

Combined Immunotherapy of Bleomycin with OK-432 and its Clinical Application for Oral Squamous Cell Carcinoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8416

OK-432・ブレオマイシン併用療法に関する基礎的検討 ならびに口腔粘膜癌への臨床応用

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任：山本悦秀教授)

能 崎 晋 一

(平成5年1月6日受付)

ブレオマイシン (bleomycin, BLM) と OK-432 を併用した免疫化学療法は、組織学的に低悪性度の口腔扁平上皮癌に対して効果的な療法であることを経験してきた。しかし、その抗腫瘍効果発現に関与する宿主介在性については、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究では両薬剤の併用効果を基礎的に明らかにする目的で、このような併用実験に頻用されているマウスの実験系であるメチルコラントレン誘発線維肉腫 Meth-A 細胞/BALA/c マウスの系を用いて、抗腫瘍効果および免疫学的パラメーターを検討した。実験には6週齢雌性の BALB/c マウスを用い、その右鼠径部皮下に同系腫瘍である Meth-A 細胞 10^6 個移植した。BLM と OK-432 の投与量、投与ルートおよびその投与時期を変化させ、担瘤マウスに投与したところ、OK-432 を腫瘍移植6日後に 50KE/kg の投与量で腫瘍内に投与した後に、BLM を腫瘍移植8日後に 100mg/kg で静脈内投与したときに最も優れた併用効果が認められた (OB 療法)。この OB 療法の効果は T 細胞の欠如したヌードマウスやマクロファージの活性を消滅させたマウスでは減弱ないしは消失したが、ナチュラルキラー細胞の活性を消滅させたマウスにおいては変化を認めなかった。OB 療法を施行した非担瘤マウスの脾臓では溶血斑形成細胞数が増加していることから、本療法が抗体産生能を増加させると考えられた。また、フローサイトメトリーで、脾細胞の T 細胞のサブセットを検討したところ、ヘルパー/インジューサー T 細胞に特異的である L3T4 陽性細胞が増加していた。したがって、OK-432 と BLM の併用療法の効果発現にはマクロファージとヘルパー T 細胞が強く関与しているとともに、口腔扁平上皮癌に対する有効な免疫化学療法になることが臨床応用例での成績と併せて示唆された。

Key words OK-432, bleomycin, immunochemotherapy, Meth-A fibrosarcoma

口腔粘膜癌に対する本邦での化学療法の歴史の中で、1966年 Umezawa ら¹⁾ によって見いだされたブレオマイシン (bleomycin, BLM) の登場は、癌化学療法単独で治癒を期待できる抗癌剤として新しい時代を開くものであった。しかし、その効果を期待するあまり、投与量が増加し肺線維症を惹起せしめた苦い経験もしてきた。その後、シスプラチンなど口腔粘膜癌にも有効な抗癌剤を中心に幾多の多剤併用療法が試みられ、奏効率は向上したが、それが必ずしも生存率の向上には貢献していないのが現状である²⁾。その理由として、抗癌剤の腫瘍制御が顕著に認められても、宿主の全身的な免疫機能の低下により、免疫的監視機構が弱まることが考えられる。このことは、治療効果や患者の日常生活の質 (quality of life, QOL) を考える上で、決して望ましい現象とは言えない。したがって、癌化学療法を行う際に、腫瘍局所に対する効果だけでなく、免疫能などを含めた宿主側の反応をも十分に考慮することが必要となる。

このように、多くの抗癌剤は一般的には免疫抑制作用を示すと考えられているが、抗癌剤の種類、投与量、投与期間、投与

時期などによっては、担瘤生体の抗腫瘍免疫を増強することが報告されている³⁾。筆者らも、日常の臨床において、少量の抗癌剤投与のみで十分な腫瘍縮小効果が認められた症例をしばしば経験している。それらの症例に対する抗癌剤の投与量から考えて、抗癌剤には直接的効果のみならず、宿主介在性の抗腫瘍効果の関与が示唆される。このような抗癌剤の免疫増強作用、すなわち、抗癌剤の生物反応修飾物質 (biological response modifier, BRM) 様作用は癌化学療法の治療効果の向上に寄与するものと考えられる。

一方、癌化学療法の効果増強を意図して、非特異的免疫療法剤と抗癌剤を併用する免疫化学療法が臨床的にも試みられるようになった。それら免疫化学療法の1つとして、Okamoto ら⁴⁾ による溶連菌の乾燥菌体製剤であるビジバニール (OK-432) と BLM を併用した BO 療法が考案されて臨床において試行されている⁵⁾。本併用療法は、サプレッサー T 細胞 (suppressor T cell) に対する抑制効果により免疫賦活作用を有するとされる BLM⁶⁾ に、種々のサイトカインを誘導する OK-432⁷⁾ を併用し、両薬剤の免疫能増強作用を相乗的に得ようとするものである。

Abbreviations: BLM, bleomycin; BRM, biological response modifier; DMSO, dimethylsulfoxide; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IL-1, interleukin 1; I.R., inhibition ratio; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; QOL, quality of life; RPMI, Roswell Park Memorial Institute

筆者らも、この考えに基づき、組織学的に低悪性度の口腔粘膜癌症例に対して、本療法を試行し、その有効性を認めている¹¹⁾。しかし、その抗腫瘍効果発現の機序、両薬剤の至適投与法など不明な点が多い。そこで、両薬剤の併用効果を明らかにする目的で、基礎的実験を行い検討した。さらに、それらの結果に基づく薬剤投与法により臨床応用を試みた。

材料および方法

1. 基礎的検討

1. 実験動物

6週齢雌性の BALB/c マウス, C3H/He マウスおよびヌードマウス [BALB/c (nu/nu)] を用いた。これらのマウスは日本チャールズリバー社 (厚木) より購入した。マウスは無病原体飼育条件下 (specific pathogen free, SPF) で滅菌飼料および滅菌水道水が自由に摂取できるようにして飼育し実験に用いた。

2. 腫瘍細胞

1) Meth-A 線維肉腫 (Meth-A)

BALB/c マウスに対して同系腫瘍であるメチルコラントレン誘発線維肉腫の Meth-A 細胞を用いて抗腫瘍性試験を行った。Meth-A 細胞は BALB/c マウスの腹腔内で継代維持した。実験に際しては、マウス腹腔内より腫瘍細胞を無菌的に採取後、細胞浮遊液を作製して用いた。

2) YAC-1 リンパ腫 (YAC-1)

A/Sn マウスに Moloney 白血病ウィルスで誘発したリンパ腫 YAC-1 細胞をナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞活性の標的細胞として用いた。YAC-1 細胞は 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Gland Island, U.S.A) とグルタミン (日水, 東京) を含んだ Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) 培地 (ニプロ, 大阪) 中で、37°C, 5% CO₂ で培養継代した。

3. 使用薬剤

BLM (日本化薬, 東京), OK-432 (中外製薬, 東京) は蒸留水にて種々の濃度にて溶解または懸濁し、マウス一匹あたり 0.1 ml 投与した。

4. 培養細胞による効果判定

Meth-A 細胞を 180 μ l の 10% FCS 加 RPMI-1640 中に 10⁴ 個となるように調整し、96 ウェルマイクロウエルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウェルに 180 μ l ずつ分注した。最終濃度が 0.1KE/ml-1KE/ml になるよう調整した OK-432 および BLM を各々 10 μ l 分注した。なお、BLM の濃度は Meth-A 細胞に対して 40-60% の増殖抑制率を示す 300 μ g/ml とした。37°C, 5% CO₂ で 72 時間培養後、各ウェルに 0.15M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で溶解した 2 mg/ml の濃度の 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma, St. Louis, U. S. A.) を 25 μ l 分注し、4 時間培養した。各ウェルの MTT ホルマザン結晶懸濁液を 1.5ml 遠心チューブ (Eppendorf, Hambrug, Germany) に移し換え、15,000rpm にて 10 分遠心後、上清を静かに吸引し、ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光純薬, 大阪) 200 μ l を加え、MTT ホルマザン結晶を溶解した。十分に溶解した後、再び元のウェルに移し換え、各ウェルの 540nm における吸光度を Immunoreader NJ-2000 (日本インターメッド, 東

京) を用いて測定した。

効果判定は、測定した吸光度より次式にて増殖抑制率 (inhibition ratio, I. R.) を算出し評価した。相乗効果および相加効果の判定は、Valeriotte ら¹²⁾ の方法に準じた。

$$I. R. (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

T: 薬剤投与群の吸光度の平均

C: 対照群の吸光度の平均

5. マウス固形腫瘍による効果判定

生理食塩水で 2 \times 10⁷ 個/ml に調整した Meth-A 細胞浮遊液 0.05ml を BALB/c マウスの右鼠径部皮下に移植し、担癌マウスとした。単独投与実験では、移植 6 日後もしくは 8 日後に、OK-432 は 50KE/kg の投与量で腹腔内投与または腫瘍内投与を、BLM は 30mg/kg または 100mg/kg の投与量で静脈内投与を行った。単独投与にて、至適投与ルートおよび至適投与量を判定後、その投与法での併用効果を判定した。一群 6 匹を使用し、効果判定は、腫瘍移植 35 日後、移植部に形成した固形腫瘍を摘出し、対照群と薬剤投与群の平均腫瘍重量より次式にて腫瘍増殖抑制率を算出した。さらに、体重を測定することにより毒性の検討も行った。

$$I. R. (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

T: 薬剤投与群の腫瘍重量の平均

C: 対照群の腫瘍重量の平均

6. OK-432 と BLM 併用による免疫能に与える影響

1) 免疫能欠如マウスにおける効果判定

OK-432 と BLM の併用効果の及ぼす宿主の免疫能の影響を検討するために、以下の実験を行った。ヌードマウスおよび抗アシアロ GM1 (和光純薬) またはシリカ (LiChrosorb[®] Si 60) (Merck, Darmstadt, Germany) を投与した BALB/c マウスを用いてそれぞれの併用効果における T 細胞, NK 細胞, マクロファージの影響を検討した。抗アシアロ GM1 は PBS にて 2 mg/ml に溶解し、一匹あたり 0.1ml を腫瘍移植 5, 8, 11, 14 日後に尾静脈より静脈内投与した。シリカは蒸留水にて 25mg/ml に懸濁し、一匹あたり 0.1ml を腫瘍移植 5 日後に静脈内投与した。効果判定はヌードマウスを用いた実験では腫瘍移植 21 日後とし、BALB/c マウスを用いた実験では 35 日後とした。

2) 脾細胞の分離

マウスより無菌的に脾臓を摘出し、ピンセットにて機械的に細切し、ステンレスメッシュを通して単細胞化した。赤血球除去用トリス緩衝液 (0.83% 塩化アンモニウム: 0.15M トリスヒドロキシメチルアミノメタン pH 7.65=9:1) にて 37°C, 5 分間処理して赤血球を除き、脾リンパ球浮遊液を得た。

3) カニンガム法¹³⁾を用いた脾細胞の抗体産生能の測定

補体のモルモット血清 (Cedarlane Lab., Ontario, Canada) は、あらかじめ氷冷下で等量の羊赤血球 (デンカ生研, 東京) と 30 分間混和し、モルモット血清中の正常抗羊赤血球溶血素を吸収しておき、遠心分離して上清を補体として用いた。

Alserver 溶液中に保存されている羊赤血球を PBS にて洗浄後、10% に調整した羊赤血球を BALB/c マウスの腹腔内に 0.1ml 投与し、感作を行った。感作 4 日後にマウスの脾臓を摘出、脾臓 1 つにつき 2 ml のハンクス液 (Hanks balanced salt solution) に脾リンパ球を浮遊させ、氷水中に保存した。この脾

リンパ球浮遊液の10倍希釈液 0.05ml に40%羊赤血球 0.05ml, ハンクス液 0.8ml, 補体としてモルモット血清 0.1mlを加えて十分混和した。直ちに、その混合液をカニンガムチャンパーに封入後、37℃で1時間補体結合反応を行い、形成した溶血斑数を数えた。脾臓一個あたりの溶血斑形成細胞数を算出して抗体産生能の指標とした。

4) 脾リンパ球サブセットの解析

10% FCS 加 RPMI-1640 にて 10^7 個/ml の BALB/c マウス脾臓よりリンパ球浮遊液を作成し、各種抗体と直接蛍光抗体法で反応させ、フローサイトメトリー (EPICS-PROFILE II) (Coulter, Hialeah, U. S. A.) にて脾リンパ球のサブセットを解析した。使用したモノクローナル抗体はフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗 Thyl.2 抗体, FITC 標識抗 Lyl2 抗体およびフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識抗 L3T4 抗体 (以上 Becton Dickinson, San Jose, U. S. A.) であった。抗体はそれぞれ25倍に希釈し実験に供した。脾リンパ球浮遊液 100 μ l と各抗体 100 μ l を十分に混和し、4℃, 60分反応させた後、0.1%アジ化ナトリウム, 1% FCS 加 PBS にて2回洗浄後、同 PBS 1ml に浮遊させ試料とした。フローサイトメトリーのサイトグラム上でリンパ球領域にゲートをかけて、それぞれの抗体の陽性細胞の割合を求めた。

5) NK 細胞活性の測定

NK 細胞活性の標的細胞として YAC-1 細胞を用いた。YAC-1 細胞は、 1×10^7 個あたり 3.7MBq の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムで37℃, 60分標識し、ハンクス液にて3回洗浄した。そのときの標識率は 8.8×10^4 cpm/ 10^6 個であった。次に、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに 5×10^4 個/ml に調整した標識 YAC-1 細胞を 100 μ l と、エフェクター細胞として 5×10^6 個/ml に調整した CH3/He マウスの脾リンパ球 100 μ l を加え、37℃, 5% CO_2 にて12時間培養した。培養液は10% FCS 加 RPMI-1640 を使用した。培養後、各ウェルより 100 μ l の上清を採取し、オートウエル γ カウンター (Arc505) (アロカ, 東京) で放射活性を測定した。自然解離は標的細胞と RPMI-1640, 最大解離は、蒸留水を加え3度凍結融解を繰り返して測定した。次式にて、NK 細胞活性を算出した。

(実験解離値 - 自然解離値 / 最大解離値 - 自然解離値) $\times 100$ (%)

7. 組織学的検討

摘出した腫瘍組織を10%ホルマリンにて固定し、常法に従いパラフィン切片を作成した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

8. 統計学的検定法

2群間の平均値の差の検定には、t検定 (Student's t-test) を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

II. 臨床的検討

1. 症例

対象とした症例は当科を受診した口腔扁平上皮癌一次症例のうち、OK-432とBLMの併用療法を施行した4例である。性別では男性1例、女性3例で、年齢は70歳から83歳までに分布し平均76.0歳と比較的高齢であった。発症部位は上顎歯肉3例、下顎歯肉1例であった。臨床病期分類ではII期 (Stage II): 2例、III期 (Stage III): 2例であった。一方、組織所見のうち分化度では高分化3例、中分化1例で、浸潤様式は全て山本-小浜

分類¹⁴⁾¹⁵⁾の2型であった。

2. 薬剤投与方法

本療法の投与スケジュールは、上記の基礎的検討結果に基づき、OK-432 先行、BLM 後続とし、その投与量は BLM では1回 15mg 静脈内点滴投与、週2回総量 90mg, また OK-432 は BLM の投与前日に 1 KE 前後の任意量を筋肉内投与または腫瘍内局所投与を行った。

3. 効果判定

臨床的腫瘍効果の判定は日本学治療学会の固形がん化学療法直接効果判定基準に準じた。効果判定は後続療法の直前とした。

4. 免疫パラメーター

本療法の免疫におよぼす影響について、化学療法開始時と終了時の末梢血中のリンパ球サブセット (T細胞, B細胞, NK細胞) の変化を指標に検討した。

成 績

I. 基礎的検討

1. 培養細胞に対する増殖抑制効果

Meth-A 細胞に対して、0.1-1 KE/ml の OK-432 の単独投与では8.2-38.3%の増殖抑制率であった。一方、BLM 300 μ g/ml を併用させた群では、45.4-65.7%の増殖抑制率を認められたが、その効果は相加的なものにとどまり、相乗効果は認められなかった (図1)。

2. マウス固形腫瘍に対する単独投与の腫瘍増殖抑制効果

腫瘍移植6日後または8日後に OK-432 を 50KE/kg 単独投与したが、腹腔内全身投与、腫瘍局所投与においても効果は認められなかった (表1)。

一方、BLM の静脈内単独投与では、100mg/kg の投与量のと

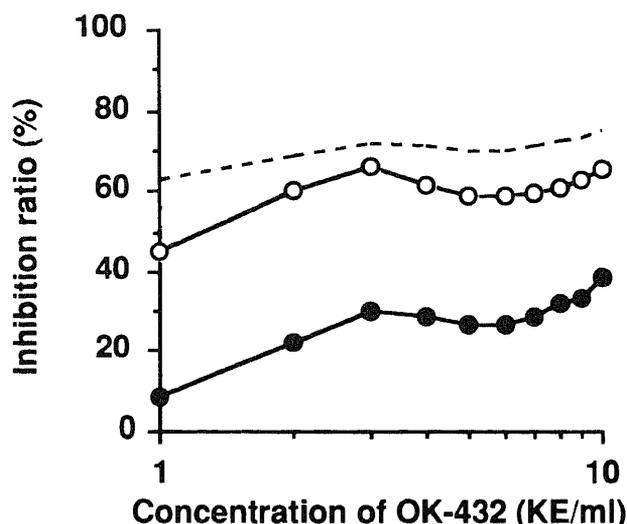


Fig. 1. Effects of combination treatment with OK-432 and bleomycin (BLM) on Meth-A fibrosarcoma. The plot symbols: ○, OK-432 and 300 μ g/ml BLM; ●, OK-432 alone. The broken line is theoretical additive effects on OK-432 and BLM. The percentage of cell growth inhibition was calculated by the following formula: Inhibition ratio = $(1 - T/C) \times 100$, where C is the mean absorbance at 540nm of the control group and T is that of the treated group.

き 20-30% の腫瘍増殖抑制率を認めた。投与量が 30mg/kg の場合には、腫瘍移植 8 日後に投与した群において効果は認められなかったが、移植 6 日後に投与すると 100mg/kg 投与時の腫瘍増殖抑制率に近似した値 28.4% を示した (表 1)。

3. 併用療法による腫瘍増殖抑制効果

1) OK-432 腹腔内投与と BLM の併用効果

OK-432 腹腔内投与と BLM 静脈内投与の併用効果の検討では、いずれのスケジュールにおいても腫瘍増殖抑制率が約 30% で、BLM 単独投与の増殖抑制率とはほぼ同様の結果であった (表 2)。

2) OK-432 腫瘍内投与と BLM の併用効果

OK-432 腫瘍内投与と BLM 静脈内投与の併用効果の検討では、BLM, 100mg/kg 投与と OK-432, 50KE/kg を併用したときに強い併用効果が認められた。特に、OK-432 腫瘍内投与を BLM 投与に先行させた群の腫瘍増殖抑制率は 62.9% で、BLM を先行投与した群の 41.3% と比べ有意な差をもって、強い併用効果を示した (表 2)。

3) OK-432 先行投与と BLM の投与間隔および OK-432 の投与量における併用効果

OK-432, 50KE/kg を腫瘍移植 6 日後に腫瘍内投与し、その後 BLM, 100mg/kg を投与するまでの投与間隔についての検討では、51.1-65.4% の腫瘍増殖抑制率で、有意差はなかった。しかし、OK-432 投与 2 日後、すなわち腫瘍移植 8 日後に BLM, 100mg/kg 投与を併用すると最も強い併用効果が認められた。この傾向は、OK-432 の腫瘍内への投与量が 10KE/kg あるいは 250KE/kg であったも、OK-432 の腫瘍内投与 2 日後、すなわち腫瘍移植 8 日後に BLM, 100mg/kg 投与を併用させ

た時に認められた。しかし、OK-432, 10KE/kg 腫瘍内投与を先行した群の併用効果は全体に弱く、46.1-56.0% の腫瘍増殖抑制率であった。OK-432, 250KE/kg 腫瘍内投与を先行した群の併用効果は、増殖抑制率が 53.2-65.2% で、OK-432, 50KE/kg 腫瘍内投与を先行した群の併用効果とはほぼ同様の結果であった (図 2)。

以上、投与量が少なくても強い併用効果を認める腫瘍移植 6 日後に OK-432, 50KE/kg 腫瘍内投与し、移植 8 日後に BLM, 100mg/kg を投与する群 (OB 療法) が最も効果的な投与方法であると考え、これを以下の実験の投与スケジュールとした。

4. OB 療法の効果発現に対する宿主免疫能の影響

1) 免疫能欠如マウスにおける併用効果

免疫担当細胞の一つである T 細胞が先天的に欠如している BALB/c (nu/nu) マウスに対する OB 療法の効果は、通常の BALB/c マウスの増殖抑制率 62.9% に比べ、その抑制率は 50.3% と効果が減弱していた。シリカを投与し、マクロファージの活性を減弱させた BALB/c マウスに対する OB 療法の増殖抑制率は 11.6% で、その効果は完全に消失していた。一方、抗アシアロ GM1 を投与し、NK 細胞活性を減弱させた BALB/c マウスに対する OB 療法の増殖抑制率は 60.3% で、通常の BALB/c マウスのものと同程度であった (表 3)。

2) 抗体産生能の解析

OB 療法の羊赤血球に対する溶血斑形成細胞数は、薬剤投与直後より高値を維持し、投与 13 日後に対照群の値に復した (図 3)。また、総脾細胞数にはほとんど変化が認められなかった。このことから、OB 療法は抗原刺激を受けた抗体産生細胞を選

Table 1. Effects of OK-432 and Bleomycin (BLM) on Meth-A fibrosarcoma subcutaneously transplanted to BALB/c mice

Drug	Dose	Administration		Tumor weight (g) mean \pm S.D. (treated/control mice)	Inhibition ratio (%)
		Route	Day		
OK-432	50 KE/kg	i. p.	6	9.35 \pm 2.13/ 8.94 \pm 2.74	-4.6
OK-432	50 KE/kg	i. p.	8	9.36 \pm 1.63/ 8.94 \pm 2.74	-4.7
OK-432	50 KE/kg	i. t.	6	11.66 \pm 3.07/ 11.82 \pm 2.17	1.4
OK-332	50 KE/kg	i. t.	8	11.43 \pm 6.18/ 11.82 \pm 2.17	3.3
BLM	100 mg/kg	i. v.	6	6.25 \pm 2.15/ 8.94 \pm 2.74	30.1
BLM	30 mg/kg	i. v.	6	6.40 \pm 2.54/ 8.94 \pm 2.74	28.4
BLM	100 mg/kg	i. v.	8	7.10 \pm 1.79/ 8.94 \pm 2.74	20.6
BLM	30 mg/kg	i. v.	8	8.64 \pm 1.34/ 8.94 \pm 2.74	3.4

Table 2. Combined effects of OK-432 and Bleomycin (BLM) on Meth-A fibrosarcoma subcutaneously transplanted to BALB/c mice

Treatment*		Tumor weight (g) Mean \pm SD (treated/control mice)	Inhibition ratio (%)
OK-432	BLM		
Day 6, i. p.	Day 8, i. v.	6.17 \pm 1.67/ 8.94 \pm 2.74	31.0
Day 8, i. p.	Day 6, i. v.	6.26 \pm 2.17/ 8.94 \pm 2.74	30.0
Day 6, i. t.	Day 8, i. v.	4.39 \pm 1.51/ 11.82 \pm 2.17	62.9
Day 8, i. t.	Day 6, i. v.	6.94 \pm 1.30/ 11.82 \pm 2.17	41.3

*OK-432 (50 KE/kg) and BLM (100 mg/kg) were administered on the indicated days and the route after the tumor inoculation.

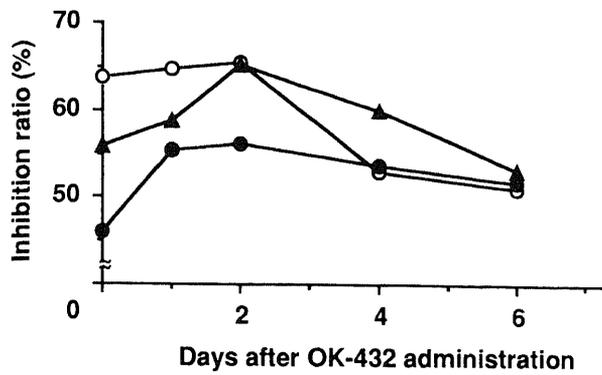


Fig. 2. Effects of timing of bleomycin administration in the combination therapy with OK-432. Meth-A fibrosarcoma cells (1×10^6) were subcutaneously inoculated on day -6 and OK-432 was administered to tumor site at doses of 10KE/kg (●), 50KE/kg (○) and 250KE/kg (▲) on day 0. BLM was intravenously administered at a dose of 100mg/kg. The tumor inhibition ratio was calculated by the following formula: Inhibition ratio (%) = $(1 - T/C) \times 100$, where C is the mean tumor weight of the control group and T is that of the treated group.

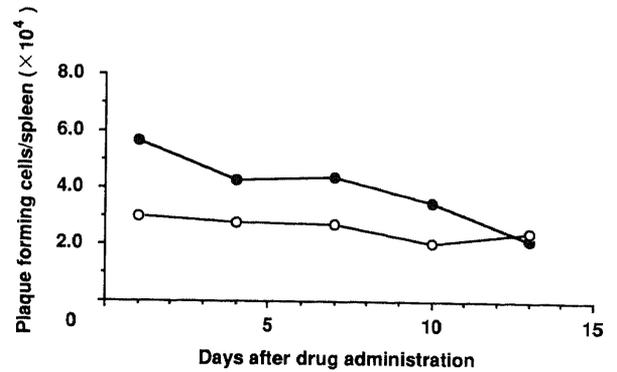


Fig. 3. Effects of OK-432 and bleomycin (BLM) on primary response to sheep red blood cells (SRBC). The plot symbols: ○, mice immunized with SRBC; ●, mice immunized and treated OK-432 and BLM. OK-432 was subcutaneously administered at a dose of 50KE/kg on day -2. BLM was intravenously administered at a dose of 100mg/kg on day 0.

Table 3. Antitumor effects of combined therapy with OK-432 and Bleomycin (BLM) on Meth-A fibrosarcoma transplanted to BALB/c mice modified immunological parameters

Immunological parameter	Modification	Tumor weight (g) Mean \pm SD (treated*/control mice)	Inhibition ratio (%)
	Normal	4.39 \pm 1.51 / 11.82 \pm 2.17	62.9
T cell	Athymic nude mouse	5.96 \pm 0.85 / 11.99 \pm 2.21	50.3
Macrophage	Silica, 2.5 mg/mouse, i. v.	7.65 \pm 3.14 / 8.65 \pm 0.27	11.6
NK cell	Anti-asialo GM1, 0.2 mg/mouse, i. v.	2.57 \pm 0.95 / 6.47 \pm 5.10	60.3

*OK-432 was injected to the tumor site at a dose of 50 KE/kg on day 6 and then BLM was intravenously injected at a dose of 100 mg/kg on day 8.

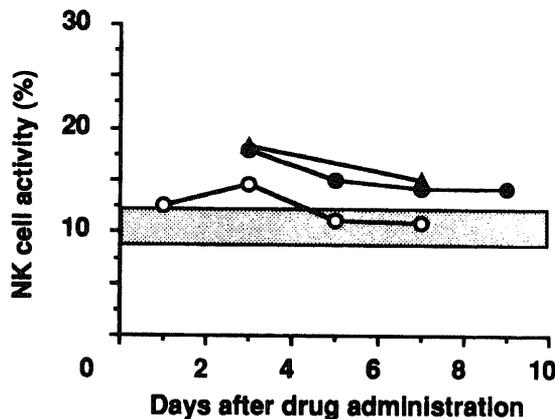


Fig. 4. Change of NK cell activity after drug administration. The plot symbols: ○, OK-432 alone; ●, BLM alone; ▲, OK-432 and BLM. The dotted area is the NK cell activity of control level. OK-432 was subcutaneously administered at a dose of 50KE/kg on day -2. BLM was intravenously administered at a dose of 100mg/kg on day 0. NK cell activity was calculated by the following formula: NK cell activity (%) = $(\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}) / (\text{maximum cpm} - \text{spontaneous cpm}) \times 100$.

Table 4. Analysis of splenic Thy1.2-positive cells, L3T4-positive cells and Lyt2-positive cells after the combination treatment

Treatment	Subsets of splenic cells (%)		
	Thy1.2	L3T4	Lyt2
Control	64.5 \pm 2.2 ¹⁾	18.0 \pm 0.6	4.7 \pm 0.4
	64.2 \pm 8.5 ²⁾	17.5 \pm 6.5	5.0 \pm 0.1
OK-432	60.2 \pm 5.4	20.0 \pm 5.1	7.0 \pm 0.9
	51.7 \pm 4.0	8.3 \pm 0.8	4.5 \pm 1.3
BLM	66.5 \pm 0.9	21.1 \pm 4.9	6.4 \pm 1.0
	61.8 \pm 8.7	17.9 \pm 2.7	4.4 \pm 1.3
OK-432 + BLM	67.6 \pm 0.8	20.5 \pm 1.8	6.0 \pm 0.1
	56.6 \pm 9.8	18.2 \pm 2.9	4.8 \pm 0.4

Subcutaneous administration of OK-432 50 KE/kg on day 0. Intravenous administration of BLM 100 mg/kg on day 2.

- 1) Surface maker on day 3.
- 2) Surface maker on day 6.

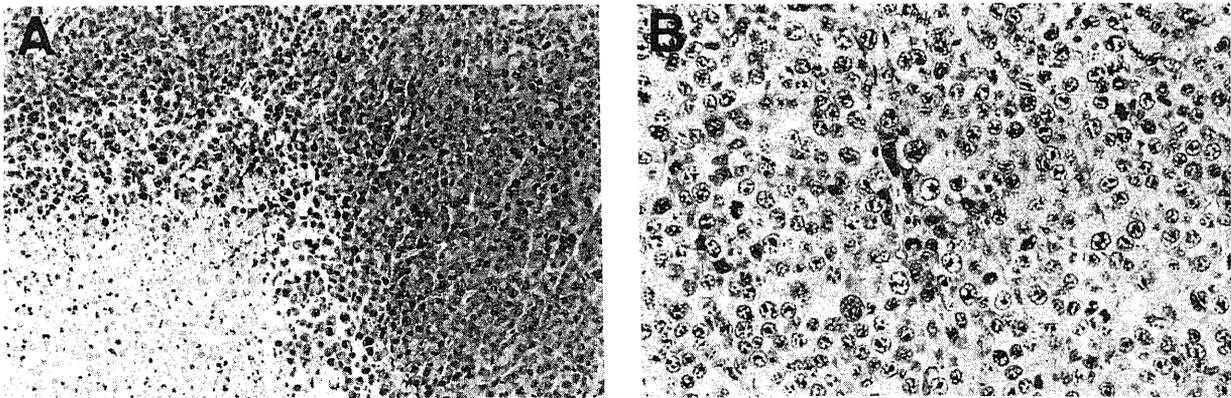


Fig. 5. Histological photomicrographs of Meth-A fibrosarcoma in BALB/c mouse treated OK-432. Meth-A fibrosarcoma cells (1×10^6) were subcutaneously inoculated on day 0 and OK-432 was administered to tumor site at a dose of 50KE/kg on day 6. Tumors were excised on day 7 (A, $\times 100$) and day 9 (B, $\times 400$). Lymphocytes and neutrophils are infiltrated around the site of OK-432 administration (A). Many macrophages are observed (B).

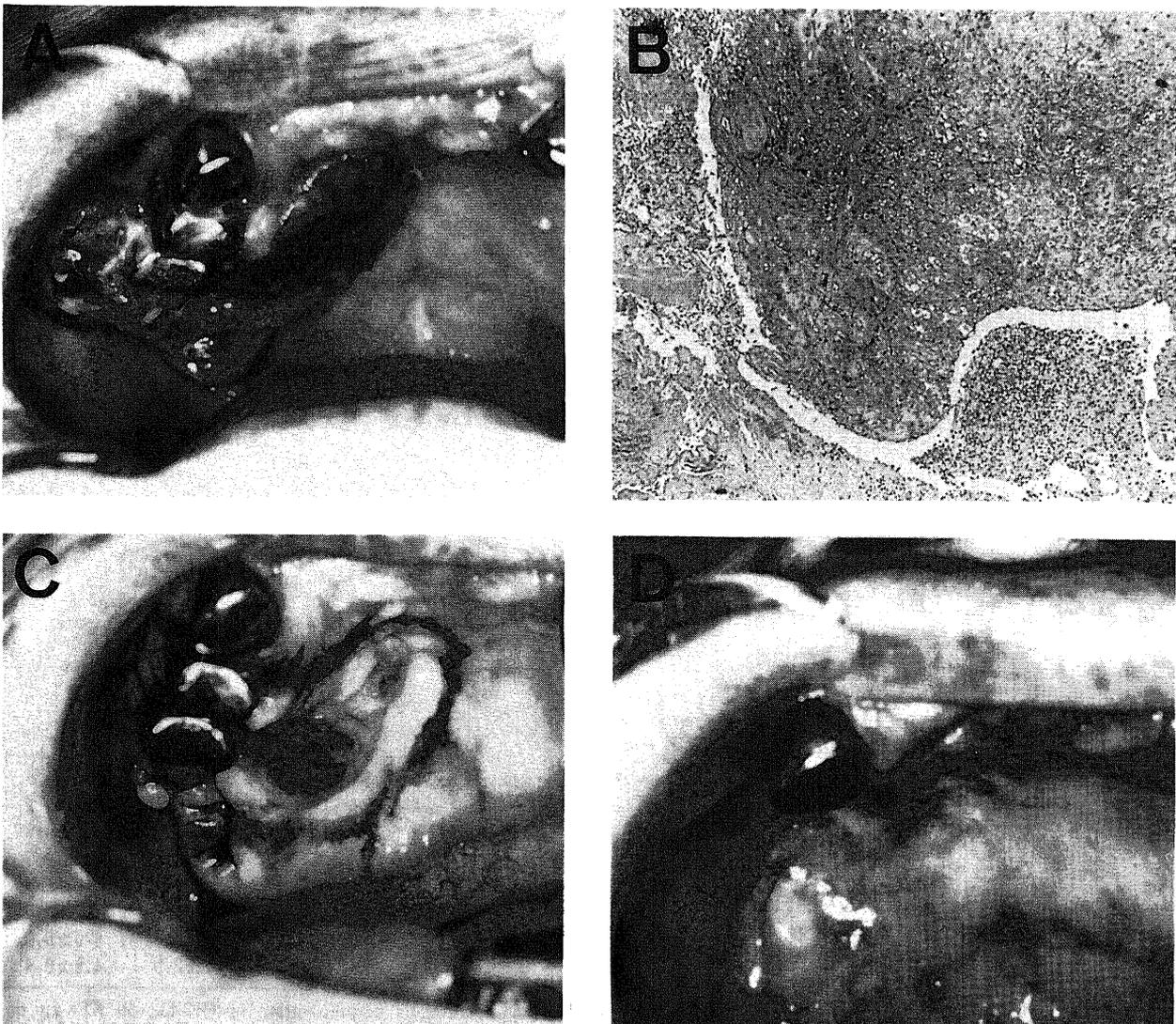


Fig. 6. Clinical case presentation of a 70-year-old female with squamous cell carcinoma (Case 4): A, intraoral view on first examination; B, histological photomicrograph on first examination showing a less marked borderline ($\times 40$); C, intraoral view after chemotherapy; D, intraoral view after operation.

的に増加させると考えられた。

3) 脾リンパ球サブセットの解析

非担癌マウスの皮下に OK-432 を 50KE/kg 投与して 3 日後および 6 日後の非リンパ球サブセットを検討したところ、L3T4 (ヘルパー/インデューサー T 細胞), Lyt2 (サプレッサー/細胞障害性 T 細胞) 陽性細胞とも 3 日後では上昇していたものの、6 日後には逆に対照群よりも減少していた。このことは、L3T4/Thy1.2 においても観察された。一方、OK-432 の 2 日後に BLM を投与した群のサブセットでは、OK-432 投与にて低下したこれらのパラメーターを下げることなく、特に L3T4 は有意な差をもって上昇していた。また、L3T4/Thy1.2 の値も上昇していた (表 4)。

4) NK 細胞活性の解析

OK-432 単独投与の NK 細胞活性は投与 3 日後に 14.5% とピーク値を示した。BLM 単独投与の活性は、投与直後より 17.9% と上昇したものの経時的に減少し、対照群の値に復した。一方、OB 療法の活性は、BLM 単独投与の活性と近似した値を示した (図 4)。

4. 組織学的検討

OK-432 の腫瘍内投与 1 日後より、局注部位周囲に好中球およびリンパ球の浸潤が認められ、3 日後にはマクロファージの浸潤が強く認められた (図 5)。

II. 臨床的検討

OK-432 と BLM の併用療法を施行した 4 例の化学療法効果は、CR 2 例、PR 1 例、NC 1 例であり奏効率は 3/4 (75%) であった。有効 3 例では、化学療法後のサプレッサー T 細胞 (CD8⁺ CD11⁺) が低下もしくは軽微な上昇であったが、無効例では、強い上昇が認められた (表 5)。他のパラメーターでは、化学療法前後での変化は軽微で、化学療法効果との関係においても明らかな傾向は認められなかった。併用療法を施行した 4 例中 1 例のみに発熱を認めたものの、化学療法を中止するまでには至らなかった。以下に代表症例を呈示する。

症例 4 : 70 歳女性。上顎義歯不適合を主訴に平成 3 年 9 月 5 日当科を受診した。初診時、腫瘍は右上顎に存在し表面肉芽状で外向性発育を呈していた。大きさは 48×35mm 大で、その範囲は前方は第 1 小臼歯から後方は上顎結節付近、また内方は口蓋正中中部、外方は頬粘膜に深く浸潤していた。初診当日に生検を行ったところ、高分化型の扁平上皮癌で、山本-小浜分類¹⁴⁾¹⁵⁾による腫瘍の浸潤様式は 2 型であった (T3N0M0)。以上の所見より低悪性の癌と判断し、前治療として OK-432・BLM 療法を選択した。両薬剤の投与に際しては、本実験結果に基づき週 2 回の BLM, 15mg 経静脈内投与の前日に OK-432 を 0.5-1.5KE 皮下注した。両薬剤投与の初期より腫瘍は縮小し

始め、総量は OK-432 が 3.4KE, BLM, 120mg 投与後には腫瘍は著しく縮小し、大きさは 20×12mm 大で縮小率は 86% であった。また、この間の免疫パラメーターの変動では、サプレッサー T 細胞 (CD8⁺ CD11⁺) が正常範囲を越えて高値を示す 19% から、化学療法終了後、正常範囲内の 14% までに低下していた。なお、他のパラメーターはいずれも正常範囲内での変化であった。そこで縮小の程度に応じて必要最小限の切除手術を行うにとどめることができ、咀嚼など口腔機能的にも満足すべき結果が得られた。初診後 1 年 3 ヶ月、腫瘍なく生存している (図 6)。

考 察

担癌生体においては免疫機能の低下が認められることが多く、また癌の発生、増殖が生体の免疫能と密接な関連を有することについても、基礎的あるいは臨床的に多くの事実がある¹¹⁾¹⁷⁾。したがって、生体の免疫能を増強することは、癌の治療成績の向上に重要であると考えられる。

現在、各臓器の固型癌患者に対しては外科療法または放射線療法が一般的な根治的療法として採用され、化学療法は補助的な治療法として利用されている。一方、免疫療法は第 4 の治療法ともいわれ、唯一、宿主免疫能の賦活を介して癌治療を目指すものであり、その効果が期待されている¹⁸⁾。さらに、化学療法に免疫療法を組み入れた免疫化学療法も提唱され、その効果についても基礎的ならびに臨床的に多くの報告がなされており^{19)~27)}、その抗腫瘍効果の免疫学的機序についての報告が散見されている²⁴⁾²⁵⁾²⁷⁾。

化学療法に免疫療法を併用する根拠として、免疫療法が単に化学療法による宿主免疫能の低下の防止やその回復、化学療法後の微小残存腫瘍の排除といった消極的なものから、免疫療法の抗腫瘍効果が十分に発揮されるように、化学療法を宿主介在的に使用する積極的なものまでが考えられる。

一般に抗癌剤は免疫抑制作用を持つと考えられているが、投与条件によっては増強することが認められており、免疫化学調節作用 (chemoimmunomodulation) の 1 つとして注目されている。これら一定条件下で、免疫増強を示す抗癌剤が多数報告され⁸⁾、またその機序についても、サプレッサー細胞活性の抑制や抗腫瘍エフェクター活性の増強などが明らかにされている⁹⁾²⁸⁾。さらに免疫抑制からの回復時のほねかえり現象も報告されている⁹⁾。しかしその免疫増強作用の発現には、それぞれの抗癌剤の種類、投与量、投与期間、投与時期などが重要であることが報告されている⁹⁾。その中で BLM の免疫系に及ぼす影響に関しては、ラットを用いた実験で検討されている。それらによると適当な投与条件でサプレッサー T 細胞の活性を抑制

Table 5. Clinico-pathological findings and chemotherapy effects

Case*	Age	Sex	Lesion (gingiva)	Stage	Response**	Suppresser T cell (%) pre-chemo.	post-
1	78	F	upper	II	CR	21	13
2	83	F	lower	III	NC	12	21
3	73	M	upper	II	CR	13	16
4	70	F	upper	III	PR	19	14

* All cases were grade 2 of mode of invasion (Yamamoto and Kohama).

**CR, complete response; NC, no change; PR, partial response.

し、他方でマクロファージを活性化作用などを介して、腫瘍免疫反応を増強することが報告されている^{27a)}。臨床においても、BLMは口腔組織への薬剤集積性が良好であることから口腔粘膜癌に頻用されている抗癌剤の1つである²⁹⁾。

BRMは、腫瘍宿主相関において癌に対する宿主の生物学的反応を修飾することによって癌の増殖を抑制することを目的とした薬剤である¹⁸⁾³⁰⁾。癌と宿主の相関は多岐にわたっており、それを修飾する手段もまた多彩である。それらのBRMの中で、OK-432は最も幅広い作用を有する物質の1つとして評価されている³¹⁾。OK-432はヒト由来A群溶連菌の弱毒株をペニシリン処理し、凍結乾燥した白色粉末で、1966年Okamotoら⁹⁾により作成された。その作用としては、エフェクター細胞の活性化やサイトカインの産生刺激などが報告されている¹⁰⁾。また臨床においては、癌患者の生命延長、腫瘍性漿膜炎治療効果などが報告されている³²⁾³³⁾。

そこで、種々のサイトカインを誘導するOK-432に免疫増強作用を有する抗癌剤のBLMを組み合わせれば、免疫能を賦活しながら高い治療効果が得られるとの考えからBLMとOK-432の併用療法が考案された⁸⁾。我々も、この考えに基づき、組織学的に低悪性度の口腔扁平上皮癌に対して、本療法を採用・試行し、その有効性を認めている¹¹⁾。しかし前述のごとく抗癌剤の免疫増強作用の発現には、それぞれの抗癌剤の種類、投与量、投与時期などの投与条件が重要となることから、その抗腫瘍効果発現の機序を明らかにしておかないと、予想した治療効果を得られない可能性が考えられる。すなわち、化学療法と免疫療法を併用し相乗効果を得るためには、その投与時期が非常に重要とされており⁸⁾、投与条件によっては逆に両剤の効果を相殺しかねないことも危惧される。そこで、今回BLMとOK-432の併用療法の腫瘍効果発現の機序、両薬剤の至適投与法、時期などを基礎的に検討した。

まず、OK-432とBLMの併用効果についての培養細胞を用いて検討したところ、両薬剤での相乗効果は認められなかったものの、拮抗することはなかった。次に、担癌マウスを用いた検討では、OK-432を腹腔内投与するBLMとの併用群では、併用効果は認めず、逆に拮抗するスケジュールも認められた。しかし、OK-432を腫瘍内投与した併用群では、BLM 100mg/kgとOK-432を併用したとき強い併用効果が認められた。特に、OK-432を先行させたスケジュールでより強い併用効果が認められた。このことより、両薬剤の併用効果発現には直接的効果でなく、宿主存在性のものであることが考えられ、OK-432を先行投与することにより誘導された抗腫瘍エフェクター細胞がBLMの抗腫瘍効果発現に相乗的に働いていることが示唆された。

前述のように、BLMを100mg/kgで併用したときに強い併用効果が認められたが、OK-432の投与量を変化させ腫瘍内投与したところ、50KE/kgまたは250KE/kgにおいてもその併用効果には差は認められなかった。これは、OK-432が濃度依存性に乏しいとされる報告¹⁸⁾¹⁹⁾を裏付ける結果となった。

化学療法にBRMを併用する際の併用時期についての基礎的な研究が多数報告されている^{19)~23)25)~27)}が、抗癌剤、BRMの種類および実験モデルで併用時期は異なる。斉藤ら²⁵⁾は、Meth-A腹水腫瘍に対してアドリアマイシン(Adriamycin)とOK-432の腹腔内投与による併用効果は、アドリアマイシン投与後にOK-432を投与した時に最も優れた併用効果を認めたと報告し

ている。また、菅ら²⁶⁾はマウスの進行悪性腹水モデルを用いたBRMと化学療法剤の至適併用時期は、免疫賦活剤をサイクロフォスファミド(Cyclophosphamide)の前に投与した時にのみ有意に化学療法効果を増強したと報告している。これとは逆にBRMの種類によっては、サイクロフォスファミド投与後に併用したほうが高い治癒が得られるとする報告もある²⁴⁾。今回の実験結果によれば、Meth-A固形腫瘍に対して、OK-432を腫瘍内に先行投与しその後BLMを静脈内投与したときに優れた併用効果を認め、それはOK-432をBLMの後に投与したときの効果より有意に優れていた。また、OK-432の投与2日後にBLMを投与したときに最も優れた併用効果を認めた。

BRMの効果発現に対する問題点として、その効果判定、投与経路、投与量、他の療法との投与時期などが考えられる。今回の動物実験では腫瘍重量で効果判定を行った。実際の臨床例においては生存期間、免疫学的パラメーターまたはQOLなどで効果判定がなされているが、確実にその効果を判定することは困難とされている。一方、投与経路、投与量、他の療法との投与時期を検討したところ、今回の条件において、腫瘍移植6日後にOK-432を50KE/kg腫瘍内投与した2日後にBLMを100mg/kgを静脈内投与したとき(OB療法)に最も優れた併用効果を認めた。この投与方法における免疫学的メカニズムを明確にすることで、より効果的で副作用の少ない併用療法が確立できると考えられる。

腫瘍に対する宿主側の抗腫瘍免疫の機構としては、その局所で、最初にマクロファージによる腫瘍抗原の認識が行われ、次にヘルパーT細胞が活性化され、さらにキラーT細胞、NK細胞などの活性化が誘導されると考えられており、その調整や媒介をする各種サイトカインの関与も確認されている³⁴⁾。

OK-432を投与して最初に出現するエフェクター細胞は活性化マクロファージであり、最も主要な細胞とされている³⁵⁾。一方、BLMがマクロファージの細胞障害活性を上昇させることが報告されている²⁸⁾。この両薬剤の相互作用により、マクロファージが惹起されれば、強い抗腫瘍性の発現が期待できる。マクロファージは海藻(Choudrus crispus)から単離されたポリガラクトースの硫酸塩であるカラゲナンやシリカによってその機能が抑制される³⁶⁾。そこで、シリカを投与したBALB/cマウスでのOB療法の効果について検討したところ、その併用効果は顕著に減弱した。この結果から、併用効果発現にはマクロファージが関与していることが強く示唆される。しかし、両薬剤の併用効果発現が投与時期に依存していることからマクロファージの関与だけでは説明できない。腫瘍内に浸潤しているマクロファージの数は腫瘍の抗原性と相関しないとされている³⁷⁾が、浸潤したマクロファージの抗原提示能やインターロイキン1(interleukin 1, IL-1)産生能が確認されている³⁷⁾³⁸⁾。また、IL-1はBLMによる好中球の活性酸素産生能を増強させることが報告されている³⁹⁾。これらのことを考え合わせれば、OK-432の先行投与により腫瘍局所のマクロファージが活性化するとともにIL-1産生が誘導され、続くBLMの抗腫瘍効果を増加することが考えられる。

次に、OB療法に対するT細胞の関与について検討した。OK-432を単独で投与した場合、腹腔内投与、腫瘍内投与いずれにおいても抗腫瘍効果を認めなかった。同時に、非担癌マウスに対する皮内投与では、L3T4(ヘルパー/インデューサーT細胞)陽性細胞の軽微な上昇を認めたものの顕著なものではな

く、また投与6日後に対照群の値よりも大きく減少した。このことは、今回のOK-432の投与でエフェクター細胞が誘導されるものの、その誘導は弱く、長く持続しないため、抗腫瘍効果に反映しないものと考えられた。

OK-432を腫瘍内投与することにより、動物実験、臨床ともに優れた治療成績が得られることが報告されている^{40)~42)}。その中で、エフェクター細胞に関して、国延⁴¹⁾はOK-432の腫瘍内投与によって腫瘍特異的キラー細胞が誘導され、増殖抑制を認めた腫瘍組織には、免疫組織学的にThy-1, L3T4, アシアロGM1陽性細胞の浸潤の増加が認められ、脾リンパ球の解析より、腫瘍内投与による増殖抑制効果は脾リンパ球における抗腫瘍活性の増強、腫瘍内への浸潤リンパ球の増加と密接な関係があると報告している。また奥野ら⁴²⁾はOK-432腫瘍内投与によってクラスII陽性抗原提示細胞の機能が亢進し、脾細胞中に腫瘍特異的キラーT細胞が誘導されると報告している。両報告とも、腹腔内投与ではこの現象は認められないことから、今回の併用効果の発現と密接に関係していることが示唆された。しかし、これらは複数回投与での検討であるため、今回の1回投与で腫瘍特異的キラー細胞の誘導がなされているかは明らかではない。

次に、BLMを併用したOB療法のT細胞のサブセットを検討したところ、前述のOK-432単独投与6日後にBLMを併用させることで、OK-432単独投与では低下するL3T4陽性細胞を有意な差をもって維持していた。また、L3T4/Thy1.2はBLM単独投与、対照群と比べ有意な差はないものの、その値を維持し続けた。同様に、溶血斑形成細胞数がOB療法にて高値を維持し続けたことから、併用効果の発現にはヘルパーT細胞が強く関与することが示唆された。しかし、サブレッサーT細胞がBLMの投与にて除去されるとするMorikawaら⁹⁾の報告の裏付けは、今回の検討では明らかにはできなかった。この理由として、サブレッサーT細胞の出現は免疫感作を前提とするため非担癌での検討では、サブレッサーT細胞の出現が十分でないことが考えられた。

また、実際の臨床例にてリンパ球サブセットの変化を検討すると、ヘルパーT細胞(CD4⁺Leu8⁺)は化学療法前後およびその途中においても変化に乏しく、一方で、サブレッサーT細胞(CD8⁺CD11⁺)は無効症例では化学療法終了後大きく上昇していた。しかし、免疫学的パラメーターは化学療法および免疫療法の効果を直接、正確に反映するとは言い難く、また今回の検討症例数も少ないことから、その本質的意義については今後の検討課題であると考えている。

次に、NK細胞の影響について検討した。OK-432がNK細胞活性を増強させる作用を持つとする報告もされている⁴³⁾。今回の検討でも軽微ではあるが、OK-432単独では、投与3日後をピークとして、NK細胞活性の上昇を認めた。その上昇のピークとOB療法の投与間隔を考えると、併用効果発現に関与すると考えられた。しかし、OB療法とBLM単独投与のNK細胞活性は同程度であり、さらに、抗アシアロGM1にてNK細胞活性を減弱させたBALB/cマウスに対するOB療法の抗腫瘍効果も減弱しなかった。

以上、併用療法の抗腫瘍効果発現の機序を検討したが、特にマクロファージの関与が強く、またT細胞も相互に作用していることが示唆された。この両者の相互作用を解明することにより、抗腫瘍効果の発現機序がさらに詳細に明らかになるものと

考えられる。山下⁴⁴⁾は移植片対宿主反応を用いた実験系にて、アロ抗原反応性T細胞の成熟と機能発現に対するOK-432活性化マクロファージの作用を解析している。その中で胸腺細胞をアロ抗原反応性T細胞へ分化、成熟させるマクロファージは、Ia抗原陽性亜群で、それはOK-432投与3日後以降に得られるとしている。この報告は大変興味深く、活性化マクロファージ、アロ抗原反応性T細胞、ヘルパーT細胞への一連の成熟期間が、OB療法の投与間隔が2日間であることと一致する。この現象が、OK-432の腫瘍内投与にて腫瘍局所で行われれば、併用効果の出現を認めるものも考えられる。

今回の基礎的検討により、溶連菌製剤のOK-432を腫瘍内投与し、その後にBLMを投与する免疫化学療法は、BLMの直接効果と両薬剤併用による免疫増強作用によって有効な治療法に成り得ることが示唆された。現在この結果を踏まえて、臨床での検討を試み、良好な結果が得られている¹¹⁾。以上の結果を基に、今後、臨床応用例を追加し、より効果的な集学的治療法の確立を検討したい。

結 論

溶連菌製剤OK-432と抗癌抗生物質BLMの併用効果について、培養細胞および担癌マウスを用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 培養細胞に対して両薬剤の併用効果は認められなかった。
2. 担癌マウスに対して、OK-432を腫瘍内投与したときに強い併用効果が認められた。一方、腹腔内投与では併用効果は認められなかった。
3. 2剤の併用効果はOK-432を先行投与したときに強い併用効果が認められた。BLMをOK-432の2日後に投与したときの効果が最も優れていた。
4. OK-432の投与量を増加しても、その効果は強くならなかった。
5. 併用効果の発現には、マクロファージおよびヘルパーT細胞の関与を示唆した。
6. 本結果に基づく、投与スケジュールで低悪性の口腔扁平上皮癌症例に臨床応用したところ、高い効果が得られ臨床的にもその有効性を示唆した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った金沢大学歯科口腔外科学教室山本悦秀教授、本学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚の謝意を捧げます。本研究の遂行にあたり、直接御指導、御協力戴きましたがん研究所化学療法部田中基裕助教授に心より深謝いたします。また、御助言、御協力を戴きました本学歯科口腔外科学教室およびがん研究所化学療法部各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第45回日本口腔科学学会総会(1991年、京都)、第29回日本癌治療学会総会(1991年、大阪)、第4回JBRM学会学術集会総会(1991年、横浜)、第46回日本口腔科学学会総会(1992年、名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. & Okami, Y.: New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.*, **19**, 200-209 (1966).
- 2) Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T. & Maeda, K.: Purification of bleomycins. *J. Antibiot.*, **19**, 210-215

(1966).

3) **Head and neck contracts program**: Adjuvant chemotherapy for advanced head and neck squamous carcinoma. Final report of the head and neck contracts program. *Cancer*, **60**, 301-311 (1987).

4) **Cognetti, F., Pinnaro, P., Carlini, P., Ruggeri, E. M., Impiombato, F. A., Vecchio, M. R. D., Giannare, D. & Perino, A.**: Neoadjuvant chemotherapy in previously untreated patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, **62**, 251-261 (1988).

5) **Schuller, D. E., Laramore, G., Al-Sarraf, M., Jacob, J. & Pajak, T. F.**: Combined therapy for resectable head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **115**, 364-368 (1989).

6) **細川真澄男**: 化学療法と BRM. *Oncologia*, **6**, 65-75 (1983).

7) **Okamoto, H., Minami, M. & Shoin, S.**: Experimental anticancer studies XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. *Jpn. J. Exp. Med.*, **36**, 175-186 (1966).

8) **山本悦秀, 小谷 勝, 永井 格, 小浜源都**: 口腔粘膜癌に対する BOP 療法について. *診療と新薬*, **24**, 227-230 (1987).

9) **Morikawa, K., Hosokawa, M., Hamada, J., Sugawara, M. & Kobayashi, H.**: Host-mediated therapeutic effects produced by appropriately timed administration of bleomycin on a rat fibrosarcoma. *Cancer Res.*, **45**, 1502-1506 (1985).

10) **星野 孝, 伊保澄子, 倉 文明, 内田温士, 高橋隆幸**: BRM の臨床応用. OK-432, 特にその臨床効果と作用機序について. *最新医学*, **42**, 283-293 (1987).

11) **山本悦秀, 岡部孝一, 能崎晋一, 鹿渡靖子, 熊谷茂宏, 中川清昌**: 口腔粘膜癌の浸潤様式に基づく化学療法レジメンとその効果. *頭頸部腫瘍*, **18**, 71-74 (1992).

12) **Valeriote, F. & Lin, H.**: Synergistic interaction of anticancer agents: A cellular perspective. *Cancer Chemother. Rep.*, **59**, 895-900 (1975).

13) **Cunningham, A. J. & Szenberg, A.**: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*, **14**, 599-600 (1968).

14) **山本悦秀, 砂川 元, 小浜源都**: びまん性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. *日口外*, **28**, 1471-1479 (1982).

15) **Yamamoto, E., Kohama, G., Sunakawa, H., Iwai, M. & Hiratsuka, H.**: Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, **51**, 2175-2180 (1983).

16) **山岡 博**: 癌患者における癌特異的細胞性免疫能に関する研究. *札幌医誌*, **46**, 341-353 (1977).

17) **漆崎一郎**: 癌患者の免疫能. *癌の臨床*, **24**, 378-385 (1978).

18) **漆崎一郎**: BRM の概説. *BIO THERAPY*, **1**, 3-11 (1987).

19) **Hosokawa, M., Sendo, F., Gotohda, E. & Kobayashi, H.**: Combination of immunotherapy and chemotherapy to experimental tumors in rats. *Gann*, **62**, 57-60 (1971).

20) **木村郁郎**: 抗がん剤と溶連菌製剤の併用. *最新医学*, **28**,

941-951 (1973).

21) **Gotohda, E., Kawamura, T., Sendo, F., Nakayama, M., Akiyama, J., Oikawa, T., Hosokawa, M., Kodama, T. & Kobayashi, H.**: Effect of combination treatment with cyclophosphamide and nonspecific passive immunization on a transplantable tumor in WKA rats. *Cancer Res.*, **36**, 2119-2123 (1976).

22) **Akiyama, J., Kawamura, T., Gotohda, E., Yamada, Y., Hosokawa, M., Kodama, T. & Kobayashi, H.**: Immunotherapy of transplanted KMT-17 in WKA rats by combination of cyclophosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. *Cancer Res.*, **37**, 3042-3045 (1977).

23) **齊藤元男, 菅原 豊, 小川春樹, 太田和雄**: Meth-A 腹水腫瘍に対する Adriamycin と OK-432 の腹腔内による併用効果. *癌と化学療法*, **6**, 1101-1107 (1979).

24) **Arinaga, S., Akiyoshi, T. & Tsuji, H.**: Augmentation of the generation of OK-432 activated killer cells after a single dose of Mitomycin C in cancer patients. *Int. J. Immunopharmac.*, **10**, 47-51 (1988).

25) **山田雄次**: 効果的な癌免疫化学療法のための化学療法効果の免疫学的解析. *北海道医誌*, **59**, 721-727 (1984).

26) **菅 典道, 沖野 孝, 佐藤剛平, 三瀬圭一, 寺村康史, 山崎誠二, 原田武尚, 大垣和久, 戸部隆吉**: BRM (免疫賦活剤・キラーT細胞・Interleukin-2) と化学療法の組み合わせに関する基礎実験. *癌と化学療法*, **17**, 1421-1427 (1990).

27) **齊藤匡人**: 頭頸部癌に対する局所免疫化学療法の基礎的研究. *日耳鼻*, **94**, 1898-1912 (1991).

28) **Morikawa, K., Hosokawa, M., Hamada, J., Xu, Z. & Kobayashi, H.**: Possible participation of tumoricidal macrophages in the therapeutic effect of bleomycin on a transplantable rat fibrosarcoma. *Cancer Res.*, **46**, 684-688 (1986).

29) **Umezawa, H., Takeuchi, T., Hori, S., Sawa, T., Ishizuka, M., Ichikawa, T. & Komai, T.**: Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J. Antibiot.*, **25**, 409-420 (1972).

30) **Oldham, R. K.**: Biological response modifiers program. *J. Biol. Res. Modif.*, **1**, 81-100 (1982).

31) **Talmadge, J. E. & Herberman, R. B.**: The preclinical screening laboratory: Evaluation of immunomodulatory and therapeutic properties of biological response modifiers. *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 171-182 (1986).

32) **Watanabe, Y. & Iwa, T.**: Immunotherapy of lung cancer: A randomized clinical trial of OK-432 immunotherapy and a review of the literature on nonspecific immunotherapy. *Int. J. Immunother.*, **2**, 51-67 (1986).

33) **Uchida, A., Micksche, M. & Hoshino, T.**: Intrapleural administration of OK-432 in cancer patients: Augmentation of autologous tumor killing activity of tumor associated large granular lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, **18**, 5-12 (1984).

34) **Yamaki, T., Ueda, T., Shijubo, N. & Kikuchi, K.**: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into

- tumors. III. Soluble factors involved in the regulation of T lymphocyte infiltration into tumors. *J. Immunol.*, **140**, 4388-4396 (1988).
- 35) Saito, M., Nanjo, M., Aonuma, E., Noda, T., Nakadate, I., Ebina, T. & Ishida, N.: Activated macrophages are responsible for the tumor-inhibitory effect in mice receiving intravenous injection of OK-432. *Int. J. Cancer*, **33**, 271-276 (1984).
- 36) Allison, A. C., Harington, J. S. & Birbeck, M.: An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. Exp. Med.*, **124**, 141-154 (1966).
- 37) Talmadge, J. E., Key, M. & Fidler, I. J.: Macrophage content of metastatic and nonmetastatic rodent neoplasmas. *J. Immunol.*, **126**, 2245-2248 (1981).
- 38) Mahoney, K. H., Fulton, A. M. & Heppner, G. H.: Tumor-associated macrophages of mouse mammary tumors. II. Differential distribution of macrophages from metastatic and nonmetastatic tumors. *J. Immunol.*, **131**, 2079-2085 (1983).
- 39) 佐藤 篤: ブレオマイシンによる好中球の活性酸素産生に対するサイトカインの効果. *日口外*, **38**, 1498-1507 (1992).
- 40) 北原 哲, 池田 真, 田部哲也, 坂田淳一, 小倉雅実, 井上鐵三: 頭頸部悪性腫瘍に対する OK-432 局所注入療法. *Ther. Res.*, **10**, 2569-2577 (1989).
- 41) 国延浩史: BRM 腫瘍内投与による抗腫瘍活性誘導の機序に関する基礎的研究. *広大医誌*, **38**, 401-420 (1990).
- 42) 奥野清隆, 中嶋一三, 白山泰明, 廣畑 健, 大西博昭, 中村洋介, 中村哲彦, 安富正幸: Biological Response Modifiers (BRM) 腫瘍内投与による宿主の抗腫瘍免疫能の変動とその機構解析. *日癌治*, **25**, 1543-1549 (1990).
- 43) 稲葉俊三: 腫瘍所属リンパ節の抗腫瘍性とその賦活化に関する実験的研究. *東女医大誌*, **60**, 897-907 (1990).
- 44) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. & Okumura, K.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 1265-1269 (1980).
- 45) 山下 昭: 活性化マクロファージとT細胞の相互作用. 溶連菌製剤 OK-432, その作用と臨床応用 (橋本嘉幸, 野本亀久男, 服部孝雄, 木村郁郎編), 第1版, 19-31頁, *Excerpta Medica*, 東京, 1986.

Combined Immunotherapy of Bleomycin with OK-432 and its Clinical Application for Oral Squamous Cell Carcinoma Shinichi Nozaki, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920- J. J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 17-27 (1993)

Key words OK-432, bleomycin, immunochemotherapy, Meth-A fibrosarcoma

Abstract

Our clinical studies have suggested that combined therapy of bleomycin (BLM) with OK-432 is effective for the treatment of human low-grade malignant oral squamous cell carcinoma. However, the mechanisms of action of this combined immunotherapy have not yet been clarified. We presumed that this combination chemotherapy exerts its antitumor activity not only by a direct cytotoxic action but also by its effect on immunological mechanisms. To confirm this speculation and the antitumor effect of this combination therapy, we examined its antitumor effect on a murine tumor, the general system for this study, and also the immunological parameters of mice implanted with it. Meth-A fibrosarcoma cells (10^6 cells) were subcutaneously inoculated into the right groin of female BALB/c mice. In this system, the combination treatment of BLM with OK-432 was synergistically more effective than the chemotherapy alone. The effect of the combination therapy depended on the timing of the combination regimen, the dose of the drugs, and the administration route of OK-432. The best antitumor effect of combined therapy was obtained when OK-432 was administered to the tumor site at a dose of 50KE/kg on day 6 after tumor inoculation and then BLM was administered intravenously at a dose of 100 mg/kg on day 8. This therapeutic effect was inhibited on athymic nude mice and BALB/c mice administered an antimacrophage agent, but was not inhibited on BALB/c administered an anti-natural killer cell agent. Immunologically, this combination therapy enhanced the capacity for antibody production in BALB/c mice, since the combined administration of BLM with OK-432 to mice caused a marked increase in the number of plaque forming cells in their spleens. L3T4 (helper/inducer T cell) positive cells in their spleens were seen to have increased on examination of T cell subset by flow cytometer. These findings suggest that macrophage and helper T cell are effector cells on the combination of BLM with OK-432 and this immunochemotherapy is a clinically useful immunotherapy for human oral squamous cell carcinoma.