尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対するヒト natural killer (NK) 細胞活性に関する研究

第3編 ヒト NK 細胞活性および腫瘍細胞増殖におよぼす OK 432
(streptococcal preparation) の効果について

	早	川	正	道*
	長	倉	和	彦
防衛医科大学泌尿器科学教室 (主任: 中村 宏教授)	畠			亮
	藤	岡	俊	夫
	中	村		宏
慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 田崎 寛教授)	丸	茂		健
	村	井		勝

STUDIES ON HUMAN NATURAL KILLER (NK) CELL ACTIVITY AGAINST CELL LINES DERIVED FROM MALIGNANT URINARY TRACT TUMORS

Part 3: Effects of OK432 on Human NK Cell Activity and
Proliferation of Tumor Cells

Masamichi Hayakawa, Ken Marumo*, Kazuhiko Nagakura, Macoto Hata,
Toshi Fujioka, Hiroshi Nakamura and Masaru Murai*

Department of Urology, National Defense Medical College

(Director: Prof. Hiroshi Nakamura)

*Department of Urology, School of Medicine, Keio University

(Director: Prof. Hiroshi Tazaki)

The aim of this study is to investigate the mechanism of both the effects of a streptococcal preparation (OK 432) on augmentation of human natural killer (NK) cell activity of peripheral blood lymphocytes (PBL) and antiproliferative activity of OK 432 for cell lines derived from urinary tract tumors.

PBL were isolated from healthy donor and patients with urogenital disorder, and were, then, cultured with OK 432 or supernatants from 15-hr OK 432-stimulated PBL cultures (sample medium). Cell lines derived from carcinoma of the prostate (DU 145 and PC 3) and kidney (KU 2) were used as the target cells. K 562 cells, well known for their high susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity, were also used as the control target. NK cell activity was tested by a short-term ^{51}Cr -release assay.

To assess the possibility of OK 432 inducing interferons (IFNs), the culture medium of PBL pretreated with OK 432 was analyzed for anti-viral activity. Determination of the type of IFN induced by OK 432 was made by both acidification (pH 2.0) and neutralization of sample medium. IFN-titer in the medium was neutralized by anti-IFN- α or - β antibody.

Antiproliferative activity of OK 432 was evaluated by examining the growth curves of KU 2 and DU 145 cells following treatment of these cells with OK 432, IFN- α or sample medium.

The present study demonstrates the following: (1) NK cell activity is significantly enhanced by

* 現在 琉球大学医学部泌尿器科学教室

treatment of PBL with OK 432; (2) OK 432 exerts direct antiproliferative effect on cell lines tested; (3) most of IFNs induced by OK 432 are IFN- α and - γ ; (4) IFN which is found to be chiefly responsible for the enhancement of NK cell activity elicited by OK 432 treatment is IFN- γ and (5) the sample medium comprising both OK 432 and IFNs has greater antiproliferative effect than OK 432 medium alone.

要旨：溶連菌の菌体制剤である OK 432 (ビシバニール®) の有する NK 細胞活性の増強効果、および腫瘍細胞の増殖に対する直接抑制効果について、主にその作用機序やインターフェロン (IFN) との関連について *in vitro* で検討を加えた。

健康人供血者と泌尿器科疾患患者の末梢血よりリンパ球 (PBL) を Ficoll-Conray 比重遠心法にて分離し、これを OK 432 あるいは OK 432 と PBL との培養上澄 (sample medium) で培養刺激して effector cell (EC) とした。また腎 (KU 2) および前立腺癌 (DU 145, PC 3) 由来培養細胞と、骨髄性白血病患者より分離した K 562 細胞を target cell (TC) として、 ^{51}Cr 放出法で NK 細胞活性を測定した。

Sample medium 中に IFN が誘起される可能性を調べる目的で、medium 中の IFN 力価を抗ビールス活性で測定し、さらにこの OK 432 誘起 IFN の種類を同定する目的で、medium の酸処理 (pH 2) と、抗 IFN 抗体を用いた中和実験を行った。

OK 432 の細胞増殖抑制効果は、OK 432, IFN- α または sample medium を KU 2 および DU 145 細胞とともに一定時間培養し、その結果得られた増殖曲線より検討された。

その結果、(1) ヒト PBL の NK 細胞活性は OK 432 により有意に増強される、(2) OK 432 はわれわれの用いた継代培養細胞に対して増殖抑制効果を有している、(3) OK 432 により誘起される IFN は IFN- α と - γ である、(4) OK 432 によりもたらされる NK 細胞活性の増強は、主に OK 432 により誘起される IFN (特に IFN- γ) の働きによる、(5) sample medium は同一濃度の OK 432 溶液に比較してはるかに強い細胞増殖抑制効果を有するとの結論を得た。

緒 言

ヒト末梢血リンパ球 (PBL) 中の natural killer (NK) 細胞の活性はインターフェロン (IFN) の刺激により有意に増強される。今回、免疫賦活剤としてわが国ですでに長期に使用され、また最近 biological response modifier として注目されている OK 432 に着目し、ヒト尿路系悪性腫瘍由来培養細胞に対する同薬剤の *in vitro* での抗腫瘍効果について検討を進めた。特に、OK 432 による NK 細胞活性の増強のメカニズムについては IFN 産生との関連において検討を加え、また OK 432 の腫瘍細胞増殖抑制効果についても研究を行った。

実験材料および方法

(1) ヒト末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) の分離：成人男子供血者および泌尿器疾患患者より得た末梢血から Ficoll-Rompacon (Lymphoprep®, Nyegaard and Co. Oslo) を用いた比重遠心法により PBL を分離した¹⁾。 $10^7/\text{ml}$ の PBL 浮遊液を作製し、その一部からプラスチックシャーレへの附着性を利用して単球を除去した²⁾。PBL の洗浄にはヘパリン添加ハンクス液

(HBSS) を、PBL の浮遊液には RPMI 1640 (Gibco, New York) に牛胎児血清 (FCS) (Gibco) を 10% 加えて用いた。

(2) 標的細胞 (Target cell: TC) ヒト腎腺癌由来培養細胞 KU 2³⁾、および前立腺癌由来培養細胞 PC 3⁴⁾、DU 145⁵⁾ を用いた。この 3 種の細胞はいずれも現在のところヌードマウス可移植性である。培養細胞は単層培養にて継代され、週 2 回の培養液交換で維持されている。培養液として、カナマイシン 60mg/L および 0.292g/L の L-glutamine を含むイーグル MEN (日水製薬、東京) に 3.7g/L の重曹と FCS (10% V/V) を加えたものを用いた。また NK 細胞に対して高感受性を有することで知られるヒト慢性骨髄性白血病患者由来の K 562 細胞⁶⁾ も同時に使用した。K 562 細胞は浮遊培養で継代維持され、培養液として、RPMI 1640 に 2g/L の重曹、300mg/L の L-glutamine、10% FCS (これを以下、メディウム-A とする) に、さらにストレプトマイシン 100mg/L とペニシリン G カリウム 10^5 単位/L を加えたものを用いた。これらの細胞は炭酸ガスフラスコ (CO₂ 5%, air 95%) 内に 37°C で静置培養されている。

(3) OK 432: 中外製薬より購入した OK 432 (ビシバニール®)を用いた。1KE (Klinische Einheit)の OK 432は、0.1mg の乾燥菌体を含み、実験前にこれを1ml の生理食塩水にて溶解し(1KE/ml)実験に供した。単球除去および未処置 PBL を 5×10^6 PBL/ml メディウム-A とし、これに0.1KE の OK 432を加えて一定時間37℃にて培養を行なった。続いてこの PBL を、メディウム-A で2回洗浄して OK 432を除去し、これを作動細胞 (Effector cell: EC) として以後の実験に用いた。また OK 432の濃度を变化させて(10^{-3} ~1KE), NK 細胞活性の増強におよぼす OK 432の濃度について検討した。

(4) インターフェロン (IFN): ヒトリンパ芽球 IFN (IFN- α) (Wellferon®, 1×10^7 IU/mg 蛋白, 住友化学工業, 東京)を用いた。 10^7 /ml メディウム-A に調節した PBL に, 10^3 IU の IFN を加えて, 12~15時間37℃にて培養した。ついでメディウム-A にて2回洗浄して IFN を除去したのち, この PBL を EC として実験に用いた。なお IFN の濃度と培養時間の選定は, 第1編⁷⁾の研究結果によった。

(5) NK 細胞活性の測定: $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の TC を含むペトリディッシュ (160×15mm) (Falcon, California, USA) に, $100 \mu\text{Ci}$ の放射性クロム酸ナトリウム (^{51}Cr) (第一化学薬品) を含むメディウム-A 2 ml を重層させ, 37℃で1~2時間静置培養して TC を標識した。培養後, TC をトリプシンで分散させ, メディウム-A にて3回洗浄して free の ^{51}Cr を除去した。同時に浮遊細胞である K 562細胞も同様の条件下で標識し, 共に 10^6 /ml メディウム-A の濃度に調節した。前述の EC を 5×10^6 /ml メディウム-A の濃度とした。TC の $100 \mu\text{l}$ を U 字型マイクロプレート (6.4mm, Falcon, Calif, USA) の各 Well に分注し, ついで EC を加えて反応させた。各 Well 内の TC 数を一定(10^4)に保ちながら, EC: TC 比を50:1から6:1まで4段階に設定し, メディウム-A を用いて各 Well を総量 $200 \mu\text{l}$ に調節した。EC を含まず, $100 \mu\text{l}$ の標識した TC に培養液又は2% Triton- $\times 100$ を加えて $200 \mu\text{l}$ とした Well を別に設定し, TC からの ^{51}Cr の自然放出および最大放出量を測定した。マイクロプレートを37℃で4時間培養し, その後上澄 $100 \mu\text{l}$ をプラスチックチューブに分注して, γ カウンターにて放射能活性を測定した。すべての実験は triplicate で行われた。NK 細胞活性は下式のごとく算出した。

Cytotoxicity (%) =

$$\frac{\text{実験 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}}{\text{最大 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出 (cpm)}} \times 100$$

異なる EC の NK 細胞活性を比較するために, Total lytic unit (TLU) も同時に計算した。Ortaldo⁸⁾らは, 複数の異なった EC 間の NK 細胞活性を比較する場合, ある一定の TC: EC 比における Cytotoxicity (%) のみで検討するより, TLU を用いて比較する方がより客観的であると報告している。TLU は下記のごとく求めた。

$$\text{TLU} = \frac{10^6 \text{ EC}}{1 \text{ lytic unit (LU) の EC 細胞数}}$$

なお, 1LU とは, 30% Cytotoxicity 値を得るのに必要な EC の細胞数である。

(6) 培養液の酸性化: 0.1KE の OK 432 を 5×10^6 PBL/ml メディウム-A に加えて15時間培養したのち, この上澄を採取し, これを sample medium とした。ついでこの sample medium を0.1M グリシン-塩酸バッファー (pH 2) 内で4℃に保ち, 24時間透析した。その後0.1M リン酸バッファー (PBS) (pH 7.4) 内でさらに24時間透析を続けた。メディウム-A のみ, あるいは0.1KE/ml メディウム-A の OK 432溶液, 透析前の sample medium, さらに透析前に IFN- α を sample medium に加えてから同様に透析した溶液のそれぞれ1ml を, 5×10^6 個の未処置 PBL に加えて3時間37℃で培養した。培養後, 各 PBL をメディウム-A で2回洗浄し, これを EC として NK 細胞活性を測定した。

(7) IFN 力価の測定:

国立予防衛生研究所で開発された小長谷¹⁰⁾らの CPE-dye uptake 法に準じた。標準 IFN は NIHJ (1,000 IU/vial) を, 抗 IFN 抗体には NIH (USA) のヒト白血球 IFN およびヒト線維芽細胞 IFN に対する抗体を用いた。ヒト羊膜由来 FL 細胞を96穴のトランスファープレートにて12時間培養した後に, 既知の IFN, 又は当研究の sample medium を加えて10~20時間処理し, その後 Sindbis virus を感染させた。フラン器内で1~2日培養した後, 0.02% の中性紅溶液で染色した。染色, ウイルスの不活化に続き, エタノールで色素を溶出し, 吸光度を測定した。50% の CPE (cytopathic effect) を示す希釈 (常用対数) の逆数を IFN 力価とし, 標準 IFN の最終力価から sample medium の相対的力価を算定した。また sample

medium と抗体を 1 : 1 および 1 : 2 で混和し, 37℃, 1 時間培養し, メディウム中の IFN の中和を試みた。以上の実験は, われわれの得た sample medium を用いて住友化学工業 (相坂 暁氏) と持田製薬研究所 (太田英見氏) において施行された。

(8) 腫瘍細胞増殖抑制効果についての検討 :

10⁵個の KU 2 又は DU 145 細胞を, 60×15mm のペトリディッシュ内に加え, 48 時間 37℃ で培養した。ついでメディウムを除去し, 新たに各濃度の OK 432 や IFN-α を含むメディウム, あるいは透析前後の sample medium を加えてさらに 48 時間又は 96 時間培養を続けた。対照として, 上記の薬剤を含まないメディウムのみにて培養したディッシュを用いた。経時的に各ディッシュ内の腫瘍細胞株をトリプシンにて分散させ, 細胞数を数えて増殖曲線を作製した。なおすべての実験は duplicate 又は triplicate で行われた。

結 果

(1) OK 432 のヒト NK 細胞活性に及ぼす効果 : ヒト NK 細胞活性増強効果に関する OK 432 の至適濃度について検討した。5×10⁶個の PBL に対して, 10⁻³~1 KE の各濃度の OK 432 を作用させて 15 時間培養した。その結果, KU 2 を TC とした場合, NK 細胞活性を増強するためには, OK 432 の濃度として 0.1 KE が最も有効であることが判明した (Fig. 1)。続いて, この増

Fig. 1 Effects of varying dose of OK 432 on NK cell activity against KU 2 cells in vitro.

PBL were incubated with various doses of OK 432 for 15 hr and tested for cytotoxicity against ⁵¹Cr-labeled KU 2 cells in a 4-hr ⁵¹Cr release assay.

強効果を得るのに, PBL 中の単球が必須であるかどうかを検討した。すなわち, プラスチックシャーレへの附着性を利用して, 単球除去を 1 時間ずつ 2 回行った後の非附着性 PBL と, 無処置 PBL を, それぞれ 5×10⁶個ずつ 0.1 KE の OK 432 で培養した。ついで, OK 432 を洗浄除去し, この PBL を用いて NK 細胞活性を測定した。その結果, K 562 に対しては 2 例中 1 例, PC 3 に対しては 2 例中 2 例において, 単球除去 PBL の NK 細胞活性が, 単球を含む PBL のそれより著明に

Table 1 Effect of monocyte-depletion on OK 432-induced cytotoxicity.

PBL and plastic-nonadherent PBL were cultured with OK 432 for 15 hr. The cells were washed and tested for cytotoxicity against K 562 or PC 3 cells at varying EC : TC ratio. (a) : EC : TC ratio. (b) : Mean of cytotoxicity (%) of triplicate.

No. of Exp.	Target cell.	Effector cell.	Cytotoxicity (%)			
			6 : 1	12 : 1	25 : 1	50 : 1 (a)
1.	K562	(1) PBL	24.2 ^(b)	41.4	62.5	63.3
		(2) PBL incubated with OK432	54.2	76.2	81.8	86.1
		(3) Monocyte-depleted PBL incubated with OK432	38.1	61.9	75.9	84.9
2.	K562	(1)	0.6	12.5	34.2	58.9
		(2) same as above	4.5	22.5	49.9	77.0
		(3)	10.2	13.9	30.5	65.1
3.	PC3	(1)			1.5	4.8
		(2) same as above	n.p	n.p	14.8	21.8
		(3)			7.7	8.0
4.	PC3	(1)			0.4	1
		(2) same as above	n.p	n.p	25.3	48.4
		(3)			10.5	23.5

Table 2 Effect of OK 432 on augmentation of NK cell activity.

5×10⁶ PBL were incubated with 0.1EK of OK 432 for 15 hr and then tested for cytotoxicity against various tumor cell lines. Values represent the mean±SD of cytotoxicity (%) or TLU of triplicate. (a): EC: TC ratio. (b): Total lytic unit/1×10⁶PBL. There were significant differences in NK cell activity between OK 432-treated PBL and nontreated PBL. (c)<(d): p<0.01, (e)<(f): p<0.02.

Target cell	Control			Effector cell treated with OK432(0.1KE/5×10 ⁶ PBL)		
	50:1 ^(a)	25:1	TLU ^(b)	50:1	25:1	TLU
K562 (n=6)	59.4±10.9 ^(c)	44.8±8.8	8.3±4.4 ^(c)	76.9±9.4 ^(d)	64.1±7.9	12.3±3.8 ^(d)
KU 2 (n=5)	13.8±3.0 ^(e)	8.7±1.4		28.1±8.3 ^(f)	19.1±5.7	
Dul45 (n=4)	3.5±1.1 ^(e)	2.1±1.5		44.0±17.3 ^(f)	25.1±12.2	
PC3 (n=4)	3.6±2.5 ^(e)	2.2±2.2		37.3±16.2 ^(f)	23.1±11.5	

低下していることが判明した (Table 1). 従って、以後の実験では単球を除去せずに、0.1KE の OK 432 を用いて PBL を刺激することとした。

TC を前述の 4 種類の培養細胞とし、OK 432 にて刺激された PBL の NK 細胞活性を測定した。EC: TC 比が 50: 1 と 25: 1 の場合の、各 TC に対する Cytotoxicity を Table 2 に示した。コントロール群と OK 432 刺激群との K 562 細胞に対する NK 細胞活性を比較するために、TLU の結果も示した。TC として用いた 4 種類の培養細胞に対する NK 細胞活性は、OK 432 との培養により、有意に増強された。

この OK 432 による NK 細胞活性の増強の機構として、① OK 432 が直接 NK 細胞に働き、その細胞障害能を高める、② 新しく pre-NK 細胞から NK 細胞を分化させる、あるいは、③ OK 432 と PBL を培養することにより、NK 細胞活性を増強させる mediator が産生される、の 3 点が推測される。そこで、PBL と OK 432 を 15 時間培養したのちに、その上澄 (sample medium) を採取し、この sample medium の NK 細胞活性に及ぼす影響と、この sample medium 中に IFN が誘起される可能性について検討を加えた。Table 3 に示されるごとく、sample medium 中に 100~1,000 IU/ml の高い IFN 値が同定されたが、この IFN 値は抗 IFN-β 抗体によりほとんど影響されなかった。また抗 IFN-α 抗体を用いた中和実験でも、sample medium の IFN 力価の 1 部が残存した。この sample medium 中の IFN の存在と、OK 432 による NK 細胞活性増強効果との関係を知る目的で、以下の実験を

Table 3 IFN-titer in the sample medium.

5×10⁶ PBL were incubated with 0.1 KE of OK 432 for 15 hr and supernatant fluid was collected. This fluid is referred to as sample medium in this study. Aliquots of the sample medium were dialyzed in 0.1M Glycin-HCl buffer (pH 2) for 24 hr and then dialyzed again in PBS (pH 7.4) for additional 24 hr. Sample medium was also treated with antisera which neutralize IFN-α or-β. Sample medium and each treated mediums were assayed for antiviral activity.

No. of Exp.	IFN titer			
	Before treatment	After dialysis	After treatment with	
			Anti-IFN-α serum	Anti-IFN-β serum
1	372	34	n.p.	n.p.
2	1300	50	n.p.	1250
3	890	n.p.	356	930
4	110	undetectable	n.p.	100

行った (Table 4). まず同一の PBL を 5 等分し、ひとつを対照としてメディウム-A のみで、他の 4 群を OK 432 と sample medium、および前述の方法で酸処理した medium にてそれぞれ 3 時間培養した。培養後、各 PBL を用いて NK 細胞活性を測定した。その結果、3 時間の培養時間では、メディウム-A と OK 432 刺激 PBL の NK 細胞活性との間にはほとんど差異を認めないが、この両群に比して、sample medium と培養した PBL は明らかに高い NK 細胞活性を呈した。しかし酸処理後の sample medium では、NK 細胞活性の増

Fig. 2 In vivo augmentation of NK cell activity with the adjuvant OK 432 therapy for a patient with advanced renal cell carcinoma.

This 72Y/O male patient with renal cell carcinoma had been pretreated with HLBI® (IFN-α) for three months. Following IFN-α treatment, intramuscular administration of OK 432 was carried out. PBL isolated from the patient was tested for cytotoxicity against K 562 cells at an appropriate time.

TLU: Total lytic unit of PBL isolated from the patient.

TLU': from the control.

Table 4 NK cell activity of PBL treated with OK 432 or sample medium.

PBL were treated for 3 hr with following mediums; (1) OK 432 solution (0.1KE/ml), (2) sample medium, (3) dialyzed sample medium and (4) dialyzed sample medium plus IFN-α. PBL were washed and tested for cytotoxicity. EC: TC ratio was 50: 1 (a) and 25: 1 (b).

No. of Exp	Target cells	Cytotoxicity (%) of PBL treated with					
		Growth medium	OK432	Sample medium	Dialyzed sample medium	Dialyzed sample medium plus IFN-α	
1	K562	(a)					
		(b)					
1	K562	37.3/25.7	40.7/31.5	70.3/42.5	56.0/28.1	65.2/34.0	
2	KU2	4.5/3.2	2.2/2.2	18.5/10.8	11.9/4.6	13.8/9.1	
3	DU145	55.2/35.6	64.1/39.1	80.2/77.4	54.5/47.0	83.8/74.9	

Fig. 3 Dose- and time-dependent inhibitory effects of OK 432 on KU 2 cell multiplication.

10⁵KU 2 cells/dish were seeded in to 60mm culture dishes. On day 2nd, the growth medium was aspirated from each dishes and the cells were cultured with OK 432 at a final concentration of 0.01, 0.1 or 0.5 KE/ml in growth medium for 2 or 4 days. The cell number was determined at 4- and 6-day growth in triplicate.

強効果が弱められ、未処置 PBL に近似の cytotoxicity を示すのみであった。IFN-α を加えてから酸処理した sample medium の NK 細胞活性増強効果は保たれており、酸処理には問題なかった。

OK 432 の NK 細胞活性の増強効果について、1 臨床例を呈示する。72 歳男性で右腎腺癌の肝浸潤、皮膚転移のため根治的腎摘出術を施行せず、代りに経カテーテル腎動脈塞栓術を行い、引き続き IFN-α (HLBI®) 300 万単位連日筋注を 3 カ月施行した。HLBI 投与末期には、増強していた NK 細胞活性も、対照患者 (非担

Fig. 4 Dose-dependent inhibitory effects of IFN- α on the multiplication of KU 2 cells.

10^5 KU 2 cells were incubated with growth medium containing 50, 200 or 500IU/ml of IFN- α for 2 days. The number of cells was determined at 4-, 5- and 7-day growth.

Fig. 5 Effects of the sample medium on the multiplication of DU 145 cells.

10^5 DU 145 cells were incubated with OK 432, dialyzed sample medium or untreated sample medium for 2 or 4 days. The cell number was counted at 4-, 6- and 8-day growth.

癌患者)のNK細胞活性より常に低値を示すようになった。しかしHLBI中止3日後から開始されたOK 432療法によりNK細胞活性の再増強が観察された (Fig. 2)。現在、この患者の肝および皮膚転移巣の増大は停止し、stable diseaseの状態である。

(2) OK 432の腫瘍細胞増殖におよぼす効果: OK 432の濃度をそれぞれ0.5, 0.1, 0.01KE/mlとし、腎腺癌由来 KU 2細胞の細胞増殖におよぼす OK 432の抑制効果について検討を加えた (Fig. 3)。OK 432を2日間持続的に作用させたのち、これを含まないメディウムに交換して、さらに2日間細胞培養を続けた。その結果、OK 432は濃度依存性の細胞増殖抑制効果を有することが示された。しかしこの抑制効果は殺細胞効果 (cytotoxic) ではなく、IFN- α の腫瘍細胞増殖抑制効果 (Fig. 4)と同様に、培養液からOK 432を除去すると細胞増殖が増強された。従って、0.01~0.1KE/ml程度の濃度では、OK 432の細胞増殖におよぼす効果はcytostaticな作用であることが推測された。また4日間OK 432を持続的に作用させると、細胞の増殖は2日間作用群よりやや抑制されるが (Fig. 3)、これも同様にOK 432を洗浄除去すると、細胞の増殖が高められた (Fig. 5)。つぎにsample mediumの細胞増殖抑制効果について検討した (Fig. 5)。このmediumには0.1KEのOK 432が含まれているが、同濃度のOK 432溶液の有する抑制効果よりはるかに強い効果を有し、cytostaticな作用よりむしろcytotoxicな作用を示した。しかしこのsample mediumを酸処理すると、その細胞増殖抑制効果は弱められ、しかもこのmediumを2日間作用させたのちに洗浄除去すると、DU 145細胞の増殖の回復が見られた。

考 察

最近の免疫学の進歩に伴ない、癌に対する免疫療法の有効性に対する期待が高まり、各種の免疫賦活剤を用いた臨床例が多数報告されるようになった。現在の癌免疫療法に用いられる免疫賦活剤のうちで、菌体成分を含む物質としてBCG、コリネバクテリウム、OK 432などが知られている。Ehrlich ascites carcinomaの増殖に対する β -hemolytic streptococciの抑制効果がOkamoto¹¹⁾により報告されて以来、溶連菌製剤OK 432の抗腫瘍効果として、腫瘍細胞増殖抑制効果が検討された¹²⁾¹³⁾。その後、OK 432はTリンパ球¹⁴⁾¹⁵⁾やマクロファージを活性化し¹⁶⁾、抗体産生を刺激し、あるいは補体を活性化するなど、種々の宿主反応を誘発する免疫賦活剤としての働きを有することが報告された。ま

た、腫瘍細胞に対するNK細胞活性を増強する作用も報告された¹⁷⁾¹⁸⁾。さらにマウスにおいて、OK 432によりIFN- γ 様物質が血中に誘起される可能性がMatsubara⁹⁾らにより指摘され、OK 432の免疫賦活剤としての働きの多くが、このIFNの産生過程や産生されたIFNそのものに起因すると考えられるにいたっている。しかし、一方、OK 432のNK細胞活性増強効果は、OK 432そのものの直接作用によるものか、それともOK 432により誘起されるIFNによりもたらされるものかについての結論が得られていない。また近年、本邦において抗癌剤とOK 432との併用療法の有用性を示す報告¹⁴⁾¹⁹⁾²⁰⁾が多いが、この臨床結果がある意味では生体内においてOK 432により誘起されるIFNと抗癌剤との併用効果を示唆する内容であるにもかかわらず、現在これに関連したin vitroの基礎的検討がほとんどなされていない。このように、免疫賦活剤としてすでに長年にわたり臨床応用されてきたOK 432の作用機序について、なお不明の点が多いと言えよう。

本研究において、泌尿器悪性腫瘍由来培養細胞を用いて、OK 432の抗腫瘍作用について、in vitroで検討を加えた。まず、ヒトPBLとOK 432との培養液(sample medium)中に高単位のIFNが産生されることを示した。このIFN力価の1部は抗IFN- α 抗体により中和されるが、抗IFN- β 抗体では全く影響を受けないことが判明した(Table 3)。またこのsample mediumはpH 2の緩衝液中で透析されることにより、NK細胞活性の増強効果を著しく失うことも示された(Table 4)。IFN- γ は酸処理に不安定であるが、IFN- α や- β は安定である。従ってsample medium中に誘起され、NK細胞活性の増強に関与するIFNの多くは、IFN- γ であろうと考えられる。さらに、ヒトPBLの培養において、OK 432によりもたらされるヒトNK細胞活性の増強効果は、OK 432そのものの直接作用によるのではなく、OK 432により誘起されるIFN(主にIFN- γ)によるものであることを意味している。また、単球を枯渇したPBLにOK 432を加えた場合、NK細胞活性の増強効果が低下することは、OK 432のIFN誘起に、単球、マクロファージ系が関与する可能性を示唆している。ヌードマウスにおいても、OK 432の投与によりIFNが産生されることが知られている。また、セファデックスG-10カラムを通過させたマウス脾細胞中のT+B細胞分画では、OK 432によりIFNが誘起されないという実験結果から、海老名²¹⁾はin vitroにおけるIFN産生に、NK細胞、プレT細胞とマクロ

ファージの関与が重要であろうと報告している。

Table 2に示されるごとく、ヒト泌尿器悪性腫瘍由来培養細胞に対するヒトPBLのNK細胞活性は、OK 432の刺激により有意に増強された。この増強効果は、Fig. 2に呈示した臨床例でも認められている。この効果がIFNを介する増強効果である限り、Oshimi¹⁸⁾らが報告しているごとく、IFN- α の投与の場合と同様に、OK 432を投与する場合でも長期的にはNK細胞活性が低下していくことになろうと推測される。しかし、OK 432投与初期にNK細胞活性がin vivoにおいて増強された事実は、患者血中においてもIFNが誘起されていることを間接的に示しており、OK 432療法のモニタリングとして、NK細胞活性の測定は、臨床上きわめて有意義であると思われる。HLBI投与末期の患者のPBLをin vitroでIFN- α および- β を用いて刺激しても、NK細胞活性の増強は認められなかった。従って、HLBI投与中のin vivoにおけるNK細胞活性低下の原因は、抗IFN- α 抗体の産生によるHLBIの中和によるとするよりむしろ、プレNK細胞の枯渇²²⁾という現象によりもたらされると考えられる。しかしこの症例のように、IFN- α 刺激に対する感受性を失ったPBLが、OK 432の投与により刺激され、NK細胞活性の再増強が認められるようになったことは興味ある現象である。プレNK細胞の特異性という問題を含め、今後さらに詳細な検討が必要であろう。

KU 2およびDU 145細胞を用いたOK 432の細胞増殖抑制効果はtime and dose dependentであり、またIFN- α のそれと類似し、cytostaticな効果であった(Fig. 3)。この傾向は、OK 432の作用時間を2日間から4日間へと延長させても変わらなかった(Fig. 3)。一方、PBLとOK 432とを培養した際のsample mediumはむしろcytotoxicな作用を示し、強い増殖抑制効果を有していた(Fig. 5)。Blalock²³⁾らによると、WishまたはHEP-2細胞を標的細胞とした場合、抗ウイルス活性単位あたりIFN- γ の細胞増殖阻止活性は、IFN- α や- β の20~100倍であった。またFleischman²⁴⁾らによりType 1 IFNと少量のIFN- γ の併用が、それぞれ単独に用いられた場合に比べ、より強い腫瘍細胞増殖抑制効果を発揮することが報告されている。これらの実験に用いられたIFN- γ はかなり精製された製品である。これに比してわれわれの用いたsample mediumは、単にOK 432のみならず、他のリンホカインや未知の活性物質、そしてIFNsを含む可能性があり、このmediumの強い腫瘍細胞増殖抑

制効果を, OK 432により誘起された IFN- γ の作用と推論するのは早計であろう。しかし, 酸処理後にはこの medium の強い増殖抑制効果が失われており, IFN- γ の作用がこの抑制効果の中心的役割をはたしていることが示唆されている。

以上より, これらの実験結果は, OK 432が体内に投与された場合, IFN- γ を中心とした IFNs の誘起や NK 細胞活性の増強等を含めて, 種々の抗腫瘍作用が誘導され得る可能性を示していると言えよう。今後, in vivo における抗腫瘍効果を最大限に生かすために, OK 432と他抗癌剤との併用療法, IFN 誘起の至適条件, あるいは自己腫瘍細胞に対する NK 細胞活性の OK 432による増強効果, 等についてさらに検討を進めていく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Böyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21(Suppl. 97), 1—109, 1968.
- 2) Zoller, M. and Matzku, S.: Characterization of natural cytotoxicity in vitro in a spontaneous rat tumor model. *J. Immunol.*, 124, 1683—1690, 1980.
- 3) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: As an intermediate of in vivo and in vitro studies. *J. Urol.*, 115, 373—376, 1976.
- 4) Kaighn, M.E., Lechner, J.F., Narayan, K.S. and Jones, L.W.: Prostate carcinoma: Tissue culture cell lines. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 49, 17—21, 1978.
- 5) Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. and Paulson, D.F.: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer*, 21, 274—281, 1978.
- 6) Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B.: Brief communication: Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 535—538, 1973.
- 7) 早川正道, Schmitz-Dräger, B.J. and Ackermann, R.B.: 尿路悪性腫瘍由来培養細胞に対するヒト natural killer (NK) 細胞活性に関する研究。第 1 編。インターフェロン β (IFN) による NK 細胞活性の増強効果とそのメカニズムについて。日泌尿会誌, 75, 32—42, 1984.
- 8) Ortaldo, J.R., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultured in vitro. *J. Immunol.*, 119, 1351—1357, 1977.
- 9) Matsubara, S., Suzuki, F. and Ishida, N.: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK432. *Cancer Immunol. Immunother.*, 6, 41—45, 1979.
- 10) 小長谷昌功, 河野晴也, 斉藤早久良: インターフェロンの試験検定。蛋白・核酸・酵素, 別冊25, 355—363, 1981.
- 11) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. and Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn. J. Microbiol.*, 11, 323—336, 1967.
- 12) Ono, T., Kurata, S., Wakabayashi, K., Sugawara, Y., Saito, M. and Ogawa, H.: Inhibitory effect of a streptococcal preparation (OK432) on the nucleic acid synthesis in tumor cells in vitro. *Gann*, 64, 59—69, 1973.
- 13) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. and Takagaki, Y.: Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemother. Rep.*, 56, 9—17, 1972.
- 14) Kimura, I., Ohnoshi, T., Yasuhara, S., Sugiyama, M., Urabe, Y., Fujii, M. and Machida, K.: Immunochemotherapy in human lung cancer using the streptococcal agent OK432. *Cancer*, 37, 2201—2203, 1976.
- 15) Kai, S., Tanaka, J., Nomoto, K. and Torisu, M.: Studies on the immunopotentiating effects of a streptococcal preparation, OK432. *Clin. Exp. Immunol.*, 37, 98—105, 1979.
- 16) Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. and Kikuchi, K.: Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK432. *Gann*, 67, 115—119, 1976.
- 17) Yamagata, S., Micksche, M., Al-Hashimi, M. and Vetterlein, M.: Natural killer cell activity of mouse splenocytes against Lewis lung tumor cells. 5th. Meeting EACR, Abstr. 40, p. 44, 1979.
- 18) Oshimi, K., Wakasugi, H., Seki, H. and Kano, S.: Streptococcal preparation OK-432 augments cytotoxic activity against an erythroleukemic cell line in humans. *Cancer Immunol. Immunother.*, 9, 187—192, 1980.
- 19) 渡辺洋宇, 小森吉晴, 山田哲司, 村田修一, 横井克己, 岩 喬: 肺癌術後における OK-432 免疫療法の意義。癌と化学療法, 6, 811—820, 1979.
- 20) 鈴木良二: 膀胱腫瘍に対する溶連菌製剤ピシバニールの膀胱内注入法の経験。癌と化学療法, 3, 203—210, 1976.

- 21) 海老名卓三郎：誘起インターフェロンの特性。統
生体防御の機構。初版，東京大学出版会，東京，
1981.
- 22) Minato, N., Reid, L., Neighbour, A., Bloom, B.
R. and Holland, J.: Interferon, NK cells and
persistent virus infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,
350, 42—54, 1980.
- 23) Blalock, J.E., Georgiades, J.A., Langford, M.P.
and Johnson, H.M.: Purified human immune
interferon has more potent anticellular activity
than fibroblast or leukocyte interferon. *Cell
Immun.*, **49**, 390—394, 1980.
- 24) Fleischmann, W.R. Jr., Kleyn, K.M. and Baron,
S.: Potentiation of antitumor effects of virus-
induced interferon by mouse immune interferon
preparations. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 963—966,
1980.

(1983年12月17日受付)