

氏 名（本籍） ぬか 額 だ 田 やす 泰 し 志

学位の種類 博 士 （ 医 学 ）

学位記番号 医 第 2 4 2 3 号

学位授与年月日 平 成 4 年 2 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最終学歴 昭 和 59 年 3 月 27 日  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 大腸癌腸間膜リンパ節転移モデルに対する OK-432 経口投与の抗腫瘍効果の検討

（主 査）

論文審査委員 教授 松 野 正 紀 教授 森 昌 造

教授 金 丸 龍之介

# 論文内容要旨

## 【緒言】

OK-432は消化器癌を中心とした悪性腫瘍患者に広く用いられているが、作用機序については不明な点も多い。近年、腸管免疫系の存在が注目されるにつれ、OK-432経口投与がいくつかの実験腫瘍において有効であるとの報告がなされているが、著者らは大腸癌のリンパ行性転移に対する治療法の確立を目的にマウス大腸癌腸間膜リンパ節転移モデルの作製を試み、同モデルにおけるOK-432経口投与の抗腫瘍効果ならびに作用機序を検討した。

## 【材料と方法】

1. 動物はBALB/cマウスを用いた。大腸癌腫瘍細胞株はCOLON-26細胞を用い、マウス腹部皮下に注入して継代を行なった。脾臓は無菌的に摘出後培地に浮遊させ、遠心分離したものを脾臓リンパ球として用いた。腸間膜リンパ節も無菌的に摘出後、培地に浮遊させ、腸間膜リンパ節リンパ球浮遊液として用いた。
2. マウス虫垂先端部リンパ濾胞にCOLON-26細胞を注入することによりモデルの作製を試みた。細胞注入後、経時的に開腹して腸間膜リンパ節転移の状況を観察後、これを摘出して病理組織学所見を検討した。
3. OK-432は滅菌生理食塩水に溶解した後、マウス用胃チューブを用いて経口投与を行った。投与スケジュールは、COLON-26細胞注入7日前より1日前まで隔日に投与するA法、注入後1日目より7日目まで隔日に投与するB法、注入後9日目より15日目まで隔日に投与するC法の3種類とし、その投与量は各投与方法とも1回当たり0.5KE, 1.0KE, 2.0KEとした。
4. WINN ASSAYはCOLON-26細胞注入後14日目の脾臓リンパ球および腸間膜リンパ節リンパ球をエフェクター細胞とし、ターゲットであるCOLON-26細胞と各比率で混合、健常マウス腹部皮下に注入して行った。抗体は抗Lyt-2.1, 抗L3/T4, 抗LFA-1の3種類のモノクローナル抗体を用い、マウスリンパ球を各抗体と反応させた後、補体処理を施してエフェクター細胞とし、WINN ASSAYに用いた。

## 【結果】

1. COLON-26細胞をマウス1匹当たり3種類の細胞数で注入し、転移状況を検討した結果、28日目の所見では、いずれの注入細胞数においても80%以上のマウスに腸間膜リンパ節転移が認められた。

2. モデルに対する OK-432経口投与の結果, 1回投与量が1.0KE および2.0KE の場合, 各投与方法においてリンパ節転移が抑制された。
3. COLON-26細胞注入後60日目における OK-432投与群の生存率は対照群に比べていずれも高かった。中でも A 法ではどの投与量においても100%であった。
4. 腸間膜リンパ節リンパ球の抗腫瘍活性を検討したところ, A, C いずれの投与方法で処理したマウスの腸間膜リンパ節リンパ球も, 腫瘍の増殖を抑制した。次いで脾臓リンパ球の抗腫瘍活性を検討したところ, A, C いずれの投与方法で処理したマウスの脾臓リンパ球も, 腫瘍の増殖を抑制したが, C 法で処理した脾臓リンパ球の腫瘍増殖抑制効果は A 法で処理した脾臓リンパ球や腸間膜リンパ節リンパ球の抑制効果に比較して軽度であった。今回の腫瘍移植系における OK-432の抗腫瘍効果は主に腸間膜リンパ節内に誘導されるエフェクター細胞によるものと考えられた。
5. 腸間膜リンパ節内に誘導されるエフェクター細胞の同定を行う目的で, A 法および C 法で処理したマウスの腸間膜リンパ節リンパ球を各種抗体と補体で処理して WINN ASSAY を行った。A 法投与群の抗 L3/T4+C', 抗 LFA-1+C'処理リンパ球では腫瘍増殖に対する抑制効果がほとんど認められなかった。C 法で処理したマウスの COLON-26細胞注入後の腸間膜リンパ節リンパ球では, 抗 L3/T4+C'処理ならびに抗 LFA-1+C'処理により抗腫瘍効果の抑制が認められたが, A 法投与群に比べると抑制は軽度であった。

### 【考 察】

COLON-26細胞をマウス虫垂先端部リンパ濾胞に注入することにより, 高率かつ特異的な大腸癌腸間膜リンパ節転移モデルの作製に成功した。このモデルに対する OK-432経口投与はいずれの投与方法においても腸間膜リンパ節転移を抑制したが, 経口投与により腸管リンパ系だけでなく宿主の全身の抗腫瘍活性を賦活化し, 癌に対する防御機構にとって有利に働くものと考えられた。そしてその効果の発現にはヘルパー/インデューサー型の T 細胞の関与が示唆された。今回の検討で, 大腸癌に対する OK-432経口投与は腸管リンパ組織を介する大腸の領域リンパ節の局所免疫応答を強く賦活化する点で他の投与方法に比べて有利であり, 大腸癌のリンパ行性転移に対する予防と治療の面で臨床的な効果が期待できるものと考えられた。

## 審査結果の要旨

OK-432 は抗腫瘍免疫賦活剤として消化器癌を中心とした悪性腫瘍患者に広く用いられている。近年、腸管免疫系の存在が注目されるにつれ、その活性化を目的とした OK-432 経口投与がいくつかの実験腫瘍系において施行され、その有効性が報告されている。しかし、その作用機序に関しては不明な点が多い。

本論文は COLON-26 細胞を用いて作成したマウス大腸癌リンパ節転移モデルに対して OK-432 経口投与を行い、その抗腫瘍効果ならびに作用機序について解析している。著者の実験系ならびに結果で特記すべきことは、第 1 に大腸癌腸間膜リンパ節転移モデルの作成に成功した点が挙げられる。COLON-26 細胞をマウス虫垂先端部リンパ濾胞に注入するユニークな手法で、28 日目には 80% 以上のマウスに腸間膜リンパ節転移が形成された。この再現性の高いモデルの確立により、今後様々な *in vivo* での治療実験を行うことが可能になった。第 2 に大腸癌腸間膜リンパ節転移モデルに対する OK-432 経口投与の結果、*in vivo* における抗腫瘍効果が腸間膜リンパ節転移に対する治療効果と生存率の改善の 2 点で証明されたことである。OK-432 の投与法の検討からは COLON-26 細胞移植前投与が特に有効であったが、移植後投与における効果も特筆すべきものであった。第 3 に OK-432 経口投与による抗腫瘍効果を発現するエフェクター細胞の性状を解析した点である。WINN ASSAY の結果、OK-432 を経口投与したマウスの脾臓ならびに腸間膜リンパ節にエフェクター細胞が存在することが証明された。また、腸間膜リンパ節リンパ球に注目してこれを各種抗体と補体で処理して WINN ASSAY を再度行った結果、抗 L3/T4+C' 処理リンパ球において抗腫瘍効果の抑制が認められ、ヘルパー/インデューサー型の T 細胞の関与が示唆された。同時に、Integrin の 1 つである LFA-1 抗原の関与も示唆された。

本論文は、これまでに殆ど報告をみない大腸癌の腸間膜リンパ節転移モデルを作成し、OK-432 経口投与が同モデルにおいてリンパ行性転移の予防と治療に極めて有効であることを明らかにするとともに、その作用機序について検討を加えて新しい知見を得ている。従って、本論文は抗癌免疫治療法としての OK-432 経口投与の確立に多くの示唆と学問的根拠を与える秀れたものであり、本研究は学位授与に値するものと認める。