

原 著

手術侵襲による生体反応に対するラジカルスカベンジャー EPC-K1 および Methylprednisolone の効果

広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科, 千寿製薬創薬研究所*

平井 敏弘 梶原 淳 井上 秀樹
峠 哲哉 井上 優* 阪上 享宏*

手術侵襲が腫瘍の転移を促進し, その主因であるサイトカイン・ストームの制御が臓器障害にみならず癌患者の予後の向上にも重要であることを報告してきた。今回ラットを用いて EPC-K1 と methylprednisolone (MP) が, 手術侵襲後の血清中の各種反応物質にどのように影響を与えるかについて検討した。手術侵襲後の IL-6 値は開胸開腹 (TL) 後に有意に上昇した。Endotoxin 値は同様に上昇したが有意ではなかった。LPO および corticosterone 値は手術直後値が上昇した。IL-6 および endotoxin 値は EPC-K1 および MP で抑制された。LPO 値は EPC-K1 でのみ抑制された。血清 corticosterone 値は両者で抑制されず, MP 群でより高値であった。さらに, 開胸開腹術後に second attack を負荷すると血清 IL-6 値および NO 値, 肝 LPO 値は著明に上昇し, EPC-K1 および MP はこれを抑制する傾向は示したがその効果は不十分であった。以上の結果より, EPC-K1 は MP よりも術後反応物質を効率よく抑制したが, second attack がかった場合にはその抑制効果は不十分であることが判明した。

はじめに

手術をはじめとする侵襲が, サイトカインを介して血管内皮細胞を損傷し, 臓器障害ひいては多臓器機能不全 (multiple organ dysfunction syndrome : MODS) を引き起こすことはよく知られた事実である。われわれは, このような大きな侵襲下に循環するがん細胞が存在した場合に転移が促進すること, さらにその機序には白血球による活性酸素の産生が深く関わっていることを報告し, この現象を stress oncotaxis と呼称することを提唱してきた^{1,2)}。手術侵襲に焦点をすれば surgical oncotaxis と呼称すべきかと思われる。したがって, 侵襲によるサイトカインの過剰産生 (サイトカイン・ストーム) を制御することは MODS の予防に寄与するのみならず, 癌の手術においてはその予後を左右する可能性をもっていることが考えられる。侵襲下におけるサイトカイン・ストームを制御する物質としては副腎皮質ホルモンがよく知られている。サイトカインの産生は systemic inflammatory response syndrome (SIRS) の状態を引き起し, このことは生体防御反応の一面もあり決して負の要因だけではないと

考えられる。したがって, 可能であれば臓器への攻撃の最終段階である活性酸素の産生のみを抑制できることが望ましいといえる。そこで, ラットを用いて強い活性酸素除去作用を有することが知られている EPC-K1 が侵襲後の各種反応物質, すなわち IL-6, 過酸化脂質 (lipid peroxide : LPO), endotoxin および corticosterone の産生におよぼす影響について検討した。また, second attack を負荷した際の IL-6, 肝 LPO および nitric oxide (NO) の産生に及ぼす影響について, methylprednisolone (MP) と比較しつつ検討した。

材料と方法

実験材料

ラットは 9 週齢 SD 系雄性ラット (日本 SLC 株式会社, 静岡) を用いた。EPC-K1 は千寿製薬株式会社 (大阪) より供与された。Methylprednisolone sodium succinate (MP) は Sigma 社製 (東京) を用いた。Lipopolysaccharide (LPS) は LPS 0-114B4 (DIFCO LABORATORIES, 米国) を使用した。

実験方法

麻酔と手術法

セボフルレン (丸石製薬株式会社, 大阪) で麻酔導入した後, 抱水クロラル (WAKO 株式会社, 大阪) 360mg/kg を腹腔内投与して麻酔を行った。挿管法, 開

< 2000年12月19日受理 > 別刷請求先: 平井 敏弘
〒734 8553 広島市南区霞1 2 3 広島大学原医研
腫瘍外科

腹術および開胸開腹術は既報¹⁾と同様に行った。

反応物質測定法

採血は、各時間に頸静脈より500 μ L ずつ採血し、セバラピッドチューブミニS(積水化学工業株式会社,大阪)で血液を遠心分離し(3,000rpm,10分),血清100 μ Lを得て実験に供した。IL-6はラットIL-6 ELISAキットワコー(WAKO株式会社,大阪)を用いてELISA法で測定した。LPOは過酸化脂質テストワコーキット(WAKO株式会社,大阪)を用いて八木法で行った。Endotoxinはトキシカラースystem(生化学工業株式会社,東京)を用いて比色法で行った。CorticosteroneはBIOTRAK rat corticosterone assay system with magnetic separation(Amersham LIFE SCIENCE,英国)にて測定した。Nitric Oxide(NO)はNITRATE/NITRITE COLORMETRIC ASSAY KIT(フナコシ株式会社,東京)を用いて吸光度法を用いて測定した。

実験1. 手術侵襲後の反応物質の測定

ラットを麻酔下に挿管し、手術を行って60分間放置した。手術後経時的(手術直前,手術開始後30分,手術直後,術後1時間,術後3時間)に採血し,血清中のIL-6, LPO, endotoxin, corticosteroneを測定した。試験物質(EPC-K1 5mg/5ml/kg, MP 50mg/5ml/kg)は手術の1時間前に静脈内投与した。

実験群は1.麻酔のみ(A群),2.開腹術(L群),3.開胸開腹術(TL群),4.開胸開腹術+EPC-K1(EPC-K1群),5.開胸開腹術+MP(MP群)とした。A群,L群は1群4匹,TL群,EPC-K1群およびMP群は1群8匹とした。

実験2. second attack 負荷後の反応物質の測定

ラットを麻酔下に挿管し,開胸開腹術を行って60分間放置した。開胸開腹術後1時間よりsecond attackとしてLPSを0.5mg/5ml/kg/時で1時間投与した。その後,1,3,5時間に血清中IL-6,肝LPOおよび血清中NOを測定した。試験物質(EPC-K1 5mg/5ml/kgおよびMP 50mg/5ml/kg)は手術の1時間前に静脈内投与した。

実験群は1.開胸開腹術(TL群)2.開胸開腹術+LPS群(LPS群),3.開胸開腹術+EPC-K1(EPC-K1群),4.開胸開腹術+MP(MP群)とした。各群5匹を用いた。

統計学的処理

各群の値は平均値 \pm 標準偏差(SD)で示し,各群間の有意差検定にはt検定を用いた, $p < 0.05$ 未満を有意差ありとした。

成績

実験1 手術侵襲後の血清中IL-6, LPO, endotoxin, corticosterone 値の変動とEPC-K1およびMP投与による影響

手術後の値の変化を比較するために,開始時の値を基準にしてそれぞれの値を100分率で示した。TL群では血清IL-6値が240分で著明に上昇し,EPC-K1およびMPは有意にこれを抑制した。120分ではMPのみが有意にこれを抑制した(Fig. 1)。血清LPO値は,手術終了時の値がTL群,MP群で有意差はないものの上昇しており,EPC-K1では全くLPO値の上昇を示さなかった(Fig. 2)。血清endotoxin値はTL群においてのみ,手術終了時,120分,240分で有意差はないものの上昇を認めた(Fig. 3)。実測値の平均値においても,

Fig. 1 Serum IL-6 level after surgery.

; Anesthesia(A), ; Laparotomy(L), O; Thoracolaparotomy(TL), ; TL+EPC-K1, ; TL+MP, * $p < 0.01$

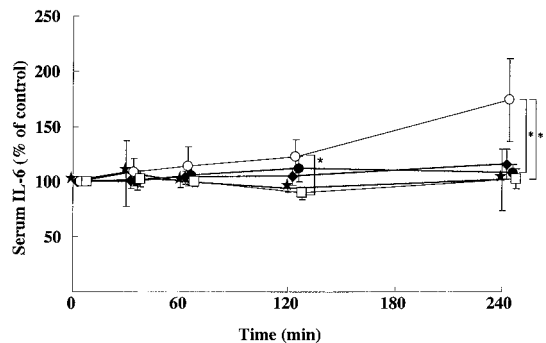
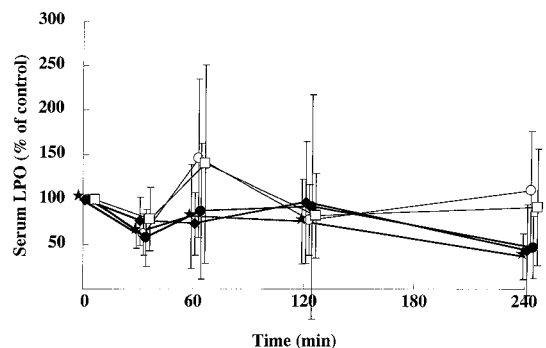


Fig. 2 Serum LPO level after surgery.

; A ; L, O; TL, ; TL+EPC-K1, ; TL+MP



手術開始時の15.2mEU/ml に比べ手術終了時、120分、240分ではそれぞれ23.2、18.0、22.4mEU/mlであった。

血清 corticosterone 値 (Fig. 4) は、手術侵襲によって上昇するが、手術直後の値が最も高く、L 群よりも TL 群が高い傾向 ($p=0.23$) を示した。また、MP 群は TL 群よりもむしろ高い値を示し、EPC-K1群は MP 群に比べ有意に低い値を示した。

実験 2 . second attack 後の血清 IL-6および NO の変動と EPC-K1および MP 投与による影響

開胸開腹術後に second attack を負荷することにより、血清 IL-6値は著明に上昇した。5 時間目においては TL 群に比べ6.6倍の有意な上昇を示した。EPC-K1および MP はこれを抑制する傾向は示したもののその効

果は不十分で、いずれも TL 群に比べ約3.8倍の有意な上昇を示した (Fig. 5)。

5 時間後の肝 LPO 値は、TL 群と LPS 投与群がほぼ同等であったが、いずれも300nmol/g 以上の高い値を示した。EPC-K1および MP はほぼ同様にこれを有意に抑制したが、いずれも200nmol/g 以上の高い値を維持したままであった (Fig. 6)。

NO 値は TL 群では徐々に低下していったが、second attack をかけることによって、180分目から上昇に転じた。EPC-K1はこの上昇を抑制し300分値では低下に転じたが、MP はこれを十分には抑制しなかった (Fig. 7)。

Fig. 3 Serum endotoxin level after surgery.

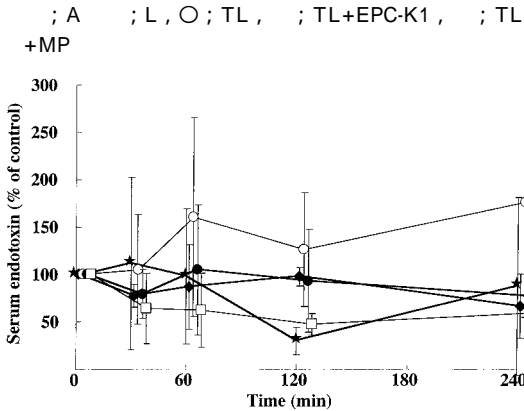


Fig. 4 Serum corticosterone level after surgery.

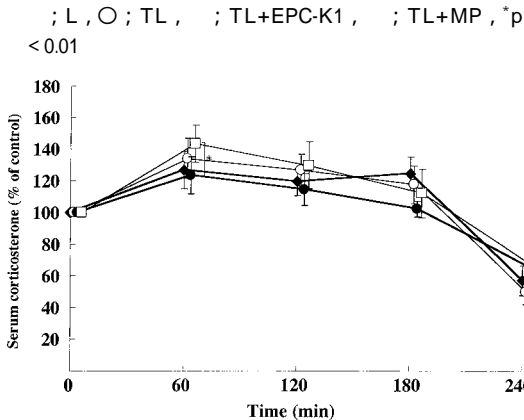


Fig. 5 Serum IL-6 level after surgery with additional second attack using LPS

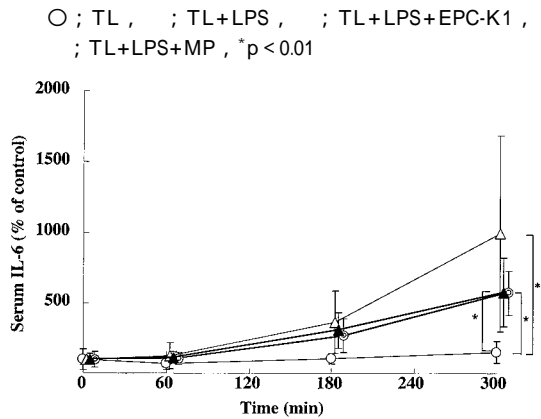


Fig. 6 Liver LPO level after surgery with additional second attack using LPS, *p < 0.05

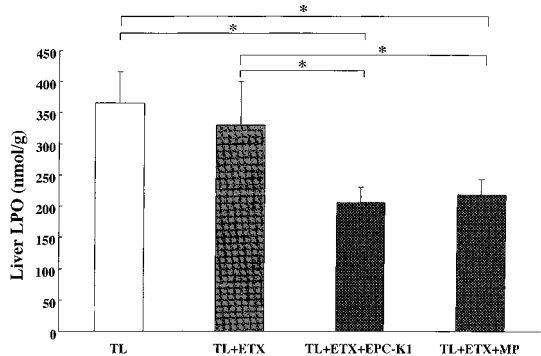
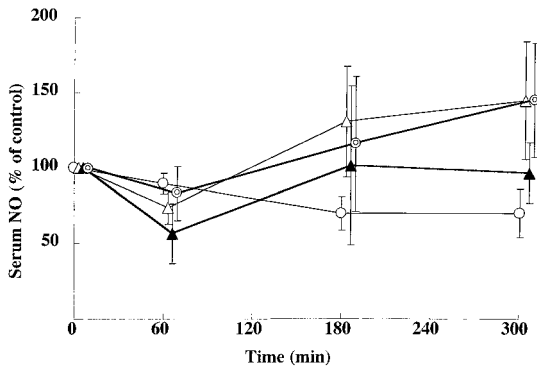


Fig. 7 Serum NO level after surgery with additional second attack using LPS

○; TL, □; TL+LPS, △; TL+LPS+EPC-K1, ▲; TL+LPS+MP



考 察

手術後のサイトカイン過剰産生（サイトカイン・ストーム）はSIRSの状態を引き起し、second attackを契機に臓器障害を引き起すと考えられている³⁾。われわれは、手術後のサイトカイン・ストームが白血球の活性酸素産生能の亢進を介して血管内皮細胞を障害し、このことが結果的に癌の転移を促進することを報告し、この現象をstress oncotoxicityと呼称してきた^{1,2)}。サイトカイン・ストームを制御するには、侵襲前に少量(methylprednisolone 250mg/body)の副腎皮質ホルモンを投与することが標準⁴⁾により提唱され、臨床的に広く応用されている。術前に副腎皮質ホルモンを投与する理由は、一連の侵襲反応がおきた後にこれを制御することは困難であろうとの想定に基づいており、実際にマウス侵襲モデルでこのことは明確に実証されている⁵⁾。われわれの実験においてEPC-K1あるいはMPを術前に投与した理由はこの成績に基づいたものである。

EPC-K1はOH⁻のscavengerであることが知られており⁶⁾、サイトカインの産生を抑制することなく活性酸素の産生そのものを抑制し、その結果としてLPOの産生を抑制することが想定された。事実、血清LPO値は開胸開腹術直後に上昇し、MPはこれを抑制できなかったが、EPC-K1はこれを抑制した。MPはIL-6の産生抑制を介して、またEPC-K1は活性酸素の制御を介してLPOの産生を抑制することが考えられるが、実際にはEPC-K1のみ血清LPOの産生を抑制してい

た。EPC-K1はIL-6の産生抑制効果をも有しており、IL-6の過剰な産生と活性酸素の作用の両者を抑制することで血管内皮細胞の損傷を防ぎ、LPOの産生を抑制していると考えられる。

Deitchら⁷⁾はラットを用いて脱血による平均動脈圧30mmHgのショック状態を30分間持続させた出血性ラットモデルを作成した。24時間後の腸間膜リンパ節における組織細菌培養で対照群の7%に比べ、ショックラットで61%のbacterial translocation(BT)を確認した。さらに、このBTはxanthine oxidaseの競合的阻害剤であるallopurinolや、その不活剤であるmolybdenumを含まないtungsten食でそれぞれ14%および10%に減少させた。Xanthine oxidaseは活性酸素の産生酵素であるから、BTにはショックによって発生した活性酸素がその機序のkeyであると考えられる。すなわち、ショックによって発生した腸管の阻血とその後の再灌流により発生した活性酸素が腸管のbarrierを破壊してBTが生じるという機序である。われわれの開胸開腹のモデルでは、手術侵襲そのものがサイトカイン・ストームを生じ、そのことにより有意差はないもののendotoxin血症を生じることが示され、しかもEPC-K1あるいはMPの投与でこれを抑制できることが示された。この機序は、阻血再灌流障害と同様に、活性化された白血球などから生じた活性酸素が腸管のbarrierを破壊してBTが生じると考えられる。EPC-K1はもちろん直接活性酸素を消去するが、同時にMPのようにサイトカイン・ストームも抑制することで二重にBTを抑制することになる。Lowryら⁸⁾やFongら⁹⁾は人でendotoxinを経口あるいは静注することでTNFやIL-6が1時間後には上昇することを示した。すなわち、BTがサイトカイン・ストームの原因になることも考えられるが、時間的には両者とも術直後から生じており、やはり侵襲直後からはじまるサイトカイン・ストームの一連の反応がBTを生じ、BTはこれらの反応をさらに増幅させることが考えられる。

われわれは開胸開腹術の1時間後にLPSを用いて人為的にsecond attackを負荷したが、血清IL-6値は5時間後には開胸開腹術単独時の7倍程度の上昇を示し、EPC-K1あるいはMPの術前投与もこれを十分には抑制できなかった。また、肝のLPO値は開胸開腹群とLPS投与群でほぼ同値で極限值であると思われるが、EPC-K1あるいはMPの術前投与と同様にこれを十分には抑制することができなかった。臨床的には典型的なsecond attackは術後合併症であるが、過剰

なBTも当然 second attack になり、あらゆる治療に抵抗性に臓器障害へと進行することが考えられる。またこのことが癌の存在下には予後を不良にする一因であることはすでに報告した通りである²⁾。

NOは研究が進むにつれて、多彩な効果を発揮することが知られるようになった。その効果は傷害あるいは保護の相反する2面性を有するとされている。しかし、過剰なNOはそれ自身、パーオキシナイトライトあるいはヒドロキシラジカルを誘導し傷害性を発揮することが知られている¹⁰⁾。Second attack 時のNOを測定すると、開胸開腹術だけでは徐々に減少しているが second attack 群では1時間値で低下するもののその後再上昇をし、EPC-K1あるいはMPはその上昇を抑制した。特にEPC-K1はMPよりも抑制効果が強く、NOは5時間値で再下降に転じた。NOはIL-6やIL-8などの炎症性サイトカインを誘導することが報告されているが¹¹⁾、また炎症性サイトカインが inducible NO synthase (iNOS) を誘導し一度合成が開始されると長期に大量のNOが産生される¹⁰⁾。すなわち、一度この反応がおこると相互に反応しあうことになる。EPC-K1はIL-6の産生も抑制するが、同時にiNOSの活性も濃度依存的に抑制することがわかっている(未発表)。したがって、この second attack による組織傷害およびそれに起因するであろう腫瘍細胞の転移促進作用すなわち stress oncotaxis を予防するという観点からしても、EPC-K1の前投与が最も効果的であると思われる。しかしながら、second attack によるサイトカイン・ストーム状態は薬物による制御が不十分であり、やはり過剰な侵襲を避け、術後合併症を生じさせないことが最大の stress oncotaxis の予防策であると思われる。

文 献

- 1) Hirai T, Yoshimoto A, Iwata T et al : Enhancing effect of Thoraco-laparotomy on liver metastasis and the role played by active oxygene in its mechanism. *Jpn J Surg* 27 : 1040 1045, 1997
- 2) Hirai T, Yamashita Y, Mukaida H et al : Poor prognosis in esophageal cancer patients with postoperative complications. *Jpn J Surg* 28 : 576 579, 1998
- 3) 杉本 壽, 田中 裕, 小倉裕司ほか : 外傷. 小川道雄, 齋藤英昭編. 臨床腫瘍学. へるす出版, 東京, 1998, p13 24
- 4) 標葉隆三郎, 西平哲郎 : ホルモン変動と免疫応答. *Surg Fronti* 1 : 14 22, 1994
- 5) 植田治昌, 平川 久, 標葉隆三郎ほか : マウス手術侵襲モデルにおけるサイトカインの変動と methylprednisolone 前投与の効果. *日消外会誌* 27 : 2191, 1994
- 6) Mori A, Edamatsu R, Kohno M et al : A new hydroxyl radical scavenger : EPC-K1. *Neuroscience* 15 : 371 376, 1989
- 7) Deitch EA, Bridges W, Baker J et al : Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation in reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. *Surgery* 104 : 191 198, 1988
- 8) Lowry SF : The route of feeding influences injury responses. *J Trauma* 30 : 10 14, 1990
- 9) Fong Y, Marano MA, Moldawer LL et al : The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* 85 : 1896 1904, 1990
- 10) 吉川敏一, 高野裕久 : NO. 小川道雄, 齋藤英昭編. 臨床腫瘍学. へるす出版, 東京, 1998, p204 212
- 11) Villarete LH, Remock DG : Nitric oxide regulation of interleukin-8 gene expression. *shock* 7 : 29 35, 1997

The Effect of Radical Scavenger EPC-K1 and Methylprednisolone
on Reactive Substances after Surgery

Toshihiro Hirai, Jun Hihara, Hideki Inoue, Tetsuya Toge,
Yutaka Inoue* and Takahiro Sakaue*
Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology
and Medicine, Hiroshima University
*Souyaku Research Institute, Senju Pharmaceutical Co. , Ltd.

Cytokine storms after surgical stress are reported to enhance tumor metastasis. Regulation of cytokine storms is extremely important in view of both organ failure control and cancer prognosis. We therefore studied the effect of the radical scavenger EPC-K1 and methylprednisolone(MP)on reactive substances IL-6, lipid peroxide (LPO) corticosterone, endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) and nitric oxide (NO) in thoracotomy (TL) in rats. EPC-K1 (5/mg/kg) or MP (50/mg/kg) was given intravenously 1 hour before surgery. Serum IL-6 and endotoxin were markedly elevated after TL. Serum LPO and corticosterone were elevated only immediately after TL. Increased serum IL-6 and endotoxin were suppressed by either EPC-K1 or MP. Serum LPO was suppressed by EPC-K1 but not by MP. Serum corticosterone was not suppressed by either EPC-K1 or MP. MP increased corticosterone. Lipopolysaccharide (0.5/mg/kg) given 1 hour after surgery markedly elevated serum IL-6 and NO and liver LPO. Neither EPC-K1 nor MP suppressed these substances sufficiently. In conclusion, EPC-K1 was more effective than MP in controlling postoperative reaction, but was not sufficient for protecting against a second attack.

Key words : operative stress, radical scavenger EPC-K1, methylprednisolone, cytokine, second attack

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 323 328, 2001]

Reprint requests : Toshihiro Hirai Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University
1 2 3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 8553 JAPAN
