

## S-180 肉腫担癌マウス生存に及ぼす BCG 併用腫瘍 vaccine 療法の効果

東京医科大学産科婦人科学教室 (指導: 高山雅臣 主任教授)

足立 匡 鈴木康伸 星野泰三 武市 信

**【要旨】** S-180 マウス肉腫腹腔内投与担癌マウスに及ぼす BCG 及び腫瘍 vaccine (放射線照射を施した S-180) の抗腫瘍効果を基礎的に検討した。腫瘍 vaccine 単独あるいは BCG 単独皮下接種に比し、両者を S-180 移植以前及び腫瘍移植時に接種した場合に、より著明な延命 (治癒) 効果がみられた。脾細胞の S-180 障害活性強度もこれにパラレルであり、BCG 接種による各種サイトカインの誘導が免疫担当細胞の腫瘍抗原認識能を高め、殺腫瘍効果も増強させた結果である事が示唆された。

### はじめに

現在婦人科悪性腫瘍に対して化学療法が広く施行されている。しかし進行悪性腫瘍では化学療法によりその長期予後はすこしづつ改善されてきたとはいえまだ不十分であり、またその副作用や、薬剤耐性の問題も多く<sup>1)</sup>、長期に全く心配なく行なえる治療ではない。このような状況下で以前より理想的治療方法として種々の免疫療法が考えられ<sup>2)3)</sup>、また実際に行われてきた。すなわち担癌個体自らの抗腫瘍免疫力を向上させて、癌を拒絶させようとする試みである。しかし、その結果は腫瘍細胞のもつ特異性により、いまだ満足のものとはなっていない<sup>4)</sup>。今回、われわれは vaccine 化腫瘍細胞 (腫瘍ワクチン) あるいはアジュバントとしての BCG を担癌個体に接種し、その抗腫瘍効果について基礎的検討を行った。その結果 BCG 併用腫瘍 vaccine の有用性を示唆する結果を得たので報告する。

### 研究材料および方法

#### 1. 細胞培養と BCG

マウス骨髄肉腫である S-180 細胞株 (理科研細胞バンク 提供) を 10% 牛胎児血清 (FCS) 添加 RPMI1640 培地にて培養し、細胞が予定数に達し、

かついまだ対数増殖期にある時期に回収した。vaccine に使用する S-180 細胞には 30 Gy (ライナック) の放射線を照射した。BCG-TICE 株はオルガノンテクニカ社より入手し、生理食塩水溶液に溶解しマウス個体あたり  $0.5 \times 10^6$  個 Colony Forming Units (CFU)/ml の細菌濃度を皮下注した。

#### 2. Vaccination の方法

産婦人科難治性悪性腫瘍に対する有効な治療法究明のため以下の実験研究を行った。6 週齢の雄性 ddy マウス (日本 SLC) を表 1 に示すごとく規定の条件下で、7 群 (各群 10 匹) に分けて飼育した。

a) 腫瘍 vaccine 接種群では、マウス個体あたり  $2 \times 10^6$  個の放射線照射 S-180 を頸部に皮下接種 (subcutaneous injection 以下 S.C. と略す) した。

b) BCG 及び腫瘍 vaccine 併用接種群 (group 5, 6) では BCG と放射線照射 S-180 を混合して同部位に S.C. した。腫瘍細胞の移植は  $5 \times 10^6$  の S-180 を腹腔内注入 (i, p) し、その日を day 0 とし、7 日前 (day -7) あるいは 7 日後 (day 7) に vaccination を行い経時的に各群の状況を観察した。一部は day 14 にクロロホルム麻酔下にて頸椎脱臼後に解剖し、腫瘍細胞の生着、腹水、転移の有無を観察した。又、マウスの生存期間を各々の群間で比較検討した。

#### 3. ATCCS (Adhesive Tumor Cell Culture

1996 年 2 月 22 日受付, 1996 年 3 月 7 日受理

キーワード: BCG, 腫瘍ワクチン, S-180, 延命, 抗腫瘍効果。

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学産科婦人科学教室 足立 匡)

表1 Vaccination 実験マウスモデル作製

group	BCG	Vaccination 時期		
		-Day 7	Day 0	+Day 7
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	+	-
4	-	-	+	-
5	+	+	+	-
6	+	-	+	-
7	-	-	-	+

注1. 各 group とも n=10  
 2. S-180 を  $5.0 \times 10^6$  個 IP した日を Day 0 とした

**System) アッセイ法による殺腫瘍活性測定**

ATCCS アッセイ法<sup>9)</sup>を用いて各群につき S-180 に対する殺腫瘍活性を定量した。方法は day14 における上記各群から個体を選択し(未処置群, BCG 単独接種群からは S-180 の生着した個体, 腫瘍ワクチン単独群と BCG 及び腫瘍ワクチン併用接種群からは S-180 の生着の無い個体を選択した), 各々の脾細胞リンパ球  $1 \times 10^5$  個と S-180 細胞  $5 \times 10^5$  を 24 ウェルプレート (ファルコン社) 中で 24 時間混合培養した。培地は 10%FCS 添加 PRMI1640 培地 (3 ml/ウェル) を用い, 培養条件は 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% air とした。その後, 上清の非附着細胞を除去し, 残りのプラスチック附着 S-180 細胞をエタノール固定した。これをクリスタルバイオレットにて染色して, 高速画像解析装置 (ルーゼックス IIIU) にて発色強度を測定した。以下の式を用いてその殺腫瘍活性指数を算出した。

殺腫瘍活性指数 =

$$\frac{\text{リンパ球非投与 well の吸光度平均}}{\text{核実験群の吸光度の平均}}$$

**4. Vaccination による形態的局所変化**

BCG あるいは腫瘍 vaccine を接種した頸部組織を外科的に採取し 20%ホルマリンに 24 時間固定後, パラフィン切片を作成, HE 染色し組織局所変化を観察した。

**5. BCG 刺激によるサイトカインの産生**

Ficoll 比重遠心法によって採取した  $1 \times 10^6$  個/ml の健常人末梢血単核細胞と  $5 \times 10^6$  個 CFU/ml の BCG-TICE を 500 ml カルチャーボトル (ファルコン社) 中 50 ml の容量で, 10%FCS 添加 RPMI1640 培地を用い, 前記培養条件下で 48 時間培養し, 上清中のサイトカイン(GM-CSF, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ,

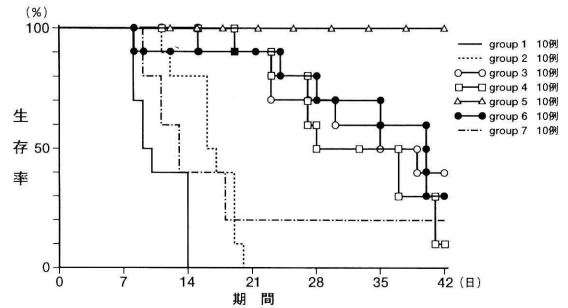


図1 表1で作成した実験マウスモデルを経過観察してゆき各群ごとの生存率をカプランマイヤー法で図にした。

INF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) 濃度を EIA 法にて定量した。

**成 績**

**1. 担癌マウス生存期間の検討**

各群のマウス生存期間をカプランマイヤー法にて図1に示した。他群に比較して BCG および腫瘍 vaccine 2 回投与併用群 (group 5) の生存期間は長期化した。その効果はワクチン 2 回投与併用群 (group 5) に比べ, 1 回投与群 (group 6) では減弱した。また腫瘍細胞が生着してしまった個体も day 14 日での比較では併用群は未処置群に比較して, 腹水量は未処置群の平均約 1.0 ml に比べ処置群は約 0.5 ml と少なく, 腫瘍塊も小さかった (写真1)。また, 処置群の生存期間は未処置群に比べ有意に延長した。

**2. ATCCS アッセイ法による殺腫瘍活性測定**

ATCCS 法による殺腫瘍細胞活性の結果を図2に示した。図2に示したように殺腫瘍活性の強さは BCG, 腫瘍 vaccine 併用群 ( $2.67 \pm 1.05$ ) > 腫瘍 vaccine 単独群 ( $2.25 \pm 2.11$ ) > BCG 単独群 ( $1.91 \pm 1.65$ ) > 未処置群 ( $1.60 \pm 1.17$ ) の順であった。

**3. Vaccination による形態的局所変化**

腫瘍 vaccine 接種局所の形態変化は, BCG 併用腫瘍 vaccine 群では 24 時間以内にすでに接種腫瘍 vaccine 細胞は認められず, リンパ球が集塊を形成していた(図3右)。しかし, 腫瘍 vaccine 細胞のみの接種群では 48 時間を経過してもいまだ腫瘍 vaccine 細胞が接種部位に散見された (図3左)。

**4. BCG 刺激によるサイトカインの産生**

BCG 添加ヒト末梢血単核球培養 48 時間後のサイトカインの変化を図4に示した。BCG 添加末梢血単核球培養では BCG 非添加培養に比較して GM-CSF

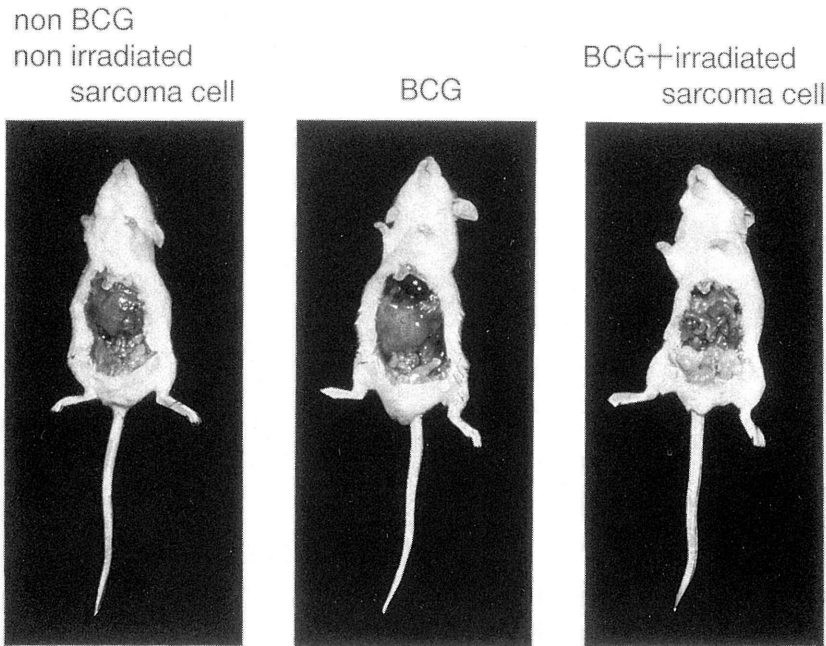


写真 1 表 1 の実験マウスモデルを S-180 を IP ご 14 日目に解剖した所見で、BCG 併用腫瘍ワクチン投与群は腹水は極少量であるが、BCG 単独投与群および未処理群では血性腹水を認めた。

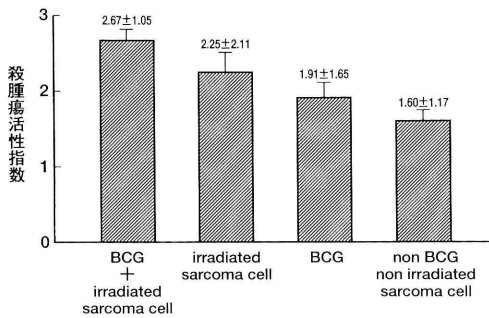


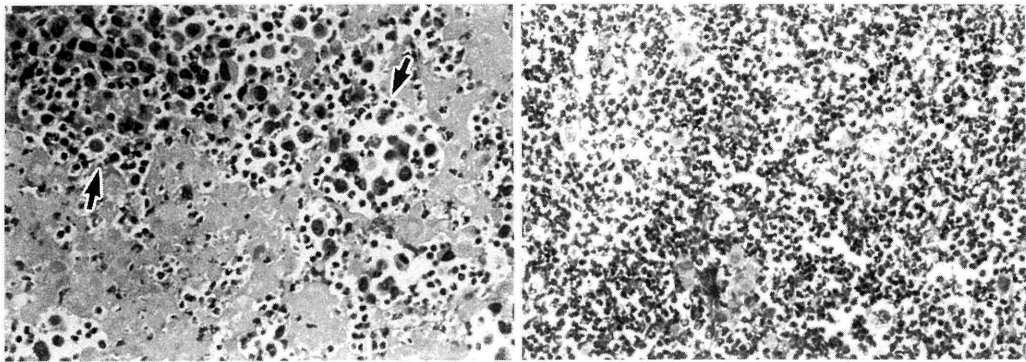
図 2 ATCCS アッセイ法を用いて各群で殺腫瘍活性を比較しグラフ化したもの。

(granulocyte-macrophage colony stimulating factor), TFN- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IL-6 (interleukin-6) のサイトカインの増加を認めることにより、これらのサイトカインが抗腫瘍効果に関与していることが示唆された。

考 察

担癌個体の抗腫瘍免疫は進行が進むほど局所、全身ともに抑制状態になっていくと考えられる<sup>97)</sup>。ま

た一部の腫瘍を除き、多くの腫瘍では、免疫担当細胞が腫瘍細胞を簡単に認識、排除できるほど腫瘍抗原は明らかに提示されていない<sup>9)</sup>。そのため腫瘍は巧みに担癌患者の免疫細胞の攻撃のをがれ増大していくと考えられる。腫瘍の腫瘍抗原性を増加させ、担当免疫細胞に認識、拒絶させるような腫瘍特異性免疫を高める治療ができれば理想的である。現在患者自身の腫瘍細胞を処理し抗原性を増加させ、vaccine として用いて患者の特異的抗腫瘍活性を高めようとする治療が現在比較的抗原性の高い腫瘍に対して行われ<sup>9)</sup>、高い奏効性が報告されている<sup>9)</sup>が、さらなる問題は抗原性の低い腫瘍の抗原性をいかにして増加させ、担癌固体の免疫担当細胞に攻撃、拒絶させるかである。これに関連して腫瘍細胞に種々のサイトカインの遺伝子を導入し、腫瘍細胞自身にサイトカイン発現、産生させて高い vaccine 効果が得られたとの報告がある<sup>10)</sup>。その抗腫瘍活性作用機構についてはサイトカインによる局所免疫の昂進、サイトカインの腫瘍細胞への autocrine, paracrine による細胞の変化等が考えられるが不明な部分が多い。また、高用量 GM-CSF を腫瘍細胞と併用して著明な vaccine 効果を得られたとの報告もある<sup>11)</sup>。こ



irradiated sarcoma cell 皮下注 48時間後  
HE染色(×100)

BCG+irradiated sarcoma cell 皮下注 24時間後  
HE染色(×100)

→ S-180 sarcoma cell

図3 BCG+腫瘍ワクチン, 腫瘍ワクチン単独をマウス頸部に皮下注後の組織を採取し  
HE染色後光学顕微鏡で観察した所見.

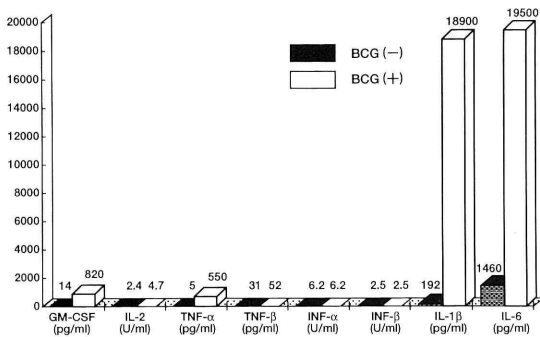


図4 健康人末梢血単核細胞をBCG添加, 非添加でそれぞれ培養しサイトカインの誘導を比較しグラフ化した. 縦軸は各サイトカインの数値を示し横軸はサイトカインの種類と単位を示した.

のことは必ずしも遺伝子導入などの煩雑な方法の必要性がないことを意味しているのかもしれない. 現時点で本邦においては倫理上の問題等から簡単に遺伝子治療を行う状況下にはない<sup>12)</sup> 事も加味し, 今回は遺伝子導入等の煩雑な方法を用いず, また高価なサイトカインを使用しない方法として, サイトカイン産生性を高めることが知られている BCG と腫瘍 vaccine の併用療法を, マウスモデルにおいて試みた. 結果として, この併用療法が S-180 担癌マウスに効果的である事が判明した. BCG 接種により周囲の担癌個体の細胞より IL-6, IL-1β などのサイトカインを分泌させ, 免疫細胞を活性化し, BCG 遅延型アレルギー反応<sup>13)</sup> によりリンパ球の vaccine 接種局

所への集積を引き起こし, 担癌個体の全身の腫瘍特異抗原への認識, 拒絶能を高めることができたと考えられる. 腫瘍ワクチン接種局所の形態変化でもわかるように局所における BCG の抗腫瘍免疫細胞活性化作用は協力であり<sup>14)</sup>, 免疫抑制状況の担癌個体の免疫力の再活性化を促進したと思われる. しかし動物実験で問題になるのは, その腫瘍が自然発癌が<sup>15)</sup>, 薬剤発癌かにより, その抗原性に相違を生じる可能性もあり, 今後自然発癌系腫瘍細胞を使用して検討することも必要であろう. 実験系を介してわかるように腫瘍細胞が生着した後の vaccine 効果は低下していた. このことは担癌個体内の腫瘍細胞の活性程度, また腫瘍細胞数が vaccine 効果を左右することを示唆し, 実際の臨床応用にあたっては手術による腫瘍量のできるかぎりの減少, また化学療法による腫瘍細胞の活性低下効果を併用してその効果を期待すべきであろう<sup>16)</sup>.

## 文 献

- 1) 寺島芳輝, 落合和徳, 岡本愛光: 婦人科悪性腫瘍の化学療法. 化学療法の領域 11(12): 2319~2328, 1995.
- 2) Rosenberg, SA., Lotz, MT., Muul LM. et al: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patients with metastatic cancer. New Eng J Med 313(23): 1485~1492, 1985.
- 3) 足立 匡, 鈴木康伸, 武市信也: 卵巣癌に対する維持療法としての Sizofiran と rG-CSF の腹腔内強調併

- 用療法の考察と検討. *Biotherapy* 8(3): 381~382, 1994.
- 4) 小倉 剛: サイトカインおよび LAK 療法. 癌と免疫, メジカルビュー社, 東京, 1993, pp. 121~127, 1993.
  - 5) 舟曳 均: Adhesive tumor cell culture system によるヒト胃癌細胞の制癌剤感受性試験に関する研究. *順天堂医学* 40(4): 429~440, 1995.
  - 6) 藤原大美: 担癌状態における細胞性免疫不全と TGF- $\beta$ . *Biotherapy* 7(2): 116, 1993.
  - 7) 峠 哲也, 服部孝雄: 免疫化学療法におけるリンパ球幼若化反応. 癌の免疫化学療法—基礎と臨床—. 南山堂, 東京, 1980, pp. 26~39.
  - 8) 仙道富士郎: 癌と宿主—免疫監視機構—. 臨床婦人科産科 49(7): 806~809, 1995.
  - 9) Kataoka, T., Kinomoto, M., Takegawa, M. et al.: Effect of synthetic adjuvant for inducing anti-tumor immunity. *Vaccine* 9: 300~302, 1991.
  - 10) Colombo, M. P., Forni, G.: Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: Where are we now? *Immunol. Today* 15(2): 48~51, 1994.
  - 11) Dranoff, G., et al.: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539~3543, 1993.
  - 12) 加藤聖子, 和気徳夫: 遺伝子導入療法. 臨床婦人科産科 49(7): 868~870, 1995.
  - 13) 徳永 徹: マクロファージ, 癌と生体防御. 東京大学出版会, 東京, 1994, pp. 126~135.
  - 14) Klostergaard, J., Stoltje, P. A., & Kull, F. C. Jr: Tumoricidal effector mechanisms of murine BCG-activated macrophages: role of TNF in conjugation-dependent and conjugation-independent pathways. *J. Leukoc. Biol.* 48: 220~228, 1990.
  - 15) H. B. Hewitt, E. R. Blake, and A. S. Walder: A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33: 241~259, 1976.
  - 16) 細川真澄男: 抗癌剤による宿主免疫増強. *Biotherapy* 4: 1229~1234, 1990.

### Therapeutic Effect of Tumor Vaccine Combined with BCG in Sarcoma S-180-Bearing Mice

Tadasu ADACHI, Yasunobu SUZUKI, Taizo HOSHINO,  
Makoto TAKEICHI and Masaomi TAKAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College

The antitumor effect of a tumor vaccine (irradiated S-180) and BCG was investigated in mice with intraperitoneally transplanted mouse sarcoma S-180. The combination of the vaccine and BCG when given before or at the time of the transplantation showed a remarkable prolongation effect on survival compared to subcutaneous tumor vaccine or BCG alone. The S-180 killing activity of splenic cells correlated with the prolongation effect. These findings suggest that the induction of various cytokines by BCG might increase the recognition of the tumor antigen by immune cells, resulting in the enhanced antitumor effect.

---

<Key words> BCG, Tumor vaccine, S-180, Prolongation, Antitumor effect.

---