

卵巣癌患者に対するシゾフィラン，ガンマー インターフェロン反復投与の検討 —腹腔マクロファージ活性化の維持について—

癌研究会附属病院婦人科

陳 瑞東 荷見 勝彦 増淵 一正

Maintenance of the Activation of Peritoneal Macrophage in Patients with Ovarian Cancer by the Repeated Administration of Sizofiran and Interferon γ

Jui-Tung CHEN, Katsuhiko HASUMI and Kazumasa MASUBUCHI

Department of Gynecology, Cancer Institute Hospital, Tokyo

概要 卵巣癌 4 例に対し second look laparotomy の前後に sizofiran の筋注と interferon γ (IFN γ) の腹腔内投与を 3～4 日間ごとに行い，腹腔洗浄により採取したマクロファージ(M ϕ)の数の増加，リポポリサッカライド刺激後の interleukin 1(IL-1), IFN γ , tumor necrosis factor(TNF), prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生能の亢進がこれらの薬剤の間断的投与により維持されているかどうか検討した。

- ① M ϕ 数は持続的に約30倍以上に増加した。
- ② IL-1産生能は持続的に約 8 倍以上に増加した。
- ③ IFN γ 産生能はほぼ持続的に増加した。
- ④ TNF 産生能は持続的に約 4 倍以上に増加した。
- ⑤ PGE₂産生能は持続的に約12倍以上に増加した。

以上より，sizofiran と IFN γ の投与を 3～4 日間ごとに繰り返すことにより，腹腔 M ϕ に対する刺激効果は維持された。PGE₂の産生能も増加したが，IL-1, IFN γ , TNF 産生能は持続的に亢進しており，両剤の投与による活性化 M ϕ の抗腫瘍作用が期待できることが示唆された。

Synopsis Four patients with ovarian cancer were treated with a 20mg injection of sizofiran, a MW 450,000 β -1,3-glucan, intramuscularly one day before and 4,7,11,14,18 and 21 days after second look laparotomy and with the administration of 2 million units of interferon γ intraperitoneally at 0,4,7,11,14,18 and 21 days after second look laparotomy. Peritoneal macrophages were obtained from the patients by peritoneal washing with saline through an indwelled tube. The number of macrophages was increased to about 30 times after the treatment. The concentrations of interleukin 1, interferon γ , tumor necrosis factor and prostaglandin E₂ in the media of 24-hour cultured macrophage with 10 μ g/ml of LPS were also increased throughout the treatment. These data suggest that the every 3 to 4 day treatment with sizofiran and interferon γ maintained the activation of peritoneal macrophages which might lead to retention of the antitumor activity in patients with ovarian cancer.

Key words: Ovarian cancer • Second look laparotomy • Peritoneal macrophage • Sizofiran • Interferon γ

緒 言

卵巣癌では腹腔内播種が治療上重要である。特に初回治療に奏功し，second look laparotomy において腹腔に腫瘍細胞が全く証明されなかつた場合でも，その後の再発率は平均約20～30%と報告されている¹⁵⁾。この対策として，抗癌剤等の全身投与，腹腔内投与が試みられているが¹⁶⁾¹⁷⁾，腫瘍細胞

が腹腔洗浄でも証明されないほど少ない場合には，理論的には，腹腔 M ϕ の活性化を first step とした免疫賦活法が有用であると期待される。

というのは，マクロファージ(M ϕ)が腫瘍免疫において重要なエフェクター細胞の一つであり，適切な刺激により in vitro では抗腫瘍活性や腫瘍障害因子の産生等が誘導できるが¹¹⁾，担癌時にお

いても、腹腔及び肺胞 M ϕ は適当な活性化刺激に反応して抗腫瘍性を発現する能力を保持しているとされているからである¹¹⁾¹⁸⁾。

既に著者らは sizofiran と interferon γ (IFN γ) の併用により、投与 1 日後の婦人性器悪性腫瘍患者の、①腹腔 M ϕ の数が増加し、4 日間持続すること、② M ϕ の interleukin 1 (IL-1), IFN γ , tumor necrosis factor (TNF) の産生能が有意に亢進すること、③超微形態学的にもこの M ϕ には顕著な ruffle 形成が観察されることを報告した^{1)~3)}。

そこで本研究では、この投与を継続することにより、M ϕ の刺激が維持されるかどうか検討した。

研究対象と方法

Informed consent を得た卵巣癌 4 例を対象とした。対象症例の平均年齢は 43.3 (33~54) 歳、臨床進行期は IIc 2 例, IIb 1 例, Ic 1 例で、組織形は 4 例とも serous cystadenocarcinoma であった。4 例中 2 例は再発の疑いのため、残りの 2 例は complete response の確認のため、second look laparotomy (SLL) を行つた。

開腹所見では 1 例に約 200ml の腹水と腹腔全体に米粒大の癌性播種を、他の 1 例に傍大動脈リンパ節に転移巣を認めた。残りの 2 例は肉眼的にも組織学的にも残存腫瘍はなかつた。

手術術式として、3 例には肉眼的な残存腫瘍の確認のみ、1 例には傍大動脈リンパ節転移巣の切除のみ施行した。閉腹時に腹腔内にシラスコン No. 2 (コーニング社製) のチューブを留置した。

使用薬剤は、① sizofiran : 20mg/1A, 科研製薬製、② recombinant IFN γ : 200 万 U/1A, KW2202, 協和発酵製である。

薬剤の投与方法は以下の通りである。

- ① SLL 24 時間前に sizofiran 20mg を筋注、
- ② SLL 術直後に IFN γ 200 万 U を生食 100ml に溶解し、腹腔内に留置したチューブより投与、
- ③ 術後 4, 7, 11, 14, 18, 21 日目に sizofiran 20mg の筋注と IFN γ 200 万 U の腹腔内投与を同時に施行し、チューブを抜去した。

M ϕ の採取は既報のように行つた¹⁾。開腹時に

は生食 800ml で、閉腹後は腹腔内に留置したシラスコンチューブを通じて生食 500ml で腹腔全面を洗浄し、ただちに M ϕ を分離した。一部は細胞診断としてそのまま固定染色した。

M ϕ の分離も既報¹⁾のように、回収溶液を 1,000 rpm で 10 分間遠心した後の細胞を比重遠心し、中間に帯状に浮遊する部分をプラスチックシャーレで培養、付着した細胞を採取した。付着細胞数を算定し、ギムザ染色により M ϕ の形態的な確認を行つた。

M ϕ の培養と培養上清中の IL-1, prostaglandin E₂ (PGE₂), IFN γ , TNF 濃度の測定も既報¹⁾²⁾のように行つた。M ϕ を 10% FCS 加 RPMI-1640 で 1×10^5 個/ml に調整した後、終濃度 10 μ /ml の lipopolysaccharide (LPS; Difco 社) を添加のうえ 24 時間培養し、上清を採取した。上清中の IL-1, PGE₂, IFN γ , TNF 濃度の測定として、IL-1 は CISTRON IL-1 β (¹²⁵I) RIA kit による RIA 法で、PGE₂ は RIA 法で、IFN γ は CENTOCOR Human γ -IFN RIA kit による RIA 法で、TNF は L-cell assay による bioassay により行つた。

推計学的な検討は、全症例数が 4 例と少数であるので不適と判断した。測定結果は平均値 \pm 標準偏差で表示し、図は標準誤差で表示した。

研究成績

I. 腹腔 M ϕ 数 ($\times 10^3$ /ml) の経時的変化

M ϕ 数は開腹時 0.86 ± 0.41 であったが、sizofiran と IFN γ の投与により増加し、Day 1 には 86.6 ± 32.4 , Day 4 には 99.7 ± 114.5 , Day 5 には 106.5 ± 26.5 , Day 7 には 66.4 ± 52.3 , Day 8 には 68.0 ± 63.6 , Day 11 には 183.7 ± 248.9 , Day 12 には 399.0 ± 622.2 , Day 14 には 32.1 ± 10.1 , Day 15 には 49.0 ± 26.0 と持続的に約 30 倍以上に増加した (図 1)。

II. M ϕ の IL-1 (ng/ml) 産生能の経時的変化

M ϕ の IL-1 産生能は開腹時 0.22 ± 0.27 であったが、sizofiran と IFN γ の投与により増加し、Day 1 には 6.82 ± 3.53 , Day 4 には 4.15 ± 1.84 , Day 5 には 4.00 ± 1.29 , Day 7 には 2.53 ± 1.81 , Day 8 には 7.06 ± 2.60 , Day 11 には 3.42 ± 0.99 , Day 12 には 3.86 ± 2.71 , Day 14 には 2.89 ± 2.62 ,

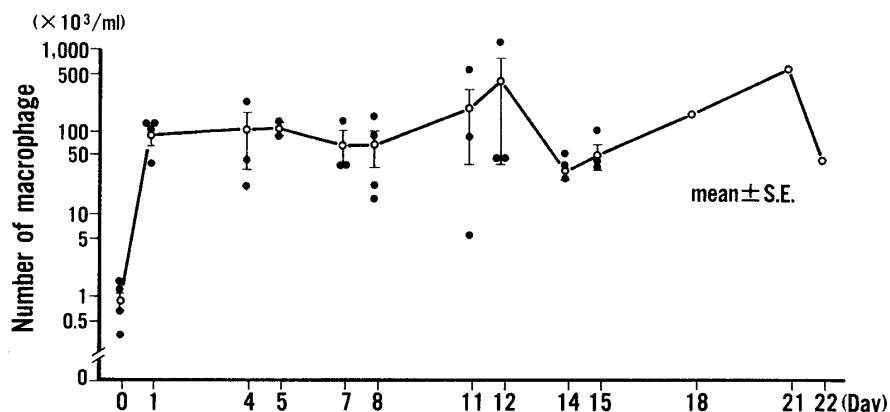


図1 Changes in the number of peritoneal macrophage following the treatment with sizofiran and interferon γ .

Sizofiran (20mg; i.m.) was injected 24-hours before SLL. Interferon γ (200×10^6 U; i.p.) was administered after SLL (Day 0). At 4, 7, 11, 14, 18 and 21 days after SLL both agents were simultaneously co-administered. —○— shows the mean value of the number of macrophage in treated patients. —●— shows the number of macrophage in each treated patient.

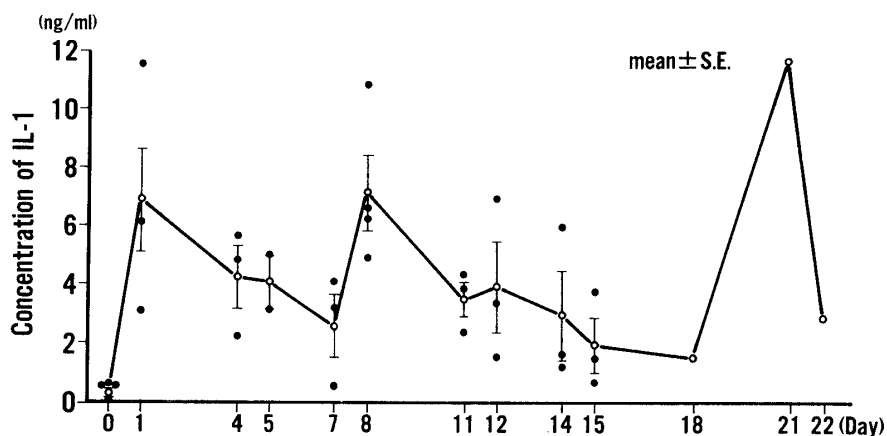


図2 Changes in the concentration of IL-1 in the media of 24-hour cultured peritoneal macrophage, following the treatment with sizofiran and interferon γ .

Macrophage was obtained by the peritoneal washing with saline and cultured in the media of RPMI-1640 with $10 \mu\text{g/ml}$ of LPS for 24 hours. —○— shows the mean value of the concentration of IL-1 in treated patients. —●— shows the concentration of IL-1 in each treated patient.

Day 15には 1.89 ± 1.61 と持続的に約8倍以上に増加した(図2)。

III. $M\phi$ の $\text{IFN}\gamma$ (IU/ml) 産生能の経時的变化

$M\phi$ の $\text{IFN}\gamma$ 産生能は開腹時 2.29 ± 4.51 であつたが, sizofiran と $\text{IFN}\gamma$ の投与により, Day 1 には 5.80 ± 6.62 , Day 4 には 6.00 ± 9.78 , Day 5 には 6.85 ± 9.41 , Day 7 には 2.00 ± 1.63 , Day 8 には 16.48 ± 18.94 , Day 11 には 4.45 ± 3.64 , Day 12 には 21.05 ± 36.24 , Day 14 には 1.01 ± 1.44 , Day 15

には 21.41 ± 28.03 とほぼ持続的に増加した(図3)。

IV. $M\phi$ の TNF (U/ml) 産生能の経時的变化

$M\phi$ の TNF 産生能は開腹時 32.7 ± 51.9 であつたが, sizofiran と $\text{IFN}\gamma$ の投与により増加し, Day 1 には 711.0 ± 398.9 , Day 4 には 445.0 ± 417.2 , Day 5 には 817.5 ± 611.7 , Day 7 には 217.7 ± 253.4 , Day 8 には 334.7 ± 259.4 , Day 11 には 317.7 ± 103.4 , Day 12 には 645.5 ± 658.3 , Day

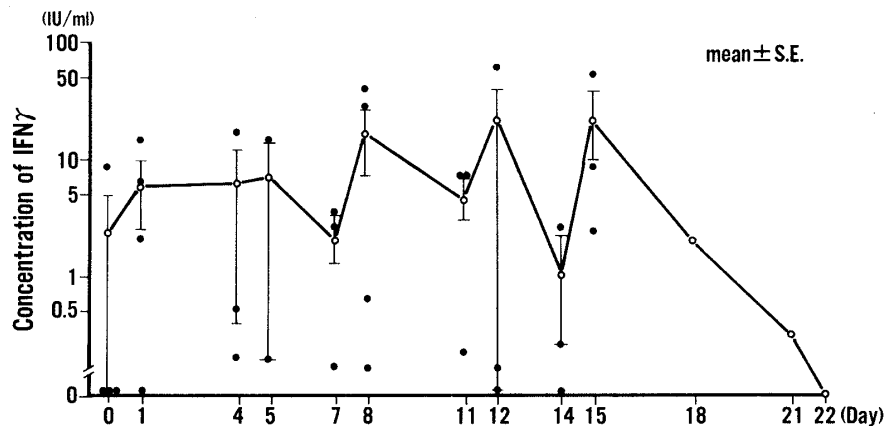


図3 Changes in the concentration of interferon γ in the media of 24-hour cultured peritoneal macrophage, following the treatment with sizofiran and interferon γ .

Macrophage was obtained by the peritoneal washing with saline and cultured in the media of RPMI-1640 with 10 μ g/ml of LPS for 24 hours. —○—shows the mean value of the concentration of interferon γ in treated patients. —●—shows the concentration of interferon γ in each treated patient.

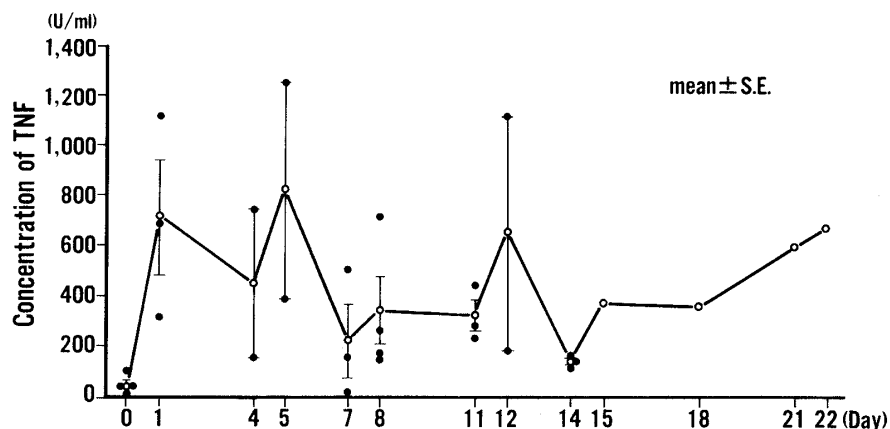


図4 Changes in the concentration of TNF in the media of 24-hour cultured peritoneal macrophage, following the treatment with sizofiran and interferon γ .

Macrophage was obtained by the peritoneal washing with saline and cultured in the media of RPMI-1640 with 10 μ g/ml of LPS for 24 hours. —○—shows the mean value of the concentration of TNF in treated patients. —●—shows the concentration of TNF in each treated patient.

14には 133.7 ± 8.14 と持続的に約4倍以上に増加した(図4)。

V. M ϕ の PGE₂ (pg/ml) 産生能の経時的变化

M ϕ の PGE₂ 産生能は開腹時 194.7 ± 307.6 であったが, sizofiran と IFN γ の投与により増加し, Day 1には $6,350.0 \pm 5,849.7$, Day 4には $7,133.3 \pm 7,006.0$, Day 5には $10,345.0 \pm 1,633.4$, Day 7には $6,239.3 \pm 5,175.8$, Day 8に

は $8,915.0 \pm 2,869.2$, Day 11には $3,986.7 \pm 2,338.9$, Day 12には $3,446.7 \pm 2,706.9$, Day 14には $2,440.0 \pm 1,075.3$, Day 15には $3,146.3 \pm 2,785.2$ と持続的に約12倍以上に増加した(図5)。

考 察

筆者らは婦人性器腫瘍患者を対象として, sizofiran の筋注と IFN γ の腹腔内投与による腹腔 M ϕ の変化を検討した。そして, 既に報告した

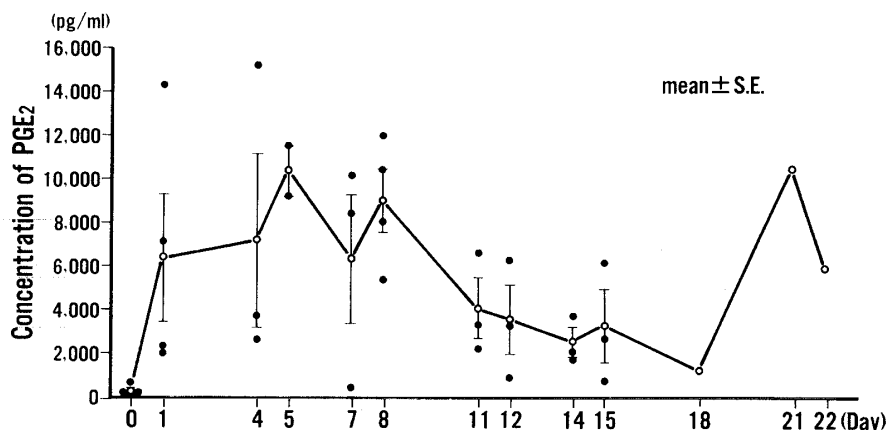


図5 Changes in the concentration of PGE₂ in the media of 24-hour cultured peritoneal macrophage, following the treatment with sizofiran and interferon γ . Macrophage was obtained by the peritoneal washing with saline and cultured in the media of RPMI-1640 with 10 μ g/ml of LPS for 24 hours. —○—shows the mean value of the concentration of PGE₂ in treated patients. —●—shows the concentration of PGE₂ in each treated patient.

ように、両剤の併用が腹腔 M ϕ 数を術後 4 日間有意に増加させるだけでなく ($p < 0.05$), M ϕ の機能面にも変化を与え、術後 1 日目の IL-1, IFN γ , TNF の産生能を有意に亢進させる一方 ($p < 0.05$), PGE₂ の産生能には有意な変化を与えないことを確認した¹⁾²⁾。

M ϕ は活性化により抗腫瘍作用を有するようになるが、この抗腫瘍作用は、活性化酸素, IL-1, TNF 等のエフェクターの産生により発現されと考えられている⁴⁾⁷⁾¹⁰⁾。しかし、これらのエフェクターの作用にはまだ疑問点がある。すなわち、活性化酸素は活性化 M ϕ の主な抗腫瘍作用機構である抗体非依存性の細胞破壊の場では産生されていないことが報告されており、また IL-1 についても IL-1 感受性腫瘍細胞がまれであることが確認されている⁷⁾¹⁰⁾。したがって、M ϕ の抗腫瘍作用に最も関与するエフェクターとしては TNF が最も注目されている。

更に、M ϕ の抗腫瘍作用には TNF 非依存性によるものが報告され、その腫瘍細胞破壊の機構の一つとして提唱されているのがアルギニンに依存した NO₂⁻(NO) による腫瘍細胞破壊である⁴⁾。この作用は IFN γ と TNF により刺激、調節されると指摘されているが¹³⁾, sizofiran と IFN γ の併用は、腹腔 M ϕ の TNF と IFN γ の産生能を有意に

亢進しているだけでなく、この両者の産生能の高い相関性も維持していることから ($r = 0.99$, $p < 0.01$)²⁾, 両剤の併用で活性化された M ϕ には抗腫瘍作用が増強されることが期待される。

さて、M ϕ の活性化を調節する因子として重要なものの一つが PGE₂ である。PGE₂ は LPS で活性化された M ϕ の IL-1 と TNF の分泌を抑制することから、IL-1 産生能の調節剤としての役割が指摘されている⁵⁾, 更に、PGE₂ は LPS 刺激 M ϕ の癌細胞障害活性を 10⁻⁸M の濃度で抑制することから、M ϕ の活性のフィードバック抑制に関連していると考えられている⁵⁾。

臨床的にも、担癌患者の血漿中の PGE₂ 濃度は異常高値である頻度が高く、担癌患者末梢単球の PGE₂ 産生能も著明に亢進していることが報告されている⁶⁾⁸⁾。興味あることに、これらの患者では末梢単球の TNF の産生能も著明に亢進しているが⁸⁾⁹⁾¹²⁾, 単球培養液に自己血漿を添加すると PGE₂ の産生は上昇するが、TNF の活性は低下すると報告されている⁸⁾。

本研究の結果、sizofiran と IFN γ の併用により腹腔 M ϕ の PGE₂ の産生は増加したが、IL-1, IFN γ , TNF 産生能も持続的に亢進しているので、理論的には M ϕ の抗腫瘍作用が期待できると考えられた。また、sizofiran と IFN γ の併用によ

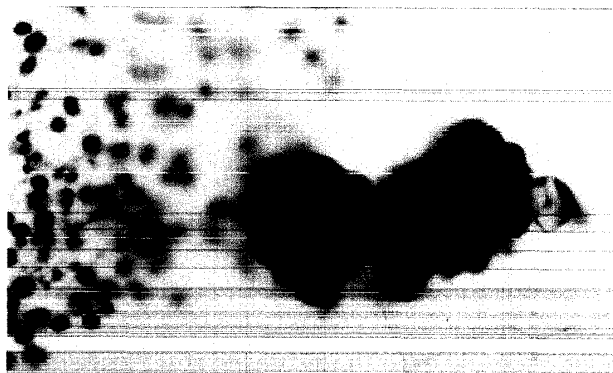


写真1 Clusters of ovarian cancer cells in the saline of peritoneal washing before the treatment of sizofiran and interferon γ ($\times 100$). Two multicellular clusters containing vacuoles are seen.

る腹腔 M ϕ 活性化の持続期間は 4 日間と考えられるが, この両剤を 4 日間ごとに繰り返すことにより, 腹腔 M ϕ に対する刺激効果は維持されることが示唆された. 最近では Porta-A-Cath などの腹腔埋め込み型の機器が開発されているので, この治療法を継続的に外来で施行することも可能と考えている.

卵巣癌に対する免疫療法は患者の performance status がよく, 腫瘍量が少ない時に奏功する可能性が高いと指摘されているが¹⁴⁾, sizofiran と IFN γ が肉眼的に残存腫瘍が認められる症例に対しても, 有効かどうかは興味のあるところである. 本研究で, 腹腔内に播種状に腫瘍細胞の残存が認められた 1 症例では, 本療法施行前後で腹腔洗浄液より採取した癌細胞には形態上の変化があつた. すなわち, 写真 1, 2 に示すように治療後の癌細胞のクラスターには, 核のクロマチンや大きさの減少, 細胞質の空胞形成, 細胞膜辺縁の不整など癌細胞の変性と考えられる変化が認められた. しかし, 一方では癌細胞の viability は保たれており, この治療法による殺細胞作用に限界があることは明らかである.

したがって, sizofiran と IFN γ の併用療法の最も適した適応は卵巣癌におけるいわゆる negative SLL 後の再発の抑制にあると考えられる.



写真2 Clusters of ovarian cancer cells in the saline of peritoneal washing after the treatment of sizofiran and interferon γ ($\times 100$). Cancer cells were obtained from the same patient of Phot. 1 at 21 days after SLL. The irregularity of the cell surface, large vacuoles and diminishing the size of nuclei were suggestive of degeneration.

この研究を行うにあたり, 御尽力頂いた科研製薬中央研究所故鈴木宗司氏に深謝致します.

この論文の一部は 82nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (1991, Houston) にて発表した.

文 献

1. 陳 瑞東, 手島英雄, 清水敬生, 荷見勝彦, 増淵一正: シゾフィラン, ガンマーインターフェロンによるヒト腹腔内滲出マクロファージの活性化—卵巣癌の腹腔内再発の予防を目標として—. 日産婦誌, 42: 179, 1990.
2. 陳 瑞東, 手島英雄, 清水敬生, 荷見勝彦, 増淵一正, 鈴木宗司: sizofiran, recombinant interferon γ による担癌ヒト腹腔マクロファージの活性化: tumor necrosis factor 産生能を中心として. 癌と化療, 17: 1365, 1990.
3. 陳 瑞東, 手島英雄, 清水敬生, 荷見勝彦, 増淵一正, 鈴木宗司, 寺嶋昭夫, 斎藤勝弘: シゾフィラン, ガンマーインターフェロンによるヒト腹腔内滲出マクロファージの超微形態学的変化. 医学のあゆみ, 150: 505, 1989.
4. 樋口昌宏: 活性化マクロファージの抗腫瘍機構の解析. 日本臨床, 48: 237, 1990.
5. 磯野法子, 熊谷勝男: IL-1 インヒビター. 臨床免疫, 21: 1648, 1989.
6. 板倉正幸, 野原隆彦, 中瀬 明: 消化器癌患者における血漿中ピロスタグランディン値測定の臨床的検討. 日癌治誌, 24: 2522, 1989.
7. 清滝千晴: マクロファージの活性化と腫瘍破壊機

- 構. 癌と化療, 16: 3386, 1989.
8. 奈良桂二, 川村 勝, 佐藤新一, 浅野真彦: 担癌患者末梢血単球の PGE₂ および TNF 産生能. 日消外会誌, 21: 1468, 1988.
 9. 小野田出磨, 菊地 秀, 中村雅志, 山内 篤, 三浦裕一, 高橋通宏, 町田哲太, 吉田弘一: 癌患者における tumor necrosis factor 産生能の検討. 医学のあゆみ, 150: 165, 1989.
 10. 笹田昌孝: ヒトマクロファージの腫瘍細胞障害作用. 臨床免疫, 21: 1882, 1989.
 11. 曾根三郎, 小倉 剛: マクロファージの活性化. BIO medica, 2: 244, 1987.
 12. 梅咲直彦, 大鹿幸信, 須川 俊: 担癌患者単球・マクロファージ系細胞の免疫調節機能. 日癌治誌, 23: 1638, 1988.
 13. *Drapier, J.C., Wietzerbin, J. and Hibbs, J.B. Jr.:* Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 18: 1587, 1988.
 14. *Freedman, R.S.:* Recent immunologic advances affecting the management of ovarian cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 28: 853, 1985.
 15. *Ghatage, P., Krepert, G.V. and Lotocki, R.:* Factor analysis of false-negative second-look laparotomy. *Gynecol. Oncol.*, 36: 172, 1990.
 16. *Podratz, K.C., Schray, M.F., Wieand, H.S., Edmonson, J.H., Jefferies, J.A., Long, H.J., Malkasian, G.D., Stanhope, C.R. and Wilson, T. O.:* Evaluation of treatment and survival after positive second-look laparotomy. *Gynecol. Oncol.*, 31: 9, 1988.
 17. *Raju, K.S., McKinna, J.A., Baker, G.M., Wiltshaw, E. and Jones, J.M.:* Second-look operations in the planned management of advanced ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144: 650, 1982.
 18. *Thomassen, M.J., Wiedemann, H.P., Barna, B. P., Farmer, M. and Ahmad, M.:* Induction of in vitro tumoricidal activity in alveolar macrophages and monocytes from patients with lung cancer. *Cancer Res.*, 48: 3949, 1988.
- (No. 7040 平3・8・19受付)