

論文内容の要旨

論文提出者氏名 竹本 健一

論文題目

Evaluation of the efficacy of peritoneal lavage with distilled water in colorectal cancer surgery: in vitro and in vivo study

論文内容の要旨

背景：大腸癌は治癒切除症例においても腹水洗浄細胞診は独立した予後因子となり、また術中操作により癌細胞が腹腔内に散布され腫瘍化するため、有効な腹腔洗浄が必要である。この研究においては独自の実験方法を用いて、低浸透圧刺激に対する癌細胞の細胞形態と容積変化を分析し、殺細胞効果発揮のために最適な低浸透圧溶液の浸透圧と最も効果的な低浸透圧刺激時間を決定した。加えて、*in vivo* において蒸留水殺細胞効果を確認した。また、低浸透圧刺激時に調節性容量減少（regulatory volume decrease:RVD）を阻害して殺細胞効果を増強させるため、クロライドチャネルブロッカーである 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid:NPPB を用いて大腸癌細胞株へ低浸透圧刺激を行った。これらの結果は、大腸癌手術時の浮遊癌細胞に対する蒸留水腹腔洗浄の有効性を示すものである。

方法と結果：細胞株はヒト大腸癌細胞株の DLD-1、HT-29、CACO-2 を用いた。蒸留水刺激後、大腸癌細胞株の形態変化を video-enhanced contrast システム微分干渉顕微鏡を用いて観察した。各大腸癌細胞は蒸留水刺激後すぐに膨張し、容積増加がおこったまま蒸留水刺激 5 分以内に破裂した。

大腸癌細胞株の容積変化の観察では、高機能フローサイトメーターである Cell Lab Quanta を用いた。大腸癌細胞の細胞容積分布は低浸透圧刺激後に容積増大へと変化し、細胞の膨化を示した。蒸留水刺激では顕著な細胞膨化を示したが、浸透圧が上昇に伴い細胞外浸透圧刺激継続にも関わらず、元の容積に戻る RVD 現象を認めた。蒸留水刺激後、全体の細胞容積は蒸留水刺激前より小さくなり、細胞のほとんどが断片化した事が示唆された。大腸癌細胞における蒸留水殺細胞効果につき、蒸留水刺激後に 48 時間の再培養を行い、蒸留水暴露の時間依存性の大腸癌細胞数の減少を観察した。続いてクロライドチャネルブロッカーの NPPB により低浸透圧刺激時の大腸癌細胞の膨化が増強することを確認した。

低浸透圧溶液に NPPB を加えるとコントロールに比較して細胞容積が大きくなり、RVD が抑制された。また、濃度の異なる NPPB を含む低浸透圧溶液に暴露 10 分後に細胞容積を測定し、NPPB が低浸透圧刺激時に容量依存性に細胞膨化を増大させる事を示した。また、NPPB は細胞の低浸透圧刺激時の殺細胞効果を増強した。*in vivo* において、蒸留水刺激により腹膜播種形成が抑制された。試験管内で大腸癌細胞を蒸留水暴露し、ヌードマウスに

腹腔内投与すると蒸留水暴露群の腹膜播種の程度抑制され、腹膜播種を形成しなかった。

考察：この研究において、蒸留水が大腸癌細胞の細胞容積増加に続いて細胞破壊をもたらす事を示し、再培養実験では大腸癌細胞における蒸留水殺細胞効果を証明した。さらに、Cell Lab Quanta を用いて、大腸癌細胞株において様々な浸透圧下での連続細胞容積変化を調べ、蒸留水刺激では細胞断片化を認めた一方で、ゆるやかな浸透圧下では一旦細胞が膨化した後の RVD 現象を観察した。これら形態学的変化、細胞容積変化の観察により細胞破壊には極端な低浸透圧刺激に加え、少なくとも 10 分程度の蒸留水暴露時間が必要であることが示された。*in vivo* 実験においては、ヒト大腸癌細胞株を蒸留水刺激し、マウスに腹腔内投与して殺細胞効果を確認した最初の報告である。蒸留水の正常細胞の影響に関しては、以前の報告で繊維芽細胞 WI38 を用いて報告している。また、蒸留水腹腔内投与によってもマウスが生存することをこれまでに報告しており、蒸留水腹腔内投与は生体に強いダメージを与えないことを示唆している。

また、我々のこれまでの報告等では腹腔内蒸留水洗浄では腹腔内分泌物等により、浸透圧が上昇し殺細胞効果が減弱している可能性が示唆されている。以前の報告で多くのタイプの細胞においてクロライドチャネルブロッカー NPPB が RVD を抑制することを示したが、低浸透圧溶液による細胞膨化の増強とこれによる殺細胞効果増強を目的に、大腸癌細胞株に NPPB を用いた実験を試みた。NPPB は低浸透圧刺激時にすべての細胞において細胞膨化を促進し、低浸透圧溶液の殺細胞効果を増強した。我々の結果からは、大腸癌細胞においてクロライドイオンチャネル活性化は RVD の主なメカニズムであり、低浸透圧刺激時のクロライドチャネル抑制は、細胞膨化を増強し、殺細胞効果を増大させる事が示された。しかし、NPPB は神経毒性のため生体実験では使用が困難であり、他にも生体に使用できるクロライドチャネルブロッカーはない。生体での使用にはより特異的な試薬や新たな siRNA 輸送法などの開発が必要である。

結論として、我々は大腸癌細胞における蒸留水を用いた低浸透圧殺細胞効果を *in vitro* 及び *in vivo* にて示した。また、クロライドイオンチャネル阻害が RVD を抑制することにより殺細胞効果の増強をきたす事を示した。低浸透圧刺激時の大腸癌細胞におけるクロライド輸送体機構のさらなる理解が、大腸癌腹膜播種に対する新しい治療戦略に発展する可能性があると考えられる。