

癌漿膜浸潤および腹膜播種の防止に関する実験的研究

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

飯 島 崇 史

(平成7年8月31日受稿)

Key words : 漿膜浸潤, 腹膜播種性転移, OK-432, 細胞性間質反応, 線維性間質反応

緒 言

胃癌に代表される腹腔内消化器癌の進展様式には直接浸潤, リンパ行性転移, 血行性転移, 腹膜播種性転移の4つがあり, このうち前二者はある程度まで手術的に切除が可能であるが, 後二者は一般に手術の対象となることが少ない。なかでも腹膜播種は結節 (散在) 型のみがわずかに手術の対象となるだけで, 大部分のものは外科医の手の届かない存在である¹⁾。しかも皮肉なことに, 腹膜播種は非切除や非治療手術の理由の中で最も多く²⁾, また手術後の再発形式の中で最も高頻度でみられるのが現状である³⁾。

一方, 腹膜播種はその治療の困難さ故に従来より数多くの研究者たちによってその成立機転や治療方法などが研究されてきた⁴⁾。しかし治療を目的とした治療という観点からすれば, 満足のいく結果が得られていないといっても過言ではあるまい。このことは, ひとたび成立してしまった腹膜播種を治療に導くのは不可能に近いという通説を暗に肯定する結果となっている。そこで予防という考え方が重要な意味をもってくるわけである。現在, 胃癌において腹膜播種を防ぐ最も確実な方法は早期発見による早期の手術であることは疑いようもなく, 予後的漿膜因子ps (-)の時期に根治手術が施行された例では腹膜再発は非常に少ない⁵⁾。反面, ほんのわずかな漿膜浸潤があっても, 手術操作などの影響で術中癌細胞散布がこりうる危険性は非常に高い⁶⁾。しかるにその危険性を少なくするための漿膜浸潤予防について論じた研究はほとんどみられない。

今回, 著者はマウスの腹壁皮下に腹水肝癌細胞を移植することにより, 壁側腹膜を介した腹膜播種実験モデルを作成した。この実験系にbiological response modifier (BRM) である細菌製剤 OK-432を投与し, 漿膜浸潤, ひいては腹膜播種を予防しうる結果を得たので報告する。

材 料 と 方 法

1. 動物および腫瘍細胞

実験には8~9週齢のC3H/Heマウス雄を使用した。腫瘍は教室においてC3H/Heマウスで継代維持されている同系のMH-134腹水肝癌細胞を用いた。

2. 薬 剤

1) OK-432; 中外製薬より供与されたものを生理食塩水で各濃度に溶解し用いた。

2) mitomycin-C (MMC); 生理食塩水で溶解し, 0.01mg/0.1ml/匹として腹腔内投与した。

3) carrageenan (CAR)^{7,8)}; type IV lambda-carrageenan, (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) を沸騰した生理食塩水で溶解し, 1 mg/0.1mlとして腹腔内投与した。

4) 抗リンパ球血清 (ALS)⁹⁾の精製と投与方法; 成熟マウスをエーテル麻酔下にて開胸し, 心穿刺による脱血後, 腋窩, 頸部, 鼠径および腸間膜リンパ節を採取した。これを細切後80メッシュの白金網で濾過し, このリンパ節細胞浮遊液 (2×10^8 個) を体重3kgの家兎に静注した。3週間後, 新たにつくったほぼ同量の細胞浮遊液を静注して追加免疫とし, 7日後に採血して血清を得, 56°C 30分間非動化を行ったあと用いた。対照として正常家兎から採血して血清を得,

56℃ 30分間非動化を行い正常家兎血清(NS)として用いた。

5) thioglycollate (TG); thioglycollate medium (BBL Microbiology Systems, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, Maryland, U. S. A.) の0.1ml/匹を腹腔内投与した。

6) PSK; 三共製薬より供与された5%溶液を0.2ml (0.1mg)/匹腹腔内投与した。

3. 方 法

1) 担癌マウスの作成と壁深達度の判定; マウス腹壁皮下にMH-134腫瘍細胞 2×10^6 個を移植して担癌マウスとし、経時的に腫瘍径と生存率を検討した。使用マウスは各群9~15匹とした。腫瘍の大きさは、水平方向の広がりと垂直方向の広がりに分けて検討し、水平方向の広がりには変数としての腫瘍長径と短径をかけて腫瘍面積として表示した。垂直方向の広がりには壁深達度で表示した。なお、最長生存観察期間は51日間とした。壁深達度の観察は、1群20匹で腫瘍移植後第2週目より第5週目まで毎週各群5匹ずつ屠殺し、臍側腹膜面を傷つけないように腫瘍とともに摘出し、10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋、H-E染色を行い鏡検した。また標本の一部は摘出後ただちにOCT compoundに包埋、液体窒素で凍結し、クライオスタットで厚さ6 μm の切片を作成し、酵素抗体法にて染色、鏡検した。

2) 各種薬剤の投与方法; 対照群として腫瘍移植後3, 5, 7日目に生理食塩水を0.1ml腹腔内投与した。OK432投与群は、まず至適投与量を決定するために0.02KE/0.1ml, 0.1KE/0.1ml, 1KE/0.1ml, 5KE/0.1mlをそれぞれ担癌3日目より隔日3回腹腔内投与して各群の生存日数をみた。つぎにOK-432の至適投与経路および至適投与時期を検討するために、担癌3日目より1KE/0.1mlを隔日3回腫瘍周囲の皮下(sc), 腫瘍内(it), 静脈内(iv), 腹腔内(ip)の各群に分けて投与し、ip投与群はその投与時期を腫瘍移植前6日, 移植後3日, 移植後7日から隔日3回投与の各群に分けて検討した。MMC投与群は、腫瘍移植後10日目から0.01mg/匹を隔日3回腹腔内投与して壁深達度を検討した。TG投与群は、腫瘍移植後3日目より0.1ml/匹を隔日3回

腹腔内投与した。PSK投与群も移植後3日目より0.1mg/匹を隔日3回腹腔内投与した。つぎにマクロファージ機能を阻害する目的で、移植後3日目からのOK-432ip投与群に対し、移植後10日目にCAR1mgを腹腔内投与した。さらにリンパ球機能を阻害する目的で、移植後3日目よりのOK-432ip投与群に対し、移植後14日目にALSの0.1mlを腹腔内投与し、NSの0.1mlを腹腔内投与した群と比較した。

3) 腹腔内浸出細胞の算出; 腫瘍移植後3日目よりOK-432を1KE隔日3回腹腔内投与後、経目的に1群5匹のマウスを頸椎脱臼で屠殺後開腹し、血液の混入をさけて腹腔内にリン酸緩衝液食塩水(PBS)を約2ml注入した。攪拌の後、可及的全量を回収し、液量を測定。その一部を血球計算盤にて細胞数を算定し、液量とかけて総数細胞を求めた。つぎに液を遠沈して塗沫標本を作成、May-Giemsa染色にて有核細胞の百分率を求め、総細胞数とかけて腹腔内浸出細胞分画ごとの細胞数を算出した。

4) 抗アシアロGM₁による酵素抗体法¹⁰; 凍結切片を30分室温乾燥させた後、アセトン固定(4℃, 8分間)を行い、PBSで洗浄した。湿室内にて一次抗体として抗アシアロGM₁血清(和光純薬)の50倍希釈で4℃1時間反応させ、二次抗体として40倍希釈の抗マウスIgGウサギ血清(Cappel社)で4℃30分、三次血清として40倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG・ヤギ血清(DAKO社)で4℃30分反応させた後、100倍希釈のPAP(DAKO社)で4℃30分間反応させた。これをDAB・H₂O₂の中で発色させた後、メチルグリーンにて一夜核染色を行って鏡検した。

5) OK-432の1KE腹腔内投与で対処しうる腹腔内遊離癌細胞数; 正常マウスの右腹部から0.1mlあたり100万, 20万, 4万, 8000, 1600個に調整した癌細胞浮遊液を腹腔内に注入し、同時に左腹部からはOK-432の1KE/0.1mlを腹腔内投与し、各群10匹の生存日数と、51日目での生存マウス数を算定した。なお統計学的有意差はStudent t-testで計算し、P-valueで表した。

結 果

1. 対照群の成績

対照群では腫瘍移植後2週で漿膜(壁側腹膜)浸潤陽性となり、その後腹水の貯留を認め、6週までに全例腫瘍死した。平均生存日数は24.2±8.3日であった。

2. OK-432の至適投与量

OK-432の0.02 KE, 0.1 KE, 1 KE, 5 KE 投与群の生存日数はおのおの28.6±11.7日, 34.7±13.5日, 43.5±10.8日, 37.7±16.8日であり、0.02 KE 投与群以外はすべて対照群と比べて有意に生存日数が延長した。なかでも1 KEが最もよい成績を示した(P<0.001)ので、以後これを至適投与量として採用した(表1)。

3. OK-432の投与経路および投与時期別効果

1) 生存期間に対する効果

OK-432投与群では、sc 投与群以外はすべて有意に生存日数が延長しており、なかでも移植後3日目からのip 投与群で最も良い成績を得た(P<0.001)(表2)。

表1 OK-432の至適投与量

OK-432 投与量	使用マウス数	平均生存日数
対照群	15	24.2±8.3
0.02 KE × 3	10	28.6±11.7 N.S.
0.1 KE × 3	10	34.7±13.15 * 1
1 K × 3	10	43.5±10.8 * 3
5 K × 3	10	37.7±16.8 * 2

* 1 : p<0.05 * 2 : P<0.02 * 3 : P<0.001

表2 OK-432の投与方法と生存期間

OK-432の投与方法		使用マウス数	平均生存日数
投与経路	投与日		
対照群(生食)	3, 5, 7	15	24.2±8.3
s.c.	3, 5, 7	9	33.0±11.8 N.S.
i.t.	3, 5, 7	9	35.7±12.8 * 2
i.v.	3, 5, 7	15	32.9±11.8 * 1
i.p.	-6, -4, -2	15	36.4±11.7 * 3
i.p.	3, 5, 7	10	43.5±10.8 * 4
i.p.	7, 9, 11	15	39.2±7.3 * 4

* 1 : p<0.05 * 2 : P<0.02 * 3 : P<0.01

* 4 : p<0.001

2) 腫瘍面積に対する効果

腫瘍移植後2週目での各群の腫瘍面積(長径と短径の積で表示した)を調べたが、腫瘍面積は生存期間との相関がみられなかった。OK-432投与により一様に腫瘍面積の縮小効果が得られたが、なかでも直接薬剤との接触の可能性があるit 投与群と、sc 投与群で効果が顕著であった(表3)。

3) 壁深達度に対する効果

腫瘍移植後4週目での各群の壁深達度を調べた。腫瘍死例は腹膜播種(P)に含めた。腫瘍移植後のOK-432 ip 投与群では腹膜播種をおこしにくいのが、一般に効果があるとされているit 投与群では早期深達例が多かった。これは生理食塩水腫瘍内投与群の腫瘍面積が475±84mm²と異常に大きいことから考えて、薬剤注入時の圧力で癌細胞が筋層内に押し込まれ、その結果早期

表3 OK-432の投与方法と腫瘍面積(長径×短径) — 腫瘍移植後2週目 —

OK-432の投与方法		使用マウス数	腫瘍面積(mm ²)
投与経路	投与日		
対照群(生食)	3, 5, 7	15	340±75
s.c.	3, 5, 7	9	187±44 * 3
i.v.	3, 5, 7	15	272±57 * 1
i.t.	3, 5, 7	9	112±96 * 3
i.p.	-6, -4, -2	15	287±47 * 1
i.p.	3, 5, 7	10	263±61 * 2
i.p.	7, 9, 11	15	213±86 * 3

* 1 : p<0.05 * 2 : P<0.02 * 3 : P<0.001

表4 OK-432の投与方法と壁深達度 — 腫瘍移植後4週目 —

OK-432の投与方法		壁 深 達 度		
投与経路	投与日			
対照群(生食)	3, 5, 7	P		
i.v.	3, 5, 7	SS	P	
i.t.	3, 5, 7	P		
s.c.	3, 5, 7	SC	SS	P
i.p.	-6, -4, -2	SS	P	
i.p.	3, 5, 7	SC	SS	P
i.p.	7, 9, 11	SS		

P : 腹膜播種 SS : 漿膜下浸潤 SC : 皮下浸潤

深達例が多くなったものと思われる(表4)。

さらに詳しく経時的要素も加味して検索するために、腫瘍移植後2週目から5週目までの毎週各群5匹の壁深達度をすべてまとめた(図1)。これによると腫瘍移植後OK-432 ip投与群では漿膜下(ss)までにとどまっているものが80~90%であるのに対し、コントロール群では15%しかなかった。一方、筋層にとどまっているものは各群とも1~3例しかなかった。

対照群では腫瘍移植後2週目ですでに癌細胞が生体の抵抗をあまり受けることなく漿膜下に浸潤してきていた(図2)。これに対しOK-432 ip投与群では腹腔内に表面白色の腫瘤突出を認め、肉眼的には漿膜浸潤陰性的のようにみえるが、大部分のものは組織診、塗抹細胞診ともに漿膜浸潤陰性であった。組織学的には腫瘍移植後4週目で筋層はすでに癌細胞で置き換えられてい

OK-432の投与方法		壁 深 達 度					
投与経路	投与日	sc	(pm)	ss	se	p	死亡
対照群(生食)	3, 5, 7		o	oo	ooo	oooo	oooooo
i. v.	3, 5, 7	ooo	ooo	oooo	o	oooo	oo
i. t.	3, 5, 7	o		oo	oo	oooo	oooo
s. c.	3, 5, 7	o	o	oooo	o	oooo	oooooo
i. p.	-6, -4, -2	oooo	oo	ooo	oo	oooo	
i. p.	3, 5, 7	oooo	o	oooo	oo	oo	
i. p.	7, 9, 11	o	oo	oooo		oo	

sc:皮下浸潤 pm:筋層内浸潤 ss:漿膜下浸潤
se:漿膜浸潤 p:腹膜播種

図1 OK-432の投与方法と壁深達度
—腫瘍移植後2週目から5週目までの総計—

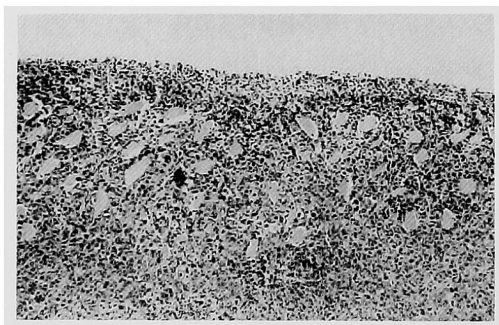


図2 対照群の腹壁組織像
—腫瘍移植後2週目, H-E染色, x33—
生体の抵抗をあまり受けることなく癌細胞は漿膜下に浸潤してきている。

るが、対照群と異なり癌先進部に壊死層とその腹腔側に著明なコラーゲン線維の増生を認め、その表面に一層の中皮細胞層が保たれている(図3)。またこのような変化は腹腔内のどこでもみられるわけではなく、癌浸潤が漿膜下に及んだところのみにみられるようである(図4)。

4) MMC投与群との比較

MMC投与群ではOK-432投与群同様に腫瘍面積を小さくおさえることができたが(250±105.6 mm²)、腹膜播種は予防しえず、癌先進部の壊死層やコラーゲン線維層はほとんどみられなかった(図5)。

5) OK-432腹腔内投与後の腹腔内細胞分画
担癌マウスに腫瘍移植後3日目より隔日3回



図3 腫瘍移植後3日目からのOK-432腹腔内投与群の腹壁組織像
—腫瘍移植後4週目, H-E染色, x33—
癌先進部に著明な壊死層とコラーゲン線維の増生を認める。

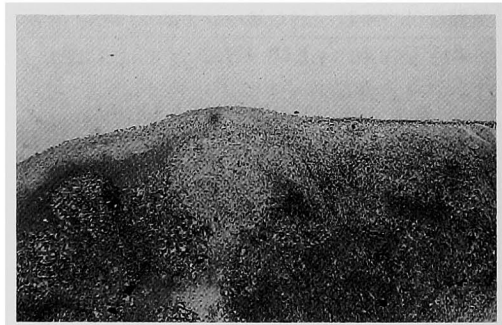


図4 腫瘍移植後3日目からのOK-432腹腔内投与群の腹壁組織像(腫瘍周辺部)
—腫瘍移植後4週目, H-E染色, x13.2—
癌の浸潤が筋層までしか及んでいない右方では、左方と異なり壊死層やコラーゲン線維層の形成がみられない。

OK-432の1KEを腹腔内投与したところ、腹腔内浸出細胞は担癌7日目までの早期には好中球が、10日目から14日目までの中期にはマクロファージ、それ以降はリンパ球が最も多くみられた(図6)。

6) CARおよびALS投与による影響

CAR投与群では腹腔内マクロファージ数は一過性に減少し(図7)、平均生存日数も有意(P<0.05)に短縮した(表5)。また正常マウスに同量のCARを腹腔内投与した毒性試験では、死亡マウスを認めなかった。ALS投与群でも腹腔内リンパ球数と末梢血リンパ球数は一過性に減少し(図8)、NSを投与した群にくらべて平均生存日数も有意(P<0.05)に短縮した(表5)。CAR併用投与群、ALS併用投与群ともOK-432単独投与群にくらべて腹水貯留例が増加し、腹

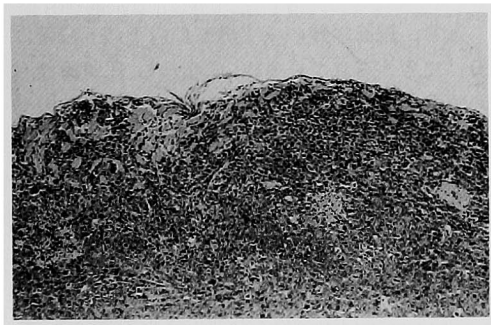


図5 MMC投与群の腹壁組織像
—腫瘍移植後3週目、H-E染色、x33—
壊死層やコラーゲン線維層の形成はみられない。

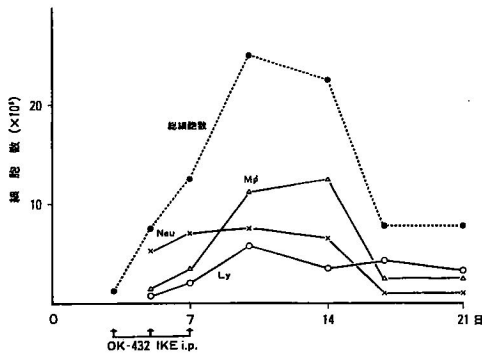


図6 OK-432腹腔内投与後の腹腔内浸出細胞分画変動
Neu: 好中球 Mφ: マクロファージ
Ly: リンパ球

壁標本の検索でも壊死層やコラーゲン線維層の形成不良が確認された(図9, 10)。

7) TG, PSK投与群との比較

TG投与群での平均生存期間は29.6±9.1日で対照群とは有意差を認めなかった(表6)。一方、PSK投与群での平均生存期間は35.5±10.9日で対照群との間に有意差(P<0.01)を認めたが、移植後3日目のOK-432 ip投与群との間には有意差を認めなかった。TG投与群では早期からの腹膜播種移行例が多かった。PSK投与群では深達度がやや抑制されているようであるが、漿膜下層での著明な壊死層やコラーゲン線維層の形成はほとんどみられなかった(図11)。

8) 抗アジアロGM₁による酵素抗体法

腹壁凍結標本を酵素抗体法で染色してみると、

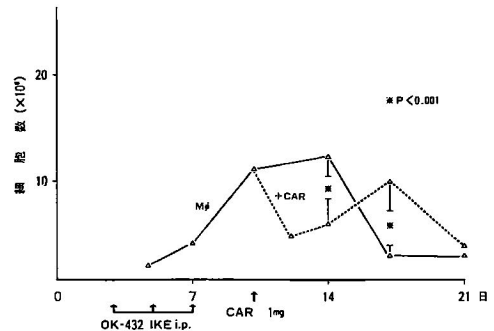


図7 CAR投与による腹腔内マクロファージ数の変化

表5 CARとALSの平均生存日数におよぼす影響

投与日	使用マウス数	平均生存日数
OK-432 ↓ ↓ ↓ 3 5 7	10	43.5±10.8
CAR ↓ ↓ ↓ ↓ 10	10	31.9±12.4 ※
NS ↓ ↓ ↓ ↓ 3 5 7 14	10	43.2±7.6
ALS ↓ ↓ ↓ ↓ 10	10	35.5±6.3 ※

※ P<0.05

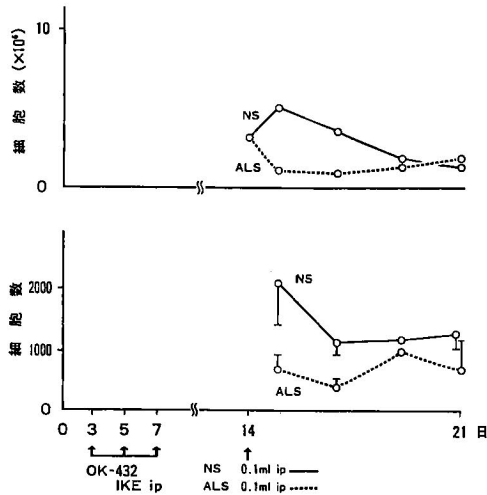


図8 ALS投与による腹腔内(上段)および末梢血(下段)リンパ球数の変化

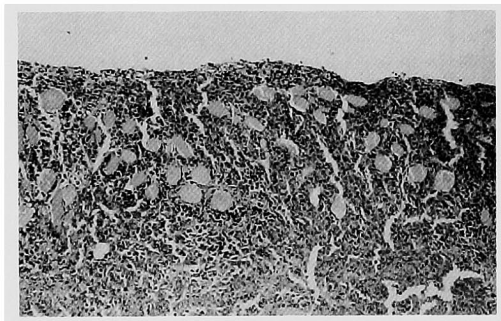


図9 OK-432投与後CAR投与群の腹壁組織像—腫瘍移植後2週目, H-E染色, x33—壊死層やコラーゲン線維層の形成はみられない。

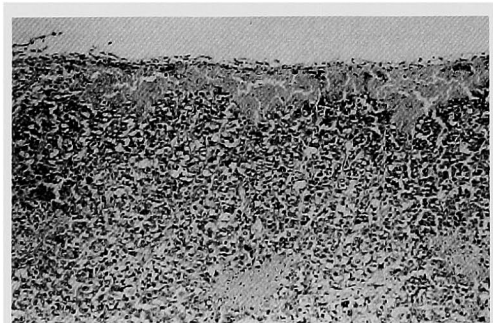


図10 OK-432投与後ALS投与群の腹壁組織像—腫瘍移植後3週目, H-E染色, x33—壊死層はみられるものの, コラーゲン線維層の形成はみられない。

OK-432 ip 投与群では癌先進部の腫瘍側に活性化マクロファージが確認されたが、その数はそれほど多くはなかった(図12)。また対照群では活性化マクロファージは確認されなかった。

9) OK-432の1KE腹腔内投与で対処しうる遊離癌細胞数

手術時における閉腹前腹腔内洗浄とOK-432腹腔内投与を想定し、1群を10匹として腹腔内移植細胞数を変えてOK-432の1KEを同時に腹腔内投与したところ、4万個/匹以下の癌細胞に対してはOK-432の1KEでかなり対処できることが判明した。平均生存日数の延長もさることながら、51日を経てもまだ腹水の貯留もなく生存しているマウス数をもても明らかである(表7)。

考 察

通常、腹膜播種の成立機転は以下の5段階に分けて考えられている¹¹⁾。すなわち、①漿膜面への進展・露出、②腹腔内への剝離、③腹腔内での移動・生存、④着床、⑤増殖の5つである。これらは数多くの研究によりその全貌が明らか

表6 TGおよびPSK投与後の生存期間

薬 剤	使用マウス数	平均生存日数	
対照群(生食) × 3	15	24.2±8.3	
T.G. 0.1ml × 3	10	29.6±9.1	N.S.
PSK 0.1mg × 3	10	35.5±10.9	* 1
OK-432 1KE × 3	10	43.5±10.8	* 2

* 1 : p<0.01 * 2 : P<0.0001

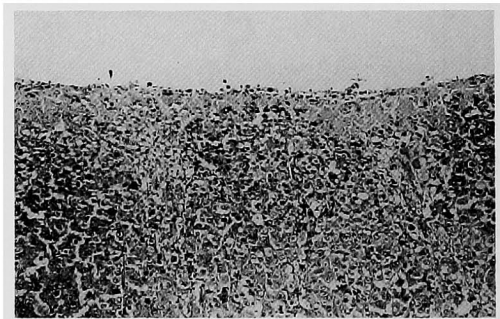


図11 PSK投与群の腹壁組織像—腫瘍移植後3週目, H-E染色, x33—軽度壊死層はみられるが, コラーゲン線維層の形成はみられない。

となりつつあり、また腹膜播種の治療に関しても数多くの報告がある⁴⁾。しかし、ひとたび成立してしまっただ腹膜播種に対しては、いずれの報告をみても生存期間の延長や自他覚所見の一時的な改善をもって効果ありとしているものが大部分であり、治癒となりえた例は皆無に等しい。そこで緒言でも述べたように、予防という概念の導入が必要となってくるわけである。腹膜播種の予防には、その成立過程から考えると、大きく分けて3つの方法がある。第一は腫瘍が占居する臓器から腫瘍細胞が腹腔内に散布されないようにすること。第二には遊離した腫瘍細胞を、死滅させるか、その後の発育を停止させうる薬剤を使用すること。第三は腹膜の防衛機能を高め、腫瘍細胞の腹膜への着床を防止する方策を講ずることの3つである。このうち第三の方法は報告も urokinase を用いたものくらいしかなく¹²⁾、その他の方法も含めて現実の予防法としてはあまり可能性がない。第一の方法は根治手

術時の操作に関係した問題であるが、これに対して no touch method や新術式の考案¹³⁾などにより、術中腹腔内癌細胞散布を防ぐ努力がなされてきた。しかし手術時ある程度の漿膜浸潤を認める例はすでに癌細胞の散布がおこっており⁶⁾、かかる例に対しては上記手術手技に加えて、閉腹時腹腔内洗浄も含めて第二の予防法である薬剤の使用が必要となってくる。すでに化学療法剤では Mitomycin-C (MMC)¹⁴⁾、活性炭吸着 MMC^{15,16)}、CCDP^{17,18)}、免疫療法剤としては OK-432¹⁹⁾、Interferon β ^{20,21)}、Interleukin 2 (IL-2)²²⁾などが完成された腹膜播種あるいは癌性腹膜炎に対して使用されており、可能性があると考えられる。また特殊な方法として温熱腹膜灌流療法^{23,24)}などの報告もある。しかしこれらの報告はいずれも完成された腹膜播種に対するものであるため、効果のほどもいま一步満足すべきものではない。手術を念頭に置いた予防という見地からすると第一の方法が最も確実であろう。そこで従来より外科医の悩みの種であった術中腹腔内癌細胞散布を、一步進んで術前の処置によってより少なくできないものかと考えて研究を行った。

まずマウスの腹壁皮下に腹水肝癌細胞を移植する腹膜播種実験モデルを作成した。この系では腫瘍細胞は皮下層から筋層を貫いて漿膜下に達し、壁側腹膜を介して腹腔内に露出し、癌性腹水の貯留を来して腫瘍死に至るといった経過をたどる。

このマウス腹壁を消化管壁とみた腹膜播種実験モデルに OK-432 を投与したところ、投与経路や投与時期をうまく設定することにより、腫瘍面積は対照群と差がないのに腹水が貯留せ

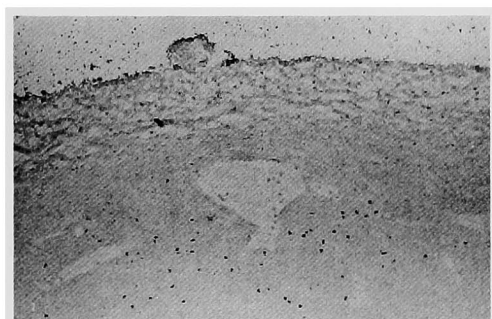


図12 OK-432腹腔内投与後の抗アジアロ MG₁ 酵素抗体法による腹壁組織像
—腫瘍移植後4週目、 $\times 33$ —
癌先進部腫瘍側に活性化マクロファージが散見される。

表7 OK-432の1KE腹腔内投与で対処しうる遊離癌細胞数

遊離癌細胞数	平均生存日数(治癒マウス数)				
	生食投与群	使用マウス数	OK-432 1KE投与群	使用マウス数	使用マウス数
1000 $\times 10^3$	19.2 ± 3.3 (0)	10	24.4 ± 3.6 * ²	(0)	10
200 $\times 10^3$	24.6 ± 3.5 (0)	10	29.5 ± 6.9 N ⁵	(0)	10
40 $\times 10^3$	22.1 ± 2.0 (0)	10	41.6 ± 9.9 * ³	(5)	10
8 $\times 10^3$	31.6 ± 12.4 (2)	10	43.6 ± 9.6 * ¹	(6)	10
1.6 $\times 10^3$	38.8 ± 12.3 (5)	10	49.3 ± 3.6 * ¹	(8)	10

* 1 : P<0.05 * 2 : P<0.01 * 3 : P<0.001

ず、平均生存期間が有意に延長する群のあることを見いだした。すなわち、癌細胞が漿膜面に露出する少し前にOK-432を腹腔内投与しておく、肉眼的には腹腔内に腫瘤が突出し、その表面が白色で漿膜浸潤陽性的のようにみえても組織学的に癌先進部には壊死層とコラーゲン線維層が形成されており、物理的に癌細胞が腹腔内に露出し得ない状態であることが判明した。その際、癌の深達を防止するためには筋層は無力で、その通過時間は早いものと想像された。OK-432の投与経路別に検討してみると、かかる漿膜浸潤防止効果発現には腹腔内投与法が最良であった。その理由として、腹腔内投与法は他の投与法に比較して癌先進部に重点的に、そして先進部全体に均一な薬剤の影響をおよぼしうることから考えられる。腫瘍の大きさだけからすると、it投与群やsc投与群では著明な腫瘍縮小効果がみられたが、両者ともip投与群と異なり癌先進部への効果的作用が得られないため、それが深達度、ひいては生存率の明確な差となってあらわれているものと考えられる。投与時期別の検討では、腫瘍移植後投与が前投与に勝っていた。壊死層やコラーゲン線維層の形成というかたちでみられる反応の主座が漿膜下層にあることと、癌先進部が漿膜下層に達する時期が移植後10日から14日目であることを考えあわせると、前投与よりも後投与が有効であることは容易に理解できる。

次に直接抗腫瘍効果を有する制癌剤のMMCを同様の方法で投与してみたところ、腫瘍面積はOK-432 ip投与群にくらべ小さくおさえることができたが、最終的に腹水の貯留は防ぎ得なかった。この差は両群の癌先進部での反応の差によるものと思われる。すなわち、MMC投与群ではOK-432投与群でみられた壊死層やコラーゲン線維層によるバリアーの形成がほとんどみられないため、長期にわたる腹膜播種防止効果が得られなかったものと考えられる。

一方、OK-432は直接抗腫瘍効果に加えて宿主介在性抗腫瘍効果を有するものとして知られている。MMCとの対比から、本実験での効果発現には宿主介在性抗腫瘍作用が主体を占めているものと思われる。一般にOK-432による宿主介在

性抗腫瘍効果の作用機序としてはリンパ球やマクロファージを中心としたcell-mediated actionが重視されている²⁵⁾。またコラーゲンの産生に関しては、リンパ球により産生されるfibroblast-activating factorが線維芽細胞を刺激するという説や²⁶⁾、マクロファージが線維芽細胞を刺激する物質を産生するという説²⁷⁾などが報告されている。そこでマクロファージ機能とリンパ球機能のおのおのについての阻害実験を行い比較検討した。まずマクロファージの阻害剤としてCAR^{7,8)}を用い、その投与時期はOK-432投与後の腹腔内浸出細胞の変動を参考にした。CAR投与により平均生存日数は有意に短縮し、腹壁組織所見でも癌先進部における壊死層やコラーゲン線維層の形成不良がみられ、腹水貯留例が増加した。またリンパ球機能を阻害するためにALS⁹⁾を投与したところ、これも平均生存日数の短縮、バリアーの形成不良、腹水貯留例の増加といった変化がみられた。以上のことより、本実験系でみられたOK-432の腹膜播種防止効果にはマクロファージとリンパ球の双方が関与しているものと考えられる。

PSKもまたOK-432同様BRMとして知られている薬剤で、その特徴は担癌によって低下したマクロファージやTリンパ球の機能を正常レベルまで回復させることにあると言われている^{28,29)}。確かにPSKもOK-432同様、平均生存日数の延長をもたらしたが、壊死層やコラーゲン線維層の形成はほとんどみられなかったことから、この両者の作用機序はやや異なるものと推察される。

ところでチオグリコレートは腹腔内投与により腹腔内マクロファージを増加させる薬剤として知られている³⁰⁾。しかしチオグリコレート腹腔内投与群の平均生存期間は対照群との間に差を認めなかった。このことは単にマクロファージの数だけではなく、活性化マクロファージが本反応に重要な役割を果たしていることを示唆している。

また抗アジアロGM₁血清による酵素抗体法でOK-432 ip投与群の腹壁標本を染色してみたが、癌先進部にわずかな活性化マクロファージが認められたのであった。したがって、OK-432によ

って誘導された腹腔内マクロファージが、壁側腹膜面に露出した腫瘍細胞に反応して、誘導されたリンパ球とともに、腫瘍細胞を取り巻くコラーゲン線維層を形成したものと考えられよう。

従来より癌の予後を良好にする因子としてリンパ球浸潤を中心とした局所の細胞性間質反応や^{31,32)}、コラーゲン線維増生を中心とした繊維性間質反応³³⁾が重視されている。幸いOK-432にはこの両反応とも増強させる作用があるようで、OK-432を術前胃癌病巣内注入して局所のリンパ球浸潤を確認した報告や³⁴⁾、癌性腹水患者の腹腔内にOK-432を投与して著効を認めた症例の腹膜に著明な繊維性肥厚を確認した報告³⁵⁾などがしばしばみられる。本実験でみられた反応も後者と同一ような機序で生じた可能性があり、その反応発現にはマクロファージおよびリンパ球双方の関与が非常に大きな要因となっているものと推察される。

最後に、すでに術前より癌細胞の遊離がおこっている症例や、術中に癌細胞の散布が発生した症例に対し、OK-432の腹腔内投与はどこまで対処しうるか検討した。それによるとマウス1匹あたり4万個以下の癌細胞に対しては、OK-432の1KEでかなりの数の治癒マウスが得られることから、十分対処しうるものと考えられる。

以上より、術前OK-432腹腔内投与法は漿膜浸潤陰性例に対してはバリアーの形成により安全

な手術が期待できるし、小数の遊離癌細胞を認めるような軽度漿膜浸潤陽性例に対しても術後腹膜再発の予防効果が得られるものと推察される。

結 論

腹腔内消化器癌の腹膜播種を術前の処置によって予防するために実験を行ったので報告する。

1. マウスの腹壁に腹水肝癌細胞を移植し、壁側腹膜を介した腹膜播種実験モデルを作成した。

2. これにOK-432を種々の投与方法で投与した結果、腫瘍移植後3日目より隔日3回腹腔内投与した群で最も良い成績が得られた。

3. その際、癌先進部の腹腔側に著明な壊死層とコラーゲン線維層の形成が認められた。

4. マクロファージ機能、リンパ球機能のそれぞれを阻害した結果、壊死層やコラーゲン線維層の形成不良がおこることが確認された。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲をいただきました折田薫三教授に深甚なる謝辞を表します。また終始御助言いただきました三輪恕昭博士ならびに実験の場を御提供いただいた半田外科病院長半田祐彦博士に深謝します。

なお本論文の要旨は第13回日本消化器外科学会総会、第43回日本癌学会総会にて報告した。

文 献

- 1) 草間 悟：癌性腹膜炎の病態生理；成り立ちと経過。消化器外科 (1983) 6, 1167—1173.
- 2) 孝富士喜久生, 橋本 謙, 田中裕穂, 矢野正二郎, 武田仁良, 掛川暉夫：切除不能胃癌症例の検討。癌の臨床 (1991) 37, 517—521.
- 3) 太田恵一郎, 中島聰總, 西 満正：胃癌の腹膜播種再発と治療。臨床外科 (1991) 46, 429—437.
- 4) 飯島崇史, 三輪恕昭, 折田薫三：胃癌の腹膜播種について。日本臨床外科医学会雑誌 (1983) 44, 854—861.
- 5) 北村正次, 栗根康行, 荒井邦佳, 吉川時弘, 神前五郎：再発胃癌に対する病理組織学的検討ならびに集学的治療の効果。日本消化器外科学会雑誌 (1988) 21, 1030—1036.
- 6) 魚返英寛：胃癌症例における臨床病理学のおよび癌細胞核DNA量からみた腹膜播種の要因に関する研究。日本消化器外科学会雑誌 (1992) 25, 763—774.
- 7) Ito M, Iizuka H, Masuno T, Yasunami R, Ogura T, Yamamura Y and Azuma I: Killing of tumor cells in vitro by macrophages from mice given injections of squalene-treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra*. Cancer Res (1981) 41, 2925—2930.
- 8) Keller R: Promotion of tumor growth in vivo by antimacrophage agents. J Natl Cancer Inst (1976)

- 57, 1355—1361.
- 9) 藤井源七郎：抗リンパ細胞抗体と抗マクロファージ抗体；免疫学・アレルギー学実験法，進藤宙二監修，文光堂，東京（1971）pp139—141.
 - 10) 渡辺慶一：酵素抗体法，学際企画，東京（1981）pp46—85.
 - 11) 西 満正，大山 満，中島聰總，大橋一郎，西俣嘉人，坂元五偉：癌性腹膜炎（播種）の発生病理，外科（1973）**35**，385—390.
 - 12) 村上 敏：腫瘍細胞の腹膜播種抑制に関する実験的研究。米子医学会雑誌（1973）**24**，354—377.
 - 13) 渡辺洋三，卜部元道，劉 星漢，能美明夫，津村秀憲，榊原 宣：漿膜露出胃癌に対する幽門側胃切除術における Omento-bursectomy の試み。日本消化器外科学会雑誌（1989）**22**，981—984.
 - 14) 中島聰總，小峪康利，高木国夫，梶谷 録：胃癌の腹膜播種に対する投与経路別化学療法の比較。癌と化学療法（1978）**5**，623—630.
 - 15) 近藤慎治，沢井清司，山口俊晴，萩原明於，横田 隆，下間正隆，岩本昭彦，高橋俊雄：腹膜播種再発防止を目的とした活性炭吸着マイトマイシン C 術中腹腔内投与について。日本消化器外科学会雑誌（1989）**22**，989—992.
 - 16) 小林 理，奥川 保，岡田賢三，西連寺意勲，本橋久彦：漿膜面浸潤胃癌に対する腹膜播種性転移の予防と治療。癌の臨床（1992）**38**，1089—1094.
 - 17) 狩野 輝，川見弘之，神殿 哲，岡 直剛，井口 潔：胃癌の腹膜播種例に対する Cisplatin 術中腹腔内投与。癌と化学療法（1990）**17**，233—237.
 - 18) 生田目公夫，高 用茂，仲吉昭夫：進行・再発胃癌の癌性腹膜炎に対する CDDP 腹腔内投与。癌と化学療法（1991）**18**，1784—1789.
 - 19) 片野光男，溝口哲郎，山本裕士，久次武晴，鳥巢要道：癌性腹膜炎患者に対する OK-432 腹腔内投与による主病巣縮小効果。日本外科学会雑誌（1987）**88**，1676—1683.
 - 20) 田中紀章，寺沢明夫，松井武志，山田潤一郎，日伝晶夫，市川純一，中山文夫，松田忠和，折田勲三：癌性胸膜炎に対する遺伝子組換え型インターフェロン β の局所投与。癌と化学療法（1988）**15**，237—241.
 - 21) 高嶋成光，佐伯英行，多幾山涉，栗田 啓，曾我浩之，棚田 稔，石田数逸，大田垣純，村上正和，土井原博義，森脇昭介：漿膜露出胃癌の腹膜再発防止を目的とした遺伝子組換え型 interferon β 腹腔内投与の試み。日本消化器外科学会雑誌（1989）**22**，1005—1009.
 - 22) Rosenberg S A, Lotze M T, Muul L M, Cang A E, Avis F P, Leitman S, Linecan W M, Rovertson C N, Lee R E, Rubin J T, Seipp C A, Simpson C G and White D E : A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. N Engl J Med (1987) **316**，889—897.
 - 23) 藤本 茂，セレスト RD，国分和司，小林国力，太田正保，木内宗三郎，小池正造，金野千行，高橋 誠，奥井勝二：腹膜再発予防を目的とした漿膜露出胃癌症例に対する制癌療法の検討。日本消化器外科学会雑誌（1989）**22**，993—996.
 - 24) 浜副隆一，貝原信明：癌性腹膜炎に対する腹腔内温熱化学療法。消化器外科（1991）**14**，1481—1488.
 - 25) 木村郁郎：OK-432による免疫療法。癌の臨床（1978）**24**，428—433.
 - 26) Wahl S M, Wahl L M and McCarthy J B : Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J Immunol (1978) **121**，942—946.
 - 27) Leibovich S J and Ross R : A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. Am J Pathol (1976) **84**，501—513.
 - 28) 片野光男，山本裕士，鳥巢要道：PSK の抗腫瘍性，癌と化学療法（1987）**14**，2321—2326.
 - 29) 小口義春，森田伊津子，松永謙一，藤井孝美，吉汲親雄，河合義雄，野本亀久雄：担癌マウスにおけるリンパ球構成の変動と PSK による回復(2)。癌と化学療法（1986）**13**，2645—2652.

- 30) 徳永 徹：腫瘍とマクロファージ：新免疫学叢書11巻，畔柳武雄，大高裕一，松橋 直編，医学書院，東京（1983）pp119—135.
- 31) Cutler S J, Black MM and Goldenberg IS：Prognostic factors in cancer of the female breast. *Cancer* (1963) **16**, 1589—1597.
- 32) 北川堯之：胃癌予後因子としての胃癌巣周囲のリンパ球浸潤. *岡山医学会雑誌* (1982) **94**, 599—612.
- 33) 野中達也：胃癌の予後を左右する因子について・特に間質反応に関する研究. *日本外科学会雑誌* (1976) **77**, 1707—1713.
- 34) 合地 明，三輪恕昭，松三 彰，市川純一，岡林孝弘，森谷行利，堀見忠司，折田薫三，橋本 修，寺田紀彦，大西信行：胃癌巣内免疫賦活剤注入時の局所組織所見ならびに全身的非特異的免疫反応：消化器と免疫，土屋雅春監修，医歯薬出版，東京（1984）pp77—81.
- 35) 弘野正司，中上和彦，松本 啓，新本 稔，服部孝雄：胃がんにおける開腹時腹腔細胞診. *消化器外科* (1983) **6**, 217—222.

Prevention of peritoneal dissemination and serosal invasion of digestive tract cancer in an experimental murine model

Takashi IJIMA

**First Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director: Prof. K. Orita)**

We report a novel prophylactic strategy for peritoneal dissemination and serosal invasion of digestive tract cancer in a murine model, in which the murine abdominal wall was compared to the wall of the human digestive tract. Subcutaneous injection of MH-134 cells to the abdominal wall of C3H mice induced tumors on the parietal peritoneum, and eventually caused peritoneal dissemination with time. In this model, the intraperitoneal administration of OK-432, a type of biological response modifier, after tumor implantation significantly inhibited the development of peritoneal dissemination of tumor cells. This effect was more profound in mice with tumors that extended to the peritoneal surface (designated as S1 stage). Histological examination revealed both the remarkable necrosis of tumoral tissue and the formation of a collagen fiber at the edge of the tumor. This antitumoral effect of OK-432 is thought to be mediated by both macrophages and lymphocytes migrated into the peritoneal cavity, because the administration of Carrageenan and anti-lymphocyte serum completely blocked the antitumoral effect of OK-432.