

氏名・(本籍)	阿部 元(大阪府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第83号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成3年3月23日
学位論文題目	LPS固定化ビーズによる抗腫瘍効果

審査委員	主査 教授	瀬戸 昭
	副査 教授	小玉 正智
	副査 教授	服部 隆則

論文内容要旨

〔目的〕

グラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) には、強力な抗腫瘍効果が存在する。しかし、その強い毒性のため、生体への直接投与は不可能とされてきた。我々の教室では、このLPSを固定化して、体外循環を用いた免疫賦活療法を目指してきた。今回新たに、操作の簡便性や血球との接触面積の広さ等を考慮して、担体をポリスチレンビーズとし、固定化するリガンドとして2種類のLPSと数種類のLPS構成成分を使用し、in vitro および in vivo での抗腫瘍効果を比較検討した。

〔方法〕

固定化ビーズ：LPSとしてE. coli、Salmonella minnesotaを使用した。LPSの構成成分としてグルクロン酸、シアル酸、ケトデオキシオクトン酸(KDO)を使用した。担体はアミノメチル化ポリスチレンビーズを用いて、リガンド物質を縮合反応させて固定化した。

固定化ビーズによる細胞障害活性の誘導：C3H/HeN マウスおよびSDラットより脾細胞を採取し、60分間固定化ビーズと接触させた後、48時間培養した。対照として無処置で培養した脾細胞を用い、さらに脾細胞をinterleukin-2と培養した lymphokine activated killer (LAK) 細胞とも比較した。細胞障害性試験は ^{51}Cr 放出試験で評価した。

C3H/HeN マウスにおける抗腫瘍効果：C3H/HeN マウスの背部皮内に、X5563 腫瘍細胞を移植した。E. coli LPS 固定化ビーズで接触刺激したマウス脾細胞を腫瘍周囲に局注した。対照群として培養液のみ、あるいは無刺激脾細胞を投与し、腫瘍増殖、生存日数を観察した。

SDラットにおける肺転移抑制効果：MRMT-1腫瘍細胞をSDラット尾静脈に注入移植した。Salmonella LPS固定化ビーズで接触刺激したラット脾細胞を尾静脈より注入した。対照群として培養液のみ、または無刺激脾細胞を注入し、転移結節数および生存日数を観察した。

〔結果〕

固定化ビーズによる細胞障害活性の誘導：C3H/HeNマウス脾細胞を用いた場合、E. coli LPS固定化ビーズで刺激された脾細胞とLAK細胞の活性は著明に増強していたが、他の固定化ビーズ刺激ではほとんど活性の増強はみられなかった。次にSDラット脾細胞では、Salmonella LPS固定化ビーズで刺激された脾細胞のみが著明に増強しており、他の固定化ビーズで刺激された脾細胞の活性は、LAK細胞を含め、ほとんどみられなかった。細胞障害活性の誘導に要する時間の検討を行うと、C3H/HeNマウス、SDラットの脾細胞ともに、刺激直後には活性がみられず、接触刺激後24時間で活性が増強し、48～72時間で最大の活性を認めた。

C3H/HeNマウスにおける抗腫瘍効果：腫瘍増殖は対照群と無刺激脾細胞投与群の間では変化を認めなかったが、刺激脾細胞投与群では腫瘍移植後10日目より有意に腫瘍増殖の抑制がみられ、有意な生存日数の延長が認められた。

SDラットにおける肺転移抑制効果：無刺激脾細胞投与群では転移結節数は抑制したが、肺転移そのものは抑制できず、刺激脾細胞投与群では90%のラットに完全治癒がみられ、有意な肺転移の抑制が認められた。

〔考察〕

グラム陰性菌の細胞壁成分の一部であるLPSが腫瘍に出血壊死を起こす抗腫瘍物質であることが判明し、その作用機序についてはLPSの補体系や凝固系への作用、T、Bリンパ球やマクロファージへの作用、あるいはこれら免疫細胞を介したinterferonやinterleukin-1の誘導など数多くの報告がされてきた。この様に広範な作用を持つ抗腫瘍物質をそのまま利用可能な方法が開発されれば、より強力な悪性腫瘍の治療法となりうる。我々が目的としているLPSの固定化は、FoxらやLubinsky-Minkらによっても、固定化しても生物学的活性が残存すると報告されている。今回、LPS固定化ビーズを作製し、接触刺激だけでin vitroおよびin vivoでも強力な抗腫瘍効果を誘導することができた。しかし、LPSの構成成分を固定化した場合ではほとんどその効果が得られなかった。さらに、C3H/HeNマウス脾細胞ではE. coli LPSで、SDラット脾細胞ではSalmonella LPSで最も抗腫瘍効果が得られ、動物種によって同じLPSに対する反応が異なることが推察された。また、細胞障害活性誘導に要する時間は、刺激後48～72時間で最大の活性を示している。これより、LPS固定化ビーズで刺激された細胞は直接細胞障害性を持つのではなく、種々のサイトカインを産生し、このサイトカインによって抗腫瘍細胞が誘導されたと推察される。LPS固定化ビーズを用いて体外循環を施行すれば操作も簡便で、LAK養子免疫療法に変わる新しい免疫賦活療法となる可能性がある。

〔結論〕

- 1) LPS固定化ビーズは接触刺激、in vitroでもin vivoにおいても強力な抗腫瘍効果が得られた。
- 2) C3H/HeN マウスではE. coliのLPS固定化ビーズで最も効果があり、SDラットではSalmonellaのLPS固定化ビーズが最も効果であった。
- 3) LPS固定化ビーズを用いた体外循環療法は新しい免疫賦活療法となる可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

本論文は、グラム陰性桿菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が持つ抗腫瘍効果に着目し、副作用の毒性を防ぐ目的でLPSをポリスチレンビーズに固定化して、in vitroおよびin vivoにてその抗腫瘍活性を検討したものである。

Escherichia coli (E.coli) と Salmonella minnesota (S.minnesota) の二種類のLPSと、さらにLPS構成成分を固定化したビーズを作製した。C3H/HeN マウス、およびSDラットより脾細胞を採取し、それぞれの固定化ビーズと接触培養した。Interleukin-2により活性化した lymphokine activated killer (LAK) 細胞を対照に用いて、細胞障害活性を検討した。C3H/HeN マウスの実験系では、E.coliのLPS固定化ビーズで刺激された脾細胞とLAK細胞で強力な活性が認められ、SDラットの系では、S.minnesotaのLPS固定化ビーズで刺激された脾細胞のみで活性が認められた。また、両実験系において刺激直後には活性が得られず、培養48～72時間後に最も強い活性が認められた。担癌マウスにE.coliのLPS固定化ビーズで刺激したマウス脾細胞を投与すると、有意に腫瘍増殖の抑制と生存日数の延長が認められた。肺転移ラットの実験系では、S.minnesotaのLPS固定化ビーズで刺激したラット脾細胞を投与すると、肺転移をほぼ完全に抑制した。

以上、LPS固定化ビーズはin vitro、およびin vivoにおいて接触刺激により強力な抗腫瘍効果を誘発し、LPS構成成分を固定化した材料ではほとんど効果が無いことが判明した。また、動物種によって最適なLPSが異なり、さらにLPS固定化ビーズで刺激された細胞は、種々のサイトカインを産生して抗腫瘍活性を誘導することが推定された。

本論文は、LPS固定化ビーズ材料を開発し、抗腫瘍作用を応用する可能性を示唆した研究で、医学博士の授与に値するものと認められる。