ルイス肺癌における腫瘍内薬剤投与による
抗腫瘍効果と転移に及ぼす影響

大泉幸雄・今宮 聡・母里知之*

Effects of intratumoral drug injection on tumor growth and lung metastases in Lewis lung carcinoma

Effects of intratumoral drug injection on tumor growth and lung metastases were studied using Lewis lung carcinoma. Puncture to the tumor from 4 directions, saline administration in the edge of tumors, or lipiodol administration in the center of tumors promoted tumor growth and lung metastases. However, intratumoral administration of ACR or DWA2114R inhibited tumor growth better than intraperitoneal administration (i. p.) and inhibited lung metastases almost the same as i. p. Administration of DWA2114R in the center of tumors inhibited tumor growth more than that in the edge of tumors. Fractionated administration of DWA2114R was more effective on inhibition of tumor growth and less effective on lung metastases than single administration. Intratumoral administration of PEP or PEP-emulsion was effective on growth inhibition and lung metastases as well as i. p. of PEP. We conclude that intratumoral administration of anti-cancer drugs inhibit tumor growth and lung metastases.

Yukio Ohizumi ·

Satoshi Imamiya · Tomoyuki Mori*

key words : intratumoral drug injection,
anti-cancer drugs, Lewis lung carcinoma,
tumor growth, metastases

固形癌に対する抗癌剤の奏効率は、概略30~50%に過ぎない^{1,2)}。再発癌や手術のできない大きな腫瘍では、その率はさらに低くなる^{1,2)}。その抵抗性の原因の一つとして、癌中心部の血流が低下し、薬剤の到達性がわるくなることがあげられる³⁻⁵⁾。腫瘍内への薬剤の注入は腫瘍に高い薬剤濃度が得られ、薬剤の消失も血流と逆の関係にあ

ることから、その欠点を捕捉する利点を持つ⁶⁾。臨床における腫瘍内薬剤注入法(以下 i. t と略)は、ふるくから試みられているが、その有効性に係わらず系統的使用法はなされていない⁷⁻¹⁰⁾。最近は、drug delivery system (DDS) の発達により、その応用性にも着目されつつある¹¹⁻¹³⁾。また、穿刺技術の発展とともにその応用性は拡がるものと予想される。しかし、問題点も残されている。薬剤の洩れとそれによる傷害や、穿刺や注入による転移促進の危惧もある。

今回筆者らは、腫瘍内投与の基礎的検討として数種の抗癌剤について、腫瘍内投与での抗腫瘍効果がどれほど期待できるか、また転移発生に及ぼす影響について腹腔内投与と比較し、その有用性について検討した。

材料と方法

(1) 実験動物と腫瘍

オスの C57BL/6 マウスの側腹部皮下に継代されている Lewis 肺癌を無菌的に取り出し、壊死部を除いて生食中で洗浄し、鉋で細切後、その浮遊細胞を用いた。細胞を $2 \sim 8 \times 10^5/40 \mu\text{l}$ に調整し、5 週齢のメス BDF1 マウスの右下腿部筋肉内に移植した。各処理群のマウスは、7~16 匹とし、1 ケージ 9~10 匹で飼育した。移植後 5 日目には触診可能となり、以後週に 3~4 回の割で腫瘍径をノギスを用いて測定した。腫瘍体積は、楕円体とし、 $\pi/6 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{厚さ}$ の式で求めた。移植後 18~19 日目に解剖し肺転移を観察した。

(2) 薬剤と投与方法

腫瘍が $0.2 \sim 0.5 \text{ cm}^3$ のときに薬剤投与などの実験を開始した。穿刺のみの影響をみるためには、27 ゲージ針で腫瘍を 4 方向穿刺をした。生食投与群では、0.1 あるいは 0.15 ml を腫瘍中心部〔C〕

* Department of Radiat. Oncology, Tokai University
School of Medicine 東海大学医学部放射線科学教室

図1 腫瘍増殖曲線(上)と肺転移発生曲線(下) DWA2114R 総量 40 mg/kg の腫瘍中心部投与回数および持続投与の効果。転移のプロットは、左から 2 mm $\leq$, 1 mm $\leq$, 0.5 mm $\leq$, 0.5 mm $>$ の大きさの転移の数(平均値)をあらわし、横軸は非処置腫瘍でその大きさの転移が発生したと推定される時期とした¹⁴⁾。

と略す)に一カ所、あるいは辺縁部([P]と略す)に4カ所投与した。その他の薬剤も同じ方法をとった。リピオドールウルトラフルイドは 0.1 ml とし、[C]投与した。aclarubicin(ACR)は生食で溶解し、10 mg/kg 0.1 ml を[C]投与、8 mg/kg 0.15 ml を腹腔内投与(i.p)あるいは[C]投与、4 mg/kg 0.1 ml を連日2回の i.p あるいは[P]投与を行った。新白金錯体 DWA2114R, 化学名(一)-(R)-2-amynomethylpyrrolidine(1,1-cyclobutanedicarboxylate)platinum(II) (中外製薬より供与)は蒸留水で溶解し、40 mg/kg 0.1 ml を i.p, [C], [P]投与した。また、総量 60 mg/kg 0.09 ml を[C]に1回投与、連日3回分割投与、持続投与で比較した。

持続投与は、Alzet 浸透圧ポンプ(1003D: ALZA Co., USA)に同量の薬剤あるいは生食を入れ、マウスの右側腹部皮下に埋め込み、腫瘍中心部とポンプを針あるいはカテーテルで連結し、3日間持続投与した。peplemycin(PEP)は、10

mg/kg 0.1 ml を1回あるいは4 mg/kg 0.05 ml を隔日で3回の i.p, [C], および同量の PEP エマルジョン(PEP-E)を[C]投与した。PEP-Eは、オリーブ油 7.2:セスキオレイン酸ソルピタン(ニッコール SO-15)0.64:ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(ニッコール HCO-60)0.16: PEP 2.0の比で乳濁した。また、局所傷害や殺細胞効果の参考として2%あるいは5%の酢酸 0.1 ml [C]投与時とも比較した。

(3) 評価法

非処理群あるいは生食投与群の腫瘍容積が約 2 cm³ のときを基準として、処理群の growth inhibition ratio(GIR:(対照群の腫瘍体積-処理群の腫瘍体積)/対照群の腫瘍体積 $\times$ 100%)を用いてあらわした。また、そのときの腫瘍容積を t 検定を用いて有意差検定した。転移は、解剖日におけるその大きさと数を測定し、総数および転移の構成を比較した。転移総数の比較は、GIR と同様の考えで metastasis inhibition ration(MIR)としてあらわし、有意差検定には t-検定を用いた。

また、転移の構成は転移の大きさべつにその数を縦軸にとり、横軸は非処理腫瘍の転移の大きさが一定としたときの解剖時の転移サイズから推定される転移発生日とした(図1)¹⁴⁾。

結 果

表1に全実験結果を示す。穿刺自体で腫瘍成長の促進および転移総数の促進傾向があり、解剖日前の死亡マウスが多かった。生食の腫瘍周辺部[P]あるいは中心部[C]投与ともに腫瘍の成長抑制傾向にあった。生食[P]投与時には、転移抑制傾向も認められ、転移構成ではすべての大きさの転移について無処置群より多かった。リピオドール単独の i.t も、腫瘍成長抑制傾向にあり、転移も全サイズで増加の傾向にあった。

ACR の i.p では、8 mg/kg 1回でも4 mg/kg 2回でも対照群と差はなかったが、同量の i.t では対照群とくらべておのおの有意に抑制された。i.p との比較では、一回投与時に有意の差があった。べつの実験で10 mg/kg 1回投与時にはさらに効果は高くなり、8 mg/kg の時の抑制率の約倍となった。ACR による転移の抑制は、i.t も i.p 投与も同程度であり、転移抑制率は腫瘍抑制率より

表 1 Effect of local injection of drugs on primary tumor volume and lung metastases

treatment	n	primary volume mean±sd	tumors GIR ^(*) (%)	P	P	metastases		P	No. of died mice ^(*)
						total No. median (range)	MIR ^(*) (%)		
control	15	2633±338	—	—		11(2-51)	—	—	2
puncture	15	2917±386	-11	<.05		10(2-76)	-23	ns	8
saline .15 ml	[P]	15	2848±324	- 8	<.10	18(3-69)	-62	ns	3
ACR 8 mg/kg×1	i. p	10	2532±305	4	ns	7(4-18)	41	ns	0
ACR 4 mg/kg×2	i. p	10	2401±507	8	ns	7(2-21)	34	ns	0
ACR 4 mg/kg×2	[P]	15	2233±320	15	<.005	8(2-19)	32	ns	1
ACR 8 mg/kg×1	[C]	10	2135±437	19	<.005	3(1-52)	43	ns	0
control	15	2360±421	—	—		20(4-61)	—	—	0
saline. 1 ml	[C]	16	2678±432	-13	<.05	18(5-48)	4	ns	1
lipiodol. 1 ml	[C]	16	2655±479	-13	<.10	33(6-54)	-33	ns	6
DWA 40 mg/kg	i. p	15	2573±410	- 9	ns	23(4-30)	14	ns	1
DWA 40 mg/kg	[P]	15	2318±379	2	ns	15(7-31)	31	ns	0
DWA 40 mg/kg	[C]	16	2165±551	8	ns	21(4-54)	8	ns	0
saline	[C]	7	2568±332	—	—	60(15-111)	—	—	1
saline cont.	[C]	6	2590±299	0	ns	58(42-76)	2	ns	1
DWA 60 mg/kg cont.	[C]	7	2505±365	3	ns	53(44-74)	6	ns	0
DWA 60 mg/kg×1	[C]	8	2056±345	20	<.01	11(6-43)	69	<.05	0
DWA 60 mg/kg×3	[C]	8	1797±160	30	<.001	27(15-42)	63	<.05	0
saline	[C]	9	2220±304	—	—	8(2-20)	—	—	0
acetic acid 5%	[C]	5	1299±102	41	<.001	8(1-11)	40	ns	0
saline	[C]	9	2264±487	—	—	44(24-75)	—	—	0
PEP 10 mg/kg	i. p	9	1628±241	28	<.01	27(4-74)	44	<.05	0
PEP 10 mg/kg	[C]	9	1772±185	22	<.05	25(11-58)	36	<.10	0
PEP+emulsion	[C]	9	1714±309	24	<.05	24(19-55)	21	ns	0
ACR 10 mg/kg	[C]	9	1423±254	38	<.001	19(7-32)	61	<.01	0
acetic acid 2%	[C]	8	2058±246	9	ns	30(5-46)	32	<.05	0
control	7	2472±216	—	—		10(4-17)	—	—	2
PEP 4 mg/kg×3	i. p	7	2435±326	2	ns	7(4-26)	-5	ns	1
PEP 4 mg/kg×3	[C]	7	1731±153	30	<.001	4(0- 8)	61	<.05	0
PEP-E 4 mg/kg×3	[C]	7	1996±248	19	<.01	5(1-26)	15	ns	0

*¹⁾ : Growth inhibition ratio(%)=100-(treated tumor volume/control tumor volume×100).

*²⁾ : Metastasis inhibition ratio(%)=100-(total number of metastases in treated mice/total number of metastases in controlled mice×100)

*³⁾ : Number of mice died within 18 days after tumor cell implantation.

[P] : injection into edge of tumors. [C] : injection into center of tumors.

cont. : continous infusion of drug into center of tumors. ns : not significant.

高かった。転移構成ではすべての大きさの転移の減少傾向にあったが、特に大きな転移の数の減少がいちじるしかった。10 mg/kg では、61%の抑制率で有意であった。

DWA2114R 40 mg/kg の投与時の腫瘍抑制は、i.t も i.p も無処置群とは有意差はなかったが、生食投与群とは有意であった。i.p 群と i.t 群の比較では、i.t 群に有意に抑制された。[P]投与と[C]投与では差がなかったが、[C]投与でわずかにすぐれた。60 mg/kg の[C]i.t 投与方法での比較では、持続投与は生食群と差がなかったが、one shot 投与は有意に腫瘍を抑制し、その3回分割投与時に

はさらに高い抑制を示した(図1)。転移抑制については、40 mg/kg では有意の抑制はなかったが、60 mg/kg の i.t では有意の抑制が認められた。

PEP 10 mg/kg 投与による腫瘍成長抑制は、投与方法に差はなかった。しかし、4 mg/kg 3回の投与の比較では、i.p 時に効果はなく、i.t の場合に有意な抑制が認められた。PEP-emulsion の i.t の効果は、PEP の i.t とかわらなかった。転移抑制効果は、10 mg/kg では i.p, i.t, PEP-emulsion の[C]投与の順であった。転移構成からみると、投与時付近で発生すると推定される大きな転移の数の抑制はなく、投与後の腫瘍成長抑制と平行する

かのように転移も抑制された。4 mg/kg 3回の投与では、腫瘍成長抑制効果と同様に i.p. で抑制はなく i.t. で有意に認められた。しかし、PEP-emulsion では転移の抑制は有意ではなかった。

酢酸の i.t. も濃度に依存して腫瘍抑制効果が認められ、転移も処置後発生すると考えられる小さな転移の減少があった。また、5%酢酸では洩れによる皮膚障害がみられたが、2%ではわずかであった。なお、抗癌剤の i.t. による皮膚障害は、ほとんどみられなかった。

考 察

腫瘍の穿刺による腫瘍成長の促進は、腫瘍被膜(筋膜)の破壊によって腫瘍は浸潤しやすくなるものとする。生食やリピオドールの腫瘍内注入時にも腫瘍の成長促進作用があるが、やはり同様の機序でないと思われる。しかし、殺細胞効果のある抗癌剤や酢酸では腫瘍成長は抑制された。

ACR や DWA2114R の抗癌剤の i.t. 投与は、i.p. 投与時とくらべるとその抗腫瘍性が高かった。PEP では i.t. も i.p. もほとんど同じ抗腫瘍効果であったが、生食投与時の促進を考えると、i.t. は i.p. より効果が高い可能性がある。また、PEP の分割投与では、i.p. に効果がない場合でも i.t. でいじめるような効果が出ている。i.p. の場合は、いずれの抗癌剤もかなりの高濃度が必要であると考えられる。一方、抗癌剤の i.t. は、腫瘍細胞に直接高濃度の薬剤と接触できるので、効果出現にも低濃度ですむ可能性がある。

ここで使われた抗癌剤は、濃度依存性、かつ時間依存性を持つ type Ib の薬剤であるが、濃度依存性の強い type Ia の薬剤では i.t. と i.p. の効果の差はもっといじめるしくなるだろう。ただし、薬剤の洩れによる正常組織傷害を克服しなければならない。この実験では組織傷害は明らかでなかった。

腫瘍辺縁部と中心部投与では腫瘍成長抑制に差がなく、この理由は辺縁部投与時に薬剤が洩れる可能性が高いことと、中心部投与ではよりながく腫瘍内に残存するためかもしれない。PEP-エマルジョンの i.t. は、PEP の i.t. より抗腫瘍効果が高くなるだろうと予測したが差がなかった。この原因は、エマルジョンにすると腫瘍内への薬剤の

拡散が悪くなるためかもしれない。i.t. の問題はいかに薬剤を腫瘍内に広く分布させるかであろう。

1回投与と分割投与では、DWA2114R および PEP で分割投与のほうに効果が高かった。投与回数の増加とともに多くの細胞が薬剤に接触する機会が増えることによると考えている。また、持続投与で効果がなかったが、腫瘍中心部に微量の薬剤が持続していても細胞と接触する容積は少なかったと考えている。腫瘍内への分布をよくするために、薬剤の浸潤を促進させる方法や細胞内取り込みを促進させる薬剤などの併用にも興味もたれる。

薬剤の局所停滞性に関して、水溶性の低分子の薬剤は腫瘍内投与してもかなりはやく血中へ入るとされる⁸⁾。エマルジョンやリピオドールでは、粘性が高く薬剤の分布がわるいと考えられる。脈管内に入りにくい高分子の抗癌剤の腫瘍内投与に興味もたれる。

ルイス肺癌の肺転移の発生数は、移植腫瘍の大きさとともに指数関数的に増加することがわかっている¹⁴⁾。また、解剖時の転移の大きさからその発生時期を推定する方法については、すでに詳しく報告している¹⁴⁾。

本実験での薬剤処理は、腫瘍が 0.2~0.5 cm³ の時点であり、自然発生転移は平均 1~数個がすでに発生している時期である。穿刺や生食やリピオドール投与時の転移は、その処理時期に発生したと考えられる大きな転移の増加が認められ、穿刺などの処理による血中への細胞数の増加に起因しているのではないかと考えられる。また、処置後の転移増加は、腫瘍容積の増大とほぼ比例している。

抗癌剤の場合には、既存の転移の成長にも影響し、作用時間もながいので転移の発生時期の推定はできないが、ある程度の参考となる。いずれの抗癌剤でも、転移の抑制は i.p. でも i.t. でもそれほどかわりがなかった。これは、前述のごとく、腫瘍内に投与してもかなりはやく血中に入り、薬剤濃度が i.p. 投与とそれほどかわらなかったためと考える。投与前にすでに発生していただろう大きな転移の抑制は、高濃度の ACR や DWA2114R に高く、既存の転移に対しても効果があると考えられる。

一方、PEP ではその効果が低く、むしろ投与後に発生するだろう小さな転移の抑制傾向がある。PEP エマルジョンの i.t 時の転移は、PEP の i.t より抑制が低い傾向にあったが、エマルジョン化による PEP の血中への流出の低下によるため、あるいはリピオドールと同様に粘性が高いために i.t 時の圧力による血中への細胞流出の増加の可能性もある。

薬剤の腫瘍内投与についての研究は少ないこともあり、考案の根拠に乏しい点があるが、臨床でもその適応は決して少なくない。最近、温熱療法や放射線との併用も行われている。腫瘍内投与の基礎的研究や他の局所療法との併用のための研究はさらに必要であろう。

結 語

腫瘍内薬剤投与による腫瘍の成長ならびに肺転移に及ぼす影響について、ルイス肺癌を用いて調べた。

① 4カ所の穿刺、生食の腫瘍辺縁部投与、リピオドールの腫瘍中心部投与は腫瘍成長の促進と転移数の促進の傾向にあった。

② ACR や DWA2114R の腫瘍内投与は、腹腔内投与と比較すると腫瘍抑制効果が高く転移の抑制もほぼ同程度であった。DWA2114R の中心部投与は辺縁部投与より腫瘍抑制効果が高く、分割投与は1回投与より腫瘍抑制が高かった。

③ PEP や PEP エマルジョンの腫瘍内投与は、腹腔内投与と腫瘍成長抑制も転移抑制も同程度であったが、頻回投与時には腫瘍内投与がすぐれた。

以上より、抗癌剤の腫瘍内投与法の転移促進のないことと、抗腫瘍性にすぐれることを確認した。

本研究の要旨は第49回日本癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) 久保明良：がん化学療法。南江堂、東京、1985。
- 2) Haskell, C. M. : Cancer Treatment. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1990.
- 3) Levin, L., Harris, J. F., Chambers, A. F. : Factors in resistance to chemotherapy cure. In Pointers To Cancer Prognosis. (ed. Stoll, B. A.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987, p 156-170.
- 4) Fallowfield, M. E. : Blood flow distribution within transplantable tumors in the mouse. Eurp. J. Cancer Clin. Oncol. 25 : 1683-1688, 1989.
- 5) 藤田史子, 藤田昌英, 木本安彦, 田口鐵男：ヒト癌マウス移植株の微細血管構築と抗癌剤感受性。癌と化学療法 12 : 1618-1624, 1975.
- 6) 大泉幸雄, 佐藤千尋, 今宮 聡, 玉井好史, 福原 昇・他：腫瘍内増感剤投与法の基礎的研究—血流と腫瘍内増感剤濃度の関係。日医放生物部会誌 3 : 15-17, 1990.
- 7) 白羽弥右衛門, 酒井克治：制癌剤の局所投与法。外科治療 6 : 568-579, 1962.
- 8) 藤田 浩：油性抗癌剤とくに油性プレオマイシンについて。抗癌剤の効果増強とターゲッティング療法。(塚越 茂, 藤田 浩, 水島 裕・編), サイエンスフォーラム, 東京, 1987, p 248-254.
- 9) 石原和之：腫瘍内投与法。癌と化学療法 16 : 173-179, 1989.
- 10) Merlano, M., Esposito, M., Fulco, R. A., Benasso, M., Rosso, R. : Topical administration of cisplatin in far-advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur. J. Cancer Oncol. 22 : 119-120, 1986.
- 11) 金子 等, 山川達郎, 山中 康, 渡会伸治, 関沢良行・他：制癌剤-油性懸濁液(Nimustine-Lipiodol 液)の特性と臨床応用。癌と化学療法 13 : 2363-2369, 1986.
- 12) 橋田 充：リンパ指向性高分子化抗癌剤。図説臨床「癌」シリーズ No. 31. 癌の新しい局所治療。(山村雄一, 杉村 隆・監修), メジカルビュー社, 東京, 1990, p 118-124.
- 13) 萩原明彦, 高橋俊雄, 沢井清司：活性炭吸着抗癌剤。図説臨床「癌」シリーズ No. 31. 癌の新しい局所治療。(山村雄一, 杉村 隆・監修), メジカルビュー社, 東京, 1990, p 125-131.
- 14) Ohizumi, Y., Maezawa, H., Mori, T. : Relationship between primary tumor volume and lung metastasis in Lewis lung carcinoma. (1) Assay for time course of development of metastasis. Tokai J. Exp. Clin. Med. 12 : 229-235, 1987.