

5-Fluorouracil (5-FU) 経口剤および徐放性 5-FU 経口剤による肝転移抑制効果に関する実験的研究

北里大学外科

佐藤 茂 大谷 剛正 辻 亮作 柿田 章

目的: 現行の経口 5-fluorouracil (5-FU) 製剤および徐放性経口 5-FU 製剤を用いて大腸癌術中散布による肝転移の予防効果を検討した。**方法:** 実験には家兎による VX2 門注肝転移モデルを用いた。現行の 5-FU 製剤と徐放性 5-FU 製剤をおのおの術前のみ 10mg/kg 1 回投与と群, 術前 10mg/kg 1 回および術後 6mg/kg 6 日間投与と群, 術後のみ 6mg/kg 7 日間投与と群の 3 群を作製し各群の肝転移巣の体積比を比較検討した。**結果:** 多重解析では術前投与を行うことが有意に肝転移を抑制した。術後投与の有無は肝転移抑制に影響しなかった。現行の 5-FU 製剤と徐放性 5-FU 製剤の比較では徐放製剤のほうが有効な傾向を認めた。**結論:** 術中散布に対し 5-FU 製剤の術前 1 回投与が有効でありその際には徐放性 5-FU 製剤がより有用であると推察された。

緒 言

5-fluorouracil (5-FU) は 1957 年 Heidelberger ら¹⁾により合成されて以来現在まで消化器癌化学療法における最も重要な制癌剤でありその経口薬は術後再発予防の目的に広く使用されている。我々は経口 5-FU 製剤が、小腸より吸収され肝による first pass effect を受ける前に門脈内において数時間、高濃度の 5-FU 濃度を保つ特性をもつことを報告した。とくに、我々の開発した徐放性製剤は現行の製剤に比べ長時間の濃度維持の可能性が示された²⁾。すなわち、5-FU 製剤 10mg/kg 投与にて既存の 5-FU 製剤は 3 時間、我々の開発した徐放性 5-FU 製剤は 4 時間 800ng/ml 以上の濃度を保っていた。この特性の応用は門脈内化学療法による治療標的として術中癌細胞散布による肝転移の抑制に有用であると思われる。

Fisher ら³⁾, Rupert ら⁴⁾, Griffiths ら⁵⁾は大腸癌の流出静脈より切除直後に採取した血液中の細胞診にて 32% に癌細胞が認められたと報告しており、肝転移の成因の一端が術中癌細胞散布にあることは十分推察できるものである。また、この術中癌細胞散布を標的として Rupert ら⁴⁾は no-touch isolation technique を Taylor ら⁶⁾は 5-FU の持続門脈内投与の有用性を強調し、本邦では大腸癌における MMC の術中門脈内 bo-

lus 投与^{7,8)}などが報告されている。Rupert ら⁴⁾の報告ではその効果は有意差をもって示しえなかったが、その後 Wiggers ら⁹⁾による同手技の追試にて脈管侵襲陽性の S 状結腸癌においては有意に肝転移再発を減少させることが報告された。また、Taylor ら⁶⁾の 5-FU の持続門脈内投与法は肝再発率が有意に低下したと報告されている。近年ではこれらの血行性転移の各ステップにおける基礎的研究が分子生物学的研究により精力的に行われている¹⁰⁾⁻¹⁵⁾。

このように Wiggers ら⁹⁾の追試や Taylor ら⁶⁾の報告がその効果を認めることや前出の Fisher ら³⁾, Griffiths ら⁵⁾の流出静脈における癌細胞の存在の報告より、大腸癌の肝転移の主経路が門脈を介したものであることとの関係が推察され、術中癌細胞散布による転移再発ではこの門脈内投与の工夫により肝転移の防止をより効果的に行いうるものと考えられる。

以上の理由より経口 5-FU 製剤による術中に散布された癌細胞による肝転移防止を目的とし、既存の 5-FU 製剤および徐放性の 5-FU 製剤を使用し動物実験にてその効果を検討した。

1. 実験方法および材料

実験は家兎の肝転移モデルを VX2 を門脈内注入することにより作製しその前後に経口 5-FU 製剤を投与し肝転移抑制効果のみた。効果の比較は転移巣の体積比によった。統計的处理は Tukey-Kramer 検定および Dunnett 検定による多重検定によった。

1. 実験動物

日本白色種家兔(2.0 ~ 2.95kg)雄(ゴキタプリーディングサービス; 東京)36 羽を使用した. なお家兔は北里大学実験動物倫理規定に準じ飼育したものを実験に供した.

2. 肝転移モデルの作製

千代田開発株式会社 ARL(茨城)より入手し当院にて家兔大腿部に継代されていた VX2 を家兔屠殺後摘出し細切, トリパンブルーにて染色, 顕微鏡下に生細胞 2×10^6 個に調整した. 家兔をセボフルレン麻酔下に開腹, 小腸間膜静脈より生細胞 2×10^6 個の VX2 を注入し肝転移を作製した. 肝転移は VX2 注入後 3 週間にて全葉に径約 3 ~ 5mm の多結節性に出現した. 着床率は 100% であった.

3. 使用薬剤

既報²⁾のごとく 5-FU 顆粒剤をアミノアルキルメタクリレートコポリマーによってコーティングし作製した徐放性 5-FU 剤(5-FU 含有率 33%)および現行の 5-FU 剤(5-FU 含有率 39%)を使用した. なお, 既報にて現行の 5-FU 剤は投与 5 分で 100% の主薬溶出がみられ, 我々の作製した徐放性 5-FU 剤は 5 時間にて 60% の主薬が溶出することを報告した.

4. 薬剤投与方法

現行製剤, 徐放性剤とも主薬である 5-FU 量により投与全体量を算出し使用した. 経口投与は先端を切除し口径差をなくした 2.5cc 用注射筒を用い投与を確実, 容易にするため 5-FU 顆粒を 10% CMC (carboxymethylcellulosesodium) に混和したものを所定投与量家兔の咽頭へ強制投与した. 家兔は投与物を嚥下することなくすべて嚥下した.

Fig. 1 5-FU concentration in portal vein after p.o. administration of sustained release 5-FU granules 10 mg/kg to a rabbit

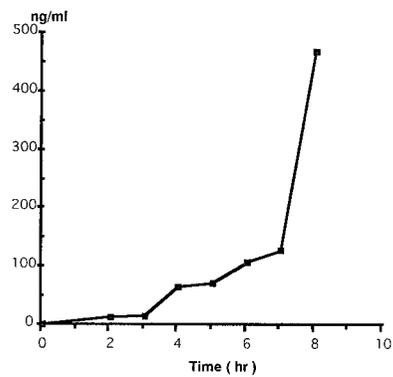


Fig. 2 A scheme of 5-FU administration in each group

S.R. ; sustain release 5-FU
 conv. ; Conventional 5-FU
 pre : pre treatment before VX2 cell inoculation
 post ; 5-FU treatment after VX2 cell inoculation
 number ; 5-FU doses. CONT. ; control group

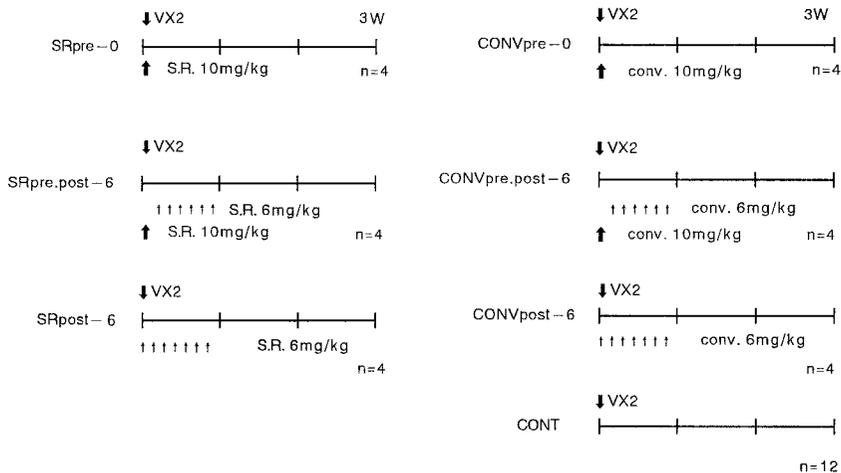


Fig. 3 Contents of 5-FU administration in each group
S.R. : sustain release 5-FU
conv. : conventional 5-FU

	5-FU administration before VX2 implantation	5-FU administration after VX2 implantation
SRpre-0	S.R. 10mg/kg	
SRpre post-6	S.R. 10mg/kg	S.R. 6mg/kg/day for 6days
SRpost-6		S.R. 6mg/kg/day for 7days
CONVpre-0	conv. 10mg/kg	
CONVpre.post-6	conv. 10mg/kg	conv. 6mg/kg/day for 6days
CONVpost-6		conv. 6mg/kg/day for 7days
CONT		

5. 薬剤投与量および投与期間

VX2 注入前(術前)に投与される5-FUは家兎の1/2LD50量である10mg/kgを投与した。

徐放性剤の前投与はVX2注入6時間前に行い、現行の5-FU製剤では1時間前に行った。徐放剤前投与時間の決定に際しそのタイミングをはかるため、徐放剤経口投与後の門脈内血中5-FU濃度の推移を家兎にて確認した。徐放剤10mg/kgを経口投与し投与後の門脈内5-FUの上昇時期を確認したところ、投与6時間後100ng/mlに達し7時間以降急上昇していく結果を得た。よって、この急上昇直前の6時間を採用し徐放性剤の前投与は6時間前と決定した(Fig. 1)。

現行の5-FU製剤はDouglassら¹⁶⁾による経口摂取後15分から60分にて血中濃度はピークに達し門脈内濃度は3時間まで高値が続くという報告に基づきVX2注入1時間前に投与した。

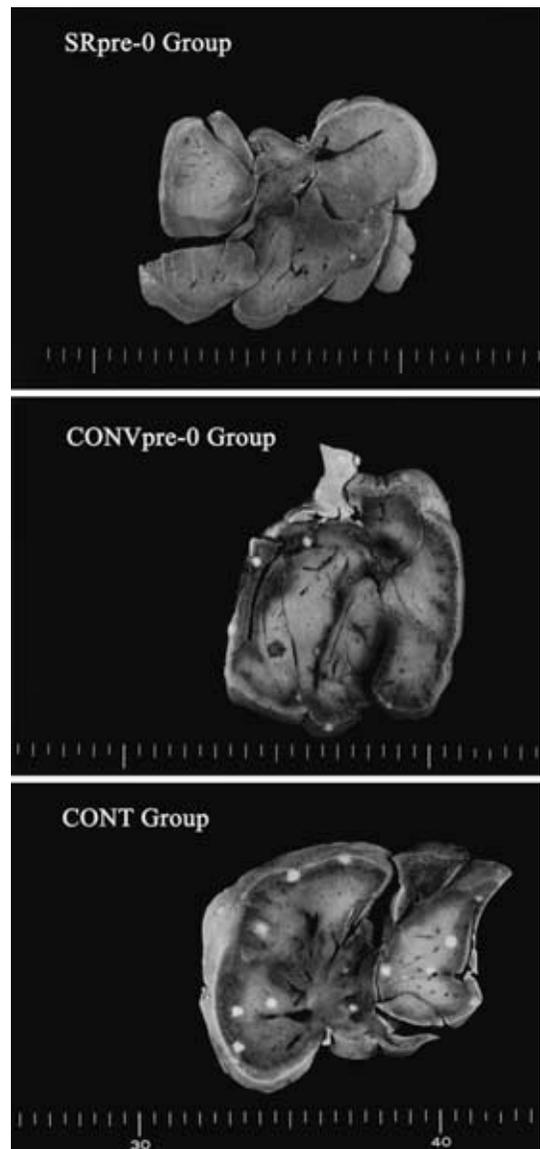
VX2注入後(術後)の5-FU製剤投与期間の設定については、中江ら¹⁷⁾塩飽ら¹⁸⁾によるVX2の門脈内注入移植による肝転移実験の報告より転移巣の極小さなうちは門脈内化療による効果を期待できるものと考え術後の抗癌剤投与期間は6日目までとし、その投与量は予備実験にて8mg/kg連日投与では家兎は数日で70%死亡してしまうため6mg/kgにて実験を行った。

6. 実験群

術前投与の有無、術後投与の有無、使用薬剤の差異(徐放剤と現行の製剤)投与量などにより以下のように分類した(Fig. 2, 3)。

すなわち、徐放性5-FU製剤(sustain release 5-FU以後、S.R.製剤)を投与した群をSR群とし術前(VX2門注前)に10mg/kg投与した群をSRpre群とした。また、このSRpre群のうち術後(VX2門注後)非投与

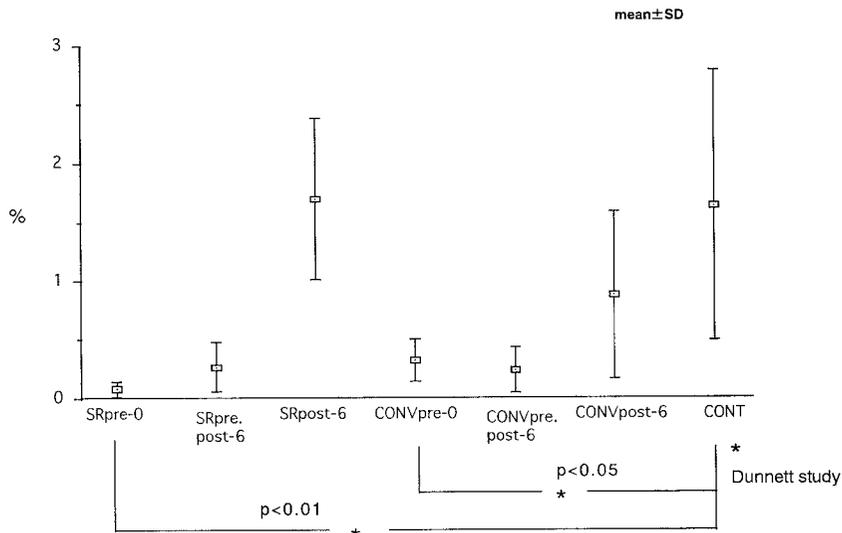
Fig. 4 Typical liver slices with average tumor volume ratio in SRpre-0 group, CONVpre-0 group and CONT group



群をSRpre-0群(n=4)、術翌日から6日間S.R.製剤6mg/kg投与群をSRpre.post-6群(n=4)とした。さらに、S.R.製剤術前非投与、術後当日より7日間S.R.製剤6mg/kg投与群をSRpost-6群(n=4)とした。

次に、現行の経口5-FU製剤(conventional 5-FU;以下、conv.製剤)投与群はCONV群とし、SR群と同様に術前投与・術後非投与群をCONVpre-0(n=4)群、

Fig. 5 Comparison with percentage of the liver metastasis volume in each group



術前投与・術翌日より6日間conv.製剤6mg/kg投与群をCONVpre.post-6(n=4)群とした。

また,conv.製剤の術前非投与・術後当日より7日間conv.製剤6mg/kg投与群をCONVpost-6群(n=4)とした。

すべてのコントロールとしてVX2門注のみ行った群をCONT群(n=12)とした。

7. 成績判定法

前出のごとくVX2門注後3週目に肝転移巣は100%出現するため上記すべての群に対しVX2門注後3週目に屠殺し肝臓を摘出した。この肝臓をホルマリン固定後4mmごとにスライス,おのおの断面積に対する転移巣の面積の割合を算出し,その総和を全肝臓に対する転移巣の体積比とした。これらの体積比を用い比較検討した。

8. 統計処理

成績の統計的処理はTukey-Kramer検定およびDunnett検定による多重検定によった。

II. 結 果

1. 各群の生存率

実験に供した36羽の家兔の生存をみると全例投与実験に耐術し生存した。

2. 開腹時所見

開腹時腹腔内に高度の癒着はみられず肝臓以外の他の部位に癌の発育転移は認められなかった。

3. 腫瘍体積比

1) CONT群(無治療群)の成績

1.64 ± 1.15%であった。

2) SR群(S.R.製剤投与群)の成績

SRpre-0群の腫瘍体積比は0.08 ± 0.07%であった。

SRpre.post-6群の腫瘍体積比は0.27 ± 0.21%であった。

SRpost-6群の腫瘍体積比は1.70 ± 0.69%であった。

3) CONV群(conv.製剤投与群)の成績

CONVpre-0群の腫瘍体積比は,0.32 ± 0.18%であった。

CONVpre.post-6群の腫瘍体積比は0.24 ± 0.19%であった。

CONVpost-6群の腫瘍体積比は0.88 ± 0.71%であった。

上記結果を無投与群との比較ではDunnett検定を,その他の群間比較ではTurkey-Kramer検定を用いそれぞれ多重検定を行った。その結果,Dunnett検定にてSRpre-0群対CONT群(p<0.01),CONVpre-0群対CONT群(p<0.05)に有意差を認めた(Fig.4,5)。

さらに,SRpre-0群とCONVpre-0群を比較するとunpaired t testにて有意にSRpre-0群の体積比は少なかった(p<0.05)。

III. 考 察

大腸癌の術中散布は前出のごとくRupertら¹⁾や

Wiggersら⁹⁾の追試や Taylorら⁶⁾の報告より肝転移の1つの原因と考えられる。これらは Fisherら³⁾, Griffithsら⁵⁾の報告のごとく門脈を介した血行性転移と推察される。また, 1913年, Tyzzer¹⁹⁾は動物実験にて移植腫瘍への機械的, 物理的刺激により著明な転移の増加を報告している。術中での刺激は癌細胞の散布の危険を招来する。このことは経口5-FU製剤の化療目標として(門脈内化学療法)5-FUの血行動態よりその効果を大いに期待できるものである。

以上の観点より行った今回の実験は術中門脈内散布の事象を癌細胞を門脈内に注入することにより再現し, 散布時に門脈内5-FU濃度を高濃度に保つよう経口的に投与した。その結果, 術前投与は有意にその効果を認めた。

神藤ら²⁰⁾は大腸癌株をもちいた *in vitro* の検討にて, 5-FUは濃度依存的に癌と5-FUの接触時間を短縮しても効果を認めることを報告している。また, 杉山ら²¹⁾は *in vitro* の検討にて, 同一AUCにて低濃度長時間と高濃度短時間の癌と5-FUの接触にて効果の差を認めていない。また, Tominagaら²²⁾は経口5-FUとUFTの投与にて, マウスの肝転移モデルの抑制実験を行い, 門脈内のAUCの高い5-FUが有意に転移を抑制したと報告している。今回, 門脈内に注入された癌細胞は既報のごとく現行の5-FUでは10mg/kg経口投与にてCmax 4,100ng/mlを示し投与後3時間は800ng/ml以上の濃度を保っている門脈内の5-FUに曝露され効果を発揮したものと推察された。また, 徐放製剤のものでは現行のものよりもCmaxは1,500ng/mlと低いものの同程度のAUCである5-FUにて曝露を受け効果を認めたものと考えられた。

一方, 術後投与については効果を認めなかった。今回, 癌細胞の門脈内注入から着床までの時間に目安を設定し術後投与を行い, 1日1回6mg/kgの投与を行った。Archerら²³⁾は癌細胞門脈内移植によるラット肝転移モデルにて移植と同日, 2日, 4日, 6日目より5-FUの門脈内注入を7日間行い同日から開始した群が有意に転移の抑制をし, 開始時期が遅れるにしたがい効果が低下していくと報告している。したがって, 本実験の術後投与では投与量が少なくAUCが効果発現量まで至らなかったものとの推測もされるがこれに加え移植と同時投与開始でなかったために効果を認めなかったものとも考えられた。

また, 統計処理を多重解析にて行ったため, 有意に抑制効果を示す術前投与と効果を示していない術後投

与の両方を行った群は, 術後投与が効果を示さなかったことがひびき個々では有意差を認めていない。

今回, 徐放性剤を試作し実験に使用したが, 多重解析にて有意差を認めていない。しかし, 有意な抑制効果を認める術前1回投与と群同士において, 徐放製剤SRpre-0群は現行のものCONVpre-0群と比較しunpaired t testを行うとさらに有意な抑制効果をみた。多重解析後でありこの結果をもって徐放性剤が明らかに抑制効果が良いとはいえないものの徐放性剤が現行のものと比較しより効果を示す傾向を表したものと思われる。これはtime dependentな性格をねらった徐放製剤の投与が既報のごとく6時間以降にても門脈内の5-FU濃度を維持しさらなるAUCの増加をきたしたためと推察され, 今後徐放性剤の増量, 徐放性の延長にて効果の上昇が期待される。

以上, 経口5-FU製剤は門脈内5-FU濃度を高濃度に保つことより門脈内に流入した癌細胞に作用し転移を抑制した。その投与は術前1回投与が効果的であった。さらに, その投与は徐放製剤にてより効果を増すことが推察された。臨床面では術中散布による肝転移抑制に対し期待できると思われた。

稿を終るにあたり, 御指導頂いた工藤康生博士, 実験動物に関し御協力を頂いた安田修一氏(北里大学実験動物系技術員)に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P et al: Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor inhibiting compounds. *Nature* 179: 663-666, 1957
- 2) 佐藤 茂, 大谷剛正, 柿田 章ほか: 徐放性5-Fu (5-Fluoro-uracil) 製剤の門脈血中濃度推移. *日消外会誌* 31: 935-939, 1998
- 3) Fisher ER, Rupert B, Turnbull JR: The cytologic demonstration and significance of tumor cells in the mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma. *Surg Gynecol Obstet* 100: 102-108, 1955
- 4) Rupert B, Turnbull Jr: Cancer to The Colon the five and ten-year survival rates following resection utilizing the isoration technique. *Ann R Coll Surg Engl* 46: 243-250, 1970
- 5) Griffith JD, Mckinna JA, Rowbotham HD: Carcinoma of the colon and rectum: Circulating malignant cells and five-year survival. *Cancer* 31: 226-236, 1973
- 6) Taylor I, Machint D, Mullett M et al: A randomised controlled trial of adjuvant portal vein cyto-

- toxic perfusion in colorectal cancer. *Br J Surg* 72 : 359 363, 1985
- 7) 北條慶一, 梶谷 鑽 : 大腸癌の補助的化學療法(梶谷班一次方式)の成績 厚生省癌研究助成金による大腸癌各種治療法に関する総合的研究班(班長梶原 鑽)の第一次共同研究の報告 . 癌と化療 13 : 3063 3073, 1986
- 8) The Colorectal Cancer Chemotherapy Study Group of Japan : Five-year results of randomized controlled trial of adjuvant chemotherapy for curatively resected colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 25 : 91 103, 1995
- 9) Wiggers T, Arends JW, Brinkhorst AP et al : No-touch isoration technique in colon cancer : a controlled prospective trial. *Br J Surg* 75 : 409 415, 1988
- 10) Fujita S, Suzuki H, Kinoshita M et al : Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of human carcinoma cell by anti-integrin β 1 subunit antibody. *Jpn J Cancer Res* 83 : 1317 1326, 1992
- 11) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S et al : Synthetic analogs of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348 : 555 557, 1990
- 12) Takayama T, Shinozaki H, Doki H et al : Aberrant expression and phosphorylation of β -catenin in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 77 : 605 613, 1998
- 13) Yamaguchi A, Urano T, Goi T et al : Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 14 : 1122 1127, 1996
- 14) Takahashi Y, Kitada Y, Bucana CD et al : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55 : 3964 3968, 1995
- 15) 朝比奈章悟, 佐藤宣貴 : 癌 転移形成のメカニズム . 薬局 37 : 469 474, 1986
- 16) Douglass HO Jr, Mittelman A : Metabolic studies of 5-Fluorouracil-II. Influence of the route of administration on the dynamics of distribution in man. *Cancer* 34 : 1878 1881, 1974
- 17) 中江史朗, 多淵芳樹, 斉藤洋一 : 家兔 XV2 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 49 : 69 83, 1988
- 18) 塩飽保博, 谷口弘毅, 高橋俊雄 : Brdu を用いた転移性肝腫瘍に対する癌化学療法における薬剤到達性の実験的検討 . 癌と化療 16 : 2829 2832, 1989
- 19) Tyzzer EE : Factors in the production and growth of tumor metastases. *J Med Res Bost* 28 : 309 332, 1913
- 20) 神藤英二, 岩本一亜, 四ノ宮成祥 : 5-Fluorouracil・leucovorin 併用療法の抗腫瘍効果の検討 大腸癌細胞株(DLD-1)を用いた細胞周期の解析 防衛医大誌 22 : 85 89, 1997
- 21) 杉山勝紀, 宇野真二, 相羽恵介 : 大腸癌における 5-Fluorouracil の至適投与様式の検討 . 慈恵医大誌 115 : 583 596, 2000
- 22) Tominaga T, Yoshida Y, Kosaki G : Effect of 5-Fluorouracil and UFT on experimental liver metastasis model of colorectal cancer using mouse colon 26 cells. *Jpn J Cancer Res* 84 : 783 786, 1993
- 23) Archer SG, Gray BN : Comparison of portal vein chemotherapy with hepatic artery chemotherapy in the treatment of liver metastasis. *Am J Surg* 159 : 325 329, 1990

Inhibitory Effect of the Oral 5-Fluorouracil (5-FU) and Sustained Release type
5-FU Administration on Hepatic Dissemination of Colorectal Cancer Cells

Shigeru Sato, Yoshimasa Ootani, Ryouzaku Tuji and Akira Kakita
Department of Surgery, Kitasato University School of Medicine

Objectives : To examine the preventive effects of Conventional 5-FU and sustained release type 5-FU administration on the hepatic dissemination of colorectal cancer cells during surgical maneuver in the animal model. Materials and methods : In this experiment, rabbits were used as an animal hepatic metastasis model utilizing the injection of VX2 carcinoma cells into the portal vein. Two forms of 5-FU, i.e. conventional 5-FU and sustained-release 5-FU, were orally administered with 3 different schedules. Three schedules of 5-FU oral administration were attempted as follows : 1) 10 mg/kg preoperative dosage only, 2) preoperative 10 mg/kg plus postoperative dosage at 6 mg/kg/day for 6 days, and 3) postoperative dosage at 6 mg/kg/day for 7 days. The hepatic metastases were compared by volume among the 6 groups mentioned above and controls. Results and Conclusion : Statistical analysis revealed that preoperative administration of 5-FU significantly reduced the hepatic metastasis while postoperative administration of 5-FU did not influence the results. Compared to the efficacy of conventional 5-FU, sustained-release 5-FU tended to more effectively suppress hepatic metastases.

Key words : sustained release type 5-Fluorouracil, neoadjuvant chemotherapy

[Jpn J Gastroenterol Surg 35 : 1771 - 1777, 2002]

Reprint requests : Shigeru Sato Department of Surgery, Sagamidai Hospital
6-24-28 Sagamigaoka, Zama, 228-0001 JAPAN
