原 著

正常肝組織の局所加温による変化に関する研究 第2報：家兎正常肝の局所加温による病理組織学的変化について

芥田敬三 徐 志 堅 平岡真寛 西村恭昌

永田 靖 高橋正治 阿部光幸

京都大学医学部放射線医学教室

Histological Changes of the Normal Liver by Local Hyperthermia
Part 2 : Histopathological Changes of the Rabbit Liver by Local Hyperthermia.

Keizo Akuta, Shiken Jo, Masahiro Hiraoka, Yasumasa Nishimura

Yasushi Nagata, Masaji Takahashi, and Mitsuyuki Abe

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University.

Summary

Histopathological changes of the normal liver by local hyperthermia were studied in rabbits. Hyperthermia was administered by an RF current heating device with needle type applicators. Rabbits were allocated into 3 heated groups according to the treatment temperature and one control group. At laparotomy the left medial lobe of the liver was heated for 30 min at 38–39, 40–41 and 42–43 °C respectively. The livers were excised for the histopathological examination 1, 3, 7, 30, 90, and 180 days after the treatment. Irreversible changes did not occur after heating at lower than 41 °C. Extensive necrosis developed 1–7 days after heating at 42–43 °C and the necrotic area was gradually absorbed and replaced by fibrosis 30–180 days after heating.

These results indicate that the effect of local hyperthermia on the normal rabbit liver depends on temperatures and the irreversible change seems to occur when the liver is heated at higher than 42–43 °C.

Key Words :

正常肝組織 : normal liver tissue

家兎肝 : rabbit liver

病理組織学的変化 : histopathological changes

局所加温 : local hyperthermia

I. 緒 言

肝腫瘍に対する局所温熱療法の臨床応用を進める上で、正常肝の耐容温度および温熱による障害に関する基礎的研究は不可欠である。しかし局所

加温による肝の変化の実験的検討は皮膚や四肢などに比べて正確な加温が容易でないため、これまでほとんどなされていなかった。そこで、我々は家兎肝の一部を均一かつ正確に加温することの可

能な加温装置を開発し、第1報において報告した¹⁾。今回これを用いて家兎肝の局所加温実験を行い、正常肝の温熱による病理組織学的変化を検討したので報告する。

II. 材料, 方法

(1)動物および加温方法

体重 2.0 ~ 3.0 kg の家兎 (日本白色種) をネンブタール[®] 静注 (20 mg/kg) による全身麻酔下に左肋骨弓下を開腹した。次いで肝内側左葉の端の部分を外に引き出し、我々の開発した針型アプリータを肝前面より刺入固定し、8 MHz RF 加温装置に接続した (Fig. 1)。

加温は 1.3 ~ 1.5 W のパワーで開始し 3 ~ 4 分で設定温度に到達した後は 0.6 ~ 0.8 W のパワーで設定温度を維持した。温度制御はアプリータ中心部より刺入した熱電対温度計を用いて on-off 自動制御により行った。

装置の性能については第1報で詳述しているが、アプリータの針で囲まれた 20 × 15 mm の範囲のうち中央部の約 10 × 10 mm が設定温度を最高に 1°C 以内に精度良く加温可能である。

加温後はアプリータを抜去し針刺入部の止血を確認の後、閉腹し感染予防のために抗生物質を筋注した。処置後 1 ~ 180 日の予定の経過観察期間中に死亡した家兎はなかった。

Fig. 1-a. 用いた針型アプリータ。5 mm 間隔で 5 本ずつの針を 1.5 cm 間隔で対向させている。

Fig. 1-b. 家兎の肝左内側葉にアプリータを刺入したところ。中央部の穴より温度制御用の熱電対温度計を刺入している。

(2)処置条件

加温温度による差を明らかにするために、アプリータ中心部での設定温度が 39, 41, 43 °C と異なる 3 群を設けた。上述のような設定温度を最高とする温度分布が得られるので、以下それぞれ 38 ~ 39 °C, 40 ~ 41 °C, 42 ~ 43 °C 加温群と表記する。各群にはそれぞれ 18 羽を用いた。加温時間は各群とも 30 分間と一定にした。また、アプリータ刺入の影響をみるために、対照群 6 羽に対して開腹してアプリータの装着のみを 30 分

間行った。

(3)組織標本の作成

加温群は処置後 1, 3, 7, 30, 90, 180 日後に各々 3 羽ずつ肝左葉の加温部位を摘出した。対照群は 1, 3 日後に各 2 羽, 7, 30 日後に 1 羽ずつ肝を摘出した (Table 1)。

摘出した肝は肉眼的所見の観察の後、10 % ホルマリン液にて固定した。その後、針の刺入方向に垂直な面で肝をスライスし、ヘマトオキシリン・エオジン染色を施した。

Table 1 処置条件と組織変化の観察時期。60 羽の家兎を対照群と 3 つの温度の加温群に分けた。() 内の数字は各時点で肝の変化を観察した家兎の数を示している。

Treatment	Days after treatment						No. of rabbit
	1	3	7	30	90	180	
control	(2)	(2)	(1)	(1)			6
38-39°C	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	18
40-41°C	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	18
42-43°C	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	(3)	18
Total							60

(4)組織学的変化の検討

加温によって生じた肝の病理組織学的変化を加温温度による違いと処置後の時間経過による変化を重点に光学顕微鏡下で観察した。また対照群ではアプリケータ刺入による影響の有無を検討した。

肝の温熱による変化のうち壊死と線維化は組織学的に判別しやすく、弱拡大でその面積も測定可能であるため、設定温度より1°C以内の加温域(10 × 10 mm)に占める壊死および線維化の面積の割合を算出した。

Ⅲ. 結 果

(1)アプリケータ刺入による影響

加温を行わなかった対照群の組織学的変化はきわめて軽微であった。1日および3日後では針と温度計の刺入部に限局した肝組織の破壊と軽度の出血が認められ、その周囲に軽度の炎症細胞浸潤を伴っていた。出血および炎症所見はともに7日目になると軽減し、30日には消失し刺入部に限局した瘢痕様の線維化をわずかに認めるのみとなった。

(2)各温度処置による変化

a. 38 ~ 39 °C 加温群

38 ~ 39 °Cでの変化はわずかで、針と温度計の刺入による機械的損傷にもとづく変化に限られ、その程度も対照群と比較して差異は認められなかった。特に30日以降では肉眼的に加温部位を確認することが困難な程で、アプリケータと温度計の刺入部のわずかな線維化が見られるのみであった。すなわち39 °C以下の加温では肝組織にはほとんど温熱によると思われる変化は認められなかった。

b. 40 ~ 41 °C 加温群

40 ~ 41 °Cでは加温後1~3日に対照群および38 ~ 39 °C群で見られた加温手技による軽度の変化に加えて、アプリケータ中央部に小範囲の肝細胞の壊死を認めた。しかし、肝小葉の構造の著明な破壊や脈管系の変化は見られなかった。7日目になるとすでに生じた壊死は吸収され始

め、その辺縁部に極く軽度の線維化が現れた。30日以降では壊死巣はほとんど吸収され、一部の家兎で中心部に小範囲の線維化が残るのみとなった。

c. 42 ~ 43 °C 加温群

41 °C以下に比べて42 ~ 43 °C加温群の変化は顕著であった。加温翌日より42 ~ 43 °Cに加温されたほぼ全域が著明な壊死に陥った(Fig. 2)。すなわち肝細胞の核は縮小し濃染されたり、膨化し融解をおこし、細胞質も破壊されたり膨化しエオジン染色性の高い均一な構造に変化した。肝細胞の索状構造も乱れsinusoidも不整となりその内部に強い出血およびうっ血が認められた。また中心静脈の血管壁の破壊も高頻度に伴っていた。炎症細胞浸潤も強く、特に壊死巣全体を取り囲むように正常肝との境界部に著明な細胞浸潤が認められた。

加温後3日の変化は翌日の変化と大差なかったが、7日目には異物巨細胞の貪食等による壊死巣の吸収が既におこり始め、炎症細胞浸潤の強い部分では周囲より線維化が生じ始めていた。

加温後30日には壊死巣の吸収が進み、壊死の周囲よりの線維化も進行し大きな面積を占めるようになった(Fig. 3)。この時期では壊死巣の辺縁部に巨細胞が多数認められた(Fig. 4)。さらに90日、180日になると壊死巣はほぼ完全に吸収され線維化に置き換わった。線維化の面積は瘢痕状の収縮と周囲よりの肝の再生のため30日後に比べてやや減少した。

(3)壊死および線維化の経時的变化

以上のまとめとして、温熱により生じる重要な変化と思われる壊死と線維化について、加温後の時間経過に伴うその程度の変化を各加温群ごとに示したものがFig. 5である。ここでは相互比較が可能なようにそれぞれの変化の程度を1°C以内の加温領域に占める変化の生じた面積の割合によって、60%以上を(++)、60%未満30%以上を(+)、30%未満を(+), 変化の認められない場合を(-)としてグレード分けし図示した。

図からわかるように、肝の局所加温によって生

ずる壊死，線維化とともにその程度は加温温度に大きく依存する．38 ～ 39 °C では変化はほとんど認められなかったのに対して 42 ～ 43 °C では

加温直後より肝細胞の広範な壊死が生じ，次第に吸収され 30 日以降には線維に置き換わっていく一連の不可逆的变化が認められた．

Fig. 2 42 ～ 43 °C の加温後 1 日目の組織像 (×50)．肝細胞は壊死に陥り，小葉の構造は乱れ，中心静脈の壁も破壊されている．

Fig. 3 42 ～ 43 °C の加温後 30 日に見られた著明な線維化 (×50)

Fig. 4 42 ~ 43 °C の加温後 30 日に壊死巣の辺縁に認められた巨細胞 (×50)

Fig. 5 壊死と線維化の加温後の時間経過に伴う変化。各時点で3羽ずつの変化を観察し、それぞれの変化の程度を●で示している。

IV. 考 察

温熱の正常組織に対する影響については、加温の容易な皮膚ではマウスの耳介²⁾や下肢³⁾を用いてすでに詳細な実験的検討がなされている。しかし、加温装置の体表面冷却機構の改良によって、臨床的には皮膚の温熱による障害はあまり問題にならなくなってきている。一方、局所加温装置の進歩によって、最近深部臓器癌に対する局所温熱療法の臨床応用が急速に普及してきたが、温熱の深部臓器に及ぼす影響に関する基礎的検討は、温水浴で容易に加温のできる小腸⁴⁾等を除いてはほとんど行われていないのが現状である。

肝における温熱の影響については、淋菌感染症等に対する治療として全身加温を試み死亡した症例や鉱山作業による熱中症患者を対象に高体温時の肝の変化を剖検や生検で臨床的に観察した報告⁵⁾⁶⁾はある。またラットや犬の全肝を血液灌流により加温した際の肝の変化に関する報告⁷⁾⁸⁾もある。しかしともに全身温や灌流の影響が無視できず、局所の温熱そのものによる肝の変化は明らかでない。

そこで、今回我々は独自に開発した加温装置を用いて家兎正常肝の局所加温実験を行いその変化を病理組織的に検討した。その結果、局所加温による肝の変化は加温温度に大きく依存した。特に42～43℃の加温では、直後より広範な壊死が生じやがて吸収され線維化に置き換わるという一連の変化が認められ、局所加温により肝に生ずる不可逆的障害として重要であることが判明した。

実験的加温による正常肝の変化に関する報告はきわめて少なく、本実験以外には Prionas ら¹⁰⁾による犬を使った実験の報告があるくらいである。彼らは開腹下に犬の肝を円盤状の電極で挟み0.5 MHz RF 波で加温を行い、加温後28日目の変化を組織学的に検討している。それによれば、いくつかの組織損傷のパラメーターのうち最も温度と相関が認められたのは肝細胞の損失、限局的な線維化および小葉構造の乱れの3者であり、壊死はしばしば認めたが温度とは関連しなかったと報告されている。これは我々の実験でも、加温後30

日の変化の主体は線維化であり、壊死はかなり吸収されていたので大きな矛盾はない。問題は彼らの検討は加温後28日という1時期のみで経時的変化が観察されていない点にある。我々の結果から明らかなように、壊死と線維化は独立した現象ではなく、壊死から線維化への一連の変化としてとらえるべきであろう。

肝に広範な不可逆的变化を引き起こす温度は今回の家兎による実験では30分間1回の加温で42～43℃であった。皮膚や間葉組織では少くとも44℃1時間以下では不可逆的な壊死は生じない¹¹⁾ので、家兎正常肝の温熱に対する感受性は他の組織に比べて高いものと思われる。

我々の施設では昭和57年よりRF誘電加温装置を用いて肝腫瘍に対する局所温熱療法を臨床的に行っている。その際、行った温度測定の結果では正常肝の温度は腫瘍の近傍を除いて40℃を越えることはなく、平均最高温度は39.3℃であった¹²⁾。これまでに正常肝の過熱に起因すると思われる副作用は認められていないので、ヒトの正常肝においても40℃以下の加温では大きな障害は生じないものと考えられる。今後、加温装置の改良や塞栓療法等の併用療法の進歩によって正常肝はさらに高温に加温されやすくなることが予測され、その際には正常肝に許容される温度が重要な問題となる。動物の種による差、加温域の大きさの違い、1回加温と分割加温の差等を考慮する必要はあるが、ヒトで正常肝の耐容温度を正確に認めるのは困難なので、家兎肝で不可逆的損傷のおこった42～43℃という温度は今後、臨床正常肝の加温限界として考慮すべき重要な指標であると考えられる。

また、今回の実験では加温時間が30分間と一定であったため、今後加温時間を変化させた実験により温度と加温時間との関係を検討していく予定である。

V. まとめ

RF電流加温装置を用いて家兎の正常肝を加温し組織学的変化を検討した。加温は38～39、40

～ 41, 42 ～ 43 °C で 30 分間行った。加温後 1, 3, 7, 30, 90, 180 日目に肝を摘出し H. E. 染色を施し光学顕微鏡下に変化を観察した。

その結果、生じた変化の程度は加温温度に依存した。すなわち、38 ～ 39 °C では著明な変化はなく、40 ～ 41 °C では極く小範囲に壊死が生じたが吸収されて 30 日以降にはほとんど変化は残らなかった。これに対して 42 ～ 43 °C では加温直後より広範な壊死がおこり、次第に吸収され線維化に置き換わり、変化は不可逆的であった。

家兎肝の局所温熱に対する感受性は比較的高く、不可逆的損傷は 42 ～ 43 °C 以上で起るものと考えられ、臨床的に肝の局所温熱療法を施行する上で正常肝の耐容温度として考慮すべきと考えられる。

組織学的変化の検討に貴重なアドバイスをいただきました、国立京都病院病理科の古田睦広先生に感謝いたします。

なお本研究の要旨は第 3 回日本ハイパーサーミア学会において発表した。

また本研究の一部は文部省がん特別研究 I (62010041), 同 II (62015032) および厚生省がん研究助成金 (62-2) の援助を受けた。

文 献

- 1) 芥田敬三, 徐志堅, 平岡真寛, 西村恭昌, 高橋正治, 阿部光幸: 正常肝組織の局所加温による変化に関する研究 第 1 報; 家兎肝加温を目的とした RF 電流加温装置について, 日本ハイパーサーミア誌, 2 : 173 ～ 179, 1986.
- 2) Law, M. P., and Field, S. B.: The response of the mouse ear to heat applied alone or combined with X-rays. *Br. J. Radiol.*, 51 : 132 ～ 138, 1978.
- 3) Urano, M., Rice, L., Kahn, J., and Sedilacek, R. S.: Studies on fractionated hyperthermia in animal systems. 1. The foot reaction after equal doses: heat resistance and repopulation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 6 : 1519-1523, 1980.
- 4) Hume, S. P., Marigold, J. C. L., and Field, S. B.: The effect of local hyperthermia on the small intestine of mouse. *Br. J. Radiol.*, 52: 657-652, 1979.
- 5) Gore, I., and Isaacs, N. H.: The pathology of hyperpyrexia. *Am. J. Pathol.*, 25: 1029 ～ 1060, 1949.
- 6) Kew, M., Bersohn, I., Seftel, H., and Kent, G.: Liver damage in heatstroke. *Am. J. Med.*, 49: 192-202, 1970.
- 7) Miyazaki, M., Makowka, L., Falk, R. E., Falk, W., Venturi, D., Ambus, U., and Falk, J. A.: Hyperthermochemotherapeutic in vivo isolated perfusion of the rat liver. *Cancer*, 51: 1254-1260, 1983.
- 8) Reed, W. A., Manning, R. T., and Hopkins, L. T.: Effect of hypoxia and hyperthermia on hepatic tissue of the dog. *Am. J. Physiol.* 206: 1304-1308, 1964.
- 9) Skibba, J. L., and Condon, R. E.: Hyperthermic isolation-perfusion in vivo of the canine liver. *Cancer*, 51: 1303-1309, 1983.
- 10) Prionas, S. D., Jayler, M. A., Fajardo, L. F., Kelly, N. L., Nelson, T. S. and Hahn, G. M.: Thermal sensitivity to single and double heat treatment in normal canine liver. *Cancer Res.*, 45: 4791-4797, 1985.
- 11) Fajardo, L. F.: Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Res.* 44: 4826s-4835s, 1984.
- 12) 永田靖, 平岡真寛, 芥田敬三, 徐志堅, 西村恭昌, 高橋正治, 阿部光幸, 福田善弘, 井村裕夫, 森敬一郎, 山岡義生, 小沢和恵, 園山輝久: 肝腫瘍に対する温熱療法—その温度測定を中心に—. 日本ハイパーサーミア誌, 3 : 183-191, 1987.