

実験腫瘍をもちいた腫瘍外科学へのアプローチ

滋賀医科大学第1外科

寺田 信國 細谷 雄治 齊ノ内良平 小玉 正智

ANALYSIS OF ONCOLOGICAL SURGERY USING THE EXPERIMENTAL NEOPLASMS

Nobukuni TERATA, Yuuji HOSOYA, Ryouhei SAINOUCHI
and Masashi KODAMA

First Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

Strain-2モルモットの Line-10肝細胞癌を用いて、手術切除と癌化学療法(MFC)の組みあわせ方について検討した。切除後のMFCの全身投与では、ヒトの常用量(1/2 MFC: 3週間)では治癒に至らしめられず、LD₅₀量ではじめて1/6匹に治癒を認めたが、免疫能の荒廃があった。至適量の局注であれば、早い時期の腫瘍は治癒させられ、しかも治癒動物で抗腫瘍性の免疫能が誘導された。MFC局注後に切除すれば、それぞれの単独にくらべ治癒率が向上し、局注と切除の間隔はわずか3時間でも良好な成績が得られる。さらに動物実験の成績と臨床の成績の解離について、とくに腫瘍の抗原性の面から解析した。

索引用語: 実験腫瘍, 術前癌化学療法剤投与, 低免疫原性腫瘍

はじめに

現在、消化器癌においては手術切除のみがある時期の癌に対して唯一の完全治癒を期待できる治療法で、臨床においては手術を中心に癌治療が行われている。しかし手術も局所療法で、近行癌に対しては満足すべきでなく、治療成績をさらに向上せしめるために他の補助的治療法をいかに組み合わせればよいかという問題があるが、これは外科医にとってきわめて関心の深いところである。その詳細な基礎的解析が強く望まれ本論文においては、前半では手術前後の癌化学療法はどのように施行すべきかという動物実験での検索を述べる。後半では、動物実験で得られた華々しい結果は臨床例での成績と並行せぬことがあり、これらの問題点について解析する。

材料および方法

モルモットは、同系である Strain 2モルモットの雌(三共ラボ Co.)の6週齢から12週齢のものを用いた。

C₃H/HeN MTV-マウスは、米国 NCI から入手したものを滋賀医大附属実験動物施設のバリアーシステムで繁殖させた4~8週齢のものを使用した。

BALB/c nu/+ (ヘテロマウス)および BALB/c nu/nu (ヌードマウス)は、日本クレア社の4~8週齢のものを用いた。

Line-10および Line-1肝癌は diethylnitrosamine を用いて発癌させられたものであり、この両者は抗原性が高いこと、またこの両者の間で抗原性は異なり cross しないことなどが確認されている¹⁾。実験には Line 10 1×10⁶個、Line 1 3×10⁶個が左側腹部皮内に移植して用いられた。この数の腫瘍が移植されると Line-10腫瘍においては約50日で全モルモットは局所腫瘍の腫大・リンパ節転移・肺転移などで死亡する。

MCB1-1は BALB/c nu/+マウスにおいて methyl-chlanthrane で発癌させた線維肉腫である。5×10⁵個を背部皮内に移植すると3カ月以内に全例腫瘍死する。この腫瘍は転移をおこさない腫瘍であり、死亡は局所腫瘍の著明な増大による。またこの腫瘍は高免疫原性であり BCG 局注などにより、抗腫瘍性の免疫を獲得する。組織培養可能であり limiting dilution

※第30回日消外会総会シンポ2: 消化器実験外科の進歩と新しい展開

〈1987年9月28日受理〉別刷請求先: 寺田 信國

〒520-21 大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学第1外科

method でクローニングしたものを用いている。

1767-3 腫瘍は Bartlett²⁾によって作られた低免疫原性の腫瘍である。すなわち diffusion chamber の中に fetal connective tissue を封じこめこれを C₃H/HeN MTV-マウスの腹腔内に1年間留置したものである。線維肉腫が得られたが、これを組織培養し得られた株化細胞をさらにクローニングした。低免疫原性であることの確認は他の論文に既述してある³⁾。

癌化学療法剤は Mitomycin C (以下 MMC, 協和発酵 Co.), 5-Fluorouracil (以下 5FU, 協和発酵 Co.), Cytosine arabinoside (以下 CA, 日本新薬 Co.) を用いそれらを併用した (以下 MFC)。投与に際しては動物の体重を測定し、体重当たりの量に換算して腹腔内投与または腫瘍内に局注した。

腫瘍の切除は腫瘍周囲の毛を引き抜くことにより脱毛し、エーテル全身麻酔下に皮内投与された腫瘍および皮下組織を紡錘型にメスを用いて切除し、創は wound clip (Clay Adams 社, カタログ#7630, 7631) を用いて閉じた。skin preparation や抗生物質の投与は一切行っていない。

Lipopolysaccharide (以下 LPS, Difco 社, E. coli 055:B5) は生食に溶解50 μ g/0.1ml を腫瘍内に局注した。

結 果

1) 腫瘍切除後の全身癌化学療法

予備実験としてモルモットに Line-10 移植後 7 日目に腫瘍切除術を施行し、翌日からヒトの 1/2 MFC 投与量 (MMC 0.04mg/kg 体重および CA 0.4mg/kg 体重を週 2 回, 5FU 5mg/kg 体重連日) を 3 週間腹腔内投与したが、1 匹も治癒はみられず、すべて腫瘍死した。そこで健常モルモットを用いて (1 群 3 匹), MMC, 5FU, CA のそれぞれの投与量を少しずつ動かして致死に至らないギリギリの量を求めた。その量は MMC 0.4mg/kg および CA 4mg/kg 週 2 回, 5FU 5mg/kg 連日 3 週間投与であった。

Line 10 肝癌は腫瘍切除のみでは治癒せず、全例 (6/6 匹) 死亡する。そこで腫瘍移植後 5 日目にこの腫瘍を切除し翌日から上に述べた投与量を腹腔内投与した。手術切除と担瘤という侵襲が加わったので半数 (3/6 匹) は癌化学療法剤の毒性で死亡した。毒性からまぬがれた 2 匹は転移巣の増殖がみられ、1 匹のみが最終的に生存し、しかも腫瘍の再発がなかった。この 1 匹は著明な体重減少があり、75 日目に同じ Line-10 を 10⁶ 個再移植したが、これは生着してしまい、抗腫瘍性の

表 1 MFC 局注の投与量の検討 (集積データ・Line-10 肝癌移植後 7 日目)

	治癒率	Line-10 再移植 生着率	Line-1 再移植 生着率
1. 治療なし	0/12	-	
2. $\frac{1}{10}$ × 標準量	1/9	-	
3. $\frac{1}{5}$ × 標準量	2/3	0/2	2/2
4. 標準量	12/12	1/12	3/3
5. 2 × 標準量	6/6	0/6	
6. 4 × 標準量	8/9	3/3	
再移植対照	-	16/16	4/4

免疫能も癌化学療法で荒廃させられていることがうかがえた。

2) MFC 腫瘍内局注一投与量の検討

全身投与では安全な投与量では治癒に導けぬことから、腫瘍内局注すれば治癒に導けぬかという問題の解析を行った。

Line-10 移植後 7 日目の腫瘍に MFC をその dose をかけて腫瘍内に局注した際の治癒率を示す (表 1)。標準量とは MMC 1mg/kg 体重, CA 10mg/kg 体重, 5FU 5mg/kg 体重をそれぞれ 1 回局注である。この表は 3 回の実験結果を集積したものである。標準量の 1/10 量では 9 匹中 1 匹と治癒率は低いがそれ以上の投与量になると治癒率は高くなる。癌化学療法剤局注で治ったモルモットに Line-10 および Line-1 を再移植したが 4 × (標準量) 以外の量では Line-10 はほとんど拒絶された。高免疫原性の腫瘍である Line-10 は至適量の癌化学療法剤で治癒に導けばこのモルモットは Line-10 に対して特異的免疫能を獲得することを示唆する。抗原性の異なる Line-1 は生着してしまった。ところが過剰量である 4 × (標準量) の局注投与で治ったモルモットは癌化学療法剤で免疫能をも荒廃させられてしまい、再移植した Line-10 はすべて生着してしまった。

3) 癌化学療法剤と手術切除の併用効果

MFC 単独および腫瘍切除のみでは腫瘍治癒が望めない 15 日目, 19 日目の腫瘍に対して、これらの治療法の併用効果を検討した。しかも癌化学療法剤局注部位は壊死がおりうることから局注後の切除は、はやく行う方がよいとの考えから、局注と切除の間の時間の検索をも同時に行った (表 2)。3 回の実験を行い局注と切除の間の時間は 3 時間と 24 時間で検索した。MFC 単独および切除のみではほとんど治癒はない一方、3 時間と 24 時間はその治癒率の面から差はなく、総計で

表2 術前癌化学療法剤局注の時期の検討—腫瘍再発のない頻度(100日目)—

	腫瘍移植後局注までの日数	MFC→切除 3時間	MFC→切除 24時間	MFCのみ	切除のみ	治療なし
実験1	19日	4/6*	2/6	0/5	0/6	0/6
実験2	15日	4/6*	1/4		0/6	0/6
実験3	19日	3/4*	4/5*	1/6	0/4	0/6
計		11/16***	7/15***	1/11	0/16	0/18

* p<0.05 *** p<0.005

図1 動物実験から得られたわれわれが提唱する癌治療法

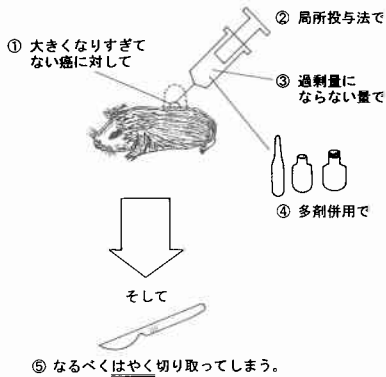


表3 動物の実験腫瘍の問題点

1. 増殖速度がきわめて早いものを用いられている。
2. 転移がきわめてまれなものがある。
3. 抗原性の高いものが好んで使われている。
——特に免疫療法の実験——
4. モノクローンの腫瘍で解析され、heterogeneityの問題がとらえられていない。

3時間の方が治癒率が高い傾向にあった。

以上の一連の実験から、われわれが得た理想的な癌治療法を図示すると図1のとおりである。ところが動物実験で得られるこのような方法も臨床に応用しようとすると、動物実験で得られたそのままの効果が出てこないことが多い。そこで実験腫瘍の問題点と思われるものを列記してみた(表3)。その中でわれわれは3番目の問題について、すなわち抗原性の問題について検索した。

4) LPSの抗腫瘍効果

LPSはこれを50 μ g, BALB/c nuヘテロマウスに移植後10日目のMCB1-1腫瘍に連日5回局注すると6匹中4匹が治癒してしまった(対照の無処置群は0/6匹の治癒率)。ところが同じ治療をヌードマウス(BALB/c nu/nu)に行っても治癒しないことから、このLPS

表4 低免疫原性腫瘍に対するLPSの効果

	治療	治癒
1767腫瘍 (低免疫原性)	LPS 50 μ g 局注 無処置	0/5 0/6
MCB1-1腫瘍 (高免疫原性)	LPS 50 μ g 局注 無処置	5/18 0/16

の抗腫瘍効果にはT細胞が必要であろうことが示唆された。

そこでヒト癌に免疫学的に近いモデルとして、低免疫原性のネズミの腫瘍を用いて、LPSの治療実験を行った(表4)。高免疫原性の腫瘍であるMCB1-1腫瘍はLPSの1回の腫瘍内投与で18匹中5匹が治癒してしまうが1767腫瘍(低免疫原性)は5匹中1匹も治癒しない。すなわち、免疫を介して治療効果が得られるBRMであるLPSは低免疫原性腫瘍に対しては効果が期待されないことになる。

考察

外科医にとって既存の癌治療法をどのように組み合わせればよいかという問題は極めて現実的で重要な課題である。そのなかで手術後の取りのこしに対して癌化学療法剤を組みあわせる、いわゆる adjuvant cancer chemotherapy は、合理的であり、動物実験でもその有効性に関する論文は数多くある⁴⁾⁵⁾。ところが固型癌、とくに消化器癌を対象とした際、その切れ味はきわめて悪い。われわれは、動物実験でこのような臨床例に近いモデルとして、モルモット肝癌 Line-10をもちいたが、術後の adjuvant cancer chemotherapy としてMFC療法を行っても、人の常用量に相当する量では、まったく治癒には到らず、LD₅₀量でやっと1匹が治癒するという惨憺たる結果であった。

そこで癌化学療法剤を腫瘍内に局注したらどうかと考えた。局注に関しては既にOhanianら⁶⁾の論文があり、その有効性が確認されている。消化器癌であれば1回投与程度であれば内視鏡を用いて局注は可能なことが多い。ところが局注の欠点は薬剤によっては局所の壊死をひきおこすことである。消化管穿孔から腹膜炎という致命的な合併症が予想される。そこで癌化学療法剤の局注にひきつづいてこの腫瘍をなるべく早く切除してしまったらどうかという解決策を考えた。われわれの検討結果では局注に手術切除をcombineすることで、それぞれの単独よりも治癒率の著明な改善がみられた。しかも局注と手術切除の間隔は3時間の短時間の方が24時間にくらべさらに良好な成績を得た。われわれの他の実験ではこの間隔を1日、7日、

14日と変えて比較しているが、それぞれの治癒率に差はなかった。このことはこの治療法が安全に行われ、しかも治癒率の向上が期待できることを示している。

一方、このような臨床に則した動物実験をやっている、問題になるのは、動物実験で得られたデータと、臨床応用のデータの解離であろう。その理由としてあげられるものを表3に示した。これらは腫瘍治療実験に関する本質的な問題としてこれから解析されてゆくべきであるが、そのうち3について、すなわち腫瘍の抗原性について検索した、LPSの局注により出血壊死はおこるが、腫瘍治癒にはT細胞が介在することが必要である。すなわちヒト癌に多いといわれる低免疫原性の腫瘍では、そもそもの抗原性が低いため宿主の免疫能がひき出されずに、たとえLPSを局注しても治癒しないと考えられるが、われわれの実験でもそのような結果が得られた。これらの腫瘍治療実験（特に免疫療法）は、動物実験と臨床の間の成績のギャップを正しく埋めるためにも、腫瘍の抗原性を断って議論されるべきである。

文 献

- 1) Zbar B, Bernstein ID, Tanaka T et al: Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumor cells and living mycobacterium bovis (strain BCG). *Science* 170: 1217—1218, 1970
- 2) Bartlett GL: Effect of host immunity on the antigenic strength of primary tumors. *J Natl Cancer Inst* 49: 493—504, 1972
- 3) 寺田信國, 小玉正智, 福谷明直ほか: MutagenesisによるNonimmunogenic tumorの免疫原性増強に関する研究. *Oncologia* 15: 128—132, 1985
- 4) Kadmon D, Heston WDW, Fair W: Treatment of a metastatic prostate derived tumor with surgery and chemotherapy. *J Urology* 127: 1238—1242, 1982
- 5) Sava G, Zorvet S, Perissin L: Therapeutic activity of ICRF-159 combined with surgery: Effect of postsurgical treatment with cyclophosphamide in mice bearing Lewis lung carcinoma lines. *Anticancer Res* 5: 511—516, 1985
- 6) Ohanian SH, Sclager SI, Goodman D: Analysis of the intralesional adriamycin-induced regression of primary and metastatic growth of Line-10 guinea pig hepatoma. *Cancer Immunol Immunother* 8: 179—187, 1980