

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791221

研究課題名（和文） 肝硬変に伴う脾腫による血小板減少症の放射線治療

研究課題名（英文） Radiation therapy for thrombocytopenia due to splenomegaly of liver cirrhosis

研究代表者

酢谷 真也（SUTANI SHINNYA）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50528825

研究成果の概要（和文）：肝硬変合併肝細胞癌の治療の主体は外科的切除、肝動脈塞栓術等がある。また、肝硬変に伴う脾腫の血小板減少が治療の障害になり治療を断念する場合も多い。肝機能を温存しながら腫瘍を消滅させる放射線治療が注目されている。現在放射線照射はリンパ腫などの悪性腫瘍による脾腫に対して血小板減少が改善するという報告がある。本研究は肝硬変に伴う脾腫による血小板減少症の治療法として、現在保険適応ではない放射線療法の臨床応用を目的とする。

研究成果の概要（英文）：Hepatocellular carcinoma (HCC) is naturally resistant to radiotherapy and cytotoxic chemotherapy, leaving surgery as the mainstream therapeutic approach. On the other hand, it is well known that platelets have a thrombotic effect. However, platelets play an important role not only in hemostasis but also in wound healing and tissue regeneration. Platelets have been reported to accumulate in the liver and promote liver regeneration after an extended hepatectomy, but the mechanism is unclear. The decrease of platelets of splenomegaly accompanying liver cirrhosis obstructs medical treatment, and gives up medical treatment in many cases. Radiation irradiation is considered as good adaptation, to splenomegaly by malignant tumors, such as a lymphoma, if the decrease of platelets improves by radiation irradiation in an example with a bad reaction, etc. to chemotherapy is increasing also with the benign disease. The decrease of platelets by hypersplenism accompanying liver cirrhosis is intractable, and can serve as the medical treatment method with effective radiotherapy. Here, the aims of this study at exploring clinical application of the radiotherapy which is not the present insurance adaptation as a cure for the plateletocytopenia by the splenomegaly accompanying liver cirrhosis in this research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：肝硬変、血小板減少、放射線治療

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界でも罹患数の多い腫瘍の一つであり、日本において肝硬変と合わせた年間死亡数は4万人を超え、肺癌、胃癌についで多い。肝細胞癌の85%が、肝硬変を合併しており、肝硬変からの発癌率は5-7%とされる。インターフェロンの適応拡大、そしてインターフェロンの長期持続投与により、肝線維化改善効果や発癌抑制効果が期待できるようになった。近年では、比較的高齢者や肝硬変患者にまで投与されるようになってきたが、貧血や血小板減少などの副作用により治療を断念されるケースも少なくない。肝硬変が進行して門脈圧上昇により脾腫を来すると、脾臓機能亢進により血小板が減少し、インターフェロン療法が適応外となるケースも多い。また、血小板減少による出血傾向のため、手術などの観血的治療のリスクが高く、輸血などの処置が必要となる。しかし、血小板の減少した状態での手術はリスクが高く、近年では、より非侵襲的な治療として、部分的脾動脈塞栓術が選択される例が増えている。放射線照射はリンパ腫などの悪性腫瘍による脾腫に対してはよい適応とされており、良性疾患でも薬剤療法に反応が悪い例などで放射線照射により血小板減少が改善する報告が増えている。肝硬変に伴う脾臓機能亢進症による血小板減少症は難治性であり、放射線療法が有効な治療方法となりうる。

2. 研究の目的

細胞がんの治療として放射線治療を行うことは、放射性肝障害の問題からこれまで困難であると考えられていました。しかし、最近では照射機器の進歩に伴い局所に限った照射が可能となったことから、肝臓に対する放射線治療の研究が進んでいます。高エネルギーX線は、単独療法から始まり、他治療と併用して根治性を高める研究が行われています。陽子線および炭素イオン線に代表される重イオン線は線量集中性が高く、病巣への選択的照射治療が可能です。近年、陽子線治療の高い治療効果が報告され、この優れた線量分布の有用性が明らかとなりました。重イオン線は、高い線量集中性に加えて陽子線やX線よりも高い生物効果(細胞致死作用)を有するため、さらに高い治療効果が期待でき、根治性と低侵襲性とを兼ね備えた新しい治療法として期待されています。本研究では肝硬変に伴う脾腫による血小板減少症の治

療法として、現在保険適応ではない放射線療法の臨床応用を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Wistar rat 10匹に対して外照射で20-50Gy照射する。ラットの脾臓は腹壁に接した位置にあり、注意深く照射する。

(2) 肝臓、脾臓への照射の影響を解剖後にHE染色にて観察する。

(3) 肝硬変に伴う脾腫の実験モデルとして、ラットの胆管結紮により作成する。

(4) 開腹時に脾臓のサイズを計測する。5週後に開腹して脾臓のサイズを計測後、脾臓摘出もしくは脾臓の放射線照射を行い、血小板減少症に対する放射線治療の有効性の有無を評価する。

(5) 放射線による脾臓機能の低下の有無をフチン酸の応用を試みる。

(6) 放射線照射の血小板減少症への予防効果を評価する。[脾腫ラットモデル・予防]300g Wistar rat 18匹を2群に分ける。18匹をネンブタール麻酔下に開腹し、胆管を結紮する。3群9匹のラットの胆管を3-0絹糸にて結紮し、縫合する。対照群3匹にはシャム手術を行う。5週間飼育し、脾腫モデルとする(Microsurgery, 2004;24(6):442-7)。5週目に、4群12匹をネンブタール麻酔下に再度、開腹する。照射群3匹については、開腹後、皮膚上に滅菌シートをのせ、シートの上に脾臓および周囲の腸管をのせる。放射線照射台の上にラットをのせ、脾臓のみが照射野になるように配置する。25Gy照射した後、脾臓・腸管を腹腔内に戻し、縫合する。脾摘群3匹は脾臓を摘出した後に縫合する。無治療群3匹と対照群3匹にはシャム手術を行う。7週目に体重を測定後、ネンブタール麻酔下に開腹し、下大静脈より採血する。採血には、ヘパリン入りと無添加の2種の真空採血管を用いる。脾摘群は肝臓を摘出する。それ以外の3群は、肝臓と脾臓を摘出する。肝臓と脾臓は重量を測定後、5mm角に細切し、1つをホルマリン固定、3個を凍結保存する。また、各々のラットの大腿骨より、骨髓を採取する。骨髓を3つに分け、同様にホルマリン固定および凍結保存する。治療群に対し、平成21年度と同様にして脾臓に放射線照射し、縫合する。残りの非治療群は、脾臓照射せずに縫

合する。10日目、20日目、30日目に治療群、非治療群から3匹ずつ無作為に選び、ネンブータル麻酔下に体重を測定後、開腹する。下大静脈より採血した後、肝臓・脾臓を摘出する。肝臓と脾臓は重量を測定後、5mm角に細切し、1つをホルマリン固定、3個を凍結保存する。また、大腿骨より、骨髓を採取する。骨髓を3つに分け、同様にホルマリン固定および凍結保存する。

[血清学的検査]白血球・赤血球・血小板数、アルブミン、TB、AST、ALT、GGTP、線維化マーカーを測定する。

[組織学的検査]肝臓については、HE染色の他、MT染色を施行し、線維化について評価する。脾臓・骨髓については、HE染色を施行する。

[サイトカイン発現]胆管結紮による肝機能低下に伴う造血機能障害を評価するため、トロンボポエチン、エリスロポエチン、IL6について血中レベルを測定する。また、凍結した肝臓・脾臓・骨髓組織より蛋白・RNAを採取し、ELISA・Northern blotにより蛋白・mRNAレベルでの発現について解析する。

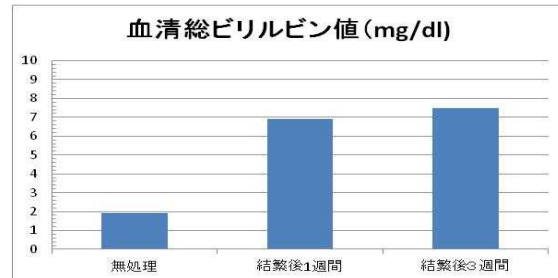
4. 研究成果

外照射で、脾臓を標的に20Gyから50Gyを投与した。ラットでは、脾臓は腹壁に接した位置にあり、胃、小腸への照射線量が高く胃炎、腸炎を併発したが、解剖にて肝臓組織を染色(HE)したところ、肝実質への障害は低いと考えられた。ヒトへの応用を考えた場合IMRTを使用すれば、腸管への影響は軽減できると考えられる。閉塞性黄疸に誘発される肝硬変モデル(脾腫を伴う)を作成するため、Wistar系雄性ラット(体重200~250g)を使用した。肝機能低下モデルとして閉塞性横断を誘発するために、ether麻酔下に上腹部正中切開を行い、総胆管をlarge pancreatic ductとgreat pancreatic ductの間で2重結紮により切断した。胆汁うっ滞による肝障害が著明で、HE染色では3~4週で線維化が起こり始めた。線維化は7~8週で著明で肝硬変状態と考えられたが、ほとんどがその段階では死亡した。

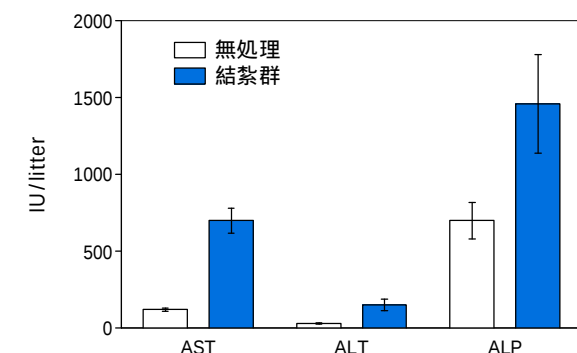
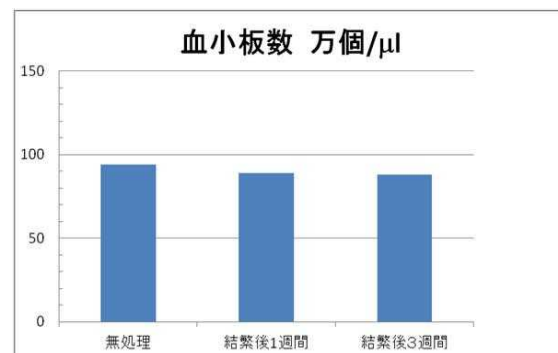
本研究では総胆管結紮4~5週間後、麻酔下にて開腹し脾臓を露出させて脾のX照射照射(20mA、150Kv)を実施した。ラットを左側に固定し、全身を厚さ6mmの鉛シートで防護し、脾臓を滅菌したタングステンシート(3mm)の上で照射した。さらに脾臓摘出ラットを作成した。また、偽手術

のみの無処ラットを対照として設定した。

総胆管結紮の肝臓などへの影響では血清総ビリルビン値は無処置ラット群は約1.93mg/dl、結紮後1週ラット群6.90mg/dl、結紮後3週ラット7.5mg/dlであった。



肝臓組織ではsinusoidの拡張を認め肝細胞全体が膨化していた。主として肝小葉周辺に浮腫、変性が著明で、Glisson鞘に接する小葉周辺では胆管の拡張、偽胆管の増生がみられ、胆汁うっ滞による肝硬変として矛盾しない所見であった。また、肝組織は、無処置ラットに比較して結紮ラットでは著明な線維化が見られた。総胆管結紮後、1週間、3週間では末梢血液中の血小板には有意な減少は見られなかった。



生化学検査からは、結紮により、AST,ALT,ALP いずれも上昇し、肝機能、胆道系の機能低下が見られた。分子生物学的手法を用いた実験は、現在進行中であり今後の研究課題として継続する。

これまでのところ、総胆管結紮により脾腫傾向が見られたが、照射により脾臓は縮小した。今回の研究では、脾臓照射による血小板の回復には有意な増加は見られなかったが、脾機能亢進に対しては将来的には有効な方法になりうると考えられた。

【臨床応用について】

倫理委員会に提出の上、肝細胞癌を有する肝硬変患者で、血小板減少症・脾腫を伴う場合において、かつ、肝細胞癌治療目的で放射線治療を行う場合に、治療計画にて安全に脾臓への照射が可能で、肝細胞癌への照射に寄与できる場合に、十分なインフォームドコンセント・同意のもとで、照射を行い、血小板数や脾臓サイズの変化についての解析を行いたい。

<人権の保護及び法令等の遵守への対応>に記載の症例を対象とした放射線治療について、当大学の倫理委員会にて承認を仰ぎ、承認が得られた後、当科に放射線治療目的にて紹介された肝細胞癌患者について、放射線治療計画をたてる。安全に脾臓照射が可能で、脾臓照射の有無が腫瘍に対する処方線量に影響しない2条件が成り立つ症例について、無作為に脾臓照射プラン群と非照射プラン群とに分ける。脾臓照射プランについては、脾臓全体を照射するプランではなく、肝細胞癌に対する治療計画において、脾臓にも照射を行った場合に脾臓体積の60%以上が含まれるプランとし、照射群については、ITP治療時と同等の線量を脾臓に照射できた時点で、非照射プランへ変更する。5症例ずつ集まった時点で、脾臓サイズの変化、血小板数・白血球数などの変化について解析し、臨床応用に結び付けたいと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

酢谷 真也 (SUTANI SHINYA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50528825