

原 著

ヒト単球のレンチナン結合能測定法ならびに簡便法の確立

*¹味の素株式会社・医薬研究所, *²株式会社エスアールエル・遺伝子・染色体解析センター,
*³山口大学医学部・消化器・腫瘍外科, *⁴味の素株式会社・医薬事業戦略部

須賀 泰世*¹ 高井 健治*² 近藤 浩史*³ 佐野 昭子*³
梶田 紀明*² 裕 彰一*³ 吉野 茂文*³ 須賀 哲也*⁴
岡 正朗*³ 村田 正弘*¹

要旨 レンチナンはシイタケから抽出された β -1,6-分岐 β -1,3-グルカンで、手術不能あるいは再発胃癌患者にテガフルとの併用において適用を認められた抗悪性腫瘍剤である。レンチナンは宿主免疫を介して、癌患者のQOL改善あるいは延命などの効果を発現する。しかし、その効果発現には個人差があり、個人のレンチナン感受性をあらかじめ予測することが重要である。われわれは、マウス単球のレンチナン結合能の簡便な測定法を確立し、マウスの系統によりレンチナン結合能に差があること、ならびに抗腫瘍効果を指標とした効果発現の強弱と一致することをすでに確認した。

今回われわれは、ヒト単球のレンチナン結合能の測定法ならびに簡便法の確立を行った。

[*Biotherapy* 20 (1) : 79-83, January, 2006]
(Received November 29, 2005/Accepted December 14, 2005)

Development of Method to Distinguish Lentinan Binding Ability of Human Peripheral Blood Monocytes

Yasuyo Suga*¹, Kenji Takai*², Hiroshi Kondoh*³, Akiko Sano*³, Toshiaki Sugita*², Shoichi Hazama*³
Shigefumi Yoshino*³, Tetsuya Suga*⁴, Masaaki Oka*³ and Masahiro Murata*¹

*¹Pharmaceutical Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., *²Center for Gene and Chromosome Analysis Section, SRL, Inc., *³Department of Digestive Surgery and Surgical Oncology (Surgery II), Yamaguchi University School of Medicine, *⁴Pharmaceutical Business Strategy and Planning Department, Ajinomoto Co., Inc.

Summary

Lentinan, a fully purified β -1,3-glucan with β -1,6-branches obtained from *Lentinus edodes*, has been approved as an anticancer drug restricted to combination with tegafur for inoperative and recurrent gastric cancer patients. Lentinan is a biological response modifier with clinical effects of QOL improvement and prolongation of survival. But it is said that the strength of these effects of lentinan may be dependent on the individual, so it is important to establish a method to estimate individual variation. We earlier established a simple and useful system to measure lentinan binding to mouse peripheral blood leukocytes, and we found that lentinan binding ability was different among various strain mice and it correlated with an anti-tumor effect.

In this study, we established a method to distinguish lentinan binding ability of human peripheral blood monocytes and its convenient method.

Key words : β -1,3-Glucan (Lentinan), Lentinan-binding, Dextran, Monocyte, Anti-tumor effects

Address request for reprints to : Yasuyo Suga, Pharmaceutical Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-8681, Japan

はじめに

レンチナン (LNT) は宿主免疫の調節により、免疫に関連する様々な疾患モデルに対し有効に働くことが示されている¹⁾。臨床においては、抗悪性腫瘍剤「レンチナン」として、手術不能または再発胃癌患者にテガフルとの併用において適用を認められており、癌患者の QOL 改善や生存期間の延長効果を発現する。

しかしながら、LNT に対する感受性には個人差があり、効果発現の程度は個人により大きく異なる。治療開始前あるいは比較的早期に LNT に対する感受性が判定できれば、LNT による効果を期待できる患者を選別することが可能となり、LNT の効果発現の確率を上昇できる。このことから、感受性予測法の確立は臨床において非常に有用であると考えられる。

LNT は単球や好中球にまず結合し、補体を含めた様々な免疫系を活性化し、効果を発現することが考えられる²⁾。最近、 β -グルカン受容体として Dectin-1 が発見されたが³⁾、古くは LNT が補体受容体を介し、ヒト単球に結合することが報告されている⁴⁾。そして、単球における LNT 結合細胞の存在率 (LNT 結合能と称す) はマウス系統あるいは個体により異なることも示されている⁵⁾。これらの検討においては、FITC 標識抗 LNT 抗体により単球などへの LNT 結合を測定していたが^{4,5)}、単球や好中球に貪食された LNT の検出は不可能であった。また、抗 LNT 抗体は普遍ではないため、感受性予測法として一般化することも困難であった。

われわれは一般的に測定可能な感受性予測法を確立する目的で、フルオレセイン標識 LNT を用いたマウス単球の LNT 結合能測定法を確立し、LNT 結合能の系統差が効果発現と一致することを確認している⁶⁾。

今回われわれは、ヒト単球の LNT 結合能測定法ならびに測定が容易な簡便法を確立した。今後、癌患者における LNT の効果発現との相関性を解析することにより、LNT に対する感受性を予見できるようになることが期待される。

I. 対象と方法

1. 対象

日本高齢消化器医学会議付置研究会消化器医食会による「ミセラピスト®超微粒子 β -グルカン」の臨床研究に、2004年7月1日～8月31日までに登録された癌患者 41 例の血液を対象とした。

2. フルオレセイン標識 LNT 溶液 (F-LNT) の調製

LNT 溶液は LNT 原末 (味の素株式会社) を蒸留水に懸濁し 120°C, 20 分高圧処理により調製した。フルオレセイン標識は Kishida らの方法⁷⁾を一部変更して行った。すなわち、LNT 溶液とメタ過ヨウ素酸ナトリウム (関東化学株式会社) を混合、4°C で一昼夜攪拌し酸化開裂を行った。次に、エチレングリコール (和光純薬工業株式会社) によるメタ過ヨウ素酸の不活化を行い、透析後 fluorescein 5-thiosemicarbazide (Molecular Probes) を加え NaOH 添加によるアルカリ性条件下で反応させた。その後、Sodium borohydride (関東化学株式会社) によりシッフ塩基の還元を行い、HCl を用いて中性に戻し透析、アジ化ナトリウムを添加し遮光下冷蔵保存とした。

FITC 標識デキストラン (F-DEX: 分子量 200 万) は Sigma 社製のものをを用いた。

3. 単球のレンチナン結合能測定法

血液には血液抗凝固剤としてヘパリンを添加し、室温で保存、株式会社エスアールエルにて採血翌日中に測定を行った。血液に最終濃度が 100 μ g/ml となるように F-LNT あるいは F-DEX を添加し、37°C で 45 分間反応した。その後、ヒト単球の表面抗原 CD14 に対する PE 標識抗体 (CALTAG) を添加、37°C でさらに 30 分間反応した。溶血、洗浄後 BD FACS Calibur による 2 カラー (FITC/PE) 解析を行った。

FACS データは、SSC/FL2 (PE) で CD14 陽性単球をゲーティングし (図 1a)、CD14 陽性単球画分の FL1 (FITC) ヒストグラムを作成した (図 1b)。F-DEX 添加時の FL1 ヒストグラムで FL1 陽性側にゲートを作成し、CD14 陽性単球の約 0.05% が入るように設定した (図 1c)。このゲートを F-LNT 添加時の FL1 ヒストグラムに複写し、ゲート内の割合を算出した (図 1d)。こ

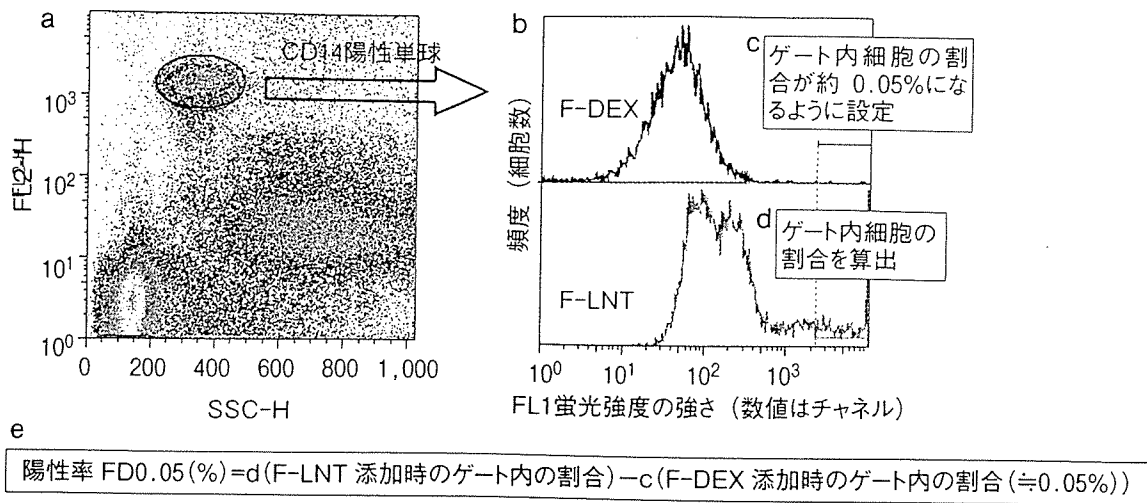


図1 FACSによる解析および陽性率FD0.05の算出法

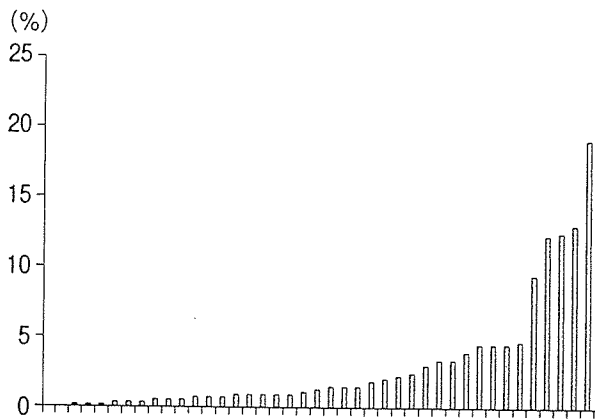


図2 41症例の単球のLNT結合能(陽性率FD0.05)

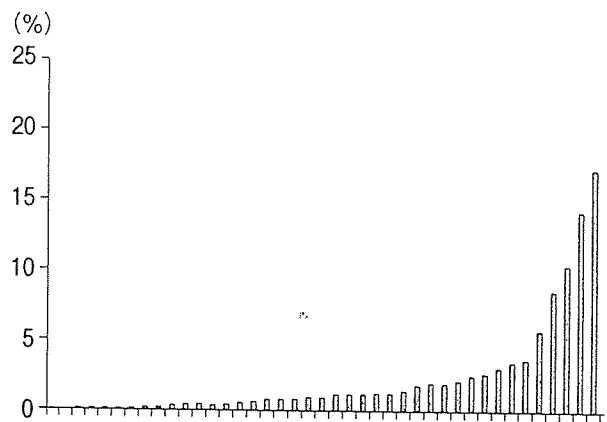


図3 41症例の単球のLNT結合能(陽性率A)

の割合からF-DEX添加時のゲート内の割合を差し引いた値を陽性率FD0.05とした(図1e)。

4. 簡便法

陽性率FD0.05を算出するために設定したゲートの開始チャンネルについて、41例すべての平均値を算出し、平均値付近のチャンネルから陽性部分にゲートを設定した。F-LNT添加時のFL1ヒストグラムでゲート内の割合を算出し、この値を陽性率Aとした。

II. 結果

1. 41例の陽性率FD0.05

図2に41例の陽性率FD0.05を示した。陽性率FD0.05には個人差がみられ、最低0.00%、最高19.09%であった。41例の平均は約3%で

あった。

2. 簡便法の検討

陽性率FD0.05を算出するのに用いたゲートの開始チャンネルにも個人差がみられ、最低667、最高9,910であった。平均は2,769であった。そこで、F-LNT添加時のFL1ヒストグラムにチャンネル2,763以上のゲートを設定し陽性率Aを算出することとした。

3. 41例の陽性率A

図3に41例の陽性率Aを示した。陽性率Aにも個人差がみられ、最低0.00%、最高17.18%であった。41例の平均は2.4%であった。F-DEX添加時のFL1ヒストグラムにチャンネル2,763以上のゲートを設定した場合、ゲート内細胞の割合は、最低0.00%、最高0.39%、平均

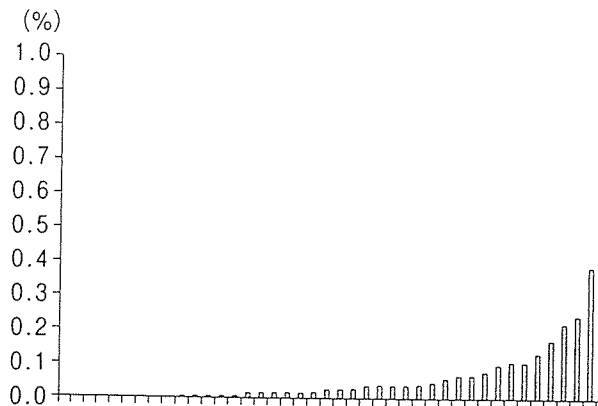


図4 F-DEX 添加時の41症例の陽性率 A

0.06%であった(図4)。

4. 陽性率 FD0.05 と陽性率 A の比較

41例の陽性率 FD0.05 を横軸に、陽性率 A を縦軸にとりグラフ化を行った(図5)。ほぼ直線上にプロットされ、高い相関係数 ($r=0.9147$) が得られた。

Ⅲ. 考 察

LNT に対する感受性を予測する目的で、F-LNT を用いたヒト単球の LNT 結合能測定法を確立し、より簡便な測定法の確立も行った。今回の検討に先立ち、健康人の血液を用いて LNT 結合能測定法の検討を行った。検査機関などでの測定を想定し、当日測定した結果と翌日測定した結果が大きく異ならない測定法および解析法を設定した。LNT 結合能を測定するために用いた F-LNT は β -1,3-グルカン側ではなく、(1,6)で分岐したグルコース側をフルオレセイン標識したものである。LNT の立体構造に多少の変化があるものと考えられるが、F-LNT の結合が未標識 LNT により阻害されることも確認している (data not shown)。

今回確立したヒト単球の LNT 結合能測定法であるが、非特異的な結合を考慮する目的で F-DEX を対照に用いている。この方法では F-DEX 添加時の陽性率が 0.05% となるようにゲート設定を行っているため、LNT 添加時の陽性率 FD0.05 は非特異的結合の強弱による影響をまったく受けない。

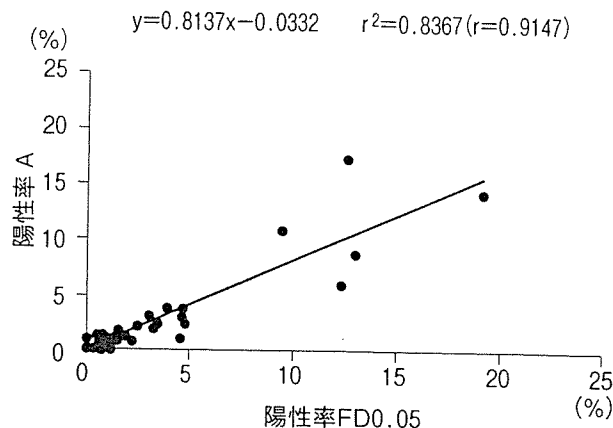


図5 陽性率 FD 0.05 と陽性率 A の相関性

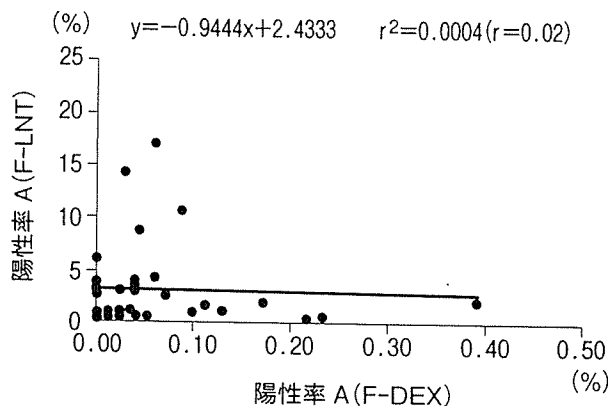


図6 F-DEX 添加時と F-LNT 添加時の陽性率 A の相関性

簡便法として確立した陽性率 A については、陽性率 FD0.05 で設定したチャンネルの平均をゲートとして設定し、非特異的結合の個人差は考慮していない。しかし、今回の検討において F-DEX 添加時の陽性率 A は F-LNT 添加時と比較して非常に低く、本測定法においても非特異的結合による偽陽性はほぼ排除できているものと考えられる。本法にて、F-DEX 添加時の陽性率 A と F-LNT 添加時の陽性率 A について相関性を検討した結果、まったく相関性は得られず(図6)、簡便法においても F-LNT 結合細胞の割合は非特異的結合の強弱とはまったく無関係であることがわかった。

現在、単球の LNT 結合能と効果発現の相関性について、癌患者を対象に検討している。まずは LNT 結合能と効果発現に相関性があることを確

認したいと考えているが、LNT 感受性予測の確率を上げる解析法への改良も必要と考えている。また、LNT 投与前後で単球のLNT 結合能に変化があるか否かについても興味深いところである。今後、LNT 投与前の結合能、LNT 投与後の結合能、投与前後の変化などを解析し、効果発現との相関性を明確にすることにより、LNT 結合能測定法をLNT 感受性予測法として確立したいと考えている。

おわりに

LNT に対する感受性を予測する目的で、ヒト単球のLNT 結合能測定法を確立し、臨床においても容易に測定可能な簡便法の確立を行った。実際にLNT に対する感受性と相関することを今後臨床研究において確認し、LNT 感受性予測法として確立したいと考える。

文 献

- 1) 羽室淳爾：生体防御とがん，講談社，東京，1994，pp.74-129.
- 2) Hamuro, J., Hadding, U. and Bitter-Suermann, D.: Solid phase activation of alternative pathway of complement beta-1,3-glucans and its possible role for tumour regressing activity. *Immunology* 34: 695-705, 1978.
- 3) Brown, G.D. and Gordon, S.: A new receptor for β -glucan. *Nature* 413: 36-37, 2001.
- 4) Oka, M., Hazama, S., Suzuki, T., et al.: *In vitro* and *in vivo* analysis of human leukocyte binding by the antitumor polysaccharide, lentinan. *Int. J. Immunopharmac.* 18(3): 211-216, 1996.
- 5) Suga, T., Ogihara, R., Izawa, M., et al.: Production of lentinan (LNT) monoclonal antibody and its application (II): characterization of anti-LNT monoclonal antibody. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.*, 50th Annual Meeting, 1991.
- 6) 須賀泰世, 村田正弘, 須賀哲也: マウス白血球の β -1,3-グルカン結合能測定法とその意義. *Biotherapy* 19(2): 197-203, 2005.
- 7) Kishida, E., Sone, Y., Misaki, A., et al.: Preparation and immunochemical characterization of antibody to branched β -(1-3)-D-glucan of *Volvariella volvacea*, and its use in studies of antitumor actions. *Agric. Biol. Chem.* 53(7): 1849-1859, 1989.

4

手術侵襲と免疫

侵襲と免疫 2006;15(1):20-3

— Key Words —

■
手術侵襲

■
アポトーシス

■
NK細胞

■
Th1/Th2バランス

■
肝局所免疫

はじめに

手術や外傷などによる生体侵襲はさまざまな生体反応を及ぼすことが報告されている。その中でも、手術侵襲により宿主の免疫能が低下し、残存した癌の増殖を促進することや、術後感染を引き起こすことが知られている。また、術後免疫能の低下は手術侵襲の大きさと相関することも事実である。手術侵襲が生じるとpro-inflammatory cytokineであるtumor necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin (IL)-1、IL-6、IL-8、interferon (IFN)- β が産生される。一方、これらサイトカイン産生に引き続き、免疫抑制を生じるanti-inflammatory mediatorであるprostaglandin (PG) E₂、IL-1 receptor antagonist (RA)、IL-10、transforming growth factor (TFG)- β が産生される。この状態は、いわゆるサイトカインバランスの不均衡と言え、術後免疫能の低下に関与する。

本項では、教室での成績を中心に、手術侵襲と免疫能の関連を述べる。

I. 術後のリンパ球減少とapoptosis

術後免疫能低下は、白血球数が増加する一方、リンパ球数が低下することでも容易に理解できる状態であり、このリンパ球減少はあらゆる侵襲後に生じる。

一般に、成熟したリンパ球はapoptosisに陥りにくい。しかし、侵襲下では末梢血リンパ球数が減少しており、この原因として、リンパ球が破壊されるか、血管外に集積することが考えられる。著者らは、このリンパ球減少が、リンパ球の破壊であり、apoptosisの機序によるとする仮説を立て、研究を行った。最初に、術前と手術開始2時間後の末梢血単核球(PBMC)を分離し、10%FCS添加RPMI-1640培養液中で24時間培養し、蛍光核染色にてapoptosisを観察した。その結果、術後のPBMCの培養では、核の断片化を呈する細胞が観察され、apoptosisを生じることが判明した。さらに、apoptosisを生じている細胞がリンパ球であることを証明するために、培養開始時に蛍光Latexを添加したところ、apoptosisを生じた細胞はLatexを貪食しておらず、リンパ球であることが確認された。

術後リンパ球apoptosisはどのような経緯を示すのであろうか。術前、手術開始2時間、術後24時間、4日目、7日目にPBMCを分離し、上記の方法で24時間培養後のapoptosisを生じたリンパ球比率を観察した。その結果、手術開始2時間または術後24時間にて最大となり、術後のリンパ球減少と一致する傾向を認めた。すなわち、術後リンパ球の減少はリンパ球のapoptosisにより生じるこ

とが示唆された。

それでは、いかなる機序にてこのリンパ球apoptosisが引き起こされるのであろうか。apoptosisに関連する膜発現蛋白としてFas抗原が発見され、Fasに結合するFas-ligandも報告され、これらが結合することによりapoptosisを生じる。リンパ球はmitogen刺激によりFas抗原を発現することも知られている。そこで、術後のリンパ球がapoptosisを生じる原因として、Fas抗原が関与しているとする仮説を立て研究を行った。術前、手術開始2時間、術後24時間、4日目、7日目に採血し、抗Fas抗体を用いてフローサイトメータによりリンパ球のFas抗原の発現を観察した。その結果、図1のように、Fas抗原陽性リンパ球の比率は術開始2時間後より増加し、術後4日までは術前より有意に高く、7日目には術前値へと低下していた。一方、リンパ球数はまったく逆の変動を示していた。このことは、術後にリンパ球がapoptosisを生じやすい結果を踏まえると、術後のリンパ球数減少がFasを介したapoptosisによることを強く示唆するものと言える。

術後のリンパ球がFas抗原を介してapoptosisを生じることを証明するために、PBMCを24時間培養し、培養開始時に抗Fas抗体(CH11)またはFas mediated apoptosisを阻害するZB4を添加して、これらを添加しない場合のPBMCのapoptosis比率と比較した。なお、CH11を添加するとFas mediated apoptosisを生じることが知られている。その結果、抗Fas抗体によりapoptosisは増強され、一方、ZB4によりapoptosisは阻害された。以上より、術後のリンパ球apoptosisがFasを介することが明白となった。

II. 手術侵襲とNK細胞

自然免疫のシステムの中で、natural killer (NK) 細胞はIFN- γ を速やかに産生して微生物の感染に対応するが、手術侵襲によりこのNK細胞の活性が低下する。当科の検討でも、K562をターゲットとし、クロームリリースアッセイでNK活性を術前後で比較したところ、術後3日目で明らかに低下していた²⁾。さらに、

食道癌患者および胃癌患者を対象に、NK細胞のマーカーであるCD56の抗体を用いてフローサイトメータによりNK細胞比率の術前後の変化を解析した。その結果、術前に比較して、術後3日目、7日目には有意に減少しており、手術侵襲の大きい食道癌術後では、胃癌に比較して著しく低下していた(図2)。このように、NK活性および細胞比率ともに術後低下していることから、術後の自然免

図1 術後リンパ球数とFas陽性リンパ球比率

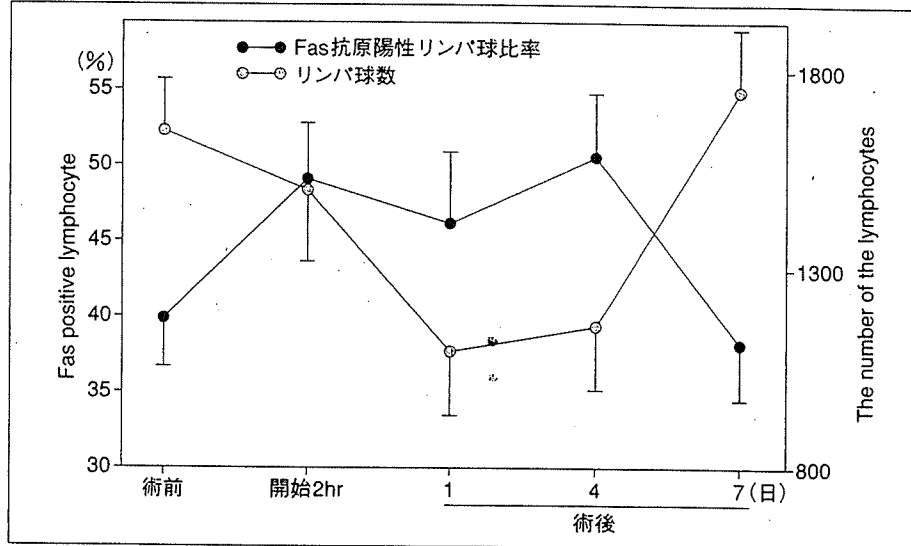
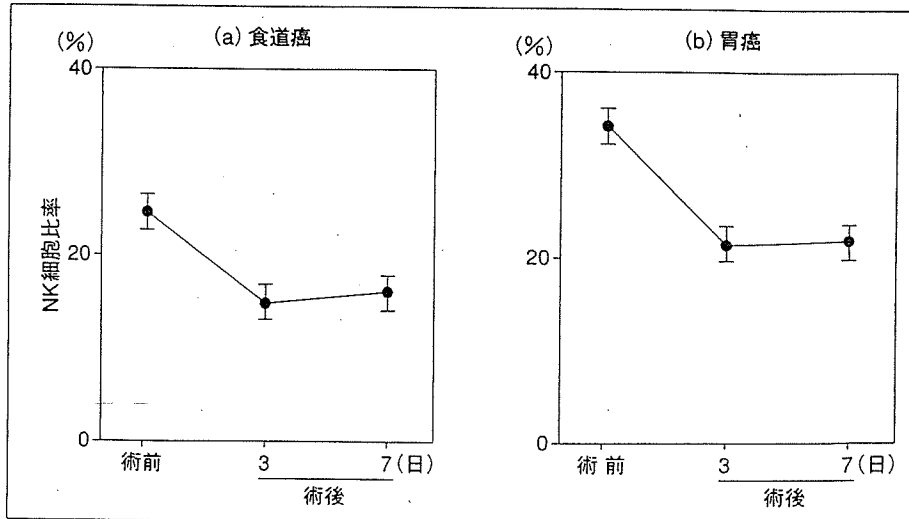


図2 術後のNK細胞比率の変化



疫低下が明らかとなった。また、その低下は手術侵襲の程度と相関すると考えられる。

III. 手術侵襲とリンパ球分画

手術侵襲により末梢血のリンパ球分画が変化することが知られている。消化器癌患者42名を対象に、術前後のリンパ球分画をフローサイトメータにより解析した³⁾。

その結果、CD4/CD8の増加、CD20陽性細胞(B細胞)の増加、CD25陽性細胞(IL-2 receptor陽性細胞)の増加、CD56陽性細胞(NK細胞)の低下、HLA-DR陽性細胞の増加、cytotoxic T細胞の低下が有意に認められた。このように、術後のリンパ球分画は術前に比較して大きく変化し、手術侵襲が患者免疫能に大きく影響していることが明らかである。

IV. 手術侵襲とTh1/Th2バランス

ヘルパーT(Th)細胞は、細胞性免疫および液性免疫を司る重要なリンパ球である。この、Th細胞はtype I(Th1)とtype II(Th2)の2種類があり、前者は細胞性免疫を、後者は液性免疫を活性化。Th1はCD4陽性細胞でIFN- γ を細胞内に有し、Th2はIL-4、IL-6やIL-10のサイトカインを細胞内に有することで区別される。種々の病態でTh1/Th2バランスが変化するが、侵襲の大きい術後にはこのバランスが崩れると報告されている。

当科では、胃癌患者の術後6時間目にELISAにより血清中のIL-6とフローサイトメータによりCD4陽性IL-6陽性細胞数を測定した。その結果、血清中のIL-6およびCD4陽性IL-6陽性細胞数は手術時間と正の相関を認め、術後のTh1/Th2バランスはTh2優位に傾くことが示唆された(図3)⁴⁾。

V. 手術侵襲と肝局所免疫

消化器癌術後に、術前には認められなかった転移巣が術後早期に出現したり、すでに存在する転移巣が急速に増大することは、臨床医であれば少なからず経験することである。その原因として、術後の免疫能低下が関与していることが報告されている。癌細胞の増殖には、全身の免疫能低下だけでなく、癌局所の免疫能の低下も重要と考えられる。消化器癌では肝転移が再発形式として重要である。肝臓には多くの免疫担当細胞が存在しており、特に肝局所に存在するNK細胞は強い抗腫瘍活性を有することが知られている。

そこで、手術侵襲と肝局所の免疫能の関係を観察するために、ラットを用いて、軽度の手術侵襲である単開腹群と比較的大きい手術侵襲である小腸切除群を作成し、術後2日目に肝臓を摘出し、肝非実質細胞を分離し、抗腫瘍活性を

図3 胃癌術後の血清IL-6値およびCD4陽性IL-6陽性細胞比率と手術時間

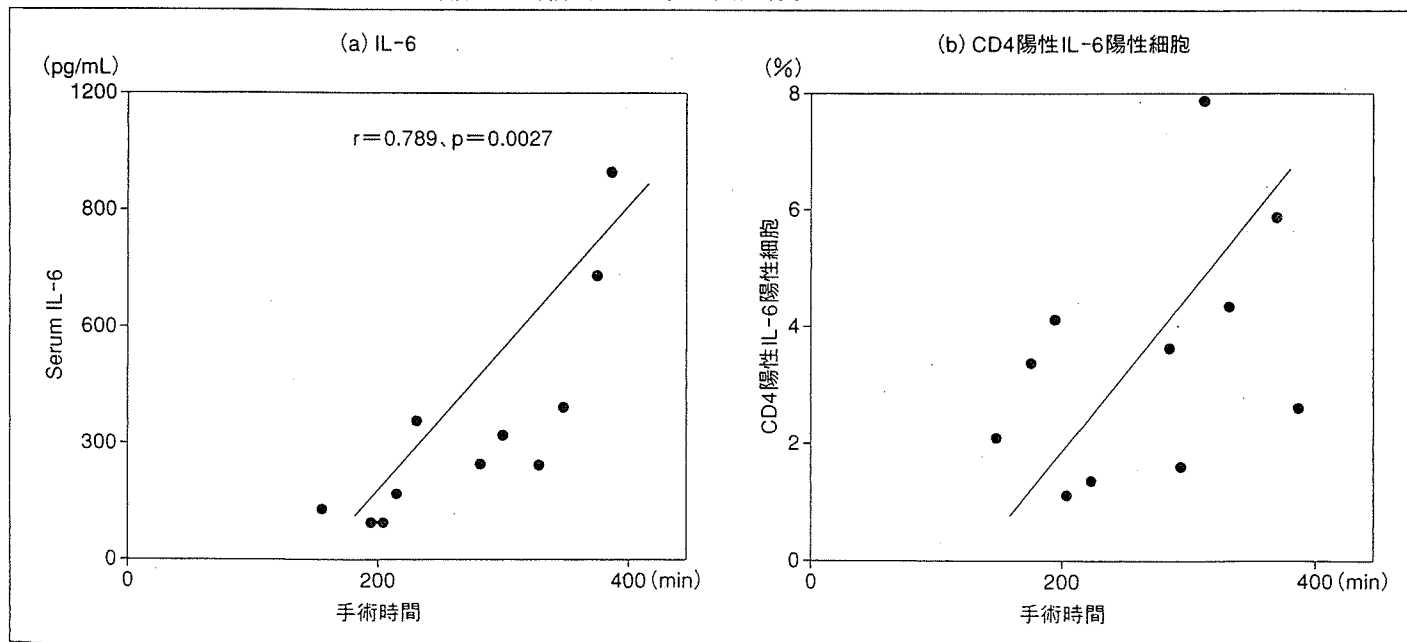
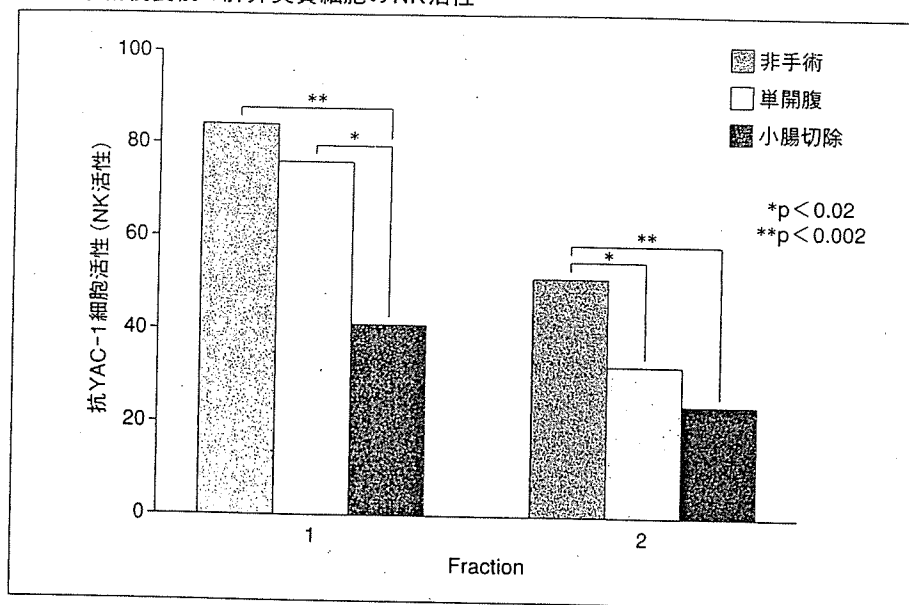


図4 手術侵襲後の肝非実質細胞のNK活性



比較した⁵⁾。また、同モデルにおいて癌細胞(MRMT-1)を経門脈的に移植し、術後14日目に肝転移の状態も観察した。その結果、大きなリンパ球(large granular lymphocyte: NK細胞)の抗YAC-1細胞活性(NK活性を示す)は小腸切除群において著しく低下していた(図4)。また、腫瘍移植後14日目において肝転移巣の肝全体に占める比率は、単開腹群で2.4±0.6%、小腸切除群で25.3±4.1%であり、小腸切除群で明らかに増大していた。以上より、大きな手術侵襲を加えると肝局所の免疫能が低下し、肝転移の促進を引き起こすことが示唆された。

おわりに

術後免疫能の変化について、教室の成績を中心に述べた。外科医としては、術後免疫能の低下が生体および転移に影響を与えることを十分に理解し、手術方法の選択や術後管理を行わなくてはならないと考える。

参考文献

- 1) Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, Iizuka N, Hazama S, Suzuki T, Kobayashi N. Induction of Fas mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann Surg* 1996; 223: 434-40.
- 2) 吉野茂文、岡正朗、裕彰一、鈴木敏。手術患者における術後免疫能と術前recombinant interleukin-2持続投与の影響。 *Biotherapy* 1991; 5: 972-4.
- 3) Oka M, Hazama S, Yoshino S, Shimoda S, Suzuki S, Iizuka N, Suzuki T, Akitomi Y, Murata S, Hattori Y, Ooba Y. Changes of lymphocyte subsets following various surgical stress. *The Bulletin of The Yamaguchi Medical School* 1993; 40: 26-35.
- 4) 加藤雅俊、裕彰一、坂本和彦、吉野茂文、丹黒章、岡正朗。肝癌切除の手術侵襲評価におけるCD4陽性リンパ球内サイトカイン測定の意義。 *癌と化学療法* 2003; 30: 1848-50.
- 5) Oka M, Hazama S, Suzuki M, Wang F, Shimoda K, Iizuka N, Wadamori K, Suzuki T, Attwood S. Depression of cytotoxicity of nonparenchymal cells in the liver after surgery. *Surgery* 1994; 116: 877-82.

PSK による大腸癌術後補助免疫化学療法の Responder 判定におけるエビデンス

吉野 茂文*¹ 裕 彰一*¹ 清水 良一*² 福田進太郎*³ 工藤 明敏*³
水田 英司*⁴ 小倉 寛*⁵ 佐野 昭子*¹ 岡 正朗*¹

(*Jpn J Cancer Chemother* 32(11):1568-1570, October, 2005)

Usefulness in Predicting Parameters for the Selection of Responders Who Received Immunochemotherapy with PSK in Patients with Colorectal Cancer: Shigefumi Yoshino*¹, Shoichi Hazama*¹, Ryouichi Shimizu*², Shintaroh Fukuda*³, Akitoshi Kudoh*³, Eishi Mizuta*⁴, Yutaka Ogura*⁵, Akiko Sano*¹ and Masaaki Oka*¹ (*¹Dept of Surgery II, Yamaguchi University School of Medicine, *²Dept. of Surgery, Ogohri General Hospital, *³Dept. of Surgery, Ube Kohsan Central Hospital, *⁴Dept. of Surgery, Onoda Red Cross Hospital, *⁵Dept. of Surgery, Ajisu Joint Hospital)

Summary

It is very important for immunotherapy to release Th2-dominated immunological conditions in patients with malignant diseases. In the present study, we assessed the intracellular cytokine profiles of CD4 positive cells in peripheral blood in patients with colorectal cancer using a flow cytometric analysis and we investigated whether Th2-dominated immunological conditions could be released by PSK.

Peripheral blood samples were collected preoperatively from 57 patients with colorectal cancer before and after the oral administration of PSK (3 g/day×1 week). After the PSK treatment, CD4+IL-10+T-cell percentages decreased significantly, whereas no significant change occurred in proportions of CD4+IL-6+T-cells. In the after/before PSK treatment percentages, the ratio of CD4+IL-10+T-cells were significantly lower in non-recurrent patients compared with recurrent patients, whereas no significant difference was seen in the ratio of CD4+IL-6+T-cells.

These results suggest that the after/before percentage ratio of CD4+IL-10+T-cells may be useful predicting parameters for the selection of responders. **Key words:** Colorectal cancer, PSK, IL-10

要旨 大腸癌患者では Th1/Th2 バランスが崩れ Th2 優位に傾いている。PSK により Th2 優位状態が解除される症例が responder になる可能性があり検討した。根治度 A, B が施行された大腸癌患者 57 例を対象とし、術前に PSK を 3g/日、7 日間経口投与し PSK 投与前後において末梢血の CD4 陽性細胞における細胞内サイトカインの解析を行った。その結果 PSK 投与により、CD4+IL-10⁺ は有意に低下したが、CD4+IL-6⁺ は低下が認められなかった。再発例と無再発例を比較すると、無再発例において PSK 投与前後の CD4+IL-10⁺ 比が有意に低値であった。CD4+IL-6⁺ 比は再発例、無再発例において差が認められなかった。再発例においては CD4+IL-10⁺ 比が 0.8 以上であるため、0.8 未満の症例が PSK の responder になる可能性が示唆された。

はじめに

癌患者においてヘルパー T 細胞(Th)のバランス(Th1/Th2 バランス)を検討した報告は数多くみられるが¹⁾、基本的には Th2 優位になっていることが実証されている。われわれも細胞内サイトカインの解析により、消化器癌患

者では明らかに Th2 優位になっていること²⁾、また大腸癌患者においても同様に Th2 優位になっていること³⁾を報告している。したがって癌免疫療法を行う際には、Th2 優位状態を解除することが重要になってくる。

非特異的免疫賦活剤である protein-bound polysaccharide K (PSK) の大腸癌における有効性は、術後補助

*² 小郡第一総合病院・外科

*³ 宇部興産株式会社中央病院・外科

*⁴ 小野田赤十字病院・外科

*⁵ 阿知須共立病院・外科

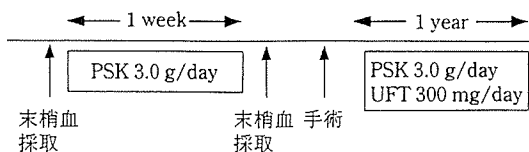


図1 PSKの投与スケジュール

療法において化学療法との併用で実証されており^{4,5)}, その効果発現の免疫学的機序についても詳細に検討されている⁶⁾。しかしどのような症例がPSKの有効例(responder)になるのか不明である。われわれは大腸癌症例において、PSKによりTh2優位の状態が解除される症例が存在すること、またTh2サイトカインであるIL-6、IL-10がPSKにより低下する症例がresponderの候補なることを報告してきた³⁾。術後補助免疫化学療法においてresponderを判別するには長期間の観察が必要となるため、今回同症例をさらに追跡調査をし、改めてresponderの候補の選択を試みた。

I. 対象および方法

1. 対象症例

手術可能な結腸、直腸癌を対象とし、術前診断において壁深達度が筋層以深で根治度A、Bが期待できる症例をエントリー基準とした。術前にPSKを投与するため、イレウスなどで経口摂取不可能な症例は対象外とした。また、術後にPSKおよびUFTを1年以上服用した症例を解析対象とした。なお、全例文書による患者の同意を得て本研究を行った。

2. PSK投与スケジュール (図1)

エントリー症例全例に対し術前にPSKを1日3g、1週間経口投与し、投与前後に末梢血を採取した。術後は、手術2週間後よりPSKを1日3g経口投与し、またUFTを1日300mgで併用投与した。

3. PSK投与前後における細胞内サイトカインの測定

細胞内サイトカインの測定は、われわれが以前より行っている方法で行った²⁾。術前のPSK投与前後において末梢血をヘパリン加で採取し、全血にBrefeldin A (Sigma Chemical)を10 μg/ml添加し5%CO₂ incubator内で4時間培養した。その後、Permeabilizing Solution (Becton Dickinson)にて細胞膜の透過性を亢進させ、抗IL-6、抗IL-10抗体(Pharmingen)を添加した。CD4陽性細胞における細胞内IL-6、IL-10陽性細胞(CD4⁺IFN-γ⁺, CD4⁺IL-6⁺, CD4⁺IL-10⁺)の割合をEPICS/XL flow cytometerにより測定した。

統計学的検定は、pairedおよびunpaired Student's t-testで行い、p<0.05をもって有意差ありとした。また結果はmean±SEで示した。

表1 エントリー症例の背景

平均年齢	67歳 (43~84)	組織型	
男性	35	wel	9
女性	22	mod	43
腫瘍占居部位		por	1
C	1	muc	4
A	7		
T	5	組織学的病期	
D	3	I	11
S	10	II	18
Rs	10	IIIa	13
Ra	8	IIIb	12
Rb	13	IV	3

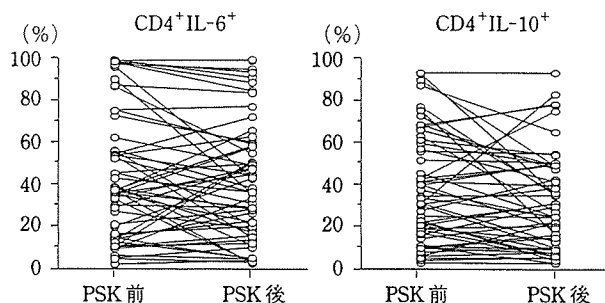


図2 PSK投与前後における細胞内サイトカイン陽性率の推移

PSK投与前 vs PSK投与後: CD4⁺IL-10⁺; p<0.05

II. 結 果

1. エントリー症例の背景 (表1)

エントリー基準を満たした結腸、直腸癌症例は57例であった。57例の性別、年齢、腫瘍占居部位、組織型、組織学的病期を表1に示す。

2. PSK投与前後における細胞内サイトカイン陽性率の推移 (図2)

PSK投与前後における末梢血のCD4⁺IL-6⁺の割合はPSK投与前45.2±4.1%、投与後41.4±3.8%と有意な変化はみられなかったが、PSK投与後に57例中32例(56%)において低下が認められた。CD4⁺IL-10⁺の割合はPSK投与前35.3±3.5%、投与後29.5±3.1%と有意に低下し(p<0.05)、PSK投与後に57例中33例(58%)において低下が認められた。

3. 再発の有無とPSK投与前後における細胞内サイトカイン変化率の関係

現在までに57例中16例において再発が認められた。再発形式は、リンパ節再発4、肝再発7、肺再発4、局所再発3、卵巣再発1例であった(重複あり)。これら16例はPSKの無効例と考えられ、57例中3年以上無再発の41例を有効例として、これら2群間において細胞内サイトカインの変化率を比較した。再発例と無再発例における

表 2 再発例と3年以上無再発例の背景因子の比較

	再発有 (16例)	3年以上無再発 (41例)	
組織学的病期			
I	2	9	
II	4	14	
IIIa	3	10	ns
IIIb	6	6	
IV	1	2	
組織型			
wel	4	5	
mod	10	33	ns
por	1	0	
muc	1	3	

組織学的病期および組織型に有意差はなかった(表2)。

再発例のPSK投与前後における $CD4^+IL-6^+$ 比は 1.5 ± 0.3 、3年以上無再発例の比は 1.1 ± 0.1 であり、両群間に差はなかった。 $CD4^+IL-10^+$ 比は再発例で 1.6 ± 0.3 、3年以上無再発例で 0.9 ± 0.1 と無再発例で有意にその比が低値であった($p < 0.01$)。また、再発例は全例 $CD4^+IL-10^+$ 比が0.8以上であった(図3)。

III. 考 察

免疫療法においては、有効症例であるresponderを見極めることがオーダーメイド治療につながるため重要である。われわれは以前、抗腫瘍多糖体であるLentinanに消化器癌患者のTh2優位状態を解除する作用があり、Th2優位が解除される症例において予後が良好であることを報告した⁹⁾。このようにTh2サイトカインの測定が、免疫療法におけるresponderを判別する一つのパラメータになる可能性がある。

また、PSKにおいても大腸癌患者のTh2優位状態を解除する作用があり、Th2サイトカインであるIL-6、IL-10が低下する症例では再発がみられないことを報告した⁹⁾。今回、術後補助免疫化学療法としてPSK+UFTを1年以上投与した大腸癌患者において、観察期間を延長することによりPSK responderの判別を再検討した。既報⁹⁾では57例中6例の再発であったが、今回3年以上の観察期間で検討すると16例の再発がみられた。PSKを投与したにもかかわらず再発してきた16例と3年以上無再発の41例を比較すると、無再発例においてPSK投与前後の $CD4^+IL-10^+$ 比が有意に低値であった(図3)。一方、 $CD4^+IL-6^+$ 比は再発例、無再発例において差が認められなかった(図3)。したがって再発例と無再発例を予測するパラメータとしては、IL-6よりIL-10のほうが優れて

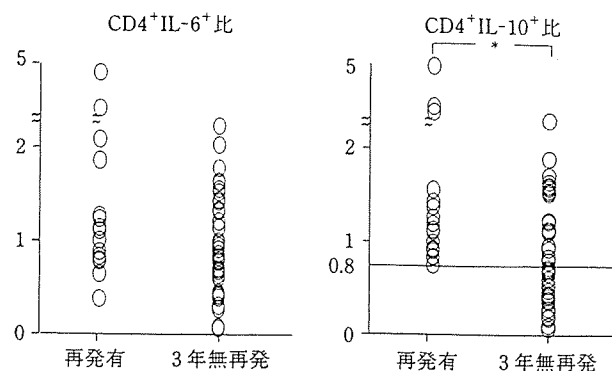


図3 再発例と3年以上無再発例におけるPSK投与前後の細胞内サイトカイン変化率の比較(*: $p < 0.01$)

いることが示唆される。再発例においては $CD4^+IL-10^+$ 比が0.8以上であるため、0.8未満の症例がPSKのresponderになる可能性がある。

非特異的免疫賦活剤のresponder予測として、IL-4⁶⁾、IL-6^{3,6)}、IL-10³⁾の測定が有用であることを報告してきたが、今回の検討ではIL-10がよい指標になるものと思われた。しかし無再発例が全例responderとは限らない。これらの症例はresponderの候補者であり、このなかに真のresponderが存在している。真のresponderを見極めるにはさらなる研究が必要であろう。

本論文の要旨は第26回癌免疫外科研究会において発表された。

文 献

- 1) Yoshino S and Oka M: Th1/Th2 balance in cancer patients. *Biotherapy* 13(11): 1079-1086, 1999.
- 2) Tabata T, Hazama S, Yoshino S, et al: Th2 subset dominance among peripheral blood T lymphocytes in patients with digestive cancers. *Am J Surg* 177: 203-208, 1999.
- 3) Yoshino S, Hazama S, Shimizu R, et al: Immunoregulatory effects of PSK on the balance between Th1 and Th2 in patients with colorectal cancer. *Biotherapy* 17(1): 26-31, 2003.
- 4) Sugiyama Y, Saji S and Kunieda K: Efficacy of anti-cancer biotherapy with PSK based on evidence. *Biotherapy* 16(1): 10-16, 2002.
- 5) Ohwada S, Ikeya S, Yokomori T, et al: Adjuvant immunochemotherapy with oral tegafur/uracil plus PSK in patients with stage II or III colorectal cancer, a randomized controlled study. *Br J Cancer* 90: 1003-1010, 2004.
- 6) Yoshino S, Tabata T, Hazama S, et al: Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Res* 20: 4707-4712, 2000.

癌性胸腹水に対する Lentinan+OK-432 胸腹腔内反復投与の臨床的検討

河岡 徹 吉野 茂文 近藤 浩史
山本光太郎 裕 彰一 岡 正朗*

[*Jpn J Cancer Chemother* 32(11):1565-1567, October, 2005]

Clinical Evaluation of Intrapleural or Peritoneal Repetitive Administration of Lentinan and OK-432 for Malignant Effusion: Toru Kawaoka, Shigefumi Yoshino, Hiroshi Kondo, Koutaro Yamamoto, Shoichi Hazama and Masaaki Oka (Dept. of Surgery II, Yamaguchi University School of Medicine)

Summary

LTN and OK-432 combined therapy is effective for controlling Th1/Th2 balance. We tried a repetitive administration of LTN and OK-432 in the pleural or peritoneal cavity for patients with malignant effusion. Of all 11 lesions of the 10 cases, 7 revealed complete remission and 1 revealed partial response.

The level of IL-12(p70) and IFN- γ in ascites of two gastric cancer patients after the second administration of LTN and OK-432 was much higher than those after the first administration, whereas the level of IL-10 was not suppressed strongly. In 8 lesions that we could confirm complete remission or partial response, 7 lesions were improved after two or three administrations of LTN and OK-432. In conclusion, a repetitive intracavitary administration of LTN and OK-432 is effective for malignant effusion. Key words: Lentinan, OK-432, Th1/Th2

要旨 われわれは以前より、Lentinan(LTN)+OK-432 併用療法は Th1, Th2 バランスを制御し得る有効な治療法になり得ると考え、癌性胸腹水患者に臨床応用を行っている。現在までに本療法を行った全 10 症例 11 病巣中、7 病巣で胸腹水の完全消失、1 病巣で減少を認め、そのうちサイトカイン濃度を経時的に測定した 2 症例では繰り返し LTN+OK-432 を投与することにより、Th1 サイトカインである IL-12(p70)、IFN- γ は初回投与より 2 回目投与にて著明に上昇する傾向がみられた。ただし Th2 サイトカインである IL-10 は明らかな抑制を認めなかった。本併用療法では効果を認めた 8 病巣中 7 病巣では 2 回以上の投与で効果を得ており、ある程度の継続投与で Th1 サイトカインをより強く誘導することが治療効果に結びつくものと予想された。

はじめに

癌免疫療法を行う際には、いかにして効率的に癌患者の Th2 優位状態を解除できるかということが重要である¹⁾。われわれは、以前より Lentinan(LTN)と OK-432 の併用が Th1, Th2 バランスを制御し得る有効な治療法となる可能性を *in vitro* で報告し、実際に癌性胸腹水患者に臨床応用を行ってきた²⁻⁴⁾。

今回、癌性胸腹水患者に対する LTN+OK-432 併用療法の現在までの臨床成績を追加報告し、また本併用療法を複数回施行した症例のサイトカイン濃度の変化を 2 症例で経時的に測定、検討したので併せて報告する。

I. 対象

performance status が 0~2 の癌性胸腹水患者 10 症

例、11 病巣 (食道 malignant melanoma の 1 例を含む) (表 1)。

II. 方法

胸腹水吸引後、LTN 2 mg を胸腹腔内投与し、直ちにドレーンをクランプする。同時に OK-432 の皮内テストを行い、24 時間後に山口らの報告⁵⁾ に準じて設定した量で OK-432 を投与し 30 分後にドレーンを開放する。以上を 1 コースとして毎週継続投与を行った (図 1)。

また、各症例で胸腹水のサイトカイン濃度(IL-10, IL-12(p70), IFN- γ) を LTN 投与前、LTN 投与 1 日後、OK-432 投与 1 日後にそれぞれ ELIZA 法で測定したが (以前に本誌で報告⁴⁾)、今回はそのうち本併用療法を複数回施行した胃癌の癌性腹膜炎 2 症例でサイトカイン濃度を経時的に測定した。

表 1 LTN+OK-432 併用療法を施行した癌性胸腹水を伴う癌患者全 10 症例の内訳

症例	疾患	癌性胸腹水の有無	OK-432 投与量	投与回数	効果
1. 57 歳, 女性	Gastric cancer	胸水 (+) 腹水 (+)	5 KE 5 KE	1 1	完全消失 無効
2. 68 歳, 男性	Gastric cancer	腹水 (+)	5 KE	2 (事前に OK-432 単独 3 回投与)	完全消失
3. 53 歳, 女性	Breast cancer	胸水 (+)	5 KE	3	完全消失
4. 66 歳, 男性	Gastric cancer	腹水 (+)	5 KE	3	減少
5. 70 歳, 男性	Gastric cancer	腹水 (+)	5 KE	3	完全消失
6. 62 歳, 女性	Rectal cancer	胸水 (+)	10 KE	2	完全消失
7. 52 歳, 男性	HCC	胸水 (+)	1 KE (1 回目) 2 KE (2 回目)	2	完全消失
8. 74 歳, 男性	Gastric cancer	腹水 (+)	5 KE	1	無効
9. 58 歳, 男性	Pancreatic cancer	腹水 (+)	5 KE	3	無効
10. 52 歳, 男性	Esophageal melanoma	胸水 (+)	2 KE	3	完全消失

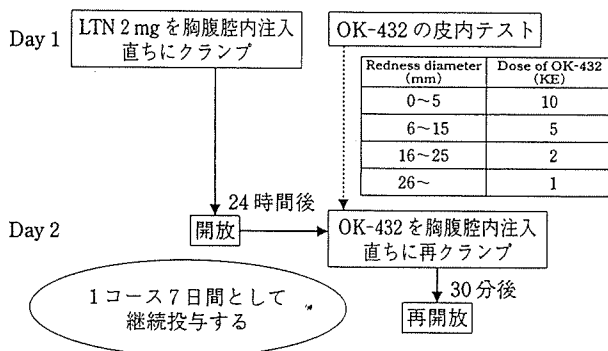


図 1 LTN+OK-432 併用療法のプロトコール

対象: 癌性胸腹水 (細胞診で class V が検出) を伴う消化器癌患者

III. 結果

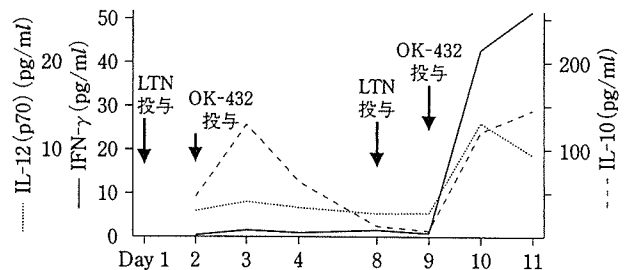
1. 臨床効果

LTN+OK-432 併用療法を施行した 10 症例 11 病巣中、胸腹水の完全消失を 7 病巣、減少を 1 病巣に認めた。完全消失例、減少例での 1 回当たりの OK-432 投与量は 1~5 KE、完全消失までの LTN+OK-432 の投与回数は 1~3 回であった。また効果を認めた 8 病巣中 7 病巣では 2 回以上の投与で効果を得ており、1 回投与のみで胸腹水の完全消失を認めた症例は 1 例のみであった (表 1)。

2. 腹水中サイトカイン濃度

症例 4 (66 歳, 男性。胃癌による癌性腹膜炎) では腹水中 IFN- γ 濃度は 4.1/48.6 pg/ml (1 回目投与後最大値/2 回目投与後最大値), IL-12 (p70) 濃度は 4.4/12.6 pg/ml, IL-10 濃度は 137.9/147.7 pg/ml であった。症例 5 (70 歳, 男性。胃癌による癌性腹膜炎) では腹水中 IFN- γ 濃度は 2.2/23.7 pg/ml, IL-12 (p70) 濃度は 4.5/16.3 pg/ml, IL-10 濃度は 21.6/292.3 pg/ml であった。症例 4 では 3 回投与後、急激に腹水の著明減少を認めた。症例 5 では 3 回投与後に腹水は完全消失し腹

<症例 4>
66 歳, 男性: 胃癌再発, 癌性腹膜炎
併用療法を 3 回施行, 一腹水は減少した。



<症例 5>
70 歳, 男性: 胃癌再発, 癌性腹膜炎
併用療法を 3 回施行, 一腹水は完全消失した。

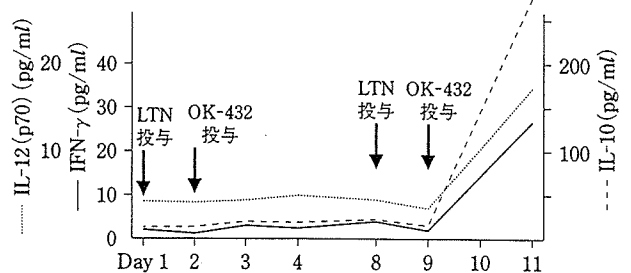


図 2 腹水中サイトカイン濃度の経時的変動

腔ドレーンを抜去することができた (図 2)。

IV. 考察

multicytokine inducer である OK-432 は Th1 サイトカインを強く誘導するが、時として Th2 サイトカインも同時に誘導し、担癌患者の Th2 優位状態を解除できない可能性がある。われわれは以前より LTN は OK-432 とは異なり、そのサイトカイン産生能自体は弱いものの効率よく Th1 サイトカインを誘導し Th2 サイトカインの産生を抑制すること、LTN 先行投与により OK-432 による Th2 誘導が抑制できる可能性があること、実際に臨床に

において癌性胸腹水患者に LTN+OK-432 併用療法を行い本療法は OK-432 単独投与よりもより効率的な治療法であるということを証明してきた²⁻⁴⁾。

今回、新たに実際に胸腹腔内という局所に対して繰り返し LTN+OK-432 を投与することにより、Th1 サイトカインである胸腹腔内 IL-12 (p70)、IFN- γ 濃度は初回より 2 回目で著明に上昇する傾向があることが確認された。本併用療法では胸腹水の完全消失あるいは減少を認めた全 8 病巣中、1 回の投与のみで効果を認めた症例は 1 病巣にすぎず、他は 2 ないし 3 回投与にて効果を得ており、ある程度の反復投与で Th1 サイトカインをより強く誘導することが実際の治療効果に結び付くものと予想された。

結 語

癌性胸腹水に対する LTN+OK-432 胸腹腔内反復投

与は、Th1 サイトカインを強く誘導することにより有効な局所療法になり得る。

文 献

- 1) Tabata T, Hazama S, Yoshino S, *et al*: Th2 subset dominance among peripheral blood T lymphocytes in patients with digestive cancers. *Am J Surg* 177: 203-208, 1999.
- 2) 吉野茂文, 裕 彰一, 田畑智之・他: Th1, Th2 理論に基づいた癌免疫療法. *Biotherapy* 12(11): 1435-1440, 1998.
- 3) Yoshino S, Tabata T, Hazama S, *et al*: Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide Lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Res* 20: 4707-4712, 2000.
- 4) 河岡 徹, 吉野茂文, 裕 彰一・他: 癌性胸腹水に対する Lentinan+OK-432 併用療法の臨床的検討. *癌と化学療法* 30(11): 1562-1565, 2003.
- 5) 山口佳之, 宮原栄治, 檜原 淳・他: OK-432 免疫療法の responder の探索と作用機序の解明. *Biotherapy* 10(1): 42-49, 1996.



侵襲後の臓器不全 予防と治療—最近の進歩

臓器不全の治療—どのように行っているか 侵襲後の免疫不全—病態と治療

Mechanisms and treatments of immune suppression after surgical stress

裕 彰 一 岡 正 朗*
HAZAMA Shoichi OKA Masaaki

癌患者は手術を受けることが一般的であるが、担癌によりすでに低下した細胞性ならびに液性免疫が周術期ストレスによりさらに低下し、腫瘍細胞の拡散や感染症を助長すると考えられる。周術期における免疫抑制因子として、外科的侵襲、麻酔薬、麻薬性鎮痛薬、輸血、体温変化、痛み刺激、精神的ストレスなどをあげることができる。なかでもNK活性の低下は癌転移と密接に関連しており、手術侵襲はNK活性を著明に低下させる。これらの周術期における免疫抑制性連鎖を軽減するための対策として、低侵襲手術、硬膜外麻酔などの積極的なペインコントロール、麻酔薬の選択、不要な輸血の回避、待機手術では十分に貧血、栄養状態、免疫能を改善しておくこと、などがあげられる。

はじめに

手術患者では、担癌、消化吸収障害、慢性炎症、化学療法、放射線療法、ステロイドや分子標的療法など、さまざまな要因により術前から免疫能が低下した症例が多く、これに手術侵襲が加わる術後には、さらなる免疫不全状態に陥り、腫瘍の急速な増大や難治性の感染症に難渋することも少なくない。一方、手術前からいわゆるSIRS状態にある症例ではこれに手術侵襲が加わることにより過剰な炎症性サイトカイン血症がもたらされ、多臓器不全に陥ることもある。いずれも手術侵襲に対する治療過程としての自己防衛的生体反応が、結果的に自己障害を引き起こしているわけであり、外科医は術前から個々の患者の病態を詳細に把握したうえで十分なる対策を講じておき、先手

先手の治療を心がけなければならない。本稿では、とくに癌患者について周術期における患者の免疫動態を考察し、術前・術中・術後における免疫不全に対する予防的並びに治療的対策について述べたい。

I. 術前の病態と治療 担癌による免疫不全の機序と対策

1. 機 序

癌は後天性免疫不全症候群の原因の一つであり、進行癌患者では細菌・ウイルス感染症に罹りやすく、抗腫瘍免疫も低下してくる。これらの免疫監視機構は主に細胞性免疫が担っている。抗腫瘍免疫応答は、抗原提示細胞からヘルパーT細胞

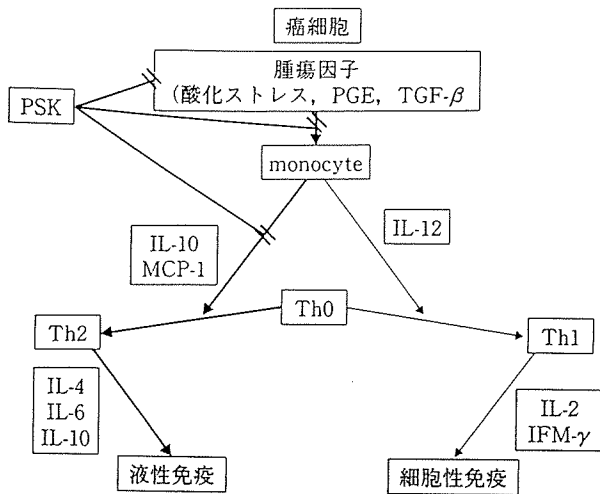


図1 癌患者における Th2 傾斜と PSK による制御

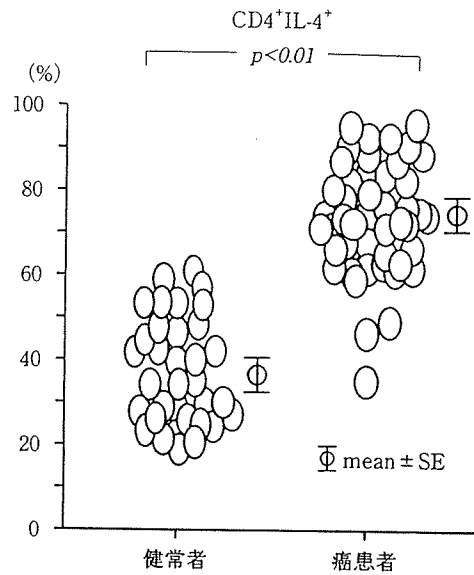


図2 癌患者における CD4+ T 細胞内サイトカイン陽性率

胞(Th), さらに細胞傷害性 T 細胞(Tc)あるいは B 細胞へと, 抗原と活性化シグナルが伝達される。このときの微小環境におけるサイトカインの種類により type1 (IL-12, IFN-g) あるいは type2 (IL-4, IL-10) 免疫応答への局在化が誘導される。Th1 は IL-2, IFN-g を産生して細胞性免疫を誘導するのに対して, Th2 は IL-4, 5, 6, 10 を産生して液性免疫を誘導する(図 1)。癌患者における免疫能低下機序を探るため, われわれは癌患者 Th の細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーを用いて検討した。その結果, 癌患者においては interleukin (IL)-4, IL-6, IL-10 などの Th2 サイトカインを産生する Th の割合が増加しており, 細胞性免疫(Th1)が抑制され, 液性免疫(Th2)に傾斜していることが判明した¹⁾(図 2)。さらに Th バランスを免疫反応の上流で制御すると考えられる抗原提示細胞へ検索を進めたところ, 癌患者の単球(monocyte; M)においては IL-10 ならびに MCP-1 産生性単球, すなわち type2 M(M2)が有意に増加していた(図 3)。腫瘍局所では, 腫瘍の無秩序な増殖による酸化状態が存在し, さらに腫瘍産生性の活性型の transforming growth factor - \cdot (TGF- \cdot), 腫瘍細胞や腫瘍浸潤マクロファージから産生される IL-6, IL-10 などのサイトカインやプロスタグランジン E-2

(PGE2)により²⁾⁻⁴⁾, 単球が type2 へ局在化したものと考えられる。Type2 M から産生された IL-10, MCP-1 などのサイトカインにより, Th においても Th0 から Th2 への局在化が助長され, ひいては細胞性免疫能の低下が起これらと考えられる(図 1)。

2. 対 策

1) 手術療法

消化器癌の唯一の根治療法は手術である。手術により癌組織が生体から除去されれば癌による免疫抑制が解除されるはずである。そこで, 消化器癌患者の術前ならびに手術侵襲が消えたと考えられる一ヵ月後に Th の細胞内サイトカインを測定したところ, 術前に高値を示していた IL-10, IL-6 陽性細胞率が術後には有意に低下しており, 腫瘍切除により Th2 傾斜が改善された⁵⁾(図 4)。術後も Th2 優位が改善されない症例では, 微小転移が残存していることが考えられ, 再発危険群として厳重な経過観察が必要と考えている。また, いったん正常化した Th バランスが再び Th2 化した場合は再発の指標と考え, CT による全身検索を追加している。

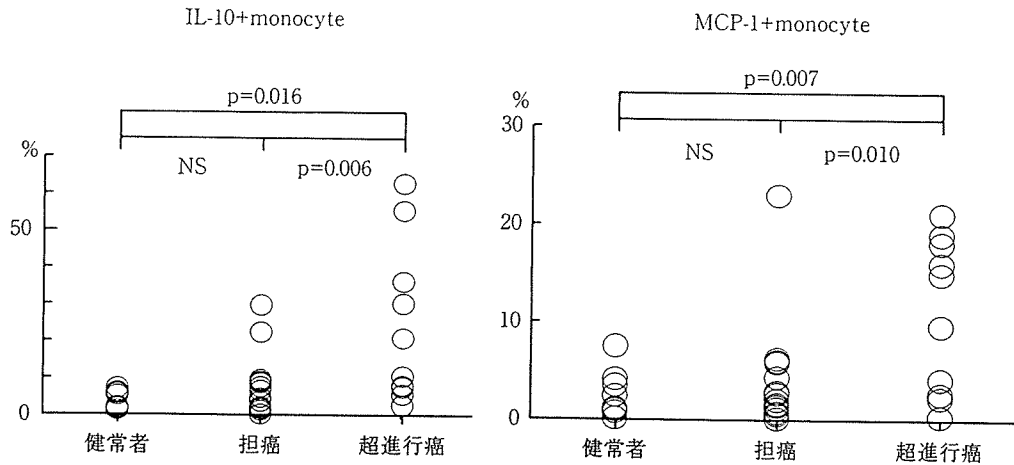


図3 単球における細胞内サイトカイン陽性率

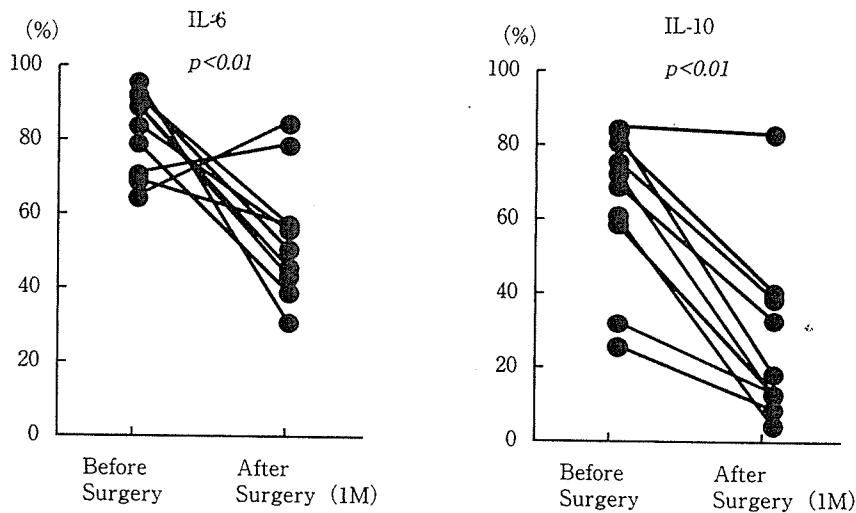


図4 手術によるCD4+T細胞内サイトカイン陽性率の推移

2) クレスチン(PSK)

PSKはカワラタケより抽出・精製された分子量約10万のタンパク多糖体であり、免疫抑制物質(TGF- β , IAP)産生抑制作用, サイトカイン産生増強と過剰産生抑制作用, 癌細胞に対する直接的抗効果などを示す生体反応修飾剤(BRM)である。担癌患者にPSKを投与してtype1/type2バランスに与える影響を検討した。術前あるいは化学療法前にPSK 3gを7日間投与し, その前後で単球(M)ならびにThの細胞内サイトカインを測定したところ, 単球ではIL-10陽性細胞ならびにMCP-1陽性細胞の割合が有意に低下し(図5),

ThにおいてもIL-6ならびにIL-10陽性細胞の割合が低下した。PSKの作用起点は貪食細胞ならびに腫瘍細胞であることから, 投与されたPSKはまず腫瘍細胞ならびに単球・マクロファージに作用し, 腫瘍細胞からの免疫抑制物質産生抑制や抗原提示細胞のtype2サイトカイン(IL-10, MCP-1)に作用し産生を抑制し, 生体のtype2傾斜をtype1へと改善したものと推察された(図1)。

3) レンチナン

レンチナン(lentinan, LNT)は椎茸由来の多糖類である。臨床試験においては phase I, II, III

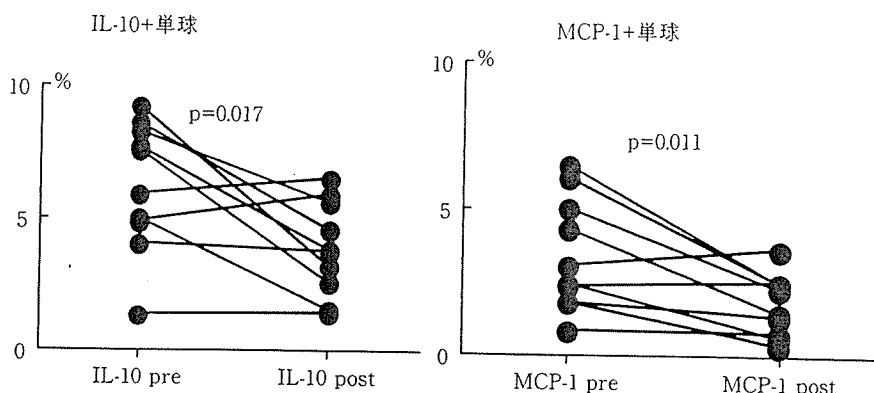


図5 PSK投与前後における単球内サイトカイン陽性率

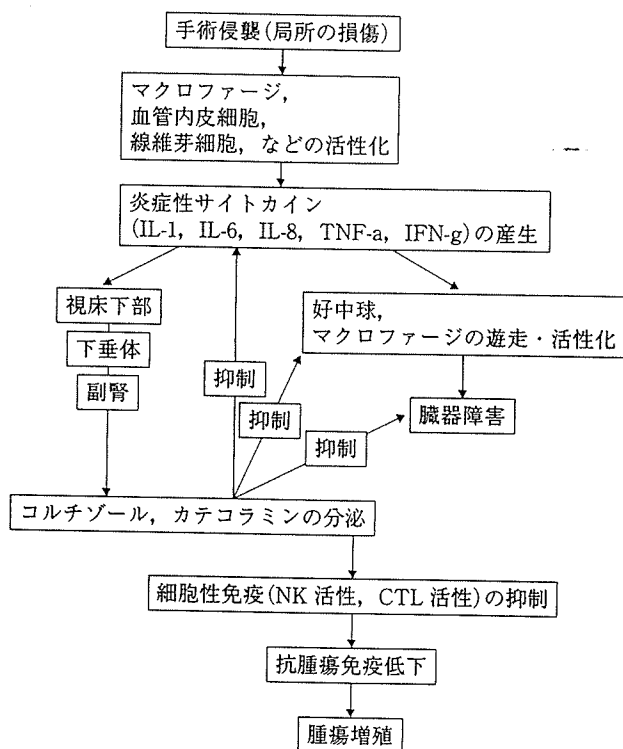


図6 手術侵襲後の免疫動態

IL-6 陽性細胞が低下したことから、LNT には Th1/2 バランスを Th1 へとシフトさせる作用があると考えられ、術前投与の意義があると考えている。

II. 手術侵襲と免疫不全

1. 機序(図6)

進行癌患者における免疫能は先に述べたが、これに手術侵襲が加わるとさらに免疫能が低下して癌の進行が助長される。原発巣切除術後に転移巣が急速に増大することは臨床の場においてしばしば経験され、この主な機序としては手術侵襲による宿主免疫能の低下によると報告されている。したがって可能な限りの低侵襲手術を心がけるとともに、病態にあわせた周術期の免疫療法が必要となる。ここでは癌患者の周術期免疫能を考察し、周術期免疫療法の有用性について考えてみたい。

手術侵襲が加わると、生体はこの侵襲から立ち直るためのさまざまな反応を起こす。まず、生じた組織損傷や細菌感染により局所においてマクロファージや血管内皮細胞、繊維芽細胞が刺激され、IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ などの炎症性サイトカインが産生され、好中球やマクロファージが活性化される。この過剰な生体反応により、臨床的には、いわゆる SIRS (systemic inflammatory response syndrome: 全身性炎症反応症候群) と呼ばれる症状が出現する。通常この生体反

study が適正に行われており、進行・再発胃癌に対する延命効果が証明されている数少ない抗癌剤の一つである。作用機序として直接の制癌作用はほとんどなく、宿主の生体反応系を介して抗腫瘍効果を発揮する、典型的な biological response modifier (BRM) である。癌患者に LNT を投与したところ Th の細胞内サイトカインにおいて IFN- γ 陽性細胞の割合が増加し、IL-4 陽性細胞、

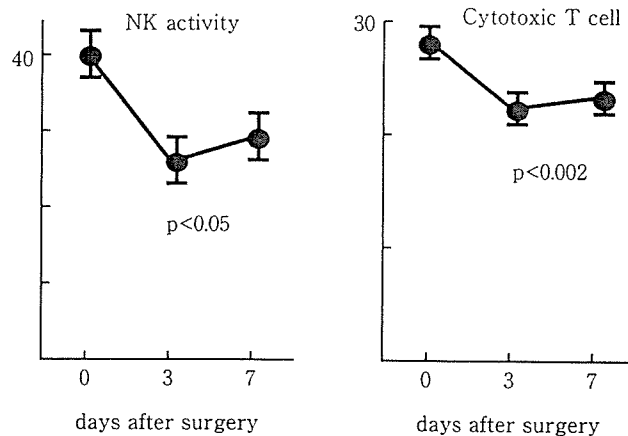


図7 手術侵襲と細胞性免疫の低下

応は侵襲に対する生体防御として正常な反応と考えられ病的意義は少なく回復過程の初期段階と考えて良いが、過大侵襲時や周術期感染症の合併などにより制御不能な過剰サイトカイン産生を招き、多臓器不全へと移行する場合がある。その後、引き続き治療過程において、炎症反応を抑制しようとする抑制性サイトカインが産生される。この炎症反応の転換は、神経-内分泌-免疫系の概念なしには説明できない。

神経-内分泌-免疫系は相互調節が可能なように密接な伝達経路を持っている¹¹⁾。炎症性サイトカインに曝されると視床下部-下垂体-副腎軸が刺激され副腎皮質からコルチゾールが分泌される。コルチゾールはサイトカイン、ヒスタミンなどの炎症性メディエータの産生や放出を強力に抑制する。これらの相互作用は生体にとって破壊的作用も合わせ持つ過剰な炎症性メディエータの産生を抑制し、生体を防御する調節的なフィードバック機構として働く。炎症性サイトカインは重篤な病態を起こすがコルチゾールは引き続き二次的なサイトカインの発現を抑制することでこれらの病態を抑制しているのである。一方、炎症性サイトカインは病原微生物に対する防御的役割も持っているため、炎症性サイトカインとそれを抑制するコルチゾールなどの抑制機構は生体のホメオスタシスを保つためにきわめて厳格に制御されている。また、手術侵襲は神経内分泌系を介してや

エピネフリン(アドレナリン)、ノルエピネフリンの分泌を増加させる。これらカテコラミンの主な作用は言うまでもなく循環動態の維持作用であるが同時に細胞性免疫抑制作用を合わせ持つ。手術侵襲による炎症性メディエータの惹起、それに対するコルチゾール、カテコラミン誘導などのネガティブフィードバック機構により、抗腫瘍(細胞性)免疫は抑制的な状態となる。

2. 対 策

手術時には癌組織を機械的に刺激するため、血行性ないしは局所的な癌細胞の播種が生じる危険性が高いと考えられる。また肉眼では確認できない微小転移の存在も否定できない。手術侵襲が加わると前述のように抗腫瘍細胞性免疫は抑制されるため、腫瘍細胞の着床・増殖が促進される結果となる。癌患者における周術期の病態を理解して適切な対策を講じることは、これゆえきわめて重要と言える。

手術後には一般的にリンパ球数が減少するが、これは手術侵襲で誘導されたコルチゾールなどの影響によりリンパ球が Fas 誘導性のアポトーシスに陥るためと考えられる⁶⁾。また手術の大きさに比例して IL-4, IL-6, PGE2 産生が昂進し、IL-2, IFN- γ の産生能や単球の HLA-DR 発現が低下する。この結果、NK 活性や LAK (lymphokine activated killer) 活性が低下し、細胞性