

肝切除後再生肝に対する経門脈性リピオドールおよび aclarubicin 投与の安全性に関する基礎的検討

千葉大学医学部第1外科

鈴木 裕之 宮崎 勝 磯野 敏夫 奥井 勝二

肝切除後の残肝再発の抑制を目的として、経門脈的なりピオドール(LP)およびaclarubicin(ACR)投与の正常肝と肝切除後再生肝に及ぼす影響をラットを用い検討した。①正常肝でのLPおよびACRの門脈内投与による血清transaminase値、アミノピリン呼吸テスト(ABT)値の経過は生食群と差を認めなかった。②再生肝DNA合成能はLPおよびACRにより24時間で有意の抑制を認めたが、そのピークは生食群の24時間に比べ36時間以降に遅延していた。③再生肝における血清transaminase値の上昇は正常肝に比べ強いが生食群と差を認めず、またABTも生食群と差異を認めず回復し、3週目で前値に復した。④生存率は正常肝、再生肝で全群100%であった。以上よりLPおよびACRの門脈内投与は正常肝への影響は少なく、再生肝に対しては肝切除直後の軽度の肝再生の抑制と遅延をもたらすも、その後の肝細胞機能の回復は順調で、投与量および時期を考慮すれば安全な方法と思われた。

Key words : hepatectomy, intraportal chemotherapy, lipiodol, liver regeneration

結 言

転移性肝癌に対して、肝切除術は積極的に適応されるようになってきたが、その予後は生存率でもいまだ満足すべき状態とはいいがたい^{1)~5)}。また肝切除後再発様式としては残肝再発が極めて多く、その対策は予後向上に結びつく重要な課題といえよう。これらの残肝再発は肝切除時に既に残肝に臨床的に確認しえない微小転移巣が存在し、そこより発生するものと推察される。肝内の微小転移巣に対しては門脈血流の優位性が報告されており⁶⁾、また制癌剤の門脈内投与により肝内微小転移巣の癌細胞を高濃度の薬剤にさらさせることが可能であり、肝切除後の残肝再発のコントロールとして経門脈性の制癌剤投与が期待される。しかしながら肝切除後の再生肝細胞は種々の障害因子に対して極めて脆弱であることは、すでに肝切除後の径動脈性の制癌剤投与および肝動脈塞栓に関する実験的検討により報告してきた^{7,8)}。今回はアントラサイクリン系制癌剤であるaclarubicin(ACR)、リピオドール(LP)およびaclarubicinとリピオドールを同時に経門脈的に投与した場合の、正常肝と肝切除後再生肝に

及ぼす影響をラットを用い基礎的に検討した。

材料および方法

WISTAR系雄性ラット(250~350g)を用い、エーテル吸入麻酔下に開腹し、正常肝およびHiggins & Anderson⁹⁾の方法に準じた68%肝部分切除後の残存肝において、門脈の幽門枝より内径0.5mm外径0.8mmのビニールチューブ(Dural社)を門脈本幹に挿入留置し、リピオドール(LP)(Laboratoire Guerbet, France)0.2, 0.5ml/kg、制癌剤としてaclarubicin(ACR)(山之内KK)1.3, 3.3mg/kg、およびLP0.2ml/kg+ACR1.3mg/kg併用群を設け、おのおの注入した。LP+ACRの作製は18G金属管にて内容が均一になるまで混合した。対照として生食水1.0ml注入群を設けた。注入後はチューブを抜去し、門脈幽門枝を結紮、腹腔内にPiperacillin natrium(富山化学KK)40mg/kgを投与し、2層に閉腹した。なお全操作は清潔下(非滅菌)に行われた。注入後以下の項目につき検討を加えた。

(1) 血清肝機能値の測定

門脈注入前と注入後1, 2, 5, 10, 14, 21日目に、眼静脈穿刺にて約1.0mlを経時的に同一ラットより採血、血清GOT, GPT値をSTA-test Wako(和光純薬)を用いて測定し、Karmen単位で表した。また血清

total bilirubin 値を Bilirubin BII-test Wako (和光純薬) を用いて測定した。

(2) 肝マイクロゾーム機能の測定

肝マイクロゾーム機能の測定は、既報のごとく¹⁰⁾in vivo における¹⁴C アミノピリン呼気テスト (aminopyrine breath test: 以下 ABT と略す) により行った。すなわち、¹⁴C-aminopyrine 0.2 μ Ci/mg を含む aminopyrine 総量16.7mg/kg を腹腔内に投与し、呼気中の CO₂ を1N NaOH にトラップし、30分間の総排泄¹⁴CO₂量を液体シンチレーションカウンターにて測定し、d.p.m.にて表現した。

(3) 再生肝 DNA 合成能の測定

門脈注入の肝再生能に与える影響とし、68%肝切除と同時に残肝に経門脈的に薬剤を投与し、その24時間、36時間および48時間後にラットを屠殺、再生肝を摘出し、Lerly¹¹⁾、三浦ら¹²⁾らの方法に準じて DNA 合成能を測定した。DNA 合成能は、³H-thymidine の肝 DNA への取り込みを指標として表した。すなわち摘出再生肝を0.5mmの切片とし、その2片に対し、20 μ Ci の³H-thymidine (Sigma 社) を含む5ml の Hank's solution を加え、95% O₂-5% CO₂下、37°C において2時間インキュベートした後、DNA を抽出し、液体シンチレーションカウンターにて³H-thymidine の取り込みを測定、この値を、diphenylamine 法で測定した DNA 含量で除した値、d.p.m./OD₆₀₀×1,000をもって DNA 合成能を表現した。なお Sham 群として68%肝切除単独群を設けた。

(4) 再生肝重量の測定

68%肝切除を行う際、切除肝重量を測定し、これにより残存肝重量を推量した。肝切除後24時間、36時間、48時間および21日目に屠殺し、再生肝重量を測定、肝重量の固体差を考慮し、重量増加は再生肝重量を切離時推定残存肝重量で除した値により表示した。

(5) 生存率

各群ラットについて、3週間にわたり生存率を観察した。結果の統計学的処理は Student's t テストにより行った。また生存率の比較は χ^2 -テストにより処理した。

結 果

(1) 正常肝における血清肝機能値の変化

Table 1 Changes in serum GOT, GPT and T-Bil values after lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein in normal liver

	PRE	2 ^{a)}	5	10	14	21
GOT (Karmen Unit)						
Saline	115 ± 16 ^{b)}	253 ± 3	223 ± 28	187 ± 31	114 ± 20	122 ± 29
LP ^{c)}	120 ± 13	220 ± 7	220 ± 16	174 ± 19	155 ± 21	133 ± 15
ACR ^{d)}	107 ± 8	233 ± 8	258 ± 23	183 ± 13	167 ± 18	96 ± 6
GPT (Karmen Unit)						
Saline	44 ± 3	90 ± 10	46 ± 5	45 ± 5	48 ± 5	46 ± 2
LP	42 ± 4	113 ± 16	86 ± 2	48 ± 6	40 ± 5	42 ± 4
ACR	40 ± 2	88 ± 28	73 ± 13	65 ± 1	66 ± 1	41 ± 4
T-BIL (mg/dl)						
Saline	0.20 ± 0.10	0.56 ± 0.17	1.04 ± 0.04	0.61 ± 0.14	0.30 ± 0.19	0.08 ± 0.03
LP	0.23 ± 0.02	0.88 ± 0.64	0.32 ± 0.06	0.56 ± 0.28	0.43 ± 0.39	0.13 ± 0.02
ACR	0.16 ± 0.06	0.60 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.11	0.27 ± 0.11	0.19 ± 0.18

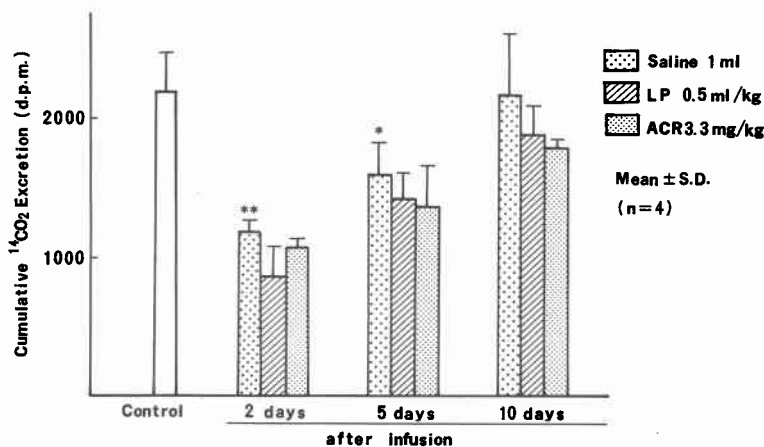
a) Days after infusion

b) Mean ± S.D.

c) Lipiodol 0.5ml/kg via portal vein

d) Aclarubicin 3.3mg/kg via portal vein

Fig. 1 Changes in aminopyrine N-demethylase activity following lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein in normal liver



* P < 0.05 in comparison with control group

** P < 0.01 in comparison with control group.

門脈内投与後血清 GOT 値は、2 日目に LP 群 ACR 群で軽度の上昇を示すが、生食群においても軽度の上昇を示し、群間に有意差を認めずその上昇も一過性であった。血清 GPT 値の変動も、上昇の程度は低いが GOT 値とほぼ同様の傾向を示した。また total bilirubin 値も同様に群間に有意差を認めなかった (Table 1)。

(2) 正常肝における ABT 値の変化

ABT 値よりみた肝マイクロゾーム機能は、門脈内投与後 2 日目に各群とも control 群の 40~50% と最低値を示し、生食群では 10 日目にほぼ前値に復した。これに比べ、LP 群、ACR 群では ABT 値が生食群に比べやや低い傾向をみるが、群間に有意差を認めなかった (Fig. 1)。

(3) 再生肝における血清肝機能値の変化

血清 GOT の上昇は正常肝に比べより著明であり、1 日目で LP 群 ACR 群 LP+ACR 群ともにピークを示すが、生食群とほぼ同様の変動を示しており差を認めなかった。またこの上昇は一過性であった。血清 GPT 値の変動も GOT 値とほぼ同様の傾向を示し、血清 total bilirubin 値は全ての群において明らかな変動を示さなかった (Table 2)。

(4) 再生肝 DNA 合成能への影響

肝部分切除と同時に門脈内投与を施行した場合の再生肝 DNA 合成能は、Sham 群で 1,114 ± 254 (d.p.m./OD₆₀₀ × 1,000) (Mean ± S.D.) であり、生食 1ml 門注群では 1,153 ± 159 と差を認めない。これに対し、LP 0.2ml/kg の門脈内投与群では 753 ± 185 (p < 0.01)、LP 0.5ml/kg 投与群では 785 ± 72 (p < 0.01) と明らかな抑制を認めた。また ACR 1.3mg/kg 投与群でも

569 ± 346 (p < 0.05)、ACR 3.3mg/kg 投与群で 524 ± 221 (p < 0.01) と強い抑制を認めた。また LP+ACR 群では 733 ± 103 (p < 0.01) と LP 単独群とほぼ同程度の抑制を認めた。これに対し、ACR 1.3mg/kg 末梢静注群では 1,036 ± 119 と抑制を認めていない (Fig. 2)。

Fig. 2 Influence of lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein on DNA synthesis in regenerating liver 24 hours after hepatectomy

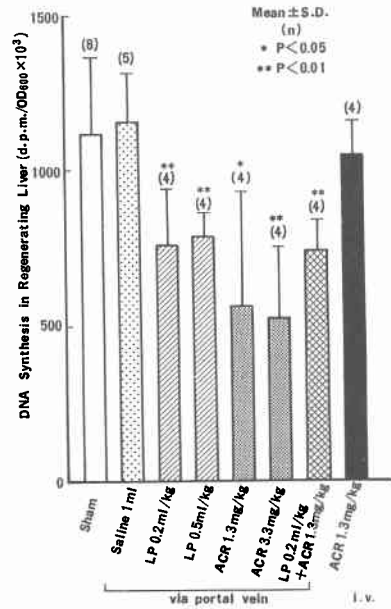


Fig. 3 Time course of DNA synthesis following lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein in regenerating liver

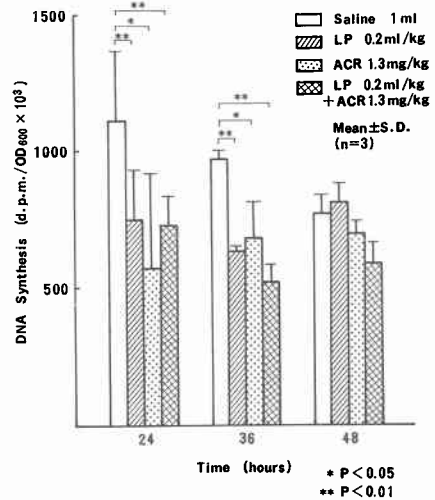


Table 2 Changes in serum GOT, GPT T-Bil values after lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein in regenerating liver

	PRE	1 ^{a)}	2	5	10	14	21
GOT (Karmen Unit)							
Saline	121 ± 13 ^{b)}	968 ± 176	416 ± 85	247 ± 38	193 ± 36	163 ± 27	120 ± 24
LP ^{c)}	126 ± 8	1333 ± 656	548 ± 192	210 ± 5	188 ± 19	181 ± 1	139 ± 7
ACR ^{d)}	118 ± 5	1309 ± 497	357 ± 94	271 ± 31	220 ± 28	200 ± 19	126 ± 7
LP + ACR ^{e)}	115 ± 16	998 ± 279	351 ± 104	222 ± 16	195 ± 12	182 ± 15	128 ± 14
GPT (Karmen Unit)							
Saline	41 ± 2	291 ± 97	176 ± 59	101 ± 47	65 ± 14	71 ± 12	58 ± 9
LP	47 ± 5	531 ± 417	181 ± 63	76 ± 6	58 ± 15	30 ± 2	44 ± 7
ACR	40 ± 3	497 ± 209	175 ± 43	111 ± 12	66 ± 6	83 ± 2	61 ± 6
LP + ACR	44 ± 3	363 ± 176	154 ± 29	102 ± 12	59 ± 5	73 ± 9	59 ± 1
T-BIL (mg/dl)							
Saline	0.16 ± 0.06	0.65 ± 0.20	0.69 ± 0.12	0.63 ± 0.16	0.32 ± 0.29	0.23 ± 0.11	0.17 ± 0.17
LP	0.22 ± 0.06	0.52 ± 0.13	1.16 ± 0.16	0.26 ± 0.18	0.5 ± 0.24	0.48 ± 0.01	0.11 ± 0.06
ACR	0.17 ± 0.15	0.63 ± 0.19	0.68 ± 0.52	1.0 ± 0.16	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.14	0.07 ± 0.06
LP + ACR	0.20 ± 0.10	0.78 ± 0.37	0.72 ± 0.46	0.68 ± 0.38	0.25 ± 0.09	0.30 ± 0.16	0.15 ± 0.15

a) Days after infusion
 b) Mean ± S.D.
 c) Lipiodol 0.2 ml/kg via portal vein
 d) Aclarubicin 1.3 mg/kg via portal vein
 e) Lipiodol 0.2 ml/kg + Aclarubicin 1.3 mg/kg via portal vein

同様に肝部分切除後36時間、48時間後のDNA合成能を測定すると、生食群が24時間後にピークを呈するの比べ、LP群 ACR群 LP+ACR群ではDNA合成能のピークが36時間以降に遅延する傾向を認め、48時間目では生食群に比べ、LP群 ACR群 LP+ACR群との間に差異を認めなくなっている (Fig. 3).

(5) 再生肝重量の測定

DNA合成能で抑制の認められた肝切除後24時間、36時間での再生肝重量比は、生食群に比べLP群、ACR群、およびLP+ACR群で軽度の抑制傾向を認めたが有意差は示し得なかった。肝切除後21日目の再

生肝重量比では、生食群、LP群、ACR群、LP+ACR群、各群間に明らかな有意差を認めなかった (Fig. 4).

(6) 再生肝における ABT 値の変化

各群とも2日目にcontrol群の約20%と最低値を示すが、群間に有意差を認めなかった。その後生食群とLPおよびACR群はほぼ同様に回復し、21日目ではすべての群で前値と有意差ないまでに回復している (Fig. 5).

(7) 生存率

正常肝および肝切除後の残肝に門脈内投与した各群とも、3週目において100%の生存率を得た。

考 察

今日の診断技術、手術手技の向上で転移性肝癌に対しても肝切除術はほぼ安全に施行できるようになり、治療手段としても確立されてきている。しかしながらその予後は、いまだ満足できる状態とはいえず、特に残肝再発が極めて多く、死因としてはこれに起因する癌死がほとんどであるのが現状である²⁾⁴⁾⁵⁾。これらの残肝再発は肝切除時に既に残肝に微小転移巣として存在しているものと推察され、これに対する治療法が必要となる。

Strohmeier⁶⁾は転移性肝癌の剖検例にて、macrometastasisの43%にその周囲にmicrometastasisを認め、それらのうち200 μ m以下の大きさのものはsinusoidの中に存在し、ほぼ門脈血流支配であると述べている。また西田¹³⁾も転移性肝癌の切除肝において、macrometastasis周囲に33.3%にmicrometastasisの存在を見出し、主転移巣から離れた門脈内の癌

Fig. 4 Regenerating ratio of liver weight 3 weeks after infusion

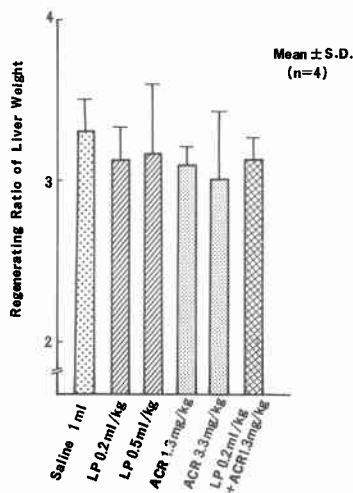
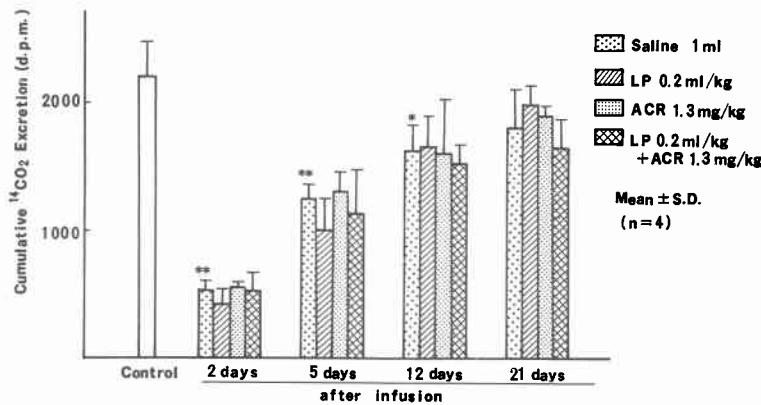


Fig. 5 Changes in aminopyrine N-demethylase activity following lipiodol and aclarubicin infusion via portal vein in regenerating liver



* P<0.05 in comparison with control group
** P<0.01 in comparison with control group

病巣の存在も報告しており、これらより門脈経由の肝内転移および micrometastasis における門脈血流の優位性が示唆された。そこで残肝に存在すると思われる micrometastasis をターゲットとした術後制癌剤門脈内投与は残肝再発のコントロールとして期待しうる合理的な手段と考えるに至った。

しかし肝に対し75%もの血流を供給している門脈からリポドールおよび制癌剤を投与した場合の肝細胞、特に再生肝細胞に与える影響に関する詳細な検討は見当たらない。今回はリポドールに溶解しやすい特徴を持つアントラサイクリン系の制癌剤 aclarubicin¹⁴⁾を使用し、経門脈性のリポドールおよび制癌剤の、正常肝と肝切除後再生肝に及ぼす影響を基礎的に検討した。

正常肝においてはリポドール、制癌剤の門脈内投与により一過性に transaminase の上昇と肝マイクロゾーム機能総量の低下を認めるが、生食群においても同様の变化を認め、これらの影響は麻酔およびカテーテル挿入時の一時的な肝脱転や門脈クランプなどの手術操作の影響と考えられ、ほぼ10日で前値に復し群間に有意差を認めないことより、今回使用した程度の量では正常肝に対しては影響を持たないものと思われた。

これに対し再生肝では Nagasue ら¹⁵⁾、高橋ら⁸⁾も報告しているように、制癌剤投与は肝切除後の肝再生の抑制と遅延をもたらす、その投与は厳重な注意が必要であるとされている。今回の検討では、再生肝においては transaminase の上昇は正常肝に比べ著明に高値を示すが、生食群、LP 群、ACR 群、LP+ACR 群の各群間に有意差を認めず、肝細胞膜障害の増強は認められないと考えられた。しかしながら肝再生能の指標として DNA 合成能を測定したところ、LP 群、ACR 群および LP+ACR 群ともに肝切除24時間目においては DNA 合成能の有意の抑制を認めた。ただ LP 群、ACR 群ともに dose dependent の抑制傾向は示さなかった。リポドールは出月ら¹⁶⁾の報告にも述べられているが、経門脈的に投与すると門脈内および sinusoid に停滞する傾向が強く、一過性に肝細胞膜における酸素供給を阻害し、DNA 合成能の低下をもたらすものと考えられた。ただしこのリポドールの門脈内停滞という特徴が制癌剤を溶解させた場合、その徐放性を利用した制癌作用の増強には役立つものと考えられる¹⁷⁾。DNA 合成能の time course を追うと、生食群が24時間目にピークを呈するのに対し、LP

群、ACR 群の DNA 合成能のピークは36、48時間に遅延する傾向を認め、最終的な DNA 合成量では明らかな低下を認め得ないものと考えられた。これは再生肝重量比で肝切除3週目において、生食群、LP 群、ACR 群、LP+ACR 群ともに有意差を認めないことから推察できる。すなわち LP、ACR による DNA 合成能の抑制は肝再生早期の一過性のものであるといえる。ここで Leuterburg ら¹⁸⁾により肝のマイクロゾーム機能総量を示しうるとされ、また菅沢ら¹⁰⁾が肝切除後においては、肝切除量に応じた低下を示し、再生肝の機能総量の回復を正確に反映すると報告した ABT 値を測定し、肝切除後門脈内投与群の機能面での再生状況を観察した。全群肝切除2日目に約20%と最低値をとるが、各群間に差異を認めず、その後生食群と差異を認めず各群とも順調に回復したことより、マイクロゾームより見た細胞機能と言う面からも LP、ACR、および LP+ACR の門脈内投与が再生肝に対し、強い障害を与えていない事が示された。そして生存率においても投与3週目で全群100%生存し門脈内投与の影響は認められなかった。すなわち肝切除後再生肝における LP 単独、ACR 単独および LP+ACR の門脈内投与は著明な肝細胞膜障害の増強は来さず、また肝切除直後には軽度の肝再生の抑制と遅延をもたらすがその影響は一過性であり、その後の肝細胞機能の回復は順調で投与量、投与時期を考慮すれば安全な方法と考えられた。

臨床的には Elias ら¹⁹⁾が肝転移切除後門脈内にカテーテルを挿入留置し、5-FU の持続門脈内投与を施行したと報告しており、著者らも現在転移性肝癌切除例において術後3週を目安として、門脈内に留置した埋め込みリザーバー付きカテーテルより5-FU および aclarubicin+lipiodol を投与しており、その有効性を検討中である。

文 献

- 1) Adson MA, VanHeerden JA, Adson M et al: Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Arch Surg 119: 647-651, 1984
- 2) Fortner JG, Silva JS, Golbey RB et al: Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. Ann Surg 199: 306-316, 1984
- 3) Rodney FP, Eugene AW, John RC et al: Hepatic resection for primary and secondary neoplasms of the liver. Am J Surg 153: 428-433, 1987

- 4) 宮崎 勝, 高橋 修, 志村賢範ほか: 転移性肝癌, 肝・胆・膵 15: 469-474, 1987
- 5) 宮崎 勝, 高橋 修, 志村賢範ほか: 胃癌肝転移例における肝切除の意義, 手術 41: 2079-2083, 1987
- 6) Strohmeier T, Haugeberg G, Lieser W: Angioarchitecture and blood supply of micro- and macrometastases in human livers. J Hepatology 4: 181-189, 1987
- 7) 高橋 修, 宮崎 勝, 菅沢寛健ほか: 肝切除前の肝動脈塞栓術(TAE)の安全性に関する基礎的検討, 日外会誌 88: 74-80, 1987
- 8) 高橋 修, 宮崎 勝, 志村賢範ほか: 肝切除後の残存肝に対する肝動脈塞栓術および制癌剤肝動脈注入療法の安全性に関するラットにおける実験的検討, 日消外会誌 21: 2388-2393, 1988
- 9) Higgins GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver. Arch Pathol 12: 186-202, 1931
- 10) 菅沢寛健, 宮崎 勝, 藤本 茂ほか: 肝切除後の再生マーカーとしてのアミノピリン呼吸テストの意義に関する基礎的検討, 日消外会誌 17: 677, 1984
- 11) Verly WG, Deschamps Y, Pushpathadam J et al: The hepatic chalone. I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. Can J Biochem 49: 1376-1381, 1971
- 12) Mahmud I, Fukui N, Miura Y: Arachidonic acid metabolism in normal and regenerating liver and hepatoma. Adv Enzyme Regul 18: 27-37, 1980
- 13) 西田 修, 白戸博志, 権藤 寛ほか: 大腸癌肝転移の拡大切除方針について, 日消外会誌 21: 1061-1067, 1988
- 14) 寺嶋吉保, 国友一史, 古味信彦: メイロン添加によるアクリルビシン・リピオドール溶液を用いた油-chemo-embolizationの基礎的検討, 日癌治療会誌 24: 526, 1989
- 15) Nagasue N, Kobayashi M, Iwai A et al: Effect of 5-fluorouracil on liver regeneration and metabolism after partial hepatectomy in the rat. Cancer 41: 435-443, 1978
- 16) Idezuki Y, Sugiura M, Hatano S et al: Hepatography for detection of small tumor masses in liver: Experiences with oily contrast medium. Surgery 60: 566-572, 1966
- 17) 山崎謙治, 今野俊光, 宮内好正ほか: 油性制癌剤門脈内投与による肝転移予防の実験的研究, 癌と治療 14: 1224-1228, 1987
- 18) Leuterburg B, Bircher J: Expiratory measurement of maximal aminopyrine demethylation in vivo: Effect of phenobarbital, partial hepatectomy, portocaval shunt and bile duct ligation in the rat. J Pharmacol Exp Ther 196: 501-509, 1976
- 19) Elias D, Lasser Ph: Early adjuvant intraportal chemotherapy after curative hepatectomy for colorectal liver metastases a pilot study. Eur J Surg Oncol 13: 247-250, 1987

Influence of Intraportal Infusion with Lipiodol and Aclarubicin on Regenerating Liver in Rats

Hiroyuki Suzuki, Masaru Miyazaki, Toshio Isono and Katsuji Okui
First Department of Surgery, Chiba University, School of Medicine

The effect of intraportal infusion with aclarubicin (ACR) and lipiodol (LP) on normal liver and regenerating liver was studied in rats. In normal liver intraportal infusion of ACR and LP had no effect on the serum transaminase level or the aminopyrine breath test (ABT). In regenerating liver, hepatic DNA synthesis was significantly inhibited 24 hours after two-thirds hepatectomy by intraportal infusion with ACR and LP, but the peak of hepatic DNA synthesis was delayed at 36 to 48 hours after hepatectomy. The decrease of the ABT and the increase in serum transaminase level were more marked in regenerating liver than in normal liver, but there were no intragroup differences. The ABT values depressed after hepatectomy had returned to normal 3 weeks after the operation. No deaths occurred until 21 days after infusion and hepatectomy. These data show that intraportal infusion with ACR and LP caused no obvious damage to normal liver. Although the infusion in regenerating liver induced slight suppression and delay in DNA synthesis, the hepatic functional mass depressed after hepatectomy soon recovered to the normal level. In conclusion this study suggests that intraportal infusion with ACR and LP is a safe therapeutic modality even after hepatectomy.

Reprint requests: Hiroyuki Suzuki First Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University
1-8-1 Inohana, Chiba, 280 JAPAN