原 著

腫瘍増殖・転移におよぼす Defibrinogenation の影響

樋 口 佑 次* 山 下 喬* 山 本 俊 明*
香 川 和 夫* 螺 良 英 郎*

Effect of defibrinogenation on tumor growth and
metastasis in mice

Yuhji HIGUCHI*, Takashi YAMASHITA*, Toshiaki YAMAMOTO*,
Kazuo KAGAWA* and Eiro TSUBURA*

Key words: defibrinogenation, ancrod, Lewis lung tumor, tumor growth,
experimental blood-borne pulmonary metastasis

Blood coagulation-fibrinolysis system is of great importance on tumor growth and metastasis. Our previous studies on the inhibition of metastases by sulfated polysaccharides have shown that intravascular coagulation was a very important mechanism at an early stage of hematogenous metastasis.

For the purpose of investigating the significance of fibrinogen on tumor growth and metastasis, we studied effect of defibrinogenation with ancrod in mice. Lewis lung tumor (3LL) is a favorable model of pulmonary metastases in syngeneic C57BL/6 mice. Therefore, 3LL cells were inoculated via tail vein for intravenously induced pulmonary metastases or subcutaneously implanted into foot pad for those of spontaneity.

Primary tumor was amputated 9 or 12 days after tumor implantation. Mice were autopsied on day 14 after intravenous tumor inoculation or day 23 after tumor implantation into foot pad. Pulmonary metastases were assayed grossly by counting the number of pulmonary surface nodules and measuring dry weight of metastatic lungs.

Our experimental results for ancrod on tumor growth and metastases are as follows. Significant reduction of intravenously induced pulmonary metastases in mice treated with 200 units/kg of ancrod once intraperitoneally, one hour before tumor inoculation ($P<0.001$). Plasma fibrinogen levels decreased to the extent of trace in the first 4 hours and was 55 mg/dl in 12 hours after administration in mice treated with same dose of ancrod. Furthermore, significant reduction of spontaneous pulmonary metastases was obtained in mice treated with 200 units/kg of ancrod twice daily for post-amputation period starting from day 15 to 22 after tumor implantation ($P<0.01$). However, no inhibition of spontaneous

* 徳島大学医学部第三内科 (〒770 徳島市蔵本町3-18-15), Third Department of Internal Medicine, The Tokushima University, Tokushima, Japan.

metastases was observed in mice treated for only pre-amputation, and pre-and post-amputation period. Plasma fibrinogen levels increased prominently after tumor amputation in mice. On the contrary, those were less than 71 mg/dl in all mice bearing 3LL treated with ancrod. No inhibition of primary tumor was observed at the time of amputation. The significance of fibrinogen on tumor growth and metastasis was discussed.

はじめに

癌転移は悪性腫瘍の大きな特徴の一つである。この現象は複雑であり、腫瘍細胞および宿主側の種々の要因によって決定されている¹⁾。とくに凝固線溶系²⁾の役割は免疫系³⁾とともに重要な宿主要因の一つである。われわれは種々の硫酸化多糖、なかでも強力な抗凝固作用を有する Xylan sulfate が著明な血行性転移抑制作用をあらわし、血行性転移の初期過程には、血管内凝固が重要であることをラットの実験系で報告してきた⁴⁾。

今回、腫瘍増殖、転移におけるフィブリノゲンの意義に関して研究するため、蛇毒製剤 ancrod による defibrinogenation の効果をマウスの実験腫瘍系にて検討した。

I. 実験材料と方法

動物は体重 20~24g, 雄 C57BL/6 マウスを用い、腫瘍は同系マウス皮下に継代移植している Lewis lung tumor (3LL) を用いた。腫瘍細胞浮遊液は既報³⁾にしたがって調整した。defibrinogenation は Malayan pit viper (Agkistrodon rhodostoma) の蛇毒からの抽出製剤である ancrod (107単位/ml: 持田製薬 KK より供与) によりなされた。本剤は使用時に生食水で溶解して用いた。転移実験は以下の2つの系について行った。一つは腫瘍細胞の静脈内注入による系 (intravenously induced metastasis) で生食水あるいは ancrod (200units/kg) を one shot で腹腔内に投与し、1時間後に 3LL, 4×10^6 細胞をエーテル麻酔下で尾静脈より注入した。移植2週後にマウスを屠殺した。他の系では 3LL, 10^6 細胞をマウス右足蹠皮下に移植し、第9日あるいは第12日にペントバルビター

ル麻酔下で cutting cautery により原発巣をもった下肢を切断した。次いで第23日に全動物はエーテル麻酔により屠殺して実験終了とした。この際 ancrod は移植翌日より原発巣切除前日まで (pre-amputation period), 原発巣切除3日後より屠殺前日まで (post-amputation period) および両期間 (pre-and post-amputation period) の3期間に分けて、200単位/kg, 1日2回、連日腹腔内投与した。同量の ancrod を投与した正常および担癌マウスについて血漿フィブリノゲン量を測定した。マウスをクロロフォルム麻酔下に開胸し、右心穿刺により採血し、トロンビン時間法による Dade 社製のキットを用い、磯部ら⁵⁾のエーゼ法による血漿半量法によった。

腫瘍増殖および転移の判定は移植肢切断時の足蹠の厚さ (mm) および転移肺の表面結節数、剔出肺の乾燥重量 (mg) により行なった。有意差検定は Student's t-test によった。

II. 実験結果

Ancrod の腫瘍増殖、転移におよぼす影響は表1に総括されている。

1) intravenously induced metastasis におよぼす影響

あらかじめ ancrod 1回投与により defibrinogenation の状態にしておいたマウスに、3LL 細胞を 4×10^6 個静脈内注入すると、2週後の肺転移結節数は表1に示すごとく対照群に比して有意に減少した ($P < 0.001$) (表1)。この際 ancrod を正常マウスに腹腔内投与した時の血漿フィブリノゲンの経時的変動は図1に示すごとくである。投与後4時間までは100, 200, 400 units/kg のいずれの投与量にあっても、血漿フィブリノゲン量は痕跡的であり、12時間後でも

Table 1 Effect of anicrod on growth and metastasis in mice

Tumor inoculation	i.v. via tail vein	s.c. into foot pad		
Treatment with anicrod	200u./kg, i.p. single dose, before tumor inoculation	200u./kg, i.p., multiple dose, twice daily during experiment		
		pre-amputation (day 1-8)	post-amputation (day 15-22)	pre-and post-amputation (day 1-8 & 12-22)
Primary tumor (foot pad thickness: mm)		4.76±0.59 (9)	4.68±0.12 (12)	5.26±0.15 (13)
		5.13±0.49 (10)	4.39±0.11 (15)	5.25±0.16 (19)
Numbers of lung surface nodules	131.9±9.4 (14)	24.0±7.1 (9)	46.9±7.6 (12)	28.4±4.1 (13)
	62.1±12.6 (14)**	29.1±4.9 (10)	18.2±6.3 (15)*	41.8±5.4 (19)
Dry weight of the lung (mg)		76.6±13.8 (9)	138.1±12.3 (12)	98.0±6.9 (13)
		104.3±15.0 (10)	62.0±11.5 (15)**	118.0±8.0 (19)

Primary tumor was amputated on day 9 or 12, and then each mice was autopsied on day 23. Values are mean±S.E. (upper: untreated control, lower: anicrod treated). Numbers of mice are shown in parentheses. Significant difference from control: * P<0.01, ** P<0.001.

Fig. 1 Change in plasma fibrinogen levels after intraperitoneal administration of anicrod into normal mice. ●-----● 100 u./kg ●- - -● 200 u./kg ●-----● 400 u./kg. Values are mean±S.D. Numbers of mice are shown in parentheses.

転移実験に用いた投与量で、平均55mg/dlと明らかに減少していた。また dose response もみられた。
2) Spontaneous metastasis におよぼす影響
図2の実線で示すごとく、3LL担癌マウスの血漿フィブリノゲン値は腫瘍の増殖につれて増

加するが、最も急激で著明な増加は原発巣切除後3日目にみられ、正常マウスの約2倍の値をとっている。なお正常マウスの下肢切断後にも、フィブリノゲン値の著しい増加がみられる。しかし、anicrod 200 units/kg, 2回/日、連日投与した場合、次の投与直前にフィブリノ

Fig. 2 Change in plasma fibrinogen levels on mice bearing 3LL. ●—● non-treated, ●-----● treated with 200u./kg of anicrod i.p. twice daily, during each experiment. Values are mean ± S.D. Numbers of mice are shown in parentheses. Open circle shows value on fibrinogen level in normal control mice 3 days after sham operation. Primary tumor was amputated on day 9. Pulmonary metastasis was assayed on day 23.

ゲンを測定すると、実験のいずれの時期でも図1にみる正常マウスにおける12時間値とほぼ同程度に充分 defibrinogenate されていることがわかった。一方、腫瘍増殖、転移におよぼす影響は表1にみるごとく anicrod を原発巣切除3日後 (post-amputation) より投与した場合のみ、肺転移結節数および乾燥肺重量の有意な減少をみた ($P < 0.01$)。なお切除した原発巣への影響はみられなかった。

III. 考 察

腫瘍増殖、転移におよぼす defibrinogenation の影響についてはこれまでにいくつかの報告がある。Wood ら⁶⁾、Ivarsson⁷⁾、西ら⁸⁾はそれぞれ家兎 V_2 癌・arvin, ラット線維肉腫・reptilase, ラット腹水肝癌・anicrod 系を使用して、静注転移を抑制した。われわれもマウス 3LL・anicrod 系で同様の効果をみた。このことは静脈内に注入された腫瘍細胞の標的臓器着床の段階における血管内凝固の重要性を指摘している。しかし Hagmar⁹⁾はマウス MCG1-SS 腫瘍、メラノーマ B16・arvin の系で静注転移に対し

て有意な肺転移抑制効果はみられず、むしろ他臓器転移の増加がみられると報告している。

ヒト固型癌の転移モデルにより近い 3LL の自然発生転移におけるわれわれの成績は、着床段階も関与しているとみられる原発巣切除前の defibrinogenation によって転移抑制はみられず、むしろ原発巣切除後の微小転移巣の増殖が始まる時期に anicrod の効果を認めた。Donati ら¹⁰⁾も 3LL マウスの筋肉内移植で原発巣切除の有無にかかわらず、batroxobin を移植第11日目より投与した場合に肺転移の減少をみている。ただし、われわれの成績を含め研究者の多くは原発腫瘍に対する影響は少ないと述べている¹⁰⁾¹¹⁾。自然発生転移の実験系では増殖、転移におよぼす要素が複雑であり、着床と遊離に対する相反する効果や、本実験にみられたような原発巣切除といった手術侵襲によるフィブリノゲン値の急激な増加も含めた凝固線溶系の異常も重要になってくる。後者については外傷が転移を促進するという報告¹²⁾と合わせて、この時期に行った defibrinogenation の増殖転移に対する効果も重要であろう。

結 語

腫瘍増殖，転移におよぼす defibrinogenation の効果は腫瘍増殖，進展の時期により異なった。

文 献

- 1) Hoover, H. C., Jr. and Ketcham, A. S.: Techniques for inhibiting tumor metastases. *Cancer*, **35**; 5~14, 1975.
- 2) Tsubura, E., et al.: Effect of sulfated polysaccharides on blood-borne pulmonary metastasis in rats. *Gann*, **67**; 849~856, 1976.
- 3) 山下 喬，他：腫瘍の肺転移におよぼす各種 immunopotentiators の影響について。癌と化学療法，**5** (Suppl. I); 103~109, 1978.
- 4) 樋口佑次，他：硫酸化多糖の抗凝固作用と実験的腫瘍転移抑制に関する研究。血液と脈管，**9**; 257~263, 1978.
- 5) 磯部淳一，他：トロンビン時間法によるフィブリノゲン迅速定量法の検討。基礎と臨床，**9**; 869~878, 1975.
- 6) Wood, S., Jr. and Hilgard, P. H.: Arvin-induced hypofibrinogenemia and metastasis formation from blood-borne cancer cells. *Johns Hopkins Med. J.*, **133**; 207~213, 1973.
- 7) Ivarsson, L.: Pulmonary metastasis formation after intravenous tumor cell injection in defibrinogenated rat. *Z. Krebsforsch.*, **85**; 83~90, 1976.
- 8) 西 満正，小代正隆：担癌体の Fibrinogen の意義における実験的考察。癌と化学療法，**5** (Suppl. I); 147~153, 1978.
- 9) Hagmar, B.: Defibrination and metastasis formation: Effect of arvin on experimental metastases in mice. *Europ. J. Cancer*, **8**; 17~28, 1972.
- 10) Donati, M.B., et al.: Growth and metastasis of the Lewis lung carcinoma in mice defibrinated with batroxobin. *Europ. J. Cancer*, **14**; 343~347, 1978.
- 11) DeWys, W. D., et al.: Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy. *Cancer Res.*, **36**; 3584~3587, 1976.
- 12) Agostino, D. and Clifton, E. E.: Trauma as a cause of localization of blood-borne metastases: Preventive effect of heparin and fibrinolysin. *Ann. Surg.*, **161**; 97~102, 1965.

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 自治医科大学教授 高久史麿
専門医21氏分担執筆

A5判 251頁 図126 表47 定価4,800円(〒200円)