

## 切除不能肝癌に対する塞栓癌化学療法の実験的研究

千葉大学医学部第1外科

藤本 茂 遠藤 文夫 宮崎 勝 高橋 修  
志村 賢範 菅沢 寛健 河田 滋 栗原 正利  
セレスター R.D. 奥井 勝二

### AN EXPERIMENTAL STUDY ON CHEMOEMBOLIZATION FOR INOPERABLE HEPATIC CANCER

Shigeru FUJIMOTO, Fumio ENDOH, Masaru MIYAZAKI, Osamu TAKAHASHI  
Takanori SHIMURA, Hirotake SUGASAWA, Shigemi KAWATA  
Masatoshi KURIHARA, Ram Dhoj SHRESTHA and Katsuji OKUI  
The First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University

切除不能肝癌治療の基礎的検討として牛血清アルブミンを担体とした直径 $45 \pm 8 \mu\text{m}$ のマイトマイシン小球体 (mitomycin C microsphere—MMC MS—) を作製して大黒鼠の肝動脈より注入し、その除放性と肝組織に対する影響について検索した。MMC MS 注入後の肝静脈よりの薬剤流出の半減時間は約85分であり、明らかな徐放性が認められた。市販 MMC, placebo MS の注入では肝組織に変化を認めないが、MMC MS の場合は投与24時間後に肝細動脈の領域に necrobiosis を認め、次いで壊死へと進展し、投与3週間後に肝動脈内に MMC MS の残留を認めた。以上、MMC MS は MMC を肝癌病巣に選択的に長時間集中させることが可能であり、切除不能肝癌症例に対する塞栓化学療法としての有用性が示唆された。

索引用語：制癌剤含有小球体，塞栓化学療法，肝癌

#### 結 言

肝悪性腫瘍の根治は腫瘍の治癒切除によってのみ可能であり、手術方法の進歩により原発性肝癌、転移性肝癌ともにその切除症例の増加を見ているが、ほかの消化器悪性腫瘍に比べてその切除率は極端に悪く、また、肝切除を受けた症例の生存率も同様に低いのが現状である。一方、肝腫瘍はその栄養のほとんどを肝動脈血に依存している<sup>1)</sup>ので、肝動脈内に制癌剤を投与することにより腫瘍内の制癌剤濃度を選択的に高めて治療効果を増強することが可能であり、著者らは転移性肝癌に対する持続的肝動脈内化学療法により4例の治癒症例を報告している<sup>2)~5)</sup>。肝動脈内化学療法では薬剤は固有肝動脈に注入するが、注入した薬剤は肝腫瘍に流入して速やかに肝静脈へと排出するため、「薬剤濃度×作用時間」は必ずしも満足すべきものではなく、

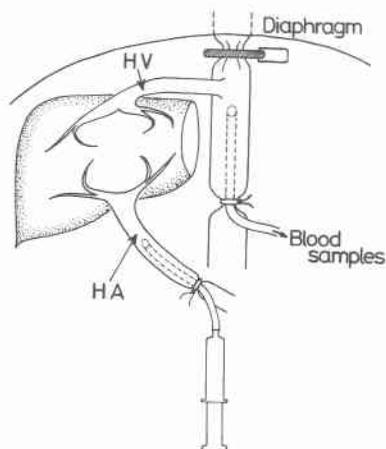
この欠点をいわゆる「作用時間依存性薬剤」の持続注入により補ってきた。しかし、肝癌に強い感受性を有する「濃度依存性薬剤」を肝動脈内に持続的に注入し、高い濃度で長時間作用させた方がはるかに強力な制癌作用が得られるが、この場合は宿主が副作用に耐えられないという矛盾がある。著者らはこれに対する解決策として腫瘍を栄養する毛細血管の直前の細動脈内に薬剤の micro-depot を作ることにより、高濃度の薬剤を長時間病巣に作用させることを可能とする塞栓化学療法を検討してきた<sup>6)~8)</sup>。本稿においては切除不能肝癌症例に対する治療の基礎的検討として、ラット肝動脈より注入したマイトマイシン含有小球体 (mitomycin microsphere—MMC MS—) を用いた塞栓化学療法について報告する。

#### 研究対象と研究方法

##### 1. 研究方法

エーテル麻酔により雄性 Wistar rat を上腹部正中切開により開腹し、Miyazaki らの方法<sup>9)</sup>に準拠して図

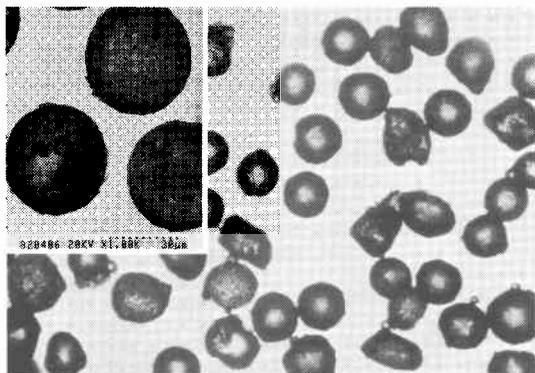
図1 研究方法



1のように固有肝動脈，上大静脈，肝静脈，腎静脈を露出する。次いで上大静脈に polyethylene tube を挿入し肝静脈流入部にまでその先端を進めて固定した後，固有肝動脈に市販マイトマイシン（conventional MMC—con MMC—）あるいは MMC MS を MMC として 1.2mg/kg 注入し，その後経時的に上大静脈の横隔膜直下と腎静脈直上を遮断して上大静脈内の血液を急速に吸引除去した後，緩徐な吸引により肝静脈血を採取した。薬剤投与 5，15，30，60，120分後に肝静脈血を採取し，Escherichia coli B を用いた bioassay<sup>10)</sup> により MMC 濃度を測定した。

一方，薬剤を肝動脈より注入するのみで肝静脈血を採取しないラットを，投与24時間，3，5，7，14，21日後に断頭屠殺し，肝組織を採取して hematoxylin-eosin 染色後，肝組織と肝動脈内の MMC MS の変化などの検討を目的として検鏡した。

図2 MMC MS の光顕像と走査電顕像



## 2. マイトマイシン小球体の作製

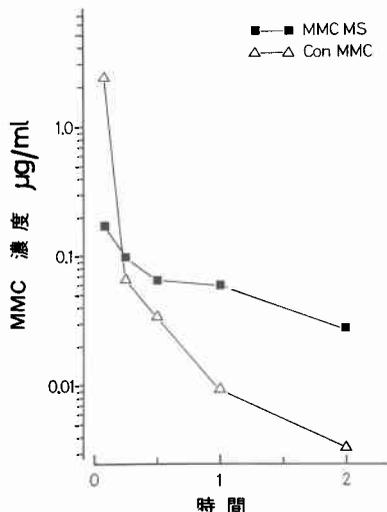
MMC MS は図2のように  $45 \pm 8 \mu\text{m}$  の直径を有し，牛血清アルブミン中に約 5% の割合で MMC を均等に含有する小球体である。in vitro における徐放性は常時攪拌している protease を含まない磷酸緩衝液中で，72時間に含有している MMC の約 20% を放出することが確認されている<sup>7)</sup>。その製法は Scheffel らの方法<sup>11)</sup> を改良したものであり，牛血清アルブミンと MMC を均等に混じた水溶液に界面活性剤である Span 85 を入れ，これを漸次加温する綿実油中に投入攪拌しつつ  $170^\circ\text{C}$  まで加熱する。この過程により MMC を含有する牛血清アルブミンは W/O 型の micro-emulsion となるので，自然冷却後に遠沈して綿実油を除き，さらに ethyl ether, ethyl alcohol 処理により小球体内の油分と水分を除去し，直径  $45 \pm 8 \mu\text{m}$  の MMC MS を無菌的に回収する。図2は MMC MS の光顕と走査電顕像である。

## 成 績

### 1. 肝静脈内 MMC 濃度の検討

con MMC 1.2mg/kg を肝動脈内に投与した際の肝静脈血中濃度（図3）は，投与15分後には投与5分後の約  $1/40$  となり，その後約 18 分の半減時間によって投与1時間後には  $0.01 \mu\text{g/ml}$  前後の血中濃度となり，2時間後には測定限界前後にまで減少した。一方，MMC MS を MMC として 1.2mg/kg 投与（図3）した場合，投与5分後における肝動脈血中濃度は con MMC の約  $1/10$  であるが，その後は2相性をもって con MMC

図3 MMC MS と市販 MMC の肝動脈内投与後の肝静脈血中 MMC 濃度の経過



に比べて緩やかに減少し、投与2時間後において約 $0.04\mu\text{g/ml}$ となった。

## 2. 肝組織への影響と MMC MS の血管内残留性

MMC MS の肝動脈内投与24時間後(図4)には MMC MS が塞栓した肝細動脈支配領域の肝組織は necrobiosis となるが, con MMC あるいは placebo MS (図5)を投与した肝組織には認められるべき変化をきたさなかった。

MMC MS 投与7日後の肝組織(図6)は, 塞栓細動脈の領域は完全な壊死に陥り, その周囲には壊死組織が吸収されて置換った線維組織の増生と巨細胞を認めた。図7は MMC MS 投与7日後の肝小葉内細動脈に残留している直径の小さくなった MMC MS であ

図4 肝動脈内 MMC MS 投与24時間後の肝組織像(×100)

肝細動脈の支配領域に細胞浸潤をともなう肝組織の necrobiosis を認め, 正常肝組織との間に線維組織の増生を認めない。

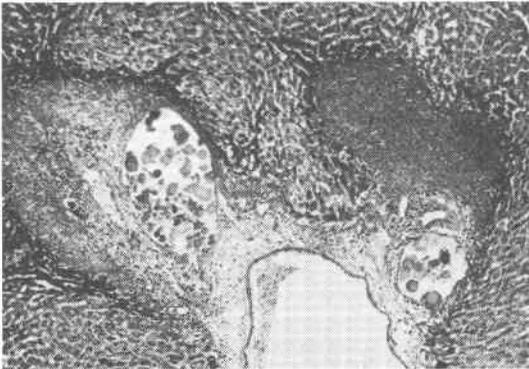


図5 肝動脈内 placebo MS 投与24時間後の肝組織像(×100)

placebo MS の塞栓している肝細動脈の領域には変化を認めない。

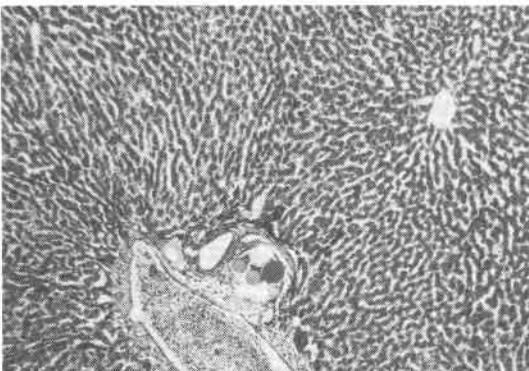


図6 肝動脈内 MMC MS 投与7日後の肝組織像(×100)

左側は正常肝組織であり, 中央稍左側が増生した線維組織で1個の巨細胞を認める。中央より右側はすべて壊死組織である。

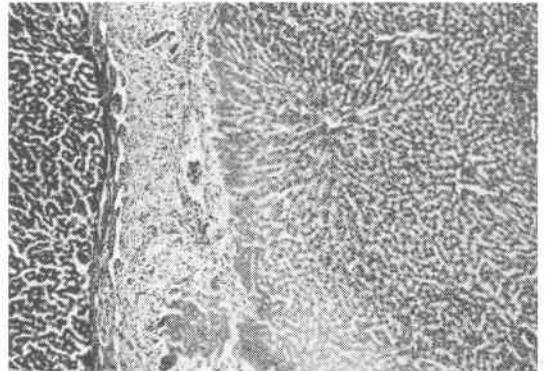
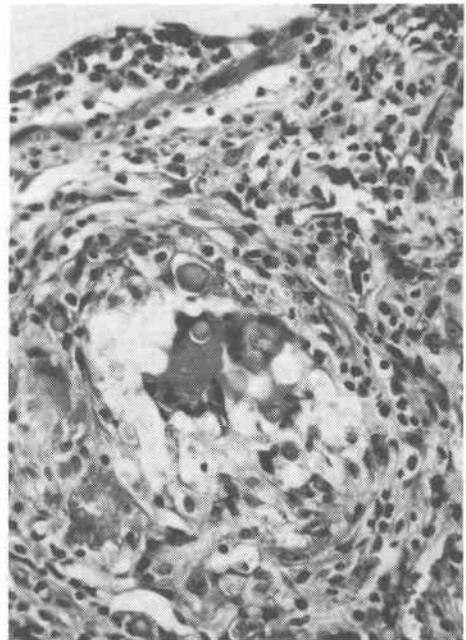


図7 MMC MS 投与7日後において貪食過程にある MMC MS(×400)



る。おそらく末梢血中の単球由来と考えられる macrophage によって貪食過程にある MMC MS と考えられる。図8は MMC MS 投与2週後の肝組織であり, 投与1週後のそれと比べて壊死巣の吸収が進んでいるために壊死巣に濃淡を認めるとともに, 周囲の線維組織がより大きくなっている。

MMC MS 投与3週後における肝小葉間細動脈(図

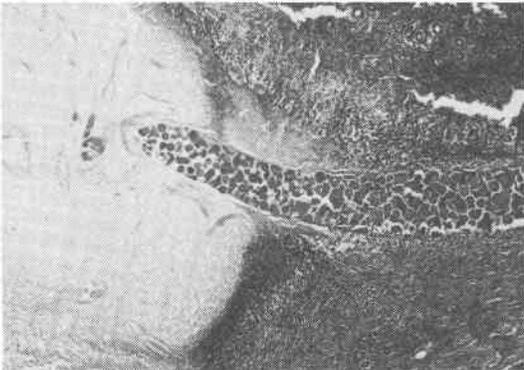
図8 肝動脈内 MMC MS 投与 2 週後の肝組織像 (×40)

肝細動脈周辺はすべて壊死組織であるが、壊死組織は吸収過程にあって周辺部より線維組織によって置換っている。



図9 MMC MS 投与 3 週後における肝小葉間細動脈内の MMC MS (×40)

左側はすべて壊死像を呈しており、右側は壊死組織をすでに吸収して増生した線維組織。



9)には、いまだ MMC MS が充満しており、その末端の部分に認められる壊死巣は、この細動脈あるいは近接した細動脈に支配されていた肝組織の壊死と考えられる。

#### 考 察

現在用いられている制癌剤の多くは核酸代謝を阻害

することにより細胞分裂—腫瘍増殖を抑制している。その作用は正常細胞と癌細胞のいかに問わず等しく発揮されるために、癌細胞に対してより選択的に作用させるように種々試みられており、本稿の MMC MS は標的腫瘍を養う細動脈内に塞栓を形成することが特徴である。その *in vitro* における徐放性では72時間内に含有する MMC を20%前後放出するのみである<sup>78)</sup>。しかし、血中には種々の protease が含まれているので、*in vivo* においてはその徐放性が促進されるものと推定された。対照としての con MMC 投与の場合(図3)投与後15分以内においては約2分の半減時間であるが、15~60分、60~120分の間ではそれぞれ約18分、45分の半減時間により減少している。15~60分における半減時間は MMC の全身投与の際の投与直後の末梢血の半減時間とはほぼ同じであるので、con MMC の肝動注では注入した薬剤は15分以内に完全に肝より流出し、その後肝を通過する MMC は全身投与と同様のものと考えらるべきであろう。

一方、MMC MS の場合投与後30分以内は約16分の半減時間をもって肝静脈血濃度が減少するが、それ以降は70~90分の半減時間である。肝に流入する門脈血と肝動脈血の割合をヒトとラットで同じ割合であると仮定すると、肝小葉間細動脈枝より毛細血管の間における薬剤濃度は肝静脈血濃度の5~10倍、すなわち投与直後より少なくとも2時間にわたって0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度と推定され、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後の濃度はこの後相当長時間続くものと推定している。

計測された MMC MS の直径は水分を含んでいない場合のものであるので、血中においては膨潤してその直径が大きくなるものと考えられる。図2の MMC MS 中球形でないものが見受けられるが、このような MS はその形と表面積が大きいなどの理由から、より膨潤の度が大きく、さらに、細動脈の搏動などによって血中 protease の働きを受ける前に物理的に細片化されるものと推定している。MMC MS の投与30分後までの16分の半減時間をもつ期間は、このような細片化した MMC MS に由来する MMC であり、図3の MMC MS と con MMC の経過より検討すると投与された MMC MS の約10%がこのように細片化され、投与直後の高濃度の MMC の因となるものと推定している。一方、MMC MS 投与30分以後は血中 protease などによる MMC MS 本来の薬剤の放出と考えられ、投与9~10時間前後までの「肝細動脈—毛細血管」における MMC 濃度は0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後と推定している。

これは con MMC 投与の場合の投与30分前後とほぼ同値であると同時に、con MMC の際は肝動脈血、門脈血、末梢血中濃度の3者が投与30分後にすべてほぼ同一となるのに対して、MMC MS の場合は MMC MS の塞栓している細動脈の支配領域のみが選択的に高い濃度であり、末梢血中濃度は循環血液によって希釈されてさらに低濃度になるので、臨床応用の際の骨髄抑制の軽減などに役立つものと考えている。

以上の MMC MS の徐放性と肝細動脈支配領域への高濃度の薬剤の放出は、図4より明らかである。しかし、この場合 placebo MS では図5のように細動脈を塞栓してもその領域の肝細胞には明らかな組織学的変化をきたしてはならず、また、con MMC によっても見られないので MMC MS の肝組織に対する作用はその塞栓効果によるものではなく高濃度の MMC の持続流入による効果と考えるべきである。MMC MS による肝組織障害は投与後24時間には図4のようにすでに認められるが、3日、5日、7日と時間の経過とともにその壊死巣はさらに大きくなるので、図3が示す MMC MS の長時間の徐放性はその組織障害性に大きく貢献している。

肝動脈内に注入された MMC MS は前記のように血中 protease によって消化されてその直径が小さくなって行くが、内径200 $\mu$ m 以上の肝小葉間細動脈を多くの MMC MS が集束して塞栓した場合は、図9のようにやや縮小した MMC MS が投与3週後においてもいまだ血管内に存在しており、その後時間の経過とともにさらに末梢へと MMC を放出しつつ移動するものと想定している。一方、毛細血管の直前の肝細動脈に塞栓した場合は、より直径の太い細動脈に集束している場合よりも早い速度で血中 protease の消化を受け、図7のように投与1週後にその直径は小さくなって末梢血中の単球由来の macrophage あるいは Kupffer 細胞によって貪食され処理されるものと思われる。

図6と図8の壊死巣周辺の組織像は2週間の方がより幅が広く、また、壊死巣そのものも投与1週後では均等な壊死であるのに対し、2週間においては線維組織によって部分的に置き換っており、MMC MS による組織障害よりの修復過程と認められる。これは MMC MS 投与による組織障害は5~7日が最高であって、それ以後は MMC MS より放出される MMC の量が少ないと見るべきであり、これは肝癌組織に対しても当然適用されるものと考えられる。

加藤ら<sup>12)</sup>は ethylcellulose を担体とした制癌剤の小球体を主に腎癌に用いて好成績を収めているが、著者らは Scheffel<sup>11)</sup>の変法を用いて牛血清アルブミンを担体としている。加藤らの小球体は生体で代謝分解されない ethylcellulose で MMC を封入したものであり、作製中の滅菌処理が煩わしく、その大きさが均一になりにくいのが、作製が簡単であるという利点がある。著者らの小球体は生体内で代謝分解される—biodegradable—担体を用い、作製過程において170℃の高温処理を行うために360℃の融点を有する MMC の制癌性に無関係に完全な滅菌が可能であり、その大きさにおいても均一性を保持しうるのが、逆に高温の綿実油を用いる点が欠点ともいえる。

以上、MMC MS の肝動脈内投与により肝組織障害は投与24時間後には出現し、投与5~7日後に最高になるものと想定され、MMC の徐放効果は明らかである。しかし、MS そのものによる塞栓効果は門脈からの血流という二重支配のためか期待を裏切る成績であるが、臨床応用に際しては安全性において満足すべき結果を惹らすものと考えられる。

#### 結 語

牛血清アルブミンを担体とした直径45±8 $\mu$ m の biodegradable MMC MS を作製し、切除不能肝癌治療の前臨床試験として Wistar rat の肝動脈内に MMC MS を注入し以下の成績を得た。

1. 肝動脈内に MMC MS を投与した際の半減時間は約85分であり、一方、市販 MMC のそれは約2分であり、明らかな徐放性を示した。
2. MMC MS 投与 Wistar rat 肝には投与24時間以降に肝内肝動脈周辺に壊死を認めたが、市販 MMC、placebo MS の投与では変化は認められなかった。
3. MMC MS は投与3週後においても肝動脈内に認めることができた。

以上、MMC MS は肝悪性腫瘍に対しての塞栓化学療法に対して有用であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Breedis C, Young G: The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* 145: 969—977, 1954
- 2) Fujimoto S, Miyoshi T, Nomura Y et al: Intra-arterial cancer chemotherapy with combined anticancer agents. *Jpn J Surg* 3: 32—39, 1973
- 3) Fujimoto S, Miyazaki M, Kitsukawa Y et al: Comparative efficacy of antitumor treatment

- for liver metastases from colorectal cancer. *Jpn J Surg* 11 : 167—174, 1981
- 4) Fujimoto S, Miyazaki M, Okui K : Antitumor treatment for synchronous hepatic metastasis from stomach cancer. *J Jpn Soc Cancer Ther* 17 : 1864—1872, 1982
  - 5) 藤本 茂, 奥井勝二 : 肝転移を伴う胃癌症例の治療. *消化器外科セミナー* (6). 東京, へるす出版, 1982, p109—126
  - 6) 遠藤文夫, 藤本 茂, 橋川征夫ほか : 効果増強を目的とした制癌剤封入アルブミン小球体の基礎的検討. *医のあゆみ* 123 : 809—811, 1982
  - 7) 藤本 茂, 遠藤文夫, 森本雅憲ほか : 制癌剤を含む biodegradable microsphere の検討. *癌と化療* 10 : 1328—1333, 1983
  - 8) Fujimoto S, Endoh F, Kitsukawa Y et al : Continued in vitro and in vivo release of an anti-tumor drug from albumin microspheres. *Experientia* 39 : 913—916, 1983
  - 9) Miyazaki M, Makowka L, Falk RE et al : Hyperthermochemotherapeutic in vivo isolated perfusion of the rat liver. *Cancer* 51 : 1254—1260, 1983
  - 10) 藤田 浩 : 制癌剤の体内分布—測定法 (第一部). *癌と化療* 1 : 497—503, 1974
  - 11) Scheffel U, Rhodes BA, Natarajan TK et al : Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J Nucl Med* 13 : 498—503, 1972
  - 12) 加藤哲郎, 新藤雅章 : 腎癌に対する MMC マイクロカプセル動注法の適応と効果. *癌と化療* 9 : 357—364, 1982
-