

消化器癌化学療法に併用する非特異的能動免疫療法に 関する基礎的研究

京都府立医科大学第2外科 (主任: 橋本 勇教授)

寺 田 信 國

STUDIES ON NON-SPECIFIC ACTIVE IMMUNOTHERAPY COMBINING WITH CANCER-CHEMOTHERAPY

Nobukuni TERATA

2nd Dep. of Surgery, Kyoto Pref. Univ. of Medicine, Kyoto

(Director: Prof. Isamu Hashimoto)

癌化学療法にいわゆる非特異的免疫賦活剤と称されている薬剤を併用投与する際の効果を、各種免疫学的パラメーターの成績の評価および生存率の面から解析した。臨床例では消化器癌とくに胃癌を対象として多剤併用癌化学療法剤 (MF (F') C) と非特異的免疫賦活剤 (OK-432) の併用効果について、動物実験では C₃H/He マウスと syngeneic の系である Methylchlantrene 誘発肉腫を用いて、Mitomycin C と OK-432, Levamisole, PS-K そして Bamfolin 等をそれぞれ併用する場合の効果を検討した。これらの薬剤の併用により一般的には、各種免疫学的パラメーターの改善する傾向が認められたが、生存率の延長に推計学的有意差はみとめられなかった。

索引用語: 消化器癌患者, 同系腫瘍, 非特異的免疫療法, 免疫学的パラメータ, 術後生存率

I 緒 言

最近 BCG¹⁾, OK-432²⁾, PS-K⁴⁾, Lentinan⁵⁾, Bamfolin⁶⁾, Bestatin⁷⁾ などを用いる非特異的能動免疫療法一宿主の免疫能を非特異的に賦活することによって、同時に腫瘍に対する宿主側の排除機能をも高めようとする試みが臨床面で頻繁に応用されている。ところが宿主のもつ異物排除機能は量的にも限度があり⁸⁾、免疫療法によって、あらゆる癌を制圧するには至っていない。そこで現状ではその効果を有効に発揮させるための工夫として、進行癌に対しては抗腫瘍性に作用するさまざまな治療法を組みあわせ、それらによる相乗効果を期待している。とくに免疫療法は、癌化学療法⁹⁾・放射線治療¹¹⁾・手術¹³⁾に共通してみられる免疫抑制作用に対して補完的に働くため、これらの療法に併用することが、宿主にとって有利であろう⁸⁾という期待をもつて施行されている。

ところが臨床面で応用されているこの療法の免疫賦活

作用については、既成の事実として認められていることが多く、現実には、この方法を施行しても、それによって宿主の免疫方法がどのように推移するのか十分に解析はなされていない。そのため免疫賦活剤のもつ他の一面、すなわち immunological enhancement¹⁴⁾・¹⁵⁾・¹⁶⁾・¹⁷⁾の可能性は無視されている危惧がある。そこで本研究では免疫療法を可及的に有効に施行するための試みとして、臨床例および動物実験において、免疫療法、免疫化学療法などを施行した場合の宿主側にみられる免疫学的諸元の変動を検討し、この結果を基礎にして免疫療法施行に関する基本的態度を明らかにしようとした。

II 実験方法

1. 臨床例の検索方法

1) 対象症例: 消化器癌患者 (胃癌305例, 大腸癌67例, 膵臓癌13例, 肝胆道癌10例, 食道癌32例) が、本研究の検索対象となり、OK-432 単独投与症例は69例、Mitomycin C (M), 5FU, (F) または FT-207 (F') お

よび Cytocine arabinoside (C) による多剤併用癌化学療法〔以下 MF (F') C〕症例は69例, MF (F') C に OK-432 を併用したもの〔以下 MF (F') C-O〕は79例であつた。これらにつき以下述べるいくつかの項目で、種々の検索を行った。

2) 薬剤投与方法: 化学療法は手術後に行う adjuvant cancer chemotherapy を基本とした。すなわち手術後10日頃から 5FU 250mg または FT-207 400mg を連日点滴静注, Mitomycin C 2mg, Cytocine arabinoside 20 mg を週2回経静脈に投与し, 3週間を1クールとした。これを MF (F') C 療法と名付けたが, 太田らの原法¹⁸⁾に比較し副作用防止の意味からかなり投与は減じられている。OK-432の投与は 0.2K.E. から漸増して 2.0 K. E. を維持量とし, 連日皮下投与を行い, MF (F') C との併用の場合は同時投与を原則とした。

3) PPD 皮内反応: purified protein derivative による皮内反応 (以下, PPD 皮内反応) には, 日本 BCG 製造株式会社的一般診断用 (0.5 μ g/ml) の PPD を, 前腕屈側皮内に 0.1ml 注射し, 48時間後に発赤の縦横径を測定して, その平均値を求め mm で示した。

4) PHA 皮内反応: Phytohemagglutinin による皮内反応 (以下 PHA 皮内反応) は, PHA-P (Difco Lab.) を滅菌生食水で 100 μ g/ml に調製し, 0.1ml (10 μ g) を皮内注射し, 24時間値を求めた。

5) T細胞・B細胞分布率: T細胞・B細胞の測定は, 橋ら¹⁹⁾の方法によつた。Eロゼット形成用指示細胞には, Neuraminidase 処理羊赤血球を用い, 補体レセプター (C₃b) 検出用指示細胞はヒト補体 EAC を用いた。なお EAC 陽性細胞に含まれる単球・顆粒球は, Peroxidase 染色により補正した。なお本法による T細胞, B細胞の和は, ほぼ100%となつた (n=295, T細胞: 77.2 \pm 0.7%, B細胞: 25.0 \pm 0.7%, T+B: 102.3 \pm 0.3%)。

6) PHA 幼若化率: Phytohemagglutinin によるリンパ球幼若化率 (以下 PHA 幼若化率) は, ヘパリン採血した末梢からリンパ球を Ficoll-Conray 400 で分離し, これを10% FCS 加 RPMI-1640 に浮遊させ, Falcon の microtestplate (#3040, 3041) の各ウェルに 2 \times 10⁵ 個を分注し, repeating dispenser で PHA-P (Difco Lab.) を 15 μ g/ml の濃度になるように加え, 72時間培養を行なつた。培養終了8時間前に ³H-Thymidine を 1 μ Ci/ml の濃度になるように加え, リンパ球の回収はセルハーベスター (MASH II, LM101 ラボマッシュ)

によつた。ついで液体シンチレーション法でリンパ球の ³H-Thymidine の取り込み値を dpm (=disintegration per minutes) で測定し, PHA を加えない値 (control) との比から, stimulation index (S. I.) を求めた。Quadruplicate で測定を行い, median の値を採用した。

7) 3MKCl 抽出可溶性抗原の抽出法: 3MKCl 抽出可溶性抗原の抽出は, Kahan²⁰⁾ が報告している方法を少し変更して行った。すなわち, 新鮮切除標本より, 腫瘍と, 対照として非癌部より抗原用組織をすみやかに採取し, それぞれ 10⁶~10⁸個/ml となるように PBS を用いて細胞浮遊液を作成し, これに 3Mol になるように KCl を加え, 4 $^{\circ}$ C で16時間攪拌処理することにより, 細胞膜に含まれる抗原を抽出した。さらにナトリウムアチドで, この抽出抗原に混入する核酸成分を沈澱除去した。このようにして得られた抽出抗原は濃縮後, 0.45 μ m の Millipore filter を通過せしめ, 4 $^{\circ}$ C の温度で保存した。

8) 3MKCl 抽出可溶性抗原による幼若化率: 3MKCl 抽出可溶性癌抗原, および対照として 3MKCl 抽出可溶性非癌部抗原をそれぞれ 100 μ g/ml と 10 μ g/ml の2つの濃度になるように autochthonous のリンパ球浮遊液に加えた。培地は10% FCS 加 RPMI-1640 であり, 細胞濃度は 1 \times 10⁶/ml であつた。5日培養後 PHA 幼若化率と同様の手技でリンパ球を回収し, 液体シンチレーション法で測定し, stimulation index が2.0以上を陽性と判定した。

2. 動物実験の検索方法

1) 動物および腫瘍: 動物は C₃H/He マウス (北山ラベス) 生後4~8週の雄を用いた。また腫瘍は syngeneic の系である Methylchlantrane 誘発線維肉腫 (塩野義研究所より提供, 以下 MCA 肉腫と略す) を皮下に継代接種して維持したものと, これを著者らの研究室で初代培養し培養株化したものを使用した。継代移植腫瘍を採取しこれを細切し mesh を通して single cell suspension としたものを 5 \times 10⁶個, C₃H/He マウスの皮下右背側に注射すると, マウスは6~7週で腫瘍死する。

2) Cytotoxicity test: Cytotoxicity test は Terasaki²¹⁾ および TakAsugi²²⁾ の adherent cell を用いた Micro testplate 法によつた。すなわち培養腫瘍細胞を 100~200個/10 μ l に調整し, Microtestplate #3034 (Falcon plastics, Los Angeles, Calif.) に 10 μ l ずつ各 well に分注した。これを 5% CO₂ 培養器内で 37 $^{\circ}$ C 24時間培養し,

腫瘍細胞が plate に付着したのを確認した後、被検マウスのリンパ節細胞をこの well に加え（腫瘍：リンパ節細胞=1：100）、対照として培養液のみを入れた。さらに16時間培養後、Hanks 液で培養細胞を数回ゆるやかに洗い、作用細胞・死細胞を除去した。well の底にはりついている生細胞をメタノール固定し、Giemsa 染色後鏡検下で算定し、障害性を次の式より得られた%で示した。

$$\frac{\text{対照腫瘍細胞数} - \text{被検腫瘍細胞数}}{\text{対照腫瘍細胞数}} \times 100$$

3) 幼若化率：リンパ節細胞に見られる PHA 幼若化率および 3MKCl 抽出可溶化抗原による幼若化率は、臨床例での方法に準じて行った。mixed lymphocyte tumor cell reaction (以転 MLTR) は、培養腫瘍細胞に MMC を 50 μ g/ml の濃度になるように加え、37°C で 30分間反応させ 50ml の Hanks 液で 3 回洗浄した後、被検マウスのリンパ球細胞 2 \times 10⁶個に対して 1/10量を添加し 6 日間培養後、他の幼若化率を求めた時と同様の方法で細胞を回収し、液体シンチレーション法で dpm を求め、腫瘍細胞を加えないリンパ節細胞の ³H-Thymidine の取りこみ (Control 値) との比から simulation index (S. I.) を求めた。

4) リンパ節細胞の採取法：繰返しの実験から、脾細胞では種々の免疫療法・化学療法に対して再現性のある in vitro でのデータが出にくい²³⁾ため、本実験ではリンパ節細胞を in vitro でのパラメーターの追跡に使用し

た。すなわち、単径部・腋窩・頸部・腸間膜のリンパ節を採取し細切後、mesh を通し、2 回洗浄した後、10% FCS 加 RPMI-1640 に 1 \times 10⁶個/ml になるように浮遊させ、前述の種々の検索に使用した。

5) 薬剤投与方法：腫瘍 5 \times 10⁵個をマウスの右背部皮下に移植後、定められた日より 5 日間、MMC は 0.5mg/kg/日を腹腔内に投与、OK-432 1.0K.E./匹/日を腫瘍と同側の、腫瘍から 1cm 以上離れた皮下に、Levamisole は 0.5mg/kg/日を同様皮下に注射し、PS-K は 100mg/kg/日を 5% の濃度に溶解したものを腹腔内に投与し、Bamfolin は 1.0g/kg/日を 4% の濃度に溶解したものを腹腔内に投与した。免疫学的パラメーターを観察する群は、投与終了時殺し、各種免疫臓器を採取した。

III 結果

1) 胃癌患者の進行度と免疫学的パラメーター：担癌生体では一般に細胞性免疫能が低下しているといわれているが、胃癌患者では、どの免疫学的パラメーターが、進行度に伴う免疫能の低下をより反映しているかを知る目的で、表 1 の検索を行った。胃癌取扱い規約による組織学的 stage I と stage IV の症例がそれぞれ、術前でしかも癌化学療法や免疫療法を受けていない時期に示す各種免疫学的パラメーターの平均値の差を推計学的に検討した。症例数は異なるために一概に断定することは困難であるが、各パラメーターの中で有意差がみられたのは PPD 皮内反応、 α_2 -globulin (p<0.01)、PHA 幼若化

表 1 Mean and level of significance of immunological parameters in stage I and IV of gastric cancer

PARAMETERS	STAGE I		STAGE IV		p.**
	n	MEAN \pm S.E.*	n	MEAN \pm S.E.	
PPD SKIN TEST (mm)	45	21.4 \pm 2.0	63	14.3 \pm 1.7	p<0.01
PHA SKIN TEST (mm)	14	20.0 \pm 2.0	20	19.1 \pm 2.1	n.s.***
LYMPHOCYTE COUNT (/cmm)	45	2313 \pm 119	68	2014 \pm 96	p<0.05
T-CELL %	8	77.8 \pm 4.1	17	80.3 \pm 2.5	n.s.
T-CELL COUNT (/cmm)	8	2024 \pm 326	17	1584 \pm 212	n.s.
B-CELL %	8	22.3 \pm 5.5	17	24.8 \pm 3.3	n.s.
B-CELL COUNT (/cmm)	8	852 \pm 351	17	498 \pm 64	n.s.
PHA BLAST.**** (S.I.)	29	65.4 \pm 8.1	38	44.7 \pm 5.4	p<0.05
α_2 -GLOBULIN (r/ml)	37	599.7 \pm 1.8	55	687.6 \pm 24.3	p<0.01

* S.E.= standard error ** P.= probability *** n.s.= not significant

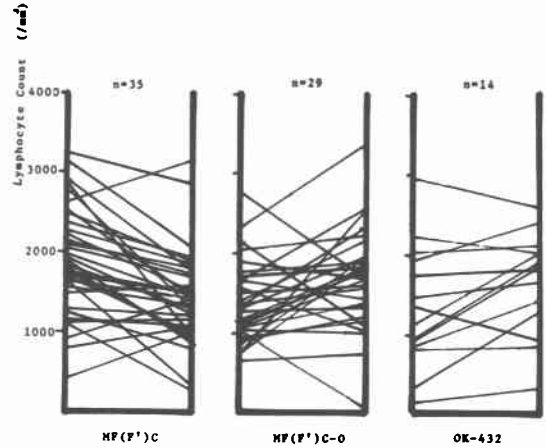
**** PHA BLAST.= PHA induced in vitro blastoid transformation

率, リンパ球数 ($p < 0.05$) の順であった. 他に PHA 皮内反応, T細胞・B細胞分布率 (%および実数) なども検索したが, 症例数が少ないので統計処理に無理があった. もし症例がふえれば, T細胞実数に有意差が期待できると思われる.

2) リンパ球数と免疫化学的療法: 癌化学療法剤の引き起こす白血球減少症, リンパ球減少症に対して, OK-432がよくこれを緩和する²⁾ことはよく知られた事実であるが, MF (F') C 療法による末梢血リンパ球の減少に対して, OK-432 の併用がどの程度これを抑えられたかを示した (図1). MF (F') C 療法では35例中29例に末梢血リンパ球数の低下がみられたのに対し, MF (F') C-O 療法では29例中わずか7例に低下が認められた ($\chi^2 = 22.2$, $p < 0.001$).

なお, OK-432 単独を投与した時のリンパ球実数は投与前に比して21.4% (3/14) の症例に低下がみられたが, この低下した3例ではいずれも $500/\text{mm}^3$ 以内の低下にすぎなかった. ちなみに Levamisole 単独投与のリンパ球実数は投与前に比して50% (5/10) 症例で低下し, この低下した症例のうち2例では $500/\text{mm}^3$ 以上の低下を示した. ただしこの Levamisole 投与例のリンパ球数は3投4休の直後の値であり, 長期連続して投与しつづれたり, 休業すると回復する傾向にある. また, PS-K 単独投与例でリンパ球数の減少した症例は50%

図1 Effect of MF (F') C, MF (F') C-O and OK-432 on lymphocyte count



(2/4) で, その程度も軽度であった. また Levamisole および PS-K は, 癌化学療法に併用しても, OK-432 併用にみられた程のリンパ球減少症に対する効果は観察できなかった.

3) PHA 幼若化率と免疫化学療法: T細胞の非特異的な免疫能測定の指標として PHA による末梢血リンパ球の幼若化率が利用されているが, 癌化学療法 [MF (F') C] およびこれに免疫賦活剤を併用すると, この幼

図2 In vitro stimulation of lymphocytes by PHA in cancer patients before and after treatments

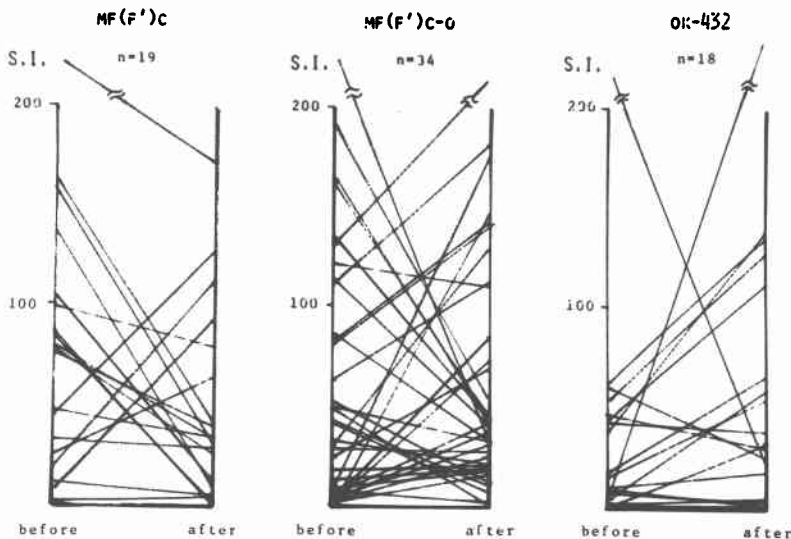
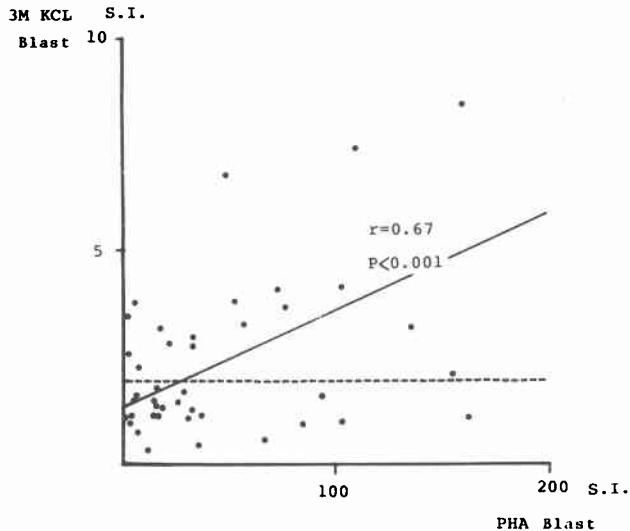


図3 Relations between 3M KCl extracted antigen induced blastoid transformation and PHA induced blastoid transformation



若化率がどのような影響をうけるかを検索した(図2)。リンパ球の PHA 幼若化率の低下がその治療の前後で観察されたのは、図の左より MF (F') C 群19例中12例(69.5%)、MF (F') C-O 群34例中15例(44.0%)、OK-432 単独群18例中4例(22.2%)であった。なお、Levamisole 単独群で治療直後に PHA 幼若化率の低下がみられたのは10例中6例(60%)、PS-K 単独群では7例中2例(28.6%)、Bamfolin 単独群では8例中2例(25.0%)であった。

4) *in vitro* での、非特異的免疫能(PHA 幼若化率)と特異的免疫能(3MKCl 抽出可溶化抗原による幼若化率)の相関関係: 癌患者の末梢血を採取し、これから分離したリンパ球を2分し、一方では PHA による幼若化率を、他方では3MKCl 抽出可溶化自己抗原を用いる幼若化率を測定し、それぞれの S. I. 値の相関関係を求めた。相関係数 $r=0.67$ ($p<0.001$, $n=44$) で、軽度ながら両者の間に相関を認めた(図3)。

5) 種々の免疫化学療法中の *in vitro* における、非特異的免疫能(PHA 幼若化率)と特異的免疫能(3MKCl 抽出可溶化抗原による幼若化率)の推移: いわゆる非特異的免疫賦活剤を投与して、非特異的免疫能の上昇を誘導できても、腫瘍そのものに対する特異的免疫能はこれに平行して動きうるか否かという点が問題である。免疫化学療法前後の免疫能の動きを、*in vitro* で同時に採血し

たリンパ球を用いて PHA および 3MKCl 抽出可溶化抗原による幼若化率で測定した(図4)。この2つのパラメーターによる値が平行して動いたのは10例であった。しかし、PHA 幼若化率の S. I. 値が20以上の変化を示した5例中、3MKCl 抽出可溶化抗原による幼若化率の S. I. 値が0.5以上変化したのは2例(40%)のみで、この点に関してはさらに十分な検討を必要とする。

6) 補助療法としての免疫化学療法が生存率に及ぼす影響: 癌化学療法に併用する免疫療法の併用効果を生存率からうかがい知る目的で、諸免疫学的パラメーターを測定した期間中(昭和49年7月~昭和53年5月)の胃癌患者について、とくに非治療切除に終つたものに MF (F') C あるいは、MF (F') C-O を施行し、その後の生存率を1年半にわたって追跡した(図5)。グラフは他病死を除いた実測生存率である。あらかじめ MF (F') C と MF (F') C-O 群の背景因子に関しては、年齢、性別、腫瘍径、n 因子、s 因子、p 因子、H因子、stage、腫瘍占居部位、術前の白血球数、リンパ球数、PPD 皮内反応、血小板数、GOT・GPT、total protein、アルブミン、腹部腫瘍触知の有無、ベッドから起きて生活していたか否かなどについて χ^2 検定を行ったが、2時間に有意の差はほとんどみとめられなかった。ただし腹膜播種のみ2群間に有意差がみられた。($p<0.05$) MF (F') C と MF (F') C-O の間では各月の χ^2 検

図4 Changes of Specific (3M KCl extracted soluble Ag blastogenesis) and nonspecific (PHA induced blastogenesis) Parameters before and after immuno- or-chemotherapy

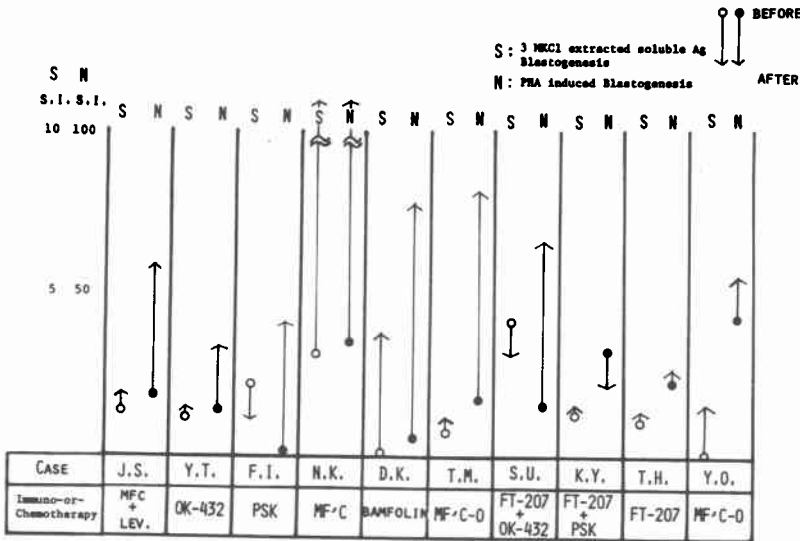
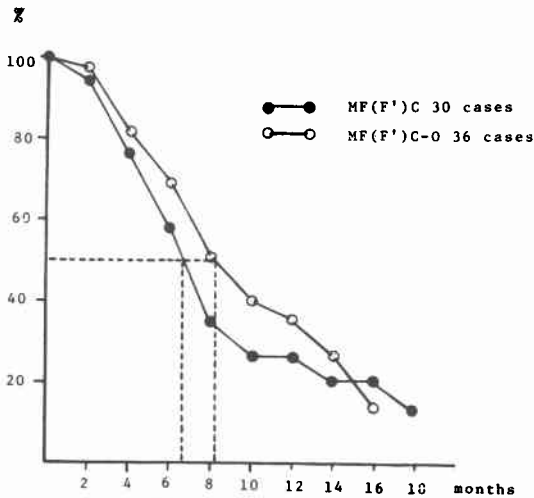


図5 Comparison of survivals between immunoch- emotherapy (MF((F'))C-O) and chemotherapy (MF((F'))C)



定および、精密累積法による分散分析により、推計学的有意差はみとめられなかつたが、MF (F') C と MF'C-O との間では8カ月 (p>0.025) と10カ月 (p>0.05) に有意の差がみとめられ、MF'C-O の組みあわせにより、生存率が延長することが示唆された。なお50%生存

期間は MF (F') C 群6.8カ月 MF (F') C-O 群8.9カ月、MFC 群7.0カ月、MF'C 群6.0カ月、MFC-O 群6.2カ月、MF'C-O 群10.0カ月であった。

7) 免疫学的パラメーターと生存率：胃癌患者において、手術前、未治療時に得られた種々の免疫学的パラメーターの値が、手術後の生存率にどの程度、反映されるかを知る目的で以下の検索を行なった。手術後の定められた各月での生存者と癌死者のそれぞれの術前の免疫学的パラメーターの値を平均し、生存者、死亡者間で平均値の差の検定を行った(表2)。1年半以内の短期の観察で見限りにおいては、PHA 幼若化率、 α_2 -globulin, PPD 皮内反応、リンパ球数の順で予後を反映していた。

8) 免疫療法施行時の免疫学的パラメーターの推移と生存率：免疫療法施行時に応用できる免疫学的パラメーターの諸値を評価する一手段として、これら値の改善が、癌患者の生存率にどのような意味をもつかを解析した。(表3)表は OK-432 単独投与、または MF (F') C-O 施行時の前後で末梢リンパ球の PHA 幼若化率が改善したか、S. I. 値が±10以内で不変であったか、逆に低下したかによってグループを設定し、これらのグループの生存率を各月で求めたものである。分母は追跡可能数であり、分子はそのうちの生存者数を示している。OK-432 を単独で投与した際、PHA 幼若化率が改善

表 2 Relations between immunological parameters and survival

		PHA Blast.	PPD Skin T.	α_2 globulin	lymphocyte count
		S.I.	mm	γ /ml	/cmm
4M	alived	64.1 n=50	18.5 n=44	595 n=53	2149.1 n=49
	dead	18.5 n=7	10.4 n=7	809 n=7	2503.6 n=7
	p	p<0.05	p<0.2	p<0.001	
6M	alived	70.1 n=38	20.1 n=35	591 n=39	2162.1 n=37
	dead	19.5 n=9	11.7 n=9	843 n=11	1888.3 n=11
	p	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.6
1Y	alived	68.1 n=24	23.2 n=22	602 n=27	2261.7 n=25
	dead	46.1 n=14	11.7 n=15	668 n=15	2072.5 n=15
	p	p 0.3	p<0.02	p<0.05	p<0.6

表 3 Survival and changes of PHA induced blastoid transformation

TREATMENT	Changes of PHA blasto. during the treatment	months after the treatment(survival)			
		3M.	6M.	12M.	18M.
OK-432	elevated	8/8	6/7	4/5	2/5
	unchanged	3/6	2/6	2/6	0/4
	decreased	0/0	0/0	0/0	0/0
MF(F')C-O	elevated	12/12	10/10	9/9	5/5
	unchanged	3/3	2/3	1/2	1/1
	decreased	13/15	8/14	3/10	1/8

The number of alival cases in each months / The total number of following-up cases in each month

したものの1年生存率は4/5 (80%)、癌免疫化学療法 (MF (F') C-O) 施行時、改善をみたものの1年生存率は9/9 (100%)で、PHA 幼若化率が不変、あるいは増悪した症例にくらべて予後が良好であるという結果を得た。

9) 免疫賦活剤使用時の、マウスリンパ節細胞における in vitro の各種パラメーターの値: C₃H/He マウスにおいて、これと同系の移植継代 MCA 肉眼を移植後1週目から各種癌免疫化学療法を5日間施行し、(この系ではこの時期に、すべてマウスで腫瘍の生着が確認で

表4 Relations between various immunopotentiators and immunological parameters. C₃H/He mice with MCA fibrosarcoma, 15 days after tumor inoculation

	PHA blast.	LPS blast.	3MKCl /n blast.	MLTR	Cytotoxicity test	
normal	72.8±35.7	26.4±26.0	0.8±0.2	0.7±0.3	25±3.6	
tumor bearing	no treatment	54.2±9.3	2.6±0.4	1.2±0.3	1.4±0.4	37.2±4.0
	MMC	50.7±8.2	2.2±0.9	1.1±0.1	1.7±0.3	31.5
	OK-432	60.6±4.4	2.6±1.1	2.1±0.5	2.2±0.1	43.1±8.0
	MMC+OK-432	58.6±1.6	1.7±0.6	1.2±0.2	1.6±0.0	39.9±2.1
	LMS	55.6±14.7	1.7±1.3	1.3	1.7±0.5	43.3
	PS-K	14.7±4.7	3.9±2.4	2.1	1.2±0.5	66.0±0.8
	MMC+LMS	32.4±26.7	1.3±0.3	1.3±0.0	1.0±0.2	35.4±3.2
	MMC+PS-K	79.3±75.3	1.3±0.2	1.4±0.3	1.2±0.0	47.7±5.1
	OK-432+LMS+PS-K	37.5±2.7	1.9±0.3	0.9±0.2	1.5±0.7	37.7±8.2
	MMC+OK-432+LMS+PS-K	12.5±2.0	1.2±0.1	1.2±0.1	1.3±0.0	41.3±17.3

きる), この時点で sacrifice したもののリンパ節細胞を用いて, PHA 幼若化率・LPS 幼若化率・MLTR・3MKCl 抽出可溶性抗原による幼若化率および同系の培養腫瘍細胞に対する Cytotoxicity test を測定した(表4). 動物実験においても, in vitro の PHA 幼若化率および Cytotoxicity test で見る限り, 非特異的免疫賦活剤を併用することにより, 癌化学療法剤で抑制された免疫反応を回復しようという傾向を得た.

10) 癌免疫化学療法(MMC, OK-432)とマウスのリンパ節細胞が示す PHA 幼若化率の腫瘍移植後各時期における変化: C₃H/He マウスに同系の MCA 肉腫移植後3日目, 1週目, 2週目, 3週目のそれぞれの時期から, MMC, OK-432, MMC+OK-432 投与群と, 非治療群の4群を設定し, それぞれ5日間この治療を施行した後, このマウスを sacrifice し, それらのリンパ節細胞を用いて, PHA 幼若化率を求め, グラフにした(図6). 各群はそれぞれ3匹のマウスを使用した. いずれの時期にも, 癌化学療法剤(MMC)は宿主の非特異的免疫能を低下させ, これに OK-432を組みあわせることで PHA 幼若化率の改善が観察された.

11) 各種癌免疫化学療法と生存実験: 各群10匹の C₃H/He マウスを用いて, これと同系の MCA 肉腫を移植後3日目より5日間, 各種免疫賦活剤(OK-432, Levamisole Bamfolin)および化学療法剤(MMC)を投与して, その生存率を求めた. なお control として非治療群

図6 Effect of Immunotherapy against PHA-induced blastoid transformation in C₃H/He mice with MCA fibrosarcoma

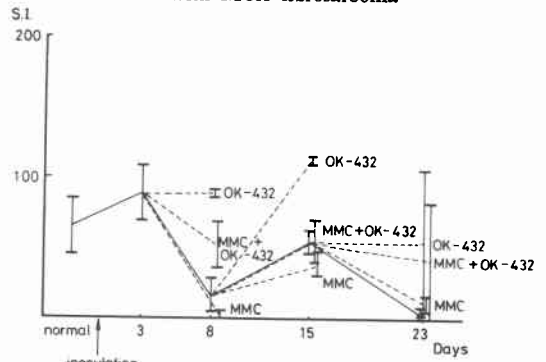
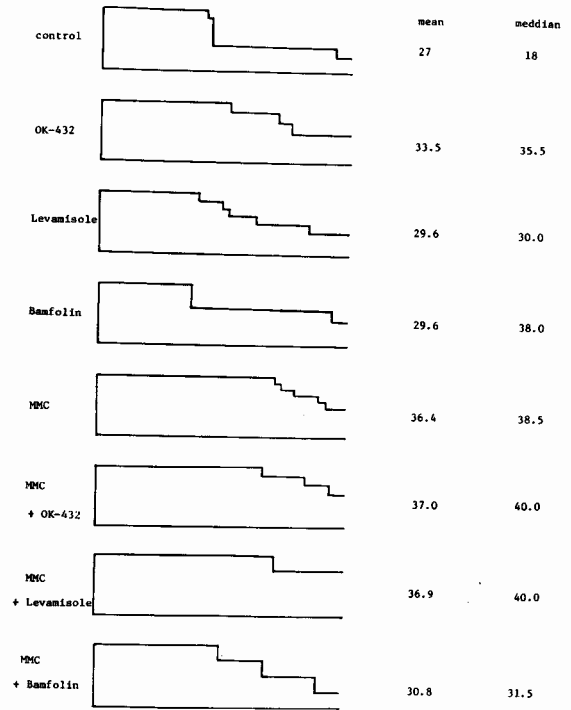


図7 Effect of combination immunotherapy to survivals of C₃H/He mice with MCA fibrosarcoma



を設定した(図7). それぞれの50%生存日数は control 18日, MMC 38.5日, OK-432 35.5日, Levamisole 30.0日, Bamfolin 38.0日, MMC+OK-432 40.0日, MMC+Levamisole 40.0日, MMC+Bamfolin 31.5日であった. 平均生存日数の差の検定では, control と

MMC ($p < 0.001$), OK-432 ($p < 0.05$), MMC+OK-432 ($p < 0.001$), MMC+Levamisole ($p < 0.001$) 群の間では有意差を認められたが, MMC 群と免疫化学療法併用群の間では, 併用群でわずかながら平均生存日数をのばしたが, 推計学的には有無の差は認められなかった。なおこの実験は, 同様の実験を3回繰返し行い, 同じような結果が得られた。

IV 考 察

腫瘍に対する免疫が存在するという実証は比較的新しく, 1960年 Klein²⁶⁾ らが C₃H/He マウスと MCA 肉腫を用いた syngeneic 系で行った実験を基にするが, 腫瘍免疫にはとくに細胞性免疫が大きな役割を演じているといわれ, 一方担癌生体では細胞性免疫能が低下している。本研究でも, 対象とした消化器癌患者から, とくに胃癌患者をとりあげ, その組織学的進行度でIとIVとに区分し, それぞれの患者の細胞性免疫能について, 現在一般に行われているいくつかのパラメーターで比較検討を試みた。また他の検索, すなわち術前の各パラメーターの値と予後(生存率)の関係についても比較検討を試みた。概していえば癌の進行とともに免疫能が低下することが示唆されるが, 予後と免疫能の低下とはよく関連しているといえるが, 詳細にみるとそれぞれの進行度で, またそれぞれの月数の生死で各症例の示す値にはかなりのばらつきがあり, この2つの検索方法からみた細胞性免疫能の低下と指標の順序には解離がみられた。このような免疫学的パラメーターの値を免疫能の評価に使用することに関して文献でもそれぞれ異論の多い点であるが, 現在では, それぞれの免疫学的パラメーター間で, 高い相関を示すものはなく, 少なくとも現存するパラメーターは, 1つで他のパラメーターを代表しうるものがない^{27)28), 9)33)}という結論が趨勢であろう。

現在の癌治療で主役を演じているのは, 外科学的根治手術であることは異論のないところであろう。今日, 担癌生体において, 癌細胞に対して GVH 反応がおけると仮定すると, *in vitro* で観察される腫瘍とリンパ系細胞の比から推測して, 全身のリンパ系細胞を動員しても, 宿主が攻撃しうる腫瘍細胞は量的に制限をうける⁹⁾ことがわかる(せいぜい人差指頭大の腫瘍)。従って, 手術により腫瘍の量を減ずることは, 宿主のもつ異物排除機構に好結果をもたらすことにもなると推測される。ところがこれは腫瘍を異物として十分に認識できると考えた仮定上のことであり, 実際には自然発生の癌はその抗原性も低く, また, いろいろの原因で宿主側の抗原認

識機能が低下しているため, 手術後に取り残された癌の腫大や再発が問題になる。また, 担癌生体に随伴する免疫のことについても, 古くから立証されているが³⁰⁾, 手術によって大部分の腫瘍を剔出すると, 反ってこの随伴免疫能を減ずる結果になるということは長く論じられてきた³¹⁾³²⁾ところでもある。加えるに, 手術の影響として, 手術後1カ月間は PHA 幼若化率, リンパ球数, PPD 皮内反応等の非特異的パラメーターで見ると, 全体的な免疫能も低下することがわかっており¹³⁾, そしてこの時期に免疫抑制的に働くといわれている癌化学療法剤を, 残遺癌制圧の意味で併用することは, 反って宿主側の抗腫瘍性に働く免疫能を低下させきわめて不利である。この手術の癌化学療法剤投与による免疫抑制作用への対策³³⁾は, 第1に制癌剤の選択とその投与方法を慎重に検討することであり, 第2は積極的に宿主の免疫能を高めてやることである。本研究ではとくに第2の可能性を追求した。免疫能を高めめるための薬剤としては, 現在よく用いられている非特異的能動免疫賦活剤と称するものであり, この薬剤を用いて, 実際に生存率をあげるか, 免疫能を高めるかという問題を追求してみた。

まず, 動物実験で非特異的免疫賦活剤を単独投与した時の効果については, 効果があつたと報告するものには, 腫瘍と動物に allogeneic 系のものが多い(Lentinan⁹⁾³⁴⁾, PS-K³⁵⁾, OK-432³⁶⁾³⁷⁾。逆に syngeneic の系の実験では, 抗腫瘍性をみとめなかったとするものがあり(Lentinan⁹⁾, Levamisole¹⁷⁾³⁸⁾), これらの非特異的免疫賦活剤が同種の組織適合抗原を reject している可能性が大で, 腫瘍特異抗原に対する免疫能を高めたかは疑問である。人間の癌は自然発生病で, 程度の差はあれその大部分は抗原性が低く, これらの非特異的免疫賦活剤によってある程度の動物腫瘍に対する抑制効果はみられるが人癌に対して有効であるかという問題とは別である。なかには syngeneic の系で効果ありとする報告(PS-K³⁹⁾, OK-432⁴⁰⁾⁴¹⁾, Levamisole⁴²⁾)もあるので, ほんの希望を持たせるが, 実際にはこの syngeneic の系でも, 非特異的免疫療法単独で腫瘍を完全治癒に導いた実験の報告は非常に少ない。おれわれも BCG, OK-432, Levamisole, PS-K, Bamfolin 等の投与について, C₃H/He と MCA 誘発肉腫を用いる syngeneic の系で繰り返し実験を行ってその結果を検討しているが, その生存率について, control との間でたとえ推計学的有意差が認められても, 実験に供されたマウスの内一匹も完全治癒できたものはない。従って現在考えられ

る非特異的免疫療法で期待できる完全治癒は、腫瘍移植前にあらかじめこれら薬剤を投与しておく場合³⁷⁾、syngeneic であっても非常に抗原性の高いものである場合⁴¹⁾などが考えられるが、そのどちらも日常の臨床において一般的ではない。

次に、これらの非特異的免疫賦活剤を単独で投与した時の免疫学的パラメーター値の変動について検討した。癌治療上、臨床面から知りたいことは、このような非特異的免疫賦活剤を投与した場合、まず実際に臨床面で多用されている非特異的免疫学的パラメーターの値の改善がみられるかどうか、もし改善がみられる場合には、非特異的免疫と同時に特異的免疫も改善されるのか否か、またそれが生存率とどう関連するかという問題であろう。動物実験での結果で、PHA 幼若化率に関しては OK-432, PS-K 投与では control に比較して S. I. 値の改善がみられた。ところが、この同じ実験系で、Levamisole 抗与では改善がみられなかった。Levamisole は至適有効投与量の range が狭いということから、たまたまこれらの一連の実験で使用した投与量が、われわれの用いた動物に対しては、細胞性免疫を賦活する濃度でなかったか、あるいは臨床例でのリンパ球数や PHA 幼若化率の動きで示したように、投与後の短時間では *in vitro* の免疫能は低下するのか、それとも、T細胞を介しない他の免疫賦活効果によるのか、さらに詳細な検討が必要である。

一方、Cytotoxicity test, MLTR あるいは 3MKCl 抽出可溶性抗原を用いたときにみられる、これらの薬剤の特異的抗腫瘍性に示す免疫学的パラメーターの値と、非特異的免疫能との間にわずかな解離が観察されるが、一般的な傾向としていずれの免疫学的パラメーターの値も、これらの免疫賦活剤によって改善されたという印象を得た。この腫瘍系は抗原性が低く、S. I. 値、Cytotoxicity index も低く出る傾向があるため、そのわずかな値の差では判定に苦しむことが多い。時に特異的免疫能パラメーターの値と、非特異的免疫能のパラメーターの値の間にはわずかながらでも解離がみられることは、非特異的免疫賦活剤投与でひき起こされる特異的な抗腫瘍性を、非特異的免疫能を示すパラメーターの値で間接的に知ろうとすることの無理や、ややもすると非特異的免疫能のパラメーターの値の変動のみに目を奪われていて、特異的免疫能には少しも変化がないことに気がついていないという可能性を示唆するものと解される。

このような動物実験での成績を基礎にして、臨床例で

の免疫療法をみると、数少ないが治癒の報告がある。われわれも BCG を食道癌に局注することで完全寛解に導びき得た 1 例⁴⁴⁾を経験しているが、このような治癒例は、malignant melanoma など、抗原性の高いとされているものに多いことから、たまたま腫瘍側の抗原に関連する治癒しやすい要因を持つ特殊例と考えられる。一般的には人間の固型癌は、免疫療法単独で完全に治癒させることは極めて困難と考えるのが妥当であろう。そこで現在では、免疫賦活剤といわれている薬剤でみられる抗腫瘍性の効果を論ずる以前に、生存率の延長が得られるか否かの検討が試みられている。しかし過去に行われた莫大な労力を費した免疫療法が批判に耐えなかった原因の 1 つは、その生存率の延長を示すのに厳密な control study がなかったことによる⁴⁵⁾という事実を無視できない。いわゆる historical control を使わないで、background の充分にそろった 2 群間で薬剤効果の判定が望まれるわけである。実際には封筒法⁴⁶⁾が行われ、このような randomized study を行った上で、臨床例で、非特異的免疫賦活剤は有効か否かの議論を行うのが現在の常態である。

臨床例で検討した免疫賦活剤投与による免疫学的パラメーター値の動きについては、OK-432 投与により PHA リンパ球幼若化率、PPD 皮内反応およびリンパ球数等の値はいずれも、上昇する傾向にある。PHA リンパ球幼若化率は OK-432 以外に、PS-K, Levamisole, Bamfolin 投与前後で検討したが、Levamisole を除いて、それぞれ S. I. 値の上昇をみた。文献的には臨床例で、これら薬剤投与による非特異的免疫能上昇の報告は非常に多いが、いずれの報告でもすべての薬剤で、免疫学的パラメーターの値が上昇するとは限らず、症例によっては反って低下するものも散見されている。むしろこのような非特異的免疫賦活剤投与で、非特異的免疫能は上昇しないという報告⁴⁷⁾も見られる。

最後に癌化学療法剤と非特異的免疫療法剤の併用に関する問題点についてのべる。その問題点の 1 つは、組みあわせる薬剤の種類に相性に関してであろうし、もう 1 つは組みあわせる薬剤投与の時期、すなわち同時投与であるか否か、どちらを先にして、何日ずらせればよいのかのタイミングの問題であろう。組みあわせの内容については、際限なく様々な組みあわせが試みられており、有効率や生存率を主体に論じられているが、発表された論文では良い成績のみが論ぜられているが、他方では、併用効果がみられないまま発表に至らなかった研究も

多いはずという意見⁴⁸⁾もあり、さらに慎重な科学的な検討が必要である。投与のタイミングについては、Levamisole, PS-K などは、免疫抑制の強い癌化学療法剤と併用するには、むしろ同時併用すると生存率を下げ、時期をずらして投与することにより併用効果をみたす意見⁴⁸⁾がある。われわれの研究では、併用投与が臨床例においても動物実験においても、推計学的有意差が出る程の延命効果を示さなかったその理由として、1つは組みあわせ薬剤の内容、もう1つは同時投与で行われたタイミングの問題が考えられる。また同時に施行された免疫学的パラメーターの評価を観察する限りにおいては、一般的な傾向としては、併用により癌化学療法剤の免疫抑制を軽減する傾向が認められるが、個々の症例では、immunopotentiator といわれる薬剤で明らかに免疫能を抑制したとしか考えられない症例もあり、このような症例がみかけの上で生存率の改善がみられないという結果を生んでいる可能性もあり、さらに検討を要するところである。その証拠に、非特異的免疫賦活剤に反応した症例は予後が良好であったので、このようなチェックを行った上で、癌免疫化学療法が施行されれば、併用により生存率を延ばしうると期待をもつものである。

V まとめ

臨床例では消化器癌患者とくに胃癌患者を対象として、多剤併用癌化学療法剤 (MF ((F')) C) と非特異的免疫賦活剤 (OK-432) の併用効果について、動物実験では C₃H/He マウスと syngeneic の系である methylchlantrone 誘発肉腫を用いて、癌免疫化学療法の併用効果について、種々の免疫学的パラメーター値の変動および生存率の面から検討し、次に述べるような結論を得た。

1) 動物実験、臨床例ともに、癌化学療法施行に対して非特異的免疫賦活剤を併用すれば、各種免疫学的パラメーター値の改善する傾向が認められた。

2) 動物実験、臨床例ともに、生存率では癌化学療法と免疫療法の併用効果を認めることは出来なかった。投与方法および投与のタイミングなどにさらに検討すべき問題がある。

3) 臨床例で、投与された免疫賦活剤に反応して免疫学的パラメーターの値が改善する症例は予後がよく、新しい治療法の指針となるべきものが示唆された。

本論文の要旨は第5、6回日本臨床免疫学会総会、第12・13回日本消化器外科学会総会、第37回日本癌学会総

会(示説)、第79回日本外科学会総会にて発表した。

稿を終るに際し、ご指導、ご校閲を頂いた恩師橋本勇教授、ならびに小玉正智助教授に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) Mathe, G., et al.: Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia, *The Lancet*: 697—699, 1969.
- 2) Morton, D.L., et al.: Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surg.*, **68**: 158—164, 1970.
- 3) Okamoto, H., et al.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytics *Streptococci*. *Japan J. Microbiol.*, **11**: 332—336, 1967.
- 4) Tsukagoshi, S., et al.: Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann*, **65**: 557—558, 1974.
- 5) Maeda, Y., et al.: The mechanism of action anti-cancer polysaccharide. I. The effect of action antilymphocyte serum on the antitumor activity of Lentinan. *Int. J. Cancer*, **8**: 41—46, 1971a.
- 6) 黒木睦彦: 笹(特に屋久笹)抽出成分による抗ガン剤の試製及び薬理作用に関する研究〔第1報〕がん細胞 AH-39 によるラット腹水肝ガンにおよぼす影響について。財団法人日本制がん研究会編, 1963.
- 7) Umezawa, H., et al.: Enhancement of delayed-type hypersensitivity by bestatin, an inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase. *J. Antibiotics*, **29**: 857—859, 1976.
- 8) Sadler, T.E., et al.: Experimental nonspecific immunotherapy, *Immunological Aspects of Cancer*: 357—384, 1978.
- 9) Harris, J., et al.: The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease. *Cancer*, **37**: 1058—1069, 1976.
- 10) Cheema, A.R., et al.: Patient survival after chemotherapy and its relationship to in vitro lymphocyte blastogenesis. *Cancer*, **28**: 851—855, 1971.
- 11) Tarpley, J.L., et al.: Prolonged depression of cellular immunity in cured laryngopharyngeal cancer patients treated with radiation therapy. *Cancer*, **35**: 638—644, 1975.
- 12) 吉汲親雄他: 制癌剤投与およびX線照射による免疫抑制と PS-K の回復効果。癌と化学療法, **2**: 853—858, 1975.
- 13) 折田薫三他: 末梢血リンパ球の免疫学的活性に

- よる癌進行度と予後の判定。手術, **29**: 949—959, 1975.
- 14) Gutterman, J.U., et al.: Immunotherapy of human solid tumors: Principles of development. *Immunological Aspects of Cancer*, 415—477, 1978.
 - 15) Baldwin, R.W., et al.: BCG immunotherapy of local subcutaneous growth and post-surgical pulmonary metastases of a transplanted rat epiderioma of spontaneous origin. *Int. J. Cancer*, **12**: 420—427, 1973.
 - 16) Floersheim, G.L., et al.: Facilitation of tumor growth by *Bacillus pertusis*, *Nature (London)*, **216**: 1235—1237, 1967.
 - 17) Potter, C.W., et al.: Levamisole in active in treatment of four animal tumors. *Nature (London)*, **249**: 567—569, 1974.
 - 18) 太田和雄: 固形癌の多剤併用療法—MFC療法を中心に—. *最新医学*, **28**: 881—893, 1973.
 - 19) 橋 武彦, 吉田明子: ヒトのT細胞, B細胞の測定法(改良法). *免疫実験操作法 A* (日本免疫学会編), 金沢: 455—462, 1975.
 - 20) Pellis, N.R., et al.: Tumor-specific and silospecific of soluble extracts from chemically induced mufine sarcoma. *J. Immunol.*, **113**: 708—711, 1974.
 - 21) Terasaki, P.I., et al.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, **204**: 998—1000, 1964.
 - 22) Takasugi, M., et al.: A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation*, **9**: 219—227, 1970.
 - 23) 寺田信国他: MCA肉腫に対する化学療法の効果と免疫賦活剤併用時の免疫学的パラメーターの検索, 第37回日本癌学会(示説), 東京, 1978.
 - 24) 胃癌研究会: 外科, 病理, 胃癌取扱い規約, 改訂第9版, 金原出版, 東京, 1974.
 - 25) 木村郁郎: 抗がん剤と溶連菌製剤の併用. *最新医学*, **28**: 941—951, 1972.
 - 26) Klein, G., et al.: Demonsration of resistance against methylchlantrane-induced sarcoma in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20**: 1561—1572, 1960.
 - 27) Stevenson, G.T., et al.: Report of a workshop on the immune response to tumor in man. *Int. J. Cancer*, **16**: 887—896, 1975.
 - 28) Stein, J.A., et al.: Immunoconpetence, immunosuppression and human breast cancer. I. An analysis of their relationship by known parameter of cell-mediated immunity in well defined clinical stages of disease. *Cancer*, **38**: 1171—1187, 1976.
 - 29) 小玉正智他: 胃癌患者における各種免疫学的パラメーターの検討—とくに胃癌進行度と非特異的免疫能について—. *臨床免疫*, **10**: 461—468, 1978.
 - 30) Southam, C.M., et al.: Quantative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer*, **14**: 971—978, 1961.
 - 31) Green, H.S., et al.: The inhibitory influence of a transplanted hamster lymphoma on metastasis. *Cancer Res.*, **20**: 1094—1100, 1960.
 - 32) Gershon, R.K., et al.: Immunologic defense against metastases: Impairment by excision of an allotransplanted lymphoma. *Science*, **159**: 646—648.
 - 33) 細川真澄男: 癌の免疫治療へのアプローチ, 化学療法と免疫. *腫瘍免疫学*: 430—440, 朝倉書店, 東京, 1974.
 - 34) Chihara, G., et al.: Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature (London)*, **225**: 943—944, 1970b.
 - 35) Yoshikumi, C., et al.: Mouse strain difference in the expression of antitumor activity of PS-K, *Gann*, **66**: 649—654, 1975.
 - 36) Sakurai, Y., et al.: Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemotherapy Report Part 1*, **56**: 36—43, 1972.
 - 37) 木村郁郎: 溶連菌剤OK-432と癌の免疫化学療法の可能性. *癌と化学療法*, **2**: 20—31, 1975.
 - 38) Hopper, D.G., et al.: Levamisole treatment of local and metastatic growth of transplanted rat tumors. *Br. J. Cancer*, **32**: 345—351, 1975.
 - 39) Ohno, R., et al.: Antitumor effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, against 3-Methylchlantrane-induced fibrosarcoma in C57BL/6 mice. *Gann*, **66**: 679—681, 1975.
 - 40) 木村郁郎他: 溶連菌剤に関する腫瘍免疫学的研究(第1報), *臨床免疫*, **7**: 1275—1278, 1975.
 - 41) 香川 征: Picibenil(溶連菌製剤)の近交系AC₁/Nラット移植膀胱腫瘍に対する免疫反応について. *日本泌尿器科学会雑誌*, **67**: 73—80, 1976.
 - 42) Ibrahim, A.B., et al.: Antitumor effects of levamisole on an allogeneic hamster melanoma and a syngeneic rat hepatoma, *Progress in cancer reseach and therapy, control of neoplasia by modulation of the immune system*: 81—96, Raven Press, New York, 1977.
 - 43) 岡部正実, 他: Levamisoleによる抗腫瘍効果の検討. 第1回 Levamisole 研究会講演要旨: 3—6, 1977.
 - 44) 小玉正智他: 食道癌手術と術後療法—術前・術

- 後の免疫併用療法について—。第31回日本胸部外科学会総会，長崎，1978。
- 45) 山村雄一：癌の免疫療法への反省—国際人癌免疫療法会議に出席して—。日本臨床，**34**：3453—3455，1976。
- 46) 東海胃癌術後免疫化学療法共同研究班：進行胃癌の術後免疫化学療法に関する研究。癌と化学療法，**3**：715—721，1976。
- 47) Richardson, R.L., et al.: Immunologic monitoring and immunotherapy in Ewing's sarcoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, **4**: 87—94, 1978.
- 48) 斉藤達雄 他：癌化学療法と免疫療法との併用。癌の臨床，**24**：502—509，1978。
- 49) 後藤田栄貴他：免疫化学療法における合併時期の治療成績に及ぼす影響，特集〈白布癌シンポジウム〉，癌と化学療法，**5**：67—71，1978。
-