

凍結化学療法の実験的研究

川崎医科大学 消化器外科

(指導: 佐野開三教授)

今 井 博 之

(昭和60年2月28日受付)

Experimental Study of Cryochemotherapy

Hiroyuki Imai

Division of Gastroenterological Surgery, Department of
Surgery, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1985)

約90羽の VX 2 担癌家兔を実験モデルとして、凍結化学療法の効果に関し、検討を行った。

VX 2 癌の移植 1 週間後、2 群に分け凍結術後の腫瘍組織血流量の変化と、制癌剤の組織内取り込みの変化について検討した。

1; 凍結術後30分の時点で、凍結された腫瘍の血流量は、コントロール値の約200%に上昇する。以後漸減し60分後から180分後にはコントロール値の約50%となる。

2; 制癌剤の取り込みは、凍結術後30分に動注した場合に最も高くなり、コントロール群の約1.5倍になる。以後漸減するが、24時間後に動注した場合にも高くなり、二峰性を呈する。

3; 正常肝組織は、凍結術後30分～60分の時点では、制癌剤の取り込みが小さい。

4; 1, 2, 3より、凍結術後30分～60分の間が制癌剤の投与を行うに適していると考えられる。

About 90 white rabbits with a transplanted VX-2 liver carcinoma were used for evaluating the effect of cryosurgery on the blood flow and concentration of anti-cancer agent in liver tissue.

One week after inoculation of VX-2 carcinoma (0.5×10^6 cells) into the left anterior lobe of the liver, animals were divided into two groups: one group for the measurement of the tissue blood flow using the RI-microsphere method, and the other group for the estimation of the tissue concentration of Bleomycin using the bioassay method.

Tissue blood flow of the tumor and of normal liver parenchyma frozen by KRYmed KR-5 was increased by 200% after 30 minutes and decreased by 50% after 180 minutes.

Tissue concentration of Bleomycin administered intra-arterially was measured at 30, 60 and 180 minutes, and 24 and 48 hours after freezing. The concentration peaked at 30 minutes and 24 hours after freezing

Key Words ① Cryosurgery ② Cryochemotherapy

はじめに

悪性腫瘍に対する治療法の第一選択は切除手術であるが、再発癌や手術不能な症例に対する治療方法には、未だ確立されたものはない。

これら末期癌に対し今日行われている治療法のうちでは、抗癌化学療法の占める比重が大きく、経静脈性高カロリー維持下の制癌剤大量投与¹⁾や、制癌剤の動脈内注入²⁾、腫瘍塞栓療法など³⁾種々の方法が試みられている。腫瘍の凍結と化学療法を併用する、いわゆる凍結化学療法も、根治手術不能な腫瘍に対し有効と考えられるが、⁴⁾本法は凍結による腫瘍への直接的効果⁵⁾と、凍結に伴う制癌剤の作用増強を期待して行われる集学的治療法の一つである。凍結化学療法に際しての制癌剤の投与時期や投与経路については、臨床的に様々な工夫がなされているが、^{6),7)}基礎的にその妥当性を追究した研究は少なく、なお解決すべき多くの問題が残されている。

凍結化学療法における、より有効な方法を解明するため、家兎の肝臓に移植した VX 2 癌を凍結し、凍結術後の血流量の変化、また凍結術後の各時期に動脈内より投与した制癌剤の組織内濃度を測定し、凍結手術後の制癌剤の至適投与方法について検索した。

実験材料及び方法

1. 実験動物

体重 2 kg 前後の成熟白色家兎を用いた。

2. 移植腫瘍

Shope papilloma virus により家兎に誘発された VX 2 腫瘍⁸⁾を用いた。これは、乳頭腫の悪性変化した未分化型扁平上皮癌である。

3. 使用薬剤

制癌剤としては、VX 2 腫瘍に感受性を示す

Bleomycin⁹⁾を使用した。

4. 実験方法

1) VX 2 担癌家兎の作成

岩城、¹⁰⁾瀬尾¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、家兎の大腿筋肉内に継代した VX 2 腫瘍を無菌的に摘出し、中心部の壊死組織を除く。ついで周辺部の灰白色充実性の癌組織片を採取し、phosphate buffer saline (以下 PBS) 中で細切、0.2 mm の金属網で濾過した後、PBS 中に浮遊させる。これを 5 分間静置し、細胞塊を沈澱させ、その上清をトリパンプルー染色し、生存細胞数が 1×10^6 個/ml の割合となるような細胞浮遊液とした。

Pentobarbital sodium を家兎の耳静脈より 30 mg/kg の割合で注射して入眠させ、笑気ガスにて維持麻酔した。上腹部正中切開にて開腹し、肝左葉前区に上記の細胞浮遊液 0.5 ml (細胞数 0.5×10^6 個) を 26G.1 ml の注射器で直接注入した。刺入部は細胞浮遊液の漏出防止のために電気凝固した後、出血および注入液の漏出のないことを確認し閉腹した。術中、術後ともに抗生物質の投与は行わなかった。

移植して 1 週間後、同様の麻酔下にて再開腹を行い、孤立性の VX 2 肝癌が作成されていることを確認し、腫瘍径が約 2.0 cm 前後の約 90 羽を以下の実験に供した (Fig. 1)。

2) VX 2 肝癌の栄養血管の検討

造影用硫酸バリウム水溶液を、肝動脈または門脈より注入し肝臓を摘出、10%ホルマリン液で固定後 X線撮影を行い、VX 2 肝癌の血管支配を microangiography 像より検討した。撮影フィルムはマンモグラフィ用フィルム (Kodak 社, X-Omat TL) 条件は 40 Kv 100 mA 0.08 sec とした。

3) 凍結手術

移植 1 週間後に再開腹を行い、作製された



Fig. 1. Solitary VX2 carcinoma formed in the liver, 1 week after transplantation

VX 2 肝癌に対して、液化炭酸ガスを冷却剤とする凍結装置 (KRYmed-KR5) にて凍結手術を行った。凍結は接触法で、1回の凍結時間を3分とする 2 cycle freezing を行い、凍結範囲は VX 2 腫瘍縁より 1 cm 外側にまで及ぶようにした。

凍結組織の温度測定は、交叉熱電対温度計 (DELTA SK-1200) を使用した。

4) 凍結後組織血流量の測定

凍結後組織血流量の測定には、RI-microsphere 法 (以下 MS 法と略す) を¹²⁾¹³⁾ 用いた。これは、radioisotope で標識した microsphere (以下 MS と略す) を動脈内へ投与して末梢血管床に捕捉させ、目的臓器の放射能を測定し、計算式より血流量を求めるものである。

右総頸動脈よりカテーテルを挿入し、圧トランスデューサー (日本光電社, MPU-05 型) に接続して血圧波形を指標に左心室挿入を確認した。圧測定と共に、三方活栓を用いて MS の注入にも用いた。

右大腿動脈内にもカテーテルを挿入し、同じく圧トランスデューサーに接続して動脈圧を測定すると共に、活栓により後述する reference blood 採取にも用いた。動脈内に挿入するカテーテルは、すべて 4 French のポリエチレン・カテーテル (Cook 社) を用いた。

凍結終了より、30分後、45分後、60分後、3

時間後、24時間後に ¹²⁵I でラベルした MS (直径 $15 \pm 3 \mu$) を左心室内に注入した。また MS 注入と同時に、右大腿動脈へ挿入したカテーテルから、定速で 5 分間 2.5 ml の動脈血 (reference blood) を採取した。

MS の左心室内注入は、注入前に注射器をよく振盪し、約 20 秒かけて緩徐に行った。注入後はカテーテル内を生食水で洗浄した。

reference blood の採取後直ちに脱血屠殺して、開心にて左心室内にカテーテルが挿入留置されている事を確認後、VX 2 肝癌、VX 2 肝癌周囲 1 cm の肝組織、および正常肝組織を摘出した。それぞれの湿重量を測定した後、試料瓶に入れ放射能活性を、Auto-gamma-scintillation spectrometer (Packard 社, 5320 型) で計測した (Fig. 2)。

組織血流量は下記の公式より求めた。

$$F = C1/C2 \times f \times 100$$

F = 組織血流量 (ml/min/100 g tissue)

C1 = 組織 1g あたりの放射能 (cpm)

C2 = reference blood の放射能 (cpm)

f = reference blood の採取速度 (ml/min)

5) 組織内制癌剤濃度の測定

(a) 検体の採取

前述の麻酔下に、大腿動脈から動注用カテーテルを挿入し、先端が腹腔動脈起始部直上になるよう、X線透視下で第11胸椎上縁に留置固定した。開腹した後、腹腔動脈起始部より末梢側の大動脈にテープをかけ、一次的に末梢側の血流を遮断した状態で、Bleomycin を 7.5 mg/kg (3 mg/ml に溶解したもの) の割合で one shot 動注した。Bleomycin の動脈内注入後末梢側の血流を再開し、速やかに脱血、還流、屠殺後、VX 2 肝癌および正常肝を摘出して凍結保存した (Fig. 3)。

(b) 濃度測定手技

Bleomycin の濃度測定は藤田¹⁴⁾ の方法に準じ、薄層カップ法を用いる bioassay 法で測定した。試験生物には Bacillus ATCC 6633 を用い、培地には Mueller-Hinton 培地を使用

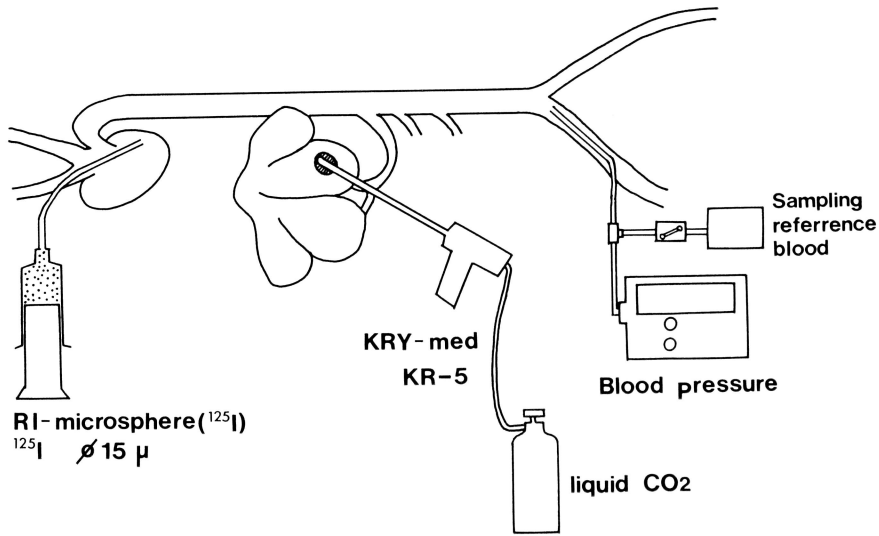


Fig. 2. Materials and Methods-I (Tissue Blood Flow)
 Animal: white rabbit (2kg)
 Tumor: VX-2 Carcinoma
 0.5×10⁶ cell suspension was implanted into
 the liver parenchyma

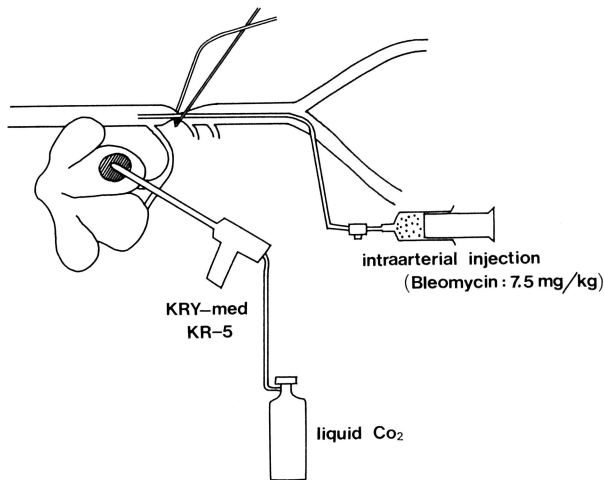


Fig. 3. Methods-II (Tissue BLM Concentration)

結 果

1. VX 2 肝癌の検討

VX 2 肝癌は、その血管支配をみると、肝動脈 microangiography では、VX 2 癌は hypervascular pattern であり、また、血管壁の不整化、血管径の大小不同、血管の蛇行が顕著であった、また、門脈 microangiography では、腫瘍への造影剤の流入はほとんど見られない (**Fig. 4**)。従って、VX 2 肝癌の栄養血管は肝動脈であることがわかる。

2. 凍結温度について

凍結術施行時の組織の温度変化を表示すると **Figure 5** のようになる。

凍結前の肝の組織温度は $36.25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ であったものが、凍結開始後30秒で 0°C まで下降し、1分後 $-17.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ となった。さらに2分後には $-27.5 \pm 2.1^\circ\text{C}$ 、3分後には $-29.5 \pm 1.3^\circ\text{C}$ と -30°C 前後まで下降する。以上を第1回目の凍結とし、次の3分間は自然融解させ

した。

凍結しておいた組織検体は、解凍後組織重量の2倍量のPBSを加え、6,000回転で1分間homogenize、その後、日立20PR-52にて高速冷却遠沈 (0°C , 10,000回転, 20分間) し、その上清を試験に供した。

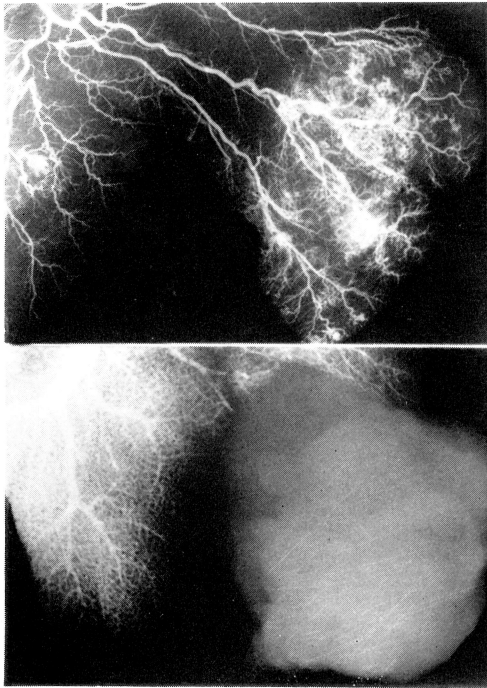


Fig. 4. Microangiography with barium sulfate
A; hepatic artery microangiography
B; portal vein microangiography

る。凍結終了後 2 分では組織内温度は 0°C 前後に上昇し、3 分後には $0.75 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ となる。

第 1 回目の凍結終了 3 分後に第 2 回目の凍結を行った。再凍結開始 1 分後 $-14.5 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ 、2 分後 $-21.8 \pm 3.3^{\circ}\text{C}$ 、3 分後 $-24.8 \pm 3.4^{\circ}\text{C}$ という下降線を示した。第 2 回目の凍結術終了後も、再び自然融解とする。凍結術終了 4 分後で $0 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ まで上昇したが、これは第 1 回目と比べてやや緩徐な解凍速度であり、10 分後には $31.0 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ まで上昇した。15 分後には $33.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ とほぼ術前レベルまで戻り、以後 34°C 前後で経過する。

3. 凍結後の変化

a) 肉眼的変化

凍結手術の 30 分後には、浮腫および充血が出現してきている。60 分後には充血が著明となり暗赤色となる (Figs. 6, 7)。

b) 組織変化

H. E. 染色を行って凍結術後の組織変化を観察した。

凍結 30 分後には組織血管腔に充血が著明であ

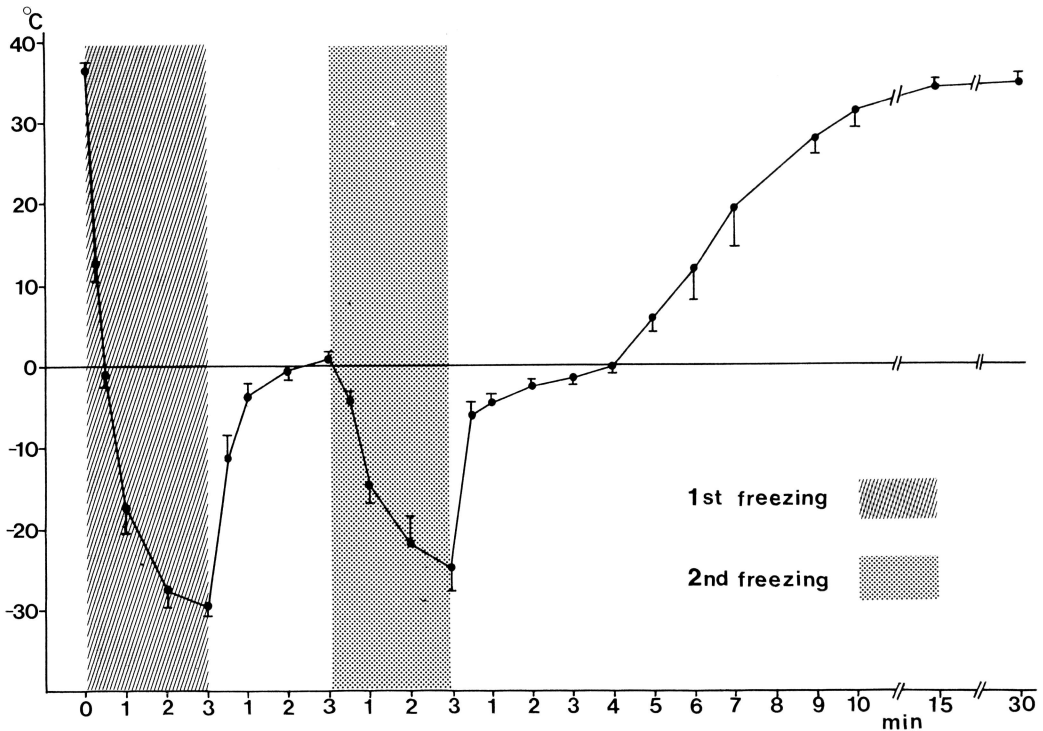


Fig. 5.



Fig. 6. 30 min. after frozen

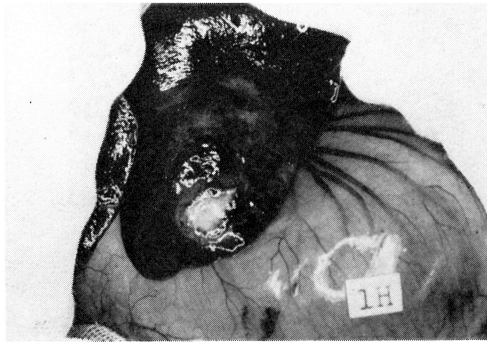


Fig. 7. 60 min. after frozen

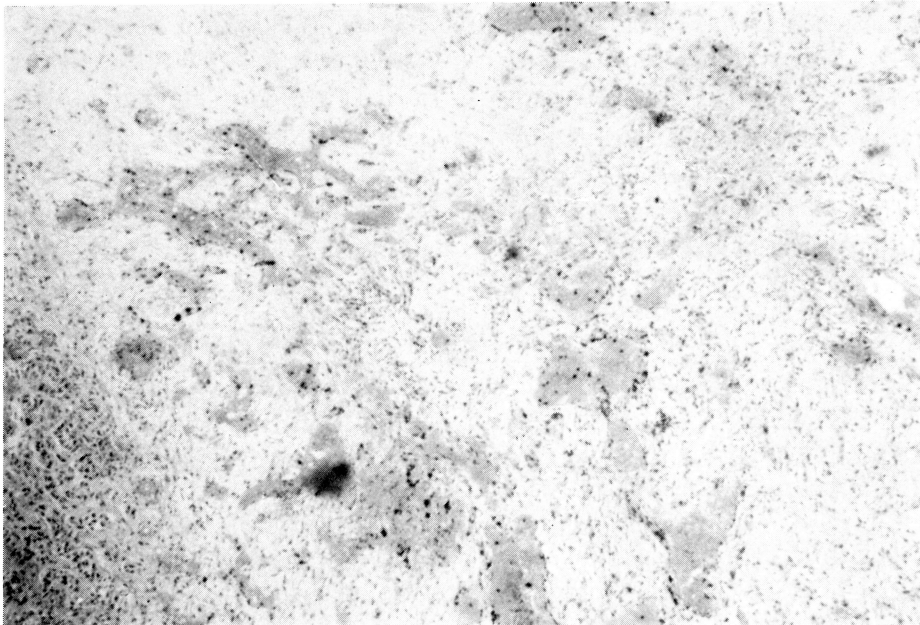
る。60分後もほぼ同様であるが、リンパ球の浸出も見られる (Figs. 8, 9).

4. 組織血流量の変化

コントロール群で VX 2 癌の組織血流量は、 67.2 ± 17.6 ml/min/100 g であり、血流変化を見ると、凍結術後30分には 124.9 ± 88.8 ml/min/100 g と2倍に増加している ($p < 0.05$). 以後は漸減し、45分後には 85.7 ± 54.4 ml/min/100 g となり、60分後には 36.3 ± 33.6 ml/min/100 g と、コントロール値の1/2にまで減少している。それ以後は著しい変動はない。

凍結手術の影響が及び、氷球が形成された腫瘍周囲1 cm の肝組織 (凍結前は正常肝組織) を見ると、凍結術施行後30分には 107.5 ± 102.1 ml/min/100 g と、コントロール値の2.5倍位にまで血流が上昇している ($p < 0.05$). そして VX 2 癌と同じように漸減し、60分後には 37.6 ± 32.3 ml/min/100 g と、コントロール群とほぼ同じになっている。

凍結の直接及ばない正常肝組織では、コントロール群が 36.5 ± 28.8 ml/min/100 g、凍結手

Fig. 8. 30 min. after frozen (H. E. stain, $\times 40$)

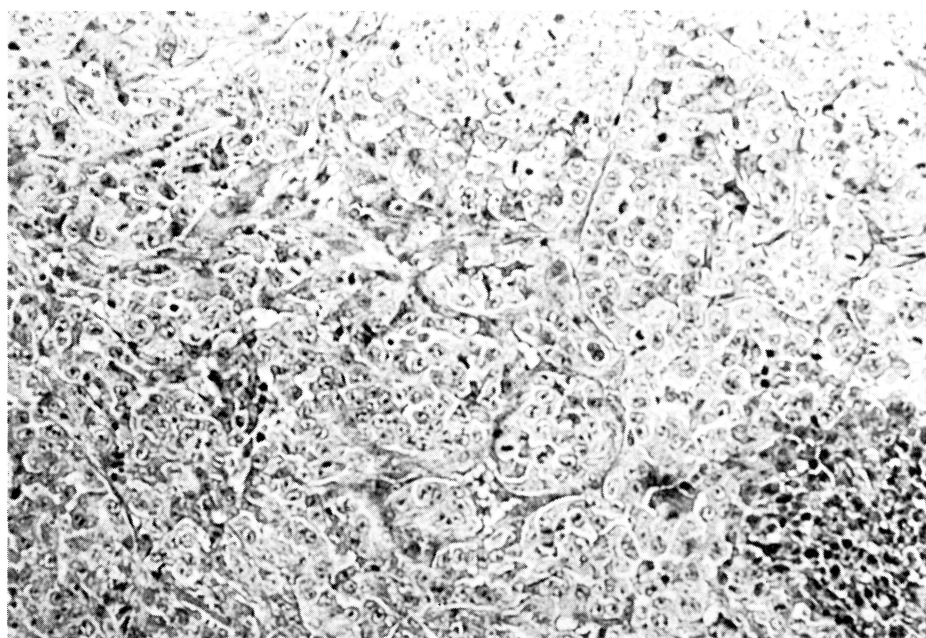


Fig. 9. 60 min. after frozen (H. E. stain, $\times 100$)

術の30分後が 36.4 ± 23.1 ml/min/100 g, 60分後は 35.1 ± 23.4 ml/min/100 g となっており, 凍結手術の及んだ部位のような大きな変動は見られない (Table 1), (Fig. 10).

5. 組織内への制癌剤の取り込み

各組織内に取り込まれた Bleomycin 濃度を表示すると, Figure 11 のようになる. なんら処置を行わなかった時の Bleomycin 濃度は, VX 2 癌も正常肝組織も余り変わらず, それぞれ 0.66 ± 0.06 μ g/g と 0.61 ± 0.08 μ g/g である.

凍結術後15分に Bleomycin を動注すると,

VX 2 癌での取り込みは, 0.91 ± 0.48 μ g/g と増加しているのに ($p < 0.1$), 腫瘍周囲 1 cm や正常肝ではほとんど変化はみられない. 凍結術後30分に動注した時は, VX 2 癌では 1.01 ± 0.19 μ g/g と, 取り込みが約1.5倍となるのに対し ($p < 0.05$), 正常肝での取り込みは 0.39 ± 0.09 μ g/g と, コントロール値の約2/3 ($p < 0.1$) となる. この傾向は, 60分後に動注した場合でも同様で, VX 2 癌での取り込みは 0.83 ± 0.43 μ g/g と, コントロール値より高い ($p < 0.1$) のに対し, 正常肝での取り込みは 0.39 ± 0.13 μ g/g と低いままである. この

Table 1. 組織血流量

時間 組織	control (n=17)	30分後 (n=6)	45分後 (n=4)	1時間後 (n=5)	3時間後 (n=2)	24時間後 (n=5)
VX-2 carcinoma	67.2 ± 17.6	124.9 ± 88.8	85.7 ± 54.4	36.3 ± 33.6	31.9 ± 4.5	34.0 ± 43.4
VX-2 周囲 1cm	36.5 ± 28.8	107.5 ± 102.1	48.6 ± 27.0	37.6 ± 32.3	25.4 ± 3.7	20.2 ± 15.7
正常肝		36.4 ± 23.1	42.4 ± 10.8	35.1 ± 23.4	17.5 ± 7.4	16.0 ± 11.0

(ml/min/100g)

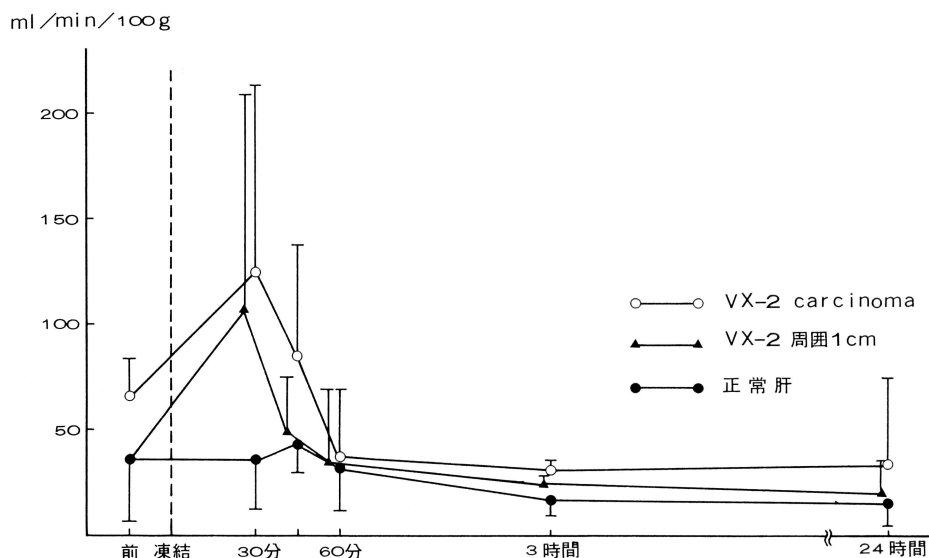


Fig. 10. 組織血流量

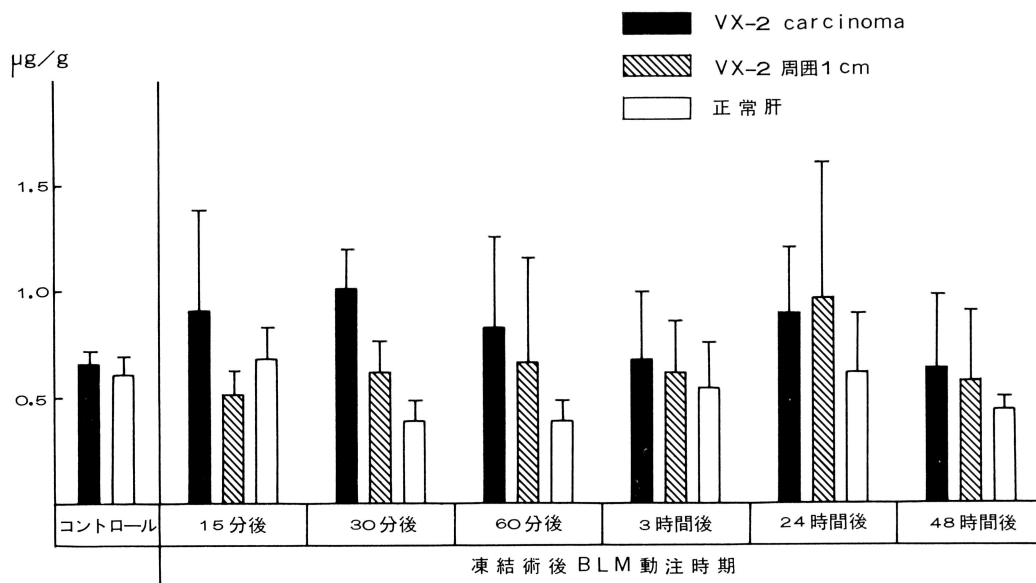


Fig. 11. 組織内 Bleomycin 濃度

間、腫瘍周囲1cmの部分での制癌剤の取り込みは、コントロール群と凍結術後の各群で大きな変化を見ない。凍結術後3時間で動注すると、VX2癌 ($0.68 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$)、腫瘍周囲1cm ($0.62 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$)、正常肝 ($0.55 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$) のそれぞれがコントロール群とほぼ同

じである。

凍結術後24時間で動注すると、VX2癌での取り込みは再び高くなり、 $0.90 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ である。この時点では、周囲1cmの部分のBleomycinの取り込みも、 $0.97 \pm 0.64 \mu\text{g/g}$ と高くなっている ($p < 0.1$)。正常肝組織はコ

コントロール値とほぼ同じである。

VX 2 癌における凍結術後の血流変化と、各時間で動注した場合の制癌剤の組織内濃度を検討すると、コントロール値を 100% とした場合に、Figure 12 に示されるようになる。凍結後 30 分で、コントロール値の約 200% に上昇した血流が、60 分には約 50% となり、以後はそれ程変化がない。

制癌剤の取り込みは、血流量でみられた様に急激な変化はしないが、凍結術後 30 分で動注した場合が最も取り込みが高くなっており、以後漸減傾向があり、24 時間で動注した場合の取り込みが再上昇している。

考 察

凍結手術後、転移の促進や局所所見の増悪を見たという報告¹⁵⁾ これと異なり、遠隔転移を促進する傾向はなく、かえって腫瘍細胞の遊離による播種を防止する可能性があるという、いわゆる Schulman 提唱¹⁶⁾ の cryo-immunology など、悪性腫瘍に対する凍結手術の適用については、なお解決すべき多くの問題がある。¹⁷⁾

凍結手術と制癌剤の併用が、抗腫瘍という点でより有効であるとする結果は、Benson や⁶⁾ 三浦ら⁷⁾ のほか二、三の報告が¹⁸⁾ みられる。

藤村は¹⁹⁾ 化学療法を併用した場合、その方法、タイミングにより治療効果に差が見られたとしており、本実験においては、この実態を究明するため凍結術後の制癌剤の至適投与方法について検索した。

1) 凍結装置と冷却剤

KRYmed-KR5 は、液化炭酸ガスを冷却剤とするもので、これは小孔より圧縮ガスが噴出する際断熱膨張時に温度の低下する、いわゆる Joule-Thomson 効果を利用して低温を得る。²⁰⁾

到達する温度は約 -80°C と、液体窒素を利用する機種種の -190°C には及ばないが、後述する組織の到達温度より考えて、凍結装置とし

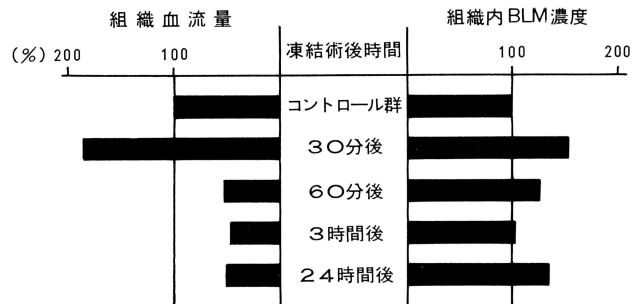


Fig. 12. VX-2 癌の凍結後血流変化と BLM 取り込みの変化

て充分であるといえる。

2) 凍結手技

凍結手術の手技として、²¹⁾ 接触法 (contact freezing), 刺入法 (penetration freezing), 注入法 (pouring method), 噴霧法 (spraying method) がある。

刺入法は、人工的に切開などを行った病巣部に凍結端子を刺入させ、凍結範囲が深部まで及ぶように工夫したものであるが、後出血が問題となる。注入法は、人工的ならびに自然に空洞化した病巣部に、直接冷却剤を流し込むもので、特殊な場合に用いられる。噴霧法は、冷媒を直接吹き付けるもので、凍結部は表面のみに限られる。接触法は、凍結端子 (probe) を直接病巣に押しつけるもので、刺入法に比べ浅い病巣に適している。今回の実験では、血流量の測定という意味から、出血を伴う操作は可及的に避ける必要があり、接触法を選択した。

家兎の肝に移植した VX 2 癌は、直径 1.5 ~ 2.0 cm の大きさであり、家兎の肝の厚みも 1.5 cm 前後と比較的薄いため、本法によって癌病巣は十分に凍結しえた。

3) 凍結範囲の設定

上原²²⁾ によると、凍結範囲は腫瘍の外側縁から、正常部の組織を約 1.0 cm 含んだ範囲とすべきであるとしている。凍結術中に氷球 (iceball) が形成されるが、その部位までがほとんど境界 (demarcate) され壊死に陥り、凍結範囲の設定に有用である。今回の実験においても氷球の形成範囲を凍結範囲とした。

4) 凍結回数について

凍結を確実にするためには“繰り返し凍結”が必要であると言われている。²³⁾ 諸家の報告によると、繰り返して同一部位を凍結すれば、凍結領域を拡大でき、かつ、冷却速度も促進されることが知られている。本実験においては、2回目の凍結では初回の凍結に比べて冷却速度はやや低下し、到達温度もやや減少するという結果であったが、氷球形成範囲は拡大された。

5) 凍結壊死について

外科的治療に応用される凍結現象の基本的特性は、a) cryo-adhesion, b) cryo-solidification, c) cryo-inflammation, および d) cryo-necrosis に分類されている。腫瘍に対する治療では、上記の cryo-necrosis が主役を演じると考えられている。⁴⁾

凍結により、細胞や組織が壊死をおこす機序については未だ不明な点も多いが、一般的には次のようなものが考えられている。²¹⁾

一次的（直接的）障害

- ① 氷晶の発育による細胞内外の物理的、機械的破壊
- ② 細胞内氷晶による脱水と電解質の異常濃縮（塩害）
- ③ 細胞膜の蛋白やリポ蛋白の変性
- ④ 急激な温度変化による thermal shock
- 二次的（間接的）障害
- ⑤ vascular stasis（血液循環障害）

さらに細胞の生死を左右する因子を考えると凍結速度と融解速度の関係、次に低温に対する対象組織の感受性の相違があげられる。

細胞や、組織に対する臨界温度（critical temperature）は -5°C ～ -50°C の間で、特に -20°C 前後に凍結破壊が強く、またこの温度に達するまでの凍結速度も重要な因子の一つである。

凍結速度については、Smith²⁴⁾ は、超急速冷却（ultra rapid freezing）； 0°C → -190°C /2秒以内、急速冷却（rapid freezing）； 0°C → -79°C /2秒～5分、緩慢冷却（slow freezing）； 0°C → -79°C /10分以上、極緩慢冷却（very

slow freezing）； 20°C /1時間以上の4つに分類している。急速冷却では氷晶は細胞内に樹枝状に発育、発達し、細胞質を物理的、機械的に破壊することになる。細胞外氷晶は緩慢冷却により生ずるが、このとき細胞内の水分は細胞外に移動流出し、細胞間に粗大な氷晶が形成され、細胞内の塩度は濃縮して、前述した①、②、③、の機序により細胞が破壊される。²⁵⁾²⁶⁾

一方、融解時にも細胞は破壊されると言われている。²⁷⁾ 急速冷却した細胞の融解が、緩慢（ $1\sim 50^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）であると、凍結可能な温度範囲内では、細胞内氷晶が更に大きな氷晶へと増大発育（再結晶（recrystallisation））しやすいためと考えられている。

本実験において到達した温度は -30°C 前後、冷却速度は組織中心部では最低温度に3分で到達しており、急速冷却の範疇に入る。また周辺部は緩慢冷却の状態であるといえる。

融解は自然融解とし、熱源は使用していないが、術後最初の1分間で -5°C 前後へ上昇している。この最初の1分間は融解速度は $20\sim 25^{\circ}\text{C}/\text{分}$ と、再結晶を起しやすい速度であった。

6) 凍結の血管系への影響

前述した組織壊死の機序のうち、血液循環障害による壊死は二次的なものと考えられている。²⁸⁾²⁹⁾ 凍結により微細血管に障害が生じると、動脈側が収縮し、ついで静脈側が拡張してくる。³⁰⁾ 血行停止はまず細静脈に生じ、毛細血管、最後に細動脈に波及して、いわゆる血栓化現象が観察されると法貴は述べている。³¹⁾ この血栓形成により、その領域組織が壊死を起してくるが、血管壁の異常は、氷球の及んだ範囲全てに起こっていると想像される。この場合、 -20°C であれ -80°C の凍結であれ、その壊死状態は終局的には差異はなく。³²⁾³³⁾ 微細血管や組織の障害程度は、 -20°C 以下では同じであると推論している。

血管径の違いによっても、凍結後の血流再開の状態は異なる。³⁴⁾³⁵⁾ 直径 $1\sim 2\text{ mm}$ の血管では一過性に血流は停止しても、融解後は血流が

再開していると田中³⁶⁾は述べている。また Benson は、⁶⁾凍結により capillary gate が開きそれが3～6時間続くとしている。

西尾らは³⁷⁾マウスの皮膚を凍結し、その血管内腔容積の変化を経時的に観察した結果、凍結終了後2時間目では凍結部皮下結合織には、充血、出血、血管拡張が認められ、この時の血管内腔容積は130%であったとしている。その後24時間には、血管内腔容積は30%にまで低下し血流の障害は最大であった。

本実験においては、凍結術後30分の時点で、腫瘍組織への血流量が増加するという現象が認められたが、60分後には減少している。組織を見ても、30分の時点では充血が著明であった。Benson⁶⁾や、西尾ら³⁷⁾の結果と合せ考えると凍結術後の一時期には(組織融解後)、凍結組織の血流の増加があるのではないかと考えられる。

その機序は、血管の拡張により血管抵抗が減少した結果と考えている。

7) 制癌剤の組織内取り込みについて

本実験においては、腫瘍局所に、より高濃度の制癌剤が到達し、しかも全身性の副作用が軽減できる動注療法を併用し、凍結術後の各時期に Bleomycin を亜選択的に動注、制癌剤の組織移行の最も良い時期について検討した。

凍結部位の制癌剤の取り込み増加は、前述した血流もその重要な因子であるが、血管壁の破壊による、血管透過性の亢進もまた重要な因子である。法貴は、³¹⁾凍結2時間後には毛細血管の sludging と浮腫が生じていると報告している。藤村¹⁹⁾によると、血管透過性は凍結術後12時間の時期に最も亢進し、さらに24時間後も亢進が推測されたとしている。

凍結術後30分をピークにして、15分から60分頃までは、凍結された VX 2 腫瘍の制癌剤の取り込みは、コントロール群の約1.5倍に増加しているのに対し、正常肝での取り込みは、コントロール群に比べて約2/3に減少している。凍結組織の制癌剤の取り込み増加は、24時間後にも認められている。この時期には、正常肝での

取り込みは、コントロール群と余り変らない状態である。

凍結組織の制癌剤の取り込みが二峰性になっているが、凍結術後30分頃に高値をとるのは、主にその時期の血流増加に起因し、24時間後での取り込み増加は、血管壁の透過性亢進が主として関与していると考えている。

正常肝での制癌剤の取り込みは、凍結30分後はコントロール群より減少しており、この時期に制癌剤を投与すると、正常組織に対する制癌剤の影響を減少させる結果となり、もっとも望ましい投与時期と考えられる。

局所療法である凍結手術と、制癌剤との併用は、いわゆる reduction surgery と制癌剤との併用という考えかたと、⁷⁾¹⁸⁾中村³⁸⁾の報告にみられるように、末期癌患者に凍結術を行うと、担癌宿主の免疫力を高め、制癌剤の持つ免疫低下作用を抑制できるという、いわゆる凍結免疫化学療法¹⁶⁾というとらえかたの二つがある。後者は凍結後の免疫能上昇反応により、制癌剤の大量投与を可能にし、その上宿主の免疫力により、残存した腫瘍細胞の増殖が抑えられる可能性を示すものである。³⁹⁾

本実験においては、制癌剤の至適投与法についてのみ追究したが、なお今後に残された問題は多い。

ま と め

家兎 VX 2 肝癌を用いて、凍結術後の腫瘍組織血流量の変化と、制癌剤の組織内取り込みの変化について検討した。

1; 凍結術後、30分の時点で、腫瘍血流量はコントロール値の約2倍となるが、以後漸減する。60分の時点では、約1/2となる。それ以後は余り変化しない。

2; 凍結された腫瘍組織の制癌剤の取り込みは、凍結術後30分に動注した場合に最も高くなる(コントロール群の約1.5倍となる)。以後漸減するが、24時間後に動注した場合にも高くなり二峰性を呈する。

3; 正常肝組織は、凍結術後30分～60分の時

点で、制癌剤の取り込みが小さい。

4; 上記1, 2, 3より凍結術後30分～60分の時点で制癌剤の投与を行うのが適していると考えられる。

本論文の要旨は、第22回日本癌治療学会総会（昭和59年9月）および第13回クライオサーージャリー研究会（昭和59年10月）において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わった、

川崎医科大学消化器外科佐野開三教授に深甚なる謝意を表するとともに、腫瘍を提供して頂いた当大学放射線科梶原康正助教授に感謝致します。また、本研究に御協力して頂いた教員各位、ならびに当大学動物飼育センター、実験センターの技術員各位に心より御礼申し上げます。

なお本研究の一部は当大学プロジェクト研究助成金（58—205）によった。

文 献

- 1) 五関謹秀, 小野寺時夫, 森 重夫, 毛受松寿: いわゆるアミノ酸インバランスによる癌補助療法. J. Jpn. Soc. Cancer Ther. 17: 1908—1916, 1982
- 2) Ansfield, F. J., Ramirez, G., Davis, H. L. Jr., Wirtanen, G. W., Johnson, R. O., Bryan, G.T., Manalo, F. B., Borden, E. C., Davis, T. E., and Esmaili, M.: Further clinical studies with intrahepatic arterial infusion with 5-fluorouracil. Cancer 36: 2413—2417, 1975
- 3) 山田龍作, 中塚春樹, 中村健治, 水口和夫, 山口真司, 佐藤守男, 宮本 武, 玉木正男: 各種悪性腫瘍に対する transcatheter arterial embolization therapy の経験. 脈管学 18: 563—571, 1978
- 4) 石川武憲: Cryosurgery の現状とその問題点. 広大歯誌 10: 161—178, 1978
- 5) Neel, H. B., Ketcham, A. S. and Hammond, W. G.: Cryonecrosis of noraml and tumorbearing rat liver potentiated by inflow occlusion. Cancer 28: 1211—1218, 1971
- 6) Benson, J. W.: Regional chemotherapy and local cryotherapy for cancer. Oncology 26: 134—151, 1971
- 7) 三浦 健, 石田正統, 灰田公彦, 灰田茂生: 進行癌に対する Cryosurgery と動脈内注入 化学療法の併用療法の検討. 臨外 30: 1244—1254, 1975
- 8) Stewart, H., Snell, K. C., Dunham, L. J. and Schlyem, S. M.: Transplantable and transmissible tumors of animals. Atlas of tumor pathology, Section-Fascicle 40, ed. by Armed Forces Institute of Pathology. 1959, pp. 38—42
- 9) 梅沢浜夫, 滝田智久: プレオマイシンの化学と生物学的作用. 化学と生物 11: 354—368
- 10) 岩城 篤: 肝癌に対する 肝動脈内制癌剤投与における 血管収縮剤の併用の 効果に関する 実験的臨床的研究. 福岡医誌 71: 471—484, 1980
- 11) 瀬尾泰雄: 動注癌化学療法における血流変化の与える影響に関する研究. 川崎医会誌 9: 133—148, 1983
- 12) Kaihara, S., Van Heerden, P. D., Migita, T. and Wagner, H. N.: Measurement of distribution of cardiac output. J. appl. Physiol. 25: 696—700, 1968
- 13) 鈴木侑信, 木谷健一: セクレチン・コレチストキニンの無麻酔ラット腹部血流分布に及ぼす影響（マイクロスフェア法による）. 核医学 13: 175—180, 1976
- 14) 藤田 浩: 制癌剤の体内分布一測定法（第1部）. 癌と化学療法 1: 497—503, 1974
- 15) 山下徹郎, 早川邦雄, 井上農夫男, 富田喜内, 細川真澄男, 小玉孝郎, 小林 博: Cryosurgery による癌転移の促進. 癌と化学療法 5: 110—114, 1978
- 16) Schulman, S., Yantorno, C. and Bronson, P. C.: Cryoimmunology, A method of immunization to autologous tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124: 658—661, 1967
- 17) Gage, A. A.: Current issues in Cryosurgery. Cryobiology 19: 219—222, 1982
- 18) 小川伸一郎, 金田浩一, 津屋 旭, 内田正興, 牛腸広樹, 宇都宮護二: 悪性腫瘍に対する Cryosurgery

- の応用. 臨外 30 : 1237—1243, 1975
- 19) 藤村健次: 凍結化学療法の基礎的研究. 日産婦誌 34 : 21—29, 1982
 - 20) 鈴木 満: 低温医学. 阿曾弘一, 隅田幸男編: 第1版. 東京, 朝倉書店. 1983, pp. 3—12
 - 21) 蔵本新太郎: 凍結手術 (その理論と実際). 亀谷寿彦, 関場香監修: 第1版. 東京, 中外医学社. 1976, pp. 82—89
 - 22) 上原孝一郎: 肝腫瘍に対する凍結手術の応用. お茶の水医誌 29 : 127—138, 1981
 - 23) Gill, W., Fraser, J. and Carter, D. C.: Repeated freeze-thaw cycles in cryosurgery. *Nature* 219 : 410—413, 1968
 - 24) Smith, A.: Effect of low temperatures on living cells and tissues; In *Biological Applications of Freezing and Drying*. by Harris, R. J. C., Academic Press, New York. 1954, pp. 1—62
 - 25) Whittaker, D. K.: Ice crystals formed in tissue during cryosurgery I—Light microscopy. *Cryobiology* 11 : 192—201, 1974
 - 26) Whittaker, D. K.: Ice crystals formed in tissue during cryosurgery II—Electron microscopy. *Cryobiology* 11 : 202—217, 1974
 - 27) Meryman, H. T.: Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science* 124 : 515—521, 1956
 - 28) Fraser, J. and Gill, W.: Observations on ultra-frozen tissue. *Brit. J. Surg.* 54 : 770—776, 1967
 - 29) Le Pivert, T.: Predictability of cryonecrosis by tissue impedancemetry. *Low Temp. Med.* 4 : 129—138, 1978
 - 30) Kryberg, L.: Stasis and necrosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15 (suppl. 71) : 1—26, 1963
 - 31) 法貴 昭: クライオサージェリーと微小循環. 耳喉 44 : 63—70, 1972
 - 32) Zacarian, S. A., Stone, D. and Clater, M.: Effect of cryogenic temperature on microcirculation in the golden hamster cheek pouch. *Cryobiology* 7 : 27—39, 1970
 - 33) Fish, J. C., Edwards, R. L. and Holaday, W. J.: Freezing and heat coagulation as hemostatics in surgery of liver and spleen in dogs. *J. Trauma* 7 : 456—463, 1967
 - 34) Gage, A. A., Fazekas, G. and Riley, E. E. Jr.: Freezing injury to large blood vessels in dogs. *Surgery* 61 : 748—754, 1967
 - 35) Albrektsson, B. and Branemark, P. I.: Early microvascular reactions to slow and rapid thawing of Frozen Tissue. *Adv. Microcirc.* 2 : 37—68, 1969
 - 36) 田中茂男, 永田 丕: Cryosurgery の外科臨床への応用—ことに各種腫瘍の破壊について—. 臨外 25 : 919—927, 1970
 - 37) 西尾 仁, 永井 巖, 森田敏照: マウス皮膚血管系に対する凍結の影響. *Cryosurgery 研究会誌* 2 : 52—54, 1974
 - 38) 中村興太郎, 小笠原二郎: 癌凍結免疫療法の臨床への応用—特に癌の凍結と 制癌剤の併用にみる 相乗効果について—. *低温医学* 1 : 291—299, 1975
 - 39) Farrnt, J. and Walter, C. A.: The cryobiological basis for cryosurgery. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 3, 4 : 403—407, 1977