

氏名(本籍) 田中千弘(岐阜県)
学位の種類 博士(医学)
学位授与番号 乙第1340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 マウス皮下腫瘍の二重移植系モデルを用いた凍結手術後の仮想転移巣に対する増殖抑制効果について
審査委員 (主査) 教授 佐治重豊
(副査) 教授 高橋優三 教授 柴田敏之

論文内容の要旨

悪性腫瘍に対する凍結手術は、腫瘍の凍結・融解処理による確実な腫瘍破壊に加え、凍結融解組織が体内に残留するため、これが徐々に吸収され抗腫瘍免疫反応が誘導される可能性が指摘され注目を集めている。しかし、凍結融解により誘導される腫瘍抗原は液性抗原のため、抗腫瘍性と腫瘍増殖性の二面性があり、さらに大きな腫瘍を一度に凍結融解するとhigh zone toleranceを誘起し免疫寛容状態を惹起する可能性が推察されている。そこで今回、申請者らはマウス皮下腫瘍を2か所に移植して原発巣と転移巣を作成する“二重移植系モデル(double tumor system)”を用い、原発巣を経皮的に凍結した場合の仮想転移巣の増殖に及ぼす影響を観察した。また、経時的に脾細胞を採取し、Concanavalin A(以下、Con-A)で刺激した場合のサイトカイン産生程度から、凍結手術後の免疫学的抗腫瘍効果の特徴と作用機序の解明を試みた。

研究対象と研究方法

6週齢の雄性BALB/cマウスにcolon 26細胞を、原発巣として左大腿部に 4×10^6 個を、転移巣として右大腿部に 0.8×10^6 個をそれぞれ皮下移植してdouble tumor systemを作製した。原発巣は、移植後12から14日目に長径約10mm(平均体積 380mm^3)となり、この時点で①無処置(対照)群、②凍結融解操作を1サイクル施行(Cryo.1)群、③2サイクル施行(Cryo.2)群、④2サイクル施行後残存凍結融解組織が $50 \sim 100\text{mm}^3$ となるように減量切除する(凍結後減量)群、および⑤外科的切除群に群分けした。また、double tumor systemの対照群として、右側大腿部のみに 0.8×10^6 個を皮下移植するsingle tumor (Single)群、および腫瘍凍結手術の対照群としてSingle群で対側大腿部の皮膚を約 1cm^2 皮下組織とともに2サイクルの凍結融解を施行する(Sham手術)群を設定した。なお、凍結手術は経皮的圧抵法で液体窒素を用い -170°C で60~90秒間凍結し、室温にて自然融解させる操作を1サイクルとし、腫瘍切除においては直上の皮膚も一括切除した。

検討項目は①各処置後、転移巣体積を7日目毎に測定した。②脾細胞のサイトカイン産生能は、1・3・7日目にマウスを犠牲死させ脾臓を無菌的に摘出後、脾リンパ球を分離しCon-Aを加えて培養し、上清中のinterferon(以下INF)- γ ・tumor necrosis factor(以下TNF)- α ・interleukin(以下IL)-4・IL-10・transforming growth factor(以下TGF)- β 1産生量をELISA法にて測定した。

研究結果

仮想転移巣の増殖曲線：①原発巣治癒例を対象に比較検討すると、切除群、Cryo.2群およびSham群とも対照群に比べ増殖促進様所見が観察された。また、Cryo.2群は、Sham群や対照群に比べ35日目の時点で有意($p < 0.01$)の増殖促進を示した。②凍結後減量群の増殖曲線は、移植後21日目以降でSham群($p < 0.05$)と、28日目以降では切除群($p < 0.01$)およびCryo.2群($p < 0.05$)との間に有意の増殖抑制を示し、この程度が35日目にはさらに増強した。③Cryo.1群は28日目以降で切除群・Cryo.2群との間に有意差($p < 0.05$)を認め、35日目にはこの傾向が

さらに増強した。

脾細胞のサイトカイン産生能：①処置後1日目のIL-4値は、Sham群、Cryo.2群および凍結後減量群が高値を示し、Single群($p<0.01$)およびCryo.1群($p<0.05$)との間に有意差がみられた。しかし、処置後3日および7日目には各群とも低下し、各群間での有意差は消失した。②IL-10値は、IL-4とほぼ同様の変化を示した。③INF- γ 値は、Sham群、切除群、Cryo.2群および凍結後減量群で処置後1日目に増加後、3日目で低値を示し、7日目にはCryo.2を除いて再度増加した。処置後7日目のCryo.2群は最も低値でSham群、切除群および凍結後減量群との間に有意差($p<0.01$)がみられた。④TNF- α およびTGF- β 1値は何れも低値で、各処置群間で有意な変動はみられなかった。⑤Th1/Th2バランスをINF- γ /IL-4比で代表すると、処置後1日目と3日目は10前後で各群間に差を認めなかった。しかし、処置後7日目の時点でCryo.2群はCryo.1群($p<0.05$)、および他の全群($p<0.01$)に比べ有意に低値で、凍結後減量群はSingle群($p<0.01$)、Sham群($p<0.01$)および切除群($p<0.05$)に比べ有意に高値であった。

考察と結語

免疫学的抗腫瘍効果の評価法として、近年、経時的に肉眼判定可能な人工的に皮下転移巣を作製する二重移植系モデルを用いた研究が増加し、凍結手術の分野でも本モデルの応用が散見される。今回の検討では、仮想転移巣の増殖は、1サイクルの不完全凍結群で増殖抑制が軽度観察されたが、完全凍結の2サイクル群では逆に増殖促進様所見が観察された。しかし、凍結後残存腫瘍を減量切除した群では有意に高い抗腫瘍効果を示した。この、Cryo.2群で増殖促進様所見を示した理由として、原発巣の腫瘍体積がマウスの体重に比べ相対的に巨大過ぎたため、凍結融解により産生された腫瘍抗原が過剰となりhigh zone toleranceを誘起した可能性が推察された。それゆえ凍結処置後、壊死組織を100mm³以下まで減量した場合に、高い抗腫瘍効果が観察されたのは了解可能と考えている。

一方、脾細胞のCon-A刺激によるサイトカイン産生能は、処置後1日目の時点ではCryo.1群を除く全ての群で、IL-4、L-10およびINF- γ とも無処置群のそれに比べ有意の高値で、手術侵襲による高サイトカイン血症状態と推察された。しかし、処置後3日目には前値レベルまで低下したが、7日目にはINF- γ が有意に増加し、Th1/Th2バランスが、とくに凍結後減量群で有意に増加した。すなわち、各処置後7日目の段階で、凍結後減量群と1サイクル凍結のCryo.1群はTh1優位状態に復帰したが、Cryo.2群は相対的Th2優位状態のままで、それゆえ仮想転移巣が増殖促進様所見を示したわけで、Th1/Th2バランスの変動による影響の可能性を推察したわけである。

以上の研究結果から、実地臨床で大きな腫瘍に対し凍結手術を施行する場合は、凍結壊死組織の大部分を減量切除するか、抗原吸収が困難な体表面露出腫瘍に限定すべきと考えている。今後は、細径プローブを用いた低侵襲性治療として、また、PSKなどのIL-6やIL-10の産生を抑制できる免疫賦活剤との併用などにより、凍結手術の臨床応用が高まるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 田中千弘は、マウス皮下腫瘍の二重移植系モデルを用い、凍結手術後の免疫反応を仮想転移巣の増殖抑制程度と脾細胞のサイトカイン産生能から検索・評価した。その結果、強大な腫瘍に対しては凍結手術後腫瘍の大部分を減量切除することで有意に高い抗腫瘍効果が誘導され、かかるマウスではTh1系優位状態が誘起される可能性を示唆した。これらの研究結果は腫瘍外科、とくに凍結療法の分野に少なからず寄与するものと認めらる。

[主論文公表誌]

マウス皮下腫瘍の二重移植系モデルを用いた凍結手術後の仮想転移巣に対する増殖抑制効果について

低温医学 2002; 28: 129~134