

# 細胞賦活剤ルミンの マクロファージ活性化作用と癌治療への基礎検討

川崎医療短期大学 医用電子技術科

三 戸 恵一郎

(平成7年8月21日受理)

## Macrophage Enhanced by Cell Activating Agent, Lumin and its Application to Cancer Immunotherapy

Keiichiro MITO

*Department of Medical Engineering  
Kawasaki College of Allied Health Professions  
Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan  
(Received on Aug. 21, 1995)*

**Key words** : マクロファージ, 細胞賦活剤, ルミン, レーザ光, 癌治療, T/B比, 免疫機能

### 概 要

細胞賦活剤である感光色素ルミンを担癌ヌードマウス(雄)へ投与すると共に, その光吸収ピークの波長に合わせたレーザ光照射を行い癌腫部局所の免疫機能を高め, 癌治療を行う光免疫癌治療法の有効性について検討した。方法は癌移植後増大した癌腫部ヘルミンを50ng局注すると共に, 比較的生体浸透性に優れた波長780nmの近赤外レーザ光を1分間照射した。この操作を1日おきに2週間行い, その後飲料水と共にルミンのみを1日平均約0.02 $\mu$ gほど実験終了まで経口投与した。その結果, 対照群はいずれも癌が増大したが, 処置群は処置4週後から腫瘍部のルミン注入部を中心にして癌細胞の変性を伴うコラーゲン増殖による瘢痕化が進み, 処置後約15週で腫瘍が萎縮した。さらに, 癌腫部の組織切片にはマクロファージ, リンパ球の集合や, 増殖したコラーゲンが癌巣を封じ込め癌増殖を抑制していることが認められた。またリンパ球のT細胞とB細胞の比は処置群で明らかに高く, ルミン投与と光照射すなわち光免疫療法によって癌細胞の破壊が免疫学的に促進されたことが窺われた。

### 1. はじめに

1981年に癌が死因率のトップになって以来, 癌による死亡者は毎年約6千—8千人程度増加し, すでに年間の死亡者数は23万人を突破するに至った。とくに, それは日本人の35才から75才の間, 各年代層ごとでも, また男女別に見ても全てにおいて癌は死因率のトップを占めている。この癌の治療に対してこれまで放射線や抗癌剤さらに外科的な切除などの治療が行われているが, 一部正常な細胞を破壊するために副作用を生じること, 生体本来の防御機能である免疫機能を低下させるために癌の転移を促すこと, 外科的な切除は生体機能へ重大な障害を与える

ことなど, 多くの治療上の難点がある。これに対して, 生体本来の治癒力を高める, すなわち免疫機能を改善することによって癌の治療をおこなうものが癌の免疫療法である。癌に対する免疫療法の有効性についてはこれまで, 1) 癌の自然退縮, 自然治癒の事実があること, 2) 免疫療法による癌の退縮, 治癒の事実があること, 3) 免疫力の低下, 抑制が発癌や癌の再発転移を促す事実, とくに老人や子供, 先天性, 後天性免疫不全症患者(エイズなど)に癌が多発すること, 免疫抑制剤を長期間投与されている臓器移植患者に癌が多発することなどが上げられる。また, 4) 化学発癌物質, 放射線, 発癌ウイルスなどの発癌物質が免疫を抑制する事実な

どが上げられることから発癌と免疫機能低下との関連性は高く、逆に癌に対する免疫学的治療が有効であることは明らかで、副作用や、癌の転移を促進しない治療法として重要である。

そこで本研究ではこれまで細胞賦活剤として用いられているシアニン系ペンタチメン三核型感光色素ルミンが癌治療における抗癌剤の副作用を抑制すること、これまでの研究でマクロファージの貪食能を促進すること、アレルギー性疾患などの免疫疾患にたいして有効であることからルミンによる癌の免疫学的な治療法について検討した。さらに、このルミンがある特定の光を吸収することに着目して、レーザー光照射の効果についての検討を行った。

## 2. 感光色素ルミン

ルミンは戦前理化学研究所の感光色素研究室で合成され、1934年波多野によってその生物学的作用の研究が着手された。1940年には今永によって微量のルミン投与が創傷や炎症の治癒促進作用があり、とくに難治性潰瘍 (BCG潰瘍, 非特異的下腿潰瘍) や慢性炎症に有効であることが報告された<sup>1-4)</sup>。この物質は細胞が虹のようにきれいに生き生きと輝くという意味や、波多野の名称から波をとり虹波と名付けられ、当初東洋医学的な細胞賦活作用をもつ物質として、戦時下の軍人の凍傷や創傷、火傷の薬として使用された。しかし、戦後は抗生物質などのように即効性のある薬にかくれて忘れられかけていたものである。これまでの研究で、このルミンがマクロファージの貪食能を著しく促進すること、

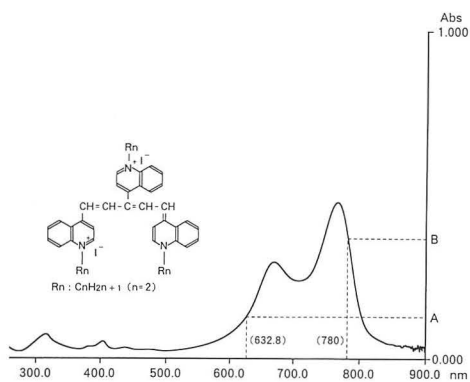


図1 ルミンの構造とその光吸収スペクトル

その作用は血清中のGCグロブリンに対してリンパ球であるB細胞からのβガラクトシダーゼや、T細胞からのシアリダーゼの酵素作用によって、GCグロブリンをマクロファージ活性因子に変える作用が明らかになった<sup>5-9)</sup>。

## 3. 方 法

### 3.1 ルミンと光照射

ルミンは分子量が789.54で図1に示すような構造式であり、さらに感光色素として670nm、および770nmに、光吸収ピークを有する。そこでこの2つのピークに近い波長のレーザー光を照射して、光の吸光度とルミンの活性作用を検討するために波長632.8nmのHe-Neレーザー光(10mW, 3235H-PC, Hughes Aircraft Co., USA), 波長780nmの半導体レーザー光(4mW, LT026MD, Sharp)を光源として用いた。

### 3.2 in vitro に於けるマクロファージ貪食能の検討

まず、マウス (Balb/c, 10-20週齢, 雌) の腹腔渗出細胞をCohnら<sup>10)</sup>や, Griffinら<sup>11)</sup>の方法で取り出し, 牛胎児血清10%を含むMEM培地で細胞数を $1-2 \times 10^6$ 個/mlに調整して, 5mlシャーレに1.5mlずつ分注した。つぎに図2の実験のプロトコールに示すように10ng/mlのルミン0.5mlを入れ, 37°Cの5%CO<sub>2</sub>フラン器で30分間培養した。この細胞を光照射群および非照射群

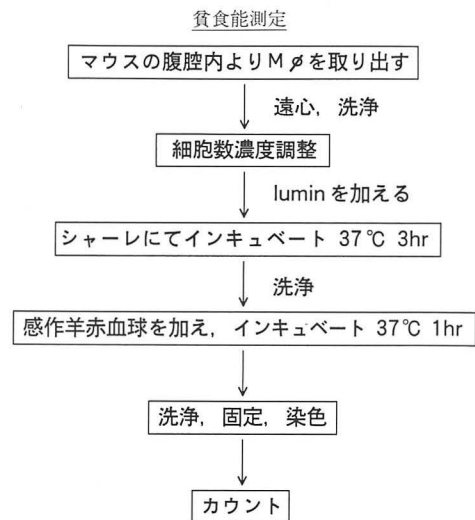


図2 マクロファージの貪食能評価のための実験方法

のグループに分け、光照射のグループは、さらに各々の光を照射時間を変えて照射した。各群でシャーレは3枚づつ用意した。また、照射光強度は光源とシャーレの距離を変えることによって、シャーレ上で0.07mW/cm<sup>2</sup>になるように調整した。強度の確認は Optical Power Meter (44 XLA, Photodyne Inc., USA) を用いて行った。つぎに、余分な色素とマクロファージ以外の細胞を取り除き、さらに3時間培養した。なおマクロファージの活性度は、Bianco ら<sup>12)</sup>の方法、即ち3時間培養後のシャーレに、IgG 抗体を感作した羊赤血球 (0.5%) を入れ、1時間培養後に Giemsa 染色を行ってマクロファージが貪食した赤血球を各々のシャーレで3回づつカウントして評価した。

### 3.3 移植したヒト癌への光免疫療法

ヌードマウス (BALB/cA JcL-nu, 5週齢, 雄) の右背部皮下にヒト肺癌 (細胞数: 10<sup>7</sup>個) を移植した。6週後腫瘍が直径20mm程度に増大

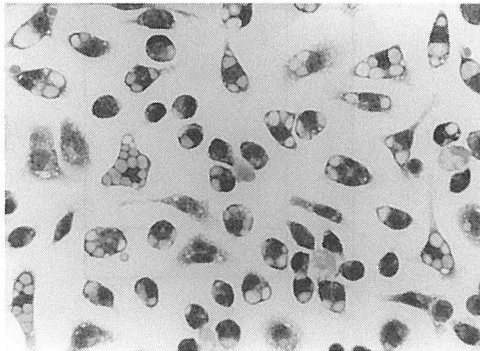


図3 羊赤血球を貪食したマクロファージ

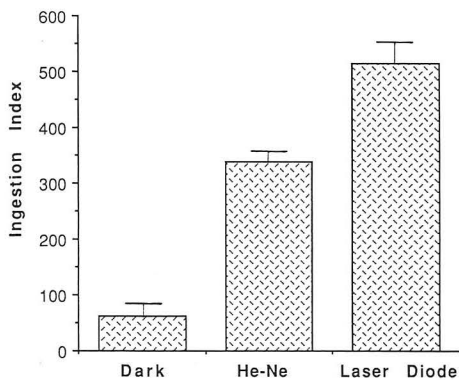


図4 光の波長の違いによるマクロファージの貪食能の差

したところで、処置群と対照群に分けて、処置群へはルミン (500 ng/ml) を腫瘍部局所に0.1ml ずつ6回に分けて注射し、1日おきに2週間波長780nmの半導体レーザー光を体表面から腫瘍内部に照射した。この場合の光照射は皮膚を通す必要があるために光強度は2 mWとやや高い強度で直接腫瘍部へ1分間照射した。同時にルミン混入の飲料水を作成、第1回目の処置後自由摂取させてマウス1匹当たり1日平均約0.02μgのルミンが経口投与されるようにした。免疫機能の評価はマウス末梢血を採取して、各リンパ球にモノクローナル抗体をラベルした後フローサイトメトリ (FACStar, Becton-Dickinson, USA) により細胞数10<sup>4</sup>個をサンプリングして、リンパ球の分布パターンから免疫機能を評価した。

## 4. 結果と考察

図3に羊赤血球を貪食したマクロファージの顕微鏡写真を示す。この図から貪食した羊赤血球の数と貪食にかかわったマクロファージの数から、次式の Bianco らの方法によって貪食能 (Ingestion Index) を評価した。

$$\text{貪食能} = (\text{赤血球を貪食したマクロファージの数}) \times (\text{マクロファージ1個が貪食した赤血球の平均の数})$$

その結果、図4に示すようにマクロファージの貪食能はルミンの高い吸光度をもたらす波長の光 (図1参照) によって明らかに高かった。したがって吸収ピークが最大に近い770nmの波長の光照射であれば、最もマクロファージの貪

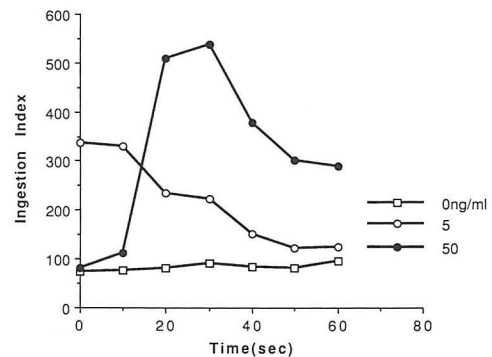


図5 半導体レーザー光の照射量によるマクロファージ貪食能の変化 (ルミン濃度: 0, 5, 50 ng/ml)

食能が高まることが窺われた。また、光の照射量については、照射時間を変えて検討した結果、図5に示すように20-30secの間、すなわち照射エネルギーが約 $2 \times 10^{-3} \text{ J/cm}^2$ で食能が高く、照射エネルギーが大きくなるとやや減少する傾向が得られた。しかし、光照射のみの場合、同図(ルミン10ng/ml)に示すように食能に顕著な差は見られず、このことから、この程度の微弱光では細胞への影響はほとんどないことが考えられた。一方、ルミンの濃度については同図の5と50ng/mlを比較すると明らかに高い濃度では光照射により食能が減少することから、ルミンと光との間には相乗効果的に最適な濃度と照射量があることが窺われた。

ヌードマウスへ移植したヒト癌の対照群はいずれも図6(A)のように癌が増大した。しかし処置群に於ては処置後4週頃から腫瘍部はルミン

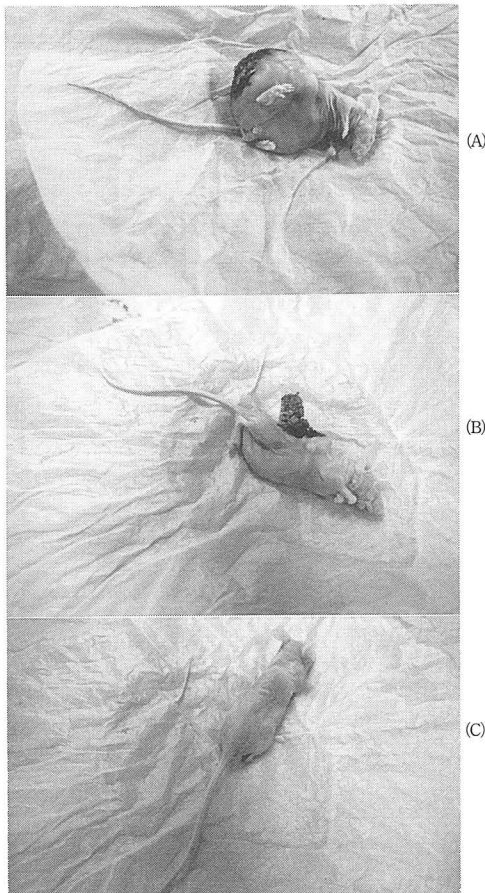
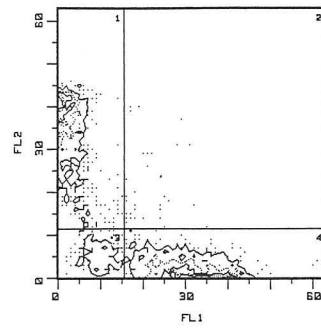
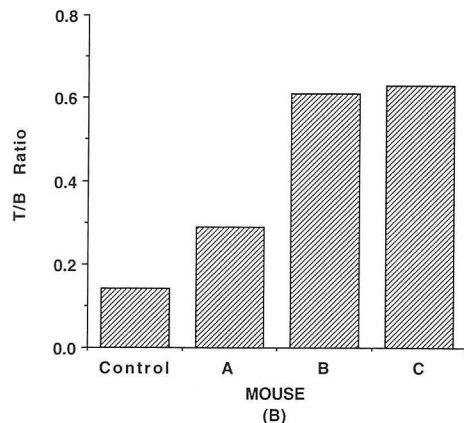


図6 光免疫療法により処置した移植ヒト癌

の局所注入部を中心にして次第にコラーゲン増殖による癬痕化が進み、12週でほぼ全体が癬痕化した(同図(B))。さらに腫瘍部が萎縮したマウスが得られた(同図(C))。一方、癌および周辺の組織切片の顕微鏡による観察の結果、癌細胞へのリンパ球、マクロファージの集合や、線維芽細胞の活性化によって増殖したコラーゲンが癌腫部を封じ込め癌増殖を抑制していることが観察されており、このことから本法の癌治療の大きな作用の一つはこのコラーゲンが最終的に癌増殖を抑制することが示唆された。これらのマウスの末梢血リンパ球の分布の一例を図7(A)に示した。同図FL1はB細胞認識抗体(I-Ad)との反応強度を、FL2はT細胞認識抗体(Thy1, 2)との反応強度を表している。つまり、分画1はT細胞を、4はB細胞を等高線により反応強度とその細胞数を表している。B細胞に対するT細胞の割合をT/B比として各マウスについて表すと図7(B)のような結果が得られた。



(A)



(B)

図7 ヒト癌を移植したマウス末梢血のT, B細胞の分布

この図から癌が増大した対照群マウスの末梢血はT/B比が0.29と低く、処置群ではT/B比が0.61と0.63で明らかに高かった。

ヌードマウスは本来胸線が欠如しているのでT細胞は存在しないとされていたが、近年 Chenらは胸腺外T細胞の存在を報告し、それが加齢により変化することを報告している<sup>13)</sup>。また、本研究ではヌードマウスを用いたが、KennedyらもT細胞を検討するうえでヌードマウスは有効であると報告している<sup>14)</sup>。T/B比については、MoertelらがT/B比の高いものが癌患者のサバイバルがよいこと<sup>15)</sup>、Kikuchiらは癌腫部でT細胞が癌免疫において主要な役割を果たすこと<sup>16)</sup>、Shimokawaraらは癌腫部でB細胞に対するT細胞の割合が多く、T細胞の癌腫部への浸潤が強いほうが患者の予後がよいことを述べている<sup>17)</sup>。本研究でもヌードマウスのT/B比は11—13週齢ではほぼピークとなり、その後徐々に減少して、本実験で用いたマウスと同週齢(約40週齢)ではT/B比は0.15であった(図7)。このことは、癌のない正常なヌードマウスのT/B比はもともと低いが、癌の発生により生体の細胞性免疫反応は高まりT/B比が増加するが、未処置群では治癒するまでには至らず、光免疫療法すなわちルミン投与と光照射によって癌治療の免疫機能が早期に改善されたことが考えられた。

## 5. ま と め

以上のことから1)ルミン投与による免疫作用はその光吸収ピークに合わせた光の照射により著しく高まること、2)癌細胞は近赤外光照射とルミンによって改善した免疫機能によって増殖が阻止され、さらに活性化した線維芽細胞からのコラーゲンによって封じ込められ、瘢痕化、あるいは萎縮することが示された。これまでもレーザ光と感光色素(ヘマトポルフィリン誘導体など)を用いた光化学療法があるが、本法はこのような直接癌細胞を破壊するものではなく、生体本来の免疫機能を改善して免疫学的に癌細胞を破壊すること、さらに線維芽細胞から増殖したコラーゲンが最終的に癌腫部を封じ込めるもので、光化学療法とはメカニズムが全く異なり、副作用の無い細胞賦活剤ルミンをベースとして癌治療を行うものである。したがっ

て本法は新しい癌治療のための光免疫療法とよべるものである。

## 6. 文 献

- 1) 川村勝, 島田祐敏, 鈴江紀子: 感光色素が Arthus 減少に及ぼす影響についての実験的研究, 感光色素, **66**, 13—21, (1962)
- 2) 市橋秀人: シアニン系感光色素による癌化学療法法の副作用の防止, 感光色素, **36**, 18—24, (1977)
- 3) 佐々木康夫, 長井紀子, 沖村勉, 山本格: Lumin の免疫学的検討(第1法)—抗アレルギー作用の検討一, 日薬理誌, **89**, 1—7, (1987)
- 4) 鈴江懐: 今永教授の感光色素の研究, 感光色素, **71**, 22—42, (1969)
- 5) Yamamoto N., Homma S., Nakagawa Y., Hayami M., Imanaga H., Kurimoto M., Mitsuhashi M. and Kimoto T.: Activation of mouse macrophages by in vivo and in vitro treatment with a cyanine dye, lumin., J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **13**, 259—306, (1992)
- 6) 三戸恵一郎: ルミンを用いた近赤外光による光免疫癌治療法の研究, 医用電子と生体工学, **31**(4), 367—320, (1993)
- 7) 三戸恵一郎: 体内深部癌の光免疫療法のためのニードル型治療システムの開発とその応用, 医用電子と生体工学, **33**(1), 40—45, (1993)
- 8) K. Mito, Y. Nakagawa, M. Hayami, S. Homma and T. Kimoto: Cancer treatment with photo — immunotherapy using near — infrared laser light and a photosensitizer, lumin. Photomed. and Photobiol., **16**, 155—162, (1994)
- 9) K. Mito: Photodynamic efficiency on macrophage activity using a photosensitizer, lumin, with near-infrared laser light for photimmunotherapy of a cancer. Frontiers of Med. and Biol. Eng., (in press)
- 10) Cohn Z. A. and Benson B.: The differentiation of mononuclear phagocytes, morphology, cytochemistry, and biochemistry. J. Exp. Med., **121**, 153—169, (1965)
- 11) Griffin B. M. and Silverstein S. C.: Segmental response of the macrophages plasma membrane to a phagocytic stimulus. J. Exp. Med., **139**, 323—336, (1975)
- 12) Bianco C., Griffin F. M. and Silverstein S. C.: Studies of macrophage component receptors. Alteration of receptor function upon macrophage activation. J. Exp. Med., **141**, 1278—1290, (1975)

- 13) Chen W. F., Scollay R., Shortman K., Skinner M., Marbock J. : T-cell development in the absence of a thymus: the number, the phenotype, and the functional capacity of T lymphocytes in nude mice. *Am. J. Anat.* **170**, 339—347, (1984)
- 14) Kennedy J. D., Pierce C. W. and Lake J. P. : Extrathymic T cell maturation phenotypic analysis of T cell subsets in nude mice as a function of age. *J. Immunol.* **148**, 1620—1629, (1992)
- 15) Moertel C. G., Jr. Ritts R. E., Schutt A. J., Hahn R. G. : Clinical studies of methanol extraction residue fraction of *Bacillus Calmette-Guerin* as an immunostimulant in patients with advanced cancer. *Cancer Res.* **35**, 3075—3083, (1975)
- 16) Kikuchi K., Yamaoka H., Uchizawa K. and Iguchi S. : Systemic and local response of immunocytes to human cancer. *Gann Monogr Cancer Research*, **21**, 45—55, (1978)
- 17) Shimokawara I., Imamura M., Yamanaka N., Ishii Y. and Kikuchi K. : Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance. *Cancer*, **49**, 1456—1464, (1982)