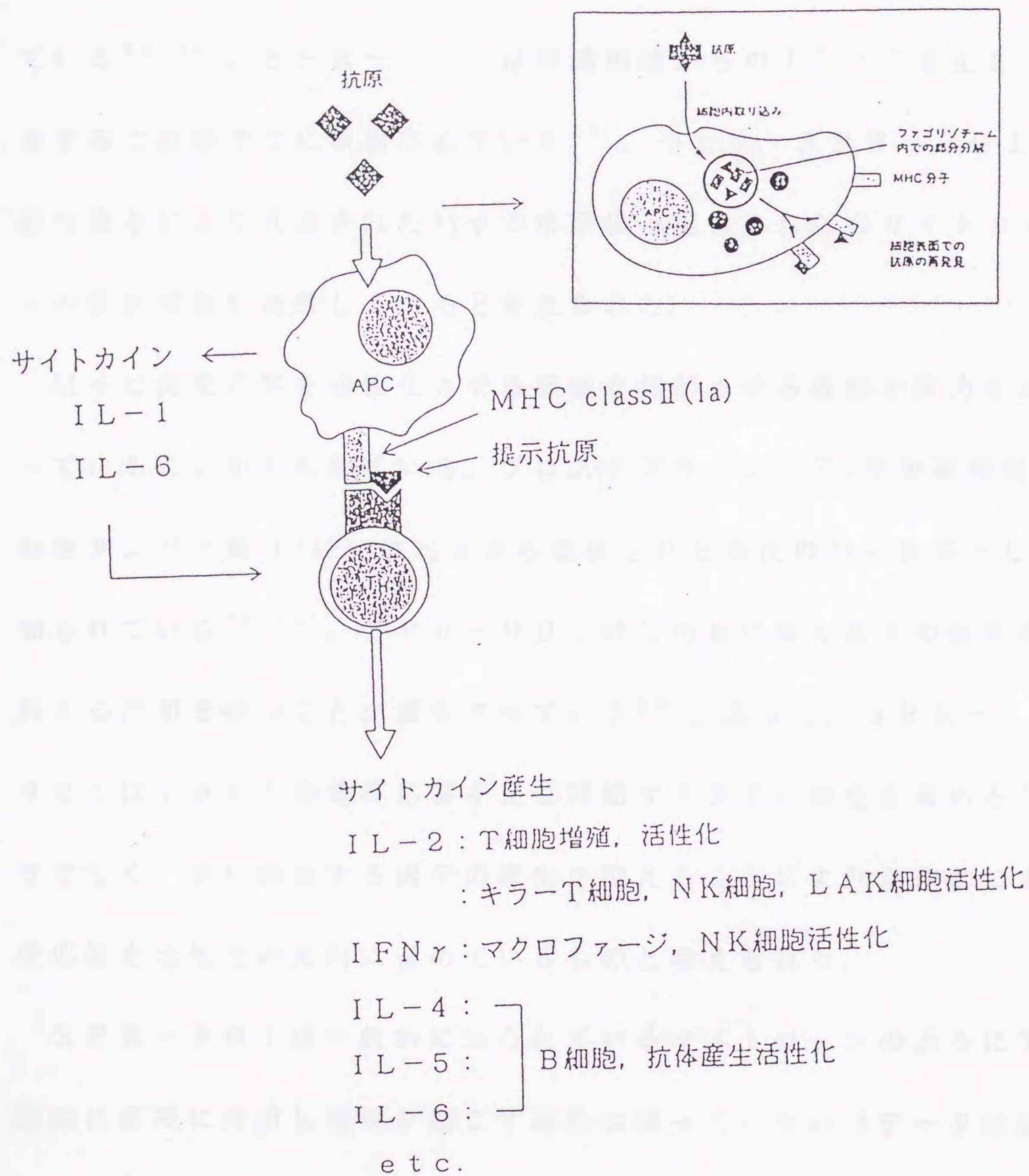


Fig. 3-4 Interaction between macrophage and T cell



T細胞からのIL-2産生に対して促進的に作用することが知られている<sup>69, 70)</sup>。SPR-901は脾臓細胞からのIL-2産生を増強することがすでに報告されている<sup>49)</sup>。つまり、SPR-901の経口投与により亢進されたMφの抗原提示能はこれらのサイトカインの産生増強に由来していると考えられた。

Mφは免疫応答を活性化させる機能と抑制させる機能の両方を持っていることが知られている。プロスタグランジンE<sub>2</sub>や免疫抑制性酸性タンパク質(IAP)はMφから産生される免疫抑制性物質として知られている<sup>71, 72)</sup>。SPR-901はこの負に働く因子の産生を抑える作用を持つことが報告されている<sup>50)</sup>。従って、SPR-901はMφからの免疫応答を正に調節する因子の産生を高めるだけでなく、負に調節する因子の産生を抑えることにより全体的に免疫応答を活性化の方向に進めているものと考えられる。

SPR-901は一般的に知られているマイトジェンのようにT細胞に直接に作用し増殖を起こす活性は持っていない(データは示していない)。従って、ここに述べたようなMφの機能亢進を介して宿主の免疫応答を賦活しているものと考えられる。次の章では担癌状態においてもSPR-901が免疫応答を亢進させているかどうか、そしてどのような免疫担当細胞が抗腫瘍効果の発現に関与しているのかを検討していくこととする。



#### 第4節 要約

抗原特異的な免疫応答にはT細胞とMφとの相互作用が重要な役割を担っている。SPR-901の免疫応答増強作用のメカニズムを解明する一環としてSPR-901の投与によりMφのどのような機能に変化がみられるのか、マウス腹腔Mφを用いて検討した。

T細胞の増殖を誘導するMφの抗原提示能はSPR-901の投与により亢進した。この亢進作用はT細胞の増殖、活性化に促進的に働くとされるIL-1、IL-6といったサイトカインの発現および分泌がSPR-901の投与により増強された結果生じることが示唆された。



## 第4章 SPR-901の抗腫瘍効果におけるメカニズムの解析

生体の免疫機能を賦活させ抗腫瘍効果を持つ多糖体についてはこれまで多くの報告がなされている。それらの多糖体は免疫担当細胞たとえばマクロファージ (Mφ)、T細胞、そしてNK (Natural killer) / LAK (Lymhokine activated killer) 細胞などを直接、あるいは間接的に活性化させることにより、宿主の免疫機能を亢進または回復させ抗腫瘍効果を示すことが知られている<sup>17-21, 28, 29, 31-33)</sup>。

SPR-901は種々のマウス実験腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている<sup>26, 27)</sup>。なかでもメチルコランスレン誘発マウス繊維肉腫Me t h Aに対して顕著にその増殖を抑制する。腫瘍に対する免疫応答にはさまざまな細胞が関与しているが、なかでもT細胞はその中心的な役割を担っている<sup>43)</sup>。T細胞はその機能からヘルパー (抗原刺激により種々のサイトカインを産生して免疫応答を調節する)、キラー (細菌、ウィルス感染細胞を破壊する)、サプレッサー (免疫応答に対して抑制性に働く) などに分類されるが、近年T細胞表面に存在している二つの膜タンパク質、すなわちL3T4分子とLy t - 2分子の発現様式から、ヘルパーT細胞系



は L 3 T 4 分子陽性 T 細胞、キラー／サプレッサー T 細胞系は L y t - 2 分子陽性 T 細胞であることが分かってきた。腫瘍に対する免疫応答および排除におけるこれら二つの T 細胞系（それぞれをサブセットと呼ぶ）の役割についても多くの報告がなされている<sup>79-84)</sup>。

M e t h A 繊維肉腫は癌と宿主免疫応答の解析によく用いられる腫瘍の一つで、MφやT細胞がこの増殖抑制に関与していることが報告されている<sup>44-46)</sup>。これまで述べてきたように、S P R - 9 0 1 は M φ からのサイトカインの産生や抗原提示能を亢進させることにより、T 細胞も含めた免疫応答を増強させることがその主要な作用の一つであると考えられた。本章ではこれまでの実験結果を踏まえ、S P R - 9 0 1 による免疫応答の増強が抗腫瘍効果とどのように関係しているか、さらに前述した二つの T 細胞サブセットが S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果の発現にどのように関与しているのかを M e t h A 腫瘍を用いて検討した。



## 第1節 試薬、材料ならびに実験方法

### 1-1 動物

7-12週齢の正常および先天的胸腺欠損（ヌードマウス）雌性

BALB/cマウスを日本チャールスリバーより購入し、最低1週間馴化飼育後実験に用いた。

### 1-2 腫瘍細胞

繊維肉腫Meth Aは1週間に1度BALB/cマウスの腹腔内で継代を続け実験に使用した。Colon 26マウス結腸癌細胞もBALB/cマウスを用いて、皮下移植により継代して実験に使用した。Yac-1およびP815腫瘍細胞は培養フラスコを用いて*in vitro*にて継代して使用した。

### 1-3 SPR-901の調製

SPR-901はサッポロビール（株）医薬開発研究所生産技術研究部において、Kadoらの報告<sup>27)</sup>による方法によって調製されたものを用いた。LPSは1 pg/mg以下しか含まれていないものを使用した。



#### 1-4 SPR-901の投与

SPR-901を蒸留水に溶解し、経口用ゾンデを用いて経口投与した。投与量は特に言及しない限り30 mg/kg/dayとし、10日間連続投与した。これは抗腫瘍効果を示す投与条件に合わせた<sup>26)</sup>。

#### 1-5 その他の試薬

細胞培養にはRPMI-1640培地（日水製薬）に $5 \times 10^{-5}$  Mの2-メルカプトエタノール、10% NaHCO<sub>3</sub>（いずれも和光純薬）、100 U/mlのペニシリンG、0.1 mg/mlのストレプトマイシン（いずれもSIGMA社）および10%牛胎仔血清（GIBCO社）を添加して使用した（以下完全RPMI培地と呼ぶ）。サイクロスポリンA（CsA）はサンド社のものを使用した。

#### 1-6 リンパ節細胞の調製

マウスの頸動脈を切断し放血屠殺後、腫瘍を移植した側の腋下リンパ節を摘出した。リンパ節を完全RPMI培地中でスライドガラスにて緩やかに押しつぶし、ステレンレスメッシュで濾過後遠心分離（110g、5分）にて細胞を回収した。同培地で2度懸濁、遠心分離を繰り返し細胞を洗浄して使用した。



### 1-7 抗腫瘍効果の測定

ハンクス液 (GIBCO社) に懸濁した  $6 \times 10^4$  個の M e t h A 腫瘍細胞を B A L B / c マウス右腋下皮内に移植し、移植後翌日から10日間 S P R - 9 0 1 を経口投与した。腫瘍の増殖は経時的にノギスを用いて腫瘍の長径と短径を測定し、その面積 (長径  $\times$  短径) として表した。

一度腫瘍を移植したマウスに、再度腫瘍を移植して (二次移植) その増殖を調べるいわゆる随伴免疫応答を、S P R - 9 0 1 投与終了後翌日に最初の腫瘍移植とは反対側に腫瘍を移植し測定した。腫瘍増殖阻害率は以下の式により算出した。

増殖阻害率 (%) =

$$\frac{(\text{対照群の腫瘍面積} - \text{薬物投与群の腫瘍面積}) \times 100}{\text{対照群の腫瘍面積}}$$

対照群の腫瘍面積

### 1-8 リンパ節細胞の腫瘍増殖中和活性の測定

リンパ節細胞の腫瘍増殖中和活性 (W i n n アッセイ) を以下の方法で測定した。S P R - 9 0 1 投与終了後翌日にリンパ節細胞を回収し、適当な比率で M e t h A 腫瘍細胞と混和した後、正常 B A L B / c マウス右腋下皮内に移植した。経時的に腫瘍の増殖を測定し、リンパ節細胞を含まない腫瘍の増殖と比較して、リンパ節



細胞の腫瘍増殖中和活性を判定した。

#### 1-9 *In vitro*におけるモノクローナル抗体と補体によるリンパ

##### 節細胞の処理

T細胞サブセットであるL3T4分子陽性T細胞およびLy t - 2分子陽性T細胞をそれぞれ除去するために、各々の分子に対する抗体と補体による処理を行った。L3T4抗原に対するモノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞株RL172/4の、Ly t - 2抗原に対しては同じく83-12.5の培養液を使用した。この培養液を完全RPMI培地で $10^7$ 個/mlに調整したリンパ節細胞懸濁液に20%添加し、37℃で45分間ゆっくり振とうした。同培地で遠心分離と懸濁を3回繰り返し細胞を洗浄後、1/30に希釈したモルモット血清を含む培地に懸濁し、さらに37℃で45分間ゆっくり振とうした。先と同様な細胞洗浄操作を行い、以後の実験に用いた。本操作により目的とする細胞が消失していることをフローサイトメーター(Coulter社、EPICS PROFILE)にて確認した。

#### 1-10 リンパ節細胞のリンフォカイン活性化キラー細胞(LAK)

##### 活性の測定

$10^7$ 個/mlに調整したリンパ節細胞をIL-2 (30 U/ml) を添加し



た完全RPMI培地にて5%CO<sub>2</sub>下、37℃で4日間培養した。培養終了後  
 同培地にて遠心分離と懸濁を3回繰り返して細胞を洗浄し、エフエ  
 クター（キラー）細胞とした。標的細胞はYac-1および  
 P815腫瘍細胞を用いた。これらの腫瘍細胞10<sup>6</sup>個を3.7 MBqの  
 Na<sup>51</sup>CrO<sub>3</sub>とともに完全RPMI培地にて5%CO<sub>2</sub>下、37℃で1時間培養後、  
 同培地にて細胞を3回洗浄し回収して10<sup>5</sup>個/mlに調整した。エフエ  
 クター細胞懸濁液（6×10<sup>6</sup>～10<sup>7</sup>/ml）と標的細胞懸濁液をそれぞれ  
 0.1 mlずつ96穴丸底マイクロプレート（Falcon社）に分注し、5%  
 CO<sub>2</sub>下、37℃で4時間培養した。培養終了後プレートを遠心分離  
 （150g、5分間）して、その上清0.1 ml中の放射能活性（R<sub>sample</sub>）  
 をガンマカウンター（Beckman）にて測定した。エフエクター細胞の  
 代わりに2N塩酸溶液0.1 mlを加えた場合の放射能活性を最大放射  
 能値（R<sub>max</sub>）、標的細胞のみを培養した時の値を最小放射能値  
 （R<sub>min</sub>）とし、エフエクター細胞の細胞傷害活性を以下の式より算  
 出した。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \frac{(R_{\max} - R_{\text{sample}}) \times 100}{(R_{\max} - R_{\min})}$$

傷害活性は3wellの平均とした。



## 1-11 モノクローナル抗体投与によるT細胞サブセット消失マウ

### スの作製

L3T4分子陽性T細胞とLyt-2分子陽性T細胞の各サブセットをマウス体内でそれぞれ除去するために、各々の抗原に対するモノクローナル抗体を投与した。L3T4分子に対するモノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞株GK1.5の、Lyt-2分子に対しては同じく83-12.5の腹水培養液を使用した。この培養液を生理食塩水にて1/10に希釈し、その0.3 mlをMeth A腫瘍移植前日より1日おきに12日間マウス腹腔内に投与した。今回用いた抗体量の投与で目的とするT細胞が生体内において消去されることを、抗体を投与したマウスの末梢血を用いて予めフローサイトメーターにより確認した。

## 1-12 統計学的手法

統計学的有意差はStudentのt検定またはMann-Whitney検定を用いて調べた。危険率(P値)5%未満を有意差ありと判定した。



## 第2節 結果

### 2-1 ノードマウスにおけるSPR-901の抗腫瘍効果

T細胞の成熟の場である胸腺を欠き、生体内で機能的に作用するT細胞がほとんど見られないノードマウスにおけるSPR-901の抗腫瘍効果を調べた。正常マウスではSPR-901の経口投与によりMeth A腫瘍の顕著な増殖抑制効果が見られたが (Fig. 4-1 a)、ノードマウスではその効果は認められなかった (Fig. 4-1 b)。従ってSPR-901の抗腫瘍効果においては、T細胞が重要な役割を担っているものと考えられた。

### 2-2 SPR-901投与による随伴免疫応答に及ぼす影響

次に、SPR-901の投与により腫瘍に対する特異的な免疫応答が亢進しているのかどうかを、マウスに同じ腫瘍を2回移植した後から移植した腫瘍の増殖から判断する、いわゆる随伴免疫応答により検討した。最初のMeth A腫瘍を移植して10日間SPR-901を投与した後、再度Meth A腫瘍を移植した (二次移植)。二次移植したMeth A腫瘍の増殖はSPR-901投与群において有意な抑制が見られた (Table 4-1)。しかし二度目に移植する腫瘍をBALB/cマウスの同系腫瘍ではあるがMeth Aとは抗原



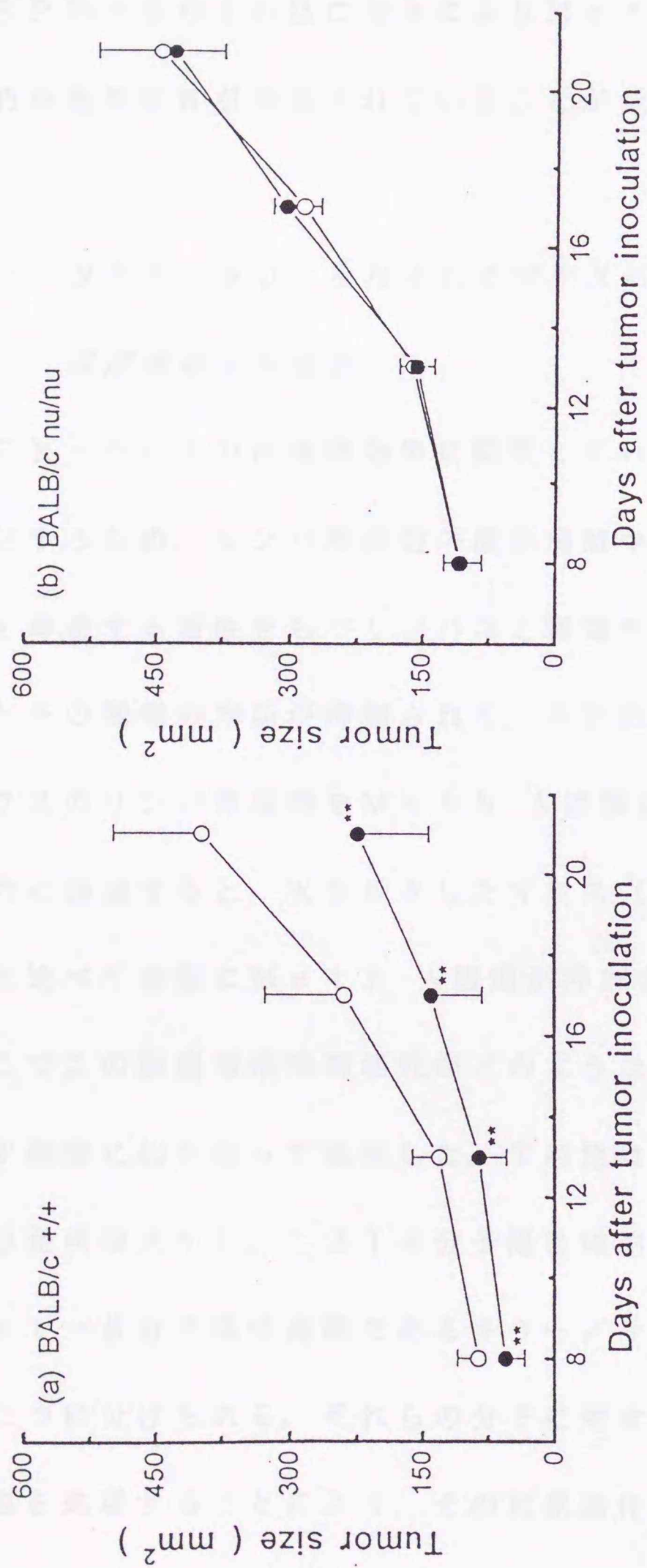


Fig. 4-1 Effect of SPR-901 on Meth A tumor growth. Normal mice(a) or nude mice(b) were inoculated i.d. with  $6 \times 10^4$  Meth A cells on day 0 and orally administered with SPR-901(●) or water(○) from days 1 to 10. Each symbol and vertical line represents the mean of ten mice and S.D. \*\*;  $P < 0.01$  compared with water-treated group by the Mann-Whitney test.



的にも免疫原的にも関連性のない c o l o n 2 6 結腸癌<sup>73)</sup>にした場合には、その増殖は抑制されなかった (Table 4-1)。これらの結果より S P R - 9 0 1 の経口投与により M e t h A 腫瘍に対する抗原特異的な免疫応答が増強されていることが示唆された。

### 2-3 S P R - 9 0 1 を投与したマウスにおけるリンパ節細胞の 腫瘍増殖中和活性

S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果に関係している T 細胞のサブセットを検討するため、リンパ節細胞の腫瘍増殖中和活性を調べた。腫瘍増殖を障害する活性をもつリンパ球と腫瘍を混合し、マウスに移植するとその腫瘍の増殖が抑制される。S P R - 9 0 1 を投与した担癌マウスのリンパ節細胞を M e t h A 腫瘍細胞と混ぜて別のマウスの皮内に移植すると、水を投与したマウス (コントロール) のリンパ節と比べて有意に M e t h A 腫瘍が抑制された (Fig. 4-2)。

そこでこの腫瘍増殖抑制活性がどのような細胞に依存しているのかを T 細胞に的を絞って検討した。T 細胞はその機能と T 細胞表面分子の発現様式から、L 3 T 4 分子陽性細胞であるヘルパー細胞系と L y t - 2 分子陽性細胞であるキラー/サプレッサー細胞系の大きく二つに分けられる。それらの分子に対する抗体と補体でリンパ節細胞を処理することにより、その抗原陽性細胞を除去することが



Table 4-1 Effect of SPR-901 on rechallenged tumor growth

| Group                | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup> |             |
|----------------------|--------------------------------------------|-------------|
|                      | Meth A                                     | Colon 26    |
| Water                | 194.5 ± 75.6                               | 54.6 ± 11.7 |
| SPR-901              | 143.1 ± 19.8*                              | 50.3 ± 18.2 |
| Control <sup>b</sup> | 205.9 ± 48.9                               | 51.9 ± 13.8 |

The procedure was described in the materials and methods section. The rechallenged tumor size was measured at 13 days (for Meth A), and 16 days (for colon 26) after the inoculation. Each group consisted of five to fifteen mice.

a ; Mean ± SD, b ; mice not inoculated with primary Meth A tumor and without any treatment, \* ; P < 0.05 compared with water-treated group by the Mann-Whitney test.



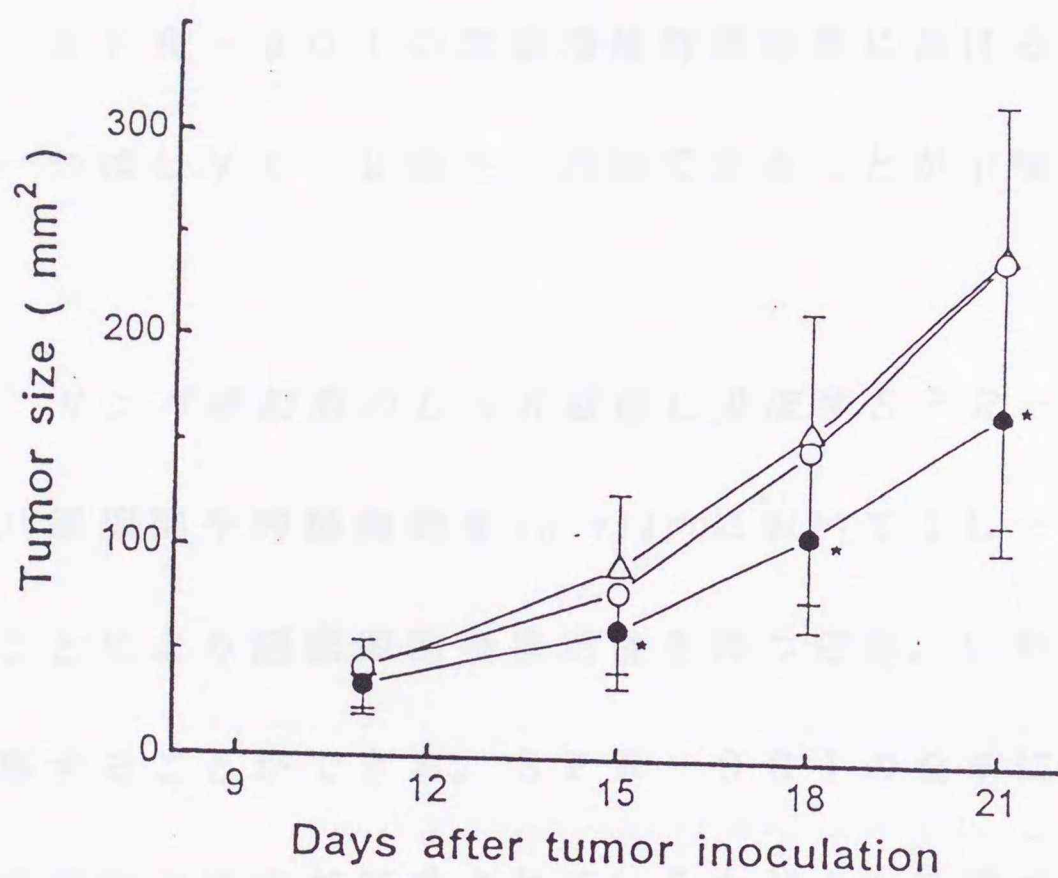


Fig. 4-2 Effect of SPR-901 on tumor neutralizing activity of regional LN cells. Meth A tumor only ( $\Delta$ ), whole LN cells from mice administered with SPR-901 ( $\bullet$ ) or water ( $\circ$ ). Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. of eight to ten mice. \* ;  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$  compared with water-treated group by the Mann-Whitney test. .



できる。それぞれのT細胞サブセットを *in vitro* で除去した後に残存するリンパ節細胞の腫瘍増殖中和活性を測定したところ、L3T4陽性細胞を除去しても中和活性は残存していたが、Lyt-2細胞を除去すると中和活性は消失することが分かった (Fig. 4-3)。従って、SPR-901の腫瘍増殖抑制効果におけるエフェクター細胞の一つはLyt-2陽性T細胞であることが示唆された。

#### 2-4 リンパ節細胞のLAK活性に及ぼすSPR-901の影響

リンパ節細胞や脾臓細胞を *in vitro* においてIL-2とともに培養することにより腫瘍細胞傷害活性を持つ細胞、いわゆるLAK細胞を誘導することができる。SPR-901の投与により腫瘍傷害性を示す細胞の機能が亢進されているかどうかを調べるため、リンパ節細胞のLAK活性について検討した。2-2で用いたものと同じ部位の担癌マウスのリンパ節細胞をIL-2とともに4日間培養した後、YAC-1およびP815腫瘍細胞を標的細胞として傷害活性を調べたところ、SPR-901の投与により有意にその傷害活性は増強されていた (Fig. 4-4)。同様な増強は腫瘍再移植マウスにおいても認められた (Fig. 4-5)。



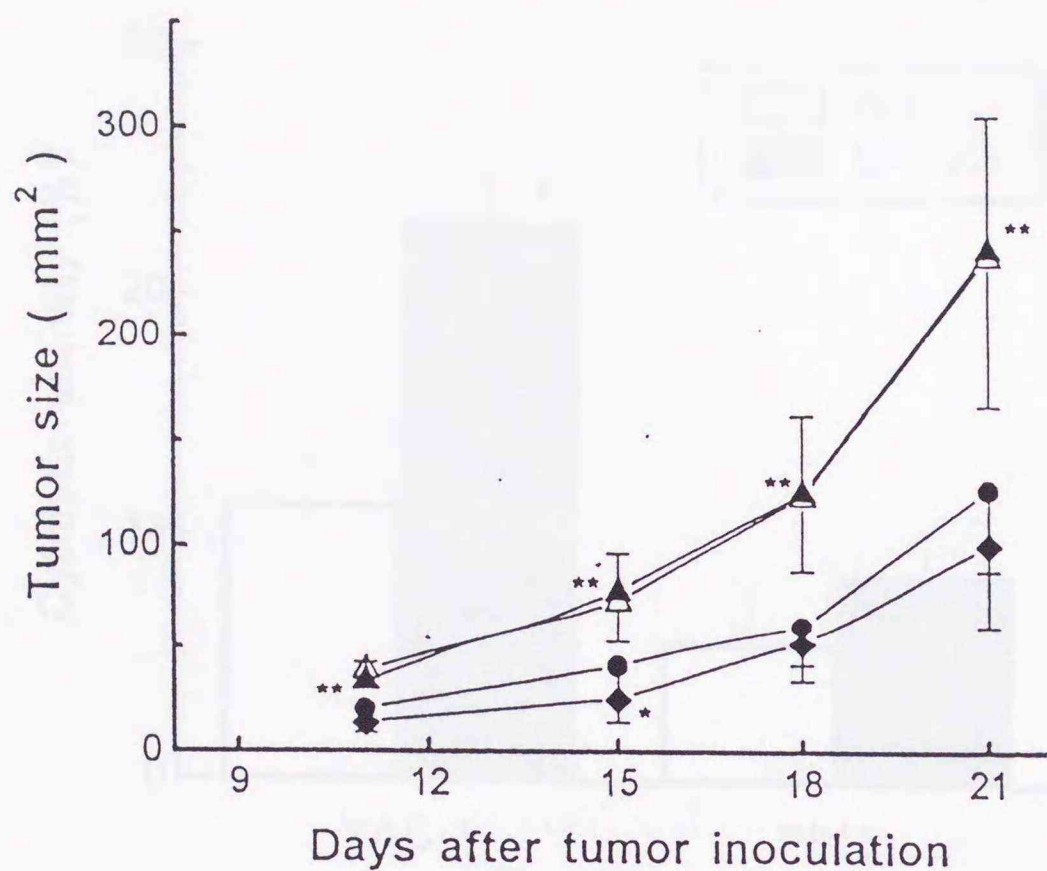


Fig. 4-3 Effect of SPR-901 on tumor neutralizing activity of regional LN cells. Meth A tumor only ( $\Delta$ ), LN cells treated with anti-L3T4 mAb and complement ( $\blacklozenge$ ), anti-Lyt-2 mAb and complement ( $\blacktriangle$ ), or complement only ( $\bullet$ ) from mice administered with SPR-901. Each symbol and vertical line represents the mean and S.D. of eight to ten mice. \* ;  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$  compared with complement only treated group by the Mann-Whitney test.



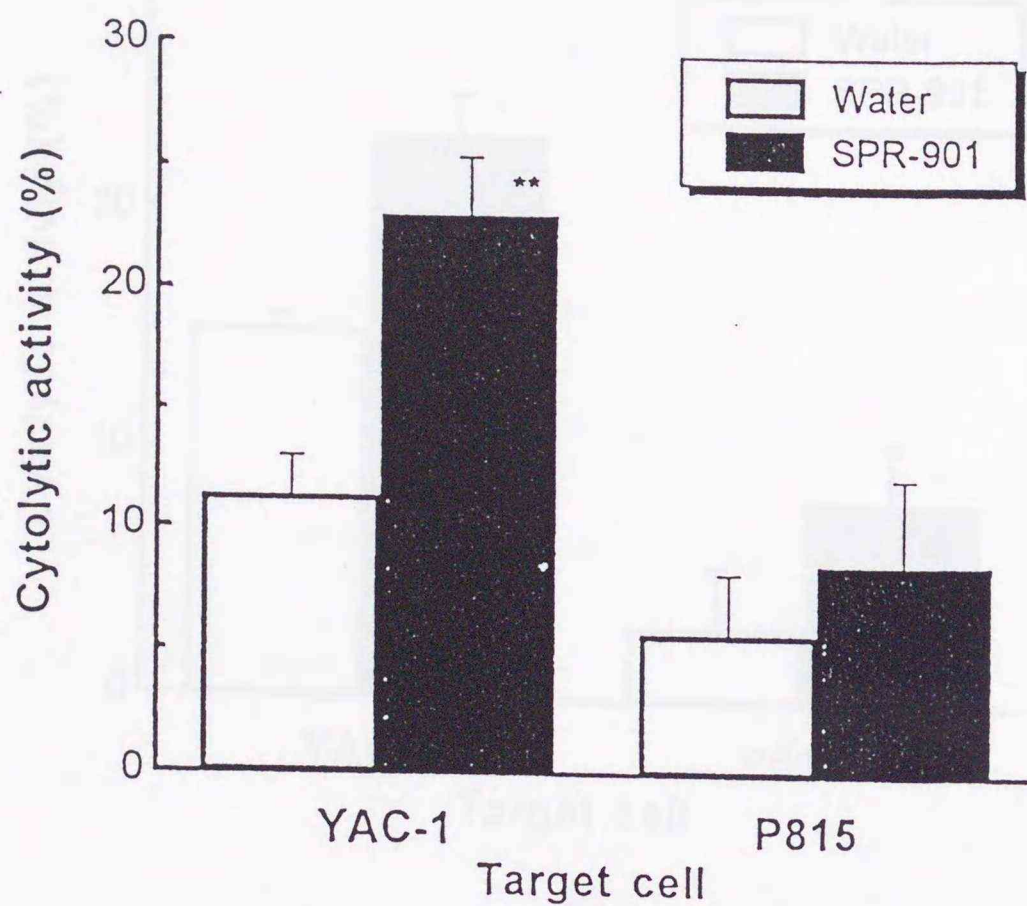


Fig. 4-4 Effect of SPR-901 on LAK activity of regional LN cells from primary Meth A-bearing mice. Each bar and vertical line represents the mean and S.D. of five mice. \* ;  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$  compared with water-treated group by the Student's t-test.



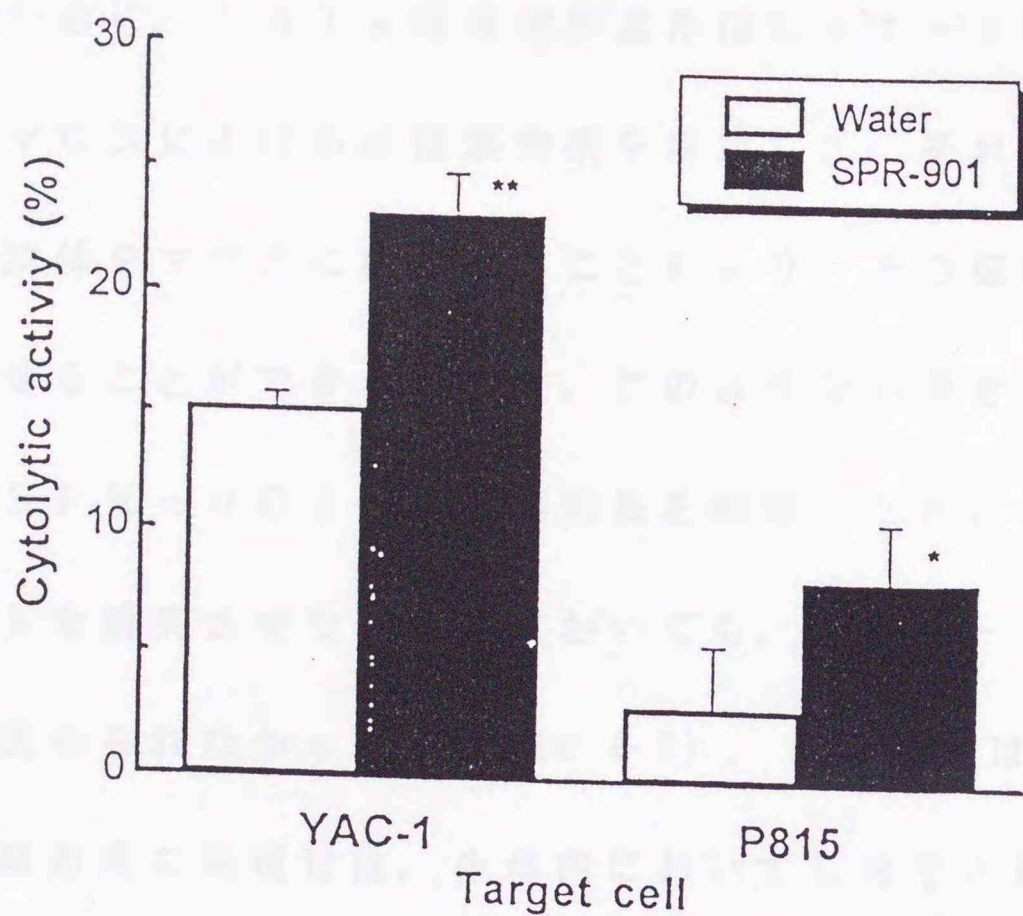


Fig. 4-5 Effect of SPR-901 on LAK activity of regional LN cells from the tumor rechallenge mice. Each bar and vertical line represents the mean and S.D. of five mice. \* ;  $P < 0.05$ , \*\* ;  $P < 0.01$  compared with water-treated group by the Student's t-test.



## 2-5 T細胞サブセット消失マウスにおけるSPR-901の抗

### 腫瘍効果

SPR-901の抗腫瘍効果におけるT細胞の関与をより詳細に調べるために、L3T4陽性細胞またはLy t-2陽性細胞を消失させたマウスにおける抗腫瘍効果を測定した。それぞれの細胞に特異的な抗体をマウスに投与することにより、その細胞を生体内より消失させることができる<sup>74, 75)</sup>。このような処理を行ったマウスにおいてSPR-901の抗腫瘍効果を測定したところ、どちらのサブセットを消失させたマウスにおいても、SPR-901の抗腫瘍効果は認められなかった (Table 4-2)。このことはSPR-901の抗腫瘍効果の発現には、生体内においてL3T4陽性T細胞およびLy t-2陽性T細胞両者の存在が必要であることを示しているものと考えられた。

## 2-6 CsA投与によるSPR-901の抗腫瘍効果の消失

最後にサイクロスポリンA (CsA) を投与したマウスにおける抗腫瘍効果について調べた。CsAは活性化したT細胞からのIL-2の産生を阻害する薬物である<sup>76)</sup>。CsAを腫瘍移植後1、4、7そして10日目に2.5 mg/kg静脈内投与したマウスでは、SPR-901の抗腫瘍効果が消失することが確認された (Table 4-3)。



Table 4-2 Effect of SPR-901 on Meth A tumor growth in mice treated with anti-L3T4 or anti-Lyt-2 mAbs

| Group   | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup> |                         |                         |
|---------|--------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|         | Treatment                                  |                         |                         |
|         | Saline                                     | Anti-L3T4               | Anti-Lyt-2              |
| Water   | 562.5 ± 101.0                              | 460.6 ± 68.6            | 555.0 ± 102.1           |
| SPR-901 | 354.4 ± 66.3**<br>(37.0)                   | 406.7 ± 103.9<br>(11.7) | 558.9 ± 146.8<br>(-0.7) |

Mice were inoculated i.d. with  $6 \times 10^4$  cells of Meth A tumor on day 0, and administered with SPR-901 or water on days 1 to 10. The treatment of mAb was described in the materials and methods section. The tumor size was measured on day 21. The value in parentheses represents the tumor growth inhibition ratio.

a ; Mean ± SD, \*\* ;  $P < 0.05$  compared with water-treated group by the Mann-Whitney test.

mAb ; monoclonal antibody.



Table 4-3 Effect of SPR-901 on Meth A tumor growth in mice treated with CsA

| Group   | Tumor size (mm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup> |                        |
|---------|--------------------------------------------|------------------------|
|         | Treatment                                  |                        |
|         | Saline                                     | CsA                    |
| Water   | 337.0 ± 136.6                              | 255.9 ± 45.1           |
| SPR-901 | 212.4 ± 124.0*<br>(37.0)                   | 242.0 ± 135.3<br>(5.4) |

Mice were inoculated i.d. with  $6 \times 10^4$  cells of Meth A tumor on day 0 and orally administered with SPR-901 or water on days 1 to 10. The mice were administered i.p. with CsA(2.5mg/kg) on day 1, 4 7 and 10. The tumor size was measured on day 21. The values in parentheses represents the tumor growth inhibition ratio.  
a ; Mean ± SD, \* ;  $P < 0.05$  compared with water-treated group by the Mann-Whitney test.



### 第3節 考察

S P R - 9 0 1 は T 細胞を介した免疫応答を増強させることによりリステリア菌に対する感染抵抗性を増強させること、さらに M  $\phi$  の免疫調節機能を正の方向に亢進させることにより宿主の免疫応答を増強させることを第2章および第3章において示した。本章ではそれらの結果を踏まえ本研究の最終目標である多糖体 S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果の発現メカニズムについて検討した。その結果 S P R - 9 0 1 は担癌状態という場においても T 細胞を介した免疫応答を増強させ腫瘍増殖抑制効果を示すものと考えられた。

腫瘍に対する生体の免疫応答にはいろいろな免疫担当細胞が関わっている。その中でも T 細胞は抗腫瘍免疫応答において中心的な役割を担っていると考えられている<sup>43)</sup>。機能的に作用する T 細胞を欠損しているヌードマウスにおいて S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果が認められないことから、S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果が T 細胞を介していることは疑いの無いものと思われる。

移植された腫瘍に対する特異的な免疫応答が宿主に誘導されることは、同一マウスに二度同じ腫瘍を移植し二度目に移植された腫瘍の増殖が抑えられることにより証明され（随伴免疫応答）、この免疫応答には T 細胞が深く関与していることが知られている<sup>77, 78)</sup>。



今回の結果から S P R - 9 0 1 は M e t h A 腫瘍抗原に対するいわゆる随伴免疫応答を増強することから、S P R - 9 0 1 は腫瘍抗原特異的な免疫応答を増強させていることが示唆された。

T細胞はその細胞表面抗原の発現形態によって現在大きく二つのサブセットに分類されている。一つは L 3 T 4 分子陽性・L y t - 2 分子陰性 T 細胞 (L 3 T 4 陽性 T 細胞)、もう一つは L 3 T 4 分子陰性・L y t - 2 分子陽性 T 細胞 (L y t - 2 陽性 T 細胞) である。機能的にはそれぞれヘルパー型 T 細胞と、キラー/サプレッサー型 T 細胞とに分類されている。腫瘍の排除に関与している T 細胞サブセットに関しては数多くの報告がある<sup>79-84)</sup>。近年、Fuyamaらは M e t h A 腫瘍を用いて L 3 T 4 および L y t - 2 陽性細胞両方が腫瘍増殖中和活性を持ち、抗腫瘍免疫応答に関与していることを報告している<sup>44)</sup>。今回の実験結果において、S P R - 9 0 1 は腫瘍増殖中和活性に関しては L 3 T 4 陽性細胞よりも L y t - 2 陽性細胞の機能を増強させていることが示唆された。L y t - 2 分子は抗原特異的に作用するキラー T 細胞だけでなく、抗原非特異的な細胞傷害作用を持つ、いわゆる L A K 細胞にも発現している。S P R - 9 0 1 投与によりこの L A K 活性も増強することから、L A K 細胞が S P R - 9 0 1 の抗腫瘍エフェクターの一つとして関与しているかも知れない。この L y t - 2 陽性細胞の詳細についてはさらに検



討が必要であろう。

生体内においてある種のT細胞を消失させるために、その細胞に特異的な抗体を投与することが知られている<sup>74, 75)</sup>。そこでSPR-901の抗腫瘍効果発現に関与するT細胞を解析するため、この手法を用いた。興味あることに、SPR-901による腫瘍中和活性の増強はおもにLyt-2陽性細胞に見られたのにも拘らず、Lyt-2陽性細胞だけでなくL3T4陽性細胞の除去もSPR-901の抗腫瘍効果を消失させた。SPR-901の抗腫瘍効果には腫瘍増殖抑制活性を示すLyt-2陽性細胞だけではなく、L3T4陽性細胞が生体内に同時に存在しなければならないことが示唆された。L3T4陽性細胞はキラーT細胞の誘導に重要な役割を演じていることがいくつか報告されている<sup>85, 86)</sup>。さらに、Shuら<sup>79)</sup>やFlamandら<sup>80)</sup>はLyt-2陽性キラーT細胞の誘導にはIL-2の産生を介したヘルパーT細胞の機能に依存していることを報告している。T細胞からのIL-2産生を阻害することが知られているサイクロスポリンAの投与によりSPR-901の抗腫瘍効果は消失した。従って、SPR-901の経口投与による抗腫瘍効果はヘルパーT細胞(L3T4陽性T細胞)の機能、例えばIL-2の産生増強などを介して、キラーT細胞(Lyt-2陽性細胞)活性を高めることにより発現すると考えられる。このことはSPR-



901の投与により正常マウの脾臓細胞だけでなく、担癌マウスの脾臓細胞からのIL-2産生を増強させるという結果<sup>49, 50)</sup>からも支持されるものであろう。

Kernら<sup>85)</sup>およびKosugiら<sup>86)</sup>は抗原提示細胞によって提示された抗原により活性化されたヘルパーT細胞が*in vitro*におけるキラーT細胞の誘導とサイトカインの産生、および*in vivo*における腫瘍の排除に関与していること報告している。第2、第3章で示した結果から考えるとSPR-901により活性化されたMφがT細胞（ヘルパー型）の活性化に促進的に作用し、さらにヘルパーT細胞の機能亢進がキラーT細胞を誘導し抗腫瘍作用を示すという一連の流れが浮かび上がってくる。

最後の章ではこれまでの実験結果を踏まえて、SPR-901の免疫賦活作用のメカニズムについて総括してみたい。



#### 第4節 要約

S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果の発現メカニズムについて、マウス  
繊維肉腫 M e t h A に対する効果をもとに検討した。

S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果発現には T 細胞を必要とすることが  
明かとなった。また、M e t h A 腫瘍に対して抗原特異的な免疫応  
答を増強させていることも判明した。T 細胞の二つのサブセット

( L 3 T 4 陽性 T 細胞 ; ヘルパー型、L y t - 2 陽性 T 細胞 ; キラ  
ー / サプレッサー型 ) のうち、S P R - 9 0 1 を投与したマウスに  
おいて腫瘍増殖を直接抑制しているのは L y t - 2 陽性のいわゆる  
キラー T 細胞と考えられたが、両方のサブセットが生体内に存在し  
ていないと S P R - 9 0 1 の抗腫瘍効果はみられなかった。従って、  
S P R - 9 0 1 はヘルパー型 T 細胞の機能亢進を介してキラー T 細  
胞を誘導、活性化させ抗腫瘍効果を示すことが示唆された。



## 第5章 総括

宿主の免疫機能を賦活させることにより感染防御効果や抗腫瘍効果を示す多糖体 SPR-901 の作用メカニズムについて検討してきた。これまで現象的に捉えられていた SPR-901 の抗腫瘍効果および免疫賦活作用を細胞および分子レベルで解明できたことはたいへん意義深いものとする。最後に本論文で示した結果をもとにこれまで報告されている SPR-901 の作用も踏まえて、SPR-901 の免疫賦活作用の発現機序とその特徴について考察してみたい。

### 第1節 SPR-901 の多糖体としての特徴

SPR-901 は

1. グルコースを唯一の構成糖する  $\alpha$ -グルカンである。
2. 経口投与で免疫賦活作用を示す。

という点において、従来の免疫賦活作用を示す多糖体とは明らかに異なる特徴を持つ。

免疫賦活作用を示す多糖体はこれまで数多く報告されているが、それらの多くは植物や担子菌由来の  $\beta$ -グルカンである。SPR-



901 はグルコースのみを構成糖とし、 $\alpha-1,6$  結合からなる主鎖の約20 残基に1箇所の割合で $\alpha-1,3$  結合による分子鎖をもつデキストランとよく似た分子量約1千万の多糖体である。免疫賦活作用をもつ $\alpha$ -グルカンに関してはPreobrazhenskayaら<sup>53)</sup>や、Countinhoら<sup>88)</sup>が報告している程度で多くはみられない。

経口投与により免疫賦活作用を示すBRMとしては、臨床的にも用いられているカワラタケより抽出されたタンパク質との複合体であるPSKが有名である<sup>88)</sup>。純粋な多糖体としてはSuzukiらが*Sclerotinia*属の担子菌から抽出した $\beta$ -グルカンであるSSGに抗腫瘍作用があることを報告しているのみである<sup>89, 90)</sup>。SPR-901は95%以上の糖質と数%の無機塩からなる多糖体である(当初無機物は含まれないとされていたが、その後数%含まれることが分かった)。デキストランに種々の置換基、たとえば硫酸基<sup>91, 92)</sup>、パルミトイル基<sup>93, 94)</sup>が付くことで免疫賦活活性がより増強されることが報告されている。SPR-901に含まれる無機塩がどのようなもので、また免疫賦活作用に関与しているのかどうかについては、まだ検討の余地が残されているものの、ほぼ純粋な $\alpha$ -グルカンとして、しかも経口投与によって免疫賦活作用を示すことは極めて特徴的であると思われる。



## 第2節 SPR-901の免疫賦活作用のメカニズム

### 2-1 Mφの機能に及ぼす影響

免疫賦活作用を示す多くの多糖体は免疫担当細胞の中でもMφに作用その機能を増強させることが知られている。本論文で示した通りSPR-901もMφに作用し、その機能を増強させることが判明した。

Mφの機能を要約すると次の4つに分けることができる。

1. 細胞表面の糖鎖やFcレセプター、補体レセプターを介して生体内の異物、細菌、腫瘍細胞を貪食したり殺傷する能力 (Phagocytosis)。
2. 貪食した物質を分解、消化しその抗原情報をリンパ球に伝達する能力 (Antigen presentation)。
3. 免疫応答遺伝子の機能により免疫担当細胞間の相互作用における遺伝的拘束を決定する能力 (Genetic regulation)。
4. 免疫反応の誘導および発現期に影響を及ぼす多くのタンパク質、サイトカイン、生理活性物質を分泌する能力 (Secretion)。

Mφはこれらの機能を介して抗原非特異的な生体防御相と抗原特異的な防御相の両方に深く関与している。

第3章で述べたSPR-901のMφの機能に及ぼす影響をまとめるとTable 5-1のようになる。この表からも明らかなように、



Table 5-1 Changes of macrophage functions by SPR-901

| Function               | SPR-901                               |
|------------------------|---------------------------------------|
| Phagocytosis           | →                                     |
| Ia molecule expression | →                                     |
| Antigen presentation   | ↑                                     |
| Secretion              | ↑<br>(IL-1 $\alpha$ , $\beta$ , IL-6) |



S P R - 9 0 1 は貪食・殺菌能など抗原非特異的な防御能に関与する機能ではなく、T細胞の増殖促進に見られるような抗原特異的免疫応答をに関与する機能を著名に亢進させていた。

## 2 - 2 抗原特異的免疫応答の亢進

抗原特異的な免疫応答の中心的役割を担う細胞はT細胞である。T細胞は無数に存在する抗原に対して反応する集団（その1つ1つをクローンと呼ぶ）と考えられる。ある抗原に対応するT細胞のみがその抗原刺激を受けて増殖し、そして機能的な作用を示す。しかしながら、T細胞は特別な抗原を除いて、単独では抗原を認識して増殖することはできず、抗原提示細胞による抗原の提示が必要である。T細胞の増殖、活性化にはT細胞自身から分泌されるI L - 2と呼ばれるサイトカインが重要な役割を果たしている。抗原提示とさらにMφから産生されるI L - 1などのT細胞増殖促進因子などによりT細胞はI L - 2を分泌し、増殖そして機能的に成熟する。これを模式的に表したのがFig. 3-4である。

第3章で示したようにS P R - 9 0 1を投与したマウスのMφはT細胞の増殖を亢進させた。S P R - 9 0 1はConcanavalin AやPhytohemagglutininのような特定の抗原刺激によらずにT細胞の増殖を引き起こす、いわゆるマイトジェン活性は有していない。従ってこのT細胞増殖の亢進は抗原提示細胞の機能亢進に由来する。外来



抗原の提示は抗原提示細胞上のH-2クラスII分子（I a分子）とともに行われるが、Table 5-1にまとめたようにSPR-901はMφのI a分子の発現量には影響しないことから、IL-1などのT細胞増殖に促進的に作用するサイトカインの産生亢進を介して、IL-2の産生を上昇させT細胞の関与する免疫応答を増強させていると考えられる。

### 2-3. 抗腫瘍効果発現のメカニズム

外来性の異物である細菌やウィルスに対する免疫応答だけでなく、腫瘍に対してもT細胞が中心的な役割を担っている（Fig. 5-1）。T細胞は種々のサイトカインを産生して、キラー細胞の誘導・活性化や遅延型反応などの細胞性免疫反応や、抗体産生を調節するL3T4分子陽性のヘルパー型T細胞と、細胞傷害性を示すLy t-2分子陽性のキラー/サプレッサー型T細胞の二つのサブセットに分けられる。

第4章で示したように、SPR-901による腫瘍増殖抑制のエフェクター細胞は主にキラーT細胞やLAK細胞などのLy t-2陽性細胞であるが、Ly t-2陽性細胞だけでなく、L3T4陽性T細胞も生体内に存在していなければSPR-901の抗腫瘍効果は認められない。これらの事実をFig. 5-1のスキームに当てはめて考えるとSPR-901の作用メカニズムは



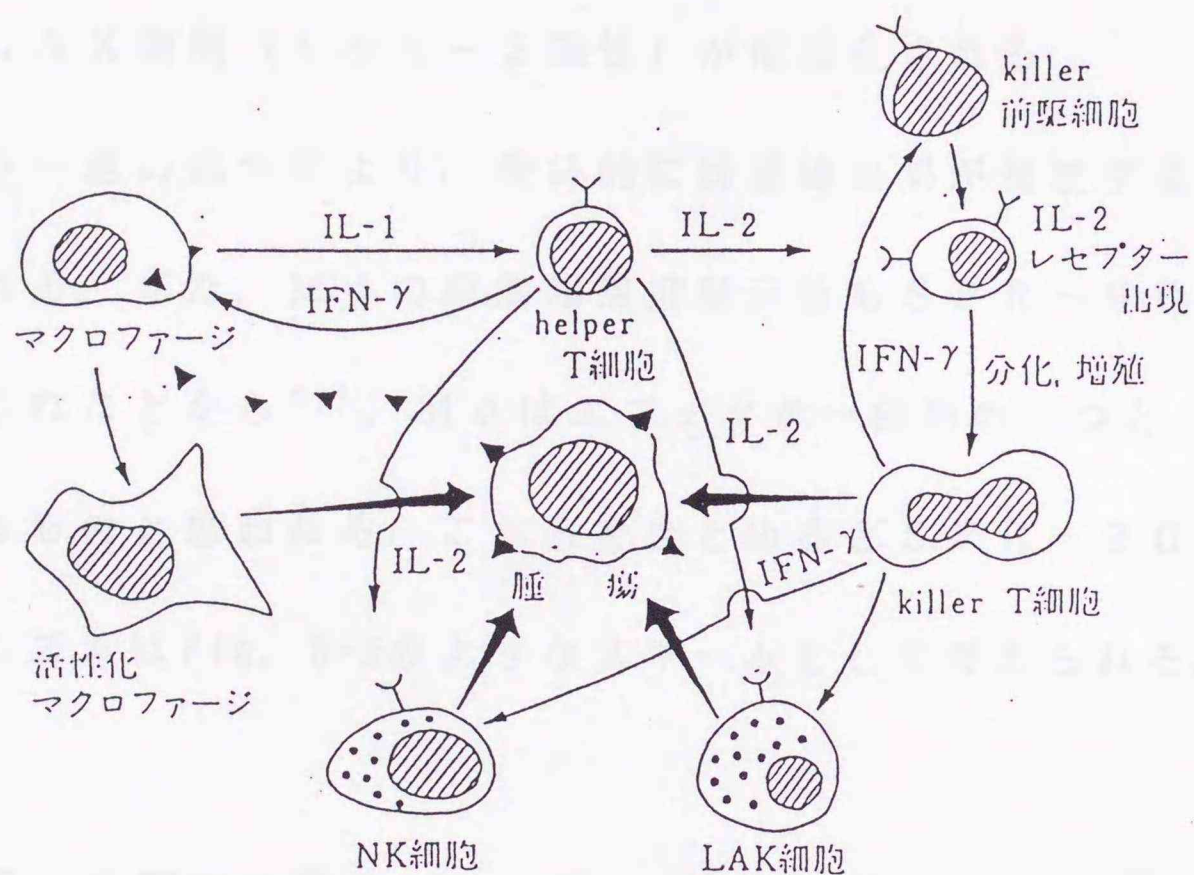


Fig. 5-1 A scheme of cytokine cascade related antitumor immunity  
(文献96)より引用, 一部改変)



1. MφからのIL-1、IL-6などの産生を亢進させ
2. T細胞（L3T4陽性；ヘルパー型）からのIL-2産生が増強され、抗原特異的な免疫応答が亢進する
3. さらにIL-2産生の増強により腫瘍傷害性のキラーT細胞やLAK細胞（Ly t-2陽性）が活性化される

という一連の流れにより、最終的に抗腫瘍効果が発現するものと考えられる。また、Mφの腫瘍増殖抑制活性もSPR-901により増強されことから<sup>51)</sup>、Mφはエフェクター細胞の一つとしても働いているものと思われる。これらをまとめるとSPR-901の作用メカニズムはFig. 5-2のようなスキームとして考えられる。

### 第3節 本研究の意義

SPR-901の場合、他の抗腫瘍剤と比べて副作用が少ないと言われている免疫賦活性物質としてだけでなく、経口投与が可能な抗腫瘍性物質としてその有用性が期待される。しかしながらこれまで、SPR-901の作用は腫瘍の増殖を抑制したという現象の報告が主なもので、そのメカニズムについては不明な点が多かった。本研究はSPR-901の作用メカニズムの解明を目的として行ったものであり、SPR-901がT細胞を中心としたいわゆる細胞性免疫応答を亢進させていること、さらにその亢進はマクロファ-



## SPR-901

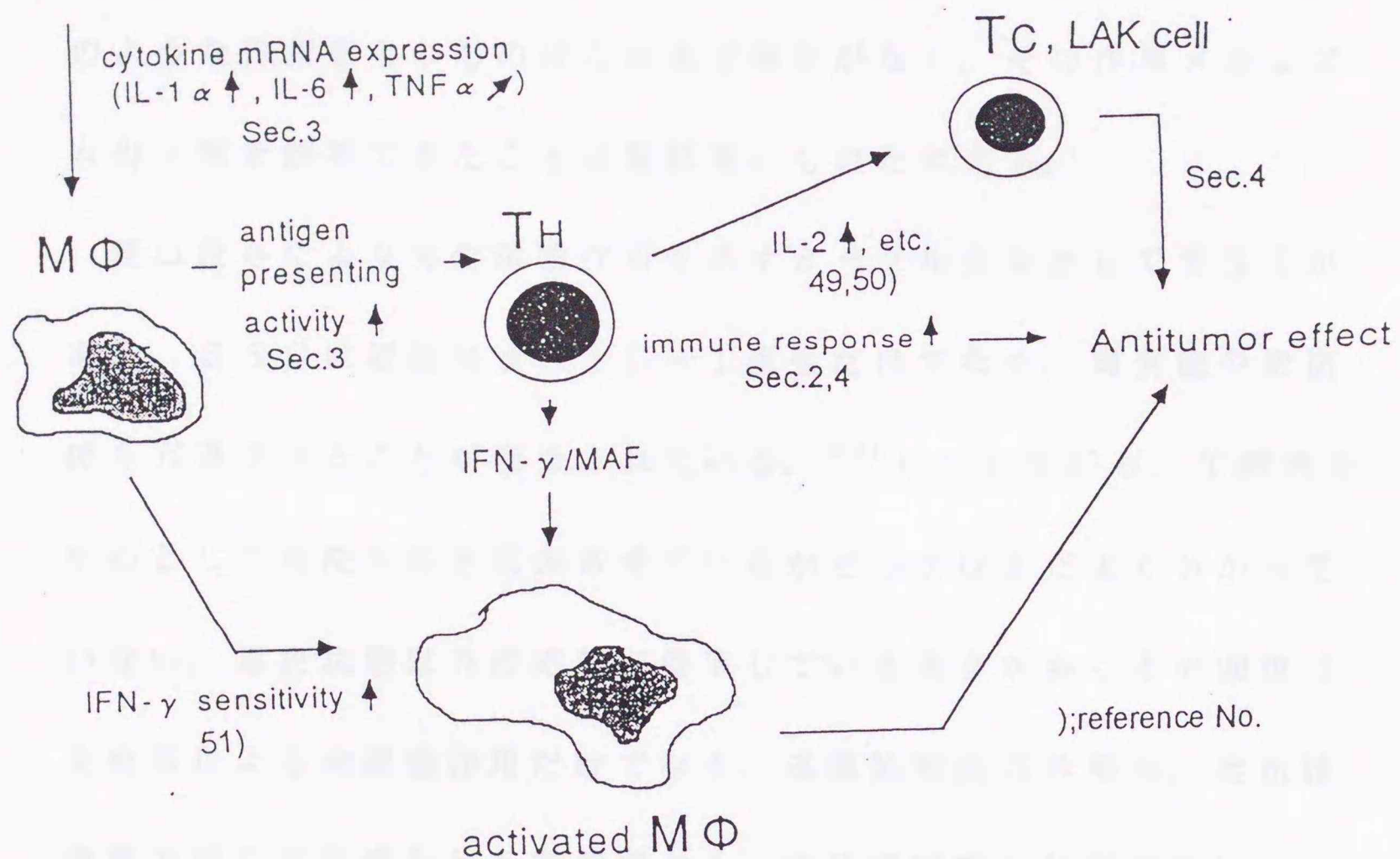


Fig. 5-2 A mode of action of SPR-901



ジからのサイトカイン産生の増強が引き金となっていることを細胞および分子レベルで証明することができた。 $\alpha$ -グルカンとしてこのような作用をもつものはこれまで報告がなく、その作用メカニズムの一端を解明できたことは意義深いものとする。

経口投与により免疫賦活作用を示す $\beta$ -グルカンとしてSSGがある。SSGは腹腔M $\phi$ のIL-1産生だけでなく、貪食能や殺菌能も亢進させることが報告されている。<sup>95)</sup>しかしながら、T細胞を中心とした免疫応答を亢進させているかどうかはまだよく分かっていない。担癌状態は免疫応答が低下している場合が多くその回復は免疫系による抗腫瘍作用だけでなく、基礎的抵抗力の増加、他抗腫瘍薬の副作用軽減なども期待できる。本研究で得られた知見は、SPR-901がこのような幅広い効果を示す可能性を示唆している。また抗腫瘍薬としてだけでなく、アレルギー性疾患や自己免疫疾患といった宿主の免疫応答が関与する他の疾患への応用も期待できるであろう。

#### 第4節 これからの課題

SPR-901はM $\phi$ の機能亢進により一連の抗原特異的な免疫応答を亢進させ免疫賦活作用を示すことが分かった。ではSPR-901は直接M $\phi$ に作用しているのだろうか。予備的な検討ではあ



るがMφを*in vitro*でSPR-901と培養することによりMφからのIL-1、IL-6の産生および膜型IL-1活性の上昇が認められていることから（データは示していない）、SPR-901はMφの機能を直接上昇させていることが示唆される。しかしながら、経口投与されたSPR-901がどのようにして生体内に取り込まれるのか、また免疫賦活作用を示すには最低限どのような分子構造が必要なのかなどまだ不明な点が多く、さらなる検討が必要である。現在、癌の治療に関しては免疫学的治療のほか、1）外科的切除、2）放射線、3）化学療法剤、4）温熱療法などが用いられている。しかしながら、どの方法にも問題点があり複数の組み合わせにより実際の治療は為されている。免疫学的治療は一般的に副作用が少なく生体の持つ防御作用を高める特徴から、切除手術後の投与や副作用が問題となる化学療法剤と併用されることが多い。SPR-901は毒性はほとんどなく、さらに経口投与が可能であり投与面での負担も軽減される。臨床応用までには今後より詳細な研究が必要ではあるが、有用な免疫賦活性抗癌剤と成ることを心から期待するものである。



## 謝 辞

本論文の作成に関して御懇篤な指導と助言を賜りました北海道大学農学部・教授 千葉誠哉博士に心から感謝いたします。

また、本論文をまとめるにあたり御指導、御助言を賜りました北海道大学農学部・教授 富田房男博士ならびに北海道大学農学部・教授 本間守博士に心から感謝いたします。

S P R - 9 0 1 の研究に関して御指導いただきました九州大学生体防御医学研究所免疫学部門・教授 野本亀久雄博士、名古屋大学医学部付属病態制御研究施設生体防御研究部門・教授 吉開泰信博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり御助言と激励をいただきましたグレラン製薬(株)代表取締役 高木智史社長、取締役 平田昭雄研究開発本部長、研究開発センター長 北森信之博士、臨床開発センター長 金澤一博士ならびに研究開発本部 松浦昭宏博士に感謝いたします。

本研究に関し多大なる御協力と励ましをいただきましたサッポロビール(株)旧医薬開発研究所腫瘍薬理研究部の方々、ならびに旧医薬開発研究所関係者の方々に感謝いたします。

最後に、本論文の作成にあたり心の支えとなり、常に励ましを与えてくれた妻、竹田かおりに心より感謝いたします。



- 1) 石田名香雄、齊藤元男ら(1988). B R Mの現状と将来の展望 - 基礎と臨床の見地から -. 治療学、20:85-95.
- 2) 山崎正利(1992). 免疫強化剤, 続医薬品の研究 寺島充男, 豊島聰 編集, pp.261-281, 広川書店.
- 3) Coley, W.B. (1906). Late results of the treatment of inoperable sarcoma by the mixed toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. Am. J. Med. Sci., 131:375-430.
- 4) Coley, W.B. (1933). The treatment of sarcoma of the long bones. Ann. Surg., 97:434-460.
- 5) Shear, M.J. and Perrault (1944). Chemical treatment of tumors. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. J. Natl. Cancer Inst., 4:461-476.
- 6) Mankowski, Z.T., Yamashita M., and Diller, I.C. (1957). Effect of *Candida guilliermondi* polysaccharide on transplantable mouse sarcoma 37. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96:79-80.
- 7) Bradner, W.T., Clarke, D.A. and Stok, C.C. (1958). Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and sarcoma 180 in mice. Cancer Res., 19:347-351.
- 8) Bradner, W.T. and Clarke, D.A. (1959). Stimulation of host defense against experimental cancer. II. Temporal and reversal studies of the zymosan effect. Cancer Res., 19:673-678.
- 9) Riggi, S.J. and Di Lizio, N.R. (1961). Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. Am. J. Physiol., 200:297-300
- 10) Diller, I.C., Mankowski, Z.T. and Fisher, M.E. (1963). The effect of yeast polysaccharides on mouse tumors. Cancer Res., 23:201-208.
- 11) Nakahara, W., Fukuoka, F. Maeda, Y. and Aoki, K. (1964).



- The host-mediated antitumor effect of some plant polysaccharides. GANN, 55:283-288.
- 12) Sakai, S., Saito, G., Sugayama, J. Kamasuka, T., Takano, T. and Takada, S. (1964). Anticancer effect of polysaccharide fraction prepared from bamboo grass. GANN, 55: 197-203.
  - 13) 鈴木茂生、齊藤健、廿日岩久典、砂山裕義、鈴木益子、内山充、北条博史、福岡文子、中西京、秋谷七郎 (1969). 屋久島産ササおよび酵母水溶性多糖のマウス移植腫瘍に対する増殖阻止作用. 日本臨床、27:1753-1758.
  - 14) Tanaka, T. (1967). Mechanism of antitumor action of polysaccharide fraction prepared from bagasse. 1. GANN, 58:1-4.
  - 15) Nakahara, W., Tokuzen, R., Fukuoka, F. and Whister R.L. (1967). Inhibition of mouse sarcoma 180 by a wheat hemi-cellulose B preparation, Nature, 216:374-375.
  - 16) Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C.F., Fukuoka, F. and Nakanishi, M. (1968). Antitumor studies on some extracts of *Basidiomycetes*. GANN, 59:159-161.
  - 17) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki T. and Fukuoka F. (1969). Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*(Berk.)Sing. (an edible mushroom). Nature, 222:678-679.
  - 18) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito., G. and Sakai S. (1969). Host-mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. GANN, 60:137-144.
  - 19) Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H. and Yadomae, T. (1978). Structural examination of antitumor, water-soluble glucans from *Grifora umbellata* by use of four types of glucanase. Carbohydr. Res., 65:235-243.
  - 20) Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T.



- and Yadomae, T. (1984). Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit of *Grifola frondosa*. Chem. Pharm. Bull., 32:1142-1151
- 21) Sakurai, T., Suzuki, I., Kinoshita, A., Oikawa, S., Masuda, A., Ohsawa, M. and Yadomae, T. (1981). Effect of intraperitoneally administered  $\beta$ -1,3-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IF09395 on the functions of murine alveolar macrophages Chem. Pharm. Bull., 39:214-217.
- 22) 仲吉洋 (1967). 担子菌チャヒラタケの産生する多糖体の抗腫瘍作用に関する研究. 第1報. 化学的性状について. 日細菌誌、22:641-649.
- 23) Hashimoto, K., Okawa, Y., Suzuki, K., Okura, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1983). Antitumor activity of acidic mannan fraction from bakers yeast. J. Pharm. Dyn., 6: 668-676.
- 24) Tokoro, A., Takewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988). Growth-inhibitory effect of Hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. Chem. Pharm. Bull., 36:784-790.
- 25) 伊藤悦男、竹尾 駿、加戸久生、山本久夫、渡辺信宏、上村 稔、相馬英一、打田輝一、森 義忠、森永 豪 (1985). 米糠由来抗腫瘍性多糖 R B S に関する研究 (第一報) 製法、物理化学的性質及び生物活性について. 薬学雑誌、105:188-193.
- 26) Takeo, S., Kado, H., Yamamoto, H., Kamimura, M., Watanabe, N., Uchida, K. and Mori, Y. (1988). Studies on an antitumor polysaccharide RBS derived from rice bran II. Preparation and general properties of RON, an active fraction of RBS. Chem. Pharm. Bull. 36:3609-3613.
- 27) Kado H., Yoneta, Y., Takeo, S., Mitsui, M., and



- Watanabe, N. (1991). Studies on an enzymatically synthesized antitumor polysaccharide SPR-901. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 39:1078-1079.
- 28) 秋山由紀雄、羽室淳爾 (1981). 多糖の抗腫瘍性発現の機序と免疫学的性状の特徴－特異的免疫応答と非特異的免疫応答に及ぼす効果－. 蛋白質・核酸・酵素, 26:208-224.
- 29) Hamuro, J. and Chihara, G. (1984). Lentinan, a T-cell-oriented Immunopotentiator-Its experimental and clinical applications and possible mechanism of immune modulation. Immune modulation agents and mechanisms. eds. Fenichel, R.L. and Chirigos, M.A., Marcel Dekker, New York, pp.409-435.
- 30) 須賀哲也、伊沢正明、山下 昭、他 (1989). レンチナン投与により腫瘍局所に集積する宿主細胞. 第48回日本癌学会総会抄録集, pp.313.
- 31) Sugawara, I., Lee, K.C. and Wong, M. (1984). Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells I. Characteristics of SPG-treated macrophages. Cancer Immunol. Immunother., 16:137-144.
- 32) 土屋吉則、山本正春、五十嵐稔、鈴木隆二、熊谷勝男 (1986). 抗腫瘍性多糖体シゾフィランの免疫増強作用の解析－液性因子レベルにおいて－. 臨床免疫, 18:575-584.
- 33) Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in anti-tumor activity of mice pretreated with Schizophyllan (SPG). (1982). Japan J. Exp. Med., 52:59-65.
- 34) 石田名香雄、斉藤元男 (1990). OK-432の作用機作をわれわれはいかに解明してきたか?－Effector cellとCytokineの誘導を中心に－. BIOTHERAPY, 4:155-165.
- 35) Mituyama, M., Takeya, K., Nomoto, K. and Shimotori, S. (1978). Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. J. Gen.



- Microbiol., 106:165-171.
- 36) North, R.J. (1978). The concept of the activated macrophage. J. Immunol., 121: 806-809.
  - 37) Mackaness, G.B. (1969). The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. J. Exp. Med., 129:973-992.
  - 38) Yoshikai, Y., Miake, S., Matsumoto, T., Nomoto, K and Takeya, T. (1980). Relationship between non-specific activity of macrophages and immune responses to *Listeria monocytogenes*. Immunology, 40:295-301.
  - 39) Nomoto, K., Miake, S., Yokokura, T., Shimizu, T., Mutai, M. and Nomoto, K. (1985). Systemic augmentation of host defense mechanism by subcutaneous administration of *Lactobacillus casei* in mice. J. Clin. Lab. Immun., 18: 43-48.
  - 40) Yoshikai, Y., Miake, S., Koga, T, Watanabe, Y. and Nomoto, K. (1984). Effect of *Bacillus Calmette-Guerin* infection on delayed footpad reaction to *Listeria monocytogenes*. Cell. Immun., 83:404-413.
  - 41) 河村勉, 沼先洋三(1980). *Listeria* 感染抵抗性におよぼすレンチナンの影響について. Proc. Jap. Cancer Assoc. (日本癌学会総会要旨集) 39:134.
  - 42) Tsuru, S., Nomoto, K., Taniguchi, M., Kitani, H., Watanabe, M. and Zinnaka, Y. (1984). Depression of macrophage functions and T-cell-mediated immunity to listeria infection in tumor-bearing mice and its prevention by PSK. Cancer Immunol. Immunother. 18:160-163.
  - 43) North, R.J. (1984). The murine antitumor immune response and its therapeutic manipulation. Advance in Immunology. Academic Press, SanDiego, pp.85.
  - 44) Fuyama, S., Komatsu, H. and Arai, S. (1991). Effect of phenotypes and mechanisms of antitumor immune reactiv-



- ity of tumor-immunizing and tumor-bearing mice in two syngeneic tumors. *Cell. Immunol.*, 137:200-215.
- 45) Mitani, M., Matsumoto T., Mori, K., Miake, S., Himeno K. and Nomoto, K. (1985). Rejection of syngeneic tumor cells by the interaction of Lyt-1+ T lymphocytes and macrophages. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 18:97-101.
- 46) Mitani, M., Mori, K., Himeno, K and Nomoto, K. (1989). Anti-tumor cytostatic activity against a syngeneic murine tumor. Comparison between neonatally thymectomized mice and congenitally athymic nude mice. *J. Immunol.*, 142:2148-2154.
- 47) Takeshita, M., Nakamura, S., Makita, F., Ohwada, S., Miyamoto, Y. and Morishita, Y. (1992). Antitumor effect of RBS (rice bran saccharide) on EMMG-induced carcinogenesis. *Biotherapy*, 4:139-145.
- 48) Miyazaki, H., Yoshikai, Y., Tanaka, M., Takeda, Y., Takeo, S. and Nomoto, K. (1992). Protective effect of SPR-901(RBS) on the decrease of peripheral leukocyte number in 5-fluorouracil-treated mice. *Int. J. Immunopharmac.*, 14:11-17.
- 49) Tanaka, M., Miyazaki, H., Takeda, Y., Takeo, S. Yoshikai, Y. and Nomoto, K. (1992). Augmentation of mitogen-induced interleukin 2 production by oral administration of polysaccharide SPR-901. *Immunopharmac. Immunotoxicol.*, 14:403-420.
- 50) Tanaka, M., Miyazaki, H., Takeda, Y., Nakamura, T. and Takeo, S. (1992). Effect of oral administration of the  $\alpha$ -1,6-polysaccharide SPR-901 on suppressed Con A-induced IL-2 production in tumor-bearing mice. *Int. J. Immunother.*, 8:177-184.
- 51) Tanaka, M., Takeda, Y., Miyazaki, H. and Takeo, S. (1993). Analysis of antitumor activities of macrophage



- in mice treated with polysaccharide SPR-901. *Int. J. Immuunotherapy*, 9:151-155.
- 52) Hestrin, S., Shilo, M. and Feingold, D.S. (1954). Infection-promoting activity of levan and dextran as a function of degree of polymerization. *Br. J. Exp. Pathol.*, 35:107-111.
  - 53) Preobrazhenskaya, M.E. and Rosenfeld, E.L. (1978). Studies on some biologically active dextrans. *Carbohydr. Res.*, 66:213-223.
  - 54) Leon, M.A. (1960). The reaction between dextrans and the properdin-complement system. *J. Immunol.*, 85:190-196
  - 55) Kiser, J.S., Lindn, H. and de Mello, G.C. (1956). The effect of various substances on resistance to experimental infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 66:312-328.
  - 56) Reed, M.J. and Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27:493-497.
  - 57) Adams D.O. and Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2:283-318.
  - 58) Metchnikoff, E. (1905). *Immunity of infections diseases*. Cambridge/London/NY:Cambridge Univ. Press.
  - 59) Langevoort, H.L., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., (1970). The nomenclature of mononuclear phagocytes. "Mononuclear phagocytes" pp.1-6. ed. van Furth, R. Blackwell, Scientific Publication, Oxford, Edinburgh.
  - 60) van Furth, R. Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey J.H. Spector W.G. Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system; A new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull WHO*, 47:651-658
  - 61) 鈴木益子 (1988). 多糖体ならびにオリゴ糖の免疫賦活作用.



医学細菌学 3 卷, pp. 49-67

- 62) Van Furth, R. and Van Zwet, T.L. (1973). *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. Handbook of Experimental Immunology, 2nd edn, vol.2 ed. Weir, D.M.). Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.
- 63) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18:5294-5299.
- 64) Lomedico, P.T., Gübler, U., Hellmann, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.C.E., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O. and Mizel, S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature*, Lond., 312:458-462.
- 65) Gray, P.W., Glaister, D., Chen, E., Goeddel, D.V. and Pennica, D. (1986). Two interleukin 1 genes in the mouse: Cloning and expression of cDNA for murine interleukin 1. *J. Immunol.*, 137:3644-3648.
- 66) Van Snick, J., Cayphas, S., Szikola, J.P., Renauld, J.C. Van Roost, E., Boon, T. and Simpson, R.J. (1988). cDNA cloning of interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur. J. Immunol.*, 18:193-197.
- 67) Pennica, D., Hayflick, J.S., Brigman, T.S., Palladino, M.A. and Goeddel, D.V. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6060-6064.
- 68) Faar, A.G., Kiely, J.M. and Unanue, E.R. (1979). Macrophage-T cell interaction involving *Listeria monocytogenes* - role of the H-2 gene complex. *J. Immunol.*, 122: 2395-2404.
- 69) Dinarello, C.A. (1988). Biology of interleukin 1. *FASEB*



- J., 2:108-115.
- 70) Van Snick, J. (1990). Interleukin 6; an over view. Ann. Rev. Immunol., 8:253-278.
- 71) Leung, K.H. and Mihich, E. (1980). Prostaglandin modulation of development of cell-mediated immunity in culture. Nature, Lond., 288:597-600.
- 72) Tamura, K., Shibata, Y., Matsuda, Y. and Ishida, N. (1981). Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascites fluids of cancer patients. Cancer Res., 41:3244-3252.
- 73) Sato, N., Yagihashi, A., Okubo, M., Torigoe, T., Takahashi, S., Sato, T., and Kikuchi, K. (1987). Characterization of tumor rejection antigen molecule of chemically induced murine colon tumor C-C26. Cancer Res., 47:3147-3151.
- 74) Cobbold, S.P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero, T.D. and Waldmann, H. (1984). Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets *in vivo*. Nature (Lond), 312:548-551.
- 75) Nakayama, E., Uenaka, A. (1985). Effect of *in vivo* administration of Lyt antibodies. Lyt phenotype of T cells in lymphoid tissues and blocking of tumor rejection. J. Exp. Med., 164:345-355.
- 76) Kronke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Arya, S.K., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Waldman T.A. and Greene W.C. (1984). Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5214-5218.
- 77) Fisher, B., Saffer, E.A. and Fisher, E.R. (1970). Comparison of concomitant and sinecomitant immunity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135:68-71.
- 78) North, R.J. and Bursuker, I. (1984). Generation and de-



- cay of the immune response to a progressive fibrosarcoma I. J. Exp. Med., 159:1295-1311.
- 79) Chou, T., Shu, S., (1987). Cellular interaction and the role of interleukin 2 in the expression and induction of immunity against a syngeneic murine sarcoma. J. Immunol., 139:2103-2109.
  - 80) Flamand, V., Biernaux, C., Van Mechelen, M., Sornasse, T., Urbain J., Leo, O. and Moser, M. (1990). Immune surveillance: both CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cells control *in vivo* growth of P815 mastocytoma. Int. J. Cancer, 45: 757-762.
  - 81) Nagarkatti, M., Clary, S.R. and Nagarkatti P.S. (1990). Characterization of tumor-infiltrating CD4+ T cells as Th1 cells based on lymphokine secretion and functional properties. J. Immunol., 144: 4898-4905.
  - 82) Puccetti, P., Bianchi, R., Romani, L., Cenci, E. and Fioretti M.C. (1989). Delayed-type hypersensitivity to tumor antigens co-expressed with immunogenic determinants induced by xenogenization. Int. J. Cancer, 43: 279-284.
  - 83) Shu, S., Chou T. and Rosenberg, S.A. (1987). Generation from tumor-bearing mice of lymphocytes with *in vivo* therapeutic efficacy. J. Immunol. 139:295-304.
  - 84) Zangemeister, U., Thiede, K. and Schirmacher, V. (1989). Recruitment and activation of tumor-specific immune T cells *in situ* functional studies using a sponge matrix model. Int. J. Cancer, 43: 310-316.
  - 85) Kern, D.E., Klarnet, J.P., Jensen, M.C.V. and Greenberg, P.D. (1986). Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I-restricted CTL. J. Immunol., 136: 4303-4310.

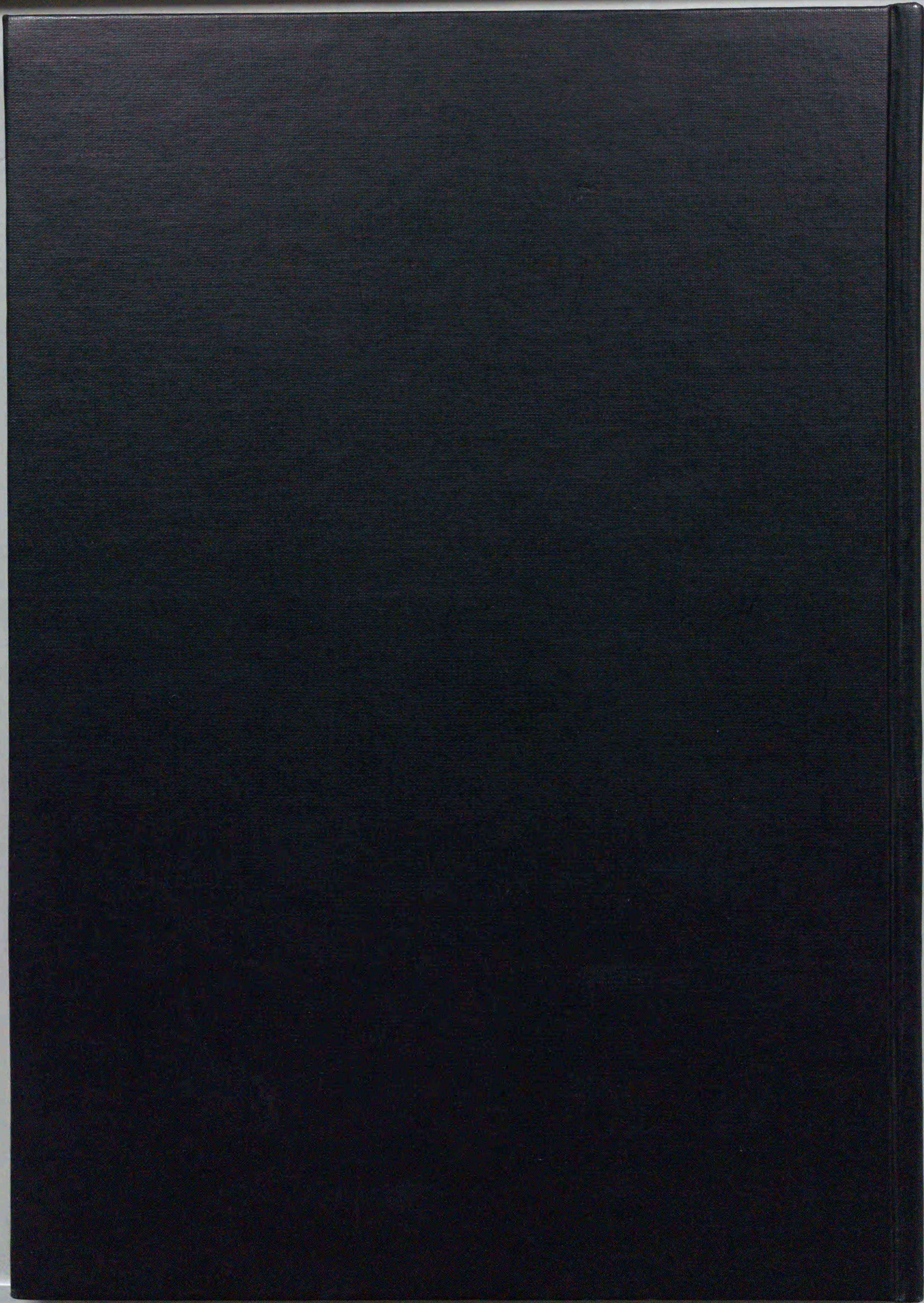


- 86) Kosugi, A., Yoshioka, T., Suda, T., Sano, H. Takahama, Y., Fujiwara, H. and Hamaoka, T. (1987). The activation of L3T4+ helper T cells assisting the generation of anti-tumor Lyt-2+ cytotoxic T lymphocytes: requirement of Ia-positive antigen-presenting cells for processing and presentation of tumor antigen. *J. Leucocyte Biol.*, 42:632-641.
- 87) Coutinho, A., Moller, G. and Richter, W. (1974). Molecular basis of B-cell activation. I. Mitogenecity of native and substituted dextrans. *Scand. J. Immunol.*, 3: 321-338.
- 88) Tsukagoshi, T., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and Orita, K. (1984). Krestin(PSK). *Cancer Treat. Rev.*, 11:131-155.
- 89) Suzuki, M., Mikami, T., Matsumoto, T. and Suzuki, S. (1977). Preparation and antitumor activity of o-palmitoyldextran phosphates, o-palmitoyldextrans, and dextran phosphate. *Carbohydr. Res.*, 53:223-229.
- 90) Suzuki, M., Mikami, T., Kadowaki, M., Matsumoto, T. and Suzuki, S. (1977). Dextran derivatives in single and combination chemotherapy against transplantable mouse ascites and solid tumor. *Cancer Res.*, 37:3448-3454.
- 91) Diamantsein, T., Ruhl, H., Vogt, W. and Bocher, G. (1973). Stimulation of B-cells by dextran sulphate *in vitro*. *Immunology*, 25:743-747.
- 92) Persson, U.C.I., Hammarstrom, L.L.G. and Smith, C.J.E. (1977). Macrophages are required for the dextran sulphate induced activation of B lymphocytes. *J. Immunol.*, 119:1138-1144.
- 93) Suzuki, I., Hashimoto, K., Ohno, N., Tanaka, H., Yadomae, T. (1989). Immunomodulation by orally administered  $\beta$ -glucan in mice. *Int. J. Immunopharmac.*, 11:761-769.

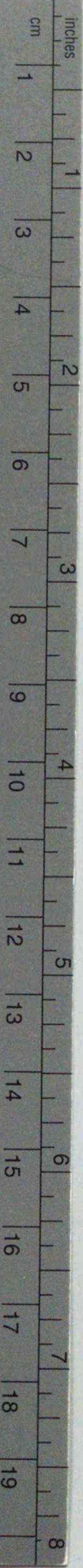


- 94) Suzuki, I., Tanaka, H., Kinoshita, A., Oikawa, S.,  
Osawa, M. and Yadomae, T. (1990). Effect of orally ad-  
ministered  $\beta$ -glucan on macrophage function in mice.  
Int. J. Immunopharmac., 12:675-684.
- 95) 笠倉新平(1991). サイトカインとは, サイトカイン基礎から最  
新情報まで. 笠倉新平編集, pp.3-10, 日本医学館.
- 96) 西村孝司, 橋本嘉幸(1985). 担癌宿主における免疫応答－癌免  
療法との関連において－. 免疫薬理, 3:136-141.





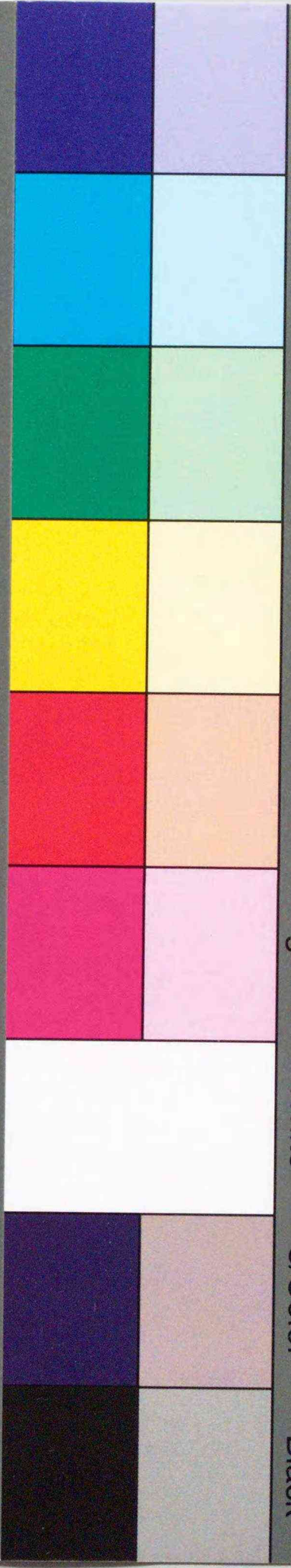




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

