Arch Jpn Chir 53(5), 662～666, Sept., 1984

腫瘍の Microwave Coagulation による転移率の実験的検討

和歌山県立医科大学消化器外科（主任：勝見正治教授）

山上　裕機，勝見　正治，田伏　克惇，青山　　修，野口　博志
江川　　博，小林　康人，永井　祐吾，森　　一成

〔原稿受付：昭和59年6月19日〕

Experimental Studies of the Incidence of Metastases following the Microwave Coagulation Therapy for Malignant Tumor

Hiroki Yamaue, Masaharu Katsumi, Katsuyoshi Tabuse, Osamu Aoyama, Hiroyuki Noguchi, Hiroshi Egawa, Yasuhito Kobayashi, Yugo Nagai and Kazunari Mori

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College
(Director: Prof. Dr. Masaharu Katsumi)

In our department, we have maked use of Microwave Tissue Coagulator (MTC) for the malignant tumor, expecting to destroy the tumor lesions and to increase the anti-tumor immunity.

This report revealed whether this procedure led to enhance tumor metastasis or not. The incidence of tumor metastasis was experimented in BALB/c mice after MTC treatment and surgical excision of primary tumors. On the 14th day after BALB/c mice were transplanted of the syngeneic fibrosarcoma (Meth A), mice were divided to the following groups: Group A; no treatment, Group B; surgical excision of primary tumor, Group C; MTC treatment of the primary tumor.

More two weeks later, mice were sacrificed. The incidence of metastasis in the lung, liver and regional lymph nodes was lowest in Group C. The weight of spleen in Group C was more increased than that of other groups,and foreign body giant cells remarkably appeared in Group C spleen.

For the purpose of studying the anti-tumor immunity following MTC treatment, Winn assay was carried out. As a result, anti-tumor immunity of the spleen lymphocytes in Group C was especially enhanced.

The authors concluded that MTC therapy suppressed the incidence of metastasis and augmented the anti-tumor immunity.

Key words: Microwave Tissue Coagulator, Microwave Surgery, Neoplasm metastasis, Winn assay.
索引語：マイクロ波凝固装置，マイクロ波外科手術，腫瘍転移，Winn 検定.
Present address: Wakayama Medical College, 1, 7-bancho Wakayama city, 640, Japan.

I. は じ め に

固形腫瘍の外科的治療において，原発巣以外に肝など他臓器に転移している場合，教室では主病巣の破壊および腫瘍抗原の増強を期待して，Microwave Tissue Coagulator (以下 MTC と略す) を用いて腫瘍凝固を行ない治療効果を上げている．しかしその際問題となるのは腫瘍の MTC 処置により臓器転移が増強されないかどうかという事であり，今回私たちは以下の実験モデルを作成し MTC 処置による転移率を検討した．

II. 実験材料および方法

(1) 実験動物および腫瘍

7～9週齢の雄性 BALB/c マウスを使用し，腫瘍細胞には Meth A sarcoma を使用した．Meth A 細胞は腹腔内継代し，赤血球除去後 PBS (Dulbecco's) にて洗浄後，実験に供した．

(2) 実験装置

実験装置は教室で開発した発振周波数 2450 MHz，波長 12 cm の MTC と手術用 Monopolar 型針状電極（電極長 5 mm）を用いた．

(3) 実 験 I (図1)

BALB/c マウスの左後肢皮下に Meth A 細胞 2×10^6 個を移植し，移植14日後（平均腫瘍重量 2.60 gr，平均腫瘍径 17 mm)，以下の各群に分けて腫瘍に処置を施行した．Group A はコントロールとしエーテル麻酔のみの群，Group B は左後肢切断群 (surgical excision 群)，Group C は 25 W，15秒の条件にて coagulation を4回施行した群であり，この条件にて腫瘍体積の約80%が完全凝固された．各群とも移植28日後に屠殺し肺，肝，局所そけい部リンパ節の腫瘍転移の有無を検索した．転移の確認[2]は，1臓器につき均等に6ケ所より切片を作成し組織学的に検討した．また各群における脾重量の比較と脾の組織学的検索もあわせて施行した．

(4) 実 験 II (図2)

実験 I の各群の脾リンパ球の抗腫瘍免疫活性を検索した．BALB/c マウスの左後肢へ 2×10^6 個の Meth A 細胞を移植し，実験 I と同様に Group A はコントロール群とし移植14日後に脾を摘出し，Group B は移植7日後に左後肢を切断し，Group C は移植腫瘍へ実験 I と同条件の MTC 処置を施行し，それぞれ処置の7日後に脾を摘出した．各群の脾より比重遠沈法にてリンパ球を単離し，Winn の方法[16]に従って各群のリンパ球と腫瘍細胞の混合液（細胞比 20：1）をマウスの側腹部へ移植した．すなわち Group I は Meth A 1×10^5 個のみ移植した群であり，Group II は Meth A 1×10^5 個と Group A の脾リンパ球の混合液を移植した群，Group III は Meth A 1×10^5 個と Group B の脾リンパ球の混合液を移植した群，Group IV は Meth A 1×10^5 個と Group C の脾リンパ球の混合液を移植した群とし，各群の移植14日後の腫瘍重量を指標として抗腫瘍免疫活性を検討した．

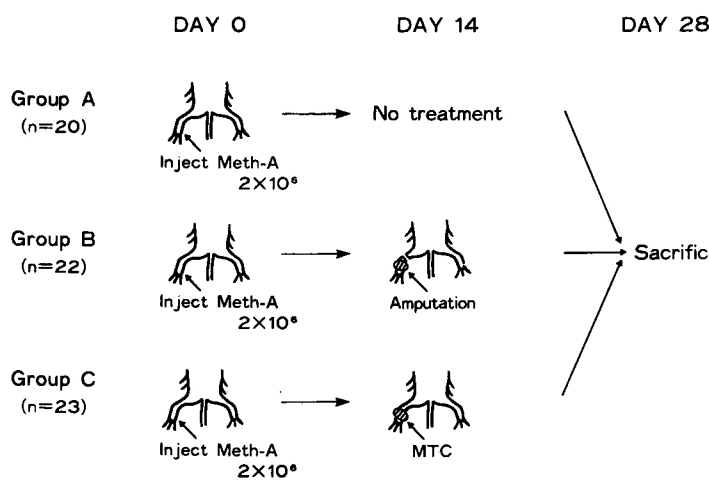

Fig. 1. Experiment on the incidence of metastasis. MTC condition: 25 W, 15 sec, 4 times. About 80% volume of tumor is coagulated.

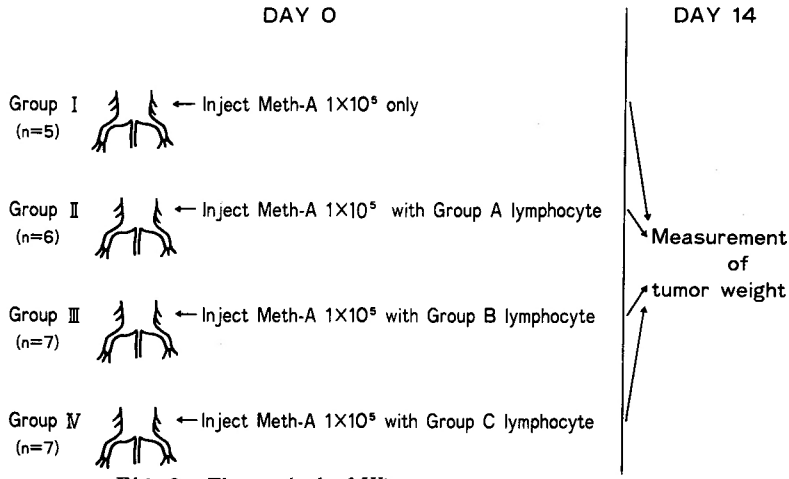

Fig. 2. The method of Winn assay
*Group A. B. C. shown in Fig. 1.
**The ratio of lymphocytes to tumor cells is 20.

III. 結　　果

(1) 実 験 I

各臓器の転移率を表1に示す．肺転移率は Group Aで75%，Group Cで30.4%であり，Group Cで転移率が低い傾向にあるが，χ^2 検定では各群に有意差は認められなかった．肝およびリンパ転移では，Group Cにおいて転移率が低い傾向にあるが，有意差は認められなかった．各群の脾重量（表2）は，Group A と Group B および Group A と Group C の間には Student t 検定にて有意差を認めたが，Group B と Group C の間には有意差は認められなかった．図3には Group C の脾細織像を示すが，Group A, B の脾と比較して foreign body giant cell の出現およびリンパ濾胞の増生が著明であった．

(2) 実 験 II

Winn assay における平均腫瘍重量（表3）は，Group IV で最も小さく，% Inhibition は67.5%であった．また Group I と Group II, III, IV の間には Student t 検定にて有意差を認めたが，Group II, III IV の間には有意差を認めなかった．

IV. 考　　察

Microwave は Hyperthermia という関点[1,6]から癌治療に用いられてきたが，教室が開発した MTC は Microwave のエネルギーを小領域に集中させたもので，止血効果にすぐれているため，肝[13]，脾[14]など実質臓器の切除に用いられている他，腫瘍組織を直接凝固する目的にも使用されているが，その際腫瘍転移を惹起しないかどうかという事が問題となる．今回私たちは MTC 処置により転移は促進せず，抑制される傾向にあるという結果を得た．MTC 処置による転移抑制の機序として，MTC 処置により脾重量は増加するが，それは単に炎症に対する反応性の重量増加のみならず，Winn assay の結果 MTC 処置により脾リンパ球に抗腫瘍免疫活性の増強が生じると推察される．

Table 1. The incidence of metastasis obtained

	Lung metastasis	Liver metastasis	Lymph node metastasis
Group A (n=20)	15/20 (75.0%)	5/20 (25.0%)	10/20 (50.0%)
Group B (n=22)	10/22 (45.5%)	4/22 (18.2%)	12/22 (54.5%)
Group C (n=23)	7/23 (30.4%)	4/23 (17.4%)	9/23 (39.1%)

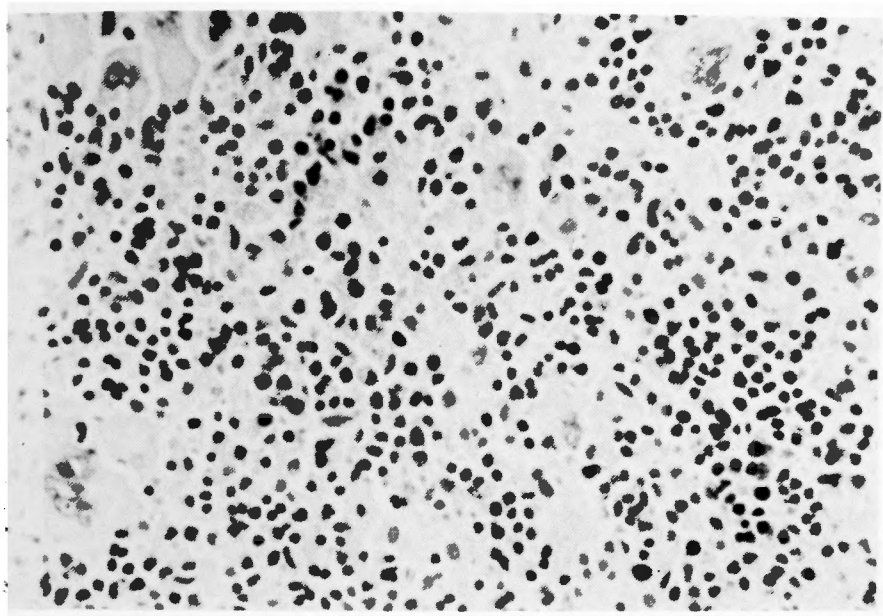

Fig. 3. Section of the spleen in Group C mice. (HE.×400)
Foreign body giant cells remarkably appeared.

Table 2. Weight of spleen

	n	$\bar{x}$±SE (mg)
Group A	20	199.2±17.5
Group B	22	346.4±21.9*
Group C	23	405.7±80.4*

*p<0.05 (as compared with Group A)

Table 3. Result of Winn assay

	n	$\bar{x}$±SE (mg)	% Inhibition (%)
Group Ⅰ	5	503.9±111.7	——
Group Ⅱ	6	179.2± 15.0*	64.4
Group Ⅲ	7	205.2± 71.6*	59.3
Group Ⅳ	7	164.0± 70.7*	64.5

$$\%\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Tumor weight}}{\text{Tumor weight in control (Group I)}}\right) \times 100(\%)$$

*P<0.05 (as compared with Group Ⅰ)

Noguchi[10,11] らは，腫瘍の MTC 処置により担ガンマウスの生存日数が有意に延長し，また cytotoxic T cell および natural killer cell (NK cell) の活性が増強されると報告しており，これらの MTC 処置による抗腫瘍免疫活性の増強が転移を抑制する一因になっていると考えられた．腫瘍の臓器転移を抑制する免疫学的機序として，NK cell[5,15]，Macrophage[9,17]，Immune T cell[4,12] の活性増強が報告されており，今後これらの免疫担当細胞の活性が腫瘍の MTC 処置によりどのように変動するかという事が問題になると思われた．また腫瘍を直接破壊する手段として MTC の他に Cryosurgery, Irradiation などがあるが，Cryosurgery の腫瘍破壊に際して，池田[7] らは抗腫瘍効果とリンパ節転移の抑制がみられたとし，岩佐[8] らは免疫賦活効果がみられたと報告している一方，Yamashita[18] らは，Cryosurgery にて癌転移が促進されたと報告している．腫瘍の local Irradiation による腫瘍処理に際しても転移が抑制されるという報告[2] と，むしろ促進されるという報告[3] があり，これらの discrepancies は実験手技のちがい，または用いる腫瘍のちがいなどによると考えられている[9] が，Cryosurgery に関しては，腫瘍のどのくらいの体積を処理できたかという事が大きな問題となると考えられ，腫瘍の MTC 処置においても，今後腫瘍体積の何%を凝固するのが最も抗腫瘍免疫活性が増強され，また転移を最も抑制するのか，検討する必要があると思われた．

IV. 結　　語

(1) 腫瘍組織のMTC処置により臓器転移率は抑制されたが，切断群とMTC処置群の間には転移率に有意差は認められなかった．

(2) 腫瘍組織のMTC処置により脾重量は増加し，foreign body giant cellの出現，リンパ濾胞増加の所見を呈した．

(3) Winn assayの結果，MTC処置群の脾リンパ球には抗腫瘍免疫活性がみられた．

なお本論文の要旨は第21回日本癌治療学会総会（1983年10月名古屋）および第2回 Microwave Surgery 研究会（1983年12月大阪）において発表した．

参 考 文 献

1) Baker HW, Snedecor PA, et al: Regional hyperthermia for cancer. Am J Surg **143**: 586-590, 1982.
2) Crile GJ, Deodhar SD: Role of preoperative irradiation in prolonging concomitant immunity and preventing metastasis in mice. Cancer **27**: 629-634, 1971.
3) De Ruitel J, Cramer SJ, et al: Comparison of metastatic disease after local tumor treatment with radiotherapy or surgery in various tumor models. Eur J Cancer Clin Oncol **18**(3): 281-289, 1982.
4) Fidler IJ, Gersten DM, et al: Influence of immune status on the metastasis of three murine fibrosarcomas of different immunogenicities. Cancer Res **39**: 3816-3821, 1979.
5) Hanna N: Inhibition of experimental tumor metastasis by selective activation of natural killer cells. Cancer Res **42**: 1337-1342, 1982.
6) Herman TS, Zukoski CF, et al: Whole-body hyperthermia and chemotherapy for treatment of patients with advanced, refractory malignancies. Cancer Treat Res **66**: 259-265, 1982.
7) 池田公彦，中村興太郎，他：凍結外科療法の実験的研究．日外会誌 **76**：1071-1072, 1975.
8) 岩佐　博，三村一夫，他：Cryosurgery と免疫賦活剤併用による実験的免疫賦活療法．防医大誌 **6**(3)：225-231, 1981.
9) Mashiba H, Matsunaga K, et al: The role of macrophages in preventing metastasis of a homotransplantable hamster lymphoma. Gann **74**: 548-553, 1983.
10) Noguchi H: Experimental studies of anti-tumor effect induced by microwave tumor coagulation. Arch Jap Chir **53**(2): 1-14, 1984.
11) 野口博志，勝見正治，他：腫瘍の Microwave Coagulation による抗腫瘍効果．日外宝 **52**(4)：520-524, 1983.
12) Schirrmacher V: Tumor metastases and cell-mediated immunity in a model system in DBA/2 mice. V. Trasfer of protective immunity with H-2 identical immune T cells from B 10. D 2 mice. Int J Cancer **24**: 80-89, 1979.
13) Tabuse K, Katsumi M: Application of a microwave tissue coagulator to hepatic surgery-The hemostatic effect on spontaneous rupture of hepatoma and tumor necrosis. Arch Jap Chir **50**: 571-579, 1981.
14) Tabuse K, Katsumi M: Microwave tissue coagulation in partial splenectomy for nonparasitic splenic cyst. Arch Jap Chir **50**: 711-719, 1981.
15) Talmadge JE, Meyers KM, et al: Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57 BL/6 normal and beige mice. J Natl Cancer Inst **65**(5): 929-935, 1980.
16) Winn HJ: Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tmor homografts. J. Immnol **86**: 228-239, 1961.
17) Wood GW and Gillespie GY: Studies on the role of macrophages in regulation of growth and metastasis of murine chemically induced fibrosarcomas. Int J Cancer **16**: 1022-1029, 1975.
18) Yamashita T, Hayakawa K, et al: Enhanced tumor metastases in rats following cryosurgery of primary tumor. Gann **73**: 222-228, 1982.