

原 著

担癌家兔における腫瘍関連糖鎖抗原の研究 第2報

腫瘍関連糖蛋白抗原感作と血漿交換

併用療法の検討

東京女子医科大学 泌尿器科学教室 (主任: 東間 紘教授)

ナカ ザワ ハヤ カズ
中 沢 速 和

(受付 平成3年8月20日)

**Study of the Tumor Associated Carbohydrate Antigens in the Tumor-bearing Rabbits
Part II. Active Immunization with Tumor-derived Carbohydrate Antigens and
Therapeutic Plasmapheresis for Tumor-bearing Rabbits****Hayakazu NAKAZAWA**

Department of Urology (Director: Prof. Hiroshi TOMA)

Tokyo Women's Medical College

VX2 tumor-bearing rabbits were subjected to active immunization with peanut agglutinin (PNA) binding tumor-associated antigen VX2-GRA which was isolated and purified by affinity chromatography. The rabbits were divided into 3 groups: Animals immunized immediately after inoculation (early immunization group), those inoculated when the tumor became palpable (pre-establishment group), and those immunized after the tumor was established in the host (late immunization group). Lung metastasis significantly decreased in the early immunization group whereas immunization with VX2-GRA proved ineffective in the late immunization group. As to the difference in serum anti-VX2 antibody titer between the early and late immunization groups, no significance was found. Then, in the scope of removing an immunosuppressive factor, rabbits with established tumor were submitted to therapeutic plasmapheresis, which resulted in a significant decrease in serum PNA receptor and anti-VX2 antibody level. Two rabbits out of the 3 with high PNA receptor level showed signs of remission after the treatment. Phenomenologically, the combined therapy resulted in an inhibition of tumor growth as well as a reduction of the tumor size: plasmapheresis obviously prolonged survival and showed anti-tumor effect otherwise not found with the sole application of active immunization.

These results suggest that the immune response induced by active immunization can be enhanced by immunoregulatory treatment, e.g., plasmapheresis. This type of combined therapy deserves further evaluation as it could offer a potent cancer immunotherapy.

緒 言

腫瘍の発生、増殖の過程において宿主の免疫応答が重要な役割を担っており、腫瘍より抽出した「腫瘍特異抗原」あるいは「腫瘍関連抗原」を用いて腫瘍特異性免疫を誘導しようとの試みは1960年代以降盛んに行われてきた。しかし、これら腫瘍

関連抗原が腫瘍細胞特異的なものでなく、正常細胞との差が量的なものであることが臨床的有効性を高める障壁となり、癌に対する免疫療法の主役をリンフォカインを中心とした非特異性免疫療法や受動免疫療法に譲ってきたが、最近、抗イデオタイプ抗体や同種培養細胞を用いた特異能動免疫

療法が肺癌や乳癌、メラノーマなどに試みられている^{1)~4)}。

細胞の癌化に伴う細胞膜表面の変化として、近年、糖鎖構造の変化が注目されているが^{5)~8)}、なかでも特異的に β -D-galactosyl (1 \rightarrow 3) α -N-acetyl-D-galactosamine 構造 (Gal-GalNAc) と結合するレクチンであるピーナッツ凝集素 (以下 PNA と略) のレセプターが種々の癌細胞や未分化な細胞表面に多く発現することが知られており^{9)~15)}、腫瘍細胞より単離した PNA 結合糖蛋白抗原を用いた特異的能動免疫療法が試みられている^{16)~20)}。

PNA 結合糖蛋白抗原を用いた能動免疫の特徴として、複数のヒト培養腫瘍細胞より単離した抗原が同様の生化学的特性を有しており²¹⁾、誘導されるキラー活性が PNA レセプター陽性癌細胞に選択的であること、マウスの腫瘍に対しても同様な作用を持つことなどが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。一方、担癌生体における血清 PNA 結合糖蛋白濃度の役割にも興味を持たれており、担癌患者において血中の PNA レセプター濃度が有意に高いこと^{22)~26)}、腫瘍関連 PNA 結合糖蛋白抗原のリンパ球に対する作用に血中の PNA 結合糖蛋白濃度や抗体が関与している可能性^{16)~20)}、などが報告されている。

ところで担癌生体において種々の免疫抑制因子の存在が指摘されており^{27)~30)}、担癌宿主を対象に免疫療法を行う場合、宿主側の免疫応答が治療の有効性に深く関与していると考えられる。担癌宿主の免疫能の改善を目的に、そうした抑制因子を取り除くため担癌患者に対して血漿交換療法が試みられてきた^{31)~35)}。

今回われわれは、担癌家兎モデルを用いて腫瘍関連 PNA 結合糖蛋白抗原の特異的能動免疫療法の有効性について検討を行った。われわれは第 1 報で担癌家兎モデルにおいて血中 PNA レセプター値が腫瘍の増殖とともに増加し、腫瘍増殖を悪化させる一つの因子である可能性について報告している。そこで今回は、担癌生体より PNA レセプターも含めた免疫抑制因子を除去する目的で担癌家兎に対して血漿交換療法を試み、腫瘍関連抗原による能動免疫療法との併用療法の有効性につ

いても検討を行ったので、その結果について本稿で述べる。

対象および方法

1. 実験動物および腫瘍の取り扱い

今回の実験にはすでに第 1 報で報告している担癌家兎モデルを使用した^{35)~38)}。すなわち本学中央動物実験室において購入された家兎 (日本白色腫、雌、体重 2.80 ± 0.36 kg) の後肢大腿筋内に、VX2 腫瘍細胞を 1×10^6 個接種したものをを用いた。VX2 腫瘍は Shope らにより確立された家兎のウイルス発癌性、可移植腫瘍で容易に肺転移をきたす扁平上皮癌である³⁹⁾⁴⁰⁾。今回の実験には (株) 千代田開発船橋農場より購入し、当科にて継代しているものを用いた。腫瘍の PNA レセプター陽性率は第 1 報で報告したように 90~97% であった。

実験用動物は本学中央動物実験施設において飼育・管理を行った。実験用家兎の取扱いは可及的、愛護的に行うよう十分に注意し、連日食欲と全身状態のチェックを行い、週 2 回体重測定と腫瘍径の測定を行った。

また、実験用家兎は定期的に週 1~2 回耳介静脈より採血を行い、血清 PNA レセプター濃度と VX2 腫瘍抗体価の検討を行った。測定法についてはすでに第 1 報で述べており詳細は割愛するが、血清 PNA レセプター値の測定は Imagawa らの報告している酵素競合法²²⁾に準じて施行し、抗 VX2 腫瘍抗体価は VX2 腫瘍浮遊細胞を標的としたロゼット形成法により測定を行った³⁵⁾。

2. 腫瘍関連 PNA 結合糖蛋白抗原 (VX2-GR) の単離および精製

Miyauchi²¹⁾、Adachi ら¹⁵⁾がすでに報告している方法に準じて、PNA 結合糖蛋白抗原の単離・精製を行った。

まず当科において継代している担癌家兎より無菌的に最も viability の高そうな腫瘍部分の採取を行う。採取した新鮮 VX2 腫瘍約 30g を細切・ホモジネートし、細胞粗膜画分から 2% Triton X-100 (和光純薬) によって可溶化した後、PNA agarose affinity chromatography (Pharmacia) を用いて抽出する。本法で単離・精製したものを家兎用腫瘍関連 PNA 結合糖鎖抗原、VX2-GR

として今回の実験に使用した。

VX2-GRA は透析，濃縮後2,500ng/ml に調製し， -30°C で冷凍保存した。

3. 腫瘍関連 PNA 結合糖蛋白抗原 (VX2-GRA) 感作の有効性の検討

担癌家兎26羽を対象に VX2-GRA を用いた能動免疫療法について検討を行った。精製した VX2-GRA 250ng の3日間連続皮下接種を1クールとし，無処置担癌家兎8羽を対照群として有効性を評価した。

VX2-GRA 投与群は感作の時期により Group 1 (n=6)；腫瘍接種後早期 (3～5日目) に感作した群，Group 2 (n=6)；腫瘍出現直前 (腫瘍接種後7～9日目) に感作した群，Group 3 (n=6)；腫瘍確立後 (20～22日目) に感作した群，の3群に分けて以下の検討を行った。

1) 抗腫瘍効果

腫瘍接種後，週2回腫瘍径の測定を行い，(長径×短径²)/2を腫瘍容量として求め，経時的な腫瘍容量の変化を検討した。平均値の差はt検定により有意差検定を行った。

転移抑制効果：腫瘍接種後31日目に実験家兎を屠殺し，剖検にて肺転移のコロニー数を計算した。

肺転移数20個未満の家兎を肺転移抑制群とし，20個以上～無数の大結節転移を有する家兎を肺転移群として検討を行った (写真1)。

2) 腫瘍抗体価の変動

腫瘍確立前に感作した家兎群 (Group 1, 2) と腫瘍確立後に感作した群 (Group 3) とで，抗 VX2 腫瘍抗体価の経時的变化について検討を行った。抗 VX2 腫瘍抗体価の測定は，既報のごとくロゼット形成法で施行した。

4. 担癌家兎に対する血漿交換と特異能動免疫併用療法の検討

1) 担癌家兎に対する血漿交換

血漿交換の方法はすでに著者らが報告している膜性血漿分離器を用いた体外循環法にて施行した³⁷⁾³⁸⁾。

担癌家兎を pentbarbital にて麻酔した後，体外循環装置 (川澄化学) を用い，写真2に示すように，耳介静脈より脱血し対側耳介静脈に返血する閉鎖回路中に血漿分離用カラムを設置し，担癌家兎血漿を分離除去した後同量の新鮮凍結家兎血漿を補う方法で行った。血漿分離器として家兎用に作製した polysulfon 膜，膜面積は 0.03m^2 のカラム (鐘化) を使用した。体外循環血液流量を4～6

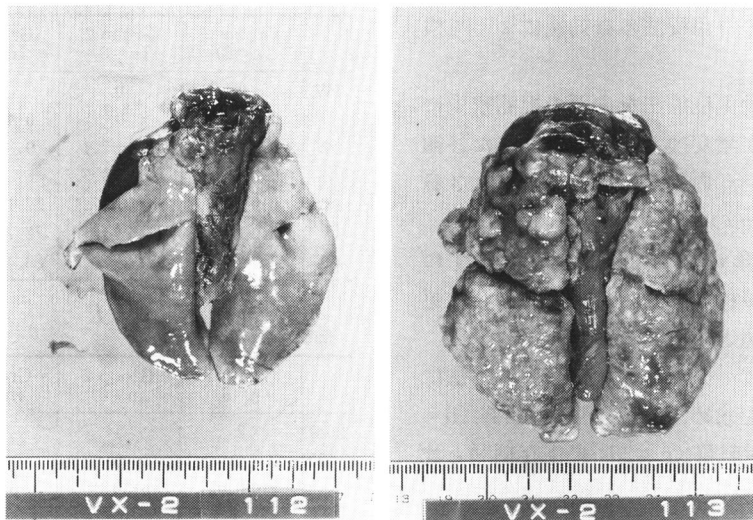


写真1 処置時肺転移の評価

(左) VX2-GRA 治療群の肺転移抑制例。(右) 無治療対照群の肺転移例—大小無数の結節性転移巣を認める。

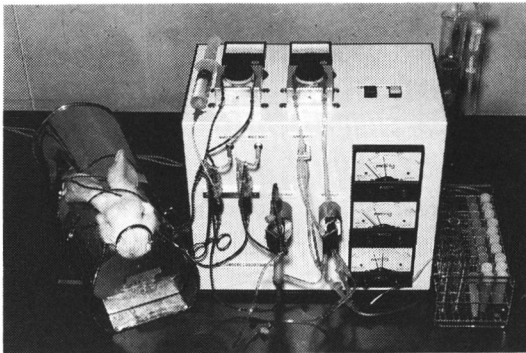


写真2 担癌家兎に対する血漿交換療法

膜性血漿分離器を用い、オンラインで血漿交換を施行した。耳介静脈より脱血し、対側耳介静脈に返血する方法で、体外循環血液流量を4~6ml/minに維持することにより、1分間に1~1.5mlの血漿交換が可能であった。

ml/minに保ち、1分間に1~1.5ml、1回の治療で40~50ml/kgの担癌家兎血漿を新鮮正常家兎血漿と交換した。

血漿交換を施行した13羽について血漿交換の前で採血を行い、血清PNAレセプター値および抗VX2腫瘍抗体価について検討を行った。

2) 血漿交換と特異能動免疫療法の併用効果の検討

担癌家兎47羽を対象に血漿交換とVX2-GRAを用いた能動免疫の併用療法の有効性について検討を行った。

血漿交換併用能動免疫療法を8羽の担癌家兎に対して施行した。血漿交換は腫瘍の確立した移植後15~17日目に行い、血漿交換施行日より3日間VX2-GRA 250ngの感作を行った。

治療後の腫瘍増殖について、血漿交換せずにVX2-GRAを腫瘍接種後15~17日目に投与した感作単独群10羽を対照として比較検討した。

また、延命効果についてはKaplan-Meier法により平均生存期間を求め、GRA感作単独群(n=13)および無治療対照群(n=26)の生存期間と比較検討した。

5. 評価法および統計学的処理

本療法の有効性を判定する指標である抗腫瘍効果、転移抑制効果、延命効果についての統計学的

検討は市販のコンピュータソフト(Medical plan II, STAX 98)を用いて行った。

平均値の差の検定はt検定, paired-t検定, Wilcoxon検定を行い、独立性の検定は χ^2 検定を行った。両側検定で $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

延命効果の検討は生存実験を行った家兎を対象とし、Kaplan-Meier法を用い腫瘍接種後癌死までの平均生存期間および実測生存率を求め、一般化Wilcoxon法にて有意差検定を行った。

結 果

1. 腫瘍関連PNA結合糖蛋白抗原(VX2-GRA)感作の有効性の検討

1) 抗腫瘍効果および肺転移の抑制効果

VX2-GRAにより特異的能動免疫療法を行った家兎の経時的腫瘍容量および処分時の肺転移の程度を表1に示す。

Group 1, 2, 3の腫瘍増殖は無治療群に比べ、統計学的に有意な差を認めなかった。腫瘍触知前にVX2-GRAを投与開始したGroup 1・2の腫瘍増殖曲線をみると、3~4週の間腫瘍増殖が無治療群に比し有意($p < 0.05$)に抑制されているが、初

表1 腫瘍関連糖鎖抗原感作の有効性

腫瘍容量：長径×短径²/2 cm³

	Group 1 (n=6)	Group 2 (n=6)	Group 3 (n=6)	Control (n=8)
1W	0 0.3±0.3	0	0 0.4±0.2	0 0.2±0.3
2W	9.6±7.8 20.2±8.9	4.8±7.1 19.6±9.7	9.3±7.4 —	8.7±7.2 23.7±7.4
3W	40.9±8.1 70.5±28.5	54.1±17.1 61.6±12.0	37.1±10.3 72.7±18.9	43.6±9.8 82.1±16.9
4W	83.4±41.1	93.7±20.5	88.4±29.5	128.5±50.1

p=ns

肺転移数：31日目に処分

	Group 1 (n=6)	Group 2 (n=6)	Group 3 (n=6)	Control (n=8)
20≤	2	1	4	7
<20	4 p<0.05	5 p<0.01	2 p=ns	1

(Group 1)：腫瘍接種後3-5日にVX2-GRA感作。

(Group 2)：" 7-10日"

(Group 3)：" 20-22日"

(Group 4)：無処置群

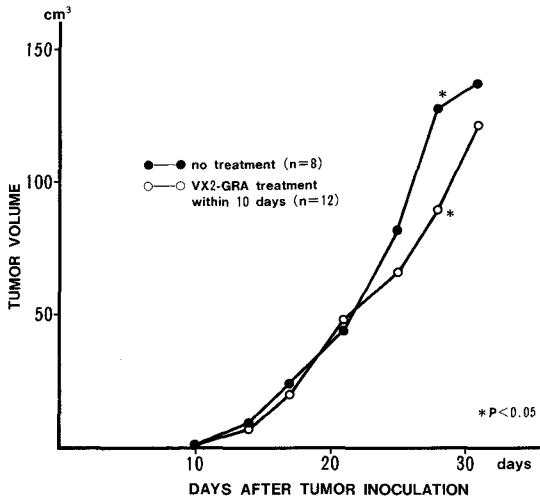


図1 VX2-GRA 感作と腫瘍増殖

早期感作を行った治療群において、有意な腫瘍増殖の抑制効果は認められなかった。

期の増殖は全く変わらなかった(図1)。

一方、肺転移数が20個未満に抑制された家兎は、Group 1では4/6(66.7%)、Group 2では5/6(83.3%)、Group 3では2/6(33.3%)であった。これは無治療群の1/8(12.5%)と比較して、Group 1, 2の腫瘍触知前感作群において有意($p < 0.05$)に転移の抑制が認められた(表1)。

2) 抗原感作と抗体価の変動

腫瘍確立前(腫瘍接種後10日以内)と腫瘍確立後(腫瘍接種14日以後)に抗原感作を行った家兎の抗腫瘍抗体価の推移を図2に示す。早期感作群の抗体価は腫瘍接種1~2週目において確立后感作群に比し高値を示す傾向が認められたが、統計学的な有意差はなかった。

2. 血漿交換療法との併用効果の検討

1) 血漿交換前後の血清 PNA 結合糖蛋白濃度および抗 VX2腫瘍抗体価の変動

血漿交換前後の血清 PNA 結合糖蛋白濃度、抗 VX2腫瘍抗体価の変動を図3に示す。

血清 PNA 結合糖蛋白濃度は血漿交換施行後有意に低下し、施行前高値(65nmol/ml以上)を示した3羽中2羽の値が正常化した。

血漿交換後の抗体価の減少は13例中11例(84.6%)に認められ、そのうち7例は10%以上の

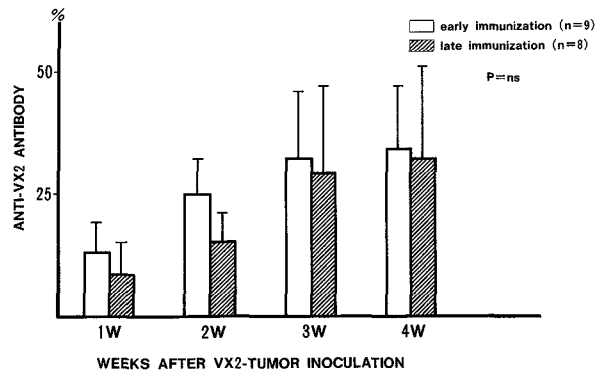


図2 VX2-GRA 感作後の抗 VX2腫瘍抗体価の変化
早期感作群(接種後10日以内)で抗体価の上昇が早く認められる傾向はあったが、統計学的な有意差はなかった。

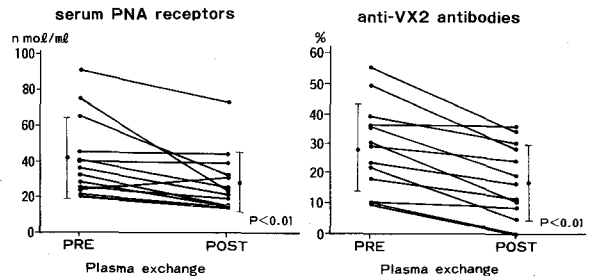


図3 血漿交換前後の血清 PNA レセプター濃度と抗 VX2腫瘍抗体価の変動

血漿交換施行後、ともに有意($p < 0.01$)な減少を示した。施行前 PNA レセプター高値(65nmol/ml)であった3羽のうち2羽の値が正常化した。抗体価の低下は13例中11例(84.6%)に認められた。

低下を示した。

2) 抗腫瘍効果

血漿交換と VX2-GRA 感作療法を行った家兎の治療後の腫瘍増殖曲線を図4に示す。血漿交換併用群の腫瘍増殖は感作単独群に比べ、治療2週後まで有意($p < 0.02$)に抑制された。

3) 延命効果

腫瘍確立後(接種15日以後)に治療を行った担癌家兎の生存曲線を図5に示す。Kaplan-Meier法により求めた平均生存期間は VX2-GRA 感作単独群($n=13$)45.3日、血漿交換併用群($n=8$)58.9日、無治療対照群($n=26$)43.4日であった。VX2-GRA 感作単独群では13羽中3羽に生存期間

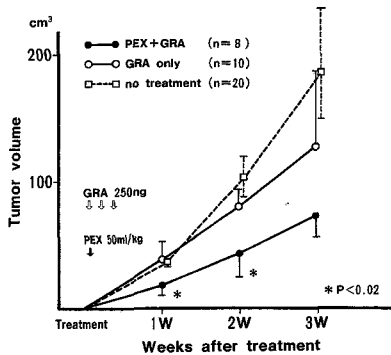


図4 血漿交換と VX2-GRA 感作併用療法の有効性
血漿交換との併用により、治療後2週目まで統計学に有意 ($p < 0.02$) な腫瘍増殖の抑制を認めた。

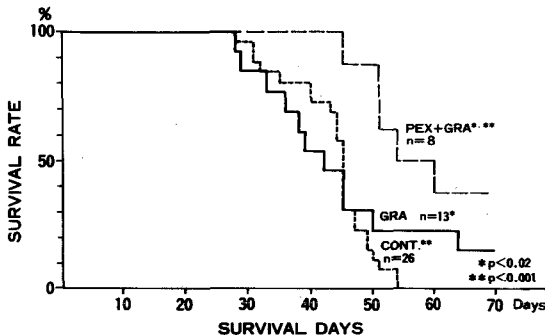


図5 VX2-GRA 感作療法を施行した担癌家兔の生存曲線

血漿交換併用群においては、感作単独群および無治療対照群に比し統計学的に有意 ($p < 0.02$, $p < 0.001$) な生存期間の延長を認める。

の延長を認めたが、平均生存期間は無治療群と比較して統計学的に有意な差を認めなかった。しかし、血漿交換療法を併用した群では GRA 感作単独群 ($p < 0.02$)、無治療対照群 ($p < 0.001$) と比べ有意に生存期間の延長を認めた。

考案

われわれは、担癌家兔を用いて PNA 結合腫瘍関連糖鎖抗原の担癌生体における動態、治療への応用について研究を行ってきた。すでに第1報で、担癌生体において血清 PNA 結合糖蛋白抗原が増加し、腫瘍増殖に関与している可能性を報告したが、本稿においては腫瘍より単離・精製した PNA 結合糖蛋白抗原を用いた能動免疫療法について検

討を行った。

まず腫瘍関連抗原についてであるが、今回の実験では、腫瘍特異性をもたせるために、in vivo で継代している VX2 腫瘍より単離・精製した抗原を用いた。

腫瘍より単離した PNA 結合糖蛋白抗原の生化学的特性については、Muramatsu らのグループが詳しく検討している。彼らは3種類の培養ヒト癌細胞より単離した PNA レセプターを分析し、それらが同一の生化学的特性を有する分子量 160,000~280,000 の糖蛋白であり、分子量 1,000~3,500 の糖鎖の集合体であることを示した²¹⁾。Adachi らはマウス肺癌細胞 (3LL) より単離した PNA レセプターを SDS gel 電気泳動法で測定した結果、200Kd および 80~90Kd にバンドを認めている¹⁵⁾。また PNA レセプターの表面糖鎖の解析では Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc の糖鎖のみが PNA と結合し⁴¹⁾、そのほかにも多くの糖鎖構造を有することが Adachi らにより報告されている²⁰⁾。

今回われわれは、Miyachi²¹⁾、Adachi¹⁵⁾ の報告しているのと同様の方法で抗原の単離・精製を行った。しかし、本腫瘍が筋層内に浸潤する腫瘍であるため腫瘍細胞の分離が困難で、培養細胞系より精製した抗原と比較してやや精度が劣る可能性が考えられた。予備実験で定量試験を行った結果、250ng の感作が最もキラー活性を誘導したため、今回の実験では同量を使用した。これは Adachi らがマウスの肺転移実験に使用した量の 2.5 倍であった¹⁵⁾。

われわれは今回の実験で、担癌家兔に対する PNA 結合糖蛋白抗原を用いた能動免疫療法について、①腫瘍接種後早期あるいは腫瘍触知前に感作を行うことにより対照群に比し有意に肺転移の抑制効果が認められた、②腫瘍確立後の感作では肺転移の抑制効果はみられなかった、③原発腫瘍の増殖抑制については有意な差を認めなかった、という結果を得た。

腫瘍より単離した PNA 結合糖蛋白抗原を用いた能動免疫療法について、Yamamura, Adachi らのグループは mouse の Lewis lung carcinoma を

実験モデルとして用い、その有効性について検討している^{15)~19)}。Adachiらは腫瘍細胞の静脈内投与モデルにおいて、PNAレセプターの感作が著明に肺転移を抑制したこと¹⁶⁾、また、Yamamuraらは原発腫瘍摘除後早期に感作することにより肺転移の抑制効果が著明であること¹⁷⁾、を報告しており、今回われわれの示した早期感作による肺転移の抑制という実験結果と一致している。

PNA結合糖蛋白抗原の抗腫瘍作用について、彼らはPNAレセプター陽性癌細胞に対する選択的なキラー活性の誘導によるものと考えている。AdachiらはPNAレセプターで感作した脾細胞を腫瘍細胞と同時に投与する(Winn assay)と生存期間の延長が得られること、また、ヒト培養細胞(KATO III)より単離した腫瘍関連抗原を健康人のリンパ球の培養液に加えて感作するとPNAレセプター陽性癌細胞に対する選択的なキラー活性の誘導が起こることを示した¹⁵⁾²⁰⁾。さらに浜田らは、その作用がPNAレセプター陽性細胞に共通であること、mouseの腫瘍にも有効であり種特異性のないことを報告している¹⁸⁾¹⁹⁾。

ところでわれわれは、第1報において早期の抗腫瘍抗体価の上昇が肺転移の抑制に関与していることを報告した。そこで、今回、抗原感作後の抗体価の変動をみた。その結果、早期感作群で抗体価の上昇はやや高い傾向を示したものの統計学的な有意差はなかった。今回の実験では早期感作群において明らかな肺転移の抑制が認められており、肺転移の抑制には抗腫瘍抗体とは別の機序が関与しているものと推察される。早期の感作により足立らのいうキラー活性の誘導が行われるが、腫瘍確立後の担癌家兎においては腫瘍関連抗原によるキラー活性の誘導を妨げる因子の存在が示唆された。

担癌患者におけるPNAレセプターによるリンパ球キラー活性誘導能について、山村らは担癌状態で低下しているが、腫瘍摘出後回復することを報告しており、同グループの浜田らはマウスの実験で手術的に腫瘍を摘出した後、PNAレセプターより誘導されるリンパ球キラー活性が有意に上昇したことを報告している¹⁸⁾¹⁹⁾。すなわち、担癌

生体においてはPNAレセプターの抑制因子が存在し、この能動免疫療法を有効に行うためには、外科的な腫瘍の摘出か他の何らかの方法を用い抑制因子を低下させる必要のあることが示唆された。

われわれは腫瘍関連抗原の作用に影響を及ぼす因子として、PNA結合糖蛋白濃度と血清抗VX2腫瘍抗体価の変動に注目し、第1報においてそれを報告した。その結果、2週以降の担癌生体では有意に血清抗VX2腫瘍抗体価の増加が認められ、腫瘍増殖とともにPNA結合糖蛋白濃度の上昇も証明された。また、早期より血清PNAレセプター濃度が高値を示した群で腫瘍増殖の促進がみられたことを報告し、血清PNA結合糖蛋白が担癌宿主の免疫応答を抑制している因子の一つであることを示した。

そこで、今回われわれは担癌状態における宿主の免疫学的環境を変える目的で、腫瘍の確立した2週以降の担癌家兎において血漿交換療法を行い、腫瘍関連抗原による能動免疫併用の有効性について検討を試みた。

その結果、併用療法により、①有意に腫瘍の増殖抑制が認められ、腫瘍の縮小がみられた、②著明な生存期間の延長が認められた、など単独治療で得られなかった抗腫瘍効果と延命効果が得られた。

担癌患者に対する血漿交換は1952年Adamsらの試みが最初とされるが⁴²⁾、担癌宿主の免疫能の改善を計り、癌の治療を目的とした血漿交換療法は1976年Herseyら³¹⁾、Browneら³²⁾、Israelら³³⁾により試みられ、細胞性免疫能の改善が認められたと報告されている。翌年、Israelらは約35%に抗腫瘍効果を認め臨床的に有効であったと報告し³⁴⁾、本療法が注目されるようになった。その後、多くの臨床例が報告されているがその評価については定まっていない²⁷⁾⁴³⁾。

われわれは担癌家兎に対する血漿交換療法の有効性について、腫瘍の増殖抑制効果は認められなかったが著明な生存期間の延長を認めたことを報告している³⁷⁾³⁸⁾。またWileらも担癌家兎を用いた実験で同様に生存期間の延長を認め、とくに10Kd

以下の低分子物質の除去の有用性について述べている²⁹⁾。

血漿交換療法が担癌宿主の performance status の改善に大きく寄与していることは事実であるが、臨床的に癌治療として有効な血漿交換を施行する場合、大量の血漿を必要とし、経済的な側面、血液製剤の調達的面から考えると問題も多い。

以前、他に治療法のない末期癌患者の延命を目的に行われた血漿交換療法であるが、最近では単独治療よりも種々の免疫療法や化学療法の前治療、併用療法として積極的に試みられている³⁵⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾。

今回のわれわれの研究は、積極的に能動免疫療法と併用することにより、効果を増強させることが目的である。

また、全血漿交換以外の方法として、標的となる抗体や blocking factor の分子量や特性を考え、選択的に効率よく除去する工夫が行われており^{45)~48)}、今後期待される治療法の一つであろう。

併用する免疫療法として、薄井は腎癌患者に対し LAK 療法との併用の有効性を報告している⁴⁵⁾。また、Bugis らは頭頸部癌患者の IL-2 に対する反応が低いのは血清中に IL-2 の blocking factor が存在するためと考え、血漿交換を行い、LAK 活性が上昇したことを報告している²⁸⁾。また TNF の blocking factor も最近指摘されており³⁰⁾、今後、併用療法が考慮されるかもしれない。

今回われわれの検討した PNA レセプターは先にも述べたように分子量 160,000~320,000 の糖蛋白と考えられているが、その他にも腫瘍増殖に関与する腫瘍関連ムチン性糖蛋白が知られており⁴⁹⁾⁵⁰⁾、マウス B16メラノーマにおいて肺の転移 potential に関係するシアロ酸糖蛋白 (PNA 結合糖蛋白)⁵¹⁾、ヒト培養大腸癌細胞における分子量 900,000 前後の高分子糖蛋白⁵²⁾、などが報告されている。こうした物質の除去が腫瘍関連糖鎖抗原による能動免疫療法の効果を増強するものと考えられる。

今回、われわれは血清 PNA レセプター値、抗 VX2 腫瘍抗体価を指標として血漿交換の前治療としての有効性を検討した。その結果、1 回の血

漿交換で PNA レセプター高値 (65nmol/ml) であった 3 羽において 18~52nmol/ml の血清値の減少を認め、そのうち 2 羽が正常値になった。また、抗体価の減少が 84.6% に認められたが、そのうち 10% 以上有意に低下したものは 53.8% であった。

今回の実験においては、技術的な問題、治療に多くの新鮮家兎血漿を必要とすることなどより、1 回の血漿交換だけで有効性の評価を行った。40~50ml/kg の血漿交換量は治療量として満足のいくものではない。しかし、今回の良好な成績より考えると、今後、継続して併用療法を施行することにより治療成績を高めうる可能性が十分ある治療法と期待される。

今回の研究をさらに進め、有効なヒト癌細胞由来の糖鎖抗原が単離・精製され、血漿交換や免疫吸着などの技法を開発・改良することにより、近い将来、本療法の臨床応用への道が開けるものと考えている。

結 語

PNA affinity chromatography を用いて単離・精製した腫瘍関連糖鎖抗原による能動免疫療法の有効性について検討し、次の結果を得た。

1) 早期感作により、有意な肺転移の抑制効果を認めた。この作用は抗腫瘍抗体を介するものではなかった。

2) 血漿交換との併用により、感作単独群で認めなかった、腫瘍増殖の抑制と著明な生存期間の延長を認めた。

3) 担癌宿主とくに進行例に免疫療法を行う場合、宿主の免疫応答能が重要な役割りを担うため、PS の改善、種々の抗体や抑制因子の除去を目的とした血漿交換療法は有用な併用療法の一つと考えられた。

今後、本研究をさらに進め、臨床応用への道を開きたい。

最後に稿を終えるにあたり、御多忙中、貴重な時間をさいて本研究の御指導御校閲を賜った泌尿器科主任東間 紘教授に心より謝意を述べたいと存じます。また技術面その他で貴重な御助言をいただいた

第三外科学太田和夫教授, 阿岸鉄三教授に深く感謝の念を抱くとともに, 家兎の血漿交換に協力していただいた透析室星野技師, 日々の実験を支えてくれた岩崎由美子嬢に厚くお礼申し上げます。また, 腫瘍抗原の単離に, 技術面で協力していただいた日本抗体研究所足立正一氏, 水田敏信氏にも深く感謝する次第であります。

文 献

- 1) **Hollinshead A, Takita h, Stewart T et al:** Specific active lung cancer immunotherapy. *Cancer* 62 : 1662-1671, 1988
- 2) **Hoover HC, Hanna MG:** Active immunotherapy in colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 5 : 436-440, 1989
- 3) **Mittelman A, Chen ZJ, Kageshita J et al:** Active specific immunotherapy in patients with melanoma. *J Clin Invest* 86 : 2136-2144, 1990
- 4) **Mitchell MS, Mitchell JK, Kempf RA et al:** Active specific immunotherapy for melanoma: Phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant. *Cancer Res* 48 : 5883-5893, 1988
- 5) **Hakomori S, Kannagi R:** Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 71 : 231-251, 1983
- 6) **Hakomori S:** Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: Overview and perspectives. *Cancer Res* 45 : 2405-2414, 1985
- 7) **神奈木玲児, 箱守仙一郎:** モノクロナール抗体による糖鎖性抗原の分析. *代謝* 23 : 141-154, 1986
- 8) **神奈木玲児, 三宅正幸, 銭田晃一ほか:** 糖鎖抗原と悪性腫瘍. *化学と生物* 26 : 220-234, 1987
- 9) **Reisner Y, Gachelin G, Dubois J et al:** Interaction of peanut agglutinin, a lectin specific for nonreducing terminal D-galactosyl residues with embryonal carcinoma cells. *Develop Biol* 61 : 20-27, 1976
- 10) **Muramatsu T, Gachelin G, Damonville M et al:** Cell surface carbohydrates of embryonal carcinoma cells: Polysaccharidic side chains of F9 antigens and receptors to two lectins, FBP and PNA. *Cell* 18 : 183-191, 1979
- 11) **Springer GF:** T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 224 : 1198-1202, 1984
- 12) **Gabius HJ, Schroter C, Gabius S et al:** Binding of T-antigen-bearing neoglycoprotein and peanut agglutinin to cultured tumor cells and breast carcinomas. *J Histochem Cytochem* 38 : 1625-1631, 1990
- 13) **Stefano DD, Mingazzini PL, Scucchi L et al:** A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. *Cancer* 67 : 463-471, 1991
- 14) **Campo E, Condom E, Palacin A et al:** Lectin binding patterns in normal and neoplastic colonic mucosa. A study of Dolichos biforus agglutinin, peanut agglutinin, and wheat geam agglutinin. *Dis Colon Rectum* 31 : 892-899, 1988
- 15) **Veerman AJP, Hogeman PHG, Huismans DR et al:** Peanut agglutinin, a marker for T-cell acute lymphoblastic leukemia with a good prognosis. *Cancer Res* 45 : 1890-1893, 1985
- 16) **Adachi M, Mizuta T, Yokota M et al:** Isolation of tumor associated antigens from Lewis lung carcinoma by affinity chromatography on peanut agglutinin-agarose. *Anticancer Res* 4 : 1-4, 1984
- 17) **Yamamura M, Hamada Y, Kogata M et al:** Postoperative immunization with peanut agglutinin-binding glycoprotein from Lewis lung carcinoma in mice. *J Surg Res* 38 : 39-44, 1985
- 18) **浜田吉則, 山村 学, 古形宗久ほか:** Peanut agglutinin receptor の Lewis 肺癌肺転移に及ぼす影響. *消化器と免疫* 12 : 65-69, 1984
- 19) **浜田吉則, 山村 学, 古形宗久ほか:** PNA binding glycorelated antigen の抗腫瘍効果. *消化器と免疫* 13 : 222-226, 1984
- 20) **Adachi M, Inui Y, Suzuki Y et al:** Active immunization of human cancer with tumor cell-associated carbohydrate antigen. *Anticancer Res* 90 : 309-312, 1989
- 21) **Miyauchi T, Muramatsu H, Ozawa M et al:** Receptors for peanut agglutinin isolated from cell lines of human Burkitt lymphoma, lung squamous cell carcinoma and gastric signet ring cell carcinoma. *Gann* 73 : 581-587, 1982
- 22) **Imagawa K, Funatsu A, Inui K et al:** *In* Teratocarcinoma and Embryonic Cell Interactions. (Muramatsu T, Gachelin G, Moscona AA et al eds) pp239-248, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1982)
- 23) **諏訪文明, 有馬揮勝, 福島正樹ほか:** 悪性腫瘍患者体液中の D-Gal- β (1 \rightarrow 3) Gqal NAc 糖蛋白質の検討. *消化器と免疫* 10 : 166-169, 1983
- 24) **諏訪文明, 有馬揮勝, 福島正樹ほか:** 血清および腹水中の PNA レクチン結合性糖蛋白. *消化器と免疫* 12 : 220-223, 1984
- 25) **中沢速和, 東間 紘, 高橋公太ほか:** 尿路系悪性

- 腫瘍患者における糖鎖関連抗原の臨床的検討。日泌尿会誌 76 : 1681, 1985.
- 26) **Ching CK, Rhodes JM** : Identification of the peanut-agglutinin binding pancreatic cancer serum maker in pancreatic tissue extracts. *Br J Cancer* 61 : 69-71, 1990
- 27) 金井弘一 : プラズマフェレーシス—悪性腫瘍。臨床水電解質 7 : 822-827, 1987
- 28) **Bugis SP, Lotzova E, Savage HE et al** : Inhibition of lymphokine-activated killer cell generation by blocking factors in sera of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 31 : 176-181, 1990
- 29) **Wile A** : Plasma ultrafiltration as cancer therapy. *Arch Surg* 124 : 222-224, 1989
- 30) **Gatanaga T, Hwang C, Kohr W et al** : Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 8781-8784, 1990
- 31) **Hersey P, Isbister J, Edwards A et al** : Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against melanoma cells induced by plasmapheresis. *Lancet* i : 825-826, 1976
- 32) **Browne O, Bell J, Holland PDJ et al** : Plasmapheresis and immunostimulation. *Lancet* ii : 96, 1976
- 33) **Israel L, Edelstein R, Mannoni P et al** : Plasmapheresis and immunological control of cancer. *Lancet* ii : 642-643, 1976
- 34) **Israel L, Edelstein R, Mannoni P et al** : Plasmapheresis in patients with disseminated cancer: Cancer results and correlation with changes in serum protein. *Cancer* 40 : 3146-3154, 1977
- 35) **Beyer JH, Schuff-Werner P, Kosterin h et al** : Efficacy of large-volume plasma exchange in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Oncology* 42 : 72-79, 1985
- 36) 中沢速和 : 担癌家兎における腫瘍関連糖鎖抗原の研究 第1報 担癌家兎における血清 PNA レセプター値および抗腫瘍抗体価の検討。東女医大誌 61 : 1018-1026, 1991
- 37) **Nakazawa H, Yamagata J, Hoshino T et al** : A trial of on-line plasmapheresis on tumor-bearing rabbits. *In Therapeutic Plasmapheresis III* (Oda T ed) pp459-461, Schattauer, Stuttgart ; New York (1983)
- 38) **Nakazawa H, Takahashi K, Hoshino T et al** : Effect of immunotherapy on tumor-bearing rabbits using tumor associated glycoprotein in combination with plasmapheresis. *In Therapeutic Plasmapheresis V* (Oda T ed) pp483-487, Schattauer, Stuttgart ; New York (1985)
- 39) **Shope RE, Hurst EW** : Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med* 58 : 607-624, 1933
- 40) **Rous P, Beard JW** : The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 62 : 523-548, 1933
- 41) **Shimoda N, Muramatsu H, Muramatsu T et al** : Carbohydrate moieties of peanut agglutinin receptors isolated from human gastric cancer cells. *J Biochem* 102 : 657-664, 1987
- 42) **Adams WS** : A method of human plasmapheresis. *Proc Soc Exp Biol Med* 80 : 377, 1952
- 43) 小川良雄, 平森基起, 永田篤文ほか : 末期尿路性器悪性腫瘍患者における血漿交換療法の臨床効果について。日泌尿会誌 79 : 1673-1679, 1988
- 44) **Uchida S, Sakagami K, Orita K** : Effect of serum fractions obtained from cancer patients by double filtration plasmapheresis combined with natural tumor necrosis factors and cyclophosphamide on murine pulmonary metastases. *Acta Med Okayama* 43 : 337-344, 1989
- 45) 薄井明博 : 腎細胞癌患者の養子免疫療法に関する研究—第2編 : 進行性腎細胞癌患者に対する血漿交換併用 LAK 療法—。日泌尿会誌 81 : 1058-1064, 1990
- 46) **Terman DS, Young JB, Shearer WT et al** : Preliminary observations of the effect on breast adenocarcinoma of plasma perfused over immobilized protein. *N Engl J Med* 305 : 1195-1200, 1981
- 47) 塩崎滋弘, 阪上賢一, 宮崎雅史ほか : 担癌患者に対する二重濾過膜血漿交換と吸着体併用の試み—低分子免疫抑制因子除去能からみた各種吸着体の比較検討—。人工臓器 15 : 1616-1620, 1986
- 48) **Hosokawa S, Mizuno H, Abe R et al** : Effective treatment for cancer by double filtration plasmapheresis. *Curr Ther Res* 45 : 152-161, 1989
- 49) 神奈木玲児, 福士泰夫, 箱守仙一郎 : 糖鎖特異的モノクローナル抗体によって認識される癌関連性ムチン (cancer-associated mucin) —SSEA-1 抗原群を中心として—。癌と化学療法 13 : 812-825, 1986
- 50) 入村達郎, 矢守隆夫, 松下能文 : 糖鎖抗原と癌転移。実験医学 6 : 33-39, 1988
- 51) **Irimura T, Nicolson GL** : Carbohydrate chain analysis by lectin binding to electrophoretical-

ly separated glycoproteins from murine B16 melanoma sublines of various metastatic properties. *Cancer Res* 44 : 791-798, 1984

- 52) **Irimura T, Carlson DA, Yamori T et al :**
Differential expression of a sialoglycoprotein

with an approximate molecular weight of 900,000 on metastatic human colon carcinoma cells growing in culture and tumor tissues. *Cancer Res* 48 : 2353-2360, 1988
