免疫剤投与と血中濃度に関する検討

栗田 口 敏 一

論文要旨

Sizofiran (SPG) を頭頸部癌患者に投与し薬剤血中濃度と末梢リンパ球免疫パラメーターの変化につき検討した。SPG 濃度測定はリムス反応を応用し初めて可能となった。SPG 20mg 1回筋注では3～5日目に150～200mg/ml のピークとなったが、2回目投与や長期投与において血中濃度に一定の傾向は認められなかった。しかし、NK, Cytotoxic T, helper T 細胞の増加や suppressor-inducer T, suppressor T 細胞の減少など免疫賦活効果の増強が認められた。免疫剤の有効な投与方法を考える上で薬剤の生体内分布と局所での免疫賦活効果は重要な問題であり、血中濃度の推移と免疫パラメーターの変化は免疫賦活機構解析の糸口となると考えられる。

Key words: シゾフィラン (Sizofiran), 血中濃度 (serum concentration), 免疫反応 (immune response), 二重染色解析 (two colour analysis), 頭頸部癌 (head and neck cancer)

はじめに

癌免疫療法は担癌状態における生体の免疫機能低下を改善すると同時に抗腫瘍免疫機構を賦活化し抗癌効果を増強することを目的としている。しかし、より効果的な免疫療法を行うための免疫剤の選択や投与方法については未だ確固たる考えは打ち出されていない。

シゾフィラン (Sizofiran : SPG) は Schizophyllum commune fries (スエヒロタケ) より抽出された分子量45000の多糖体である。構造的には β -1.3グルコシド結合を主鎖とし β -1.6結合で分岐した側鎖からなる三重らせん体であり、この高次構造が強い抗腫瘍効果を持つことがわかっている¹⁾。SPG には直接的な抗腫瘍細胞障害性はなく、宿主介在により細胞障害性マクロファージ, NK 細胞, 細胞障害性T細胞の活性増強作用が報告されている^{2,7)}。

これまで免疫剤の体内動態を検討する場合にはアイソトープでラベルした薬剤を用いていたが、臨床的には血中濃度測定は行われておらず各症例毎の体内動態は不明のまま免疫剤投与が継続されて来た。従来エンドキシン測定に用いられていたリムス反応が β -1.3グルカンによっても活性化されることが見い出されており⁸⁾、SPG の血中濃度も測定可能となった。今回、この測定系を用い SPG の血中濃度の推移と免疫賦活効果につき検討するとともに免疫剤の局在の意義につき若干の考察を加えたので報告する。

対象及び方法

I. 対 象

頭頸部進行癌患者未治療例を対象とした。Stage I～Ⅲ, Performance status 0～2であった。

Ⅱ. 方 法

1) SPG 血中濃度測定法

採血は endotoxin-free の disposable syringe を用い、20単位のヘパリン (NOVO 社製) を加え 2ml の採血を行った。採血後、3000rpm で15分間遠心分離して得られた血漿を使用した。血漿100 μ l を endotoxin-free 試験管に分取し、0.32M 過塩素酸 (PCA) 液 200 μ l を添加して37°C で20分間放置し、除蛋白を行った。氷冷後3000rpm で15分間遠心し、遠心上清50 μ l を等量の0.18 NaOH で中和した。ついで SPG の三重らせん構造を解離し、リムス反応の感度向上を計かるため、0.5M NaOH を加え室温で30分放置した。反応液を0.5 M HCl で中和した後に回収された SPG をトキシカラートテスト LS-20 (生化学工業) を用いて測定した (表1)。

2) SPG 投与方法

全ての症例に対し1回につき SPG 20mg の筋肉内投与を行った。入院中は週2回、外来では2週間に1回の投与を原則とした。

3) 末梢血リンパ球の免疫パラメーターの検索

各種モノクローナル抗体を用いた single 又は two colour 分析を行った。また、NK 活性の測定は ⁵¹Cr release 法で行った。

東北厚生年金病院耳鼻咽喉科

Toshiichi AWATAGUCHI: A study of the relation between the concentration of immunopotentieter in serum and immunological paramaters

Department of Otolaryngology, Tohoku Koseinenkin Hospital

表 1 SPG 血中濃度測定法

1. Pretreatment	
Sample (plasma) 100 μ l	
$\leftarrow$ 0.32 M PCA, 200 μ l	
stored for 20 min. at 37° C	
ice cold for few sec.	
cfg. 3000 rpm. 15 min.	
ppt. sup. 50 μ l	
$\leftarrow$ 0.18 M NaOH, 50 μ l	
$\leftarrow$ Dilution (With Et free D. W.)	
sampling 100 μ l	
$\leftarrow$ 1 N NaOH, 100 μ l	
stored for 30 min. at R. T.	
$\leftarrow$ 1 N HCl; 100 μ l	
sample	
2. Assay	
sample 100 μ l	
$\leftarrow$ LS-10* 100 μ l	
stored for 30 min. at 37° C	
$\leftarrow$ Diazo-coupling reagent	
0.04 % NaNO ₂ /0.48 M HCl, 500 μ l	
0.30 % Ammonium sulfate, 500 μ l	
0.07 % N-(1-Naphthyl) ethylenediamine	
hydrochloride, 500 μ l	
absorbance at 545 nm	
Toxicolour system LS-10 set (SEIKAGAKU KOGYO)

図 1 SPG 1回筋注後の血中濃度の推移

結 果

I) 1回投与後の血中 SPG 濃度の推移

4症例に対し SPG 20mg を1回筋肉内投与を行い血中濃度を経時的に測定した。最初の24時間は緩やかに上昇した後、立ち上がり3日目、5日目に150~250ng/ml 程度のピークを作り、2例は更に上昇、他の2例は減少した(図1)。

II) 1回投与における血中濃度と免疫パラメーターの変化

SPG 1回投与の血中濃度の推移と NK 活性及び末梢血リンパ球分画の変化につき検討した。症例は73歳男、喉頭癌 T3N0M0 である。SPG 投与後4日目で血中濃度は61ng/ml、8日目は67ng/ml であった。NK 活性は投与前及び投与後4日目は共に36%であり8日目には32%とやや低下傾向はあるものの一定レベルを維持していた。CD16 陽性細胞について見ると4日目7.5%

図 2 SPG 1回筋注後の血中濃度と免疫パラメーターの経時的変化
(症例: 喉頭癌, T₃N₀M₀ 73歳 男)

図 3 SPG 2回筋注後の血中濃度の推移

であったものが8日目には11.5%と増加した。two colour 分析でみた活性化 NK (CD16⁺ Leu7⁺, CD16⁺ Leu7⁻) 細胞について見ると血中濃度の上昇と共に4日目には CD16⁺ Leu7⁺ 細胞4.7%, CD16⁺ Leu7⁻ 細胞7.4%と増加した後、8日目までは軽度の低下傾向にあるものの一定のレベルを維持していた。CD 4/8 比は投与前2.31であったものが4日目には1.73と低下したが8日目には2.78と投与前よりも上昇した(図2)。

III) 2回投与における SPG 血中濃度の推移

4症例に対し7日目に再投与を行い血中濃度の推移を見た。再投与後、1例は急激な立ち上がりを示し、他の1例は緩やかに上昇した後、11日目より急上昇に転じた。しかし、残る2例には著明な変化がなく、再投与前のレベルを維持した(図3)。

IV) 長期投与患者の SPG 濃度

3カ月以上 SPG 投与を行った7症例につき血中濃度を測定した。血中濃度が3176ng/ml と高値を示すものや29ng/ml と低値を示すものなど患者間に大きな差異が認められた(図4)。

図 4 SPG 長期投与症例の血中濃度

図 5 SPG 長期投与による NK 細胞の変化
two colour 分析で NK (CD16⁺Leu7⁻,
CD16⁺Leu7⁺, CD16⁻Leu7⁺) 細胞を
同定した

V) 長期投与患者における免疫パラメーターの変化

3 カ月以上の長期投与患者 8 症例を対象に各免疫パラメーターの推移につき検討した。NK (CD16⁺Leu7⁻, CD16⁺Leu7⁺, CD16⁻Leu7⁺) 細胞の増加は 8 症例中 6 例に見られたが、他の 2 例は低下した (図 5)。NK 細胞のうち活性化 NK (CD16⁺Leu7⁻, CD16⁺Leu7⁺) 細胞の変化について見ると NK 細胞の増加のあった 6 例のうち 3 例に活性化 NK の増加が認められた。一方、NK 細胞の減少した 2 例では全て活性分画も減少していた。

CD4⁺2H4⁻ (Suppressor inducer T) 細胞は投与前 11.5 ± 10.5 , 投与後 10.1 ± 6.2 と低下傾向にあった。CD4⁺2H4⁺ (helper T) 細胞は投与前 28.8 ± 9.1 , 投与後 30.4 ± 3.4 と増加した。

CD8⁺CD11⁺ (Suppressor T) 細胞は投与前 12.2 ± 7.4 , 投与後 9.9 ± 4.1 と低下傾向にあったが、CD8⁺CD11⁻ (cytotoxic T) 細胞は投与前 16.9 ± 4.9 , 投与後 18.5 ± 5.1 と増加した。しかし、いずれの細胞群も投与前、後の変化には有意の差は認められなかった (図 6)。

図 6 SPG 長期投与によるリンパ球サブセットの変化
CD4⁺2H4⁺: Suppressor-inducer T, CD4⁺2H4⁻:
helper T.
CD8⁺CD11⁺: Suppressor T, CD8⁺CD11⁻:
Cytotoxic T

図 7 SPG 長期投与によるリンパ球サブセットの変化
(症例: 喉頭癌 T₁N₀M₀ 62歳 男)
activ. NK: CD16⁺Leu7⁻, CD16⁺Leu7⁺
CD4⁺DR⁺: 活性化 helper T
CD8⁺DR⁺: 活性化 cytotoxic T

VI) 長期投与症例における免疫パラメーターの推移

16カ月間継続投与を行った62歳男 喉頭癌 (T₁N₀M₀) 症例につき活性化 NK 細胞と CD4⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺ の推移を見た。活性 NK 細胞は18%から4カ月目には26%と増加した後、緩やかに減少し、12カ月目には19%と投与前のレベルまで低下したがその後、再上昇の兆候が見られた。CD8⁺DR⁺, CD4⁺DR⁺ は投与前 CD4⁺DR⁺が CD8⁺DR⁺ をやや上廻っていたが、SPG 投与により逆転し、経過中は CD8⁺DR⁺ が優位となっていた (図 7)。

考 察

癌患者に免疫療法を行う目的は担癌により生ずる免疫抑制状態の解除と抗腫瘍効果の増強にある。今日まで多くの BRM (biological response modifier) が用いられているが、患者各個人に最大の効果発現をもたらす至適投与量や投与回数、投与経路については未だ確固たる見解は示されていない。免疫剤の生体内動態を把握し、

各部位における免疫賦活効果を検討することは有効な投与法を考える上で回避できない問題であろう。

SPG は β -1.3グルカンを主鎖とし三重らせん構造を持つ多糖体である。通常 β -グルカンは合成基質法により測定可能であるが、SPG の場合、複雑な高次構造をとるため一定の処理を加えることで検出が可能となった。アイソトープラベルの SPG を正常ラットに筋肉内投与した場合、肝臓、脾臓、リンパ節、骨髄に6カ月後も活性が持続していたが、血中の活性は低く、7日後には消失したと報告されている。今回、担癌患者を対象に血中濃度を測定すると7日目を過ぎててもなお増加する例を認めた。この現象は一旦、網内系に蓄積された後、血中に出たことによると推測され、担癌状態という特殊な状況においては薬物動態にも変化が生じていることを裏付けている。2回目投与における血中濃度の変化も同様であった。また、長期投与例においては血中濃度に大きな個体差が認められ一定の傾向はなかった。

免疫剤の局在と免疫賦活効果についてみると、SPG を投与した場合、大半が肝臓、特に Kupffer 細胞に取り込まれることより、免疫効果発現の場が主に肝網内系の中心である Kupffer 細胞にあると考えられる^{9,10)}。しかし、免疫活性の中心である網内系から血中へと薬剤分布を変える機序については不明である。

担癌状態では SPG が腫瘍およびその周辺に集積されていることが報告されている¹¹⁾。しかし、この現象は免疫剤に共通のものではなく OK-432 の場合には、腫瘍局所へは弱い分布しか認められないといわれており¹²⁾、腫瘍局所への免疫剤の分布と血中濃度との関係も興味ある問題である。

また、血中での免疫賦活効果と血中濃度との関係も重要で、血中の NK 活性増強は血行転移抑制に作用する¹²⁾といわれている。今回の症例でも活性化 NK 細胞の増加と NK 活性の維持が認められた。

SPG の代謝に関しては、生体内に分解酵素である β -1.3グルカナーゼはほとんど存在しないと考えられており、電顕所見では SPG が phagolysosome の形で細胞内に貯蔵されているのが観察されている⁹⁾。不活化をうけ難い SPG は免疫剤の体内動態を知る上でも重要と考えられる。SPG 投与により引き起こされる複雑多岐な免疫反応も次第に解明されてきており¹³⁾、網内系に捕獲された SPG が血中に出現する過程を解析し、その経過で誘起される一連の免疫反応を追うことは免疫剤の生体内局在の意義をより明確にすると考えられる。

まとめ

1. Sizofiran (SPG) の血中濃度が測定可能となり、

免疫剤の血中濃度の経時的变化がわかった。筋肉内投与を行ったが血中濃度には一定した傾向は認められなかった。この結果より担癌生体において SPG の生体内分布には個体差の存在することが示唆された。

2. SPG 投与による末梢血レベルでの免疫賦活効果を検討したが、NK, helper T, cytotoxic T 細胞の増加と Suppressor-inducer T, Suppressor T 細胞の減少が認められ、抗腫瘍免疫賦活効果の増強が認められた。

3. 免疫剤の血中濃度測定は生体内での薬剤分布を知る指標となり、網内系などの生体各部位における免疫賦活機構解析の糸口となるものと考えられる。また、担癌体での免疫機構の特徴も把握されるであろう。

SUMMARY

The immunological effect has been studied, using of non-specific immunopotentiator Sizofiran (SPG) on the patients with advanced head and neck cancer, in special reference of the relation between the concentration of SPG in serum and immunological parameters on peripheral blood lymphocytes.

The concentration of SPG in serum has been able to detect by applying a conventional limulus test.

Therefore, we examined the relation between the SPG level in serum and immune response. When SPG administrated 20 mg intramuscularly, the SPG level increased moderately during first 24 hours, then elevated rapidly to 150-200 ug/ml after 5 days, coincidentally CD16⁺ Leu7⁻ and CD16⁺ Leu7⁺ (activated NK) cells increased in the peripheral blood.

Next we examined the effect on the second administration after 7 days, we could not find a definite manner relative to the SPG level in serum. Furthermore, seven patients who administrated SPG continuously over 3 months were examined the SPG level in serum, each SPG levels were not constant. But we found CD16⁺ Leu7⁻ and CD16⁺ Leu7⁺ cells, CD8⁺ CD11⁻ (cytotoxic T) and CD4⁺ 2H4⁻ (helper T) were increased, CD4⁺ 2H4⁺ (suppressor-inducer T) and CD8⁺ CD11⁺ (suppressor T) were decreased after long-term SPG administration. These results suggested that the increase of SPG level in serum induced the activation of immune response in patients with head and neck malignancy, predominantly NK, helper T and cytotoxic T cells.

文 献

- 1) Norisue T, Yanaki T et al: Triple helix of a Schizophyllum commune polysaccharide in aqueous solution. J. polymer Sciences: Polymer Physics 18: 547-558, 1980.
- 2) Komatsu N, Okubo S et al: Host mediated anti-

- tumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. Jpn. J. Cancer Res, (Gamm) 60 : 137-144, 1969.
- 3) Sugawara I, Lee KC et al: Schizophyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against dynergic and allogeneic tumor cells. I. Characteristics of SPG-treated macrophages. Cancer Immunol. Immunother. 16 : 137-144, 1984.
 - 4) 三谷満昭, 有可 正 他: Schizophyllan を用いた癌化学療法に関する基礎的研究. 癌と化学療法 9(1) : 122-128, 1982.
 - 5) 三谷満昭, 有可 正 他: ラット同系腫瘍 AMC-60 線維肉腫および BC-47 膀胱癌に対する Schizophyllan (SPG) の抗腫瘍効果. 癌と化学療法 11(9) : 1809-1817, 1984.
 - 6) Schizophyllan (SPG) の ADCC および NK 活性に対する作用. 近大医誌 6(3) : 375-381, 1981.
 - 7) Tsuchiya Y, Igarashi M et al: Cytokine-related immunomodulating activities of an antitumor glucan, sizofiran (SPG). J. Pharmacobio-Dyn 12 : 616-625, 1989.
 - 8) Iwanaga S, Morita T et al: The limulus coagulation system sensitive to bacterial endotoxin. In: Bacterial endotoxin: Chemical, biological and Clinical aspects. (ed. by Homma, J. Y. et al). Verlag chemie, Weinheim, pp. 365-382, 1984.
 - 9) Mizuhira V, Shihara M et al: The fate of ³H-SPG administered to sarcoma-180 grafted mice. Electrton Microscopy 2 : 382-383, 1980.
 - 10) 野口和典: 肝網内系に対する免疫賦活剤の効果. 肝臓 28(10) : 1306-1314, 1987.
 - 11) 木下雅博: 担癌動物への投与 SPG (Schizophyllan glucan) の体内分布とその組織・細胞化学的研究 II. SPG 投与担癌マウス及びラットに於ける SPG 有効群と無効群の SPG の体内分布とリゾチーム性酵素活性の生化学・細胞化学的差異について. お茶の水医学雑誌 34 : 221-237, 1986.
 - 12) 中野英樹, 大谷武彦 他: 溶連菌製剤 OK-432 の担癌生体における吸収, 分布, 代謝排泄機構. Proc. 3rd, Symp. on Drug Metabolism and Action. No. 19-20, 1971. in Fukuoka, Japan.
 - 13) 梅津康生, 永山正明 他: Sonifilan が誘導する抗腫瘍機構の可能性: 口腔癌患者からの知見. Biotherapy 4(8) : 1413-1424, 1990.