原	著
---	---

VX2 癌移植家兎における Lipiodol Bleomycin リンパ管内 直接注入の影響に関する実験的研究

橋 本 賢 二

東京医科歯科大学歯学部第1口腔外科学教室（主任：塩田重利教授）

（1981年9月30日 受付）

Experimental Studies on the Effects of Intralymphatic Injection of Lipiodol Bleomycin in Rabbits with VX2 Carcinoma

Kenji Hashimoto

The First Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief: Prof. Shigetoshi Shioda)

The experiments were carried out in order to investigate the tissue distribution of Lipiodol Bleomycin (L-BLM; 15 mg/ml) among the various organs by the bioassay method using *Bacillus subtilis* and the histologic changes of the regional lymph nodes and other organs after intralymphatic injection of L-BLM (3mg/kg) in rabbits with VX2 carcinoma and their controls.

The summary of the results is shown below:

1) A high concentration of BLM in the control rabbits immediately after the injection was found in the blood, primary and secondary lymph nodes, skin, spleen, stomach and colon.

All of the organs examined in the rabbits with VX2 carcinoma showed a remarkable increase of BLM, as well as in the popliteal lymph nodes of the opposite side.

2) L-BLM injected intralymphatically to the experimental group showed an effective concentration and remained in the regional lymph nodes for 4 to 5 weeks and a clear suppressive effect of metastasis was found as compared with the non-injected group.

3) Histologic observation of the regional lymph nodes in the early stage after the injection showed oil droplets in the lymphonoduli and the surrounding tissues. Eosinophils and giant cells were found around the oil droplets in the lymphonoduli. These phenomena disappeared about 2 or 3 weeks after the injection.

Histologic investigations of the other principal organs after the intralymphatic injection of L-BLM showed a normal structure.

From the facts described above, it can be said that intralymphatic injection of L-BLM is a valuable method for the diagnosis and treatment of metastatic lymph nodes in the early stage.

目 次

I. 緒 言

II. 実験動物ならびに実験材料

1. 実験動物

2. 使用薬剤

3. 実験腫瘍

III. 実験方法

1. 注入リンパ管

2. 注入手技

3. リンパ系造影X線写真撮影
4. 移植癌転移リンパ節形成
5. Bleomycin 組織内濃度測定
6. 病理組織標本作製

IV. 予備実験

V. 成績

1. リンパ系造影X線写真
2. Bleomycin の組織内濃度
 - 1) 注入側膝窩リンパ節内濃度
 - 2) 注入側二次リンパ節内濃度
 - 3) 反対側膝窩リンパ節内濃度
 - 4) 血中濃度
 - 5) 尿中濃度
 - 6) 主要臓器内濃度
3. Lipiodol Bleomycin の健常家兎直接リンパ管内注入による組織の経時的変化
 - 1) リンパ節
 - i) 触知所見
 - ii) 肉眼所見
 - iii) 油滴分布所見
 - iv) 組織所見
 - 2) 主要臓器
4. Lipiodol Bleomycin の VX2 癌担癌家兎直接リンパ管内注入による組織の経時的変化
 - 1) リンパ節
 - 2) 主要臓器

VI. 考察

1. リンパ系造影法について
 - 1) 歴史と名称
 - 2) 方法
 - 3) 使用薬剤
2. Bleomycin の組織内濃度について
 - 1) 組織内濃度測定法
 - 2) 組織内濃度
 - i) 血中濃度
 - ii) リンパ節内濃度
 - iii) 他臓器内濃度
3. 組織学的変化について
4. リンパ系造影像について
5. リンパ系造影法の副作用

VII. 結 語

I. 緒 言

悪性腫瘍治療の原則は“早期発見・早期治療”であり、疑わしい浸潤・転移巣の系統的かつ徹底的な廓清手術ならびに術前、術後の放射線、化学療法の併用が最良の方法とされている。

口腔領域の悪性腫瘍の治療も、他領域のそれと同じく外科療法、放射線療法、化学療法および免疫療法が単独あるいは種々併用して行われ、原発巣に対しては、かなりの成績が得られるようになってきた。しかるに、悪性腫瘍の特徴の1つに転移形成があり、口腔領域の悪性腫瘍においても、所属リンパ節への転移が早期に、かつ高率に発現するため、その制御は予後を左右する重要な因子となっている。

転移リンパ節に対しては、根治的あるいは予防的に転移リンパ節を含めた所属リンパ節の廓清手術が最良とされるが、完全な廓清手術は極めて困難であり、術後さらに放射線照射や制癌剤、免疫療法剤などの投与が追加されるのが現状である。

しかし、放射線照射による発癌や放射線性骨疽、機能障害などの問題があるため、根治的大量照射には限界があり、また制癌剤においても、腫瘍細胞にのみ特異的に作用し、これを死滅させ、しかも正常細胞に対してなら障害を及ぼさないような理想的な薬剤が望まれるが、現存薬剤の従来の投与方法では薬剤を、リンパ節に高濃度かつ持続的に作用させることは期待できない。

したがって、これらの薬剤を集中的にリンパ管内に注入し、解剖学的に転移の可能性があるリンパ節や転移リンパ節、もしくは増殖以前の腫瘍細胞に直接作用させることができれば、リンパ系内の腫瘍細胞を破壊し、増殖の抑制、着床の防止さらに再発の制御や延命効果も期待できると思われる。

そこで、著者は、リンパ系に直接制癌剤を注入することにより、転移形成期のリンパ系内の腫瘍細胞が、いかなる影響を受けるかを知る目的で、造影性のある Lipiodol Bleomycin を用い、家兎

膝窩リンパ節を指標とし、リンパ節内濃度ならびに主要臓器内濃度を経時的に測定すると共に、リンパ節ならびに主要臓器の変化を組織学的に検索した。また、口腔領域の悪性腫瘍に、最も多い扁平上皮癌に類似した実験腫瘍 VX2 癌を移植し、同様の実験を行い興味ある知見を得たので報告する。

II. 実験動物ならびに実験材料

1. 実験動物

実験に使用した動物は、体重 2.5kg 前後の日本白色家兎で、本学医学部附属動物実験施設内の恒温 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$)、恒湿 ($55 \pm 5\%$) にて、Oriental RC-5 固型飼料と水で 1 週間以上飼育し、異常のないことを確認した後、実験に供した。

2. 使用薬剤

リンパ管の染色には、0.3% Evans blue を用いた。制癌剤は Lipiodol Bleomycin (以下 L-BLM と略す) を用いた。L-BLM は、Lipiodol Ultra Fluide (以下 LUF と略す) 1ml 中に BLM 15mg を含有するもので、日本化薬社より提供を受けた。注入量は 3 mg/kg とし、注入に当たり十分攪拌、均質化し使用した。

3. 実験腫瘍

Shope¹⁾、Kidd と Rous²⁾ らによって確立された家兎可移植性癌である VX2 癌を、当教室で安藤³⁾ の方法に準じ累代移植中のものを用いた。

III. 実験方法

1. 注入リンパ管

西田⁴⁾ によれば、家兎後肢リンパ系は、坐骨静脈と大伏在静脈とに随伴上行し膝窩リンパ節に流入する 2 つの経路があり、本実験では坐骨静脈随伴リンパ管を用いた。

2. 注入手技

Kinmonth^ら⁵⁾ に準じて行った。Nembutal (0.5 ml/kg 静注) 麻酔下に、家兎を背位に固定し、0.3% Evans blue 0.3 ml を足関節部に 1% Xylocain 0.5 ml とともに注入後、下腿外側部皮膚に約 3 cm の切開を加えると、筋膜上に数条の拡

張、青染したリンパ管が認められる。その 1 つに、26 Gauge Mantoux 針を刺入、絹糸にて結紮し、刺入点と結紮部に瞬間接着剤 (Aron Alpha®) 1 滴を滴下固定し、L-BLM 3mg/kg を注入した。

3. リンパ系造影 X 線写真撮影

L-BLM 注入直後ならびに屠殺時に X 線写真を撮影し、リンパ系造影を行った。撮影には、Yoshida Acmedental X ray 撮影装置を用い、焦点・Film 間距離 100cm、電圧 90kVp、撮影時間 0.4 秒にて撮影した。Film は、Fuji X ray Film Rx medical を、増感紙は Toshiba DMS を用いた。

4. 移植癌転移リンパ節形成

移植方法は、安藤の方法に準じ、家兎大腿部に VX2 癌を累代移植し、4～5 週目に手拳大になったものを空気塞栓にて屠殺し、無菌的に中心部の壊死物を除き、腫瘍周辺部の発育旺盛な腫瘍組織片を採取し、滅菌生理食塩水にて十分洗浄し、茶濾し器に取り形成用玉付剪刀にて細切、濾過し、その濾過物を滅菌試験管に取り、Diffco 製 Medium Eagle 液にて細胞を遊離させ、800rpm、5 分間遠沈し、細胞浮遊液 $50 \times 10^4/\text{mm}^3$ を作製し、その 0.5 ml を家兎の左足背部皮下に注入すると、7～10 日目に移植部は小指頭大の腫瘍形成が認められる。その後、腫瘍は漸次増大し、以後潰瘍を形成し、徐々に後肢上方へ浸潤拡大し衰弱死に至る。

一方、所属一次リンパ節である膝窩リンパ節は、移植後 1 週目までは小豆大～大豆大で、あまり変化は認められないが、それ以後増大し、10 日目には小指頭大、2 週目には示指頭大、3 週目には母指頭大となる。組織学的には、移植後 2～3 週目に VX2 癌の転移巣が、リンパ節皮質内に限局して形成されている (図 1)。

外科的侵襲による播種をできるだけ避け、臨床的に術前のリンパ管内注入を想定し、薬剤のリンパ管内注入直後、移植巣を切除、摘出した。以上の操作は無菌的に行った。

5. Bleomycin 組織内濃度測定

日本化薬薬品研究所の方法に準じた⁶⁾。Bacillus subtilis PCI 219 (微化研) 株を検定菌とし、寒天平板培地を用いた Disc 法による bioassay 法にて行った。検定用寒天培地の組成は下記に示すもので、pH を 7.2 に調整して使用した。

Pepton	10.0g
Meat ext	10.0g
NaCl	2.5g
Agar	19.0g
蒸留水	1,000 ml (pH 7.2)

検定にあたり水溶性 BLM を倍数希釈し、同一平板上にて測定し、これより標準曲線を作成し、資料内の BLM 濃度を求めた。リンパ管内直接注入の一定時間後、空気塞栓にて屠殺し、各種臓器を摘出 2 分割し、一方を濃度測定に、他を組織学的検索に用いた。

6. 病理組織標本作製

組織片を採取後、リン酸緩衝 10% Formalin 液固定後、一部は組織内の LUF を観察するため、凍結切片を作製し Sudan III 染色を行い、他方は通法に従い Paraffin 包埋後 Hematoxylin-Eosin 染色、鍍銀染色、Van Gieson 染色を行った。

IV. 予備実験

本実験に先立ち、前述の実験動物、実験材料、実験方法を用いて L-BLM の投与方法と生存率について調べた。すなわち、日本白色家兎体重 2.5kg 前後のものをを用い、足背部皮下に VX2 癌細胞浮遊液 ($50 \times 10^4/\text{mm}^3$) 0.5 ml を注入し、無処置のまま飼育した群と移植巣を切除した群、L-BLM を各種投与した群に分け、各群 5 羽ずつを用い生存曲線を調べた (図 2, 3)。

第 1 群は対照として移植後無処置のまま飼育した群、第 2 群は移植後 10 日目に移植巣を切除した群、第 3 群は移植後 10 日目に、L-BLM 3 mg/kg を直接リンパ管内に注入し、注入直後に移植巣を切除した群、第 4 群は移植巣をそのままにし、L-BLM を間接的にリンパ管に注入した群、第 5 群は移植巣をそのままにし、L-BLM を直接リン

図 2 VX2 癌移植後の生存率 (1)

図 3 VX2 癌移植後の生存率 (2)

パ管内に注入した群とした。それらの生存率を比較したところ、移植巣切除の有無に関しては、図 2 に示すように、第 1 群では移植後 2 週より死亡し、最長 10 週で全例死亡した。第 2 群では、移植後 5 週より死亡し最長 16 週まで生存したが、L-BLM 直接注入と同時に移植巣を切除した第 3 群では、移植後 10 週で 1 羽死亡したのみで 20 週目の生存率は 4/5, 80% であった。L-BLM の投与方法との関係は、図 3 に示すごとく、第 4 群では、第 1 群すなわち無処置群と生存率に差はみられなかった。第 5 群では、注入後 5 週までは明らかな生存率の延長が認められた。この結果から、移植巣の制御が完全であっても、移植後 10 日目では、すでに所属リンパ節への転移形成が起こっているか、あるいは転移巣の形成には至らないが、腫瘍細胞の体内 (リンパ系内) 遊走が起こっており、早晚腫瘍死するものと考えられる。また、その時期に抗癌剤を直接リンパ管内に注入した場合、転移の抑制や延命効果があると考えられる

が、間接注入の場合は、ほとんどその効果が認められない。また、直接注入し移植巣をそのまま残存させた群で、注入後約 5 週間生存率の延長がみられたことから、直接注入の薬剤効果は、注入後

4～5 週間と考えられる。

そこで本実験では、VX2 癌移植後 10 日目の腫瘍細胞が遊走し、リンパ節へ着床を開始すると思われる時期を用い、L-BLM のリンパ管内直接注

表 1 対照群主要臓器内 BLM 濃度

		直 後	3 時間	6 時間	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	1 週	3 週	5 週
心	臓	—	0.4	—	—	—	—	0.1	—	—	—	—	—
肺		—	—	—	—	0.2	—	0.1	0.1	0.13	0.1	0.3	—
肝	臓	—	—	—	—	0.4	—	0.1	—	0.1	0.2	—	—
腎	臓	—	1.6	—	0.1	—	0.2	0.13	0.1	0.13	0.3	0.4	0.1
脾	臓	0.4	0.3	0.3	0.35	0.35	0.2	0.4	0.35	0.16	0.15	0.7	0.35
胃		0.6	0.5	—	0.25	—	—	0.17	0.1	0.1	0.2	—	0.3
大	腸	0.3	0.8	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—
筋	肉	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—	—	—
皮	膚	5.1	7.0	9.1	—	—	0.25	—	0.3	0.63	0.3	—	—
舌		—	—	—	—	—	—	—	—	0.07	—	—	—
リ	ン												
ン	パ												
L 1		18.0	37.0	0.6	2.35	0.7	0.45	0.47	0.15	0.13	0.3	—	—
L 2		15.0	8.7	—	1.4	0.6	0.6	0.1	—	0.07	—	—	—
R		—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	0.25	—	—
尿		—	30.0	40.0	12.7	0.45	—	—	—	0.07	—	—	0.15

(単位: $\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)

L1: 注入側一次リンパ節, L2: 注入側二次リンパ節, R: 反対側膝窩リンパ節

表 2 実験群主要臓器内 BLM 濃度

		直後	3 時間	6 時間	12 時間	1 日	2 日	3 日	5 日	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週
心	臓	3.77	0.4	—	0.63	0.4	0.4	0.1	0.1	0.15	—	—	—	—	—	—	—
肺		0.93	0.6	0.1	1.2	1.1	1.2	0.2	0.1	0.15	0.2	0.4	0.1	0.13	0.3	0.1	0.2
肝	臓	1.43	0.65	—	0.63	0.7	0.57	0.2	—	0.15	—	0.2	—	0.13	—	0.1	0.2
腎	臓	2.1	0.3	0.28	1.5	3.2	1.27	0.3	0.45	0.24	0.3	0.73	0.1	0.2	0.85	0.1	0.3
脾	臓	0.93	0.55	0.43	1.2	0.9	0.93	0.27	0.3	0.4	0.3	0.65	0.25	0.27	0.45	0.1	0.2
胃		0.93	0.25	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.15	—	—	0.15	0.1	0.13	0.1	—	0.3
大	腸	0.56	0.2	0.45	0.2	1.1	1.33	0.76	—	0.5	—	0.5	—	0.67	—	—	0.4
筋	肉	0.6	0.1	0.1	0.6	—	—	0.1	—	—	—	—	—	0.15	—	—	0.2
皮	膚	25.5	1.2	—	0.63	0.5	0.23	0.6	—	—	—	0.2	—	—	—	—	0.3
舌		1.8	0.1	—	0.75	0.5	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
リ	ン																
ン	パ																
L 1		23.5	2.95	1.3	7.8	1.0	0.7	0.4	0.3	0.9	0.1	0.6	0.1	0.2	—	—	0.3
L 2		3.0	0.6	0.47	0.7	0.75	0.55	0.2	0.15	0.2	0.2	0.4	0.1	0.3	0.2	—	／
R		0.5	0.4	0.2	0.75	0.5	0.2	0.25	—	0.1	0.1	0.2	0.15	0.2	0.1	—	／
尿		40.0	32.0	23.0	3.5	4.2	14.0	—	1.35	0.4	—	—	—	—	—	—	／

(単位: $\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)

L1: 注入側一次リンパ節, L2: 注入側二次リンパ節, R: 反対側膝窩リンパ節

入による影響を調べることにした(図4)。

V. 成 績

1. リンパ系造影X線写真

坐骨静脈随伴リンパ管内に直接L-BLMを注入した家兎では、注入直後すでに膝窩リンパ節ならびにその輸入・輸出リンパ管、二次リンパ節である内腸骨リンパ節・下腰リンパ節、さらに腰リンパ管まで造影されている(図5)。24時間後では、リンパ管の造影像は消失し、注入直後の像に比べリンパ節の微細構造が著明になっている(図6)。その後約4週までリンパ節の構造を認め得るが、それ以後は漸次不明瞭となる(図7)。

2. BLM の組織内濃度 (表1, 2)

1) 注入側膝窩リンパ節内濃度

注入側膝窩リンパ節内濃度は、対照群では注入直後より認められ、3時間値で最高値 $37.0 \mu\text{g/g}$ を示し、以後減少し、24時間後には $2.35 \mu\text{g/g}$ となり、1週間で消失した。これに対し、実験群では注入直後最高値 $23.5 \mu\text{g/g}$ を示し、以後急激に減少し24時間後には $1.0 \mu\text{g/g}$ となるが、5週目まで低濃度を維持するものが多くみられた。

2) 注入側二次リンパ節内濃度

二次リンパ節である内腸骨リンパ節および下腰リンパ節内濃度は、対照群では注入直後最高値 $15.0 \mu\text{g/g}$ を示し、その後漸減し24時間後では $1.4 \mu\text{g/g}$ となり、6日目まで認められた。実験群でも注入直後最高値 $3.0 \mu\text{g/g}$ を示し、24時間後には $0.75 \mu\text{g/g}$ となり、その後低値ながら6週目まで認められるものが多かった。

3) 反対側膝窩リンパ節内濃度

反対側膝窩リンパ節内濃度は、対照群では注入

直後より測定期間中ほとんど認められなかったが、実験群では注入直後 $0.5 \mu\text{g/g}$ を示し、24時間後 $0.5 \mu\text{g/g}$ を1週後 $0.1 \mu\text{g/g}$ を示し、その後も微量ながら6週目まで認められた。

4) 血中濃度

血中濃度は、採血部位により濃度差が認められることがあり、左大腿静脈より採血した。採血後遠沈し、血清を濃度測定用資料とした。対照群では、直後より高く注入後20～30分後に最高値 $12.5 \mu\text{g/ml}$ を示し、その後徐々に減少し、6時間以後は認められなかった。実験群でも注入直後より認められ、1時間後に最高値 $11.2 \mu\text{g/ml}$ を示し、8時間以後は全く認められなかった(表3, 図8)。

5) 尿中濃度

尿中濃度は、対照群では直後は検出されなかったが、3時間値は $30.0 \mu\text{g/ml}$ と高く、6時間値では $40.0 \mu\text{g/ml}$ と最高値を示し、24時間後に $12.7 \mu\text{g/ml}$ 、48時間後 $0.45 \mu\text{g/ml}$ となり、その

図8 血中 BLM 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

表3 血中 BLM 濃度

時間 投与群	0	5分	10分	15分	20分	30分	1時間	1.5時間	2時間	2.5時間	3時間	3.5時間	4時間	5時間	6時間	8時間
対 照 群	8.0	8.0	11.2	11.3	12.5	12.5	7.5	5.2	2.7	1.8	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	—
実 験 群	7.5	6.5	7.7	5.8	4.5	3.8	11.2	10.1	4.2	0.8	0.3	0.2	0.2	0.15	0.1	0.05

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

後は認められなかった。実験群では、注入直後 $40.0 \mu\text{g/ml}$ と最高値を示し、その後徐々に下降し、1週目まで認められた。また BLM の尿中排泄率は両群とも高く、24時間後に約55%、48時間後には約90%が排泄されていた。

6) 主要臓器内濃度

注入側一次・二次リンパ節、反対側一次リンパ節、血中・尿中 BLM 濃度を測定すると同時に全身の主要臓器内濃度を測定した。濃度測定臓器は、舌（舌尖部）、心臓（心尖部左心室）、肺（左肺下葉内前方部、ヒト S^8 相当部）、肝臓（左葉前方部）、脾臓（正中側）、腎臓（左腎上端部）、胃（胃底部大弯側）、大腸（横行結腸）、筋肉（左大腎筋）、皮膚（左腰部）である。

対照群では、皮膚で注入直後より高濃度に認められ、次いで胃、脾臓、大腸にみられたが、心臓、肺、肝臓、腎臓、筋肉、舌ではほとんど検出されなかった。一方、実験群では、注入直後より皮膚、心臓、腎臓、舌、肝臓、肺、脾臓、胃、筋肉、大腸の順で認められた。対照群で認められなかった心臓、腎臓、肝臓では直後より高値を示し、肺、脾臓、舌、胃、大腸、皮膚、筋肉でも直後より検出され、なかでも脾臓、肺、腎臓では8週目まで低値ながら認められた。

3. L-BLM の健常家兎直接リンパ管内注入による組織の経時的変化

1) リンパ節

i) 触知所見

健常家兎の膝窩リンパ節は皮膚上より触知でき大豆大前後、孤立した円形で周囲組織との癒着はない。L-BLM 注入後、やや増大傾向を示し、注入4～5日後には通常の約3～4倍の大きさになり、その後漸次縮小し、4～5週目にはほぼ注入前の大きさに復し、触知では健常家兎膝窩リンパ節と比べ同程度の大きさになる。各時期とも周囲組織との癒着は認められない。

ii) 肉眼所見

摘出リンパ節の肉眼所見は、健常家兎では大豆大前後、類円形、弾性軟、帯黄白色で周囲は被膜で被われている。時に周囲に脂肪組織の付着をみ

る。注入直後は、リンパ節の腫大は著明ではなく、リンパ節の表面より Evans Blue で青染した部分と、半透明黄色の油様物質の沈着が認められる部分がある。その後腫大は明らかになり、注入後4日目には小指頭大前後となり、漸次腫大は減じ油様物質・色素沈着とも消退してくる。その後、ほぼエンドウ大くらいになり、弾性硬で約2～3週間後に注入前的大豆大、弾性軟となるものが多い。

剖面では、注入直後のリンパ節は Evans Blue で全体的に青染され、油様物質が全剖面にキラキラ光ってみられる。

iii) 油滴分布所見

リンパ節内の油の分布を調べるために、Sudan III 染色にて検索した。LUF は Sudan III にて赤橙色に染色される。L-BLM 注入直後のリンパ節では、辺縁洞における油の充満が著明で、リンパ洞の拡張として認められるが、髄質内には認められない。注入3時間後より LUF は拡散し、リンパ小節内にみられるようになる（図9）。

注入1日後のリンパ節では、全リンパ洞に多量の油がみられ、リンパ小節内では大きな油滴となり、髄質内では小油滴としてみられた。

注入2日後では、油滴はさらに大きくなり、実質細胞の著明な減少がみられる。

注入1週後には、油（LUF）は全リンパ洞内に認められるが、著しく拡張したリンパ洞においては、その壁に付着しているのがみられ、油のリンパ洞よりの流出時期と思われた（図10）。

注入2週後には、リンパ洞において、油の充満しているものから油の認められないものまである。

注入3～5週後には、油滴は小さくなりリンパ洞内に散在し、時間の経過とともに次第にその大きさ、数を減じ、5週をすぎる頃にはほとんど認められなくなる。

iv) 組織学的所見

L-BLM 注入直後のリンパ節組織像は、被膜に軽度の炎症性細胞浸潤を認め、辺縁洞には被膜や小柱の直下に小油滴が並んでみられ、リンパ小節

を圧排している像がみられるが、中間洞には油滴は存在せず、とくに異常所見は認められない(図11)。

注入3～24時間後の組織像では、拡張した辺縁リンパ洞周辺部の一部にうっ血がみられ、好酸球の軽度浸潤もみられ、リンパ節周囲の炎症性細胞浸潤は、より顕著になっている。

注入2日後、脂肪沈着が著明で、好酸球の浸潤が明らかとなり、リンパ節周囲の炎症性細胞の浸潤は、さらに著明となり、リンパ節の実質細胞は減少し、一部の血管周囲では壊死巣が認められるところもある。

注入4日後の組織像は、全体的に浮腫状となり、油によると思われる血管周囲浮腫や血管周囲壊死もみられる。一部ではうっ血を示す部分もみられ、細網細胞の著明な増生や好銀線維の増加がみられる(図12)。

注入1週後の組織像は、注入4日目の所見とほとんど変化はなく、細網細胞、形質細胞の増生が著明となる。リンパ節細胞の変性や壊死は減少し、油滴も小さく減少してくる。

注入2週後では、リンパ節内に脂肪沈着が認められるが、リンパ節自体の組織にほとんど変化はみられず、1週目でみられた細網細胞や形質細胞は減少している。

注入3週以後、辺縁リンパ洞の拡張はみられるが、大部分のリンパ小節は正常に復している。

注入4カ月後では、一部に辺縁リンパ洞の拡張がみられるが、髄質の線維化も軽度となり、ほぼ修復された像を示している(図13)。

2) 主要臓器

肺では、観察した注入後5週目までには、Sudan III 染色による油の沈着は認められず、油塞栓を思わせる所見もみられなかった(図14)。

肝臓では、注入直後より肝細胞の脂肪沈着が軽度に認められ、4週目まで持続していたが、L-BLM の影響と思われる油塞栓や、肝障害を思わせる所見は認められなかった(図15)。

腎臓では、皮質・髄質部ともに異常所見は、いずれの時期にも認められなかった。注入4週目の

1羽に amyloid 沈着が認められた(図16)。

脾臓では、注入直後に著明な hemosiderin 沈着と脂肪を貪食した、細網細胞が認められた(図17)。注入3時間後には、好酸球の浸潤が認められ、1日後にはさらに著明となり、4日目頃まで続く、脂肪貪食は注入後約4週目まで持続してみられ、この所見は組織内濃度と関係があると思われる。

その他の臓器(心臓、舌、筋肉、胃、大腸)では、とくに異常は認められない。

4. L-BLM の VX2 癌担癌家兎直接リンパ管内注入による組織の経時的変化

1) リンパ節

注入直後は辺縁洞、とくに輸入リンパ管周囲に、小油滴の沈着を思わせる空隙が認められるが、リンパ小節内および中間洞には、いまだ油滴は認められない。

注入3～24時間後には、直後辺縁洞に局限していた小油滴は、漸次大きくなり辺縁洞からリンパ小節、中間洞へ散在し、好酸球の浸潤がみられるようになる。

注入2日後には、リンパ節の実質細胞は少なくなり、リンパ節内は大小油滴が散在し、好酸球の浸潤、細網細胞の増加が著明になる。

注入4日目には、大油滴はやや小さくなり、油滴の周辺に多核巨細胞を認めるものが多くなり、鍍銀染色で油滴の周囲に輪状に好銀線維の増生が認められる。H-E 染色でリンパ小節内に好酸球の散在を認める(図18)。

注入1週後には、油滴はさらに小さくなり、その数も減じてくるが著変はみられない。

注入2週後には、小油滴が大部分となり小柱の周辺に集合しており、Sudan III 染色で脂肪空隙内面に油の存在を認めるものもあるが、空隙を満たすほどではなく、油の流出する時期と思われる。

注入3～4週目は2週目と著変はないが、油滴は少なくなり、脂肪空隙は小さく減少している。脂肪空隙周辺に多核巨細胞が数多く散在し、好酸球や macrophage、形質細胞もみられる。

注入5週以後では油滴はほとんどみられなくなり、リンパ節は組織学的にほぼ正常構造に復していると思われる。一部に好酸球の浸潤や、形質細胞や巨細胞の散在がみられるものもある(図19)。

2) 主要臓器

肺では、対照群と同様にとくに異常は認められなかった。

肝臓では、対照群で観察されたように、注入直後より肝細胞内の脂肪沈着が認められた。注入2週目と10週目に軽度のうっ血像を示していた。その他、異常所見を認めなかった。

腎臓では、観察期間中異常所見は認められない。

脾臓では、hemosiderin の沈着、好酸球の浸潤が直後よりみられるものが多く、注入3週目以後に amyloid 様沈着物を認めるものが多くなる。

その他の臓器では、異常所見は認められなかった。

VI. 考 察

1. リンパ系造影法について

1) 歴史と名称

リンパ系の造影は、1692年 Nuck⁷⁾ が屍体のリンパ系内に水銀を注入したとの記載があるといわれるが、本格的な造影は1928年 Zolotukhin⁸⁾ の動物実験に始まり、本邦では1920年 Funaoka⁹⁾ の研究に端を発するとされる。生体への応用は、1931年 Carvalhoら¹⁰⁾ が Thorotrast を直接リンパ節内に注入することにより、リンパ節造影法 (Lymphadenography) を開発したことに始まり、1952年 Kinmonth¹¹⁾ が下肢のリンパ管に水溶性造影剤を注入する手技を発表し、リンパ管造影法 (Lymphangiography) が確立され、種々のリンパ系病変、とくに浮腫性病変、血液疾患、悪性腫瘍のリンパ節転移などの診断に用いられるようになった。その手技の確立とともに、リンパ管外に急速に漏出する水溶性造影剤に代わって、新しく油性造影剤が開発され、リンパ管およびリンパ節が長時間にわたり、明瞭な像として観察されるようになり、リンパ管節造影法 (Lymphangiode-

nography), またはリンパ系造影法 (Lymphography) とよばれるようになった。本論文では、平木・入野¹²⁾ によるリンパ系造影法 Lymphography なる名称を用いた。

リンパ系造影法は、組織内に注入した造影剤がリンパ系に取り込まれ造影される間接法と、色素剤により染色され可視性となったリンパ管に、直接造影剤を注入する直接法とがある。間接法は、手技は簡単であるが、造影効果が不確実でリンパ節の状態を十分に描出することが不可能であり、また、必要領域のすべてを描出することが困難であるため臨床的価値は低く、ほとんど用いられない。これに対し、直接法は明視下に直接リンパ管内に注入針を刺入し造影剤を注入するため、確実にリンパ管およびリンパ節を明瞭な造影像として得ることができ、また解剖学的に必要な領域を造影できる点ですぐれており、現在最もよく用いられている。頭頸部領域では、耳介後リンパ管およびオトガイ部リンパ管から注入することにより、浅頸・深頸リンパ系の全域の描出が可能とされるが¹³⁾、リンパ管が細く、解剖学的理由によりリンパ管の露出が困難で、手技に熟練を要するため頻用されなかったが、近年 microsurgery の普及により、頭頸部領域においても利用されつつある。

リンパ系造影法は診断のみならず、治療にも応用されている。1958年 Jantet¹⁴⁾ は radioisotope を用いた intralymphatic radiotherapy を発表し、1978年 仙田ら¹⁵⁾ は、手技的に困難である頸部リンパ系造影に同法を応用し、頭頂部皮下に ¹⁹⁸Au colloid を注入し、浅・深頸リンパ系を描記できたとし、臨床的有用性を示唆している。1958年 安住¹⁶⁾、1961年 Wallaceら¹⁷⁾ は、制癌剤をリンパ管内に注入する intralymphatic chemotherapy を報告し、その後制癌剤やその剤型の改善により、成果が報告されている。

本実験では、薬剤注入にあたり直接リンパ管内へ注入された量を明確にでき、系統的にリンパ系が描出されるため、現在臨床的に最も広く用いられている Kinmonth 法に準じた、リンパ管内直接注入法によった。

2) 方 法

リンパ管内直接注入法によるリンパ系造影法は、1952年 Kinmonth により開発され、その後改良されてきたが、原則的には、①色素剤注入によるリンパ管の染色、②リンパ管内注入針（またはチューブ）の刺入、③造影剤の注入、④X線写真撮影の4段階よりなっている。

色素剤は、従来より Patent Blue V (Gurr, London SW 6; R. A. L., Paris), Evans Blue (0.3%) (National Aniline Division, Allied Chemical and Dye Corp., N. Y.), Direct Sky Blue (Wyeth Lab., Philadelphia), Indigo Carmine, Pontamin Sky Blue, Indocyanin Green (1957年 Fox) などが用いられてきたが、現在発癌性や種々の副作用で使用されなくなり、現在市販されているヒト生体染色剤は、Indocyanin Green があるのみである。本実験では、従来より用いられていた Evans Blue を用いた。

リンパ管造影用造影剤は大別すると、水溶性造影剤と油性造影剤の2種があり、水溶性造影剤は、リンパ管造影にはその漏出性による不明瞭さのゆえに不向きである(1962年高島¹⁸⁾, 1963年片山¹⁹⁾)として油性造影剤が多く用いられる。なかでも、粘稠度、滞留時間などよりケン油脂脂肪酸の、38%ヨードエチルエステル混合液で、欧州では、Lipiodol Ultra Fluide(Guerbet, Saint-Ouen, Seine, Paris), 米国では Ethiodol (Fougera, Hicksville, N. Y.) がよいとされ、リンパ系造影には現在最も一般的に用いられている。本実験でも造影剤として LUF を用いた。

注入手技は Kinmonth の方法に準じて行った。家兎の後肢リンパ管は、色素注入後リンパ管の下流、すなわち中枢側の圧迫により容易に怒張するため、26 G. Mantoux 針の肉眼的用手刺入は可能であるが、臨床的にはリンパ管注入用 27~30G の専用針が最適である。しかし、リンパ管の大きさに比べ、注入針が細いと注入圧による逆流などの原因になるため、本実験では 26G. Mantoux 針刺入後、リンパ管中中枢側を絹糸で結紮固定し、刺入点と結紮部へ瞬間接着剤(Aron Alpha®)滴下

により刺入部と注入針を固定し、針の移動や抜針、逆流による薬剤の漏れを防止でき、有効な方法であると思われた。

臨床的には、注入針の刺入ならびに固定を容易に確実にするため種々のクランプやピンセット、注入針などの工夫開発がなされている(1963年 Fisch²⁰⁾, 1966年 de Roo²¹⁾と Turner²²⁾, 1974年 Tegtomeyer²³⁾)。

3) 使用薬剤

BLM は濃度、時間依存性の薬剤であるため、長時間しかも高濃度に維持できれば、さらに臨床効果は向上すると考えられ、その投与法も静脈・筋肉・動脈内注射、また局所注射、軟膏剤があり、さらに BLM の持続性製剤として開発された、Aluminum monostearate 入りゴマ油懸濁液である油性 BLM が完成され、筋肉注射あるいは局所注射により、その有効性は長時間、かつ高濃度で維持できるようになった。しかし、リンパ節への移行は期待できない。1975年石井・大川²⁴⁾は造影剤 LUF に BLM を混和し、造影性のある油性の BLM、すなわち L-BLM を試作し、リンパ系造影法による悪性腫瘍の診断に際して懸念される腫瘍細胞の転移の促進に対し、X線写真上の診断能を低下させることなく転移を防止し、またリンパ系の悪性腫瘍に対する治療を目的として使用し、本剤の臨床応用を報告している。

本実験においては、LUF に BLM 15mg/ml を混和したものを用いた。しかし、本剤は LUF と BLM の混合物であるため、松原²⁵⁾, Jackson²⁶⁾の指摘するように、十分な混和の直後用いても注入針につまることが多く、今後改良の余地があるものと思われる。

本実験の目的である、所属リンパ節における転移巢形成に対する予防効果は、注入後その有効濃度が持続する4~5週目まで認められるので、L-BLM の直接リンパ管内注入を臨床に応用すれば、リンパ節転移の診断・治療ならびに転移防止に役立つものと思われる。

2. BLM の組織内濃度について

1) 組織内濃度測定法

藤田²⁷⁾によれば、制癌剤の微量定量法には Radioisotope を用いる radioactivity による方法、紫外線法、比色法、滴定法、bioassay 法などがあり、現在 bioassay 法が広く用いられている。しかし、bioassay 法は前記の物理化学的定量法に比べ、薬剤の不活化物質や同化あるいは異化産物が陽性に出ないため、薬剤の真の生体内動態を把握するには、radioactivity による方法と bioassay 法をあわせて測定することが望ましいとされる。Bioassay 法は、試験生物として細菌を用いる方法と、組織培養細胞を用いる方法があるが、細菌を用いる方法が簡易性、迅速性、再現性、経済性ですぐれており、頻用されている。

本実験では、検定菌として、藤田ら、日本化薬薬品研究所生物研究室に準じ、細菌 *Bacillus subtilis* PCI 219 株を用い、薄層寒天培地に Disc 法による bioassay 法にて濃度測定した。

2) 組織内濃度

組織内濃度は、成績に示すごとく、対照群と実験群の間に検出臓器、検出期間および検出濃度に大きな差異がみられた。

BLM の組織内濃度測定には、舌、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、大腸、皮膚、筋肉、注入側一次リンパ節（膝窩リンパ節）、注入側二次リンパ節（内腸骨リンパ節および下腰リンパ節）、反対側膝窩リンパ節および血清、尿を用いた。

従来より BLM の体内分布については数多くの報告がみられるが、いずれも水溶性 BLM による成績で、油性 BLM の臓器内濃度については、1975年上田ら²⁸⁾、石井・大川、Nakamoto ら²⁹⁾、1976年村西ら³⁰⁾、堀端ら³¹⁾、Takahashi ら³²⁾1977年高橋ら³³⁾、藤田ら³⁴⁾、杉村ら³⁵⁾、堂原³⁶⁾、1978年松原らの報告をみるにすぎない。

これらのうち、本実験と同じ L-BLM を用いた石井・大川、松原ならびに実験動物および方法が、類似の堂原の成績と比較してみた。

i) 血中濃度

石井・大川は、L-BLM (1 mg/ml) 10 ml をヒトに用い、足背リンパ管より直接リンパ管内注入を行い、血中濃度では1時間値 1.9 μ g/ml で最高

値を示し、2時間後にはその約 1/2 となり、6時間以後10時間余にわたって次第に緩やかな下降線をたどったと報告している。松原は、子宮広範全摘術術前の5名にL-BLMを足背リンパ管より注入し、血中・尿中濃度ならびに手術材料の濃度測定を行い、血中濃度では注入直後が最も高く、1.6～0.5 μ g/ml であったと報告している。また、堂原は家兎を用い、油性 BLM (15 mg/ml) を大伏在静脈随伴リンパ管より直接注入し、健常群では、注入直後 3.8 μ g/ml で約30分まで同様の値を示し、その後徐々に下降し3時間30分値で 0.2 μ g/ml を示し、それ以後は検出できなかったのに対し、VX2 癌膝窩リンパ節転移群では、直後 4.1 μ g/ml と対照の健常群より高く、10分値で 6.4 μ g/ml と最高値を示し、6時間後 (0.2 μ g/ml) まで検出できたとしている。

本実験では、対照群で直後すでに 8.0 μ g/ml と高く、20～30分後最高値 12.5 μ g/ml を示し、その後急激に下降し、6時間以降は認められなかった。実験群では直後 7.5 μ g/ml であり、1時間後 11.2 μ g/ml の最高値を示し、その後急激に下降し6時間以後は検出できず、いずれもほぼ同様の消退曲線を描いた。

このことから、油性 BLM と L-BLM は、ともに注入直後より血中に検出され、その後最高値を示し、6時間以後は検出されない。血中濃度でみるかぎり、他の投与方法（油性 BLM の筋肉注射や水溶性 BLM の静脈内注射など）と、ほぼ同様の消退曲線を描くことが判明した。

ii) リンパ節内濃度

BLM のリンパ節内濃度については、従来の報告ではリンパ節での検出濃度は低値を示し、リンパ移行性が悪く、またリンパ節で不活化されるとされている（木村³⁷⁾）。

そこで lipid や fat emulsion がリンパ系から吸収され、選択的に所属リンパ節に到達することが着目され、高橋は制癌剤を fat emulsion として実験的に使用し、水溶性制癌剤としての投与に比べ、所属リンパ節内濃度ならびに胸管内濃度が高く、長時間持続し延命効果も期待できると報告

している。さらに石井・大川は、油性造影剤LUFにBLMを混和し、X線写真において診断能を低下させることなく転移を防止し、リンパ系内の悪性腫瘍の治療を目的とし、その臨床応用の可能性を述べている。

当然のことながら、リンパ管内に直接BLMを注入した副島・塩田³⁸⁾、堂原、石井・大川、松原らの報告では、その使用BLMが水溶性、油性を問わずリンパ節内濃度は高値を示し、とくに油性BLMでは高濃度で持続時間も長いという報告が多い。家兎に油性BLMを用いた堂原によれば、足趾部筋注でのBLMの所属リンパ節内濃度は、6時間値 $6.3\mu\text{g/g}$ 、24時間値 $4.7\mu\text{g/g}$ で、二次リンパ節内濃度は $0.8\mu\text{g/g}$ 、 $0.4\mu\text{g/g}$ であるが、直接リンパ管内に注入した場合、所属一次および二次リンパ節内濃度は、注入直後でそれぞれ $4,005\mu\text{g/g}$ 、 $280\mu\text{g/g}$ と極めて高く、1週間後まで検出され、高濃度に長時間持続し油性BLMの直接リンパ管内注入は、有効な方法であろうと述べている。

本実験では、L-BLMを直接リンパ管内に注入した。対照群の一次リンパ節では直後 $18.0\mu\text{g/g}$ 、3時間後最高値 $37.0\mu\text{g/g}$ を示し、1週目まで検出できた。二次リンパ節では、直後 $15.0\mu\text{g/g}$ で最高値を示し、その後漸減したが6日目まで検出できた。

また、堂原は油性BLMをVX2癌転移リンパ節に対し、直接リンパ管内注入を行い、一次リンパ節内濃度は直後 $2,634\mu\text{g/g}$ で1週後まで検出され、転移群では注入直後より2日目までは健常群より低値を示すが、3日目より1週目までは転移群の方が高値を示し、その後3週目まで低濃度ながら持続してみられ、VX2癌転移群では健常群に比べBLMは長時間停留するとし、その理由としてBLMの転移巣内の取り込みを思考している。

本実験においても、VX2癌移植群においてL-BLMを直接リンパ管内に注入したところ、一次リンパ節では直後 $23.5\mu\text{g/g}$ と最高値を示し、その後急減するが低値ながら5週目まで認めら

れ、二次リンパ節でも直後 $3.0\mu\text{g/g}$ と最高値を示し、その後も微量ながら6週目まで検出された。さらに興味深いことは、実験群において注入反対側膝窩リンパ節においても、注入直後より微量ながらBLMを検出でき、注入後6週目まで持続して認められたことである。この結果について、本実験と堂原の実験との差異を比較検討してみると、①薬剤；L-BLM (15 mg/ml) と油性BLM (15 mg/ml)、②注入リンパ管；坐骨静脈随伴リンパ管と大伏在静脈随伴リンパ管、③注入法；手圧と持続注入器、④注入時期；リンパ節転移形成期（移植10日目）とリンパ節転移期（移植3週目）、さらに⑤実験動物の種と繁殖場および環境の差などが考えられる。

注入薬剤については、BLMの含有量は両者とも 15 mg/ml で同一濃度、注入量も 3 mg/kg と同一量であったが、LUFを基剤としたL-BLMとゴマ油を基剤とした油性BLMでは、物理的性状が異なっている。LUFはケン油の脂肪酸 ethyl ester のヨード化合物で、比重 1.280 (15°C)、粘度 27 cps (Ostwald 粘度計) で、L-BLM (15 mg/ml) の粘度は 65 cps であり、油性BLMの油は Aluminum monostearate 10 mg 含有の局方ゴマ油で、比重 0.918 、粘度 $100\sim 300\text{ cps}$ である。これらの粘度の違いにより、注入後のリンパ管内およびリンパ節での、薬剤の流れや滞留時間に差が生じてくるものと思われる。

注入リンパ管は、後肢内側の大伏在静脈に随伴するものと、坐骨静脈に随伴する後肢外側のものがあるが、両者とも膝窩リンパ節に流入しており、その走行・太さなどに大差なく、強い影響はないと考えられる。

注入法は、油性の基剤にBLMを混和したものを 26 G 以下の注入針を用いて注入すると、松原、Jacksonらの指摘するごとく、低圧注入中にめづまりするため、本実験では手圧により可及的に低圧にて注入した（注入圧 $1.0\sim 4.0\text{ kg/cm}^2$ ）。これに対し堂原はアトム社製 Atom LG-2 型 Lymphangiography を用い、注入圧 $0.5\sim 1.0\text{ kg/cm}^2$ にて注入しており、この注入圧の差は、リンパ流

に対し影響を与えたと思われる。

注入時期について、堂原はリンパ節転移後（移植後3週目）に注入し、転移群と健常群の濃度差について、BLMの転移腫瘍内取り込みを示唆している。本実験では、リンパ節に腫瘍細胞はあるが、転移巣形成に至っていない時期であり、BLMの濃度差は腫瘍細胞内の取り込みより、転移形成期におけるリンパ節、ならびにリンパ管の変化、すなわち免疫機構や生体防御機構等の働きによる形態的、機能的变化により、リンパ節の機能やリンパ流の変化などに起因すると考えられる。

実験動物の種と繁殖場および環境について、町田³⁹⁾は同一実験動物業者のWistar系ラットが、生産方式によって網内系機能に差が生じるとし、原⁴⁰⁾はC₃H/He mouseの実験的Amyloid症発生に、動物繁殖場による差を認めている。これらの系統の明らかな実験動物でも、生産方式が異なると網内系機能に差が生じることから、より厳密な意味では、動物繁殖場による動物間のリンパ系、網内系の機能比較も必要だと思われる。しかし、本実験では、同一個体より経時的に組織を採取したものではなく、別個体を用いたため、個体差も大きな影響を及ぼしたであろうと考え、この点については検討より除外した。

以上より、移植後の注入時期、注入薬剤および注入圧などの違いが、検出臓器、検出期間、検出濃度に差を生じたと考えられた。

iii) 他臓器内濃度

所属リンパ節、血液、尿以外の他の主要臓器内L-BLM濃度を、油性BLMの濃度と比較してみると、堂原の油性BLM直接リンパ管内注入では、健常群で直後より肺、脾臓、皮膚に微量認められ、転移群では直後より肺、腎臓、脾臓、皮膚に健常群よりやや高値に認められている。

本実験では、対照群で皮膚において直後5.1 µg/gと高値を示し、次いで脾臓、胃、大腸に認められたが、心臓、肺、肝臓、筋肉、舌ではほとんど検出されなかった。実験群では、検索したいずれの臓器でも直後より微量ながら認められ、直後では対照群で認められなかった心臓、腎臓、舌、

筋肉、肝臓、肺などでもかなり高値に認められ、心臓、大腸、肝臓、舌、筋肉では3日目まで、その他の臓器、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃では、8週目まで微量ながら検出できるものが多かった。これも先に述べた実験法の違いと、担癌生体内における生体機構の変化によるものと思われる。

3. 組織学的所見

L-BLMの直接リンパ管内注入による組織の変化は、L-BLM注入による機械的变化、LUFによる変化、BLMによる変化、ならびにそれらの相互作用による変化が考えられ、また、L-BLMのLUFとBLMの消退が平行しているか否かを組織学的に検討した。

組織内に注入されたLUFの経時的变化を、Sudan III染色により観察した。LUFは注入直後はリンパ節皮質の辺縁洞内に充満し、髄質内には認められないが、注入1日後では全リンパ洞に多量の油が認められ、2日後では油滴はさらに増大し、1週後では油は全リンパ洞内に認められ、著しく拡張したリンパ洞においてその壁に付着しており、この時期は油のリンパ洞よりの流出時期と考えられた。その後、徐々に油滴は小さく少なくなり、注入後10週目にはリンパ洞からの油の流出はほとんど完了し、リンパ小節内の油滴の分布も不均等で、油滴の存在を認めないものが多くなる。これは、野々山⁴¹⁾の成犬にPopiodolを用いたリンパ管造影所見や、堂原の家兎における油性BLMを用いたリンパ管注入所見、Fisch⁴²⁾のヒト頸部リンパ系造影時の所見と同様で、薬剤の消退が油の消退より早いことがわかった。

健常家兎のリンパ節の組織学的所見の変化については、注入直後辺縁洞はL-BLM注入による機械的圧迫と思われる拡張を示し、周囲のリンパ小節は圧排され、被膜に軽い炎症性細胞浸潤像がみられた。注入3～24時間後の組織では、辺縁洞周辺にうっ血や好酸球の浸潤がみられ、リンパ節周囲の炎症性細胞浸潤は著明となっていた。

注入2日後では、好酸球の浸潤や被膜周囲の細胞浸潤はさらに強くなり、一部の血管周囲には壊死巣も認められる。注入4日～1週後では、細網

細胞や形質細胞の増生が顕著で、次第に血管周囲の浮腫や壊死巣は少なくなってくる。

注入2週目をすぎるとリンパ節内に脂肪沈着は認められるが、リンパ節の組織構造は正常に復し、細網細胞や形質細胞も減少してくる。注入4週後では、一部に油滴による影響が認められるが、ほぼ修復された所見を示していた。

これらの所見は、薬剤の直接リンパ管内注入によるリンパ節の変化について、諸家の報告（Jacksonら, Averette⁴³⁾, 野々山, Fisch, 谷口⁴⁴⁾, 堂原）の、注入後10カ月～1年で形態学的変化は軽微になるとの報告と同様の結果であった。

副島・塩田は水溶性 BLM を成犬舌リンパ管に注入し、リンパ節組織の回復を報告しており、1972年市村⁴⁵⁾はヒトのリンパ管造影において、12週後にリンパ節本来の構造はほとんど認められず、リンパ球も少なく全体が瘢痕組織に置換されているが、これらは生体防御機構の許容域内であると述べている。

このような変化は、注入量および注入圧による物理的機械的な変化であり、薬剤による化学的变化は少なく、その程度も軽度で可逆的な変化と考えられ、L-BLM の直接リンパ管内注入法による注入は、リンパ節組織に対し、致命的な変化は起こさないと考えられた。

一方、局所の所属リンパ節における、免疫機構による防御機転での転移防止効果の報告⁴⁶⁾などから考えると、薬剤による転移防止と局所のリンパ節における免疫機構による転移防止とを比較検討しなければならないが、外科的リンパ節摘出に比べ、将来形態的に修復されうるリンパ管内直接注入法の方が、免疫学的にみても価値があるものと考えられる。

転移形成期における L-BLM のリンパ管内直接注入の影響を組織学的にみると、対照群と同様に注入早期には注入による機械的变化がみられ、その後油滴は徐々に吸収され、リンパ節の組織は修復される。注入後4日目より脂肪腔の周辺に多核巨細胞の出現がみられ、好酸球の浸潤が対照群より著明である。これらの所見も担癌生体、ことに

所属リンパ節における局所免疫機構と、密接な関係があると思われる。

本実験において、移植10日目にL-BLM を直接リンパ管内注入を行ったものの中に、一部すでに一次リンパ節に転移を認めたものがあり、それらについて BLM の転移巣に対する作用を組織学的に検索した。1971年右田⁴⁷⁾は、VX2 癌に対する影響として、VX2 癌巣を間質に富む外層と、間質の少ない中間層および壊死巣に近接する内層の3層に分け、BLM を投与した場合、外層では空胞変性を示す細胞が多く、間質の増加がみられ、中間層を経ることなく直接内層に移行していると述べている。Shimosato は、化学療法の組織学的効果判定基準として Grade 0～Grade IV の5型に分類しており、その基準により転移リンパ節への油性 BLM の影響について検討した堂原によれば、注入1日後で細胞間隙の増大と一部腫瘍細胞質の膨化、4日～1週後では細胞質・核の膨化が著明となり、一部核の破壊など細胞壊死を示したものが観察され、2週後では変性した腫瘍細胞が僅かに辺縁部にみられるので、3週後の組織ではほとんどの腫瘍細胞は壊死に陥っており、好銀線維の増加が認められたと報告している。本実験では、転移形成を起こしたものが少なく、経時的に変化を追えなかったが、堂原の報告とほぼ同様の所見であった。このことから、油性 BLM と L-BLM は薬効的に差はみられないと思われた。

4. リンパ系造影について

1963年平木・入野は、リンパ系造影法の臨床的意義として次のように述べている。

リンパ系造影法の適応は診断の目的として、①四肢とくに下肢浮腫の原因の検索（リンパ系の先天異常、悪性腫瘍の転移、炎症性疾患など）、②癌のリンパ節転移、③悪性血液疾患におけるリンパ節侵襲の検索（白血病、リンパ肉腫、細網肉腫、Hodgikin病など）、④Chylothorax や Chyloperitoneum における胸管異常の有無、⑤炎症性疾患におけるリンパ系の関与の診断などがあげられる。

治療ないし治療効果判定の目的として、①手術時リンパ節の完全廓清のための指標として、術前

診査および術中撮影による取り残しの有無の検索等, ②放射線照射野の正確な決定, ③抗癌剤, 放射性物質を治療の目的で直接リンパ節内へ注入する, ④種々の治療によるリンパ節の縮小効果を経時的に観察するなどが主な適応である。

造影剤の直接リンパ管内注入直後の X 線写真で, リンパ管およびリンパ節が, その後はリンパ節の造影像が観察される。

リンパ管では, その圧迫, 狭窄, 結紮の効果, 副行路の発達, 管壁よりの漏出, 皮膚への逆流, リンパ管の太さ, 数, 走行などが観察され, またリンパ節像より, 充満像, 充満全欠損像, 陰影欠損像, 辺縁不整, 構造不整, 腫大, 虫喰い像などが観察される (石田ら⁴⁸⁾)。

リンパ系造影法は悪性リンパ腫や血液疾患等に広く応用されるため, 悪性リンパ腫などにおけるリンパ系造影像の診断基準はかなり詳細に報告されているが, 癌腫や肉腫などの悪性腫瘍のリンパ節転移に関しての報告は少ない。

西峯ら⁴⁹⁾は, リンパ系造影像の診断基準を述べ, 炎症や脂肪変性などにより造影像だけでは判定を誤りやすいことを指摘し, 疑わしい部分の拡大撮影などが診断に有効であると述べている。打田ら⁵⁰⁾は, 悪性リンパ腫のリンパ造影像に関し, 顆粒状 (Granular), 泡沫様欠損 (Foamy), レース状 (Lacy) に 3 大別し, それらを異常の程度により第 1 度から第 3 度に分け, 第 3 度を確診, 第 2 度を疑診, 無所見 (第 0 度) と第 1 度を含め正常としている。

一般に癌腫の場合の造影像としては, 虫喰い像として造影されることが多く, 頭頸部領域においては, 癌腫の頻度が高いが悪性リンパ腫の好発部位であり, さらに大小唾液腺由来の腺系腫瘍も多く, 組織学的所見とリンパ節造影像の相関関係から, 診断基準の早期確立が望まれる。

5. リンパ系造影法の副作用

リンパ管内直接注入法の副作用として, Sheehan ら⁵¹⁾は, 次の 7 項目をあげている。①注入中の疼痛, ②注入後の疼痛, ③感染, ④皮膚の色素沈着, ⑤造影剤過敏症, ⑥油塞栓, ⑦リンパ路の

閉塞である。

これらの副作用に対する対策は, ①注入中の疼痛は注入による機械的作用によると思われ, 緩徐な注入や鎮痛剤により防止できる。

②注入後の疼痛は, 薬剤の直接リンパ節への反応, リンパ管の破裂と周囲軟組織への薬剤の漏れにより起こるため, 低圧注入に注意し, 鎮痛剤や経過観察にて軽快する。

③感染については, 無菌的な手術を行い, 術後感染防止のため抗生剤の投与を行えば, 比較的容易に解決できると思われる。

④皮膚の色素沈着は, リンパ管の指標としての色素を皮下に注入するため, 注入後 2～3 週間残存するが, その後消失する。

⑤過敏症に対しては, 術前の問診や皮内反応の励行により, 大部分は回避できよう。

⑥油塞栓は, 本実験でも示すごとく, 低い注入圧で少ない量を注入すれば, ほとんどその危険はなく安全に行いうるといえよう。しかし, 従来の報告^{52, 53)}によれば, 術後 2～3 日目に胸部 X 線写真で, 油塞栓によると思われる肺梗塞所見が認められた例があるが, いずれも可逆的で 3～7 日で回復している。

⑦リンパ系の閉塞は, 油性造影剤によるものと, リンパ管の注入による損傷によるものとが考えられるが, 残存健常リンパ管や再生リンパ管, 副行路等により, 一時的な問題であり症状もなく一過性に解決されると思われる。

また, 石田⁵⁴⁾によれば, 臨床的副作用として, ①発熱および悪感戦慄, ②全身倦怠あるいは疲労感, ③食欲不振, ④悪心・嘔吐, ⑤咳嗽・喀痰, ⑥胸内不快感・呼吸困難, ⑦その他をあげている。彼の報告によれば, ①発熱は 62% にみられ, その 2/3 は 37.5°C 前後で, 1/3 が悪感戦慄を伴う 38～39°C であったとし, 注入後数時間で発現し, 通常数日以内に消退し, 悪感戦慄のないものは無自覚に経過することが多いという。②の全身倦怠については, 25% にみられ, ③の食欲不振は 26% にみられ, ①の発熱との関係を示唆している。④～⑦については, 発現頻度は少ないが, 過敏症の

試験を行い、術後の経過観察と発現時の対症療法の必要性を述べている。

悪性腫瘍のリンパ節転移の可能性のある場合、薬剤のリンパ管内直接注入による腫瘍細胞の播種についての危険性に関しては、従来より種々の報告があり、薬剤を緩徐に適当量を注入すれば、その可能性はないと考えるものが多い（1963年平木ら、Schaffer ら⁵⁵⁾、市村ら）。

1967年庵原・千野⁵⁶⁾は、進行癌にリンパ系造影法を行い、胸部リンパ液中に著しい癌細胞の増加を認め、早期癌や中等度進行癌においても同様の危険性を指摘し、手術操作や診断法への細心の注意や、併用療法の必要性を報告している。堂原も油性 BLM 注入後、輸出リンパ液中の細胞数の増加はみられるが、腫瘍細胞の増加は極くわずかであり、使用薬剤 BLM の輸出リンパ液中、および二次リンパ節内濃度における長時間の持続により、遠隔転移の可能性は少ないと報告しており、播種に関しては、注入による機械的な播種を避けられ、注入薬剤の長期間の一次・二次リンパ節内滞留により、臨床的にはその危険性はないと思われる。

これらの結果から、油性造影剤含有制癌剤（本実験においては L-BLM）のリンパ管内直接注入は、リンパ系の診断、リンパ廓清手術の補助療法、手術不能例に対する治療さらに転移の抑制、着床の防止、播種に対する制御等リンパ系に対しては、他の投与方法に比べて、有効でかつ長時間にわたり効果が持続するため、臨床的に好ましい方法といえよう。

VII. 結 語

悪性腫瘍のリンパ節転移抑制効果をみるために、L-BLM を直接リンパ管内に注入し、薬剤の体内分布ならびに諸臓器に対する影響を、健常家兎および VX2 癌担癌家兎を用いて実験を行い、次の結果を得た。

1. VX2 癌移植後10日目に L-BLM を直接リンパ管内に注入した群では、無処置群に比べ明らかな転移抑制効果、および延命効果がみられた。

2. L-BLM の直接リンパ管注入直後のリンパ系造影写真で、膝窩リンパ節輸入リンパ管から腰リンパ管まで観察され、24時間後には一次・二次リンパ節の明瞭な造影像が得られ、注入後4週まで診断的価値が持続した。

3. L-BLM の直接リンパ管注入により、健常家兎では、血中、一次・二次リンパ節内 BLM 濃度は、直後から高濃度を示した。他臓器では皮膚、脾臓、胃、大腸で直後より認められたが、心臓、肺、肝臓、筋肉、舌では検出されなかった。

4. VX2 癌移植10日目の家兎に L-BLM を直接リンパ管内に注入したところ、血中、一次・二次リンパ節では、対照群と大差ないが、他臓器では注入直後より、皮膚、心臓、腎臓、舌、肝臓、肺、脾臓、胃、筋肉、大腸の順に認められ、対照群で検出されなかった反対側膝窩リンパ節にも、注入直後より認められた。

5. 組織学的には、リンパ節では注入後早期には、L-BLM 注入による機械的変化が主として認められるが、2～3週後にはこの影響は少なくなり、その後修復される。油滴の周囲やリンパ小節内に、好酸球の浸潤や多核巨細胞がみられた。

他の主要臓器では、油塞栓所見もみられず、特記すべき異常は認められなかった。

6. 以上のことより、臨床的に悪性腫瘍の確定診断時に、L-BLM をリンパ管内直接注入を行えば、触診で診断不可能な部位や小形のリンパ節造影像を長期間観察でき、リンパ節転移の早期診断とともに、所属リンパ節転移に対する早期治療、ならびにリンパ節転移の制御も可能となると考えられ、臨床応用に当たって適応を選べば、リンパ節転移に対する有用な方法であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なご指導を賜りました塩田重利教授、ならびにご教示とご校閲を賜りました本学第2口腔外科学教室榎本昭二教授、口腔細菌学教室堀川高大教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究を始めるにあたり、組織内濃度測定について

てご指導いただきました，前日本化薬株式会社薬品研究所所長松田明博士に深く感謝の意を表するとともに，ご援助，ご協力をいただいた第 1 口腔外科学教室第 5 研究室，ならびに教室の諸先生方に深謝いたします。

なお，本研究は昭和51年度文部省科学研究費の一部により行われたものであり，本論文の一部は，第26回日本化学療法学会東日本支部総会（昭和54年11月，東京），第9回関東甲信越地区リンパ系研究会（昭和56年6月，東京）において口演発表した。

文 献

- Shope, R. E.: A transmissible Tumor-like condition in Rabbits. *J. Exptl. Med.*, 56: 793-802, 1932.
- Kidd, J. G. and Rous, P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J. Exptl. Med.*, 71: 813-838, 1940.
- 安藤静男：上顎洞癌の増殖態度に関する研究。九州歯会誌，25：183-203, 1940.
- 西田邦彦：家兎のリンパ管系に就いて。熊本医学誌，28：295-318, 1954.
- Kinmonth, J. B., et al.: Lymphangiography; A technique for its clinical use in the lower limb. *Brit. Med. J.*, 16: 940-942, 1955.
- 日本化薬株式会社医薬部薬品研究所生物研究室編：塩酸ブレオマイシン及び硫酸ブレオマイシンの排泄及び体内分布。1-3頁。
- Nuck: *Adenographia curiosa et uteri foeminei anatome nova*. *Lugd. Bat.*, 140, 1692, 12) より引用。
- Zolotukhin (1928), 18) より引用。
- Funaoka, S.: Kurze mittlung über die Röntgenographie des Lymphgefäß systems sowie über den Mechanismus der Lymph strömung. *Proceeding of the Imperial Academy*, 5: 100-115, 1929.
- Carvalho, R., et al.: La mise en évidence par la radiographie du système lymphatique chez le vivant. *Ann. d'anat. path.*, 8: 193-197, 1931.
- Kinmonth, J. B.: Lymphangiography in man; a method of outlining Lymphatic Trunks at operation. *Clin. Sci.*, 11: 13-20, 1952.
- 平木 潔，入野昭三：リンパ系造影法 (Lymphography) の臨床応用—自家経験例を中心とした綜説—。総合臨牀，12：2218-2233, 1963.
- Jackson, L., et al.: Cervical Lymphangiography. *Laryngoscope*, 73: 926-941, 1963.
- Jantet, G. H.: Direct intralymphatic injections of radioactive gold in treatment of malignant disease. *Brit. J. Radiol.* 35: 692-697, 1962.
- 仙田宏平，他：RI リンフォグラフィ，特に頸部の RI リンフォグラフィについて。リンパ学，1：75-76, 1978.
- 安住修三：抗癌剤のリンパ管注射に関する実験的並びに臨床的研究。京府医大誌，63：1019-1040, 1958.
- Wallace, S., et al.: Lymphangiograms; their diagnostic and therapeutic potential. *Radiol.*, 76: 179-199, 1961.
- 高島 力：リンパ管造影に関する研究—特にその造影剤に就いて。金沢医理学叢書，68：1-54, 1962.
- 片山通夫，他：リンパ管造影撮影法（特に注入手技に就いて）。サクラXレイ写真研究，14：5-10, 1963.
- Fisch, U. and del Buono, M. S.: Die Lymphographie des Halses. *Arch. Klin. exp. Ohr-Nasen u. Kehlk. Heilk.*, 182: 311-315, 1963.
- de Roo, T.: An improved, simple technique of lymphangiography. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, 98: 948-951, 1966.
- Turner, F.: Lymphangiographic Needle Calcip. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, 96: 1053, 1966.
- Tegtomeyer, J.: A new technique for Cannulating lymphatic vessels; Experience in 150 extremities. *Lymphology*, 7: 116-120, 1974.
- 石井義昭，大川智彦：BLM 油性リンパ系造影剤の試作について。病院薬学，1：14-17, 1975.
- 松原一仁，他：BLM-油性リンパ系造影剤の使用経験。リンパ学，1：53-56, 1978.
- Jackson, L. G., et al.: Chemotherapy by intralymphatic infusion. *Cancer*, 15: 955-957, 1962.
- 藤田 浩：制癌剤の体内分布—測定法（第1部）。癌と化学療法，1：497-503, 1974.
- 上田外幸，他：油性ブレオマイシンの子宮癌手術療法に対する補助療法としての可能性。日産婦誌，27：579-580, 1975.
- Nakamoto, Y., et al.: Studies on Pharmaceutical Modification of Anticancer Agents II. *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 3125-3131, 1975.
- 村西昌三，他：リンパ指向性を目的とした制癌剤新剤形の開発，油中微粒子型乳剤。医学のあゆみ，99：745-747, 1976.
- 堀端謙吉，他：Depot 型 Bleomycin の生体内分に関する研究—とくに実験的脳腫瘍に対する治療に関連して—。Chemotherapy, 25：461-467, 1977.
- Takahashi, T., et al.: Attempt at local administration of anticancer agents in the Form of

- fat emulsion. *Cancer*, 38: 1507-1514, 1976.
- 33) 高橋俊雄, 他: 制癌剤エマルジョン化によるリンパ節親和性を目標とした化学療法. 癌と化学療法, 4: 119-124, 1977.
 - 34) 藤田 浩, 他: オイル・ブレオマイシンの生体内動態. 鶴見歯学, 2: 13-18, 1976.
 - 35) 杉村正仁, 他: 口腔癌に対する固型および油性 Bleomycin (油性 BLM) 局所使用の有用性について. 日口外誌, 23: 75-83, 1977.
 - 36) 堂原義美: 家兎リンパ節に対する油性 Bleomycin リンパ管内直接注入の影響に関する実験的研究. 鹿大医誌, 29: 43-70, 1977.
 - 37) 木村禧代二: 悪性リンパ腫の化学療法, Bleomycin の効果を中心に. 日本臨床, 27: 1597-1610, 1969.
 - 38) 副島公生, 塩田重利: 制癌剤の舌リンパ管内直接注入によるリンパ系組織における変化, 第1報, BLM 注入における経時的变化について. 日癌治, 第11回総会抄録集, 189, 1973.
 - 39) 町田和彦: 同一実験動物業者の Wistar 系ラットに現われた網内系機能の変化. 日網会誌, 18: 127-131, 1978.
 - 40) 原 卓司: アミロイド症の病理学的研究, 各種動物繁殖場間別によるマウス (C_3H/He) のアミロイド症の発生比較. 山口医学, 29: 65-71, 1980.
 - 41) 野々山純: 頸部リンパ系造影の実験的ならびに臨床的研究. 耳鼻, 8: 1390-1419, 1967.
 - 42) Fisch, U.: Lymphography of the cervical lymphatic system. Philadelphia, 1968., W. B. Sanders, pp. 45-76.
 - 43) Averette, H. E.: Lymphangiadenography; Application in the study and management of gynecologic cancer. *Cancer*, 17: 1093-1109, 1964.
 - 44) 谷口郷美: 頸部リンパ系造影の臨床的並びに病理組織学的研究. 耳鼻臨床, 62: 857-881, 1969.
 - 45) 市村 博: リンパ系造影に関する諸問題に関する研究. 引前医学, 24: 88-104, 1972.
 - 46) 西村幸喜, 他: 所属リンパ節の抗腫瘍性についての実験的研究. リンパ学, 1: 89, 1978.
 - 47) 右田信行: 家兎上顎癌におよぼす制癌剤動注の影響に関する光顕および電顕的研究. 九歯会誌, 26: 309-333, 1971.
 - 48) 石田 修, 他: リンパ系造影法による悪性腫瘍の診断. 日医放誌, 24: 966-981, 1964.
 - 49) 西峯康雄, 他: 脈管造影—リンパ管, その見方と解析. 日本臨床, 25: 2549-2560, 1967.
 - 50) 打田日出夫, 他: 悪性リンパ腫のリンパ造影像に関する検討. 日医放誌, 33: 479-495, 1963.
 - 51) Sheehan, R., et al.: The use of Lymphography as a Diagnostic Method. *Radiol.*, 76: 47-53, 1961.
 - 52) Fuchs, U. A.: Complications in lymphography with oily contrast media. *Acta Radiol.*, 57: 427-432, 1962.
 - 53) Bron, K. M., et al.: Oil Embolism in lymphangiography. *Radiol.*, 80: 194-202, 1963.
 - 54) 石田 修, 他: リンパ系造影後の副作用. 日医放誌, 24: 982-997, 1964.
 - 55) Schaffer, B., et al.: A critical Evaluation of Lymphangiography. *Radiol.*, 80: 917-930, 1963.
 - 56) 庵原昭一, 千野宗之進: リンパ液の細胞診. 癌の臨床, 13: 757-764, 1967.

図 説 明

- 図1 VX2 癌リンパ節転移巣 (H-E 染色, $\times 110$)
- 図4 移植後10日目の摘出膝窩リンパ節
- 図5 注入直後のリンパ系造影写真
膝窩リンパ節 ($\uparrow$), 輸出リンパ管, 二次リンパ節 ($\uparrow\uparrow$) が造影されている
- 図6 注入後5日目のリンパ系造影写真 (図5 と同一例)
リンパ像は消失してみられないが, 一次・二次リンパ節は明瞭に造影されている
- 図7 注入後5週目のリンパ系造影写真
一次リンパ節像はほとんど認められないが, 二次リンパ節はまだ読影可能である
- 図9 注入直後のリンパ節, 油滴は辺縁リンパ洞に充満している (Sudan III 染色, $\times 82$)
- 図10 注入1週後のリンパ節, 油は拡張したリンパ洞の壁に附着している (Sudan III 染色, $\times 67$)
- 図11 注入直後, 辺縁リンパ洞の拡張, なかに油のぬけた脂肪空隙が被膜・小柱にそって認められる (H-E 染色, $\times 110$)
- 図12 注入4日目, 油滴はリンパ小節内に散在している (H-E 染色, $\times 82$)
- 図13 注入4週目, はほぼ正常に復しており油滴も数少なくなっている (H-E 染色, $\times 33$)
- 図14 肺, 正常像を示している (H-E 染色, $\times 110$)
- 図15 肝臓, 異常所見を認めない (H-E 染色, $\times 110$)
- 図16 腎臓, 異常所見を認めない (H-E 染色, $\times 110$)

図17 脾臓, hemosiderin 沈着以外, 異常所見を認めない (H-E 染色, $\times 110$)

図18 実験群注入 2 日後のリンパ節, 小柱近くに油滴がみられ, その周囲に多核巨細胞が認められる (H-E 染色, $\times 110$)

図19 実験群注入 4 カ月後, ほぼ正常構造を示す。一部に巨細胞や好酸球がみられる (H-E 染色, $\times 110$)

図 1

図 4

図 5

図 6

図 7

図 9

図12

図10

図13

図11

図14

図15

図18

図16

図19

図17