

Effect of Endotoxin on Tumor Growth and Metastasis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8384

エンドトキシンの抗腫瘍効果および転移に 及ぼす影響に関する基礎的研究

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

柿原 稔

(平成4年7月9日受付)

グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成成分の一つである内毒素 (エンドトキシン) の腫瘍発育および腫瘍原発巣切除後の転移形成におよぼす影響とその機序を検討する目的で, 自然発生的に肺転移をおこす Lewis 肺腫瘍を C57BL/6 マウスに皮下ないし静脈内に移植し, これにエンドトキシンを静注投与する基礎的研究を行った. エンドトキシンとしては lipid A を主成分とする *Salmonella typhimurium* Re 変異株由来のものを使用し, 投与量と回数は微量 (2.5 μ g) 一回, 微量連続, ないし大量 (25 μ g) 一回とした. Lewis 肺腫瘍細胞 5×10^6 個をマウスの右後肢足趾皮下に移植し, 9日後に腫瘍移植肢を股関節より外科的に切断 (外科的原発巣切除) し, この腫瘍移植肢を腫瘍重量として測定してそれを目安として Ex による移植腫瘍発育抑制について調べた. さらに腫瘍移植後21日目に解剖して肺を切除し, 重量と表面の転移結節数を測定してそれを目安として Ex による自然発生的肺転移の発育抑制について調べた. 微量エンドトキシン (2.5 μ g) 一回投与実験群は更に次の2つの条件, 腫瘍移植巣の外科的切除2日前に微量エンドトキシンを一回投与する群, 外科的切除直後に微量エンドトキシンを一回投与する群に分け, 外科的切除のみの対照群と比較した. 微量連続投与実験群では次の3つの条件, 移植巣の血管侵襲が陽性となる腫瘍移植後5日目より外科的切除後4日目まで連続8日間微量エンドトキシンを投与する群, 腫瘍移植後5日目より外科的切除前までの4日前微量エンドトキシンを投与する群, 外科的切除後に4日間微量エンドトキシンを投与する群に分け, 外科的切除のみの対照群と比較した. さらに大量エンドトキシン投与実験群では大量エンドトキシンを一回のみ外科的切除前に投与する群と外科的切除後に投与する群を作成し, 微量エンドトキシンを腫瘍移植後5日目より外科的切除前まで4日間投与する群, 外科的切除後4日間投与する群と比較した. 結果として移植腫瘍の発育に関してはエンドトキシンに有意な抑制効果が認められ, それも微量を連続投与する群が最も顕著であった ($P < 0.001$). 肺転移に関してもエンドトキシンが有意に抑制し, それも血管侵襲が陽性となる腫瘍移植後5日目より外科的切除後4日目まで8日間微量連続投与した群の転移結節数の現象が最も顕著であった ($P < 0.001$). 一方エンドトキシンには Lewis 肺腫瘍静注マウスの血小板凝集能を亢進する作用が認められ, これは血小板凝集抑制剤プロスタグランディン I_2 により抑制される. そこで人工的肺転移形成モデルにおけるエンドトキシンの影響に関しては血小板凝集能と転移の関係を調べる必要があると考え, Lewis 腫瘍細胞直後より4日間エンドトキシンを投与する群, 腫瘍細胞静注直後から4日間エンドトキシンと血小板凝集抑制剤のプロスタグランディン I_2 を投与する群, 腫瘍細胞静注直後から4日間プロスタグランディン I_2 を投与する群を作成し, 腫瘍細胞静注のみの対照群と比較した. その結果, エンドトキシンは有意に転移組織重量と転移結節数を増加させたが ($P < 0.001$), しかし血小板凝集抑制剤のプロスタグランディン I_2 はエンドトキシンによる転移促進効果を顕著に抑制した ($P < 0.001$). したがってエンドトキシンは局所の癌組織に対してはその発育を抑制することで結果的に転移を抑制する作用と, 逆に一方で血中に遊離した癌細胞に対しては血小板との凝集を促進することにより転移を促進するという相反する作用を持つことを示している.

Key words endotoxin, Lewis lung carcinoma, metastasis, prostaglandin- I_2 , platelet aggregation activity

グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成成分の一つである内毒素 (エンドトキシン, endotoxin, Ex) は生体に対して極めて多彩な活性を示す¹⁾. そのため発熱・ショック・播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 等, 日常の外科臨床で Ex により引き起こされる種々の病態の治療にあたっては難渋することが多い. その反面 Ex は生体にとって有用な活性をも示し, その一つとして抗腫瘍性が注目され, Coley²⁾ によって示された頸部の肉腫患者に感染を惹起してこ

れが治療された臨床実験をきっかけに, その後 Shapiro³⁾, Ribl⁴⁾, Stinebring⁵⁾, Freudenberg⁶⁾ による多数報告がある. しかしこれらは実験的な腫瘍組織の Ex による消退を報告したもので, Ex による抗腫瘍療法を悪性腫瘍の手術的切除療法に併用した場合に転移形成に及ぼす影響について検討された報告はほとんどない. 本来 Ex には強い毒性があるため, 現状では実験の臨床において抗腫瘍効果を目的に Ex をそのまま投与することは考え難い. しかし悪性疾患に対して行われる手術療法

Abbreviations: ADP, adenosine-5-diphosphate; Ex, endotoxin; INF, interferon; LPS, lipopolysaccharide; PGI $_2$, prostaglandin- I_2 ; PPP, platelet poor plasma; PRP, platelet rich plasma

は常に細菌感染の危険性を付随しているため、Ex が転移，再発を含めた予後に影響する因子となりうると推測され，それを基礎的に検討する意義は大きいと考えられる．そこで癌の自然肺転移モデルと人工的肺転移モデルを用いて，Ex が原発巣切除後の転移形成に及ぼす影響とその機序を明らかにする目的の実験を行い検討した．

材料および方法

I. 使用動物

動物は6～8週齢，体重18～20g，雌性のC57BL/6Nマウス(日本クレア社，東京)を用い，各実験群には5～20匹を使用した．

II. 腫瘍および腫瘍細胞混濁液作製法

防衛医大第一外科において雌性のC57BL/6Nマウスの右側腹皮下に継代維持されているLewis肺腫瘍を，腫瘍塊の長径が1.5～2cmに達した時点で無菌的に採取し，これを細切後，0.07%コラゲナーゼ加Eagle minimum essential medium (MEM)に移し，37℃のインキュベーターで1時間攪拌した後，400メッシュで濾過した．細胞を10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) 加Eagle MEMで2回洗浄した後，さらに400メッシュで濾過し， 1×10^7 細胞/mlに調整した腫瘍細胞混濁液を0.05ml (5×10^5 個/マウス)右足蹠皮下に移植し，自然肺転移モデルとした．また 1×10^6 細胞/mlに調整した腫瘍細胞混濁液を0.05ml (5×10^4 個/マウス)尾静脈より注射し，人工的肺転移モデルとした．なお腫瘍細胞混濁液の生細胞率はトリパンプル一法で算出したが，95%以上であった．

III. 薬品，使用機器

エンドトキシン (lipid A を主成分とする Salmonella typhimurium Re 変異株由来の糖脂質) は Ribi ImmunoChem Research (Inc, Hamilton, Montana, USA) より，プロスタグランディン₂ (prostaglandin I₂, PGI₂, ONO-26433) は小野薬品 (東京) より購入し，自動血小板凝集能測定装置 (NKK ヘマトレーサー-1, MODEL PAT-4A) は二光バイオサイエンス社 (東京) のものを用いた．

IV. 血小板の採集とその凝集能測定

1. 採血

所定の処置終了後，マウス後眼窩叢から採血した．

2. 多血小板血漿 (Platelet rich plasma, PRP) 及び乏血小板血漿 (Platelet poor plasma, PPP) の作製

谷本¹⁰⁾の方法に準じ，血液9に対し，3.8%クエン酸ナトリウム溶液を1の割合で添加し，直ちに120×g 10分間遠心を行い，上清をシリコン加工試験管に採取し，これを原PRPとした．またPPPは血液を3000×g 15分間遠心を行い，その上清を分取して得た．原PRPは自動血球計数器により血小板を算定後，約30万/mm³になるように調整した．

3. 血小板凝集惹起物質

Adenosine-5-diphosphate (ADP) はベーリンガー・マンハイム・ジャパン社 (東京) のものを用い，蒸留水で所定の濃度に溶解し，使用した．

4. 血小板凝集能測定

凝集計 (二光バイオサイエンス社，東京) を用い，経時的な血小板凝集能変化は発光ダイオードからの電気シグナルを血漿の入ったシリコン加工試験管を介してシリコンホセトルで受光して測定した．電気シグナルの透過率 (%transmission) を原

PRPは0%，PPPは100%に調整し，調整直後の原PRP 200μlを30℃，3分間加温した後，終末濃度が100mmolとなるようにADP溶液22μlを添加し，マグネティックスターラーを用い1000rpm回転数で混和した．尚，ADP添加による透過率の変化は一過性で5分で元に戻るため，添加後5分以内の変化を記録した．

V. エンドトキシン投与実験

1. 自然肺転移モデル

マウスの足蹠にLewis肺腫瘍細胞を 5×10^5 個皮下注射し，9日後にこの移植巣を切断するモデルを作製した．Exは尾静脈より投与するものとし，投与時期，投与量を各種設定した群を作製した．切断した足は腫瘍重量として測定し，それを目安としてExによる移植腫瘍の発育抑制を調べた．腫瘍細胞移植後21日目 (腫瘍移植足切断後12日目) に解剖して肺を切除し，重量を測定して対照と比較し，Exによる転移組織の発育抑制について調べた．その後，Wexler¹¹⁾の方法に準じ，ブアン液で一日固定した．この操作により正常肺組織は黄色に，転移巣は白色になり，これを肉眼的に算定し，Exによる転移結節形成の抑制効果について調べた．実験群は次の3群とし，それぞれの実験群はさらに3～4条件に分けてEx投与を行った．

1) 微量Ex (2.5μg) 一回静注実験群

微量Ex (2.5μg) 一回投与の影響は以下の3つの実験群により調べた．第1群は手術2日前 (腫瘍細胞移植後7日目) にExを静注する術前微量Ex一回静注群，第2群は手術直後にExを静注する術後微量Ex一回静注群，第3群はEx非投与で手術のみを施行する対照群とした (図1)．

2) 微量Ex (2.5μg) 連続静注実験群

微量Ex (2.5μg) 連続投与の影響は以下の4つの実験群により調べた．第1群は手術4日前よりEx静注を開始し，術後も4日間連続してExを静注する術前術後微量Ex連続静注群，第2群は手術前4日間のみExを投与する術前微量Ex (2.5μg) 連続静注群，第3群は手術後4日間のみExを静注する術後微量Ex連続静注群，第4群はEx非投与で手術のみを施行する対照群とした (図2)．

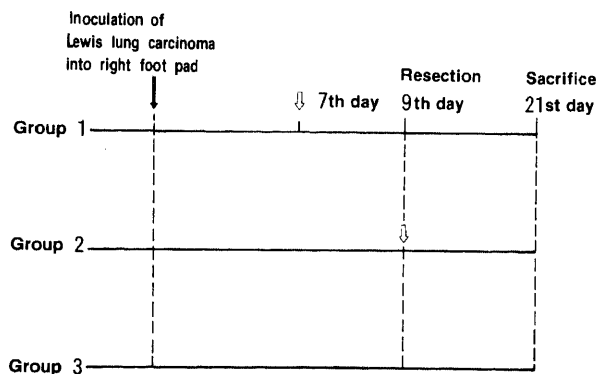


Fig. 1. Experimental plan for spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma (One time injection of a small amount of endotoxin). 5×10^5 cancer cells were inoculated in the foot pad of mice. Nine days later, tumor inoculated foot was resected and their weight was measured. Twenty-one days later, mice were sacrificed and weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. A small amount of endotoxin (2.5μg) was injected intravenously at the time of indicated (open arrows).

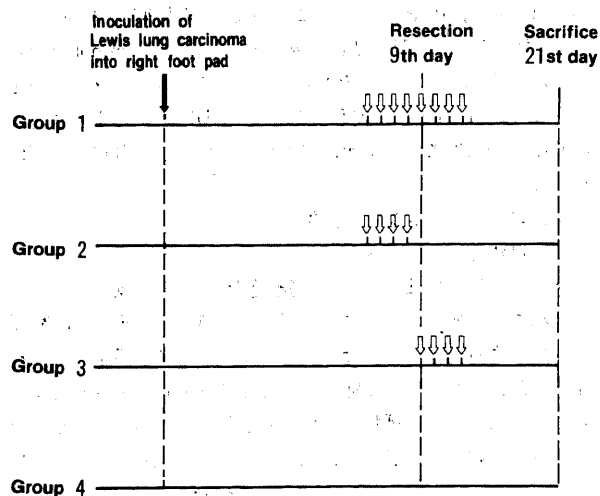


Fig. 2. Experimental plan for spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma (Several times injection of a small amount of endotoxin). 5×10^6 cancer cells were inoculated in the foot pad of mice. Nine days later, tumor inoculated foot was resected and their weight was measured. Twenty-one days later, mice were sacrificed and weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. A small amount of endotoxin ($2.5 \mu\text{g}$) was injected intravenously at the time of indicated (open arrows).

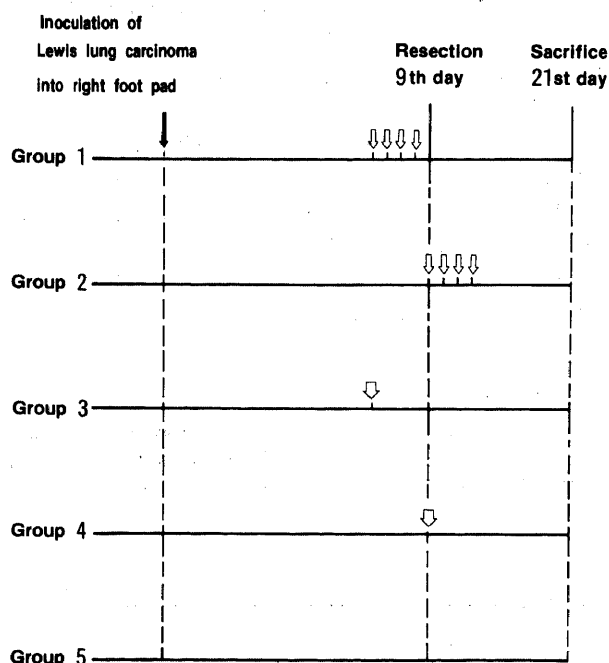


Fig. 3. Experimental plan for spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma (Comparison of one time injection of a large amount of endotoxin with several times injection of a small amount of endotoxin). 5×10^6 cancer cells were inoculated in the foot pad of mice. Nine days later, tumor inoculated foot was resected and their weight was measured. Twenty-one days later, mice were sacrificed and weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. A large amount of endotoxin ($25 \mu\text{g}$) was injected intravenously at the time of indicated (large open arrows). A small amount of endotoxin ($2.5 \mu\text{g}$) was injected intravenously at the time of indicated (small open arrows).

3) 大量 Ex ($25 \mu\text{g}$) 一回静注実験

前述の微量 Ex ($2.5 \mu\text{g}$) 連続投与の効果と大量 Ex ($25 \mu\text{g}$) 一回投与の効果と比較する実験を行った。すなわち 2) の実験系に準じて、第 1 群は術前微量 Ex 連続静注群、第 2 群は術後微量 Ex 連続静注群、第 3 群は術前大量一回 Ex 静注群、第 4 群は術後大量一回 Ex 静注群、第 5 群は Ex 非投与で手術のみを施行する対照群とした (図 3)。

2. 人工的肺転移形成モデル

マウス尾静脈より Lewis 腫瘍細胞 5×10^4 個を静注するモデルを作製し、Ex $2.5 \mu\text{g}$ 静注および PGI_2 $10 \mu\text{g}$ 腹腔内注を腫瘍細胞静注直後または 3 日後に投与開始する群を作製した。

第 1 群は腫瘍細胞静注直後より 4 日間 Ex を静注する Ex 単独 4 日間群、第 2 群は腫瘍細胞静注直後から 4 日間 PGI_2 を腹腔内に注射する PGI_2 単独 4 日間群、第 3 群は腫瘍細胞静注直後から 4 日間 Ex を静注し、同時に PGI_2 を腹腔内に注射する Ex + PGI_2 4 日間群、第 4 群は腫瘍細胞静注後、腫瘍が着床したと考えられる 3 日後より 4 日間 Ex を静注する着床後 Ex 群、第 5 群は腫瘍細胞静注 3 日後より 4 日間 PGI_2 を腹腔内に注射する着床後 PGI_2 群、第 6 群は腫瘍細胞静注のみの対照群とした。第 1 群、第 2 群、第 3 群、第 6 群および正常無処置の各群よりそれぞれマウス 6 匹を無作為に抽出し、Ex ないし PGI_2 投与直後に眼窩動脈より採血し、血小板凝集能測定を行った。13 日後に全例解剖し、肺重量を測定し肉眼的に肺の転移結節数を算定した (図 4)。

VI. 統計学的評価

平均値 (M)、標準偏差 (S.D.) を算出し、student の t 検定によって有意差を検討した。有意水準は $P < 0.05$ として、統計学的有意差のない場合には N.S. とした。

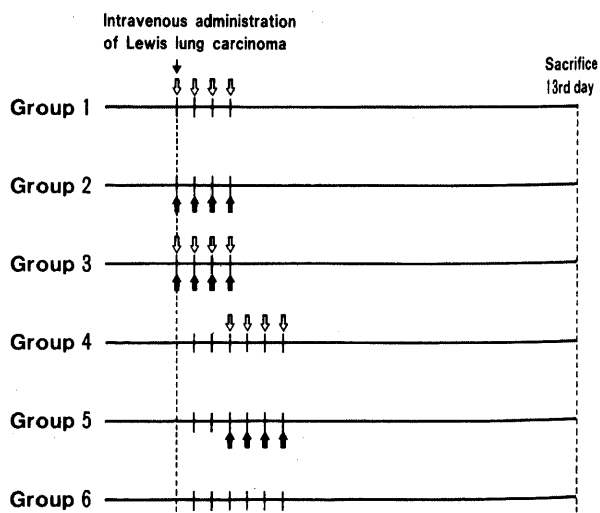


Fig. 4. Experimental plan for artificial metastasis of Lewis lung carcinoma (Effect of prostaglandin- I_2 on endotoxin injection experiments). 5×10^4 cancer cells were injected through tail vein of mice. Thirteen days later, mice were sacrificed and weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. A small amount of endotoxin ($2.5 \mu\text{g}$) was injected intravenously at the time of indicated (open arrows). Prostaglandin- I_2 ($10 \mu\text{g}$) was injected intraperitoneally at the time of indicated (closed arrows).

成 績

エンドトキソンの腫瘍増殖および転移に及ぼす影響を2つのモデル系、すなわち移植腫瘍の増殖に対する効果(自然肺転移モデル)と転移に対する効果(人工的肺転移形成モデル)について検討した。

1. 自然肺転移モデル

1. 微量 Ex (2.5 μ g) 一回静注実験群

1) 移植腫瘍の Ex による増殖抑制効果(足重量)

術前微量 Ex 一回静注群(第1群)は0.78 \pm 0.12g (N=18), Ex 非静注群(第2群および第3群) 0.87 \pm 0.12g (N=20)で、移植巣発育に関しては差はみられなかった(N.S.) (図 5-A).

2) 移植腫瘍からの肺転移の Ex による抑制効果

i. 肺重量

術前微量 Ex 一回静注群(第1群)は0.21 \pm 0.05g (N=18), 術後微量 Ex 一回静注群(第2群)は0.23 \pm 0.07g (N=13), 対照群(第3群)は0.31 \pm 0.15g (N=7)で、肺重量に関しては、術前微量 Ex 一回静注群が対照群に比べ有意に抑制されていた(P<0.02) (図 5-B).

ii. 肺転移数

術前微量 Ex 一回静注群(第1群)は3.06 \pm 2.58個 (N=18), 術後微量 Ex 一回静注群(第2群)は6.23 \pm 4.58個 (N=13), 対照群(第3群)は12.71 \pm 8.70個 (N=7)で、肺転移巣形成に関しては術前および術後微量 Ex 一回静注群が対照群に比べ有意に

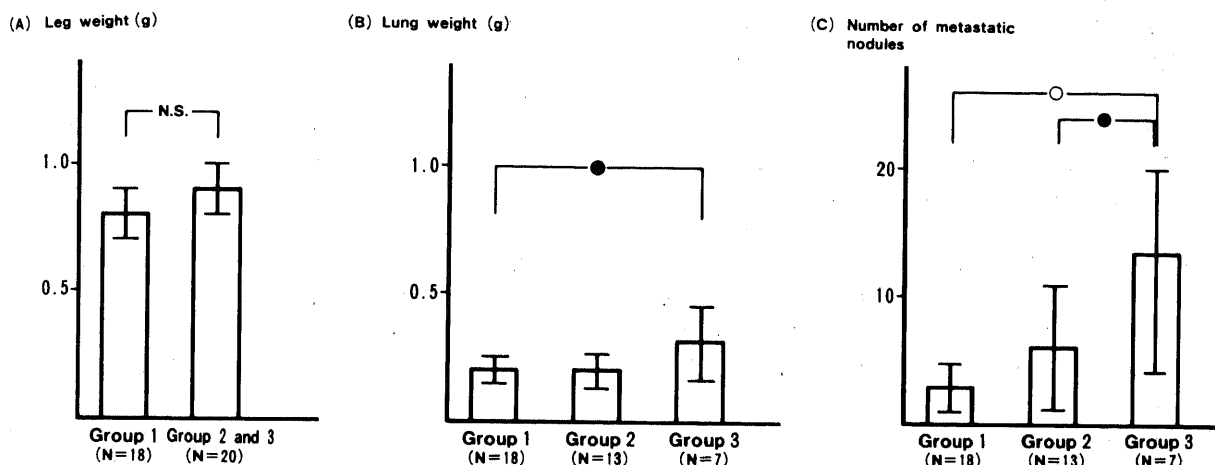


Fig. 5. Effect of one time injection of a small amount of endotoxin (2.5 μ g) on the growth and metastasis of inoculated Lewis lung carcinoma: leg weight (A), lung weight (B) and number of metastatic nodules (C). Experimental conditions were shown in Fig. 1. (A): One time injection of a small amount of endotoxin did not inhibited the growth of inoculated Lewis lung carcinoma. (B): One time injection of a small amount of endotoxin before the resection (Group 1) significantly inhibited the increase of the lung weight compared with the control group (Group3). (C): One time injection of a small amount of endotoxin before the resection (Group 1) and that of after the resection (Group 2) significantly inhibited the increase of the number of metastatic nodules compared with the control group (Group3), although there was no difference between Group 1 and Group 2. Values are mean \pm S.D., ○, P<0.01; ●, P<0.02; N.S., not significant.

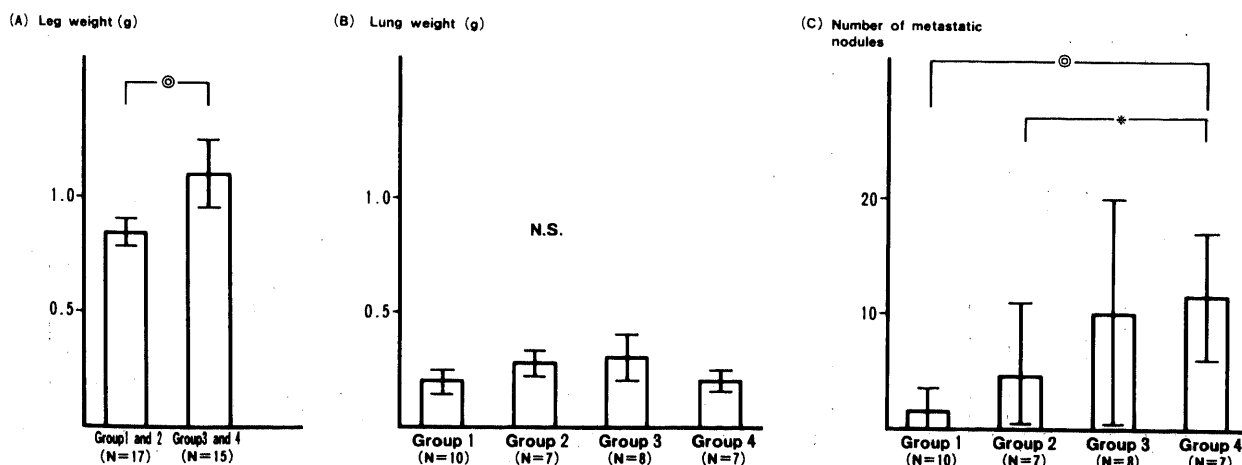


Fig. 6. Effect of several times injection of a small amount of endotoxin (2.5 μ g) on the inoculated Lewis lung carcinoma: leg weight (A), lung weight (B) and number of metastatic nodules (C). Experimental conditions were shown in Fig. 2. (A): Endotoxin (Group 1 and Group 2) inhibited the growth of inoculated Lewis lung carcinoma compared with the control group (Group3 and Group 4). (B): Endotoxin did not inhibited the increase of the lung weight compared with the control group (Group 4). (C): Several times injection of a small amount of endotoxin before and after the resection (Group 1 and Group 2) significantly inhibited the increase of the number of metastatic nodules compared with the control group (Group4), although there was no difference between Group 1 and Group 2. Values are mean \pm S.D., ⊙, P<0.001; ※, P<0.05; N.S., not significant.

抑制されていた ($P < 0.01$, $P < 0.02$) (図 5-C).

2. 微量 Ex (2.5 μ g) 連日静注実験群 (図 6)

1) 移植腫瘍の Ex による増殖抑制効果 (足重量)

術前に微量 Ex を連日静注した群 (第 1 群および第 2 群) は 0.85 ± 0.08 g (N=17) であったのに対し, Ex 非静注の群 (第 3 群及び第 4 群) は 1.09 ± 0.14 g (N=15) で, 移植巣発育に関しては, 術前に微量 Ex を連日静注した群は, Ex 非静注の群に比べ有意に抑制されていた ($P < 0.001$) (図 6-A).

2) 肺転移の Ex による抑制効果

i. 肺重量

術前術後微量 Ex 連続静注群 (第 1 群) 0.21 ± 0.05 g (N=10), 術前微量 Ex 連続静注群 (第 2 群) は 0.24 ± 0.06 g (N=7), 術後微量 Ex 連続静注群 (第 3 群) は 0.29 ± 0.11 g (N=8), Ex 非静注の対照群 (第 4 群) は 0.22 ± 0.06 g (N=7) で, 肺重量に関しては各群とも対照群と比べ差はみられなかった (N.S.) (図 6-B).

ii. 肺転移巣数

術前術後微量 Ex 連続静注群 (第 1 群) は 1.50 ± 1.27 個 (N=10), 術前微量 Ex 連続静注群 (第 2 群) は 4.57 ± 3.69 個 (N=7), 術後微量 Ex 連続静注群 (第 3 群) は 10.38 ± 8.93 個 (N=8), 対照群 (第 4 群) は 11.00 ± 5.51 個 (N=7) で肺転移巣形成に関しては術前術後微量 Ex 連続静注群および術前微量 Ex 連続静注群が対照群と比べ有意に抑制されていたが ($P < 0.001$, $P < 0.05$), 術後微量 Ex 連続静注群は対照群と比べ差はみられなかった (図 6-C).

3. 大量 Ex (25 μ g) 静注実験群 (図 7)

1) 移植腫瘍の Ex による抑制効果 (足重量)

術前微量 Ex 連続静注群 (第 1 群) は 1.16 ± 0.15 g (N=7), 術前大量 Ex 一回静注群 (第 3 群) は 1.19 ± 0.19 g (N=9), 術前

Ex 非静注の第 2 群, 第 4 群, 第 5 群を合わせた対照群は 1.34 ± 0.27 g (N=25) で, 移植巣に関しては術前微量 Ex 連続静注群は対照群に比べ有意に抑制され ($P < 0.05$), 術前大量 Ex 一回静注群でも抑制傾向が認められた (図 7-A).

2) 肺転移の Ex による抑制効果

i. 肺重量

術前微量 Ex 連続静注群 (第 1 群) は 0.27 ± 0.06 g (N=5), 術後微量 Ex 連続静注群 (第 2 群) は 0.23 ± 0.05 g (N=8), 術前大量 Ex 一回静注群 (第 3 群) は 0.21 ± 0.04 g (N=9), 術後大量 Ex 一回静注群 (第 4 群) は 0.31 ± 0.05 g (N=9), Ex 非静注の対照群 (第 5 群) は 0.34 ± 0.20 g (N=8) で, 肺重量に関しては各群とも対照群に比べ, 差はみられなかった (図 7-B).

ii. 肺転移数

術前微量 Ex 連続静注群 (第 1 群) は 8.80 ± 8.35 個 (N=5), 術後微量 Ex 連続静注群 (第 2 群) は 18.00 ± 12.00 個 (N=8), 術前大量 Ex 一回静注群 (第 3 群) は 8.11 ± 5.16 個 (N=9), 術後大量 Ex 一回静注群 (第 4 群) は 26.11 ± 10.14 個 (N=9), Ex 非静注の対照群 (第 5 群) は 24.71 ± 23.11 個 (N=8) で, 肺転移巣形成に関しては術前微量 Ex 連続静注群および術前大量 Ex 一回静注群が対照群と比べ有意に抑制されていた ($P < 0.01$, $P < 0.001$). しかしながら術後 Ex 静注の第 2 群と第 4 群は対照群と比べ差はみられなかった (図 7-C).

II. 人工的肺転移形成モデル

エンドトキシンは血小板に直接働いて凝集反応を起こすことが知られている¹²⁾¹³⁾. 一方プロスタグランジン₂(PGI₂)は血小板凝集反応を抑制する¹⁴⁾¹⁵⁾. 腫瘍細胞転移に及ぼす Ex の影響がこの血小板凝集反応を介するものかどうかを PGI₂ の存在の有無による Ex 投与実験で検討した.

1. 腫瘍細胞静注後の Ex ないし PGI₂投与による血小板凝集

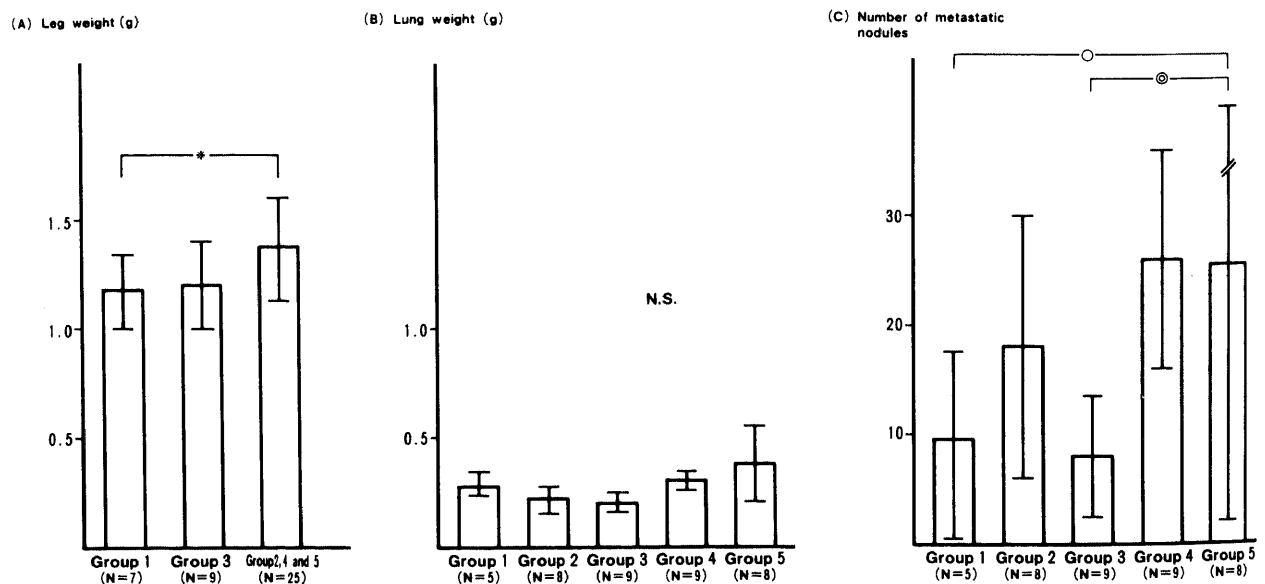


Fig. 7. Comparison of the effect of one time injection of a amount of endotoxin with several times injection of a small amount of endotoxin: leg weight (A), lung weight (B) and number of metastatic nodules (C). Experimental conditions were shown in Fig. 3. (A): Several times injection of a small amount of endotoxin (Group 1) inhibited the growth of inoculated Lewis lung carcinoma compared with the control group (Group 2, Group 4 and Group 5). (B): Endotoxin did not inhibited the increase of the lung weight compared with the control group (Group 5). (C): Injection of a small amount of endotoxin before the resection (Group 1 and Group 3) significantly inhibited the increase of the number of metastatic nodules compared with the control group (Group 5), although there was no difference between the dose of endotoxin injected (Group 1 and Group 2). Values are mean \pm S.D., \odot , $P < 0.001$; \circ , $P < 0.01$; \times , $P < 0.05$; N.S., not significant.

能の変化

正常無処置のマウスの血小板凝集能と比較して Ex 単独 4 日間群 (第 1 群) が最も亢進し、ついで Ex-PGI₂ 4 日間群 (第 3 群), Ex-PGI₂ 非投与で腫瘍静注のみの群 (第 4 群) の順に亢進していた。なお PGI₂ 単独 4 日間群 (第 2 群) の血小板凝集能は正常無処置のマウスより低下していた (図 8)。また PGI₂ 腹腔内投与の 90 分間後には血小板凝集能は正常に復した。

2. 転移に対する Ex および PGI₂ の影響 (図 9)

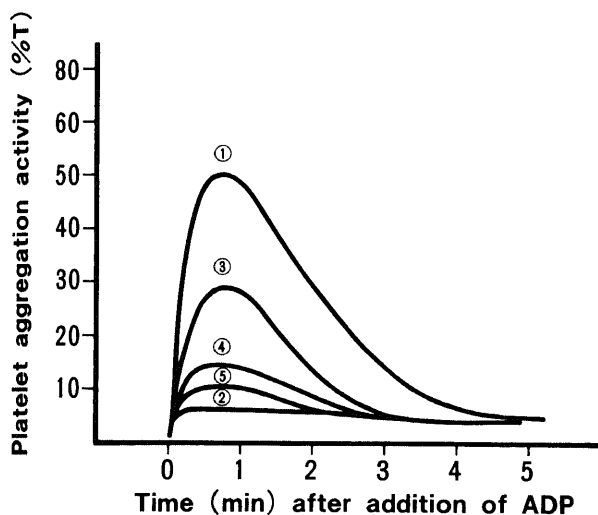


Fig. 8. Effect of endotoxin and prostaglandin-I₂ on the platelet aggregation reaction. Platelet aggregation was measured by the addition of ADP: ①, endotoxin 2.5μg and Lewis lung carcinoma (Group 1); ②, prostaglandin-I₂ 10 μg and Lewis lung carcinoma (Group 2); ③, endotoxin 2.5μg, prostaglandin I₂ 10μg and Lewis lung carcinoma (Group 3); ④, Lewis lung carcinoma (Group 4, control) and ⑤, untreated mice. Endotoxin increased the platelet aggregation activity (①), which was suppressed by prostaglandin-I₂ to some degree (③). Prostaglandin-I₂ suppressed completely the platelet aggregation activity (②).

1) PGI₂による肺転移抑制効果

i. 肺重量

Ex 単独 4 日間群 (第 1 群) は、0.87±0.17g (N=13), PGI₂ 単独 4 日間群 (第 2 群) は 0.18±0.15g (N=12), Ex+PGI₂ 4 日間群 (第 3 群) は 0.19±0.02g (N=12), 着床後 Ex 群 (第 4 群) は 0.28±0.08g (N=12), PGI₂ 群 (第 5 群) は 0.38±0.09g (N=13), 腫瘍静注のみの対照群 (第 6 群) は 0.40±0.08g (N=12) で、肺重量に関しては対照群に比べ、Ex 単独 4 日間群は有意に増加し (P<0.001), PGI₂ 単独 4 日間群および Ex-PGI₂ 4 日間群は有意に抑制されていた (P<0.001)。また着床後 Ex 群は対照群に比べ有意差は認められないものの抑制傾向がみられた (図 9-A)。

ii. 肺転移数

Ex 単独 4 日間群 (第 1 群) は 29.69±12.21個 (N=13), PGI₂ 単独 4 日間群 (第 2 群) は 1.50±0.90個 (N=12), Ex+PGI₂ 4 日間群 (第 3 群) は 14.67±6.73個 (N=12), 着床後 Ex 群 (第 4 群) は 16.00±10.83個 (N=12), 着床後 PGI₂ 群 (第 5 群) は 22.15±12.77個 (N=13), 対照群 (第 6 群) は 20.33±15.34個 (N=12) で肺転移形成に関しては、対照群に比べ Ex 単独 4 日間群は有意に増加し (P<0.05), PGI₂ 単独 4 日間群は有意に抑制されていた (P<0.001)。Ex+PGI₂ 4 日間群は対照群に比べ有意差は認められないものの抑制傾向がみられた (図 9-B)。

考 察

Coley²⁴⁾の報告以来、Ex の抗腫瘍効果については多くの研究がなされている。一方、Ex の構造に対する研究も進み、その構成成分に関し、Droge ら¹⁵⁾や Galanos ら¹⁶⁾は主成分である lipopolysaccharide (LPS) を希酢酸で水解して得られる lipid 部分の存在を明らかにし、この物質を lipid A と命名した。この後 lipid A は広範な種属より抽出される Ex にほぼ共通する化学構造を示すもつことが指摘され、その基本構造もサルモネラ株を中心に多くの腸内細菌で解明されつつある。さらに Nikaido¹⁷⁾, Wolleweber ら¹⁸⁾は lipid A の構造と生物活性を検討して lipid A が Ex の持つ殆ど全ての活性を示すことを明ら

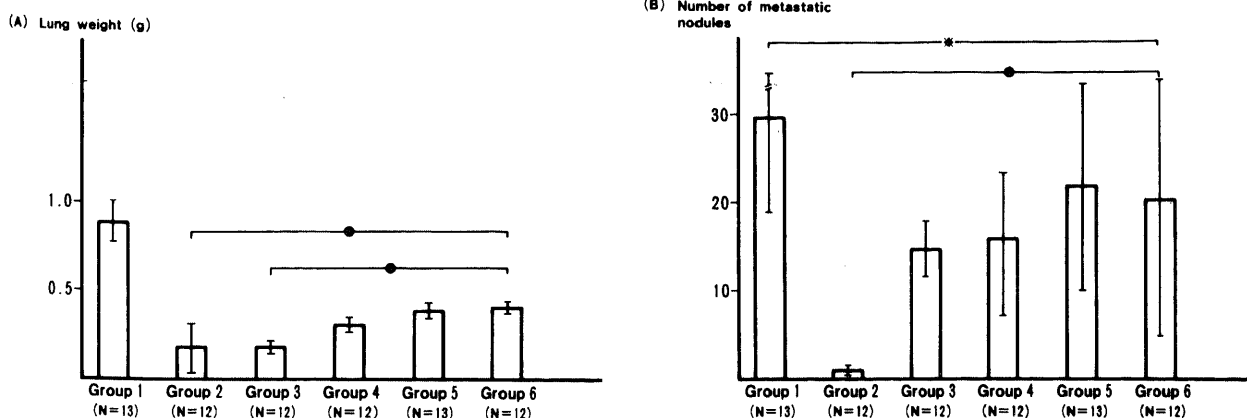


Fig. 9. Effect of endotoxin and prostaglandin-I₂ on artificial metastasis of Lewis lung carcinoma: lung weight (A) and number of metastatic nodules (B). Experimental conditions were shown in Fig. 4. (A): Endotoxin (Group 1) increased the lung weight significantly compared with the control group (Group 6). Prostaglandin-I₂ (Group 2) inhibited the increase of the lung weight compared with the control group (Group 6) significantly, and it (Group 3) inhibited the increase of the lung weight by endotoxin. (B): Endotoxin (Group 1) significantly increased the number of metastatic nodules compared with the control group (Group 6), Prostaglandin-I₂ (Group 2) inhibited the increase of the number of metastatic nodules compared with the control group (Group 6) significantly, and it (Group 3) inhibited the increase of the number of metastatic nodules by endotoxin. There was a significant difference between Group 1 and Group 2. Values are mean±S.D., ◎, P<0.001; ※, P<0.05.

かにした。また Amano ら¹⁹⁾²⁰⁾は Lipid A の構造の中でも抗腫瘍活性部位と毒性部位とは異なることを指摘し、さらに Galanos ら²¹⁾²²⁾や Matsuura ら²³⁾は化学的に lipid A を合成し、天然型 lipid A との活性を比較検討することで lipid A の抗腫瘍活性部位の解明も試みられている。このように Ex の抗腫瘍効果を含めた生物活性の中心はその基本構造である lipid A にあることが示唆されるが、一般に Ex の構成成分としては lipid A のみならず、菌体表面抗原である O 抗原の活性を示す多糖成分が必ず含まれており、これが菌種、菌株によって異なるため、Ex の生物活性は宿主の免疫反応によっても大きく修飾されることになる。そのため著者は Ex の生物活性の検討には純粋な lipid A を用いる方が、異なった菌種由来の Ex においても共通性の高いものとなると考えた。しかし、化学的に合成された lipid A が必ずしもすべての天然型の lipid A と同一であるとは結論されておらず、さらに天然型の lipid A についてもサルモネラ型のものとしてシュドモナス型のものとはその構造が若干異なることも問題とされているため²⁴⁾、実験に使用する Ex はその構造や活性についての研究が詳細に進んでいるサルモネラ型のもので適当であると考えた。そこで Takayama ら²⁵⁾や Ribi ら²⁶⁾により報告されたグラム陰性桿菌の *Salmonella typhimurium* のヘプトース欠損 Re 変異株から抽出されたものを選択し、実験に用いた。この菌はヘプトースの産生能が先天的に欠損しているため、この菌由来の Ex は菌の O 抗原活性を決定する多糖側鎖をもたず、lipid A と 2-ケト-3-デオキシーオクトン酸 (2-keto-3-deoxy-octonate, KDO) とのみから成ることが認められており、Ex の抗腫瘍効果を検討する際に免疫学的影響を除外できる。

Ex によって引き起こされる腫瘍組織の組織学的変化については Freudenberg ら⁹⁾が、マウスの Methylcolanthren A (Meth A) 誘発腫瘍に対して *Salmonella abortus-equi* S 由来の Ex25 μ g を静脈内に投与して検討している。それによると腫瘍組織に間質浮腫、出血壊死が認められ、さらにこの抗腫瘍性の原因としては 1) Ex による局所シュワルツマン反応を介した腫瘍組織内の出血、2) Ex により生体内に誘導された TNF による腫瘍壊死作用、3) T 細胞を介した免疫学的反応、などを推測した。また Ex 一回投与により抗腫瘍効果が認められる腫瘍組織の大きさは 8mm 以下であったと報告し、これよりも大きな腫瘍組織に対し Ex による抗腫瘍効果を得るためにはさらに Ex を継続的に投与する必要があると示唆している。

これらの報告はすべて、Ex が実験動物の腫瘍組織に及ぼす影響についての検討であるが、発熱を始めとする各種臓器障害等、種々の副作用のために臨床の場において Ex を抗腫瘍効果を目的として使用するには投与量を始め解決されるべき問題が多い。そのため近年は生物学的応答調節剤 (biologic response modifier, BRM) の一つとして、Ex がマクロファージを刺激することにより生体内に誘導される腫瘍壊死物質 (tumor necrosis factor, TNF^{27)~30)} や白血球を刺激して誘導されるインターフェロン (interferon, INF) 等による抗腫瘍効果についての研究が進み、さらにこれらが遺伝子工学的に大量に生産精製され、臨床応用も進んでいる。

一方悪性腫瘍の根治は腫瘍原発巣および周囲組織の効果的な外科的切除と、術後の転移ないし局所再発の防止いかにかかっている。しかし手術を中心とした治療の臨床経過中に生体がグラム陰性桿菌感染症等を始めとして Ex に暴露され、生体

の臓器が種々の障害をうける可能性は常に念頭に置かなくてはならないし、さらにそれが術後の転移形成ないし局所再発に及ぼす影響について検討された報告はほとんどない。そこで著者は Lewis 肺腫瘍を用い、Ex の腫瘍発育および腫瘍の転移巣形成におよぼす影響を以下のように検討した。すなわち腫瘍発育におよぼす影響は Lewis 肺腫瘍細胞を移植した足の重量を指標に、肺転移巣発育に関しては個々の肺転移巣腫瘍重量の増大と肺重量との増加に相関があるとの報告³¹⁾³²⁾から肺重量を指標に、また肺転移巣形成の初期段階である腫瘍細胞の着床に関しては肺転移結節数を目安にそれぞれ検討した。

この際 Ex の投与量が問題となるが、かつて田村ら³³⁾は担瘤マウスに TNF を誘導する目的で Ex25 μ g を投与したところマウスは死亡したと報告している。そこで予備実験としてまず Ex の投与量を検討した。Ex25 μ g を静注投与したマウスは活動性が極端に衰え、立毛および発汗し、死亡するものもみられた。一方、Ex2.5 μ g 静注投与ではマウスに何ら異常は認められず、活動性は正常で死亡例は認められなかったので本実験系では 2.5 μ g を微量 Ex 静注の基準値とした。

一方、本移植腫瘍の培地や転移の時期については、初瀬³⁴⁾³⁵⁾が腫瘍細胞を右足蹠に移植した場合、移植 7 日目頃より腫瘍細胞の脈管浸潤が認められ、さらに血中からも腫瘍細胞が証明され、さらに 2 日経過すると肺に組織学的に微小転移巣を形成し始めたと報告した。そこで Ex の早期静注モデルとして組織学的に腫瘍細胞の静脈浸潤を認め始める腫瘍移植後 7 日目に Ex 2.5 μ g を 1 回静注し、その 2 日後に腫瘍移植足を切断する群 (術前微量 Ex 一回静注群)、Ex の晚期投与モデルとして既に組織学的に肺に微小転移巣を形成している腫瘍移植後 9 日目に腫瘍移植足を切断し、その直後に Ex を静注する群 (術後微量 Ex 一回静注群)、及び腫瘍移植足切断のみの群 (Ex 非投与手術群) の 3 種類の群を作製した。その結果腫瘍移植巣の発育に関しては、微量 Ex 一回静注では出血壊死や浮腫も認められず、Ex 非静注の対照群と比較して腫瘍重量には有意差は認められなかった。予備実験での Lewis 肺腫瘍 5×10^6 細胞移植後 7 日目の腫瘍径は平均 1cm で重量は 292mg であったが、Ex 単独一回投与で抗腫瘍効果が得られる腫瘍の大きさは 8mm 以下であるという Freudenberg ら⁹⁾の報告と同様に、治療対象とする腫瘍が大きい場合には微量 Ex 一回静注では抗腫瘍効果が得られないと結論された。これに対し微量 Ex 連続静注では有意に腫瘍発育が抑制され、さらに大量 Ex (25 μ g) 一回静注によっても抑制傾向がみられた。しかしながら大量 Ex 静注群では副作用も強く、腫瘍発育抑制効果についても微量 Ex 連日静注群を上回る効果は認められなかったことより、Ex による移植腫瘍の発育抑制効果を有効に得るには微量を連続的に静注する方法が最も良いと結論された。

転移巣形成に関しては術前術後微量 Ex 連日静注群が最も抑制効果が強いが、移植巣発育の抑制効果がみられた術前大量 Ex 一回静注群においても転移抑制効果がみられていることから、自然発生的転移形成に関する限り、Ex による移植巣発育抑制の結果、肺転移巣形成が抑制されるものと考えられた。以上の結果から大きく発育した移植巣は微量 Ex 一回静注では発育は抑制されないが、微量 Ex 連日静注あるいは大量一回静注では抑制されることが示唆された。しかしながら自然転移巣形成に関しては術後微量 Ex 一回静注でも認められた抑制効果が術後微量連日静注群にはみられず、むしろ転移が亢進している

傾向が認められることから、Ex の持続静注による他の生物活性の存在が転移形成に作用している可能性が示唆された。

さて腫瘍の血行性転移の過程は1) 移植巣からの腫瘍細胞の遊離と血管内侵入, 2) 血中遊離腫瘍細胞の血管内移動, 3) 血管壁への着床, 4) 血管外組織への浸潤, 増殖, に分けられ, 特に3) の血管壁への着床については Gasic ら^{36)~38)}が血小板の関与を明らかにし, Jones ら³⁹⁾, Warren ら⁴⁰⁾は転移局所において, 腫瘍細胞と血小板が凝集塊を作っている現象を報告した。また腫瘍の転移過程において血小板凝集能亢進作用が多大な影響をおよぼし, また血小板凝集能抑制作用を持つプロスタグランジン系薬剤に腫瘍転移抑制効果がある現象を Honn ら⁴¹⁾, Bando ら⁴²⁾, 石垣⁴³⁾, 新津ら⁴⁴⁾, 小野ら⁴⁵⁾, 初瀬ら⁴⁶⁾が報告しているが, この機序はプロスタグランジン系薬剤の中でも特に PGI₂ が血小板凝集の抑制作用が強く, 腫瘍細胞と血小板の凝集を阻害することで結果的に転移を抑制するとされている。

著者のこれまでの実験で, 微量の Ex が連日静注されれば抗腫瘍効果が認められるが, 一方で Ex には生物学的活性の一つとして血小板凝集能亢進作用¹³⁾がよく知られている。もし Ex により血小板の凝集が亢進し腫瘍塞栓形成が促進すれば, 結果的に転移巣の増加の形で転移が亢進するという可能性も考えられる。そこで腫瘍細胞と Ex を同時に静注する実験を行い, Ex 静注による血小板凝集能の変化と肺転移巣形成との関係について検討した。さらに Ex による血小板凝集能亢進を抑制する目的で, Ex 静注と同時に血小板凝集抑制剤であるプロスタグランジン₂ (PGI₂)⁴⁷⁾を腹腔内に投与する群を作成し, Ex の抗腫瘍効果を温存し, なおかつ転移巣をも減少させようか否かについて実験的に検討した。その結果腫瘍細胞静注と同時に Ex を静注すると, マウスの血小板凝集能は亢進し, 肺転移巣数の有意な増加が認められ, 肺重量も著明に増加した。この現象は Ex の血小板凝集能亢進作用を介する転移巣形成促進作用であると推測された。しかし Ex 静注時に PGI₂ を併用投与した群では血小板凝集能は対照群に比べて軽度亢進の状態に維持され, Ex による肺転移巣増加作用は抑制され, 対照群と同程度の転移巣数であった。さらに肺重量は対照群と比較して有意に抑制され, Ex に因る転移巣の発育抑制効果が発現したものと考えられた。

また Ex が, 一旦肺に着床し, 増殖を始めた腫瘍組織の発育に及ぼす影響を検討する目的で, Ishibashi ら¹²⁾の血行性転移の実験の報告に基づき, 腫瘍静注後, 着床の臨界点とされる3日目以降に Ex を静注した場合, 肺転移巣数は対照群との間に有意差は認められなかったものの, 肺重量は対照群と比較して少ない傾向が認められ, これは Ex による肺転移巣の発育抑制効果によると考えられた。

以上の結果より Ex は一旦肺に着床し, 増殖を始めた転移巣の発育を抑制するが, 一方で血小板凝集能亢進作用を介して血中遊離腫瘍細胞と血小板との凝集による腫瘍塞栓形成を促進し, 腫瘍の肺への着床を促進している可能性が示唆された。さらにこの促進作用は PGI₂ 投与により有意に抑制されることが明らかとなった。

結 論

腫瘍を皮下に移植すると血行性転移を形成する Lewis 肺腫瘍を用い, 移植巣および肺転移巣形成に及ぼす Ex の影響を検

討し, 以下の結果を得た。

1. Ex には移植巣および肺転移巣の腫瘍発育抑制作用が認められる。

2. Ex 微量連続静注を腫瘍移植後早期より開始した場合, 最も腫瘍発育抑制作用が強い。

3. 腫瘍細胞と Ex が同時に血中に存在する場合, Ex は血小板凝集能亢進作用を介して, 腫瘍細胞の着床を促進し, 結果的に転移巣形成を促進する。

4. 抗血小板凝集剤である PGI₂ を同時に投与すると Ex による転移巣形成促進作用が抑制される。

以上の実験結果より, Ex は腫瘍の発育を抑制する事により結果的に転移も抑制しうるものの, 血小板凝集亢進を介し血中の腫瘍細胞の着床を促進するという相反する作用を持つことが確認された。

謝 辞

稿を終わるにあたり, 御指導御校閲を賜りました金沢大学第二外科宮崎逸夫教授ならびに防衛医科大学第一外科玉熊正悦教授に深甚なる謝意を捧げます。

なお本論文の要旨の一部は第27回日本癌治療学会(1989年名古屋)において発表した。

文 献

- 1) 本間 遜: 内毒素. 第1版, 149-150 頁, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1983.
- 2) Joiner, K. A. & Wolff, S. M.: The Role of Endotoxin in Human Disease and its Therapy. *In* E. M. Hersh, M. A. Chirigos & M. J. Mastrangelo (eds.), Augumenting Agents in Cancer Therapy, p125-134, Raven Press, New York, 1981.
- 3) Coley, W. B.: The treatment of inoperable sarcoma with the mixed toxins of Erysipelas and Bacillus prodigiosus. *J. Am. Med. Assoc.* 31, 389-395 (1898).
- 4) Coley, W. B.: The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 3, 1-48 (1909).
- 5) Shapiro, C. J.: The effect of a toxic carbohydrate complex from *S. enteritidis* on transplantable rat tumors in tissue culture. *Am. J. Hyg.*, 31 (Sec. B), 114-126 (1940).
- 6) Ribi, E., Granger, D. L., Milner, K. C. & Strain, S. M.: Brief Communication: Tumor Regression Caused by Endotoxins and Mycobacterial Fractions. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1253-1257 (1975).
- 7) Ribi, E., Parker, R., Strain, S. M., Mizuno, Y., Nowotny, A., Von Eschen, K. B., Cantrell, J. L., McLaughlin, C. A., Hwang, K. M. & Goren, M. B.: Peptides as requirement for immunotherapy of the Guinea-pig Line-10 tumor with endotoxins. *Cancer Immunol. Immunother.*, 7, 43-58 (1979).
- 8) Stinebring, W. R. & Stevens, D.: Escherichia coli endotoxin effect on a Methylcholanthrene-induced sarcoma in the Hamster cheekpouch (39912). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 156, 229-235 (1977).
- 9) Freudenberg, N., Joh, K., Westphal, O., Mittermayer, C. H., Freudenberg, M. A. & Galanos, C. H.: Haemorrhagic tumor necrosis following endotoxin administration. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 403, 377-389 (1984).

- 10) 谷本義文, 服部祐二, 鈴木修三: ウサギおよびラットの血小板凝集におよぼす絶食の影響. 日本血液学会誌, 43, 856-863 (1969).
- 11) Wexler, H.: Accurate identification of experimental Pulmonary metastasis. J. Natl. Cancer Inst., 36, 641-645 (1966).
- 12) Ishibashi, T., Yamada, H., Harada, S., Harada, Y., Miyazaki, N., Takamoto, M. & Watanabe, K.: Distant metastasis facilitated by BCG: Spread of tumor cells injected in the BCG-primed site. Br. J. Cancer, 41, 553-561 (1980).
- 13) Casko, G., Suba, E. A. & Elin, R. J.: Endotoxin-induced platelet activation in human whole blood in vitro. Thromb. Haemost., 59, 378-382 (1988).
- 14) Honn, K. V., Cicone, B. & Skoff, A.: Prostacyclin: A potent antimetastatic agent. Science, 212, 1270-1272 (1981).
- 15) Honn, K. V., Busse, W. D. & Sloane, B. F.: Prostacyclin and Thromboxans, Implication for their role in tumor cell metastasis. Biochem. Pharmacol., 32, 1-11 (1983).
- 16) Droge, W., Ruschmann, E., Luderitz, O. & Westphal, O.: Biological studies on lipopolysaccharides of Salmonella R mutants. Eur. J. Biochem., 4, 134-138 (1968).
- 17) Galanos, C., Luderitz, O. & Westphal, O.: A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem., 9, 245-249 (1969).
- 18) Nikaido, H.: Studies of the biosynthesis of cell wall polysaccharide in mutant strains of Salmonella (I). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 48, 1337 (1962).
- 19) Wolleweber, H. W., Broady, K. W., Ludwritz, O. & Rietschel, E. T.: The chemical structure of lipid A. Eur. J. Biochem., 124, 191-198 (1982).
- 20) Amano, K., Ribí, E. & Cantrell, J. L.: Different structural requirements of endotoxic glycolipid for tumor regression and endotoxic activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 106, 677-682 (1982).
- 21) Amano, K., Ribí, E. & Cartrell, J. L.: Structural Requirement of endotoxic glycolipid for antitumor and toxic activity. J. Biochem., 93, 1391-1399 (1983).
- 22) Galanos, C., Lehmann, V., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M. A., Hansen-Hagge, T., Luderitz, T., Mckenzie, G., Schade, U., Strittmatter, W., Tanamoto, K., Zahringer, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., Kusumoto, S. & Shibata, T.: Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Eur. J. Biochem., 140, 221-227 (1984).
- 23) Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M. A., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. & Shiba, T.: Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. Eur. J. Biochem., 148, 1-5 (1985).
- 24) Matsuura, M., Kojima, Y., Homma, Y., Kubota, Y., Yamamoto, A., Kiso, M. & Hasegawa, A.: Biological activities of chemically synthesized analogues of the nonreducing sugar moiety of lipid A. FEBS Lett., 167, 226-230 (1984).
- 25) Luderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E., TH. & Shaw, D. H.: Lipopolysaccharides of gram negative bacteria. In F. Bronner & S. Razin (eds.), Current Topics in Membranes and Transport, p79-151, Academic Press, New York, 1982.
- 26) Takayama, K., Ribí, E. & Cantrell, J. L.: Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity. Cancer Res., 41, 2654-2657 (1981).
- 27) Ribí, E., Amano, K., Cantrell, J., Schwartzman, S., Parker, R. & Takayama, K.: Preparation and antitumor activity of nontoxic lipid A. Cancer immunol. Immunother., 121 91-96 (1982).
- 28) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 3666-3670 (1975).
- 29) Michie, H. R., Springs, D. R., Manogue, K. R., Sherman, M. L., Revhaug, A., O Dwyer, S. T., Arthur, K., Dinarello, C. A., Cerami, A., Wolff, S. M., Kufe, D. W. & Wilmore, W.: Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. Surgery, 104, 280-286 (1988).
- 30) 原中勝正: TNF. 腫瘍壊死因子, 第1版, 1-285頁, 日本医事新報社, 東京, 1984.
- 31) 淵本定儀, 折田薫三: TNF 療法の展開, 臨床免疫, 20, 715-723 (1988).
- 32) Gorelik, E. G., Segal, S. & Feldman, M.: Growth of a local tumor exerts a specific inhibitory effect on progression of lung metastasis. Cancer, 21, 617-625 (1978).
- 33) 渡辺秀臣, 千木良正機, 長瀬満夫, 前原進, 有田覚, 宇田川英一: 肺転移結節数と肺体重比(肺体重/体重)との相関. 第41回日本癌学会総会記事, 382 (1982).
- 34) 田村啓二, 石田名香雄: Tumor Necrosis Factor (TNF) の担癌生体内誘導効果. 癌と化学療法, 11, 1369-1378 (1985).
- 35) 初瀬一夫: Lewis 肺腫瘍の血管浸潤と肺転移に関する研究, 第I報, 防衛医科大学校雑誌, 8, 35-42 (1983).
- 36) 初瀬一夫: Lewis 肺腫瘍の血管浸潤と肺転移に関する研究, 第II報, 防衛医科大学校雑誌, 11, 323-330 (1984).
- 37) Gasic, G. J. & Gasic, T. B.: Removal of sialic acid from the cell coat in tumor cells and vascular endothelium, and its effects on metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 48, 1172-1177 (1962).
- 38) Gasic, G. J., Gasic, T. B. & Stewart, C. C.: Antimetastatic effects associated with platelet reduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 61, 46-52 (1968).
- 39) Gasic, G. J., Gasic, T. B., Galanti, N., Johnson, T. & Murphy, S.: Platelet-tumor cell interaction in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. Int. J. Cancer, 11, 704-718 (1973).
- 40) Jones, D. S., Wellace, A. C. & Fraser, E. E.: Sequence of events in experimental metastases of Walker 256 tumor; Light, immunofluorescent, and electron microsc-

opic observations. J. Natl. Cancer Inst., 46, 493-504 (1971).
 41) Warren, B. A. & Vales, O.: The adhesion of thromboplastic tumor emboli to vessel in vivo. Br. J. Exp. Pathol., 53, 301-313 (1972).
 42) Bando, H., Yamashita, T. & Tsubura, E.: Effects of antiplatelet agents on pulmonary metastasis. Gann, 75, 284-291 (1984).
 43) 石垣聖史: 各種プロスタグランジンアナログの癌転移抑制作用に関する研究. 札幌医誌, 55, 513-522 (1986).
 44) 新津洋司郎, 漆崎一郎: 抗血小板剤による転移抑制—プロ

スタグランディンを中心に—. 癌と化学療法, 12, 1228-1234 (1985).
 45) 小野一郎, 大浦武彦, 浅見謙二, 星光聡, 長谷川隆, 堤正彦: プロスタグランディン_{I₂}誘導体 OP-41483 の血小板機能抑制効果についての研究—投与量による効果の差とアスピリンとの併用効果についての検討—. 現代医療, 18, 870-875 (1986).
 46) 初瀬一夫, 柿原 稔, 玉熊正悦: 抗血小板凝集剤の転移抑制効果に関する研究. 日本癌治療学会誌, 26, 1-5 (1991).
 47) 藤谷武一, 平工誠治: 新規 PGI₂誘導体(OP-41483) の抗血小板・抗血栓作用. 血管と脈管, 14, 178-181 (1983).

Effect of Endotoxin on Tumor Growth and Metastasis Minoru Kakihara, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 720—729 (1992)

Key words endotoxin, Lewis lung carcinoma, metastasis, prostaglandin-I₂, platelet aggregation activity

Abstract

The effect of endotoxin on tumor growth and metastasis was evaluated by using Lewis lung carcinoma in C54BL/6 mice in which lung metastasis occurred spontaneously or artificially. The endotoxin used in this experiment was a lipid A rich type extracted from the cellular membrane of polysaccharide deficient Re mutant strains of Salmonella typhimurium. A small amount (2.5 μg per mouse) or a large amount (25 μg per mouse) of endotoxin was injected into the tail vein of mice at various intervals after tumor inoculation. Firstly, as the spontaneous metastasis model, 5 × 10⁵ cancer cells were inoculated in the foot pad of mice. Nine days later, the tumor-inoculated foot was resected and its weight was measured. Twenty-one days later, the mice were sacrificed and the weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. Endotoxin inhibited the growth of the inoculated Lewis lung carcinoma. Injection of a small amount of endotoxin several times before the resection was more effective than those in the other experimental groups (P<0.001). Endotoxin also inhibited spontaneous metastasis in the lung after the resection of the tumor inoculated foot. Injection of a small amount of endotoxin several times for 4 days before and another 4 days after the resection was the most effective (P<0.001). Second, as the artificial lung metastasis model, 5 × 10⁴ cancer cells were injected into the tail vein of mice. Thirteen days later, the mice were sacrificed and the weight of the lung was measured and number of metastatic nodules in the lung was counted. To investigate the effect of endotoxin on the platelet aggregation reaction, mice were divided into 4 experimental groups: 1) a small amount of endotoxin was injected with cancer cells simultaneously; 2) as an antiplatelet aggregation drug, prostaglandin-I₂ was given intraperitoneally with cancer cells; 3) endotoxin and prostaglandin-I₂ were injected simultaneously with cancer cells; 4) as a control group, only cancer cells were injected. Endotoxin increased the platelet aggregation activity; on the other hand, prostaglandin-I₂ suppressed its increment. Endotoxin promoted artificial lung metastasis more significantly than control group (P<0.05), but prostaglandin-I₂ had a suppressive effect on the surplus metastasis caused to some extent by endotoxin. The above results indicate that endotoxin has an inhibitory effect on the growth of inoculated tumor resulting in suppressed metastasis, while, on the other hand, endotoxin increases the platelet aggregation activity which promotes metastasis.