

消化器癌の肝転移再発に対する予防法の研究

富山医科薬科大学第2外科, *同 RI施設

笠木 徳三 田沢 賢次 山下 巖 石沢 伸
増山 喜一 藤巻 雅夫 前田 正敏* 本田 昴*

A STUDY ON THE PROPHYLACTIC MEASURES FOR THE HEPATIC METASTATIC RECURRENCE OF THE GASTROINTESTINAL CANCER

Tokuzo KASAGI, Kenji TAZAWA, Iwao YAMASHITA,
Shin ISHIZAWA, Kiichi MASUYAMA, Masao FUJIMAKI,
Masatoshi MAEDA* and Takashi HONDA*

Second Department of Surgery, Radio-Isotope Laboratory*,
Toyama Medical and Pharmaceutical University

消化器悪性腫瘍の肝転移再発に対する予防的な治療を目的として OK-432 を中鎖脂肪でエマルジョン化して経口投与し、その効果を実験的、臨床的に検討した。腫瘍細胞 AH60C を用いたラットの肝転移実験において、OK-432 中鎖脂肪エマルジョン経口投与群の転移抑制率は 57.1% で、無処置群との間に有意差を認めた。細胞障害活性試験では OK-432 中鎖脂肪エマルジョン経口投与群は、腸間膜リンパ節 43%、脾細胞 50% で水溶液投与群より高い傾向にあった。臨床例では OK-432 中鎖脂肪エマルジョン経口投与により NK 活性の低い担癌患者 5 例中 3 例が正常値に復した。また OKT4/OKT8 比が上昇した。以上より、OK-432 中鎖脂肪エマルジョン経口投与の有用性が示唆された。

索引用語：肝転移再発の予防, OK-432, 中鎖脂肪エマルジョン, biological response modifier, ラットの実験的肝転移

はじめに

悪性腫瘍の最も重要な特徴は転移能を有すること、すなわち原発巣からかけ離れた部位に腫瘍を形成することである。消化器癌においては、根治手術後に肝転移のかたちで再発する、いわゆる肝転移再発は予後を左右する重大な因子である。近年の転移に関する研究はめざましく、消化器癌の肝転移に対する治療法が多数報告されている。われわれは肝転移の治療のひとつとして予防的な治療を検討してきた。この概念はすでに形成され大きく発育した肝転移に対しての治療と異なり、手術時に肉眼的には見だせない転移、すなわち微小転移巣や、手術操作による腫瘍細胞の遊離をきっかけとした転移巣の形成、あるいは手術侵襲による免疫能の低下による腫瘍の増殖能の増強を抑制することであり、これからの癌治療には欠かせないものとい

えよう。このような治療には biological response modifier (BRM) は最も適したもの 1 つである¹⁾。われわれは BRM の代表的な 1 つである OK-432 を用いて肝転移再発の予防的な治療を検討してきた²⁾³⁾。OK-432 の投与法には種々の方法が報告されているが、経口投与は重篤な副作用もなく、比較的大量を反復してしかも長期間にわたり投与できる利点がある。OK-432 を、門脈系に直接移行するとされている中鎖脂肪 (medium chain triglyceride, 以下 MCT) でエマルジョン化し経口投与を試みたところ、実験的肝転移に対し良好な成績を得た。臨床においてもその有用性を示唆する結果を得たので報告する。

材料・対象および方法

1. OK-432 MCT エマルジョンの調製

油層として MCT (ミグリオール 812), HCO-60 (ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体), MGS-B (グリセリンモノステアリン酸誘導体), 水層として OK-432 水溶液を 60°C に加温し、1 万回転以上で 5 分間ホモゲ

<1989年6月7日受理>別刷請求先: 笠木 徳三
〒930-01 富山市杉谷2630 富山医科薬科大学第2外科

ナイズしてOK-432 MCT エマルジョンを調製した(図1)。

2. ^{99m}Tc-OK-432の調製

OK-432 (5.0KE) 水溶液を0.1N HClでpH 1.5~2.5にする。これに0.1N HCl 50mlにSnCl₂を100mg溶解した試薬0.5ml加える。つぎに^{99m}TcO₂水溶液1mlを加えて15分間放置したのち0.1N NaOHでpH約5.5に調節した。MCT エマルジョンは標識された^{99m}Tc-OK-432を用い、図1に準じて調製した(図2)。

3. 経腸的投与された^{99m}Tc-OK-432 Sn コロイドの門脈血中濃度の測定

1日絶食させた雄性ドンリュウラット(300g)6匹を2群にわけ、^{99m}Tc-OK-432 MCT エマルジョン投与群と^{99m}Tc-OK-432水溶液投与群とした。ネブタール麻酔下に開腹し、胃液、胆汁によるOK-432の変質や^{99m}TcがOK-432から遊離される可能性を考慮し十二指腸にカニューレを挿入し、これより投与した。また、カニューレより口側の腸管は結紮した。1匹あたりに投与した^{99m}Tc-OK-432の比活性放射能は2mCi(5.0KE)とした。投与5分後から90分後まで経時的に門脈血を採取し、その放射能活性はガンマカウン

ター(Auto well, Aloka社製)により測定した。

4. ^{99m}Tc-OK-432の体内臓器分布

雄性ドンリュウラット(300g)4匹を2群にわけ、それぞれの群に^{99m}Tc-432 MCT エマルジョンまたは水溶液を経腸的に投与し90分後に屠殺して各臓器の放射能活性を測定した。1匹あたりの^{99m}Tc-OK-432の比活性放射能は2mCi(5.0KE)とした。

5. OK-432-MCT エマルジョンおよびOK-432水溶液経口投与における細胞障害活性の測定

C3H/He マウスを3群にわけ(各群5匹)、それぞれの群にOK-432(0.5KE) MCT エマルジョン、OK-432(0.5KE)水溶液、生理食塩水を0日目、3日目に金属カニューレで胃内に投与した。4日目に屠殺し、脾細胞、腸間膜リンパ節、腹腔浸出細胞の細胞障害活性を測定した。測定の方法は、標的細胞としてYAC-1を用いEffector/Target ratioは50:1とし、⁵¹Cr遊離法にて行った。

6. 実験肝転移の抑制効果の検討

OK-432 MCT エマルジョン経口投与による肝転移抑制効果を実験モデルを用いて検討した。肝転移モデルは教室で樹立した方法²⁾、すなわち腫瘍細胞AH60C⁴⁾⁵⁾を約2.5×10⁶個/ratをドンリュウラットの門脈内に注入し、肝に転移巣を形成せしめる方法にて作成した。5週齢(140~160g)の雄性ドンリュウラットを3群にわけ、第1群はOK-432 MCT エマルジョン投与群、第2群はOK-432水溶液投与群、第3群は対照群とした。OK-432投与群にはAH60Cの門脈内注入前に2回(0.5KE×2/週)、注入後に8回(0.5KE×2/週)金属カニューレで胃内に投与した。第3群は腫瘍細胞250万個の門脈内注入のみとした。これら3群を30日後に屠殺し、肝転移の有無を検討した(図3)。

7. OK-432 MCT エマルジョン経口投与における健康成人のNK活性の変化

21~23歳の男性健康成人にOK-432 MCT エマルジョン20KEを経口的に投与し、投与前、投与3日後、

図1 OK-432中鎖脂肪エマルジョンの調整

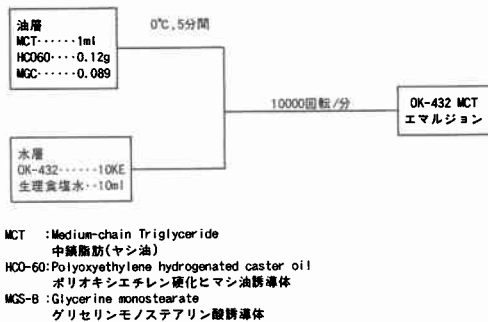


図2 ^{99m}Tc-OK-432 Sn コロイド溶液の調整

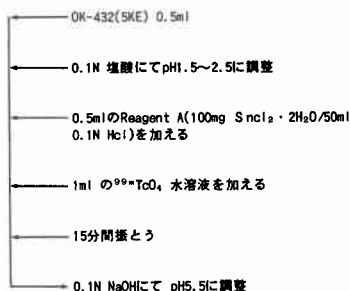
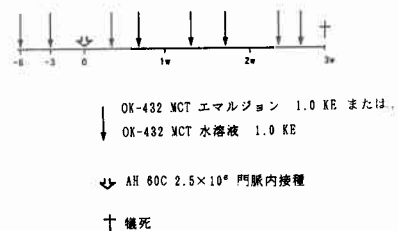


図3 ラット肝転移の抑制実験のプロトコール



投与7日後に末梢血のNK活性を測定した。

8. OK-432 MCT エマルジョン経口投与における大腸癌患者の術前・術後のNK活性の変化

画像診断上、肝転移のない大腸癌患者12例(結腸癌6例, 直腸癌6例)を対象とした。手術3日前および術後10日目にOK-432 MCT エマルジョン20KE/20mlを投与し、末梢血のNK活性を投与前, 投与3日後, 手術3日後, 7日後に測定しその変化を検討した。

9. フローサイトメトリーによる大腸癌患者末梢血のリンパ球サブセットの検討

画像診断上、肝転移のない大腸癌患者18例に対しOK-432 MCT エマルジョンを上記8と同様に投与し、末梢血のリンパ球サブセットを投与前, 投与3日後, 手術3日後, 5日後, 7日後, 14日後にフローサイトメーター (EPICS C, Coulter 社製) により解析した。

結 果

1. 調製されたエマルジョンはO/W型でその粒子の大きさは1~3ミクロンである。また、OK-432の菌体は大部分がエマルジョンの外水層に分散し、一部がエマルジョン粒子の表面に付着あるいは粒子内にとりこまれていることが認められた(図4)。

2. 調製された ^{99m}Tc -OK-432-Snコロイドをペーパークロマトグラフィにより検定したが、Free ^{99m}Tc 、 ^{99m}Tc Snコロイド、 ^{99m}Tc -OK-432 Snコロイドおよびエマルジョン調製の操作を加えても ^{99m}Tc が遊離することなくほぼ安定していた(図5)。

3. ^{99m}Tc -OK-432 MCT エマルジョン投与群における門脈血中の放射能活性は ^{99m}Tc -OK-432水溶液投与群に比較して、いずれの測定点においても約10倍高いことが認められた(図6)。

図4 →印はエマルジョン粒子, ↓印はOK-432菌体粒子

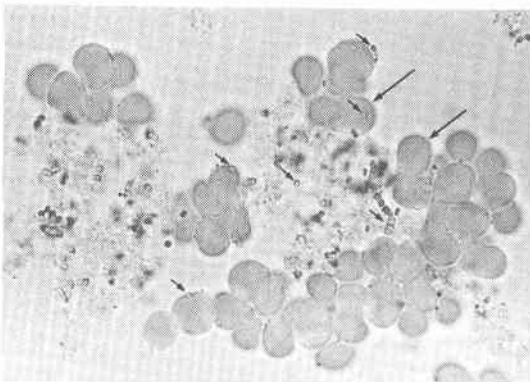


図5 ペーパークロマトグラフィーによる ^{99m}Tc -OK-432 MCT エマルジョンの安定性の検討

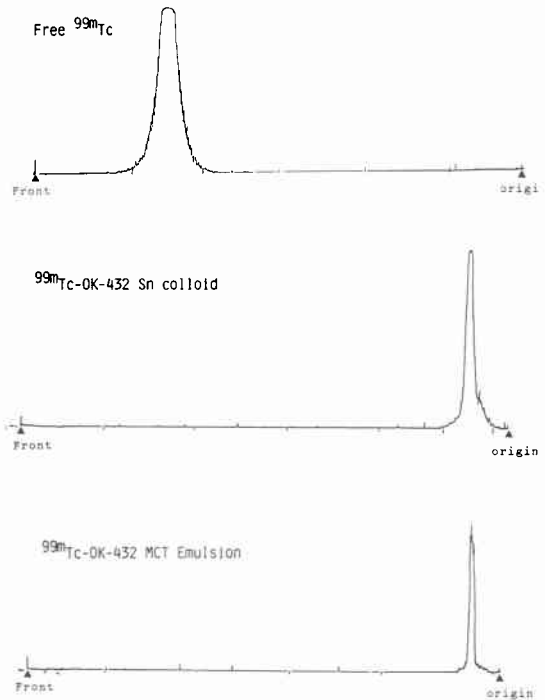
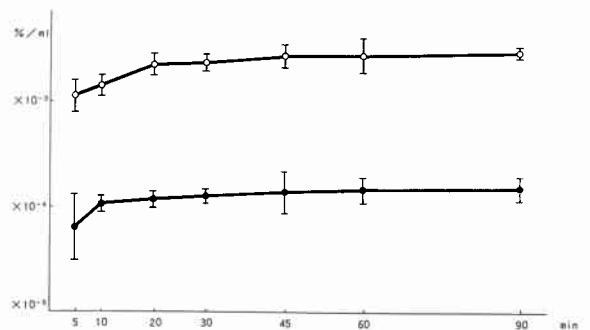


図6 ^{99m}Tc -OK-432 MCT エマルジョン、 ^{99m}Tc -OK-432水溶液経腸管投与時の門脈血中 ^{99m}Tc -OK-432の経時的变化



4. 経腸的に ^{99m}Tc -OK-432 MCT エマルジョンおよび、 ^{99m}Tc -OK-432水溶液を投与された各群における放射能活性の臓器内分布では、両群とも肝、腎に高く認められた。しかし、両群の各臓器について比較すると、 ^{99m}Tc -OK-432 MCT エマルジョン投与群は ^{99m}Tc -OK-432水溶液投与群の約8.5倍を示した(表1, 図7)。

5. 腸間膜リンパ節、脾細胞、腹腔浸出細胞の細胞障害活性は、OK-432 MCT エマルジョン投与群では、そ

図7 ^{99m}Tc-OK-432経腸管投与90分後の臓器内分布

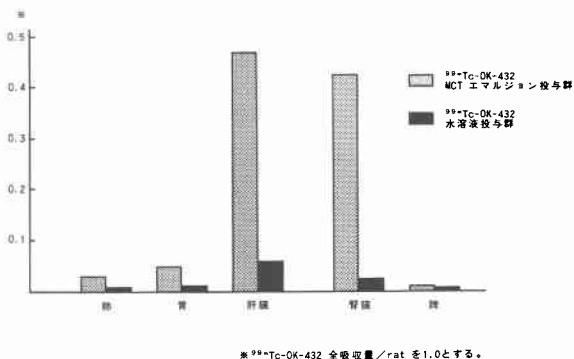


表1 経腸的(十二指腸より)投与された^{99m}Tc-OK-432 MCT エマルジョンの体内臓器分布

	単位	肺	胃	肝臓	腎臓	脾
^{99m} Tc-OK-432 MCT エマルジョン	DPM (%)	912031 (0.098)	1074041 (0.1159)	16164138 (1.74)	15076355 (1.627)	346442 (0.0374)
^{99m} Tc-OK-432 水溶液	DPM (%)	19110 (0.0208)	316065 (0.0341)	1881923 (0.203)	1296805 (0.1399)	119338 (0.0129)

図8 OK-432 MCT エマルジョン, OK-432水溶液投与による細胞障害活性

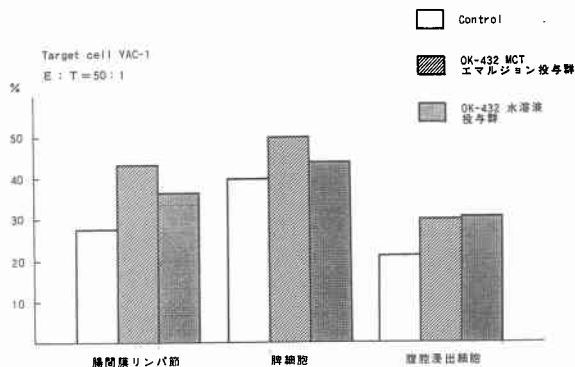


表2 OK-432 MCT エマルジョンおよびOK-432水溶液経口投与による実験肝転移抑制効果

群	接種腫瘍細胞数 ¹⁾	投与形態	OK-432投与量	肝転移形成を認めた個体数(匹)	肝転移形成率
Group 1 (n=14)	2.5×10 ⁶	OK-432 MCT エマルジョン	8.0 KE (1.0×2/W)	6	42.9%(7/14)*
Group 2 (n=13)	2.5×10 ⁶	OK-432 水溶液	8.0 KE (1.0×2/W)	7	53.1%(7/13)
Group 3 (n=18)	2.5×10 ⁶	コントロール	—	2	90.0%(2/18)

¹⁾腫瘍細胞: AH60C
*P<0.05, コントロールとの間に有意差を認めた

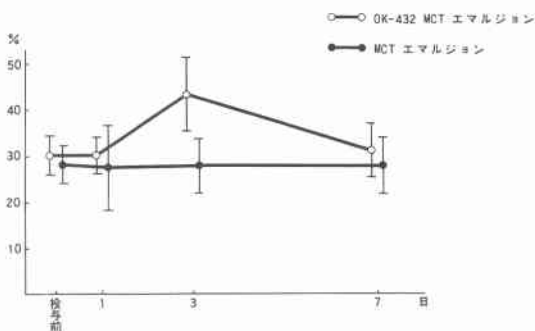
それぞれ43%, 50%, 31%を示し, 対象群の約1.2倍から1.5倍の増強を認めた. 一方, OK-432水溶液投与群はそれぞれ, 37%, 43%, 32%であった. OK-432 MCT エマルジョン, 水溶液の両群間に有意差はなかった(図8).

6. OK-432 MCT エマルジョンを投与した第1群では57.1%(8/14), OK-432水溶液を投与した第2群(同250万個)では46.1%(6/13)に肝転移を認めなかった. 対照群に肝転移を認めないものは14.3%(2/14)であった(表2). 第1群と対照群とのあいだに有意差(p<0.05)を認めたが, 第2群と対照群とのあいだには有意差を認めなかった.

7. 健康成人における末梢血のNK活性では, OK-432 MCT エマルジョンを経口的に投与したところ, 投与3日後にピークをみとめ7日後に投与前値に復した. MCT エマルジョンのみを投与した群にはNK活性の上昇は認められなかった(図9).

8. 大腸癌患者13例における末梢血のNK活性については, OK-432 MCT エマルジョン投与前に低値を示したものが5例あったが, 投与により3例が正常値に復した. 投与前に正常値であった症例は正常範囲内の変動を示した. 手術前と手術3日後を比較検討すると, 術後3日目に低値を示した症例は5例であった. このうち3例はOK-432 MCT エマルジョンの経口投与に

図9 OK-432 MCT エマルジョン, MCT エマルジョン経口投与による健康男子成人の末梢血NK活性の推移



より正常に復したものが再度低下したものであった. 術後7日目では, 低値を示したものは5例で, このうち2例は合併症をおこした症例であった(図10).

9. 担癌患者におけるOKT4/OKT8はOK-432 MCT エマルジョンの経口投与により上昇し術後の低下もほとんどないことが認められた. Lue 7, Lue 11の変動はOK-432 MCT エマルジョンの経口投与後に

図10 OK-432 MCT エマルジョン術前経口投与によるNK活性の変化

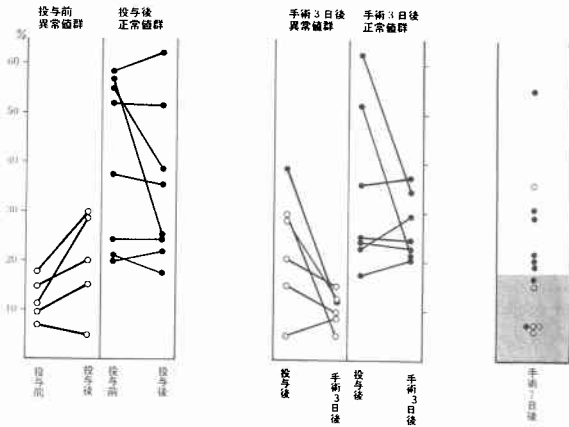
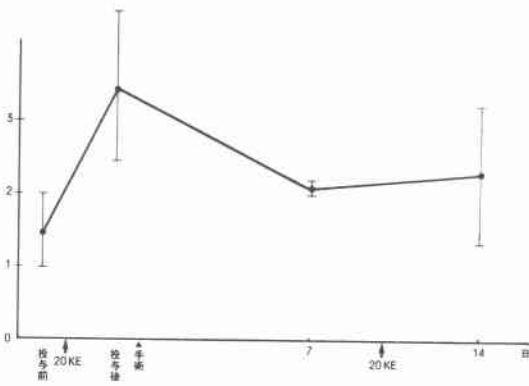


図11 OK-432 MCT エマルジョン経口投与症例におけるOKT4/OKT8

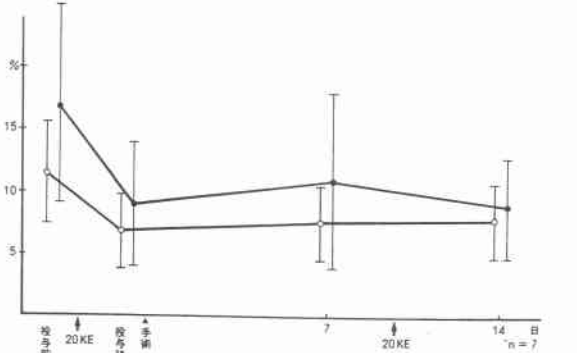
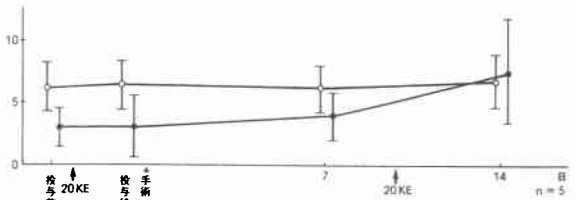
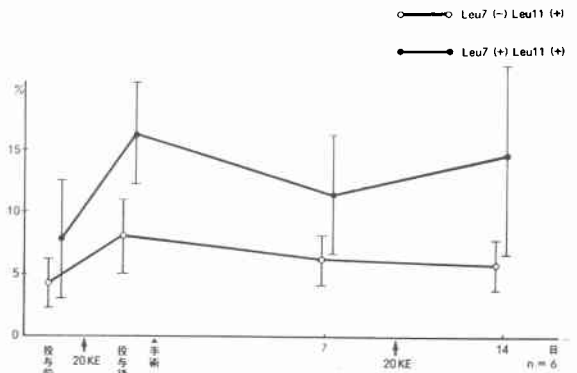


上昇したものが6例、不変のもの5例、低下したものが7例認められた(図11, 図12)。

考 察

OK-432の投与経路として、皮内、皮下⁶⁾、筋肉内⁶⁾、腫瘍内⁷⁾、動脈内⁸⁾、静脈内⁹⁾、門脈内¹⁰⁾、胸腔内¹¹⁾、経口¹²⁾などが考えられ、それぞれの投与方法にはさまざまな利点と効果があるが、肝微小転移巣の抑制については門脈への大量投与が最も効果的と思われる。しかしながら、門脈内投与の臨床応用となると副作用あるいは投与期間の制限などの点で予防的治療としてはやや実用性に欠ける面が多い。したがって、門脈内に高い濃度のOK-432を得るためには経口的に投与することが考えられるが、従来、OK-432は消化管からは比較的吸収され難いとされている。したがって、われわれはOK-432の吸収の増強を期待し、その吸収経路が加水分

図12 OK-432 MCT エマルジョン経口投与した症例のLeu 7 (-) Leu 11 (+), Leu 7 (+) Leu 11 (+)の変動



解を受けず、直接門脈系に移行する中鎖脂肪(MCT)を用いてエマルジョン化して経口投与する方法を試みた。その効果を検討するため、^{99m}Tc-OK-432-SnコロイドをMCTを用いてエマルジョン化し、ラットに経腸の投与して門脈血中および臓器内分布をその放射能活性の測定により求めた。門脈血中の放射能活性はOK-432 MCT エマルジョン、および対照のOK-432水溶液投与の両群とも速やかに上昇し、約20分後に平衡に達したが、いずれの測定時期においても前者は後者の約10倍の放射能活性が認められた。また、臓器への分布では両群とも肝に最も高い値が認められたが、両

群間の臓器で比較すると OK-432 MCT エマルジョン投与群は OK-432水溶液投与群の約 8 倍の放射能活性を認めた。これは、門脈内へ OK-432を直接投与しなくとも中鎖脂肪を用いてエマルジョン化し経口投与することで門脈内に比較的多量の OK-432が集中させることが可能であることを示唆している。さらに、肝において OK-432水溶液の約 8 倍の放射能活性が得られたことは、肝を Target とする本治療において、その有用性を強く示唆しているものと考えられる。高橋ら¹³⁾、Watanabe ら¹⁴⁾は長鎖脂肪を用いて 5-Fu をエマルジョン化して経口投与しているが、この際にはリンパ系への移行が高いとしている。一方、八木ら¹⁵⁾は中鎖脂肪を用いて 5-Fu をエマルジョン化することにより、門脈への移行が増強することを報告している。これは、中鎖脂肪の吸収経路の特殊性によるものと思われる。形態がこれらの薬剤とは異なる OK-432の吸収機序についてはさらに検討を要するものの、中鎖脂肪を用いたエマルジョン化の効果は一連の基礎実験により十分期待できると考えている。

また、C3H/He マウスの細胞障害活性において検討すると、OK-432投与群はいずれも NK 活性の上昇を認めたが特に OK-432 MCT エマルジョン投与群が OK-432水溶液投与群より高い傾向にあった。これは、OK-432を中鎖脂肪によりエマルジョン化して投与することが、吸収増強のみならず全身性免疫能をより高める効果を示唆しているものと考えられる¹⁶⁾。

臨床例に用いる前に OK-432 MCT エマルジョンの最も適切な投与時期を決定するため健康正常人の NK 活性を測定したところ、投与 3 日後にはそのピークを認めた。以上の結果より、免疫能の最も上昇した時に手術を施行するのが望ましいことから、臨床例については手術 3 日前に OK-432 MCT エマルジョンを経口投与した。実際の評価は困難なため、末梢血の NK 活性とリンパ球サブセットを用いて検討した。NK 活性について考察すると、術前に NK 活性の低下している症例の正常化が OK-432 MCT エマルジョンの経口投与により得られた。しかし、これらの症例が一般的に最も免疫能の低下するとされる術後 3 日目に再度、投与前の低値に復することも認められたことから、術前に NK 活性が低下している症例には術中の OK-432門脈内投与がこの免疫能の再低下を予防できると考え、現在は両者の併用についても症例を重ねて検討中である。以上のような症例があるものの、術後 3 日目の NK 活性は大半の症例が正常値を維持することから、術前

に OK-432 MCT エマルジョンを経口投与することの意義は大きいと考えている。また、末梢血のリンパ球サブセットについても、OKT4/OKT8は投与後上昇し、Lue 7, Lue 11の上昇が認められる症例もあることなどから本剤の投与は全身性の免疫能をも増強せしめることを示唆していると考えられる。Leu 7, Leu 11が投与後に低下している症例は術前の絶食、下剤の投与など、プレバレーションの影響が考えられるが、さらに検討を要すると思われる。現在、臨床応用開始約 2 年とまだ日も浅く実際の臨床上的評価は難しいが、肝転移再発例はなく、またラットでの肝転移の実験において肝転移を抑制する効果が高いことから、臨床においても良好な結果が得られるものと思われる。

結 語

代表的な BRM の 1 つである OK-432を中鎖脂肪によりエマルジョン化し、実験的、臨床的に経口投与して以下の結論を得た。

- 1) ^{99m}Tc 標識 OK-432を中鎖脂肪(MCT)を用いてエマルジョン化しドミニオンラットの十二指腸より投与し経時的に門脈血中の放射能活性(%dpm/ml)を測定した。投与後20分でピークに達したが、すべての測定点において、OK-432 MCT エマルジョン投与群は水溶液投与群の約10倍高い値を示した。
- 2) 投与90分後に測定した体内の臓器分布は各臓器において、^{99m}Tc-OK-432 MCT エマルジョン投与群は水溶液投与群の約8.5倍の放射能活性を示した。
- 3) マウスを用いた細胞障害活性において、OK-432 MCT エマルジョン投与群、水溶液投与群とも脾細胞、腸間膜リンパ節細胞、腹腔浸出細胞に活性の上昇を認めたが、前者は後者よりも高い傾向を示した。
- 4) 腫瘍細胞 AH 60C を用いたラットの肝転移実験において、肝転移形成を認めなかったものは、OK-432 MCT エマルジョン投与群は14匹中 8 匹 (57.1%)、OK-432水溶液投与群は13匹中 6 匹(46.1%)、無処置のものは18匹中 2 匹 (11.1%) で OK-432 MCT エマルジョン経口投与群とのあいだに有意差を認めた。
- 5) 男子健常成人に OK-432 MCT エマルジョンを経口投与し、末梢血の NK 活性を測定したところ、投与 3 日後にピークに達し、7 日後に投与前値に復した。MCT エマルジョンのみを投与した群では NK 活性の上昇を認めなかった。
- 6) 大腸癌患者13例に対し OK-432 MCT エマルジョン20KE を術前経口投与し、末梢血中の NK 活性を投与前、投与後、手術 3、7 日後に測定した。投与

前に低値を示した5例中3例が正常値に復した。

7) 大腸癌患者18例に対しOK-432 MCT エマルジョンを術前20KE投与し、フローサイトメトリーで末梢血のリンパ球サブセットを解析した。OKT4/OKT8比は投与後上昇し術後も低下せず経過した。Leu 7, Leu 11については、投与前に低値を示した6例が上昇したが、投与後に低下した7例は投与前は正常値であり、その原因については、さらに検討を要する。

以上の結果よりOK-432を中鎖脂肪にてエマルジョン化して経口投与することは肝転移の予防的な治療として有用であることが示唆された。

文 献

- 1) 漆崎一朗, 塚越 茂編: 癌とBRM. サイエンスフォーラム, 東京, 1982, p14-41
- 2) 田沢賢次, 笠木徳三, 永瀬敏明ほか: 外科手術後の肝転移形成に対する予防的治療の研究. 外科診療 58: 237-238, 1988
- 3) 永瀬敏明: 転移性肝癌の治療に関する実験的研究—³²P 肝内照射療法による転移予防に関する実験. 日本大腸肛門病会誌 39: 149-161, 1983
- 4) 小田島成和: 腹水肝癌の樹立. 長崎医学会誌 38: 428-448, 1963
- 5) 宮川正澄: 実験腫瘍学. 朝倉書店, 東京, 1966, p485-499
- 6) Kurokawa T, Hattori T, Furue H: Clinical experiences with the streptococcal anticancer preparation OK-432 (NSC-B11620). Cancer Chemother Repo 56: 211-220, 1972
- 7) 豊田文一, 前坂明男: 広汎な口蓋癌患者に対する溶連菌制癌剤“PC-B-45”の使用経験. 日耳鼻会誌 71: 62-71, 1968
- 8) 佐野秀一, 石黒敏史, 岩永力三ほか: 切除不能肝癌に対するImmunochemotherapy. 診療と新薬 16: 2819-2821, 1983
- 9) 黒川利雄, 服部隆延, 古江 尚ほか: PC-B-45の臨床治験. 癌の臨 15: 1058-1062, 1969
- 10) 田沢賢次: Biological response modifierを用いる外科手術後の肝転移形成に対する予防治療の可能性. Ther Res 8: 822-833, 1988
- 11) 太田和雄, 尾山 淳, 栗田宗次ほか: 癌性胸膜炎に対する溶連菌製剤OK-432の効果. 癌と化療 2: 255-262, 1972
- 12) 土谷利晴, 児玉 宏, 戸部隆吉ほか: ビンパニール(OK-432)経口投与の試み(6報)—実験的消化管腫瘍に対する溶連菌製剤OK-432の経口投与のin vivo抗腫瘍免疫に及ぼす影響. 日癌治療会誌 20: 609-617, 1985
- 13) 高橋俊雄, 河野研一, 山口俊晴ほか: 胃癌に対する5-FU Emulsion術前経口投与療法. 手術 33: 21-26, 1979
- 14) Watanabe T, Nakao E, Cho K et al: Basic experiments on administration of 5-fluorouracil emulsion as adjuvant chemotherapy to surgical treatment for gastric cancer. Jpn J Surg 8: 41-50, 1978
- 15) 八木 実, 和田寛治, 小林清男ほか: フルオロウラシル-MCT エマルジョンの投与で著効を示した肝癌の治療例. 基礎と臨 17: 320-325, 1983
- 16) 増山喜一, 田沢賢次, 笠木徳三ほか: OK-432中鎖脂肪(MCT)エマルジョン経口投与によるマウス肺転移抑制効果. 日癌治療会誌 23: 72-78, 1988