

氏名(本籍)	木村 敦(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1346 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	OK-432, IL-2封入W/O/W型徐放製剤の抗腫瘍効果について
審査委員	(主査) 教授 佐 治 重 豊 (副査) 教授 高 橋 優 三 教授 出 口 隆

論文内容の要旨

大腸癌術後症例での最大の予後規定因子は同時性あるいは異時性の肝転移で、外科切除や経皮的tumor ablation療法(エタノール注入、マイクロ波やラジオ波凝固、凍結手術、等)による転移結節の摘出或いは壊死に至らしめる治療法が第一義的に選択されている。しかし、これらの治療法が無効な症例や適応外症例に対しては、局所(免疫)化学療法や肝動脈塞栓術などが、薬剤到達経路や剤型の工夫により改善され、治療成績の向上がみられている。一方、教室では局所免疫化学療法の立場から、薬剤の標的指向性と目的組織停滞性及び放出制御能を高める目的で、drug delivery system(以下 DDS)に注目し、その剤型を種々模索・評価してきた。すなわち、DDSとしてのwater-in-oil(以下W/O)型エマルジョンにbiological response modifiers(以下BRMs)を封入する方法である。この場合、BRMsとして非特異的免疫賦活剤であるOK-432と抗腫瘍調節性サイトカインであるinterleukin 2(以下IL-2)を用い、これらを封入したW/O型エマルジョンの肝転移抑制効果につき種々検索し、その有用性を評価してきた訳である。そこで今回、申請者らはDDSの剤型の利点をさらに高める目的で、water-in-oil-in-water(W/O/W)型エマルジョンを新たに作製し、マウス大腸癌肝転移モデルを用いてBRMs封入DDSの抗腫瘍効果を転移結節数、肝脾リンパ球の細胞傷害活性及び病理組織学的所見から検索し、その有用性を評価した。

研究対象と研究方法

動物は雌性BALB/cマウスで、腫瘍は同系可移植性大腸癌株colon 26を用いた。DDSはOK-432, IL-2を溶解したiohexolとlipiodolを充填した2本のシリンジを三方活栓で連結し、pumpingする方法でエマルジョン化した。腫瘍移植方法は予め脾臓を皮下脱転後、 1×10^5 個のcolon 26を経門脈的に注入移植して肝転移モデルを作製し、DDSを移植直後に脱転脾内に注入投与し7日目に犠牲死させた。実験群はエマルジョンの種類(W/O/W型、W/O型)とOK-432のプライミングの有無からBILE-1,-2,-3群を、エマルジョン単独のILE群および生食単独のBS群の5群を作製し、肝転移結節数、肝および脾リンパ球のcolon 26及びYAC-1に対する細胞傷害活性(^{51}Cr release assay)、肝転移巣の病理組織学的所見(HE及びCD4,CD8免疫染色)を観察した。さらに、捕捉実験としてW/O/W型エマルジョン投与に伴う肝障害の程度をGOT,GPT値から評価し、W/O型エマルジョンと比較検討した。

研究結果

① 肝転移結節数はBILE-1群が 3.6 ± 1.1 、BILE-2群が 4.0 ± 1.3 、BILE-3群が 5.0 ± 1.6 とILE群の 9.1 ± 1.9 およびBS群の 11.1 ± 2.0 に比べとも有意($p < 0.05$)の抑制を示した。なお、BILE-1群、BILE-2群およびBILE-3群間で転移結節数に有意差はみられなかったが、抑制程度はこの順で高値を示した。なお、肝湿重量は各群間で差はみられなかった。② 肝リンパ球の細胞傷害活性：colon 26に対する特異的傷害活性は、BILE-1群が $7.51 \pm 0.62(\%)$ でBILE-2群の 6.29 ± 0.82 およびBILE-3群の 5.73 ± 0.58 に比べ有意($p < 0.05$)に高値であったが、BILE-2群と

BILE-3群間では有意差はみられなかった。また、BS群以外の4群はBS群に比べ全て有意($p < 0.01$)の高値を示した。YAC-1に対するNK活性は、BILE-1群が 17.82 ± 1.75 と他4群より有意($p < 0.01$)の高値で2倍以上の活性を示した。また、BILE-2群はBILE-3群、ILE群およびBS群に比べ有意($p < 0.05$)の高値を示した。③ 脾リンパ球の細胞傷害活性：colon 26に対する特異的傷害活性はBILE-1群が 9.55 ± 0.88 と最高値を示し、BILE-2、BILE-3、ILE、BS群の順に低値となったが、各群間全てに有意差($p < 0.01$)が認められた。YAC-1に対するNK活性はBILE-1群が 18.16 ± 1.42 と他の4群に比べ有意($p < 0.01$)の高値で、肝リンパ球のそれらとほぼ同様の傾向を示した。④ 肝転移結節の病理組織学的所見：平均腫瘍径はBILE-1群がBS群に比べ小さく、腫瘍径のばらつき幅も小さかった。リンパ球浸潤像はBILE-1群で転移結節とその周囲に観察されたが、BS群ではほとんど観察されなかった。なお、W/O/W型はW/O型に比べ正常肝組織の一部に壊死巣がみられたが、その程度はW/O/W型(BILE-1、-2、ILE群)の平均が $4.2 \pm 0.9(\%)$ でW/O型(BILE-3群)の 7.9 ± 1.3 に比べ有意($p < 0.01$)に軽度であった。⑤ 免疫組織染色所見：抗CD4抗体染色はBILE-1群、BILE-2群、BILE-3群、ILE群で転移結節周囲に陽性顆粒の発現が強くみられたが、結節から離れた部位では発現の減弱が観察された。結節周囲の発現はBILE-1群で特に顕著であった。抗CD8抗体染色はBILE-1群においてのみ陽性顆粒の発現がみられた。⑥ GOT、GPTは脾内注入後速やかに上昇し、一過性の肝障害が観察され3日後に前値に回復したが、上昇程度はW/O/W群がW/O群に比べ有意($p < 0.01$)に軽度であった。

考察と結語

BRMs封入W/O/W型エマルションは、既報のW/O型エマルションと同等ないし、これを上回る抗腫瘍効果を示し、副作用を軽減できる可能性が実験的に確認された。また、DDSの特性としての肝組織集積性と封入薬剤の徐放性は、W/O/W型がW/O型に比べ良好で、高い抗腫瘍効果をもたらす可能性が示された。なお、薬剤の組織集積性の観点から、W/O/W型エマルションはW/O型に比べ油滴径を標的臓器の脈管構造に合わせて随時制御できる可能性が高いため、臨床の現場で簡便に制御できるDDSとして、また薬剤保持性と安全性の面から、今後応用範囲が拡大するDDSとして期待されるものと思われた。

論文審査の結果の要旨

申請者 木村 敦は、免疫賦活剤、OK-432とIL-2をwater-in-oil-in-water型エマルションに封入するDDSを新たに作製し、その有用性をBALB/Cマウスにcolon26を経門脈的に注入移植して作製した肝転移モデルを用い検索し、従来のwater-in-oil型との間で比較検討した。その結果、新たに作製したDDSは肝転移抑制効果、肝及び脾リンパ球の特異的細胞傷害活性及びNK活性の何れも高値で、腫瘍浸潤リンパ球数及びCD4とCD8陽性細胞の発現が顕著で、かつ肝障害程度が軽度であることを明らかにした。これらの研究結果は腫瘍外科学、特に大腸癌術後の転移性肝癌の治療分野で少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

OK-432、IL-2封入W/O/W型徐放製剤の抗腫瘍効果について

Biotherapy. 2003 ; 17(1) : 65~74