日消外会誌　28（11）：2174～2183，1995年

肝動脈塞栓術における細胞障害に関する臨床的，実験的検討

埼玉医科大学第２外科学教室（主任：石田　清教授）
橋　本　　大　樹

Transcatheter arterial embolization（TAE）による腫瘍部および非腫瘍部の組織障害と活性酸素，サイトカインとの関連性をヒト肝癌（n＝30）および家兎VX2腫瘍肝癌モデル（n＝20）を用いて検討した．ヒト肝癌で，体温，白血球数，AST，ALT，LDH，superoxide dismutase activity（SOD活性），interleukin-6，nitric oxide（NO）のいずれもがTAE後１日目に高値を示し，７日目にはTAE前値に戻った．AST，ALT，LDHに対する重回帰分析の結果，NOが肝障害と最も強い関係にあった．実験で，腫瘍部のSOD活性，thiobarbituric acid reactive substancesはTAE直後から高値を示し，かつ，非腫瘍部に比べ上昇率が高かった．また，腫瘍部ではTAE後１日目にelectron spin resonance signalとして大量の脂質過酸化物が確認され，病理組織学的検討では腫瘍部の壊死と腫瘍周囲に好中球，マクロファージの浸潤を認めた．以上より，TAEによる組織障害に活性酸素の関与が示唆された．

Key words： transcatheter arterial embolization，active oxygens，nitric oxide，cytokine

はじめに

肝動脈塞栓術（transcatheter arterial embolization：以下，TAEと略記）は肝細胞癌の治療法として考案され[1]，臨床上，広く施行されている．その作用機序は非腫瘍部は動脈と門脈の二重支配を，一方，腫瘍部は動脈単独の支配を受けているという特殊性に依存している．つまり，腫瘍組織の栄養血管を塞栓させることで物理的に癌組織に阻血を起こさせ，選択的に壊死に陥らせるという方法である．現在，手技，使用機材および塞栓物質などの改善も進み[2]，その治療成績も向上している．しかし，それぞれの個体により有効性は異なり，正常肝組織への影響や全身的な副作用などの点で若干の問題もあり[3][4]，作用機序や治療成績についての検討を要する問題もある．したがって，TAEの臨床的効果の改善を目的とし，さらに理想的な治療法を模索するうえでもTAE施行前後の局所および全身における病態の解明は重要である．

著者はTAEにより人工的にもたらされる臓器虚血およびそれによる組織障害に注目し，臓器虚血と関係の深い活性酸素・free radical[5]が同治療法の抗腫瘍効果や副作用発現に関与しているのではないかと考えた．そこで，ヒト肝癌および家兎VX2腫瘍肝癌モデルについて，superoxide dismutase activity（以下，SOD活性と略記），nitric oxide（以下，NOと略記）ならびにその関連物質や組織障害時に産生され，生体防御反応に関与するといわれるサイトカインの測定を行い，抗腫瘍効果や副作用発現との関連性を検討した．このようにTAE施行前後の病態の検討を活性酸素およびサイトカインの両面から行った報告は少ない．

＜1995年７月５日受理＞別刷請求先：橋本　大樹
〒350-04　埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38　埼玉医科大学第２外科

対象と方法

1）臨床的検討

＜対象＞

1993年３月から1994年12月の間に当教室でTAEを施行した肝悪性腫瘍30例（原発性肝癌11例，転移性肝癌19例），年齢41歳から78歳（平均61歳）の男性20例，女性10例を対象とした（**Table 1**）．いずれもTAE施行時にMitomycin C 50mg，Epirubicin 30mg，Lipiodol 3～8mlを動注した．

＜測定項目＞

TAE施行前，施行直後，10分後，１日目，３日目，７日目に肘正中皮静脈より採血を行い，白血球数，aspartate aminotransferase（以下，ASTと略記），alanine aminotransferase（以下，ALTと略記），LDH，SOD活性，thiobarbituric acid reactive substances（以下，TBARSと略記），interleukin-6（以下，IL-6と略記），tumor necrosis factor-α（以下TNF-αと略記）を測定した．NOは15例に測定を行った．また，

Table 1 Tumor size and location of hepatocellular carcinoma or liver metastasis

No.	Age	Sex	Origin	Tumor [location & size (cm)]
1	55	male	A-colon cancer	S_4 : 4.0×3.0
2	42	female	HCC	S_{5-8} : 15.0×12.0
3	70	male	HCC	S_{2-3} : 6.5×6.0
4	50	female	S-colon cancer	S_8 : 5.0×5.0
5	66	male	S-colon cancer	S_7 : 4.5×4.5, S_8 : 4.0×4.0, S_6 : 3.0×3.0
6	61	male	A-colon cancer	S_7 : 2.0×2.0, : 2.0×2.0, S_5 : 2.0×2.0
7	78	male	HCC	S_6 : 2.0×2.0, S_7 : 1.0×1.5
8	77	male	GB cancer	S_4 : 2.5×3.0, S_5 : 2.5×2.5
9	41	male	HCC	S_{7-8} : 8.0×10.0
10	70	female	A-colon cancer	S_8 : 1.0×1.5
11	67	male	HCC	S_5 : 4.5×5.0
12	65	male	HCC	S_7 : 3.0×3.5, S_6 : 3.0×3.0, S_2 : 2.0×2.0
13	66	male	HCC	S_6 : 3.5×4.1, S_7 : 3.6×3.0, S_2 : 2.2×2.2
14	67	male	HCC	S_5 : 2.0×2.0, : 1.5×1.5
15	43	male	rectal cancer	S_6 : 3.5×4.0, S_7 : 2.0×2.5
16	50	female	S-colon cancer	S_8 : 6.0×4.5
17	66	male	S-colon cancer	S_8 : 4.5×4.5, S_6 : 2.0×2.0, S_7 : 2.0×2.0
18	48	female	gastric cancer	S_{2-3} : 13.0×11.0
19	70	female	HCC	S_8 : 7.0×8.0
20	70	female	T-colon cancer	S_5 : 5.0×5.0, S_6 : 1.5×1.0
21	45	male	rectal cancer	S_6 : 3.5×4.5, S_7 : 2.5×2.5
22	66	male	S-colon cancer	S_7 : 4.0×4.5, S_8 : 4.0×4.0, S_6 : 3.0×3.5
23	51	female	S-colon cancer	S_8 : 5.0×4.5
24	59	male	S-colon cancer	S_6 : 3.0×3.5, S_7 : 2.0×2.5
25	70	female	HCC	S_8 : 8.0×7.5
26	72	male	HCC	S_3 : 3.0×4.0
27	72	male	S-colon cancer	S_8 : 2.0×3.5, S_7 : 1.5×1.5
28	72	female	breast cancer	S_8 : 4.0×4.0, S_7 : 2.5×3.5
29	42	male	gastric cancer	S_6 : 3.0×3.0, S_7 : 2.0×2.0
30	59	male	S-colon cancer	S_{7-8} : 5.0×5.0, S_6 : 4.0×4.5

HCC : hepatocellular carcinoma, GB : gallbladder, A-colon : ascending colon, T-colon : transverse colon, S-colon : sigmoid colon

採血時に体温を測定した．

なお，採血はすべてインフォームドコンセントを得て行った．

＜測定方法＞

① 血清 SOD 活性

O_2^-と nitro blue tetrazolium との反応による diformazan 形成の減少の程度を阻害率とし，試料中の SOD 活性値を求めた[6]．

② 血清 TBARS

過酸化脂質―テストワコー（和光純薬）を用い，励起波長：515nm，蛍光波長：553nm で TBARS を malondialdehyde 量として求めた．標準物質は1,1,3,3-tetraethoxy propane を用いた[7]．

③ 血中 IL-6

Human IL-6 Immunoassay（測定感度：0.35pg/ml以上，R & D systems, USA）を用い，IL-6モノクローナル抗体とIL-6ポリクローナル抗体の反応をenzyme linked immunosorbent assay（以下，ELISA法と略記）で測定した．

④ 血中TNF-α

ヒトTNF-α測定キット（測定感度：15〜1,000pg/ml，大塚アッセイ研究所）を用い，抗ヒトTNF-αモノクローナル抗体とperoxidase標準抗ヒトTNF-αモノクローナル抗体の反応をELISA法で測定した．

⑤ NO

Sonodaら[8]の方法を改変し，NO-Hbを測定した．静脈血より遠心分離で血球成分を採取．0.15M NaCl-Tris-HCl（10mM，pH 7.4）で洗浄後，Tris-HCl（10 mM）を同量加え，遠心分離し，上清を採取．次に，溶液中の硝酸塩や低分子のニトロソ化合物を除去する目的でSephadex G-25カラム（Pharmacia LKB, Sweden）に通し，Tris-HClで溶出．溶出液0.1mlとGriess試薬（1%-sulfanilamide，0.1%-naphthylethylene diamine dihydrochloride，2.5%-phosphoric acid）0.5mlを混合，80°Cで20分間加熱後，0.4mlをUltra-free（Millipore C3LCC，MW5000）にセット，8,000r.p.m. 30分間の遠心分離で限外濾過．濾液の吸光度（542nm）を分光光度計（Shimadzu UV-2100S）で測定．さらに，各試料中のHb含量をヘモグロビンB-テストワコー（和光純薬）で測定，Hb 1mgあたりの値を求めた．また，同試料の血清成分のジアゾ反応をGriess試薬で測定し，Hbと結合しなかったNOをNOの最終産物であるNO_2^-として求めた．

2）実験的検討

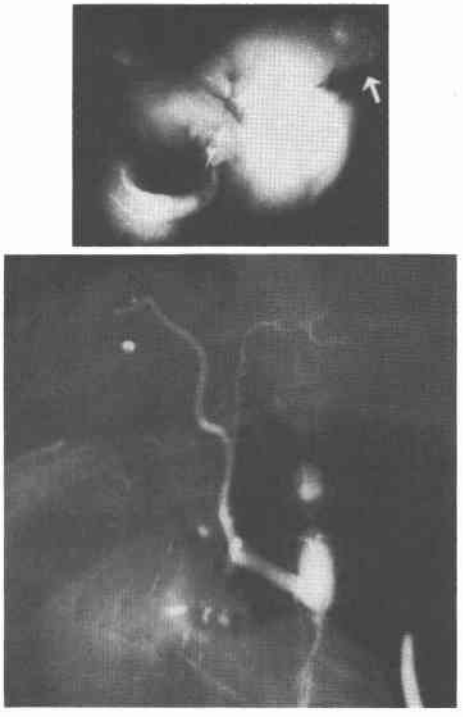
＜家兎肝癌モデル作成＞

体重約3kgの白色家兎をケタラール，セラクタール混合液で麻酔．開腹し，肝左葉被膜下に家兎VX2腫瘍細胞浮遊液0.5mlを注入移植した．細胞浮遊液は継代移植したVX2腫瘍を細片後，腫瘍細胞を5×10^5個/mlの濃度にHanks液で調整し，作製した．移植後14日目（腫瘍径10〜20mm）のものを実験に用いた．

＜TAEの方法＞

VX2腫瘍移植家兎20羽を前記麻酔下に開腹，大腿動脈より3Frのポリエチレンカテーテルを挿入，先端を腹腔動脈分岐部に留置．分岐部より下方の大動脈と胃動脈，脾動脈を一時的に遮断，血流を肝動脈のみとした（**Fig. 1**）．遮断による各臓器の虚血・再灌流障害は虚血時間が5分と短かく，無視できると考えた[9]．次に，カテーテルよりUrografin：0.5ml, Lipiodol：0.5mlの混合液：1mlを5分間で注入，TAEを行った．

Fig. 1 Angiogram of hepatic artery in a rabbit. Hepatic artery was mainly demonstrated by clamping of gastric artery and splenic artery in catheterization into aorta. The arrow showed the retention of lipiodol in the tumor.



＜測定項目＞

TAE施行前，施行直後，1日目，3日目に家兎を各5羽ずつ犠牲剖検し，腫瘍部，非腫瘍部の組織を3個ずつ採取．組織中のSOD活性，TBARS, electron spin resonance（以下，ESRと略記）signalを測定，3個の平均をもって測定値とした．さらに病理組織学的検討を行った．なお，腫瘍部組織は腫瘍中心部より，非腫瘍部は対側の右葉より採取した．

犠牲剖検はpentobarbitalを過量に投与して行った．

＜測定方法＞

① 組織内SOD活性

約1gの肝組織をリン酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄，赤血球を除去．ホモジナイズして得られた懸濁液を1,500 r.p.m.で遠心分離．上澄を血清SOD活性と同じ方法で測定．蛋白質量をLowry法で測定し，1mlあたりの値

を求めた．

② 組織内 TBARS

組織内 SOD 活性と同様の方法でホモジナイズして得られた懸濁液に 4 %sodium dodecyl sulfate を加え，血清 TBARS と同じ方法で測定．蛋白質量を Lowry 法で測定し，定量を行った．

③ 組織内 ESR signal

組織を採取後，直ちに液体窒素で凍結．凍結試料100 mg に対し α-phenyl-N-tert-butylnitrone（PBN, SIGMA；33mg/ml, $CHCl_3$：methanol＝2：1 溶液)：2ml, 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4)：1ml, microperoxidase（MP-11, m-POD, SIGMA；0.5mg/ml)：0.05ml を加え，ホモジナイズを行った．遠心後，水層を除去し，$CHCl_3$：0.5ml を添加．再び遠心し，スピンアダクトを含む $CHCl_3$層を分離．$CHCl_3$を蒸発させ，残渣を dimethyl sulfoxide：0.2ml に溶解後，ESR spectorometer（JEOL, RE-1-X）で測定．測定条件は Power：8mW, modulation amplitude：0.1mT, field modulation：100KHz, microwave frequency：9.42～9.43GHg, time constant：0.03sec, scanning time：20sec, 超微細結合定数は内部標準 MnO を用いて計算，computer simulation で確認した．

④ 病理組織学的検討

組織を採取後，10%ホルマリンで固定．パラフィン切片を作製し，hematoxylin-eosin 染色を行った．

成績は mean±SD で示し，経時的変化は paired-t-test で，原発性肝癌と転移性肝癌間の検定には重複測定-分散分析，相関関係の検定には Pearson's correlation coefficient を用いた．また，AST, ALT, LDH と相関を示した各項目について変数選択-重回帰分析[10]を行った．すべての検定は危険率 5 %以下をもって有意とした．

結　果

1）臨床的検討

① 体温

TAE 前値に比べ，TAE 後 1 日目は38.0±0.6°Cと有意に上昇し（$p<0.01$），以後低下，7 日目には36°C台に戻った（**Table 2**）．

② 白血球数

TAE 前値5,670±1,614/mm³に比べ，TAE 後 1 日目に9,249±3,762と有意に増加（$p<0.01$），7 日目には TAE 前後に戻った．分画では好中球が57%(mean)から TAE 後 1 日目に83%と増加，その他の血球成分は不変または減少した（**Fig. 2**）．

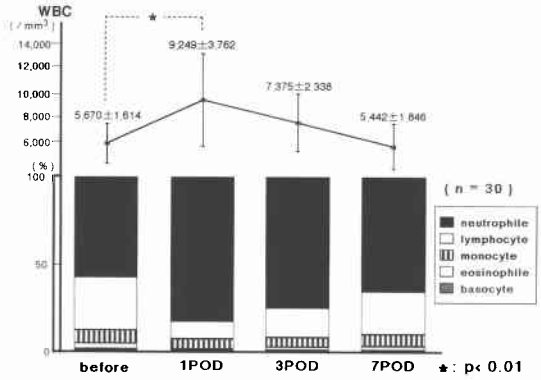
Table 2 Changes of parameters before and after TAE

A	before (n=30)	0 min. (n=30)	10 min. (n=30)	1 POD (n=30)	3 POD (n=30)	7 POD (n=30)
body temperature (°C)	36.3±0.5	—	36.7±0.5	38.0±0.6	37.3±0.6	36.7±0.5
serum AST (IU/l)	55.4±35.2	—	56.3±33.0	172.8±76.2	76.5±43.3	50.0±34.5
serum ALT (IU/l)	40.2±32.4	—	50.3±32.0	116.6±74.9	80.3±54.5	32.3±8.7
serum LDH (IU/l)	276.8±97.2	—	311.5±65.8	640.9±433.2	363.0±256.6	237.1±76.4
serum SOD activity (U/ml)	8.5±3.0	7.7±4.1	8.1±3.3	14.0±3.5	9.6±3.9	8.1±4.3
serum TBARS (n mol/ml)	2.5±1.0	2.0±0.4	2.4±0.8	2.8±0.7	2.3±0.5	2.1±0.6
serum IL-6 (pg/ml)	3.5±5.6	6.2±8.0	6.1±7.2	29.1±27.3	14.8±9.7	10.0±4.7

B	before (n=15)	1 POD (n=15)	3 POD (n=15)	7 POD (n=15)
NO-Hb (NO n mol/Hb μmol)	0.4±0.2	0.8±0.4	0.7±0.3	0.6±0.3
serum NO_2^- (μmol/l)	2.1±1.6	5.1±2.9	4.0±2.3	3.9±2.8

*：$p<0.01$, **：$p<0.05$ (mean±SD)

Fig. 2 Changes of white blood count (mean±SD) and differential white blood count (mean) before and after TAE therapy



③ 血清 AST，ALT，LDH

TAE 前はそれぞれ55.4±35.2IU/l，40.2±32.4，276.8±97.2であったが，TAE 後 1 日目に172.8±76.2，116.6±74.9，640.9±433.2といずれの項目も TAE 前に比べ有意に高値を示した（$p<0.01$）．その後，低下し 7 日目には TAE 前値に戻った．

④ 血清 SOD 活性

TAE 前値8.5±3.0U/ml に比べ TAE 後 1 日目に14.0±3.5と有意に高値を示した（$p<0.05$）．その後，低下し 7 日目には TAE 前値に戻った．SOD 活性の変動は AST，ALT，LDH の変動とそれぞれ相関関係を示した（$r=0.63$，0.56，0.64，$p<0.01$）．

⑤ 血清 TBARS

ほとんどの症例が 1 日目に高値を示したが，TAE 前値との間に有意差はなかった．3 日目より低下，7 日目には TAE 前値に戻った．

⑥ 血清 IL-6

TAE 後 1 日目29.1±27.3pg/ml と高値を示し，TAE 前値3.5±5.6に比べ有意差を認めた（$p<0.05$）．その後，低下し 7 日目には TAE 前値に戻った．IL-6の変動は AST，ALT，LDH の変動とそれぞれ相関関係を示した（$r=0.53$，0.50，0.62，$p<0.01$）．そして SOD 活性とも相関関係を認めた（$r=0.83$，$p<0.01$）．また，体温の変動とも相関した（$r=0.60$，$p<0.01$）．

⑦ 血清 TNF-α

1 例を除き測定感度以下であった．

⑧ 血中 NO-Hb

TAE 前値0.4±0.2NO nmol/Hb μmol に比べ 1 日目に0.8±0.4と有意に上昇した（$p<0.01$）．その後，低下し 7 日目には0.6±0.3と TAE 前値に戻った．AST，ALT，LDH との間に相関関係を認めた（$r=0.70$，0.70，0.76，$p<0.01$）．

⑨ 血清 NO_2^-

TAE 前値2.1±1.6μmol/l に比べ TAE 後 1 日目に5.1±2.9と有意に上昇した（$p<0.01$）．また，AST，ALT，LDH とそれぞれ相関関係を示した（$r=0.68$，0.76，0.60，$p<0.01$）．

⑩ 重回帰分析

AST，ALT，LDH と相関関係を示した SOD 活性，IL-6，NO-Hb，NO_2^-について重回帰分析を行った結果，NO-Hb が AST，ALT，LDH と最も深く関係にあった（**Table 3**）．

⑪ 原発性肝癌と転移性肝癌の比較

①～⑥のいずれの項目に関しても有意差は認められなかった（**Table 4**）．

2）実験的検討

① 組織内 SOD 活性

非腫瘍部に比べ腫瘍部の SOD 活性は低値を示した．腫瘍部は TAE 前値11.4±1.7U/mg protein で TAE 直後に17.4±2.4と上昇した（$p<0.01$）．非腫瘍部は TAE 前の24.2±0.3に比べ TAE 後 1 日目に28.9±6.1と高値を示した．腫瘍部は 1 日目より，非腫瘍部は 3 日目より低下した．また，TAE 前値から TAE 直後および 1 日目の値への上昇率は腫瘍部で52%，非腫瘍部で19%であった．健常家兎の肝組織は

Table 3 Correlations of liver cell damages with each factor (SOD activity, levels of IL-6, NO-Hb, and NO_2^-)

Complication	Adjusted R Squared (R2)	P-Value
$y_1=-145.84+336.84(\text{NO-Hb})+33.38(NO_2^-)$	0.848	<0.01
$y_2=-69.77+106.73(\text{NO-Hb})+14.53(NO_2^-)+4.99(\text{SOD activity})$	0.841	<0.01
$y_3=-22.89+1,277.82(\text{NO-Hb})+22.52(\text{SOD activity})$	0.918	<0.01

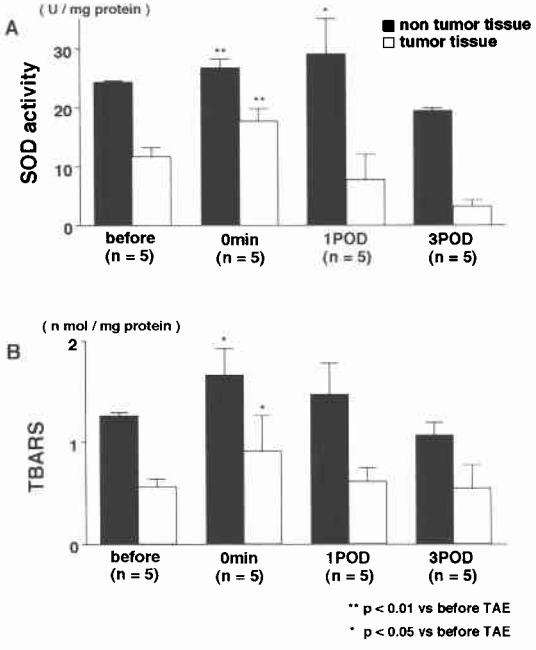
y_1 : AST, y_2 : ALT, y_3 : LDH

Table 4 Differences between primary and metastatic liver tumor in each parameters

		Before	0 min	10 min	1 POD	3 POD	7 POD	P-Value
Body temperature (°C)	P (n=11)	36.1±0.4	—	36.6±0.3	37.9±0.6	37.3±0.7	36.9±0.4	0.507
	M (n=19)	36.5±0.6	—	36.8±0.7	38.1±0.9	37.2±0.3	36.4±0.7	
WBC (/mm³)	P (n=11)	5,527±1,594	—	5,190±1,298	7.581±1,728	5,588±1,828	5,104±1,991	0.446
	M (n=19)	6,143±1,842	—	4,000±950	10,796±4,045	7,641±2,457	6,213±2,379	
AST (IU/l)	P (n=11)	37.0±25.4	—	38.5±16.3	241.1±143.5	73.9±50.1	31.8±14.3	0.866
	M (n=19)	38.3±18.8	—	92.1±2.3	146.7±22.9	85.5±3.5	74.5±21.9	
ALT (IU/l)	P (n=11)	34.9±34.4	—	50.3±39.2	132.1±59.4	72.8±39.7	30.9±7.7	0.980
	M (n=19)	46.3±12.7	—	49.2±25.3	190.3±70.8	108.0±96.2	41.5±0.7	
LDH (IU/l)	P (n=11)	275.6±88.8	—	311.5±65.8	718.9±444.2	460.4±301.4	270.1±106.4	0.770
	M (n=19)	311.0±65.5	—	390.2±72.3	633.0±494.6	376.3±55.8	215.6±97.4	
SOD activity (U/ml)	P (n=11)	8.5±2.9	7.6±4.4	8.3±3.3	15.0±3.5	9.6±4.5	8.8±4.2	0.145
	M (n=19)	8.4±3.4	7.7±3.6	8.3±3.4	12.6±3.3	9.5±3.2	7.1±4.6	
IL-6 (pg/ml)	P (n=11)	2.4±3.4	3.8±4.1	3.4±3.4	31.0±30.0	15.0±9.0	9.4±4.9	0.549
	M (n=19)	2.3±3.5	5.4±3.9	5.0±3.2	24.3±15.3	19.2±10.1	13.1±0.1	

P : primary M : metastasis (mean±SD)

Fig. 3 A : SOD activity in rabbit liver tissue before and after TAE therapy (mean±SD). B : Changes of TBARS in rabbit liver tissue before and after TAE therapy (mean±SD)



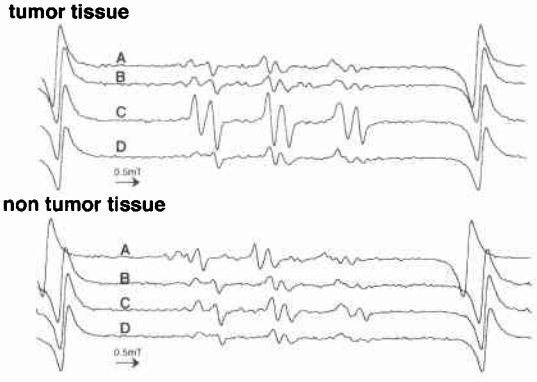
2.7±0.8でVX2腫瘍移植肝の腫瘍部，非腫瘍部に比べ低値であった（**Fig. 3A**）.

② 組織内TBARS

腫瘍部はTAE前0.6±0.1nmol/mg proteinに対し，TAE直後は0.9±0.4と有意に高値を示し（$p<0.01$），その後，低下した．非腫瘍部もTAE前1.3±0.1に比べTAE直後に1.7±0.3と有意に高値を示し（$p<0.01$），その後，低下した．上昇率はそれぞれ63，31%であった（**Fig. 3B**）.

Fig. 4 Changes of ESR spectra of PBN spin adducts in rabbit liver

A : before, B : just after operation, C : on the 1 POD (postoperative day), D : on the 3POD

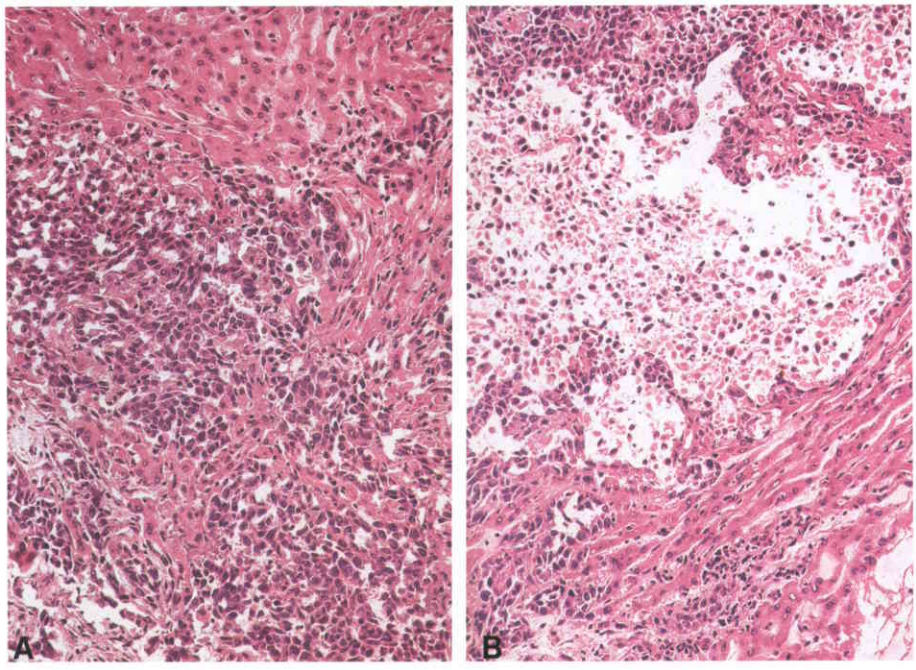


③ 組織内ESR signal

TAE前は腫瘍部と非腫瘍部で差はなかったが，TAE後1日目の腫瘍部のsignalは急激に増大した．非腫瘍部はTAE前後にわたり変動は少なかった（**Fig. 4**）.

④ 病理組織学的検討

Fig. 5 Microscopic pictures. On the third postoperative day, it demonstrated necrotic tumor cells and infiltration of neutrophiles.
A : before TAE, B : third postoperative day (hematoxylin eosin stain, ×20)



TAE後1，3日目の腫瘍細胞周囲および小葉中心帯に好中球，マクロファージの浸潤を認めた．この変化はTAE前の組織には認められなかった．また，1，3日目の腫瘍細胞で核濃縮を伴う壊死像，さらに小葉中心帯で肝細胞プレートの萎縮像と類壊死像を認めた．これはTAE前の組織では軽度であった（**Fig. 5A，B**）．

考　察

TAEの抗腫瘍効果は血行遮断で腫瘍細胞が呼吸障害から壊死に至る結果と単純に考えられてきた[11]．しかし，腫瘍辺縁や着床直後は門脈系からの血行を受けているとされる転移性肝癌でもTAEの有効なことが報告されており[12]，TAEによるすべての変化を細胞の呼吸障害だけで説明するのは難しく，別の機序の関与も否定できない．近年，各種臓器の虚血または虚血・再灌流による組織障害に活性酸素やサイトカインなど多くのmediatorが関与していることが明らかとなっている[5]．

今回の検討ではTAE施行1から3日目にサイトカインの高値を認めた小川らの報告[13)14]とヒト肝癌症例No. 1と2についてTAE施行直後，10分後，1，3，12時間後と1，3，7日目に測定を行った結果，IL-6，活性酸素関連物質とも1日目に最も高い値を示したことに基づき採血時間を決定した．その結果，TAE後1日目にsuperoxide anion radical（以下，O_2^-と略記）のscavengerである血清SOD活性の一過性の上昇や，TAE直後と1日目の肝臓の腫瘍部および非腫瘍部組織でSOD活性，TBARSの上昇を認めた．活性酸素は細胞膜またはミトコンドリアの膜脂質の過酸化を来し，その生成物である脂質過酸化物がおのおのの膜の構造と機能を障害し，死に至らしめるといわれている[15]．したがって，TBARSはSODで消去しきれなかった活性酸素により生じ，その上昇は過剰な活性酸素の存在を反映していると考えられる．加えて，TAE後1日目の腫瘍部で大量の過酸化脂質がESR signalとして確認され[16]，TAEにおいてもTAE直後からfree radicalが腫瘍部および非腫瘍部の病態に強くかかわっていることが示唆された．

虚血・再灌流による脂質過酸化の機序はいまだ明確でないがO_2^-やperoxynitrite（以下，$ONOO^-$と略記）により産生されるhydroxyl radical（以下，•OHと略記）により引き起こされるとする説が有力である[17]．本

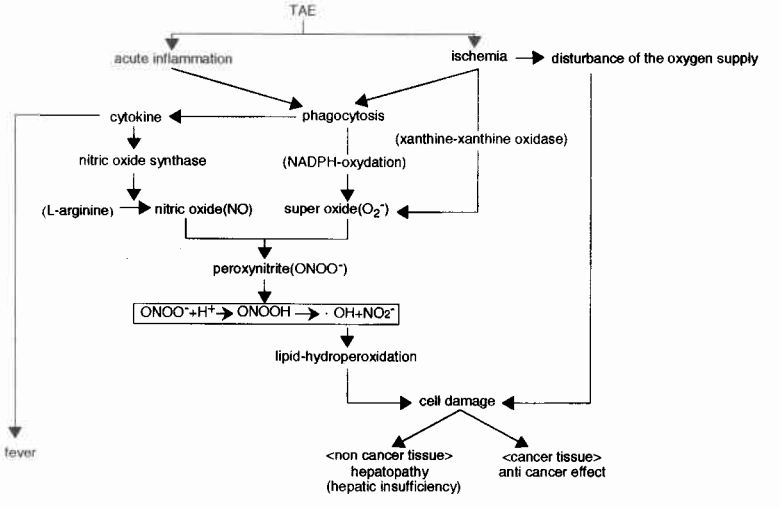
研究のヒト肝癌ではTAE後1日目に血中白血球数の増加を認め，その分画では好中球が最も多かった．また，実験ではTAE後1および3日目の腫瘍細胞周囲に好中球やマクロファージなど炎症性細胞の浸潤と腫瘍細胞の壊死像が見られ，急性炎症が起きていることを示していた．炎症組織内で発生するO_2^-は好中球やマクロファージなど貪食細胞由来のものが多く，他の系を介したO_2^-は微量であるといわれている[18]．したがって，TAEでのO_2^-の発生は貪食細胞の活性化によるものが主であると思われる．

ヒト肝癌でTAE後1日目に血中NO（血中NO-Hbと血清NO_2^-）が大量に増加し，同時に血清IL-6値が上昇した．NOは臓器移植の拒絶反応や虚血・再灌流など種々の生体反応に関与することがわかっている[19]．このNOもNO合成酵素により貪食細胞などで産生され，生理的な調節作用にたずさわるNOとサイトカインの刺激で誘導され，組織障害性に作用するNOの2種に分けられる[19]．そして1日目に増加したNOはTAE後1および3日目の肝組織に壊死像を認めることから後者のNOと考えられる．しかし，虚血・再灌流障害やエンドトキシン血症時の肝障害においてNOが細胞を保護するという報告[20)21]と障害するという相反する報告[22)23]がみられるなど，その生理活性は状況によって，表現様式が異なるようである．一般にSOD活性の上昇はO_2^-の過量産生で誘導されたものと考えられており[24]，TAE後1日目に血中SOD活性が上昇したことは同時期にNOに加えO_2^-が大量に存在したことを意味する．その結果，$ONOO^-$が発生し，その代謝過程で産生される・OHにより組織障害（抗腫瘍効果）が生じたと考えられる[25]．また今回，AST，ALT，LDH値の変動と血中SOD活性，IL-6，NO-Hb，NO_2^-の変動は相関し，重回帰分析の結果，NO-HbがAST，ALT，LDH値のいずれとも最も強い相関関係を示した．これらのことは，TAE後の肝細胞障害がみずからも細胞破壊作用をもつNO[26]あるいは$ONOO^-$によって発現している可能性を示している．

実験において腫瘍部のSOD活性とTBARSは共に非腫瘍部に比べTAE前からTAE直後および1日目への上昇率が高かった．TBARSよりも精度の高いESR signalも腫瘍部で強く，脂質過酸化物が多く発生していることを示していた．これらのことは抗酸化機構をうわまわるfree radicalが腫瘍部で急激に発生したためと考えられ，非腫瘍部より強い組織障害を示した病理組織学的所見と一致する．また，上昇率に反し腫瘍部のSOD活性が非腫瘍部に比べ低値であったことはTakedaらの報告[27]とも一致し，肝腫瘍部では非腫瘍部よりもSODの局在が少なく，free radicalによって障害され易いことを示唆している．そして，free radicalの組織障害作用の程度がTAEの抗腫瘍効果を反映していると思われる．

TAEは抗腫瘍効果に付随して，局所的には正常肝組織に影響を及ぼし，全身的には発熱，白血球増多な

Fig. 6 The schematic mechanism of cell damage on transcatheter arterial embolization therapy



どの変化を起こす．これは単純な虚血・再灌流障害と違い，塞栓物質や抗腫瘍薬の注入とカテーテルの挿入が，異物として生体反応を引き起こした結果と考えられる．一般に，活性化したマクロファージはIL-6やTNF-αなどの炎症性サイトカインを放出する[28]と言われているがTNF-αは測定感度が低く，今回は1例を除き測定限界以下であった．しかし，TAE後1日目の血清IL-6は施行前に比べ有意に上昇し，しかもTAE後の体温との間に相関関係（r=0.60）を認めたことは，TAE後の発熱が炎症性サイトカインと強い関連性を有することを示唆している．このことは炎症性サイトカインが視床下部の発熱中枢を刺激し，体温を上昇させるという報告[29]や炎症性サイトカイン受容体拮抗物質により発熱を抑制できたとする報告[30]でも裏付けられる．

以上からTAEによる抗腫瘍効果や局所および全身における副作用発現のメカニズムとして以下のことが考えられる（**Fig. 6**）．TAEにおける塞栓物質や抗腫瘍薬の注入により腫瘍部，非腫瘍部の一部に虚血とそれに伴う炎症が起きる．これにより，①腫瘍，非腫瘍細胞の呼吸障害と②好中球やマクロファージなどの貪食細胞の活性化が生じ，O_2^-が産生される．③また，貪食細胞はサイトカインを放出し，これらのサイトカインによりNO合成酵素が誘導され，NOが産生される．④NOと上記のO_2^-が結合して$ONOO^-$となり，その代謝過程で•OHとなる．⑤•OHは発生部位の細胞膜脂質の脂質過酸化を引き起こす．この反応が組織障害を起こし，腫瘍部では抗腫瘍効果を，非腫瘍部では副作用である肝細胞障害を来していると考えられる．一方，炎症性サイトカインは全身的な副作用である発熱にも関与していると考えられた．

稿を終えるにあたり，終始御指導，御校閲をいただいた埼玉医科大学第2外科学教室石田　清教授に深く謝意を表します．また直接御指導賜った同教室里見　昭助教授ならびに御協力くださった埼玉医科大学第1生化学教室坂岸良克教授，薗田　勝講師，第2病理学教室高濱素秀教授に深謝いたします．

なお，本論文の要旨は第55回日本臨床外科医学会総会（東京），第94回日本外科学会総会（東京）にて発表した．

文　献

1) Yamada R, Sato M, Kawabata M et al: Hepatic artery embolization in 120 patients with unresectable hepatoma. Radiology **148**: 397—401, 1983
2) 伊谷賢次，吉川敏一，田井中憲三ほか：Degradable Starch Microspheresによる化学塞栓療法．癌と化療　**14**：388—395，1987
3) 田沢潤一，西村正信，朝比奈靖浩ほか：TAE施行後の肝不全に関する検討，その病態と長期予後について．Tsukuba Symp **7**：78—82，1991
4) 山田龍作，佐藤守男：肝硬変に対するtranscatheter embolizationの影響．消外　**6**：1725—1728，1983
5) Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology **81**: 22—29, 1981
6) 篠原力雄：スーパーオキサイドディスムターゼ（SOD）．臨検　**29**：1447—1452，1985
7) 八木国夫：Thiobarbituric acid蛍光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法．ビタミン　**49**：403—405，1975
8) Sonoda M, Hashimoto T, Satomi A et al: Diazotization reaction of nitric oxide trapped by hemoglobin. Life Sci **55**: 199—204, 1994
9) Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y et al: Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. Free Radic Res Commun **7**: 3—6, 1986
10) 長田　理：2要因で分類される多群の検定．長田理編．Macintosh—医学—統計マニュアル．真興交易医書出版部，東京，1993, p158—230
11) 園村哲郎，岸　和史，西田典史ほか：肝動脈塞栓療法の進歩．消外　**14**：1379—1388，1991
12) Sugimoto E: Value of transcatheter arterial embolization using lipiodol for hepatic metastases.埼玉医大誌　**21**：185—192，1994
13) 小川道雄，酒本喜与志，中川和浩ほか：侵襲に対する生体反応とサイトカイン．外科治療　**67**：574—581，1992
14) Ikei S, Ogawa M, Beppu T et al: Changes in IL-6, IL-8, C-reactive protein and pancreatic secretory trypsin inhibitor after transcatheter arterial chemo-embolization therapy for hepato-cellular carcinoma. Cytokine **4**: 581—584, 1992
15) 片山時孝，横山清七，田島知郎ほか：虚血による肝障害．片山時孝編．虚血と臓器障害．へるす出版，東京，1991, p72—81
16) 薗田　勝，里見　昭，橋本大樹ほか：スピントラッピング法による過酸化脂質測定とその臨床応用．磁気共鳴と医学　**5**：100—105，1994
17) 吉川敏一，古倉　聡，近藤元治：フリーラジカルとは善玉か悪玉か？近藤元治編．フリーラジカル．メジカルビュー社，東京，1992, p46—54
18) 佐藤英介，井上正康：活性酸素代謝制御と抗炎症作用．炎症と免疫　**1**：561—566，1993

19) 服部隆一，由井芳樹：NO合成酵素．平田結喜緒編．NOとNOS基礎と臨床．メディカルレビュー社．東京，1993, p12—18
20) Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG et al: Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. J Leukoc Biol **48**: 565—569, 1990
21) Frederick JA, Hasselgren PO, Davis S et al: Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein synthesis during endotoxemia. Arch Surg **128**: 152—157, 1993
22) Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ et al: Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. Ann Surg **212**: 462—471, 1990
23) Curran RD, Ferrari FK, Kispert PH et al: Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. FASEB J **5**: 2085—2092, 1991
24) 門田一宣，有井滋樹，今村正之：生体反応とフリーラジカル．Surg Fronti **1**: 173—182, 1994
25) Radi R, Beckman JS, Bush KM et al: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys **288**: 481—487, 1991
26) 中野昌康，斎藤慎二：マクロファージとNO．炎症と免疫 **2**: 595—601, 1994
27) Takeda Y, Noguchi T, Okabe T et al: SOD in various tissues from rabbits bearing the VX2 carcinoma in the maxillary sinus. Cancer Res **42**: 4233—4235, 1982
28) 笠倉新平：サイトカインカスケード．小野崎菊夫編．サイトカイン—基礎から最新情報まで—．日本医学館，東京，1991, p113—118
29) 渋谷正徳：発熱．Surg Fronti **1**: 55—60, 1994
30) 池島 喬：サイトカインと発熱機構．病態生理 **12**: 30—35, 1993

Crinical and Experimental Studies of Cell Damage on Transcatheter Arterial Embolization Therapy

Taiju Hashimoto
The Second Department of Sugery, Saitama Medical School

The relationship between tissue damage in tumor and non-tumor regions following transcatheter arterial embolizsation (TAE) and active oxygen/cytokines was studied in clinical cases (n=30) and in VX2 tumor-bearing rabbits used as models of hepatic carcinoma (n=20). Body temperature, white blood cell count, AST, ALT, LDH, superoxide dismutase (SOD) activity, interleukin-6, and nitric oxide (NO) were all temporarily increased in the clinical cases 1 day after TAE, but returned to the preoperative levels on the 7th day. Stepwise regression analysis of AST, ALT, and LDH revealed that NO was most closely correlated with liver injury. In the animal study, both SOD activity and thiobarbituric acid reactive substances increased just after operation, more in the tumor region than in the non-tumor region. In the tumor region, a large amount of lipid hydroperoxide was detected as an electron spin resonance signal on the 1st postoperative day, and necrosis of the tumor region and infiltration of neutrophiles and macrophages into the surroundings were histopathologically observed. From these results, it was suggested that active oxygens would be involved in tissue damage following TAE.

Reprint requests: Taiju Hashimoto The Second Department of Surgery, Saitama Medical School
38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama, 350-04 JAPAN