

## マクロファージ活性と癌線維化の病理

### —シアニン系感光色素ルミンによる光化学的癌免疫療法—

木本 哲夫

化学構造式の明らかな増感剤でシアニン系ペンタチメン三核型感光色素であるルミンのマクロファージ (mφ) 活性作用に着目し, BRM による癌癒痕化の実験を試みた。

ルミンについては, 古くから難治性潰瘍, 創傷治癒の促進作用が知られているが, ルミンは B-細胞, T-細胞を介する mφ の活性を促進することが分かり, BRM による各種培養癌細胞をヌードマウスに移植して癌免疫療法の病理学的研究を行った。

Xenografts, allografts を作成し, ルミン 50 ng/mouse 皮下注射と電気メスによる創傷治癒機転の誘発と共に光照射を行い, ルミンの活性を励起した。その結果, リンパ球増殖と mφ 活性により癌巣をとりまく著明な線維芽細胞の増殖に次いで線維化がみられ癌は癒痕化へと進行した。

他方, 肝癌治療, 胃癌治療としてエタノールの癌巣内注射が行われているが, エタノールにエタノール可溶性のルミンを加え癌の凝固壊死を起こし, ルミン飲料を長期続けると mφ 活性とリンパ球増殖が起こり癌巣の癒痕化が促進した。

従来, 免疫療法は免疫細胞よりのサイトカインによる殺癌細胞を目的としたものであるが, 免疫細胞の活性化の恒常性を長期間維持することにより, BRM による癌間質の線維芽細胞を増殖し, collagen 増殖による癌封じ込め, 転移を抑制し, さらに癌浸潤による組織傷害巣の修復を促し, 終局的には非特異的な癌癒痕化を起こし癌免疫療法として重視すべきものと考ええる。

(平成 6 年 2 月 10 日採用)

## Photodynamic Activation of Macrophages and Cicatrization of Cancer by Treatment with a Cyanine Dye, Lumin

Tetsuo Kimoto

The cyanine photosensitizer, lumin (NK-4), is a potent macrophage activating agent. The antitumor activity of lumin as a biological response modifier (BRM) was investigated with xenografts and allografts of human cancer cells (HLC, HGC, PC-9, MKN-1 and liver carcinoma) and murine malignant melanoma cells (clone-M-3 and B-16), which were implanted in nude mice. The mice received a subcutaneous injection of lumin at a dose of 50 ng, and were exposed to white light for 30 min or had a small area (0.5×0.5 cm) of their skin burnt by cauterization with a soldering iron, after which the antitumor activity of the drug was followed. In addition, antitumor

川崎医療福祉大学 感覚矯正学科  
〒701-01 倉敷市松島288

川崎医科大学 名誉教授

Department of Sensory Science, Faculty of Medical  
Professions, Kawasaki University of Medical Welfare:  
288 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan  
Professor Emeritus, Kawasaki Medical School



activity of ethanol-lumin treatment and oral administration of lumin were investigated with grafts of human and rat hepatoma cells (human: PLC/PRF/5, rat: RL-34, HTS). It should be noted that lumin induces the migration and proliferation of lymphocytes and macrophages in a tumor stroma. Considerable proliferation of macrophages has an important effect on the interaction between the tumor and collagen fiber proliferation: Macrophages contribute to the repair of damaged tissues that have been invaded by tumor cells and to the suppression of tumor growth by accelerating the proliferation of collagen fibers in the stroma surrounding the tumors. This is especially important when a scar is formed during the treatment of tumors. (Accepted on February 10, 1994) *Kawasaki Igakkaishi 20 Suppl: 91-109, 1994*

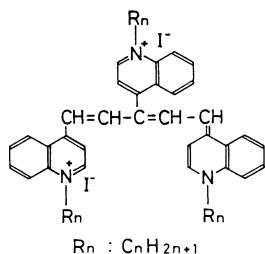
**Key Words** ① Photosensitizing dye ② Lumin  
③  $m\phi$  activation ④ Collagenation  
⑤ Confinement of cancer

#### シアニン系感光色素ルミンによる マクロファージ活性と癌線維化

増感剤でシアニン系ペンタチメン三核型感光色素であるルミン (lumin: NK-4) (Fig. 1) は故伴野<sup>1)</sup> (日本感光色素研究所) により創製合成され、その後1934年、波多野輔久<sup>2)</sup> (神戸大・病理) は生物学的作用を報告した。その後1940年、今永一 (名大・愛知がんセンター外科) 一門<sup>3)</sup> により lumin (NK-4) について医薬品開発が進められ、微量の lumin 投与 (1r/kg) が創傷、炎症の治癒促進作用を有し、特に BCG 潰瘍や非特

異的下腿潰瘍等の難治性潰瘍に有効であることが報告された。その後 lumin の多彩な活性が注目され、中でも免疫作用として異物処理活性のあることが多くの研究者により発表された。これらの作用発現について、鈴江懐<sup>3),4)</sup> (京大・病理) は正常細胞よりも障害細胞に対する細胞賦活作用のあることを実証し、結核治療にも有効であることを示唆した。

lumin が T および B リンパ球のみならず macrophage ( $m\phi$ ) の貪食能を著しく促進し、特に、Fc-receptor を介する  $m\phi$  の貪食能を強く上昇する作用のあることに着目<sup>5),6)</sup> し、人型結核菌より抽出した多糖体アラビノマンナン的作用



(a)  $n=2$  Lumin

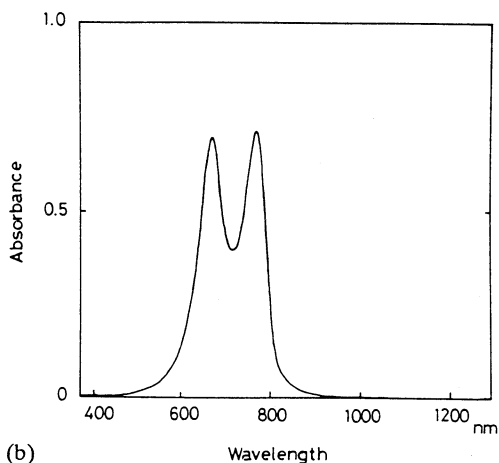


Fig. 1. Structure of lumin (a) and its absorption spectrum (b)



を実証するため、癌における癌細胞と間質細胞の相互関係について実験を行った。その結果、lumin がヒト癌細胞を移植したヌードマウスにおいても著明な mφ 増殖とリンパ球の増殖を促進し、生体内でも両者の接着や増殖が観察され、長期使用することによって癌巣の線維化 (collagen fiber の増殖: collagenation) とこれによる癌病巣の癒痕化を促進する結果を得た。

# 1. lumin の *in vivo* および *in vitro* での mφ 貪食能について

## *in vivo* での実験

lumin を Balb/c マウス腹腔内に直接注射し、4 日後腹腔内滲出細胞 (PEC: Peritoneal exudate cells) を取り出し、その腹腔 mφ の貪食能を調べた。lumin 注射 4 日後 Cohn<sup>7)</sup>, Griffin<sup>8)</sup> の方法で PEC を取り出し、 $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml に調

整した。37°C, 30 分間 incubate して、非付着細胞 (non adherent PEC) を取り除き、分離した付着細胞 (adherent PEC) につき腹腔 mφ の貪食能を Bianco<sup>9)</sup> らの方法で測定した。この結果は、mφ の superoxide 産生能をチトクローム C 法を用いて行ったものと同値であった (Figs. 2, 3b)。

Figure 2 に示すように 20 ng/mouse 群で未処置群の貪食指数 (I. I.: ingestion index) 29 をはるかに越えた 103 の最高の I. I. が示された。Figure 3 a は遺伝的に mφ 活性を欠損した C3 H/HeJ マウスでの lumin の成績を示したもので 40 ng/匹群で未処置群 33 に比し約 8 倍の 266 を示した。

以上のように腹腔内に lumin を注入することにより、マウスでは 20~40 ng/匹で腹腔 mφ の

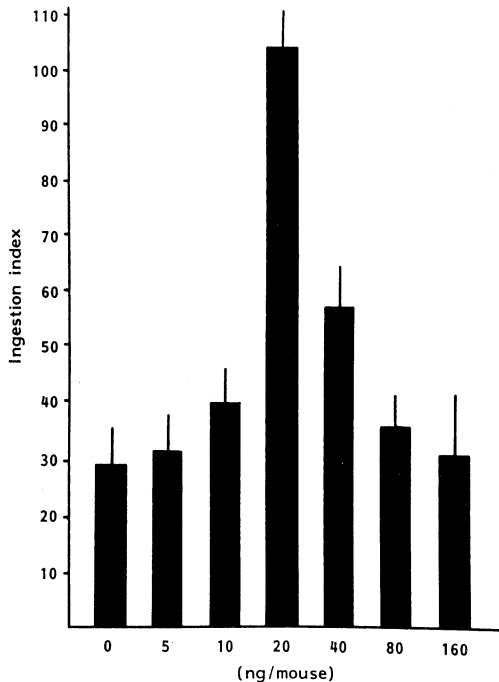


Fig. 2. Effect of lumin dose on activation of macrophages in BALB/c mice. Fc-mediated ingestion of erythrocytes by peritoneal macrophages was assayed 4 days post-administration of lumin. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of triplicate assays.

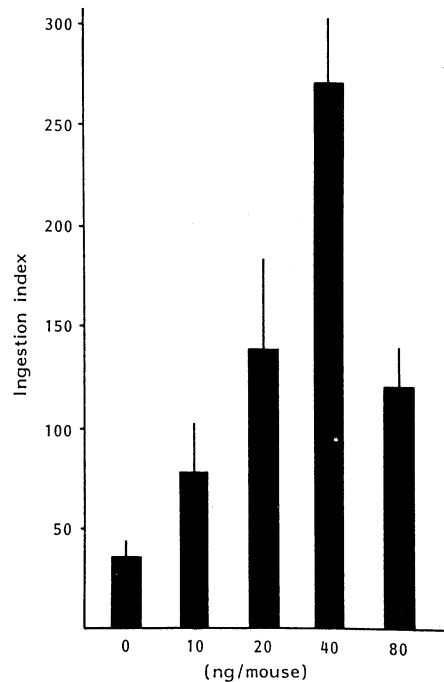


Fig. 3a. Effect of lumin dose on activation of macrophages in C<sub>3</sub>H/HeJ mice. Fc-mediated ingestion activity of erythrocytes by peritoneal macrophages was assayed 4 days post-administration of lumin. Data are mean  $\pm$  SEM of triplicate assays.



I. I. が顕著に上昇することが見いだされた。

### *in vitro*での実験

#### mφ 活性化に及ぼす光照射の影響

シアニン系色素は従来、写真増感剤として用いられているので、光照射によって励起し細胞に対する作用も変化することが考えられる（後述）。

Balb/c マウスの PEC 浮遊液に種々の濃度の lumin を加え 30 時間培養し、余分の色素と nonadherent PEC を洗浄して取り除き分離した adherent PEC はさらに 3 時間培養した後、腹腔 mφ の ingestion activity を測定した。lumin 添加時に 15, 30, 60, 120 sec で白色光を照射した。その結果、光非照射群では前述のように 30 ng/ml で強い活性化を示した。ところが 3 分間白色光照射群ではその 30 ng/ml では有意な活性化を示さず、色素の影響は消失したようにみえた。そこで lumin 濃度を減少して行った。

Figure 4 に示すように、3 ng/ml の低濃度で 30~120 sec の照射量で I. I. が上昇し、特に 30

sec で最も高い活性がみられた。10 ng/ml の濃度では 15 sec の照射量の時のみで、未処置群の 155 と比べ最大の 320 I. I. がみられた。30 ng/ml では光照射時間に関係なく I. I. が低下した。

以上の実験結果から、lumin による腹腔 mφ の活性化に光照射が影響を及ぼすことは明らかである。光関与での反応は暗所での反応に比べてより少ない色素濃度（約10分の1）で起こることが明らかになった。

### 2. ノードマウス移植癌における lumin の mφ 活性と collagen 増殖促進による癌癒痕化

以上の実験結果により lumin は mφ を著しく活性化させることがわかり、癌の増殖抑制について mφ の活性がいかなる役割を演ずるかについての病理学的研究を行った。

athymic および thymic Balb/c mouse 雌雄 (5W) に xenografts および allografts を作成し移植後 3 日、癌周辺に lumin 50 ng 皮下注射し白色光 (30分) 射光、無射光のものは移植後 5 日目に腫瘍表面に電気ゴテで熱傷(直径 0.5 cm)

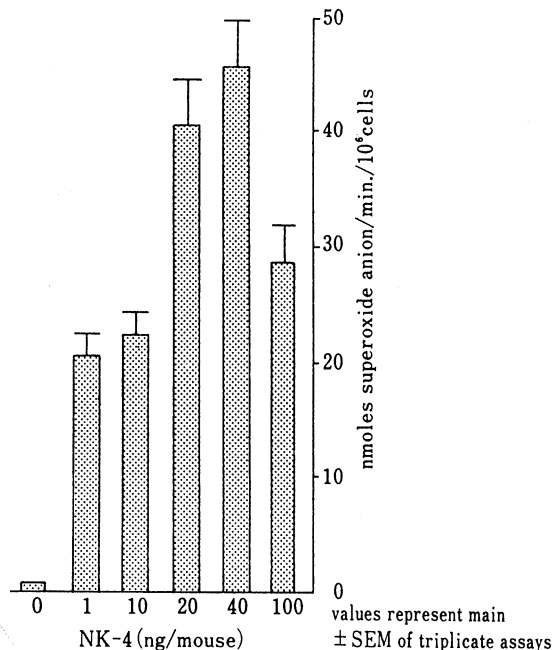


Fig. 3b. Effect of lumin dose on activation of macrophages in Balb/c mice. Activity was assayed by determination of the superoxide.

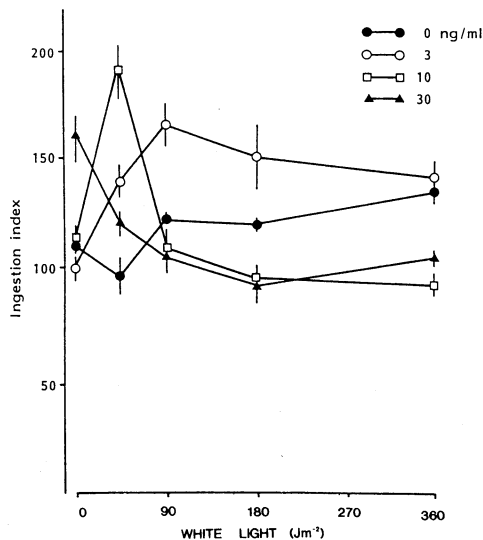


Fig. 4. Photodynamic activation of macrophages as expressed by ingestion indexes at three different lumin concentrations (3, 10 and 30 ng ml<sup>-1</sup>) and various doses (45-360 Jm<sup>-2</sup>) of white fluorescent light. Plots with vertical bars represent mean  $\pm$  SEM of triplicate assays.



を加えて創傷治癒機転の誘導を行って観察した。lumin の皮下注射は週 3 回行った。

xenografts にはヒト由来癌細胞として Table 1 の細胞を使用した。無処置対照群は各群10匹作成した。

培養液は人癌および B-16では MEM に10% BFS, clone-M-3は DMEM に10% BFS で培養した。

# 病理所見

既報のように, HGC(ヒト未分化胃癌), HLC

(ヒト肺腺癌), PC-9(ヒト肺高分化癌), MKN-1(ヒト胃扁平上皮癌), clone-M-3(マウス悪性黒色腫), B-16細胞(マウス悪性黒色腫)をヌードマウスに移植した場合, 宿主の反応, 正確には grafts をとりまく angiogenesis はそれぞれの癌細胞によって異なるが, angiogenesis<sup>11)~14)</sup> は癌間質の構築形成に重要な影響を及ぼす。すなわち癌をめぐる微小環境における angiogenesis は初期には癌増殖促進を招来するが, 癌による組織の破損が進むにつれて angiogenesis に端を

Table 1. The culture cells for xenografts and allografts

				graft	
ヒト胃癌	HGC	胃 未 分 化 癌	$1 \times 10^7$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
	MKN-1	胃扁平上皮癌	$1 \times 10^7$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
ヒト肺癌	HLC	肺 腺 癌	$1 \times 10^7$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
	PC-9	肺高分化腺癌 (類上皮癌)	$1 \times 10^7$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
マウス悪性黒色腫 clone-M-3, B-16					
athymic mouse			$2 \times 10^5$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
thymic mouse			$1 \times 10^7$ 20	10:射	光
				10:熱	傷
各群コントロール			10		

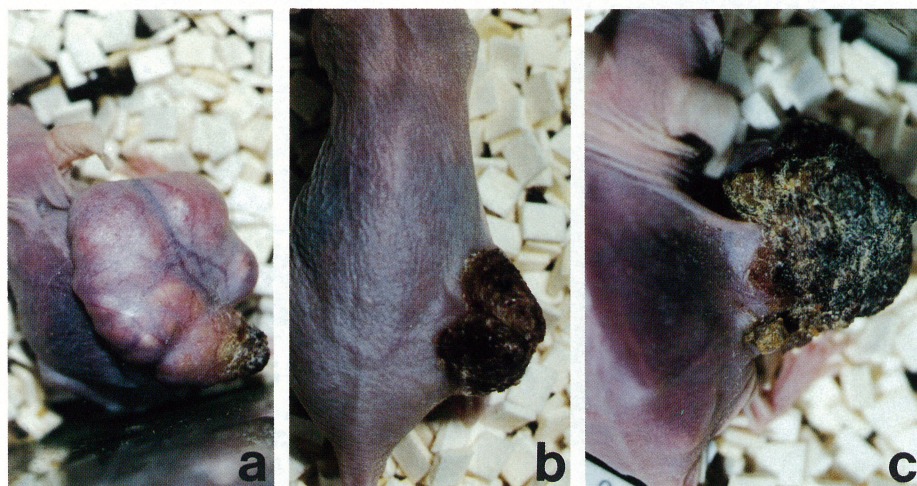


Fig. 5. Xenografts transplanted HLC (human lung cancer, adenocarcinoma)  $10^7$  cells to nude mice.

- Control mouse without a treatment with lumin. 169 days.
- Lumin 50 ng/mouse S. C injection 169 days. Cicatrization of the tumor.
- Lumin 50 ng/mouse S. C injection at white light dose 30 minutes every other days. 180 days. Cicatrization of the cancer. The tumor will be taken away.



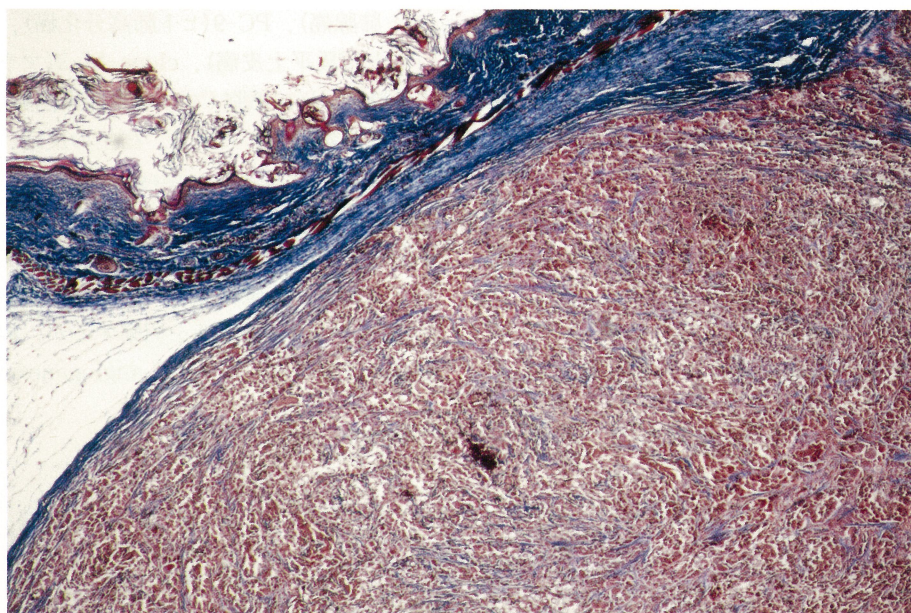


Fig. 6. Histological finding of xenograft transplanted HLC  $6 \times 10^6$  cells. 25 days. Control mouse. Collagen fibers proliferation is not remarkable. Mallory stain.  $\times 40$ .

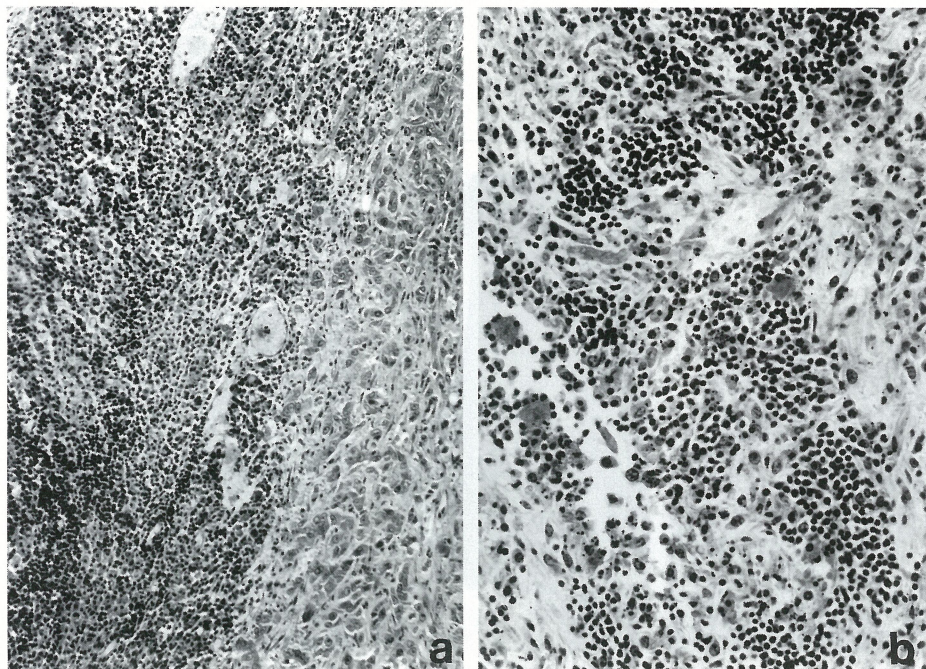


Fig. 7. Predominant proliferation of lymphocytes and macrophages in stroma surrounding of a cancer transplanted PC-9 (human lung cancer, well differentiated adenocarcinoma)  $10^7$  cells.

a. Lumin 50 ng/mouse S. C injection at white light dose 30 minutes. 138 days. H. E staining.  $\times 100$ .

b. Lymphocytes and macrophages interaction in the cancerous stroma. H. E staining.  $\times 200$ .



発する間質の成分，特に collagen 成分の多寡は，これを生合成の素材とし，BRM による線維化，ひいては癌浸潤部の組織障害部の修復機能に関与し，lumin の長期使用でアラビノマンナンと同じように癌の癒痕化を起こした。

HGC は未分化胃癌であるが collagen 増殖は著明で，移植時すでに個々の癌細胞間へ collagen のびまん性増殖がみられる。HLC（ヒト肺腺癌）では通常の腺癌にみられるような定型的な小葉状で，むしろ collagenation は前者ほど著明でない。

PC-9（ヒト肺高分化癌）の類上皮癌やMKN-1（胃癌の扁平上皮癌）は癌の中でも癌をとりまく間質形成や collagen 増殖は著明で，無処置群でも小葉状に癌巣をとりまくとともに癌巣内にもびまん性に進入増殖し，移植後 1 週で collagen 増殖はすでに著しい。

clone-M-3 や B-16 のマウス悪性黒色腫の grafts も，angiogenesis は比較的著明で腫瘍細胞は血管中心性に増殖するが，腫瘍内では内皮細胞の増殖に由来する IV type collagen を主成分とした collagen fiber の増殖が著明である。

腫瘍細胞移植時の cicatrization（かさぶた化）は無処理の対照群でも小局所性にみられるが（Fig. 5a），lumin 50 ng 皮下注射，射光または

小熱傷を加え長期注射することにより  $m\phi$  およびリンパ球増殖とともに著しい癌の癒痕化を来した（Fig. 5b, c: 5c 腫瘍は切除容易となる。）

特に重要な所見は，nude mouse でも lumin 注射によってリンパ球，および  $m\phi$  の増殖の顕著なことで，Figure 7a, b の如く無処理対照ヌードマウス（Fig. 6）に比較して癌間質でのリンパ球浸潤と  $m\phi$  の増殖の著しいことは注目すべきものであった。

nude mouse でも三戸のセルソーターによる解析では T リンパ球を少数含むが，他方，免疫酵素組織化学的には認められず，殆ど B 細胞と形質細胞であった。特に，grafts 周辺の間質のリンパ叢では著明なリンパ球増殖がみられ，分化成熟した B 細胞や  $m\phi$  の増殖が著明であった。癌間質で多数の  $m\phi$ -リンパ球の接着がみられ PEC の実験にみられるようにリンパ球と  $m\phi$  の接触が生体内でも観察された。さらに注意すべきことは，活性化した  $m\phi$ -リンパ球の増殖によって癌巣周囲の線維芽細胞の著明な増殖が誘発された。また， $m\phi$  の単クローン抗体による immunoperoxidase method で癌巣内には著明な  $m\phi$  の進入と増殖がみられ，緊密に癌細胞に接着していた（Fig. 8）。

悪性黒色腫でも grafts をとりまく間質には

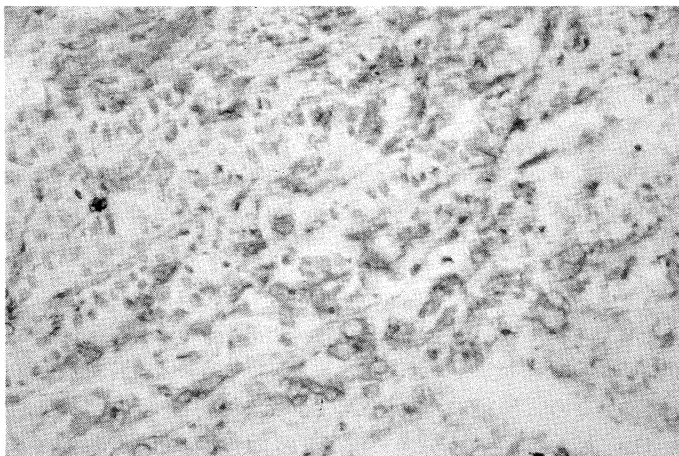


Fig. 8. Monoclonal antibody immunoperoxidase staining of macrophages in the HLC tumor. Predominant proliferating  $m\phi$  were observed in cancer.  $\times 400$ .



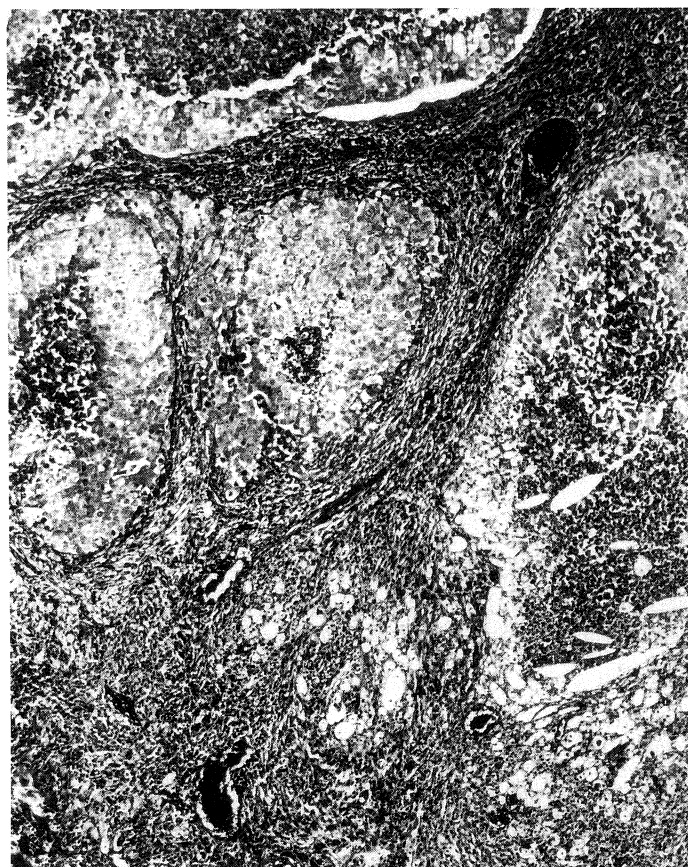


Fig. 9. Lymphocytes infiltration and cirrhotic fibrosis in the stroma. Cancer cells are degradating in a tumor(HLC) confined by fibroblasts proliferation. Lumin 50 ng/muouse at dose of white light. 30 min. 249 days. Mallory staining.  $\times 100$ .

lumin 注射で著明な  $m\phi$  の増殖が誘発され, athymic mouse よりも T 細胞を有する thymic mouse に著明で T 細胞の関与が  $m\phi$  活性に重要であることを示唆していた.

以上の所見により, lumin は *in vitro*, *in vivo* の実験データの示すように, nude mouse でも  $m\phi$  の活性とリンパ球増殖が共存し, これにより著明な線維芽細胞の増殖が起こり, さらに collagen 増殖を促進した (Figs. 9, 10). この collagen 増殖は lumin の長期使用により癌細胞を封じ込め癌増殖を抑制しさらに癌巣の癒痕化へと進行した (Fig. 11a, b).

### 3. 考 察

lumin は安全性に優れきわめて微量で造血機

能の賦活作用, 創傷治癒促進作用, 免疫調節作用, 細胞賦活作用が報告され, その結果, 生体の恒常性維持機構の調節に役立つことが注目され, このシアニン系感光色素については lumin と名付けられた. lumin とは「イルミネーション」または「ルメン」から連想され呼吸活性を上昇して生体にエネルギーを与える細胞賦活物質という意味である.

lumin の  $m\phi$  活性の上昇については, あらかじめマウスの腹腔内に注射し腹水細胞を集め adherent cells としての  $m\phi$  の貪食能と, 他方, 腹腔内注射等の前処置を行わず腹腔細胞の adherent cell のみを集め *in vitro* において lumin で処理した *in vitro* と, 前者の *in vivo*



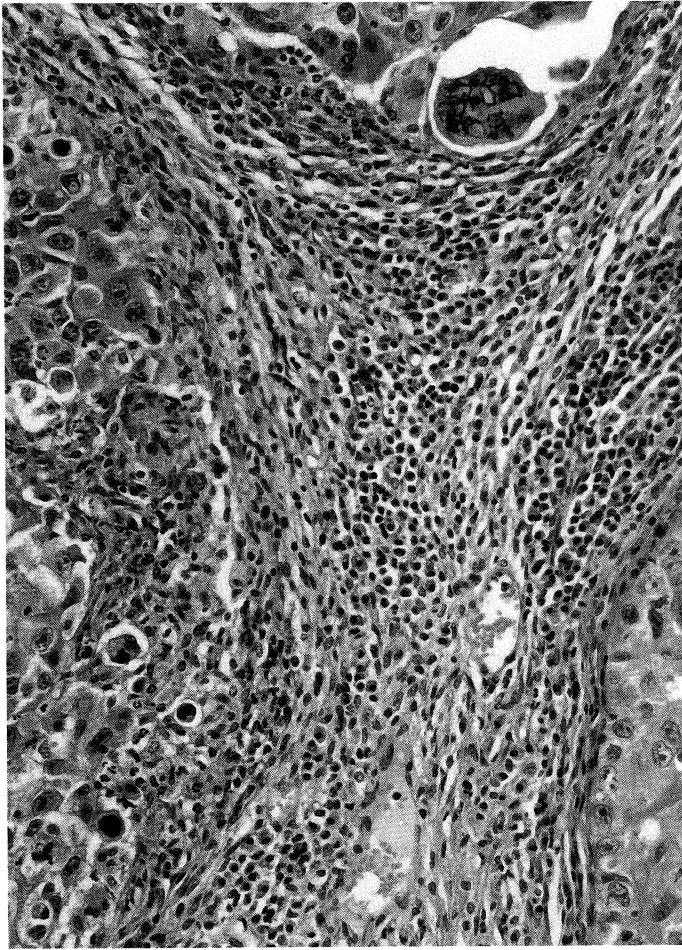


Fig. 10. Predominant proliferation of fibroblasts and lymphocytes infiltration in the cancerous stroma. Lumin 50 ng/mouse S.C injection at dose of white light, 30 min. 90 days. H. E staining.  $\times 200$ .

Table 2. Contribution of non-adherent cells to lumin photodynamic activation of macrophages

Cell	Lumin (3ng ml <sup>-1</sup> )	Red fluorescent light (7.5Jm <sup>-2</sup> )	Ingestion index
Adherent cells <sup>a</sup>	—	+	77 $\pm$ 6
Adherent cells + non-adherent cells <sup>a</sup>	—	+	81 $\pm$ 10
Adherent cells <sup>a</sup>	+	+	84 $\pm$ 9
Adherent cells + non-adherent cells <sup>a</sup>	+	+	282 $\pm$ 13
Non-adherent cells added to adherent cells <sup>b</sup>	—	+	77 $\pm$ 12
Treated non-adherent cells Added to adherent cells <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	+	279 $\pm$ 28

<sup>a</sup>Experiment I. <sup>b</sup>Experiment II.

<sup>c</sup>Non-adherent cells were treated with lumin, washed and then added to untreated adherent cells.



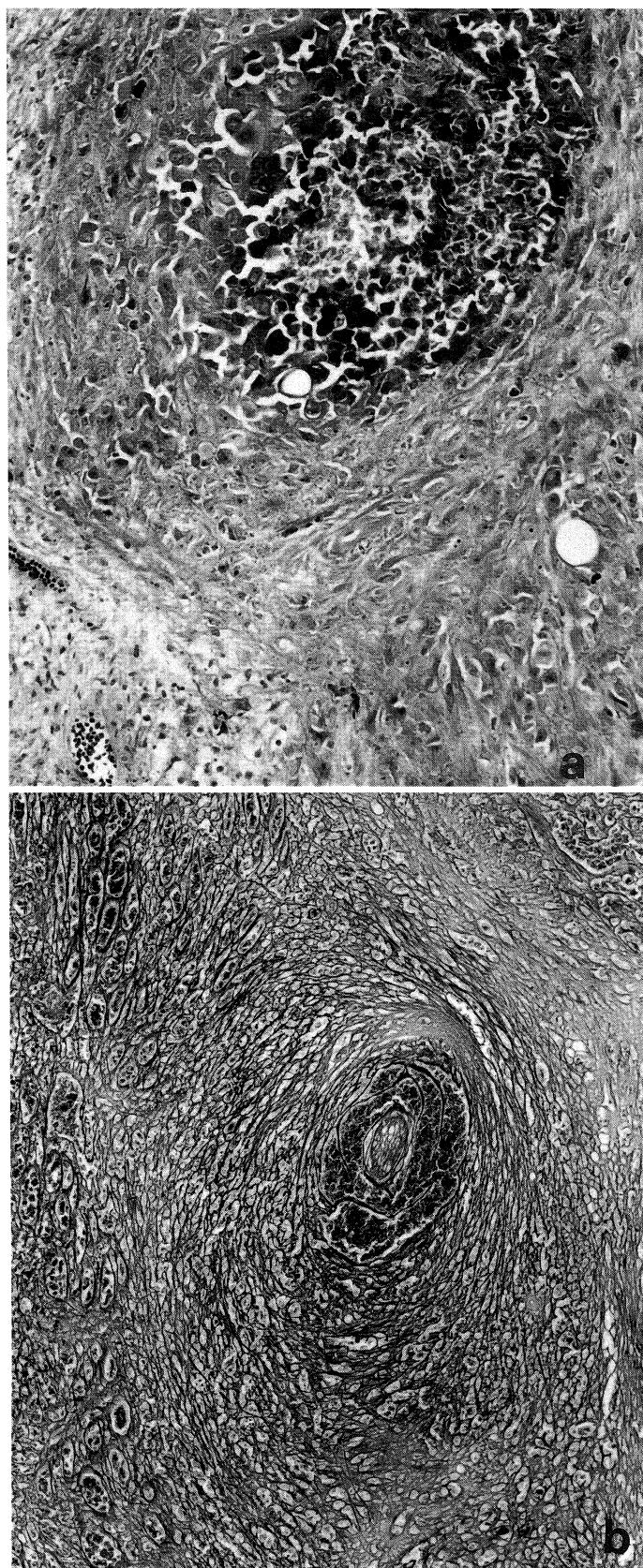


Fig. 11.



処理の実験において mφ の活性を比較すると、後者 *in vitro* の処理では mφ の活性の上昇はみられなかった。

一方、正常マウスの腹腔細胞を集め lumin で処理した時は、mφ の活性は上昇された (Table 2)。

このことは mφ 活性には今回行った lumin の処理量では T または B 細胞の関与が必要であることを示唆している。

かねてより、癌免疫療法について癌における BRM の病理所見に着目し、癌の angiogenesis に端を発する collagen fiber の増殖の動向に注目してきた。このたび lumin が mφ の活性 (食食能) を著しく高め、創傷治癒を促進し、且つまた、安全性に優れていることに着目し、nude mouse に各種ヒト由来の癌細胞 (HGC, HLC, PC-9, MKN-1, clone-M-3, B-16細胞, 等) を移植し、lumin 50~100 ng 皮下注射し白色光 30 分間射光又は電気ゴテで腫瘤に小熱傷を加え創傷治癒機転の誘導を試みて癌巣の病理所見に注目した。

その結果、Figure 6 にみるように、nude mouse においても間質形成の比較的小さい腺癌 (HLC) でも癌間質に著明なリンパ球増殖、mφ 増殖、線維芽細胞増殖がみられ (Figs. 9, 10)、後には collagen 増殖により癌巣を被包化し、封じ込め、癌増殖の抑制がみられた (Fig. 11a, b)。特に、活性化した形質細胞の浸潤が著明で、リンパ管腔には著しいリンパ球の増殖と貯留と移動がみられ、血管内および間質のいたるところで mφ への接着がみられた (Fig. 7b)。

このように mφ 活性化薬剤で癌移植の比較的初期 (約 30 日) の間質での mφ、リンパ球の浸潤増殖、次いで線維芽細胞の増殖が著明となり、これに伴い collagen fiber の増殖が癌細胞を

りまき、癌巣は肝硬変症に類似し (Fig. 9)、徐々に癌細胞の自然壊死 (spontaneous death) を招来し、持続する mφ 活性化により壊死巣の修復機転が促進し腫瘍は cicatrization を起こした (Fig. 11a, b)。

この実験でみられるように担癌体における mφ 活性化やサイトカインについては、殺癌作用を期待するよりも人型結核菌アラビノマンナンと同じように、長期投与で起こる恒常性の持続により修復機転の促進こそ重要で、癌巣を封じ込め、癌転移の阻止が起こるものと考えられる<sup>11)~14)</sup>。

## ルミン—エタノール の肝癌治療への応用

### 1. 生体におけるルミンによるマクロファージ 活性の作用機序の仮説

前述のように腹腔細胞を用いての検索でルミンによる mφ 活性はリンパ球を介することが分かったが、この度、生体での mφ 活性機序も明らかに becoming つつある。

共同研究者、山本信人<sup>5)</sup>、本間定<sup>6)</sup>らは極めて興味ある研究を行った。従来、シアニン色素は写真の増感剤として用いられているので、光によって化合物の物理化学的性質が変化し、細胞膜親和性が増減する。この親和性が重要で B 細胞膜に作用するものと考えられる。以下、この作用機序を説明する。

この新しい pathway に関しては細胞膜の重要な構成成分である phosphatidylcholine が炎症などによる細胞の破壊によって phospholipase A<sub>2</sub> の作用を受けて lysophosphatidylcholine (lyso-pc) へと分解されるが、この lyso-pc や lumin により B 細胞が刺激を受け、細胞表面酵

← Fig. 11. Confinement and cicatrization of cancer with collagen fibers proliferation in a nude mouse.

- a. Human lung cancer (PC-9) 10<sup>7</sup> cells was transplanted. Cancer cells are degradating by confinement with fibroblasts and collagen fibers proliferation. Lumin 50 ng/mouse S.C injection every other days. 131 days. Mallory staining. ×200.
- b. PC-9 cells 10<sup>7</sup> was transplanted. Cancer cells are disappearing by confinement with collagenation. Lumin 50 ng/mouse S.C injection every other days. 339 days. Pap staining. ×40.



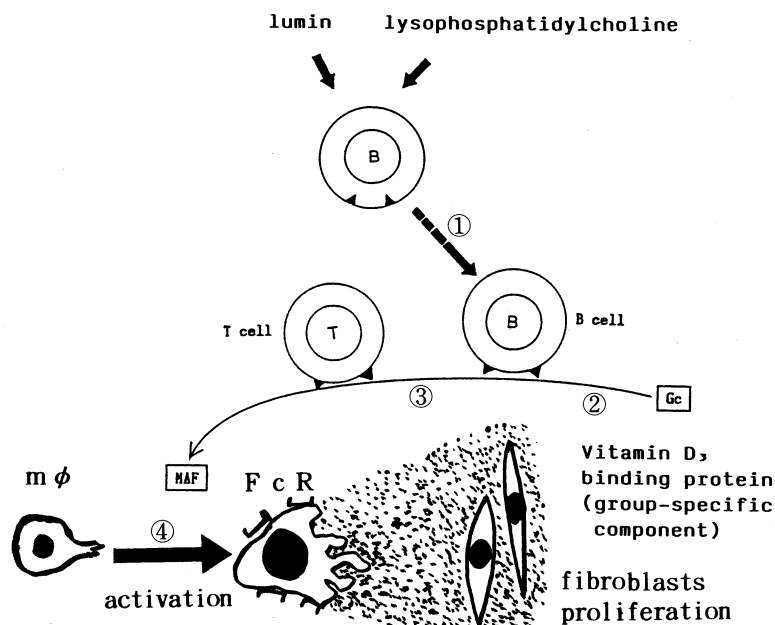


Fig. 12.

素 ( $\beta$ -galactosidase) が活性化される (Fig. 12-①). この酵素により血清因子 Vitamin D3 結合性蛋白 (GC: Vitamin D3 binding protein: group-specific component) が分解される (Fig. 12-②). 次いで, T-cell 表面にある酵素 (sialidase) によりさらに分解され, その生成物が  $m\phi$  活性因子 (MAF) となるのである (Fig. 12-③). この MAF により Fc-receptor を介する  $m\phi$  の貪食活性が高められる (Fig. 12-④). このように lumin は B-cell 表面に作用して酵素を放出させる作用をするので, この①~④のメカニズムで  $m\phi$  を活性化するものと考えられる.

## 2. サイトメトリーによる nude mouse 血中の T 細胞の分析

三戸の実験<sup>10)</sup> によって nude mouse は概ね生後 3~5 週までは T 細胞を欠如しているが, サイトメトリー解析によって nude mouse でも老化に伴い成熟 T 細胞 (ヘルパー T 細胞, サプレッサー T 細胞) の存在を確認した. したがって, lumin によるコラーゲン増殖の促進は nude mouse でも  $m\phi$  活性には B 細胞, T 細胞が関与しているものと考えられる (後日 B 細胞だけでもよいことが分かった).

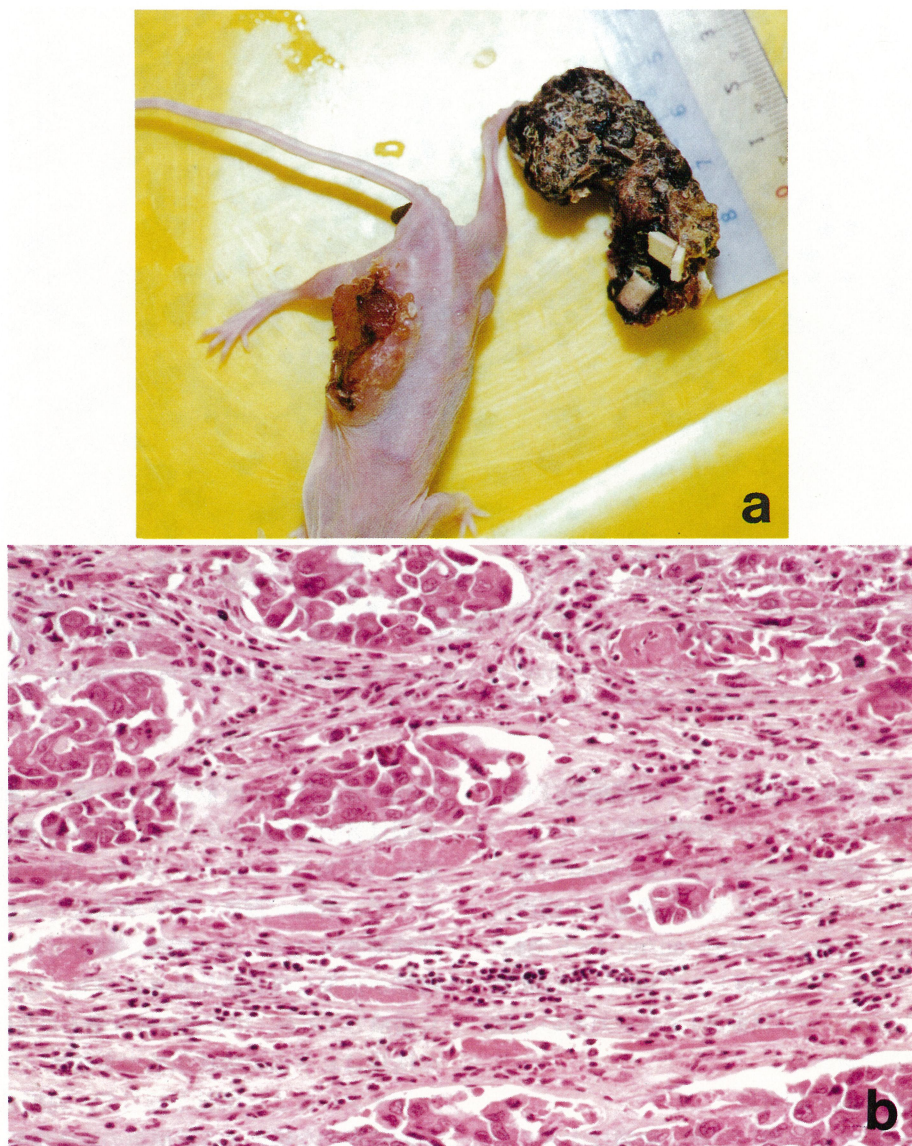
## 3. ethanol-lumin 注入と lumin 常飲による肝癌治療への基礎実験

試作実験として, 射光, 熱傷を加えることなく, 今までの実験結果を参考にして, 先ず, 肺癌 (HLC) を移植した nude mouse で ethanol-lumin 注射と lumin 飲料の併用による癌増殖抑制について検討したところ, Figure 13 にみられるように, 癌腫瘍の癒痕化と脱落が促進されたので, エタノール注入が行われている肝癌の治療としての有効性の有無について企画した.

この予備実験は, ヒト肺癌 (HLC) 移植により増大した腫瘍 (30 mm×30 mm) へ ethanol-lumin 250 ng/0.1 ml を 5 回注入し, 以後 lumin 飲料のみとし, 約 80 日後に腫瘍全体が癒痕化し, 脱落した. 組織学的に残存した癌巣では, nude mouse にもかかわらず著明なリンパ球浸潤とコラーゲン増殖がみられ, 漸次癒痕化へ進行し, 脱落した (Fig. 13a~c, Fig. 6 と比較).

今回のように光化学反応と生体の免疫機構が深く関与した方法は光化学免疫療法ともいうべきもので, lumin がエタノール可溶性であり全く副作用のないことに着目し, ethanol-lumin 局所





**Fig. 13.** a. HLC tumor (30×30 mm) was cicatrized and fell by treatment with ethanol-lumin injection and lumin drink for 80 days.  
b. Predominant fibrosis and lymphocyte infiltration in the remain tumor. Compare to the control mice (Fig. 6). H. E staining. ×100.

注入と lumin 常飲による肝癌治療への基礎実験を行い，将来ヒトの癌転移巣をはじめ肝癌治療に応用できることを明らかにした。

#### 4. 研究方法と結果

- (1) lumin による *in vivo* および *in vitro* の  $m\phi$  の活性  
三戸は  $m\phi$  の貪食能について superoxide 産

生能をチトクローム C 法を用いて検討し，20～40 ng/mouse の投与で著しい superoxide の産生増加を認めた (Fig. 3b). その結果， $m\phi$  活性化に及ぼす光照射により lumin は励起し， $m\phi$  活性はリンパ球相互作用に依存することが再確認された。

- (2) nude mouse の背部皮下にラット肝癌細



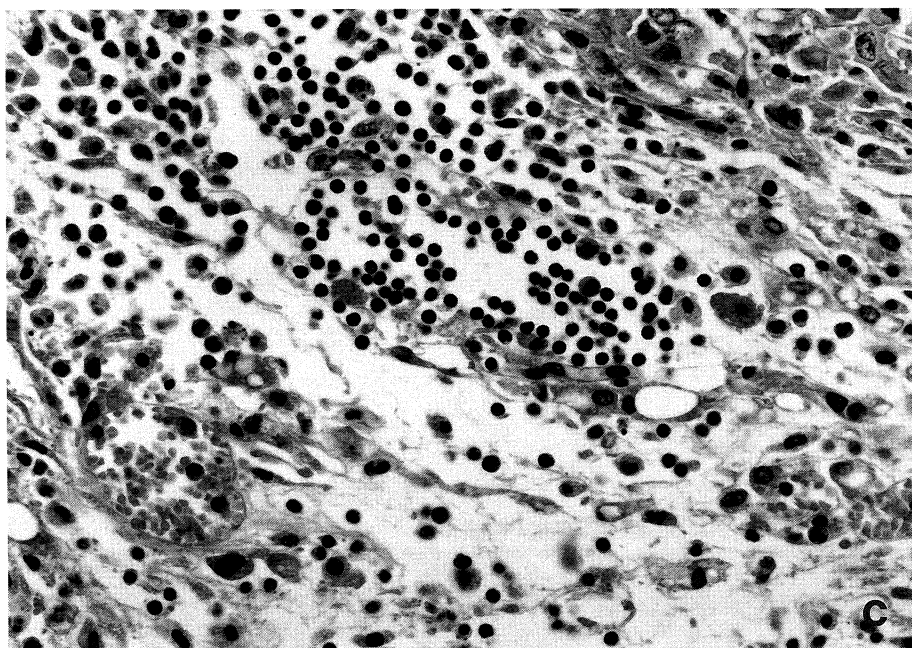


Fig. 13 c. Predominant proliferation of lymphocytes and macrophages in the stroma of the HLC tumor. H. E. staining.  $\times 200$ .

胞(RL-34, HTS), ヒト肝癌細胞(PLC/PRF/5)  $1\sim 2 \times 10^7$  移植腫瘍について

形成された腫瘍組織内に 250 ng lumin 含量エタノール 0.1 ml を初回または 3 週後に 1 回注入した. nude mouse [Balb/c nu/nu 4~6 週齢, 雄 (日本クレア)] の飲料として 100 r/100 ml 水を常飲 (1 匹約 5 ml/日飲水) させ, 対照の水飲料マウスと比較した.

### (3) 病理組織学的所見

nude mouse に移植した後, 腫瘍は大きくなりながら ethanol による凝固壊死を起こした後, 周囲よりの修復作用により癒痕化がみられるが, lumin 投与開始後 10~30 日では免疫反応としてリンパ球,  $m\phi$  増殖が著明にみられ, lumin 常飲 90 日で壊死巣を取り囲み, 線維芽細胞, コラーゲン増殖が促進し癒痕化が進み, 腫瘍は脱落を起こすものもある.

非ルミン含量エタノール 0.1 ml のみの注射の場合, 肝癌壊死はみられるが壊死巣周辺よりリンパ球およびコラーゲンを含む修復反応は著明でない (Fig. 14a, b). これに反して, ethanol-

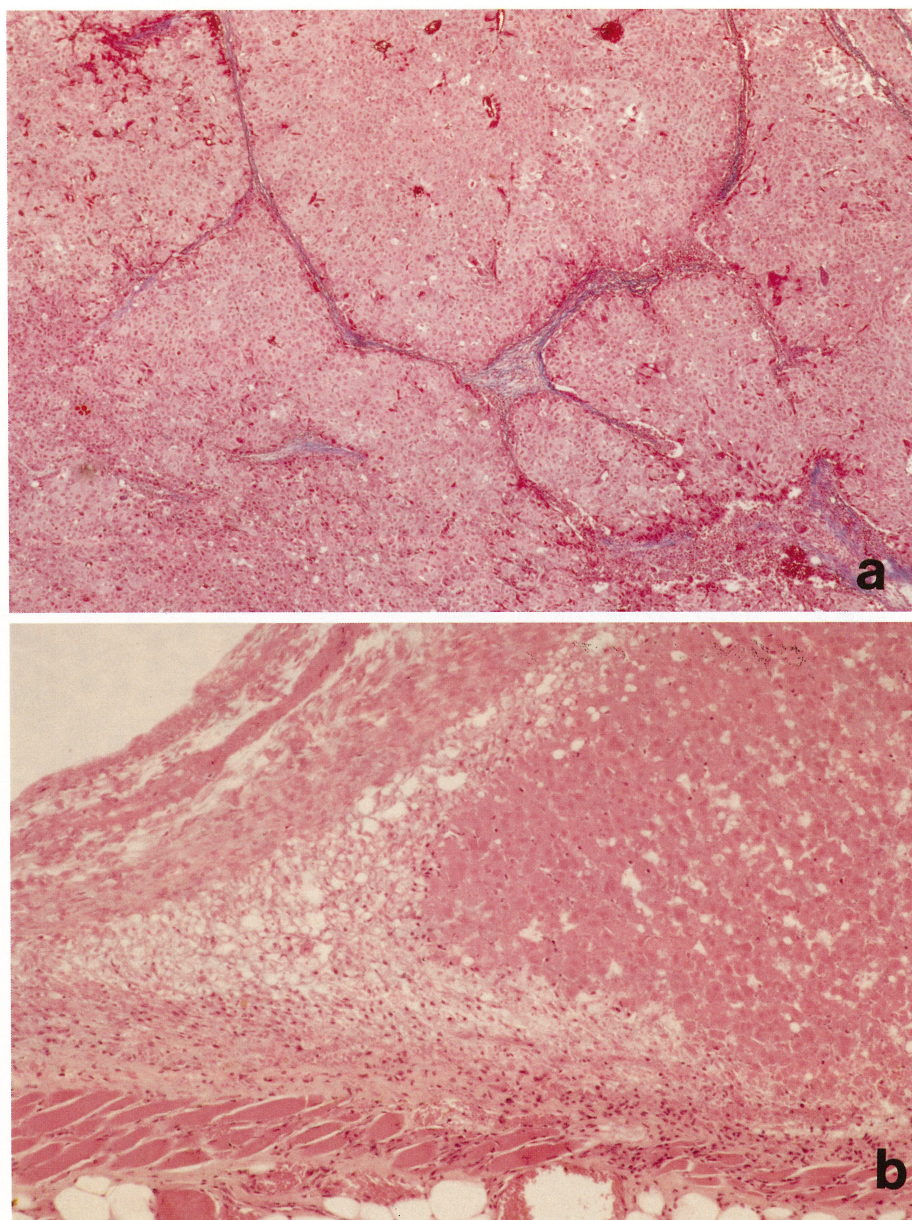
lumin および lumin 飲料併用の場合, 癌壊死巣周辺は著明な免疫反応としてリンパ球浸潤,  $m\phi$  遊走 (約 30 日) がみられ (Fig. 15a~c), 後コラーゲン増殖が進展し壊死巣周辺を取り囲んで非特異的なコラーゲン増殖が顕著となり, 修復機転が促進し癌は被包化され (Fig. 15c), 次第に癒痕となるが, 中には石灰沈着もみられた. この所見はヒト由来結核菌抽出多糖体 (アラビノマンナン) による所見と同じで, 免疫基盤に立つ非特異的な癌による破壊巣の治癒機転である.

一部の nude mouse では, lumin 皮下注射により腫瘍周辺の皮下リンパ節の胚中心の著明な腫大とリンパ球の著明な増殖動員も観察された.

### (5) 将来光化学免疫療法としての lumin の臨床応用への展望

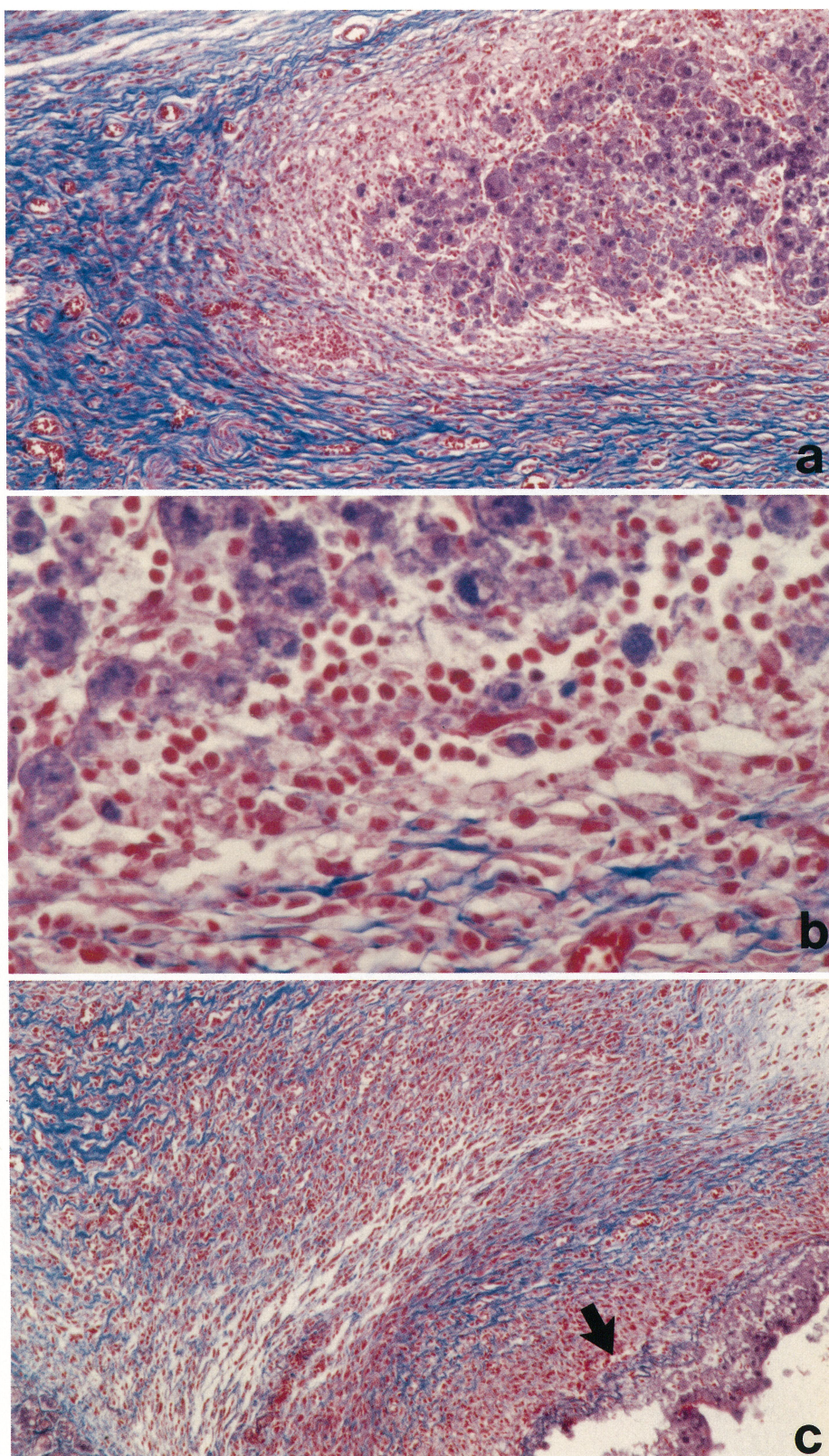
以上の基礎実験でエタノール注射の行われている肝癌, 胃癌への応用が望まれ, 共同研究者の本間らにより実施されている. 特に肝癌および胃癌組織中に ethanol-lumin または lumin を単独局所注射し, 新たに三戸の開発した細径光ファイバーを使用して lumin 注射と共に腫瘍組





**Fig. 14.** a. Xengraft of PLC (human hepatoma)  $10^7$  cells. 100 days. Control mouse. Proliferation of collagen fibers in the stroma is not remarkable. Mallory staining.  $\times 40$ .  
b. Ethanol 0.1 cc was injected in the tumor (I. T) without lumin twice in the tumor transplanted PLC cells ( $2 \times 10^7$ ). 110 days. A little collagen fibers proliferation and lymphocytes infiltration are observed in the surrounding of the necrotic cancer. H. E staining.  $\times 100$ .







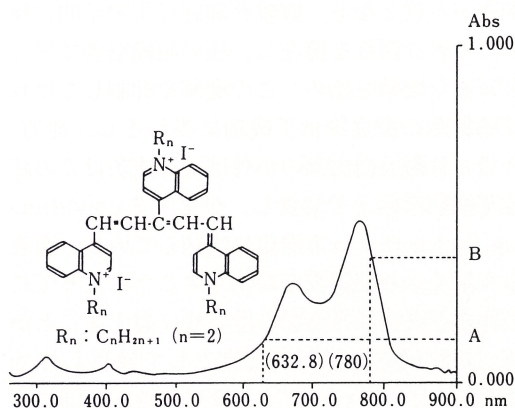


Fig. 16. Structure of lumin and its absorption spectra

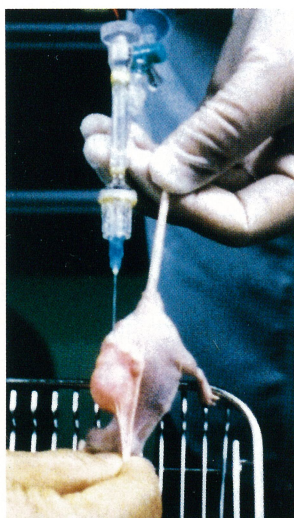


Fig. 18. Laser irradiation apparatus designed by Dr. Mito.

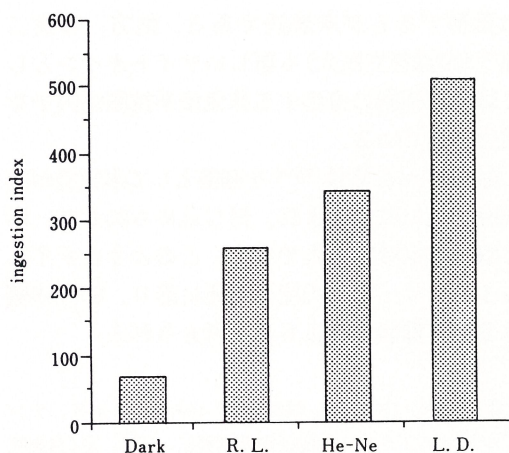


Fig. 17. Comparison of the ingestion index of macrophages at different light wavelengths.

Dark : non-irradiated group.  
 R. L. : group irradiated by a room lamp.  
 He-Ne : group irradiated by He-Ne laser light.  
 L. D. : group irradiated by a laser diode.

織内光照射が技術的に可能になり、感光色素による mφ 活性化を促進するレーザー光の開発が進められている。

#### (A) lumin の光吸収スペクトル

Figure 16 のような 670 nm, 770 nm の所に強い吸収 peak が存在する。したがって、この peak に合わせた波長の光を照射することによって高い mφ の活性が得られる。A, B は He-Ne レーザー光 (632.8 nm) およびレーザー半導体 (780 nm) の吸収 peak の高さである。実験の結果、780 nm の場合のほうが明らかに高い活性が得られた。

さらに、780 nm の光は近赤外光であり、組織への透過性が高く、より深部の癌組織への効果が考えられる。

#### (B) 光の種類による mφ の活性

Figures 16, 17 から明らかに吸収 peak の高い mφ 活性化の亢進がみられた。

← Fig. 15a, b, c. Lumin solution (100γ/100 cc water), after Ethanol-Lumin 0.1 cc I. T (PLC tumor 10<sup>7</sup>) injection twice, was drunk for 51 days.

- Collagen fiber proliferation and lymphocyte infiltration were predominant in the stroma surrounding of the necrotic hepatoma. Mallory staining. ×40.
- Lymphocytes infiltration into the tumor was predominant. Mallory staining. ×40.
- A necrotic hepatoma are replacing by granulation and cicatrization by collagen fiber proliferation. Mallory staining. ×40.



以上の実験データに基づいて、三戸は装置のシステムが二つの機能から成る腫瘍内照射用の細径光ファイバーを作製した。すなわち、luminを局所へ注入するための注射針と同時にレーザー光を導入するための光ファイバーで組み立てられている。レーザー光は、注射針に内蔵された光ファイバーを経て癌組織局所へ照射され、luminはその注射針とファイバーの隙間を通して同部位へ注入されるので、lumin注射と光照射が腫瘍局所で行われるようになった (Fig. 18)。

## 結 論

(1) nude mouse への移植肝癌へ ethanol-lumin 0.1 ml (250 ng) 2 回注射を試み、以後 lumin 飲料のみに切り替え長期の飲水により、マウスの肝癌内では nude mouse にかかわらず著明なリンパ球、 $m\phi$  の浸潤、集積が認められ、 $m\phi$  活性を中心とする著しい免疫反応が誘発された。特にエタノール注射による人工的な癌壊死巣周囲の間質に著明で、これに続き壊死巣の線維化、被包化が進行し、癌の癒痕化が促進した。

(2) nude mouse は老化に伴い成熟 T 細胞 (ヘルパー、サブプレッサー共に) の存在が確認され、lumin によるコラーゲン増殖の促進には B 細胞、T 細胞、 $m\phi$  の関与が考えられた。

(3) 肝癌をはじめ胃癌など、ethanol-lumin および lumin 常飲による免疫活性がみられ、これを基盤とする病理所見として癌浸潤による組織破壊部の修復が促進され、癌の被包化、癒痕化が起こる。 $m\phi$  活性剤の一つとして lumin は全く副作用なく細胞活性がみられるので、癌免疫治療法の一つとして QOL についても極めて重要な治療と考えられる。

以上述べた通り、本課題では終局的に線維芽

細胞が主役となる。線維芽細胞は生物学的に極めて多彩な活性を潜在し、癌の組織培養で早くも旺盛な増殖を始め、この増殖を抑制しなければ癌細胞の樹立株は不成功に終わるし、他方、今日の骨髓性白血病の体外培養の成功はこの線維芽細胞単層上で培養し、分泌する conditioning factor によって株化に成功している。著者らも早くから細胞膜を変化させることによってこの線維芽細胞は貪食能を潜在的に有することから、免疫細胞の第三の細胞として注目してきた<sup>15)</sup>。また、in vivo でも線維芽細胞培養層に癌細胞を重積すると癌細胞自身も著明な collagen 増殖を促進し、リンパ球無存在でも癌細胞—線維芽細胞直接的接触で collagen 増殖を促進する。この癌細胞よりの collagen 増殖因子の研究は重要であるが未解決である。他方、今西二郎<sup>16)</sup> (京都府立医大) も新しいサイトカインとして線維芽細胞の分泌する非免疫系抗腫瘍因子を重要視している。

最後に  $m\phi$  活性<sup>17),18)</sup> を基盤として癌細胞が線維芽細胞に取り囲まれ、封じ込められると、単に機械的な傷害のみでなく、このようなサイトカインによって癌細胞は壊死に陥り、癌の増殖はさらに抑制されるものと考えられる。

本研究は、山本信人 (米国、フィラデルフィア、テンプル大学ソクラテス免疫研究所所長)、本間 定 (慈恵医大、三内科、清水桜ヶ岡総合病院内科主任)、三戸恵一郎 (川崎医療短期大学医用電子工学科助教授)、速水正明 (日本感光色素研究所所長)、中川美典 (日本感光色素研究所主任)、栗本雅司 (林原生物化学研究所所長)、新井成之 (林原生物化学研究所主任) の共同研究によるものである。茲に謝意を表します。癌細胞の培養には福島不二子技術員のお世話になり併せて深謝します。

## 文 献

- 1) 伴野 賢：三核型感光色素の合成。日本化学 第八年会誌：10, 1955
- 2) Hatano S: Historical Review, Medical Application of Photosensitizing Dyes, From 1934 to 1950. 感光色素 71: 14—21, 1967



- 3) Suzue K : Medical Researches for photosensitizing dyes by Prof. Imanaga. 感光色素 71 : 22—42, 1969
- 4) 鈴江 懐 : 制癌剤使用時における副作用の感光色素プラトニンによる防止について. 感光色素 30 : 31, 1955
- 5) Yamamoto N, Homma S, Nakagawa Y, Hayami M, Imanaga H, Kurimoto M, Mitsuhashi M, Kimoto T : Activation of mouse macrophages by in vivo and in vitro treatment with a cyanine dye, lumin. J Photochem Photobiol 13 : 295—306, 1992
- 6) Yamamoto N, Homma S : Vitamin D<sub>3</sub> binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 8539—8543, 1991
- 7) Cohn ZA, Benson B : The differentiation of mononuclear phagocytes, morphology, cytochemistry and biochemistry. J Exp Med 121 : 153—169, 1965
- 8) Griffin FM, Silverstein SC : Segmental response of the macrophages plasma membrane to a phagocytic stimulus. J Exp Med 139 : 323—336, 1975
- 9) Bianco C, Griffin FM, Silverstein SC : Studies of macrophage component receptors. Alternation of receptor function upon macrophage activation. J Exp Med 141 : 1278—1290, 1975
- 10) 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 (日本 ME 学会論文集) : 1—4, 1993
- 11) Kimoto T : Collagen and stromal proliferation as preventive mechanisms against cancer in tuberculosis bacillus (SSM). Cancer Detect Prev 5 : 301—314, 1982
- 12) Kimoto T, Watanabe S, Hyodoh F, Saito T : Collagen fiber formation and proliferation as mechanism of cancer prevention and repression induced by extract from mycobacterium tuberculosis : Correlation between clinical observation and animal experiments. Cancer Detect Prev 11 : 173—189, 1988
- 13) Kimoto T : Pathological studies of three cases of cancer treated with polysaccharides from human-type mycobacterium tuberculosis-antitumor activity through collagen fiber proliferation. Acta Pathol Jpn 37 : 1919—1934, 1987
- 14) Kimoto T : Patho-biological observation on biological response modifier (Maruyama vaccine) in cancer : Important roles of collagen fibers proliferation as prevention of cancer development and metastasis. Kawasaki Med J 16 : 147—180, 1990
- 15) 木本哲夫, 横村英一, 高田厚行, 多田広嗣, 田中明輔, 妹尾左知丸 : SV-40腫瘍細胞の細胞認識と貪食. 細胞生物シンポジウム 23 : 241—250, 1972
- 16) 今西二郎 : 間質系細胞の抗腫瘍作用. 「がんに対する生体防御機構」(今西二郎編). 共和書院. 1993, pp 85—100
- 17) 木本哲夫, 山本信人, 中川美典, 栗本雅司 : 感光色素ルミンを用いた癌光化学免疫療法の基礎研究. 日本医事新報 (第3526号) : 30—34, 1992
- 18) 木本哲夫, 三戸恵一郎, 本間 定, 山本信人, 中川美典, 新井茂之, 栗本雅司 : 感光色素ルミン(NK-4)—エタノールの肝癌への適用. 日本医事新報 (第3625号) : 30—34, 1993