

# 制癌剤の局所動脈内挿管投与法の肺転移に及ぼす 影響に関する実験的研究

京都大学医学部整形外科科学教室（指導：伊藤鉄夫教授）

柴 田 大 法

（原稿受付：昭和43年5月10日）

## The Inhibitory Influences of the Intra-arterial Infusion Chemotherapy on the Lung Metastases of Walker's Carcinosarcoma 256 Implanted into the Tibia in Rats

by

TAIHO SHIBATA

From the department of Orthopedic Surgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. Tetsuo Ito)

Experimental study was performed on the possibility, that an intra-arterial infusion chemotherapy via the nutrient artery to malignant tumor inhibits the development of distant metastasis

For this experiment Walker's carcinosarcoma 256 implanted into the proximal tibia was used. For the purpose of intra-arterial infusion, a polyethylene catheter was inserted into the common iliac artery via contralateral femoral artery, through which chemotherapeutic agents, Mitomycin C (MC) and Cyclophosphamide (EX) were infused.

398 rats were employed for this series. Among them, thirty-four rats which were not treated after tumor implantation were served as control. The tumor was taken in twenty-seven rats (79.4%). The mean survival period of the control series was 22.5 days. Furthermore, pulmonary metastases have been noted grossly in 22 rats (64.6%) as early as seventh day after implantation.

364 tumor-bearing rats were treated in five separate ways: (1) infusion chemotherapy of MC and EX with 50 units of heparin using intra-arterial catheterization by KLOPP's procedure, (2) intra-arterial infusion of 50 units of heparin alone, (3) intravenous administration of MC and EX, (4) intraperitoneal administration of MC and EX, and (5) above-knee amputation after intra-arterial infusion chemotherapy.

Intra-arterial infusion chemotherapy was started at four varying time intervals after implantation of the tumor mass into the proximal tibia: (1) immediately after implantation, (2) at twenty-four hours, (3) six to eight days, and (4) twelve to fourteen days. Administration of chemotherapeutic agents was performed once a day. The infusion was repeated for successive five days in all cases. High dosages (MC 1.0 mg/kg, and EX

50 mg/kg) and low dosages (MC 0.1 mg/kg and EX 10 mg/kg) were given in each group of animals. In the other groups, systemic administration of MC and EX were performed in the same way as that in intra-arterial infusion group. Intra-arterial infusion in 154 rats out of 364 was performed, intravenous administration in 75, and intraperitoneal administration in 76. In 39 rats 50 units of heparin were given for five days as control. In 20 rats, the tumor-bearing hind limbs were amputated after intra-arterial infusion chemotherapy for five days was completed.

In the group in which an intra-arterial infusion of anti-cancer agents was started immediately after implantation, tumor growths in the tibia were observed in four rats (11.1%) out of 39, and pulmonary metastases were seen in two (5.1%) of them. In the group in which an intra-arterial infusion of anti-tumor agents was started 24 hours after implantation, tumor growths were observed in 15.4%, and pulmonary metastatic ratio was 7.7%.

However, in the group in which an intra-arterial infusion was started at seven days or more after tumor implantation, primary tumor growths and pulmonary metastases were more frequently observed than in previous group. The results obtained were summarized in Table.

**Table** Observations at the time of death or sacrifice (41st day) after tumor implantation showing (A) : rats apparently free of tumor, (B) : rats with tumor of the tibia and without pulmonary metastasis, and (C) : rats with tumor of the tibia and pulmonary metastasis.

| Treatment                                   | Drug and Dosage            | Time interval of administ.       | No. of rats | A  | B | C  |
|---------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------|----|---|----|
| 1. Intra-arterial infusion                  | MC 1.0mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 19          | 19 | 0 | 0  |
|                                             |                            |                                  | 17          | 3  | 6 | 8  |
|                                             | EX 50mg/kg                 | within 24 hrs.<br>7 days or more | 19          | 18 | 1 | 0  |
|                                             |                            |                                  | 20          | 3  | 6 | 11 |
|                                             | MC 0.1mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 20          | 17 | 1 | 2  |
|                                             |                            |                                  | 20          | 2  | 4 | 14 |
|                                             | EX 10mg/kg                 | within 24 hrs.<br>7 days or more | 20          | 14 | 3 | 3  |
|                                             |                            |                                  | 19          | 2  | 4 | 13 |
|                                             | Heparin<br>50 u./rat alone | within 24 hrs.<br>7 days or more | 20          | 7  | 5 | 8  |
|                                             |                            |                                  | 19          | 1  | 5 | 13 |
| 2. Systemic administration (intravenous)    | MC 1.0mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 9           | 5  | 2 | 2  |
|                                             |                            |                                  | 10          | 0  | 4 | 6  |
|                                             | EX 50mg/kg                 | within 24 hrs.<br>7 days or more | 10          | 7  | 1 | 2  |
|                                             |                            |                                  | 8           | 1  | 2 | 5  |
|                                             | MC 0.1mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 10          | 1  | 2 | 4  |
|                                             |                            |                                  | 9           | 0  | 2 | 7  |
|                                             | EX 10mg/kg                 | within 24 hrs.<br>7 days or more | 9           | 5  | 1 | 3  |
|                                             |                            |                                  | 10          | 0  | 4 | 6  |
| 3. Amputation after intra-arterial infusion | MC 1.0mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 4           | 4  | — | 0  |
|                                             |                            |                                  | 6           | 2  | — | 4  |
|                                             | MC 0.1mg/kg                | within 24 hrs.<br>7 days or more | 5           | 5  | — | 0  |
|                                             |                            |                                  | —           | —  | — | —  |
| 4. Control                                  |                            |                                  | 34          | 7  | 5 | 22 |

The results obtained suggest that when an intra-arterial infusion chemotherapy is started within 24 hours after implantation, both of tumor take and pulmonary metastasis are markedly inhibited, and, when it is given seven days or more after implantation, lung metastasis is not prevented.

Since heparin have no inhibitory effect on tumor-take and metastasis, it is evident that the inhibition of tumor growth in intra-arterial infusion chemotherapy was the effect of anti-cancer agent.

Systemic administration of anti-tumor agents has some inhibitory effects on tumor growth and the development of metastasis, when it is performed at the early stage.

There were no differences in the inhibitory effects between Mitomycin C and Cyclophosphamide.

In the group of intra-arterial infusion chemotherapy combined with amputation of tumor-bearing hind limb, no pulmonary metastasis was found in the earlier application group. But four rats out of six died of pulmonary metastasis in the group with later amputation.

Pulmonary metastatic tumors were smallest in number in the group of intra-arterial infusion chemotherapy.

Number and size distribution of pulmonary metastases are shown in Figs. 1 a through 8. As seen in these Figures, tumors of small size are mostly categorized in number in the groups of early infusion, whereas tumors of large size are not rarely seen in the groups of later infusion.

The facts suggest that anti-cancer agents make an attack on the "loose cancer cells" which are flowing in the blood stream or on the tumor cell emboli in the lung, preventing development of metastasis, but they have no marked inhibitory effects on the established lung metastases.

## 目 次

| 目 次                        | 移                               |
|----------------------------|---------------------------------|
| 第1章 緒 言                    |                                 |
| 第2章 実験材料及び実験方法             | 第1項 制癌剤の種類による肺転移形成の差異           |
| 第1節 実験材料                   | 第2項 制癌剤の濃度の肺転移発生率に及ぼす影響         |
| 第2節 実験方法                   | 第3項 ヘパリン投与対照群にみられる肺転移           |
| 第1項 ラット脛骨骨髓内移植             | 第4項 小 括                         |
| 第2項 カテーテル大腿動脈内挿管手技         | 第4節 動脈内挿管制癌剤投与後、腫瘍肢切断群における肺転移   |
| 第3項 制癌剤投与法                 | 第5節 肺転移巣の数及び転移結節の径の分布           |
| 第3章 実験成績                   | 第1項 肺転移巣の数                      |
| 第1節 脛骨骨髓内腫瘍移植率及び生存日数       | 第2項 肺転移結節の大きさ                   |
| 第2節 肺 転 移                  | 第6節 肺転移巣における組織学的変化              |
| 第1項 無処置群にみられた肺転移           | 第1項 無処置対照群における肺転移巣の組織学的所見       |
| 第2項 静脈内及び腹腔内制癌剤投与群にみられた肺転移 | 第2項 動脈内挿管制癌剤投与群の肺転移巣にみられた組織学的変化 |
| 第3項 動脈内挿管制癌剤投与群にみられた肺転移    |                                 |
| 第4項 小 括                    |                                 |
| 第3節 制癌剤の種類、量及びヘパリン投与と肺転    | 第4章 総括ならびに考按                    |

I 肺転移の研究に用いられる実験腫瘍系について  
II 動脈内挿管制癌剤投与方法について

III 肺転移の発生とその増殖抑制について  
第5章 結 語

## 第1章 結 言

悪性骨腫瘍のなかで、四肢に原発するものに対し行なわれる切断術や離断術は原発腫瘍に対しては根治的意味を有しているに拘らず生命に関する予後は極めて悪い。悪性骨肉腫の5年生存率は14.9%（青池, 1967<sup>6)</sup>）或は13.2%（McKenna, 1966<sup>50)</sup>）と報告されているように著しく不良であり、患者の80%～90%は5年以内に肺転移その他の遠隔転移を来して死亡するのが現状である。腫瘍の転移に関する研究は枚挙にいとまのない<sup>1)</sup>行なわれているが、これが臨床面に応用され、患者を遠隔転移より救い、延命を得るというまでには、未だ至っていない。しかしながら一方、多数の制癌剤が開発され、その特性や投与方法などについても研究が進められている。制癌剤投与方法については Klopp<sup>37)</sup>、Bierman<sup>8)</sup>、Sullivan<sup>67)</sup> 等によつて導入された intra-arterial infusion chemotherapy は癌治療の一つの新しい方向を与えた画期的なものといわねばならない。我々の教室においても1963年より本法を悪性骨腫瘍に応用してきたが<sup>31)33)4)</sup>、その意図するところは、制癌効果が強い、不活性化されていない制癌剤を、高濃度に腫瘍に作用させると共に流血中の向肺性腫瘍細胞を追跡しながら遠隔転移を抑制することであつた。かくすることによつて腫瘍細胞を破壊又はその発育を抑制し、しかも活力の減弱した腫瘍組織を体内に長期間おくことによつて個体の免疫性を残して late amputation<sup>20)</sup> に似た効果の発現を期待した。しかしこの方法が、転移抑制に関して、果して当初企図されたような効果を挙げることができるかどうかは多数の症例について長期の観察を行なつたのちにはじめて明かになることである。しかし悪性骨腫瘍の治療に関する研究は緊急を要する課題であり、臨床的応用を行なうと同時に、その基礎的研究も必須の問題であると考え、そこでこの問題の解明に資する目的で本研究を計画した。この実験に用いられる腫瘍に要求される条件は、移植率の高いこと、転移率の高いこと、転移率が高くしかも転移は主として肺に限られること、原発腫瘍がヒトの骨肉腫に類似していること、腫瘍を移植された動物が適当な生存日数を持ち、自然退縮が少ないこと等であるが、教室で行なわれた一連の研究（葛岡<sup>41)</sup>、北<sup>35)</sup>、岡本<sup>55)</sup>、池田<sup>29)</sup>、加藤<sup>32)</sup>）は Walker's carcino-

sarcoma 256<sup>19)64)21)</sup> のラット骨髄内移植腫瘍が、この要求を満足するものであることを明らかにしており、赤星<sup>1)2)</sup> は本腫瘍系が骨肉腫および癌の骨転移の研究に、現状では実験研究に非常に有用なものであることを強調しており、本実験を行なうに当つては、Walker 腫瘍の骨髄内移植腫瘍を用いることが最適であると考えている。しかしこのような実験方法の難点は、静脈内移植と同様の人工的肺転移がおこるために、純粋な原発腫瘍からの二次的転移だけを分離して作製することができない点にある。したがつて、この研究の結果をもつて直ちに臨床に結びつけることには多くの危険がある。しかし他面では、肺転移発生が移植時にはじまるという明確な条件を有しているために、種々の実験操作を加えることによつて肺転移に関する動脈内挿管制癌剤投与方法の効果を秩序だてて検討することができるといふ利点があるといえる。

## 第2章 実験材料及び実験方法

### 第1節 実験材料

本実験に用いた腫瘍は塩野義研究所峰下研究室において Wistar 系ラット皮下に累代移植されてきた Walker's carcinosarcoma 256（以下 Walker 腫瘍と略す）であつて、150余世代にわたつて、移植率、これを移植されたラットの平均生存日数等が一定した固定株である。

使用した動物は Donryu 系雄性ラットで、生後約20日、体重80g～100gのものであつて、これを Clea 固型飼料及び水のみで飼育した。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 ラット脛骨骨髄内移植

腫瘍を側腹壁皮下に移植し、7～14日を経ると、示指頭大から母指頭大の皮下結節が形成される。このうち弾力性をもち、被覆皮膚に潰瘍を生じていないものを選び、その部を除毛したのち0.1% mersonin alcohol で消毒し、皮膚を切開して腫瘍を無菌的に摘出し、これを滅菌シャーレ内で壊死に陥っていない周辺部の帯赤白色を呈する実質部を採取して別の滅菌シャーレに移し、これを約0.05cm立方の小塊にまで刻み、この小組織片の数個ないし十数個をガラス製トロアカルに充填し<sup>41)</sup>、マンドリンを附して移植の準備をおえた。次に、予め nembutal を用いて腹腔内麻酔を行なつた

ラットを手術台に背臥位に固定し、その右膝部前面を除毛し、0.1% mersonin alcohol で消毒した後、術者の左手で右膝関節をほぼ90°屈曲位に保持しながら15 gauge 動注針を膝蓋靱帯内側より刺し、脛骨関節面を貫通して脛骨長軸に沿って骨髓内深く刺通したのち、これを抜去し、生じた骨穿孔部にさきに準備しておいた腫瘍塊を満たしたガラス・トロアカールを挿入し、マンドリンをもつて腫瘍塊の1個ないし数個を圧入移植した。この移植法はガラス製トロアカールを用いるので腫瘍塊が骨髓内に完全におし込まれるのを直視出来る利点がある。腫瘍塊1個ないし2個に含まれる移植細胞数は略、250万～500万個と算定された。

#### 第2項 カテーテル大腿動脈内挿管手技

右脛骨骨髓内に移植された Walker 腫瘍は、その栄養を右大腿動脈より受けるが、ラットのような小動物では、右大腿動脈にカテーテルを留置すれば、カテーテルは完全に血管腔を閉塞してしまうので、腫瘍への血流が遮断される。ヒトでは大腿動脈分枝より逆行性に大腿動脈内にカテーテルを留置したり<sup>82)</sup>、経皮的に直接大腿動脈を穿刺し<sup>89)</sup>、カテーテルを留置することは容易であるが、小動物ではこのような手技を用いることはできない。そこで著者らは Kloop<sup>79)</sup>の方法にのっとり、左大腿動脈の深大腿動脈分岐部の末梢に挿入部を求めこれより逆行性に大動脈分岐部までカテーテルの先端を進めて留置し、このカテーテルを通じて薬剤を右総腸骨動脈を経て右大腿動脈に流入させる方法を採用した。即ち nembutal 腹腔内注射麻酔下にラット四肢を手術台に固定し、左鼠脛部皮膚を除毛、消毒したのち、同部に約1.5cmの縦切開を加え、脂肪組織を除くと神経血管束が現われる。大腿動脈を遊離し、動脈壁の略1/3に横切開を加え、動脈血の噴出を認めた上で、Clay-Adams 社製の内径0.001 inch の polyethylene 管（以下PE管と略す）を挿入し、先端を中枢側に約2.8cm進め、血液がPE管内に逆流するのをみて、PE管を動脈に結紮固定した。ついでラット背部中央に小切開を加え、皮下を通じてPE管を引き出し、皮膚貫通部を縫合した。この縫合によつて同時にPE管を皮膚に固定した。PE管にはヘパリン溶液を満たしたのち先端を焼灼閉鎖するか、もしくは絹糸で二重結紮を施し、PE管内での血液凝固を防いだ。ラットの運動によるPE管の抜去や噛み切り等の事故を防ぐために、躯幹に纏絡した絆創膏の中にPE管を埋没した。又、右後肢がinfuseされることを知るために、10% fluorescein dye をPE管より注入し、暗室内で紫外

線ランプ下に右後肢の蛍光発生状態を検査した。この検査はPE管挿入手技に熟達したのちには、その必要性を感じなくなつたので、実験の後半では省略した。

#### 第3項 制癌剤投与法

Walker 腫瘍を脛骨骨髓内に移植したラットを次の6群に分け実験に供した。

1. 動脈内挿管後、経日的に制癌剤を投与したもの
2. 動脈内挿管後、経日的にヘパリンを投与したもの
3. 動脈内挿管制癌剤投与後、担腫瘍肢を切断したもの
4. 静脈内に経日的に制癌剤を投与したもの
5. 腹腔内に経日的に制癌剤を投与したもの
6. 腫瘍移植後、無処置のまま放置観察したもの

即ち、ラット60頭に骨髓内移植を行ない、16頭を動脈内挿管制癌剤投与群とし、他の4頭を動脈内挿管ヘパリン投与群と対照とした。又、各16頭ずつを静脈内及び腹腔内投与群とし、比較検討の対照とした。4頭は無処置放置群とし、残る4頭は実験遂行中の事故死及び移植陰性動物に対する予備として保存した。上記のような実験を10回繰返して行なつた。ただし静脈内及び腹腔内投与実験だけは5回まで繰返して行ない、それ以後は動脈内挿管制癌剤投与後担腫瘍肢を切断する実験を追加した。

使用した制癌剤は endoxan（以下EXと略す）及び mitomycin C（以下MCと略す）の2種類で、その各々の高濃度群（EX 50mg/kg, MC 1.0mg/kg）及び低濃度群（EX 10mg/kg, MC 0.1mg/kg）をもうけて比較検討した。

投与開始の時期は次の4期とした。

1. 腫瘍移植後5分より制癌剤投与を開始した直後投与群
2. 移植後2日目（24時間後）より投与を開始した早期投与群
3. 移植後6日乃至8日目より投与を開始した中期投与群
4. 移植後11日乃至14日目より投与を開始した晚期投与群

以上の各群において、投与回数は1日1回 one shot で規定の量を注入し、連続5日間行なつた。上記のような薬剤投与の時期の選定は無処置放置群の平均生存日数が22.5日（自然退縮例を除く）であるという事実に基づいて行なつたものである。又、動脈内直後投与群ではPE管挿管操作に長時間を要するため、先ずPE管を左大腿動脈内に挿管したのちに Walker 腫瘍

を移植し、5分後に規定の制癌剤をPE管を通じて投与する方法をとった。更に、直後、早期、中期、晩期の各群で、動脈内に規定量の制癌剤を連続5日間投与し、投与を終了した翌日に、担腫瘍肢を大腿上部で切断し、または、腫瘍が大きい場合には股関節で離断を行なったのち、ラットを飼育観察した。この切断併用実験では、制癌剤としてMCだけを使用し、直後及び早期投与後切断群では高、低両濃度薬剤を投与し、中期・晩期投与後切断群では高濃度薬剤だけを投与した。

各実験の成績判定には次の方法を用いた。

1. 肉眼的観察：各実験群とも、所定の操作を終了したのち毎日、全身状態及び移植局所の肉眼的観察を行ない、体重の推移をもつて全身状態の示標とした。死亡した動物はその都度剖検に附し、移植後40日生存したラットは41日目に屠殺し剖検した。即ち、移植局所腫瘍の所見を記録したのち腫瘍肢を切断し、健常肢を同高位で切断したものとの重量差で腫瘍重量を測定した。次いで開胸し、胸水殊に血性胸水の有無をみたのち、気管を横断し、縦隔を含めて胸部内臓を一塊として摘出し、心を除去したのち肉眼及びルーペをもつて肺表面と肺葉間を観察し、肺転移巣の有無及びその数を算え、また、ノギスをもつて直径を計測し、記録した。この場合肺は平圧下で縮小しているが、転移巣は肺表面より軽く膨隆し、帯黄白色斑として存在し、暗赤乃至朱色の肺実質とはかなり明瞭に区別された。当初は Romthdahl<sup>59)</sup>の記載するように、15%墨汁を気管より注入し肺実質を黒染させる方法を試みたが、新鮮標本の肉眼的観察で十分であることを知り、以後は本法を用いながつた。この計測を行なった後、肺を10%フォルマリン液で固定したが、固定後は、転移巣は白色、肺実質は褐色を呈し、両者は明瞭に区別し得るようになるので、再度肺転移巣を確認し、新鮮標本での観察と比較した。

2. 組織学的観察：実験動物の肺は肉眼的に転移の有無にかかわらず全てフォルマリンにて固定保存し、動脈内挿管制癌剤投与群においては、その全例について、その他の実験群については必要に応じてパラフィン包埋を行ない、切片標本を作製し、hematoxylin-eosin染色を施して観察した。

3. レ線学的観察：実験ラットは全て移植後7日目にsoftexを用いて全身のレ線撮影を行ない、移植局所の骨萎縮、骨皮質の菲薄化、骨幹端部、骨幹部の骨髄内透明像、蜂窩状透明果、骨幹部の膨大像或いは骨棘形成の有無について検討し、更に肉眼的変化を照合し

て、腫瘍移植陽性の判定を行なった。中期以後の制癌剤投与実験で、移植陰性と判定されたものは実験より除外した。又胸部のレ線像検索を試みたが、肺野の病変が微細で、明瞭な所見をうることができなかつた。

第3章 実験成績

第1節 脛骨骨髓内腫瘍移植率及び生存日数

脛骨骨髓内に Walker 腫瘍を移植したのち、無処置のまま飼育したラットは4乃至5日頃より下腿近位部の腫脹が認められるようになり、徐々に横径を増し、10日を過ぎる頃より急速な増大をきたし、14日に至れば胡桃大となり、以後鶏卵大にまで発育して、20日を過ぎる頃から動物は腫瘍死しはじめる。無処置群の移植率は有効動物34頭中27頭(79.4%)に認められた。実験手技が一定したのちは、移植率の低下する夏期実験を避けたため、移植率は略一定し、移植率の極端に低い群はなかつた。腫瘍移植後動脈内挿管制癌剤投与を行なったものの移植率についてみると(表1)、直後投与群のうち、EX、MC高濃度群では、全動物が移植陽性を示さず、低濃度群でも、EX投与の10頭中3頭、MC投与の10頭中1頭にのみ移植陽性であつたにすぎず、著しい抑制効果が認められた。これに対し、直後ヘパリン投与群では、10頭中7頭に移植陽性であり、無処置群と略同値を示した(表2)。早期動

表1 動脈内挿管制癌剤投与群

| mg/kg  | 移植陽性動物数 | 移植陰性動物数 | 死亡動物数 | 屠殺*動物数 | 肺転移陽性動物数 | 平均生存日数 |
|--------|---------|---------|-------|--------|----------|--------|
| 直後投与   |         |         |       |        |          |        |
| EX 50  | 10      | 0       | 5     | 5      | 0        | 23.6   |
| MC 1.0 | 9       | 0       | 4     | 5      | 0        | 25.0   |
| EX 10  | 10      | 3       | 6     | 4      | 1        | 25.3   |
| MC 0.1 | 10      | 1       | 5     | 5      | 1        | 26.8   |
| 早期投与   |         |         |       |        |          |        |
| EX 50  | 9       | 1       | 6     | 3      | 0        | 20.5   |
| MC 1.0 | 10      | 0       | 6     | 4      | 0        | 21.5   |
| EX 10  | 10      | 3       | 7     | 3      | 2        | 22.3   |
| MC 0.1 | 10      | 2       | 6     | 4      | 1        | 25.0   |
| 中期投与   |         |         |       |        |          |        |
| EX 50  | 10      | 7       | 10    | 0      | 4        | 20.6   |
| MC 1.0 | 9       | 6       | 7     | 2      | 3        | 25.8   |
| EX 10  | 9       | 7       | 8     | 1      | 5        | 23.3   |
| MC 0.1 | 10      | 8       | 9     | 1      | 6        | 25.6   |
| 晩期投与   |         |         |       |        |          |        |
| EX 50  | 10      | 10      | 10    | 0      | 7        | 18.4   |
| MC 1.0 | 8       | 8       | 8     | 0      | 5        | 19.8   |
| EX 10  | 10      | 10      | 10    | 0      | 8        | 21.1   |
| MC 0.1 | 10      | 10      | 10    | 0      | 8        | 23.5   |

\* 延命をみたもので、41日目屠殺したもの

表2 動脈内挿管ヘパリン投与群

|       | 動物数 | 移植陽性動物数 | 死亡動物数 | 屠殺動物数 | 肺転移陽性動物数 | 平均生存日数 |
|-------|-----|---------|-------|-------|----------|--------|
| 直後投与群 | 10  | 7       | 8     | 2     | 4        | 23.2   |
| 早期投与群 | 10  | 6       | 9     | 1     | 4        | 21.4   |
| 中期投与群 | 10  | 9       | 10    | 0     | 6        | 21.5   |
| 晩期投与群 | 9   | 9       | 9     | 0     | 7        | 19.7   |
| 無処置群  | 34  | 27      | 27    | 7     | 22       | 26.8   |

脈内投与群でも、制癌剤による移植腫瘍着生の抑制効果が認められた。しかし、中期及び晩期動脈内制癌剤投与群ではヘパリン投与対照群や無処置群の移植率に比し、有意の差をもつて抑制効果を認めることはできなかった。

移植陽性の無処置群の生存日数は、最短14日、最長41日で、平均生存日数は22.5日である。しかしこの群に属する34頭中7頭は41日をすぎても生存し続け75日目に屠殺剖検したが、移植局所に腫瘍が認められず、転移もなく、更に生き続け得るものであることを知った。このような自然退縮例のあることから移植後41日を過ぎてもなお生存する動物は腫瘍死しないと考えられるので、長期生存する動物は全て41日目に屠殺し、それらの生存日数を41日として算定した。この長期生存動物7頭を含めた無処置群の平均生存日数は26.8日となった(表2)。

動脈内挿管制癌剤投与群の平均生存日数は、直後投与群では、腫瘍の移植や挿管のための手術侵襲の後に死亡するものがあり、あるいは又制癌剤の急性中毒によつて投与終了後短時間で死亡するものもあつたが、41日まで生き続けたものが39頭中19頭あり、無処置群の生存日数に比し明らかに延命に成功したものがあるといえる。早期投与群では延命に成功したものは39頭中14頭で、自然退縮例を含むとしてもかなり高率である。しかし、中期投与群では38頭中4頭だけが延命したに過ぎず、晩期投与群では1例の延命動物も認められなかった。一方、ヘパリン投与対照群では直後投与群で10頭中2頭、早期投与群で10頭中1頭に延命がみられただけで、移植局所腫瘍陰性動物を除いて行なつた中期、晩期投与群では、延命に成功した動物はなく、全例一定期間内に死亡した。担腫瘍動物に対する治療の延命効果については、種々の要因が絡み合うため、軽々しく結論を引き出すことは出来ない。たとえ移植陽性と判定される時期までに制癌剤の毒性や手

術侵襲などで死亡した動物は、移植陰性と判定される可能性があり、各要因についての推計学的考察が要求されるが、この点についての詳細は協同研究者、米沢<sup>84)</sup>が詳述する。

## 第2節 肺 転 移

### 第1項 無処置群にみられた肺転移

骨髓内移植後、無処置のまま飼育されたラット34頭中、22頭に肺転移を認めた。即ち、肺転移率は64.6%である。F検定法を用いて信頼限界を求めてみると、危険率5%として信頼上限は78.1%、信頼下限は49.2%であり、本腫瘍が転移に関する実験に適当な腫瘍系であることを示している。これを移植腫瘍の着生をみた動物27頭に限れば、肺転移率は81.2%となり、F検定による信頼限界は92.4%~64.9%( $P \leq 0.05$ )と更に高率となる。肺転移巣は肺表面の殆ど全域に互る高度のものから、数葉に局限するものまで種々であるが、平均肺転移巣数は31.6個/ratであつた。又肺転移結節の径は1mm~2mmのものが最も多く、次いで1mmに満たない小径のものが多くみられたが、反面、動物によつては径5mm~8mmの比較的大きいものが多くみられるものもあり、肺転移発生の個体差による違いも推察された。しかし、一般には、小径のものは移植局所腫瘍或いは肺転移巣より二次性に播種され発生したもので、転移巣形成後の時日が浅く、大径のものは移植時又は移植後早期に流血中に放出された腫瘍細胞を起源として発生した謂わば人工的肺転移と称すべきものと考えられる。

### 第2項 静脈内及び腹腔内制癌剤投与群にみられた肺転移

Walker 腫瘍を右脛骨骨髓内に移植し、5分後に尾静脈よりMC及びEXの高濃度又は低濃度を注射された直後静注群では、19頭中5頭(26.3%)に肺転移が認められた。早期静注群では、19頭中6頭(31.6%)に肺転移が証明された。いずれも低濃度群により高率にみられたか、無処置群の肺転移に比較すれば低率で、肺転移発生に対する抑制効果がうかがわれる。無処置群の肺転移率との差について $\chi^2$ 検定を行なつてみると、危険率5%において、直後静注群の $\chi^2$ は7.19、早期静注群の $\chi^2$ は5.32となり、いずれも有意の差があるといえる結果を得た。しかし、中期静注群では肺転移率は19頭中8頭(42.0%)、( $\chi^2=2.54$ ,  $P \leq 0.05$ )を示し、晩期静注群では18頭中16頭(88.9%、 $\chi^2=3.4$ ,  $P \leq 0.05$ )であり、肺転移発生に関する限り、中期・晩期静脈内投与は有効であつたとはいひ難い(表3)。

表 3 静脈内投与群

| mg/kg  | 動物数 | 移植陽動物数 | 死亡動物数 | 屠殺動物数 | 肺転移陽動物数 | 平均生存日数 |
|--------|-----|--------|-------|-------|---------|--------|
| 直後投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 5   | 1      | 4     | 1     | 1       | 19.0   |
| MC 1.0 | 4   | 2      | 3     | 1     | 1       | 22.0   |
| EX 10  | 5   | 2      | 4     | 1     | 1       | 23.4   |
| MC 0.1 | 5   | 3      | 5     | 0     | 2       | 20.8   |
| 早期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 5   | 2      | 4     | 1     | 1       | 20.8   |
| MC 1.0 | 5   | 2      | 4     | 1     | 1       | 20.8   |
| EX 10  | 4   | 2      | 3     | 1     | 2       | 25.5   |
| MC 0.1 | 5   | 3      | 4     | 1     | 2       | 22.0   |
| 中期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 4   | 3      | 3     | 1     | 1       | 24.0   |
| MC 1.0 | 5   | 5      | 5     | 0     | 2       | 20.2   |
| EX 10  | 5   | 5      | 5     | 0     | 2       | 21.6   |
| MC 0.1 | 5   | 5      | 5     | 0     | 3       | 19.6   |
| 晚期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 4   | 4      | 4     | 0     | 4       | 21.3   |
| MC 1.0 | 5   | 5      | 5     | 0     | 4       | 19.6   |
| EX 10  | 5   | 5      | 5     | 0     | 4       | 22.6   |
| MC 0.1 | 4   | 4      | 4     | 0     | 4       | 21.8   |

\* 延命をみたもので、41日目屠殺したもの

腹腔内投与群では（表4）、肺転移率は夫々、直後投与群31.6%、早期投与群45.0%、中期投与群73.5%、晚期投与群88.9%であり、中期以後は急激に増大する傾向がみられ、僅かに直後投与群だけに抑制効果が窺われた。 $\chi^2$ 検定では、無処置群と比較すると、直後腹

表 4 腹腔内投与群

| mg/kg  | 動物数 | 移植陽動物数 | 死亡動物数 | 屠殺動物数 | 肺転移陽動物数 | 平均生存日数 |
|--------|-----|--------|-------|-------|---------|--------|
| 直後投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 4   | 1      | 3     | 1     | 1       | 19.0   |
| MC 0.1 | 5   | 2      | 3     | 2     | 1       | 26.2   |
| EX 10  | 5   | 2      | 4     | 1     | 2       | 23.8   |
| MC 0.1 | 5   | 3      | 1     | 1     | 2       | 26.8   |
| 早期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 5   | 2      | 5     | 0     | 2       | 16.2   |
| MC 0.1 | 5   | 2      | 4     | 1     | 2       | 10.6   |
| EX 10  | 5   | 3      | 4     | 1     | 2       | 24.2   |
| MC 0.1 | 5   | 3      | 5     | 0     | 3       | 18.6   |
| 中期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 5   | 5      | 5     | 0     | 3       | 17.4   |
| MC 0.1 | 5   | 5      | 4     | 1     | 4       | 26.6   |
| EX 10  | 4   | 4      | 4     | 0     | 3       | 18.5   |
| MC 0.1 | 5   | 5      | 5     | 0     | 4       | 19.6   |
| 晚期投与   |     |        |       |       |         |        |
| EX 50  | 5   | 5      | 5     | 0     | 4       | 19.4   |
| MC 0.1 | 5   | 5      | 5     | 0     | 4       | 20.6   |
| EX 10  | 3   | 3      | 3     | 0     | 3       | 21.0   |
| MC 0.1 | 5   | 5      | 5     | 0     | 5       | 22.0   |

\* 延命をみたもので、41日目屠殺したもの

表 5 平均肺転移果数

|            | 動脈内挿管投与群 | 静脈内投与群 | 腹腔内投与群 | 胸腔内投与群 | 動脈内後投与群 |
|------------|----------|--------|--------|--------|---------|
| 直後投与群      |          |        |        |        |         |
| EX 50mg/kg | 0        | 15     | 18     | —      | —       |
| EX 10      | 14.0     | 22     | 21     | —      | —       |
| MC 1.0     | 0        | 15     | 20     | 0      | 0       |
| MC 0.1     | 9        | 18.5   | 22.5   | 0      | 0       |
| ヘパリン       | 21.2     | —      | —      | —      | —       |
| 早期投与群      |          |        |        |        |         |
| EX 50      | 0        | 21     | 16     | —      | —       |
| EX 10      | 8        | 20     | 23.5   | —      | —       |
| MC 1.0     | 0        | 20     | 17.5   | 0      | 0       |
| MC 0.1     | 10       | 19     | 25.0   | 0      | 0       |
| ヘパリン       | 26.5     | —      | —      | —      | —       |
| 中期投与群      |          |        |        |        |         |
| EX 50      | 12.5     | 27     | 17.0   | —      | —       |
| EX 10      | 14.0     | 28     | 19.0   | —      | —       |
| MC 1.0     | 8.0      | 27.5   | 14.7   | 12     | 12      |
| MC 0.1     | 10.6     | 26.6   | 20.5   | —      | —       |
| ヘパリン       | 26.2     | —      | —      | —      | —       |
| 晚期投与群      |          |        |        |        |         |
| EX 50      | 21.8     | 19.8   | 25.2   | —      | —       |
| EX 10      | 21.3     | 24.6   | 24.3   | —      | —       |
| MC 1.0     | 19.2     | 21.0   | 19.0   | 11.3   | 11.3    |
| MC 0.1     | 13.5     | 28.3   | 24.4   | —      | —       |
| ヘパリン       | 23.8     | —      | —      | —      | —       |
| 無処置群       | 31.6     |        |        |        |         |

腔内投与群 ( $\chi^2=5.32$ ,  $P\leq 0.05$ ) であり、有意の差があるといえるが、早期腹腔内投与群では  $\chi^2=1.99$ ,  $P\leq 0.05$  であつて、有意の差があるとはいえないことから、静脈内投与より劣るという結果を得た。しかし、平均肺転移果は（表5）、静脈内投与群では、最高28.3個/rat、最低15個/rat であり、腹腔内投与群では25.2個/rat～16個/rat の値を示し、いずれも結節数は無処置群のそれに比しやや少ない傾向がみられた。転移果の大きさと数の関係では、静脈内・腹腔内投与群とも、無処置群のそれと異なり、大小各径の転移結節が、略同数程度に分散する傾向を示すのが特徴的で（図6参照）、無処置群にみられた転移の様相とはかなり異なることを知つた。

第3項 動脈内挿管制癌剤投与群にみられた肺転移

1. 直後投与群における肺転移  
既に述べたように、本投与群にあつては、予め左大腿動脈内に PE 管を設置しておき、ついで右脛骨々髓内に Walker 腫瘍を移植し、5分後に規定量の制癌剤

を one shot で注入し、以後連日 5 日間、体重変化に呼応して規定された制癌剤の投与を続け、その後は放置飼育した。本群に供された 39 ラットのうち、明瞭な肺転移を形成したものは、MC 及び EX の低濃度投与群の各 1 頭だけであり、肺転移率は 5.1% に過ぎない。一方高濃度群では、一例の肺転移をも認めることができなかった (表 1)。これに対し移植直後のヘパリン 50 u./rat 動脈内挿管投与対照群では、10 頭中 4 頭 (40%) に肺転移が証明された。本群にみられた肺転移抑制効果を推計学的に  $\chi^2$  法によつて差の検定を行なつてみると、危険率  $P \leq 5\%$  で、無処置群 ( $\chi^2 = 29.21$ )、移植直後のヘパリン投与群 ( $\chi^2 = 9.00$ ) の肺転移率に対して明らかに差異があり、有意の差があると考えられることかてくる。即ち、肺転移形成に対しては明瞭な抑制効果を示した。また移植直後の静脈内投与群 ( $\chi^2 = 5.40$ ) 及び腹腔内投与群 ( $\chi^2 = 7.51$ ) の肺転移率に対しても有意の差が認められた。即ち、直後動脈内挿管制癌剤投与法は同量の制癌剤の静脈内及び腹腔内投与によるよりも肺転移抑制効果については著しく優れていると云える。

## 2. 早期投与群における肺転移

腫瘍移植後 24 時間目より制癌剤を腫瘍栄養動脈内に 5 日間投与した早期投与群では、肺転移陽性動物は 39 頭中 3 頭 (7.7%) であり、その他の動物は転移陰性であつた。早期のヘパリン投与対照群では、10 頭中 4 頭 (40%) に転移陽性であつた。北<sup>35)</sup>によれば、Walker 腫瘍の骨髄内移植後 24 時間では、まだ肺には肉眼的変化は認められないが、この時期の動脈内制癌剤投与は局所腫瘍の抑制だけでなく、移植時に肺に生じた腫瘍細胞栓子の定着発育をも強く障害することを証明している。早期投与群の肺転移率は、前項に示した直後動脈内投与群のそれに比して、推計学的に差異を認めることができず ( $\chi^2 = 0.21$ ,  $P \leq 0.05$ )、直後投与と略同様の転移抑制効果を認めることができた。また、早期静脈内投与群 ( $\chi^2 = 5.56$ ,  $P \leq 0.05$ ) 及び早期腹腔内投与群 ( $\chi^2 = 11.35$ ,  $P \leq 0.05$ ) に対しても、肺転移率では明らかに有意の差が証明され、動脈内挿管制癌剤投与が最も高い肺転移抑制を示した。

## 3. 中期投与群における肺転移

この実験群においては、移植後 7 日目に肉眼的及びレ線学的に移植局所腫瘍陰性と判定されたラットは実験より除外したため、移植率の上昇とともに肺転移陽性動物数の増加が認められた。即ち、肺転移率は 38 頭中 18 頭 (47.5%) で、直後投与群・早期投与群に比べ

て飛躍的な増加を示した。この値は無処置群の肺転移率 (64.6%) に比すれば尚低率であるが、差の検定では  $\chi^2 = 2.17$ ,  $P \leq 0.05$  で有意の差があるとはいえない。しかし実験群の選び方からみれば、無処置群の自然退縮例を除外して算された肺転移率 81.2% と比較されるべきであり、そして、 $\chi^2 = 7.72$ ,  $P \leq 0.05$  であることは転移抑制効果があることを示している。一方、中期静脈内投与群では、19 頭中 8 頭 (42.0%) の肺転移率が認められ、中期腹腔内投与群では 19 頭中 14 頭 (73.6%) に肺転移が認められ、動脈内投与群に転移率が低い傾向がみられたが、 $\chi^2$  検定では有意の差を認めることが出来なかつた。即ち、中期の動脈内投与が他の経路によるより優れているとはいえない。

## 4. 晩期投与群における肺転移

中期投与群と同様に、移植陰性動物は実験より除外したため、移植率は 100% を示し、肺転移率は 73.7% であつた。これは無処置群の肺転移率に比し有意の差があるとはいえない ( $\chi^2 = 0.69$ ,  $P \leq 0.05$ )。また晩期の静脈内投与群及び腹腔内投与群に比しても、有意の差は認められず ( $\chi^2$  iv = 1.66,  $\chi^2$  ip = 1.68,  $P \leq 0.05$ )、このような晩期での制癌剤投与はいかなる経路によつても、既に形成された肺転移を抑制することは不可能であることが証明された。

## 第 4 項 小 括

制癌剤投与のルートを選定するに当つては、制癌剤が腫瘍に到達するまでに不活性化されないこと、有効濃度が得られること、全身の臓器に対する毒性を可及的に軽減すること等が考慮されねばならないが、動脈内挿管制癌剤投与法は高濃度の制癌剤を、不活性化することなく、直接腫瘍に作用させるとともに、全身性の中毒作用を最小限にとどめることができるのであつて、長期大量投与を目標として開発された方法である。本節で、動脈内挿管投与法を移植直後または早期に行なう場合には、静脈内及び腹腔内投与に比して、移植腫瘍の発育が強く抑制され、なおその上に推計学的にも有意の肺転移抑制効果があることが認められた。しかし、中期及び晩期投与では、いずれのルートによつても肺転移を抑制することはできず、既に形成された肺転移巣に対しては有効であるとは云えない。

## 第 3 節 制癌剤の種類、量及びヘパリン投与と肺転移

### 第 1 項 制癌剤の種類による肺転移形成の差異

本実験では、Endoxan (EX) 及び Mitomycin C (M C) を用いたが、EX は酵素によつて水解されて活性型

の Cytoxylamine, Cytoxylalcohol, Nor-HN<sub>2</sub> を生ずるが<sup>22)23)</sup>, EX が腫瘍細胞内で活性化されるか否かについては尚議論がある<sup>9)62)</sup>。もし腫瘍細胞内で活性化されなければ、これを動脈内挿管投与に用いることは無意味である。本実験において動脈内に投与した結果は表6に示すとおりであつて、直後または早期に投与した場合には、EX, MC 何れも略同率に、著しい肺転移抑制効果を示した。協同研究者米沢<sup>84)</sup>はEX による移植腫瘍の発育抑制を組織学的所見から証明しているが、我々の実験成績からしても EX が腫瘍細胞内で活性化され有効に作用することが推定される。

## 第2項 制癌剤の濃度の肺転移発生率に及ぼす影響

EX 及び MC の濃度の肺転移に対する影響を高濃度投与群と低濃度投与群について比較検討した結果は表6に示すとおりであつて、高濃度投与群のうち特に直後及び早期投与群においては、1例の肺転移例も認められず、高濃度投与群に著しい肺転移抑制効果があることが証明された。しかし低濃度投与群のうちでも、直後及び早期投与群においては、抑制効果が認められた。そこで直後及び早期投与群のうち、高濃度及び低濃度投与群について肺転移率の差を検定してみると、 $\chi^2=5.11$ ,  $P \leq 0.05$  であつて、有意の差が認められた。即ち、高濃度投与群に抑制効果が高いことが証明された。一方、中期及び晩期投与群においては、高及び低濃度投与群とも肺転移率は上昇し、両者の間には差は認められなくなつた ( $\chi^2=2.52$ ,  $P \leq 0.05$ )。

## 第3項 ヘパリン投与対照群にみられる肺転移

Koike<sup>30)</sup> はヘパリンの抗凝固剤としての性質が、腫瘍細胞の流血中での集簇を妨げることから、ヘパリンに転移形成抑制作用があることを実験的に示し、その作用は腫瘍細胞そのものの *toxic action* によるもの

ではないことを明らかにした。本実験においては、留置した PE 管内での血液凝固を予防する目的で、制癌剤の毎回の注入の度毎に50 u./rat のヘパリン溶液を注入したので、ヘパリン単独の影響をみるためにヘパリン単独動脈内挿管投与群を対照に加えた。この群にみられる肺転移は、表2に示すように、制癌剤投与群よりも高率を示しており、無処置群との間に有意の差が認められなかつた ( $\chi^2=1.95$ ,  $P \leq 0.05$ ) ことからすれば、ヘパリン自体に肺転移抑制効果があるとは考えられない。即ち、制癌剤投与群にみられた肺転移抑制効果は同時に使用されたヘパリンによるものではないということは明らかである。

## 第4項 小 括

腫瘍栄養動脈内に投与された EX, MC の肺転移抑制効果については、両薬剤の間に差異は認められず、いずれも直後及び早期投与群において著しい肺転移抑制効果が認められた。投与された薬剤の濃度による差についていえば、高濃度薬剤を直後及び早期に投与する場合に、最も強い抑制効果があり、低濃度投与でもかなりの効果が認められた。しかし、中期乃至晩期投与では、高低いずれの濃度の薬剤を投与しても両者の間に著明な差は認められなかつた。また、ヘパリン単独動脈内挿管投与実験では、どの時期に投与を開始しても、有意の抑制効果を認めることができなかったことからして、ヘパリンは流血中の腫瘍細胞の動態に変化をもたらす可能性はあるが、腫瘍細胞自体を障害するものではなく、動脈内挿管制癌剤投与時にみられる肺転移抑制効果はやはり制癌剤の直接的作用によるものであることが推定される。

## 第4節 動脈内挿管制癌剤投与後、腫瘍肢切断群における肺転移

臨床的に制癌剤動脈内挿管投与によつておこる四肢

表6 動脈内挿管投与による制癌剤の濃度及び種類に対する投与時期別肺転移率

|             | 直後投与群 |          |      | 早期投与群 |          |      | 中期投与群 |          |      | 晩期投与群 |          |      |
|-------------|-------|----------|------|-------|----------|------|-------|----------|------|-------|----------|------|
|             | 動物数   | 肺動脈転移陽性数 | 転移率% | 動物数   | 肺動脈転移陽性数 | 転移率% | 動物数   | 肺動脈転移陽性数 | 転移率% | 動物数   | 肺動脈転移陽性数 | 転移率% |
| EX 50mg/kg  | 10    | 0        | 0    | 9     | 0        | 0    | 10    | 4        | 40   | 10    | 7        | 70   |
| MC 1.0mg/kg | 9     | 0        | 0    | 10    | 0        | 0    | 9     | 3        | 33.3 | 8     | 5        | 62.5 |
| EX 10mg/kg  | 10    | 1        | 10   | 10    | 2        | 20   | 9     | 5        | 55.5 | 10    | 8        | 80   |
| MC 0.1mg/kg | 10    | 1        | 10   | 10    | 1        | 10   | 10    | 6        | 60   | 10    | 8        | 80   |

の悪性骨腫瘍の変化は比較的軽く可逆的であるから、これのみで腫瘍を消滅させることはできない。患肢の切断又は腫瘍の広汎切除術を併用して死因をなす肺転移形成を防止しなければならない<sup>49)5)</sup>。そこで著者は骨髄内移植腫瘍に制癌剤動脈内挿管投与を行なつたのうち、腫瘍肢を切断することによつて原発腫瘍を完全除去し、その後の肺転移発生の状況について検討した。腫瘍移植直後及び早期投与切断群では、全例に intra-arterial infusion を行ない、中期・晩期のものでは腫瘍が生着したものに対して i-a. infusion 及び切断を行なつた。切断は大腿にて行なつた。即ち、大腿動静脈を結紮したのち大腿を一気に切断し、止血を行ない、筋及び皮膚を密に縫合した。ヘパリンを用いているために術後創からの出血が続く傾向がみられ、特に中期及び晩期投与群では手術の翌日もしくは第3日目に出血死又は衰弱死するものがかかなり多くみられた。

実験結果は表7に示すように、直後及び早期投与後切断群では、高濃度及び低濃度投与群ともに、平均生存日数を越えて生き続け、41日目の剖検においても肺転移巣が発見された動物はなく、著しい肺転移抑制効果が認められた。これに対して、中期投与後切断群では、3頭中1頭に肺転移が認められた。晩期投与後切断群においては、全動物が41日以内に死亡し、全例に著明な肺転移が認められ、制癌剤の投与も切断術もこの場合には無意味であることを示した。

#### 第5節 肺転移巣の数及び転移結節の径の分布

肺転移巣の多寡は転移形成に対する制癌剤の抑制効果の一つの指標となる。また Collins<sup>13)14)</sup> が指摘するように、もし腫瘍が一定の发育速度で増殖し続けるものとすれば、肺転移結節の大きさから転移発生の時点

を推定することができる。肺転移結節のうちのある大きな結節群が欠落していれば、その時点において何らかの転移抑制作用が働いたと推定することができる。このような観点から肺転移巣の数と大きさの検討を行なつた。

#### 第1項 肺転移巣の数

転移陽性ラットの肺転移の数の合計をラット数で除した平均肺転移巣の数は表5に示す通りである。投与時期別にみると、動脈内、静脈内、腹腔内投与群のいずれの実験群においても、直後及び早期投与群に少ない傾向がみられた。投与ルート別にみると動脈内投与群は静脈内及び腹腔内投与群に比して、平均転移巣数はもつとも少ない。殊に中期動脈内投与群では、既に述べたように、転移形成の有無という見地からすれば抑制効果は殆ど認められなかつたのであるが、転移巣の数という量的見地から比較してみれば、僅かながら抑制効果を示しているといえる。しかし晩期動脈内投与群では、上記の意味での抑制効果さえも認めることができない。一方、ヘパリン投与群では、その転移巣数は各時期を通じて、略一定の値を示し、制癌剤投与群に比べるとより多数の転移巣が認められた。動脈内投与後切断群では、転移巣の数は最少である。このことは切断によつて二次的転移が防止され、更に動脈内制癌剤投与によつて肺内の潜在性腫瘍細胞栓子も发育増殖を阻止されることを推定させる。

#### 第2項 肺転移結節の大きさ

肺転移結節の大きさを次のように6段階に分類した。即ち、直径1mm以下をI度、1mm以上2mm以下をII度、2mm以上3mm以下をIII度、3mm以上5mm以下をIV度、5mm以上8mm以下をV度、8mm以上をVI度とし

表7 制癌剤動脈内挿管投与後切断群における肺転移率

|          | 制癌剤<br>mg/kg | 動物数 | 事故死数 | 有効動物数 | 生存日数                    | 肺転移陽性<br>動物数 | 肺転移率 |
|----------|--------------|-----|------|-------|-------------------------|--------------|------|
| 直後投与後切断群 | MC 1.0       | 3   | 1    | 2     | 41 s.                   | 0            | 0    |
|          | MC 0.1       | 3   | 0    | 3     | 41 s.                   | 0            | 0    |
| 早期投与後切断群 | MC 1.0       | 2   | 0    | 2     | 41 s.                   | 0            | 0    |
|          | MC 0.1       | 2   | 0    | 2     | 41 s.<br>70 s.          | 0            | 0    |
| 中期投与後切断群 | MC 1.0       | 5   | 2    | 3     | 31 d.<br>41 s.<br>41 s. | 1            | 33.3 |
| 晩期投与後切断群 | MC 1.0       | 5   | 2    | 3     | 24 d.<br>27 d.<br>35 d. | 3            | 100  |

s.: 屠殺, d.: 死亡

た<sup>35)</sup>。これを横軸に、上記各径の結節の数を百分比で表わした値を縦軸にとり図示する方法で比較した。

無処置対照群にみられた肺結節の径分布曲線は、図1 a 及び b に示すように、大径結節群と小径結節群の数が特に多く、2 峰性分布型式を示すのに対して、制癌剤動脈内挿管投与群の結節径分布曲線は各投与時期によつて特徴ある分布型式を示した。即ち、直後動脈内投与群では図1 a 及び b に示すように、小径結節だけがみられ、大径結節は認められない。これは移植時に播種された人工的肺転移ともいえる転移が抑制され

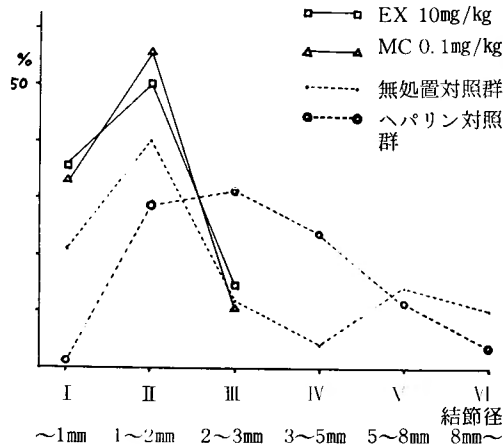


図1 a 移植直後動脈内挿管投与群肺転移果の大きさと数

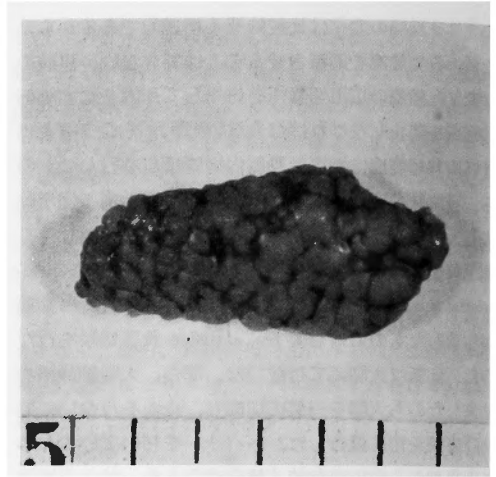


図1 c 直後 Heparin 50 u./rat 動脈内 5 日間投与、移植後18日目に死亡。中結節が肺を殆んど占居している。

た結果、大径の結節がみられないと理解することができる。又、小結節は制癌剤の投与を中止したのちに発生したものと考えることができる。一方、直後ヘパリン投与対照群では（図1 a 及び c），直後制癌剤投与群と異なる分布型式を示している。即ち、1 mm以上5 mm以下の比較的大きさの揃つた中径の転移結節が多くみられ、大径のものは少ない。

早期動脈内挿管投与群における肺結節の径分布は図2 a 及び b に示すように、直後動脈内投与群に似た分布型式を示すが、少数ながら大径結節がみられた。このことは、動脈内投与を5日間続けたにも拘らず、投与開始前に、即ち移植後24時間の間に、すでに肺に定着した腫瘍細胞の一部が生存増殖したことを証明している。ここに i-a. infusion の効果が明瞭に示されてい

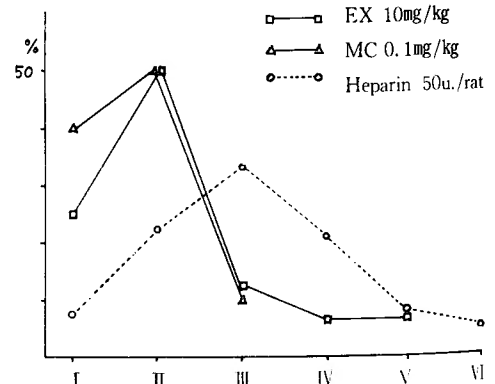


図2 a 早期動脈内挿管投与群肺転移果の大きさと数

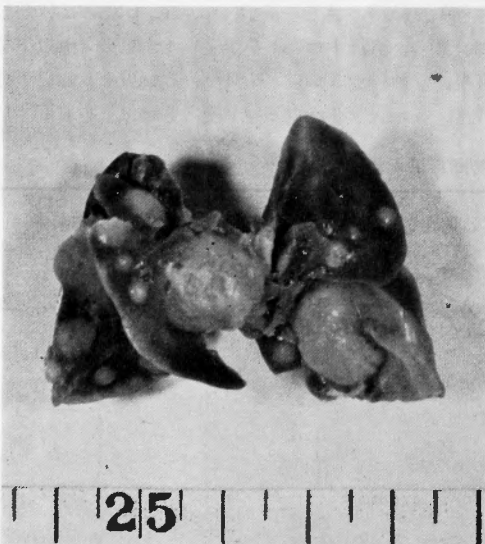


図1 b 無処置群、移植後22日目に死亡。大結節と小結節が混在している。

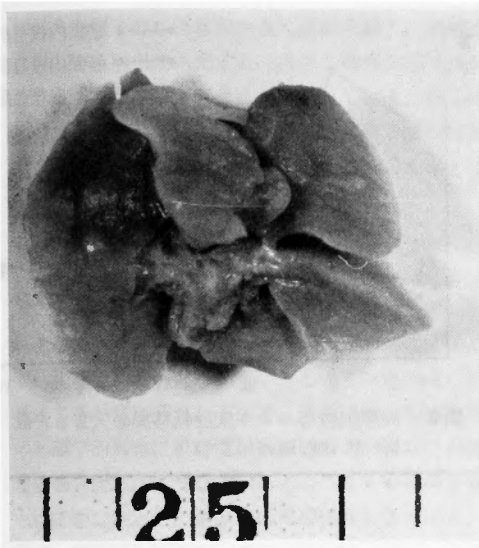


図2b 直後 MC 0.1mg/kg 動脈内5日間投与。移植後21日目に死亡。転移は小結節のみで数も少い。

る。

中期動脈内挿管投与群では(図3a及びb), 直後及び早期動脈内投与群にみられる分布型式と異なり, 小径結節の占める割合が少なくなるとともに, 大径結節の数が増加し, 無処置対照群の分布型式に移行する傾向がみられる。晩期動脈内挿管投与群の結節の径分布は(図4a及びb)に示すように, いずれも無処置群の2峰性分布型式に類似しており, 制癌剤の種類や濃度による影響はみられない。

図5は MC 0.1 mg/kgの動脈内挿管投与を行なった場合の直後投与群から晩期投与群までの転移陽性動物の肺転移の結節径分布を示したものであつて, 本項において述べた肺転移結節の径の分布の投与開始時期による相違を端的に表現している。次いで, 投与ルートによる差をみるために, 早期投与群において, MC 0.1 mg/kgの動脈内, 静脈内, 腹腔内投与各群が示した肺結節の径分布を比較検討すると(図6), 動脈内投与群だけが小径結節を欠き, 静脈内及び腹腔内投与群とは異なる分布型式を示している。しかし中期投与群についてみると(図7), すでに動脈内投与群に特徴的な分布型式は認められなくなり, 抑制効果は認められない。この点はこれまで述べてきた結果とよく一致している。

動脈内挿管制癌剤投与後切断群にみられる肺転移の大きさと数の関係は図8に示すように, 中期の例で

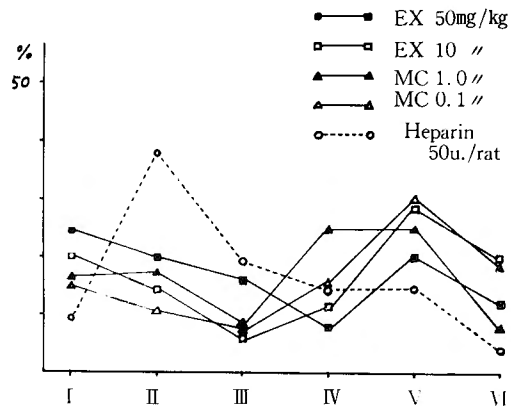


図3a 中期動脈内挿管投与群肺転移巣の大きさと数

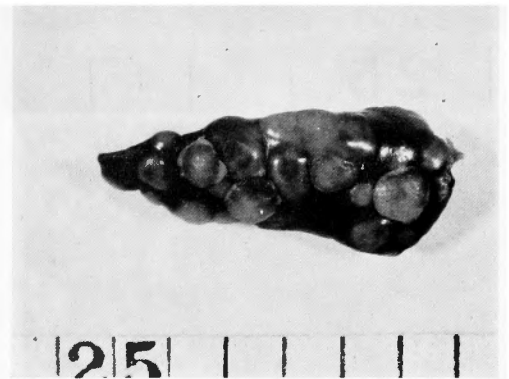


図3b 中期 EX 10mg/kg 動脈内5日間投与。移植後19日目に死亡。中結節が多い。

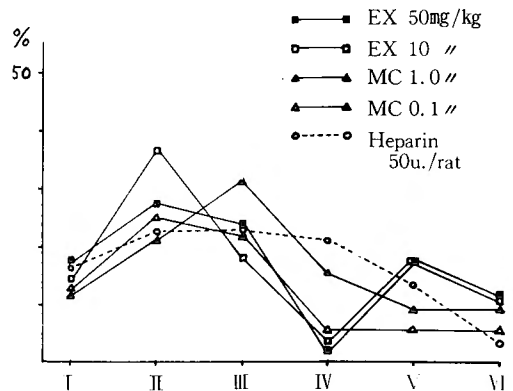


図4a 晩期動脈内挿管投与群肺転移巣の大きさと数

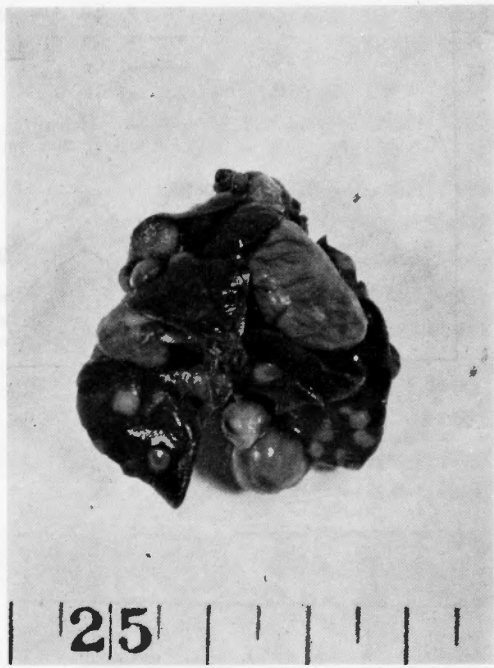


図4 b 晩期 MC 1.0mg/kg 動脈内5日間投与。移植後19日目に死亡。大結節と小結節が混在している。

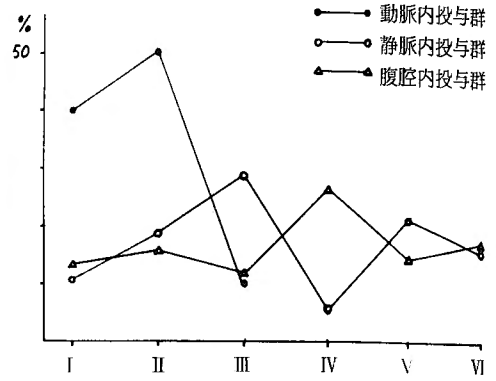


図6 制癌剤投与ルート別肺転移巣の大きさと数 MC 0.1mg/kg, 早期投与

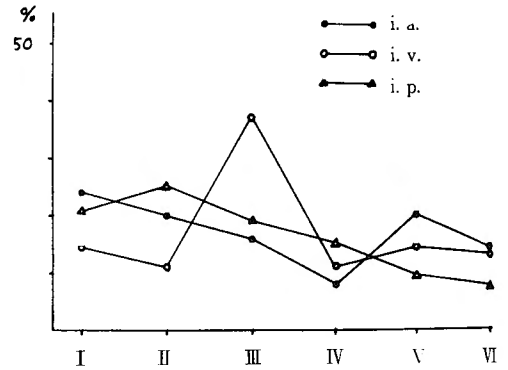


図7 制癌剤投与ルート別肺転移巣の大きさと数 EX 50mg/kg, 中期投与

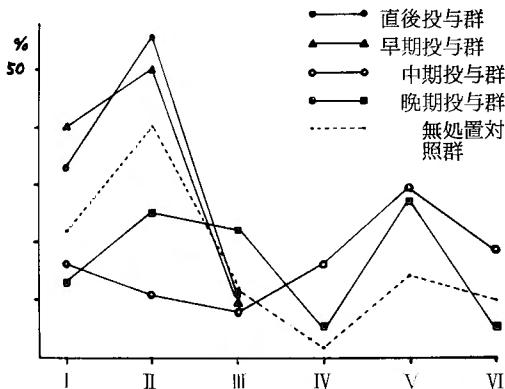


図5 MC 0.1mg/kg動脈内挿管投与。時期別肺転移巣の大きさと数

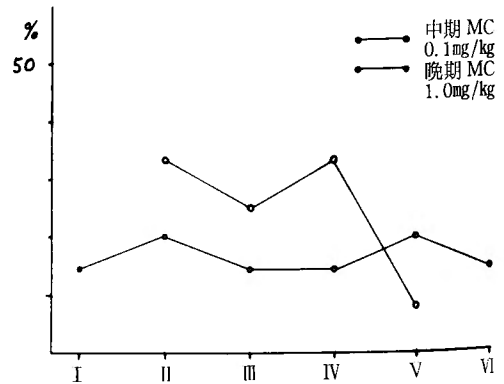


図8 動脈内挿管投与後切断群における肺転移巣の大きさと数

は、1 mm以下の小径結節が全く認められず、移植された腫瘍の原病巣に由来する二次的の腫瘍細胞播種が切断術によつて中絶されたことを示している。晩期動脈内投与後切断群では、切断時期以前に既に肺転移が確立されており、切断術は無意味であることを示している。

#### 第6節 肺転移巣における組織学的変化

制癌剤投与が腫瘍細胞に及ぼす組織学的変化については、いついかなる形態学的変化を伴なつて現われるものか、また、その変化は制癌剤独自の作用による特異的变化であるかどうかということを決定することは極めて難しいとされている。浜島<sup>27)</sup>は、制癌剤効果の形態学的観察によつて、癌細胞が用いられた制癌剤の影響を明らかに受けているということを証明することはできないとし、制癌剤の作用機序なるものも、所詮は、細胞機能のある一部を阻害しているというに過ぎず、そのために癌細胞の増殖が不可逆的に阻害されるとは考え難いと警告している。本実験の場合でも、脛骨骨髓内移植腫瘍に対し、栄養動脈内に投与された制癌剤が、その遠隔転移巣の腫瘍細胞に、どのように影響したかを形態学的に捉え、比較検討することは極めて難しく、たとえある特殊な変化が起つていたとしても、時日の経過とともに吸収され、生残り細胞の増殖によつて置き換えられ、観察の目を逃れる可能性も大きいのであるが、何らかの変化を比較観察する目的で実験動物の肺転移巣について組織学的検索を行なつた。

##### 第1項 無処置対照群における肺転移巣の組織学的所見

移植直後では、肺胞壁の毛細血管又は細小血管に数個乃至数十個の腫瘍細胞栓塞が認められるが、その形態及び染色性は皮下腫瘍のそれとの間に差は認められない。移植後24時間では、肺胞壁の血管には赤血球の充血している像が認められ、腫瘍細胞栓塞部では、核が濃染し或いは消失して細胞全体として膠様変性に陥つた部分が認められる(図9)。移植後3～5日では微小転移が小結節として認められるようになり、周囲の肺胞を圧迫しているが、結合繊維性被膜の形成は未だ明瞭ではない。腫瘍細胞はP細胞及びU細胞からなっており、細胞分裂像も認められる(図10)。7～10日では肉眼的にも明らかに肺表面に小結節が認められるようになり、組織学的には結合繊維性被膜を有し、結節はP細胞とU細胞により占められる(図11)。21日後のものでは、中心部に壊死巣が認められ、組織学的

には腫瘍結節は無気肺の部と薄い結合繊維性被膜に囲まれており、その内部にP細胞及びU細胞よりなる実質性腫瘍部がある。結節の中心部では、細胞及び核の膨化、染色性の低下や消失を示す壊死部がみられ、巨細胞も散見される(図12)。岡本<sup>55)</sup>は骨髓内移植腫瘍の肺転移巣においては、組織像は骨髓移植局所に比しよ

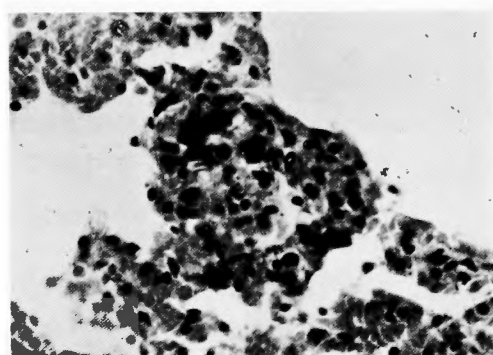


図9 無処置群 移植後24時間、変性した腫瘍細胞栓塞。×400

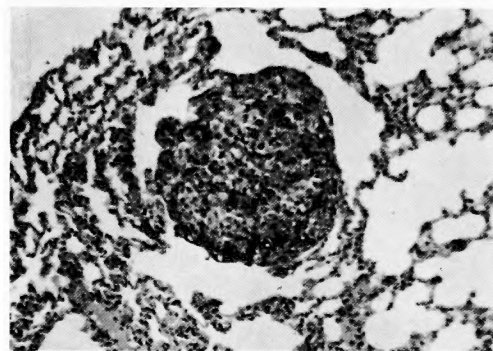


図10 無処置群 移植後5日目、微視的転移巣。主細胞と未分化細胞よりなり変性を認めない。×100

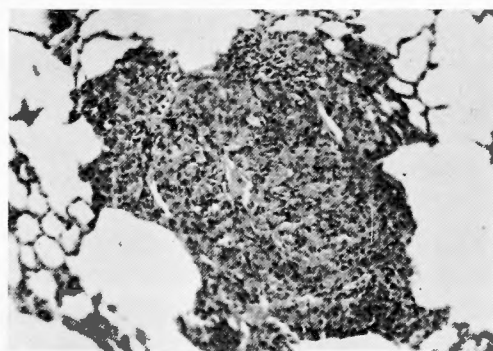


図11 無処置群 移植後10日、肺転移巣。×100

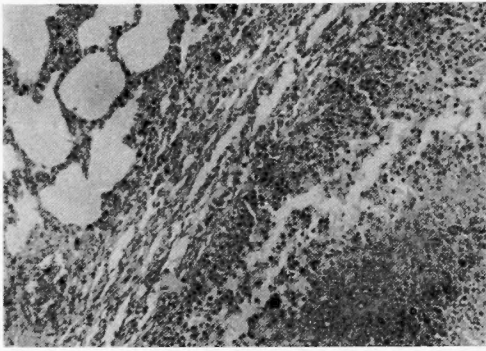


図12 無処置群 移植後21日目。無気肺部に接したうすい被膜下に主細胞層があり、その内方に壊死に陥った部分がみられ巨細胞を含む。×100

り単純で、皮下腫瘍のそれと似ており、結節が大きくなるに従つてP細胞が減少し、U細胞がふえることを観察している。著者の研究においても、これと同様の所見が認められた。

## 第2項 動脈内挿管制癌剤投与群の肺転移巣にみられた組織学的変化

浜島<sup>27)</sup>はヒトにおける制癌剤投与例にみられる組織学的変化について観察して次のように述べている。即ちEX投与例では、DNA代謝阻害作用によつて分裂期にある細胞の機能停止状態、異常分裂（分裂核の不完全分離、染色体の異常分散と凝集、染色体極形成が4極性を示す）、多核巨細胞形成などがみられる。又ヒト胆嚢癌の肝転移に対するMC肝動脈内注入例では、核の扁平萎縮、核仁の凝集、核内透明野出現、Golgi野の顕著な浮腫性膨化、胞体のmicrocystの形成等が屢々みられる。牧野<sup>46)</sup>はMCは休止期の癌細胞に作用し、その核、特に核仁に働き染色質の変化、核の変性崩壊を起し、次いで細胞質の変化を起すという。著者は上記の所見を示標として動脈内制癌剤投与群の肺について検索を加えた。しかし、本群に属する大部分のラットでは、肺転移巣がないか、あつても制癌剤注入後かなりの時を経て死亡したものが多く、このような制癌剤による直接的变化と認められる所見を示したのは少数例に過ぎなかつた。

移植直後及び早期投与終了後に何ら異常なく生存し続け、41日目に屠殺されたラットの肺は全く正常であつたか、投与終了後1～2日に制癌剤による中毒死を来したラットの肺は肉眼的に鮮紅色を呈し、組織学的には肺胞壁に充血があり、肺胞内には浸出液の貯溜が認められ肺炎を思わせる所見がみられた（図13）。し

かし一部では、肺胞壁内に、核の縮小濃染と細胞質の透明像などの強い変性を示す腫瘍細胞も散見された（図14）。中期動脈内投与群のうち、投与終了後2日目に死亡したラットの肺転移巣において、典型的なP細胞に接し、細小血管に沿つて核の萎縮、染色物質の濃縮、細胞質内の透明巣など強い変性像を呈する腫瘍細胞が多数認められたが（図15）、このような所見は制癌剤による変化と推察される。また、中膜を有する小血管に接して腫瘍細胞の膨化と細胞質内の空胞形成、核の崩壊消失の著明な部分がみられたが（図16）、その拡大像では、やはり無変化のP細胞と混在して核の濃縮、細胞質の空胞変性を伴う変性腫瘍細胞が多数みられた（図17）。更に核の膨化、核膜の消失、クロマチン構造の消失したもの（図18）、核仁の消失、クロマチンの濃縮偏在、正常構造の消失、細胞質の透明化したもの（図19）、或いは核の膨化、クロマチンの消失、核内透明巣の出現を認めるもの（図20）、異常核分裂と思われるもの（図21）、巨細胞の出現（図22）

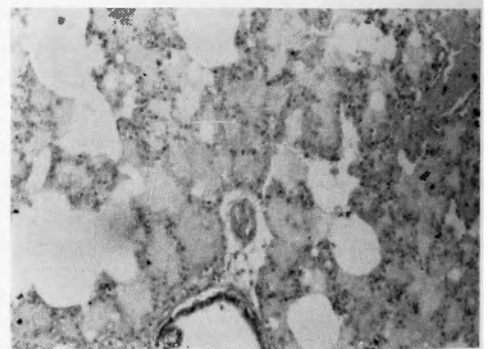


図13 直後 EX 10mg/kg動脈内5日間投与。胞隔の拡大と肺胞内浸出液貯溜。×100

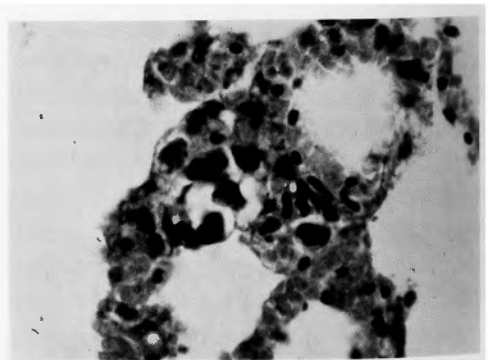


図14 直後MC 0.1mg/kg動脈内5日間投与。胞隔の拡張と核濃縮し、胞体透明化した腫瘍細胞群がみられる。×1000

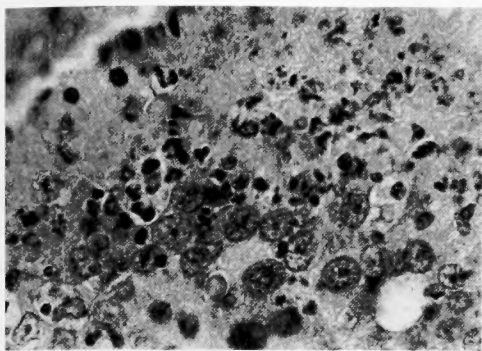


図15 中期MC 1.0mg/kg動脈内5日間投与。細小血管に接し、正常主細胞との間に核の濃縮、消失と胞体透明化を示す変性腫瘍細胞が帯状に配列している。×400

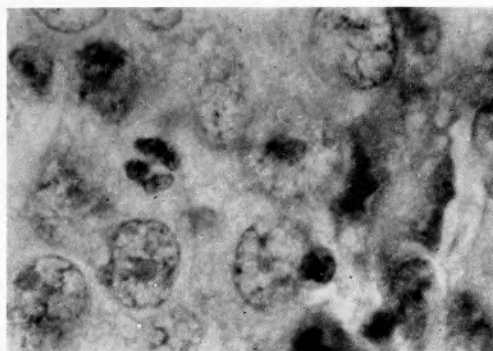


図18 中期 MC 0.1mg/kg 動脈内5日間投与。核の膨化、核膜の消失、クロマチンの不鮮明化、核仁の濃縮がみられる。×1000

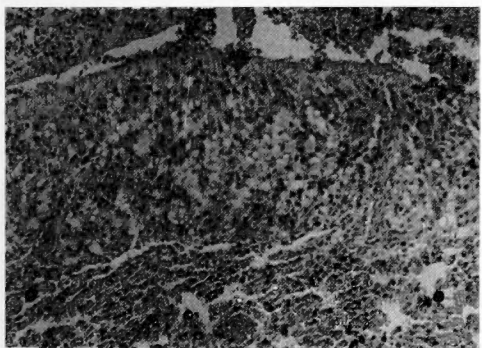


図16 中期 MC 10mg/kg動脈内5日間投与。小血管周囲に胞体は膨化透明化し、核は濃縮、消失し、疎な腫瘍細胞の破壊がみられる。×100

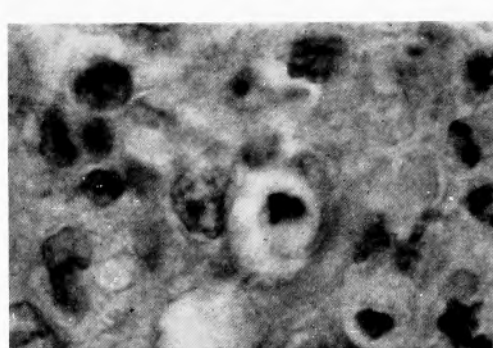


図19 中期 MC 1.0mg/kg 動脈内5日間投与。核構造の消失、クロマチンの濃縮偏在、胞体の透明化がみられる。×1000

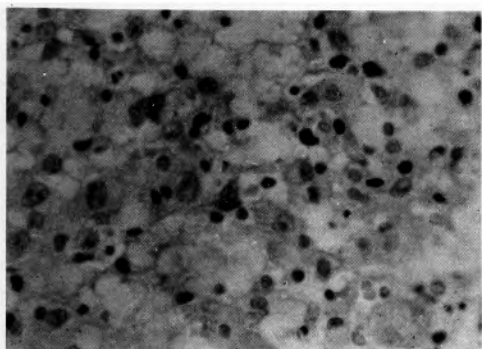


図17 中期 MC 1.0mg/kg 動脈内5日間投与。図14の拡大。核の濃縮と胞体の空胞化した腫瘍細胞が変化のない主細胞とし混在している。×400

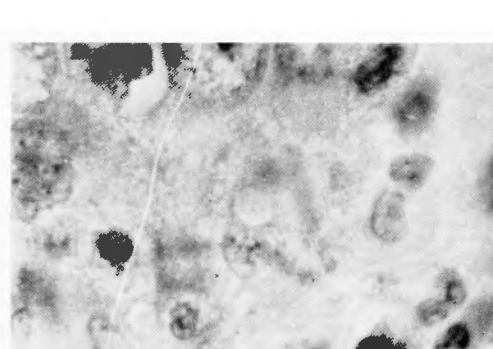


図20 晩期 MC 1.0mg/kg 動脈内5日間投与。核膨化、核膜およびクロマチンの消失、核内透明野の出現がみられる。×1000

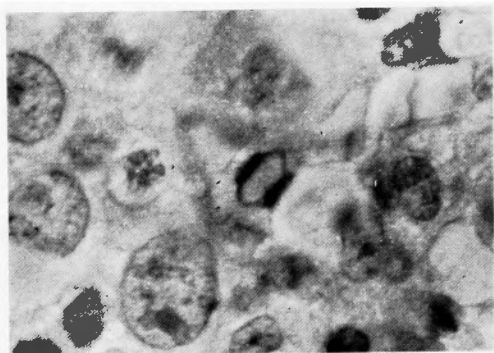


図21 中期 EX 50mg/kg動脈内5日間投与。染色体異常分散と凝集がみられる。×1000

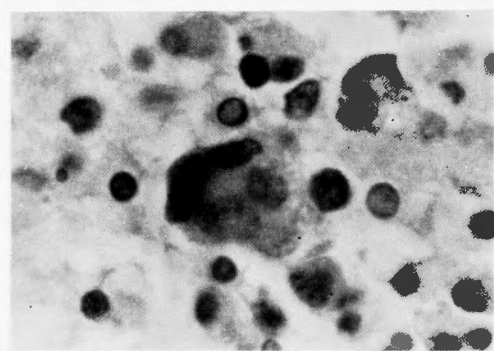


図22 晩期 EX 10mg/kg動脈内5日間投与。巨細胞形式。×1000

等がみられたものがあり、この際に出現する巨細胞は退行変性に陥った数個の腫瘍細胞が融合したもので、加藤<sup>32)</sup>が述べているように、レ線、コバルト照射時に多数出現する変性巨細胞と同様のものと考えられる。特に空胞形成と巨細胞の出現が対照群のそれと異なるように思われた。

#### 第4章 総括ならびに考按

I. 肺転移の研究に用いられる実験腫瘍系について  
悪性骨腫瘍、特に骨肉腫の肺転移に関する実験腫瘍としては、出来れば自然発生骨肉腫で、高率に肺転移を来すものが理想的であるが、種々の実験操作を加えた screening 形式の研究を行なう場合は、累代移植が可能で、しかも腫瘍の性格が一定しているいわゆる固定株が最も適していると考えられる。しかしこのような実験骨肉腫は現在の所未だ見出されていない。

実験的骨肉腫については古くから、自然発生したもの及び放射性物質や発癌性化学物質を用いて人工的に

作り出されたものが枚挙のいとまのない程報告されている<sup>2)</sup>。しかしこれらの腫瘍はいずれも次代或いは数代の移植を重ねる間に骨形成能を失ない、未分化型の肉腫細胞はより分化型の悪性度の低い肉腫に変化し、或いは自然退縮し、骨肉腫としての性格を失なうことが、多くの研究によつて知られている。また、人工的に動物骨髓内に腫瘍を発生させるることによつて、ヒト悪性骨腫瘍の経過に数似したものが得られるが、小動物では肺転移を来す前に腫瘍死するために肺転移の実験には供し難い。従つて、著者が企図したような実験目的には可移植性実験腫瘍を用いざるを得ない。Brunshwig<sup>10)</sup>はマウス脛骨内に methylcholanthrene を注入し、渡辺<sup>81)</sup>も同じ methylcholanthrene によつてラットに骨肉腫及び線維肉腫を発生させた。堀江<sup>28)</sup>はラット骨髓内に 20-methyl cholanthrene, benzpyren を注入し、同時に <sup>32</sup>P を全身的に投与する方法で、骨肉腫及び線維肉腫を高率に発生させた。この肉腫は可移植性腫瘍として皮下及び骨髓内に継代移植される間に、線維肉腫様の組織変遷を示すが、骨髓内移植を行なうことによつて骨肉腫に似た腫瘍を再現出来る利点を有している。しかし、その組織片を骨髓内に移植した島山<sup>76)</sup>らの実験では、肺転移率は17.1%であり、組織消化液を骨髓内に移植した場合<sup>72)</sup>でも、23.3%であつて、肺転移発生が低いという欠点を有しており、著者の企図した肺転移に関する実験に用いられる腫瘍系としては適当ではない。一方、吉田肉腫や腹水肝癌のような遊離細胞癌を骨髓内に移植した実験<sup>73)18)</sup>では、比較的高率の肺転移が得られるが、その転移は肺に止まらず、全身性に広汎な遠隔転移を形成する傾向が強く、ヒト骨肉腫の自然経過とは余りにも相違するという難点をもっている。京都大学 整形外科教室においては、1963年来 Walker's carcinosarcoma 256を用いて種々の実験を行なつてきたが、本腫瘍のもつ特異な骨肉腫の性格が骨髓内移植によつて肉腫様性格を強く発現してくること、移植率及び肺転移形成率が高く、しかも転移は主として肺に限られ、また、それが移植後1～2週で発現すること、また、制癌剤に対する感受性等については詳細な研究が既に行なわれており<sup>66)</sup>、制癌剤の screening 実験に現在でも最も広く用いられている固定株である。これは著者の実験目的をかなりよく満足させるものである。しかし、このような実験では、骨髓内移植そのものの特異性から、いわゆる人工的肺転移を来すことは免れ得ないので、この点については、実験成績の判定上十分な考慮が必要である。

## II. 動脈内挿管制癌剤投与法について

1950年, Klopp<sup>37)</sup>らは放射線療法は腫瘍局所に限局して作用し, 他の臓器殊に骨髄に対して著しい抑制作用を示さない点に注目し, 放射線類似物質である  $\text{HN}_2$  即ち bis-( $\beta$ -chloroethyl) methylamine を腫瘍に限局して与える方法として intra-arterial infusion 法を創始した。即ち, Klopp らは腫瘍栄養動脈内に PE 管を挿入設置し, ヒト癌10例に対して制癌剤の注入を行なった結果, 8例に腫瘍の縮小を認め, これを“chemical radiation”と呼んだ。一方 Bierman<sup>9)</sup>ら(1950)もヒト悪性腫瘍に  $\text{HN}_2$  の動脈内 infusion を行ない, これが静脈内投与よりも造血系に対する障害が少ないという利点をもっていることを強調した。次いで Cromer(1952)<sup>17)</sup>, Grady(1953)<sup>24)</sup>, Sullivan(1953)<sup>67)</sup>らによつて同様の報告がなされた。

Klopp & Trams<sup>77)</sup>はまた1955年に初めて動脈内 infusion の動物実験を行なった。即ちラット大腿動脈より挿管され大腿動脈分岐部に設置した PE 管を通じて, 移植腫瘍に対し  $\text{HN}_2$  を分割投与し, これまで, 他のどのようなルートによつても得られなかつた程の強い障害を腫瘍に与えることができた。1956年, 酒井<sup>61)</sup>は Walker 腫瘍をラット大腿皮下に移植し, Klopp の方法によつて PE 管を設置し, NMO を1日1回3~5mg づつ7~10日間連続投与し, 腫瘍発育の停止, 縮小を認め, また, 組織学的にも腫瘍を破壊することを確認した。また, 寺中<sup>74)</sup>(1958)はラットの大腿移植 Walker 腫瘍に対して mitomycin X の動脈内挿管投与を行ない, 腫瘍発育の抑制と延命効果があることを認めた。Straub & Burchenal<sup>65)</sup>(1964)はウサギの  $\text{VX}_2$  癌を用い, これに methotrexate, mitomycin, vincristine の動脈内挿管投与を行なったが, 実験操作の複雑なことから, その効果についての明瞭な結論を出すことができなかった。このように動脈内挿管制癌剤投与に関する実験的研究は比較的少なく, しかも四肢悪性骨腫瘍をモデルとした骨髄内移植腫瘍に対する実験は我々の実験より外には見当たらない。

従来, 動脈内インフュージョンに用いられる制癌剤は  $\text{HN}_2$  及びその誘導体に限られていたのであるが, 1959年 Sullivan<sup>68)</sup>は代謝拮抗剤を本法に応用することに成功し, 更に中和剤を併用することによつて全身に対する毒性を軽減させる方法を導入した。さらにまた, 投与法についても, その作用機序から, 従来の分割投与法から長期持続投与法に移り, infusion pump 等の infusion assembly も開発され, 現在では, 動脈

内インフュージョンの方向は代謝拮抗剤長期持続投与が悪性腫瘍の化学療法の主流をなすようになった感がある。

更に, Kremenz(1962)<sup>40)</sup>や Ryan(1963)<sup>60)</sup>は TEM の動脈内インフュージョンに X 線照射を併用する方法を, また, Lawton(1965)<sup>43)44)</sup>は  $^{60}\text{Co}$  照射を組み合わせる方法を発表した。伊藤, 赤星<sup>31)</sup>(1963), 増田<sup>48)</sup>(1963)は四肢悪性骨腫瘍に動脈内インフュージョン法を応用し, 腫瘍摘出術と併用する方法が有効であることを強調している。しかしながら, 冒頭に述べたように, 四肢悪性骨腫瘍の予後は遠隔転移により左右されるものであるから, 動脈内挿管制癌剤投与法が果して肺転移に対してどの程度有効であるかということについての検討は極めて重要な課題である。

制癌剤腫瘍栄養動脈内投与法が肺転移抑制に有効であると考えられる理由として次のような種々の利点を挙げることができる。

- 1) 転移の原因である原発腫瘍の発育を抑制し, これを破壊することによつて転移を防止する。
- 2) 原発腫瘍より遊出した流血中の腫瘍細胞を制癌剤をもつて追跡し, 肺に定着して発育することを阻止する。
- 3) 原発腫瘍の細胞活性を減弱させ, 即ち, 弱毒腫瘍化し, しかも, その免疫性を維持して, 全身的抵抗反応を獲得させ, 転移の発生を抑制する<sup>36)79)</sup>。
- 4) 肺内の制癌剤の有効濃度を高めて転移果の発育増殖を抑制する。
- 5) 制癌剤の全身に対する毒性が他の投与法よりも低いために, 長期に亘つて持続的に投与することができるので, 腫瘍細胞の分裂期や, 休止期を通じて長期に亘つて作用させることができる。

移植腫瘍の抑制についていえば, 本実験によつて示されたように移植直後及び早期投与群においては, 明らかな増殖抑制効果がみられたが, 中期以後の, 既に着生し増殖しつつある移植腫瘍全体に対しては, これを完全に退縮させることは出来なかつた<sup>84)</sup>。このことからしても, 本法の肺転移抑制効果は十分とは考えられない。

制癌剤を動脈内に投与することによつて腫瘍内に高濃度の薬剤がとり込まれ, 発育抑制的に作用することは協同研究者吉栖<sup>85)</sup>によつて明らかにされたが, 薬剤の一部は腫瘍灌流後に静脈血に移行し, 肺に向うことになる。一方, 血中の向肺性腫瘍細胞の大部分は変性壊死に陥る運命にあるか, これが更に血中の制癌剤に

よつて、無毒化され、肺に栓塞を起した腫瘍細胞栓子も、生着する前に肺動脈血中の制癌剤の作用を受けて、転移巣形成を阻害されるという可能性が十分考えられる。肺に定着した当初の腫瘍細胞塊は血管をもつておらず、肺動脈血の中であたかも組織培養におけると同様の状態で増殖し、次いで血管内膜、中膜を経て、外膜リンパ管にまで増殖侵入<sup>57)</sup>し、転移巣を完成する。転移巣内の栄養血管の形成については、Ogilvie<sup>54)</sup>らはウサギを用いて実験を行ない、次のような成績をえた。即ち、肺転移巣のうち3mm径以下のものは肺動脈のみから血液を受け、気管支動脈よりは血液を受けない。3mm径以上のものは肺動脈及び気管支動脈の両方から血液を受けていることを立証している。このことからすれば、肺動脈血中の制癌剤は腫瘍細胞栓子に作用すると考えられる。吉栖<sup>55)</sup>は、制癌剤の1回投与では肺内力価は腹腔内投与による方が動脈内投与よりも高いが、5日間連続投与後では、動脈内挿管投与法は最高力価を長時間維持することを証明した。本実験においては小動物を用いたため操作上の難点から長期連続投与は試みることが出来なかつたが、臨床的には腫瘍灌流後の還流静脈内に制癌剤の中和剤を注入することによつて<sup>30)</sup>比較的長期間の投与が可能であり、腫瘍灌流後、薬剤は肝の門脈系を通過することなく肺に到達するのであるから、本法は肺転移抑制も同時に期待することができると思われる。

全身的抵抗性の獲得について臼淵<sup>79)</sup>は制癌剤により減弱された腫瘍細胞が生体内で抗腫瘍性免疫を産生すると推論し、Klein<sup>36)</sup>は、実験的に発生した腫瘍を抗原として産生された免疫の抗体を証明し、この免疫は移植腫瘍に比して弱いものであるが、転移巣に対しては抗体の作用が期待されると述べている。腫瘍の栄養動脈内への制癌剤投与は最も強い抗腫瘍作用を発揮し<sup>73)</sup>、一次性腫瘍抑制効果が大きく、しかもこの腫瘍が長期間に亘つて生体と連続性を保つときは、ある程度の全身抵抗が獲得され、ある程度の肺転移阻止効果が期待される。結局、本実験の成果の項においても述べたように、肺転移発生の時期にi-a. infusionが行なわれた場合には、肺転移抑制が期待されるが、臨床的には転移発生の時期を前もつて知ることはむづかしく、既に転移巣が形成されている場合には、i-a. infusionの抑制効果はそれ程期待することはできない。更に強い肺転移抑制を期待するとすれば、肺動脈、または気管支動脈の両者を介して直接肺をinfuseする等の新しい投与法の工夫がなされねばならないであろう。

### Ⅲ. 肺転移の発生とその増殖抑制について

肺転移の発生については、1891年にPagetが唱えたような沃土説、即ち、肺は腫瘍細胞にとつて沃土であるとする説や1919年にEwingが唱えた機械的不適合説、即ち、肺血管系と腫瘍細胞の大きさの不適合による説が代表的なものであるが<sup>15)38)</sup>、以後なされた数多くの転移に関する実験的研究の成績からしても、上記の諸要因の他に種々複雑な要因が関与することが知られている。高橋<sup>71)</sup>はマウスの腫瘍細胞浮遊液を静脈内に注入し、肺に変性した腫瘍細胞栓塞を証明した。彼はこの研究の成績から、転移形成の成否は単に腫瘍細胞が血行内侵入するというだけでなく、その細胞が血管内での十分な活力を有するかどうかということにかかっていると述べている。Warren<sup>80)</sup>らもWalker腫瘍細胞を静脈内に注入すると、肺に多数のヒアリン化した腫瘍細胞栓塞が早期に出現するが、その多くのものは壊死に陥り消失することを認め、転移形成の最も重要な因子は個々の腫瘍細胞の活力にあることを強調した。

悪性腫瘍の血行性転移には特異な臓器親和性があることも知られている。たとえば筋肉に転移が起らないのは乳酸の存在と筋が常に収縮を繰り返すことが転移形成に対して不適当な「土壌」であると考えられているが<sup>15)</sup>、この意味では肺もまた常に呼吸性に働いていること、好気性であること<sup>45)</sup>等は決してよい「沃土」ではあり得ないともいえる。Coman<sup>15)</sup>らはウサギV<sub>2</sub>癌の実験で、活性をもつた腫瘍細胞が十分量到達するならば、筋を含めていかなる組織でも転移性腫瘍が発育し得ることを示し、一方、大腿静脈より注入された場合には、肺にのみ転移を生ずる事実と考え合せ、肺はむしろ他の臓器への転移を防ぐ役目をしており、十分な量の腫瘍細胞が肺を通過できないために肺外転移の発生が少なく、肺にのみ転移が高率に起ると説明している。これに対してZeidman<sup>87)</sup>らはウサギのV<sub>2</sub>及びBrown-Pearce癌、ラットのWalker腫瘍等の細胞浮遊液中の腫瘍細胞は肺血管系を直ちに通過し得ることを証明し、Knisley<sup>38)</sup>らは篩を用いて大・中・小粒子の3種の腫瘍細胞浮遊液を調製し、これを静脈内に注入した結果、小粒子の細胞塊は肺表面に近く転移巣を形成するだけでなく、肺を通過して肝・腎にも屢々転移巣を作るが、中・大粒子のものは肺の深部に転移を形成するが、肺外転移は生じないことを認めた。

これらの事実から、彼は血管内腫瘍塊の大きさの差が転移分布の決定因子であると論じている。又、Zeid-

man<sup>88)</sup> は、ウサギの腸間膜動脈に腫瘍細胞浮遊液を注入しながら、動脈毛細管移行部を顕微鏡下に観察し、径の大きい Brown-Pearce 癌細胞の方が、径の小さい V<sub>2</sub> 癌細胞よりも通過し易いことを観察し、細胞の大小よりもその硬さ (rigidity) が問題であると述べ、機械的不適合が肺転移発生の第一要因でないことを示した、Potter<sup>89)</sup> らもウサギの肺を生体内で直視下に観察しながら、V<sub>2</sub> 及び Brown-Pearce 癌細胞の捕捉状態を検索し、V<sub>2</sub> 細胞が定着しやすいことをみている。

腫瘍組織塊の骨髓内移植実験では、骨髓腔を反覆穿刺するために血管壁が破壊されること、また組織塊の細片が注入されることによつて、移植後血管系に入る腫瘍細胞は、個々に遊離した単一細胞から、間質を有する小組織塊までの種々の状態にあると考えられる。葛岡<sup>41)</sup>は移植直後より24時間までに大腿静脈内に多量の腫瘍細胞が数個ないし十数個の細胞塊として流入することを認めている。Griffiths<sup>26)</sup>は Walker 腫瘍細胞浮遊液を静注したのち心血を経時的に採取して検査を行なつた結果、注入直後には細胞は現れないが、45分より腫瘍細胞が現われはじめ90分まで最高の検出率を示すことを認めた。そしてこの事実は注入後45分迄は腫瘍細胞が肺の血管内膜に接着していることに原因すると述べている。

しかし、肺に到達した腫瘍細胞栓子は容易に破壊消失するものが多く、その全てが肺転移を形成するものではないことは多くの実験が示す所である。Warren<sup>90)</sup>によると、腫瘍細胞栓子はヒアリン化して早期に消失するものであつて、器質化することはないと述べており、宗像<sup>54)</sup>は腹水型肝癌細胞14万個を含む腹水をマウスに静注して経時的に肺を観察したが、肺に達した腫瘍細胞の99.7%は変性消失することを認めている。Koike<sup>38)</sup>は、血行性転移形成には、ある大きさ以上の栓子の成立とその数が重要な因子であると論じており、Knisley<sup>38)</sup>はウサギ大腿に VX<sub>2</sub> 癌を移植し、肺を生体の儘観察して、ほとんどの自然発生転移は直径100 $\mu$ ～175 $\mu$ の腫瘍細胞塊もしくは腫瘍細胞栓子によることを実証している。以上のことから、肺に栓塞した腫瘍細胞栓子のうち単一細胞や小径のものを程変性破壊を受けやすく、大径のものを程生き残つて転移を形成しやすいといえる。Collins<sup>13)14)</sup>は、肺転移果のレ線計測から、その発生時点を推測する方法を提唱しているが、著者はこの方法に準じて、転移果の肉眼的大きさから本実験における肺転移の発生時点での細胞数を推定した。即ち、移植後7日目にみられた肺転移果の

最大のものは1mmの径を有し、22日目では、8mm～10mmであつた。Collinsの仮設に従つて、細胞増殖速度は一定であり、転移果が径10 $\mu$ の単一腫瘍細胞から発生したものとすれば、1mm径の転移結節は20 doublingsを経て成長したことになる。また1cm径のものは30 doublingsを経たものという計算になる。一方 Walker 腫瘍の100% cell increase (=doubling time) は Bertalanffy<sup>7)</sup>によれば1.7日とされている。これが事実とすれば、移植後7日で1mm径に育っている転移結節が、単一細胞の doubling によつて生じたものとすれば、1.7日 $\times$ 20 doublings=34日を要したことになり、これは実際の移植時点を遡ること27日前という矛盾となり、事実と一致しない。即ち、1mm径の転移結節は7 $\div$ 1.7日=4.1 doublings を経ているに過ぎず、この転移結節の最初の細胞数は  $2^{(20-4.1)} \div 2^{16} \div 6$  万個の分裂増殖能を有する腫瘍細胞塊であつたことになる。移植後22日で径1cmになつている転移結節は同様に、22 $\div$ 1.7日=13 doublingsによつて形成されたもので、 $2^{(30-13)} = 2^{17}$ 個の細胞塊から増殖したことが推測される。以上二つの算定から、転移果を形成する腫瘍片の細胞数は $2^{16}$ 乃至 $2^{17}$ 個となり、両者の値は略一致する。即ち最大のものは300～100 $\mu$ 径の腫瘍細胞塊が移植時肺に到達していることになる。Walker 腫瘍の骨髓内移植のさいに比較的高率の肺転移がおこる原因の一つはこの点にあるのではないかと考えられる。即ち、本実験においては、無処置群にみられた肺転移果は大径及び小径結節の数が多く、中間結節の数が少ないという2峰性の分布型式を示したが、大径結節は、移植時骨髓より静脈に入つた向肺性腫瘍細胞のうち大きい組織塊が定着し増殖したものと考えることができるし、小径結節は移植部に生着した腫瘍より一定の日時を経たのちに二次的に遊出した腫瘍細胞塊によるものか、或いは、移植時肺に到達した腫瘍細胞栓子のうち、たまたま変性を免れて増殖したものである可能性もあるが、以上の考察により後者の可能性は極めて少ないといえる。

肺転移発生の時期については、腫瘍細胞が血中に証明される時期とよく一致することが認められており<sup>51)</sup> <sup>52)</sup>、本実験で直後及び早期動脈内投与が著しい肺転移抑制効果を示したことは流血中にある腫瘍細胞や肺に栓塞しても未だ器質化していない細胞が制癌剤の作用を特に強く受けることを立証している。また、移植骨髓内の着生を抑制することによつて、爾後の二次的肺転移をも抑制したことが更に肺転移抑制効果を顕著に

したものと思われる。中期動脈内投与群が同期のヘパリン投与対照群の肺転移結節径分布と異なる型式を示したのも制癌剤投与時期に血中に游出した腫瘍細胞を障害し、それを芽とする転移巣を抑制したことによると考えられる。

尚、本実験においては、併用されたヘパリンの影響が検討されねばならない。Coman<sup>16)</sup>らは局所のカルシウム不足は細胞間の接着性を弱くし、腫瘍組織の分離を促して転移形成を容易にすると述べている。Laurence<sup>42)</sup>らはウサギの VX<sub>2</sub> 癌浮游液に高いトロポブラステン能があることを見出して、これが腫瘍細胞栓子形成を促進し、肺通過を抑制するために、肺以外の臓器に転移巣を作らないのであると説明した。また、Cliffton<sup>11)</sup>らはラットを高脂肪食で飼育し、脂肪血症を起こさせると、Walker 腫瘍細胞浮游液の注入によつて著しい肺転移がおこり、転移巣数も増加することを認め、これを脂肪血症によつてフィブリン溶解能が低下していることによると説明している。また、Koike<sup>39)</sup>は予めヘパリンを投与された動物に腹水型腫瘍を静注すると肺及び肺外転移が減少する事実を認めたが、予めヘパリンと作用させた腫瘍細胞を静注すると転移は減少しないことから、上記実験における抑制効果はヘパリンの直接作用ではないと考えた。著者の実験では、直後及び早期ヘパリン投与対照群に有意の肺転移抑制効果が認められなかつたことは骨髓内移植実験における肺転移形成は個々の単一細胞の集つた栓子を芽とするのではなく、人工的な小腫瘍組織塊の流入によるものとの推論とよく合致する。

Zeidman<sup>65)</sup>らは移植細胞数及び組織塊の大きさに比例して転移巣数が多いことを述べ、Wood, Jr.<sup>83)</sup>らは局所腫瘍が大きい程、転移巣数が多く、また、転移巣数が多い程、局所腫瘍は大きいことから、原発腫瘍と肺転移巣数の間には有意の正の相関があることを示しているが、著者の実験で、移植直後及び早期動脈内投与が肺転移抑制をみたことは肺内での薬剤の直接的効果のほかに局所腫瘍の増殖を抑制したこと、即ち、制癌剤が移植腫瘍と遊離細胞の両者に強く作用したことを示していると考えることができる。また、著明な肺転移率の低下を認めることが出来なかつた中期及び晚期動脈内投与群でも、その平均肺転移が他の投与ルートによるものに比べて低率であつたことは局所移植腫瘍の中に活動性腫瘍細胞がより少なくなつたことを想像させる。換言すれば、腫瘍としての活性を失なつた細胞が局所腫瘍中に多いことが転移抑制の一因になるこ

とを推定させる。

原発腫瘍の切断と肺転移との関係については、Marie<sup>47)</sup>ら、Tyzzer<sup>78)</sup>、川島<sup>33)</sup>、北<sup>35)</sup>は原発腫瘍の切除が転移を増加させることを報告し、また、Schatten<sup>63)</sup>、Greene<sup>25)</sup>は腫瘍肢の切断が肺転移結節数の増加とその急速な増大を来すことを認め、これは手術侵襲の結果ではなくて、原発腫瘍の存在そのものが転移結節の発育阻止作用をもつことを、正常肢の切断と比較対照して立証している。この事実について、Schatten は肺に常に存在する腫瘍細胞栓塞が、原発腫瘍を取り除くことによつて、それ自体のもつ発育抑制効果が消失するために潜在転移巣が強く増殖するが、しかし、原発腫瘍が残存していれば、潜在転移巣は静止しているか、消滅してしまう可能性があると推論している。また、Greeneは原発腫瘍の存在は転移巣の stromatization の抑制によると説明している。Ketcham<sup>34)</sup>は原発腫瘍の切断は腫瘍栓子及び転移結節数の減少を来すが、その1個1個の大きさは増大することを報告し、北<sup>35)</sup>は移植後3～5日目の切断では肺転移率は減少し、結節数も少ないのに反し、10～14日目の中期切断では、肺転移頻度の増大と結節数の増加を来すことを認めており、原発腫瘍の存在が転移抑制効果を有することを強調している。これらの実験結果は動脈内挿管制癌剤投与法の肺転移抑制効果に有力な根拠を与えるものであつて、局所腫瘍の抑制によつて、新たな腫瘍細胞栓塞の発生をおさえるとともに、そのもつ免疫的転移抑制能を残し、同時に既に存在している潜在性転移の増殖をも抑制する可能性を有していると考えられる。即ち、本実験では、移植直後及び24時間後より動脈内に制癌剤を投与した場合、その抑制効果は移植局所腫瘍のみならず肺転移形成にまで及ぶことは、動脈内制癌剤投与が単に化学的に局所腫瘍増殖を抑制した謂わば“chemical amputation”に止らず、転移巣の発育を阻止したということは、切断術のみを行なつた場合と大いに異なる優れた効果といえよう。また、動脈内制癌剤投与後切断を行なつた場合には、切断によつて、もはや新たな腫瘍栓子は発生しないという利点他方では、原発腫瘍のもつ転移抑制効果が消失して、既に存在する潜在肺転移巣の増殖を促進するという不利を招来することになるが、実験結果は、直後・早期・中期投与後切断では、肺転移率の減少と転移結節数の減少を示し、潜在転移の増殖を促進する所見はみられなかつた。

制癌剤投与の効果は肺転移成立の過程即ち、1) 原発腫瘍の浸潤性増殖と腫瘍細胞の分離、2) 血行内游

出、3) 肺への定着、4) 肺における増殖の各時期でそれぞれ異なるものと考えられるが、本実験では、移植直後・早期・中期・晩期の4期を設定して検討した。移植直後投与群においてえられた所見から、臨床では明らかにし難い腫瘍発生の時点を確認することができた。しかも、移植操作によつて生ずる肺内の腫瘍細胞栓子から肺転移が発生することを証明することができた。そしてこの時期の制癌剤投与の効果は極めて著しいものであることを知った。早期投与は腫瘍移植局所及び肺に栓塞した腫瘍細胞のうちで変性死滅を免れたものが定着増殖を開始する時期に制癌剤が投与されたことを意味しており、直後投与に次ぐ良い効果が明らかにみられた。移植後6～10日に行なつた中期投与は、移植局所及び肺内で一次性及び転移性腫瘍が盛んに発育増殖している時期に制癌剤を投与することを意味しており、臨床的に現在行なわれている腫瘍の化学療法に近似している。実験結果は動脈内投与において平均肺転移果数の減少がみられたものの、既に形成された転移に対しては無力であることを示した。晩期投与群は担腫瘍動物の末期に相当する時期における制癌剤投与が life span にどの様に影響するかをうかがわんとしたものであるがこの実験では、延命効果は認められず、むしろ弊死の時期を早める結果を招いたということとは化学療法の適応の限界を示唆するものであろう。

肺癌或いは肺転移に対して積極的に肺動脈或いは気管支動脈を介して行なわれる i-a. nfusion もしくは regional perfusion も Clifton<sup>12)</sup>ら、鈴木、佐藤<sup>70)</sup>、大野<sup>56)</sup>らによつて臨床的に行なわれているが、Collins<sup>14)</sup>が指摘するように、1 mm 径の悪性腫瘍が発見された時期は、既にそれは早期ではなく、腫瘍発生より腫瘍死に至る期間の2/3を既に経過してしまつている場合もあり得ることを考えると、悪性腫瘍に対する化学療法が如何に困難なものであるかを改めて認識させられる。

## 第5章 結 語

Donryu 系ラットの右脛骨骨髓内に Walker's carcinoma 256 の組織細片を移植し、左大腿動脈より大動脈分岐部まで挿入されたPE管を通じて endoxan 及び mitomycin C の高濃度及び低濃度液を移植直後・早期・中期・晩期の4期に分け、連続5日間、動脈内挿管投与を行ない、更にこれに切斷術を併用して、その肺転移に対する影響について追求し、次のような結果を得た。

1. 無処置対照群の骨髓内移植陽性率は79.4%、肺

転移率は64.6%(78.1%～49.2%)であつたが、移植直後動脈内挿管制癌剤投与群では、移植陽性率11.1%、肺転移率5.1%であり、移植腫瘍着生の抑制効果と肺転移抑制効果が平行して認められた。早期投与群でも、移植陽性率15.4%、肺転移率7.7%を示し、直後投与群に次ぐ、推計学的に有意の抑制効果を認めた。しかし、中期及び晩期投与群では抑制効果は認められなかつた。

2. 動脈内挿管ヘパリン投与対照群では、移植陽性率、肺転移率ともに抑制を示した実験群はなかつた。

3. 動脈内挿管投与群の肺転移抑制効果を、静脈内・腹腔内投与群における効果と比較検討した。直後及び早期投与では、動脈内挿管投与法が最も強い抑制効果を示したが、中期以後では投与ルートによる効果の差は認められなくなつた。

4. 動脈内挿管投与法においては、endoxan 及び mitomycin C の間に肺転移抑制効果の差は認められなかつた。

5. 制癌剤の濃度による効果の差は、直後及び早期動脈内挿管投与群では、有意の差をもつて高濃度投与群に強い肺転移抑制効果が認められた。

6. 動脈内挿管投与と切斷術併用群では、直後及び早期群において全例肺転移は認められなかつた。中期群でも、抑制効果が僅かに認められたが、晩期群のみは全例に肺転移が証明された。

7. 動脈内挿管制癌剤投与法によると、平均肺転移果数が最も少なく、転移結節の径分布も明らかな抑制効果を示す特徴ある型式を示した。

8. 以上の実験成績からして、骨悪性腫瘍に対する化学療法の実施方法、その意義、切斷術併用の意義について詳細な考察を行なつた。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師伊藤鉄夫教授に深甚なる謝意を表します。また、終始、御指導御助言を戴いた赤星義彦助教授に衷心より感謝致します。更に病理学的所見について御助言を戴いた病理学教室 浜島義博助教授に深謝致します。また、腫瘍株の分与と御助言を戴いた塩野義研究所山口建二博士に感謝の意を表します。更に本研究に種々御協力戴いた協同研究者米沢広講師、吉栖正博博士に心から感謝の意を表します。尚、病理組織標本作製に御助力戴いた和風会医学研究所の御協力に感謝致します。本研究は文部省骨腫瘍研究費によつて行なわれたことを感謝します。

本論文の一部は第29回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

# 文 献

- 1) 赤星義彦, 他: 骨髓内移植腫瘍. 特に Walker 腫瘍の骨髓内移植について. 中部整災誌, **8** : 326, 1965.
- 2) 赤星義彦 実験的骨腫瘍に就いて. 中部整災誌, **8** : 320, 1965.
- 3) 赤星義彦, 米沢 広, 柴田大法: 骨巨細胞腫の治療. 臨床整形外科, **1** : 669, 1966.
- 4) 赤星義彦: 悪性骨腫瘍に対する制癌剤動脈内挿管投与と手術との併用療法, 臨床整形外科, **2** : 539, 1967.
- 5) 赤星義彦: 悪性骨腫瘍の治療に関する研究. 日整会誌, **41** : 502, 1967.
- 6) 青池勇雄: 長期生存 骨肉腫の治療に対する検討. 臨床整形外科, **2** : 565, 1967.
- 7) Bertalanffy F. D., and Lan C. : Rates of cell division of trans-plantable malignant rat tumors. Cancer Res., **22** : 627, 1962.
- 8) Bierman H. R., Byron R. L., Kerry K. H., and Grady A. : Therapy of inoperable visceral and regional metastases by intra-arterial catheterization in man. Cancer Res., **11** : 236, 1951.
- 9) Brock V. N., Hohorst H. J. : Ueber die Aktivierung von Zyκλο-phosphamid in vivo und in vitro. Arzneimittelforschung, **13**, 12, 1021, 1963.
- 10) Brunshwig A. : Production of primary bone tumors by intramedullary injection of methylcholanthrene. Am. J. Cancer, **34** : 540, 1938.
- 11) Cliffton E. E., Agostino D., and Minde K. : The effect of hyper-lipemia on pulmonary metastases of Walker 256 carcinosarcoma in the rat. Cancer Res. **21** : 1062, 1961.
- 12) Cliffton E. E. and Mahajan D. R. : Technique for visualization and perfusion of bronchial arteries : Suggested clinical and diagnostic applications. Cancer, **16** : 444, 1963.
- 13) Collins V. P., Loeffler R. K., and Tivey H. : Observation on growth rates on human tumors. Am. J. Roentgenol., **76** : 988, 1956.
- 14) Collins V. P. : Time of occurrence of pulmonary metastasis from carcinoma of colon and rectum. Cancer, **15** : 387, 1962.
- 15) Coman D. R., Eisenberg R. B., and McCutcheon M. : Factors affecting the distribution of tumor metastases. Experiments with V<sub>2</sub> carcinoma of rabbits. Cancer Res., **9** : 649, 1949.
- 16) Coman D. R. : Cellular adhesiveness in relation to the invasiveness of cancer. Electron microscopy of liver perfused with a chelating agent. Ibid. **14** : 519, 1954.
- 17) Cromer J. K., Bateman J. C., Berry G. N., Kenelly J. M., Klopp C. T., and Platt L. T., : Use of intra-arterial nitrogen mustard therapy in the treatment of cervical and vaginal cancer. Am. J. Obst. & Gynec., **63** : 538, 1952.
- 18) 段 亮一: 実験的骨腫瘍に関する研究. Ascites Hepatoma 130 のラット大腿骨々髓内移植実験. 日整会誌, **41** : 237, 1967.
- 19) Earle W. R. : A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. Am. J. Cancer, **24** : 566, 1935.
- 20) Ferguson A. B. : Treatment of osteogenic sarcoma J. B. J. S., **21** : 916, 1940.
- 21) Fisher E. R. and Fisher B. : Electron microscopic, histologic, and histochemical features of the Walker carcinoma. Cancer Res., **21** : 527, 1961.
- 22) Foley G. E., Friedman O. M. and Drolet B. P. : Studies on the mechanism of cytoxan, Evidence of action in vivo and in vitro. Cancer Res., **21** : 57, 1961.
- 23) Golomb M. F. : Agents used in cancer chemotherapy. Am. J. Surg., **105** : 579, 1963.
- 24) Grady E. D. : Treatment of cancer by intermittent injection of nitrogen mustard via cannulated arteries. Ann. Surg., **137** : 366, 1953.
- 25) Greene H. S. N. and Harvey E. K. : The inhibitory influences of a transplanted hamster lymphoma on metastasis. Cancer Res., **20** : 1094, 1960.
- 26) Griffiths J. D., and Salisbury A. J. : The fate of Walker 256 tumor cells injected intravenously in rats. Brit. J. Cancer, **17** : 546, 1963.
- 27) 浜島義博: 制癌剤と人癌細胞. 京都医学会雑誌,

- 14 : 18, 1965.
- 28) Horie K., Makita M., and Sato K. : Experimental osteogenic sarcoma : Histogenesis of osteogenic sarcoma. *Gann*, **51** : 399, 1960.
- 29) 池田一郎 : 骨髓内移植腫瘍 (Walker Carcinosarcoma) に及ぼす抗癌剤の影響に関する実験的研究, 日外宝, **32** : 211, 1963.
- 30) 井上 諒, 他 : 制癌剤動脈内持続注入法の手技, 外科治療, **14** : 523, 1966.
- 31) 伊藤鉄夫, 赤星義彦, 他 : 悪性骨腫瘍に対する制癌剤動脈内投与と腫瘍剥出術. 中部整災誌, **7** : 445, 1964.
- 32) 加藤広嗣 : 骨髓内移植腫瘍に対する X線並に<sup>60</sup>Co照射の影響に関する実験的研究. 中部整災誌, **9** : 346, 1966.
- 33) 川島芳子 : 腫瘍転移の研究. V. C<sub>3</sub>H マウス腹水肝癌の手術後の腫瘍再発並びに転移形成について. 福島医誌, **10** : 433, 1960.
- 34) Ketcham A. S. and Mantel N. : The effect of a "primary tumor" on the development of spontaneous metastasis. I. Development of a standardized experimental technique. *Cancer Res.*, **19** : 940, 1959.
- 35) 北 暁 : 実験的骨髓内移植腫瘍における転移に関する研究. 日外宝, **32** : 258, 1963.
- 36) Klein G. et al. : Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, **20** : 1561, 1960.
- 37) Klopp C. T., Alfort T. C., Bateman J., Berry G. N., and Winship T. : Fractionated intra-arterial cancer chemotherapy with methyl bis-amine hydrochloride, a preliminary report. *Ann. Surg.*, **132** : 811, 1950.
- 38) Knisley W. H., and Mahaley M. S. : Relationship between size and distribution of spontaneous metastasis and three size of intravenously injected particles of VX<sub>2</sub> carcinoma. *Cancer Res.*, **18** : 900, 1958.
- 39) Koike A. : Mechanism of blood-borne metastases I. Some factors affecting lodgement and growth of tumor cells in the lungs. *Cancer*, **17** : 450, 1964.
- 40) Kremenz E. T., Schlosser J. V., and Ramage J. P. : The treatment of retinoblastoma by fractional intra-arterial TEM and X-ray therapy. *Cancer Chemother. Rep.*, **16** : 571, 1962.
- 41) 葛岡健作 : 悪性骨腫瘍の外科的療法に関する実験的研究, 日外宝, **32** : 234, 1963.
- 42) Laurence E. A., Bowman D. E., Moore D. B., and Bernstein G. I. : A thromboplastic property of neoplasms. *Surg. Forum*, pp. 694, 1952.
- 43) Lawton R. L. : Cancer chemotherapy of gastrointestinal tract with reference to intra-arterial infusion and irradiation. *Am. J. Surg.*, **109** : 47, 1965.
- 44) Lawton R. L., Latourette H. B., and Collier R. G. : Simultaneous high-energy irradiation and chemotherapy. *Arch. Surg.*, **91** : 155, 1965.
- 45) Lucké B., Breedis C., Woo Z. P., Berwick L., and Nowell P. : Differential growth of metastatic tumors in liver and lung. Experiments with rabbit V<sub>2</sub> carcinoma. *Cancer Res.*, **12** : 734, 1952.
- 46) 牧野佐二郎 : 第10回日本医師会設立記念医学大会発表 (東京), 1954.
- 47) Marie P. and Clunet J. : Frequence des metastases viscerales chez les souris cancéreuses apres ablation chirurgicale de leur tumeur. *Bull. Assoc. franc. p. létude du cancer*, **3** : 19, 1910, cited by Tyzzer.
- 48) 増田元彦, 他 : 四肢悪性腫瘍に対する制癌剤の動脈内注入療法. 第1回日本癌治療学会総会発表, 1963.
- 49) 増田元彦 : 四肢悪性腫瘍に対する動脈内持続注入療法, 癌の臨床, **10** : 344, 1964.
- 50) McKenna R. J. et al., Sarcomata of the osteogenic series (osteosarcoma, fibrosarcoma, chondrosarcoma, parosteal osteogenic sarcoma and sarcomata arising in abnormal bone) analysis of 552 cases. *J. B. J. S.*, **48-A** : 1, 1966.
- 51) 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, 福島医誌, **11** : 1263, 1961.
- 52) 宗像秀夫 : 腫瘍転移の研究. XI. マウス腹水肝癌 (MH134) 細胞の血行性撒布について. 福島医誌, **11** : 1277, 1961.
- 53) 宗像秀夫 : 腫瘍転移の研究. XII. 血中癌細胞の

- 転帰に関する実験. 福島医誌, **11** : 1281, 1961.
- 54) Ogilvie R. W., Blanding J. D., Wood M. L., and Knisley W. H. : The arterial supply to experimental metastatic VX<sub>2</sub> and VY tumors in rabbit lungs. *Cancer Res.*, **24** : 1418, 1964.
- 55) 岡本林平 : 実験的骨髓内移植腫瘍の組織学的並びに組織化学的研究. 中部整災誌, **6** : 665, 1963.
- 56) 大野藤吾, 御巫清允 : 骨原性肉腫の肺転移予防を目的とする制癌剤の気管支動脈注入. 臨床整形外科, **1** : 727, 1966.
- 57) 太田邦夫 : 癌の転移. 癌研究の進歩, 第2版. 医学書院, 東京, 1960.
- 58) Potter J. F., Buttarazzi P. J., and Cozzerelli J. D. : Differential pulmonary microcirculatory response to tumor cell emboli as observed in vivo. *Cancer Res.*, **22** : 1202, 1962.
- 59) Romth Dahl M. D., Chu E. W., Hume R. B. S., and Smith R. R. : The time of metastasis and release of circulating tumor cells as determined in an experimental system. *Cancer*, **14** : 883, 1961.
- 60) Ryan R. F. : Fractional intra-arterial chemotherapy for malignant disease. *Am. J. Surg.*, **105** : 640, 1963.
- 61) 酒井克治 : Nitrogen mustard N oxideの動脈内挿管投与に関する実験的研究. 日外宝, **25** : 527, 1956.
- 62) 佐野圭司, 早川 勲, 佐藤 修 : 脳腫瘍の頸動脈内制癌剤分割注入療法. 最新医学, **19** : 1224, 1964.
- 63) Schatten W. E. : An experimental study of postoperative tumor metastases following total removal of primary leg tumor. *Cancer*, **11** : 455, 1958.
- 64) Stewart H. L. et al. : Transplantable and transmissible tumors of animals. Armed forces Inst. Path., Washington D. C., 1959.
- 65) Straub P. W., Nelson J. H. Jr. Marik L. R. and Burchenal J. H. : A technique for prolonged continuous intra-arterial infusion in rabbits. *Cancer*, **17** : 831, 1964.
- 66) Sugiura K. : Studies in a tumor spectrum VIII. The effect of Mitomycin C on the growth of a variety of mouse, rat and hamster tumors. *Cancer Res.*, **19** : 438, 1959.
- 67) Sullivan R. D., Jones R. J., Schnabel T. G., and Shorey J. M., Treatment of human cancer with intra-arterial nitrogen mustard (methyl bis (2-chloroethyl) amine hydrochloride) utilizing a simplified catheter technique. *Cancer*, **6** : 121, 1953.
- 68) Sullivan R. D., Miller E. and Sikes M. P. : Antimetabolite-metabolite combination cancer chemotherapy ; Effects of intra-arterial methotrexate intramuscular citrovorum factor therapy in human cancer. *Cancer*, **12** : 1248, 1959.
- 69) Sullivan R. D., and Watkins E. : Effects of the prolonged intravenous and intra-arterial infusion of cancer chemotherapeutic compounds. *Am. J. Roentgenol.* : **89** : 590, 1963.
- 70) 鈴木千賀志, 佐藤春郎 : 気管支動脈内制癌剤注入法による肺癌外科療法の拡大と関連病理像. 第25回日本癌学会総会記事, 3, 1966.
- 71) 高橋 信 : 腫瘍転移に関する実験的研究. 癌, **10** : 48, 1916.
- 72) 谷口定義 : 実験的骨肉腫の骨髓内および血管内移植に関する研究. 日大医誌, **22** : 530, 1963.
- 73) 丹下一郎 : 吉田肉腫の関節及び骨髓内移植に関する研究. 日整会誌, **32** : 1007, 1958.
- 74) 寺中達夫 : Mitomycin Xの抗腫瘍性に関する研究. 大阪市大医誌, **7** : 24, 1958.
- 75) 徳山英太郎, 他 : 悪性腫瘍に対するN. M. O. 動脈注射療法 : 実験的ならびに臨床的研究 (第一報). 癌, **47** : 330, 1956.
- 76) 鳥山貞宜, 他 : 実験的骨腫瘍の骨髓内移植および血行性肺転移の研究. 日整会誌, **36** : 692, 1962.
- 77) Trams E. G. and Klopp C. T. : Investigation of the effects of the intra-arterial administration of nitrogen mustard and chlortetracycline on two transplantable rat tumors. *Antibiotics and Chemotherapy*, **V** : 67, 1955.
- 78) Tyzzer E. E. : Factors in the production and growth of tumor metastases. *J. M. Research*, **23** : 309, 1913, cited by Wood Jr.
- 79) 白淵 勇 : Mitomycin C の投与法に関する研究, とくに腫瘍免疫の役割について, 癌の臨

- 床, **9** : 17, 1963.
- 80) Warren S., and Gates O. : The fate of intravenously injected tumor cells. *Am. J. Cancer*, **27** : 485, 1936.
- 81) Watanabe R. : Pathology of bone sarcoma induced by 20-methyl-cholanthrene. *Arch. Jap. Chir.*, **35** : 437, 1966.
- 82) Watkins Jr. E. and Sullivan R. D. : Cancer chemotherapy by prolonged arterial infusion. *Surg. Gynec. and Obst.*, **118** : 3, 1964.
- 83) Wood, Jr. J. S., Holyoke E. D., Clason W. P. C., Sommers S. C., and Warren S. : An experimental study of the relationship between tumor size and number of lung metastases. *Cancer*, **7** : 437, 1954.
- 84) 米沢 広 : 未発表.
- 85) 吉栖正博 : 動脈内挿管投与による Mitomycin C の動態に関する研究. *日外宝*, **36** : 334, 1967
- 86) Zeidman I., McCutcheon M., and Coman D. R. : Factors affecting the number of tumor metastases. Experiments with a transplantable mouse tumor. *Cancer Res.*, **10** : 357, 1950.
- 87) Zeidman I. and Buss J. M. : Transpulmonary passage of tumor cell emboli. *Cancer Res.*, **12** : 131, 1952.
- 88) Zeidman I. : The fate of circulating tumor cells I. passage of cells through capillaries. *Cancer Res.*, **21** : 38, 1961.