

新たに作製したラット腹膜転移モデルを用いた paclitaxel 腹腔内投与の効果に関する検討

西山厚子¹ 今野元博^{1,2} 佐藤隆夫³ 今本治彦¹ 安田卓司¹
塩崎 均¹

¹近畿大学医学部外科学教室 ²近畿大学医学部附属病院通院治療センター ³近畿大学医学部附属病院病理解剖部

抄 録

近年, taxane 系薬剤を用いた腹腔内化学療法について多くの報告がなされているが, その腹膜浸透距離を論じた論文はない。本研究では, 我々が新たに考案したラット腹膜転移モデルに paclitaxel を腹腔内投与し, その腹膜浸透距離を検討した。まず, Fischer 344 ラットの壁側腹膜を擦過した後に 1×10^6 個の RCN-9 細胞を腹腔内投与すると, 2週間後に厚さ約 1 mm の板状腹膜転移巣を形成するという, ラット腹膜転移モデルを樹立した。このラット腹膜転移モデルに paclitaxel の腹腔内投与 (60 mg/m^2) を施行した。paclitaxel の腹腔内投与は 1週間間隔で 3 回行い, 腹膜内投与後 0.5, 1, 2, 7 日で腹膜の採取を行った。採取した腹膜に通常の HE 染色を行い, 形成された板状転移巣の腫瘍厚を測定した。また TUNEL 法にて RCN-9 細胞の apoptosis を検出し, 腹膜転移巣表面から TUNEL 陽性 RCN-9 細胞が集簇して出現している部分までの距離をもって薬剤浸透距離とした。その結果, paclitaxel 1 回投与群では投与後 2 日で平均 $673 \mu\text{m}$ の浸透距離を認めた。またすべての観察時点において, paclitaxel 3 回投与群は 1 回投与群に比べ薬剤浸透距離は有意に浅くなった ($p < 0.01$)。本研究の結果, paclitaxel 腹腔内投与により腹膜表層の腫瘍細胞に apoptosis が誘導される事が判明し, paclitaxel の腹腔内投与による直接的な抗腫瘍効果が確認された。また厚さ約 $670 \mu\text{m}$ 以下の腹膜転移巣には paclitaxel 腹腔内投与による抗腫瘍効果が期待できると考えられた。

Key words: 胃癌, 腹腔内化学療法, 腹膜播種モデル, paclitaxel, 薬剤浸透距離

緒 言

多くの固形癌にとって腹膜転移は主な腫瘍進展形式のひとつであり, 予後が非常に不良である¹。腹膜転移は癌細胞が腹膜に播種したように転移し, すべての腫瘍を外科的に切除するのは困難であるため, 化学療法が行われる事が多い。その中でも抗癌剤を静脈投与する全身化学療法が主である。

しかし腹腔を 1 つの局所としてとらえた場合, より効果的な投与方法として, 局所である腹腔に直接抗癌剤を投与する治療法 (腹腔内化学療法) が成り立つ。この治療方法は特に婦人科領域で発展し, cisplatin や carboplatin, 5-FU などの薬剤を用いた様々な試みがなされてきた²⁻⁴。その結果, 米国では卵巣癌に対する標準治療法として, 腹腔内化学療法を含むレジメンが認められている⁵。しかし卵巣癌と

同様に再発形式として腹膜転移が高頻度である胃癌領域では, いまだ臨床研究の範疇を脱していない⁶。

近年, 腹膜転移を有する胃癌患者に対し taxane 系薬剤を用いた腹腔内化学療法を行い, 好成績を修めた報告が散見され^{7,8}, 当院においても奏効例を多数経験している⁹。全身化学療法では抗癌剤は腫瘍栄養血管を介し腫瘍細胞に運ばれるが³, 腹腔内化学療法は抗癌剤と腹腔内の腫瘍細胞が直接接触することにより効果を発揮する治療法である。その為, 腫瘍に対する薬剤の浸透距離が本治療の効果を決定する重要な鍵と言える。しかし, taxane 系薬剤を腹腔内投与した際における同薬剤の腫瘍浸透距離に関する報告はない。

一方 taxane 系薬剤の一種である paclitaxel は, 本邦では 1997 年から販売開始となった新規抗癌剤で, イチイ科の植物の針葉又は小枝から抽出, 半合

成されたタキソイドであり、微小管の蛋白重合を促進し微小管の安定化、過剰形成を引き起こす事で微小管の脱重合をおこし難くし、細胞分裂を阻害して抗腫瘍効果を示す抗悪性腫瘍剤である¹⁰。Jang ら¹¹は組織培養したヒト Xenograft tumor に paclitaxel を 120 nM という高濃度で作用させると、Xenograft tumor に高頻度の apoptosis を誘導すると報告している。

これらの知見を基に、本研究では我々が新たに考案したラット腹膜転移モデルに paclitaxel を腹腔内投与し、腫瘍細胞の apoptosis を指標に paclitaxel の腫瘍浸透距離を検討した。

材料と方法

実験動物と細胞

全ての動物実験手技は、NIH (the National Institutes of Health) の実験動物の管理と使用に関する指針に準じて施行し、近畿大学医学部動物実験委員会で承認された。実験動物は Fischer 344 ラット (8 週齢雄, 体重 154-180 g, 日本クレア株式会社, 東京) を用いた。飼育はクリーンラック内で室温 22°C, 湿度 50%, 12 時間明暗サイクルの条件下にて行った。飼料はラット飼育用固形飼料 (日本クレア株式会社, 東京) を与え、飼料用水は制限なく与えた。細胞は 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 誘発大腸癌株細胞である RCN-9¹² (理化学研究所 CELL BANK, 栃木) を使用した。培養液は 10% 牛胎仔血清 (FBS) 添加 RPMI-1640 を使用し, 37°C, 5% CO₂ の条件下で静置培養した。

実験 1: 腹膜転移モデルの作製

ラットにペントバルビタールを腹腔内投与 (37.5 mg/kg) し十分な麻酔を行った。まず腹部正中を 2 cm 切開し、滅菌綿棒にて右側壁側腹膜のみを器械的に擦過した後、創部を 4-0 vicryl (Ethicon, Somerville, NJ) にて閉創した。その後、RCN-9 細胞 1×10⁶/100 μl in PBS を滅菌済み 18G 針にてラットの腹腔内に注入した¹³。以上を転移モデル群とした。一方、手術操作は施行せず RCN-9 細胞 1×10⁶/100 μl in PBS の腹腔内投与のみを行ったものをコントロール群とした。

処置当日を 0 日とし、転移モデル群は 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 21 日後に、コントロール群は 14, 21 日後に屠殺し、肉眼的および組織学的に壁側腹膜における腹膜転移の有無について検討を行った。壁側腹膜は腹壁ごと採取し、直ちに 10% ホルマリン液にて固定した。

実験 2: paclitaxel 腹腔内投与モデルの作製 薬剤の調整

抗悪性腫瘍剤として paclitaxel (Taxol®: プリストルマイヤーズ株式会社, 東京, より供与) を用いた。Jang ら¹¹ は, paclitaxel は 12 nM の濃度では xenograft tumor に apoptosis を生じないが, 120 nM の濃度では xenograft tumor に有意に高頻度の apoptosis を生じると報告している。従って今回の検討では, 投与する paclitaxel の濃度を 120 nM とし, 生理食塩水を用いて調整した。また, 腹腔内に投与する paclitaxel の用量は, 卵巣癌に対して行われた第 I / II 相臨床試験^{14,15} において, 推奨用量は 60 mg/m²/week とされ, その後に引き続いて行われた第 III 相臨床試験⁵ でもこの用量が使用された事より, 今回の実験でも同様に 60 mg/m²/week とした。ラットの体表面積は Meeh's formula¹⁶ (body surface area (cm²) = 9.1 × [animal weight (g)]^{2/3}) を用いて算出した。

実験方法

同様の麻酔を行ったラットの腹部正中を約 2 cm 切開し、滅菌綿棒にて両側の壁側腹膜を擦過した後、創部を 4-0 vicryl (Ethicon, Somerville, NJ) にて閉創した。その後、RCN-9 細胞 1×10⁶ 細胞/100 μl in PBS を滅菌済み 18G 針にてラットの腹腔内に注入した。

図 1 に示すように、上記処置当日を 0 日として、paclitaxel を初回は 14 日後に、2 回目は 21 日後に、3 回目は 28 日後に 60 mg/m² の用量で腹腔内投与した。腹腔内投与 0.5 日後: A, 1 日後: B, 2 日後: C, 7 日後: D にペントバルビタールの過剰麻酔にて屠殺し検討した。つまり paclitaxel 腹腔内投与モデルには計 12 点の観察ポイントを設けた。壁側腹膜は腹膜転移モデルと同様に腹壁ごと採取し、直ちに 10% ホルマリン液にて固定した。

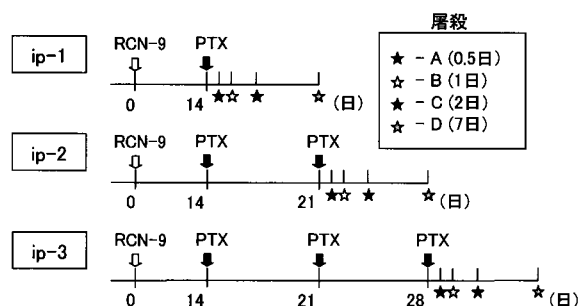


図 1 paclitaxel 腹腔内投与モデル作製プロトコル
腹腔内に RCN-9 細胞を投与した日を 0 日とし、14, 21, 28 日後に paclitaxel (PTX: 60 mg/m²) を腹腔内投与する。投与回数によりそれぞれ一回投与群 (ip-1), 2 回投与群 (ip-2), 3 回投与群 (ip-3) とし、各々最終投与から 0.5, 1, 2, 7 日後 (時点 A, B, C, D) に屠殺を行う。

組織学的検討

10%ホルマリンで24~48時間固定した腹膜は、パラフィン包埋後に4 μ mの切片を作製してHE染色を施行した。HE染色は、脱パラフィン後に浸水し、カラツィのヘマトキシリンで10分間染色、水洗、分別した後、エオジン染色液で4分間染色し、脱水、透徹、封入後に光学顕微鏡にて検鏡した。

また腫瘍細胞のapoptosisを検出するため、In situ Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ株式会社、滋賀)を用いたTUNEL法を施行した¹⁷⁾。TUNEL法は、標本をprotease K (400 μ g/ml)で8分間処理し、その後3% H₂O₂水溶液で5分間反応させ、TdT enzyme + labeling safe bufferで90分反応させた。次いでanti-FITC HRP conjugateと90分間反応させた後、発色を0.04% DABにて10~15分間行った。ヘマトキシリンで核染色、脱水、透徹、封入後に、光学顕微鏡にて検鏡した。各工程は室温で行い、工程間には0.01 M リン酸緩衝液 (PBS), pH 7.4による十分な洗浄を行った。

HEならびにTUNEL法を施行した標本から腫瘍部位を光学顕微鏡20倍視野で任意の2~9カ所選択し、その画像をCCDカメラ(NIKON DIGITAL SIGHT, DS-2Mv, ニコン, 東京)にてデジタル画像として取り込んだ。この際、切開創部および培養細胞移植部位に形成された腫瘍は除外した。

この画像を用いて腫瘍の厚さ (Tumor Depth: TD) ならびに薬剤浸透距離 (Drug Penetration: DP) を測定した。TDはHE標本で腫瘍が形成されている部分の腹膜中皮細胞もしくは腫瘍最表層部から、腫瘍最深部までを腫瘍の厚さとした。TUNEL法で標識される腫瘍細胞のapoptosisは表層部位に

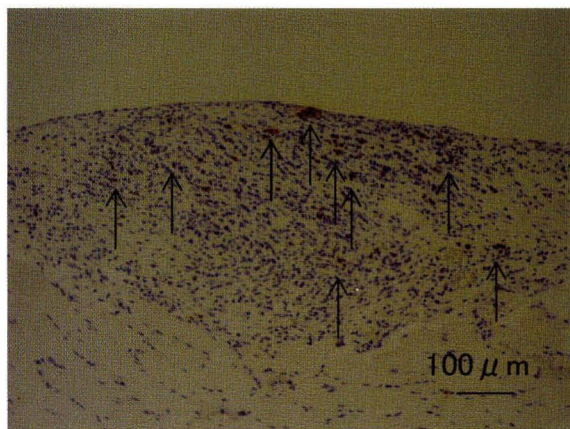


図2 TUNEL法によるapoptosis細胞の検出
腹腔内投与モデル, 1回投与群0.5日後の腹膜(ip-1-A)にTUNEL法を施行。核が褐色に濃染されたapoptosis細胞(矢印)は、腫瘍表層部位に多く、深層に進むにつれ減少した。

多く、深層に進むにつれapoptosis陽性腫瘍細胞の数は減少した(図2)。この結果に従い、DPを腹膜中皮細胞もしくは腫瘍最表層部からapoptosis細胞が4~5個集簇してみられる最深部までの距離とした。

さらに、TUNEL法を施行した標本で腫瘍の最表層部分で2カ所の一定面積(40,000 μ m²:深さ100 μ m×幅400 μ m)中の腫瘍細胞数を計測し、全腫瘍細胞におけるapoptosis細胞の割合を百分率で表示しapoptotic index (A.I.)とした。

両群において観察期間中に屠殺以外での死亡例はなかった。

統計処理

統計処理はMicrosoft® Excel X for Mac® (マイクロソフト, レッドモンド, ワシントン州)を用いANOVA-LSAにて解析を行った。データの表記は平均値±標準偏差で示し、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結 果

実験1: 腹膜転移モデル

肉眼所見

転移モデル群では擦過側腹膜に7日後よりごく薄い膜状の転移巣が確認され、14日後にはその転移巣は板状均一に増殖した(図3-a)。一方、非擦過側腹膜には14日後までは何ら変化は現れず、17日後に

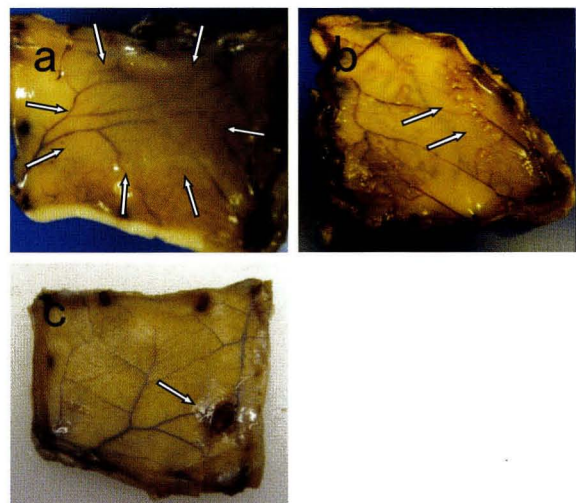


図3 腹膜転移モデルの結果: 肉眼所見

- a: 転移モデル群の擦過側腹膜(14日後)。板状均一な転移巣(矢印に囲まれた範囲)を形成している。
- b: 転移モデル群の非擦過側腹膜(17日後)。小結節状の転移巣(矢印)を形成している。
- c: コントロール群の腹膜(21日後)。RCN-9細胞注入部位のみ腫瘍(矢印)を形成している。

初めて小結節状の転移巣が確認された (図3-b)。
また17日以後には血性腹水の貯留がみられた。

コントロール群では14, 21日後とも RCN-9 注入部のみに腫瘍の形成を認めた (図3-c)。その他の腹膜に転移巣はみられなかった。

病理組織所見

転移モデル群擦過側腹膜では、1日後には、機械的に擦過された部位の中皮細胞は剝離し、基底膜が露出している部分が観察された (図4-a)。その他の残存する中皮細胞は反応性の腫大を示し、正常では菲薄な submesothelial layer¹⁸ は、腫瘍の存在しない部分で約40 μm の肥厚を呈していた (図4-b)。腫瘍細胞は腹膜表層に浸潤・増殖していた (図4-c)。7日後には腫瘍非存在部位では、腫大した腹膜中皮細胞下方の submesothelial layer は約90 μm まで肥厚し、腹膜に転移した腫瘍細胞の増殖は筋層にまで達していた (図4-d)。14日後では腫瘍非存在部位の submesothelial layer は約100 μm に肥厚し、ほとんどの腫瘍組織の厚さは約1000 μm に達していた (図4-e)。

一方、非擦過側では、腹膜中皮細胞の腫大は12日後に初めて明らかとなり、同時に submesothelial layer の肥厚 (約40 μm) を認め、14日後には腹膜表層部分に散在性に腫瘍細胞の接着が観察された (図4-f)。また17日後には小結節状の転移巣が腹膜表層に増殖していた (図4-g)。

コントロール群では腹膜中皮細胞の腫大や submesothelial layer の肥厚はいずれの観察点でも認

められなかった (図4-h)。

実験2：paclitaxel 腹腔内投与モデル 肉眼所見

全てのラットの両側壁側腹膜に板状転移巣が認められた (図5-a)。また、腹腔内に投与した paclitaxel 溶液は ip-1 と ip-2 の全観察ポイントと ip-3-A

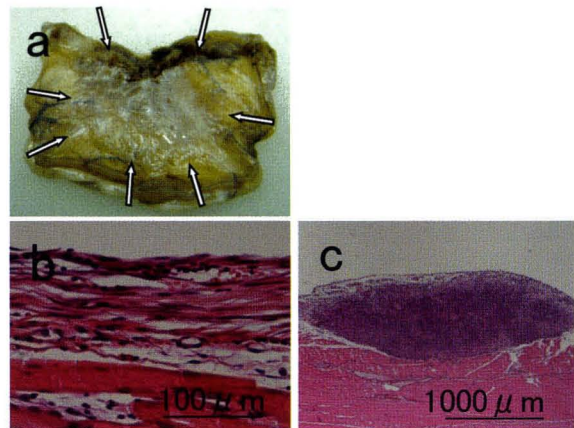


図5 paclitaxel 腹腔内投与モデルの結果：肉眼及び病理組織学的所見

a：1回投与群0.5日後 (ip-1-A) 肉眼所見。板状均一な転移巣 (矢印に囲まれた範囲) を形成している。

B：1回投与群0.5日後 (ip-1-A) 組織学的所見。腫瘍非存在部位の腹膜中皮細胞は腫大し、submesothelial layer は約100 μm の肥厚を呈している。

C：1回投与群0.5日後 (ip-1-A) 組織学的所見。腹膜の腫瘍細胞は筋層まで浸潤・増殖している。

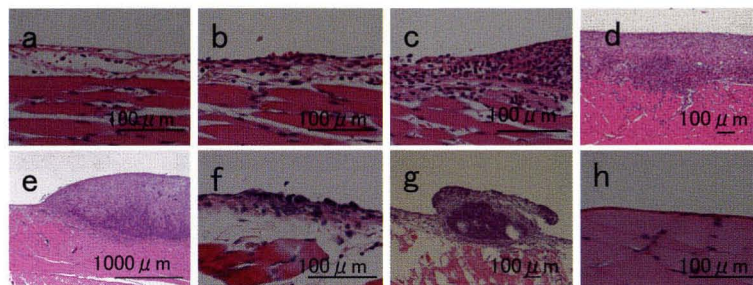


図4 腹膜転移モデルの結果：病理組織学的所見

a：転移モデル群の擦過側腹膜 (1日後)。擦過された部位では中皮細胞が剝離し、基底膜が露出している。

b：転移モデル群の擦過側腹膜 (1日後)。腫瘍非存在部位の中皮細胞は腫大し、submesothelial layer は約40 μm の肥厚を呈している。

c：転移モデル群の擦過側腹膜 (1日後)。腹膜中皮細胞下から submesothelial layer 浅層での腫瘍細胞増殖がみられる。

d：転移モデル群の擦過側腹膜 (7日後)。腹膜の腫瘍細胞の増殖は筋層まで達している。

e：転移モデル群の擦過側腹膜 (14日後)。播種巣の厚さは約1000 μm となっている。

f：転移モデル群の非擦過側腹膜 (14日後)。腹膜表層部分に散在性に腫瘍細胞の接着が観察される。また submesothelial layer に fibroblast like cell が認められる。

g：転移モデル群の非擦過側腹膜 (17日後)。小結節状の腫瘍細胞の転移が認められる。

h：コントロール群の腹膜 (21日後)。腹膜中皮細胞の反応や submesothelial layer の肥厚は認めない。

では吸収され残存していなかったが、ip-3-Bでは溶液が多量に残留していた。また ip-3-C, Dには血性腹水の貯留が認められた。

病理組織学的所見

ip-1-A以降の全ての観察ポイントにおいて腹膜中皮細胞は腫大し、submesothelial layerは約100 μmに肥厚していた(図5-b)。また腹膜転移部位の板状の腫瘍細胞は筋層まで浸潤していた(図5-c)。

図6に示すように、各群の腫瘍の厚さ(Tumor Depth: TD)の変化を経時的に観察すると、ip-1, ip-2においては時点A(ip-1: 838±303, ip-2: 854±303), 時点B(ip-1: 815±254, ip-2: 882±262)に比べ時点D(ip-1: 1191±378, ip-2: 1094±

231)では有意(p<0.01)に厚く、またip-3でも時点A(994±200)に比べ時点D(1153±355)では有意に厚く観察された(p<0.05)。

図7に示すように、各群の薬剤浸透距離(Drug Penetration: DP)の変化を経時的に観察すると、全ての群において時点C(ip-1: 673±142, ip-2: 562±170, ip-3: 461±113)は時点A(ip-1: 493±167, ip-2: 421±141, ip-3: 367±118), 時点B(ip-1: 591±167, ip-2: 423±163, ip-3: 375±139)と比べ有意(p<0.05)に深く、また全ての群において時点Dでは腫瘍にapoptosisを認めなかった。

また図8-aに示すように、TDをpaclitaxel投与

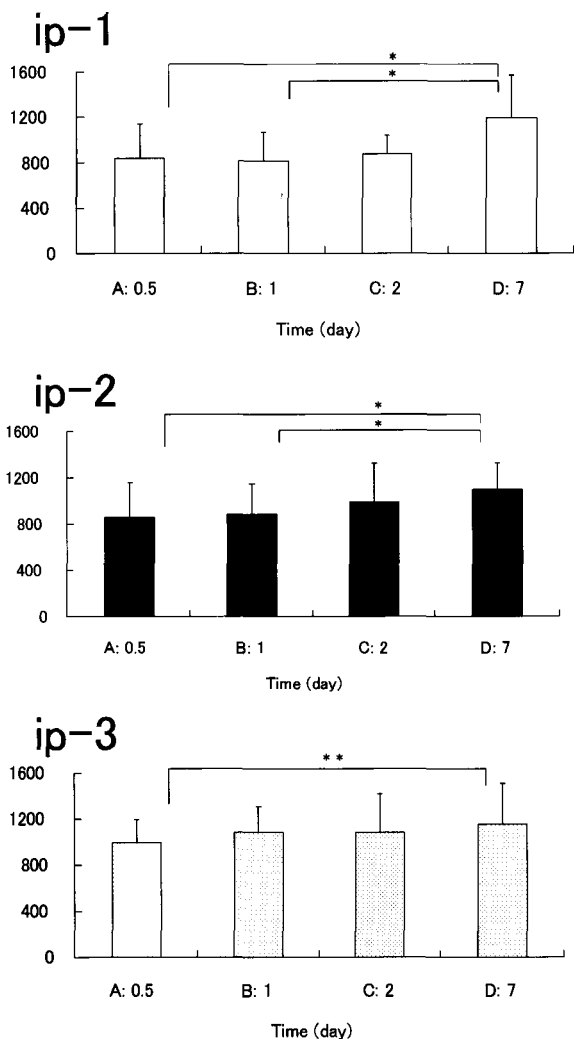


図6 paclitaxel 腹腔内投与モデルの各群における腫瘍の厚さ(Tumor Depth: TD)の経時的变化

1回投与群(ip-1)や2回投与群(ip-2), 3回投与群(ip-3)のいずれにおいても、TDは時点A(0.5日後)に比べ時点D(7日後)では有意に厚かった。(平均値±標準偏差, n=5) * : p<0.01, ** : p<0.05

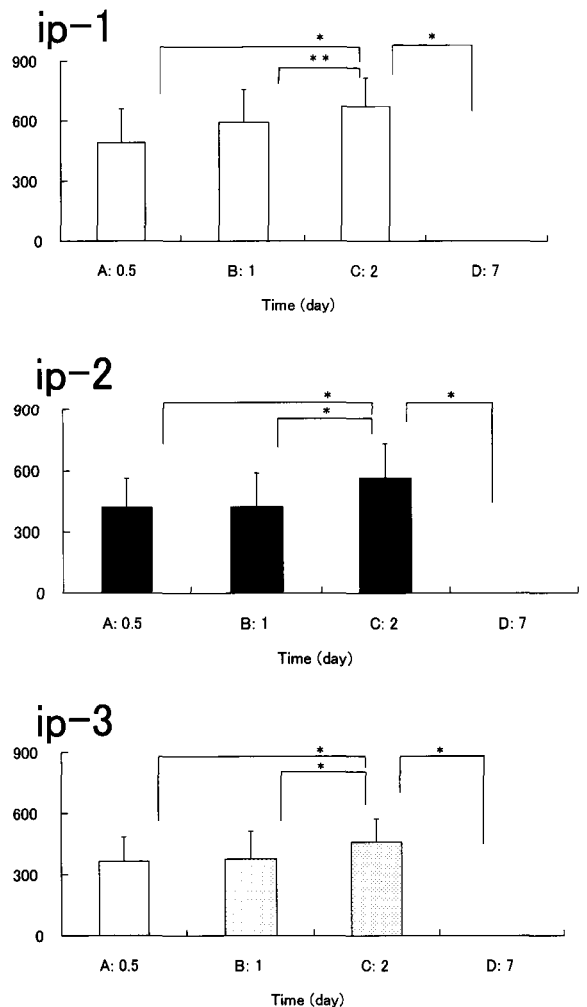


図7 paclitaxel 腹腔内投与モデルの各群における薬剤浸透距離(Drug Penetration: DP)の経時的变化

1回投与群(ip-1)や2回投与群(ip-2), 3回投与群(ip-3)のいずれにおいても、時点C(2日後)のDPは時点A(0.5日後), 時点B(1日後)のDPと比べ有意に深く、時点D(7日後)では腫瘍に有意なapoptosisを認めなかった。(平均値±標準偏差, n=5) * : p<0.01, ** : p<0.05

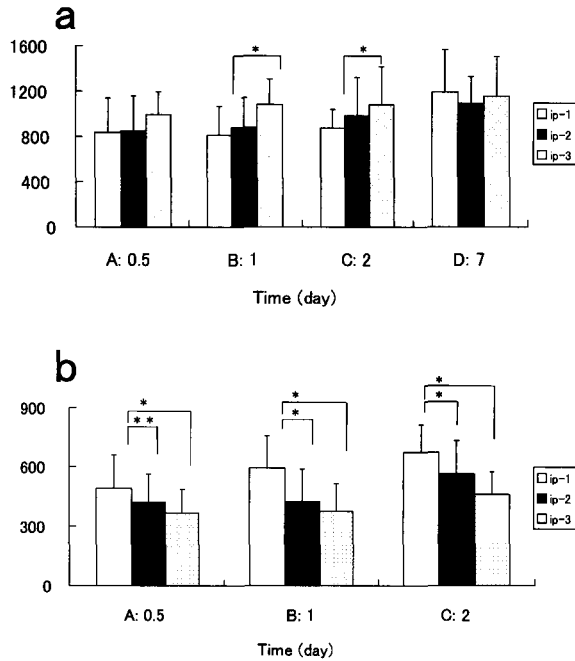


図8 paclitaxel 腹腔内投与モデルの各時点における腫瘍の厚さ (Tumor Depth : TD), 薬剤浸透距離 (Drug Penetration : DP) の腹腔内投与回数による比較
 a : 各時点における TD の群間比較. 時点B (1日後) と時点C (2日後) において, 3回投与群 (ip-3) の TD は1回投与群 (ip-1) の TD より有意に厚かった. (平均値±標準偏差, n=5) * : p<0.01
 b : 各時点における DP の群間比較. 全ての時点において, 1回投与群 (ip-1) の DP は2回投与群 (ip-2), 3回投与群 (ip-3) の DP と比べて有意に深かった. (平均値±標準偏差, n=5) * : p<0.01, ** : p<0.05

後の時間 (時点A, B, C, D) ごとに各群間で比較すると, 時点AとDでは各群間に有意差を認めなかったが, 時点BとCにおいては ip-3 の TD (時点B : 1085±226, 時点C : 1084±335) は ip-1 (時点B : 815±254, 時点C : 874±165) と比較して有意 (p<0.05) に厚く観察された. また図8-bに示すように, DPも paclitaxel 投与後の時間 (時点A, B, C, D) ごとに各群間で比較すると, どの時点でも ip-1 (時点A : 492±167, 時点B : 591±167, 時点C : 673±142) が ip-2 (時点A : 421±141, 時点B : 423±163, 時点C : 562±170), ip-3 (時点A : 367±118, 時点B : 375±139, 時点C : 461±113) に比べて有意に深く観察された (p<0.01 and 0.05).

図9に示すように, Apoptotic index を paclitaxel 投与後の時間 (時点A, B, C, D) ごとに各群間で比較すると, 各時点で ip-1 (時点A : 30.3±4, 時点B : 30.6±6, 時点C : 29.3±8) が ip-2 (時点A : 11.4±7, 時点B : 14.1±6, 時点C : 8.3±4),

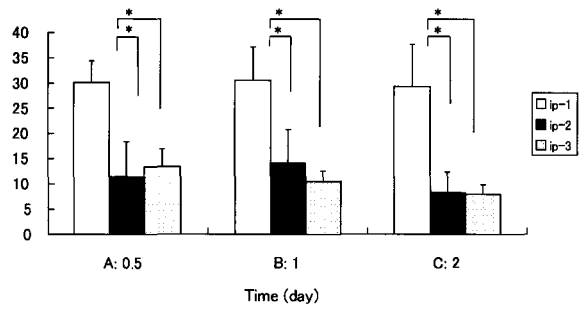


図9 paclitaxel 腹腔内投与モデルの各時点における全腫瘍細胞における apoptosis 細胞の割合 (apoptotic index : A.I.) の腹腔内投与回数による比較
 全ての時点において, 1回投与群 (ip-1) の A.I. は2回投与群 (ip-2), 3回投与群 (ip-3) の A.I. と比べて有意に高かった. (平均値±標準偏差, n=5) * : p<0.01

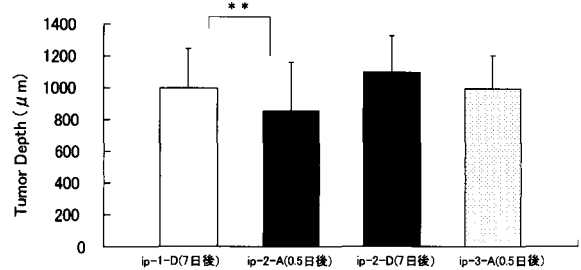


図10 paclitaxel の腹腔内投与回数と腫瘍の厚さ (Tumor Depth : TD) の変化
 2回投与群0.5日後 (ip-2-A) の TD は1回投与群7日後 (ip-1-D) の TD よりも有意に浅いが, 2回投与群7日後 (ip-2-D) と3回投与群0.5日後 (ip-3-A) の TD 間には有意な差を認めなかった. (平均値±標準偏差, n=5) ** : p<0.05

ip-3 (時点A : 13.4±3, 時点B : 10.5±2, 時点C : 8.2±1) に比べて有意に高かった (p<0.01).

また, 図10に示すように, paclitaxel の腹腔内投与を繰り返す事による TD の変化を観察する為 (p<0.05) に, ip-1-D, ip-2-A, ip-2-D, ip-3-A の TD を比較すると, ip-2-A (854±303) は ip-1-D (1191±378) よりも有意に浅いが, ip-2-D (1094±231) と ip-3-A (994±200) 間には有意な差を認めなかった.

考察

腹膜は一層の扁平な中皮細胞とその直下に存在する中皮下層 submesothelial layer により構成されている¹⁸. 腹膜転移の成立過程として, 癌細胞が腹腔内に達するか, もしくはそれ以前の段階で, 正常状態では扁平な中皮細胞が立方化し, 細胞間に間隙を持つ反応性中皮細胞と呼ばれる形態に変化する¹⁸. またそれと同時に submesothelial layer の肥厚が生じる¹⁸. 腹腔内に遊離した癌細胞は, この反応性中皮細

胞の間隙もしくは何らかの理由で中皮細胞が剝離し基底膜の露出した腹膜に接着し、それを足がかりに肥厚した submesothelial layer に浸潤・増殖すると考えられている¹⁸。

腹膜転移モデル動物^{19,20} はマウスを用いたものがほとんどであるが、マウスの腹膜は非常に薄く、腫瘍に対する薬剤の浸透距離測定が目的である本研究に用いることは困難であると判断した為、腹膜の比較的厚いラットを使用した。ラットの腹膜転移モデルには2件の報告^{13,21} が見いだされる。Los²¹ らは、WAG/Rij ラットに CC531 細胞を腹腔内投与すると約 4 週間後に腹膜転移を形成すると報告している。しかしこのラット及び細胞株は現在一般に流通しておらず、入手ならびに安定した供給が困難である。また Yanagi ら¹³ は、Fischer 344 ラットに RCN-9 細胞を腹腔内投与すると約 2 週間後に大網ならびに腸間膜に腹膜転移が生じるが、壁側腹膜に転移巣は形成されないとしている。我々もコントロール群として追試を行ったが、RCN-9 細胞は単に腹腔内投与するだけでは転移巣を形成する事はおろか、組織学的に中皮細胞ならびに submesothelial layer に変化を起こすことができない。癌細胞が腹膜へ接着する足がかりとなる中皮細胞並びに submesothelial layer の反応性変化を生じる事が出来ないという RCN-9 細胞の持つ性質が、壁側腹膜に転移巣が形成されない原因の 1 つではないかと考える。

一方、悪性腫瘍手術後に腹膜損傷部である腹部切開創に転移を形成することは我々も臨床的に経験する事であるし、また以前より同様の報告^{22,23} は多くなされている。これは前述の腹膜転移成立過程とも矛盾しない。これらの知見に基づき今回我々は、擦過することにより器械的に腹膜を損傷し、中皮細胞を剝離した状態、つまり癌細胞が腹膜に接着する足場を作成した Fischer 344 ラットに RCN-9 細胞を腹腔内投与した。その結果、2 週間で板状腹膜転移巣を形成するという新たなラット腹膜転移モデルの樹立に成功した。

この転移モデル群の非擦過側腹膜にも、投与 1 日後より腹膜中皮細胞は反応性に腫大し、細胞間隙が認められ、submesothelial layer の肥厚は日を追うごとに大きくなった。Yashiro ら²⁴ は、マウスの高播種株 D3 の培養上清のみをヌードマウスに腹腔内投与するだけで、腹膜中皮細胞の腫大と submesothelial layer の肥厚を認めたと報告している。我々の結果も擦過という操作による生体反応が paracrine 的に非擦過側の中皮細胞および submesothelial layer に影響をあたえていると推察された。

腹膜転移に対する抗悪性腫瘍薬の腹腔内投与は

1970年代頃より主に卵巣癌に対して開始され、以後様々な癌に対して試験が行われてきた²⁷。胃癌に対しては mitomycin C や 5-FU, cisplatin 等の腹腔内投与が行われてきた^{2,25,26} が、それらは分子量が小さくまた多くは水溶性であり、投与後早期に臓側腹膜や腸間膜から吸収され経門脈的に肝臓へ至る為²⁷、期待される効果が得られ難かった。しかし分子量が 853.92 と大きく脂溶性である paclitaxel は腹腔内投与時に腹腔内濃度を長時間高濃度で保つことが可能²⁸ であり、腹腔内化学療法に適した薬剤であるといえる。

腹腔内化学療法が経静脈的な全身化学療法に比べて腹膜に転移した癌細胞に対する効果が優れている理由として、経静脈的投与方法と比較して薬物血中濃度一時間曲線下面積 (AUC: area under the blood concentration time curve) にして約 1000 倍の濃度の薬剤と癌細胞が直接接触する事があげられる²⁸。これは腹腔内に遊離する癌細胞はもちろん、腹膜に接着し増殖している癌細胞にも大きな影響を及ぼす。しかし腹膜上の癌細胞はその増殖に伴い腹膜深層へ進展する。腹腔内に遊離している癌細胞と、腹膜表層部分に存在する癌細胞は腹腔内に散布された抗癌剤と直接接触してその影響を受けるが、腹膜深層に存在する癌細胞は抗癌剤が浸透しない限り、抗癌作用を被ることはない。

一般に、腹腔内に投与された抗癌剤は(1)腫瘍表面から腫瘍組織へ直接浸透することにより、また(2) submesothelial layer の毛細血管から吸収され、腫瘍栄養血管を經由して腫瘍内部へ散布する事により作用を発揮すると考えられている²⁹。しかし前述したように最も重要な作用発揮因子は腫瘍表面からの薬剤の浸透である。

抗癌剤の腹膜浸透距離に関してはいくつかの報告^{21,30,31,32} がある。Ozols ら³⁰ は、腹膜転移させたマウスに蛍光性を持つ doxorubicin を腹腔内投与し、その腹膜を蛍光顕微鏡で観察し核が蛍光を呈する細胞を測定する事で、4~6 cell layers の浸透距離であったと報告した。また West ら³¹ は、ヒト骨肉腫細胞のコロニーを用いて、放射性同位体でラベルされた methotrexate を投与した後にオートラジオグラフィを撮影することで、浸透距離は 250 μm であったと報告した。同様に、平林ら³² は腹腔内に吉田肉腫を移植したラットに、放射性同位体でラベルした 5-FU を腹腔内投与し、経時的にマイクロラジオオートグラフィで観察する事で、最大 2-2.5 mm の浸透距離があると報告した。さらに Los ら²¹ は、腹膜転移させたラットに白金製剤である carboplatin 及び cisplatin を腹腔内投与し、白金の濃度を測定でき

る特殊なレントゲン機器を用いて腹膜を観察し、薬剤浸透距離を測定した。これによると、cisplatinの方が薬剤浸透に優れており、1~1.5 mmであったと報告している。

しかし腹腔内投与した paclitaxel の腹膜下組織への浸透距離についての研究は、現在のところ皆無であり、本論文が初めての報告である。また、Jangら¹¹は組織培養したヒト xenograft tumor に paclitaxel を作用した場合、12 nM の濃度では xenograft tumor に apoptosis を誘導しないが、120 nM をいう高濃度で作用すると高頻度の apoptosis を生じると報告している。この報告をもとに我々は同じ 120 nM の濃度の paclitaxel を腹腔内投与し、腫瘍の腹膜中皮細胞もしくは最表層部から apoptosis 細胞が集簇してみられる最深部までの距離を薬剤浸透距離であると定め測定した。TUNEL 法で標識された腫瘍細胞の apoptosis は、腫瘍の深層に及ぶにつれ減少した。これは腫瘍深層になるにつれ腹腔内に投与した paclitaxel の影響が低下している現れと考えられた。また、本手法は抗腫瘍効果が認められた癌細胞を指標に測定するという、より厳密な手法にて測定した薬剤浸透距離である。これと同様の方法での報告は今までになく、過去の報告より正確な測定方法と考える。

今回の実験では、図6で示す様に、paclitaxel 投与回数にかかわらず時点Aと比較し時点Dでは腫瘍の厚さ (Tumor Depth: TD) の増大を認めた。これは paclitaxel の抗腫瘍効果が7日間という長期間は持続しない事を伺わせた。また図7で示す様にいずれの群においても時点C、つまり腹腔内投与2日後に薬剤浸透距離 (Drug Penetration: DP) が最も深く観察された。一般に抗癌剤が腫瘍に触れてから apoptosis が最もおこるのは24時間後と言われている³³。Jangら¹¹は組織培養したヒト xenograft tumor に120 nM の paclitaxel を作用させた場合、paclitaxel は48時間後に xenograft tumor 全体に浸透し、24時間後には約30%、72時間後には約50%の腫瘍細胞が apoptosis を呈するとしている。薬剤浸透距離を apoptosis により推察した今回の実験において、2日後 (48時間後) に最長浸透距離が得られた理由として、経静脈的に投与した場合と比較して高濃度の paclitaxel が腫瘍に浸透するのに時間を要した可能性が考えられる。今後観察ポイントを増やした実験、また腹腔内ならびに血漿中の薬剤濃度を測定する事が必要である。しかしいずれにせよ、投与7日後である時点Dにおいて apoptosis はみられず、TD の増大をあわせて考慮すると、腹腔内投与された paclitaxel が効果を発揮する時間には限り

があるものと考えられた。

また、図8-bに示すように、腹腔内投与を繰り返し施行するとABCどの時点においても、初回に比して2、3回目の腹腔内投与後のDPは有意に減少した。図9で示すように、全腫瘍細胞における apoptosis 細胞の割合 (apoptotic index: A.I.) も同様に、どの時点においても初回に比して2、3回目では有意に減少した。さらに図10で示す様に、2回目の腹腔内投与を行う事で、TDはip-1-Dに比してip-2-Aでは有意に減少していたが、3回目の腹腔内投与後には同様の変化は観察されなかった。paclitaxel に対する耐性を獲得する機序の1つとして、Duanら³⁴はヒト卵巣癌の細胞株であるSKOV-3に paclitaxel を高用量で長時間、繰り返し投与する事により paclitaxel に耐性を示すSKOV-3TR細胞を確立した。このSKOV-3TRはSKOV-3と比較してTRAG-3 (Taxol Resistance Associated Gene-3) を過剰発現していると報告している。我々の検討でも同様に薬剤耐性の機序が働いた可能性が考えられる。つまり、これらは腹腔内投与を繰り返し施行する事の限界を現していると考えられる。加えて、腹腔内投与を施行した場合、DPの範囲内の腫瘍細胞はダメージを受けるが、DPより深い部分に存在する腫瘍細胞はダメージを受ける事なく、後に増大すると考えられる。よって複数回の腹腔内化学療法を行っても、DPがTDを上回るような薬剤濃度設定、投与方法の工夫を行わなければ腫瘍全体に薬剤が到達することはなく、腹腔内化学療法のみでは十分な治療効果が得られるとは言いがたい。つまり腹腔内化学療法単独での治療効果を得るためには、腹腔内腫瘍のサイズが大きな影響を与えると考えられた。

結 語

腹腔内化学療法の使用薬剤として有用であるとされている paclitaxel の転移腫瘍組織における薬剤浸透距離を新たに樹立したラット腹膜転移モデルを用いて測定した。その薬剤浸透距離は初回腹腔内投与時に最大を示し、平均 $673 \pm 142 \mu\text{m}$ であった。しかしTDは paclitaxel の投与回数を重ねても増大した。これは paclitaxel の影響が及ばなかったDP以深の腫瘍細胞の増大が関与していると推察される。つまり腹腔内化学療法単独での治療効果は、腹腔内腫瘍のサイズに大きく左右されると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、始終御助言をいただきました近畿大

学病理学教室伊藤龍生博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究にご協力いただきました近畿大学ライフサイエンス研究所渡辺信介氏、水口信行氏、江川賢太郎氏、山中重明氏ならびに近畿大学外科学教室の先輩諸氏、実験助手の鎌田房子女士に心から感謝致します。

文 献

1. Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC (1989) Peritoneal carcinomatosis in non-gynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer* 63: 364-367
2. Reichman B, Markman M, Hakes T, Kemeny N, Kelsen D, Hoskins W, Rubin S, Lewis JL Jr (1988) Phase I trial of concurrent intraperitoneal and continuous intravenous infusion of fluorouracil in patients with refractory cancer. *J Clin Oncol* 6: 158-162
3. Polyzos A, Tsavaris N, Kosmas C, Giannikos L, Katsikas M, Kalahanis N, Karatzas G, Christodoulou K, Giannakopoulos K, Stamatiadis D, Katsilambros N (1999) A comparative study of intraperitoneal carboplatin versus intravenous carboplatin with intravenous cyclophosphamide in both arms as initial chemotherapy for stage III ovarian cancer. *Oncology* 56: 291-296
4. Terauchi F, Moritake T, Yamamoto Y, Ogura H (2002) Combination chemotherapy with paclitaxel and intraperitoneal cisplatin for ovarian cancer with disseminated lesions in the peritoneum and the diaphragm. *Int J Clin Oncol* 7: 356-360
5. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA; Gynecologic Oncology Group. (2006) Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 354: 34-43
6. 伏田幸夫, 藤村 隆, 福島紀雅, 梨本 篤, 加治正英, 廣野靖夫, 山口和也, 種村廣巳, 今野元博, 辻谷俊一, 栗田信浩, 渡部祐司, 栗田 啓, 合田文則, 太田哲生 (2007) 胃癌腹膜播種に対する S-1 併用 Docetaxel 腹腔内投与の多施設第 I/II 相臨床試験. *癌と治療* 34: 1942-1945
7. Tamura S, Miki H, Nakata K, Takiuchi D, Okada K, Nakahira S, Okamura S, Sugimoto K, Tomita N, Takatsuka Y (2007) Intraperitoneal administration of paclitaxel and oral S-1 for a patient with peritoneal dissemination and hydronephrosis due to advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 10: 251-255
8. Fushida S, Kinoshita J, Yagi Y, Funaki H, Kinami S, Ninomiya I, Fujimura T, Nishimura G, Kayahara M, Ohta T (2008) Dual anti-cancer effects of weekly intraperitoneal docetaxel in treatment of advanced gastric cancer patients with peritoneal carcinomatosis: a feasibility and pharmacokinetic study. *Oncol Rep* 19: 1305-1310
9. 今野元博, 安田卓司, 平井紀彦, 新海政幸, 彭 英峰, 安田 篤, 白石 治, 武本智樹, 清川厚子, 岩間 密, 中森康浩, 今本治彦, 伊藤龍生, 佐藤隆夫, 奥野清隆, 塩崎 均, 大柳治正 (2007) スキルス胃癌腹膜播種陽性症例に対する Paclitaxel 腹腔内投与と逐次 S-1+Weekly Paclitaxel 併用療法. *消化器科* 45: 169-175
10. Diaz JF, Andreu JM (1993) Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* 32: 2747-2755
11. Jang SH, Wientjes MG, Au JL (2001) Determinants of paclitaxel uptake, accumulation and retention in solid tumors. *Invest New Drugs* 19: 113-123
12. Inoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K (1991) A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response. *Jpn J Cancer Res* 82: 90-97
13. Yanagi K, Ohshima N (1996) Angiogenic vascular growth in the rat peritoneal disseminated tumor model. *Microvasc Res* 51: 15-28
14. Francis P, Rowinsky E, Schneider J, Hakes T, Hoskins W, Markman M (1995) Phase I feasibility and pharmacologic study of weekly intraperitoneal paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group pilot Study. *J Clin Oncol* 13: 2961-2967
15. Markman M, Brady MF, Spirtos NM, Hanjani P, Rubin SC (1998) Phase II trial of intraperitoneal paclitaxel in carcinoma of the ovary, tube, and peritoneum: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 16: 620-624
16. Meeh K (1879) Oberflächen Messungen des Menschlichen Körpers. *Z Biol* 15: 425-430
17. Tornusciolo DR, Schmidt RE, Roth KA (1995) Simultaneous detection of TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)-positive cells and multiple immunohistochemical markers in single tissue sections. *Biotechniques* 19: 800-805
18. 今野元博 (1995) 腫瘍性および炎症性反応中皮細胞の実験的形態学的研究. *近畿大医誌* 20: 105-119
19. Yashiro M, Chung YS, Nishimura S, Inoue T, Sowa M (1996) Peritoneal metastatic model for human scirrhous gastric carcinoma in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 14: 43-54
20. Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T (2006) A photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res* 66: 7532-7539
21. Los G, Verdegaal EM, Mutsaers PH, McVie JG (1991) Penetration of carboplatin and cisplatin into rat peritoneal tumor nodules after intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 28: 159-165
22. Hughes ES, McDermott FT, Polglase AL, Johnson WR (1983) Tumor recurrence in the abdominal wall scar tissue after large-bowel cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 26: 571-572
23. Reilly WT, Nelson H, Schroeder G, Wieand HS, Bolton J, O'Connell MJ (1996) Wound recurrence following conventional treatment of colorectal cancer. A rare but perhaps underestimated problem. *Dis Colon Rectum* 39: 200-207

24. Yashiro M, Chung YS, Nishimura S, Inoue T, Sowa M (1996) Fibrosis in the peritoneum induced by scirrhous gastric cancer cells may act as "soil" for peritoneal dissemination. *Cancer* 77 : 1668-1675
25. Hagiwara A, Takahashi T, Kojima O, Sawai K, Yamaguchi T, Yamane T, Taniguchi H, Kitamura K, Noguchi A, Seiki K (1992) Prophylaxis with carbon-adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. *Lancet* 14 : 629-631
26. Tsujitani S, Okuyama T, Watanabe A, Abe Y, Maehara Y, Sugimachi K (1993) Intraperitoneal cisplatin during surgery for gastric cancer and peritoneal seeding. *Anticancer Res* 13 : 1831-1834
27. Sugarbaker PH, Cunliffe WJ, Belliveau J, de Bruijn EA, Graves T, Mullins RE, Schlag P (1989) Rationale for integrating early postoperative intraperitoneal chemotherapy into the surgical treatment of gastrointestinal cancer. *Semin Oncol* 16 : 83-97
28. 今野元博, 安田卓司, 今本治彦, 塩崎 均, 大柳治正 (2008) 腹膜播種 化学療法 : 抗癌剤腹腔内投与・全身化学療法併用療法. *日本臨床* 66 : 596-602
29. Fujiwara K, Armstrong D, Morgan M, Markman M (2007) Principles and practice of intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 17 : 1-20
30. Ozols RF, Locker GY, Doroshow JH, Grotzinger KR, Myers CE, Young RC (1979) Pharmacokinetics of adriamycin and tissue penetration in murine ovarian cancer. *Cancer Res* 39 : 3209-3214
31. West GW, Weichselbaum R, Little JB (1980) Limited penetration of methotrexate into human osteosarcoma spheroids as a proposed model for solid tumor resistance to adjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 40 : 3665-3668
32. 平林光司 (1989) 腹腔内投与. *癌と化療* 16 : 180-186
33. Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK (1999) Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 5 : 1876-1883
34. Duan Z, Feller AJ, Toh HC, Makastorsis T, Seiden MV (1999) TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line. *Gene* 229 : 75-81