DMBA 誘導ハムスター舌癌に対する内発性腫瘍壊死因子 (TNF) の抗腫瘍効果に関する検討

尾古 俊 哉

Study of the effects of endogenous tumor necrosis factor (TNF) on experimental lingual carcinoma induced by local applications of DMBA in hamsters

Toshiya_Oko

Abstract: In this study, we examined the antitumor effect of a biological response modifier in relation to the induction of tumor necrosis factor (TNF).

Lingual carcinoma was induced in hamsters by a local application of DMBA. The animals were divided into treated and non-treated groups where in the former received an intravenous injection of LPS or OK-432 and the latter was left as controls. All animals were further classified according to the growth pattern of lingual carcinoma, either external or internal growth. The preventive rate of tumor growth for external carcinoma was examined and the survival rate of the animals with internal carcinoma was examined.

After LPS was injected into hamsters, and when a high titer of TNF was induced in the peripheral blood, lingual carcinoma was remarkably reduced. After OK-432 was injected, and when a very low titer of TNF was induced, lingual carcinoma was hardly reduced and practically remained unchanged.

The survival rate of both treated animals was significantly longer than that of the non-treated ones.

These results indicate that TNF plays an important role in reducing the tumor volume of external lingual carcinoma in hamsters. Furthermore, it was assumed that the reduction of tumor volume and prolongation of survival rate were of different action mechanisms.

Key words: tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子), experimental lingual carcinoma (実験舌癌), OK-432 (ピシバニール)

結 言

口腔癌、特に舌癌においては、その機能保存が治療上の重要な問題点である。当科では早期癌に対しては、その機能保存のため、放射線療法を第1選択としている。

しかし、根治療法として放射線を用いた場合、照射中の口内炎による疼痛、照射後長期にわたる骨壊死など、患者にとっての苦痛は決して軽いものではない。一方、他の保存的療法として、化学療法がしばしば用いられているが、本療法も抗腫瘍効果の割には骨髓抑制などの副作用が強く、宿主への負担が大きい。

そこで第4の療法として、従来の治療法の欠点を補うべく免疫療法の試みが注目を集めている。当科においても、以前より口腔癌に対する免疫療法を動物実験で試み、効果を上げている^{1,2)}。しかし、その結果を参考に、癌患者に免疫賦活剤の全身投与を行ってみると、必ずしも動物実験で認められたのと同程度の抗腫瘍効果は認め

神戸大学医学部口腔外科学講座
(主任：島田桂吉教授)
Department of Maxillofacial Surgery, Kobe
University School of Medicine
(Chief: Prof. Keikichi Shimada)
受付日：平成2年10月22日

られなかった。また同時に種々の免疫パラメータを測定しその変動を検討しても、動物実験における成績と異なり、ヒトでは有意な変動は認められなかった。

近年、遺伝子組換え型腫瘍壊死因子 (recombinant TNF: 以下 rTNF) の臨床応用例が報告されている^{3,4)}。しかし、rTNF は開発当初多くの期待がもたれたにもかかわらず、その効果については必ずしも満足できるとはいえない⁵⁾。評価が低くなった理由として2つの事由が考えられる。1つはヒト癌に対する抗腫瘍効果が動物のそれに比べてかなり劣る点、もう一点は全身衰弱を惹起する強い副作用である。動物の移植癌に対して強い抗腫瘍効果を発揮する TNF が、自然発生のヒト癌に対して抗腫瘍効果の点で劣ることは、標的となる腫瘍の性質により、作用発現の機構が異なることを示唆している。また、後者に関しては TNF の抗腫瘍作用と Cachectin 作用の二面性をもった生物学的作用⁶⁾ によるとされているが、まだ議論されつくされているとはいえない。いずれにせよ、rTNF の血中濃度が高くなれば、それによる副作用の発現率もその程度も強くなるであろう。ところで、外因性に rTNF を投与する代わりに、TNF を生体内に誘導できるような条件下で、免疫賦活剤を投与すると、強い抗腫瘍効果が誘導されたとする報告がある⁷⁾。

著者らは、移植癌より、より臨床に近い実験モデルとして、DMBA 誘導ハムスター舌癌⁸⁾ をその評価の対象として用い、担癌ハムスターに免疫賦活剤を投与することによって、血中に TNF を誘導し、ついで誘導された TNF と抗腫瘍効果との関係を検討したので報告する。

実験材料および実験方法

I. 実験動物

シリアン系ゴールデンハムスター雄 (26~28週齢、クローズドコロニー、日本 SLC) を使用した。

II. TNF 誘導剤

細菌内毒素 Lipopolysaccharide (以下 LPS) は、E. coli (serotype 0127:B8) 由来のものを GIFCO から購入し実験に用いた。溶連菌製剤 OK-432 は中外製薬より、またホルマリン処理した *Propionibacterium acnes* は、幀東京免疫薬理研究所より恵与されたものを用いた。

III. 発癌方法

重岡ら⁹⁾の方法に準じ、100匹のハムスターに発癌操作を行った。すなわち、エーテル麻酔下に10週齢ハムスター右舌縁部を歯科用クレンザー (No. 0 ピアス社) で擦過し、上皮を軽度損傷させた。この部位に9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (以下 DMBA、和光製薬) 1%アセトン溶液を画笔にて週3回16週間にわたり塗布した。その後肉眼的に発癌が疑われるまで放置した。小腫瘤あるいは潰瘍が認められ発癌が疑われた時点で、

扁平上皮癌の存在を生検にて組織学的に確認した。腫瘍の発育様式により、外向発育型と内向発育型とに分けし、前者は腫瘍の最大径が 10 mm を越えた時点で、後者は腫瘍体積の測定が困難なため、体重が20%減少した時点で実験に用いた。

IV. TNF の誘導

正常ハムスターをエーテルで麻酔した後、心臓内血液中にホルマリン処理した *P. acnes* の 5~10 μ g を投与した。ついで8日後に LPS の 1~10 μ g を同様に投与した。LPS 投与から原則として、1.5~2時間後に心臓より採血し、常法に従い血清を分離した。非特異的な殺細胞活性を除去する目的で 56°C 30分間処理後、細胞障害活性測定まで -80°C に凍結保存した。OK-432 を投与して TNF を誘導する場合は、OK-432 の投与量、投与間隔については山本¹⁰⁾らの報告に従った。すなわち、正常ハムスターに OK-432 の 1 KE/20 g 体重 (5~8 KE/匹) を5時間間隔で2回心臓内血液中に投与した。担癌ハムスターに対しても同様の投与方法、投与量、投与間隔で TNF の誘導を試みた。

V. TNF 活性測定

血清中に誘導された TNF 活性の測定は、L 929 細胞 (東京免疫薬理研究所より恵与) を標的細胞とした lytic assay¹¹⁾ により行った。細胞障害活性は L 929 細胞の50%を殺すのに必要な血清の希釈度の逆数で表した。

VI. TNF 活性の中和

血中に誘導された細胞障害因子が TNF であることの確認は、抗マウス TNF- α ラビット血清 (IP-400, Genzyme) を用いた中和方法によった。

VII. TNF 誘導に伴う抗腫瘍効果の検討

a. 外向性腫瘍に対する抗腫瘍効果

発癌が確認されたハムスターのうち、外向性腫瘍を有するもの14匹を、腫瘍の最大径が 10 mm を越えた時点で、1) 未処置群5匹、2) LPS 10 μ g 投与群4匹、3) OK-432 投与群5匹、の3群に分けた。抗腫瘍効果の判定は、経時的に腫瘍の縦×横×高さ、の3辺の掛け合わせにより腫瘍の体積を算定し、同一個体の処置直前の腫瘍体積を100とした時の腫瘍の退縮率で表した。

b. 内向性腫瘍に対する抗腫瘍効果

内向性腫瘍を有するハムスターを、発癌が確認された後、体重が20%減少した時点で、1) 未処置群13匹、2) LPS 10 μ g 投与群5匹、3) OK-432 投与群11匹、の3群に分け、以後の60日間にわたって各群の生死を確認した。抗腫瘍効果の判定は、未処置群に対する延命率で判定した。各群間の有意差検定は Cox-Mantel test を用いて行った。

写真 1 a 発癌が疑われた時点での生検像(×40)

写真 2 a 外向性発育型の扁平上皮癌

写真 1 b 1 a の強拡大像 (×200: 高分化型扁平上皮癌)

写真 2 b 内向性発育型の扁平上皮癌

表 1 ハムスター舌への DMBA 塗布による発癌率

発癌様式	発癌匹数/全匹数
外向発育型	18/100
内向発育型	40/100
未 発 癌	42/100

実 験 結 果

I. DMBA 誘導ハムスター舌癌

100 匹のハムスターの舌に DMBA を塗布し発癌を試みた。DMBA 塗布開始後 15～29 週間に、63 匹のハムスター右舌縁部に小腫瘍あるいは潰瘍が出現した。すべての小腫瘍あるいは潰瘍について、肉眼的に発癌が疑われた時点で生検を行った。その結果、58 匹において高分化型の扁平上皮癌が確認された(表 1、写真 1)。腫瘍の発育様式で分類すると、外向性に発育し、腫瘍を形成したものの 18 匹、潰瘍を形成し内向性に発育したものの 40 匹

であった(写真 2)。これらのうち、腫瘍の大きさ、潰瘍の程度や全身状態が比較的揃ったものの 43 匹を今回の実験に用いた。すなわち、外向発育型 14 匹、内向発育型 29 匹であった。また発癌が確認されたハムスターのうち、未処置群では経時的に腫瘍の増殖と体重の減少を認め、最終的には全例が腫瘍の増殖に伴う全身状態の悪化による死(腫瘍死)の転機をとった。

II. 正常ハムスターでの TNF の誘導

正常ハムスターに、一次刺激剤として *P. acnes* を、8 日後に二次刺激剤として LPS を心臓内血液中に投与した。*P. acnes* 5 mg、ついで LPS 3 μ g の投与で、L 929 細胞に対し 8.7×10^5 U/ml の細胞障害活性を有する因子が誘導された(表 2)。また LPS を単独投与しても、用量依存的に細胞障害活性が認められ、LPS 10 μ g では 3.6×10^4 U/ml と *P. acnes* と LPS を投与した場合の約 10 分の 1 の細胞障害活性が誘導された(表 3)。

LPS 投与によって誘導された L 929 に対する細胞障害活性は、抗マウス TNF- α ラビット血清とともに反応させると、完全にその活性は消失した(表 4)。

III. 担癌ハムスターでの TNF の誘導

正常ハムスターに LPS を単独投与した場合、血中に TNF の誘導が可能であった。そこで担癌ハムスターで

表 2 正常ハムスター血中への TNF の誘導

投与量 投与間隔	細胞障害活性 (平均±SE, U/ml)
8 days <i>P. acnes</i> LPS 10 mg 10 µg	$1.6 \pm 0.9 \times 10^5$ (n = 4)
8 days <i>P. acnes</i> LPS 5 mg 10 µg	$3.5 \pm 1.5 \times 10^5$ (n = 4)
8 days <i>P. acnes</i> LPS 5 mg 3 µg	$8.7 \pm 0.9 \times 10^5$ (n = 4)
8 days <i>P. acnes</i> LPS 5 mg 1 µg	$1.7 \pm 0.4 \times 10^5$ (n = 4)

表 3 LPS 単回投与による TNF の誘導

投与量	細胞障害活性 (平均±SE, U/ml)
LPS 10 µg	$3.6 \pm 2.8 \times 10^4$ (n = 4)
LPS 3 µg	$1.1 \pm 8.7 \times 10^4$ (n = 4)
LPS 1 µg	$5.9 \pm 6.3 \times 10^3$ (n = 4)

も, LPS 単独で血中に TNF を誘導できるか否か検討した。担癌ハムスターに LPS の 10 µg を投与すると, LPS 投与 2 時間後に $5.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ U/ml の L929 細胞に対する細胞障害活性が誘導された。この誘導された細胞障害活性は, 正常ハムスターの血中に誘導された活性よりも約 10 倍の強さであった。また担癌ハムスター血中に誘導された細胞障害因子も, 抗マウス TNF- α ラビット血清で中和された。

IV. DMBA 誘導ハムスター舌癌に対する抗腫瘍効果

a. 外向発育型腫瘍に対する抗腫瘍効果

外向発育型腫瘍を有するハムスターに, LPS を投与すると, 腫瘍は投与 48 時間後より縮小しはじめ, LPS 投与直前の腫瘍体積を 100 とした場合の退縮率は, 6~10 日後に 87~37%, 平均 70% であった (図 1b, 写真 3)。LPS は DMBA 誘導ハムスター舌癌に対して腫瘍の退縮を伴う強い抗腫瘍効果を示した。また, 同時に行った LPS 投与 2 時間後の血清中の細胞障害活性の測定では, 4 匹全例で $5.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ U/ml の TNF 活性が得られた。一方, OK-432 を 5 時間間隔で 2 回投与すると, 腫瘍の経時的な退縮経過は LPS と同様であったが, 腫瘍の退縮率は LPS に比して小さく, 最高 30% の退縮

表 4 抗マウス TNF- α ラビット抗体による細胞障害因子の中和

血清 (n = 4)	希釈	障害活性 (平均±SE, U/ml)
LPS 投与ハムスター血清		$3.4 \pm 1.1 \times 10^3$
+抗 TNF 抗体	1/2	< 20
	1/10	< 20
	1/100	158
+正常ラビット血清	1/2	$1.5 \pm 0.8 \times 10^3$
	1/10	$3.6 \pm 3.2 \times 10^3$
	1/100	$3.9 \pm 1.6 \times 10^3$

※ハムスター血清と各希釈血清は 37°C 1 時間培養後 assay に使用。

率を示したに過ぎなかった (図 1c)。また同時に血中への TNF 誘導の有無を調べてみると, 5 匹中 3 匹で 110~250 U/ml の弱い活性を有する TNF が誘導されていた (表 5)。

b. 内向発育型腫瘍に対する抗腫瘍効果

内向発育型腫瘍を有するハムスターでは, 平均生存日数は, 体重 20% 減少時より LPS 投与群 42.4 日, OK-432 投与群 37.3 日, および未処置群は 19.4 日であった。平均生存率が LPS 投与群で 2.2 倍, OK-432 投与群で 1.9 倍に延長され, LPS 投与群は未処置群に比して $p < 0.01$, OK-432 投与群は未処置群に比して $p < 0.05$ と, いずれも未処置群に対して有意に生存期間の延長が認められた (図 2)。一方, 血中の TNF 活性を測定すると, LPS 投与群では, 5 匹全例に TNF の誘導が認められた。しかし, OK-432 投与群では 100 U/ml 以上の細胞障害活性が得られたのは, わずかに 11 匹中 2 匹であった。

考 察

1975 年 Carswell ら¹²⁾ は, Meth A 肉腫を移植したマウスに BCG, *C. parvum* などを投与し, 続いてその 2~3 週間後に LPS を投与すると, 移植した腫瘍が出血性壊死に陥ることを報告した。このとき, 血中に誘導された物質 (サイトカイン) は腫瘍壊死因子 (TNF) と名づけられ, その後, 多くの研究者たちが TNF の研究に取り組んできた。その結果, TNF (TNF- α) はマクロファージ^{12), 13)}で産生されること, 種非特異的に *in vivo* のみならず, *in vitro* においても種々の癌細胞, またある種の正常細胞に対して, cytolytic にあるいは cytostatic に障害性を発揮することが明らかにされた^{14), 15)}。また, 癌細胞の *in vitro* と *in vivo* での TNF に対する感受性が一致しないことも明らかにされた¹⁶⁾。In vitro での細胞破壊の機構に関して栗山ら¹⁷⁾は, 細胞内に直接 TNF

図 1a 腫瘍体積変化率 (未処置群, n = 5)

図 1b 腫瘍体積変化率 (LPS 投与群, n = 4)

図 1c 腫瘍体積変化率 (OK-432 投与群, n = 5)

図 1 処置直前の腫瘍体積を 100 とし、処置後の体積変化を処置直前の体積に対する比で表す。

- a 未処置群では腫瘍の最大径が 10 mm を越えた時点を 0 日とし、以後の腫瘍体積の増大を計測した。
- b 腫瘍の最大径が 10 mm を越えた時点で、LPS 10 μ g を血中に投与し、以後の腫瘍体積の変化を計測した。
- c 腫瘍の最大径が 10 mm を越えた時点で、OK-432, 1 KE/20 g BW を 5 時間間隔で投与し、以後の腫瘍体積の変化を計測した。

※腫瘍体積は腫瘍の縦、横、高さの 3 辺の掛け合わせで表した。

写真 3a LPS 10 μ g 投与直前の舌癌の状態

写真 3b LPS 投与 7 日後の状態 (退縮率70%)

表 5 担瘤ハムスター（外向発育型）血中に誘導された TNF 活性

投与試薬	細胞障害活性 (U/ml)
LPS (10 μ g) 投与群 (n = 4)	5.5×10^4
	1.5×10^5
	5.0×10^5
	1.0×10^6
OK-432 (1 KE/20 gBW) 投与群 (n = 5)	< 20
	< 20
	110
	240
	250

を注入しても細胞破壊は起こらないことより、TNF の効果発現には TNF が細胞膜上の TNF 受容体と結合することが不可欠で、TNF-受容体複合体となった後、細胞内に移行しライソゾーム分画へ送られると報告しているが、Smith ら¹⁸⁾は TNF が受容体と結合後、TNF 自体が細胞内に移行し細胞を破壊することを報告している。また、松原らは TNF が受容体と結合後、Protein kinase C が活性化されることを報告している¹⁹⁾。TNF の細胞破壊の機構としては、細胞内 hydroxyl radical 産生の亢進²⁰⁾、ライソゾーム崩壊の関与²¹⁾が報告されている。

In vivo に関しては、TNF は直接的な細胞障害作用の他に、腫瘍血管を破壊することで腫瘍細胞を壊死に導く機序が報告されている²²⁾。この機構の相違のため、*in vitro* における腫瘍細胞の TNF に対する感受性は、*in vivo* での感受性とは一致しないとされている。

近年、遺伝子組み替え型 TNF (rTNF) が開発され^{22,23)}、製剤化されたことにより、TNF に関する研究は飛躍的に発展した。また、臨床治験も行われ、その結果が報告されはじめている^{3,4)}。しかし、rTNF の抗腫瘍効果に関する評価は、その対象が実験動物から臨床に移るにつれ低くなってきた⁵⁾。その理由の1つとして、動物実験ではその効果判定を移植腫瘍で行ってきたため、自然発生ヒト癌との間に性質の隔たりがあり、期待どおりの効果が得られなかったことが考えられる。著者らが検索したところ、動物モデルの自然発生癌に対する TNF の効果に関する報告は見当たらず、化学発癌に対する Schwartz²⁴⁾らの報告が認められたのみである。そこで今回、著者らは、移植癌よりもよりヒト癌に近い性質をもつとされる、DMBA 誘導舌癌ハムスターを治療モデルとして用い、口腔領域悪性腫瘍、特に舌扁平上皮癌への内因性 TNF の応用の可能性について検討を行った。

DMBA 誘導ハムスター頬嚢癌は、以前より多くの研

図 2 生存期間

Cox-Mantel test

control 群 * OK-432 投与群

U = 2.385 P = 0.0171 P < 0.05

control 群 * LPS 投与群

U = 2.831 P = 0.0046 P < 0.01

究者たちにより治療モデルとして用いられてきた。この頬嚢癌を Fujita ら⁹⁾が舌癌に発展させ、さらにその発癌方法を重岡ら⁹⁾が改良した。当科では、この舌癌ハムスターを以前よりヒト口腔癌の治療モデルとして用い、免疫療法の有効性を報告してきた^{1,2)}。DMBA を塗布することによる発癌の機構に関しては、現在、Sakai ら²⁵⁾がトランスジェニックマウスを用いて発癌遺伝子の解析を試みている。発癌率に関して、当科での過去の報告では90%以上とされているが、今回著者らが行った実験では発癌率60%と低かった。その理由として、著者らは発癌の有無を生検によって組織学的に調べ、扁平上皮癌の存在を厳密に確認したことが、発癌率の低下という結果として現れたものと考えられる。

本実験では、この化学物質誘導癌を標的とし、生体内にまず免疫賦活剤を投与して TNF を誘導し、ついで誘導された TNF による抗腫瘍効果の発現の有無について検討した。

まず正常ハムスター血中に一次刺激剤として *P. acnes* を、ついで二次刺激剤として LPS を投与してみると、 $1.6 \times 10^5 \sim 8.7 \times 10^5$ U/ml と、他の動物で従来報告されているのと同程度の TNF 活性が誘導された。Carswell らの報告以来、TNF の産生機序は、一次刺激剤にて細胞内皮系の賦活化、マクロファージの過形成が起り、マクロファージが TNF 産生準備状態となり、二次刺激にてマクロファージの活性化が起り TNF が産生される、とされていたが、現在ではさらに T 細胞の関与が考えられている²⁶⁾。すなわち、一次刺激によりマクロファージの活性化に加えて、T 細胞からマクロファージ増殖因子が放出されマクロファージの数を増加させる。このようにして TNF 産生準備状態となり、二次刺激にてマクロファージでの TNFm-RNA の転写、翻訳が起こる

とされている。いずれにせよ、*in vivo* での TNF の誘導には、2 回の刺激が必要であることは一般に認められている。ところが、Beutler²⁷⁾は、ラビットで LPS の単独投与にて TNF の誘導が可能であることを報告している。また、原中²⁸⁾はその著書のなかで、ハムスターでは LPS の単独投与にても TNF の誘導が可能であることを述べている。そこで、著者らは正常ハムスターに、LPS の単独投与を行ってみた。その結果、LPS 単独投与にても血中に $5.9 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^4 \text{ U/ml}$ の TNF 活性が誘導され、しかもその活性は用量依存性であった。ついで、担癌ハムスターに LPS の単独投与を行うと、 $5.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ U/ml}$ の TNF 活性が誘導され、これは正常ハムスターで誘導される活性よりも約 10 倍強かった。担癌ハムスターにおいては、発癌操作あるいは担癌状態が一次刺激となり、TNF が誘導されやすい状態にあるのかも知れない。また、単回の刺激で TNF の誘導が可能であったことは、*in vivo* での TNF 誘導について、従来いわれてきた機構以外の可能性を示唆するものであり、今後解明が必要であろう。

今回の実験で、DMBA 誘導舌癌は外向性に腫瘍を形成する外向発育型と、潰瘍を形成し内方へと浸潤していく内向発育型とに大別された。外向発育型腫瘍は、腫瘍径の計測は可能であったが発生頻度が低く、 $n = 9$ であったため生存曲線を描くことはできなかった。したがって、腫瘍の退縮率を抗腫瘍効果の指標とした。一方、内向発育型腫瘍は、腫瘍の大きさを測定することが困難であったため、延命効果を抗腫瘍効果判定の指標とした。

今回われわれの実験では、外向性腫瘍に対しては LPS、OK-432 いずれの投与群でも、TNF が誘導された場合には、一時的にはあるが腫瘍の退縮が認められ、また誘導された TNF 活性の強さと腫瘍の退縮率はある程度相関した。このことより、腫瘍の退縮を TNF がきたす直接的な証拠は得られていないが、外向性腫瘍に対する LPS や OK-432 の抗腫瘍効果発現には、TNF が重要な役割を果たしていることが示唆された。*In vivo* において、TNF が腫瘍細胞を障害する機構については、Shklar²⁹⁾は DMBA 誘導ハムスター頬嚢癌に、 β -カロチンなどを局所投与することで腫瘍の退縮が認められること、またその際、腫瘍周囲のマクロファージ内に TNF が存在することより、TNF の直接作用を示唆する報告をしている。一方、North³⁰⁾はマウス移植腫瘍に対して TNF の抗腫瘍効果は、腫瘍血管の破壊が主たる機構であることを証明している。著者らは、以前にハムスター由来悪性黒色腫 RPMI 1846 を移植したハムスターに、今回の実験と同様の方法にて血中に TNF の誘導を行った。その結果、腫瘍の多くは出血性壊死と思われる黒変をきたし、完全脱落例も認められた。しかし、今回の実験では、退縮を示した腫瘍には、出血性壊死を思わせる所見は認められなかった。したがって、TNF

による DMBA 誘導舌癌の退縮と、移植腫瘍の障害とは異なる機構によるものではないだろうか。すなわち、移植腫瘍では、TNF による腫瘍血管の破壊が主たる作用となるが、DMBA 誘導舌癌では、他の機構が主となっている可能性が考えられる。さらに、両者の抗腫瘍作用には、異なるサイトカインが主役を演じている可能性も考えられるため、今後その機構の詳細の解明を試みるつもりである。

内向性に発育する腫瘍に対しては、誘導された TNF の強さと延命効果の間には、LPS では相関性が認められたものの、OK-432 では認められなかった。すなわち、OK-432 投与群で発癌ハムスターの生存日数は、未処置群に比して有意 ($P < 0.01$) に延長されたにもかかわらず、血中に TNF はほとんど誘導されなかった。したがって、OK-432 は直接的な腫瘍の障害とは異なった機構で、延命に寄与しているのかも知れない。

今回の実験では、LPS 投与により $1 \times 10^4 \text{ U/ml}$ 以上の TNF 活性が得られたにもかかわらず、腫瘍の完全退縮は認められず、しかもその多くが再度増殖を示した。また、内向発育型腫瘍に対しては、LPS 投与にて高濃度の TNF が誘導された場合、延命は可能であるが結局は全例死亡の転機をとった。すなわち、化学発癌に対しては、血中に TNF の誘導を行っても完全治癒は望めない結果が得られた。この結果は他の動物での移植腫瘍に対する結果とは異なり、いわばヒト癌に対する評価に近いと考えられる。したがって、今後このモデルを治療モデルとして使用することの意義が認められたと考える。

今回の実験は、LPS や OK-432 などの免疫賦活剤の投与によって、一時的にはあるが、腫瘍の退縮が得られたことより、免疫賦活剤による血中への TNF の誘導が、癌治療において有効な併用療法となり得る可能性を示唆したものである。一方、ほとんどのハムスターで腫瘍の完全退縮は認められず再度増殖を示したこと、また延命効果は認められるものの全例腫瘍死の転機をとったことより、免疫賦活剤による血中への TNF の誘導のみでは完全な治癒は望めず、根治的效果を欲するのであれば、さらに他の免疫賦活剤、サイトカインあるいは化学療法の併用などの検討が必要であることを示したものである。また、最近 rTNF の局注が有効であるとの報告もあり³¹⁾、今後免疫賦活剤による局所への TNF の誘導も検討していく予定である。

結 語

今回、DMBA 誘導舌扁平上皮癌を有するハムスターの血中に、免疫賦活剤を投与することで TNF を誘導し、それに伴う抗腫瘍効果について検討した。その結果、以下の結論を得た。

1. ハムスターでは、LPS を血中へ単回投与すること

で、血中に高濃度の TNF 活性が得られた。しかし、OK-432 1 KE/20 g 体重を5時間間隔で投与を行っても、血中への TNF の誘導は困難であった。

2. 外向発育型腫瘍の退縮に、血中への TNF の誘導が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。また、この抗腫瘍効果はある程度、血中 TNF 活性に依存していた。

3. 内向発育型腫瘍を有するハムスターに対する延命効果は、LPS, OK-432 のいずれの投与にても、未処置群に比して有意に延長が認められたが、OK-432 投与群では血中 TNF の誘導はほとんどが認められなかった。

4. 免疫賦活剤投与により血中へ TNF の誘導が可能であれば、それは舌癌治療において有効な併用療法となり得る可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師島田桂吉教授に深甚なる感謝の意を表します。併せて、本研究の推進に際し、ご助言、ご援助頂きました中西孝一助教授、発癌の確認に際しご尽力頂きました寺延治講師に深謝いたします。また、本研究に終始ご懇切なるご指導、ご協力を頂きました宇佐美博子博士はじめ東京免疫薬理研究所の諸氏に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は第48回日本癌学会総会（1989年10月23日、於名古屋）において発表した。

引用文献

- 1) 赤沢 登, 大西 克, 他: DMBA 誘導ハムスター舌腫瘍の形成と治療に関する研究 第V編 ハムスター舌腫瘍形成過程に及ぼす、細胞表面酵素阻害物質(ペスタチン)の影響について. 口科誌33: 73-82 1984.
- 2) 築田幸慶, 酒井伸夫, 他: DMBA 誘導ハムスター舌腫瘍形成過程における細胞性免疫能の検討. II. DMBA ハムスター舌腫瘍形成過程の腹腔マクロファージの機能について. 日口外誌31: 739-743 1985.
- 3) Blick, M., Sherwin, S.A., et al.: Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 47: 2986-2989 1987.
- 4) Creagen, E.T., Kovach, J.S., et al.: A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer* 62: 2467-2471 1988.
- 5) 川上正舒: 腫瘍壊死因子(TNF)とリンフォトキシン(LT). *日本臨床* 46: 123-128 1988.
- 6) Beutler, B. and Cerami, A.: Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320: 584-588 1986.
- 7) 梅津康生, 永山政明, 他: OK-432 複合療法の基礎的・臨床的検討—OK-432 の至適投与方法について— *臨床成人病* 18: 1357-1363 1988.
- 8) Fujita, K., Kaku, T., et al.: Experimental production of lingual carcinoma in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *J Dent Res* 52: 327-332 1973.
- 9) 重岡 潔, 赤沢 登, 他: DMBA 誘導ハムスター舌腫瘍の形成と治療に関する研究 第I編 ハムスター舌腫瘍の自立的増殖能獲得時期について. *口科誌* 30: 378-386 1981.
- 10) 山本章博: 溶連菌製剤 OK-432 による TNF の誘導. *Ther Res* 7: 259-266 1987.
- 11) Ostrove J.M. and Gifford, G.E.: Stimulation of RNA synthesis in L-929 cells by rabbit tumor necrosis factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 160: 354-358 1979.
- 12) Carswell, E.A., Old, L.J., et al.: An endotoxin-induced serum factor causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666-3670 1975.
- 13) Philip, R. and Epstein, L.B.: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity and uced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature* 323: 86-89 1986.
- 14) Shau, H.: Characteristics and mechanism of neutrophil-mediated cytostasis induced by tumor necrosis factor. *J Immunol* 141: 234-240 1988.
- 15) Shalaby, M.R., Espevik, T., et al.: The involvement of human tumor necrosis factors- α and- β in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 141: 499-503 1988.
- 16) Manda, T., Shimomura K., et al.: Recombinant human tumor necrosis factor α : Evidence of an indirect mode of antitumor activity. *Cancer Res* 47: 3707-3711 1987.
- 17) 栗山 浩, 渡辺直樹, 他: TNF receptor の細胞内動態の解析. *癌と化学療法* 15: 325-333 1988.
- 18) Smith, M.R., Munger, W.E., et al.: Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 144: 162-169 1990.
- 19) 松原長秀, 淵本定儀: Tumor necrosis factor の抗腫瘍効果発現におけるCキナーゼの関与. *Biotherapy* 4: 528-531 1990.
- 20) 山内尚文, 渡辺直樹, 他: TNF の腫瘍細胞障害機構における Hydroxyl radical の意義. *Biotherapy* 4: 532-537 1990.
- 21) 加藤 革, 中村 聡, 他: リソゾーム不安定化剤による TNF の抗腫瘍効果増強作用. *Biotherapy* 4: 538-541 1990.
- 22) Pennica, D., Aggarwal, B.B., et al.: Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.

- Nature 312: 724-729 1984.
- 23) Shirai, T., Yamaguchi, H., et al.: Cloning and exprsion in escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor. Nature 313: 803-806 1985.
- 24) Schwartz, J.L., Sloane, D., et al.: Prevention and inhibition of oral cancer in the hamster buccal pouch model associated with carotenoid immune enhancement. Tumor Biol 10: 297-309 1989.
- 25) Sakai, N.: Chemical carcinogenesis is accelerated in c-fos transgenic mice. Kobe J Med Sci 136: 37-53 1990.
- 26) 漆崎一朗, 新津洋司郎, 他: TNF, 癌と化学療法 14: 1208-1215 1987.
- 27) Beutler, A.B., Milsark, I.W., et al.: cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. J Immunol 135: 3972-3977 1985.
- 28) 原中勝征: TNF 腫瘍壊死因子. 第1版, 日本医事新報社, 東京, 1984, 59頁.
- 29) Shklar, G. and Schwartz, J.: Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphotocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract. Eur J Cancer Clin Oncol 24: 839-850 1988.
- 30) North, R.J. and Havell, E.A.: The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF). II. Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. J Exp Med 167: 1086-1099 1988.
- 31) 新津洋司郎, 渡辺直樹: TNF の臨床応用. 医学のあゆみ 152: 579-583 1990.