

活性化 MΦ のグリオーマ細胞に対する傷害活性に関する基礎的研究

京都大学医学部脳神経外科教室 (指導: 菊池晴彦教授)

大 山 憲 治

[原稿受付: 平成 4 年 12 月 21 日]

Experimental Analysis of Cytotoxicity Mediated by Activated Macrophages Against Glioma Cells in Mice

KENJI OHYAMA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University.

Macrophage (MΦ) has a very important role in host natural defence and tumor cell killing. Activated MΦ with tumor cytotoxicity can be induced by various lymphokines, such as interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-2, IL-4, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), but also by various bacterial products, such as lipopolysaccharide (LPS), Bacillus Calmette Guérin (BCG), corynebacterium parvum (C.p.), and muramyl-di-peptide (MDP). Although the brain is considered as an "immunologically privileged site", it has been demonstrated that in malignant brain tumors infiltration of lymphocytes or MΦ can be seen in tissue samples. This may suggest that immune surveillance exists in the brain. But the biological significance of infiltrative MΦ is unclear.

The purpose of this study is to confirm the significant generation of activated MΦ with cytotoxicity to glial tumor cells and to elucidate the cytotoxic mechanism associated with cellular interaction between effector MΦ and target cells. This is the first report on experimental analysis of cytotoxicity mediated by activated MΦ against glioma cells in mice.

The cytotoxicity mediated by murine peritoneal activated MΦ was examined against 3 kinds of murine glioma cell lines; VM-Glioma (spontaneously occurring astrocytoma of the VM mouse origin, H-2^b), RSV-M (Schmitt-Ruppin Rous sarcoma virus-induced malignant glioma of the C3H/He mouse origin, H-2^k), and 203-Glioma (methylcholanthrene-induced ependymblastoma of the C57BL/6 mouse origin, H-2^b). Activated MΦ were obtained from peritoneal exudate cells of 4 strains of mice, C57 BL/6 (H-2^b), C3H/He (H-2^k), DBA/2 (H-2^d), and BALB/c (H-2^d), following intraperitoneal injection of (1) LPS 200 μ g, (2) BCG 200 μ g, (3) C.p. 200 μ g, (4) MDP 350 μ g, and (5) IFN- γ 10³ units, 7 days prior to

Key words: Activated macrophages, Glioma, IFN- γ , TNF- α , Cytotoxicity, ⁵¹Cr release-assay, ³H-TdR release-assay, Mouse

索引語: 活性化マクロファージ, グリオーマ, γ 型インターフェロン, 腫瘍壊死因子, 傷害活性, クロム放出試験, チミジン放出試験, マウス

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University.

20 hr ^{51}Cr release-cytotoxicity assay. Of the various combination of mouse strains and activating agents tested, that of activated MΦ of the C3H/He mouse with induction by LPS had the most tumoricidal effect against the glioma cells, which was not MHC restricted. Although LPS-activated MΦ underwent marked loss of cytotoxicity within 24 hr following initiation of in vitro culture, this 20 hr pretreatment with IFN- γ or TNF- α inhibited this reduction in tumoricidal effects in a dose dependent fashion. It was found that there were MΦ suppressive factors in the fetal calf serum (FCS) facilitating this reduction in tumoricidal effects, but prostaglandin E_2 was not relevant to the rapid decrease in Cytotoxicity of activated MΦ. On the other hand, 24 hr pretreatment of target cells with IFN- γ did not increase their susceptibility to lysis by activated MΦ. These findings suggest that although IFN- γ augments the in vitro tumoricidal activation of MΦ, it is unlikely that there is any influence of IFN- γ on target sensitivity to lysis by MΦ.

The association between cell surface expression of adhesion molecules and MΦ cytotoxicity against glial tumor cells was investigated. It was first found that activated MΦ with killing activity to glioma cells expressed Mac-1 and inter cellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not lymphocyte function associated antigen (LFA)-1 on the cell surface. Furthermore, it was noted that IFN- γ and TNF- α augmented the expression of both Mac-1 and ICAM-1, but not LFA-1. All 3 glioma cell lines had no cell surface expression of these 3 adhesion molecules and did not show an enhancement of the expression after treatment with both cytokines. On the other hand, MΦ sensitive EL-4 (benzopyrene-induced thymoma of the C57BL/6 mouse origin, H-2^b) exhibited ICAM-1 and LFA-1 on the cell surface, which was markedly augmented by IFN- γ and TNF- α . Anti-LFA-1 antibodies blocked the tumoricidal activities mediated by MΦ against EL-4, but not VM-Glioma. It was thus suggested that there may be significant relationship between cell surface expression of LFA-1 and MΦ susceptibility in the EL-4 cell line, while the 3 glioma cell lines showed no interaction because of no expression of the molecules.

It has been postulated that MΦ may require a longer time, more than 20 hours, to show a tumoricidal action in the in vitro cytotoxicity assay, compared to cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. Thus, in parallel to experiments used with ^{51}Cr release-assay, ^3H -TdR release-assay was also evaluated to play a significant role in MΦ cytotoxicity. Whereas ratios of spontaneous release to maximum release were over 30% in 20 hr ^{51}Cr release-assay, those in ^3H -TdR release-assay were less than 20%, even in a longer 40 hr release-assay. Furthermore, actual cytotoxic values were significantly higher in the ^3H -TdR release assay. Therefore, it was found that this ^3H -TdR release-assay was much more useful in examining the cytotoxicity of MΦ against glioma cells.

In conclusion, activated MΦ had an ability of in vitro killing activity against glioma cells, which was augmented its cytotoxicity by IFN- γ and TNF- α . And it was suggested that the cytotoxicity mediated by activated MΦ was related to the LFA-1/ICAM-1 interaction between tumor cells and activated MΦ.

はじめに

腫瘍細胞に対して生体内における細胞性免疫に関与するエフェクター機構の主な免疫担当細胞として、(1) CTL (細胞傷害性T細胞)¹⁾, (2) NK (ナチュラルキラー) 細胞²⁾, あるいは (3) MΦ (マクロファージ)^{3,4)}などがあげられる。CTL や NK 細胞と比較して MΦ に関する抗腫瘍傷害機構は不明な点が多い。MΦ は通常、常在性 MΦ として組織中に存在し、種々の刺激により活性化 MΦ になると、微生物やその他の

清掃処理作用のみならず、分泌作用、抗原提示作用、殺菌作用、腫瘍細胞傷害作用、組織修復作用、骨の形成と修復作用、脂質の代謝作用など多種多様の機能を示し、生体の防御機構や恒常性の維持に重要な役割を担う細胞群である事が明らかにされてきた⁵⁾。また、従来より immunologically privileged site⁶⁾と言われた脳内においても脳腫瘍の生物学的悪性度と関連してリンパ球や MΦ など単核球の浸潤が認められており、局所性に免疫監視機構が働いている事が示唆されている^{7,8)}。しかしながら、脳局所に浸潤した単核球の

単離およびその長期培養が容易でない理由から、脳における活性化 M ϕ の認識機構と腫瘍傷害機序は不明である。

近年、悪性脳腫瘍を含め癌に対する養子免疫療法として LAK 細胞, CTL などが臨床応用されているが⁹⁻¹¹⁾、活性化 M ϕ を用いた治療法に関する報告は少なく¹²⁾、悪性脳腫瘍においてはまだ見当たらないようである。そこで、我々は局所浸潤能を有した活性化 M ϕ の抗腫瘍性に着目し、下記の3項目(第I部から第III部)について基礎的検討を行い、脳腫瘍細胞に対する活性化 M ϕ の傷害活性の機序を解析した。即ち、第I部では活性化 M ϕ の至適誘導法およびグリオーマ細胞に対する傷害活性、第II部では M ϕ の抗腫瘍活性の発現機序と腫瘍細胞認識機構、そして第III部では活性化 M ϕ の抗腫瘍活性の評価方法、について検討した。

最後に、活性化 M ϕ の脳腫瘍宿主に対する免疫療法の展望とその治療上の問題点、あるいは脳局所に浸潤した M ϕ と microglia の異同等 M ϕ の脳における免疫生物学的役割について考察を加えて報告する。

研究材料および方法

1. 実験動物

6週令の正常雄 C57BL/6 (H-2^b), C3H/He (H-2^k), DBA/2 (H-2^d)、および BALB/c (H-2^d) マウス(浜松 SLC Co. Japan より購入)を使用した。

2. 実験腫瘍

実験腫瘍は3種類のマウスグリオーマ株、VM-Glioma (spontaneously occurring astrocytoma of the VM mouse origin, H-2^b), 203-Glioma (methylcholanthrene-induced ependymoblastoma of the C57BL/6 mouse origin, H-2^b)、ならびに RSV-M (Schmitt-Ruppin Rous sarcoma virus-induced malignant glioma of the C3H/He mouse origin, H-2^k) を用いた。対照群として M ϕ 感受性の EL-4 (benzopyrene-induced thymoma of the C57BL/6 mouse origin, H-2^b)、および M ϕ 抵抗性の P815 (methylcholanthrene-induced mastocytoma of the DBA/2 mouse origin, H-2^d) を使用した。

グリオーマ細胞株の培養には10%非働化牛胎児血清(FCS, fetal calf serum, GIBCO) 添加 Dulbecco's modified essential medium (DMEM) 培地 (Nissui. Co.) を用い、浮遊細胞株には10% FCS 添加 RPMI-1640 培地 (Nissui. Co., 以下、完全培地とする) を用いて継代培養した。3種のグリオーマ細胞は monolayer 細胞

のため、継代培養には 0.1% trypsin および ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Wako Junyaku Co.) を添加した生理食塩水による trypsinization を必要とした。各培地には、Penicillin G 100 U/ml, Kanamycin 160 μ g/ml, および Polymyxin B 10 μ g/ml を添加した。全ての細胞は、GIBCO 社の mycoplasma detection kit を用いて mycoplasma が陰性である事を適宜確認した。

3. 薬剤および抗体

M ϕ 刺激誘導物質としては、thioglycollate 培地 (Nissui. Co.), lipopolysaccharide (LPS, trichloroacetate extract from *E. coli* 026: B6, Sigma), BCG (cell walls from *Bacillus Calmette-Guérin*, RIBI Inc.), heat-killed *corynebacterium parvum* whole cells (C.p., RIBI Inc.), muramyl-di-peptide (MDP, Sigma), Recombinant mouse interferon- γ (IFN- γ , specific activity=4.5-9 $\times$ 10⁶ units/mg, Genzyme), および recombinant mouse tumor necrosis factor- α (TNF- α , specific activity=4 $\times$ 10⁷ units/mg, Genzyme) を用いた。

蛍光抗体法と腫瘍傷害活性阻止試験には、各種抗体と indomethacin (Wako Junyaku Co.) を用いた。抗体として、anti-mouse lymphocyte function associated antigen (LFA)-1 antibody (KBA, diluted ascites fluid, concentration of 0.3-0.5 mg/ml, Seikagaku Co.), anti-intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 antibody (CAT-1, diluted ascites fluid, concentration of 0.3-0.5 mg/ml), anti-Mac-1 antibody (M1/70, Serotec Co.), fluorescein isothiocyanate-conjugated rat anti-mouse polyclonal immunoglobulin G (FITC-labeled IgG, The Binding Site Ltd.) を用いた。

4. エフェクター細胞 (M ϕ) の調整と活性化

in vivo での M ϕ 誘導法としては、次の種々の方法により調整した。(1)thioglycollate 2 ml 腹腔内投与後4日目、(2)LPS 200 μ g, (3)BCG 200 μ g, (4)C.p 200 μ g, (5)MDP 350 μ g, および (6)IFN- γ 10³ units を腹腔内投与後7日目のマウスを屠殺し、5 ml phosphate buffer-saline (PBS) にて腹腔洗浄後、回収された peritoneal exudate cells (PEC) を無血清 RPMI-1640 培地で各濃度に希釈し、96穴平底プレート (Corning, N.Y.) に 0.1 ml ずつ分注し、37°C, 5% CO₂ 条件下に2時間培養した。その後、非附着細胞を除去し、完全培地を 0.1 ml 加えた附着細胞をエフェクター細胞として用いた。得られた附着細胞は、ギムザ染色および非エステラーゼ染色法にて 95%以上が M ϕ である事

を確認した。

in vitro での Mφ の抗腫瘍活性に対する種々の物質の添加効果を調べる際には、上記の方法で得られた異なる成熟段階にある Mφ に対して、完全培地に種々の濃度の、(1)IFN- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml), (2)TNF- α (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml), (3)LPS (10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 μ g/ml), および (4)Prostaglandin E_2 inhibitor, indomethacin (10^{-7} , 10^{-5} M), を添加し 20 時間培養した。FCS の影響をみる場合には、上記の方法で得られた Mφ を、完全培地あるいは無血清 RPMI-1640 培地のみで 20 時間培養した。その後、上清を除去し、5% FCS 添加 RPMI-1640 培地で付着細胞である Mφ の細胞表面を 3 回洗浄し、新たに完全培地 0.1 ml を加えたものをエフェクター細胞として用いた。

5. 標的細胞の IFN- γ 処理

対数増殖期の腫瘍細胞を種々の濃度の IFN- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) 存在下に、37°C, 5% CO $_2$ 条件下で 24 時間培養した。その後、付着性の腫瘍細胞の場合には、0.1% EDTA を用いて浮遊細胞とした後、3 回洗浄し、新たに完全培地を加えて至適濃度に調整し標的細胞とした。IFN- γ により処理された細胞はトリパンブルーを用いた色素排除試験で 95% 以上が viable である事を確認した。

6. 蛍光抗体法

8 chamber slide (LabTek Co.) 上に付着させた対数増殖期の標的細胞および種々の成熟段階での Mφ を、-20°C acetone に 20 分間反応させた後に乾燥させ、細胞の固定を行った。その後、種々の抗体をスライド上に添加した。浮遊細胞である EL-4 を用いた場合には、Eppendorf (Iwaki Co.) 内で 2×10^5 個に細胞数を調整した後、種々の抗体を添加した。一次抗体として、1/50 に希釈した KBA, 1/50 に希釈した CAT-1, および 1/100 に希釈した M1/70 を、-4°C で 45 分間反応させた。PBS を用いて各細胞を 3 回洗浄し、二次抗体として 1/30 の濃度に希釈した FITC-labeled IgG を添加した後、-4°C で 45 分間反応させ、さらに各細胞を 3 回洗浄した。以上の過程を経て、浮遊細胞はサイトスピンドで 1000 回転、10 分間の遠心を行いスライドグラス上に回収した後に、グリセリンで封入し、蛍光顕微鏡で鏡検した。弱拡大で 100 個の細胞について調べ、全く発現していないものを (-), 75% 以下が発現しているものを (±), 75% 以上に明らかに発現しているものを (+), 75% 以上に非常に強く発現しているものを (++++), (+) と (++++ の中間を (++) とした。

7. ^{51}Cr 放出試験

対数増殖期の標的細胞を 5×10^6 /ml に調整し、0.1 ml ^{51}Cr ($^{51}\text{CrNa}_2\text{O}_4$, Du Pont corp.; specific activity = 1.0 mCi/ml) で 60 分間の標識を行った後、完全培地で 3 回洗浄し、あらかじめ分注しておいたエフェクター細胞上に 10^4 /well となるよう添加し、更に 20 時間混合培養した。その後プレートを 15000 転、10 分間遠心し、その上清を 0.1 ml ずつ回収し、遊離した radioactivity を ANSR gamma-counter で測定した。傷害活性は次の計算式で算出した。

$$\% \text{ Specific lysis} =$$

$$\frac{\{(\text{experimental release}) - (\text{spontaneous release})\}}{(\text{maximum release}) - (\text{spontaneous release})} \times 100$$

Effector to Target ratio (E/T) は、20, 10, および 5/1 とした。spontaneous release (自然解離) は完全培地 (0.1 ml) を添加した際に遊離した radioactivity とし、maximum release (最大解離) は 1% NP-40 (Sigma Chemical Co.) 溶液を 0.1 ml 添加した際に遊離した radioactivity とした。

8. ^3H -TdR 放出試験

対数増殖期の標的細胞に対し、20 μ Ci/ml となるように ^3H -TdR (tritiate-labeled methyl thymidine, Du Pont corp.; specific activity = 1.0 mCi/ml) を加え、37°C, overnight で標識を行った後、完全培地で 3 回洗浄し、あらかじめ分注しておいたエフェクター細胞上に 2×10^4 /well となるよう添加し、4, 8, 20, 40 時間培養した。各時間後にプレートを 1500 回転、10 分間遠心し、その上清を 0.1 ml ずつ回収し、2 ml scintillator (Packard Chemical Co.) とともに遊離した radioactivity を LD5000 scintillation-counter で測定した。傷害活性は次の計算式で算出した。

$$\% \text{ Specific lysis} =$$

$$\frac{\{(\text{experimental release}) - (\text{spontaneous release})\}}{(\text{maximum release}) - (\text{spontaneous release})} \times 100$$

E/T 比は、20, 10, および 5/1 とした。spontaneous release (自然解離) は完全培地 (0.1 ml) を添加した際に遊離した radioactivity とし、maximum release (最大解離) は 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS, Wako Junyaku Co.) 溶液を 0.1 ml 添加した際に遊離した radioactivity とした。また、最大解離に対する自然解離の比率 (S/M) を各アッセイごとに算出してアッセイ時間の至適時間を評価した。

9. 抗接着因子抗体を用いた腫瘍細胞傷害阻止試験

LPS 200 μ g の腹腔内投与後7日目に回収された PEC より分離された直後の活性化 M ϕ に、完全培地で種々の濃度に希釈した抗接着因子抗体である、KBA (1/160, 1/40, 1/20 dilution), CAT-1 (1/160, 1/40, 1/20 dilution), および M1/70 (1/160, 1/40, 1/20 dilution) を添加したものをエフェクター細胞とし、あらかじめ標識された標的細胞も直ちに添加した後、20時間の ^{51}Cr 放出試験と、20, 40時間の ^3H -TdR 放出試験を行った。E/T 比は 20/1 とした。コントロールとしては、抗接着因子抗体と同等量のタンパク量をもつ normal polyclonal IgG を用いた。また、これらの抗体は、抗体依存性細胞傷害活性を示さない事を確認した。

第 I 部：マウス腹腔 M ϕ のマウスグリオーマ細胞に対する傷害活性能

結果および考察

活性化 M ϕ の腫瘍傷害活性機序ならびに認識機構を検討する第一段階として、まずマウスグリオーマ細胞に対するマウス腹腔 M ϕ の抗腫瘍効果を検討した。

1. in vivo activation により活性化された M ϕ の傷害活性

M ϕ 活性化物質は多方面で検討されているが、その中で IFN- γ ¹³⁾, TNF- α ¹⁴⁻¹⁶⁾, interleukin (IL)-2¹⁷⁾, IL-4¹⁸⁾, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)¹⁹⁾, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)²⁰⁾ などのサイトカイン、あるいは LPS²¹⁾, MDP²²⁾, BCG²³⁾, C. parvum²⁴⁾ などの菌体由来成分に関する報告が M ϕ の抗腫瘍機序の解析と関連して数多

い。その中で我々は、(1)LPS, (2)MDP, (3)BCG, (4)C.p., および (5)IFN- γ を用い、種々のマウス生体 (腹腔) 内に直接投与することにより in vivo で活性化された M ϕ のマウスグリオーマ細胞に対する抗腫瘍性を比較検討した。その結果、LPS 200 μ g を C3H/He マウスの腹腔内に投与した後 5-7 日目に回収された PEC 由来の活性化 M ϕ をエフェクター細胞として用いた場合に、グリオーマ細胞に対し最も強い傷害活性を示した (Table 1)。

20時間の ^{51}Cr 放出試験では、E/T 比 20/1 で、VM-Glioma, 203-Glioma, RSV-M の3種のグリオーマ細胞に対し、各々約30%, 約15%, 約10%の傷害活性を示した。なお、コントロールに用いた M ϕ 感受性 EL-4 と M ϕ 抵抗性 P815 に対しては、各々約50%と5%以下であった。文献上、LPS 以外の物質も強い M ϕ 活性化作用を有する事が報告されているが、我々の実験系では LPS と比較してそれらの抗腫瘍活性の誘導性は低かった。その原因は M ϕ の活性化によって放出される多くの腫瘍傷害因子である、superoxide (O_2^-) などの活性酸素分子^{25,26)}, 中性セリンプロテアーゼ²⁷⁾, IL-1²⁸⁾, TNF- α ²⁹⁾ およびアルギニン由来の活性化窒素分子 (NO^{3-} , NO^{2-} , $\text{NO} \cdot$)³⁰⁻³²⁾ などの標的細胞に対する感受性の違い、その産生量の違い、あるいはエフェクター細胞と標的細胞間の種々の細胞接着因子を介した結合力の違いなどが関与していると思われる。

次に、至適濃度の LPS を生体内に投与し in vivo で活性化 M ϕ を誘導する場合、グリオーマ細胞に対し高い傷害活性を有する活性化 M ϕ がどの時期に最も効率的に誘導されるかを経時的に解析した。この際、M ϕ

Table 1 Comparison of augmenting cytotoxic effects among various macrophages (M ϕ) activations. Activated M ϕ were obtained from C3H/He mice following ip. injection of 200 μ g lipopolysaccharide (LPS), 200 μ g Bacillus Calmette Guerin (BCG), 200 μ g corynebacterium parvum (C.p.), 200 μ g muramyl-di-peptide (MDP), or 10^3 units interferon (IFN)- γ 7 days prior to 20 hr ^{51}Cr release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results $\pm$ standard error from 3 independent experiments. Effector to target of 20/1.

Tumor Cell Line	% Specific Lysis-Mediated by Macrophage Activating Agents				
	LPS(200 μ g)	BCG(200 μ g)	C.p.(200 μ g)	MDP(200 μ g)	IFN- γ (10^3 units)
VM-Glioma(astrocytoma)	32.1 $\pm$ 7.8	4.1 $\pm$ 1.7	3.5 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.6
203-Glioma(ependymoblastoma)	14.5 $\pm$ 6.9	3.9 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 1.5
RSV-M(malignant glioma)	10.2 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 1.6	1.4 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 1.5	3.4 $\pm$ 0.6
EL-4(thymoma;M ϕ sensitive)	52.4 $\pm$ 9.7	0.9 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 1.1	3.7 $\pm$ 3.3	2.2 $\pm$ 1.1
P815(mastocytoma;M ϕ resistant)	3.2 $\pm$ 1.8	4.1 $\pm$ 2.1	3.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 1.3

の感受性腫瘍細胞株である EL-4 に対する活性化 Mφ の抗腫瘍性と比較した。Fig. 1 に示す如く、LPS 腹腔内投与後 4 日目以降に得られた Mφ は両株化細胞に対し傷害活性を示すようになり、5 日目に最大活性を有し、E/T 比 20/1 で EL-4 に対し約 50%、VM-Glioma に

対し約 30% の傷害活性を示した。そして、その後数日間、活性化 Mφ の傷害活性は維持される事がわかった。

2. Mφ の傷害活性と MHC (Major Histocompatibility Complex) クラス I 抗原の膜発現性との関連性

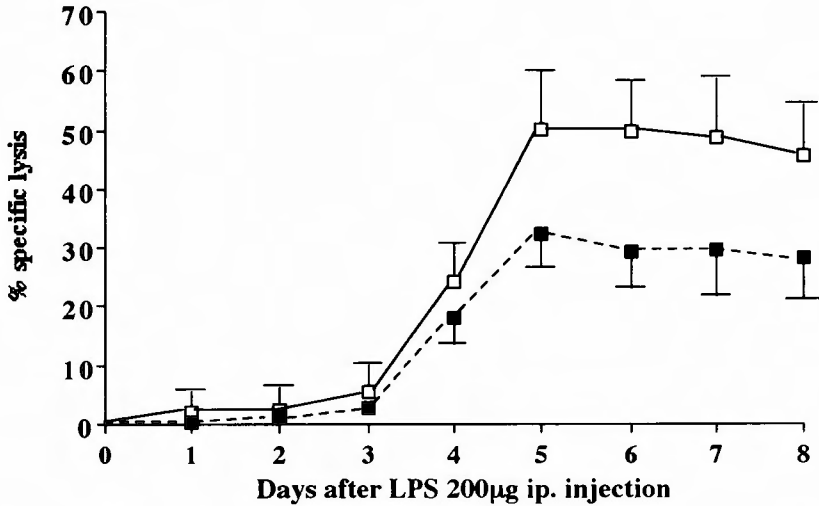


Fig. 1 Time course of killing activity of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Mφ) against EL-4 (—□—) and VM-Glioma (---■---). Activated Mφ were obtained from C3H/He mice following ip. injection of LPS 200 μg between days 0 and 8 prior to 20 hr ⁵¹Cr release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results ± standard errors from independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

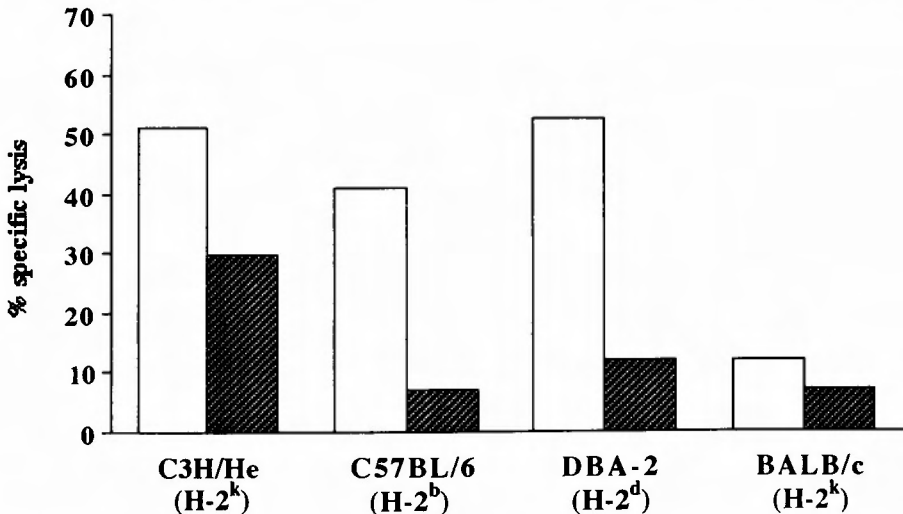


Fig. 2 Cytotoxicity of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Mφ) derived from mice of 4 strains against EL-4 (H-2^k, □) and VM-Glioma (H-2^b, ▨) was not major histocompatibility complex (MHC) restricted. % specific lysis is expressed as men of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

活性化 M ϕ の腫瘍細胞傷害活性が MHC クラス I 抗原の膜発現性により拘束性に調節されているか否かを MHC クラス I 抗原の異なる C3H/He (H-2^k), C57BL/6 (H-2^b), DBA/2 (H-2^d), および BALB/c (H-2^d) マウス由来の活性化 M ϕ を用いて検討した. Fig. 2 に示すように, 種々の異なるハプロタイプを有するマウスの腹腔内に LPS を投与した後, 7 日目に得られた活性化 M ϕ は, EL-4 (H-2^b) と VM-Glioma (H-2^b) の各々の腫瘍細胞に対して, MHC クラス I 抗原のハプロタイプとは無関係に傷害活性を示した. 即ち, C3H/He (H-2^k) と DBA/2 (H-2^d) マウス由来の活性化 M ϕ はともに E/T 比 20/1 で EL-4 に対しては約 50% の傷害活性を示したのに対し, VM-Glioma に対しては, 4 種のマウスの中では C3H/He マウス由来の M ϕ のみが E/T 比 20/1 で約 30% の有意な傷害活性を示した. その他の syngeneic の関係にある C57BL/6 マウスならびに allogeneic な関係にある DBA/2 および BALB/c マウス由来の活性化 M ϕ は VM-Glioma に対し有意な傷害活性を示さなかった. 従って, 活性化 M ϕ は MHC クラス I 抗原の膜発現性に対して非拘束性にその傷害活性を呈する事が示唆された.

3. 常在性 M ϕ と浸出性 M ϕ の *in vitro* activation 後の傷害活性 抗腫瘍活性を示していない常在性あるいは浸出性

M ϕ を, *in vitro* で IFN- γ あるいは TNF- α により刺激し, M ϕ 感受性細胞株である EL-4 と, グリオーマ細胞株の中で最も活性化 M ϕ に対し感受性を示した VM-Glioma を用い, その抗腫瘍活性を検討した. エフェクターとしては C3H/He マウス由来の常在性 M ϕ と thioglycollate の腹腔内投与後 4 日目に得られた浸出性 M ϕ を用いた. なお, 浸出性 M ϕ を用いた場合には, IFN- γ , TNF- α に加えて LPS の M ϕ 傷害活性増強作用に対する添加効果も検討した.

まず, 正常マウスより得られた常在性 M ϕ を, *in vitro* で 20 時間完全培地のみで培養した後にエフェクター細胞として用いた場合, EL-4 および VM-Glioma に対する傷害活性は認められなかった (Fig. 3). 一方, 種々の濃度の IFN- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) 存在下に培養した後の M ϕ をエフェクター細胞として用いた場合, IFN- γ の濃度依存性に M ϕ は傷害活性を示し, VM-Glioma に対しても低値ながら同様の傾向を示した. しかし, IFN- γ と比べ TNF- α (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) には両細胞株に対する M ϕ の傷害活性増強作用は明かではなかった.

次に, thioglycollate の生体内投与により誘導された浸出性 M ϕ の場合, 常在性 M ϕ と同様に完全培地での培養後では傷害活性は認められなかったが, *in vitro* で IFN- γ により活性化された M ϕ は濃度依存性

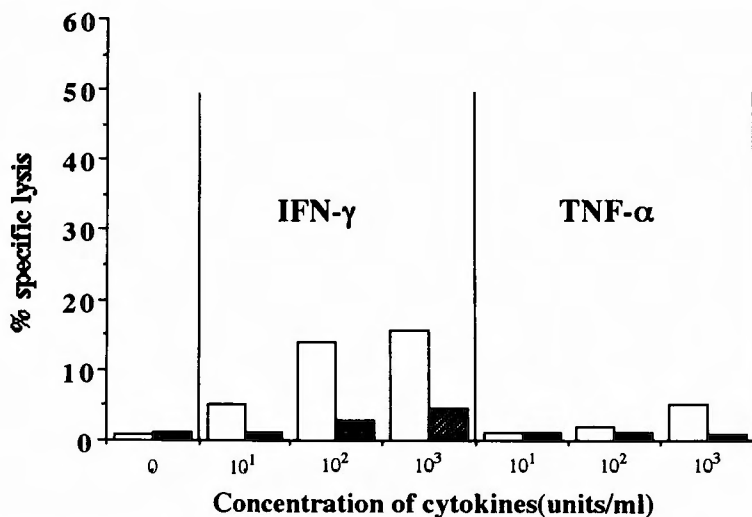


Fig. 3 Effects of interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α on the cytotoxicity of resident macrophage against EL-4 (□) and VM-Glioma (▨). Resident macrophages were obtained from C3H/He mice with peritoneal lavage. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from independent experiments Effector to target ratio of 20/1.

に両細胞株に対し傷害活性を示した (Fig. 4). IFN- γ の濃度が 10^2 units/ml 以上では, 浸出性 Mφ は常在性 Mφ よりも高い傷害活性値を示した. LPS は低濃度では有意な傷害活性増強作用を示さなかったが, $1 \mu\text{g/ml}$ の高濃度では EL-4 に対してのみ有意な傷害活性増強効果を認めた (Fig. 4). しかし, $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ の

低濃度の条件でも IFN- γ とともに添加すると, Mφ の傷害活性は EL-4 に対して相加または相乗効果を示し, VM-Glioma に対しても同様の傾向を認めた. 一方, TNF- α には, IFN- γ や LPS と比べ浸出性 Mφ の腫瘍細胞傷害活性に対する増強作用は明かではなかった. さらに, LPS との相加または相乗作用も認められな

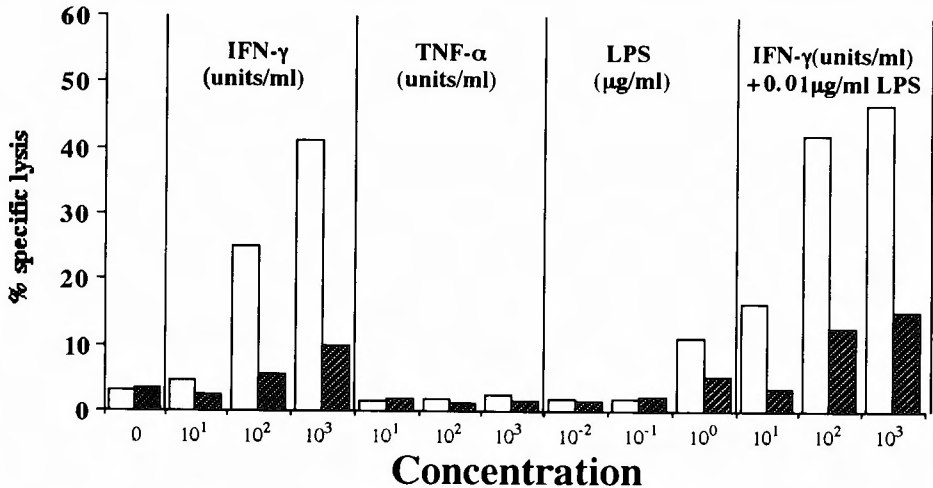


Fig. 4 Effects of interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , lipopolysaccharide (LPS) and combination of IFN- γ and $0.01 \mu\text{g/ml}$ LPS on the cytotoxicity mediated by thioglycollate-elicited macrophages against EL-4 ($\square$) and VM-Glioma (hatched). % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

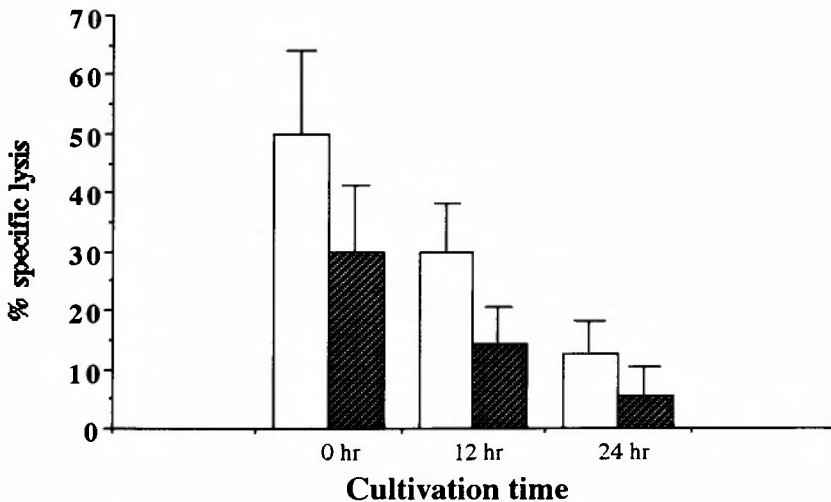


Fig. 5 Kinetics of spontaneous decrease in killing activity of activated macrophages (Mφ) following initiation of in vitro culture. Lipopolysaccharide (LPS)-activated Mφ were assayed for their cytotoxicity against EL-4 ($\square$) and VM-Glioma (hatched) at 0, 12, and 24 hr after initiation of in vitro culture. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results $\pm$ standard error from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

かった (データ未提示)。

M ϕ の抗腫瘍機序に関連したシグナル伝達経路は不明である。しかし、IFN- γ と LPS に関して、いずれも単独で活性化 M ϕ に働いて種々の腫瘍傷害因子の産生を惹起して抗菌作用を発現する事が指摘されている^{33,34}。抗腫瘍活性に関しては IFN- γ による一次刺激 (priming) 後に二次刺激として LPS の刺激 (triggering) が加わった場合、あるいは両者の併用時に M ϕ の傷害勝性を増強させるという抗腫瘍機構が報告されているが^{21,35,36}、必ずしもそうではないという報告もある³⁷。我々の実験系では、IFN- γ と LPS 間に相加または相乗効果を認めた。TNF- α も単独で M ϕ の抗腫瘍活性を誘導したり¹⁴、他の物質と synergistic に作用して、抗腫瘍活性を増強するという報告があるが¹⁵、我々の実験系では、常在性 M ϕ および浸出性 M ϕ に対する TNF- α の有意な抗腫瘍活性を誘導できなかった。

4. 活性化 M ϕ の長時間培養による抗腫瘍活性の自然低下

以上の結果より、種々の方法で刺激誘導された M ϕ の中で、LPS により *in vivo* で活性化された C3H/He マウス由来の M ϕ が、最も高い抗腫瘍傷害活性を示したので、この条件下で誘導した M ϕ を用い、活性化 M ϕ の抗腫瘍傷害機構を検討した。

まず、LPS により *in vivo* で活性化された M ϕ を *in*

vitro で培養を開始した後の抗腫瘍活性の経時的変化を観察した。Fig. 5 の如く、活性化 M ϕ は培養開始前では、E/T 比 20/1 で EL-4 に対し約50%、VM-Glioma に対し約30%の傷害活性を示した。しかし、培養12時間後には、各々約30%と約15%に低下し、培養24時間後には更に各々約15%と約5%に著減し、その後、M ϕ の傷害活性は培養時間の経過とともに消失していく事がわかった。従って、生体内で活性化された M ϕ を単に培養したのみではその抗腫瘍活性は次第に低下する事が示唆された。

5. 活性化 M ϕ の傷害活性自然低下に対する IFN- γ および TNF- α の影響

Fig. 5 に示したように、LPS の生体内投与により *in vivo* で活性化された M ϕ は、常在性 M ϕ や浸出性 M ϕ とは異なり、PEC から分離された直後では、最も高い傷害活性を示し、VM-Glioma より EL-4 に対しより高い傷害活性を呈した。しかし、*in vitro* で完全培地のみで長時間培養すると、その抗腫瘍傷害作用は自然に低下する事がわかった。そこで、この傷害活性の自然低下に及ぼす IFN- γ と TNF- α の影響を検討した。種々の濃度の IFN- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) や TNF- α (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) の存在下で20時間処理した M ϕ をエフェクター細胞として用いた。IFN- γ は、濃度依存性にその傷害活性の自然低下を抑制し、

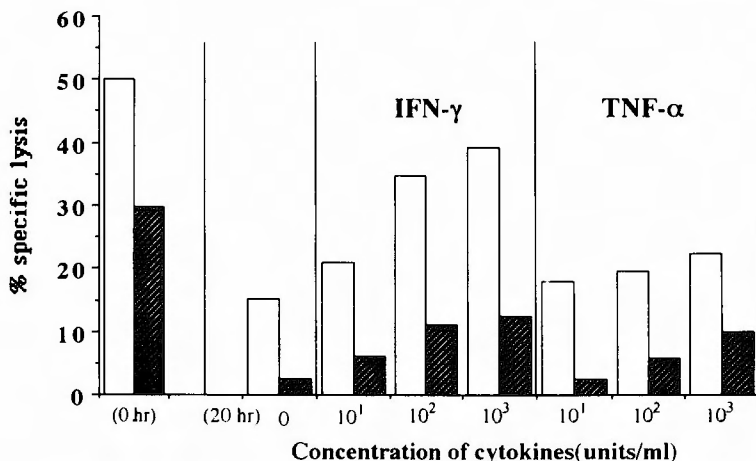


Fig. 6 Effects of interferon (IFN)- γ and tumor necrosis cfactor (TNF)- α on the cytotoxicity of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (M ϕ) against EL-4 ($\square$) and VM-Glioma ($\blacksquare$). LPS-activated M ϕ were cultured *in vitro* with IFN- γ or TNF- α for 20 hr. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

その抑制作用は VM-Glioma を用いた場合より、EL-4 を用いた場合の方がより顕著であった。一方、TNF- α も濃度依存性に活性化 M ϕ の傷害活性の自然低下に対する抑制効果を示したが、IFN- γ に比べ軽度であった (Fig. 6)。

小 括

1. 種々の M ϕ 活性化物質を用いて抗腫瘍活性を有する M ϕ を誘導し、3 種のマウスグリオーマ細胞 (VM-Glioma, 203-Glioma, RSV-M) に対する傷害活性を 20 時間の ^{51}Cr 放出試験で比較検討した。
2. in vivo においては、種々の M ϕ 活性化物質の中で LPS をマウス腹腔内に投与した場合に最も高いグリオーマ細胞に対する抗腫瘍効果を誘導できた。その際、活性化 M ϕ の抗腫瘍活性は、MHC クラス I 抗原の膜タンパク発現に非拘束性であり、生体内投与後 7 日目に得られた活性化 M ϕ が VM-Glioma, 203-Glioma, RSV-M の順に傷害活性を示した。
3. 常在性 M ϕ および浸出性 M ϕ はグリオーマ細胞に対し傷害活性を示さなかったが、IFN- γ あるいは LPS 単独添加により濃度依存性に抗腫瘍活性は増強された。さらに、IFN- γ および LPS 共存下では、M ϕ の抗腫瘍活性は相加または相乗的に増強

した。しかし、TNF- α による M ϕ のグリオーマ細胞に対する抗腫瘍活性の増強作用は明かではなかった。

4. 活性化 M ϕ の抗腫瘍活性は、in vitro での培養開始とともに急速に低下したが、IFN- γ あるいは TNF- α はその自然低下に対し抑制作用を示した。その抑制効果は、TNF- α に比べ IFN- γ の方がより強く認められ、また、VM-Glioma に対するよりも EL-4 に対する方がより顕著であった。

第 II 部：活性化 M ϕ の抗腫瘍傷害活性機序に関する検討

第 I 部で述べたように、in vivo で LPS により活性化された M ϕ は、グリオーマや EL-4 細胞に対し最も高い傷害活性を示したが、その抗腫瘍活性は in vitro で培養を開始すると 24 時間以内に著減した。M ϕ は機能的に異なる細胞の subpopulation から構成され、heterogeneity を示す細胞集団であるため、種々の物質で刺激誘導された M ϕ の中には様々な活性化段階の抗腫瘍傷害活性を有する subpopulation だけでなく、それとは逆に抑制作用を有する subpopulation も存在する可能性があり、それら種々の細胞集団の相互作用により生体の免疫応答が調節されていると考えられる³⁸⁻⁴¹⁾。我々が用いた活性化 M ϕ の抗腫瘍傷害作用の

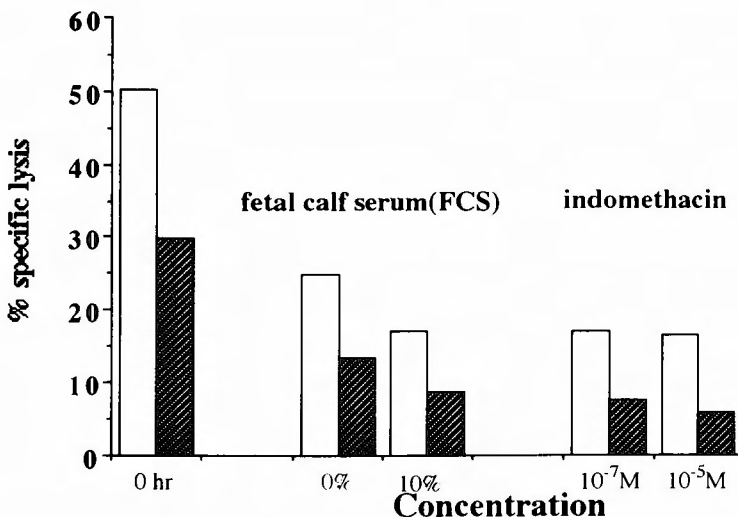


Fig. 7 Effects of fetal calf serum (FCS) and indomethacin on the cytotoxicity of LPS-activated macrophages (M ϕ) against EL-4 (□) and VM-Glioma (▨). LPS-activated M ϕ were cultured in vitro with FCS or indomethacin for 20 hr. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

in vitro における自然低下の機序としては、(1)抑制性 M ϕ より放出される可溶性 mediator の関与^{40,41)}, (2) FCS 内に存在する M ϕ 抑制物質の関与⁴²⁾, (3)活性化 M ϕ の腫瘍細胞との結合あるいは接着段階の低下⁴³⁾, などが考えられる。

以下の実験では各々について検討を行った。

1. 活性化 M ϕ の腫瘍傷害活性に及ぼす FCS および indomethacin の影響

LPS の腹腔内投与後 7 日目に回収された PEC より分離された直後の M ϕ を、さらに in vitro において、(1)10% FCS 添加完全培地、(2)無血清培地、(3)種々の濃度の indomethacin (10^{-7} , 10^{-5} M) を含む完全培地、の存在下で 20 時間培養した。付着細胞を洗浄した後、新たに完全培地を添加したものをエフェクター細胞として 20 時間の ^{51}Cr 放出試験を行った。腹腔細胞より分離された直後の M ϕ の傷害活性は、E/T 比 20/1 で、EL-4 と VM-Glioma に対し、約 50% と約 30% であった。しかし、in vitro で完全培地のみで 20 時間培養すると、各々約 15% と約 10% に低下した。一方、無血清培地のみで培養した場合には、その傷害活性は約 25% と約 15% であり、活性化 M ϕ の傷害活性の自然低下は完全培地下で培養した条件下でみられた抑制効果よりも少なかった (Fig. 7)。即ち、FCS 内には、M ϕ の抗腫瘍傷害活性を低下させる物質が存在する事

が示唆された。

LPS 腹腔内投与により in vivo で活性化された M ϕ 種々の濃度の indomethacin (10^{-7} , 10^{-5} M) を含む完全培地で 20 時間培養した後、腫瘍傷害活性試験を行った。いずれの濃度下においても indomethacin の添加では有意な傷害活性の増強効果あるいは抑制効果は認められず、本実験系では PGE₂ の関与はないものと考えられた (Fig. 7)。LPS による M ϕ の抗腫瘍作用は、prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生に関与する phospholipase A₂ の阻害剤である indomethacin によって阻害され、逆に、PGE₂ の添加により阻害は解除されるという報告があり、M ϕ の腫瘍活性機構に PGE₂ の関与が示されている⁴⁴⁾。一方、活性化 M ϕ が標的細胞を破壊する段階において PGE₂ を添加すると、M ϕ の抗腫瘍活性が抑制されるという報告もある^{45,46)}。我々の実験系では PGE₂ の関与は明かではなかった。これらの異なる実験結果は、実験に使用された M ϕ が多様な細胞集団であり、その採取部位、活性化物質の種類、標的細胞の種類、あるいは動物種の種類などに起因しているものと思われた^{47,48)}。

以上の結果より、FCS 中には PDG₂ 以外の M ϕ の抗腫瘍活性を抑制する物質が存在する事が示唆された。

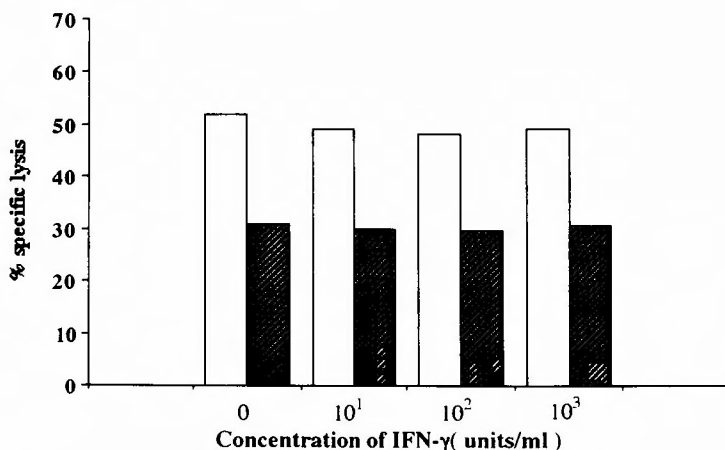


Fig. 8 No effect of 24 h pretreatment of target cells with interferon (IFN)- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) on cytotoxic activity of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (M ϕ) against EL-4 ($\square$) and VM-Glioma (▨). % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

2. 標的細胞の IFN- γ 処理が活性化 Mφ の抗腫瘍機構に及ぼす影響

IFN- γ は、腫瘍細胞認識機構において重要な役割を担っている MHC クラス I 抗原および MHC クラス II 抗原や、種々の細胞接着因子である ICAM-1⁴⁹⁾, LFA-1⁴⁹⁾ などの細胞膜タンパクの発現性の増強作用をもち、その結果、エフェクター細胞の腫瘍傷害活性を増強させるという報告が多い⁴⁹⁾。そこで、IFN- γ (10^1 , 10^2 , 10^3 units/ml) であらかじめ24時間前に処理した標的細胞と、LPS で刺激誘導された7日目の腹腔内 PEC から得られた活性化 Mφ とを混合培養し、標的細胞の IFN- γ 処理による活性化 Mφ の抗腫瘍傷害活性に及ぼす影響を検討した。Fig. 8 に示すように、いずれの条件下でも活性化 Mφ の傷害活性に有意な変化はみられなかった。一方、Fig. 6 に示したように、IFN- γ により活性化 Mφ の傷害活性の自然低下は濃度依存性に抑制された実験結果を考慮すると、IFN- γ は活性化 Mφ のグリオーマ細胞に対する抗腫瘍増強を有するが、グリオーマ細胞に対してではなく主にエフェクター細胞の活性化に対してその作用が発現されているものと考えられた。

3. 活性化 Mφ の腫瘍認識機構における細胞接着因子の関与

CTL, LAK 細胞および NK 細胞の腫瘍細胞認識機構に重要な役割を担っている細胞接着因子である LFA-1 (CD11a/18)⁴⁹⁾, そのリガンドである ICAM-1 (CD54)⁴⁹⁾ および Mφ 系細胞に発現され、LFA-1 と共通の β 鎖を有し、ICAM-1 がそのリガンドである、Mac-1 (CD11b/18)^{49,50)} の3種の接着因子が活性化 Mφ

の抗腫瘍傷害活性に関与しているかを検討した。

まず、標的細胞表面上における細胞接着因子の発現を3種類のグリオーマ細胞の中で最も高い Mφ 感受性を示した VM-Glioma と Mφ 感受性株 EL-4 を用い、蛍光抗体法で観察した (Table 2)。EL-4 は殆ど全ての細胞の膜表面に LFA-1 および ICAM-1 を発現しているが、Mac-1 の発現は認められなかった。IFN- γ (10^2 units/ml, 20時間) 処理すると、LFA-1 と ICAM-1 の膜発現性は著明に増強された。TNF- α (10^2 units/ml, 20時間) 処理後にも LFA-1 と ICAM-1 の膜発現性は増強されたが、その程度は IFN- γ に比べ軽度であった。一方、VM-Glioma には、LFA-1, ICAM-1, ならびに Mac-1 のいずれも発現されておらず、IFN- γ および TNF- α 処理後もその膜発現性は認められなかった。

次に、種々の成熟段階にある Mφ の細胞膜上における細胞接着因子の発現を検討した。Mac-1 と ICAM-1 は、その膜発現性に程度の差はあるものの、常在性 Mφ, 浸出性 Mφ および活性化 Mφ の全てにおいて細胞表面上に発現されており、IFN- γ (10^2 units/ml, 20時間) 処理でそれらの発現は増強された。また、TNF- α (10^2 units/ml, 20時間) 処理でもそれらの発現は増強されたが、IFN- γ に比べその強度は低かった。一方、LFA-1 は、いずれの Mφ 細胞表面上にも発現されておらず、TNF- α 処理後にもそれらの膜発現性は認められなかった (Table 2)。

4. 抗細胞接着因子抗体の活性化 Mφ の傷害活性に及ぼす影響

LFA-1, ICAM-1, および Mac-1 の細胞接着因子が、

Table 2 Expression of adhesion molecules on EL-4, VM-Glioma, resident, elicited and activated macrophages (Mφ) by fluorescence assay. Resident Mφ were obtained with peritoneal lavage, elicited Mφ were obtained by ip. injection of 2 ml thioglycollate, and activated Mφ were obtained by ip. injection of 200 μ g lipopolysaccharide (LPS). Expression of adhesion molecules on the Mφ or tumor cells were compared among three conditions, (1) untreated, (2) treated with 10^2 units/ml interferon (IFN)- γ for 20 hr, (3) treated with 10^2 units/ml tumor necrosis factor (TNF)- α for 20 hr. Results were obtained from 3 independent experiments. Expression of adhesion molecules is classified as follows: -, negative; +, positive; ++, mildly positive; +++, strongly positive

adhesion molecules	EL-4			VM-Glioma			resident Mφ			elicited Mφ			activated Mφ		
	untreated	IFN- γ	TNF- α	untreated	IFN- γ	TNF- α	untreated	IFN- γ	TNF- α	untreated	IFN- γ	TNF- α	untreated	IFN- γ	TNF- α
LFA-1	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ICAM-1	+	+++	++	-	-	-	+	++	++	+	++	++	++	++	++
Mac-1	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++

活性化 Mφ の抗腫瘍活性の発現に関与しているかを腫瘍傷害活性阻止試験で検討した。即ち、種々の濃度の抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体および抗 Mac-1 抗体を、20時間の ⁵¹Cr 放出試験アッセイ中に添加する事により、活性化 Mφ の抗腫瘍活性が阻止されるかを確認した。エフェクター細胞としては、ICAM-1 陽性、Mac-1 陽性、LFA-1 陰性である、LPS の腹腔内投与後 7 日目に得られた活性化 Mφ を用いた。

その結果、いずれの抗細胞接着因子抗体存在下も、活性化 Mφ の抗腫瘍活性を阻止する事はできなかった (Fig. 9)。文献上、種々の細胞接着因子の中で LFA-1/ICAM-1 interaction が活性化 Mφ の抗腫瘍傷害活性に関与しているという報告がある³⁰⁾。故に、必ずしも、我々が用いた Mφ の抗腫瘍活性にこれらの細胞接着因子が関与していないとは断定できない。それを示唆させる事実として、20時間の IFN-γ あるいは TNF-α 処理により著明にその発現が増強された ICAM-1 を細胞膜上に有する活性化 Mφ の抗腫瘍活性は、そのリガンドである LFA-1 を細胞膜上に発現している EL-4 に対しての方がそれを発現していない VM-Glioma に対してより高かった、という実験結果や、また、活性化 Mφ の細胞膜上に TNF-α より強い ICAM-1 の発現を認めた IFN-γ の方がより高い抗腫瘍活性の増強効

果を示したという実験結果より、Mφ の抗腫瘍活性の腫瘍認識機構には、エフェクター細胞と標的細胞間の LFA-1/ICAM-1 interaction が関与している事が推測された。

小 括

1. 活性化 Mφ のグリオーマ細胞に対する傷害活性の培養後にみられる急速な自然低下に関する機構を検討した。
2. 活性化 Mφ の傷害活性の自然低下が無血清条件下で抑制されたのに対し、indomethacin を加えた培養条件下では抑制されなかったことから、血清中に PGE² とは異なる抑制因子の存在が示唆された。
3. 活性化 Mφ は、Mac-1 陽性、ICAM-1 陽性、LFA-1 陰性であり、IFN-γ と TNF-α はともに ICAM-1 の著明な発現の増強効果を示したのに対し、グリオーマ細胞には有意な ICAM-1、Mac-1、LFA-1 の発現はなく、IFN-γ や TNF-α 処理後もそれらの膜発現性に変化はみられなかった。故に、接着因子の膜発現性は活性化 Mφ のグリオーマ細胞に対する抗腫瘍活性に影響を及ぼさなかったものと考えられた。

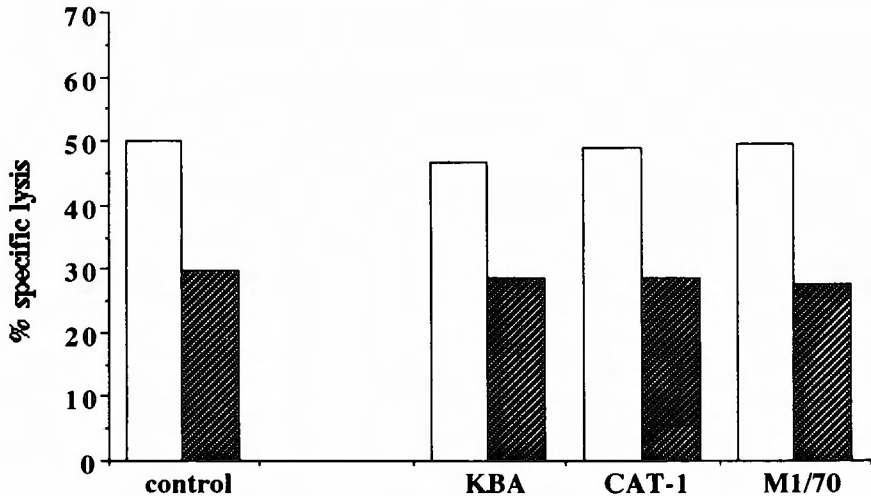


Fig. 9 Blocking effects of anti-adhesion molecules antibodies on the cytotoxicity mediated by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Mφ) against EL-4 (□) and VM-Glioma (▨). Anti-lymphocyte functioning antigen (LFA)-1 antibodies (KBA, 1/20 diluted ascites fluid), anti-intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 antibodies (CAT-1, 1/20 diluted ascites fluid), and anti-Mac-1 (M1/70, 1/20 dilution) were added during 20 hr ⁵¹Cr release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

EL-4 は, Mac-1 陰性, ICAM-1 陽性, LFA-1 陽性であり, IFN- γ と TNF- α はともに ICAM-1 と LFA-1 の発現を増強したが, グリオーマ細胞と同様に活性化 MΦ の抗腫瘍活性に影響は及ぼさなかった。

第三部: MΦ の腫瘍細胞傷害活性試験における検討; ^3H -TdR 放出試験の有用性について

MΦ の抗腫瘍効果発現は NK 細胞や LAK 細胞などと異なり長時間を要するため, 特に MΦ 抵抗性腫瘍細胞を標的細胞とする場合, 通常の ^{51}Cr 放出試験では評価判定が困難な事がある。そこで, 我々は腫瘍細胞傷害試験として ^3H -TdR を用いた方法で, 活性化 MΦ のマウスグリオーマ細胞に対する傷害活性を測定し, その有用性について ^{51}Cr 放出試験と比較検討した。

結果および考察

1. 傷害活性試験に用いる種々の放射性同位元素の特徴

MΦ の抗腫瘍効果を評価判定する場合, 種々の放射性同位元素を用いた方法が報告されている⁵¹⁻⁵⁵⁾。Table 3 に MΦ の細胞傷害活性を評価する上でよく用いられている放射性同位元素とそれぞれの特徴および欠点を示した。数多くの腫瘍細胞傷害性試験の中では, ^{51}Cr を用いた方法が最も一般的であるが, MΦ の抗腫瘍作用の発現は NK 細胞や LAK 細胞と異なり少なくとも20時間以上の時間を要するといわれているた

め⁵⁶⁾。20時間のアッセイで最大解離に対する自然解離の比率 (S/M) がしばしば30%を越す ^{51}Cr 放出試験はグリオーマ細胞のような MΦ 抵抗性細胞株に対してはその抗腫瘍効果を判定する際に困難な場合がある。¹¹¹In は細胞質内に取り込まれ24時間以上のアッセイが可能であるが, 半減期が短く取扱いがやや困難である⁵⁴⁾。 ^{131}I -IdUrd や ^{125}I -IdUrd は, ^3H -TdR と同様に核内に取り込まれ細胞傷害を反映するが, ^3H -TdR に比べ細胞に対する radiotoxicity が高いといわれている⁵⁷⁾。以上の理由により我々は長時間のアッセイが可能で, radiotoxicity が少なく, 細胞傷害を反映する ^3H -TdR を MΦ の腫瘍細胞傷害性試験に用い, これまでに述べてきた ^{51}Cr 放出試験と比較し, マウスグリオーマ細胞に対する活性化 MΦ の腫瘍細胞傷害能を検討した。

1. 常在性 MΦ の腫瘍細胞傷害活性能

MΦ は生体内で, 常在性 MΦ, 浸出性あるいは炎症性 MΦ, および活性化 MΦ などとして, 様々な免疫応答に関与しているため⁵⁾, (1)常在性 MΦ として正常マウスから回収された腹腔細胞, (2)浸出性 MΦ として thioglycollate 2 ml を腹腔内投与後 4 日目に回収された腹腔細胞および (3)活性化 MΦ として LPS 200 μg を腹腔内投与後 7 日目に回収された腹腔細胞, からそれぞれ付着性を利用して分離した 3 種類の MΦ を用い, 各エフェクターの腫瘍傷害活性を検討した。

まず, 常在性 MΦ の EL-4 および VM-Glioma に対する傷害活性を検討した。Fig. 10 に示すように ^3H -

Table 3 Characteristics of various radioisotopes utilized in macrophage cytotoxicity assays

radioisotopes	location	radiation	characteristics
$^{51}\text{CrNa}_2\text{O}_4$	intraplasmic	γ ray	The spontaneous release of radioactive label in the absence of any lysis is usually too rapid to allow the extension of assays beyond 24 hours.
^3H -TdR	intranuclear	β ray	^3H -TdR does not form a cytoplasmic pool and is less radiotoxic, but is partially reutilizable. Culture medium had better contain nonradioactive TdR to block this reutilization.
^{111}In	intraplasmic	γ ray	It is not easy to deal with ^{111}In because of its short half life
^{125}I -IdUrd	intranuclear	β ray	^{125}I -IdUrd does not form a cytoplasmic pool and is essentially nonreutilizable, but is 5 times as radiotoxic as ^3H -TdR.
^{131}I -IdUrd	intranuclear	γ ray	^{131}I -IdUrd does not form a cytoplasmic pool and is essentially nonreutilizable, but is 10 times as radiotoxic as ^3H -TdR.

TdR 放出試験において4, 8時間のアッセイでは常在性 Mφ はいずれの標的細胞においても E/T 比 20/1 で20%以下の傷害活性しか示さなかったのに対し, 20時間以上のアッセイでは EL-4 に対し E/T 比 20/1 で60%以上の傷害活性を示し, E/T 比 5/1 でも40%以上の傷害活性を示した. 故に, 常在性 Mφ は培養開始後

20時間を系かすると活性化され, 抗腫瘍傷害活性を呈するようになることが示唆された. 一方, VM-Glioma に対し常在性 Mφ は長時間のアッセイで E/T 比 20/1 でも20%以下の傷害活性しか示さなかった.

2. 浸出性 Mφ の腫瘍細胞傷害活性
thioglycollate で刺激誘導された浸出性 Mφ の EL-4

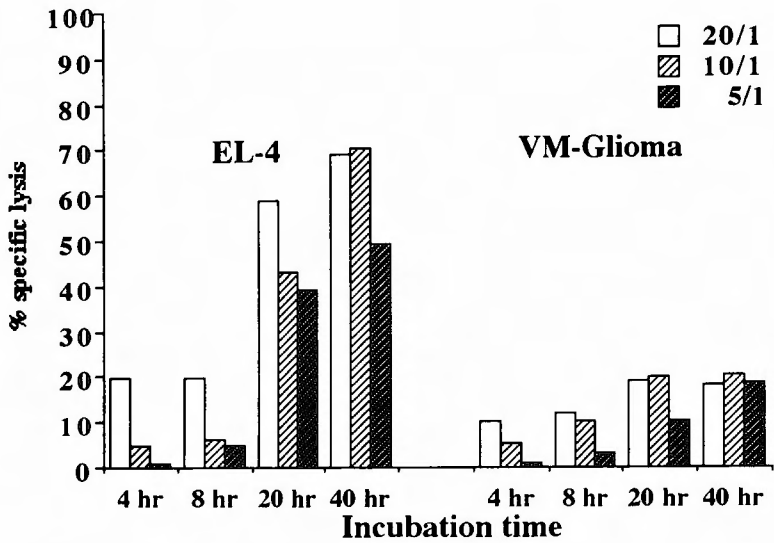


Fig. 10 Cytotoxicity mediated by resident macrophage (Mφ). Resident Mφ were obtained with peritoneal lavage of C3H/He mice. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments.

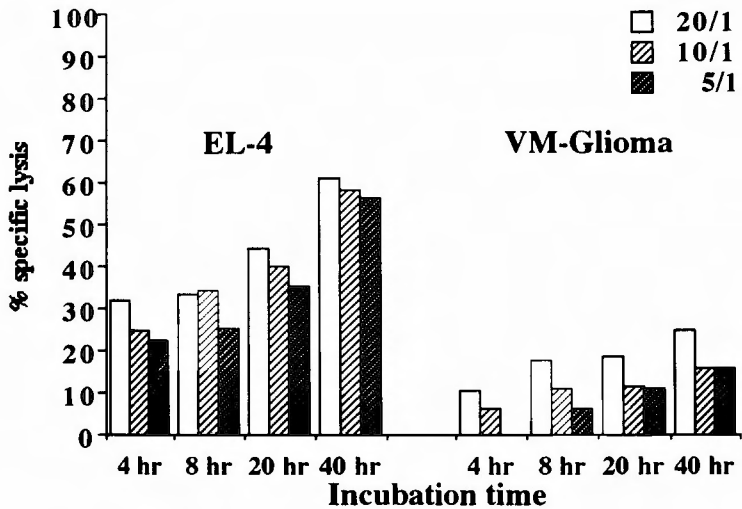


Fig. 11 Cytotoxicity mediated by elicited macrophage (Mφ). Elicited Mφ were obtained from C3H/He mice following ip. injection of 2 ml thioglycollate 4 days prior to ³H-TdR release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments.

と VM-Glioma に対する傷害活性を検討した (Fig. 11). 常在性 M ϕ と異なり浸出性 M ϕ は、4 時間の ^3H -TdR 放出試験で既に EL-4 に対して約 30% の傷害活性を呈し、20 時間以上では更に高い傷害活性を示すようになった。一方、VM-Glioma に対して浸出性 M ϕ は長時間のアッセイでも常在性 M ϕ と同様に高い傷害活性を示さなかった。

^{51}Cr 放出試験を用いて M ϕ の抗腫瘍活性を評価した場合、常在性 M ϕ および浸出性 M ϕ は EL-4 と VM-Glioma に対し 20 時間のアッセイ後も有意な傷害活性を示さなかった (Fig. 3, Fig. 4). また、最も高い傷害活性を示した活性化 M ϕ も 4、8 時間のアッセイ後では有意な傷害活性を示さず、活性化 M ϕ の抗腫瘍活性の発現には 16 時間以上のアッセイが必要であった (データ未提示)。

3. 活性化 M ϕ の腫瘍細胞傷害活性

in vivo で LPS により活性化された M ϕ の抗腫瘍傷害活性を検討した (Fig. 12). LPS で活性化された M ϕ は常在性 M ϕ や浸出性 M ϕ と異なり VM-Glioma に対し、 ^3H -TdR 放出試験において 8 時間のアッセイでは E/T 比 20/1 ですでに傷害活性 (約 25%) を呈するようになり、40 時間のアッセイでは更に高い傷害活性 (約 50%) を示した。一方、20 時間の ^{51}Cr 放出試験法で VM-Glioma に対する活性化 M ϕ の傷害活性を測定し

た場合には E/T 比 20/1 で約 30% であった (Fig. 1). 従って、VM-Glioma など M ϕ に対し比較的抵抗性を示す腫瘍細胞株を標的細胞とする場合、 ^3H -TdR 放出試験法の方が ^{51}Cr 放出試験法に比べより抗腫瘍効果を判定するのに有用であると考えられた。

4. 活性化 M ϕ の長時間培養による抗腫瘍活性の自然低下

^{51}Cr 放出試験法では、LPS により in vivo で活性化された M ϕ を in vitro で培養した際、その抗腫瘍活性は 24 時間以内に急速に著減した。 ^3H -TdR 放出試験法においても、活性化 M ϕ の傷害活性の自然低下を経時的に検討した。Fig. 13 の如く、活性化 M ϕ は培養開始前では、40 時間のアッセイにおいて、E/T 比 20/1 で EL-4 に対し約 75%、VM-Glioma に対し約 50% の高い傷害活性を示した。培養 24 時間後には、各々約 45% と約 40% に低下したが、有意な傷害活性を示した。さらに、培養 48 時間後でも各々約 40% と約 35% とその傷害活性は保持された。従って、長時間のアッセイが可能で、かつ、鋭敏である ^3H -TdR 放出試験法を用いれば、少なくとも 48 時間以上にわたり活性化 M ϕ の傷害活性は有意に認められる事がわかった。アッセイ時間が 96 時間までは、その腫瘍傷害活性は維持されている事も確認している (データ未提示)。

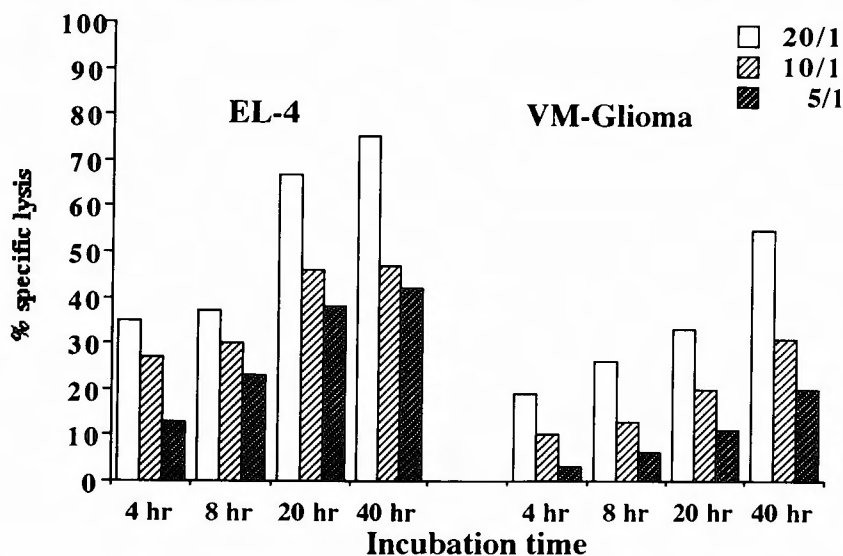


Fig. 12 Cytotoxicity mediated by activated macrophage (M ϕ). Activated M ϕ were obtained from C3H/He mice following ip. injection of 200 μg lipopolysaccharide (LPS) 7 days prior to ^3H -TdR release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments.

5. 活性化 Mφ の各種グリオーマ細胞株に対する傷害活性能の比較

LPS で活性化された Mφ の、3 種類のグリオーマ細胞株に対する傷害活性能を40時間の ^3H -TdR 放出試験法で比較検討した (Table 4). 活性化 Mφ の抗腫瘍活性は E/T 比 20/1 で EL-4 に対し75.6%, VM-Glioma に対し50.1%, RSV-M に対し45.7%, 203-Glioma に対し9.7%であり、グリオーマ細胞間では VM-Glioma, RSV-M, 203-Glioma の順に活性化 Mφ は抗腫瘍傷害活性を示す事がわかった. 同じハプロタイプを示す 203-Glioma (H-2^b) と VM-Glioma (H-2^b) において、前者は Mφ 抵抗性であり、後者は Mφ 感受性である事がわかった. また、エフェクターとして用いた活性化 Mφ (H-2^b) と同系の関係を示す RSV-M (H-2^b) は比較 Mφ 感受性である事も示唆された.

6. ^{51}Cr と ^3H -TdR を用いた放出試験法の比較

radioisotope を用いた腫瘍傷害試験では、細胞内に取り込まれた標的細胞が、エフェクター細胞に傷害された際に遊離する radioactivity を計測する事によって、その傷害活性を定量解析する. しかし、アッセイの時間が経過するにつれて、用いた radioisotope より放出される放射線が標的細胞を傷害するために、実際のエフェクター細胞による傷害活性能が正確に反映されなくなり、真の抗腫瘍活性を正しく評価できない場

合がある. 故に、放出試験における最大解離 (maximum release) に対する、自己崩壊した標的細胞の radioactivity を示す自然解離 (spontaneous release) の比率 (S/M) が、用いたアッセイ法の信憑性を決定するのに重要であり、一般的には、その比率が20%以下とした場合のデータが用いられている. そこで、LPS で活性化された Mφ の EL-4 および VM-Glioma に対する細胞傷害能を、S/M 比とともに ^{51}Cr と ^3H -TdR を用いた放出試験で比較検討した (Table 5).

^{51}Cr を用いたアッセイ法の場合、4 時間のアッセイ時間では S/M 比は EL-4 で16.5%, VM-Glioma で13.5%であり、ともに20%以下を示し、傷害活性を検討する上で有用であると考えられた. しかし、この場合における活性化 Mφ の腫瘍細胞傷害活性は E/T 比 20/1 で EL-4 に対しては14.5%であったが、VM-Glioma に対しては3.5%と極めて低値を示した. 20時間のアッセイ時間では、腫瘍細胞傷害活性は EL-4 で49.8%, VM-Glioma で29.5%を示したが、この時の S/M 比は、各々は33.2%と29.3%であり、評価判定の限界であると考えられた.

^3H -TdR を用いたアッセイ法の場合、4 時間のアッセイ時間では S/M 比は EL-4 で19.3%, VM-Glioma で9.3%であり、その際、各々の腫瘍細胞傷害活性は E/T 比 20/1 で各々、34.6%と18.4%であった. ア

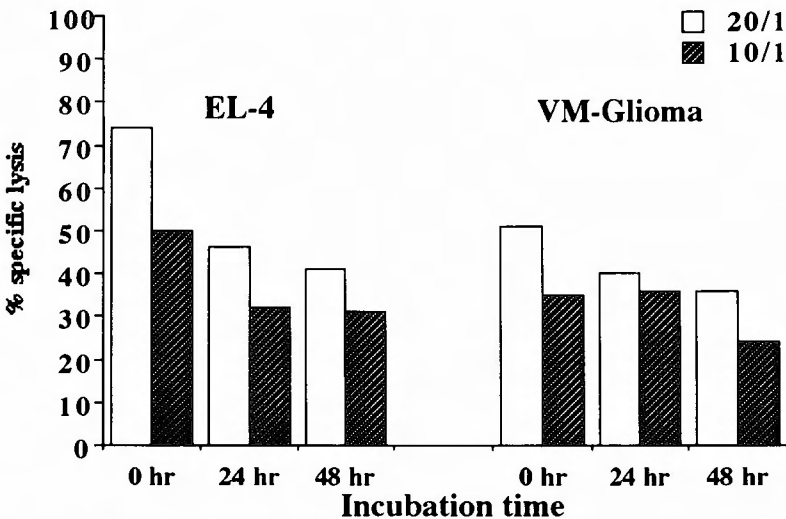


Fig. 13 Kinetics of spontaneous decrease in killing activity of activated macrophage (Mφ) following initiation of in vitro culture. Lipopolysaccharide (LPS)-activated Mφ were assayed for their ^3H -TdR release-assay at 0, 24, and 48 hr after initiation of in vitro culture. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments.

セイ時間を 20 時間とした場合、S/M 比は EL-4 で 25.9%, VM-Glioma で 13.5%であり、その際、各々の腫瘍細胞傷害活性は E/T 比 20/1 で各々 67.1%, 29.2%を示した。更に、アッセイ時間を40時間とした場合には、S/M 比は EL-4 では 39.5%と高値を示し、その腫瘍細胞傷害活性は E/T 比 20/1 で 75.6%を示したのに対し、VM-Glioma では S/M 比は 19.7%と比較的低値であり、その腫瘍細胞傷害活性は 50.1%を示した。

以上より、 ^3H -TdR を用いた放出試験は ^{51}Cr 放出試験よりも鋭敏であり、40 時間の長時間のアッセイでグリオーマ細胞のような比較的 Mφ 抵抗性株に対する傷害活性を評価する場合にも有用である事がわかった。従って、 ^3H -TdR 放出試験の至適条件下では種々のサイトカインが Mφ と標的細胞間の傷害活性メカニズムにどのような影響を及ぼすかを詳細に解析するこ

とが可能であると考えられた。しかしながら、 ^3H -TdR 放出試験で長時間のアッセイを行う際、放出された ^3H -TdR の一部が再び腫瘍細胞に取り込まれることがあり、その場合 Mφ の傷害活性値は低値を示し、真の Mφ の腫瘍傷害活性が正しく評価されないなどの欠点を伴う事がある。この問題点に対し、培地中に一定量の cold TdR を添加することによりアッセイ中における ^3H -TdR の再利用を防止することなどの注意が必要であると考えられた⁵⁰⁾。

8. 抗細胞接着因子抗体の Mφ の傷害活性に及ぼす影響

第Ⅱ部で述べたように活性化 Mφ の VM-Glioma および EL-4 に対する抗腫瘍活性において、種々の細胞接着因子の関与を示唆する所見は得られなかったが、Mφ の傷害活性発現には時間を要するため、長時間のアッセイが可能である ^3H -TdR 放出試験を用いて同

Table 4 Comparison of cytotoxicity mediated by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Mφ) among various tumor cell lines. Activated Mφ were obtained from C3H/He mice following ip. injection of 200 μg LPS 7 days prior to 40 hr ^3H -TdR release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results±standard error from 3 independent experiments.

E/T ratio	Target Cell Lines			
	Mφ sensitive line	Glioma cell lines		
	EL-4	VM-Glioma	RSV-M	203-Glioma
20/1	75.6 ± 18.8	50.1 ± 4.6	45.7 ± 12.7	9.7 ± 2.6
10/1	64.0 ± 13.1	47.6 ± 5.1	34.2 ± 7.3	5.4 ± 1.2
5/1	49.8 ± 10.6	38.6 ± 3.2	26.9 ± 14.5	2.0 ± 0.6

Table 5 Comparison between ^{51}Cr and ^3H -TdR release-assays associated with % specific lysis and ratios of spontaneous release per maximum release (S/M). Lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (Mφ) and labeled target cells were co-cultured for 4, 20, and 40 hours at effector to target ratio of 20/1. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results±standard errors from numbers (N) of independent experiments.

	^{51}Cr release-assay		^3H -TdR release-assay	
	EL-4	VM-Glioma	EL-4	VM-Glioma
S/M				
4 hr assay	16.5 ± 0.7 (N=2)	13.5 ± 2.1 (N=2)	19.3 ± 8.5 (N=3)	9.3 ± 4.0 (N=5)
20 hr assay	33.2 ± 0.9 (N=4)	29.3 ± 1.3 (N=7)	25.9 ± 8.3 (N=11)	13.5 ± 5.1 (N=11)
40 hr assay	92.4 (N=1)	89.2 (N=1)	39.5 ± 4.3 (N=5)	19.7 ± 6.0 (N=12)
% specific lysis				
4 hr assay	14.5 ± 0.7 (N=2)	3.5 ± 2.1 (N=2)	34.6 ± 8.5 (N=3)	18.4 ± 4.6 (N=5)
20 hr assay	49.8 ± 8.5 (N=4)	29.5 ± 4.9 (N=4)	67.1 ± 9.2 (N=6)	29.2 ± 8.7 (N=6)
40 hr assay	not done		75.6 ± 9.8 (N=5)	50.1 ± 4.6 (N=10)

様の腫瘍傷害阻止試験を行った。種々の濃度の抗 LFA-1 抗体, 抗 ICAM-1 抗体および抗 Mac-1 抗体を, 20時間および40時間の ^3H -TdR 放出試験アッセイ中に添加する事により, 活性化 M ϕ の抗腫瘍活性が阻止されるかを検討した。エフェクター細胞としては, ICAM-1 陽性, Mac-1 陽性, LFA-1 陰性である, LPS の腹腔内投与後7日目に得られた活性化 M ϕ を用いた。

LFA-1 陽性, ICAM-1 陽性, Mac-1 陰性の EL-4 細胞に対して, 抗 LFA-1 抗体を用いた場合, 活性化 M ϕ の抗腫瘍傷害活性は抗体の濃度に依存して阻止された (Fig. 14)。抗 Mac-1 抗体は抗 LFA-1 抗体と比べその阻止効果は軽度ではあった。しかし, 抗 ICAM-1 抗体を用いた場合には抗腫瘍活性に変化はみられなかった。

一方, LFA-1, ICAM-1, および Mac-1 すべてを細胞膜表面に発現していない VM-Glioma を標的細胞とした場合には, これらの抗体による活性化 M ϕ の傷害活性に対する抑制効果は20時間, 40時間いずれのアッセイにおいても認められなかった (データ未提示)。

この実験では, 抗接着因子の抗体をアッセイ中に添加したため, 種々の細胞接着因子の抗体が, 標的細胞側か, エフェクター細胞側かどちらに主に関与してい

るかは断定はできない。しかし, 活性化 M ϕ の抗腫瘍効果発現において細胞接着因子が関与している事は40時間の ^3H -TdR 放出試験を用いて初めて示唆された事であり, M ϕ の抗腫瘍効果発現をみる場合には, 長時間の培養が可能である ^3H -TdR 放出試験が ^{51}Cr 放出試験に比べ有用であった。

グリオーマ細胞に発現する細胞接着因子のひとつとして neuronal cell adhesion molecule (NCAM) が NK 細胞の傷害活性と関連性を有するという報告があり, 注目されている⁵⁹⁾。しかし, 活性化 M ϕ のグリオーマ細胞に対する腫瘍傷害活性における NCAM の膜発現性と意義を検討した報告はなく, 今後の研究課題と考えられる。

小 括

1. 種々の活性化段階の M ϕ のグリオーマ細胞に対する抗腫瘍活性を ^3H -TdR を用いた放出試験で測定し, ^{51}Cr 放出試験と比較検討する事により ^3H -TdR 放出試験の有用性を確認した。
2. ^3H -TdR 放出試験においては in vivo で LPS により活性化された M ϕ は VM-Glioma, RSV-M, 203-Glioma の順に有意な傷害活性を示した。その際, 長時間 (40時間) アッセイでも, 最大解離に対す

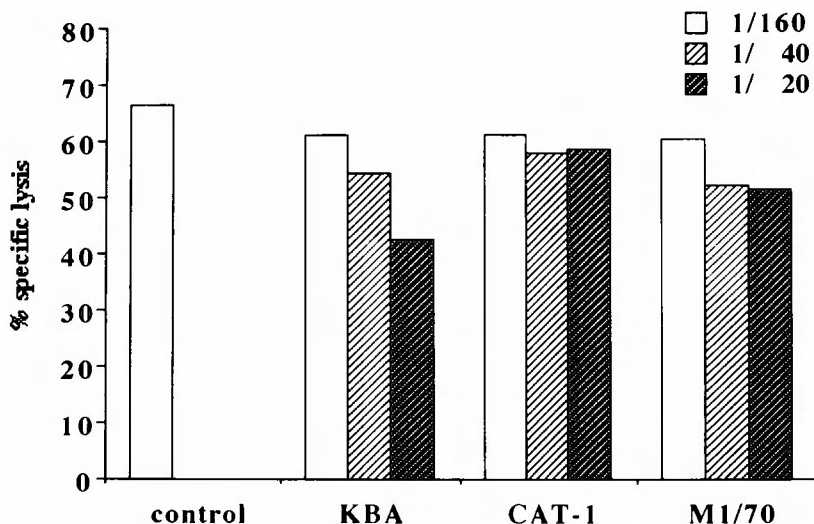


Fig. 14 Blocking effects of anti-adhesion molecules antibodies on the cytotoxicity mediated by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages (M ϕ) against EL-4. Anti-lymphocyte functioning antigen (LFA)-1 antibody (KBA, 1/160, 1/40, 1/20 diluted ascites fluid), anti-intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 antibody (CAT-1, 1/160, 1/40, 1/20 diluted ascites fluid), and anti-Mac-1 (M1/70, 1/160, 1/40, 1/20 dilution) antibody were added during 40 hr ^3H -TdR release-assay. % specific lysis is expressed as mean of triplicate results from 3 independent experiments. Effector to target ratio of 20/1.

る自然解離の比率は20%を越える事はなかった。

3. 細胞接着因子の中では、LFA-1 が、活性化 Mφ の腫瘍細胞発現に関与している事が長時間の ^3H -TdR 放出試験で示唆された。

総 括

Mφ は、運動性と強い貪食能を持ち、細胞質顆粒に富む大型の単核球細胞であり、生体防御での免疫生物学的役割、特にその認識機構と抗腫瘍活性が注目されている⁵⁾。脳内では Mφ 系細胞として microglia が存在し、その起源は van Furth らにより骨髄幹細胞由来の単核食細胞であると提唱されているが⁶⁰⁾、glioblast 由来であるという説も報告されており⁶¹⁾、いまだ統一的な見解が得られていない。近年、microglia の培養法が確立され⁶²⁾、その生物学的役割が次第に明らかにされてきた。即ち、IL-1 産生による astrocyte 増殖への関与⁶³⁾、TNF 産生による組織変性、抗腫瘍活性への関与⁶⁴⁾、IFN- γ による MHC クラス I および MHC クラス II 抗原の膜発現増強とその免疫応答への関与⁶⁵⁾、astrocyte から産生された IL-3 あるいは GM-CSF による microglia の増殖への関与⁶⁶⁾、astrocyte あるいは microglia から産生された IL-6 による astrocyte 由来の NGF 産生の誘導、そして、最近では、脳内での human immunodeficiency virus (HIV) ウイルス感染の主な細胞である⁶⁷⁾、などの報告が注目される。さらに microglia の同定法としてこの細胞表面に存在する糖残基を特異的に認識する RCA-1 lectin や GS-1 lectin に対する抗体を用いた標識方法が従来の鍍銀法に比べ有用である事が確立されてきた⁶⁸⁾。しかし、脳腫瘍組織からの microglia の単離培養が困難である事から、脳における Mφ の生物学的役割については依然として不明な点が多い。また、癌に対する Mφ の抗腫瘍性は詳細に調べられているが、脳腫瘍細胞に対する Mφ の作用に関する報告は少ない。そこで、我々はこの Mφ に着目し、グリオーマ細胞に対する活性化 Mφ の抗腫瘍性を実験的に検討した。その結果、マウス腹腔細胞由来の活性化 Mφ はグリオーマ細胞に対し、傷害活性能を有する事がわかった。さらに、IFN- γ あるいは TNF- α などのサイトカインが標的細胞のみならずエフェクターである活性化 Mφ の細胞表面に発現される細胞接着因子との相互関係により、その認識機構と傷害機構において重要な役割を担っている事がわかった。

抗腫瘍活性を有する Mφ のシグナル伝達経路は最近

解明されつつあるが、不明な点も少なくない。Mφ 活性化物質として、IFN- γ ¹³⁾、TNF- α ¹⁴⁻¹⁶⁾、IL-2¹⁷⁾、IL-4¹⁸⁾、GM-CSF¹⁹⁾、M-CSF²⁰⁾、LPS²¹⁾、など数多くが報告されている中で、IFN- γ の抗腫瘍性に関する解析が注目される。Mφ の活性化には、IFN- γ による priming が必須であり、引き続き LPS などによる triggering が引き起こされて最終的に Mφ が活性化されるといわれている³⁵⁻³⁷⁾。さらに、最近の分子レベルの解析の結果から、IFN- γ によるシグナル伝達は、receptor を介する機構⁶⁹⁾、protein kinase C の活性化が関与する機構⁷⁰⁾、あるいは Ca^{2+} channel を介する機構⁷¹⁾ などが明らかにされている。また、LPS によるシグナル伝達には、receptor を介する機構⁷²⁾、 PGE_2 や cyclic 3', 5' adenosine monophosphate (cAMP) の活性化が関与する機構⁷⁴⁾、あるいは GTP 結合蛋白が関与する機構^{73, 74)} などが報告されている。他の活性化物質の抗腫瘍機構は解明されていないのが現状である。

Mφ は多くの腫瘍傷害因子を放出することにより、抗腫瘍活性を示す。その傷害因子の中では、活性酸素分子^{25, 26)}、中性セリンプロテアーゼ²⁷⁾、IL-1²⁸⁾、TNF- α ²⁹⁾ および活性化窒素分子 (NO^{3-} 、 NO^{2-} 、 $\text{NO} \cdot$)³⁰⁻³²⁾ などが報告されている。しかし、グリオーマ細胞に対する抗腫瘍活性に如何なる傷害因子が関与しているかは不明であり、今後の検討が必要である。

Mφ は先にも述べたように多様な機能をもつ細胞集団であるため、活性化 Mφ の中には抗腫瘍活性を有する Mφ だけでなく、抑制性 Mφ も存在している可能性が高い。また、担癌状態では、腫瘍細胞自身より放出される transforming growth factor- β (TGF- β) などの抑制性物質の関与⁷⁵⁾、生体内で産生された抑制性 Mφ から放出される PGE_2 のような可溶性 mediator の関与^{40, 41)}、などにより単に強力な抗腫瘍活性をもつエフェクター細胞を担癌宿主に投与してもその治療効果は有効でない場合が多い。また、反応性の fibrosis、脳内においては gliosis 形成により、エフェクター細胞と腫瘍細胞との接着性の傷害が生じ、そのために Mφ の治療効果の弊害となる事が示唆されている。

従って、Mφ を用いた養子免疫療法を確立する上においての問題点としては、(1)採取方法、(2)増殖方法、(3)活性化方法、および、(4)投与方法、に加えて、上に述べたように、担癌宿主側のエフェクター機構の発現に対する抑制機構の解除、などがあげられる。Mφ を用いた治療法をさらに期待される治療法のひとつとするためには、将来、microglia あるいは生体内

に豊富に存在する腹腔 M Φ などを、遺伝子工学的手法を用いて種々のサイトカイン遺伝子を導入する事により、抑制性 M Φ を含まない monoclonal な抗腫瘍活性化 M Φ を作製し、臨床応用の足がかりにしたいと考えている。

以上、マウス腹腔 M Φ のグリオーマ細胞に及ぼす抗腫瘍活性における基礎的検討を行い、また、活性化 M Φ の抗腫瘍活性機構、脳内における最近の知見などについて述べ、M Φ を用いた養子免疫療法の展望について考察した。M Φ のグリオーマ細胞に対する傷害活性機構を研究することは、悪性脳腫瘍の治療についてのみならず、脳内の免疫調節機構を解明する上においても重要な課題であると思われる。

結 語

1. 4種のマウス腹腔細胞由来の M Φ を、種々の M Φ 活性化物質を用いて活性化し、グリオーマ細胞に対して傷害活性を有する M Φ を誘導した。生体内で LPS により活性化された C3H/He マウス由来の M Φ が、マウスグリオーマ細胞株に対し最も高い傷害活性を示した。
2. IFN- γ は、常在性 M Φ や浸出性 M Φ に対し、単独で濃度依存性に抗腫瘍性の発現を誘導し、LPS との共存下で相加または相乗効果を示した。一方、TNF- α は抗腫瘍性の発現には関与を示さなかった。
3. 活性化 M Φ の抗腫瘍傷害機構において、IFN- γ と TNF- α は、濃度依存性にその抗腫瘍性に対し増強する作用を示した。一方、FCS はその発現に抑制的に作用したが、PGE₂ の関与は明らかではなかった。
4. 活性化 M Φ の抗腫瘍活性は、MHC クラス I 抗原の膜タンパク発現に非拘束性であった。
5. 抗腫瘍性をもつ活性化 M Φ において、生体内のエフェクター細胞の腫瘍細胞認識機構に重要である種々の細胞接着因子の発現を検討した。その結果、活性化 M Φ は、Mac-1 陽性、ICAM-1 陽性、LFA-1 陰性であり、IFN- γ と TNF- α はともに、ICAM-1 の著明な発現の増強効果を有する事がわかった。40時間の ³H-TdR 放出試験を用いた場合、抗 LFA-1 抗体が部分的に活性化 M Φ の抗腫瘍性を抑制することが示唆された事より、LFA-1 と M Φ の抗腫瘍活性の関連性が示唆された。
6. M Φ の抗腫瘍活性を評価する上で、⁵¹Cr 放出試験と ³H-TdR 放出試験を比較検討した。³H-TdR 放出試験は、長時間のアッセイが可能であり、感度が鋭敏な

ため、短時間のアッセイでも、活性化 M Φ のグリオーマ細胞に対する抗腫瘍性の評価が可能であった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科菊池晴彦教授に深甚なる謝意の意を表します。また、終始御指導頂きました現島根医科大学脳神経外科山崎俊樹助教授、および京都大学脳神経外科織田祥史助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Burnet FM: Immunological surveillance in neoplasia. *Transplat Rev.* 7: 3-25, 1971.
- 2) Herberman RB and Ortaldo JR: Natural killer cells: their role in defense against disease. *Science* 214: 24-30, 1981.
- 3) Chow DA, Greene MI, and Greenberg AH: Macrophage-dependent, NK cell-independent "natural" surveillance in syngeneic mouse. *Int. J. Cancer* 23: 788-797, 1979.
- 4) Hibbs JB, Chapman HA, and Weinberg JB: The macrophage as a antineoplastic surveillance cell: biological perspectives. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24: 549-570, 1980.
- 5) 徳永 徹: マクロファージ. 講談社サイエンティク: 60-89, 1987.
- 6) Michael Apuzzo LJ and Mitchell MS: Immunological aspects of intrinsic glial tumors. *J. Neurosurg* 55: 1-18, 1981.
- 7) Paine DJ, Handa H, Miyatake S, et al: Immunohistochemical analysis of infiltrating lymphocytes in central nervous system tumors. *Neurosurgery* 18: 776-781, 1986.
- 8) Shinonaga M, Chan CC, Kuwabara T, et al: Immunohistological evaluation of macrophage infiltrates in brain tumors. *J. Neurosurg* 68: 259-265, 1988.
- 9) Rosenberg SA, Lotze MT, Mull LM, et al: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activating killer cells and interleukin-2 or high-dose of interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889-897, 1987.
- 10) Rosenberg SA, Packard BS, Achtersold PM, et al: Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 319: 1676-1680, 1988.
- 11) Kitahara T, Watanabe O, Okumura K, et al: Establishment of interleukin 2 dependent for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor. *J. Neuro-oncol.* 4: 329-336, 1987.

- 12) Reinhard A, Carman S, George W, Lohr, et al: Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: A new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **50**: 7450-7456, 1990.
- 13) Schreiber RD: Identification of gamma-interferon as a murine macrophage-activating factor for tumor cytotoxicity. *Contemporary Topics in Immunology* **13**: 171-195, 1984.
- 14) Heidenreich S, Weyners M, Gong JH, et al: Potentiation of lymphokine-induced macrophage activation by tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **140**: 1511-1518, 1988.
- 15) Esparza I, Mannel D, Ruppel A, et al: Interferon γ and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma Mansoni*. *J. Exp. Med.* **166**: 589-594, 1987.
- 16) Koizumi H, Ehrke MJ, Mace K, et al: Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the induction of murine macrophage tumoricidal activity. *Cancer Res.* **47**: 2793-2798, 1987.
- 17) Malkovsky M, Loveland M, North M, et al: Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* **325**: 262-265, 1987.
- 18) Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, et al: B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J. Immunol.* **139**: 135-141, 1987.
- 19) Grabstein KH, Urdal DL, Tushishi RJ, et al: Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage stimulating factor. *Science* **232**: 506-509, 1987.
- 20) Suzu S, Yokota H, Yamada M, et al: Enhancing effect of human monocyte colony-stimulating factor on monocytes tumoricidal activity. *Cancer Res.* **49**: 5913-5919, 1989.
- 21) Pace JL and Russell SW: Activation of mouse macrophages for tumor cell killing. I. Quantitative analysis of interactions between lymphokines and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **126**: 1863-1869, 1981.
- 22) Fogler WE and Fidler IJ: The activation of tumoricidal properties in human blood monocytes by muramyl dipeptide requires specific intracellular interaction. *J. Immunol.* **136**: 2311-2317, 1986.
- 23) Hibbs JB. Jr: Activated macrophage nonimmunologic recognition.; Target cell factors related to contact inhibition. *Science* **180**: 868-870, 1973.
- 24) Okuda S, Taniguchi K, Nomoto K, et al: Accessory cell function in tumor-bearing mice and effects of *Corynebacterium parvum*. *J. Natl. Cancer Inst.* **69**: 1293-1296, 1982.
- 25) Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**: 319-326, 1987.
- 26) Nathan CF, Bruckner LH, Silverstein LE, et al: Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. *J. Exp. Med.* **149**: 84-99, 1979.
- 27) Adams DO: Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. *J. Immunol.* **124**: 286-292, 1980.
- 28) Gaffney EV and Tasai SC: Lymphocyte-activating and growth inhibitory activities for several sources of native and recombinant interleukin 1. *Cancer Res.* **46**: 3834-3839, 1986.
- 29) Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, et al: Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5233-5237, 1986.
- 30) Klostergaard J, Leroux ME, and Hung MC: Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro; Characterization of cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways in vitro. *J. Immunol.* **147**: 2802-2808, 1991.
- 31) Hibbs Jr JB, Vavrin Z, and Taintor RR: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition to target cells. *J. Immunol.* **138**: 550-560, 1989.
- 32) Stuehr DJ and Marletta MA: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J. Immunol.* **139**: 518-525, 1987.
- 33) Hamilton TA and Adams DO: Molecular mechanism of signal transduction of activated macrophage. *Immunol. Today* **8**: 151-158, 1987.
- 34) 四宮博人, 中野昌康: エンドトキシンの細胞内シグナル伝達. *化学療法の領域* **5**: 47-52, 1989.
- 35) Pace JL, Russell SW, Gray PW, et al: Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* **130**: 2011-2013, 1983.
- 36) Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* **127**: 179-185, 1981.
- 37) Sadik JR, Hoyer M, Rinehart JJ, et al: Lymphokine supernatant-induced human monocyte tumoricidal activity; Dependence on the presence of γ interferon. *Cancer Res.* **45**: 1940-1945, 1985.
- 38) Bursukey, I and Goldman R: On the origin of macrophage heterogeneity. *J. Reticulo-endothel. Soc* **33**: 207-220, 1983.

- 39) 片岡達治: 免疫抑制マクロファージ 免疫薬理 2: 359-364, 1984.
- 40) Shibata Y and Volkman A: The effect of bone marrow depletion on prostaglandin E-producing suppressor macrophages in mouse spleen. *J. Immunol.* 136: 3987-3994, 1985.
- 41) Schultz RM, Pavlidis NA, Chirigos MA, et al: Regulation of macrophage tumoricidal function. *Science* 202: 320-321, 1978.
- 42) Walker L, Lowrie DB, Andrew PW, et al: Activation of mouse macrophages by maintenance in serum free medium. *Immunology* 73: 109-113, 1991.
- 43) Somers SD, Pastin JP, and Adams DO: The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided into two qualitatively distinct types. *J Immunol* 131: 2086-2093, 1983.
- 44) Drysdale BE and Shin HS: Activation of macrophages for tumor cytotoxicity; Identification of indomethacin sensitive and insensitive pathways *J. Immunol.* 127: 760-765, 1981.
- 45) Parhar RS and Lala PK: Prostaglandin E2 mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *J. Leukocyte. Biol.* 44: 474-484, 1988.
- 46) Tannenbau CS and Hamilton TA: Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J. Immunol.* 138: 951-956, 1987.
- 47) 片桐達雄, 清瀧千晴, 濱岡利之他: 各種刺激物質により誘引されたマウス腹腔渗出マクロファージの γ -インターフェロンおよび Lipopolysaccharide 反応性の差異について. 日本免疫学会総会記録 16: 315, 1986.
- 48) Fidler IJ: Whether MuIFN- γ primes or activates macrophages in tumor cell killing. *J. Leuko. Biol.* 37: 475-479, 1985.
- 49) 宮坂昌之: 接着分子 メジカルビュー社, 1991.
- 50) Ho MK and Springer TA: Mac-1 antigen: quantitative expression in macrophage populations and tissue, and immunofluorescent localization in spleen. *J. Immunol.* 128: 2281-2286, 1982.
- 51) Ting CC, Park YJ, Nunn ME, et al: Comparison of three isotopic assays of cell-mediated cytotoxicity against mouse tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 323-330, 1977.
- 52) Webb DA, Mostowski HS and Gerrard TL: Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J. Immunol.* 146: 3682-3686, 1991.
- 53) Peavy DL and Piece CW: Cell mediated immune response in vitro; Elimination of specific cytotoxic lymphocyte response by ^3H -thymidine suicide. *J. Immunol.* 115: 1521-1524, 1975.
- 54) Wiltout RH, Taramelli D and Holden HT: Measurement of macrophage-mediated cytotoxicity against adherent and non-adherent target cells by release of $^{111}\text{indium-oxine}$. *J. Immunol.* 127: 319-331, 1981.
- 55) Teruhiko Utsugi and Sabro Sone: Comparative analysis of the priming effect of human interferon- γ , α , and β on synergism with muramyl dipeptide analog for anti-tumor expression of human blood monocytes. *J. Immunol.* 136: 1117-1122, 1986.
- 56) Sone S, Berestein GE and Fidler IJ: Kinetics and function of tumor cytotoxic factor produced by human monocytes activated to the tumoricidal state. *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 583-590, 1985.
- 57) Kurt G Hofer and Walter L Hughes: Radiotoxicity of intranuclear tritium, $^{125}\text{iodine}$ and $^{131}\text{iodine}$. *Radiation Res.* 47: 94-109, 1971.
- 58) Ertl HH, Feinendegen LE, Heiniger HJ, et al: Iodine-125, a tracer in cell biology; Physical properties and biological aspects. *Phys. Med. Biol.* 3: 447-456, 1970.
- 59) Nitta T, Yagita H, Okumura K, et al: Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J. Exp. Med.* 170: 1757-1761, 1989.
- 60) van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, et al: The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. WHO.* 46: 845, 1972.
- 61) Ling EA: The origin and nature of microglia. *Adv. Cell Neurobiol.* 2: 33-39, 1981.
- 62) Suzumura A and Mezitis SGE: MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain.; Induction of Ia antigen expression by γ -interferon. *J. Neuroimmunol.* 15: 263-268, 1987.
- 63) Giulian D, Baker TJ, Lachman LB, et al: Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J. Exp. Med.* 164: 594-604, 1986.
- 64) Sawada M, Kondo N, et al: Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 491: 394-399, 1989.
- 65) Suzumura A and Siverberg DH: MHC antigen expression on glial cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 540: 495-497, 1988.
- 66) Frei K and Bodmer S: Astrocyte-derived interleukin-3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 137: 3521-3526, 1986.
- 67) Koenig S and Gendelman HE: Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS pa-

- tients with encephalopathy. *Science* **233**: 1089-1091, 1986.
- 68) Mannoji H and Yeger H: A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol.* **71**: 341-345, 1986.
- 69) Celada A, Gray PW, Rinderenecht E, et al: Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* **160**: 55-74, 1984.
- 70) Somers SD, Weiel JE, Hamilton TA, et al: Biochemical models of γ -interferon action; Altered expression of transferrin receptors on murine peritoneal macrophages after treatment in vitro with PMA or A23187. *J. Immunol.* **134**: 293-298, 1985.
- 71) Celada A and Shreiber RD: role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon- γ . *J. Immunol.* **137**: 2373-2379, 1986.
- 72) Hamilton YR, Golenbock DT, and Raetz CRH: Lipid A binding site in membranes of macrophage tumor cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 14802-14807, 1988.
- 73) 赤川清子: エンドトキシンのマクロファージ活性化作用. *化学療法の領域*. **5**: 41-45, 1989.
- 74) Harnett MM and Klaus GGB: G protein regulation of receptor signalling. *Immunol. Today* **9**: 315-320, 1988.
- 75) Tunawaki S, Sporn M, Ding A, et al: Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature* **334**: 260-262, 1988.