マウス膀胱癌 (MBT-2) 皮下移植腫瘍に対する 高エネルギー水中衝撃波と抗癌剤併用療法

東北大学医学部泌尿器科 (主任: 折笠精一教授)

鈴木 謙一 折笠 精一 星 宣次 吉川 和行
斉藤 誠一 大山 力 佐藤 信 川村 貞文

COMBINATION THERAPY OF HIGH ENERGY UNDER WATER SHOCK WAVES AND ANTICANCER DRUGS FOR SUBCUTANEOUS MURINE BLADDER CANCER (MBT-2)

Ken-ichi Suzuki, Seiichi Orihara, Senji Hoshi, Kazuyuki Yoshikawa, Seiichi Saitoh,
Chikara Ohya, Makoto Satoh and Sadahumi Kawamura
Department of Urology, Tohoku University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi Orihara)

The effect in combination therapy of high energy under water shock waves (HESW) and anticancer drugs for subcutaneous murine bladder cancer (MBT-2) in C3H/He mice was examined. HESW were generated by piezoceramics and directed to the subcutaneous tumor under ultrasonographic guidance. The subcutaneous tumor was exposed to HESW alone (100 MPa, 1000 shots, 3 shots/sec) or in combination with pirarubicin (THP, 5 mg/kg, i.p.) or carboplatin (CBDCA, 40 mg/kg, i.p.). Remarkable bleeding in the tumor was seen immediately after the exposure of HESW, destroyed cancer cells appeared after one day and wider and clearly bordered tumor necrosis was observed after three days. In the HESW alone therapy, tumor growth of smaller tumors ($<10 \text{ mm}^3$, $n=8$) were suppressed more than that of larger tumors ($10\sim35 \text{ mm}^3$, $n=11$). Tumor growth ratio on the 14th day (TGR 14) (tumor volume on the 14th day/tumor volume on the 1st day) was examined in larger tumors. TGR 14 were 152.2 ± 146.6 (mean $\pm$ S.D.) in the control ($n=20$), 116.3 ± 98.9 in HESW alone ($n=11$), 75.5 ± 110.7 in THP alone ($n=8$), 90.7 ± 61.6 in CBDCA alone ($n=6$), 75.8 ± 72.2 in THP + HESW ($n=9$), 3.2 ± 4.5 in CBDCA + HESW ($n=8$) and 0.8 ± 1.3 in CBDCA + HESW 2 cycles ($n=9$). Evident suppression on tumor growth was more often seen in CBDCA + HESW and CBDCA + HESW 2 cycles therapies than in the other therapies ($p<0.01$). The cumulative survival rates were higher in CBDCA + HESW and CBDCA + HESW 2 cycles therapies than in the other therapies ($p<0.05$). Tumor metastasis was seen only in the lungs of the dead mice after 19 days. Lung metastases were seen in 1/6 in the control, 0/5 in HESW alone, 1/5 in CBDCA alone, 0/6 in CBDCA + HESW and 1/5 in CBDCA + HESW 2 cycles therapy, respectively.

Key words: high energy underwater shock waves, anticancer drugs, murine bladder cancer (MBT-2)

要旨: マウス膀胱癌 (MBT-2) を皮下に移植し, 高エネルギー水中衝撃波 (HESW) と抗癌剤を併用して治療効果を検討した。HESW の発生源に piezoceramics, 焦点部最大圧力100MPa で1,000発照射した。治療は1群を除き1回のみ行った。抗癌剤との併用は, pirarubicin (THP) (5mg/kg) あるいは carboplatin (CBDCA) (40mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与15分後に HESW を単独群と同じ条件で照射した。

照射直後には腫瘍内に著しい出血が出現し, 1日後には癌細胞の崩壊がみられはじめ, 3日後には境

界明瞭な広範囲の壊死が生じた。治療時腫瘍体積 $<10\text{mm}^3$ では、14日後の腫瘍相対増殖率は HESW を照射した群が無治療群に比べて平均値で約 $1/2$ の値を示したが、統計学的有意差を認めなかった。治療時腫瘍体積 $10\sim35\text{mm}^3$ の14日後の腫瘍相対増殖率は、CBDCA と HESW 併用を 1 回施行群と 1 週後に 2 回施行した群で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。HESW 単独群、THP 単独群、CBDCA 単独群、THP と HESW 併用群では有意な増殖抑制はみられなかった。累積生存率は、CBDCA と HESW 1 回併用群と 2 回併用群においてのみ有意に高く認められた。治療後死亡したマウスの転移は肺のみにみられ、出現頻度は HESW を用いた群と用いない群で差はみられなかった。

キーワード：高エネルギー水中衝撃波、抗癌剤、マウス膀胱癌 (MBT-2)

緒 言

高エネルギー水中衝撃波 High Energy Underwater Shock Waves (以下 HESW) は、現在では尿路結石治療の主流となり、手術を必要としないその治療は、多くの患者に福音を与えてきた。しかし当初副作用があまり問題とされなかった HESW も、少なからず組織損傷を生じることが明らかとなってきた。そこで逆にこれを利用して、HESW が癌治療に応用できないかと考え、実験的癌 VX-2 膀胱癌に対して HESW を照射し、HESW 単独または抗癌剤 (pirarubicin) との併用が強い抗腫瘍効果を示すことを我々は報告してきた^{5)~7)}。しかし、HESW の癌細胞および癌組織に及ぼす影響は未だ不明な点が多く、臨床応用するためにはよりいっそうの基礎的研究が必要である。

目 的

今回は、前報と異なる皮下に移植したマウス膀胱癌 (MBT-2) を用いて、HESW 照射による組織学的効果、HESW 照射と抗癌剤併用による腫瘍の増殖抑制効果と生存率、および HESW 照射による転移誘発の有無につき検討した。

対 象

1) 腫瘍：用いたマウス膀胱癌 MBT-2 は、C3H/He マウスに化学発癌剤 FANFT (N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide) を経口摂取させて発癌させた未分化型膀胱癌である¹⁾。我々の動物実験施設において、C3H/HeSlc マウス背部皮下に継代移植しており、同系マウスへ移植可能な癌種である。(筑波大学医学部泌尿器科内田克紀先生のご厚意により頂いた)

2) 実験動物：7 週齢の C3H/HeSlc マウス雌で、体重が $20\sim24\text{g}$ のものを日本エスエルシーより購入した。

方 法 I

1) 移植癌細胞の調製：エーテルによる吸入麻酔と、pentobarbital sodium (ネプタール®) による腹腔内麻酔 ($20\sim30\text{mg/kg}$) 下に、背部皮下担癌マウスから

滅菌操作にて腫瘍塊を摘出した。摘出腫瘍は壊死部分を除去した後に、眼科用鉗にて細片、糊状とした。細片組織を細胞培養液 RPMI (GIBCO) に浮遊させガーゼにて濾過し、 $1,200\text{rpm}$ 5 分遠沈した後に、RPMI にて細胞濃度が約 5×10^7 個/ml となるように調製した。

2) 実験動物の作製：マウス背部の毛を鉗と脱毛剤にて除去し、先に調製した癌細胞浮遊液を 0.1ml (約 5×10^6 個) 背部の皮下に注入して移植した。腫瘍は 2~3 日後には触知可能となり、実験に適した大きさになった腫瘍を用いることとした。

3) 衝撃波発生装置および照射方法 (図 1, 2)：衝撃波発生装置 (東芝) は、発生源に piezoceramics を用いている。この装置は直径 33cm 、曲率半径 26cm の半球面に扇型凹面状の piezoceramics が緻密に貼られている。中央部には、位置合わせ用の超音波診断装置のプロープが取り付けられている。この piezoceramics に、高電圧駆動回路から高電圧 pulse 波 (印加電圧 1.3 kV) が印加されることにより衝撃波が発生する。発生した衝撃波は、アプリーケーター内の脱気水、ウレタン製のアプリーケーター膜、そして生体へと伝播し、照準部に収束する。衝撃波の焦点部の最高圧力領域の半値幅は $1\times1\times20\text{mm}$ で、最大圧力は 100MPa 、3 発/秒にて 1 回治療に $1,000$ 発照射した。今回用いた MBT-2 皮下腫瘍は、全て隆起性の腫瘍となるため、超音波で位置合わせが可能で、照射に際してマウスの体の位置をずらしながら腫瘍全体を照射するように行った。治療中マウスは、エーテル吸入麻酔と pentobarbital sodium による腹腔内麻酔 ($20\sim30\text{mg/kg}$) にて固定した。

4) 腫瘍体積の測定方法：腫瘍体積の測定は、腫瘍形状をほぼ楕円体とみなし、slide caliper にて長径 a 、短径 b 、高さ c を 1 日おきに測定し、 $\pi\times1/6\times a\times b\times c$ で計算した²⁾。

5) 抗腫瘍効果：抗腫瘍効果は、治療後 14 日目の腫瘍体積の相対増殖率 (14 日目の腫瘍体積 V_{14} /治療時の

図1 HESW 発生装置および照射方法：ピエゾ素子から発生した衝撃波は、脱気水中を伝播し、ウレタン膜を介して、超音波にて照準したマウス皮下腫瘍に到達する。

図2 HESW 照射の実際：矢印は皮下腫瘍の中心部に照準したところ、皮下腫瘍は線で囲ってある。

腫瘍体積 V_0) で評価した。有意差は Mann-Whitney の U 検定にて検定した²⁾。

6) 累積生存率：累積生存率は Kaplan-Meier 法を用いて計算を行い、差の検定には一般化 Wilcoxon 検定を用いた³⁾。

7) 抗癌剤：臨床膀胱癌に治療効果が認められている carboplatin (以下 CBDCA, パラプラチン®, プリストル・マイヤーズスクイブ), pirarubicin (以下 THP, ピノルビン®, メルシャン・日本化薬) を用いて検討した。

方 法 II

1) HESW 照射による肉眼的および組織学的検討
HESW 照射直後 ($n=2$), 1 日後 ($n=2$), 3 日後 ($n=2$) に腫瘍形状を肉眼的に観察するとともに、腫瘍を摘

出し、HE 染色で組織学的に検討した。

2) 治療時腫瘍体積 10mm^3 未満の相対増殖率

癌細胞移植後 3 日目、腫瘍体積 10mm^3 未満を下記の 2 群に分け、1 回治療後の腫瘍相対増殖率を検討した。

① コントロール群 ($n=6$)：無治療群で、治療開始時の腫瘍体積 6.5 ± 0.7 (mean $\pm$ S.D.) mm^3 ($5.9 \sim 7.8 \text{mm}^3$)

② HESW 単独群 ($n=8$)：HESW 照射のみ行い、腫瘍体積 $5.6 \pm 1.0 \text{mm}^3$ ($3.9 \sim 7.0 \text{mm}^3$)

3) 治療時腫瘍体積 $10 \sim 35 \text{mm}^3$ の相対増殖率と累積生存率

癌細胞移植後 4～5 日目、腫瘍体積 $10 \sim 35 \text{mm}^3$ となったマウスを下記の群に分け、⑦群を除き 1 回治療後の相対増殖率と累積生存率を検討した。

① コントロール群 ($n=20$)：無治療群で、治療時の腫瘍体積 17.5 ± 6.3 (mean $\pm$ S.D.) mm^3 ($10.0 \sim 31.2 \text{mm}^3$)

② HESW 単独群 ($n=11$)：HESW 照射のみ行い、腫瘍体積 $19.8 \pm 3.7 \text{mm}^3$ ($14.6 \sim 25.0 \text{mm}^3$)

③ THP 単独群 ($n=8$)：THP を 5mg/kg 腹腔内投与、腫瘍体積 $18.8 \pm 4.9 \text{mm}^3$ ($13.5 \sim 21.5 \text{mm}^3$)

④ CBDCA 単独群 ($n=6$)：CBDCA を 40mg/kg 腹腔内投与、腫瘍体積 $30.1 \pm 2.2 \text{mm}^3$ ($27.6 \sim 33.3 \text{mm}^3$)

⑤ THP+HESW 群 ($n=9$)：THP を 5mg/kg 腹腔内投与 15 分後に HESW 照射、腫瘍体積 $19.2 \pm 5.2 \text{mm}^3$ ($10.4 \sim 27.0 \text{mm}^3$)

⑥ CBDCA+HESW 群 ($n=8$)：CBDCA を 40mg/kg 腹腔内投与 15 分後に HESW 照射、腫瘍体積 $24.2 \pm 6.3 \text{mm}^3$ ($10.4 \sim 31.2 \text{mm}^3$)

⑦ CBDCA+HESW 2 回治療群 ($n=9$)：CBDCA と HESW の併用を 1 週間後にもう一度計 2 度併用、腫瘍体積 $19.2 \pm 5.4 \text{mm}^3$ ($15.6 \sim 32.8 \text{mm}^3$)

4) HESW が転移を誘発するか否かの検討

下記の 5 群について、治療開始 19 日以降に死亡したマウスの腹腔内を観察した後、肺および肝臓を摘出して肉眼的および組織学的に転移の有無につき検討した。

衝撃波非照射群

① コントロール群 ($n=6$)

② CBDCA 群 ($n=5$)

衝撃波照射群

③ HESW 群 ($n=5$)

④ CBDCA+HESW 群 ($n=6$)

⑤ CBDCA+HESW 2 回治療群 ($n=5$)

結 果

1) HESW 照射による肉眼的および組織学的検討 (図 3, 4, 5, 6)

肉眼的には、照射直後は腫瘍周辺に点状の皮下出血が認められ (図 3 上), 皮下を観察すると腫瘍及びその周辺に出血が認められた (図 3 下). 照射 1 日後には皮下の出血部位は認められにくくなり, 照射 3 日後には腫瘍の陥没がみられはじめた (図 4 左).

組織学的には、照射直後腫瘍内に著しい出血が広範に認められ (図 5 上), なかには腫瘍を貫く形で带状の出血がみられた (図 5 下). 照射 1 日後には出血巣に囲まれた部位に、癌細胞の崩壊がみられはじめ (図 6 上), 照射 3 日後には腫瘍底部から上部にかけて境界が明瞭で、一様な壊死巣が広範に出現した (図 4 右, 図 6 下).

2) 治療時腫瘍体積 10mm^3 未満の相対増殖率 (図 7)

14日後の腫瘍相対増殖率は、コントロール群 359.7 ± 278.5 (mean $\pm$ S.D.) ($93.9 \sim 768.9$), HESW 群 188.9 ± 155.6 ($8.7 \sim 394.4$) であった. 平均値では HESW 群が約 $1/2$ の値を示したが, 統計学的に有意差は認めなかった.

3) 治療時腫瘍体積 $10 \sim 35\text{mm}^3$ の相対増殖率と累積生存率

各群の14日目の腫瘍相対増殖率は、①コントロール

図 3 HESW 照射直後の肉眼的観察：(上) 腫瘍部分に点状の皮下出血を認めた。(下) 皮下を観察すると、腫瘍とその周辺に出血を認めた。

図 4 HESW 照射 3 日目の観察：(左) 腫瘍表面に陥没が出現してきた。(右) HE 染色 ($\times 20$) では、腫瘍底部から上部にかけて、境界の明瞭で広範な腫瘍壊死が認められた。

図5 HESW照射直後の腫瘍組織(×400, HE染色): (上) 腫瘍組織に広範に著しい出血がみられた。(下) 腫瘍組織を貫く形で、帯状の出血がみられた。

図6 HESW照射1日後と3日後の腫瘍組織(×400, HE染色): (上) 照射1日後; 出血巣に囲まれる部分に崩壊した癌細胞が認められる。(下) 照射3日後; 境界の明瞭で、広範で一様な壊死巣が出現した。

群 152.2 ± 146.6 (1.9~594.9), ② HESW 単独群 116.3 ± 98.8 (0.2~271.6), ③ THP 単独群 75.7 ± 110.7 (1.8~315.4), ④ CBDCA 単独群 90.7 ± 61.6 (8.5~190.4), ⑤ THP+HESW 群 75.8 ± 72.2 (0~247.6), ⑥ CBDCA+HESW 群 3.2 ± 4.5 (0.3~13.5), ⑦ CBDCA+HESW 2 回治療群 0.8 ± 1.3 (0.1~4.3) であった。

HESW 単独群, THP 単独群, CBDCA 単独群, THP+HESW 群ではいずれもコントロール群と比較して平均値で低い値を示したが, 統計学的有意差を認めなかった。しかし CBDCA と HESW の 1 回併用でコントロール群と比較して有意に低い値を示し ($p < 0.01$), 2 回併用では control 群 ($p < 0.01$), および 1 回併用群 ($p < 0.05$) と比較しても有意に低い値を示し, 9 頭中 4 頭が腫瘍体積 0 となった(図 8, 9, 10)。各群において, 腫瘍体積測定とともに体重を測定したが, 治療後体重の減少はみられず, また体重の増加も差はみられなかった。

図7 治療時腫瘍体積 10mm^3 未満の腫瘍の相対増殖率: 14日目の腫瘍相対増殖率では, HESW 群がコントロール群に比べ約 1/2 の値を示したが, 有意差を認めなかった。

累積生存率は, HESW 単独群, THP 単独群, CBDCA 単独群, THP+HESW 群ではコントロール群と比較して有意な差を認めず, THP 単独群はむしろ

図8 コントロール群と HESW 群の腫瘍相対増殖率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : 14日目の腫瘍相対増殖率で, コントロール群と HESW 群に有意差を認めなかった。

図9 コントロール群, THP 群, THP+HESW 群の腫瘍相対増殖率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : 14日目の腫瘍相対増殖率で, コントロール群, THP 群, THP+HESW 群に有意差を認めなかった。

図10 コントロール群, CBDCA 群, CBDCA+HESW 群, CBDCA+HESW 2回併用群の腫瘍相対増殖率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : 14日目の腫瘍相対増殖率で, コントロール群に比べ CBDCA 群は有意差を認めないが, CBDCA+HESW 群と CBDCA+HESW 2回併用群では有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。

図11 コントロール群と HESW 群の累積生存率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : コントロール群と HESW 群で有意差を認めなかった。

図12 コントロール群, THP 群, THP+HESW 群の累積生存率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : コントロール群と比べ THP 群で有意に低かったが ($p < 0.05$), THP+HESW 群では有意差を認めなかった。

図13 コントロール群, CBDCA 群, CBDCA+HESW 群, CBDCA+HESW 2回併用群の累積生存率 (治療時腫瘍体積 $10\sim 35\text{mm}^3$) : コントロール群に比べ CBDCA 群は有意差を認めないが, CBDCA+HESW 群と CBDCA+HESW 2回併用群で有意に累積生存率が高かった ($p < 0.05$)。

ろ有意に低かった。しかし、CBDCA+HESW 群と CBDCA+HESW 2 回併用群でコントロール群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図11, 12, 13) (各群でみられる打ち切り例は、その時点で経過観察を止めたマウスを示す)。

4) HESW が転移を誘発するか否かの検討

転移が認められたのは肺のみで、全て結節型の肺転移であった。肝転移およびリンパ節転移はみられなかった。肺転移の頻度は、衝撃波非照射群 2/11 (①コントロール群 1/6, ②CBDCA 群 1/5), 衝撃波照射群 1/16 (③HESW 群 0/5, ④CBDCA+HESW 群 0/6, ⑤CBDCA+HESW 2 回併用群 1/5) であった。衝撃波非照射群と照射群とで差は認められなかった。

考 察

固型癌に対して、手術療法、化学療法、放射線療法が主に行われているが、現在尿路結石治療の主流となっている水中衝撃波を新しく加えることができれば、癌治療に対する新しい戦略を我々は得ることとなる。

高エネルギー水中衝撃波 (HESW) を *in vivo* において癌組織に照射する試みは、1985年 Russo らがラットの前立腺癌 (R3327AT-3) をラット大腿に移植し、HESW 照射にて腫瘍増殖の抑制がみられたことを報告したことから始まった⁴⁾。我々の教室でも星が、anaplastic squamous cell carcinoma である VX2 癌を用いて実験的膀胱癌を作製し、1日の HESW 照射では部分的壊死が、2～3日の照射で広範な腫瘍壊死が生じることを報告した⁵⁾。また8～10日の連続照射で腫瘍増殖抑制効果と腫瘍血管の破綻を認め、さらに HESW 照射は肺転移を誘発しないこと⁶⁾、THP との併用にて併用効果が生じることを報告した⁷⁾。今回は HESW の臨床応用に向けてのさらなる基礎実験として、同系マウスへ移植可能な未分化型膀胱癌である MBT-2 を用いて皮下腫瘍を作製して検討した。

今回用いたマウス MBT-2 癌は、1973年に Soloway らによって同系マウスへの移植可能癌として確立された未分化型膀胱癌である¹⁾。形態的にも組織学的にもヒト膀胱癌に類似しているため、今までに膀胱癌モデルとして数多く利用されてきた⁸⁾。

今回の実験では、照射直後に著しい腫瘍内出血が認められ、照射1日後に出血巣に囲まれる部分に核の染色性が落ちてくる細胞や、核の崩壊しはじめた細胞が出現しはじめた。そして、照射3日後には境界の明瞭

な、コントロール群に見られる腫瘍壊死とは明らかに異なる、一様な壊死巣が広範に出現した。この明らかな壊死巣と生存細胞の混在は、癌細胞が受けた HESW の照射数の違いによるものと考えられた。今回の実験では、腫瘍に対する照準は超音波を用い、腫瘍全体に均一に HESW を照射したつもりだったが、実験装置の超音波による照準方法の限界のためか、あるいは HESW 照射数が1回1,000発では少なかったためか、全領域の癌細胞に致死量の HESW を照射することは出来なかったと考えられた。文献的に HESW 単独にて腫瘍増殖抑制効果の有りとする報告と、単独では腫瘍増殖抑制効果は無しとする報告がみられ⁹⁾¹⁰⁾、今回の実験では HESW 単独1回治療では明らかな腫瘍増殖抑制効果は認められなかった。Oosterhof らはヒト腎細胞癌のヌードマウス移植腫瘍で、48時間毎に800発ずつ計4回照射にて腫瘍増殖抑制がみられたが、48時間毎に1,500発ずつ計4回の照射ではより腫瘍増殖抑制がみられたこと、また1回800発の照射では24時間毎2回の照射より6回照射した方が腫瘍増殖抑制がみられたことを報告している¹¹⁾。今回の実験では衝撃波照射単独の1,000発1回のみでは腫瘍増殖抑制はコントロール群に比較してみられなかったが、1回の照射数を増やすか、または2回3回と繰り返せば組織学的検討からも増殖抑制がみられる可能性があり、今後更に検討が必要と考えられた。腫瘍に対する HESW の照射は、1カ所への照射よりも4カ所以上、特に腫瘍辺縁の照射でより大きな効果が得られたとの Weiss らの報告もあり¹²⁾、HESW のより正確な照準方法とより効果的な照射方法についての工夫が必要と考えられた。具体的には照準に用いる超音波の精度を上げ、腫瘍全体に様に照射し、さらに正常組織への誤射を防ぐ方法を開発することであろう。Russo らも HESW 照射後に腫瘍内に出血を認めており¹³⁾、また星らは type 4 コラーゲンに対する polyclonal antibody を用いて腫瘍血管の基底膜の免疫染色を行い、HESW 照射により腫瘍血管に損傷が生じていることを認めている⁶⁾。庵谷らは犬生体腎に HESW を照射し、血腫形成と間質のびまん性出血を認め、それらの原因は弓状動脈、小葉間動脈の内弾性板の断裂と動静脈短絡の形成が原因だろうと述べている¹⁴⁾。さらに斎藤らは HESW を家兎腎に照射し、電子顕微鏡にて近位尿細管細胞における空胞形成および刷子縁とミトコンドリア等の細胞内小器官の破壊を観察し、¹⁵⁾ また VX2 膀胱癌では腫瘍細胞間の離開を観察している¹⁶⁾。これらの報告から

HESW 照射による壊死の出現は、腫瘍血管損傷による血流障害と腫瘍細胞に対する直接的な損傷によることが考えられる。HESW の組織障害の機序に関しては、膨張波によるキャビテーション現象、水撃作用(流れ)による剪断応力¹⁷⁾¹⁸⁾、熱作用、free radical¹⁹⁾などが作用していると考えられる²⁰⁾。また HESW 照射により G2, M 期細胞の減少の報告もあり²¹⁾²²⁾、組織的には明らかな障害を受けなかった細胞には細胞周期に影響を与え、腫瘍増殖に影響を及ぼすのかもしれない。細胞周期の変化は、後述の薬剤併用に関係してくる可能性がある。いずれにせよ今回の組織学的検討では、癌細胞に対する致死量の HESW が照射されれば、癌細胞は壊死に陥るのは間違いなく、いかに正確に致死量以上の HESW を癌組織全体に照射し、しかも宿主には大きな影響を与えないということが大切な問題となるであろう。

組織学的検討では、HESW 照射単独にて腫瘍に壊死が生じるのは明らかで、衝撃波の照準の工夫と治療回数を増やすことにより、HESW 単独にても腫瘍増殖抑制効果を得ることは可能と考えられた。

一方、抗癌剤との併用による検討では、CBDCA と HESW の併用により有意に腫瘍増殖抑制を示し、累積生存率も有意に高かった。これまでの報告では、抗癌剤と HESW の併用について、Randazzo らは adriamycin に併用効果があり、cisplatin には併用効果がみられなかったと報告し²²⁾、Oosterhof らはやはり adriamycin に併用効果があり、vinblastine には併用効果はみられなかったと報告¹¹⁾、Lee らは cisplatin と併用効果があったと報告している²⁴⁾。星らは pirarubicin (THP) との併用でより広範に腫瘍壊死が出現したと報告している⁷⁾。今回の実験において、HESW と併用効果のみられたのは carboplatin (CBDCA) で、pirarubicin (THP) では併用効果がみられなかった。CBDCA+HESW 2 回治療群では 9 頭中 4 頭で腫瘍が完全退縮した。しかし癌に対する HESW 照射はあくまで局所療法であり、致死量以上の照射を免れた癌細胞は増殖を続けていくこととなる。CBDCA の併用療法は、壊死まで至らないが、何らかの障害を受けた癌細胞群に作用し、単独では殺細胞効果を示さなかった低濃度の CBDCA に効果を示したのかもしれない。CBDCA と HESW の相乗効果の機序は、HESW 照射による癌細胞の CBDCA の取込みの促進と薬剤感受性の亢進、HESW による障害を受けた細胞の回復過程を CBDCA が阻害する。HESW 照射により CBDCA

そのものが変化する等が考えられる。今回の実験では、THP とは併用効果はみられなかったが、この違いは今後の検討事項である。

転移頻度に関しては、HESW 照射群と非照射群とで差はみられなかった。星らは家兎 VX2 膀胱癌で、HESW 照射は肺転移を誘発しないと報告し⁶⁾、Gamarrá らはハムスターのメラノーマ皮下腫瘍で、HESW 照射はリンパ節転移を誘発しなかったと報告している²⁵⁾。しかし桑原らは、家兎 VX2 腎癌モデルに対する HESW 照射では肺転移が促進される可能性を示唆している²⁶⁾。腎臓のような血流の非常に豊富な組織での腫瘍に対する HESW 照射は、破綻する血管の数が多いため転移が促進される可能性があるのかもしれない。HESW 照射の癌治療への応用の 1 番の問題点は、転移の誘発の有無にあると言える。皮下腫瘍モデル、膀胱癌モデル、腎癌モデルと各報告者によりモデルが異なり、また癌の組織型が異なるため一概には論じられないが、転移に関しては各腫瘍の血管構築と組織型が大きな影響を与えることは間違いなく、今後さらに検討が必要と考えている。

龍治らは、培養細胞に衝撃波を照射すると adriamycin の細胞内への透過性が高まることを報告しているが²⁷⁾、先に報告した家兎 VX2 膀胱癌を用いた実験では、THP 静注後 HESW を照射すると腫瘍内 THP 濃度がむしろ有意に低くなった²⁸⁾。抗癌剤の HESW 照射後の腫瘍組織内濃度は、それぞれの腫瘍の血管構築と HESW による血管障害の程度の違いに加えて、HESW による癌細胞膜の透過性の変化が複雑に関係してくると考えられるので、in vivo の実験は in vitro の成績のように単純ではない。単に抗癌剤の組織内濃度や細胞内濃度が重要なのではなく、今回の実験で CBDCA と HESW との併用で相乗効果がみられたことは、臨床応用に明るい光を与えるものであろう。抗癌剤と HESW の併用効果の機序につきさらに検討が必要である。

結 語

マウス膀胱癌 (MBT-2) の皮下移植腫瘍に対し、高エネルギー水中衝撃波 (HESW) と抗癌剤を併用して以下の成績を得た。

1. HESW 照射単独にて癌組織に壊死が生じた。HESW 照射直後、腫瘍組織内に著しい出血を認め、1 日後には癌細胞の崩壊が始まり、3 日後には境界の明瞭で一様な壊死巣が広範に出現した。

2. HESW 照射単独では、統計学的に有意な腫瘍増

殖抑制効果はみられなかったが、腫瘍体積が小さいもの (<10mm³) で、その傾向がみられた。

3. CBDCA と HESW 照射の併用で、有意な腫瘍増殖の抑制と累積生存率の延長が認められた。

4. 転移は肺のみにみられ、HESW 照射群と非照射群とで差は認められなかった。

5. 今後 HESW 照射の癌治療への臨床応用は、腫瘍組織への正確な HESW 照射と適切な抗癌剤との併用にて、十分期待できるものと考えられた。

文 献

- 1) Soloway, M.S., Dekernion, J.B., Rose, D. and Persky, L.: Effect of chemotherapeutic agents on bladder cancer: a new animal model. *Surg. Forum*, 13, 542—544, 1973.
- 2) 野村達次, 櫻井欽夫, 稲葉 實編著: ヌードマウスと抗癌剤評価, 初版, 107—213, 蟹書房, 東京, 1991.
- 3) 日本癌治療学会, 癌の治療に冠する合同委員会癌規約総論委員会 編: 日本癌治療学会・癌規約総論, 初版, 15—30, 金原出版, 東京, 1991.
- 4) Russo, P., Heston, W.D.W. and Fair, W.R.: Suppression of in vitro and in vivo tumor growth by high-energy shock waves. *Surg. Forum*, 36, 646—648, 1985.
- 5) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M.: The effect of high-energy underwater shock waves on implanted urinary bladder cancer in rabbits. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 317—319, 1991.
- 6) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Yoshikawa, K., Saitoh, S., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M.: High energy underwater shock wave treatment on implanted urinary bladder cancer in rabbits. *J. Urol.*, 146, 439—443, 1991.
- 7) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Shirai, S., Yoshikawa, K. and Nose, M.: Shock wave and THP-Adriamycin for treatment of rabbit's bladder cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 248—250, 1992.
- 8) Soloway, M.S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, 37, 2918—2929, 1977.
- 9) Laudone, V.P., Morgan, T.R., Hutyk, R. F., Heston, W.D.W. and Fair, W.R.: Cytotoxicity of high energy shock waves: methodologic considerations. *J. Urol.*, 141, 695—968, 1989.
- 10) Geldof, A.A., Voogt, H.J.D. and Rao, B.R.: High energy shock waves do not affect either primary tumor growth or metastasis of prostatic carcinoma, R3327-MatLyLu. *Urol. Res.*, 17, 9—12, 1989.
- 11) Oosterhof, G.O.N., Smits, G.A.H., de Ruyter, A. E., Schalken, J.A. and Debruyne, F.M.J.: In vivo effects of high energy shock waves on urological tumors: an evaluation of treatment modalities. *J. Urol.*, 144, 785—789, 1990.
- 12) Weiss, N., Delius, M., Gambihler, S., Dirschedl, P., Goetz, A. and Brendel, W.: Influence of the shock wave application mode on the growth of AMEL3 and SSK2 tumors in vivo. *Ultrasound Med. Biol.*, 16, 595—605, 1990.
- 13) Russo, P., Mies, C., Huryk, R., Heston, W.D.W. and Fair, W.R.: Histopathologic and ultrastructural correlates of tumor growth suppression by high energy shock waves. *J. Urol.*, 137, 338—341, 1987.
- 14) Ioritani, N., Kuwahara, M., Kambe, K., Taguchi, K., Saitoh, T., Shirai, S. and Orikasa, S.: Renal tissue damage induced by focused shock waves. *Am. Inst. Phys. Conf. Proc.*, 208, 185—190, 1989.
- 15) 斎藤敏典, 折笠精一, 庵谷尚正, 神部広一, 桑原正明, 田口勝行, 白井修一, 目時利林也: 衝撃波照射による腎組織損傷—超微細構造からの観察—. *日泌尿会誌*, 83, 23—32, 1992.
- 16) 斎藤敏典, 折笠精一, 星 宣次, 桑原正明, 鈴木謙一, 庵谷尚正, 田口勝行, 白井修一: VX2癌超微細構造への衝撃波の影響. 平成4年度衝撃波シンポジウム講演論文集, 635—638, 1993.
- 17) Kambe, K., Kuwahara, M., Orikasa, S. and Takayama K.: Mechanism of fragmentation of urinary stones by under water shock wave. *Urol. Int.*, 43, 275—281, 1988.
- 18) Kuwahara, M., Ioritani, N., Kambe, K., Taguchi, K., Saitoh, T., Igarashi, M., Shirai, S. and Orikasa, S.: Acoustic cavitation bubbles in the kidney induced by focused shock waves in extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). *Am. Inst. Phys. Conf. Proc.*, 208, 173—178, 1989.
- 19) Morgan, T.R., Laudone, V.P., Heston, W.D.W., Zeitz, L. and Fair, W.R.: Free radical production by high energy shock waves-comparison with ionizing irradiation. *J. Urol.*, 139, 186—189, 1988.
- 20) 折笠精一: 体外衝撃波碎石術と水中衝撃波の生体に及ぼす影響. *日泌尿会誌*, 82, 1027—1044, 1991.
- 21) Russo, P., Stephenson, R.A., Mies, C., Huryk, R., Heston, W.D.W., Melamed, M.R. and Fair, W. R.: High energy shock waves suppress tumor growth in vitro and in vivo. *J. Urol.*, 135, 626—628, 1986.

- 22) 梅川 徹, 石川泰章, 児玉光正, 片山孔一, 高村和論, 高田昌彦, 片岡喜代徳, 郡健二郎, 井口正典, 栗田 孝: 高エネルギー衝撃波のBBN誘発ラット膀胱癌に対する抗腫瘍効果について. 日泌尿会誌, **82**, 1391—1398, 1991.
- 23) Randazzo, R.F., Chaussy, C.G., Fuchs, G. J., Bhuta, S.M., Lovrekovich, H. and de Kernion J. B.: The in vitro and in vivo effects of shock waves on malignant cells. *Urol. Res.*, **16**, 419—426, 1988.
- 24) Lee, K., Smith, P. and Cokett, A, T, K.: Influence of high-energy shock waves and cis-platin on antitumor effect in murine bladder cancer. *Urology.*, **36**, 440—444, 1990.
- 25) Gamarra, F., Spelsberg, F., Dellian, M. and Goetz, A.E.: Complete local tumor remission after therapy with extracorporeally applied high energy shock waves (HESW). *Int. J. Cancer.*, in press.
- 26) 桑原正明, 星 宣次, 庵谷尚正, 斎藤敏典, 折笠精一, 高山和喜: 衝撃波の生体に及ぼす影響: 兎腎癌モデルによる検討. 平成4年度衝撃波シンポジウム講演論文集, 151—154, 1993.
- 27) 龍治 修, 伊藤文夫, 中村倫之助, 中沢速和, 東間紘,: 衝撃波による細胞障害の検討. 第4回日本EE総会抄録集, p.86, 1990.
- 28) 鈴木謙一, 折笠精一, 星 宣次, 桑原正明, 吉川和行, 大山 力, 佐藤 信, 川村貞文: 抗エネルギー水中衝撃波による家兎VX2膀胱癌の治療—衝撃波とTHP-ADM組織内濃度について—. 日泌尿会誌, **84**, 1007—1012, 1993.