微粒子活性炭吸着 MMC のリンパ系組織への取り込み

伊藤勝基・桐山幸三・渡辺 正・秋山清次・近藤 建・高木 弘*

Transportation of MMC to lymph-system by means of small particles of activated charcoal for the treatment of metastatic cancer of lymphnodes

A newly developed drug delivery system, ultra-fine particles of activated charcoal is introduced and 2 types of them are examined in absorbability of MMC and ability of transport of MMC to lymph system. One is Mitsubishi CH-40 and the others Mitsubishi 1500AA. The sizes of each primary particle of them are about 20 nm in diameter. As for the absorbability concern, much better one is observed to MMC in 1500AA than in CH-40. Serial samplings of lymph of thoracic duct by canulation and serial blood samplings of peripheral vein are done in canine to know the dynamics of lymph-blood systems through those clearance curves of MMC. Clearance K and half value period $T_{1/2}$ are calculated from the formula: $C(t) = C(t_0) e^{-kt}$. Comparing to that of MMC-saline, the activated charcoals are proved to have good abilities of transport MMC to lymph systems and in 1500AA charcoal, MMC is retained much longer time than in CH-40.

Congestive effects of the lymph systems are observed by ligation of the thoracic duct in CH-40 with 25% prolong of $T_{1/2}$. In conclusion, these drug delivery systems are suitable for the targeting chemotherapy of lymphnodes metastasis of colorectal cancer, especially by 1500AA activated charcoal.

Katsuki Ito・Kouzou Kiriyama・
Tadashi Watanabe・Seiji Akiyama・
Ken Kondou・Hiroshi Takagi*

key words : activated charcoal, CH-40, 1500AA,
targeting chemotherapy, thoracic duct ligation

大腸癌の治療における癌の組織リンパ管浸潤、および所属リンパ節転移の持つ意味はきわめて重

大である。目にみえる大きな主病巣の切除、周りのリンパ節の切除も外科的に可能な症例も、離れた部分のリンパ節まで全部廓清することは困難である。このことが、大腸癌、特に直腸癌の手術予後がわるいと考えられる理由の一因である¹⁾。マイトマイシンC (MMC) は、代表的な抗癌剤であり、比較的にこれら腺癌に効くとされているが、これをこのままの形でリンパ節に転移した腫瘍を治療するには使えない。MMC が低分子で水溶性であり、リンパ節には取り込ませにくいという性質があるからである。

最近になって、リンパ腺郭清のマーカーとして微粒子活性炭を消化管の漿膜下に注射し、所属のリンパ腺に取り込ませて黒染させる方法が、各地の病院で行われるようになった²⁾。また、炭素懸濁液の粒子径とリンパ指向性についてもすでに検討されている³⁾。MMCをこのような微粒子活性炭に吸着させ、腸管の粘膜下に注入してリンパ節にMMCを移行させようという試みが近年、萩原・高橋らによりなされるようになった⁴⁾。

筆者らは、2種類の微粒子活性炭を使い、MMCをこれに吸着させ、MMCのリンパ管への移行、リンパ節への取り込み、血中への移行動態などを調べた。さらに、胸管結紮によるリンパの鬱滞による、これら移行動態に対する影響についても調べた。

材料と方法

使用した活性炭はミツビシ CH-40 および 1500AA である。一次粒子径が、それぞれ 21 nm, 20 nm, 二次(懸濁)粒子径が、それぞれ 190 nm, 176 nm の微粒子活性炭である。これをおのおの生理的食塩水に溶かし、50 mg/ml の溶液とし、分散安定剤ポリビニールピロリドン K-30 をおのおの

* Department of Surgery II, School of Medicine, Nagoya University, Nagoya Japan 466 名古屋大学医学部第二外科科学教室

表 1 胸管ドレナージ群 I の胸管内のリンパ液中の MMC 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の 5 分ごとの変化

時間 (分)	5	10	15	20	25	30	35	$T_{1/2}$ 分	k
MMC-生食									
mean (n=3)	0.88	3.58	1.55	0.75	0.47	0.25		5.88	0.132
SD	0.58	4.24	1.09	0.40	0.46	0.25		2.53	0.052
MMC-CH40									
mean (n=3)	1.6	0.58	0.29	0.09	0.07	0.06	0.04	6.36	0.111
SD	0.46	0.46	0.36	0.03	0.03	0.03	0.01	1.02	0.017
MMC-1500AA									
mean (n=5)	0.25	0.57	0.83	0.81	0.39	0.07	0.04	9.73	0.090
SD	0.48	0.70	0.77	0.80	0.45	0.11	0.06	4.20	0.056

30 mg/ml, 20 mg/ml の濃度になるようにローラー混和し, 使用まで冷所保存とする. 使用直前に MMC を 500 $\mu\text{g/ml}$ の割合になるように加え, 約 30 分混和して吸着を平衡状態とした.

活性炭の吸着能を調べるために, 30 分間混和した後, 40,000 rpm で 15 分間遠心沈降し上澄みを取り, カラム μ -BONDAPAK C18 4 mm $\times$ 250 mm を使った高速液体クロマトグラフィーで, 移動相 0.001M リン酸 Buffer (pH 7.5): MeOH (3:1), 検出波長 360 nm で測定した.

動物実験

体重約 10~44 kg の雑種成犬を 3 群にわけ, 胸管ドレナージ群(I), 胸管結紮群(II), 対照群(III)とした. チオペンタール静脈全身麻酔下に I 群には, 胸管ドレナージを, II 群には胸管結紮を行った. III 群は対照群とし胸管には触らず, 以下の処置だけ行うこととした.

全例に浅頸静脈にカットダウンを行い, ポリエチレンチューブを挿入し, これを経時的末梢血採血のルートとした. MMC を MMC-CH40, または MMC-1500AA として 0.5 mg/ml の溶液として, 全例開腹し, 虫垂根部漿膜下に 26G のツベルクリン針で MMC 0.1 mg/kg を注射した. 胸管ドレナージ液, および末梢血液を経時的に約 3 ml 取り, これを遠心沈降し上澄みをディープフリーザーに保存し, MMC 測定の直前に解凍した. 各時間でのリンパ節を取り, その組織を細切後超音波にて液状にしホモゲナイズして, 上澄みを取り組織の MMC 濃度を測定した.

測定は, 宮村法に準じた Bioassay 法であり^{5,6)},

寒天培地上での *E. Coli* B 株を用いた薄層カップ法を用いた. またリンパ節の一部を, 病理組織検索のためスライド切片とし, ヘマトキシリンエオジン染色を行った.

結 果

CH-40 および 1500AA と MMC との結合能をみるために活性炭 200 mg/生理的食塩水 4 ml + MMC 2 mg を 30 分間混和, 平衡状態に達したあと遠心沈降を行い, その上澄み液内の MMC 濃度を測定したところ, それぞれ 1343, 0.40 $\mu\text{g/ml}$ であった. 前者のほうが, MMC との結合が後者にくらべ非常に緩やかであった. 両者について, さらに MMC の溶出を調べるために, 上澄みをすて同量の生理的食塩水を加え, 30 分間振ったあと遠心沈降し, その上澄みの MMC 濃度を測定したところ, その値はそれぞれ 306, 0.06 $\mu\text{g/ml}$ であった. もう一度同じ操作を繰り返したところ, その値はそれぞれ 110, 0.06 $\mu\text{g/ml}$ であった.

動物実験における結果

胸管内に挿入したポリエチレン管より 5 分間ごとの廃液を試験管に貯め, 時間ごとに並べたのが図 1 である. 腸管の漿膜下に MMC-CH40 懸濁液を入れたあと, きわめて早い時間 (1~2 分後) から活性炭微粒子の出現を認めた. そのピークが 5~10 分後であった. そのおのおのの群における測定値は, 表 1 および 2 であり, それをグラフにしたのが図 2 である. おのおのの測定曲線がガンマ曲線上に乗ると仮定すれば, つぎのようにあらわすことができる.

図 1

図 3

$$C(t) = C_0 \times e^{-kt}$$

ここで $C(t)$ は時間 t のときの MMC の濃度の関数であり、 C_0 は計算上求めた $t=0$ のときの MMC の濃度であり、 e は Napierian 自然対数の base である。 k はクリアランス定数である。 MMC の血中濃度の半減時間 $T_{1/2}$ は、 $C(t) = C_0 \times 1/2$ のときの t である。 各曲線のクリアランス定数 k は、 $k = \log_e 2 / T_{1/2}$ で求められる。 そのおのこの結果は、表 1～4 に示した。 $T_{1/2}$ および k はもとのおのこの一本一本の曲線から計算した値の平均値とその標準偏差値であり、表に示されたおのこの時間での濃度の平均値をプロットした曲線から求めたのではない。

MMC-CH40 と MMC-生理的食塩水の漿膜下投与後の末梢血中の MMC の濃度のクリアランス曲線をくらべると、胸管に結紮という操作を加

図 2 胸管内リンパ液中の MMC 濃度

図 4 胸管結紮犬の末梢血液中の MMC 濃度

えなければ、両者間にほとんど差がなく、胸管結紮を行うと、その半減期 $T_{1/2}$ が、結紮群で約 25% ほど非結紮群にくらべ延長することが認められたが、60 分後の所属リンパ節組織にはともに MMC の濃度が測定不可能なまでの低濃度にまで下がってしまうことが証明された。一方、所属リンパ節の組織切片には、活性炭の粒子が図 3 のように認められている。2 週間後のリンパ節組織からも同様な結果を得ている。

表 2 胸管ドレナージ群 I の末梢血液中の MMC 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の 5 分ごとの変化

時間 (分)	5	10	15	20	25	30	35	$T_{1/2}$ 分	k
MMC-CH40 mean (n=4)	.0109	.0388	.0503	.0229	.0226	.0127	.018	19.06	0.052
SD	.006	.028	.0332	.0227	.0218	.0158	.016	15.4	0.043
MMC-1500AA	.0036	.0036	.0036	.004	.0036	.0036		65.79	0.0099

表 3 胸管結紮群 II の末梢血液中の MMC 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の 5 分ごとの変化

時間 (分)	5	10	15	20	25	30	$T_{1/2}$ 分	k
MMC-CH40 mean (n=12)	.080	.061	.058	.046	.040	.035	23.85	0.034
	.044	.029	.026	.019	.017	.013	10.26	0.004
MMC-1500AA mean (n=7)	.0049	.0048	.0047	.0044	.0042	.0042	199.0	0.012
SD	.0015	.0006	.0010	.0009	.0004	.0007	314.6	0.010

表 4 胸管非結紮群 (対照群) III の末梢血液中の MMC 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の 5 分ごとの変化

時間 (分)	5	10	15	20	25	30	35	$T_{1/2}$ 分	k
MMC-生食 mean (n=3)	.0787	.0687	.059	.048	.0387	.0306		15.99	0.04
SD	.0149	.0158	.0096	.0017	.0067	.0010		3.55	0.01
MMC-CH40 mean (n=9)	.068	.057	.048	.040	.032	.025		17.94	0.04
SD	.015	.016	.013	.009	.011	.010		7.94	0.02
MMC-1500AA mean (n=6)	.032	.0131	.0077	.0061	.0052	.0053	.0049	73.4	0.05
SD	.025	.0113	.0038	.0026	.0019	.0017	.0007	141.6	0.04

表 5 リンパ節内の MMC 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の時間による変化

		30'	60'	90'	2hr	3hr	4hr	24hr	48hr
MMC-CH40	ドレナージ I	ND	ND		ND			ND	ND
	結 紮 II	0.075	ND		ND			ND	
	非結紮 III	0.066						ND	
MMC-1500AA	I		1.4						
	II	19.5	21	40			0.74	1.7	0.14
	III		2.5	5.4	10.5	1.1		0.15	

ヒトの場合に、リンパ腺郭清のマーカーとしてこの活性炭を使用し、約 6 カ月後再開腹して、黒染されたリンパ節を観察しており、活性炭微粒子のリンパ節遺残は、ほとんど永久的と考えられる。

MMC-1500AA は、MMC-CH40 にくらべ末梢血中の MMC 濃度もほとんど上がらず (表 3, 4, 図 4, 5), $T_{1/2}$ が胸管を結紮しない場合でも、平

均 73.4 分、胸管結紮という操作を加えると約 200 分にまで延長する。リンパ節組織内の MMC 濃度も、後者と違って 2 日後にも $0.14 \mu\text{g/ml}$ の高濃度の MMC を認めている。

考 按

微粒子活性炭をリンパ腺郭清の指標として使う

図5 胸管非結紮犬の末梢血液中のMMC濃度

試みは、筆者らを含め全国各地の病院でなされるようになり、学会でも発表をみているが、これにMMCやpeplomycinを吸着させ、癌の転移したリンパ節に対する治療が、萩原・高橋^{4,9,11)}らによりはじめられた。MMCを吸着させる活性炭の吸着能、漿膜下投与後のリンパ腺、リンパ管、末梢血中のMMCの移行動態の一部を明らかに出来たと考える。ここに提示した2種類の活性炭を使い、そのリンパ指向性が認められたが、そのうち、CH40の方は転移リンパ腺の治療の目的には、徐放能という点で弱く、胸管結紮という操作を加えても局所にMMCを留める効果は少なかった。

1500AA活性炭は、吸着能もすぐれ、局所に留まり、長期にわたる徐放効果という点でもすぐれており、その目的に適している。実際の臨床における使用に関しては、活性炭がほとんど半永久的にリンパ節に残るという問題も含め、活性炭の至適量、MMCの至適量など多くの詰める点を有している。

現在行われはじめている活性炭吸着MMCによる治療は、術前に内視鏡的に粘膜下に、または術中に漿膜下に、活性炭吸着MMCを投与し、手術時に所属のリンパ腺まで含め癌病巣を切除するわけで、きわめて大量のMMCが遺残することはないと考えられるが、特にMMCの副作用の出た場合、すぐに投薬が止められないという深刻な問

題もできる可能性があるため、これに対する対策も必要である。

他の一つの問題点は、癌の転移のあるリンパ節での輸入リンパ管が、詰まっている場合、活性炭が入りえないことである。リンパ節のマーカーとして活性炭の懸濁液を腸管の漿膜下に注入したとき、明らかな癌転移リンパ節に黒染が認められないことがときどきあることである。このような場合、当然抗癌剤もリンパ節に入りえないと考えられがちであるが、現在筆者らのところで進めている実験では、その近くに活性炭があれば、徐放効果により転移癌が抑えられることが観察されている。

抗癌剤を脂肪乳剤として投与し、リンパ節に取り込ませ、リンパ節内の抗癌剤濃度を上げようとした実験もある¹⁰⁾が、リンパ節に対する投与効率は活性炭のほうがよい。

胸管結紮の効果に関しては、リンパ流の鬱滞が、局所の小リンパ管からの流出を少なくするという報告があり^{7,8)}、リンパ節内への停滞効果を期待したが、吸着能の緩いCH40では、少々末梢血内へ出る遅延効果が認められるが、1500AA活性炭では吸着能がすぐれているため、リンパ節内への停滞効果も末梢血内へ出る遅延効果も認められなかった。ただし $T_{1/2}$ の多少の延長効果は認められた。

動物実験に際し多くの労力を割いてくれた当教室の実験助手の原田伸一君に深謝します。活性炭を提供くださった京都府立医科大学第一外科の高橋俊雄教授に感謝します。また、MMCの測定に関しご教示ご協力いただいた協和発酵富士工場試験分析センターの毛利郁二、杉沢勝治、武本宣教氏に深謝致します。

文 献

- 1) 陣内伝之介、泉本源太郎：リンパ節転移の経過と予後“大腸癌の臨床”。へるす出版、1984、p638-645。
- 2) 沢井清司、高橋 滋、加藤元一・他：胃癌リンパ節郭清指標としての微粒子活性炭(CH44)術前内視鏡下注入の有効性。日消外会誌 18：912-917、1985。
- 3) 萩原明彦、高橋俊雄、上田 忠・他：微粒子炭素の懸濁液粒子径とリンパ指向性。リンパ学 10：51-53、1987。
- 4) 萩原明彦、高橋俊雄、李 力行・他：組織内局所用活

- 性炭吸着マイトマイシンC(MMC-CH40 および MMC-CH44)のリンパ指向性. 秋田医学 11 : 581-585, 1985.
- 5) 宮村定男, 庭山清八郎, 重野直也・他 : Mitomycin C の体液中濃度測定. Ser. B. 14 : 251-254, 1961.
 - 6) 藤田 浩, 木村禰代二 : Mitomycin C の血中組織内濃度. 癌の臨床 (別冊)80-85, 1966.
 - 7) Laine, G. A., Allen, S. J., Katz, J., Gubel, J. C., Drake, R. E : Outflow pressure reduces lymph flow rate from various tissues. Microvascular Research 33 : 135-142, 1987.
 - 8) Miller, G. E., Seale, J. L. : The recovery of terminal lymph flow following occlusion. Journal of Biochemical Engineering 109 : 48-53, 1987.
 - 9) Hagiwara, A., Takahashi, T., Ueda, T., Iwamoto, A., Yamashita, H., Maeda, T. : Enhanced therapeutic efficacy on lymphnode metastasis by the use of peplomycin adsorbed on small activated carbon particles. Anticancer Research 8 : 287-290, 1988.
 - 10) Tanigawa, N., Satomura, K., Hikasa, Y., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H. : Surgical chemotherapy against lymph node metastases : An experimental study. Surgery 87 : 147-152, 1980.
 - 11) Hagiwara, A., Takahashi, T., Ueda, T., Iwamoto, A., Torii, T. : Activated carbon particles as anti-cancer drug carrier into regional lymph nodes. Anti-Cancer Drug Design 1 : 313-321, 1987.