原 著

エピネフリンの腫瘍内投与による温熱効果の増強

大泉幸雄 前沢 博 母里知之

東海大学医学部放射線科学教室

Heat-sensitizing effect of epinephrine injected intratumorally

Yukio Ohizmmi, Hiroshi Maezawa and Tomoyuki Mori

Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Tokai University

Summary

Combining effects of epinephrine injected intratumorally and hyperthermia were studied in Lewis lung carcinoma growing in the hind legs of BDF₁ mice. When 10% of epinephrine at the amount of 0.02 ml (0.14 mg/kg) was injected intraperitoneally or intratumorally, no growth inhibition was observed. However, when the same dose of epinephrine injected intratumorally was combined with 43.5°C of hyperthermia for 45 min, the effect on tumor growth delay was three times as the effect of hyperthermia alone. The sensitizing effect depended on temperature of hyperthermia and dose of epinephrine. The effect was significantly different between 1% epinephrine at 43.5°C for 30-45 min or 10% epinephrine at 40.5°C for 60 min and hyperthermia alone. Number of lung metastases was also inhibited by the combined therapy with high dose of epinephrine and 43.5°C of hyperthermia. Blood flows in the tumors were inhibited depending on the dose of epinephrine. The mechanism of sensitizing effect was considered that reduced blood flow of the tumors by locally injected epinephrine induced the changes on tumor environment, perhaps decreased pH. Intratumoral injection of epinephrine seemed to be useful for clinical hyperthermia.

Key Words :

温熱療法	Hyperthermia
エピネフリン	Epinephrine
腫瘍内投与	Intratumoral injection
温熱増感	Heat sensitization
ルイス肺癌	Lewis lung carcinoma

1. はじめに

温熱と化学療法の併用療法が臨床でも試みられているが、難治性癌や進行癌が対象となり、局所制御が難しいのが現状である¹⁾²⁾。そのような腫瘍においては、通常の薬剤投与方法では十分な腫瘍内薬剤濃度は得られないと考えられる³⁾。これを克服する一つの方法として、腫瘍内薬剤投与方法が検

討されている⁴⁾⁵⁾。我々は、温熱効果を増強させるために薬剤の腫瘍内投与方法の併用をマウス固形腫瘍を用いて検討してきた⁶⁾。抗癌剤においては、Bleomycin や Cisplatin のようにかなりの温熱増強効果をもった薬剤があるが、十分な効果を得るにはかなり大量の抗癌剤が必要であることがわかってきた。また、種々の温熱増強効果があると

される薬剤の腫瘍内投与と温熱の併用も行ってきたが、十分な増感は得られていない⁷⁾。しかし、血管収縮剤であるエピネフリンの腫瘍内投与を温熱と併用したところ、著しい温熱効果の増強を認めた。その効果は温熱と相乗効果があるとされる抗癌剤に匹敵し⁸⁾、臨床使用も有望ではないかと思われる、その基礎的検討をおこなった。

2. 材料と方法

実験動物と腫瘍：5～6週令の雌の BDF₁ マウス (チャールズリバー社、厚木) を用いた。1 ケージ 9～10 匹とし、クリーンラックで飼育した。腫瘍は、C 57 BL/6 マウスの側腹部皮下に継代されているルイス肺癌を用いた。腫瘍を無菌的に取り出し、壊死部を取り除き、生食中で鉗にて腫瘍を細切し、得られた浮遊単細胞 ($2 \sim 3 \times 10^5$ 個/0.025ml; 生存率は約 50%) をマウスの右下腿部皮下に移植した。移植後 6 日目には腫瘍は測定可能となり、週に 2～3 回腫瘍径を測定した。腫瘍容積は、楕円体として $3.14 / 6 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{厚さ}$ の式で求めた。

温熱：温熱処理は、腫瘍容積が 40～150mm³ の時点でおこなった。各実験の腫瘍容積は、無処置群と処置群は同一である。特製の固定台にマウスを固定し、無麻酔のもとに担瘤右下肢を恒温槽に浸した。恒温槽は Thermo-minder (大洋科学機器株式会社、東京) を用い、目標温度の $\pm 0.1^\circ\text{C}$ に保った。温熱中は、マウスの湯気の吸入や体温の上昇を避けるため扇風機で風を送った。温度測定は、銅-コンスタンタン熱電対を使用し、温熱中はマウスの腫瘍内温度と腸内温度をモニターした。腫瘍内温度は温熱開始後約 3 分で温水とほぼ一致し、肛門より 2～3 cm の腸内温度は、 43.7°C の温熱で体温より約 1°C の上昇 (最高 40.0°C 以下) であった。温熱は、無処置あるいは 37.5°C 60 分、 40.5°C 60 分、 42.0°C 60 分、 43.5°C 30～45 分とした。

薬剤：1 mg/ml のエピネフリンを含有するボスミン (第一製薬) あるいはエピネフリン原末 (第一製薬より提供) を 1 mg/ml に調整して用いた。

エピネフリン濃度 1 mg/ml を 100% とし、50～0.1% 溶液、0.025 あるいは 0.05ml (0.7mg/kg～0.0014mg/kg) を腫瘍中心部に投与した。薬剤の投与は温熱直前 15 分以内におこなった。

アッセイ法：腫瘍の平均容積から成長曲線を描き、実験日の腫瘍容積より 5 倍に達する日数を求め、対照群に対する処置群の成長遅延日数 (Growth delay) を算出した。有意差検定は、対照群の腫瘍容積が 1cm³ 付近において各群間の腫瘍容積を t-検定で比較した。肺転移は、移植後 18 あるいは 19 日目に解剖し、転移総数を数え、t-検定をもって比較した。一群のマウスは、5～7 匹とした。腫瘍内血流の測定は、同腫瘍を用いて、レーザー式組織血流計 (LBF-220; パイオメディカルサイエンス株式会社、金沢) で測定した。

3. 結果

ボスミンの毒性：50% 0.025ml (0.7mg/kg) のボスミンの腫瘍内投与は、投与 10 分以内に 2/13 (15%) が死亡し、全例一時的衰弱がみられた。同濃度で 43.5°C 温熱併用時の死亡率は、2/14 (14%) であり、温熱による致死効果の増強はなかった。10% 以下のボスミンでは、腫瘍内投与でも腹腔内投与でもマウスに外見的变化はみられなかった。また、10% 以下のボスミン投与による投与部位の変化はみられなかった。

ボスミン (あるいはエピネフリン) と温熱併用効果：50% ボスミンの腫瘍内投与による Growth delay への影響はなかった (Table 1)。 43.5°C 、45 分間の温熱との併用は、温熱単独時の Growth delay 1.8 日に比べ、8.7 日となって約 5 倍の延長となった (Fig. 1)。10% ボスミンでは、4.8 日で約 3 倍の延長が認められ、著しい温熱増感作用を認めた。10% ボスミン単独の腹腔内投与は、Growth delay に影響を与えなかった。また、温熱との併用でもその増感作用はなかった。10% から 0.1% ボスミンの腫瘍内投与と温熱は、濃度に依存した増感効果が認められた (Fig. 2)。また、ボスミンと同濃度のエピネフリンは、同等の

Table 1 Growth delays according to dose of Bosmin (epinephrine) with or without 43.5°C of hyperthermia.

Exp. No.	Dose %	Tumor volume* mm ³	Growth delay (days)	
			No heat	43.5°C **
1	50 × 2	100	0.0	5.3
2	50	150	0.2	3.0
	10	150	-	3.0
3	10	100	-	2.7
	10 epinephrine	100	0.3	3.1
6	5	100	0.2	1.5
4	1	40	0.0	1.3
3	1	100	-	2.5
	1 epinephrine	100	-	1.4
	0.1	100	-	0.3

* Tumor volume at the treatment.

** Growth delay against that of hyperthermia alone.

Fig. 1 Growth curves of Lewis lung carcinoma treated with hyperthermia and Bosmin.

Fig. 2 Growth curves of Lewis lung carcinoma treated with hyperthermia and Bosmin (epinephrine).

Table 2 Growth delays according to dose of epinephrine with or without 40.5 or 42.0°C of hyperthermia.

Exp. No.	Dose %	Tumor volume* mm ³	Growth delay**(days)	
			42.0°C	40.5°C
7	10	110	1.5	1.1
6	5	100	1.3	1.1
5	2.5	40	1.8	-
7	1	110	-	0.5
	1	70	-	0.7

* Tumor volume at the treatment.

** Growth delay against that of hyperthermia alone.

温熱増強効果があった。Table 1は、ボスミンあるいはエピネフリン単独投与時と 43.5°C, 30 ~ 45 分間の温熱との併用効果を Growth delay で示した。実験によってばらつきがみられるが、ボスミンの濃度に依存して温熱増感作用がみられた。0.1%ボスミンと温熱効果は温熱単独と $P < 0.05$ の有意差はなかったが、それ以上の濃度では有意差がみられた。Table 2は、42.0あるいは40.5°C, 60分間の温熱とボスミン併用時の Growth delay を示す。1%ボスミンと40.5°C温熱併用効

果は、温熱単独時と有意ではなかったが、それ以上では有意差を認めた。Table 2の実験6, 7から、増感効果は温熱温度と依存するようにみえる。42°C以下でのボスミン濃度と増感との関係は、実験数が少ないことや腫瘍容積の違いもあって不明瞭である。

ボスミン (あるいはエピネフリン) と肺転移: 移植後 18 日あるいは 19 日目に解剖した時の総肺転移数を表3にまとめた。表には示さなかったが、エピネフリン単独時の腫瘍内投与では転移数

Table 3 Number of lung metastases according to dose of Bosmin (epinephrine) and temperature of hyperthermia.

Exp. No.	Dose %	Temperature °C	No. of lung metastases	
			Heat alone	Heat+Bosmin
1	50	43.5	30.6 ± 13.3	9.3 ± 4.2*
3	10	43.5	11.6 ± 5.7	5.8 ± 4.0**
	10 (Epi.)	43.5	11.6 ± 5.7	13.4 ± 8.7
6	5	43.5	3.4 ± 4.1	2.1 ± 1.7
4	1	43.5	19.3 ± 12.8	17.6 ± 9.8
3	1	43.5	11.6 ± 5.7	11.4 ± 5.0
	1 (Epi.)	43.5	11.6 ± 5.7	14.4 ± 3.1
	0.1	43.5	11.6 ± 5.7	26.2 ± 25.9
7	10	42.0	20.7 ± 9.3	16.0 ± 8.5
6	5	42.0	2.7 ± 1.9	3.4 ± 2.5
5	2.5	42.0	3.2 ± 5.1	4.9 ± 8.6
7	10	40.5	17.4 ± 14.7	16.6 ± 8.9
6	5	40.5	1.8 ± 1.3	4.7 ± 4.1
7	1	40.5	17.4 ± 14.7	23.4 ± 14.2
	1	40.5	21.5 ± 8.8	20.3 ± 10.4

Epi.: Epinephrine. *: $p < 0.01$. **: $p < 0.1$

に影響はなかった。転移数のばらつきが大きい
が、50%および10%エピネフリンと43.5°C温熱
併用時に有意の転移抑制効果が認められた。その
ほかのものは、有意の差はなかった。

エピネフリンによる血流変化：エピネフリン投
与前の相対的血流を基準にして、投与後の血流

(%)を求めた(Table 4)。10%エピネフリンの
腹腔内投与では不変であったが、10%エピネフリン
の腫瘍内投与では投与前の16%に、2%で56
%, 0.4%で77%にまで腫瘍内血流は低下した。こ
の血流低下は腫瘍内投与直後よりおこり、15分間
以上持続した。

Table 4 Changes in tumor blood flow by Bosmin.

Dose (%)		Blood flow (%)*
10	i. p.	103 ± 23
10	i. t.	16 ± 8
2	i. t.	56
0.4	i. t.	77 ± 85

*: 100% indicates blood flow at
pre-administration.

4. 考 察

温熱療法の効果に関して、腫瘍特異性をもつと
考えられる第一の因子は、腫瘍内血管にあると考
えられる。つまり、腫瘍の自立的増殖を支えるだ
けの血管新生が十分でない為、血管から離れた腫
瘍細胞は低酸素、低栄養、低 pH の状態になる。
細胞の低 pH 状態は、温熱に感受性が高く殺細胞
効果が高まることが知られている⁸⁾⁹⁾。また、腫瘍
血管は構造的にも機能的にも不完全であり、外部
から熱が与えられてもそれに反応せず、熱の鬱滞
が起こり腫瘍は高温となって腫瘍細胞は死に易く
なる。エピネフリンは、代表的な血管収縮剤であ
り、臨床で全身あるいは局所投与として使用され
ている。また、エピネフリン自身は低 pH の薬剤
でもある。この実験でのエピネフリンの温熱増感
効果の機構として考えられることは、エピネフリン
そのものによる温熱増強作用とエピネフリンの
血流低下作用に基づく組織環境変化による温熱増

強作用が考えられる。前者については、in vitro の
実験で確かめる必要があるが、腹腔内投与では効
果がないことから現在のところエピネフリン自体
には増強作用はないと考えている。後者について
は血流以外に測定してないが、10%ボスミンで血
流は16%にも下降し、それ以下の濃度では濃度依
存的に血流が抑制されることもわかっている。腫
瘍の血流低下に基づいた組織環境の変化、恐らく
嫌氣的解糖によっておこる組織 pH の低下によ
る温熱増強と考えている。本実験でエピネフリン
の温熱増強効果は42°C以下でも認められている
が、in vitro の実験報告では低 pH による温熱増
強効果は42°C以下の比較的低い温熱で著しいと
されている⁸⁾⁹⁾。今後、in vitro での実験や組織内
pH について調べたい。

エピネフリンの血管収縮作用による温熱増強作
用とした場合のもう一つの疑問がある。それは、
腫瘍内の血管はエピネフリンで直接収縮しないと

されていることである。これに対する説明は、腫瘍内投与されたエピネフリンが周辺組織へ移行し、腫瘍栄養血管を収縮したのであろうと解釈できる。事実、予備実験で腫瘍周辺部投与でも効果を認めている。また、我々の用いた腫瘍が小さいこともあって、腫瘍中心部に投与した水溶性造影剤が一分足らずで周辺組織に移行することをX線透視で確認している。腫瘍の大きさとエピネフリンの投与量との関係や投与方法について今後検討したい。

薬剤の腫瘍内投与自身に伴う問題点としては、今までにも述べているが、腫瘍内薬剤の浸潤範囲が限られるのではないかと問題と腫瘍外への薬剤の洩れがある^{4),5)}。エピネフリンの場合は周辺部に投与しても効果は期待でき、洩れてもその組織障害も問題ではないと考えられる。また、腫瘍内投与によって転移促進をさせるのではないかという危惧がある。我々は粘稠な薬剤や何カ所かの穿刺で転移促進傾向を同腫瘍で認めているが、水溶性薬剤では促進は認めていない⁵⁾。また、抗癌剤ではむしろ転移は抑制されている⁶⁾。エピネフリン単独の場合の促進傾向はなく、温熱との併用時には局所効果増強によってむしろ転移は抑制される結果を得ている。

エピネフリンの臨床投与は、温度測定の為に腫瘍を穿刺する際に可能である。エピネフリンの濃度は1%でも増強効果があるが、少量であれば10%でも可能であろう。また、比較的低い温度でも増強作用を持つので、高温の得られない腫瘍でも効果が期待できる。さらに、抗癌剤も同時投与すれば、エピネフリンの血管収縮作用で薬剤の血中への流入が抑制され、薬剤が腫瘍内に高濃度で長時間滞留できる結果、抗癌剤の効果が増強されるであろう¹⁰⁾。

5. 結 語

エピネフリンの腫瘍内投与によって温熱の増感作用を認めた。臨床応用も可能なエピネフリン濃度で、かつ比較的低い温度でも増感があるので、局所温熱療法との併用効果に期待がもてる。その

作用機序は血流低下による腫瘍内 pH の低下と考えている。

この研究の一部は、文部省がん特別研究 (I) 加納班、および文部省科学研究費一般研究(C)の援助によった。

本論文の要旨の一部は、第 50 回癌学会総会(東京)、および第 8 回日本ハイパーサーミア学会総会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Landberg, T. : Hyperthermia and cancer chemotherapy clinical results : A literature review. Hyperthermic oncology 1984. Proceedings of the 4th international symposium on hyperthermic oncology. Vol. 2, (ed., J. Overgaard) pp. 169-180 (1985) Taylor & Francis, London, Philadelphia.
- 2) Pilepich, M. V., Jones, K. B., Emami, B. N., Perez, C. A., Fields, J. N., and Myerson, R. J. : Interaction of bleomycin and hyperthermia-results of a clinical pilot study. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 16 : 211-213, 1989.
- 3) Levin, L., Harris, J. F., and Chambers, A. F. : Factors in resistance to chemotherapy cure. Pointers to cancer prognosis, (ed., B. A. Stoll, pp. 156-170 (1987) Martinus Nijhoff, Dordrecht, London, Lancaster.
- 4) Begg, A. C., Bartelink, H., Stewart, F. A., Brown, D. M., and Luck, E. E. : Improvement of differential toxicity between tumor and normal tissues using intratumoral injection with or without a slow-drug-release matrix system. NCI Monogr. 6 : 133-136, 1988.
- 5) 大泉幸雄, 今宮 聡, 母里知之: 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. Drug Delivery System 6 : 449-453, 1991.
- 6) Ohizumi, Y., Imamiya, S., Maezawa, H.,

- and Mori, T. : Combined effects on tumor growth and lung metastases in Lewis lung carcinoma treated by hyperthermia and intratumoral injection of anti-cancer drugs (Aclarubicin, DWA2114R, Peplomycin). Int J Hyperthermia(submitted).
- 7) 大泉幸難, 今宮 聡, 母里知之: 種々の薬剤の腫瘍内投与と局所温熱療法の併用効果. 日本ハイパーサーミア誌 (第8回総会) : 343, 1991.
 - 8) Gerweck, L., E. : Modification of cell lethality at elevated temperatures-The pH effect. Radiat. Res. 70 : 224-235, 1977.
 - 9) Freeman, M., L., Raaphorst, G., P., Hopwood, L., E., and Dewey, W., C. : The effect of pH on cell lethality induced by hyperthermic treatment. Cancer 45 : 2291-2300, 1980.
 - 10) Yu, N., Y., Conley, F., K., Luck, E. E., and Brown, D., M. : Response of murine tumors to matrix-associated cisplatin intratumoral implants. NCI Monogr. 6 : 137-140, 1988.