

平成23年 3月31日現在

機関番号：11401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591618  
 研究課題名(和文) 肝切除術が塩酸ゲムシタビン代謝に与える影響に関する研究  
 研究課題名(英文) Effect of liver resection on the pharmacodynamics of gemcitabine hydrochloride  
 研究代表者  
 山本 雄造 (YAMAMOTO YUZO)  
 秋田大学・医学系研究科・教授  
 研究者番号：70281730

研究成果の概要(和文)：ラット肝切除モデルではゲムシタビンの推奨量投与を行うと、肝体積の小さい術後2日目には血中濃度は期待値よりも1.24倍高くなり、推奨量の80%程度の投与で通常の推奨量投与と同等の血中濃度が得られた。しかし、肝再生後には推奨量の投与で期待通りの血中濃度が得られた。一方、ヒトにおいては推奨量の投与でも肝切除症例において血中濃度が有意に高くなる現象はみられなかった。ヒト肝切除症例において血液毒性が高くなる理由については血中の薬物代謝動態以外の要因の検索が必要である。

研究成果の概要(英文)：In rat partial hepatectomy model, gemcitabine administration of recommended dose resulted in higher blood concentration (1.24 times) than non-hepatectomized rat on POD 2. Ad-ministration of 80% dose could achieve the blood concentration similar to that in non-hepatectomized rat received recommended dose. However, after completion of liver regeneration on POD 14, recommended dose was necessary to achieve the expecting blood concentration. On the other hand, in the clinical setting of partial hepatectomy, administration of recommended dose of gemcitabine did not cause an excessive blood concentration in spite of reduced liver volume. However, the incidence of an adverse effect relating to bone marrow suppression was higher in the patients after hepatectomy. These result suggest that reduced tolerance for gemcitabine following hepatectomy does not simply responsible for gemcitabine pharmacodynamics in the blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究代表者の専門分野：肝胆膵外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆道外科学、胆道癌、補助化学療法、ゲムシタビン、薬物代謝動態、手術侵襲

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌では特に、肝門部胆管癌の場合、手術治療において肝側断端を癌陰性にするために肝切除を併施しなければならない事

が多いが、手術治療においては断端等に僅かに癌陰性にできずに手術を終了し、その後の治療として化学療法に移行せざるを得ない症例が存在する。

近年、ゲムシタピンをベースとしたプロトコールが有効であるとのエビデンスが紹介され、切除不能癌に対して保険適応も認可されたところである。ヒトへの臨床推奨投与量は  $1,000\text{mg}/\text{m}^2$  とされ、これより減量した場合には治療効果が認めにくいとされている。しかし、日常の臨床において肝切除後に  $1,000\text{mg}/\text{m}^2$  を投与すると強い骨髄抑制を示しこの化学療法を継続できない症例を数多く経験する。このことは、胆道癌に対して肝切除を伴う手術を施行した後にゲムシタピンによる化学療法を行った経験のある外科医師たちの共通の認識でもある。

## 2. 研究の目的

ゲムシタピンの臨床開発過程では正常個体における体内代謝動態が詳細に検討されているものの、肝切除術の後では正常個体と異なり機能的肝重量の低下と手術侵襲に伴う肝代謝機能の低下のため抗腫瘍効果・副作用の発現が手術を施行していない患者とは異なる可能性がある。この点に関する基礎研究が存在しないことから、果たして体表面積あたりで計算したゲムシタピン投与量でその血中濃度が正常の全肝の個体と肝切除後の個体とで同等であるかどうかを解明する必要があった。

これは、内科系の臨床腫瘍医とは全く観念の異なるところであり、全肝の患者のみが臨床試験の対象であった経緯からこれまで注目されなかったポイントである。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験における肝切除後ゲムシタピン投与後の血中濃度の推移

①ラット70%肝切除モデルとSham手術を施行ラットに対し塩酸ゲムシタピンを静脈内投与した後の血中濃度の定量:ヒトへの臨床推奨量 $1,000\text{mg}/\text{m}^2$ からラットに換算し、 $24\text{mg}/\text{kg}$ をネンブータル麻酔( $40\text{mg}/\text{kg}$ )下に尾静脈から3分間で投与。血中濃度の測定は投与後2時間後に右心房からヘパリン採血を行い、シチジンデアミナーゼ入りのヘパリン管にとり、分離した血漿をクロマトグラフィーにて行った。

②肝再生による肝実質体積の増加により血中ゲムシタピン濃度が調整されるかどうかの実験:肝切除2日目に肝体積が術前の50%、14日目に104%まで再生することを確かめた後に、それぞれのタイミングでゲムシタピンを投与して血中濃度を測定した。

③術後2日目の時点での投与量を減じた場合に血中濃度の調節が可能であるかどうかの実験:上記の実験の結果、肝切除2日目ではSham手術群で濃度が80%になったため、肝切

除群で80%量を投与した場合にSham群と同様になるかどうかを検証した。

### (2) 全身化学療法を受けている患者の血中ゲムシタピン濃度測定

胆道癌または膵癌のために術後化学療法や、非手術のためにゲムシタピン治療が適応となった患者で同意が得られた症例に対して血中濃度を測定し、肝切除例と非切除例間にて標準量投与に対する認容性と投与後の血中濃度を比較検討した。

#### ①患者背景

胆道癌(7例)、膵癌(2例)で手術を受け、術後の補助化学療法としてゲムシタピン投与の同意を得た9症例の血中ゲムシタピン濃度を測定した。非肝切除症例は5例で、内訳は膵頭十二指腸切除3例、膵体尾部切除1例、胆嚢摘出1例であった。肝切除は4例に施行され、内訳は拡大肝左葉切除2例、肝右葉切除1例、肝右3区域切除1例であった。男女比は非肝切除症例で2:3、肝切除症例で3:1であった。手術終了日から補助化学療法を開始するまでの期間は非肝切除例で17日-80日(中央値60日)、肝切除例で27日-40日(中央値29.5日)と肝切除症例で短期間の傾向にあった。全例ゲムシタピン $1000\text{mg}/\text{m}^2$ を30分間で経静脈投与した。実投与量は非肝切除例で $1258\text{mg}-1580\text{mg}$ (中央値 $1500\text{mg}$ )、肝切除例で $1200\text{mg}-1789\text{mg}$ (中央値 $1633\text{mg}$ )と両群間でほぼ同量投与された。すべての症例で腎機能は正常であった。

#### ②血中濃度測定ポイント

血中濃度は初回の補助化学療法時に測定した。ゲムシタピン投与前、投与開始15、30、60、90、120、150分後に採血し、各ポイントの血中濃度を測定した。採血法、濃度測定法は動物実験と同様に行った。

#### ③有害事象判定

投与終了7日後の血液生化学検査で有害事象の有無を確認した。有害事象判定基準はCTCAE v4.0-JCOGに準拠した。

#### ④肝再生率

肝切除症例において、術前および補助化学療法前に行ったCT検査から、各時点での肝体積をCTボリュームメトリーにて求め、肝再生率を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 動物実験における肝切除後ゲムシタピン投与後の血中濃度の推移

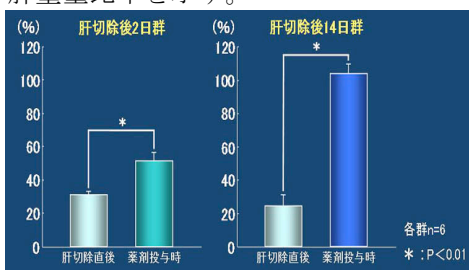
①Sham手術での投与後2時間目の血中濃

度は平均 10,283±740ng/ml であったが、70% 肝切除後のラット(術後 2 日目で肝重量が術前の 52%)における血中濃度は平均 12,700±1039 ng/ml で、1.24 倍に有意に上昇していた。ゲムシタビンの血中濃度が術後の肝機能ならびに腎機能の影響を受ける可能性があることから、投与時の肝機能と腎機能も測定したところビリルビン濃度や肝逸脱酵素値が肝切除群で明らかに高値を示し、クレアチニンも差は僅かではあったが、有意に上昇していた。このことは、臨床と本実験系の比較における限界である。臨床では肝機能や腎機能が正常範囲内に戻るまでに術後化学療法を開始することはまずない。しかし、ラットにおける実験系では術後 2 日目の肝逸脱酵素値がこれほどであるにも拘らず、肝の再生がかなり進んでおり、術後の日数を待つとヒトの場合と異なり、迅速な肝再生により肝実質体積が回復してしまい、肝体積減少がゲムシタビンの血中濃度に及ぼす影響を探究できなくなってしまう。そこで、肝再生が進行した場合に基準投与量でも血中濃度の上昇が生じないかの実験と術後 2 日目の時点で投与量を減じた場合に血中濃度の調節が可能であるかどうかの実験を追加した。

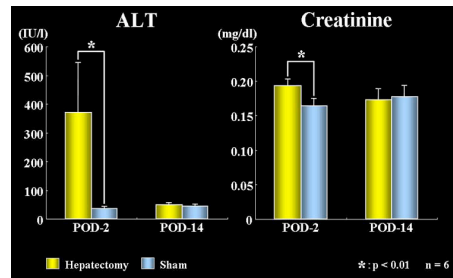
②肝再生と術後日数の関係をまず調べた。薬剤投与時に肝重量を実測定できないため、体重を基準とした肝重量の推定値を統計的に求めた。数匹のラットを用いて、体重測定の後全肝切除を行い、体重に対する全肝重量比を求めたところ、3.58%であったため、以後の実験においては以下の式を使用した。

$$\begin{aligned} \text{予測総肝重量(g)} &= \text{体重} \times 0.0358 \\ \text{肝切除術直後の肝重量比率(\%)} &: \\ 100 - (\text{切除肝重量} / \text{予測総肝重量}) \times 100 \\ \text{薬剤投与時の肝重量比率(\%)} &: \\ (\text{残肝重量} / \text{予測総肝重量}) \times 100 \end{aligned}$$

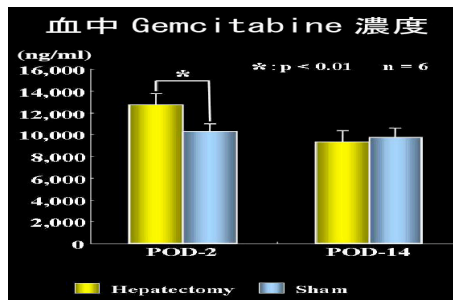
図に肝切除直後と 2 日目、14 日目の肝重量比率を示す。



肝再生が完了した時点で肝機能と腎機能が回復しているかを検討したのが次の図である。肝切除 14 日目には ALT もクレアチニンも正常化していた。

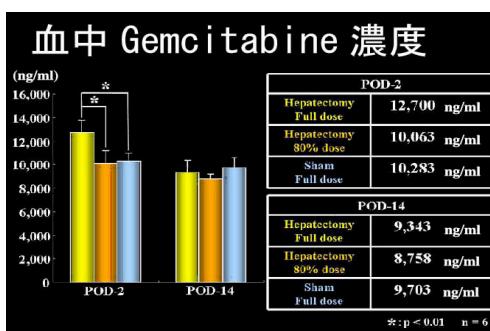


これらの条件下において、再度、24mg/kg のゲムシタビンの投与を行い、血中濃度測定を行った結果が下図である。



肝切除 2 日目で肝重量が本来の 52% 時点での血中濃度は 1.24 倍に上昇しているが、14 日目で肝重量が 100% まで回復すると、血中濃度は Sham 手術群と差がなく、全肝での期待値と同じになる。ただし、問題が残るのは血中濃度が異常高値になっていない群はすべて肝実質重量が同じであるばかりでなく、肝機能、腎機能も正常であり、異常高値を示さない理由が肝実質重量のみに左右されているとは言い切れない点である。

③肝切除ラットでは血中濃度が 1.24 倍になったことから、80%量 (20mg/kg) において血中濃度が期待値に近づくかどうかを検証した。肝切除術後 2 日目と 14 日目両群において、20mg/kg 投与の群を追加した。全群の関係がわかるように図示した。



肝切除術後 2 日目で肝重量が 50% のラットに推奨量の 80% にあたる量を投与した場合には、血中濃度は非肝切除のラットに推奨量を投与した場合と同程度の血中濃度で、しかも、Sham 手術の丁度 80% 濃度 (10,063 ng/ml / 12,700 ng/ml) が得られる事がわ

かる。即ち、50%重量の肝実質ではゲムシタピンに対して 80%の代謝能力しか有しない可能性と、腎機能の低下が血中消失率を 80%に抑えている可能性のどちらか、または双方の影響が働いている事を示唆する。

一方、14 日目では腎機能も正常化し、肝重量も回復しているが、投与量が 80%であっても血中濃度は 94% (8,758 ng/ml / 9,343 ng/ml) にしか低下しない。Sham 手術に比べても 90%(8,758 ng/ml / 9,703 ng/ml)までの低下にとどまっている。これは投与直後のピーク値が 80%に下がった場合に、初期の減衰率が 100%の場合に比べて低下するためであろう。この事を考慮すると、肝切除群 2 日目に抑制されている代謝能力は 20%以上に及ぶ事も推測される。

測定誤差、動物の個体差を否定できる訳でないが、Sham 手術群同士を比較すると、肝機能、腎機能、肝実質重量が共に同じであるにも拘らず、2 日目に比較して 14 日目には推奨量の投与で血中濃度が 94% (9,703 ng/ml / 10,283 ng/ml)に低下している事は術後 2 日目では肝切除や腎機能に拘らず、手術の何らかの影響でゲムシタピンの代謝が遅れている可能性も示唆される。

このように、肝切除術後のゲムシタピン代謝（不活化）は単純に肝体積の違いのみで説明できるものではなさそうである。しかし、少なくとも、「ゲムシタピンの代謝は血中のシチジンデアミナーゼで行われる」から、手術や肝機能の影響を受けないという仮定は誤りである。肝再生が完了するまでの患者に非肝切除患者の臨床試験で得られた推奨量を投与することは、予想外に高い血中濃度に達している危険をはらむ事実注意到すべきである。

## 結論

ラット 70%肝切除モデルではゲムシタピンの推奨投与量投与を行うと、

1. 肝切除後 2 日目においては有効血中濃度は期待値よりも高くなり、推奨量の 80%程度の投与で、通常の推奨量投与と同等の有効血中濃度が得られた。
2. 肝重量が術前の値にまで再生した術後 14 日目の時点では、推奨量の投与で期待通りの有効血中濃度が得られた。

ヒトではラットより肝切除後の再生速度がかなり遅く、肝再生で体積増加がみられる頃には、腎機能や炎症反応を含めた全身の生理動態が十分に回復している。このため、これらが回復してからのゲムシタピン投与の場合でも、まだ肝体積が増加してい

ない。今回のモデルはヒトにおける肝切除術後のゲムシタピン投与のシミュレーションとしては十分とは言えないが、正常肝で得られた推奨量をそのまま肝切除患者に演繹する事の危険性を示す結果であった。一方で、肝再生が完了し、全身状態が安定した場合には、推奨量の投与で得られる有効血中濃度は非肝切除の場合と同じであり、減量投与した場合には十分な有効血中濃度を得られない可能性が示唆された。

以上の事より、肝切除患者に術後化学療法としてゲムシタピンを用いる場合には、非肝切除患者を対象として行われた臨床研究から得られた経験的な推奨プロトコルをそのまま適応するのではなく、体内代謝動態を考慮した個別プロトコルや血中濃度の確認をモニターしながらの投与が望まれると考えられた。

## (2) 全身化学療法を受けている患者の血中ゲムシタピン濃度測定

### ①ゲムシタピン投与後の有害事象

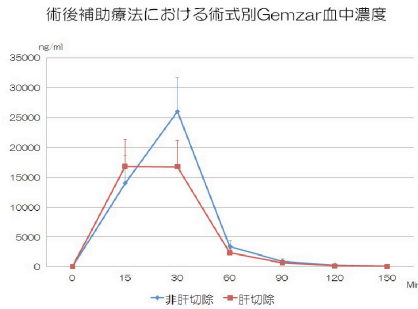
投与 7 日後における Grade3 以上の有害事象は、非肝切除群で 1 例 (20%) に白血球および好中球減少、肝切除群で 2 例 (50%) に好中球減少を認めた。今回の症例数のみならず、2006 年から 2009 年までのゲムシタピン単剤で術後に化学療法を行った 12 症例においても、非肝切除群 (6 例) では Grade3 以上の有害事象を認めなかったが、肝切除群では 6 例中 3 例 (50%) に Grade3 以上の白血球減少もしくは血小板減少を認め、肝切除群で骨髄抑制の発生率が多い結果となった。

### ②ゲムシタピンの血中濃度の推移

図に血中濃度の推移を示す。非肝切除症例、肝切除症例ともに投与開始 15 分から 30 分にかけて血中濃度は上昇し、その後急速に低下した。投与速度が異なるとはいえ、ラットの実験では投与終了 2 時間後における血中濃度は 10,283ng/ml であったが、ヒトでは、投与終了 2 時間後 (投与開始 150 分後) には両群とも検出感度下限のレベルとなり、種により薬剤代謝が異なる可能性が示唆された。

非肝切除群では投与開始 15 分後の血中濃度の平均が 14,046±4731 ng/ml、30 分後が平均 26,040±5764 ng/ml で投与終了まで上昇し続けたのに対し、肝切除群では投与開始 15 分後の血中濃度の平均が 16,875±4473 ng/ml、30 分後が平均 16,825±4414 ng/ml で上昇傾向になく横ばいで

推移、さらに最高血中濃度は非肝切除群より低値となった。



### ③血中濃度と有害事象

肝切除群において、最高血中濃度が非肝切除群に比べて低値であるにもかかわらず、重篤な有害事象が発生したことを鑑み、各症例における最高血中濃度と有害事象の発生を検討した。表のように最高血中濃度が13200ng/mlと低値であっても、Grade3の有害事象が発生する症例もあれば、最高血中濃度が33700ng/mlと高値であっても有害事象が認められない症例も存在した。

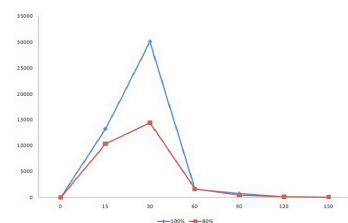
Gemzar投与後最高血中濃度と有害事象の有無

最高血中濃度(ng/ml)	有害事象
13200	Grade3
13800	なし
17500	なし
20000	Grade3
21600	Grade2
22800	Grade3
24800	なし
30100	Grade2
33700	なし

非肝切除群 1 症例において、80%減量時にも血中濃度を測定した。この症例は、100%投与後 7 日目は有害事象を認めなかったが 6 日目に Grade3 の白血球減少を認めていたため一週休薬、その後 80%に減量して投与したところ、一週後に Grade4 の好中球減少を認めた。

Gemzarの100%および80%投与時の血中濃度推移

そのときの薬剤濃度推移をグラフに示す。



100% (1000mg/m<sup>2</sup>) 投与時の投与開始 15 分後の血中濃度は 13,200ng/ml、30 分後は 30,100ng/ml であったが、80% (800mg/m<sup>2</sup>) 減量時では 15 分後は 10,300ng/ml、30 分後は 14,400ng/ml であった。15 分後は投与量の減量率と同様、血中濃度も 80%に低下していたが、30 分後の血中濃度は 100%投与時に比べ、47.8%にまで低下していた。この現象は、同一症例であるため、個体差が生じ得ないことから、30 分間の投与時間内で起こった薬剤投与速度の若干の揺らぎなど他の因子

が関与していると思われる。一方、投与開始 60 分以降の血中濃度は 100%投与、80%投与ともほぼ同様の値で推移したことから、投与終了後の血中濃度に関連したゲムシタピン初期代謝には差が無いと思われた。この症例からも、血中濃度の高さおよび血中消失率の低下が、有害事象の発生に直接関与しないことが示唆された。

### ④肝再生率

肝切除群において、術前の肝体積と化学療法直前の肝体積を測定し、肝再生率と血中濃度・有害事象との相関を検討した。血中濃度と肝再生率には一見して相関は認められず、肝体積が小さいからといって、重篤な有害事象の発生に繋がらないものと思われた。

	術前肝体積(ml)	術後肝体積(ml)	肝体積比(%)	GEM最高血中濃度	有害事象
症例1	1409	1080	74.5	13800	なし
症例2	1353	989	73.1	23000	Grade3
症例3	2068	637	30.8	17500	なし
症例4	1465	720	49.1	22800	Grade3

### 結論

ゲムシタピンを用いた補助化学療法において、肝切除を施行された症例では非肝切除症例に比べ、有意に重篤な有害事象が発生した。しかし、ラットを用いた実験と異なり、肝切除群におけるゲムシタピンの血中濃度が非肝切除群より高値になることはなく、さらに血中にゲムシタピンが蓄積することもなかった。単純に「小さな肝体積=>高濃度=>重篤な有害事象」、というスキームではなさそうである。

ゲムシタピンの代謝は、1) 血液およびその他の組織においてシチジンデアミナーゼにより不活性型のゲムシタピンウラシル体 (dFdU) に変換される経路 2) 細胞内でデオキシシチジンキナーゼ (dCK) によるリン酸化を受け、ゲムシタピン二リン酸 (dFdCDP) およびゲムシタピン三リン酸 (dFdCTP) に変換される経路 の 2 種類が存在する。近年、重篤な有害事象が発生する原因として、シチジンデアミナーゼの遺伝子変異による多型が報告されている。遺伝子多型を持つ患者では、ゲムシタピンの AUC (the area under the concentration-time curve) 値は、多型でない患者に比し約 5 倍高く、不活性型である dFdU の AUC 値は約半分であったとされている。しかし、我々の研究では、肝切除症例、非肝切除症例におけるゲムシタピンの血中濃度の動態は同様で、代謝効率には差が認められないにもかかわらず、肝切除群における有害事象の発生

率が高かった。そのメカニズムについて今回の研究では明らかにできなかったが、我々は2つの代謝経路のうち細胞内への取り込み経路が優位になっていれば、細胞内におけるdFdCDP濃度が上昇し、有害事象を生じる率が高くなるのではないかと考えている。

高濃度のdFdCDPはribonucleotide reductaseを抑制することでdCTP濃度を低下させ正常DNA合成経路を阻害する。また、dCTPにより負の制御を受けているdCKは、dCTP低下によって活性化するため、ゲムシタビンのリン酸化が促進される。さらにdFdCDPを脱アミノ化し、不活性型のdFdUに変換するdCMP deaminaseも、その補酵素であるdCTPが低下するため抑制され、ゲムシタビンの不活性化が抑制される。このようにdFdCDPは細胞内濃度が高くなると細胞内に蓄積しやすくなるself-potential機能があることから、骨髄細胞への取り込みが増加すると、造血機能に障害を来し有害事象に繋がる可能性が高いと考えられる。ゲムシタビンの細胞内への取り込みは、human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1)によって制御されているが、肝切除という刺激がhENT1の発現を亢進しているのかもしれない。我々の仮説を証明するには今後、細胞内dFdCDP濃度の測定、hENT1の発現について検討する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 打波 宇、阿部ゆき、工藤和夫、久米 真、南條 博、山本雄造 急速な転帰をたどった下部胆管原発の未分化癌の1例 日消外会誌 43:166-171, 2010. 査読有
- ② Iwasaki W, Kume M, Kudo K, Uchinami H, Kikuchi I, Nakagawa Y, Yoshioka M, Yamamoto Y. Change in the fatty acid composition of the liver with the administration of n-3 poly unsaturated fatty acids and the effects on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. Shock. 2010 33:306-14. 査読有
- ③ Kikuchi I, Uchinami H, Nanjo H, Hashimoto M, Nakajima A, Kume M, Mencin A, Yamamoto Y. Clinical and prognostic significance of urinary trypsin inhibitor in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Ann Surg Oncol. 2009 10:2805-17. 査読有
- ④ Satoh K, Kume M, Abe Y, Uchinami H,

Yakubowski S, Takahashi T, Sato T, Yamamoto Y. Implication of protein kinase A for a hepato-protective mechanism of milrinone pretreatment. J Surg Res 155:32-39, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 久米 真、後藤 徹、山本雄造 ラット肝切除術がゲムシタビン薬物動態に及ぼす影響 第47回日本癌治療学会 2009年10月 横浜
- ② 久米 真、後藤 徹、山本雄造 肝胆膵領域癌術後のゲムシタビン補助化学療法で肝切除によって影響される薬物認容性の変化 第64回日本消化器外科学会 2009年7月16-18日、大阪
- ③ Goto T, Kume M, Yamamoto Y. Surgery-affected pharmacokinetics of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) after 70% hepatectomy in rats. 44<sup>th</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), 2009, May 20-23, Nimes, France.
- ④ 後藤 徹、久米 真、山本雄造 ラット肝切除術による塩酸ゲムシタビン血中動態の変化第109回日本外科学会定期学術集会 2009年4月2-4日、福岡

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山本雄造 (YAMAMOTO YUZO)  
秋田大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 70281730

##### (2)研究分担者

久米 真 (KUME MAKOTO)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号: 00372326 (H20~H21)

打波 宇 (UCHINAMI HIROSHI)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号: 40400486 (H22)

##### (3)連携研究者

なし ( )  
研究者番号:

##### (4)研究協力者

後藤 徹 (GOTO TORU)  
吉岡政人 (YOSHIOKA MASATO)  
渡辺 剛 (WATANABE GO)  
岩崎 渉 (IWASAKI WATARU)  
菊地 功 (KIKUCHI ISAO)  
佐藤浩平 (SATO KOHEI)  
中川康彦 (NAKAGAWA YASUHIKO)  
工藤和夫 (KUDOH KAZUHIRO)