日消外会誌　33（9）：1635～1642，2000年

原　著

OK-432とIL-2を用いた徐放製剤のマウス大腸癌肝転移モデルにおける抗腫瘍効果について

岐阜大学医学部第2外科
安田　邦彦　　杉山　保幸　　加藤　元久
李　　宗一　　佐治　重豊

BALB/cマウスにcolon 26を門脈内移植して作製した大腸癌肝転移モデルを用い，OK-432・IL-2封入エマルジョン（BILE）を脾内投与した場合の肝転移抑制効果を検討した．結果，①OK-432の肝での滞留はOK-432，IL-2水溶液投与群（BRM群）では投与後10日目まで，BILE群では14日後でも転移結節周囲で確認された．②腫瘍移植後14日目の肝転移結節数はBILE群がBRM群および生理食塩水群に比べ有意の低値を示した．③肝リンパ球のcolon 26に対する特異的傷害活性は，BILE群，BRM群とも腫瘍移植後10日目まで経時的に漸増後14日目に低下したが，前者の低下程度は緩徐であった．④YAC-1細胞に対するNK活性はBILE群が直線的に漸増し，BRM群は変動が軽度であった．以上の結果，OK-432とIL-2を徐放するエマルジョンの経門脈的投与は肝内の免疫担当細胞を賦活して肝転移を抑制する可能性が示唆され，大腸癌肝転移の有用な治療戦略となる可能性が推察された．

I．はじめに

大腸癌の予後を左右する最大の因子は肝転移で，治療法として外科的切除が第1義的に選択されている．しかし，切除不能症例に対しては，肝動脈内あるいは門脈内注入による局所（免疫）化学療法，肝動脈塞栓術，エタノール局注療法，マイクロ波熱凝固療法，凍結手術などが試みられているが，いまだ満足すべき結果は得られていない．

そこで，教室では局所免疫化学療法の立場から薬剤の放出制御能増強と標的指向化目的で，drug delivery system（以下，DDS）に注目し種々検討を重ねてきた．すなわち，切除不能癌に対する局所免疫療法として，biological response modifiers（以下，BRM）を，組織停滞性の優れた徐放製剤，water in oil（以下，W/O）型エマルジョンで封入する剤型の開発である[1]．その中で，今回非特異的免疫賦活剤，OK-432と抗腫瘍調節性サイトカイン，interleukin 2（以下，IL-2）を封入したエマルジョンを作製し，マウス大腸癌肝転移モデルを用い抗腫瘍効果と作用細胞の性格を種々検索したので，その概要を報告する．

＜2000年5月23日受理＞別刷請求先：安田　邦彦
〒500-8705　岐阜市司町40　岐阜大学医学部第2外科

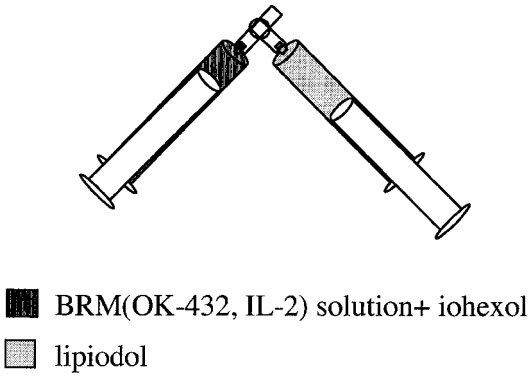
II．研究対象と方法

1．対象

実験動物は6～8週齢，体重18～20gの雌性BALB/cマウス（Japan SLC, Inc. Shizuokaより購入）を，腫瘍細胞はBALB/cマウス由来の可移植性大腸癌株，colon 26[2]を用いた．

2．W/O型エマルジョンの作製法

Fig. 1　Preparation of drug delivery system by use of emulsion with OK-432, IL-2, iohexol and lipiodol
At first OK-432 and IL-2 were dissolved in iohexol, then emulsified that water phase to lipiodol in a ratio of one to three by pumping with two syringes.



W/O 型エマルジョンは既報[3]のごとく，水溶性基剤として inhexol（オムニパーク300, 第一製薬），油性基剤として lipiodol（リピオドール・ウルトラフルイド，ラボワトラール・ゲルベ）を用い，OK-432（ピシバニール，中外製薬）と recombinant IL-2（TGP-3, 武田薬品工業）を徐放する製剤である．すなわち，2.0KE の OK-432と20,000U の IL-2を0.02ml の蒸留水に溶解後，0.08ml の iohexol を添加・混和し，次いで，この混合液0.1ml に対して lipiodol を0.3ml（水溶液と脂溶液比が1：3）の割合で混合し三方活栓を用いて pumping 法により撹拌乳化して作製した（**Fig. 1**）．

3．抗腫瘍効果の検索

1）肝転移モデルの作製法

エーテル吸入麻酔下に BALB/c マウスを背臥位に固定し，左肋弓下小切開法で脾臓を有茎皮下脱転した．腫瘍細胞は手術侵襲の影響が無視可能な脱転後 7 日目に再開腹し，RPMI-1640に浮遊させた1×10^5個/0.1ml の colon 26細胞を27G ツベルクリン注射針にて上腸間膜静脈より注入移植した[4]．

2）薬剤投与法

腫瘍移植直後にあらかじめ，皮下脱転した脾臓内へ 0.04ml の OK-432・IL-2徐放型エマルジョン（BRM-iohexol-lipiodol-emulsion：以下，BILE）を27G ツベルクリン注射針にて経皮的に投与した．次いで，薬剤投与後7，10および14日目にマウスを犠牲死させ，肝臓および脾臓を摘出後，以下の検討を行った（**Fig. 2**）．なお，対照群として BRM を含有しない W/O 型エマルジョン（以下，ILE），OK-432と IL-2を用量溶解した水溶液（以下，BRM），および生理食塩水（以下，BS）の 3 群を設定した．

3）薬剤停滞性の検索法

徐放製剤の肝内停滞性は OK-432に対する抗 SU 抗体を用い，薬剤投与後 7，10，14日目の免疫組織染色所見から推察した．すなわち，ホルマリン固定パラフィン包埋標本から4μm の連続薄層切片を作製し，抗 SU 抗体（中外製薬より寄与）で褐色に染色された顆粒を OK-432菌体成分と判断した（**Fig. 3-a**）．

4）肝湿重量と転移結節数の測定法

摘出肝湿重量を通常方法で測定後，肝表面の結節を 4 倍ルーペで観察し，転移結節数を算定した．

4．BILE で誘導される作用細胞の解析

BILE 脾内投与で誘導された作用細胞の性格は，肝および脾リンパ球の細胞傷害活性から推察した．

1）肝および脾リンパ球の採取法

肝リンパ球は Wiltrout ら[5]の方法に準じて，肝を無菌的に摘出・細切後，2.5ml シリンジ内筒で圧挫してステンレスメッシュ（#100）で濾過後，Collagenase type IV 23mg（Sigma 社）と DNAaseI 3mg（ブリストル・マイヤーズ）を含む PBS 溶液20ml 内で37℃，30分間撹拌処理した．次いで，3 回洗浄後ナイロンメッ

Fig. 2　Out line of experimental schedule for antitumor effects of BILE
1）Intrasplenic administration was performed with BILE, BRM, ILE or BS.
2）For the evaluation, number of metastatic nodules and wet weight of the liver, cytotoxic activity of splenocytes and lymphocytes obtained from the liver against colon 26 and YAC-1 target cells and accumulation of OK-432 by immunostain of anti-SU antibody were examined.
BILE：emulsion with OK-432 and IL-2　BRM：solution of OK-432 and IL-2
ILE：BILE without OK-432 and IL-2　BS：buffer solution

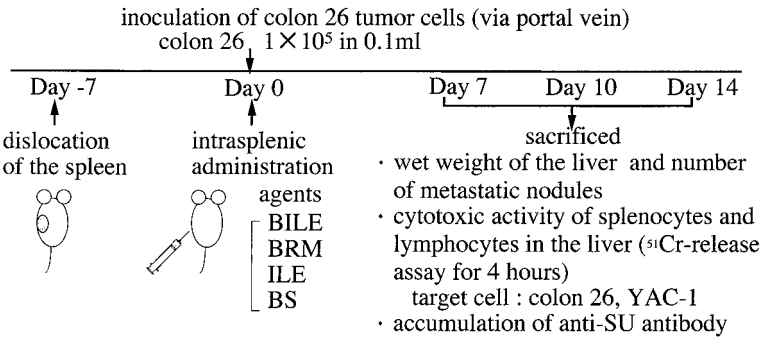


Fig. 3　Positive expression of anti-SU antibody for the evaluation of OK-432

a）anti-SU antibody stain
（↑：anti-SU stainedlipids）

b）on day of tumor inoculation
（↑：positive anti-SU）

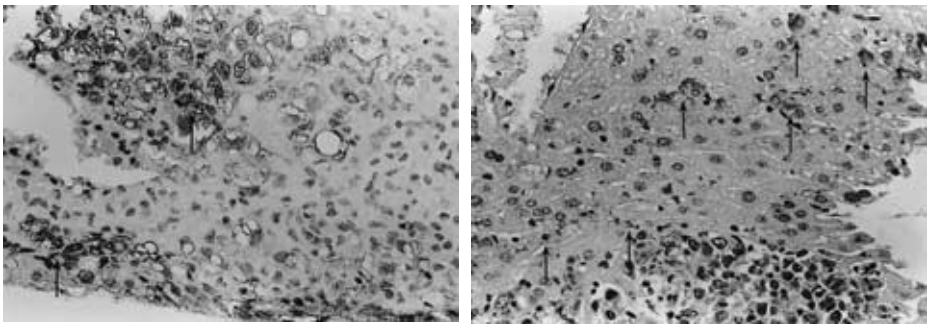
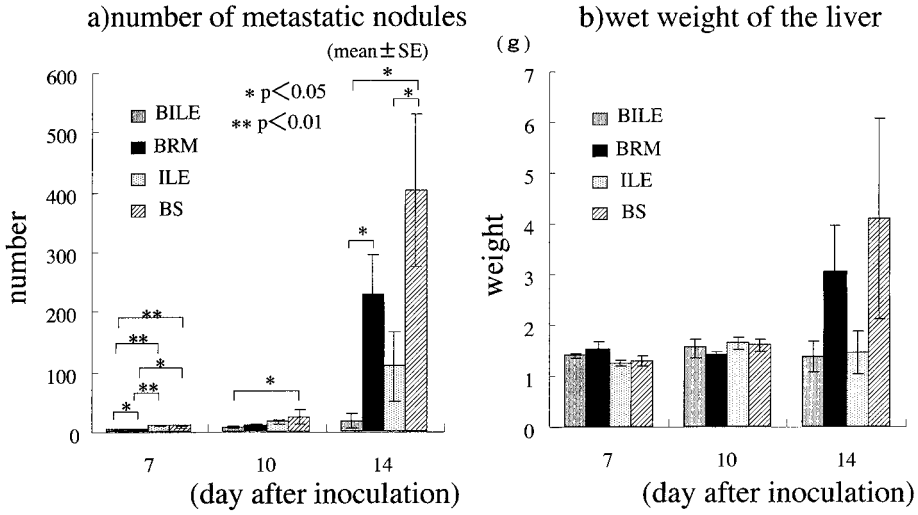


Fig. 4　Serial changes of metastatic nodules（a）and wet weight（b）of the liver following intrasplenic administration of BILE



シュ（No. S300；NBC 工業）で濾過し，得られた single cell suspension を，Ficoll-Paque（Pharmacia，Sweden）で比重遠心分離（1800r. p.m. 25分間）してリンパ球層を回収し，10%胎児牛血清（FCS）添加 RPMI-1640 で 3 回洗浄後，以下の実験に供した．

脾リンパ球は脾臓を無菌的に細切後，＃100メッシュで濾過して細胞浮遊液を作製し，ナイロンメッシュで再濾過後，同様に比重遠心分離してリンパ球層を採取し，10%FCS 添加 RPMI-1640で洗浄後，以下の実験に供した．

2）細胞傷害活性の測定

肝および脾リンパ球の細胞傷害活性は colon 26（特異的傷害活性）とマウス由来 YAC-1（NK 活性）細胞を標的とした^{51}Cr release assay 法で測定した[6]．すなわち，標的細胞を 1×10^6個/ml に調整し $Na_2{}^{51}CrO_4$（NEZ-030S，NEN）で標識後（生細胞数は95%以上），5×10^5/100μl の作用細胞と1/50で混和し，その100μl を96穴平底型マルチプレート（住友ベークライト，MS 3096F）に分注後，600rpm で 2 分間遠心し37℃，5% CO_2環境下で 4 時間培養した．培養終了後800rpm で 8 分間遠心し上清100μl 中の放射活性を測定した．なお，自然解離は培養液のみを，最大解離は0.1%Nonided-P 40（半井化学薬品）を用い下記計算式から傷害活性を算出し， triplicate で施行した平均値を検討に用いた．

Table 1　Serial changes of cytotoxic activity of lymphocytes obtained from the liver after intrasplenic administration of BILE

a）against colon 26

	day 7	day 10	day 14
BILE	5.7±0.7	12.8±5.5[a)]	4.9±0.5[d)]
BRM	7.2±4.2	13.0±6.7	0.3±0.2[e)]
ILE	4.0±2.0	6.0±1.7[b)]	2.7±0.4[f)]
BS	3.0±1.1	1.7±0.6[c)]	0.7±0.3[g)]

d)-e), d)-f), d)-g), e)-f), f)-g) : p<0.01　a)-b), a)-c) : p<0.05

b）against YAC-1

	day 7	day 10	day 14
BILE	6.1±4.3	9.3±0.9[a)]	16.3±6.0[c)]
BRM	6.3±1.4	3.9±2.7	4.1±1.6
ILE	4.8±3.3	8.2±3.0	8.5±1.6
BS	3.2±2.7	3.4±0.7[b)]	3.8±1.8[d)]

a)-b) : p<0.01　c)-d : p<0.05

Table 2　Serial changes of cytotoxic activity of splenocytes after intrasplenic administration of BILE

a）against colon 26

	day 7	day 10	day 14
BILE	8.1±0.5[a)]	4.1±1.8	5.2±3.0
BRM	6.2±1.2	5.1±1.2	2.2±1.4
ILE	5.6±2.4	3.2±0.3	2.2±1.4
BS	3.4±1.2[b)]	1.7±1.3	0.3±0.2

a)-b) : p<0.01

b）against YAC-1

	day 7	day 10	day 14
BILE	10.6±4.8	15.4±4.5[a)]	15.3±6.7
BRM	7.8±2.2	5.2±3.0	12.3±3.9
ILE	9.0±3.2	10.9±4.6	12.2±6.3
BS	7.4±2.2	4.7±2.8[b)]	9.0±6.4

a)-b) : p<0.05

% Cytotoxicity＝(experimental release-spontaneous release)/(maximum release-spontaneous release)×100

なお，得られた測定値は mean±standard error (S. E.)で表示し，統計学的検定は student 's t-test を用い，危険率5%未満を有意差ありと判定した．

Ⅲ．研究結果

1．徐放製剤の組織停滞性

抗 SU 抗体による検索で，BILE 群と BRM 群はともに投与 7，10日目まで肝転移巣内と転移単周辺で転移結節を取り囲むように褐色の染色が観察された．14日目では BILE 群で染色所見がみられたが，BRM 群では観察されなかった（**Fig. 3-b**）．

2. 徐放製剤の抗腫瘍効果

肝転移結節数は腫瘍移植後 7 日目では BILE 群が対照群に比べ何れも低値であり，10日目でも同様の傾向がみられた．14日目では BILE 群は18±12で，BRM 群(228±68.5)と BS 群(404±128)に比べ有意(p=0.036 と p=0.012）の低値であった（**Fig. 4-a**）．

肝湿重量は 7，10日目では各群間に差はみられなかったが，14日目では転移結節数に比例して相対的に増加した（**Fig. 4-b**）．

3．細胞傷害活性

1）肝リンパ球

colon 26に対する傷害活性は，移植後 7 日目では BILE 群が5.7±0.7%と BRM 群（7.2±4.2%）に比べ低値で，ILE 群(4.0±2.0%)および BS 群(3.0±1.1%)に比べ高値であったが，各群間で有意差はみられなかった．10日目では BILE 群(12.8±5.5%)と BRM 群(13.0±6.7%）は全期間中の最高値を示し，BILE 群は ILE 群および BS 群に比べ有意(共に p<0.05)の高値であった．14日目では BILE 群が4.9±0.5%と漸減したが，BRM 群は0.3±0.2%と著明に低下し両群間に有意差(p<0.01)がみられた．ILE 群も低下(2.7±0.4%)したが BRM 群に比べ高値で，BS 群との間に有意差（p<0.01）がみられた（**Table 1-a**）．

YAC-1に対する NK 活性は BILE 群が移植後 7，10，14日目でそれぞれ6.1±4.3%，9.3±0.9%，16.3±6.0%と漸増したが，BRM 群では 7 日目に，ILE 群では10，14日目に高値を示し，BS 群では変動はみられなかった．また，BILE 群の NK 活性は BS に比べ10，14日目では有意（p<0.01，p<0.05）の高値を示した（**Table 1-b**）．

2）脾リンパ球

colon 26に対する傷害活性は移植後 7 日目では BILE 群（8.1±0.5%）が BS 群（3.4±1.2%）に比べ有意(p<0.01)の高値を示した．10および14日目はいずれの治療群も 7 日目に比べ低値で，14日目の BILE 群(5.2±3.0%）は対照群（BRM 群；2.2±1.4%)，ILE 群：2.2±1.4%，BS 群；0.3±0.2%）に比べ高値であったが有意差はみられなかった（**Table 2-a**）．

YAC-1に対する NK 活性は移植後 7 日目で，BILE 群が10.6±4.8%と対照群に比べ高値であったが有意差

はみられなかった．10日目ではBILE群（15.4±4.5%）とILE群（10.9±4.6%）は活性増強し，BRM群（5.2±3.0%）とBS群（4.7±2.8%）は低下し，BILE群とBS群の間に有意差がみられた（$p<0.05$）．14日目ではBILE群とILE群は15.3±6.7%と12.2±6.3%で高い活性を持続し，BRM群も12.3±3.9%と増強した（**Table 2-b**）．

Ⅳ．考　察

教室では，ラット実験的肝転移モデルやヒト消化器癌肝転移症例に対し，OK-432とIL-2をこの順で間欠的に肝動注する治療法を考案し，その有用性を報告してきた[7)8)]．理論的には，OK-432によるマクロファージや好中球の集積と活性増強，サイトカイン産生に端を発する抗腫瘍免疫機構の賦活で，結果として癌局所に動員されたIL-2R陽性細胞がIL-2追加投与によりlymphokine activated killer細胞やcytotoxic T lymphocyte（以下，CTL）が効率よく誘導されたためと推察した．同様の試みは多数報告されているが[9)10)]，臨床応用に際しては効率的に誘導するための至適投与量や投与方法の改善が必要である．

そこで，教室で開発したOK-432とIL-2を徐放するエマルジョンを用い，今回マウス大腸癌肝転移モデルを用いてその有用性を検討し，上記諸結果を得たわけである．

1．W/O型エマルジョンの特徴について

教室で開発したOK-432・IL-2含有エマルジョン（BILE）は安定した剤型で，SD系ラットにMRMT-1腫瘍を皮下移植して作製した担癌モデルで，腫瘍内投与後OK-432は局所に長期間滞留して単核球浸潤を誘起し，癌の縮小または消失を惹起できる可能性を明らかにした．またラット脱転脾内にBILEを投与した場合には，lipiodolは肝内にのみ停滞する所見が観察され，先に報告した[1)]．著者らの抗SU抗体を用いた免疫染色でも，腫瘍移植後10日目まではBILE群とBRM群ともOK-432の停滞が観察されたが，14日目にはBILE群のみが転移巣周囲でOK-432の滞留がみられたが，BRM群では観察されなかった．それゆえ，BILEは標的指向性と放出制御能に優れた製剤で，徐放性剤としての基準を十分満たすものと考えている．

ところで，DDS製剤は化学療法の効果増強と副作用軽減目的で種々開発されている．悪性腫瘍に対してはモノクローナル抗体との結合[11)]，リポゾーム[12)]，mini-pellet[13)]，pluronic F-127ゲル[14)]，lipiodol[15)]，Degradable Starch Microsphere[16)]などに，IL-2，TNF，INFなどの抗腫瘍性サイトカインを封入する方法が報告されている．一方，OK-432に関しては中鎖脂肪（Medium chain triglyceride）[17)]に封入する方法や直腸癌に対するフィブリン糊などとの併用による治療成績[18)19)]が報告されているが，IL-2とOK-432をW/O型で封入した報告はない．

2．BILEの抗腫瘍効果と作用機序について

抗SU抗体を用いた免疫染色で，腫瘍移植後10日目までBILE群とBRM群でOK-432の停滞が観察され，この間に肝転移結節数の減少が観察されたが，ILE群でも同様の抗腫瘍効果がみられた．作用機序として肝リンパ球のcolon 26に対するCTL様活性の増強が観察されたが，BILEは経脾的投与のため先に脾細胞が活性化され内因性キラー細胞が誘導された可能性が推察される．しかし，今回の検討では脾細胞のキラー活性は特異的・非特異的で差がみられず，肝転移巣の着床，増殖，発育に肝リンパ球が大きな役割を果たしたと推察している．なお，先のラットでの検討[1)]でも，MRMT-1を経門脈的に注入移植して作製した肝転移モデルでは，BILE投与により有意の腫瘍増殖抑制効果を示したが，対側背部皮下移植腫瘍に対しては何ら影響を及ぼさなかったことから，作用細胞の主体は肝リンパ球の活性増強に由来すると考えている．

ところで，腫瘍の増殖は着床期（肝転移モデルでは腫瘍移植後3日目まで[20)]）があり，血管新生非依存性増殖期を経て，腫瘍が1～2mm^{3}以上になると血管新生依存性増殖期に移っていく[21)]とされている．この観点から，BRMを経門脈的投与した場合はBILE群でもBRM群でも，血管新生非依存性増殖期までの段階で抗腫瘍効果を発揮したものと推察される．すなわち，経門脈的に注入移植された腫瘍抗原を肝リンパ球が認識してTh1系リンパ球[22)]を賦活してCTLが誘導されるが，脾内投与されたBRMがこの機構を賦活したものと考えられる．一方，BRM群は水溶液のため薬剤滞留能に乏しく，14日目の細胞傷害活性が低値で，血管新生依存性の対数増殖期で抑制効果を発揮できなかったと考えられる．また，BILE群では14日目でも癌微小環境にデリバリーされているBRMによって，CTL様活性が維持され抗腫瘍効果を継続できたと推察している．

今回の検索でcolon 26に対する傷害活性は移植後10日目から14日目に低下し，逆にNK活性が増強した．すなわち，脾内投与後，経門脈的に徐放されたBRMは肝の抗腫瘍免疫機構を持続的に賦活したが，初期に

は特異的な傷害機構が，後期には非特異的傷害機構が中心となる可能性を示唆する結果と推察される．この機序解明には肝リンパ球の経時的なサブセットの検索が必要であるが，著者らは特異的細胞傷害機構によって腫瘍細胞がアポトーシスをきたし，肝内で貪食・処理されて抗原提示細胞として作用した可能性を推察している．すなわち，BRM の脾内投与により継続的に供給される OK-432や IL-2，あるいは他の因子（CD80やCD86などが関与する副活性化シグナルの欠落やCTLA-4の発現など）[23)24)]によって CTL 誘導のカスケードが継続されず，NK-T 系のキラー細胞[25)26)]が誘導された可能性である．

3．ILE の抗腫瘍効果について

ILE は BRM を含有しないエマルジョンであるが，腫瘍移植後14日目の転移結節数は BRM 群に比べ低値で，肝リンパ球の colon 26や YAC-1に対する傷害活性も BILE 群に次いで高値を示した．しかし，7 日目では転移結節数は BRM 群に比べ ILE 群が有意の高値を示した．この理由として，ILE は腫瘍の着床制御時期より血管新生依存性増殖期以降で作用した可能性が推察される．すなわち，脾臓から経門脈的に流入した lipiodol による腫瘍血管塞栓効果，あるいは lipiodol・iohexol 中のヨード製剤が colon 26の増殖を抑制し[27)]，血管新生依存性増殖期への移行を遷延させた可能性などである．

4．BILE の投与経路について

本研究では，BILE は腫瘍細胞の門脈内注入移植と同時に脱転脾内へ注入する，経門脈的経路を採用した．一般に消化器悪性腫瘍の場合，肝転移は門脈系を介する血行性[28)29)]で，微小肝転移巣の段階では主に細門脈近傍に存在して門脈系からの血行支配[30)]を受けて増殖する．この考えから，著者らは BILE を肝転移早期段階を想定した治療法として経門脈的に投与し，肝内の免疫担当細胞を賦活させ腫瘍細胞の肝への着床抑制に作用した可能性を示唆したわけである．しかし，転移巣の増大とともに門脈系血管は圧排され消失し，ヒト肝転移の場合に径が1mm を越えると肝動脈支配になると考えられている[31)]．また，高橋[20)]は家兎肝転移モデルを用いて抗癌剤含有リピオドール・エマルジョンの抗腫瘍効果を経肝動脈的投与と経門脈的投与で比較し，着床期では両群間に差がみられなかったが微小肝転移期に相当する移植後10日目では，肝動脈内注入の方が門脈内注入よりも有効であったと報告し，臨床応用に際しては予防的投与も含めて経肝動脈的投与が有用と述べている．それゆえ，BRM 含有エマルジョンを用いて良好な肝転移抑制効果を得るためには，着床期の攻防をいくぐって生着，増殖した腫瘍に対する別個の治療戦略，すなわち補充追加投与や肝動脈経路による注入などが必要と思われる．また，著者らのエマルジョンでは，OK-432と IL-2が同時に徐放されるが，教室の理論的根拠に基づけば，OK-432先行投与に続いて IL-2の放出が理想的である[32)]．この目的のため，現在新たに water/oil/water 型のエマルジョン[33)]を試作し，薬剤徐放の時間差を企図した製剤による抗腫瘍効果の増強を目指して種々検討中である．

文　献

1）上西　宏，安田邦彦，佐治重豊ほか：OK-432と Interleukin 2を用いた内因性 LAK 誘導法に関する実験的研究(II)．峠阜大医紀　**44**：452―461, 1996

2）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

3）安田邦彦，佐治重豊，宮　喜一ほか：OK-432・IL-2徐放型エマルジョンの肝転移抑制機序に関する検討．Biotherapy **12**：83―86, 1998

4）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

5）Wiltrout RH, Mathieson BJ, Talmadge JE et al：Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. J Exp Med **160**：1431―1449, 1984

6）Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH：Methods in immunology. W.A. Benjamin Inc, London, 1997, p 394―400

7）宮　喜一，佐治重豊，古田智彦ほか：転移性肝癌に対する動注免疫化学療法の治療成績．癌と化療 **18**：1992―1995, 1991

8）佐治重豊，古田智彦，東　修次ほか：転移性肝癌に対する動注ポートを用いた内因性 LAK 誘導療法の臨床効果に関する研究．がん治療のあゆみ **11**：63―70, 1992

9）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．Biotherapy **3**：42―45, 1989

10）下田勝広，斎藤貴生，小林迪夫ほか：OK-432投与によるマウス脾臓への LAK 前駆細胞の誘導．Biotherapy **1**：46―49, 1989

11）Oya M, Marumo K, Murai M et al：Pharmacokinetics and antitumor effects of an interleukin-2

immunocomplexing agent in murine renal cell carcinoma. Int J Urol **3**：141—144, 1996
12）中村勝人，奥野清隆，廣畑　健ほか：Galactose含有 Liposome IL-2を用いた肝類洞リンパ球の選択的増強効果．癌と化療　**21**：2105—2107, 1994
13）藤原俊義，阪上賢一，松岡順治ほか：Interleukin 2徐放システムの局所抗癌療法への応用—マウス大腸癌肝転移モデルによる転移抑制効果の検討—．Drug Delivery Syst **5**：249—254, 1990
14）森川清志，岡田　太，細川真澄男ほか：徐放性基剤 pluronic F-127ゲルによるヒト DNA リコンビナント interleukin 2の抗腫瘍効果の増強．Oncologia **18**：142—146, 1986
15）田中邦哉，山岡博之，若杉純一ほか：fibrin gel および lipiodol を担体とした Tumor Necrosis Factor-α の抗腫瘍効果の実験的検討．日癌治療会誌　**30**：548—555, 1995
16）Taguchi T：Chemo-occlusion for the treatment of liver cancer. A new technique using degradable starch microspheres. Clin Pharmacokinet **26**：275—291, 1994
17）藤巻雅夫，笠木徳三，田沢賢次ほか：BRM（OK-432 medium chain trigryceride-emulsion）の経口投与と肝転移抑制．Drug Delivery Syst **4**：276—280, 1989
18）門田卓司，森元秀起，室谷昌弘ほか：OK-432と fibrinogen の混合投与による大腸癌局所免疫療法の検討．日外会誌　**92**：31—36, 1991
19）若杉英二郎，門田卓士，関本貢嗣ほか：大腸癌転移巣に対する OK-432/fibrinogen/thrombin 局注療法の検討．Biotherapy **11**：591—593, 1997
20）高橋直樹：大腸癌肝転移予防のための抗癌剤投与経路に関する実験的研究．日消外会誌　**27**：2543—2550, 1994
21）Folkman J, Klagsbrun M：Angiogenic Factors. Science **235**：442—447, 1987
22）Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al：Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted Proteins. J Immunol **136**：2348—2357, 1986
23）大木伸司：T細胞の活性化における CD28/CTLA-4/CD80/CD86．臨免疫　**31**：531—536, 1999
24）大畑順子，東みゆき：CD28/CTLA-4を介する T 細胞の活性化と腫瘍免疫への応用．血・免疫・腫瘍　**2**：378—385, 1997
25）中村英二郎，杉江知治，湊　長博：NKT 細胞の抗腫瘍作用．臨免疫　**30**：312—321, 1998
26）Kawano T, Cui J, Koezuka Y et al：Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated $V_{\alpha}14$ NKT cells. Proc Natl Acad Sci USA **95**：5690—5693, 1998
27）加藤伸幸，舟橋啓臣，安藤邦彦ほか：DMBA 誘発ラット乳癌に対するヨードの腫瘍増殖抑制効果．日癌治療会誌　**29**：582—588, 1994
28）Desai AG, Park CH, Schilling JF：“Streaming” in portal vein Its effect on the spread of metastases to the liver. Clin Nucl Med **10**：556—559, 1985
29）Fisher ER, Turnbull RB：The cytologic demonstration and significance of tumor cells in the mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma. Surg Gynecol Obstet **100**：102—108, 1955
30）磯野敏夫，宮崎　勝，中島　透ほか：転移性肝癌肝切除例における肝内微小転移巣の存在およびその意義に関する検討．日外会誌　**91**：1778—1783, 1990
31）Lin G, Lunderquist A, Hagerstrand I et al：Postmortem examination of the blood supply and vascular pattern of small liver metastases in man. Surgery **96**：517—526, 1984
32）金田成宗：転移性肝癌に対する内因性 LAK 誘導療法の有効性に関する実験的臨床的研究(I)．岐阜大医紀　**42**：304—315, 1994
33）日野知証，竹内洋文，丹羽敏幸ほか：肝細胞癌の塞栓療法のための塩酸エピルビシン封入 w/o/w 型リピオドールエマルジョンの設計．Drug Delivery Syst **10**：115—119, 1995

Antitumor Effect of Water in Oil Type Emulsion Encapsulating OK-432 and Interleukin-2 on Liver Metastasis of Colorectal Cancer in Mice

Kunihiko Yasuda, Yasuyuki Sugiyama, Motohisa Katou,
Souichi Ri and Shigetoyo Saji
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

The effects of intrasplenic administration of an encapsulated emulsion of OK-432 and IL-2（BILE）were investigated against metastatic liver tumor of colon 26 cells, following inoculation intraportally to BALB/c mice. Results：①OK-432 was observed around the metastatic nodules of the liver on day 10 following both BILE and BRM administration. However it wan no longer detected on day 14 in the BRM group. ②The number of metastatic nodules in the liver was significantly lower in the BILE group as compared with that in the BRM and BS groups. ③The cytotoxic activity of hepatic lymphocytes against the colon 26 cells（specific）gradually increased until day 10 of tumor inoculation in both the BILE and BS groups. However it showed a gradual decrease until day 14, more significantly in the BRM group. ④THE NK cell activity evaluated with YAC-1 showed the tendency toward a linear pattern of increase in the BILE group, however, it remained almost unchanges in the BRM group. From the above results, it is suggested that transportal infusion of an emulsion of OK-432 and IL-2 was effective in activating the immunological functions of the liver and induced supression of liver metastases. It could also be recommended as one of the treatment options for liver metastases in patients with colorectal cancer.

Key words：OK-432, Interleukin（IL）-2, drug delivery system（DDS）, colon 26, metastatic liver tumor

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：1635—1642, 2000〕

Reprint requests：Kunihiko Yasuda　Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasamachi, Gifu, 500-8705 JAPAN