OK-432 経口投与による大腸癌所属

リンパ節の免疫活性の賦活

峠 哲 哉・山田 博文・世戸 芳博・山口 佳之
沢村 明広・柳川 悦朗・服部 孝雄・畠山 哲朗*

Jpn. J. Clin. Immun., 10 (1): 19~23, 1987.

Enhancement of immune reactivities of regional lymphnodes by oral administration of OK-432 in colon cancer patients

Tetsuya Toge, Hirofumi Yamada, Yoshihiro Seto, Yoshiyuki Yamaguchi,
Akihiro Sawamura, Etsuro Yanagawa, Takao Hattori and Tetsuroh Hatayama*

*Department of Surgery, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology,
Hiroshima University, *Department of Surgery, Hiroshima City Hospital*

【Summary】

Effect of oral administration of OK-432 on the immune reactivities of regional lymphnode (RNLs) and peripheral blood lymphocytes (PBLs) in colon cancer patients were investigated. Twenty KE of OK-432 was given orally on 7 days prior to the operation, and peripheral blood and regional lymphnodes were collected at the time of operation. As for the immune reactivities of PBLs such as lymphocyte proliferative response to phytohemagglutinin (PHA), natural killer (NK) cell activity and Concanavalin A (Con-A) induced suppressor cell activity, there were no significant differences between patients with oral OK-432 (OK-432 (+) group) and those without OK-432 (OK-432 (-) group). NK cell activity of RLNs was significantly higher in OK-432 (+) group than in OK-432 (-) group. Furthermore, the decline of Con-A induced suppressor cell activity was found in OK-432 (+) group. T cell subsets in regional lymphnode tissues were identified with the use of monoclonal antibodies and immunoperoxidase technique. Both of Leu-2 a and Leu-7 positive cells distributed more frequently in lymphnodes from OK-432 (+) group than in those from OK-432 (-) group. Thus, these results suggested that immune reactivities of regional lymphnodes were enhanced by oral administration of OK-432 in colon cancer patients.

Key words : Oral OK-432,
Regional lymphnode,
Immune reactivity

【概 要】

経口的非特異的免疫療法の可能性を考慮して、大腸癌患者において OK-432 を経口投与し、所属リンパ節の免疫学的活性および免疫組織学的に T 細胞亜群の検討を行った。

OK-432 20 KE を手術 1 週間前に経口投与し、手術時に末梢血および所属リンパ節を採取した。末梢血リンパ球におけるリンパ球幼若化反応、Con-A 誘導サプレッサー細胞活性は経口投与群および非投与群において差を認めなかった。所属リンパ節においては、経口投与群では非投与群に比べ NK 細胞活性は有意に増強され ($p < 0.05$)、また Con-A 誘導サプレッサー細胞活性は低下した。さらに経口投与群においては、OKT 8 陽性および Leu 7 陽性細胞が増加した。こうしたことより、臨床的に OK-432 経口投与により大腸癌所属リンパ節の免疫活性が賦活されることが示された。

I. はじめに

経口投与された抗原が、腸管局所免疫を成立させ、さらに全身の免疫を成立させることが明らかにされている。消化器癌の免疫療法において、腸管局所の免疫応答を効率よく賦活させることは治療成績向上に寄与するものと考えられる。経口投与された OK-432 は、リンパ行性に吸収され、腸間膜リンパ節に達することが認められ¹⁾、さらに腸間膜リンパ節の抗腫瘍活性が増強されることが認められている²⁾。しかし、これらの成績は動物実験において示されたものであり、臨床的に OK-432 を経口的に投与した場合の腸管リンパ節に対する効果は不明な点が多い。

本報においては、経口的非特異的免疫療法の可能性を考慮して、大腸癌患者において OK-432 を経口投与し、所属リンパ節の免疫学的検討を行った。

II. 材料と方法

1. 対 象

術前未処置の大腸癌患者 17 名および正常健康者 17 名を対象とした。大腸癌患者は無作為に OK-432 経口投与群、非経口投与群の 2 群に分けた。

2. OK-432

溶連菌製剤 OK-432 (0.1 mg/KE) は中外製薬 KK より分与された。OK-432 経口投与群においては、手術 7 日前に OK-432 20 KE を投与した。

3. 末梢血およびリンパ節リンパ球の採取

末梢血は手術当日に採取した。リンパ節は開腹時に大腸癌所属第一次リンパ節を採取した。末梢血リンパ球の分離は Conray-Ficoll 法による。リンパ節は 2~3 個採取し転移のないことを確認し、細分後ワイヤーメッシュ

にて濾過、RPMI-1640+20% AB 血清にてリンパ球浮遊液を作製した。

4. リンパ球幼若化反応および Natural killer (NK) 細胞活性

末梢血およびリンパ節リンパ球の phytohemagglutinin (PHA) に対するリンパ球幼若化反応および K-562 細胞に対する NK 細胞活性の測定は既報によった^{3,4)}。NK 細胞活性の測定は ⁵¹Cr release assay によった。

5. Concanavalin-A (Con-A) 誘導サプレッサー細胞活性

Con-A 誘導サプレッサー細胞活性の測定は既報によった⁵⁾。活性は以下の式にて算出した。

Con-A 誘導サプレッサー細胞活性 (%) = $(1 - A/B) \times 100$

A : Con-A 刺激リンパ球 + 反応細胞 (4 cpm)

B : Con-A 非刺激リンパ球 + 反応細胞 (4 cpm)

6. 大腸癌所属リンパ節の T 細胞亜群の固定

大腸癌所属リンパ節について、モノクローナル抗体 (anti-Leu 2a, 3a, 7, Becton-Dickinson, USA) を用いた酵素抗体法による組織内 T 細胞亜群を既報により同定した⁶⁾。組織内の陽性細胞数はリンパ節において、各モノクローナル抗体に対する陽性細胞がもっとも高頻度分布する部位において顕微鏡下 100 倍視野で 3 視野を算定しその平均値で表した。各群間の統計学的有意差の検定は Student' t-test を用いた。

III. 結 果

大腸癌患者において、OK-432 経口投与群 (OK-432 (+) 群) と非投与群 (OK-432 (-) 群) での末梢血リンパ球における PHA 反応 Con-A 誘導サプレッサー細胞

活性および NK 細胞活性について検討した (表 1). リンパ球幼若化反応, Con-A 誘導サプレッサー細胞活性および NK 細胞活性のいずれにおいても, OK-432 (+) 群, OK-432 (-) 群において有意差を認めなかった.

大腸癌所属リンパ節リンパ球における活性を同様に検討した. 表 2 に示すように, リンパ球幼若化反応は OK-432 (+) 群および OK-432 (-) 群において差は認めなかった. Con-A 誘導サプレッサー細胞活性は OK-432

(+) 群において低下する傾向を示した. NK 細胞活性は OK-432 (+) 群において有意に高いことが認められた ($p < 0.05$).

所属リンパ節組織内での T 細胞亜群をモノクローナル抗体により同定し, 陽性細胞数を算定した. Cytotoxic/suppressor T 細胞である Leu 2a 陽性細胞あるいは NK 細胞である Leu 7 陽性細胞は OK-432 (+) 群において, より高頻度に認められた. 逆に helper/inducer T 細胞は OK-432 (-) 群で高頻度に分布する傾向を示した. Leu 3a/Leu 2a 比を検討すると, OK-432 (+) 群において有意に低値を示した ($p < 0.1$).

表 1 大腸癌患者末梢血リンパ球の免疫反応に対する経口 OK-432 の効果

Responses	Oral OK-432 administration	
	(+) (n = 9)	(-) (n = 6)
PHA responses (cpm)	35287.2 ± 3799 ^{a)}	49697.8 ± 3601
Con-AS activities ^{b)} (%)	10.2 ± 2.1	16.0 ± 0.4
NK activities × 40 ^{c)} (%)	15.8 ± 4.3*	6.5 ± 3.3
	12.0 ± 3.1*	3.8 ± 1.1

a) Mean ± SE, b) Con-A induced suppressor cell activities, c) E/T ratio. Significant difference between two groups,

* $p < 0.05$.

IV. 考 案

消化器癌所属リンパ節における NK 細胞活性は末梢血リンパ球あるいは脾細胞における活性に比較して有意に低下しており, またリンパ節組織においても Leu 7 陽性細胞の分布も低頻度であることを認めている⁶⁾. 所属リンパ節での抗腫瘍活性については, リンパ節リンパ球は末梢血に比較して同等に killer T 細胞を産生する能力は有しているが担癌状態では明らかにその機能は低下しており, また NK 活性や activated killer 活性は明らかに低く, リンパ節は抗腫瘍性に働く可能性は少ないと

表 2 大腸癌患者所属リンパ節リンパ球の免疫反応に対する経口 OK-432 の効果

Responses	Oral OK-432 administration		
	(+) (n = 7)	(-) (n = 10)	Control (n = 17)
PHA responses (cpm)	26460.9 ± 2233 ^{a)}	38221.3 ± 2789	29401.5 ± 1523
Con-AS activities ^{b)} (%)	8.2 ± 3.1	9.8 ± 2.4	7.3 ± 2.3
NK activities × 40 ^{c)} (%)	24.8 ± 3.7	22.5 ± 4.4	21.6 ± 2.7
	14.2 ± 3.3	16.6 ± 3.6	16.5 ± 7.0

a) Mean ± SE, b) Con-A induced suppressor cell activities, c) E/T ratio

表 3 大腸癌所属リンパ節における T 細胞亜群の同定 (経口 OK-432 投与)

Oral OK-432 administr.	Cells reactive with			
	Leu 2 a	Leu 3 a	Leu 7	Leu 3 a/Leu 2 a
(-) (n = 4)	54.5 ± 2 ^{a)}	282.9 ± 27	8.9 ± 4	5.2 ± 0.2
(+) (n = 4)	88.5 ± 14	240.7 ± 7	17.3 ± 6	2.9 ± 0.6*

Cells reactive with monoclonal antibodies in the lymphnodes were counted in the area where positive cells were present dominantly by the grid in the ocular under 100 times magnified field. Three magnified areas chosen in each of tissue were used.

a) Mean number of positive cells ± SD

Significant differences from the value of OK-432 (-), * $p < 0.1$

されている⁷⁾。さらに胃癌患者において第 1, 2, 3 群リンパ節は転移の有無にかかわらず細胞性免疫能において低下しており、この傾向は癌進行した症例ほど著明であることが報告されている⁸⁾。一方、こうした低下したリンパ節での抗腫瘍活性は OK-432 の腫瘍内投与により増強されることが認められており⁹⁾、所属リンパ節を癌細胞に対する biological barrier と考えるなら、リンパ節での免疫活性の賦活増強は、癌免疫療法において重要な意味を持つといえよう。

今回の大腸癌患者において OK-432 経口投与を行い所属リンパ節での NK 細胞活性の賦活およびサプレッサー細胞活性の低下が認められた。この場合、リンパ節組織内での T 細胞亜群の変化を観察すると、Leu 7 陽性細胞、Leu 2a 陽性細胞の増加が認められた。Leu 2a 陽性細胞は cytotoxic T および suppressor T 細胞であるとされているが、サプレッサー T 細胞の変化とを考えると、リンパ節内での Leu 2a 細胞の増加は cytotoxic T 細胞の増加と考えることができよう。われわれはすでに OK-432 の作用機序の 1 つとして、サプレッサー細胞誘導阻害を認めている¹⁰⁾。また、OK-432 の腫瘍内あるいは体腔内投与により局所における NK 細胞活性が賦活されることが認められている¹¹⁾。こうしたことより、経口投与された OK-432 はリンパ行性に大腸癌所属リンパ節に達し、リンパ節での免疫活性を増強することが示され、経口投与による消化器癌局所免疫療法の可能性が示唆さ

れたといえる。

臨床的に OK-432 を経口投与した報告は少ないが、仁尾らは胃癌患者において経口投与群では術後 3 ヶ月目より PPD, PHA は皮内反応が緩徐に増強されることを報告している。また乳癌患者においても溶連菌 Su 株由来の Su polysaccharide に対する皮内反応が増強されることが報告されており、こうした経口投与の場合 OK-432 筋注の場合と異なり末梢血リンパ球数の増加が認められなかったとされている¹²⁾。われわれの今回の検討においても、経口投与後 1 週間では末梢血リンパ球の免疫反応には何ら変化が認められず、仁尾らも述べているように⁶⁾、経口投与が全身の免疫系に働くのは時間的に遅れるものと考えられる。

OK-432 経口投与においては所属リンパ節近位、遠位の活性の賦活、微少転移巣における活性に対する効果、あるいは OK-432 の投与量、投与のタイミング等についての検討が必要であろう。

V. おわりに

OK-432 経口投与により、大腸癌所属リンパ節における NK 細胞活性の賦活、サプレッサー細胞活性の低下、Leu 2a および Leu 7 陽性細胞の増加が認められ、OK-432 による経口非特異的免疫療法の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 仁尾義則・大垣和久・稲本 俊・堀 泰祐・中山昇・山崎信保・菅 典道・日笠頼則・土谷利春・児玉 宏・戸部隆吉：ピシバニール (OK-432) 経口投与の試み (第 2 報)—腸管免疫の観点より：その吸収過程と消化管リンパ組織の反応。日本癌学会誌：19：71～79, 1984。
- 2) 仁尾義則・稲本 俊・菅 典道・堀 泰祐・中山昇・山崎信保・日笠頼則・土谷利春・戸部隆吉：OK-432 経口投与の試み (第 3 報)—腸管免疫の観点から—, Natural killer 活性とリンパ球幼若化反応の増強効果について。日本癌学会誌：19：803～810, 1984。
- 3) Toge, T., Nagusa, Y., Nakano, A., Ikeda, H., Hattori, T.: Lymphocyte responsiveness to PHA and its modification by serum inhibitor in patients with breast cancer. *Gann*, 70: 245～248, 1979。
- 4) Toge, T., Hirai, T., Takiyama, W., Hattori, T.: Effects of surgical stress on natural killer activity, proliferative response of spleen cells and cytostatic activity of lung macrophages. *Gann*, 72: 790～794, 1981。
- 5) Toge, T., Hamamoto, S., Itagaki, E., Yajima, K., Nakane, H., Kohno, H., Nakanishi, K., Hattori, T.: Concanavalin-A induced and spontaneous suppressor cell activities in peripheral blood lymphocytes and spleen cells from gastric cancer patients. *Cancer*, 52: 1624～1631, 1983。
- 6) 世戸芳博・峠 哲哉・中根英幸・友田修三・亀田彰・服部孝雄：胃がん所属リンパ節、脾臓における T 細胞亜群の同定。Oncologia, 12: 151～153, 1985。
- 7) 木場文男・秋吉 毅・有永信哉・和田哲哉・辻秀男：胃癌所属リンパ節の細胞性免疫。日消外会

- 誌, 19: 854~857, 1986.
- 8) 小川健治・矢川裕一・勝部隆男・川田裕一・大谷洋一・榊原 宣: 胃癌所属リンパ節の抗腫瘍的な免疫応答について. 日消外会誌, 19: 862~866, 1986.
- 9) 折田薫三: 免疫賦活剤の腫瘍内注射による主病巣, 所属リンパ節における生体防御反応の増強の試み. 溶連菌製剤 OK-432—その作用と臨床応用—. 橋本, 野本, 服部, 木村編, Excerpta Medica, 東京, 1986, pp 157~172.
- 10) Toge, T., Seto, Y., Hattori, T.: Reduction of suppressor cell activities by OK-432 immunotherapy in cancer patients, Recent Advances in Chemotherapy. Edited by Ishigami, J. University of Tokyo Press, Tokyo. 1985, pp 1003~1004.
- 11) 内田温士: 自己腫瘍細胞障害 (auto tumor killing) 活性と OK-432. 溶連菌製剤 OK-432—その作用と臨床応用—. 橋本, 野本, 服部, 木村編, Excerpta Medica. 東京, 1986, pp 59~67.
- 12) 仁尾義則・大垣和久・辺見公雄・菅 典道・稲本俊・土谷利春・児玉 宏・戸部隆吉: ピシバニール (OK-432) 経口投与の試み (第1報)—腸管免疫の観点より—. 日癌治会誌, 17: 728~734, 1982.
-