

肝癌に対する制癌剤の経門脈的投与療法に関する 基礎的研究 (第2報) —Doxorubicinの組織内濃度変化について—

延藤 浩

肝細胞を制癌剤による障害から保護する目的で、fructose溶液を経門脈的に注入し、肝におけるfructoseの急激な代謝で、肝エネルギーレベルを一過性に低下させることにより、制癌剤の代謝過程で生じる有害な中間代謝産物やフリーラジカルが減少するため、薬剤による肝細胞障害を抑制しうる方法を考案して先に報告した。今回、経門脈的制癌剤投与直前に40% fructose溶液を5分間注入し、末梢静脈内、肝組織内、腫瘍組織内薬剤濃度の経時的変化を測定した。

1. 末梢静脈血の経時的濃度変化は、制癌剤投与終了後3分で、 $3.8 \mu\text{g/ml}$ まで上昇し、その後は次第に低下した。投与終了後10分では、末梢静脈内に投与した場合と同程度の濃度となった。

2. 肝組織内の経時的濃度変化は、3分で最高値を示し、門脈内制癌剤単独投与に比べ投与終了後15分値、30分値で有意に低下した。

3. 腫瘍組織内の経時的濃度変化は、fructose溶液の前注入の有無にかかわらず、末梢静脈内投与に比べ有意に高値を示した。

4. 腫瘍組織内濃度と肝組織内濃度の比は、40% fructoseの前注入を行うと、わずかではあるが上昇させる傾向にあった。
(平成3年10月19日採用)

Studies on the Treatment of Hepatic Carcinomas by Intraportal Infusion of an Anticancer Drug —Time Course of Drug Levels in Liver and Tumor—

Hiroshi Nobutou

We previously reported a method for intraportal infusion of fructose solution which we devised for the purpose of reducing or preventing hepatocellular damage caused by anticancer agents. If the liver is suddenly loaded with fructose, the hepatic energy level is transiently reduced, resulting in a decrease in harmful free radicals, which are intermediate products of the hepatic metabolism of anticancer agents. In the present study, we compared the time course of the level of an anticancer agent in the peripheral venous blood, liver and tumors administered by three methods: (1) intraportal injection after five-minutes intraportal infusion of 40% fructose solution, (2) intraportal injection without intraportal infusion of 40% fructose solution and (3) injection via the peripheral vein. The following results were obtained.

1. The drug level in the peripheral vein rose to $3.8 \mu\text{g/ml}$ three-minutes after the end of fructose-pretreated intraportal injection. The level decreased thereafter and became equal to the level recorded after peripheral venous injection.

2. The drug level in the liver reached a peak ($28.6 \mu\text{g/g}$) three-minutes after fructose-pretreated intraportal injection. The levels 15 and 30 minutes after the same injection were significantly lower than those on corresponding occasions after intraportal injection of the drug without fructose pretreatment.

3. The drug level in tumors after intraportal injection with or without fructose pretreatment was significantly higher than that after peripheral venous injection. The ratio of the tumor drug level to the liver tissue drug level, determined three-minutes after injection, was significantly higher with intraportal injection than with peripheral venous injection. Pretreatment with fructose solution slightly elevated this ratio in the intraportal injection group. (Accepted on October 19, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(3): 289-295, 1991

Key Words ① Intraportal infusion therapy of hepatic malignancies

② Time course of tissues drug level

③ Elimination of hepatic dysfunction

緒 言

今日、多発性肝癌病巣に対しては、選択的な制癌剤投与方法が繁用されているが、いわゆる局所化学療法のための目的は、標的臓器に対しては高濃度でより抗腫瘍効果を増強させるとともに、骨髄、心等の dose limiting tissue への薬剤濃度を低下させることにある。¹⁾ 肝臓の特異性に着目した薬剤の経門脈的投与方法についても、選択的動脈内投与方法と同様、多くの研究者^{2), 3)}により局所化学療法の一つとして有用であるとの認識がほぼ確立されつつある。また、大腸癌や胃癌の術後早期に、経門脈的に制癌剤を投与方法により肝転移の防止効果⁴⁾や、進展した肝癌に対して動脈内投与方法との併用効果⁵⁾も期待できる。さらに、門脈系が肝癌の輸出血管を形成するとの報告^{6), 7)}もあり、肝癌の肝内転移防止としても有用な方法であろう。以上のごとく、経門脈的制癌剤投与方法の発達につれ、制癌剤による肝細胞障害を防止軽減する積極的な補助手段の開発が必要となってきた。肝細胞には特有の代謝経路が多く存在するが、⁸⁾ これをうまく利用することによ

り、制癌剤の分解や制癌剤の核酸、膜代謝への吸着を減少させる新しい方法の開発が可能である。遊離肝細胞の代謝実験で、一時的に肝細胞の代謝を抑制するため、fructose 溶液を付加した培養液が使用されている。⁹⁾ この原理を応用し、肝細胞を制癌剤による障害から保護する目的で、fructose 溶液を経門脈的に注入し、肝エネルギーレベルを一過性に低下させる方法を考案した。第1報では、肝エネルギーレベルを測定し、経門脈的に注入する fructose 溶液の至適投与方法、投与方法について検討し、濃度は40%で、投与方法は5分間が最も有効であった。しかも、本法が doxorubicin 投与方法による GOT, GPT の上昇を抑制する傾向を示したことを報告した。¹⁰⁾ さらに今回は、経門脈的制癌剤投与方法の有効性について、doxorubicin を使用して、組織内濃度を経時的に測定することにより、fructose 溶液の前注入の有無で比較検討して報告する。

実験方法

1. 実験材料

実験動物としては、体重 200 g 前後の雄性 SD

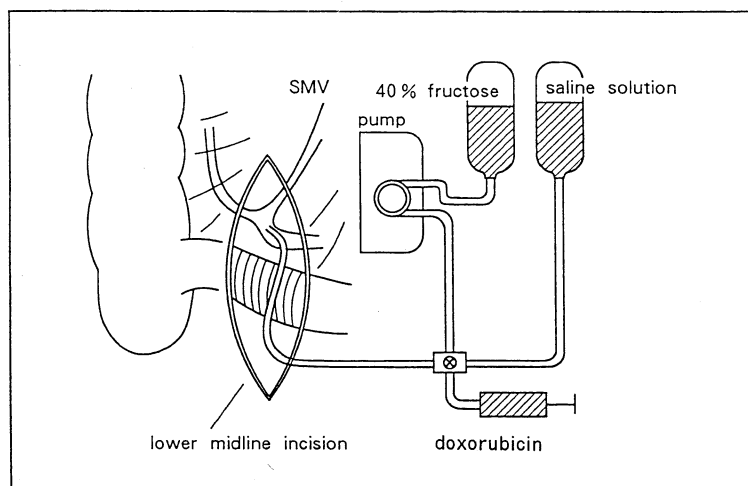


Fig. 1. Experimental model

ラットを2週間固形飼料と水道水で飼育後、正常な体重増加を示したものを使用し、MNNG (n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine) 0.5 ml (2.5 mg/kg) の16日間の直腸内注入と、DMH (1, 2-dimethyl-hydrazine) 4 mg (20 mg/kg) 週1回の16週間の皮下注射で大腸癌を作製した。^{11), 12)} 35週目に大腸の部分切除を行い、切除した癌組織を浮遊細胞化して腸間膜静脈末梢より注入し、肝転移モデルを作製した。癌細胞注入後28日目(腫瘍径の平均が1.8 mm)で実験に使用した。¹⁰⁾

2. 制癌剤投与方法

pentobarbital sodium 50 mg/kg による全身麻酔後、保温手術台上に仰臥位で固定し、ラットの下腹部に小切開を加えて小腸末端を露出した。腸間膜静脈末梢より24 GのジェリコIVカテーテル(Critikon社製)を挿入して doxorubicin の投与、40% fructose 溶液の注入を行った(Fig. 1)。投与、注入は下記の3方法で行った。

1) doxorubicin (4 mg/kg) を腸間膜静脈末梢より one shot で投与。

2) 40% fructose 溶液を腸間膜静脈末梢より 0.15 ml/100 g/5 min の速度で持続注入後に doxorubicin (4 mg/kg) を腸間膜静脈末梢より one shot で投与。

3) doxorubicin (4 mg/kg) を尾静脈末梢よ

り投与。

3. 測定方法

doxorubicin 投与後所定の時間に、下腹部の小切開を頭側に拡大し正常肝組織、腫瘍組織を切除後液体窒素で凍結し、組織内の制癌剤濃度を測定した。下腹部大静脈より採血し、遠心分離した後に血清を凍結保存、蛍光強度法にて制癌剤濃度を測定した。

腫瘍組織内制癌剤濃度と正常肝組織内制癌剤濃度の比を、40% fructose 溶液

前注入の有無で測定時間ごとに計算した。

4. 統計処理

統計学的分析は、分散分析によって実験群間に有意差があるものにつき、modified *t*-test を用いて2群間の有意差を決定した。

実験結果

1. 末梢静脈内の経時的濃度変化 (Fig. 2)

経門脈的に one shot 投与した場合、投与3分後には3.8 μ g/ml まで増加し、その後は次第に低下して投与10分後に、末梢静脈投与の場合と同程度の濃度となった。その後は、末梢静脈内投与と経門脈的投与との差はなくなった。40% fructose 溶液の前注入を行った場合の経時的変化は、経門脈的に単独投与した場合とほぼ一致した。

2. 正常肝組織内の経時的濃度変化 (Fig. 3)

経門脈的に doxorubicin を単独投与した場合や、40% fructose 溶液の前注入を行った場合、投与3分後の濃度は28.6 μ g/g、24.2 μ g/g と、末梢静脈内に投与した場合に比べ有意に高濃度を示した。さらに、経門脈的に doxorubicin を単独投与した場合と、40% fructose 溶液の前注入を行った場合の間にも、投与終了後15分値、30分値に有意差を認めた。また、経門脈的投与

の経時的な濃度は、末梢静脈内投与に比べ、測定した30分まで有意に高値を示した。

3. 腫瘍組織内の経時的濃度変化 (Fig. 4)

経門脈的に doxorubicin を単独投与した場合、投与終了後3分で $38.3 \mu\text{g/g}$ 、40% fructose 溶液の前注入を行った場合、 $34.1 \mu\text{g/g}$ と末梢静脈内投与に比べ有意に高値を示した。

また、経門脈的投与の経時的濃度は、末梢静脈内投与に比べ測定した30分まで有意に高値を示した。

4. 腫瘍組織内濃度と正常肝組織内濃度の比

末梢静脈内投与の場合、投与後3分で 0.87 ± 1.25 であるのに対し、経門脈的投与では単独投与の場合 1.34 ± 2.01 、40% fructose 溶液の前注入を行った場合 1.42 ± 2.13 であった。

考 察

肝は生体内の代謝の中心で、糖質、脂質、蛋白代謝が主として営まれており、多くの肝特有な代謝経路が存在する。生理的な肝代謝機能のうち、代謝エネルギーを急速に消費する反応を利用して、制癌剤による肝障害を防止しうる可能性がある。ATP の急激な減少によって脂質、核酸代謝、解毒反応は抑制され、その結果、制癌剤から発生する有害な中間代謝産物の減

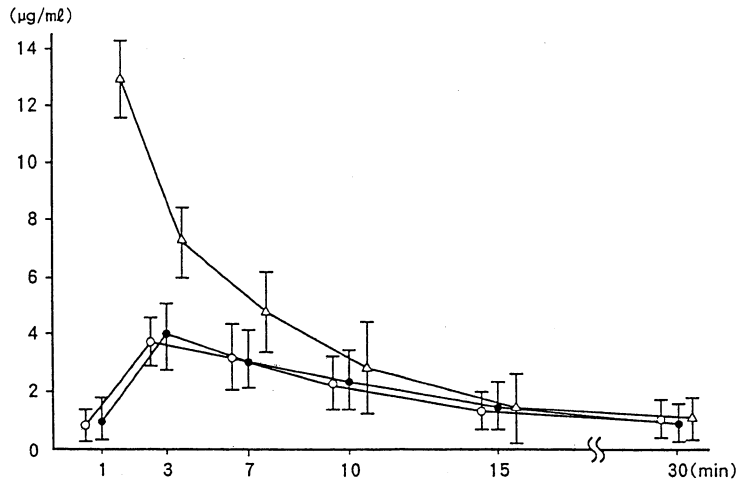


Fig. 2. The drug level in the peripheral vein rose to $3.8 \mu\text{g/ml}$ three-minutes after the end of fructose-pretreated intraportal injection. The level decreased thereafter and became equal to the level recorded after peripheral venous injection (doxorubicin 4 mg/kg).

—△— peripheral venous injection
 —○— intraportal injection without fructose-pretreatment
 —●— intraportal injection with fructose-pretreatment

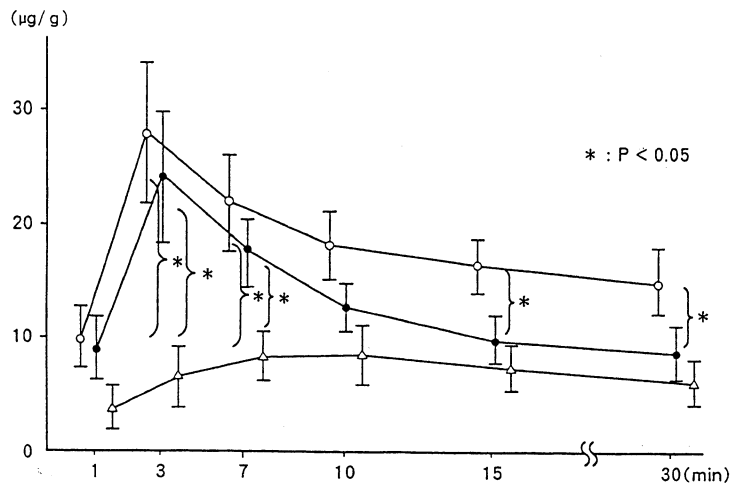


Fig. 3. The drug level in the liver reached a peak ($28.6 \mu\text{g/g}$) three-minutes after fructose-pretreated intraportal injection. The levels 15 and 30 minutes after the same injection were significantly lower than those on corresponding occasions after intraportal injection of the drug without fructose pretreatment (doxorubicin 4 mg/kg). Triangles, hollow and filled circles are the same as those in Fig. 2.

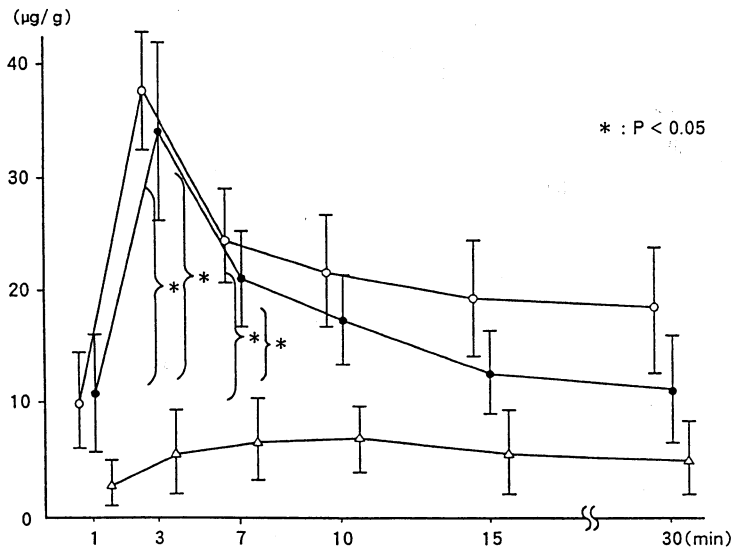


Fig. 4. The drug level in tumors after intraportal injection with or without fructose pretreatment was significantly higher than that after peripheral venous injection (doxorubicin 4 mg/kg). Triangles, hollow and filled circles are the same as those in Fig. 2.

Table 1. The drug level in the liver administered by intraportal injection (doxorubicin 0.2 mg/kg)

	(µg/g)	
	one shot	continuous infusion
lt. upper lobe	9.52±1.30	13.25±3.14
lower lobe	9.52±0.82	8.51±1.54
rt. upper lobe	8.75±1.37	9.02±1.43
middle lobe	8.76±0.57	9.02±3.19
lower lobe	10.93±0.87	10.41±2.04
mean	9.50±0.89	10.04±1.93

(1988, 城ら)¹⁶⁾

少、核酸、細胞膜への制癌剤による影響の減少により、正常肝細胞の障害を防止できる。

先に報告したように、¹⁰⁾ 40% fructose 溶液を5分間、門脈末梢より持続投与すると肝細胞の代謝が一過性に低下し、制癌剤の門脈内投与によるGOT、GPTの上昇を抑制することができ、40% fructose 溶液による制癌剤の抗腫瘍効果の抑制は認めなかった。

制癌剤の種類、投与方法の種々の組合せによる抗腫瘍効果の正確な判定は、基礎生物学的並

びに臨床上の多くの問題を含んでいるため困難なことが多い。^{13)~15)} 経門脈的制癌剤投与方法でも、その特異な血流がしばしば問題となり研究が繰り返されている。門脈から投与された制癌剤の組織濃度を測定した実験で、肝の各葉における組織内濃度に有意な差はない (Table 1).¹⁶⁾ 今回、正常肝組織内濃度測定は、主として正中切開直下の前葉で行い、その他の肝葉でも一部測定して検討したが、分葉間での制癌剤濃度に有意差はなかった。したがって、癌腫の存在部位による制癌剤の到達は、一定と仮定して、fructose 溶液前投与による影響を更に

明らかにするため、肝組織、腫瘍組織と末梢静脈内の制癌剤濃度を経時的に測定した。

40% fructose 溶液の前投与を行っても、肝組織に達する制癌剤濃度は3分値で、前投与を施行しなかった場合と同程度まで上昇するが、しかし、15分後には有意に低下し、肝組織への制癌剤の遺残は減少していた。これは、制癌剤濃度が高い時期に、肝細胞での代謝を抑制していたことにより、膜やミトコンドリアに結合する制癌剤を減少させることができたためと考えられる。これに対し、腫瘍組織内の制癌剤濃度の経時変化では、前投与によってやや15分値以後で低下する傾向があったが、末梢静脈内投与に比べ高値を維持した。腫瘍組織内と肝組織内の濃度比を、40% fructose 溶液前投与の有無で比較すると、前投与を行うことで腫瘍組織内の制癌剤濃度が上昇する傾向にあり、肝細胞内に入った制癌剤も肝代謝が抑制されているため、核酸代謝や膜代謝で取り込まれ、分解する制癌剤の量が減少し、注入後比較的早期に肝細胞内の制癌剤濃度は低下、制癌剤が腫瘍組織に再分布するものと思われた。末梢静脈内の制癌剤濃度

の経時的測定でも、40% fructose 溶液の前投与によって肝組織から再分布された制癌剤の濃度は、40% fructose 溶液前注入を施行しなかった場合と同程度で、経門脈的制癌剤投与による他臓器への影響を軽減するという利点^{17), 18)}に反するものではなく、生体内に取り込まれた制癌剤の薬物代謝^{19), 20)}を考慮すると、40% fructose 溶液前注入併用経門脈的制癌剤投与法は、肝細

胞障害の軽減防止と制癌剤の抗腫瘍効果の増強に有用であると思われる。

稿を終えるにあたり、本実験に際し御指導、御教示をいただきました川崎医科大学消化器外科教室 佐野開三教授に心から深く感謝申し上げます。

また、終始有益な助言と協力をいただきました各センター及び当教室の諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Ensminger, W. D. and Gyves, J. W.: Regional cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 68: 101-115, 1984
- 2) 佐野 博: 肝癌の治療に関する提案. *信州医誌* 18: 502-538, 1969
- 3) 梅北信孝, 岩崎 甫, 中込 博, 上野 明: 門脈内注入時のadriamycinの薬物動態. *山梨医大誌* 2: 69-72, 1987
- 4) Taylor, I., Machint, D., Mullett, M., Trotter, G., Cooke, T. and West, C.: A randomized controlled trial of adjuvant portal vein cytotoxic perfusion in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 72: 359-363, 1985
- 5) Almersjo, O., Bengmark, S. and Hafstrom, L.: Results of liver dearterialization combined with regional infusion of 5-fluorouracil for liver cancer. *Acta Chir. Scand.* 142: 131-138, 1976
- 6) 坂本和義: 原発性肝細胞癌の病理形態学的研究—微小肝癌について—. *久留米医会誌* 39: 18-33, 1976
- 7) 岡部正之: 原発性肝癌の病理学的研究—肝細胞癌における癌結節の皮膜並びに隔壁の形成機転について—*肝臓* 20: 144-156, 1979
- 8) Tanaka, K. and Ichihara, A.: Different effects of amino acid deprivative on synthesis of intra- and extracellular proteins in rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 94: 1339-1348, 1983
- 9) Smith, C. M., Rovano, L. M. and Raivio, K. O.: Fructose induced adenine nucleotide catabolism in isolated rat hepatocytes. *Can. J. Biochem.* 55: 1237-1240, 1977
- 10) 延藤 浩: 肝癌に対する制癌剤の経門脈的投与療法に関する基礎的研究—肝細胞障害防止と効果増強について—. *川崎医会誌* 16: 29-38, 1990
- 11) Thurnherr, N., Deschner, E. E. and Lipkin, M.: Induction of adenocarcinoma of the colon in mice by weekly injection of 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 33: 940-945, 1973
- 12) 安富正幸: 1, 2-dimethylhydrazine と n-methyl-n'-nitro-n-nitrosoguanidine の併用によるラット実験腸発癌. *日癌治療会誌* 21: 978-984, 1986
- 13) 松浦知和, 永森静志, 藤瀬清隆: Fluorochrome を用いた chromatine DNA の colorimetric assay 法による単層培養細胞増殖動態の検討. *医のあゆみ* 142: 957-958, 1987
- 14) Carmichael, J., Degraff, W. G. and Gazdar, A. F.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942, 1987
- 15) 永森静志, 藤瀬清隆, 蓮村 哲, 本間 定, 筋野 甫, 松浦知和: 培養肝細胞を用いた障害実験—培養肝細胞の障害判定と新しい方法の検討—. *肝・胆・膵* 9: 269-275, 1989
- 16) 城 一也: 門脈内アドレアマイシン (ADM) 注入法の実験的研究並びに臨床例による検討. *日小児外会誌* 24: 29-38, 1988
- 17) Harris, P. A. and Gross, J. F.: Preliminary pharmacokinetic model of adriamycin (NSC123-127). *Cancer Chemotherapy Reports Part 1* 59: 819-825, 1975

- 18) Chen, H. G. and Gross, J. F. : Intra-arterial infusion of anticancer drugs : Theoretic aspects of drug delivery and review of responses. *Cancer Chemotherapy Reports Part 1* 59 : 826—833, 1980
- 19) 田口鉄男：動注化学療法の理論と実際—薬物動力学的研究の重要性—。癌と化療 11 : 1717—1728, 1984
- 20) 藤田 浩, 刀根 弘, 井口博史：抗癌剤の Pharmacodynamics—とくに adriamycin, THP-adriamycin, aclacinomycin について—。Oncologia 7 : 92—106, 1983