

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17246

研究課題名（和文）リンパ節転移に対するリンパ系インターベンション：直接リンパ管内化学療法の新規開発

研究課題名（英文）Lymphatic Intervention for Lymph Node Metastases: Novel Direct Intralymphatic Chemotherapy

研究代表者

富田 康介 (Tomita, Kosuke)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：70803485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リンパ節転移の治療において抗がん剤の経静脈的投与が一般的に行われているが、抗がん剤のごく一部しかリンパ系に到達しないため治療効果は不十分かつ抗がん剤の副作用が問題となることが多い。そこで、リンパ系に直接抗がん剤とリピオドールの混合物を投与する新しい治療法「直接リンパ管内化学療法」の概念実証をVX2担癌ウサギモデルを用いて行った。結果、エピルピシンとリピオドールのエマルジョンを投与した実験群においてウサギの後腹膜リンパ節転移への治療効果が確認され、新しい有用な抗がん剤の投与方法の一つとなり得る事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ系はがんの初期転移経路であり、有望な治療対象であるが、リンパ系への選択的な治療手法はまだ確立されていない。これまで、リポソームやポリマーを使用して皮下や腹腔にリンパ系に選択的に取り込まれる物質を投与する方法が研究されてきた。しかし、これらの手法では局所での炎症反応や全ての薬剤がリンパ系に吸収されず、毛細血管からも吸収されるという問題が解決できない。この研究では、リンパ系に直接抗がん剤を投与することで、抗がん剤の効果を最大化しつつ、副作用を軽減することが出来ると期待される。また、抗がん剤をリンパ流に順行性に注入することで、がん細胞の分布と一致することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Although intravenous administration of anticancer agents is commonly used for the treatment of lymph node metastases, the therapeutic effect is often insufficient because only a small fraction of the anticancer agent reaches the lymphatic system, and the side effects of anticancer agents are often problematic. Therefore, we conducted a proof-of-concept study of "direct intralymphatic chemotherapy," a new treatment method in which a mixture of an anticancer drug and lipiodol is administered directly into the lymphatic system, using the VX2 carcinoma-bearing rabbit model. The results showed that the treatment of retroperitoneal lymph node metastases in rabbits treated with an emulsion of epirubicin and Lipiodol was effective, suggesting that this may be a new and useful method of administering anticancer agents.

研究分野：インターベンショナルラジオロジー

キーワード：インターベンショナルラジオロジー 化学療法 リンパ管造影 リピオドール VX2腫瘍 リンパ節転移

## 1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因の第一位であり、日本人の二人に一人が生涯にがん罹患するとされている。がん患者の死因の9割は転移に起因し、がんの多くはまずリンパ管を介して所属リンパ節に転移することが多い。抗がん剤を静脈から投与する全身化学療法はリンパ節転移に対する一般的な治療法であるが、リンパ系に到達する抗がん剤はごく一部であり、治療効果は不十分で副作用も問題となる。

近年、リンパ系に対して経皮的に治療を行う「リンパ系インターベンション」が注目されている(松本(研究協力者1)、富田(申請者)、長谷部(研究協力者2)、第23回日本血管内治療学会総会シンポジウム, 2017)。申請者らも油性造影剤(リピオドール)を用いたリンパ管造影がリンパ液の漏出(乳び漏)に対して治療効果があること(Matsumoto T, et al. Br J Radiol. 2009)、鼠径リンパ節を超音波ガイド下で穿刺し、リンパ管造影を行う経リンパ節リンパ管造影手技の有用性(Matsumoto T, Hasebe T, et al. Minim Invasive Ther Allid Technol. 2015)について報告した。さらに、申請者らは、本年度、ウサギを用いた動物モデル経リンパ節リンパ管造影法を独自に確立した(図1)。また、リピオドールは、ミリプラチンやエピルピシンなどの抗がん剤と混合して、懸濁液あるいは乳濁液として、肝細胞がんに対する肝動脈的化学塞栓療法の際に以前から用いられている。以上から、申請者は、リンパ節転移に対するリンパ系インターベンション研究のベースが整ってきた。

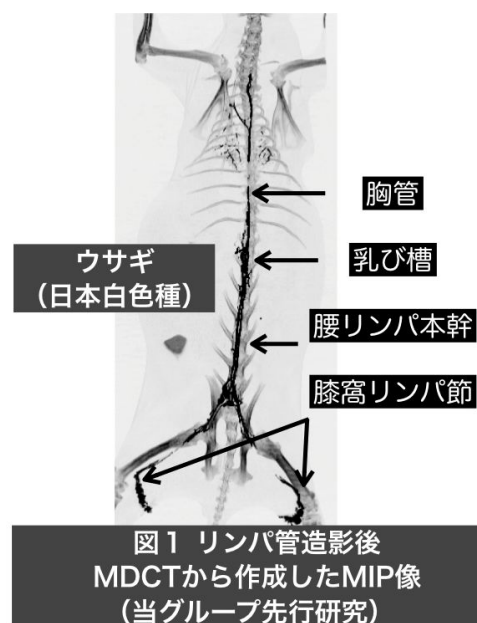


図1 リンパ管造影後MDCTから作成したMIP像(当グループ先行研究)

## 2. 研究の目的

### ● 本研究の目的

本研究では直接リンパ管内化学療法の新規開発のため、後腹膜リンパ節転移を来したVX2担癌ウサギを用いて、動物モデルで直接リンパ管内化学療法の安全性と有効性を検討する。

具体的には研究期間内に次の事を明らかにする。

- (1) 経膝窩リンパ節リンパ管造影におけるリピオドール最大耐容量を検討する。
- (2) 直接リンパ管内化学療法の評価に最適なVX2担癌ウサギの週数を決定する。
- (3) 直接リンパ管内化学療法の有効性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 経膝窩リンパ節リンパ管造影におけるリピオドール最大耐容量を検討する。

2.5-3.5 kgの健常な日本白色種(JW)ウサギを9羽準備する。リピオドール投与量を0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 mlに設定し(ヒトでの投与量の約10 ml, 20 ml, 30 mlに相当する。尚、添付文書上の用量は下肢片側で10 mlである)、各群に3羽ずつ無作為に割り当てる。各群に設定された用量のリピオドールを用いて下記の手法で経膝窩リンパ節リンパ管造影を行い、その後、2週間の観察を行う。一般状態(浅速呼吸、流涎、活動性の低下)および摂餌量を毎日観察し、体重を1週間



図2 ウサギ膝窩リンパ節穿刺(当グループ先行研究)

に1回測定する。ある用量で3羽中1羽に死亡もしくは瀕死状態、1週間で25%以上の体重減少を認めた場合、その群に追加で3羽割り当てる。3羽中2羽もしくは6羽中3羽で上記の状態がみとめられた場合、その用量より一段階少ない容量を最大耐容量とし、以降の実験で用いる。1.5 mlでも最大耐容量に達しなかった場合、以降の実験では1.5 mlを投与量として用いる。

**経膝窩リンパ節リンパ管造影 (図2):** 吸入麻酔下で、パテントブルーを右後肢の足底に0.1 ml皮内注射する。右膝窩の皮膚を切開し上記色素を吸収した右膝窩リンパ節を露出する。露出したリンパ節に30 Gリンパ造影用針を穿刺し、医療用アロンアルファAを刺入部に滴下して針を固定する。リピオドールを手動的に緩徐に注入する。注入終了後、動物実験用X線透視装置を用いて造影されたリンパ系を撮影する。撮影後、抜針し切開創を縫合し閉創する。

## (2) 直接リンパ管内化学療法の評価に最適な VX2担癌ウサギの週数を決定する。

2.5 – 3.5 kgの12週齢時に右大腿部にVX2腫瘍を移植した日本白色種ウサギ (VX2担癌ウサギ) 9羽を準備する。それぞれ移植後12日後、15日後、19日後の時点でそれぞれ3羽ずつ、上述の方法で右膝窩リンパ節よりリンパ管造影を行う。リンパ管造影直後、1日後、7日後にそれぞれ128列MDCT装置 (シーメンス) で撮影する。CT装置は学内研究協力機関である東海大学医学部の装置を用い、得られた3D画像はMaximum Intensity Projection (MIP) を用いて再構成する。作成された画像を放射線診断専門医2名でリンパ節転移の有無やリンパ系の形態 (リンパ管の閉塞や側副路の有無など) 等について解析し、直接リンパ管内化学療法の評価に最適なVX2担癌ウサギの週数を決定する。

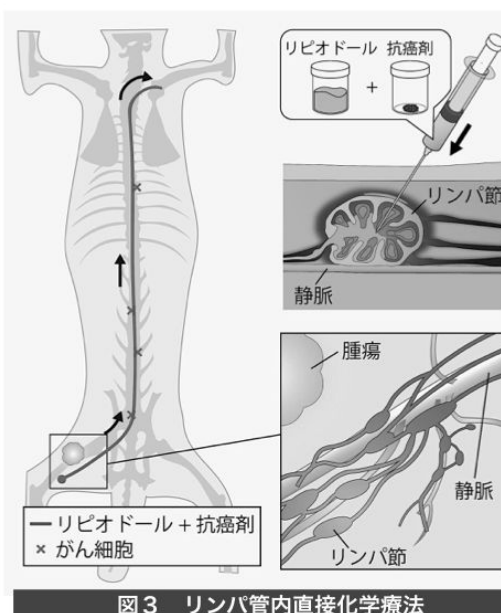


図3 リンパ管内直接化学療法

## (3) 直接リンパ管内化学療法の有効性を検討する。

(2) で最適化された週数の2.5 – 3.5 kgのVX2担癌ウサギを15羽準備し、コントロール群、ミリプラチン群、エピルピシン群にそれぞれ5羽ずつ無作為に割り付ける。で決定したリピオドールの用量に基づき、経膝窩リンパ節穿刺による**直接リンパ管内化学療法 (図3)**を行う。術前および術後7日後にCTを撮像し、術後7日後のCT撮影の後ウサギを安楽死させ後腹膜リンパ節を摘出する。CT上の後腹膜リンパ節の体積の変化の画像評価と、摘出した後腹膜リンパ節のヘマトキシリン-エオジン染色および抗サイトケラチンAE1+AE3抗体 (VX2腫瘍が染色される) を用いた免疫染色による病理評価に基づいて、治療前後の後腹膜リンパ節転移の有無を比較し、直接リンパ管内化学療法の有効性を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 経膝窩リンパ節リンパ管造影におけるリピオドール最大耐容量を検討する。

リンパ管造影はすべてのウサギで成功裏に行われた。リンパ管造影時のウサギの平均体重は $2.88 \pm 0.15$  kgであった。1.0 mLまたは1.5 mLのリピオドールを用いてリンパ管造影を行ったウサギは、大腿リンパ管から胸管までのすべての部位で、平均ビジュアルスコア (ビジュアルスコアは以下のように定義: 4: リンパ管全体が明確に描出され、欠損がない。3: リンパ管がよく描出され、欠損は最小限である。2: リンパ管が描出され、許容できる範囲の欠損がある。1: リンパ管の描写が不十分で、許容できない欠損がある。) が3.0以上であった。0.5 mL投与群のウサギは、大腿リンパ管から腰部リンパ幹までの平均ビジュアルスコアが3.0以上、乳び槽と胸管での平均ビジュアルスコアが3以下

であった。評価者1、2、3のGwet's AC1一致係数は0.847 (95%CI: 0.739 - 0.955)であった。

1.5ml群の3羽のウサギのうち1羽は、リンパ管造影の翌日に死亡した。その他のウサギは2週間の観察期間中、全身状態や餌の摂取量に異常はなく、リンパ管造影の2週間後の0.5ml群、1.0ml群、1.5ml群の平均体重はそれぞれ $3.20 \pm 0.03$  kg、 $3.02 \pm 0.31$  kg、 $3.06 \pm 0.25$  kgだった。なお、体重減少は認められなかった。以上の結果から、体重2.5~3.5kgのウサギに対するリピオドールの至適投与量は1.0mlと決定され、以降の実験に使用した。

### (2) 直接リンパ管内化学療法の評価に最適なVX2担癌ウサギの週数を決定する。

リンパ管造影はすべてのウサギで正常に行われた。day12とday15のグループでは、大腿リンパ管から胸管までのリンパ系の平均ビジュアルスコアは3.0以上であった。day19群では、大腿リンパ管から乳び槽までの平均視覚スコアが $> 3.0$ 、胸管の平均視覚スコアが $< 3.0$ であった。評価者1、2、3のGwet's AC1一致係数は0.815 (95%CI: 0.698 - 0.931)であった。リンパ節転移は、12日目および19日目のグループのすべてのウサギで、15日目のグループの3羽のウサギのうち2羽で検出された。これらの結果から、VX2腫瘍の後腹膜リンパ節転移のモデルとして、VX2腫瘍細胞を右大腿部に移植してから12日目のウサギを次の実験に使用した。

### (3) 直接リンパ管内化学療法の有効性を評価する。

抗がん剤とLipiodolの混合物のリンパ系への直接投与は、すべてのウサギで成功した。投与時のウサギの平均体重は $2.57 \pm 0.16$ kgであった。1週間の観察期間中、すべてのウサギに全身状態および食物摂取量の異常は認められず、1週間の観察期間終了時のエピルビシン群、ミリプラチン群およびコントロール群の平均体重は、それぞれ $2.70 \pm 0.19$ kg、 $2.66 \pm 0.15$ kgおよび $2.72 \pm 0.23$ kgだった。体重減少は認められなかった。

治療前に透視下で測定した後腹膜リンパ節の長径は、エピルビシン群、ミリプラチン群、対照群で有意差はなかった (平均 $\pm$ 標準偏差: エピルビシン群  $14.8 \pm 1.6$  mm、ミリプラチン群  $13.0 \pm 3.7$  mm、対照群  $14.2 \pm 3.3$  mm、 $P = 0.637$ )。

各群の治療1週間後の後腹膜リンパ節の平均直径は、エピルビシン群  $14.9 \pm 1.9$  mm、ミリプラチン群  $15.8 \pm 4.4$  mm、コントロール群  $16.3 \pm 2.8$  mmであった。ミリプラチン群と対照群では、リンパ節の大径化の傾向が見られたが、全群で統計的に有意な差は見られなかった。(Wilcoxon符号付順位検定、エピルビシン群 $P=0.500$ 、ミリプラチン群 $P=0.063$ 、コントロール群 $P=0.063$ )。

切除された後腹膜リンパ節の病理評価を行った。エピルビシン群の5羽のウサギのうち、2羽がCR、3羽がPRであった(図4)。ミリプラチン群およびコントロール群のウサギはすべてNRであった(図5)。

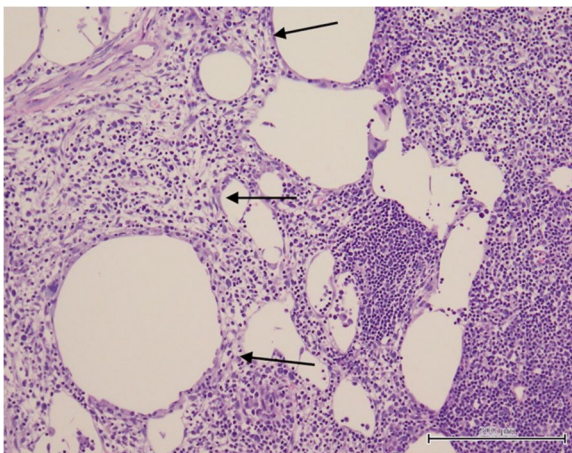


図4

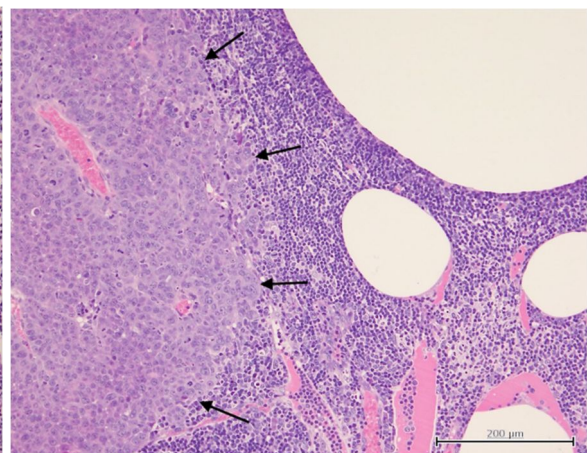


図5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 富田康介, 松本知博, 山本章太, 大佛健介, 須田慧, 橋田和靖, 亀井俊佑, 中山正光, 今井裕, 長谷部光泉
2. 発表標題 ウサギ大腿VX2腫瘍モデルにおける経膝窩リンパ節リンパ造影の検討
3. 学会等名 第50回日本IVR学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田康介, 松本知博, 亀井俊佑, 山本章太, 橋田和靖, 須田慧, 夏山雄揮, 長谷部光泉
2. 発表標題 ウサギ経膝窩リンパ節リンパ造影でのリピオドール投与量の最適化
3. 学会等名 第49回日本IVR学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosuke Tomita, Tomohiro Matsumoto, Shota Yamamoto, Satoshi Suda, Shunsuke Kamei, Kazunobu Hashida, Yutaka Imai, Terumitsu Hasebe
2. 発表標題 Dose Optimization of Lipiodol for safe and feasible transnodal lymphangiography in rabbits
3. 学会等名 CIRSE2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosuke Tomita, Tomohiro Matsumoto, Shota Yamamoto, Satoshi Suda, Kazunobu Hashida, Shunsuke Kamei, Masamitsu Nakayama, Terumitsu Hasebe
2. 発表標題 Lymphangiography via the popliteal lymph node in a rabbit VX2 thigh tumor model.
3. 学会等名 CIRSE2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------