

脊椎悪性腫瘍切除術における抗癌剤洗浄の安全性と有効性に関する実験

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9310

脊椎悪性腫瘍切除術における抗癌剤洗浄の安全性と有効性に関する実験

金沢大学医学部医学科整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

古瀬久裕

脊椎悪性腫瘍の根治的切除はその中央に位置している脊髄を愛護しながら行わなければならないので極めて困難である。脊髄機能を温存するためには一部で腫瘍内に切り込まなければならない場合もあり、そのような際には腫瘍細胞の術野へのコンタミネーションが危惧される。脊椎悪性腫瘍に対する手術療法の局所根治性を高めるために、筆者は抗癌剤を用いて直接手術野を洗浄することを検討した。シスプラチンで局所洗浄を行った場合の脊髄への影響と、シスプラチンの殺細胞効果について実験を行った。方法として、ラットを椎弓切除した後、2mg/kgのシスプラチン(0.5mg/ml)を硬膜外に投与した群と大腿静脈内へ投与した群に分けた。その結果、どちらの群においても下肢の運動機能異常は見られず、脊髄の組織学的変化も認められなかった。血中のシスプラチンの濃度は、どの時点においても硬膜外へ投与した群と大腿静脈内へ投与した群の間に有意な差を認めなかった($P < 0.05$)。またどちらの群も脊髄内のシスプラチン濃度は測定感度以下($< 0.10 \mu\text{g/g}$)であった。次に腫瘍細胞にシスプラチンまたは蒸留水を作用させた場合の殺細胞効果について検討した。まずシスプラチンを接触させた場合、接触時間が長くなるに従って殺細胞効果は増強したが、10分間接触させた場合でも腫瘍細胞を絶滅させることはできなかった。一方、蒸留水には殺細胞効果を認めなかった。しかし蒸留水でシスプラチンを128倍まで倍希釈し、腫瘍細胞にそれぞれの希釈液を5分間接触させたところ、2倍に希釈した場合に殺細胞効果は最大となり、細胞内のシスプラチン濃度も最高となった。また蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させるとその効果は著明に増強され、腫瘍細胞は絶滅した。この方法の方が2倍に希釈した場合よりも殺細胞効果も細胞内シスプラチン濃度も高かった。以上より、脊椎手術時にシスプラチンで術中洗浄を行っても脊髄に対して安全であることが確認された。また蒸留水、次いでシスプラチンを併用して腫瘍細胞による汚染の可能性がある術野を洗浄することは腫瘍細胞に対して著明な殺細胞効果を示すことが明らかとなった。この方法は脊椎悪性腫瘍切除術の局所根治性を高め、再発防止を防止する有効な手段であると考えられた。

Key words cisplatin, distilled water, local irrigation, malignant vertebral tumor

従来より四肢の悪性腫瘍に対しては正常組織を含めた腫瘍切除、即ち広範切除術が標準的治療として行われているが、脊椎悪性腫瘍の手術では脊髄機能を温存しようとする限りそのような広範切除は困難である。なぜならば脊椎の中央には脊髄が存在しているという解剖学的特性を有するからである。このため脊椎悪性腫瘍の治療において根治性を求めることはほとんど不可能と考えられてきた。それ故に以前は放射線療法や化学療法のための対症療法ですまされることも多かった。さらに手術療法は脊髄機能に障害が出現して初めて選択されることが多く、その方法も脊髄の一時的な除圧を目的とした単なる病巣搔爬や椎弓切除のみに止まっていた。もちろんその治療成績は高い局所再発率の故に不良であり、そのため一部では脊椎悪性腫瘍は手術をするべきではないというような認識もあった¹⁾²⁾。しかし、1968年にLievreら³⁾により脊椎骨全切除術が最初に報告されて以来、脊椎悪性腫瘍を手術によって全て切除しようとする試みが行われるようになってきた^{4)~6)}。また近年の脊椎インストレーションの進歩と手術手技の向上に伴い、新しい術式の開発も可能となってきた。当教室の富田ら(Tomitaら)^{7)~9)}は脊

椎骨全切除術の考えをさらに発展させ、腫瘍学的根治性を追求した脊椎骨全摘出術(total en bloc spondylectomy)を開発し、報告してきた。これは悪性腫瘍に罹患した脊椎骨を腫瘍学的に一塊として摘出し、しかも脊椎の支持性を失うことなく脊髄機能をも温存することができる術式である。この方法では脊椎腫瘍のほとんどの部分で腫瘍外操作が可能であるが、脊髄機能を温存するためには腫瘍に侵された椎骨をいずれかの部分で切離せざるを得ない。実際には椎骨の前方要素と後方要素の接合部である椎弓根の部分で切離して脊椎を摘出している。そのため腫瘍の進展様式によってはこの限られた切離部分で腫瘍内に切り込むことは止むを得ない。この場合に問題となるのは腫瘍細胞による術野のコンタミネーションであり、これによって局所再発を引き起こすことが危惧される。

消化器癌や卵巣癌の場合には腹膜転移の治療としてシスプラチンによる腹腔内洗浄が行われている^{10)~14)}。筆者はこの方法を脊椎悪性腫瘍手術時における腫瘍細胞のコンタミネーションに対処する方法として応用できるのではないかと考えた。整形外科領域においてはシスプラチンの局所投与に関する報告は少

なく¹⁵⁾、脊椎手術時におけるシスプラチン局所投与に関する報告は未だ無い。従って脊椎の近傍へシスプラチンを局所投与した場合にどのような問題が起こるかは不明である。また手術中の行為であるため「容易かつ短時間で最大の効果が挙げられる」方法であることが望ましいが、そのような極めて短時間接触させた場合の殺細胞効果に関する報告も見られなかった。筆者は脊椎悪性腫瘍の手術時にシスプラチンで局所洗浄を行った場合の脊椎に対する安全性と、コンタミネーションした腫瘍細胞に対する殺細胞効果について検討した。

対象および方法

1. シスプラチンの硬膜外投与の安全性

本実験ではシスプラチン(日本化薬, 東京)は希釈しない場合は全て0.5mg/mlの濃度のものを使用した。

1. 実験動物および麻酔方法

体重200~300gのWister系雌性ラット(日本クレア, 東京)を実験に供した。全ての群において1群につき5匹ずつを以下の実験に使用した。ジエチルエーテルにて吸入麻酔を行った後、ペントバルビタール(大日本製薬, 東京)を30mg/kg腹腔内投与し、続いて硫酸アトロピン(田辺, 東京)を1mg/kg筋肉内投与した。この全身麻酔下で以下の実験を行った。

2. 椎弓切除ラットの作成

ラットの背部正中に約2cmの縦切開を加え、傍脊柱筋を棘突起および椎弓より剥離した。開創器を用いて術野を展開し、顕微鏡を用いて出血に十分注意しながら第8胸椎の椎弓を切除し、硬膜を露出させた。

3. 薬物の投与方法

1) 硬膜外へのシスプラチンの投与

作成した椎弓切除ラットの手術野、即ち硬膜の背側にシスプラチンを2mg/kg投与し、そのまま直ちに創を閉じた。

2) 静脈内へのシスプラチンの投与

ラットの大腿静脈を展開し、静脈内へシスプラチンを

2mg/kg投与し創を閉じた。

3) 硬膜外への生理食塩水の投与

作成した椎弓切除ラットの手術野に生理食塩水を4ml/kg投与し、そのまま直ちに創を閉じた。

4. 血清内および脊髄内シスプラチン濃度の測定

1) 群および2) 群のラットに対し0.5, 1, 2, 4, 24, 48時間後に全身麻酔を施し、大腿静脈より静脈血を約2ml採取した。これを1500rpmで10分間遠心分離し、血清を約1ml採取して-80℃で冷凍保存した。次にジエチルエーテルにて層殺した後に脊髄を摘出し、これも-80℃で冷凍保存した。これらの血清および脊髄のシスプラチン濃度を原子吸光計Zeeman Z8100型(日立, 東京)にて測定した。

5. 下肢の運動機能評価

1), 2), 3) 群のラットを4週間経過観察し、その間の下肢の運動機能をTarlovの評価法¹⁶⁾¹⁷⁾に準じて評価した。グレード1, 下肢が全く動かない完全麻痺; グレード2, わずかに動くもの; グレード3, 立ち上がることができるもの; グレード4, 歩くことができるもの; グレード5, 20°の坂を登ることができるもの。

6. 脊髄の組織学的変化の観察

1), 2), 3) 群のラットに対し4週間後に全身麻酔下に10%

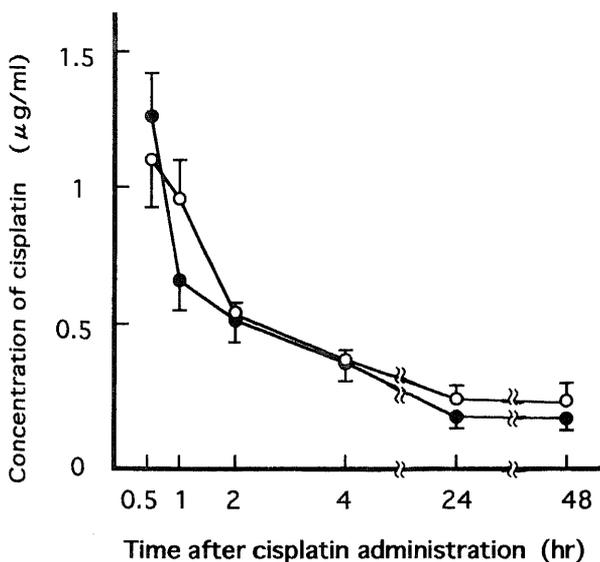


Fig. 1. Concentration of cisplatin in the plasma of rats. ●, cisplatin was intravenously administered; ○, cisplatin was extradurally administered.

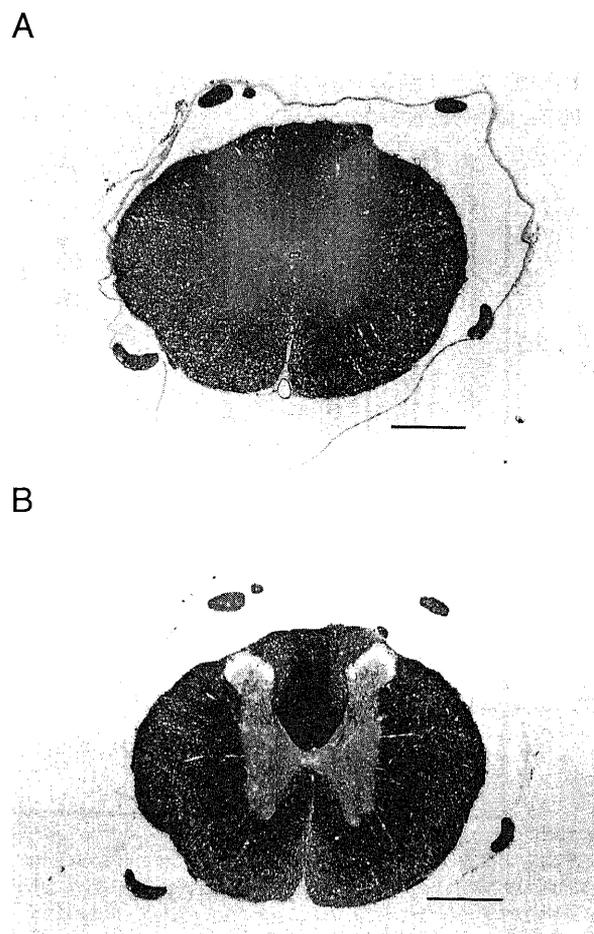


Fig. 2. Light micrographs of the spinal cord of a rat. The rats was administered cisplatin extradurally and spinal cord was extirpated 4 weeks after. Bar indicates 0.5 mm. (A) HE stain; (B) Luxor fast blue stain. No abnormal changes are observed.

ホルムアルデヒドにて経心臓灌流固定にて前固定を行い、脊髄を摘出してさらに24時間浸潤固定を行った。この脊髄をエタノールおよびキシレンで脱水した後、パラフィン包埋し横断切片を作成した。これにHE染色またはルクソールファストブルー染色を施し、それぞれの脊髄の変性、および脱髄の状態を光学顕微鏡を用いて観察した。

II. シスプラチンの短時間接触による殺細胞効果

1. シスプラチンがヒト骨肉腫培養細胞の増殖に及ぼす影響
まずヒト骨肉腫培養細胞 OST (当教室にて樹立¹⁸⁾) を用いて次の実験を行った。6穴プレート (培養面積9.4cm²/穴) に細胞を1穴あたり2×10⁵個播種し、RPMI-1640培地 (Gibco, New York, USA) にて37.0℃, 5.0% CO₂, 水蒸気飽和の状態にて培養した。48時間後に腫瘍細胞が生着していることを確認し、磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (日水製薬, 東京) で静かに2回洗浄した後に次の方法で薬剤と接触させた (n=5)。

1) 蒸留水との接触

蒸留水を1分間, 5分間, 10分間接触させた。

2) シスプラチンとの接触

シスプラチンを1分間, 5分間, 10分間接触させた。

3) 蒸留水またはNaCl水溶液と接触後にシスプラチンと接触させる2段階接触

蒸留水または0.3%, 0.6%, 0.9%のNaCl水溶液を2.5分間接触させ、これを吸引して取り除いた後にシスプラチンを2.5分間接触させた。

4) 対照

PBSと10分間接触させた。

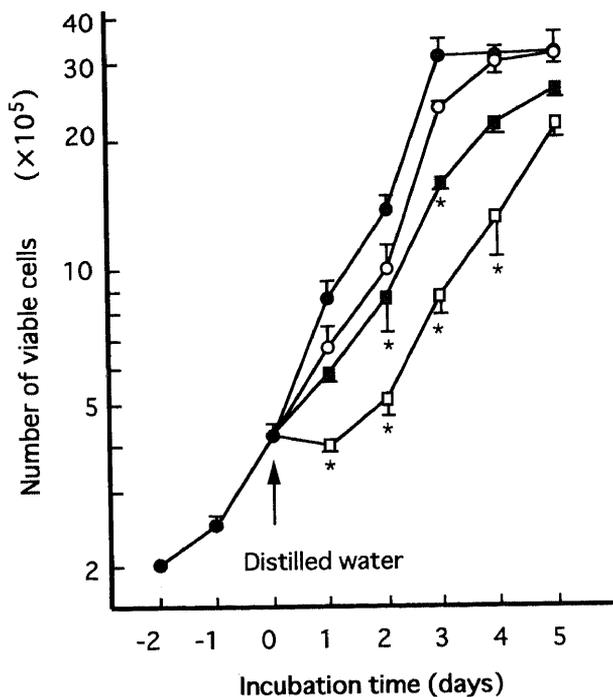


Fig. 3. Growth curve of OST cells after exposure to distilled water. OST cells were exposed to distilled water and the number of the viable cells was counted. ●, control; ○, exposed for 1 min; ■, exposed for 5 min; □, exposed for 10 min. *p<0.05 compared with control group.

これらの操作の後PBSで2回洗浄し、RPMI-1640培地で引き続き培養を行った。その後5日目まで24時間毎にトリプシンを用いて細胞をプレートからはがし、トリパンブルー色素排除試験法を用いて生細胞の濃度を計測した。この生細胞の濃度と全液量の積をもって生細胞の総数を算出した。

2. 3種類の腫瘍細胞に対するシスプラチンの殺細胞効果

次に使用する腫瘍細胞としてOST, ヒト乳癌細胞 (ZR-75-30)¹⁹⁾, ヒト骨肉腫細胞 (MG-63)²⁰⁾の3種を用いた。6穴プレートに1穴あたり1×10⁶個の細胞を播種し、48時間培養した後に次の方法で薬剤と接触させた (n=5)。

1) 蒸留水によるシスプラチン希釈液との接触

蒸留水を用いてシスプラチンを2倍から128倍まで倍希釈し、これらの希釈液をそれぞれ腫瘍細胞に5分間接触させた。なお0.5mg/mlのシスプラチンを希釈せずに5分間接触させたものを1倍希釈の群とした。

2) 蒸留水接触後にシスプラチンと接触させる2段階接触

i) それぞれの腫瘍細胞に蒸留水を1分間接触させ、これを吸引して取り除いた後にシスプラチンを1分間接触させた。

ii) 蒸留水を2.5分間接触させ、これを吸引して取り除いた後にシスプラチンを2.5分間接触させた。

3) 蒸留水との接触

それぞれの腫瘍細胞に蒸留水を5分間接触させた。

これら1), 2), 3) 群の細胞をPBSで2回洗浄し、引き続き培養した。5日後に各々の生細胞数をトリパンブルー色素排除試験法を用いて算出した。

3. シスプラチンのコロニー形成能に対する影響

前述の1), 2), 3) 群のOSTをPBSで2回洗浄し、その後も培養を継続した。培養14日目に倒立顕微鏡で40個以上の細胞

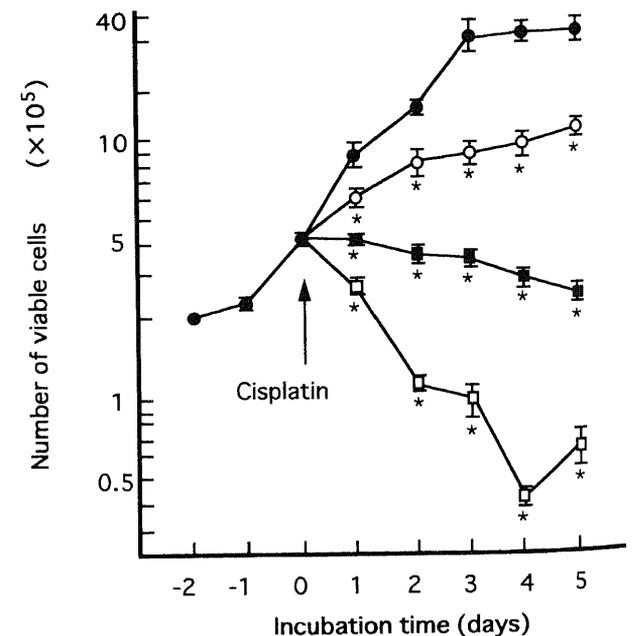


Fig. 4. Growth curve of OST cells after exposure to cisplatin. OST cells were exposed to cisplatin and the number of the viable cells was counted. ●, control; ○, exposed for 1 min; ■, exposed for 5 min; □, exposed for 10 min. *p<0.05 compared with control group.

よりなる集団をコロニーとして、その数を計測した (n=5)。

4. 細胞内シスプラチン濃度の測定

直径10cmのディッシュにOSTを 1×10^7 個播種し、48時間後に前述の2. 1) (但し16倍希釈まで) および2. 2) と同様の方法で処理した。その後PBSで2回洗浄し、この細胞をトリプシンで剥がして1000rpmで10分間遠心した。上清を吸引し、残った細胞を -80°C で冷凍保存した。これらの細胞内のシスプラチン濃度を原子吸光計にて測定した (n=3)。

5. 統計処理

測定値は全て、平均値±標準偏差で示した。各群間の比較にはStudentのt検定を用いた。危険率5%未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありとした。

成 績

1. シスプラチンの硬膜外投与の安全性

1. 血清内シスプラチン濃度

硬膜外ヘシスプラチンを投与した群では血清内シスプラチン濃度は30分後に $1.11 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ と最高値を示し、以後は経時的に漸減した。24時間後には $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ となり、ほぼプラトーに達した。

大腿静脈内ヘシスプラチンを投与した群における血清内シスプラチン濃度は30分後に $1.27 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ と最高値を示

した。これらの群も以後は経時的に漸減し、24時間後には $0.15 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ となり、その後は大きな変化を認めなかった。

どの時点における測定値も、硬膜外ヘシスプラチンを投与した群と静脈内ヘシスプラチンを投与した群の両群間に有意差は認めなかった (図1)。

2. 脊髄内シスプラチン濃度

硬膜外ヘシスプラチンを投与した群および静脈内ヘシスプラチンを投与した群とも、脊髄内のシスプラチン濃度は30分後から48時間後のどの時点においても測定感度以下 ($< 0.10 \mu\text{g/g}$) であった。

3. 下肢の運動機能評価

4週間の経過観察期間中、下肢の運動機能は全ての群においてグレード5であった。全てのラットは正常に歩行し、明らかな下肢の運動機能異常を認めたものはなかった。

4. 脊髄の組織学的変化

4週間後の脊髄の光学顕微鏡的組織学的変化は全ての群においてHE染色、ルクソールファストブルー染色のいずれにおいても形態学的変化、脱髄などの所見は認めなかった (図2)。

II. シスプラチンの短時間接触による殺細胞効果

1. シスプラチンがOSTの増殖に及ぼす影響

2×10^5 個播種したOSTの生細胞数は指数関数的に増殖し、播種後24時間で $(2.30 \pm 0.12) \times 10^5$ 個であり、播種後48時間、即ち薬剤を接触させる時点では $(4.25 \pm 0.11) \times 10^5$ 個となった。

1) 蒸留水との接触

2×10^5 個播種したOSTの対照群は1日後は $(8.76 \pm 0.77) \times$

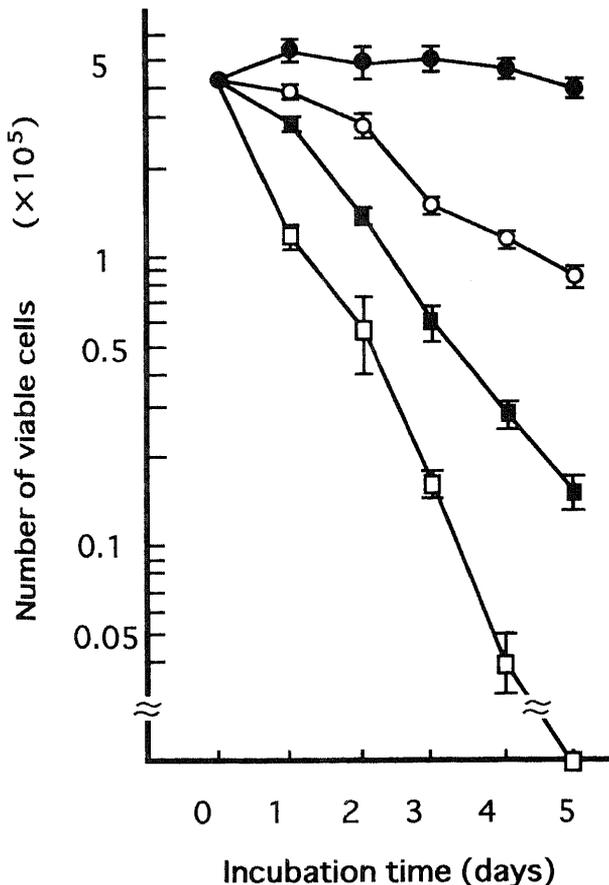


Fig. 5. Growth curve of OST cells after exposure to NaCl solution and cisplatin. OST cells were exposed to various concentration of NaCl solution for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min. ●, 0.9% NaCl solution; ○, 0.6% NaCl solution; ■, 0.3% NaCl solution; □, distilled water.

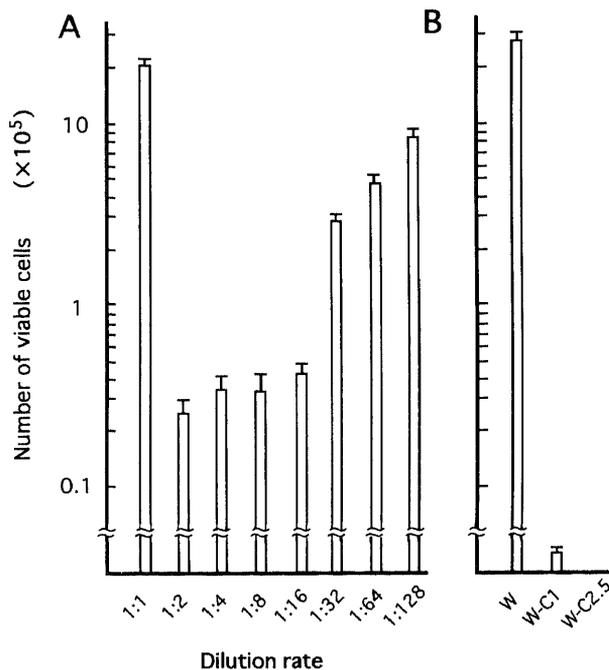


Fig. 6. Number of the viable OST cells 5 days after exposure to various solution. (A) Cisplatin was diluted 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64 and 1: 128. OST cells were exposed to cisplatin with each dilution for 5 min. (B) OST cells were exposed to distilled water and cisplatin respectively. W, tumor cells were exposed to distilled water for 5 min; W-C1, tumor cells were exposed to distilled water for 1 min and cisplatin for 1 min; W-C 2.5, tumor cells were exposed to distilled water for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min.

10^5 個であり、以後3日後まで増加し続けた。その後は大きな変化を認めず、 30×10^5 個前後であった。OSTに蒸留水を1分間接触させた群では生細胞数は1日後に $(6.78 \pm 0.82) \times 10^5$ 個であった。以後は指数関数的に増加し、5日後には $(31.3 \pm 1.47) \times 10^5$ 個となった。5分間接触させた群は1分間の群に比べて増加速度は低下したもののやはり指数関数的に増加し、5日後には $(26.3 \pm 0.62) \times 10^5$ 個となった。10分間接触させた群では1日後は $(4.10 \pm 0.20) \times 10^5$ 個と一時増加が抑制されたが、その後は再増殖し5日後は $(22.0 \pm 1.40) \times 10^5$ 個であった。どの群においても5日後の時点では対照群と有意差を認めなかった(図3)。

2) シスプラチンとの接触

対照群は前項の蒸留水との接触の実験と同じものを用いた。 2×10^5 個播種したOSTにシスプラチンを1分間接触させた群の生細胞数は、増加し続けはしたもののどの時点においても対照群より有意に少ない値であり、5日後は $(11.0 \pm 0.89) \times 10^5$ 個であった。5分間接触させた群ではその後経時的に減少し、1日後は $(4.14 \pm 0.18) \times 10^5$ 個であり5日後には $(2.46 \pm 0.18) \times 10^5$ 個となった。10分間接触させた群ではさらに減少して5日後には $(0.64 \pm 0.10) \times 10^5$ 個となった。しかしシスプラチンと10分間接触させてもOSTが死滅することはなかった(図4)。

3) 蒸留水またはNaCl水溶液と接触後にシスプラチンと接触させる2段階接触

2×10^5 個播種したOSTに蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンに2.5分間接触させた群では、生細胞数は激減した。

1日後には $(1.22 \pm 0.12) \times 10^5$ 個となり、その後も指数関数的に減少して4日後は $(0.04 \pm 0.01) \times 10^5$ 個となり、5日後にはついに生細胞は観察されなくなった。0.3% NaCl水溶液を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群でも生細胞数は経時的に減少したがその速度はやや鈍く、1日後は $(2.96 \pm 0.15) \times 10^5$ 個であり5日後には $(0.16 \pm 0.02) \times 10^5$ 個の生細胞が残った。NaCl水溶液の濃度が0.6%の群では生細胞数はさらに残存する傾向を見せ、5日後は $(0.85 \pm 0.08) \times 10^5$ 個であった。0.9% NaCl水溶液を用いた群では生細胞数に大きな変化は見られず1日後は $(5.33 \pm 0.40) \times 10^5$ 個であり、5日後は $(3.94 \pm 0.33) \times 10^5$ 個であった(図5)。

2. 3種類の腫瘍細胞に対するシスプラチンの殺細胞効果.

1×10^6 個のOSTにシスプラチンまたはこれを蒸留水で希釈した溶液を5分間接触させ、5日後の生細胞数を計測した実験では、シスプラチンに接触させた場合は生細胞数は $(20.6 \pm 1.60) \times 10^5$ 個であったが、2倍に希釈すると $(0.25 \pm 0.04) \times 10^5$ 個となった。以後16倍希釈までは 0.4×10^5 個前後と比較的少ない値であったが、32倍以上の希釈になると再び増加し、128倍希釈では $(8.60 \pm 1.30) \times 10^5$ 個となった(図6A)。

1×10^6 個のOSTに蒸留水を5分間接触させた結果、5日後の生細胞数は $(28.9 \pm 1.12) \times 10^5$ 個であった。同数のOSTに蒸留水を1分間接触させた後にシスプラチンを1分間接触させた2段階接触群の5日後の生細胞数は $(0.03 \pm 0.01) \times 10^5$ 個であった。蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接

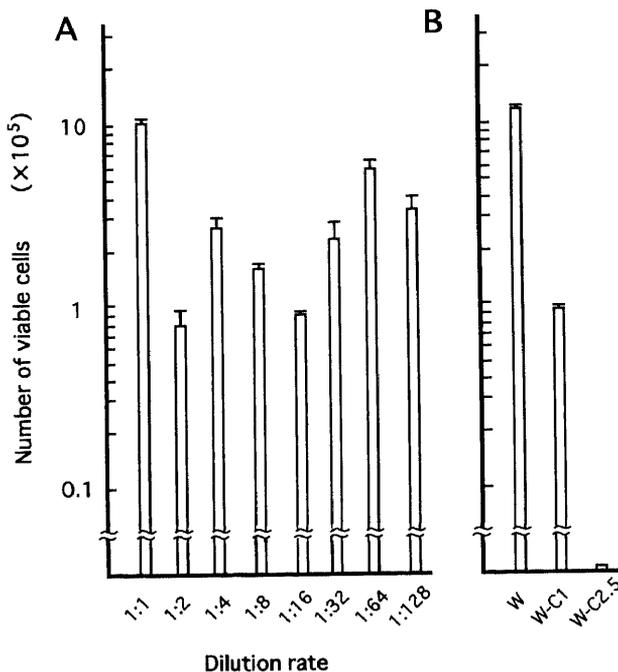


Fig. 7. Number of the viable MG-63 cells 5 days after exposure to various solution. (A) Cisplatin was diluted 1: 1 to 1: 128. MG-63 cells were exposed to cisplatin with each dilution for 5 min. (B) MG-63 cells were exposed to distilled water and cisplatin. W, tumor cells were exposed to distilled water for 5 min; W-C1, tumor cells were exposed to distilled water for 1 min and cisplatin for 1 min; W-C 2.5, tumor cells were exposed to distilled water for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min.

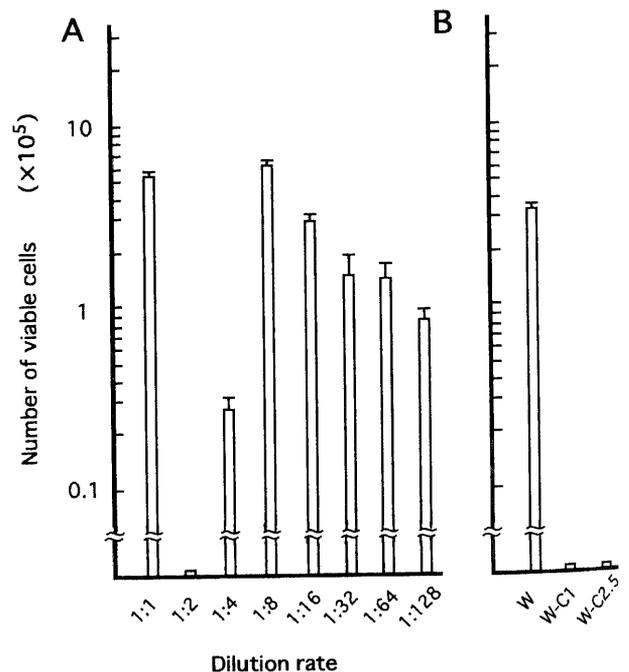


Fig. 8. Number of the viable ZR-75-30 cells 5 days after exposure to various solution. (A) Cisplatin was diluted 1: 1 to 1: 128. ZR-75-30 cells were exposed to cisplatin with each dilution for 5 min. (B) ZR-75-30 cells were exposed to distilled water and cisplatin. W, tumor cells were exposed to distilled water for 5 min; W-C1, tumor cells were exposed to distilled water for 1 min and cisplatin for 1 min; W-C 2.5, tumor cells were exposed to distilled water for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min.

触させた群では5日後には生細胞は観察されなかった (図6B)。

1×10⁶個のZR-75-30にシスプラチンまたはこれを蒸留水で希釈した溶液を5分間接触させ、5日後の生細胞数を計測した実験では、シスプラチンに接触させた場合は(10.1±0.76)×10⁵個であったが、2倍に希釈すると(0.80±0.16)×10⁵個となった。これ以上希釈した場合の生細胞数には一定の傾向は見られず、およそ1×10⁵個から6×10⁵個の間の値であった (図7A)。

1×10⁶個のZR-75-30に蒸留水を5分間接触させた結果、5日後の生細胞数は(11.7±0.82)×10⁵個であった。同数のZR-75-30に蒸留水を1分間接触させた後にシスプラチンを1分間接触させた群の5日後の生細胞数は(0.93±0.02)×10⁵個であった。また蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群は5日後で(0.01±0.01)×10⁵個であった (図7B)。

1×10⁶個のMG-63にシスプラチンまたはこれを蒸留水で希釈した溶液を5分間接触させ、5日後の生細胞数を計測した実験では、シスプラチンに接触させた場合は(5.55±0.16)×10⁵個であったが、2倍に希釈すると激減し(0.01±0.01)×10⁵個となった。以後は増加し8倍希釈では(6.43±0.22)×10⁵個となったが、16倍以上の希釈では再び減少する傾向がみられた (図8A)。

1×10⁶個のMG-63に蒸留水を5分間接触させた結果、5日後の生細胞数は(3.37±0.18)×10⁵個であった。同数のMG-63に蒸留水を1分間接触させた後にシスプラチンを1分間接触させた群、および蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群の5日後の生細胞数はどちらも(0.01±0.01)×10⁵個であった (図8B)。

この実験ではOST, ZR-75-30, MG-63のどの細胞においても蒸留水に2.5分間接触させた後にシスプラチンと2.5分間接触させた場合に最小値を示し、生細胞はほとんど観察されなかった。

3. シスプラチンのコロニー形成能に対する影響

1×10⁶個のOSTにシスプラチンを5分間接触させた結果、2週間後のコロニーの数は多数のコロニーが重なり合い計測不能であった。蒸留水を用いて2倍から16倍まで希釈したシスプラチン溶液に接触させた群ではコロニーの形成は認めなかったが、32倍以上に希釈した群では再びコロニーを形成し、128倍に希釈した群では多数のコロニーが重なり合い計測不能であった (図9A)。

同数のOSTに蒸留水を5分間接触させた群でも多数のコロニーが重なり合い計測不能であった。蒸留水を1分間接触させた後にシスプラチンを1分間接触させた群、および蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群ではどちらもコロニーの形成は認めなかった (図9B)。

4. 細胞内のシスプラチン濃度

直径10cmのディッシュに1×10⁷個のOSTを播種し、48時間後に薬剤と接触させた実験において、細胞内のシスプラチン濃度はシスプラチンと接触させた場合は1.14±0.29μg/gであったが、シスプラチンを蒸留水で2倍に希釈した群では大幅に増加し21.3±2.95μg/gとなった。それ以上の希釈では徐々に減少していった。蒸留水に1分間接触させた後にシスプラチンに1分間接触させた群は28.9±4.99μg/gであった。蒸留水に2.5分間接触させた後にシスプラチンに2.5分間接触させた群は33.4±6.47μg/gであり、この実験における最高値を示した (図10)。

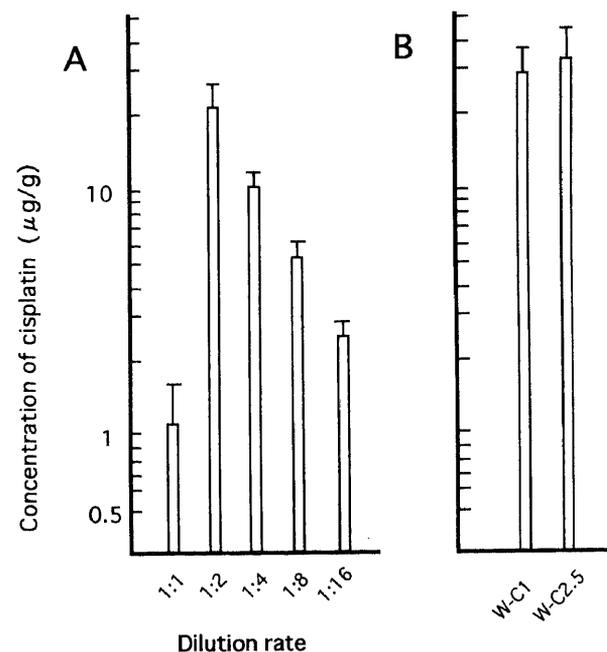
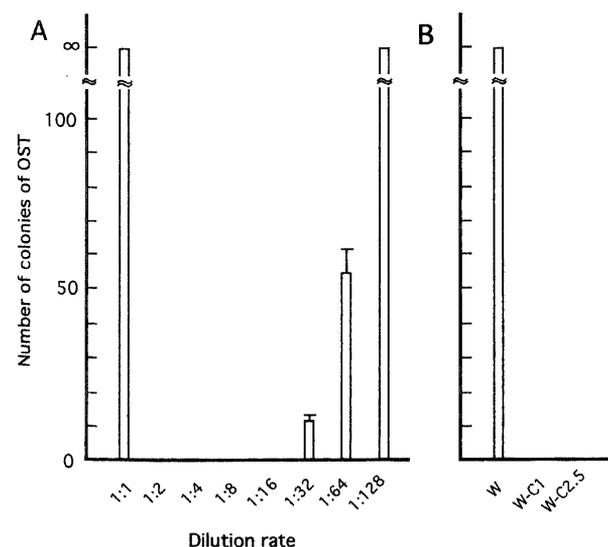


Fig. 9. Number of colonies of OST cells 14 days after exposure to various solution. (A) OST cells were exposure to various dilution of cisplatin. (B) OST cells were exposed to distilled water and cisplatin. W, tumor cells were exposed to distilled water for 5 min; W-C1, tumor cells were exposed to distilled water for 1 min and cisplatin for 1 min; W-C 2.5, tumor cells were exposed to distilled water for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min.

Fig. 10. Concentration of cisplatin in OST cells. OST cells were exposed to various solution and the concentration of cisplatin in the cell was measured with an atomic absorption spectrophotometer. (A) OST cells were exposed to various dilution of cisplatin from 1: 1 to 1: 16. (B) OST cells were exposed to distilled water and cisplatin. W-C1, tumor cells were exposed to distilled water for 1 min; W-C 2.5, tumor cells were exposed to distilled water for 2.5 min and cisplatin for 2.5 min.

考 察

悪性腫瘍を治療する際の原則は病巣を一塊として切除することである。四肢においてはEnnekingが提唱したサージカルステージングシステム²¹⁾を用いて、腫瘍外操作を行うことによって患肢温存の可能性が高まった。一方、脊椎悪性腫瘍においては椎骨の中央に脊髓が存在するため、四肢における場合と同様の治療を行うことはできない。そのため手術治療は対症的に行われるに過ぎず、成績は根治性とは程遠いものであり、脊椎悪性腫瘍の治療は困難を極めた。しかし近年当教室の富田ら(Tomitaら)は腫瘍学的に可能な限り徹底的に病巣を切除できる脊椎骨全切除術を開発した。この術式の概略は以下の通りである。まず背側正中切開にて侵入し、腫瘍に侵された椎骨に達する。次に富田ら(Tomitaら)が独自に開発したワイヤーで左右の椎弓根を切離し椎弓を一塊として摘出する。このワイヤーは直径0.54mmのステンレス鋼であり、硬膜を傷つけずに椎弓根を極めて鋭利に切離することが可能である。続いてインストルメンテーションを設置し、最後に椎体の周囲を十分に剝離してこれを摘出する⁷⁻⁹⁾。この術式によって脊髓機能および脊椎支持性をどちらも温存したまま脊椎悪性腫瘍を一塊として摘出できるようになった。しかし腫瘍の進展様式によっては、僅かに椎弓根部のみとはいえ、そこで腫瘍細胞のコンタミネーションを生じる危険性がある。局所根治性を高めるためにはその細胞も根絶する必要があり、筆者は抗癌剤で術野を洗浄することによりこの問題を解決できるのではないかと考えた。

1965年細菌学者Rosenbergら²²⁾は細菌の成長と電磁場の相関についての研究中、白金電極から生ずる白金化合物が大腸菌の増殖を抑制することを偶然に発見した。その後種々の白金化合物の立体異性体のうちcis型のシスプラチンが抗腫瘍効果を持つことを見だし、多くの動物実験でその有効性が証明された。現在、悪性腫瘍の治療薬としてシスプラチンは頓用され、治療成績の向上に重要な役割を果たしている。この薬剤の特徴は優れた抗腫瘍効果と比較的穏やかな局所毒性であり、血管内投与はもとより腹腔内投与や腔内投与など様々な投与方法が検討され臨床使用されている。本研究ではこのシスプラチンを用いて局所を洗浄した場合の脊髓に対する安全性と腫瘍細胞に対する殺細胞効果について検討した。

シスプラチンを血管内へ投与した場合の副作用の一つに腎機能障害が挙げられ、投与量が制限される因子として重要である。これはシスプラチンが尿細管上皮の蛋白と結合し、遠位尿細管と集合管の巣状壊死や尿細管の拡張および円柱形成を生じるためである。投与量が少ない場合はその障害性は軽度で可逆性であるが、多い場合には非可逆性となると言われている¹⁰⁾²³⁾²⁴⁾。このほかにも末梢神経障害、中枢神経障害、内耳障害、骨髄機能抑制などの副作用が報告されている²⁵⁾。

シスプラチンを局所投与した場合に問題となるのは蛋白非結合型による細胞毒性である。これはシス位に結合したクロール基またはカルボン酸基が水酸基と置換し、さらに核内DNAと結合して核酸および蛋白の代謝異常を生じるためと考えられる²⁶⁾。そのため今回のように硬膜周囲に直接投与する場合には蛋白非結合型による殺細胞効果が期待できる反面、神経系への悪影響が危惧される。シスプラチンを血管内投与した場合の神経毒性に関してはすでに多くの報告がある。末梢神経障害については運動機能障害はほとんど出現しないが下肢の感覚障害を主徴と

した多発性知覚神経障害をみるのが特徴的であり、これは総投与量が $200 \sim 600 \text{mg/m}^2$ から生じるとの報告がある^{27) 31)}。中枢神経障害については軸索変性、髄鞘の破壊などの報告があり³²⁾、3歳の小児に 900mg/m^2 を投与した例の剖検では脊髄後索の変性と後根神経の髄鞘線維の脱落が見られたとの報告がある³³⁾。さらに実験または臨床において脳への移行を認めたとの報告も見られるが、その移行量は極めて少量であったと述べられている^{27)28)34) 37)}。一方入江らはラットを用いた実験でシスプラチンを投与すると、それは直ちに腎を始めとして多くの臓器に移行したが脳への移行は認めなかったと述べている³⁸⁾。

硬膜外にシスプラチンを局所投与した場合、これが脊髓へ到達する経路としては、硬膜外静脈叢などから吸収され循環系に入ってから脊髓へ到達する場合と、硬膜外周囲から直接硬膜内へ入る場合が考えられる。今回ラットの硬膜外に投与した実験では下肢の運動機能障害は生じなかった。また脊髓には組織学的な変化を認めず、脊髓内のシスプラチン濃度はどの時点においても測定されなかった。以上の結果より硬膜外周囲に 2mg/kg のシスプラチンを投与した場合、循環系に入ってから脊髓へ到達する可能性と硬膜外周囲から直接硬膜内へ入る可能性のどちらにおいても硬膜内へ移行してその悪影響が発現することはないものと考えた。

脊椎悪性腫瘍に対して手術療法を行う場合、腫瘍の浸潤の状態によっては時に腹腔内や胸腔内に達することがある。このような際にシスプラチンを術野に使用した場合、胸腔内や腹腔内へ入った薬剤が何らかの問題を生じる可能性が考えられた。しかし腹腔内へ入った場合はこれまでになされた数多くの報告からその安全性については特に問題がないものと考えられる^{10) 14)}。一方、胸腔内投与に関しての報告は腹腔内投与に比べると極めて少ないが、Figlinら³⁹⁾やLerzaら⁴⁰⁾、Leeら⁴¹⁾は臨床にて $100 \sim 120 \text{mg/m}^2$ のシスプラチンを胸腔内へ投与しており、その安全性を確認している。また本邦でも実験的または臨床的に検討され、その副作用が軽度であることが報告されている^{42) 46)}。従って薬剤が胸腔内へ漏れたとしても重篤な副作用を生じることはないものと考えられる。

本実験ではラットの硬膜外へシスプラチンを投与した場合の薬物動態を見るために、その血中濃度を大腿静脈内へ投与した場合と比較した。その結果両群の間には有意差を認めなかった。このことからシスプラチンを硬膜外へ投与すると比較的早期に血中へ移行することが判明した。これは脊髄周囲には静脈叢が発達しているためそこから薬剤が速やかに吸収されることによるものと考えられた。早期に血中へ移行するということは投与した部には長期間残存しないということでもあり、局所に対する毒性はかなり軽減されるものと思われる。

以上の検討から、脊椎悪性腫瘍の手術において硬膜が露出している場合にシスプラチンを用いて洗浄しても脊髓に対して悪影響を及ぼすことはなく安全に使用できるものと結論した。

シスプラチンはDNAの2本鎖のうち1本鎖上の隣接するグアニン残基と鎖内架橋を形成することによってDNA合成阻害を起すと考えられている。障害を受けた細胞はまずS期で停止し、ある程度損傷を除去修復してDNA合成を行う。しかし、細胞がM期に入るための遺伝子の転写が阻害され、メッセンジャーRNAの合成ができないうちに再びG2/M期でブロックが生じる。シスプラチンの濃度が低くその効果が不十分な場合には、不完全な新生RNAは穴埋め減少などの複製後修復を受けて有

糸分裂に必要な蛋白合成を行い、2～3日のうちに再び細胞周期を回るものと、DNA2本鎖の切断を来たし、そのまま死滅するものとに分かれる。一方、濃度が高い場合にはG2ブロックは永久的なものとなり、細胞は死滅する⁴⁷⁾⁴⁸⁾。この抗腫瘍活性は分子量約300の蛋白非結合型にあるとされている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。しかしシスプラチンは強い組織結合能を有するために、静脈内へ投与されると速やかに血漿蛋白と強く結びつき4時間後には90%が結合型となり、抗腫瘍効果を持つ非結合型は10%に過ぎなくなる^{51)～53)}。即ち、目的臓器に達する前にかなりの抗腫瘍活性が失われることになり、そのためにいかにしてより多くの非結合型シスプラチンを腫瘍細胞に集中させるかが重要になる。

このため、様々な局所使用が試みられるようになり、具体的には腹腔内投与^{10)～14)}、腔内投与⁵⁴⁾⁵⁵⁾、胸腔内投与^{39)～46)}、乳癌に対する局所注入⁵⁶⁾⁵⁷⁾、心嚢内注入⁵⁸⁾⁵⁹⁾などが行われている。なかでも腹腔内投与は近年盛んに行われ、その高い奏効率の故に癌性腹膜炎に対して有効な治療法の一つとなっている。その薬物動態の特徴は、腹水中の非結合型シスプラチンの濃度が著明に高く、それが比較的長時間腹水中に維持されることである。このために高い腫瘍活性を得ることができ、さらに局所での濃度が高いにもかかわらず全身への影響は比較的少なくなると言われている¹⁴⁾。

本研究ではこのような点に着目し、脊椎悪性腫瘍を切除する際に生じる腫瘍細胞のコンタミネーションに対してシスプラチンを用いて局所洗浄した場合の有効性について実験を行った。当初はシスプラチンを腫瘍細胞に直接接触させれば、血液を介さずに薬剤が目標臓器に到達するため非結合型の割合は極めて高くなり、接触時間が極めて短くても十分な殺細胞効果が得られると考えた。ところが0.5mg/mlのシスプラチンを用いても10分間以内の接触では腫瘍細胞を絶滅させることはできなかった。シスプラチンは拡散による膜輸送システムが存在することにより細胞内へ流入すると考えられており⁶⁰⁾、10分間程度の短時間接触では細胞を死滅させるのに十分な量の薬剤が細胞内に入り込まず、このような結果になったと推測された。接触時間をより長くすれば十分な効果を得られるものと考えられるが、術中洗浄の場合は手術中の操作の一環として行う以上接触時間にはおのずと制限がある。筆者は洗浄に供することのできる時間は最大10分間程度と考えており、これ以上接触時間を延長することは望ましくない。シスプラチンの抗腫瘍効果は濃度依存性であるため、効果を増強させる手段として濃度を上げる方法も考えられた。しかし今回使用している濃度は0.5mg/mlであり、これは現在市販されている原液の濃度であるため濃度を上げることは容易ではない。このように接触時間を延長することも薬剤の濃度を上げることも困難であるため、さらに大きな効果を挙げることのできる他の方法を検討した。

抗腫瘍剤の効果を増強させる手段の一つとして低浸透圧を利用する方法がある。これは溶媒の浸透圧を低くすることによって抗腫瘍剤の効果を増強するものであるが、これに関する報告は極めて少ない^{61)～64)}。そこで本研究ではこの方法を術中洗浄へ応用することについて検討した。0.5mg/mlのシスプラチンの浸透圧比は約1.0である。この浸透圧を下げるには蒸留水で希釈すればよいが、これはすなわちシスプラチンの濃度を下げることになる。そこで浸透圧が低くなることによる作用増強と、シスプラチンの濃度が下がることによる作用減弱の両者の影響を見るために、シスプラチンを蒸留水で希釈して、その殺細胞効

果を確かめた。

その結果、OST、MG-63、ZR-75-30のいずれにおいても2倍に希釈した場合に生細胞数は最小値を示し、その値は希釈しなかった場合よりも少なかった。さらにOSTのコロニー形成についても検討した結果、1倍および32倍以上の希釈でコロニーの形成を認めたが2倍希釈から16倍希釈まではコロニーは形成されなかった。このようにある倍率までは抗腫瘍剤を希釈すると効果が増強するという一見矛盾した結果が得られた。しかしこの二相性の結果は、ある程度の希釈までは浸透圧が低くなることによる作用増強が薬剤の濃度が低くなることによる作用減弱を上回り、さらに希釈すると薬剤濃度低下による作用減弱が低浸透圧による作用増強を上回ったと考えると理解できる。

ここまでの段階で、シスプラチン単独では十分な殺細胞効果は得られなかったが、蒸留水で希釈しその浸透圧を下げることによって効果を増強できることが判明した。またその最大有効希釈倍率は2倍であった。しかし、その場合でもいくらかの生細胞が残っていたため、さらにこの効果を増強させ、腫瘍細胞を絶滅できる方法として蒸留水とシスプラチンを併用した2段階接触を検討した。まず 2×10^5 個のOSTに蒸留水を接触させたが腫瘍細胞障害性はほとんどなかった。しかし蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させたところ、腫瘍細胞は死滅した。次に蒸留水にNaClを加えて浸透圧を変えたところ、NaClの濃度を上げるに依り殺細胞効果は低下した。

シスプラチンのみを接触させても腫瘍細胞の絶滅には至らなかったこと、蒸留水単独による腫瘍細胞障害性がほとんどなかったことから、蒸留水を接触させた後にシスプラチンを接触させる二段階接触での殺細胞効果の著明な増強は相乗的作用によるものと判断された。また2段階接触において初めに接触させる蒸留水にNaClを加えた結果、その濃度が上がるに依り殺細胞効果は低下したことより、殺細胞効果の増強は浸透圧の低さに依存していることが裏付けられた。また殺細胞効果が増強された群ほど細胞内シスプラチン濃度が高くなっており、この効果増強はより多くのシスプラチンが細胞内に取り込まれたためと判断された。これらのことより、もし接触時間を5分間と設定するならば、蒸留水を接触させた後にシスプラチンを接触させる方法が最も効果的であることが判明した。蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群ではどの腫瘍細胞でも生細胞はほとんど残らなかったが、蒸留水を1分間接触させた後にシスプラチンを1分間接触させた群ではZR-75-30で約9%の生細胞が残った。従って2.5分間ずつの接触時間では十分な効果が得られたが、1分間ずつでは不十分である可能性があると思われた。

低浸透圧シスプラチンの効果増強作用については『溶媒牽引』が原因の一つではないかとする意見もある⁶²⁾⁶³⁾。これは細胞が低浸透圧溶液と接すると溶媒が細胞内へ侵入して細胞体積が増加するが、その際に溶質も溶媒に引きずられて流入する現象である。しかし今回の実験では蒸留水を接触させた後にシスプラチンを接触させており、低浸透圧環境にあるときはシスプラチンは存在していない。それにもかかわらず結果的に効果は増強されていることから、その原因が溶媒牽引とする説には無理があると考えられた。筆者は浸透圧の低下が細胞膜の透過性を亢進させ、その後投与されたシスプラチンが大量に細胞内へ流入して細胞内濃度が高くなり、その結果腫瘍細胞が絶滅したと推

測している。この説を用いれば低浸透圧シスプラチンによる効果増強作用も、蒸留水を接触させた後にシスプラチンを接触させた場合の効果増強作用も説明できる。

本実験ではこのように劇的な殺細胞効果が得られた。但しこの方法を用いたとしても、残存腫瘍組織に対しては十分な効果が得られない可能性があることは心しておく必要があろう。しかし脊椎全摘術は腫瘍椎骨を一塊として摘出する手術であるため、問題となるのは残存する腫瘍塊ではなく椎体を前方要素と後方要素とに切り離す際に生じる切離面での腫瘍細胞のコンタミネーションである。本研究における対象はその遊離腫瘍細胞であり、蒸留水を併用したシスプラチン局所洗浄は5分間で腫瘍細胞を死滅させたことを考えると、この方法は腫瘍細胞のコンタミネーションに対して非常に有効な手段と思われた。

以上、腫瘍細胞に蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させることによって、筆者が目標とする「容易かつ短時間で最大の効果が挙げられる術中抗腫瘍剤洗浄」が達成できると考えた。

結 論

脊椎悪性腫瘍手術時におけるシスプラチン洗浄療法の脊髄に対する安全性についてラットを用いて検討した。続いてその抗腫瘍効果についてヒト骨肉腫培養細胞 (OST)、ヒト乳癌細胞 (ZR-75-30)、ヒト骨肉腫細胞 (MG-63) を用いて検討した。これらの実験より以下の結果を得た。

1. 第8胸椎を椎弓切除したラットの硬膜外に0.5mg/mlのシスプラチンを2mg/kg投与しても下肢の運動機能障害は認めず、脊髄の組織学的変化も生じなかった。また、その時のシスプラチンの脊髄内濃度は測定感度以下 ($<0.10 \mu\text{g/g}$) であった。血中のシスプラチン濃度は、どの時点においても硬膜外へ投与した群と大腿静脈内へ投与した群の両群間に有意差はなかった。

2. 2×10^5 個のOSTにシスプラチンを10分間接触させたが腫瘍細胞を絶滅することはできなかった。しかし低浸透圧のNaCl水溶液を2.5分間接触させてからシスプラチンを2.5分間接触させると殺細胞効果は増強し、その程度は浸透圧の低さに依存していた。

3. 1×10^6 個のOST, ZR-75-30, MG-63にシスプラチンを蒸留水で希釈した溶液を5分間接触させた。その結果どの腫瘍細胞においても殺細胞効果は2倍に希釈した場合に最大となった。これは低浸透圧による作用増強が、薬剤の濃度が低くなることによる作用減弱を上回ったためと考えられた。また蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させたところ、殺細胞効果はさらに増強され、どの腫瘍細胞もほぼ全滅した。

4. 様々な方法でOSTにシスプラチンを接触させ、その細胞内薬剤濃度を測定した。シスプラチンを5分間接触させた群では $1.14 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ であったが、蒸留水によって2倍に希釈した群では $21.3 \pm 2.95 \mu\text{g/g}$ となった。蒸留水を2.5分間接触させた後にシスプラチンを2.5分間接触させた群ではさらに高くなり $33.3 \pm 6.47 \mu\text{g/g}$ であった。これは浸透圧が低下することにより細胞膜の透過性が亢進し、より多くのシスプラチンが細胞内に流入したためと考えた。

以上の結果より、0.5mg/mlのシスプラチンを用いて硬膜外を洗浄しても脊髄に対しては安全であることがわかった。また、

蒸留水に接触させてからシスプラチンと接触させると殺細胞効果は著明に増強されることも判明し、この方法は局所根治性の増強を目的とした術中抗腫瘍剤洗浄に有用であると考えた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の機会と終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導と御教授を頂きました金沢大学医学部附属病院整形外科川原範夫講師に深く感謝いたします。さらに貴重な御指導や御助言を頂きました土屋弘行講師に深謝致します。最後に多大な御協力を頂いた金沢大学医学部整形外科講座第1研究室、第3研究室内の諸先生方に心から感謝いたします。

この研究の一部は文部省平成6年度科学研究費補助金奨励研究 (B) (課題番号06922052) の援助を受けた。

なお、本論文の要旨の一部は第79回中部日本整形外科災害外科学会および第29回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会において発表した。

文 献

- 1) McAfee PC, Zdeblick TA. Tumours of the thoracic and lumbar spine: surgical treatment via the anterior approach. *J Spinal Disord* 2: 145-154, 1989
- 2) Sundaresan N, Digiaccinto GV, Hughes JEO, Cafferty M, Vallejo A. Treatment of neoplastic spinal cord compression: result of a prospective study. *Neurosurgery* 29: 645-650, 1991.
- 3) Lievre JA, Darcy M, Pradat P, Camus JP, Be'nichou C, Attali P, Joublin M. Tumeur a cellules géantes du rachis lombaire, spondylectomie totale en deux temps. *Rev Rhum* 35: 125-130, 1968
- 4) Stener B. Complete removal of vertebrae for extirpation of tumors. *Clin Orthop* 245: 72-82, 1989
- 5) Sundaresan N, Digiaccinto GV, Krol G. Spondylectomy for malignant tumor of spine. *J Clin Oncol* 7: 1485-1491, 1989
- 6) Camille RR, Mazel CH, Saillant G, Lapresle PH. Treatment of malignant tumors of the spine with posterior instrumentation. *In* N Sundaresan, HH Schmidek, AL Schiller, DI Rosenthal (eds), *Tumors of the spine*, 1st ed, p473-487, WB Saunders Comp. Philadelphia, 1990
- 7) 富田勝郎, 川原範夫. 脊椎 (原発性, 転移性) 腫瘍に対する脊椎全摘術 (total en bloc spondylectomy). *臨整外* 28: 561-569, 1993
- 8) Tomita K, Toribatake Y, Kawahara N, Ohnari H, Kose H. Total en bloc spondylectomy and circumspinal decompression for solitary spinal metastasis. *Paraplegia* 32: 36-46, 1994
- 9) Tomita K, Kawahara N, Baba H, Tsuchiya H, Fujita T, Toribatake Y. Total en bloc spondylectomy. *Spine* 22: 324-333, 1997
- 10) 生田目公夫, 佐々木栄一, 高用 茂, 島田耕次, 広瀬忠次, 浜井直人, 大久保雅彦, 池田忠明. 進行, 再発胃癌の癌性腹膜炎に対する CDDP 腹膜内投与の検討—特に薬物動態について—. *基礎と臨* 24: 7615-7617, 1990
- 11) Howell SB, Kirmani S, Lucas WE, Zimm S, Goel R, Kim S, Horton MC, McVey L, Morris J, Weiss RJ. A phase II trial of intraperitoneal cisplatin and etoposid for primary treatment of ovarian epithelial cancer. *J Clin Oncol* 8: 137-145, 1990
- 12) Casper SE, Kelsen PD, Alcock WN, Lewis JL. IP cisplatin in patients with malignant ascites: Pharmacokinetic evaluation and

- comparison with the IV route. *Cancer Treat Rep* 67: 235-238, 1983
- 13) Ozols RF, Vermorken JB. Chemotherapy of advanced ovarian cancer: current status and future directions. *Semin Oncol* 24: S1-9, 1997
- 14) 岩佐 剛, 白井直行, 鈴木正明, 高田道夫. 悪性卵巣腫瘍に対する Cisplatin (CDDP) 腹腔内反復長期投与療法における CDDP の体内動態ならびに安全性と臨床成績について. *順天堂医学* 38: 418-427, 1992
- 15) 福録 潤, 楠崎克之, 村田博昭, 福本和生, 平澤泰介. マウス骨肉腫を用いたシスプラチン局所洗浄の腫瘍再発抑制効果の基礎的研究. *日整会誌* 69: 1417, 1995
- 16) Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. *AMA Arch Neurol & Psychiat* 71: 271-290, 1954
- 17) Delamarter RB, Sherman JE, Carr JB. Cauda equina syndrome: Neurologic recovery following immediate early, or late decompression. *Spine* 16: 1022-1029, 1991
- 18) 高瀬武平, 山崎安朗, 井村慎一, 安元三郎, 布谷 豪, 森田聖一, 宮沢洋一, 荒川弥二郎, 高田克弘, 山田清夫. 組織培養法によるヒト骨肉腫の研究. *中部日整災外会誌* 7: 577-589, 1964
- 19) Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 38: 3352-3364, 1978
- 20) Billiau A, Edy VG, Heremans H, Damme JV, Desmyter J, Georgiades JA, Somer PD. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12: 11-15, 1977
- 21) Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop* 153: 106-120, 1980
- 22) Rosenberg B, Van Camp L, Kringas T. Inhibition of cell division in *Esherishia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698-699, 1965
- 23) Cole WC, Wolf W. Renal toxicity studies of Protein-bound platinum (cis). *Chem Biol Interact* 35: 341-348, 1981
- 24) Finley RS, Fortner CL, Grove WR. Cisplatin nephrotoxicity: A summary of preventative interventions. *Drug Intell Clin Pharm* 19: 362-367, 1985
- 25) Williams CJ, Whitehouse JMA: Cis-platinum: a new anticancer agent. *BMJ* 23: 1689-1691, 1989
- 26) Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: Evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cisdiammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* 46: 1972-1979, 1986
- 27) Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 54: 1269-1275, 1984
- 28) Daugaard GK, Petrera J, Trojaborg W. Electrophysiological study of the peripheral and central neurotoxic effect of cis-platin. *Acta Neurol Scand* 76: 86-93, 1987
- 29) Von Hoff DD, Reichert CM, Cuneo R, Reddick R, Gallagher M, Rozenzweig M. Demyelination of peripheral nerves associated with cis-diamminedichloroplatinum (II) (DDP) therapy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 20: 91, 1979
- 30) Mollman JE. Cisplatin neurotoxicity. *N Engl J Med* 322: 126-127, 1990
- 31) Cowan JD, Kies MS, Roth JL, Joyce RP. Nerve conduction studies in patient treated with cis-diamminedichloroplatinum (II): a preliminary report. *Cancer Treat Rep* 64: 1119-1122, 1980
- 32) Clark AW, Parhad IM, Griffin JW, Price DL. Neurotoxicity of cis-platinum: Pathology of the central and peripheral nervous systems. *Neurology* 30: 429, 1980
- 33) Walsh TJ, Clark AW, Parhad IM, Green WR. Neurotoxic effects of cisplatin therapy. *Arch Neurol* 39: 719-720, 1982
- 34) Charles LL, Theodore EG, Robert LD, Andre FL, Anthony MG. Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Res* 36: 2340-2344, 1976
- 35) LeRoy AF, Lutz RJ, Dedrick RL, Litterst CL, Guarino AM. Pharmacokinetic study of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (DDP) in the Beagle dog: Thermodynamic kinetic behavior of DDP in a biologic milieu. *Cancer Treat Rep* 63: 59-71, 1979
- 36) Stewart DJ, Leavens M, Luna M, Seifert W, Loo TL, Benjamin RS, Anderson MD. Human central nervous system pharmacology of cis-diamminedichloroplatinum (DDP). *Proc Am Assoc Cancer Res* 22: 359, 1981
- 37) Madajewicz S, Kanter P, West C, Bhargava A, Prajapati R, Caracandas J, Avellanosa A, Fitzpatrick J. Plasma spinal fluid and organ distribution of cis-platinum (DDP) following intravenous (IV) and intracarotid (IC) infusion. *Proc Am Assoc Cancer Res* 22: 176, 1981
- 38) 入江 毅, 橋本 豊, 入江朱美, 石橋正充, 宮崎 浩, 町田春男, 唐沢由香, 中森浩太. イヌ及びラットにおけるシスプラチンの吸収・排泄・分布. *医薬品研* 14: 384-410, 1983
- 39) Figlin R, Mendoza E, Piantadosi S, Rusch V. Intrapleural chemotherapy without pleurodesis for malignant pleural effusions. *Chest* 106: 363S-366S, 1994
- 40) Lerza R, Esposito M, Vannozzi M, Bottino GB, Bogliolo G, Pannacciulli I. High dose of intrapleural cisplatin in a case of malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 73: 79-84, 1994
- 41) Lee JD, Perez S, Wang H, Figlin RA, Holmes EC. Intrapleural chemotherapy for patient with incompletely resected malignant mesothelioma: UCLA experience. *J Surg Oncol* 60: 262-267, 1995
- 42) 中村謙弥. 癌性胸膜炎における Cisplatin 胸腔内投与による胸水貯留抑制ならびに胸水動態の新評価法. *弘前医* 43: 354-365, 1992
- 43) 小野原信一, 中條政敬, 阿部山和浩, 新牧大彦, 相良晃一, 向井浩文, 内山典明, 宮路紀昭, 原田 治, 平木嘉幸, 井上裕喜. 肺癌の局注療法を目的とした Cisplatin Lipidol Suspension (CLS) の家兎肺への経皮的局注実験. *日医放線会誌* 52: 1433-1442, 1992
- 44) 工藤新三, 龍藤伸英, 劉震永, 酒井直道, 松井 薫, 根来俊一, 玉井精雄, 高田 実, 楠 洋子, 福岡正博, 森野英雄. シスプラチンの胸腔内投与の試み. *癌と化療* 12: 2161-2165, 1985

- 45) 中村謙弥, 高梨信吾, 石田正文, 湯浅光悦, 高瀬 洋, 工藤 優, 櫛引大輔, 小野寺庚牛, 谷村竹生, 松本一仁. 癌性胸膜炎に対する Cisplatin 胸腔内投与療法—その基礎的, 臨床的検討. 肺癌 30: 527-536, 1990
- 46) 高梨信吾. 癌性胸膜炎に対する fibrinogen, thrombin, CaCl_2 , ならびに tranexamic acid 胸腔内注入療法に関する実験的研究. 弘前医 38: 116-137, 1986
- 47) Wennerberg J, Alm P, Biorklund PA, Killander D, Langstrom E, Trope C. Cell cycle perturbations in heterotransplanted squamous-cell carcinoma of the head and neck after mitomycin C and cisplatin treatment. *Int J Cancer* 33: 213-222, 1984
- 48) Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: Role of G2 arrest and DNA double strand breaks. *Cancer Res* 48, 4484-4488, 1988
- 49) 光畑直喜, 日野理彦, 田草川良彦, 菅 健, 西垣慎一. Angiotensin II 併用による内頸動脈内 CDDP 投与について. 癌と化療 11: 2594-2597, 1984
- 50) 半藤 保, 黒瀬高明, 佐々木敏江, 安田雅弘, 望月雅子, 山崎俊彦, 笹川 基, 田中耕平. シスプラチンの投与方法別薬理動態. 産婦治療 57: 341-347, 1988
- 51) 諏訪田順二, 平賀聖悟, 飛田美穂, 高宮登美, 飯田宜志, 佐藤 威. 慢性腎不全患者における CDDP の血中動態. 癌と化療 15: 243-248, 1988
- 52) 涌井 昭, 石岡千加史. 抗癌剤の体内動態と投与方法. *Oncol Chemother* 6: 234-241, 1990
- 53) Manaka RC, Wolf W. Distribution of cis-platin in blood. *Chem Biol Interact* 22: 353-358, 1978
- 54) 中山一武, 清水敬生, 荷見勝彦, 増淵一正. 子宮頸癌に対する CDDP 腔内投与. 日癌治 25: 826-829, 1990
- 55) 藤原久也, 松永 天, 村上朋弘, 松岡敏夫, 藤原 篤. 子宮頸癌並びに体癌に対するシスプラチン軟膏を用いた局所化学療法の検討. 産婦中四会誌 42: 246-274, 1994
- 56) 堀 泰祐, 大垣和久. 局所再発乳癌に対する CDDP の効果—特に腫瘍内局所投与の意義について—. 癌と化療 19: 557-559, 1992
- 57) 小島 治, 高橋俊雄, 田村幸男, 竹本洋一, 蔭山典男, 間島 孝, 堀江 弘, 伊藤昌彦, 川上定男, 西植 隆, 大西一嘉, 松井道宣, 田村隆郎. シスプラチン腫瘍内注入と温熱併用による乳癌術前療法の検討. 乳癌の臨 5: 673-675, 1990
- 58) 高橋敬一, 一丸恭子, 田中智子, 吉井大介, 寺師恵子, 佐藤 孝, 石原 理, 箕浦茂樹. シスプラチン (CDDP) の心嚢内注入が著効を示した卵巣癌再発の 1 例. 日産婦関東連会報 48: 5-9, 1988
- 59) Markman M, Howell SB. Intrapericardial instillation of a patient with a large malignant effusion. *Cancer Drug Delivery* 2: 49-52, 1985
- 60) 波多江正紀. シスプラチン耐性細胞における細胞膜とその修復. *Mebio* 10: 87-94, 1993
- 61) 近藤 亮, 前田迪郎, 飯塚舜介. シスプラチン腹腔内化学療法の抗腫瘍性に及ぼす溶液浸透圧の影響. 米子医誌 45: 54-69, 1994
- 62) Stephan RL, Novak JM, Jensen EM, Kablitz C, Buys SS. Effect of osmotic pressure on uptake of chemotherapeutic agents by carcinoma cells. *Cancer Res* 50: 4704-4708, 1990
- 63) Smith E, Brock AP. The effect of reduced osmolarity on platinum drug toxicity. *Br J Cancer* 59: 873-875, 1989
- 64) Groos E, Walker L, Masters JRW. The influence of osmolarity on drug cytotoxicity in vitro. *Br J Cancer* 54: 181, 1986

Experimental Studies on the Safety and Effectiveness of Local Irrigation with an Anticancer Drug Following Resection of Malignant Vertebral Tumors Hisahiro Kose, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107**, 214 — 225 (1998)

Key words cisplatin, distilled water, local irrigation, malignant vertebral tumor

Abstract

Malignant vertebral tumors are very difficult to treat, because the ring-shaped structures of the vertebrae contain the spinal cord. To preserve spinal cord function, the surgeon should excise the site of the affected vertebrae. Since some amount of tumor cell contamination can be expected, the author examined the effectiveness of local irrigation of the operative field with an anticancer drug. This study was performed to examine the changes in the spinal cord and the cytotoxic effect on tumor cells resulting from local irrigation with cisplatin. In the first study, rats underwent a laminectomy and then were divided into two groups: rats irrigated with 2 mg/kg cisplatin (0.5 mg/ml) in the epidural space and rats administered intravenous cisplatin. Neither motor dysfunction of the lower extremities nor histologic changes in the spinal cord were observed in either group. No significant differences in plasma cisplatin concentrations were observed between the epidural group and the intravenous group at any time ($p < 0.05$). In both groups, the cisplatin level in the spinal cord remained at less than the sensitivity of an atomic absorption spectrophotometer ($< 0.10 \mu\text{g/g}$). In the second study, the growth curve of tumor cells placed in contact with either cisplatin or distilled water was studied. The longer the cells remained in contact with cisplatin, the fewer living cells were observed. However, a certain number of cells survived even in the 10 minutes contact group. On the other hand, pure distilled water had no cytotoxic effect. The cisplatin was then diluted with distilled water (1: 2-1: 128) and the tumor cells exposed to this medium for 5 minutes. The cytotoxicity was found to be much higher with the 1: 2 diluted medium, and the concentration of cisplatin in the cells was also higher. The cytotoxic effect was at its highest, however, when tumor cells were placed in contact with distilled water for 2.5 minutes followed by contact with cisplatin for 2.5 minutes: no living cells could be detected. The concentration of cisplatin in cells in this group was also higher than that seen in the diluted medium group. In conclusion, local irrigation with cisplatin was found to be safe in this rat model. Irrigation with distilled water and cisplatin seems very effective against possible tumor cell contamination. These findings suggest that local recurrence following resection of a malignant vertebral tumor may be prevented with this method.