大腸癌におけるレーザー温熱療法 (レーザーサーミア) の検討

大久保雄彦、石田 清、森田孝夫、里見 昭、田中克幸、大工園則雄*

埼玉医科大学第二外科, エス・エル・ティ・ジャパン*

A Study of Laser Hyperthermia for Human Colon Carcinoma

Katuhiko Ookubo, Kiyoshi Ishida, Takao Morita, Akira Satomi,
Katuyuki Tanaka, Norio Daikuzono*

The 2nd Department of Surgery, Saitama Medical School
Surgical Laser Technologies Japan, Co., Ltd.*

Abstract

In order to investigate the influence of Nd:YAG laser on hyperthermia in cultured colonic cancer cells (HT 29), we performed flow cytometric DNA analysis. HT 29 cells were cultured in 24 - well dishes in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal calf serum. A hyperthermia group was heated by a 5 % - CO / 95 % - air incubator at 42°C for 20 minutes. A laser - treatment group was exposed to Nd:YAG laser with output power of 2 W for 10 minutes in a fixed - temperature water bath (37 °C). A combined therapy group was heated by the incubator after the laser irradiation.

In the laser experiments the temperature in the wells ranged from 37.0°C to 38.0°C. On the fifth day of culture, both in the laser - treatment group and the hyperthermia group, no significant changes were observed in the viability of the cells, but the proportion of DNA synthesis phase S was relatively larger than in the control group, suggesting the kinetics of an increase after the completion. In the combined therapy group, the viable - cell number was significantly decreased ($P < 0.05$), and no cells in G2 / M phase were found.

This suggests that the tumor - killing effect of hyperthermia on colorectal carcinoma can be potentiated by laser light.

緒言

低出力のNd:YAGレーザーによるレーザー温熱療法 (レーザーサーミア) は消化器癌のみならず広く臨床応用されている。本療法の抗腫瘍効果は温熱効果のみならず、レーザーの光作用の関与が推測されている。われわれはヒト

大腸癌培養細胞の温熱療法にレーザー照射し、温熱療法におよぼす効果について検討した。

対象と方法

＜使用機材＞光源としてNd:YAGコンタクトレーザー (SLTJ社, CL50) を、プ

図1 レーザー照射の方法

ローブとして一般外科用ハンドピース（SLT J社）を使用した。

＜レーザー光照射条件の検討＞培養dish底面に一致した照射スポット（2.0 cm）を得るためのファイバー先端と培養dish底面との距離を検討し、次に、培養dishフタおよび培養dish内に1 mlの培地（10% FCS加RPMI 1640）を入れたときのレーザー透過率を検討した。

＜培養細胞および培養条件＞ヒト大腸癌培養細胞（HT29）を10% FCS加RPMI 1640下に、24-well plastic dishに播種し、CO₂ インキュベーターにて培養した。ウェル底面全域に密集した単層培養細胞に対して以下の4群を設定した。

＜実験群の設定＞コントロール群（37℃恒温槽内に10分間静置）、温熱療法群、レーザー照射群、レーザー照射+温熱療法群の4群を設定した。コントロール群は37℃恒温槽内に10分間静置した。レーザー照射は37度の恒温槽内にて10分間行い、温熱療法は、42度のCO₂ インキュベーター内にて20分間

図2 各実験群の生細胞数（X10個/ml）の変動

加温し、レーザー照射+温熱療法群ではレーザー照射後に温熱療法を施行した（図1）。

＜培養細胞の経時的変化の検討＞培養細胞はトリパンブルー染色にて、経時的に生細胞数をカウントするとともに、propidium iodide溶液にて核染色後、1 X 10⁴コの細胞核をFACScanを用いて測定し、DNA histogramを解析した。

結果

1) レーザー光の照射条件：2.0 cmの照射スポットを得るためのファイバー先端と培養dish底面との距離は5.4 cmであった。培養dishフタのレーザー透過率は約92%、培地のレーザー透過率は約55%であり、出力2W照射時では培養dish底面に1.15 Wのレーザー光が達していた。さらに、2W、10分間のレーザー照射中の培地の温度は38℃以上には上昇せず、レーザー照射時の温度の影響は除外出来ると考えられ、レーザー出力は2Wとした。

2) 各実験群の生細胞数の変動：実験開始時の各実験群の生細胞数は20.5 X 10⁴個/mlであり、差は認められなかった。実験5日後のコン

図3 Flow Cytometryによる DNA解析

コントロール群の生細胞数は $35.5 \pm 6.6 (\times 10^4)$ 、温熱療法群 $27.5 \pm 9.9 (\times 10^4)$ 、レーザー光群 $34.5 \pm 6.6 (\times 10^4)$ 、レーザー照射+温熱療法群 $19.5 \pm 8.0 (\times 10^4)$ であり、コントロール群とレーザー照射、温熱療法群との間には差を認めなかったが、レーザー光+温熱療法群では有意に減少していた ($P < 0.05$) (図2)。

3) 各実験群の細胞周期の解析：コントロール群ではG1期 32.8%，S期 63.65%，G2/M期 3.6%であった。温熱療法群ではG1期、G2/M期の割合がともにコントロール群に比較して小さく、また、S期は逆に増加していた (図3)。レーザー光群ではG1期、S期、G2/M期ともに温熱療法群と差を認めなかった。

	G ₁ 期 (%)	S期 (%)	G ₂ +M期 (%)
コントロール群	32.80	63.60	3.60
温熱療法群	30.00	68.45	1.55
レーザー光群	30.66	67.91	1.42
レーザー光+温熱療法群	37.82	62.17	0.01

図4 各実験群における細胞周期

レーザー光+温熱療法群ではG1期 37.2%とG1期の占める割合が高く、S期・G2/M期はともに低く、特にG2/M期の占める割合はほとんど0%であった。温熱療法群、レーザー光群の生細胞数はコントロール群と差を認めなかったが、これら2群のS期の占める割合はコントロール群より高く、また、逆にG2/M期の割合が低いことから、細胞増殖の抑制が解除され、再び細胞回転が活発になった状態であると考えられた。レーザー光+温熱療法群ではコントロール群に比較してS期、G2/M期の割合がともに低く、G1期が多いことから、細胞増殖の抑制が持続しており、細胞回転が静止している状態と考えられた (図4)。

考察

温熱療法におけるレーザーの光作用を検討したin vitroの実験成績は報告されているが、大腸癌に関する報告はいまだ認められない。また、温熱療法におけるレーザーの光作用をFlow Cytometryを用いたDNA解析から検討した報告も認められていない。今回の実験結果から、

ヒト大腸癌細胞においてもレーザー光は温熱療法における温熱効果を相乗的に高めることが示唆された。さらに、レーザー光単独、温熱単独においても細胞は障害されるが、一時的な可逆的な変化であること、温熱とレーザー光とが同時に作用したときに非可逆的な変化となり得ることが示唆され、レーザーサーミアを考える上で重要な点であると考えられた。

結論

レーザーの熱作用を除外したin vitro の実験成績より、ヒト大腸癌細胞の温熱療法におけるレーザー光自身の癌細胞障害性が示唆され、大腸癌に対するレーザー温熱療法（レーザーサーミア）の効果が期待された。

文献

- 1) 印牧直人, 他: レーザー内視鏡的局所癌温熱療法に関する基礎的、臨床的検討. 日本レーザー医学会誌 7: 47-48, 1987.
- 2) 田尻久雄, 他: 光化学療法および局所温熱療法の検討ー実験的検討を含めてー, Gastroenterological Endoscopy 28: 2282-2287, 1986
- 3) 竹内 来, 他: 低出力Nd:YAG Laserを用いた局所ハイパーサーミアの基礎的検討. 日本レーザー医学会誌 8: 77-78, 1987.