

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791437

研究課題名（和文） ラジオ凝固療法+免疫賦活因子局所注入により局所制御と遠隔制御も可能か？

研究課題名（英文） Radiofrequency ablation of rabbit VX2 liver tumors model in combination with immunostimulant agent

研究代表者

大隈 智尚 (OKUMA TOMOHISA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号:50445029

研究成果の概要（和文）：家兎 VX2 肝腫瘍と遠隔転移モデルを耳皮下に作成し、肝腫瘍に CT ガイド下の経皮的ラジオ波凝固療法と免疫賦活因子（OK-432、ピシバニール）の局所注入を行い、生存延長と局所および遠隔制御への効果を検討した。無治療群、ラジオ波凝固単独群、ラジオ波凝固+免疫賦活因子局所注入群の 3 群で比較検討を行った。ラジオ波+免疫賦活因子局所注入群で生存率に有意な延長を認め、局所腫瘍も無治療群に比して増加率に有意差を認めた。

研究成果の概要（英文）：To evaluate anti-tumor immunity activated by radiofrequency ablation combination with immno-stimulant agent, we examined end-point survival and local, distant tumor for combination therapy of rabbit VX2 liver model. Untreated control group, radiofrequency ablation alone, and radiofrequency ablation with combination therapy group were assigned. Radiofrequency ablation with combination therapy improved survival and suppression of distant and local tumor growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線医学

キーワード：ラジオ波凝固療法、実験腫瘍、免疫賦活

1. 研究開始当初の背景

ラジオ波凝固療法（radiofrequency ablation:以下 RFA）は、ラジオ波で発生する高熱により病変の局所壊死を産み出し、腫瘍組織を崩壊させる治療法である。発熱の原理は日常生活で用いられる電子レンジや外科手術で用いる電気メスと同様の周波数が用いられている。具体的な方法は超音波や CT 画像を参照し、電極針を腫瘍に直接穿刺、通電を行い熱凝固させるものである。現在、RFA は肝細胞癌の治療では外科切除、経カテーテ

ルの動脈塞栓術と並んで 3 大治療法の 1 つとして保険診療下で広く行われている。RFA は肝以外に、肺、腎、骨腫瘍にも応用されており、当施設も多数の症例に対して治療および基礎実験を行ってきた。RFA の有効性については多数の論文報告がされているが、問題点として電極針径の制限から 3 cm 以上の大きな腫瘍では局所制御成績に限界があり、動脈塞栓術の併用や生理食塩水の注入など何らかの手技を加えなければ凝固範囲の

拡大が期待できないとされている。しかし広範に凝固治療すると治療後の発熱遷延や胆管炎や膿瘍の合併、腹水などの合併症の危険も伴うため、焼灼範囲を拡大する以外の方法の開発が必要と思われる。

RFA による体内での腫瘍壊死で崩壊した腫瘍細胞内から抗腫瘍免疫を誘導する抗原を放出されることが報告されているが、さらに RFA に加えて腫瘍組織に免疫活性化因子 (OK-432 (ピシバニール：抗悪性腫瘍剤) を注入することで、免疫細胞の活性化、免疫細胞にかかわるサイトカインの産出により免疫作用を増強させ、RFA と腫瘍免疫活性化因子の 2 つの因子が同時に働くことが重要な役割を果たし、治療成績を向上させることが可能と考えた。申請者は平成 21・22 年度文部科学省科学研究費補助金「家兔 VX2 肺腫瘍モデルに対する CT ガイド下の経皮的ラジオ波凝固におけるラジオ波単独治療群と免疫賦活化因子の GM-CSF の局所注入併用群との局所制御率の比較検討」では肺腫瘍と遠隔転移モデルに対して、RFA と免疫賦活化因子の使用が有効であったと示した。肝腫瘍モデルでも RFA に免疫活性化をさせることで、腫瘍の局所制御、遠隔転移制御、および生存率について改善が得られるかの検討を行い、本研究を応用した臨床例での治療効果の向上に反映させたいと考えた。

2. 研究の目的

ラジオ波凝固療法より凝固壊死した腫瘍細胞内から抗腫瘍免疫を誘導する抗体が放出されるが、それに加えて免疫賦活因子の局所注入を併用することで抗腫瘍免疫をさらに活性化させ、①局所制御率の改善②遠隔転移への制御の可能性③生存率が有意に延長するかを実験モデルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験はすべて全身麻酔下に行った。日本白色種兎 (メス：12 週令、体重 2.0-2.5Kg を使用) 麻酔は Ketamine40mg と xylazine4mg の混合液を筋肉および静脈内持続注入により維持した。

(2) 腫瘍モデルは動物実験用の CT を用い、CT ガイド下で経皮的に VX2 腫瘍の浮遊液を注入、遠隔腫瘍モデルは耳介皮下に腫瘍を注入して作成した。7 日後に CT を撮影し肝への腫瘍生着を確認し実験を行った。

(3) ラジオ波凝固：ラジオ波発生装置は RF2000、電極針は LeVeen Electrode を使用した。電極針を CT ガイド下に穿刺、腫瘍到達を確認し展開針を広げて、毛剃した腹部に電極板を貼付する。通電は 30 ワットで開始、30 秒ごとに 10W ずつ出力を上げ、最大抵抗に至るまで通電した。

(4) RFA 直後に電極針に沿わせて 24G 針を穿刺、CT で先端を確認後、腫瘍に薬剤 (OK-432) の局所注入を行った。

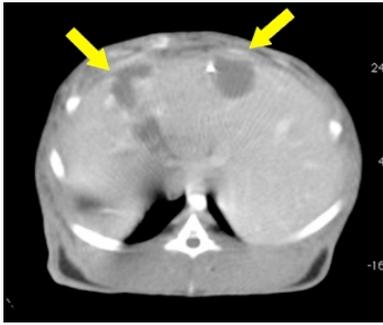
(5) 非治療群、RFA 単独群、OK-432 単独、RFA+OK432 局所注入併用群の 4 群の①生存期間を比較、② 4 群の遠隔耳転移モデルの経時的体積変化を比較③造影 CT で肝腫瘍体積を計測し、経時的体積変化を比較した。

(6) 病理標本作製のため、過量の麻酔薬にて固定し、肝を摘出後、H-E 染色を行った

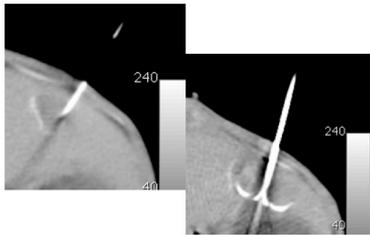
4. 研究成果

(1) ラジオ波凝固治療
肝、耳への VX2 腫瘍生着率：92%、97%。ラジオ波治療および局所注入手技は全例で成功した。

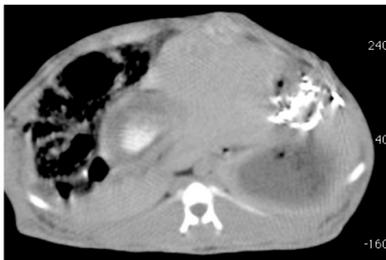
治療前の造影 CT。黄矢印に低吸収域あり生着した VX2 腫瘍。



ラジオ波凝固治療中の展開した電極針



ラジオ波凝固直後に OK-432 を注入。CT 画像で薬剤分布が確認できるように高吸収を示す油性造影剤を混注した。



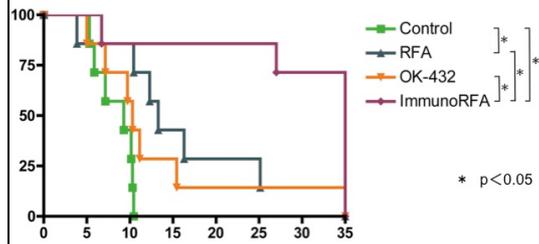
治療 4 週間後の造影 CT。黄矢印は縮小した腫瘍。



(2) 生存曲線

Kaplan-Meier 法での生存曲線。次頁の図に示すように未治療群と OK432 単独、RFA 単独、

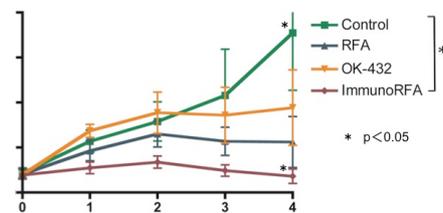
RFA+OK432 局所注入併用群のそれぞれに有意に生存期間が延長した (Log-rank test, $p < 0.05$)。



(3) 遠隔転移モデルの体積変化



左上；腫瘍植え付けより 1 週間、中央；3 週間後、右下；5 週間後で腫瘍は縮小している。治療 4 週後で非治療群と RFA+OK432 局所注入併用群で腫瘍体積に有意差が示された。 ($p < 0.05$)



(4) 肝腫瘍の体積変化

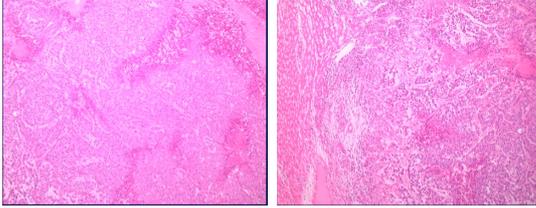
治療 7 週で非治療群と RFA+OK432 局所注入併用群で腫瘍体積に有意差が示された。 ($p < 0.05$)

(5) 病理組織

病理組織では、未治療の VX2 腫瘍 (左図、弱拡大) は核の大小不動が著明で核小体が明瞭な腫瘍細胞が観察された。一方、RFA+OK432 局所注入併用群を施行した腫瘍 (右図、弱拡大) は壊死していた。ラジオ波凝固後に特徴

的な細胞質の萎縮と核小体の不明瞭化、ongoing necrosis の所見が認められた。

(非治療群の腫瘍) (治療後の腫瘍)
(HE 染色、弱拡大)



(6) 展望

今回の実験における家兎 VX2 腫瘍を使った肝腫瘍実験モデルに対する経皮的ラジオ波凝固治療に加え免疫賦活因子局所注入により腫瘍の局所制御率改善と生存率の延長のみならず耳皮下に作成した遠隔転移腫瘍モデルまで制御可能であることが示された。ラジオ波凝固により起きる腫瘍抗原を樹状細胞が認識、抗原提示を行い、腫瘍特異的な細胞障害性 T リンパ球活性化の抗腫瘍免疫の活性化を免疫賦活因子注入によりさらに免疫機能を増強させ、ラジオ波凝固単独より生存率延長や遠隔転移の縮小に至ったと示唆された。ラジオ波凝固療法と免疫賦活の併用療法は治療適応の拡大につながる臨床的にも特色のある研究の基盤ができたと思われる。ただし実際に臨床応用するには免疫賦活因子に対する人間と兎の免疫反応の相違が想定される他、免疫賦活薬剤の選択や投与量、ラジオ波凝固療法後からいつの時点で注入するか、注入方法/経路(直接注入、経静脈、経動脈注入するか等)、治療に伴う合併症の検討などの様々な問題点がある。また、家兎 VX2 腫瘍は非常に高悪性度な性質を持った細胞で、他種類の腫瘍モデルでの検討も必要である。このような問題をふまえ、今後もラジオ波凝固治療と他の免疫賦活物質や抗癌剤との併用療法で良好な局所制御や生存率延長、遠隔転移への治療効果が期待できるか、

さらなる検討を加え発表していく予定である。

5. 主な雑誌論文等

(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 3 件)

(1) Kageyama K, Yamamoto A, Hamamoto S, 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 interv radiol. In press. (査読あり)

(2) Hamamoto S, Okuma T, Yamamoto A, et al. Radiofrequency ablation and immunostimulant OK-432: combination therapy enhances systemic antitumor immunity for treatment of VX2 lung tumor model. Radiology 2013;267:405-413 (査読あり)

(3) Okuma T, Tsuji T, Sakamamoto T, et al. A case of postoperative pyopneumothorax following CT-guided radiofrequency ablation for lung cancer with interstitial pneumonia. Acta radiol Scand 2012;1:19 (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隈 智尚 (OKUMA TOMOHISA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50445029

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

影山 健 (KAGEYAMA KEN)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学院生

濱本 晋一 (HAMAMOTO SHINICHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号: 80711788

山本 晃 (YAMAMOTO AKIRA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 60419695

松岡 利幸 (MATSUOKA TOSHIYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40295697