
バイオブラン (米ぬかアラビノキシラン誘導体)
によるがん患者のNK免疫回復
(患者32人の4年間追跡試験)

Mamdooh Ghoneum, Ph.D. & Jimmy Brown, M.D.
Department of Otolaryngology, Drew University of Medicine and Science, USA

NK細胞とは、胸腺の影響を受けずに骨髄から生じる、成熟マクロファージの特徴を欠く非B細胞又は非T細胞とされている^{1,2)}。NK細胞は腫瘍拒絶、免疫監視、感染に対する抵抗、及び免疫調節に決定的な役割を果たす³⁻⁵⁾。NK細胞の癌細胞破壊には連続的な反応が関与している⁶⁾。まず、NK細胞が癌細胞を認識してこれに結合する。このプロセスには受容体と受容体の相互作用が必要である。次に、NK細胞は癌細胞に浸透して最終的に殺す顆粒を放出する。そしてその癌細胞から分離して別の癌細胞に結合し、同じプロセスを繰り返す。

しかし、癌細胞はその細胞戦争における反撃方法を知っている。我々の研究室では、癌細胞が貪食作用という現象により白血球を破壊できることを初めて発見した⁷⁻¹⁰⁾。これには3通りの方法があるのを我々は観察している。癌細胞は2本の腕を白血球の周りに伸ばすか、カップ形の開口部を生じて白血球を内部に引き入れる。3番目の方法は、長い1本の腕を伸ばして白血球を捕らえ、癌細胞の内部に引き入れ、消化する。さらに、他の研究者による多くの研究から、癌細胞が免疫抑制物質を分泌し、それが免疫系の機能を阻害することが判明している¹¹⁻¹³⁾。

この25年間で、様々な生体反応調整物質 (BRM) を用いて免疫系の力を強化しようという試みが行われている。これらは免疫増強作用を有する細菌や菌類に由来する物質である^{4,14,15)}。さらに、イ

本論文は Anti-Aging Medical Therapeutics, Vol.3, pp.217-226, 1999 に掲載されたものを、翻訳後、一部改変して再掲載したものである。

III-1-2 バイオブラン (米ぬかアラビノキシラン誘導体) によるがん患者のNK免疫回復 (患者 32 人の…

インターフェロン, インターロイキン-2, インターロイキン-12 など, ある種のサイトカインが BRM として作用する^{16,17)}。これら BRM に関連する問題が 2 つある。1 つは毒性であり, もう 1 つは低反応性が生じることである。これは BRM の単回投与で NK 細胞活性は大いに増強するが, 同じ BRM の投与を繰り返すと NK 細胞活性が低下することである¹⁸⁻²⁰⁾。

バイオブラン/MGN-3 が他の BRM にまさる利点を有していることは興味を引かれることである。バイオブラン/MGN-3 は毒性がなく, 患者を経過観察した 4 年間に低反応性は認められなかった。この研究は, バイオブラン/MGN-3 として知られる新しい BRM が NK 細胞機能と T 細胞及び B 細胞増殖に及ぼす増強効果を 32 人の患者において検討するために行った。腫瘍関連抗体は選択した患者について報告した。

患者, 試験材料, 試験方法

1. 患者

本試験は 32 人の患者を対象として実施された。患者は, 前立腺癌¹⁰⁾, 乳癌¹²⁾, 多発性骨髄腫⁵⁾, 白血病と, 異なる種類の悪性腫瘍に罹患していた。患者の大多数は先ず, 手術, 放射線療法, 又は化学療法など通常の治療法を用いた腫瘍減量治療を受けていた。

2. 試験材料

MGN-3 は, 椎茸抽出物で酵素処理を行った米ぬかから抽出されたアラビノキシランである。これは 1,4 キシロピラノース・ヘミセルロースを含む多糖類であり, バイオブランとして販売されている (大和薬品株式会社, 東京)。

3. 試験方法

- (1) 治療プロトコール: 患者にはバイオブラン/MGN-3 (1 日 3 g) が毎日経口投与された。
- (2) 腫瘍関連抗原 (TAA): 各種腫瘍の TAA をバイオブラン/MGN-3 投与前と投与 1 ヶ月後に測定した。
- (3) 腫瘍細胞株: ヒト赤白血病細胞株である K562 を標的として用いた。腫瘍細胞は, 10%胎児ウシ血清及び 1%抗生物質 (ペニシリン 100U 及びストレプトマイシン 100 µg/ml) を添加した RPMI-1640 からなる完全培地 (CM) で培養した。
- (4) 末梢血リンパ球 (PBL) の調製: PBL は Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心を用いてヘパリン添加新鮮末梢静脈血から調製した。細胞はハンク平衡塩類溶液 (HBSS) で 2 回洗浄し, 10×10^6 細胞/ml の濃度で CM 中に再懸濁させた。
- (5) NK 活性測定のための ⁵¹Cr リリースアッセイ: NK 活性は標準的な 4 時間 ⁵¹Cr リリースアッセイにより測定した。簡単に述べると, CM 0.1 ml 中の 1×10^4 個の ⁵¹Cr 標識腫瘍細胞を 96 マイクロタイタープレートに加える。その後, 効果細胞を, E:T 比が 12:1, 25:1, 50:1, 100:1 になるように 4 穴ずつにピペットで加えた。37°C で 4 時間インキュベートした後, プレートを遠心分離し (1,400 rpm で 5 分間), 各穴の上清 0.1 ml を採取し, ガンマカウンターで計数した (Beckmann G50, Beckmann Instruments)。

放出されたアイソトープのパーセンテージは以下の式で算出した。

$$\text{溶解\%} = \frac{\text{Exp. Rel.} - \text{Sp. Rel.}}{\text{Total Rel.} - \text{Sp. Rel.}} \times 100$$

III-1-2 バイオブラン (米ぬかアラビノキシラン誘導体) によるがん患者のNK免疫回復 (患者32人の…)

- (6) 標的細胞からの自然放出量 (SP) は総放出量の 8-10% を超えなかった。総放出量は特定の穴にトリトン X-100 (シグマ化学) 0.1 ml を加えることにより測定した。溶解単位 (LU) は, 1LU を, K562 の 20% 溶解を達成するのに必要な効果細胞数と定義し, 効果細胞力価曲線から求めた。
- (7) NK 顆粒集積性: パーコール画分 PBL を 2.5×10^6 細胞/ml に調整し, サイトスピン細胞遠心機 (Shandon Southern Institute, Sewickley, PA) を用いてスライド上で 1,000 回転/分で 5 分間遠心分離した。スライドは風乾させ, 100% MeOH で固定し, 5% ギムザ溶液で 10 分間染色した。染色した標本の NK 細胞の顆粒集積性を検討した²¹⁾。
- (8) *in vivo* での T 及び B リンパ球増殖: バイオブラン/MGN-3 が T 及び B 細胞増殖に及ぼす *in vivo* での影響を, ³H-チミジン取り込みを用いて検討した。MNC は 5 人の白血病患者の末梢血からバイオブラン/MGN-3 投与前及び投与 1 カ月後に調製した。細胞は CM 中で 2×10^6 細胞/ml 濃度でインキュベートした。細胞はフィトヘムアグルチニン (PHA), コンカナバリン A (ConA), あるいはポークウィードマイトジェン (PWM) の 10 μ g/ml 溶液で 3 日間処理した。最後の 18 時間に 1 μ Ci の ³H チミジン (New England Nuclear) を細胞培養液に加えた。DNA を採取し, ³H チミジン取り込みをシンチレーションカウンタを用いて測定した。すべての実験は 3 重測定し, データは 1 分あたりのカウント数 (cpm) で表した。
- (9) 統計解析: Student T 検定を用いて, NK 活性と T 及び B 細胞のマイトジェンに対する反応のバイオブラン/MGN-3 投与前後での差の有意性を検討した。

結 果

1. NK 細胞活性

Fig. 1 は癌患者 32 人における NK 細胞の細胞毒性反応の投与前値を示す。患者は全体的に NK 機能が有意に低下していた。NK 活性の低下は様々な癌患者で認められた。すなわち, 前立腺癌患者では 11.1 LU, 乳癌患者では 11.4 LU, 多発性骨髄腫患者では 7.3 LU, 白血病患者では 4.3 LU であった。最初の試験の 1-2 週間後に被験者 12 人の末梢血リンパ球に対して実施された検査結果から, NK 活性は最初の結果と有意差がないことが明らかになった。バイオブラン/MGN-3 の投与により NK 活性は 10 倍まで有意に上昇した。前立腺癌患者で 41.9 LU, 乳癌患者で 33 LU, 多発性骨髄腫患者で 31.9 LU, 白血病患者で 51.4 LU とバイオブラン/MGN-3 の増強効果は全種類の癌で認められた。バイオブラン/MGN-3 の増強効果に対する反応には個人差があった。

2. NK 顆粒集積性

サイトスピン細胞遠心による投与前の PBL-NK 細胞標本では, 顆粒集積性は低い顆粒が全く存在していない細胞が認められた (Fig. 2a)。一方, バイオブラン/MGN-3 投与 1 週間後には顆粒含有量の有意な上昇が生じた (Fig. 2b)。バイオブラン/MGN-3 により活性化された NK 細胞は癌細胞への結合能力や殺細胞能力を高めたことが証明された (Fig. 3)。

3. T 及び B リンパ球の *in vivo* での増殖

Fig. 4 は, バイオブラン/MGN-3 の投与により T 細胞増殖が有意に上昇することが, マイトジェン PHA 及び ConA への反応により証明されたことを示す。B 細胞増殖も投与前値に比べて上昇したことが, B 細胞マイトジェンである PWM への反応により示された。

Ⅲ-1-2 バイオブラン（米ぬかアラビノキシラン誘導体）によるがん患者のNK免疫回復（患者32人の…

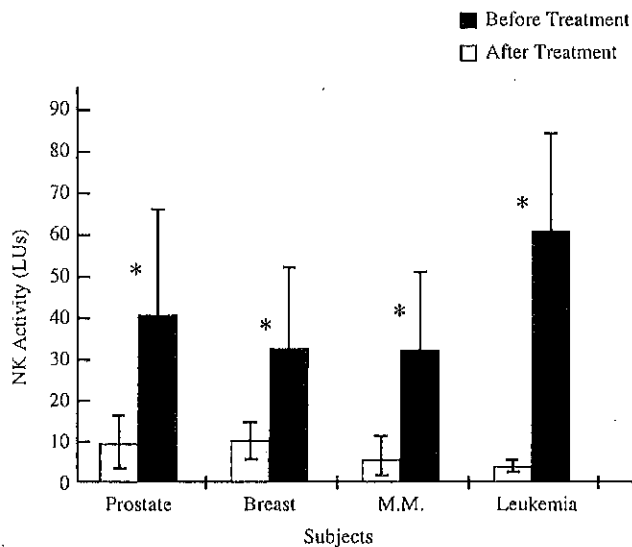


Fig. 1 Effects of MGN-3 on NKcell activity of 32 patients at one to two weeks after treatment

Malignancies were: prostate (10), breast (12), multiple myeloma-MM (5), and leukemia (5)

LUs at 20% *P<0.001.

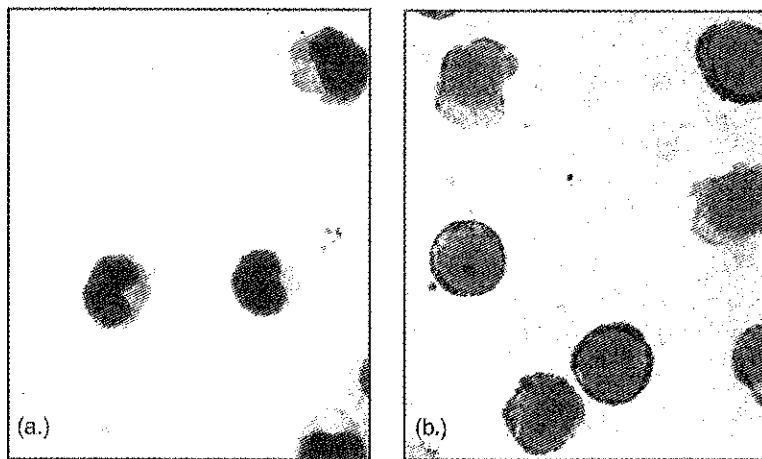


Fig. 2

(a): Cyto centrifuge preparation of PBL-NK cells isolated from cancer patient before treatment with MGN-3.

(Giemsa, X740).

Notice high nuclear cytoplasmic ratio and absence of granules.

III-1-2 バイオブラン（米ぬかアラビノキシラン誘導体）によるがん患者のNK免疫回復（患者32人の…

(b): Cytocentrifuge preparation of PBL-NK cells of the same patient at one week post-treatment with MGN-3. Cells demonstrated high granular content.

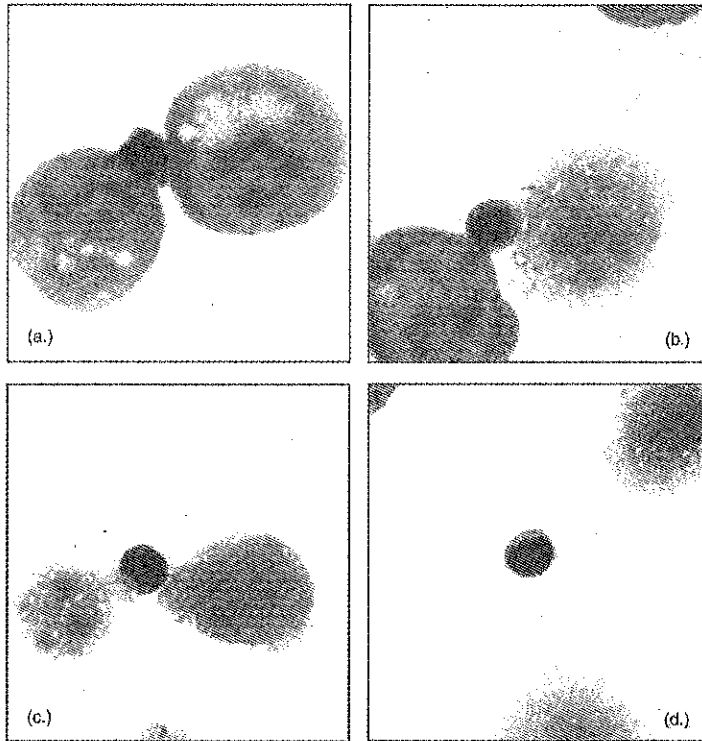


Fig. 3 Cytocentrifuge preparation of two K562 tumor cell destruction by one MK cell NK cells were activated by MGN-3

- (a) First step in the process represented by binding of NK cell to tumor cells. (Giemsa, X740).
(b) Preparation showing one tumor cell is dead. (Giemsa, X740).
(c) Preparation showing both tumor cells are dead while NK cell in between is still alive. (Giemsa, X740).
(d) Cytocentrifuge preparation showing NK cell detach itself from the dead tumor cells. (Giemsa, X740).

4. 選択した患者におけるTAAとNK活性

患者は腫瘍関連抗原の測定を行い監視された。すなわち前立腺癌はPSA、多発性骨髄腫はBJPかIgGを測定した。一方、乳癌はCEAとCTを年1-2回実施することで再発が監視された。種類の異なる悪性腫瘍患者別に分別して分析した。

急性骨髄性白血病(AML)と診断された39歳の男性患者Kには、化学療法が行われ、これにより白血球数が5.6となった。正常範囲は4.5-10.5である。患者は化学療法を休止して、1995年1月にバイオブラン/MGN-3の服用を開始した。患者の白血球数はこの時以来正常範囲内にある。患者の投与前NK活性は7.9LUであったが、バイオブラン/MGN-3投与後1週間以内に113LUに上昇した。患者のNK活性はこれまで4年間高い値を維持している。

52歳の販売店マネージャーで日本人男性のYもAMLと診断された。この患者は従来の療法を受けなかった。患者の白血球数は1998年3月31日に18,700/mlであった。バイオブラン/MGN-3の服用

III-1-2 バイオブラン (米ぬかアラビノキシラン誘導体) によるがん患者のNK免疫回復 (患者32人の…

を開始し、4月30日には11,000に低下した。以後、状態は全く安定している。

1994年男性患者Rは前立腺癌に罹患し当科を受診した。ホルモン療法によりPSAは0.1になった

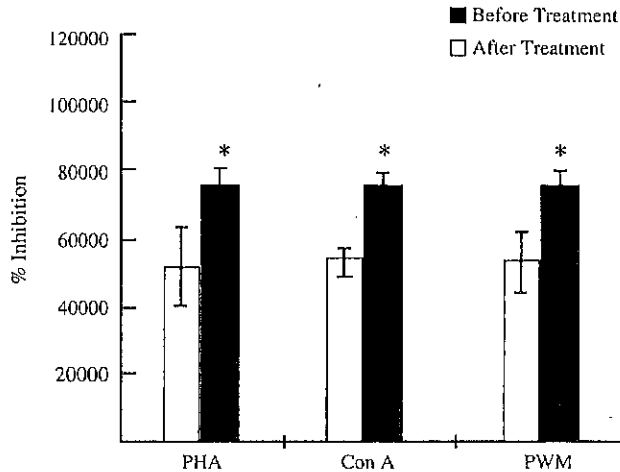


Fig. 4 In vivo action of MGN-3 on T and B cell mitogen response at one month after treatment

MNC were cultured for three days in the presence of PHA, Con A and PWM.

Data represent mean (S.D. of five individuals. *P<0.001).

が、時とともに腫瘍マーカーは再度上昇すると予想された。

患者にはバイオブラン/MGN-3が投与され、PSAはこの4年間正常値を維持している。

女性患者Mは1995年4月に乳癌が再発し、手術とその後化学療法が行われた。患者は化学療法終了後バイオブラン/MGN-3を開始し、それ以来すべてのCATスキャンとバイオプシーの結果は陰性である。いずれにも再発の所見は認められない。患者の投与前のNK細胞活性は16.4 LUであったが、バイオブラン/MGN-3投与後1週間で2倍に上昇した。患者のNK活性はさらに128 LUに上昇し、以後高い値を維持している。

考 察

バイオブラン/MGN-3は、動物や人でNK活性上昇を誘発することが認められており、強力なBRMと考えられている。バイオブラン/MGN-3を腹腔内投与されたマウスは投与後2日でNK細胞活性が数倍に上昇した。バイオブラン/MGN-3を食品と混ぜてラットに摂取させた別の試験でも用量依存的にNK細胞活性が上昇するのが認められた。試験は正常被験者でも実施され、バイオブラン/MGN-3が経口投与された。30及び45 mg/kg/日の用量ではバイオブラン/MGN-3の投与後1週間で2-3倍のNK活性上昇が見られたが、低用量の15 mg/kg/日では1ヵ月後にNK活性が2倍に上昇した²⁰⁾。

バイオブラン/MGN-3のNK活性増強効果を癌患者で検討するのは非常に興味深いと考えられた。患者は腫瘍減量が必要なので化学療法や放射線療法が行われた。しかし、これらの治療の結果NK活性は低下する。腫瘍のコントロールに自然免疫が必要なのであれば、化学療法や放射線療法を免れた残存細胞を破壊するためにNK活性を増強させることが臨床的に重要であると考えた。様々なBRM

III-1-2 バイオブラン (米ぬかアラビノキシラン誘導体) によるがん患者のNK免疫回復 (患者32人の…

を用いてNK細胞活性を増強させることは可能である。しかし、BRMにより毒性や低反応性が生じるのでその使用は限られる。バイオブラン/MGN-3は安全な製品であり、患者は本試験の4年間に低反応性を生じることはなかった。NK細胞はBRMによる活性化の高感度指標である。これをモニターすることによって、これらBRMの治療時における循環免疫細胞の活性変化を実証できる。バイオブラン/MGN-3によるNK活性増強作用は投与後わずか1-2週間で認められ、バイオブラン/MGN-3の投与を継続することでNK活性を高レベルに維持できた。

腫瘍減量後にバイオブラン/MGN-3による免疫療法を行う治療を32人の癌患者に実際に適用した。NK活性の上昇とともに、患者はTAAが徐々に低下し、試験の4年間に再発の徴候は認められなかった。

バイオブラン/MGN-3がNK細胞活性を上昇させるメカニズムが検討されてきた。我々の研究結果に基づく、バイオブラン/MGN-3によるNK細胞の活性化には2つのメカニズムが関わっている。1つはNK細胞の顆粒集積性増加、もう1つはサイトカインの産生増加である。顆粒集積性に関しては、本試験の患者のNK細胞は顆粒集積性が低いか、顆粒が全く存在していないと思われた。興味深いことに、バイオブラン/MGN-3はNK細胞の顆粒含有量を有意に増加させた(図2)。顆粒は細胞質部分だけでなく核と細胞膜の間にも存在する。NK顆粒のエクソサイトーシスと細胞質顆粒として蓄えられた細孔生成分子(パーフォリン)の分泌が、NK細胞系による癌細胞殺傷の最も重要なメカニズムの1つと考えられている²³⁻²⁵。分離・精製された顆粒が様々な腫瘍細胞を溶解することが認められたことにより、NK細胞の標的細胞破壊作用において顆粒が重要な役割を演じることが示されている²⁴。したがって、我々は、NK細胞の顆粒量増加がバイオブラン/MGN-3によるこれら効果細胞の増強の重要な因子であると考えられる。

サイトカインに関しては、数種類のサイトカインがNK細胞の増殖や細胞溶解活性に影響を及ぼすことが判明している。これらのうち、インターフェロン(IFN)とIL-2は最もよく研究されている^{16,17,26,27}。癌患者におけるNK活性抑制はリンフォカインの産生障害に関連していた。バイオブラン/MGN-3によるNK細胞の細胞毒性機能増強作用は、様々なサイトカイン濃度の有意な上昇と並行しているようである。LGLの高度の顆粒化は分泌機能を示している可能性がある。様々なリンフォカインの産生が単一のLGLサブセットによる多能性であるかどうかは不明である。異なるリンフォカインはサブセットの異なるLGLによって産生される可能性のほうが高い。バイオブラン/MGN-3で処理したPBLではTNF及びIFNの産生が有意に増加することが*in vitro*の研究で示されている²⁴。さらに種々の悪性疾患患者でバイオブラン/MGN-3投与後にIL-2、IL-12、TNF、IFNの濃度が増加することが示され(データ掲載せず)、バイオブラン/MGN-3によるNK細胞毒性の増強にはサイトカインが介在している可能性がある。

本研究の主な知見はNK細胞に及ぼすバイオブラン/MGN-3の顕著な作用である。しかし、健常対照被験者においてバイオブラン/MGN-3投与後にT細胞及びB細胞機能が増強されているという証拠も得られている²⁵。本試験においてもT細胞及びB細胞の様々なマイトジェンに対する増強反応によって示されるように、両細胞の機能増強が証明された。このことからバイオブラン/MGN-3は免疫系全体を刺激することが示唆される。

本試験による予備的な結果は、引き続き複数の臨床試験の実施を促すのに十分なものである。

文 献

- 1) Herberman, R.B., Holden, H.T. : Natural cell mediated immunity. *Advances in Cancer Research*, : Academic Press, New York, Vol. 27, 1997, pp., 305
- 2) Kiessling, R., and Wigzell, H. : An analysis of the murine NK cell as to structure, function and biological relevance. *Immun. Rev.*, **44** : 165, 1979
- 3) Herberman, R.B. : Natural killer cells and tumor immunity. *Surv. Immun. Res.*, **2** : 306, 1983
- 4) Ghoneum, M., Gill, G., Wojdani, A., Payne, C., Alfred, L. : Suppression of basal and *Corynebacterium parvum*-augmented NK activity during chemically induced tumor development. *Int. J. Immunopharmac.*, **9** : 71, 1987
- 5) Whiteside, T.L., Herberman, R.B. : Human natural killer cells health and disease. Biology and therapeutic potential. *Clin. Immunother.*, **1** : 56, 1994
- 6) Roder, J.C., Kiessling, R., Biberfeld, P., Anderson, B. : Target-effector interaction in the natural (NK) cell system. II. The isolation of NK cells and studies on the mechanism of killing. *J. Immunol.*, **121** : 2509, 1978
- 7) Ghoneum, M., Gill, G., Stein, E., Salem, F., and Cooper, E. : In vitro tumor cell phagocytosis of large granular lymphocytes and other leukocytes. In *Natural Immunity, Cancer and Biological Response Modification* (Lotzova, E. and Herberman, R.B., Eds.), Karger Basel, 1986, pp.104-113
- 8) Ghoneum, M., Salem, F., Shum, S.T., Perry, L., and Gill, G. : In situ lymphophagocytosis by non-lymphoreticular neoplasms. *Nat. Immun. Cell Growth Reg.*, **6** : 77, 1987
- 9) Ghoneum, M., Salem, F., Allen, H., and Gill, G. : Phagocytosis of autologous lymphocytes by cervical pre-neoplastic and neoplastic cells. *Nat. Immun. Cell growth Regul.*, **7** : 239, 1988
- 10) Ghoneum, M., and Grewal, I. : Change in tumor cell-lymphocyte interactions with age. *Hemat. Oncol.*, **8** : 71, 1990
- 11) Balch, C.M., Itoh, K., Tilden A.B. : Cellular immune defects in patients with melanoma involving interleukin-2-activated lymphocyte cytotoxicity and a serum suppressor factor. *Surgery*, **98** : 151, 1985
- 12) Itoh, K., Pellis, N.R., Balch, C.M. : Monocytic-dependent serum-borne suppressor factor against induction of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, **29** : 57, 1989
- 13) Strasnick, B., Lagos, N., Lichtenstein, A., and Mickel, R.A. : Suppression of lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by a soluble factor produced by squamous tumors of the head and neck. *Otolary. Head Neck Surg.*, **103** : 537, 1990
- 14) Morinaga, H., Tazawa, K., Tagoh, H., Muraguchi, A.K., Fujimaki, M. : An in vivo study of hepatic and splenic interleukin-1 beta mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Japn. J. Cancer Res.*, **85** : 1298, 1994
- 15) Yunoki, S., Tanaka, N., Hizuta, A., et al. : Enhancement of antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes by oral administration of PSK. *Int. J. Immunopharmacol.*, **16** : 123, 1994
- 16) Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Seehra, J., London, L., Perussia, B. : Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. *J. Exp. Med.*, **160** : 1147, 1984
- 17) Brunda, M.J., Tarnowski, D., Davatellis, V. : Interaction of recombinant interferons with recombinant interleukin-2: Differential effects on natural killer cell activity and interleukin-2 activated killer cells. *Br. J. Cancer*, **37** : 787, 1986
- 18) Maluish, A.E., Ortaldo, J.R., Conlon, J., Sherwin, S.A., Leavitt, R., Strong, D.M., Weirnik, P., Oldham, P.K., Herberman, R.B. : Depression of natural killer cytotoxicity after in vivo administration of recombinant leukocyte interferon. *J. Immunol.*, **131** : 503, 1983
- 19) Sait, T., Ruffman, R., Welker, R.D., Herberman, R.B., Chirigos, M.A. : Development of hyporesponsiveness of natural killer cells to augmentation of activity after multiple treatments with biological response modifiers. *Cancer Immunol. Immunother.*, **19** : 130, 1985
- 20) Talmadge, J.E., Herberman, R.B., Chirigos, M.A., Maluish, A.E., Schneider, M.A., Adams, J.S., Phillips, H., Thurman, G.B., Varesio, L., Lohg, C., Oldham, R.K., Wilttrout, R.H. : Hyporesponsiveness to augmentation of