

## Biological response modifier (BRM) の腫瘍内投与 および全身投与を併用した癌治療に関する研究

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薫三教授)

村 上 努 士

(平成 7 年 11 月 1 日受稿)

**Key words :** biological response modifier (BRM), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),  
tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), OK-432, Shwartzman 反応

### 緒 言

癌に対する宿主の多面的な生物学的反応を修飾することにより治療効果を得ようとする物質あるいは試みは、biological response modifier (BRM) と呼ばれている。サイトカインは本来生体内で産生される物質であり BRM のひとつに数えられている。近年、大量細胞培養技術の進歩、遺伝子組み換え技術の応用により種々のサイトカインが量産されるようになり、基礎的研究が進みサイトカインが多面的な細胞機能制御因子である事が明らかにされた。サイトカインの、いくつかのものは直接、細胞増殖阻害あるいは細胞傷害活性を持つが、サイトカインは一般に独立に作用するだけではなく、複雑な相互依存関係にあるネットワークとして作用する。ある一つのサイトカインの投与は生体内で、他のサイトカインを誘導したり、他のサイトカインに顕著な影響を及ぼす。このような性質上、サイトカインは組み合わせ使用の方が、単独で使用するよりも目的とする効果を増強する可能性がある<sup>1)2)3)</sup>。溶連菌製剤である OK-432 は宿主の免疫系を刺激し、種々のサイトカインの産生を誘導する強力な BRM として知られている<sup>4)5)</sup>。OK-432 の抗腫瘍効果は BRM として作用するサイトカインの産生を誘導することにより発揮されると考えられている。

interleukin-1 (IL-1) の産生は抗原、毒素、損傷、炎症過程、および interferon (IFN) や tumor necrosis factor (TNF)<sup>6)</sup> などの他のサ

イトカインによって誘導される。IL-1 は、アミノ酸配列の異なる IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の 2 種類が存在し、胸腺細胞、骨髓系造血細胞の増殖促進作用のほかリンパ球活性化、炎症反応増強作用、神経内分泌系の調節作用など多彩な生物学的活性を持つことが知られている。IL-1 には単独投与で抗腫瘍効果が存在し、皮膚悪性リンパ腫、神経膠芽腫、乳癌などに有効例が認められている<sup>7)</sup>。

TNF はマクロファージ由来の Meth A 肉腫の出血性壊死を引き起こす因子として報告された<sup>8)</sup>。この TNF は同一容体に結合し生物活性を共有する lymphotoxin (TNF $\beta$ ) として区別して TNF $\alpha$  と呼ばれる。TNF $\alpha$  の作用は腫瘍細胞に限らず多種類の正常細胞におよび、その中でも炎症反応に大きく関与するため IL-1 とともに炎症性サイトカインに分類されている。

Shwartzman<sup>9)</sup> は、少量のチフス菌の培養濾液を皮内に注射し、24 時間後に皮内注射に用いたものと同じ濾液を静脈内に投与すると、最初の注射部位に出血壊死を伴う急性炎症反応が生じることを報告した。Beck ら<sup>10)</sup> は、IL-1 を家兎の健常皮内に注射し、24 時間後に大腸菌由来の endotoxin を静脈内に投与して IL-1 の局注部位に急性炎症を誘導しうる事を示し、チフス菌の培養濾液以外でも局所 Shwartzman 反応が惹起されることを明らかにした。

この現象が正常皮膚だけでなく腫瘍組織において惹起されうるものであるならば、ヒト腫瘍の治療に応用できると考えられる。そ

こで、臨床的に抗腫瘍効果が検討されているサイトカインである IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  の局所投与と、すでに臨床的に使用されている細菌製剤 OK-432 の静脈投与を併用して、その腫瘍治療効果をマウスを用いて検討した。さらに OK-432 の代わりに組成が同定されておりサイトカインとしてより直接的な作用を期待できる TNF $\alpha$  を静脈内投与にも併用して、その抗腫瘍効果をマウスを用いて検討した。

## 材 料 と 方 法

### 1. 使用動物

6週齢の C3H/HeN 雌性マウスを使用し、岡山大学動物実験施設において、通常の条件下で飼育した。

### 2. 腫 瘍

マウス肝細胞癌由来細胞株 MH-134<sup>11)</sup> を使用し、その  $1 \times 10^6$  個をマウス皮下に接種して腫瘍を作成した。

### 3. 薬 剤

OK-432 は中外製薬（東京）より供与されたものを使用した。ヒト天然型 TNF $\alpha$  は林原生物科学研究所（岡山）から供与された。比活性は  $5 \times 10^7$  U/mg protein である。ヒト遺伝子組み換え型 IL-1 $\beta$  は大塚製薬（東京）より供与されたものを使用した。比活性は  $5 \times 10^7$  IU/mg protein である。

### 4. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ および OK-432 投与方法

IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g と TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g を生理食塩水 0.2ml に溶解し、マウスの健常皮膚あるいは背部皮下に移植した腫瘍内に局所投与し、24時間後に OK-432 0.1KE (1 KE に乾燥菌体 0.1mg を含有する) あるいは TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g を生理食塩水 0.5 ml に溶解して、尾静脈より静脈内投与した。局所投与および静脈内投与の対照として生理食塩水のみを使用した。サイトカインと OK-432 による治療は、腫瘍接種 7 日後（平均直径 6.5mm）より開始し、その後 7 日毎に繰り返した。

### 5. 組織学的検索

サイトカインを局所投与した健常皮膚および腫瘍組織を 20% ホルマリンにて 8 時間固定し、99.5% アルコールで 9 時間脱脂し、99% クロロホルムで 4 時間脱水した後にパラフィンで 4 時

間包埋し、3 $\mu$ m の厚さに切り出した。これをヘマトキシリン・エオジン染色した後に検鏡した。

### 6. 抗腫瘍効果の評価

腫瘍の最長径を同一測定者が、ノギスを用いて計測した。また、同時に担癌マウスの生存日数を測定した。

### 7. 統計処理

腫瘍径の有意差検定には t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。生存期間の有意差検定には generalized Wilcoxon 法を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 局所投与, OK-432 静脈内投与のマウスの健常皮膚に及ぼす影響

IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g と TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g をマウスの背部皮内に局所投与し、24時間後に OK-432 0.1KE を静脈内投与した。その 6 時間後には、IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を局所投与した部位に出血壊死を伴う潰瘍形成が認められ、24時間後に最大に達し、4 日後に痂皮を形成して、10 日後には瘢痕を残して治癒した (Fig. 1)。

OK-432 投与 24 時間後の IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  の局所投与部位の皮膚組織像では浮腫、肥厚が認められ、表皮が一部脱落し壊死像を呈し、潰瘍を形成していた。更に表皮および真皮に好中球が浸潤し、急性皮膚炎症像を呈していた。これに対し局所皮内に TNF $\alpha$  を単独で皮内に投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与したマウスでは、局所投与部位に炎症所見を認めなかった。IL-1 $\beta$  を単独で皮内に投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与したマウスでも同様の反応が認められたが、その程度は軽度であった。IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  とを皮内に投与し、24時間後に生理食塩水を静脈内投与したマウスでは、局所投与部位に発赤を認めたが潰瘍形成は認められなかった。

### 2. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 局所投与, OK-432 静脈内投与の併用による抗腫瘍効果

#### 1) 病理組織像

マウスの背部皮下に MH-134 細胞を移植して作成した腫瘍内に IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g と TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g を局所投与し、24時間後に OK-432 0.1

KE を静脈内投与した。その24時間後の腫瘍の病理組織像では腫瘍は広範に核溶解を起こし壊死に陥っていた。これに対し腫瘍内に TNF



Fig. 1 健常背部皮内の IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  局所投与24時間後に OK-432 を静脈内投与し、その24時間後の局所投与部位に生じた潰瘍の肉眼像

$\alpha$  を単独投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与したマウスの腫瘍に壊死性変化は認めなかった (Fig. 2)。IL-1 $\beta$  を単独で腫瘍内に投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与したマウスの腫瘍にも壊死像が認められたが、その程度は、TNF $\alpha$  を併用したマウスに比べ軽度であった。IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を腫瘍内投与し、生理食塩水を静脈内投与したマウスでは、腫瘍の壊死は認められなかった。OK-432 静脈内投与のみを行ったマウスの腫瘍には、壊死性変化は認められなかった。

## 2) 腫瘍径に及ぼす効果

IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g と TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g を局所投与し、OK-432 を静脈内投与するときに投与量を 0.01, 0.05, 0.1KE で実施した。この時のマウスの腫瘍接種後28日目の平均腫瘍径は、それぞれ35.8 $\pm$ 5.2mm, 27.7 $\pm$ 4.9mm, 26.7 $\pm$

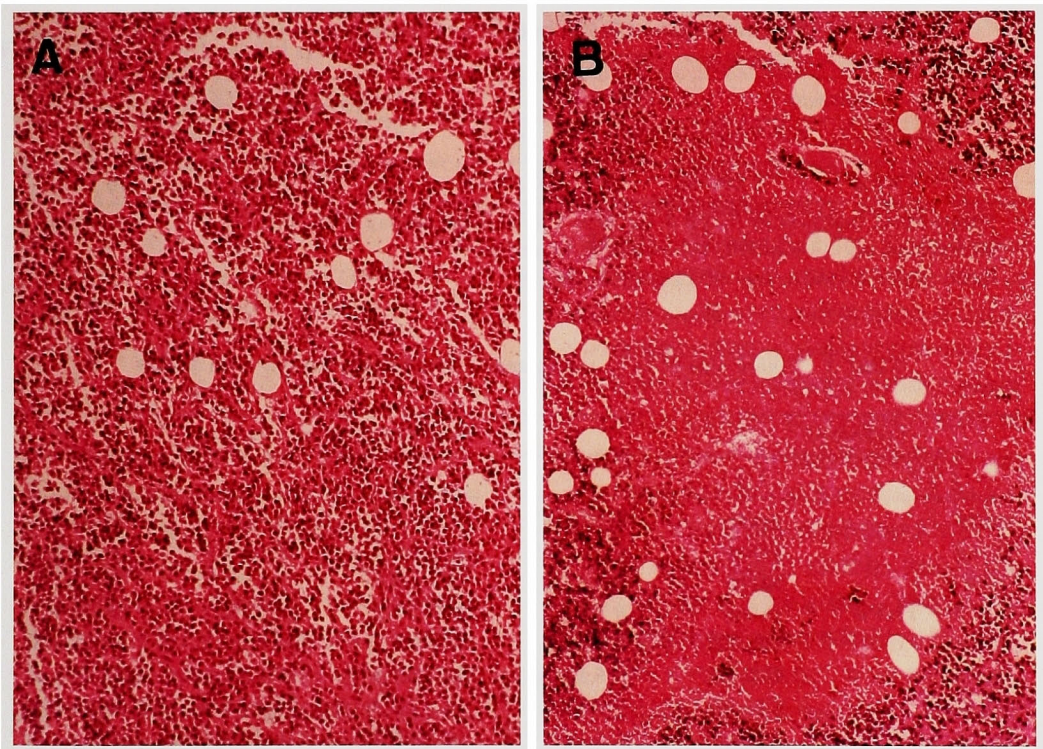


Fig. 2 腫瘍治療後組織像

A : 接種後7日目の腫瘍内に TNF $\alpha$  を投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与し、その24時間後の腫瘍組織像 ( $\times 50$ )。

B : 接種後7日目の腫瘍内に IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与し、その24時間目の腫瘍組織像 ( $\times 50$ )。

4.3mmであり、OK-432の投与量が0.1KEのときに最も腫瘍の増殖を抑制した (Table 1)。さらに OK-432の投与量を1KEまで増量すると投与したマウスの20-40%が OK-432 静脈内投与24時間以内に死亡した。

OK-432の静脈内投与を行わず、IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g単独、TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g単独、および同量の IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$ の局所投与によって治療したマウスの腫瘍接種後28日目の平均腫瘍径は、各々38.4 $\pm$ 5.4mm, 39.2 $\pm$ 4.3mm, 38.2 $\pm$ 4.9mmであり、局所および静脈内投与に生理食塩水を投与した、対照マウス腫瘍径40.3 $\pm$ 4.8mmと有意差は認められなかった。OK-432 0.1KEの静脈内投与のみによって治療したマウスの腫瘍径は35.6 $\pm$ 5.8mmであり、対照マウスとの有意差は認められなかった。TNF $\alpha$ 局所、OK-432静脈内投与治療マウスの腫瘍径は34.1 $\pm$ 4.8mm

であり、対照マウスとの有意差は認められなかった。IL-1 $\beta$ 局所、OK-432静脈内投与治療マウスの腫瘍接種後21日目、28日目の腫瘍径は、各々19.4 $\pm$ 4.5mm, 29.2 $\pm$ 4.7mmであり、対照マウスおよびOK-432静脈内投与治療マウスに比べ有意に低値であった (21日目  $p < 0.05$ , 28日目  $p < 0.01$ )。IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$ 局所、OK-432静脈内投与治療マウスの腫瘍接種後21日目、28日目の腫瘍径は、各々16.8 $\pm$ 4.2mm, 25.2 $\pm$ 4.7mmであり、IL-1 $\beta$ 局所、OK-432静脈内投与治療マウスに比べさらに低値であったが、その両者に有意差は認められなかった (Table 2)。

### 3) 生存日数に及ぼす効果 (Fig. 3)

OK-432の静脈内投与を行わず、IL-1 $\beta$ 単独、TNF $\alpha$ 単独、IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$ の局所投与によって治療したマウスの平均生存日数は、

Table 1 Dose response of OK-432 in local and systemic combination therapy

| Treatment                   |                  | Dose of OK-432 (KE)         |                |                |
|-----------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| I T <sup>a</sup>            | I V <sup>b</sup> | 0.01                        | 0.5            | 0.1            |
| IL-1 $\beta$ + TNF $\alpha$ | OK-432           | 35.8 $\pm$ 5.2 <sup>c</sup> | 27.7 $\pm$ 4.9 | 26.7 $\pm$ 4.3 |

<sup>a</sup> intratumoral injection of IL-1 $\beta$  0.1 $\mu$ g plus TNF $\alpha$  0.1 $\mu$ g on day 7, 14, and 21.

<sup>b</sup> intravenous injection of OK-432 on day 8, 15, and 22.

<sup>c</sup> mean tumor diameter (mm) of 10 mice on day 28.

Table 2 Tumor size of local and systemic combination therapy with BRMs

| Treatment                   |                  | Days after tumor inoculation |                |                  |                   |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|----------------|------------------|-------------------|
| I T <sup>a</sup>            | I V <sup>b</sup> | 7                            | 14             | 21               | 28                |
| saline                      | saline           | 6.5 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>   | 17.1 $\pm$ 2.9 | 29.0 $\pm$ 4.3   | 40.3 $\pm$ 4.8    |
| IL-1 $\beta$                | saline           | 6.5 $\pm$ 1.6                | 16.3 $\pm$ 3.2 | 27.6 $\pm$ 4.8   | 38.4 $\pm$ 5.4    |
| TNF $\alpha$                | saline           | 6.6 $\pm$ 2.1                | 16.0 $\pm$ 3.6 | 27.8 $\pm$ 4.2   | 39.2 $\pm$ 4.3    |
| IL-1 $\beta$ + TNF $\alpha$ | saline           | 6.5 $\pm$ 1.5                | 15.8 $\pm$ 3.3 | 27.1 $\pm$ 4.3   | 38.2 $\pm$ 4.9    |
| saline                      | OK-432           | 6.5 $\pm$ 1.8                | 14.9 $\pm$ 3.1 | 26.8 $\pm$ 4.2   | 35.6 $\pm$ 5.8    |
| IL-1 $\beta$                | OK-432           | 6.6 $\pm$ 1.7                | 13.1 $\pm$ 3.6 | 19.4 $\pm$ 4.5 * | 29.2 $\pm$ 4.7 ** |
| TNF $\alpha$                | OK-432           | 6.6 $\pm$ 2.3                | 14.3 $\pm$ 3.3 | 24.5 $\pm$ 4.1   | 34.1 $\pm$ 4.8    |
| IL-1 $\beta$ + TNF $\alpha$ | OK-432           | 6.5 $\pm$ 1.7                | 10.9 $\pm$ 3.5 | 16.8 $\pm$ 4.2 * | 25.2 $\pm$ 4.7 ** |

<sup>a</sup> intratumoral injection

<sup>b</sup> intravenous injection

<sup>c</sup> mean tumor diameter (mm) of 10 mice

\*  $p < 0.05$  vs saline (IT) plus OK-432 (IV)

\*\*  $p < 0.01$  vs saline (IT) plus OK-432 (IV)

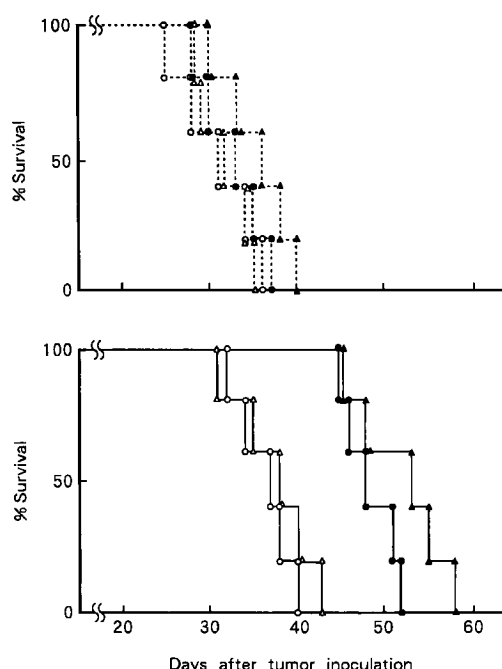


Fig. 3 Survival of local and systemic combination therapy with BRMs.

○—○ : saline (intratumoral : IT) plus saline (intravenous : IV).  
 ●—● : IL-1 $\beta$  (IT) plus saline (IV).  
 △—△ : TNF $\alpha$  (IT) plus saline (IV).  
 ▲—▲ : IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  (IT) plus saline (IV).  
 ○—○ : saline (IT) plus OK-432 (IV).  
 ●—● : IL-1 $\beta$  (IT) plus OK-432 (IV).  
 △—△ : TNF $\alpha$  (IT) plus OK-432 (IV).  
 ▲—▲ : IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  (IT) plus OK-432 (IV).

各々 $32.6 \pm 2.9$ 日,  $31.4 \pm 3.1$ 日,  $35.4 \pm 3.6$ 日であり, 局所および静脈内投与に生理食塩水を投与した対照マウス生存日数 $30.8 \pm 4.0$ 日と有意差は認められなかった. OK-432 の静脈内投与のみによって治療したマウスの生存日数は $36.2 \pm 4.2$ 日であり, 対照マウスとの有意差は認められなかった. TNF $\alpha$  局所, OK-432 静脈内投与治療マウスの生存日数は $37.4 \pm 4.1$ 日であり, 対照マウスとの有意差は認められなかった. IL-1 $\beta$  局所, OK-432 静脈内投与治療マウスの生存日数は $48.4 \pm 2.7$ 日であり, 対照マウスおよび OK-432 静脈内投与治療マウスに比べ有意に延長した ( $p < 0.01$ ). IL-1

$\beta$  + TNF $\alpha$  局所, OK-432 静脈内投与治療マウスの生存日数は $51.8 \pm 4.7$ 日であり, IL-1 $\beta$  局所, OK-432 静脈内投与治療マウスに比べさらに延長したが, その両者に有意差は認められなかった. 以上の結果よりそれぞれの単独投与では抗腫瘍効果の認められない少量のサイトカイン局所投与と OK-432 の静脈内投与を併用することにより, 有意な抗腫瘍効果が認められた. 以上の実験は3回繰り返ししたがいずれも同様の結果が得られた.

### 3. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 局所投与, TNF $\alpha$ 静脈内投与の併用による抗腫瘍効果

これまで Shwartzman 反応を誘起するために静脈内投与される物質は細菌由来物質が用いられてきたが, その有効成分と考えられる細菌内毒素は強力な TNF $\alpha$  誘導作用を持つことが知られている<sup>9)</sup>. OK-432 抗腫瘍効果の少なくとも一つはその TNF $\alpha$  誘導作用にあると考えられている<sup>12)</sup>. そこで IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  の腫瘍内投与と TNF $\alpha$  の静脈内投与の併用による抗腫瘍効果を検討した.

#### 1) 腫瘍径に及ぼす効果 (Table 3)

TNF $\alpha$  の静脈内投与のみによって治療したマウスの腫瘍接種後14日目, 21日目, 28日目の腫瘍径は, 各々 $14.2 \pm 2.7$ mm,  $25.2 \pm 3.7$ mm,  $32.6 \pm 3.8$ mmであった. TNF $\alpha$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの腫瘍接種後28日目までの腫瘍径は TNF $\alpha$  の静脈内投与のみによって治療したマウスの腫瘍径との間に有意差は認められなかった. IL-1 $\beta$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの腫瘍接種後21日目, 28日目の腫瘍径は, 各々 $15.8 \pm 3.8$ mm,  $25.0 \pm 3.9$ mmであり, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスに比べ有意に低値であった (21日目, 28日目  $p < 0.01$ ). IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの腫瘍接種後14日目, 21日目, 28日目の腫瘍径は, 各々 $9.8 \pm 2.5$ mm,  $14.2 \pm 3.3$ mm,  $23.8 \pm 3.9$ mmであり, TNF $\alpha$  静脈内単独投与治療マウスに比べ有意に低値であった (14日目  $p < 0.05$ , 21日目, 28日目  $p < 0.01$ ). またこの場合, IL-1 $\beta$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスに比べさらに低値であったが, その両者に有意差は認められなかった.

Table 3 Tumor size of local and systemic combination therapy with IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ 

| Treatment                   |                  | Days after tumor inoculation |                 |                   |                   |
|-----------------------------|------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| I T <sup>a</sup>            | I V <sup>b</sup> | 7                            | 14              | 21                | 28                |
| Saline                      | TNF $\alpha$     | 6.5 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>   | 14.2 $\pm$ 2.7  | 25.2 $\pm$ 3.7    | 32.6 $\pm$ 3.8    |
| IL-1 $\beta$                | TNF $\alpha$     | 6.7 $\pm$ 1.2                | 10.2 $\pm$ 2.2  | 15.8 $\pm$ 3.8 ** | 25.0 $\pm$ 3.9 ** |
| TNF $\alpha$                | TNF $\alpha$     | 6.3 $\pm$ 1.1                | 12.2 $\pm$ 2.6  | 22.6 $\pm$ 2.8    | 30.2 $\pm$ 3.3    |
| IL-1 $\beta$ + TNF $\alpha$ | TNF $\alpha$     | 6.5 $\pm$ 1.5                | 9.8 $\pm$ 2.5 * | 14.2 $\pm$ 3.3 ** | 23.8 $\pm$ 3.9 ** |

<sup>a</sup> intratumoral injection<sup>b</sup> intravenous injection<sup>c</sup> mean tumor diameter (mm) of 10 mice\* p<0.05 vs saline (IT) plus TNF $\alpha$  (IV)\*\* p<0.01 vs saline (IT) plus TNF $\alpha$  (IV)

た。

## 2) 生存日数に及ぼす効果 (Fig. 4)

TNF $\alpha$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの生存日数38.0 $\pm$ 4.6日であり, TNF $\alpha$  の静脈内投与のみによって治療したマウスの生存日数37.6 $\pm$ 4.8日との間に有意差は認められなかった. IL-1 $\beta$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの生存日数は49.6 $\pm$ 3.9日であり, TNF $\alpha$  静脈内単独投与治療マウスに比べ有意に延長していた(p<0.01). IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  局所, TNF $\alpha$  静脈内投与治療マウスの生存日数は53.2 $\pm$ 4.9日であり, TNF $\alpha$  静脈内単独投与治療マウスに比べ有意に延長していた(p<0.01). またこの場合, IL-1 $\beta$  局所, TNF $\alpha$

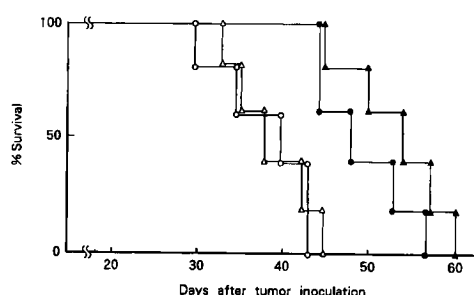


Fig. 4 Survival of local and systemic combination therapy with IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ .  
 ○—○: saline (intratumoral: IT) plus TNF $\alpha$  (intravenous: IV).  
 ●—●: IL-1 $\beta$  (IT) plus TNF $\alpha$  (IV).  
 △—△: TNF $\alpha$  (IT) plus TNF $\alpha$  (IV).  
 ▲—▲: IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  (IT) plus TNF $\alpha$  (IV).

静脈内投与治療マウスに比べさらに延長していたが, その両者に有意差は認められなかった. 以上の実験は3回繰り返したがいずれも同様の結果が得られた.

## 考 察

IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  の局所投与と24時間後の OK-432 の全身投与を併用する事によって, マウスの皮膚に出血を伴う潰瘍を形成し, チフス菌培養濾液や endotoxin を使用して惹起される局所 Shwartzman 反応と同様の現象を誘導することが可能であった. さらに同様の BRM をマウスの背部皮下に移植した腫瘍内に局所投与し, その後全身投与を付加することにより腫瘍の増殖を抑制し, 生存日数をも延長させた. しかし局所投与に使用した量の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  を単独で局所投与し, 全身投与を併用しなかった場合には抗腫瘍効果は認められなかった. また OK-432 の全身投与のみでも抗腫瘍効果は得られなかった. IL-1 $\beta$  の局所投与に TNF $\alpha$  を加え OK-432 の静脈内投与を併用した場合に最も強い抗腫瘍効果が認められ, TNF $\alpha$  の単独局所投与と OK-432 の静脈内投与の併用では治療効果が認められなかった. OK-432 が誘導するサイトカインの中で TNF $\alpha$  を選択して OK-432 の代わりに静脈内投与しても同様の抗腫瘍効果を認めしたが, 局所投与には単独投与の場合でも他の薬剤と併用した場合でも IL-1 $\beta$  が必要であった.

Shwartzman<sup>9)</sup> は, 少量のチフス菌の培養濾液を皮内に注射し, 24時間後に皮内注射に用いた

ものと同じ濾液を静脈内投与すると、皮内注射部位に出血壊死を伴う急性炎症反応が生じることを報告し、この反応は局所 Shwartzman 反応と呼ばれている、この反応は、局所投与に IL-1 を用い静脈内投与に endotoxin を用いても惹起しうることが報告されており<sup>10)</sup>、この場合 IL-1 局注部には、時間経過とともに好中球の集積が認められる。この好中球の局所集積により組織破壊反応の準備状態が形成され、本実験では、elicitation 刺激である、24時間後の OK-432 あるいは TNF $\alpha$  の静脈内投与により局所の出血壊死が生じると考えられる。

IL-1 の priming 効果は、その血管内皮細胞における凝血活性や inter cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、E-セレクトリン等の細胞接着因子の発現を誘導し<sup>13)</sup>、局所における IL-8 等の白血球走化因子の産生を促進する作用に基づいている<sup>14)</sup>。これにより白血球の集積が進行するため priming と elicitation との間に時間差を必要とする。

Movat ら<sup>15)</sup>は、IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を局所投与に用い、静脈内投与に endotoxin を用いて家兎健康皮膚の局所 Shwartzman 反応を観察している。その場合好中球の集積に IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  との併用効果を認めているが、本研究では抗腫瘍効果に有意な併用効果は認められなかった。局所 Shwartzman 反応による組織破壊は、集積する好中球数のみでなく、その活性化の程度にも依存するものと思われる。

本研究に使用した TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、OK-432 には、腫瘍の種類や投与方法に依存する臨床的抗腫瘍効果が認められている<sup>16)7)17)</sup>。しかしながら、これらの BRM を全身投与した場合の共通する副作用として発熱、悪寒、戦慄、血圧低下などが生じ、その用量制限因子は血圧低下である。従って、これらの BRM は増量によって抗腫瘍効果の増強をはかることは困難であり、臨床的に単独で投与されることはないのが現状である。endotoxin である lipopolysaccharide (LPS) も強力な BRM 作用を持つが、エンドトキシンショックの原因物質であり臨床的に使用することは困難である。そこで局所 Shwartzman 反応を応用し、臨床的に使用可能な BRM を大量に

投与することなく、大きな抗腫瘍効果を得ることを目的として本研究を行った。すでに臨床応用されている OK-432 を静脈内投与の併用薬として使用したところ、LPS と同様に Shwartzman 反応の elicitation 物質として有効に使用し、抗腫瘍効果を誘導することが明らかになった。さらに、組成がすでに同定されており、遺伝子組み換え型として大量生産の可能な TNF $\alpha$  を elicitation 物質として使用し、有効な腫瘍治療効果が得られた。TNF $\alpha$  は強力な好中球活性の刺激因子であり、皮内細胞に対する接着を促進し、食作用、脱顆粒を刺激する<sup>18)</sup>。また血管内皮細胞に対してもさまざまな直接的効果を示し、血液凝固、炎症反応を促進する。投与量の 0.1 $\mu$ g/body (5 $\mu$ g/kg) はヒトに投与可能な量であり、マウス実験では少量であるにもかかわらず、OK-432 と同様の著明な抗腫瘍効果が認められた。

今回の実験で使用した量の IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  を単独で腫瘍内に投与しても腫瘍に壊死性変化を起こさせることができなかった。しかし IL-1 $\beta$  を腫瘍内に投与し、24時間後に TNF $\alpha$  を静脈内投与すると著明な抗腫瘍効果が認められた。このように同じ種類、同じ用量を使用しても投与方法が異なれば腫瘍に対する効果も異なってしまうのはサイトカインの相互作用が多面的であるためと思われる。まずサイトカインは、ほとんどの環境で、一過性に局所的に産生される。隔たった部位の腫瘍に作用させるためにサイトカインを全身投与しても、癌細胞が全身に広く散布していない状況では局所投与ほど効果的ではない。さらにサイトカインは天然に産生されるにしても、治療として投与されるにしても、遍在する細胞表面受容体に結合するためと、活発な排泄によって血流中から急速に取り除かれる。以上のことから局所的なサイトカインの遊離の維持、局所的または近傍領域へのサイトカインの注入、さらには標的へのサイトカインの到達が実現されうることが効果的な治療法の条件であり、この点で局所投与が有効である<sup>19)</sup>。投与日程を考慮することもより大きな治療効果をあげるためには重要である。サイトカインの連続投与は急速に耐性や応答の低下、あるいは完全な阻害さえも引き起こす可能性がある。その

ような場合には、用量ごとに応答を引き起こすような断続的な投与がより効果的だと考えられる<sup>20)</sup>。上記の条件を検討すると、今回の治療方法は断続的な投与であり、局所においてサイトカインネットワークを作用させ得るということにおいて合目的である。

本研究における IL-1 $\beta$  + TNF $\alpha$  局所投与と OK-432 あるいは TNF $\alpha$  全身投与の時間差併用投与はヒト固型癌に対して臨床応用が可能であり新しい癌治療として期待できるものと思われる。

## 結 論

ヒト腫瘍に対して、局所 Shwartzman 反応を応用した有効な治療法を開発する目的で BRM の局所投与と全身投与との時間差併用効果を検討した。

IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  をマウスの健常皮内に局所投与し、24時間後に OK-432 を静脈内投与する

と、局所投与部位に出血壊死を伴う急性炎症が惹起された。また背部に移植した腫瘍内に IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を投与した後24時間後に OK-432 を静脈内投与すると、腫瘍にも同様の急性炎症が惹起された。これを繰り返すことにより腫瘍の増殖が抑制され、生存日数も延長した。

OK-432 の代わりに TNF $\alpha$  を静脈内に併用投与した場合、OK-432 と同様の抗腫瘍効果が認められた。

以上により、局所投与と全身投与を併用する時間差 BRM 療法は臨床応用可能な新しい癌治療法になり得るものと思われた。

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った恩師折田薫三教授に深甚なる謝意を表すると共に、直接御指導頂いた日伝晶夫博士に深謝いたします。また実験の遂行にあたりご協力下さいました教室員各位に心より感謝の意を表します。(本文の要旨は、第31回日本癌治療学会総会において報告した。)

## 文 献

- 1) Kelley SL : Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* (1990) **141**, 765—788.
- 2) Andus T, Bauer J and Gerok W : Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* (1991) **13**, 364—375.
- 3) Balkwill FR and Burke F : The cytokine network. *Immunol Today* (1989) **10**, 299—304.
- 4) Saito M, Ebina T, Koi M, Yamaguchi T, Kawabe Y and Ishida N : In vitro production of immune interferon (IFN $\gamma$ ) by mouse spleen cells when different sensitizing antigens are used in vivo and in vitro. *Cell Immunol* (1983) **78**, 379—386.
- 5) Ichimura O, Suzuki S, Saito M, Sugawara Y and Ishida N : Augmentation of interleukin 1 and interleukin 2 production by OK-432. *Int J Immunopharmacol* (1985) **7**, 263—270.
- 6) Locksley RM, Heinzel FP, Shepard HM, Agosti J, Eessalu TE and Aggarwal BB : Tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  differ in capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J Immunol* (1987) **139**, 1891—1895.
- 7) 北村 聖 : IL-1, *Biotherapy* (1993) **7**, 1438—1445.
- 8) Carswell EA, Old LJ, Kassal RI, Green S, Fiore N and Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) **72**, 3666—3670.
- 9) Shwartzman G : Studies on bacillus toxic substances. *J Exp Med* (1928) **48**, 247—270.
- 10) Beck G, Habicht GS, Benach JL and Miller F : Interleukin 1 : a common endogenous mediator of inflammation and the local Shwartzman reaction. *J Immunol* (1986) **136**, 3025—3031.
- 11) Sato H, Kawashima Y, Kanno K and Munakata H : Studies on the transplantability of the mouse ascites hepatomas. *Fukushima J Med Sci* (1958) **5**, 155—169.
- 12) Yamamoto A, Nagamuta M, Usami H, Sugawara Y, Watanabe N and Niitsu Y : Release of tumor necrosis factor (TNF) into mouse peritoneal fluids by OK-432, a streptococcal preparation.

- Immunopharmacology (1986) 11, 79—86.
- 13) Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y and Shaw S : Lymphocyte interactions with endothelial cell. *Immunol Today* (1992) 13, 106—112.
  - 14) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N and Matsushima K : Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* (1991) 9, 617—648.
  - 15) Movat HZ, Burrowes CE, Cybulsky MI and Dinarello CA : Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Am J Pathol* (1987) 129, 463—476.
  - 16) 池田重雄, 石原和之 : 皮膚悪性腫瘍に対する遺伝子組み換え型ヒト腫瘍壊死因子 sertenef (PT-050) の臨床第2相試験. *Skin Cancer* (1990) 5, 210—226.
  - 17) 星野 孝, 伊保澄子, 倉 文明, 内田温士, 高橋隆幸 : OK-432 — 特にその臨床効果と作用機序について —. *最新醫學* (1987) 42, 283—293.
  - 18) Larrick JW, Graham D, Toy K, Lin LS, Senyk G and Fendly BM : Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* (1987) 69, 640—644.
  - 19) Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J and Fiers W : Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res* (1986) 46, 3990—3993.
  - 20) Patton JS, Peters PM, McCabe J, Crase D, Hansen S, Chen AB and Liggitt D : Development of partial tolerance to the gastrointestinal effect of high doses of recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$  in rodents. *J Clin Invest* (1987) 80, 1587—1596.

**Combination cancer therapy with local and systemic  
injection of biological response modifiers (BRMs) in mice.**

**Tsutoshi MURAKAMI**

**First Department of Surgery,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan  
(Director: Prof. K. Orita)**

To evaluate local Shwartzman's phenomenon in the treatment of malignant tumor, mice were given local injections followed by intravenous injections of biological response modifiers (BRMs). An intradermal injection of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  followed by an intravenous injection of OK-432 24 hours later induced acute inflammation with hemorrhage and necrosis at the injection site. An intratumoral injection of these cytokines into MH-134 tumor in the back followed by an intravenous injection of OK-432 induced similar hemorrhage and necrosis in the tumor, and repetition of combined injections suppressed tumor growth and prolonged survival in tumor-bearing mice. Intravenous injections of TNF $\alpha$  were also effective as an eliciting agent in this tumor therapy model. These results indicated serial local and systemic combination therapy with BRMs may be a new clinical therapy for patients with malignant tumor.