肝転移予防に対する持続門脈化学療法の実験的検討

東京医科歯科大学第2外科

石田 秀行 岩間 毅夫 西岡 良薫 大久保 靖 今城 眞人 三島 好雄

肝転移に対する予防的門脈化学療法の有効性について、ドンリュウラットを用いて実験的に検討し、以下の結果を得た。①5-Fu 20mg/kg/日を腸間膜静脈より持続投与した場合、同量の5-Fu を大腿静脈から持続投与した場合に比べ5-Fu 濃度は門脈本幹で8.5倍、尾静脈で0.45倍であった(6 時間時)。② 経門脈的に腹水肝癌 AH60C 4×10^6 個を移植した肝転移モデルに対する転移抑制効果(転移容積)の比較では、5-Fu (20mg/kg/H) +heparin (100u/kg/H) 持続門注(移植当日より5日間)群にのみ、無治療群に比べ、有意な(p<0.01) 転移抑制効果が認められたが、5-FU +heparin 持続静注群や heparin 単独持続門注群には肝転移抑制効果は認められなかった。5-Fu の持続門脈内投与は癌細胞の肝内着床を著明に阻止し、しかも全身へ与える影響が少ない有効な予防的局所化学療法と考えられた

Key words: prevention of liver metastasis, prophyractic portal vein chemotherapy, 5-fluorouracil, Heparin, cancer of digestive organs

緒 言

消化管悪性腫瘍の手術後の肝転移を予防する試みはいくつかなされている。そのうち、大腸癌治癒切除後の肝転移予防として、5-fluorouracil (5-Fu) を中心とした抗癌剤と heparin の持続門脈内投与が有効であったとする欧米での報告 1 ⁻⁴)がみられ、本邦でも同様の試み 5 がなされている。しかしながら、この点に関する基礎的・実験的裏付けはきわめて少ない。

今回、ラットの門脈内あるいは末梢静脈内に数日間持続的に薬剤の注入が可能な実験モデルを考案した。この手技を用いて、臨床量の5.Fuを持続的に経門脈的、経静脈的に投与した場合の血中および肝組織内5.Fu濃度を経時的に測定した。さらに持続的に門脈内あるいは静脈内に5.Fu・heparinを投与する治療群の転移性肝癌モデルに対する転移抑制効果について、持続門脈内 heparin 単独投与群と無治療群を対照において検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

方 法

1. 5-Fu 濃度測定

Pentobarbital 麻酔下に200~250gのドンリュウラット(Japan SLC)の前腸間膜静脈あるいは大腿静脈を24G血管留置針(Jelco, Johnson & Johnson 社)

<1991年10月9日受理>別刷請求先:石田 秀行 〒113 文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学第 2 外科

にて穿刺し、微量注入器 (SP-10, Nipro 社) に接続した。5·Fu (協和発酵 K.K) を生理食塩水にて希釈し、20mg/kg/日(9.6ml/日)の割合で持続注入し、1、2、6、24時間の尾静脈血、肝組織(内側左葉)と6時間時の門脈血を採取した。血液は遠心後の血清を、肝組織は摘出後ただちに凍結保存し、後日 bioassay 法⁶⁾にて5·Fu 濃度を測定した。

2. 肝転移抑制効果

ドンリュウラット(80~120g)の腹腔内で継代維持し、純培養状態(7~10日目)となった腹水肝癌 AH60 Cⁿ(富山医科薬科大学第 2 外科より供与)の血性腹水を採取し、heparin 加生理食塩水にて1,000rpm、5 分間×2回洗浄後、2×10⁷個/ml に調整した。pentobarbital 麻酔下に雄性ドンリュウラット(約200g)を開腹し、前腸間膜静脈分枝より上記細胞浮遊液 4×10⁶個/0.2ml を注入した後、ラットを無作為に下記のごとく4 群に分けた。

A 群:5-Fu+heparin 持続門脈内投与群(n=8)

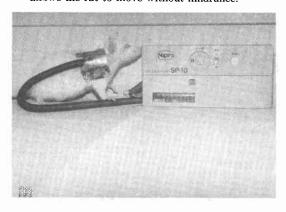
B 群:5-Fu+heparin 持続大腿静脈内投与群(n=8)

C 群:heparin 持続門脈内投与群(n=7)

D群:無治療群 (n=8)

門脈カニュレーションは門脈本幹下端を上記24G 血管留置針にて穿刺し、その外套から先端を伸展加工した3-Fr ポリエチレンチューブ (アトム静脈カテーテル、アトム K.K) を門脈本幹に誘導した。刺入点にア

Fig. 1 The rat receiving continuous 5-day infusion of 5-Fu via portal vein. This infusion system allows the rat to move without hindrance.



ロンアルファを滴下した後、カテーテルを後腹膜を通 して後頸部皮下まで誘導した。さらに保護コイルの中 を通して上記微量注入器に接続した(Fig. 1). 静脈カ ニュレーションは,左右いずれかの大腿静脈を用い, 門脈カニュレーションの場合と同様に挿管後、外誘導 した.5-Fu は20mg/kg/日, heparin は100u/kg/日を生 理食塩水に溶解して、全量を4.8ml/日に調整し、5日 間持続投与した。なお、門脈および静脈カニュレーショ ンは、細胞浮遊液注入後2時間以内に完了し、カニュ レーション直後より薬剤の投与を開始した。腫瘍細胞 移植後21日目にすべてのラットを犠死せしめ、肝を摘 出した。10%ホルマリンにて3日間固定後、肝を2mm 間隔のスライスとし、写真撮影を行った。 planimeter (内田洋行 K.K) を用いて転移総面積/肝総面積比を求 め、これに肝容量を乗じて近似的肝転移容量とし、こ れを各群間で比較検討した.

3. 統計学的検討

有意差検定は1., 2. いずれにおいても Wilcoxon 順位和検定にて行い,危険率5%未満(p<0.05)の場合,有意差ありとした.

結 果

1. 尾静脈血5-Fu 濃度: 6 時間以後の尾静脈血中5-Fu 濃度は比較的安定した推移を示し、 6 時間時には、前腸間膜静脈注入群: $0.41\pm0.12\mu g/ml$ ($M\pm SE$)、大腿静脈注入群: $0.91\pm0.31\mu g/ml$ であり、前腸間膜静脈注入群のほうが有意に低値であった(**Fig. 2**)。

門脈血5-Fu 濃度: 6 時間時の門脈血5-Fu 濃度は前腸間膜静脈注入群: 5.3 ± 1.3 (M \pm SE) $\mu g/ml$, 大腿静脈注入群: $0.62\pm0.23\mu g/ml$ であり、前腸間膜静脈

Fig. 2 Changes in bioactive 5-Fu concentration in caudal vein blood during continuous infusion (20 mg/kg/24hr). M±SE.

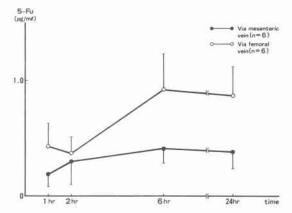
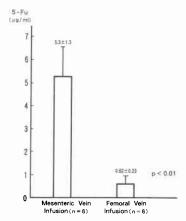


Fig. 3 Bioactive 5-Fu concentration in portal vein 6 hours after the start of continuous infusion (20 mg/kg/24hr). M±SE.



注入群のほうが平均値で8.5倍の高値(p<0.01)を示した(**Fig. 3**)。

肝組織内5-Fu 濃度: 前腸間膜静脈注入群,大腿静脈 注入群いずれも1,2,6,24時間の各時期において すべて定量限界 $(0.018\sim0.032\mu g/g)$ 以下であった。

2. 肝転移抑制効果

A 群の37.5% (3/8) に肉眼的・組織学的に肝転移を認めなかったが、ほかのすべてのラットに肉眼的に明らかな肝転移巣を認めた(Fig. 4)。 各群の近似的腫瘍体積は、A 群1.0±0.5 (M±SE) cm³、B 群8.5±2.2 cm³、C 群8.8±2.6cm³、D 群14.6±1.0cm³であり、D 群の腫瘍容積の平均を100%とした場合の各群平均腫瘍容積%は、A 群7.1%、B 群58.2%、C 群60.3%であった。また、A 群の腫瘍体積は、C 群のそれの11.4%で

Fig. 4 The liver of the control rat removed on the 21-th day after intraportal inoculation of ascites hepatoma AH60C (4×10⁶cells). Discrete hepatic metastases are recognized.

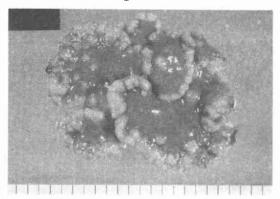
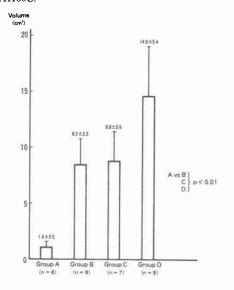


Fig. 5 Comparison of the tumor volume on day 21. M±SE. Only group A thows statistically significant decrease in the tumor volume. Group A: Continuous portal infusion of 5-Fu+heparin. Group B: Continuous femoral venous infusion of 5-Fu+heparin. Group C: Continuous portal infusion of heparin. Group D: Control. 5-Fu: 20mg/kg/day×5days. Heparin: 100u/kg/day×5days. Each infusion was started within 2 hours after intraportal inoculation of ascites hepatoma AH60C.



あった。 すなわち A 群のみほかの群に対し有意 (p < 0.01) な転移抑制効果を認めた (Fig. 5).

考察

消化管悪性腫瘍の肝転移は予後を決定する主要な因

子のひとつであり、これを予防することは臨床上きわめて重要である。この肝転移は門脈系に逸脱した腫瘍細胞が肝内血管系に着床することから生じると理解されているが、その機会がもっとも多いのは原発巣の手術時かと考えられる。近年、大腸癌の治癒切除後の局所補助化学療法として5・Fuやmitomycinなどの抗癌剤とheparinの併用が行われ、予後の改善を見たとする報告リーリが散見され、現在欧米を中心に大規模なprospective randomized study が進行している。しかしながら、臨床におけるこれらの経過観察での成績を評価する場合、原発巣手術時にすでに形成されている種々の段階の occult liver metastases の存在りを考慮しなければならない。

癌細胞の肝内着床期における経門脈化学療法に関する実験的検討の報告はしばしば見られるが、その多くは adriamycin・mitomycin などの濃度依存性抗癌剤の単回¹⁰¹¹¹あるいは反復大量投与¹²¹の場合がほとんどである。

5-Fu は臨床では消化器癌に対して最も広く用いられている抗癌剤であるにもかかわらず、肝転移予防の実験モデルに対し、経門脈的に投与した報告は少ない。その理由として、①5-Fu の作用機作から、可移植性腫瘍株のある小動物(マウス、ラット、ハムスターなど)の門脈内に反復類回あるいは持続投与しなければならない技術的困難さ、②カニュレーションに適した家鬼は、5-Fu に対する感受性が高く、臨床量の5-Fu が十分投与できないこと¹³⁾などがあげられる。

着床期の肝転移モデルに対して臨床量の5-Fuを持続的に門脈あるいは末梢静脈経由で投与し、転移阻止効果について両者を比較検討した報告例は今回のわれわれの実験を除いては見あたらない。今回の実験では、4.8ml/日×5日間持続注入の形式をとったため、heparinの使用は不可避であった。そこで無治療群に加え heparin 単独持続門脈注入群も対照としたが、使用した heparin の量(100u/kg/day)は、予防的門脈化学療法の際に併用される臨床量(5,000u/body/day)に相当するものである。

今回示した実験結果では、heparin+5-Fu 持続門脈 内投与群のみに有意な転移抑制効果が認められた。そ の第1の理由としては、持続末梢静脈内投与では得ら れない、はるかに高い門脈血5-Fu 濃度(約8.5倍)が持 続的に維持されることで、肝内門脈系における癌細胞 の着床~初期増殖の一連の過程を著明に抑制すること が考えられる. Heparin の併用効果については、heparin 単独持続門脈内投与群では有意な転移阻止効果が 得られなかったことより、今後さらに検討が必要と考 えられる.

しかしながら、heparin の投与効果の評価については、今回用いた転移モデルの特徴を考慮する必要がある。すなわち、single cell suspension の経門脈的移植によって作成される、最も一般的な実験的肝転移モデルにおける肝内初期像の検討では、小葉間静脈内の赤色血栓中の腫瘍細胞の存在が着床に関与することが指摘¹³⁾されており、かかる場合には抗血栓療法の肝転移阻止効果は大きいと考えられる。われわれが用いた腹水肝癌 AH60C は、継代 4 日目には約60%が10個を越える細胞塊(いわゆる島)を形成し¹⁴⁾し、8~10日めには、90%以上が20~30個の細胞塊を形成する。門脈内に移植された細胞塊は、移植直後には、門脈枝内に浮

Fig. 6a Photomicrograph shows the liver 5 minutes after intraportal inoculation of AH60C. Tumor cells are floating in the portal branch. (Weigert H-E stain, original magnification ×33)

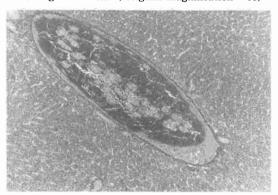
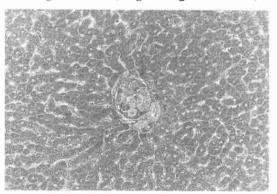


Fig. 6b Tumor emboli in the portal venule 2 hours after intraportal inoculation of AH60C. (Weigert H-E stain, original magnification ×66)



遊しているものが多く認められる (Fig. 6a) が、移植後2時間で必ずしも血栓の形成を伴わずに門脈細枝 (Fig. 6b) あるいは類洞で腫瘍塞栓を形成することを確認している。このことが heparin の門脈内投与が有意な転移阻止効果を示さなかった一つの理由と考えられた。

ただし、今のところ heparin³)や urokinase⁴)の単独 持続門脈内投与が大腸癌肝再発予防に有効であったと いう臨床での報告は見あたらない。

最近では prostaglandin $E_1^{16)$ や prostacyclin $^{16)$ ~18) (PGI $_2$)などの抗血小板製剤の転移抑制効果に関する実験的検討が数多く報告され,臨床応用が期待されているが,薬剤投与のタイミング $^{16)18}$)、薬剤の与える腫瘍増殖促進作用 19)、臨床応用の場合の副作用の発現などの問題があり,今後の検討の余地を残している。

今回の実験成績から、5-Fu の持続門脈内投与は持続 静脈内投与に比べてはるかに高濃度の門脈血5-Fu濃 度が得られる一方, 肝ですみやかに5-Fu が代謝される ために、末梢血5-Fu濃度が低く維持されることが示さ れた、すなわち全身に与える影響を可及的に少なくし、 門脈血流の支配を受ける腫瘍細胞に選択的に高濃度の 抗癌剤を作用させるという regional chemotherapy の利にかなうものである. したがって, 臨床では肝転 移が予後を左右する主要な因子とされる大腸癌の治癒 切除や, 原発性・転移性肝癌に対する肝切除の際に manipulation によって門脈系に逸脱するとされる癌 細胞に最も有効性を発揮するものと考えられる。しか しながら手術時にすでに形成されていた微小肝転移巣 に対する予防的門脈化学療法に対しては、一般に行わ れている抗癌剤の投与量・投与期間から考えてその有 効性に疑問がある。この問題についてはさらに臨床 的・実験的検討が必要と考えている.

本研究の一部は文部省科学研究費(一般研究 c)によった。

- Taylor I, Rowling J, West C: Adjuvant cytotoxic liver perfusion for colorectal cancer. Br J Surg 66: 838-837, 1979
- Taylor I, Machin D, Mullee M et al: A randomized controlled trial of adjuvant portal vein cytoxic perfusion in colorectal cancer. Br j Surg 72: 359—363, 1985
- Metzger U, Mermillod B, Aeberhand P et al: Intraportal chemotherapy in colorectal carcinoma as an adjuvant modality. World J Surg 11: 452-458, 1987

- Wereldsma JCJ, Bruggink EDM, Meijer WS et al: Adjuvant portal liver perfusion in colorectal cancer with 5-fluorouracil/heparin versus urokinase versus control. Cancer 65: 425-432, 1990
- 5) 大久保靖, 丸山 洋, 今城眞人ほか: 転移性肝癌 (大腸) の予防に対する持続門脈内注入療法の試 み, 癌と化療 16:3028-3031, 1989
- 6) 藤田 浩,向島 達,中山 昇ほか∶抗癌剤の Bioassay について、ファルマシア 1:1-27, 1965
- 7) 小田島成和:腹水肝癌の樹立。長崎医会誌 **38**: 428-448, 1963
- 8) Fisher ER, Turnbull RB: The cytotological demonstration and significance of tumor cells in the mesentric venous blood in patients with colorectal carcinoma. Surg Gynecol Obstet 100: 102-108, 1955
- Finlay IG, Meek D, Brunton F et al: Growth rate of hepatic metastases in colorectal carcinoma. Br J Surg 75: 641-644, 1988
- 10) Tominaga T, Yoshida Y, Kitamura M et al: Liver metastases of colon 26 cells implanted into the superior mesenteric vein in mice. Jpn J Cancer Res (Gann) 78: 846-850, 1987
- 11) 安田聖栄, 野登 隆, 池田正見ほか: 大腸癌肝転移 モデルを用いた実験化学療法。日本大腸肛門病会 誌 43:595-600, 1990
- 12) 岩崎 甫, 中込 博, 上野 明ほか:抗癌剤門脈内 反復投与による肝転移予防の実験的研究。日消外 会誌 21:1050-1053, 1988

- 13) 森 武生: 持続動注療法による 5-FU Leucovorin 投与の実験的研究。癌と化療 16:2838-2841, 1990
- 13) 中江史朗, 多淵芳樹, 斉藤洋一:家兎 VX2 腫瘍の 肝転移成立過程と制癌剤 MMC・ADR の肝転移抑 制効果に関する研究。神戸大医紀要 49:69-83, 1988
- 14) Odashima S: Establishment of ascites hepatoma in the rat, 1951—1962. Natl Cancer Inst Monogr 16: 51—93, 1964
- 15) 笠木徳三,田沢賢次,山下 巌ほか: Biological Response Modifier (BRM) による消化器悪性腫 瘍の肝転移再発に対する予防的治療: OK-432 門 脈内投与における実験肝転移抑制の基礎的研究。 日癌治療会誌 25:112—120, 1990
- 16) 加藤宜誠, 小針雅男, 松野正紀ほか:ハムスター実験廃癌における肝転移抑制に関する研究。日外会誌 90:745-752, 1989
- 17) Honn KV, Busse WD, Sloane BF: Commentary prostacycline and thromboxanes; Impricatins for their role in tumor cell metastases. Biochem Pharmacol 32:1-11, 1983
- 18) 初瀬一夫, 柿原 稔, 玉熊正悦: 抗血小板凝集剤の 転移抑制効果に関する研究。日癌治療会誌 26: 1-5, 1991
- 19) Kenneth VH, Richard SB, Lawrence JM: Prostaglandins and cancer: A review of tumor initiation through tumor metastasis. Prostaglandins 21:833-864, 1981

An Experimental Study on Portal Vein Chemotherapy as a Prophylactic Treatment Against Liver Metastases

Hideyuki Ishida, Takeo Iwama, Yoshinobu Nishioka, Yasushi Okubo, Mahito Iwajo and Yoshio Mishima Second Department of Surgery, Tokyo Medical and Dental University

This study was conducted in male Donryu rats to investigate the role of portal vein chemotherapy for prevention of liver metastasis. Continuous mesenteric venous infusion of 5-Fu (20 mg/kg/day) resulted in a high portal vein level $(5.3\pm1.3\,\mu\text{g/ml})$ and a low caudal vein level $(0.41\pm0.12\,\mu\text{g/ml})$ of 5-Fu, whereas a low portal vein level $(0.62\pm0.23\,\mu\text{g/ml})$ and a high caudal vein level $(0.91\pm0.31\,\mu\text{g/ml})$ were detected 6 hours after continuous femoral venous infusion. To evaluate the ability to prevent liver metastasis, Donryu rats $(180-200\,\text{g})$ receiving intraportal inoculation of ascites hepatoma AH60C (4 × 106 cells) were randomly assigned to 4 groups. Group A; continuous portal venous infusion of 5-Fu (20 mg/kg/day) + heparin (100 u/kg/day). Group B; continuous femoral venous infusion of 5-Fu+ heparin. Group C; continuous portal vein infusion of heparin. Group D; Control. Infusion was started on the same day as tumor inoculation and maintained for 5 days. The volume of metastases on day 21 was calculated in each group. The tumor volume of Group A exclusively showed statistically significant reduction compared with that of the other groups. In conclusion, continuous portal venous infusion of 5-Fu was considered to be effective against liver metastasis by preventing the lodging of tumor cells in the intrahepatic portal system.

Reprint requests: Hideyuki Ishida Second Department of Surgery, Tokyo Medical and Dental University 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 JAPAN