

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10436

研究課題名(和文) 肝腫瘍に対する局所ならびに肝動脈内免疫賦活因子注入による抗腫瘍効果についての研究

研究課題名(英文) Experimental study on the immunostimulatory effects by combination of OK432 with hepatic artery embolization therapy or cryotherapy

研究代表者

蒲田 敏文 (GABATA, Toshifumi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00169806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝動脈塞栓療法および凍結療法にOK-432を併用してabscopal effectをもたらす治療の開発を試みた。OK-432とリピドールエマルジョンによる肝動脈塞栓療法は、ウサギ肝臓での選択的塞栓で想定外に大きな梗塞を生じ、免疫賦活が期待できなかったことから検証を断念した。凍結療法については、動物実験用に簡易凍結システムを開発して冷却性能を確認したのち、ウサギVX2肝・皮下腫瘍モデルに対してOK-432局注と凍結療法の併用療法を行ったが、abscopal effectは確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で動物実験用に作成し冷却性能を確認した凍結システムは、簡便に作成し凍結療法を行うことができる。これを用いることにより、臨床応用の拡大が期待されている凍結療法に関して、今後さらなる探索的実験を進めることが可能となった。また、ウサギ肝動脈は容易に攣縮が生じてヒトでのTAEと異なり比較的強い塞栓となることがわかり、ウサギ肝臓を用いた経血管インターベンション実験を行っていくうえでの課題が判明した。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop new treatments that cause the abscopal effect by combining OK-432 with hepatic artery embolization therapy or cryotherapy. The verification of hepatic arterial embolization with the emulsion of OK-432 and lipiodol was abandoned because selective hepatic artery embolization of rabbits resulted in unexpectedly large infarction, and immunostimulation could not be expected. We have developed a simple freezing system for animal experiments and confirmed its cooling performance. Using the freezing system, we performed the combination therapy of OK-432 local injection and cryotherapy on the rabbit VX2 liver and subcutaneous tumor models, but the abscopal effect could not be confirmed.

研究分野：放射線医学

キーワード：免疫賦活 凍結療法 動注

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身転移を伴う肝細胞癌 (HCC) 症例の治療はソラフェニブなど分子標的薬が第一選択となり生存期間の延長が示されているが、依然腫瘍の制御は困難である。これに対し肝内に局在する HCC では、肝動脈化学塞栓療法 (TACE) やラジオ波焼灼療法 (RFA) など局所療法が行われ優れた成績をあげている。このような局所療法後に遠隔転移の縮小効果 (abscopal effect) が得られた症例が報告されているが、大変稀である。これまでに abscopal effect の向上を目指して、局所療法に様々な免疫修飾因子を組み合わせた治療の研究が進められ、マウスやウサギを用いた動物実験、ヒトでの臨床研究が行われているが、臨床実用されていないのが現状である。

ウサギ VX2 埋め込み肝腫瘍モデルを用いて RFA と OK-432 の組み合わせで abscopal effect を認めたことが報告されており¹⁾、今回同様のモデルを用い、我々が日常臨床で行っている肝動脈塞栓療法 (TAE) や凍結療法に OK-432 を組み合わせた治療で abscopal effect が起こせるか検討を行うこととした。

abscopal effect は局所での免疫賦活効果と考えられており、凍結療法は組織構築や抗原活性が保たれるため、RFA などの高温療法と比べ abscopal effect がより期待できると考えられる。しかし臨床応用されている凍結療法は機器や冷却源となるガスが高価なため探索的な実験を行うことが難しく、今後の凍結療法の実験推進のためには動物に使用可能で臨床と同等の冷却効果を有する簡易な凍結システムが必要である。

また TACE での abscopal effect の報告は多くないが、血流遮断と抗癌剤の免疫抑制作用により局所での抗腫瘍免疫の賦活が起こりにくくなっていると推測される。TACE ではリピオドールエマルジョンは抗癌剤の担体および塞栓物質として使用されているが、塞栓効果が不十分なためゼラチンスポンジの後塞栓が必要となる。そこでゼラチンスポンジを使用せず、OK-432 とリピオドールのエマルジョンによる肝動脈塞栓療法 (TAE) とすることで、弱い塞栓効果により不十分な腫瘍壊死になると予測されるが、早期の血流再開と OK-432 の免疫賦活効果により abscopal effect が起こる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

動物に使用可能な簡易凍結システムの作成と冷却性能の評価、OK-432 とリピオドールエマルジョンによる TAE の治療効果の検証、TAE および凍結療法などの局所療法に OK-432 を組み合わせた治療での abscopal effect の発生の有無を検証する。

3. 研究の方法

(1) 凍結システムの作成と冷却性能の評価

凍結針を作成のうえ、下記 (ア) (イ) の実験を行う。

(ア) ファントム実験

組織ファントムは生理食塩水、3%ゼラチン、0.3%アガロースで作成し、ファントムを約 30 にして 10 分凍結を行う。ファントム内に凍結針先端 10mm を刺入し、凍結針先端 5mm の位置、凍結針中心から約 2mm の距離で約 5mm の深さ、凍結針中心から約 5mm の距離で約 5mm の深さの 3 点の温度を熱電対で測定し、データロガーで記録する。また 10 分後のファントム表面のアイスボール径を測定する。

(イ) ウサギ肝臓を用いて開腹下での凍結療法の手技・手法の確立。

(2) OK-432 とリピオドールエマルジョンの TAE による治療効果の検証

ラット肝臓を用いて細径マイクロカテーテルおよびマイクロワイヤーの性能評価および手技確立を行い、(3)の方法で作成したウサギ VX2 埋め込み肝腫瘍モデルに対して TAE を行う。鼠径部切開で大腿動脈を露出してシースを挿入し経動脈経路を確立し、胆嚢動脈に流れないようにマイクロカテーテルを肝動脈一次分枝より遠位まで進めてリピオドールエマルジョンを動注する。リピオドールエマルジョンはリピオドール：生食 = 2：1 で作成し、0.5ml 動注する。動注後 2 日目と 7 日目に肝動脈造影を行い、血流再開の有無を評価し、7 日目に病理学的に治療効果の評価する。

(3) TAE もしくは凍結療法に OK-432 を組み合わせた治療での abscopal effect 検証実験

大腿部筋肉内 VX2 担がんウサギを 1 羽購入し、腫瘍を取り出して 2mm 角の VX2 組織片を作成し、細胞・組織用保存液に iCell-80 で保存する。この組織片を自然解凍のうえ、購入した 12 週齢メスの日本白色種ウサギの肝・皮下に埋め込み、ウサギ VX2 肝・皮下腫瘍モデルを作成する。埋め込みから 2 週間後にエコーで肝臓・皮下それぞれの生着を確認し、コントロール (無治療) 群、局所療法単独群、OK-432 併用局所療法群の 3 群に無作為にわけ、肝腫瘍治療後、毎週皮下腫瘍体積を、皮膚と平行な平面での長径 (a)・短径 (b) を経皮的にノギスで、深さ (c) をエコーで計測して、楕円体と仮定して $3.14 \times a \times b \times c / 6$ で算出する。7 日間に 25% 以上の体重減少やそれに準ずる状態がみられた場合を人道的エンドポイントとする。

凍結療法は 6cm の腹部正中切開を設け、腫瘍中心に凍結針を刺入のうえ、10 分凍結 5 分自然解凍 10 分凍結 自然解凍を標準時間として 2 サイクルの凍結を行う。凍結針抜去後に出血があるため圧迫止血し、止血を確認して腹部筋層と皮膚をそれぞれ結紮して終了する。ただし凍結時間は腫瘍に対して 6mm のマージンを目標としそれぞれ最大 15 分ずつまで時間延長を可能とす

る。また OK-432 の局注は 0.3KE を 0.15ml 生食に溶解し、開腹後直視下に腫瘍内複数方向に注入する。

4. 研究成果

(1) 凍結システムの作成と冷却性能の評価

下記の 2 種類の凍結針を作成し、冷却性能評価を行った。

ステンレス製中空針

工学部技術支援センターに依頼して作成した 2.7mm 径ステンレス製中空針にカテーテル（内径 1.0mm）を挿入し、冷却源である液体窒素をカテーテルに接続したシリンジを用いて先端に注入して、凍結する。液体窒素は先端で気化し、その圧力でカテーテル周囲を通り凍結針から排出される。

良好な温度低下とアイスボール作成が可能であったが、温度低下にばらつきが大きいため使用を断念した。経路の凍結により液体窒素の循環が阻害されることやシリンジを用いた注入であり注入圧が相対的に弱く安定しなかったことなどが原因と考えられた。

銅針

シリンジに銅針を固定し、シリンジ内に液体窒素を随時注入して凍結する。銅針は 1mm 径、1.5mm 径、2mm 径を用い、先端 15mm をシリンジから出し、先端 3mm は四角錐の針になるよう形状加工した。

図 1 にアイスボールの形成過程、図 2・3 に 1.5mm 径銅針と 2mm 径銅針の温度測定結果を示す。1mm 径、1.5mm 径、2mm 径銅針のアイスボール径はそれぞれ 17mm、17mm、20mm であった。温度測定ではいずれも銅針の温度は -40℃ 以下に達した。銅針が太くなるほど周囲の温度は低下し、2mm 径銅針では約 5mm の位置で -20℃ に達した。以上の結果から、10mm ほどの肝腫瘍に対して適切なサイズのアイスボールサイズとなる 2mm 径銅針を用いて abscopal effect 検証実験を行うこととした。

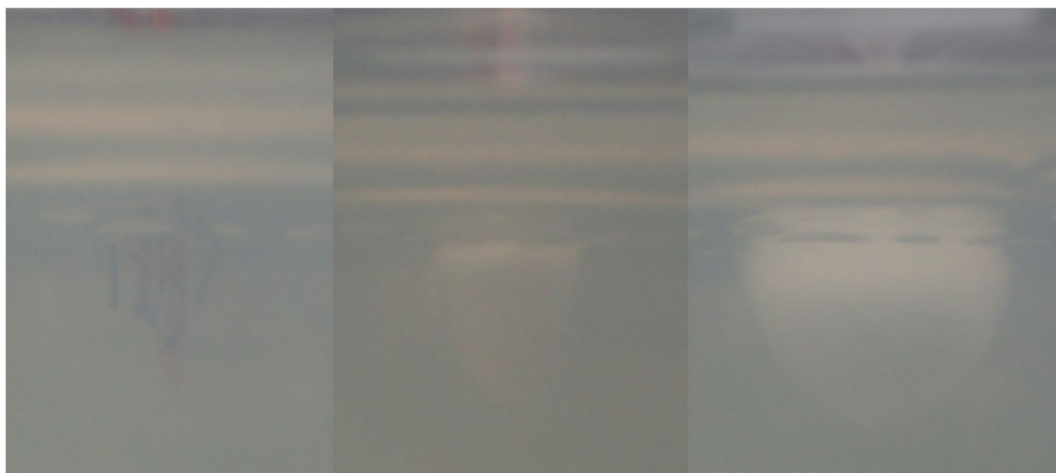


図 1 (1) 凍結システムのアイスボール形成過程（ファントム実験）
凍結針の先端 5mm と凍結針の中心から 2mm、5mm の位置を熱電対で温度測定

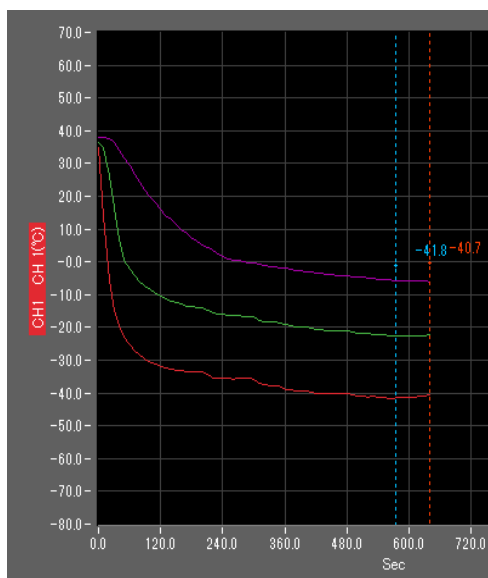


図 2 温度測定結果（1.5mm 銅針）

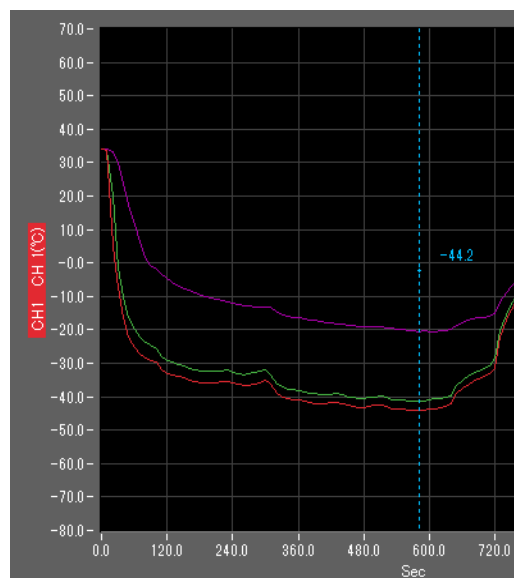


図 3 温度測定結果（2mm 径銅針）

(2) OK-432 とリピオドールエマルジョンの TAE による治療効果の検証

ウサギ肝動脈では一次分枝以遠での動注は容易に攣縮を来たして wedge 下の動注となった。その結果、動注した肝動脈の領域以外へ側副路を介してリピオドールエマルジョンの迷入が起こるほか、比較的塞栓効果が強くなって広範囲に梗塞となることがわかった。高度の塞栓効果により術後 2、3 日で死亡する個体もみられ、また生存した個体では術後 2 日目、7 日目でも塞栓した領域の肝動脈血流は消失しており、解剖を行うと肝臓の半分が完全に梗塞となっていた(図 4)。攣縮を回避するため、先端 1.5Fr マイクロカテーテルおよび 0.014inch マイクロワイヤーを使用するなど、より細径のシステムでの動注を試みたが、free flow 下の塞栓は 1 回のみしかみられなかった。この手法では安定して free flow 下の塞栓を行うことは難しく、梗塞後の血流再開が起こる可能性は低いと考えられ、免疫賦活および abscopal effect は期待できないと判断し、OK-432 とリピオドールエマルジョンによる TAE の abscopal effect 検証実験は断念した。



図 4 肝左葉 TAE 1 週間後の総肝動脈造影
左肝動脈は閉塞し、左葉に広範囲にリピオドールが残存している。左葉は梗塞となっていた。

(3) 凍結療法に OK-432 を組み合わせた治療での abscopal effect 検証実験

コントロール群 2 羽、凍結療法群 3 羽、OK-432 局注併用凍結療法群 3 羽の 3 群で実験を行った。全羽で肝臓・皮下腫瘍の生着を確認でき(図 5)、埋め込み 2 週での肝腫瘍の長径は 5.6-13.2mm (平均 9.2mm)であった(図 6)。凍結療法による治療後(図 7)、いずれの個体も皮下腫瘍は単調増加を示し、abscopal effect を示す傾向はみられなかった(図 8)。治療後 4 週から 5 週時点で体重減少などによる人道的エンドポイントとなる個体を複数認めため、治療後 5 週で実験を中止した。

abscopal effect がみられなかった原因として、安楽死後に肝臓局所の観察を行うと凍結療法を行った 6 羽のうち 5 羽で再発が認められ、局所療法が不十分であったことが考えられる。ファントム実験からは腫瘍内の多くは壊死しうる -20 以下に達したと考えられるが、腫瘍壊死温度は腫瘍タイプで異なっており²⁾、VX2 に対しては十分な温度低下でなかった可能性がある。また局注では OK-432 の分布は不均一であり、OK-432 の量と分布が不十分であった可能性がある。OK-432 局注併用凍結療法での abscopal effect にはさらなる検討が必要と考えられた。

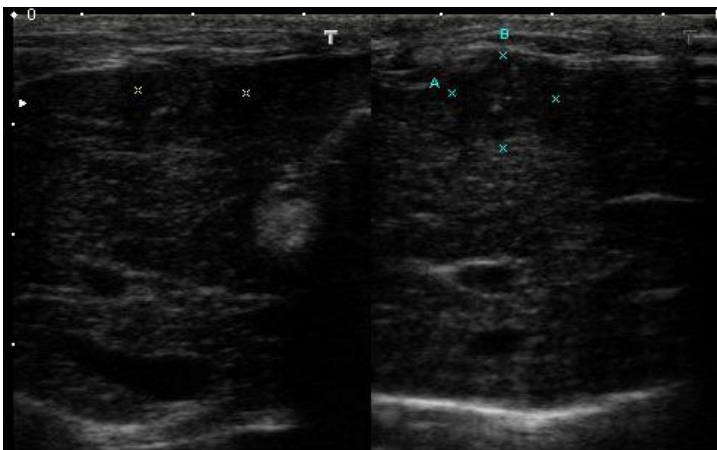


図 5 エコーで肝 VX2 の生着を確認

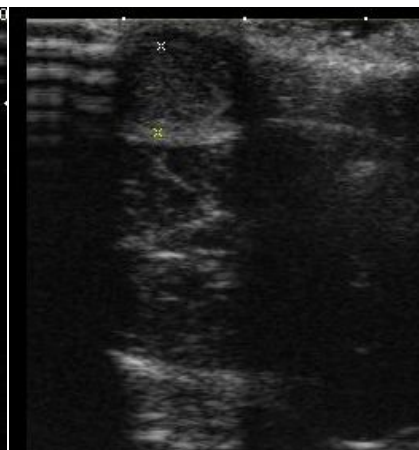


図 6 皮下 VX2 の厚みをエコーで測定

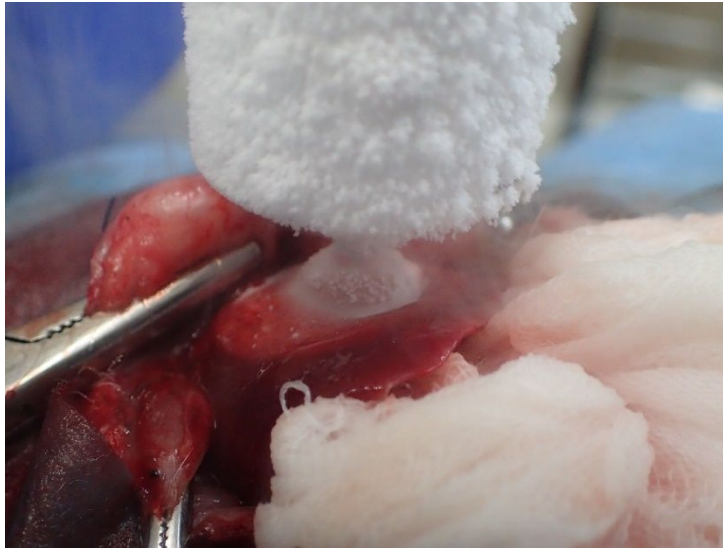


図7 開腹下に肝 VX2 に対して凍結療法を施行
マージンを持ってアイスボールが形成されている

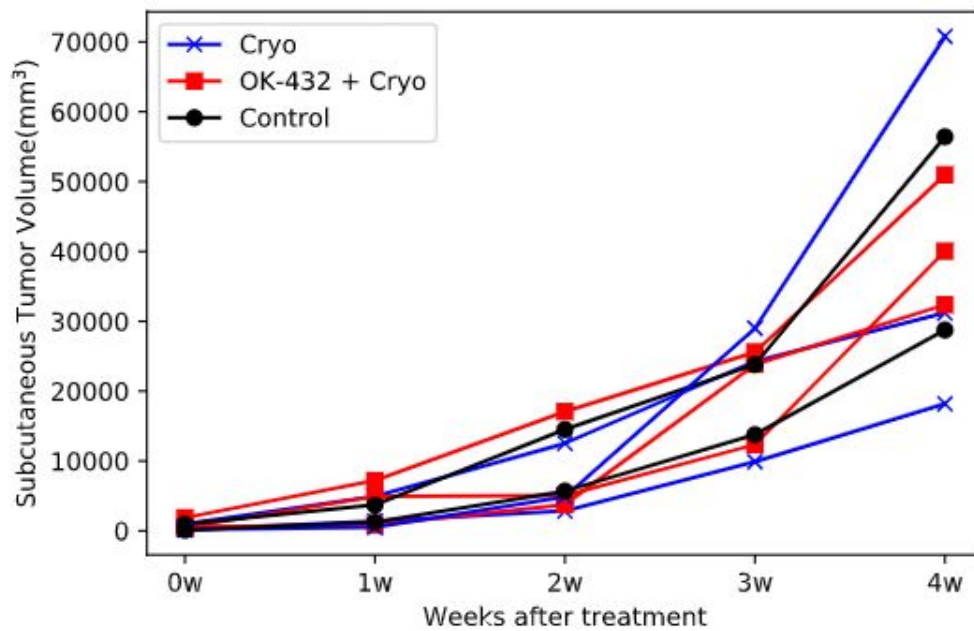


図8 皮下腫瘍サイズの経過

<引用文献>

- 1) Kageyama K., Yamamoto A., Okuma T., et al. Radiofrequency ablation of liver tumors in combination with local OK-432 injection prolongs survival and suppresses distant tumor growth in the rabbit model with intra- and extrahepatic VX2 tumors. Cardiovasc Intervent Radiol. 36:1383-1392, 2013.
- 2) Gage A. A., Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. Cryobiology. 37:171-186, 1998.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 耕太郎 (YOSHIDA Kotaro) (30645130)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	
研究分担者	土屋 弘行 (TSUCHIYA Horoyuki) (40227434)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	南 哲弥 (MINAMI Tetsuya) (60436813)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	