

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591507  
 研究課題名（和文）腫瘍内投与磁性体を RF 誘導加温することで得られる抗腫瘍効果  
 についての実験的研究  
 研究課題名（英文）Experimental study about anti-tumor effect by RF inductive heating  
 of magnetite administrated in the tumor.  
 研究代表者  
 片山 寛次（KATAYAMA KANJI）  
 福井大学・医学部・准教授  
 研究者番号：30204431

研究成果の概要：兎 VXII 移植腫瘍に Dextran Magnetite (DM) を注入、RF 誘導加温し、加温特性と効果を検討した。注入 2 日目 DM は細胞周囲に存在、5 日後に消失。注入後加温、DM 存在下腫瘍内温は 45 度に達し 5 日目 CT 上 DM 残存した。鉄染色で DM は細胞質内に存在。兎腫瘍で 45 度 30 分の加温が可能で腫瘍の縮小と増大速度の遷延を認めた。結果、DM 注入後 RF 加温で腫瘍細胞内に DM が取り込まれ、再度の誘導加温が可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ハイパーサーミア・RF 加温・移植腫瘍・誘導加温・Dextran Magnetite・兎腫瘍・VXII 腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、実質臓器の悪性腫瘍に対して電磁波誘電加温による RF-ablation (RFA) が行われている。この場合、加温するためにはその都度腫瘍を 16 G という太いアンテナ針で直接穿刺することが必要で、出血や他臓器損傷、しかも正常組織の熱損傷も無視できない。流動体磁性物質 Dextran Magnetite (DM) を腫瘍内に投与し RF 波で誘導加温を行うと、DM が注入された部位のみが加温される。しかもその注入は 23 G 程度の細い針で十分であり、そのため安全で侵襲が小さいと考えられる。

## (2) Magnetite の腫瘍内投与と RF 波誘導加温

の効果についての報告は既にくつかなされてはいるが、その Magnetite の安全性に関しては未だ未知であり、そのために臨床応用までには至っていない。今回我々が用いる Dextran Magnetite は既に核磁気共鳴画像診断装置 (MRI) による診断の造影剤として既に市販されている製剤である。従って、動物実験の効果をそのまま臨床治療に役立てることが可能である点が特色である。この研究成果によって、体幹の軟部組織の悪性腫瘍、転移性または原発性肝癌の治療はより低侵襲となり得る。研究対象を広げて他の臓器の腫瘍を標的とすれば、腎臓癌・膵癌・前立腺癌・舌癌など他にも多くの悪性腫瘍に応用で

きる可能性が大であると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 今回、兎に VXII 腫瘍を移植して担癌モデルを作成し、腫瘍内に DM を注入して誘導加温を行い、その加温特性と治療効果について検討する。

この担癌兎腫瘍に注入された DM の細胞内への取り込みの程度、腫瘍組織での分散の変化と兎個体内での動態を観察する。その上で、金沢大学工学部長野教室にて開発された電磁波誘導加温装置を用いて、DM を注入した癌病巣を加温し、加温による DM の細胞内、組織内分散の変化を研究する。最終的に大腿筋内及び肝内に移植した腫瘍組織の加温による抗腫瘍効果を超音波検査や CT を用いて経時的に観察する。また、組織学的に抗腫瘍効果を観察し、担癌個体の生存期間の延長効果の有無を研究する。臨床使用を目的に改良を重ねてきた現在の誘導加温装置を用いて、設計理論値まで深部の腫瘍が加温できるかを実証したい。これらの実験から得られた結果から、臨床応用への足がかりとしたい。

## 3. 研究の方法

(1) 体重約 2.5Kg の日本白色家兎の大腿部皮下に VXII 腫瘍を移植針を用いて継代移植する。大腿部筋内に VXII 腫瘍を移植し、腫瘍の大きさの経時変化等自然経過を追った。CT・超音波診断装置を用いて局所の進展様式や多臓器への転移状況を観察する。また、適宜屠殺して組織学的にその腫瘍組織内・体内での移行状況を観察した。

(2) 腫瘍内に DM (Resovist) を 27G 針を用いて注入し、CT・超音波診断装置を用いて DM の腫瘍内や周囲組織への分布を観察する。経時的に屠殺して組織学的に検討し、その腫瘍組織内・体内での移行状況を観察する。また、細胞内への取り込みを観察した。

(3) 腫瘍径が 15mm になった時点で、イソフルレン吸入により全身麻酔をい、Resovist を腫瘍内に局所注入、腫瘍内・周辺の筋肉内・直腸内に光温度センサーを留置、誘導加温装置のアプリーターをウサギの大腿部腫瘍直上に設置し、加温を行った。この時、注入する Resovist の量・濃度・腫瘍強度（出力電流）、アプリーターと腫瘍の距離・加温時間と、腫瘍内の温度上昇との関係を記録した。また、周囲臓器・体温の上昇程度も観察した。

(図 1) RF 誘導加温機第 3 号機（金沢大学工学部長野研究室提供）



加温機は、金沢大学工学部長野研究室にて試作改良をされた機器を用いた（図 1）。

(4) 加温後、CT・超音波診断装置を用いて腫瘍の消長・DM の腫瘍内や周囲組織への分布を観察した。また、経時的に屠殺して組織学的に検討し、腫瘍の壊死・細胞浸潤・DM の存在部位と温熱効果の関係を観察した。また、DM の腫瘍組織内・体内での移行状況・細胞内への取り込みを観察した。これらの実験から、最も有効な DM の投与方法と誘導加温法を検討した。

(5) VXII 腫瘍大腿筋内移植兎を 3 群に分けた。

I : 腫瘍の自然経過観察群

II : 腫瘍内 DM 注入処置群

III : 腫瘍内 DM 注入後加温群

各群 8 羽程度として腫瘍体積の経時変化を記録した。最終的には生存期間を記録、これらを 3 群間で比較し有意差検定を行った。

(6) 小開腹下に、VX2 腫瘍細胞浮遊液を肝左葉に注入し移植、移植 2 週間後に超音波検査(US)にて、径 1~2 cm の肝腫瘍が形成されていることを確認した。腫瘍の大きさの経時変化等自然経過をた。CT・超音波診断装置を用いて局所の進展様式や多臓器への転移状況を観察する。また、適宜屠殺して組織学的にその腫瘍組織内・体内での移行状況を観察した。

(7) 腫瘍内に超音波ガイド下に Resovist を 27G 針を用いて注入し、CT・超音波診断装置を用いて DM の腫瘍内や周囲組織への分布を観察、経時的に屠殺して組織学的に検討し、その腫瘍組織内・体内での移行状況を観察した。また、細胞内への取り込みを観察した。

## 4. 研究成果

(1) 白色家兎大腿部に VX2 腫瘍を移植したモデルを作成し、Dextran Magnetite (DM) を注入、その消長を CT 画像と組織像で検討した。

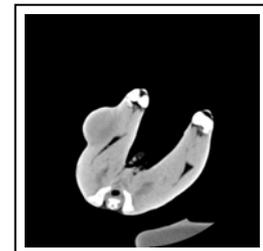


図 2 左 : DM 腫瘍内注入後 10 日目  
右 : 23 日目の兎大腿腫瘍 CT 像

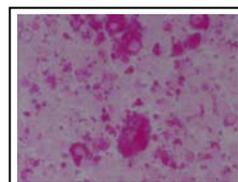


図3 DM腫瘍内注入後7日目の組織像  
DMは、細胞間の間質に存在する腫瘍に Resovist を注入して経過を追うと、2週間程で腫瘍内から消失することが分かった。(図2、3) 参照

(2) 大腿部 VX2 腫瘍に DM を注入、加温を行った。

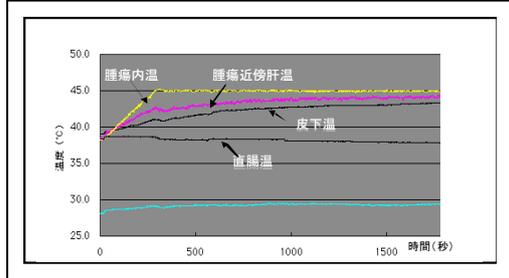


図4 加温中の腫瘍内と腫瘍近傍の温度、体温の変動。腫瘍内の温度は45℃を保持することが可能であった。

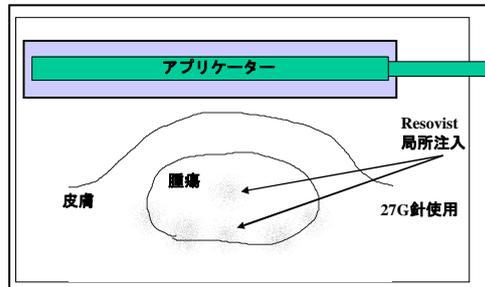


図5 腫瘍へのDM注射の工夫  
加温効果はアプリーケーターと Resovist の距離の二乗に反比例するので、腫瘍の中心と、その背側に重点的に注射した。

腫瘍にDMを注射してRF加温すると、Resovist が確実に残留した腫瘍では加温開始後5分以内に45℃まで加温することができた。(図4) しかし、加温効果はアプリーケーターと Resovist の距離の二乗に反比例するので、注射の部位を工夫する必要があった。腫瘍内加温効果を得て腫瘍温度を上げるために腫瘍の中心に十分な量として腫瘍体積の5から10%程の量の Resovist を注射し、また、腫瘍血流の遮断の目的で、腫瘍の背側に重点的に10-15%程を注射した。(図5)

(3) 安定した加温の方法が樹立されたので、VX2腫瘍大腿筋内移植兔を作成し、3群に分け、実験を行った。

I : 腫瘍の自然経過観察群 4羽

II : 腫瘍内DM注入処置群 8羽

III : 腫瘍内DM注入後加温群 8羽

結果、加温群では8羽中7羽で45℃にまで加温可能であった。

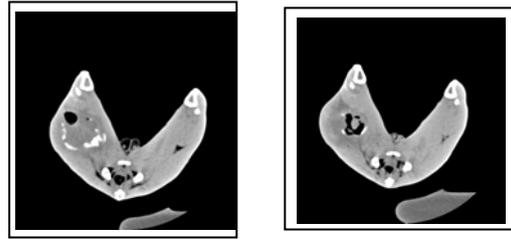


図6 左：DM腫瘍内注入後加温、3日目  
右：14日目の兔大腿腫瘍CT像  
Resovist は腫瘍内に残存し、腫瘍サイズは縮小している。

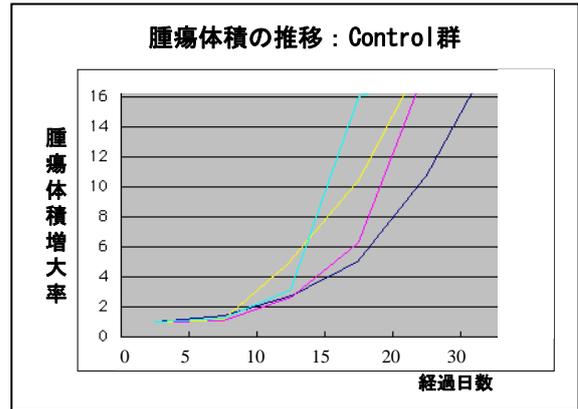


図7 VX2 兔大腿筋内移植腫瘍の体積増大曲線全例2週間から3週間以内で屠殺せざるを得なかった。

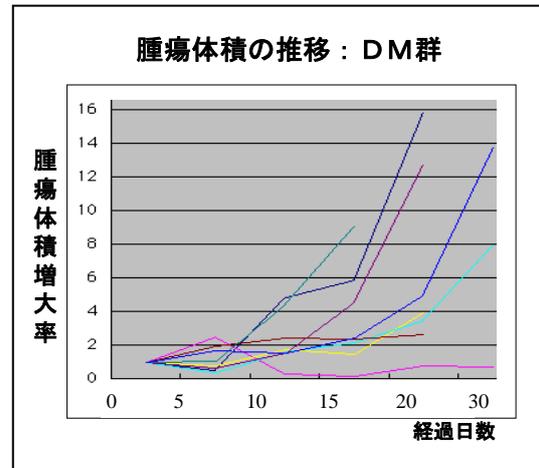


図8 Resovist の注入によって25%の兔で腫瘍増大の抑制が認められた。最終的には全例死亡した。

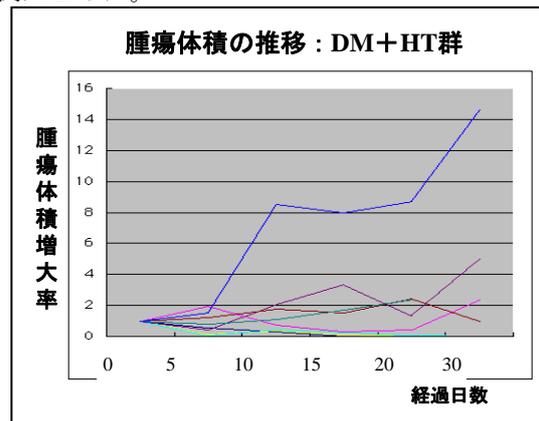


図9 1例を除いて総て腫瘍は消失した。この1例は、加温中温度が41℃までしか上昇せず、Resovist が腫瘍内に充分留まらなかったものと考えられる。

結果、VXII 兎大腿筋内移植腫瘍の体積増大曲線をみると、I 群では腫瘍は短期間に増大し、全例2週間から3週間以内で屠殺せざるを得なかった。

II 群においては、Resovist の注入によって25%の兎で腫瘍増大の抑制が認められた。しかし、最終的には全例腫瘍が増大し死亡した。

III 群では、8例に加温を行い、7例で45℃まで加温できた。1例を除いて総て腫瘍は消失した。この1例は、加温中温度が41℃までしか上昇せず、Resovist が腫瘍内に充分留まらなかったものと考えられた。

(図6、7、8、9)

(4) 画像上、Resovist 注入後加温することで Resovist が滞留することを組織的に検証した。

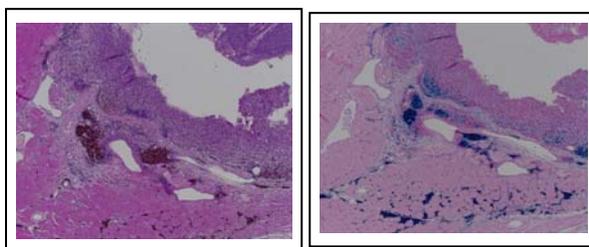


図10 Resovist 注入後加温2週間後の腫瘍内 DM の分布

左：H E 染色  
右：Berlin Blue 染色

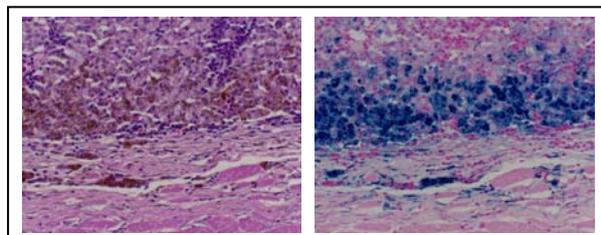


図11 Resovist 注入後加温2週間後の腫瘍内 DM の分布。強拡大(×200)

左：H E 染色  
右：Berlin Blue 染色

加温前は間質に存在した鉄が細胞内に移行し残留していることが分かる。

Resovist 注入後加温し、2週間後の腫瘍内における DM の分布を H E 染色と Berlin Blue 鉄染色で検討した。加温前は間質に存在した鉄が、RF 照射後細胞内に移行し残留していることが分かった。(図10、11)。このことから、Resovist 注入後加温し、その後複数回の加温が組織内加温として可能である可能性があると考えた。

(5) 臨床腫瘍に対する効果についての検討  
人大腸がん継代株、胃がん継代株それぞれ3種をシャーレにて培養、Resovist を接触させただけの場合に比べて RF 照射した場合は細胞内への Resovist の取り込みは著しく増大することが観察された。今後は臨床治療に向けて次のステップに移りたいと考える。

#### (6) 考察

Resovist は、Dextran magnetite として、局所注射が容易で、電磁誘導により体外からの十分な局所加温が可能であった。

Resovist 電磁誘導加温により兎大腿部移植 VX2 腫瘍の局所における増大抑制が可能であった。

初回加温後も Resovist が腫瘍内に残存することから再加温の効果も期待できる。

今後腫瘍内でのより均一な薬剤拡散が可能であれば、電磁誘導加温による抗腫瘍効果が期待できると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Kanji Katayama, Akio Yamaguchi, Makoto Murakami, et al. Chemo-hyperthermic peritoneal perfusion for appendiceal pseudomyxoma peritonei. *Int. J. Clin Oncol*, 14: 120-124 2009.

[学会発表] (計2件)

①片山寛次, 村上 真, 他. ウサギ移植 VX-2 腫瘍内 Resovist 局注による電磁誘導加温の効果. 北陸東海ハイパーサーミア研究会. 2007年7月28日

②片山寛次, 村上 真, 他. ウサギ移植 VX-2 腫瘍内 Resovist 局注による電磁誘導加温温熱療法の効果. 日本外科学会総会. 2007年4月11日. 大阪国際会議場.

[図書] (計2件)

①片山寛次, 廣野靖夫, 五井孝憲, 山口明夫. 胃・大腸の腹膜転移-局所進行臓がんに対する放射線温熱化学療法-ハイパーサーミア がん温熱療法ガイドブック. 日本ハイパーサーミア学会編. 64-69, 2008

②片山寛次, 村上 真, 山口明夫. すい臓の腫瘍-腹膜転移に対する化学温熱腹膜灌流療法-ハイパーサーミア がん温熱療法ガイドブック. 日本ハイパーサーミア学会編. 80-85, 2008

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

片山 寛次 (KATAYAMA KANJI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：30204431

### (2)研究分担者

村上 真 (MURAKAMI MAKOTO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：00334821