

肝癌のエタノール注入療法の基礎的, 臨床的検討

山本晋一郎, 高取 敬子, 大元 謙治, 井手口清治, 山本 亮輔, 大海 庸世,
日野 一成, 平野 寛

肝癌に対するエタノール局注療法 (PEIT) の有用性について, ラット DAB 肝癌および臨床例について病理組織的検討を行った. また, エタノール局注による生体免疫能の変化を検討するため, NK 活性, リンパ球サブセットおよび NK 細胞表面 マーカーの変化を観察した. また, エタノール以外に, レンチナンや OK-432 を腫瘍内に局注し免疫能に及ぼす影響を比較した. 1) エタノール局注部位は 2 日後には完全な壊死に陥っていたが, エタノール非浸透部は影響されず, 効果は限局的であった. 2) エタノール単独局注では NK 活性の低下, OKT 4; 4/8 比の増加, Leu7⁻ CD16⁺ 細胞は減少した. 3) レンチナン OK-432 の単独局注では NK 活性の増加, OKT 8 の増加がみられた. 4) OK-432 単独局注で Leu7⁻ CD16⁺ 細胞は増加し, エタノールと OK-432 の併用局注でも同様の結果を得た.

(平成元年 8 月 10 日採用)

Percutaneous Ethanol Injection Therapy (PEIT)—Experimental and Clinical Studies

Shinichiro Yamamoto, Keiko Takatori, Kenji Ohmoto, Seiji Ideguchi,
Ryosuke Yamamoto, Tsuneyo Ohumi, Kazunari Hino and Yutaka Hirano

The usefulness of percutaneous ethanol injection therapy (PEIT) under ultrasonic guidance was examined in both experimental and clinical liver cancer, and its influence on the host immune response was also investigated. Natural killer (NK) activity, NK cell surface markers and T cell subsets were compared in PEIT and intratumoral injection of Lentinan and OK-432. 1. Pathological examination of DAB-induced rat liver cancer revealed that ethanol induced complete necrosis as early as 2 days after injection, but the area of necrosis was localized and limited in extent. 2. Decrease in NK activity, increase in the OKT 4 and 4/8 ratio and decrease in Leu7⁻ CD16⁺ were noted in PEIT. 3. Intratumoral injection of Lentinan and OK-432 induced increases in NK activity and OKT 8. 4. OK-432 increased Leu7⁻ CD16⁺ and combined injection of ethanol and OK-432 prevented decrease in Leu7⁻ CD16⁺. (Accepted on August 10, 1989) *Kawasaki Igakkaiishi* 15(3): 437-444, 1989

Key Words ① PEIT ② Rat DAB tumor ③ NK activity
④ Surface marker of NK cell ⑤ T cell subsets

はじめに

肝癌に対するエタノール局注療法 (percutaneous ethanol injection therapy: PEIT) に関する報告は、近年急速に増加しており、肝動脈塞栓術 (TAE) との併用が比較的大きな肝細胞に対しても有効であるといわれている。われわれも1982年より TAE 療法を、また1988年より PEIT を本格的に肝癌の治療に応用し、主として PEIT の生体免疫能に及ぼす影響を中心に報告してきた。^{1)~3)} 今回 PEIT の基礎的検討としてラット DAB 肝癌にエタノールを局注し、その組織学的変化を検討した。臨床例についても PEIT 前後での肝組織像の変化を、生検にて確かめ、また、NK 活性、リンパ球サブセット、さらに two color flowcytometry 法による NK 細胞の phenotype 別の比率の経時的変動に関して報告する。エタノールのみならず biological response modifier (BRM) として知られるレンチナンや OK-432 の単独局注時のこれらの免疫能の変化についても検討した。エタノール単独局注との比較も行い、エタノールと BRM の併用の意義についても考察した。

Table 1. Clinical backgrounds of the hepatocellular carcinoma (HCC) patients treated by intratumoral injection of ethanol, Lentinan and OK-432

	エタノール		レンチナン OK-432	
	(10)	(5)	(4)	(4)
年齢	59.3	71.4	59.5	
性別	M10 F 0	M 4 F 1	M 2 F 2	
腫瘍径	4.8 cm	3.7 cm	4.2 cm	
PS	0	1		1
	1	4	3	1
	2	3	2	2
	3	2		
Child	A	3	3	1
	B	5	2	3
	C	2		

対象と方法

実験モデルとして Wistar 系雄性ラット (体重 150 g 前後) 10 匹を用い、0.06% 3'-Me-DAB 含有試料を摂取させ肝癌を作成した。投

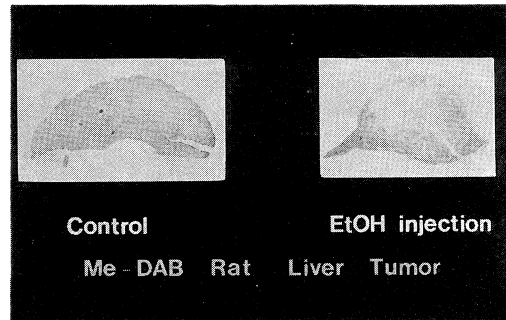


Fig. 1. Cut surface of DAB-induced rat liver cancer of untreated control (left) and 2 days after ethanol injection (right) (HE stain).

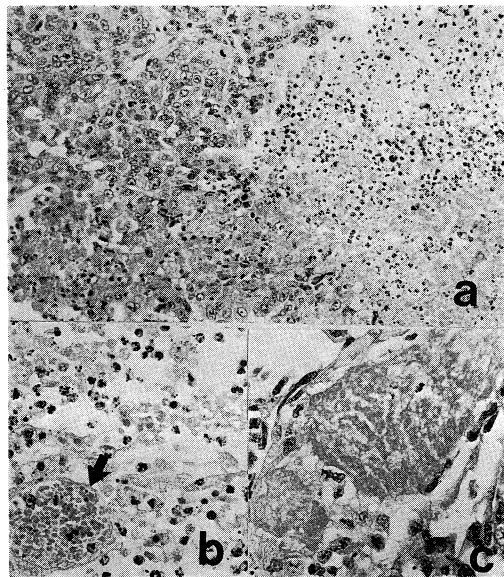


Fig. 2. Microscopic findings of rat liver tumor 2 days after ethanol injection. **a.** Necrosis of the tumor cell is seen adjacent to non-necrotic viable cells (HE, $\times 100$). **b.** Necrotic tumor cells and neutrophil infiltration is shown. Thrombus formation is also noted (arrow) (HE, $\times 200$). **c.** Aggregation of fibrins is observed near the necrotic area (HE, $\times 400$).

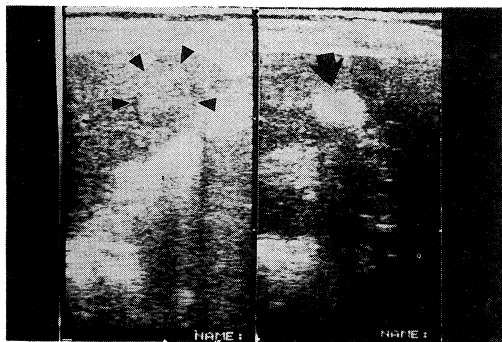


Fig. 3. Ultrasonograph of HCC before (left) and after (right) PEIT. Isoechoic tumor (arrowheads) changed to hyperechoic area (arrow) just after PEIT.

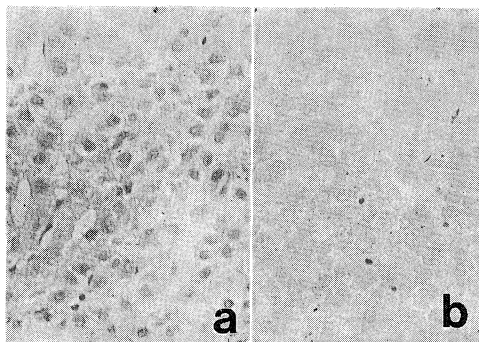


Fig. 4. Liver biopsy of the tumor before (a) and after (b) PEIT. Tumor cells became completely necrotic without cell infiltration (HE, $\times 400$).

与4カ月後に全例肝癌の発生がみられたため各ラットに開腹後99.5%エタノール0.2mlを肝腫瘍に局注した。局注後2日、4日、7日後に屠殺し10%ホルマリン液にて固定し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色を行い顕微鏡で観察した。臨床的検討としてPEITを施行した肝細胞癌患者10例、レンチナン局注を行った5例、OK-432局注を行った4例の計19例を対象とした。各々の群の患者の背景因子はTable 1に示している。レンチナン群が年齢がやや高齢である以外各群間には有意な差を認めなかった。PEITの方法は、超音波装置(横河RT 3600セクタ型プローブ)を用いて22G PTC針を使用し、腫瘍内穿刺を行った。99.5%エタノールを1回2~10ml注入した。レンチナンは生食水3mlに3mg溶解し注入した。OK-432は1回10KEを局注した。検査項目は局注前、1日後、7日後の3回、末梢血、 ^{51}Cr 放出法によるNK活性、リンパ球サブセット(OKTシリーズ)およびflowcytometryを用いたtwo color解析によるリンパ球表面マーカーの検討を行った。

結 果

1. ラット DAB 肝癌における検討

Figure 1 は無処置ラット肝癌(左)とエタ

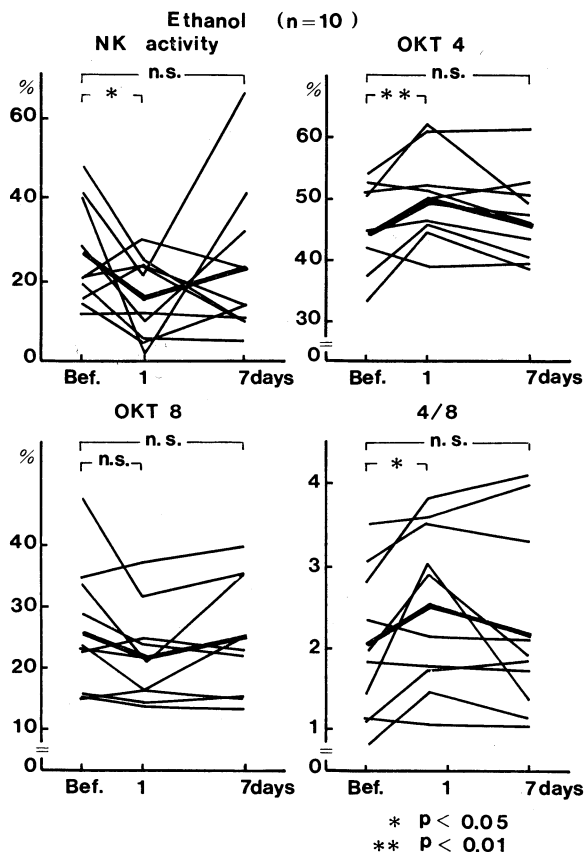


Fig. 5. Changes of NK activity and T cell subsets after ethanol injection

ノール局注後2日目の肝癌(右)の断面像を示す。エタノール注入部は染色性が乏しくなり、完全な壊死に陥っていた。Figure 2は、その組織像でFigure 2aに示すように、健常部と

壊死部は互いに隔壁は認めず移行していた。すなわちエタノールの浸透した部分は完全な壊死に陥っているが非浸透部は全く変化を認めなかった。Figure 2b は壊死部の強拡大像で、肝癌細胞は好酸性壊死に陥り、好中球の浸潤が目立った。また血栓形成もみられた。Figure 2c は、フィブリン塊を示す。このほか4日目、7日目と経過するにつれて、肝癌細胞の脱落、細胞構築の破壊、線維増生などの変化がみられた。

2. 臨床例における変化

Figure 3 は PEIT 前後の US 像である。左は注入前で S₅ に 2.8×3 cm の腫瘍がみられ、この部位にエタノールを注入すると、右側の写真のように、高エコーに変化し腫瘍内に的確に注入されたことが US にて判定しうる。Figure 4 はその生検組織像である。Figure 4a は PEIT 前の組織で、偽腺管構造を示す肝細胞癌と診断された。Figure 4b は PEIT 後 2 週後の肝生検像で、肝癌細胞は完全な好酸性壊死を示し核の消失もみられた。しかしながら細胞浸潤は生検組織では認めなかった。

3. 局注後の NK 活性、リンパ球サブセットの変化

エタノール単独局注例 10 例における NK 活性やリンパ球サブセットの経時的変化を Figure 5 に示す。NK 活性は前値 26.3±12.7% から 1 日後 15.4±9.8% と有意に低下し、7 日後には、22.2±18.6% に回復傾向を示した。リンパ球サブセットの変化では OKT 4 は前 44.7±6.8% から 1 日後 49.8±7.5% と 1% 以内の危険率で有意の増加を示し、7 日後も 46.6±7.4% と前値より高値を示した。OKT 8 はやや減少傾向を認めたが有意でなかった。4/8 比は前 2.0 から 1 日後 2.5 と有意に増加し、7 日後も 2.2 と高値を示した。次にレンチナンのみ局注 5 例について Figure 6 に示す。NK 活性は前 31.0±13.4 から 1 日後 38.4±10.5 とやや高値を示し 7 日後も 37.0±31.1 であった。リン

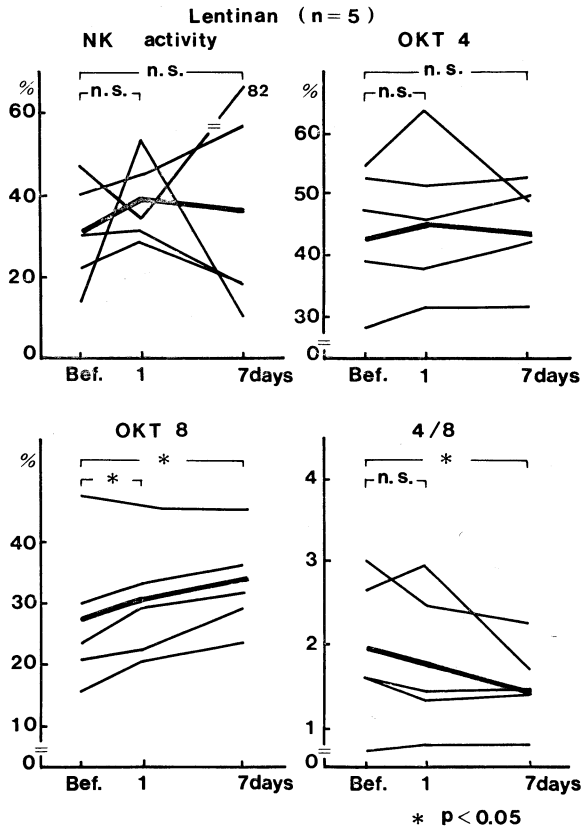


Fig. 6. Changes of NK activity and T cell subsets after intratumoral injection of Lentinan

パ球サブセットの変化としては OKT 4 は著変を認めなかったが OKT 8 は前 27.9±12.3% から 1 日後 30.6±10.7, 7 日後 33.4±9.1 と有意に高値を示し、4/8 比は低下がみられた。OK-432 のみの局注例 4 例の変化は Figure 7 に示す。NK 活性は前 25.7±14.7, 1 日後 23.7±30.9, 7 日後 37.0±26.7 と 7 日後に高値を示した。OKT 4 および OKT 8 はいずれも有意に低下を認めた。4/8 比には変化がみられなかった。Table 2 はこれらの結果をまとめたものでエタノール局注では NK 活性の低下 OKT 4 の増加が特徴であった。レンチナンと OK-432 はともに NK 活性の増加傾向を示した。リンパ球サブセットに関してはレンチナンは OKT 8 の上昇をもたらしたが、OK-432 は OKT 3, 4, 8 すべてを低下させた。

4. flowcytometry 法によるNK細胞の測定

Leu 7 と CD 16 (Leu 11) の両抗体を用いた two color 解析により Leu7⁻CD16⁺, Leu7⁺CD16⁺, Leu7⁻CD16⁻, Leu7⁺CD16⁻ の分画の

変化を検討した。Figure 8 は OK-432 局注の場合の変化を示す。Leu7⁻CD16⁺ は前 3.9 ± 2.0%, 1日後 7.5 ± 3.9%, 7日後 5.1 ± 1.6% といずれも前値に対して有意の増加を示していた。Leu7⁺CD16⁺ は変化に乏しく Leu7⁺CD16⁻ は前値 15.9 ± 6.6% から 1日後 10.4 ± 3.8% と有意に低下していた。7日後は 14.1 ± 4.5% と回復した。Leu7⁻CD16⁻ はほとんど変化を認めなかった。

次に、OK-432 単独、エタノール単独、両者併用局注によりNK細胞の phenotype の変化をみた2例を呈示する。Figure 9 は 65 歳女性の肝細胞癌例で、OK-432 単独局注時には Leu7⁻CD16⁺ は 3.6% から 9.8% へと増加がみられた。一方、エタノール 13 ml 局注後には Leu7⁻CD16⁺ は 5.2% から 2.9% へと減少を示した。また Figure 10 に示すように 66 歳女性の肝細胞癌例で OK-432 10 KE とエタノール 15 ml の併用局注後には、Leu7⁻CD16⁺ は 3.7% から 8.9% へと増加を示した。

考 察

肝癌の治療は近年 TAE が確立されてきたが、TAE に際しては肝予備能の悪い肝癌例に対しては術後肝不全を来すことや、腫瘍辺縁部に残存癌細胞がみられる点から一定の限界があると考えられている。一方 PEIT は、

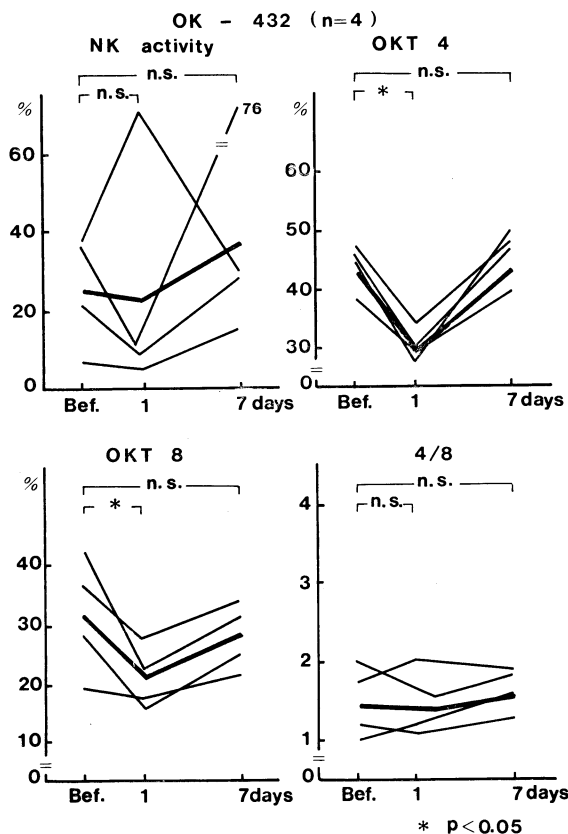


Fig. 7. Changes of NK activity and T cell subsets after intratumoral injection of OK-432

Table 2. Comparison of immunological reaction in HCC with various intratumoral injection by ethanol and biological response modifiers (Lentinan and OK-432)

	NK activity	OKT 3	OKT 4	OKT 8	4/8	WBC	Lymph
Ethanol (n=10)	↓	n.c.	↑	↓	↑	n.c.	n.c.
Lentinan (n=5)	↑	n.c.	n.c.	↑	↓	n.c.	n.c.
OK - 432 (n=4)	↑	↓	↓	↓	n.c.	↑	n.c.

n.c. = no change ↑ slight ↑ significant

高度の肝機能異常例でも安全に施行しうる方法であることから TAE に代わる。あるいは、TAE と併用しうる有力な治療法と考えられている。今回われわれは PEIT の病理組織学的

変化をラット肝癌モデルを使ってあるいは臨床例では生検により検討した。その結果、エタノールは強力な凝固壊死効果をもつことが組織学的にも証明された。さらに PEIT が生体免

疫系に支える影響についても検討し、NK 活性の低下作用および NK 細胞のうち NK 活性の強い Leu7⁻CD16⁺ 細胞や Leu7⁺CD16⁺ 細胞を低下させることを明らかにした。従来 TAE により NK 活性は低下することがよく知られている。^{4),5)} さらに NK 細胞表面マーカーのうち Leu7⁻CD16⁻ の増加 Leu7⁺CD16⁻ および Leu7⁺CD16⁺ の減少傾向を認めたと報告されている。⁶⁾ NK 細胞のうち Leu7⁻CD16⁺ が最も強い NK 活性をもち、次いで Leu7⁺CD16⁺ が強く Leu7⁺CD16⁻ は活性が弱いことが知られており、肝細胞癌では Leu7⁻CD16⁺ のみならず、Leu7⁺CD16⁺ の細胞群が減少しているといわれる。⁷⁾ 以上 NK 活性および NK 細胞に対する影響は PEIT と TAE とは類似した点があり、これらの処置は生体にとって不利な反応と考えられる。これに対し BRM であるレンチナンや OK-432 の局注は NK 活性を増加させる傾向があり、とくに OK-432 は NK 細胞のうち Leu7⁻CD16⁺、Leu7⁺CD16⁺ 細胞を増加させ PEIT とは全く逆の作用をもつ。1 例ではあるがエタノールと OK-432 の併用

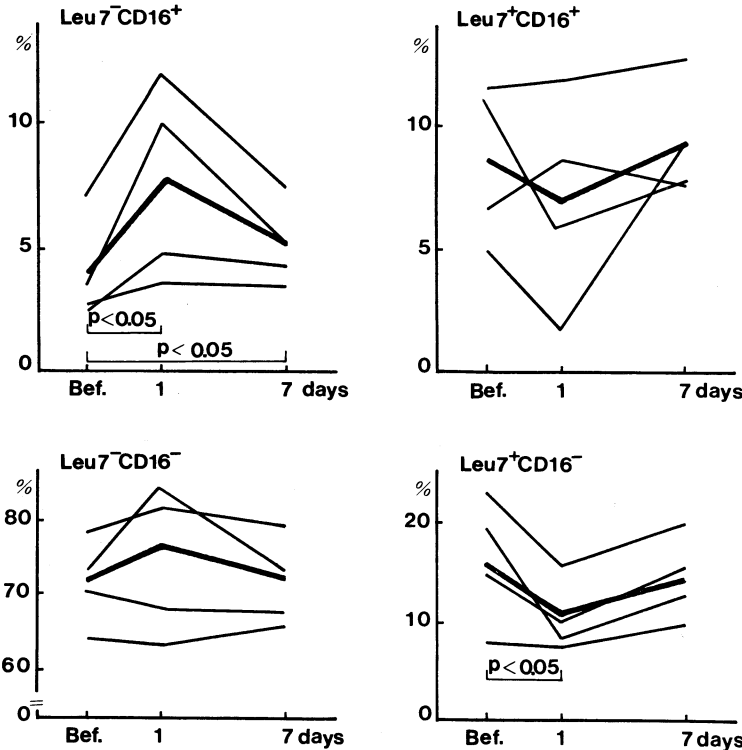


Fig. 8. Changes of surface marker of NK cells by two color flowcytometry in intratumoral injection of OK-432

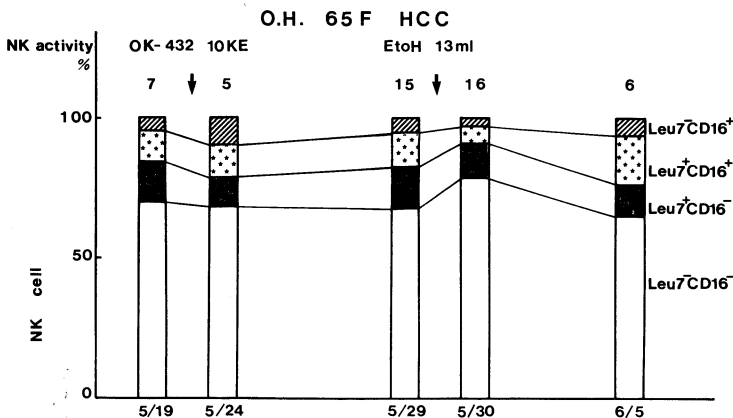


Fig. 9. Serial changes of NK cell ratio in 65-year-old female of HCC by intratumoral injection of OK-432 and ethanol. Leu7⁻CD16⁺ increased in OK-432 injection and both Leu7⁻CD16⁺ and Leu7⁺CD16⁺ decreased in ethanol injection.

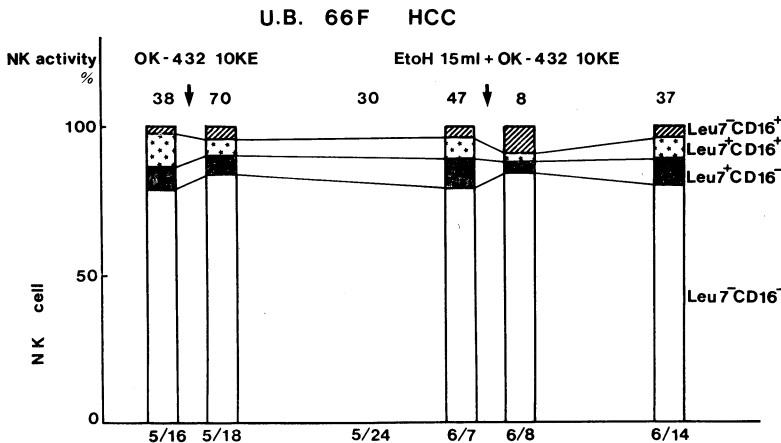


Fig. 10. Serial changes of NK cell ratio in 66-year-old female of HCC by combined use of ethanol and OK-432. Leu7-CD16⁺ increased after combined use.

局注時に Leu7-CD16⁺ は明らかに局注後増加を示しており、OK-432 併用局注がNK活性低下を阻止することから今後検討されるべき治療法と考えられた。リンパ球サブセットの変化としては、OKT 4の増加、OKT 8の減少、4/8比の増加がエタノール単独局注でみられたが、このことはTAEでもみられており^{8),9)} PEITとTAEはこの点においても類似していた。

ま と め

1. ラットDAB肝癌モデルに対するエタノール注入の組織学的検討から完全な凝固壊死が注入後2日目に認められた。

2. PEIT後生検を行った肝細胞癌例では細胞浸潤を伴わない凝固壊死が認められた。

3. エタノール局注後NK活性は低下し、OKT 4の増加、OKT 8の減少、4/8比の増加がみられた。

4. エタノール単独局注後NK細胞のうち、Leu7-CD16⁺ および Leu7⁺ CD16⁺ 細胞の減少、Leu7⁻ CD16⁻ の増加がみられた。

5. レンチナン、およびOK-432の各々の単独局注ではNK活性の増加作用がみられた。

6. OK-432の単独局注ではLeu7⁻ CD16⁺ の増加とLeu7⁺ CD16⁻ の減少が認められた。

7. エタノールとOK-432の併用局注はLeu7⁻ CD16⁺ を増加させ、腫瘍免疫から有用であることが示唆された。

本論文の要旨は第51回日本消化器病学会中国四国地方会(平成元年6月、広島)および第12回岡山癌免疫化学療法研究会(平成元年7月、岡山)にて発表した。本研究は川崎医科大学プロジェクト研究II-1-206番の補助による。

文 献

- 1) 山本晋一郎, 斎藤逸郎, 和田あゆみ, 高取敬子, 井手口清治, 山本亮輔, 大元謙治, 大海庸世, 日野一成, 平野 寛: 肝癌に対するエタノール局注療法. 川崎医会誌 14: 586-593, 1988
- 2) 山本晋一郎, 高取敬子, 大元謙治, 山本亮輔, 井手口清治, 大海庸世, 日野一成, 平野 寛: 肝細胞癌に対するエタノール局注療法におけるNK活性とT Cell Subsetsの検討—レンチナン併用局注の影響について—. 川崎医会誌 15: 429-436, 1989
- 3) 山本晋一郎, 高取敬子, 大元謙治, 井手口清治, 山本亮輔, 大海庸世, 日野一成, 平野 寛: 肝癌に対するエタノール局注療法(PEIT)におけるNK活性およびリンパ球サブセットの変化—レンチナン局注併用の意義. 癌と化療 16: 3291-3294, 1989
- 4) 大元謙治, 山本晋一郎, 山本亮輔, 井手口清治, 古城研二, 斎藤逸郎, 和田あゆみ, 山本真理子, 大海庸世, 日野一成, 平野 寛: 肝細胞癌に対するOK-432動注併用肝動脈塞栓術(TAE)の試み—NK活性におよぼす影響. Biotherapy 2: 741-747, 1988
- 5) 高木 均, 山田昇司, 小沢賢子, 植原政弘, 小島 亨, 阿部毅彦, 斎藤修一, 高山 尚, 片貝重之, 小林節雄: 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術による免疫系への影響—細胞性免疫と液性免疫に分けての検討—.

日消病会誌 85 : 2207—2216, 1988

- 6) 水嶋宣章, 中島猛行, 金井弘一, 長沢正通: 肝動脈塞栓術が肝細胞癌患者のNK活性およびNK細胞表面マーカーに及ぼす影響. 肝臓 30 : 748—753, 1989
- 7) 樋口清博, 杉山和子, 井上恭一, 佐々木 博, 中野 護: 肝硬変および肝細胞癌患者末梢NK活性に関する研究: Phenotype 別の細胞の比率および活性について. 肝臓 30 : 206—216, 1989
- 8) 山本晋一郎, 大元謙治, 山本亮輔, 井手口清治, 大海庸世, 日野一成, 古城研二, 福嶋啓祐, 平野 寛: 肝癌におけるOK-432腫瘍内注入前後の末梢血リンパ球サブセットの変動. 癌と化療 13 : 1077—1078, 1986
- 9) 大崎往夫, 清水達夫, 樋口 拓, 伊達克彦, 国立裕之, 高松正剛: 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓療法における T cell subsets の検討. 消化器と免疫 15 : 39—43, 1985