

超選択的動注化学療法および化学塞栓療法の基礎的研究

(1) —動物実験モデルと微小塞栓物質の製作—

粟飯原輝人

目的：超選択的動注化学療法 (super-selective transcatheter arterial chemotherapy : STAC) と超選択的的化学微小塞栓療法 (super-selective transcatheter arterial chemo-microembolization : STACME) による抗腫瘍効果の基礎的検討を行うために、動物実験モデルの確立と微小塞栓物質の調製を行った。

材料と方法：体重 4 kg の雄性日本白色家兎12羽をもちい、VX 2 腫瘍細胞浮遊液の移植数により、以下の4群すなわち 3×10^4 個/0.03 ml, 5×10^4 個/0.05 ml, 1×10^5 個/0.1 ml, 1×10^{11} 個/0.1 ml に分け耳介2/3先端部にそれぞれ移植し14日後の腫瘍成長を比較した。

微小塞栓物質として、イミベネム・シラスタチン (imipenem-cilastatin sodium : IPM/CS) 懸濁液を採用した。IPM/CS 0.5 g にイオギザグレード 10 ml および 20 ml を加えて懸濁液を作製し、顕鏡により微小塞栓物質の粒子径と粒子数を比較検討した。この懸濁液を移植腫瘍の耳介動脈に投与し、投与直後、腫瘍を摘出し H-E 染色切片を組織学的に検討した。

結果：移植腫瘍は、 5×10^4 個/0.05 ml 細胞浮遊液を移植した場合に最も安定した腫瘍成長を認めた。

微小塞栓物質は、IPM/CS 0.5 g をイオギザグレード 10 ml にて懸濁したものが粒子数、粒子径ともに塞栓物質としての性状に優れていた。また同懸濁液投与による組織所見では、 $60 \mu\text{m}$ 以下の血管に塞栓が確認された。

結論：本実験で作製された動物実験モデルは、STAC の基礎実験に有用であり、本実験結果から得られた IPM/CS 懸濁液は、STACME の基礎的検討を行う際に適切な微小血管塞栓効果が得られることが確認された。

(平成11年5月13日受理)

A Basic Study of Super-Selective Transcatheter Arterial Chemotherapy and Chemoembolization (1) — Establishment of an Animal Model for Super-selective Transcatheter Arterial Chemotherapy and Preparation for Appropriate Suspension of Microembolization —

Teruhito AIHARA

Purposes : It is well known that super-selective transcatheter arterial chemotherapy produces good results in the treatment of malignant tumors and has a greater potential tumoricidal effect in clinical practice when microembolization is included with the arterial chemotherapy. But the mechanisms of effectiveness have not as yet been clarified in detail. Therefore I planned to clarify

them using experimental animals and procedures.

Materials and methods : Four kinds of tumor cell suspensions ($3 \times 10^4/0.03$ ml, $5 \times 10^4/0.05$ ml, $1 \times 10^5/0.1$ ml, $1 \times 10^{11}/0.1$ ml) were prepared for inoculation to search for optimal tumor adaptation, which I defined as obtaining tumors sized about 10~20 mm in diameter at 14 days after inoculation.

I examined the Imipenem cilastatin sodium (IPM/CS) suspensions of two volumes of ioxalic acid (10 ml and 20 ml) and the embolization effect was evaluated by microscopic examination of tumor tissue excised immediately after the transcatheter arterial microembolization.

Results : As a result, it was determined that the cell suspension of $5 \times 10^4/0.05$ ml afforded the most stable tumor growth in rabbit auricles.

A IPM/CS-ioxalic acid suspension of a compounding ratio of 0.5 g/10 ml offers the most suitable microembolization effect in rabbit VX 2 tumors certified by microscopic examinations.

Conclusions : This experimental animal model and the embolization material of the IPM/CS-ioxalic acid suspension are promising for use in further study and clarification of the mechanism of super-selective transcatheter arterial chemo-microembolization. (Accepted on May 13, 1999)

Kawasaki Igakkaishi 25(1) : 47-54, 1999

- Key Words** ① Experimental animal model ② VX 2 tumor
③ Super-selective transcatheter arterial chemotherapy
④ Imipenem-cilastatin sodium suspension

はじめに

動注化学療法 (transcatheter arterial chemotherapy : TAC) は、抗癌剤を腫瘍の栄養動脈本管に直接投与することにより、高濃度の薬剤を腫瘍に分布させ、抗腫瘍効果を高める治療法である¹⁾。また、超選択的動注化学療法 (super-selective transcatheter arterial chemotherapy : STAC) は、TACよりさらに末梢の、腫瘍を栄養する終末動脈から、超選択的に直接薬剤を投与する治療法で、より高濃度の腫瘍内薬剤分布が期待できる。Harimaら^{2),3)}は、TACに微小塞栓療法 (transcatheter arterial chemo-microembolization : TACME) を併用することで、さらに高い腫瘍内薬剤濃度が達成される可能性を報告し、同様に他施設からも、本法の優れた臨床的有効性が報告されている^{4),5)}。

しかし現在までのところ、臨床的検討^{6),7)}が先行しており、超選択的動注化学療法 (super-selective transcatheter arterial chemo-micro-

embolization : STACME) における、血中薬剤動態や腫瘍内薬剤濃度の推移、副作用の標的臓器における組織内薬剤濃度などに関する基礎的検討は乏しく、加えてTACやSTACなど他療法との比較検討は全く行われていない状態である。

今回著者は、この点を明らかにすべく、まずSTACの動物実験モデルを作製し、さらにそのモデルを用いてSTACMEで利用可能な微小塞栓物質の調整法を検討したので報告する。

材料と方法

1) 動物実験モデルの作製

実験動物として、24 G以上の留置針が挿入可能な太い耳介動脈径を有する、体重4 kgの雄性日本白色家兔を用いた。なお、以下に述べる実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認(承認番号:96-100, 97-091)を受け、川崎医科大学動物実験指針に基づき実施されたものである。

用いた腫瘍は、家兎大腿筋肉内で継代された Shope papilloma virus 由来の VX 2 腫瘍^{8),9)}である。

予備実験として流入動脈，流出静脈の一本化を図るべく，不要な静脈路の電気メスによる間引きを試みたが，こうした環境下では腫瘍の家兎耳介での発育が不良であったため，以後の実験では血管系に操作を加えず，移植14日目の腫瘍径が20 mm 弱に発育する，至適移植細胞数を求めることにした。

VX 2 細胞浮遊液は，あらかじめ PBS (phosphate buffer solution) で (a) 1×10^6 個/ml および (b) 1×10^{12} 個/ml に濃度調整した。移植にあたり，低濃度群として，(a) を (1) 3×10^4 個/0.03 ml, (2) 5×10^4 個/0.05 ml, (3) 1×10^5 個/0.1 ml の3群に，高濃度群として (b) を (4) 1×10^{11} 個/0.1 ml の1群に分け，それぞれを移植した。細胞接種部位は耳介先端から2/3遠位で，耳介動脈から1 cm 側方とし，1群各3羽，計12羽の家兎を実験に供した。

移植部位の腫瘍発育状態を経時的に観察し，移植14日目の腫瘍径を評価することで至適移植細胞濃度を求めた。

次に腫瘍への血流を確認するため，発育が最

も良かった 5×10^4 個/0.05 ml 移植群の腫瘍を対象に，耳介動脈造影を行った。方法は，ネブタールで麻酔導入後，笑気と酸素で麻酔を維持した家兎を用い，皮膚の切開・剥離操作で耳介動脈を明視下におき，24 G のカテラン針経由で5 ml のイオギザグレートによる造影を行った (Fig. 1)。

2) 微小塞栓物質の調整

微小塞栓物質として，イミベネム・シラスタチン懸濁液 (imipenem-cilastatin sodium suspension: IPM/CS 懸濁液) を採用し，以下のごとく調整し検討した。すなわち IPM/CS 0.5 g にイオギザグレート 10 ml および 20 ml を加え，30分間ポンピングの後，両希釈条件下での粒子径，粒子数を顕鏡し比較した。

3) 組織学的検討

3羽の家兎耳介に VX 2 細胞浮遊液 5×10^4 個/0.05 ml を移植。移植7日後の径が約10 mm の腫瘍を使用し，IPM/CS 懸濁液の微小血管に対する塞栓効果を組織学的に検討した。方法は，IPM/CS 懸濁液 (IPM/CS 0.5 g をイオギザグレート 10 ml で懸濁) 2 ml を耳介動脈から超選択

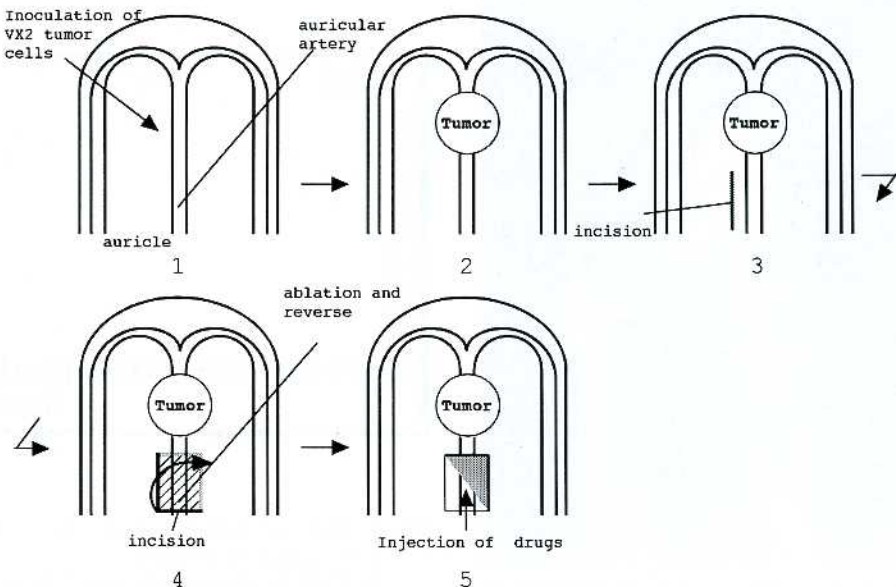


Fig. 1. Experimental model of STAC chemotherapy on rabbit auricle

的動注法にて投与し、塞栓直後に腫瘍を摘出、ホルマリン固定後にH-E染色を施し、100倍で鏡検した。

以上の各実験結果のうち、統計評価が必要なものはStudent-t検定で検定し、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

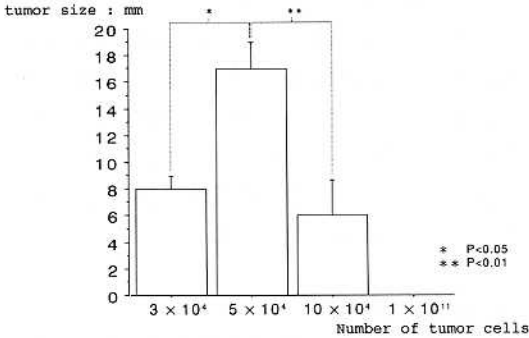


Fig. 2. Tumor size according to the number of inoculated cells (n = 12 : each 3)

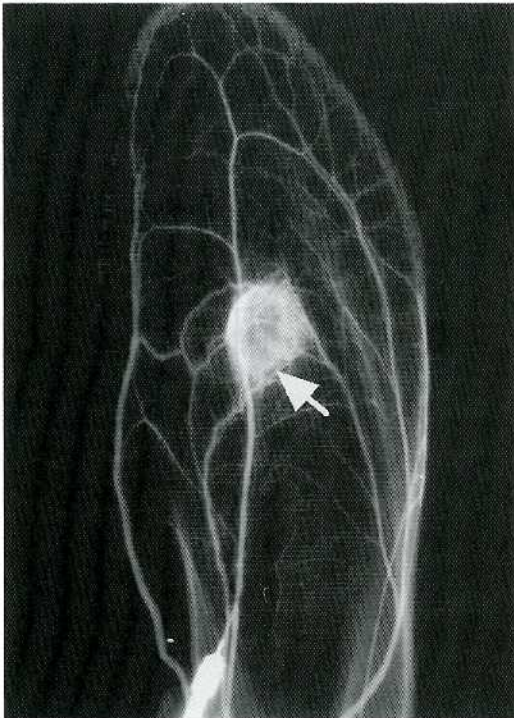
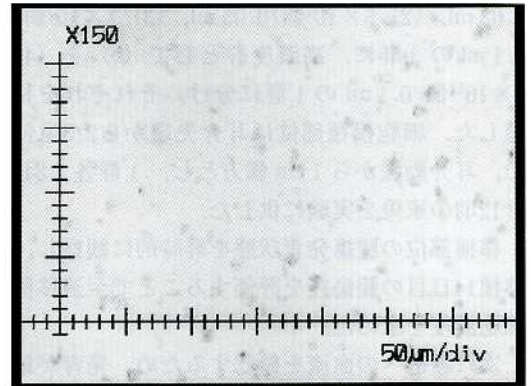


Fig. 3. Angiographic findings of VX2 tumor (arrow) inoculated 14 days before

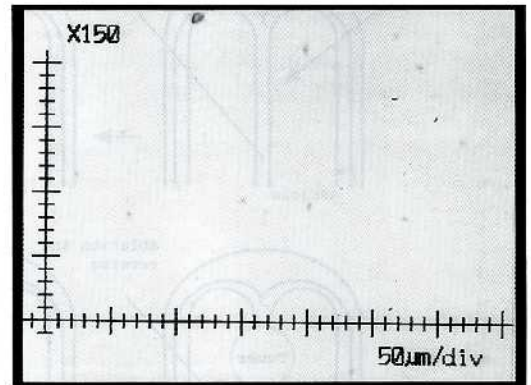
結 果

1) 動物実験モデルの作製

移植後14日目の腫瘍径は、(1)群が 8.0 ± 1.0 mm、(2)群が 17.0 ± 2.0 mm、(3)群が 6.0 ± 2.6 mm、(4)群が0 mm (生着せず)であった (Fig. 2)。最も発育の良かった(2)群の腫瘍径と(1)群、(3)群の腫瘍径間には $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ で有意差が認められた。また、(2)群の腫瘍に対する耳介動脈造影では、腫瘍は造影開始直後から強い濃染像を示し、腫瘍は耳介動脈から血液供給を受けており、腫瘍が耳介動脈



A



B

Fig. 4. Photomicrograph of imipenem-cilastatin (IPM/CS) sodium particles in suspension

A : IPM/CS sodium/ioxaglic acid : 0.5 g/10 ml

B : IPM/CS sodium/ioxaglic acid : 0.5 g/20 ml

に対し、超選択状態であることが確認された (Fig. 3).

2) 微小塞栓物質の調整

IPM/CS 0.5 g をイオギサグレート 10 ml に懸濁したものは粒子数が豊富で (Fig. 4A) あったが、イオギサグレート 20 ml に懸濁したものは、粒子数が少なかった (Fig. 4B). 一方、粒子径分布をみるとイオギサグレート 10 ml に懸濁したものは、40 μm を中心に 10~70 μm の

範囲にほぼ正規分布しており、30~60 μm の大きさが全体の74%を占めていた (Fig. 5A) が、イオギサグレート 20 ml に懸濁したもので、粒子径分布は 10~70 μm の範囲で大小不同が著しく、20~40 μm の範囲に70%が存在した (Fig. 5B).

以上から、20 ml 懸濁群は 10 ml 懸濁群に比較して、粒子の短径化と粒子径の不揃いが目立ち、10 ml 懸濁群が微小塞栓物質として適していると考えられた。

3) 組織学的検討

IPM/CS-10 ml 懸濁液 2 ml を投与直後に抽出した腫瘍の H-E 染色組織像の観察では、Figure 6 に示したように 60 μm 以下の血管に塞栓像が散見された。

考 察

超選択的動注化学療法の実験モデルの報告は、著者の検索し得た範囲では Moses らの報告¹⁰⁾のみであった。彼らの報告はヒト扁平上皮癌をヌードマウスに移植し、vascular pedicle で周囲組織から隔離して CDDP の腫瘍内濃度その他を検討したものである。この方法では、実験時にヌードマウスに osmotic pump を植え込む必要があり、極めて手技が煩雑で使用できる血管も細径あるため、著者が今後予定している実験には適さないと判断した。この意味で、今回開発した方法は、動脈の走行が把握しやすく、血管系に対する処置が比較的容易に行える利点がある^{11), 12)}。他に金沢ら¹³⁾から著者と同様に、家兎耳介で行われた実験の報告があるが、研究目的が異なるため、抗癌剤の腫瘍組織内濃度を特定する際に必要な移植後の腫瘍壊死に注意が払われておらず、我々独自の実験系の確立が必要であった。

STAC や STACME の比較実験で使用する VX2 腫瘍の理想的性状は、腫瘍組織内に壊死が無い状態で腫瘍径ができるだけ大きく、栄養血管が特定でき、腫瘍血流分布が均等なもの

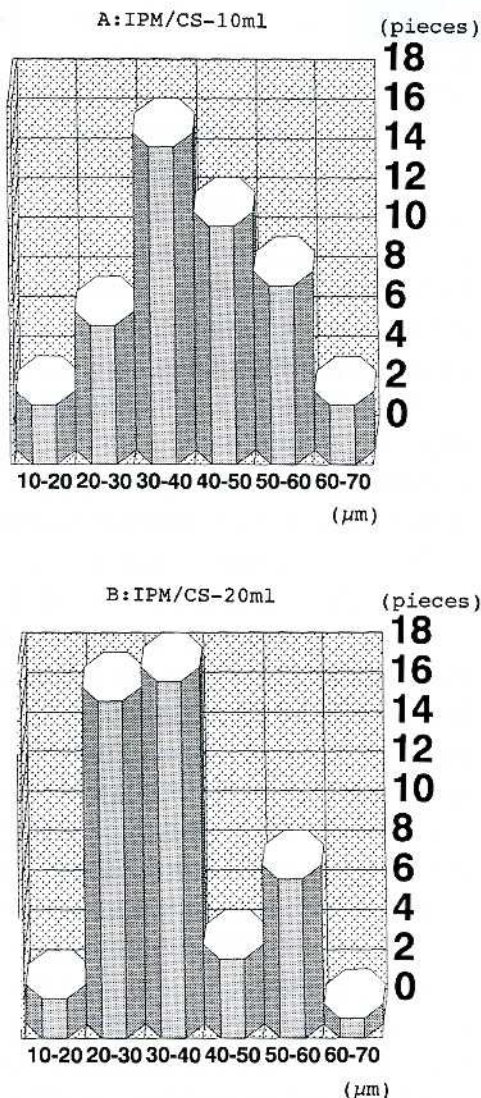


Fig. 5. Distribution of IPM/CS suspension particle size. — examined about every 50 pieces —

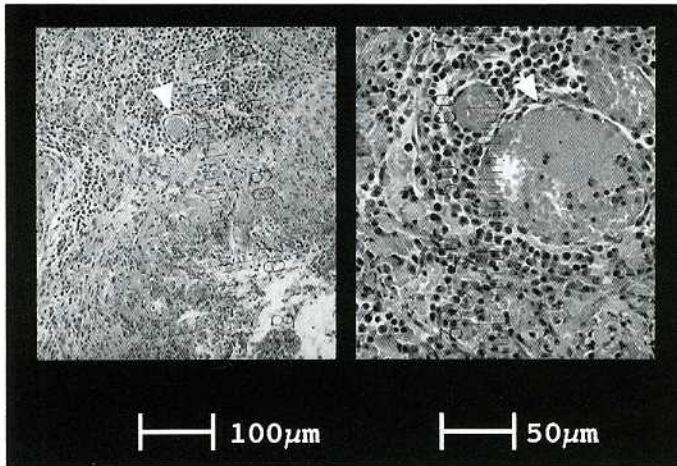


Fig. 6. Microscopic findings of VX2 tumor immediately after the infusion of IPM/CS suspension. IPM/CS emboli occluded tumor vessels (arrows). (H-E stain, Rt. $\times 100$, Lt. $\times 200$)

よいと考えられる。VX2腫瘍の発育過程では、移植14日目頃から腫瘍内血管の動静脈短絡が認められ、終末毛細血管構造が変化し、腫瘍内に壊死が発生する¹⁴⁾。従って本実験系の確立に当たっては、動静脈短絡が現れる移植14日目以内の腫瘍が必要で、こうした意味から腫瘍径の測定は14日目に行った。

VX2腫瘍の移植に関する諸家の報告では、移植細胞数は $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 個と様々であるが、いずれも10~14日後に腫瘍径が10~20 mmに達し、良好な発育が示されている^{15)~19)}。しかし本実験のように栄養動脈が1本化された環境では、比較的移植細胞数の多い 1×10^5 個では発育が緩徐であり、さらに細胞数を増加(1×10^{11} 個)させると腫瘍は全く生着しなかった。また、耳介動脈径が細い(24 G留置針が挿入できない)家兎や、耳介静脈を切除し血流改変を試みた家兎では 5×10^4 個の移植でも腫瘍の発育が遅延したことから、家兎耳介のように組織容量が乏しく、血流の少ない部位への腫瘍移植は至適細胞接種量があり、VX2の発育は腫瘍床の厚みや血流量に依存すると思われた。

さて、奥野により1993年に臨床報告されたIPM/CS懸濁液による微小塞栓療法²⁰⁾は、それ自体が腫瘍発育を抑制する効果があり、動注療

法との併用で腫瘍に対する有用性が増加すること²¹⁾が報告されている。しかし原法通りの懸濁液の作成方法、すなわちIPM/CS 0.5 gをイオキサグレート10~20 mlで懸濁するという方法²¹⁾では、IPM/CS粒子径に幅が生じ塞栓効果が不安定になると思われる。そこで、至適混合比を特定するために、まず基礎としてIPM/CS 0.5 gをイオキサグレート5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 mlで懸濁を行い、鏡検上で比較的適当と思われた、イオキサグレート10 mlおよび20 mlの懸濁液を再調整して両者を比較した。今回の結果では前者が、粒子

径が一定で、粒子数も豊富であったため、塞栓物質としての性状に優れていると判断した。IPM/CSの抗腫瘍効果の機序は、IPM/CSの粒子がヒト腫瘍組織の栄養動脈から派生してくる径約40 μm の毛細血管網を選択的に塞栓し、新生血管の発育を抑えることにより腫瘍全体の発育を抑制することと説明されている²¹⁾。ここでヒト腫瘍組織と家兎VX2腫瘍組織の血管径の差が問題になるが、家兎VX2腫瘍組織の血管径は、長谷川らは10~70 μm ²²⁾、石上は5~30 μm ²³⁾であると報告しており、ヒト腫瘍との間に本質的な差は無いと考えられる。今回使用したIPM/CS懸濁液の粒子径はほとんどが30~60 μm の範囲に分布しており、ほぼ同等の大きさであるDegradable Starch Microspheres : DMSでも、抗癌剤(MMC)との併用で抗腫瘍効果が増強したと報告されており²⁴⁾、臨床的にも使用上の不適合は無いと思われた。本実験の組織所見では、60 μm 以下の微小血管に塞栓物質が認められたことから、IPM/CS懸濁液の粒子径はVX2腫瘍においても適切な大きさであったと考えられる。しかし組織所見での塞栓血管数は筆者の予想よりはるかに少数で、組織摘出後のホルマリン固定および染色時に懸濁液粒子が溶解または脱落したことが予想され、塞栓血管の更なる検

討を行うためには、未固定、無染色標本が適していると思われた。

以上、本実験で確立された実験系と塞栓物質を用い、さらにSTACMEの有効性を検討すべく基礎的実験を継続する予定である。

ま と め

1) 家兎耳介を用い、超選択的動注化学療法の簡便な動物実験モデルを作製した。24 G以上の耳介動脈径を有する家兎耳介の至適 VX 2 接種細胞数は、 5×10^4 個/0.05 mlであった。

2) IPM/CS 懸濁液は、IPM/CS 0.5 gをイオキサグレート 10 mlで懸濁したものが、微小塞栓物質として適していると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学放射線医学（治療）教室 今城吉成教授に深謝します。また終始懇切なご助言を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室 原田 保教授、同放射線医学（診断）教室 梶原康正教授をはじめ医局員の諸先生に深く感謝いたします。

この論文の要旨は、第11回日本血管造影・インターベンショナルラジオロジー学会中国四国地方会（1998、岡山）、第99回日本耳鼻咽喉科学会総会（1998、札幌）で報告した。

本研究の一部は、日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助大学院重点特別経費（高度化の推進：学生分、平成9年度）、川崎医科大学プロジェクト研究費（8-712）の援助によったことを付記し、深謝する。

文 献

- 1) 田口鐵男：動注化学療法の理論と実際－薬物動力学的研究の重要性－。癌と化学療法 11：1717-1728, 1984
- 2) Harima K, Harima Y, Hasegawa T, Tanaka Y：Transcatheter arterial embolization as a method of cisplatin-retention enhancement on the VX 2 tumor uterus transplant. Cardiovasc Intervent Radiol 18：30-34, 1995
- 3) Harima Y, Harima K, Hasegawa T, Shikata N, Tanaka Y：Transcatheter arterial embolization with cisplatin：Apoptosis in VX 2 tumor uterus transplants. Anticancer Res 16：193-200, 1996
- 4) 吉弘 剛, 折田洋造, 秋定 健, 河合見充, 武浩太郎, 奥本香苗, 栗飯原輝人, 今井茂樹, 梶原康正, 半田徹：頭頸部腫瘍に対する CDDP・CBDCA 併用超選択的動注療法の検討。耳鼻臨床 96：補169-177, 1998
- 5) Flick PA, Gemmette JJ, Robinsons KT, Gold RE, Kumar P：Intraarterial therapy of head and neck cancer. Seminars in Interventional Radiology 15：421-428, 1998
- 6) Imai S, Kajihara Y, Munemori O, Kamei T, Mori T, Handa T, Akisada T, Orita Y：Superselective cisplatin (CDDP) - carboplatin (CBDCA) combined infusion for head and neck cancers. Eur J Radiol 21：94-99, 1995
- 7) Robbins KT, Storniolo AM, Kerber V, Seagren S, Berson A, Howell SB：Rapid superselective high-dose cisplatin infusion for advanced head and neck malignancies. Head Neck 14：364-371, 1992
- 8) Rous P, Kidd JG, Smith WE：Experiments on the case of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. J Exp Med 96：159-174, 1952
- 9) Rous P：Viruses and tumor causation. Nature 207：457-463, 1965
- 10) Moses BL, Chan DW, Hruban RH, Forastiere A, Richtsmeier WJ：Comparison of Intra-arterial and intravenous infusion of cisplatin for head and neck squamous cell carcinoma in a modified rat model. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 119：612-617, 1993
- 11) 上田英二, 佐古正雄, 廣田省三, 土師 守, 藤井正彦, 長江利幸, 楠本昌彦, 河野通雄：抗癌剤動注療法の血管系への影響に関する基礎的研究。日本医放会誌 49：1430-1432, 1989
- 12) 上田英二, 佐古正雄, 廣田省三：抗癌剤動注療法の血管壁に及ぼす影響－実験的並びに臨床的検討－。日本医放会誌 52：960-970, 1992

- 13) 金沢利定：痛化学療法の基礎的、臨床的研究（Ⅲ）抗癌剤動脈内注入時の血管像の変化。日外宝 47：594-600, 1978
- 14) Lörelius, Stridbeck H：Age related changes in tumor vascularity. Acta Radiologica Diagnosis 25：529-533, 1984
- 15) 梶原康正, 宗盛 修, 相馬 孝, 今井茂樹, 西下創一, 畑 毅：転移リンパ節の血管構築に関する実験的研究（第1報）。リンパ学 10：47-50, 1987
- 16) 今井茂樹：腎動脈塞栓術における Absolute Ethanol の効果に関する基礎的研究-家兎 VX2 腫瘍を用いた実験的検討-。画像医学誌 8：47-56, 1989
- 17) Imai S, Kajihara Y, Nishishita S, Hayashi T：Effect of ethanol induced occlusion of the renal artery in rabbit kidney implanted with VX2 carcinoma. Acta Radiol 30：535-539, 1989
- 18) 畑 毅：実験的口腔癌における転移リンパ節の血管構築の変化-放射線学的ならびに病理組織学的検討-。日本口腔科学会誌 43：386-400, 1994
- 19) Kuo JH：Ultrastructural study on effects of cisplatin on VX2 carcinoma cells. Bull Tokyo Med Dent Univ 37：35-50, 1990
- 20) 奥野哲治：頭頸部良性腫瘍のアンギオグラフィー-頭頸部血管性病変の診断治療を通じて-。Johns 9：1689-1695, 1993
- 21) 奥野哲治：Interventional Neuroradiology の現状と展望：微細な新生血管に対する選択的塞栓療法。Medical Tribune 496：14-15, 1994
- 22) 長谷川恵美：家兎 VX2 移植卵巣腫瘍における Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP) 腹腔内投与後の血流動態と腫瘍血管の変化。日本産科婦人科学会雑誌 45：451-456, 1993
- 23) 石上哲郎：家兎 VX2 癌に及ぼす抗癌剤の影響に関する電子顕微鏡学的研究-腫瘍血管の変化を中心として-。日本口腔外科学会誌 36：1-20, 1990
- 24) 田口鐵男：肝癌における局所療法：Spherex®-動脈塞栓剤。癌と化学療法 22：969-976, 1995