
肝虚血障害における
活性酸素を利用した
新しい肝腫瘍治療法の開発

(6 2 5 7 0 5 8 6)

昭和63年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 浅 川 全 一

（旭川医科大学医学部助手）

は し が き

肝虚血障害は、肝外傷，肝手術，移植時のドナー肝，ショック時などに見られ、また肝腫瘍に対する塞栓療法では、いかに選択的かつ有効に腫瘍部に虚血障害を誘導するかが問題であり、いづれにしても虚血障害の機序の理解と、それに立脚した予防あるいは応用法の研究は、肝外科領域の重要な課題である。

近年、虚血および再灌流障害時の mediator として活性酸素の役割が脳，心臓，小腸などで認められ、その発生源として ATP の分解産物である Hypoxanthine が Xanthine Oxidase により Xanthine に分解される反応が上げられている（図 1）。肝虚血障害における活性酸素の意義についても報告が散見されるようになったが、まだ一定の見解には至ってはいない。本研究では、①肝虚血再灌流障害に Hypoxanthine - Xanthine Oxidase 反応系により産生される活性酸素が関与しており、Xanthine Oxidase の特異的阻害剤である Allopurinol に虚血再灌流障害を抑制する働きのあることを示す。②ウサギ実験腫瘍に Hypoxanthine, Xanthine Oxidase を投与し、発生する活性酸素に抗腫瘍効果が認められるかを検索することを目的とした。

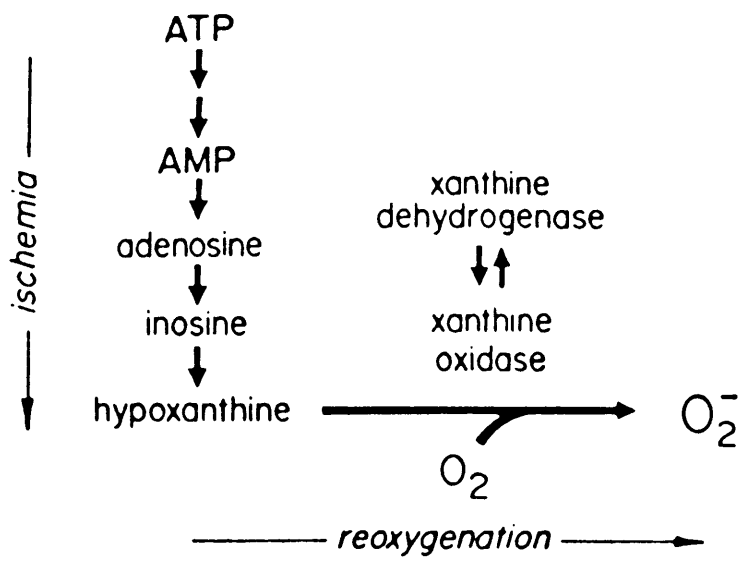


図1 虚血再灌流障害時の活性酸素発生系。

研究組織

研究代表者： 浅川全一（旭川医科大学医学部 助手）
研究分担者： 草野満夫（旭川医科大学医学部 講師）
林 宏一（旭川医科大学医学部 助手）

研究経費

昭和62年度	1,000千円
昭和63年度	1,000千円
計	2,000千円

研究発表

口頭発表

- 1.浅川全一，水戸迪郎，他：肝虚血障害に対するXanthine Oxidase Inhibitor (Allopurinol) の効果． 第23回日本肝臓学会総会，昭和62年 6月11日．
- 2.浅川全一，水戸迪郎，他：肝組織を用いた代謝熱の測定法と虚血障害肝のViability の判定． 第88回日本外科学会総会．昭和63年 4月20日．

目 的

I . 肝虚血障害のMediatorとしての活性酸素の検討 .

I -A, 分離肝細胞による検討

I -B, ラット (in vivo)による検討

I -C, ラット肝組織片を用いたMicro Calorimetryによる
検討

II . ウサギ移植腫瘍に対する活性酸素の抗腫瘍効果に関する検討 .

研究成果

I . 肝虚血障害のmediatorとしての活性酸素の検討 .

I -A, 分離肝細胞による検討

肝を構成する細胞には肝実質細胞と類洞壁細胞があり、肝機能の発現や、逆に肝障害の成立機序に両者間の相互作用が関与すると考えられている。また、類洞壁細胞であるクッパー細胞は物質を貪食する際に活性酸素を放出するので、肝実質細胞の虚血障害機序の解

明には、類洞壁細胞の関与を除外できる分離肝細胞モデルを使用するのが適当と考え、実験を行なった。

1. 実験方法

Wistarラット（雄）体重 200～250gを使用した。肝細胞分離はコラゲナーゼ灌流消化法により行ない、分離肝細胞のViabilityの判定は、トリパンブルー色素排除試験にて行なった。細胞培養は培養液として 10%牛血清を含むRPMI-1640を用い、培養液中に直接、酸素、二酸化炭素、窒素などの混合ガスを噴入し、酸素分圧を比較的容易に調節できるスピナーフラスコを用いた浮遊培養法にて行なっ

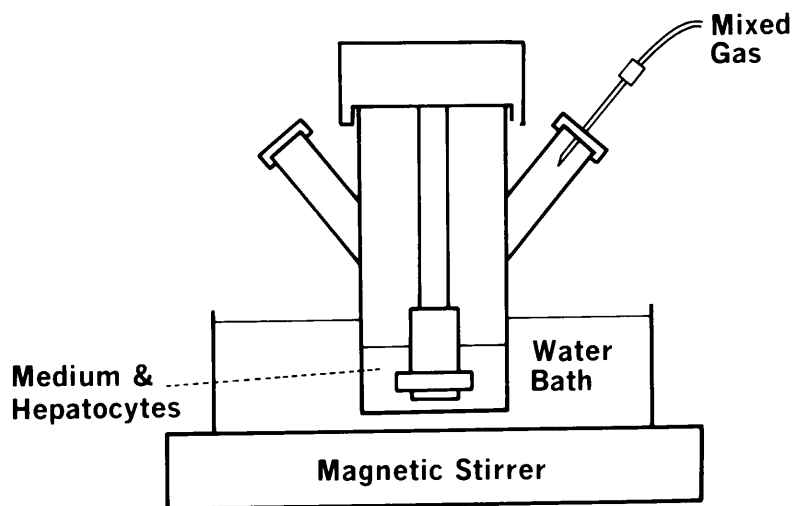


図2 分離肝細胞浮遊培養法の実験装置。

た（図2）。培養条件は37°C，95% O₂+ 5% CO₂ の混合ガス噴入下で培養（好気条件）し、次に、95% N₂+ 5% CO₂ 混合ガス（嫌気条件）に置換し、肝細胞のViability の変動を検索した。また培養液中に Superoxide Dismutase (Sigma) を5,000 U/100ml を混入し、viability の変動を観察した。Allopurinol は難溶解性で、溶解には等モルの1N NaOH を要し、培養液pHが 9~10となり、本実験には使用不能であった。

2. 実験成績

95% O₂+ 5% CO₂混合ガス下では、培養液中の酸素分圧は 450~500mmHg であった。次に95% N₂+ 5% CO₂混合ガスに代えると、約15~20分で酸素分圧は30~50mmHgに低下していた。分離直後の肝細胞のViability は90~95% であった。好気条件下では肝細胞のviabilityは培養1時間後では70%，2時間後では50% に低下していた。好気条件で1時間培養後、嫌気条件に代えるとviability は20% と著明に低下した。その後、好気条件にもどしてもviability の低下はわずかであった（図3）。培養液中にSuperoxide Dismutase (SOD) を添加すると、好気条件下ではviability の改善はなかったが、嫌気条件でのviability の低下を抑制した（図4）。

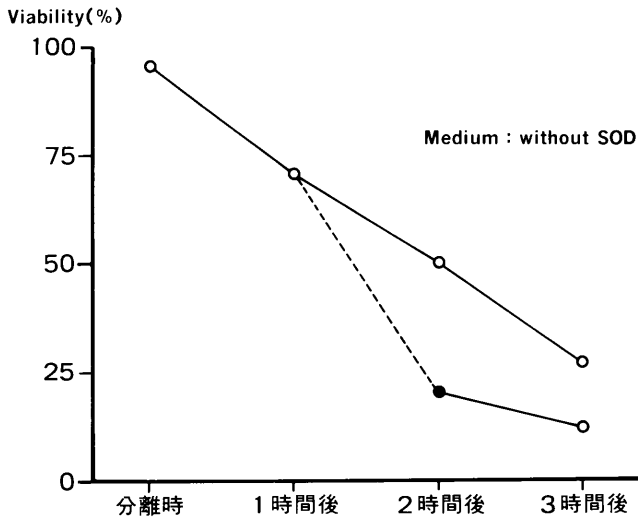


図3 SOD非添加時のViabilityの変動.

3. 小括

肝細胞を嫌気条件 (95% N_2 + 5% CO_2) で1時間培養後、好気条件にもどし、酸素の供給 (すなわち活性酸素の発生) を行なったが、障害の増悪は認めなかった。これは、培養条件を無酸素状態に急激に変化させても、培養液中の酸素分圧は徐々にしか変化しないため無酸素状態にはならず、肝細胞には培養液からの酸素の供給が続き、活性酸素の発生がこの時点ですでに起こったものと考えられる。また

アロプリノールを使用した実験が不可能であったので、活性酸素の発生系についての言及はできなかった。肝の虚血障害の機序解明のモデルとして肝細胞培養系を選択した理由は、肝を構成する細胞には、肝実質細胞の他に Kupffer細胞，内皮細胞などがあり、これらの細胞は phagocytosis の過程で活性酸素の産生と密接に関係するため、肝実質細胞の虚血障害の機序を純粹に検証するには、このモデルが適当と考えたからであった。しかし基礎実験の結果は、培養肝細胞に虚血障害を定量的に誘導する困難性を示した。

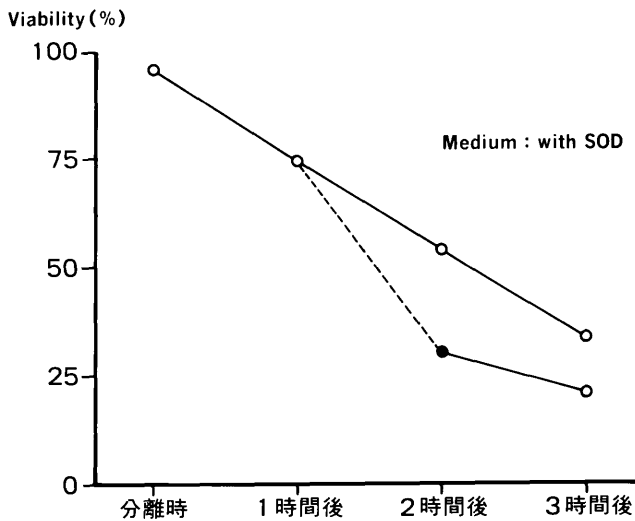


図4 SOD添加時の Viabilityの変動.

生体臓器の虚血再灌流障害は、ショックによる全身的な低灌流状態や血栓、塞栓あるいは人為的な血管遮断によりもたらされるが、必ず脈管が介在するプロセスであり、この点からも、臨床医学に直結した虚血の病態生理の研究には肝灌流法や *in vivo*系がより適切なモデルと考えられ、以下の実験を追加した。

I-B, ラット *in vivo*による検討

1. 虚血肝不全モデルの作成

Sprague-Dawleyラット（体重 250～300g）の 70%肝葉(median & lt. lateral lobes)を支配する動脈，門脈，胆管を微小血管クリッ

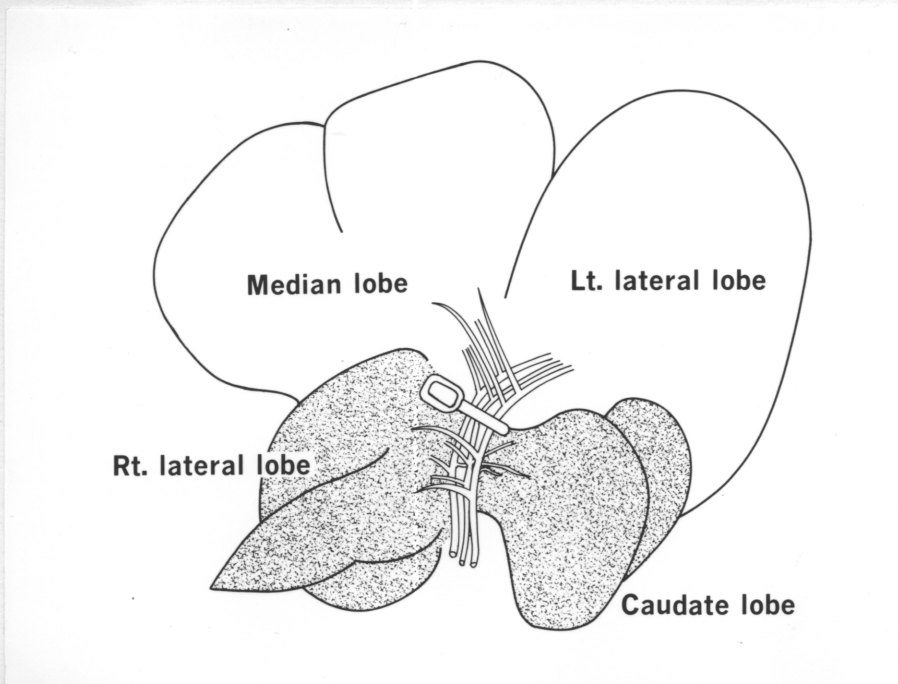


図5 ラット虚血肝不全モデル

プにて各々60分, 90分, 100分, 110分, 120分間クランプし、クランプ解除時に30%の非虚血肝葉を切除し作成した(図5)。本モデルでは、クランプ時にも30%の非虚血肝葉が門脈血床として働き、門脈鬱血が起こらない特徴を持つ。各虚血時間における死亡率は図6に示すとおりであった。100分虚血群と110分虚血群では死亡率に有意差はないが、120分虚血では100%死亡するので、肝不全モデルの具備すべき条件である肝不全からの回復性を考慮し、100分虚血が適当な肝不全モデルと結論された。

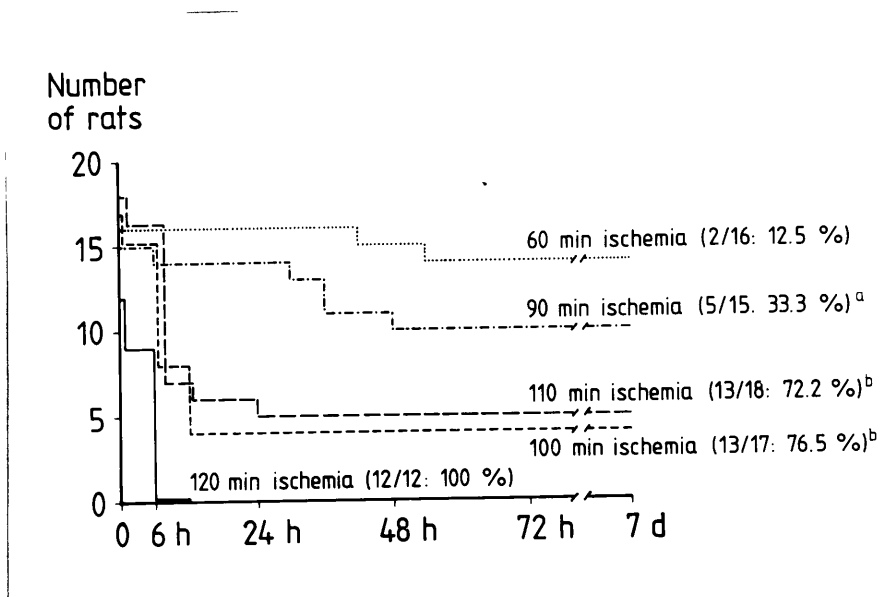


図6 虚血時間による生存曲線の推移。

2. 虚血肝不全ラットの生存率に及ぼす Allopurinol の効果

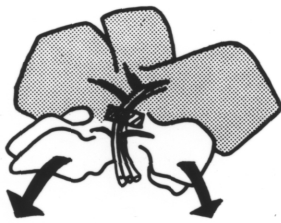
(1) 実験方法

上記肝不全モデルを作成し、Allopurinol の効果を検討した。

実験群は図7に示す如くで、1群はAllopurinol を2日間胃内投与(50mg/kg)し、虚血誘導10分前に静注(50mg/kg)した。2群では、虚血前の投与はなく、虚血解除再灌流10分前に静注した。3群はコントロール群で生食(pH 10.5)を2日間胃内投与、虚血10分前に生食を静注した。6時間毎にラットの生死をチェックした。

MATERIALS & METHODS

Exp.-1 : Survival of ischemic liver failure rats.



Model : Acute liver failure was induced by 100 min. ischemia with vascular clamp to median and lt. lateral lobes and resection of remaining non-ischemic lobes at declamping.

Group-1 : Allopurinol(50mg/kg) given intragastric daily for 2 days + i.v. bolus 10 min. before ischemia.

Group-2 : Allopurinol(50mg/kg) given i.v. bolus 10 min. before reperfusion.

Group-3 : Control--NaCl given instead of Allopurinol in group-1.

図7 Allopurinol の虚血肝不全ラット生存率に及ぼす効果

(実験方法)

(2) 実験成績

術後2日目での死亡率は、1群 50%、2群、3群は共に91.6%で有意差($P < 0.05$)をもってAllopurinolの虚血前投与が死亡率を抑制した(図8)。

3. Allopurinolの虚血肝障害抑制作用についての検討。

(1) 実験方法

Sprague-Dawleyラット(体重 250~300g)の70%肝葉を、前記したのと同様に90分間クランプし、クランプ解除時には30%の非阻血肝葉は切除することなく温存した(図9)。これによりラットは全例生存し、任意の時間に犠牲死させることが可能となった。

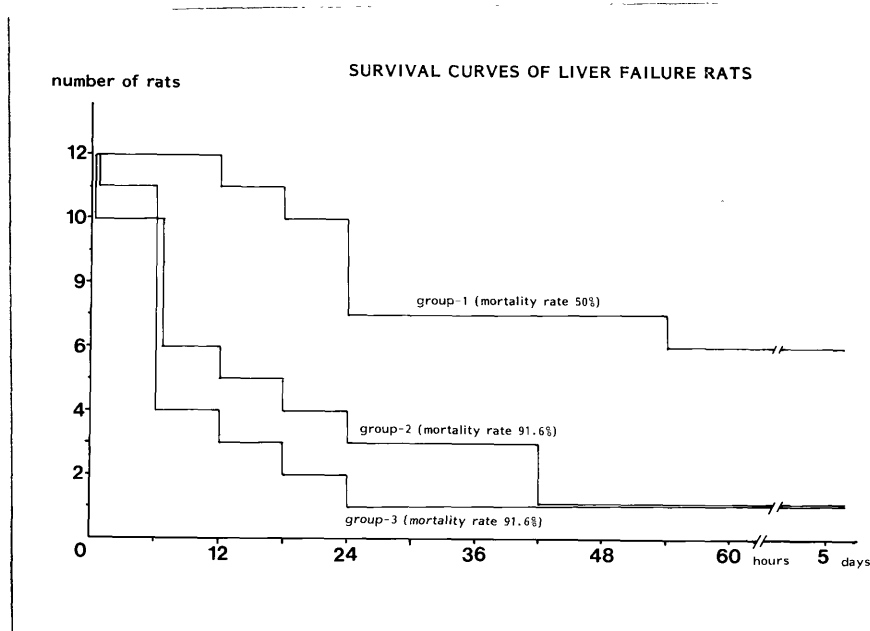
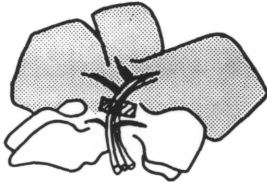


図8 生存率曲線の推移。

アロプリノールを2日間胃内投与し、虚血10分前に静注したアロプリノール投与群と、アロプリノールの代わりに生食を投与したコントロール群において、阻血解除時、解除後3, 6, 12, 24時間(n=6)で犠牲死させ、血中ALAT, ASAT, β -Hexosaminidase, ヘパラスチンテスト, および肝組織水分量を測定した。また、阻血解除後12, 24時間後に犠牲死させたラット肝葉の最大割面に占める壊死巣の面積をイメージアナライザー(IBAS-2, KONTRON)にて算出した。

Exp.-II & III : Allopurinol---its protective effect and mechanism on ischemic injury.



Model : 90 min. ischemia to median and lt. lateral lobes without resection of remaining non-ischemic lobes.

Allopurinol group
Allopurinol(50mg/kg) given intragastric daily for 2 days + i.v. bolus 10 min. before ischemia.

Control group
NaCl given instead of Allopurinol.

図9 Allopurinol の肝障害抑制作用の検討

(実験方法)

(2) 実験結果

各実験結果を図示した。アプロピノール投与群では、ALAT, ASAT (図10), β -Hexosaminidase (図11)などの血中への逸脱や肝組織水分量(図12)が有意に減少($p < 0.05$)しており、またヘパラスチンテスト(図13)も同様にアロプロピノール投与群で良好であった。写真1は、コントロール群の虚血24時間後の肝断面像(H-E染色)であるが、エオジン好性の広範な凝固壊死巣を認める。写真2は、アロプロピノール投与群の虚血24時間後の肝断面像であり、小壊死巣が散見されるに過ぎない。以上の結果を表示したのが表1である。虚血後12時間, 24時間の両時点でもアロプロピノール投与群に壊死巣の縮小化($P < 0.05$)を認めた。

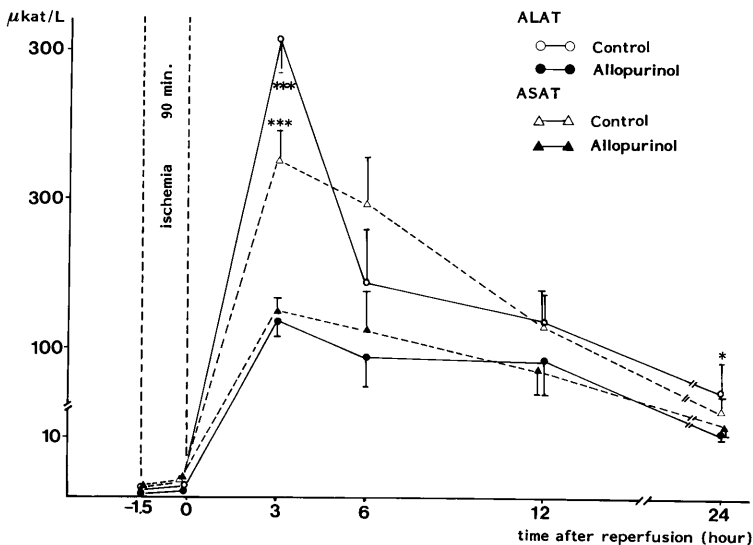


図10 血中ALAT, ASATの推移.

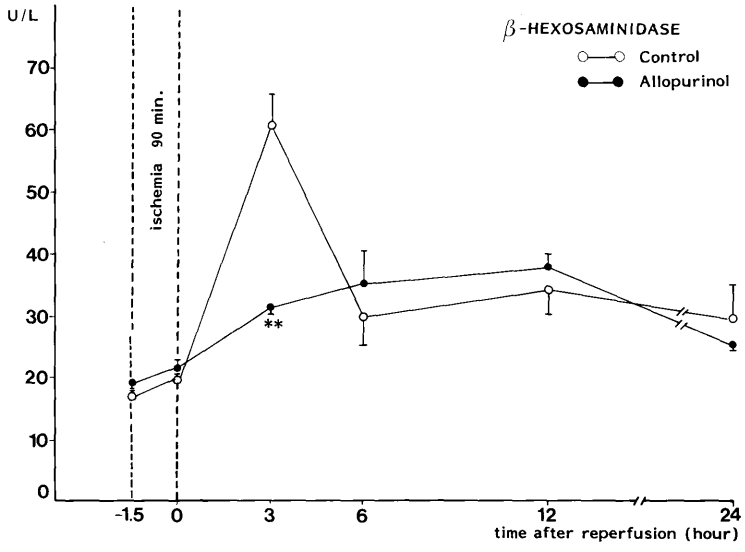


図 1 1 β-Hexosaminidase の推移.

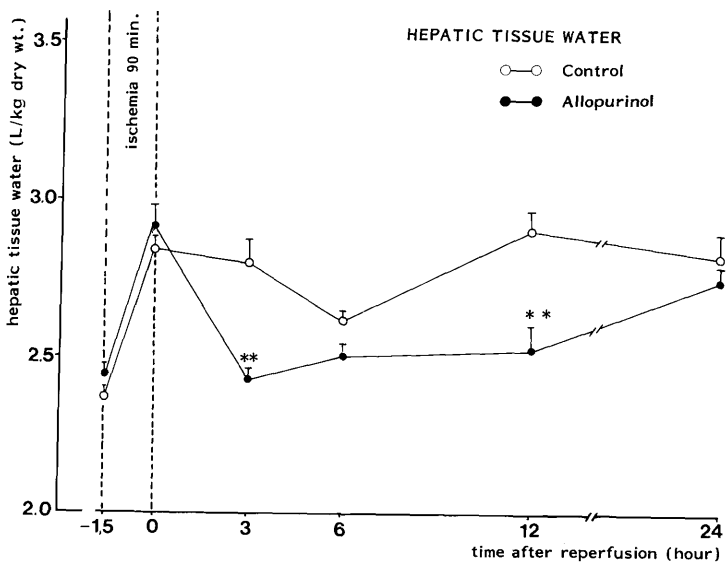


図 1 2 肝組織水分量の推移.

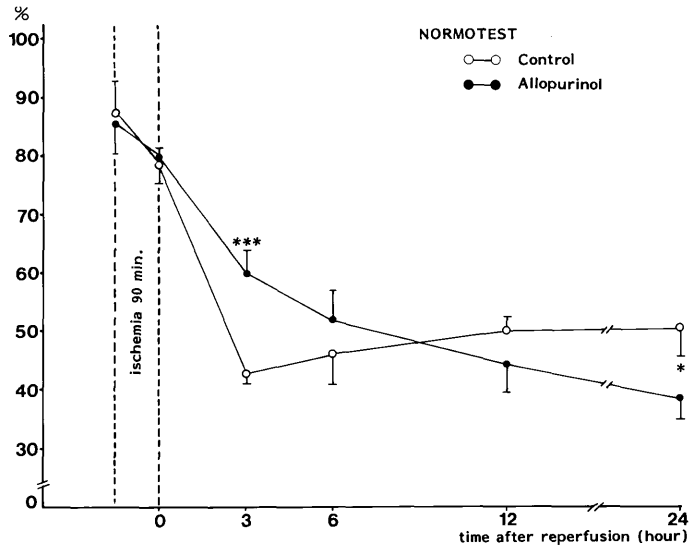


図 13 ヘパプラスチンテストの推移.

Per Cent Necrotic Area of Liver with 90 min. Ischemia

	at 12 hrs after reperfusion	at 24 hrs after reperfusion
Allopurinol Group	4.65 13.87 26.71 28.12 30.13 37.53 <u>23.5 ± 11.0</u>	16.96 17.10 17.23 17.35 20.99 30.70 <u>20.01 ± 5.0</u>
Control Group	41.11 49.36 50.26 54.66 58.48 63.86 <u>53.0 ± 7.2</u>	60.76 71.88 73.26 80.26 80.44 89.48 <u>76.0 ± 8.9</u>

表 1 肝壊死巣の占有率の比較.

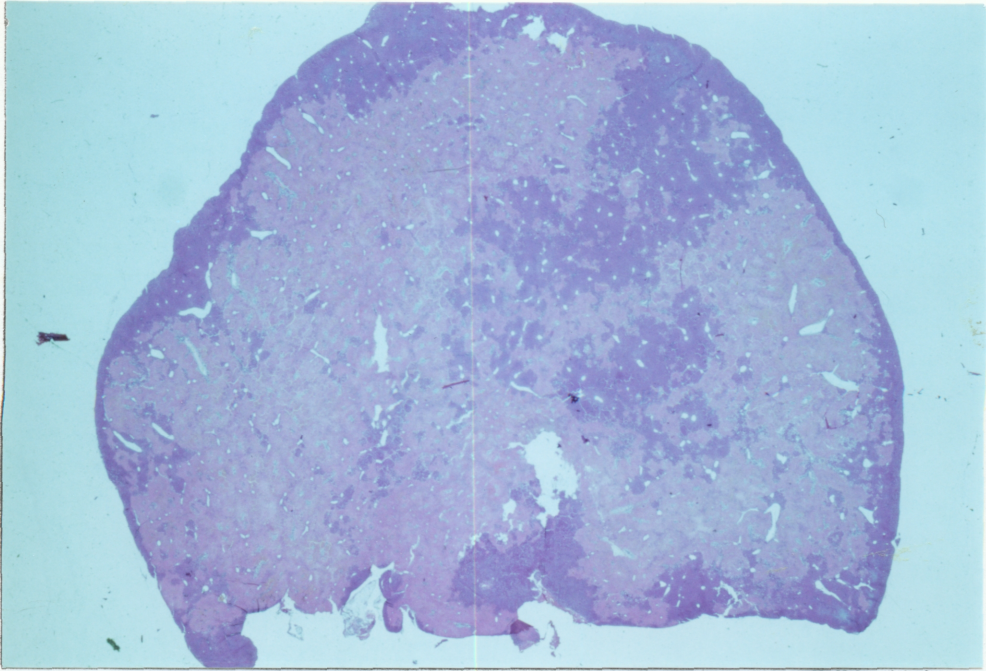


写真1 コントロール（生食投与）群，虚血24時間後の肝組織断面図。

H-E 染色。

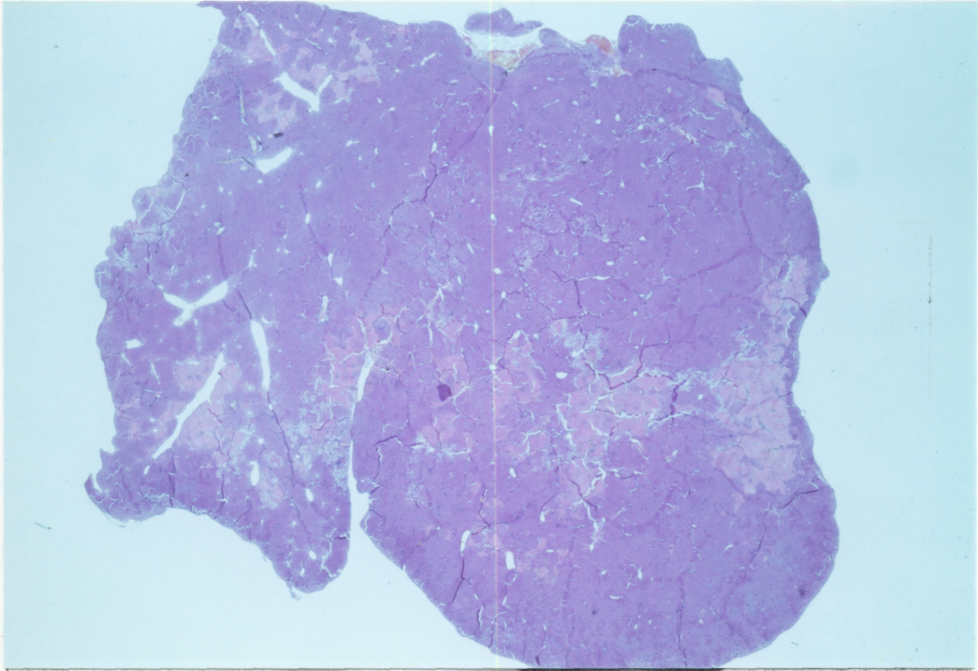


写真2 70mg/kg投与群，虚血24時間後の肝組織断面図。

H-E 染色。

4. 虚血肝組織チオバルビツール酸反応物質の測定

(1) 実験方法

上記アロプリノール投与群とコントロール群において、阻血前、90分阻血解除時、解除再灌流1,2時間後(各n=5)に肝を摘出、冷生食で血液を灌流除去後、TBA法にて過酸化脂質含量を測定した。

(2) 実験結果

アロプリノール投与群ではMalondialdehyde (MDA)の生成は完全に抑制されたが、コントロール群では再灌流時および再灌流2時間後にMDAの著明な増加をみた(図14)。

5. 小括

肝不全モデルによる救命率、血液生化学検査や組織学的検査を指標にした虚血再灌流肝障害度は、アロプリノールの投与により有意に改善された。また、主に活性酸素が細胞膜のリン脂質をアタックし生成されてくるとされるMDAも、アロプリノールの投与により抑制されたことより、肝虚血再灌流障害には活性酸素が関与し、その発生反応系にXanthin Oxidaseが関与することを示すものである。虚血後再灌流直前のアロプリノール投与は無効であったことから、活性酸素は肝虚血中にすでに発生している可能性が示唆された。

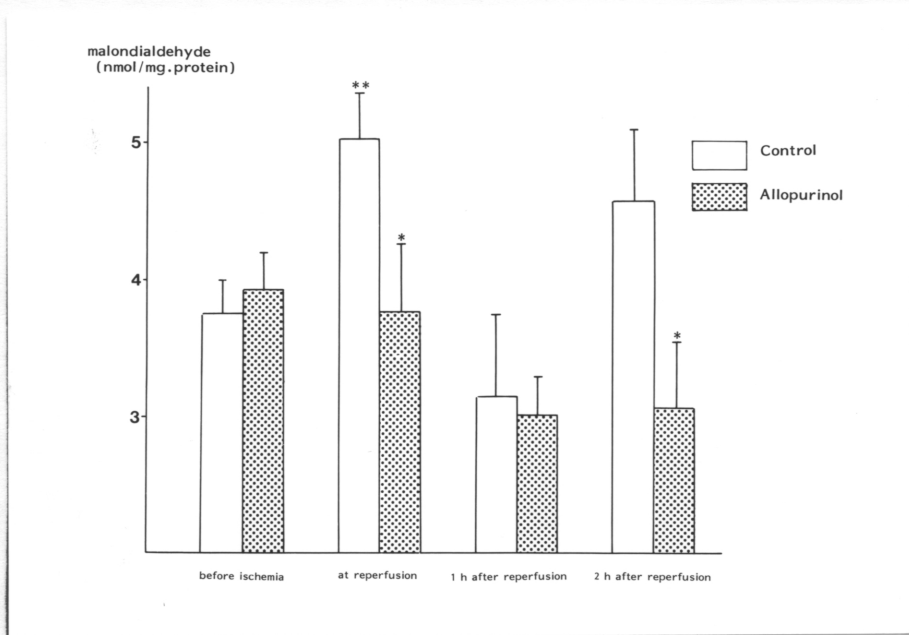


図 1 4 肝組織中Malondialdehyde 量の推移.

I -C, ラット肝組織片を用いたMicrocalorimetry による検討.

肝臓は代謝の中心臓器であり、その多岐にわたる機能の発現のためにエネルギーを生成、消費している。そのエネルギーの利用効率は40~50%で、残りの50~60%は熱として放出され、体温維持や科学反応の至適環境を保つために利用されている。したがって、熱量はエネルギーの生成、消費、変換による仕事量、すなわち、Totalな肝臓の機能を反映するものと考えることができる。そこで肝組織片を試料として代謝熱測定法を確立し、虚血肝のviabilityの判定と、それにおよぼすAllopurinolの効果を検討した。

1. 実験方法

代謝熱の測定には microcalorimeter (LKB, Sweden) を使用した (図 15 左)。その原理は、一対の円筒型アンプルの一方に肝組織片と培養液、他の一方には培養液のみを入れ、これらを 37°C に保たれた温炉に静置し、二つのアンプル間に発生する温度差を電気信号に変換記録するものである。培養液は HEPES 20mM を含む Leibovitz L-15 を用いた。肝組織は Sprague-Dawley ラット肝を 16G 生検針で採取し、さらにメスで輪切りに細切したものを 2~8 片を使用した。また肝虚血再灌流実験では、肝葉の 70% を栄養する動脈、門脈をクラ

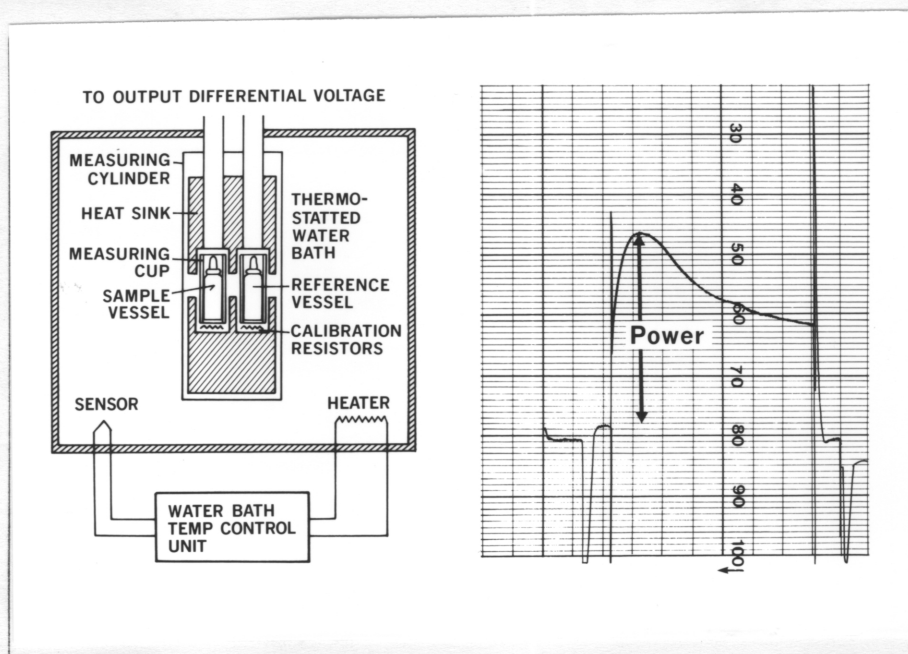


図 15 左：マイクロカロリメーターの原理。

右：検出された熱曲線。

ンプし、その後クランプを除去再還流した。アロプリノール投与群は、従来通り2日間胃内投与し、虚血前10分に静脈内投与した。また、コントロール群は生食を投与した。

2. 実験結果

記録された熱曲線（図15右）は、測定開始後5～10分でピークとなり、以後減衰している。このピーク値を測定使用した。肝組織重量と熱産生には強い正の相関を認め、肝のTotalな代謝機能を反映するものと考えられた（図16）。特に、肝組織重量を2～10mg wet weight（蛋白量にして20～100 μ g）に限定すると、相関係数0.929, $p < 0.01$ であった。

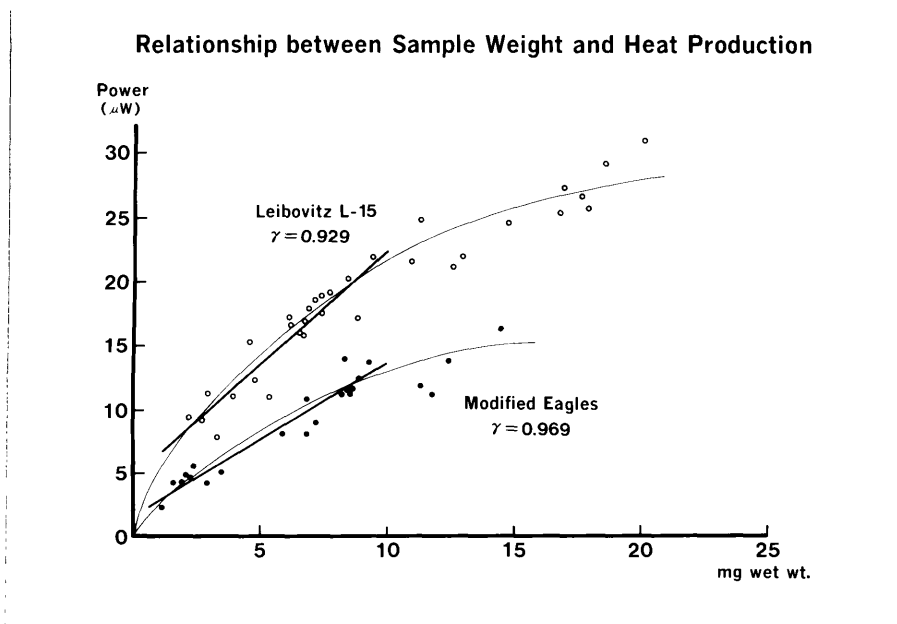


図16 肝組織重量と熱量の関係。

次に、虚血肝組織の熱産生（図17実線部分）をみると、虚血30分ですでに低下を認め、60分では虚血前値の約75%まで減少し、以後虚血2時間まで同様な値で推移した。次に、再灌流の熱産生（図17破線部分）を検索すると、虚血30分、60分後再灌流では、虚血前値あるいは前値近くまで回復するが、虚血時間が90分以上になると熱産生の回復は得られなかった。

以上の結果から、90分虚血再灌流モデルを採用し、アロプリノール投与の効果を検定した（図18）。虚血前および90分虚血時の肝組織熱産生量は、コントロール群が高く、アロプリノール投与によ

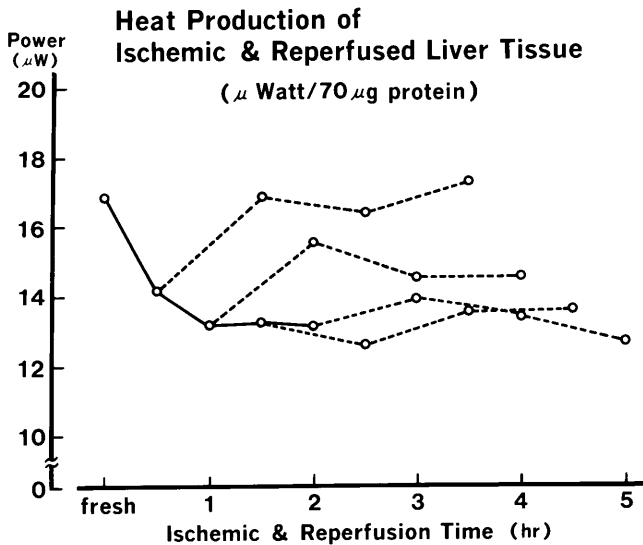


図17 虚血再灌流時の熱量の推移。実線は虚血組織の熱量の推移、波線は再灌流組織の熱量の推移を示す。

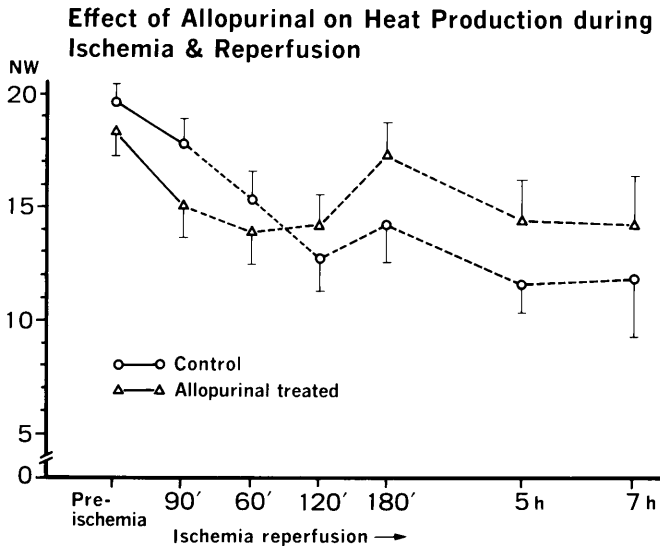


図 18 アロプリノール投与による虚血，再灌流組織の熱量の変化。

る熱産生抑制が認められた。しかしアロプリノール投与群では、再灌流3時間後ではほぼ虚血前値に回復したのに対し、コントロール群では回復を認めず、この傾向は再灌流7時間までほぼ同様であった。

3. 小括

虚血30分，60分後の再灌流では熱量の回復傾向が見られたが、虚血時間が90分を越えると再灌流後に熱量の回復が得られなかった。この結果は、不可逆的肝虚血障害を惹起する虚血時間が90分前後にあるとする従来からの報告と一致する所見であり、本法の虚血障害肝のviability判定の有効性を示唆するものである。またアロプリノール投与により、90分虚血後再灌流時に熱量の回復傾向が見られ

たことは、アロプリノールの虚血障害軽減作用を示すとともに、障害機序に Xanthine Oxidase 系から発生する活性酸素が関与することを間接的に示すものである。

II. ウサギ移植腫瘍に対する活性酸素の抗腫瘍効果に関する検討。

現在、肝腫瘍に対する治療法として外科的切除が第1選択とされるが、その対象となる症例は半数に満たない。切除不能例には、肝動脈結紮や種々の塞栓物質による塞栓術などの虚血療法が行なわれているが、術後の側副血行路の増生が治療効果を減弱させている。本研究の意図は、肝虚血障害機序に活性酸素が介在していると考えられるので、Hypoxanthine - Xanthine Oxidase 反応系による化学反応によって活性酸素を発生せしめ、虚血時と同様な組織障害を惹起させ、肝腫瘍の治療に応用しようとするものである。本法は、血管床を塞栓することがないので側副血行路の発生はなく、血管床が開存しているので反復投与や抗癌剤との併用も可能などの利点を持つと思われる。また free radical 自身が、蛋白や DNA を傷害する働きがあり、抗腫瘍効果を発揮する可能性も考えられる。

1. 実験方法

(1) ウサギ移植腫瘍モデルの作成

当科で継代培養されていた VX₂腫瘍細胞を、ウサギ大腿筋へ 4×10^7 個移植した。移植後4週目で明らかな腫瘍の形成を認め、7週目に腫瘍塊を摘出し、腫瘍被膜側に近い viable な腫瘍組織を 2mm 角に細切し、ウサギ1匹につき組織片4個を大腿部に移植した。約4週間で径10~20mmの腫瘍塊が形成された(写真3)。また血管撮影では、腫瘍血管(写真4)や腫瘍濃染像(写真5)を認めた。

(2) Hypoxanthine - Xanthine Oxidase 投与実験

前記の血管撮影所見より、Hypoxanthine, Xanthine Oxidaseを注



写真3 ウサギ大腿部に移植された VX₂腫瘍



写真4 ウサギ VX₂腫瘍の血管撮影動脈相.



写真5 ウサギ VX₂腫瘍の血管撮影実質相.

分枝したものが主であり、担癌肢側にはカニューレーションできる適当な動脈枝がないので、ネンブタール麻酔下に健常肢側の大腿動脈を切開し、カニューレーションし、その先端を担癌肢の総腸骨動脈分岐部に留置し、担癌肢の血行障害のないよう配慮した。

Hypoxanthine, Xanthine Oxidaseの反応は、瞬時に進行し活性酸素（スーパーオキシオド）を発生するので、ウサギ体内に注入する直前に混和し、反応を開始する必要がある、図19の如く、Hypoxanthine, Xanthine Oxidaseは別々に注入し、動脈注入部直前にチャンバーを間置し、両物質を反応させるよう配慮した。Hypoxant-

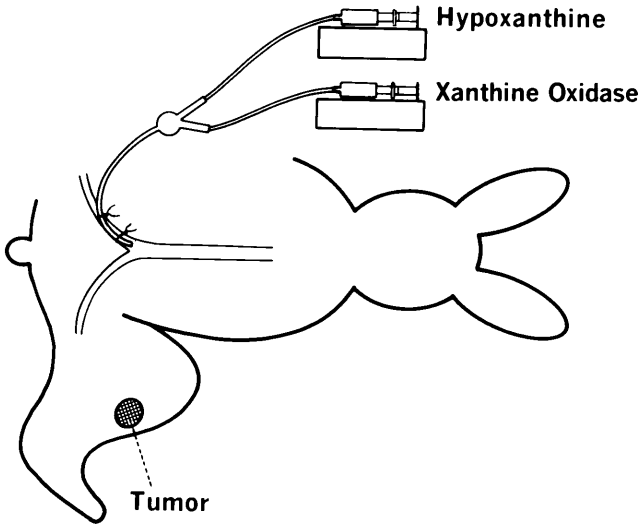


図19 ウサギ VX₂腫瘍に対するHypoxanthine, Xanthine Oxidaseの注入実験図。

入する至適動脈ルートを検討した。腫瘍血管は、大腿動脈から直接
hine, Xanthine Oxidase濃度は各々28mg/100ml, 8.4U/100mlとなる
よう、phosphate buffer saline で希釈した。注入速度はそれぞれ
0.11ml/minとし、60分間注入した。コントロール群にはphosphate
buffer saline を60分間注入した。注入前, 注入終了24時間後に腫
瘍の長径(a)と短径(b)を計測し、腫瘍体積を $V=a \cdot b^2$ で計測し、比
較した。また腫瘍組織をHematoxylin - Eosin 染色し、組織学的検
討を行なった。

2. 実験結果

移植腫瘍の径が2cmを越えると中心壊死が始まり、抗腫瘍効果の
判定に支障をきたすので、径10~20mmの腫瘍塊が形成された時点で
実験に供した。治療前と治療後24時間時の推定腫瘍体積の変動は、
Hypoxanthine, Xanthine Oxidase注入群, 対象群どちらでも見られ
なかった(図20)。組織学的検討では、対象群ではViableな腫瘍
細胞が塊状に融合して見られたが(写真6)、Hypoxanthine, Xant-
hin Oxidase 投与群では、多核白血球の浸潤を伴う広汎な壊死巣
を認め、Viableな腫瘍細胞は小集塊として島状に散在するのみであ
った(写真7)。

3. 小括

推定腫瘍体積の比較では、対照群、治療群とも注入前後で変化を認めなかった。これは組織が壊死に陥っても腫瘍径の縮小となって表われてくるには相当の時間を要すためと考えられる。しかし組織学的検討では、Hypoxanthine, Xanthine Oxidase注入群では、著明な腫瘍細胞の壊死像を認め、Viableな腫瘍細胞は、島状に散在するのみであった。この点で対照群とは明らかに異なった像を呈していた。本実験では、注入回数は1回のみであったが、これを複数回にして、腫瘍径、生存日数、転移巣の検討など、他のparameterも検討する必要がある。

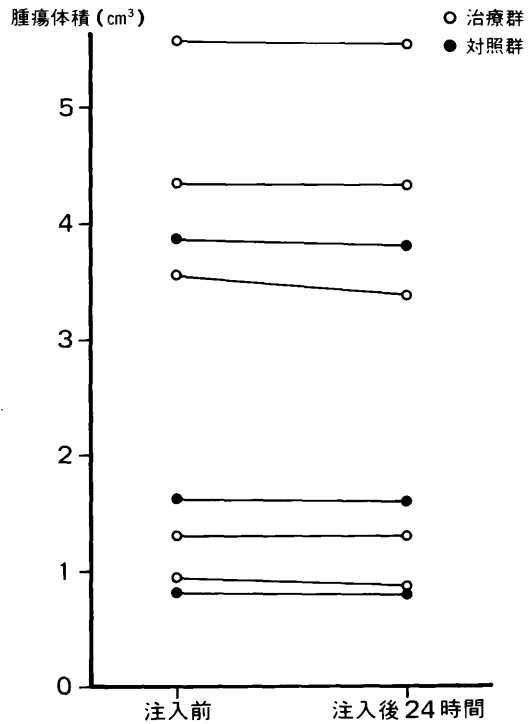


図 2 0 Hypoxanthine, Xanthine Oxidase注入前後の腫瘍体積の変動.

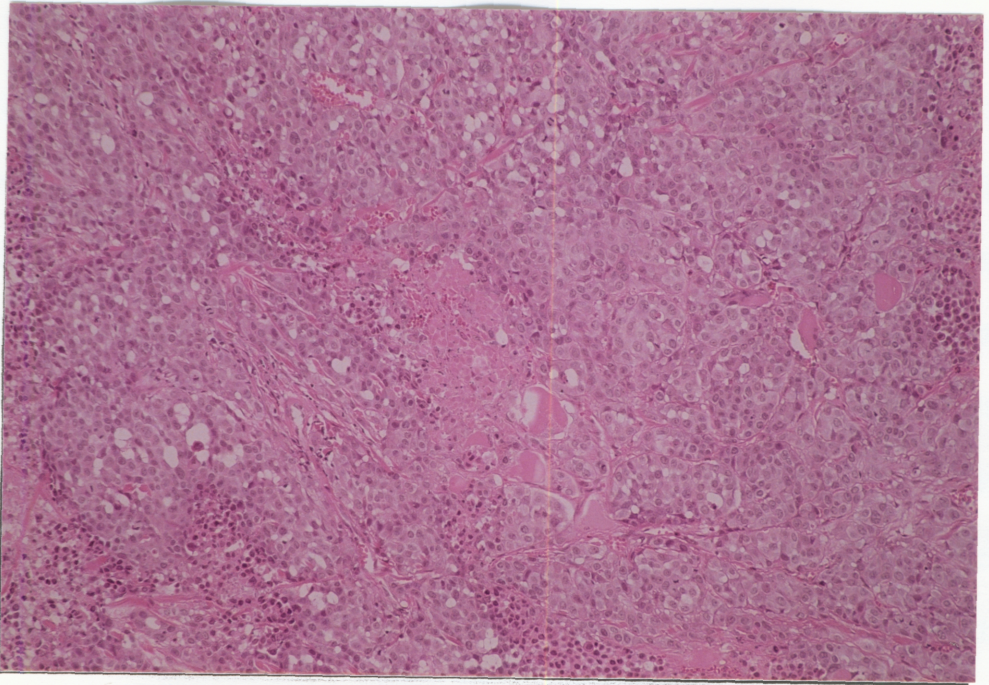


写真6 対照群の組織像．H.E.染色，×100

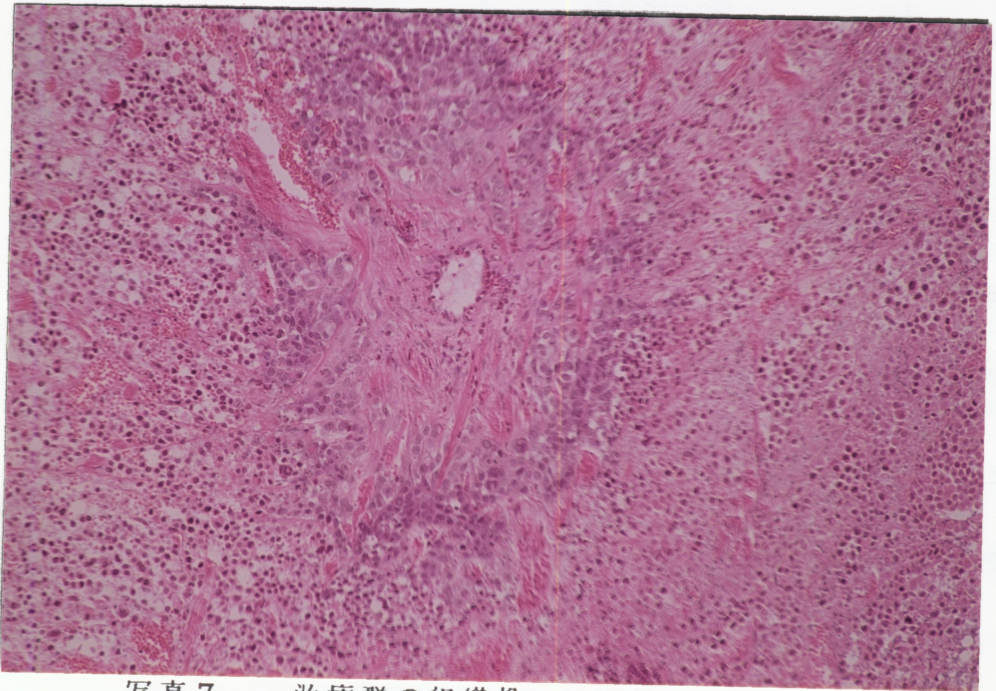


写真7 治療群の組織像．H.E.染色，×100

Ⅲ. 総括

種々の実験モデルやparameterよりAllopurinolには虚血肝障害を軽減させる働きがあることが示された。その作用機序としては、Xanthine OxidaseによるSuperoxideの発生を抑制すると考えられるが、Superoxideの発生をin vivoで検出する方法が現在のところないので、直接的証明はなされていない。

Free radicalによる抗腫瘍効果の検討では、組織学的にその効果を認めることができた。この効果が、Hypoxanthine, Xanthine Oxidaseにより発生したfree radicalによるものなのか、非特異的な反応によったものなのかは、上記と同じ理由で慎重な検討を要するところである。free radicalを消去する作用のあるSuperoxide Dismutaseを併用しての検討、組織化学的検討などが次のステップとして考えられよう。本研究で示された成績は、肝虚血再灌流障害におけるfree radical theoryを、supportするものであった。