

## 原 著

## 頭頸部癌における酸化ストレスの評価

高橋 克昌<sup>1</sup>, 高安 幸弘<sup>1</sup>, 近松 一朗<sup>1</sup>

1 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

## 要 旨

**背景・目的：**生体において酸化と抗酸化のバランスが崩れ、活性酸素が蓄積する状態を酸化ストレスと言う。癌や感染症では、白血球の産生する過剰な活性酸素のために酸化ストレスが蓄積する。癌の治療前後で酸化ストレスの状態を評価し、白血球との関連を検討した。

**対象と方法：**10名の頭頸部癌患者の抗癌剤投与前・後と回復期において、血清中の酸化ストレス(dROM, diacron-Reactive Oxygen Metabolite)と抗酸化力(BAP, biological antioxidant potential)を測定した。10名の中耳炎患者の手術前・後と回復期で同様の測定をし、両者を比較検討した。dROMは活性酸素により酸化された血清のヒドロペルオキシド濃度で、酸化ストレスの指標とした。BAPは血清が還元した3価の鉄イオンを含む呈色液の濃度で、抗酸化力の指標とした。

**結 果：**癌は中耳炎と比較して有意にdROMが高値を示した。BAPは両者に差を認めなかった。治療によって癌ではdROMが変化した。白血球数の減少と一致しなかった。中耳炎ではdROMは一定で、白血球数の増加に伴った変化も認めなかった。

**結 語：**中耳炎の手術前後でdROMが上昇しなかったことから、局所炎症や全身麻酔手術程度では酸化ストレスと抗酸化力のバランスが崩れないと考えた。逆に治療前から高いdROMを示した癌は、常に強い酸化ストレス状態にあると推測された。治療により白血球が減少してもdROMの低下は伴わず、白血球以外で活性酸素を放出すると考えられた。

## 文献情報

## キーワード：

頭頸部癌,  
活性酸素,  
酸化ストレス,  
抗酸化力,  
dROM

## 投稿履歴：

受付 平成28年2月22日  
修正 平成28年3月9日  
採択 平成28年3月10日

## 論文別刷請求先：

高橋克昌  
〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22  
群馬大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科・頭  
頸部外科学  
電話：027-220-8358  
E-mail: takamasa@gunma-u.ac.jp

## 緒言

生体に取り込まれた酸素は、ミトコンドリア電子伝達系においてATP(アデノシン三リン酸)を産生する目的で使われるが、やがて還元されて水や水酸化物に変化する。しかし数%の酸素は還元されない中間体、すなわち不安定な活性酸素となって組織障害を起こすことが知られている。酸素を利用する好氣的生物にとっては、活性酸素の解毒消去は不可欠で、通常は、血清タンパクの持つ抗酸化力やSOD(スーパーオキシドディスムターゼ)などの活性酸素消去酵素の働きで、水へと還元される。しかし活性酸素の過剰な生成や、不適切な場所での停滞が原因で、生体の酸化と抗酸化のバランスが崩れ、活性酸素が蓄積する酸化ストレスの状態に陥ることがある。酸化ストレスの原因として、癌や感染症、生活習慣病である動脈硬化などが報告されている。<sup>1-6</sup>

癌や各種炎症における活性酸素の主な発生源は、白血球とくに好中球をはじめとする食細胞で、刺激により細胞膜に存在するNADPH oxidaseが活性化されると、爆発的に活性酸素が生成されて殺菌作用や抗腫瘍効果を発揮する。<sup>7</sup>細菌を活性酸素で殺菌するため、感染時に好中球が誘導されることは理にかなっている。同様に癌においても白血球が増加することは知られているが、抗癌剤治療では副作用として白血球が減少するため、活性酸素を介した抗腫瘍効

果には不利な状況である。癌治療に活性酸素が果たす役割についての研究は少なく、いまだ解明されていない。

本研究では、頭頸部癌患者の血清中の酸化ストレスを評価し、抗癌剤治療前後の白血球数変動により、酸化ストレスが変化するかを調べた。

## 方法

対象は、stage III以上の頭頸部癌で、抗癌剤投与の目的に群馬大学医学部附属病院に入院し、説明と同意を得て採血に協力した10名(男8名、女2名、平均67.8歳)とした。BMI (Body Mass Index) 30以上の高度肥満、糖尿病、高脂血症、狭心症や脳梗塞など血管イベントの既往がある症例は除外した。また中耳炎の手術目的に入院し、前記の既往を除外し同意を得た10名(男6名、女4名、平均56.8歳)も比較対象とした。

治療前・後、回復期の3条件を調べるため、癌患者では抗癌剤投与前、投与後7日目、14日目に採血し、中耳炎患者では手術前、手術後7日目、14日目に採血を行った。全血0.5mlから遠心分離で血清を分離し、以下の検査に使用した。

専用機器のFRAS (Free Radical Analysis System, ウィスマー社)を用いて、酸化ストレスはdROM (diacron-Reactive Oxygen Metabolite)で、抗酸化力はBAP (biological antioxidant potential)で測定した。

dROMは、活性酸素によって血清タンパクが酸化されて生じたヒドロペルオキシド (ROOH)濃度を、呈色反応で計測するものである。血清を酸性緩衝液で希釈すると、酸化ストレスで生じたROOHが分解され、ROO<sup>-</sup>が産生される。これに無色の呈色液クロモゲン (芳香族アミンN, N-ジエチルパラフェニレンジアミン)を加えると、呈色液が酸化されて有色(紫)のラジカル陽イオンになる。光度計を備えた専用機器で505nmの吸光度の変化量を測定し、標準曲線と比較することで血清のROOH濃度が計測される。単位はCARR-Uが用いられ、1CARR-Uは過酸化水素水0.08mg/mlの持つ酸化力に相当する。約5,000人の健康成人におけるdROMは正規分布し、正常が200-300CARR-Uの範囲と分かっている。<sup>8,9</sup>健康日本人男子の平均値は285CARR-U、女子は284CARR-Uと報告され、340-400は中等度の酸化ストレス、400-500は強度の酸化ストレス、500以上はかなり高度の酸化ストレスを意味している。<sup>10</sup>

BAPは、血清タンパクが持つ活性酸素に抗する還元力を計測するものである。血清を有色(赤茶)の3価の鉄イオンを含む呈色液(チオシアン酸塩)と混ぜると、呈色液が還元されて無色透明な2価の鉄イオンに変わる反応を、505nmの吸光度の変化量で測定することで、血清が還元した鉄イオンの量を推測し、抗酸化力の指標とする。単位は $\mu\text{Eq/L}$ が用いられる。健康日本人男子の平均値は $2,124\mu\text{Eq/L}$ 、女子は $2,151\mu\text{Eq/L}$ で、1,800以下では抗酸化力がやや弱く、1,600以下ではかなり弱いことを意味している。<sup>10</sup>

dROMの正常値とBAPの正常値とを除いて算出される比が1.0になるような係数を算出すると、係数=7.54だった。<sup>10</sup>いわゆる修正比(BAP/dROM/係数)を個々の症例で算出した。1.0が正常でそれ以下は、酸化ストレスが強く抗酸化力が弱い生体にとって望ましくない状態を意味している。

治療前・後、回復期におけるdROMと白血球の変化にはKruskal-Wallis検定を、癌と中耳炎の比較にはMann-Whitney検定を行い、解析ソフトはSPSS statistics ver.22 (IBM社)を使用した。p値が0.05未満を有意差ありと判定した。

なお、本研究は群馬大学医学部臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った(番号15-105)。

## 結果

癌では抗癌剤治療に伴いdROMが変化するが、症例により増減は様々で、治療前、治療後、回復期の比較で差がなかった( $p=0.790$ , 図1上)。治療に伴って減少する症例、増加する症例、一定の症例に分けて検討したが、臨床的な特徴は見い出せなかった。多くの症例で治療前から高値(400

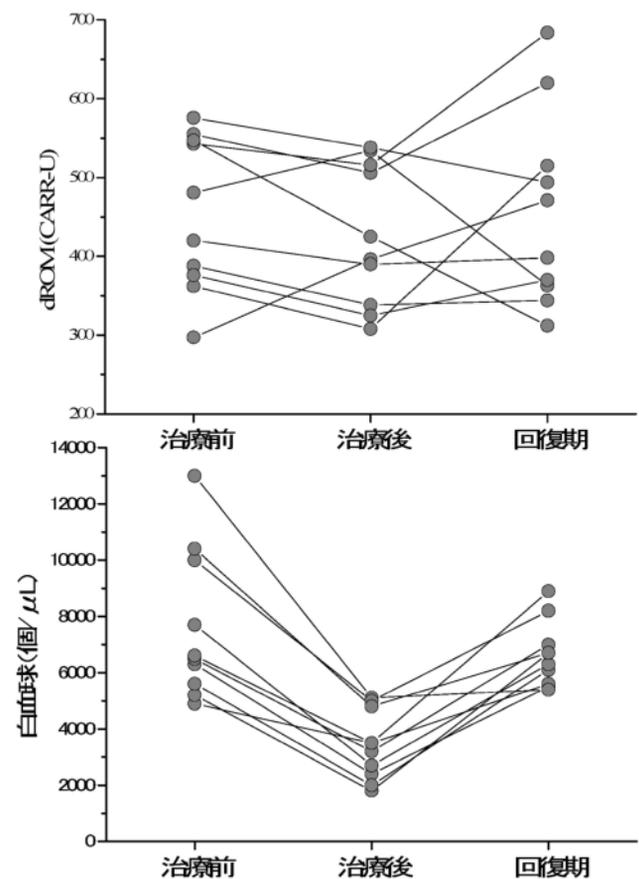


図1 癌における治療によるdROMの変化  
上: dROMの変化。治療によって値は変化するが、症例によってばらつきが大きく、治療前後で有意差はなかった( $p=0.790$ )。  
下: 白血球の変化。抗癌剤によって白血球は減少し、2週間後には回復した(有意差あり,  $p<0.001$ )。

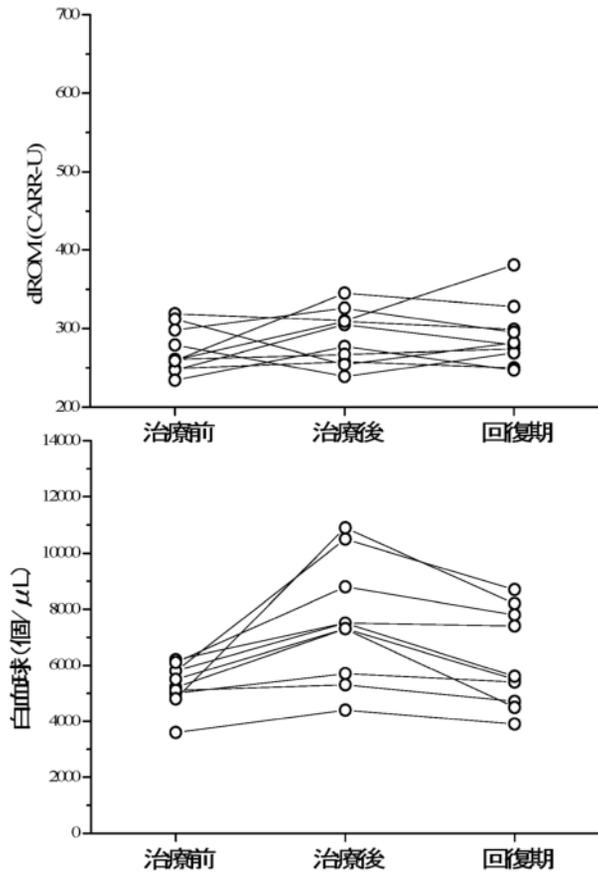


図2 中耳炎における治療によるdROMの変化  
 上: dROMの変化. 治療による変化は少なく, 有意差もなかった ( $p=0.468$ ).  
 下: 白血球の変化. 手術後は白血球が増加し, 2週間後には回復する傾向にあったが, 有意差はなかった ( $p=0.054$ ).

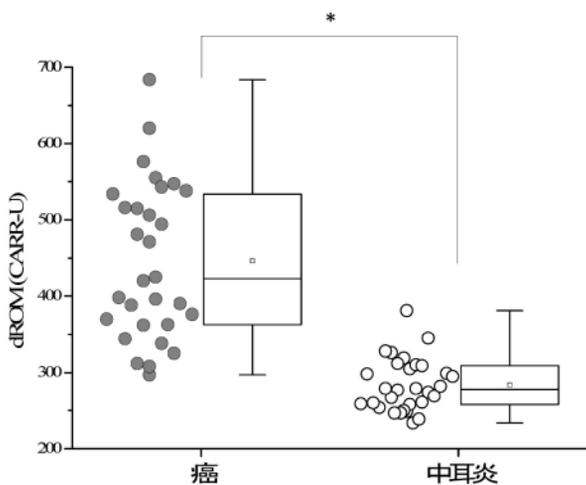


図3 癌と中耳炎におけるdROMの比較  
 癌(黒丸)は中耳炎(白丸)と比較して有意に高値で ( $p < 0.001$ ), 強い酸化ストレス状態にあった. 箱ひげ図のひげは最大値と最小値, 箱は25から75%分布を表し, 横線は中央値, 四角は平均値を示す.

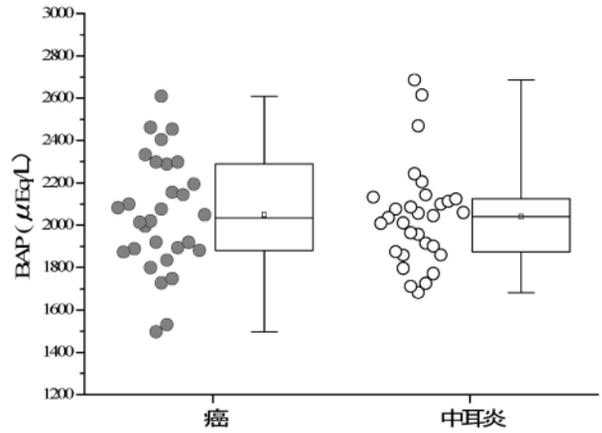


図4 癌と中耳炎におけるBAPの比較  
 癌(黒丸)は中耳炎(白丸)と比較して違いがなく ( $p=0.752$ ), 抗酸化力は両者に違いがなかった. 箱ひげ図は図3と同様である.

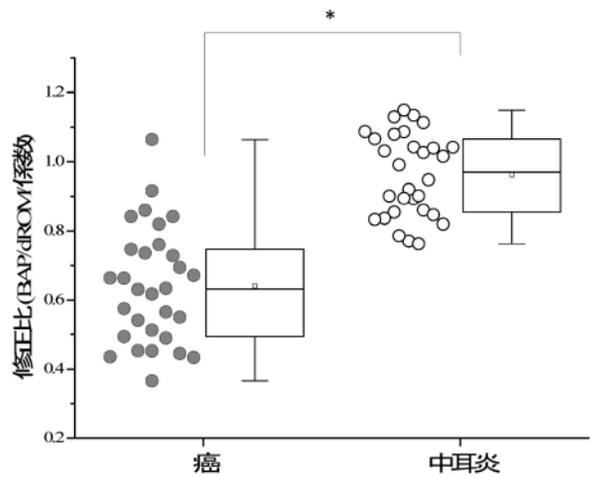


図5 癌と中耳炎における修正比の比較  
 癌(黒丸)は正常値1.0よりかなり低く, 中耳炎(白丸)は正常値に近かった. 両者の分布には有意差があった ( $p < 0.001$ ). 箱ひげ図は図3と同様である.

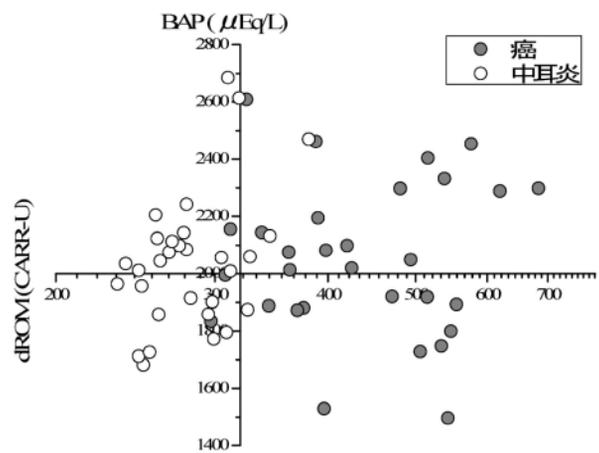


図6 dROMとBAPの分布  
 横軸にdROM, 縦軸にBAPのプロット図で, 軸の交点は健常者における正常値を示す. dROMが低くBAPが高い(弱い酸化ストレスと強い抗酸化力)状態(図の左上)が望ましい. 中耳炎(白丸)では酸化ストレスは弱い, 抗酸化力は症例によって様々だった. 癌(黒丸)では多くが強い酸化ストレス状態にあった.

CARR-U 以上) を呈し、治療後も正常値 (300 CARR-U) まで低下した症例はなかった。抗癌剤投与による予期された副作用で治療後は白血球が有意に減少し、2 週間後の回復期には再び増加に転じた ( $p < 0.001$ , 図 1 下)。

中耳炎では治療に伴う dROM の変化は僅かで、治療前、治療後、回復期の比較で有意差はなかった ( $p = 0.468$ , 図 2 上)。多くの症例が治療前から正常値 (300 CARR-U 以下) であった。治療 (手術) 後に白血球は増加し、回復期には再び低下する傾向にあったが有意差はなかった ( $p = 0.054$ , 図 2 下)。同様に BAP も治療中 3 回の測定に有意な変化は認められなかった (Data not shown)。

治療による dROM 変化がなかったことから、治療前・後、回復期の 3 回の測定結果を統合し、10 症例 30 回の測定結果を癌と中耳炎の疾患別で比較した。癌における dROM の平均は 450 CARR-U、中耳炎では 290 CAR-U で両者は統計学的な有意差があった ( $p < 0.001$ , 図 3)。癌における BAP の平均は  $2,100 \mu\text{Eq/L}$ 、中耳炎では  $2,150 \mu\text{Eq/L}$  で両者には差がなかった ( $p = 0.752$ , 図 4)。癌における修正比の平均は 0.65 と低く、中耳炎では 0.95 で健常者の 1 に近かった (図 5)。両者の分布には有意差があった ( $p < 0.001$ )。横軸に dROM を縦軸に BAP を取り、軸の交点をそれぞれの正常値としてプロットすると、癌は右側の酸化ストレスが強い面に、中耳炎は左側の酸化ストレスの弱い面に分布した (図 6)。

## 考察

dROM の値は、被検者の健康状態に変化がなければ 1 日や 1 週間で変動しない。<sup>8</sup> また大規模スクリーニングの結果、性別による値の差が無く、年齢による差も僅かであった。<sup>10</sup> 今回の症例では、癌と中耳炎とで男女比や年齢分布に違いを認めるが、疾患の性質上、頭頸部癌は飲酒と喫煙の影響から男性に多く、かつ中耳炎よりも高齢者に多く発症するためである。しかし、年齢や性別に左右されないはずの dROM が、癌では中耳炎に比べて明らかに高値であった (図 1-3)。癌では強い酸化ストレス負荷がかかっていると推測される。

活性酸素は主に白血球で産生されるため、治療 (抗癌剤投与) によって白血球が減少すると、dROM も低下すると予測したが、両者の増減は一致しなかった (図 1)。癌における酸化ストレスの原因は、誘導された白血球が産生する活性酸素ではないと推測される。今回の研究では、癌細胞自体が活性酸素を出すのか、周囲の何らかの細胞を出すのかは明らかでない。癌としての組織は癌細胞で均一ではなく、新生血管、結合組織や集められた炎症細胞 (白血球) など多くの構造で成り立ち、サイトカインを分泌して周囲の細胞を刺激し続けている。個々の細胞の振る舞いではなく、癌全体として酸化ストレスが増した状態が作り出されていると推測される。

中耳炎では全身麻酔前後でも dROM は一定で (図 2-3)、手術による酸化ストレスは、体内に癌が存在する状態と比較すると軽微であることが分かった。

抗酸化力は症例によって BAP の変化が大きく、疾患とは関係がないと思われた (図 6)。抗酸化力は日内変動も大きく、食事の影響を強く受け、ポリフェノールなどの抗酸化物質を摂取すると上がることが分かっている。<sup>10</sup> 癌患者の状態把握には、有用ではなかった。

修正比は癌と中耳炎とで有意差を認めたが、BAP で差がなかった分、dROM の差をそのまま反映していると思われた (図 3-5)。中耳炎では正常の 1.0 に近いことから、癌での異常値は強い酸化ストレスを意味していた (図 5)。

癌では dROM が有意に上昇し、強い酸化ストレスにあることが今回の結果で分かった。今後は、治療に伴う癌の縮小で dROM は減少するのか、また再発によって再び増加するのか、経時的な変化を調べることが重要である。癌の病勢と dROM とが相関すれば、治療効果判定や再発の早期発見に有用と期待される。

## 利益相反の開示

著者らは申告すべき利益相反を有しない。

## 引用文献

- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 570-582.
- Sakane N, Fujiwara S, Sano Y, et al. Oxidative stress, inflammation, and atherosclerotic changes in retinal arteries in the Japanese population; results from the Mima study. *Endocr J* 2008; 55: 485-488.
- Bloom HL, Shukrullah I, Veledar E, et al. Statins decrease oxidative stress and ICD therapies. *Cardiol Res Pract* 2010; 2010: 253803.
- 齋藤 美, 原澤 信, 山田 浩ら. 透析患者におけるキセノン光治療の効果と酸化ストレス抑制効果の検討. *日大医学雑誌* 2013; 72: 225-231.
- Hirata Y, Yamamoto E, Tokitsu T, et al. The pivotal role of a novel biomarker of reactive oxygen species in chronic kidney disease. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94: e1040.
- Hirata Y, Yamamoto E, Tokitsu T, et al. Reactive oxygen metabolites are closely associated with the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *J Am Heart Assoc* 2015; 4.
- 吉川 敏. 最終講義 フリーラジカルの医学. *京都府立医科大学雑誌* 2011; 120: 381-390.
- 関 泰. 【酸化ストレス】 d-ROMS テストによる酸化ストレス総合評価. *生物試料分析* 2009; 32: 301-306.
- Cesarone MR, Belcaro G, Carratelli M, et al. A simple test to monitor oxidative stress. *Int Angiol* 1999; 18: 127-130.
- 永田 勝, 長谷川拓, 広門 靖ら. 生活習慣病と心身医学生活習慣病と酸化ストレス防御系. *心身医学* 2008; 48: 177-183.

---

# Evaluation of Oxidative Stress in Head and Neck Carcinoma

Katsumasa Takahashi<sup>1</sup>, Yukihiro Takayasu<sup>1</sup> and Kazuaki Chikamatsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

---

## Abstract

**Background and Aim:** Oxidative stress is an imbalance between the production and the elimination of oxidant species. In cancer and infection, white blood cells overproduce reactive oxygen species, causing the oxidative stress. In the present study, we evaluated the oxidative stress in patients with cancer, and compared the relationship between the oxidative stress and the number of white blood cells (WBC).

**Subjects and Methods:** The subjects were head and neck carcinoma patients (HNC) who were treated by chemotherapy (n=10), and blood tests were achieved before and after treatment. Otitis media patients (OM) who had surgery were also applied (n=10). The diacron-reactive oxygen metabolite (dROM), which indicated the concentration of hydroperoxides in serum, was measured as an index of oxidative stress. The biological antioxidant potential (BAP), which indicated the concentration of deoxidized iron ion in serum, was also measured as an index of anti-oxidative status.

**Results:** The dROM was significantly high in HNC, although dROM in OM was normal. There was no difference in BAP between HNC and OM. In HNC, WBC decreased significantly after chemotherapy, but changes in dROM did not show a particular trend. There was no relationship between them. In OM, WBC tended to increase after surgery, but dROM did not change.

**Conclusions:** The dROM did not increase after OM surgery, meaning that general anesthesia and surgery did not change the balance of oxidative stress and antioxidant potential. In HNC, a strong oxidative stress was present, as dROM was very high even before treatment. The dROM stayed high, whereas WBC decreased after chemotherapy. Reactive oxygen species in HNC patients might not be produced by WBC.

---

---

## Key words:

head and neck carcinoma,  
reactive oxygen species,  
oxidative stress,  
antioxidant potential,  
dROM

---