

## 臨床経験

# サイトカインの変動からみた免疫賦活併用凍結治療の 効果予測法について

岐阜大学腫瘍外科

野 中 健 一	長 田 真 二	奥 村 直 樹
坂 下 文 夫	松 井 康 司	杉 山 保 幸
佐 治 重 豊		

## Significances of Measurement of Cytokine Production for an Evaluation of Percutaneous Cryoablation with Use of Immunopotentiators

Kenichi NONAKA, Shinji OSADA, Naoki OKUMURA,  
Fumio SAKASHITA, Koji MATSUI, Yasuyuki SUGIYAMA  
and Shigetoyo SAJI

*Surgical Oncology, Gifu University School of Medicine*

免疫賦活剤polysaccharide-Kurehaと全身化学療法併用下の局麻下穿刺式凍結手術の治療効果予測を血清サイトカインの術後変動から検討した。PCSは穿刺式細径プローブからなる凍結装置を用いた。液体窒素を用い局所麻酔下に超音波ガイド下で週1度の割合で穿刺法にて凍結・融解し、有効例と無効例につき比較検討した。対象は切除不能胆管細胞癌の2例で、血中CRPとamyloid A値は治療後共に増加した。TNF- $\alpha$ 値は有効例では著明に上昇し、IL-10の発現が抑制され、IFN- $\gamma$ /IL-4比から評価したTh1/Th2比が高値を示した。しかし、無効例ではTNF- $\alpha$ の増加はみられず、IL-10が上昇しTh1/Th2比が低値のままであった。以上の結果、Th1/Th2比とサイトカイン値の術後推移から凍結手術の治療効果が予測可能と推察された。

**索引用語：**凍結治療 (cryoablation therapy), 免疫賦活剤 (immunopotentiators), サイトカイン (cytokines)

### はじめに

当科では切除不能進行・再発肝癌（転移性を含む）に対し、Quality of Life（以下QOL）重視の考えから、低侵襲療法である局麻下穿刺式凍結手術（Percutaneous Cryo-Surgery, 以下PCS）<sup>1)</sup>を積極的に採用してきた。また、2002年12月から経験した13例で術後サイトカインの変動を測定してきたが、その中で最近経験した切除不能胆管細胞癌の有効例と無効例で興味あるサイトカインの変動が観察された。未だ症例数が少ないので、この変動からPCS適応症例選択基準と効果予測を評

価することは困難ではあるが、その可能性を臨床経験として報告する。

### 対象と方法

**対 象：**症例1は74歳男性、症例2は64歳女性である。両例ともCT画像所見から胆管細胞癌と診断し、脈管侵襲程度等より切除不能と判断した。

PCSの方法は前川製作所で開発・試作された細径プローブからなる凍結装置（MYCOMクライオニードル治療用機器）を用い、十分なインフォームド Consentのもとで局所麻酔下に穿刺可能な病巣に対し、週1回を原則に超音波ガイド下穿刺

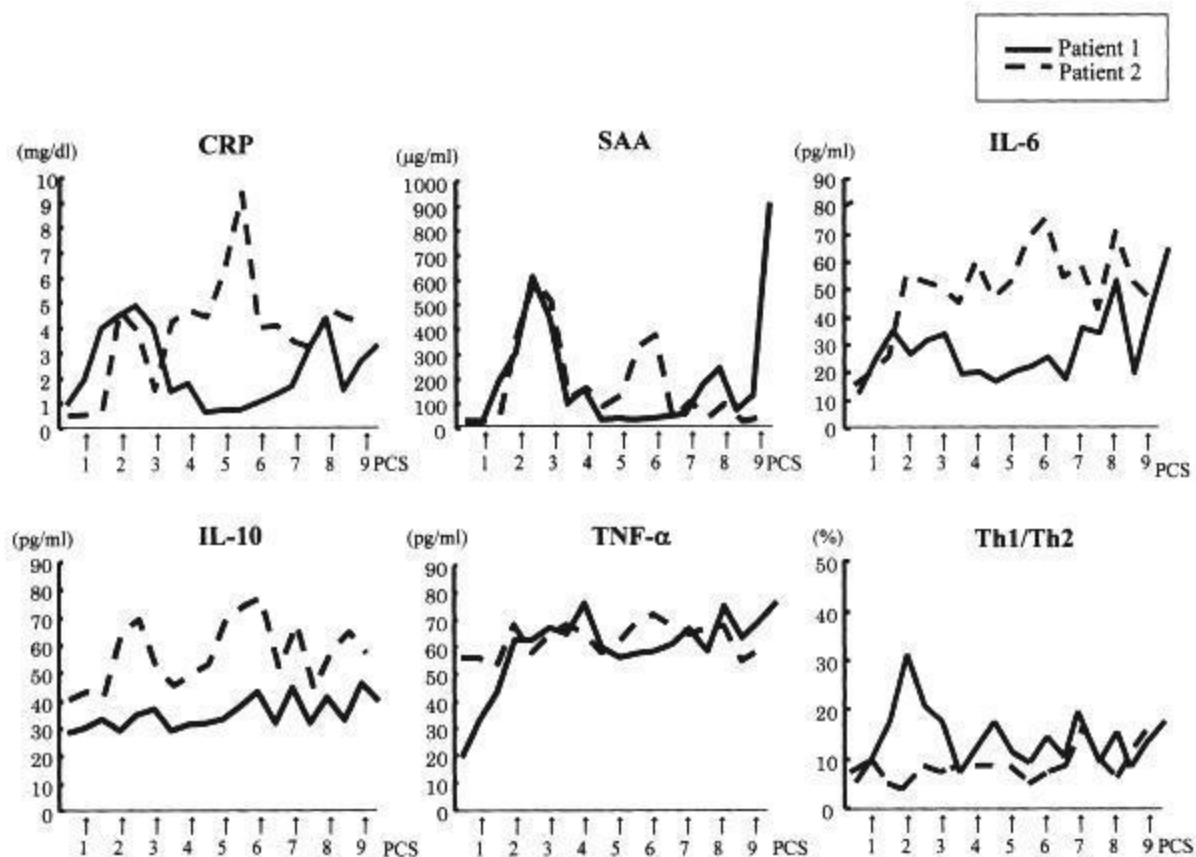


Fig. 1 Serial changes of serum CRP, SAA and cytokines following the PCS

CRP and SAA increased after PCS, and these proteins showed synchronous changes in both patients. The value of both IL-6 and IL-10, which are Th2 cytokines, showed fluctuated elevation in non responder case, patient 2. TNF- $\alpha$  level of responder case, patient 1 showed marked increase soon after the PCS. On the other hand, TNF- $\alpha$  of non responder case, patient 2 showed almost no changes. The Th1/Th2 balance showed marked increase in patient 1.

法で凍結・融解を繰り返した。なお、本装置を用いた液体窒素（ $-170^{\circ}\text{C}$ ）での15分間の凍結で径約3 cmのアイスボールが形成可能で、術中これを超音波上で確認できる点に本療法の利点と特徴がある。凍結は標的病巣を超える大きさのアイスボールが形成されるまで行い、5分間の融解を1サイクルとし、毎回これを3回繰り返した<sup>2)3)</sup>。また、補助療法としてPCS翌日に5-Fluorouracil 250 mg, Adriamycin 10 mg, Mitomycin-C 4 mgの化学療法1回/週と polysaccharide-Kreha（以下PSK）を3 g/日の連日内服を併用した。

**サイトカインの測定：**PCS前および翌日に血清を採取し、IFN- $\gamma$ /IL-4比からみたTh1/Th2比と serum amyloid A（以下SAA）はシオノギバイオメディカルラボラトリーズで、Interleukin（以下IL）-6, IL10, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ （以下TNF- $\alpha$ ）は教室でELISA法（R & D systems）にて測定し、CRPは当院検査値を用いた。

## 臨床経過と結果

**CT画像所見：**症例1（有効例）では、8回のPCS施行で肝内側区域から前区域にかけての腫瘍（Fig. 2a）は壊死状態となり著明に縮小した。この変化は治療対象病巣のみならず肝内全領域の転移巣にも壊死様所見が確認され（Fig. 2b）、治療中断2カ月後でも腫瘍縮小傾向が継続したので、免疫学的抗腫瘍効果の誘導が示唆された（Fig. 2c）。症例2（無効例）では、8回のPCS治療で肝左葉中心の腫瘍（Fig. 3a）は凍結局所で壊死像が観察された（Fig. 3b右）。しかし、凍結領域外病巣への凍結・壊死傾向は全くみられず（Fig. 3b左）、本人の希望で治療中断した。本例は2カ月後に主腫瘍の明らかな増大と新たな転移巣の出現およびCT上腹水が観察され腹膜播種と診断した（Fig. 3c）。

**腫瘍マーカーの変動：**症例1では carcinoembryonic antigen（以下CEA）と carbohydrate

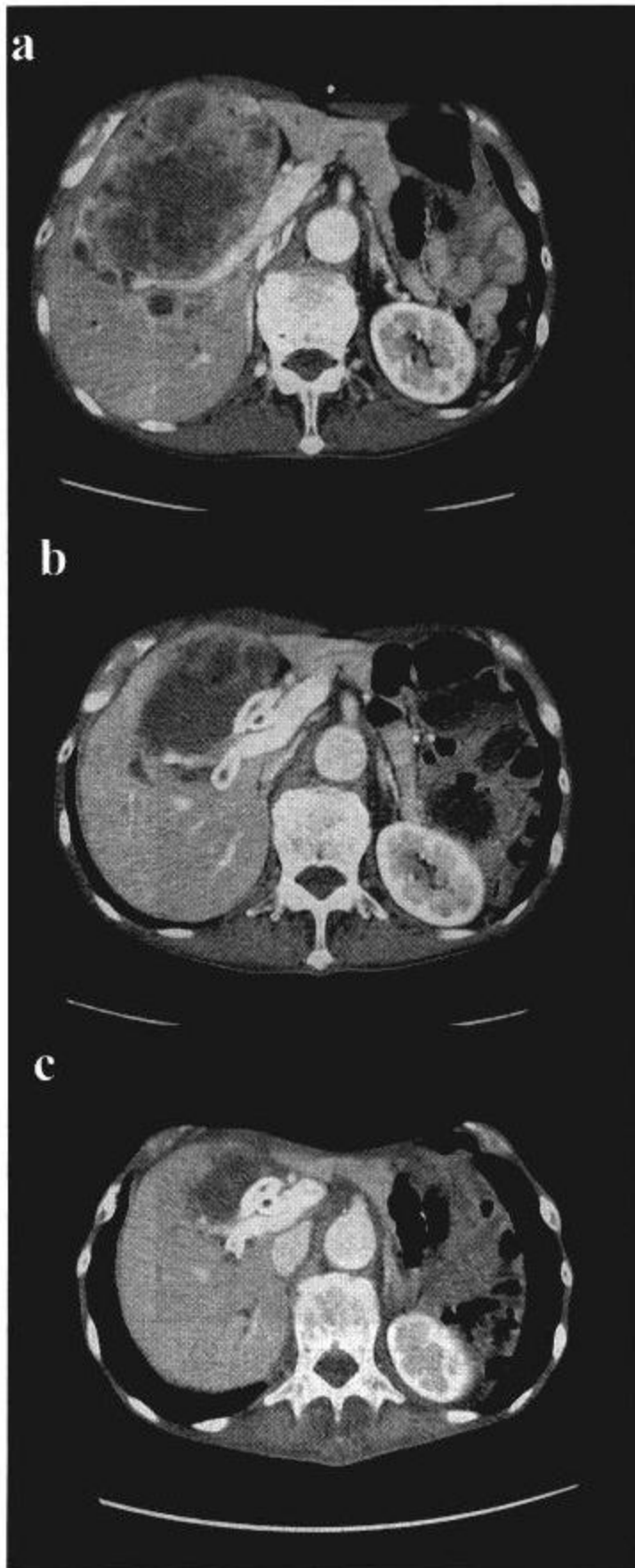


Fig. 2 The effects of PCS evaluated with CT (responder case, patient 1)

a) Before therapy at admission: The tumor invaded both internal and anterior segment of the liver. The degree of vascular invasion in the liver was very severe, and was considered as unresectable.

b) Abdominal CT after 4 courses of PCS therapy: the tumor extremely decreased in size.

c) Abdominal CT after 8 courses of PCS (on month two): The tumor almost disappeared even in the non PCS region.

antigen (以下CA19-9)は、治療前の18.4mg/mlと1792.5U/mlが8回のPCS後に1.7と21.6へと正常値まで低下した。症例2ではAlpha-Feto Protein (以下AFP)は430.9ng/mlから108.2へ、CA19-9は240.9から85.8と軽度の低下傾向がみられた。

**血清サイトカインの変動 (Fig. 1):** 血清IL-6とIL-10 (Th2系サイトカイン, pg/ml)はPCS後症例2では一貫して高値を示し、症例1では全期間を通して低値のままで推移した。一方、TNF- $\alpha$  (Th1系サイトカイン, pg/ml)は、症例1では施行前の21.0から増加し、治療開始後3回目で68.9と最高値に達し、以降この高値が維持された。症例2では開始時すでに56.3と高値を示していたが全経過中変動は少なく、この値(68.4)が維持されていた。IFN- $\gamma$ /IL-4比から計算したTh1/Th2比は、症例1では2回目治療後に30.2%とピーク値を示し以降治療前に比べ高値を示す傾向がみられた。しかし、症例2では明らかな増加はみられなかった。

なお、CRPとSAAは両側とも治療開始後2回目前後で増加し、特に、CRPは症例2で5回目治療後に、SAAは症例1で9回目治療後に急増した。

## 考 察

悪性腫瘍に対する凍結手術は、凍結部位の局所的な腫瘍破壊作用に加え、体内に残存した凍結壊死腫瘍組織が抗原として作用し、抗腫瘍免疫を誘導できる可能性が推察され、非凍結部位に対する抗腫瘍効果が期待されている<sup>4)</sup>。教室でも、凍結手術後の抗腫瘍免疫反応誘導の可能性を実験的・臨床的に種々検討し報告<sup>5)</sup>してきた。その中で、凍結条件によってはヒト癌でも抗腫瘍免疫が誘導できる可能性が確認できたので、OK-432やPSKなどの免疫賦活剤を併用投与することで相加的誘導作用<sup>6)</sup>の可能性を検討してきた。

一方、教室では末期・再発進行癌患者に対する抗癌療法の適応の有無を、入院治療前血清サイトカイン値から評価してきた。その結果、Th1/Th2比が2.0以下や、IL-10やIL-6値異常高値例では1～2カ月以内に死亡する例が多く、治療効果の期待が困難であった<sup>7)</sup>。一方文献ではTh1/Th2比が



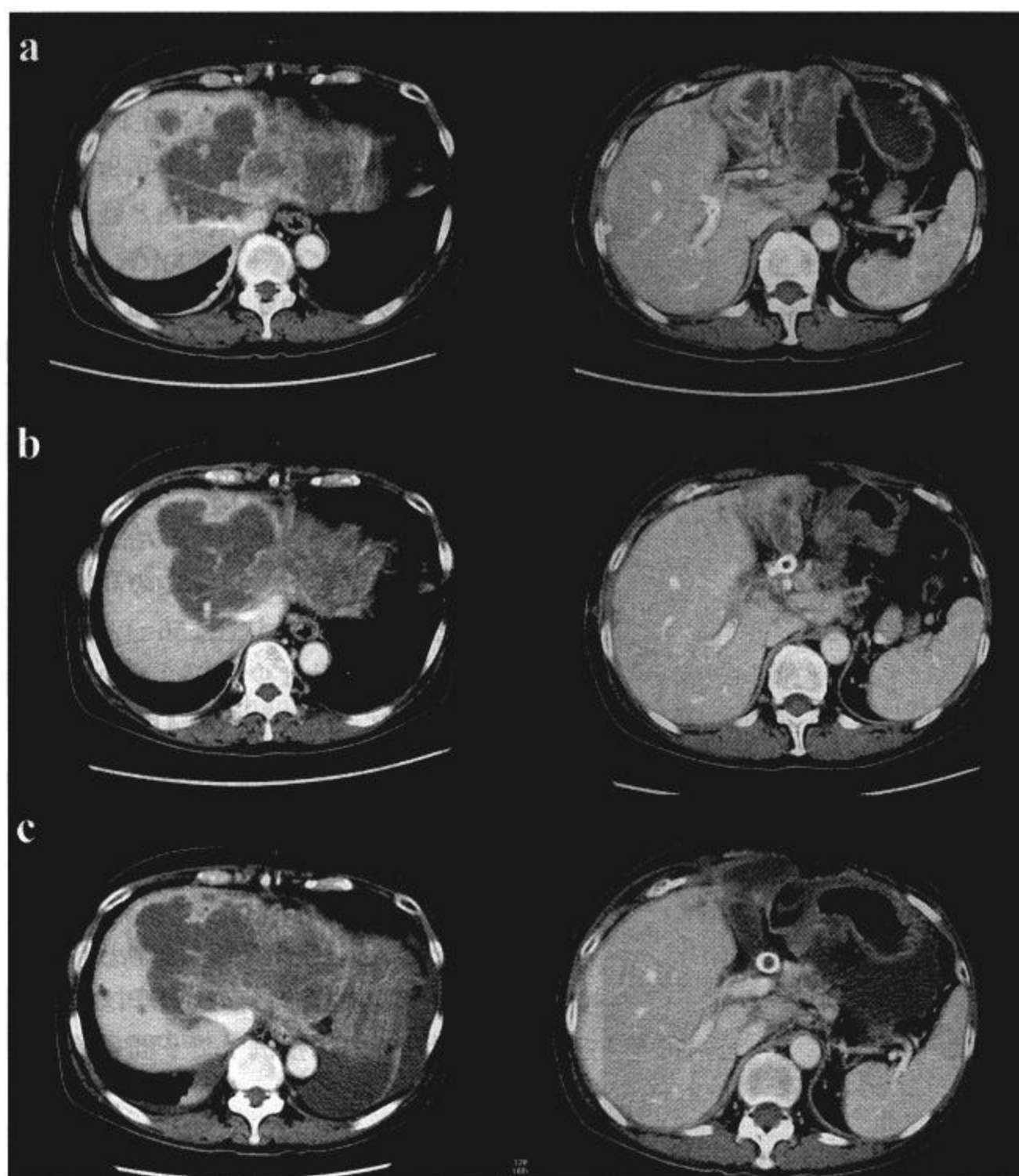


Fig. 3 The effects of PCS evaluated with CT (non responder case, patient 2).  
 a) Before therapy at admission: The tumor located predominantly in the left lobe of the liver, and was considered as unresectable due to severe vascular invasion.  
 b) Abdominal CT after 6 courses of PCS therapy: the tumor of the PCS region reduced in the size (right), but the other region showed enlargement (left).  
 c) Abdominal CT after last PCS (on month two): The tumor increased in size and observed the collection of ascites.

高値であると、予後が良いことが報告されている<sup>8)</sup>。そこで、PCS療法の適応と治療効果の予測を術後サイトカインの変動から推察する目的で、最近経験したPCS症例の中から有効例と無効例を抽出し比較検討した。すなわち、症例1では凍結局所のみならず非凍結部の腫瘍およびリンパ節にも縮小効果が確認されたが、症例2では凍結部の縮小と一時的な腫瘍マーカーの低下を認めたが、

非凍結部腫瘍は逆に増殖促進様傾向を示し、広汎な治療効果は観察されなかった。そこで、前者を有効例、後者を無効例としてサイトカインの変動から凍結治療の予測を試みた訳である。

SAAは一般的な炎症発現時に普遍的にみられる因子で、上昇率は90%と報告されており<sup>9)</sup>、CRPの23%、IL-6の42%に比べ明らかに高頻度である。また、SAAはリンパ球におけるTNF- $\alpha$ の産生

を促している」と報告されており<sup>10)</sup>、血中サイトカインの変動に関与している可能性が高い。自験例でもCRPおよびSAA値は治療に反応して上昇したことから、凍結壊死により炎症性サイトカインの誘導に始まる生体反応が確認された。一方、治療効果との関連では、有効例ではTNF- $\alpha$ がPCS後著明に増加したが、無効例ではほとんど変動が観察されなかった。また、抗腫瘍免疫反応誘導の有無を予測する方法として、Th1/Th2バランスが注目されている。すなわち、Th1系リンパ球はIFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ を誘導することで細胞性免疫による抗腫瘍効果と炎症効果を誘導し、Th2系リンパ球はIL-4, IL-6, IL-10などを誘導し液性免疫と抗炎症反応を誘導するなどが知られている。また、TNF- $\alpha$ は腫瘍細胞上のI型TNF受容体に結合することでapoptosisを誘導するほかに、腫瘍の出血性壊死<sup>11)</sup>や血管新生の抑制、腫瘍血管の閉塞<sup>12)</sup>などを誘起し、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。一方IL-10は、抗原提示細胞に作用してIL-12mRNAの発現の抑制<sup>13)</sup>、Natural Killer T細胞におけるIL-12受容体の発現抑制<sup>14)</sup>、IFN- $\gamma$ の産生抑制などの作用が報告されている。またIL-10は進行固形癌の独立した予後既定因子であり、腫瘍増殖のモニタリングに有用である<sup>15)</sup>と報告されている。さらにIL-6は、直接T細胞に働きかけてIFN- $\gamma$ の産生を抑制する<sup>16)</sup>。それゆえ、生体内でTNF- $\alpha$ 産生の亢進は抗腫瘍効果増強を示唆し、IL-6やIL-10の産生亢進はTh1系の発現を抑制し、腫瘍増殖促進の可能性を示唆していると解釈可能である。教室における過去の基礎的研究結果でも、凍結治療による抗腫瘍免疫賦活にはTh1系が優位であることが必要条件で、逆にTh2系優位の場合には抗腫瘍効果が低下する可能性を確認してきた<sup>5)</sup>。文献上でも、他の免疫賦活剤によりTh1/Th2が高値になると治療効果が上昇すると報告されている<sup>17)</sup>。

今回の症例では、CT画像所見からは局在・腫瘍径・形態などで著差はなく、治療効果の予測は困難であったが、IFN- $\gamma$ /IL-4比をTh1/Th2バランスとして検討した結果、症例1では凍結治療と化学療法による腫瘍壊死物質が何らかの誘因で、サイトカインバランスをTh1系優位に移行させ強力

な抗腫瘍効果を発揮したが、症例2ではIL-6やIL-10が過剰産生されTh2系優位となり、TNF- $\alpha$ 発現の誘導に繋がらず、抗腫瘍免疫を賦活し得なかったものと推察している。それゆえ、凍結治療後にTNF- $\alpha$ が増加し、Th1系優位に傾く場合は治療効果が期待できる可能性が推察されたので、術後血清サイトカイン測定意義が確認された。しかし、SAAとTNF- $\alpha$ の関連およびIL-6とIL-10抑制法などについても今後さらに症例数を増し検討する予定である。

## 結 語

切除不能肝腫瘍に対する局所療法として経皮的凍結治療の有用性を臨床経験として報告し、凍結腫瘍壊死組織から抗腫瘍免疫が誘導される可能性を示唆した。また、PCS後の血清サイトカインの変動から治療効果を予測できる可能性について検討した。

## 参考文献

- 1) 長田真二, 佐治重豊: 切除不能転移性肝癌に対する凍結治療の試み. 臨外58: 779-782, 2003
- 2) 長田真二, 八幡和憲, 棚橋利行他: 腫瘍免疫活性誘導併用凍結治療と化学療法が奏効した巨大肝腫瘍の1例. 日臨外会誌66: 1994-1999, 2005
- 3) 長田真二, 八幡和憲, 棚橋利行他: 胃癌肝転移再発に対する免疫賦活療法併用凍結治療の有用性. 日外科連会誌30: 203-209, 2005
- 4) Poston G: Cryosurgery for colorectal liver metastases. Hepatogastroenterology 48: 323-324, 2001
- 5) 田中千弘, 安江充里, 杉山保幸他: 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28: 129-134, 2002
- 6) Garcia-Lora A, Martinez M, Pedrinaci S, et al: Different regulation of PKC isoenzymes and MAPK by PSK and IL-2 in the proliferative and cytotoxic activities of the NKL human natural killer cell line. Cancer Immunol Immunother 52: 59-64, 2003
- 7) Yamamoto M, Nagao N, Sugiyama Y, et al: Significance of measuring serum cytokine level

- prior treatment for patients with far-advanced and/ or recurrent gastric cancer to predict survival periods. *Surg Today* (in press)
- 8) Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, et al: Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep* 13: 1153-1158, 2005
  - 9) Lannergard A, Friman G, Larsson A: Serum amyloid A: a novel serum marker for the detection of systemic inflammatory response in cystitis. *J Urol* 170: 804-806, 2003
  - 10) Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP, et al: Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunol Lett* 91: 33-37, 2004
  - 11) Creasey AA, Reynolds MT, Laird W: Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 46: 5687-5690, 1986
  - 12) Renard N, Nooijen PT, Schalkwijk L, et al: VWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF alpha. *J Pathol* 176: 279-287, 1995
  - 13) D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, et al: Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178: 1041-1048, 1993
  - 14) Wu C, Warriar RR, Wang X, et al: Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 27: 147-154, 1997
  - 15) De Vita F, Orditura M, Galizia G, et al: Serum interleukin-10 is an independent prognostic factor in advanced solid tumors. *Oncol Rep* 7: 357-361, 2000
  - 16) Tomura M, Natatani I, Murachi M, et al: Suppression of allograft responses induced by interleukin-6, which selectively modulates interferon-gamma but not interleukin-2 production. *Transplantation* 64: 757-763, 1997
  - 17) Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, et al: Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 25: 443-449, 2005