原 著

エピネフリンの局所投与による温熱増強効果

—投与法の検討—

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 locally

-Study on administration of epinephrine

Yukio Ohizumi, Hiroshi Maezawa and Tomoyuki Mori

Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Tokai University

Summary

We have reported that epinephrine injected intratumorally sensitized the effect of heat depending on the temperature of hyperthermia and dose of epinephrine. In this study the effect of the administration routes and timings of epinephrine was carried out using Lewis lung carcinoma growing in the hind legs of BDF₁ mice. The effects were evaluated by tumor growth delay. The strongest sensitizing effect of epinephrine was obtained by the injection immediately before heating. The sensitizing effects were observed both on intratumoral injection and subcutaneous injection around the tumors. The strong effect was observed in high concentration (20%) and small amount (0.025 ml) of epinephrine injected intratumorously for small tumors (50 mm³). And in case for large tumors (250mm³) the stronger effect was observed in medium concentration (5%) and medium amount (0.1 ml) of epinephrine injected subcutaneously around the tumors. It seemed that these effects were depended on the infiltration of epinephrine to the blood vessels nearby the tumors. The site of injection and the amount of epinephrine should be taken into consideration.

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

薬剤の腫瘍内投与法には適応症の制限や問題点もあるが、その局所的治療効果は高く、全身的副作用が少ないことは魅力のある治療法といえる¹⁾²⁾。臨床的には、腫瘍内投与薬剤の改善や他の

局所療法との併用も既に試みられている³⁾⁴⁾⁵⁾。我々は、種々の薬剤の腫瘍内投与と温熱の併用効果について調べてきたが⁶⁾、エピネフリンが温熱増感作用をもち、その効果は抗癌剤と温熱の併用効果より高く、副作用も少ないことを報告し

た⁶⁾⁷⁾。また、この温熱増感作用は、温熱温度とエピネフリン濃度に依存することもわかった。増感の機構については、エピネフリンの血管収縮作用に基づく腫瘍内 pH の低下による増強作用やエピネフリンそのものの増強効果が考えられる。

今回は、温熱増感機構の一つの解析としてエピネフリンの腫瘍周辺部投与での検討と臨床応用の立場から、投与時期・投与量および転移への影響について、さらに詳しく検討した。

2. 方法

実験動物と腫瘍：5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、C57BL/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、生食中で鉄にて腫瘍を細切し、得られた浮遊単細胞(2～3×10⁵個/40μl；生存率は50%)をマウスの右下腿部筋肉内あるいは皮下に移植した。

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：各群の平均腫瘍容積を同一にして実験に用いた。温熱処理時期は、各実験で腫瘍容積を異にし、40～250mm³の間の腫瘍で行った。温熱方法と温度測定については、今までの報告と同様である⁷⁾。簡単に述べると、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 Thero-minder(大洋科学機器株式会社、東京)を用い、目標温度の±0.1℃に保たれた。腫瘍内温度は温熱開始後約3分で温水とほぼ一致し、腸内温度は、40.0℃以下であった。温熱は、無処置あるいは37.5℃で60分、40.5℃で60分と120分、42.0℃で60分、43.5℃で30分と45分とした。

薬剤：1mg/mlのエピネフリンを含有するボスミン(第一製薬)およびエピネフリン原末(第一製薬より提供)を1mg/mlに調整して用いた。1mg/mlを100%とし、100%～0.1%の濃度で0.

Fig. 1 Growth delay according to epinephrine dose and temperature in Lewis lung carcinoma.

Of 0.025–0.05ml Epinephrine was injected intratumorally 5 min before heating. Tumor volumes at treatment varied from 40 to 250 mm³. Growth delay by epinephrine meant the additional days against hyperthermia alone.

0.025 ~ 0.2ml (2.8mg/kg ~ 0.014mg/kg) を腫瘍中心部に一カ所投与あるいは腫瘍周辺部皮下組織に数カ所投与した。投与は 27 ゲージツベルクリン針を用いた。投与時期に関する実験は、温熱前 1 時間, 30 分前, 直前, 直後, 温熱後 30 分に投与を行った。それ以外の実験は投与後 5 分以内に温熱を開始した。

アッセイ法: 実験日の腫瘍の平均容積を 1 とし、相対的腫瘍容積で表した成長曲線を求めた。処理による成長遅延日数 (Growth delay) は、実験日の腫瘍容積より 5 倍に達する日数を対照群のそれを引いた値とした。有意差検定は、温熱後同一日における各群の腫瘍容積あるいは相対的腫瘍容積比率を t-検定した。

肺転移は腫瘍移植後 19 日目に解剖し、総転移数を評価した。さらに転移サイズの構成をみるために転移を大きさ別に数え、1mm以上の大きさの転移についても評価した。

3. 結果

Fig. 1 は、各種濃度のエピネフリンを 0.025 ~ 0.05ml 腫瘍内に投与し、直後に温熱を加えた時の温熱増強効果を Growth delay でみたものである。前報告⁷⁾に今回のデータを加えたものである。エピネフリン単独では効果はない⁷⁾。エピネフリンの増感作用は、その濃度および 43.5, 42.0, 40.5°C の間で温度依存的増強が認められた。

Fig. 2 は、温熱単独と 5% エピネフリン 0.

Fig. 2 Growth curves in Lewis lung carcinoma treated by intratumoral injection of epinephrine immediately before or after hyperthermia.

0.025ml を温熱直前あるいは直後に腫瘍内投与した時の Growth curves である。エピネフリンの温熱直前投与は温熱単独に比較して有意に腫瘍容積は抑制された。温熱直後投与は直前投与には及ばないが、温熱の効果を増強する傾向にあった。

Table 1 は、温熱前 1 時間, 30 分前, 直前, 直後, 温熱後 30 分に腫瘍内投与した時の Growth delay と温熱後 8 日目の腫瘍容積の比較を示す。

すべてのエピネフリン併用群に 0.4 日以上 Growth delay が認められた。Growth delay の有意差検定は、温熱後 4 日目の相対的腫瘍容積を t-検定したものである。温熱直前投与が最も効果が高く (温熱単独群と $P < 0.01$)、次に温熱前 60 分が有意に効果があった ($P < 0.05$)。

Fig. 3 は、処理日の腫瘍容積が 50mm³ と 250mm³ の腫瘍で、5% エピネフリン 0.1ml の腫

Table 1 Influence of sequence with epinephrine injection and hyperthermia. 5% epinephrine (0.025ml) was injected intratumorously.

Timing	Growth delay days	Tumor volume mean $\pm$ s.d. mm ³
Hyper. alone	-	1442 $\pm$ 316
60min pre	1.1 *	1170 $\pm$ 66
30min pre	0.4	1552 $\pm$ 312
<5min pre	1.8 **	945 $\pm$ 258 *
>5min post	0.5	1173 $\pm$ 267
30min post	1.1	1148 $\pm$ 293

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$.

Fig. 3 Growth curves in small or large Lewis lung carcinoma treated by intratumoral injection or subcutaneous injection around the tumor before hyperthermia.

瘍内投与と腫瘍周辺皮下投与時の Growth curves である。小さな腫瘍においては、腫瘍内投与も周辺部投与であっても同等の効果が得られたが、大きな腫瘍においては周辺部投与の方が有意に優れた。Table 2 は、大・中・小の腫瘍でエピネフリンの投与濃度・投与量・投与部位の比較を

Growth delay でみたものである。20%エピネフリン 0.025ml の腫瘍内投与による効果と腫瘍容積の関係は、腫瘍が大きくなるにつれて効果が低下した。5%エピネフリン 0.1ml の腫瘍内投与でも効果の順は同じであるが、20%エピネフリン 0.025ml と比べ小さな腫瘍で効果が低下し、大きな

Table 2 Growth delays combined with hyperthermia and epinephrine injected intratumorously (i. t.) or subcutaneously (s. c.) around the tumor.

Tumor volume	Growth delay (days)				
	i. t. 20% 0.025ml	i. t. 5% 0.1ml	s. c 5% 0.1ml	i. t. 2.5% 0.2ml	s. c 2.5% 0.2ml
50 mm ³	3.3	2.6	1.9	—	—
175 mm ³ *	1.5	1.7	2.0	—	—
250 mm ³	1.2	1.4	2.5	0.6	0.9

Growth delay (GD) = (GD by combined treatment) - (GD by hyperthermia alone)

* intramuscular tumors.

Seven mice were used in each group.

腫瘍で高くなる傾向にあった。5%エピネフリン 0.1ml の投与量で投与部位による影響は、腫瘍容積が小さい場合には腫瘍内投与が優れるが、腫瘍が大きくなると周辺部投与が優れる結果となった。250mm³腫瘍で 2.5% 0.2ml のエピネフリン投与は、腫瘍内投与も周辺部投与も 5% 0.1ml に比べ効果は低下した。

Table 3 は、肺転移数を示す。転移数にばらつきが大きく、総転移数のt-検定ではすべてに $P < 0.05$ の有意差はなかった。しかし、転移発生前にあると考えられる 50mm³ 腫瘍では、無処置群と比べ温熱群に抑制傾向がみられた。転移発生時期にあると考えられる 175mm³ の腫瘍では、5%エピネフリン 0.1ml の腫瘍内投与と温熱併用群で

Table 3 Number of lung metastases in Lewis lung carcinoma treated with hyperthermia and epinephrine injected intratumorously or subcutaneously (s. c.) around the tumor.

Tumor volume	Treatment		Number of lung metastases			
	Hyper.	Epine.	43.5°C —	43.5°C 20% 0.025ml	43.5°C 5% 0.1ml	43.5°C 5% 0.1ml(s.c.)
Total number of metastases (mean±s.d.)						
50 mm ³			13±3	8±5	8±6	8±3
175 mm ³ *			12±4	12±4	13±10	22±18
250 mm ³			13±3	7±4	7±7	13±7
Large sized metastases (median, range (number of mice without meta.))						
50 mm ³			0, 0-15(4)	1, 0-7(3)	0, 0-6(5)	0, 0-1(3)
175 mm ³ *			0, 0- 2(3)	0, 0-6(4)	0, 0-3(1)	2, 0-3(1)
250 mm ³			0, 0-15(4)	0, 0-7(4)	0, 0-8(2)	2, 2-12(0)

* intramuscular tumors. Seven mice were used in each group.

やや増加しているようにみえる。表には示さなかったが、250mm³腫瘍で 2.5%エピネフリン 0.2ml を腫瘍中心部投与と周辺部投与と併用した場合の総肺転移数は、各々 25 ± 21 と 18 ± 6 であり、大きな腫瘍では 0.1ml 以上の腫瘍内投与時に転移の増加が疑われる。処理時期に発生すると考えられる 1mm 大以上の転移でみると (Table 3 の下段)、その増加傾向が明らかとなった。1mm 大以上の転移を持っていないマウスのは、250mm³腫瘍で無処置群と温熱単独群では 8/14 匹に対し、2.5% 0.2ml と 5% 0.1ml のエピネフリン腫瘍内投与群では 0/14 匹であり、両群間には X²検定で P < 0.01 の有意差を認めた。

4. 考 察

エピネフリンの腫瘍内投与時の温熱増強効果は、その濃度と温熱温度に依存し、その機構としてエピネフリンの血管収縮による pH 低下に基づくこととエピネフリン自身の増感作用の二つが考えられた⁷⁾。今回の実験で、腫瘍周辺皮下投与でも腫瘍内投与でも増強効果が得られたので、血管収縮によるエピネフリンの二次的効果であることがわかった。投与量や投与部位に関しては、腫瘍の大きさや薬剤の浸潤程度が大きく効果に係わってくる。つまり、小さな腫瘍では、少量を腫瘍中心部に投与しても薬剤は腫瘍周辺部へ十分に浸潤するであろう。一方、大きな腫瘍では、少量では腫瘍周辺部への浸潤は不足するため、腫瘍周辺に投与した方が優れる。もし、腫瘍内投与でも十分に周辺部に薬剤が浸潤できるなら、高濃度にした方が有利である。同じことは腫瘍周辺部投与でも言え、腫瘍周辺の血管をカバーできる最小投与量で濃度を高くしたほうが良いことがわかる。しかし、小さな腫瘍で 5%エピネフリン 0.1ml の腫瘍内投与と周辺投与の効果を比べてみると、腫瘍内投与の方に優れている傾向があった。0.1ml であれば腫瘍内投与でも薬剤は周辺組織へ十分に浸潤していると考えられる量であるから、周辺部投与と同等の効果が期待できるはずである。このことは、エピネフリン自身が増強作用を持っている可

能性も否定できない。今後の *in vitro* の研究で判明させたい。

エピネフリンの投与時期に関しては、温熱直前投与が最も優れていた。温熱時に血流が低下していることが増感には必要と考えられる。エピネフリンの血管収縮作用時間はエピネフリンの滞留時間とも関係するが、15 分間以上の収縮作用は認められている⁷⁾。しかし、温熱直後投与でも効果があった。これは温熱後に pH を下げても温熱の増強効果があるという報告から説明できる⁸⁾⁹⁾。

温熱時の転移に関して、転移の促進がないことは¹⁰⁾今回の結果からもいえる。しかし、大きな腫瘍に対して 0.1ml 以上のエピネフリンの腫瘍内投与は転移を亢進させるかも知れない。濃度が濃くて少量の場合は促進がないので、この転移の促進は、エピネフリン自体より腫瘍内注入時のその容積による機械的刺激によるものでないかと考えている。大きな腫瘍でのこの促進は、転移の起こり易い時期に処理をしている為であり、小さな腫瘍ではまだ転移の起こらない時期である為と考えられる¹¹⁾。

臨床使用に際し、投与量・投与濃度に関しては、小さな腫瘍では高濃度少量を腫瘍内投与すればよいが、大きな腫瘍では濃度を薄くしてある程度の量を周辺部投与した方がよい。種々の腫瘍で薬剤の浸潤性が異なることや、ここでの実験の腫瘍は大きくても 250mm³であり、臨床での数十 cm³のモデルとはならないので臨床での経験が必要となろう。投与時期は温熱直前が良い。温熱療法と PEP や CDDP の誘導体である DWA2114R 等の抗癌剤の腫瘍内投与でも高い効果があるが¹²⁾¹³⁾、エピネフリンと併用することによってさらに効果の増強も期待できる¹⁴⁾。また、転移促進を防ぐ意味でも抗癌剤との併用が望まれる¹²⁾¹³⁾。

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。

文 献

- 1) Begg, A. C., Bartelink, H. Stewart, F. A., Brown, D. M. and Luck, 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.
- 2) 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.
- 3) 高橋俊雄, 渡辺信助, 西岡文三, 河野研一, 間島 進 : 転移に対する新しい試みとしての制癌剤 Emulsion によるリンパ節転移の化学療法. 癌と化療 1 : 381-387, 1974.
- 4) 奥村敏之, 大原 潔, 立崎英夫, 轟 健, 折居和男, 岩崎洋治, 菅原信二, 吉田次男, 五本木武志, 更科広美 : BrdU および Peplomycin 局注を併用した直腸癌術前照射の治療成績. 日癌治 26 : 2521-2530, 1991.
- 5) 小島 治, 高橋俊雄 : 乳癌の局所温熱・cisplatin 腫瘍内局注療法. 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, pp.152-155, 1990, メジカルビュー社, 東京.
- 6) 大泉幸雄, 今宮 聡, 前沢 博, 母里知之 : 種々の薬剤の腫瘍内投与と局所温熱の併用効果. 第8回日本ハイパーサーミア学会総会. 日本ハイパーサーミア誌 7 : 343, 1991.
- 7) 大泉幸雄, 今宮 聡, 母里知之 : エピネフリンの腫瘍内投与による温熱効果の増強. 日本ハイパーサーミア誌投稿中
- 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) Ohizumi, Y., Maezawa, H. and Mori, T. : Relationship between primary tumor volume and lung metastasis in Lewis lung carcinoma. (I) Assay for time course of development of metastasis. Tokai J Exp Clin Med, 12 : 227-233, 1987.
- 11) Ohizumi, Y., Imamiya, S., Maezawa, H., Tamai, Y., Fukuhara, N. and Mori, T. : Re-evaluation on lung metastases by local hyperthermia in Lewis lung carcinoma. 日本ハイパーサーミア誌 7 : 33-41, 1991.
- 12) Imamiya, S., Ohizumi, Y. and Mori, T. : Combined effect of local hyperthermia and intratumoral administration of ACR and DWA2114R. In Hyperthermic oncology in Japan '90. ed. by Sekiba, K. Asahi print. & pub. Co., Ltd. Okayama. pp. 349-350, 1991.
- 13) Ohizumi, Y., Imamiya, S. and Mori, T. : Combining effects of local hyperthermia and peplomycin-intraperitoneal and intratumoral administration. In Hyperthermic oncology in Japan '90. ed. by Sekiba, K. Asahi Print. & Pub. Co., Ltd. Okayama. pp. 355-356, 1991.
- 14) 大泉幸雄, 今家 聡, 母里知之 : 抗癌剤の腫瘍内投与とエピネフリン. Drug Delivery System 投稿中.