

# 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 REFERNCE 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、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<sup>1)2)</sup>。

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<sup>3)4)</sup>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<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>、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<sup>7)</sup>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リセプター陽性T (T $\gamma$ )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エル内で、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 $\gamma$ 細胞比は、新保らの方法<sup>9)</sup>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 $\gamma$ 細胞としT細胞中の百分率を求めT $\gamma$ 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<sup>9)</sup>の方法を用いて測定した。リンパ球 $5 \times 10^5$ 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 $\mu$ g/mlまたはCon-A 10 $\mu$ 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%CO $_2$ 濃度下で、70時間培養後に各チューブに $^3$ H-thymidine 2 $\mu$ 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) によった。

NK活性は、Kiesslingらの方法<sup>10)</sup>により測定した。分離したリンパ球を20%FCS加RPMI-1640にて $5 \times 10^6$ 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 $^{51}$ Cr (Na $_2$   $^{51}$ CrO $_4$ , 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 $2.5 \times 10^5$ 個/mlに調整した。標的細胞 $1 \times 10^4$ 個にeffector細胞を $5 \times 10^5$ 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。

$$\text{NK細胞活性} = \frac{(\text{experimental } ^{51}\text{Cr-release})}{(\text{maximum } ^{51}\text{Cr-release-spontaneous } ^{51}\text{Cr-release})}$$

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

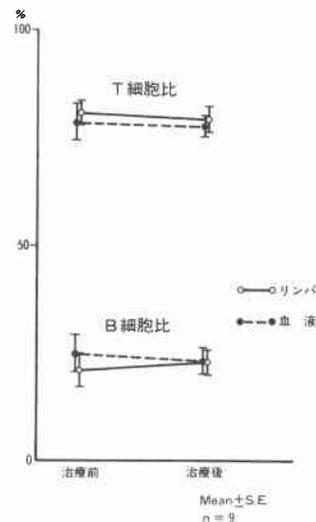


図2 Tγ細胞比

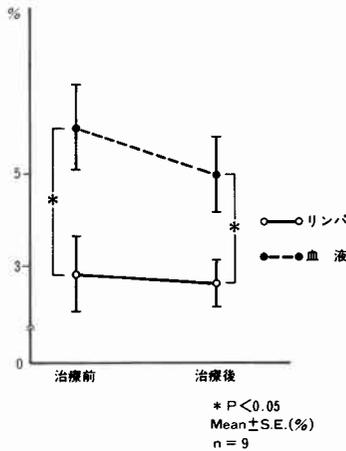


図4 リンパ球幼若化反応 (Phytohemagglutinin)

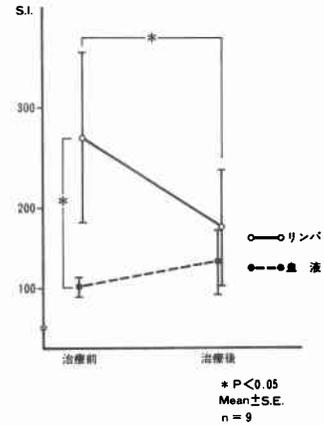


図3 リンパ球幼若化反応 (Concanavalin-A)

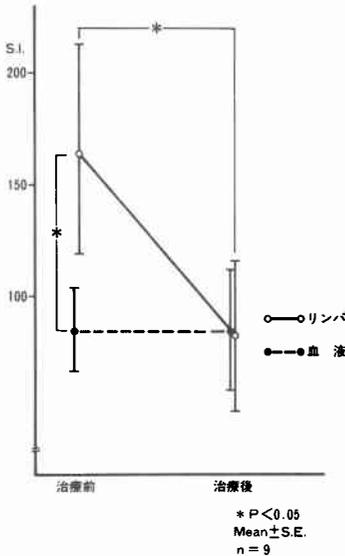
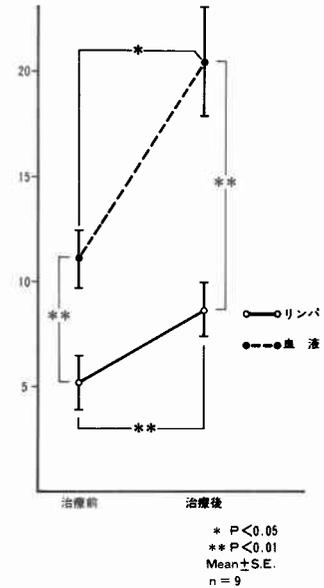


図5 Natural Killer 細胞活性



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)。

Tγ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 Cooper<sup>11)</sup>により初めて指摘された。初期においては Virchow<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>や、担癌患者の免疫能をモニターする場<sup>14)</sup>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<sup>15)</sup>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<sup>16)</sup>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<sup>17)18)</sup>、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<sup>19)</sup>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<sup>20)</sup>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<sup>9)</sup>のほかに、相当数の large lymphoid blast cell が存在すると報告<sup>21)</sup>されており、吉崎ら<sup>22)</sup>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<sup>8)</sup>。T $\gamma$ 細胞の局在についてみると、板垣<sup>23)</sup>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 $\gamma$ 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<sup>23)</sup>。われわれの成績では、TDLのT $\gamma$ 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<sup>20)</sup>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、癌患者血清中のサプ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 $\gamma$ 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<sup>18)</sup>の報告と異なる。これはUchidaら<sup>18)</sup>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<sup>24)</sup>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<sup>24)</sup>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 $\gamma$ 細胞比<sup>25)</sup>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<sup>26)</sup>。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 $\gamma$ 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<sup>27)</sup>は、ヒト、ラット、およびマウスなどで何ら前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<sup>28)</sup>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<sup>29)</sup>, また T 細胞系の細胞であると言う報告<sup>30)</sup>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 $\gamma$  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<sup>31)32)</sup>. 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 においてほかにさきか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 $\gamma$  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-Fc receptor 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 anticancer 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. Fefects 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 cyoyoxic 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- $\gamma$  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