

BALB/c マウス自然発生腎細胞癌に対する BRMs (Biological
Response Modifiers) の抗腫瘍効果

—レンサ球菌製剤 OK-432の転移抑制効果に関する研究—

岩手医科大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久保 隆教授)

丹 治 進

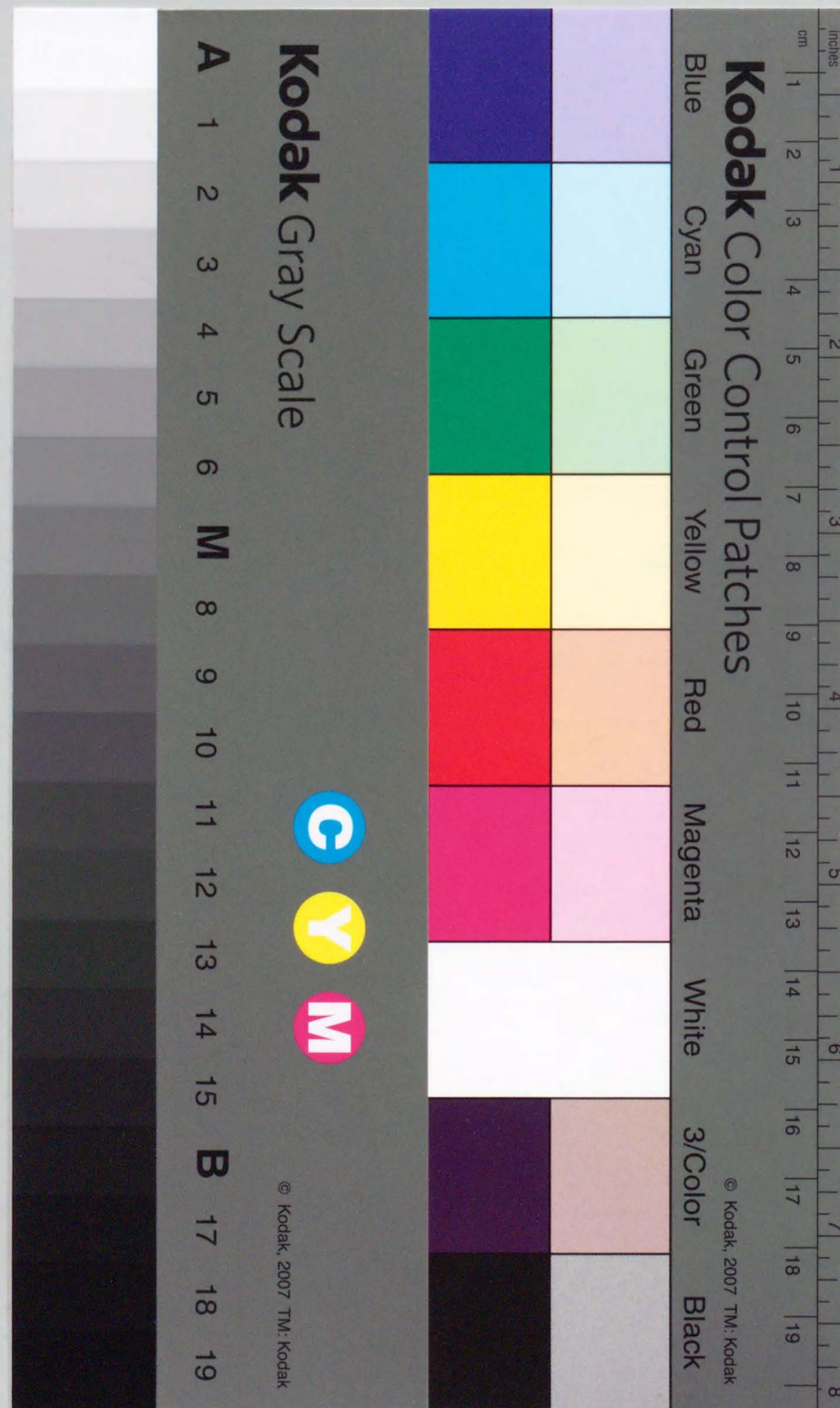
EFFECT OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS ON A SPONTANEOUS
MURINE RENAL CELL CARCINOMA:

Regression of Metastases Caused by the Streptococcal Preparation OK-432

Susumu Tanji

Department of Urology, Iwate Medical University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi Kubo)



BALB/c マウス自然発生腎細胞癌に対する BRMs (Biological Response Modifiers) の抗腫瘍効果

—レンサ球菌製剤 OK-432の転移抑制効果に関する研究—

岩手医科大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久保 隆教授)

丹 治 進

EFFECT OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS ON A SPONTANEOUS MURINE RENAL CELL CARCINOMA:

Regression of Metastases Caused by the Streptococcal Preparation OK-432

Susumu Tanji

Department of Urology, Iwate Medical University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi Kubo)

The effect of the streptococcal preparation OK-432, which is one of the biological response modifiers, was examined in BALB/c mice using a transplantable murine renal cell carcinoma (Renca) of spontaneous origin, and an analysis of effector cells was performed. The tumor grew progressively and metastasized consistently to the abdominal lymph nodes and then to distant organs following the inoculation of Renca cells in the left renal subcapsular site in BALB/c mice, and the survival time of the mice was under 42 days. In this tumor model, i.p. administration of OK-432 after tumor inoculation significantly extended the survival time and significantly inhibited the formation of the inoculated tumor itself. Removal of the left kidney on the 7th day after tumor inoculation neither extended the survival time nor augmented the effect of OK-432. Splenic cells obtained on the 7th day after tumor inoculation from Renca-bearing mice treated with OK-432 were capable of lysing syngeneic Renca cells, NK-sensitive allogenic YAC-1 cells, and LAK-sensitive EL-4 cells in a 4-hour ⁵¹Cr-release assay in vitro. Those obtained from healthy mice treated with OK-432 also showed cytotoxic activity against Renca cells. The cytotoxicity of splenic cells from Renca-bearing mice treated with OK-432 was lost almost completely for both Renca and YAC-1 cells after in vitro treatment with anti-asialo GM1 antibody, and was partially lost after in vitro treatment with anti-Thy-1,2 antibody. Additionally, in vivo i.p. administration of anti-asialo GM1 antibody significantly counteracted the effect of OK-432 on survival. These findings demonstrated that Renca cells were NK-sensitive and that the i.p. administration of OK-432 was beneficial for the prevention of the spontaneous metastasis of Renca carcinoma. As the effectors, NK cells played a dominant role and activated T cells were also involved.

Key words: Renca, BRMs, OK-432

要旨: BALB/c マウス自然発生腎細胞癌(Renca)を用いて, BRMsの一つである OK-432の抗腫瘍効果を検討した。同種マウスの左腎被膜下に移植された Renca は, 移植局所の増殖に伴い移植後 8 日目以降に腹部リンパ節, 肺, 肝, 脾, 消化管および腹壁に転移し, マウスは移植後42日以内に癌死した。OK-432の腹腔内投与は移植局所の腫瘍増殖に対する抑制効果や組織学的変化を示さなかったが, 有意な転移抑制と延命効果を示した。また, 移植後 7 日目の腫瘍移植腎摘出は延命効果を示さず, OK-432の抗腫瘍効果にも影響を与えなかった。

OK-432を投与された Renca 移植マウスの脾細胞は, Renca 細胞とともに YAC-1細胞と EL-4細胞を傷害し, この effector 細胞は, asialo GMI または Thy-1, 2の表面マーカーを持つ細胞群であった。一方, OK-432を腹腔内投与された正常マウスの脾細胞は, YAC-1細胞のみならず Renca 細胞をも傷害し

た。さらに, 抗 asialo GM1抗体の腹腔内投与は, OK-432の延命効果を障害した。

以上より, Renca 実験系において OK-432は著明な転移抑制効果および延命効果を示し, その effector としては NK 細胞が主体であるが, 活性化 T 細胞も関与することが示唆された。

キーワード: Renca, BRMs, OK-432

緒 言

腎細胞癌患者は, 初診時にかなりの頻度で転移を伴い, 治癒的腎摘除術例でも長期観察で60%以上に転移を認める¹⁾。一方, 腎細胞癌の治療は摘出手術が主体で, 進行症例に対する現行のホルモン療法, 化学療法および免疫療法の効果は限られている。従って, 腎細胞癌患者の予後向上には, 早期発見とともに, 治癒的手術後の転移再発の抑制, すなわち手術時既に生体内に散布されている少数の癌細胞の増殖阻止と退縮を標的とした治療が不可避な課題である。今回, ヒト腎細胞癌の臨床像に類似した転移進展を呈するマウス腎細胞癌の実験系に対し, 本邦の代表的な生物反応修飾物質(BRMs)の一つで, 各種サイトカイン誘導薬剤として注目されているレンサ球菌製剤, OK-432^{2)~4)}の抗腫瘍効果を検討したので, 若干の文献的考察を加え報告する。

材料および方法

1. 動物および腫瘍系

動物は, 6~8 週齢の雌性 BALB/c マウス(日本クレア)を使用した。腫瘍は, Dr. R.H. Wiltout (National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility, USA)より恵与されたマウス腎細胞癌(Renca)を使用した。この腫瘍系は, BALB/c マウスの腎皮質における自然発生腺癌で, 未分化で極めて悪性度の高い細胞形態を呈し, ヒト腎細胞癌の dark cell subtype に相応する⁵⁾。

in vivo 抗腫瘍実験には, BALB/c マウスの腎において継代維持している Renca 細胞を使用した。

in vitro 細胞傷害試験には, in vitro でそれぞれ継代維持している Renca, A 系マウス由来の NK(natural killer)感受性白血病細胞 YAC-1, C57BL/6マウス由来の LAK (lymphokine activated killer) 感受性白血病細胞 EL-4および BALB/c マウス由来の NK 非感受性肉腫細胞 Meth-A を標的細胞に用いた。培地は炭酸水素ナトリウム (1mg/ml), Hepes (10mM), L-グルタミン (300μg/ml), ストレプトマイシン (100μg/l), ペニシリン G カリウム (100単位/ml) および10%牛胎児血清を加えた RPMI 1640 (Gibco) を使用した。

2. BRM および投与方法

OK-432 (Picibanil[®], 中外製薬より供与) は, 熱およびペニシリン処理された A 群レンサ球菌 Su 株 (ATCC 21060 3 型)の菌体製剤であり⁶⁾⁷⁾, 各実験とも 0.1mg を0.1ml の生理食塩水に溶解し, 隔日 3 回, 腹腔内に投与した。なお対照として, 0.1ml の生理食塩水を連日 5 回, 腹腔内に投与した。

3. 腫瘍移植および実験系の検討

in vivo にて継代中の Renca を摘出し, 細切後にステンレススチールメッシュ (50メッシュ) で濾過し, さらに18ゲージ注射針で単離し, 腫瘍細胞浮遊液 (5 × 10⁵細胞/0.04ml) を作製した。ネブタール麻酔下にマウスの左側腹部を切開し, Elkins⁸⁾の腎被膜下移植法に準じ 5 × 10⁵細胞の Renca を左腎に移植し, マウスの生存日数を測定した (n=30)。さらに, 移植後 7, 14, 21および28日目に頸椎脱臼により屠殺したマウスと経過観察中に癌死したマウスに対し剖検を行い, 移植腫瘍の直径および重量を測定し, 各臓器の腫瘍転移を肉眼的および組織学的に検索した (総 n=70)。

4. in vivo 抗腫瘍実験

i. 投与量の検討

Renca 移植後 2 日目より OK-432を0.05, 0.1および 0.2mg/マウスの各量ずつ投与し, 各群の生存日数を比較検討した (各群 n=10)。

ii. 投与時期の検討

Renca 移植後 2, 8 および15日目の各時期より OK-432を0.1mg/マウス投与し, 各群の生存日数を比較検討した (各群 n=10)。

iii. 腎摘併用効果の検討

Renca 移植後 7 日目に麻酔下に左腎を摘出し, さらに腎摘翌日より OK-432を0.1mg/マウス投与し, 各群の生存日数を比較検討した (各群 n=10)。

iv. 移植局所の腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果ならびに組織学的効果の検討

Renca 移植後 2 日目より OK-432を0.1mg/マウス投与し, 移植後21および28日目に剖検を行い, 移植腫瘍径, 重量および各臓器転移率を測定した。さらに病理組織学所見により抗腫瘍効果を検討した (各群 n=20)。

5. in vitro 細胞傷害試験

Renca 移植マウス (5 頭) に移植後 2 日目より OK-432 を 0.1mg/マウス投与し、移植後 7 日目に脾を摘出収集し浮遊細胞とした後に、マウス・リンパ球比重分離液 (M-SMF, 比重 1.090 ± 0.001 , JIMRO) を用いた比重遠心法により単球核を分離した (1×10^4 個/ μ l)。この脾細胞を effector とし、Renca, YAC-1, Meth-A および EL-4 の各標的細胞 (1×10^4 個/ 4μ l) に対する細胞傷害活性を測定した。一方、正常マウス (5 頭) に OK-432 を 0.1mg/マウス投与し、投与終了翌日に同様に脾細胞を採取し、その Renca および YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。なお、各標的細胞は放射性クロム酸ナトリウム ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, 第一ラジオアイソトープ研究所, 814319) で標識し、傷害活性は 4 時間反応による ^{51}Cr 遊離量を well type counter (ARC-351, Aloca) を用いて測定した。これらの実験はすべて triplicate で行い、細胞傷害を以下のごとく算出した。

Cytotoxicity (%) =

$$\frac{(\text{実験}^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{自然}^{51}\text{Cr 遊離量})(\text{cpm})}{(\text{最大}^{51}\text{Cr 遊離量} - \text{自然}^{51}\text{Cr 遊離量})(\text{cpm})} \times 100$$

6. effector 細胞の解析

5 に準じ採取した OK-432 投与後の Renca 移植マウス脾細胞より、プラスチックシャーレ法およびナイロンウールカラム法で B 細胞および単球を除去した。これにより得た細胞を、抗マウス T 細胞抗体 (anti-Thy-1.2, Cedarlane, CL8959) または抗 asialo GM1 抗体 (和光純薬, Code No. 014-09801) で 0°C, 40 分間、さらに補体 (Low-Tox-M Rabbit Complement, Cedarlane, CL3051) で 36°C, 40 分間処理し、Renca および YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。

7. in vivo 抗 asialo GM1 抗体投与

正常マウスに 20 倍希釈の抗 asialo GM1 抗体を 0.1 ml/マウス、隔日 3 回、腹腔内投与し、加えて同時に OK-432 を 0.2mg/マウス投与し (各群 $n=5$)。5. の方法に準じ各群より採取した脾細胞の YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。一方、Renca 移植マウスに対し移植後 2 日目より 20 倍希釈の抗 asialo GM1 抗体を 0.1ml/マウス、隔日 3 回、腹腔内投与し、加えて同時に OK-432 を 0.2mg/マウス投与し、各群の生存日数を比較した (各群 $n=10$)。

8. 統計学的検討

生存日数の比較は generalized Wilcoxon test により、細胞傷害試験および移植局所での腫瘍増殖抑制効果の検討は Student's t-test により、また転移抑制効果

の検討は chisquare test により行った。

結 果

1. Renca 移植マウスの生存日数、移植局所の腫瘍増殖および臓器転移 (図 1, 2, 3 および表 1)。

Renca 移植マウスは、移植後 42 日目まで 30 頭総てが癌死し、その平均生存日数は 32.7 日であった。腫瘍は、移植後 7 日目には腎被膜下にその生着および増殖が肉眼的に 100% 確認され、その後、腎実質へ浸潤しつつ経目的に増殖し、29 日目以降にはほぼ腹腔全体を占拠するほどに腫大した。また、腫瘍転移は移植後 8 日目以降に認め、14, 21, 28 および 42 日目の転移率は、腹部リンパ節ではそれぞれ 10, 50, 70 および 100 各%, 肝ではそれぞれ 0, 0, 30 および 60 各%, 肺ではそれぞれ 0, 15, 40 および 50 各%, 脾ではそれぞれ 0, 20, 40 および 60 各%, 消化管または腹壁ではそれぞれ 0, 45, 55 および 70 各% であった。しかし、対側の右腎には転移を認めなかった。

図 1 Renca (5×10^5 細胞) 左腎被膜下移植後 28 日目におけるマウス剖検像: 移植局所での著明な腫瘍増殖 (▲) と肺 (a), 肝 (b), 脾 (c) および消化管漿膜 (d) に転移を認める。

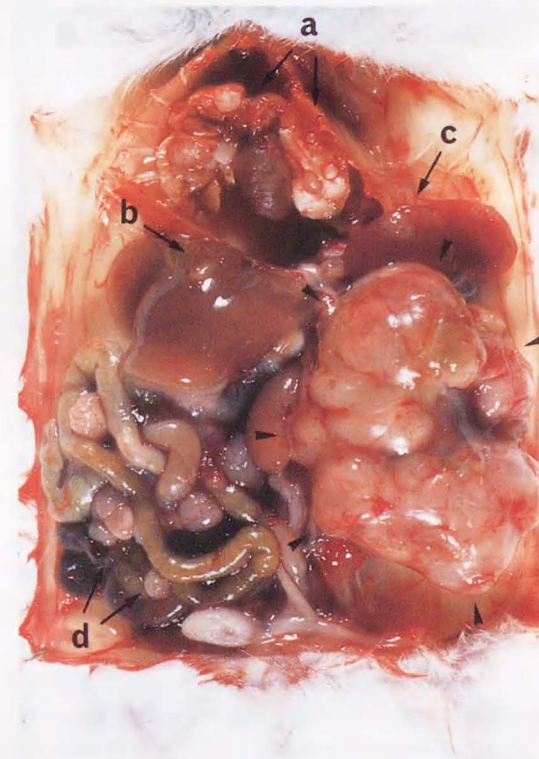


表 1 移植局所の腫瘍増殖および各臓器転移

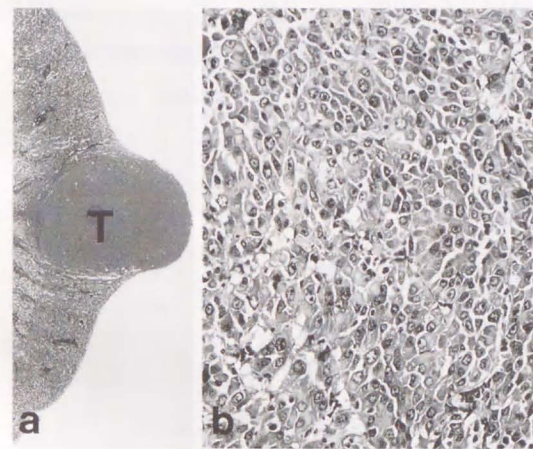
病期	Renca 移植 ¹⁾ 後日数	マウス 頭数	死亡率 (%)	移植局所の腫瘍増殖		各臓器転移率 (%) ²⁾					
				重量 (g)	径 (mm)	腹部 リンパ節	肝	肺	脾	消化管 および 腹壁	右腎
Stage I	≤ 7	10	0	—	1.6	0	0	0	0	0	0
Stage II	8—14	10	0	0.1	2.3	10.0	0	0	0	0	0
Stage III	15—21	20	0	0.8	11	50.0	0	15.0	20.0	45.0	0
	22—28	20	40	2.2	17	70.0	30.0	40.0	40.0	55.0	0
	29—42	10	100	2.5	24	100	60.0	50.0	60.0	70.0	0

¹⁾ 5×10^5 細胞/マウス

²⁾ 肉眼的および病理組織学的に確認

図 2a 移植後 7 日目における移植局所の腫瘍増殖像: 左腎被膜下に移植した腫瘍 (T) の増殖は、実質にも及んでいる。ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 12$ 。

図 2b 図 2a の組織像: 腫瘍は充実型の構築を示し、胞体は暗く染まり、大小不同の核を有する。ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 250$ 。



なお、便宜上転移のない移植後 1～7 日目を Stage I, 腹部リンパ節転移のみを認める 8～14 日目を Stage II, 遠隔転移を認める 15 日目以降を Stage III に病期分類した。

2. in vivo における OK-432 の抗腫瘍効果

i. 投与量と延命効果 (図 4)

対照群では、腫瘍移植後 40 日目までに総て死亡したのに対し、治癒生存は得られなかったものの、0.05, 0.1 および 0.2mg/マウスの各 OK-432 投与群のいずれも生存日数の有意 ($p < 0.01$) の延長を認めた。各時間の対比では、0.1 および 0.2mg/マウス投与群は、0.05 mg/マウス投与群との間に有意 ($p < 0.05$) の差異を認

図 3 肺転移像: 肺に孤立性の腫瘍巣 (T) を認める。組織並びに細胞の形態は移植局所の腫瘍 (図 2b) と同様である。ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 100$ 。

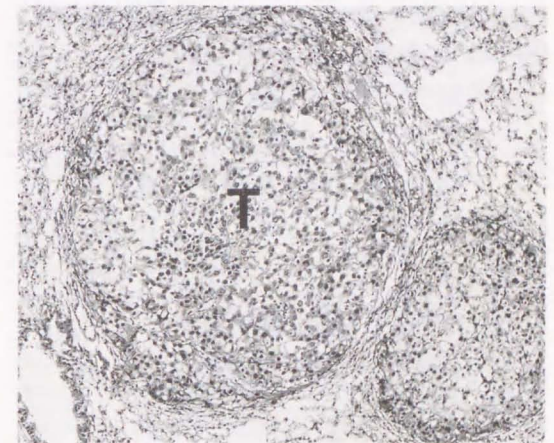
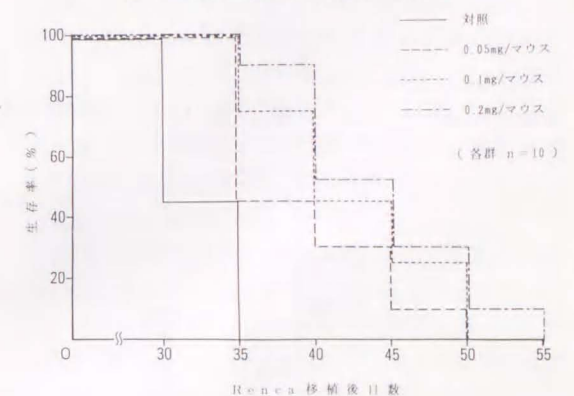


図 4 OK-432 の投与量と延命効果。



めたが、0.1 と 0.2mg/マウス投与群との間には有意の差異を認めなかった。

ii. 投与時期と延命効果 (図5)

移植後2および8日目に投与を開始した群 (Stage I および Stage II 投与群) の生存日数は、対照群に比較して有意 ($p < 0.01$) の延長を認めたが、両治療群間に有意の差異はなかった。移植後15日目に投与を開始した群 (Stage III 投与群) は、有意の延命効果を認めなかった。

iii. 腫瘍移植腎摘出と延命効果 (図6)

手術死を除いた腫瘍移植腎摘出群 ($n=10$) の生存日数は、対照群に比較して有意の延長を認めなかった。また、腎摘後に OK-432 投与を行った群 ($n=10$) の生存日数は、OK-432 投与単独群に比較し有意の差異を認めなかった。

iv. 移植局所の腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果 (図7および8)

対照群に対する OK-432 投与群の移植腫瘍重量および平均径は、腫瘍移植後21日目では $0.9 \pm 0.3g$ および $12.0 \pm 2.1mm$ に対し、 $0.7 \pm 0.4g$ および $9.7 \pm 2.8mm$

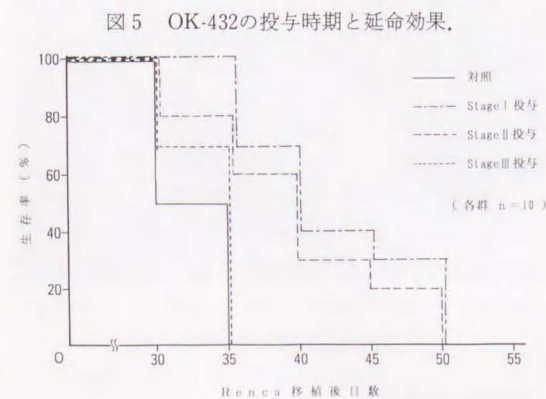


図5 OK-432の投与時期と延命効果.

であり、また移植後28日目では $2.4 \pm 0.6g$ および $20.0 \pm 2.3mm$ に対し、 $2.2 \pm 0.7g$ および $18.0 \pm 3.1mm$ であり、いずれも有意の差異は認めなかった。

一方、対照群に対する OK-432 投与群の移植後21および28日目における臓器転移率は、腹部リンパ節では

図6 腫瘍移植腎摘出およびOK-432投与併用による延命効果.

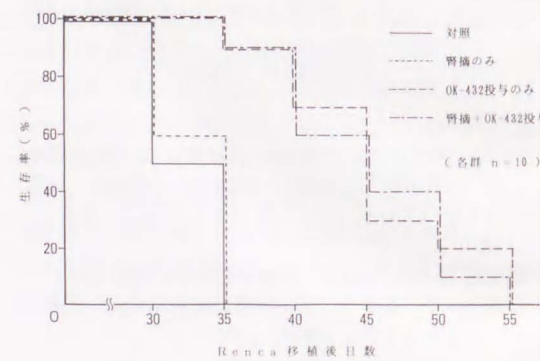


図7 OK-432の移植局所における腫瘍増殖抑制効果.

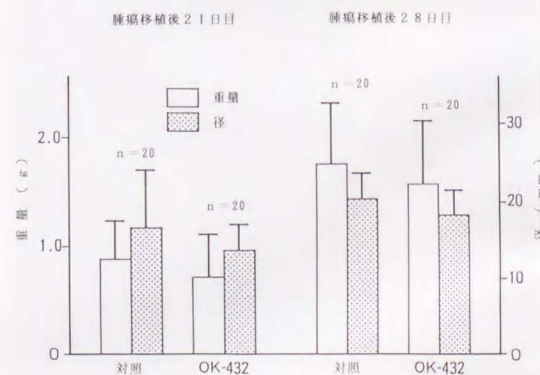


図8 OK-432の転移抑制効果.

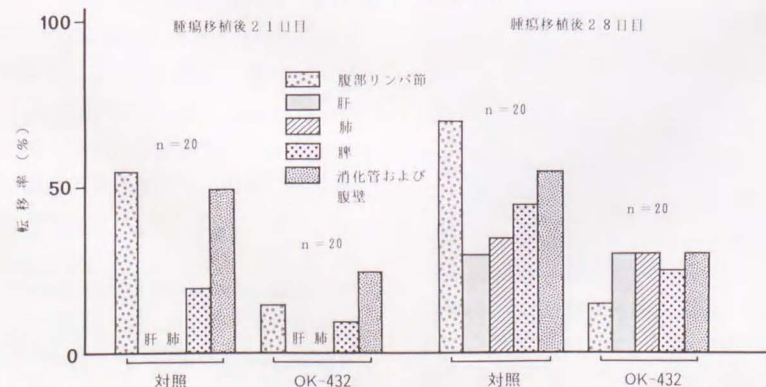


図9 OK-432を投与された Renca 移植マウス脾細胞の各種瘍に対する細胞傷害活性.

治療	E/T 比	細胞傷害活性* (%)											
		Renca			YAC-1			Meth-A			EL-4		
		5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
生食 (対照)	100:1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
OK-432	100:1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* 4hr ^{51}Cr 放出試験

図10 OK-432を投与された正常マウス脾細胞の細胞傷害活性.

治療	E/T 比	細胞傷害活性* (%)			
		Renca		YAC-1	
		10	20	10	20
生食 (対照)	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10
OK-432	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10

* 4hr ^{51}Cr 放出試験

図11 抗体および補体処理による effector 細胞の解析.

処理	E/T 比	細胞傷害活性* (%)			
		Renca		YAC-1	
		10	20	10	20
未処理	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10
抗Thy1.2抗体 + 補体	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10
抗asialoGM1抗体 + 補体	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10
補体	100:1	10	10	10	10
	50:1	10	10	10	10

* 4hr ^{51}Cr 放出試験

55および70%に対し15および15%, 脾では20および45%に対し10および25%, また、消化管および腹壁では50および55%に対し25および30%であり、いずれも有意 ($p < 0.05$) の差異を認めた。しかし、対照群に対する OK-432 投与群の移植後28日目における肝および肺転移率は、30および35%に対し30および30%と有意の差異を認めなかった。

3. 病理組織学的所見

OK-432 投与群における移植局所の腫瘍および各転移巣の組織学的所見は、対照群と比較し変化を認めなかった。

4. in vitro における OK-432 投与マウス脾細胞の抗腫瘍活性 (図9および10)

OK-432 を投与された Renca 移植マウス脾細胞の Renca 細胞に対する細胞傷害活性は、対照群の $8.4 \pm 1.8\%$ に比し、 $17.9 \pm 3.2\%$ と有意 ($p < 0.01$) の増強を認めた。同様に、YAC-1 細胞に対し、OK-432 投与群 ($18.1 \pm 4.5\%$) は対照群 ($8.1 \pm 1.7\%$) に比較し約2倍の細胞傷害活性を認めた。さらに、EL-4 細胞に対し

でも、OK-432 投与群 ($13.2 \pm 1.0\%$) は対照群 ($1.8 \pm 1.1\%$) には認められなかった細胞傷害活性を認めた。しかし、Meth-A 細胞に対しては細胞傷害を認めなかった。一方、OK-432 を投与された正常マウス脾細胞の Renca および YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性は、 $17.3 \pm 1.8\%$ および $19.1 \pm 4.2\%$ であり、Renca 移植マウス脾細胞と同程度の細胞傷害を示した。

5. effector 細胞の性状 (図11)

OK-432 を投与された Renca 移植マウス脾細胞の Renca 細胞に対する細胞傷害活性は、脾細胞よりプラスチックおよびナイロンウール付着細胞を除いても変化せず、脾細胞を抗 Thy-1, 2 抗体と補体で処理すると約30%減少し、抗 asialo GM1 抗体と補体で処理すると約90%減少した。また、YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性は、脾細胞を抗 Thy-1, 2 抗体と補体で処理すると約50%減少し、抗 asialo GM1 抗体と補体で処理すると

図12 抗 asialo GM1抗体およびOK-432の in vivo 投与における正常マウス脾細胞のNK活性。

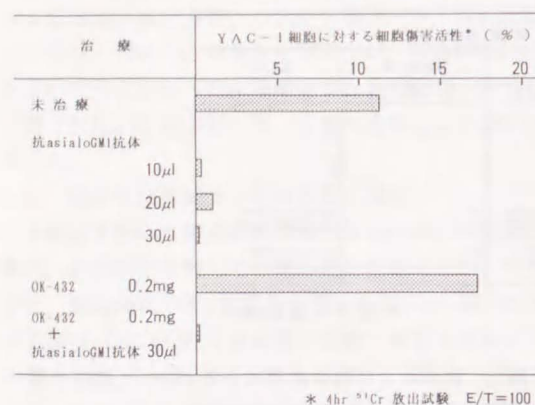
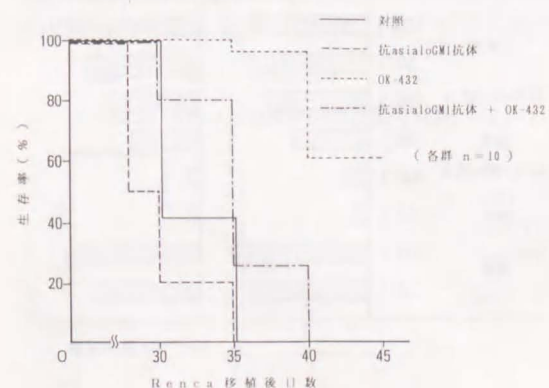


図13 抗 asialo GM1抗体 in vivo 投与がOK-432の延命効果に与える影響。



殆ど消失した。

6. 抗 asialo GM1抗体の in vivo 投与が抗腫瘍効果に与える影響 (図12および13)

正常マウス脾細胞の YAC-1細胞に対する細胞傷害活性は、抗 asialo GM1抗体の腹腔内投与により殆ど消失し、OK-432投与を加えても回復しないことを確認した。また、Renca 移植マウスの生存日数は、抗 asialo GM1抗体投与により有意 ($p < 0.05$) に短縮したが、OK-432投与を加えると有意 ($p < 0.05$) の延長を示した。しかし、OK-432単独投与に比較し、この場合の生存日数は有意 ($p < 0.01$) の短縮を示した。

考 察

今回の実験に用いたマウス腎細胞癌 Renca は、本邦では使用した実験報告はないが、下記のごとく治療実験系として数々の利点を有しており、Wiltout ら^{9)~11)}

の報告を始めとした抗癌剤、BRMs および養子免疫療法等の抗腫瘍効果の検討に用いられている。第一に、Renca はマウスにおける自然発生癌であり、かつ同系マウスの腎被膜下への移植が可能で、さらに増殖により腹部リンパ節、肺、肝、脾、および消化管漿膜等への広範な転移を形成することから、ヒト腎細胞癌の臨床像に極めて類似した実験系の作製が可能である。つまり、ヒト腎細胞癌に近い病期分類や、原発巣摘除としての移植腎摘出を行うことにより、各病期ごとの治療効果や、原発巣または転移巣に対する抗腫瘍効果を検討することが可能である。さらに、対照腎への転移がなく腎不全を呈さないことも、治療実験系として優れている。第二に、この実験系では自然発生の転移形成をとるため、腫瘍細胞を静脈内に投与する他の転移実験系に比べて全転移過程をより正確に再現し、また、腫瘍転移を伴う宿主の免疫監視機構の状態よりも自然な形で表現する。従って、BRMs 等の転移抑制効果の検討に用いる場合、より正確な免疫学的機序の解析が可能である。今回、実験を開始するにあたり、まず移植後 Renca の進展および転移状態を追試し、以上に述べた病期進展および実験系の特性を確認した。

Renca 実験系を用いての OK-432の抗腫瘍効果に関する検討は未だ報告がない。今回の実験において、Renca 腎被膜下移植マウスに対し、既に肝、肺等の遠隔転移を有する時期での OK-432の隔日3回、腹腔内投与は生存日数の延長は認めなかったが、転移形成前または腹部リンパ節転移のみの時期における投与では生存日数の有意の延命効果を認めたことから、投与時期に限定はあったものの OK-432の Renca に対する抗腫瘍延命効果が示された。また、剖検による検討で、転移形成前の OK-432投与は腹部リンパ節、脾、消化管および腹壁転移を著明に抑制したことから、その転移抑制効果も示された。一方、移植局所の腫瘍増殖に対しては抑制効果を認めず、さらには、転移形成前の腫瘍移植腎摘出では延命効果はなく、かつ OK-432の延命効果にも影響を与えなかった。従って、OK-432の Renca 移植マウスに対する延命効果は、移植局所の腫瘍増殖抑制によるものではなく、腹部リンパ節転移等に対する転移抑制作用によるものと考えられた。また、投与量による延命効果の比較では必ずしも用量依存性を示さなかったことから、今回の抗腫瘍効果は OK-432の持つ免疫賦活作用に基づいたものと推察した。

本邦で研究開発された OK-432⁶⁾⁷⁾に対し、近年、サイ

トカイン誘起剤 (multi-cytokine inducer) としての役割が注目されている。すなわち、担癌生体への OK-432の投与により、まず抗腫瘍性マクロファージが誘導され³⁾、このマクロファージ由来のインターロイキン 1 (IL-1) と腫瘍抗原提示によりヘルパー T 細胞が刺激され¹²⁾、T リンパ球よりインターフェロン γ (IFN- γ)、IL-2および好中球活性化因子 (NAF) が誘起される²⁾。続いて IFN- γ を介し NK 細胞および細胞障害性 T 細胞 (CTL) が¹³⁾¹⁴⁾、IL-2を介し LAK 細胞が¹⁵⁾、さらに NAF を介し抗腫瘍性好中球が分化誘導される¹⁶⁾。従って、OK-432の抗腫瘍効果は、これらの順次分化誘導される細胞群による宿主介在の効果により説明されている。また、OK-432はマクロファージより腫瘍壊死因子 (TNF) を誘導することも知られている⁴⁾¹⁷⁾。

今回の実験において、OK-432を投与された Renca 移植マウスの脾細胞は、自己腫瘍細胞に加え YAC-1 および EL-4細胞に対して抗腫瘍活性を示した。しかし、Meth-A 細胞には細胞傷害を示さなかった。また、この Renca および YAC-1 細胞に対する細胞傷害は、in vitro での抗 Thy-1、2抗体処理によりその一部が、また抗 asialo GM1抗体処理によりその殆どが抑制された。一方、OK-432を投与された正常マウスの脾細胞も Renca 細胞に対して抗腫瘍活性を示し、また、in vivo での抗 asialo GM1抗体投与は、Renca 移植マウスの生存日数を短縮させ、かつ、OK-432の延命効果をも抑制した。以上により、Renca は NK 細胞感受性株であり、その移植マウスにおける OK-432の抗腫瘍効果は、asialo GM1陽性で YAC-1細胞に細胞傷害を示す細胞、すなわち NK 細胞の活性増強が主体をなし、さらに Thy-1、2、陽性で EL-4細胞にも細胞傷害を示したことから活性化 T 細胞の関与も示唆された。

腫瘍転移抑制を担当する effector 細胞が因子として、NK 細胞がその主役をなしている可能性についての報告がなされている。Hanna ら¹⁸⁾は、C57BL マウスでの B16メラノーマ実験系において、NK 活性の低い生後3週齢では、NK 活性の高い生後6週齢に比較し、移植腫瘍の転移率が高いことを、また、Gorelik ら¹⁹⁾は、同実験系において、抗 asialo GM1抗体の投与により肺転移率が著明に増加し、通常では生じない肝転移も認められることを報告した。さらに、Barlozzari ら²⁰⁾は、抗 asialo GM1抗体を投与されたラットにおいて NK 細胞の移入により、転移抑制が回復したことを報告した。一方、Salup ら⁹⁾は、Renca 実験系において、BRMs の一つである MVE-2 (maleic anhydride

divinyl ether) の投与によりマウスの NK 活性を増強すると転移が抑制され、抗 asialo GM1抗体の投与により NK 活性を抑制すると転移率が増加することを報告している。これらの報告は、今回の実験の結果を支持するものである。

しかし、今回の実験では、OK-432は Renca 移植マウスに対し転移抑制効果と延命効果を示したものの、移植局所の腫瘍増殖抑制や組織学的な変性効果は得られず、またその延命も移植後50日程度であり、治癒生存させることはできなかった。Saito ら¹⁵⁾は、OK-432により完全治癒が得られたマウス腹水型腫瘍 BAMC-1の実験系において、OK-432投与により初期の活性化マクロファージおよび LAK 様細胞の誘導に加え、後期では CTL 細胞が誘導されたと報告している。従って、今回の実験においては、前述のごとく OK-432投与により NK 細胞のほかに活性化 T 細胞の関与が示唆されたが、CTL は誘導されなかったためその抗腫瘍効果が限られ、治癒生存を得ることができなかったと推測した。近年、複数の BRMs の併用効果が期待されているが、藤岡ら²¹⁾は、NK 非感受性腫瘍 Meth-A の実験系において、OK-432と rIL-2の併用により再移植された同種腫瘍の生着が阻止され、長期生存が得られたと報告している。また、Hornung ら²²⁾は、Renca 実験系において、インターフェロン誘起剤であるフラボン酢酸と rIL-2の併用により治癒することに成功している。従って、Renca 実験系に対し OK-432を用いて治癒を得るためには、今後 IL-2等の他の BRMs との併用も検討すべきであると思われる。

結 語

マウス自然発生腎細胞癌 Renca の実験系において、OK-432の抗腫瘍効果を検討した。

1. OK-432は、Renca 移植マウスにおいて転移形成前もしくは転移早期に投与を開始した場合に延命効果を示し、この抗腫瘍効果は、転移抑制に基づくものと示唆された。

2. OK-432投与は、Renca に病理組織学的変化を与えなかった。

3. OK-432を投与された Renca 移植マウス脾細胞は、in vitro で自己腫瘍に加え YAC-1および EL-4細胞に対し細胞傷害活性を示した。

4. OK-432を投与された Renca 移植マウス脾細胞の自己腫瘍に対する effector 細胞は、asialo GM1陽性および Thy-1、2陽性であった。

5. 抗 asialo GM1抗体の in vivo 投与により、マウ

ス脾細胞のNK活性は消失し、かつ、Renca 移植マウスにおけるOK-432の延命効果も著明に障害された。

なお、本論文の要旨は第26回日本癌治療学会総会(1988年9月、新潟)、第21回国際泌尿器科学会総会(1988年10月、プエノスアイレス)において報告した。

稿を終えるにあたり、御指導を賜った大堀勉岩手医科大学学長(前泌尿器科学講座、教授)、ならびに久保隆教授に深く感謝の意を表します。さらに、組織所見について御教示頂いた里館良一教授ならびに田村元先生(病理学第2講座)に深く感謝致します。最後に、本研究全体にわたり直接御指導頂いた藤岡知昭助教授に心からの謝意を表します。

文 献

- 1) 里見佳昭, 仙賀 裕, 福田百邦, 中橋 満, 西村隆一, 大島博幸, 近藤猪一郎, 吉邑貞夫, 福島修司, 古畑哲彦, 石塚栄一, 福岡 洋: 腎癌患者の10年生存率及び10年以上生存例の検討. 日泌尿会誌, 75, 118—125, 1984.
- 2) Wakasugi, H., Kasahara, T., Minato, N., Hamuro, J., Miyata, M. and Morioka, Y.: In vitro potentiation of human natural killer activity by a streptococcal preparation, OK-432: Interferon and interleukin-2 in the stimulation with OK-432. J. Natl. Cancer Inst., 69, 807—812, 1982.
- 3) Kawaguchi, T., Suematsu, H., Koizumi, M., Mitsui, H., Suzuki, S., Matsumoto, T., Ogawa, H. and Nomoto, K.: Activation of macrophage function by intraperitoneal administration of the streptococcal antitumor agent, OK-432. Immunopharmac., 6, 177—189, 1983.
- 4) Fujioka, T., Tanji, S., Koike, H., Kumagai, K., Kubo, T. and Ohhori, T.: Endogenous production of tumor necrosis factor and interferon-gamma in patients with renal cell carcinoma by the streptococcal preparation OK-432, in International Society of Urology Reports, Immunotherapy of Urological Tumors, ed., p. 299—308, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1990.
- 5) Murphy, G.P. and Hrushesky, W.J.: A murine renal cell carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., 50, 1013—1025, 1973.
- 6) Okamoto, H., Shoin, S. and Minami, M.: Experimental anticancer studies. Part XXX. Factors influencing the streptolysin-S forming ability of streptococci having anticancer activity. Jpn. J. Exp. Med., 36, 161—174, 1966.
- 7) Okamoto, H., Minami, M. and Shoin, S.: Experimental anticancer studies. Part XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. Jpn. J. Exp. Med., 36, 175—186, 1966.
- 8) Elkins, W.L.: Invasion and destruction of homologous kidney by locally inoculated lymphoid cells. J. Exp. Med., 120, 329—359, 1964.
- 9) Salup, R.R., Herberman, R.B. and Wiltrodt, R. H.: Role of natural killer activity in development of spontaneous metastases in murine renal cancer. J. Urol., 134, 1236—1241, 1985.
- 10) Salup, R.R. and Wiltrodt, R.H.: Adjuvant immunotherapy of established murine renal cancer by interleukin-2 stimulated cytotoxic lymphocytes. Cancer Res., 46, 3358—3363, 1986.
- 11) Wiltrodt, R.H., Salup, R.R.: Adoptive immunotherapy in combination with chemotherapy for cancer treatment. Prog. Exp. Tumor Res., 32, 128—153, 1988.
- 12) Farrar, W.L., Mizel, S.B. and Farrar, J.J.: Participation of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell response. J. Immunol., 124, 1371—1377, 1980.
- 13) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. and Okumura, K.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. J. Natl. Cancer Inst., 65, 1265—1269, 1980.
- 14) Hojo, H. and Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rat by a streptococcus preparation (OK-432). GANN, 72, 692—699, 1981.
- 15) Saito, M., Ichimura, O., Kataoka, M., Moriya, Y., Uno, K., Sugawara, Y., Nanjo, M. and Ishida, N.: Pronounced antitumor effect of LAK-like cells induced in the peritoneal cavity of mice after intraperitoneal injection of OK-432, a killed streptococcal preparation. Cancer Immunol. Immunother., 22, 161—168, 1986.
- 16) Watabe, S., Sando, F., Kimura, S. and Arai, S.: Activation of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by in vivo administration of a streptococcal preparation, OK-432. J. Natl. Cancer Inst., 72, 1365—1370, 1984.
- 17) Yamamoto, A., Nagamuta, M., Usami, H., Sugawara, Y., Watanabe, N., Niitsu, Y. and Urushizaki, I.: Production of cytotoxic factor into mouse peritoneal fluid by OK-432, a streptococcal preparation. Immunology Letters 11, 83—88, 1985.
- 18) Hanna, N. and Burton, R.C.: Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. J. Immunol., 127, 1754—1758, 1981.
- 19) Gorelik, E., Wiltrodt, R.H., Okumura, K., Habu, S. and Herberman, R.B.: Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. Int. J. Cancer, 30, 107—112, 1982.
- 20) Barlozzari, T., Reynolds, C.W. and Herberman, R.B.: In vivo role of natural killer cells: Involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM₁-treated rats. J. Immunol., 131, 1024—1027, 1983.
- 21) 藤岡知昭, 白石正彦, 丹治 進, 小池博之, 熊谷幸三, 久保 隆, 大堀 勉: OK-432 と遺伝子組換えインターロイキン2のマウス実験腫瘍に対する併用効果. 日癌治, 24, 948—956, 1989.
- 22) Hornung, R.I., Back, T.C., Zaharko, D.S., Urba, W.J., Longo, D.L. and Wiltrodt, R.H.: Augmentation of natural killer activity, induction of IFN and development tumor immunity during the successful treatment of established murine renal cancer using flavone acetic acid and IL-2. J. Immunol., 141, 3671—3679, 1988.

(1991年1月28日受理, 特別掲載)

