



Inhibition of Growth in a Rabbit VX2 Thigh Tumor Model with Intraarterial Infusion of Carbon Dioxide-Saturated Solution

Ueshima, Eisuke

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6243号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006243>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Inhibition of Growth in a Rabbit VX2 Thigh Tumor Model with Intraarterial Infusion of Carbon Dioxide-Saturated Solution

ウサギ VX2 大腿モデルに対する炭酸ガス飽和水動注療法

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
血管内治療学
(指導教員：杉本 幸司教授)

上嶋 英介

序文

炭酸ガスは、腎機能不良患者やヨード造影剤に対するアレルギーを有する患者等に対して、血管造影時の陰性造影剤としてしばしば用いられている。血管内に投与された炭酸ガスはすぐに血中に溶解込み、人体への副作用はほとんど見られない。一方で、炭酸泉は皮膚の血流を増加させ、Bohr 効果により局所の酸素分圧を上昇させることが知られており、下肢の潰瘍など皮膚病変に対する有効な治療法となっている。

近年、神戸大学整形外科において、ラット MFH モデルに対し経皮的に炭酸ガス投与実験を行い、抗腫瘍効果が確認された。ただし、この治療法は経皮的吸収治療法であることから、比較的表層の腫瘍が治療対象と予想され、体内深部に存在する病変への治療効果については不明である。

そこで我々は、深部に存在する病変への治療応用を見据え、炭酸ガスを飽和させた炭酸水を動脈内に投与し、ウサギ VX2 大腿モデルに対する抗腫瘍効果を検証した。

対象と方法

右大腿後肢に VX2 腫瘍を移植されたウサギ 14 匹 (日本白色家兔: 週齢 15、治療群 7 匹, 対照群 7 匹) を用いた。

全身麻酔下に右鼠径部を切開し、大腿動脈を露出した。24G 針にて大腿動脈を穿刺し、X 線透視下に血管造影を施行した。腫瘍血管の描出を確認後、同ルートより炭酸水 (生理食塩水 100ml に炭酸ガスを 15 分かけてバブリング (pH=4)) 50ml を 10 分間で投与した。対照群には同量の生理食塩水を同時間かけて投与した。投与後は穿刺針を抜去し、用手圧迫にて止血を確認した後に創閉鎖を行っ

た。実験終了後は常食管理とし、3日後に薬殺、臓器を摘出した。また、処置直前と薬殺前に、ノギスによる体表からの腫瘍径計測、造影CT (Rm-CT 2, Rigaku) を撮影後 3mm 厚スライスによる volumetry にて各々腫瘍体積を算出した。

摘出された検体は、TUNEL 染色による DNA フラグメンテーションアッセイ、Cleaved caspase-3 抗体を用い Western blotting にて分子生物学的にアポトーシスを評価 (Image J を用い定量化) した。

結果

経過の中で合併症や関連死亡は見られず、体重の増減に関しても 2 群間に有意差は見られなかった。

平均腫瘍増大率は、直接計測にて動注群：コントロール群 = $-9.5\% \pm 7.9$: $27.2\% \pm 6.6$ 、CT による計測にて動注群：コントロール群 = $4.1\% \pm 4.4$: $35.7\% \pm 4.5$ であり、両計測ともに動注群で有意に腫瘍増大が抑制されていた ($p < 0.01$)。Tunel 染色では、動注群：コントロール群 = 215.0 個 ± 58.7 : 21.8 個 ± 5.4 (各視野毎の細胞死)、cleaved caspase-3 の Gel 濃度は動注群：コントロール群 = 0.23 ± 0.07 : 0.04 ± 0.01 で、いずれも有意に動注群で高かった。

考察

動注群ではコントロール群に比較し腫瘍のアポトーシスの誘導が高率であり、ウサギ VX2 腫瘍の増大を有意に抑制することが示された。また、細胞死の過程において caspase-3 は 3 つの経路に関与するが、今回の実験にて炭酸ガス飽和水注入により caspase-3 の活性化を通してアポトーシスが誘導されていることがわかった。

これらの事項を説明しうるメカニズムはいくつか考えられる。第一に CO₂ そのものによる直接的な抗腫瘍効果が挙げられる。CO₂ は細胞内の Ca イオン濃度の上昇を来し、ミトコンドリア機能を活性化させることが知られている。さらに経皮的炭酸ガス治療により MFH 細胞にて腫瘍内の Ca イオン濃度上昇を来し、caspase-9 経路を介してミトコンドリア DNA アポトーシスを生じることが示されている。また CO₂ は reactive oxygen species を誘導し、proapoptotic p53 シグナルを刺激することも知られている。それゆえ、今回の炭酸ガス飽和水投与でもこれらと同様の経路を介してアポトーシスが誘導され、腫瘍増大の抑制に繋がった可能性が推測される。

2, 3 番目の可能性として、腫瘍内環境の酸素化や pH との関連が考えられる。今回の実験ではこれらの測定は行っていないが、経皮的炭酸ガス治療では有意に細胞内 pH や oxyhemoglobin の低下が生じることが分かっている。これにより人体内でも Bohr 効果 (CO₂ 分圧の低下あるいは pH 低下により、酸素解離曲線の右方移動を生じ、組織内でより酸素を放出する現象) が生じることが分かっている。我々の実験でも同様に強い Bohr 効果が生じ、局所での酸素分圧の上昇により腫瘍内低酸素の改善に繋がった可能性が考えられる。腫瘍内低酸素の改善自体が腫瘍増大抑制効果を有するか否かは未だ不明であるが、腫瘍内定酸素が腫瘍浸潤を促進することは分かっており、さらなる研究が必要である。

また、微小環境内の pH 低下の効果に関しては、骨肉腫における細胞サイクルを低下させ、pH 6.8 以下ではアポトーシスを誘導することが知られている。pH 低下自体による直接的な caspase-3 の活性化も知られ、今回も同様の作用が生じた可能性が考えられる。

今回の炭酸ガス飽和水動注療法には臨床応用において、以下の利点があると考えられる。まず既存の抗癌剤に比べ、副作用が少ない点がまず挙げられる。低酸素状態で治療抵抗性となる化学療法や放射線療法の効果を増強させる効果

も有している可能性がある。また、カテーテルの良好な血管内到達性により、人体のあらゆる部位への局所的な治療が可能となる利点も有している。

今回の実験に以下の limitation が挙げられる。第 1 に今回使用した VX2 腫瘍はヒト由来ではない軟部腫瘍であること。第 2 にサンプル数が少なく、動注量や投与時間などが限られた 1 方法のみであること。第 3 に観察期間が短く、腫瘍への効果の至適期間が決められないこと。第 4 に腫瘍移植後 15 日が経過しており、腫瘍内壊死が生じており、検体採取時に bias を生じているかのうせいがあること。第 5 に腫瘍周囲の正常組織への影響を確認していないこと。第 6 に画像評価は造影 CT のみで、機能画像の評価を行っていないこと。最後に非常に preliminary な研究であること、が挙げられ、これらを解消すべく今後の追加実験が必要と思われる。

今回、我々は炭酸ガス飽和水動注療法を行い、caspase-3 経路を介してアポトーシスを誘導し、ウサギ VX2 腫瘍の増大を抑制することを示した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2456号	氏 名	上 嶋 英 介
論文題目 Title of Dissertation	Inhibition of Growth in a Rabbit VX2 Thigh Tumor Model with Intraarterial Infusion of Carbon Dioxide-Saturated Solution ウサギ VX2 大腿モデルに対する炭酸ガス飽和水動注療法		
審査委員 Examiner	主 査 黒 坂 昌 弘 Chief Examiner 副 査 千 田 陵 一 Vice-examiner 副 査 伊 藤 有 佳 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

炭酸ガスは、腎機能不良患者やヨード造影剤に対するアレルギーを有する患者等に対して、血管造影時の陰性造影剤としてしばしば用いられている。血管内に投与された炭酸ガスはすぐに血中に溶解込み、人体への副作用はほとんど見られない。また、炭酸泉は皮膚の血流を増加させ、下肢の潰瘍など皮膚病変に対する有効な治療法となっている。近年、ラット MFH モデルに対し経皮的に炭酸ガス投与実験にて抗腫瘍効果が確認されたが、経皮的吸収治療法であることから、比較的表層の腫瘍が治療対象と予想され、体内深部に存在する病変への治療効果については不明である。そこで深部に存在する病変への治療応用を見据え、炭酸ガスを飽和させた炭酸水を動脈内に投与し、ウサギ VX2 大腿モデルに対する抗腫瘍効果を検証している。

対象と方法

右大腿後肢に VX2 腫瘍を移植されたウサギ 14 匹 (日本白色家兔: 週齢 15、治療群 7 匹、対照群 7 匹) を用いた。全身麻酔下に大腿動脈を露出、24G 針にて大腿動脈を穿刺し、炭酸水 (生理食塩水 100ml に炭酸ガスを 15 分かけてバブリング (pH=4)) 50ml を 10 分間で投与した。対照群には同量の生理食塩水を同時間かけて投与した。処置直前と 3 日後薬殺前に、ノギスによる体表からの腫瘍径計測、造影 CT を撮影後 3mm 厚スライスによる volumetry にて各々腫瘍体積を算出した。摘出された検体は、TUNEL 染色によって DNA フラグメンテーションアッセイ、Cleaved caspase-3 抗体を用い Western blotting にて分子生物学的にアポトーシスを評価 (Image J を用い定量化) した。

結果

平均腫瘍増大率は、直接計測にて動注群: コントロール群 = $-9.5\% \pm 7.9 : 27.2\%$

± 6.6 、CT による計測にて動注群: コントロール群 = $4.1\% \pm 4.4 : 35.7\% \pm 4.5$

であり、両計測ともに動注群で有意に腫瘍増大が抑制されていた ($p < 0.01$)。

Tunel 染色では、動注群: コントロール群 = $215.0 \text{ 個} \pm 58.7 : 21.8 \text{ 個} \pm 5.4$ (各視野毎の細胞死)、cleaved caspase-3 の Gel 濃度は動注群: コントロール群 = $0.23 \pm 0.07 : 0.04 \pm 0.01$ で、いずれも有意に動注群で高かった。

考察と結論

動注群ではコントロール群に比較し腫瘍のアポトーシスの誘導が高率であり、ウサギ VX2 腫瘍の増大を有意に抑制することが示された。また、細胞死の過程において caspase-3 は3つの経路に関与するが、今回の実験にて炭酸ガス飽和水注入により caspase-3 の活性化を通してアポトーシスが誘導されていることがわかった。これらのメカニズムとして第一に CO₂ そのものによる直接的な抗腫瘍効果、2 番目の可能性として、腫瘍内環境の酸素化や pH との関連が考えられる。

本研究は、動脈内より炭酸ガス飽和水を注入することで、caspase-3 経路を介してアポトーシスを誘導、VX2 腫瘍の増大が抑制されることを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった炭酸水の動脈内投与による VX2 腫瘍に対する抗腫瘍効果を示したものであり、今後、深部に存在する多くの腫瘍に対する新たな治療法の可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。