

# マウス実験肝転移モデルにおける手術周期免疫療法と その肝転移予防効果

市立長浜病院外科（指導：戸部隆吉教授）

伴 貞 興

〔原稿受付：平成3年10月7日〕

## Prevention of Mouse Liver Metastases by Perioperative Immunostimulation using OK-432

SADAOKI BAN

The Department of Surgery, Nagahama City Hospital

Two surgical procedures were required to make experimental model of liver metastasis (SC42-DS). In this paper, the protective effects of OK432 against liver metastasis were examined experimentally, as a immunotherapeutic agent under perioperative condition. In 5 combinations of administration, OK432 showed some different effects on liver metastasis, however, in general, simultaneous intrasplenic injection of OK432 reduced liver metastasis. From this result, the efficacy of intraoperative OK432 via portal vein was speculated.

### 要 旨

DS マウス脾内に同系自然発生乳癌由来の SC-42,  $2 \times 10^5$  ケを移植し, 1 日後に摘脾を行なうと, 2 週間後には肉眼的に明らかな肝転移巣が形成される<sup>2)</sup>. この肝転移モデルを用いて, OK-432 による手術周期免疫療法<sup>1)</sup>を行ない, その肝転移抑制効果について検討した. 投与方法により肝転移の抑制, あるいは増大が観察されたが, SC42 脾内移植時に OK-432 の脾内注入を併用した群ではいずれも肝転移巣の減少がみられ, 経門脈性に肝に流入した腫瘍細胞と OK-432 の共存は肝転移の成立に抑制的に作用するものと思われた.

### は じ め に

外科医は, 比較的早期の癌に対する手術の後に, 時として予想外の癌の再発・再燃を経験する事がある. これは手術後における, 一過性の免疫抑制状態が大きな要因と思われる. 癌手術が大なり小なり癌細胞の遊離散布の原因となっていることは, よく知られており, その遊離癌細胞の転移着床発育と, 術後の免疫抑制とは重要な関連性を有していると思われ, それに対応する為には, 手術周期免疫療法を考慮する必要がある.

今回筆者は, 新たに開発したマウス肝転移モデルを用いて, OK-432 の種々の投与方法による手術周期免疫療法を試みたので, その結果を報告する.

Key words: Perioperative immunostimulation, OK432, Mouse, Liver metastasis.

索引語: 手術周期免疫療法, Picibanil, マウス, 肝転移.

Present address: Department of Surgery, Nagahama City Hospital, Yahatahoshi, Nagahama 526.

材料と方法

(1) 動物及び腫瘍細胞

この研究において試用されたマウスは、26-30 g の7週令の雄 DS マウスで、腫瘍は同系自然発生乳癌由来の SC-42 を用いた。

(2) 腫瘍細胞の継代法

SC-42  $5 \times 10^5$  ケを皮下継代後3週目の担癌 DS マウスを、頸椎脱臼にて屠殺後、アルコールにて皮膚を消毒し、無菌的に RPMI1640 溶液中にとり、ハサミにて約1 mm 角片とし、0.125%トリプシンで37°C 20分間処理後上清液を除去した後に、0.25%トリプシンにて、37°C で40分間処理後、#100 メッシュを通して、10%FCS RPMI1640 中に浮遊した。Hanks 液で3度洗浄し、RPMI 中に再浮遊させて、トリパンブルー染色下に細胞数を数えた。生細胞は、 $1 \times 10^7$  細胞 ml RPMI1640 とした。

(3) 肝転移の作成法

エーテル麻酔下に、DS マウスの左背部を切開し、脾臓内に 0.02 ml の腫瘍細胞浮遊液を29ゲージの皮下針にて、 $2 \times 10^5$  ケ注入した。刺入針は約10秒間そのまま留置した後に引き抜き、脾臓を腹腔内に還納させ

た。1日後に、同切開部より摘脾術を施した。これらのマウスの全ては、約2週間以内に肝転移を形成した。

(4) 免疫賦活剤

OK-432 (乾燥溶連菌製剤・中外製薬より提供)は RPMI1640 にて、1 KE/0.5 ml の濃度で真皮内及び経口投与に使用し、5 KE/ml の濃度にて脾髄質内投与に用いた。

(5) 実験群 (Table 1)

実験群として以下の6群を設置した。全群 day 0 に SC-42 細胞の脾内注を行なった。第1群、前日に RPMI1640 0.5 ml を皮内注入した。第2群、前日に OK-432 1 KE 皮内投与後、OK-432 および SC-42 細胞を脾髄質内に注入した。第3群、前日に OK-432 1 KE を皮内投与し、SC-42 細胞のみを脾髄質内に注入後、直ちに、OK-432 1 KE の皮内投与を行なった。第4群、前日に OK-432 1 KE を皮内投与した。第5群、前日に RPMI1640 0.5 ml のみを投与し、OK-432 および SC-42 細胞を脾髄質内に注入した。第6群、前日に OK-432 1 KE を経口投与、OK-432 および SC-42 細胞を脾髄質内に注入した。以上1-6群すべてにおいて、day 1 に摘脾術を行なった。

(6) 肝転移巣の評価

Table 1 肝転移と OK432 の種々の投与法

|                                                                      |           |                        |       |        |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------|-------|--------|
| 1) control<br>(n=4)                                                  | RPMI ID   | SC42 IS                | SR    | assay  |
| 2) preoperative OK 1KE ID<br>+ intraoperative OK 0.1KE IS<br>(n=5)   | OK 1KE ID | SC42 IS<br>OK 0.1KE IS | SR    |        |
| 3) preoperative OK 1KE ID<br>(n=5)                                   | OK 1KE ID | SC42 IS                | SR    |        |
| 4) preoperative OK 1KE ID<br>+ intraoperative OK 1KE ID<br>(n=5)     | OK 1KE ID | SC42 IS<br>OK 0.1KE IS | SR    |        |
| 5) intraoperative OK 0.1KE IS<br>(n=5)                               | RPMI      | SC42 IS<br>OK 0.1KE IS | SR    |        |
| 6) preoperative OK 1KE p.o.<br>+ intraoperative OK 0.1KE IS<br>(n=5) | OK 1KE PO | SC42 IS<br>OK 0.1KE IS | SR    |        |
|                                                                      | day -1    | day 0                  | day 1 | day 14 |
| ID:真皮内投与, IS:脾内注入, SR:脾臓摘術                                           |           |                        |       |        |

以上1-6群のマウスを day 14 に頸椎脱臼にて屠殺し、肝臓を摘出して肝重量を計測後、肝表面の肝転移結節数を数えた。更に、1群、2群については、同一実験を3度行ない、又、経時的变化を観察する目的で、day 7, day 11, day 14 にマウスを屠殺して、同様の観

察を行なった。

#### (7) 統計的処理の方法

有意差の有無の判定には、Student T 検定を用いた。肝転移結節数と肝重量との相関をみる為に相関係数を用いた。

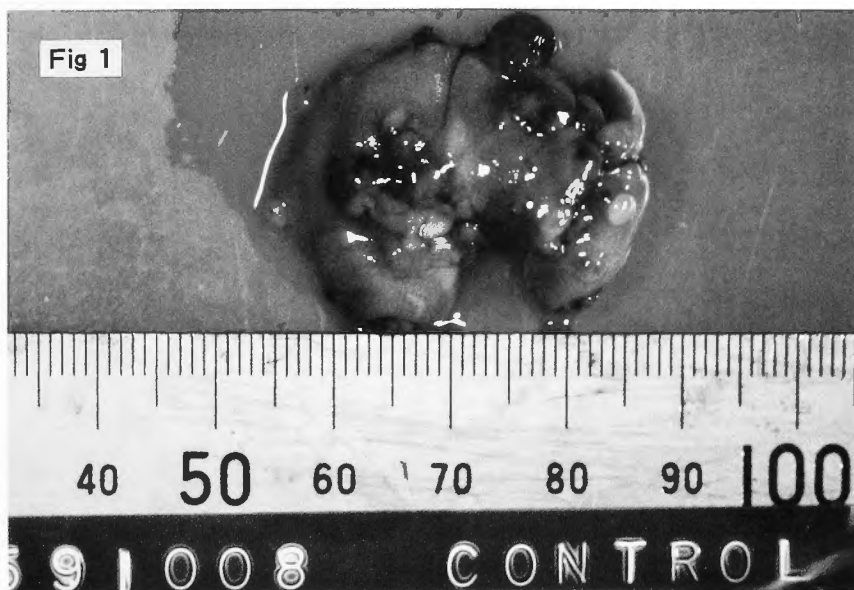


Fig. 1

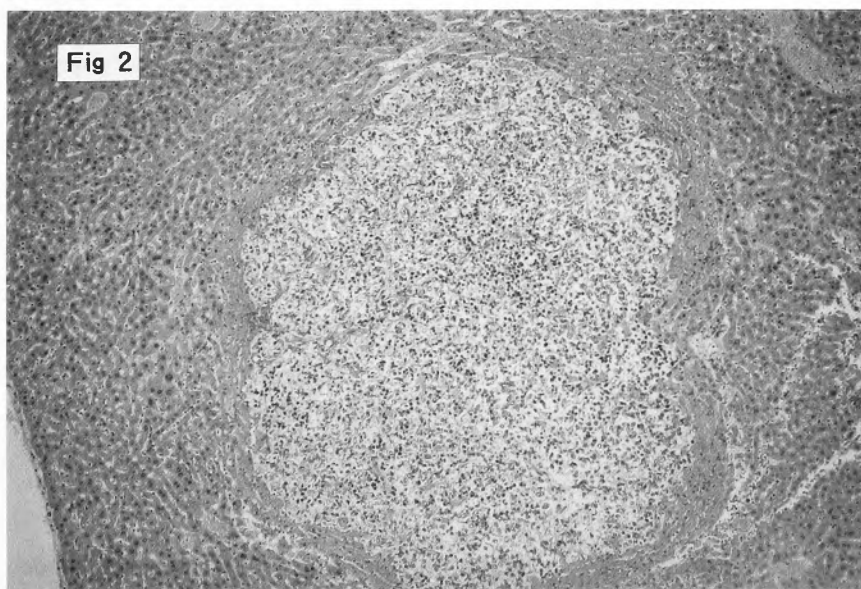


Fig. 2

結 果

SC-42 の腫瘍細胞  $2 \times 10^5$  ケを、DS マウスの脾髄質内に注入して、1日目に摘脾術を施行した場合、100%肝転移をおこす事は先に報告した。一連の実験において腫瘍細胞を脾髄質内に注入後次日摘脾術を施行した場合の術死は10%以内であった。この肝転移の肉眼的写真は Fig. 2 のようなもので、帯白色あるいは、

表面出血壊死をともなった結節性肝転移巣が認められる。組織学的写真を Fig. 3 に示すが、リンパ球を主とした単核球の細胞浸潤を伴った結節性転移である。  
第1群と第2群の対照実験は、Table 2 のように3回の実験で、肝重量において第1群より第2群が全ての実験において有意の減少を認めた。  
第1群と第2群の比較において、肝重量及び肝転移巣に対する経時的变化をみたところ、Fig. 3 および

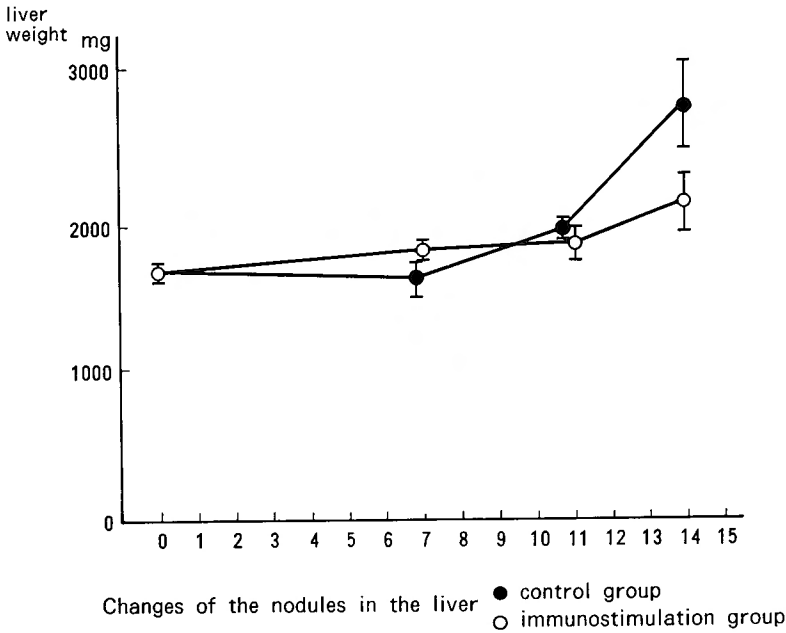


Fig. 3 Liver metastases and perioperative immunostimulation

Table 2 Perioperative immunostimulation

| Exp. No. | Control                  | Perioperative Immunostimulation | Student T   | P         |
|----------|--------------------------|---------------------------------|-------------|-----------|
| 1        | 2 - 6                    | 0 - 3                           | 2.07172959  | p < 0.02  |
|          | 1.758 ± 0.058<br>(n = 5) | 1.426 ± 0.104<br>(n = 5)        | 4.20660222  |           |
| 2        | 22 - 64                  | 3 - 29                          | 1.470921559 | p < 0.05  |
|          | 2.717 ± 0.293<br>(n = 5) | 2.081 ± 0.193<br>(n = 5)        | 3.128711309 |           |
| 3        | 10 - 70                  | 7 - 38                          | 1.200474469 | p < 0.002 |
|          | 3.098 ± 0.960<br>(n = 4) | 2.047 ± 0.275<br>(n = 5)        | 9.6858867   |           |

Fig. 4 のように推移し、肝重量においては14日目に、全転移巣数については11日目に有意差が認められた。

Table 1 に示した6群による OK-432 の投与経路及

び投与時期を変えた実験の結果は、Fig. 5 に示すようなものであり、第2群において有意に肝転移の減少を認めた。第3群及び第4群においては、むしろ肝転移

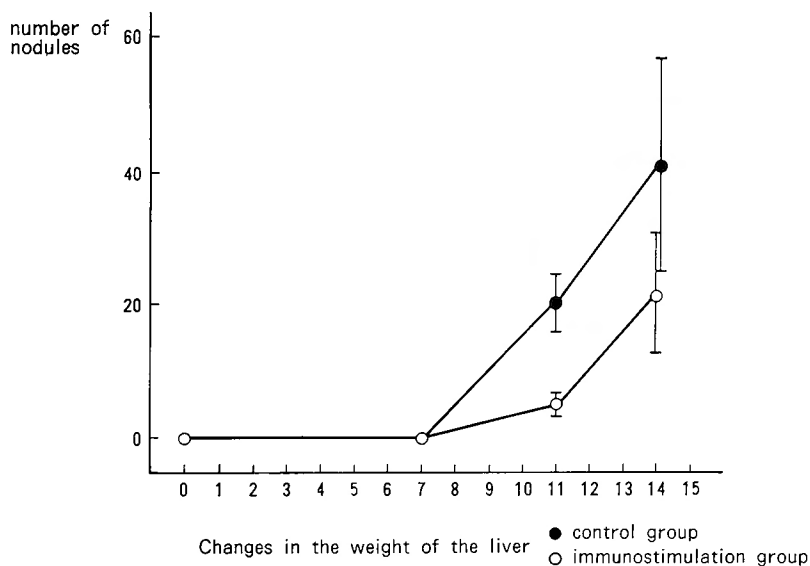


Fig. 4 Liver metastases and perioperative immunostimulation

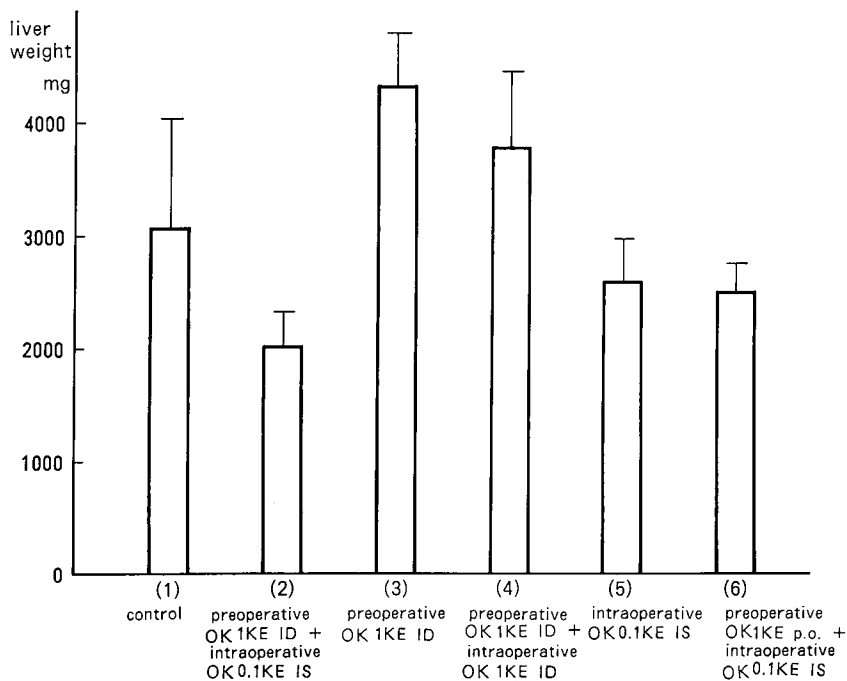


Fig. 5 肝転移と OK432 の種々の投与結果

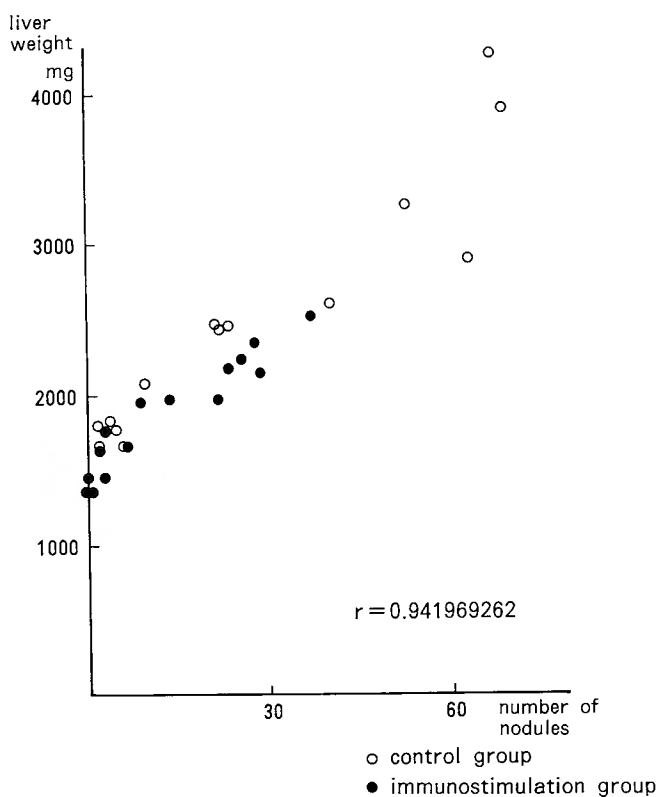


Fig. 6 control group と immunostimulation group の相関係数

が増強した。第5群は day-1 において OK-432 を投与せず、第6群は OK-432 1 KE の経口投与を行なった群であるが、両群とも腫瘍細胞を OK-432 に混注する事で、第1群よりも肝転移の減少を認めた。

Fig. 5 の第1群-第6群の計29匹の肝臓において、肝重量と肝転移結節数との相関係数を求めたところ、 $r = 0.94197$  と正の相関が得られた (Fig. 6)。

## 考 案

腹部手術は生体にとって侵襲であり、術後に免疫抑制をきたす事は広く知られている。また、この宿主抵抗性の減弱に加えて悪性腫瘍に対する手術操作自体により、腫瘍細胞の全身的或いは経門脈の散布をきたす可能性がある。全身麻酔下の手術においても、普通の患者や癌患者及び動物においても、免疫機能の低下が認められる。二期に分けて行なわれた悪性腫瘍の手術よりも、一期的に行なわれた悪性腫瘍の手術の方が予後が良いと言われており<sup>3)</sup>、このような場合、一期目

の手術によって引き起こされる免疫抑制が予後不良の原因になっていると思われる。

たとえば PHA や PPD による T 細胞幼弱化現象の術後の一時的抑制や、PPD による白血球遊走阻止反応の減弱などの報告からみると、免疫系が外科手術によって動揺することが理解される。抗腫瘍免疫能の低下は、手術侵襲による全身的術後免疫能低下の一部分であるが、このような効果は累積的であるように思われる。3週間の間に連続して3つの外科手術（たとえば生検した後根治手術、そして皮膚移植といった）を受ける患者の場合、全体で28-40日免疫学的に不応な状態が続くという。白血球遊走阻止反応が術前に陽性であった患者の場合、術後6日目から22日目まで陰性となり<sup>7)</sup>、その後再び術前のレベルまでもどる事も報告されている。手術操作により遊離散布された癌細胞が組織に定着する可能性のある時期に、抗腫瘍免疫能が抑制されているという事は、肝転移成立の原因となりうる。

OK-432 はインターフェロン誘起能があり、NK 細胞活性増強作用のある事がわかっており<sup>8)</sup>、悪性腫瘍患者の NK 細胞活性を上げる事も臨床的に報告されている<sup>11)</sup>。一方、新鮮腫瘍細胞は NK 細胞によって融解する事はほとんどないので、NK 細胞活性と転移との関係は以前より論議の多い所である<sup>9)</sup>。

今回、筆者は独自に作成した DS-SC42 の系での肝転移モデルにおいて、その作成課程で腫瘍細胞の脾内移植、一日後の脾摘と 2 回の外科的処置を要することに着目し、OK-432 を腫瘍移植前日及び当日に、様々な投与経路で使用し、その肝転移の変動を観察した。1 群と 5・6 群を比較するに脾髄質内に OK-432 と SC-42 細胞を注入した場合には、対照群と比較して肝転移の減少が観察された。これは OK-432 の腫瘍細胞への直接の効果あるいは、いわゆる巻き込み現象等の関与が考えられ、更に前日に OK-432 1 KE/尾を皮内に投与した第 2 群では、第 5・6 群よりも有意な肝転移巢の抑制が認められたことは、OK-432 前投与によって生じた免疫学的環境の変化が関与しているものと思われる興味深い。逆に第 3 群や第 4 群にみられるように、術前日と当日に OK-432 を皮内のみに投与した時には“sneak through”現象のように、かえって肝転移の増強が認められ Biological Response Modifier (BRM) としての OK-432 の複雑な性格を表していると思われる。

Michael 等は<sup>6)</sup>  $\alpha$ -インターフェロンを 4 回連続 IP 投与した後に腫瘍細胞を尾静脈より注入した群においては、肺への転移巢の減少を認めたが、腫瘍注入後に  $\alpha$ -インターフェロンを IP 投与しても肺転移巢の減少を認めず、又、尾静脈より腫瘍細胞を注入する前 10 日間連続で  $\alpha$ -インターフェロンを投与した場合には、NK 活性の低下が認められ、肺転移巢の減少が少なくなると報告しているが、OK-432 についても、その投与の時期と期間及び経路が重要である事が示唆される。今回の実験結果で重要な事は、OK-432 前投与の有無にかかわらず、腫瘍細胞注入時に、OK-432 脾内注を併用すると肝転移の減少が観察されることである。その機序については今後の解析を要するが、少なくとも経門脈性に肝に遊離流入した腫瘍細胞と OK-

432 の共存は、肝転移の成立に抑制的に作用しているものと思われ、手術周期療法のひとつの方法として臨床応用の可能性が示唆される。

## Reference

- 1) James L, Weese MD, Ellen M, Gilbertson BA, et al: Prevention of rat colon cancer metastases by perioperative immunostimulation. *Surgery* 96 (2): 420-426, 1984.
- 2) Kopper L, Van Hanh T, et al: Experimental model for liver metastasis formation using Lewis Lung Tumor. *J. Cancer Research and Clinical Oncology* 103: 31-38, 1982.
- 3) Fielding LP, Wells BW: Survival after primary and after staged resection for large bowel obstruction caused by cancer. *Br J Surg* 61: 16-8, 1974.
- 4) Alister J, Cochran MD: *Man Cancer and Immunity* (1978) Academic press London New York San Francisco.
- 5) Robert C, Bast Jr MD, Berton Zbar MD, et al: BCG and Cancer *New Eng. J. Med* 290 (25): 1413-20, 1974.
- 6) Michael J, Brunda, Deborah Rosenbaum, et al: Inhibition of experimentally induced murine metastases by recombinant interferon. Correlation between modulatory effect of interferon treatment on natural killer cell activity and inhibition of metastases. *Int J Cancer* 34: 421-426, 1984.
- 7) Cochran AJ, Splig Rona WGS, et al: Postoperative depression of tumor directed cell-mediated immunity in patients with malignant disease. *Br Med J* 4: 67-70, 1972.
- 8) 海老名卓三郎, 柴井 明, 他: 免疫賦活剤によるインターフェロン誘起と NK 細胞活性増強. *医学のあゆみ* 第 117 号 229-234.
- 9) Jerome P, Roche MD: Ablogation of heterogenous metastases in a murine model by natural killer cells. *Surgery August* 96 (2): 133-38, 1984.
- 10) 藤中源七郎: 癌免疫療法の展望—固形癌のばあい—. *Oncologia* Vol.11: 143-147, 1984.
- 11) 押味和夫, 狩野庄吾, 他: 悪性腫瘍患者の natural killer 細胞活性手術および溶連菌製剤 OK-432 の影響について. *日本臨床免疫学会雑誌* 3 (1): 53-56, 1980.