

Nitrogen mustard N-oxide の動脈内挿管投与に関する実験的研究*

大阪市立大学医学部外科学教室 (指導: 白羽弥右衛門教授)

講 師 酒 井 克 治

(原稿受付 昭和31年9月10日)

STUDIES ON THE EFFECT OF INTRA-ARTERIAL ADMINISTRATION OF NITROGEN MUSTARD N-OXIDE ON RAT TUMOR.

by

KATSUJI SAKAI

Department of Surgery, Osaka City University Medical School

(Director: Prof. Dr. YAEMON SHIRAHARA)

It has been reported that a partial regression of malignant tumors, which are not amenable to intravenously administered drugs, has usually been obtained by repeated injection of chemotherapeutic agents over a prolonged period, through a cannula inserted directly into the artery which supplies the blood to the lesion of malignant tumor. This report deals with macroscopic and microscopic changes observed following intra-arterial administration of nitrogen mustard N-oxide (henceforth abbreviated to NMO) via cannulated arteries in rat with Walker's carcinoma.

1) In WALKER'S tumor of animals receiving NMO both intraperitoneally and intra-arterially, regression is observed. When this drug is used intra-arterially the number of regressions of tumor is more obvious than in a group injected intraperitoneally.

2) All treated animals which were sacrificed because of moribund conditions, and untreated ones which survived until the 27th day after implantation of the tumor, were subjected to further examination. The stromal connective tissues in tumors of treated animals were found in abundance as seen in case of fibroma, and each tumor treated consisted of cyst like structure containing yellowish translucent fluid.

3) Histologically, WALKER'S tumor when treated with NMO intraperitoneally was markedly occupied by the interstitial connective tissue cells. Giant tumor cells which were very rare in the untreated animals were numerous observed in the intraperitoneally treated tumor group and within many tumor cells pyknotic nuclei were demonstrated. When treated with NMO intra-arterially, microscopic examination revealed rather typical changes: the nuclei of tumor cells were swollen extremely ranging to cytolysis, while the interstitial connective tissues were proliferated.

内 容 目 次

第1章 緒 言	i) 実験材料
第2章 動脈内挿管法	ii) 実験方法

* 本論文の要旨は昭和31年7月15日第15回日本癌学会総会において報告した。

第3章 Nitrogen mustard N-oxide の動脈内挿管投与による Walker 腫瘍の態度

- i) 発育抑制効果
- ii) 摘出腫瘍の肉眼的所見

iii) 摘出腫瘍の組織学的所見

第4章 総括並びに考察

第5章 結 論

第1章 緒 言

薬剤を動脈内に直接投与して、病変部に大量の薬剤を作用せしめようとする方法は临床上には古くから行われている。

1950年 Klopp⁶⁾らは悪性腫瘍の治療にあたって、薬剤を動脈内に投与しようとして Polyethylene 管を動脈内に挿入し、これを通じて抗腫瘍剤を投与し、その効果をさらに験めようと試みた。すなわち10例の重症悪性腫瘍患者の末梢動脈枝から主幹動脈内へ Polyethylene 管を逆行性に挿入し、頻りに Nitrogen mustard を注入したところ、8例において腫瘍の縮少をみとめたと報告した。

その後 Bierman (1951)⁷⁾, Cromer (1952)⁸⁾, Grady (1953)⁹⁾らもやはり Polyethylene 管を腫瘍の栄養動脈内に挿入し、これを通じて Nitrogen mustard を連日注入し、著しい効果をあげたとのべている。

しかし彼らが報告した動脈内挿管投与による抗腫瘍剤の効果はすべて臨床例から求められたものである。それゆえその効果を全身投与時と確実に比較判定するには、やはり実験的研究にまたなければならぬ。

最近に至り Klopp (1955)¹⁰⁾はラットを試験動物として実験腫瘍を移植したうえ、動脈内挿管を行って Nitrogen mustard を投与し、その効果が著しいことを実験的に立証した。しかし動脈内挿管法による抗腫瘍剤の効果を実験的に求めたものは、今日までこの Klopp の報告以外にはまだ存在しない。

昭和31年5月白羽教授¹⁰⁾は日本化学療法学会第4回総会シンポジウムで Nitrogen mustard N-oxide の臨床応用に関する課題を担当し、本剤の動脈内挿管投与方法について基礎的実験成績並びにその臨床応用成績を詳細に報告した。こゝに記述する実験成績はその講演の一部であつて、ラットに実験腫瘍移植後、動脈内挿管を行い Nitrogen mustard N-oxide の抗腫瘍性を全身投与時と比較して検討したものである。

第2章 動脈内挿管法

i) 実験材料

実験動物：雑系ラット、雄、体重150g以上のものを用いた。

実験腫瘍：ラットの腫瘍である Walker's carcinoma (以下 Walker 腫瘍と記述する) を使用した (本腫瘍は塩野義研究所から分与された)。

Polyethylene 管：(以下 PE 管と略述する) 米国 Clay-Adams 社製、内径0.011吋、外径0.024吋、PE 10を用いた。

抗腫瘍剤：Nitrogen mustard N-oxide (Nitro-min : 吉富製薬、以下 NMO と略述する) を蒸留水で十分に溶解後、さらに蒸留水で適宜稀釈して用いた。

ii) 実験方法

Walker 腫瘍をラットの片側大腿部皮下に移植すると、約2週間後には約クルミ大に発育する。この時期に10% オロパンソーダ溶液0.1ccの腹腔内投与による全麻ののち、腫瘍移植部と反対側の大腿部皮膚を切開し、大腿動脈を露出する。この大腿動脈の末梢側を結紮したのち、中枢側動脈壁の一部を切開、中枢側に向つて PE 管を挿入する (写真1.)。

PE 管の挿入先端を大動脈分岐上に固定するが、この位置は70%ピラセトンを用いる血管造影法によつて確める。しかし多数のラットを剖検した結果、大腿動脈露出部から大動脈分岐までは約2cmであつて、大腿動脈切開部から PE 管を逆行性に2cm挿入すれば、先端が大動脈分岐上に確実に到達することを知つた。

PE 管内に動脈血が逆流してくることを確め (写真2.)、挿入 PE 管を大腿動脈に充分固定したのち、体外に出た部分は、これを背側皮下を通して項部に誘導し項部皮膚に小切開を加えて管端を体外に出し、PE 管を小切開部で皮膚に固定する (写真3.)。管端は絹糸でくゞつて、出血を防ぐ。薬剤投与にあつてはその都度この絹糸を解いて薬剤を注入するのであるが、注入後はなお管内に残つている薬剤を動脈内へ充分におし出すためと、管内での血液の凝固を防ぐために、1,000倍ヘパリン稀釈液もしくは3.8%クエン酸ソーダ

溶液を少量追加注入する。

実験には4～5匹を1群として、NMOを1日1回3～5mg、7～10日間連日投与した。なお対照としてWalker腫瘍移植後NMOを投与しない無処置群を設けたほか、同じ時期に同量のNMOを腹腔内に投与した一群を作り、全身的にNMOを投与した場合とNMOの動脈内挿管投与群との効果を比較検討した。

第3章 NMOの動脈内挿管投与によるWalker腫瘍の態度

i) 腫瘍発育抑制効果

無処置対照群の移植腫瘍はその後日を逐つて増大し、移植後20日頃には約鶏卵大近くまで増大し、やがて腫瘍の中心部は壊死に陥り、これが進行してついには皮膚を穿破するに至る。それに比べてNMOの腹腔内投与群、動脈内挿管投与群では腫瘍が殆んど増大せず、かえつてその硬度を著しく増して来るほか、動脈内挿管投与群ではNMO投与に伴つて腫瘍がかえつて縮小したものもある。

移植後約25日で無処置対照群の腫瘍は著しく大きくなり、試獣が死亡しはじめたので、腫瘍移植後26日目に実験ラッテをすべて撲殺し、腫瘍を摘出した。

なお腫瘍の大きさを確実に記録するために、ラッテ生存中は麻酔下に石膏を用いて腫瘍の鋳型をとり、さらに石膏で腫瘍を忠実に再生した。写真4は動脈内挿管投与群(72, 73)、腹腔内投与群(74, 75)、無処置対照群(76)のそれぞれNMO投与前(1)、NMO投与後5日目(2)及び撲殺時(3)の腫瘍再生模型である。最下列の無処置対照群の腫瘍は日を逐つて著しく大きくなり、撲殺時には腫瘍の壊死部が崩壊したために、かえつて小さくなっているが、腹腔内投与群及び動脈内挿管投与群では腫瘍の大きさは投与前と撲殺時との間に殆んど差がないか、もしくは縮小していることがわかる。

ii) 摘出腫瘍の肉眼的所見

すべての試獣撲殺時の摘出腫瘍を肉眼的に観察した所見を記載すると、つぎのようである。

無処置対照群の腫瘍は約鳩卵大ないし鶏卵大で、腫瘍の表面は暗赤色を示し、あるものは腫瘍の一部が崩壊して、黒色泥状の壊死組織が流出している。弾性軟の硬度をもち、その断面は中心部がすべて壊死に陥り、暗赤色の壊死物で充満している。周辺部の発育旺盛な部分は赤褐色を呈して、出血し易く、血液含有量が多

い。

これに対して腹腔内投与群、動脈内挿管投与群では腫瘍の大きさはすべて拇指頭大ないしクミ大以下であり、健全組織から全く孤立して存在し、灰白黄色を呈して弾性硬。腫瘍の中心部には黄色透明な液体を容れた囊腫を形成し、断面は線維腫様に結合織に富み断面からの出血は全くない。

iii) 摘出腫瘍の組織学的所見

摘出腫瘍をホルマリン固定後、切片を作りヘマトキシリン-エオジン染色を行つて顕微鏡標本を作つた。

無処置対照群：(写真5.弱拡大, 写真6.強拡大)。

Walker腫瘍は細い間質が網目を作り、この間質網の間に腫瘍細胞が合胞性に、あるいは遊離性に増殖している。強拡大像では細い網状間質(写真右端)から星状腫瘍細胞が一見細網肉腫様に互に突起をもつて繋がつて増殖している像がみられ、この腫瘍細胞増殖部には間質の介入をみとめえないので、癌巢形成像と看做することができる。腫瘍細胞には異型性がみられ、核膜が厚く、核網構造が明かである。しかし巨細胞は出現していない。

腹腔内NMO投与群：(写真7.弱拡大, 写真8.強拡大)。

腫瘍の切片は発育のもつとも旺盛な腫瘍周辺の筋肉内浸潤部から採取した。

対照群の組織像でみられた腫瘍内の細い間質は著しく肥厚し、あるいは彌漫性に増殖して、間質部が占める面積の方が腫瘍細胞のそれよりもかえつて広がっている。この増殖した線維細胞には膨化像を示すものも少数みられるが、一般には正常細胞像を示し、活潑に増殖している。

このような線維細胞の態度に反して、腫瘍細胞は巨細胞化し、かつその数が著しく減少し、ことに細胞質が広がつて核は一般に濃染し、ピクノーゼ状態を示すものが多い。すなわち腫瘍細胞は異常分裂のために巨細胞化して、変性の過程にあることを示している。

動脈内挿管投与群：(写真9.弱拡大, 写真10.強拡大)。

結合織細胞の核が腹腔内投与群の場合に比べると、やゝ球形化しているが、腹腔内投与時と同じように著明に増殖して腫瘍組織の大半を占めている。

これに反して腫瘍細胞はその数を著しく減少して、腹腔内投与時にみられた巨細胞像にさらに強い細胞膨

化像が加わっており、正常細胞像を示す腫瘍細胞は全くみとめられない。すなわち腫瘍細胞は細胞質も核も極度に膨化して、細胞融解を起す直前の像を示している。また核仁が大きく目立っているが、これも細胞変性像をあらわしている。なお間質の間に点々と存在する丸い空隙は腫瘍細胞の細胞融解ないし空隙変性のためにできたものであろう。強拡大像ではこの腫瘍細胞の膨化から融解に至る過程をよくうかがうことができる。

第4章 総括並びに考察

実験腫瘍学の発達に伴い、確実に腫瘍細胞の発育を阻害する物質が相ついで発見され、临床上にも応用されているが、現今まで細胞毒または分裂毒として抗腫瘍作用の知られた薬剤は、腫瘍細胞のみならず、同時に正常体細胞に対しても毒性を発揮する難点がある。たとえば Nitrogen mustard はこれをもつているβ位のクロールが活性であるという一つの化学的性質が腫瘍細胞のような基質の代謝ないし酵素系の活動が旺盛な細胞に障害を与えるものであつて、健全な細胞、生理的に必要なあらゆる蛋白質またアミノ酸などに対してもその作用をおよぼして来る。そのため大量の Nitrogen mustard を一度に生体に与えることは危険であつて、少くとも少量ずつ頻回に投与しなければならぬ。Nitrogen mustard N-oxide はその毒性を少くするために作られたものであるが、その作用機作は全く前者と同じであるから、投与を重ねるとやはり著しい毒性をあらわして来る。

動脈内に直接薬剤を投与すれば、その動脈配下組織には当然高濃度の薬剤が到達する。しかし薬剤を頻回連続して投与するには、その都度動脈穿刺を繰返さねばならないから、これによつて動脈壁を損傷する恐れがある。また病巣の占める位置によつては動脈穿刺を行うことすら困難な場合もある。

教室の笹野⁹⁾は犬を試験として、PE管挿入後の動脈壁の態度を検討したが、PE管を長期間動脈内に挿入留置しても、被挿入動脈の内膜には著明な変化のおこらないことを確めた。すなわちPE管を動脈内に挿入後長期間留置してもふつう危険がないものと思われるのであつて、Kloppらの行つた動脈内挿管による抗腫瘍剤投与法は、連続して薬剤を動脈内に投与する利点をもつている。

私はさきに腫瘍組織内では血管系が増殖し、かつその血管壁透過性が亢進していることを報告したが、こ

の事実から推察すれば腫瘍組織を栄養している動脈内に直接薬剤を注入すれば、薬剤の種類にもよることではあるが、薬剤は腫瘍組織内に高濃度に移行しうると考えられ、また他方移行した薬剤は正常組織よりも長時間にわたつて腫瘍組織内に停滞するために、全身を循環する薬剤量が減少し、ひいては薬剤投与に伴う副作用をも少くすることができると思われる。

教室の井上¹⁰⁾は悪性腫瘍患者に動脈内挿管を行つてNMOを連日投与した結果、末梢白血球数の減少程度は静注時に比べて著しく緩慢で、全身性投与時の約2倍の日数を要し、そのため静注時の約2倍量以上のNMOを投与しようと報告した。すなわち動脈内挿管を行つて抗腫瘍剤を動脈内に投与すれば、著明な臨床効果をあげうる(Bierman, 1951¹¹⁾, Cromer, 1952¹²⁾, Grady, 1953¹³⁾, 白羽, 1956¹⁴⁾)のみならず、副作用もまた著しく減少させることが明かである。

1955年 Kloppら⁸⁾はラットの実験腫瘍、Hardrian gland carcinoma No. 2226 及び Pseudomucinous adenopapillary carcinoma of the ovary(OVCA)を用いて、動脈内挿管による Nitrogen mustard 及び Chlortetracycline の抗腫瘍性を調べたが、実験腫瘍によつて多少の差はあつても、静注時に比べると腫瘍細胞の変性が著しいことを確認している。

このような抗腫瘍剤の動脈内挿管投与方法にもとづいて、私はラットの Walker 腫瘍に対する NMO の効果を検討したのであるが、Walker 腫瘍が肉眼的にも組織学的にも著しい変性を示すことを確認した。写真に示したような間質間の丸い空隙は腫瘍細胞の早期変性から細胞融解に至つた像と考えられ、またこのような高度の変性を起した腫瘍細胞は再び増殖する能力を失つているものと解釈される。

核仁が著しく腫大しているのも腫瘍細胞の高度の変性の一指標である。武田¹⁵⁾によれば腫瘍細胞の変性過程において変性が進むと核仁が腫大するが、核仁は最後まで保たれる特徴をもつている。一般に細胞が変性あるいは老化する際、その核仁が大きさを増すことが知られている。このような短期間における核仁の腫大像は NMO の大量が急激に腫瘍細胞にはたらいたために引き起された変化であると考えられる。

これら高度の細胞変性像を NMO の腹腔内投与群の組織像と比較してみると、後者では腫瘍細胞が巨細胞化し、核の態度もピクノーゼを呈する程度にすぎない。すなわち NMO の動脈内挿管投与時の急激な細胞

変性に対して、腹腔内投与時には NMO が腫瘍細胞に対して徐々に作用したものと考えられる。

なお間質の態度も興味ある所見を示した。腹腔内投与群の腫瘍内間質は NMO が腫瘍細胞に対しては著しい障害を与えているにもかかわらず、かえつて著明に増殖し、結合織細胞は全く変性を受けていない。しかし他方動脈内挿管投与群でも間質は著しく増殖しているが、しかも結合織細胞はやゝ球形となつて、大量の NMO が間質の細胞にまで作用するほど腫瘍組織に到達したものと考えられる。この所見から明かなように、全身性に薬剤を投与して腫瘍組織に少量の薬剤がはたらいた場合には、NMO に感性の高い腫瘍細胞は直ちに反応を示し、変性して来るが、NMO に強い抵抗性をもつた結合織細胞は少量の NMO によつてその発育を刺戟されるのではあるまいか。動脈内投与群では投与初期に結合織細胞がやはり増殖を示すが、漸次大量の NMO の作用をうけるうちに変性を示すに至ると考えられるのであつて、こゝにも抗腫瘍剤の動脈内挿管投与方法の方が腹腔内投与や他の経路による全身性投与方法に比べてはるかに強力に腫瘍組織に作用しうることが立証される。

なお従来薬剤の抗腫瘍性を *in vivo* で判定する場合、動物に腹水型または結節型の実験腫瘍を移植して試獣の体重増加抑制効果、生存日数の延長作用、腫瘍発育抑制効果などを指標としていた。しかしこのような動脈内挿管法を用いて抗腫瘍剤の腫瘍に対する直接効果を検討すれば、前述の方法よりも、より明確にその抗腫瘍性が認識されると思われるから、今後抗腫瘍性物質のスクリーニングにも本法が用いられてよいのではなかろうか。

第5章 結 論

Walker 腫瘍をラットの大腿部に移植し、反対側大腿動脈から PE 管を逆行性に大動脈分岐部まで挿入して NMO を連日投与し、Walker 腫瘍に対する NMO の効果を腹腔内投与群及び無処置対照群と比較検討したところ、つぎの如き結果をえた。

1) 腫瘍の発育は動脈内投与群では著しく抑制され腫瘍が縮小を示した。

2) 抗腫瘍剤を動脈内に挿管投与した試獣の撲殺時における Walker 腫瘍の肉眼的所見としては、線維腫様に結合織に富み、その中心部には黄色透明の液状を容れた囊腫を形成していた。

3) 3 群の腫瘍の組織学的所見上には著しい差がみられ、動脈内挿管投与群がもつとも高度の細胞変性像を示した。すなわち腫瘍細胞は極度に膨化し、細胞融解に至る所見を呈し、これらの変性腫瘍細胞は再び増殖する能力をも失つていると考えられる。

擱筆するに当り、御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師白羽教授に対し衷心より謝意を表するとともに、御親切な御教示と御助言をいただいた現三重県立大学医学部病理学教室武田教授に対しても深甚なる感謝の意を表する。また本研究遂行に当り終始御援助をいただいた岸和田康二研究生にも深く感謝する。

文 献

- 1) Bierman, H. R., K. H. Kelly, K. S. Dod and R. L. Byron: Studies on the Blood Supply of Tumors in Man. II. Intra-Arterial Nitrogen Mustard Therapy of Cutaneous Lesion. *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**; 891, 1951.
- 2) Bierman, H.R., E. R. Miller, R. L. Byron, K. S. Dod and D. Black: Therapy of Inoperable Visceral and Regional Metastases by Intra-Arterial Catheterization. *Cancer Research*, **11**: 236, 1951.
- 3) Cromer, K., J. C. Bateman, G. N. Berry, J. M. Kennely and C. T. Klopp: Use of Intra-Arterial Nitrogen Mustard Therapy in the Treatment of Cervical and Vaginal Cancer. *Am. J. Obst. & Gyn* **63**; 538, 1952.
- 4) Grady, E.D.: Treatment of Cancer by Intermittent Injection of Nitrogen Mustard via Cannulated Arteries. *Ann. Surg.*, **137**; 366, 1953.
- 5) 井上喬之: NMO の動脈内挿管投与による末梢血の諸変化について。抗生物質学術協議会関西支部第29回研究会講演, 昭31.
- 6) Klopp, C. T., J. C. Bateman, G. N. Berry, T. C. Alford and T. Winship: Fractionated Regional Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, **10**; 229, 1950.
- 7) Klopp, C. T., T. C. Alford, J. C. Bateman, G. N. Berry and T. Winship: Fractionated Intra-Arterial Cancer Chemotherapy with Methyl bis Amine Hydrochloride. *Ann. Surg.*, **132**; 811, 1950.
- 8) Klopp, C. T., and E. G. Trams: Investigation of the Effect of the Intra-Arterial Administration of Nitrogen Mustard and Chlorotetracycline. *Antibiotics & Chemotherapy*, **5**; 67, 1955.
- 9) 笹野寛: 化学療法剤の動脈内挿管投与について, 第79回近畿外科学会, 昭31.
- 10) 白羽弥右衛門: 悪性腫瘍の化学療法, 主として Nitrogen mustard N-oxide の動脈内挿管投与について, 日本化学療法学会第4回総会シンポジウム講演, 昭31.
- 11) 武田進: 腫瘍細胞, 永井書店, 昭31.

写 真 説 明

図版 I.

(1.~3.) ラッテにおける動脈内PE管挿入法.

1. 大腿動脈露出後, 大腿動脈内に PE 管を挿入固定.
2. 動脈血の逆流をみとめる.
3. PE 管血管外部分を背側皮下を通して項部から体外に導き, その部に固定する.
4. 各種投与法による Walker 腫瘍発育抑制を示す腫瘍復元石膏模型の写真. 72, 73は動脈内挿管投与法を行ったもの. 74, 75は腹腔内投与群, 76は無処置群

1.は NMO 投与前, 2.は投与後 5 日目, 3.は投与後 8 日目撲殺時の腫瘍. なお 76:3は矢印の部で腫瘍が自然に崩壊し, かえつて小さくなっている.

図版 II.

(5.~10.) 各種投与法による Walker 腫瘍の組織像, ヘマトキシリン・エオジン染色. 5, 7, 9は弱拡大(すべて同拡大), 6, 8, 10は強拡大(すべて同拡大). 5, 6は無処置対照群. 7, 8は腹腔内投与群, 間質は著しく増殖して腫瘍細胞は巨細胞化し, ビクノーゼを示すものが多い. 9, 10は動脈内挿管投与群, 間質の増殖は腹腔内投与群と似ているが, 腫瘍細胞は極端に膨化し, 細胞融解に至る像を示している.



