

研 究

ウサギ VX 2 舌癌におけるシスプラチンの  
組織内蓄積量と血管構築との関連性

藤澤 完爾

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任 : 工藤 啓吾 教授)

(受付 : 1998年12月22日)

(受理 : 1999年1月8日)

**Abstract :** To investigate the effect of cisdiammine-dichloroplatinum (cisplatin, CDDP) on rabbit VX 2 tongue cancer, the relationship between the amount of CDDP accumulation in the tissue after CDDP administration by particle induced X-ray emission (PIXE) and the morphological changes of blood vessels was explored.

VX 2 cancer cells were transplanted into the marginal region of tongues of male Japanese white rabbits. On 3, 7 and 14 days after transplantation of cancer cells, 4 mg of CDDP was administered via the auricular vein once a day for various periods of one time, 3 times for 3 consecutive days and 5 times for 5 consecutive days. The animals were sacrificed 24 hours after the end of each administration period. The tongues, deep cervical lymph nodes and kidneys were removed and embedded in paraffin according to the common procedure used to prepare serial sections of 30  $\mu\text{m}$  and 5  $\mu\text{m}$  thickness alternately. The 30  $\mu\text{m}$  sections were used to determine the CDDP accumulation by PIXE and the 5  $\mu\text{m}$  sections were used to measure the ratio of blood vessel per area, the number of blood vessels and tongue tumor volume.

The accumulation of CDDP, ratio of blood vessels area and number of blood vessels increased during the period from 3 days to 7 days after transplantation as the tumors grew. However, they decreased on 14 days after transplantation because of necrosis in the central part of tumors. The increases of CDDP accumulation inhibited the increasing tendency of tumor volume. The half-life of CDDP accumulation was estimated to be about 1 day after administration. The accumulation of CDDP in the deep cervical lymph nodes increased with the times of administration, although no morphological change in the blood vessels was observed. The CDDP accumulation in the kidneys also increased with the times of administration without any change of blood vessels, although atrophy of the glomeruli and dilatation of the urinary tubules were observed.

Thus, the accumulation of CDDP was associated with increases and decreases in the ratio of blood vessels per area and the number of blood vessels in the tongue tumors. However, such a relationship was not explicit in the lymph nodes and kidneys.

**Key words :** rabbit VX 2 tongue cancer, cisplatin, particle induced X-ray emission, kidney toxicity, tumor vessel

---

Relationship between the amount of accumulation of cisplatin and the architecture of blood vessels in rabbit VX 2 tongue cancer

Kanji FUJISAWA

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 24 : 1-15, 1999

## 緒 言

近年、頭頸部悪性腫瘍に対する化学療法として白金系抗癌剤である Cisplatin<sup>1)</sup> の適応例が増加する傾向にある。本薬剤は DNA 二重鎖構造に直接作用し、クロスリンクを形成して DNA の合成阻害作用を引き起こすことにより抗腫瘍作用をもたらす<sup>2)</sup>。その抗腫瘍効果は用量および時間依存性<sup>3)</sup>であることから、組織内濃度もきわめて重要な因子であると考えられる。これまでも Cisplatin の抗腫瘍効果を期待して局所濃度を高める目的で、動注化学療法<sup>4)</sup> や温熱化学療法<sup>5, 6)</sup>などが検討され、その有効性が明らかにされつつある。さらに薬剤輸送路としての血管、あるいは腫瘍血管の特殊性について種々の追究がなされ、抗癌剤投与後には腫瘍血管の透過性<sup>7-10)</sup>が亢進することも明らかにされている。しかし Cisplatin 投与後には腎機能障害をきたしやすいことから用量が制限されるなど、副作用を十分に考慮する必要がある。

抗癌剤の組織内濃度に関しては、原子吸光法<sup>4, 5, 11, 12)</sup>や高速ガスクロマトグラフィーによる Cisplatin 量の計測が行われ、Cisplatin 連続投与による組織内濃度の上昇<sup>12)</sup>が確認されているものの組織内濃度の測定方法や薬剤の投与方法については必ずしも一致した見解が得られていない。従来の組織内濃度の測定には瀉血が施行されていないため、血液成分が含まれており、真の Cisplatin 組織内濃度を測定しているとは考えがたい。

本研究ではウサギ VX 2 舌癌を用いて血管から舌腫瘍、深頸リンパ節および腎臓へと移行する Cisplatin の瀉血後の組織内蓄積量を Particle Induced X-ray Emission (PIXE) 法<sup>13)</sup>によって計測し、併せて腫瘍組織における血管形態の変化、血管面積率と血管数および腫瘍体積との関連性について検索した。

## 材料および方法

## 1. 実験材料

## 1) 実験動物

実験動物には体重約 3 kg の日本白色種雄性ウサギ (日本エスエルシー) 36 匹を用いた。動物を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎 (室温: 23±2°C, 湿度: 55±5%) にて 1 週間の予備飼育を行い、全身状態および口腔内に異常がないことを確認してから実験に用いた。

## 2) 実験腫瘍

VX 2 癌細胞はウサギに可移植性であり、ヒト扁平上皮癌に類似した組織型を有する。VX 2 癌細胞は岩手医科大学口腔外科学第一講座にて 1993 年より累代移植されているものを使用した。

## 3) 使用抗癌剤

Cisplatin (日本化薬ランダ®; Cisdichlorodiammineplatinum, 以下 CDDP と略す) は、通常、体内には存在しない白金元素を分子構造内に有している。

## 2. 実験方法

## 1) 腫瘍の移植

VX 2 癌細胞の舌への移植は伊藤ら<sup>14)</sup>の方法に準じて行った。実験群には VX 2 癌細胞浮遊液 (細胞数 5 × 10<sup>5</sup> 個) をウサギの舌体前方 1 / 3 の左側辺縁部で、舌粘膜表面から約 3 mm 深層の筋層内に移植した。なお、非移植群には腫瘍細胞浮遊液が移植されていないウサギを用いた。

## 2) 薬剤の投与

麻酔には Pentobarbital sodium (ダイナポット) 10 mg/kg をウサギ耳静脈に注入した。

CDDP は 4 mg を生理食塩水 (扶桑) 20 ml に溶解し、VX 2 癌細胞移植後、3 日目、7 日目、14 日目から 1 日 1 回投与 (以下 1 回投与と略す)、1 日 1 回の 3 日間連日投与 (以下 3 回投与と略す)、および 5 日間連日投与 (以下 5 回投与と略す) した (Fig. 1)。非移植群にも同様の投与を行った。CDDP の投与量は予備実験において検出可能であった 4 mg を基準とし、5 回投与を想

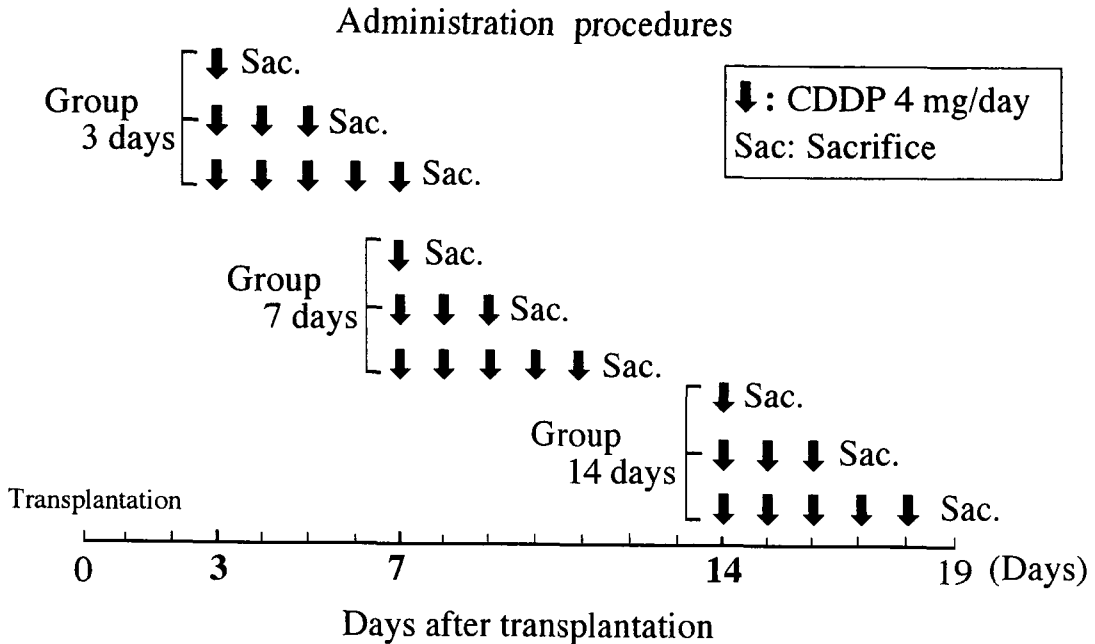


Fig. 1. The time table for CDDP administration and sacrificing to each tumor transplant group.

定した。薬剤はシリンジポンプ（テルモ社製）を用いてウサギ耳静脈から20 ml/hの速度で注入した。非移植群および移植群はそれぞれ3匹ずつ、計36匹を使用した。

### 3) 墨汁注入標本の作製

CDDP 最終投与の24時間後、Pentobarbital sodium (25 mg/kg) をウサギ耳静脈に注入し、静脈内麻酔を施行した。開胸後、頭頸部の瀉血のために心尖よりカテーテルを上行大動脈まで挿入した。同時に腎臓の瀉血のために胸大動脈にカテーテルを尾方に向けて挿入し、右心耳に切開を加えた。瀉血はヘパリン加生理食塩水1000 mlを用いて110 mmHg 圧で行い、その後5%中性緩衝ホルマリンにて15分間の灌流固定を施した後、墨汁を110 mmHg 圧で注入した。注入は右心耳より墨汁が流出するまで行った。総頸動脈、外頸静脈、内頸静脈を結紮後、直ちに断頭を行い、頭頸部を10%中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定した。腎臓は腎動静脈を結紮した後に摘出し、同様に固定した。固定後、頭頸部より舌および深頸リンパ節を摘出し、腎臓とともに

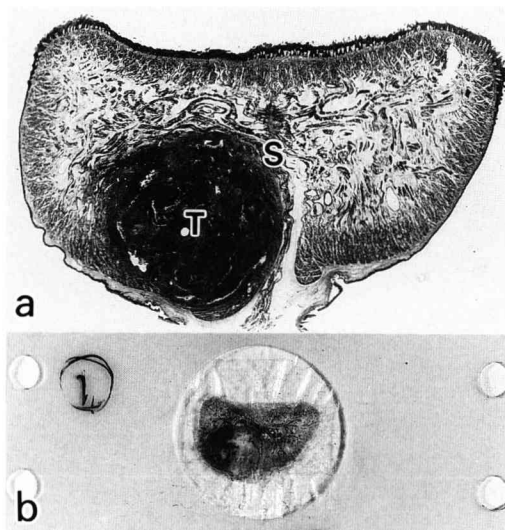
通法に従ってパラフィンに包埋した。

腫瘍の中心に近い部位の試料は組織構造の観察と元素分析のために、それぞれ5 μm厚と30 μm厚の切片を交互に連続前額断し作製した。

### 4) PIXE による元素分析

PIXE 分析には日本アイソトープ協会、仁科記念サイクロトロンセンターにある医療用小型サイクロトロン（島津製作所 MCY-1750）を用い、CDDP の構造式中にある白金を標的要素とした。

試料の調整はターゲットホルダーの枠内に糊付けした厚さ4 μmポリプロピレンバックリング膜上に30 μmパラフィン切片を貼付した (Fig. 2 a, b)。定量分析はSeraら<sup>15)</sup>の方法に準じ、無標準定量法を用いた。サイクロトロンにより加速された2.9 MeVの陽子ビームは、幅3 mmのコリメーターを通過後、試料に照射されたが、発生した特性X線は2台のSi(Li)検出器(ORTEC)により、低エネルギーと高エネルギー領域に分けて測定された<sup>13)</sup>。スペクトル解析および定量解析には、Sera and Futatsugawa<sup>16)</sup>により開発された



**Fig. 2.** The serial section specimens of rabbit tongue.

The 5  $\mu\text{m}$  section (a) was stained with HE to check of the tumor position, whereas the 30  $\mu\text{m}$  section (b) was used for PIXE analysis.

T: Tumor S: Lingual septum

コンピューターコード“SAPIX”によるパーソナルコンピューターを使用した。

予備実験として行った CDDP 非投与ウサギでは舌、深頸リンパ節、腎臓から白金の検出は認められなかった。

#### 5) 光学顕微鏡による観察

定量分析を行った 30  $\mu\text{m}$  切片の隣接 5  $\mu\text{m}$  切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、PIXE の測定範囲を検鏡した。

舌の腫瘍体積( $\text{mm}^3$ )はヘマトキシリン・エオジン染色標本から幅径×前後径×厚径を計測し、このうち前後径については再構築画像から計測した。深頸リンパ節の体積( $\text{mm}^3$ )は長径、短径および厚径をノギスで計測し、算出した。

血管面積は元素分析を行った部位に相当するヘマトキシリン・エオジン染色標本の10倍の拡大像から血管壁を含めて測定し、組織に対する血管面積率を求めた。血管数は血管面積測定部位から算出した。

組織像は光学顕微鏡 (Nikon ECLIPS E800)

を通して Power Macintosh G3 に入力後、Adobe Photoshop ver. 4.0 にて画像処理を施した。総血管面積率および総血管数は NIH Image を用いて測定した。

#### 6) 統計処理

各組織における CDDP 蓄積量と血管面積率および血管数の測定結果は平均値±標準偏差で示した。相関関係は統計用ソフト Stat View-J 4.5 (ABACUS Concept) を用い、危険率10%で Fisher's test を行った。

## 結 果

### 1. 舌、深頸リンパ節および腎臓の組織変化

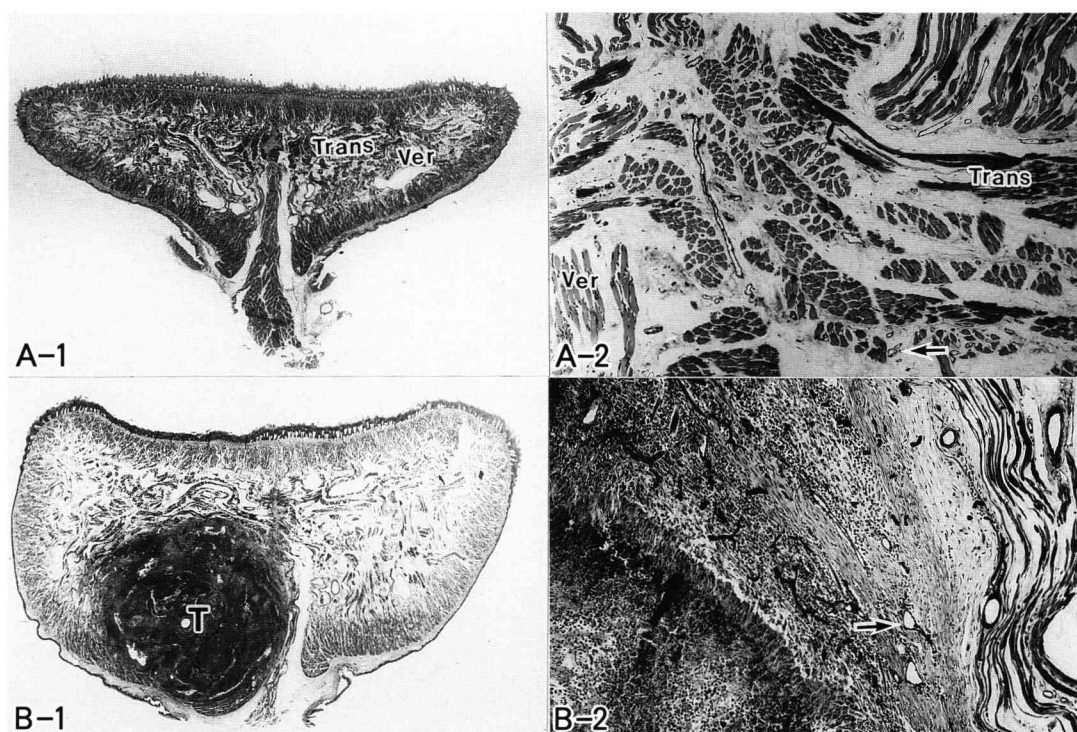
#### 1) 舌

##### (1) CDDP 1回投与群

非移植群の舌における癌細胞移植相当部の組織像では、横舌筋、垂直舌筋筋束の斜断面および横断面が観察された。これらの筋束周囲に巻き付くように螺旋状走行を示す毛細血管が内筋周膜内から一部筋内膜に走行していた。毛細血管の直径は10  $\mu\text{m}$ 前後で、予備実験の生理食塩水投与群と比較しても、特に変化を示さなかった (Fig. 3 A-1, A-2)。

移植後3日目に CDDP を1回投与した群では舌粘膜表面に変化を認めず、また明らかな硬結も触れなかった。腫瘍は縦舌筋の内筋周膜内に筋束を圧迫するように腫瘤状を呈していた。腫瘍塊周囲にはほとんど新生血管が認められず、内筋周膜および筋内膜の既存血管の拡張が観察された。腫瘍周囲の血管には蛇行が認められず、腫瘍から離れた筋層内の血管と同様の走行となっていた。

移植後7日目に CDDP を1回投与した群では3匹中1匹の粘膜表面に潰瘍と外向性増殖がみられ、前後径約7~9mmの明らかな硬結が触れた。腫瘍は筋周膜を破壊し、索状に浸潤する癌胞巣として観察された。癌胞巣を取り囲む周囲新生血管は著しく拡張、蛇行し、直径は約30  $\mu\text{m}$ であった。血管の拡張は癌胞巣周囲の筋周膜内の毛細血管にも及んでいた。新生血管の配列は筋肉がすでに腫瘍増殖によって圧排、破壊さ



**Fig. 3.** The HE staining images of tongues which received a single administration of CDDP.

A-1 : The entire view of a tumor non-transplanted tongue ( $\times 2.5$ ).

A-2 : The enlargement of the morphometric site in A-1 ( $\times 50$ ).

Oblique and cross sections of the transverse and vertical lingual muscles can be seen. Blood capillaries of  $10\ \mu\text{m}$  in diameter (arrow) are seen among the muscle bundles.

B-1 : The entire view of a tongue at 7 days after the tumor transplantation ( $\times 2.5$ ).

B-2 : The enlargement of the morphometric site in B-1 ( $\times 50$ ). Newly formed blood vessels (arrow) around cancer nest show a remarkable dilatation and wandering.

Trans : Transverse muscle Ver : Vertical muscle

T : Tumor

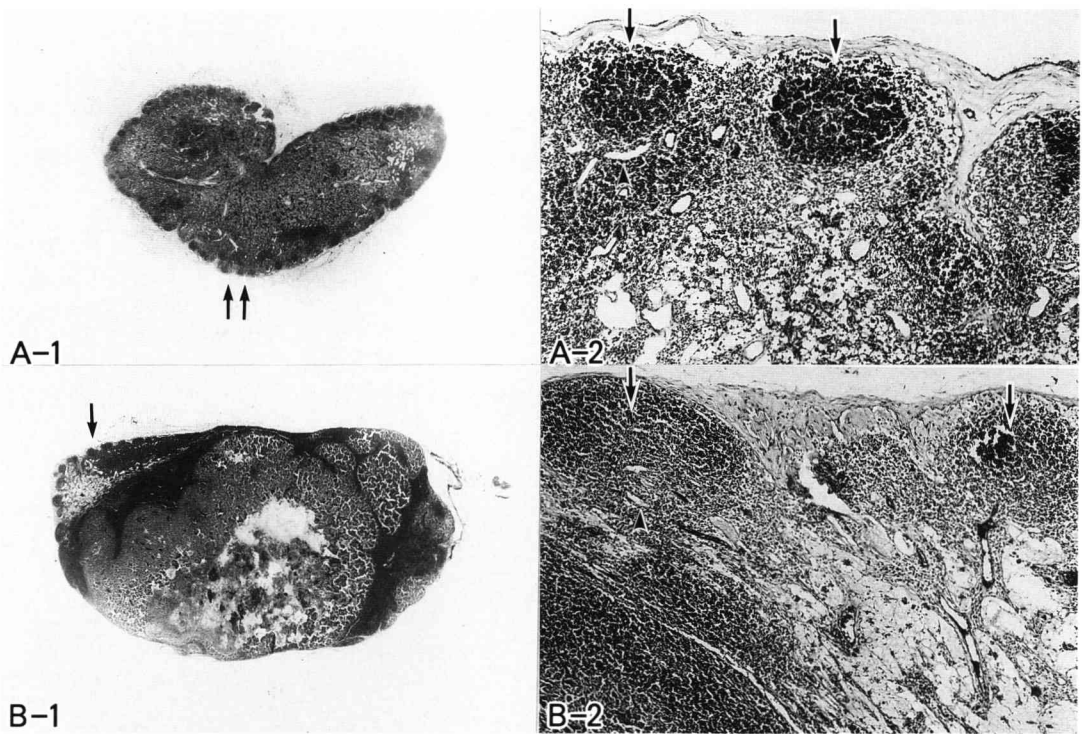
れているため、血管の走行は不整となっていた (Fig. 3 B-1, B-2)。

移植後14日目にCDDPを1回投与した群では腫瘍は著明な外向性増殖を示し、全例に潰瘍形成がみられ、前後径約15 mmの硬結が触れた。組織学的には移植後7日群より、さらに筋層を破壊し、強く舌中隔を圧排するような癌胞巣の増殖がみられた。癌胞巣の浸潤は上皮直下に達し、舌中隔を越えて浸潤する例もみられた。癌胞巣周囲の腫瘍血管は移植後7日群と比較し、さらに拡張し、蛇行していた。逆に腫瘍中央部では壊死組織が増加していた。

## (2) CDDP 3回投与群

非移植群の舌における腫瘍細胞移植相当部には1回投与群と同様に内筋周膜から筋内膜に向かって走行する直径約 $10\ \mu\text{m}$ の毛細血管がみられた。

移植後3日目からCDDPを3回投与した群では、舌粘膜表面には変化を認めず、硬結も触れなかった。屠殺時には移植後6日を経過しているが、腫瘍は横舌筋筋周膜内に腫瘤状に局限していた。腫瘍の経日的変化による新生血管の増生はみられないが、腫瘍周囲毛細血管は拡張し、直径は約 $30\ \mu\text{m}$ に達し、筋線維束に一致して



**Fig. 4.** The HE staining images of lymph nodes which received CDDP administration.

A-1 : The entire view of a lymph node from a tumor non-transplanted rabbit received a single administration ( $\times 2.5$ ). Arrows : Lymph follicles

A-2 : The enlargement of the morphometric site in A-1 ( $\times 50$ ).

Lymph follicles (arrows) in the cortex have no germinal center. Venules of 100-200  $\mu\text{m}$  in diameter are seen in the paracortex (arrows).

B-1 : The entire view of a lymph node from a rabbit which received daily CDDP injection for 5 consecutive days starting on the 14 days after tumor transplantation ( $\times 2.5$ ). Arrow : Lymph follicles

B-2 : The enlargement of the morphometric site in B-1 ( $\times 50$ ).

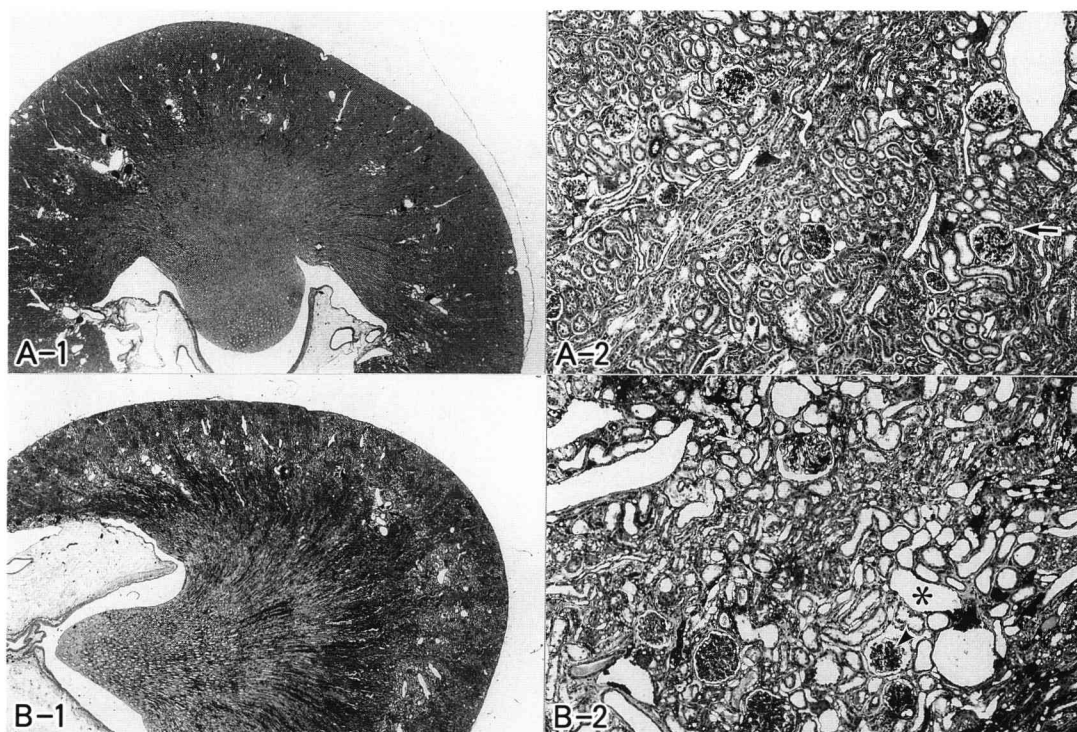
Increase in the size and number of lymph follicles (arrows) can be seen in the cortex. The formation of a germinal center is remarkable in the lymph follicles. No change in blood vessels (arrow head) is notable.

走行していた。CDDP 1回投与した場合と比較し、血管の走行に変化を認めなかった。

移植後7日群ではCDDP 3回投与後、屠殺までの3日を合算すると、移植後10日を経過していたが、3匹中1匹には舌粘膜表面に外向性腫瘍がみられ、他の1匹は潰瘍を伴っていた。腫瘍の硬結は長径約9mmの大きさを呈した。しかし腫瘍の大きさは移植後7日目にCDDPを1回投与した群との間に有意差を認めなかった。癌巣周囲の既存血管および新生血管は変化

し、CDDP 1回投与した場合と同様に拡張、蛇行が著明であった。

移植後14日群ではCDDP 3回投与後の3日間を合算すると屠殺時には移植後17日を経過していた。この群の移植腫瘍は外向性増殖を示し、全例に潰瘍がみられ、長径約15mmの明らかな硬結が触れ、移植後14日目にCDDPを1回投与した場合と同様の変化を認めるのみであった。



**Fig. 5.** The HE staining images of kidneys from rabbits received administration of CDDP.

A-1 : The entire view of a kidney from a rabbit received a single administration of CDDP without tumor transplantation ( $\times 2.5$ ).

A-2 : The enlargement of the morphometric site in A-1 ( $\times 50$ ). Arrow : Glomerular arteriole

B-1 : The entire view of a kidney injected daily with CDDP for 5 consecutive days starting on the 14th days after the tumor transplantation ( $\times 2.5$ ).

B-2 : The enlargement of the morphometric site in B-1 ( $\times 50$ ).

Dilatation of urinary tubules (\*) and atrophgia of glomeruli (arrow head) can be seen.

### (3) CDDP 5 回投与群

非移植群, 移植後 3 日群, 7 日群, 14 日群のそれぞれにおいては CDDP 1 回投与した場合とほぼ同様の組織像と血管形態の変化が認められるのみであった。しかし 5 回投与群では移植相当部の筋線維に萎縮がみられた。また移植後 7 日目から 5 回投与した群と, これとほぼ同じ日数を経過している移植後 14 日目に 1 回投与を行った群では組織所見に違いがみられなかった。

## 2) 深頸リンパ節

### (1) CDDP 1 回投与群

非移植群の深頸リンパ節は皮質に胚中心を持

たない直径  $150 \sim 300 \mu\text{m}$  のリンパ小節が皮質表層に配列し, 被膜から延長する梁柱内には直径  $30 \mu\text{m}$  の血管が走行していた。この血管から皮質リンパ小節内に向かって直径約  $10 \mu\text{m}$  の毛細血管がまばらに分布していた。傍皮質には直径  $100 \sim 200 \mu\text{m}$  の血管がまばらに分布し, そのほとんどは細静脈で, 毛細血管は少なかった (Fig. 4 A-1, A-2)。

移植後 3 日群では皮質リンパ小節はやや腫大し, 長径は  $200 \sim 300 \mu\text{m}$  で, 胚中心の形成は認められなかった。血管は非移植群と同様で, 血管の形態変化および新生も認めなかった。

移植後 7 日群では皮質リンパ小節の長径は

300~500  $\mu\text{m}$ と増大傾向を示したが、胚中心の形成は明らかでなかった。舌腫瘍の転移は認められなかったが、移植後3日群と比較して皮質リンパ小節が増加し、梁柱内に直径30  $\mu\text{m}$ 前後の血管が増加していた。皮質リンパ小節内の毛細血管径は約30  $\mu\text{m}$ に拡張していた。傍皮質の細静脈は蛇行していたが、移植後3日群と同様に新生血管の増加は認められなかった。

移植後14日群では皮質リンパ小節の数が増加し、大きさも長径約400~500  $\mu\text{m}$ と著しく増大し、胚中心の形成が明瞭であった。梁柱内の血管およびリンパ小節内の毛細血管がやや拡張していた。傍皮質の細静脈は軽度に拡張するが、新生血管はほとんど認められず、蛇行や配列の乱れも軽度であった。

## (2) CDDP 3回投与群

非移植群、移植後3日群、7日群、14日群は各々がCDDP 1回投与群とほとんど同じ変動を示した。すなわち、皮質リンパ小節は経日的にその数を増し、血管は軽度の拡張、蛇行を示すが、新生血管はほとんど認められなかった。

## (3) CDDP 5回投与群

深頸リンパ節の組織像では非移植群、移植後3日群、7日群、14日群 (Fig. 4 B-1, B-2) は各々CDDP 3回投与群とほとんど同じであった。すなわち、CDDP 1回投与の場合と比較すると血管の拡張、蛇行がやや強く、血管新生はほとんど認められなかった。また、舌腫瘍の転移が3匹中2匹に認められ、辺縁洞から皮質を越え傍皮質に及んでいた。

## 3) 腎臓

### (1) CDDP 1回投与群

非移植群とほぼ同様の組織像がみられ、皮質の腎小体では糸球体に入り込む直径70  $\mu\text{m}$ 前後の輸入、輸出細動脈、糸球体を取り囲むボウマン嚢、その周囲に近位および遠位尿細管が観察された。近位尿細管、遠位尿細管周囲の毛細血管は直径約10  $\mu\text{m}$ のものが多く、尿細管にからみつくように走行していた (Fig. 5 A-1, A-2)。移植後3日群、7日群、14日群では皮質尿細管の管腔は軽度に拡張していた。

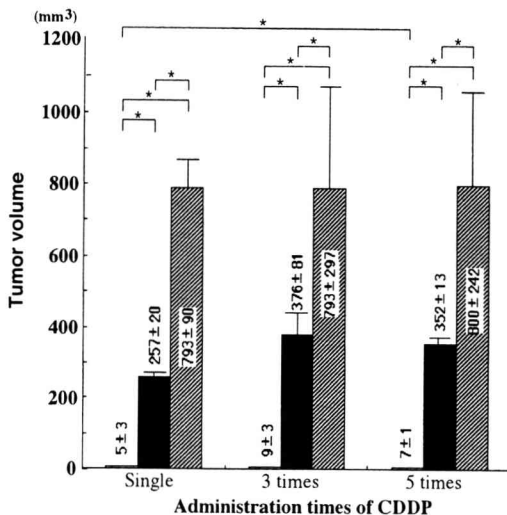


Fig. 6. Changes of the tumor volume in tongues after administration of CDDP. Tumor volume increased significantly on the days after transplantation. (\* $p < 0.1$  : Significant difference)

■ : 3 days after transplantation  
 ■ : 7 days after transplantation  
 ▨ : 14 days after transplantation

## (2) CDDP 3回投与群

非移植群の皮質は尿細管の管腔が軽度に拡張し、糸球体は萎縮して、尿細管の周囲毛細血管には直径約10  $\mu\text{m}$ と変化が認められなかった。移植後3日群、7日群、14日群では非移植群と同様の変化がみられるのみであった。

## (3) CDDP 5回投与群

非移植群、移植後3日群、7日群、14日群 (Fig. 5 B-1, B-2) とともに、尿細管の管腔に高度の拡張と壁尿細管細胞の扁平化がみられ、糸球体は高度に萎縮するものの、輸入、輸出細動脈、尿細管周囲の毛細血管などには変化を認めなかった。

## 2. 舌および深頸リンパ節の体積

### 1) 舌腫瘍の体積

腫瘍体積はCDDP投与の回数に関わりなく移植後のCDDP投与までの日数に応じて増大する傾向を示した (Fig. 6)。



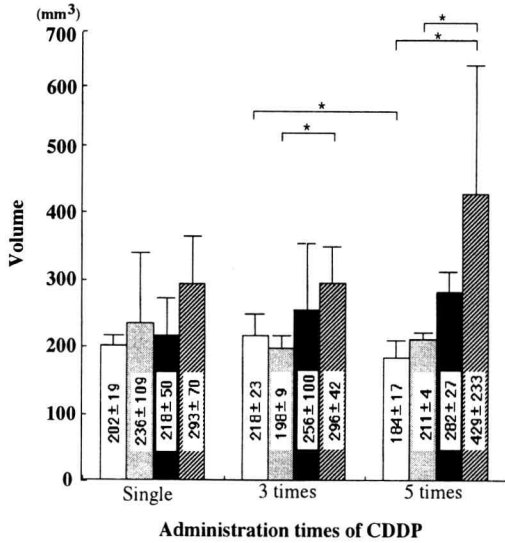


Fig. 7. Changes of the volume in deep cervical lymph nodes.

Lymph node volume increased significantly with daily administration of CDDP for 5 consecutive days in the group 14 days after the tumor transplantation with tumor metastasis, while no change was found in the other experimental groups without metastasis. (\* $p < 0.1$  : Significant difference)

□ : Non transplanted group  
 ◻ : 3 days after transplantation  
 ◼ : 7 days after transplantation  
 ▨ : 14 days after transplantation

腫瘍の体積はCDDPの同一投与回数群を比較すると移植後も経日的に増大し、特に移植後3日から7日にかけての増大が著しく、各投与回数群間における有意差はほとんど認められなかった。腫瘍体積は移植後の経過日数が同じ8日目になった場合を比較すると、移植後3日群に対するCDDP 5回投与群と移植後7日群に対するCDDP 1回投与群では、前者に比べて後者が有意に増大していた。

## 2) 深頸リンパ節の体積

深頸リンパ節における腫瘍の転移は移植後14日目からのCDDP 5回投与群において3匹中2匹に認められ、他の1匹には細胞反応のみが

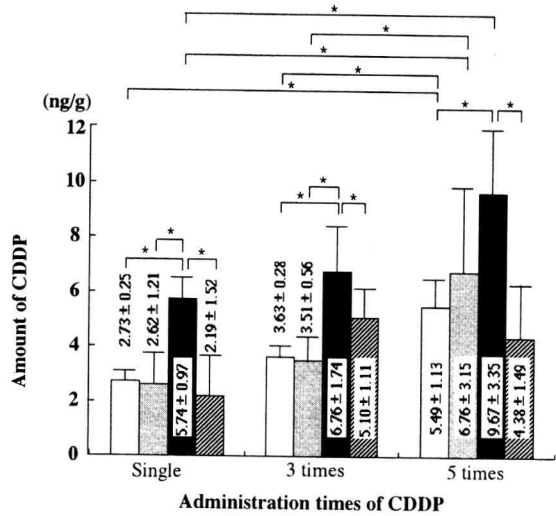


Fig. 8. Kinetics of the CDDP accumulation in the tongue after administration.

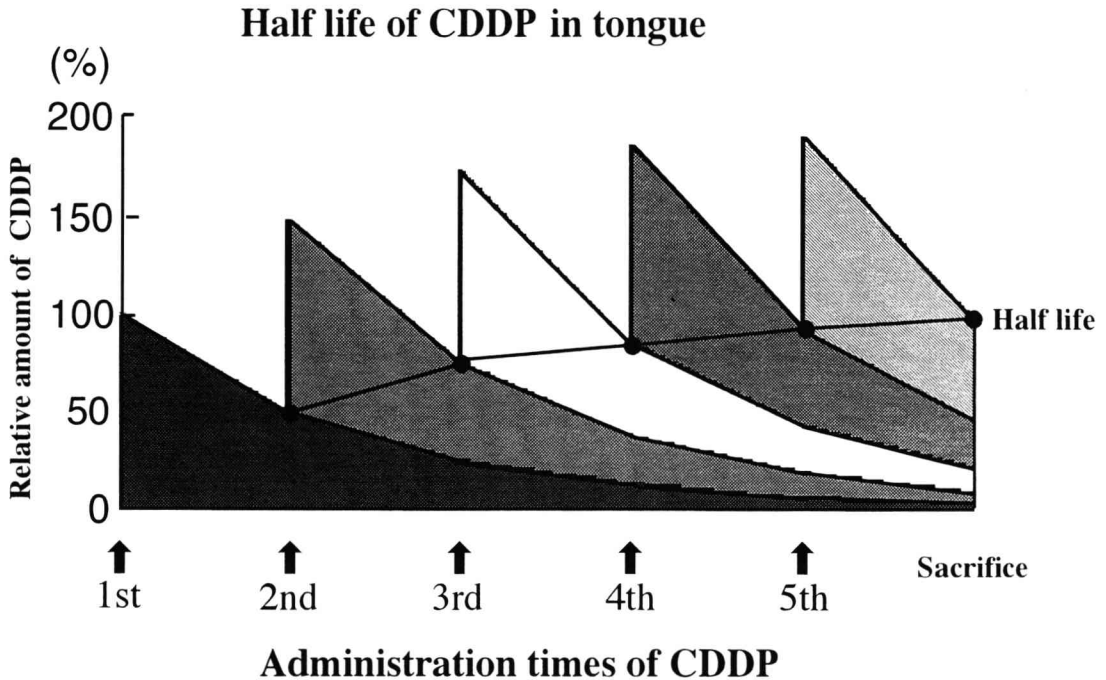
The amount of accumulation of CDDP shows more increase significantly in 7 days after tumor transplantation than in the other groups, and increases with times of the administration. (\* $p < 0.1$  : Significant difference)

□ : Non transplanted group  
 ◻ : 3 days after transplantation  
 ◼ : 7 days after transplantation  
 ▨ : 14 days after transplantation

みられた。

CDDP 1回投与群では投与時の移植後日数の相違による有意差は認められなかった。CDDP 3回投与群では移植後14日群が移植後3日群に比べて有意に増大していた。CDDP 5回投与群では非移植群および移植後3日群に比べ移植後14日群が有意に増大していた (Fig. 7)。

リンパ節体積は各移植後日数群間に有意な増大を認めず、また各投与回数群間でもほとんど増大を認めなかった。しかし、移植後14日目から5回投与した群では深頸リンパ節内に明らかな転移が確認され、しかもリンパ節体積が増大していた。転移を認めないリンパ節では各移植後日数群間および各投与回数群間に有意な体積の増大がほとんど認められなかった。



**Fig. 9.** Half life of the amount of accumulation of CDDP in the tongue after administration.

The amount of CDDP accumulation in the tongue after administration for 5 consecutive days is about twofold higher than of the single administration. The half life of the amount of CDDP accumulation in the tongue is thus about one day.

### 3. CDDP の蓄積量

#### 1) 舌

いずれの CDDP 投与回数においても移植後 7 日目に投与を開始した場合に最も高い蓄積量が認められた (Fig. 8)。CDDP 蓄積量は同じ投与回数で各移植後日数群を比較すると移植後 7 日群が 3 日群および 14 日群に比較して有意に高い値を示した。

一方、各投与回数群間では 5 回投与群が有意に高い値を示し、CDDP が確実に舌組織内に蓄積されていた。なお、CDDP 5 回投与後の翌日の屠殺時における舌組織内蓄積量は 1 回投与の約 2 倍量に達していることから、CDDP の半減期はほぼ 1 日であった (Fig. 9)。

#### 2) 深頸リンパ節

同じ投与回数で比較すると CDDP の組織内蓄積量は移植後 7 日群が最も高くなり、移植後 14 日群では減少する傾向にあった。CDDP の組

織内蓄積量は各投与回数群間の比較では投与回数に応じて増加傾向を示した (Fig. 10)。

#### 3) 腎臓

投与回数の増加に伴って腎臓内の CDDP 組織内蓄積量が増加し、特に 1 回投与群に比べ 3 回投与群は 2 倍以上に増加していた。しかし 3 回投与群と 5 回投与群の間では移植後 7 日目から投与を開始した場合においてのみ有意な増加が認められた (Fig. 11)。

#### 4. 舌の血管面積率

血管面積率は CDDP 1 回投与では非移植群と移植後 3 日群との間に有意差を認めなかったが、これら 2 群と移植後 7 日群および 14 日群の間には有意差を認めた (Fig. 12)。

CDDP 3 回投与群では移植後 7 日目に投与を開始した群が非移植群および移植後 3 日群に比べ有意に増加し、移植後 14 日群においても増加していた。CDDP 5 回投与群でも移植後 7 日目

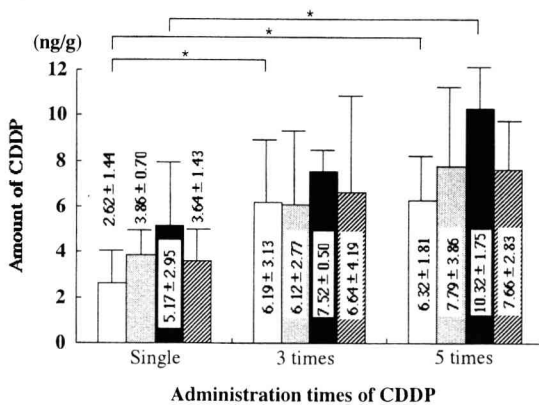


Fig. 10. Kinetics of the CDDP accumulation in the deep cervical lymph nodes after administration.

Whether tumors grow or not in the tongue as the tumor transplantation site is determined by the amount of the accumulation of CDDP increase with the administration times.

(\* $p < 0.1$  : Significant difference)

□ : Non transplanted group

▨ : 3 days after transplantation

■ : 7 days after transplantation

▩ : 14 days after transplantation

に投与を開始した群が非移植群および14日群に比べ有意に増加していた。

同じ投与回数で比較すると移植後7日群の血管面積率はほとんど有意に増加していた。血管面積率の増減は各投与回数群間ではほとんど認められなかったが、5回投与群の移植後14日群のみは1回投与群に比べ有意に減少していた。

#### 5. 舌の血管数

移植後7日目にCDDPを1回投与した場合は、非移植群に比べて有意に多い値を示したが、移植後14日群は移植後3日群および7日群に比べ有意に少ない値を示した (Fig. 13)。

CDDP 3回投与群では移植後7日目から投与を開始した場合、3日目および14日目から投与した場合に比べ有意に高い値を示した。CDDP 5回投与群では移植後7日目から投与を開始した群が移植後3日目および14日目から投与を開

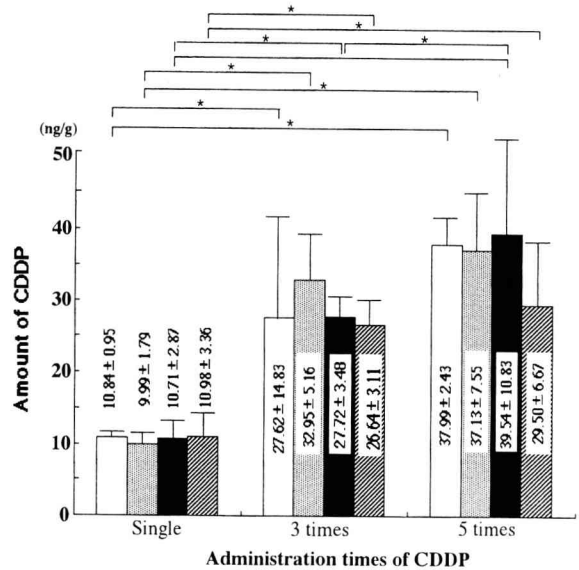


Fig. 11. Kinetics of the CDDP accumulation in the kidneys.

Compared with the single administration group, the administration group for 3 consecutive days increase a over twofold higher in the amount of accumulation of CDDP.

(\* $p < 0.1$  : Significant difference)

□ : Non transplanted group

▨ : 3 days after transplantation

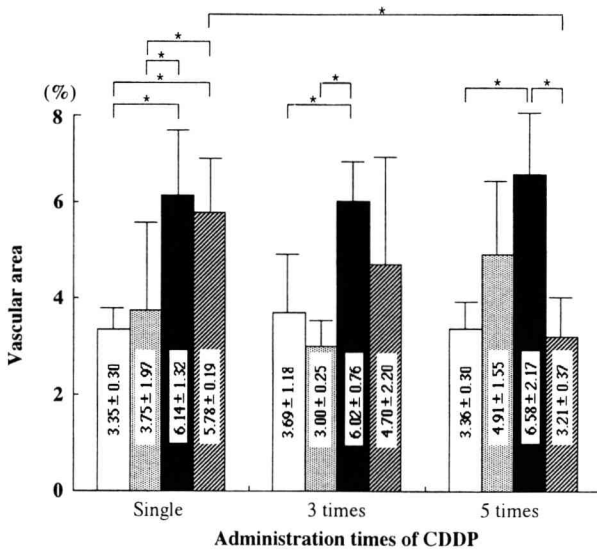
■ : 7 days after transplantation

▩ : 14 days after transplantation

始した群に比べ有意に血管数が多く、移植後14日目から投与したものは非移植群に比べても有意に減少していた。

## 考 察

CDDPは組織へ移行して細胞内に取り込まれると、細胞内解毒酵素から逃れてDNAにクロスリンクするが、その割合はおよそ1~8%<sup>17)</sup>である。またCDDPは用量依存性の抗癌剤でもあり、腫瘍細胞への初期接触によって細胞内へ取り込まれると、その量は一次関数的に増加<sup>17, 18)</sup>する。このようなことからCDDPの組織移行量の測定はきわめて重要であるといえる。しかし、これまでのCDDP投与後の組織内濃



**Fig. 12.** Changes of ratio of blood vessel area in the tongue.

The group 7 days after tumor transplantation significantly increased in the ratio of area of blood vessel, although no change with the times of CDDP administration is acknowledged. (\* $p < 0.1$  : Significant difference)

- : Non transplanted group
- ▨ : 3 days after transplantation
- : 7 days after transplantation
- ▩ : 14 days after transplantation

度の測定<sup>11,12)</sup>は組織内に抗癌剤を含んだ血液が存在するため血中濃度に大きく左右され、組織へ移行するCDDP量は明らかでなかった。本実験ではあらかじめウサギの血液を瀉血して血中のCDDPを排除しているので、真の組織内濃度の測定が可能と考えられる。

本実験に用いたPIXEの利点としては、1) 少ない試料の測定が可能である、2) PPM単位の測定が可能である、3) 検出された各元素の測定値の相対比が正確である、などがあげられている。試料の作製に際しては、ポリプロピレンバックリング膜に切片を貼付すると、乾燥する際に収縮し、切片の厚さが試料の大きさによって変化するため、測定値の定量化に亜鉛の相対値を用いる無標準定量法が用いられている。亜鉛は組織中の量がCDDP投与後の白金量との

間の測定誤差が少なく、また、血中の組織内濃度の変化が少ない利点がある。

CDDPを投与しない場合、舌に移植されたVX2腫瘍の体積は移植後7日目までに急激に増大し、14日目には舌中隔を圧迫ないしは越える範囲にまで増大するといわれている<sup>20,21)</sup>。これに対し、今回の実験ではCDDPの投与回数相当の日数が加算されているにもかかわらず、腫瘍は増大傾向を示さなかった。犬山<sup>22)</sup>は頭頸部癌に対するCDDP単独使用の奏効率は約25%であると述べている。本実験のウサギに使用したCDDP1回投与量の4mgはPIXE分析のための必要最小量であり、60kgのヒトに換算すると80mgに相当する。従って、CDDPの5回投与量は20mgとなり、ヒト使用量の約5倍となる。それでも全身状態を著しく損なうことなく、投与後においてもウサギVX2舌癌は縮小には至らなかったものの腫瘍の増大傾向も示さなかった。舌の腫瘍体積は移植後3日群のCDDP5回投与群が移植後7日群の1回投与群に比べて有意な増大を示さず、むしろ抑制傾向にあった。

このことから本実験においてもCDDPの抗腫瘍効果は十分に得られたものと考えられる。VX2癌細胞移植後における舌腫瘍の増大はCDDP投与によって抑制され、その結果、血管面積率の増加傾向も少なかった。しかし、一方では移植後3日から7日にかけて腫瘍の増大に伴って血管は拡張、蛇行などの形態変化を示した。このような変化は血管内皮細胞の物質透過性<sup>7-10)</sup>の亢進が考えられる。

深頸リンパ節では移植後14日にCDDPを5回投与すると3匹中2匹にのみ腫瘍転移が認められ、他の1匹はリンパ節の細胞反応<sup>23)</sup>が皮質を中心とする部位に限局してみられた。深頸リンパ節の体積は移植後14日群では腫瘍の転移あるいは舌腫瘍からの細胞反応によって増大し、CDDPの投与回数の増加によるものとは考えがたい。

一般に腫瘍の増大に伴って腫瘍周囲では血管

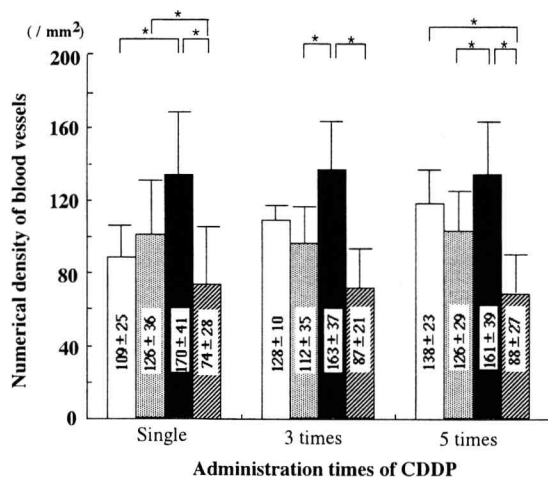


Fig. 13. Changes in number of blood vessels.

The group 7 days after tumor transplantation significantly increased the number of blood vessels, although no change with the times of CDDP administration is acknowledged. (\* $p < 0.1$ : Significant difference)

□: Non transplanted group  
 ▨: 3 days after transplantation  
 ■: 7 days after transplantation  
 ▩: 14 days after transplantation

が新生し、腫瘍内部では血流停止による腫瘍細胞の壊死を繰り返す<sup>24,25)</sup>。本実験でも腫瘍径が2 mm以上の大きになると血管新生がみられ、移植後7日になると新生血管が急激に増加し、それに伴って血管面積率も増加していた。しかしCDDPの投与回数が多くなると血管内皮細胞が傷害され、血管面積率の減少が予想されたが、実際にはCDDP投与による影響はほとんどみられなかった。このことはCDDPには腫瘍増殖抑制作用はみられるが、薬剤としての血管構造への障害が少ないことを示している。

一方、舌における血管数は移植後7日では有意に増加するが、14日では減少していた。これは移植後7日では血管の拡張に加えて毛細血管が新生するが、移植後14日では腫瘍中心部が壊死をきたし、その結果、血管数が減少するものと考えられる。このように血管数は血管面積率の経日的な増減傾向と相関しており、血管からの物質透過性<sup>7,8,9)</sup>の亢進が推察される。

本実験に用いたCDDPは耳静脈に直接注入されたが、血管内に墨汁を注入する前に生理食塩水によって灌流され、機能血管内に存在するCDDPは除去されたことになる。舌におけるCDDPの組織内蓄積量は移植後7日群のみが非移植群、移植後3日群および14日群に比べ有意に増加していた。これは前述したように移植後14日になると舌腫瘍中央部が壊死に陥るのに対し、移植後7日ではまだ腫瘍の血管面積率と血管数が最も増加した時期に相当し、それに伴ってCDDPの蓄積量が増加するものと考えられる。CDDPの蓄積量は投与回数に伴って増加するが、逆に舌の腫瘍体積は増大傾向を示さなかったことから、CDDPの抗腫瘍効果が得られたものと推察できる。なお、CDDPの抗腫瘍効果は組織内蓄積量の増加と関連するが、CDDP投与後に一定期間の経過観察が必要であろう。本実験ではCDDP投与後の翌日に屠殺しているので抗腫瘍効果についてはなお検討の余地がある。

CDDPのヒト体内における血中濃度の半減期は約67時間<sup>26,27)</sup>であり、CDDPを5回投与した場合、その長い半減期のため第5日目の投与直後の血中濃度は第1日目の投与直後の約3倍になる<sup>28)</sup>。本実験に使用したウサギの場合、CDDP投与後の半減期は1回投与と5回投与との蓄積量を比較すると約1日になるものと推定される。このことからCDDPの血管から組織への移行量は血中濃度と一定の関係があるものと考えられる。CDDPの各投与回数群間における舌組織内蓄積量は移植後14日群では大きな変動を認めなかった。予備実験では第1日目のみCDDPを投与し、その5日後に屠殺すると、その蓄積をほとんど認めることができなかった。このことから各投与回数群の組織内蓄積量を大きく左右するのは屠殺前日に投与するCDDP量であり、これが血管から組織へ移行する量に依存しているものと考えられる。

深頸リンパ節では舌と同様にVX2癌移植後の経過日数群間に有意差がなく、CDDPの投与回数が増えるに従ってその蓄積量も増加してい

た。VX2舌癌のリンパ節の組織変化について、松浦<sup>23)</sup>は移植後3日ですでに細胞反応が生じ、傍皮質の肥厚、リンパ洞の拡大が経的に著明になると述べている。畑<sup>23)</sup>は口腔癌の転移リンパ節の血管構築に関する実験的研究を行い、腫瘍の転移が生じていない時期と転移の初期における血管密度とを検索し、これらの時期ではまだ健常部位に比べて変化していないと述べている。深頸リンパ節におけるVX2癌移植後の3日群、7日群、14日群間ではCDDPの蓄積量に大きな変動がみられなかった。これはリンパ節の血管形態の変化によるものではなく、癌細胞移植部位である舌の組織液を吸収するリンパ管が排泄機能の役割を演じ、CDDPの投与回数に応じて有意に増加するものと考えられる。

腎臓では移植腫瘍による組織学的反応は認められず、CDDPの蓄積量は3回投与では1回投与の約3倍、5回投与では約4倍に増加していた。特に糸球体濾過液を再吸収する近位尿細管にCDDP投与による反応性の影響が大きく、投与回数の増加によって尿細管が拡張し、それが糸球体を圧迫していた。CDDP蓄積量の増加率は1回投与から3回投与に比べて、3回投与から5回投与の方が減少する傾向にあった。これは糸球体の萎縮によって通過する原尿が減少し、同時に血管を通過する血液量も減少するものと考えられる。

## 結 論

- 1) 舌腫瘍におけるCDDPの組織内蓄積量と血管面積および血管数は移植後3日から7日にかけて増加するが、移植後14日には腫瘍中央部の壊死に伴って減少した。
- 2) CDDPの5回投与群の組織内蓄積量は1回投与群の約2倍量に達することから、組織内蓄積量の半減期は約1日と推定された。
- 3) 舌腫瘍におけるCDDPの組織内蓄積量の増加は腫瘍体積の増大を抑制する傾向のあることが示唆された。
- 4) 深頸リンパ節のCDDP蓄積量は投与回数に伴って増加するが、血管形態には明らかな変

化がみられなかった。

- 5) 腎臓ではCDDP蓄積量の増加に伴って糸球体の萎縮と尿細管の拡張がみられ、CDDPによる腎障害の可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました工藤啓吾教授ならびに終始ご指導とご助言をいただきました本学口腔解剖学第一講座野坂洋一郎教授と口腔病理学講座佐藤方信教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行にあたり数々の御助言をいただきました口腔外科学第一講座大屋高德助教授、横田光正講師、口腔解剖学第一講座藤村朗助教授、仁科記念サイクロトロンセンター世良耕一郎助教授および日本アイソトープ協会NMCCニッ川章二先生に深く感謝いたします。さらにご協力頂きました口腔外科学第一講座および関連講座の諸先生に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第52回日本口腔科学会総会(1998年4月、松山市)において発表した。本研究の一部は日本私学振興財団平成9年度大学院重点特別経費の補助を受けて行った。

## 文 献

- 1) Rosenberg, B., Van Camp, L., and Krigas, T.: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698-699, 1965.
- 2) 太田和男: シスプラチン, 癌治療・今日と明日, 4: 32-36, 1982.
- 3) 高橋克俊, 海老原和男, 本田恭成, 西川清広, 喜多瑞子, 木村美奈子, 柴崎智恵子: cis-dichlorodiammineplatinum (II) の抗腫瘍効果および細胞周期内進行におよぼす作用, 癌と化学療法, 9: 624-631, 1982.
- 4) 金森康展: シスプラチンの家兎内腸骨動脈注入による生体内プラチナ動態に関する研究, 日産婦誌, 45: 31-37, 1993.
- 5) 小林浩司: ヌードマウス可移植性ヒト乳癌株を用いた実験的局所的温熱化学療法, *J. Jpn. Cancer Ther.* 30: 830-840, 1995.
- 6) Terens, S. H., Beverly, A. T., and Laura, S. C.: Effect of hypoxia and acidosis on the cytotoxicity of four platinum complexes at normal and

- hyper thermic temperatures. *Cancer Res.* 48 : 2342-2347, 1988.
- 7) 佐藤友美：誘発舌扁平上皮癌における血管内皮細胞の微細構造に関する研究 -特にペプロマイシンとシスプラチンによる透過性の差異について-, 日口外誌, 37 : 327-340, 1991.
  - 8) 笹原健児：抗癌剤投与が誘発舌癌の腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響に関する電顕的研究, 岩医大歯誌, 18 : 189-209, 1993.
  - 9) 石神哲郎：家兎 VX 2 癌に及ぼす抗癌剤の影響に関する電子顕微鏡学的研究, 日口外誌, 36 : 1-20, 1990.
  - 10) 二山孝司：実験的悪性腫瘍の微細血管系に及ぼす抗癌剤の影響に関する研究, 日整会誌, 54 : 33-45, 1980.
  - 11) 岡本公彰, 高岡亜由子, 藤田浩：シスプラチンおよび実験動物における薬動力学的解析, CHEMOTHERAPY, 38 : 639-645, 1990.
  - 12) 早瀬良二, 山本順子, 山本昌彦：Cisplatin 連日投与における Pt 値の推移, 癌と化学療法, 22 : 565-568, 1995.
  - 13) Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitoh, Y., Suzuki, S., and Orihara, H. : Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron). *Int. J. PIXE* 2 : 325-330, 1992.
  - 14) 伊藤洋平：移植癌, 宮川正澄, 佐藤春郎, 蝶良義彦監修：実験腫瘍学, 第 1 版, 朝倉書店, 東京, 554-557 ページ, 1966.
  - 15) Sera, K., Futatsugawa, S., and Saitoh, K. : Method of quantitative analysis making use of bromine in a nucleopore filter. *Int. J. PIXE* 7 : 71-85, 1997.
  - 16) Sera, K. and Futatsugawa S. : Personal computer aided data handling and analysis for PIXE. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 109 : 99-104, 1996.
  - 17) 中島牧, 井上勝一, 小林邦彦：ヒト肺癌培養細胞株のシスプラチン, カルボプラチン, 254-S の細胞内取り込み量の検討, 肺癌, 34 : 313-319, 1994.
  - 18) 横尾聡, 藤原美定, 島田桂吉：白金錯体抗癌剤の DNA クロスリンキングと細胞致死作用に関する分子生物学的研究, 口科誌, 43 : 1-14, 1994.
  - 19) 外山勤吾：VX 2 舌癌移植による家兎舌癌の病理組織学的研究, 九州歯会誌, 32 : 340-356, 1978.
  - 20) 武田信洋：移植 VX 2 舌癌の血管構築に関する 3 次元解析, 岩医大歯誌, 22 : 228-241, 1997.
  - 21) 斎藤恒夫：レーザー血流計を用いたウサギ VX 2 舌癌における舌および転移リンパ節の血流動態, 岩医大歯誌, 21 : 257-270, 1996.
  - 22) 犬山征夫, 竹田千里, 木田亮紀：頭頸部癌に対する Cisplatin の Phase II study, 癌と化学療法, 13 : 232-238, 1980.
  - 23) 松浦政彦：ウサギ VX 2 舌癌モデルにおける頸部リンパ節転移ならびにリンパ節の細胞反応, 日口外誌, 42 : 29-41, 1996.
  - 24) Penfold, N. C., Partridge, M., and Rojas, R. : The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 34 : 37-41, 1996.
  - 25) Folkman, J., Watson, K., and Ingber, D. : Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339 : 58-61, 1989.
  - 26) Gormley, P. E., Bull, J. M., Leroy, A. F., and Cysik, R. : Kinetics of cisdichlorodiammineplatinum. *Clin. Pharmacol.* 25 : 351-357, 1979.
  - 27) DeConti, R. C., Toftness, B. R., Lange, R. C., and Creasey, W. A. : Clinical and pharmacological studies cisdiamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* 33 : 1310-1315, 1973.
  - 28) 堀内正敏, 犬山征夫, 甲能直幸：Cisdichlorodiammineplatinum (II) の体内動態, 癌と化学療法, 9 : 632-637, 1982.
  - 29) 畑 毅：実験的口腔癌における転移リンパ節の血管構築の変化, 口科誌, 43 : 386-400, 1994.