シンポジウム I

ラット移植舌癌における Electrochemotherapy の 基礎的研究

長谷川 博 鹿野 真人* 佐藤 栄 需**
臼 潤 公 敏** 川 寄 建 治**

要旨：Electrochemotherapy (ECT) は腫瘍に高電圧パルスをかけることにより、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強する新しい治療法である。本研究では、口腔癌の治療を想定し、ラット扁平上皮癌細胞株 (SCC158) をラットの舌へ移植し、ECT の実験的検討を行った。方法は、ブレオマイシンを投与 30 分後に移植舌癌に高電圧パルス (1200V/cm, 0.1msec, 8 pulses) を加え、抗腫瘍効果について検討するとともに、腫瘍の変性効果、ならびに周囲組織の治療過程について組織学的に観察評価した。さらに、ECT における高電圧パルスの電圧を変化させ (125-1200V/cm, 0.1msec, 8 pulses), 組織学的に至適電圧を検討した。結果は、ECT 後 3 日目で、移植舌癌は消失し、組織学的にもほぼ完全に消失することが判明し、その治療過程は概して異常なく経過したが、電場内の正常組織も壊死変性した。また、ECT の抗腫瘍効果は電圧が 1000V/cm 以上で最も強く発現したが、電場内の正常組織の損傷も同時に高度となった。ECT は舌癌の優れた治療法であり、ヒト口腔癌への応用が期待されるが、今後、正常組織への損傷や転移誘発の問題を解決する必要がある。

キーワード：電撃化学療法, 舌癌

緒 言

Electrochemotherapy (ECT) は Mir ら¹⁾、沖野ら²⁾により提唱された治療法であり、高電圧パルスをかけることにより細胞膜に電氣的穿孔を生じさせ、癌細胞内に大量の抗癌剤を移入させて、抗腫瘍効果を増強するものである。近年、種々の細胞株でその優れた抗腫瘍効果が証明され³⁻⁵⁾、また、国外では、1993 年以降、皮膚癌での臨床応用^{6,7)}が散見され、今後、本邦においても臨床応用が期待される。一方、口腔癌での本療法の基礎的検討を行った報告⁸⁻¹⁰⁾は数少なく、その効果については不明な点が多い。そこで、口腔癌への臨床応用を想定し、ラット移植舌癌モデルを

用いて、本療法の有用性を検討したので報告する。

材料と方法

1. 動物

6～7 週齢 (100～150g) のフィッシャー系雌性ラット (日本クレア, 東京) を使用した。また、本研究は福島県立医科大学動物実験方針に基づいて実験を行った。

2. 腫瘍細胞と抗癌剤

ラット扁平上皮癌細胞株 SCC158 を用いた。SCC158 細胞は外耳道由来の自然発生扁平上皮癌であり、JCRB 細胞銀行 (Japanese Cancer Research Resources Bank, 東京) より供与を受けた。また、抗癌剤は Bleomycin (BLM) (日本

大原総合病院歯科口腔外科 (主任：長谷川博部長)

*福島県立医科大学耳鼻咽喉科 (主任：大谷 巖教授)

**福島県立医科大学歯科口腔外科 (主任：川寄建治助教授)
〔2000 年 7 月 31 日受付, 2000 年 8 月 18 日受理〕

図 1 舌への高電圧パルス付加
舌に移植した腫瘍を *in vivo* 用電極で挟み、高電圧パルスを加えた。

化薬、東京)を用いた。

3. 装置

高電圧パルス発生装置は、BTX 社 (San Diego, CA, USA.) の Electro-square porator T820 を、また、パルス解析装置は Optimizer (BTX 社) を用い、高電圧パルス発生装置に接続し、実効波形を計測した。電極は *in vivo* 用電極 (Unique medical IMADA 社、宮城) を用い、腫瘍を挟み込み電圧を加えた。

4. 実験方法

(1) 舌への移植方法

in vitro で大量培養した SCC158 細胞をラットの背部に移植し、増殖が安定するまで背部で継代した。その後、背部の腫瘍を採取し、腫瘍片を金属メッシュで擦り潰し、PBS 中に浮遊させ、細胞数を 1×10^8 個/ml に調整した。この細胞浮遊液 0.025cc (細胞数: 2.5×10^6 個) を 27G 針付 0.25cc シリンジにて舌右側縁部の粘膜下に移植した^{9,10)}。

(2) ECT の抗腫瘍効果

SCC158 細胞を移植後、腫瘍長径が 4 mm 前後になったラットを無作為に、それぞれ以下の 4 群に分けた。A. 無処置対照群、B. BLM 単独投与群: ラットにおける最大耐量である LD₅₀ の 1/10 量 (3~4 mg) を皮下注で投与、C. 高電圧パルス単独投与群: 設定電圧 1200V/cm、パルス幅 100 μ sec、パルス回数 8 回で高電圧パルスのみを負荷、D. ECT 群: BLM 皮下注後、30 分後に高電圧パルス単独投与群と同じ設定で高電圧パルスを負荷。また、高電圧パルス負荷はエーテル麻酔下で行い、ピンセットでラットの舌を牽引し、唾液を拭きとつ

た後、Electolyte jelly (マイオトロニクス社、Seattle, USA) を塗布し、*in vivo* 用電極を接触させ行った (図 1)。

効果判定は、以下に述べる方法で行った。まず、処置後それぞれ経日的に長径 (L)、短径 (W)、高さ (H) を 10 日目まで歯科用ノギスで測定し、*n* 日目の腫瘍体積 (V_n) を次式¹¹⁾にて算出した。

$$V_n = \pi / 6 \times L_n \times W_n \times H_n$$

さらに、治療直前の腫瘍体積 V_0 に対する *n* 日目の腫瘍体積 V_n の比 (V_n/V_0) を腫瘍増殖率 (Tumor growth rate: TGR_n) として算出し、各群間の TGR の比較は、Student T-test を用い、5% 以下を有意差ありと検定した。なお、ECT 群では、治療後約 1~2 日間は強い浮腫が生じ、正確な計測が困難であったため、浮腫の減退する 3 日目より腫瘍体積を測定した。測定を終了したラットは屠殺後、舌を摘出し、10%ホルマリンで固定、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した上で、下里の分類^{12,13)}による組織学的抗腫瘍効果の判定に供した。

(3) ECT 後の治癒過程

ECT 施行後の経時的治癒過程を明らかにするため、ECT 後、1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、14 日目に屠殺し、舌の肉眼的組織学的変化を検討した。なお、本実験に供したラットはそれぞれ各 2 匹、ECT の条件は (2) と同じである。

(4) ECT における電圧の影響

ECT における電圧の影響を検討するため、以下の実験を行った。電気条件はパルス幅を 100 μ sec、パルス回数を 8 回と固定し、ラット舌に対し、設定電圧を 125~1000V/cm まで変化させ、ECT を行い、3 日目に屠殺し、移植舌癌に対する組織学的効果を前述と同様に判定した。同時に、各群における腫瘍に近接した正常組織への影響についても光顕的に観察評価した。

結 果

(1) ECT の抗腫瘍効果

本実験系では、すべてのラットが処置後 10 日間生存し、腫瘍の測定が可能であった。それぞれの TGR は高電圧パルス単独投与群では対照群に対し 1~3 日目までは有意に増大し、7 日目まで増

図 2 各群における Tumor growth rate.

大し続けたが、7～10日目ではむしろ減少した。BLM 単独投与群では高電圧パルス単独投与群とはほぼ同様で、1～7日目までは対照群に対し増大傾向を示したが、7～10日目ではむしろ減少した。一方、ECT 群では、腫瘍は6匹全例において肉眼的に消失し、3日目以降は腫瘍を触知できなくなった。10日目の TGR を統計学的に検定すると、ECT 群と他群で有意差を認めた ($p<0.01$) が、その他の各群間では有意差を認めなかった (図2)。10日目の組織学的抗腫瘍効果は高電圧パルス単独投与群では下里分類で Grade 0-5 匹、BLM 単独投与群では Grade 0-2 匹、Grade I-3 匹、と抗腫瘍効果は認めなかったが、ECT 群では Grade IV-5 匹、Grade III-1 匹と、6匹中5匹に組織学的に腫瘍消失が認められた。

(2) ECT 後の治療過程

それぞれの群の特徴的な肉眼的組織学的変化について、以下に示す。

(1) 肉眼所見

ECT 後、1日目は電極が接触した部位を中心に舌全体に強い浮腫が見られ、腫瘍は触診上触れず、腫瘍測定は困難であった (図3-a)。この浮腫は1日目と2日目にかけてが最大であり、3日目前後より改善し、5日目には消失した。また、電極の接触部位は3日目より、上皮に一部壊死が見られ、5日目にはすべて壊死に陥り (図3-b)，7～10日目で壊死部は脱落した (図3-c)。その後、脱落部表層より肉芽組織が盛り上がり、14日目には上皮化し、ほぼ治療状態となった。

(2) 病理組織所見

図 3 .a. ECT 後1日目の肉眼所見。電極が接触した部位 (矢印) を中心に、全体的に強い浮腫が見られる。b. ECT 後5日目の肉眼所見。電極の接触部位はすべて壊死に陥っている (矢印)。c. ECT 後10日目の肉眼所見。壊死組織は脱落し、一部に肉芽組織が見られる (矢印)。

表 1 電圧と組織学的抗腫瘍効果

設定電圧 (V/cm)	125	250	500	750	1000	1200
ラット No 1	0	0	I	I	II b	III
2	0	I	I	II a	II b	III
3	0	I	II a	II b	III	III
4	0	I	II a	II b	III	III

1～2日目：間質には高度の浮腫および鬱血があり，癌巣中の癌細胞の大半は離解し，核の濃縮および細胞質の好酸化など変性壊死の所見を呈した。周囲組織では，上皮は電極が接触した部位で変性剥離していたが，非接触部位では変性は認めなかった。血管組織は，血管内皮細胞の核の腫大や血管内膜からの剥離を認め，一部に血管壁の壊死を認めた。筋組織は，電場内に限り，横紋の消失した細胞や核の変性した細胞が一部に見られた。3～4日目：浮腫はやや改善し，癌巣の大部分は出血壊死に陥り，残存した癌細胞も高度の変性壊死を示した。また，粘膜下組織全体が凝固壊死に陥っていた。5～6日目：浮腫はほぼ改善し，癌細胞は全く認めず，電場内に著明な壊死組織，好中球，形質細胞の浸潤が見られた。電場外の周囲組織では壊死組織を取り囲むように肉芽組織が増生進展した。7～10日目：壊死組織は脱落し，肉芽組織の増生進展が目立ち，再生上皮の進展を認めた。10～14日目：壊死脱落部は，ほぼ全層にわたり，再生上皮により被覆された。

以上の経時的観察から，①治療後1～3日目にかけて，強い浮腫とともに癌細胞が死滅すること，②7～10日目で電極に接触した部位が壊死脱落すること，③14日目では壊死脱落部位は周囲の上皮化によりほぼ治癒状態となることが判明した。

(3) ECT における電圧の影響

組織学的抗腫瘍効果は電圧の上昇に従い，増強傾向にあり，Grade III 以上の抗腫瘍効果は1000V/cm 以上の条件で認められた（表1）。また，それぞれのラットにおける，腫瘍に近接した電場内の正常組織の特徴的病理組織所見は，125V/cm 群では，上皮の配列の乱れや，小静脈の拡張と血管内皮細胞の核の円形化などが認められた。筋組織には特に変化を認めなかった。250V/cm 群では，上皮の一部が剥離し，小静脈ならびに小動脈の血

管内皮細胞の核の腫大が目立った。500V/cm 群では，上皮は広範囲に壊死脱離し，血管組織では毛細血管，リンパ管の拡張が著明となり，内皮細胞下の空腔変性や剥離が認められた。750V/cm 群では，血管およびリンパ管の拡張がさらに著明となり，血管壁の壊死を一部に認めた。1000V/cm 群および1200V/cm 群では，血管およびリンパ管の内皮細胞の剥離，変性が著明で，筋組織でも一部に，核の濃縮した変性細胞が認められた。

以上の結果，抗腫瘍効果は電圧の上昇により増強するが，腫瘍に近接した正常組織でも，電圧の上昇に従い，高電圧パルスの影響を強く受け，最終的には壊死に陥った。

考 察

本研究では ECT の口腔癌への臨床応用を想定し，ラット培養癌細胞株 SCC158 細胞を舌へ移植し，その抗腫瘍効果と治療過程ならびに，ECT の重要な条件である電圧負荷が組織に及ぼす影響について検討した。

ECT の抗腫瘍効果について，Mir ら¹⁾，沖野ら²⁾が，ECT を報告して以来，Lewis 肺癌，マウス膀胱癌など様々な癌細胞に有効性が認められ³⁻⁵⁾，BLM 以外でも cisplatin, mitomycin C, cyclophosphamide など有効とする報告³⁾がある。いずれの報告も背部皮下へ移植した腫瘍であるが，口腔癌のモデルでは Omura ら⁸⁾がハムスターの DMBA 誘発舌癌で，Hasegawa ら⁹⁾が移植舌癌で有効性を報告しており，その優れた抗腫瘍効果は異論がないと考えられる。

ECT 後の治療過程について，1～3日目にかけて，強い浮腫とともに癌細胞は死滅し，7～10日目に壊死脱落したが14日目にはほぼ治癒した。10日目のラットの舌を観察すると，壊死脱落部は肉眼的には正常な肉芽組織が盛り上がり，潰瘍形成等はなく，舌の動きも良好であった。しかしながら，電極に挟まれた組織全域が壊死脱落したことは，挟まれた組織に確実に電場がかかり，腫瘍周囲の正常細胞も損傷され壊死したことを意味する。すなわち，電氣的穿孔は癌特異的な現象ではないため，正常細胞にも大量の BLM が入り込み損傷したと考えられた。

電圧が組織に及ぼす影響について，電圧を125

～1200V/cm まで変化させて、その抗腫瘍効果を検討した結果、その効果は電圧の増加につれ増強し、強度の抗腫瘍効果は 1000V/cm 以上の条件で認められたが、周囲組織への影響は、比較的低電圧の 125V/cm でも軽度の上皮および血管内皮細胞の障害が見られ、1000V/cm では、上皮や血管など、電場内のほとんどすべての組織が変性した。従って、抗腫瘍効果の面からは 1000～1200V/cm 前後が至適電圧であるが、周囲組織損傷も強く、臨床応用を考える場合、この点について十分留意する必要がある。腫瘍に特異的に作用させる方法として、沖野ら¹⁴⁾は AH109A 移植腫瘍において、BLM 濃度を減少させることで、Dose-Response の相違により皮膚損傷が有意に減少したと報告している。また、omura ら⁸⁾は BLM 濃度を LD₅₀ の 1/100 量で行い、舌粘膜上皮の損傷はなかったと報告しており、今後、より腫瘍特異性の高い条件を明らかにする必要がある。また、ECT では組織学的に血管およびリンパ管も障害されることから、転移を促進する可能性も否定できず、この点も今後の実験に期待したい。

結 語

1. 本研究では、ラット培養癌細胞株 SCC158 細胞を舌に移植した実験系を用いて、Electrochemotherapy の基礎的検討を加えた。

2. BLM を用いた ECT では SCC158 移植舌癌は肉眼的に消失し、組織学的にもほぼ完全に消失することが確認された。

3. ECT 後の治癒過程について、治療後 1 日～3 日目にかけて、強い浮腫とともに癌細胞が死滅し、7～10 日目では、電極に接触した部位が壊死脱落したが、14 日目では、壊死脱落部位は周囲の上皮化によりほぼ治癒状態となった。

4. ECT の抗腫瘍効果は電圧の上昇に従い増強するが、電場内の正常組織の損傷も同時に高度となり、臨床応用のためには腫瘍特異性の高い条件や、転移への影響などを検討する必要があると考

えられた。

文 献

- 1) Mir, L.M., Orlowski, S., et al.: Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 27: 68-72, 1991.
- 2) Okino, M., Mohri, H.: Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78: 1319-1321, 1987.
- 3) 兼定博彦: 濃度依存性抗癌剤を用いた電撃化学療法 of 抗腫瘍効果—Lewis 肺癌に対する in vivo での検討—. *日癌治* 25: 2640-2648, 1990.
- 4) Yamaguchi, O., Irisawa, C., et al.: Potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses in mouse bladder tumor. *Tohoku J exp Med* 172: 291-293, 1994.
- 5) Heller, R., Jaroszeski, M., et al.: Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electroporation and chemotherapy. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 36: 83-87, 1995.
- 6) Belehradsek, M., Domenge, C., et al.: Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. *Cancer* 72-12: 3694-3700, 1993.
- 7) Mir, L., Glass, L., et al.: effective treatment cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 77: 2336-2342, 1998.
- 8) Omura, S., Tsuyuki, Y., et al.: In vivo antitumor effects of electrochemotherapy in a tongue cancer model. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 965-972, 1999.
- 9) Hasegawa, H., Kano, M., et al.: An electrochemotherapy model for rat tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 27: 249-254, 1998.
- 10) 長谷川博, 鹿野真人, 他: ラット移植舌癌の電撃化学療法における至適電気条件の検討. *日口外誌* 45: 80-87, 1999.
- 11) Steel, G.G.: Growth rate of tumours. Growth kinetics of tumors, Steel GG, Clarendon Press, Oxford, 1977, p 5-7.
- 12) 下里幸雄, 尾形利郎: 病理学的にみた肺癌の術前照射. *肺と心* 13: 332-338, 1966.
- 13) 大星章一, 下里幸雄, 他: 放射線療法の病理. *医学のあゆみ* 61: 618-625, 1967.
- 14) 沖野基規, 富恵 博, 他: 電撃化学療法による腫瘍特異的選択毒性の誘導 —Dose Response Curve の解析より—. *Oncologia* 24: 1-79, 1991.

An experimental study of electrochemotherapy for a rat tongue carcinoma model

Hiroshi Hasegawa, Makoto Kano*, Eijyu Satoh*,
Masatoshi Usubuchi** and Tateharu Kawasaki**

Department of Dentistry and Oral Surgery,
Ohara General Hospital
(Chief : Hiroshi Hasegawa)

Department of Otolaryngology, Fukushima Medical College
(Chief : Prof. Iwao Otani)

Department of Dentistry and Oral Surgery,
Fukushima Medical College
(Chief : Associate Prof. Tateharu Kawasaki)

Abstract

Electrochemotherapy (ECT) is a new technique that enhances the antitumor effect of various anticancer agents by delivering high-voltage electrical impulses to the tumor. In the present study, ECT was used in the treatment of oral cancer using SCC158 cell, a rat squamous cell carcinoma, which was transplanted into the tongue. These tumors were subjected to high-voltage electrical impulses (1200V/cm, 0.1msec, 8 pulses) 30 minutes after the injection of bleomycin. The antitumor effect of ECT on these tumors was then evaluated, as were histological changes in the damaged tumor, and healing of the surrounding damaged tissue. In a further experiment, to determine the optimum voltage of electrical impulse histologically, these tumors received various electrical pulses (125-1200V/cm, 0.1msec, 8 pulses) in ECT.

As a result, the tongue tumors were no longer visible from the 3rd day after ECT, and histological examination revealed complete regression. The healing following ECT proceeded in an almost uneventful manner, but the normal tissue within the electrical field was necrotic. In addition, the antitumor effect of ECT appeared most strongly when the voltage was more than 1000V/cm; however, the surrounding normal tissue within the electrical field was seriously damaged.

In conclusion, ECT was shown to be an efficient therapy for treating tumors of the tongue, and it is expected to be applied to human oral cancer. It is hoped that problems related to damage to normal tissue and the inducement of metastasis will soon be resolved as a result of future investigations.

Key words : electrochemotherapy (ECT), tongue cancer

Requests for reprints to : Dr. Hasegawa H., Department of Dentistry and Oral Surgery, Ohara General Hospital, 6-11 omachi, Fukushima city, 960-8611, Japan.