

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592347

研究課題名(和文) 活性酸素測定による生体侵襲の定量化に関する研究

研究課題名(英文) Study on quantification of the living body involvement by the active oxygen measurement

研究代表者

大脇 哲洋 (OWAKI, TETSUHIRO)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50322318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス値(d-ROMs:Reactive Oxygen Metabolites derived compounds)、抗酸化力値(BAP:Biological Antioxidant Potential)による手術侵襲の定量化を検討した。侵襲が大きい食道癌切除、開腹胃癌切除、膵頭十二指腸切除、肝中央2区域切除で術直後のd-ROMs/BAP比が高かった。食道切除ではd-ROM値は術直後に有意に減少し、術後1日目には回復、3日目には前値まで回復した。手術時間および出血量と術直後・術後1/3/7日目のBAP、d-ROMsは有意に相関し、これらは手術侵襲の評価指標となることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We examined oxidative stress value (d-ROMs: Reactive Oxygen Metabolites derived compounds), quantification of the operative invasion by the antioxidant titer (BAP: Biological Antioxidant Potential).

The d-ROMs/BAP ratio was high just after the operation of the esophagectomy, laparotomy gastrectomy, pancreatoduodenectomy and 2 central segmentectomy of the liver which were one of the most invasive surgery. In the esophagectomy, the d-ROM level significantly decreased just after an operation and recovered on day one after an operation, and recovered to a previous value on the third day. BAP of eyes, d-ROMs significantly correlated with an operative time and bleeding just after an operation on postoperative 1/3/7 day, and it was confirmed that these showed metrics of the operative invasion.

研究分野：手術侵襲

キーワード：手術侵襲 抗酸化力 酸化ストレス d-ROM BAP 食道癌 定量化

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療において、手術・放射線・抗癌剤・温熱療法・免疫療法など様々な加療手段が開発されている。侵襲が大きいことを理由に治療法の選択が行われることも多い。侵襲には治療法そのものや患者毎の生体反応が大きく関わり、その定量化は難しい。これまで白血球数、CRP、IL-6、IL-8等が用いられ、その他にも安静時基礎代謝量、尿中8-イソプロスタグランディン F2 (8-isoPGF2)、尿中8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)、血中Advanced oxidation protein products (AOPP)、血中diamine oxidase(DOA: Kamei H et al. Am J Surg, 189, 2005)などが試されているが、確立した測定法はなかった。我々は、酸化ストレス (d-ROMs: Reactive Oxygen Metabolites derived compounds) および抗酸化力 (BAP: Biological Anti-oxidant Potential) に着目し、食道癌切除患者においてその侵襲度の定量化に寄与することを証明した。一方で手術前後の管理には、侵襲低減を目的とした栄養投与、抗サイトカイン療法等が行われるが、その効果判定の評価法はほとんどなく困難である。

## 2. 研究の目的

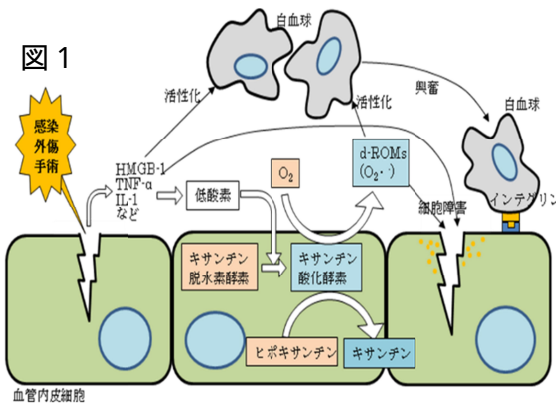
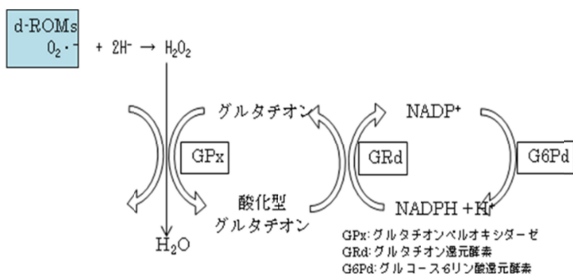


図 1



生体が侵襲を受けると、細胞傷害が起こり様々なサイトカインが分泌され、活性酸素 (d-ROMs: O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> など) が発生する (図 1)。生体はそれに対

し抗酸化力を高め、活性酸素による過剰な傷害に備える (グルタチオンの酸化等による)。この抗酸化力は、侵襲が大きいほど大きくなる (図 2)。

我々は様々な手術術式の中で、最も侵襲の大きな食道癌患者に対する食道切除において、血清中の活性酸素 (d-ROMs)、抗酸化力 Biological Anti-oxidant Potential (BAP) を経時的に測定し、これらが手術侵襲の定量化手段となり得ることを証明した。この結果を基に、術前術後に施行される、様々な侵襲低減処置 (栄養投与、副腎皮質ステロイド投与、抗サイトカイン療法、鏡視下手術など) の評価に応用できることを検証し、今後の様々な臨床研究の評価法として有意義かどうかを検証する。

## 3. 研究の方法



図 3 Free carpe diem<sup>®</sup>

活性酸素 (d-ROMs: Reactive Oxygen Metabolites derived compounds) は、ヒドロペルオキシドの量を、フリーラジカルによる酸化で赤紫色のラジカル陽イオンになる N,N ジエチルパラフェニレンジアミン (DEPPD) の光度計による定量化で測定する。

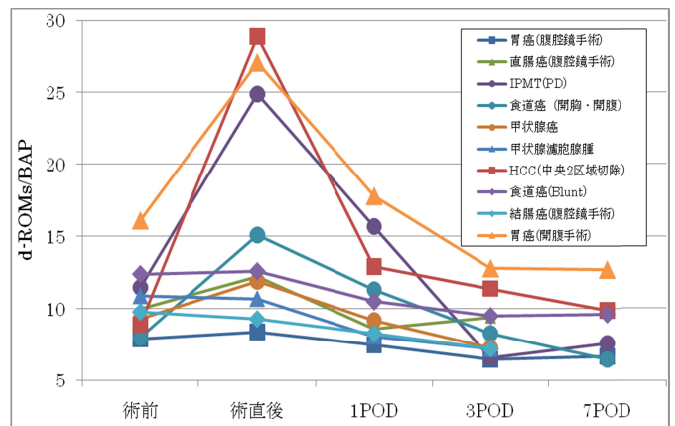


図 4 術式別 BAP/d-ROMs 比の経時的推移

抗酸化力 (BAP : Biological Anti-oxidant Potential) の測定は、チオシアン酸塩誘導物により酸化された赤色の三価鉄塩  $FeCl_3$  を、血漿中の抗酸化物質の作用で二価鉄  $Fe^{2+}$  イオンに還元させ脱色させる光度変化で測定する。また、これまでの d-ROMs および BAP テストに加えて、次亜塩素酸 (HClO) の酸化に対抗する血液の抗酸化バリア (OXY 吸着テスト) の測定を行う。これらの測定には、フリーラジカル解析装置 Free carpe diem® (医療機器届出番号 : 13B2X10066W00004) を用いた (図 3)。

甲状腺切除、胃切除、肝切除、脾切除、大腸切除、食道切除患者に対し、術前・術直後・術後 1 日目・術後 3 日目、術後 7 日目に採血し、測定した。

#### 4. 研究成果

甲状腺切除、結腸切除 (腹腔鏡手術)、胃切除 (腹腔鏡手術)、肝中央 2 区域切除、脾頭十二指腸切除、食道癌切除 (抜去術、開胸・開腹手術) の術直後の d-ROMs/BAP 比の測定では、比較的侵襲が大きいと推察される、開胸・開腹による食道癌切除、開腹による胃癌切除、脾頭十二指腸切除、肝中央 2 区域切除で高かった (図 4)。

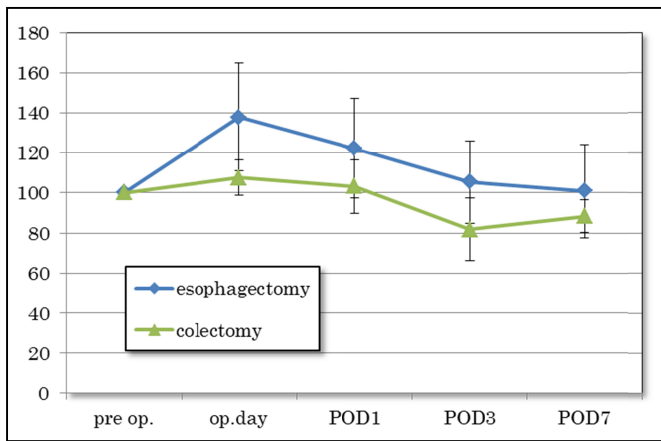


図 5 食道切除と結腸切除の BAP/d-ROMs

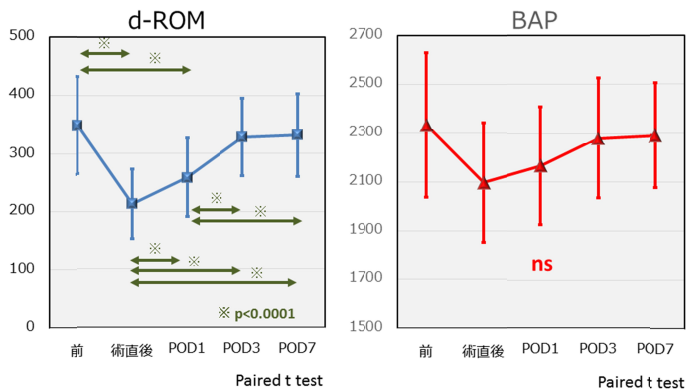


図 6 BAP・d-ROM の推移

図 5 の様に、特に食道切除においてその推移が著しいことを確認し、食道癌患者において、術式別、術前加療別に対する食道切除手術に d-ROMs および BAP を測定した (図 6)。

Pearson の相関係数	手術					術直後					
	手術時間	出血量	WBC	Lym	Plt	T-Bil	AT-III	TP	dROM	BAP	BAP/dROM
手術時間	C.C.	-0.219	0.186	0.018	0.226	0.128	0.064	0.044	0.13	0.02	-0.004
	p 値	0.292	0.374	0.935	0.277	0.543	0.768	0.835	0.543	0.927	0.984
出血量	C.C.	-0.219	-0.53	0.014	-0.245	0.238	-0.523	-0.442	-0.506	0.021	0.592
	p 値	0.292	0.006	0.95	0.238	0.251	0.009	0.027	0.012	0.923	0.002
術直後 AT-III	C.C.	0.064	-0.523	0.304	0.209	0.38	-0.352		0.471	0.569	0.253
	p 値	0.768	0.009	0.149	0.326	0.067	0.091		0.02	0.005	0.245
POD 1 CRP	C.C.	-0.302	0.073	-0.295	0.093	-0.082	-0.262	0.195	-0.426	-0.051	-0.221
	p 値	0.143	0.729	0.152	0.664	0.697	0.206	0.362	0.034	0.813	0.3
POD 3 CRP	C.C.	0.256	0.189	-0.44	-0.36	-0.147	-0.128	-0.077	-0.357	0.003	-0.292
	p 値	0.217	0.365	0.028	0.084	0.484	0.541	0.719	0.08	0.989	0.167
POD 7 CRP	C.C.	0.264	-0.163	-0.188	-0.499	0.029	-0.068	-0.073	0.028	0.249	-0.271
	p 値	0.203	0.437	0.369	0.013	0.889	0.746	0.735	0.893	0.241	0.24

表 1-1 侵襲との相関 Pearson 相関係数

手術侵襲を表す手術時間および出血量と術直後・術後 1/3/7 日目の BAP、d-ROMs は非常に良く相関 (Pearson の相関係数) しており (表 1-1、表 1-2) 手術侵襲の評価指標の一つとして応用できることが確認された。

Pearson の相関係数	POD 1				POD 3				POD 7				
	dROM	BAP	BAP/dROM	CRP	dROM	BAP	BAP/dROM	CRP	dROM	BAP	BAP/dROM	CRP	
手術時間	C.C.	0.148	-0.202	-0.164	-0.302	0.141	-0.357	-0.303	0.256	0.432	0.296	-0.336	0.264
	p 値	0.489	0.344	0.445	0.143	0.522	0.094	0.16	0.217	0.031	0.151	0.101	0.203
出血量	C.C.	-0.491	0.169	0.648	0.073	-0.495	-0.046	0.494	0.189	-0.446	-0.044	0.436	-0.163
	p 値	0.015	0.429	0.001	0.729	0.016	0.836	0.017	0.365	0.026	0.836	0.029	0.437
術直後 AT-III	C.C.	0.557	0.254	-0.473	0.195	0.621	0.04	-0.551	-0.077	0.722	0.131	-0.582	-0.073
	p 値	0.006	0.242	0.023	0.362	0.002	0.858	0.006	0.719	0.0001	0.54	0.003	0.735
POD 1 CRP	C.C.	0.011	0.097	0.089		0.345	-0.111	-0.393		-0.093	-0.124	0.176	
	p 値	0.959	0.652	0.678		0.107	0.613	0.064		0.657	0.555	0.4	
POD 3 CRP	C.C.	-0.014	-0.017	0.058		0.06	-0.515	-0.305		0.108	-0.076	-0.042	
	p 値	0.949	0.936	0.789		0.784	0.012	0.157		0.607	0.717	0.84	
POD 7 CRP	C.C.	0.133	-0.206	-0.128		-0.029	-0.375	-0.149		0.038	-0.199	-0.082	
	p 値	0.537	0.335	0.55		0.897	0.078	0.498		0.857	0.339	0.696	

表 1-2 侵襲との相関 Pearson 相関係数

特に、術直後は有意に d-ROM 値は減少し (図 6) 術前の d-ROM 値と比較した減少率は、出血量と有意な相関を示した。また、術前化学放射線治療 (CRT) により抗酸化力が低下していることが d-ROMs および BAP の測定により確認できた (表 2-1、表 2-2)。CRT の影響についても評価可能であることが示唆された。食道癌切除術後の直後は、酸化ストレス物質は減少し、術後徐々に増加した。そして、出血量と酸化ストレス (血中 d-ROM) 測定値は、術直後から術後 7 日目にわたって有意な相関が見られた。このことから、d-ROM は手術侵襲の大きさを反映していると考えられる。

術式として、鏡視下食道切除と、開胸開腹による食道切除術を比較したが、酸化ストレス（血

		術前加療なし n=8	NACRT n=11	p value
術直後	d-ROM	191.1	235.8	0.138
	BAP	2126.4	2120.7	0.965
	BAP/d-ROM	12.0	9.4	0.144
	AT-3	62.9	65.6	0.801
	Platelets	15.3	14.7	0.786
	TP	4.28	4.29	0.943
	Alb	2.59	2.61	0.847
POD 1	d-ROM	228.6	281.0	0.159
	BAP	2238.6	2172.7	0.588
	BAP/d-ROM	10.5	8.0	0.024
	Lym	727.9	467.7	0.04
	Platelets	16.9	16.7	0.958
	TP	4.76	4.89	0.509
	Alb	2.74	2.870	0.412
	CRP	7.3	7.3	0.992

表 2 -1 食道切除 CRT の有無での比較

中 d-ROM・BAP) 測定値は有意差はなかった。このことから、胸腔鏡および開胸手術にける侵襲には差が少ないことが考えられる。更に、術前化学放射線療法症例では、術後の抗酸化力 (BAP) の低下が確認された。NACRT では抗酸化力が消耗するといえる。一方で、術後重篤合併症発症の有無での、酸化ストレスや抗酸化力値の差はなかった。このことより、術後合併症の予測は単純ではない事が推察される。

		術前加療なし n=8	NACRT n=11	p value
POD 3	d-ROM	322.1	336.7	0.701
	BAP	2331.5	2226.4	0.404
	BAP/d-ROM	7.63	6.88	0.387
	Lym	1080.4	568.0	0.072
	Platelets	16.16	16.77	0.792
	TP	5.513	5.280	0.403
	Alb	2.950	2.845	0.484
	CRP	4.178	4.626	0.759
POD 7	d-ROM	340.1	344.8	0.887
	BAP	2412.9	2191.9	0.031
	BAP/d-ROM	7.354	6.572	0.267
	Lym	1386.0	574.0	0.02
	Platelets	20.91	18.64	0.436
	TP	5.56	5.29	0.228
Alb	2.88	2.70	0.197	
CRP	5.57	8.06	0.334	

表 2 -2 食道切除 CRT の有無での比較

#### < 引用文献 >

Res. Chem. Intermed. 23:253-267,2000  
 Macromolecules, 36: 736, 2003  
 Res. Chem. Intermed., 30:615,2004  
 Res. Chem. Intermed., 26, 253,2000

#### 5 . 主な発表論文等

#### [雑誌論文] (計 3 件)

Omoto I, Matsumoto M, Uchikado Y, Kita Y, Sakurai T, Sasaki K, Setoyama T, Okumura H, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S.  
 Immunohistochemical evidence of association between ghrelin expression and tumor growth in esophageal carcinoma. Anticancer Res. 査読有, 2014 Jun;34:2727-33.  
Okumura H, Uchikado Y, Omoto I, Kita Y, Sasaki K, Arigami T, Uenosono Y, Matsushita D, Hiraki Y, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S. The usefulness of neoadjuvant chemoradiation therapy for locally advanced esophageal cancer with multiple lymph-node metastases. Ann Surg Oncol. 査読有, 2014 Sep;21:2845-9.  
Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, Ishigami S, Natsugoe S. Biomarkers for predicting the response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemoradiation therapy. Surg Today. 査読有, 2014 Mar;44:421-8.

#### [学会発表] (計 6 件)

Owaki T, Okumura H, Uchikado Y, Sasaki K, Omoto I, Kawasaki Y, Natsugoe S. THE TRANSITION OF THE OXIDATIVE STRESS AFTER THE ESOPHAGECTOMY BY THE RIGHT THORACOTOMY IN THE ESOPHAGEAL CANCER PATIENTS. ISDE 2014. Vancouver, CANADA. 22nd September, 2014.  
奥村浩, 川崎洋太, 内門泰斗, 尾本至, 大脇哲洋, 喜多芳昭, 佐々木健, 石神純也, 夏越祥次. 食道癌細胞の活性酸素産生能による食道癌術前化学放射線療法の効果予測. 第 68 回日本食道学会学術集会. 東京. 7 月 3 日, 2014 .  
大脇哲洋, 尾本至, 奥村浩, 内門泰斗, 喜多芳昭, 恵浩一, 松本正隆, 佐々木健, 石神純也, 上野真一, 川崎洋太, 夏越祥次. 酸化ストレス測定による食道癌手術侵襲の評価. 第 115 回 日本外科学会定期学術集会. 名古屋市, 4 月 17 日, 2015 .  
奥村浩, 石神純也, 大脇哲洋, 内門泰斗, 尾本至, 喜多芳昭, 佐々木健, 有上貴明, 上之園芳一, 夏越祥次. 食道・胃接合部癌に対する治療戦略 食道胃接合部癌に対する治療戦



略．第 69 回日本消化器外科学会総会．郡山市．7 月 17 日，2014．

奥村浩，内門泰斗，尾本至，喜多芳昭，佐々木健，上之園芳一，有上貴明，大脇哲洋，盛慎一郎，柳政行，石神純也，夏越祥次．多発リンパ節転移を伴う食道癌に対する術前化学放射線療法．第 76 回日本臨床外科学会総会．郡山市，11 月 21 日，2014．

川崎洋太，有上貴明，上之園芳一，石神純也，大脇哲洋，上野真一，夏越祥次 酸化ストレス度で評価した胃切除術の手術侵襲度について．第 25 回日本内視鏡外科学会総会．横浜市，12 月 6 日，2012．

[研究組織]

(1) 研究代表者

大脇 哲洋 (OWAKI, Tetsuhiro)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 50322318

(2) 研究分担者

根路銘 安仁 (Nerome, Yasuhito)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号 00457657  
奥村 浩 (OKUMURA, Hiroshi)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号 10398282  
上野 真一 (UENO, Shinichi)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号 40322317  
夏越 祥次 (NATSUGOE Shoji)  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 70237577