

直腸癌に対する OK-432の腫瘍近傍投与による NK 活性増強効果

久留米大学医学部第1外科

緒方 裕 磯本 浩晴 白水 和雄
荒木 靖三 中川喜一郎 掛川 暉夫

直腸癌患者23例に対し OK-432の腫瘍近傍投与を行ない、peripheral blood lymphocytes (以下 PBL), portal vein lymphocytes (以下 PVL), tumor infiltrating lymphocytes (以下 TIL) および lymphnode lymphocytes (以下 LNL) の natural killer (以下 NK) 活性の増強の有無を検討した。比較対照として無処置の25例を用いた。

PBL および LNL では、OK-432の局注による NK 活性の増強は認められなかった。TIL では、17例中8例のほぼ半数に約20%以上の高い活性値が得られ、対照例に比べ明らかに高値を示した。局注例では、PVL の NK 活性値は PBL に比べ有意に高値を示した。また、TIL の NK 活性高値例では低値例に比べて PVL の NK 活性値が有意に高かった。

以上、OK-432の腫瘍近傍投与により TIL および PVL の NK 活性が増強され、直腸癌に対する術前補助療法として本法の有用性とくに肝転移抑制効果が期待される。

Key words: peritumoral administration of OK-432, natural killer activity of portal vein blood lymphocytes, natural killer activity of peripheral blood lymphocytes, rectal cancer

I. 緒 言

一般に癌患者では健常人に比べて免疫能の低下がみられ、さらに、手術患者では手術侵襲に伴う術後早期の免疫抑制が加わり著しい低免疫状態になる¹⁾。このような免疫能とくに細胞性免疫能の低下は、遺残した癌細胞の着床発育やすでに存在する微小転移巣の増大にかかわる要因の1つ²⁾と考えられ、術後の再発に深く関与すると推測される。最近では、このような免疫能の観点から、術前後を通じた免疫療法が癌治療における補助療法として期待され、その有用性について臨床研究がなされている。

ヒト自然発生癌では癌の低抗原性の理由から、免疫監視機構における effector として抗原の感作なしで細胞障害性を示す natural killer (以下 NK) cell³⁾や lymphokine activated killer (以下 LAK) cell⁴⁾が注目され、免疫療法による NK 活性や LAK 誘導能の増強が報告⁵⁾されている。しかし、門脈血リンパ球(portal vein lymphocytes 以下 PVL) の NK 活性に関する報告⁶⁾は少なく、OK-432の腫瘍内局注による腫瘍灌流門脈血の NK 活性についての報告はない。そこで、われわれは直腸癌症例に対し、biological response

modifier (以下 BRM) の1つである OK-432を術前腫瘍近傍に投与し、PVLをはじめ末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocytes 以下 PBL)、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes 以下 TIL) およびリンパ節リンパ球(lymphnode lymphocytes 以下 LNL) の各 NK 活性の増強の有無を検討することにより、術前 OK-432腫瘍近傍投与の術前補助療法としての有用性について考察した。

II. 研究対象および方法

1. 対象

教室で切除した大腸癌症例のうち、術前に OK-432を腫瘍縁に投与した直腸癌23例(非切除2例を含む)を対象とした。比較対照として無処置の S 状結腸癌9例と直腸癌15例の24例を用いた。局注例の組織学的進行度は Stage I : 2例, II : 7例, III : 6例, IV : 3例, V : 3例および不明2例であり、対照例は Stage I : 3例, II : 8例, III : 6例, IV : 3例および V : 4例で腫瘍の局在以外両群の背景因子に差を認めなかった。なお、検索に用いた症例は OK-432の局注以外の術前合併療法が行われていないものとし、大腸癌取り扱い規約⁷⁾に従って行った。

2. 方法

1) OK-432の投与方法

術前2週と1週の計2回、OK-432 20KEを生食5ml

に溶解し、直腸鏡下に肛門側腫瘍縁粘膜下に分割注入した。腫瘍占居部が後壁にかかる癌に対しては6hに、その他の腫瘍には、12h, 3h, 9hのうち癌の主体が最も近い部位に約1/3周性に注入し、組織採取時の指標とした。

- 2) PBL, PVL, TIL および LNL の NK 活性
- ① PBL, PVL, TIL および LNL の分離

OK-432投与前と手術前日に肘静脈より採血した末梢血および手術時に下腸間膜静脈より採血した門脈血より Ficoll-Paque 比重勾配遠心分離法で単核細胞を得た。また、手術時に採取した肛門側の腫瘍組織(正常癌境界部、局注例では前述の注入部に相当)および近位(第1群および2群)と遠位(第3群以遠)の所属リンパ節の半切の一方を細切り、フローサイトグラスで軽く圧挫し浸潤細胞を遊出させた後、ステンレスメッシュで濾過して細胞の浮遊液を作成し、同様に単核細胞の分離を行い phosphate buffered saline (以下 PBS) に浮遊させた。その後、プラスチックシャーレ内に細胞を浮遊させ、37℃、5%CO₂下で45分間インキュベートし、adherent cell を除去した。遠心洗浄後、細胞数を2×10⁶個/ml に調節し、10%FCS 加 RPMI-1640に再浮遊させ、effector cell とした。なお、用いたリンパ節は組織学的に転移のないものとした。

- ② 標的細胞 (target cell)

ヒト白血病細胞由来の K-562細胞株を用いた。2×10⁶個の K-562細胞に50~100μci の Na₂CrO₂ (ミドリ十字)を添加し、37℃、5%CO₂下で1時間インキュベートした後、細胞数を1×10⁵個/ml に調節して10%FCS 加 RPMI-1640に再浮遊させた。

- ③ NK 活性の測定法

Effector cell と target cell の浮遊液を100μl ずつ96穴マイクロプレートに分注し、37℃、5%CO₂下の条件で4時間インキュベートした後、マイクロプレートを1,000rpm で5分間遠心し、各WELL から上清を100μl ずつ採取し、Well 型ガンマシンチレーションカウンターで放射活性を測定し、さらに自然放出量 (spontaneous cpm) と最大放出量 (maximum cpm) を求め、次式を用いて NK 活性値を算出した。

$$\% \text{cytotoxicity} = \frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

- 3) 末梢血のリンパ球数とリンパ球サブセット

OK-432投与例では投与前と2回投与後すなわち手術前日に末梢血リンパ球数とリンパ球サブセットの測定を行った。リンパ球のサブセットの測定は、ヘパリ

ン加全血100μl に Leu シリーズ FITC 標識モノクローナル抗体 (CD4, CD 8, Leu 7, CD 16) 10μl を加え、4℃30分間インキュベートした後、塩化アンモニウム溶液 (NH₄Cl 8.26/l, KHCO₂ 1.0/l, EDTA-4Na 0.0037g/l) 3μl を加え、37℃で10分間インキュベートして赤血球を溶血させた。次に、4℃ 300G で5分間遠心し、洗浄後2ml の PBS に再浮遊させ、レーザーフローサイトメーター (spectrum III, ortho 社) を用いて蛍光陽性細胞の百分率を求めた⁸⁾。

- 4) 統計学的処理

平均値はすべて Mean±S.D. で表示し、有意差の検定には pared t および student's t-test を用いて p<0.05 を有意差有り と判定した。

III. 結 果

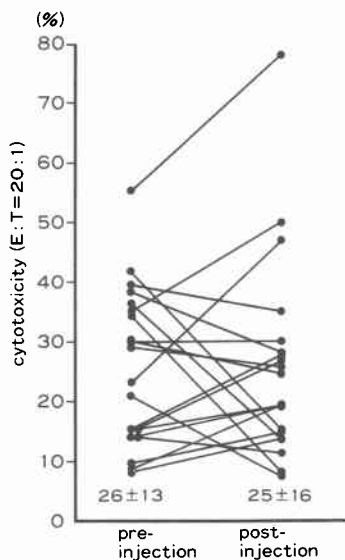
- 1) PBL の NK 活性

OK-432の投与前後に測定しえた20例のNK活性値は、投与前が25±12%、投与後が25±16%で差を認めなかった。また、OK-432の投与によるNK活性値の上昇例は9例、低下例は10例および不変1例であった (Fig. 1)。

- 2) PVL の NK 活性

PBL と PVL の NK 活性をともに測定しえた症例は局注群12例、対照群6例であった。PVL の NK 活性値を手術前日の PBL の NK 活性値と比較すると、

Fig. 1 NK activity of peripheral blood lymphocytes in rectal cancer with OK-432 tumoral administration



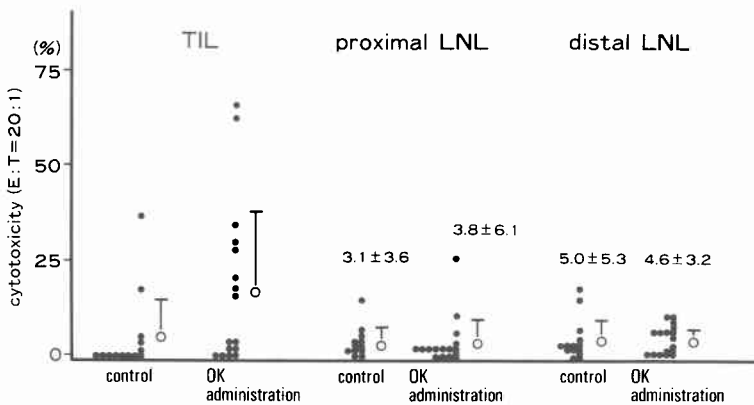
OK-432投与群では、PBLが $21 \pm 9\%$ 、PVLが $27 \pm 8\%$ で、PVLのNK活性値はPBLのそれに比べて有意に高値であった($p < 0.05$)。一方、対照群では、PVLのNK活性値がPBLのそれに比べ著しく低値を示した症例が6例中2例に認められ、PBL $24 \pm 11\%$ 、PVL $20 \pm 14\%$ とPVLのNK活性値がやや低い傾向にあった (Fig. 2)。

3) TILのNK活性

局注群17例のNK活性値を無処置の対照群13例と比較した。対照群では、ほとんど活性値を示さない症例が13例中11例と多数を占めたのに対し、局注群では、17例中8例のほぼ半数に約20%以上の高い値が得られた (Fig. 3)。

4) LNLのNK活性

Fig. 3 NK activity of TIL and LNL. TIL: Tumor infiltrating lymphocytes, Proximal LNL: Lymphocytes in the first and second lymphnodes according to General Rules for Clinical and Pathological Studies on Cancer of Colon, Rectum and Anus, Distal LNL: Lymphocytes in the third and the further lymphnodes

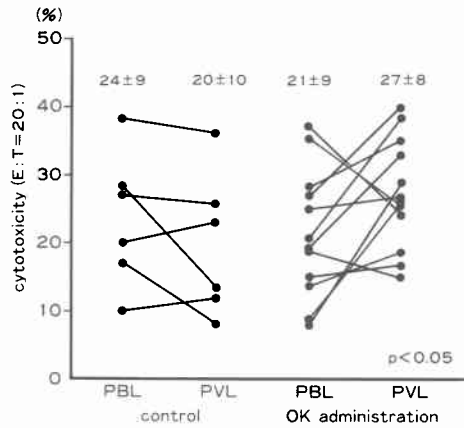


LNLのNK活性値は一部の症例を除いてきわめて低値を示し、近位リンパ節のNK活性値は、対照群が $3.1 \pm 3.6\%$ ($n=14$)で、局注群が $3.8 \pm 6.1\%$ ($n=17$)で両群間に差を認めなかった。遠位リンパ節では、対照群が $5.0 \pm 5.3\%$ ($n=15$)で、局注群が $4.6 \pm 3.2\%$ ($n=17$)であり近位リンパ節と同様、両群間に差を認めなかった (Fig. 3)。

5) TILのNK活性値別のPVLのNK活性

TILのNK活性値により、局注群を活性値が10%以下の低値群6例と約20%以上の活性値を示した6例に分けてPVLのNK活性値を比較した。TIL高値群のPVLのNK活性値は $34 \pm 5\%$ 、低値群は $21 \pm 5\%$ と

Fig. 2 Comparison between PVL and PBL on NK activity



TILのNK活性高値群は低値群に比べて有意にPVLのNK活性値が高値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 4)。

6) 末梢血のリンパ球数とリンパ球サブセット

末梢血リンパ球数は、OK-432投与前が $1,880 \pm 840$ 個/ml、投与後が $1,890 \pm 710$ 個/mlとOK-432の局注による変化は認めなかった。リンパ球サブセットは、CD4⁺細胞およびCD8⁺細胞については投与前後で差がなかったが、NKサブポピュレーションはLeu7⁺細胞が投与前 $28 \pm 10\%$ 、投与後 $25 \pm 10\%$ で、Leu11a⁺細胞が投与前 $13 \pm 9\%$ 、投与後 $10 \pm 5\%$ とOK-432局注後低下する傾向を認めた (Table 1)。

Fig. 4 NK activity of PVL assigned by TIL activity. low TIL: NK activity of TIL is less than 10%, high TIL: NK activity of TIL is more than 20%

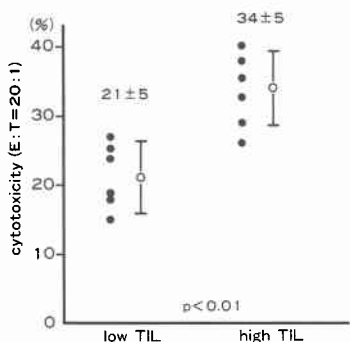


Table 1 Number and subsets of peripheral blood lymphocytes

	No. of lymphocyte	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Leu7 ⁺	CD16 ⁺
pre-injection	1880 ± 840 (/ml)	38 ± 10 (%)	27 ± 9 (%)	28 ± 10 (%)	13 ± 9 (%)
post-injection	1890 ± 910 (/ml)	39 ± 9 (%)	27 ± 10 (%)	25 ± 10 (%)	10 ± 5 (%)

Values are mean ± SD (n=23)

IV. 考 察

BRM の腫瘍内投与は、癌局所が免疫応答の最も強く現われる場であるという前提のもとに、BRM を直接刺激することで担癌生体の免疫能を賦活し、より強い抗腫瘍性を誘導出来るのではないかという観点から行われるようになった。さらに、最近では所属リンパ節の抗腫瘍性を高め、切除予後の向上を目的として術前より BRM の腫瘍内投与が試みられている⁹⁾。

冒頭でも述べたように、ヒト自然発生病ではその低抗原性の理由から腫瘍特異的なキラーT細胞の誘導に疑問がもたれ、抗原の感作なしで細胞障害性を示すNK細胞やLAK細胞が免疫監視機構におけるeffectorとして注目されている。転移形成や微小転移巣の増殖の抑制に重要な働きをされるとされるNK活性¹⁰⁾は、治癒切除が施行された症例の術後再発の防止に少なからず寄与すると期待される。著者¹¹⁾は直腸癌症例にOK-432を術前腫瘍近傍投与した結果、TILのNK活性の増強やLNLでのLeu 2a⁺, Leu 15⁻のkiller cellおよびそのprecursorの増加など主病巣と所属リンパ節の抗腫瘍性増強についてすでに報告している。今回、さらにPVLおよびPBLの各NK活性の

増強の有無を検索することにより、OK-432腫瘍近傍投与の術前補助療法としての有用性について検討を加えた。

無処置対照例のTILやLNLのNK活性は諸家の報告¹²⁾同様きわめて低値であるが、OK-432を腫瘍近傍に投与することによって、TILでは約半数の症例に高いNK活性が得られた。PVLのNK活性について森谷¹³⁾は、癌患者では末梢血より低値を示すことを報告している。今回のわれわれの直腸癌6例でもPBLと同等かきわめて低値のいずれかであり、腫瘍灌流門脈血のNK活性はPBLのそれより低値であることが示された。この原因として腫瘍局所のサブレッサー細胞¹⁴⁾や免疫抑制物質あるいは長時間の麻酔¹⁵⁾の影響が考えられる。しかし、OK-432局注例ではPVLのNK活性はPBLのそれに比べて有意に高値を示し、OK-432の局注によりPVLのNK活性が増強される事が示唆された。著者¹⁶⁾はTILのNK活性増強はそのリンパ球サブセットの検討よりリンフォカインに活性化誘導された細胞群による可能性を報告したが、さらに、今回の検討で、TILのNK活性が高値を示す例ではPVLのNK活性が高いことから、PVLにもTIL同様broadなtarget spectrumをもつLAK様細胞が誘導されていることも考えられ、自己の腫瘍細胞に対して強い細胞障害活性を有する可能性が示唆された。このようなPVLの細胞障害活性の増強は、手術操作に伴って血管内に遊離した癌細胞やその肝での着床あるいはすでに存在する微小転移巣の増殖に対し殺細胞的または抑制的に働くものと推測され、直腸癌におけるOK-432の術前局注療法は術後の肝再発防止の観点から有用性が期待される。

さて、癌患者の末梢血NK活性はOK-432の皮内、筋肉内、静脈内など全身投与により増強する¹⁷⁾¹⁸⁾ことが知られているが、今回のOK-432の腫瘍近傍投与による検討では活性の増強は認められなかった。その理由として、測定時期の問題が上げられる。Wakasugiら¹⁸⁾はOK-432の筋肉内投与による末梢血のNK活性増強は3日目をピークに6日間で低下する一過性のものと報告しており、われわれの測定した局注後1週間前後では、すでに活性の低下をきたした可能性が考えられる。一方、末梢血のリンパ球サブセットより検討すると、OK-432の局注後1週ではLeu 7⁺細胞やCD 16⁺細胞などNKサブポピュレーションは局注前に比べてむしろ減少傾向を認め、NK活性が増強しなかったことと一致した。リンパ球のうちNKサブポピュレー

シオンは生体の環境の違いに最も敏感に反応するサブセットであり、直腸癌患者では腸管狭窄に伴う経口摂取量の減少による栄養状態の低下や術前の腸管前処置がNK サブポピュレーションの減少に関与していることも予想される。いずれにしても、本投与法の術前補助療法としての有用性を論ずるには末梢血リンパ球NK 活性の増強や術後早期の低下を防止することが不可欠であり、そのためにはOK-432術直前の systemic な投与の併用など、より効果的な投与法の検討が必要と考える。

文 献

- 1) Slade MS, Simmonns RL, Yunis E et al: Immunodepression after major surgery in normal patient. *Surgery* 78 : 363-372, 1975
- 2) Fisher EB, Fisher B: Experimental studies of factors influencing hepatic metastasis. *Cancer* 12 : 926-928, 1959
- 3) Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Reactivity of lymphocyte from normal person on cultured tumor cells. *Cancer Res* 33 : 2898-2902, 1973
- 4) Rosenstein M, Yorn I, Kanfman Y et al: Lymphokine-activated cells: Lysis of fresh syngeneic natural-resistant murine tumor cells by lymphocytes culture in interleukin 2. *Cancer Res* 44 : 1946-1953, 1984
- 5) Uchida A, Micksche M: Augmentation of NK cell activity in cancer patient by OK432. Activation of NK cells and reduction of suppressor cells. Edited by Herberman RB. "NK Cells and Other Natural Effector Cells". Academic Press, New York, 1982, p1303-1308
- 6) Gibson PR, Verhaar HJJ, Selby WS et al: The mononuclear cells of human mesenteric blood, intestinal mucosa and mesenteric oymph nodes: compartmentalization of NK cells. *Clin Exp Immunol* 56 : 445-452, 1984
- 7) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 金原出版, 東京, 1985
- 8) 原 昭典, 大久保慶二, 横山三男: 市販 T リンパ球サブセット測定用モノクローナル抗体の特異性および力価の比較検討. *臨検* 28 : 1094-1098, 1984
- 9) 鈴木孝雄, 落合武徳, 浅野武秀ほか: 胃癌患者に対する免疫療法剤局所投与による所属リンパ節の免疫学的分析. *日消外会誌* 20 : 1682-1689, 1987
- 10) Herbermann RB: NK cells and other natural effector cells. Academic Press, New York, 1982, p1353-1358
- 11) 緒方 裕: 直腸癌に対する術前 OK-432 の腫瘍近傍投与による免疫学的研究—とくに主病巣および所属リンパ節の抗腫瘍性反応について—. *日本大腸肛門病会誌* 42 : 526-536, 1989
- 12) Vose BM, Vanky F, Argov S et al: Natural cytotoxicity in man: Activity of lymphnode and tumor infiltrating lymphocytes. *Eur J Immunology* 7 : 353-357, 1977
- 13) 森谷行利: 胃癌患者の胃癌組織, 健常胃と各組織におけるリンパ球 Subpopulation とNK 活性に関する研究. *日外会誌* 85 : 132-142, 1984
- 14) Uchida A, Micksche M: Suppressor cells for natural killer activity in carcinomatous pleural effusions of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 11 : 255-263, 1981
- 15) 田中紀章, 吉原久司, 小野 稔ほか: 手術侵襲のNK 活性に及ぼす影響. *日外会誌* 84 : 203-210, 1983
- 16) 緒方 裕: OK-432 局所投与による直腸癌浸潤リンパ球のNK 活性増強に影響を及ぼす諸因子. 第13回消化器癌の免疫療法研究会報告集. 中外製薬, 東京, 1988, p41-45
- 17) 細井 順, 若杉 尋, 宮田道夫: 溶連菌製剤 OK-432 の投与経路の検討—特に Natural Killer 細胞活性増強作用を中心に—. *日癌治療会誌* 17 : 2044-2055, 1982
- 18) Wakasugi H, Osimi K, Miyata M et al: Augmentation of natural killer (NK) cell activity by a streptococcal preparation, OK-432, in patients with malignant tumors. *J Clin Immunol* 1 : 154-162, 1981

Augmentation of Natural Killer Activity after Peritumoral Administration of OK-4 32 In Rectal Cancers

Yutaka Ogata, Hiroharu Isomoto, Kazuo Shirouzu, Yasumi Araki,
Kiichiro Nakgawa and Teruo Kakegawa
The First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine

OK-432 was administered preoperatively into the peritumoral tissues of 23 patients with rectal cancer. Natural killer (NK) activity of lymphocytes was isolated from peripheral blood, portal vein blood, and tumorous lesions, and

the regional lymph nodes were measured by ^{51}Cr release assay. There was no effect on peripheral blood lymphocytes (PBL) or lymph node lymphocytes (LNL) with the administration of OK432. NK activity of tumor infiltrated lymphocytes (TIL) was increased in half the cases after the administration of OK-432. NK activity of portal vein blood lymphocytes (PVL) was higher than that of PBL following OK-432 administration. The cases which showed high NK activity on TIL also showed high activity on PVL. The above results suggested that peritumoral administration caused increases in both TIL and PVL activity. Therefore, the preoperative injection of OK-432 to the peritumoral region in rectal cancer patient could be effective as preoperative adjuvant therapy, particularly for the inhibition of liver metastasis.

Reprint requests: Yutaka Ogata The First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine
67 Asahi-machi, Kurume city, 830 JAPAN
