

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担癌患者の 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	1	完全消失
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

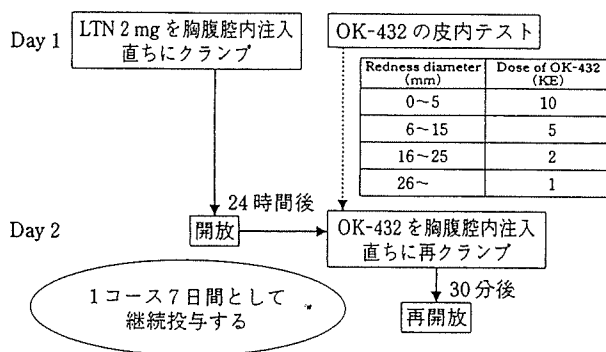


図 1 LTN+OK-432 併用療法のプロトコール

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

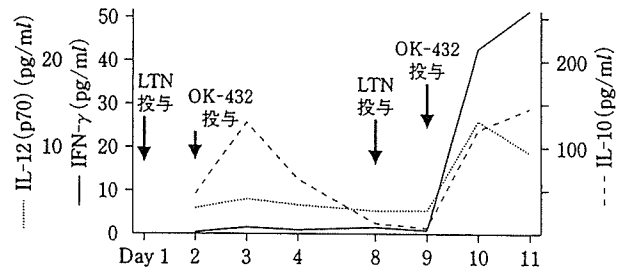
LTN+OK-432 併用療法を施行した 10 症例 11 病巣中, 胸腹水の完全消失を 7 病巣, 減少を 1 病巣に認めた。完全消失例, 減少例での 1 回当たりの OK-432 投与量は 1~5 KE, 完全消失までの LTN+OK-432 の投与回数は 1~3 回であった。また効果を認めた 8 病巣中 7 病巣では 2 回以上の投与で効果を得ており, 1 回投与のみで胸腹水の完全消失を認めた症例は 1 例のみであった (表 1)。

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。

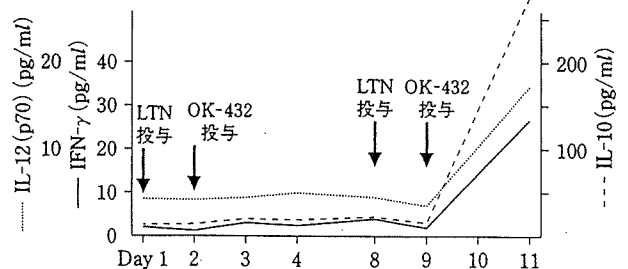


図 2 腹水中サイトカイン濃度の経時的変動

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.

特集 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、消化吸收障害、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

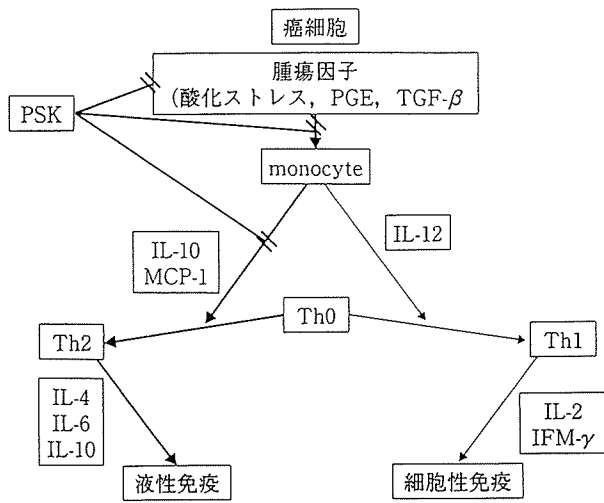


図1 癌患者における Th2 傾斜と PSK による制御

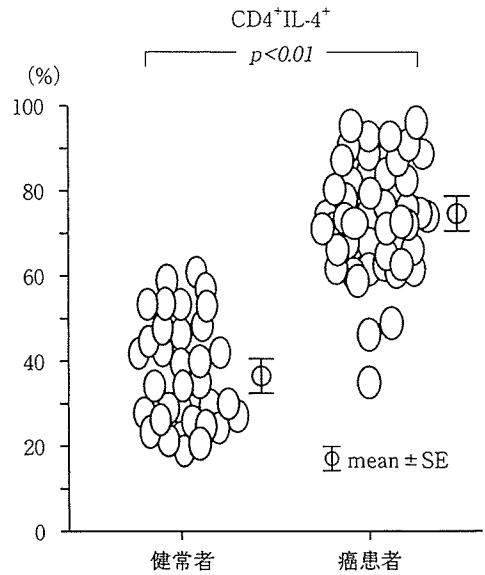


図2 癌患者における CD4+T 細胞内サイトカイン陽性率

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思わ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ると考えられる(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カ月後に 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, 再発危険群として嚴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。

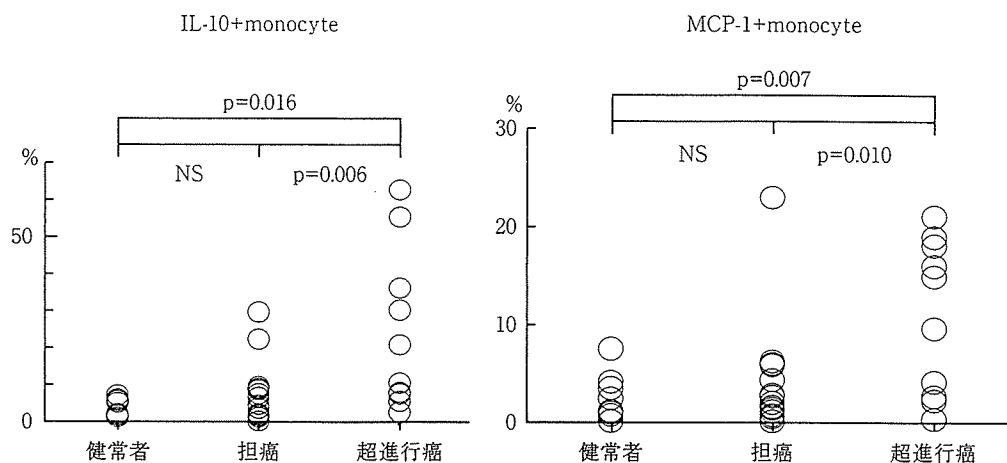


図3 単球における細胞内サイトカイン陽性率

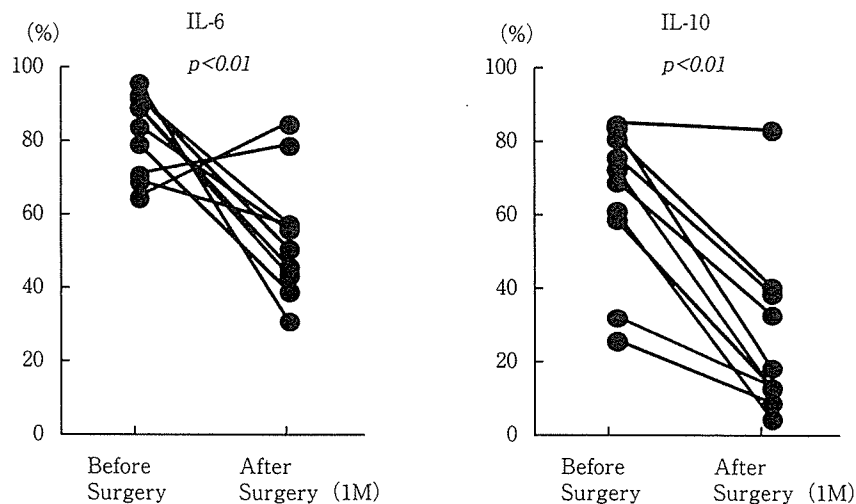


図4 手術によるCD4+T細胞内サイトカイン陽性率の推移

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

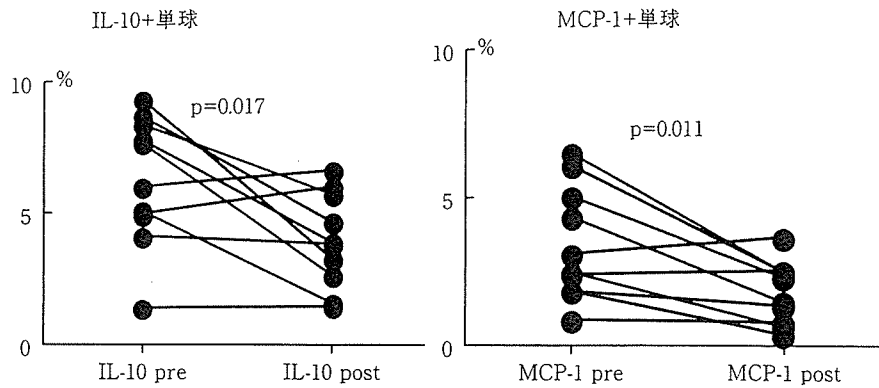


図5 PSK 投与前後における単球内サイトカイン陽性率

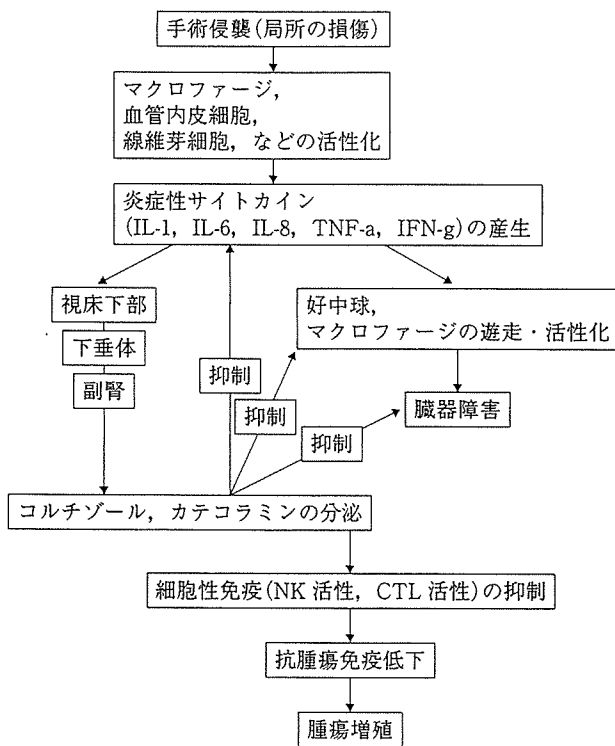


図6 手術侵襲後の免疫動態

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-g 陽性細胞の割合が増加し, IL-4 陽性細胞,

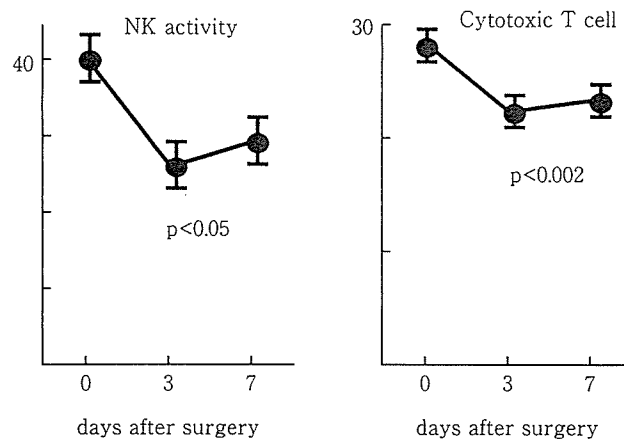


図7 手術侵襲と細胞性免疫の低下

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、引き続き治癒過程において、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

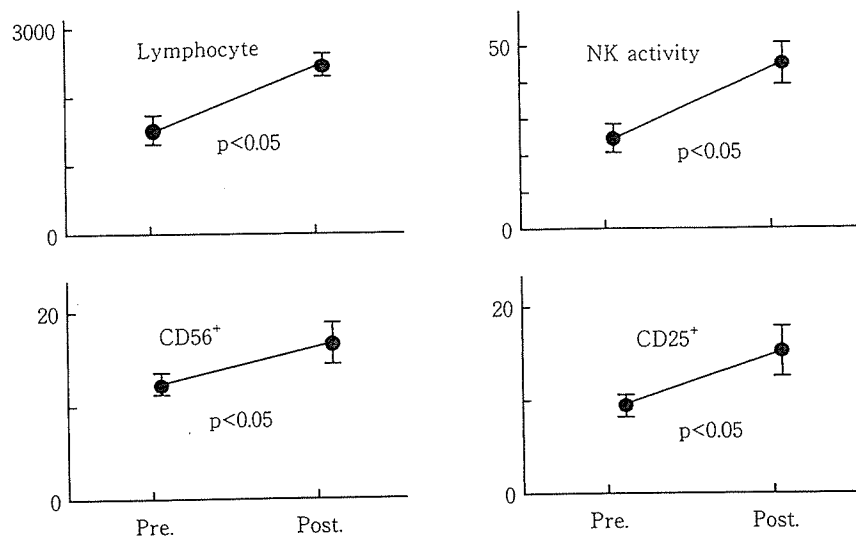


図8 免疫療法(IL-2 持続投与)前後の免疫指標

免疫が低下する(図7)。この免疫抑制は手術侵襲に比例して起こるため、可能な限り手術侵襲を小さくする必要がある。近年腹腔鏡下手術が導入され、美容上、入院期間短縮、疼痛軽減などの利点のほかに、手術侵襲軽減による癌転移予防効果も確認されている⁷⁾。腹腔鏡下手術ではIL-4、IL-10の産生昂進は認めず、IFN- γ 、IL-2産生の低下も認めないとの報告もある⁸⁾⁹⁾。多くの文献の考察によると、腹腔鏡下手術は開腹手術とは異なり、免疫抑制ではなく逆に軽い免疫活性化状態を引き起こすとされており、根治性を損なわない限り選択すべき術式である⁸⁾。

術中の出血に対する輸血も免疫能を低下させ癌再発を助長する。同種血輸血を受けた大腸癌患者ではIL-10、sIL-2R、TNFRが術後有意に上昇し、破傷風トキソイドに対する反応性(液性免疫能を示す)も上昇する。逆に自己血輸血患者では皮膚の遅延性過敏反応(細胞性免疫を示す)が無輸血患者よりも高値を示す。これらの結果より、同種輸血はTh2優位の液性免疫を、逆に自己血輸血はTh1優位の細胞性免疫を誘導すると推定される。したがって可及的に輸血を避け、可能なら自己血輸血を準備することが望ましい⁹⁾。また、術前に貧血を認める患者において術前補正群と術中補正群を比較すると術前補正群で免疫能の低下が少な

く遠隔成績も良好であるため、術前に貧血の補正を行う必要がある。

また、周術期の免疫療法も多く試みられている。NK細胞、Tリンパ球の活性化因子であるIL-2周術期投与により、NK活性およびLAK活性の上昇、リンパ球の活性化と増加、さらにCD25(interleukin 2 receptor)およびCD45RO(T-memory cells)陽性細胞の増加が認められている(図8)。さらにDukes分類Dの進行大腸癌患者に対して、術前IL-2投与・非投与のランダムイズ治験が行われ、投与群では非投与群に比較して、腫瘍浸潤リンパ球の増加、さらに有意な予後の延長が報告されている¹⁰⁾。消化器癌の再発部位としては、肝転移が多くを占める。そこで手術侵襲後の肝局所免疫能を検討するためラット肝転移モデルを使用して単開腹・小腸切除を負荷し、48時間後の末梢血および肝非実質細胞のNK活性を測定したところ、小腸切除群では肝非実質細胞のNK活性が著明に低下していた。また肝転移巣の増殖は小腸切除群で著明に促進された¹¹⁾。次に術後にIL-2を門脈内投与したところ、肝非実質細胞のNK活性と抗移植腫瘍活性は著明に増強され、転移巣出現率および転移巣の増殖率も有意に抑制された¹²⁾。これらの結果は肝転移予防には周術期の門脈内IL-2投与が有効であることを示し

ている。他のサイトカインでは IFN- γ の周術期投与が行われ発熱以外の毒性は認めず、術後の NK 活性の低下が予防されたとの報告もある¹³⁾。

PGE2 は強力な免疫抑制物質であり、炎症や腫瘍局所のマクロファージから産生される。大腸癌患者の門脈血の PGE2 レベルは動脈血と比較して有意に高く、しかも進行癌患者で有意に高値を示した。さらに門脈血 PGE2 レベルが 100 pg/ml 以上であった 9 症例中 4 症例が 2 年以内に肝転移再発をきたした⁴⁾。このように PGE2 は腫瘍増殖と再発にきわめて強い関連性を示す。したがって術後の炎症巣からの PGE2 産生を抑制することは重要である。実際、術後にモルヒネ、プロスタグランジン (PG) E2 抑制剤 (インドメサシン)、IL-2 の 3 者をさまざまな組み合わせで投与し、術後の NK 活性と腫瘍増殖を観察したところ、少量の IL-2 と PGE2 抑制剤の組み合わせが手術

による免疫抑制の解除に最も優れており、腫瘍の発育を著明に抑制した。逆にモルヒネは NK 活性をさらに低下させ、腫瘍の発育を著明に促進した。この結果から術後の疼痛管理には PGE2 抑制剤 (インドメサシン) が優れており、モルヒネは極力使用を避けるべきと言える¹⁴⁾。

また、侵襲ストレスによる上部消化管出血の予防として H2-blocker であるシメチジンやラニチジンが投与されているが、これらの周術期投与により細胞性免疫の低下が防止できると報告されている¹⁵⁾。

周術期の経腸栄養は、経口摂取が十分に行えない症例の栄養状態ならびに免疫能の改善に有効であり、さらに術後早期からの経腸栄養も免疫能回復に有効であると報告されており、食道癌などの術後に応用されている¹⁶⁾。

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) Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, et al: Relationship between serum levels of interleukin-6, various disease parameters, and nutrition in patients with esophageal squamous carcinoma. *Cancer Res* 56: 2776-2780, 1996.
- 3) Oka M, Hirose K, Iizuka N, et al: Cytokine mRNA expression patterns in human esophageal cancer cell lines. *J. Interfer. Cytokine Res* 15: 1005-1009, 1995.
- 4) Oka M, Inaba A, Uchiyama T, et al: Prostaglandin E2 Levels and Lymphocyte Subsets in Portal Venous Drainage of Colorectal Cancers. *Am J Surg* 167: 264-267, 1994.
- 5) 吉野茂文, 裕 彰一, 田畑智之ほか: 腫瘍による Th2 細胞の誘導. *臨床免疫* 31: 139-144, 1999.
- 6) Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, et al: Induction of Fas-Mediated Apoptosis on Circulating Lymphocytes by Surgical Stress. *Ann Surg* 223: 434-440, 1996.
- 7) Allendorf JD, Bessler M, Horvath KD, et al: Increased tumor establishment and growth after open vs laparoscopic bowel resection in mice. *Surg Endosc* 12: 1035-1038, 1998.
- 8) Vittimberga FJ Jr, Foley DP, Meyers WC, et al: Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg* 227: 326-334, 1998.
- 9) Heiss MM, Fraunberger P, Delanoff C, et al: Modulation of immune response by blood transfusion: evidence for a differential effect of allogeneic and autologous blood in colorectal cancer surgery. *Shock* 8: 402-408, 1997.
- 10) Barni S, Lavorato F, Fumagalli L: Preoperative interleukin-2 subcutaneous immunotherapy may prolong the survival time in advanced colorectal cancer patients. *Oncology* 53: 263-268, 1996.
- 11) Oka M, Hazama S, Suzuki M, et al: Depression of cytotoxicity of nonparenchymal cells in the liver after surgery. *Surgery* 116: 877-882, 1994.
- 12) 裕 彰一: 門脈内 IL-2 持続投与による肝転移巣増殖の抑制と肝臓内単核球の細胞傷害活性の増強. *山口医学* 39: 401-411, 1990.
- 13) Houvenaeghel G, Bladou F, Blache JL, et al: Tolerance and feasibility of perioperative treatment with interferon-alpha 2a in advanced cancers. *Int Surg* 82: 165-169, 1997.
- 14) Colacchio TA, Yeager MP, Hildebrandt LW: Perioperative immunomodulation in cancer surgery. *Am J Surg* 167: 174-179, 1994.
- 15) Altomare DF, Lupo L, Pannarale OC, et al: Reduction of postoperative immunosuppression with ranitidine in patients with cancer of the stomach or large bowel. *Eur J Surg* 161: 109-113, 1995.
- 16) Braga M, Vignali A, Gianotti L, et al: Immune and nutritional effects of early enteral nutrition after major abdominal operations. *Eur J Surg* 162: 105-112, 1996.

Immunohistological Evaluation of Single Small Hepatocellular Carcinoma with Negative Staining of Monoclonal Antibody Hepatocyte Paraffin 1

TAKAAKI SUGIKI,¹ MASAKAZU YAMAMOTO,^{1*} ATSUSHI ARUGA,¹ KEN TAKASAKI,¹
AND MASAYUKI NAKANO²

¹Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

²Division of Clinical Pathology, National Chiba Hospital, Chiba, Japan

Background and Objectives: The sensitivity and specificity of the monoclonal antibody Hepatocyte Paraffin 1 (Hep Par 1) for hepatocellular carcinoma (HCC) are very high, and the usefulness for differential diagnosis of hepatic tumors has been reported. However, there are some cases of HCC with negative staining for Hep Par 1. We examined the histopathological features of HCC with negative staining for Hep Par 1. **Methods:** We examined 69 samples of single nodular HCC less than 2 cm in greatest dimension, resected from 1985 to 1994 in our hospital, with immunohistological staining for Hep Par 1, cytokeratin 19 (CK 19), MUC-1 glycoprotein (MUC-1), and epithelial membrane antigen (EMA).

Results: Hep Par 1 staining was positive in 64 cases (93%) and negative in 5 cases (7%). With regard to the histological structure, 3 of the 5 negative cases were scirrhous HCC. With regard to the grade of histological differentiation, 2 cases were poorly differentiated HCC, 3 cases were moderately differentiated HCC, and no well-differentiated HCC was found in the negative cases. CK 19, MUC-1, and EMA staining were negative in all cases.

Conclusions: It is necessary to recognize the existence of Hep Par 1 negative HCC, in particular scirrhous HCC. This may be due to a different mechanism in the earlier stage of hepatocarcinogenesis.

J. Surg. Oncol. 2004;88:104–107. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Hepatocyte Paraffin 1; hepatocellular carcinoma; scirrhous hepatocellular carcinoma; immunohistochemistry

INTRODUCTION

In 1993 Wennerberg et al. reported the monoclonal antibody Hepatocyte Paraffin 1 (Hep Par 1), which reacts with normal and neoplastic hepatocytes in routine formalin-fixed and paraffin-embedded tissues [1]. Later other reports have proved the usefulness of Hep Par 1 for differential diagnosis of hepatic tumors [2–4]. Hep Par 1 is considered specific for normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma (HCC), and rarely reacts with bile duct cells, nonparenchymal liver cells, and metastatic tumor cells. The sensitivity and specificity of Hep Par 1 for HCC are very high, but there are some cases of HCC with negative staining for Hep Par 1. In the present study, we examined the histopathological features of HCC with negative staining for Hep Par 1.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

MATERIALS AND METHODS

We examined 69 samples of single HCC less than 2 cm in greatest dimension, resected from 1985 to 1994 in our hospital. The pathological diagnosis was confirmed by review of available hematoxylin and eosin (H&E) stained slides in each case by a pathologist. On the slice with greatest dimension of HCC, we performed immunohis-

*Correspondence to: Masakazu Yamamoto, Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho Shinjuku-ku, 162-8666 Tokyo, Japan. Fax: +81-3-5269-7435. E-mail: yamamoto@ige.twmu.ac.jp

Accepted 9 August 2004

DOI 10.1002/jso.20144

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

tological staining for Hep Par 1 and biliary marker, cytokeratin 19 (CK 19), MUC-1 glycoprotein (MUC-1), and epithelial membrane antigen (EMA). Sections of formalin-fixed and paraffin-embedded cell block tissue were deparaffinized and hydrated in a series of xylene, graded alcohols, and water. To improve the staining pattern methods for antigen retrieval, heating in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 by microwave was used. Endogenous peroxidase was blocked by immersion in 3% hydrogen peroxide. The sections were then washed in phosphate-buffered saline (PBS). Application of the primary antibody was done with an overnight incubation at 4°C. The mouse monoclonal antibody Hep Par 1 (clone OCH1E5.2.10; DAKO, Carpinteria, CA) was used at a dilution of 1:50. The mouse monoclonal antibody CK 19 (clone RCK108; DAKO) was used at a dilution of 1:200. The mouse monoclonal antibody MUC-1 (clone Ma695; Novocastra, Burlingame, CA) was used at a dilution of 1:100. The mouse monoclonal antibody EMA (clone E29; DAKO) was used at a dilution of 1:100. After another wash with PBS, application of biotinylated goat antimouse secondary antibody (DAKO) was done at room temperature for 40 min. The sections were washed again and treated for 40 min with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (DAKO). The colorizing agent diaminobenzidine was used subsequently. Sections were counterstained with hematoxylin. Negative control was performed by substituting PBS for the primary antibody. When more than about 80% of the tumor area showed negative staining for Hep Par 1, it was judged to be a Hep Par 1 negative case. Although HCC with diffuse clear cells or fatty vacuoles was visualized as Hep Par 1 negative under low magnification, the cytoplasm compressed by abundant glycogen or fat vacuoles showed positive staining under high magnification, and these were included as positive cases.

RESULTS

Normal hepatocytes around tumor cells were Hep Par 1 positive with cytoplasmic, diffuse, and granular patterns. In our 69 cases of single small HCC, Hep Par 1 staining was positive in 64 cases (93%) with characteristic cytoplasmic granular pattern (Fig. 1A,B). On the other hand, 5 of 69 cases (7%) were found to show negative staining (Fig. 1C). According to the distribution pattern, 1 of 5 cases showed completely negative staining for Hep Par 1, and 4 of 5 cases showed a little area of scattered positive staining in the tumor. In all 69 cases, biliary marker CK 19, MUC-1, and EMA staining were negative. With regard to the histological structure [5], 66 cases were of the trabecular type, no cases were of the pseudo-glandular and compact type, and 3 cases were of the scirrhous type. In the trabecular type, 64 of 66 cases

showed positive staining for Hep Par 1. In the scirrhous type, all 3 cases showed negative staining for Hep Par 1 (Fig. 1D,E). With regard to the grade of histological differentiation, 16 cases were well-differentiated HCC, and all 16 cases were positive for Hep Par 1. Forty-one and 12 cases were moderately and poorly differentiated HCC, and 38 of 41 and 10 of 12 cases were positive, respectively (Table I). The only completely Hep Par 1 negative case was moderately differentiated HCC, non-scirrhous type.

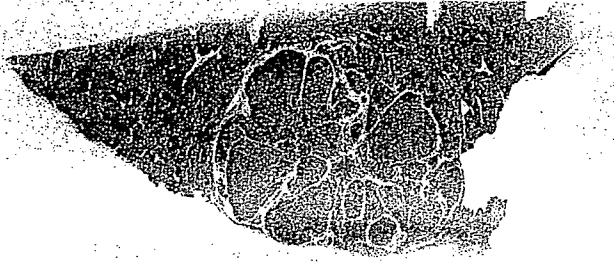
DISCUSSION

In our study, 93% cases of single small HCC less than 2 cm in greatest dimension showed positive staining for Hep Par 1. Previous reports have proved Hep Par 1 to be a very useful marker for differential diagnosis between HCC and cholangiocellular carcinoma and metastatic liver tumor, including liver metastasis of hepatoid adenocarcinoma of the gastrointestinal tract [2-4,6,7]. It has been reported to have very high specificity (bordering on 100%) and slightly lower sensitivity (approximately 80-90%) for the identification of HCC [8]. However, some cases of HCC stained negative for Hep Par 1; 5 of 69 (7%) single small cases in our study, 1 of 38 (3%) reported by Wennerberg, 2 of 32 (6%) reported by Leong, 8 of 96 (8%) reported by Peiguo, and 1 of 290 (0.3%) reported by Wu [1,2,7,9]. In our study and other reports the final pathological diagnosis as HCC was established on the basis of H&E staining [1,2,7,9]. The tumors showed a morphologically hepatoid structure which was compatible with HCC. This indicates, however, that the pathological diagnosis was established on the basis of the only morphological character, not the detailed origin of the tumor.

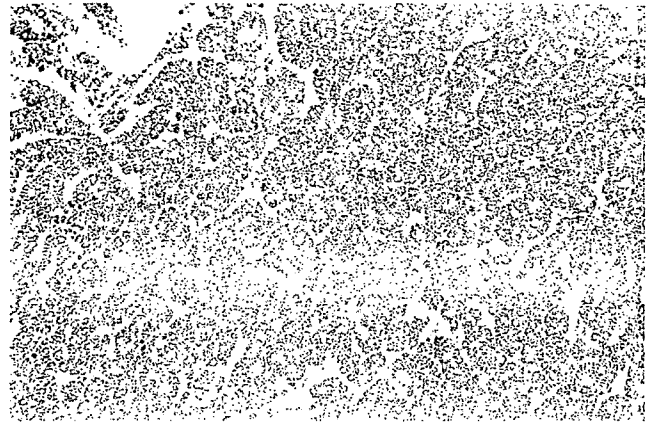
In our study, all three cases of scirrhous HCC showed negative staining for Hep Par 1. In other reports, one case of Hep Par 1 negative staining reported by Wennerberg was scirrhous HCC, and two cases of Hep Par 1 negative staining reported by Leong were scirrhous HCC and poorly differentiated HCC, respectively [1,2]. Although the reason has been unclear, we can state that some cases of scirrhous HCC show negative staining for Hep Par 1. The usefulness of Hep Par 1 for differential diagnosis of liver biopsy has been reported [4], but it is necessary to recognize the existence of Hep Par 1 negative HCC, in particular scirrhous HCC, in small tissue samples.

Microscopic examination revealed that the antigen of Hep Par 1 might be the mitochondria in the hepatocytes [1]. Almost all HCC have hepatocellular intracellular organs and show positive staining for Hep Par 1 just like normal hepatocytes. In our study, Hep Par 1 staining was positive in 16 of 16 (100%), 38 of 41 (93%), and 10 of 12 (83%) cases of well and moderately/poorly differentiated

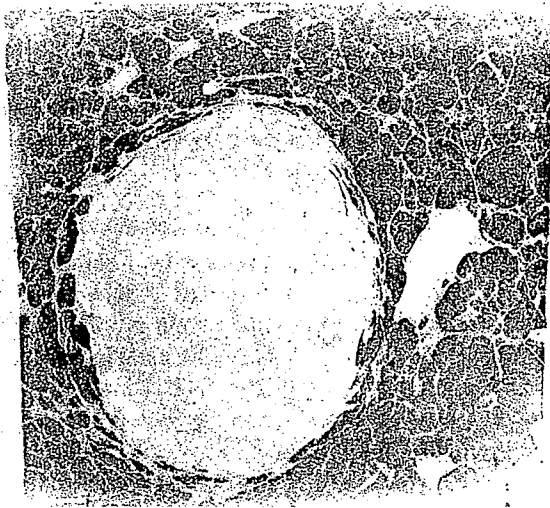
A



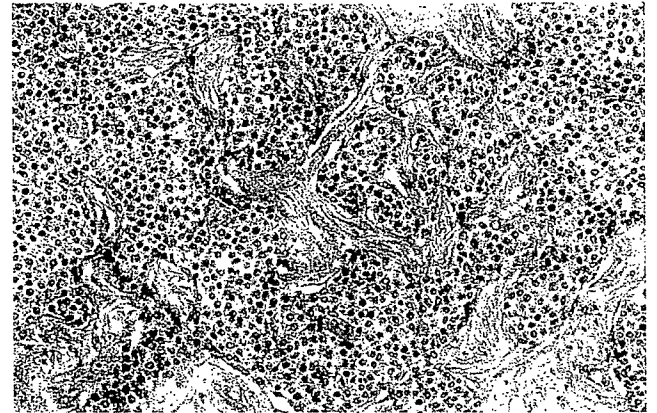
B



C



D



E

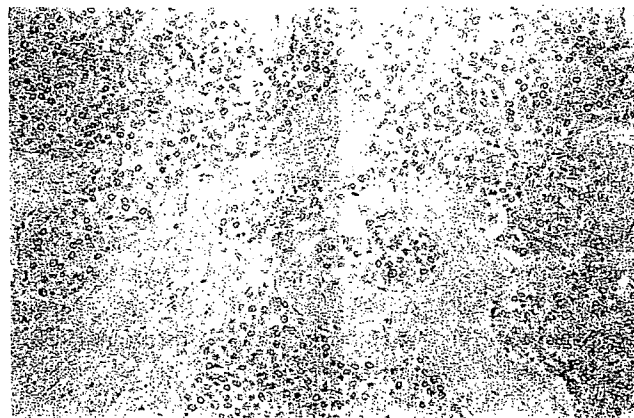


Fig. 1. Immunohistological staining of single small HCC using Hep Par 1. A, B: HCC with positive staining for Hep Par 1, with cytoplasmic, diffuse and granular pattern. C: HCC with completely negative staining for Hep Par 1 (non-scirrhou type). D: Scirrhou HCC with abundant fibrous stroma in H&E staining. E: Scirrhou HCC with negative staining for Hep Par 1. [Color figure can be viewed in the online issue, available at www.interscience.wiley.com.]

TABLE I. Immunohistological Staining of Single Small HCC Using Hep Par 1

	Total	Hep Par 1 positive	Hep Par 1 negative
HCC cases	69	64	5
Well differentiated	16	16	0
Moderately differentiated	41	38	3
Poorly differentiated	12	10	2
Scirrhou	3	0	3

HCC, hepatocellular carcinoma; Hep Par 1, Hepatocyte Paraffin 1.

HCC, respectively. It is possible that Hep Par 1 reactivity is related to the degree of hepatocyte differentiation. Fasano has already suggested this hypothesis in 1998, from the fact that in a study of hepatoblastoma, Hep Par 1 staining was generally less intense in the embryonal type than in the fetal type [10]. In our study, all cases of well-differentiated HCC stained completely positive, while poorly differentiated HCC did not always stain negative. It is also noteworthy that Wennerberg reported that all five cases of fibrolamellar HCC showed positive staining [1], while these are generally well differentiated.

From these data we suggest that Hep Par 1 immunogenicity may be lost as HCC becomes more poorly differentiated and more scirrhou. Supposing that single small HCC less than 2 cm in greatest dimension reflects the relatively early stage of HCC, there is less modification by focal differentiation and other changes as it grows in size. From this point of view, we believe that the appearance of a Hep Par 1 negative area in a smaller size HCC is significant. We suggest the possibility of a different mechanism in the earlier stage of hepatocarcino-

genesis between Hep Par 1 positive and negative staining HCC.

REFERENCES

1. Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB: Hepatocyte paraffin 1: A monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993;143:1050-1054.
2. Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM, et al.: Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumors and metastatic carcinoma. *Histopathology* 1998;33:318-324.
3. Minevini MI, Demetris AJ, Lee RG, et al.: Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 1997;10:686-692.
4. Siddiqui MT, Saboorian MH, Gokaslan ST, et al.: Diagnostic utility of the HepPar1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2002;96:49-52.
5. Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH: *Histological typing of tumours of the liver*, 2nd edn. WHO. New York: Springer-Verlag, 1994.
6. Maitra A, Murakata LA, Albores-Saavedra J: Immunoreactivity for Hepatocyte Paraffin 1 antibody in hepatoid adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:689-694.
7. Peiguo GC, Ishizawa S, Emerald W, et al.: Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: An immunohistological comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol* 2002;26:978-988.
8. Murakata LA, Ishak KG, Nzeako UC: Clear cell carcinoma of the liver: A comparative immunohistochemical study with renal clear cell carcinoma. *Mod Pathol* 2000;13:874-881.
9. Wu PC, Fang JW, Lau VK, et al.: Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. *Am J Pathol* 1996;149:1167-1175.
10. Fasano M, Theise ND, Nalesnik M, et al.: Immunohistochemical evaluation of hepatoblastomas with the hepatocyte-specific marker, hepatocyte paraffin 1, and the polyclonal anticarcinoembryonic antigen. *Mod Pathol* 1998;11:934-938.

2 臨 床

② 樹状細胞を用いた癌免疫療法の理論と実際

清水 公一*1, 有賀 淳*2, 高崎 健*3

Key Sentences

- ① ミエロイド由来の樹状細胞(MDC)は臨床的に培養方法が確立しており, 簡便に比較的大量に誘導・生成が可能のため, ほとんどの施設でMDCが治療に用いられている。
- ② 樹状細胞に抗原を提示させて生体に投与する前には, 樹状細胞を成熟化させる必要がある。
- ③ ライセート, ペプチド, タンパク質, RNA, apoptotic tumor cellが抗原として用いられている。また腫瘍抗原をコードした遺伝子の樹状細胞内移入やDC/腫瘍融合細胞が用いられている。どの抗原形態を用いるのが最も適しているのかについては, いまだコンセンサスが得られていない。
- ④ 悪性黒色腫, 非ホジキンリンパ腫, 多発性骨髄腫, 前立腺癌, 大腸癌, 非小細胞性肺癌, 原発性肝癌, 腎癌, 小児腫瘍を中心に臨床試験が行われており第Ⅰ相・Ⅱ相臨床試験が終了して第Ⅲ相臨床試験を行っている疾患もある。
- ⑤ 樹状細胞療法の今後の方向性としては, 標準療法後の微小残存病変に対する補助療法として位置づけ, 第Ⅱ相・Ⅲ相臨床試験を行い, relapse free survival (RFS)やoverall survival (OS)の延長を証明することが必要である。

Key Words

樹状細胞療法, 臨床試験, 術後補助療法, 獲得免疫, 併用療法

はじめに

異物(抗原)を排除する免疫応答には, 自然免疫と獲得免疫の2つの免疫応答があることは周知の事実である。異物(抗原)が排除される時には, 自然免疫系が活性化され好中球や好酸球に代表される顆粒球, マクロファージやNK細胞が異物(抗原)局所に遊走・集積し, 貪食を行ったりサイトカインを放出することで, 生体内から異物(抗原)の排除が行われる。また, より有効に

生体内からの排除が可能のように, 獲得免疫系の誘導・成立が行われる。その際には抗原提示細胞, 特に樹状細胞(Dendritic cell: DC)が重要な役割を果たす。樹状細胞は異物(抗原)局所に遊走し, 異物(抗原)の断片を貪食し所属リンパ節へと遊走する。貪食された異物(抗原)の断片は分解され樹状細胞表面の抗原提示分子(MHC分子)上に適した抗原エピトープとして提示される。樹状細胞が所属リンパ節内で主にT細胞と抗原情報をやり取りすることで, 抗原特異的T細胞に代表される細胞性免疫あるいは抗体に代表される体液性免疫が

Current strategy of dendritic cell-based Immunotherapy

- * 1 SHIMIZU Koichi : 東京女子医科大学消化器病センター外科
- * 2 ARUGA Atsushi : 東京女子医科大学大学院医学研究科がん免疫細胞治療学分野教授
- * 3 TAKASAKI Ken : 東京女子医科大学消化器病センター外科主任教授

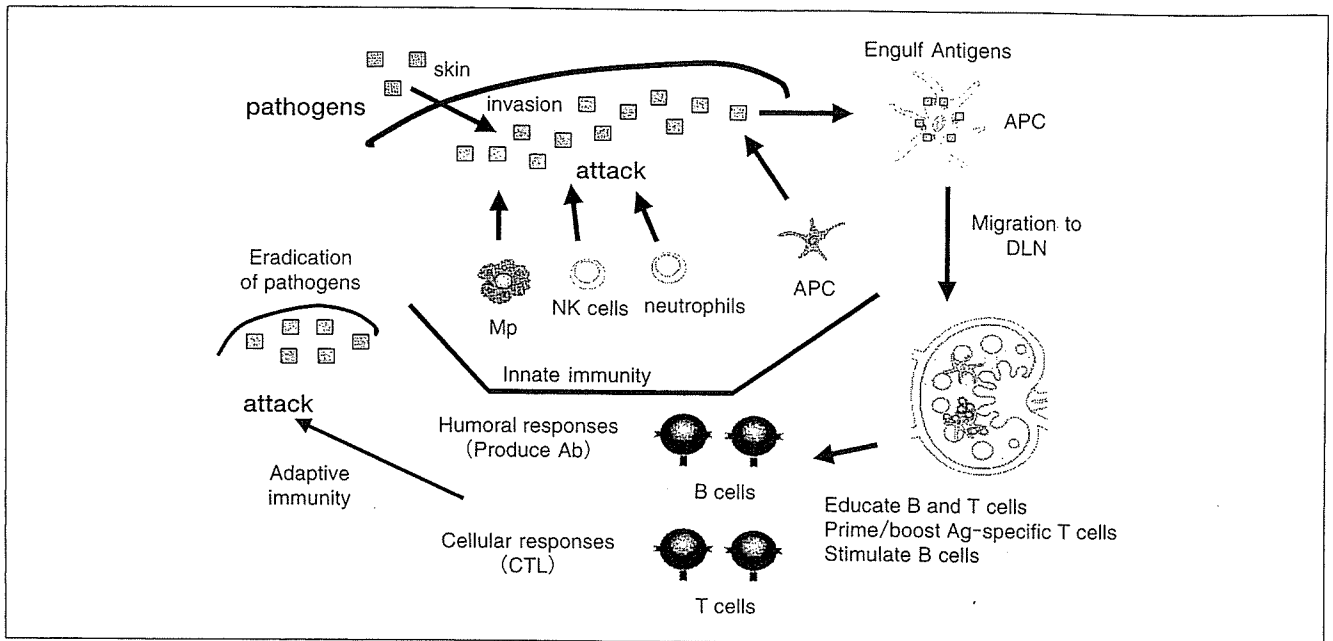


図1 Immune Cycle

Mp : macrophage, APC : antigen presenting cells, DLN : draining lymph nodes

誘導・確立され、異物(抗原)がより効果的に排除され
ると考えられている(図1)。獲得免疫の誘導・成立は
routine immunization に代表され、特定の疾患に対して
生体の免疫防御を行う上で重要な役割を担うものと考え
られる。

腫瘍免疫学の進展から、腫瘍に対しても同様の免疫応
答(サイクル)が成り立つと考えられている(図2)。微小
腫瘍の段階では自然免疫系を代表する顆粒球、マクロ
ファージやNK細胞が腫瘍の排除に重要な役割を果たし
ているが、腫瘍の増大とともに抗原提示細胞(特に樹状
細胞)によって細胞性免疫や体液性免疫の成立が必要で
あり、抗原特異的T細胞や抗原特異的抗体が効果的に
腫瘍の増大を抑制すると考えられている。

このような理解に基づいて、免疫療法は研究・開発が
進められてきており、樹状細胞療法は2つの部位で免
疫応答(サイクル)に関与している(図3)。1つ目は樹状
細胞を誘導し適切な抗原をその表面上に提示する段階ま
で生体外で生成してから、生体内に投与し免疫応答(サ
イクル)に関与するやり方、2つ目は樹状細胞を誘導・
生成し腫瘍内部に投与することで免疫応答(サイクル)

に関与するやり方である。

2つの関与方法が可能になった背景には、樹状細胞を
誘導・生成する方法が確立してきたこと、腫瘍に発現す
る抗原の検索・同定が進んできたことが挙げられる。

動物実験 (preliminary results)

マウスの実験モデルにおいて、様々な抗原(ペプチド¹⁾、
ライセート²⁾、タンパク質³⁾、RNA⁴⁾)をパルスした、あ
るいはDC/腫瘍融合細胞を用いた樹状細胞療法で、マ
ウスに抗原に対する獲得免疫を成立させることが可能で
あり、腫瘍の生着を拒絶したり、担癌マウスにおける癌
の増殖を抑制あるいは縮小させることが可能であること
が示された。また誘導された樹状細胞をマウスに生着し
た腫瘍内部に直接投与することで、腫瘍内部でアポトー
シスを起こしている腫瘍細胞や腫瘍細胞の断片を樹状細
胞に貪食させ、その後腫瘍近傍の所属リンパ節へ樹状細
胞が遊走し、貪食した腫瘍の抗原を免疫担当細胞(主に
T細胞)に提示することで、腫瘍特異的な獲得免疫を誘
導させることが可能であることが示された⁵⁾。

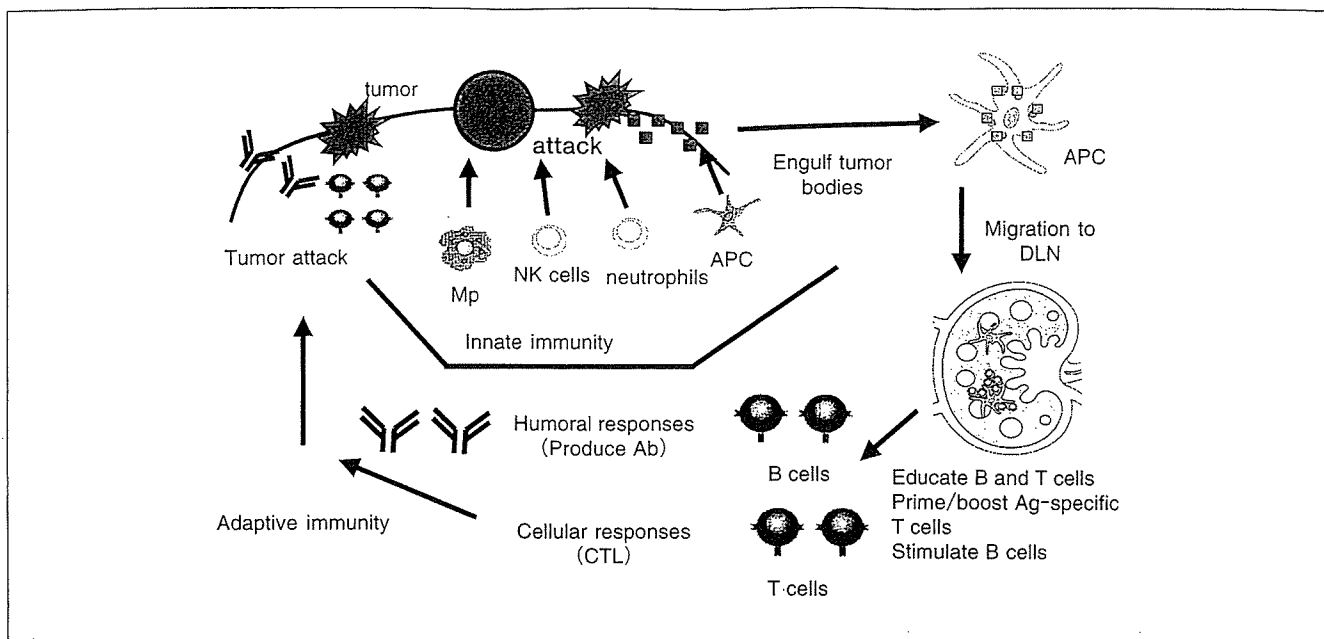


図 2 Immune Cycle for Tumor Eradication

Mp : macrophage, APC : antigen presenting cells, DLN : draining lymph nodes

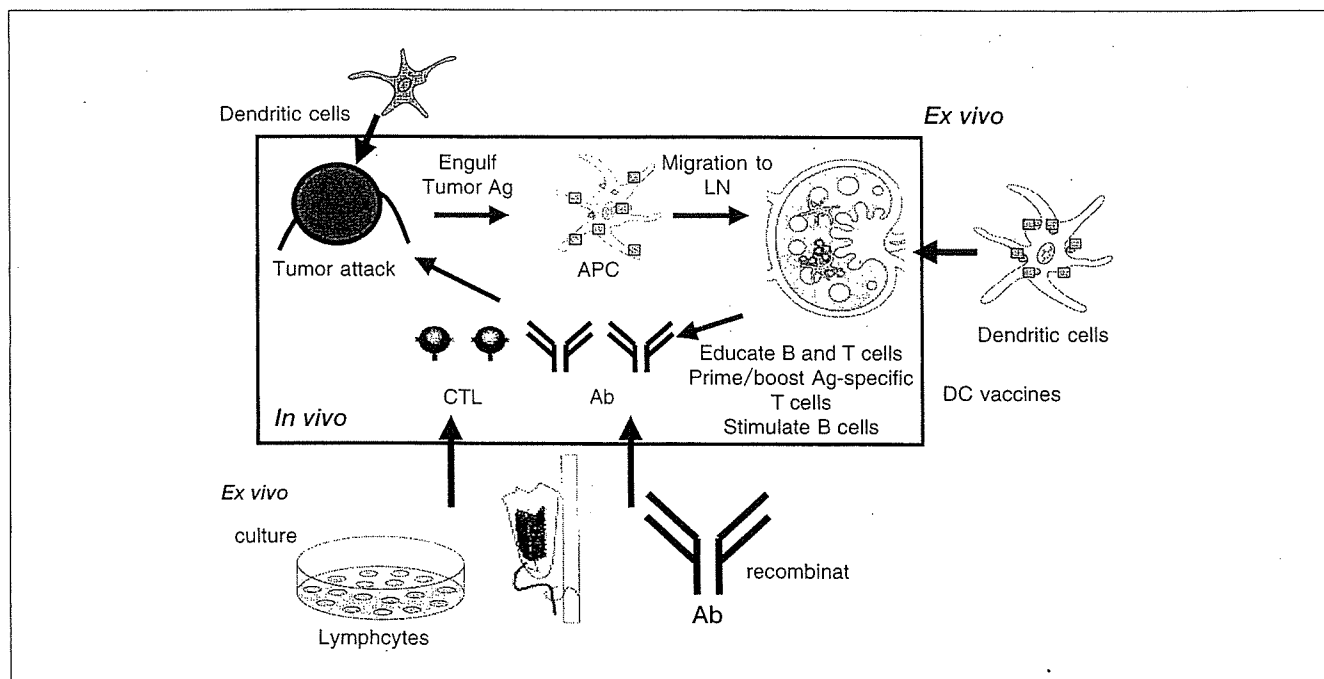


図 3 Immunotherapy

APC : antigen presenting cells

マウスを主とした動物実験の結果を基に、現在樹状細胞療法の臨床試験が計画・施行されている。

ヒトにおける樹状細胞療法

1. 樹状細胞の誘導・生成

樹状細胞には大きくミエロイド由来とリンホイド由来があり、それぞれの前駆細胞から樹状細胞を誘導する方法が異なると同時にその機能も異なると考えられている。様々な検討・解析がなされているが、現時点ではどのサブセットの樹状細胞を用いるのが良いかのコンセンサスは得られていない。しかしミエロイド由来の樹状細胞(MDC)は、マウスやヒトの *in vitro* モデルでナイーブあるいはメモリーT細胞に作用して、1次あるいは2次免疫応答を誘導することが示唆されている。そのため、MDCを使用することに関してはコンセンサスが得られている。またMDCは臨床的に培養方法が確立しており、簡便に比較的大量に誘導・生成が可能のため、ほとんどの施設でMDCが治療に用いられている。

MDCはCD 14陽性の単球あるいはCD 34陽性細胞から誘導・生成することが可能である。Leukapheresisを行い簡便に大量のCD 14陽性の単球を採取することが可能であることから、多くの施設が末梢血CD 14陽性の単球由来の樹状細胞を用いている。末梢血中のCD 14陽性の単球はGM-CSFとIL-4で7日前後培養されると、未熟な樹状細胞に分化・誘導される。誘導されてきた樹状細胞は、抗原提示分子であるMHC class Iあるいはclass II分子を高発現しているが、抗原提示を行う際重要なアクセサリ分子であるCD 80やCD 86分子は低発現にとどまっている。成熟化の指標であるCD 83分子や所属リンパ節への遊走に必要なCCR7などのケモカイン受容体はほとんど発現しておらず、一方高い貪食能を有している。未熟な樹状細胞はその状態で生体に投与すると獲得免疫系を誘導・成立させるよりはむしろ免疫寛容を誘導・成立させることがわかってきたため、樹状細胞に抗原を提示させて生体に投与する前には樹状細胞を成熟化させる必要があることでコンセンサスが得られてきている。

2. 樹状細胞の成熟化

成熟化した樹状細胞では貪食能が低下するかわりにCD 80, CD 86, CD 40, CD 83といった分子が強発現し抗原提示能が増加する。また、いろいろなサイトカイン遺伝子の発現も上昇し産生が増加する。

樹状細胞の成熟化には様々な因子が関与する。LPSやTNF- α , Type 1 IFN (IFN- α , β), CpG, monocyte conditioned medium, サイトカインカクテル(PGE 2, IL-1 β , TNF- α , IL-6), OK-432, Poly I : C, CD 40 Lなどが樹状細胞に成熟化を促す因子として検討されているが、どの方法が最も良いかについては結論が出ていない。いずれの方法を用いるかは別として、抗原を提示させた樹状細胞を成熟化させて生体内に投与することに関してはコンセンサスが得られてきている。

3. 抗原

現在、腫瘍ライセート、ペプチド、タンパク質、RNA, apoptotic tumor cellが抗原として用いられている。また腫瘍抗原をコードした遺伝子の樹状細胞内移入やDC/腫瘍融合細胞が用いられている。腫瘍の種類によって同定された抗原が存在しない場合やHLAがマッチングしない場合は、すでに同定されているペプチドを用いることができないという欠点がある。

いろいろな抗原同定法を用いることで、悪性黒色腫や前立腺癌に対するペプチドや大腸癌に対するCEA由来ペプチド、MAGEファミリー由来ペプチド、食道扁平上皮癌に対するSART由来ペプチド、などの同定された免疫原性の高い抗原ペプチドが増えてきている。

どの抗原形態を用いるのが最も適しているのかについてははまだコンセンサスが得られていない。現時点では癌の免疫逃避という問題や腫瘍側の抗原の発現に不均一性があるという問題から、ペプチドを使用する場合は、1種類のペプチドよりは数種類のペプチドを組み合わせの方がより効果的ではないか、あるいは複数の抗原エпитープを含むと考えられる抗原(ライセート、タンパク質、RNA、腫瘍細胞)を使用するべきであると考えられる。

4. 樹状細胞の投与部位

臨床試験では主に皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節内投与の4つが行われている。樹状細胞の抗原提示は、樹状細胞投与部位の所属リンパ節にて行われると考えられており、樹状細胞の投与後の遊走状況を調べる研究がいくつかなされている。マウスモデルおよび臨床試験において放射性同位元素でラベルされた樹状細胞の投与が行われ、投与樹状細胞の移動が観察された¹⁰⁾。現時点でコンセンサスが得られていることは、皮内あるいは皮下投与された樹状細胞の90%以上は投与部位にとどまり所属リンパ節へは移動しないこと、未熟な樹状細胞よりは成熟した樹状細胞のほうが2倍から3倍所属リンパ節へ移動しやすいことの2点である。樹状細胞の投与ルートで抗原特異的免疫応答や臨床効果に差があるかどうかについては現在臨床試験が行われている¹¹⁾。リンパ節内投与では他の投与ルートよりも試験管内のアッセイでは高いT細胞刺激能が得られる結果が出ており¹¹⁾、ヨーロッパの施設を中心にリンパ節内投与が推奨されるムードがあるが¹²⁾、投与ルートと臨床効果の関係に関しては、いまだ明確な結果が得られていない。そのため施設ごとで様々な投与ルートが行われており、コンセンサスが得られていないのが現状である。

5. 自己樹状細胞かアロの樹状細胞か？

大部分の臨床試験では、自己由来の樹状細胞が用いられている。一方、樹状細胞と腫瘍細胞を融合させるDC/腫瘍融合細胞では、自己由来の腫瘍と自己のHLAと一致しない非自己由来の樹状細胞を融合させて投与する臨床試験が行われている。

マウス悪性黒色腫モデルでは、同系の樹状細胞に悪性黒色腫由来の抗原ペプチドやライセートをパルスしてマウスを免疫すると、ほぼ100%近く免疫後の腫瘍の生着を抑制することが可能である。一方、同様のモデルにおいてMHCが一致しない非同系の樹状細胞に悪性黒色腫由来の抗原ペプチドやライセートをパルスしてマウスを免疫した場合、免疫した後の腫瘍の生着を部分的に抑制することは可能であるが、その効果は同系の樹状細胞には及ばない。このことから、臨床試験において抗原を

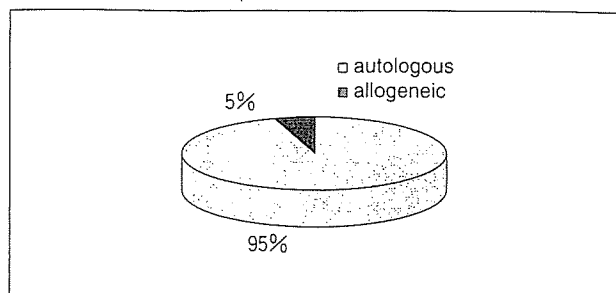


図4 DC

樹状細胞にパルスする場合は、自己由来の樹状細胞を用いるべきであると考えられる。

6. 各施設の概要

4th International Expert Meeting On Clinical Dendritic Cell Immunotherapy (2003)でのアンケート調査ではヨーロッパ、米国、日本、韓国など各国の施設における62件の臨床試験が集計された。それによれば非自己由来の樹状細胞を用いている臨床試験が3件(5%)認められるが、59件(95%)は自己由来の樹状細胞が用いられている(図4)。樹状細胞を分化誘導するための前駆細胞としては、大部分の臨床試験がleukapheresisを用いてCD14陽性の単球を採取して分化誘導している。一部の臨床試験ではCD34陽性細胞を採取して樹状細胞を分化・増殖・誘導している。樹状細胞の培養方法は、一部のヨーロッパの臨床試験ではGM-CSFとIL-13(3%)を用いて培養を行っているが、その他の試験は原則としてGM-CSFとIL-4(97%)を用いて樹状細胞を分化誘導している(図5)。現在、樹状細胞に抗原をパルスして生体内に投与する場合、成熟化させてから投与することでコンセンサスがほぼ得られており、アンケートの結果からも、ヨーロッパのグループを中心にサイトカインカクテルを使って成熟化を促す臨床試験(54%)が最も多く、次いでTNF- α (5%)やOK432、CD40L(2%)を使用する試験が認められる。しかし一方依然としてGM-CSFとIL-4で未熟な樹状細胞を誘導して生体内に投与する臨床試験(31%)も比較的多く認められる(図5)。それらの臨床試験は、ライセートを抗原としてパ

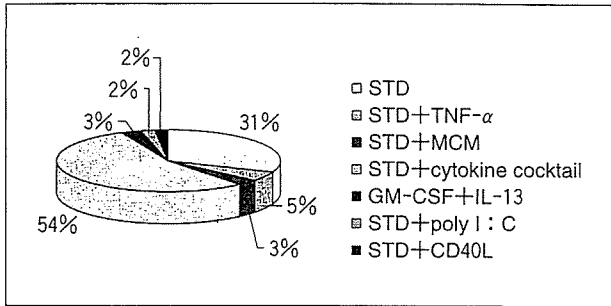


図5 Culture condition

STD : GM-CSF + IL-4, MCM : monocyte conditioned medium, cytokine cocktail : PGE 2/IL-6/TNF- α /IL-1 β

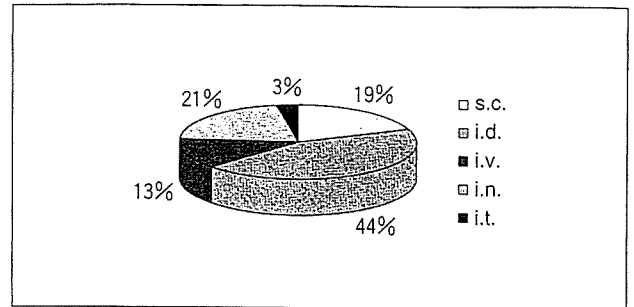


図7 route

s.c. : subcutaneous, i.d. : intradermal, i.v. : intravenous, i.n. : intranodal, i.t. : intratumoral

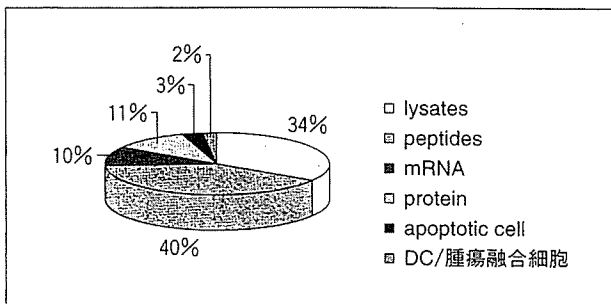


図6 antigens

ルスしている場合が多い。抗原は40%の臨床試験がペプチドを使用しているが、ライセート(34%)や腫瘍由来RNA(10%)、タンパク質(11%)なども認められる(図6)。投与部位に関しては、いくつかの施設では投与部位の違いでの免疫応答や臨床効果の差を検討するための臨床試験を行っているため、複数回答になっているが、ヨーロッパの施設を中心にリンパ節内投与(21%)が行われている。全体としては皮内投与(44%)が最も多く、次いでリンパ節内投与(21%)、皮下投与(19%)、静脈内投与(13%)の順番となっている(図7)。

樹状細胞療法の実際(臨床試験)

1. 抗原を提示させた樹状細胞療法

悪性黒色腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、前立腺癌、大腸癌、非小細胞性肺癌、原発性肝癌、腎癌、小児腫瘍を中心に臨床試験が行われており第I相・II

相臨床試験が終了して第III相臨床試験を行っている疾患もある。

2. 悪性黒色腫(melanoma)

免疫細胞療法の研究が最も進んでいる疾患の代表で、様々な施設で樹状細胞療法の臨床試験が行われている。悪性黒色腫では腫瘍関連抗原の同定が進んでおり、HLA-A 0201にマッチする抗原ペプチドが数種類同定されている。MAGE-3.A2, tyrosinase, gp100, MelanA/MART-1が代表的な抗原ペプチドであり、ELISPOT, tetramerなどを用いることで治療後の免疫応答を容易にモニターできる。一方、ライセートを用いた臨床試験も行われている。ライセートは試験管内での免疫応答のモニターがペプチドに比べると煩雑であるが、逆に遅延性過敏反応(DTH)を重要視する傾向が強くなる。

1998年ごろから現在までいくつかの臨床試験の結果が報告されてきている(表1)¹³⁾⁻²²⁾。Stage IVあるいは再発性悪性黒色腫の症例が対象であること、第I相臨床試験が多いことからどの程度の臨床効果が期待できるかは今後の第II相・III相臨床試験の結果を待たなくてはならない。HerseyらはMAGE-3.A2, tyrosinase, gp100, MART-1の4種類のペプチドあるいはライセートをパルスした樹状細胞療法の第I相、II相臨床試験を行い、AJCC stage IV悪性黒色腫の症例で、ライセートでは37%、ペプチドでは35%のdisease control rate (PR + SD)を認めている。