

図 3 7. 漢方成分 No. 16 投与による担がんマウスの Treg 細胞への効果

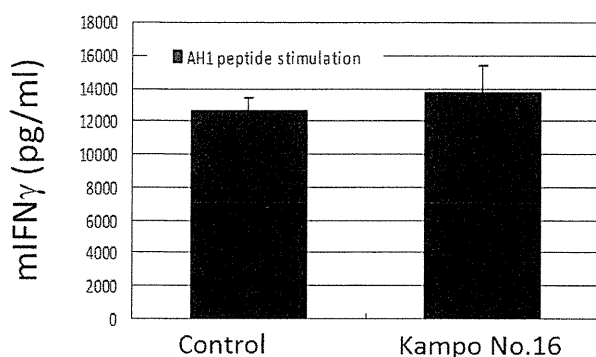


図 3 8. 漢方成分 No. 16 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 3) 漢方成分 No. 17

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 17 の細胞毒性を確認した。CT26 細胞に対しては 10 μ M の漢方成分 No. 17 溶液が有意に細胞傷害性を示し、健常マウス脾細胞に対しても 3.33-10 μ M の濃度範囲で細胞傷害性が確認された (図 3 9)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 17 の作用を調べた (図 3 9)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、10 μ M の濃度で増殖抑制を生じた。また、健常マウス脾臓細胞に対しては 0.123-10 μ M の濃度依存的に有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 17 液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 4 0 a)。

漢方成分 No. 17 溶液投与群の担がんマウスは対照群と比較して漢方成分の投与開始早期から有意ではないものの、腫瘍の増大を抑制する傾向が見られた (図 4 0 b)。

脾臓の重量は漢方成分 No. 17 溶液投与群が軽く、小さい傾向が見られた (図 4 1)。移植 2 4 日目の腫瘍の重量は漢方成分 No. 17 溶液投与群が有意に軽く、また腫瘍重量の増大を抑制していることが明らかとなった (図 4 1)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。脾臓や、鼠径リンパ節では差が認められないものの、腫瘍中で $CD8^+$ T細胞の割合が増加する傾向が見られた (図 4 2)。また、NK T細胞、Treg 細胞頻度も解析を行ったが抗腫瘍免疫の増強を示す結果は見られなかった (図 4 2、図 4 3)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する $IFN\gamma$ を ELISA 法により測定した。溶液投与群は対照群と比較し、 $IFN\gamma$ 産生量が減少する傾向が見られた (図 4 5)。

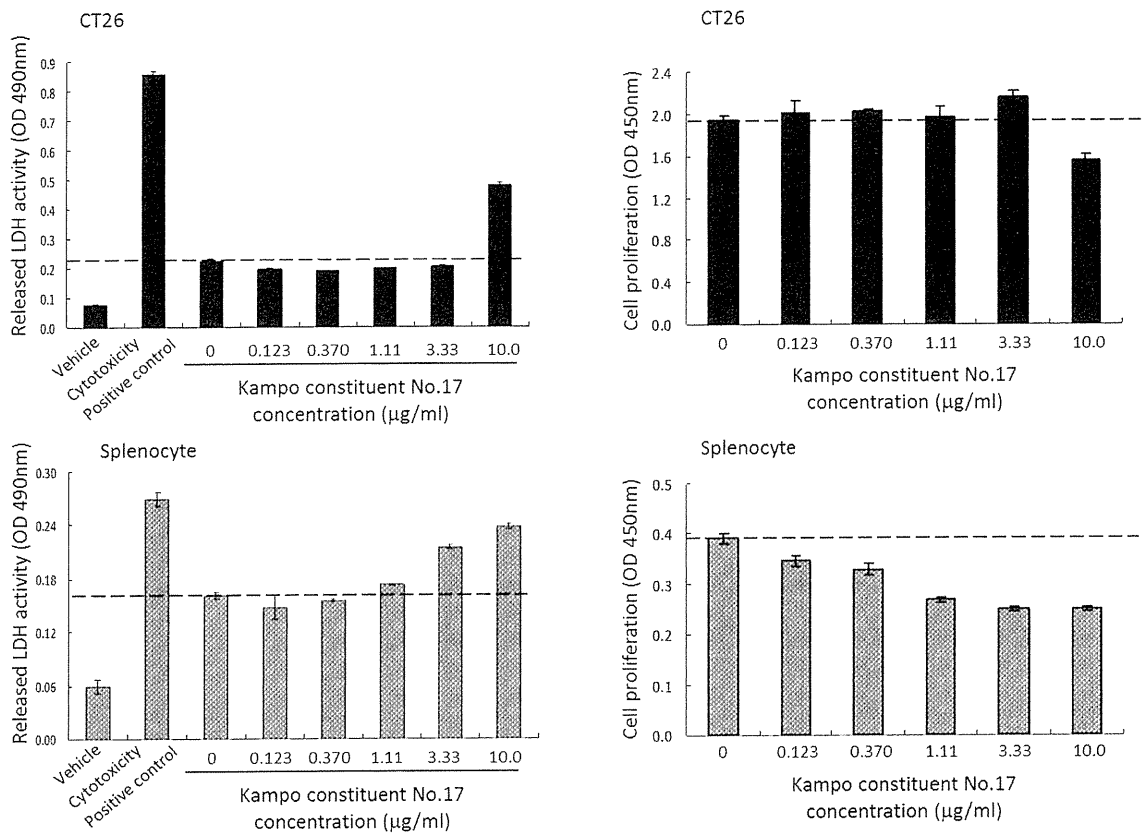


図 3 9. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 17 の影響

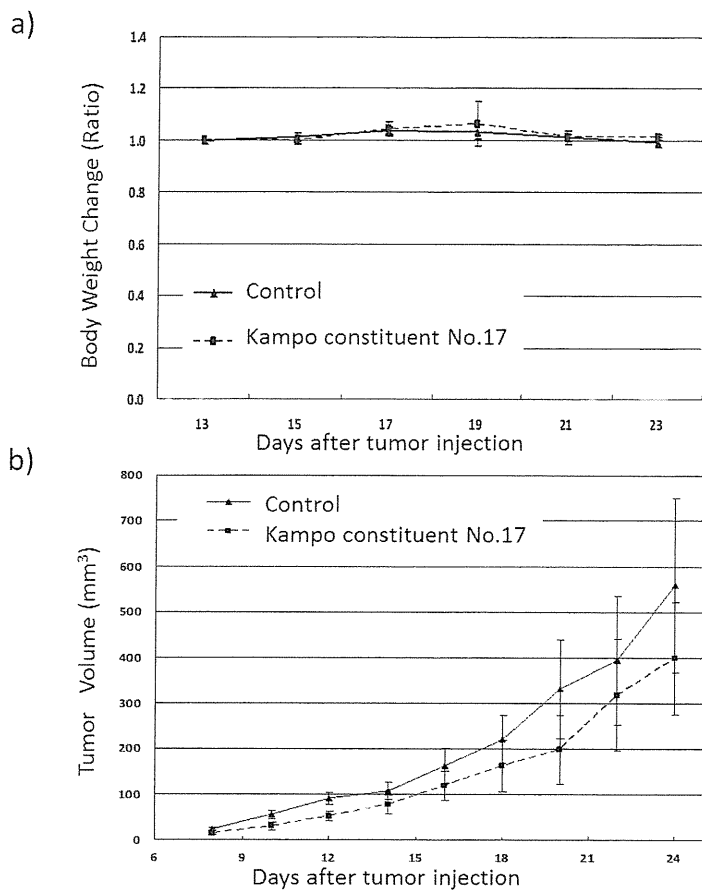


図 4 0 . 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

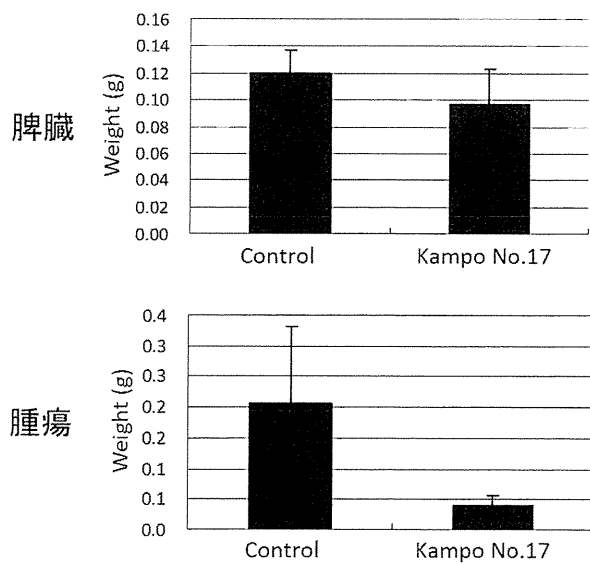


図 4 1 . 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスの脾臓および腫瘍への影響

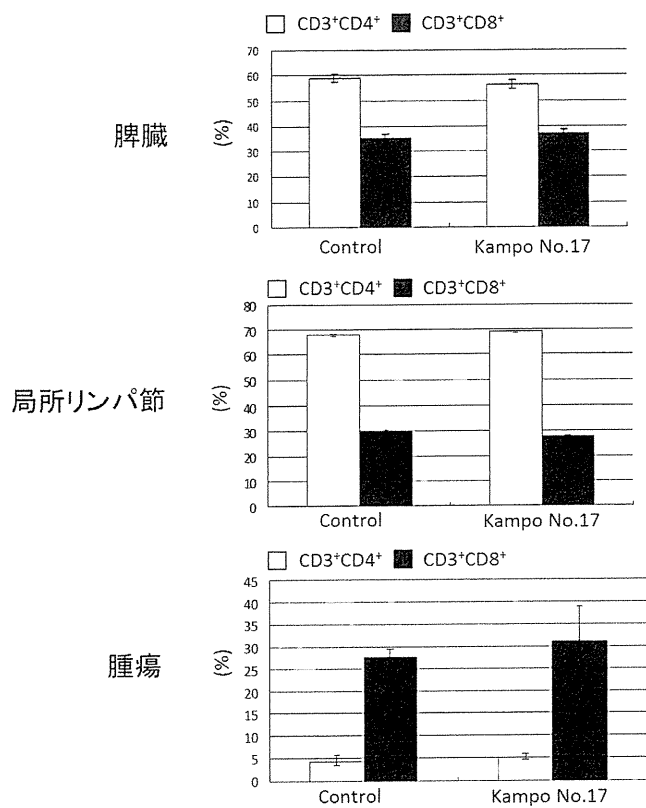


図 4 2. 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

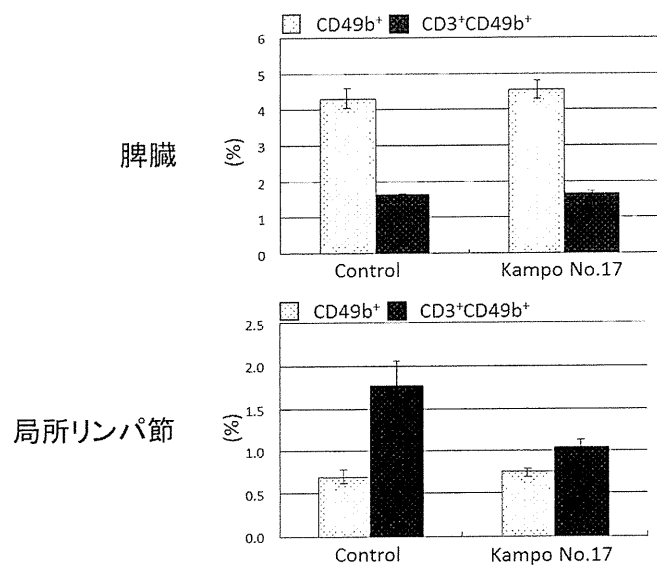


図 4 3. 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスの NK/NKT 細胞への効果

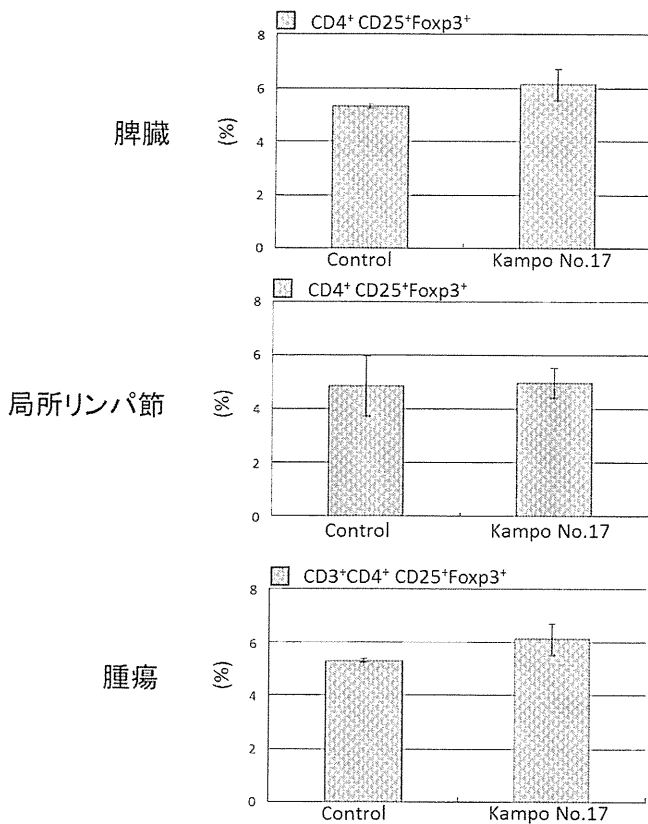


図 4 4. 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスの Treg 細胞への効果

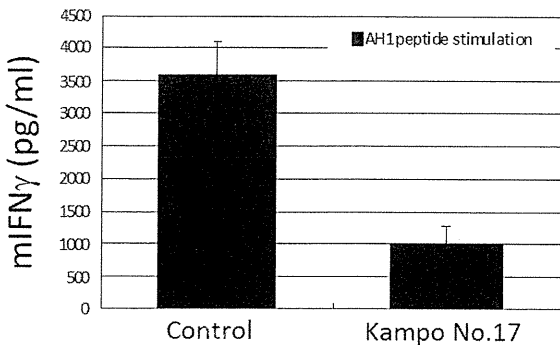


図 4 5. 漢方成分 No. 17 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 4) 漢方成分 No. 23

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 23 の細胞毒性を確認した。CT26 細胞に対しては漢方成分 No. 23 溶液 0.123-10 μ M の濃度範囲で細胞毒性は見られなかった。しかしながら、健常マウス脾細胞に対しては 3.33-10 μ M の濃度範囲で細胞傷害性が確認された (図 4 6)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 23 の作用を調べた (図 4 6)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10 μ M の濃度範囲の漢方成分 No. 23 溶液では増殖抑制を生じることはなかったが、健常マウス脾臓細胞に対しては 10 μ M の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 23 溶液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 4 7 a)。

漢方成分 No. 23 溶液投与群の担がんマウスは対照群と比較して漢方成分の投与開始早期から有意ではないものの、腫瘍の増大を抑制する傾向が見られた (図 4 7 b)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。脾臓や、腫瘍近傍の鼠径リンパ節で

は差が認められないものの、腫瘍中で CD4⁺T細胞の割合が有意に増加していた (図 4 8)。また、抗腫瘍免疫を担うNK細胞、NK T細胞が局所リンパ節で頻度が増加していた (図 4 9)。Treg 細胞頻度はどの臓器においても差が見られなかった (図 5 0)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN γ を ELISA 法により測定した。漢方成分 No. 23 溶液投与群は対照群と比較し、IFN γ 産生量が有意に増加した (図 5 1)。

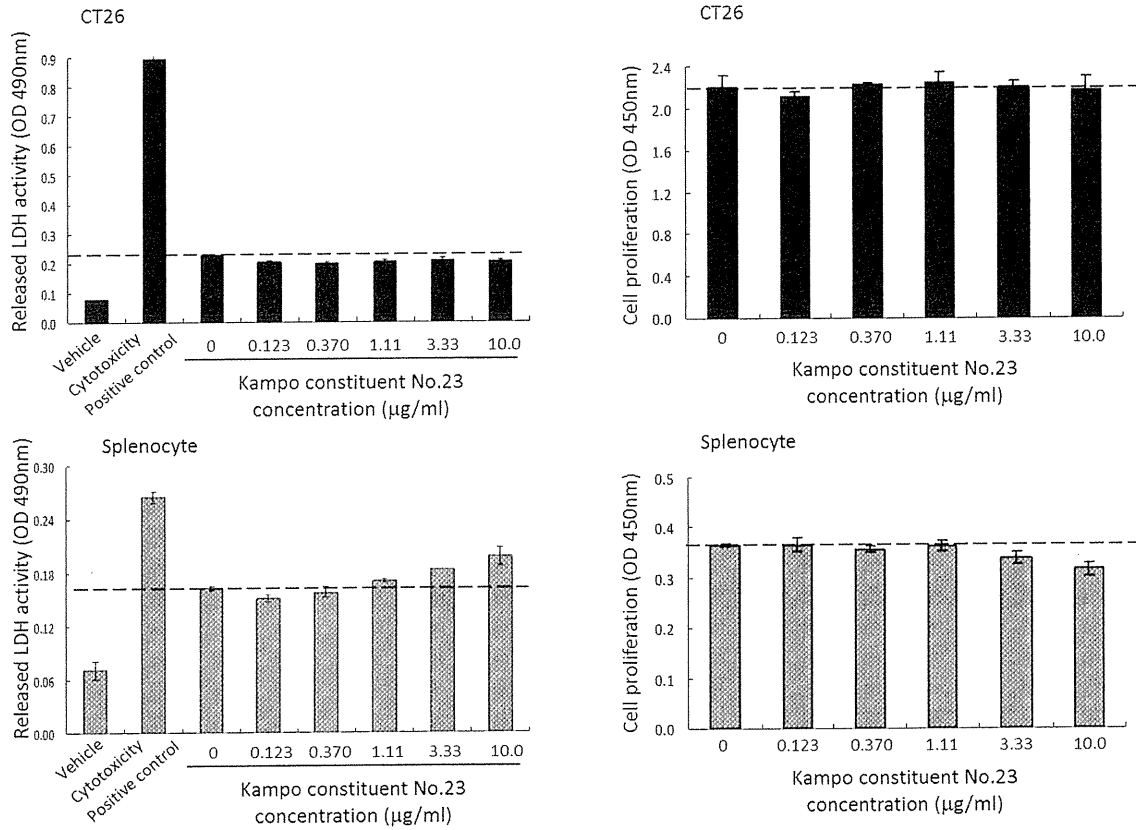


図 4 6. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 23 の影響

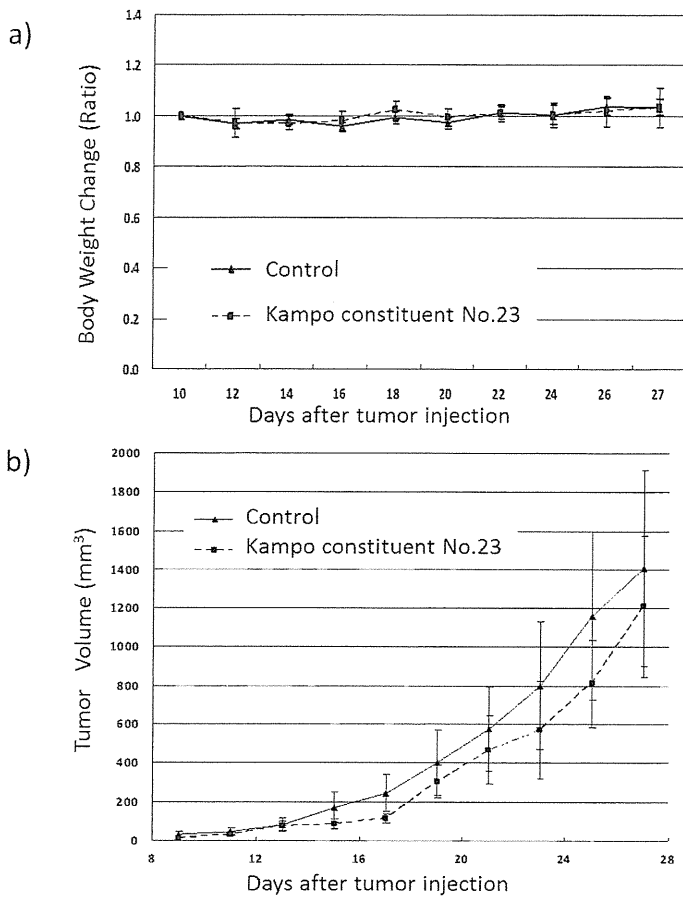


図 4.7. 漢方成分 No. 23 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

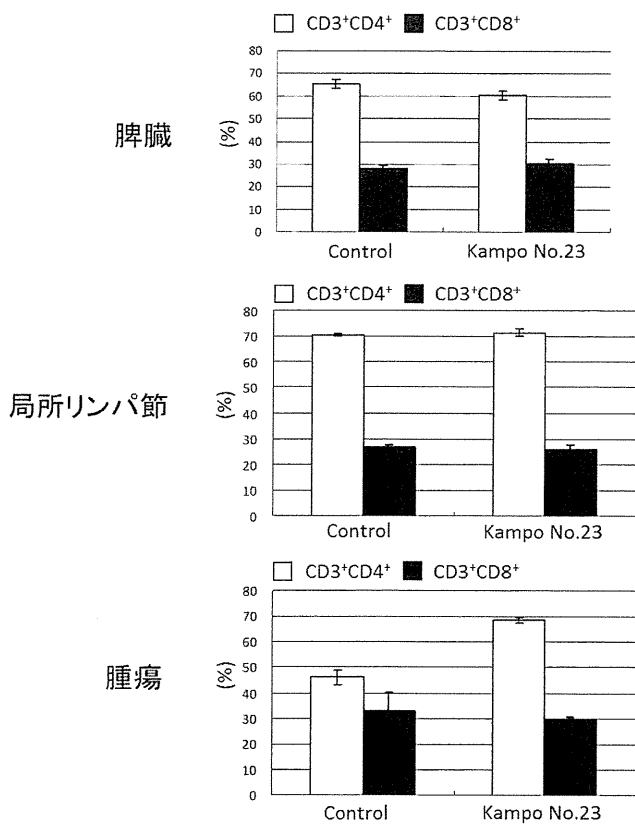


図 4.8. 漢方成分 No. 23 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

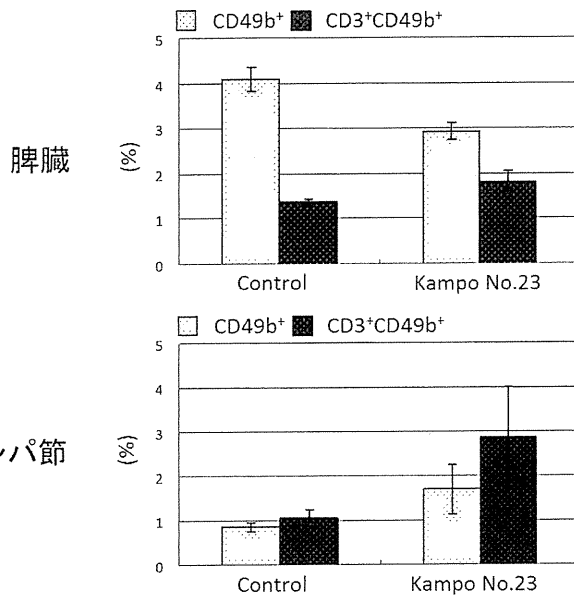


図 4 9. 漢方成分 No. 23 投与による担がんマウスの NK/NKT 細胞への効果

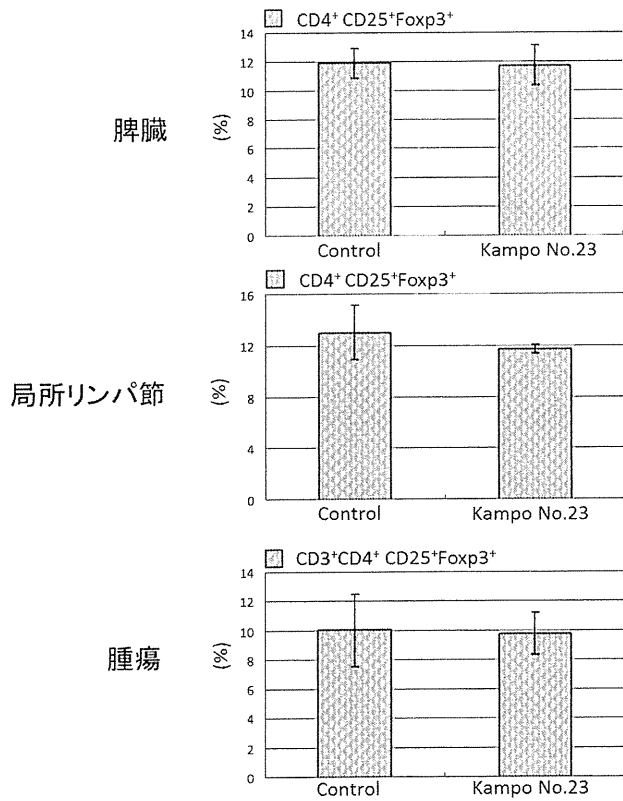


図 5 0. 漢方成分 No. 23 投与による担がんマウスの Treg 細胞への効果

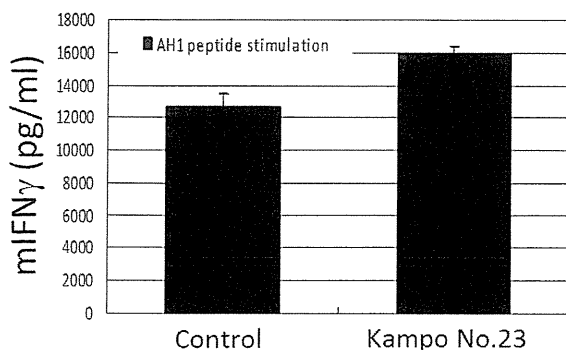


図 5 1. 漢方成分 No. 23 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 5) 漢方成分 No. 24

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 24 の細胞毒性を確認した。CT26 細胞に対しては漢方成分 No. 24 溶液 0.123-10 μ M の濃度範囲で細胞毒性は見られなかった。しかしながら、健常マウス脾細胞に対しては 10 μ M の濃度範囲で細胞傷害性が確認された (図 5 2)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 24 の作用を調べた (図 5 2)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10 μ M の濃度範囲の漢方成分 No. 24 溶液では増殖抑制を生じることにはなかったが、健常マウス脾臓細胞に対しては 3.33-10 μ M の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 24 溶液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 5 3 a)。

漢方成分 No. 24 溶液投与した担がんマウスは対照群と比較して漢方成分の投与開始早期から腫瘍径の増大を有意に抑制した (図 5 3 b)。

脾臓の重量は対照群と比較して漢方成分 No. 24 溶液投与群が重く大きい傾向が認められた。一方で腫瘍の重量は対照群と比較して、軽く小さい傾向であった。これにより、重量からも腫瘍の増大を抑制していることが明らかとなった (図 5 4)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。脾臓中で CD8⁺T 細胞の割合がわずかに増加するが腫瘍で CD8⁺T 細胞の割合が減少する傾向がみられ (図 5 5)、脾臓中で NKT 細胞頻度が増加するが局所リンパ節では減少する傾向が見られた (図 5 6)。また腫瘍中の Treg 細胞頻度が減少する傾向が見られた (図 5 7)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN γ を ELISA 法により測定した。漢方成分 No. 24 溶液投与群は対照群と比較し、IFN γ 産生量が有意に増加した (図 5 8)。

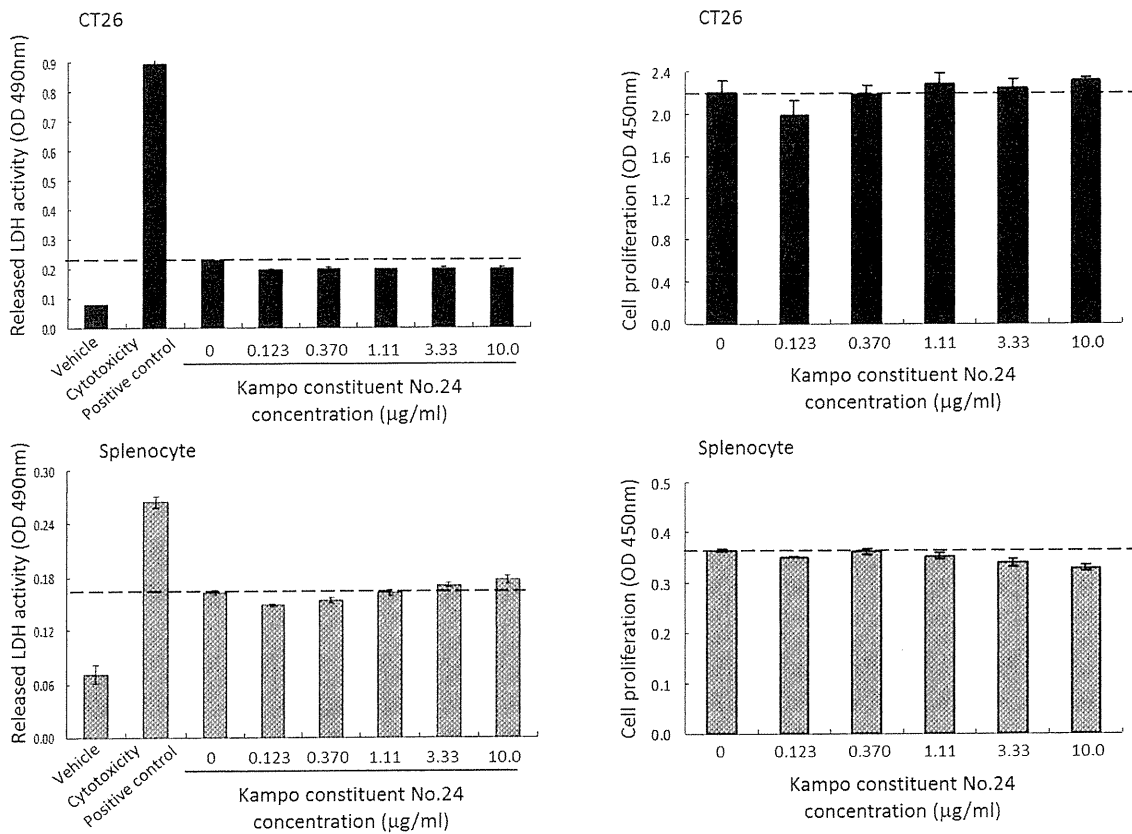


図 5.2. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 24 の影響

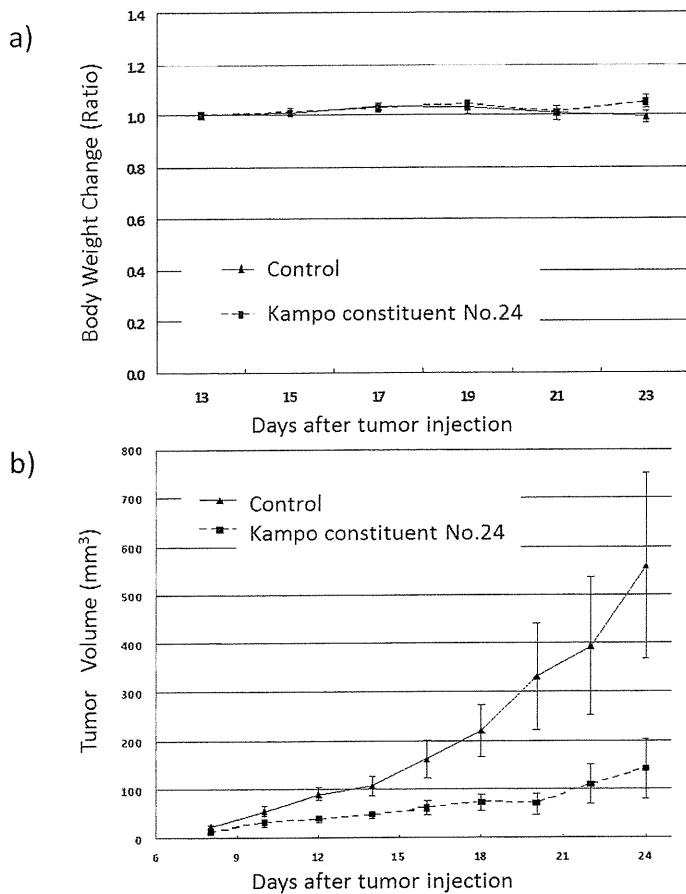


図 5.3. 漢方成分 No. 24 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

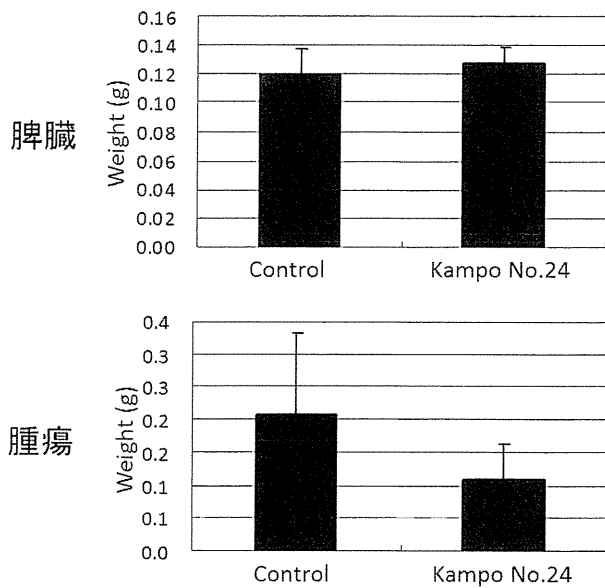


図 5 4. 漢方成分 No. 24 投与による担がんマウスの脾臓および腫瘍への影響

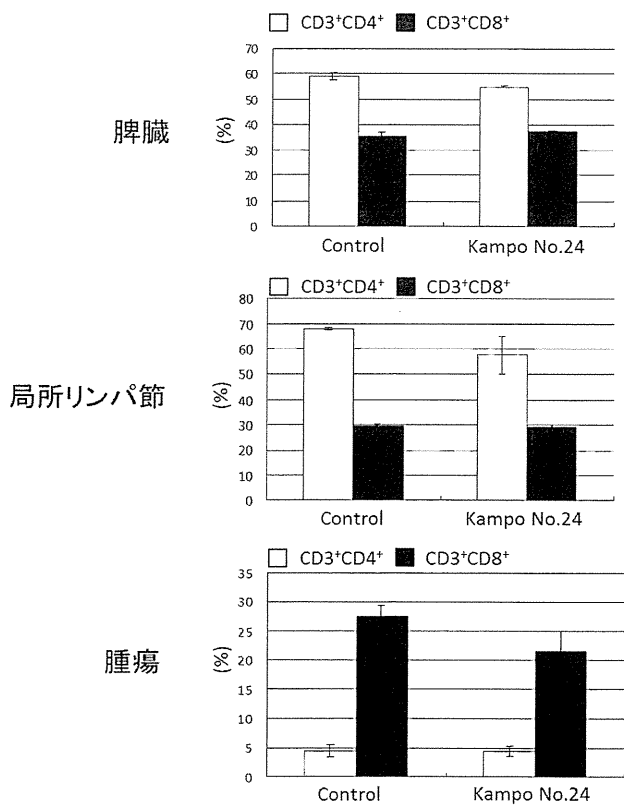


図 5 5. 漢方成分 No. 24 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

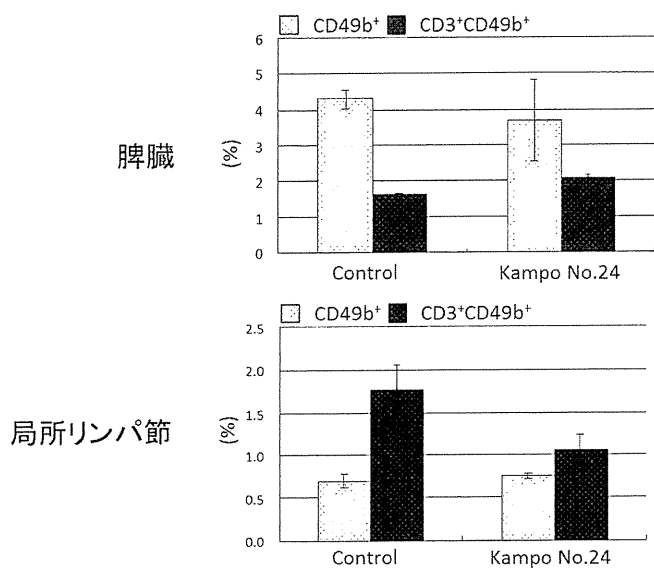


図5 6. 漢方成分 No.24 投与による担がんマウスのNK/NKT細胞への効果

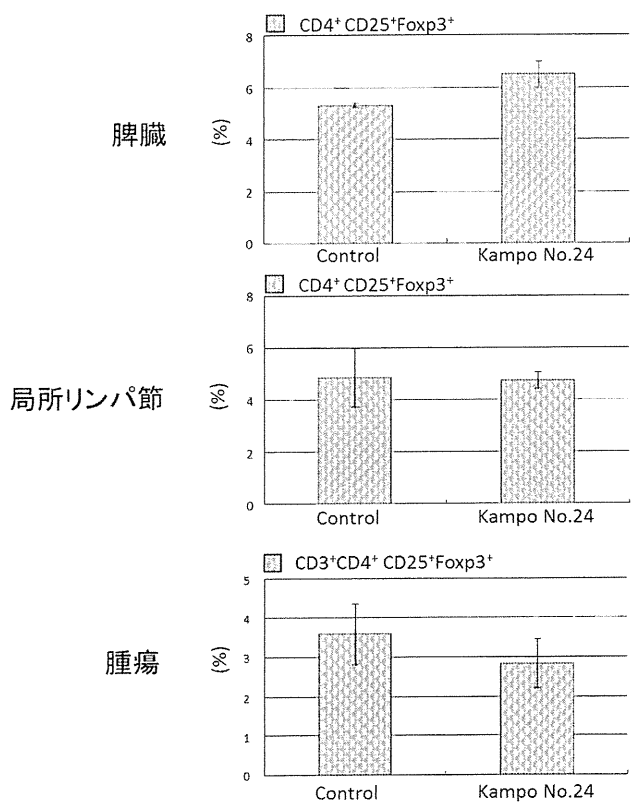


図5 7. 漢方成分 No.24 投与による担がんマウスのTreg細胞への効果

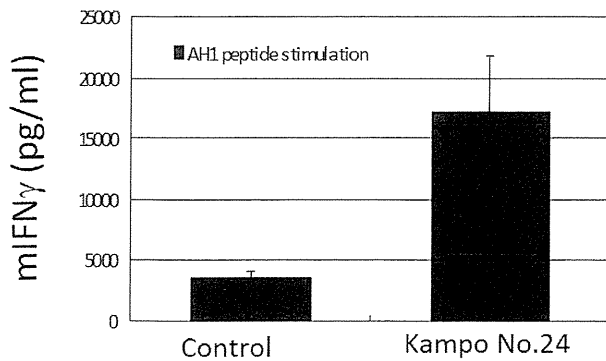


図 5 8. 漢方成分 No. 24 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 6) 漢方成分 No. 25

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 25 の細胞毒性を確認した。CT26 細胞に対しては漢方成分 No. 25 溶液 0.123-10 μM の濃度範囲で細胞毒性は見られなかった、しかしながら、健常マウス脾臓細胞に対しては 10 μM において細胞傷害性が確認された (図 5 9)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 25 の作用を調べた (図 5 9)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10 μM の濃度範囲の漢方成分 No. 25 溶液では増殖抑制を生じることはなかった。しかしながら、健常マウス脾臓細胞に対しては 3.33-10 μM の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

全実験期間を通して漢方成分 No. 25 溶液投与群の体重増加は対照群と差はなく、マウスの成長に影響を及ぼさなかった (図 6 0 a)。

漢方成分 No. 25 溶液を投与した担がんマウスは対照群と比較して漢方成分の投与開始早期から腫瘍の増大を抑制する傾向が見られた (図 6 0 b)。

脾臓の重量は対照群と比較して漢方成分 No. 25 溶液投与群は差が無かった。また腫瘍の重量は対照群と比較して、軽く小さい傾向であった (図 6 1)。

フローサイトメトリーを用い、免疫担当細胞の発現頻度を解析した。腫瘍中で CD8⁺T 細胞の割合が減少する傾向がみられたが (図 6 2)、脾臓で NK T 細胞の頻度がわずかに増加した (図 6 3)。Treg 細胞頻度は腫瘍において減少傾向が見られた (図 6 4)。

CT26 の腫瘍抗原である AH1 ペプチドを用いて、腫瘍抗原特異的な T 細胞誘導を行い、誘導後の抗原特異的 T 細胞が産生する IFN γ を ELISA 法により測定した。漢方成分 No. 25 溶液投与群は対照群と比較し、IFN γ 産生量が有意に増加した (図 6 5)。

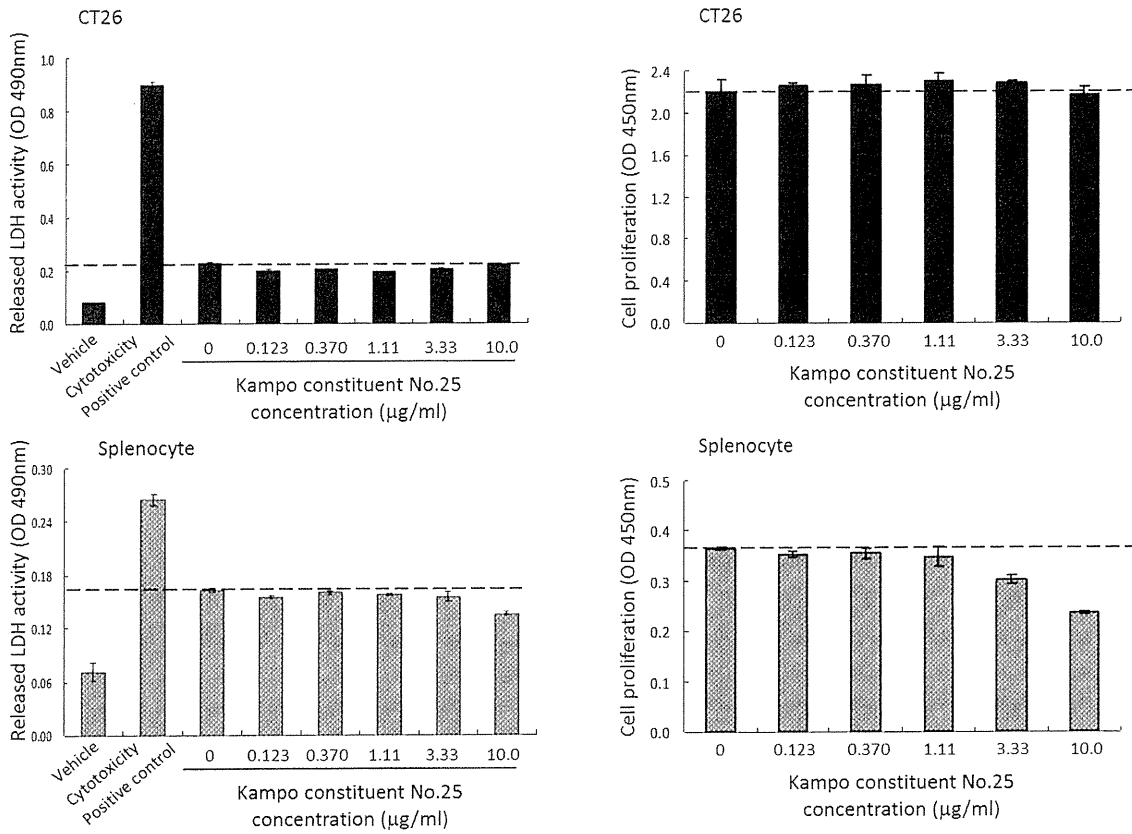


図 5 9. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 25 の影響

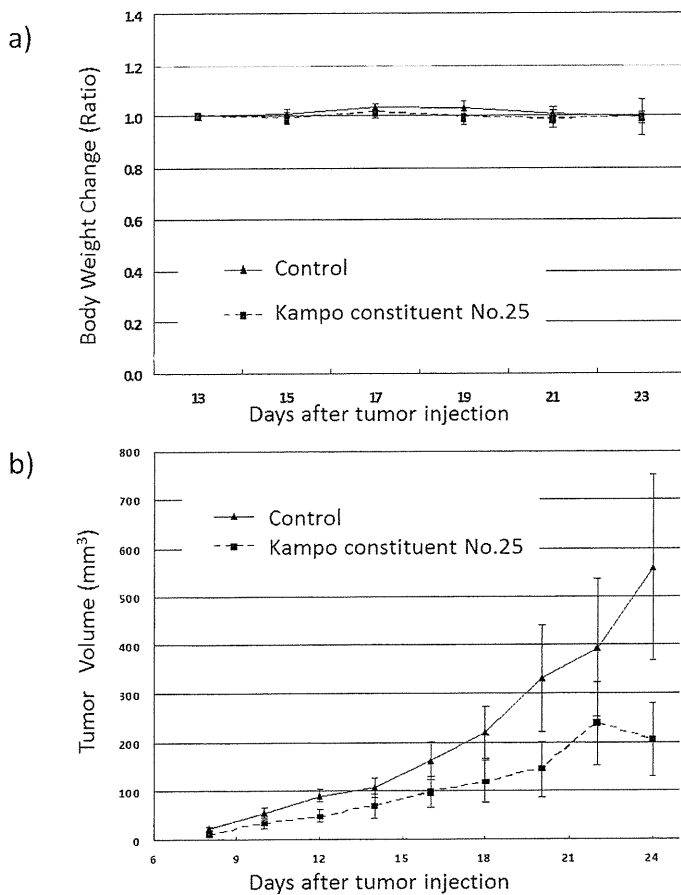


図 6 0. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用
a) 体重変化、b) 腫瘍径変化

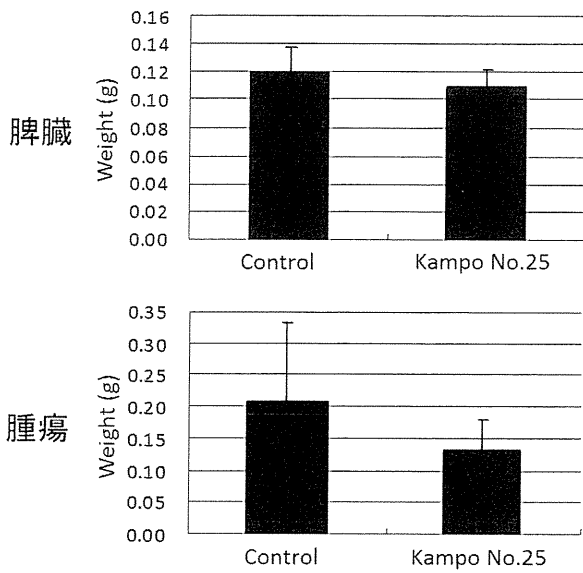


図 6 1. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスの脾臓および腫瘍への影響

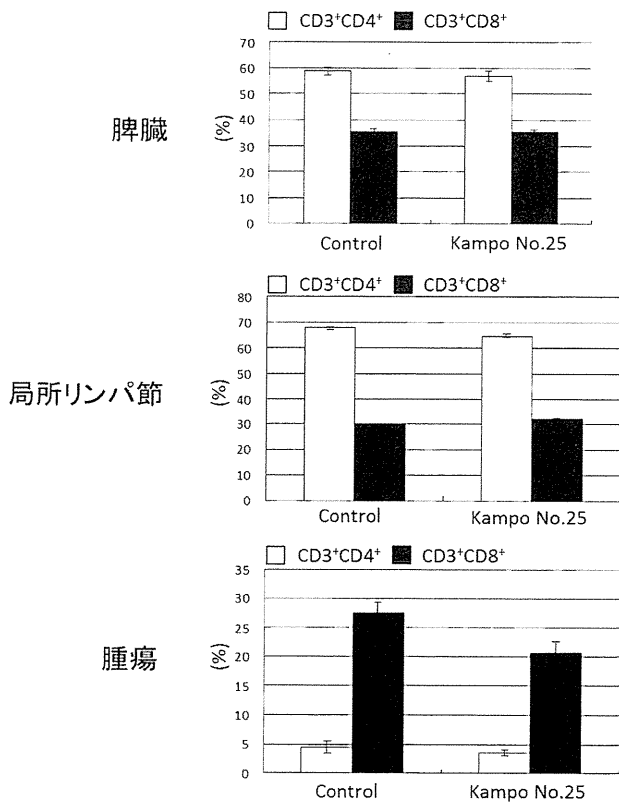


図 6 2. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスの T 細胞への効果

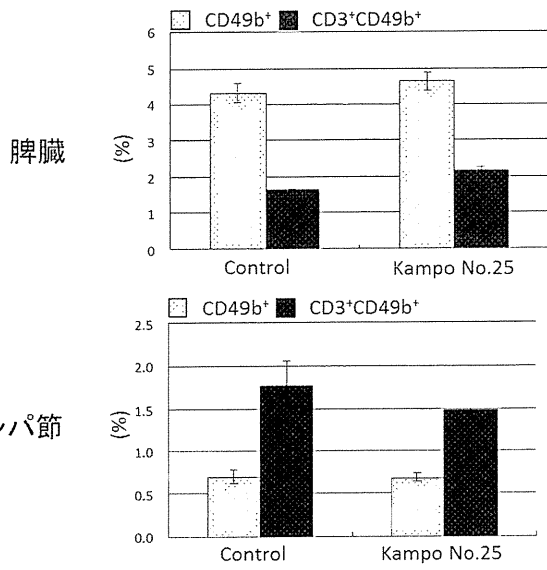


図 6 3. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスの NK/NKT 細胞への効果

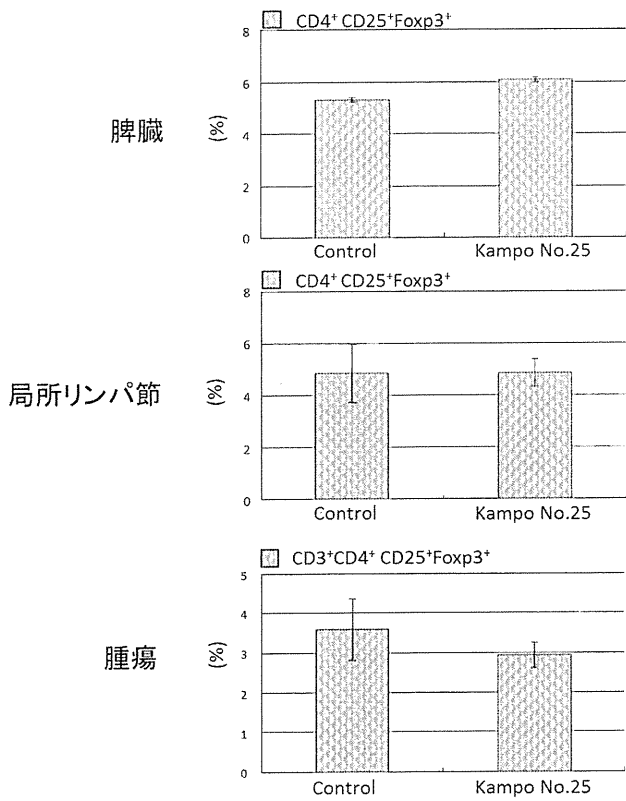


図 6 4. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスの Treg 細胞への効果

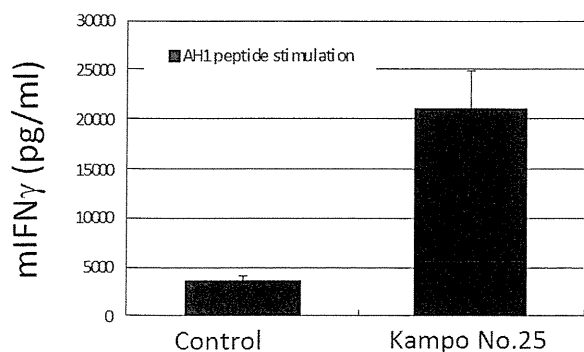


図 6 5. 漢方成分 No. 25 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導

6. 7) 漢方成分 No. 35

マウス大腸がん細胞 CT26 と健常マウス脾臓細胞の培養上清中に放出された LDH 量を測定することで漢方成分 No. 35 の細胞毒性を確認した。漢方成分 No. 35 溶液 0.123-10 μ M の濃度範囲で細胞毒性は見られなかった (図 6 6)。

CT26 と健常マウス脾臓細胞の細胞増殖に対する漢方成分 No. 35 の作用を調べた (図 6 6)。CT26 細胞の細胞増殖に対して、0.123-10 μ M の濃度範囲の漢方成分 No. 35 溶液では増殖抑制を生じることはなかった。しかしながら、健常マウス脾臓細胞に対しては 0.123-10 μ M の濃度において有意に細胞増殖抑制がみられた。

漢方成分 No. 35 の経口投与 (50 mg/kg/day) により皮下腫瘍の増殖は抑えられ、この抑制効果は投与開始後、特に投与開始 7 日目から、明白になった (図 6 7)。

漢方成分 No. 35 投与により、脾臓の CD4⁺T 細胞、CD8⁺ T 細胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 細胞の細胞数が増加する傾向がみられた (図 6 8)。しかし、腫瘍 (図 6 9) や小腸 (図 7 0) では、これらの細胞の数に顕著な変化は見られなかった。

これらの細胞の数に、顕著な変化がないにもかかわらず腫瘍体積の縮小がみられた原因を明らかにするため、腫瘍高原特異的 T 細胞応答誘導の可能性を検証した。パーコール密度勾配遠心分離法で単離した腫瘍内浸潤単核球を、CT26 細胞に対する腫瘍抗原ペプチド AH-1 で 5 日間刺激し、ELISA による IFN- γ の測定に使用した。漢方成分 No. 35 を投与されたマウスの単核球においては、CT26 細胞と AH-1 ペプチドによる特異的な IFN- γ 産生の増加がみられたが、コントロールを処置されたマウスの細胞で IFN- γ 産生の増加は確認されなかった (図 7 1)。

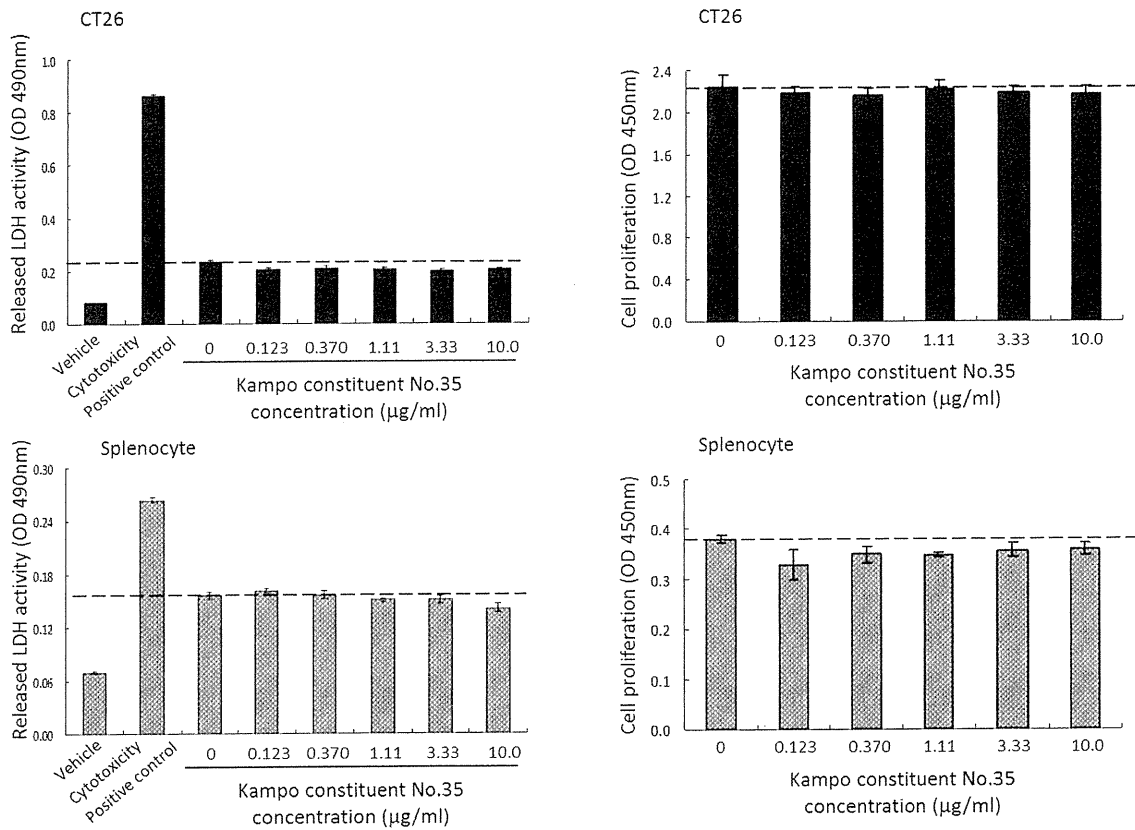


図 6 6. マウス大腸がん細胞株 CT26 と健常マウス脾細胞に対する漢方成分 No. 35 の影響

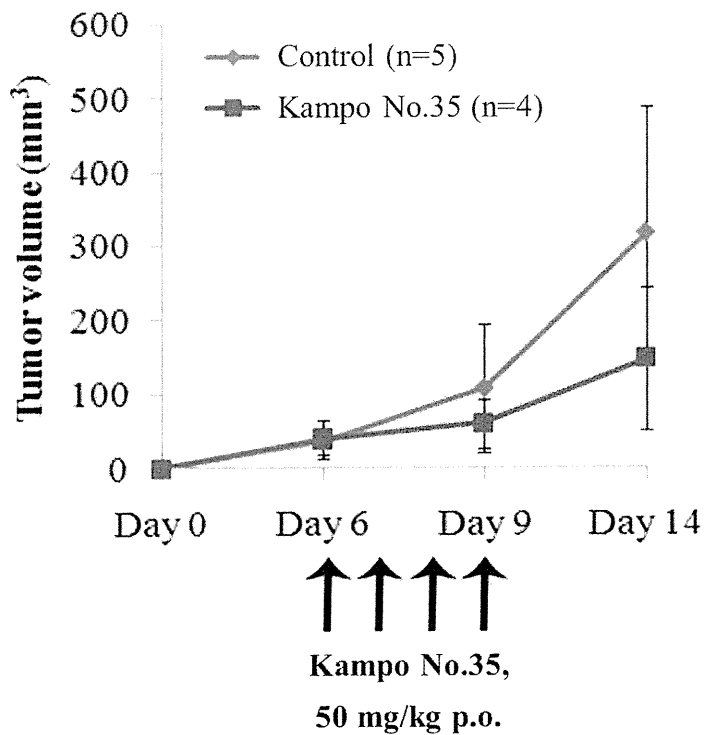


図 6 7. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスへの *in vivo* 作用 (腫瘍径変化)

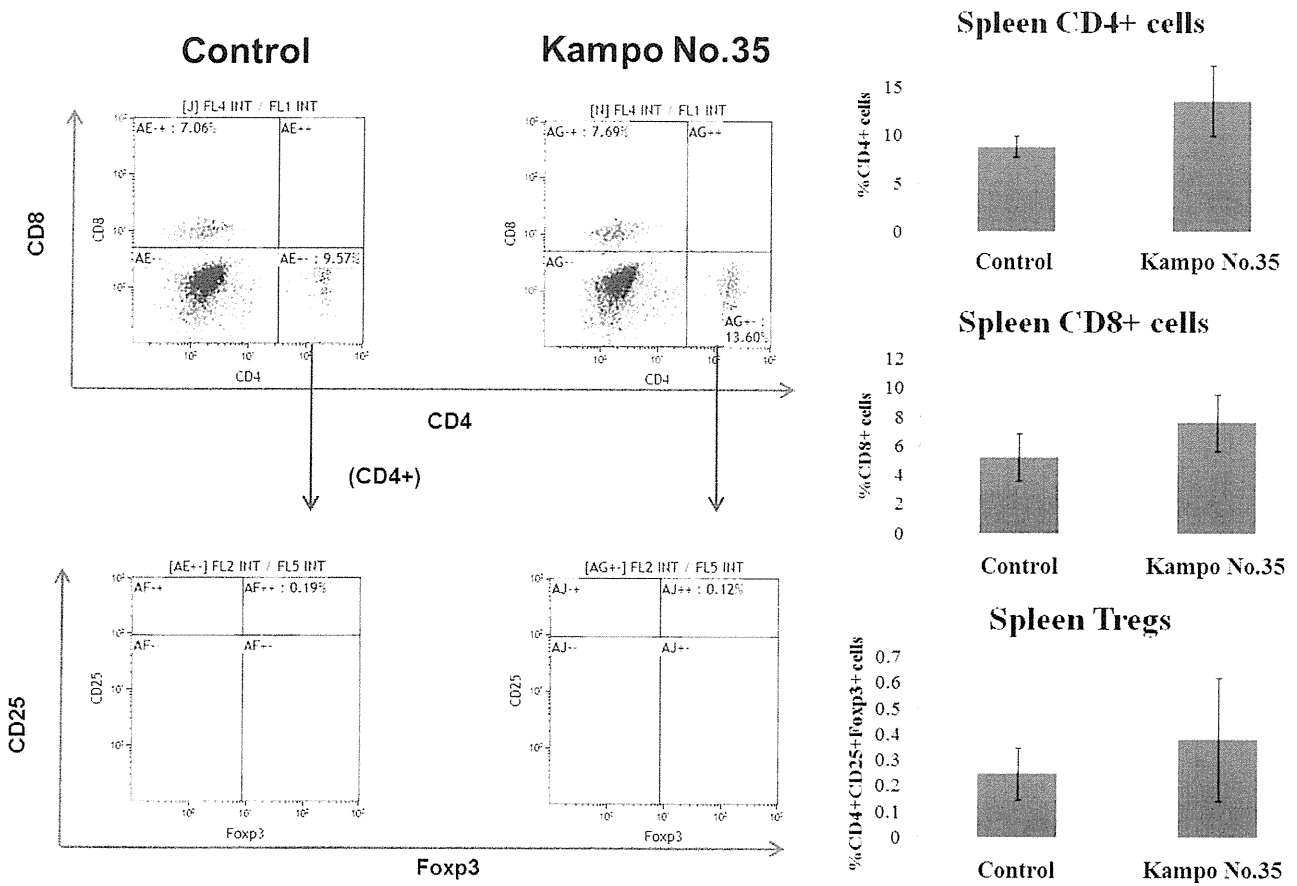


図 6 8. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの脾臓内 T 細胞、Treg 細胞への効果

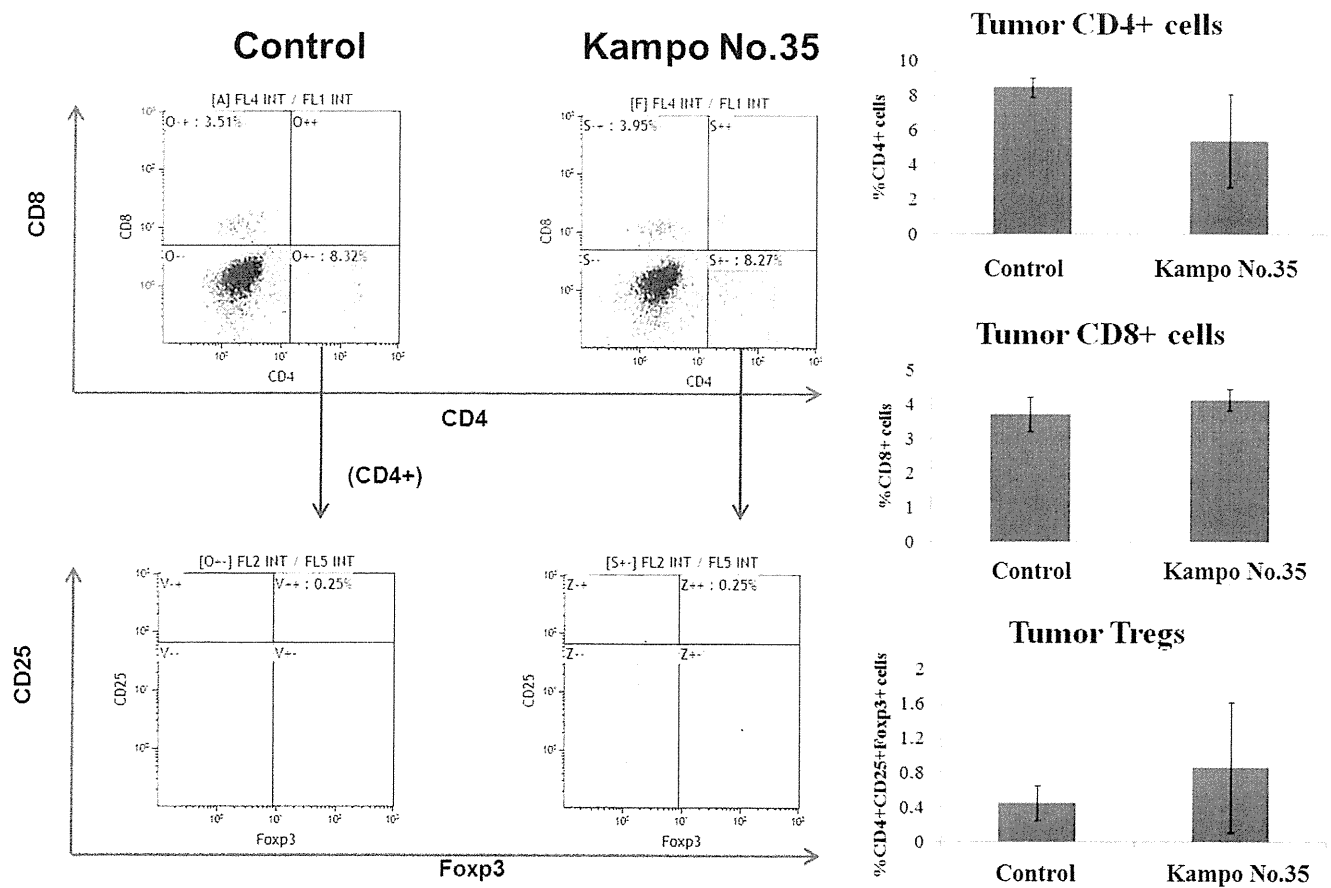


図 6 9. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの腫瘍内 T 細胞、Treg 細胞への効果

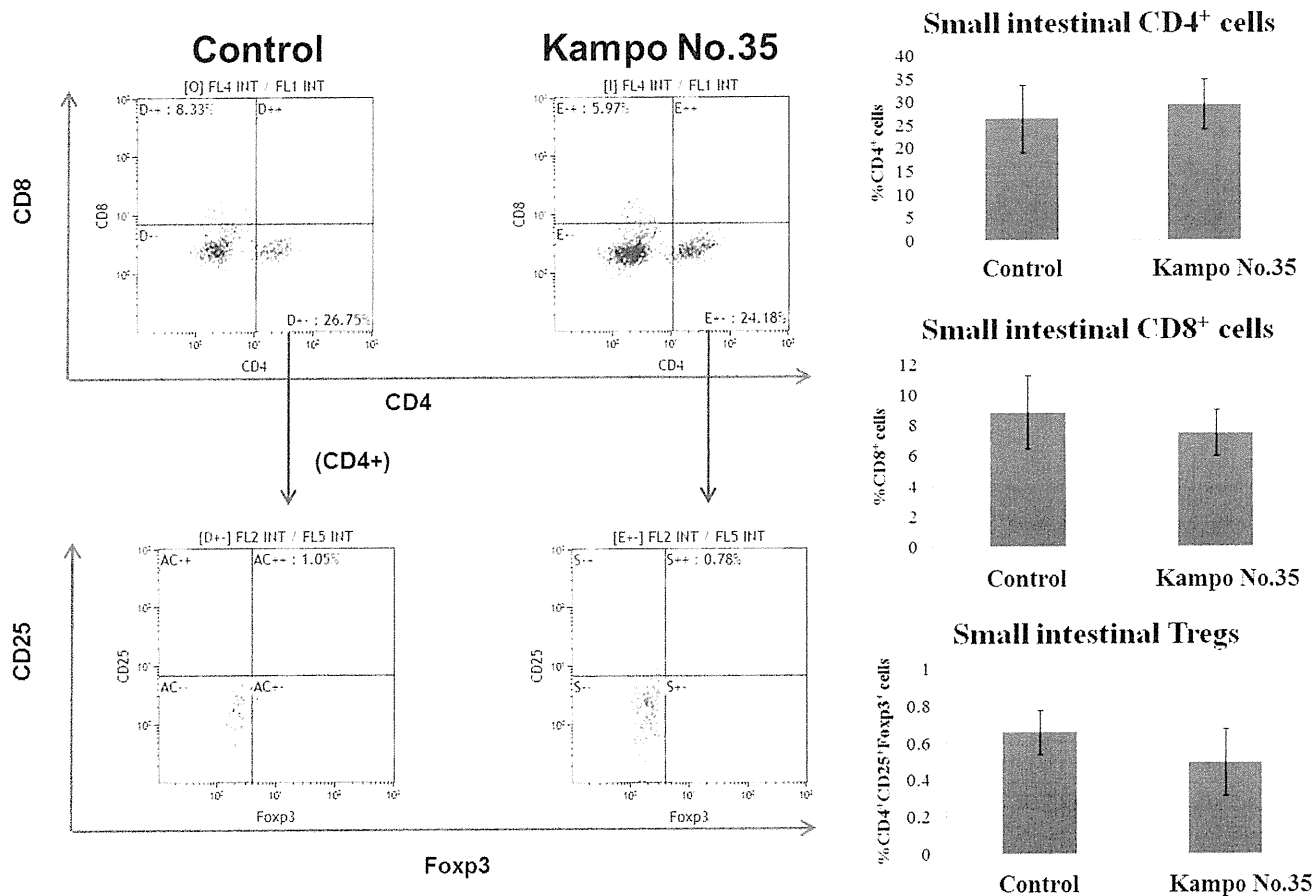


図 7 0. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの小腸内 T 細胞、Treg 細胞への効果

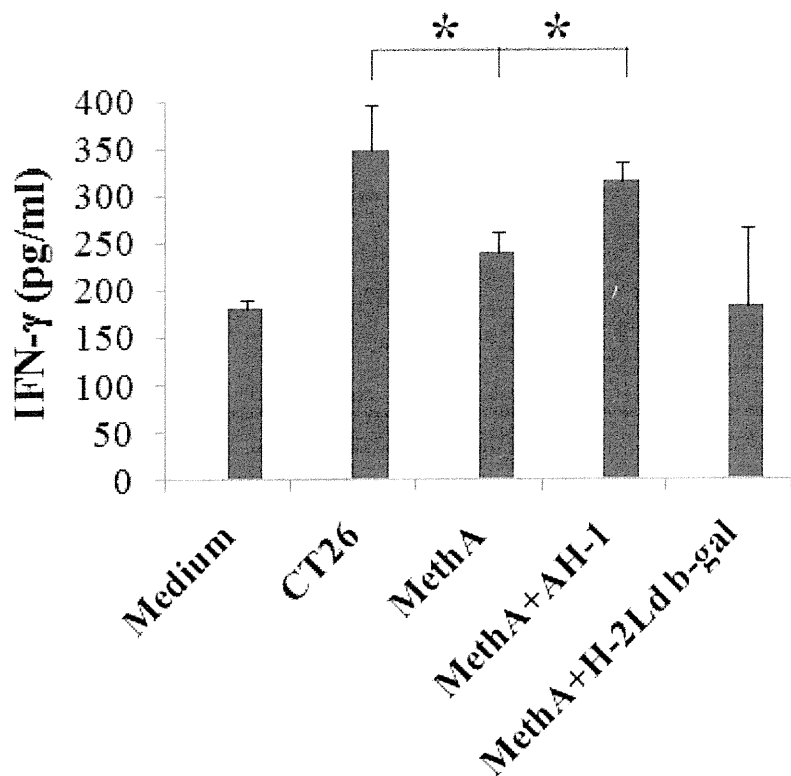


図 7 1. 漢方成分 No. 35 投与による担がんマウスの腫瘍抗原特異的 T 細胞の誘導