

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461894

研究課題名(和文)肝細胞癌に対するRI標識リピオドールを用いた新しい放射線塞栓療法の開発

研究課題名(英文)Development of new radioembolization using radioisotope labeled lipiodol for hepatocellular carcinoma

研究代表者

谷川 昇(TANIGAWA, Noboru)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90227215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：手術不能肝細胞癌において肝動脈塞栓術は治療の中心的な役割を果たしている。本研究では肝癌モデル家兔を用いて、従来法であるリピオドールによる肝動脈塞栓術(TAI)を行った群と放射性同位元素(RI)標識したリピオドールを用いてTAIを行った群、無治療群に分け、その治療効果を比較した。結果はRI標識リピオドールを用いた治療症例には3週以上の長期生存個体が見られた。特に標識リピオドール治療群では49日生存した症例が見られ、RIによる抗腫瘍効果の治療の上乗せ効果が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：Transarterial chemoembolization is essential for unresectable hepatocellular carcinoma. We developed new radioembolization using Y-90 labeled lipiodol. Treatment model was divided into three groups according to the embolic materials, that is, lipiodol group, Y-90 labeled lipiodol group, and no treatment group, and treatment effects were compared among the three groups. The rabbits treated with Y-90 labeled lipiodol got the longest term survival among the three groups. New radioembolization using Y-90 labeled lipiodol is thought to be effective and shown the result of which the additional effect is expected compared with the conventional embolization.

研究分野：IVR

キーワード：放射性同位元素 肝細胞癌 肝動脈塞栓術

## 1. 研究開始当初の背景

手術・化学療法・放射線療法はがん治療における3本柱である。肝細胞癌もその例外ではなく、手術不能例においてはラジオ波凝固療法、肝動脈塞栓術、全身化学療法、放射線療法などが選択される。その中でも肝動脈塞栓術は本邦において開発・発展してきた手技であり、現在でも手術不能肝細胞がんに対する治療の中心的な役割を果たしている。本邦での肝動脈塞栓術においては抗がん剤とリピオドールとの混合液を肝動脈内に注入し、その後ゼラチンスポンジ製剤による動脈塞栓を施行する方法、いわゆる肝動脈化学塞栓療法が一般的である。一方、海外では1960年代より肝腫瘍に対して肝動脈より放射線同位元素を注入する内照射療法の研究が開始され、近年 Y-90 **マイクロスフェア** (Therasphere; MDS-Nordion 社、Canada, SIR-Sphere; SIRTex Medical 社、Australia) の臨床応用がなされている。しかしながら、Y-90 が純ベータ崩壊核種であるため画像による視覚化が不可能であり、さらには Y-90 を含有したガラスビーズのサイズに起因したマイクロスフェアの病巣内到達部位の不確実さ、および Y-90 の体内分布の視覚化が不可能なことなど、解決すべき問題が残存している。本邦でも I-131 を用いた塞栓療法の報告を国内で認めるが(日本医学放射線学会雑誌、1985 Aug 25;45(8): 1176-8.) 臨床応用には至っていない。一方、Lau らにより“ I-131 標識リピオドールの肝動脈内投与が再発率を減少させ生存期間延長に有効である ”との報告がなされ ( Adjuvant Intra-arterial

Iodine-131-labeled Lipiodol for Resectable Hepatocellular Carcinoma, Wan Yee Lau et.al., Annals of Surgery, Vol 247, No 1, January 2008) 肝癌診療ガイドライン 2009 年度版の補助療法の項でも言及されている。しかし、I-131 は線のみならず β線も放出するため本邦での臨床応用については放射性同位元素の取り扱い規制上極めて困難と考えられる。

そこで、本研究申請者は、本邦での肝動脈化学塞栓術の際に一般的に用いるリピオドールにベータ線放出核種であるイットリウム-90 (Y-90) を標識し、リピオドールの特性を生かした新しい放射線塞栓療法の開発を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究ではこのリピオドールの特性に注目して Y-90 標識リピオドールを作成し、血管造影の手技を用いて家兔の実験的肝腫瘍モデルに局所投与し抗腫瘍効果を検証すること、および Y-90 の他臓器への放射線の影響を軽減するため Y-90 投与前に RI 標識リピオドールの体内分布を明らかにする必要がある。具体的には、動物腫瘍モデル(家兔の VX 2 細胞を用いた実験的肝腫瘍モデル)に対して Y-90 標識リピオドールを投与し、RI 標識リピオドールの分布の画像化を、後者においては腫瘍の局所制御効果を確認することである。

## 3. 研究の方法

### 平成25年度

(1)Y-90標識リピオドールおよびIn-111標識リピオドールの作成

キノリン誘導体である8-ヒドロキシキノリンをエタノールに溶かし、20mg/mL濃度に調製する。

上記の溶液 100  $\mu$ L をガラス製の容器にとり、これに In-111 あるいは Y-90 塩酸溶液を 50  $\mu$ L (放射線濃度 1000MBq/mL) 添加し、数秒間攪拌して 8-ヒドロキシキノリンと Y-90 の錯体溶液を得る。

上記で得た溶液に窒素ガスを吹きかけることにより溶媒を飛ばし、乾固させる。

上記で得たものにリピオドールを 1mL 加え、120 で 30 分間加熱することにより注射液を得る。

作成した注射液の標識率を TLC にて確認。90%以上となるように、放射線濃度や加熱時間を適宜調整し、適切な調整法の確立を目指す。

#### 平成 26 年度以降

(1)VX2 細胞を用いた家兔の実験的肝腫瘍モデルに対する Y-90 標識リピオドールの経カテーテル的投与による抗腫瘍効果の検証

家兔を全身麻酔下で経皮的に VX2 腫瘍細胞浮遊液を肝臓に注入する。細胞注入後約 2 週間で直径 2cm 前後の孤立性腫瘍に発育し、超音波検査により確認可能な VX2 実験的肝腫瘍が作成される。同様に、同腫瘍細胞浮遊液を家兔の肝動脈に経カテーテル的に投与すると肝内転移肝腫瘍モデルが作成される。これらに対して大腿動脈をカットダウンしてマイクロカテーテルを肝動脈本幹に挿入留置し Y-90 標識リピオドールを注入する。注入放射能は 5 mCi を基本とし、実験で得られたデータをもとに適宜増減を検討する。薬剤注入後 2 日間ごとに超音波検査、CT による腫瘍のサイズ変化を測定し抗腫瘍効果を画像的に検討する。また薬剤注入後約 2 週間で動物を犠牲死させ腫瘍部位の壊死、アポトーシスを病理学的、免疫組織学的に評価する。染色は HE 染色に加え炎症・apoptosis を反映する免疫染色 (GFAP・シナプトフィジン・ルクソールファストブルー・TUNEL・CD4・CD8・CD11) を行い、結果を ROC 解析により定量評価する。加えて、In-111 の特異的集積を認めた部位についても同様に病理学的、免疫組織学的に評価する。

#### 4. 研究成果

RI 標識リピオドールの作成は、<sup>111</sup>In-8-キノリノール-リピオドールおよび <sup>90</sup>Y-8-キノリノール-リピオドールの生体内での動態に関するデータを収集した。<sup>111</sup>In-8-キノリノール-リピオドールの安定性はやや不安定であったため、改善の必要性ありと判断し、その安定性向上のため標識法を検討中である。一方 <sup>90</sup>Y-8-キノリノール-リピオドールにおいては、生体内でも高い安定性を保つのに成功した。

VX2 細胞の放射線感受性を確認するため、培養 VX2 細胞に外照射 (0, 6, 12, 24Gy) を行い (Gammacell 40 Exactor; Nordion International)、照射前と照射後 1 週間の細胞数を計測し、増殖率を計測し放射線感受性の有無を調査した。その結果、形態には変化がなかったが放射線照射により 6Gy 以上では有意に増殖抑制が認められ、本細胞モデルが内照射の標的モデルとしては問題がないことを確認した。

次いで、VX2 細胞を用いた肝腫瘍モデル兔を作成した。108 cell/300  $\mu$ l の medium 希釈液を (基底膜マトリックス併用例も含む。) 吸入麻酔下の兔の大腿筋および肝臓にエコーガイド下で直接穿刺した。大腿モデルの継代腫瘍を刻みペースト状にしたものを作成し、0.5cc ずつ吸入麻酔下の兔大腿筋へ直接穿刺した。肝臓については上記ペースト作成時に PBS で  $3 \times 10^8$  cell/ml の single cell suspension となるよう調整し、吸入麻酔下の兔を開腹にて肝実質直接穿刺および腸間膜静脈穿刺に 0.5ml ずつ投与し原発性肝腫瘍モデル、転移性肝腫瘍モデルとした。移植後、1 週間ずつ超音波検査で観察を行い、経時的な腫瘍増大を確認し、生着と判断した。移植後の死亡例は安楽死個体を除き、全例で死亡後解剖を行った。また肝モデルは原発性、転移性モデル双方の腫瘍標本を作成し、病理的に検討を行った。すなわち、開腹にて肝左葉を引き出し、 $3.5 \times 10^8$  cell/ml の single cell suspension の VX2 細胞を直接穿刺し注入した。さらに開腹にて腸管を引き出し、少量のヨ-

ド造影剤にて腸間膜静脈造影を行い門脈を確認した後、VX2 細胞を注入した。その結果は、大腿筋/肝ともに組織移植であればほぼ移植生着率が高かった。肝臓モデルは経門脈摂取であれば 100%の生着が確認できた。肝転移モデルの組織移植は 100%と良好な生着が見られた。肝臓へのTAIの方が大腿へのTAIに比べリピオドールの静脈還流が少なくTAIの安全性が高いと考えられた。尚、TAI後の画像評価はCTが必要であった。

家兔肝転移モデルに対し無治療群、リピオドール (Laboratoire Guerbet, Roissy, France)またはRI 標識リピオドール: Y90-リピオドール (92.5MBq/ml)(Fujifilm RI Pharma., Co., Ltd., Japan)を用いたTAI施行群の3群に対しその生存日数を群別に比較検討し、治療効果を判定した。その結果、腫瘍移植を行った全個体は死亡した。長期生存が見られた個体であっても、死後解剖では肝臓には無数の腫瘍が見られた。生存期間にばらつきは見られたが、TAI 単独で完治することはできなかった。転移性肝腫瘍モデル兔を作成において全例生着する移植法を確立した。体重 2.5kg 台の家兔に対して肝動脈塞栓術を安全に行う手法、至適リピオドール量を決定できた。CTにて塞栓1ヶ月後のリピオドール滞留を確認できた。統計学的有意差はないが、治療症例には3週以上の長期生存個体が見られた。特に標識リピオドール治療群では49日生存した症例が見られた。肝転移腫瘍モデルは病態生理的にも合致した移植法であり、生着率が高く、腫瘍増大速度も早いと考えられた。本研究では早期に治療効果を判定できるためこのモデルを採用した。しかしながら門脈腫瘍栓の程度が生存期間に影響を与えるため移植法、治療を統一しても、生着部位によってその生存期間にばらつきが生じたと考えられた。そのため腫瘍モデルの再検討が必要であると考えられた。リピオドールによる肝動脈塞栓術は一定量の肺

への流出が存在することはヒトへの治療でも報告されており、内用療法では肺塞栓だけでなく長期的な放射線障害も考慮して使用量を決定する必要があると考えられた。リピオドールTAIを行った群では長期生存個体が存在し標識リピオドール治療群ではさらなる長期生存個体が見られ、RI 標識の放射線照射による抗腫瘍効果の上乗せが期待できる結果となった。

## 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〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷川 昇 (TANIGAWA NOBORU)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90227215

### (2) 研究分担者

宇都宮 啓太 (UTSUNOMIYA KEITA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20193914

狩谷 秀治 (KARIYA SHUJI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40368220

河野 由美子 (KOHNO YUMIKO)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10598957