

癌化学療法の基礎的，臨床的研究

(Ⅱ) 実験的移植癌，VX2 腫瘍における微細血管構造の変化と，ヒト癌との比較

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

金 沢 利 定

〔原稿受付：昭和53年5月10日〕

Microcirculation in the Human Stomach Cancer and Experimentally Implanted VX 2 Carcinoma in the Rabbit Intestine

TOSHISADA KANAZAWA

The Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director : Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Microangiographic studies were performed in the implanted VX 2 carcinoma and human stomach cancer.

VX2 carcinoma was implanted into the intestinal submucosal layer of rabbits. At the intervals of 5, 7, 10 and 21 days after implantation, microangiography and histological studies were done. Ten days after implantation, the tumor grew to a palpable size (10 mm in diameter) and its vascularity was found to have the tumor pattern, such as dilatation, twisting, curling and interruption breaking down. Coincidentally metastases were observed in the regional lymph nodes.

In addition, a comparative study of microcirculation of the human stomach cancer and the VX 2 carcinoma of the rabbit intestine was done.

Microangiograms of these two lesions revealed a quite similar vascular pattern of each other.

1 緒 言

前編¹⁾において、ヒト悪性腫瘍（胃癌、結腸癌）の血管像は、他の良性消化器疾患にみられる血管像の変

化と様相を異にしていることを報告した。

ヒト胃癌結腸癌の血管像は、癌組織の種類、病型および病期 (stage) によって、hypervascular type あるいは hypovascular type の2型のいずれかに大別さ

Key words : VX2 carcinoma Microangiography avascular zone (blank space)

Present address : The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

れる。しかしながら、ヒト癌では経時的に病像、血管像の変化を追求することは不可能であり、手術を施行し得た時点における肉眼的、組織学的な病変像、進展度から病期を推定しているにすぎない。したがって血管像の変化にしても、ある特定の病期に至って急激に起るものか、あるいは、発病初期から連続的に、腫瘍の発育成長に併行¹²、それに附随して惹起されるものかは断定し難い。

癌化学療法、ことに脈管内注入療法の効果を期待するためには、腫瘍が hypervascular type であることが望ましく、血管の減少、屈曲、拡張、pooling 等、腫瘍組織へ抗癌剤の到達を阻害する因子が少ない程、効果が高まるものと考えられる。

本研究では病期 stage を経時的に、連続して観察し得、しかもそれぞれの病期における変化を検索出来る実験移植腫瘍を用い、その血管像の変化をヒト癌における所見と対比させて検討した。

II 研究方法および研究対象

1) microangiography

前編 (癌化学療法の基礎的、臨床的研究 (1) microangiography による各種消化器疾患と悪性腫瘍の血管像変化の比較検討¹¹) において用いた microangiography の手技、方法をそのまま応用した。その要点は次の通りである。切除標本の主幹静脈あるいは動脈にポリエチレンチューブ ($\phi = 1 \sim 2 \text{ mm}$) を挿入し、まず、ヘパリン添加 ($10 \mu\text{g/ml}$) 加温生理的食塩水 (40°C) で腫瘍組織を十分に灌流する。灌流注入圧に関しては、腫瘍による血管壁の障害、脆弱化を考慮し、静脈カニューレーションの場合は $90 \sim 100 \text{ mmHg}$ 、動脈カニューレーションの時には $120 \sim 140 \text{ mmHg}$ と前編において用いた灌流圧、注入圧よりも、低い圧で行った。他側の主幹血管から流出する灌流液の無色化、腫瘍組織の色調の褪色を指標として灌流を終了し、直ちに表 1 に示す組成の硫酸バリウム溶液を注入、漿膜下血管の白色充盈像、すなわち、腫瘍部を中心として全切除標本のバリウムによる白色化を確認し注入を終る。カニューレを抜去すると同時に主幹動静脈を結紮し、10%氷冷ホルマリン液中に浸漬して固定した。

軟線レントゲン、超軟線レントゲン撮影法、表 2 の条件で、まず、上記方法で作成した標本の平面像を撮影し、ついで 500μ の剖面標本を作り、断面像の撮影を行った。

表 1

microangiography 用硫酸バリウム溶液の組成	
生理的食塩水	250 ml
硫酸バリウム	100 g
(Micropaque [®] , 粒子の径 $0.1 \sim 0.3 \mu$)	
ゼラチン	10 g

表 2

軟線、超軟線レントゲン撮影の条件	
線源	Softex
線量	25 KVp
電流	10 mA
時間	90 sec
管球距離	65 cm
使用フィルム	Sakura Lith film 100 E

2) 家兎 VX 2 移植法

VX2 腫瘍は Shope' papilloma から発生した継代移植の容易な実験腫瘍であり、(1)移植率が高く、(2)固型腫瘍 solid tumor であり、(3)リンパ節転移、時に肺転移等、ヒト癌に近似した疾患の進展性を有し、広く利用されている⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁵⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾

本実験に用いた VX2 腫瘍は愛知がんセンターより提供を受けたものである。

家兎大腿筋内に増殖した腫瘍を外科手術に準じた無菌操作によって切除し、Hanks 液に浸漬し、外科剪刀で細切、十分攪拌して 4 枚ガーゼで濾過した。濾液を 800G 5 分間遠沈にかけ、その沈渣を採取、改めて、20%浮遊液となるように Hanks 液で稀釈、移植した。この浮遊液は (10^6) \sim 10^7 個/ml の割合に VX2 腫瘍細胞を含有していることを、血球計算の手技を用いて確認した。

腸管壁内移植には、この液 $0.1 \sim 0.3 \text{ ml}$ (VX2 腫瘍細胞約 10^6 個) を注入、また継代移植には、 0.5 ml (細胞数 5×10^6 個) を大腿筋内に注入した。試獣として体重 3kg 前後の家兎 24 羽を用いた。Nembutal[®] (25 mg/kg) の耳静脈内注射によって全身麻酔下に開腹、空腸を創外に露出させ、VX2 浮遊液を注入移植した。26 G 注射針を用い、漿膜側から粘膜炎下に刺入、 0.3 ml (VX2 腫瘍細胞数約 10^6 個) を注入した。針先が粘膜炎下に位置していることは、(1)筋層の穿通する抵抗感、(2)注入液による漿膜下膨隆が少なく、やゝ深い位置での水胞の形成、(3)吸引によって、注射器内に腸内容物 (食餌、ガス) の逆流のないことによって確認した。注入孔からの漏液を防ぐため、注射後 3 \sim 5 分間、指先で

圧迫した。なお注入位置は、移植後の切除標本の断面における腫瘍形成の localization によって再確認された。

VX2 腫瘍移植家兎は 20°C の恒温室、空調室内の個別 cage に収容、固型飼料（オリエンタル餌料社製）を ad livitum に与え飼育した。

移植後、5、7、10、14、21日にそれぞれ再開腹し、移植部を中心とした約 10cm 長の腸管を、主幹動静脈を附着させたまま切除し、直ちに前述の方法に従って microangiography を施行した。

まず平面像を撮影し、ついで、腸管の長軸、横軸に沿った断面を作り、腫瘍の 3-dimension の、計測を行なった。さらに 500 μ の section を作製し、断面レ線像の撮影を施行した。

3) 臨床研究の対象

切除したヒト消化器癌標本を、先に述べた方法で処理し、microangiography を行った。section は 500 μ と 6 μ の 2 種類を作製し、前者は断面の microangiography に供し、後者には haematoxylin-eosin 染色を施行した。この標本で、腫瘍の組織像を検討し、腺癌、未分化癌、硬性癌といった種類の確認を行ない、angiogram と対応させて標本の病型、病期の同定の資料とした。

Ⅲ 研究成績

1) 家兎空腸壁内移植 VX 2 腫瘍の成長、増殖の観察 (図 1)

移植後 5 日までは、肉眼的には病変としては認められない。壊死に陥入り吸収されたものと、生着した移植腫瘍との区別も行い難い。粘膜下注入部腸管の腸間膜附着部に指標として置いた、黒色絹糸結紮部を、まず触診によって腫瘍増殖による硬結の有無を検索し

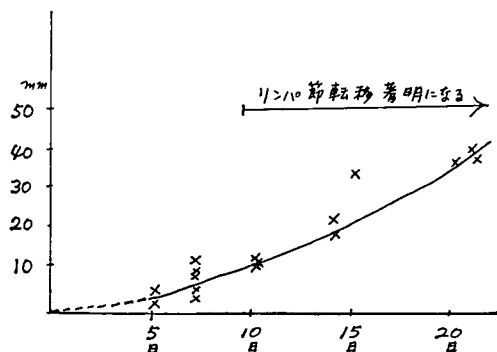


図 1 家兎腸管に移植した VX2 腫瘍の成長曲線

た。ついで腸間膜附着部の対側を腸管の長軸に沿って切開し、腸管切除を行なうことなく、内腔から病変を肉眼的に探索しても確認し難かった。この切開創を絹糸で縫合閉鎖し、7 日以後に再開腹して病変を改めて確認し、遑って、移植後 5 日以前の生着を判断した。したがって、7 日以後の再開腹によって病変の認められなかった症例は、5 日以前にすでに脱落していたものと推測した。

これらの操作によって、移植後 5 日まではたとえ生着していても肉眼的に認め難いものといえる。しかし、組織学的検索あるいは angiogram ではすでに病変が確認し得た。移植後 10 日には 1 cm 径の腫瘍として認められ、21 日後には径 3.5 cm となり、家兎空腸の内腔を占拠する程の大きな腫瘤を形成していた。成長曲線は比較的緩徐な曲率を有する放物線を呈した。しかし 21 日以後は増大率が急激に高くなるようであった。この時期には家兎は悪液質の症状を呈して来た。

形成された移植腫瘍は、回転楕円体状を呈し壁に沿ってやゝ薄い円板状をなしている。

2) ヒト消化器癌と家兎移植 VX2 腫瘍の血管像の比較

図 2 に示すように、ヒト胃癌 Borrmann II 型、結腸癌と家兎空腸に移植した VX2 腫瘍 (長径 1.4 mm 移植後 14 日) の血管像、特に断面レ線像は極めて類似している。いづれも、腫瘍中心部の血管像は極めて少なく、陰影欠損として認められる。いわゆる blank space の像を呈する。ごく小數認められる血管も破壊像が著明で、血管の断裂、狭小化、血管径の大小不同、不規則化等の変化がみられる。一方、腫瘍周辺部においては、腫瘍増大の方向に一致して血管径の増大した像が著明に認められた。

このような血管像の変化、異常化が腫瘍の増殖、発育とどのように関連して発生するか、VX2 腫瘍の経時的観察によって検討した。

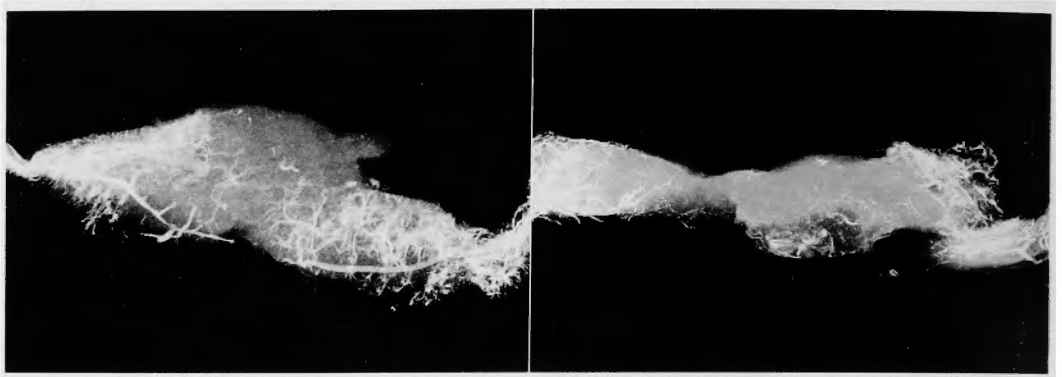
長径 0.2 cm

移植後 5 日、極めて早期の VX2 実験腫瘍の微小血管像は図 3 に示す。

平面像では殆んど正常部位と区別し難い。断面像では、この時期すでに、avascular zone すなわち blank space が認められる。blank space の中の血管は連続性が断絶し、血管破壊像がみられる。しかし、腫瘍周囲の血管増殖像はみられない点が特異的である。

長径 0.9 cm, 移植後 7 日 (図 4)

平面像で明確に blank space が認められる。この



VX 2 1.4 cm

Gastric Cancer Borr III

a) 家兎移植腫瘍 VX2 (移植后14日) の microangiogram (横断面)

b) ヒト胃癌 (Borrmann III) microangiogram

a), b) とも中心部腫瘍による blank space と、これに圧排された血管像が認められる。周辺血管の断裂、蛇行、ちゞれ、彎曲等異常血管像が極めて類似している。

図2 実験移植癌 VX2 とヒト胃癌血管像の比較

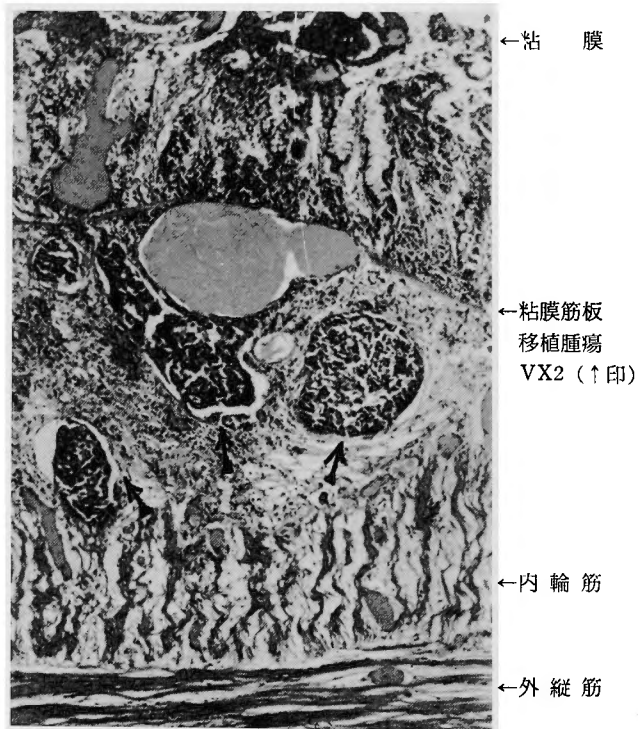
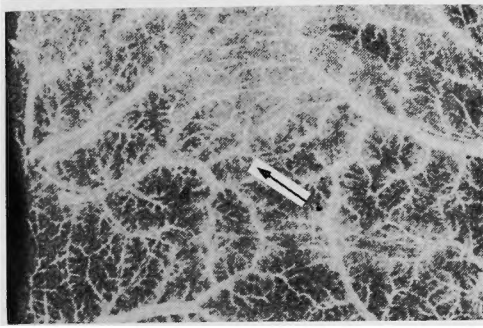
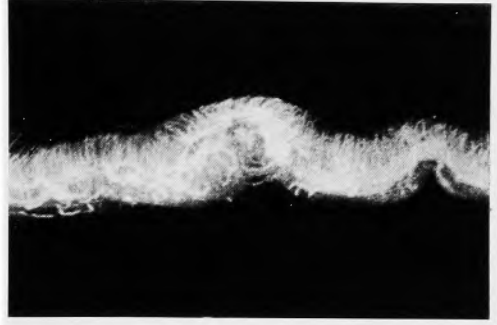


図3-I a. 移植癌 VX2 の初期組織像 (移植后5日) Haemotoxylin-Eosin × 100



b. VX 2 0.2 cm

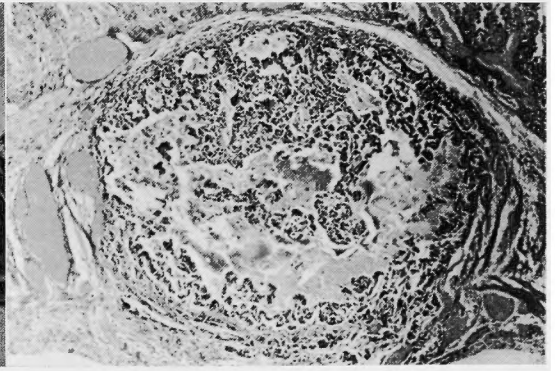


c.

図 3 - II 移植癌 VX 2 の初期血管像 (移植后 5 日) (図 3 I-a と同じ標本)

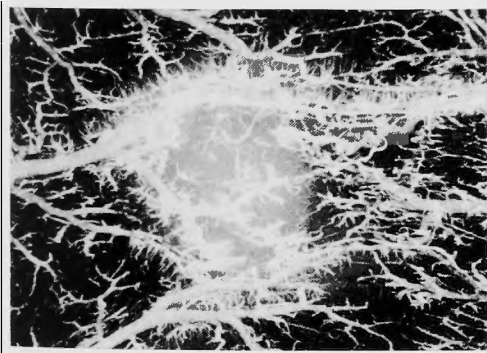


a

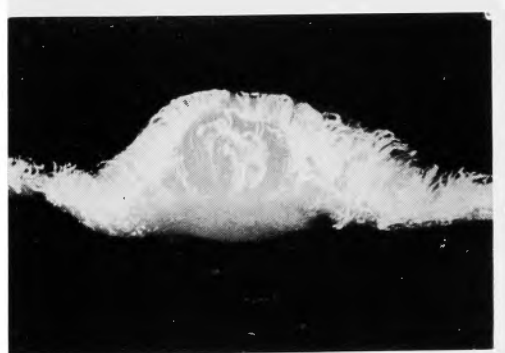


b

図 4 - I VX 2 移植 7 日后的組織像 (断面像) Haemotoxylin-Eosin a, $\times 40$ b, $\times 100$

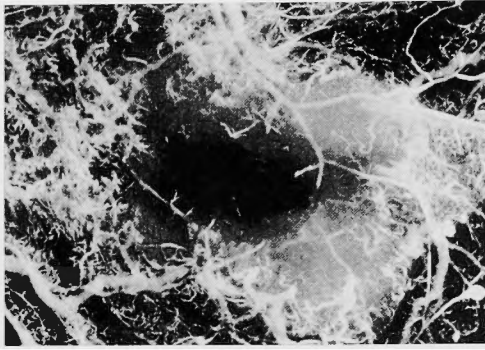


c) 平面像 XV2 0.9 cm

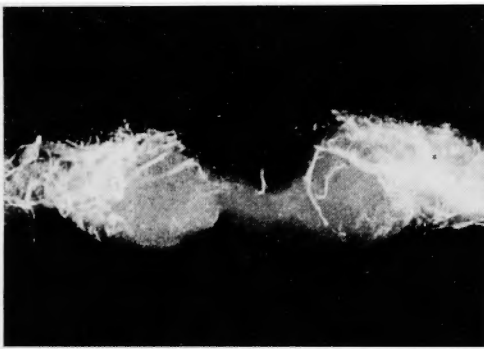


d) 断面像

図 4 - II VX 2 移植 7 日后的 microangiogram (図 4-1 a, b と同じ標本)



a. 平面像 VX2 1.2 cm



b. 断面像

図5 VX 2 移植后10日の microangiogram

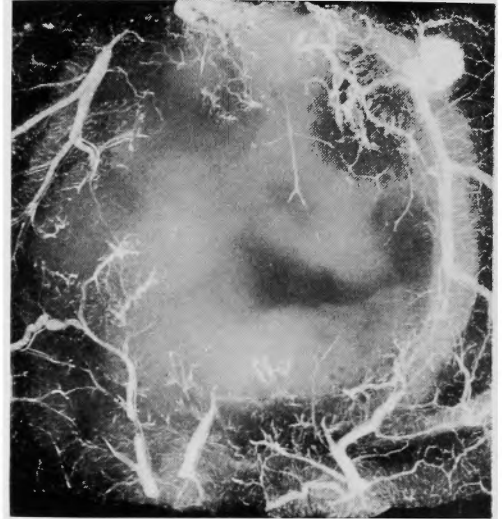
blank space (=腫瘍) に異常血管像が存在する。腫瘍周囲の血管の増殖像が明瞭になって来る。この時期までは、リンパ節転移を認める症例は少ない。

長径 1.2 cm) 移植后10日 (図5)

平面像で中心部 blank space は拡大し、これからやゝ離れて、異常血管像が一層著明に認められる。この時期以降になると、腫瘍増殖方向に沿って血管破壊像が高度に発生する。腫瘍の増大進展に並行して、腫瘍辺縁の血管の拡張、増大像が著明で、繊細な細血管あるいは毛細血管像が撮り難くなる。これら末梢血管の破壊と、それに至る中細血管の通過障害が、末梢への造影剤の到達を遮断しているための像と考えられる。この時期以後には、ほとんどの症例にリンパ節転移を認めた。

長径 3.5 cm, 移植后21日 (図6)

非常に進展した VX2 腫瘍である。血管像では blank space の圧倒的拡大、辺縁血像の高度の破壊像がみられる。すなわち、血管の拡張像、さらには拡張した血管の断裂像、蛇行、屈曲、径の大小不同、不規



VX2 3.5 cm

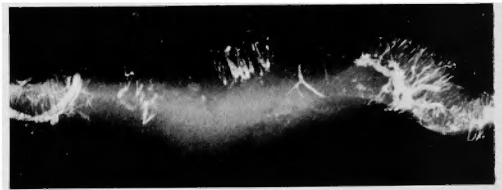


図6 VX2 移植21日后

則性等、前編で述べた悪性腫瘍の血管像の全てが明確に現出して来る。

Ⅱ 考 按

家兎移植 VX2 腫瘍は、筋肉、消化管等広範囲に移植可能であり、固型腫瘍 (solid tumor) を形成、主としてリンパ節転移を生じ⁹⁾、時に肺転移を生じる。増殖の形式、転移状態がヒト消化器癌に近似し、消化器癌研究の実験モデルとして利用可能な腫瘍である。一方、粘膜に初発するヒト癌との比較検討に際し、内胚葉性成分 endodermal factor の破壊に関しては論議もあり²²⁾、また腫瘍自体も血管に乏しいと云われる。しかし、腫瘍周辺部の血行の変化を経時的に追究するという今回の研究の目的には、急速な増殖、発育能力を有する本腫瘍は適当なものであったと判断される。

腫瘍の増殖、発育には血管系が重要な役割を果たしているものとして、多数の研究者の注目を集めて来た。われわれも、前編¹¹⁾においてヒト消化器癌における血管像の特異な変化について報告したが、本来の研究目標である、癌化学療法、特に脈管内抗癌剤注入療法の

確立という見地からすると、かゝる腫瘍脈管像の変化が、経時的に連続的に変化するものか、あるいは、段階的、特発的にある stage に至って発生するかを確認する必要がある。前者のような経過で発生するなら、腫瘍発育のどの時点においても脈管内注入療法の可能性が期待される。もし、段階的に、突発的に不可逆性をもって、一定の stage に血行障害が起るなら、その時期以後における脈管内注入療法の意義は極めて薄弱なものと考えてよいであろう。むしろ、全身的な投与方法によって、遊離腫瘍細胞による転移巣形成を防止に役立て、また副作用の軽減に努力を払うべきである。

VX2 腫瘍が惹起する血管像の変化も、ヒト胃癌 Borrmann II 型、結腸癌のそれと酷似していることが観察された。

まず VX2 腫瘍の腸管壁内の増殖は、Vargha²²⁾ らが、家兎胃幽門部壁内に移植した実験成績と同じように、太腿筋内へ移植した場合よりも急速に起り、死亡に至る時間も短い。

VX2 腫瘍は一般に太腿筋内に継代移植されている。腫瘍細胞 10^6 個の移植によって 3~4 週間には触知可能な腫瘤を形成する¹⁰⁾¹⁵⁾²²⁾³⁰⁾。その後、急速に増大し、放置すると移植後10週前後に悪液質あるいは肺転移によって死亡することが観察されている。

VX2 腫瘍の消化管系への移植は食道はじめ所々に試みられているが、比較的少ない。Vargha らは、家兎胃幽門部粘膜下に移植し、2~3 週間には生着、増殖が確認し得る大きさとなり、5 週間には斃死すると報告、筋肉内移植例よりも発育が極めて早いことを指摘している。われわれの、今回の実験においても、遅くとも 7~10 日で生着増殖が確認し得る大きさ (0.9~1.2cm 径) にまで発育していた。消化管壁の薄いことが触知に有利な条件であることを考慮しても、腫瘍自体の体積が筋肉内移植後同時期のものより増大していた事実は、消化管系が腫瘍の発育に好適な場であることを証するものと理解された。

VX2 腫瘍自体は Vargha²²⁾ らも指摘するように血管に乏しいが、その周辺血管、腫瘍へ流入する血管系が、消化管に豊富に存在することが、腫瘍増殖を有利にする一因と考えられる。

さて、太腿筋内に移植した VX2 腫瘍の筋組織を破壊する状態を観察した Galasco¹⁰⁾ らの研究によると、(1)移植増大した VX2 腫瘍による血管の圧迫が、筋組織の ischemia を来とし、変性を惹起し、線維化を

生じるが、VX2 腫瘍はこの線維化した組織内でも増殖発育し得る。(2)、筋組織の表面にそって腫瘍が発育し、包み込むようにして、筋組織を直接圧迫し、萎縮させる。(3)血管内、血管周囲リンパ系の中に VX2 腫瘍細胞が遊出し、その栓塞による血流の遮断が筋組織の壊死を惹起する。(4)特殊な型として Sarcolemma 内の腫瘍増殖により筋組織の破壊が招来される。といったような以上 4 型が認められている。

VX2 の腫瘍が solid tumor であり、その血管系の変化も、初期の一部にみられる hypervascular な状態を除けば、avascular 乃至 hypovascular zone の形成が主様相である。

移植後10乃至14日、腫瘍長径が 1.0 cm を超える頃から、腫瘍周辺の血管の異常像が著明になる。この時期は腫瘍の増殖、増大が目立つ時である。Galasco¹⁰⁾ らの指摘する組織破壊の第 1 形式、すなわち、急激な腫瘍の増大による血管の圧迫が、血管像変化の主因であると考えられる。しかし、この時期からリンパ節転移が認められるようになる事実から、腫瘍細胞による血管内栓塞も、異常血管造影像に関与していることは明らかである。

当初、腫瘍の増大とともに圧迫され、腫瘍による avascular zone (=blank space) に平行して走る拡大した血管像に、腫瘍細胞の遊出、血管内栓塞による断裂像が加って来るといった経過をとると考えてよいであろう。

V 結 語

実験移植腫瘍 VX2 にみられる血管像は、ヒト胃癌 (特に Borrmann II, III 型) 結腸癌の血管像に酷似していることが観察された。

この血管像の変化は、急激に増大する腫瘍による圧迫が主体で、stage が進むと、血管内に遊出した腫瘍細胞の栓塞による像が附加されて来ることによる。

稿を終るにあたり、御校閲を賜った、京都大学外科学教室日笠頼則教授に深甚の感謝の意を表します。また終始、御指導を頂きました里村紀作助教授および技術面で多大の助力を頂いた同学、谷川允彦先生に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Ackerman NB: The blood supply of experimental liver metastasis. IV. Changes in vascularity with increasing tumor growth. *Surgery* 75: 589-596. 1974.

- 2) Algire GH and Chalkley HW : Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Nat Cancer Inst* **6** : 73-85, 1945-46.
- 3) Algire GH and Legallais FY et al : Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. II. The vascular reactions of normal and neoplastic tissues of mice to a bacterial polysaccharide from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiogus*) culture filtrates. *J Nat Cancer Inst* **8** : 53-62, 1947.
- 4) Algire GH and Legallais FY : Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. IV. The effect of peripheral hypotensions on transplanted tumors. *J Nat Cancer Inst* **12** : 399-421, 1951.
- 5) Barlow TE : Vascular pattern in the alimentary canal. A Ciba Foundation Symposium J and A Churchill Ltd London 1952.
- 6) Bellman S : Microangiography. *Acto radiol Suppl* **102**, 1-104, 1953.
- 7) 大同礼次郎, 岡西 茂, 他 : 癌の血行性肝転移に関する実験的研究 *京府医大誌* **82** : 361-366, 1973
- 8) Engell HC : Cancer cell in the circulating blood. *Acta Chir Scand Suppl* **201**, 1955.
- 9) Engzell U and Rubio C et al: The lymph node barrier against VX2 cancer cells before, during and after lymphography. *Europ J Cancer* **4** : 305-312, 1968.
- 10) Galasko CSB and Muckle DS : Intersarcolemmal proliferation of the VX2 carcinoma. *Brit J Cancer* **29** : 59-65, 1974.
- 11) 金沢利定 : 癌化学療法の基礎的, 臨床的研究 (I) Microangiography による各種消化器疾患と悪性腫瘍の血管像変化の比較検討. 日外宝投稿中
- 12) 倉田当助 : 腫瘍細胞の血行性撒布に関する実験的研究. *日本病理学会誌* **48** : 1329-1336, 1959.
- 13) 宗像秀夫 : 腫瘍転移の研究, X. ラット腹水肝癌細胞の血行性撒布について *福島医学誌* **11** : 1263-1273, 1961
- 14) McAlister WH and Margulis AR et al: Arteriography of gastric and colonic lesions. *Radiology* **79** : 769-782, 1962.
- 15) Muckle DS and Dickson JA : Hyperthermia (42°C) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogenic VX2 carcinoma in the rabbit. *Brit J Cancer* **27** : 307-315, 1973.
- 16) Nylander G and Qlerud S : Simple microangiographic procedure for study of vascular pattern in alimentary canal. *Acta Soc Med Upsal* **65** : 374-388, 1960.
- 17) Rubin P and Casarett G : Microcirculation of tumors. I. Anatomy, function and necrosis. *Clin Radiology* **17** : 220-229, 1966.
- 18) Sandberg AA and Moore GE: Examination of blood for cancer cells. *J Nat Cancer Inst* **19** : 1-10, 1957.
- 19) Stocker TAM : The effect of cortisone therapy and limb exercise on the dissemination of cancer via the lymphatic system. *Br J Cancer* **19** : 132-135, 1969.
- 20) 鈴木磨郎, 佐藤春郎 : 癌細胞の血管壁附着機構. 血行性転移における定着機転. *血液と尿管* **3** : 501-509, 1972.
- 21) Sato H: Cancer cells in the circulating blood, with reference to cancer metastasis. *Bull Wld Hlth Org* **26** : 675-681, 1962.
- 22) Vargha G and Miltenyi L et al : Implantation of VX2 carcinoma into the rabbit stomach. *Acta Chir Acad. Scient Hungaricae* **13** : 93-103, 1972.
- 23) Wood S Jr : Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo the rabbit ear chamber. *Arch Path* **66** : 550-568, 1958.
- 24) Wood S Jr : Experimental studies of the intravascular dissemination of ascitic VX2 carcinoma cells in rabbit, with special reference to fibrinogen and fibrinolytic agents. *Bull S Acad Med Soc* **20** : 92-121, 1964.
- 25) Willis RA: The spread of tumors in the human body. 2nd ed London Butlerworth 1952.
- 26) Zeidman and JoAnne MB . Transpulmonary passage of tumor cell emboli. *Cancer Res* **12** : 731-733, 1952.
- 27) Zeidman I and JoAnne MB : Exqerimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I. Effectiveness of the lymphnode as a barrier to the passage of embolic tumor cells. *Cancer Res* **14** : 403-405, 1954.
- 28) Zeidman I : Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. III. Tumor emboli in thoracic duct. The pathogenesis of Virchow's node. *Cancer Res* **15** : 719-721, 1955.
- 29) Zeidman I : Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. Retrograde spread *Cancer Res* **19** : 1114-1117, 1959
- 30) Zeidman I : The fate of circulating tumor cells. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Res* **21** : 38-39, 1961.
- 31) Zeidman I : Fate of circulatiing tumor cells. III. Comparison of metastatic growth produced by tumor cell emcoli in veins and lymphatics. *Cancer Res* **25** : 324-326, 1965.