

家兎自家癌における肺胞マクロファージの 抗腫瘍性に関する実験的研究

横 崎 恭 之

広島大学医学部内科学第二講座 (主任: 山木戸道郎教授)

受付 平成1年1月9日

受理 平成1年4月1日

肺胞マクロファージは、常に外気と接触し刺激を受けている細胞であり肺胞内細胞の90%以上を占め、生体防御機構において重要な働きをしているものと考えられている。また肺内における環境の変化に対応して腫瘍免疫においても重要なエフェクター細胞と考えられる。しかし、肺癌の発癌過程における肺胞マクロファージの免疫学的意義は、十分に明らかではない。そこで著者は家兎を用い、肺胞マクロファージの機能的変化を、抗腫瘍活性を中心に検討した。

まず、家兎の肺胞マクロファージは、気管支ファイバースコープにて BAL を行う事により採取したが、はじめにその方法、間隔について検討した。次に家兎の肺に化学発癌を惹起させ、発癌過程における肺胞マクロファージの機能的変化を観察した。さらに BRM を用いその抗腫瘍活性の増強方法について検討し、以下の結論を得た。

- 1) 家兎における、気管支ファイバースコープを用いた BAL は、注入量 20 ml, 洗浄回数 2 回で $2\sim 3\times 10^6$ 個の肺胞マクロファージを回収できた。
- 2) BAL の施行間隔を 1 週間以下とした場合、肺胞内細胞成分または肺胞マクロファージの機能に変化が認められた。2 週間では変化を認めなかった。
- 3) 家兎肺胞マクロファージは、6 種のヒト培養腫瘍細胞株に対し、増殖抑制能を示したが、正常細胞であるヒト線維芽細胞に対しては、増殖抑制能を示さなかった。
- 4) MNU を左主気管支に注入し、12週で 1 羽/3 羽, 24週で 3 羽/3 羽の中枢型肺癌の発生を認めた。
- 5) その発癌過程における肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能を観察し、経時的な上昇を認めた。
- 6) 実験12週で屠殺した 2 羽の家兎において、発癌家兎と非発癌家兎の間で腫瘍細胞増殖抑制能の上昇の程度には差を認めなかった。実験24週で屠殺した 3 羽の家兎において癌腫の浸潤の程度と腫瘍細胞増殖抑制能の上昇に関連は認められなかった。
- 7) 発癌過程における肺胞マクロファージの NBT 還元能は有意な変化を示さず、貪食能は経時的な低下、免疫抑制活性は経時的な上昇を認めた。免疫抑制活性は個体差を認めた。
- 8) 発癌過程における肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能は、免疫抑制活性との間に正の相関を認め、貪食能との間には負の相関を認めた。
- 9) LPS, N-CWS, $IFN\gamma$ は、腫瘍細胞に対し、直接の増殖抑制作用は示さず、TNF は腫瘍細胞に対し、腫瘍細胞の種類によっては直接、増殖抑制作用を示した。
- 10) LPS, N-CWS, $IFN\gamma$ は、それぞれ肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能を増強させた。
- 11) その場合 $IFN\gamma$ に対する反応性は、個体差が認められ反応性を示さないものも認められた。
- 12) 反応性を示さない家兎においても $IFN\gamma$ 添加後に LPS を添加した場合は、 $IFN\gamma$ に容量依存性作用の発現を認めた。

13) 併用の場合他に, N-CWS と $IFN\gamma$, N-CWS と TNF および $IFN\gamma$ と TNF の組み合わせにおいて肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能増強作用に関して相乗効果が認められた。

TNF を含む組み合わせでは, 特に TNF resistant cell line に対して強い相乗効果を認めた。

以上より肺胞マクロファージは発癌の初期段階において抗腫瘍性を上昇させており, それは BRM の併用により効果的に上昇させ得ることが試験管内において確認できた。但し腫瘍細胞増殖抑制能と免疫抑制活性の間には相関が認められ肺胞マクロファージの抗腫瘍性の検討の際に注意が必要であると思われた。

Key words : Pulmonary alveolar macrophage, Antitumor activity, Carcinogenesis, Bronchoalveolar lavage, Biological Response Modifiers

抗腫瘍免疫のエフェクター細胞は大別して特異的免疫を司る T リンパ球と非特異的なマクロファージ, NK (natural killer) 細胞および LAK (lymphokine activated killer) 細胞などに分けられる。ところが後者の内マクロファージはリンパ球に抗原を提示したり¹⁴³⁾, また IL-1 によりリンパ球に刺激を与えたり¹⁰¹⁾, 逆に MAF (macrophage activating factor) によりリンパ球より刺激を受ける事⁹⁶⁾ 等リンパ球とも複雑に相互作用を行っていることが明らかになるにつれ, 特異免疫の成立にも深く関わっているものと考えられるようになった。

また, 本来免疫という言葉は, 抗原に対して用いられ, CTL (cytotoxic lymphocyte) に代表される特異的な腫瘍細胞の攻撃こそ真の腫瘍免疫と信じる人も少なくない。ところが現在においても腫瘍特異抗原の検出が困難であり⁷⁸⁾, 存在したとしても強い抗原性を持たないと思われる。さらに, 癌細胞集団は抗原的にも不均一な細胞集団であることが想像され, また抗原の変調³⁾ や消失⁴⁵⁾ など様々の変化を起こすと考えられている。これらは特異的エフェクター機構の弱点とも言える側面であるが, 実際胸腺を欠損するヌードマウスで癌の自然発生率は高くない。その理由として NK 細胞や, マクロファージなどの非特異的細胞の存在が考えられるが, NK 細胞は生体内で実際に抗腫瘍効果を発現していないという報告もあり²²⁾, これも生体内での腫瘍細胞攻撃におけるマクロファージのエフェクターとしての重要性を支持する事実であろう。

担癌患者のマクロファージ機能に関しては, その貪食能, 殺菌能, 走化性, 抗腫瘍性, 抗原提示能等, 多種多様に調べられているが^{81, 111, 157, 158, 166-168)}, 癌の病期や治療の実施状況が一定でないため相互の比較は容易ではなく, 亢進しているという報告や否定的な報告があり多様な性状を示しているものと思われる。

肺は本邦においても発癌率の上昇が問題となっている器官であるが, 肺胞内の細胞は90%以上がマクロ

ファージであり, 肺内での生体防御において中心的な役割を担っているものと思われる。その肺胞マクロファージの抗腫瘍性に関する事実は近年次第に明らかになりつつあり, ヒトにおいて正常状態でも cytostatic activity が認められている^{84, 161)}。Cytolytic activity については存在するとする報告があるが^{69, 154)}, 認めないとする報告もある^{12, 71)}。また, 肺の腫瘍内のマクロファージの抗腫瘍性と予後に相関を認めたとする報告や¹⁶¹⁾, 肺癌患者の肺胞マクロファージの抗腫瘍性に病期別に変化を認めたとする報告もある^{72, 80)}。

前癌病変において, その性質をとらえようとする試みは, 子宮頸癌等では比較的良く行われている^{8, 12, 131)} が, 他の腫瘍では病変部へのアプローチが難しく, 解析に困難を伴う。肺癌においても, その発生母地の不明瞭さとあいまって, 病理学的には前癌病変の解明がさかんである^{6, 10, 138, 144, 149)}。また, 近年正常ヒト気管支上皮の培養が可能となり, 細胞の分化と調節の機構¹⁴²⁾ さらに発癌過程の研究¹⁰⁰⁾ が進歩しつつある。ところが免疫学的には, 病理学上異型上皮と称せられ前癌病変とする意見もある病変の抗原性に関しては, ほとんど知られていない。Burnet の免疫監視機構説には賛否両論あるが, 気管支においては肺癌患者以外にも多くの異型上皮が存在すること^{5, 6, 19, 32, 67, 103)} も確認されており, Burnet の説に従えば免疫監視機構をくぐりぬける事ができる腫瘍細胞よりも, 新たに生じては排除される異型上皮⁴⁾ は抗原性が高いが故に排除されていると考えられる。

また, 近交系動物が組織適合抗原を一致させるために用いられ, 腫瘍特異移植抗原の検出には不可欠であったが, ヒトは遺伝学的に均一な実験動物とは異なり, 宿主の応答はより複雑で多彩と思われる。腫瘍免疫を学問的に進歩させる上で大きく役立ち, なくてはならぬ存在であった近交系動物であるが, 特定の種の1つの系においてのみの現象はヒトにおける応答の多様性を必ずしも反映していない面もあると思われる。

これらの事を考え、著者は発癌過程における観察即ち、化学物質により前癌状態の細胞あるいは腫瘍細胞が生じては排除されていると思われる状態を作り遂には癌腫の生着を許す過程における宿主応答を、交雑種であるという点において実験用マウス、ラットに比べよりヒトに近いと思われる家兎において確かめることを試みた。肺の発癌実験にはいくつかの方法があるが^{55, 63, 72)}、著者は気管内に直接発癌物質を注入し肺内だけに腫瘍を生じさせた。機能としては、肺胞マクロファージの抗腫瘍活性を中心に、食食能、殺菌能を総合的に観察することとし、同時に免疫抑制性についても検討した。また、肺胞内細胞の変化や末梢血リンパ球の mitogen response についても観察した。次に、その抗腫瘍性を種々の BRM (Biological Response Modifiers) の単独および併用によって高めることを考えた。

当然ながら交雑種において移植腫瘍を用いることは不可能であり、また各群を経時的に屠殺し異なる個体より得られた値を比較することは不適當であると考えられる。そこで著者は化学発癌により生じさせた自家癌を用いることとし、屠殺を行わず同一個体より経時的に検体を得た。肺胞内の細胞を得るためには bronchoalveolar lavage (BAL) が、現在広く行われているが、動物実験においては屠殺後に行われるのが常であり、同一個体より経時的に検体を得ることはできない。そこで著者は、家兎においてもヒトと同様に気管支ファイバースコープを用いて BAL を行う方法を考案した。BAL 施行において注入された洗浄液は肺内に残る事実^{28, 77, 99, 129)} が示されており、同一個体に複数回の BAL を施行することは BAL 自体によって変化を残してしまう事が想像できる。臨床においても BAL は繰り返し行われる事もあり、実験動物においても気管支切開下に比較的短期間に繰り返される事があるが、間隔に関してはあまり注意が払われておらず、近年の総説^{25, 130)} にもその記載はない。そこで著者は注入量、注入部位などの基本的な検討とともに経時的観察における至適間隔についても検討した。

Table 1. Abbreviation

AIDS	Aquired immune deficiency syndrome
ADCC	Antibody dependent cell mediated cytotoxicity
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BRM	Biological response modifiers
CPM	Count per minute
CSF	Colony stimulating factor
CTL	Cytotoxic lymphocyte
Con A	Concanavalin A
E/T ratio	Effector to Target ratio
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine N'-ethane sulfonic acid
³ H-TdR	Tritiated thymidine
IFN γ	Interferon gammer
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
LAK	Lymphokine activated killer
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	Macrophage activating factor
2ME	2-mercaptoethanol
MNU	N-Methyl-N-nitrosourea
MPS	Mononuclear phagocyte system
N-CWS	Nocardia rubra cell wall skeleton
NBT	Nitroblue tetrazorium
NK	Natural Killer
PAM	Pulmonary alveolar macrophage
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohemagglutinin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TNF	Tumor necrotizing factor
TSTA	Tumor specific transplantation antigen
UICC	Union International Contre Cancer

Table 2. Subjects in this research

Content	Number of rabbit	Total number of BAL
Study of method of serial BAL in the rabbit.	27	63
Preliminary study for cytostatic activity of PAM.	7	7
Study of changes in PAM functions during carcinogenesis.	12	63
Study of effect of BRM on cytostatic activity of PAM.	15	15
Total	61	148

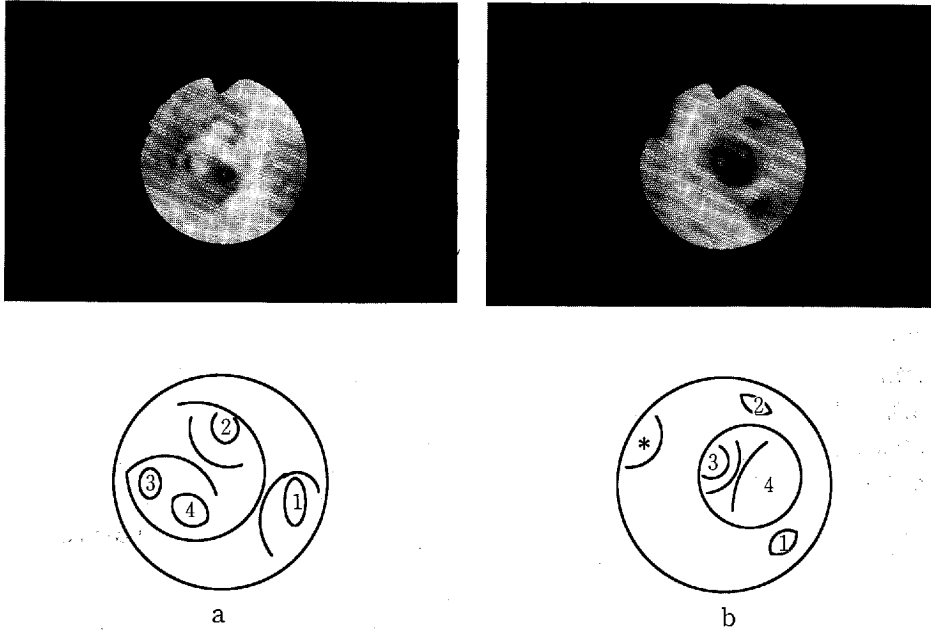


Fig. 1. Bronchoscopic view from right main bronchus indicating bifurcation of lobar bronchi of the right lung. These two types were often observed
 1: Anterior lobe bronchus
 2: Middle lobe bronchus
 3: Accessory lobe bronchus
 4: Posterior lobe bronchus
 * Left main bronchus

また、本論文中で用いた記号略号の説明は Table 1 に一括して示した。

対象および方法

A. 実験対象

体重約 2.8 kg の、家兎日本白色種を用いた。実験の内容別の家兎数は Table 2 に示す如くで計61羽であり、1羽の家兎に対し繰り返し BAL を施行する場合もあり延べ BAL 数は148回であった。

B. 実験方法

1. 家兎における気管支ファイバースコープを用いた気管支肺胞洗浄 (BAL) の実施方法

家兎を塩酸ケタミンの筋肉注射 (50 mg/kg) により麻酔した。四肢を固定し、先端部が径 4.8 mm の気管支ファイバースコープ BF-4B2 (オリンパス) を右または左の後葉気管支に楔入し、1回につき 20 ml の生理食塩水を注入し 2回洗浄することにより検体を得た。右肺にて施行する場合は詳しくは副葉支にもまたがる。後副葉支のみの楔入が Fig. 1a に示すタイプのもものでは解剖学的に不可能であり、中葉支にもややまたがるように楔入した。この場合も摘出肺による検

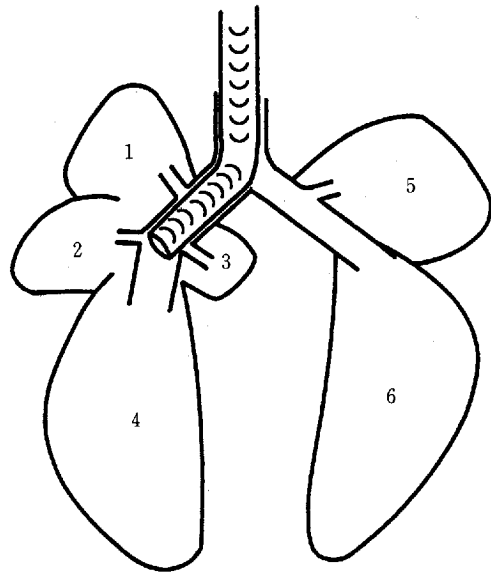


Fig. 2. Schema of lobar anatomy of the rabbit and location of the wedged bronchofiberscope in the right side
 1: Right anterior lobe
 2: Middle lobe
 3: Accessory lobe
 4: Right posterior lobe
 5: Left anterior lobe
 6: Left posterior lobe

討では注入液のほとんどは後葉を満たし Fig. 2 に示すような解剖学的位置関係のためか中葉には少量のみ流入した。また無菌的に BALF を採取すべく施行前に99.5%エタノールを吸引することにより気管支ファイバースコープの内孔を殺菌し十分に空気を吸入して乾燥させた後に BAL を施行した。

2. 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) 中の細胞数算定および細胞分類

BALF 中の細胞数は、改良型 Neubauer 血球計算盤にて算定した。細胞分類は BALF の一部を遠沈し、塗抹標本を作製し、Wright-Giemsa 染色及び、非特異的エステラーゼ染色 (エステラーゼ染色キット; 武藤化学) を施し、肺胞マクロファージ、多形核白血球、リンパ球に分類した。正常家兎においては95%以上がマクロファージであった。

3. ヘモグロビン、白血球数の測定

ヘモグロビンは末梢血の一部をとり、ヘモグロビンテストワコー (和光純薬) にて発色させ、比色定量を行った。白血球数は、改良型 Neubauer 計算盤にて算定した。また、塗抹標本を作製後 Wright-Giemsa 染色を施し、細胞分類に用いた。

4. BALF 中単核細胞の分離

BALF 中にはわずかな非細胞成分や死細胞、また、時に少量の赤血球を混じることがあるため、Ficoll-Hypaque 比重遠沈法を用い単核細胞のみ分離した。まず、BALF を径 100 μm のステンレスメッシュ (飯田製作所) で濾過し、遠沈管に加えその底に Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) を重層し、400 G、30分間遠沈した。遠沈後、単核球層を採取し、非動化した Fetal Calf Serum (FCS; KC Biological) を2.5%含む Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; 日水) で2回遠沈した。

多形核白血球に関しても BAL 間隔検討の際に認められた多形核白血球の著増した BALF を用いて検討したところ、Table 3 の如く大半が除去された。

5. 家兎における末梢血リンパ球の分離

ヒトにおける Böyum¹³⁾ の比重遠沈法に準じて行った。すなわち、家兎の耳動脈よりヘパリン加末梢血を得、等量の Phosphate Buffered Saline (PBS) と遠沈管内で混和後、Ficoll-Hypaque を遠沈管の底に重層し 400 G、30分間遠沈した。遠沈後単核球層を採取し、非動化した HBSS にて、2回遠沈した。このようにして洗浄した単核球を、10%非動化 FCS、2 mM L-glutamine (日水)、10 mM HEPES (Boehringer Mannheim)、penicillin (100 U/ml)、および streptomycin (100 μg/ml) を含む RPMI 1640 medium

Table 3. Changes in differential cell counts in BALF from 3 rabbits before and after Ficoll-Hypaque gradient centrifugation^{a)}

	PAM	LY	PMN
Before ^{b)}	18.4±4.5	2.3±0.5	79.7±4.9
After	90.7±2.4	7.3±1.7	2.0±0.8

a) %

b) The rabbits were in a state of highly increase of PMN

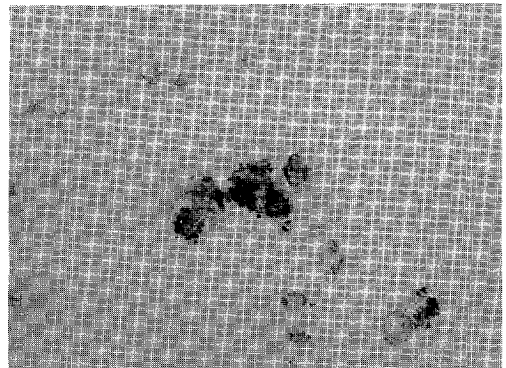


Fig. 3. NBT positive cells containing formazan granules. Original magnification: ×100

(Gibco) (以下、complete RPMI とする) に浮遊し、以下の実験に用いた。

6. 肺胞マクロファージの nitroblue tetrazorium (NBT) 還元能

Gifford⁴⁴⁾、島田⁴⁷⁾ らの方法に準じて行った。10⁶/ml に complete RPMI に浮遊させた肺胞マクロファージを、Lab-Tek tissue culture slide (Lab-Tek) に 1 ml 加え、37°C、5% CO₂ 下で30分培養した後、上清を除去し、生理食塩水にて2回洗浄後、NBT 末を 10% FCS 加 PBS に溶解し0.1%としたものを、1 ml 加え、さらに乾燥アルコール固定後サフランin O で染色し、光学顕微鏡下で明らかな顆粒を持つもの (Fig. 3) を NBT 陽性細胞とし、陽性率 (%) を算定した。なお、0.1% NBT 溶液は pH に留意し pH 7.2 に調整後直ちに加えた。

7. 肺胞マクロファージの貪食能

松阪⁴⁴⁾ らの方法に従って行った。すなわち 10⁶/ml に complete RPMI に浮遊させた肺胞マクロファージ、及びオートクレーブ処理し 2×10⁶/ml に調整し complete RPMI に浮遊させた Yeast 粒子を 15 ml

遠沈管 (Corning) に各々 1 ml ずつ加え, 培養液が入り口から流出しない程度に水平に近づけ, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。30分後, 4°C PBS を加え反応を止め, 4°C で遠沈し, 上清を捨て, 10% 石炭酸フクシン液を一滴下し, 振盪混和し, 一滴をスライドガラスに滴下し, 光学顕微鏡下で, マクロファージ内に貪食されている Yeast 粒子の数を算定した。100個の肺胞マクロファージについて, それぞれに貪食されている Yeast 粒子の数を算定し, 1個当りの平均を貪食指数 (Phagocytic Index) とした。

8. 標的細胞

本研究で標的細胞として用いた継代培養細胞株は7種類で, いずれも付着性の単層培養細胞株である。内訳はヒト肺腺癌由来の Luci 3, Luci 10, ヒト肺扁平上皮癌由来の SK-MES-1, RERF-LC-AI, ヒト膀胱癌由来の T-24, ヒト悪性黒色腫由来の MeWo およびヒト正常細胞である線維芽細胞である。

9. 肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能 (cytostatic activity) (Fig. 4)

培養フラスコに付着した標的細胞を PBS で2回洗

浄後 0.15% trypsin, 0.02% EDTA 混合液で処理し, 単離細胞を得, complete RPMI で2回洗浄後, 細胞数を 10⁵/ml に調整し, 96穴平底 microst plate (FALCON) に tridak stepper (INDICON) にて 10 μl ずつ分離した。6~8時間培養後 10⁵/ml に調整した肺胞マクロファージをエフェクター細胞として 0.1 ml ずつ加えた。エフェクター細胞と標的細胞の比 (E/T ratio) は10:1となる。37°C, 5% CO₂ 存在下で72時間培養し, 培養終了18時間前に, ³H-Thymidine (³H-TdR; Amersham) を 50 μCi/ml としたものを 10 μl ずつ各 well に加えた (0.5 μCi/well)。培養終了時に, microst plate を生理食塩水で洗浄し, さらに各 well に trypsin を加え遊離させ, オートマチックセルハーベスターにより, 標的細胞を回収し, ³H-TdR の取込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。以下の式で増殖抑制活性を算出し, %Cytostasis とした。

$$\%Cytostasis = (1 - \text{CPM in target cells} / \text{CPM in target cells cultured with macrophages}) \times 100$$

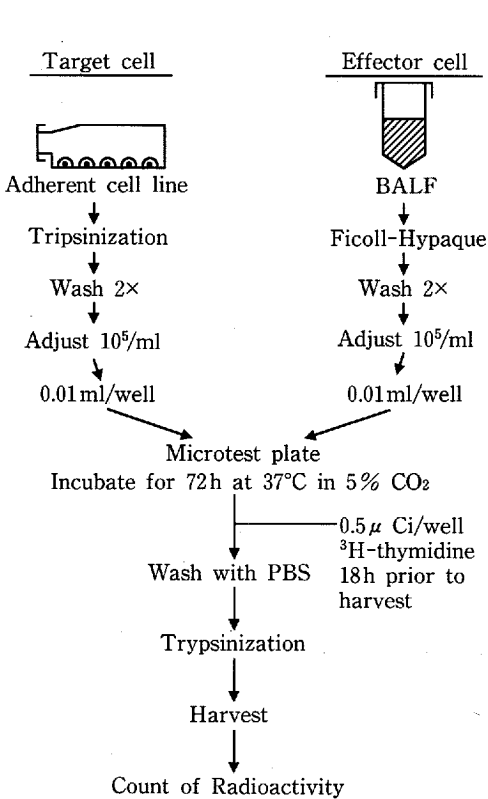


Fig. 4. Method for measurement of cytostatic activity of PAM

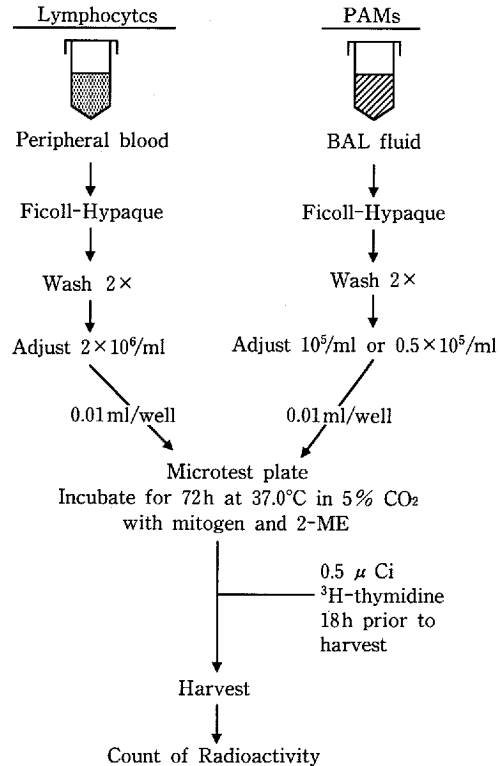


Fig. 5. Method for measurement of suppressor activity of PAM. PHA or Con A was used as the mitogen

10. 肺泡マクロファージの免疫抑制活性 (Fig. 5)

末梢血単核球を 2.0×10^6 /ml に調整し, complete RPMI に浮遊させ, microtest plate の各 well に 0.1 ml 分注した。mitogen は, phytohemagglutinin (PHA; HA16; Wellcome), Concanavalin A (CoA; Sigma) を最終濃度がそれぞれ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となる様に各 well に添加し, 2-mercaptoethanol (2ME) を最終濃度が $1 \times 10^{-5} \text{M}$ となるように加えた。さらに自己肺泡マクロファージを 10^5 /ml および 0.5×10^5 /ml に調整し, complete RPMI に浮遊させて, 各 well に 0.1 ml ずつ加えた。すなわち, 肺泡マクロファージ:末梢血単核球比は, 1:20 および 1:40 とした。 37°C , 5% CO_2 存在下で 72 時間培養し, 培養終了 18 時間前に, ^3H -TdR を $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ としたものを $10 \mu\text{l}$ ずつ各 well に加えた ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$)。培養終了時に, オートマチックセルハーベスターにより, リンパ球を回収し, ^3H -TdR の取込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。以下の式で抑制活性を算出し %Suppression とした。

$$\% \text{Suppression} = (1 - \text{CPM in lymphocytes} / \text{CPM in lymphocytes cultured with macrophages}) \times 100$$

11. 末梢血単核球の mitogen response

肺泡マクロファージの免疫抑制活性を測定する方法において, マクロファージを加えない control well の CPM をもって mitogen response とした。

12. BRM の肺泡マクロファージ腫瘍細胞増殖抑制能に対する増強作用

Immunomodulator として Lipopolysaccharide (LPS; Sigma), Nocardia rubra cell wall skelton (N-CWS; 藤沢), サイトカインとして Interferony ($\text{IFN-}\gamma$; 日本ロシユ), Tumor necrotizing factor (TNF; 旭化成) を用いた。最終濃度をそれぞれ $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \text{JRU}/\text{ml}$, $100 \text{U}/\text{ml}$ とし, 培養開始時に各 well に添加した。

13. 家兎の実験肺癌

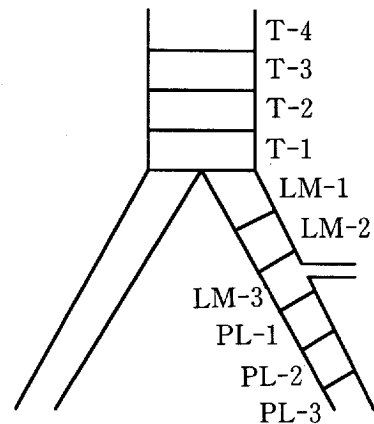
教室の長谷川⁵³⁾の報告に従い, 家兎の気道に MNU (N-Methyl-N-nitrosourea; 半井化学) を注入し, 発癌させた。注入には著者は気管支ファイバースコープを用い, 左主気管支に, MNU を $3 \text{mg}/\text{ml}$ に蒸留水に溶解したものを 1 ml 注入した ($3 \text{mg}/\text{rabbit}/1 \text{time}$)。

14. 病理組織切片 (Fig. 6)

病理組織切片は気管および左主気管支を 3 mm 間隔に切断し, 連続横断切片を作製した。

15. 統計処理

平均値の差の検定には t 検定を用い, 同一個体にお



T : trachea

LM : left main bronchus

PL : posterior lobe bronchus

Fig. 6. Section for pathological investigation. Trachea and left bronchus were cut at 3 mm intervals

いて経時的に変化を観察した場合の変化は paired t test にて検定した。いずれの場合も両側検定を施行した。相関はピアソンの相関係数を用いた。まだ全ての場合において P-value が 0.05 未満の際に有意なものと判定した。

成 績

A. 家兎における気管支ファイバースコープを用いた BAL の実施方法に関する検討

1. 洗浄液量および洗浄回数に関する検討—連続的 BAL によって得られた検体の解析—

1 回の洗浄量は摘出肺により検討した。即ち家兎の後葉支に気管支ファイバースコープを楔入し, 洗浄液を注入しその膨脹する様子を肺外から観察する事と, 一定量以上の洗浄液を注入した場合の楔入部からの逆流の程度を気管支ファイバースコープ下に観察する事により, 1 回に注入する液量は 20 ml が適当であると判断した。

次に洗浄の至適回数を検討するため, 方法に述べた如くの手技で麻酔下の家兎に BAL を行った。1 回の BAL につき 5 回の洗浄を行い, その都度別のシリンジに回収し, 回収量, 細胞数, 細胞分類等の検討を行った。Table 4 に示す如く, 各分画毎の回収量は, シリンジ 1 にて約 10 ml と少量であるが, シリンジ 2 以降は, シリンジ 2 が若干少ないものの, 回収量はほ

Table 4. Estimated fractional recovery of fluid in segmental lavage samples^{a)}

	Syringe 1	Syringe 2	Syringe 3	Syringe 4	Syringe 5
Fluid volume instilled, ml	20.0±0.0	20.0±0.0	20.0±0.0	20.0±0.0	20.0±0.0
Fluid volume recovered, ml ^{b)}	9.7±0.5	15.7±0.5	17.7±0.5	17.7±0.5	21.3±1.2
Total volume remaining after instillation, ml ^{c)}	20.0±0.0	30.0±0.5	34.7±0.9	37.0±0.8	39.3±0.5
Total volume remaining after withdrawal, ml ^{c)}	10.3±0.5	14.7±0.9	17.0±0.8	19.3±0.5	18.0±1.6
Percent recovered of total volume remaining ^{c)}	48.3±2.4	51.7±2.3	51.0±1.4	47.7±0.6	54.3±3.7

a) Values are mean±SD

b) Observed data from 3 rabbits

c) Calculated data, assuming no absorption or spillage of fluid

ば一定するものと思われた。また最終洗浄であるシリンジ5にて回収量が急激に上昇しているが、これは気管支ファイバースコープを抜去するため、気管支ファイバースコープの内孔、いわば死腔となっている部分の液も回収する事によるものである。また注入液の動態に関して、各分画ごとに、注入後に肺内に存在する量、吸引後にもなお残存する量を示した。吸引後の総残存量は洗浄5回目まで漸次増加している。さらに下段には回収率を示しているが、これは各分画ごとに回収量と注入終了時に肺内に存在する量(注入量と前分画の残存量の和)の比を表したものである。吸引後の残存量および回収率は2回目以降ほぼ一定しており、2回目の洗浄で洗浄部の肺葉内は注入時ほぼ洗浄液で満たされるものと思われた。

次に細胞数は、Table 5 に示す如く、シリンジ2以降は 3×10^6 個以上が回収されており、Fig. 7 に示す如く、回収された BALF 中の細胞濃度は、2回目又は3回目をピークとして、やや低下の傾向がみられ

た。

細胞分類は、90%以上はマクロファージが占めておりほぼ一定であるが、リンパ球は、1回目の洗浄にお

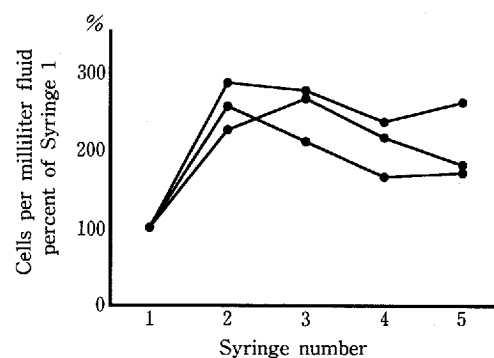


Fig. 7. The concentration of cells in serial lavage samples of 3 rabbits expressed as percentage of the concentration in the Syringe 1

Table 5. Cell components in the sequential BALF^{a)}

	Syringe 1	Syringe 2	Syringe 3	Syringe 4	Syringe 5
Total cell yield, ×10	0.81±0.14	3.32±0.61	3.60±0.09	2.29±0.20	3.56±0.55
Cells per ml, ×10	0.83±0.12	2.12±0.38	2.04±0.05	1.68±0.07	1.67±0.25
Alveolar macrophage, %	94.0±0.8	96.7±0.5	96.7±0.9	97.3±0.5	97.0±0.8
Lymphocytes %	3.3±0.5*	1.3±0.5	1.0±0.8	1.3±0.5	1.3±0.5
Polymorphonuclear cells, %	2.7±0.5	2.0±0.8	2.3±0.5	1.3±0.5	1.7±0.9

a) Values are mean±SD

* Significantly different from Syringe 3, $p < 0.05$

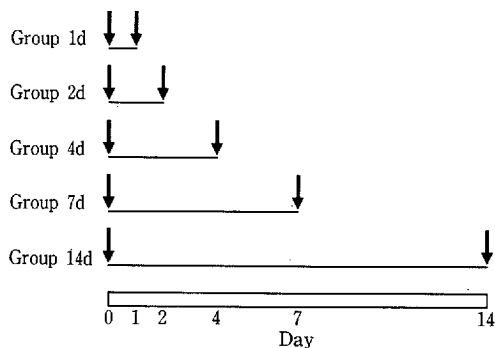


Fig. 8. Experimental design for investigation of the effect of BAL itself. BAL was performed at different intervals

いて平均3.3%とシリンジ3における値との間に有意差を認めた (Table 5)。以上より、2回の洗浄で、十分な細胞数が得られ、また肺胞内細胞の代表的サンプルを得るのに不都合はないと思われ、以後の実験においては、20 ml×2の洗浄を行った。なおこれらのデータは右肺において行われた場合の結果であるが、左肺においてもほぼ同様であった。

2. 施行の間隔に関する検討—BAL 自体の肺に対する影響—

同一個体において、BAL を繰り返し施行する際、

BAL 自体の影響が肺内に残り次回の BAL の結果に変化を及ぼす事が考えられ、施行間隔について、Fig. 8 に示す如く、2回の BAL の間隔を1日、2日、4日、7日、および14日としたそれぞれ3羽の家兎からなる群を作り検討した。

1) 総細胞数および分類

Fig. 9 には、2回の BAL 施行の間隔を変えた各群における回収総細胞数を1回目と2回目を対比させて示す。BALF 中総細胞数は Group 1d では 12×10^6 におよび、Group 2d, Group 4d と漸減するものいずれも前値との間に有意差を認めている。Group 7d では有意差は認めないものやや増加しており Group 14d ではほぼ前値に復したものと思われた。その原因を、細胞分類別に検討した。Fig. 10 に示す如く、多形核白血球の増加が著明である。棒グラフは、それぞれのグループにおける2回目の BAL における回収細胞実数値であるが、グループ間で前値がやや異なる場合があり、グループ間の厳密な比較は困難であるため、1回目における値との比をとったものを折れ線グラフで示し、互いに比較した。グラフ右のスケールは各細胞種により異なる。多形核白血球の著明増加、および肺胞マクロファージ、リンパ球の軽度増加が認められる。多形核白血球増加率は Group 1d ですでに著明に上昇しているが、肺胞マクロファージおよびリンパ球の増加率ともに Group 4d で最も増加率が

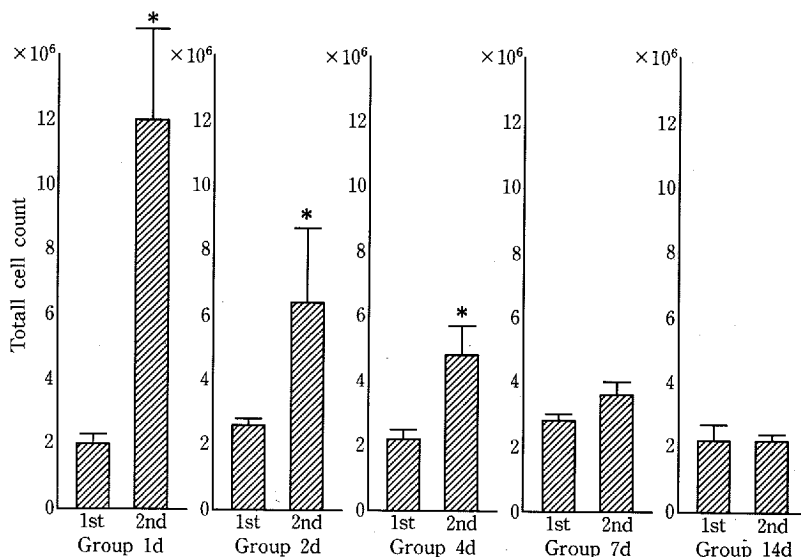


Fig. 9. Changes in total cell counts in BALF between first (1st) and second (2nd) collection in each group. Each bar represents mean±SD

* p < 0.05 compared to 1st performance

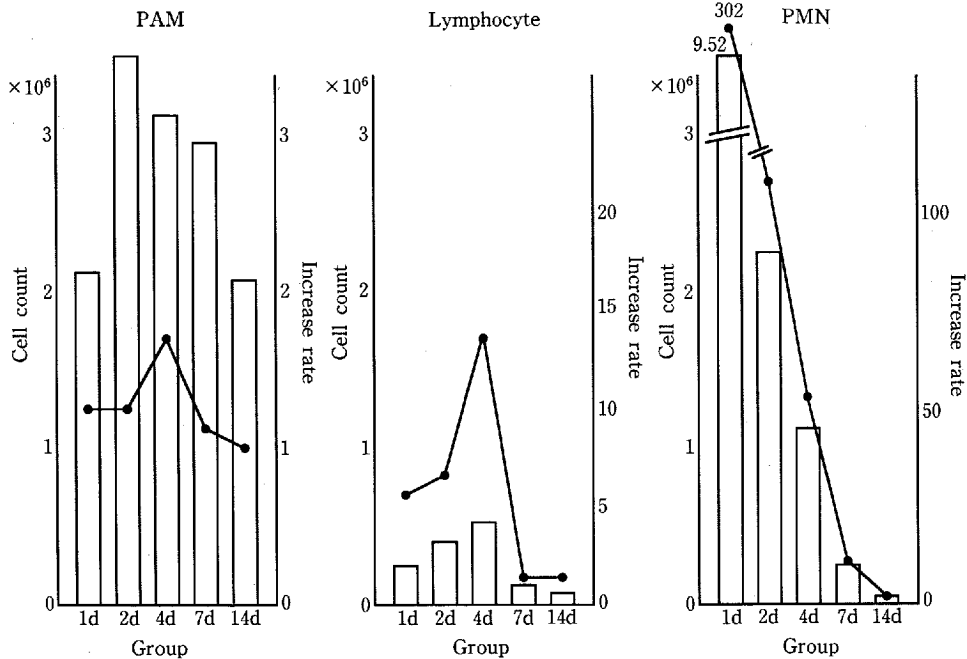


Fig. 10. Cell counts (bars) and rate of increase (points) of PAM, Lymphocytes and PMN in each group. Rate of increase is expressed cell counts at 1st BALF/cell counts at 2nd BALF. Values are mean of 3 rabbits

高かった。Group 7d では、両者ともほぼ前値に復しているものの、多形核白血球数および増加率は完全に

Table 6. Changes in differential cell counts in BALF between 1st and 2nd performance

Group ^{a)}		1st			2nd		
		PAM%	LY%	PMN%	PAM%	LY%	PMN%
1d	mean	96.0	2.7	1.3	18.0**	2.3	79.7**
	SD	0.8	0.5	0.9	4.5	0.5	4.9
2d	mean	97.0	2.3	0.7	56.0**	7.0*	37.0**
	SD	0.8	0.5	0.5	10.7	2.2	11.6
4d	mean	97.0	2.0	1.0	67.7*	10.3**	22.0**
	SD	0.8	0.8	0.8	11.7	1.2	10.4
7d	mean	96.0	3.0	1.0	88.3	3.3	8.3*
	SD	0.8	0.8	0.0	4.5	2.6	2.1
14d	mean	97.7	1.3	1.0	97.0	1.7	1.3
	SD	0.9	0.5	0.8	0.8	0.5	0.5

a) Each group contains 3 rabbits

* Significantly different from 1st performance, p<0.05

** Significantly different from 1st performance, p<0.01

前値に復していない。Table 6 には各細胞の相対的な比率を表した。Group 1d, Group 2d および Group 4d においてマクロファージ、多形核白血球の比率に有意差を認め、Group 7d においても多形核白血球の比率になお有意差を認める。Group 14d においてはいずれの値にも有意差を認めず、ほぼ前値に復してい

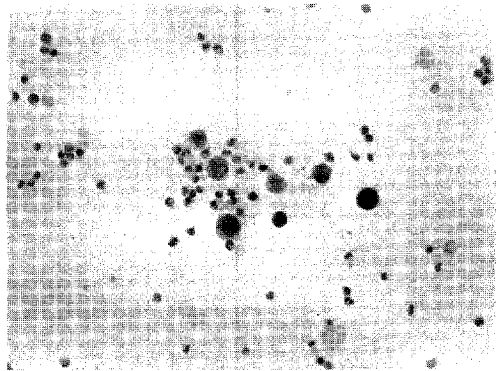


Fig. 11. Microscopic findings of lavage cells of Group 1d. Remarkable increase of polymorphonuclear cells were observed. Original magnification: ×50

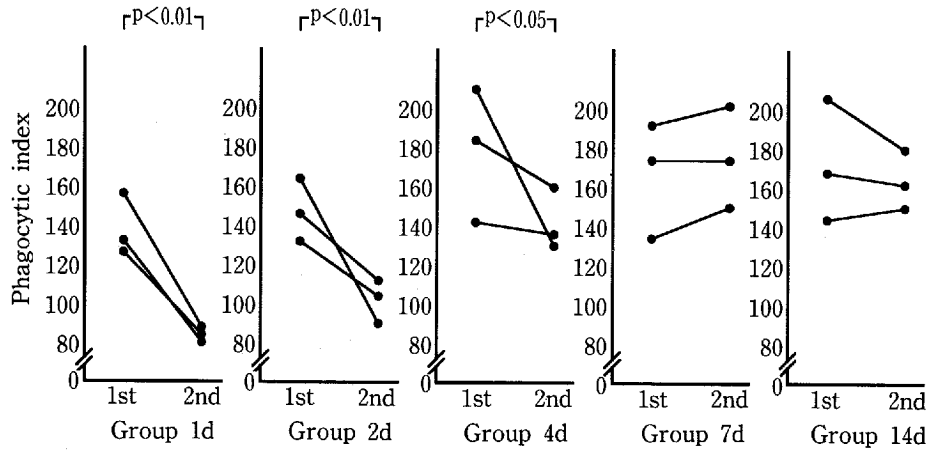


Fig. 12. Changes in phagocytic index in each group between first (1st) and second (2nd) collection in each group

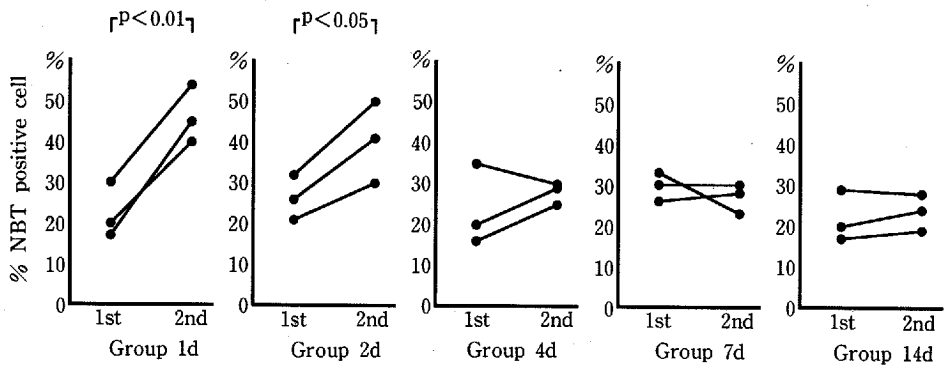


Fig. 13. Changes in NBT reduction of PAM in each group between first (1st) and second (2nd) collection in each group

Table 7. Changes in cytostatic activity of PAM by intervals of serial performance of BAL^{a)}

Interval	%Cytostasis against									
	Luci 3					Luci 10				
	0w	1w	2w	3w	4w	0w	1w	2w	3w	4w
Every 1 week	51.7±6.7	51.5±8.2	49.1±5.0	50.7±5.9	52.8±2.8	53.3±2.7	53.9±6.4	49.9±7.3	50.1±9.2	50.9±13.2
Every 2 weeks	54.7±4.0	ND	53.9±5.6	ND	46.7±7.5	51.7±1.6	ND	49.9±5.4	ND	44.4±13.8
Every 4 weeks	56.5±6.6	ND	ND	ND	57.1±7.1	58.1±5.2	ND	ND	ND	58.4±9.1

ND; not done

a) values are mean±SD, Each group contains 3 rabbits

る。なお Group 1d の 2 回目の多形核白血球の著増した BALF 中の細胞を Fig. 11 に示す。

2) 肺胞マクロファージの機能

Fig. 12, Fig. 13 には 2 回の BAL 施行の間隔を変

えた各群における貪食能および NBT 還元能を 1 回目と 2 回目を対比させて示す。貪食能は、Group 1d, Group 2d, Group 4d において、1 回目、2 回目の間に有意な低下を認めた (Fig. 12)。NBT 還元能は、

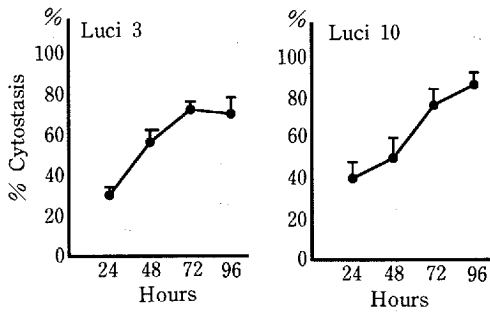


Fig. 14. Time course of cytostatic activity against Luci 3 and Luci 10. Each point represents the mean ± SE of 2 rabbits

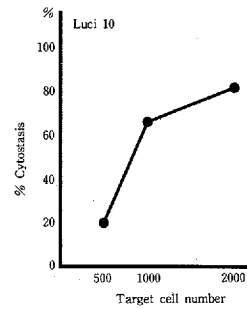


Fig. 16. Effect of cell density on cytostatic activity of a rabbit. The effector to target ratio was 10:1.

Group 1d, Group 2d において有意な上昇を認めたが Group 4d 以降では有意差を認めなかった (Fig. 13).

腫瘍細胞増殖抑制能は、1週、2週、4週おきに繰り返し3つの群を3羽ずつの家兎で構成し4週にわたり検討したが、1週以上の間隔をあけた場合、繰り返し施行しても %Cytostasis は標的細胞 Luci 3, Luci 10 のいずれを用いた場合も、40~60%の間にあり有意な変化は認められなかった (Table 7).

以上より、同一家兎に繰り返し BAL を施行する場合、2週間または、それ以上の間隔をおくこととした。

B. 肺胞マクロファージ腫瘍細胞増殖抑制能に関する基礎的検討—培養条件に関する検討—

1. 培養時間に関する検討 (Fig. 14)

2羽の家兎について E/T=10 にて、標的細胞 Luci 3, Luci 10 を用いて培養時間の検討を行った。培養時間を24, 48, 72, 96時間としたところ、72時間で Luci 3 においては頂値をとり Luci 10 においても72時間以降の上昇は緩やかで72時間で十分な腫瘍細胞増殖抑制能を認め、かつ検体間の差も反映できるものと思われた。

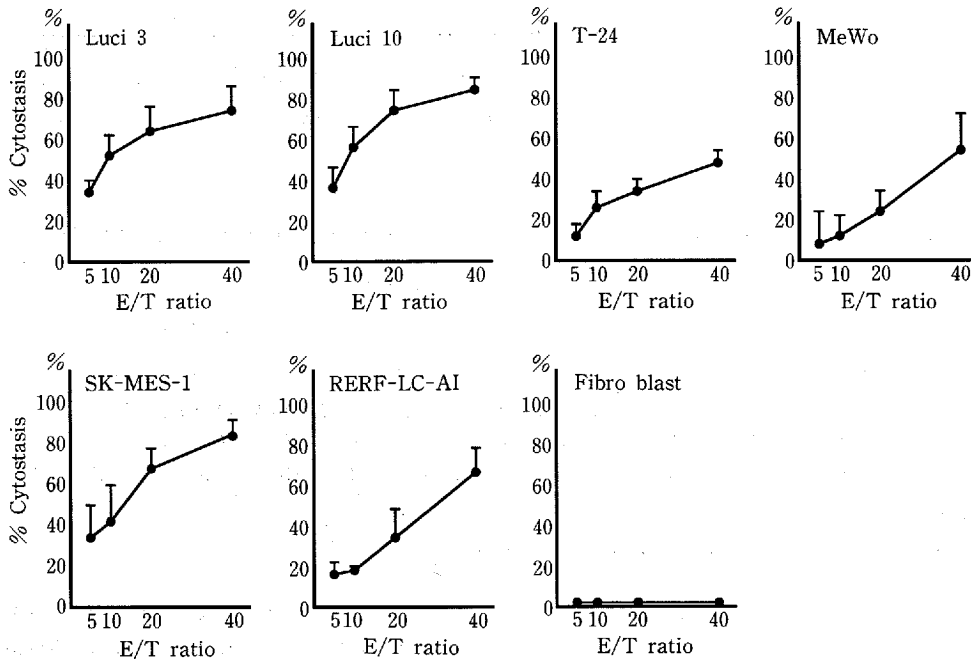


Fig. 15. Differences in susceptibility of 7 target cells according to the effector to target ratio. Each point represents mean ± SE of 4 rabbits

2. Effector/Target ratio の検討 (Fig. 15)

4羽の家兔について、E/T ratio を、5, 10, 20, 40とし、6種の腫瘍細胞株、Luci 3, Luci 10, T-24, MeWo, SK-MES-1, および RERF-LC-AI について検討したところ、いずれも E/T ratio 依存性に腫瘍細胞増殖抑制能の上昇を認め、Luci 3 および Luci 10 に対しては E/T=10 で十分な腫瘍細胞増殖抑制能を発現し、かつ検体間の差を反映できるものと考えた。

3. 細胞密度に関する検討 (Fig. 16)

培養に関する細胞の密度はあまり低いと十分な腫瘍細胞増殖抑制能は得られずまた実験に用いた範囲では密度に応じて上昇し、標的細胞の密度で 10^3 /well が適当であると考えられた。

4. 腫瘍細胞増殖抑制能の選択性に関する検討 (Fig. 15)

上述の腫瘍細胞株と、正常細胞である線維芽細胞株において比較してみると、前者では E/T ratio 依存性に、腫瘍細胞増殖抑制能が発現しているが、後者に対しては E/T=40 としても、作用は全く発現せず、腫瘍細胞に対し選択的に働くものと思われた。また腫瘍細胞に限って検討すると肺癌のみならず、他臓器の悪性腫瘍（膀胱癌、悪性黒色腫）に対しても E/T ratio 依存性に作用を発現している。肺癌に限ってみると、腺癌、扁平上皮癌いずれに対しても E/T ratio 依存性に作用を発現している。

以上より、家兔肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能の測定は、以下の実験において、標的細胞として Luci 3, Luci 10 および T-24 を用い、E/T=10 ($10^4/10^3$), 72時間培養にて施行した。なおこれらの検討においては実験ごとに上記の条件で多少 %Cytostasis が異なるが全て異なった家兔を用いており個体差の存在があることが考えられ、また実験条件の差に留意することが必要であると思われた。

C. 家兔の発癌過程における肺胞マクロファージ抗

腫瘍活性および他の機能の経時的変化

以下の経時的な検討においては微妙な実験手技の差による day to day variation を減少させるため、培養液、標的細胞側の条件として継代培養の方法や単離から実験に用いるまでの時間等、またエフェクター側の条件として採取から実験に供するまでの時間等を常に一定にして行った。

MNU 注入は、Fig. 17 に示すごとく1回/週で、3週連続で施行し、1週の休止期間をおいた。BAL は、4週おきに、最後の注入から2週間後に施行した。その際 10 ml の採血を耳動脈より行った。

家兔は Fig. 18 に示すごとく、MNU 注入し BAL を行うものを Group M、コントロールとして MNU を注入せずに BAL を行うものを Group C とした。さらに Group M はMNU 注入反対側（右肺）にて BAL を行う Group Mc、同側（左肺）にて BAL を行う Group Mi に分けた。家兔は12羽を用い、それぞれ1から12の識別番号を付け、No. 1-No. 6 を Group Mc, No. 7-No. 9 を Group Mi, No. 10-No. 12 を Group C とし開始した。実験は12週又は24週にわたり行い、実験12週で結果を解析し Group Mi として開始した家兔は実験16週より、BAL を MNU 注入

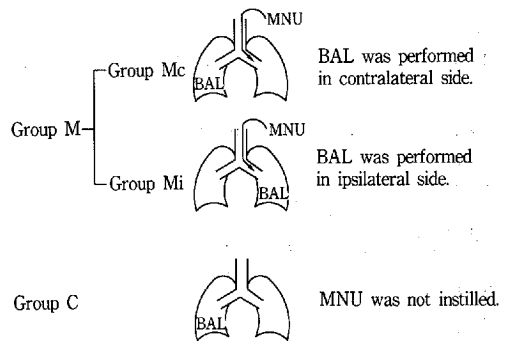


Fig. 18. Experimental groups

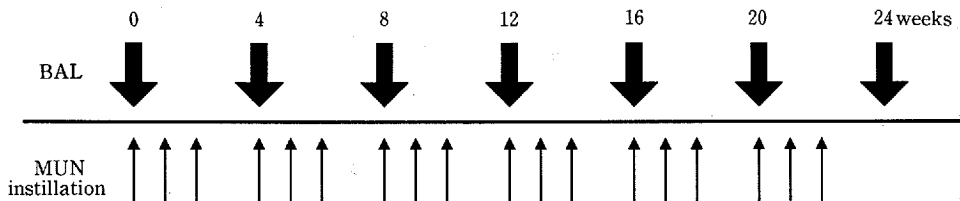


Fig. 17. Experimental protocol. MNU was instilled once a week for 3 weeks. BAL was performed every 4 weeks, two weeks later for the last instillation. MNU was instilled after the BAL on the day of BAL. MNU was dissolved in 3 mg/ml distilled water and 1 ml of the solution was instilled into the rabbit using a bronchofiberscope

Table 8. Incidence of carcinoma in the rabbits

Cause of death	Experimental period	Group	Carcinoma	Incidence
Sacrifice	12w	Mc	NE	1/3
		Mc	(-)	
		Mc	(+)	
		Mi	(-)	
	24w	C	(-)	0/1
		Mc	(+)	3/3
		Mi→Mc	(+)	
		Mi→Mc	(+)	
		C	(-)	0/2
		C	(-)	
Accident	4w	Mc	ND	
	20w	Mc	ND	

NE: not evaluated

ND: not done

反対側（右肺）で行う事とし、Group Mc に編入した。発癌状況確認のため、実験12週で各グループより無作為に5羽（No. 1, 4, 8, 9, 10）屠殺し、残りは実験24週に屠殺した。なお、屠殺時以外2羽が事故により死亡した（No. 2, 20週；No. 5, 4週）。

1. 発癌状況

Table 8 に示す如く、屠殺した10羽の家兎のうち、

Table 9. Extention of tumor in the rabbits in Group M

Specimen	12 Weeks ^{a)}			24 Weeks		
	4 ^{b)}	6	9	3	7	8
T-4						●
T-3				○	○	●
T-2				○	◆	●
T-1				○	◆	●
LM-1	○	◆	○	○	◆	●
LM-2	○	○	○	◆	○	◆
LM-3	○	○	○	●	◆	◆
PL-1				◆		
PL-2				◆		
PL-3				◆		

○ : No evidence of carcinoma

◆ : Carcinoma within mucosa

● : Carcinoma invading to outside of cartilage

a) Experimental period

b) Rabbit No

病理組織を検討し得たものが9羽であった。Group M (Group Mi および Group Mc, 以下同様) 実験12週では、1羽/3羽に、実験24週では3羽/3羽に発癌を認めた。Group C においては0羽/3羽であった。癌腫の広がりには Table 9 に示した如くである。検索部位は、肉眼的に変化が認められる部分を中心に行ったが、実験12週で発癌を認めた1羽は1切片にのみ発癌、実験24週で発癌を認めた3羽は複数の切片に広がっており、家兎 No. 3 においては5切片に発癌を認め、気管支軟骨輪外層に及ぶものも認められた。家兎 No. 7 では4切片に癌腫を認めたがその間に癌腫をもたない切片が認められた。家兎 No. 8 では、7切片にわたり癌腫を認め、内5切片に気管支軟骨輪外層におよぶ浸潤を認め、気管支外壁脂肪組織中に小腫瘍の形成を認め、転移巣である可能性が考えられた。切片 T-2 には血管又はリンパ管侵襲を疑わせる所見がある事もその可能性を支持している。これらの病理組織像を一括して Fig. 19 に示す。家兎 No. 6 は切片 LM-1, No. 3 は LM-3, No. 7 は LM-1, No. 8 は T-2, である。家兎 No. 3, No. 7, は気管支軟骨外に浸潤が認められる切片を示した。

2. 発癌に伴う家兎の一般状態

1) 末梢血ヘモグロビン量

実験12週まで、ヘモグロビン量の測定を行った。実験0週において Group M (12.9±1.9 g/dl), Group C (12.4±1.5 g/dl) であり両群とも0週値と以後の各週値との間に有意差を認めなかった。

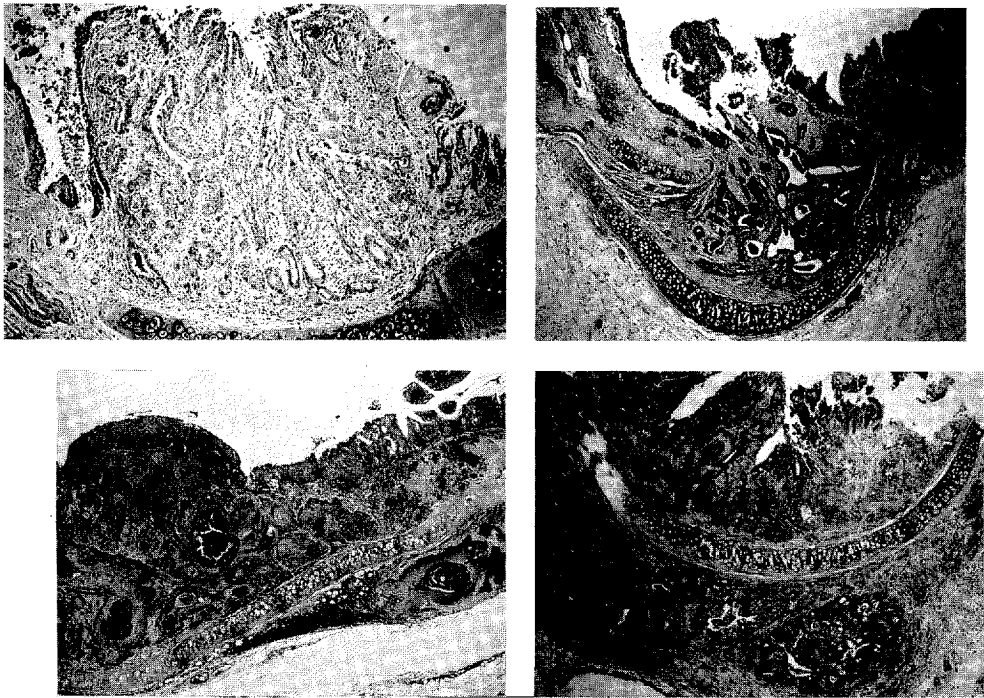


Fig. 19. A : (left top). Pathological findings of LM-1 in Rabbit No. 6 sacrificed at 12 weeks. Tumor invasion into lamina propria mucosae was observed. Original magnification: $\times 20$
 B : (left bottom). Pathological findings of LM-3 in Rabbit No. 3 sacrificed at 24 weeks. Tumor invasion into the outside of bronchial cartilage was observed. Original magnification: $\times 5$
 C : (right top). Pathological findings of LM-1 in Rabbit No. 7 sacrificed at 24 weeks. Tumor invasion into lamina propria mucosae was observed. Original magnification: $\times 5$
 D : (right bottom). Pathological findings of T-2 in Rabbit No. 8 sacrificed at 24 weeks. Tumor invasion into the outside of bronchial cartilage was observed. Original magnification: $\times 5$

Table 10. Changes in recovery volume of BALF^{a)}

		Weeks						
		0	4	8	12	16	20	24
Group Mc	mean	27.7	26.2	27.6	24.0	25.8	24.3	25.0
	SD	1.4	3.2	2.4	2.6	3.7	3.1	0.8
Group Mi	mean	21.7	23.7	28.0	24.3	ND	ND	ND
	SD	2.9	3.3	2.2	2.9	ND	ND	ND
Group C	mean	24.0	23.0	28.7	21.7	24.5	21.5	21.5
	SD	0.8	1.4	1.9	3.9	0.5	0.5	1.5

ND; not done

a) ml

No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks. No significant difference was also observed between Group Mc and Group C, Group Mi and Group C

Table 11. Changes in cells per ml in BALF^{a)}

		Weeks						
		0	4	8	12	16	20	24
Group Mc	mean	1.13	1.05	1.19	1.27	1.38	1.53	1.42
	SD	0.20	0.07	0.21	0.19	0.44	0.33	0.21
Group Mi	mean	1.37	1.98	1.90	2.05	ND	ND	ND
	SD	0.30	0.09	0.07	0.06	ND	ND	ND
Group C	mean	1.09	1.23	1.16	1.03	1.16	1.24	1.11
	SD	0.24	0.31	0.09	0.20	0.09	0.28	0.14

ND; not done

a) $\times 10^5$ /ml

No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks. No significant difference was also observed between Group Mc and Group C, Group Mi and Group C

2) 末梢白血球

同様に末梢白血球数も実験12週まで測定した。0週値は Group M (7329±2183/mm³) Group C (7917±1513/mm³) であり以後の各週値との間に、両群とも有意差を認めなかった。

3) 体重

実験経過にしたがって体重の増加を認め、0週値との比較で4週値より有意差を認めたが、成長に伴うものと思われ24週にわたり観察したが Group M と Group C の間には各週とも有意差を認めなかった。

3. 発癌に伴う BALF 中細胞成分の経時的变化

1) 回収量 (Table 10)

BALF 回収量は多少変動の認められる場合もあったが、各グループとも0週値と各週値の間に有意差を認めなかった。

2) 細胞濃度 (Table 11)

BALF 中の細胞濃度は Group Mi において、MNU 注入後細胞分類に変化を認めない時期より軽度増加していたが、有意差は認めなかった。

3) 細胞分類 (Table 12)

BALF 中の細胞分類は、Group Mi にて、実験8週および12週で軽度多形核白血球が増加する傾向が認められたが、0週値との間に有意差なく、Group Mc, Group C においては実験経過中大きな変化はなかった。

4. 発癌に伴う肺マクロファージの諸機能の経時的变化

肺マクロファージ機能として、NBT 還元能、貪食能、腫瘍細胞増殖抑制能、免疫抑制能を用いたが、前3者は、各週における、実験条件の違いによる値の

Table 12. Changes in differential cell count in BALF^{a)}

		Week																				
		0			4			8			12			16			20			24		
		PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN	PAM	LY	PMN
Group Mc	mean	98.0	1.8	0.5	98.2	1.5	0.5	95.2	3.8	1.0	95.2	2.8	1.4	96.0	2.3	1.8	95.5	3.0	1.5	94.3	4.3	1.3
	SD	1.3	1.2	0.8	0.7	0.8	0.8	2.6	1.7	1.3	1.9	1.3	0.8	2.1	0.4	2.0	1.5	0.7	1.7	1.2	1.2	1.2
Group Mi	mean	98.3	1.7	0.3	97.0	2.7	0.3	93.0	5.0	1.7	90.0	4.3	5.7	ND		ND			ND			ND
	SD	0.5	0.5	0.5	0.8	1.2	0.5	2.4	2.2	1.2	2.4	0.9	1.7	ND		ND			ND			ND
Group C	mean	96.3	3.7	0.3	97.3	2.7	0.3	95.7	4.0	0.3	94.3	5.3	0.3	95.5	1.0	3.5	96.5	2.5	1.0	96.5	3.0	0.5
	SD	1.9	1.9	0.5	0.9	0.9	0.5	1.2	1.4	0.5	1.7	1.2	0.5	2.5	0.0	2.5	0.5	0.5	0.0	1.5	1.0	0.5

ND; not done

a) %

No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks. No significant difference was also observed between Group Mc and Group C, Group Mi and Group C

Table 13. Changes in relative NBT reduction^{a)}

		Week						
		0	4	8	12	16	20	24
Group Mc	mean	81.7	92.9	93.0	87.6	76.1	63.8	71.9
	SD	37.1	20.2	34.9	36.3	34.5	23.4	35.5
Group Mi	mean	98.0	64.8	70.3	70.8	ND	ND	ND
	SD	25.3	16.7	31.9	26.3	ND	ND	ND

ND; not done

a) Actual value/average value of Group C; %

No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks

Table 14. Changes in NBT reduction in Group C^{a)}

Rabbit No.	Week						
	0	4	8	12	16	20	24
10	44	40	45	37	ND	ND	ND
11	30	23	24	30	32	40	36
12	27	25	22	22	37	36	40
mean	33.7	29.3	30.3	29.7	34.5	38.0	38.0
SD	7.4	7.6	10.4	6.1	2.5	2.0	2.0

ND; not done

a) %

No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks

変動を除くため、各家兎における実測値の Group C の平均値に対する比をとり%で表した。また、免疫抑制活性については、Group C の平均値が0となる場合があり、実測値で表した。

1) NBT 還元能

NBT 還元能は、Group Mc, Group Mi とも0週値と、各週値との間に有意差を認めなかった。また比較的大きな個体差を示した (Table 13)。Table 14 には、Group C における実測値を示す。多少の変動があるものの、0週値と各週値の間に有意差は認めなかった。

2) 食 食 能

Table 15. Changes in relative phagocytic index^{a)}

		Week						
		0	4	8	12	16	20	24
Group Mc	mean	104.2	90.9	78.9	73.1	71.5	60.7	51.2
	SD	10.4	16.8	12.8	12.7	10.7	17.6	13.3
Group Mi	mean	93.2	75.3	62.5	79.4	ND	ND	ND
	SD	6.7	14.2	5.6	13.2	ND	ND	ND

ND; not done

- a) Actual value/average value of Group C; %
- * Significantly different from week 0, $p < 0.05$
- ** Significantly different from week 0, $p < 0.01$

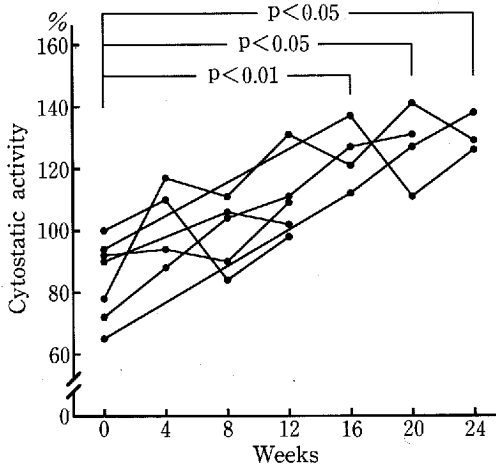


Fig. 20. Changes in cytotstatic activity against Luci 3 in Group Mc. Cytostatic activity is expressed as a relative value compared to Group C

食食能は、Group Mc では経時的に低下し、実験8週以降で0週値との間に有意差を認めた。Group Mi でも同様に低下し、実験8週で0週値との間に有意差を認めた (Table 15)。Table 16 には、Group C における実測値を示す。多少の変動があるものの、0週値と各週値の間に有意差は認めなかった。

3) 腫瘍細胞増殖抑制能

a) Group M における Luci 3 に対する腫瘍細胞増殖抑制能 (Fig. 20, Fig. 22)

Fig. 20 の如く、Group Mc 実験8週で実験4週に比べやや低下していたが全体として、経時的な上昇を

Table 16. Changes in phagocytic index in Group C^{a)}

Rabbit No.	Week						
	0	4	8	12	16	20	24
10	142	178	181	163	ND	ND	ND
11	123	128	150	119	126	120	132
12	162	155	168	154	165	170	161
mean	142.3	153.7	166.3	145.3	145.5	145.0	146.5
SD	15.9	20.4	12.7	19.0	19.5	25.0	14.5

ND; not done

- a) %
- No significant difference was observed between week 0 and the other experimental weeks

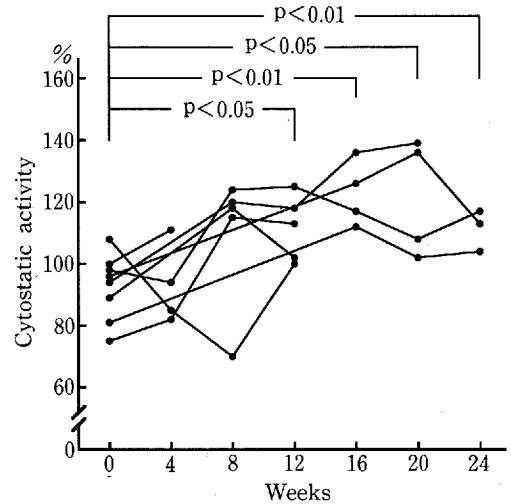


Fig. 21. Changes in cytotstatic activity against Luci 10 in Group Mc. Cytostatic activity is expressed as a relative value compared to Group C

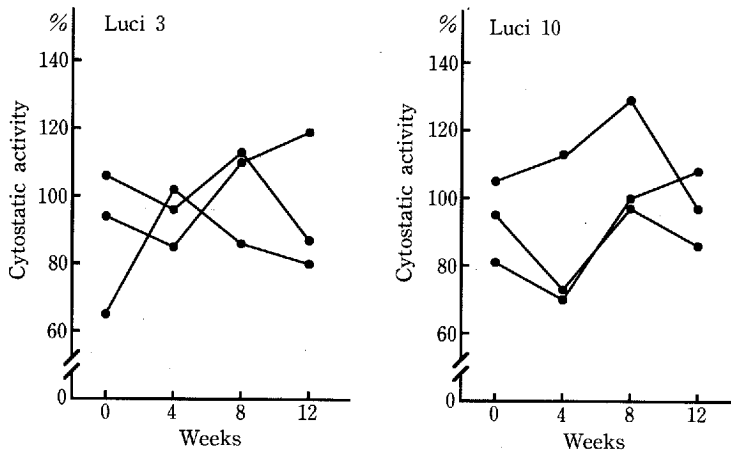


Fig. 22. Changes in cytotstatic activity against Luci 3 and Luci 10 in Group Mi. Cytostatic activity is expressed as a relative value compared to Group C

認め、実験16週以降で0週との間に有意差を認めた。Group Miにおいては12週まで観察したが、Fig. 22の如く、一度低下して上昇するものや上昇後低下するものが認められ一定の傾向を示さなかった。

b) Group Mにおける Luci 10 に対する腫瘍細胞増殖抑制能 (Fig. 21, Fig. 22)

Fig. 21 の如く、Group Mc においては実験8週目で低下するものもあったが、全体的には Luci 3 を用いた場合と同様経時的な上昇を認め、実験12週以降で0週値との間に有意差を認めた。Group Mi において

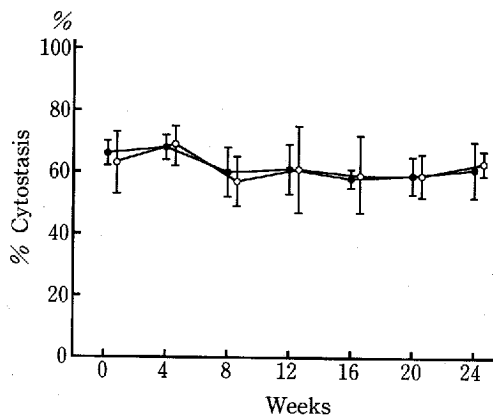


Fig. 23. Changes in cytotstatic activity against Luci 3 and Luci 10 in Group C. Actual cytotstatic activity is shown. Closed circle represents cytotstatic activity against Luci 3 and open circle Luci 10

も、Fig. 22 の如く Luci 3 を用いた場合同様一定の傾向を示さなかった。

c) Group C における腫瘍細胞増殖抑制能 (Fig. 23)

実験期間中の Group C における Luci 3 および Luci 10 に対する実測値を示す。平均値の経時変化は±10%以内であり、実験条件はほぼ一定しているものと考えられた。なお、Group M における相対的に表した腫瘍細胞増殖抑制能が、0週において100%を割るものが多かった理由として正常家兎の腫瘍細胞増殖抑制能には個体間に若干の差があり、Group C の3羽においては、Group M に比べ絶対値がやや高かったためと思われた。

4) 免疫抑制活性

a) Group M における PHA response に対する抑制活性 (Fig. 24)

肺胞マクロファージと、末梢血単核細胞の比 (PAM/PBMNC) を1:20および1:40とし、検討した。いずれにおいても実験0週ではいずれの家兎にも認められなかった抑制活性が次第に出現し上昇する様子が窺われたが、腫瘍細胞増殖抑制能に比べ個体差が大きく実験20週まで0%のまま経過する家兎も存在した。また用いた細胞の比を変えても同様の傾向が認められた。しかし0週値との間に有意差を認める週はなかった。

b) Group M における Con A response に対する免疫抑制活性 (Fig. 25)

同様に PAM/PBMNC を1:20および1:40とし

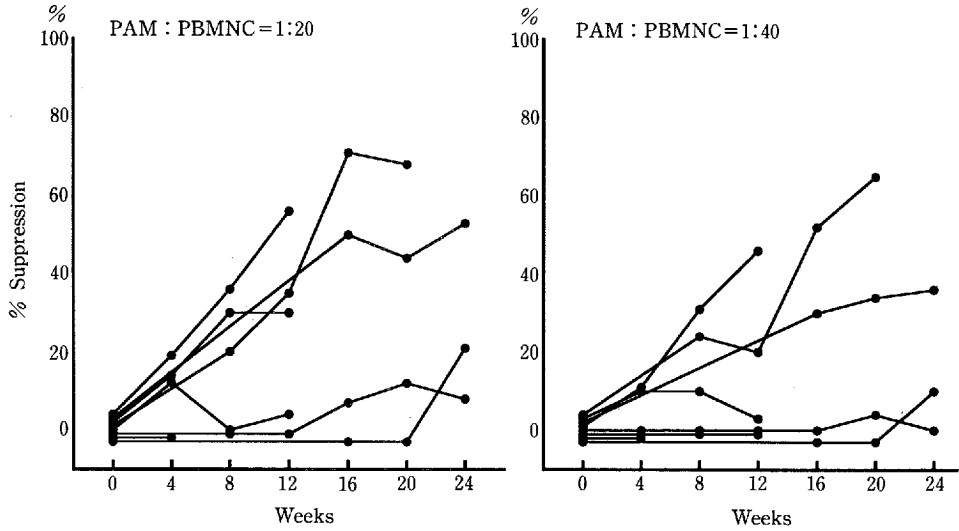


Fig. 24. Changes in suppressor activity of PAM against PHA response of PBMC

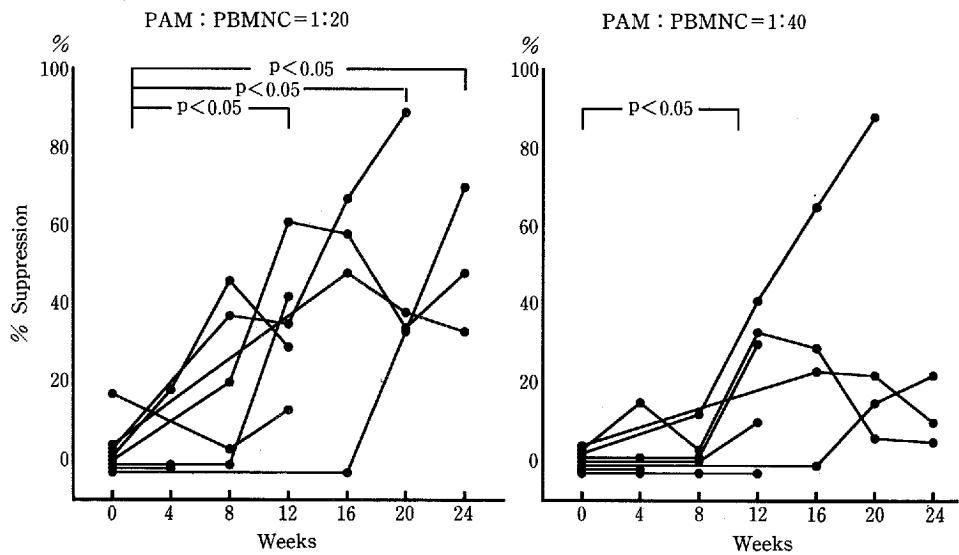


Fig. 25. Changes in suppressor activity of PAM against Con A response of PBMC

て検討した。いずれの場合においても PHA response に対する場合と同様次第に上昇し、前者においては実験12週、20週、24週において0週値との間に有意差を認めた。後者では、実験12週において有意差を認めた。

c) Group C における免疫抑制活性 (Table 17)

PHA response, Con A response 両者に対する免疫抑制活性とも、Group C においては各週の平均値がほぼ10%以下であり、実験条件に大きな差はないものと思われた。

以上、免疫抑制能は、変動の程度が個体間において

大きく異なり、統計処理上、有意差を表しにくいものと思われたが、発癌に伴い経時的に上昇する様子が窺われた。

5. 発癌に伴う mitogen response の経時的変化 (Table 18)

家兔の末梢単核細胞の PHA, Con A に対する response は、PHA は Group M, 実験24週、Con A は Group M, 実験20週で、0週値との間に有意差を認め、発癌に伴い、次第に上昇する様子が窺われた。

6. 癌の進展度別に比較した腫瘍細胞増殖抑制能

Table 17. Suppressor activity of PAM against mitogen response of PBMNC in Group C

Mitogen	Rabbit No.	0	4	8	12	16	20	24
PHA PAM:PBMNC =1:20	10	5	0	8	0	ND	ND	ND
	11	0	0	0	0	0	0	0
	12	7	NE	4	0	16	0	0
	mean	4.0	0.0	4.0	0.0	8.0	0.0	0.0
	SE	1.7	0.0	1.9	0.0	5.7	0.0	0.0
PHA PAM:PBMNC =1:40	10	13	0	0	0	ND	ND	ND
	11	0	0	0	0	7	0	0
	12	3	NE	2	0	8	0	0
	mean	5.3	0.0	0.7	0.0	7.5	0.0	0.0
	SE	3.2	0.0	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0
Con A PAM:PBMNC =1:20	10	0	0	0	18	ND	ND	ND
	11	0	11	0	0	0	0	0
	12	18	NE	0	0	7	23	0
	mean	6.0	5.5	0.0	6.0	3.5	11.5	0.0
	SE	4.9	3.9	0.0	4.9	2.5	8.1	0.0
Con A PAM:PBMNC =1:40	10	0	0	0	9	ND	ND	ND
	11	0	0	0	0	14	0	0
	12	2	NE	0	0	0	0	0
	mean	0.7	0.0	0.0	3.0	7.0	0.0	0.0
	SE	0.5	0.0	0.0	2.4	5.0	0.0	0.0

NE; not evaluated

ND; not done

Table 18. Changes in mitogen responses^{a)}

Mitogen		Week							
		0	4	8	12	16	20	24	
PHA	Group M	mean	5915	9668	7397	9839	5675	16976	17391*
		SE	1711	2487	1743	1702	2006	3595	2469
	Group C	mean	13065	10656	5706	11111	4733	7190	12278
		SE	6565	6421	2856	3831	885	2666	7042
Con A	Group M	mean	9343	11234	15315	16480	10223	21794*	35360
		SE	3829	3624	3516	2219	2097	2933	5775
	Group C	mean	12797	8058	7175	22883	6769	17800	16210
		SE	7426	2167	2414	2158	3078	723	3347

a) CPM

* Significantly different from week 0, $p < 0.05$

各家兎の肺胞マクロファージと培養した腫瘍細胞の増殖の程度を、腫瘍細胞に取込まれた³H-TdRによるCPMをもって表し比較した。

1) 実験12週 (Table 19)

この時点で、Group Mcにおいて2羽の家兎を屠殺し1羽に発癌を認めているが、発癌家兎と非発癌家兎の間に差を認めなかった。

2) 実験24週 (Table 20)

Table 19. Target cell proliferation against cytostatic activity of PAM from the rabbits with or without carcinoma at week 12

PAM from	CPM of ³ H-Thymidine incorporated in	
	Luci 3	Luci 10
Rabbit 4 ^{a)}	650±157	1144±254
Rabbit 6 ^{b)}	783±137	1124± 43
Control ^{c)}	2157±236	3812±325

- a) No cancer bearing rabbit
 - b) Cancer bearing rabbit
 - c) Target cell was cultured in the absence of PAM, control well
- No significant difference in CPM was observed between the rabbit 4 and 6

この時点において Group Mc において3羽の家兔を屠殺している。発癌の程度は Table 9 に示す如くであるが、いずれの家兔間で比較した場合も有意差は認めなかった。

7. 種々の発癌状態における各種肺胞マクロファージ機能間の相関 (Table 21)

Table 20. Target cell proliferation against cytostatic activity of PAM from the rabbits bearing cancer with different degree of extention

PAM from	CPM of ³ H-Thymidine incorporated in	
	Luci 3	Luci 10
Rabbit 3 ^{a)}	341± 37	637± 50
Rabbit 7 ^{b)}	381± 74	849±159
Rabbit 8 ^{c)}	301± 32	690± 72
Control ^{d)}	2005±316	2654±210

- a) Invasion outside of the bronchial cartilage was observed in 1 specimen
 - b) No invasion outside of the bronchial cartilage was observed
 - c) Invasion outside of the bronchial cartilage was observed in 5 specimens
 - d) Target cells were cultured in the absence of PAM, control well
- No significant difference was observed among the rabbits 3, 7 and 8

1) 腫瘍細胞増殖抑制能と、免疫抑制活性との相関両者は良く相関し、腫瘍細胞増殖抑制能として Lu-

Table 21. Correlation among the functions of PAM from rabbits in various steps of carcinogenesis^{a)}

	rCTS-L3 ^{b)}	rCTS-L10 ^{c)}	Sup-P20 ^{d)}	Sup-P40 ^{e)}	Sup-C20 ^{f)}	Sup-C40 ^{g)}	rNBT ^{h)}	rPI ⁱ⁾
rCTS-L3		0.620**	0.490**	0.415**	0.739**	0.541**	-0.239	-0.582**
rCTS-L10			0.572**	0.535**	0.560**	0.468**	-0.093	-0.443**
Sup-P20				0.930**	0.683**	0.723**	-0.101	-0.338*
Sup-P40					0.846**	0.774**	-0.088	-0.276
Sup-C20						0.861**	-0.271	-0.480**
Sup-C40							-0.124	-0.278
rNBT								-0.031
rPI								

- a) r-Value
- b) Relative cytostatic activity against Luci 3
- c) Relative cytostatic activity against Luci 10
- d) Suppressor activity against PHA response of PBMNC. PAM:PBMNC ratio was 1:20
- e) Suppressor activity against PHA response of PBMNC. PAM:PBMNC ratio was 1:40
- f) Suppressor activity against Con A response of PBMNC. PAM:PBMNC ratio was 1:20
- g) Suppressor activity against Con A response of PBMNC. PAM:PBMNC ratio was 1:40
- h) Relative NBT reduction index
- i) Relative phagocytic index

* p<0.05
** p<0.01

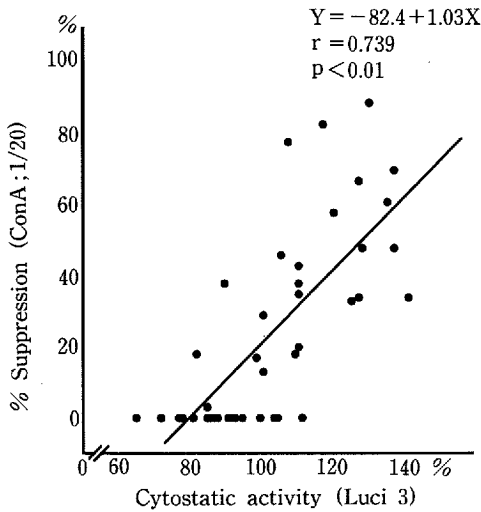


Fig. 26. Correlation of PAM functions between relative cytotostatic activity against Luci 3 and suppressor activity against Con A response of PBMNC. PAMs were collected from the rabbit at various stages of carcinogenesis. Measurement for suppressor activity was performed with PAM:PBMNC ratio 1:20

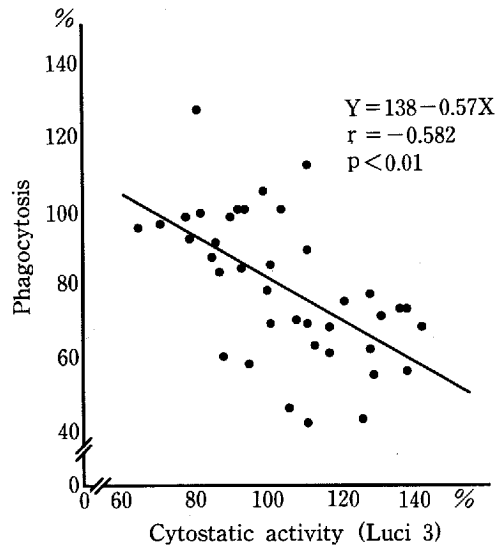


Fig. 28. Correlation of PAM functions between relative cytotostatic activity against Luci 3 and relative phagocytic index. PAMs were collected from the rabbit at various stages of carcinogenesis

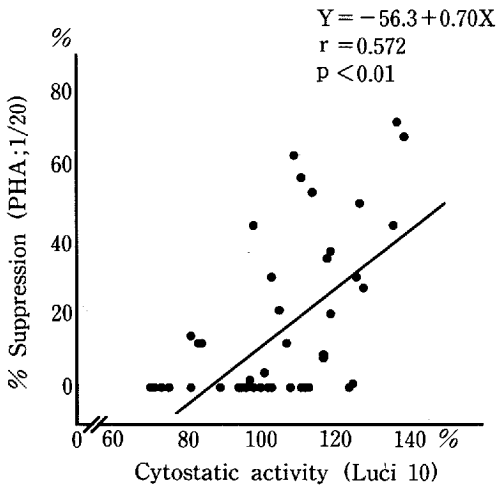


Fig. 27. Correlation of PAM functions between relative cytotostatic activity against Luci 10 and suppressor activity against PHA response of PBMNC. PAMs were collected from the rabbit at various stages of carcinogenesis. Measurement for suppressor activity was performed with PAM:PBMNC ratio 1:20

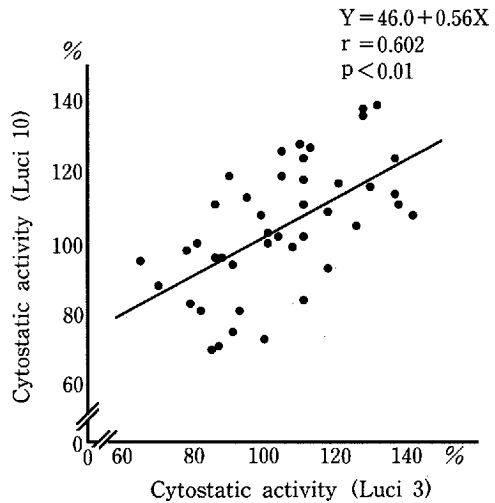


Fig. 29. Correlation of PAM functions between relative cytotostatic activity against Luci 3 and Luci 10 of the rabbits at various stages of carcinogenesis

ci 3, Luci 10 に対する相対的腫瘍細胞増殖抑制能の2つ、免疫抑制活性として、PHA response, Con A response に対する抑制を PAM/PBMNC 比率を 1:20, 1:40とした場合の4種類を用いてお互いの間の

組合せ8種類において、すべて有意な相関が得られた。Luci 3 に対する腫瘍細胞増殖抑制能は、Con A response に対する抑制活性に、Luci 10 に対する腫瘍細胞増殖抑制能は、PHA response に対する抑制活性によく相関した。前者の結果のプロットを Fig. 26 に、後者の結果のプロットを Fig. 27 に示した。

2) 腫瘍細胞増殖抑制能と NBT 還元能および貪食能との相関

NBT 還元能は腫瘍細胞増殖抑制能との間に相関を示さなかったが、貪食能とは負の相関を示した。Fig. 28 に Luci 3 に対する腫瘍細胞増殖抑制能と貪食能の相関をプロットで表した。

3) Luci 3 と Luci 10 に対する腫瘍細胞増殖抑制能の相関 (Fig. 29)

両者には有意な相関が認められ、肺胞マクロファージは両腫瘍細胞株に対し非特異的に増殖抑制作用を示しているものと思われた。

D. 家兔肺胞マクロファージ腫瘍細胞増殖抑制能を上昇させる試み—BRM の *in vitro* における単独および併用の効果—

本実験において家兔の肺胞マクロファージは発癌に伴い、腫瘍細胞増殖抑制能を上昇させることが示され発癌に対する宿主応答の一つと考えられた。そこでさらに強力な宿主応答を引きだすため種々の BRM を

用いて効果を検討した。

BRM は、エフェクター細胞のみならず標的細胞に対しても作用を有する場合のある事と、また両者の接触している時点において作用する可能性もある事より、Fig. 4 の方法において培養開始時に、両者の存在する well に単独または併用で添加し相乗効果についても検討した。相乗効果はいずれを単独で用いたよりも強い作用が現れた場合に、効果ありと考えた。

1. BRM の腫瘍細胞に対する直接の効果

4 種の BRM を用い、標的細胞に対する直接の効果を単独、または併用で確かめた。細胞増殖の程度を、細胞内に取込まれた ³H-TdR の CPM をもって表した。

1) Luci 3 (Fig. 30)

Luci 3 に対しては、単独では、LPS, N-CWS および IFN γ は、増殖抑制作用を示さないが、TNF は強い増殖抑制作用を示した。従って併用の場合は、TNF を含まない場合と、含む場合に分けて検討した。TNF を含まない、LPS と IFN γ , N-CWS と IFN γ および LPS と N-CWS の3種の組合せにおいては LPS と IFN γ の組合せが増殖抑制作用を示し有意差を認めた。TNF を含む組合せにおいては、いずれも強い増殖抑制作用を示したが、TNF 単独における作用が大きいためか相乗効果は得られなかった。

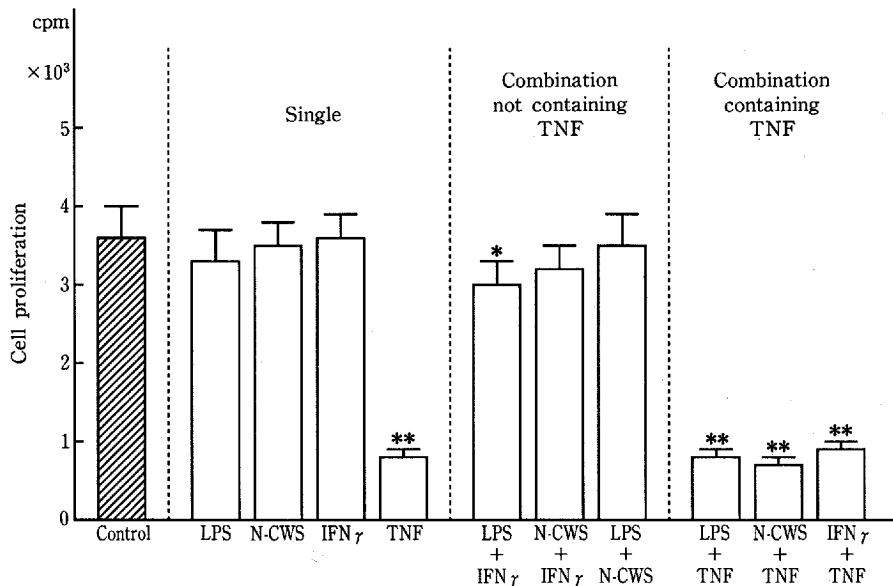


Fig. 30. Direct effect of BRMs on proliferation of Luci 3. Each bar represents mean±SD of triplicated wells

* p<0.05 compared to control
 ** p<0.01 compared to control

2) Luci 10 (Fig. 31)

Luci 10 に対してもほぼ同様であったが, TNF の作用は, Luci 3 における場合より小さく, また,

TNF を含まない組合せの場合, 増殖抑制作用を示さず, 相乗効果は認めなかった。TNF を含む併用では, 増殖抑制作用を示したが, 相乗効果は得られなかった。

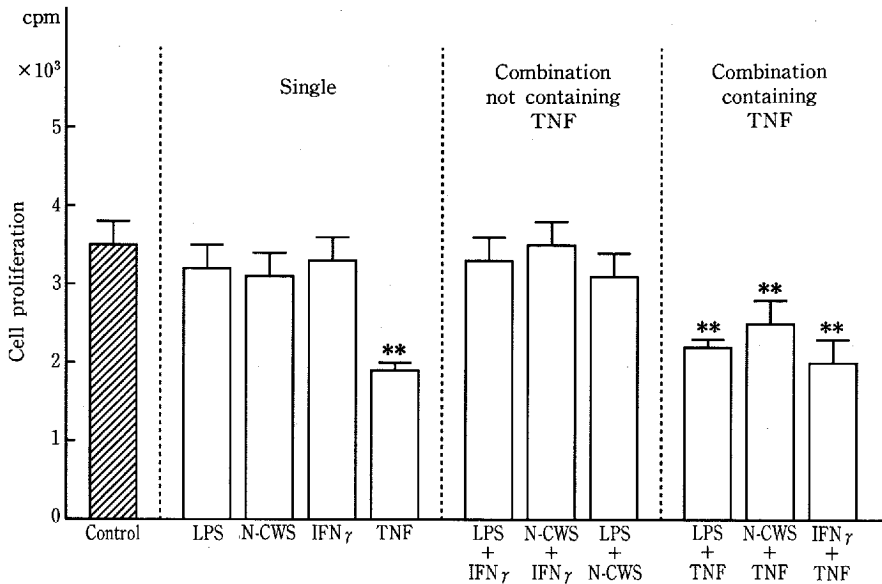


Fig. 31. Direct effect of BRMs on proliferation of Luci 10. Each bar represents mean ± SD of triplicated wells
 ** p < 0.01 compared to control

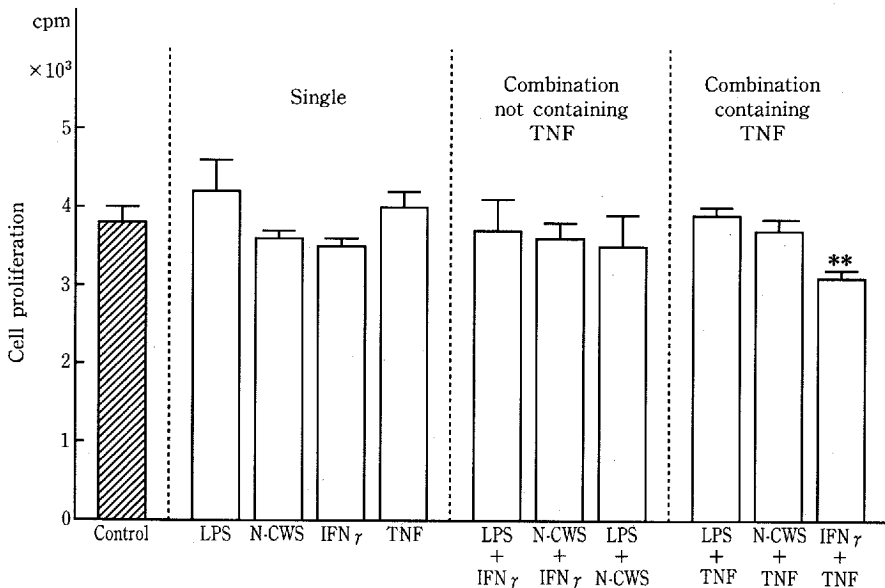


Fig. 32. Direct effect of BRMs on proliferation of T-24. Each bar represents mean ± SD of triplicated wells
 ** p < 0.01 compared to control

3) T-24 (Fig. 32)

T-24 に対しては、単独使用および TNF を含まない併用では増殖抑制作用は現れないが、IFN γ と TNF の併用においては、相乗効果が得られた。

2. 肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能の測定系に添加した場合の作用

BRM を用いた場合の増強効果は、以下の式により

算定した。

$$\% \text{Augmentation} = (1 - \text{CPM in target cells in control well} / \text{CPM in target cells in test well}) \times 100$$

Control well contains E/T mixture in the absence of BRM. Test well contains E/T mixture in the presence of BRM.

1) 単独添加

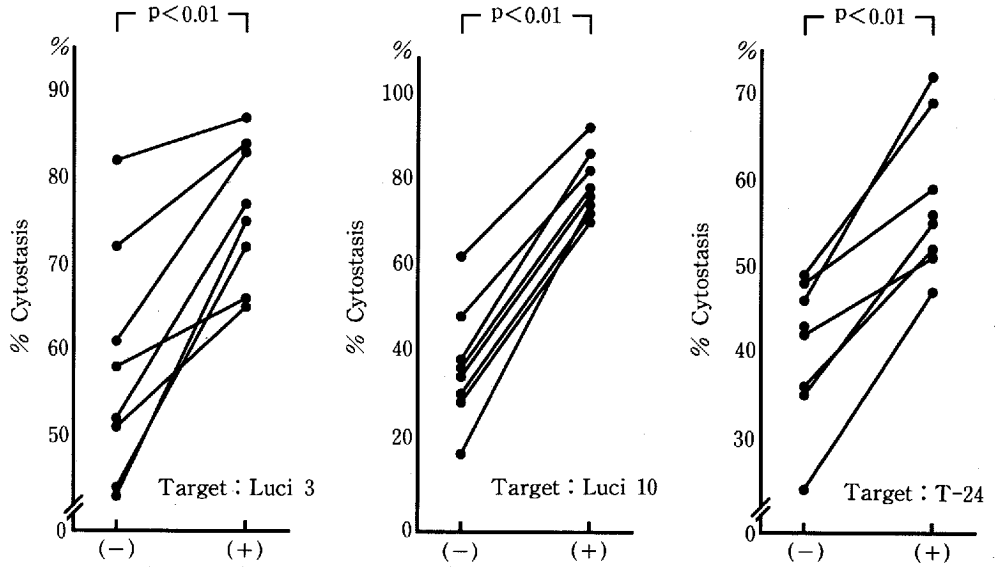


Fig. 33. Effect of LPS on cytostatic activity of PAM. PAMs and target cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of LPS (5 μ g/ml)

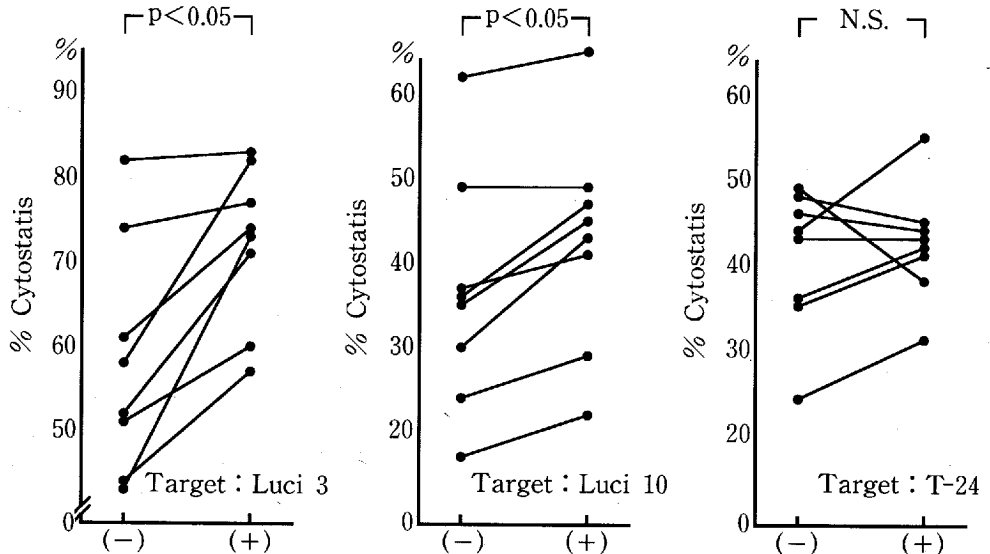


Fig. 34. Effect of IFN γ on cytostatic activity of PAM. PAMs and target cells were cocultured in the presence (+) or absence (-) of IFN γ (100 JRU/ml)

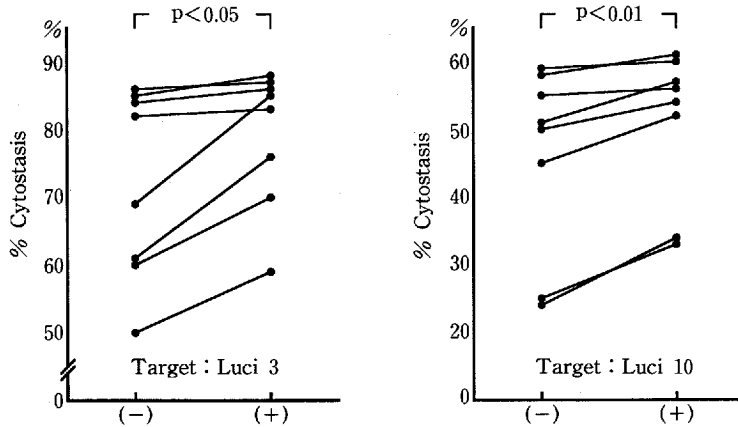


Fig. 35. Effect of N-CWS on cytostatic activity of PAM. PAMs and target cells were cocultured in the presence (+) or absence (-) of N-CWS (10 μ g/ml)

8羽の家兎から得られた肺胞マクロファージについて3種の腫瘍細胞株 Luci 3, Luci 10, T-24 を用いて添加の影響を観察した。

a) LPS (Fig. 33)

LPS は、いずれの標的細胞に対する腫瘍細胞増殖抑制能も有意差をもって著明に増強させた。

b) IFN γ (Fig. 34)

IFN γ は Luci 3, Luci 10 に対する腫瘍細胞増殖抑制能を有意に増強させた。T-24 に対する腫瘍細胞増殖抑制能に増強作用を認めたものは8羽中4羽のみであった。

c) N-CWS (Fig. 35)

N-CWS は、Luci 3, Luci 10 に対する腫瘍細胞増殖抑制能を有意に増強させた。

2) 併用添加

a) IFN γ と LPS (Fig. 36)

IFN γ と LPS は併用により、マクロファージの抗腫瘍性を効果的に上昇させる事が知られており、培養開始24時間後に、培養液を入れ変えることによって添加の順を変え、種々の濃度の IFN γ にて検討した。2羽の家兎より得られた肺胞マクロファージについての検討を左右 a, b のグラフに示す。交雑種である家兎は、個体により異なった phenotype を示す事が考えられるが、Fig. 36a に示す家兎においては、IFN γ 単独でも増強作用を示し、添加の順を変えても同様に容量依存性が認められる。IFN γ 添加後 LPS を加えた場合の方が、その逆の順より高い増強作用を認めている。一方、Fig. 36b に示す家兎においては、IFN γ 単独では全く増強作用を示さない。LPS 添加後、

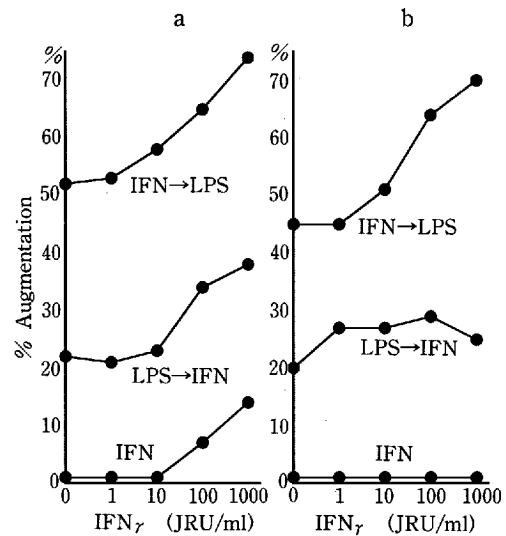


Fig. 36. Synergistic effect of LPS and IFN γ on cytostatic activity of PAM against Luci 10. PAM from two rabbits (a, b) were examined. LPS: 5 mg/ml

IFN γ を加えた場合には、増強作用が認められるが、IFN γ に対する容量依存性にはなく、LPS の効果のみと思われる。しかしながら、IFN γ 添加後 LPS 添加した場合は、IFN γ の作用が容量依存性に出現している。

b) TNF を含まない併用 (Fig. 37)

2羽の家兎において TNF 以外の3種の BRM を、単独または併用で用いた場合の作用は、LPS はいず

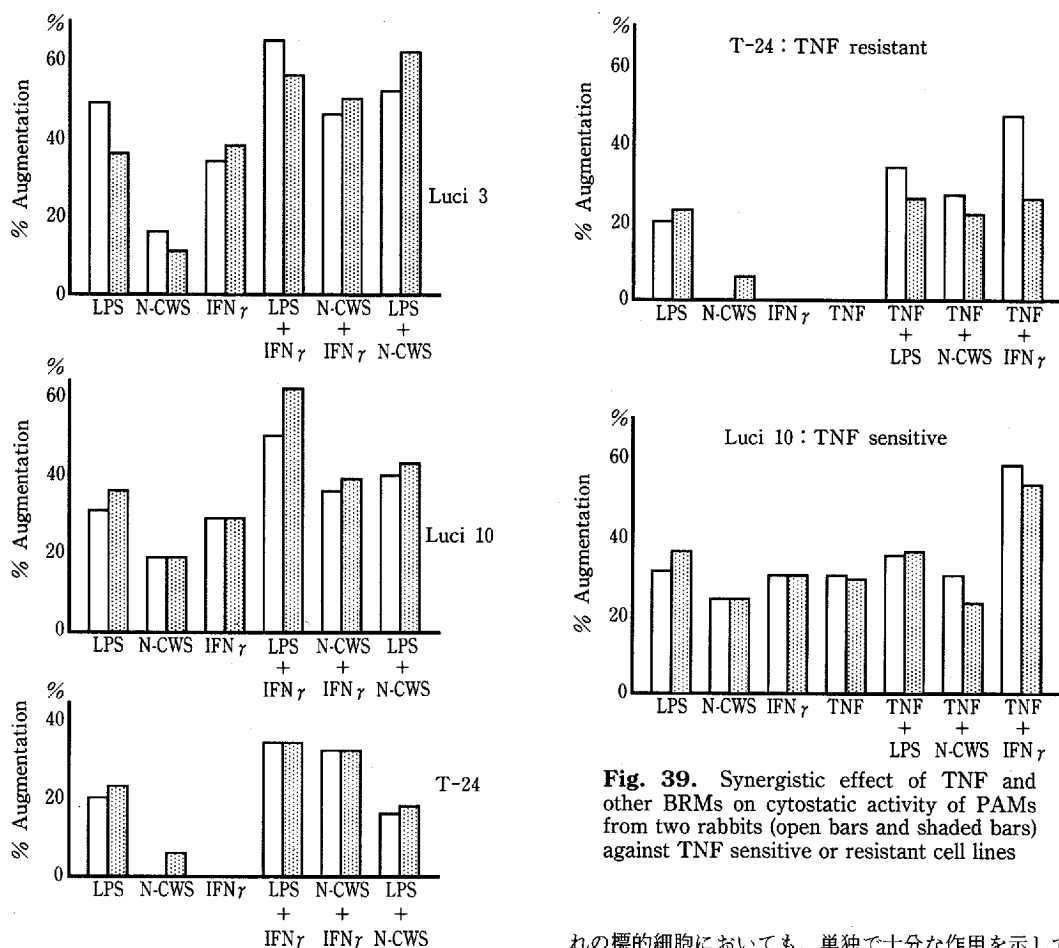


Fig. 37. Synergistic effect of BRMs on cytostatic activity of PAMs from two rabbits (open bars and shaded bars). LPS, N-CWS and IFN γ were used as BRM

Fig. 39. Synergistic effect of TNF and other BRMs on cytostatic activity of PAMs from two rabbits (open bars and shaded bars) against TNF sensitive or resistant cell lines

れの標的細胞においても、単独で十分な作用を示しているが、IFN γ と併用した場合にはさらに増強されている。N-CWS は単独で用いた場合、LPS に比べ低

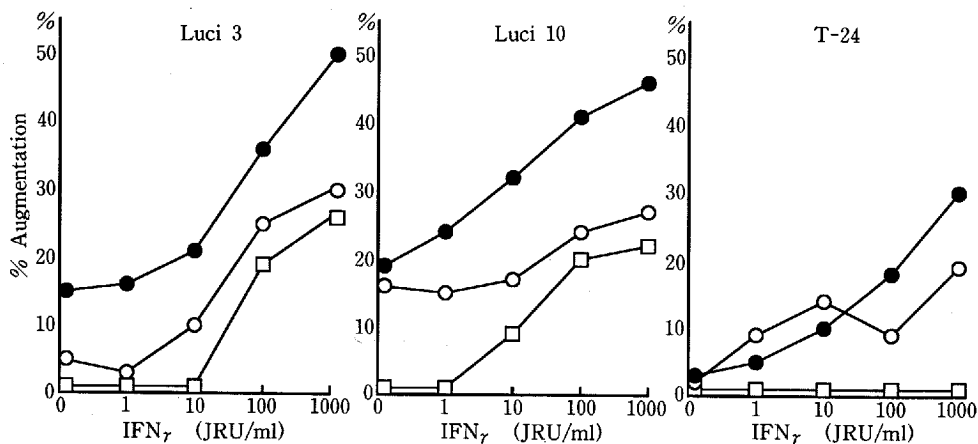


Fig. 38. Synergistic effect of IFN γ and N-CWS on cytostatic activity of PAM. N-CWS was used at 10 μ g/ml (closed circle), 1 μ g/ml (open circle) or not used (square)

い増強作用を示すが, IFN γ と併用した場合, 相乗効果が認められた。特に T-24 においては, 単独ではいずれも作用が認められないが, 併用により作用を発現する相乗効果を示した。相乗効果を認めた, N-CWS と IFN γ において容量依存性を検討した (Fig. 38)。Luci 3, Luci 10 において認められる IFN γ に対する容量依存的な作用は, N-CWS 添加する事により IFN γ の各濃度において高められている。IFN γ 単独では全く作用を認めない標的細胞 T-24 の場合にも, N-CWS 添加により IFN γ に対する容量依存性を発現させている。

c) TNF との併用 (Fig. 39)

TNF 感受性である Luci 10 (Fig. 31) と, TNF 抵抗性である T-24 (Fig. 32) の2種の標的細胞を比較して検討した。Luci 10 を用いた場合, TNF の標的細胞に対する直接の作用もあると思われるが, TNF のみで約30%の増強作用が認められ, LPS, N-CWS との併用によっても相乗効果は認められなかったが, IFN γ と併用した場合には, 増強作用はさらに大きくなり, 相乗効果が認められた。TNF 抵抗性である T-24 単独ではやはり増強作用を認めないが, LPS, N-CWS, IFN γ のいずれと併用した場合にも強い相乗効果が得られた。

考 察

A. 家兎を用いた実験手技に関する検討

家兎は近交系が確立されていないこともあり免疫学的に細胞成分を検討する実験においては用いられることが少なく, まだ十分に手技的に確立されていない部分も多い。本実験で用いた手技について若干の考察を加えた。

1. マクロファージ, リンパ球の分離

本実験では BALF よりマクロファージを分離するにあたって比重遠沈法を用いた。比重遠沈法により, ラット腹腔浸出液やヒト末梢血単球を分離する方法は以前より検討されている^{42, 46, 125, 161}) が, 阪本¹⁴¹) はヒト末梢血において, リンパ球と単球を分離することを目的とし重層液の比重を1.063とし, その重層部に得られた細胞成分を検討し, 純度90-95%の単球成分が得られたとしているがその下層部においても5-10%の単球成分が混在しているとしている。BALF においては, 細胞成分のほとんどが肺胞マクロファージであり, リンパ球の比率は末梢血に比べ極めて少なく, むしろ一部比重の高いマクロファージも洩れなく回収することを目的として, 比重1.077のものを用いた。その方法で, Ficoll-Hypaque の下層には, viable 肺

胞マクロファージはほとんど認めず, リンパ球, 多形核白血球は除去でき大半のマクロファージが回収できるものと思われた。また, BALF 中には非細胞成分の混在も避けたいが, これも同時に除ける上で有用であると考えた。

リンパ球分離に関しては, マウスにおいて行われる場合はヒトにおける分離液と異なるものが用いられているが家兎においては詳細な検討はなされていない。比重遠沈法における細胞の沈降は, 重層液の比重のみでなく浸透圧, 粘性などにより決定される液体力学的性状に依るとされている¹⁵⁾ が, 著者は Ficoll-Hypaque を用いる前に Conray (第一製薬) と Hypaque (Pharmacia) を種々の濃度または容量で混じり分離に用いる重層液の性状と回収されるリンパ球の比率について検討したところ, ヒトにおける場合と同じく 9% Ficoll 24容と 33.4% Conray 10容で混じたものが最も良くこれに近い性状である Ficoll-Hypaque を用いた。

2. 気管支ファイバースコープを用いた BAL 実施方法に関する検討

家兎に対して気管支ファイバースコープを用いて BAL を行ったが, 手技が簡単であり短時間で行え一度に多くの検体を得られることや, 屠殺を要しないため同一個体において繰り返し施行でき, 経時的に変化を観察できる長所があると考えられた。ところが他にこの方法に関する報告は見当たらない。動物実験において BAL は, 1960年に Myrvik が家兎において行い¹⁶⁶⁾, 生体のマクロファージについて研究する上で収集の良い手段として報告し, これが原法とされ以後もさかんに行われている。手技的にはほとんど屠殺後に行われ一部には生体において施行する報告もあるものの⁹⁵⁾ 全身麻酔の装置や専用の挿管チューブが必要である。

気管支ファイバースコープを用いた BAL は実験的よりもむしろ臨床的に用いられた方が早く1973年に初めて行われ¹⁷⁾, その手技的容易さや, 安全性もあり, 急速に広まり, 肺胞内細胞の構成, 蛋白質, 脂質などの^{25, 66, 83, 86, 97, 98)} 解析が進み病因論や診断に大きく寄与している。そして1970年代後半より BAL という名称もほぼ定着し, 1979年, 1986年²⁵⁾ には BAL の国際シンポジウムも行われている。ところがなお現在も BAL は洗浄部位や洗浄回数は標準化されておらず得られた結果を評価する上で多少の問題が残っている。家兎においては, 先端部の径 4.8 mm の気管支ファイバースコープを用いた場合, 気管支の解剖学的径より前葉支, 中葉支のみへの楔入は不可能であり, 後葉

支が適当であると思われる。またここは主気管支に楔入した後そのまま押し進める事によって自ら気管支ファイバースコープの先端が到着する場所であり、操作が容易である。洗浄量および洗浄回数は臨床的には、20 ml×5回もしくは50 ml×2又は3回がほとんどである^{25, 130}。1回の注入量に関してははっきりした根拠は示されておらず習慣的に決まってきたものと思われるが、注入部位として比較的良く用いられる右中葉の亜区域は165 mlの容積を持つとする報告がある。著者は家兎において摘出肺における洗浄液注入時の後葉の膨脹の程度、および気管支ファイバースコープ下に観察した液体の逆流の程度より20 mlが適当と考えた。家兎の1回換気量は21 ml程度¹⁴⁰でありヒトにおける値を外挿すれば全肺気量は200 ml程度と思われるが、著者が摘出肺において生理食塩水を注入して検討したところでは全肺気量はそれよりは小さいものと思われる。しかし後葉の容積は左右肺とも大きく、それぞれ半分以上を示し全肺気量の1/4以上を占め少なくとも今回洗浄に用いた20 mlはあると思われる。また洗浄回数と回収される細胞の構成および数の関係はDavis²⁸らが詳細に報告しているが、著者の検討においても細胞数は2回目または3回目がピークである。細胞分類は従来の報告通り、1回目においてリンパ球がやや多いが、全体に占める割合は小さく、Crystal²⁵の述べる通り大きな問題ではなく、特にBALF中の液性成分を検討する際は1回目の洗浄液は破棄すべきとする意見³⁶もあるが20 ml×2回の洗浄を行い、いずれも回収することとした。

近年ではBALという手技自体に関する検討も盛んで、注入液の動態の解明も^{28, 77, 99, 129}進んだ。BAL中の液性成分は、洗浄回数が増すに従って次第に希釈されることが示されているが、単純に希釈されたとして計算した濃度よりは高く、この原因として洗浄液が一部肺に吸収されることや、これらの物質の肺胞壁を通過しての流入が考えられる。細胞成分に関しても、本実験においても確かめられた通り、同様に単純に希釈されたとして計算した値より回を重ねるにつれての希釈のされかたが小さいが、細胞は洗浄の間に間質から流入してくることは考えられず、注入により単純に希釈されていない可能性がある。すなわち、肺胞マクロファージは肺胞壁に付着していると考えられ、洗浄液の流入により単純に液中に混じらず、洗浄を繰り返すごとに一部剥離するものと思われる。これに対しリンパ球は肺胞表面に付着しておらず、連続検体において最初に多く、次第に減少する傾向を示す²⁸ものと考えられる。また、上述の洗浄液と間質および肺循環

系との液体の交換は、近年、tritiated water と technetium colloid の肺胞の通過性、非通過性を用いて、洗浄液の間質への流入および間質から液体の流入などが詳細に検討されている⁷⁷。

また、BALは、病勢の経過観察に用いるため、繰り返し施行される¹⁷¹ことがあるが、その適当な間隔を明らかにする事は重要である。注入された液体は完全に回収されない事実^{28, 77, 99, 129}が示されており、また液体の圧力によって肺胞がおし広げられることや、肺の細胞が一部除去されることは、その後の生体の肺内において変化が生じている可能性があり、短期間のうちに繰り返して行うことは、BAL施行自体によって生じ残っていた影響を観察してしまう可能性がある。ヒトにおいて注入液の動態を確かめる実験は米国では志願者を用いて比較的良く行われているが、短期間にBALを繰り返しその影響を見ることは倫理的にも成し得ないことであり報告を見ない。著者の検討によれば、家兎においては多形核白血球の急激で著明な増加を認め、1日後にピークがあり1回目に得られた値の302倍にもおよび1週間後でもなお軽度の上昇を認めている。一方マクロファージおよびリンパ球も、緩徐ではあるが、4日後にそれぞれ1.7倍、14倍程度に増加している。またマクロファージの機能に関しても貪食能は低下、NBT還元能は上昇と変化を認めており、それぞれ4日後、2日後まで有意差を認めた。BAL施行直後には肺内の環境に大きな変化が生じている様子が窺われた。同一個体に繰り返しBALを施行する際にはある程度の間隔をおく事が必要であり、家兎においてはマクロファージ機能に関しては1週間、多形核白血球増多が消失するにはそれ以上の間隔が必要であり、2週間おけば十分であると思われた。

B. 肺胞マクロファージの抗腫瘍性に関する検討

移植腫瘍の拒絶現象により今世紀始め成立したかに思われた腫瘍免疫はWolgram¹⁷⁷らにより組織適合抗原の見地から誤りを指摘され、長い間低迷した。その後化学発癌の成功や、近交系動物の実用化もあり、1950年頃には、同種同系動物を用いて、移植腫瘍に対する腫瘍免疫の成立が次々と報告^{37, 50, 79, 127}され、癌細胞移植拒絶現象が癌特異移植抗原(tumor specific transplantation antigen; TSTA)という名のもとに明らかになった。さらにBCGの腫瘍免疫に対する効果が示され⁹非特異的免疫療法が1970年代に至り爆発的な研究の盛り上がりを示したがその効果は期待された程ではなく、1980年のはじめにかけて深刻な悲観論^{58, 139}も見られた。ところが、近年では遺伝子工学の進歩により腫瘍免疫に関与する細胞の産生する物質

が純粋な蛋白質として得られる様になり^{7,163)}, 腫瘍免疫のエフェクター細胞にかなり明瞭な変化を生じさせる事ができるようになってきている。

このように幾度か壁に当たりながら徐々に進歩してきている腫瘍免疫であるが, その歴史は感染症に比べるとたいへん短く今後更に解明されるべき点は多い。しかし癌細胞は, 自己の正常細胞が変化して生じたものであり, 微生物の外來異物と比べると非常に自己に近いものと言えるであろう。多くの研究者が癌特異抗原を見出すのに窮々とし, 我々生体の免疫監視機構はその自己と非自己の識別に困惑し時に攻撃を怠る。ところが, ヒト癌の自然治癒例が少なからず報告されていること^{24,33)} や, 剖検時に認められる癌腫の頻度は臨床におけるより高い¹¹⁵⁾ 等腫瘍との共存状態⁹⁴⁾ が考えられること, また免疫抑制剤投与時^{65,121,122)}, Wiscott-Aldrich 症候群³⁵⁾, および AIDS¹⁷⁵⁾ (acquired immune deficiency syndrome) などの免疫不全時^{41,123)} に腫瘍の発生率が高いなど癌に体する宿主抵抗性というものが感染症同様確かに存在するという事を示す証拠も少なくない。

抗腫瘍エフェクター機構は特異的および非特異的機構に大別できるが, 免疫とは本来抗原に体する反応であり, 抗原特異的な反応こそが真の腫瘍免疫という立場をとる人も少なくない。ところが生まれながらにして胸腺を欠くヌードマウスの自然発癌率²¹⁾ や, 化学発癌率^{159,160)} は正常マウスと比較しても差が認められず⁸⁸⁾, むしろT細胞以外の細胞群が抗腫瘍エフェクターとして重要ではないかとする考えもある。さらにモノクロナル抗体や癌遺伝子を用いた解析によっても腫瘍特異抗原の検出が困難であり⁷⁸⁾, 存在したとしても強い抗原性を持たないと思われる事や, 癌細胞集団は例えば肺癌の病理所見においても異なった組織型のコンポーネントの混在が認められる事がある様に, 抗原的にも不均一な細胞集団である事が想像され, また抗原の変調³⁾ や消失⁴⁵⁾ など様々の変化を起こすと考えられているなど特異的免疫機構には特異的であるが故の短所も考えられる。非特異的エフェクター機構としては Herbermanら⁵⁷⁾ により提唱されたNK細胞, マクロファージなど¹⁴¹⁾ があげられるが Chow²²⁾ は, NK細胞と腫瘍抵抗性には相関がみられないとし, マクロファージの抗腫瘍性が重要であるとした。ヌードマウスや低いNK活性をもつマウスも正常なマクロファージ機能を持つことや, 現在用いられているBRMの多くがマクロファージ活性化作用を持つことを考え合せると, やはりマクロファージの持つ大きな役割を考えずにはいられない。またマクロファージは,

近年ではリンパ球に対し抗原を提示したり¹⁴³⁾, 逆に抗原特異的リンパ球からMAFにより活性化を受ける¹⁵¹⁾ などの事実が判明し, 特異免疫の成立と発現にも深く関与していると考えられ, さらにはLAKの制御も^{112,156)} 行っているとする報告もある。かくして単なる清掃作用, 抗菌作用として貪食機構のみが注目されていたマクロファージは腫瘍に体する宿主応答において重要な役割を演じるものであると考えられる様になってきた。van Furthら¹⁷³⁾ はマクロファージはすべて骨髓の前駆細胞から成熟した末梢血のモノサイトに由来すると結論し, mononuclear phagocyte system (MPS) と称しており, 異論や矛盾もなくはないが現在広く容認されるに至っている。

実際にマクロファージの抗腫瘍性に関する知見は1970年代中頃から集積され始め動物およびヒトでマクロファージの機能と腫瘍抵抗性^{62,76,90)}, 予後²²⁾, 転移^{31,52,82)} 等に関して詳細に検討されており, *in vitro* で実際に抗腫瘍性を呈する^{61,75,132,133)} ことも認められた。これらは人為的に誘導したマクロファージや腫瘍内のマクロファージおよびモノサイトに関してであり, 常在性マクロファージの抗腫瘍性, いわゆる natural cytotoxicity に関する検討は1980年頃より行われはじめ, Mantovaniら⁸⁹⁾ は乳汁中のマクロファージに関して検討している。常在性マクロファージの代表的存在である肺胞マクロファージは, 他のMPSと同じく¹⁷⁴⁾ 多くの生体防御に関する役割を担っているが¹⁴⁾, 構造的, 機能的にかなり特長的であるとする報告²³⁾ もある。抗腫瘍性に関する検討は既述の如くBALの臨床応用に伴い1980年頃より行われ始めている。肺胞マクロファージの antitumor activity は末梢血モノサイトよりも強いとするものが多い⁸⁴⁾ が, 弱いとする報告¹²⁾ もあり一定せず後述の担癌状態においてはその変化はより複雑である。また肺胞内においてはNK細胞は存在するが機能していないとする報告¹²⁴⁾ がありこれも肺内の腫瘍に体する肺胞マクロファージの重要性を支持するものであろう。

エフェクター細胞の抗腫瘍性を評価する手段として, 腫瘍細胞にアイソトープを標識し細胞の融解の程度, cytolytic activity を測定する pre-label 法の他に, 1978年に Brooksらが増殖抑制の程度を求める方法 post-label 法を発表し広く用いられるようになった。当初は, 後者の方法において cytolytic effect も検出されるため, cytotoxicity と表現された⁸⁴⁾ が, 現在では, この方法によって得られる抗腫瘍性を cytostatic activity, 前者の方法によるものを cytolytic activity あるいは cytocidal activity と称し, 両者を総称して

antitumor activity とされる事が多く、cytotoxicity は cytolytic activity と同じ意味として用いられることが多い。漢字で表す場合両者を総称して腫瘍細胞に対する傷害性、後者は障害性とする意見もある。

著者は、 $^3\text{H-TdR}$ を用いた post-label 法で antitumor activity を cytostatic activity として測定した。Assay 法にもよるが、一般に cytostatic activity は cytolytic activity よりも出現しやすく⁸⁴⁾、後者が検出されない場合にも認められることがある。マクロファージの抗腫瘍性は非特異的であるが腫瘍細胞に対し選択的であるとされており^{26, 60, 85)}、xenogenic な系においても抗腫瘍性を示す^{12, 69, 152)}。このような選択性は、荷電や特異的レセプターを介すると解釈されておりレセプターとしてはレクチン様物質、Fc レセプター、補体レセプターなどが考えられている。著者の用いた系は xenogeneic であるが、家兎肺胞マクロファージは正常細胞である線維芽細胞に対しては cytostatic activity を示していないにもかかわらず、他の6種の cell line に対してはすべて cytostatic activity を示している。E/T ratio に関しては Swinburne ら¹⁶¹⁾ が詳細に検討しているが、E/T ratio の増加に従い、cytostatic activity も上昇しており、20:1 ではほぼ100%となっている。他の報告^{80, 106)} においても10:1前後で行われているものが多い。培養時間は標識物質の差による影響もあるものと思われ、8時間でピークに達したとする報告もあるが、著者の検討では72時間が適当であり、他の報告とも一致^{80, 106)} する。またマクロファージの抗腫瘍性には E/T 間の接触を介するものもあり、培養液中の細胞密度も関与すると思われるが、著者の検討でも同一の E/T ratio 下で細胞密度の上昇に従って cytostatic activity の上昇が認められた。

担癌個体のマクロファージ機能については、モノサイトに関して観察した場合 antitumor activity は亢進^{68, 91)} しているという報告と、抑制されているという報告¹¹⁰⁾ および正常者との間に差を認めないとする報告^{108, 178)} がある。肺胞マクロファージに関して、正常者と肺癌患者の間に差はないとする報告¹⁵¹⁾ や、上昇しているという報告^{72, 161)} と低下しているという報告⁸⁰⁾ がある。しかしながら、常在性マクロファージは、全身を循環するモノサイトと異なり、担癌部以外では直接腫瘍と接することはなく、その活性化の程度をモノサイトと単純に比較する事は困難であり、担癌部位と非担癌部位のものを分けて考えなくてはならないであろう。しかしマクロファージの活性化には、リンパ球が分泌し全身を循環する MAF によって制

御される面がある事や、流血中にも腫瘍成分の一部が循環しマクロファージと直接接触する可能性があり、さらには既述の如くマクロファージの由来がモノサイトであるとされている事などを考えれば、腫瘍を攻撃すべく何らかの変化を生じているとも考えられる。Antitumor activity には担癌部位と非担癌部位で差がないとする報告もあることから非担癌部位のマクロファージに関し検討することもまた重要であると思われる。安元ら^{80, 108)} は肺癌患者における肺胞マクロファージの cytostatic activity を検討し、担癌部位の方がやや低いとしている。その後、病期別に検討し、UICC (Union International Contre Cancer) のII期において最も上昇することを示しているが担癌部位および非担癌部位いずれにおいても同じ態度を示し、また上昇の程度も同じである。すなわち肺胞マクロファージは肺癌に対し、病勢がある程度になるまでは非担癌部位においてもその抗腫瘍性を上昇させ、癌を迎え撃つべく備えていると解することができよう。著者の実験は非担癌部位におけるマクロファージ機能を観察したものであるが100%の家兎が担癌状態にある実験24週では、やはり cytostatic activity は有意な高値を示している。この時点で家兎にみられる癌腫は病期としては初期癌であり、進行癌で低下するとされている、リンパ球の PHA, Con A に対する反応も上昇している様子が窺われたことも免疫機構は初期癌として捉えていたことを示していると思われる。なお、MNU 注入側肺の肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制能が一定の傾向を示さなかった理由としては MNU の直接の肺胞マクロファージに対する影響が考えられた。

貪食能は、昔から良く知られたマクロファージの機能であり、担癌個体においても検討がなされており、肺胞マクロファージにおいては Gudewicz⁵¹⁾ は実験的肺転移腫瘍において低下するとし、Sone ら¹⁵¹⁾ は変化しないとしている。また、肺癌患者において著明な低下を認めたとするものがあり⁴⁹⁾、また個体差が大きいとされている⁴⁰⁾。健康者と差がなかったとするものもある⁴⁰⁾。また担癌部位と非担癌部位においては差を認めなかったとするものもある。本実験では担癌状態において低下を示し cytostatic activity との間に負の相関を認めている。

NBT 還元能は、肺胞マクロファージの産生する O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素種により、NBT が formazan に変化する反応¹⁶⁹⁾ であり、一般的に殺菌能を反映しているものと考えられている。担癌個体においてこれらの機能の検討報告は少ないが、NBT 還元能が上昇しているとするものや¹¹⁷⁾、 H_2O_2 の産生は低下

しているとするものがある⁴⁹⁾。また食食能との関係は、食食能が亢進した場合 hexose monophosphate shunt が亢進し活性酸素種の産生が増加すると考えられる²⁾。ところが喫煙者と非喫煙者の比較では喫煙者においては NBT 還元能は上昇し食食能は低下しているとする報告¹⁴⁸⁾ も認められる。このように NBT 還元能は食食能が亢進した結果生ずる細胞内の代謝の変化以外にも影響を受け、条件によっては食食能との相関は必ずしも認められない。またこれは活性化マクロファージと言う場合、すべての機能が亢進するわけではなく多様な性状を示す事を表していると言えよう。

化学発癌物質の中には代謝の過程で活性酸素種を生成するものが多く知られており^{113, 145)}、最近ではさらに種々の発癌プロモーターには O_2^- 産生能を亢進させる作用があること^{27, 150)} に興味もたれている。本実験においては、NBT 還元能に担癌状態においても特に有意な変化は認めていない。食食能の低下は、活性酸素種の産生に対しては抑制的に作用すると考えられるが、発癌物質である MNU の投与は促進的に働いたと考えられ、また活性酸素種の産生能には他に様々な因子が関与していると考えられ、本実験において食食能と NBT 還元能に相関が認められなかったことは多角的に解釈すべきと思われる。

マクロファージの antitumor activity にも活性酸素種の関与があるものと考えられ近年検討が加えられているが^{30, 43, 164, 170, 176)} 本実験では cytostatic activity と NBT 還元能にも相関を認めておらず、マクロファージの antitumor activity は、活性酸素種以外にも多くの要因が存在することを示唆している。

なお、本実験では24週にわたりアルキル化剤である MNU を注入したが末梢血ヘモグロビン量や白血球数に変化を認めず、また BALF 中細胞数や細胞分類にも変化を認めておらず上述の肺胞マクロファージの機能変化は家兎の一般状態の変化に起因するものではないと思われた。

マクロファージは免疫学的監視機構¹⁵⁾ の中で重要な役割を占めていると考えられるが、免疫学的監視機構とは概念的な意味合いが強く、前癌病変あるいは病理学的に良く言われるところの異型上皮が免疫学的に排除されているという事の証明は非常に困難である。にもかかわらず、免疫学的監視機構は腫瘍免疫を理論づける上で非常に有用であり一般に良く用いられるが、この理論からすると、癌細胞は自己に近いが故に監視機構をくぐり抜けたわけであり、生じては排除される異型上皮は、より異物に近い、即ち抗原性が強いと考えざるを得ない。筆者の実験では、実験12週で既

に cytostatic activity に有意な上昇を認めるが、この時点で発癌率は約30%であるものの、教室の長谷川⁵⁵⁾ の報告によれば気管および中樞気管支の上皮は広く異型上皮でおきかわったとされ、本実験においても同様の結果が得られた。この時点で注入反対側肺の肺胞マクロファージ機能を観察し屠殺した家兎は2羽であるが内1羽に発癌を認めた。発癌家兎と非発癌家兎の間に、cytostatic activity に特に差を認めていない。即ち、癌腫を有さない家兎も cytostatic activity を上昇させており、このことは異型上皮の抗原性について示唆するものであろう。

ところで、マクロファージにはまた生体の免疫反応に対し抑制的に働く事が知られ免疫抑制性マクロファージ、あるいは suppressor macrophage と呼ばれている。具体的には mitogen や抗原によるリンパ球分裂増殖³⁹⁾、T-cell の細胞傷害性細胞への分化と活性化^{38, 128)}、さらに記憶細胞への分化、T細胞からのマクロファージ遊走阻止因子とT細胞増殖因子の産生^{39, 102)}、NK細胞活性等を阻害するとされるが、その抑制性を実際に評価するにあたっては mitogen によるリンパ球の分裂増殖を抑制する程度が指標として良く用いられ suppressor activity、日本語では抑制活性あるいは免疫抑制活性と表現される⁷²⁾。またそれらの抑制性の可溶性因子としては、プロスタグランジン⁴⁷⁾、プロテアーゼ、活性酸素種等が考えられている。末梢血モノサイトの NBT 還元能と免疫抑制活性に相関を認めたとする報告¹⁷⁹⁾ は活性酸素種の関与を示唆するものであろう。またそれ以外に suppressor T-cell を誘導することや、suppressor T-cell の分泌する可溶性の免疫抑制物質のキャリアーとして働くことも知られている。

このようなマクロファージの産生が認められる場合は担癌個体を考えると2通り存在する。第1は担癌状態の進行に伴って生じる場合であり、第2は治療のため、非特異的免疫刺激剤を投与した場合である。In vivo においても、動物では担癌マウスに腫瘍細胞を抗腫瘍免疫細胞に混じて腹腔内に注入する際免疫抑制性マクロファージを加えると治癒率が低下¹⁶⁵⁾ する事や、他にも種々の事実が報告されている。ヒトにおいても、末梢血モノサイトやマクロファージの免疫抑制作用が強いと生存期間が短くなったり¹⁰⁵⁾、再発が生じ易かったりする事⁵³⁾ が認められている。

さて、このように免疫抑制マクロファージは存在し、担癌状態および、免疫賦活剤作用により出現すると考えられているが、とすれば抗腫瘍活性の出現の場合とよく似ており両者の関係には興味もたれる。実際に

肺胞マクロファージにおいて両者に相関を認めたとする報告⁵⁶⁾があり、また腫瘍内モノサイトが cytostatic activity と相関を示したとする報告¹⁰⁷⁾もあるが、逆に両者に関連を認めなかったとする報告^{11, 20, 172)}もある。著者はこの suppressor activity を cytostatic activity と対比させたが、まず第1に suppressor activity は、cytostatic activity に比べ個体差が大きかった。cytostatic activity はほぼ様に上昇したが、suppressor activity は正常家兎の肺胞マクロファージはほとんど示さず、出現する時期も様々であり、Con A response に対する抑制は実験16週、PHA response に対しては実験20週まで全く suppressor 活性を示さないものが認められた。第2に、種々の発癌過程にある家兎から得られた肺胞マクロファージの2つの機能を比較してみると mitogen, PAM/PBMNC 比をそれぞれ2種用いた4通りのケースにおける抑制活性は、2種類の腫瘍細胞に対する cytostatic activity といずれの場合においても有意な相関を認めた。肺胞マクロファージの抗腫瘍性を検討する上でこのような負の方向への作用も考慮に入れるべきであると考えられた。

なお、本実験では、末梢血単核球の中から、モノサイトを除く操作は特に行っていないが、抑制性マクロファージの実験の際、必ずしもこの操作は行われておらず、また除いても除かなくても反応に大差ないとする報告⁶⁴⁾もある。PAM/PBMNC 比は、小さいと mitogen response に促進的に働き、多いと抑制的に働くとされる^{116, 124)}ため、1/20, 1/40の2通りで行った。また mitogen も2種用いそれぞれに2つの標的細胞に対する cytostatic activity を組合せ、計8種類の組合せで行った。

癌の免疫療法は、Mathé⁹²⁾や Morton¹⁰⁴⁾が BCG を臨床的に用いてその効果を報告して以来大きな関心が払われて来たが、その後行われてきた非特異的免疫賦活剤による臨床的效果は必ずしも期待されたほどではない。しかし多くの情熱が注がれ数々の物質が試みられ米国立癌研究所は治療研究の体制を総括、発展させることを目的にそれらを Biological Response Modifiers と総称することにした¹¹⁸⁾。近年生体内で産生されるサイトカイン、モノカインを遺伝子工学的に純粋かつ大量に得られるようになり^{7, 163)}、それらを投与して治療に用いる臨床的試みが行われ、一部の腫瘍に対し有効な物質も見出された。1985年 IL-2 を用い自己リンパ球を *in vitro* で活性化させ再び *in vivo* に戻す Rosenberg¹³⁶⁾ の Lymphokine activated killer cell (LAK) 療法は、その効果の大きさもあり再び大

きな反響をよびおこした。また、その他、種々のサイトカイン、モノカインが同様に純粋な型で得られる様になり、これらの *in vivo* への応用もさかんに行われている。

現在ではさらに、LAK 療法に修飾が加えられ、腫瘍細胞とあらかじめ混合培養し誘導した特異的な cytotoxic T-cell (CTL)^{71, 93)} や腫瘍内のリンパ球¹³⁵⁾ (tissue infiltrated lymphocyte) を IL-2 により増殖させる方法が注目されている。また recombinant サイトカインおよびモノカインは併用する事により組合せによっては強い相乗作用を現す事^{16, 34, 54, 126, 137)} も示され、さらにこれらと他の BRM の併用⁷⁰⁾、またこれらと IL-2 で活性化させた CTL の併用⁴⁸⁾ などが試みられ成果を上げつつある。著者は、家兎の自家癌において、肺胞マクロファージの抗腫瘍性の増強を確認しこの現象は生体の腫瘍排除に備えた反応と解釈しこの反応をさらに増強させるべく、肺胞マクロファージの cytostatic activity に対する BRM およびサイトカインまたそれらの併用による相乗効果について *in vitro* で検討した。

BRM はエフェクター細胞のみならず標的細胞に対しても作用する場合のある事、およびエフェクター細胞と標的細胞の接触の存在下で作用する可能性も考えられ、培養開始時に両者の存在する well に単独または併用で添加した。そのためまず、標的細胞に対する直接の影響を確かめた。著者が用いた4種の BRM のうち TNF のみは腫瘍細胞株によっては直接の増殖抑制作用を示した。また LPS, N-CWS, IFN γ との併用により相乗効果を認めている。このため併用効果について検討する際は、TNF を含む組み合わせと、含まない組み合わせに分けて検討した。TNF を含まない場合、IFN γ と LPS の併用の際に Luci 3 において増殖抑制作用を呈し、相乗効果を認めた。即ち、従来の報告通り、LPS, N-CWS には直接の腫瘍細胞増殖抑制作用はないが、TNF は腫瘍細胞株によっては強い作用を示し、IFN γ も弱い増殖抑制作用を持つ可能性が示唆された。次に肺胞マクロファージの cytostatic activity におよぼす影響に関しては LPS は強い作用を呈し、IFN γ ^{74, 109, 119, 120)}、N-CWS^{151, 153, 155)} にも従来の報告通り肺胞マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制を増強させる作用を認めた。また、併用による増強作用については LPS と IFN γ の組み合わせにおいて機序に関しては詳細な検討がなされており、IFN γ は LPS に対するレセプターをマクロファージに表現させる¹⁾ としているが、著者の実験においても LPS 添加後に IFN γ を添加した場合に比

べ、その逆では高い相乗効果を認めている。また、交雑種である家兎は個体により異なった phenotype を表現することから IFN γ 単独では反応しないものも認められ、LPS 添加後に IFN γ を添加しても IFN γ に対する容量依存性は認められず、LPS の効果のみが認められた。ところが添加の順を変えると IFN γ に容量依存性に cytostatic activity は上昇した。これらの結果はレセプターレベルの知見¹⁸⁾に一致する。

TNF を含まない組み合わせで増強作用を検討したところ、N-CWS と IFN γ にも相乗効果を認め、特に標的細胞 T-24 に対する cytostatic activity 増強作用はいずれも単独で用いた場合にはほとんど認められないにもかかわらず、併用により、作用が出現している。また、LPS と N-CWS は腫瘍細胞株によっては相乗的に作用した。また、TNF と他の BRM の組み合わせでは、TNF resistant cell line においては、TNF と N-CWS、IFN γ が、TNF sensitive cell line においては IFN γ のみが明らかな相乗効果を示した。

相乗効果とは、本来複数の物質を使用する際に、個別に用いた作用の和よりも大きい場合に用いるべきであろうが、本実験においては、反応は 0% から上限 100% の間に位置しており実際相乗的な作用があったとしても測定値には表れない可能性があり、便宜的に、数値からは相乗作用的なものも含めて相乗効果と表現した。その中で明らかに認められると思われる相乗効果は 1) LPS+IFN γ 2) N-CWS+IFN γ 3) TNF+N-CWS (TNF resistant cell line において) 4) TNF+IFN γ (TNF resistant, sensitive 両者において) である。

近年様々のサイトカインがリコンビナント物質として純粋かつ大量に用い得る様になり、IL-1 と TNF¹³⁷⁾、colony stimulating factor (CSF) と IFN γ ⁵⁴⁾、TNF と IFN γ ^{34, 137)}、IL-2 と IFN α ¹⁶⁾ など様々な組み合わせで抗腫瘍効果が検討されている。中でもマクロファージを介した抗腫瘍効果に関し特に注目されるのは TNF^{29, 67, 126, 137)} であり、マクロファージの抗腫瘍性に大きな役割を占めていると考えられている。しかしながら、TNF および TNF によって活性化されたマクロファージに対し抵抗性を示す腫瘍細胞株もありそれらは IFN γ 、IFN γ および IL-2 で活性化したモノサイトには感受性があるなど、TNF を介さない部分によりレギュレーションを受けているとされている¹²⁶⁾。

エフェクター細胞の抗腫瘍作用において BRM の相乗効果を論ずる場合、effector phase のみならず target phase にも作用する可能性を念頭におくべき

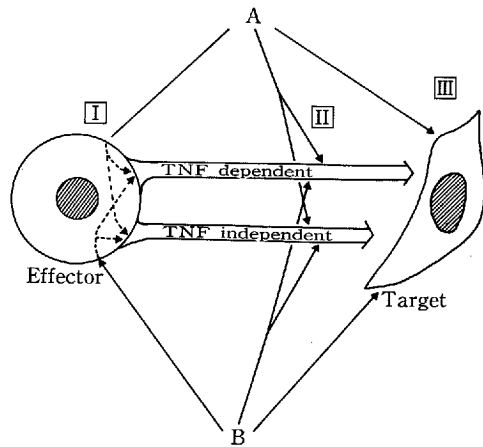


Fig. 40. All considerable points to which BRM affect in E/T relation when effector and target has no contact each other

である。Fig. 40 は細胞間の接触なくして攻撃する場合において、TNF dependent, TNF independent の 2つの経路があり BRM A と BRM B を用いたと仮定した場合に考えられる作用点で、I はエフェクター細胞に対する作用であり、II はエフェクター細胞の TNF dependent, independent それぞれの攻撃に対する標的細胞の sensitization を表しており、receptor の発現などが考えられ、III は標的細胞に対する直接の作用である。これだけで 10箇所の作用点が考えられるが、細胞間の接触がある場合にはさらに複雑になる事が考えられ相乗効果の機序を推察することは容易ではない。

しかしながら IFN γ と TNF の併用の効果については比較的詳細に検討^{34, 126)}がなされ、IFN γ にはエフェクター細胞に対する TNF 誘導作用と、標的細胞に対しては TNF に対する感受性を上げるという 2つの作用を認めると報告されている。著者が確認した相乗効果を生ずる組み合わせは、上述の如くでありこの報告に従えばこのうち 1), 2), 4) は IFN γ を含み、IFN γ が標的細胞を感受性にし、LPS, N-CWS が TNF 産生を促進したとの解釈も成り立つ。3) は TNF resistant cell line に対する効果であるが、N-CWS が標的細胞の TNF に対する感受性を上げた事や、N-CWS 刺激によりマクロファージより産生される物質が TNF とともに作用した場合 cytostatic な作用を発現する事などが考えられる。

以上の様に本実験において BRM の併用により組み合わせによっては肺胞マクロファージの抗腫瘍性を著明に上昇させることができ、相乗効果が得られた。

LPS は、その毒性故に人体に用いる事は不適当¹⁶²⁾であるが、その他の BRM を併用する事は免疫学的治療の有用な手段と思われる。

以上本実験で得られた結果を踏まえ、肺胞マクロファージの抗腫瘍性の意義について考察してきた。癌特異抗原は存在したとしても強くないと考えられる事、また癌細胞集団は抗原的に不均一であることが想像され特異的エフェクターが十分に攻撃し得ない可能性があるがそれらの点においても非特異的に腫瘍細胞を攻撃するマクロファージを活性化させることは大きな意義があると考えられる。しかも本実験で得られた結果では発癌初期において既に抗腫瘍性を上昇させており、さらにマクロファージは BRM により抗腫瘍性を大きく増強する事が可能であり、また抗腫瘍効果は killer T-cell の 1/10 以下の数で発現することが *in vitro* の実験において認められているなど癌の免疫療法上有用であると思われる点は多い。ところが上述の如く、担癌個体のマクロファージは免疫に対し抑制的に働くこともあり、マクロファージの抗腫瘍性を上昇させる際には免疫抑制活性も含めた総合的な検討が必要である。また、免疫抑制活性は個体差が大きく、これを制御することは治療上大きな意味をもつと思われる⁵³⁾。

腫瘍免疫を学問的に推し進める上で必要不可欠であった同種同系動物の移植腫瘍であるが動物の可移植性モデルはヒトの自家癌と異なるという懷疑あるいは批判^{56, 59)}は根強く存在している。この批判は動物モデルのほとんどが化学発癌あるいはウイルス発癌の可移植モデルを用いられており宿主の免疫応答は人工的に導入された免疫原性に起因していると考えられ、一方ヒトにおいては自然発生自家癌であり免疫原性はないのが普通であるという考察に基づいている。本実験は化学発癌ではあるが移植腫瘍ではなく自家癌で、健常個体が癌腫の着生を許すに至る過程における変化を観察したものである。また、ヒトの癌は自然にはあるが化学物質によらないとは言いきれないであろう。また上述の如く免疫の低下する状態で癌の発生率が高い事実はヒト癌においても、やはり免疫原性の存在することを示している。BRM に対する反応に、ヒトにおいては high-responder と low-responder が混在している可能性があり、これらを同一対象として randomized trial を行っているためコントロール群との差がでにくいのではないかとする考え¹¹⁴⁾もあるがこのような反応の多様性は一系の近交系動物を用いた実験では捕えることはできない。自己、非自己という免疫学の基本的な概念に基づく実験を容易にした近交系

動物は様々な現象の解明に貢献し、また反応性も原則としてほとんど個体差がなく実験に用いる上で非常に有用である。しかしそれは逆に反応の多様性を表すことができないという側面をもつことに他ならず、双生児を除けばヒトは実験動物に例えるならば交雑種であることにも留意すべきであろう。本実験においてマクロファージのサプレッサー活性に大きな個体差が認められたことや、IFN γ の反応性に個体差が認められるなどの結果が得られたことは、近交系動物を用いた実験結果をヒトに適用する場合には注意が必要であることを示唆しているものと思われる。

以上筆者は、腫瘍免疫のエフェクター機構をより詳細に検討するため、重要なエフェクターと考えられるマクロファージについて担癌個体における機能を検討した。現在肺癌の発生率が高まりつつあるが、肺においてその防御機構の中心を担っていると考えられる肺胞マクロファージの抗腫瘍性を、現在なお免疫学的に不明の部分が多い発癌過程において、ヒトにより近い反応を示すと思われる交雑種である家兔を用いて検討した。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師・山木戸道郎教授に深甚なる謝意を表します。また多大の御支持、御鞭撻を戴いた上綱昭光医局長に深謝致します。また終始親身な御指導、および激励を下さいました石岡伸一博士に心から感謝致します。さらに多くの御助言を頂いた長谷川健司博士並びに広島大学医学部第二内科の各位に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第27回日本胸部疾患学会総会(1987年4月、東京)、第28回(1987年11月、大阪)、第29回(1988年10月、福岡)日本肺癌学会総会、The 10th Asia-Pacific Congress on Disease of the Chest(1987年11月、台北)、および第47回日本癌学会総会(1988年9月、東京)において発表したものである。

参 考 文 献

1. Akagawa, K. S. and Tokunaga, T. 1985. Lack of binding of bacterial lipopolysaccharide to mouse lung macrophages and restoration of binding by γ interferon. *J. Exp. Med.* 162:1444-1459.
2. Alföldy, P. and Lemmel, E. M. 1979. Reduction of nitroblue tetrazolium for functional evaluation of activated macrophages in the cell-mediated immune reaction. *Clin. Im-*

- munol. Immunopathol. 12:263-270.
3. **Aoki, J. and Johnson, P. A.** 1972. Suppression of Gross leukemia cell surface antigens. A kind of antigenic modulation. J. Natl. Cancer Inst. 49:183-192.
 4. **Auer, G., Ono, J., Nasiell, M., Caspersson, T., Kato, H., Konaka, C. and Hayata, Y.** 1982. Reversibility of bronchial cell atypia. Cancer Res. 42:4241-4247.
 5. **Auerbach, O., Saccomanno, G., Kuschner, M., Brown, R. D. and Garfinkel, L.** 1978. Histologic findings in the tracheobronchial tree of uranium miners and non-miners with lung cancer. Cancer 42:483-489.
 6. **Auerbach, O., Stout, A. P., Hammond, E. C. and Garfinkel, L.** 1961. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. N. Engl. J. Med. 265:253-267.
 7. **Auron, P. E., Webb, A. C. and Rosenwasser, L. J.** 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:7907-7909.
 8. **Barron, B. A. and Richart, R. M.** 1970. Statistical model of the natural history of cervical carcinoma. Estimates of the transition time from dysplasia to carcinoma in situ. J. Natl. Cancer Inst. 45:1025-1030.
 9. **Biozzi, G., Benacerra, B., Grumbach, F., Halpern, B. N., Levaditi, J. and Rist, N.** 1954. Etude de l'activite granulopexique du systeme reticulo-endothelial au cours de l'infection tuberculeuse experimentale de la souris. Ann. Inst. Pasteur 87:291-300.
 10. **Black, H. and Ackerman, L. V.** 1952. The importance of epidermoid carcinoma in situ in the histogenesis of carcinoma of the lung. Ann. Surg. 136:44-55.
 11. **Boraschi, D., Soldateschi, D. and Tagliabue, A.** 1982. Macrophage activation by interferon: dissociation between tumoricidal capacity and suppressive activity. Eur. J. Immunol. 12:320-326.
 12. **Bordignon, C., Avallone, R., Peri, G., Polentarutti, N., Mangioni, C. and Mantovani, A.** 1980. Cytotoxicity on tumour cells of human mononuclear phagocytes: defective tumoricidal capacity of alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol. 41:336-342.
 13. **Boyum, A.** 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21(Suppl):1-109.
 14. **Brain, J. D.** 1988. Lung macrophages: How many kinds are there? What do they do? Am. Rev. Resp. Dis. 137:507-509.
 15. **Burnet, M.** 1957. Cancer; a biological approach. Brit. Med. J. 1:779-847.
 16. **Cameron, R. B., McIntosh, J. K. and Rosenberg, S. A.** 1988. Synergistic antitumor effects of combination immunotherapy with recombinant interleukin-2 and a recombinant hybrid α -interferon in the treatment of established murine hepatic metastases. Cancer Res. 48:5810-5817.
 17. **Cantrell, E. T., Warr, G. A., Busbee, D. L. and Martin, R. R.** 1973. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in human pulmonary alveolar macrophages by cigarette smoking. J. Clin. Invest. 52:1881-1884.
 18. **Celada, A., Gray, P. W., Rinderknecht, E. and Schreiber, R. D.** 1984. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. J. Exp. Med. 160:55-74.
 19. **Chang, S. C.** 1957. Microscopic properties of whole mounts and sections of human bronchial epithelium of smokers and nonsmokers. Cancer 10:1246-1262.
 20. **Chang, Z. L., Bonvini, E., Varesio, L., Holden, H. T. and Herberman, R. B.** 1988. Differential *in vitro* modulation of suppressor and antitumor functions of mouse macrophages by lymphokines and/or endotoxin. Cell. Immunol. 114:282-292.
 21. 千原呉郎 1980. 癌と免疫増強—新しい宿主抵抗増強抗癌物質の開拓—。講談社, 東京。
 22. **Chow, D. A., Greene, M. I. and Greenberg, A. H.** 1979. Macrophage-dependent, NK-cell-independent "natural" surveillance of tumours in syngeneic mice. Int. J. Cancer 23:788-797.
 23. **Cohen, A. B. and Cline, M. J.** 1971. The human alveolar macrophage: isolation, cultivation *in vitro*, and studies of morphologic and functional characteristics. J. Clin. Invest. 50:1390-1392.
 24. **Cole, W. H.** 1976. Opening address: Spontaneous regression of cancer and the importance of finding its cause. Natl. Cancer Inst. Monogr. 44:5-9.
 25. **Crystal, R. G., Reynolds, H. Y. and Kalica, A. R.** 1986. Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. Chest 90:122-131.
 26. **Currie, G.** 1976. Immunological aspects of host resistance to the development and growth

- of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 135-165.
27. **Czerniecki, B., Gad, S. C., Reilly, C., Smith, A. C. and Witz, G.** 1986. Phorbol diacetate inhibits superoxide anion radical production and tumor promotion by mezerein. *Carcinogenesis* 7:1637-1641.
 28. **Davis, G. S., Giancola, M. S., Costanza, M. C. and Low, R. B.** 1982. Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:611-616.
 29. **Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L. and Gifford, G. E.** 1987. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J. Immunol.* 138:957-962.
 30. **Drath, D. B.** 1986. Modulation of pulmonary macrophage superoxide release and tumoricidal activity following activation by biological response modifiers. *Immunopharmacol.* 12:117-126.
 31. **Eccles, A. and Alexander, P.** 1974. Macrophage content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Nature* 250:667-669.
 32. 江川博彌 1982. 職業性 Mustard Gas 障害者における気管・気管支粘膜上皮の前癌性病変及び初期癌に関する病理組織学的研究. *広大医誌* 30:741-786.
 33. **Everson, T. C. and Cole, W. H.** 1966. A study and abstract of reports in the world medical literature and of personal communications concerning spontaneous regression of malignant disease. W. B. Saunders, Philadelphia.
 34. **Feinman, R., Henriksen-Destefano, D., Tsujimoto, M. and Vilcek, J.** 1987. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol.* 138:635-640.
 35. **Fialkow, P. J.** 1967. "Immunologic" oncogenesis. *Blood* 30:388-394.
 36. **Finley, T. H., Swenson, E. W., Curran, W. S., Huber, G. L. and Ladman, A. J.** 1977. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann. Intern. Med.* 66:651-658.
 37. **Foley, E. J.** 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13:835-837.
 38. **Fujii, T., Igarashi, T. and Kishimoto, S.** 1987. Significance of suppressor macrophages for immunosurveillance of Tumor-bearing mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 509-517.
 39. **Fujiwara, H. and Ellner, J. J.** 1986. Spontaneous production of a suppressor factor by the human macrophage-like cell line U937. 1. Suppression of interleukin 1, interleukin 2, and mitogen-induced blastogenesis in mouse thymocytes. *J. Immunol* 136:181-185.
 40. **Gangemi, J. D., Olsen, G. N., Fechter, C., Hightower, J. A., Bauguess, C. T. and Krech, L.** 1985. Phagocytic activity of alveolar macrophages in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 20:158-166.
 41. **Gatti, R. A. and Good, R. A.** 1971. Occurrence of malignancy in immuno deficiency diseases. *Cancer* 28:89-98.
 42. **Gauci, C. L.** 1976. The significance of the macrophage content of human tumors. *Rec. Adv. Cancer Res.* 56:122-124.
 43. **Ghezzi, P., Erroi, A., Acero, R., Salmona, M. and Mantovani, A.** 1987. Defective production of reactive oxygen intermediates by tumor-associated macrophages exposed to phorbol ester. *J. Leukocyte Biol.* 42:84-90.
 44. **Gifford, R. H. and Malawista, S. E.** 1970. A simple rapid micromethod for detecting chronic granulomatous disease of childhood. *J. Lab. Clin. Med.* 75:511-519.
 45. **Globerson, A. and Feldman, M.** 1964. Antigenic specificity of benzpyren induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 32:1229-1243.
 46. **Gmelig-Meyling, F. and Waldmann, T. A.** 1980. Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous percoll gradient. *J. Immunol. Methods* 33: 1-9.
 47. **Goodwin, J. S. and Webb, D. R.** 1980. Review. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15:106-122.
 48. **Graaf, P. W. D., Horak, E. and Bookman, M. A.** 1988. Adoptive immunotherapy of syngeneic murine leukemia is enhanced by the combination of recombinant IFN- γ and a tumor-specific cytotoxic T cell clone. *J. Immunol.* 140:2853-2857.
 49. **Greening, A. P. and Lowrie, D. B.** 1984. Profound depression of alveolar macrophage functions in bronchochial carcinoma. *Eur. J. Respir. Dis.* 65:373-376.
 50. **Gross, L.** 1943. Intradermal immunization of C3H mice against sarcoma that originated

- in animal of same line. *Cancer Res.* 3: 326-333.
51. **Gudewicz, P. W. and Sada, T. M.** 1977. Inhibition of phagocytosis and glucose metabolism of alveolar macrophages during pulmonary tumour growth. *Br. J. Cancer* 36: 670-677.
 52. **Hamlin, I.** 1968. Possible host resistance in carcinoma of breast. A histological study. *Br. J. Cancer* 22:383-385.
 53. **Harris, J. E. and Braun, D. P.** 1982. Suppressor cell development predicts for tumor recurrence in surgically resected lung cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 23: 989-991.
 54. **Hart, P. H., Whitty, G. A., Piccoli, D. S. and Hamilton, J. A.** 1988. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- γ . increased TNF- α but not IL-1 activity. *J. Immunol.* 141:1516-1521.
 55. 長谷川健司 1988. N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の気管内投与による実験的家兎肺門型肺癌の研究. 広大医誌 37: 15-46.
 56. **Hengst, J. C. D., Kan-Mitcell, J., Kepf, R. A., Strumpf, I. J., Sharma, O. P., Kortés, V. L. and Mitchell, M. S.** 1985. Correlation between cytotoxic and suppressor activities of human pulmonary alveolar macrophages. *Cancer Res.* 45:459-463.
 57. **Herberman, R. B., Munn, M. E. and Lavrin, D. H.** 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16:216-229.
 58. **Hewitt, H. B.** 1982. Point and counterpoint. animal tumor models and their relevance to human tumor immunology. *J. Biol. Resp. Modif.* 1:107-119.
 59. **Hewitt, H. B.** 1983. Second point: animal tumor models and their relevance to human tumor immunology. *J. Biol. Resp. Modif.* 2: 210-216.
 60. **Hibbs, J. B., Jr., Chapman, H. A., Jr. and Weinberg, J. B.** 1978. The macrophage as an antineoplastic surveillance cell: biological perspectives. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24:549-570.
 61. **Hibbs, J. B.** 1972. Control of carcinogenesis: A possible role for the activated macrophage. *Science* 177:998-1000.
 62. **Hibbs, J.** 1975. Activated macrophages as cytotoxic effector cells. I. Inhibition of specific and non-specific tumor resistance by trypan blue. *Transplantation* 19:77-81.
 63. **Hirao, F., Fujisawa, T., Tsubura, E., Akamatsu, Y. and Yamamura, Y.** 1968. Experimental lung cancer in rabbits induced by chemical carcinogens. *Gann* 59:497-505.
 64. **Holt, P. G.** 1980. Alveolar macrophages. 4. Interspecies differences in activity in proliferating lymphocyte cultures. *Cell Immunol.* 50:210-215.
 65. **Hoover, R. and Fraumeni, J.** 1973. Risk of cancer in renal-transplant recipients. *Lancet* 1973:55-57.
 66. **Hunninghake, G. W., Gadek, J. E., Kawanami, O., Ferrans, V. J. and Crystal, R. G.** 1979. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* 97:149-206.
 67. **Ide, G.** 1959. A comparison of the histopathology of tracheal and bronchial epithelium of smokers and nonsmokers. *Cancer* 12:473-484.
 68. **Jerrells, T. R., Dean, J. H., Richardson, G., Cannon, G. B. and Herberman, R. B.** 1979. Increased monocyte-mediated cytostasis of lymphoid cell lines in breast and lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 23: 768-776.
 69. **Johnson, W. J. and Balish, E.** 1981. Tumor-cytotoxic activity of resident rat macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 29: 369-379.
 70. 菅 典道, 戸部隆吉 1988. 痛補助療法としての LAK および CTL 療法. 外科治療 58: 529-536.
 71. **Kan-Mitchell, J., Hengst, J. C. D., Kempf, R. A., Rothbart, R. K., Simous, S. M., Brooker, A. S., Kortés, V. L. and Mitchell, M. S.** 1985. Cytotoxic activity of human pulmonary alveolar macrophages. *Cancer Res.* 45:453-458.
 72. 蟹沢成好 1988. 肺癌の動物モデル. 過去・現在と将来への展望. 医学のあゆみ 145: 40.
 73. 片岡達治 1986. 6-mercaptopyrin による免疫抑制性マクロファージの除去とその意義. 癌と医学療法 13: 701-705.
 74. **Keller, R. and Keist, R.** 1986. Induction, maintenance, and reinduction of tumoricidal activity in bone-marrow-derived mononuclear phagocytes by macrophage-activating lymphokines. *Cell Immunol.* 101:659-666.
 75. **Keller, R.** 1973. Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells *in vitro* by

- nonspecifically activated macrophages. *J. Exp. Med.* 138:625-644.
76. Keller, R. 1976. Promotion of growth *in vivo* by antimacrophage agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 57:1355-1361.
77. Kelly, C. A., Fenwick, J. D., Corris, P. A., Fleetwood, A. Hendrick, D. J. and Walters, E. H. 1988. Fluid dynamics during bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:81-84.
78. 菊池浩吉, 珠玖 洋 1987. がん免疫—今日の課題と展望—. *Med. Immunol.* 14:737-747.
79. Klein, E. and Sjogren, H. O. 1960. Humoral and cellular factors in homograft and isograft immunity against sarcoma cells. *Cancer Res.* 20:452-461.
80. Kuda, T., Yasumoto, K., Yano, T., Nakahashi, H., Sugimachi, K. and Nomoto, K. 1987. Role of antitumor activity of alveolar macrophages in lung cancer patients. *Cancer Res.* 47:2199-2202.
81. 畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直 (編) 1983. 新免疫学叢書 11. マクロファージ. 医学書院, 東京.
82. Lauder, I., Aherne, W., Steward, J. and Sainsbury, R. 1977. Macrophage infiltration of breast tumors: A prospective study. *J. Clin. Pathol.* 30:563-568.
83. Lawrence, E. C., Blaise, R. M., Martin, R. R. and Stevens, P. M. 1978. Immunoglobulin secreting cells in normal human bronchial lavage. *J. Clin. Invest.* 62:832-835.
84. Lemarbre, P., Hoidal, J., Vesella, R. and Rinehart, J. 1980. Human pulmonary macrophage tumor cell cytotoxicity. *Blood* 55:612-617.
85. Levy, M. H. and Wheelock, E. F. 1974. The role of macrophages in defense against neoplastic disease. *Adv. Cancer Res.* 20:131-163.
86. Low, R. B., Davis, G. and Giancola, M. S. 1978. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of normal healthy volunteers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118:863-875.
87. Mace, K. F., Ehrke, M. J., Hori, K., Maccubbin, D. L. and Mihich, E. 1988. Role of tumor necrosis factor in macrophage activation and tumoricidal activity. *Cancer Res.* 48:5427-5432.
88. Maguire, H., Jr., Outzen, H. C., Custer, R. P. and Prehn, R. T. 1976. Brief communication: Invasion and metastasis of a xenogeneic tumor in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 57:439-442.
89. Mantovani, A., Shavit, Z. B., Peri, G., Polentarutti, N., Bordignon, C., Sessa, C. and Mangioni, C. 1980. Natural cytotoxicity on tumour cells of human macrophages obtained from diverse anatomical sites. *Clin. Exp. Immunol.* 39:776-784.
90. Martin, F., Olsson, N. O. and Jeannin, J. F. 1981. Effects of agents that modify microtubules and microfilaments (vinblastine, colchicine, and cytochalasin B) on macrophage-mediated cytotoxicity to tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 10:113-119.
91. Mashiba, H., Matsunaga, K., Yagawa, K., Nomura, Y., Yoshinaga, H., Furusawa, M. and Jimi, S. 1981. Elevated cytostatic activity of monocytes from cancer patients. *Gann* 72:848-853.
92. Mathe, G., Amiel, J., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattani, A. and Schlumberger, J. R. 1969. Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1:697-699.
93. Matis, L. A., Shu, S., Groves, E. S., Zinn, S., Chou, T., Kruisbeek, A. M., Rosenstein, M. and Rosenberg, S. A. 1986. Adoptive immunotherapy of a syngeneic murine leukemia with a tumor-specific cytotoxic T cell clone and recombinant human interleukin 2: correlation with clonal IL2 receptor expression. *J. Immunol.* 136:3496-3501.
94. 松阪 茂, 柳田実郎, 保澤総一郎, 行武正力, 岸本圭子, 小泊直美, 山木戸道郎, 西本幸男 1984. イースト粒子を用いた単球貪食能測定の基礎的検討. *広島医学* 37:949-952.
95. Mauderly, J. L. 1977. Bronchopulmonary lavage of small laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.* 27:255-261.
96. Meltzer, M. S. 1981. Macrophages activation for tumor cytotoxicity: characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* 127:179-181.
97. Merrill, W. W., Goodenberger, D., Strober, W., Matthay, R. A., Naegel, G. P. and Reynolds, H. Y. 1980. Free secretory component and other proteins in human lung lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122:156-161.
98. Merrill, W. W., Naegel, G. P. and Reynolds, H. Y. 1980. Reagenic antibody in the lung lining fluid: analysis of normal human bronchoalveolar lavage IgE and comparison to immunoglobulins G and A. *J. Lab.*

- Clin. Med. 96:494-500.
99. **Merrill, W. W., O'hearn, E., Rankin, J., Naegel, G., Matthay, R. A. and Reynolds, H. Y.** 1982. Kinetic analysis of respiratory tract proteins recovered during a sequential lavage protocol. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:617-620.
 100. **宮下正夫, 笹島耕二, 松倉則夫, 増井 徹, Lechner, J. F. and Harris, C. C.** 1988. ヒト気管支上皮細胞の培養と機能. (2)発癌機構の解明のために. *呼吸* 7:1152-1156.
 101. **Mizel, S. B., Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. L.** 1978. Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the macrophage cell line, P388D. I. Enhancement of LAF production by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 122:2112-2114.
 102. **Monick, M., Glazier, J. and Hunninghake, G. W.** 1987. Human alveolar macrophages suppress interleukin-1 (IL-1) activity via the secretion of prostaglandin E. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:72-77.
 103. **森田豊彦** 1972. 気管支粘膜上皮の増殖および化生性変化の病理組織学的研究—肺癌発生に関する考察—. *癌の臨床* 18:398-411.
 104. **Morton, D. L., Silber, F. R. and Holmes, E. C.** 1974. BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. *Ann. Surg.* 180:635-641.
 105. **Murray, J. L., Springle, C. and Ishmael, D. R.** 1981. Adherent indomethacin-sensitive suppressor cells in malignant melanoma correlation with clinical status. *Cancer Immunol. Immunother.* 11:165-172.
 106. **Myrvik, Q. N., Leaks, E. S. and Fariss, B.** 1961. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* 86:128-132.
 107. **Mytar, B., Zembala, M., Uracz, W. and Czupryna, A.** 1982. Cytostatic activity on tumour cells of monocytes from patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 13:190-193.
 108. **Nakahashi, H., Yasumoto, K., Nagashima, A., Yaita, H., Takeo, S., Motohiro, A., Furukawa, T., Inokuchi, K. and Nomoto, K.** 1984. Antitumor activity of macrophages in lung-cancer patients with special reference to location of macrophages. *Cancer Res.* 44:5906-5909.
 109. **Nakajima, H., Fujiwara, H., Takaki, Y., Izumi, Y., Sano, S., Tsuchida, T. and Hamaoka, T.** 1985. Studies on macrophage-activating factor (MAF) in antitumor immune responses. I. tumor-specific lyt-1+2- T cells are required for producing MAF able to generate cytolytic as well as cytostatic macrophages. *J. Immunol.* 135:2199-2205.
 110. **中田安成** 1982. 末梢血単球機能検査法と臨床的意義. *臨床病理* 30:734-741.
 111. **日本細菌学会教育委員会 (編)** 1985. 細菌学技術叢書 5: マクロファージの機能と機能測定法—新しいマクロファージの免疫生物学—. 菜根出版, 東京.
 112. **Nii, A., Sone, S., Utsugi, T., Yanagawa, H. and Ogura, T.** 1988. Up- and down-regulation of human lymphokine (IL-2)-activated killer cell induction by monocytes, depending on their functional state. *Int. J. Cancer* 41:33-40.
 113. **越智崇文** 1988. 発癌プロモーターとフリーラジカル. *組織培養* 14:137-142.
 114. **落合武徳** 1985. 癌免疫療法の臨床応用とその問題点. *免疫薬理* 3:161-166.
 115. **小原 保, 吉田孝人 (訳)** 1977. 癌と免疫応答. 近代出版, 東京.
 116. **大塚盛男, 渡辺 宏, 吉澤靖之, 木村敬二郎, 長谷川 堯, 福田 潔, 亀山昌明, 長谷川鎮雄** 1985. ヒト肺胞マクロファージの補助細胞機能に関する研究. *日胸疾会誌* 23:521-527.
 117. **岡野昌彦, 佐藤篤彦** 1988. 各種呼吸器疾患における肺胞マクロファージの NBT (Nitroblue tetrazolium dye) 還元能に関する研究. *気管支学* 10:140-147.
 118. **Oldham, R. K.** 1982. Biological response modifiers program. *J. Biol. Resp. Modif.* 1:81-100.
 119. **Pace, J. L., Russell, S. W., Torres, B. A., Johnson, H. M. and Gray, P. W.** 1983. Recombinant mouse γ interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* 130:2011-2013.
 120. **Pace, J. L., Varesio, L., Russell, S. W. and Blasi, E.** 1985. The strain of mouse and assay conditions influence whether $\text{muIFN-}\gamma$ primes or activates macrophages for tumor cell killing. *J. Leukocyte Biol.* 37:475-479.
 121. **Penn, I., Hammond, W., Brettschneider, L. and Starzl, T. E.** 1969. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Trasplant. Proc.* 1:106-112.
 122. **Penn, I. and Starzl, T. E.** 1972. Malignant tumors arising de novo in immunosup-

- pressed organ transplant recipients. *Transplantation* 14:407-417.
123. **Penn, I.** 1974. Occurrence of cancer in immune deficiencies. *Cancer* 34:858-866.
 124. **Penline, K. J. and Herscowitz, H. B.** 1981. Dual role for alveolar macrophages in humoral and cell-mediated immune responses: evidence for suppressor and enhancing functions. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30:205-217.
 125. **Petoft, H., Johnsson, A., Warmegard, B. and Seljelid, R.** 1980. Separation of human monocytes on density gradients of percoll. *J. Immunol. Methods* 33:221-229.
 126. **Philip, R.** 1988. Cytolysis of tumor necrosis factor (TNF)-resistant tumor targets differential cytotoxicity of monocytes activated by the interferons, IL-2 and TNF. *J. Immunol.* 140:1345-1349.
 127. **Prhn, R. P. and Main, J. M.** 1957. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18:769-778.
 128. **Pretell, J. O. and Falchuk, Z. M.** 1986. Generation of suppressor macrophages during the human autologous mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 65:158-164.
 129. **Rennard, S. I., Basset, G., Lecossier, D., O'donnell, K. M., Pinkston, P., Martin, P. G. and Crystal, R. G.** 1985. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *Am. Physiol. Society* 532-538.
 130. **Reynolds, H. Y.** 1987. Bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:250-263.
 131. **Richart, R. M.** 1973. Cervical intraepithelial neoplasia., p. 301-328. *In* S. C. Sommers (ed.), *Pathology annual.*, Appleton-Century-Croft, New York.
 132. **Rinehart, J., Lange, P., Gormus, B. J. and Kaplan, M. E.** Human monocyte induced tumor cell cytotoxicity. *Blood.* 52: 211-220.
 133. **Rinehart, J. J., Vesella, R., Lange, P. and Gormus, B. J.** 1979. Characterization and comparison of human monocyte and macrophage-induced tumor cell cytotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 93:361-369.
 134. **Robinson, B. W. S., Pinkston, P. and Crystal, R. G.** 1984. Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent. *J. Clin. Invest.* 74: 942-950.
 135. **Rosembrg, S. A., Spiess, P. and Lafreniere, R.** 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321.
 136. **Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skiber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. and Reichert, C. M.** 1985. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313:1485-1492.
 137. **Ruggiero, V. and Baglioni, C.** 1987. Synergistic anti-proliferative activity of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 138:661-663.
 138. **Saccomanno, G., Archer, V. E., Auerbach, O., Saunders, R. P. and Brennan, L. M.** 1974. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 33:256-270.
 139. 西篠長宏 1984. Biological Response Modifier. 概論と分類, 臨床評価. *日本臨床 (秋期臨時増刊号)* 42: 572-579.
 140. 坂垣 博, 大倉永浩, 伊東昭吾, 北村佐三郎 (訳) 1978. 家兔の解剖学および生理学, 生化学, p. 71-102. 実験用ウサギの生物学. 文永堂, 東京.
 141. 阪本晴彦 1981. Percoll を使用した単球の分離. 免疫実験操作法 VI: 3289-3293.
 142. 笹島耕二, 宮下正夫, **Harris, C. C., Lechner, J. F.** 1988. ヒト気管支上皮細胞の培養と機能.(1)培養法と増殖・分化. *呼吸* 7: 1044-1049.
 143. **Schmartz, R. H.** 1984. The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. p. 379-438. *In* W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York.
 144. **Schreiber, H., Saccomanno, G., Martin, D. H. and Brennan, L.** 1974. Sequential cytological changes during development of respiratory tract tumors induced in hamsters by benzo(a)pyrene-ferric oxide. *Cancer Res.* 34:689-698.
 145. **Schultz, R. M.** 1981. Factors limiting tumoricidal function of interferon-induced effector systems; activated macrophages and natural killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 10:61-66.
 146. 仙波まり 1988. *In Vitro* 発癌プロモーションにおける活性酸素の役割. *組織培養* 14: 149-152.
 147. **Shellito, J. and Murphy, S.** 1980. The ef-

- fect of experimental acid aspiration on alveolar macrophage function in rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122:551-560.
148. 島田久夫, 安岡 劭, 中山 正, 石見寿康, 後東俊博, 河野知弘, 福島和文, 尾崎敏夫, 螺良英郎 1981. ヒト肺胞マクロファージの NBT 還元能と貪食能. *日胸疾会誌* 19:162-169.
 149. 下里幸雄 1983. 肺癌: その組織発生, 分化, 予後因子について. *日病理会誌* 72:29-57.
 150. Slaga, T. J., Klein-Szanto, A. J. R., Triplett, L. L. and Yotti, L. P. 1981. Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science* 213:1023-1024.
 151. Sone, S. and Fidler, I. J. 1981. Activation of rat alveolar macrophages to the tumoricidal state in the presence of progressively growing pulmonary metastases. *Cancer Res.* 41:2401-2406.
 152. Sone, S. and Fidler, I. J. 1981. *In vitro* activation of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages by synthetic muramyl dipeptide encapsulated in liposomes. *Cell. Immunol.* 57:42-50.
 153. Sone, S. and Fidler, I. J. 1982. In situ activation of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages and rejection of experimental lung metastases by intravenous injections of *Nocardia rubra* cell wall skeleton. *Cancer Immunol. Immunother.* 12:203-209.
 154. Sone, S., Moriguchi, S., Shimizu, E., Ogushi, F. and Tsubura, E. 1982. *In vitro* generation of tumoricidal properties in human alveolar macrophages following interaction with endotoxin. *Cancer Res.* 42:2227-2231.
 155. Sone, S., Pollack, V. A. and Fidler, I. J. 1980. Direct activation of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages by *Nocardia rubra* cell wall skeleton. *Cancer Immunol. Immunother.* 9:227-232.
 156. Sone, S., Utsugi, T., Nii, A. and Ogura, T. 1987. Effects of human alveolar macrophages on the induction of lymphokine (IL-2)-activated killer cells. *J. Immunol.* 139:29-34.
 157. 曾根三郎, 螺良英郎 1984. 肺胞マクロファージの抗腫瘍活性とその意義. *呼吸* 3:118-125.
 158. Sone, S. 1986. Role of alveolar macrophages in pulmonary neoplasias. *Biochim. Biophys. Acta* 823:227-245.
 159. Stutman, O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183:534-536.
 160. Stutman, O. 1975. Immunodepression and malignancy. *Adv. Cancer Res.* 22:261-423.
 161. Swinburne, S., Moore, M. and Cole, P. 1982. Human bronchoalveolar macrophage cytotoxicity for cultured human lung-tumour cells. *Br. J. Cancer* 46:625-634.
 162. 高田春比古 1988. LPS の免疫毒性一特に致死毒性について一. *免疫薬理* 6:139-146.
 163. Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302:24-26.
 164. Thomassen, M. J., Wiedemann, H. P., Barna, B. P., Farmer, M. and Ahmad, M. 1988. Induction of *in vitro* tumoricidal activity in alveolar macrophages and monocytes from patients with lung cancer. *Cancer Res.* 48:3949-3953.
 165. Ting, C. C. and Zhang, S. R. 1983. Studies on mechanisms for the induction of *in vivo* tumor immunity. VII. Development of specific antitumor in progressors and regressors. *Int. J. Cancer* 32:385-391.
 166. 徳永 徹 1986. マクロファージ. 講談社, 東京.
 167. 徳永 徹 1977. 癌免疫とマクロファージ. 代謝 14:1559-1568.
 168. 徳永 徹 1983. 癌患者の免疫応答. ヒトの癌とマクロファージ. 免疫と疾患 5:29-34.
 169. 螺良英郎, 香西勝人 1978. NBT テスト. 感染症学雑誌 52:517-520.
 170. Tsunawaki, S. and Nathan, C. F. 1986. Macrophage deactivation: Altered kinetic properties of superoxide-producing enzyme after exposure to tumor cell-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 164:1319-1331.
 171. Turner-Warwick, M. and Haslam, P. L. 1987. The value of serial bronchoalveolar lavages in assessing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:26-34.
 172. Unsgaard, G., Hammerstrom, J. and Lamvik, J. 1982. Dissociation between tumour cell cytostatic and immunosuppressive capacity of human monocytes activated with lymphokines. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C.* 90:73-79.
 173. van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G. and Langevoort, H. L. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new

- classification of macrophage phagocytosis. J. Reticuloendothel. Soc. 29:307-319.
174. **van Oud, Alblas, A. B. and van Furth, R.** 1979. Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. J. Exp. Med. 149:1504-1518.
175. **WHO.** Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). WHO/CDC case definition for AIDS. Weekly Epidemiological Report No. 10.
176. **Weissler, J. C., Lipscomb, M. F., Lem, V. M. and Toews, G. B.** 1986. Tumor killing by human alveolar macrophages and blood monocytes. Am. Rev. Respir. Dis. 134: 532-537.
177. **Woglom, W. H.** 1929. Immunity to transplantable tumors. Cancer Rev. 4: 129-214.
178. **Yanagawa, E., Yasumoto, K., Manabe, H., Nagano, N., Hirota, N., Ohta, M., Hattori, T., Nomoto, K. i, Azuma, I. and Yamamura, Y.** 1979. Cytostatic activity of peripheral blood monocytes against bronchogenic carcinoma cells in patients with lung cancer. Gann 70:533-539.
179. **Zembala, M., Lemmel, E. M. and Uracz, W.** 1980. Activation of human monocytes for nitroblue tetrazolium reduction and the suppression of lymphocyte response to mitogens. Clin. Exp. Immunol. 41:309-316.

Experimental Studies on Antitumor Activity of Rabbit Alveolar Macrophages during Carcinogenesis

Yasuyuki YOKOSAKI

Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Michio YAMAKIDO)

To examine the effects of carcinogenesis on the antitumor activity of alveolar macrophages, MNU was instilled into the rabbit bronchus to produce cancer, and changes in rabbits were observed for the next 24 weeks. Alveolar samples were collected by bronchofiberscopic BAL (Bronchoalveolar lavage), which does not require animal sacrifice. Although BAL itself causes changes in the lung, it was confirmed an interval of two weeks allows BAL to be performed serially.

Significant changes with time in the total cell count and differential cell count in BALF (Bronchoalveolar lavage fluid) were not seen. Functions of PAM were as follows: cytostatic activity increased progressively, phagocytosis gradually decreased, and both showed significant differences from pre-values. No significant change with time was noted in the NBT reduction. Suppressor activity increased with time in some rabbits, and showed a significant correlation with cytostatic activity.

The *in vitro* effect of BRMs on the cytostatic activity of alveolar macrophage was also studied. LPS potentiated the cytostatic activity against each of 3 kinds of target cells, while N-CWS, IFN and TNF each potentiated activity partially. When these were used in combinations, synergistic effects were observed between LPS and IFN, between N-CWS and IFN and between TNF and N-CWS.