

氏名 (本籍) 上 西 宏 (岐阜県)  
 学位の種類 博士 (医学)  
 学位授与番号 乙 第 1078 号  
 学位授与日付 平成 8 年 10 月 15 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とInterleukin 2を用いた内因性LAK誘導法に関する実験的研究  
 第 1 編 ラット癌性腹水に対する脾内投与の有用性について  
 第 2 編 転移性肝腫瘍に対する徐放性エマルジョン製剤脾内投与の有用性について  
 審査委員 (主査) 教授 佐 治 重 豊  
 (副査) 教授 高 見 剛 教授 大 谷 勲

### 論文内容の要旨

一般臨床で応用可能な癌免疫療法を目指して、biological response modifier (BRM) を一定方式で腫瘍支配血管内へ投与し、内因性に lymphokine activated killer (LAK) 細胞や cytotoxic T lymphocyte (CTL) を誘導する方法の有用性を実験的に検討した。研究 I では胃癌切除後の腹膜再発防止策として OK-432 と rIL-2 を術前経脾動脈的に脾内投与して脾細胞を活性化 (activated splenocyte: AS) し、この AS 細胞あるいは AS 細胞を rIL-2 で再刺激した LAK 細胞 (AS-LAK) を術直後および術後経日的に腹腔内反復移入する養子免疫療法 (AIT) を想定し、ラット癌性腹水モデルを用いて基礎的検討を行った。また、研究 II では Drug Delivery System (DDS) の概念を導入し、BRM を標的病巣へ選択的に到達させ、長時間作用させる目的で BRM-Iohexol-Lipiodol-Emulsion (BILE) を新たに作製した。次いで、この BILE を転移性肝癌モデルの皮下脱転脾内へ投与し、転移抑制程度から徐放化製剤 BILE を用いた内因性 LAK 誘導療法の安全性・有効性を検索し、ヒト癌治療における養子免疫療法の簡便化と労働力および経費の節減の可能性を模索した。

#### 研究対象と研究方法

実験動物は 4 週齢 Sprague-Dawley (SD) 系雌ラットを、実験腫瘍は MRMT-1 と YAC-1 を用いた。  
 研究 I :  $1 \times 10^6$  個の MRMT-1 を腹腔内注入移植して癌性腹膜炎モデルを作製した。次いで OK-432 と rIL-2 を一定方法で脾内投与して AS 細胞を、またこの AS 細胞を 500U/ml の rIL-2 で 3 日間培養刺激して AS-LAK 細胞をそれぞれ誘導し、その性格を種々検討した。治療効果は、ラット癌性腹水モデルに OK-432 と rIL-2 を脾内投与後、4 日間に脾摘して採取した AS 細胞と AS 細胞から誘導した AS-LAK 細胞を腹腔内養子移入し延命程度から評価した。  
 研究 II : 10KE の OK-432 と 10 万単位の rIL-2 を 0.1ml の RPMI-1640 液に溶解し、0.4ml の Iohexol と 1.5ml の lipiodol を添加・攪拌・乳化させ BILE を作製した。効果は 0.2ml の BILE を背部皮下移植 MRMT-1 の腫瘍内あるいは脱転脾内へ投与した場合の、採取脾細胞の細胞傷害活性増強程度から評価した。また、 $1 \times 10^6$  個の MRMT-1 を経門脈的に注入移植して作製したラット肝転移モデルに対し、0.2ml の BILE を脾内投与した場合の転移結節数抑制程度、経日的に採取した AS 細胞および末梢血単核球 (PBMC) の細胞傷害活性増強程度、Sudan III, HE, SU 染色による組織学的所見を検討した。

#### 研究結果

研究 I : 1) 癌性腹水ラットに OK-432 と rIL-2 を脾内投与した場合、生存曲線、脾湿重量、脾細胞数とも生食水脾内投与した対照群に比べ有意の差はみられなかった。2) YAC-1 細胞に対する脾細胞の NK 活性は、AS 細胞が対照群に比べ有意に高く、AS-LAK 細胞は AS 細胞に比べさらに高値を示した。MRMT-1 に対する自己腫瘍傷害活性は AS-LAK 細胞のみ高値を示した。3) 腹腔内中和試験で AS 細胞は対照群に比べ、AS-LAK 細胞は AS 細胞に比べ高い中和能を示した。4) OK-432 と rIL-2 を脾内投与した場合、対照群に比べ生存期間には著差はみられなかったが、4 日目に脾摘し誘導した AS 細胞および AS-LAK 細胞を腹腔内投与した場合には有意の延

長を示した。5) 腹腔内遊出細胞は、脾摘単独の場合はCD4とCD8陽性比率が漸減したが、AS細胞あるいはAS-LAK細胞を腹腔内移入した場合にはCD4とCD8陽性比率が14日目に有意に増加した。

以上の結果、ラット癌性腹膜炎に対して活性化脾細胞(AS)をrIL-2で再刺激して腹腔内投与する方法の有用性が示唆され、胃癌術後の腹膜再発予防策としての臨床応用の可能性が推察された。

研究Ⅱ：1) BILE腫瘍内投与後7日目および14日目でも、SudanⅢ染色およびSU染色でlipiodolおよびOK-432の残存が観察された。平均腫瘍径は生食群に比べ有意に低値で、高い生着阻害率を示した。2) 腫瘍皮下移植後BILEを脾内投与して採取したAS細胞は、MRMT-1に対し傷害活性の増強を殆ど示さなかった。3) 転移性肝癌モデルで、BILE脾内投与は生食群に比べ転移結節数を有意に抑制したが、従来のBRM溶液脾内投与に比べ有意差はみられなかった。4) YAC-1に対するNK活性はBILE群とBRM溶液群は生食群に比べPBMCでは有意に高く、脾細胞でも若干高値を示したが、何れもBILE群の活性のpeakはBRM溶液群に比べ遅延する傾向が観察された。5) BILE投与後14日目の組織像で、転移結節周囲に脂肪滴を貪食したマクロファージとSUの残存が観察された。

以上の結果、今回開発した徐放製剤BILEは、脾内投与により肝臓内で優れた局在性と停滞性を示したが、転移抑制効果は微弱で、原因として徐放化に伴う薬剤溶出性遅延の可能性が示唆された。

#### 考察と結語

一般臨床での養子免疫療法は医療経済的見地や手技の煩雑さから、現状ではヒト癌治療に対する貢献度は低いと考えられる。この反省から、著者は各種BRM製剤をラット脾内へ投与し、脾細胞や肝類洞細胞を賦活・活性化することにより内因性にLAKあるいはCTL細胞を誘導せんと試みた。研究ⅠではOK-432とrIL-2を一定の方法で脾内投与して内因性にAS細胞を誘導し、養子移入細胞の供給源としての有用性は示唆されたが、内因性のLAK(CTL)細胞を誘導することは困難であった。理由として、投与BRMの半減期や濃度の問題が推察された。そこで研究ⅡではBRM徐放化製剤BILEを新たに開発し、その有用性を種々評価した。その結果、腫瘍局所における薬剤溶出の面では若干課題が残り、投与後早期の活性増強が不十分であった。しかし、薬剤到達性、長期停滞性、安全性の面では優れており、今後locoregional immnotherapyとして期待される治療法に成長するものと考えている。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者上西 宏は、胃癌切除後の腹膜再発防止策としてOK-432とrIL-2の脾内投与により活性化した脾細胞あるいはこれをrIL-2で再刺激したLAK細胞を用いた腹腔内養子免疫療法の有用性を、ラット癌性腹水モデルを用いて基礎的に検討した。また、OK-432とrIL-2をiohexol-lipiodolでemulsion化することにより徐放製剤BILEを新たに作製し、これを用いた内因性LAK誘導療法の安全性・有効性を転移性肝癌モデルを用い検索した。これらの研究結果は、従来の養子免疫療法による医療経済的負担や人的負担を著しく改善可能で、腫瘍外科学の向上と癌患者の治療成績向上に少なからず寄与するものと認める。

#### [主論文公表誌]

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

第1編 ラット癌性腹水に対する脾内投与の有用性について

岐阜大医紀 44(3): 443~451, 1996

第2編 転移性肝腫瘍に対する徐放性エマルジョン製剤脾内投与の有用性について

岐阜大医紀 44(3): 452~461, 1996