日消外会誌　28（3）：667～672，1995年

大腸癌微小肝転移モデルにおけるOK-432，ヒトrecombinant interleukin-2（rIL-2）連続脾内投与の肝転移抑制効果に関する検討

大阪市立大学第1外科，大阪市立総合医療センター外科*

有本　裕一　　鄭　容錫　　山田　靖哉　　前田　清
新田　敦範　　平山　晃司　　澤田　鉄二　　仲田　文造
西口　幸雄　　奥野　匡宥*　　曽和　融生

大腸癌の予後を左右する肝転移の予防における免疫療法の有効性を検討するために実験的微小肝転移モデルを作製し，OK-432，rIL-2(以下，IL-2)連続脾内投与による肝転移抑制効果につき検討した．BALB/c nu/＋マウスに同系のマウス大腸癌株であるcolon 26，1×10^5を経門脈的注入後7日目に微小肝転移が生じることを確認し，これを微小肝転移モデルとして利用した．その結果，微小肝転移が形成されてからOK-432，IL-2を投与しても，各薬剤単独あるいは併用脾注にて，いずれもコントロールに比べて有意に肝転移形成を抑制した($p<0.005$)．またOK-432，IL-2併用脾注にて，OK-432単独脾注に比べて有意に肝転移形成を抑制した（$p<0.025$）．この両薬剤併用脾注による肝転移抑制効果は，薬剤を投与した脾細胞の抗腫瘍中和活性の上昇から，脾臓内への薬剤投与が重要である可能性が示唆された．

Key words：colorectal carcinoma，micrometastatic liver tumor，OK-432，recombinant interleukin-2，BRM therapy

はじめに

進行大腸癌においては，初回診断時にはすでに10～20%に肝転移が認められる[1)2)]．また大腸癌治癒切除後の再発形式においても肝転移が最も多く，肝転移が予後を左右する重要な因子となっている．

大腸癌の肝転移に対しては現在，化学療法，放射線療法，免疫療法やそれらの併用療法などいろいろ試みられているが，決定的な治療法はいまだ確立されていない[3)]．

われわれは大腸癌肝転移予防における免疫療法の意義を検討するために，マウス大腸癌株colon 26による微小肝転移モデルを作製し，OK-432，ヒトrecombinant interleukin-2（rIL-2：以下，IL-2と略記）の脾臓内投与による肝転移抑制効果につき検討した．今回は微小肝転移巣に対する治療効果につき検討したので，若干の文献的考察を加え報告する．

＜1994年11月9日受理＞別刷請求先：有本　裕一
〒545　大阪市阿倍野区旭町1－5－7　大阪市立大学医学部第1外科

方　法

1）肝転移モデルの作製

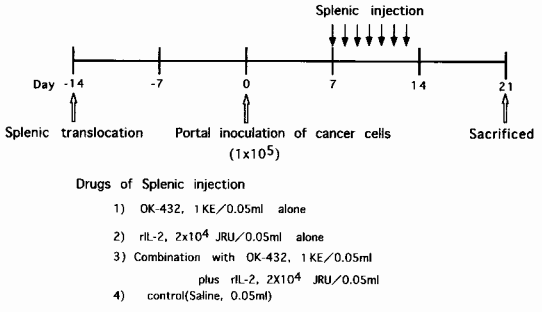
N-methyl-N-nitrosourethane誘発マウス可移植性大腸癌であるcolon 26を用い，皮下継代移植後10日～20日の腫瘍を実験に使用した．

BALB/c nu/＋，雌，6週齢の皮下に継代された腫瘍を無菌的に摘出し，Phosphate-buffered saline（以下，PBSと略記）内でハサミでできるだけ細切し，酵素カクテル（0.02%collagenase type I，0.05% pronase，0.02%DNaseを含む）を用いて37℃で30分の酵素処理をおこない，メッシュを用いて腫瘍細胞浮遊液を作製した．この細胞浮遊液を1,500rpm，10分の遠心により2回洗浄し，トリパンブルーにより生細胞数を確認し，必要な細胞数をPBS溶液に浮遊させて実験に用いた．

マウスをエーテル麻酔下に左肋弓下切開し，脾臓を有茎で皮下に脱転固定し[4)]，その手術麻酔侵襲の消失した2週間後より実験を開始した．

肝転移の作製は経門脈的に行った．エーテル麻酔下

Fig. 1　Schedule of experiments



にマウスを開腹後，PBS 溶液0.2ml 内に浮遊させた腫瘍細胞を30G 眼内注射針を用い，上腸間膜静脈より注入した[5]．

実験に先立ち，colon 26門脈内接種による肝転移形成状況を知るために，腫瘍細胞数を1×10^4, 1×10^5, 1×10^6の各オーダーで門脈内に接種し，腫瘍接種後，3，7，14，21日目にマウスを犠牲死させ，各時期における肉眼的および組織学的肝転移につき検討した．

2）投薬方法

薬剤は非特異的免疫賦活剤として OK-432（中外製薬（株））を，サイトカインとして IL-2（武田薬品工業（株））を用いた．OK-432, IL-2をそれぞれ1KE/mouse, 2×10^4JRU/mouse, 各0.05ml とし，1）OK-432単独投与群（n=6），2）IL-2単独投与群（n=6），3）OK-432, IL-2併用投与群（n=6），4）コントロール（生食0.05 ml/mouse 投与群）（n=6）の4群に分け検討した．

薬剤投与は皮下に有茎で脱転した脾臓内に，腫瘍接種後7日目（Day 7）より1週間連続で，無麻酔下に経皮的に行った．

3）肝転移の判定

腫瘍移植後21日目（Day 21）にマウスを犠牲死させ，肝転移結節数を肉眼的に計測し肝重量を測定し，肝転移抑制効果を判定した（**Fig. 1**）．

4）脾内投与の有効性の検討

各薬剤を投与した担癌マウス脾細胞の抗腫瘍中和試験（Winn assay，Effector/Target 比（E/T 比）=50：1）を行い，脾内投与の有効性を検討した．

統計学的検討は T 検定を用いて行った．

結　果

1．微小肝転移モデルの作製

腫瘍細胞 1×10^4個注入後14日目には全例に顕微鏡的肝転移が認められたが，肉眼的肝転移は20%（1/5）にしか認められなかった．1×10^6個注入後7日目には全例に顕微鏡的肝転移が認められたが，40%（2/5）に肉眼的肝転移も認められた．1×10^5個注入後7日目には全例に顕微鏡的肝転移が認められたが，肉眼的肝転移は全く認めず，14日目には全例に肉眼的肝転移が認められた（**Fig. 2**）．以上の結果より，腫瘍細胞 1×10^5 個注入後7日目（Day 7）のマウスを微小肝転移モデルと考えて実験に用いた（**Table 1**）．

Fig. 2　Photomicrograph of the mice liver 7 days after inoculation of 1×10^5 colon 26 cells (Day 7): micro metastasis was identified in the liver. staining: Hematoxylin/Eosin, magnification: ×100.

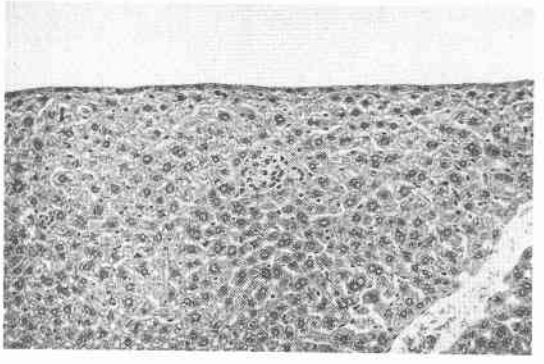


Table 1　Preliminary experiments of micrometastasis in the liver

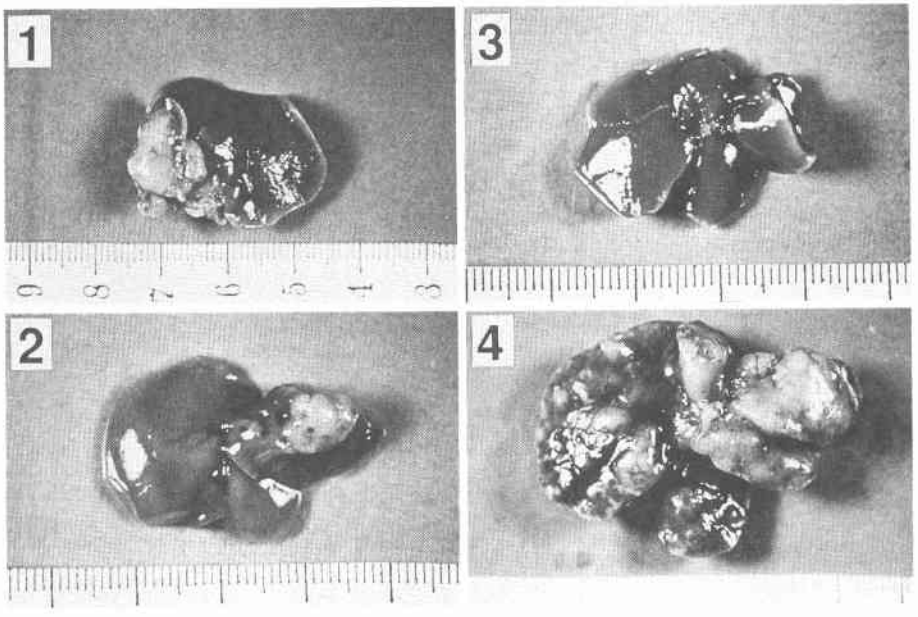
Tumor cells (10^4, 10^5, 10^6) were inoculated into the portal vein of syngenic mice. On the day7 after inoculation of 10^5 cells, all mice showed microscopic liver metastasis and no macroscopic metastasis was observed. On the day14 after inoculation of 10^5 cells, all mice showed macroscopic liver metastasis. So the mice, on the day7 after inoculation of 10^5 cells, were used for the model of micrometastasis in the liver.

Cells	Duration (days)	No. of mice	Liver meta.(No. of mice)	
			macro.(+)	micro.(+)
10^4	7	5	0	5
	14	5	1	5
10^5	7	5	0	5
	14	6	6	6
10^6	7	5	2	5
	14	5	5	5

2．薬剤脾内投与による肝転移抑制実験

1）OK-432単独投与群，2）IL-2単独投与群，3）OK-432, IL-2併用投与群，4）コントロール群の各群におけ

Fig. 3 Photomacrograph of the mice liver 21 days after inoculation of 1×10^5 colon 26 cells (Day 21), 1. OK-432 alone was injected into the spleen, 2. rIL-2 alone, 3. Combination with OK-432 plus rIL-2, 4. Saline alone (control) : metastatic liver nodules were identified on the liver surface in 1 and 2, smaller number of nodules were in 3 and larger number of nodules were in 4.



る肝重量（g）および肝転移結節数はそれぞれ，

1)：2.68±1.03，58.13±31.22

2)：1.35±0.47，16.0±17.05

3)：1.20±0.07，1.0±2.24

4)：6.02±1.41，196.6±33.42

(Mean±SD）であった（**Fig. 3**）.

この結果より，微小肝転移が形成されてからOK-432，IL-2を投与しても，各薬剤単独あるいは併用脾注にて，いずれもコントロールに比べて有意に肝転移形成を抑制した($p<0.005$)．また，OK-432，IL-2併用脾注にて，OK-432単独脾注に比べて有意に肝転移形成を抑制した（肝重量で$p<0.025$，肝転移結節数で$p<0.005$)．さらにOK-432，IL-2併用脾注にて，IL-2単独脾注に比べて肝転移形成をより強く抑制する傾向が見られたが，有意差は認められなかった（**Fig. 4**）.

3．脾内投与の有効性の検討

担癌マウスの皮下脱転脾臓内に各薬剤を1週間連続投与し，その脾細胞をeffectorとし，colon 26をtargetとした抗腫瘍中和試験を行った．脾細胞混合腫瘍皮下接種後21日目の腫瘍径〔mean tumor diameter (mm)〕で比較すると，生食脾注脾細胞群（normal spleen

Fig. 4 Liver metastasis, treated with drugs for 7 consecutive days after Day 7

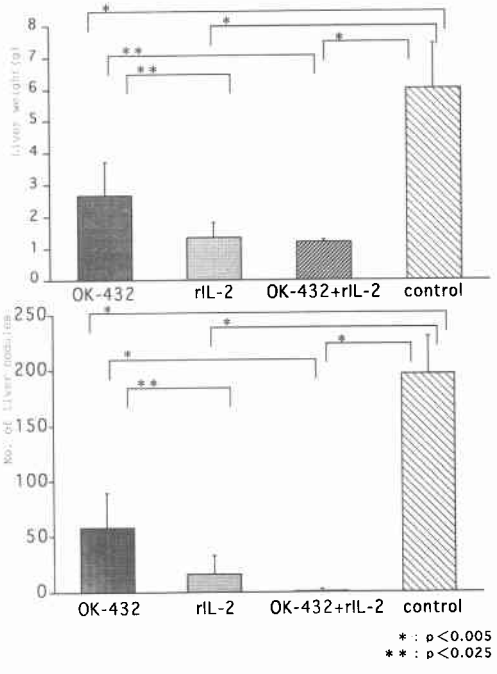
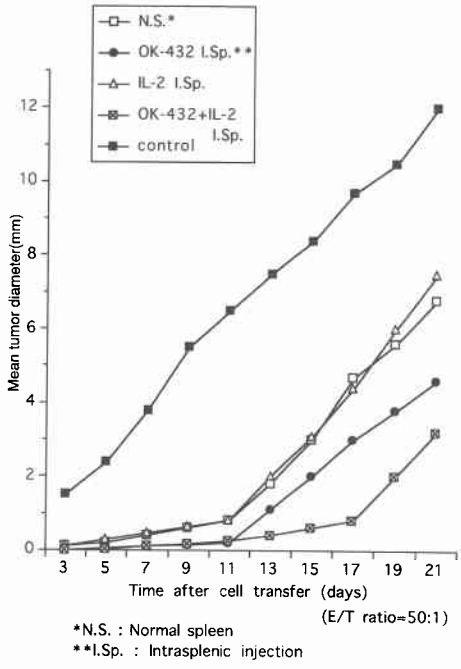


Fig. 5　Winn assay



cells：以下，NS と略記）においてもコントロール（腫瘍のみ接種した群）に比べて高い抗腫瘍中和活性を示し，OK-432，IL-2併用脾注脾細胞群において各薬剤単独脾注脾細胞群，NS 群に比べて高い抗腫瘍中和活性を示した（**Fig. 5**）．

考　察

大腸癌の肝転移は予後を左右する大きな因子であるが，肝転移に対する治療は現在，主として画像診断等で明らかな転移巣に対して行われるものであり，その有用性も手術を初めとして種々の試みで認められている．しかし，多くの大腸癌肝転移は異時性転移であり，周術期に既に肉眼的に認められない微小転移が形成されている可能性が大である．したがって，この時期に有効な治療法を行うことによって微小転移再発の予防につながり，予後の改善が期待できる．この時期の治療法の基礎的検討を行ううえでも，今回確立した微小肝転移モデルは有効と考えられる．

Corbett ら[6]により樹立された N-methyl-N-nitrosourethane 誘発マウス大腸癌株である colon 26 は組織学的には低分化腺癌で，皮下継代移植が容易であり，生物学的性状が比較的明らかである[7]．腫瘍細胞の門脈内投与により，短期間に全例で肝転移が認められ，その転移は肝全葉に散在し，肉眼的肝転移成立までの期間は注入細胞数に依存すると考えられた．

大腸癌肝転移に対する治療は手術療法が中心であるが，切除不能症例に対しては免疫複合体による動注療法，DSM（degradable starch microspheres）併用間歇的肝動脈化学塞栓療法，間歇的大量5FU 肝動注療法などが行われており，その効果が報告されている[8)~10)]．また，OK-432をはじめとする BRM や IL-2を代表とするサイトカインも最近，癌およびその転移巣に対する治療に用いられ，その有効性が報告されている[11)12)]．OK-432は，マクロファージの活性化，細胞障害性 T 細胞（cytotoxic T cell：以下，CTL と略記）・NK 細胞・ヘルパーT 細胞活性の増強，各種サイトカインの産生とそれらの作用増強効果をもたらす BRM であり，IL-2レセプター陽性細胞の発現も誘導する[13)]が，門脈内接種された腫瘍細胞の生着を直接阻害しないことが確認されている[14)]．IL-2は，T 細胞を活性化するサイトカインであるが，それ自身は抗腫瘍作用を有しないとされている[15)]．よって，両薬剤を併用投与する意図は，薬剤の直接的な抗腫瘍効果を期待するというよりは，宿主介在性反応による LAK（lymphokine activated killer），CTL 様細胞を誘導し，その抗腫瘍作用に期待するところにある．両薬剤の併用投与は，動物実験でその有効性が報告されており[16)~18)]，臨床応用もされ効果をあげている[19)20)]．しかし投与経路としては腹腔内，静脈内，肝動脈内投与であり，脾臓を介する投与方法の検討はみられない．臨床的に脾動脈内カテーテルによる薬剤の投与は手技的には可能であり，連続投与を考えた場合，皮下埋め込み式リザーバーの応用も有効と考えられるが今後の課題である．

脾臓はリンパ・骨髄系組織として大循環系の生体防御器官であり，全身性の免疫応答において，末梢リンパ性組織の中で免疫情報の提示，中継，増幅など半中枢的機能をもっている[21)]．この体内最大のリンパ器官に BRM を投与することにより，抗腫瘍活性の高いエフェクター細胞が有効に誘導されるのではないかと考えられる．実際，BRM を含む薬剤の脾臓内投与の有効性が動物実験で報告されており[4)22)23)]，その作用機序も解明されつつある．しかし脾臓内投与を，無侵襲下連続門脈内投与の代用経路としてのみ利用している報告もみられる．脾臓内へ投与することにより，解剖学的には脾静脈から肝臓へ薬剤は直接到達する．門脈内投与された OK-432の体内動態を検討した実験では，1時間，12時間後には投与全量の約98%，77%が肝臓に取り込まれていることが確認されており[14)]，脾内投与

でも同程度の肝臓への薬剤の集積が推測される．しかし今回の検討で，薬剤を投与した脾細胞の抗腫瘍中和活性の上昇が示されたことからも，この実験モデルにおける両薬剤併用による肝転移抑制効果の発現には，脾臓内投与が何らかの意義を有していると考えられる．

病理学的には，OK-432脾内投与にて脾のT細胞帯と呼ばれる中心動脈周囲リンパ球鞘でのリンパ球の著明な増生が認められ，また脾洞へのマクロファージを含む組織球の著しい増生も認められ，Sinus histiocytosis（以下，SHと略記）の所見を呈することが報告[24]されている．SHの程度が細網内皮系を介する抗腫瘍効果の指標となるという報告[25]もあり，BRMの脾内投与による肝転移抑制効果の発現機序を考える上で興味深く，真の機序の解明には今後さらに検討すべき問題であると考えられた．

しかし今回の実験結果が示すごとく，実験的肝転移モデルにおいてOK-432，IL-2の併用脾臓内投与は，微小肝転移巣が形成されてから投与しても肝転移形成を抑制しえた事実より，大腸癌の肝転移再発，特にSubclinical liver metastasis（潜在的肝転移巣）に対して有効な治療法である可能性が示唆された．

文　献

1) 森谷宜皓，小山靖夫，北條慶一：大腸癌肝転移の検討—転移巣の切除とその遠隔成績を中心に—．日本大腸肛門病会誌　36：1—6，1983
2) August DA, Ottow RT, Sugarbaker PH: Clinical perspective of human colorectal cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 3：303—324，1984
3) 加藤知行，平井　孝：大腸癌手術の補助療法．臨外 45：1749—1758，1990
4) 藤井昌彦，今　　充，山中祐治ほか：ラット遊離有茎脾臓内BRM連続投与における門脈血中抗腫瘍効果誘導の試み．消と免疫　17：168—172，1986
5) Tominaga T, Yoshida Y, Kitamura M et al: Liver metastasis of colon 26 cells implanted into the superior mesenteric vein in mice. Jpn J Cancer Res (Gann) 78：846—850，1987
6) Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ et al: Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. Cancer Res 35：2434—2439, 1975
7) Tsuruo T, Yamori T, Naganuma K et al: Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. Cancer Res 43：5437—5442，1983
8) 山口俊晴，高橋俊雄，北村和也ほか：免疫複合体による動注療法．Karkinos 6：323—330，1993
9) 高安幸生：DSM併用動注療法．Karkinos 6：339—346，1993
10) 荒井保明，木戸長一郎，有吉　寛：大腸癌肝転移に対する間歇的大量5FU肝動注療法．Karkinos 6：347—352，1993
11) 岡　正朗，硲　彰一，下田宏二ほか：各種BRMを併用した新しい肝癌動注療法（複合免疫療法）—切除不能肝細胞癌の治療—．外科治療　66：252—258，1992
12) 奥野清隆，安富正幸：IL-2・MF肝動注療法．Karkinos 6：331—337，1993
13) 内田温士，星野　孝：OK-432の臨床薬理的作用機作と治療成績．橋本嘉幸，野本亀久雄，磯部孝雄，木村郁郎 監修．溶連菌製剤OK-432—その作用と臨床応用—．Excerpta Medica, 東京，1986, p83—91
14) 笠木徳三，田沢賢次，山下　巌ほか：Biological Response Modifier（BRM）による消化器悪性腫瘍の肝転移再発に対する予防的治療：OK-432門脈内投与における実験肝転移抑制の基礎的研究．日癌治療会誌　25：112—120，1990
15) 大西博昭：Interleukin 2 (IL-2) 脾動脈内注入によるLymphokine activated killer（LAK）活性誘導の基礎的検討．日癌治療会誌　23：2785—2793，1988
16) 藤岡知昭，白石正彦，丹治　進ほか：OK-432と遺伝子組かえインターロイキン2のマウス実験腫瘍に対する併用効果．日癌治療会誌　24：948—956，1989
17) 佐藤幸雄，山口佳之，川見弘之ほか：がん性腹膜炎モデルにおけるBRM腹腔内投与の併用効果．Biother 5：1239—1244，1991
18) 緒方秀章，田中正俊，島田雅弘ほか：肝類洞内Large Granular Lymphocyteに対するOK-432，IL-2の効果の検討．Biother 3：42—45，1989
19) 山口佳之，佐藤幸雄，高島郁博ほか：がん性腹水に対するOK-432/IL-2併用局所療法．Biother 7：29—33，1993
20) 佐治重豊：転移性肝癌に対するADM，OK-432，IL-2併用反復投与の効果．Ther Res 13：4454—4463，1992
21) 浅井淳平：脾臓と免疫．肝・胆・膵　6：869—875，1987
22) 奥野清隆，大西博昭，高木宏己ほか：Interleukin 2（IL-2）脾内投与による担癌生体内でのlymphokine activated killer（LAK）細胞活性の増強とその腫瘍転移抑制効果．日外会誌　88：802—807，1987
23) 閑啓太郎，山岸久一，大森浩二ほか：マウス自然肝

転移モデルにおける BRM 脾臓内投与療法に関する検討．Biother 7：339—340，1993
24) 藤井昌彦，今　充，山中祐治ほか：転移性肝癌抑制に関する実験的検討—脾内 BRM 投与による門脈血中内因性抗腫瘍効果誘導の試み．診療と新薬 24：1409—1414，1987
25) Wartman WB: Sinus cell hyperplasia of lymph nodes regional to adenocarcinoma of the breast and colon. Br J Cancer 13：389—397，1959

The Effect of Combination Therapy with OK-432 and rIL-2 by Intrasplenic Administration to Inhibit Micrometastasis in the Liver on Metastatic Model of Colorectal Carcinoma

Yuichi Arimoto, Yong-Suk Chung, Nobuya Yamada, Kiyoshi Maeda, Atsunori Nitta, Koji Hirayama, Tetsuji Sawada, Bunzo Nakata, Yukio Nishiguchi, Masahiro Okuno* and Michio Sowa
The First Department of Surgery, Osaka City University Medical School, Surgery of Osaka City General Medical Center*

An experimental liver micrometastatic model of colorectal carcinoma was developed and the effects of combination therapy with OK-432 and γIL-2 by splenic injection to inhibit liver metastasis, a critical element of prognosis of colorectal carcinoma, were determined. Micrometastasis in the liver was observed on day7 after transportal inoculaiton of colon 26 cells, which are murine colon carcinoma cells. Although the mice were treated with drugs after the development of micrometastasis in the liver, both treatment with each drug singly and in combination resulted in significant inhibition of the development of liver metastasis compared with the control ($p<0.005$). Combined treatment significantly inhibited the development of liver metastasis compared with OK-432 alone ($p<0.025$). The anti-tumor activity of splenic cells injected with drugs became stronger. These results suggest that intrasplenic drug injection was effective in inhibiting liver metastasis.

Reprint requests: Yuichi Arimoto First Department of Surgery, Osaka City University Medical School
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545 JAPAN