再発胃癌症例における biological response modifier の 胸管リンパ球におよぼす影響について —溶連菌製剤 OK-432の検討—

帝京大学第1外科

花上 仁 黒澤 努 北野 善昭 宮川 貞昭
根本 明久 箭本 浩 浅越 辰男 四方 淳一

CLINICAL STUDIES OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIER ON THORACIC DUCT LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RECURRENT GASTRIC CANCER WITH SPECIAL REFERENCE TO EFFECT OF STREPTOCOCCAL OK-432

Hitoshi HANAUE, Tsutomu KUROSAWA, Yoshiaki KITANO,
Sadaaki MIYAKAWA, Akihisa NEMOTO, Hiroshi YAMOTO,
Tatsuo ASAGOE and Jun-ichi SHIKATA

The First Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine

再発胃癌9例において、溶連菌製剤 OK-432の免疫療法を行い、治療前および治療開始後4週に胸管リンパ球(TDL)と末梢血リンパ球(PBL)を採取し免疫学的検索を行った。治療前ではTDLはPBLに比較しT/B細胞比は高く、 $T\gamma$ 細胞比は有意($p<0.05$)に低く、リンパ球幼若化率は有意($p<0.05$)に高く、Natural killer細胞活性は有意($p<0.01$)に低かった。治療後4週ではT/B細胞比と $T\gamma$ 細胞比は有意の変動を示さなかったが、リンパ球幼若化率はTDLでは有意に($p<0.05$)に低下しPBLでは変化しなかったため両者の間に有意差は認められなかった。Natural killer細胞活性は両者において有意($p<0.05$)に増強された。

索引用語：胸管リンパ球、再発胃癌、biological response modifier、胃癌免疫療法、溶連菌製剤

結 言

悪性腫瘍の治療を目的として、宿主と腫瘍の関係を宿主優位に変換させようとする薬剤および治療法、すなわち biological response modifier (BRM) の概念が定着しつつある。現在使用されている免疫療法剤のほとんどがBRMの範ちゅうに含まれ、その投与により担癌生体にじゃっ起される免疫機能の変化が多くの研究者により検討された。その結果、悪性腫瘍における臨床免疫学的理解が急速に進み、担癌生体の正確な免疫能の把握が効果的な免疫療法を行う上で重要なことが明らかにされた¹⁾²⁾。

担癌生体の細胞性免疫を知るためにさまざまなリンパ球機能検査がなされているが、大部分は末梢血リンパ球(PBL)についてなされているのが現状である。腫瘍および腫瘍周囲の組織や所属リンパ節内のリンパ球は、腫瘍免疫において極めて重要な役割をはたしている³⁾⁴⁾と考えられるが、臨床例においてこれら組織リンパ球の機能を経時的に検索することは不可能である。

一方において、胸管は生体において毛細血管床に匹敵した容積を有し⁵⁾、全身の組織リンパ液を集めたリンパ管内リンパが静脈に流入する最終経路である。そのため胸管リンパ球(TDL)には組織からリンパ管内に移行したリンパ球が含まれる⁶⁾ので、担癌生体においては、腫瘍と接触したリンパ球が存在すると考えら

れる。その上、われわれがすでに報告したごとく⁷⁾、胸管リンパ液は胸管瘻を作ることにより、経時的に採取することができるので、TDLの免疫機能の経時的動態を知ることが可能である。しかしながら、胸管瘻造設術は手術手技が煩雑なため一般に普及していないので、臨床例において担癌状態下のTDLの特性や免疫療法がTDLにおよぼす影響についての報告は極めて少ない。

本研究は、BRMによる非特異的免疫療法を再発胃癌患者に対して施行し、TDLとPBLの免疫学的検索を行うことにより、TDLとPBLの生物学的特性の差異ならびにTDLの腫瘍免疫上での意義を解明することを目的として行った。

対象と方法

胃癌の根治術後再発例9例を対象とした。全例男性で年齢は46～72歳で平均年齢は61歳である。これらの症例はすべて広範な癌病巣を有するために再手術の適応外と判断されたものである。

胸管瘻は、局所麻酔下に以前報告した方法⁷⁾で作成し、胸管リンパ液の採取に供した。

BRMとして、溶連菌製剤OK-432 (PIC) を1回につき5klinische Einheit (KE)、週3回皮内投与した。化学療法として、 N_1 -(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (Tegafur) を800mg、連日経口投与した。

治療前および治療開始後4週において、胸管瘻より胸管リンパ液と肘静脈より血液を同時に採取し、それぞれよりTDLならびにPBLを分離し、T・B細胞比、IgG-Fc レセプター陽性T (T_γ) 細胞比、Concavalin-A (Con-A) および Phytohemagglutinin (PHA) に対するリンパ球幼若化反応、ならびに natural killer (NK) 細胞活性を測定した。

T・B細胞比は、T・B細胞測定キット(日本抗体研究所)を用い測定した。マイクロプレートウェル内で、分離したリンパ球とヒツジ赤血球ならびに補体感作ウシ赤血球とのロゼット形成を鏡鏡し、それぞれのロゼット形成リンパ球をT細胞ならびにB細胞として、測定し、T・B細胞比を求めた。

T_γ 細胞比は、新保らの方法⁹⁾にて測定した。すなわち、形態が特異でT細胞との spontaneous rosette formation のないニワトリ赤血球にIgG抗体を感作し、この赤血球とヒツジ赤血球とを分離したリンパ球に反応させ、両者と結合し double rosette を形成するリンパ球を T_γ 細胞としT細胞中の百分率を求め T_γ 細胞比とした。

リンパ球幼若化反応は、T細胞に対する mitogen として PHA (Difco 社) と Con-A (Difco 社) を用いて、新保ら⁹⁾の方法を用いて測定した。リンパ球 5×10^5 個を培養チューブ (Falcon 2054または2058) にとり、培養液1mlに浮遊し、PHA 100 μ g/ml または Con-A 10 μ g/ml を加えた。またいずれの mitogen も加えないものも用意した。37 $^\circ$ C、5%CO₂濃度下で、70時間培養後に各チューブに³H-thymidine 2 μ Ci を加え2時間培養した後、細胞を回収しシンチレーションカウンターにて放射性活性を測定した。mitogen に対する反応性の評価は mitogen 添加時の測定値と非添加時の測定値の比、すなわち stimulation index (SI) による。

NK 活性は、Kiessling らの方法¹⁰⁾により測定した。分離したリンパ球を20%FCS 加 RPMI-1640にて 5×10^6 個/ml に調整した。標的細胞には、ヒト白血病細胞由来の株化細胞 K562を用いた。K562に⁵¹Cr (Na_2 ⁵¹CrO₄, 3mCi/3ml, 日本アイソトープ協会) を加えて標識した後、10%FCS 加 RPMI-1640にて 2.5×10^5 個/ml に調整した。標的細胞 1×10^4 個に effector 細胞を 5×10^5 個加え、4時間培養した後、以下の式に従い% lysis を算出し、NK 細胞活性とした。

NK 細胞活性 = (experimental ⁵¹Cr-release) / (maximum ⁵¹Cr-release-spontaneous ⁵¹Cr-release)。

測定値の統計学的解析には、student の t 検定を用いた。

成績

T・B細胞比についてみると、TDLはPBLに比較し

図1 T・B細胞比

図2 T γ 細胞比

図4 リンパ球幼若化反応 (Phytohemagglutinin)

図3 リンパ球幼若化反応 (Concanavalin-A)

図5 Natural Killer 細胞活性

T細胞比は高くB細胞比は低い傾向を示した。TDLとPBLの両者において、PIC投与による有意の変動は認められなかった(図1)。

T γ 細胞比についてみると、TDLはPBLに比較し有意に低かった。TDLとPBLの両者において、PIC投与による有意の変動は認められなかった(図2)。

Con-AならびにPHAに対するリンパ球幼若反応についてみると、PIC投与前ではTDLがPBLに比較し有意に高いSIを示した。PIC投与開始後4週では、投与前に比較しPBLのSIが明らかな変動を示さなかったのに対し、TDLのSIは有意に低下しており、

両者の間には有意の差は認められなかった(図3, 4)。

NK細胞活性についてみると、TDLはPBLに比較し有意に低かった。PIC投与後4週では、投与前に比較しTDLとPBLの両者においてNK細胞活性は有意に上昇した(図5)。

PICによる免疫療法の効果についてみると、NK細胞活性がTDLおよびPBLにおいて、上昇していることから、本症例においては免疫賦活効果が得られたものと思われた。

考 察

悪性腫瘍患者における胸管リンパの重要性は、1798

年に Cooper¹¹⁾により初めて指摘された。初期においては Virchow¹²⁾により胃癌症例において左鎖骨上窩リンパ節転移がしばしば見られることが報告されて以来、胸管は悪性腫瘍のリンパおよび血行性転移の経路として興味を集めていたが、近年の臨床免疫学の進歩に伴い臓器移植や自己免疫疾患における免疫抑制の手段¹³⁾や、担癌患者の免疫能をモニターする場合¹⁴⁾として注目されるに至った。

一方、PICは丹毒を併発した肉腫患者において腫瘍が退縮したと言う報告に基づき、Okamoto ら¹⁵⁾が streptolysin-S を産生しない溶連菌製剤として開発した免疫賦活剤である。PIC は in vitro において腫瘍細胞と混合させると接触した腫瘍細胞が壊死すること¹⁶⁾から、当初は通常の制癌剤と同様に直接細胞障害を示す薬剤と考えられていた。しかしその後の研究から、PIC が担癌宿主の免疫担当細胞を介して抗腫瘍効果を発現していることが明らかにされて以来¹⁷⁾¹⁸⁾、BRM として広くわが国において使用されるに至った。

われわれは、進行消化器癌患者に対して、PIC の皮内投与を行っておりその担癌宿主における免疫能賦活や生存期間の延長¹⁹⁾についてはすでに報告した。本研究では、TDL と PBL の生物学的特性と PIC 皮内投与による影響の差異について臨床免疫学的検討がなされた。

TDL は PBL に比較し T 細胞比は高く B 細胞比は低い傾向を示したが、この成績は永井ら²⁰⁾のモノクローナル抗体を用いた成績ともほぼ一致する。TDL の中には血液から組織へ遊走しリンパ組織内に再循環しているリンパ球⁹⁾のほかに、相当数の large lymphoid blast cell が存在すると報告²¹⁾されており、吉崎ら²²⁾も TDL 中に PBL では見られない末熟な T 細胞を電顕的検索により証明している。TDL と PBL の T・B 細胞比の差は、このような末梢血には見られないリンパ球が TDL に含まれていることに起因すると考えられる。

IgG 分子の Fc 部に対するリセプターは、マクロファージや B 細胞のみならず一部の T 細胞の表面にも存在し、T 細胞の機能の一部を担当する T 細胞サブセット、すなわち cytotoxic effector や suppressor の性格を持つ T 細胞との相関が考えられている⁸⁾。T γ 細胞の局在についてみると、板垣²³⁾によれば PBL に比較し脾に有意に多くまた転移陰性リンパ節に有意に少なく存在した。T γ 細胞の増加には、脾と血清が関与していると考えられており、正常者の T 細胞を胃癌患者

血清で培養すると IgG-Fc リセプターの増加が認められている²³⁾。われわれの成績では、TDL の T γ 細胞比は PBL のそれに比較し有意に低かったが、これは永井ら²⁰⁾の成績と一致する。これには、TDL が胸腺やリンパ節リンパ球に近い特性を持つこと、癌患者血清中のサブレッサー活性を誘導する物質がリンパ液中には少ないこと、ならびに TDL には末分化な T 細胞が多く含まれていること、などが原因として考えられる。

TDL および PBL における T・B 細胞比ならびに T γ 細胞比は PIC 投与によっても有意の変動を示さなかった。われわれのこの成績は、PIC 投与により T 細胞系免疫能の改善を認めた Uchida ら¹⁸⁾の報告と異なる。これは Uchida ら¹⁸⁾の症例は、大部分腫瘍の進展が所属リンパ節に止どまっているのに対し、われわれの症例は再発例なので、より広範囲に腫瘍が浸潤しているため、宿主免疫能の荒廃は高度であり、PIC 投与は病期の進行による T 細胞機能の低下を阻止しえたが賦活するにはいたらなかったためと考えられる。

Con-A および PHA に対する SI では、TDL が PBL に比較し高値を示した。Benninghoff ら²⁴⁾も同様の報告をしており、TDL に T 細胞が多いことによるとしている。われわれの成績でも、TDL の T 細胞比は PBL に比較し高かったが Benninghoff ら²⁴⁾の成績ほどその差は顕著でないので、TDL と PBL における SI の差はそれぞれに含まれる T 細胞数のみでなく成熟度やリンパ球幼若反応と負の相関をもつ T γ 細胞比²⁵⁾の差にもよっていると考えられる。

PIC 投与により、PBL の SI は有意の変動を示さなかったが TDL の SI は低下した。PHA と Con-A によるリンパ球幼若化反応は T 細胞機能の指標であり、癌患者においてその進行に従った低下が知られている²⁶⁾。われわれの症例において PIC 投与中に、TDL と PBL の T 細胞比、T γ 細胞比、ならびに PBL の SI が維持されているのにもかかわらず TDL の SI が低下したことは、T 細胞機能の障害は初期においてまず TDL に出現することを示唆していると考えられる。このことから腫瘍免疫において重要な役割を果している T 細胞機能の変動を早期にとらえるためには、TDL の検索が極めて有用であると考えられる。

NK 細胞²⁷⁾は、ヒト、ラット、およびマウスなどで何らかの感作なしに腫瘍細胞を破壊するリンパ球であるが、その effector cell の性格については議論の多いところである。ヒツジ赤血球とロゼットを作らず、表面免疫グロブリン陰性、かつ IgG-Fc リセプター陽性の

リンパ球, つまり null cell 系の細胞であると言う報告²⁸⁾が多かったが, IgG-Fc リセプター陽性T細胞にもNK細胞活性が認められており²⁹⁾, またT細胞系の細胞であると言う報告³⁰⁾もある。TDLのNK細胞活性はPBLに比較し有意に低かったが, これはTDLにnull系細胞やT γ 細胞が少ないことによると思われるが, TDLに未熟なリンパ球が多いため分化が十分に行われていないこともその原因として考えられる。

PICは, インターフェロン(INF)やインターロイキン(IL)-2などのリンフォカインを誘起し, これらを介してNK細胞活性を増強する³¹⁾³²⁾。本研究においても, TDLとPBLの両者においてPIC投与によりNK細胞活性は有意に増強された。PIC投与により, T細胞系免疫能が増強されえないほど進行した再発胃癌患者においてさえも, NK細胞活性が有意に増強されたことは, NK細胞活性を持つ effector cell のPICに対する感受性が免疫能の低下した担癌患者においても保持されていることを示すものと考えられる。

以上のごとく, TDLとPBLはさまざまな点で異なった生物学的特性を持つことが明らかにされた。特に, T細胞の機能障害がTDLにおいてほかにさがけて感知されたことは, 癌免疫療法においてはTDLの積極的な検索が必要であることを示唆するものと考えられる。

結 語

PICによる非特異的免疫療法を受けた9例の再発胃癌患者において治療前後にTDLならびにPBLの免疫学的検索を行い以下の結論を得た。

1) TDLはPBLに比較し, T細胞比は高くB細胞比は低かったが, 両者においてPIC投与により有意の変動は認められなかった。

2) TDLはPBLに比較し, T γ 細胞比は有意に低かったが, 両者においてPIC投与により有意の変動は認められなかった。

3) TDLはPBLに比較し, リンパ球幼若化反応のSIは治療前では有意に高値を示したが, 治療後ではSIはTDLで低下しPBLでは有意に変動しなかったもので両者のSIには有意の差は認められなかった。

4) TDLはPBLに比較し, NK細胞活性は有意に低かったがPIC投与により両者のNK細胞活性は上昇した。

5) 以上により, TDLとPBLの生物学的特性はさまざまな点で異なっており, 特にT細胞機能障害がPBLよりTDLにおいてより早期に感知されている

ことは, 癌免疫療法におけるTDLの積極的な検索の重要性を示唆するものと考えられた。

文 献

- 1) Hanaue H, Nomoto S, Kimura T et al: Immunological parameters in gastric cancer patients treated with immunotherapy of streptococcal preparation OK-432. *Keio J Med* 31: 159—168, 1982
- 2) Hanaue H, Yoshizaki S, Kurosawa T: Re-evaluation of immunological parameters in immunotherapy for advanced carcinoma of the digestive tract. *Gastroenterol Jpn* 18: 377—383, 1983
- 3) Watanabe S, Sato Y, Kodama T et al: Immunohistochemical study with monoclonal antibodies on immune response in human lung cancers. *Cancer Res* 43: 5883—5889, 1983
- 4) Fisher B, Saffer E, Fisher ER: Studies concerning the regional lymph node in cancer. IV. Tumor inhibition by regional lymph node cells. *Cancer* 33: 631—636, 1974
- 5) Abell JJ, Hampil B, Jonas AF et al: Researches on tetanus. VII. *Bull Johns Hopkins Hosp* 62: 522—563, 1938
- 6) Gowans JL: The re-circulation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* 146: 54—69, 1959
- 7) Hanaue H, Kurosawa T, Kitano Y et al: N-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207) in the postoperative adjuvant chemotherapy of gastric cancer. *Cancer* 57: 693—698, 1986
- 8) 新保敏和, 矢田純一, 中川俊郎ほか: ヒトIgG-Fcreceptor陽性Tリンパ球の検出法と各種疾患における変動。臨免疫 9: 141—145, 1977
- 9) 新保敏和, 麦谷曜夫, 菅原真智子ほか: 癌患者にみられるリンパ球とマクロファージの異常。癌と治療 5: 261—271, 1978
- 10) Kiessling R, Klein E, Wigzell H: "Natural Killer cells in the mouse". I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5: 112—117, 1975
- 11) Cooper A: Three instances of obstruction of the thoracic duct, with some experiments, showing the effects of typing the vessel. *London, Med Rec Private M Assoc*, 1978, p86—115
- 12) Virchow R: Zur diagnose der krebse in unterliebe. *Med Reform* 45: 248, 1848
- 13) Starzl TE, Weil R, Koep LJ et al: Thoracic duct drainage before and after cadaveric kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 149:

- 815—821, 1979
- 14) Girardet RE, Benninghoff DL, Ransdell HT: Technic of chronic throacic duct "Side Fistula" for immunologic evaluation of patients with cancer. *Am J Surg* 130 : 97—101, 1975
 - 15) Okamoto H, Minai M, Shoin S et al: Experimental anticancer studies. Part XXXI. On the streptococcal preparation having potent anti-cancer activity. *Jpn J Exp Med* 36 : 175—186, 1966
 - 16) Lirplawa T, Hattori T, Furue H: Clinical experience with streptococcal anticancer preparation OK-432. (NSC-B 116209). *Cancer Chemother Rept* 56 : 211—220, 1972
 - 17) Ishii Y, Yamaoka H, Toh K et al: Inhibition of tumor growth in vivo and in viro ny macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. *Gann* 67 : 115—119, 1976
 - 18) Uchida A, Hoshino T: Clinical studies on cell-mediated immunity in patients with malignant disease: I. Fefeacts of immunotherapy with OK-432 on lymphocyte subpopulation an dphytomitogen responsiveness in vitro. *Cancer* 45 : 476—483, 1980
 - 19) Hanaue H, Kurosawa T, Yoshizaki S et al: Efficacy of streptococcal preparation OK-432 for gastric cancer patients-comparison between intradermal and intramuscular injection. *Jpn J Surg* 14 : 191—197, 1984
 - 20) 永井研治, 松本純夫, 杉本辰男ほか: 胃癌患者におけるヒト胸管リンパ球の腫瘍認識と Interleukin-2 による Killer 細胞誘導の検討. *日消外会誌* 19 : 12—18, 1986
 - 21) Heath TJ, Lascelles AK, Morris B: The cells of sheep lymph. *J Anat* 96 : 397—403, 1962
 - 22) 吉崎 聰, 笠原正男: 胸管リンパによる胃癌診断及び治療上の意義. *外科診療* 24 : 1797—1808, 1982
 - 23) 板垣衛治: 胃癌患者における IgG-Fc リセプター陽性 T 細胞の意義に関する基礎的並びに臨床的研究. *日外会誌* 86 : 1405—1416, 1985
 - 24) Benninghoff DL, Girardet RE, Porteous DD: Thoracicduct and blood lymphocytes in cancer. *Lancet* 2 : 264—265, 1973
 - 25) 滝 正憲: 消化器癌患者における IgG-Fc リセプター陽性 T 細胞の検討. *日癌治療会誌* 17 : 720—727, 1982
 - 26) 田口公晴, 前田廸郎, 岸本宏之ほか: 胃癌術後成績と組織反応およびこれと免疫パラメーターとの関連. *癌の臨* 25 : 1389—1395, 1979
 - 27) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Reactivity of lymphocyte from normal person on cultured tumor cells. *Cancer Res* 33 : 2898—2902, 1973
 - 28) Shellan GR: Gross-virus-induced lymphoma in the rat. V. Natural cyyoyoxic cells are non-T cells. *Int J Cancer* 19 : 225—235, 1977
 - 29) West WH, Cannon GB, Kay HD et al: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of effector cells. *J Immunol* 118 : 353—361, 1977
 - 30) Kay HD, Bonnard GD, West WH et al: A functional comparison of human Fc-receptor-bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 118 : 2058—2066, 1977
 - 31) Saito M, Ebina T, Koi M et al: Induction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of streptococcus pyogenes. *Cell Immunol* 68 : 187—192, 1982
 - 32) Wakasugi H, Kasahara T, Minato N: In vitro potentiation of human natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432: Interferin and interleukin-2 participation in the stimulation with OK-432. *J Clin Immunol* 69 : 807—812, 1982