

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 04 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591620

研究課題名（和文） 脊髄髄内 glioma に対する direct injection 治療

研究課題名（英文） Direct injection treatment for intra-parenchymal spinal glioma

研究代表者

山田 昌興（YAMADA SHOKO）

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：60287761

研究成果の概要（和文）：

ラット glioblastoma である C6 cell の培養細胞に対し、in vitro で temozolomide (TMZ) 投与を行い、100mM にて有意な増殖抑制効果を得た。100 mM の TMZ が脳組織に毒性を呈さないことを確認後、ラットの皮下および脳内に C6 cell を移植し、TMZ を直接腫瘍内に投与した。その結果、生理食塩水を腫瘍内に投与した対照群に比べて、腫瘍増殖が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

C6 is a glioblastoma cell originated from brain of a rat. The cells were treated by temozolomide (TMZ) in vitro for dose-response study, and the cell growth was definitely suppressed in 100 μ M of TMZ. And next, we evaluated that whether 100 μ M TMZ causes toxic effect or not to rat's brain parenchyma. No brain parenchymal damage was identified in the brain as far as inject-speed was kept in less than 0.25 μ l/minutes. First, C6 cells were implanted into subcutaneous in bilateral lumbar regions, and TMZ was injected directly into the tumor 3 days after the implantation of C6 cells. As a control, saline solution was injected into the tumor instead of TMZ. Tumor growth was suppressed in TMZ injected cases. And next, C6 cells were injected into the right brain sub-cortex, and TMZ was injected directly into the tumor 3 days after the implantation of C6 cells. Saline solution was injected into the tumor in control rats. Compared with control, TMZ-treated tumor showed much slower growth.

交付決定

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：グリオーマ、テモゾロマイド、脳腫瘍、直接投与、CED (convection-enhanced delivery)

1. 研究開始当初の背景

Glioblastoma multiforme (GBM)は脳原

発の悪性腫瘍であり生存期間1年と非常に予後不良とされ、その予後は、手術での摘出率

に大きく左右される。しかし、脳および脊髄内に発生した場合、外科的に全部摘出することは不可能である。また、中枢神経系への放射線治療は神経障害、汎血球減少など生活レベルを低下させる副作用が強く、更に、中枢組織には血液-脳関門(BBB: blood-brain barrier)があるため、抗がん剤の組織内への移行が非常に悪く、これも、中枢神経系腫瘍の予後の悪い大きな理由となっている。実際、化学療法は薬物の髄内移行性が悪いため 30-40%にしか投与されず、放射線治療も 70%の症例に留まる。そのため、依然として治療成績は不良である。

2. 研究の目的

脊髄内の glioma は全摘出が困難であり、機能的に日常生活レベルを低下させない目的から、生検や部分切除に留まることが多い。TMZ (temozolomide: テモダール) は、従来の抗がん剤と異なり、頭蓋内悪性 glioma に対し、放射線治療のみの症例と放射線治療+TMZ 投与の症例とで、生存期間 2.5ヶ月延長とのデータを認めた唯一の抗がん剤である。ことを踏まえ、脊髄髄内の glioma に同剤が行き渡れば、有効な治療法となると思われる。しかし、TMZ も BBB を通過しにくい薬剤の一つである。そこで、convection-enhanced delivery 法 (CED 法) を用いて、腫瘍内安全に直接薬剤投与できれば、脊髄腫瘍のように全摘不可能な悪性腫瘍の治療が可能ではないかと考え、ラットを用いた研究で検討を行う計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) In vitro での C6 cell に対する TMZ の dose-response study:

2×10^4 個の C6 培養細胞を 6-well プレートに撒き、2 日目から、培養液中に 0, 25, 50, 75, 100, 200 μM の濃度となるように TMZ を投与し、3 日間連続 TMZ を投与し、1 週間後の細胞数を計測することで、細胞増殖抑制効果を評価した。1 回の実験で、6-well plate を 3 つ用い (各濃度 3 個)、5 回施行し、各濃度、計 15 個のデータを計測し結果を出した。

(2) CED 法による injection 速度の決定: ラットの脳内に液体を注入する場合、流入操作にて脳損傷を生じる可能性もあり、安全に投与できる流入速度を検討した。

Hamilton の 100 μl シリンジを micro-injector に設置し、30G の穿刺針を用いて穿刺、投与し、脳損傷が生じない注入速度を評価した。ラットをペントバルビタールにて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定する。ラットの頭皮を縦切開し、脳 (bregma から、

右に 3mm、後方に 4mm の位置) に 18G で burr hole を開け、頭蓋骨の抵抗がなくなった時点で、burr hole が開いたと判断した。30G の穿刺針を脳表に当たるまで進め、そこから、ゆっくり 4mm の深さまで針を刺し込み、micro-injector にて 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ の各投与速度で 100 μM TMZ 入り生理食塩水 0.4 μl を注入した。その 1 週間後、病理学的に脳損傷を形成していないかを確認した。また、この実験においては、投与速度の評価と同時に、100 μM TMZ 入り生理食塩水が正常脳細胞に壊死や毒性効果を与えるかどうかも評価した。

(3) 皮下への C6 cell 移植と TMZ 投与: 1×10^8 の培養 C6 cell を採集し、100 μl の MEM 培養液に混入し、両側の大腿部の皮下に植えた。まず、同部にて増殖可能であるかを検討し、3 日後の腫瘍サイズを計測し、固形腫瘍として増大していることを確認した。その後、腫瘍内に 1 つは 100 μM TMZ を、他方は生理食塩水を直接注入し、2 週間後の腫瘍サイズを計測した。また、ラットを sacrifice し、その腫瘍を病理学的に検索した。

(4) 脳内および脊髄内への C6 cell 移植と TMZ 投与:

C6 cell を脳組織内に 2mm 径となるように (4 μl) micro-injector を用いた CED 法で 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ で注入し、1 週間後に、その腫瘍内に同様の方法で 100 μM TMZ または生理食塩水を 3 日間投与し、2 週間後にラットを sacrifice し、病理学的に腫瘍の状況を検討した。その結果を踏まえ、脊髄内では 0.5mm 径の腫瘍となるように C6 cell を移植し、その腫瘍内に脳内で行ったと同様の方法で 100 μM TMZ または生理食塩水を CED 法にて 3 日間投与し、2 週間後にラットを sacrifice し、病理学的に腫瘍状況を確認する予定を立てた。

4. 研究成果

(1) TMZ の D-R study (図 1) :

図 1 が示すように、TMZ の投与濃度を濃くするに従い、1 週間後の C6 cell の細胞数も減少する傾向が認められた。TMZ 25-50 μM では、0 μM 群と比較し細胞数に差を認めなかったが、75 μM では、1 週間後の細胞数が生理食塩水を投与した群と比較し 53%であった。1 週間後の細胞数が 50% 以下となる TMZ 濃度を至適濃度と考え、C6 cell に対する TMZ の至適濃度を 100 μM と決定した。(100 μM では、約 80%の腫瘍増殖効果を得た。)

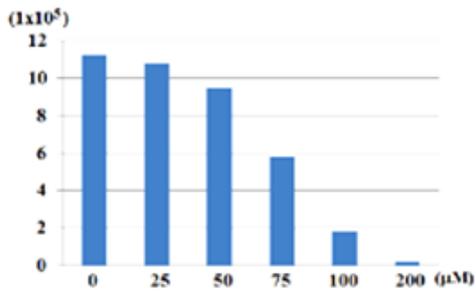


図1: Dose-response study

(2) 安全な脳内への注入速度 (図2):

100μM TMZ入り生理食塩水0.4μlをラットの脳組織に micro-injector を用いて各投与速度で注入した結果、0.5, 1.0 μl/minの注入速度では注入部位に一致した脳欠損部が認められ、速度が速過ぎるための脳損傷と判定した。一方、0.25, 0.1 μl/minの投与速度では、病理学的に脳組織の破壊を来してないことを確認し、安全に投与できる速度は0.25μl/minに決定した。また、100μM TMZは正常ラット脳組織に炎症や毒性反応を生じないことも確認された。

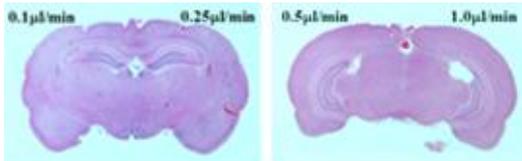


図2: 脳内投与速度と脳損傷

(3) C6 cellの皮下移植およびTMZ直接投与による治療 (図3、4):

ラットの大腿にC6 cellを植え、3日後にはしっかりと固形腫瘍として増殖していることが確認された。その時点での左右差は認められなかった。それから、3日間TMZまたは生理食塩水を腫瘍の中心部投与した結果、図3に示すように、TMZを投与した腫瘍では、2週間後の腫瘍体積が、27mm³であったのに対し、生理食塩水を投与した群では、43mm³と優位な相違を認めた。



図3: 皮下移植C6cellに対するTMZ投与

また、病理学的検索をも行なった。生理食塩水を投与した腫瘍では、腫瘍が大きいのみならず、中心部に necrosis に陥っている部分

が多く目立ち、その周囲に腫瘍の強い増殖が認められた。一方、TMZで治療した腫瘍では、腫瘍サイズが小さいことに加えて、腫瘍内出血は散在してはいたものの、腫瘍中心部の necrosis はほとんど認められなかった。その結果、TMZによる腫瘍縮小効果では、腫瘍細胞が necrosis に陥ることは少なく、腫瘍の増殖抑制効果および apoptosis 誘導による腫瘍縮小効果の可能性が高いと考えられた。

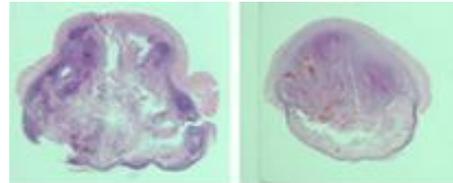


図4: 皮下移植C6cellの病理所見

(4) ラットの脳および脊髄グリオーマに対する、TMZ CED法 (図5):

①申請時の計画では、ラットの脊髄に腫瘍を植える予定であったが、5匹のラットのC1-2にC6 cellを移植した結果、その場で四肢麻痺になるラットや、何とか動ける状態になっても経口摂取不可能となり、1-2日でラットが死亡したため、頸髄へのC6 cell移植、TMZ投与はひとまず中止し、脳内に移植したC6 cellに対し、CED法でTMZを投与し、その効果を検討した。

②C6 cellを2mm直径(4μl)となるようにラットに移植し、1週間後から、連続3日間100μMTMZを8μl投与し、投与終了後から1週間してラットを sacrifice した。

③最初は、移植したC6 cellの腫瘍中心部にTMZを投与する目的から、C6 cellを注入した30G穿刺針をラットの頭蓋骨にボンドで固定し、1週間後から、その針を用いてTMZを投与する計画を立てた。ラットがお互いに引っ掻き合わないよう、1匹ずつ別々のケージに入れたが、覚醒すると自分で針を動かしたり、ゲージに頭をこすりつけることで、直ぐに針を抜去するか、抜けかけるため、TMZ投与に使用することができず、その方法はやむを得ず中止とした。結局、頭蓋骨に針を固定することはあきらめ、TMZ投与の連続3日間、ラットに麻酔をかけ、頭蓋骨に開けた孔から、その度に30Gで穿刺を行い、4mmの深さでTMZを投与した。

④図5が示す如く、移植後から2週間での、TMZ投与ラットと生理食塩水投与ラットでは、明らかに腫瘍の増大が異なっていた。しかし、TMZを投与した場合でも、かなりの大きさで腫瘍が増大していたことも事実であり、治療の点から効果が充分にあるとは

言い難い結果となった。

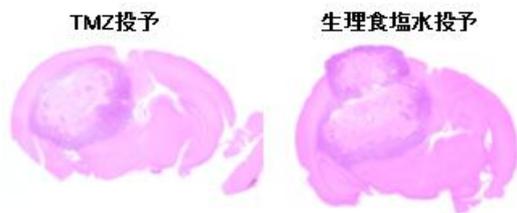


図5: 脳内移植C6cellに対するTMZ投与

この理由として、TMZ 投与が、腫瘍全体に及んでいなかったことが考えられる。その原因は、ラットの生存中には腫瘍の大きさの評価が困難であり、腫瘍全体に十分行き渡るTMZ 投与量を正確に把握できないことである。また、0.25 μ l/minの投与速度下で、4mm直径(約32 μ l体積)の腫瘍にTMZを行き渡らせるとしたら、128分は掛かり、さらに6mm直径大きくなった腫瘍には864分と14時間以上かかる計算となり、辺縁まで十分にTMZが行き届かない可能性があるのみならず、余りに長時間では、すでにTMZの薬効も低下していることとなり、現実ではなくなってしまう。

⑤現在、ラットの腰髄に100 μ M TMZ入り生理食塩水の投与を試みている。頸髄レベルに腫瘍を移植したり、TMZを投与すると、神経圧迫により呼吸障害、嚥下障害、四肢麻痺となるため、死亡が早い。一方、腰髄であれば、下肢の麻痺はきたす可能性あるが、両上肢の麻痺はないためある程度動け、また、呼吸障害、嚥下障害は来さないため、比較的長期生存してくると期待している。現時点で、4匹のラットの腰髄に100 μ M TMZ入り生理食塩水を投与またはC6 cellを移植した実験を行ったが、全匹において翌日から両下肢の動きが悪くなっていたが、両側上肢を用いて何とか動いており、2週間は生存していることが確認できた。

⑥今後、ラットの腰髄にC6 cellを移植し、TMZをCED法にて注入し、その効果を判定する予定である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 昌興 (YAMADA SHOKO)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：60287761

(2) 研究分担者

松野 彰 (MATSUNO AKIRA)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：00242058

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：