

原 著

胃癌に対する電撃化学療法後抗癌剤組織内移行に関する検討

野島真治, 中屋敷千鶴, 藤井雅和, 井口智浩, 小林哲郎, 榎 忠彦

山口大学医学部器官病態系・外科学第一講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 電撃化学療法, electroporation, 濃度依存性抗癌剤

はじめに

1987年当科において開発された抗癌剤と高電圧パルスの併用による癌治療は「電撃化学療法 (electrical impulse chemotherapy)」と名付けられ¹⁾, 動物実験でその効果, 安全性について検討してきた。1年後の1988年フランスのMirらにより同様の実験がおこなわれ²⁾, 1991年にはelectrochemotherapyとして, 頭頸部癌に対して臨床応用されるようになった。その後も欧米諸国で頭頸部癌に対して本法が用いられ一定の臨床効果をあげている^{3, 4, 5)}。またその作用機序よりelectroporation therapyとも呼ばれている。オリジナルの電撃化学療法は, 山口大学の生命倫理委員会での審議が終わり1994年より消化器癌に対して臨床応用を開始した。本邦初の試みであるので安全性を第一に考えて計画した。対象は転移性肝癌のみとし, 一般的に行われている治療法で効果を認められなかった症例, あるいは治療効果が期待できないことが明らかである症例とした。使用抗癌剤は安全性を確かめる実験に使用したプレオマイシンとし投与量は通常投与量とした。転移性肝癌2例 (肺癌, 大腸癌) に対して実施した。2例とも癌死し, 予後の改善にはつながらなかったものの一過性ではあるが腫瘍マーカーの低下という一応の臨床効果が得られた。しかし切除不能例においては単回の開腹時の施行のみでは十分な治療効果が得られていない。そこで切除不能消化器癌患者において手術中のみならず, 手術後も継続的・反復的に電撃化学療法

を行うためのシステムを考案中である。

一方, 現在では治療対象を拡大し各種悪性腫瘍に対して多様な治療条件下での電撃化学療法を施行し治療の最適化を計っている。その中のひとつとして切除可能進行胃・大腸癌に対して癌細胞の揉み出しや腹腔内への散布抑制効果を期待した術中補助化学療法として電撃化学療法を行っている。実際には手術直前より抗癌剤を投与し, 開腹直後に腫瘍に電撃を加え, その後に通常の切除術を行っている。今回, その切除標本の抗癌剤濃度を測定し, 電撃化学療法により胃癌の組織内抗癌剤濃度が実際に上昇するか否か検討した。

対象と方法

病理学的に確定診断された進行胃癌で切除可能であった15例を対象とした。患者には臨床治験であることを伝え, 十分なインフォームドコンセントを得た。本研究における基本的な条件を以下のように設定した。

1) 電気条件の設定

高電圧パルス発生装置にはECTES-17 (Nihon Medix) を用いた。本装置は矩形波高電圧パルスを対象患者の心電周期のR波に同期して発生させるため理論的には心臓への影響はない。出力範囲は電圧0-10kV, パルス巾0.7-7.2msecであり連続可変方式を採用している。またME機器に必須の各種安全機構を備えている (図1)。

われわれの基礎データでは至適電気条件は電圧2kV/cm, パルス巾3msecであった。臨床応用する

平成13年5月29日受理

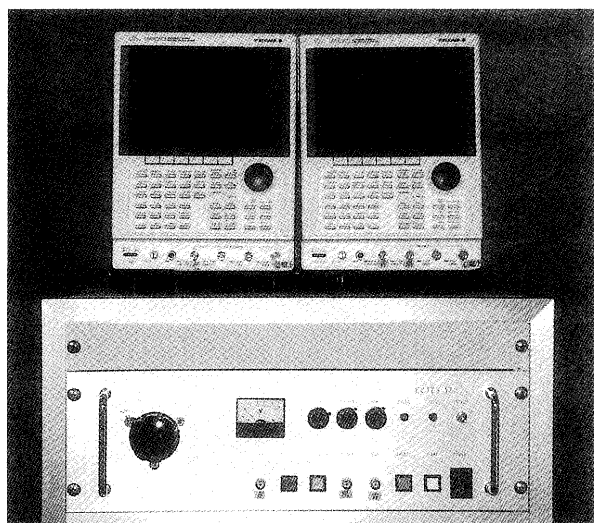


図1 電撃発生装置 (ECTES-17; Nihon Medix)

上では安全性が第一なので腫瘍径に関係なく5kV., 3msec.に固定することとした。これは臨床で用いられている除細動装置による放出エネルギーとほぼ同等であり比較的安全と考えられる。

2) 使用電極

対象とする腫瘍をはさみこむような平板電極とした。大きさは腫瘍径に応じて選択する (図2)。

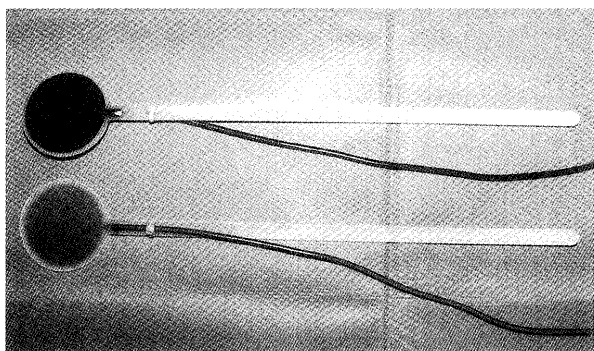


図2 平板電極

3) 併用抗癌剤

本法は薬剤感受性に関係なく広い抗腫瘍スペクトラムを有する。また濃度依存性抗癌剤が有効であった。実験段階では抗腫瘍効果が薬剤そのものの作用よりも電撃を加えることに起因することを明白にするために実験に用いた腫瘍系に感受性のない薬剤を中心に使用した。しかし本研究は臨床治験であり、患者の不利益とならないように胃癌に感受性のあるシスプラチンを使用した。

以上の条件設定の基に電撃化学療法を施行した。

手術2時間前よりシスプラチン (35mg/m²) を点滴静注し、開腹後直ちに腫瘍の両側に腫瘍の大きさに応じた平板電極を平行に装着し、高電圧パルスを一回路付加した。電撃施行後約2時間で切除し、速やかに腫瘍部と非腫瘍部を採取しそれぞれの組織内シス

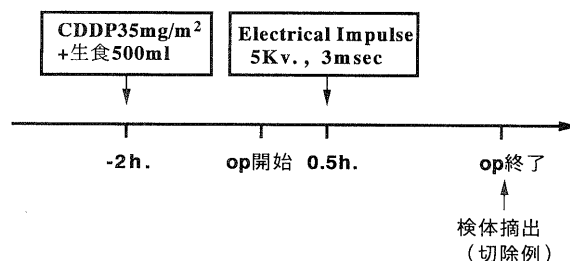


図3 電撃化学療法プロトコール

プラチン濃度を測定した (図3)。シスプラチン濃度の測定は日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計Z-8000 (フレームレス) を用い、シスプラチン中のプラチナ量を測定しその値を組織内シスプラチン濃度とした。

結 果

投与シスプラチン量は極量の半分程度のために全例、術中、術後に輸液を負荷したり、利尿を図らなくても腎障害をきたすことはなかった。また術後は通常の胃切除と同様に重篤な合併症はなく経過した。組織内シスプラチン濃度は腫瘍部で0.60~1.12 $\mu\text{g/g}$ (平均 $0.80 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$) で非腫瘍部で0.43~0.86 $\mu\text{g/g}$ (平均 $0.60 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$) と腫瘍部で有意に高濃度であった ($p < 0.05$) (表1)。

腫瘍部	vs.	非腫瘍部
$0.80 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$		$0.60 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$
($p < 0.05$)		

表1 胃癌切除例組織内シスプラチン濃度

考 察

当科において抗癌剤 (プレオマイシン) の全身投与とともに、高電圧パルス (spike wave ; 10kV. / 2cm, 2msec) を局所負荷することによって増殖し

つつある悪性腫瘍を制御できることが見出されたのは1987年5月であった。我々が本治療法を考案した発端となった事実は細胞工学で活発に応用されているelectroporation現象である。遺伝子などの高分子を含む溶液中に浮遊する細胞に高電圧パルス（電場強度1~20kV/cm, パルス幅1~1000 μ s）を負荷すると細胞外の高分子が細胞内に流入する現象はelectroporation（電気穿孔）またはelectroinjection（電気注入）と呼ばれており、高電場による電気力学的な力が細胞膜に一過性の孔を形成するためと考えられている⁶⁾。我々はこの現象をin vivoで誘導できれば抗癌剤を大量に細胞内に注入でき強力な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。結果は予想どおりであり直ちに臨床応用に向けて更なる検討を加えた⁷⁾。

最初ブレオマイシンに対して薬剤感受性を持たないAH-109A腹水肝癌の皮下移植固形腫瘍に対しブレオマイシンとともに高電圧パルスを負荷することによって著明な腫瘍の退縮が引き起こされた。抗癌剤による化学療法では（1）血中に投与された抗癌剤の癌組織への移行（2）癌組織の間質から細胞膜を経由して細胞内への移行（3）細胞内でのDNA, RNA等の標的分子との結合の各過程がスムーズに進行してはじめて抗腫瘍効果が発揮される。電撃化学療法における作用機序は前記（2）の抗癌剤の細胞内への移行過程を促進することでありブレオマイシン（BLEO）、ペプロマイシン（PEP）、サイクロフォスファミド（CPA）、マイトマイシンC（MMC）、シスプラチン（CDDP）などの濃度依存性抗癌剤が良好な成績を示した⁸⁾。一方腫瘍系を変更して検討したがマウス/Lewis肺癌、ラット/AH-109A腹水肝癌、ラビット/VX-2腫瘍など数種の宿主/腫瘍系に対して有効性を示し、広い抗腫瘍スペクトラムを持つことを確認した。この事実は薬剤感受性の壁を打ち破る新しい知見といえる。

電撃化学療法における抗腫瘍効果は負荷電気エネルギー量に正比例して増加し、一定値に達した後はエネルギー量を増加しても変化しないことが明らかになった。すなわち電気エネルギー量は電圧とパルス幅で規定されるが一方を固定して他方を変化させた場合に抗腫瘍効果はともにプラトーに達する。こうして得られた至適電圧は2kV/cm, パルス幅は3msec.であった⁹⁾。

Electroporationによる細胞膜透過性亢進は一過性で可逆的な現象であることがわかっており、高電圧パルス負荷直後に細胞膜透過性は最大となり以後数分から数十分の単位で漸減すると考えられる。in vivoの実験でブレオマイシンの筋注による全身投与モデルでは腫瘍組織内濃度は筋注後30分で最高値に達した。高電圧パルスの負荷時期を変えて抗腫瘍効果をみたところ筋注30分後に高電圧パルスを負荷した群でやはり抗腫瘍効果は最大であった¹⁰⁾。またin vitroの検討では蛍光顕微鏡を用いて測定することができるアドリアマイシン（ADR）を使用して細胞内ADR蛍光の観察を行った。高電圧パルス負荷直後にADRを添加したもので陽性細胞数は最高で、添加時期を遅らすと陽性細胞数は最初の5分で半分となり、15分ではわずかに残存する程度となった¹¹⁾。したがって電撃化学療法によって高い抗腫瘍効果を得るには抗癌剤の投与経路（筋注、静注、動注など）に応じて抗癌剤投与後の腫瘍組織内抗癌剤濃度が最も高いと考えられる時期に一致して高電圧パルスを加えることが肝心である。

ビーグル犬を用いた動物実験においてブレオマイシン投与下にECG上のR波に同期させて高電圧パルス（5kV, 3msec）を肝臓に負荷した。その結果循環動態に異常なく、ECG上も注目すべき変化はなかった。また血液生化学検査で異常を示したのはGOT, GPT, LDHのみであり、病理学的に変化を認めた臓器は肝の電極周囲のみであった。以上より本法の安全性が確認された^{12, 13)}。

実験段階では抗腫瘍効果が薬剤そのものの作用よりも電撃を加えることに起因することを明白にするために実験に用いた腫瘍系に感受性のない薬剤を中心に使用した。また対象となる腫瘍に感受性を示す抗癌剤と高電圧パルスを併用すると最も強力な抗腫瘍効果が期待できるとのデータもある。臨床応用に際してはこの点にも留意し行うこととした。投与量は実験段階では通常投与量よりかなり大量であったが、臨床応用ではせいぜい薬剤の通常使用量の極量までしか使えない。しかし電撃化学療法の作用機序を考えるとその程度の量でも抗癌剤単独投与よりは抗腫瘍効果は期待できる考えられる。

本邦初の試みであるので安全性を第一に考えて計画した。対象は転移性肝癌のみとし、一般的に行われている治療法で効果を認めなかった症例、あるい

は治療効果が期待できないことが明らかである症例とした。使用抗癌剤は安全性を確かめる実験に使用したブレオマイシンとし投与量は通常投与量とした。

転移性肝癌2例（膵癌、大腸癌）に対して実施した。全身麻酔下に開腹し、対象となる腫瘍を平板電極で挟み込んだ。ブレオマイシン15mgを経静脈的に全身投与した。電撃条件は5kV、3msecでブレオマイシン投与5分後に心電図R波に同期させて高電圧パルスを負荷した。2例とも循環動態は安定しており、術後一過性にGOTの上昇をみたが速やかに改善した。その他安全性に対して問題はなかった。

画像上では抗腫瘍効果は認められなかった。腫瘍マーカーにおいて膵癌肝転移例では、CA19-9が術前2290U/mlであり術後1ヵ月に1715U/mlまで低下したがその後漸増した。大腸癌肝転移例では、CEAが術前14.9ng/mlであり術後1週に7.6ng/mlまで低下したが術後1ヵ月には14.4ng/mlと再上昇しその後漸増した。2例とも癌死し、予後の改善にはつながらなかったものの一過性ではあるが腫瘍マーカーの低下という一応の臨床効果が得られた。

本法の安全性は確認されたものの治療対象が限定されていた。したがって今後は治療対象を拡大し、各種悪性腫瘍に対して多様な治療条件下での電撃化学療法を施し治療の最適化を行うこととした。

対象は切除不能消化器癌（膵臓癌、胆道癌、転移性肝癌など）および進行胃癌、大腸癌（切除不能例も含む）とした。電気条件は同様（5kV、3msec）であるが使用抗癌剤はシスプラチンとした。臨床的意義としては1) 切除不能例は腫瘍に対する直接効果を期待して行う、2) 進行胃・大腸癌の場合、癌細胞の揉み出しや腹腔内への散布抑制効果を期待した術中補助化学療法のひとつとして行う、ということである。本研究では進行胃癌に対して電撃施行後約3時間で胃切除を終了し切除後速やかに腫瘍部と非腫瘍部を採取しそれぞれのシスプラチン濃度を測定した。

切除例15例のシスプラチン濃度は腫瘍部で有意に高濃度となっていた ($p < 0.05$)。電撃を加えない群は実験段階でその無効性が示されているために本研究は電撃化学療法群のone armとした。しかし文献的には田中らが胃癌におけるシスプラチン静注後の切除胃の組織内シスプラチン濃度は腫瘍部と非腫瘍

部で差がないと報告している¹⁹。したがって電撃化学療法により腫瘍部への抗癌剤の取り込みは非腫瘍部に比べ有意に増強されることが示された。もちろんこの程度の薬剤濃度の上昇が、どの程度の抗腫瘍効果を生み、臨床的に効果があるのかは現在の所不明である。しかし安全性に関しては問題のないことが明らかになってきており今後現プロトコルに以下のような改良をする予定である。

切除不能例に対して現行のプロトコルで最大の問題点は電撃化学療法が1回しか施行できないことである。実験でも明らかなように本法の抗腫瘍効果は永久的なものではなく一定の期間をおいて反復して繰り返すことが必要と思われる。そこで初回手術時に針状の電極を目的とする腫瘍に植え込むと術後一定期間毎に反復治療することが可能となる。また本法で最も重要である高電圧パルスの至適条件は2kV/cmであるが対象となる腫瘍径が大きくなると電圧が高くなりすぎて危険なため従来のプロトコルでは5kVに固定されていた。これに対しては腫瘍径が大きい場合には針状電極を何本か植え込み電極間距離を短くし複数回の高電圧パルス負荷ができるようにすることを検討中である。Mirらは、頭頸部の扁平上皮癌に対してブレオマイシンを投与し、1kV程度の電圧で反復施行することにより一定の臨床効果を上げている^{3,4,5}。

切除可能例における補助化学療法としての本法の対象となる腫瘍の大きさはせいぜい2~3cmであり電氣的条件は現在のままで妥当であると考えられる。今後は症例数を増やしてその遠隔成績を厳重に追跡すると共に併用抗癌剤の種類、量による腫瘍部、非腫瘍部、周囲組織での抗癌剤の取り込みの差および効果の差を検討し腫瘍特異的選択毒性の発現が可能であるか否かを検討する。

現在、消化器癌に対する電撃化学療法は局所化学療法にすぎない。しかしながら今後electroporation（電気穿孔）を癌細胞と正常細胞との間に差別的に発現せしめるような電氣的条件、抗癌剤投与方法および投与量などの条件が明らかにされれば電撃化学療法は現在の局所療法から臓器治療法、さらには全身療法へとその治療対象は広がるであろう。

文 献

- 1) Okino M, Mohri H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res* 1987 ; **78** : 1319-1321.
- 2) Mir LM, Orłowski S, Belehradec Jr J, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991 ; **27** : 68-72.
- 3) Belehradec M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradec Jr J, Mir ML. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment first clinical phase I-II trial. *Cancer* 1993 ; **72** : 3694-3700.
- 4) Domenge C, Orłowski S, Luboinski B, Baere TD, Belehradec Jr J, Mir LM. Antitumor electrochemotherapy new advances in the clinical protocol. *Cancer* 1996 ; **77** : 956-963.
- 5) Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, Messina JL, Rapaport DP, Deconti RC, Fenske NA, Gilbert RA, Mir LM, Reintgen DS. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* 1996 ; **77** : 964-971.
- 6) Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric field. *EMBO J* 1984 ; 841-845.
- 7) Okino M, Esato K. The effects of a single high voltage electrical stimulation with an anticancer drug on in vivo growing malignant tumors. *Jpn J Surg* 1990 ; **20(2)** : 197-204.
- 8) 兼定博彦. 濃度依存性抗癌剤を用いた電撃化学療法の抗腫瘍効果 - Lewis肺癌に対する in vivo での検討 -. *日癌治* 1990 ; **25(11)** : 32-40.
- 9) Okino M, Tomie H, Kanesada H, Marumoto M, Esato K, Suzuki H. Optimal electric conditions in electrical impulse chemotherapy. *Jpn J Cancer Res* 1992 ; **83(10)** : 1095-1101.
- 10) 沖野基規, 富 恵博, 兼定博彦, 丸本 多, 守田信義, 江里健輔, 鈴木 浩. 電撃化学療法による腫瘍特異的選択毒性の誘導 - dose response curveの解析より -. *Oncologia* 1991 ; **24(4)** : 71-79.
- 11) 富 恵博. 電撃化学療法におけるアドリアマイシンの細胞内移行動態の解析. *山口医学* 1992 ; **41(6)** : 429-437.
- 12) 沖野基規, 富 恵博, 江里健輔, 鈴木 浩. 犬正常肝に対する電撃化学療法. *日本癌学会総会記事* 1992 ; **51** : 408.
- 13) 森田文雄, 黒川恭子, 広田富夫, 鈴木 浩, 沖野基規. 電撃化学療法のイヌにおける安全性試験. 大鵬薬品工業株式会社社内資料, 1992.
- 14) 田中信義, 宮川清彦, 壇上 泰, 小池忠康, 大野正博, 渡部公二, 山下忠勝, 山本隆司. 消化器癌のCDDP投与症例における血中濃度及び癌組織内濃度の検討. *癌と化療* 1986 ; **13(12)** : 3513-3518.

Analysis of Intracellular Influx of Anticancer Drug after Electrical Impulse Chemotherapy for Gastric Cancer

Shinji NOSHIMA, Chizuru NAKAYASHIKI, Masakazu FUJII, Toshihiro INOKUCHI,
Tetsurou KOBAYASHI and, Tadahiko ENOKI

*First Department of Surgery. and. Medical Bioregulation Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minamikogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

We have previously reported the tumoricidal effect of a single high-voltage electrical impulse on a tumor together with an anticancer drug treatment, i.e., electrical impulse chemotherapy. We studied the intracellular influx of anticancer drug in electrical impulse chemotherapy by means of the analysis of the anticancer drug concentration in tumor and normal mucosa. Before resection of the stomach, a single electrical impulse (5KV.,3ms) were applied in 15 patients with advanced gastric cancer 2 hours after the intravenous administration of Cisplatin (35mg/m²). The concentration of Cisplatin was $0.80 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$ in tumor, which was significantly higher as compared with the values of $0.60 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ in normal mucosa ($p < 0.05$). It is suggested that spike wave electrical impulse chemotherapy induce electroporation of the cell membrane and permit the intracellular influx of a large amount of anticancer drug, exerting a strong cartinostatic effect.