

# 主腫瘍切除に伴う転移巣増殖防止のための 補助療法に関する実験的研究 —免疫賦活剤 OK-432 の術前腫瘍内投与 および摘脾の併用効果—

岡山大学第一外科学教室（主任：折田薫三教授）

鳩 崎 明 一

（昭和57年6月24日受稿）

**Key words**：補助療法，摘脾，OK-432，  
術前腫瘍内投与，  
delayed type hypersensitivity

## 緒 言

遠隔転移をおこした悪性腫瘍の原発巣を切除すると転移巣の増殖が活発化し、予後に対してかえって悪い結果を与えることをしばしば経験する。しかし臨床的には主症状をとり腫瘍量を減少させる目的で原発巣摘除を行なう reduction surgery が必要とされることしばしばある。そのような例の予後を少しでも良くするためには原発巣摘除による転移巣増殖の機序を解明し、目的にかなった方法にて担癌生体の延命をはかることが要求される。そこで今回著者は動物実験モデルを設定し、その機序の解明の糸口として免疫学的背景の検討を行なった。さらに術後の転移巣増殖の活発化をおさえて良好な予後を得るための有効な補助療法についての検索を行なった。

Simpson-Herrenら<sup>1-3)</sup>は BDF<sub>1</sub> マウスにルイス肺癌（3LL）細胞を皮下移植し、14日後に原発巣の外科的切除を行ない、肺転移巣の増殖との関係を <sup>3</sup>H-TdRによるlabeling index (LI)を指標として見ている。それによると肺転移巣のLIは担癌マウスでは経目的に低下をみるが、原発巣切除マウスでは術前の高値をとりつづけたという。そしてその原因を原発巣切除が肺転移巣の増殖を活発化するためとした。橋本<sup>4)</sup>も同

様の実験を行ない、同じく原発巣切除により肺転移巣の細胞分裂が促進されることを観察している。また彼は Wexler<sup>4)</sup>の方法を応用して肺転移結節の数を算定し、原発巣切除により肺転移結節数が増加することを観察している。そこで著者もこの腫瘍実験系を用い、肺転移巣の観察方法として橋本と同じく Wexler の方法によって肺転移結節の数と大きさを測定して肺転移及びその増殖の指標とした。またその細胞性免疫能に与える影響をみるため夏梅ら<sup>5)</sup>の方法にしたがって塩化ピクリルによる皮膚反応を観察し、delayed type hypersensitivity (DTH) の指標とした。

手術に対する補助療法としては放射線療法、化学療法、内分泌療法などがあげられるが、近年特に注目を集めているものに免疫療法がある。免疫療法は特異的免疫療法と非特異的免疫療法とに分けられるが、現在主として後者が行なわれ、臨床的にも広く応用されている。非特異的免疫療法は最初 BCG (Bacillus Calmett-Guérin) に網内系賦活作用のあること<sup>6)</sup>が知られて以来始まったもので、その後同じような細菌製剤として BCG-CWS (cell wall skeleton), Nocardia rubra CWS, Corynebacterium parvum, OK-432 などが登場した。また菌類由来の多糖体として PSK, レンチナン, SPG など、化学物質

として levamisole, bestatin, DNCB, PPDなどが免疫賦活剤として応用されるようになった。今回は現在臨床的に最も多用されている免疫賦活剤の一つであり、しかも腫瘍内に投与して直接効果を有する OK-432 を選び、その単独腫瘍内投与の効果と至適量の検討を行なうとともに、術前に原発腫瘍内に投与して手術に対する補助療法としての併用効果を検討した。

また一方、広い意味での免疫療法と言える摘脾の併用効果についても検討を加えた。脾臓は体液性抗体産生においても細胞性免疫においても重要な役割を持つ免疫臓器である。実験腫瘍系において摘脾が抗腫瘍効果を持つことは以前より知られている。しかし、摘脾もその時期や移植する腫瘍の量によっては腫瘍促進的に作用することも知られている。即ち、摘脾には相反する2つの効果があり、腫瘍の進行時期や量によりどちらか一方が優位になると考えられるが、その機序についてはまだ充分解明されていない。そこで今回は3LL細胞移植後時期をかえて摘脾を行なうことによって摘脾単独の効果を検討するとともに、そこで得られた至適時期の摘脾を原発巣切除に併用した場合の効果を検討した。

最後にこの2種の異なった性格を有する免疫療法が手術に対する補助療法として互いに与える影響を見るため、両者を手術に併用した場合の効果についても検討を加えた。

### 実験材料および方法

#### A) 実験動物

静岡実験動物農業協同組合より購入した8ないし9週齢、体重約20gの雌 BDF<sub>1</sub> マウスを使用した。

#### B) 実験腫瘍

当教室において C57BLマウスの皮下に継代維持されているルイス肺癌 (3LL) 細胞を用いた、BDF<sub>1</sub> マウスへの移植は継代操作後10日目の直径約15mmとなった時点のものを使用した。無菌的に採取した腫瘍塊を眼科用剪刀にて mincing し、これを Hanks 液にて数回希釈、遠沈をくりかえして洗浄したのちトリプシン処理を行ない、さらに数回メッシュにて濾過し、Eagle 液中にて single cell suspension とした。トリパ

ンプルー染色にて生細胞にして  $5 \times 10^5$  cells/0.05ml となるように調整し、トップ社製の 1 ml シリンジと 27G 3/4 注射針を用いて 0.05ml を BDF<sub>1</sub> マウス右大腿部内側皮下に注射した。

#### C) 実験方法

##### 1) 原発巣切除の設定

移植された 3LL細胞は血行性に肺転移をおこすが、 $5 \times 10^5$ 個の細胞を大腿部皮下に移植した場合予備実験にて第14日目に 100%の肺転移が見られた<sup>7)</sup>。そこで、原発巣の非治癒的切除を腫瘍移植後第14日に行ない、エーテル麻酔下に無菌的に右大腿部を股関節を含めて切断した。

##### 2) 肺転移巣の増殖の観察

肺転移巣の増殖の指標として Wexler法<sup>4)</sup> による肺転移結節数の算定と大きさの測定を行なった。即ち、肺転移結節が肉眼的に観察し得る十分な大きさとなる腫瘍移植後第24日目にエーテル麻酔下に約1.2mlの墨汁を気管より注入し、直ちに肺を en bloc に摘出し、流水にて洗浄したのち Feket液にて約24時間固定と漂白を行ない、白く漂白された転移結節の数と大きさを測定した。

##### 3) 免疫学的背景の観察

細胞性免疫能をあらわす指標として、夏梅ら<sup>5)</sup>の方法に従い塩化ピクリルを用いた遅延型過敏症 delayed type hypersensitivity (DTH)の測定を行なった。即ち、エタノール中に7%溶液とした半井化学薬品製塩化ピクリルを腫瘍移植時に剃毛したマウスの腹部に塗布して immunization し、第7日目にオリブ油中に1%溶液とした塩化ピクリルを耳介に塗布して challenge し、24時間後に耳介の肥厚を測定した。これを1次反応とし、同様の操作により2次反応、3次反応をそれぞれ第16日目、第25日に測定した(図-1)。

##### 4) OK-432の腫瘍内投与

免疫賦活剤として中外製薬社製ピシバニールを使用した。OK-432腫瘍内投与単独の効果と至適量を知るために2KE/mouse, 10KE/mouse, 50KE/mouseの各投与群とコントロール(生食群)に分け、生存日数、腫瘍増殖曲線、およびDTHからその効果を比較した。即ち、1バイアル50KEのピシバニールを用い、蒸留水にて

2KE/0.1ml, 10KE/0.1ml, 50KE/0.1ml となるよう調整し, BDF<sub>1</sub>マウスに3LL細胞  $5 \times 10^5$  個を移植後第7日目に腫瘍径が約8mmとなったところで0.1mlを前記の注射器にて腫瘍内に直接注射した。生食群には生食0.1mlを同様の方法で注射した。

#### 5) 摘脾の効果の観察

摘脾はエーテル麻酔下に無菌的に左側腹部縦切開にて開腹し, 脾門部を3号絹糸にて一重結紮したのち行ない, 腹壁切開創はペッツによる一層縫合にて閉鎖した。腫瘍移植後第3日目, 第10日目, 第14日目にそれぞれ摘脾を行なう群, および sham operation として第10日目に単純開腹を行なう群を設け, 摘脾単独の時期と効果を生存日数, 腫瘍増殖曲線, および DTH から比較した。

#### 6) 原発巣切除手術と補助療法の併用効果の観察

OK-432 至適量を腫瘍移植後第7日目, 即ち原発巣切除術7日前に腫瘍内投与し, 術前腫瘍内投与とした。最も効果のあった時期の摘脾を原発巣切除手術に併用した。OK-432 術前腫瘍内投与, 摘脾, および両者の原発巣切除手術に対する併用効果を生存日数, DTH, および肺転移巣の変化から検討した。

#### 7) 統計処理

Student の t 検定を用いて有意差検定を行なった。

## 実験結果

### A) 原発巣切除後の動態

BDF<sub>1</sub>マウスに3LL細胞を移植した後, 第14日目に腫瘍切除を行ない, 担癌コントロール群とを比較した。

#### 1) 肺転移結節の変化

原発巣切除により肺転移結節の総数は  $21.6 \pm 6.9$  個から  $29.4 \pm 4.6$  個へと有意に増加 ( $p < 0.05$ ) し, 3mm 以上の大結節の数だけをみれば  $3.7 \pm 1.1$  個から  $6.3 \pm 1.4$  個へとさらに著明な増加 ( $p < 0.005$ ) を示した(表-1)。

#### 2) 生存日数

生存日数は担癌コントロール群で  $27.5 \pm 3.5$  日, 切除群で  $29.5 \pm 3.0$  日と有意な差はなかつ

た(図-9)。

#### 3) DTH の変化

塩化ピクリルによる DTH の測定結果は2次反応において担癌コントロール ( $2.40 \pm 0.37$ )  $\times 10^{-3}$  cm に対して切除群 ( $3.60 \pm 0.37$ )  $\times 10^{-3}$  cm, 3次反応において担癌コントロール ( $0.40 \pm 0.37$ )  $\times 10^{-3}$  cm に対して切除群 ( $1.80 \pm 0.51$ )  $\times 10^{-3}$  cm と切除群で有意な増強(ともに  $p < 0.005$ ) をみた(図-2)。

即ち, 原発巣の切除によって肺転移結節数は増加し, 延命効果は得られなかった。しかし, 術後 DTH は有意に上昇した。

#### B) 免疫賦活剤 OK-432 の腫瘍内投与時の至適量とその効果

BDF<sub>1</sub>マウスに3LL細胞を移植した後第7日目に免疫賦活剤 OK-432 を2KE/mouse, 10KE/mouse, 50KE/mouse を各々投与した群, およ

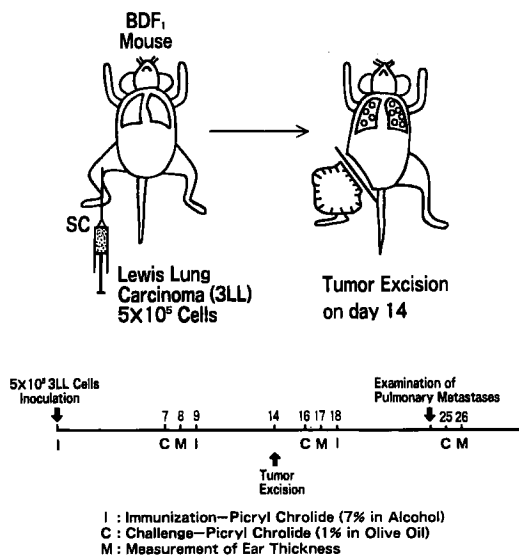


図-1 塩化ピクリルによる DTH 測定のためのスケジュール。

1次反応: 7日目, 2次反応: 16日目,  
3次反応: 25日目。

表-1 原発巣切除による肺転移結節数の変化

	Total	>3mm
Control群	$21.6 \pm 6.9^{\dagger}$	$3.7 \pm 1.1$
切除群	$29.5 \pm 4.6^*$	$6.3 \pm 1.4^{**}$

$\dagger$ : Mean  $\pm$  SD,  $*$ :  $p < 0.05$ ,  $**$ :  $p < 0.005$ .

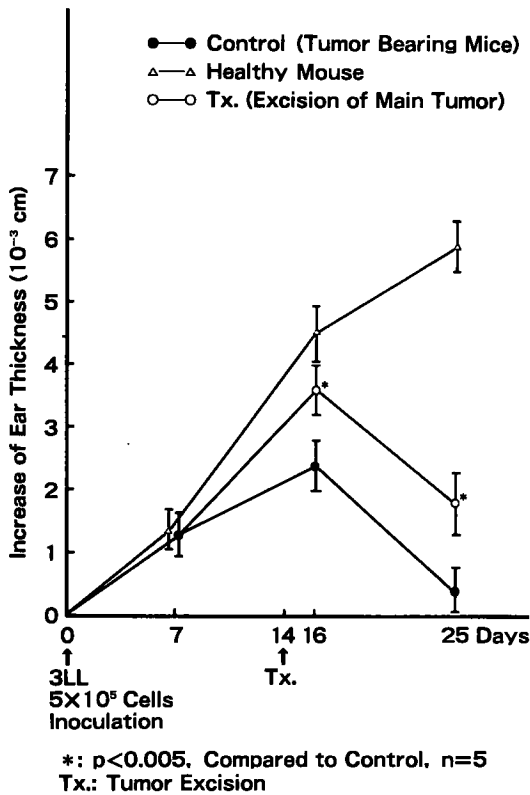


図-2 原発巣切除の DTH に及ぼす影響

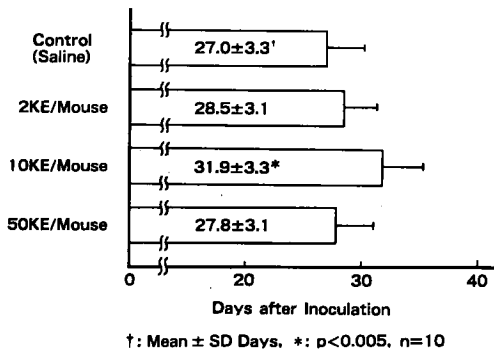
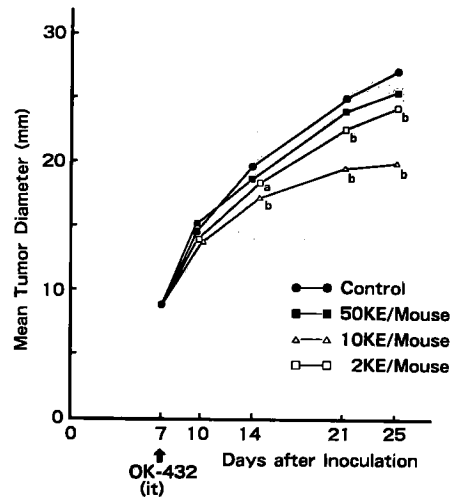


図-3 OK-432 腫瘍内大量投与による延命効果

び同量の生理食塩水を投与したコントロール群を比較した。

1) 延命効果

コントロール群の生存日数27.0±3.3 日に対してOK-432 2KE/mouse 投与群(以下2KE群) 28.5±3.1日, 10KE/mouse 投与群(以下10KE群) 31.9±3.3日, 50KE/mouse 投与群(以下50KE群) 27.8±3.1日であり, 10KE群にて有意



a: p<0.025 Compared to Control, b: p<0.005 Compared to Control, it: Intratumoral Injection

図-4 OK-432 腫瘍内投与の抗腫瘍効果

の延命効果(p<0.005)をみた(図-3)。

2) 腫瘍増殖抑制効果

腫瘍移植後第10日目の腫瘍径はコントロール群14.6±1.3mm に対して2KE群14.1±1.7mm, 10KE群13.9±1.5mm, 50KE群14.9±1.3mm と有意差はなかった。第14日目ではコントロール群19.7±0.8mm に対して2KE群18.4±1.2mm, 10KE群17.3±1.3mm, 50KE群18.7±1.2mm で, 2KE群(p<0.025)と10KE群(p<0.005)で有意な抑制をみた。第21日目ではコントロール群25.0±1.0mm に対して2KE群22.7±1.4mm, 10KE群19.6±1.1mm, 50KE群24.0±1.0mm と, 2KE群と10KE群にて有意の抑制(ともに p<0.005)をみた。第25日目ではコントロール群27.2±1.3mm に対して2KE群24.2±1.3mm, 10KE群20.0±1.5mm, 50KE群 25.5±1.5mm と, 2KE群と10KE群にて有意の抑制(ともに p<0.005)をみた(図-4)。

3) DTH に対する効果

2次反応においてコントロール群(1.90±0.37) ×10<sup>-3</sup>cm に対して2KE群(2.10±0.49) ×10<sup>-3</sup>cm, 10KE群(3.50±0.55) ×10<sup>-3</sup>cm, 50KE群(3.00±0.32) ×10<sup>-3</sup>cm と, 10KE群と50KE群で有意の増強(ともに p<0.005)をみた。3次反応ではコントロール群(0.30±0.37) ×10<sup>-3</sup>cm に対して2KE群(0.40±0.39) ×10<sup>-3</sup>cm, 10KE

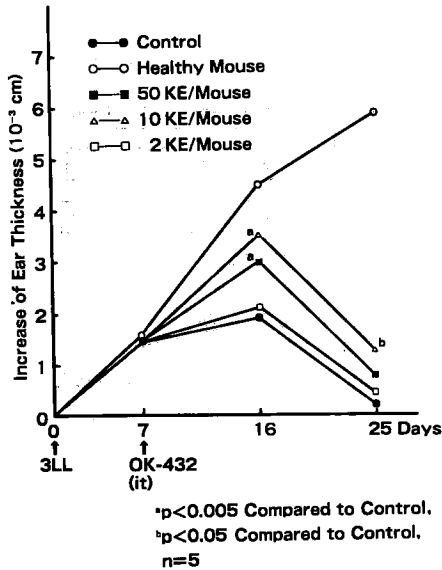


図-5 OK-432 腫瘍内投与の DTH に及ぼす効果

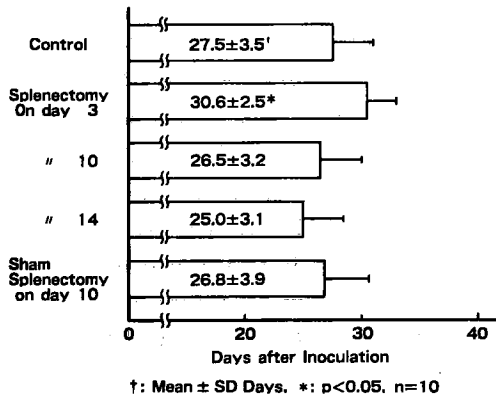


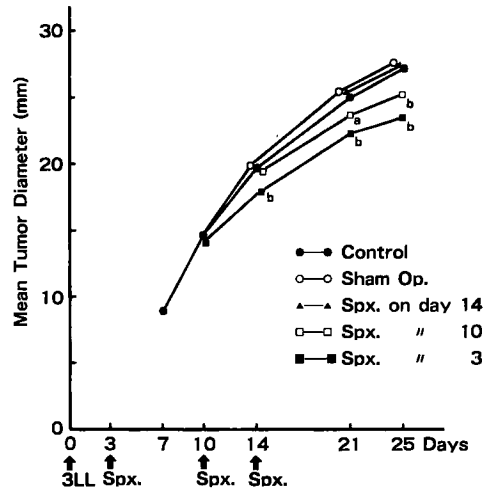
図-6 摘脾による延命効果

群(1.25 ± 0.50) × 10<sup>-3</sup>cm, 50KE群(0.75 ± 0.22) × 10<sup>-3</sup>cm で, 10KE群のみ有意の増強(p < 0.05)を示した(図-5).

即ち OK-432 の腫瘍内投与の至適量は10KE/mouseであり, 有意の延命効果, 腫瘍増殖抑制効果, および DTH 増強効果が得られた.

C) 摘脾の効果

BDF<sub>1</sub>マウスに3LL 細胞移植後第3日目, 第10日目, 第14日目にそれぞれ摘脾を行なった群, および第10日目に sham operation を行なった sham splenectomy 群を比較した.



a: p < 0.025 Compared to Sham Operation, b: p < 0.005 Compared to Sham operation, Spx.: Splenectomy

図-7 摘脾の抗腫瘍効果

1) 延命効果

sham splenectomy 群26.8 ± 3.9日に対して第3日目に摘脾した群(以下3日目摘脾群)30.6 ± 2.5日, 第10日目に摘脾した群(以下10日目摘脾群)26.5 ± 3.2日, 第14日目に摘脾した群(以下14日目摘脾群)25.0 ± 3.1日であり, 3日目摘脾群で sham splenectomy 群に比較して有意の延命効果(p < 0.05)が見られた(図-6).

2) 腫瘍増殖抑制効果

腫瘍移植後第14日目の腫瘍径は sham splenectomy 群19.9 ± 1.2mm に対して3日目摘脾群23.8 ± 1.0mm, 14日目摘脾群25.3 ± 1.2mm で, 10日目摘脾群(p < 0.025)と3日目摘脾群(p < 0.005)で有意の抑制効果がみられた. 第25日目では sham splenectomy 群27.6 ± 1.2mm に対して3日目摘脾群23.7 ± 0.9mm, 10日目摘脾群25.4 ± 1.0mm, 14日目摘脾群27.5 ± 1.0mm で, 3日目摘脾群と10日目摘脾群で有意の抑制効果(ともに p < 0.005)があった(図-7).

3) DTH に対する効果

2次反応において sham splenectomy 群(1.10 ± 0.45) × 10<sup>-3</sup>cm に対して3日目摘脾群(2.30 ± 0.40) × 10<sup>-3</sup>cm, 10日目摘脾群(2.00 ± 0.50) × 10<sup>-3</sup>cm, 14日目摘脾群(1.00 ± 0.48) × 10<sup>-3</sup>cm であり, sham splenectomy 群に比較して3日目摘脾群(p < 0.01)と10日目摘脾群(p < 0.05)

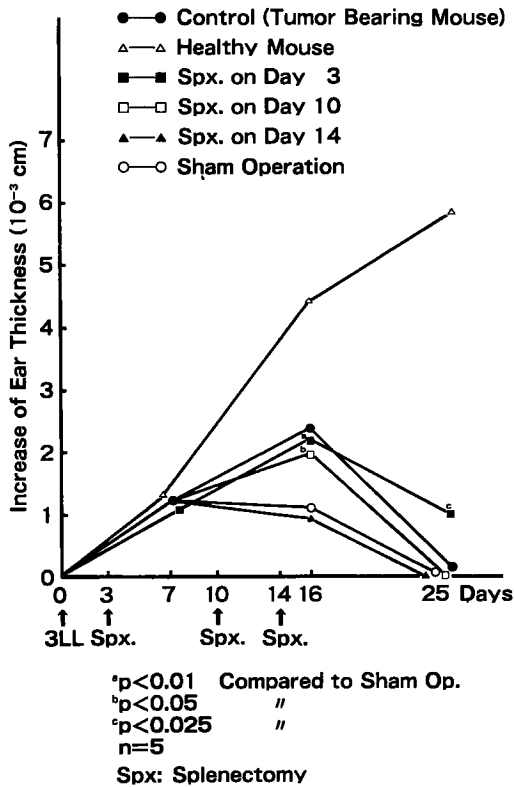


図-8 摘脾のDTHに及ぼす効果

表-2 補助療法併用による肺転移抑制効果 (Wexler法による肺転移結節数)

	No. of Case	Total	>3mm
Control	8	21.6±6.9	3.7±1.1
Tx.	6	29.5±4.9*	6.3±1.4**
Spx.+Tx.	6	21.5±5.4	2.7±1.1
OK-432+Tx.	6	16.3±5.4	2.5±1.0*
Spx.+OK-432+Tx.	6	14.0±5.2*	1.3±1.1*

Tx.: Tumor Excision, Spx.: Splenectomy, \*: p<0.05, \*\*: p<0.005.

で有意の増強があった。3次反応ではsham splenectomy群(0.10±0.37)×10<sup>-3</sup>cmに対して3日目摘脾群(1.00±0.35)×10<sup>-3</sup>cm, 10日目摘脾群(0.00±0.63)×10<sup>-3</sup>cm, 14日目摘脾群(0.00±0.50)×10<sup>-3</sup>cmであり, 3日目摘脾群でのみ有意の増強(p<0.025)がみられた(図-8)。

即ちこれらの実験では早期の摘脾は有効であるが, 後期の摘脾ではむしろ有害な傾向のある

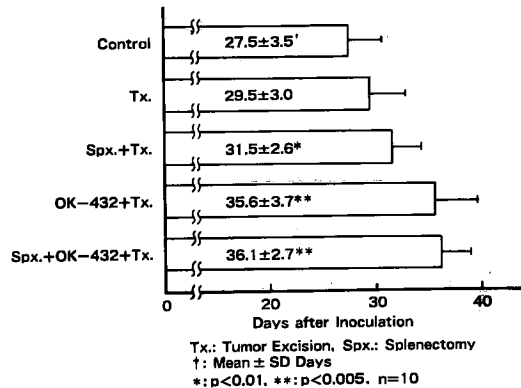


図-9 補助療法併用による延命効果

ことが示された。

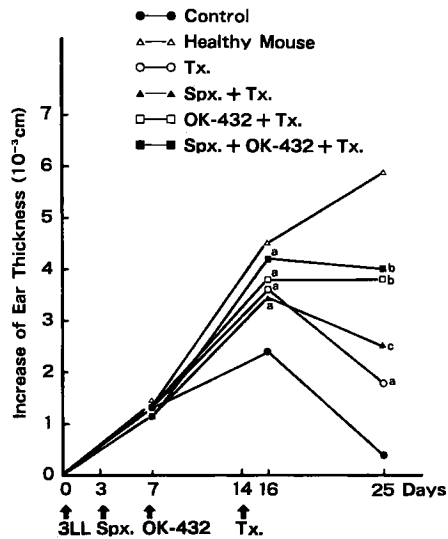
D) 原発巣切除術と補助療法の併用効果

1) 摘脾併用の効果

BDF<sub>1</sub>マウスに3LL細胞移植後第3日目に摘脾し, 第14日目に腫瘍切除を行なった群では生存日数がコントロールの27.5±3.5日に対して31.5±2.6日と有意な延長(p<0.01)がみられた(図-9)。DTHでは前述のごとく原発巣切除により第2次, 第3次反応で有意の増加が見られるが, 摘脾の併用では2次反応で原発巣切除群(3.60±0.37)×10<sup>-3</sup>cmに対して(3.50±0.45)×10<sup>-3</sup>cmと有意差はなく, 3次反応で原発巣切除群(1.80±0.51)×10<sup>-3</sup>cmに対して(2.50±0.32)×10<sup>-3</sup>cmと有意な増強効果(p<0.05)を示した(図-10)。肺転移結節数は前記のごとく原発巣切除により総数が21.6±6.9個から29.5±4.9個へ(p<0.05), 3mm以上の大きな結節の数では3.7±1.1個から6.3±1.4個へ(p<0.005)と有意に増加するが, 摘脾の併用により総数では21.5±5.4個とほぼコントロールの値に復し, 3mm以上の結節数では2.7±1.1個とコントロールより減少する傾向を示した(表-2)。

2) 免疫賦活剤OK-432 10KEの術前腫瘍内投与の併用効果

腫瘍移植後第7日目にOK-432 10KEを腫瘍内に投与した後, 第14日目に腫瘍切除を行ない, その効果を見た。生存日数では35.6±3.7日とコントロールに比較して著明な延命効果(p<0.005)がみられた(図-9)。DTHでは2次反応で(3.80±0.60)×10<sup>-3</sup>cmと原発巣切除群に比較



Tx.: Tumor Excision, Spx.: Splenectomy, a:  $p < 0.005$  Compared to Control, b:  $p < 0.005$  Compared to Tx. group, c:  $p < 0.05$  Compared to Tx. group,  $n = 5$

図-10 補助療法併用のDTHに及ぼす効果

して増加傾向を示し、3次反応では  $(3.80 \pm 0.51) \times 10^{-3} \text{cm}$  と原発巣切除群に比較して有意な増加 ( $p < 0.005$ ) を示した(図-10)。肺転移結節数では総数で  $16.3 \pm 5.4$  個とコントロールに比較して減少傾向を示し、3 mm 以上の大結節数では  $2.5 \pm 1.0$  個とコントロールに比較して有意な減少 ( $p < 0.05$ ) を示した(表-2)。

3) 摘脾およびOK-432 術前腫瘍内投与の両者の併用効果

腫瘍移植後第3日目に摘脾を行ない、第7日目にOK-432 10KE の腫瘍内投与を行なったのち、第14日目に腫瘍切除を行ない、その効果を見た。生存日数では  $36.1 \pm 2.7$  日とコントロールに比較して有意な延長 ( $p < 0.005$ ) を示し、さらにそれぞれの単独併用群よりも延長する傾向がみられた(図-9)。DTHでは2次反応で  $(4.20 \pm 0.51) \times 10^{-3} \text{cm}$  と原発巣切除群およびそれぞれの単独併用群に比較して上昇傾向を示し、3次反応では  $(4.00 \pm 0.32) \times 10^{-3} \text{cm}$  と原発巣切除群に対して有意な上昇 ( $p < 0.005$ ) とそれぞれの単独併用群に比較して上昇傾向がみられた(図-10)。肺転移結節数では総数で  $14.0 \pm 5.2$  個とコントロールに比較して有意の抑制効果 ( $p < 0.05$ ) が得られた。3 mm 以上の大結節数でも 1.3 ±

1.1個と有意な抑制効果 ( $p < 0.05$ ) を示し、ともに各単独併用群よりも少ない傾向が見られた(表-2)。

## 考 察

進行癌の主病巣を切除すると転移腫瘍が増大することのあることが知られているが、その原因の解明は完全にはなされていない。

その原因については原発巣が転移巣と互いに関連しており、特に原発巣が転移巣の増殖を抑制しているものと思われるが、そのメカニズムには免疫学的なものや手術侵襲などの関与が考えられよう。

まず原発巣切除による転移腫瘍の動態についてみると、今回の実験結果では3LL細胞とBDF<sub>1</sub>マウスを用いた実験系で  $5 \times 10^5$  個の3LL細胞をマウス大腿部皮下に移植し、100%肺転移をおこした第14日目に原発巣を切除すると肺転移結節数が増加し、しかも特に3 mm以上の大きな結節の数の増加が顕著であった。これは原発巣切除により肺転移および転移巣の増殖が促進されたことを意味するといえよう。Simpson-Herrenら<sup>1-3)</sup>は同じ実験系を用いて肺転移巣の<sup>3</sup>H-TdRのとり込みをオートラジオグラフィの手技により観察し、Labeling Index (LI)の経日的推移をみている。それによると細胞分裂の指標であるLIは担癌マウスでは経日的に低下して行くが、原発巣切除群では低下せず術前の高値をとりつづけるという結果が得られている。橋本ら<sup>8)</sup>もSimpson-Herrenらと同様の実験を行ない、同じく原発巣切除により肺転移巣の細胞分裂が活発化することをみている。これらの結果は今回のWexler法による実験結果、特に3 mm以上の大結節の増加と一致すると思える。これは逆に言えば原発巣による肺転移の抑制作用が推測されるということが出来る。そこでこの効果は原発巣が個体の免疫能を介して転移巣を抑制しているのではないかという疑問が出て来る。今回の実験結果では原発巣切除によりDTHはむしろ上昇する結果が得られているが、その間の解析が問題となる。

さて、腫瘍切除手術の免疫能に対する影響については様々な報告が見られている。すなわち、

Paranjeら<sup>9)</sup>は BALB/Cマウスと E4 tumor を用いた foot-pad assay による実験で、腫瘍がある程度大きくなった時点から低下しはじめる DTH が原発巣切除手術によって回復することを示している。また Heppner<sup>10)</sup>は原発巣切除により blocking antibody が経時的に低下し、細胞性免疫能が賦活化されることを示し、Whitneyら<sup>11)</sup>は tumor-specific cell mediated immunityが原発巣切除により増強されることを colony inhibition と neutralization による実験で示し、Barskiら<sup>12)</sup>も同様の結果を報告している。今回の実験でも原発巣切除により細胞性免疫能をあらわす DTH が増強されることが示されたわけであり、本来なら原発巣切除によって細胞性免疫能が増強され、そのために肺転移巣が縮小または消失してもよいわけである。しかし結果は逆であることからこの機序の解析は単に細胞性免疫能からのみ行なうことは困難なようである。Goelik<sup>13)</sup>は 3LL細胞と C57BL マウスを用いた実験系で、あらかじめ450Rのtotal body irradiation をかけたマウスに 3LL 細胞を移植すると正常マウスに移植した場合に比べて肺転移結節数は著明に増加し、さらに原発巣を切除すると肺転移結節数もさらに有意な増加をみることを示し、原発巣の転移抑制効果は個体の免疫系を介するもの以外に、原発巣による直接の抑制効果の存在が示唆されるとしている。

しかし一方では手術操作や麻酔が個体の免疫能を低下させ、転移を促進するという報告も見られる。Sabaら<sup>14)</sup>はラットを用いた実験で術後30分では網内系の機能が低下していることを示している。Park<sup>15)</sup>は臨床例で末梢血液中のリンパ球の PHA に対する幼若化反応が術後低下し、特に術後2時間で極度に低下していることを示し、Riddle<sup>16)</sup>も同様の報告をしている。また三輪ら<sup>17)</sup>も手術侵襲による細胞性免疫能の変動を末梢血リンパ球の PHA, ConA, PWM, LPS による mitogen 反応, Tcell 百分率, active T-cell 百分率, PPD皮膚反応で検討し、それらが術後1~2週間の早期に低下し、約1ヵ月後に術前値に回復することをみており、術後早期の細胞性免疫能の低下が遊離癌細胞の転移着床を促進するのではないかとしている。

即ち、腫瘍切除により免疫能低下の原因そのものがとり除かれた結果免疫能は回復するが、手術直後少なくとも一過性の免疫能の低下および原発巣による直接の転移抑制効果の消失により肺転移およびその増殖が活発化したものと考えられる。

次にこれらの主腫瘍摘出時の転移腫瘍を促進する原因の一つである免疫能の低下を如何に防止するかを検討した。その一方法として免疫賦活剤を用いる免疫療法を用い、中でも腫瘍内に直接投与して効果を有する OK-432 を使用した。OK-432は岡本ら<sup>18,19)</sup>により開発された溶連菌製剤で、これは悪性腫瘍患者が丹毒に感染すると腫瘍が縮小することを端緒として改発された薬剤である。これは A群溶連菌 Su 株にペニシリン処理を行なったものであり、これを製剤化したものが OK-432 である。IKEに乾燥菌量として0.1mg の Su 株が含有されている。OK-432 の作用機序は最初岡本らによると溶連菌が癌細胞の RNA を利用することによるいわゆる RNA 効果によるとされたが<sup>19)</sup>、その後木村ら<sup>20,21)</sup>により非特異的免疫賦活作用のあることも実証された。本剤は主として細胞性免疫能を賦活化し、担癌生体の macrophage やリンパ球の機能を賦活化することによって制癌作用をあらわすことが示されている<sup>22)</sup>。この薬剤は正常動物に投与しても免疫能を増強させるもので、腫瘍細胞への直接効果も有し、腫瘍内投与が最も有効な薬剤の分類に入れられている。腫瘍内投与については服部ら<sup>23)</sup>が ddNマウスとエールリッヒ腹水癌の実験系および臨床例について行なった報告がある。それによるとマウスにおける腫瘍内投与の至適量は500KE/kg であり、有意の延命効果、脾細胞の PHA 活性の増強、および脾細胞の cytotoxicity の亢進を見ている。また臨床的には進行癌、再発癌に100KEの腫瘍内投与を施行し、良い成績も得ている。彼らはその作用機序として直接的な cytocidal な作用、個体の非特異的な抵抗性の増強の他に、腫瘍内投与で腫瘍細胞が変性、壊死におちいることにより抗原性が強く表現される可能性があるのではないかとしている。今回の実験でも至適量は10KE/mouse と彼らの至適量とほぼ同じ結果であり、有意の



延命効果、抗腫瘍効果、および DTH 増強効果が得られた。

さて、担癌生体の免疫能を増強させる他の方法として摘脾が注目されており、摘脾を補助療法として用いるためにその効果について検討した。元来脾臓は液性抗体産生においても細胞性免疫においても主要な役割をはたす臓器である。実験腫瘍系において摘脾が腫瘍抑制作用を持つことは以前より多くの研究者によって知られるようになったが、その機序としては腫瘍特異移植抗原 tumor specific transplantation antigen (TSTA) に対して enhancing antibody<sup>24)</sup>や blocking factor<sup>25-27)</sup>が産生されること、さらに Suppressor T cell が脾臓に集中する傾向がある<sup>28,29)</sup>ことなどにより説明されている。Hellström ら<sup>24,30,31)</sup>は担癌生体の血清が *in vitro* で免疫リンパ球による癌細胞の破壊を抑制する一方、摘脾した担癌生体の血清にはその作用の弱いことを観察し、脾臓の腫瘍増殖促進作用は主として体液性因子を介するとしてその因子を enhancing antibody としている。Ferrer ら<sup>25)</sup>は同様の機序を摘脾による血清中の blocking factor の減少として説明している。しかし摘脾もその時期や腫瘍移植量によっては腫瘍抑制効果を示さないばかりかかえって促進的に働くことさえある。即ち脾臓には腫瘍抑制的に働く細胞障害性 T cell や macrophage などによる正の免疫と、腫瘍促進的に働く suppressor T cell や blocking factor などによる負の免疫との相反する二面性があり、腫瘍の進行時期や腫瘍の量によってどちらか一方が優位になると考えられる<sup>32-38)</sup>。摘脾の効果を見る実験は以前は主として腫瘍移植前に摘脾したものが多かったが、治療的效果をみるという立場からは腫瘍移植後の摘脾の効果を観察する必要がある。岡田<sup>33)</sup>は Ehrlich 腹水癌と DDS マウスの実験系で腫瘍移植後 5 日目の摘脾により腫瘍抑制効果、即ち治療効果のあることを示したが、逆に第 10 日目の摘脾では腫瘍促進的に作用することを観察した。湯村ら<sup>34)</sup>は臨床例で胃癌の Stage I, II の前期の例に摘脾が延命に働くことをみており、岡田の動物実験での成績と類似の結果を出している。また三輪ら<sup>35)</sup>は中期癌である胃癌 Stage III では脾臓は免疫活性状態に

あるので温存した方がよく、後期癌である胃癌 Stage IV では脾臓は再び免疫抑制系が主体となるため胃切除に加えて摘脾を併用した方が細胞性免疫能の増強と延命をもたらすとしており、Yu ら<sup>36)</sup>や白石ら<sup>37)</sup>の賛同報告もある。今回の実験では腫瘍移植後第 3 日目の摘脾は有効であったが、第 14 日目では逆の傾向がみられた。また Milas ら<sup>38)</sup>は C57BL マウスと syngeneic な fibrosarcoma の実験系で腫瘍移植量が少ないほど摘脾の効果が大きいとしている。以上のことから摘脾は腫瘍移植後早期あるいは少ない移植量で治療効果があり、臨床的には早い Stage で有効であるという一方、後期にかけての摘脾の効果についても注目されて来ている。この方面では更に詳細な検討が必要となろう。

進行癌で転移巣を残して原発巣の切除をせざるを得ない場合、手術のみではかえって予後を悪くすることがあるということは前記のとおりであり、今回の実験結果でも示された。このような場合の予後に少しでも良い結果を与えるために、補助療法として非特異的免疫賦活剤 OK-432 の術前腫瘍内大量投与および摘脾の各単独および両方の手術との併用効果について検討を加えた。免疫療法はそれ自体では微力であるが、手術に対する補助療法として位置づけた場合かなりの効果を発揮する。免疫賦活剤の投与方法としては BCG, *Corynebacterium parvum*, OK-432 等では術前投与、術後投与および全身投与、局所投与などがあり、それらの種々の組合せが考えられる。橋本<sup>8)</sup>は同じ実験系で *Corynebacterium parvum* の術前および術後の腹腔内投与について Wexler 法による肺転移結節数の算定と <sup>3</sup>H-TdR の肺転移巣内への取り込みの経日的変化とから見ているが、それによると *Corynebacterium parvum* 投与により肺転移結節数は減少し、肺転移巣の Labeling Index も手術単独群に比べ経日的に漸減するが、その効果は術前投与群においてより有効であったとしている。そこで今回の実験でも術後の細胞性免疫能の増強を期待し、それによる肺転移およびその増殖の抑制を期待するという観点から術前投与を選択した。また原発巣に対する直接作用の期待と、OK-432 では腫瘍内投与が最も良い効果をもたら

すであろうという観点から腫瘍内投与を選択した。OK-432の投与量としては今回の実験結果により得られた至適量である10KE/mouseという大量投与を用いた。さらに広義の免疫療法と言える摘脾の併用についても今回の実験結果により得られた至適時期である腫瘍移植後第3日目に行なった。その結果OK-432術前腫瘍内大量投与の併用により細胞性免疫能をあらわすDTHの有意な増強効果、肺転移および転移巣の増殖に対する有意の抑制効果が得られ、その結果著明な延命効果を得ることができた。第3日目と早期の摘脾の併用によっても効果は多少前者よりは劣るが同様の有意な効果を得ることができた。これら両者を共に併用するとその効果はさらに高められた。即ち、OK-432術前腫瘍内大量投与と早期の摘脾は補助療法として相加的に作用したと言える。

免疫賦活剤の腫瘍内投与を術前に併用する試みは最初BCGを用いて行われた。Smithら<sup>39)</sup>によるとGuinea pigとsyngeneicなhepatocellular carcinomaを用いた実験系で腫瘍切除7日前にBCGの腫瘍内投与を行ない、著効が得られたとしている。臨床的には三輪ら<sup>40,41)</sup>は胃内視鏡を用いて手術1週間前にBCG-CWSを胃癌腫に直接注射し、癌組織へのリンパ球浸潤に伴う細胞性免疫能の賦活化と良好な予後をみており、*Nocardia rubra* CWSではそれがTcellの浸潤を主体とするものであることをみている<sup>42)</sup>。藤井らはC<sub>3</sub>H/HeマウスとMH-134 tumorの実験系でOK-432 2KE/mouseを腫瘍移植後第3日目と第7日目に腫瘍内投与し、第14日目に腫瘍切除を行ない、局所リンパ節転移の抑制と延命効果を得、OK-432腫瘍内投与による所属リンパ節の賦活効果を強調している。竹中ら<sup>44)</sup>も同じ実験系を用いて同様の実験を行ない、類似の結果を得ている。これらの実験で用いられたOK-432の量は比較的少量であるが、今回の実験においてはあらかじめ得られた至適量として10KE/mouseという大量のOK-432を投与したため、著効を得ることができたと思われる。

今回の実験結果から推測できる機序は次のよ

うに総括できると考えられる。早期の摘脾により優位な免疫抑制をとり去ったところにさらに免疫賦活剤OK-432を大量に主腫瘍内に投与し、直接作用により腫瘍量の減少を得ると同時に所属リンパ節賦活を含む全身の免疫能の賦活を得、手術により少なくとも一過性におこり得る免疫能の低下と、原発巣の転移巣に対する直接的抑制効果の消失による転移およびその増殖の促進を予防し、また術後の免疫能を増強することによって転移巣の増殖を抑制し、良好な予後を得ることができたものと思われる。

## 結 論

BDF<sub>1</sub>マウスと3LL細胞の腫瘍実験系を用いた動物実験で腫瘍切除手術の及ぼす影響と補助療法に関する研究を行ない、次のような結論を得た。

1) 原発巣切除により肺転移および肺転移巣の増殖は促進され、延命効果は得られなかったが、DTHは増強された。

2) OK-432の腫瘍内投与の至適量は10KE/mouseと大量であり、有意の腫瘍増殖抑制効果、延命効果、およびDTH増強効果があった。

3) 摘脾は腫瘍移植後早期に行なった場合有効で、有意の抗腫瘍効果、延命効果、およびDTH増強効果があった。

4) OK-432術前腫瘍内大量投与および早期の摘脾は有効な補助療法であり、DTHを有意に増強し、手術により促進される肺転移およびその増殖を抑制して著明な延命効果を得ることができた。さらにこの両者を手術に併用した場合相加的な効果が得られた。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導をいただいた三輪恕昭講師と実験方法について常に御指導をいただいた橋本修先生に心から深く感謝の意を表します。

なお本論文の一部要旨は第29回日本化学療法学会西日本支部総会、第82回日本外科学会総会、第41回日本癌学会にて発表した。

## 文 献

1. Simpson-Herren, L., Sanford, A.H. and Holmquist, J.P.: Cell population kinetics of transplanted and metastatic Lewis lung carcinoma. *Cell Tissue Kinet.* 7, 349—361, 1974.
2. Simpson-Herren, L., Sanford, A.H. and Holmquist, J.P.: Effect of surgery on the cell kinetics of residual tumor. *Cancer Treat. Rep.* 12, 1749—1760, 1976.
3. Simpson-Herren, L., Springen, T.A., Sanford, A.H. and Holmquist, J.P.: Kinetics of metastases in experimental tumors. *Prog. Cancer Res. Ther.* 5, 117—133, 1977.
4. Wexler, H.: Accurate identification of experimental pulmonary metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 36, 641—645, 1966.
5. 夏梅俊之助, 右田俊介: 塩化ピクリルによるマウスの遅延型皮膚反応. 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, 東京 pp. 614—620, 1972.
6. Biozzi, G., Benacerraf, B., Grumbach, F., Levanditi, J. et Rist, N.: Étude de l'activité granulopexique du système réticuloendothélial au cours de l'infection tuberculose expérimentale de la souris, *Ann. Inst. Pasteur* 87, 291—300, 1954.
7. 鳩寄明一, 三輪恕昭, 橋本 修, 守山 稔, 岡 哲秀, 中村憲治, 守屋直人, 折田薫三: 腫瘍の外科的切除とその補助療法——*C. parvum*, OK-432 の効果と摘脾の併用効果について. 第82回日本外科学会総会記事, p. 362, 1982.
8. 橋本 修, 三輪恕昭, 鳩寄明一, 鶴身孝文, 岡 哲秀, 田中紀章, 阪上賢一, 三村 久, 折田薫三: 転移腫瘍増殖に対する手術侵襲の影響と *Corynebacterium parvum* の効果. 第40回日本癌学会総会記事, p.371, 1981.
9. Paranjpe, M.S. and Boone, C.W.: Kinetics of the anti-tumor delayed hypersensitivity response in mice with progressively growing tumors. : Stimulation followed by specific suppression. *Int. J. Cancer* 13, 179—186, 1974.
10. Heppner, G.H.: In vitro studies on cell-mediated immunity following surgery in mice sensitized to syngeneic mammary tumors. *Int. J. Cancer* 9, 119—125, 1972.
11. Whitney, R.B., Levy, J.G. and Smith, A.G.: Influence of tumor size and surgical resection on cell-mediated immunity in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 111—116, 1974.
12. Barski, G. and Youn, J.K.: Evolution of cell-mediated immunity in mice bearing an antigenic tumor. Influence of tumor growth and surgical removal. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 111—121, 1969.
13. Gorelik, E., Segal, S. and Feldman, M.: Growth of a local tumor exerts a specific inhibitory effect on progression of lung metastases. *Int. J. Cancer* 21, 617—625, 1978.
14. Saba, T.M. and DiLuzio, N.R.: Surgical stress and reticuloendothelial function. *Surgery* 65, 802 — 807, 1969.
15. Park, S.K.: Immuno suppressive effect of surgery. *Lancet* 1, 53—55, 1971.
16. Riddle, P.R.: Disturbed immune reactions following surgery. *Br. J. Surg.* 54, 882—886, 1967.
17. 三輪恕昭, 活合知則, 中原東重, 折田薫三: 手術侵襲による細胞性免疫能の低下と Levamisole によるその防止. 臨床免疫, 11, 121—127, 1979.
18. Okamoto, H.: Über die hochgradige Steigerung des Hämolysebildungsvermögens des Streptococcus hemolyticus durch Nucleinsäure. *Jap. J. Med. Sci., IV Pharmacology* 12, 167—208, 1940.
19. Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. and Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn. J. Microbiol.* 11, 323—336, 1967.
20. 木村郁郎: 抗癌剤と溶連菌製剤の併用. 最新医学, 28, 941—951, 1973.

21. 木村郁郎：溶連菌製剤 OK-432 と癌の免疫化学療法の可能性。癌と化学療法，2，21—33，1975。
22. 木村郁郎：OK-432による免疫療法。癌の臨床，24，428—433，1978。
23. Hattori, T., Niimoto, M., Yamagata, S., Tohge, T. and Terao, H.: Experimental study on the effect of large-dose intratumoral OK-432 administration in mice. *Gann* 67, 105—110, 1976.
24. Hellström, I., Hellström, K.E. and Sjögren, H.O.: Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcholanthrene-induced murine sarcomas. *Cell. Immunol.* 1, 18—30, 1970.
25. Ferrer, J.F. and Mihich, E.: Effect of splenectomy on the regression of trans-plantable tumors. *Cancer Res.* 28, 1116—1120, 1968.
26. Bansal, S.C. and Sjögren, H.O.: Counteraction of the blocking of cell-mediated tumor immunity by inoculation of unblocking sera and splenectomy. *Int. J. Cancer* 9, 490—509, 1972.
27. Hellström, K.E. and Hellström, I.: Clinical immunology Vol. II, *Academic Press Inc., New York*, pp. 233—264, 1974.
28. Gershon, R.K., Lance, E.M. and Kondo, K.: Immuno-regulatory role of spleen localizing thymocytes. *J. Immunol.* 112, 546—554, 1974.
29. Sampson, D., Glotuelueschen, C. and Kauffman, H.M.Jr.: The human splenic suppression cell. *Transplantation* 20, 362—367, 1975.
30. Hellström, I. and Hellström, K.E.: Studies on cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Moloney-virus induced mouse sarcomas. *Int. J. Cancer* 4, 587—600, 1969.
31. Hellström, K.E. Hellström, I.: Immunological enhancement as studied by cell culture techniques. *Ann. Rev. Microbiol.* 24, 373—398, 1970.
32. Hara, S.: Cellular antibody in mice bearing Ehrlich cancer. I. A quantitative study on antitumor activity of cellular antibody in vitro. *Acta Med. Okayama* 19, 91—98, 1965.
33. 岡田 剛：摘脾の腫瘍増殖と細胞性免疫に及ぼす影響に関する実験的研究。岡山医学会雑誌，92，39—51，1980。
34. 湯村正仁，林 茂夫，岡田 剛，山元 勇，福田範三，三輪恕昭，万波徹也，小長英二，国米欽明，折田 薫三，田中早苗：癌免疫療法(2)脾合併切除を併用した癌免疫療法の可能性について。日外会誌，76，1076—1078，1975。
35. 三輪恕昭，折田薫三：進行胃癌胃全摘例への摘脾と免疫療法。癌と化学療法，9，336—337，1982。
36. Yu, S., Lannin, D.R., Tsui-Collins, A.L. and Mckhann, C.F.: Effect of cyclophosphamide on mice bearing methylcholanthrene-induced fibrosarcomas. *Cancer Res.* 40, 2756—2761, 1980.
37. 白石守男，神代龍之助，玉田隆一郎，狩野 巖，井上文夫，平本陽一郎，安部能成，能獄隆之，児玉好児，杉町圭蔵，井口 深：脾摘の担癌生体に及ぼす影響に関する実験的研究，脾の抗腫瘍性に関する相反二面性について。第82回日本外科学会総会記事，p 424，1982。
38. Milas, L. and Mujagic, H.: The effect of splenectomy on fibrosarcoma “metastases” in lungs of mice. *Int. J. Cancer* 11, 186—190, 1973.
39. Smith, H.G., Bast, Jr., R.C., Zbar, B. and Rapp, H.J.: Eradication of microscopic lymph node metastases after injection of living BCG adjacent to the primary tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 1345—1352, 1975.
40. 三輪恕昭，河合知則，浜崎啓介，折田薫三：BCG-CWS内視鏡下注射による免疫療法—予報—。日臨外会誌，39，32—34，1978。
41. 三輪恕昭，守山 稔，小野二三雄，折田薫三：術前 BCG-CWS腫瘍内投与を併用した消化器癌免疫療法。日消外会誌，13，1168—1173，1980。
42. 松三 彰，三輪恕昭，筒井保太，折田薫三：N-CWS 内視鏡下注入法を併用した胃癌免疫療法。第19回日

本癌治療学会総会記事. p. 1180, 1981.

43. 藤井源七郎, 宮本洋寿, 江里口正純: 癌治療における免疫療法の併用, 外科療法と併用. 癌の臨床, **24**, 495—501, 1978.
44. 竹中 温: 術前腫瘍内 immunopotentiator 投与のリンパ節転移抑制効果と, リンパ節内細胞反応についての実験的研究. 京府医大誌, **89**, 351—364, 1980.

**Adjuvant therapy of metastatic tumor after excision of main tumor  
Effect of preoperative intratumoral administration of immunostimulant  
OK-432 and splenectomy on metastatic tumor**

**Akikazu HATOZAKI**

**First Department of Surgery, Okayama University School of Medicine**

**(Director: Prof. K. Orita)**

The acceleration of metastasis after excision of the main malignant tumor and the worsening of the prognosis are sometimes experienced. This phenomenon was simulated in model experiments using Lewis lung carcinoma (3LL) cells and BDF<sub>1</sub> mice. The change of cell-mediated immunity was also studied using delayed type hypersensitivity (DTH) skin reaction. For the purpose of getting a better prognosis, preoperative intratumoral administration of large doses of the immunostimulant OK-432 and splenectomy were studied as possible adjuvant therapy to surgical treatment.

Pulmonary metastases and their growth were accelerated after excision of the main subcutaneous tumor, and as a result survival time was not extended. However, DTH increased after the operation. Splenectomy in the early stage was significantly effective on survival, increase of DTH and growthinhibition of the main tumor. The optimum dose of OK-432 in intratumoral administration was 10KE/mouse, and a significant effect was obtained on survival, increase of DTH and growth-inhibition of the main tumor with this dose. Preoperative intratumoral administration of OK-432 and splenectomy in the early stage were useful adjuvant therapy to surgical treatment. A significant effect was obtained on suppression of pulmonary metastases, increase of DTH and survival.