

悪性骨腫瘍の外科的療法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：近藤鋭矢教授）

葛 岡 健 作

〔原稿受付 昭和38年2月5日〕

EXPERIMENTAL STUDIES ON SURGICAL TREATMENT
FOR MALIGNANT BONE TUMOR

by

KENSAKU KUZUOKA

From the Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. EISHI KONDO)

A fragment of solid tumor of walker carcinosarcoma and the tumor cell suspension were implanted into the tibia of the albino rat. Roentgenological and histological investigations of the implanted bone tumor were performed, and the tumor cells which appeared in the femoral vein of the affected limb were traced with the periods of time.

It is later than the 7th day after the implantation when the development of the tumor in the local region can become macroscopically detectable, and also later segmental neutrophilia can be recognized in the peripheral blood findings.

About on the 6th to 8th day after the transplantation some transparent area appeared in the metaphysis of the tibia rentgenologically, while on 3rd to 5th days after the transplantation the marked proliferation of the tumor cells took place in the implanted region.

The effects of the operation (disarticulation of the hip on the affected limb) were investigated on the different periods of time after the transplantation. The results are summarized in the following table. Namely, at the stage when the tumor growth is recognizable in the clinical and roentgenologic findings, the infiltration and destruction of the bone substances are found to be already in considerable progress in the histological findings and the exfoliated tumor cells flowing toward the lung appearing in the femoral vein. In case that the suspension containing about four million tumor cells is implanted into the tibia marrow cavity, 1,450,000~2,830,000 tumor cells flow out into the femoral vein during the initial 10 seconds after the implantation. More than 95% of these tumor cells are occupied by the destructs and degenerates through the implantation procedures, producing so called artificial pulmonary metastasis in 30~50% of frequency. The results of the implantation in the groups used in this studies are shown in the following table.

	Nos. of animals	Accident	Take	Transpl. rate(%)	(Metastasis%)		Life span Mean (Min.~Max.)
					Lymph-	Lymph-	
					Lung	nodes	
Suspension	85	6	64	81.0	70.3	51.6	25 (17~50)
Fragment	75	5	59	84.3	69.5	56.1	26 (17~42)

The effects of the operation (disarticulation of the hip on the affected limb) were investigated on the different periods of time after the transplantation. The results are summarized in the following table.

After transplantation	Metastasis (%)		Life span Mean (Min.~Max.)
	Lung	Lymph nodes	
Soon-after. & 24 h.	89~100	0~18	23 (11~34)
3d. & 5d.	42~51	14~26	33 (22~50)
7d.	63~81	25~32	32 (27~60)
10d. & 14d.	88~100	55~67	21 (18~34)

From the above-mentioned results it can be said that the pulmonary metastasis promotes general exhaustion, that if the operation had been performed before the occurring of spontaneous metastasis, the metastasis to lung will be inhibited.

If the operation performed at the flourishing stage of the regional tumor, the experimental animals were killed so early due to the rapid growth of pulmonary metastasis.

The combination of the surgical operation and the chemotherapy result in a very good condition showing only 20% of lung metastasis and 42 days of mean values in the survival.

It is also known that the X-ray irradiation on the breast gives a considerable inhibitory effect on so called artificial pulmonary metastasis introduced by the intramedullar transplantation.

Since the pulmonary metastasis occurs at a very early stage in malignant bone tumors, the establishment of early diagnosis and the early removal of the primary tumor are necessary, and moreover, as to the pulmonary metastasis after the operation, not only chemotherapy but also radiotherapy throughout the breast should be employed from the early stage which difficult to recognize the pulmonary metastasis.

目 次

第1章 緒 言	第1項 移植同時に股静脈血中に流出する 腫瘍細胞数に就いて
第2章 実験材料並に実験手技	I 実験方法
第1節 実験材料	II 実験結果
第2節 移植手技	第2項 移植後股静脈血中に出現する腫瘍 細胞の経時的變動に就いて
第3節 手術手技	I 実験方法
第3章 無処置群の経過観察	II 実験結果
第1節 全身の所見	第3項 小 括
第1項 肉眼的所見	第2節 手術及び麻酔の転移に及ぼす影響に 就いて
第2項 体重変化	第1項 実験方法
第3項 末梢血液所見	第2項 実験結果
第2節 レ線学的所見	第3項 小 括
第3節 組織学的所見	第5章 移植肢離断実験
第4節 小 括	第1節 実験方法
第4章 基礎実験	
第1節 灌流静脈血中における腫瘍細胞の消 長に就いて	

第2節 実験結果

第1項 肉眼的観察並びに体重変化

第2項 末梢血液所見

第3項 手術成績

第4項 小 括

第6章 追加実験

第1節 手術と化学療法との併用に関する実験

第1項 実験目的

第2項 実験方法

第1章 緒 言

骨肉腫に対する治療として早期発見並びに外科的療法が第一要件である事は論を俟たないが、近年悪性腫瘍に対する化学療法或は放射線療法の進歩と共に、之等を術前術後に併用してその効果に就き臨床に種々検討がなされている。然しながら悪性腫瘍に対する化学療法剤が化膿性或は結核性骨関節炎に対すると同様に有効であるとい得る段階には未だ立ち到つておらず、又極めて悪性度の強い骨肉腫に対してその発育を充分阻止するに足る放射線乃至放射性同位元素療法も未だ発見されていない。従つて之等と手術とを併用してもその効果は現在の処尚到底満足するに足る程度には至っていないので、骨肉腫の予後が如何に悲観的であるかは骨肉腫の生存率に関する諸家の統計から見ても明らかである¹⁾。

骨肉腫の外科的療法に関しては従来早期切断、晩期切断の両説に分れ^{2) 3) 4) 5) 6) 7)}、何れが治療上妥当であるか未だに確証を得ていない。又化学療法との併用に関しては全身投与のみならず近年これを局所に灌流して高濃度に作用せしめて腫瘍の発育を阻止した後患肢を切断する方法が試みられ^{8) 9) 10) 11)}、一方放射線療法に関しては最近超高圧X線照射或は人工放射性同位元素の体内¹²⁾及び体外照射¹³⁾による治療成績が報告されている。然し各種の化学療法剤或は各種の放射線に対する感受性が骨肉腫の種類によつて異なるのみならず、之を外科的療法と併用するに当つてその投与及び照射の方法、量、期間等最適と保証される方式も未だ確立されていない。この様に臨床前に於ては手術の適応乃至手術時期の決定更に化学療法、放射線療法とを如何に併用すべきか等その治療方式に就いて未解決の問題が甚だ多い。

之は悪性腫瘍そのものの本態が未だ充分解明されていない事にもよるが現在の段階では実験的基礎的研究

第3項 実験結果

第4項 小 括

第2節 術前胸部X線照射に関する実験

第1項 実験目的

第2項 実験方法

第3項 実験結果

第4項 小 括

第7章 総括並びに考案

第8章 結 語

の乏しい事も一つの理由であらう。周知の如く骨肉腫は極めて早期に血行性肺転移を生じ、臨床的に之を診断し得た時には既に潜在性肺転移が形成されているのではないかとさえ考えられており⁷⁾、この事は Ferguson⁵⁾等晩期切断論者の考え方の根底をなすものであらうが、特に手術効果の成否を決定する転移の状況に就いて現在の段階では之を正確に把握する事すら出来ない状態にある。然るに著しく予後不良な悪性骨腫瘍に対する治療対策の樹立は極めて緊急を要する重要問題であるので、骨肉腫における転移発生機転を追究し之に対する手術の効果乃至影響を知る為に我々は可能な限りの基礎的研究を行なつてこの難問題を解決すべく努力しなければならない。

実験的骨肉腫に関しては既に1911年 Levin¹⁴⁾が鼠癌及び肉腫を白鼠及び廿日鼠の脛骨内に移植して以来可移植性動物腫瘍を骨髓内に移植しその組織像、レ線像、血液像及び転移形成等に就いて検討した報告があり^{15) 16) 17) 18) 19) 20)}最近では亦 Beryllium 或は 20-Methylcholantrene その他種々の発癌物質を骨髓内に注入して実験的に骨肉腫を発生せしめ、これを用いて生物学的、生化学的乃至病理学的研究を行なつている。然しながら骨肉腫の外科的療法に関する基礎的実験を行なう為に実験資料が具備せねばならない条件は移植率の高い事、生存日数が適当である事、レ線学的及び組織学的に人間に於ける骨肉腫に類似し臨床的に同様の経過を辿る事、肺にのみ主要な臓器転移を來す事、更に化学療法剤或は放射線に感受性を有する事等であるが、従来の骨髓内移植腫瘍乃至実験的骨肉腫は之等の条件を必ずしも兼ね備えているとは云い難い。

著者は最近数種の可移植性動物腫瘍を用いて之を骨髓内に移植して実験材料としての適否を比較検討した結果 Walker carcinosarcoma 256 が上記の如き諸条件を比較的よく満足せしめる事を知り、之を用いて前述の問題点即ち骨肉腫における肺転移防止乃至抑制、手

術時期選定の問題等に就き基礎的研究を行なつた。勿論このような動物腫瘍は必ずしも人間に於ける骨肉腫と同様ではなく、骨髄内移植の際起こる所謂人工的肺転移の問題も充分考慮されなければならないことは言うまでもないが、従来の可移植性動物腫瘍と比較すれば人間の骨肉腫によりよく似た腫瘍を作り得るので、之を研究対象に選んで研究を行なつた結果諸実験操作を加え外科的療法の基礎的な問題を解明する上に聊かなりとも貢献し得たと思われるので以下之を報告する。

第2章 実験材料並びに実験手技

第1節 実験材料

本実験に使用した動物は京都北山商店飼育の岐阜雄系雄白鼠で移植時の体重は60乃至80grである。移植腫瘍は1951年12月武田薬品研究所梶原博士より譲与された Walker carcinosarcoma 256 (以下 Walker 腫瘍と略す) の皮下結節を腹部皮下に累代移植して移植後7乃至9日目のものを無菌的に採取し、その灰黄白色実質性の部分を使用した。

第2節 移植手技

移植は常に無菌的に行ないNembutal 3～4 mg/rat を腹腔内に注射して全身麻酔下に行なつた。

組織片移植——先づ採取した腫瘍塊を細切して自家製硝子トロアカールに充填し右後肢脛骨の近位関節面より予め1mm径の注射針で脛骨上部膨大部の骨髄に達する孔を穿ちおき、この孔よりトロアカールの針部を骨髄腔内に挿入し金属マンドリンにて腫瘍塊を骨髄内に圧入移植した。この際移植細胞数を可及的一定にし且つ腫瘍細胞の破壊を避ける為トロアカール針部の一定の長さに充填された腫瘍を出来るだけ愛護的に圧入し直視下にて移植を確認した。

浮遊液移植——細切腫瘍片を硝子製ホモゲナイザーに入れ、約倍量の滅菌生理的食塩水を加えた上、数回緩かに内管にて腫瘍片を圧碎した。生じた腫瘍細胞浮遊液を注射筒に吸い、之を充分振盪混和して後述の如く単位容積中の腫瘍細胞が一定となる様に生理的食塩水を加え適当に稀釈し、その0.05cc を右脛骨近位関節面より脛骨上部膨大部に注入移植した。

何れの場合も移植後約5分間穿刺部を指頭にて圧迫し、腫瘍細胞を含む骨髄からの関節囊外出血を最少限にとどめた。

次に移植細胞数の算定には、組織片移植の場合トロアカール針の一定長に充填された腫瘍片を時計皿に入れ、一定量の生理的食塩水を加え緩かに粉砕溶解せし

めて生じた浮遊液を充分混和した後、白血球算定用メランジュールを用い白血球計算と全く同じ要領で腫瘍細胞数を算定した。之によつて得た単位容積中の細胞数から全浮遊液中の細胞数を求め、更に残渣は再びトロアカールに充填して残渣が占めるトロアカール針の長さより移植組織片中の腫瘍細胞総数を補正して計算した。浮遊液中の腫瘍細胞数算定にはツベルクリン注射筒に吸入された浮遊液を充分振盪混和し、その一滴を採つて白血球数算定と同一の要領で腫瘍細胞数を算定し浮遊液 0.1cc 中 800×10^4 個の腫瘍細胞を含有する様に適宜稀釈した。この結果本実験に於て移植された腫瘍細胞数は組織片の場合 250×10^4 乃至 500×10^4 個、浮遊液の場合約 400×10^4 個となるが、移植操作中相当数の腫瘍細胞が破壊される事は当然考慮されなければならない。

第3節 手術手技

手術はすべて Nembutal 麻酔下に無菌的に行なつた。又切断高位を一定にし且つ腫瘍との距離を保つて切断部における再発を防止する為すべて股関節において後肢を離断した。即ち股関節の高さで輪状皮切を加え先づ股動静脈を露出してこれを別個に2重結紮切断した後、筋肉を輪状に切つて関節囊を開き大腿骨頭を脱臼せしめ残存関節囊及び腱、靱帯を大腿骨附着部で切り後肢を離断した。縫合は絹糸を用い筋肉及び皮膚を別個に縫合した。股動静脈の切断に際しては流血中腫瘍細胞検出動物では後述の如く先づ股静脈より少量の血液を採取した後直ちに結紮切断した(4章1節2項のI参照)。

第3章 無処置群の経過観察

30匹の白鼠を使用し15匹に組織片を、15匹に浮遊液を移植した後無処置観察群として毎日肉眼的に経過を観察し経日的に体重測定、末梢血液検査及びレ線撮影を行なつた。組織学的所見は動物節約の關係上離断実験動物の有腫瘍肢を用いた。30匹のうち移植陽性動物は組織片移植群13匹、浮遊液移植群12匹であつた。

第1節 全身的所見

第1項 肉眼的所見

移植後骨穿刺孔からの血性浸潤が膝関節部皮下に現れるが24時間以内に消失する。時にはこの浸潤液中に含まれる腫瘍細胞から5乃至7日の潜伏期を経て皮下に娘結節を生ずる事がある。移植後2～4日目まで下腿上部及び膝関節部に軽度の腫脹膨隆を認め足部に浮腫を來す事がある。之は移植時の機械的損傷による反

応性腫脹と思われるが組織片移植群の方が程度が強くこの腫脹は一旦消失する事もあるし、又そのまま腫瘍が発生する場合もある。7～10日目になると移植陽性動物では下腿上部より膝関節にかけ稍々腫脹し軽度の跛行を呈するが高動作は活発で摂食飲水量は正常乃至正常以上である。初期における局所の変化は組織片移植群の方が一般に浮遊液の犬に比して程度が強いが之は移植時の機械的損傷が大きい事及び後述の如く腫瘍塊として骨髓内に残存する腫瘍細胞数が多く従つて腫瘍発育の程度が浮遊液移植群に比して強い事に起因するものと考えられる。10～12日目には腫瘍は小指頭大となり、この頃より動物は動作が不活発となり脱臼し易く鼻口部が稍々貧血様を呈してくる。14～16日に至ると腫瘍は更に指頭大となり弾力性を失なつて皮膚と癒着し足部の浮腫は次第に高度となる。摂食量は次第に減少し無刺戟状態では常に静止し呼吸数が増加してくる。17日以後になると腫瘍は更に増大し鳩卵大乃至それ以上となり大腿屈側にまで浸潤増殖し、更に自潰して持続的出血により死亡するものもあるが、多くは血腫を生じ圧迫により黄白色の壊死様流動物の滲出を見る。この頃になると動物の可視皮膚は蒼白となり皮膚温低下し末期には呼吸促進状態となつて移植後23～30日で死に到るものが多い。

腫瘍の退縮するものでは移植後10日までに一旦生じた腫瘍が漸次縮小するが、この様な動物のその後の発育は移植陰性動物と同様甚だ活発である。注意を要する事は個々の動物によつて上記変化の出現には可成り時間的変動の存する事で、生存日数の分布も幅が広い。梶原²¹⁾は本腫瘍を19代に亘つて皮下に累代移植し、生存日数は11～80日に亘つたと報告し、Dunham等²²⁾の記載でも14～70日とあるが本実験に於ても生存日数は11～50日に亘つた。

第2項 体重変化

移植後の体重変化は個々の動物により相当変動があるが、一般的には10乃至16日目を頂点として減少の傾向を辿るものが多く、死亡時には90～110gの事が多くて、正常動物の140～150gに比し相当の開きがある(第2図)。又末期になるほど減少度が大になる傾向を示し肺転移程度の強いもの乃至肺炎を併発したものは特に減少傾向強く死亡時に移植時体重(60～80g)を下回るものも少なくない。之に反し局所よりの失血乃至局所の二次感染が主たる死因の動物では比較的体重減少度が軽く110～130grの場合が多い。

第3項 末梢血液所見

採血は非麻酔下に尾静脈を鋭利な剃刀にて切り流出する血液を採つた。採血時の出血が以後の体重変化乃至血液所見等に影響しない様に出来るだけ最少必要限の採血に止めるよう注意した。4～5匹を1群として4日毎に採血し1群につき2回の採血を限度とした。

一般に移植後7乃至10日目頃から赤血球減少と白血球増加が略々平行して現れ3乃至4週になると異常な値に達する(第3図)。塗沫検鏡で有核赤血球、赤血球の大小不同性乃至多染性は殆ど認めず又有核細胞の殆どは成熟白血球で腫瘍細胞乃至骨髓系細胞は極めて少く毎常0.2%以下であつた。ヘモグラムでは移植後7日目頃より多核好中球の増加及び淋巴球の相対的減少が見られる(第5表)。

有腫瘍動物では一般に赤血球減少と多核白血球増多を主体とする白血球増加が見られると云われているが²³⁾、本実験においても同様の所見が認められた。又丹下²⁴⁾は吉田肉腫を骨髓内に移植した場合末梢血で白血球増多を来すが5～30%が腫瘍細胞であると報告している。本実験では末梢血に於ける腫瘍細胞の出現は極めて少なく、之は自由細胞癌である吉田肉腫と結節型Walker腫瘍との体内での拡がり方の相違によるものであろう。

第2節 レ線学的所見

移植後14日目までの材料はすべて離断肢を利用し、それ以後のものについては無処置観察群(以下単に観察群と略す)及び対照群の有腫瘍肢(以下腫瘍肢と略す)を使用した。生存肢の撮影に際しては厚さ2mmの鉛板で腫瘍肢以外の全身を被覆保護してレ線による全身的影響を極力避け腫瘍局所に及ぼすレ線の影響も考へて撮影は1動物1回を原則とした。又観察群の健常肢脛骨内に腫瘍移植と全く同様の手技で生理的食塩水0.05ccを注入して経目的に撮影を行ない、その所見を比較検討した。

移植翌日～3日目 組織片移植骨では脛骨上部に斑点状透明像や骨梁の乱れ、時には淡い骨膜肥厚像を認めるが対照骨にも同様の所見を認めるので、これは移植時の機械的骨損傷に由来するものであらうと思われる。

4～5日目 浮遊液移植群では対照骨とともに未だ何等の変化も現れない。組織片移植群では対照骨の骨梁の乱れ、骨膜肥厚等が漸次修復経過を辿り始めるのに反し、依然として之等の所見が存在し、却つて骨皮質硬化乃至骨膜肥厚の増大するものがある。恐らく腫瘍塊が骨髓内に残留しているための反応性変化ではな

いかと思われる。

6～8日目 浮遊液移植骨の近位骨幹端に初めて淡い透明帯が生じ、この部の皮質陰影が菲薄となつてくる。組織片の場合でも同様の所見が稍々明瞭に見れる。組織片の巾が広く、骨幹端部が蜂巢状に膨大するものがあり一般に浮遊液移植群より程度が強い。

9～12日目 浮遊液移植群もこの時期になると骨幹端部より骨幹部に向つて蜂巢状透明巣を生じ皮質は稍々膨脹として軟部の腫瘍陰影を認め同時に骨皮質外側より骨軸と垂直方向に火焰状の Spicula を認める。然し骨端線は却つて硬化し破壊は骨端部に及ばない。組織片の場合更に之等の所見が高度で破壊は骨幹骨髄部に及ぶものが多い。生理的食塩水注入群ではこの時期には既に修復され正常に復するものが多い。退縮するもの多くはこの時期から骨膜及び骨皮質全体としての肥厚、骨硬化を示しつつ次第に正常所見へと修復過程を辿る。

13～17日目 浮遊液移植群における変化も急速に進展して組織片移植群のそれと同程度に達する。即ち硬化した骨端線は極度に横径を増し骨端核は扁平化して関節囊附着部より骨端部に破壊が及んでくる。骨幹端部では骨陰影が消失し、既に病的骨折を起こすものがあり蜂巢状透明像は骨幹中央部の骨髄に達しこの部の皮質に硬化像を屢々認めるが反対に菲薄化するもの及び硬化と菲薄化が部分的に混在するものもあり、同時に Spicula 様骨造成を伴う。軟部の腫瘍陰影は更に増大し腓骨にまで破壊の及ぶものも見られる。

18日以後 殆ど全例に於て骨幹端部で骨性陰影は消失し病的骨折を起こして屈曲し、腓骨も蜂巢状に膨大して病的骨折を来すものもみられる。然しこの破壊像は骨幹中央部を超えて末梢にまで及ぶ事は少なく又膝関節裂隙及び大腿骨々端部迄末期に至るまで保存される事が多い。大腿骨に破壊が及ぶ場合は軟部腫瘍が大腿に及び次いで大腿骨皮質を二次的に破壊する場合に限られる。

一般に骨腫瘍としての病的所見が組織学的に認められるのは移植後6乃至8日目頃で初期には組織片移植群の方が強い変化を示す。又骨幹端部に初発しこの部を中心に破壊が開闊皮質及び骨幹骨髄に波及していくこと、骨端部の抵抗が強いこと、骨の破壊菲薄化と共に部分的に増殖硬化像も認められこと及び Spicula 様陰影が出現すること等人間における骨肉腫に類似した所見を呈し甚だ興味深い。

第3節 組織学的所見

離開部の腫瘍部分を採り Plank & Rychlo 氏法にて脱灰し Zelloidin 包埋の後切片を作りヘマトキシリン、エオジン染色を施した。主に腫瘍の拡がり方を中心として組織学的に観察し次の如き所見を得た。

移植翌日～4日目 骨穿刺による骨梁の破壊及び出血巣、肉芽組織を骨髄内に認める。組織片移植群では腫瘍細胞が骨髄腔及び破壊された骨梁の間に一塊として存在するが、之に反し浮遊液移植群では腫瘍細胞は比較的数も少なく骨髄細胞、出血巣乃至骨梁間に介在して認められる。移植後1～2日に於ては之等腫瘍細胞の多くは核及び原形質が崩壊して変性に陥つたものが多いが3～4日目になると円形乃至楕円形の核を有する大小種々の円形腫瘍細胞が骨髄腔乃至骨梁の間を充填し骨髄細胞を排除し始める。この傾向は骨幹端部に近いほど著しい。

5～10日目 既存骨梁及び皮質は次第に吸収消失し部分的には腫瘍組織に置換されるが一方においては新生骨様組織の増生を示し腫瘍細胞集団がこの間隙を皮質栄養孔に向つて伸び、皮質部に Spicula 様骨増生を示してくる。發育旺盛なものでは既に骨膜下に浸潤し更に骨膜を破壊して筋肉内に腫瘍細胞の浸潤するものもあるがこの様に旺盛な發育を示すものでは軟骨組織の新生を部分的に認める事がある。この時期に骨髄内では紡錘形、三角形、日月形或は垂鈴形等種々の形の核を有する異形性の強い細胞集団が出現し、数個乃至10数個の核を有する巨細胞もこの部に多数認められる。

11～15日目 骨幹端及び之に近い骨幹部では皮質が部分的に吸収され浸潤増殖した腫瘍組織の間に既存骨梁の遺残及び新生骨梁が見られ同時に Spicula 様骨増生が認められ骨幹部全体として紡錘状の腫大を示すものが多い。骨膜下に拡がった腫瘍細胞は更に筋肉内へと旺盛な増殖を示すが、一方この時期になると腫瘍浸潤は骨幹中央部に及びこの部の骨髄細胞は次第に腫瘍細胞によつて置換されてくる。骨端線軟骨は尚この時期に保存されるが一部の動物では骨端線部で骨膜下に浸潤した腫瘍細胞は関節囊附着部より関節内に侵入しこの部で関節軟骨を破壊して骨端骨髄中において増殖し初めるものもある。

16日以後 上記の所見は更に骨幹部に波及し骨幹端部では全く正常の骨構造は消失して無構造の壊死組織を中心に変性腫瘍細胞が之を取り囲み、その中に骨様組織の残骸を認める。その周辺部には旺盛な骨梁の肥

厚増大が見られ、骨皮質からの Spicula 様骨増生は部分的ではあるが尚著明に認められる。又多くは病的骨折を伴うが骨吸収と異常骨増生或は石灰沈着硬化等が混在し、時には異常な軟骨増生を見る事もあり人間における骨、軟骨肉腫との類似点も可成り存在していると云えよう。この点に関しては協同研究者岡本²⁹⁾の組織化学的研究を参照され度い。

第4節 小 括

Walker 腫瘍の組織片及び浮遊液を 白鼠脛骨々髓内に移植し全身所見、レ線学的所見及び組織学的所見を経目的に観察して次の如き結果を得た。

1) 移植後7～10日目より肉眼的に腫瘍発生を認め10～16日目には小指頭大乃至拇指頭大に達しこの頃より次第に動物は不活発となる。17日以後になると腫瘍は鳩卵大乃至それ以上の大きさに達し血癍を生じ易い。末期には動物は貧血様を呈し皮膚温低下して呼吸が著しく促迫し平均23～30日で死亡する。

2) 末梢血液所見 移植後7～10日目より赤血球減少及び多核好中球増多、淋巴球減少を主体とする白血球増加が起こり末期には異常な値に達する。腫瘍細胞の出現は極めて少なく有核細胞中0.2%を超えることはない。

3) レ線学的所見 移植後6～8日目より骨幹端部を中心に変化が始まり骨の破壊吸収像と同時に増殖硬化像も併存し骨皮質よりの Spicula 様陰影を認める。

4) 組織学的所見 移植後3～4日目に既に腫瘍細胞の骨髓内に於ける増殖を認め5～10日目より骨栄養孔を中心とした浸潤増殖が起こり骨組織の吸収と同時に一方に於ては骨様組織並びに軟骨組織の増生を認め、紡錘形或は三日月形等種々の形の核を有する異形性の強い細胞より成る肉腫様所見を部分的に認める。

5) 一般に初期に於ては組織片移植群における所見が浮遊液移植群におけるそれより若干高度であるが移植後2週目前後から両者の間に明確な差異を認め難くなる。又退縮するものでは通常移植後10～14日で腫瘍の縮小、レ線像の修復開始を認め長期観察結果は正常動物と何等変る処がない。

第4章 基 礎 実 験

第1節 灌流静脈血中における腫瘍細胞の消長に就いて

第1項 移植同時に股静脈血中に流出する腫瘍細胞数に就いて

I 実 験 方 法

Nembutal 麻醉下に予め股静脈を露出し移植開始と同時に止血鉗子にて血管を挟み、その末梢側に於て鋭利な鉗で静脈を切断し、自然に流出する静脈血を移植開始後10秒間ツベルクリン注射器にて吸引した。注射器は予めヘパリン0.01ccを吸い攪拌用の小硝子片を入れたものを使用した。吸引した血液をヘパリンと共に充分振盪混和した後全量を正確に読み、その一滴を換つて白血球算定と同一の方法で有核細胞数を算定し次の計算式によつて移植開始後10秒間に流出する腫瘍細胞総数を求めた。尚移植細胞数を可及的一定にするため実験には主として浮遊液を用い又塗抹検鏡によつて腫瘍細胞を形態的に観察した。

$$C = aA - 12,000(A - 10)$$

C……10秒間に流出した腫瘍細胞総数

A……10秒間に流出した血液全量+ヘパリン量 (mm³)

a……同上の 1 mm³ 中に含まれる有核細胞数

(A, a は実測値で平均白血球数を 12,000/mm³ とした)

II 実 験 結 果

移植した約400×10⁴個の腫瘍細胞の中骨髄内注入開始後10秒間に145×10⁴～283×10⁴個は股静脈を通過して肺に向う(第1表)。この中には計算盤で鑑別不能の骨髓系細胞も含まれているが塗抹検鏡でこれが占める率は全有核細胞数に対して毎常5%を超える事はなかつた。組織片移植の場合移植細胞数が一定せず又流出腫瘍細胞は塊状集団をなして計算盤では算定困難であり、従つて移植数及び流出数との間の正確な比率を知ることは出来ないが数回の実験で組織片移植の場合も矢張り相当量の腫瘍細胞が股静脈を通過する事を知つた。次に塗抹検鏡で(May-Grünwald Giemsa 染色)腫瘍細胞の形態を観察した結果甚だ異常なものが多く原形質及び核が崩壊する種々の段階のものが毎常95%

第1表 移植後10秒間に股静脈を通過する腫瘍細胞数

動物番号	流出血液量	腫瘍細胞数/mm ³	腫瘍細胞総数
1	0.23cc	6,300	145×10 ⁴
2	0.20	10,000	200×10 ⁴
3	0.16	13,400	214×10 ⁴
4	0.21	9,200	193×10 ⁴
5	0.27	7,100	192×10 ⁴
6	0.14	20,200	283×10 ⁴

浮遊液移植 (腫瘍細胞 400×10⁴ を含む)

以上を占め正常形態を保っているものは極めて少ない事を知った。この傾向は浮遊液移植の方が組織片移植の場合より高度であつた。

この機械的要因に基づくと思われる腫瘍細胞の破壊は移植用浮遊液の塗抹標本で既に相当認められるが更に流血中では著しく破壊程度を増す。之は骨髓内注入時にうける骨髓内圧の抵抗及び毛細管通過時に更に腫瘍細胞が傷害をうけるものである事は想像に難くない。

第2項 移植後股静脈血中に出現する腫瘍細胞の経時的変動に就いて

I 実験方法

腫瘍肢離断に際して股静脈を動脈より分離し静脈中樞側を先づ結紮した。末梢側を結紮する直前にその中間部において注射針で静脈壁を損傷し、流出する血液をツベルクリン注射器にて約0.01cc吸引採取した後、直ちに末梢側を結紮した。凝血を防止する為注射筒の内壁を予めヘパリンにて洗い攪拌用の小硝子片を入れておいた。採血後充分振盪混和しその一滴を採つて塗抹標本を数枚作り May-Grünwald Giemsa 重染色を施

して検鏡した。有核細胞 10^4 個を算え、この中に含まれる腫瘍細胞数について移植後1分, 30分, 1時間, 24時間, 3日, 5日, 7日, 10日, 14日, 21日目の間隔で検索を行なつた。

II 実験結果

腫瘍細胞の特徴は一般に大型で原形質は境界不鮮明にして好塩基性顆粒を有し、空胞を有するものが多い。核は偏在し大型で円形、楕円形乃至腎臓形を呈し時に2~3個の核を認める。核膜は極めて明瞭で濃染性のクロマチン顆粒及びクロマチン網が発達し1乃至数個の濃染核小体を有する。染色性の低下したもの、原形質の空胞が異常に多く細胞が膨化したもの、核膜不明瞭で核内に空胞が生じたもの等は変性過程の腫瘍細胞と考えられるが固有の有核細胞とは比較的識別容易で熟練すれば中等拡大で充分検出し得る。中等拡大下に白血球を算えながら腫瘍細胞を発見する毎に強拡大にして上記の特性から之を確認した。この結果第2表に示す如く移植1分後には腫瘍細胞は急速に減少するが24時間後まで検出可能であつた。然しこの時期に認め

第2表 股静脈血中に出現する腫瘍細胞数

浮遊液移植 (約 400×10^4 個の腫瘍細胞を含む)

	1min.	1/2h.	1h.	24h.	3d.	5d.	7d.	10d.	14d.	21d.
実験動物数	5	5	5	7	6	5	5	5	5	5
白血球 10^4 に対する 腫瘍細胞数	16	5	3	1,0	0,0	0	8	21	20	23
	4	3	3	1,0	0	0	5	17	16	19
	2	3	1	0	0	0	2	4	10	12
	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
陽性動物数	3	3	3	2	0	0	3	3	4	5
平均	4.4	2.2	1.4	0.3	0	0	3.0	8.4	10.0	13.4

組織片移植 ($300 \times 10^4 \sim 500 \times 10^4$ の腫瘍細胞を含む)

	1min.	1/2h.	1h.	24h.	3d.	5d.	7d.	10d.	14d.	21d.
実験動物数	5	5	5	6	7	5	4	5	5	5
白血球 10^4 に対する 腫瘍細胞数	41	18	9	9,0	0,0	12	14	28	27	108
	17	9	5	5	0,0	3	11	11	19	37
	10	4	3	3	0	0	0	4	7	11
	3	2	3	0	0	0	0	2	5	1
	0	0	0	0	0	0		0	3	3
陽性動物数	4	4	4	3	0	2	2	4	5	5
平均	14.2	6.6	4.0	2.8	0	3.0	6.3	9.0	12.2	32.6

られる腫瘍細胞は形態的に核及び原形質の高度の破壊を伴った異常なものが多く明らかに機械的乃至移植時の損傷による破壊と考えられるものが多い、従つて移植後24時間以内に流血中に出現するものは移植された腫瘍細胞それ自体であると考えられる、又浮遊液移植群と組織片移植群とを比較すると後者の方が多量に検出されるが之は組織片の場合移植後骨髓内に停留する時間が長く且つ細胞集団として発見される事が多いためであろうと考えられる。

移植後3日目には全例に於て検出不能であり5日目に於ても浮遊液移植群では検出不能で、組織片移植群に於て初めて5匹中2匹に腫瘍細胞の出現を見た、浮遊液移植群では7日目、組織片移植群では5日目より次第に出現頻度が増加する傾向を認める、而も重要な事は5日目以後に出現する腫瘍細胞は、時に変性を思わせるものもあるが移植後24時間以内に見られた様な移植操作による損傷と思われる著しい形態的異常を伴った細胞を認めず一般に正常形態を示すものが多い、亦2乃至数個の細胞集団として発見される事も屢々ある、この事は5日目以後に股静脈血中に出現する腫瘍細胞は骨髓内で増殖した腫瘍細胞から離脱したものである事を意味し局所腫瘍の増殖破壊の進展と共にその数も次第に増加してくる事は甚だ興味深い、組織片移植群の中に108個と云う極端な1例があるが之を統計値から除外すると10日目以後においては浮遊液移植群との間に腫瘍細胞数の有意の差は認められない。

第3項 小 括

Walker 腫瘍の浮遊液及び組織片を 白鼠脛骨骨髓内に移植し経時的に同側股静脈血中に出現する腫瘍細胞を検出して次の如き結果を得た。

1) 腫瘍細胞約400×10⁴個を含む浮遊液移植では移植と同時に145×10⁴乃至283×10⁴個の腫瘍細胞が股静脈を通過して肺に向う、組織片移植の場合も出当数の

腫瘍細胞が移植と同時に股静脈に流出する、

2) 之等の腫瘍細胞の中95%以上は破壊変性に陥つたもので浮遊液移植の方が組織片移植と比較して細胞損傷の程度が強い、

3) 股静脈を流れる腫瘍細胞は移植後急速に減少し24時間後まで認められるが3日後には検出不能であり組織片では5日目、浮遊液では7日目より出現し漸次増加してくる、

4) 移植後初期に流血中に出現する腫瘍細胞は移植された腫瘍細胞そのものと考えられるが5～7日目より出現するものは発育増殖した局所腫瘍より離脱して血中に入つたものである、

第2節 手術及び麻酔の転移に及ぼす影響に就いて
第1項 実験方法

脛骨骨髓内に Walker 腫瘍の細胞浮遊液(約400×10⁴個の腫瘍細胞を含む)を移植した白鼠40匹を4群に分ち、実験群では移植後30分以内、24時間後、7日後に夫々移植反対側の健常肢を Nembutal 麻酔下に股関節に於て離断し、無処置の対照群と比較検討した、動物は腫瘍死を遂げるまで毎日観察し死亡後直ちに肺及び淋巴腺転移の有無を肉眼的に検し転移の不確実なものは更に連続切片による組織学的検索を行なつて之を確かめた、又肺の転移結節に対してはSchatten²⁵⁾ 26) 及び Ketcham等²⁷⁾ が行なつた様に肺表面の転移結節数を算え更にその大きさを6階級に分類して数と大きさの関係を各群について比較した、

第2項 実験結果

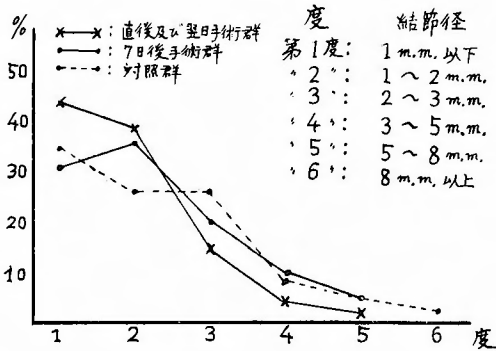
移植直後及び翌日に手術を行なつたものでは肺転移率が100%で平均生存日数も短い(第3表)、又肺表面の転移結節数も多く(第4表)大きさの分布では結節径の小さいものが多い(第1図)、之に反し移植後7日目に麻酔及び手術を施行した群では対照動物に比し肺転移頻度、転移結節数及び大きさの分布、生存日数等有意

第3表 移植反対側健肢離断成績

(浮遊液：腫瘍細胞数 約400×10⁴)

	実験動物数	事故死	移植陽性動物	肺 転 移動物数	率	淋巴腺 転 移動物数	率	平均生存日数(最短～最長)
対 照	10	0	8	6	75%	4	50%	25日 (18～39)
直 後 手 術	10	0	8	8	100%	4	50%	22 (19～32)
翌 日 手 術	10	1	7	7	100%	3	43%	18 (16～26)
7 日 後 手 術	10	1	7	5	61%	3	43%	24 (20～42)

第1図 肺転移結節径分布



の差を認めなかつた。淋巴腺転移は全実験群とも略々同程度であつた。

以上の結果から麻酔及び手術的侵襲自体は転移或は生存日数に特別の影響は及ぼさないが全身の消耗が極めて高度の場合には肺転移が促進されるのであろうと考へざるを得ない。何故ならば麻酔及び骨髄内移植操作そのものによる全身の消耗が未だ回復しない時期に再び股関節離断と云う大きな侵襲をうけた実験群にのみ肺転移の増強を認めたからである。

Schatten 及び Kramer²⁵⁾ は手術、麻酔及び Cortison 投与それ自体は転移に影響を及ぼさないと述べているが本実験に於ても同様の結果を得た。然しながら極端な消耗は転移に対する個体の防衛力を低下させる要因になる事は事実であろう。

第3項 小 括

Walker 腫瘍の浮遊液を白鼠脛骨骨髓内に移植し直後、24時間後及び7日後に移植反対側の健常肢を麻酔下に離断し肺転移の頻度、転移結節数及び大きさの分布、淋巴腺転移率並びに生存日数を対照動物と比較検討して次の如き結果及び結論を得た。

- 1) 移植後7日目手術群では肺転移及び生存日数に対して麻酔、手術は影響を及ぼさないが移植直後及び翌日手術群では肺転移が増強し生存日数は短縮する。
- 2) 淋巴腺転移に就いては全群とも影響を受けない。
- 3) 以上により高度の全身の消耗状態は明らかに肺転移を促進する因子となるが動物が比較的健康な状態にある限り麻酔及び手術自体は肺転移に直接的影響を与える因子にはなり得ない。

第5章 移植肢離断実験

第1節 実験方法

第4表 肺転移結節数

	結 節 数			平 均
対 照	104, 59,	93, 55,	60, 50.	70
直 後 手 術	158, 61,	97, 60,	72, 53.	84
翌 日 手 術	171, 73,	134, 61,	102, 57.	100
7 日 後 手 術	108, 57,	89, 45.	73,	74

Walker 腫瘍の浮遊液及び組織片を白鼠の脛骨骨髓内に移植して、直後、24時間後、3日、5日、7日、10日、14日後に夫々股関節離断を行なつた。各群20匹の動物を使用し10匹は実験群として腫瘍肢離断を、10匹は対照群として反対側健常肢を離断した。

梶原²¹⁾は本腫瘍の皮下移植に就いてその生存日数分布の中が広く又退縮率が高いので化学療法剤の screening test に使用する場合には注意を要すると述べており、井坂²⁸⁾は一般に移植腫瘍就中組織片中の腫瘍細胞数の正確な算定は本質的に困難であると述べている。本腫瘍を骨髄内に移植した場合生存日数分布は11~60日の長きに亘り移植率も時により100%のこともあり、又70%に満たないこともある。即ち移植された腫瘍細胞の数及び変性の程度乃至季節的要因等により移植率が常に一定しない事を考えるとこのような系統の実験では効果判定の基準になる対照群を作るには余程慎重を期さねばならない。従つて本実験に於てはデーターを少しでも正確にするため各実験群毎に同数の対照動物をおき、その移植率から実験群の想定移植陽性動物数を定めた。

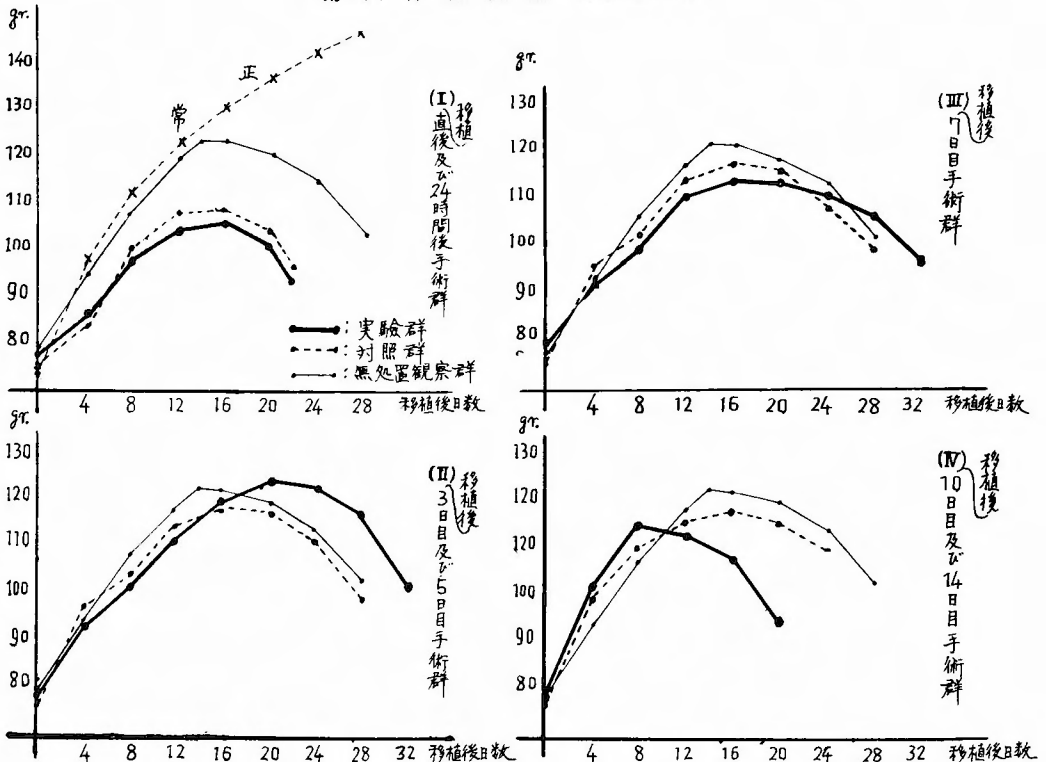
離断後は腫瘍死を遂げるまで毎日観察し経日的に体重測定及び末梢血液検査を行なつた。採血は尾静脈より行ない採血時の失血が生存日数、肺転移、体重等のデーターに影響を及ぼさない様考慮し採血は一群につき2回を限度とし且つ10日以上の間隔をおいて行なつた。又移植後60日以上経過したものは屠殺して局所並びに肺、淋巴腺を肉眼的に観察し腫瘍並びに転移の有無を確めた。

第2節 実験結果

第1項 肉眼的観察並びに体重変化

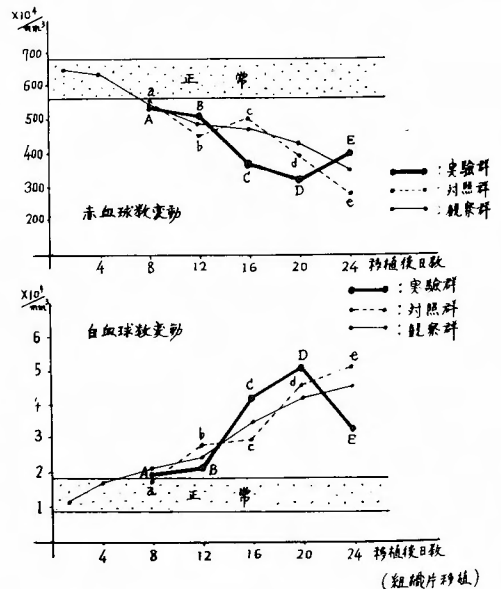
移植3日以後に手術を行なつた動物では実験群、対照群ともに術後2~3日間摂食飲水量は低下し動作も不活潑であるがその後は手術創も乾燥し摂食量も増加

第2図 体重変動 (組織片移植群)



し再び活潑になつてくる。之に反し移植直後及び翌日手術群では一般に全期間を通じて動作が不活潑である。体重変動は個々の動物により可成り差異があり一定しないが移植後3～5日目の手術動物では第2図の如く実験群の方が対照群より体重増加の傾向が強い。之に反し移植10日目以後の手術動物では実験群、対照群ともに観察群より体重の伸びは少なく実験群と対照群を比較すると前者の方が減少の程度が強い。即ち10日目以後に運動場を離断すると急速に体重は減少し死亡時期も早くなる。移植直後及び3日目手術動物では実験群、対照群の間に有意の差を認めず又両者とも観察群と比較して体重増加の程度が著しく少ない。之は前章第2節で述べた様に移植後連続した手術侵襲による全身消耗が肺転移を増強させた事が要因であろう。対照群で移植陰性の動物乃至退縮したものでは常に体重は増加し正常曲線と同様の値を示し実験群でも肺転移による腫瘍死を免れたものでは同様に常に増加の傾向を辿るが、この中には肺転移による死亡を手術によつて防ぎ得たもの並びに移植陰性のものとが含まれている。60日以上生存例ではすべて体重は増加の傾向を示し転移を認めたものはなかつた。

第3図



A, D 及び a, b: 14日目実験群 (6匹) 及び
その対照群 (6匹) の平均
B, E // b, e: 3及び5日目 // (7匹) // (7匹) //
C // c: 10日目 // (6匹) // (4匹) //

第2項 末梢血液所見

手術効果なく腫瘍死をとげた動物及び対照群の中移植陽性動物では観察群と同様赤血球減少及び白血球増加を示す。第3図においてCは移植後10日目実験群の

術後6日目、Dは移植後14日目実験群の術後6日目、A及びEは移植後3～5日目実験群の7～9日目及び19～21日目の血球数を夫々示す。従つて移植後10日目及び14日目に腫瘍肢を離断した群ではその対照群並び

第5表 末梢血液所見

(組織片移植)

正 常		多 核 好 中 球			淋 巴 球		
		16 ± 5			64 ± 6		
移植後日数		実験群	対照群	観 察 群	実験群	対照群	観 察 群
2		---	---	18 ± 4	---	---	60 ± 7
4		---	---	14 ± 3	---	---	63 ± 8
7	A, a	19 ± 6	21 ± 4	18 ± 5	60 ± 7	58 ± 7	60 ± 10
12	B, b	24 ± 4	29 ± 5	25 ± 4	52 ± 9	48 ± 6	52 ± 6
16	C, c	35 ± 7	30 ± 4	32 ± 5	39 ± 6	43 ± 5	40 ± 6
20	D, d	43 ± 8	33 ± 5	36 ± 6	31 ± 10	40 ± 6	38 ± 4
24	E, e	34 ± 7	39 ± 6	40 ± 5	41 ± 7	36 ± 6	36 ± 5

A, D, a, d. : 移植後14日目実験群 (6匹) 及びその対照群 (6匹)

B, E, b, e. : // 3及び5日目 // (7匹) // (7匹)

C, c. : // 10日目 // (6匹) // (4匹)

第6表 組織片移植群の手術成績

(300×10⁴～500×10⁴ の腫瘍細胞を含む)

手術時期		実験動物数	事故死	移植陽性動物	移植率	肺 転 移		淋 巴 腺 転 移		平均生存日数 (最短～最長)
						動物数	転 移 率	動物数	転 移 率	
直 後	実験群	10	1	(7.0)*		7	100 %	0	0 %	23日 (15～32)
	対照群	10	1	7	78%	6	86 %	3	43 %	24 (16～23)
24時間後	実験群	10	2	(5.6)		5	89 %	1	18 %	24 (11～29)
	対照群	10	0	7	70%	6	86 %	4	57 %	23 (14～35)
3 日目	実験群	10	0	(9.0)		4	44 %	2	22 %	33 (22～50)
	対照群	10	0	9	90%	5	56 %	3	33 %	29 (20～35)
5 日目	実験群	10	0	(7.8)		4	51 %	2	26 %	36 (27～44)
	対照群	10	1	7	78%	5	71 %	5	71 %	29 (21～42)
7 日目	実験群	10	2	(6.2)		5	81 %	2	32 %	34 (32～46)
	対照群	10	1	7	78%	6	86 %	4	57 %	30 (20～36)
10日目	実験群	10	1	(6.8)		6	88 %	4	59 %	23 (19～34)
	対照群	10	2	6	75%	4	67 %	5	83 %	27 (17～41)
14日目	実験群	10	1	(7.2)		8	100 %	4	54 %	22 (20～29)
	対照群	10	0	8	80%	5	63 %	4	57 %	26 (17～35)

* 括弧内は想定移植陽性動物数 即ち (実験動物数 - 事故死動物数) × $\frac{\text{移植率}}{100}$

に移植後3乃至5日目に離断した群と比較して赤血球減少、白血球増多がより早期に出現し速やかに悪液質に陥る事を意味している。この事は次項で述べる様にこの群では手術によつて肺転移頻度及び程度が増強し速やかに死に到る事と関連があり重要な所見である。

塗抹検鏡の結果観察群と同様赤血球の異常性を認めず増加した有核細胞の多くは好中球で腫瘍細胞乃至骨髓系細胞の出現は極めて稀で0.2%を超える事はなかった。ヘモグラムでは第5表の如く実験群の中腫瘍死を遂げたものは対照群、観察群と同様移植後7乃至12日目より多核好中球の増加、淋巴球の減少が起り末期になる程この傾向は著しくなる。之に反して腫瘍死を免れたものでは正常の白血球分割を示した。

ともあれ実験群に於ては局所腫瘍が既に除去され従つて局所からの失血或は局所の二次感染を全く否定し得るにもかかわらず、少なくとも手術効果なく肺転移による死亡を遂げたものでは赤血球減少、白血球増多が必ず認められた。一方対照群の中移植陰性のもの乃至退縮したものは術後一過性に軽度の貧血を示すがや

が白血球数と共に正常範囲内に復し又実験群に於ても肺転移を免れた動物では常に正常範囲内に留まる。この事はヘモグラム所見と相俟つて手術の予後判定に極めて重要な事柄である。

第3項 手術成績

手術によつて転移を防止し60日以上生存を全うし得た動物数の想定移植陽性動物数(本章1節)に対する比率を治癒率としたが、第4図の如く移植後3〜5日目離断実験群では50〜60%の治癒率を認めた。之に反し移植直後乃至翌日実験群では肺転移頻度多く手術効果を殆ど認めない。之は基礎実験に於て実証した様に連続的手術侵襲による全身の消耗が転移に対する個体の防衛力を低下せしめた事が原因と思われる(第4章2節2項)又7日目以後の実験群では次第に治癒率は減少し14日目離断実験群では治癒率零である。

次に肺転移頻度は移植後3〜5日目実験群がもっとも少なく直後、翌日及び7日目実験群では対照群と有意の差がなく10日目以後の実験群では対照群に比して却つて頻度が増加してくる。実験群の死因はすべて肺

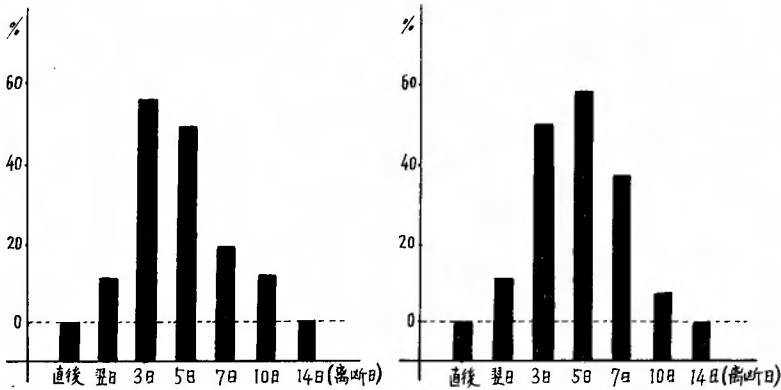
第7表 浮遊液移植群の手術成績

(約400×10⁴個の腫瘍細胞を含む)

手術時期		実験		移植陽性動物	移植率	肺 転 移		淋 巴 腺 転 移		平均生存日数 (最短〜最長)
		動物数	事故死			動物数	転 移 率	動物数	転 移 率	
直 後	実験群	10	2	(5.6)*		6	100 %	0	0 %	24 (13~34)
	対照群	10	0	7	70%	6	86 %	3	43 %	22 (17~34)
24時間後	実験群	10	2	(5.6)		5	89 %	0	0 %	25 (16~29)
	対照群	10	0	7	70%	7	100 %	4	57 %	24 (17~37)
3 日目	実験群	10	0	(10.0)		5	50 %	2	20 %	29 (22~40)
	対照群	10	1	9	100%	6	67 %	4	44 %	23 (17~34)
5 日目	実験群	10	2	(7.1)		3	42 %	1	14 %	32 (27~37)
	対照群	10	1	8	89%	6	75 %	1	50 %	25 (20~37)
7 日目	実験群	10	0	(8.0)		5	63 %	2	25 %	30 (27~60)
	対照群	10	0	8	80%	5	63 %	3	38 %	28 (19~50)
10日目	実験群	10	2	(5.4)		5	93 %	3	56 %	20 (18~26)
	対照群	10	1	6	67%	4	67 %	4	67 %	24 (21~33)
14日目	実験群	10	1	(6.0)		8	100 %	4	67 %	22 (18~25)
	対照群	10	1	6	67%	4	67 %	5	83 %	26 (20~34)

* 括弧内は想定移植陽性動物数 即ち (実験動物数 - 事故死動物数) × $\frac{\text{移植率}}{100}$

第4図 治 癒 率
(組織片移植群) (浮遊液移植群)



転移のためであるから、肺転移率と治癒率との間に逆比例関係が成立する事は当然であるが10日目以後の実験群で肺転移率が増し従つて治癒率の低下したことは甚だ重要な所見である。

淋巴腺転移に就いては7日目までの実験群では明らかに転移防止の効果が有り特に早期に腫瘍肢を離断したものほど成績良好である。骨髓内移植実験では移植時に局所以外に腫瘍細胞が多少とも洩出する事は防止出来ないが、皮下結節としての Walker 腫瘍が所属淋巴腺に転移を起こし易い性質を有する事から²²⁾²⁹⁾筋肉乃至皮下に洩出した腫瘍細胞から淋巴行性に転移の起こる事は充分に考えられる。協同研究者北³⁰⁾は組織学的に移植後3日目に既に所属淋巴腺転移の形成を認めているが移植後5～7日目までの離断実験群で淋巴腺転移を認めたものは恐らく移植時に皮下乃至筋肉、関節内に洩出した腫瘍細胞に起因するものが多いと思われる。又骨髓内で増殖した腫瘍が骨皮質を破壊して周囲軟部組織に浸潤してくれば所属淋巴腺に転移を起こす頻度も当然増加するが、この骨皮質外への腫瘍浸潤は組織学的に移植後5～10日目に認められるので、その時期までに離断をうけたものは当然転移頻度が減少するものと考えられる。

生存日数は移植直後及び翌日実験群では対照群に比して有意の差なく3～5日目実験群では対照群に比し延長し、10日目以後実験群では逆に短縮する。10日目以後実験群では肺転移率が増加する事は前述の通りであるが一方肺転移程度に就いて北³⁰⁾は10日目以後の実験群では転移結節数が対照に比して一般に増加し3～5日目の離断実験群では反対に転移結節数が少ないと述べている。従つて生存日数の短縮が肺転移程度の増

大に起因するものである事は疑問の余地がない。

第4項 小 括

Walker 腫瘍の浮遊液及び組織片を 白鼠脛骨骨髓内に移植し経日的に股関節において離断して次の如き結果を得た。

- 1) 移植後24時間以内では実験群、対照群ともに有意の差を認めないが観察群と比較すれば肺転移率高く生存日数は短い。
- 2) 移植後3～5日目離断実験群では対照群及び観察群と比較して肺転移率少なく生存日数が延長する。
- 3) 移植後7日目離断実験群では対照群及び観察群と比較して肺転移率は略々同様で生存日数は若干延長する。
- 4) 移植後10日目以後の実験群では対照群及び観察群と比較して肺転移率増加し生存日数は短縮する。
- 5) 淋巴腺転移の頻度は早期実験群程軽少である。
- 6) 転移程度の強い動物ほど体重減少著しく且つ赤血球減少及び多核好中球増加、淋巴球減少を伴う白血球増多の程度が高度となり生存日数は短縮する。
- 7) 手術により肺転移を免れた動物及び移植陰性動物では体重増加、末梢血液所見は正常動物の夫等と略々同一である。
- 8) 組織片移植群と浮遊液移植群との間には離断実験データの上で本質的な相違を認め得ない。

第6章 追 加 実 験

第1節 手術と化学療法の併用に関する実験

第1項 実 験 目 的

近年癌の治療に対する化学療法剤の研究が旺んになり動物腫瘍に対する screening test で著効を奏する優

第8表 化学療法との併用

(組織片移植)

	実験 動物数	事故死	移植陽 性動物	移植率	治癒率	肺 転 移			平均生存日数 (最短～最長)
						動物数	率	結節数	
手術単独群	10	0	(7.8)		48.7%	4	51%	36	36日(27～44)
化学療法単独群	10	0	(7.8)		61.5%	3	38%	49	34(26～43)
手術+化学療法群	20	1	(14.9)		79.1%	3	20%	17	42(32～56)
対 照 群	10	1	7	78%		5	71%	75	29(21～42)

秀な抗癌物質が数多く発見されて臨床面に於ても使用され一方外科的療法との併用に関しても種々動物実験が行なわれている。即ち川島³¹⁾はマウスC3H腹水肝癌を用い腫瘍除去後 Nitromin を使用して再発及び増殖が抑制され生存日数が延長したと報告し、更にその作用機序に就いて検討を行なつた。Shapiro 及び Fugmann 等³²⁾³³⁾はマウスの carcinoma 755 に就いて化学療法を手術に併用して夫々を単独に行なうより遙かに優秀な生存効果を認め、Kramar 及び Schatten³⁴⁾もマウスの S-91 melanoma で術後肺転移が増大すると云う自己の実験事実に基づいて之を抑制する為に TSPA を併用し著効を認め又梶原³⁵⁾も吉田肉腫の皮下移植後、術前術後種々の組合せて化学療法を併用して術前化学療法群に最も良好な成績を得ている。この様に手術と化学療法の併用が動物実験で著効を奏すると云う報告に基き骨髓内移植腫瘍に就いても同様の事が云い得るかを確かめる為本実験を行なつた。

第2項 実験方法

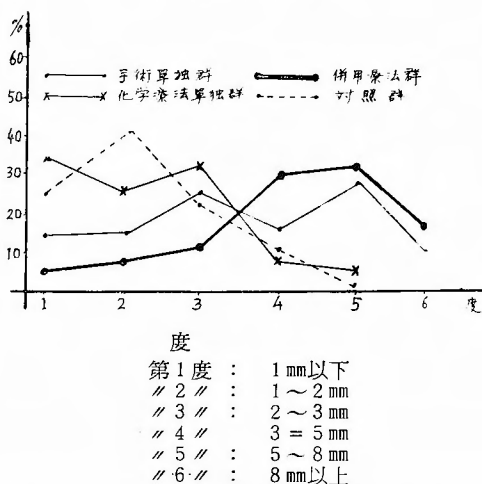
白鼠50匹を使用し Walker 腫瘍の組織片を脛骨骨髓内に移植し30匹に対して移植後3日目より7日間 Thio-TEPA (Tespamin) 150 γ /rat を毎日尾静脈より注射しその中20匹について移植後5日目に移植肢離断を行ない10匹は化学療法単独群とした。又残りの20匹中10匹は移植後5日目に移植肢を離断し手術単独群とし、10匹は対照群として無処置のまま観察した。動物は死亡時まで毎日観察し死後直ちに剖検して肺転移の有無を肉眼的に確かめ4章2節1項と同じ要領で転移結節の数及び大きさを算定実測した。

第3項 実験結果

第8表の如く治癒率は併用群が最も高く化学療法単独群、手術単独群の順となつた。肺転移率は勿論之と逆で併用群が最も低く且つ死亡動物の平均生存日数も延長された。亦転移結節数は併用群が最も少なく手術単独群、化学療法単独群、対照群の順に増加する。一方結節径の分布は前2者に於て結節径の大きいものが

第5図 肺転移結節径分布

(化学療法との併用群)



多く之に反して後2者に於ては結節径の小さいものが多い(第5図)。化学療法単独群で結節数の多いのは化学療法剤の投与終了後死亡までの期間局所腫瘍からの自然転移が累加した為と思われる。一方併用群の転移結節数が少ないのは腫瘍肢離断によつてこの自然転移の累加を防止し得た為と考えられる。即ち腫瘍細胞が転移巣を形成する可能性は手術によつて半減され化学療法を併用する事によつてその可能性を更に半減せしめ得る事を確め得た。

第4項 小 括

Walker 腫瘍の組織片を白鼠の脛骨骨髓内に移植し手術単独療法、化学療法(Thio-TEPA)及びその併用療法を行ない各群における実験成績を比較検討して次の如き成績を得た。

- 1) 治癒率は併用群が最も高く化学療法単独群次に次ぎ手術単独群が最も低い。
- 2) 死亡動物の平均生存日数は併用群が最も長い。
- 3) 肺転移結節数は併用群が最も少なく手術単独群、化学療法単独群の順に増加する。

第9表 術前胸部X線照射群

(組織片移植)

	実験 動物数	事故死	移植陽 性動物	移植率	治癒率	肺 転 移			平均生存日数 (最短～最長)
						動物数	率	結節数	
手術単独群	10	0	(9.0)		55.6%	4	44%	31	36 (22～50)
照射単独群	10	3	(6.3)		20.6%	5	79%	42	23 (18～30)
術前照射群	10	2	(7.2)		16.6%	6	83%	14	25 (19～33)
対 照 群	10	0	9	90%		6	67%	69	26 (20～35)

4) 以上より肺転移形成を防止する為に併用療法は充分期待し得る事を知った。

第2節 術前胸部X線照射に関する実験

第1項 実験目的

既に基礎実験に於て述べた様に骨髓内に移植された腫瘍細胞の過半数は移植と同時に股静脈を通過して肺に向う(4章1節1項)。換言すれば本実験は骨髓内への腫瘍の移植と所謂人工的肺転移形成を同時に兼ね備えたものにならざるを得ない。

Warren 及び Gates³⁵⁾ は Walker 腫瘍を用いて人工的肺転移を形成する過程で移植腫瘍細胞の多くが肺に於て崩壊する事を組織学的に実証している。従つて肺に於て崩壊変性を免れた移植腫瘍細胞がX線照射により若しその発育能力を失い変性崩壊するならば転移に関して本実験が持つ二元的要素即ち移植時における所謂人工的肺転移並びに発育増殖しつつある局所腫瘍からの自然転移の二者の中少なくとも前者を防止する事が出来、従つて転移に関して一元的な姿にして爾後の研究材料に使用出来るのではないかと考え、更に又発見困難な肺転移巣に対する放射線治療がどのような効果をもたらし得るかに就いてこの方面に於ける研究のいとぐちを見出す為に本実験を行なつた。

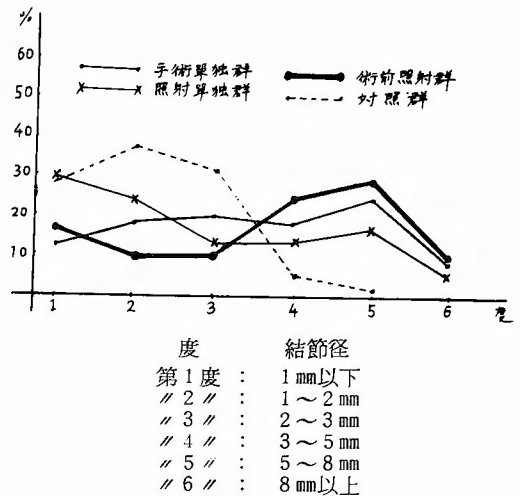
第2項 実験方法

白鼠40匹を使用し腫瘍組織片を脛骨骨髓内に移植し20匹に対して移植直後にX線100R.を胸部に照射し翌日より毎日100R.宛5日間計600R.の照射を行なつた。その中10匹は移植後5日目に移植肢を離断し術前照射群とし他は照射単独群とした。又残り20匹はX線照射を行なわず、その中10匹は移植後5日目に移植肢を離断し手術単独群とし他の10匹は無処置のまま対照群として観察した。

X線照射装置はG. E. 製 Maxitron 300 を用い、管電圧300KV., 管電流20mA., 半価層2.0mmCuの条件下において行ない、焦点・動物間距離は52cmであつた。照射はNembutal 麻酔下に行ない厚さ2mmの鉛板で遮

第6図 肺転移結節径分布

(術前胸部X線照射群)



へい箱を作製し動物の胸部に相当する部分を開窓しこの孔に5×5cm口径の照射用ツーツスを密着せしめて行なつた。

照射後の観察方法は前節2項と同様である。

第3項 実験結果

肺転移率は第9表の如く術前照射群及び照射単独群が高く手術単独群が最も低い。肺転移程度は術前照射群における結節数が著しく少なく結節径分布は大きいものが非常に多い(第6図)。又照射単独群では結節数が対照群と手術単独群の中間に位し結節径分布は略々一様であるが対照群の夫に比し大きいものが多い。

基礎実験の結果から(4章1節1項)手術単独群に於ける肺転移結節の多くは移植時に肺に到達した腫瘍細胞から発生したもの即ち所謂人工的肺転移によるものであり従つて術前照射群における肺転移結節は移植腫瘍細胞が所謂人工的肺転移を形成する過程でX線照射をうけしかも尚生活能力を失わずに肺に定着増殖し得た腫瘍細胞から発生したものと考えられる。従つて術前照射群の肺転移結節数が手術単独群のそれに比

して著明に少ない事から次の様に結論する事が出来る。即ち本実験に於て使用したX線量及び照射方法では所謂人工的肺転移を完全に抑制し得ないが肺に到達した腫瘍細胞の中少なくとも生活力の弱い細胞に対してはX線がその發育を抑制し、その為肺に定着増殖して転移結節を形成する腫瘍細胞乃至腫瘍栓塞数が全体として減少したものと考えられる。

次に照射単独群及び術前照射群に於て肺転移率が増加しているが、これは移植日を含め連続6日間に亘る麻酔によつて起こる全身的消耗が転移頻度を増加させる要因になった事も充分考慮しなければならない。この事は照射期間中動物が甚だ不活潑で体重は増加せず寧ろ減少するものがある事からも想像出来る。又生存日数か他の群に比して短いのもこの様な初期における消耗が照射によつて抑制し得なかつた遺残腫瘍細胞による肺転移の發育速度を早めた結果であろうと考えられる。

照射単独群に於て肺転移結節の多いのは照射終了後移植局所で發育増殖しつつある腫瘍からの自然転移が累加された為であろうと考えられ、従つて適当な時期に離断する事によつてこの自然転移を防止すれば術前照射群と同様結節数をより少なくし得る可能性があると考えられる。

第4項 小 括

Walker 腫瘍の組織片を白鼠の脛骨骨髓内に移植し直後より麻酔下にその胸部に対してX線分割照射を行ない5日目に移植肢を離断し手術単独群及び照射単独群の実験成績と比較検討して次の如き結果を得た。

- 1) 肺転移頻度は術前照射群及び照射単独群が手術単独群及び対照群に比して高い。
- 2) 之に反して肺転移結節数は術前照射群が著しく少なく手術単独群、照射単独群が之に次ぎ、対照群が最も多い。
- 3) 以上より腫瘍の骨髓内移植に伴う所謂人工的肺転移はX線照射により或る程度抑制され得る事を知つた。

第7章 綜括並びに考按

I 骨髓内移植腫瘍に就いて

(1) 臨床像、レ線像及び血液像と組織像との関係

Walker 腫瘍を骨髓内に移植した場合最初肉眼的に局所の膨隆乃至腫脹等を認め得るのは移植後7～10日目であり、レ線学的に異常所見の現れるのは移植後6～8日目である。又多核好中球の増加及び淋巴球減少

を伴う白血球增多、赤血球減少等末梢血液所見で異常を認めるのは移植後7～10日目以後である。之に反し組織学的には移植後3～4日目より既に骨髓内で腫瘍細胞の増殖像を認め5～10日目には既に腫瘍による骨組織の浸潤破壊像を認め人間に於ける骨肉腫に可成り類以した Spicula 様骨・軟骨性の変化を来してくる。

人癌の早期診断特にその生物学的診断法に關しては現在まで枚挙に遑のないほど多数の報告がなされておるにかかわらず、未だ之に基いて早期治療を行ない、満足すべき結果を得るには至つていない。一方骨肉腫に於ても Biopsy, Oxygram, 血清生化学検査或はisotopeの使用等によりその早期発見には近年種々の努力が払われ嚴重な駆血下に患肢の切断が行なわれているにかかわらず尚確実な効果を期待し得ない現状である。

本実験に於ても臨床的或はレ線学的に腫瘍発生に対して辛うじて診断を下し得る時期即ち移植後6日目頃には腫瘍局所の浸潤破壊は相當に進行し、向肺性の腫瘍細胞が既に流血中に出現している事より肺転移形成前に於ける骨肉腫の早期診断が如何に困難であるかを痛感する。現在の段階では臨床的に肺転移を証明し得ない時期に於てもレ線学的に骨肉腫としての骨吸収破壊像が認められるとすれば少なく共潜在性の肺転移形成が既に発生しつつあると考えてもよいのではなからうか。

(2) 移植腫瘍細胞の運命

腫瘍細胞約 400×10^4 個を含む Walker 腫瘍の浮遊液を白鼠脛骨骨髓内に移植した場合移植開始後10秒間に $145 \times 10^4 \sim 283 \times 10^4$ 個の腫瘍細胞が股静脈を通過して肺に向ひ急速にその数は減少して3日後には検出不能になる事及び之等の腫瘍細胞の中95%以上は形態的に明らかに破壊変性に陥つたものである事は既に述べた通りである。即ち本実験が腫瘍の骨髓内移植と共に所謂人工的肺転移の要素を併せ有する所以のものである。

Warren 及び Gates³⁶⁾ は Walker 腫瘍を用い腹水培養をして得た自然浮遊液と腫瘍結節より得た人工的浮遊液を各別個に静脈注射して人工的肺転移を起こさせ両者を比較した結果自然浮遊液における無損傷の腫瘍細胞の方が人工的浮遊液の損傷細胞に比して、より多く又より早く肺に転移結節を形成もると報告している。又移植操作によつて移植腫瘍細胞が損傷され、その生活力を失つて変性に陥る事は Rössle³⁷⁾, Hörner³⁸⁾, Costa³⁹⁾, De Gaetani⁴⁰⁾, Zeidman⁴¹⁾ 等により主張されてきたが、本実験に於ては移植前浮遊液の塗抹標本で見

られる腫瘍細胞と移植後流血中に見られる夫とを比較して後者の方が遙かに破壊変性の程度が強い事から移植時に於ける骨髓内圧の抵抗により又毛細管通過時に移植腫瘍細胞が更に破壊変性をうけるものと考えられる。一方 Schmidt⁽⁴²⁾, Iwasaki⁽⁴³⁾, Warren 及び Gates⁽³⁶⁾ は肺に到達した腫瘍細胞が肺血管内で崩壊する過程を組織学的に証明し 協同研究者北⁽³⁰⁾ も Walker 腫瘍の骨髓内移植に際し肺に到達した腫瘍細胞の多くが破壊変性に陥っている事を強調している。従つて移植操作による破壊変性を免れた少数の移植腫瘍細胞の中肺に於て定着し増殖を起し得るものは更に僅少であると思われる。他方 de Ropp 及び Mckenzie⁽⁴⁴⁾ は double slide culture を用い Walker 腫瘍組織から自然に剝離した無損傷の細胞を用い僅か5個で移植が可能であつたと報告しているが、この事から本実験に於て移植時に肺に向う腫瘍細胞のうち無損傷のものがより多数有れば所謂人工的肺転移率は恐らく更に高率になるであろう。

(3) 灌流静脈血中における腫瘍細胞の動向に就いて

Walker 腫瘍を骨髓内に移植して5乃至7日後より灌流静脈血中に腫瘍細胞の出現を認めその後次第に増加する傾向のある事を知つた。Engell⁽⁴⁵⁾ は1869年に既に腫瘍細胞が循環血流中に発見されていたと述べており、1900年より1930年頃にかけて Schmidt⁽⁴²⁾, Schleip⁽⁴⁶⁾, Marcus⁽⁴⁷⁾, Quensel⁽⁴⁸⁾, Jonescu⁽⁴⁹⁾ 等によつて癌患者或は担腫瘍動物の循環血流中に癌乃至腫瘍細胞と思われるものを証明して之を癌の診断に利用しようとする試みも行なわれ、更に Knox⁽⁵⁰⁾ は実験的に動物腫瘍を massage して転移の増強する事を認めたが、その過程を流血中の腫瘍細胞 (atypical cell) の増加によつて説明しようと試みた。この様に流血中の癌細胞検出に関する試みは歴史的に古いが1934年 Pool 及び Dunlop⁽⁵¹⁾ が血中の腫瘍細胞を比重分離して集結する方法を報告して以来腫瘍局所を灌流する静脈血中から腫瘍細胞を検出する研究が特に人癌において活発に行なわれる様になつた。即ち Gray 及び Mitchell⁽⁵²⁾, Moore 及び Sandburg⁽⁵³⁾, Engell⁽⁴⁵⁾, Fischer 及び Turnbull⁽⁵⁴⁾, Malmgren 等⁽⁵⁵⁾, 宇野⁽⁵⁶⁾, 林⁽⁵⁷⁾, 間島⁽⁵⁸⁾, Wakasa⁽⁵⁹⁾ 等は何れも種々の腫瘍細胞集結法を用いて可成り高率に灌流静脈血中より癌細胞を証明しているが、更に Papanicolaou⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾ が剝落癌細胞に対し特殊の染色法を用いて形態学的に癌細胞を特徴づける等染色法の発達と相俟つて癌に於けるこの方面の研究は近年益々活発に行なわれつ

つあるが、骨肉腫に関しては未だこの種の報告を見ない。

本実験に於ては採血量を僅少に留めるため単純血液塗抹標本による腫瘍細胞の検出にとどまつたが、若し上記の様に腫瘍細胞集結法を用いれば恐らくもつと高率に検出し得たに相違ない。即ち骨肉腫においては造血器官である骨髓が血管系特に静脈系と密接な関係を有する事から灌流静脈血中には恐らく一般の癌に於けると同様或はより多くの剝落腫瘍細胞が肺に向つて流出する可能性があり、之は本実験に於て移植局所における腫瘍増大の程度と併行して血中腫瘍細胞数をより多く検出し得た事からも充分予想し得るものである。

(4) 骨髓内移植実験に附随する所謂人工的肺転移の問題に就いて

骨髓内移植実験に於ては移植時に所謂人工的肺転移を伴う事は避け得られないが、先に述べた様に肺に到達した移植腫瘍細胞の中転移を形成するものは極めて僅少のものであらうと思われる。若し移植後腫瘍細胞が肺に定着して増殖を初める初期に肺組織全般に亘る広汎な胸部X線照射を行なえば僅少の生存腫瘍細胞が更に生活力を失ない変性に陥つて転移を形成する率が減少するのではないかと云う事が期待される。Walker 腫瘍がX線に感受性を有する事は Elson 及び Lametor⁽⁶²⁾ により既に証明されており本実験に於ても転移結節数の著しく少ない事から所謂人工的肺転移の成立に対してX線照射は確かに抑制効果を有するものと考えられる。

所謂原発性骨肉腫の発生機転は今日尚不明であり従つてその転移の発端も不詳であるが骨髓内移植腫瘍を用いて治療面の基礎的研究を行なう為には少なくとも最初骨髓にのみ腫瘍細胞が定着し、その後増殖して血行性自然転移を起す様な条件、即ち転移に関して一元的な形態をとる方が研究材料として好都合である。この点では発癌物質による実験的骨肉腫が優れているが一面腫瘍発生までの期間が長く且つ一様でない事、移植率、転移率及び転移様式が一定しない等の欠点もあり、何れが研究材料として優れているか判定を下し難い。然し少なく共移植腫瘍を用いて骨肉腫の治療、特に外科的療法に関する基礎的研究を行なう以上はデータの分析をより容易にする為に移植時に起こる所謂人工的肺転移を何等かの方法で阻止する事が望ましく、著者は之に対してX線照射法を試み必ずしも期待したほどの成績は得られなかつたが、この問題は更に考慮すべき余地が残されていると考えられる。

II 骨髓内移植腫瘍に対する外科的療法に就いて

移植後3～5日目に移植肢を離断した動物では対照に比し肺転移率が12%乃至33%減少し治癒率は最も高い。一方股静脈血中に於ける腫瘍細胞の検出結果から考え局所からの自然転移が起こるのは移植後5乃至7日以後と推定される。従つて3～5日目に離断した動物で肺転移を起こしたものは前述した様に主として移植時の所謂人工的肺転移によるものが多いと考えられる。即ちこの事から本実験では骨髓内移植によつて40～50%の所謂人工的肺転移が起こり更に發育増殖した局所腫瘍からの自然転移が20～30%の頻度で之に累加して平均約70%の肺転移を生ずるものと考えられる。換言すれば3～5日目手術群ではこの自然転移を未然に防止し得た事になる。

次に移植後7日目に移植肢を離断した動物では対照に比し肺転移率の差を認めないが、この事から Walker 腫瘍の骨髓内移植に於ては移植後5日目後より離脱腫瘍細胞が流血中に出現し6～7日目には既に肺に定着して転移を形成する腫瘍細胞の運命が決定しているものと考えなければならぬ。然もこの時期は臨床的或はレ線学的に局所腫瘍発生の有無を診断するのに極めて困難な時期である事より古来多くの骨肉腫臨床例に於て転移防止を期待して患肢の切断を行なつたにもかかわらず、殆ど全例に術後肺転移の発生を来し不良なる予後を辿つている。之は本実験でも示された様にレ線学的に著明な骨変化を来している時期では既に肉腫細胞による迅速な肺転移形成の芽が完成されていた事を物語るものであろう。

最後に移植後10日目以後に腫瘍肢を離断した動物では肺転移率が対照に比し21%乃至34%増加し又手術によつて死期を早める結果になつたが、この事は甚だ興味深い事である。

Marie 及び Clunet⁶³⁾ はマウスの移植腫瘍を切除して転移の増加する事を報告し Tyzzer⁶⁴⁾, Tadenuma 及び Okonogi⁶⁵⁾, 川島⁶⁶⁾ 等も同様の結果を得ている。又 Schatten²⁶⁾ もマウスの腫瘍肢を切断して肺転移結節数及び大きさが増大する事を報告している。他方 Ketcham 等²⁷⁾ は詳細なる追試を行ない切断によつて肺転移の頻度及び転移結節数は減少し転移結節の大きさは増大すると報告している。又 Wood⁶⁷⁾, Coman⁶⁸⁾ 等は腫瘍の除去が転移頻度を減少せしめると云い Lewis 及び Cole⁶⁹⁾ は早期に切断すれば肺転移頻度が減少すると述べている。

著者の実験及び協同研究者北³⁰⁾の転移に関する研究

から、骨髓内移植腫瘍に於ては早期離断群(移植後3～5日目)では肺転移頻度は減少し転移結節数が少なく、成熟期離断群(移植後10～14日目)では肺転移頻度は増大し転移結節数も増加する。この点に關し Schatten²⁶⁾ は原発腫瘍を除去する場合既に肺に腫瘍栓塞が存在しており原発腫瘍の抑制効果を除いた為にこの潜在転移巣が急速に發育してくる。然るに若し原発腫瘍が残存しておれば之等転移腫瘍の大部分は静止しているか或は消滅してしまうであろうと推論し、協同研究者北³⁰⁾も同一個体内における腫瘍間の抑制効果を認めている。一方臨床面で花北⁷⁰⁾は局所症状の未だ明らかでない骨肉腫発生の初期に肺に於ては既に潜在転移巣が芽生えており、切断等により原発腫瘍が除去されると腫瘍増殖の全エネルギーが肺転移巣の發育に集中して急速に増殖を来すのではなからうかと述べている。又 Ferguson⁵¹⁾ は258例の骨肉腫切断に就き調査した結果発症後6カ月以内に切断をうけたものよりそれ以後に切断をうけたものの方が5年生存率が遙かに高いと報告し、切断によつて起こる全身的循環の変化が遊離腫瘍細胞の肺に於ける定着並に發育を容易ならしめ又發育初期の活動期には未分化の腫瘍細胞が多く、切断により肺転移を生じ易いが、發育静止期にはこの傾向が軽減すると推論し、従つて切断はこの静止期を選んで行なうべきだと結論し、早期切断を避ける可きであると主張している。そして Green⁶⁾ もこの考え方に賛同している。

著者の実験結果からも或る程度發育した原発腫瘍はその転移巣の發育を抑制する作用を有し、之を離断除去する事により転移巣の發育が急速に増大すると考えざるを得ない。所が一方肉眼的乃至レ線学的に局所腫瘍の発生を診断し得る所謂早期(移植後7日目)に離断を行なつたものでは肺転移抑制に対する手術効果も認められないが、この様な転移巣の術後の急速な發育も特に認められなかつた。腫瘍發育の時期に關する概念を動物実験と臨床とを比較して直結させる事には慎重を要するであろうが、少なくとも診断可能な極めて早期に切断を行なつても、これによつて肺転移巣を増大せしめるとは思はず、寧ろ肉眼的乃至レ線学的に局所に於て既に發育が旺盛に認められ末梢血液像で明らかな異常を認める様な時期に切断を行なえばこの様な危険を伴う可能性があるので、従つて早期発見及び早期治療の必要性を寧ろ強調し度い。

手術と化学療法の併用は近年臨床的には殆ど常識として行なわれている。Ehrlich によつてその概念が

確立された化学療法はその後癌に対するその作用機点を通じて母体内に於ける癌の生物学的乃至生物学的態度を解明する方向に発展し、更に癌発生の本質を究明すべく数多の努力がなされてきた。現在制癌物質の効果判定には動物腫瘍及び non-tumor System が使用されているが、実験的に有効である事と臨床上に於ける価値判定とは無関係であるとすら極言するものもあり、従つて制癌物質の研究は一層 clinical level で進められる必要のある事が強調されている。

教室の池田⁷⁰⁾は骨髄内移植腫瘍 (Walker 腫瘍) に及ぼす制癌物質の影響を追究し或る種の制癌剤に腫瘍発育抑制効果を認めているが、著者の追加実験では更に手術と化学療法 (Thio - TEPA) の併用が著明に治癒率を高め肺転移を抑制して延命効果をもたらす事を知つた。然し上述の如くこれは飽くまでも骨髄内移植腫瘍 (Walker 腫瘍) に対する特定制癌剤の Screening test であり勿論臨床上の効果と直結させる事は出来ないであろうが、少なくともこの実験系に於て手術乃至化学療法を各単独に施行するよりは両者の併用が遙かに有効である事は疑う余地がない。

最後に Walker 腫瘍の骨髄内移植に伴う所謂人工的肺転移に対し胸部全般の X 線照射が或る程度抑制効果を及ぼす事は既に述べた通りである。勿論肺組織全般に亘る広汎な胸部 X 線照射は肺組織の fibrosis を起こす点等より臨床的に直ちに應用出来得るものではない。最近骨肉腫に於て患肢切断後の肺転移巣に対する放射線治療が臨床的に行なわれて或る程度の成果が認められているが本実験において証明した様に臨床的に診断を下し得る時期には既に肺における血行性転移が行なわれつつあると見なければならないから、放射線治療学の進歩と相俟つて切断後の肺転移に対しては発見困難な早期にその潜在転移巣に化学療法のみならず放射線療法を何等かの形で行なう事が出来れば骨肉腫に於ける治療成績はより向上するのではなからうかと期待される。

第 8 章 結 語

Walker carcinosarcoma 256 の腫瘍組織片及び腫瘍細胞浮遊液を白鼠の脛骨々髄内に移植して臨床像、レ線像並びに組織像を比較観察し、移植後灌流静脈血中に出現する腫瘍細胞の数的及び質的消長を経時的並びに経日的に検索した。又手術及び麻酔それ自体が転移に及ぼす影響を検討した上で被移植肢を移植後経日的に離断し更に化学療法を併用してその成績を比較検討

した。又移植に伴つて起こる所謂人工的肺転移に対して胸部全般に亘る X 線照射を施行しその抑制効果を検討した。

1) 肉眼的に局所の腫瘍発生を認め又末梢血液像の変化を認めるのは移植後 7～10 日目でありレ線学的に異常所見の現れるのは移植後 6～8 日目頃である。之に反し組織学的には移植後 3～4 日目に既に腫瘍細胞の発育増殖像を認める。

2) 一方灌流静脈血中に於ては移植後 5～7 日目より腫瘍細胞が出現し従つて局所腫瘍からの自然転移は既にこの頃より初まり且つ日を経るに従つて向肺性の腫瘍細胞数は漸次増加して来る。即ち肉眼的乃至レ線学的に局所の腫瘍発生を診断し得る時期には既に潜在性肺転移巣が形成されつつあると考えなければならない。

3) この時期以前に外科的療法を行なえば肺転移防止の可能性はあり、化学療法を併用すれば更に優秀なる治療効果を發揮する。然しこの時期以後では肺転移防止に対する手術効果を期待し得ないのみならず、肉眼的乃至レ線学的に腫瘍の発育増大が旺盛で又末梢血液像の変化が著明になる様な時期に原発腫瘍を除去すると却つて肺転移巣の発育を促進し生存日数を短縮せしめる。

手術及び麻酔それ自体は極端な全身の消耗を伴わない限り転移に対し何等の影響も与えない。

4) 骨髄内移植と同時に移植腫瘍細胞の過半数は股静脈を通過して肺に向うが転移巣形成前の広汎なる胸部 X 線照射はこの所謂人工的肺転移成立に対して或る程度の抑制効果を示した。

稿を終るに臨み、御指導並びに御校閲の労を賜つた恩師近藤鋭矢教授に深甚なる謝意を捧げ、又常に御鞭撻、御指導を賜つた赤星義彦講師に深甚の謝意を表すると共に、御助言、御教示頂いた内科熊谷講師、放射線科小野山講師及び本腫瘍を分与せられ、且つ御助言を賜つた武田薬品研究所梶原照所長に衷心より感謝の意を表するものである。最後に終始温かい激励及び助言を頂いた協同研究者池田、北両君に御礼を申し上げる。本研究費は財団法人藤原記念財団よりの研究奨励金によつて行なわれた事を記して、共同研究者と共にその厚意に感謝するものである。

本論文の一部は第92回近畿外科学会において発表した。

附図1 : 移植後経日的レ線像



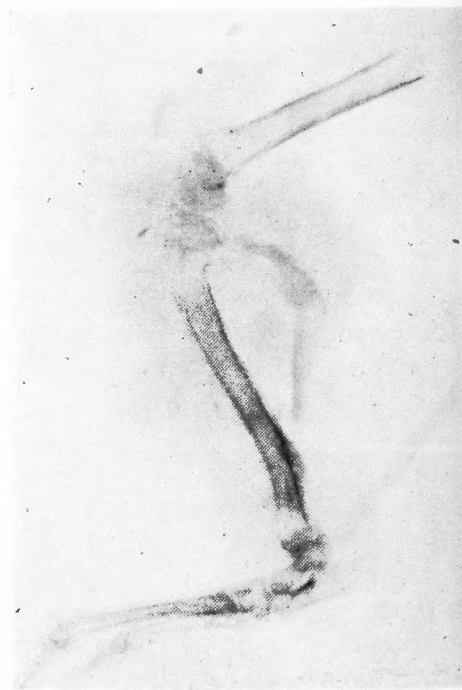
5 日 目



10 日 目

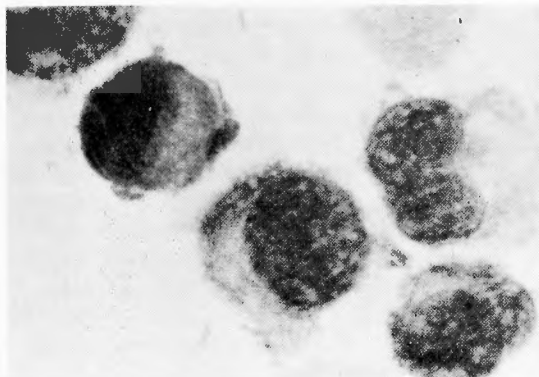


15 日 目

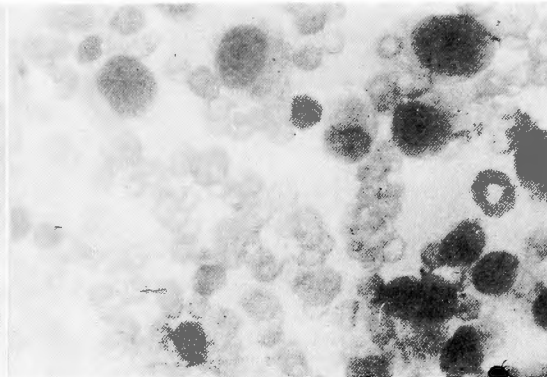


20 日 目

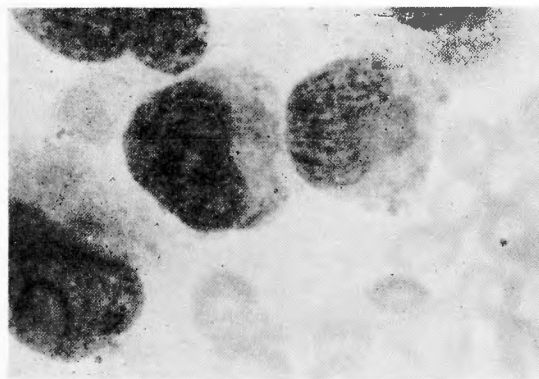
附図2：股静脈血中に出現した腫瘍細胞



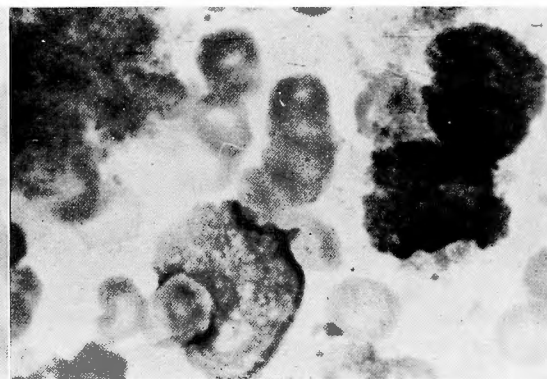
a) 移植浮遊液中の腫瘍細胞 (×1500)



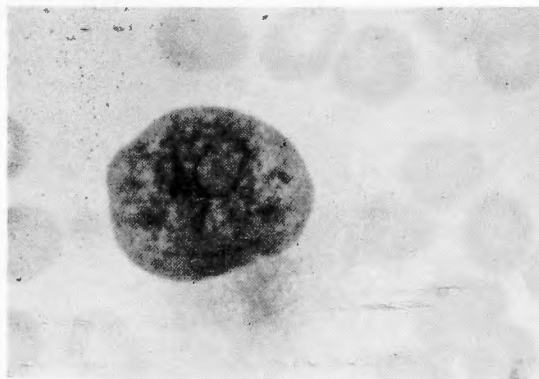
b) 移植開始後10秒以内に股静脈血中に流出した腫瘍細胞 (×600)



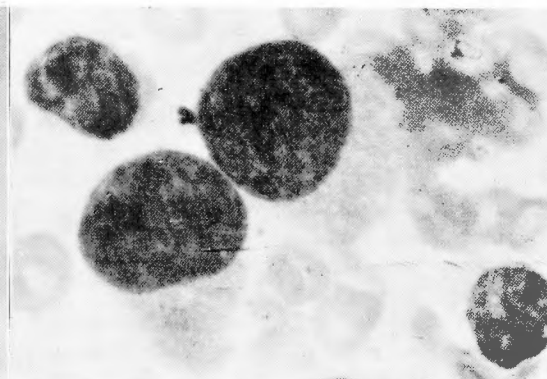
c) b) と同じ、——比較的正常形態を保っている (×1500)



d) b) と同じ、——移植操作によつて破壊された腫瘍細胞 (×1500)



e) 移植後7日目 (×1500)



f) 移植後14日目 (×1500)

参 考 文 献

- 1) 前山巖：骨原性肉腫の治療と予後. 外科, **23**, 1157, 昭36.
- 2) Coventry, M. D. et al : Osteogenic Sarcoma. J. B. J. S., **39-A**, 741, 1957.
- 3) Coley, B. L. et al : An Analysis of Fifty-nine Cases of Osteogenic Sarcoma with Survival for Five Years or More. J. B. J. S., **32-A**, 307, 1950.
- 4) Prevo, S. B. : A clinical Analysis of 205 Cases of Malignant Bone Tumor J.B.J.S., **32-A**, 298, 1950.
- 5) Ferguson, A. B. : Treatment of Osteogenic Sarcoma. J. B. J. S., **22**, 916, 1940.
- 6) Green, W. T. : Recent Experiences with Treatment of Osteogenic Sarcomata. J. B. J. S., **40-A**, 1437, 1958.
- 7) 花北良臣他：骨肉腫の予後, 特に肺転移について. 整形外科, **8**, 153, 昭32.
- 8) Stehlin, J. S. et al : Regional Chemotherapy for Cancer, Ann. Surg., **151**, 605, 1960.
- 9) Kremenz, E. T. et al : Treatment of Malignant Tumors of the Extremities by Perfusion with Chemotherapeutic Agents. J. B. J. S., **41-A**, 977, 1959.
- 10) 山田憲吾他：悪性骨腫瘍. 外科, **23**, 591, 昭36., 悪性骨腫瘍の治療対策特に制癌剤局所灌流の経験について. 日整会誌, **36**, 8, 121.
- 11) 三木威勇治他：局所灌流法による悪性腫瘍の治療, 第1報. 日整会誌, **36**, 8, 122.
- 12) Gottschalk, R. G. et al : Radioactive Sulphur in Chondrosarcomata. J. B. J. S., **42-A**, 1239, 1960.
- 13) 山田 牧他：Co⁶⁰ 照射を行なつた悪性腫瘍患者の経過について. 整形外科と災害外科, **8**, 22, 昭33.
- 14) Levin, I. : On the Mechanism of the Formation of Metastases in Malignant Tumors. J. Exper. Med., **14**, 138, 1911.
- 15) 武藤昌知：移植し得べき鶏腫瘍の一新種に就いて. 日病会誌, **5**, 553 及び **6**, 651, 大5.
- 16) 加藤竹男：家鶏腫瘍の移植増殖に関する知遺補遺, 殊に翼骨内移植に就いて. 京都医誌, **16**, 1441, 大8.
- 17) 高橋正樹：白鼠の腹水腫瘍の骨髄内移植. 遺伝学誌, **30**, 4, 188, 昭30.
- 18) 本城 治他：吉田肉腫移植による白血病像について. 癌, **42**, 151, 昭26, **43**, 136, 昭27, **44**, 324, 昭28.
- 19) 丹下一郎：吉田肉腫の関節及び骨髄内移植に関する実験. 日整会誌, **32**, 10, 1007, 昭34.
- 20) Toriyama, S., Miyagi, Y. et al : Study on the Intramedullary Transplantation of an Experimental Bone Tumor. J. Jap. Orthop. Ass., **35**, 12, 1215, 1962.
- 21) 梶原, 川路他：制癌実験法に関する研究 (III), 武田研究所年報, **18**, 134.
- 22) Dunham, L. J. & Stewart, H. L. : A Survey of Transplantable and Transmissible Animal Tumors. J. Nat. Cancer Inst., **13**, 1299, 1953.
- 23) 福岡文子：担癌動物の系統的変化. 癌研究の進歩, **512**, 1960. (医学書院)
- 24) 岡本林平：未発表.
- 25) Schatten, W. E. et al : An Experimental Study of Postoperative Tumor Metastases. II. Cancer, **11**, 460, 1958.
- 26) Schatten, W. E. : An Experimental Study of Postoperative Tumor Metastases I. Cancer, **11**, 445, 1958.
- 27) Ketcham, A. S. et al : The Effect of Removal of a "Primary" Tumor on the Development of Spontaneous Metastases. Cancer Res. **19**, 9, 940, 1959.
- 28) 井坂英彦：腫瘍の移植. 癌研究の進歩, **405**, 1960. (医学書院)
- 29) Stewart, H. L. et al : Transplantable and Transmissible Tumors of Animals. Atlas of Tumor Pathology, Section XI, Fascicle 40, 261, 1959.
- 30) 北 暁：未発表.
- 31) 川島芳子：腫瘍転移の研究VI, 手術後の再発並びに転移に対する Nitrogen mustard N-oxide (ナイトロミン) の抑制効果について. 福島医誌, **10**, 447, 1960.
- 32) Shapiro, D. M. & Fugmann, R. A. : A Role for Chemotherapy as Adjunct to Surgery. Cancer Res., **17**, 1098, 1957.
- 33) Shapiro, D. M. & Fugmann, R. A. et al : Partial Regression of a "Solid" Tumor with Multi-Compound Therapy. Cancer Res., **16**, 1067, 1957.
- 34) Kramer, W. M. & Schatten, W. E. : An Experimental Study of TSPA in the Prevention of Postoperative Pulmonary Metastases. Cancer, **11**, 463, 1958.
- 35) 梶原 彊：制癌剤の Screening test. 癌研究の進歩, **785**, 1960. (医学書院)
- 36) Warren, S & Gates, O. : Fate of Intravenously Injected Tumor Cells Am. J. Cancer. **27**, 485, 1936.
- 37) Rössle, R. : Über die Anfänge der Krebsigen Neubildung bei Impfgeschwülsten. Press. Akad. d. Wissenschaft, Phys.-Math. Kl. III, 1936.
- 38) Hörner, O. : Lückenlose Serienuntersuchungen an Transplantierten Mäusekrebs. Z. Krebsforsch., **43**, 377, 1936.
- 39) Costa, H. : Untersuchungen über die zur Über-

- tragung experimenteller Geschwülste Notwendige Zellenzahl, unter Bezugnahme auf die Filtrierungsversuche und auf die Pathogenese der Metastasen. *Z. Krebsforsch.*, **36**, 399, 1932.
- 40) De Gäetani, G. F. und Blothner, E. : Ein Beiträge zur Geschwulsttransplantation mit ausgezähltem Zellenmaterial. *Z. Krebsforsch.*, **44**, 108, 1936.
- 41) Zeidman, I. & McCutcheon, M. et al : Factors Affecting Number of Tumor Metastases ; Experiments with Transplantable Mouse Tumor. *Cancer Res.*, **10**, 357, 1950.
- 42) Schmidt, M. B. : Die Verbreitungswege der Karzinome und die Beziehung Generalisierter Sarcome zu den Leukämischen Neubildung. Jena. G. Fischer, 1903.
- 43) Iwasaki, T. : Histological and Experimental Observations on Destruction of Tumor Cells in Blood Vessels. *J. Path. & Bact.*, **20**, 85, 1915.
- 44) De Ropp, R. S. & Mackenzie, D. : The Transplantation of Small Numbers of Tumor Cells. *Cancer Res.*, **14**, 588, 1954.
- 45) Engell, H. C. : Cancer Cells in Circulating Blood. ; Clinical Study on occurrence of Cancer Cells in Peripheral Blood and in Venous Blood Draining Tumour Area at Operation. *Acta Chir. Scandinav. Suppl.*, **201**, 9, 1955.
- 46) Schleip, K. : Zur Diagnose von Knochenmarkstumoren aus dem Blutbefunde. *Zschr. klin. Med.*, **59**, 261, 1906.
- 47) Marcus, H. : Krebszellen im Strömenden Blut ?. *Zschr. Krebsforsch.*, **16**, 217, 1919.
- 48) Quensel, U. : Zur Kenntnis des Vorkommens von Geschwulstzellen im Zirkulierenden Blute. *Upsala läk. rn. fören. förh.*, **26**, 1, 1921.
- 49) Jonescu, P. : Über das Vorkommen von Geschwulstzellen im Strömenden Blut von Tieren mit Impftumoren. *Zschr. Krebsforsch.*, **33**, 364, 1930.
- 50) Knox, L. C. : Relationship of Massage to Metastasis in Malignant Tumors. *Ann. Surg.*, **75**, 129, 1922.
- 51) Pool, E. H. & Dunlop, G. R. : Cancer Cells in Blood Stream. *Am. J. Cancer.*, **21**, 99, 1934.
- 52) Gray, S. J. & Mitchell, E. B. : Proceedings of the Soc. of Exper. Biology & Med., **51**, 403, 1942.
- 53) Moore, G. E. & Sandburg, A. et al : Clinical and Experimental Observations of the Occurrence and Fate of Tumor Cells in the Blood Stream, *Annals of Surgery*, **146**, 1957.
- 54) Fisher, E. R. & Turnbull, R. B. : Cytologic Demonstration and Significance of Tumor Cells in Mesenteric Venous Blood in Patients with Colorectal Carcinoma : *Surg., Gynec. & Obst.*, **100**, 102, 1955.
- 55) Malmgren, R. A. & Pruitt, J. C. et al : A Method for the Cytologic Detection of Tumor Cells in Whole Blood. *J. Nat. Cancer Inst.*, **20**, 1203, 1958.
- 56) 宇野広治他 : 血中癌細胞の固定に関する研究. 日本癌学会記事, 第10回総会, 15, 昭36.
- 57) 林 源信他 : 血中癌細胞に関する研究. 日本癌学会記事, 第20回総会, 16, 昭36.
- 58) 間島 進, 他 : 胃癌患者の血中癌細胞, ことに手術侵襲の影響について. 日本癌学会記事, 第20回総会, 16, 昭36.
- 59) Wakasa, K. et al : Cancer Cells in the Blood of Lung Cancer Patients, *Gann*, **51**, Suppl, 258, 1960.
- 60) Papanicolaou, G. N. & Traut, H. F. : Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. Cambridge, 1943.
- 61) Papanicolaou, G. N. : Atlas of Exfoliative Cytology. Cambridge, 1954.
- 62) Elson, L. A. & Lameter, L. F. : The Influence of Protein Content of the Diet on the Response of Walker Rat Carcinoma 256 to X Radiation. *Brit. J. Cancer*, **3**, 411, 1949.
- 63) Marie, P. & Clunet, J. : Frequence des Métastases Viscerales Chez les Souris Cancéreuses Après Ablation Chirurgicale de Leur Tumeur. *Bull. Assoc. franc. p. Létue du Cancer*, **3**, 19, 1910.
- 64) Tyzzer, E. E. : Factors in Production and Growth of Tumor Metastasis. *J. M. Research*, **28**, 309, 1913.
- 65) Tadenuma, K. & Okonogi, S. : Experimentelle Untersuchungen über Metastasen bei Mäusercarcinom. *Ztschr. f. Krebsforsch*, **21**, 168, 1924.
- 66) 川島芳子 : 腫瘍転移の研究V, C3H 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**, 3, 433, 1960.
- 67) Wood, F. C. : Diagnostic Incision of Tumors, *J. A. M. A.*, **73**, 764, 1919.
- 68) Coman, D. R. : Decreased Mutual Adhesiveness; A Property of Cells from Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.*, **4**, 625, 1944.
- 69) Lewis, M. R. & Cole, W. H. : Experimental Increase of Lung Metastases after Operative Trauma (Amputation of Limb with Tumor). *Arch. Surg.*, **77**, 621, 1958.
- 70) 池田一郎 : 未発表.