

bilirubin of <1.5 mg/dl, platelet count of $\geq 100,000/\mu\text{l}$, hemoglobin of ≥ 8.0 g/dl, and total WBC of $\geq 3,000/\mu\text{l}$. Hepatitis B surface antigen and Hepatitis C antibody were negative in all patients. The patients were untreated for at least 4 weeks before entry into the study, and had to have an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) of 0 to 2 at the time of entry. Patients with evidence of other serious illness, immunosuppression, or autoimmune disease were excluded. Treatment was carried out at Yamaguchi University and Kurume University Hospitals from March 2001 through November 2004.

Screening of peptide-specific CTL precursors. Peripheral blood (30 ml) was obtained before and after every 3 vaccinations. PBMCs were isolated by means of Ficoll-Conray density gradient centrifugation, and were then used for a CTL precursor assay, as reported previously (20). In brief, PBMCs (1×10^5 cells/well) were incubated with $10 \mu\text{M}$ of a peptide in wells of u-bottom-type 96-well microculture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in $200 \mu\text{l}$ of culture medium containing 100 U/ml of interleukin-2 (IL-2). Half of the medium was removed and replaced with new medium containing a corresponding peptide ($20 \mu\text{M}$) every 3 days. After incubation for 12 days, these cells were harvested and tested for their ability to produce interferon- γ (IFN- γ) in response to CIR-A2402 cells for HLA-A24⁺ or to T2 cells for HLA-A2⁺ patients, were pre-loaded with either a corresponding peptide or a HIV peptide (RYLRQQLGI for HLA-A24⁺ and SLYNTVATL for HLA-A2⁺ patients) as a negative control. The level of IFN- γ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (limit of sensitivity: 10 pg/ml). Two-tailed Student's t-test was employed for the statistical analyses.

Peptides and vaccination. The peptides used in the present study were prepared according to good manufacturing practice conditions using Multiple Peptide System (San Diego, CA). The sequences of the peptides are shown in Table I. All of these peptides have the ability to induce HLA-A24- or HLA-A2-restricted and tumor-specific CTL activity in the PBMCs of cancer patients (7-20). Montanide ISA-51 adjuvant [known as incomplete Freund's adjuvant (IFA)] was purchased from Seppic, Inc. (Franklin Lakes, NJ). The peptides were supplied in vials containing 2 mg/ml sterile solution for injection. One ml of solution was added in a 1:1 volume to IFA, and then the solution was mixed in a vortex mixer (Fisher, Inc., Alameda, CA). The resulting emulsion was injected subcutaneously into the thigh using a glass syringe. The interval between vaccinations was 2 weeks, and a total of 3 injections were performed. For patients with a favorable clinical course, vaccination was repeated in order to further evaluate adverse events, immunological responses, and clinical responses.

Immunological assays. Skin tests were performed by intradermal injection of $50 \mu\text{g}$ of each peptide using a tuberculin syringe and a 27-gauge needle. Saline was used as a negative control. Immediate- and delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions were determined at 20 min and 24 h after the skin test, respectively. At least 5 mm of induration or 10 mm of erythema was needed to score the skin test as positive. Cytotoxic activity was measured by a standard 6-h ⁵¹Cr-release

Table I. Vaccinated peptide and immune responses.

Peptide name	Sequence	No. of vaccinated patients ^a	Increased immune responses ^b		
			CTL	IgG	DTH
HLA-A24-binding					
SART1-690	EYRGFTQDF	1	0/1	0/1	1
SART2-93	DYSARWNEI	1	1/1	1/1	1
SART2-161	AYDFLYNYL	2	0/1	0/1	1
SART2-899	SYTRLFLIL	1	0/1	0/1	0
SART3-109	VYDYNCHVDL	3	0/2	1/3	2
SART3-315	AYIDFEMKI	2	1/2	1/2	1
CypB-84	KFHRVIKDF	0	-	-	-
CypB-91	DFMIQGGDF	4	0/3	0/3	2
Lck-208	HYTNASDGL	6	0/6	1/6	4
Lck-486	TFDYLRSLV	5	1/5	0/5	3
Lck-488	DYLRSVLEDF	6	2/4	0/4	4
ART1-170	EYCLKFTKL	3	0/2	2/2	2
ART4-13	AFLRHAAL	1	0/1	0/1	0
ART4-75	DYPSLSATDI	0	-	-	-
HLA-A2-binding					
SART3-302	LLQAEAPRL	1	-	0/1	1
SART3-309	RLAEYQAYI	0	-	-	-
CypB-129	KLKHYGPGWV	0	-	-	-
CypB-172	VLEGMEVV	0	-	-	-
Lck-246	KLVERLGAA	1	-	0/1	1
Lck-422	DVWSFGILL	1	-	0/1	1
ppMAPkkk-294	GLLFLHTRT	0	-	-	-
ppMAPkkk-432	DLLSHAFFA	1	-	0/1	1
WHSC2-103	ASLSDPWV	0	-	-	-
WHSC2-141	ILGELREKV	0	-	-	-
UBE2V-43	RLQEWCSVI	0	-	-	-
UBE2V-85	LIADFLSGL	0	-	-	-
UBE2V-208	ILPRKHHRI	0	-	-	-
HNRPL-140	ALVEFEDVL	0	-	-	-
HNRPL-501	NVLHFFNAPL	0	-	-	-
EIF4-51	RIHYDRKFL	0	-	-	-

^aHLA-A24-binding and -A2-binding peptides were injected into 10 and 2 patients, respectively. ^bImmune responses to the peptide were compared at pre- and post-vaccination. Interferon- γ production of CTLs, peptide-specific IgG antibody density, and DTH responses were tested.

assay, as reported previously (20). In brief, cryopreserved pre- and post (3rd to 9th)-vaccination PBMCs were thawed at the same time, and then were cultured in the medium with 100 U/ml of IL-2 in the absence of peptides. On the 21st to 25th days of culture, the cells were harvested and used for the assay. MIA PaCa2 (HLA-A24⁺A2⁻ pancreatic carcinoma, which was obtained from Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University), PK-8 (HLA-A24⁺A2⁻ pancreatic carcinoma), YPK-1 (HLA-A24⁺A2⁻ pancreatic carcinoma) (19), Panc-1 (HLA-A24⁺A2⁺ pancreatic adenocarcinoma), and phytohemagglutinin (PHA)-blastoid T cells (HLA-A24⁺ or HLA-A2⁺) were used as target cells.

Table II. Patient characteristics.

No.	Age/ sex	HLA type	PS	Stage ^a	Histology ^b	Site of metastases ^c	Surgery ^d	Previous treatments Chemotherapy ^e	Radiotherapy
1	60/M	A24	0	T4N1M0 III	Adeno s/o	Abdominal LNs	-	-	-
2	63/F	A24	1	Recurrence	Tubular adeno	Neck LNs bone	PPPD	GEM	LN bone
3	70/M	A24	0	Recurrence	Well diff. tubular adeno	Liver local	PD	5-FU MTX	-
4	63/M	A24	0	T3NxM1 (HEP) IV	Adeno s/o	Liver	-	5-FU CDDP	Local
5	59/M	A2	0	Recurrence	Moderately diff. tubular adeno	Peritoneum local	PD	-	-
6	69/M	A24	0	Recurrence	Well diff. tubular adeno	Abdominal LNs	DP	-	-
7	84/F	A24	0	T4N1M0 III	Adeno s/o	-	-	-	-
8	67/M	A24	0	T3N1M1 IV	Adeno s/o	-	-	-	-
9	68/F	A24	0	Recurrence	Well diff. tubular adeno	Abdominal LNs	PPPD	5-FU CDDP	-
10	60/M	A24	2	T3NxM1 (HEP) IV	Acinar cell carcinoma s/o	Liver	-	-	-
11	71/F	A24	0	T3N0M0 IIA	Moderately diff. tubular adeno	-	PD	-	-

^aUICC Classification of Pancreatic Cancer (6th edition, 2002). ^bs/o, suspected of; diff., differentiated; adeno, adenocarcinoma. ^cNs, lymph nodes. ^dPPPD, pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy; PD, pancreaticoduodenectomy; DP, distal pancreatectomy. ^eGEM, gemcitabine; 5-FU, fluorouracil; MTX, methotrexate; CDDP, cisplatin.

The serum levels of peptide-specific IgG were measured by ELISA, as previously reported (14-19). In brief, 100 µl/well of serum sample diluted with 0.05% Tween-20 Block Ace were added to the peptide (20 µg/well)-immobilized plate. After 2-h incubation at 37°C, the plate was washed and further incubated for another 2 h with a 1:1,000-diluted rabbit anti-human IgG (γ-chain-specific, Dako, Glostrup, Denmark). The plate was washed, then 100 µl of 1:100-diluted goat anti-rabbit Ig-conjugated horseradish peroxidase-dextran polymer (En Vision, Dako) was added to each well, and the plate was incubated for 40 min. After washing, 100 µl/well of tetramethyl-benzidine substrate solution (KPL, Guildford, UK) was added, and the reaction was stopped by the addition of 1 M phosphoric acid. To estimate the peptide-specific IgG levels, the optical density (OD) values of each sample were compared with those of serially diluted standard samples, and the values are shown as OD units/ml.

Evaluation of adverse events and clinical response. All adverse events were evaluated by the National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0 at every vaccination. All known sites of disease were evaluated by computed tomography (CT)-scan before and after every 3

vaccinations. Patients were assigned to a response category according to the response evaluation criteria for solid tumors, a revised version of the WHO criteria published in June 1999 in the WHO Handbook for reporting results of cancer treatment. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were evaluated from the first vaccination, and were analyzed in order to investigate correlations between clinical benefits and immune responses. Kaplan-Meier curves were described, and survival times were compared using the log-rank test.

Results

Patient characteristics. Eleven PC patients were enrolled in this phase I clinical study of personalized peptide vaccination. The detailed characteristics are shown in Table II. The mean age of the patients was 66.7 (range: 59-84). Six patients had undergone surgical resection of the primary lesion, and had histologically determined adenocarcinomas. For the remaining 5 inoperable patients, adenocarcinoma (n=4) and acinar cell carcinoma (n=1) were suspected by clinical evaluation and the laboratory findings, i.e., tumor markers, computer tomography (CT), and needle biopsy. Four patients had received

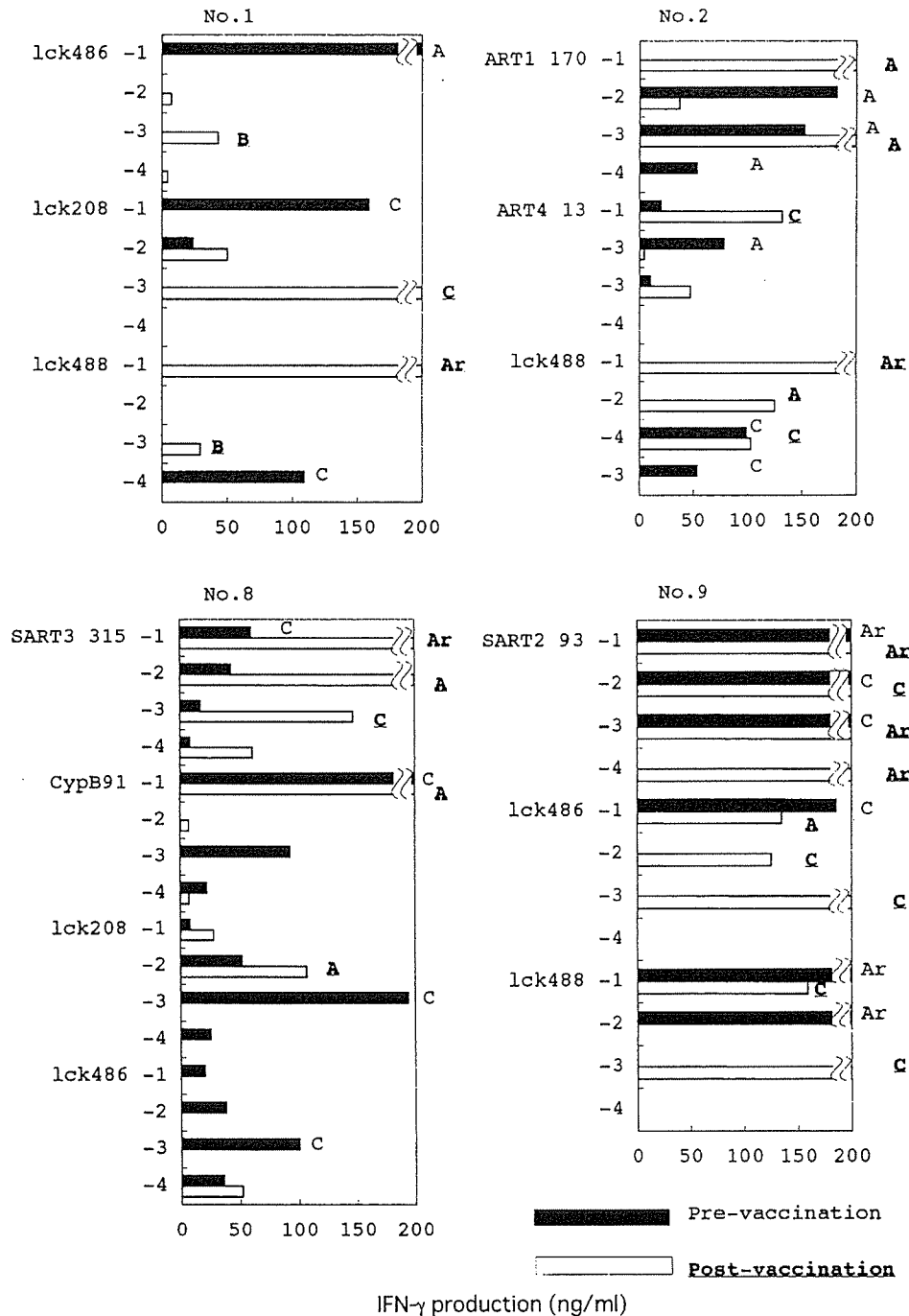


Figure 1. Representative results of peptide-specific CTL precursors in PBMCs of the pre- and post (6th)-vaccinations. Four sets of columns in each peptide indicate the results of quadruplicate cultures in the 4 wells. The value of each well was evaluated based on the following criteria. A level of armed response (Ar): $p \leq 0.01$ and ≥ 500 net value (the amount of IFN- γ in response to the corresponding peptide minus that in response to HIV peptide); A level of response (A): $p \leq 0.05$ and ≥ 50 net; B: $p \leq 0.05$ and ≥ 25 net < 50 ; C: $0.05 < p \leq 0.1$ and ≥ 50 net; D: $0.05 < p \leq 0.1$ and ≥ 25 net < 50 .

chemotherapy, and 2 of them had received additional radiotherapy. The remaining 4 patients did not have any prior treatment. Ten advanced cases with confirmed recurrence entered into this trial, while the remaining one patient (case no. 11) received the vaccination 93 days after surgery as an adjuvant treatment without confirmed recurrence.

With regard to treatment after the vaccination, 9 patients did not receive any other combined form of therapy, but the remaining 2 patients received the vaccination combined with chemotherapy. Namely, case nos. 9 and 10 received GEM/5-fluorouracil/cisplatin after the 7th vaccination because of an

elevation in tumor markers, and the 3rd vaccination because of progressive disease (PD), respectively.

Peptide screening, vaccination, and adverse events. Ten patients were HLA-A24 positive and were vaccinated with HLA-A24-binding peptides. Among the 14 peptides for HLA-A24⁺ patients, Lck-derived peptides were most frequently used for the vaccination (Lck-208 and Lck-488 for 6 patients, and Lck-486 for 5 patients) (Table I). CypB-84 and ART4-75 were not used for the vaccination into any patient due to an immediate-type hypersensitivity reaction. Representative results

Table III. Immuno-responses and clinical outcome.

No.	Peptide	CTL response ^a		Antibody to peptide ^b			Cyto-toxicity ^d	No. of vaccination	Clinical response at ^c		PFS ^f (days)	OS ^g (days)
		Pre	Post	Pre	Post	DTH ^e			6th	12th		
1	Lck-486	A	B	0.09	-	+(3)	Not	10	PD	-	59	165
	Lck-208	C	C	0.05	0.03	+(3)	increased					
	Lck-488	C	ArB	-	-	+(3)						
2	ART1-170	AAA	AA	-	-	-	Not	7	SD	PD	102	271
	ART4-13	A	C	-	-	-	increased					
	Lck-488	CC	ArAC	-	-	-						
3	SART1-690	ArA	B	0.31	0.37	+(5)		8	PD	-	43	194
	SART2-161	A	A	0.12	0.12	+(5)	Not					
	CypB-91	A	-	0.14	0.23	+(5)	increased					
	Lck-208	A	A	0.27	0.22	+(2)						
4	SART3-109	C		-	-	+(1)	Not	6	PD	-	57	232
	Lck-488	D	NT	-	-	+(1)	increased					
	ART1-170	D		-	1.18	+(1)						
5	SART3-302	C		-	-	+(2)		5	PD	-	43	73
	Lck-246	Ar	NT	-	-	+(2)	NT					
	Lck-422	C		-	-	+(2)						
	ppMAPkkk-432	C		-	-	+(2)						
6	ART1-170	ArBCC	-	-	2.06	+(3)		36	SD	SD	1058+	1058+
	Lck-488	AAA	-	-	-	+(3)	Not					
	Lck-208	AC	A	-	0.25	+(3)	increased					
	SART3-315	C	-	-	0.03	+(3)						
7	SART2-899	AA	-	-	-	-		8	PD	-	110	247
	SART3-109	A	-	0.10	0.09	-	NT					
	Lck-208	A	A	-	-	-						
	Lck-486	A	B	-	-	-						
8	SART3-315	C	ArAC	-	-	-		8	PD	-	96	206
	CypB-91	C	A	-	-	-	NT					
	Lck-208	C	A	-	-	-						
	Lck-486	C	-	-	-	-						
9	Lck-488	ArAr	CC	-	-	+(4)	Not	7	SD	chemo+	96	623
	SART2-93	ArCC	ArArArC	-	0.04	+(4)	increased					
	Lck-486	C	ACC	-	-	+(4)						
10	SART2-161	A				-		3	PD	PR chemo+	49	783+
	Lck-488	AB	NT	NT	NT	-	NT					
	CypB-91	Ar				-						
11	Lck-486	A	B	-	-	+(3)		12	no rec	no rec	336	339
	CypB-91	A	-	-	-	+(3)	Not					
	SART3-109	D	C	0.03	1.51	+(3)	increased					
	Lck-208	D	-	-	-	+(3)						

^aThe peptide-specific CTL precursor cells were evaluated by quadruplicate assay in pre- and post (6th)-vaccination. NT, not tested. ^bValues indicate the fluorescent intensity of sera (x100 dilution). ^cNumber of the vaccination when DTH to the peptide was detected for the first time. ^dCytotoxicity to HLA-matched cancer cells of pre- and post-PBMCs was evaluated by ⁵¹Cr-release assay. ^ePD, progressive disease; SD, stable disease; PR, partial response; no rec, no recurrence. ^fPFS, progression-free survival; Pulse (+) mark, patients are alive (2004.9.15). ^gOS, overall survival.

for peptide selection in 4 patients whose post-vaccination PBMCs showed increased responses are shown in Fig. 1, and the summary is given in Table III.

All 11 patients were evaluated for adverse events according to the NCI-CTC. The vaccinations were generally well tolerated without hematological toxicity or symptoms of

Table IV. Adverse events.

	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Fever	1	2	
Inflammatory reactions at the vaccination site	3	3	1
Anorexia	1		
Fatigue	1		

According to NCI-CTC criteria version 2.0.

any autoimmune diseases. The most frequently observed toxicity was an inflammatory reaction at the injection site in 7 of 11 patients. Three patients showed a grade 1, and 3 showed a grade 2 reaction. No treatment was required for these 6 patients. The remaining 1 patient showed a grade 3 inflammatory reaction with leg edema at the 31st vaccination, after which a non-steroidal antiphlogistic agent was administered. Fever (grades 2 and 1), anorexia (grade 1), and fatigue (grade 1) were observed in 3 (2 and 1), 1, and 1 patient, respectively (Table IV).

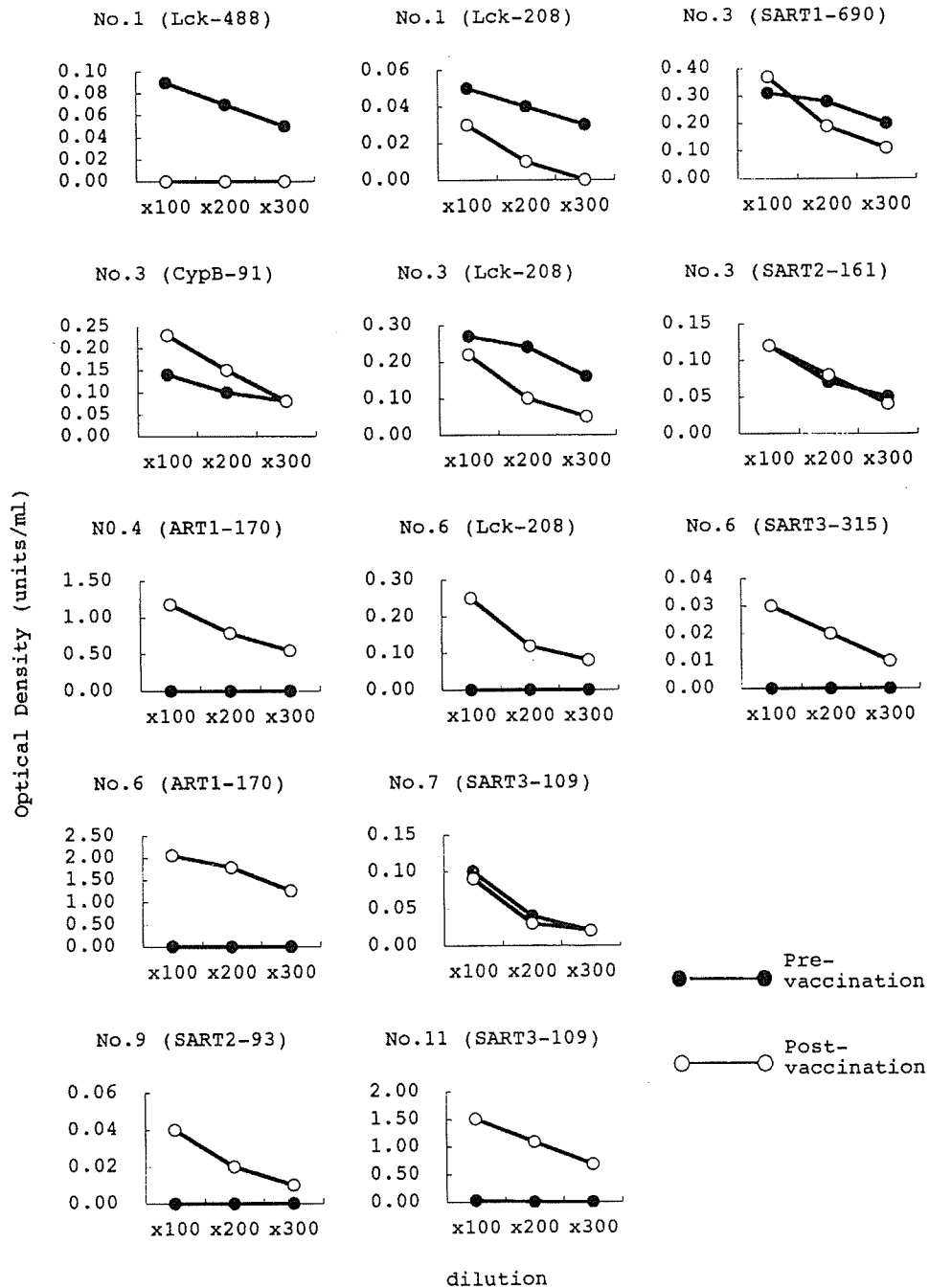


Figure 2. Kinetic study of IgG levels specific to the peptides administered to each patient. Pre- and post (6th)-vaccination sera were serially diluted and the levels of peptide-specific IgG were measured using ELISA, as described in Patients and methods. Results of 7 cases are shown in the figure. Horizontal lines indicate optical density (OD) and vertical lines the dilution of sera.

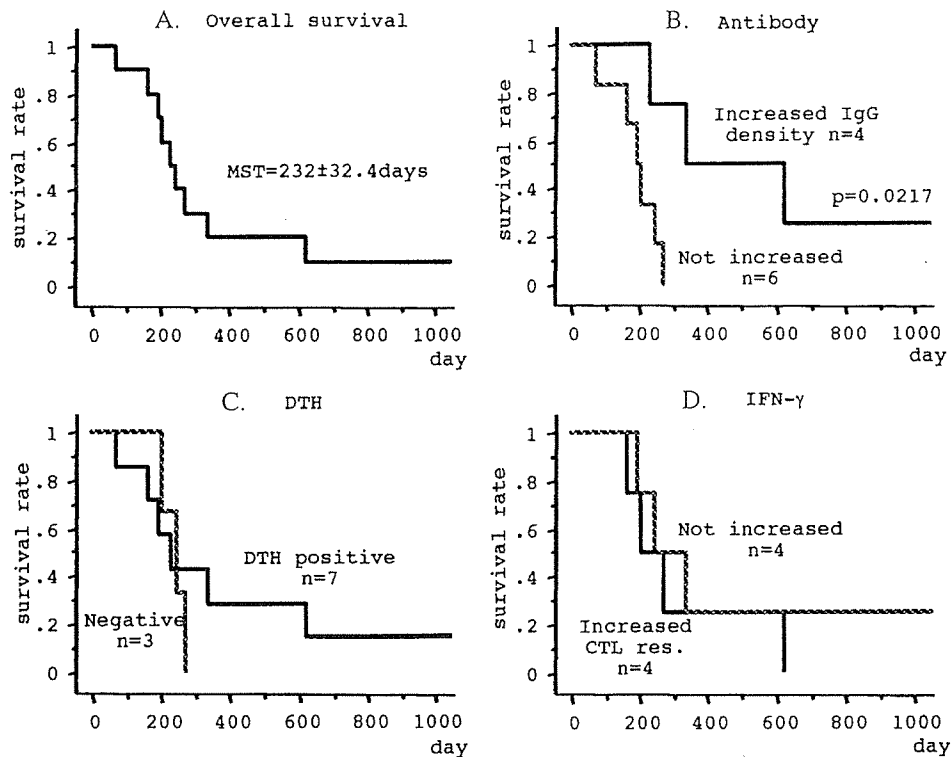


Figure 3. Antibody response and overall survival. Overall survival of 10 cases is given in (A). The group of patients with increased peptide-specific IgG levels ($n=4$) showed prolonged survival compared to the group of patients with no increase in peptide-specific IgG levels ($n=6$) (B). In contrast, neither the positive DTH response (C) nor the augmentation of CTL precursor reactive to peptide (D) influenced their survival.

Cellular immune responses. No DTH reaction against the peptides was observed prior to vaccination in any patient. DTH reactions were observed in 7 patients (nos. 1, 3-6, 9, and 11) until the 5th vaccination, the details of which are given in Table III. For example, in case no. 3, a DTH reaction to Lck-208 was observed after the 2nd vaccination and reactions to SART1-690, SART2-161, and CypB-91 were observed after the 5th vaccination.

Augmentation of CTL precursors reactive to at least one of the vaccinated peptides was observed in 4 of 8 patients tested (case nos. 1 and 2 for Lck-488, no. 8 for SART3-315, and no. 9 for SART2-93 and Lck-486; Fig. 1). Because of the limited availability of blood samples, we kinetically evaluated the anti-tumor cytolytic activity of pre- and post-vaccination PBMCs by a ^{51}Cr -release assay in 7 patients in response to each of the four different cells of PC cell lines, but none of the post-vaccination PBMCs showed increased cytotoxicity against PC cells in an HLA-class-I-restricted manner (data not shown). Significant and equal levels of cytotoxicity against PC cells were observed in an HLA-class-I-non-restricted manner in both the pre- and post-vaccination PBMCs from 4 patients (case nos. 2, 6, 9, and 11). In contrast, such cytotoxicity decreased in the post-vaccination PBMCs from the remaining 3 patients (case nos. 1, 3, and 4).

Humoral immune responses. We also examined whether or not peptide-specific IgG could be detected in the vaccinated patients. Peptide-specific IgG to the vaccinated peptides was detected in the pre-vaccination sera of 4 of 10 patients tested (Table III). Peptide vaccination increased the IgG levels in 1 of these 4 patients (case no. 11, IgG to SART3-109) (Fig. 2).

Although no peptide-specific IgG was detected in the other 6 tested patients before the peptide vaccination, peptide vaccination resulted in the induction of peptide-specific IgG in 3 patients (case no. 4, anti-ART1-170; no. 6, anti-ART1-170, -Lck-208, and -SART3-315; no. 9, anti-SART2-93). The results are shown in Fig. 2. The peptide specificity of the IgG in the sera of these patients was confirmed by an absorption test, however, the data are not shown because the peptide specificity was reported previously (14-19).

Clinical outcome and prognostic factor analysis. It was difficult to draw any definitive results from this small-scale phase I study with regard to clinical responses and a prognostic factor analysis. Nevertheless, demonstration of the available results may be relevant from the point of view of developing a suitable peptide vaccine. In 10 patients who received >3 vaccinations and were eligible for clinical evaluation, stable disease (SD) of 3 patients (case nos. 2, 6, and 9) and PD of 6 patients were diagnosed at the time of 6th vaccination. The remaining one patient (case no. 11) with an adjuvant-setting vaccination had a recurrence in the bone marrow 336 days after the initial vaccination. The median time to progression (TTP) and the median survival time (MST) were 96 ± 22.2 (\pm standard error) days and 232 ± 32.4 days, respectively. Their 6-month and 1-year survival rates were 80% and 20%, respectively.

As regards the identification of a laboratory marker to predict long-term survival, the group of patients with increased peptide-specific IgG levels ($n=4$) showed prolonged survival compared to the group of patients with no increase in peptide-specific IgG levels ($n=6$) (MST 339 days vs. 194 days, respectively; log-rank test $p=0.0217$) (Fig. 3). In contrast,

neither the augmentation of a CTL precursor reactive to a peptide nor a positive DTH response influenced survival.

Discussion

This study was conducted in order to evaluate the safety and biological responses of the personalized peptide vaccination. Severe toxicity was rarely associated with the peptide vaccination, and this regimen can be recommended for further evaluation. Cellular and humoral responses to the vaccinated peptides were observed in 50% and 40% of the post-vaccination PBMCs and sera, respectively. Therefore, this regimen is also recommended for further evaluation of the immunological responses. Although the clinical response was not the main objective, only 1 patient maintained a minor response for 3 years, this regimen is not recommended if used alone. No significant clinical response was obtained, although the MST was not as short as those of the other clinical trials investigating patients with advanced PC (3-5,21,22). Personalized peptide vaccination combined with chemotherapy might be recommended, since one such case had a desirable clinical course. Nevertheless, clinical studies in a phase II setting are needed to address this issue.

Increased rates of peptide-reactive cellular and humoral responses to the vaccinated peptides in the post-vaccination PBMCs and sera of advanced cancer patients other than PC patients were somewhat higher than those of the PC patients observed here (14-19). In addition, no increment in HLA-class-I-restricted CTL activity against PC cells was observed at all in the post-vaccination PBMCs from any of the 7 patients tested. In contrast, such an increment was observed in the post-vaccination PBMCs from patients with other types of cancer (14-19). These results suggest that immunity in advanced PC is more depressed than that in other epithelial cancers. Alternatively, a more suitable peptide repertoire might be provided for PC patients. Tumor-associated antigens and peptides derived from PC cell lines might be more suitable in use for personalized peptide vaccinations administered to PC patients. From this point of view, the 14 peptides provided for HLA-A24⁺ patients were primarily derived from esophageal cancers (7-9). In contrast, the 16 peptides provided for HLA-A2⁺ PC patients were primarily derived from a PC9 tumor cell line, as reported previously (10), but only one HLA-A2⁺ patient was enrolled in this clinical study. Therefore, clinical study of additional HLA-A2⁺ patients is needed to address this issue, which is now in progress.

We previously reported that the increase in IgG levels due to administration of a personalized peptide vaccination correlated well with long-term survival in patients with advanced stages of cancers other than PC (19). The statistically significant difference ($p=0.0217$) was also observed among PC patients, although the number of patients in this study was small. Further studies are therefore needed to confirm this issue.

The biological role of peptide IgG in anti-tumor immunity should be clarified by future basic and clinical studies. The mechanisms of peptide-specific IgG production, including the involvement of CD4 T helper cells and HLA-restriction, also need to be elucidated.

Goydos *et al* reported the data obtained from a phase I trial of a synthetic mucin MUC-1 peptide vaccine admixed BCG (21), and only 1 of 24 patients (4.2%) had SD. The MST data were not given in that report. Gjertsen *et al* presented the data from a clinical phase I/II trial involving PC patients who were vaccinated by intradermal injection of synthetic mutant ras peptides in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (22). That report showed that, in the group with non-resectable cancer, 11 out of 34 patients (32%) had SD and the 1-year survival rate was 6.3% (3 out of 48 cases). Our patients appeared to have better survival rates than those in previous clinical trials. However, this regimen by itself is not recommended for HLA-A24⁺ patients with advanced PC. Further basic and clinical studies should be conducted for developing therapeutically effective peptide vaccinations for advanced PC patients.

Acknowledgements

This study was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan (no. 12213134 to K.I. and Research Center of Innovative Cancer Therapy of 21st Century COE Program for Medical Science to K.I. and S.S.), from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 14570526 to S.S.), and from the Ministry of Health and Welfare, Japan (no. H14-trans-002 and 11-16).

References

1. Evans DB, Abbruzzese JL and Willett CG: Cancer of the pancreas. In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 6th edition. De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1126-1161, 2001.
2. Tempero M, Plunkett W, Ruiz van Haperen V, Hainsworth J, Hochster H, Lenzi R and Abbruzzese J: Randomized phase II comparison of dose-intense gemcitabine: thirty-min infusion and fixed dose rate infusion in patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 21: 3402-3408, 2003.
3. Ulrich-Pur H, Kornek GV, Raderer M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Greul R, Schneeweiss B, Krauss G, Funovics J and Scheithauer W: A phase II trial of biweekly high dose gemcitabine for patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88: 2505-2511, 2000.
4. Burris HA III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD and von Hoff DD: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413, 1997.
5. Kulke MH: Recent developments in the pharmacological treatment of advanced pancreatic cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 983-992, 2003.
6. Muler JH, McGinn CJ, Normolle D, Lawrence T, Brown D, Hejna G and Zalupski MM: Phase I trial using a time-to-event continual reassessment strategy for dose escalation of cisplatin combined with gemcitabine and radiation therapy in pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22: 238-243, 2004.
7. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H and Itoh K: A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 187: 277-288, 1998.
8. Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T, Inoue Y, Matsunaga K, Yamada A, Kikuchi M, Tsuda N, Ohta K, Takamori S, Yamana H, Fujita H and Itoh K: Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J Immunol* 164: 2565-2574, 2000.

9. Yang D, Nakao M, Shichijo S, Sasatomi T, Takasu H, Matsumoto H, Mori K, Hayashi A, Yamana H, Shirouzu K and Itoh K: Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res* 59: 4056-4063, 1999.
10. Ito M, Shichijo S, Tsuda N, Ochi M, Harashima N, Saito N and Itoh K: Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 61: 2038-2046, 2001.
11. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH and White DE: Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4: 321-327, 1998.
12. Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K and Itoh K: Phase I clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for lung cancer patients. *J Immunother* 25: 439-444, 2002.
13. Miyagi Y, Imai N, Sasatomi T, Yamada A, Mine T, Katagiri K, Nakagawa M, Muto A, Okouchi S, Isomoto H, Shirouzu K, Yamana H and Itoh K: Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. *Clin Cancer Res* 7: 3950-3962, 2001.
14. Mine T, Gouhara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K and Yamana H: Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci* 94: 548-556, 2003.
15. Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y, Kondo M, Takahashi S, Shinohara T, Katagiri K, Sato S, Okada S, Matsui K, Yamada A, Yamana H, Itoh K and Todo S: Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci* 94: 802-808, 2003.
16. Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Yao A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, Yamana H and Noda S: Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci* 95: 77-84, 2004.
17. Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M, Shinohara T and Hida N: A phase I trial of cytotoxic T lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 90: 1334-1342, 2004.
18. Mochizuki K, Sato Y, Tsuda N, Shomura H, Sakamoto M, Matsuura K, Ushijima K, Maeda Y, Katagiri K, Yamada A, Todo S, Kamura T and Itoh K: Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol* 25: 121-131, 2004.
19. Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K and Yamana H: Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing peptide-specific cellular responses. *Clin Cancer Res* 10: 929-937, 2004.
20. Suzuki N, Maeda Y, Tanaka S, Mine T, Yamamoto K, Oka M and Itoh K: Detection of peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 98: 45-50, 2002.
21. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ and Lotze MT: A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. *J Surg Res* 63: 298-304, 1996.
22. Gjertsen MK, Buanes T, Rosseland AR, Bakka A, Gladhaug I, Soreide O, Eriksen JA, Moller M, Baksaaas I, Lothe RA, Saeterdal I and Gaudernack G: Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant. *Int J Cancer* 92: 441-450, 2001.

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

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

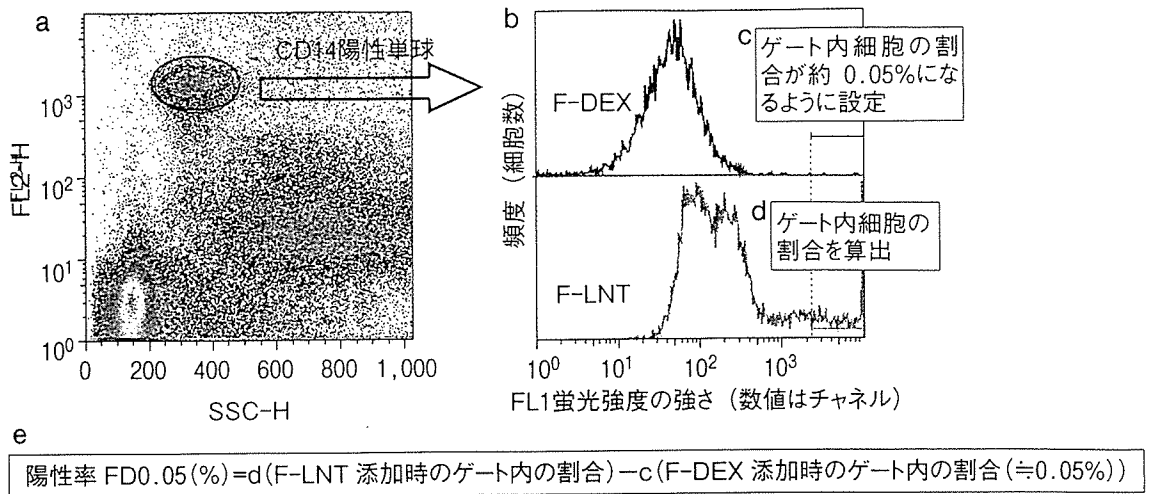


図1 FACSによる解析および陽性率FD0.05の算出法

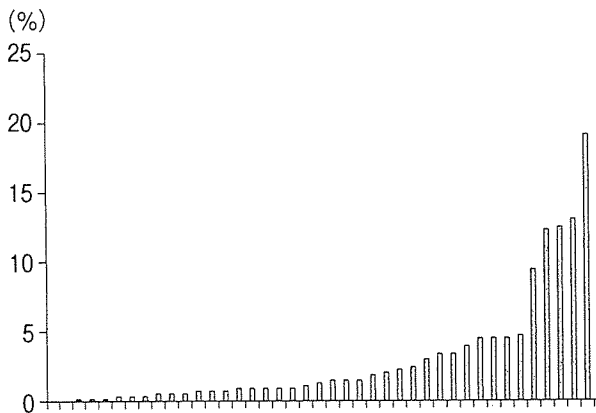


図2 41症例の単球のLNT結合能(陽性率FD0.05)

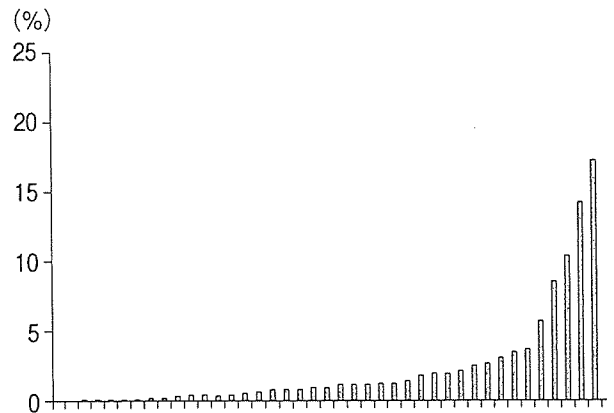


図3 41症例の単球のLNT結合能(陽性率A)

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

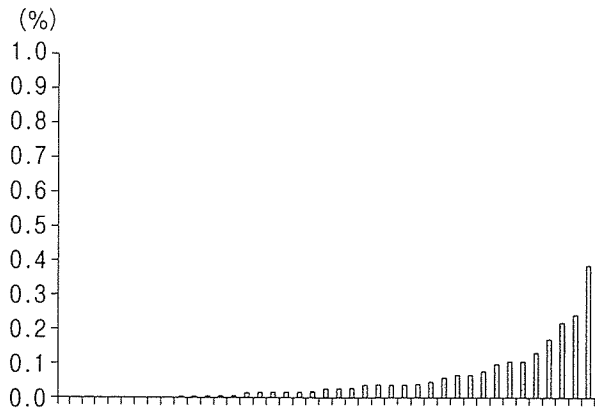


図4 F-DEX 添加時の41症例の陽性率 A

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 は非特異的な結合の強弱による影響をまったく受けない。

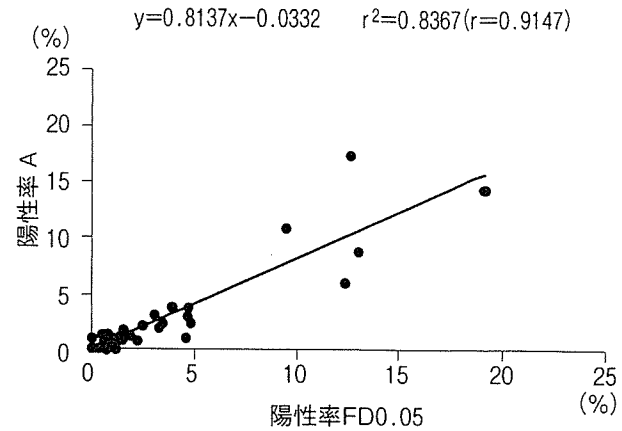


図5 陽性率 FD 0.05 と陽性率 A の相関性

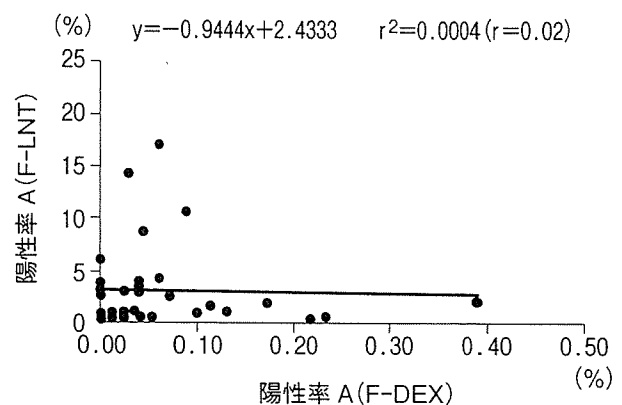


図6 F-DEX 添加時と F-LNT 添加時の陽性率 A の相関性

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、非特異的な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な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な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

5)
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 by β -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術後低下していることから、術後の自然

図1 術後リンパ球数とFas陽性リンパ球比率

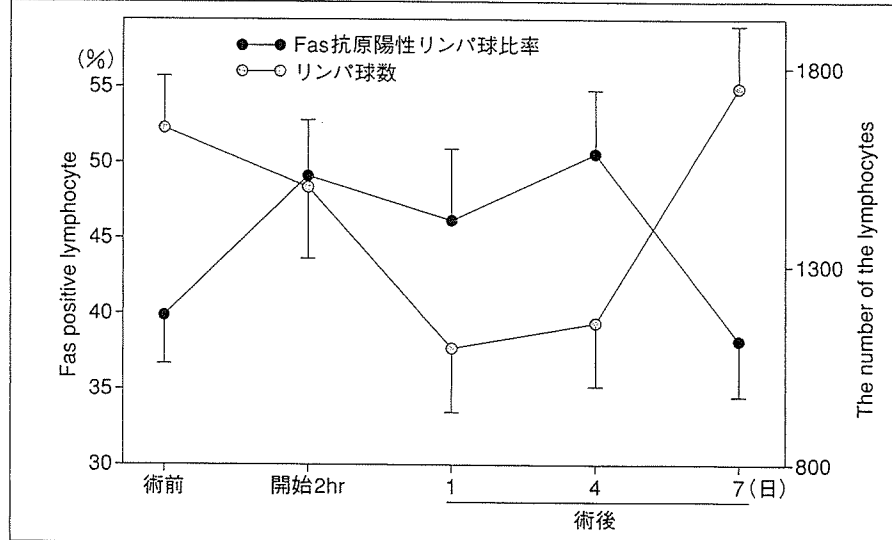
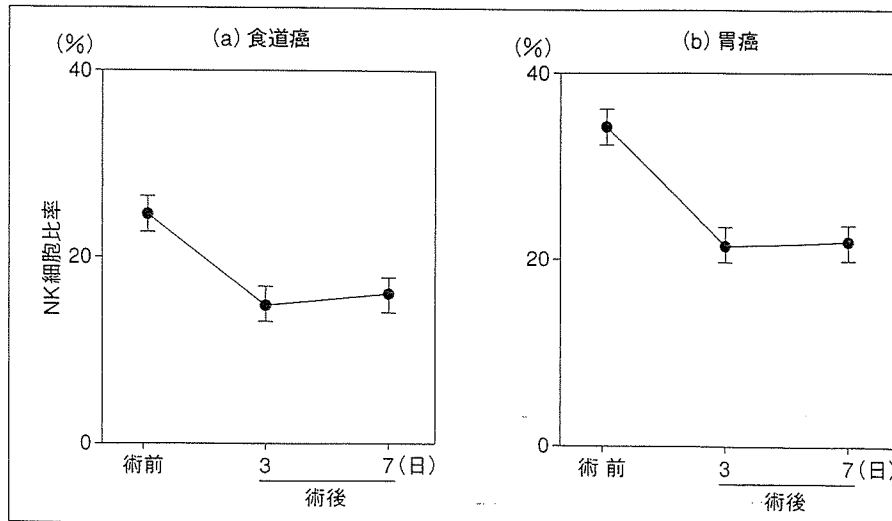


図2 術後のNK細胞比率の変化



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はなく、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

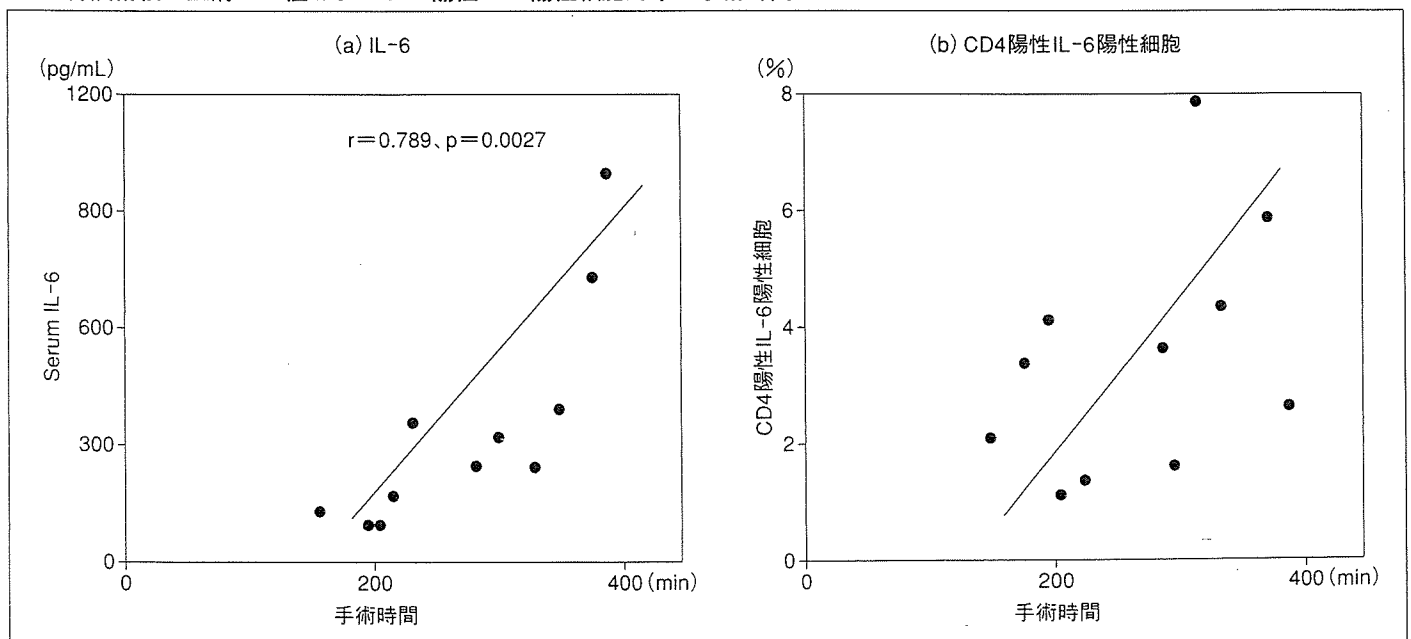
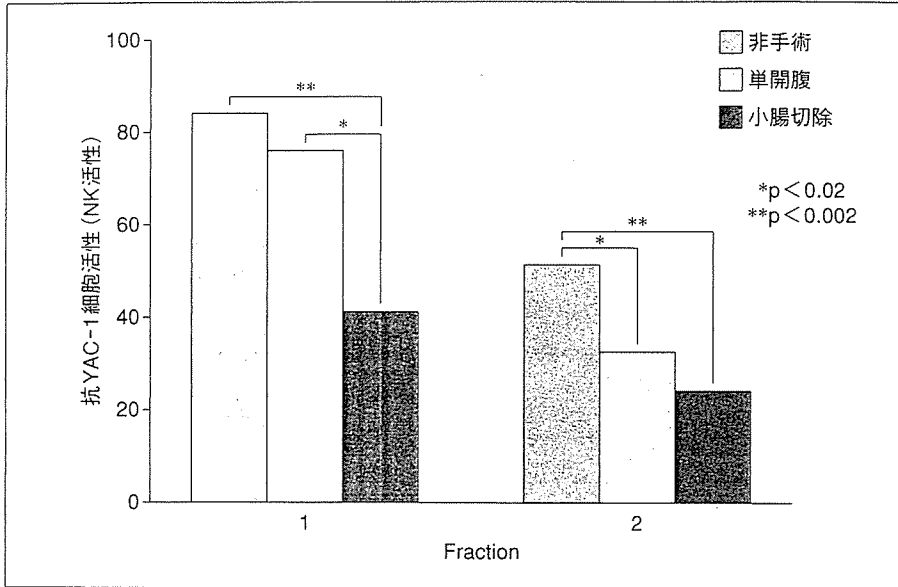


図4 手術侵襲後の肝非実質細胞のNK活性



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日目に於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、鈴木徹. 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 3 g/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

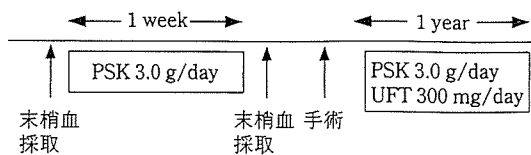


図 1 PSK の投与スケジュール

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⁴⁾。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 の候補に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 300 mg 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 (Pharming) 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' 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

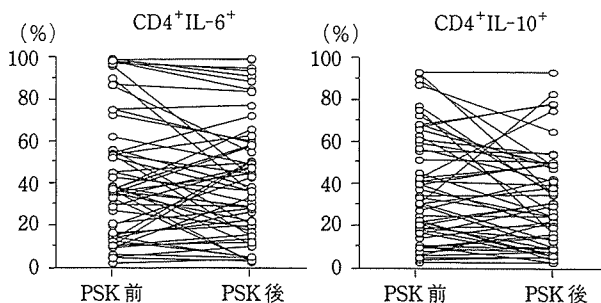


図 2 PSK 投与前後における細胞内サイトカイン陽性率の推移

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⁶⁾。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³⁾。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³⁾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

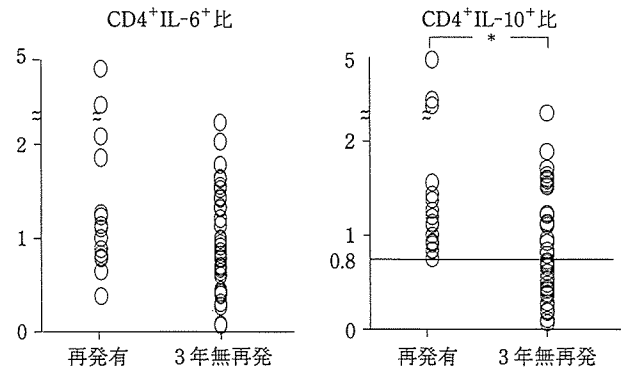


図3 再発例と3年以上無再発例におけるPSK投与前後の細胞内サイトカイン変化率の比較(*: p<0.01)

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.