Lewis肺癌実験モデルにおけるLaserメス減量術後の影響

矢田浩章、加藤麦夫、吉田憲司

愛知学院大学歯学部口腔外科学第1講座

Effects of laser reduction on the spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma cells

Hiroaki Yata, Mugio Kato, Kenji Yoshida

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Aichi-Gakuin University

Abstract

Background. Malignant tumor cells are believed to be shed into the bloodstream during conventional surgical resection of a primary tumor. In head and neck neoplasms, laser resection (Nd:YAG and CO₂) is one treatment for resection of organ-confined primary tumors. To date, however, the evidence of malignant tumor cell dissemination during laser resection remains unclear. In this study, the author have examined the effect of laser reduction on the shedding of tumor cells into blood and micrometastasis formation in the lung using a marker gene-tagged mouse Lewis lung carcinoma model.

Methods. 1×10⁶ Lewis carcinoma cells transfected with hygromycin-resistant gene (Hyg) were injected subcutaneously into C57BL male mice, and tumor cells in blood and the lung were estimated after 10 minutes of laser reduction of primary tumors leaving 1/5 of them by polymerase chain reaction for Hyg as a target gene. Macroscopic metastasis was estimated by counting visible parietal nodules in the lung after fixation in Bouin's solution.

Results and conclusion. The detection rate of circulating tumor cells in blood was higher in the Nd:YAG (54.5%) and CO₂ (60.0%) laser treatment group than in the control group (30.0%). Macroscopic metastasis in the lung were also increased in the Nd:YAG and CO₂ laser treatment group, when compared with the control group. These results suggest that laser reduction of malignant tumor enhances tumor cell shedding into the bloodstream.

I. 緒 言

口腔白板症など前癌病変に対してレーザーメスを用いた治療を行い、癌化の促進がみられたとの報告があり^{1,2)}、近年、前癌病変に対するレーザー照射の影響に関する基礎的研究が散見される^{3,4)}。しかし悪性腫瘍の転移に関する検討はみられない。

本論文では、レーザーメスおよびスチールメスを用いた外科的侵襲（減量術）の転移への影響について、マーカー遺伝子導入細胞およびPCR（Polymerase chain reaction）法を用いて比較検討を行ったので、その結果について報告する。

II. 材料および方法

マーカー遺伝子としてヒグロマイシン耐性遺伝子 (HYG) を導入したLewis肺癌細胞A11 Hyg-1^{5,6)}、 1×10^6 個を6週齢雄性C57BL/6 マウス鼠径部に皮下接種して実験モデルとした。これらを生体群、スチールメス群、Nd:YAGレーザーメス群、CO₂レーザーメス群の4群に分け、腫瘍接種後18日目に、レーザーメスおよびスチールメスを用いて原発腫瘍の約1/5を残して腫瘍減量術を行った。

Nd:YAGレーザーはNd:YAG CONTACT LASER CL-50 (SLT 社) を用いた。CO₂レーザーはベルラクサー CO₂ Laser DS-LX-20 (ラクサー社) を用いた。照射出力はハンドピース先端出力を、Nd:YAGレーザーにおいては接触型プローブ未装着の状態13 Wで、またCO₂レーザーでは先端出力4 W、焦点位 (1.5 mm) とした。

血液中癌細胞の検出は、HYGを指標としたNested primer PCR法^{7,8)}で行い、肺の肉眼的転移結節数はブアン固定後、算定した。

血液中癌細胞の陽性率の検定には χ^2 検定を、その他はMann-Whitney's U検定により行った。

実験1. 外科的侵襲の癌細胞血液中移行におよぼす影響

腫瘍減量術を約30秒かけ行い、その10分後に採血し、血液中癌細胞の陽性率を算定した (総計42匹使用)。

実験2. 過度の手術侵襲の癌細胞血液中移行におよぼす影響

腫瘍に対する手術操作の影響をよりいっそう明らかにするために、実験1と同様な実験系を設定し (使用マウス30匹)、過度の手術侵襲を加えるために手術時間を2倍 (約1分) とし、血液中癌

細胞の陽性率を算定した。

実験3. 外科的侵襲の肉眼的転移におよぼす影響

手術から17日目にマウスを屠殺、肺の肉眼的転移結節数を算定した (29匹使用)。

III. 結 果

実験1.

血液中癌細胞について生体群の陽性率に比べ、有意差は認めなかったもののいずれも切除群で増加傾向を示した (図1 A, 1 B)。

図1. 手術直後血液中癌細胞のPCR法による検出
実験2.

スチールメス群とNd:YAGレーザーメス群は、生体群との間にそれぞれ有意な ($p < 0.025$) 増加が認められた (図2 A, 2 B)。

実験3.

生体群に比べ、スチールメス群では肺の肉眼的転移結節数が約半分に減少した。しかし

Nd:YAGレーザーメス群およびCO₂レーザーメス群では軽度ながら増加が認められ、無処置群とスチールメス群間 ($p<0.03$)、スチールメス群とNd:YAGレーザーメス群 ($p<0.02$) およびCO₂レーザーメス群間 ($p<0.03$) において有意差を認めた (図3)。

図2. 過度手術直後血液中癌細胞のPCR法による検出

図3. 外科的侵襲の肉眼的転移におよぼす影響

IV. 考 察

外科的侵襲の癌細胞血液中移行におよぼす影響についての検討結果は、スチールメス、レーザーメスとメスの種類を問わず外科的侵襲を加えることにより、血液中癌細胞の陽性率はいずれも増加

傾向を示した。また、過度の手術侵襲を加えた実験では、血液中癌細胞の陽性率のいっそうの増加が認められた。したがって腫瘍細胞の血液中への移行は外科的侵襲の種類によらず、その程度に比例して促進されるものと考えられた。

次に手術操作により癌細胞の血液中移行が促進された後、これらの細胞がはたして肉眼的な転移巣を形成しうるか否かについて検討した。

Nd:YAGレーザーメス群およびCO₂レーザーメス群で、無処置群よりも肺の肉眼的転移結節数において、増加が認められたことから、レーザーメス切除により血液中に移行した癌細胞が、実際に肉眼的な転移巣に発育する可能性が示唆された。

今回の結果は特異的な条件から得られたもので、ただちに悪性腫瘍の切除にNd:YAGおよびCO₂レーザーメスを使用することが遠隔臓器への転移の危険性を促進すると結論づけることはできない。逆にレーザーメスは、熔着現象⁹⁾による術野の止血、リンパ管閉鎖、切離面の少量の残遺腫瘍細胞を焼灼・蒸散できるなど^{10,11)}、スチールメスに比べ局所再発や血行性あるいはリンパ行性転移に対する抑制効果を持ち、非常に有効なメスであるとその有用性を支持する報告もある¹²⁾。そこで、悪性腫瘍の外科的治療においてレーザーメスを用いる場合には、なるべく十分な安全域を確保し、慎重に操作を行うことが重要になってくるものと思われる。また現在、スチールメス、レーザーメス共に血液中への癌細胞の移行を促進するにも関わらず、なぜレーザーメス群のみで転移が促進されたのか、血液中癌細胞のViability等について、さ

らなる検討を行っている。

V. 結 語

1. 外科的侵襲により腫瘍細胞の血液中への移行が促進された。

2. Nd:YAGおよびCO₂レーザーメスにより腫瘍本体に侵襲を加えることがあれば、癌細胞の血液中移行が促進されるだけでなく、肺転移が促進される可能性が示唆された。

3. 十分な安全域を得られない場合には、従来言われていた程にはレーザーメスの安全性はないと思われた。

VI. 文 献

- 1) 水沼秀之, 木下鞠彦, 小林 優, 井上 聡, 本間義郎, 浅野信雄, 河原健司, 福岡真一, 志村介三 : 口腔白板症のCO₂レーザー治療. 神奈川歯学, 30 (3) : 300~304, 1995.
- 2) Jones, G., Shepherd, J. P. and Scully, C.: A case of squamous cell carcinoma arising in an area treated with a carbon dioxide laser. Br J Oral Maxillofac Surg, 25 (1) : 57~60, 1987.
- 3) 小川 純 : Nd:YAG レーザーの発癌過程に及ぼす影響について. 日口外誌, 35 (9) : 2280~2299, 1989.
- 4) 水沼秀之 : 口腔粘膜の発癌過程におけるCO₂レーザー照射の影響について. 口科誌, 44 (1) : 21~31, 1995.
- 5) Takenaga, K.: Characterization of low- and high-metastatic clones isolated from a Lewis lung carcinoma. Gann, 75 (1) : 61~71, 1984.
- 6) Nakanishi, H., Oguri, K., Takenaga, K., Hosoda, S. and Okayama, M.: Differential fibrotic stromal responses of host tissue to low- and high-metastatic cloned Lewis lung carcinoma cells. Lab Invest, 70 (3) : 324~332, 1994.
- 7) Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239 (4839) : 487~491, 1988.
- 8) Datta, Y., Adams, P. T., Drobyski, W. R., Ethier, S. P., Terry, V. H. and Roth, M. S.: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol, 12 (3) : 475~482, 1994.
- 9) 石原 朗 : Nd:YAG Contact Laser 接触照射によるラット舌の創傷治癒に関する基礎的研究. 愛院大歯誌, 28 (3) : 895~912, 1990.
- 10) 佐藤文男, 今野哲朗, 佐藤直樹 : レーザー及びマイクロウエーブを用いた肝癌手術について. Oncologia, 17 : 100~109, 1986.
- 11) 佐藤文男 : レーザー外科の現状と未来展望. 日本臨牀, 45 (4) : 710~715, 1987.
- 12) Miyaguchi, M. and Sakai, S.: The contact Nd-YAG laser for oral and oropharyngeal malignant tumors. Auris Nasus Larynx, 21 (4) : 226~231, 1994.