

結腸癌に対するレンチナンの apoptosis 誘導能に関する免疫組織学的検討

東京医科大学外科学教室 (指導: 小柳泰久主任教授)

和田建彦 中島 厚 坂本啓彰

【要旨】 結腸癌に対するレンチナンの apoptosis 誘導能を免疫組織染色を用いて検討した。同時に apoptosis と関連する Le^v 糖鎖, p53, および Fas 抗原, さらに細胞増殖能の指標である Ki-67 に対するレンチナンの影響も検討した。結腸進行癌症例を対象群, レンチナン 2 mg, 4 mg, 8 mg の 4 群に分け, レンチナン投与群は手術 2 週間前と 1 週間前の 2 回それぞれの用量を全身投与した。手術後, 切除標本を 20%ホルマリンで固定し, 連続切片を作成し TUNEL 染色, Le^v 糖鎖, p53, Fas 抗原および Ki-67 のそれぞれを免疫組織染色しその陽性率を比較した。

その結果, レンチナン 4 mg 投与群で TUNEL 染色陽性率の有意な増加を認め ($p < 0.05$), レンチナンの結腸癌に対する apoptosis 誘導能が認められた。今回の検討では, Le^v 糖鎖発現の増強を認めなかったが, apoptosis 以外の癌細胞にも広範に Le^v 糖鎖が発現しており, レンチナンの apoptosis 誘導能がマスクされてしまったためと考えられた。p53 陽性率も変化を示さず, レンチナンの apoptosis 誘導能は p53 に依存しないことが示された。Fas 抗原陽性率もレンチナンによる変化を示さないことから, Fas リガンドの関与は不明だが, レンチナンの apoptosis 誘導能は少なくとも癌細胞側の Fas 抗原を増強させ誘導しているのではないことが判明した。さらに, 細胞増殖能の指標である Ki-67 はレンチナンによる変化を示さないことから, レンチナンの apoptosis 誘導能は, レンチナンが癌細胞に直接作用し増殖能を低下させ apoptosis を誘導しているのではなく, 細胞障害性 T 細胞などの細胞性免疫機構を介して作用しているとの結論を得た。

緒 言

高分子中性多糖体であるレンチナンは BRM (Biological Response Modifier) 製剤の一種であるが, 他の BRM 製剤と異なり直接の細胞毒性作用を有さず, 宿主の免疫能を増強することにより抗腫瘍効果を示す薬剤である¹⁻³⁾。その作用機序として癌局所における局所細胞性免疫反応が惹起されることが必要である。この反応は様々な腫瘍において確認されており, 賦活される細胞としてはマクロファージ, NK 細胞, B 細胞および活性化された T 細胞とされ, 特にこの T 細胞の関与が強い^{4,5)}。胃癌においては癌局所における腫瘍浸潤リンパ球の増加が⁶⁾, また, 結腸癌においても同様の所見が報告されている⁷⁾。この腫瘍浸潤リンパ球は, T リンパ球であり, その subset は CD8 陽性細胞が主体である。当研究

室における解析においても, 結腸癌においてレンチナン投与により癌局所での細胞性免疫反応が惹起するのは確認されているが, この浸潤した T リンパ球が癌細胞に対して抗腫瘍作用を有し, いわゆる細胞障害性 T 細胞 (CTL) として作用しているとの確証は得られていない。一方, 永田らは⁸⁾ *in vitro* の実験においてレンチナン投与により培養癌細胞で apoptosis が誘導され, これが抗腫瘍作用の一面を有していると推察している。

そこで, 本研究ではレンチナンが細胞障害性 T 細胞 (CTL) を介し, 結腸癌に抗腫瘍作用を有していることを明確にするために, レンチナンの結腸癌組織に対する apoptosis 誘導能を TUNEL 染色を用いて検討し, 同時に apoptosis と関連の深い Le^v 糖鎖, Fas 抗原および p53 の免疫組織染色を行ない検討するとともに, レンチナンによる癌細胞の細胞増

1996年2月5日受付, 1996年2月19日受理

キーワード: レンチナン, apoptosis, TUNEL 染色, 結腸癌。

(別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学教室 和田建彦)

殖能とapoptosisの関係を確認するため、細胞増殖能の指標であるKi-67の検討も同時に行った。

対象及び方法

1. 対象と投与方法

1993年4月から1995年3月までに東京医科大学外科学第三講座において切除された(これらの症例には投与前に十分なインフォームド・コンセントを行い、承諾が得られている)結腸進行癌症例(Dukes B or C) 47例を対象とした。その内訳は術前レンチナン2 mg 2回投与群(以下、2 mg 群) 10例、4 mg 2回投与群(4 mg 群) 5例、8 mg 2回投与群(8 mg 群) 11例及び術前無治療群(対照群) 21例である。

レンチナンの投与方法は各群共に手術2週間前と1週間前に5%ブドウ糖液500 mlに混じ約3時間かけて点滴静注にて投与した。

2. 標本作成と観察方法

摘出された切除標本はただちに20%ホルマリンに固定後、肉眼的に壊死に陥っていない腫瘍部位のパラフィン包埋標本を用い連続切片を作成した。次いで、SAB (Streptavidin-Biotin) 法にてTUNEL染色、Le^y糖鎖、p53、Ki-67およびFas抗原のそれぞれを免疫組織染色した。一時抗体として、TUNEL染色にはMEBSTAIN Apoptosis kit (MBL社製、米国)を用いbiotinにて標識し、Le^y糖鎖にはBM-1 (JIMRO社製、日本)、p53にはRSp53 (ニチレイ社製、日本)、Fas抗原には抗Fas抗体(MBL社製、米国)およびKi-67にはMIB-1 (MBL社製、米国)を用いた。

TUNEL染色、Le^y糖鎖、p53、Fas抗原およびKi-67は標本内の腫瘍先進部の癌巣を強拡大(200倍)で観察し、癌細胞1,000個当たりの濃染細胞数をカウントし、これを3回繰り返しその平均値を、それぞれの陽性率とした。

TUNEL染色は細胞質や核内に顆粒状に染色され、これらを有する癌細胞を陽性とした(Fig. 1)。

Le^y糖鎖は主に細胞質が濃染されている癌細胞を陽性とした(Fig. 2)。また、Le^y糖鎖は腫瘍先進部と標本全体との染色性にばらつきを認めたため、標本全体の染色性をFig. 2の如くGrade 1:軽度(Fig. 2-a)、Grade 2:中等度(Fig. 2-b)、Grade 3:高度(Fig. 2-c)の3段階に分けて評価した。

p53は癌細胞の核が濃染されたものを陽性とした(Fig. 3)。

Fas抗原は細胞質が濃染された癌細胞を陽性とした(Fig. 4)。

Ki-67は癌細胞の核が濃染されたものを陽性とした(Fig. 5)。

3. 統計学的検討

背景因子は年齢・性別・病理組織学的分化度・Dukes分類をそれぞれ各群間ごとに比較し、年齢はF検定を用い、性別・病理組織学的分化度・Dukes分類はFisher's検定を用いて検討した。またTUNEL染色、Le^y糖鎖、p53、Ki-67、Fas抗原のそれぞれの陽性率はt検定を用いて検討した。危険率はすべて5%未満とした。

結果

1. 背景因子の検討

各群間における年齢・性別・病理組織学的分化度・Dukes分類はそれぞれの項目において統計学的偏りは認めなかった(Table 1)。

2. TUNEL染色陽性率

TUNEL染色陽性率の結果をFig. 6-Aに示した。4群すべてにおけるTUNEL染色陽性率の最大は5.4%(対照群)、最小は0.0%(対照群)、平均 $2.3 \pm 1.5\%$ であった。対照群のTUNEL染色陽性率は最大が5.4%最小は0.0%、平均 $1.8 \pm 1.6\%$ であり、レンチナン投与群のTUNEL染色陽性率は2 mg群が最大3.9%、最小0.5%、平均 $2.3 \pm 1.5\%$ 、4 mg群が最大4.6%、最小0.5%、平均 $3.5 \pm 1.7\%$ 、8 mg群が最大5.1%、最小0.7%、平均 $2.2 \pm 1.2\%$ であった。

以上の結果からTUNEL染色陽性率は、レンチナン4 mg群が対照群に比し有意に増加を示した($p < 0.05$) (Fig. 6-A)。しかし、2 mg群、8 mg群では軽度増加を示したものの有意差は認められなかった(Fig. 6-A)。

3. Le^y糖鎖の発現

Le^y糖鎖のGrade別分布は、癌巣全体および一部周囲間質にも染色を呈すGrade 3(高度)の割合が、対照群およびレンチナン投与群ともに62%(対照群13/21、LNT投与群16/26)占め、両群間に差を認めなかった。即ち、レンチナンによるLe^y糖鎖の発現の増強は認められなかった(Table 2)。

4. p53陽性率

p53陽性率の結果をFig. 6-Bに示した。4群すべてにおけるp53陽性率の最大は90.7%(8 mg群)、最小は0.0%が4群すべてで示され、平均 $33.3 \pm$

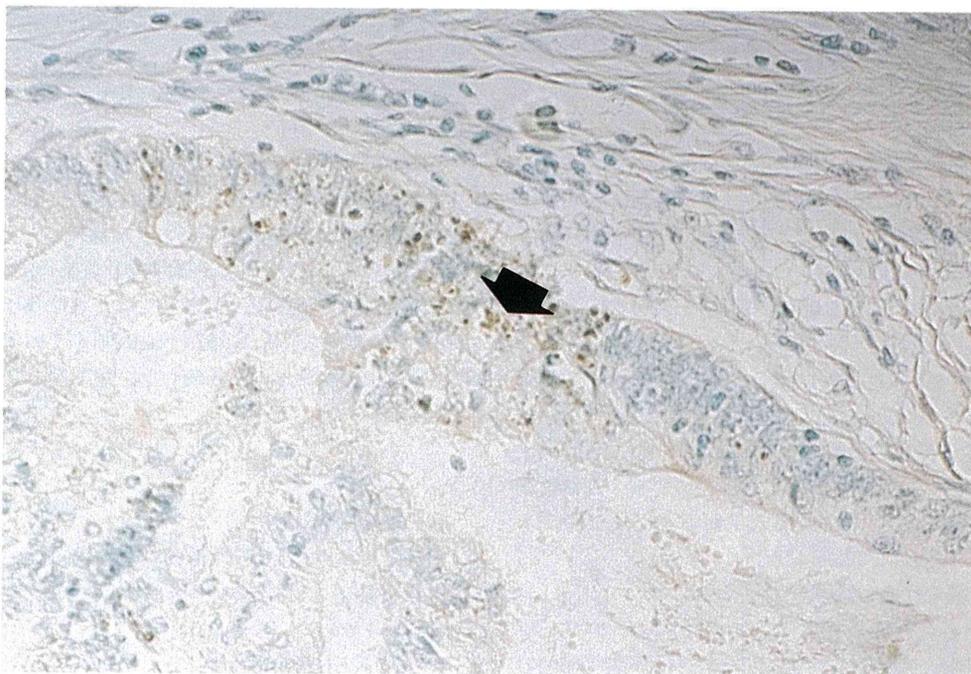


Fig. 1 Immunostaining of TUNEL method apoptotic cancer cells in the tumor of a patient given lentinan at 4 mg. (↑ apoptic body) (×100)

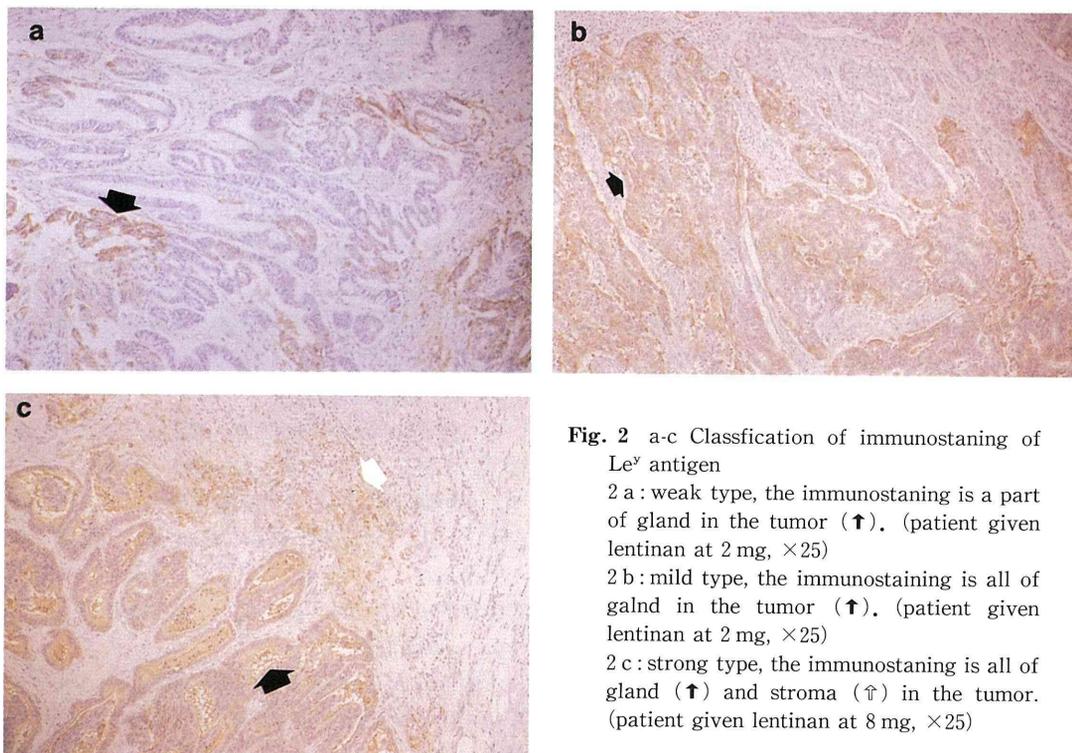


Fig. 2 a-c Classification of immunostaining of Le^y antigen

2 a : weak type, the immunostaining is a part of gland in the tumor (↑). (patient given lentinan at 2 mg, ×25)

2 b : mild type, the immunostaining is all of gland in the tumor (↑). (patient given lentinan at 2 mg, ×25)

2 c : strong type, the immunostaining is all of gland (↑) and stroma (↑) in the tumor. (patient given lentinan at 8 mg, ×25)

Fig. 3 Anti p53 antibody immunostaining on the tumor of a patient given lentinan at 8 mg. ($\times 200$)

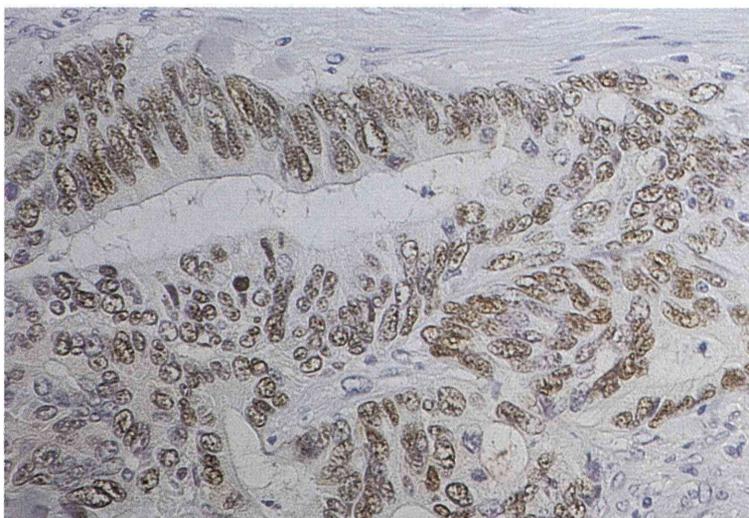


Fig. 4 Anti Fas antibody immunostaining on the tumor of a patient given lentinan at 8 mg. ($\times 200$)

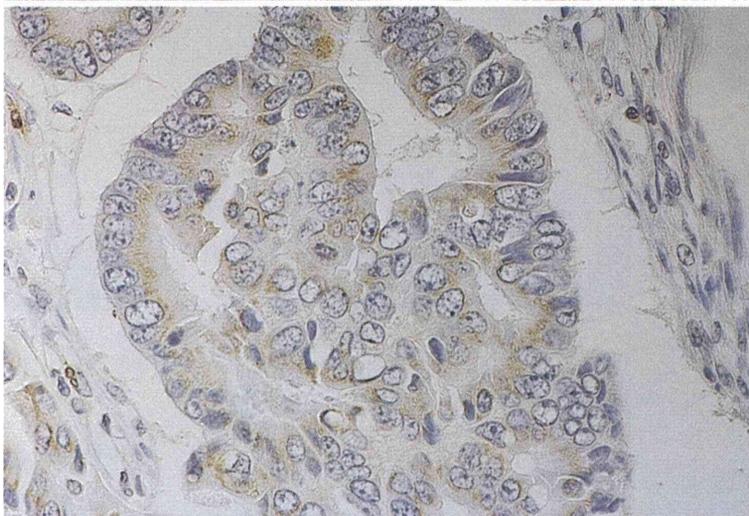


Fig. 5 Anti Ki-67 antibody immunostaining on the tumor of a patient given lentinan at 8 mg. ($\times 200$)

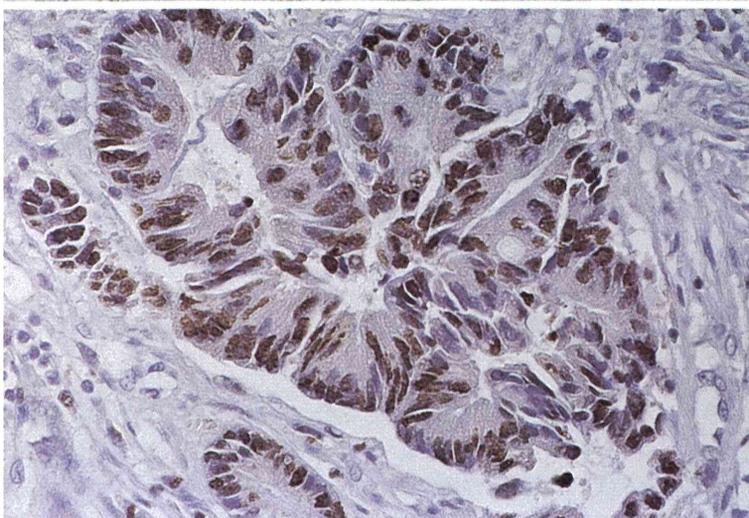


Table 1 Clinical characteristics of the subjects

		Control group	Lentinan-treated groups			Statistical analysis
			2 mg group	4 mg group	8 mg group	
No. of patents		21	10	5	11	
Age	Mean	61	58	55	64	NS*
	(SD)	(10.9)	(7.0)	(16.3)	(7.2)	
Sex	Male	12	5	5	6	NS**
	Female	9	5	0	5	
Histological	differentiation Well	3	3	1	1	NS**
	Moderately	18	7	4	10	
Dukes' classification	B	10	7	2	8	NS**
	C	11	3	3	3	

*F Test **Fisher's Exact Test

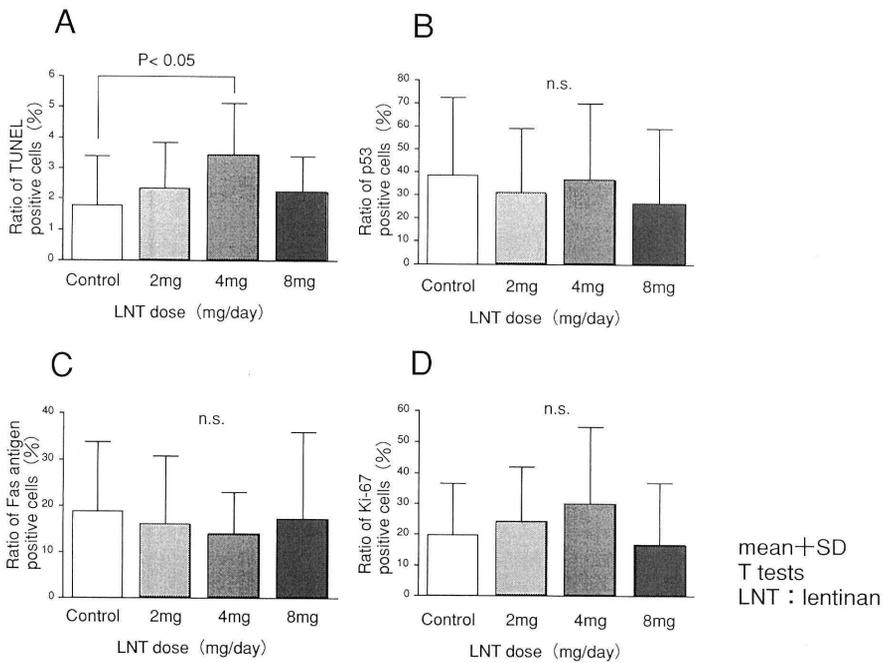


Fig. 6 Effects of lentinan on tumor of colon cancer.

A : Ratio of the cancer cells positive immunostaining with TUNEL method.

B : Ratio of anti p53 antibody positive cancer cells.

C : Ratio of anti Fas antibody positive cancer cells.

D : Ratio of anti Ki-67 antibody positive cancer cells.

32.0%であった。その内、対照群の p53 陽性率は最大が 88.1%，平均 38.4 ± 33.8%であった。一方、レンチナン投与群の p53 陽性率は 2 mg 群が最大 66.0%，平均 30.6 ± 28.6%，4 mg 群が最大 84.1%，

平均 36.2 ± 33.6%，8 mg 群が最大 90.7%，平均 25.9 ± 33.4%であり、対照群と比較し各群とも p53 陽性率の有意な変化は認められなかった (Fig. 6-B)。

Table 2 Comparison of Le^y antigen between Two Groups of the patients

	Grade	Grade	Grade	NS*
	1	2	3	
Control group	6	2	13	
Lentinan treated group	5	5	6	

5. Fas 抗原陽性率

Fas 抗原の陽性率の結果を Fig. 6-C に示した。4 群すべてにおける Fas 抗原陽性率は最大が 53.1% (8 mg 群), 最小が 0.0% (対照群, 2 mg, 8 mg), 平均 $17.3 \pm 15.1\%$ であった。その内, 対照群の Fas 抗原陽性率は最大が 47.8%, 平均 $18.8 \pm 15.1\%$ であった。一方レンチナン投与群の Fas 抗原陽性率は 2 mg 群が最大 43.1%, 平均 $15.9 \pm 14.9\%$, 4 mg 群が最大 29.0%, 最小 6.3%, 平均 $14.0 \pm 9.1\%$, 8 mg 群が最大 53.1% 平均 $17.3 \pm 18.8\%$ であり, 対照群と比較し各群とも Fas 抗原陽性率の有意な変化は認められなかった (Fig. 6-C)。

6. Ki-67 陽性率

Ki-67 陽性率の結果を Fig. 6-D に示した。4 群すべてにおける Ki-67 陽性率は最大が 75.7% (8 mg 群) 最小が 2.3% (8 mg 群), 平均 $21.2 \pm 18.5\%$ であった。その内, 対照群の Ki-67 陽性率は最大が 61.7%, 最小が 3.2%, 平均 $19.9 \pm 16.8\%$ であった。一方, レンチナン投与群の Ki-67 陽性率は 2 mg 群が最大 62.2%, 最小 10.1%, 平均 $24.4 \pm 17.7\%$, 4 mg 群が最大 66.4%, 最小 8.7%, 平均 $29.9 \pm 24.9\%$, 8 mg 群が最大 75.7%, 最小 2.3%, 平均 $16.7 \pm 20.3\%$ であり, 対照群と比較し各群とも Ki-67 陽性率の有意な変化は認められなかった (Fig. 6-D)。

考 察

1. レンチナンの抗腫瘍効果における apoptosis 誘導の可能性について

レンチナンは 1969 年 Chihara らによってシイタケの熱水抽出物より精製された中性多糖体である¹⁾。マウスを用いた動物実験において抗腫瘍効果および延命効果が認められており, その作用機序は直接細胞毒性ではなく, 宿主の細胞性免疫系を賦活し効果を発揮することが確認されている^{1), 2) 9-11)}。また, 胃癌などで抗腫瘍効果や延命効果が認められて

いる¹²⁾。臨床例でのレンチナンの作用を癌局所に注目してみると, 上野らは胃癌患者にレンチナンを静脈内投与することによって癌局所に T リンパ球の浸潤が亢進することを報告している⁶⁾。一方, Sakamoto らは結腸進行癌でも間質内に T リンパ球浸潤が亢進すること, さらに, 癌細胞膜との接着あるいは接着を経由したことを意味する, 光顕レベルでの emperipoetic T lymphocytes が増加すること, そしてそのほとんどが CD8 陽性 T 細胞であることを報告している⁷⁾。そして, これら浸潤した T リンパ球が細胞障害性 T 細胞 (CTL) として癌細胞に作用していると考えられている。

細胞障害性 T 細胞 (CTL) が癌細胞を障害する場合, perforin による経路と Fas を介して apoptosis を誘導させる経路の 2 つの pathway が報告されている¹³⁻¹⁶⁾。Perforin による標的細胞の死は, 一般に perforin が標的細胞の細胞膜に孔を開け細胞内に水が侵入し, 細胞が膨張し necrosis を来すといわれている¹⁷⁻¹⁹⁾, 開けた孔より fragmentin や granzymes などの蛋白分解酵素が移送され, その結果, 標的細胞内の Ca⁺ が高まり apoptosis を起こさせるとの考えもある²⁰⁾。

そこで, 本研究ではレンチナンの結腸癌に対する抗腫瘍作用を apoptosis²¹⁻²⁴⁾ に着目し検討した。Apoptosis に陥っている細胞は, 形態学的変化と DNA の fragmentation による DNA ladder の形成が特徴的²⁵⁾ であるが, 最近, DNA fragmentation によってできる, 数の多い新たな DNA の 3'-OH 末端を認識できる TUNEL 染色法²⁶⁾ により検出可能となった。しかし, TUNEL 法だけでは DNA に損傷が生じ fragmentation が起きただけの場合も認識するため, HE 染色の形態と十分対比させて判定する必要がある。

本研究における癌細胞の TUNEL 染色の陽性率をみると Fig. 6 のように対象群では約 1.8% の結腸癌細胞が apoptosis を起こしている。それに対してレンチナン投与群では 4 mg 群で陽性率が一番高く, 約 3.5% が apoptosis を起こしており, レンチナンにより有意に apoptosis の増加を認め, レンチナンが結腸癌組織に対し抗腫瘍効果を示していると考えられる。また, レンチナンによる TUNEL 染色陽性率は 4 mg 群で一番高値を示し, 次いで 8 mg 群, 2 mg 群とつづく。この事はこれまでいわれているように⁵⁾, レンチナンの抗腫瘍効果発現には容量依存

性ではなく、至適濃度が存在する可能性をうかがわせる。一方、Sakamotoらはレンチナン容量依存性にTリンパ球の浸潤が増加すると報告しており⁷⁾、レンチナンによるapoptosis細胞障害性T細胞(CTL)のみで誘導されるならば、TUNEL染色陽性率も容量依存性に増加を示すと考えられる。しかし、本研究の結果は異なり、ヒト大腸癌細胞に対し単球の抗体依存性細胞障害活性においてapoptosisが関与するとの報告²⁷⁾もあるように、細胞障害性T細胞(CTL)以外にレンチナンにより結腸癌細胞にapoptosisを起こす機構が存在する可能性が考えられる。

Apoptosisを免疫組織染色で評価する場合TUNEL染色が一般的であるが、Le^y糖鎖もapoptosis cellに高頻度に出現し、apoptosisの評価に有用性を示すとの報告がある²⁸⁾²⁹⁾。本研究においても、Le^y糖鎖を認識するBM-1抗体を用いた免疫組織染色を試みたが、レンチナン投与によるLe^y糖鎖がapoptosisを起こしていない癌細胞にも発現している、レンチナンによるapoptosisがマスクされてしまった可能性を示していると考えられる。事実、生方らはBM-1による癌細胞のapoptosisの検出はTUNEL染色より高頻度に出現すると報告している³⁰⁾。

2. レンチナンによるapoptosis誘導のメカニズムについて

レンチナンがapoptosisを誘導する機構について検討した。癌細胞のapoptosisを考える場合、まず癌関連遺伝子を考える必要がある。癌遺伝子としてはc-mycやbcl-2、癌抑制遺伝子としてはp53やs-mycなどがapoptosisと関連している。p53は細胞のapoptosis誘導において中心的役割をはたすため、変異型p53が認められる癌細胞ではapoptosisが起きにくくなっている³¹⁾。そこで、本研究では比較的検出が簡単な変異型p53に着目し、レンチナンが変異型p53を介し、apoptosisの誘導に影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、レンチナンによる変異型p53の陽性率の変化は認めず、変異型p53にレンチナンが影響を及ぼし、apoptosisを誘導しているのではない。つまり、p53に依存しないapoptosisと考えられた。

次いで、細胞障害性T細胞(CTL)を紹介するapoptosisを検討した。近年、細胞障害性T細胞(CTL)がapoptosisを誘導する場合、perforinと

Fas-Fasリガンドによる2つの経路しか存在しないことが、ノックアウトマウスを用いた実験で証明されている¹³⁾¹⁴⁾³²⁾。後者の場合、細胞障害性Tリンパ球(CTL)がFasリガンドを発現し、標的細胞である癌細胞がFas抗原を発現している。そこで、レンチナンの癌細胞Fas抗原に対する影響を検討した。その結果は、レンチナン投与によるFas抗原の発現の変化は認められなかった。この結果は、Sakamotoらが報告した、レンチナンにより癌局所で誘導されるTリンパ球の主体はほとんどCD8陽性細胞であった⁷⁾という事実と関連して考案する必要がある。つまり、細胞障害性T細胞(CTL)にはCD8陽性細胞とCD4陽性細胞とがあり、このうち、CD4陽性細胞はperforinを発現せず、その殺細胞機構はFas抗原とFasリガンドによるapoptosisだけである。一方、CD8陽性細胞はperforinとFas-Fasリガンドの両方の機構を有している。従って、レンチナンによりCD8陽性細胞を介しapoptosisが誘導されるには、perforinの経路によるものが多いと思われ、癌細胞のFas抗原の発現を増強する必要がないと考えられるからである。しかし、レンチナンは細胞性免疫機構を介し抗腫瘍効果を示すため、T細胞のFasリガンドの発現を増強し、Fas抗原には影響を及ぼさず、apoptosisを免れていたFas抗原を有する癌細胞にapoptosisを誘導している可能性も考えられる。

3. レンチナンのapoptosis誘導能と癌細胞の増殖活性能の関係について

Ki-67³³⁾³⁴⁾を指標にして癌細胞の増殖活性能とレンチナンの誘導するapoptosisを検討した。その結果、レンチナンによるKi-67の陽性率の変化は認められなかった。また、TUNEL染色とKi-67の陽性率の相関も検討したが、相関係数は-0.0026であり、相関は認められなかった。

以上の結果より、癌細胞の増殖活性能とは関係なくapoptosisが誘導されることが示され、やはりレンチナンは癌細胞の直接障害作用を有せず、Tリンパ球などの細胞性免疫機構を介して抗腫瘍効果を発揮し、apoptosisを誘導していると考えられた。

本研究においてはレンチナンを全身投与し、原発巣でのapoptosis誘導を確認した。マウスを用いた動物実験において、レンチナンの全身投与で転移抑制効果がみられた報告もあり³⁵⁾、レンチナン投与により浸潤したTリンパ球が、術前の微小転移での癌

細胞や術後の肝転移をきたそうとする癌細胞にapoptosisを誘導し、未然に癌の進展を防いでいる可能性が考えられ、臨床応用により、結腸癌の予後改善が期待される。

結 語

免疫組織染色法を用い、結腸癌に対するレンチナンのapoptosis誘導能を検討した。同時に、apoptosisに関連するLe^y糖鎖、p53、Fas抗原および細胞増殖能の指標であるKi-67のレンチナンによる変化を検討した。

レンチナン4mg群でTUNEL染色陽性率の有意な増加を示し、結腸癌に対するレンチナンのapoptosis誘導能が認められた。

Le^y糖鎖はapoptosis以外の癌細胞にも発現すること、また、レンチナンによるapoptosisは、p53には依存せず、癌細胞側のFas抗原を増強し誘導するものではない事が判明した。

レンチナンのapoptosis誘導能は、癌細胞の増殖能を低下させ誘導しているものではないことが示された。

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました東京医科大学外科学教室小柳泰久教授に深甚なる謝意を表すとともに、御教示と御助言を頂きました東京医科大学病院病理部芹沢博美講師、東京医科大学外科学教室日馬幹弘講師、加藤孝一郎博士に深謝いたします。また、多大なご協力を頂きました斉藤準先生、井上敬一郎先生はじめ当教室員各位に感謝申し上げます。

なお本論文の要旨は第8回日本BRM学会学術集会総会で報告した。

参 考 文 献

- 1) Cihara, G., Maeda, Y., Hamuro, et al.: Inhibition of mouse sarcomal 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Nature* **222**: 687~688, 1969
- 2) Y. Y. Maeda, J. Hamuro and G. Cihara: The Mechanism of action of antitumor polysaccharides. I. The effects of anti lymphocyte serum on the anti tumor activity of lentinan. *Int. J. Cancer*, **8**: 41, 1971
- 3) Y. Arai, H. Tanaoka, T. Sekine et al.: Effect of immunosuppressive agent on antitumor action of lentinan. *Gann* **62**: 131, 1971
- 4) R. Tokuzen: Comparison of Local Cellular Reaction to Tumor Graft in Mice Treated with Some Plant Polysaccharides. *Cancer Res* **31**: 1590, 1971
- 5) 羽室淳爾: 生体防御とがん 講談社: 87~90, 1994
- 6) 上野正見, 龍沢千晶, 近裕他: レンチナンの静注による胃癌局所Tリンパ球浸潤の亢進. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* **26**: 2359~2364, 1991
- 7) N. Sakamoto, Y. Koyanagi, A. Nakajima et al.: Immunohistochemical analysis of advance colon cancer after lentinan administration. *Ann Cancer Res Ther* **4**: 91~97, 1996
- 8) 永田緑, 杉山保幸, 佐治重豊他: BRM製剤の腫瘍細胞アポトーシス誘導能に関する基礎的検討. 第16回癌免疫外科研究会抄録集: **22**, 1995
- 9) Zakany J, Chihara G, Fachel J: Effect of lentinan on tumor growth in murine allogenic and syngentic hosts. *Int. J. Cancer* **25**: 371~376, 1980
- 10) Suga T., Shio T., Maeda Y.: Antitumor activity of lentinan in murine syngenic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthreneinduced carcinogenesis. *Cancer Res.* **44**: 5132~5137, 1984
- 11) Hamuro J., Rolvinghoff, M. Wagner H.: β (1→3) Glucanmediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T-lymphocytes in vivo. *Cancer Res.* **38**: 3080~3085, 1978
- 12) Taguchi t.: Clinical efficacy with stomach cancer: and point results of a four-year followup survey. *Cancer Detection and Prevention Supl.* **1**: 333~349, 1987
- 13) Suda T., Takahashi T., Golestein P. et al.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of tumor necrosis factor family. *Cell* **75**: 1169~1178, 1993
- 14) Suda T., Nagata S.: Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* **179**: 873~878, 1994
- 15) Kagi D., Vagnaux F., Ledermann B. et al.: Fas and perforin pathway as major mechanisms of T cellmediated cytotoxicity. *Science* **265**: 528~530, 1994
- 16) Lowin B., Hahne M., Mattmann C. et al.: Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathway. *Nature* **370**: 650~652, 1994
- 17) Podak ER., Hengartner H., Lichtenheld MG.: A central role of perforin in cytolysis. *Ann Rev Immunol* **9**: 129~157, 1991
- 18) Yagita H., Nakata M., Kawasaki A. et al.: Role of perforin in lymphocyte-mediated cytolysis. *Advances in Immunology* **51**: 215~242, 1992
- 19) Liu C.-C., Walsh C., Young J. D.-E. et al.: Perfor-

- in: structure and function. *Immunol Today* **16**: 194~201, 1995
- 20) 石井秀始, 若杉尋: 悪性腫瘍とアポトーシス臨床医中外医学社 **9**: 2134~2135, 1995
- 21) Kerr JFR, Whillie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *Brit J. Cancer* **26**: 239, 1972
- 22) Kerr JFR: Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**: 13~20, 1971
- 23) Raff, M. C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 379~400, 1992
- 24) Dive C., Hickman JA.: Drug-target interaction: Only the first step in the commitment to a programmed cell death. *Br. J. Cancer* **64**: 192~196, 1991
- 25) Wyllie AH.: Glucorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555~556, 1980
- 26) Gravieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson SA.: Identification of programmed cell death in situ via specific binding of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Bio.* **119**: 493~501, 1992
- 27) 馬場欽也, 高椋清, 李健他: 抗体依存性細胞障害活性におけるアポトーシスの関与: INF- γ による増強. 第8回日本BRM学会学術集会総会抄録集: **69**, 1995
- 28) Hiraishi K., Suzuki K., Hakomori S.: Ley antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* **3**: 381~390, 1993
- 29) Arends MJ., Wyllie AH.: Apoptosis: Mechanism and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol* **32**: 223~254, 1991
- 30) 生方英幸, 田淵崇文, 岡本光順他: 胃癌, 大腸癌組織における Le-y 糖鎖の発現とアポトーシスに関する検討. 第16回癌免疫外科研究会抄録集: **22**, 1995
- 31) Clarke AR., Purdie CA., Harrison DJ. et al.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathway. *Nature* **362**: 849~852, 1993
- 32) Yonehara S., Ishii A., Yonehara M.: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **169**: 1747~1756, 1989
- 33) Gerdes J., Schwab U., Lemke H, et al.: Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* **31**: 13~20, 1983
- 34) 山口明夫, 石田哲也, 西村元一他: モノクローナル抗体 Ki-67 を用いた大腸癌の細胞動態の検討. 日外会誌: **1045**, 1987
- 35) Suga T., et al.: Prevention of tumor metastasis and recurrence of DBA/2. Mc. CS-1, DBA/2. Mc. CS-T, fibrosarcoma, MH134 hepatoma and other murinetumors using lentinan. *Int. J. Immunotherapy* **4**: 187~193, 1989

Immunohistological Analysis of Apoptosis Induction by Lentinan Therapy in Colon Cancer

Tatehiko WADA, Atsushi NAKAJIMA
and Nobuaki SAKAMOTO

Department of Surgery, Tokyo Medical College
(Director: Prof. Yasuhisa KOYANAGI)

The ability of lentinan to induce apoptosis in colon cancer was evaluated by immunohistological staining. Effects of lentinan on Le^y saccharide chain, p53, and Fas antigen, which are related to apoptosis, and also on Ki-67, which is an indicator of cell proliferation, were also examined. Patients with advanced colon cancer were divided into the following 4 groups: control and 2-mg, 4-mg and 8-mg lentinan-treated groups. Lentinan was systemically administered 2 weeks and 1 week before operation at a specified dose. After operation, excised specimens were fixed with 20% formalin solution, and sequential tissue sections were stained with TUNEL and also immunohistologically stained for Le^y saccharide chain, p53, Fas antigen and Ki-67. Positive rates were compared between groups.

The TUNEL-positive rate significantly increased in the 4-mg lentinan-treated group ($p < 0.05$), demonstrating the ability of lentinan to induce apoptosis in colon cancer. Although the expression of Le^y saccharide chain was not augmented, Le^y saccharide chain appeared in a wide range of cancer cells, other than those with apoptosis. This indicated that the ability of lentinan to induce apoptosis was masked. The p53-positive rate remained unchanged, indicating that the ability of lentinan to induce apoptosis is not governed by p53. The Fas antigen-positive rate was also unchanged, at least revealing that apoptosis induced by lentinan does not occur by enhancement of Fas antigen in cancer cells although it is unclear whether Fas ligand is involved in the induction of apoptosis by lentinan.

Ki-67, an indicator of cells proliferation, was not influenced by lentinan. Thus it was concluded that the ability of lentinan to induce apoptosis is mediated by cellular immunity, for example cytolytic T-lymphocyte (CTL)-mediated cytolysis, but does not result from the direct effect of lentinan on cancer cells in inducing apoptosis through suppression of cell proliferation.

<Key words> Lentinan, Apoptosis, Tunel method, Colon cancer.
