



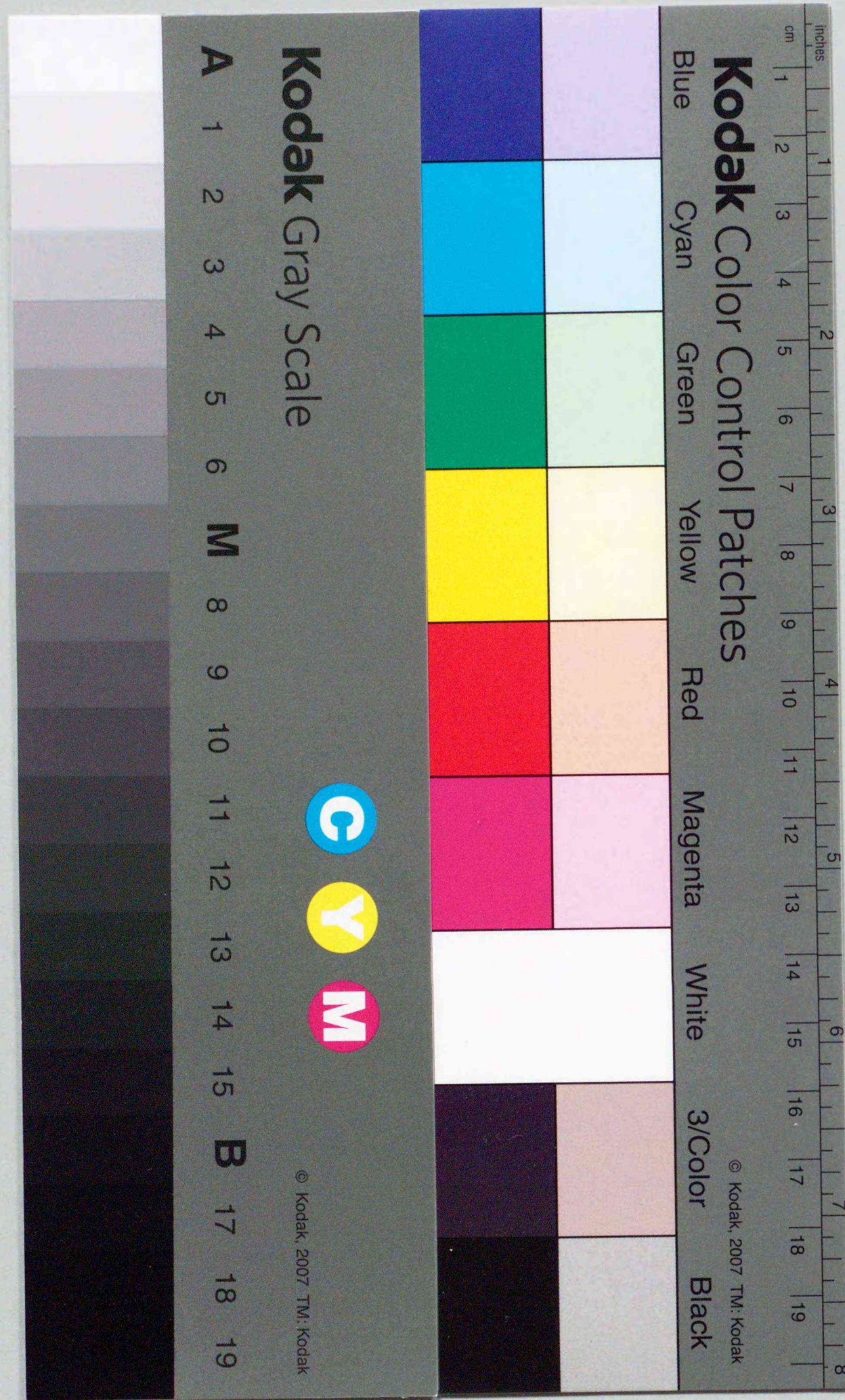
Title	ヒト胆管細胞癌に対するBalloon Laserthermiaの抗腫瘍効果に関する基礎的研究
Author(s)	小井戸, 一光
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第4477号
Issue Date	1994-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3076797
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51265
Type	doctoral thesis
File Information	000000272875.pdf



ヒト胆管細胞癌に対するBalloon Laserthermiaの
抗腫瘍効果に関する基礎的研究

北海道大学 医学部 内科学第3講座 小井戸 一光

(主任：宮崎 保 教授)



①

ヒト胆管細胞癌に対する Balloon Laserthermia の

抗腫瘍効果に関する基礎的研究

北海道大学 医学部 内科学第 3 講座 小井戸 一光

(主任 : 宮崎 保 教授)

Anticancer Effect of Balloon Laserthermia

on Human Cholangiocellular Carcinoma

Kazumitsu KOITO

The Third Department of Internal Medicine, Hokkaido
University School of Medicine, Sapporo 060, Japan

要 旨

ヒト胆管細胞癌に対する Balloon Laser thermia の抗腫瘍効果を基礎的に検討し、臨床応用への可能性を探った。

使用したヒト胆管細胞癌は富山医科薬科大学第3内科より提供された HuCC-T1 細胞である。HuCC-T1 細胞は腫瘍 marker CA19-9 産生能を有している。HuCC-T1 細胞 ($1 \times 10^4 / \text{ml}$) を 12 穴の microtiter plate に plating 後、96 時間目に Simple hyperthermia (STt; t: 分) および Balloon Laser Treatment (r BLTt; r : 温度, t: 分) を施行した。治療後、24 および 48 時間目に位相差顕微鏡下に HuCC-T1 細胞を鏡検し写真撮影を行った。さらに、上清を採取し遠沈 (2,000 rpm, 30 分) した後、CA19-9 を計測した。生細胞数は trypan blue 非染色細胞を測定して求めた。Control, ST₁₅, 4_2 BLT₁₅ および 3_7 BLT₁₅ の各群においては、 1×10^4 個の生細胞数に調整して破碎し、遠沈 (2,000 rpm, 30 分) した後 CA19-9 を測定した。nude

i)

mice に各々 1×10^7 個の HuCC-T1 細胞を接種し、14 日目に ST₁₅, 4_2 BLT₁₅ あるいは 4_2 BLT₃₀ の治療を施行した。治療後 7 日目に腫瘍湿重量を測定し、各々の標本を HE 染色下に鏡検した。STt 群の抗腫瘍効果は 48 時間目に初めて出現した (hyperthermic effect at delayed stage)。しかし、BLT 群の抗腫瘍効果は治療後 24 時間目にはすでに出現し (cytotoxic effect at early stage)、Hyperthermia を併用した群 (4_2 BLTt) では 48 時間にも認められた。すなわち、全ての実験群の中で 4_2 BLT₁₅ 群が最も有効な抗腫瘍効果を示した。上清中の CA19-9 値は各培養時間毎におけるどの 2 群間にも有意差は存在しなかったが、生細胞中の CA19-9 値は BLT を施行することによって有意に低下した。in vivo 実験における腫瘍湿重量は 4_2 BLT₁₅ および 4_2 BLT₃₀ の各群において Control 群および ST₁₅ 群に比較して有意に低値であった。in vitro および in vivo における細胞の変性・壊死および組織の壊死は BLT

ii)

施行によってきわめて顕著であった。

4.2 BLT_{1.6} が early stage に cytocidal effect を、delayed stage に hyperthermic effect を発揮することを示している。さらに、BLT は生細胞内の CA19-9 を低下せしめ、Simple hyperthermia では認められない癌細胞の質的変性を惹起している可能性が示唆された。以上より、Balloon Laserthermia は胆管癌の局所治療法として、従来の hyperthermia に比較してより有効な方法であり、集学的治療法の一つとして強力な武器になりうるものと考えられた。

緒 言

消化器癌の診断と治療は、近年、長足の進歩を遂げ、特に胃・大腸癌における早期診断体系と治療法はほぼ確立された感がある。

しかしながら、膵胆道系悪性腫瘍の診断は各種画像診断の発達によって比較的容易にはなったものの、切除可能な症例は未だ少ないのが現状である¹⁾。従って、切除不能胆管癌に対しては化学療法や放射線療法に代表される集学的治療法が施行されている^{2, 3, 4)}ものの、その有効性は不十分である。

温熱療法は集学的治療法の一つであり、細胞培養法を用いた in vitro の実験は、癌細胞に対する温熱療法の有用性を示している⁵⁾。しかしながら、ヒト胆管癌に対する温熱療法の基礎的検討はほとんど報告されていない⁶⁾。

これまで、各種癌に対する加温法としては全身的には radiofrequency wave, 局所的には microwave が主に用いられてきた^{7, 8)}。近年、

局所温熱用高拡散 microrod を用いた低出力
Nd : YAG laser 断続照射による温熱療法
(以下 Laserthermia) が開発された^{9, 10)}。

Laserthermia は laser 光自体が有する cytoci-
dal effect と hyperthermic effect の相乗効
果が期待されうるものと考えられるが、この
相乗効果を直接指摘した報告はない。

そこで、ヒト胆管細胞癌の cell line (HuCC
-T1) を用い、Laserthermia の抗腫瘍効果に
関する基礎的検討をおこない、臨床応用の可
能性を検討した。

実験材料と方法

細胞株

ヒト胆管細胞癌 HuCC-T1 株は富山医科薬科
大学第3内科において樹立され継代¹²⁾され
ており、同教室(渡辺明治教授)の御好意に
より提供を受けた。HuCC-T1 株は継代中常に
腫瘍 marker CA19-9 産生能を有し、populati-
on doubling time は約 55 時間である¹²⁾。

細胞培養

HuCC-T1 株は、RPMI (日水製薬(株), 東京)
に 10% fetal calf serum (GIBCO, MD, USA), 0.2
% lacto albumin hydrolysate (Difco Lab.,
MI, USA) および 0.04% L-glutamine を加えた
培地を用い、0.5% CO₂ humidified incubat-
or (37°C) (朝日ライフサイエンス(株), 東京)
で培養した。HuCC-T1 細胞は $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で pl-
ating すると 4 ~ 5 日で subconfluent な状態
になった。細胞の剥離は 0.2% trypsin 加
0.02% ethylenediaminetetraacetic acid
(EDTA) を用いて行なった。

加温法

本実験では二種類の加温法を用いた。一つは incubator 内の温度を $42.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に安定化した状態で培養細胞を静置し、その後 37°C の incubator 内に戻す方法である。他は Nd:YAG laser を用いた Balloon Laserthermia である¹³⁾。laser 発振装置は laserthermia 用の laser 照射制御 system を備えた CL-50 (SLT-Japan, 東京) を、laser probe は ceramic 製高拡散 microrod (SLT-Japan, 東京) を使用した。

Balloon Laserthermia の実験モデルを Figure 1 に示した。すなわち、筆者ら¹³⁾が独自に開発した 1.7mm の polyethylene 製の catheter 先端に latex 製の balloon を装着し、内部に 0.25% の脂肪乳剤 Intralipos (ミドリ十字, 大阪) を 1ml 注入する。これによって balloon は長径 18mm, 短径 8mm に膨張し、laser 光は脂肪乳剤で拡散され、同心円状約 10mm、深さ約 10mm の範囲内がほぼ均一に照射される。

温度管理は温度 sensor (SLT-Japan, 東京) を balloon 表面に接着させて行なった。balloon は無菌的に培養液中に静置し、表面温度が $42.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ になるまで連続的に laser を発振する。同温度に達した後は pulse 発振に切り換えて、温度を恒常化した。以上の温度設定は全て computer 管理下に行われた。laser の出力条件は 5W とした。

in vitro の抗腫瘍効果判定

継代中の HuCC-T1 株を $1 \times 10^4/\text{ml}$ に調整して、12穴の microtiter plate (Corning CO., NY, USA) に各 1ml ずつ plating し、培養液をさらに各 1ml ずつ追加した (in triplicate)。plating 後 96 時間目に Mg^{++} , Ca^{++} free の phosphate buffered saline で各 3 回ずつ洗浄した後、培養液 2ml を加えた。

実験群は ① Control 群、② Simple hyperthermia (ST) 群; incubator 内で $42.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の加温を 10 分間 (ST₁₀ 群) および 15 分間 (ST₁₅ 群) 行なった。③ Laser Treatment 群 (STBLT₁₀ 群)

③ 37.5 ± 0.5 °C の Laser Treatment を 10 分間 (37BLT_{10} 群) あるいは 15 分間 (37BLT_{15} 群) および ④ Laserthermia (42BLT_{10} , 42BLT_{15}) 群; 42.5 ± 0.5 °C の BLT を 10 分間 (42BLT_{10} 群) あるいは 15 分間 (42BLT_{15} 群) 行なった。各治療群においては 24 時間および 48 時間後に培養上清を採取し、遠心分離 (2,000 rpm, 30 分間) 後に上清を -20 °C にて凍結保存して腫瘍 marker CA19-9 の測定に供した。

生細胞数の算定は、trypsin EDTA で細胞を剥離した後、0.4% trypan blue 非染色細胞を血球計算板を用いて鏡検下に測定して求めた。

さらに、Control 群、 37BLT_{15} 群、 42BLT_{15} 群および 37BLT_{15} 群ではそれぞれ 1×10^4 個の生細胞数に調整して全量で 2 ml になるように培養液を加えた後、ULTRASONIC DISRUPTOR (トミ-精工, 東京) を用いて細胞を破碎した。次いで遠心分離 (2,000 rpm, 30 分間) 後、上清を -20 °C に凍結保存して CA19-9 の測定に供した。

CA19-9 は GLA-0-ZYME CA19-9 (和光製薬 K.K., 東京) を用いて全自動酵素免疫分析装置 PK 310 (オリンパス光学工業 K.K., 東京) を用いて測定された。

各治療群における細胞の形態変化は位相差顕微鏡 (Nikon, 東京) で観察し、写真撮影を行った。

in vivo 抗腫瘍効果の判定

日本クレア (株) より購入した体重 20 g の nude mice に 1×10^7 個の HuCC-T1 細胞を 27 G 針を用いてその右側背部皮下に接種すると 14 日目には径 4 ~ 6 mm の球状の腫瘍を形成した。同日に ① Control 群, ② 37BLT_{15} 群, ③ 42BLT_{15} 群および ④ 42BLT_{10} 群を設定した。要約すると 5 mg の pentobarbital sodium を nude mouse 皮下に注入して麻酔をかけた後、balloon を腫瘍直上皮膚に密着せしめ、温度 sensor を腫瘍中心部に刺入して、 42.5 ± 0.5 °C の温度管理下に BLT を施行した。

各治療後 7 日目に ether 麻酔下に sacrifice

せしめて腫瘍の湿重量を測定し、中性 formalin 溶液で固定した後、Hematoxylin & Eosin 染色を施行して鏡検した。

統計学的解析

得られた諸値は Mean $\pm$ Standard Deviation で表わした。各2群間の統計学的有意差検定は Students' t-test を使用し、in vitro の実験系では $p < 0.01$ 、in vivo の実験系では $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

1. in vitro 抗腫瘍効果

ST群の抗腫瘍効果は、治療後24時間目では治療時間に関係なく Control群との間に有意差を認めなかったが、48時間目には有意 ($p < 0.001$) な生細胞数減少が認められた (Figure 2, 3)。すなわち、Simple hyperthermia の抗腫瘍効果は遅延性に出現することが示された。

10分間の治療施行 (ST₁₀, 37BLT₁₀, 42BLT₁₀) 後の経時的抗腫瘍効果の成績は Figure 2に示した。24時間目の ST₁₀群と 37BLT₁₀あるいは 42BLT₁₀群との間には各々有意差 ($P < 0.001$) が存在したが、37BLT₁₀群と 42BLT₁₀群との間には有意差は存在しなかった。48時間目の ST₁₀群と 37BLT₁₀群との間には有意差は存在しなかったが、ST₁₀群あるいは 37BLT₁₀群と 42BLT₁₀群との間には有意差 ($P < 0.005$) が存在した。次いで、15分後の治療施行 (ST₁₅, 37BLT₁₅, 42BLT₁₅) 後の経時的抗腫瘍効果の成績は Figure 3に示した。24時間目の抗腫瘍効

果は $4_2BLT_{1.5}$ 群が最大、 $ST_{1.5}$ 群が最小であり、 $3_7BLT_{1.5}$ 群を含めたこれら3群のうち、どの2群間にも有意差（各々、 $P < 0.001$ ）が存在した。48時間目の抗腫瘍効果に関して、 $ST_{1.5}$ 群と $3_7BLT_{1.5}$ 群との間には有意差は存在しなかったが、 $ST_{1.5}$ あるいは $3_7BLT_{1.5}$ 群と $4_2BLT_{1.5}$ 群との間には有意差（ $P < 0.001$ ）が存在した。すなわち、各治療時間毎の比較では、 $4_2BLT_{1.0}$ 群および $4_2BLT_{1.5}$ 群の抗腫瘍効果が最大であり、治療時間の異なる $4_2BLT_{1.0}$ 群と $4_2BLT_{1.5}$ 群との間の比較では $4_2BLT_{1.5}$ 群の抗腫瘍効果は早期に顕著であった。（ $P < 0.001$ ）。

以上の結果から、Laser Treatment による抗腫瘍効果は治療後24時間目においてすでに認められ、かつ、治療時間と相関していることが示された。この抗腫瘍効果は、上述の Simple hyperthermia の遅延性の抗腫瘍効果（delayed effect）に対応すべく early effect と定義した。さらに、Laser Treatment の抗腫瘍効果は Hyperthermia を併用することによ

って delayed effect も期待できることが判明した。

2. CA19-9 値

培養上清中の CA19-9 値は、各種治療後24時間目および48時間目に測定したが、Control, $ST_{1.0}$, $ST_{1.5}$, $4_2BLT_{1.0}$, $4_2BLT_{1.5}$, $3_7BLT_{1.0}$ および $3_7BLT_{1.5}$ の各群の間には有意差は存在しなかった。しかし、培養時間の長い48時間目の CA19-9 値は24時間目のそれに比べて各群で有意に増加した（Table 1）。

培養上清中の CA19-9 値は治療後の死細胞からの放出および生細胞からの産生・遊離が関与していると考えられた。そこで、Control, $ST_{1.5}$, $4_2BLT_{1.5}$ および $3_7BLT_{1.5}$ の各群において治療後24時間目および48時間目の生細胞に表現されている CA19-9 値を測定した。破碎後の CA19-9 値は Control 群と $ST_{1.5}$ 群との間には各培養時間毎の比較で有意差は存在せず、異なる時間における同一群内の値の間にも有意差は存在しなかった。しかし、 $4_2BLT_{1.5}$ および

3.7BLT₁₅の各群のCA19-9値は、各時間毎の比較でControlあるいはST₁₅の各群に比べて有意に低値であったが両者間には有意差は存在しなかった。4.2BLT₁₅あるいは3.7BLT₁₅の各群の異なる時間毎のCA19-9値の比較では、培養時間が長くなる48時間目の値は24時間目の値に比べて両群はいずれも有意に増加していた(Table 2)。すなわち、ControlあるいはSimple hyperthermiaにおけるHuCC-T1細胞のCA19-9の表現は治療の有無および培養時間の長短に関わらず変化しないことを示した。しかし、Laser Treatmentは癌細胞のCA19-9の産生を低下せしめ、時間経過とともに回復傾向にあることが判明した。

3. 培養細胞の形態の変化

ヒト胆管癌HuCC-T1は単層、多稜形で敷石状の比較的整な配列を成し、細胞の膨化や空胞化は認められなかった(Figure 4-a)。しかし、Laserthermia(4.2BLT₁₅)を施行された24および48時間後のHuCC-T1細胞の多くは、そ

の形態をとどめぬほどに破壊され、細胞配列は全く規則性を失っていた(Figure 4-b)。一方、生残したHuCC-T1細胞は球形状に膨化し、細胞質の空胞化と変性顆粒状物質の出現が観察され、さらに、核の濃縮化が顕著であった(Figure 4-c)。同様の変化はHyperthermia(ST₁₅)後48時間目の細胞にも認められたが、その変化は全体に軽微であった。

4. in vivo 抗腫瘍効果

in vitroの系で認められた抗腫瘍効果がin vivoの系でも認められるか否かを検討した。

1 × 10⁷個のHuCC-T1細胞をnude miceの右側背部皮下に移植すると14日目で径4-6mmの球状の腫瘍として容易に認識できた。これらnude miceを任意に抽出して4群に分けた。

各種治療後7日目のControl群の腫瘍湿重量は6.21 ± 1.52 mg (n=10)と増殖し、ST₁₅群では5.15 ± 1.58 mg (n=10)、Laserthermiaを施行した群は4.2BLT₁₅群が2.82 ± 1.62 mg (n=10) BLT₃₀群が2.62 ± 0.651 mg (n=10)であった。

Control群とST₁₅群、₄₂BLT₁₅群と₄₂BLT₃₀群の間には有意差は存在しなかったが、₄₂BLT₁₅群あるいは₄₂BLT₃₀群とControl群との間には $p < 0.001$ 、ST₁₅群との間には各々 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ の有意差が存在した(Table 3)。

5. in vivo の組織像の変化

腫瘍移植後14日目の組織像をFigure 5-aに示した。HuCC-T1細胞は大小不同の核を有し、これら腫瘍細胞は小さな癌巣を形成しつつ増殖していた。さらに、一部で小腺腔を形成し、低分化型腺癌の組織像であった。他方、₄₂BLT₃₀施行後7日目の組織像をFigure 5-bに示した。腫瘍細胞は変性・壊死に陥ってghost化していた。周囲には高度の組織球、線維芽細胞の増生がみられ、好中球を含む炎症性細胞浸潤も著明であり、多くは肉芽腫で置換されていた。生残するHuCC-T1細胞はごく少数で認められるのみであった。₄₂BLT₁₅の組織所見も₄₂BLT₃₀と全く同様であった。

考 察

胆管癌には特異的な自・他覚症状は存在せず、診断時には手術適応となりえない場合が少なくない。切除不能胆管癌には姑息的な減黄術としてendoscopic retrograde biliary drainage (ERBD)やpercutaneous transhepatic biliary drainage (PTBD)が行なわれ、全身化学療法²⁾や局所療法としての抗癌剤局注¹⁴⁾、密封小線源による腔内照射⁴⁾や温熱療法⁸⁾が試みられている。しかし、このような治療法を駆使しても胆管癌患者に対して必ずしも有効ではなく、一般的には予後の改善に寄与しているとは言い難いのが現状である。

胆管癌のhyperthermiaとしては、radiofrequency waveによる体外照射とmicrowaveによる局所照射が用いられてきた^{7, 8)}。Nd:YAG laserを用いたLaserthermiaは早期胃癌を対象に導入されて日常臨床に应用されている¹⁵⁾。Laserthermiaの抗腫瘍効果はhyperthermiaの抗腫瘍効果とlaser光のcytocidal effectの

相乗効果と考えられている¹¹⁾が、高拡散rodを用いたlaserthermiaは一回当たりの照射治療域が狭く、また深部到達域が浅いという欠点を有している¹⁶⁾。そこで、広範囲かつ十分な深達域を有する方法としてlaser光を散乱物質(脂肪乳剤)で拡散させて照射するBalloon Laserthermiaに着目し、独自に開発した装置¹⁸⁾を利用してBalloon Laserthermiaの臨床応用の可能性を検討した。

一般に、肝・胆・膵系の悪性疾患に対するhyperthermiaの基礎実験はきわめて少なく¹⁹⁾、胆管癌に対するBalloon Laserthermiaの基礎実験は筆者が検索した限り、皆無であった。

そこで、laser光自体の有するcytotoxic effectと腫瘍細胞に対するhyperthermic effectがどのような関連性をもつかを命題として基礎実験を施行した。Simple hyperthermiaの抗腫瘍効果は確かに存在したが、それは治療後48時間目に認められる効果であり、24時間目においては有意差はないもののControl

群に比べてむしろ増殖促進の傾向を示した。

他方、BLTはhyperthermiaの有無に関わらず、24時間目にはST群に対し有意に生細胞数の減少をきたした。しかも、10分間のirradiation timeではhyperthermiaの有無で生細胞数に有意差は存在しないものの、15分間に延ばすと有意差が存在した。すなわち、BLTの時間とhyperthermiaの有無の間には腫瘍細胞に与える影響に関連性があるものと考えられた。48時間目の生細胞数はST群においても著明に低下して、hyperthermic effectが認められたが、hyperthermiaを併用しないBLT群との間には有意差は認められなかった。一方、Laserthermia群は、ST群およびBLT群に対して有意に生細胞数の減少を認めた。

上記の結果はhyperthermiaの抗腫瘍効果に関する新しい知見を与えた。すなわち、Balloon Laserthermiaによる抗腫瘍効果はearly stageにおいて既に発現し、これは治療時間と相関を有していること、これまで報告され

てきた hyperthermic effect は delayed effect と考えられるものであること、である。従来の加温法では delayed effect のみを表現しているものと考えられ、Laserthermia は cytotoxic effect (early effect) と hyperthermic effect (delayed effect) を有し、強力な局所治療法となりうる可能性が示唆された。

次いで、in vitro で認められた抗腫瘍効果と HuCC-T₁ 細胞が産生する腫瘍 marker CA19-9 の変動との間に関連性が存在するか否かを検討した。

培養上清中の CA19-9 値は、同一培養時間ではどの 2 群間においても有意差を認めなかった。BLT は cytotoxic effect を有しており、破壊された細胞から CA19-9 が培養上清中に遊出し、Simple hyperthermia では生細胞（特に 24 時間目の CA19-9 値）からの産生だけでなく変性細胞からも遊離しているものと考えられた。一方、治療後 24 および 48 時間の各群の生細胞数を 1×10^4 個に調整して破碎した後

で、CA19-9 値を測定し、生細胞内の CA19-9 量を推定したところ、42BLT₁₅ 群の CA19-9 値は

Control 群および ST 群に比較して有意に低値であった。この事実は BLT 群の培養上清中の CA19-9 の多くが壊死癌細胞から放出されたことを強く示唆したが、さらに、BLT は cytotoxic effect を発揮するのみでなく、生き残った癌細胞の CA19-9 の産生機構に影響を与えているのではないかという可能性をも示唆した。in vitro および in vivo の細胞あるいは組織の形態学的変化は、細胞の破壊および組織の壊死が主要所見であり、Laserthermia の cytotoxic effect を支持する所見であった。しかも、生残した HuCC-T₁ 細胞の形状、細胞質および核の変化も顕著であった。laserthermia が癌細胞に与える影響を電顕を用いて検討した成績では、細胞内小器官とくに mitochondria や粗面小胞体の破壊が顕著であったと報告されている¹⁸⁾。今回の観察および上記の電顕像の報告から、Laserthermia は癌細胞が

死に至らぬ場合でも顕著な変性を惹起し、CA19-9の産生異常という質的な変化にも関与している可能性が考えられた。しかし、BLT後48時間目のCA19-9値が24時間目に比較して有意に増加していることから、この質的变化は一時的なものであると考えられる。

Laserthermiaはcytotoxic effectとhyperthermic effectの両者を有するものと考えられ、現実にin vivoの実験系においてもその抗腫瘍効果が認められた。Laserthermiaの臨床応用はこの基礎実験によってその有効性が十分に期待されるものと考えられた。しかし、Laserthermiaのみで胆管癌の治療が十分であるわけではない。ヒトの肝胆道系癌に対するhyperthermiaは必ずしも全例で有効とは限らない¹⁹⁾が、Laserthermiaはcytotoxic effectが存在するがゆえに直接的な抗腫瘍効果が期待できるという利点がある。hyperthermiaが放射性感受性の最も低いlate S期(DNA合成後期)に最も有効であるという事実¹⁹⁾は放射

線治療の弱点を補う作用を有している。放射線照射によって生じる亜致死障害(sublethal damage, SLD)や潜在的致死障害(potentially lethal damage, PLD)の回復がhyperthermiaの併用によって阻害される²⁰⁾。放射線治療においては癌細胞の低酸素状態が放射線抵抗性の主因であると考えられている²⁰⁾。これらの低酸素細胞は同時に低栄養状態にあり、また癌細胞は嫌気性解糖に傾いて乳酸量が増加し、pHの低下とそれによるlysosome酵素活性の上昇²¹⁾により、hyperthermiaの効果を高めることになる。以上の理論的根拠を基に放射線治療とhyperthermiaの併用が癌治療に有効と考えらる。これにlaserのcytotoxic effectを加味することはより高い有効性が期待されるであろう。さらに、抗癌剤との三者併用療法による相乗効果の可能性についても新めて道が拓かれるかもしれない。

Laserthermiaが正常細胞に及ぼす影響、すなわち安全性に関しては、ニッ木ら¹⁸⁾の報

告がある。laser control および組織温度変化制御の手技上の安定性あるいは安全性は、ブタ肝臓の組織学的検討から、正常粘膜に対する安全性はヒト胃粘膜の組織学的観察から問題はない。筆者がブタの正常総胆管に Balloon Laserthermia を施行して鏡検した結果では、治療域温度であれば総胆管粘膜の変化は軽微であり安全性を確認し得た²²⁾。

以上の結果および考察から Balloon Laserthermia はヒト胆管細胞癌に対する臨床応用の可能性かつ有効性が示唆され、しかも安全に施行しうるものと考えられた。

結 語

ヒト胆管細胞癌 HuCC-T₁株を用いて、Balloon Laserthermia の抗腫瘍効果を in vitro および in vivo の系で実験的に検討し、以下の結果が得られた。

- ① Balloon Laserthermia は単純な hyperthermia にはない early effect (cytotoxic effect) と delayed effect (hyperthermic effect) の両者の抗腫瘍効果を有していた。
- ② Laserthermia は in vitro および in vivo の実験系のいずれにおいても、癌細胞の破壊・変性および腫瘍組織の壊死を惹起せしめた。
- ③ Laserthermia によって残存癌細胞の産生する腫瘍 marker CA19-9 値は減少した。
- ④ Laserthermia は癌細胞それ自体に対する質的変化を惹起している可能性が示唆された。
- ⑤ 以上から、Laserthermia は集学的癌治療法の一つとして安全かつ有用であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました北海道大学医学部内科学第3講座宮崎保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を戴きました北海道大学医学部癌研究施設病理部門細川真澄男教授、同細胞制御部門武市紀年教授、札幌厚生病院病院長村島義男医学博士、同消化器科須賀俊博主任部長に心から感謝致します。本実験に際し、ヒト胆管細胞癌 HuCC-T1株を御供与下さいました富山医科薬科大学第3内科渡辺明治教授、同助手清水幸裕医学博士に深謝致します。さらに、実際の研究に際し懇切に御指導・御助言を賜りました札幌厚生病院外科医長波江野力医学博士、北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門助手岡田太医学博士に特段の感謝を申し上げます。

文 献

1. 羽生 富士夫 (1989): 胆道癌の外科. 日消外会誌 22: 2163-2171
2. Harvey JH, Smith FP, Shein SP (1984): 5-Fluorouracil, mitomycin, and doxorubicin (FAM) in carcinoma of the biliary tract. J Clin Oncol 2: 1245-1248.
3. 高田 忠敬、小林 誠一郎、内田 泰彦 (1976): 切除不能胆道癌の治療に関する検討 - とくに経皮的胆管ドレナージを応用した放射線治療について - . 外科 38: 53-60
4. 竜 崇正、山田 滋、佐藤 滋宏 (1993): RAL S 胆管腔内照射. 腹部画像診断 13: 697-704
5. Okumura H, Udagawa Y, Yamada K, Tsukasaki K, Azuma Y, Nozawa S (1979): Effect of Temperature on the Proliferation and Viability

of Culture. Proc. Japan Acad, 55, Ser. B 135-140

6. 本間 定、永森 静志、藤瀬 清隆、筋野 甫
松浦 知和、清水 恵一郎、亀田 治男 (1985): ヒ
ト肝胆道系癌培養細胞の生存と増殖に及ぼす
温熱の効果. 日消誌 82:2043-2048

7. 栗原 正利、宮崎 勝、川田 滋、遠藤 文夫
志村 賢範、菅沢 寛健、高橋 修、宇田川 郁夫
越川 尚男、伊藤 博、神野 弥生、中島 透、
藤本 茂、奥井 勝二 (1986): 肝、胆、膵癌に
対する Radiofrequency (RF) 波温熱療法の試み.
J. Jpn. Soc. Cancer Ther. 21:2337-2342

8. 唐沢 英偉、五月女 直樹、杉浦 進之、三木 亨
(1990): 肝外胆管癌の温熱療法. 胆と膵 11:
383-386

9. 鈴木 荘太郎、青木 純、椎名 泰文、野見山

哲、三輪 剛、大工園 則雄 (1986): 内視鏡下
Nd:YAGレーザー温熱療法に関する基礎的研究
および制御システムの開発. 日本レーザー医
学会誌 6:347-350

10. Sugiura M, Kurokawa A, Hotta M, Ina N, Mo
ri N, Kanemaki N, Nishida M, Bruger C, Iizuka
A, Morise K, Daikuzono N (1988): Experimental
and clinical studies on laser thermia
using an Nd:YAG laser. Laser Surgery: Cha-
racterization and Therapeutics. SPIE 907:
66-70

11. Tajiri H, Yanao O, Sumao E, Sugimura T (1
988): Local Hyperthermia Using a Low Powe-
red Nd:YAG Laser. 北海道医学雑誌 63:889-
896

12. 宮際 幹、市田 隆文、舟木 淳、佐々木
博 (1988): CA19-9 高産生ヒト胆管細胞癌由来

細胞株 - HuCC-T1 株の樹立とその性状 . 肝臓 29
: 276-277

13. 小井戸一光、村島義男 (1991): 胆道系悪性腫瘍に対する、レーザーサーミア療法 - 特にバルンレーザーサーミアについて。第41回日本内視鏡学会総会、パネルディスカッション2、内視鏡による胆道系悪性腫瘍の診断と治療 . Gastroenterol Endosc 33:2493

14. 須山正文、有山襄、小川薫 (1989): 切除不能悪性胆管狭窄に対するPTBEと抗癌剤局注療法 . 胃と腸 24:762-763

15. 印牧直人、服部和彦、伊藤圓、恒川洋、伊奈研二、杉浦眞 (1989): 早期胃癌に対する内視鏡的Nd:YAGレーザーによる局所温熱療法 (レーザーサーミア) の臨床的検討。消化器内視鏡の進歩 . 35:125-129

16. 平井信二、檜村博正、中原朗、松本好正、福富久之、大管俊明、崎田隆夫 (1989): 早期胃癌に対する各種内視鏡的治療法 - YAGレーザー焼灼法とマイクロ波凝固の比較、及びYAGレーザー温熱療法の検討 - . Gastroenterol Endosc 31:698-709

17. Futatsuki K, Saifuku K, Yamamoto K, Takeuchi N, Kanda Y, Uehara T, Sekiguchi Y, Daikuzono N, Joffe S.N. (1989): Study of balloon laser thermia. SPIN 1066:231-239

18. ニツ木浩一、山本邦男、上原敏敏、西福幸二 (1993): バルーンレーザーサーミアの基礎的、臨床的検討 . 日本レーザー医学会誌 14:51-58

19. Westra A, Dewey WC (1971): Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro.

Int J Radiat Biol 19:467-477

20. Dewey WC, Hopwood LE, Sapareto SA, Gerweck LE (1977): Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation. Radiology 123:463-474

21. Von Ardenne M (1972): Selective multiphase cancer therapy: Conceptual aspect and experimental basis. Adv Pharmacol 10:339

22. 小井戸一光、村島義男 (1993): 悪性胆道狭窄に対するレーザーサーミア療法 - その基礎的臨床的検討 - ; 第29回日本胆道学会総会シンポジウム; 胆道癌: 基礎から臨床へ. 胆道 17:98

Figure Legends

Figure 1. Scheme of the experimental model for the Nd:YAG Balloon Laserthermia. The Balloon Laserthermia was performed with a 5 Fr. balloon catheter under a computer-controlled system.

Figure 2. The anticancer effect of the Balloon Laserthermia (10min). The Simple hyperthermia (ST₁₀) did not show any anticancer effect at the 24 hour point, however, showed the significant effect at the 48 hour point compared with the Control group. The Balloon Laserthermia significantly brought about an anticancer effect at the 24 hour point and the effect continued until the 48 hour point.

□-□: Simple hyperthermia (ST₁₀)

△-△: Laser Treatment (37BLT₁₀)

○-○: Laserthermia (42BLT₁₀)

a, e p<0.001, d p<0.005, b, c not significant

Experimental model for Nd:YAG laserthermia with balloon catheter

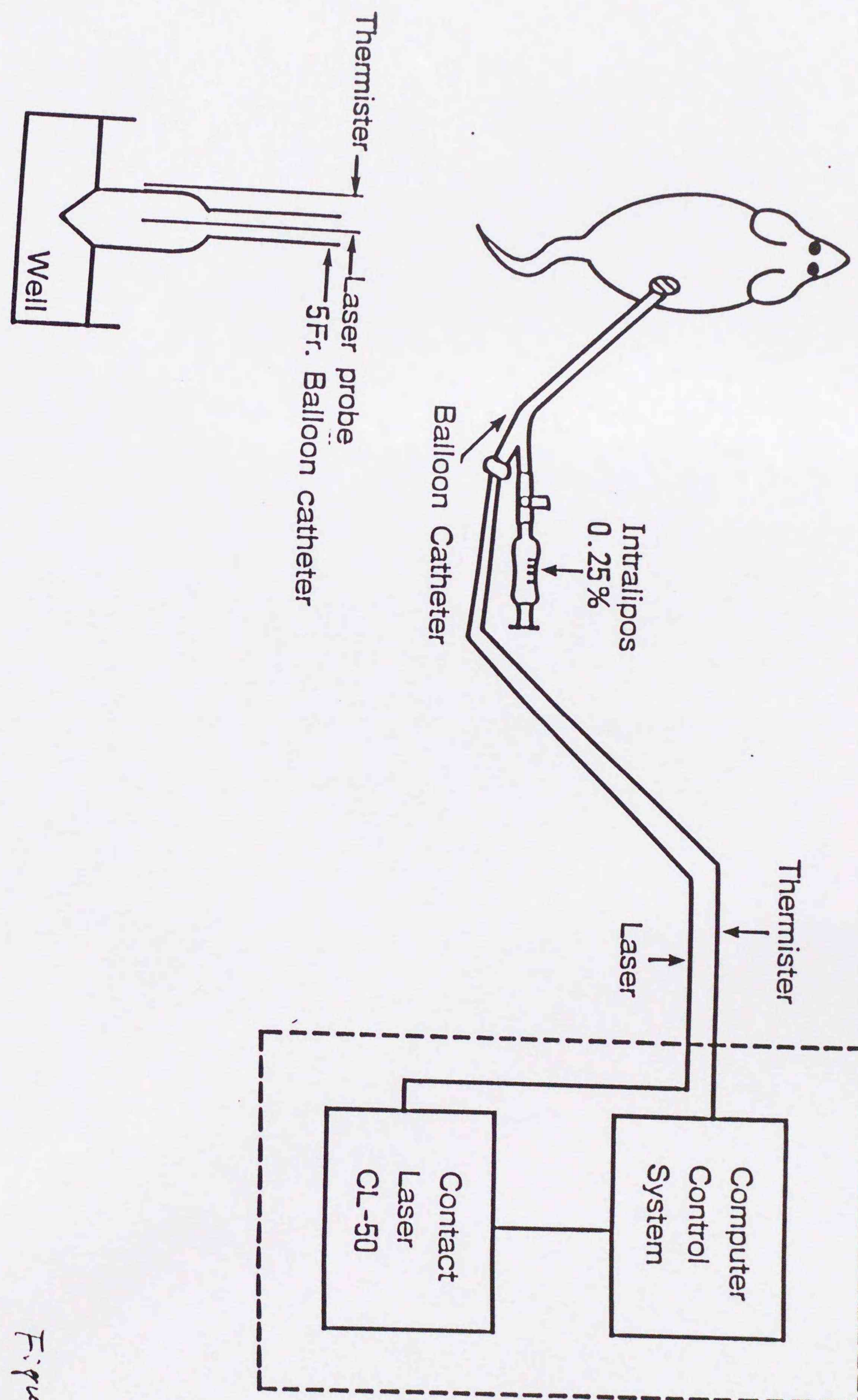


Figure 1

Figure 1

Figure 3. The anticancer effect of the Balloon Laserthermia(15 min). The anticancer effects of every groups were as almost same as the effects shown in Figure 2.

□-□ : Simple hyperthermia (ST₁₅)

$\Delta-\Delta$: Laser treatment ($_{37}BLT_{15}$)

○-○: Laserthermia(₄₂BLT₁₅)

^a $p < 0.005$, ^{b,d,e} $p < 0.001$, ^c not significant

Figure 4. Morphological findings of the cultured HuCC-T1 cells. The HuCC-T1 cells without treatments formed a regular, cobblestone arrangement (a). Most of the HuCC-T1 cells treated with BLT were destroyed (b). In addition, living cells were expanded with cytosomal ballooning, degenerative granular particles in the cell bodies, and nuclear condensation (c).

Figure 5. The histology of HuCC-T1 cells inoculated into a nude mouse showed a poorly differentiated adenocarcinoma (a). The specimen obtained from the tumor treated with BLT showed necrotic tissue with a ghost-like appearance, being replaced by granular tissue (b). (a and b are both on EH stain.)

ii)

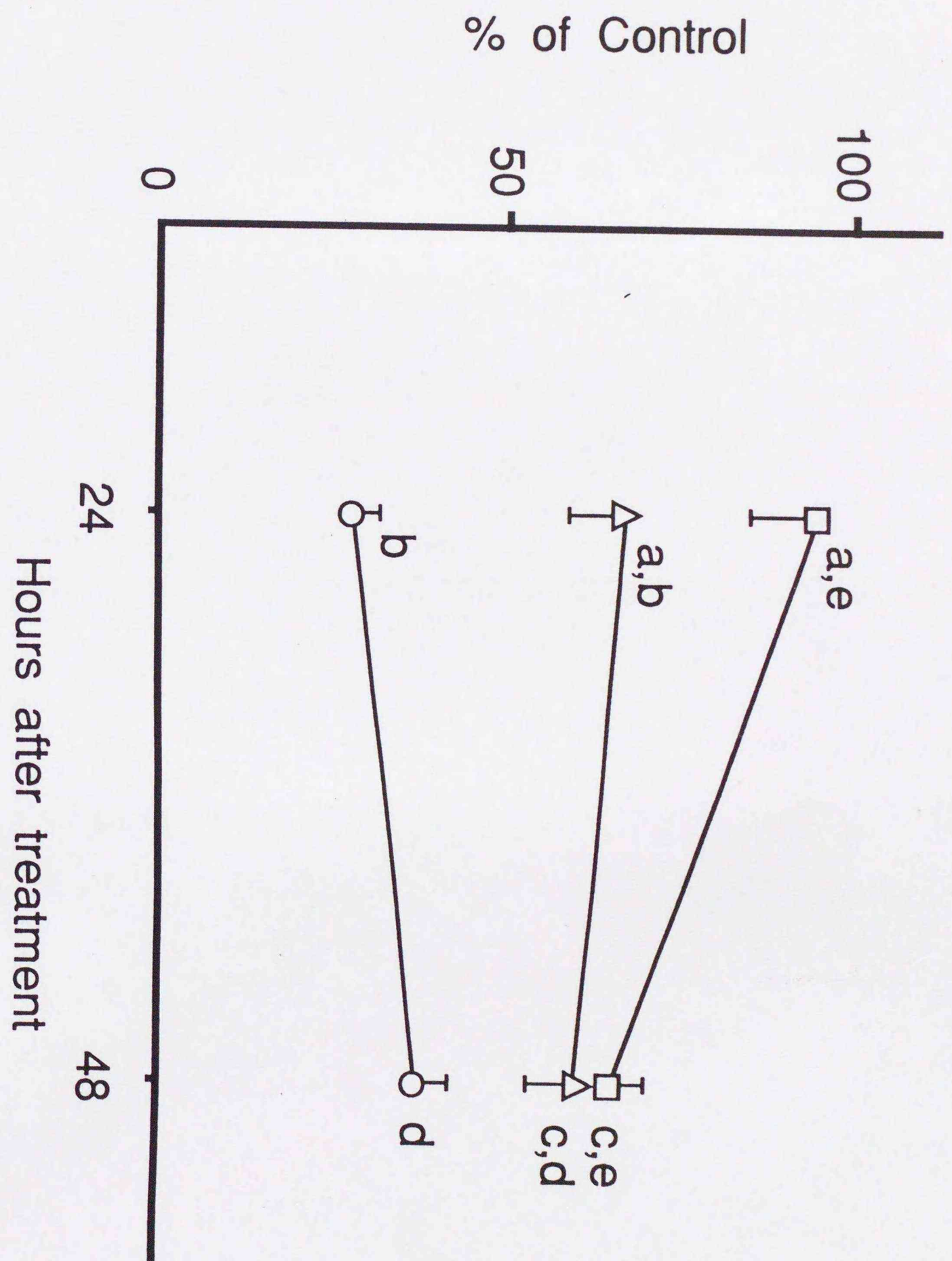


Figure 3

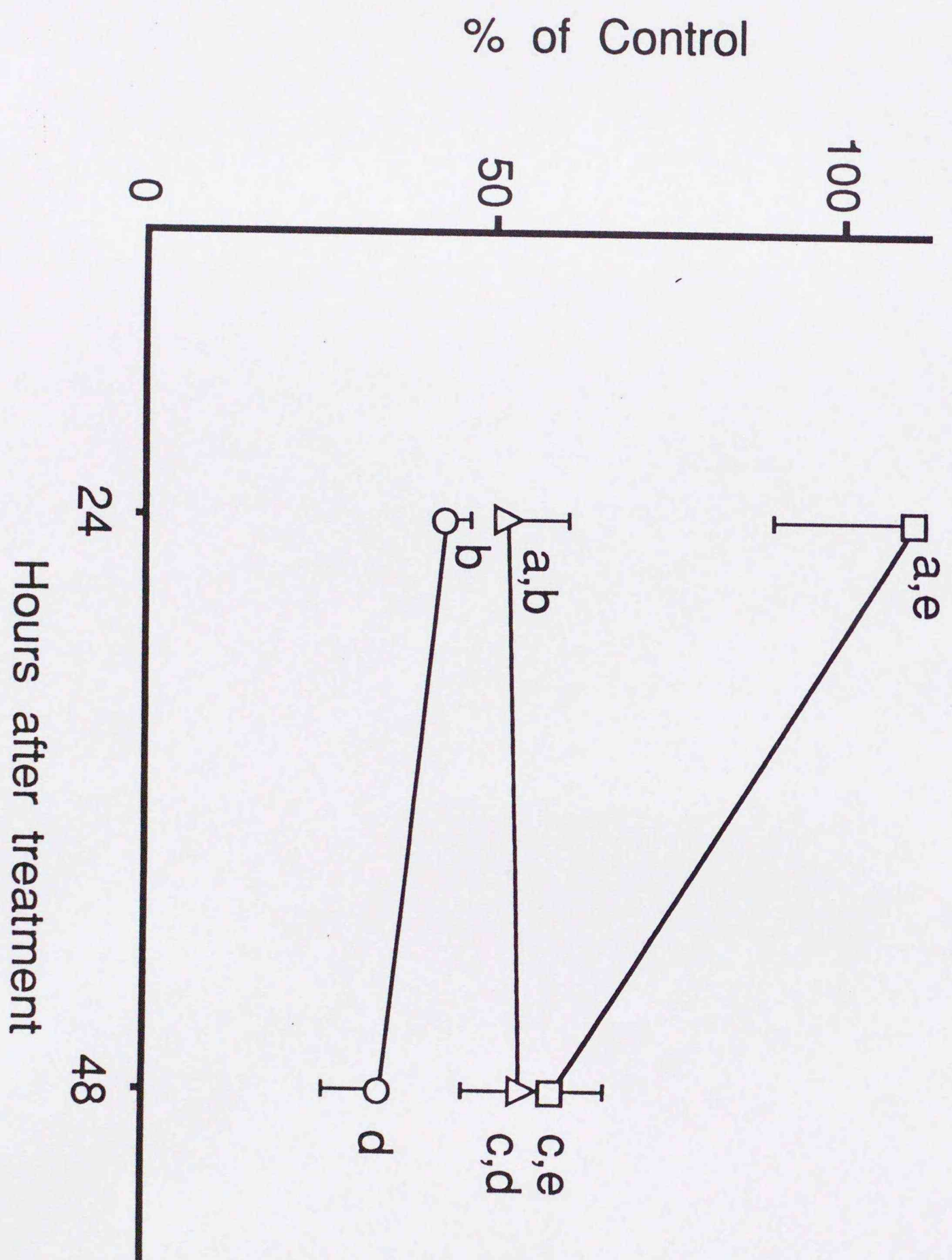


Figure 2

Table 2 Value of CA 19-9 (U/ml) in the Lysated Cells (1×10^4) after Treatments

Treatments	Hours after treatment		
	24 ^a	48 ^b	p-value (a vs b)
Control	7.2 $\pm$ 0.75	7.7 $\pm$ 3.0	n.s
Simple hyperthermia (ST ₁₅)	6.7 $\pm$ 1.7 ^{c, d}	7.3 $\pm$ 1.6 ^{e, f}	n.s
Laserthermia (42BLT ₁₅)	3.1 $\pm$ 0.22 ^c	5.2 $\pm$ 0.34 ^e	<0.001
Laser treatment (37BLT ₁₅)	4.1 $\pm$ 0.94 ^d	5.8 $\pm$ 0.65 ^f	<0.01

c, d, e p<0.001, f p<0.005,
n.s : not significant

Each value (Mean $\pm$ S.D.) was composed of six independent measurements.

Table 1 Value of CA 19-9 (U/ml) in the Cultured Supernatants after Treatments

Treatments	Hours after treatment		
	24 ^a	48 ^b	p-value (a vs b)
Control	25.1 $\pm$ 4.1	57.9 $\pm$ 7.1	<0.001
Simple hyperthermia (42°C)	10 min	23.6 $\pm$ 3.6	53.6 $\pm$ 9.7
	15 min	25.3 $\pm$ 5.8	54.2 $\pm$ 8.3
Laserthermia (42°C)	10 min	24.2 $\pm$ 2.9	49.1 $\pm$ 9.1
	15 min	25.1 $\pm$ 9.6	45.3 $\pm$ 11.9
Laser treatment (37°C)	10 min	23.7 $\pm$ 2.2	43.1 $\pm$ 11.8
	15 min	24.6 $\pm$ 5.8	44.3 $\pm$ 8.9

Each value (Mean $\pm$ S.D.) was composed of six independent measurements.
There were not significant differences between any two values at the same hours after the treatments.

Fig. 4 a

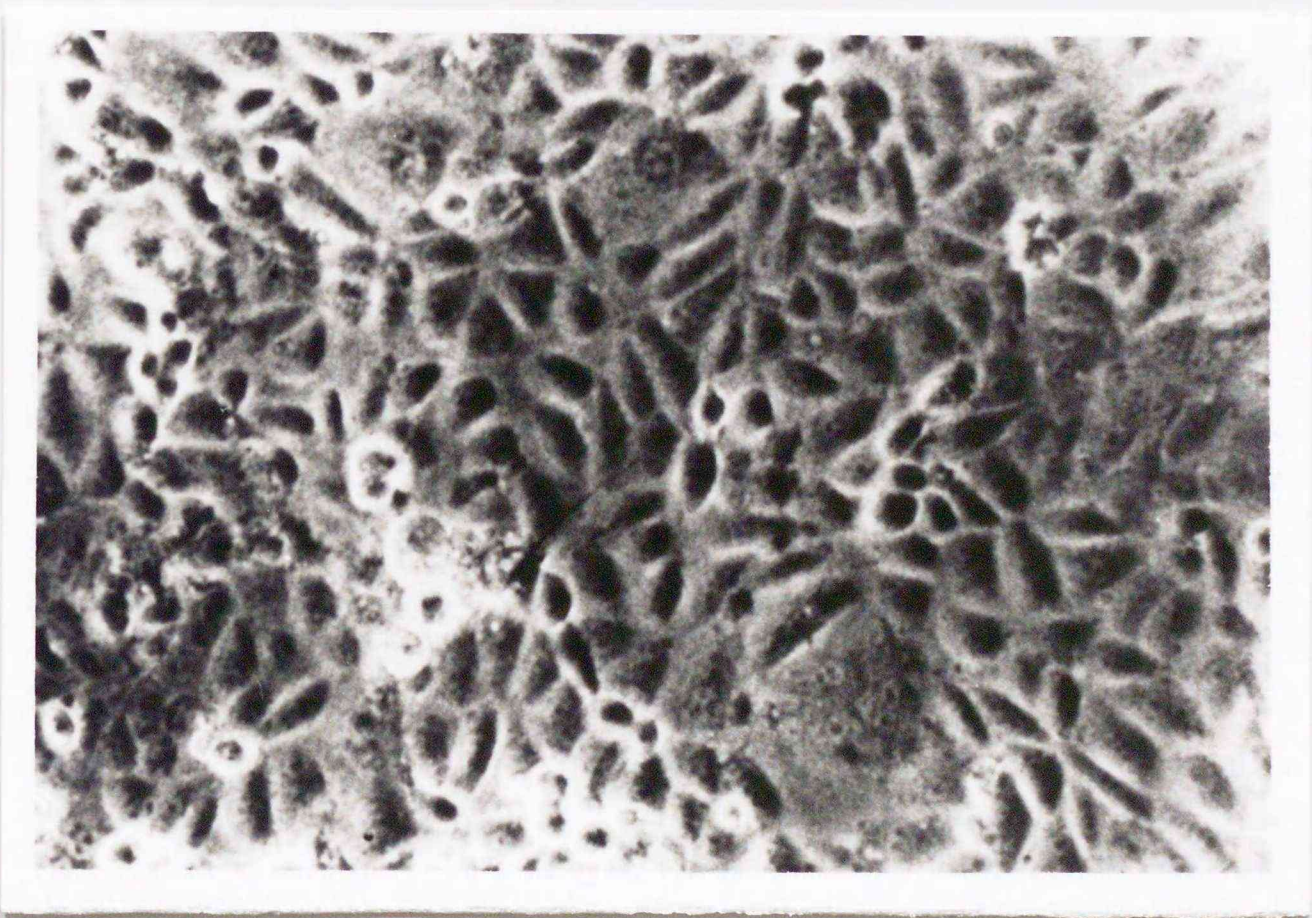


Table 3 Effect of Laserthermia on in vivo Tumor Growth

Procedure	No. of mice	Tumor wet weight (mg)
Control	10	6.21 ± 1.52 ^a , ^b
Simple hyperthermia	10	5.15 ± 1.58 ^a , ^c , ^d
Laserthermia for 15 min	10	2.82 ± 1.62 ^b , ^c , ^e
Laserthermia for 30 min	10	2.62 ± 0.651 ^d , ^e

^a not significant, ^b p<0.001, ^c p<0.01, ^d p<0.001, ^e not significant

Fig. 4 - b

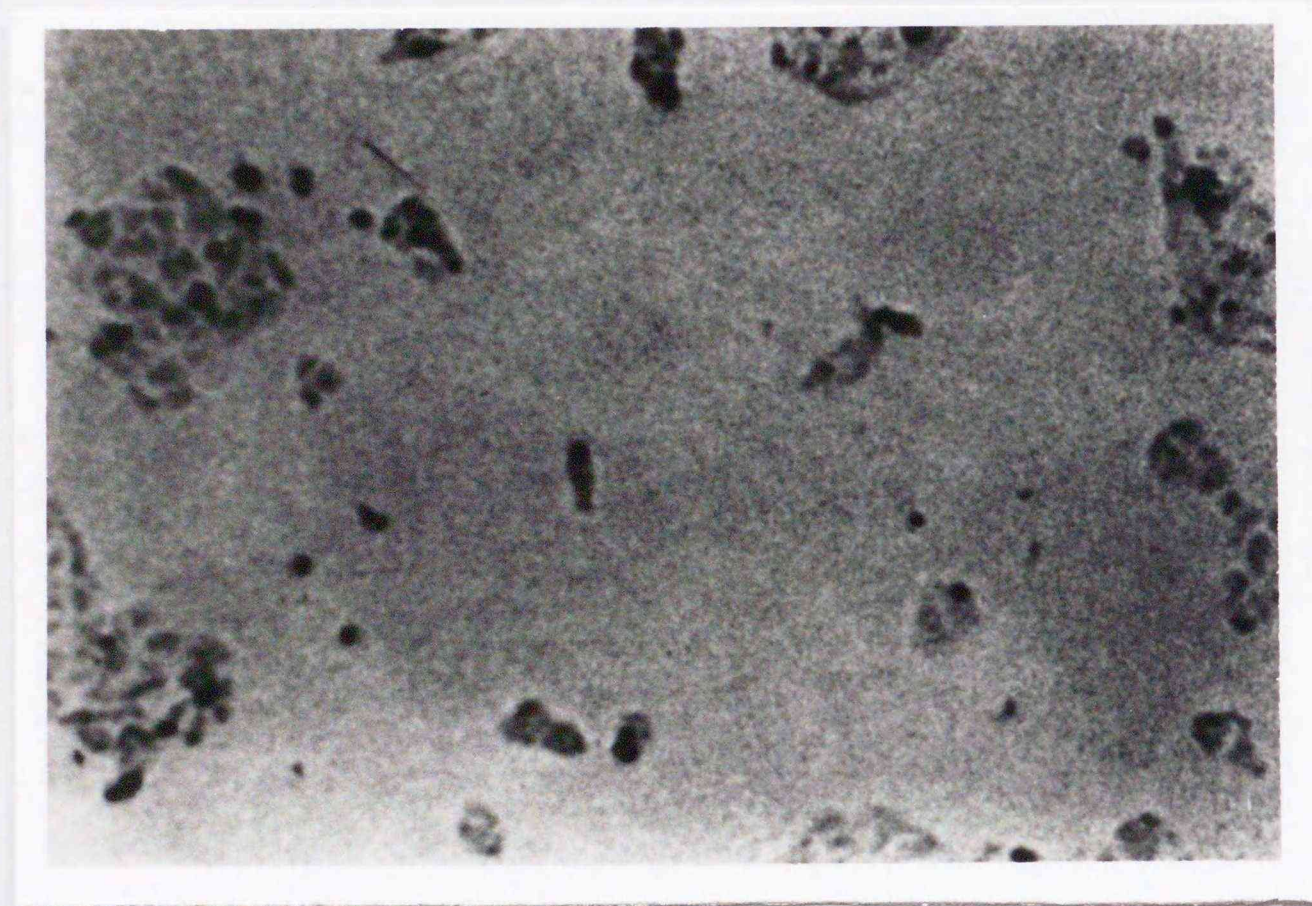


Fig. 4 - c

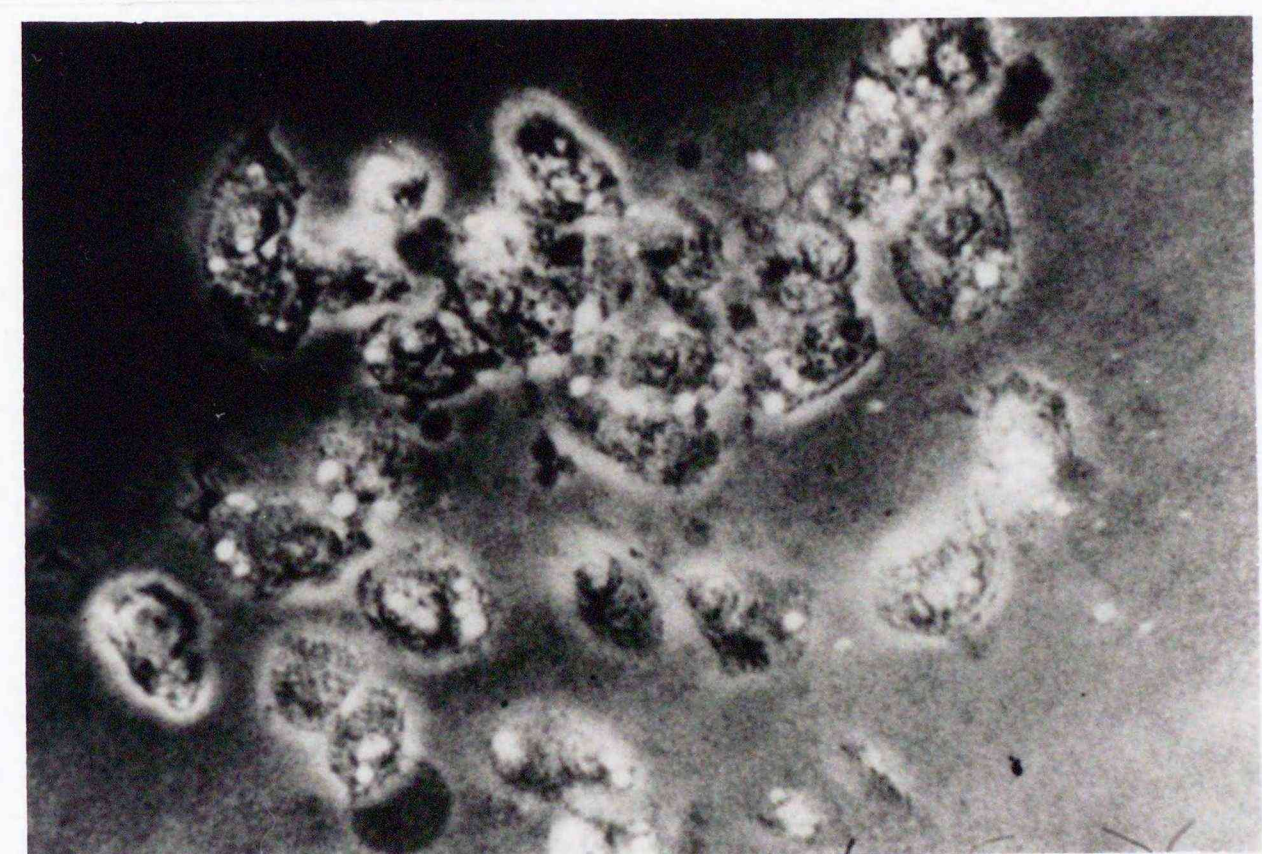


Figure 5-9



Figure 5-6

