

OK-432 脾臓内投与における抗腫瘍効果の実験的研究

奈良県立医科大学第1外科学教室

佐道三郎

ANTI-TUMOR EFFECT ON INTRASPLENIC INJECTION OF A STREPTOCOCCAL PREPARATION, OK-432

SABURO SADO

The 1st Department of Surgery, Nara Medical University

Received January 31, 1990

Summary: It is known that a streptococcal preparation, OK-432, is able to induce cytotoxic activity in vivo, and that the spleen has large amounts of immune response cells. Thus the therapeutic efficacy of splenic administration of OK-432 was examined.

Intrasplenic injection of OK-432 inhibited tumor growth in tumor bearing mice and prolonged the survival rate in metastasis model compared with no injection or intramuscular injection. It was attributed to the cytotoxic activity acquired by splenocyte directly injected with OK-432.

These results indicate the effectiveness of intrasplenic injection of OK-432. Intrasplenic injection is considered suitable for clinical application allowing the operation in vitro, too, whereas it has so far been necessary to induce tumoricidal cells in vivo.

Index Terms

BRM, immunotherapy, OK-432, intrasplenic injection

I 緒言

Biological Response Modifier (BRM)の一つであるOK-432は、臨床応用されてからの期間も長く、その効果も様々な方向から検討、報告されている。その中でも、natural killer(NK)活性を中心とした細胞性免疫を介する効果は、癌治療における重要な要素とされ、今後もその癌治療の可能性は広く発展するものと考えられている。一方、lymphokine activated killer cell (LAK)療法を中心とした養子免疫療法は実験的、臨床的に強い抗腫瘍効果が認められている。しかし、移入する細胞数の絶対数が少ないなどの問題が残されており今後の課題であろう。そこでOK-432が生体内において細胞性免疫能を活性化することから、特に免疫応答細胞の豊富な脾臓に着目し、OK-432脾臓内直接投与を中心に、投与経路別抗腫瘍効果について、実験的検討を行った。

II 材料および方法

1) 実験動物

日本チャールズ・リバー研究所より購入した雌性7週齢のC3H/HeNマウス320匹(平均体重20g)を用いた。

2) 脾細胞

C3H/HeNマウスの脾をホモジュナイズしnylon meshを通しsingle cell化した。さらにTris-NH₄Cl溶液にて赤血球を浸透圧的に破壊し、Hanks' balanced salt solution (HBSS)にて3回洗浄することにより得た。

3) 実験腫瘍

C3H/HeNマウス由来、腹腔内で継代したX-5563形質細胞腫と、フラスコ内で継代培養されたYAC-1, lymphomaを使用した。

4) OK-432投与経路の設定

OK-432の投与経路は以下の4群に分けて検討した。

I群：大腿筋肉内（以後筋肉内）注入群

II群：腹腔内注入群

III群：脾臓内注入群

IV群：無投与，コントロール群

脾臓内注入を行うためにすべての群のマウスに前処置を加えた。つまり，エーテル麻酔下に左側腹部より開腹し，脾臓を腹腔外に取り出した。この脾臓を皮下結合組織を剥離して作ったスペースに有茎に授動し閉腹する。約一週間経過し，脾臓が皮下に定着したマウスを使用した。

注入量は0.05 mlとし，26G ツベルクリン針にて，経皮的に脾内に bolus injection で注入した。

5) in vivo 抗腫瘍効果の検討

a) 腫瘍増大抑制能

腫瘍増大抑制能は X-5563 2×10^6 をマウスの背部皮内に接種し，これにより生じる背部腫瘍の長径と短径の平均径を求め，この腫瘍平均径の X-5563 接種日からの経時的変化により判定した。

b) Winn type 腫瘍中和能の検討

X-5563 担癌マウスにおける脾細胞の OK-432 投与経路別抗腫瘍効果を Winn type 中和 assay にて検討した。つまりマウスに X-5563, 1×10^6 を背部皮内に接種し，接種翌日より先に示した4群の投与方法にて OK-432, 0.005KE/0.05 ml を接種13日目まで隔日に注入する。接種14日目に脾臓を取り出し，得られた脾細胞 2×10^7 を効果細胞とし，OK-432 投与方法別に X-5563 2×10^6 とで 0.1 ml の HBSS に混和し (E/T ratio 100:1)¹⁾ 背部皮内に接種する。接種後の背部腫瘍の経時的変化を測定した。

c) 転移抑制能モデルにおける延命効果

X-5563 1×10^6 をマウスの背部皮内に接種し，10日目に背部に生じた腫瘍を切除する。マウスはこの時点で，肺，肝などに微小転移が生じており，約25日後に全例死亡する。転移抑制能は，このマウスの腫瘍切除後の生存率にて検討した。

6) in vitro 抗腫瘍効果の検討

a) 細胞培養完全培地 (Complete Medium: CM)

CMは10% fetal calf serum (FCS), 1mM 4-[2-hydroxy-ethyl]-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), penicilinG 100U/ml, streptomycin 50pg/ml を RPMI1640 溶液に溶解することにより作成した。

b) 標的細胞

標的細胞として腫瘍細胞 2.5×10^6 個を 0.5 ml の培養液に浮遊し，これに $100 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}_2\text{O}_4$ (New Eng-

land Nuclear Corporation 製) を加え 37°C , 5% CO_2 の培養器に静置し，15分ごとに静かな攪拌をくわえ，60分間反応させた後3回洗浄したものを使用した。

c) 効果細胞

C3H/HeN マウスの脾より得られた脾細胞を OK-432 0.01KE/ml, 0.1KE/ml, 1KE/ml の濃度で添加した CM にて 5% CO_2 , 37°C の条件下で 18 時間培養し効果細胞として使用した。

d) 効果判定

標的細胞 2.5×10^4 に対し効果細胞と標的細胞の比 (E/T ratio) が 50:1, 25:1, 12.5:1 となるように効果細胞を 96 穴丸底マイクロプレート (コーニング社製) に総量が 0.2 ml となるように3検体ずつ (triplicate) 注入し， 37°C , 5% CO_2 の条件下にて 4 時間培養した。さらにマイクロプレートを 1300rpm/min にて 20 分間遠沈し上清 0.1 ml に含まれる ^{51}Cr 放射活性を γ シンチレーションカウンターにてカウントした。% cytotoxicity は次式により算出された。

$$\% \text{cytotoxicity} = 100 \times$$

実験遊離群 (c.p.m.) - 自然遊離群 (c.p.m.)

最大遊離群 (c.p.m.) - 自然遊離群 (c.p.m.)

なお自然遊離群は腫瘍細胞液 0.1 ml に 0.1 ml の CM を加えたものとし，最大遊離群は腫瘍細胞液 0.1 ml に 0.1 ml の 5% sodium dodecyl sulfate を加えたものとした。実験は triplicate とした。

III 結 果

1) OK-432 1 回投与量の決定

投与経路別抗腫瘍効果を検討するに先立って，OK-432 の 1 回投与量を腫瘍増大抑制能から決定した。まず OK-432 の筋肉内投与によって検討した。OK-432 の 1 回投与量は 0.05 KE, 0.01 KE, 0.005 KE とし 0.05 ml の生食水に溶解したものを X-5563 接種後 2 日目，4 日目，6 日目に大腿筋肉内に注入した。さらに脾臓内注入群も作成し筋肉内投与群と同様に OK-432 の注入を行った。

a) 筋肉内投与群における投与量別抗腫瘍効果

Fig.1 に示すように，OK-432 筋肉内投与において，X-5563 接種後 22 日目の平均腫瘍径は，OK-432, 0.05 KE 投与群で 12.4 ± 9.0 mm, 0.01 KE 投与群で 16.4 ± 10.4 mm, 0.005 KE 投与群で 17.4 ± 9.6 mm また無投与群で 20.1 ± 6.2 mm と有意差は認められなかったが，0.05 KE 投与群は，無投与群，0.01 KE, 0.005 KE 投与群に比べ，強い抗腫瘍効果が認められた。また，0.005 KE 投与群は，無投与群と比較し，ほとんど抗腫瘍効果が認められなかった。

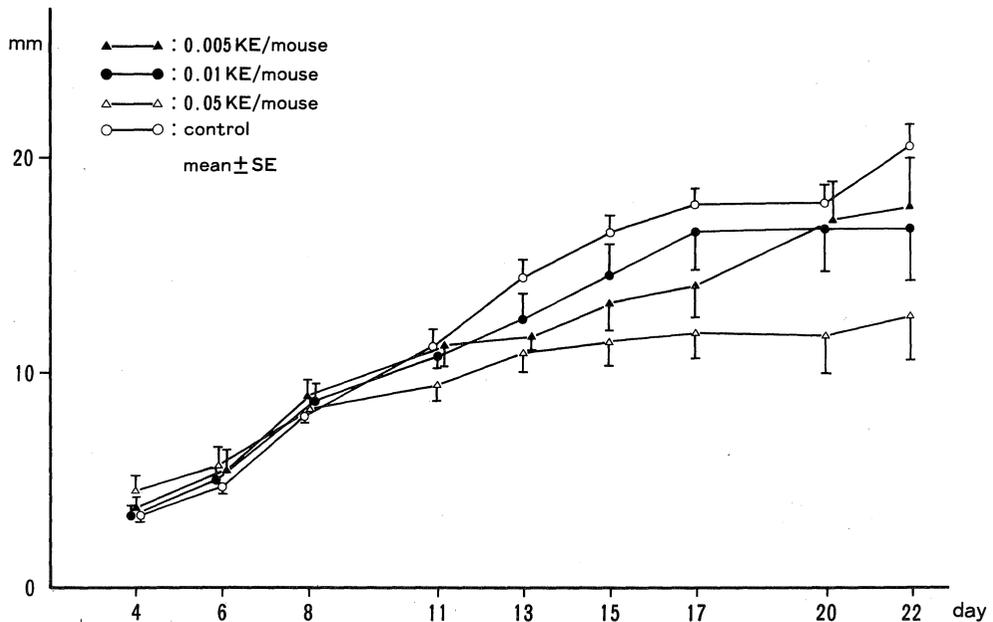


Fig. 1. Inhibitory effect on X-5563 tumor bearing mice following therapy of OK-432 intramuscular injection.

b) 脾臓内投与群における投与量別抗腫瘍効果

OK-432 脾臓内投与では、Fig.2 に示すように X-5563 接種後 22 日目の腫瘍径は OK-432, 0.05 KE 投与群で 14.6 ± 10.3 mm, 0.01 KE 投与群で 20.3 ± 4.2 mm, 0.005 KE 投与群で 11.5 ± 3.2 mm, 無投与群 20.1 ± 6.2 mm と OK-432, 0.005 KE 投与群は、無投与群と比較して、有意に腫瘍増大抑制能が認められた ($p < 0.05$)。なお、0.05 KE 投与群は、無投与群と比較して増大抑制能が認められたが、有意差はなかった。

この二つの実験結果から、OK-432 の 1 回投与量を、0.005 KE/0.05 ml に設定し、投与経路別抗腫瘍効果を比較検討した。

2) OK-432 投与経路別抗腫瘍効果の検討

a) 腫瘍増大抑制能による検討

1) の実験結果から、OK-432 の 1 回投与量を 0.005 KE/0.05 ml (OK-432 溶液の濃度は 0.1 KE/ml とする) とし、投与経路を先に示した I 群(筋肉内投与)、II 群(腹腔内投与)、III 群(脾臓内投与)、IV 群(無投与)の 4 群 ($n=6$) に対し、OK-432, 0.005 KE/0.05 ml を X-5563 接種後 2 日目、4 日目、6 日目にそれぞれの経路から注入し、腫瘍増大抑制能にて検討した。結果は、Fig.3 に示すように、X-5563 接種後、21 日目の腫瘍径は、III 群で 9.1 ± 7.7 mm と IV 群 20.0 ± 3.7 mm, I 群 18.1 ± 6.2 mm に比

べ、有意に腫瘍増大抑制能が認められ ($p < 0.05$)、II 群は 11.7 ± 5.9 mm と、IV 群に比べ、有意に抑制能が認められた ($p < 0.05$)。I 群にはほとんど腫瘍増大抑制能が認められなかった。

以上より、腹腔内投与、脾臓内投与に強い抗腫瘍効果が認められ、なかでも脾臓内投与は、より強い効果が得られる可能性が示唆された。

b) Winn type 腫瘍中和能の検討

X-5563 担癌マウスにおける脾細胞の OK-432 投与経路別抗腫瘍効果を Winn type 中和 assay にて検討した。その結果、接種後の背部腫瘍の増大は Fig.4 に示すように接種後 28 日目で III 群が 4.3 ± 6.1 mm, I 群が 12.7 ± 7.9 mm, II 群が 9.7 ± 9.7 mm, IV 群が 10.5 ± 10.8 mm で有意差は認めなかったが III 群が他の群に比較して高い抗腫瘍活性を獲得していると想像された。また X-5563 の背部皮下への生着率では、注入した X-5563 の細胞数が 2×10^6 とほぼ全例生着する数であるにもかかわらず、III 群 33.3%, II 群 57.1%, I 群 77.7%, IV 群 57.1%, であった。

c) 転移抑制能による検討

前処置として脾臓授動を行ったマウスから先に述べた転移モデルを作成する。この転移モデルに対し、腫瘍切除後 2 日目、4 日目、6 日目に OK-432, 0.005 KE/0.05 ml

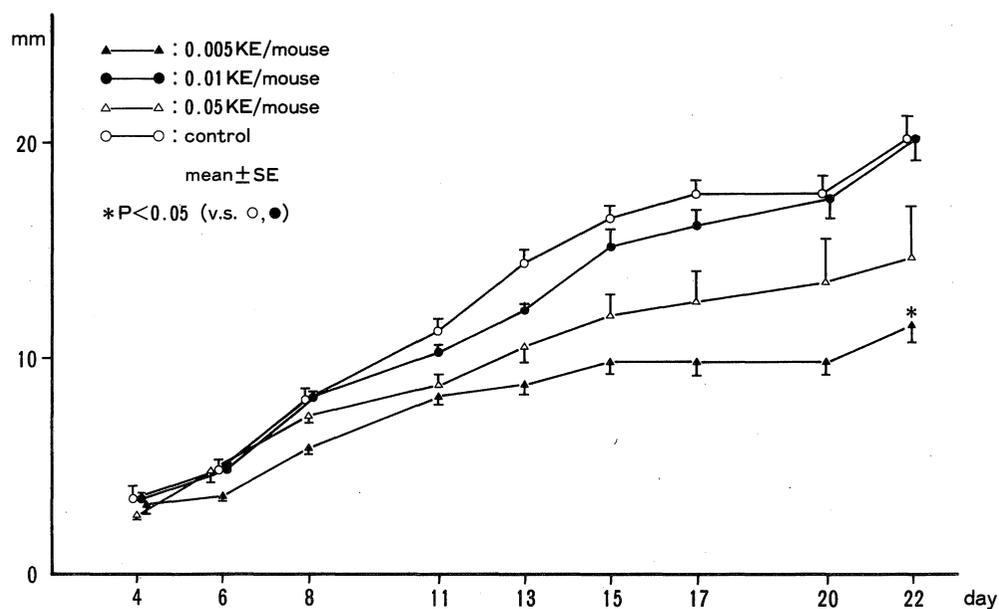


Fig. 2. Inhibitory effect on X-5563 tumor bearing mice following therapy of OK-432 intrasplenic injection.

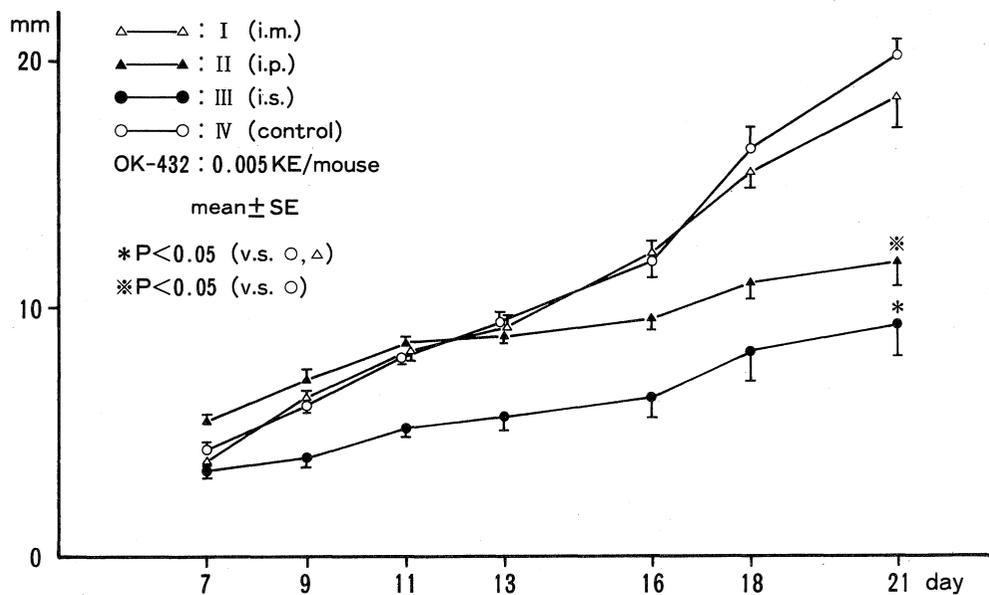


Fig. 3. Inhibitory effect on X-5563 tumor bearing mice following therapy with various routes of OK-432 administration.

i.m. : intramuscular injection i.p. : intraperitoneal injection
i.s. : intrasplenic injection control : no injection

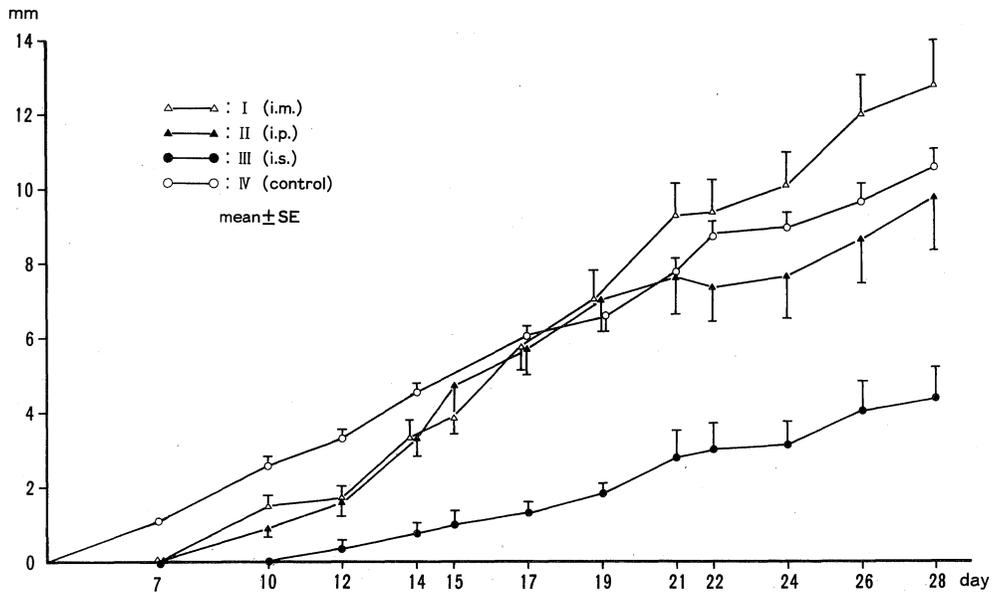


Fig. 4. Augmented cytotoxic activity of splenocytes in tumor bearing mice after OK-432 administration. (Winn type neutralization assay)

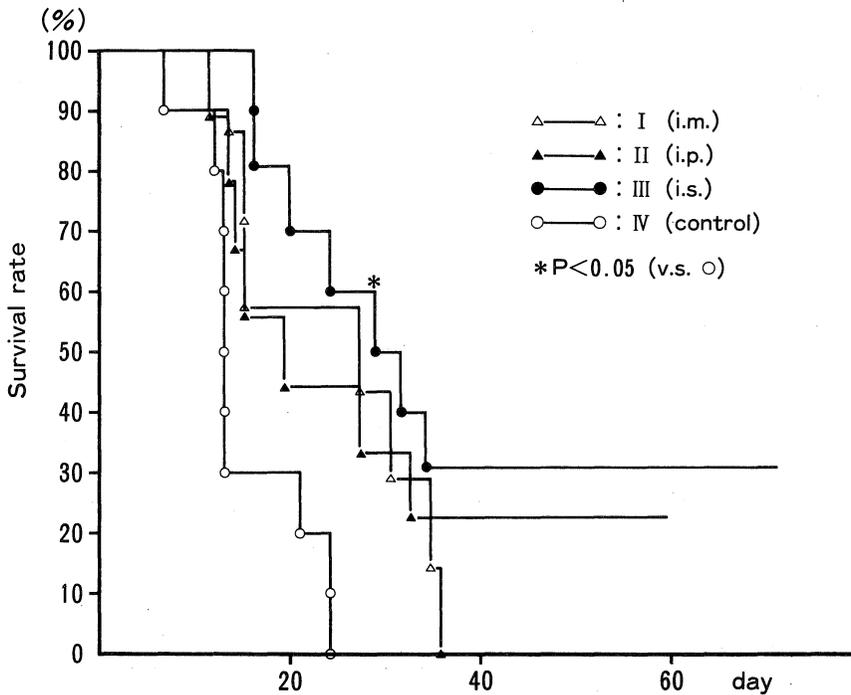


Fig. 5. Survival rate of mice bearing X-5563 metastasis following therapy with various routes of OK-432 administration.

を先に示した4群の経路から投与し、腫瘍切除後の生存日数を求めた。Fig.5は腫瘍切除後の投与経路別生存率をKaplan Meier法にて示したものである。IV群は、30日以内に全例死亡したが、III群は、30日目の生存率が60.0%と有意に生存率の上昇が認められた ($p<0.05$)。また、I群は28.5%、II群においても33.3%と生存率の上昇が認められた。

3) in vitroでの抗腫瘍活性

a) 抗 X-5563 活性

X-5563を標的細胞として行ったin vitro cytotoxic assayではFig.6に示すようにOK-432、0.01KE/mlの濃度で培養した脾細胞はE/T ratio 50:1において $4.6 \pm 0.6\%$ とOK-432無添加の $1.9 \pm 0.3\%$ に比べてわずかの% cytotoxicityの上昇がみられるのみであった。しかし、0.1KE/mlの濃度では、E/T ratio 50:1で $13.8 \pm 2.0\%$ と上昇しており、またOK-432の濃度を1KE/mlにしたときもE/T ratio 50:1、 $6.6 \pm 0.9\%$ 、25:1で $9.8 \pm 0.6\%$ と% cytotoxicityの上昇がみられた。つまり、マウス脾細胞はOK-432と共に培養することにより、X-5563に対する cytotoxic activity を獲得し、OK-432の濃度依存性に活性が上昇するのではなく、OK-432濃度が0.1KE/ml付近のときに最も強い活性を得られると考えられた。

b) NK 活性

YAC-1を標的細胞にした assay では、Fig.7に示すよ

うにE/Tratio 50:1、OK-432濃度が0.01KE/mlで% cytotoxicity $38.4 \pm 2.0\%$ 、0.1KE/mlで $26.8 \pm 3.2\%$ 、1KE/mlで $20.1 \pm 3.4\%$ でありOK-432無添加の $6.8 \pm 1.1\%$ に比較して、cytotoxicityの上昇がみられた。このことからどちらの腫瘍に対しても抗腫瘍活性は獲得しているが、X-5563を標的細胞にした場合では0.01KE/ml、YMC-1を標的細胞にした場合では0.01KE/mlと最も強い活性を得るためのOK-432至適濃度に違いがみられた。

IV 考 察

悪性腫瘍の治療には外科的療法、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法などがあるが、外科的療法はもっとも確実に効果的な方法である。しかし、切除不能進行例や再発例など手術療法が不可能な症例もあり、これらの治療には外科的療法以外の治療法にたよるしかない。なかでも免疫療法はこのような症例に対する補助療法として期待され、LAK細胞や特異的KillerT細胞の応用は、養子免疫療法 (adoptive immunotherapy: AIT)として研究され注目を集めている¹⁾。RosenbergらはLAK細胞投与と同時にIL-2を補充投与することで効果を高める工夫を行ってきた²⁾。また、腫瘍局所に浸潤してきたリンパ球であるTIL (tumor infiltrating lymphocyte)はLAK細胞より強い効果が誘導される前駆細胞として注目されてきた^{3,4)}。しかし養子免疫療法で

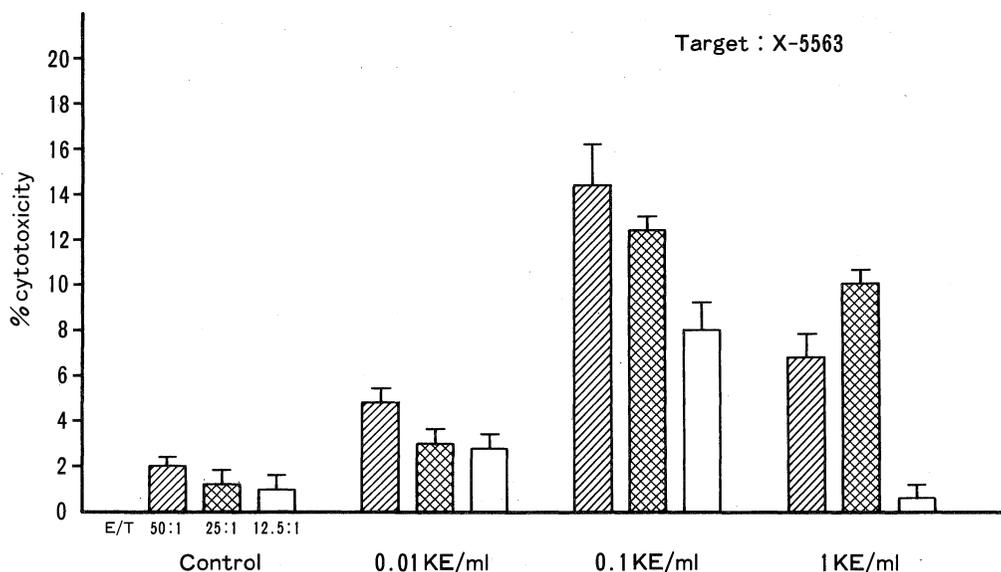


Fig. 6. Killer activity of murine splenocyte incubated with OK-432 for 18 hours. (^{51}Cr release assay, Target: X-5563)

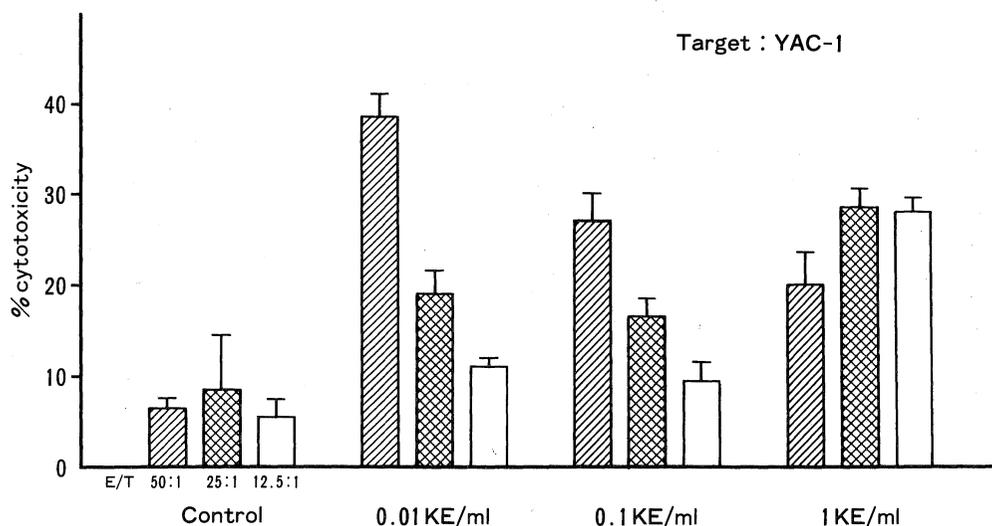


Fig. 7. Killer activity of murine splenocyte incubated with OK-432 for 18 hours. (^{51}Cr release assay, Target: YAC-1)

は効果細胞を得るには *in vitro* での操作が必要であり、腫瘍塊となった癌細胞を攻撃するに十分な数の効果細胞を得るには多大な労力と費用を要することが問題とされる。

溶連菌製剤である OK-432 は BRM の一つとして広く臨床に応用され、治療上の有用性もよく示されている。その作用機序についてこれまでも多数の報告があり多彩な機序が明らかになりつつある。これまでの研究では、初期から考えられている直接効果⁹⁾だけでなく、古くは PHA, ConA の幼若化反応の変動に基づいた効果による⁷⁾との研究があり、次第に腫瘍の発生と進展に対する免疫能にかかわってくるものが解明されてきた。つまりそれは、NK 活性の増強⁹⁾¹⁰⁾、マクロファージの活性化¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、細胞障害性 T 細胞の誘導¹⁵⁾¹⁶⁾、suppressor T 細胞の抑制、好中球の活性化¹⁷⁾、好中球活性化因子の増強¹⁸⁾など、多数の細胞性免疫機構を活性化することである。さらに interferon¹⁹⁾²⁰⁾ (INF), tumor necrosis factor²¹⁾ (TNF), natural killer activating factor²²⁾²³⁾ (NKAF), などの液性因子の産生刺激にも関与することが報告されている。

その代表的な作用として *in vitro* において NK 活性を上昇させ、臨床的に癌患者の生存期間を延長する⁷⁾²⁴⁾ことが Uchida らにより報告されている。また癌性腹水や癌性胸水に対しては、OK-432 の局所への直接投与が腫瘍細胞数の減少や腹水量の減少に効果があると報告されており、この効果は主に活性化された好中球やマク

ファージが作用すると考えられている²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾

このように、OK-432 により誘導される抗腫瘍効果は *in vivo* において活性化されたリンパ球やマクロファージを介した細胞性免疫が主体となった効果であると考えられる。そこで、このような効果をもとに OK-432 を直接担癌生体に投与することで *in vitro* での煩雑な操作をなくし、しかも前駆細胞が豊富な脾臓に直接投与することにより、大量の効果細胞を得ることを想定し、実験的研究を行った。

OK-432 の投与量別の抗腫瘍効果を筋肉内投与で検討すると、0.05KE/0.05 ml-0.005KE/0.05 ml の間では、濃度依存的に効果の増強がみられた。ところが、脾臓内投与では 0.005KE/0.05 ml の最小濃度においても明らかな効果が得られた。このことは OK-432 の X-5563 に対する抗腫瘍効果を示す至適濃度は投与経路によって異なることを示している。そこでさらに投与経路を脾臓内投与と、これに比較検討する目的で筋肉内投与、腹腔内投与とともに OK-432 無投与群を設定し 0.005KE/0.05 ml を投与し比較検討した。この結果、腫瘍増大抑制能、転移抑制能のいずれにおいても脾臓内注入における OK-432 の効果はほかの投与方法より少ない投与量で優れた効果を示した。

臨床的に従来からの投与方法がおもに皮内投与である理由は、最初に効果が確認された静注に比較して、皮内注が副作用が少ないこと、さらに副作用が少ないにもかかわらず、PHA, Con A 幼若化反応において静注とあまり差

がなかったことによる⁷⁾。これは皮下の網内系を刺激するという発想から生まれた考えであり、それをさらに発展させた研究も行われている。たとえば、OK-432の腫瘍内投与はTILを中心とした局所での免疫細胞に直接働きかけてより有効な効果を得ようという試みであり、有効例も報告されている²⁸⁾。またOK-432の経口投与は、パイエル板を中心としたgut associated lymphoid tissueに着目し、これらの免疫能を効率よく利用しようという試みである²⁹⁾³⁰⁾。今回の研究はOK-432の効率の良い作用発現のための試みとして、脾臓に着目し良好な成績を得た。

脾臓内投与がより有効であった理由を検討するにはOK-432の作用が多様であるためにいろいろな方面から考えるべきだが、その一つとしてOK-432投与後のマウス脾細胞の細胞障害活性の変化を投与方法別にWinn type 中和 assay で検討した。この結果、OK-432脾臓内投与群の脾細胞の細胞障害活性は、他の投与経路群の脾細胞の細胞障害活性に比較して活性が上昇している傾向を認めた。つまり、OK-432を直接脾臓に投与することにより、脾細胞は他の投与方法より抗腫瘍活性を持つ細胞が強く誘導されたと考えられる。

さらに脾臓に投与されたOK-432は門脈内にも流入し抗腫瘍活性を持つ因子の誘導を促し、肝とそれを取りまく門脈系の豊富な免疫能を有効に利用することが可能である。また脾臓内で活性化された細胞も肝に直接作用すると想像される。つまり、消化器癌の切除不能な症例に対しては塞栓術³¹⁾やAIT¹⁾がおこなわれているが、このAITのin vitroでの煩雑さという欠点を補うためOK-432を脾臓内に直接投与することを考えた。これにより門脈内での抗腫瘍活性を持つ因子の誘導を効果的に促し、さらに、この誘導された因子が、門脈を通じて肝と直接接することで、肝に存在する腫瘍に対しより有効に作用すると考えられる。これらの結果から臨床的には、OK-432の脾臓内もしくは門脈内投与が効果的に宿主の免疫能を高め特に肝腫瘍に対して高い治療成績が期待される投与方法と考えられる。

さらに今回のモデルのように背部腫瘤や肺・肝転移巣などの局所での効果が、脾臓内で活性化された因子以外の作用である可能性がある。それは例えば、腫瘍増大抑制能での腹腔内投与が、筋肉内投与、無投与に比較して効果的である傾向が出ている理由として、腹腔内に誘導される活性化マクロファージや好中球が、抗腫瘍効果発現に関与していると考えられることから理解される。

それでは、in vivoにおけるOK-432の投与経路と生体内での分布³¹⁾、それにしたがった作用発現の機序の解明

が必要であるが、in vivoにおけるOK-432の投与後の分布と、細胞障害活性発現との関係はほとんど不明である。ただ、in vivoにおいてもin vitroと同様、濃度の問題も含めて細胞障害活性発現のための良い条件をどのように作り出すかが問題になってくる。それには投与経路、投与量、投与速度、投与間隔などの問題を総括した上で検討されなければならない。投与経路からいえば、他の条件を等しくした場合、脾臓内投与が他の投与方法よりも少ない投与量で抗腫瘍効果を発現することが判明した。

またOK-432の脾臓内への投与量からすると、濃度依存的には抗腫瘍効果が認められなかった。このことはOK-432の脾臓内投与による抗腫瘍効果の誘導には至適濃度があると考えられる。

in vitroにおいても、OK-432のマウス脾細胞に対する細胞障害活性の誘導を確認した。この結果マウス脾細胞はOK-432と共にin vitroで培養することでX-5563に対する細胞障害活性を獲得し、この時OK-432の濃度が0.1 KE/ml付近で最も高い活性を得られることが解った。またOK-432のNK活性増強作用⁴⁾は以前から知られているが、マウスにおけるNK感受性株であるYAC-1対しても活性の上昇がみられた。X-5563はNK非感受性の腫瘍株であるが、NK活性と同様にX-5563に対する細胞障害活性の上昇が認められることで、OK-432により非特異的な細胞障害活性がin vitroでの培養により誘導が可能であった。

ところでOK-432によるin vitroでのNK活性上昇は、濃度依存的ではなく至適濃度を超えた場合濃度の上昇につれて活性が落ちてくることがいわれている³²⁾。今回行ったYAC-1に対する細胞障害活性でも0.01 KE/mlより濃度をあげるにつれて活性が低下したため、0.01 KE/ml付近の濃度に至適濃度が存在すると考えられた。これに対し、X-5563に対する細胞障害活性は0.01 KE/ml、1 KE/mlの濃度で培養した場合に比べて0.1 KE/mlの濃度の場合に高い活性が得られた。OK-432の作用機序が先に述べたように多様であることを考えれば、細胞障害活性を得るための至適濃度の違いは、NK活性以外のautologous tumor killing activity³²⁾を持つ細胞やLAK細胞また活性化マクロファージの誘導を反映しているとも考えられる。つまりこのことはOK-432による細胞障害活性上昇に対する至適濃度の存在と、発現する作用の多様性を示唆している。

以上よりOK-432の脾臓内投与は、生体内で免疫細胞の豊富な脾臓や門脈系を直接刺激することで、従来の投与方法より強い効果が認められた。外科的療法が不可能な症例に対し、従来は煩雑な操作が必要とされたAIT

等の免疫療法が行われてきたが、今後はOK-432の脾動脈内注入や門脈内注入などの方法により、煩雑さを除き臨床応用に即した治療法となりうると考えられる。

V 結 語

溶連菌製剤OK-432の投与経路別抗腫瘍効果をC3H/HeNマウスを用い同型由来X-5563形質細胞腫を標的細胞として実験的研究を行い以下の結論を得た。

(1) *in vivo*において投与経路を筋肉内投与、腹腔内投与、脾臓内投与、無投与とし、OK-432の投与量0.005KE/0.05mlを隔日に合計3回投与で比較した。背部皮内に接種した腫瘍は、接種後21日目にはその平均腫瘍径が、脾臓内投与群で 9.1 ± 7.7 mmと筋肉内投与群 18.1 ± 6.2 mm、無投与群 20.0 ± 3.7 mm、に比べ、有意に腫瘍増大抑制能が認められた ($p < 0.05$)。

(2) マウス転移モデルにおけるOK-432脾臓内投与の効果は、無投与群は腫瘍切除後30日以内に全例死亡したが、脾臓内投与群は30日目の生存率が60.0%と有意に生存率の上昇が認められた ($p < 0.05$)。

(3) OK-432と共に培養することにより、マウス脾細胞にNK活性を誘導でき、同時にX-5563に対しても殺腫瘍活性を獲得した。

悪性腫瘍に対する免疫療法として、各種の免疫賦活剤を担癌生体に投与する方法が一般的である。その中でも、OK-432は担癌生体内で細胞性免疫能を高める作用のあるBRMとしてこれまでもさまざまな投与方法が試みられてきた。とりわけ免疫系細胞の豊富な脾臓を標的とした投与方法は、抗腫瘍活性を持つ免疫系細胞を生体内で効果的に誘導できる方法として有効な治療法となりうると考えられた。

本論文の要旨は、第16回日本臨床免疫学会総会(1988年6月、大阪)において発表した。稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました第1外科学教室中野博重教授、ならびに、御校閲、御助言を賜りました腫瘍病理学教室小西陽一教授、病態検査学教室中野博教授に深謝致します。さらに、直接の御指導、御教示を賜りました藤井久男助手、山本克彦助手、ならびに御助力をいただいた教室の諸兄に感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費(奨励研究62770977)によって行われた。

文 献

- 1) **Rosenberg, S.A.**: The development of new Immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. *Ann. Surg.* **208**: 121-135, 1988.
- 2) **Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.A., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C. and Reichert, C.M.**: A new approach to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Surgery* **100**: 262-272, 1986.
- 3) **Rosenberg, S.A., Spiess, P. and Lafreniere, R.**: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science (Wash, D.C.)* **233**: 1318-1321, 1986.
- 4) **Topalian, S.L., Solomon, D., Avis, F.P., Chang, A.E., Freeksen, D.L., Linehan, W.M., Lotze, M.T., Robertson, C.N., Seipp, C.A., Simon, P., Simpson, C.G. and Rosenberg, S.A.**: Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J. Clin. Oncol.* **6**: 839-853, 1988.
- 5) **Ono, T., Kurata, S., Wakabayashi, K., Sugawara, Y., Saito, M. and Ogawa, H.**: Inhibitory effect of streptococcal preparation (OK-432) on the murine acid synthesis in tumor cell in vitro. *Gann* **64**: 59-69, 1973.
- 6) **Sakurai, V., Tszgatoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. and Takagaki, V.**: Tumor inhibitory effect of streptococcal preparation. *Cancer chemothe. Repts.* **56** 9-17, 1972.
- 7) **Uchida, A. and Hoshino, T.**: Clinical studies on immunity in patients with malignant disease I. Effect of immunotherapy with OK-432 on lymphocyte subpopulation and phyto mitogen responsiveness in vitro. *Cancer* **45**: 476-483, 1980.
- 8) **Uchida, A. and Micksche, M.**: In vitro augmentation of natural killing activity by OK-432. *Int. J. Immunopharmac.* **3**: 365-375, 1981.
- 9) **Collota, F., Rambaldi, A., Colombo, N., Tabacchi, L., Introna, M. and Mantobani, A.**: Effect of streptococcal preparation (OK-432) on natural killer activity of tumor associated lymphoid cell in human ovarium carcinoma and on lysis of fresh ovarian tumor cell. *Br. J. Cancer* **48**: 515-

- 525, 1983.
- 10) **Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. and Okumura, K.:** Augmentation on mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation (OK-432). *J. Natl. Cancer Inst.* **65**: 1265, 1980.
 - 11) **Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. and Kikuchi, K.:** Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. *Gann* **67**: 115-119, 1976.
 - 12) **Kawaguchi, T., Suematsu, M., Koizumi, H. M., Mitsui, H., Suzuki, S., Matsuno, T., Ogawa, H. and Namoto, K.:** Activation of macrophage function by intraperitoneal administration of the streptococcal antitumor agent OK-432. *Immunopharmacology*. **6**: 177-189, 1983.
 - 13) 齊藤元男, 青沼悦子, 野田哲生, 中館一郎, 南條正季, 海老名卓三郎, 石田名香雄: OK-432の抗腫瘍効果(2) OK-432誘起活性化マクロファージの抗腫瘍性. *癌と化学療法* **10**: 1363-1371, 1978.
 - 14) 田中憲一, 鈴木利光, 大星章一: 溶連菌製剤 OK-432 処理マクロファージ 抗腫瘍性に関する研究. *癌と化学療法* **5**: 1233-1241, 1978.
 - 15) **Hojo, H. and Hashimoto, Y.:** Cytotoxic cell induced in tumor-bearing rats by a streptococcal preparation on OK-432. *Gann* **72**: 692-699, 1981.
 - 16) **Mashiba, M., Matsunaga, K. and Jimi, J.:** Effect of immunostimulants of the in vitro generation of cytotoxic lymphocyte. *Japan J. Ext. Medica* **53**: 235-241, 1983.
 - 17) **Watabe, S., Sendo, F., Kimura, S. and Arai, S.:** Activation of cytotoxic polymorphonuclear leukocyte by in vivo administration of a streptococcal preparation, OK-432. *J. Ncl.* **72**: 1365-1370, 1984.
 - 18) 安田 新, 阿部吉弘, 新沢陽英, 石川 誠, 木村青史, 井上富夫, 荒井 茂, 仙道富士郎: ヒト末梢血リンパ球(PBL)由来の細胞障害性好中球活性化因子. *消化器と免疫* **13**: 206-210, 1984.
 - 19) **Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawabe, Y. and Ishida, N.:** Induction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of streptococcus pyogenes. *Cellular Immunol.* **68**: 187-192, 1982.
 - 20) **Saito, M., Yamaguchi, T., Ebina, T., Koi, M., Aomuma, E., Usami, H. and Ishida, N.:** In vitro production of immune interferon (IFN- γ) by murine spleen cells when different sensitising are used in vivo and in vitro. *Cellular immunol.* **78**: 379-386, 1983.
 - 21) **Watanabe, N., Niitsu, Y., Yamauchi, N., Neda, H., Sone, H., Urushizaki, I., Yamamoto, A., Nagamuta, M. and Sugawara, Y.:** Therapeutic effect of OK-432 induced endogenous TNF on tumor bearing mice and cancer patient. *Immunopharmacol. & Immunotoxicol.* **10**: 53-65, 1988.
 - 22) **Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. and Osawa, T.:** Lymphokines induction by streptococcal preparation OK-432. *in Excerpta medica.* Amsterdam, p50-72. 1983.
 - 23) **Ichimura, O., Suzuki, S., Sugawara, Y. and Osawa, T.:** Characterization of mouse NKAF induced by OK-432: Evidence for interferon and IL-2 independent NK cell activation. *Br. J. Cancer* **50**: 97-108, 1984.
 - 24) **Uchida, A. and Hoshino, T.:** Reduction of suppressor cell in cancer patient treated with OK-432 immunotherapy. *Int. J. Cancer* **26**: 401-404, 1980.
 - 25) 浦田敦夫, 西村 稔, 太田和雄: OK-432による癌性胸膜炎の治療 Randomized controlled studyの成績. *癌と化学療法* **10**: 1497-1503, 1983.
 - 26) **Torisu, M., Katano, M., Kimura, Y., Itoh, H. and Takesue, F.:** New approach to management of malignant ascites with a streptococcal preparation, OK-432: 1 improvement of host immunity and prolongation of survival. *Surgery* **93**: 357-364, 1983.
 - 27) **Fujimura, M. and Torisu, M.:** Neutrophil mediated tumor cell destruction in cancer ascites: 2 OK-432 attracts killer neutrophils through activation of complement C5. *Clin. Immunol. & Immunopathol.* **43**: 174-184, 1987.
 - 28) **Tsujitani, S., Okumura, T., Baba, H., Koranaga, D., Haraguchi, M. and Sugimachi, K.:** Endoscopic intratumoral injection of OK-432 and Langerhans' cell in patient with gastric carcinoma. *Cancer* **61**: 1749-1753, 1988.
 - 29) 仁尾義則, 稲本 俊, 堀 泰祐, 菅 典道, 土谷俊晴, 児玉 宏, 戸部隆吉, 大垣和久: ビンバニール (OK-432) 経口投与の試み (第5報). *日癌治*, **20**: 597

- 607, 1985.
- 30) 仁尾義則, 大垣和久, 土谷俊晴, 今井史郎, 白石 隆, 坪野充彦, 森本秀樹, 曾振球, 戸部隆吉: ビンパニール (OK-432) 経口投与の試み (第 8 報). 日癌治, 24: 1607-1615, 1989.
- 31) 土岐博信, 石川盛寛, 藤井昌史, 湯本泰弘, 石光鉄三郎: ^{99m}Tc テクネシウム標識 OK-432 のヒト静脈内投与時の臓器分布について. 癌と化学療法 9: 2201-2206, 1982.
- 32) Uchida, A., Yamagawa, E. and Micksche, M.: In vitro and in vivo augmentation of natural killer and autotumor killing activity by OK-432. *in Excerpta Medica*. Amsterdam, p75-95, 1984.
- 33) Okamura, J., Horikawa, S., Fujiyama, T., Monden, M., Kambayashi, J., Sikujara, O., Sakurai, M., Kuroda, C., Nakamura, H. and Kosaki, G.: An appraisal of transcatheter arterial embolization combined with transcatheter arterial infusion of chemotherapeutic agent for hepatic malignancies. *World J. Surg.* 6: 352-357, 1982.