

胃癌患者における腹腔滲出細胞の抗腫瘍活性と OK432 術前投与によるその変動効果

近畿大学医学部第1外科

奥野 清隆 中村 洋介 高木 宏己 国土 修平
大西 博昭 中村 哲彦 犬房 春彦 田中 晃
浜田 宏 岩佐 善二 安富 正幸

SURFACE ANTIGEN ANALYSIS AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF PERITONEAL EXUDATE CELLS IN THE PATIENTS WITH GASTRIC CANCER AND THEIR MODULATING EFFECT OF OK432 PRETREATMENT

Kiyotaka OKUNO, Yousuke NAKAMURA, Hiromi TAKAGI,
Syûhei KOKUDO, Hiroaki ÔNISHI, Tetsuhiko NAKAMURA,
Haruhiko INUFUSA, Akira TANAKA, Hiroshi HAMADA,
Zenji IWASA and Masayuki YASUTOMI
First Department of Surgery Kinki University School of Medicine

胃癌患者の腹腔滲出細胞を採取してその抗腫瘍活性の測定と OK432術前投与によるその変動効果を検討した。平均回収細胞数は $(2.2 \pm 0.4) \times 10^7$ 個で各臨床病期間で有意差を認めなかった。抗腫瘍活性の測定として、① lymphokine-activated killer (LAK) 誘導能、②腹腔マクロファージの腫瘍増殖抑制能を検討したが LAK 誘導能ではいずれの症例からも有意な活性は認められず、また OK432術前投与にて効果は認めなかった。腫瘍増殖抑制能では Stage II, III 症例で比較的高い活性を認め (Stage I $16.3 \pm 6.0\%$, Stage II $45.0 \pm 4.4\%$, Stage III $23.0 \pm 9.0\%$, Stage IV $12.2 \pm 10.2\%$) また OK432投与にてその活性増強を認めたものの総体的にその抗腫瘍活性は高くなく、腹腔滲出細胞の局所防禦に占める役割は大きいものではないと考えられた。

索引用語：腹腔滲出細胞, cytostatic assay, lymphokine-activated killer 細胞

I. はじめに

胃癌の腹膜播種は最も多い再発様式で、しかもその予後は極めて不良である。腹膜播種発生の機構の解明やその対策をたてることは胃癌治療上極めて重要な意義がある。腹腔内撒布癌細胞に対し、抗腫瘍的役割を担うと考えられる胃癌患者の腹腔滲出細胞 (peritoneal exudate cells: PECs) を手術時に採取して、その細胞学的特性や機能的抗腫瘍活性を検討し、さらに、術前投与によるその抗腫瘍効果を検討した。

II. 対象および方法

(1) 研究対象

昭和60年9月以降に近畿大学第1外科で手術を受けた70歳未満の初発胃癌患者27例を対象に無作為に、① OK432術前投与群 (2KE を隔日で計3回投与、4~5日休薬後に根治手術)、②非投与群の2群にわけた。

(2) 腹腔滲出細胞 (PECs) の採取

開腹後直ちに温生食約1,000mlでよく腹腔内洗浄後、洗浄液を回収して細胞分画を得た。検鏡による細胞数算定ののうち一部は flow cytometry 法 (Ortho Spectrum III, Ortho 社製) による細胞表面抗原の検索に用い、残りは凍結保存し以下の functional assay に

用いた。

(3) 腹腔マクロファージによる腫瘍細胞の DNA 合成抑制活性の測定 (cytostasis assay)¹⁾ PECs (5×10^5 /well) を平底96穴マイクロプレート (Falcon #3072) にて3時間培養 (37°C, 5% CO₂) する。そのの上澄みをすててプレート附着性細胞のみとし、マクロファージ活性化因子としての γ -interferon (γ -INF) を加えてさらに20時間培養する。上澄みをすてて次に腫瘍細胞 (Daudi 細胞, 2×10^4 /well) を加えてさらに24時間培養する。培養終了の4時間前に各 well に³H-thymidine 0.5 μ Ci を添加して各群の腫瘍細胞 DNA 合成抑制能 (cytostasis) を検索した。

$$\% \text{Cytostasis} = 1 -$$

$$\frac{\text{腹腔マクロファージ存在群のカウント (cpm)}}{\text{腫瘍単独群のカウント (cpm)}}$$

(4) lymphokine-activated killer (LAK) 活性の測定²⁾

PECs (5×10^5 /well) を recombinant interleukin 2 (rIL-2) (2units/well; 武田薬品工業 K.K. より供与) とともに96穴丸底マイクロプレート (Flow 社製) にて3日間培養 (37°C, 5% CO₂) する。培養後プレートを遠心 (1,400r.p.m. 5分) し、上澄みをすてたのち⁵¹Cr (Na₂ ⁵¹Cr O₄; New England Nuclear 社製) をラベルした腫瘍細胞 (2×10^4 /well) を入れ、よく攪拌振とう後、型のごとく4時間⁵¹Cr 遊離法 (⁵¹Cr-release assay) を行った。

III. 結 果

(1) 腹腔滲出細胞 (PECs) の細胞数とその表面抗原の検索

検索した27例を胃癌取り扱い規約³⁾に準じて臨床病期別に分類しそれぞれの性比、平均年齢ならびに回収された腹腔滲出細胞数、表1に示した。全症例を通じて平均年齢は52.6 \pm 1.6歳で Stage III, IV 群が Stage I, II 群にくらべて高齢傾向であったが回収された細胞数には各病期での有意差は認めず平均 (2.2 \pm 0.4) $\times 10^7$ 個であった。また術前 OK432投与群で明らかに細胞数の多い例 (最多例: 1.8×10^8 個) も認められたが全体的にはこれまでのところ非投与群との間に有意差は認めず、今後 Su-Ps 反応性との関連を含めて症例を重ねるべき問題と思われた。細胞表面抗原の解析でも各臨床病期間での差よりむしろ個体差が大きく表2に各病期での具体的な代表例3例ずつを呈示した。OKM1陽性細胞の比率が最も高く (平均38.9 \pm 2.7%) 明らかに末梢血リンパ球のそれとは異なる分画様式を示し

表1 対象症例

Stage	症例	性別 (男/女)	平均年齢	腹腔滲出細胞数 ($\times 10^7$ 個) 平均値
I	7	4/3	47.6 \pm 2.8	1.7 \pm 0.4
II	6	3/3	48.2 \pm 4.3	2.9 \pm 1.8
III	6	3/3	56.6 \pm 1.7	2.1 \pm 0.9
IV	8	5/3	57.9 \pm 4.6	2.5 \pm 1.0
全症例	27	15/12	52.6 \pm 1.6	2.2 \pm 0.4

表2 フローサイトメトリー法による PECs 細胞表面抗原の検討

Stage	年齢/性別	OKT3	OKT4	OKT8	OKM1
I	37/女	21.1%	11.6%	13.1%	30.3%
	60/女	36.3	32.3	27.6	57.6
	44/女	36.5	19.7	26.4	40.2
II	64/女	26.3	16.6	18.9	30.3
	44/女	31.4	15.2	20.2	38.4
	55/男	27.6	20.1	22.2	41.1
III	51/男	41.5	19.3	14.2	40.5
	65/女	19.9	13.1	7.7	24.5
	56/男	55.2	34.7	43.8	31.7
IV	65/男	48.0	19.8	35.2	35.0
	63/男	36.7	16.5	24.3	51.4
	64/女	21.4	14.5	24.6	46.2
平均値 (%)		33.5 ± 3.2	19.5 ± 2.0	23.2 ± 2.8	38.9 ± 2.7

た。

(2) 腹腔滲出細胞からの lymphokine-activated killer (LAK) 活性誘導能

これまでに検索した14例 (OK432術前投与群4例, 非投与群10例) ではいずれの場合も培養胃癌細胞 (NUGC 4) や Daudi 白血病細胞に対して有意な細胞傷害活性を有する LAK 細胞を誘導することはできなかった (表3)。

もちろんいずれの症例も末梢血リンパ球からは強い LAK 活性を誘導することができることからこの結果が各症例の免疫抑制状態に起因しているものではないことは明らかである。

(3) 腹腔マクロファージの腫瘍細胞 DNA 合成抑制活性 (cytostasis) の測定

腹腔滲出細胞から得た dish 附着性細胞は形態学的にもまた latex beads を貪食する能力からみてもその90%以上がマクロファージである。この細胞自体、あるいはさらに活性化因子 (recombinant γ -interferon)

表3 腹腔滲出細胞(PECs)のLAK(lymphokine activated killer)活性

	症例	細胞傷害活性(%)	
		NUGC4	Daudi
対照群	1	<1	4.6
	2	<1	<1
	3	<1	8.2
	4	<1	2.4
	5	<1	<1
	6	<1	<1
	7	<1	2.1
	8	<1	<1
	9	<1	<1
	10	<1	<1
	平均値	<1	1.7±0.4
OK432術前投与群	1	<1	<1
	2	<1	4.8
	3	<1	<1
	4	<1	2.8
		平均値	<1

表4 腹腔マクロファージの腫瘍増殖抑制活性の臨床病期による比較

Stage	症例	増殖抑制活性(%)		平均値	
		MAF(-)	(+)	(-)	(+)
I	1	12.6	34.4	10.0±3.2	16.3±6.0
	2	7.3	13.1		
	3	10.4	9.3		
	4	0	0		
	5	19.6	24.5		
II	1	14.8	45.6	19.8±1.9	45.0±4.4*
	2	24.2	53.3		
	3	20.4	48.6		
	4	19.8	32.5		
III	1	0	0	16.7±8.2	23.0±9.0
	2	9.5	18.2		
	3	38.6	40.8		
	4	18.6	32.8		
IV	1	0	0	4.2±3.0	12.2±10.2
	2	0	0		
	3	12.6	42.6		
	4	4.2	6.3		

*p<0.01(Stage II versus Stage I, IV) MAF(マクロファージ活性化因子), 本文参照

表5 OK432術前投与によるPECsの腫瘍増殖抑制活性の増強効果

	対照群	OK432術前投与群
Stage I	3例	2例
II	2	2
III	2	2
IV	2	2
平均年齢	51.3±2.8	52.9±3.5
MAF*(-)	9.0±2.6	16.9±4.0
増殖抑制活性(%)	p<0.05	
M MAF(+)	15.5±5.3	33.3±6.3

MAF* (macrophage activating factor) 本文参照
N.S.** not significant

別に分類して表4に示した。個体差はみられるもののStage II, III症例ではcytostasis活性が高く、 γ -interferonを加えるとStage IIでは19.8±1.9%から45.0±4.4%と有意な増強効果(p<0.01)を認め、またStage IIIでも16.7±8.2%から23.0±9.0%と活性増強傾向が認められた。

(4) OK432術前投与による腹腔マクロファージのcytostasis活性増強効果

OK432による活性化マクロファージ増強効果はこれまでに多くの報告があり⁴⁾⁵⁾、著者らもマウスの系で腹腔滲出細胞のLAK活性、抗腫瘍性マクロファージ活性が著明に上昇することを報告している。そこで実際の胃癌患者で術前にOK432投与を行い腹腔マクロファージの抗腫瘍活性が増強するか否かを検討した。これまでに検討したOK432術前投与群は8例、対照群は9例でそれぞれの平均年齢、臨床病期は表5に示したとおりで両群間に有意差は認めない。その結果cytostasis活性は対照群9.0±2.6%、OK432術前投与群16.9±4.0%であったが、*in vitro*でさらに γ -interferonを加えて活性化すると著明な活性増強を認め(表5, 下欄)、OK432術前投与によって腫瘍傷害性マクロファージ(tumoricidal macrophage)に分化するelicited macrophageが誘導されることが示唆された。

IV. 考 察

これまでのマウスを主とした動物実験で腹腔内マクロファージおよび腹腔内滲出T細胞, NK細胞の抗腫瘍活性に関する報告は数多く^{6)~8)}、しかもそれらの抗腫瘍活性は総じて高く、腹腔内滲出細胞が担う局所免

を加えて*in vitro*活性化を誘導した細胞の腫瘍細胞(Daudi)に対するDNA合成抑制(増殖抑制)活性を測定した。これまでに検討した17例の結果を臨床病期

疫能は決して小さいものではないのではないかと考えられる。しかしながらこれらはいずれも *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) やコリネ菌, ウイルスなどを動物に感作させて得た腹腔滲出細胞であり, 必ずしも実際の臨床例のモデルとはなりえない。著者らは胃癌患者の腹腔滲出細胞を採取してその細胞の表面抗原および機能的な抗腫瘍活性を検討してこの細胞の局所免疫に占める役割を明確にしようとした。腹腔滲出細胞は開腹手術時に温生食で腹腔内をよく洗浄することによって得たが, この際正確に正中線上でかつ可及的速やかに開腹することが重要で, この操作により末梢血の腹腔内流入を防ぐことができる。回収された細胞の表面抗原解析によって細胞構成を検討したところ個体差は大きいが OKM1陽性を示すマクロファージ分画が平均40%近くを占め明らかに末梢リンパ球のそれとは様相を異にしていた。また回収細胞数も個体差が大きい平均 2×10^7 程度で臨床病期とは全く相関を示さず(表2)むしろ患者個人の栄養状態(肥満度)と関連があるように思われた。一般に肥満体型で大網や腹腔内脂肪の発達した症例では回収される細胞数が少なく逆に筋肉質でやややせ型の症例では回収細胞数が多かった。菱沼らが食餌制限をさせたマウスの免疫能を検討したところ, 制限群は対照群に比較して明らかに体重が低く, また脾臓重量も低いにもかかわらずその中に含まれるT細胞の比率, 機能は高く, 種々の免疫能が亢進していたという興味ある報告をしており, 今後さらに症例を重ねて検討すべき問題と思われる。

次に機能的な面からその抗腫瘍活性を検討した。まず lymphokine-activated killer (LAK) 活性の誘導能を測定したが, これまでに検索しえた症例では rIL-2 10units/ml 存在下で NUGC4胃癌細胞に対して有意な細胞傷害性を有する LAK 活性はいずれの症例からも誘導されなかった。もちろんこれらの症例の末梢リンパ球からは同条件下で NUGC4に対して約20~30%の細胞傷害性を有する LAK 活性が誘導できることから腹腔滲出細胞から LAK 活性が誘導されない原因がこれらの症例の免疫抑制状態に起因するものではないことは明らかである。また OK432術前投与群においても同様に LAK 誘導能に関しては OK432術前投与によってもその賦活作用は認められなかった。ところが, 腹腔滲出細胞から dish 付着性細胞を残し, Daudi 腫瘍細胞に対する増殖抑制活性を検討すると表4に示したように Stage II, III 症例ではその活性が認められ

interferon のような macrophage activity factor (MAF)を加えるとさらにその活性増強が認められた。このことはこれまで著者ら⁹⁾の胃癌患者脾細胞を用いた LAK 誘導能の検索にて Stage II, III では有意にその活性が増強していた事実と考えあわせると担癌時期(臨床病期)と抗腫瘍免疫能という面から興味深い結果である。さらに OK432を術前投与することによって cyto-stasis 活性が増強することから本剤の投与で腹腔マクロファージが刺激され elicited macrophage が誘導されていることが示唆された。このように cyto-stasis 活性は認められたものの一般的には胃癌患者の腹腔滲出細胞は凍結融解などの操作にても容易に変性をうけやすい脆弱な細胞群でその抗腫瘍活性においても著者らはこれまでのところ殺腫瘍活性 (cytotoxic activity)を見出しておらず腫瘍細胞の DNA 合成阻害能 (cytostatic activity) を検出できなかったにすぎない。したがってこれまでに得られた結果からは腹腔滲出細胞が担う局所免疫は決して大きな役割を占めているとは考え難くそれがゆえに腫瘍の腹腔内播種をきたした場合は, 容易に広がり, その予後を不良なものにしてしまいかもしれない。今後 OK432などの免疫賦活剤のより効果的な術前投与法や投与量の検索を行って腹腔滲出細胞の抗腫瘍活性増強法を検討していきたい。

V. 結 語

胃癌患者の腹腔滲出細胞を採取してその抗腫瘍活性の測定と OK432術前投与による変動効果を検討し, 以下の結果を得た。

(1) 平均回収細胞数は $(2.2 \pm 0.4) \times 10^7$ 個で各臨床病期間で有意差を認めなかった。

(2) 腹腔滲出細胞の lymphokine-activated killer (LAK) 活性誘導能を測定したところ, いずれの症例からも有意な活性は認められずまた OK432術前投与による効果も認めなかった。

(3) 腹腔マクロファージの腫瘍増殖抑制能を検討したところ Stage II, III 症例で比較的高い活性を認め (Stage I $16.3 \pm 6.0\%$, Stage II $45.0 \pm 4.4\%$, Stage III $23.0 \pm 9.0\%$, Stage IV $12.2 \pm 10.2\%$), また OK432投与にてその活性増強を認めた。

文 献

- 1) Gallelli A, Garrec YL, Chedid L et al: Macrophage stimulation in vitro by an inactive muramyl dipeptide derivative after conjugation to a multi-poly PL-alanyl poly L-lysine carrier. *Infect Immun* 28: 1--5, 1980

- 2) 奥野清隆, 中村哲彦, 高木宏己ほか: 担癌生体の摘出脾より誘導された Lymphokine-activated killer (LAK) cell とその抗腫瘍効果. 日癌治療会誌 20 : 2055-2062, 1985
 - 3) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第11版, 東京, 金原出版, 1985
 - 4) Chirigos MA: The immunodulatory activity of picibanil (OK432). Edited by Hoshino T, Uchida A: Amsterdam, Excerpta Medica 1983, p20-31
 - 5) Ishii Y, Yamaoka H, Toh K et al: Inhibition of tumor growth in vivo, and in vitro by macrophage from rat treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann 67 : 115-119, 1976
 - 6) Fidler IJ: Recongnition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages. Isr J Med Sci 14 : 177-191, 1978
 - 7) Tracey DE, Wolf SA, Durdik JM, et al: BCG-induced murine effector cells. I. Cytolytic activity in peritoneal exudates: An early responses to BCG. J Immunol 119 : 1145-1151, 1977
 - 8) Wolf SA, Tracey DE, Honney CS et al: BCG induced murine effector cells. II. Characterization of natural killer cells in peritoneal exudates. J Immunol 119 : 1152-1158, 1977
 - 9) 高木宏己, 奥野清隆, 中村哲彦ほか: ヒト脾細胞を用いた抗腫瘍エフェクター細胞の誘導とその臨床応用に関する基礎的研究. 日癌治療会誌 21 : 721-727, 1986
-