

学位申請論文

In vitroにおける加温蒸留水の殺腫瘍効果

獨協医科大学 整形外科学

本田 俊夫

要旨 骨軟部腫瘍において、悪性腫瘍及び良悪性境界型腫瘍の辺縁切除術、骨内良性腫瘍の骨内掃爬術では腫瘍の完全な摘出が困難な症例があり、残存した微量な腫瘍細胞が再発を引き起こすことがある。一方、胸腔や腹腔内腫瘍の外科手術の症例では、蒸留水が局所再発を防ぐ目的で使用された報告がある。こうした背景から、過去に当科では室温での蒸留水の殺腫瘍効果を骨軟部腫瘍の手術に応用する検討を行ったが、臨床応用可能な程度の殺腫瘍効果を得ることができなかった。今回、蒸留水を加温することで、蒸留水の殺細胞効果に、温熱による殺細胞効果 (hyperthermia) を加え、その殺腫瘍細胞効果を増強させ、併せてその温熱による殺細胞効果による正常細胞の生存抑制を最小限にするための至適条件を検討した。方法として、手術中に採取した腫瘍組織と正常組織を、46℃と48℃に加温した蒸留水に浸水させ、浸水の時間条件を変えて、殺細胞効果を検討した。その結果、46℃10分間あるいは48℃5分間の加温により、十分な殺腫瘍細胞効果を得、且つ正常細胞の生存抑制を最小限に抑えることが可能であった。臨床においても、手術時間の制約も含め、上記条件は十分応用可能な条件であると推察された。

Key Words : 蒸留水 (distilled water), 殺細胞効果 (hyperthermia)

緒言

骨軟部腫瘍の手術において、十分な切除縁 (5 cm 以上) を確保できない悪性腫瘍及び良悪性境界型腫瘍の辺縁切除術や骨内良性腫瘍骨の掃爬術後において、腫瘍組織の完全摘出が不可能な症例が存在する。残存した腫瘍細胞が局所再発の一因と考えられる。一方、胸腔や腹腔の外科手術においては、蒸留水の特長である低浸透圧と弱酸性を利用して、術野に残存した微量な腫瘍組織を破壊滅滅させ、手術成績を向上させるとの報告がある¹⁾。また、古瀬ら²⁾ は、ラットを用いた実験でシスプラチンと蒸留水の併用による脊椎悪性腫瘍に対する洗浄療法を行い、殺細胞効果があったと報告している。

こうした報告より、前回、良悪性境界型腫瘍の辺縁切除術、骨内良性腫瘍骨の掃爬術等の骨軟部腫瘍の外科的治療に用いるべく、骨軟部腫瘍における蒸留水の殺腫瘍細胞効果を検討したが、室温での蒸留水の使用は、腫瘍細胞に対して生理食塩水よりは殺腫瘍細胞効果があるも

の、臨床応用可能な程度の殺腫瘍細胞効果を得ることはできなかった^{3,4)}。

一方、外科領域において、悪性腫瘍に対する温熱療法の効果が報告され、殺腫瘍細胞効果は広く認められている^{5~7)}。そこで今回は、蒸留水の殺細胞効果に、蒸留水を加温し温熱による殺細胞効果 (hyperthermia) を加えることにより、その殺腫瘍細胞効果を増強させようかを手術中に採取した腫瘍組織を用いて検討した。さらに同時に採取した正常組織を用い、その生存抑制を最小限にするための至適条件を検討した。

方 法

書面によるインフォームドコンセントを得た後に、検体として、腫瘍組織は、過去7年間に当科で手術し、組織を採取した腫瘍18例 (骨肉腫; 3例, 脂肪腫; 4例, fibrous dysplasia; 2例, 神経鞘腫; 3例, 巨細胞腫; 1例, 脂肪肉腫; 1例, 線維腫; 1例, 血管腫; 1例, 悪性リンパ腫; 1例, 上皮肉腫; 1例) を用いた。骨肉腫の3例のみに術前化学療法が行われている。また正常組織への影響を調べるため、手術時同時に採取した正常組織16例 (筋組織; 4例, 神経組織; 6例, 血管組織; 6例) を用いた (筋組織1例に化学療法を用いた症例を含む)。

腫瘍組織と筋組織はそれぞれ、2 mm 角に細断し、血管

平成19年10月31日受付, 平成19年12月20日受理
別刷請求先: 本田俊夫

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 整形外科学

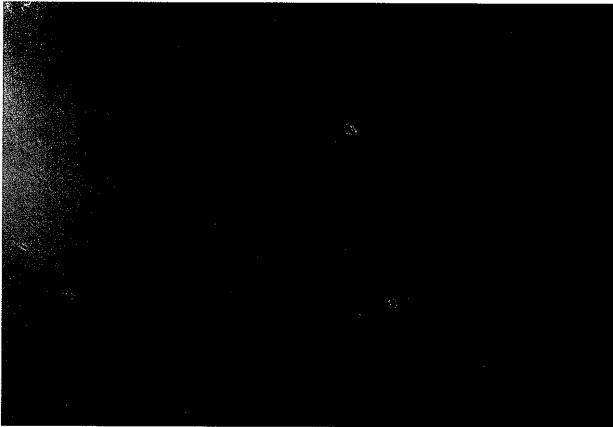


図 1a 骨肉腫 (症例3)

コントロールとした骨肉腫の腫瘍組織の培養直後の顕微鏡写真 (倍率×200)

中央やや上方と下方に生細胞を2つ認める。



図 1c 骨肉腫 (症例3)

図 1a, 図 1bと同じ骨肉腫の腫瘍組織コントロールの培養3週間目の顕微鏡写真 (倍率×200)

図 1bと比較して生細胞が増加している。



図 1b 骨肉腫 (症例3)

図 1aと同じ骨肉腫の腫瘍組織コントロールの培養1週間目の顕微鏡写真 (倍率×200)

培養直前の図 1aと比較して生細胞が増加している。

および神経は長さ2mmの切片を作製した。これらの組織塊をそれぞれ5検体ずつ作製した。

各種の組織検体5つのうち、1検体をコントロールに、4検体をそれぞれ異なった温度、時間条件での加温蒸留水浸水とした。

温度条件は、46℃又は48℃に加温し、ウォーターバスにて一定温度に保った滅菌蒸留水に一定時間浸水させた。使用した蒸留水は日本ミリポア社のエリックスで水道水を精製し作製した (純度: 3MΩ・cm以上)。それを、滅菌したボトルに入れオートクレーブにて121℃20分間加熱処理して使用した。

設定時間は46℃又は48℃とも、それぞれ、5分及び10分とした。

一定時間の蒸留水に浸した後に組織を取り出し、その

直後に、滅菌した眼科尖鉗および尖刀でさらに細断した。

αMEM培地 (10%牛胎仔血清を含む) にて37℃, 5% CO₂の条件に設定したインキュベーター内で1週間に1度培養液を交換しながら、組織の生存の程度を比較し、3週間培養した。

コントロール検体は、同一の組織を蒸留水に浸水させず細断し、同一の培地、条件下で1週間に1度培養液を交換しながら培養した。培養1週間目に生細胞が確認できた場合を初代培養成功とした。

各種の検体を培養開始後1週間、2週間、3週間で倒立型生物顕微鏡 (オリンパス社製IMT-2) にて判定した。培養1週間目に生細胞をまったく認めなかった場合をNull、1週間目に生細胞が確認できたが2週目以降に生細胞が死滅し生細胞が確認できなかった場合を生存+と判定した。同様に、2週間目に生細胞が確認できたが3週目では生細胞が確認できなかった場合を++、3週間目に生細胞が確認できた場合を+++と定義した。

これらの結果を各腫瘍組織、正常組織ごとにまとめ、表を作成し、殺細胞効果の傾向を表現した。

結 果

腫瘍組織18例中10例のコントロール群では培養後1週間目に生細胞が確認できた。これらのコントロール10例では7例が3週間目まで生細胞が確認できた (図 1a, 図 1b, 図 1c)。

この10例を用いて、蒸留水の殺腫瘍細胞効果および、温度と時間の影響を検討した。

10例の内訳は骨肉腫; 3例, 脂肪腫; 3例, fibrous dysplasia; 1例, 神経鞘腫; 2例, 巨細胞腫; 1例であった。

表1 腫瘍組織に対する加温蒸留水の生存阻害効果

	46℃ 5分間	46℃ 10分間	48℃ 5分間	48℃ 10分間	コントロール
骨肉腫 (症例1) 14歳 男	+++	N	+	N	+++
骨肉腫 (症例2) 60歳 男	+	N	N	N	+++
骨肉腫 (症例3) 12歳 女	N	N	N	N	+++
脂肪腫 (症例4) 40歳 女	N	N	N	N	++
脂肪腫 (症例5) 50歳 男	N	N	N	N	++
脂肪腫 (症例6) 73歳 女	N	N	N	N	+++
Fibrousdysplasia (症例7) 47歳 女	N	N	N	N	+++
神経鞘腫 (症例8) 62歳 男	++	N	+	N	++
神経鞘腫 (症例9) 55歳 女	+++	+++	+++	N	+++
巨細胞腫 (症例10) 39歳 男	+++	N	N	N	+++

腫瘍各組織 (骨肉腫, 脂肪腫, fibrousdysplasia, 神経鞘腫, 巨細胞腫) の加温蒸留水浸水下での生存阻害効果表中, Nは1週間目で生細胞が確認できなかった場合, +は2週間目で生細胞が確認できなかった場合, ++は3週間目で生細胞が確認できなかった場合を示す, +++は3週間目で生細胞が確認できた場合を示す。

1. 加温蒸留水浸水群の結果

46℃ 5分の条件下で, 腫瘍組織10例中5例が1週間目で生細胞が確認できなかった。残り5例中1例が2週間目で, もう1例が3週間目で生細胞が確認できなかった。3例は3週間目でも生細胞が確認できた (Null 5例, +1例, ++1例, +++3例)。

46℃ 10分の条件下では, 腫瘍組織10例中9例が1週間目で生細胞が確認できなかった。1例のみが3週間目でも生細胞が確認できた (Null 9例, +++1例)。

48℃ 5分の条件下では, 7例が1週間目で生細胞が確認できなかった。2例が2週間目で生細胞が確認できず, 1例のみが3週間目でも生細胞が確認できた (Null 7例, ++1例, +++1例)。

48℃ 10分の条件下では, 1週間目において全ての例で生細胞が確認できなかった (Null 10例) (表1)。

2. 腫瘍型別での結果

骨肉腫では3例中1例が, 46℃ 5分の条件下で1週間目に生細胞が確認できず, さらにもう1例が2週間目に生細胞が確認できなかった。1例が3週間目でも生細胞が確認できた (Null 1例, +1例, +++1例)。またその46℃ 5分の条件下で3週間目に生細胞が確認できた例は48℃ 5分の条件下では, 1週間目に生細胞が確認できたが, 2週間目には生細胞が確認できなかった (Null 2例, +1例)。46℃ 10分および48℃ 10分の条件下では, 骨肉腫の全例が1週間目から生細胞が確認できなかった (Null 3例)。

脂肪腫では3例全例がすべての条件下で, 生細胞が確

認できなかった (Null 3例)。

Fibrousdysplasiaにおいても, すべての条件下で, 生細胞が確認できなかった (Null 3例)。

巨細胞腫は, 46℃ 5分間の条件下で, 3週間目まで生細胞が確認できたが (+1例), それ以外の条件下では, 生細胞が確認できなかった (Null 1例)。

神経鞘腫は46℃ 5分の条件下で, 1例が3週間目に生細胞が確認できなかった。 (+1例, ++1例) 46℃ 10分の条件下では1例が1週間目に生細胞が確認できなかった (Null 1例, +++1例)。48℃ 5分の条件下では1例が2週間目に生細胞が確認できなかった (+1例, ++1例)。48℃ 10分の条件下では2例ともに生細胞が確認できなかった (Null 2例) (表1)。

3. 正常組織の結果

正常組織16例中7例のコントロール群では培養後1週間目に生細胞が確認できた。これらのコントロール7例では6例が3週間目まで生細胞が確認できた。これらの7例を対象に, 組織の加温蒸留水浸水による殺細胞効果を検討した。

46℃ 5分の条件下では, 正常組織7例中1例が2週間目に生細胞が確認できなかった。6例は3週間目でも生細胞が確認できた (+1例, +++6例)。

46℃ 10分の条件下では, 正常組織7例中1例が1週間目に生細胞が確認できず, さらに残り6例中2例が3週間目に生細胞が確認できなかった。4例が3週間目でも生細胞が確認できた (Null 1例, ++2例, +++4例)。

48℃ 5分の条件下では, 正常組織7例中5例が1週間目

表2 正常組織に対する加温蒸留水浸水の生存阻害効果

	46℃ 5分間	46℃ 10分間	48℃ 5分間	48℃ 10分間	コントロール
筋肉	+	N	N	N	++
血管①	+++	++	N	N	+++
血管②	+++	++	N	N	+++
血管③	+++	+++	N	N	+++
血管④	+++	+++	N	N	+++
神経組織①	+++	+++	++	N	+++
神経組織②	+++	+++	+++	N	+++

正常各組織（筋肉、血管、神経組織）の加温蒸留水浸水下での生存阻害効果
 表中、Nは1週間目で生細胞が確認できなかった場合、+は2週間目で生細胞が確認できなかった場合、++は3週間目で生細胞が確認できなかった場合を示す。+++は3週間目で生細胞が確認できなかった場合を示す。

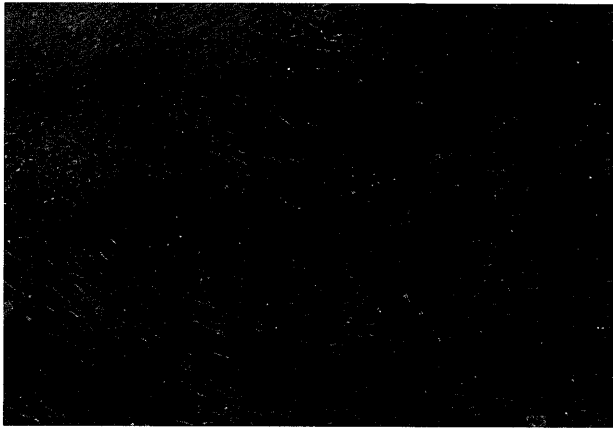


図2 血管②

血管組織塊から培養したコントロールの培養3週間目の顕微鏡写真（倍率×200）

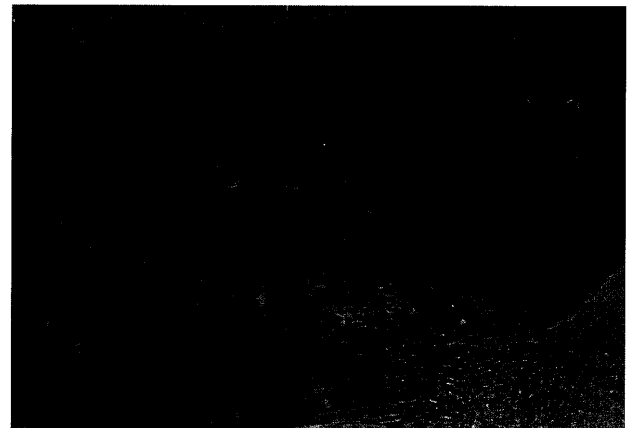


図3 神経①

神経組織塊から培養したコントロールの培養3週間目の顕微鏡写真（倍率×200）

に生細胞が確認できず、さらに残りの2例中1例が3週間目に生細胞が確認できなかった。1例が3週間目でも生細胞が確認できた（Null 5例，++1例，+++1例）。

48℃ 10分の条件下では、1週間目において全ての例で生細胞が確認できなかった（Null 7例）（表2）。

4. 分離組織別の結果

筋組織塊から培養した1例は46℃ 5分の条件下で2週間目に生細胞が確認できなかった（+1例）。46℃ 10分、48℃ 5分及び48℃ 10分の条件下では1週間目から生細胞が確認できなかった（Null 1例）。

血管組織塊から培養した4例がコントロールの初代培養に成功した。46℃ 5分の条件下では4例とも3週間目に生細胞が確認できた（+++4例）。46℃ 10分の条件下では2例が3週間目に生細胞が確認できなかった（++2例，+++2例）。48℃ 5分、48℃ 10分の条件下では、全

ての例で1週間目から生細胞が確認できなかった（Null 4例）。

神経組織塊から培養した2例がコントロールの初代培養に成功した。2例とも48℃ 10分の条件下でのみ1週間目で生細胞が確認できなかった（Null 2例）。48℃ 5分の条件下では1例が3週間目に生細胞が確認できなかった。（++1例，+++1例）46℃ 5分、46℃ 10分の条件下では2例とも3週間目に生細胞が確認できた（+++2例）（表2、図2、図3）。

考 察

骨軟部腫瘍において、悪性腫瘍、良悪性境界型腫瘍、または良性であっても易再発性の腫瘍では、局所再発を繰り返し、予後不良な経過をたどることがある。局所再発の原因として、腫瘍細胞の骨、筋肉内又は主要な血管や神経への浸潤などにより、腫瘍組織を全摘出しえない

ことにより、残存する細胞の再増殖があげられる。臨床問題となる局所再発を防止するために、術後に化学療法などがおこなわれることがある。しかし、個々の症例によっては、抗腫瘍薬に対して抵抗性を示すことがあり、必ずしも十分な抗腫瘍効果が得られるとは限らない。

一般外科領域においては、局所の再発予防法として、温熱療法の効果が報告され、殺腫瘍細胞効果 (hyperthermia) は広く認められている⁵⁻⁷⁾。貝原ら⁸⁾は、胃癌の手術中に45℃の温熱生理食塩水による腹腔灌流を行い再発抑制の効果があつたと報告している。また、蒸留水を用いた方法として、内田ら¹⁾は肺癌の手術時に、抗がん剤を含んだ生理食塩水の胸腔内投与と蒸留水での胸腔内洗浄を比較し、蒸留水での胸腔内洗浄のほうが癌の再発防止に有効であると報告した。しかし、酒井ら⁹⁾は大量蒸留水灌流による表在性膀胱癌の術中播種の防止を検討し、効果がなかったと報告している。Mercillら¹⁰⁾や Sweitzerら¹¹⁾は *in vitro* において常温の滅菌蒸留水を用い殺腫瘍細胞効果を検討し、効果がないと報告しており、一般外科においても常温蒸留水の評価は一定していない。

骨軟部腫瘍においても局所再発への対策として、液体窒素による冷却療法¹²⁾や温熱療法¹³⁾があるが、成績は良好とはいえない。松本ら¹⁴⁾は、主要な神経血管系の近傍にある骨軟部組織肉腫に対して腫瘍を手術中に十分に切除できない場合、腫瘍と神経血管系を一塊として術野から持ち上げエタノールおよび蒸留水浸水を行い、腫瘍の再発を抑制した報告している。しかし、エタノールの正常組織に対する影響が危惧される。また、他の報告としては、前述の古瀬ら²⁾の報告以外に、同様にシスプラチンと蒸留水を手術中に併用した中村ら¹⁵⁾、古瀬ら¹⁶⁾、羽藤ら¹⁷⁾の報告がある。

一方我々は、蒸留水の殺細胞効果に着目し、常温での蒸留水浸水による殺腫瘍細胞効果の研究を行ってきた。早乙女ら²⁾は常温の滅菌蒸留水を用い、浸す時間の長さによる殺腫瘍細胞効果を *in vitro* において検討し、効果があるとしている。しかしその報告では細胞融解は、30-60分以上が必要であり、手術時間の制約を考慮すると臨床への応用は困難と思われた。そこで、蒸留水の殺腫瘍細胞効果を、温熱療法により増強可能かの検討も行い、早乙女ら³⁾は、腫瘍組織を47℃以上に温めた蒸留水に15分以上浸水することで、少なくとも厚さ1mmの腫瘍組織内の腫瘍細胞の増殖を抑制すると報告した。しかしながら、この研究では正常組織への影響を検討しておらず、また、15分間という時間設定など、臨床応用には問題が多かった。

今回、蒸留水の殺腫瘍細胞効果を、温熱療法を併用す

ることにより増強可能かを条件を変えて再検討した。さらに腫瘍細胞が正常細胞に比べて温熱に対する耐性が低い点に着目し正常細胞を障害することなく十分な効果を発揮できる最適な条件を検討した。設定温度は早乙女の47℃の条件をそれぞれ+ - 1℃で設定し、至適時間を臨床応用を考え5分と10分に設定した。また、早乙女ら³⁾が、47℃以上に温めた蒸留水に15分以上浸水することで、厚さ1mmの腫瘍組織内の腫瘍細胞の増殖を抑制すると報告していたことにより、腫瘍組織と正常筋組織を2mm角に細断して行った。

結果を、1週間目に生細胞が確認できなかった場合と1週間目まで生細胞が確認できたが2週間目に生細胞が確認できなかった場合 (Nullおよび+) を生存阻害効果あり、2週間目以降も生細胞が確認できた場合 (++, +++) を生存阻害効果なしと定義してまとめると、46℃10分の蒸留水浸水により生存阻害効果ありと認められた割合は90%であった。この条件における正常組織は、筋肉組織例では生存阻害効果があるものの、血管、神経組織の例では生存阻害効果は認められなかった。また48℃5分の条件では生存阻害効果ありと認められた割合は90%であった。この条件下では、筋肉組織と血管組織の例では100%生存阻害効果が認められたが、神経組織の例では生存阻害効果が認められなかった。すなわち、主要血管近傍の腫瘍に対しては46℃10分の蒸留水浸水の条件が適し、主要な血管が近傍にない腫瘍には48℃5分の蒸留水浸水の条件が適することが推測された。逆に46℃5分での生存阻害効果は1週間目では60%と低く、逆に、48℃10分では生存阻害効果が100%のため、臨床応用不可能と推測された。

本研究の問題点として、今回得られた殺腫瘍細胞効果 (生存阻害効果) が、温熱によるものか、あるいは蒸留水の低浸透圧と弱酸性によるものかが区別できない点にある。この点に関しては、加温蒸留水と加温生理食塩水の比較検討が今後必要である。また、骨軟部腫瘍の発生頻度の低さから、今回の実験では、多種の組織型の腫瘍を同一の評価で検討せざると得なかった。腫瘍の特性により、最適な条件が異なる可能性が高く、今後組織型別の条件の検討をしていく必要がある。また、今回の研究では培養された細胞の同定までには至っていない。この点に関しては、今後も研究を続け細胞の生存と増殖の状態やアポトーシスなどの細胞活性を確認する必要がある。実験手技上の問題点としてコントロールにおいても初代培養に成功しなかった症例が多かったことがあげられる。この理由として採取した組織の洗浄が不十分であったことなどがあげられる。今後さらに症例数を増やして研究を進めていく予定である。

結 論

- 1) In vitroにおいて異なる温度と加温時間設定下での蒸留水の殺腫瘍効果と正常組織への影響を検討した。
- 2) 神経鞘腫を除き、良性悪性境界型腫瘍の辺縁切除術や骨内良性腫瘍骨の掃爬術において、重要な血管が腫瘍に近接している場合は46℃ 10分の蒸留水浸水が、重要な血管が近接していない場合は48℃ 5分の蒸留水浸水が再発を防ぐ効果を期待できると推察された。

参考文献

- 1) 内田達男, 中川路桂: 肺癌術中胸腔内洗浄について. 日本呼吸器外科学会誌, **7**: 10-15, 1993.
- 2) 古瀬久裕, 川原範夫, 富田勝郎: 脊椎悪性腫瘍切除術におけるシスプラチン洗浄療法. **10**: 358-364, 1999.
- 3) Saotome K, Tamai K, Koguchi Y, et al.: The effect of ultrapure water on tumor cell lines in vitro. Dokkyo J Med Sci, **25**: 33-36, 1998.
- 4) 早乙女絃一, 小口泰司, 田中浩史, 他: 骨軟部腫瘍手術での洗浄液としての蒸留水の有用性について. 日本整形外科学会誌, **76**: S834, 2002.
- 5) 柄川順: ヒト腫瘍の温熱感受性. 癌の臨床, **35**: 1517, 1989.
- 6) 築山巖: ハイパーサーミアの実際 骨・軟部組織腫瘍に対する温熱療法. 医学のあゆみ, **168**: 110-113, 1994.
- 7) 本間隆義: 温熱療法におけるアポトチック細胞死の特性. 日本臨床, **54**: 1949-1954, 1996.
- 8) 貝原信明, 前田迪郎, 浜副隆一: 温熱腹膜灌流による胃癌の腹膜再発防止に関する研究. 外科, **52**: 1495-1497, 1990.
- 9) 酒井康之, 藤井靖久, 兵地信彦, 他: 大量蒸留水灌流による表在性膀胱癌の術中播種阻止の検討. 泌尿器科紀要, **52**: 173-175, 2006.
- 10) Mercill DB, Jones NR and Harbell JW: Human tumor cell destruction by distilled water: Cancer, **55**: 2779-2782, 1985.
- 11) Switer KL, Nathanson D, and Nelson LT, et al.: Irrigation does not dislodge or destroy tumor cells adherent to the tumor bed. J Surg Oncol, **53**: 184-190, 1993.
- 12) 山本憲男, 土屋弘行, 久門弘, 他: 骨盤部悪性骨腫瘍に対する患肢温存手術, 液体窒素処理自家骨を用いた悪性骨盤腫瘍切除後再建とその成績. 整形・災害外科, **49**: 249-254, 2006.
- 13) 太田弘敏: 悪性骨・軟部腫瘍に対する温熱療法に関する基礎的及び臨床的研究. 名古屋市立大学医学会雑誌, **53**: 65-75, 2002.
- 14) Matsumoto S, Kawaguchi N, Manabe J, et al.: "In situ preparation": new surgical procedure indicated for soft-tissue sarcoma of a lower limb in close proximity to major neurovascular structures. Int J Clin Oncol, **7**: 51-56, 2002.
- 15) 中村紳一郎, 楠崎克之, 村田博昭, 他: 股関節包外切除後, 患肢再建を施行した大腿骨近位部悪性骨腫瘍の3例. 整形外科, **51**: 154-158.
- 16) 古瀬久裕: 脊椎悪性腫瘍切除における抗癌剤洗浄の安全性と有効性に関する実験. 金沢大学十全医学会雑誌, **107**: 214-225, 2000.
- 17) 羽藤泰三, 北野喜行, 堀本孝士, 他: 転移性頸椎腫瘍に対する T-saw を用いた頸椎亜全摘術の経験, **36**: 1197-1200, 2001.