

感染性侵襲が消化器系悪性腫瘍増殖 に及ぼすメカニズムの研究

まつ もと ゆう すけ
松 本 佑 介

(外科系プライマリー・ケア学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 25 年度

目 次

第一章 緒 言	1 頁
第二章 術後感染性合併症が胃癌切除後の予後に及ぼす影響に関する検討	
(参考論文 1)	
第 1 節 背景および目的	3 頁
第 2 節 対象および方法	4 頁
第 3 節 結果	5 頁
第 4 節 考察	7 頁
第 5 節 小括	9 頁
第三章 感染性侵襲が大腸癌細胞株の肝転移におよぼす影響に関する検討	
第 1 節 背景および目的	10 頁
第 2 節 材料および方法	11 頁
第 3 節 結果	14 頁
第 4 節 考察	15 頁
第 5 節 小括	17 頁
第四章 感染性侵襲が肝転移防御自然免疫メカニズムに及ぼす影響に関する検討	
第 1 節 背景および目的	18 頁
第 2 節 材料および方法	19 頁
第 3 節 結果	24 頁
第 4 節 考察	28 頁
第 5 節 小括	32 頁
第五章 総 括	33 頁
第六章 結 論	35 頁

謝 辞	36 頁
参考文献	37 頁
図・表	41 頁

第一章 緒言

近年、手術手技・麻酔技術の向上、抗菌薬の改良・投与方法の工夫などにより、周術期管理技術の向上がめざましい。一方で、縫合不全による腹膜炎や腹腔内膿瘍、手術部位感染、肺炎、尿路感染症など、消化器癌手術後に発症する感染性合併症の頻度は、必ずしも減少していない。また、術後に合併症が発生した場合には、医療費の増大、術後補助療法開始の遅れ、周術期死亡率の上昇など患者の quality of life(以下、QOL)に多大な影響を及ぼす。

1970 年代に DerHagopian らは、局所の持続的な炎症反応が dormancy 状態にある腫瘍細胞を刺激し、転移能を獲得する現象を発見し、「inflammatory oncotaxis」と呼称した⁽¹⁾。それ以降、頭頸部癌、食道癌、大腸癌など、さまざまな悪性腫瘍において、術後の感染性合併症の併発と長期予後に関する検討がなされ、それらのほとんどが、術後の感染性合併症の発症が手術関連死亡などの短期予後のみならず、長期的予後を悪化させるという結果であった⁽²⁻¹³⁾(表 1)。

しかしながら、感染性合併症の併発が悪性腫瘍の長期予後を悪化させる詳細なメカニズムについての記載はなく、また臨床的事象を裏付ける実験データも存在しない。

そこで本研究では、感染性合併症の併発が悪性腫瘍の増殖に及ぼす影響について明らかにするため、担癌状態において感染症が抗腫瘍免疫に与える影響や

腫瘍細胞の増殖に直接的に関与する因子などを探求することを目的とした。まず臨床的検討として当科における胃癌根治手術後の感染性合併症発症が予後に与える影響について後方視的に検討した。次に癌肝転移モデルマウスに腹膜炎を併発させ、肝転移形成に与える影響を検討するとともに、そのメカニズムについて、宿主側の因子として血中サイトカインの動態の変化や肝局所、特に肝単核球に注目した免疫学的検討を行った。

第二章 術後感染性合併症が胃癌切除後の予後に及ぼす影響に関する検討

(参考論文 1)

第 1 節 背景および目的

DerHagopian らによる inflammatory oncotaxis 説⁽¹⁾が提唱されて以降、頭頸部癌⁽³⁾、大腸癌^(2, 4, 8-10, 12, 13)、食道癌^(5, 7, 11)、転移性肝癌⁽⁶⁾において術後合併症と予後に関する報告が散見されてきたが、胃癌における感染性合併症と長期予後に関する検討は報告されていない。そこで、当科における胃癌根治切除症例を対象とし、術後の感染性合併症発生が予後に及ぼす影響を明らかにすることを目的として後方視的に検討した⁽¹⁴⁾。

第2節 対象および方法

(1) 対象

1986年から2005年までに根治度A、Bの切除術を受けた初発胃癌1,332例を対象とし、術後に感染性合併症を併発した141例(10.6%)を感染性合併症発症群、感染性合併症を発症しなかった1,191例を非発症群とした。感染性合併症は表2のように定義し、担当医によるカルテ記載に基づいて診断した。表層の手術部位感染は全身的な炎症性変化に乏しいため発症群からは除外した。

(2) 統計学的解析

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。有意差については Stat View 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)を用いて解析を行った。2群間の比較はWhitney U 検定もしくはカイ 2 乗検定で行った。生存率に関してはKaplan-Meier 法を用い、log-rank test でその差を検定した。単変量解析および多変量解析にはCox 比例ハザードモデルを用いた。いずれも $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 結果

(1) 感染性合併症の内訳と患者背景

感染性合併症の内訳では肺炎が 50 例 (3.8%) と最も多く、次いで縫合不全が 48 例 (3.6%) であった (表 2)。感染性合併症・発症群には男性が多く、有意に高齢であった。また、感染性合併症・発症群では腫瘍が U 領域に存在する症例、胃全摘を行った症例、他臓器合併切除を行った症例、手術時間が長く出血量が多い症例に加え、壁深達度 T3 以上、リンパ節転移 N2 など、より進行した病期の症例が多かった (表 3)。

(2) 術後感染性合併症と予後

全生存期間および癌特異的生存期間において、感染性合併症・発症群は非発症群と比較して 5 年生存率は低かった (5 年生存率: (A) 78.1% vs. 57.9%, $P < 0.001$, (B) 84.6% vs. 72.9%, $P = 0.0003$) (図 1)。全生存期間を Stage 別に検討すると、Stage I あるいは Stage IV 症例では両群間に差は認められなかったが、Stage II および III 症例において、感染性合併症・発症群の 5 年生存率は有意に低値であった (65.6% vs. 49.7%, $P = 0.03$ (Stage II), 41.2% vs. 20.6%, $P = 0.005$ (Stage III)) (図 2)。また、癌特異的生存期間をみると、Stage I、Stage II、Stage IV 症例では両群間に差は認められなかったが、Stage III 症例においては

感染性合併症・発症群の5年生存率が有意に低値であった(55.6% vs. 38.6%, $P = 0.03$) (図 3)。さらに術式別に検討したところ、胃全摘術、幽門側胃切除のいずれにおいても、感染性合併症・発症群で5年生存率が有意に低値であった(83.6% vs. 59.8%, $P < 0.01$ (幽門側胃切除)、43.8% vs. 33.8%, $P < 0.0001$ (胃全摘)) (図 4)。

(3) 予後因子に関する単変量、多変量解析による検討

全生存および癌特異的生存に関与する因子を単変量、多変量解析により検討した。全生存に関する単変量解析においては、年齢、併存疾患の存在、占居部位がU領域、腫瘍径 50mm 以上、輸血、腫瘍の壁深達度、リンパ節転移、他臓器合併切除に加えて、術後感染性合併症の発症が胃癌術後の全生存率に関与していた。また、多変量解析では、年齢、併存疾患の存在、輸血、腫瘍の壁深達度、リンパ節転移に加えて、感染性合併症の発症が独立して全生存率に関与する因子として選択された (表 4)。さらに癌特異的生存に関する解析では、単変量解析において、併存疾患の存在、占居部位がU領域、腫瘍径 50mm 以上、輸血、腫瘍の壁深達度、リンパ節転移、他臓器合併切除に加えて術後感染性合併症の発症が胃癌術後の全生存率に関与しており、多変量解析を行うと、併存疾患の存在、腫瘍の壁深達度、リンパ節転移に加えて、感染性合

併症が独立して癌特異的生存率に関与する因子として選択された (表 5)。

感染性合併症別に生存に関与する因子の検討を行ったところ、全生存期間に関しては単変量解析において肺炎、縫合不全、胆嚢炎の関与が示唆され、多変量解析でも同様に予後への関与が示唆された。一方で、癌特異的生存に関しては、単変量解析においては、縫合不全、胆嚢炎の関与が示唆されたが、多変量解析では縫合不全のみが予後への関与を示した(表 6)。

第 4 節 考察

今回の検討により、胃癌においてこれまで予後不良因子とされてきた年齢、併存疾患の存在、輸血、腫瘍の壁深達度、リンパ節転移に加え、術後感染性合併症が全生存期間のみならず癌特異的生存にも関与していることが示唆された。また、感染性合併症の中でも、特に縫合不全の発症が全生存期間および癌特異的生存期間に影響を及ぼしていることが示唆された。一方、感染性合併症・発症群では、腫瘍占居部位が胃上部に存在する症例、術式として胃全摘を行った症例、他臓器合併切除を行った症例、手術時間が長く出血量が多かった症例、より進行度が高度な症例が多かった。すなわち、胃全摘術＋脾臓合併切除などの侵襲の高い手術を行った症例において感染性合併症が高率であった。一般的

に胃全摘術では、幽門側胃切除と比較して縫合不全が多いことが知られている。

しかし、術式別の検討では、幽門側胃切除術においても感染性合併症・発症群において全生存率が低率であったことから、今回の結果は、このような背景因子の bias によるものではないと考えられた。

前述の如く、これまで頭頸部癌、食道癌、大腸癌などでは、術後の感染性合併症が長期予後を悪化させるという報告が多い。Lagarde ら⁽⁷⁾は食道癌術後の内科的・外科的合併症の有無と長期予後との関連を検討した。その結果、食道癌術後合併症を併発した症例では、合併症を併発していない症例と比較して予後が悪化する傾向を認めたものの、統計学的有意差はなかった。しかし、合併症併発例では手術から再発死までの期間が有意に短かったため、合併症の発症が腫瘍の増殖・進展に関与すると考察した。Tsujimoto らは大腸癌症例において、縫合不全を含む感染性合併症と予後との関連を比較した⁽¹⁵⁾。その結果、Stage III 症例において、感染性合併症を併発した症例では併発しなかった症例と比較して有意に予後不良であり、再発例では手術から再発死までの期間が短かった。

以上のことから、感染性合併症は単に再発率を増加させるばかりでなく、腫瘍の増殖速度にも影響を与える可能性があり、感染症を併発した際の宿主の免疫学的特徴と腫瘍増殖に関与する因子についての免疫学的検討が必要と考えられた。

第 5 節 小括

胃癌症例において胃切除術後感染性合併症の発症は、全生存期間および癌特異的生存期間に関する予後不良因子であることが示された。

第三章 感染性侵襲が大腸癌細胞株の肝転移におよぼす影響に関する検討

第1節 背景および目的

前述のように、多数の消化器系悪性腫瘍において、術後感染性合併症の発症が長期予後を増悪させるという臨床報告が蓄積されてきているが、この観察事象を裏付ける実験的検討はない。本事象の明確なメカニズム解明のためには、動物モデルの確立と感染性合併症発症時の宿主の免疫学的検討が不可欠であると考えられる。

そこで本章では、大腸癌高肝転移細胞株をマウスの脾臓に接種することにより肝転移モデルを確立して、第二章における検討で腫瘍の増殖要因とされた縫合不全を反映した盲腸結紮穿刺による腹膜炎発症が肝転移に及ぼす影響を明らかにすることを目的として検討した。

第2節 材料および方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認(承認番号 10073)を受け、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに基づいて実施した。

(1) 動物と細胞株

① マウス

8-10 週齢の雌性 BALB/c マウス(日本エスエルシー)を使用。固形餌や水分の摂取は自由とした。

② マウス大腸癌細胞株

マウス大腸癌細胞 Colon-26 を親株とする高肝転移株 (NL17)を用いた (癌研究会癌化学療法センター分子薬理部矢守隆夫博士より供与)。大腸癌細胞株は 5%胎児ウシ血清(FBS)加 RPMI1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)培地上で、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

(2) 方法

① 担癌マウスの作成

NL17 細胞ペレットを 1% BALB/c マウス血清加 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) に浮遊させ 1×10^6 cells/ ml に調整した。ペントバルビタールによる全身麻酔下に、マウスの左季肋部の皮膚に約 1 cm の切開をおき、皮下を剥離し腹膜を露出させ、経腹膜的に脾臓に 27G 注射針を用いて NL17 細胞を 1×10^5 個接種した。なお、この状態で侵襲を加えないものを Control 群とした。

② 腹腔内感染モデル

腫瘍細胞接種後に、盲腸結紮穿刺法 (cecal ligation and puncture model ; 以下 CLP)による腹膜炎モデルを作成した (CLP 群) ⁽¹⁶⁾。すなわち、中腹部正中で約 1 cm 開腹し、盲腸根部を 3-0 絹糸で結紮した後に 23G 針を盲腸に 1 回貫通させた。補液として閉腹時に 1 ml の生理食塩水を腹腔内投与した。飲用水には抗生物質テトラサイクリン (和光純薬工業)を溶解し、3 日目まで投与した。処置後は、水分、食餌摂取とも自由とした。なお、CLP 作成後の 14 日生存率は約 78 %であった。なお、開腹後、盲腸の結紮および穿刺を行わずに閉腹したものを sham 群とした。

③ 肝転移の評価

各群における肝転移状況を確認するため、NL17 細胞の脾臓接種後 7 日目と 14 日目に、ペントバルビタール麻酔下に、経心臓採血による脱血により犠死させ肝組織を採取した。肝組織は、肉眼的な肝転移の評価を行い肝重量を測定した後に、10%ホルムアルデヒド中に 48 時間固定し、パラフィン固定を行った。肝転移は、肝外表面の肉眼的肝転移個数、肝重量に加えてパラフィン包埋標本から得られた薄切スライド標本 (4 μm) を脱パラフィン、親水化し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、HE 染色)により得られた組織像を紙面にトレースし肝内における腫瘍の占拠面積比を紙の重量比により算出して評価した。なお、組織切片は肝の最大割面となるレベルで作成した。

④ 統計学的解析

得られたデータは Prism 5 (GraphPad software) を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、多群間の比較に関しては、one-way ANOVA もしくは two-way ANOVA を用いて検定した。いずれの検定においても $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

第3節 結果

(1) 腫瘍細胞の脾臓接種後、腹膜炎がマウスの肝転移に及ぼす影響

腫瘍細胞の脾臓接種後7日目にCLP群で肉眼的肝転移が確認された control 群および sham 群では観察し得なかった。14 日目には CLP 群で腫瘍は顕著に増殖し、control 群および sham 群でも明らかな肉眼的肝転移が複数個確認された (図 5)。各群を 20 匹ずつ用いて 14 日目における肝転移を評価したところ、腫瘍増殖のため CLP 群は control 群および sham 群と比較して肝重量が有意に増加していた (図 6)。また、肝転移は組織像の解析においても確認され、CLP 群の肝における腫瘍の面積比は control 群および sham 群と比べ有意に高値であった(control 群 vs. sham 群 vs. CLP 群 : $0.3 \pm 0.05\%$ vs. $0.33 \pm 0.01\%$ vs. $2.92 \pm 0.09\%$, $P < 0.001$ (7 日目); $9.8 \pm 4.5\%$ vs. $13.9 \pm 4.9\%$ vs. $44.8 \pm 18.1\%$, $P < 0.001$ (14 日目)) (図 7)。

(2) 腫瘍細胞の脾臓接種後、腹膜炎が生存率に及ぼす影響

CLP 群の生存期間の中央値は 17 日と、sham 群の 20.5 日および control 群の 24 日と比較して有意に不良であった (log-rank test, $p < 0.001$)(図 8)。なお、本検討においては、14 日目以前に死亡したマウスが CLP 群で 2 例認められたが、これらは血性腹水を認め広範な腸管壊死を伴う汎発性腹膜炎像を呈したこと

から、異なる病態と判断し検討から除外した。一方、14日目以降に死亡した CLP 群の腹腔内所見では、転移による著明な肝腫大を認めたが、腸管壊死はほとんど認めなかった。なお、control 群および sham 群では 14 日目以前の死亡例は認めなかった。

第 4 節 考察

本検討では、動物を用いた消化器癌の担癌モデルの作成を企画するにあたり理研バイオリソースセンター（URL: <http://www.brc.riken.jp/lab/cell/>）においてマウス由来の消化器癌細胞株を検索したところ、胃癌細胞株は見当たらず唯一確立されているのが大腸癌細胞株であったためこれを採用した。また、胃癌や大腸癌などの消化器癌では肝転移が主な再発形式^(17, 18)であることから肝転移による担癌モデルを導入し実験に臨んだ。その結果、肝転移モデルマウスを用いた実験で、CLP のような感染性侵襲は肝転移を促進することが明らかとなった。そして、生存率も CLP 群で有意に低下することが示された。これまで、マウスにおける CLP モデルは腸内細菌による腹腔内の混合感染により septic shock をきたすモデルとしてその病態解明のために用いられ、盲腸を穿刺する針が太くなるほど劇的な経過でより早期に死亡するとされていた⁽¹⁹⁾。今回の実験

においては、早期の sepsis による死亡は避けなければならなかったため、より小さな針を用いた盲腸穿刺に加え、最小限の開腹、十分な補液、抗生剤の使用など工夫を凝らし 14 日以上生存が得られる腹腔内持続感染を成立させた。作成した CLP 群のマウスではそのすべてが、14 日目に犠死の際、盲腸周囲に局限した腹腔内膿瘍を認めたことから、持続性の炎症状態にあるものと考えられた。

また、CLP 群における死亡時の腹腔内所見では、広範な腸管壊死等の汎発性腹膜炎所見は認められず、転移による肝腫大が著明であったため死因は癌死と判断される。第 2 章で述べたように、消化器癌の予後を不良にさせる感染性合併症の代表として縫合不全が挙げられる。このことは本実験で施行した CLP の病態によく似たものであるといえる。以上のことから、本実験により作成した「NL17 細胞脾接種+CLP」のモデルは、担癌に感染性侵襲が合併した病態をよく反映する解析モデルとなるものと考えられた。

脾臓に注入した腫瘍細胞が肝転移に至る過程に影響する要因は、脾臓における腫瘍細胞の遊離の促進、血管内への侵入の促進、肝臓における接着の亢進、その転移巣における腫瘍細胞の増殖亢進などが挙げられている^(20, 21)。その一方で、肝転移の阻止に係る宿主の免疫病態については、ほとんどわかっていない。今回の検討において、如何なるメカニズムで腹腔内感染が肝転移を促進したかについての詳細は明らかではないが、腸管内微生物の腹腔内への侵入による自

然免疫への影響に代表されるような直接的な免疫系への影響、あるいは腹膜炎発症に起因する局所および全身の生体防御反応やサイトカイン動態の変化が関与している可能性が考えられる。したがって、これらの関与について CLP による腹膜炎発症時の免疫反応を腫瘍免疫の観点から検討する必要があると考えられた。

第 5 節 小括

高肝転移大腸癌細胞株 NL17 細胞をマウスの脾臓に接種し CLP を行うことにより腹腔内感染を惹起させて肝転移が促進されるモデルを確立した。このモデルでは、腫瘍接種の 7 日後という早期より肝転移が認められ、14 日目には更に転移巣が拡大した。また、その生命予後も control 群および sham 群に比して不良であった。

第四章 感染性侵襲が肝転移防御自然免疫メカニズムに及ぼす影響に関する検討

第1節 背景および目的

腹膜炎を発症した際には、白血球の増加、発熱、頻脈、頻呼吸などを主徴とする全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome : SIRS)と称される病態に至る⁽²²⁾。病態形成には局所的あるいは全身性に産生されるサイトカインが関与していることが知られている^(16, 23, 24)。サイトカインは、本来は組織修復や炎症の誘導など、生体にとって有利に働くべきものであるが、感染性合併症に伴って産生される場合には、しばしば生体防御にとって負の側面を呈する。我々のグループでの過去の実験的検討で示されるように、担癌生体においては、炎症性サイトカインが癌の増殖に有利に働き、サイトカインの過剰な産生やそのバランスの不均衡は癌の増殖・予後に関与している可能性がある⁽²⁵⁾。

そこで本章では、前章において作成した「NL17 細胞脾接種+CLP」マウスモデルを用いて、癌の増殖に関与する宿主側の因子を明らかにすることを目的に検討を行った。特に、生体防御系による抗腫瘍免疫メカニズムに着目し、本モデルマウスでの末梢血あるいは肝内におけるサイトカイン産生の動きを見ると

ともに、肝内単核球の有する抗腫瘍細胞傷害活性について実験的解析検討を行った。

第2節 材料および方法

本研究における動物実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認(承認番号 10073)を受け、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに基づいて実施した。

(1) 動物と細胞株

8-10 週齢の雌性 BALB/c マウス (日本エスエルシー)を使用した。固形餌や水分は自由摂取とした。また、腫瘍細胞には NL17 細胞を用いた。

(2) 方法

① 担癌腹腔内感染モデル(「NL17 細胞脾接種+CLP」モデルの作成)

ペントバルビタールによる全身麻酔下に、左季肋部の皮膚に約 1 cm の切開をおき、皮下を剥離し腹膜を露出させ、27G 注射針を用いて NL17 細胞を 1×10^5 個経腹膜的に脾臓に接種した。その後、CLP 法により腹膜炎

モデルを作成した (CLP 群)。開腹後、盲腸の結紮および穿刺を行わずに閉腹したものを sham 群とした。閉腹時には、補液として 1 ml の生理食塩水を腹腔内投与した。なお、NL17 細胞を脾臓接種のみ行ったものを control 群とした。飲用水に抗生物質テトラサイクリン (和光純薬工業) を溶解し、3 日後まで投与した。処置後は、水分、食餌ともに自由摂取とした。各群ともに手術後 1 日目、3 日目、7 日目にペントバルビタールによる麻酔後、経心臓採血での脱血により犠死させ、血液および肝を採取した。

② 肝臓の単核球抽出法

肝を摘出後、10 ml 注射器のガスケット部を用いて破碎しつつステンレスメッシュで濾過し、1% FBS 加 RPMI1640 液中に浮遊させた。2 回の洗浄後、ペレットを 20ml の 1%ヘパリン加 33% Percoll solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に浮遊させ、2,200 rpm で 20 分間遠心した後に上清を除去した。ペレットを 3ml の Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma-Aldrich) に浮遊させ、5 分間静置することで赤血球を除去した。1,500 rpm で 5 分間遠心した後、1% FBS 加 RPMI1640 液で 2 回洗浄し、肝単核球として以下の実験に用いた⁽²⁶⁾。

③ 細胞傷害活性測定

Target として用いる NL17 細胞を蛍光標識するため、以下の操作を行った。まず、10% FBS 加 RPMI1640 培地を用いて細胞浮遊液を作成し、Calcein-AM solution (同仁化学研究所) を 50 μ l 添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、1,500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収し、 2×10^5 cells/ml に調整した。一方、肝より抽出した Effector 単核球は 5×10^6 cells/ml に調整した。細胞傷害活性の測定に際しては、96 穴プレートにエフェクター細胞数(肝単核球):標的細胞数(腫瘍細胞)の比(E:T 比)として 50:1、25:1、12.5:1 の割合で細胞を播種した。標的細胞のみのウェルを作成し、自然遊離値の測定に用いた。プレートを 500 rpm×2 分間の弱遠心にかけた後、テラスキャン VPC (ミネルヴァテック、東京)を用いて各ウェルの蛍光強度を測定した。最大遊離値を期待するウェルには、界面活性剤 (NP-40)を添加し、ピペッティングした後、37°C、5% CO₂ 下にインキュベートした。8 時間後に再測定を行い、前測定と比べた蛍光強度の減衰をもって細胞傷害活性の指標とし、以下の式で数値化した⁽²⁷⁾。

細胞傷害活性(%) = ([測定値 - 自然遊離値] / [最大遊離値 - 自然遊離値]) × 100。

④ Natural killer(以下、NK)細胞の失活化

ウサギ抗マウスアシアロ GM1 抗体(和光純薬工業)を 1:100 の割合で加えた BALB/c マウス正常血清中に肝単核球を浮遊させ、37°C で 1 時間インキュベーションを行った⁽²⁸⁾。そして、処理後の肝単核球を NK 細胞失活状態として細胞傷害活性測定に用いた。なお、対照群には抗アシアロ GM1 の代わりに 100 倍希釈した正常ウサギ血清を添加して同様の処理を行ったものを用いた。

⑤ フローサイトメトリー

肝単核球を 10% FBS 加 RPMI1640 で 5×10^5 cells/100 μ l に調整し、サブセット特異的な各抗体(後述)を添加し、暗所にて 4°C、15 分間のインキュベーションを行った。3000 rpm で 2 分間の遠心後、染色バッファー (20% FBS, 1% NaN₃, PBS)で 2 回洗浄し、IsoFlow (Beckman Coulter)に浮遊させた。フローサイトメトリー解析には Cytomics FC500 (Beckman Coulter)を用いた。細胞内染色 (パーフォリン、グランザイム)のための細胞は、Fixation and Permeabilization solution (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)にて処理した後に、各抗体を添加し、4°C で 30 分間インキュベーションした。その後、Permeabilization buffer (Miltenyi Biotec)で洗浄し、IsoFlow (Beckman

Coulter)に浮遊させて測定した。なお、本研究で用いた蛍光標識抗体は、FITC 標識抗マウス CD4 抗体 (eBioscience)、FITC 標識抗マウス CD122 (eBioscience)、PECY5 標識抗マウス CD8a 抗体(eBioscience)、PECY5 標識抗マウス $\alpha \beta$ TCR 抗体(eBioscience)、PE 標識抗マウス perforin 抗体 (eBioscience)およびPE 標識抗マウス granzyme B 抗体 (eBioscience)である。

⑥ 蛋白抽出法

凝固後の全血を 8,000 rpm、10 分間遠心分離し、上清を血清として採取した。また、肝組織については、凍結組織検体に PBS を加え、ホモジナイザーを用いて細胞破碎液を作成し、これを 15,000 rpm で 30 分間遠心した後、上清分画を蛋白検体として回収した。得られた蛋白検体は Quick Start プロテインアッセイ(Bio-Rad、Hercules、CA)により定量した。いずれの検体も、 -80°C で冷凍保存し、必要時に解凍してサイトカイン等の測定に用いた。

⑦ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法

血清または肝組織中の IL-6、IL-10、IL-12p70 は、OptEIA ELISA set (BD)を用いマニュアルに従って測定した。肝組織中濃度に関しては、測定値を

検体総蛋白値で除した値を補正值として用いた。

⑧ 統計学的解析

得られたデータは Prism 5 (GraphPad software)を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、多群間の比較に関しては、two-way ANOVA を用いて検定した。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。

第3節 結果

(1) サイトカイン産生

「NL17 細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける末梢血中のサイトカインの推移をみると(図 9)、IL-6 値は、1 日目では有意に高値を示し、3 日目以降は CLP 前のレベルに戻った(control 群 vs. sham 群 vs. CLP 群(以下同順): 54.6 ± 6.9 pg/ml vs. 57.6 ± 4.2 pg/ml vs. 4133.4 ± 2018.9 pg/ml, $p < 0.001$)。IL-10 値も、1 日目において CLP 群で有意に上昇した(8.0 ± 0.5 pg/ml vs. 8.1 ± 0.1 pg/ml vs. 258.8 ± 73.0 pg/ml, $p < 0.001$)が、3 日目には下降し、7 日目には CLP 施行前の値まで減少した。一方、末梢血中の IL-12p70 値は、1 日目 (29.4 ± 1.4 pg/ml vs. 28.0 ± 4.1

pg/ml vs. 182.1 ± 51.0 pg/ml, $p < 0.01$) および 3 日目 (23.8 ± 0.9 pg/ml vs. 24.2 ± 3.6 pg/ml vs. 224.5 ± 73.6 pg/ml, $p < 0.001$) となり、3 日目をピークとして 7 日目には元のレベルに戻った。

これに対し、肝組織中のサイトカインの推移は末梢血中のそれとはまったく異なるパターンを示した(図 10)。IL-6 値は、腫瘍細胞接種後 7 日目まで徐々に上昇する傾向にあった。CLP 群においては肝内 IL-6 値は、他群に比べて上昇が悪い傾向を示したが、統計学的には有意ではなかった。肝内 IL-10 値は、1 日目に一旦上昇した後 3 日目には元のレベルに下がったが、7 日目には再度上昇する傾向にあった。しかし、CLP 群と sham 群との間に有意な差は見られなかった。一方、肝内 IL-12p70 値は、CLP 群では終始低値を示し、3 日目にやや上昇したが、7 日目には有意な低下が認められた (36247.2 ± 8222.6 pg/肝 50mg vs. 29230.8 ± 7903.5 pg/肝 50mg vs. 7861.5 ± 651.7 pg/肝 50mg, $p < 0.001$)。

このことは、CLP により全身性(末梢血中)にサイトカイン血症が起きる一方で、脾に接種した腫瘍細胞が転移を起こしうる肝では、これとは異なる生体防御系が働いている可能性を示唆する。また、CLP 群における肝内 IL12p70 値の低下は、肝での抗腫瘍免疫が低下している可能性を示している⁽²⁹⁾。そこで次に、肝内の免疫細胞(肝単核球)の抗腫瘍活性を測定することにした。

(2) 肝における抗腫瘍活性

「NL17 細胞脾接種+CLP」モデル作成後、NL17 細胞に対する肝単核球の細胞傷害性を検討した。CLP 群の肝単核球細胞傷害活性は 1 日目および 3 日目で有意に低値を示した。その後、7 日目には CLP 群の抗腫瘍活性は回復し、sham 群と同じレベルを示した (図 11)。第 3 章で作成した「NL17 脾接種+CLP」モデルマウスで顕著な肝転移の促進がみられたのが、CLP 処理後早期の肝単核球の細胞傷害活性の低下によるものと考えられたため、肝単核球について更に詳しく検討することにした。

(3) 肝単核球数および肝単核球の細胞分画

肝から分離できる単核球数の総数を見ると、CLP 群では 1 日目(control 群 vs. sham 群 vs. CLP 群(以下同順): 6.1×10^6 vs. 6.0×10^6 vs. 3.4×10^6 , $p < 0.01$)および 3 日目(6.0×10^6 vs. 4.2×10^6 vs. 2.1×10^6 , $p < 0.05$)に有意に低下していた(図 12)。しかし、7 日目になると担癌のみの Control 群に近いレベルにまで回復した。Sham 群は 3 日目に肝単核球数の低下がみられたが、その程度は CLP 群に比べて軽度であった。

CLP 群と sham 群との間で差が最も顕著であった 1 日目における肝単核球の細胞分画をフローサイトメトリーにて解析したところ、CLP 群において NK

細胞の分画が有意に低下していることが確認された(図 13(A))。CD4T 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞に分けて細胞分画を更に細かく解析すると、CLP 群では NK 細胞以外にも CD8T 細胞の分画が低下する傾向が認められた(図 13(B),左)。肝単核球細胞数総数にこれらの分画(%)をかけて、それぞれの実細胞数を計算したところ NK 細胞および CD8T 細胞は分画のみならず実細胞数としても顕著に減少していることが確認された(図 13(B),右)。なお、細胞分画の解析では CLP 群で NKT 細胞分画が有意に増加しているように見えたが(図 13(B),左)、実細胞数は増加していなかったことから(図 13(B),右)、NK 細胞分画の低下によりフローサイトメトリー解析上 *reciprocal* に変動した結果であることが判明した。

CLP 群での肝転移抗腫瘍活性の低下にかんがみ、CLP 群で肝内実質細胞の減少が認められた CD4T 細胞、CD8T 細胞、NK 細胞のうち、初期自然免疫に於ける抗腫瘍効果に最も関連が深い NK 細胞について更なる検討を加えた。

(4) NK 細胞失活化の抗腫瘍免疫への影響

CLP 群に比べて 1 日目に抗腫瘍活性が高値であった sham 群の肝単核球を採取し抗アシアロ GM1 抗体による処理を施したところ、未処理対照群と比べ抗腫瘍活性の有意な低下を認めた(図 14)。

(5) 肝 NK 細胞におけるパーフォリン・グランザイム活性

「NL17 細胞脾接種」モデルマウス 1 日目の肝単核球を採取し、フローサイトメトリーにより NK 細胞のパーフォリン・グランザイム活性を測定した(図 15(A))。肝 NK 細胞におけるパーフォリン陽性細胞の平均蛍光強度は、sham 群と比べて CLP 群で有意に低値であった(図 15(B))。また、グランザイムにおいても同様の傾向を認めた(図 15(B))。これらのことから、CLP 群における肝 NK 細胞は数のみならず細胞傷害活性の面でも有意な低下が起きているものと考えられた。

第 4 節 考察

本章では、CLP という腹腔内感染が癌の増殖とくに肝転移機転に及ぼす影響について宿主側の防御因子の面から検討した。これまで、種々のサイトカインが消化器癌の増殖や抗腫瘍免疫能に影響を及ぼすことが知られている(表 7)⁽²⁵⁾。IL-10 や Transforming growth factor- β (TGF- β)の過剰発現、Interferon- γ や IL-18 の産生低下は、宿主の腫瘍免疫を低下させ、その結果として腫瘍の増殖を促進する⁽³⁰⁻³³⁾。また、Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)などのケモカインや tumor necrosis factor- α (TNF- α)などは、腫瘍細胞

に発現する受容体を介して直接的に腫瘍増殖に関与するサイトカインとして報告されている^(34, 35)。我々の教室では、以前、胃癌細胞は IL-18 受容体を発現しており、IL-18 の添加により濃度依存性の増殖亢進を示すことを報告している⁽³⁶⁾。

我々は、そのうち、①増殖活性への直接作用、②抗腫瘍免疫の抑制、③抗腫瘍免疫の賦活の観点から、代表的なサイトカインとして、IL-6、IL-10、IL-12 を選び検討することにした。CLP 処理後 1 日目をピークに末梢血中の IL-6 および IL-10 が上昇し、また 3 日目をピークに血中 IL-12p70 が上昇した。このような全身性のサイトカイン増加がみられる一方で、肝内環境でのサイトカインは IL-6、IL-10 に差は認められず、IL-12p70 に関しては CLP 群でむしろ低値を示した。

IL-6 は多機能性サイトカインであり、特に B 細胞の分化誘導や自然免疫反応の調整に関与することが知られている^(37, 38)。Ito ら⁽³⁹⁾は、胃癌細胞において、腫瘍細胞自身が産生する IL-6 が自身が発現する IL-6 受容体を介してオートクリン的に働き増殖促進する機序を、また Ashizawa ら⁽⁴⁰⁾は、IL-6 が Hepatocyte growth factor (HGF)の発現増強を介してリンパ節転移や肝転移を促進することを証明した。一方、IL-10 は代表的な抗炎症性サイトカインであり、過剰な炎症性反応を終焉に向かわせる一方で、宿主には免疫抑制的に働くことが知られている⁽⁴¹⁾。我々のグループでは、腹腔内の IL-10 濃度が高値な症例は腹膜播種を来

しやすく、予後不良であることを以前に報告している⁽³³⁾。本実験において、CLP 群での末梢血中で増加する IL-6 や IL-10 などのサイトカインが腫瘍細胞の増殖に有利に働く可能性が考えられた。しかしながら、肝内におけるこれらのサイトカインの動向を高頻度かつ促進的な肝転移がみられる CLP 群において観察しても、他群と比較して有意な変化は見られなかった。したがって、末梢血での IL-6、IL-10 の増加が腫瘍細胞の肝転移促進に何らかの役割を果たしていることは十分に考えられるが、その詳細なメカニズムは不明であり、かつ肝内でのサイトカイン動向にどのような関連性をもっているのかについても明確な説明はできない。

その一方で、CLP 群が肝内における IL-12p70 の低下を示したことは、このサイトカインが NK 細胞や NKT 細胞のインターフェロン γ 産生を制御して抗腫瘍免疫に影響を与えること⁽²⁹⁾を考えると興味深い現象である。そこで、本研究では腫瘍細胞の肝への転移阻止に重要な役割を果たすと考えられる肝単核球の働きについて CLP 群での変化を検索することにした。

CLP 群の肝単核球における抗腫瘍活性は、1 日目、3 日目で有意な低下がみられた。このような CLP 群における早期の抗腫瘍活性低下の原因は、肝単核球数において抗腫瘍活性を担うと考えられる NK 細胞や CD8T 細胞の実質的な減少が考えられた。特に、NK 細胞は抗腫瘍自然免疫の働きを担う中心的な細胞分画

であり、抗腫瘍獲得免疫の成立していない担癌早期に最も重要と考えられる。

実際に sham 群の肝単核球において抗アシアロ GM1 抗体を用いて NK 細胞を失活化したところ、その抗腫瘍活性が著明に低下したことからも本細胞の役割の重要性が裏付けられる。更には、CLP 群の NK 細胞ではパーフォリン・グランザイム B の発現率の低下が認められており、数のみならず細胞傷害活性の面でも、肝転移阻止能が障害されていることがわかる。しかしながら、CLP 群の肝内における IL-12p70 産生能の低下は 7 日目に観察されており、NK 細胞の減少時期や抗腫瘍活性低下の時期と必ずしも一致していないのが現状である。したがって、本検討で測定し得た血中や肝組織中サイトカインの消長だけでは NK 細胞を主軸とした抗腫瘍免疫の説明をつけることができない。腹腔内感染により惹起される肝内 NK 細胞の減少に関しては apoptosis や肝外局所への誘導などの可能性が考えられるが推測の域を出ない。メカニズムの核心に迫るためには今後更なる検討が必要である。

今回の検討では、「NL17 細胞脾接種+CLP」モデルマウスを用いて、CLP という感染性侵襲が腫瘍肝転移の促進にどのように関与しているのかを、宿主側の肝における NK 細胞数・機能低下という観点から明らかにすることができた。したがって、今後は「NK 細胞の賦活化」が感染性侵襲をともなう担癌患者に対する抗腫瘍治療戦略の一つとなる可能性がある。

第5節 小括

「NL17 細胞脾接種+CLP」モデルマウスは、CLP 後早期に全身性の高サイトカイン血症(IL-6, IL-10, IL-12)を示した。一方、肝組織では、催炎症性サイトカイン(IL-12p70)の低下に加え、肝単核球の抗腫瘍活性が低下していた。なかでも、NK 細胞の量的・質的低下が顕著でありこれが腫瘍肝転移促進の大きな要因となっているものと考えられた。本研究は、感染性侵襲による環境が、肝転移促進に有利に働いていることを実験レベルではじめて示した。

第五章 総括

本研究では、まず臨床的検討として、当科における胃癌に対する根治切除症例を対象に、術後感染性合併症の発症が予後に及ぼす影響について検討を行った。その結果、胃癌根治切除症例の 10.6%に術後感染性合併症の発症を認め、多変量解析の結果から、感染性合併症の発症は独立して予後不良に関与する因子と考えられた。特に、縫合不全は癌特異的生存期間を短縮する最大の要因であり、腹腔内に感染を引き起こしうる侵襲が微少残存腫瘍の増殖や転移に大きく関わっている可能性が考えられた。

そこで、大腸癌高転移株(NL17)を脾臓に接種したマウス肝転移モデルにおいて CLP の操作を行い、これにより起きる腹膜炎の発症により肝転移が著明に増加することを示した。このようなモデルマウスでの腹膜炎時の免疫学的反応を検討すると、腫瘍の細胞増殖に係る炎症性サイトカインである IL-6 や抗腫瘍免疫の抑制に係る抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中濃度が上昇していた。また、肝内においては IL-12p70 の有意な低下がみられ、肝内での抗腫瘍免疫に影響を与えていることが考えられた。そこで、肝内の単核球について詳細な検討を行ったところ、肝の NK 細胞の量的低下・機能低下が示され、腹膜炎のような感染性侵襲は腫瘍細胞の肝転移に有利に働く病態であることが示唆された。しかしながら、サイトカインとの直接的な関連性は示すことができなかった。

本研究では、根治手術後の感染症発症が長期予後を悪化させるという点について、その機序を動物実験により検討した。術後の感染性合併症は、入院期間や絶食期間の延長、医療費の増大などの短期的な影響にとどまらず、長期予後も悪化させる。したがって、術後感染性合併症の根絶に向けて、徹底した予防策をとることや合併症の重篤化を回避する策を講じることは、極めて重要であると考えられる。本研究は、腫瘍の肝転移・増殖に関わる感染性侵襲の影響を、生体防御反応特にNK細胞を中心とした自然免疫の観点から実験的にそのメカニズムの一端を明らかにした(図 16)。本結果は、術後に感染性合併症を発症した患者に対する新たな治療戦略の可能性を示唆する重要な知見であり、今後の悪性腫瘍患者予後向上に向けて臨床的にも大きな意義を有するものと考えられる。

第六章 結論

- 1、臨床的検討の結果、胃癌根治切除症例において、術後の感染性合併症の発症が予後不良因子となることが示された。特に縫合不全は癌特異的な予後とよく関連していた。
- 2、NL17 腫瘍細胞の脾臓接種モデルにおいて、盲腸結紮戦穿刺(CLP)を施行することにより腹腔内感染を起こすと肝転移が促進された。
- 3、腹腔内感染(CLP)により肝転移が促進される機序の一つとして、肝 NK 細胞数の減少に起因する細胞傷害活性の低下が起きていることが原因と考えられた。
- 4、本研究で得られた結果は、術後に感染性合併症を発症した患者に対する新たな治療戦略の可能性を示すもので、今後の悪性腫瘍患者の予後向上に向けて、臨床的に大きな意義を有するものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました防衛医科大学校外科学講座の長谷和生教授ならびに山本順司教授に深甚なる感謝の意を表します。また、長きに渡り終始直接御指導、御教示を頂きました防衛医科大学校外科学講座の辻本広紀講師、防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の小野聡准教授に深く感謝いたします。さらに、実験的御指導を頂きました防衛医科大学校分子生体制御学講座の四ノ宮成祥教授に深く感謝いたしますとともに、協力いただきました教室ならびに防衛医科大学校研究センター外傷研究部門の諸先生方に感謝いたします。

本研究の主旨は、第 112、113 回日本外科学会定期学術集会、第 66-68 回日本消化器外科学会総会、第 48 回日本腹部救急医学会総会、第 49 回日本外科代謝栄養学会、第 16 回日本がん免疫学会等において発表した。

参考文献

1. DerHagopian RP, Sugarbaker EV, Ketcham A. Inflammatory oncotaxis. *Jama*. 1978 Jul 28;240(4):374-5.
2. Akyol AM, McGregor JR, Galloway DJ, Murray GD, George WD. Anastomotic leaks in colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence? *Int J Colorectal Dis*. 1991 Nov;6(4):179-83.
3. de Melo GM, Ribeiro KC, Kowalski LP, Deheinzelin D. Risk factors for postoperative complications in oral cancer and their prognostic implications. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Jul;127(7):828-33.
4. Fujita S, Teramoto T, Watanabe M, Kodaira S, Kitajima M. Anastomotic leakage after colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence and poor prognosis. *Jpn J Clin Oncol*. 1993 Oct;23(5):299-302.
5. Hirai T, Yamashita Y, Mukaida H, Kuwahara M, Inoue H, Toge T. Poor prognosis in esophageal cancer patients with postoperative complications. *Surg Today*. 1998;28(6):576-9.
6. Ito H, Are C, Gonen M, D'Angelica M, Dematteo RP, Kemeny NE, et al. Effect of postoperative morbidity on long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg*. 2008 Jun;247(6):994-1002.
7. Lagarde SM, de Boer JD, ten Kate FJ, Busch OR, Obertop H, van Lanschot JJ. Postoperative complications after esophagectomy for adenocarcinoma of the esophagus are related to timing of death due to recurrence. *Ann Surg*. 2008 Jan;247(1):71-6.
8. Law WL, Lee YM, Choi HK, Seto CL, Ho JW. Impact of laparoscopic resection for colorectal cancer on operative outcomes and survival. *Ann Surg*. 2007 Jan;245(1):1-7.
9. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2005 Sep;92(9):1150-4.
10. Nespoli A, Gianotti L, Totis M, Bovo G, Nespoli L, Chiodini P, et al. Correlation between postoperative infections and long-term survival after colorectal resection for cancer. *Tumori*. 2004 Sep-Oct;90(5):485-90.
11. Rizk NP, Bach PB, Schrag D, Bains MS, Turnbull AD, Karpeh M, et al. The impact of complications on outcomes after resection for esophageal and gastroesophageal junction carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2004 Jan;198(1):42-50.
12. Varty PP, Linehan IP, Boulos PB. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 1994 Jun;81(6):915-8.

13. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):255-9.
14. Tsujimoto H, Ichikura T, Ono S, Sugasawa H, Hiraki S, Sakamoto N, et al. Impact of postoperative infection on long-term survival after potentially curative resection for gastric cancer. *Annals of surgical oncology.* 2009 Feb;16(2):311-8.
15. Tsujimoto H, Ueno H, Hashiguchi Y, Ono S, Ichikura T, Hase K. Postoperative infections are associated with adverse outcome after resection with curative intent for colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2010 Jan;1(1):119-25.
16. Tsujimoto H, Ono S, Mochizuki H, Aosasa S, Majima T, Ueno C, et al. Role of macrophage inflammatory protein 2 in acute lung injury in murine peritonitis. *J Surg Res.* 2002 Mar;103(1):61-7.
17. Shiraishi N, Inomata M, Osawa N, Yasuda K, Adachi Y, Kitano S. Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Cancer.* 2000 Jul 15;89(2):255-61.
18. Lorenz M, Hottenrott C, Encke A. [Adjuvant regional chemotherapy after resection of liver metastases of primary colorectal tumors]. *Zentralblatt fur Chirurgie.* 1993;118(5):279-89.
19. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery.* 1983 Aug;94(2):331-5.
20. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Beelen RH, Meijer S, Coffey JC, van Egmond M. The perioperative period is an underutilized window of therapeutic opportunity in patients with colorectal cancer. *Ann Surg.* 2009 May;249(5):727-34.
21. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2005 Dec 15;92(4):347-59.
22. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74.
23. Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Osada S, Takayama E, et al. Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J Surg.* 2000 Jan;24(1):10-6.
24. Ono S, Ueno C, Aosasa S, Tsujimoto H, Seki S, Mochizuki H. Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. *Am J Surg.* 2001 Nov;182(5):491-7.
25. Tsujimoto H, Ono S, Ichikura T, Matsumoto Y, Yamamoto J, Hase K. Roles of

inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? *Gastric Cancer*. 2010 Nov;13(4):212-21.

26. Tsujimoto H, Ono S, Matsumoto A, Kawabata T, Kinoshita M, Majima T, et al. A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells. *J Hepatol*. 2006 Dec;45(6):836-43.

27. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Nov;8(6):1131-5.

28. Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K, Tokunaga T. In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature*. 1981 May 28;291(5813):334-5.

29. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16:495-521.

30. De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Infusino S, Auriemma A, et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer*. 1999 Nov 15;86(10):1936-43.

31. Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999 Feb;17(2):607-14.

32. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Matsumoto A, Kawabata T, et al. The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma. *Anticancer research*. 2002 Mar-Apr;22(2B):1193-9.

33. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Hiraide H, Mochizuki H. Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2001 Oct;78(2):124-30; discussion 31.

34. Sugawara H, Ichikura T, Kinoshita M, Ono S, Majima T, Tsujimoto H, et al. Gastric cancer cells exploit CD4+ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8+ cell-involved tumor elimination. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2535-41.

35. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2009 May;9(5):361-71.

36. Majima T, Ichikura T, Chochi K, Kawabata T, Tsujimoto H, Sugawara H, et al. Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth and evasion of host

immunity. International journal of cancer Journal international du cancer. 2006 Jan 15;118(2):388-95.

37. Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, Burger C, McAuliffe PF, Scumpia PO, et al. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. Surgery. 2006 Nov;140(5):793-802. PubMed

38. O'Malley K, Moldawer LL. Interleukin-6: Still crazy after all these years. Crit Care Med. 2006 Oct;34(10):2690-1.

39. Ito R, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Tahara E. Expression of interleukin-6 and its effect on the cell growth of gastric carcinoma cell lines. Jpn J Cancer Res. 1997 Oct;88(10):953-8.

40. Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, et al. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. Gastric Cancer. 2005;8(2):124-31.

41. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med. 1996 Jul;24(7):1125-8.

表1 各種癌における術後合併症と予後に関する報告

著者	発表年	癌種	合併症の種類	合併症発生率	p値	生存期間の評価	ハザード比	95%信頼区間	参考文献 引用番号
Akyol	1991	大腸癌	縫合不全	19.20%	p<0.001	疾患特異的 生存期間	記載なし	記載なし	2
Fujita	1993	大腸癌	縫合不全	3.40%	p<0.01	無病生存期間	記載なし	記載なし	4
Varty	1994	大腸癌	腹腔内感染	12.20%	p=0.23	全生存期間	1.43	記載なし	12
Hirai	1998	食道癌	術後合併症	51.20%	p<0.01	全生存期間	記載なし	記載なし	5
de Melo	2001	口腔癌	術後合併症	50.00%	p<0.001	全生存期間	6.27	記載なし	3
Rizk	2004	食道癌	手術手技関連 合併症	27.00%	p=0.008	全生存期間	1.41	1.22-1.63	11
Walker	2004	大腸癌	縫合不全	1.60%	p=0.0002	全生存期間	1.6	1.3-2.1	13
Nespoli	2004	大腸癌	感染性合併症	29.40%	p=0.0004	全生存期間	2.44	1.43-4.17	10
McArdle	2005	大腸癌	縫合不全	3.80%	p=0.002	全生存期間	1.61	1.19-2.16	9
Law	2007	大腸癌	術後合併症	27.30%	p=0.023	全生存期間	1.26	1.03-1.52	8
Lagarde	2008	食道癌	術後合併症	63.30%	p=0.062	疾患特異的 生存期間	1.32	0.99-1.77	7
Ito	2008	転移性肝腫瘍	術後合併症	42.00%	p=0.10	疾患特異的 生存期間	1.2	0.96-1.5	6

表2 術後感染性合併症における発症の内訳とその定義

感染性合併症	症例数	発症率 (%)	定義
肺炎	50	3.8	発熱を伴い、胸部X線にて新たな浸潤影をみとめるもの
縫合不全	48	3.6	食事開始後の発熱などによる臨床的診断、もしくは、透視により管腔外に造影剤の漏出を認めるもの
創感染	27	2	創部より膿性排液を認め、創が離開し筋層以深の層が露出したもの
腹腔内膿瘍	15	1.1	発熱や腹痛を伴い、CTやUSにて腹腔内に液体貯留が認められるもの
腸炎	15	1.1	発熱を伴う下痢を認め、便中に病原性細菌が検出されたもの
脾液瘻	13	1	発熱や腹痛を伴い、ドレーン排液中のアミラーゼ値が血中アミラーゼ値の3倍以上となったもの
胆嚢炎	10	0.8	発熱や腹痛を伴い、CTやUSにて胆嚢壁の肥厚が確認できるもの
中心静脈カテーテル 関連感染	3	0.2	中心静脈カテーテルが挿入された状態で発熱を呈し血液培養にて菌が検出されるが、明らかな器質的疾患を認めないもの
Sepsis	2	0.2	全身性炎症反応症候群を呈しており、その原因が感染性疾患であるもの
合計	183		

表3 患者における術後感染性合併症の発症別にみた人口統計的、臨床病理学的背景因子

因子	感染性合併症		P値
	発症群 (n = 141)	非発症群 (n = 1191)	
年齢	63±1	61±0	0.02
性別（男女比）	3.86	1.99	< 0.01
Body mass index	22.7±0.6	22.6±0.1	0.54
高血圧			
あり	18(12.8%)	101(8.5%)	0.12
なし	123(87.2%)	1090(91.5%)	
糖尿病			
あり	13(9.2%)	80(6.7%)	0.27
なし	128(90.8%)	1111(93.3%)	
原発巣腫瘍径(mm)	46±3	39±1	0.07
腫瘍の局在			
U領域	38(27.0%)	167(14.1%)	< 0.01
M領域	56(39.7%)	566(47.9%)	
L領域	47(33.3%)	458(38.7%)	
腫瘍壁深達度			
T1・T2	108(76.6%)	1009(84.7%)	0.03
T3・T4	33(23.4%)	182(15.3%)	
リンパ節転移			
N0	73(51.8%)	721(60.5%)	0.01
N1	35(24.8%)	304(25.5%)	
N2	33(23.4%)	166(13.9%)	
病期			
Stage I・II	95(67.3%)	946(79.4%)	< 0.01
Stage III・IV	46(32.6%)	245(20.6%)	
手術術式			
胃全摘	61(43.3%)	262(22.0%)	< 0.01
胃切除	80(56.7%)	929(78.0%)	
他臓器合併切除			
あり	78(55.3%)	407(34.2%)	< 0.01
なし	63(44.7%)	784(65.8%)	
手術時間（分）	270±8	243±2	< 0.01
出血量（ml）	581±55	379±13	< 0.01
輸血施行			
あり	25(17.7%)	93(7.8%)	< 0.01
なし	116(82.3%)	1098(92.2%)	

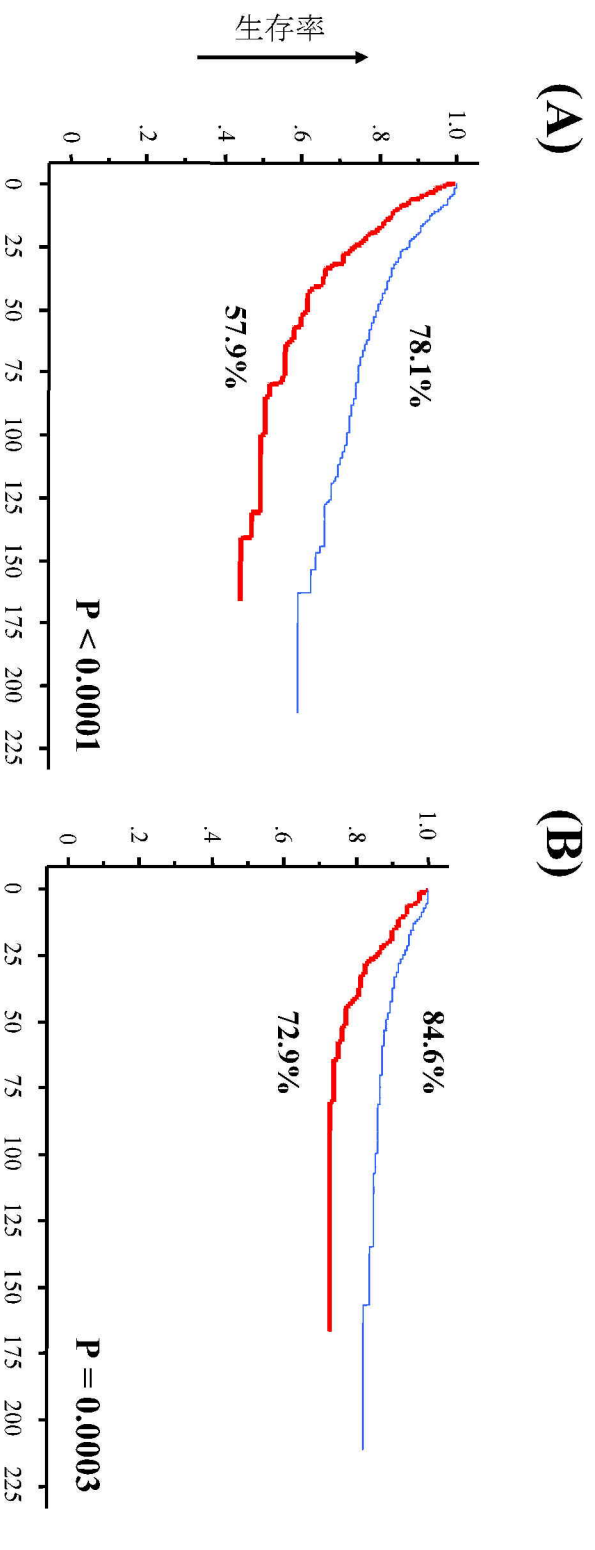


図1 胃癌根治切除後の生存曲線

両実線はKaplan-Meier法で解析された生存曲線であり、(A)は全生存期間を、(B)は癌特異的生存期間を表している。術後感染性合併症の有無で色分けてある。挿入された数値は各群における5年生存率とlog-rank testにおけるP値を示している。全生存期間および癌特異的生存期間において感染性合併症・発症例は非発症群と比べ生存率が低値であった(5年生存率: (A) 78.1% vs. 57.9%, $P < 0.0001$, (B) 84.6% vs. 72.9%, $P = 0.0003$)。

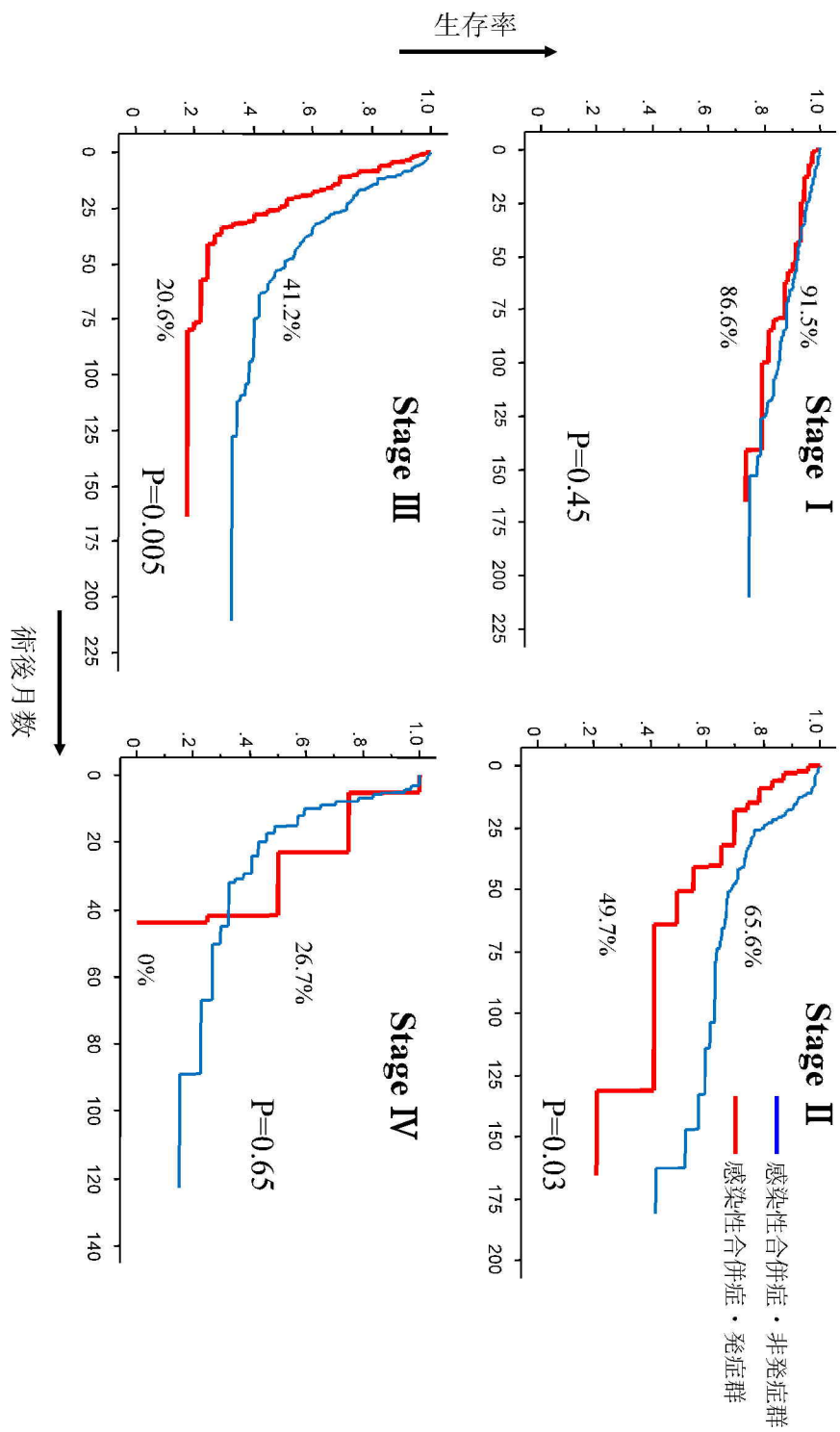


図2 病期別にみた胃癌根治切除後の全生存曲線

両実線はKaplan-Meier法で解析された生存曲線を示す。術後感染性合併症の有無で色分けしてある。挿入された数値は各群における5年生存率と、log-rank testにおけるP値を示している。Stage IIおよびIIIにおいて感染性合併症・発症群は生存率が低値であった(log-rank test; 5年生存率: 65.6% vs. 49.7%, $P = 0.03$ (Stage II), 5年生存率: 41.2% vs. 20.6%, $P = 0.005$ (Stage III))。

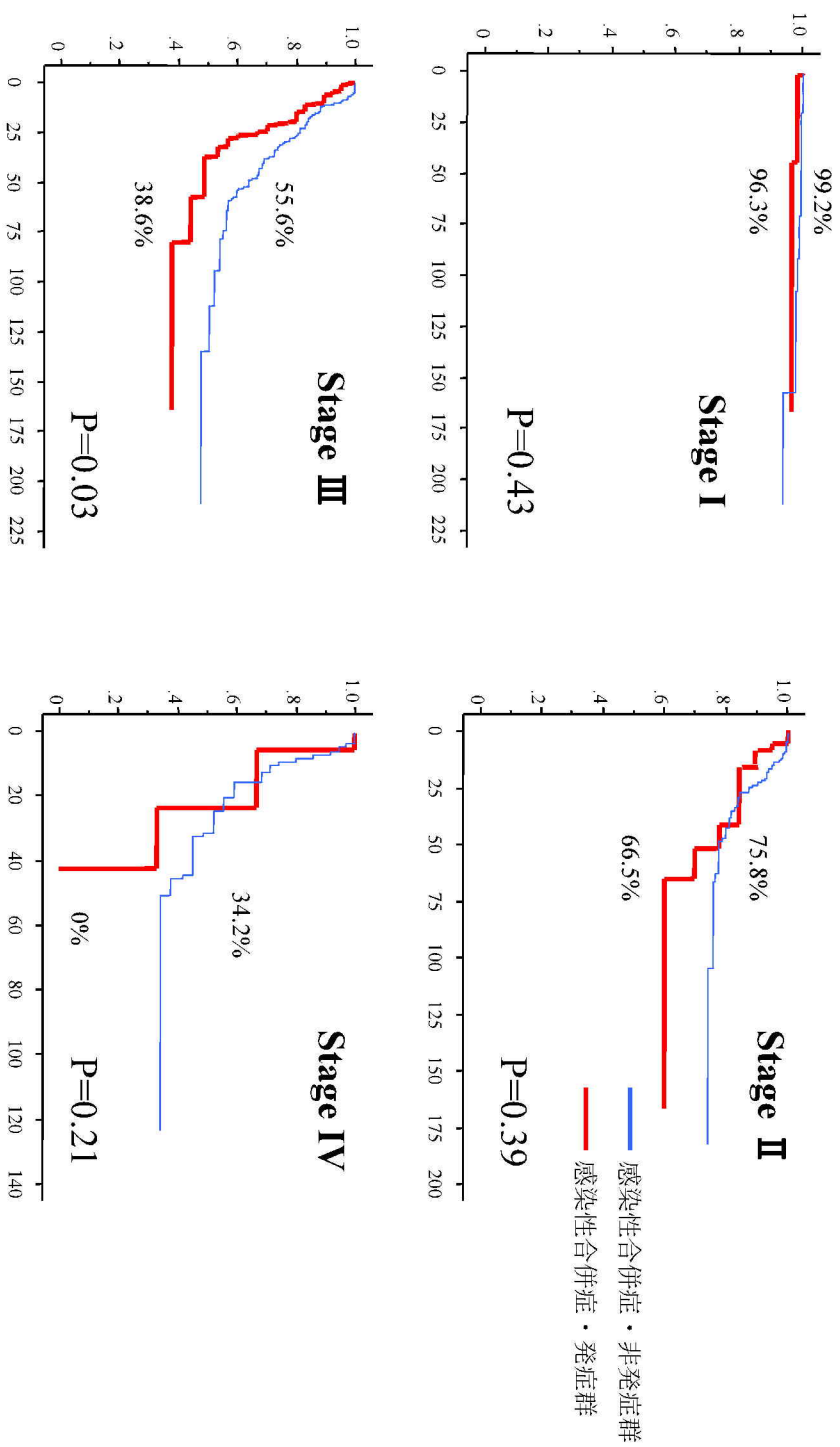


図3 病期別にみた胃癌根治切除後の癌特異的生存曲線
 両実線はKaplan-Meier法で解析された生存曲線を示す。術後感染性合併症の有無で色分けしてある。挿入された数値は各群における5年生存率と、log-rank testにおけるP値を示している。
 Stage IIIにおいて感染性合併症・発症群は生存率が低値であった (log-rank test; 5年生存率: 55.6% vs. 38.6%, $P = 0.03$)。

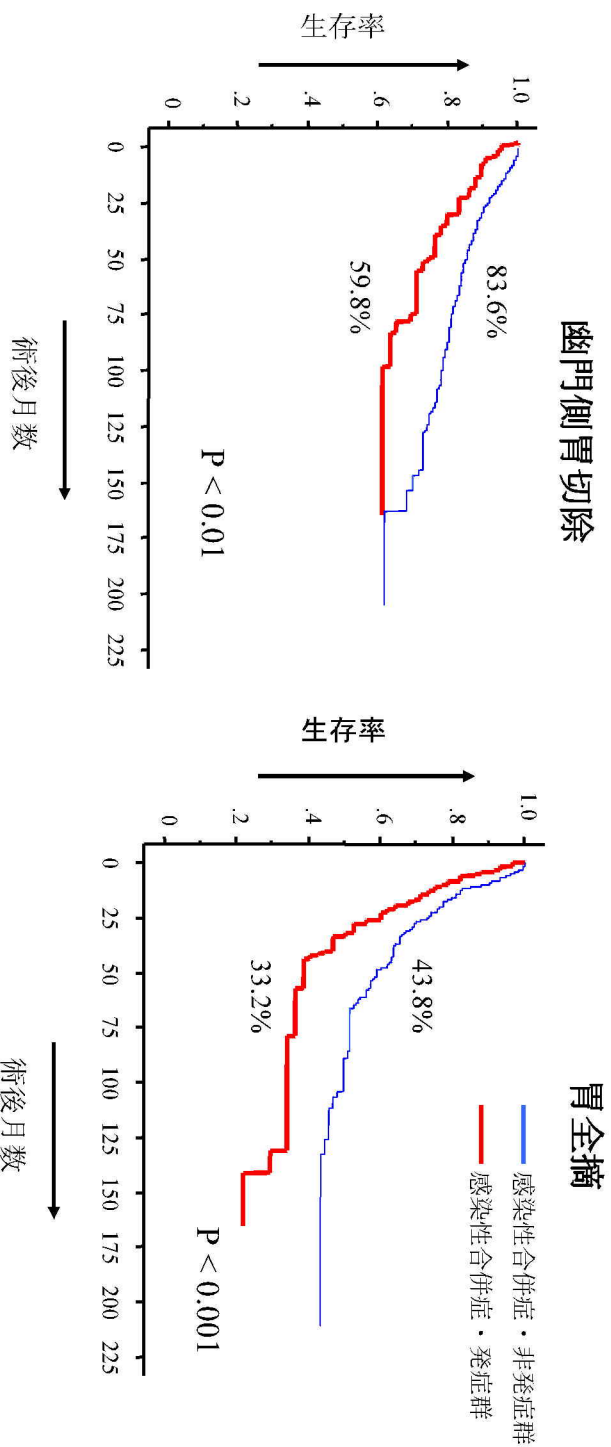


図4 術式別にみた胃癌根治切除後の全生存曲線

両実線はKaplan-Meier法で解析された生存曲線を示す。術後感染性合併症の有無で色分けしてある。挿入された数値は各群における5年生存率と、log-rank testにおけるP値を示している。幽門側胃切除、胃全摘いずれの術式においても感染性合併症・発症群は生存率が低値であった(log-rank test; 5年生存率: 83.6% vs. 59.8%、 $P < 0.01$ (幽門側胃切除)、5年生存率: 43.8% vs. 33.8%、 $P < 0.0001$ (胃全摘))。

表4 胃癌根治切除後の全生存期間に関する因子の単変量解析および多変量解析

因子	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	P値	ハザード比	95%信頼区間	P値
加齢	1.04	1.03-1.05	< 0.0001	1.03	1.02-1.04	< 0.0001
性別：男性	1.13	0.91-1.41	0.285	—	—	—
併存疾患あり	1.85	1.50-2.28	< 0.0001	1.5	1.14-1.98	0.0042
腫瘍局在（U領域）	1.18	1.01-1.37	< 0.0001	1.36	0.99-1.87	0.0598
腫瘍径50.0mm以上	2.14	1.71-2.68	< 0.0001	0.84	0.62-1.15	0.2751
輸血施行あり	3.28	2.54-4.23	< 0.0001	1.47	1.00-2.15	0.0491
腫瘍の組織型（浸潤型）	1.21	0.98-1.48	0.0722	—	—	—
腫瘍壁深達度						
T2	2.9	2.23-3.78	< 0.0001	1.37	0.91-2.08	0.1364
T3・T4	7.96	6.14-10.32	< 0.0001	2.69	1.69-4.28	< 0.0001
リンパ節転移						
N1	3.15	2.45-4.04	< 0.0001	2.06	1.38-3.07	0.0004
N2・N3	6.54	5.07-8.42	< 0.0001	3.23	2.09-5.00	< 0.0001
他臓器合併切除あり	2.56	2.02-3.24	< 0.0001	1.15	0.82-1.60	0.4182
術後感染性合併症の発症	1.91	1.47-2.48	< 0.0001	1.88	1.50-2.94	< 0.0001

表5 胃癌根治切除後の癌特異的生存期間に関する因子の単変量解析および多変量解析

因子	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	P値	ハザード比	95%信頼区間	P値
加齢	1.01	0.99-1.03	0.0622	—	—	—
性別：男性	1	0.73-1.37	0.9925	—	—	—
併存疾患あり	1.55	1.13-2.12	0.0063	1.83	1.24-2.70	0.0025
腫瘍局在（U領域）	2.27	1.61-3.19	< 0.0001	1.09	0.69-1.72	0.7142
腫瘍径50.0mm以上	3.77	2.71-5.25	< 0.0001	0.78	0.51-1.17	0.2298
輸血施行あり	3.78	2.58-5.53	< 0.0001	1.5	0.90-2.51	0.1239
腫瘍の組織型（浸潤型）	1.75	1.29-2.39	0.0004	1.4	0.95-2.09	0.093
腫瘍壁深達度						
T2	13.26	7.19-24.45	< 0.0001	4.17	1.87-9.29	0.0005
T3・T4	42.61	23.28-77.97	< 0.0001	9.24	4.03-21.18	< 0.0001
リンパ節転移						
N1	10.91	6.65-17.89	< 0.0001	3.61	1.88-6.96	0.0001
N2・N3	25.78	15.76-42.19	< 0.0001	6.1	3.08-12.08	< 0.0001
他臓器合併切除あり	4.25	2.99-6.05	< 0.0001	1.41	0.88-2.26	0.1524
術後感染性合併症の発症	2.07	1.38-3.10	0.0005	1.84	1.13-2.99	0.0139

表6 胃癌根治切除後の生存期間に関する感染性合併症の単変量解析および多変量解析

因子	単変量解析			多変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	P値	ハザード比	95%信頼区間	P値
全生存期間						
肺炎	1.98	1.28-3.04	0.002	2.05	1.33-3.16	0.0011
縫合不全	1.94	1.26-2.99	0.0026	2.02	1.31-3.10	0.0015
腹腔内膿瘍	1.57	0.70-3.52	0.2728	—	—	—
腸炎	1.84	0.87-3.88	0.112	—	—	—
脾液瘻	1.95	0.81-4.71	0.1384	—	—	—
胆嚢炎	2.47	1.02-5.99	0.0448	2.64	1.09-6.39	0.0319
創感染	1.75	1.29-2.39	0.0004	—	—	—
癌特異的生存期間						
肺炎	1.37	0.65-2.93	0.4103	—	—	—
縫合不全	1.97	1.04-3.73	0.0381	1.98	1.05-3.76	0.0358
腹腔内膿瘍	2.03	0.65-6.36	0.2241	—	—	—
腸炎	2.26	0.84-6.10	0.1069	—	—	—
脾液瘻	1.72	0.43-6.95	0.4439	—	—	—
胆嚢炎	4.02	1.28-12.62	0.0172	1.53	0.57-4.12	0.4025
創感染	1.48	0.55-4.00	0.4365	—	—	—

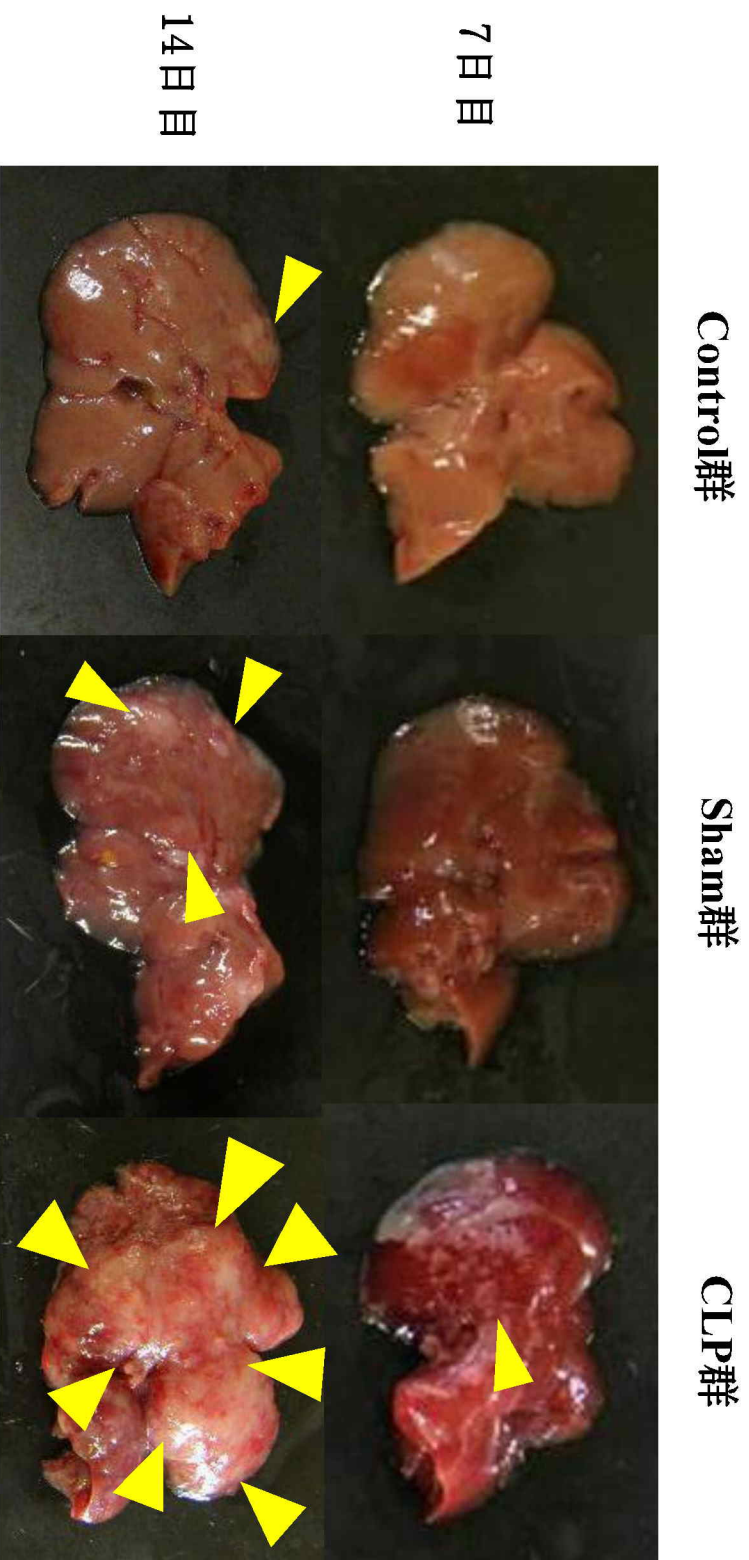


図5 経時的に見た「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける肝転移形成状況
 1×10^5 個のNL17細胞を脾臓接種後、7日目および14日目におけるcontrol、sham、CLP各群の肝転移形成状況を示す。写真上の矢頭は肉眼的肝転移巣を示している。CLP群では7日目より肉眼的肝転移が確認され、14日目には顕著化している。一方、control群、sham群では14日目に肉眼的肝転移が確認された。

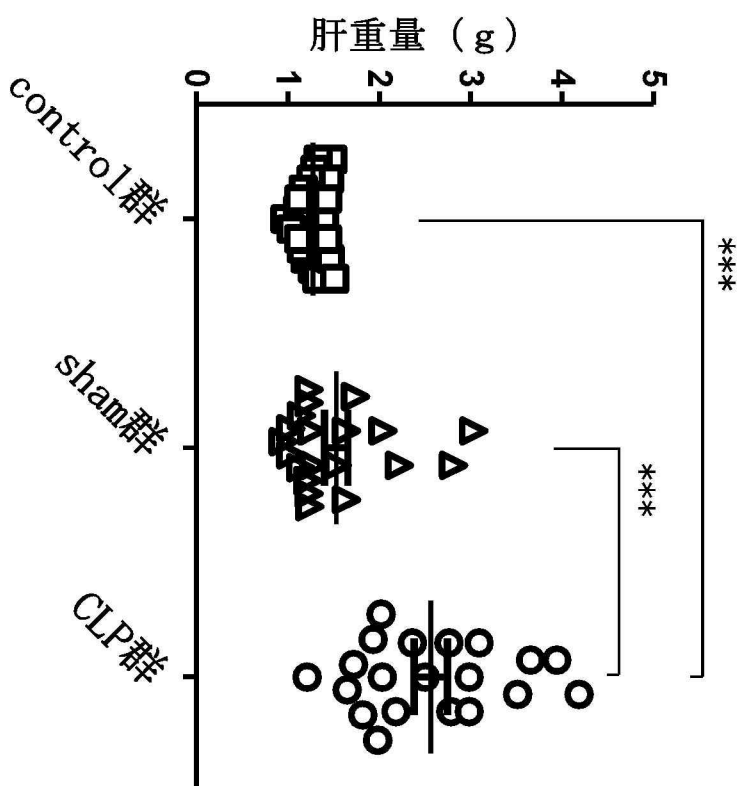


図6 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける肝転移形成状況
 1×10^5 個のNL17細胞を脾臓注入後14日目におけるCLP(○; $n=20$)、Sham(△; $n=20$)、control(□; $n=20$) 各群の肝転移形成状況を示す。グラフは各群における肝重量を示している。CLP群における肝重量はsham群と比べ有意に高値であった。
 *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA and Tukey's test

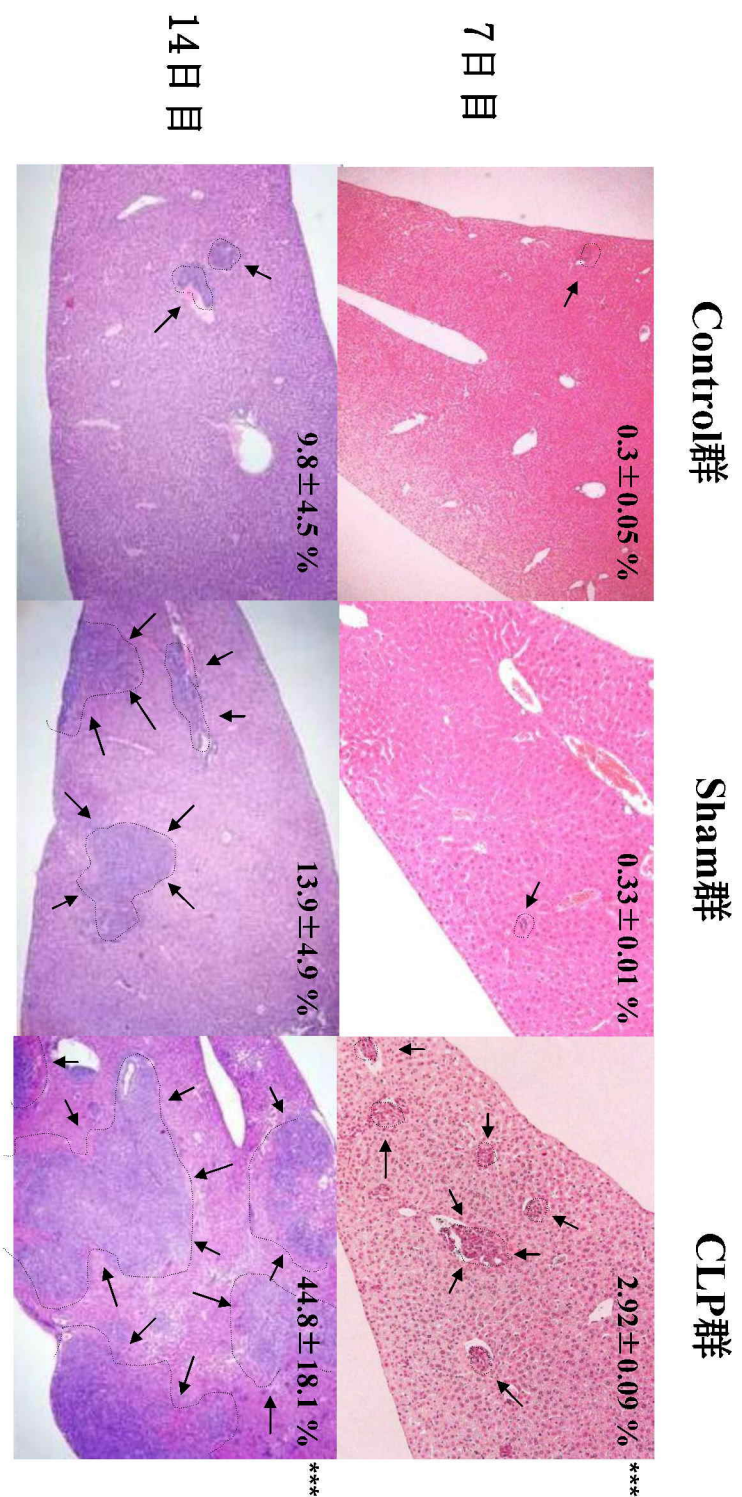


図7 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスの肝転移組織像

7日目および14日目におけるcontrol群、sham群およびCLP群のHE染色を施した肝組織切片(100倍拡大像)を示す。転移巣を点線で囲っている。写真中の矢印は転移巣を、写真に挿入された数値は肝内において腫瘍が占める面積比(平均値±SD(%))を示している(各群n=4)。CLP群では転移形成が著明であった。*** p<0.001 vs. sham by one-way ANOVA and Tukey's test

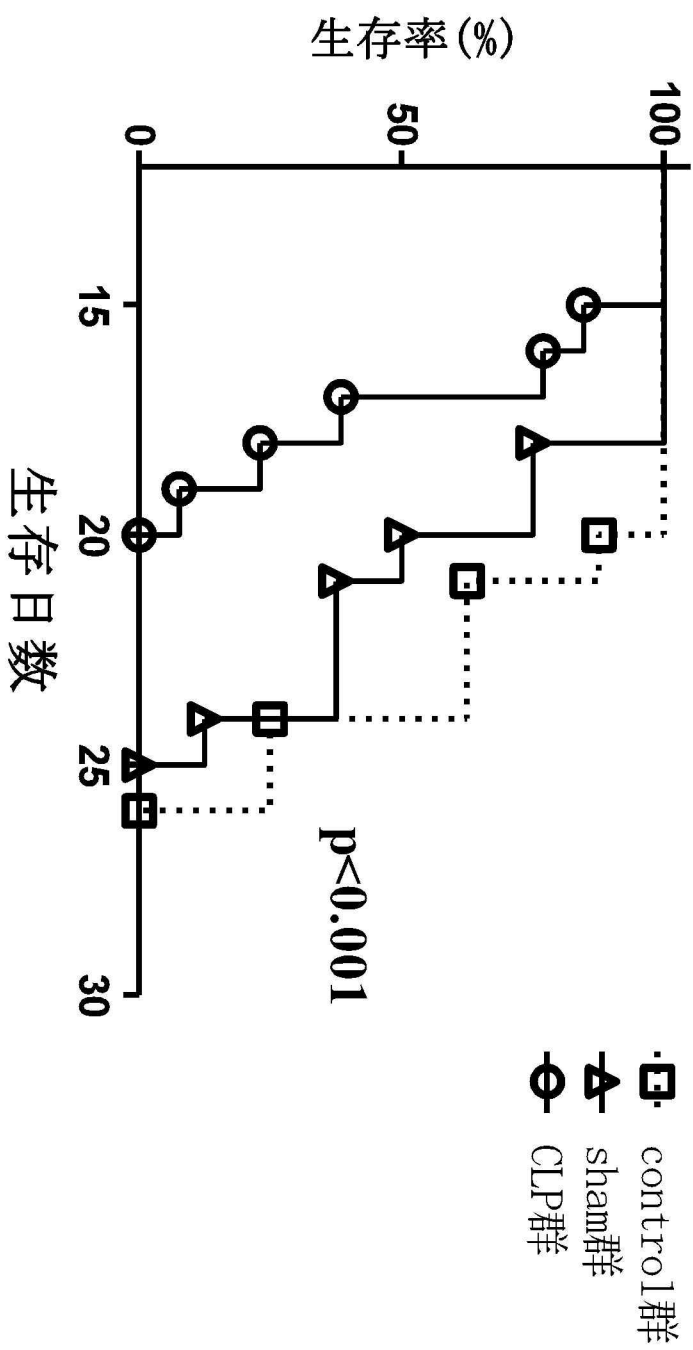


図8 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスの生存曲線
各線はKaplan-Meier法で解析された生存曲線を示す。control群を(---□---)、LAP群を(---△---)、CLP群を(---○---)で示す。挿入された数値はlog-rank testにおけるP値を示している。各群における50%生存期間はcontrol群で24日、sham群で20.5日、CLP群で17日であった。

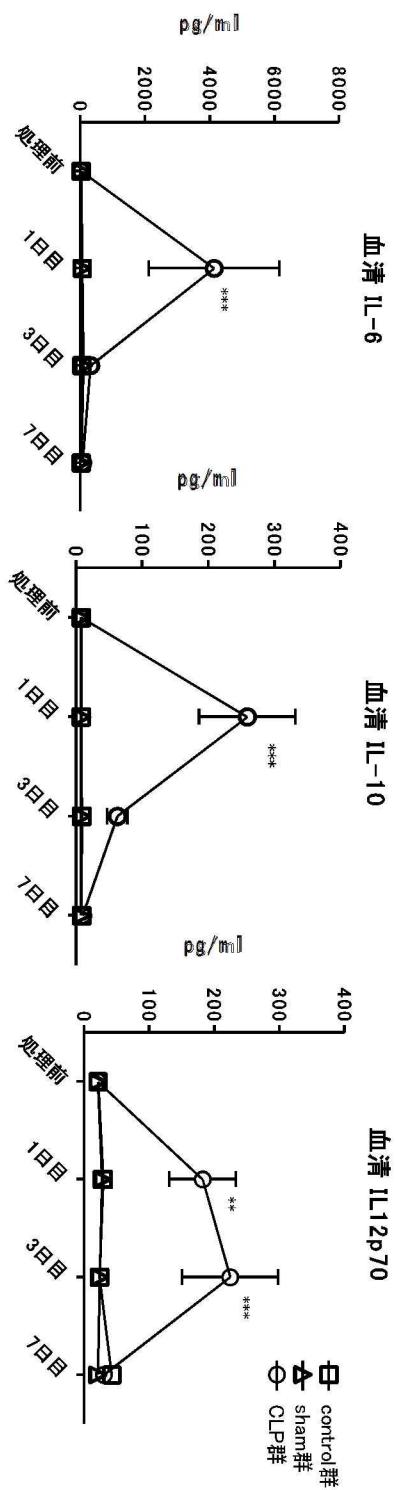


図9 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける血中サイトカインの推移
 血中IL-6値、IL-10値、IL-12p70値の推移を示す。IL-6値は1日目においてCLP群で有意に上昇したが($p<0.001$)、3日目および7日目においては差を認めなかった。IL-10値は、1日目においてCLP群で有意に上昇し($p<0.001$)、3日目および7日目においては差を認めなかった。IL-12p70値は1日目($p<0.01$)および3日目($p<0.001$)においてCLP群で有意に上昇した。
 $** p<0.01$, $*** p<0.001$ vs. sham by two-way ANOVA and Tukey's test

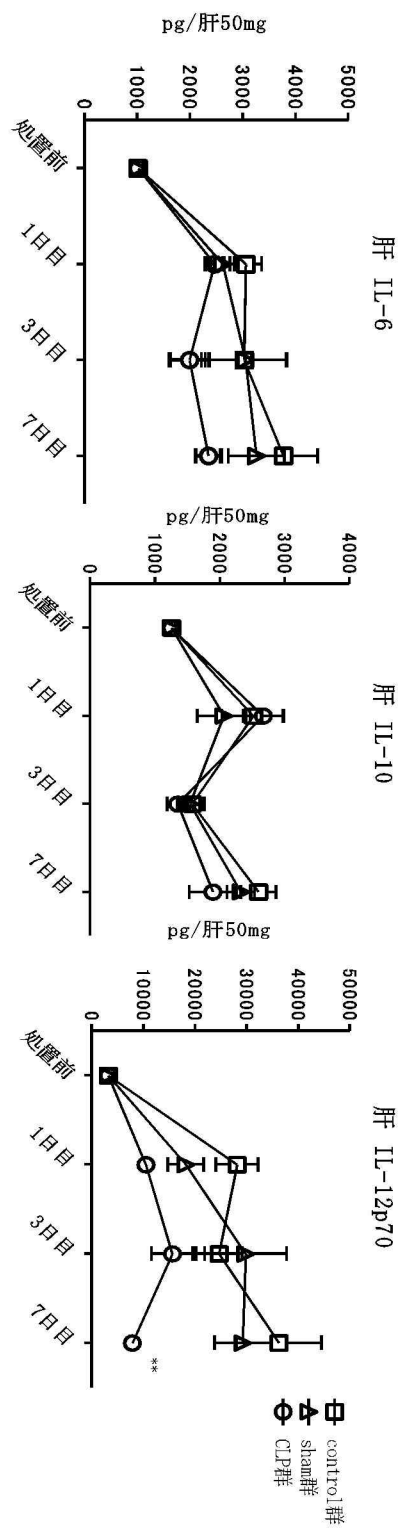


図10 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける肝組織中サイトカインの推移
 肝組織中IL-6値、IL-10値、IL-12p70値の推移を示す。IL-6値およびIL-10値に差は認めなかった。
 一方、IL-12p70値は7日目(p<0.01)においてCLP群で有意に低下した。
 ** p<0.01 vs. sham by two-way ANOVA and Tukey's test

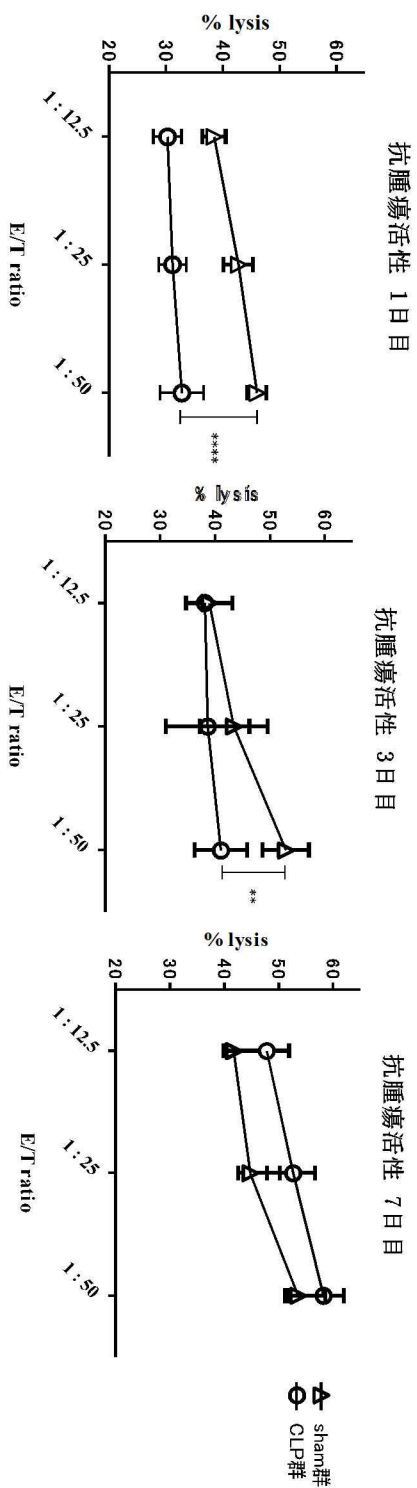


図11 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける肝単核球の抗腫瘍活性の推移

1日目、3日目、7日目における各群の抗腫瘍活性を示す。エフェクター・標的比(E/T ratio)1:50において、1日目($p < 0.0001$ vs. sham)および3日目($p < 0.01$ vs. sham)はCLP群の抗腫瘍活性が低下した。一方、7日目にはsham群と差を認めなかった。

** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. sham by two-way ANOVA and Tukey's test

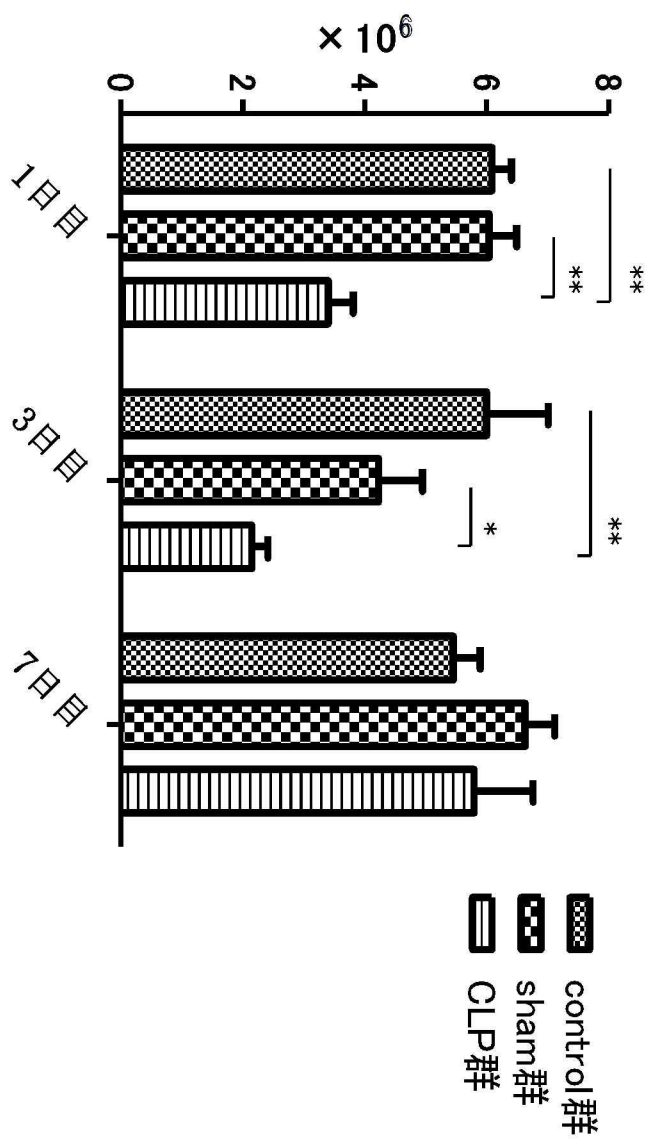


図12 「NL17細胞脾接種+CLP」モデルマウスにおける肝単核球数の推移
 各群における肝単核球数(肝あたりの総数)の推移を示す。CLP群では1日目、3日目において
 control群およびsham群と比較し有意に単核球数の減少を認める。7日目では差は認めない。
 *p<0.05, **p<0.01 vs. CLP by two-way ANOVA and Tukey's test

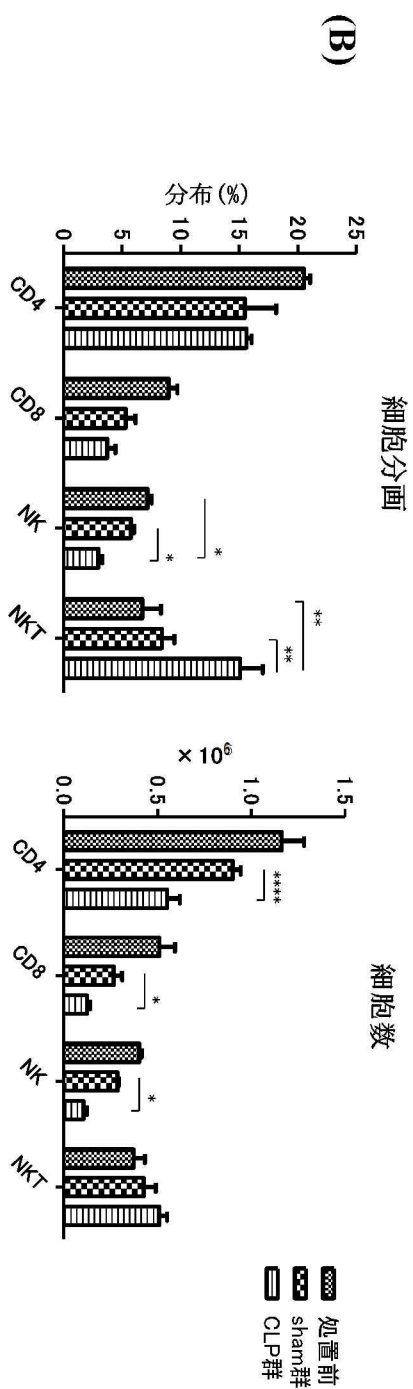
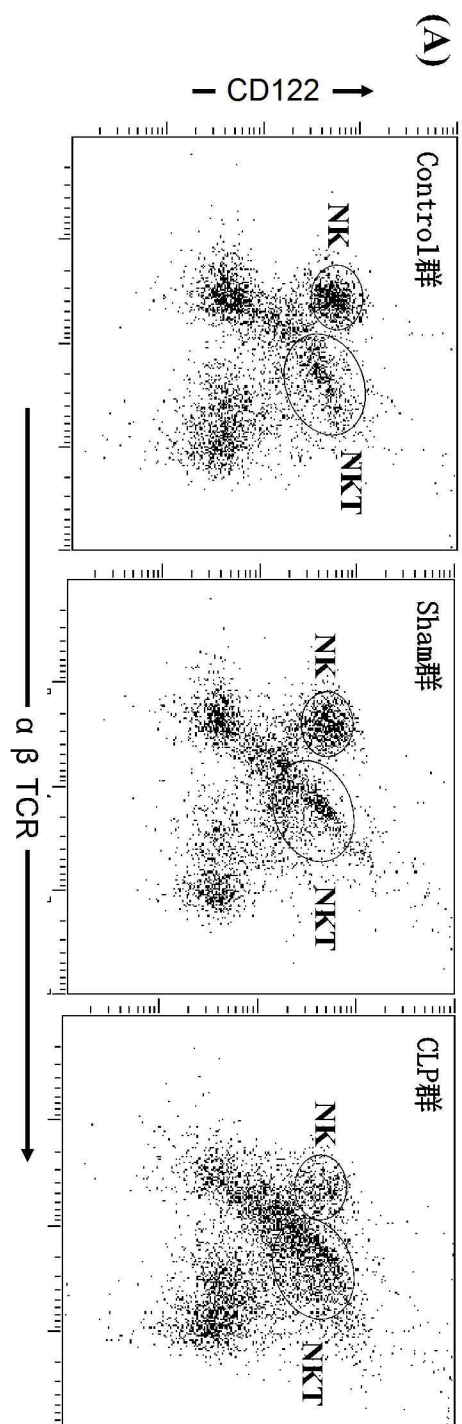


図13 フローサイトメトリーによる肝単核球の細胞分画、各種マーカー陽性細胞数の計測

(A)侵襲後1日目における肝単核球に関し、上段はX軸に $\alpha\beta$ TCR、Y軸にCD122を標識したフローサイトメトリーを示す。楕円で囲った領域はNK細胞、もしくはNKT細胞のポジューレーションを示している。(B)各種細胞分画と細胞数を示している。CLP群ではNK細胞の分布が低く細胞数も少ない。一方で、CLP群ではNKT細胞の分布が高いが、細胞数は他群と変わらない。また、CLP群ではCD4ならびにCD8陽性細胞数が少ない。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ vs. CLP by two-way ANOVA and Tukey's test

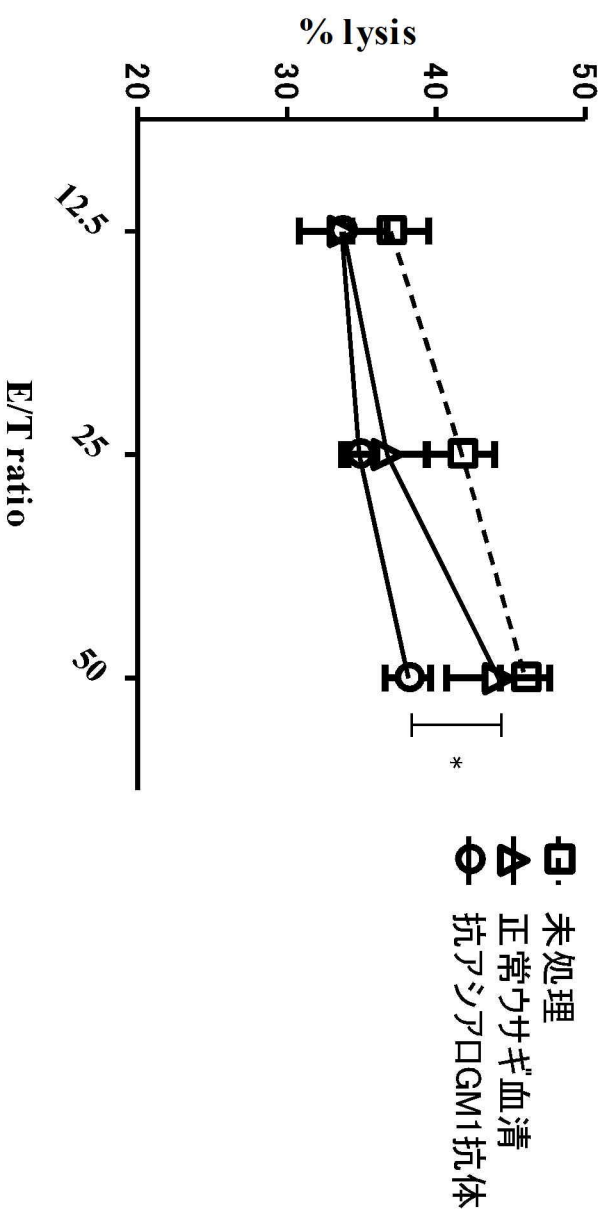
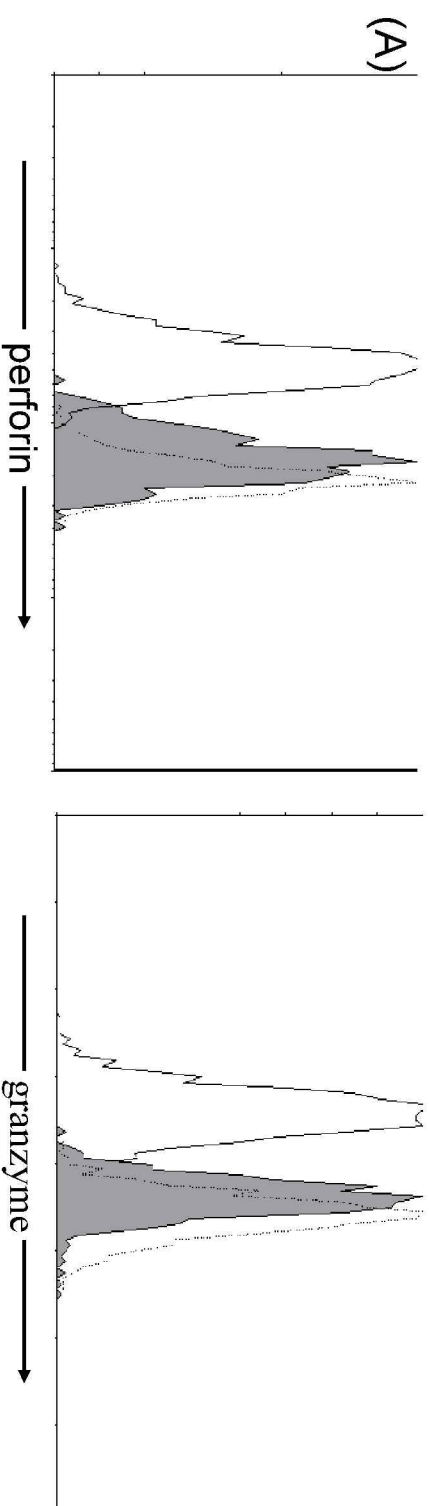


図14 Sham群1日目の肝から採取した肝単核球の抗腫瘍活性
 肝単核球を抗アシアロGM1抗体で処理した後の抗腫瘍活性を示す。対照群(NRS+NMS)は正常ウサギ血清で処理した。抗アシアロGM1抗体処理を行うと抗腫瘍活性の低下が認められた。
 * p<0.05 vs. NRS+NMS by two-way ANOVA and Tukey's test
 NRS: normal rabbit serum, NMS: normal mouse serum, α AGM1: anti-asialo GM1 antibody



(B)

	処理前 (n=2)	sham群 (n=4)	CLP群 (n=4)	p 値
perforin *	20.5 ± 0.7	19.6 ± 0.9	17.5 ± 0.6	p < 0.05
granzyme *	20.3 ± 0.4	19.3 ± 1.3	16.5 ± 1.2	p < 0.05

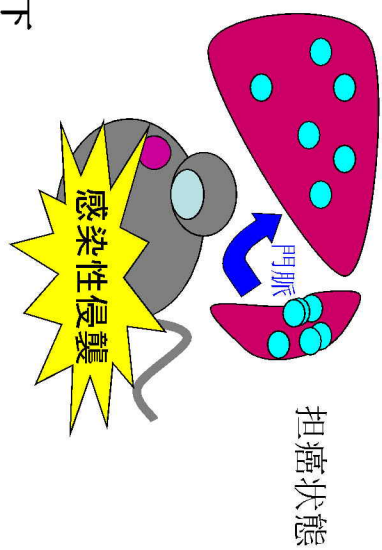
図15 肝NK細胞におけるパーフォリン・グランザイム活性

(A) 侵襲後1日目における肝単核球におけるNK細胞分画にゲートをかけ、パーフォリン(左)、グランザイム(右)の発現をヒストグラムで表したものの。実線白抜きはnegative controlを、実線灰色抜きはCLP群を、破線白抜きはsham群を表す。

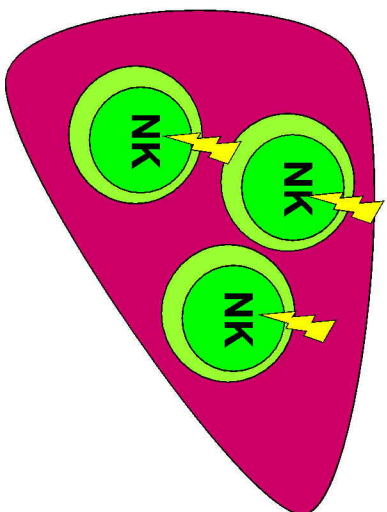
(B) NK細胞におけるパーフォリン陽性細胞もしくはグランザイム陽性細胞における mean fluorescence intensityを示している。CLP群ではパーフォリンおよびグランザイムの発現が低下している。*p<0.05 by one-way ANOVA

表7 胃癌の増殖や宿主の抗腫瘍免疫に関与するサイトカイン 文献22より改編引用

サイトカイン	主な産生細胞	作用機序
増殖活性への直接作用型		
TNFα	マクロファージ、樹状細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、角質細胞	DNA損傷亢進、DNA修復阻害、血管新生の誘導
IL-1	マクロファージ、樹状細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、角質細胞	シクロオキシゲナーゼ2、iNOS、プロスタグランジンE2、ICAM-1、VCAM-1、血管新生因子の発現増強
IL-6	マクロファージ、T細胞、B細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞	JAK/ STAT3シグナルの活性化
IL-18	マクロファージ	腫瘍細胞に発現するIL-18受容体への結合
TGFβ	マクロファージ、制御性T細胞	JNK、ERK シグナルの活性化
ケモカイン	マクロファージ、T細胞、好酸球、線維芽細胞、血管内皮細胞、血小板	血管新生の促進、腫瘍細胞に発現するケモカイン受容体への結合
抗腫瘍免疫抑制型		
TGFβ	マクロファージ、制御性T細胞	宿主抗腫瘍免疫の抑制
IL-10	マクロファージ、T細胞、B細胞、肥満細胞	宿主抗腫瘍免疫の抑制
抗腫瘍免疫賦活型		
IFNγ	ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞、T細胞	腫瘍細胞に対する直接的な増殖抑制作用、催アポトーシス作用、細胞周期の進行阻止、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞、マクロファージの活性化
IL-12	マクロファージ、樹状細胞、B細胞	インターフェロン産生によるナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞の活性化
IL-18	マクロファージ	インターフェロン産生によるナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞の活性化



肝抗腫瘍免疫能の低下



- ◆肝単核球、特にNK細胞の細胞数減少
- ◆パーフォリン・グランザインの発現低下
- ◆細胞傷害活性の低下

肝転移巣の拡大

図16 感染性侵襲(CLP)による腹腔内感染に伴う肝転移促進のメカニズム

ORIGINAL ARTICLE – GASTROINTESTINAL ONCOLOGY

Impact of Postoperative Infection on Long-Term Survival After Potentially Curative Resection for Gastric Cancer

Hironori Tsujimoto, MD, PhD, Takashi Ichikura, MD, PhD, Satoshi Ono, MD, PhD, Hidekazu Sugawara, MD, Shuichi Hiraki, MD, Naoko Sakamoto, MD, Yoshihisa Yaguchi, MD, Kazumichi Yoshida, MD, Yusuke Matsumoto, MD, and Kazuo Hase, MD, PhD

Department of Surgery, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa 359-8513, Japan

ABSTRACT We focused on the impact of postoperative infection on long-term survival after potentially curative resection for gastric cancer. Postoperative surgical and medical complications have been implicated as a negative predictor of long-term outcome in various malignancies. However, there have been no published reports assessing the impact of complications arising from postoperative infection on survival in gastric cancer. We studied a population of 1,332 patients who underwent curative resection for gastric cancer. These patients were divided into two groups based on the occurrence (141 patients, 10.6%) or absence (1,191 patients, 89.4%) of postoperative complications due to infection. We investigated the demographic and clinicopathological features of each patient with and without postoperative complications from infection, and thereby the impact of postoperative infection on long-term survival. Patients with postoperative infection had significantly higher frequency of males, upper side tumor location, and total gastrectomy as a surgical procedure, more advanced stage of gastric cancer, and greater age compared with those without postoperative infection. Patients with complications due to postoperative infection had significantly more unfavorable outcome compared with those patients without postoperative infection. Multivariate analysis demonstrated that age, preoperative comorbidity, blood transfusion, tumor depth, nodal involvement, and postoperative infection correlated with overall survival. We conclude that postoperative complications from infection are a predictor of adverse clinical outcome in patients with gastric cancer. However, further

immunological study and prospective trials are necessary to confirm the biological significance of these findings.

Nosocomial infections after major surgery for gastrointestinal cancer are the most frequent complications; despite considerable advances in the areas of prevention, diagnosis, and therapy, complications due to postoperative infection increase the cost of treatment, delay adjuvant therapy, augment late-term effects, affect quality of life, and can be associated with premature mortality.^{1,2}

In the 1970 s, DerHagopian et al. reported that inflammation stimulated dormant neoplastic cells and enhanced metastases at the site of insult. This phenomenon is termed inflammatory oncotoxicity.³ Since then, many researchers have reported that postoperative surgical and medical complications may contribute to a high rate of recurrence and unfavorable long-term survival in various malignancies such as cervical cancer, colorectal cancer, and esophageal cancer.^{4–6} More recently, there has been increasing evidence that postoperative complications due to infection, typically caused by anastomotic leakage, after colorectal surgery were significantly associated with negative long-term outcome.^{4,7–9} In contrast, beneficial effects of postoperative emphysema and intrapleural infection have been reported after pneumonectomy for lung cancer. Most of these cases were only based on a small number of patients and were published several decades ago.^{10,11} Therefore, whether or not infection and/or febrile complication after surgery is associated with long-term survival of patients after curative resection for cancers is still controversial.^{9,12–14} None of the studies published to date provide an assessment of the contribution of postoperative infection to postoperative survival in gastric cancer.

We hypothesize that persistent postoperative inflammation induced by infection may affect cancer progression, resulting in poor prognosis after gastrectomy. To verify this scenario, we focused on the impact of postoperative

infection on long-term survival after potentially curative resection for gastric cancer.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Between January 1986 and December 2005, 1,784 consecutive patients underwent gastrectomy for adenocarcinoma of the stomach at the National Defense Medical College Hospital (Tokorozawa, Saitama, Japan). Among the 1,784 patients, 1,332 patients (905 men, 427 women; mean age 61.2 ± 0.3 years, range 20–94 years) who underwent gastrectomy with potentially curative resection were enrolled in this study and 3 patients who died of postoperative complications within 30 days after the operation were excluded. No patient underwent laparoscopic gastrectomy during this period. The population of 1,332 patients was then divided into two groups based on the occurrence (141 patients, 10.6%) or absence (1,191 patients, 89.4%) of complications due to postoperative infection. If no gross residual disease was evident at time of the operation and the margins of resection were tumor

TABLE 1 Demographic and clinicopathological data of patients with or without postoperative complications due to infection (percentages shown in parentheses)

	Complications	No complication	P-value
Number	141	1,191	
Age (years)	63.3 ± 1.0	60.9 ± 0.3	0.02
Gender (M:F)	112 : 29	793 : 398	\ 0.01
Body mass index (kg/m ²)	22.7 ± 0.6	22.6 ± 0.1	0.54
Comorbidity			
Yes	61 (43.3)	352 (29.6)	\ 0.01
No	80 (56.7)	839 (70.4)	
Hypertension			
Yes	18 (12.8)	101 (8.5)	0.12
No	123 (87.2)	1,090 (91.5)	
Diabetes			
Yes	13 (9.2)	80 (6.7)	0.27
No	128 (90.8)	1,111 (93.3)	
Cardiovascular disease			
Yes	9 (6.4)	80 (6.7)	0.88
No	132 (93.6)	1,111 (93.3)	
Liver disease			
Yes	6 (4.3)	36 (3.0)	0.44
No	135 (95.7)	1,155 (97.0)	
Respiratory disease			
Yes	5 (3.5)	34 (2.9)	0.60
No	136 (96.5)	1,157 (97.1)	

TABLE 1 continued

	Complications	No complication	P-value
Renal disease			
Yes	2 (1.4)	16 (1.3)	[0.99
No	139 (98.6)	1,175 (98.7)	
Tumor size (mm)	46.0 ± 2.9	38.7 ± 0.7	0.07
Location			
U	38 (27.0)	167 (14.1)	\ 0.01
M	56 (39.7)	566 (47.9)	
L	47 (33.3)	458 (38.7)	
Macroscopic type			
0	70 (49.6)	786 (66.0)	\ 0.01
1	3 (2.1)	36 (3.0)	
2	22 (15.6)	138 (11.6)	
3	37 (26.2)	195 (16.4)	
4	9 (6.4)	36 (3.0)	
Tumor depth			
T1	61 (43.3)	661 (55.5)	0.03
T2	47 (33.3)	348 (29.2)	
T3	29 (20.6)	161 (13.5)	
T4	4 (2.8)	21 (1.8)	
Nodal involvement			
N0	73 (51.8)	721 (60.5)	0.01
N1	35 (24.8)	304 (25.5)	
N2	33 (23.4)	166 (13.9)	
Stage			
I	69 (48.9)	766 (64.3)	\ 0.01
II	26 (18.4)	180 (15.1)	
III	43 (30.5)	205 (17.2)	
IV	3 (2.1)	40 (3.4)	
Surgical procedure			
Distal gastrectomy	71 (50.5)	868 (72.9)	\ 0.01
Proximal gastrectomy	8 (5.7)	41 (3.4)	
Limited gastrectomy	1 (0.7)	20 (1.7)	
Total gastrectomy	61 (43.3)	262 (22.0)	
Extent of lymphadenectomy			
D0	1 (0.7)	28 (2.4)	0.29
D1	31 (22.0)	300 (25.2)	
D2	109 (77.3)	863 (72.5)	
Resection of other organs			
Yes	78 (55.3)	407 (34.2)	\ 0.01
No	63 (44.7)	784 (65.8)	
Operating time (min)	269.8 ± 7.9	243.4 ± 2.4	\ 0.01
Blood loss (ml)	580.5 ± 55.3	378.6 ± 13.4	\ 0.01
Blood transfusion			
Yes	25 (17.7)	93 (7.8)	\ 0.01
No	116 (82.3)	1,098 (92.2)	
Postoperative hospital stay (days)	33.7 ± 1.8	21.4 ± 0.4	\ 0.01

U upper third; M middle third; L lower third

free on histological examination, the surgery was considered curative. Resected specimens were examined histopathologically and were staged according to the International Union Against Cancer (UICC) tumor-node-metastasis (TNM) classification of malignant tumors.¹⁵ Adjuvant therapy by oral anticancer agents such as 5-fluorouracil (5-FU) and fluoropyrimidine (S-1) were recommended in patients with stage III or stage IV disease, or who had highly potential of recurrence based on the pathological findings, and performed in 43 (35.5%) patients with postoperative infectious complication (PIC) and 245 (23.4%) patients without PIC. Twenty-nine patients had an early gastric cancer with incomplete D1 lymphadenectomy (D0), which were potentially curative resection. These patients were retrospectively evaluated for their pre- and postoperative status, pathological findings, and surgical procedure according to our computer database or medical and nursing charts.

Definition of Infectious Complications

Complications due to postoperative infection were defined by a combination of clinical findings and results of laboratory and other tests recorded in medical records. Clinical evidence was derived from direct observation of the infection site or from review of the patient's chart. Laboratory evidence included culture results, antigen or antibody detection tests, or analysis by microscopic visualization. Supportive data were derived from other diagnostic studies, such as X-ray, ultrasonography (US), and computed tomography (CT). In our study, complications from postoperative infection included pneumonia (pyrexia with infiltrate on chest X-ray), enterocolitis (pyrexia with diarrhea and microbiological evidence), cholecystitis (pyrexia with wall thickness diagnosed by US or CT), anastomotic leakage (identified radiographically or clinical suspicion), and intraperitoneal abscess such as pancreatic fistula and other systemic infections (pyrexia

with fluid collection diagnosed by US or CT, or identified radiographically). The other infections included central venous catheter-related infections and sepsis. Superficial wound infections were excluded from our analysis because of their minimal effect on the systemic immune response.

Follow-Up

Overall survival time was measured from date of resection to date of death due to any cause. Patients who survived were censored in our survival analyses. One hundred two patients (7.7 %) for whom cause of death could not be identified were excluded from our analysis of cancer-specific survival. All patients were observed at our hospital or the outpatient clinic at 3- to 4-month intervals during the first 2 years of the study and every 6 or 12 months thereafter for 3 years. After 5 years, annual follow-up was conducted through telephone conversations with the patient, patient's family, or their practitioner.

Statistical Analysis

Statistical calculations were performed using StatView version 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Data are expressed as mean $\pm$ standard error on the mean (SEM). Statistical analyses were performed using either Mann-Whitney U test or chi-square test with Fisher's exact test, as appropriate. Survival rates were obtained using the Kaplan-Meier method and the significance of the difference in survival rate was determined by log-rank test. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox proportional hazards model. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Demographic and clinicopathological data are shown in Table 1. Patients with postoperative infection complications

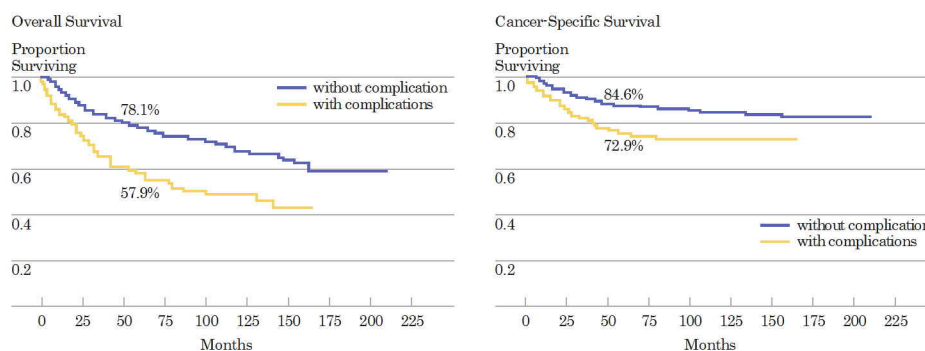


FIG. 1 Overall and cancer-specific survival after potentially curative gastrectomy. Bold and fine lines indicate survival curves for patients with and without postoperative complications from infection,

respectively. There is a significant difference in overall and cancer-specific survival between them (log-rank test; $P < 0.0001$ and 0.0003 , respectively). Cumulative 5-year survival rates are inserted

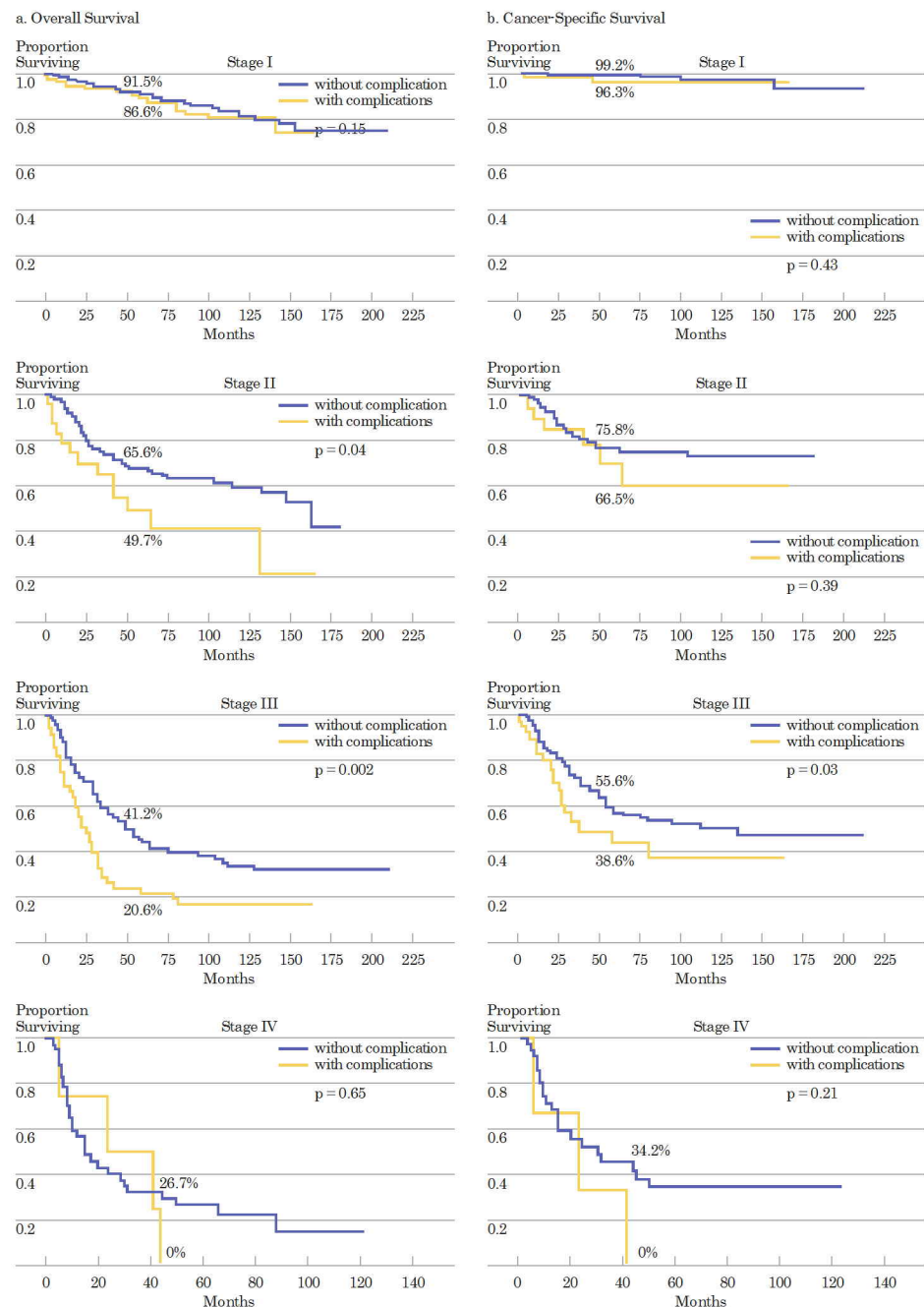
(PIC) had significantly higher frequency of males and greater age compared with patients without postoperative infection. Patients with PIC had significantly higher frequency of comorbidity. Patients with PIC had a tumor located on the upper third of the stomach, total gastrectomy as the surgical procedure, and resection of other organs more frequently than those without PIC. Patients with PIC had more advanced stage of gastric cancer compared with those without PIC.

The occurrence rate of PIC in patients with cancer-specific death, i.e., blood-bone metastasis and dissemination,

was 20.3%, while that in patients with another cause of death, i.e., pneumonia, secondary malignancy, and so on, was 17.2%. There was no statistical difference between the two populations.

Median follow-up of surviving patients was 68.5 months (range 3–211 months). Overall 5-year survival using Kaplan–Meier analysis was 72.3%, and cancer-specific survival was 82.2%. There was a significant difference in both overall and cancer-specific survival between patients with and without PIC (Fig. 1).

FIG. 2 Overall (a) and cancer-specific survival (b) after potentially curative gastrectomy according to tumor stage. Bold and fine lines indicate the survival curve of patients with and without postoperative complications from infection, respectively P-values of log-rank test and accumulative 5-year survival rates are inserted in each graph



Specifically, for stage II and stage III gastric cancer patients, those with PIC had poorer overall survival than those without PIC. This was not the case, however, for patients with stage I and stage IV gastric cancer (Fig. 2a). Similar results were observed for cancer-specific survival for patients with stage III disease (Fig. 2b).

It is known that there is a significant difference in surgical stress, incidence of postoperative complication, and risk of anastomotic leakage between total gastrectomy and distal gastrectomy. We compared overall survival according to these surgical procedures. Patients with PIC had poorer overall survival than those without PIC in patients with both distal gastrectomy and in total gastrectomy (Fig. 3).

In univariate analysis, age, preoperative comorbidity, tumor location, tumor size, blood transfusion, tumor depth,

nodal involvement, resection of other organ(s), and PIC were all significantly associated with the overall survival rate (Table 2). The same correlation was observed for cancer-specific survival in all categories except for age (Table 3). Multivariate analysis demonstrated that age, preoperative comorbidity, blood transfusion, tumor depth, nodal involvement, and PIC were significantly associated with overall survival, tumor location, tumor depth, nodal involvement, and PIC in cancer-specific survival.

Type and frequency of PIC, including wound infection, are depicted in Table 4. Multivariate analysis demonstrated that only anastomotic leakage was significantly associated with cancer-specific survival, and that anastomotic leakage, cholecystitis, and pneumonia were correlated with overall survival (Table 5). Wound infection was not associated with either cancer-specific or overall survival.

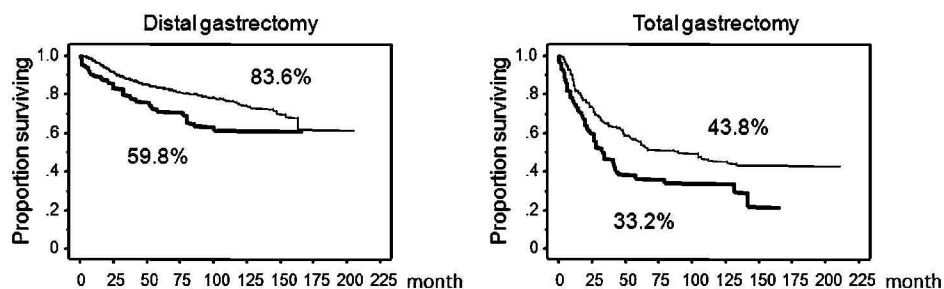


FIG. 3 Overall survival after potentially curative gastrectomy according to surgical procedure. Bold and fine lines indicate the survival curve of patients with and without postoperative

complications from infection, respectively. There is a significant difference in overall survival between them (log-rank test; $P \leq 0.01$ and 0.001 , respectively). Cumulative 5-year survival rates are inserted

TABLE 2 Univariate and multivariate analysis of factors that might affect the overall survival

	Overall survival					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
Age, 1-year increment	1.04	1.03–1.05	≤ 0.0001	1.03	1.02–1.04	≤ 0.0001
Sex (Male)	1.13	0.91–1.41	0.2850	–	–	–
Comorbidity (yes)	1.85	1.50–2.28	≤ 0.0001	1.50	1.14–1.98	0.0042
Tumor location (U)	1.18	1.01–1.37	≤ 0.0001	1.36	0.99–1.87	0.0598
Tumor size (C50.0 mm)	2.14	1.71–2.68	≤ 0.0001	0.84	0.62–1.15	0.2751
Blood transfusion (yes)	3.28	2.54–4.23	≤ 0.0001	1.47	1.00–2.15	0.0491
Histology (diffuse type)	1.21	0.98–1.48	0.0722	–	–	–
Tumor depth (compared with T1)						
T2	2.90	2.23–3.78	≤ 0.0001	1.37	0.91–2.08	0.1364
T3,4	7.96	6.14–10.32	≤ 0.0001	2.69	1.69–4.28	≤ 0.0001
Nodal involvement (compared with N0)						
N1	3.15	2.45–4.04	≤ 0.0001	2.06	1.38–3.07	0.0004
N2,3	6.54	5.07–8.42	≤ 0.0001	3.23	2.09–5.00	≤ 0.0001
Resection of other organs (yes)	2.56	2.02–3.24	≤ 0.0001	1.15	0.82–1.60	0.4182
Infectious complications (yes)	1.91	1.47–2.48	≤ 0.0001	1.88	1.50–2.94	≤ 0.0001

TABLE 3 Univariate and multivariate analysis of factors that might affect the cancer-specific survival

	Cancer-specific survival					
	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
Age, 1-year increment	1.01	0.99–1.03	0.0622	–	–	–
Sex (male)	1.00	0.73–1.37	0.9925	–	–	–
Comorbidity (yes)	1.55	1.13–2.12	0.0063	1.83	1.24–2.70	0.0025
Tumor location (U)	2.27	1.61–3.19	\ 0.0001	1.09	0.69–1.72	0.7142
Tumor size (C50.0 mm)	3.77	2.71–5.25	\ 0.0001	0.78	0.51–1.17	0.2298
Blood transfusion (yes)	3.78	2.58–5.53	\ 0.0001	1.50	0.90–2.51	0.1239
Histology (diffuse type)	1.75	1.29–2.39	0.0004	1.40	0.95–2.09	0.0930
Tumor depth (compared with T1)						
T2	13.26	7.19–24.45	\ 0.0001	4.17	1.87–9.29	0.0005
T3,4	42.61	23.28–77.97	\ 0.0001	9.24	4.03–21.18	\ 0.0001
Nodal involvement (compared with N0)						
N1	10.91	6.65–17.89	\ 0.0001	3.61	1.88–6.96	0.0001
N2,3	25.78	15.76–42.19	\ 0.0001	6.10	3.08–12.08	\ 0.0001
Resection of other organs (yes)	4.25	2.99–6.05	\ 0.0001	1.41	0.88–2.26	0.1524
Infectious complications (yes)	2.07	1.38–3.10	0.0005	1.84	1.13–2.99	0.0139

TABLE 4 Frequency of postoperative infectious complications

Infectious complications	Number	%
Pneumonia	50	3.8
Anastomotic leakage	48	3.6
Wound infection	27	2.0
Intraperitoneal abscess	15	1.1
Enterocolitis	15	1.1
Pancreatic fistula	13	1.0
Cholecystitis	10	0.8
Central venous catheter-related infections	3	0.2
Sepsis	2	0.2
Total	183	

DISCUSSION

We demonstrate that complications due to postoperative infection are important prognostic factors after potentially curative resection for gastric cancer. Our study indicated that only anastomotic leakage from infectious complications was associated with poor cancer-specific survival.

Many previous reports demonstrate a significant increase in cancer-specific mortality in association with the occurrence of anastomotic leakage in colorectal cancer.^{6,8,9,16} Our findings corroborate these results. The precise mechanism relating long-term survival and postoperative infection, however, remains unclear. We suggest two possible mechanisms. (1) The enhancement of innate biological factors during infection or those produced by the

infection-causing bacteria may directly activate cancer cells to proliferate and acquire metastatic potential. Cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-18, and oxygen free radicals and nitrogen-based biological effectors have all been implicated in promoting cancer cell growth.^{17–21} In addition, we demonstrate that bacterial components such as lipopolysaccharide derived from Gram-negative bacteria may also promote proliferation and progression of gastric cancer cells through toll-like receptor 4 binding.²² (2) A deregulated host immune response during infection may also contribute to tumorigenesis. Khuri et al. studied the effect of postoperative complications on survival using the data derived from more than 100,000 patients who underwent eight major operations for both malignant and benign disease from the National Surgical Quality Improvement Program.²³ Their analyses identified an important independent predictive role of postoperative complications upon both short- and long-term survival after major surgery. Specifically, myocardial infarction and pneumonia consistently exhibited a significant effect on long-term survival (1 and 5 years after surgery), unlike wound infection, which is consistent with our findings. These findings suggest that long-term survival after surgery may be affected by degree of systemic immune response to the infection. It has been demonstrated that systemic infection and sepsis could develop systemic inflammatory response syndrome and lead to a period of immunosuppression, which is especially enhanced after surgical trauma.^{24–26} Many authors have demonstrated that surgical trauma and

TABLE 5 Univariate and multivariate analysis of postoperative infectious complications that might affect overall and cancer-specific survival

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
Overall survival						
Pneumonia	1.98	1.28–3.04	0.0020	2.05	1.33–3.16	0.0011
Anastomotic leakage	1.94	1.26–2.99	0.0026	2.02	1.31–3.10	0.0015
Intra-abdominal abscess	1.57	0.70–3.52	0.2728	–	–	–
Enterocolitis	1.84	0.87–3.88	0.1120	–	–	–
Pancreatic fistula	1.95	0.81–4.71	0.1384	–	–	–
Cholecystitis	2.47	1.02–5.99	0.0448	2.64	1.09–6.39	0.0319
Wound infection	1.17	0.55–2.48	0.6787	–	–	–
Cancer-specific survival						
Pneumonia	1.37	0.65–2.93	0.4103	–	–	–
Anastomotic leakage	1.97	1.04–3.73	0.0381	1.98	1.05–3.76	0.0358
Intra-abdominal abscess	2.03	0.65–6.36	0.2241	–	–	–
Enterocolitis	2.26	0.84–6.10	0.1069	–	–	–
Pancreatic fistula	1.72	0.43–6.95	0.4439	–	–	–
Cholecystitis	4.02	1.28–12.62	0.0172	1.53	0.57–4.12	0.4025
Wound infection	1.48	0.55–4.00	0.4365	–	–	–

septic inflammation cause a shift toward Th2-type lymphocyte pattern.^{27,28} Mokart et al. demonstrated that anti-inflammatory cytokines such as IL-1 receptor antagonist, IL-6, and IL-10 in patients with postoperative complications due to sepsis are predominantly elevated compared with those without complications. In contrast, proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-12, and interferon- γ (IFN γ) were not affected.²⁵ Th2 cytokines, such as IL-10, were shown to downregulate tumor-specific immune responses by directly suppressing IFN γ and IL-12 production. This caused a reduction in major histocompatibility complex (MHC) expression on the surface of tumor cells and inhibited tumor antigen presentation by antigen-presenting cells.^{29–31} Indeed, we previously demonstrated that high IL-10 levels in peritoneal washings during surgery was significantly associated with unfavorable outcome in patients with gastric cancer.^{32,33} Taken together, these findings suggest that development of a postoperative Th2 response during septic complications after major surgical trauma likely contributes to the proliferation of occult or dormant cancer cells, resulting in decreased survival.³⁴

In conclusion, our report indicates that complications due to postoperative infection are a good predictor of adverse clinical outcome in patients with gastric cancer. However, we could not demonstrate the postoperative biological status such as serum cytokine levels in this study, and further immunological cytokine study will be

essential to substantiate our current data. Future prospective trials should investigate whether prevention of postoperative infection can improve long-term survival and should also provide an assessment of their overall biological effects.

REFERENCES

- Collins TC, Daley J, Henderson WH, Khuri SF. Risk factors for prolonged length of stay after major elective surgery. *Ann Surg.* 1999;230:251–9.
- Tsutsui S, Moriguchi S, Morita M, et al. Multivariate analysis of postoperative complications after esophageal resection. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:1052–6.
- DerHagopian RP, Sugarbaker EV, Ketcham A. Inflammatory oncotaxis. *JAMA* 1978;240:374–5.
- Nowacki MP, Szymendera JJ. The strongest prognostic factors in colorectal carcinoma. *Surgicopathologic stage of disease and postoperative fever.* *Dis Colon Rectum* 1983;26:263–8.
- Hirai T, Yamashita Y, Mukaida H, Kuwahara M, Inoue H, Toge T. Poor prognosis in esophageal cancer patients with postoperative complications. *Surg Today.* 1998;28:576–9.
- Lagarde SM, de Boer JD, ten Kate FJ, Busch OR, Obertop H, van Lanschot JJ. Postoperative complications after esophagectomy for adenocarcinoma of the esophagus are related to timing of death due to recurrence. *Ann Surg.* 2008;247:71–6.
- Fucini C, Bandettini L, D'Elia M, Filippini F, Herd-Smith A. Are postoperative fever and/or septic complications prognostic factors in colorectal cancer resected for cure? *Dis Colon Rectum* 1985;28:94–5.
- Akyol AM, McGregor JR, Galloway DJ, Murray GD, George WD. Anastomotic leaks in colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence? *Int J Colorectal Dis.* 1991;6:179–83.

9. Nespoli A, Gianotti L, Totis M, Bovo G, Nespoli L, Chiodini P, et al. Correlation between postoperative infections and long-term survival after colorectal resection for cancer. *Tumori*. 2004; 90:485–90.
10. Sensenig DM, Rossi NP, Ehrenhaft JL. Results of the surgical treatment of bronchogenic carcinoma. *Surg Gynecol Obstet*. 1963;116:279–84.
11. Ruckdeschel JC, Codish SD, Stranahan A, McKneally MF. Postoperative empyema improves survival in lung cancer. Documentation and analysis of a natural experiment. *N Engl J Med*. 1972;287:1013–7.
12. Dionigi R, Dominioni L, Campani M. Infections in cancer patients. *Surg Clin North Am*. 1980;60:145–59.
13. Wigmore SJ, McMahon AJ, Sturgeon CM, Fearon KC. Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88:255–60.
14. Varty PP, Linehan IP, Boulos PB. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 1994; 81:915–8.
15. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors. 5th ed (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 1997; 80:1803–4.
16. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Charpuz PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2004;240:255–9.
17. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:11–22.
18. Perwez Hussain S, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 2007;121: 2373–80.
19. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2004;202: 275–93.
20. Majima T, Ichikura T, Chochi K, et al. Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth and evasion of host immunity. *Int J Cancer*. 2006;118:388–95.
21. Sugawara H, Ichikura T, Kinoshita M, et al. Gastric cancer cells exploit CD4⁺ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8⁺ cell-involved tumor elimination. *Int J Cancer*. 2008;122:2535–41.
22. Chochi K, Ichikura T, Kinoshita M, et al. *Helicobacter pylori* augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide attenuates antitumor activities of human mononuclear cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2909–17.
23. Khuri SF, Henderson WG, DePalma RG, Mosca C, Healey NA, Kumbhani DJ. Determinants of long-term survival after major surgery and the adverse effect of postoperative complications. *Ann Surg*. 2005;242:326–41.
24. Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, et al. Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J Surg*. 2000;24:10–16.
25. Mokart D, Capo C, Blache JL, Delperro JR, Houvenaeghel G, Martin C, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br J Surg*. 2002;89:1450–6.
26. Tsujimoto H, Ono S, Majima T, et al. Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clin Immunol*. 2006;119:180–7.
27. Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol*. 1997;159:4857–67.
28. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, Garcia ZC, Stein DS, Denny T, et al. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med*. 2003;31:1722–9.
29. Clerici M, Shearer GM, Clerici E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:261–3.
30. Moore KW, O'Gara A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165–90.
31. Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol*. 1995;154:1280–6.
32. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Hiraide H, Mochizuki H. Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2001;78:124–30.
33. Majima T, Ichikura T, Seki S, et al. The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22:1193–9.
34. Mynster T, Christensen IJ, Moesgaard F, Nielsen HJ. Effects of the combination of blood transfusion and postoperative infectious complications on prognosis after surgery for colorectal cancer. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Br J Surg*. 2000;87:1553–62.