

腸管洗浄法による大腸癌切除標本での遊離癌細胞検出頻度と その viability について

昭和大学医学部外科

角田 明良 渋沢 三喜 神山 剛一
高田 学 横山 登 草野 満夫

大腸癌新鮮切除標本を用いて、腸管内遊離癌細胞の存在と viability について研究した。切除標本19例を対象に腸液の細胞診を行った。Cell viability は切除標本15例を対象として、癌腫の口側と肛門側腸管洗浄液を採取し、密度勾配遠心法で癌細胞を分離した後、trypan blue exclusion と蛍光色素法にて評価した。細胞診における癌細胞の陽性率は67~100%と高率であった。また癌細胞の密度は癌腫からの距離が5cm 以内のほうが、5cm より遠位に比べて大であった。Viability study では口側腸管洗浄液から分離された癌細胞数の中間値は 0.66×10^5 個で、その viability は79%であった。肛門側腸管洗浄液からの癌細胞数の中間値は 0.27×10^5 個で、その viability は83%であった。蛍光色素法を行った症例は、全例に蛍光を発する大型の viable な癌細胞が認められた。以上、腸管内遊離癌細胞は高率に viability を有し、implantation metastasis の可能性が強く示唆された。

Key words: implantation metastasis of colorectal carcinoma, viability of free malignant cells

はじめに

大腸癌術後局所再発は、血行性転移とならんで予後を左右する主要な再発形式である。多施設の集計で直腸癌では10~20%¹⁾、結腸癌でも12%²⁾の局所再発をみると報告されている。局所再発の成因の1つに implantation が考えられている³⁾が、大腸癌患者の腸管内遊離癌細胞の viability に関する研究で、Rosenberg ら⁴⁾は viability が認められないとして、implantation はまれであると報告している。しかしその後、Umpleby ら⁵⁾は腸管内容から遊離癌細胞を分離して検索した結果、viability は高率であると述べている。本邦では局所再発の成因の1つとして implantation という概念は認識されている⁶⁾が、その前提である遊離癌細胞の viability に関する報告は著者らが調べたかぎりでは見当たらなかった。本研究では遊離癌細胞の存在および viability の有無を明らかにし、implantation metastasis について考察した。

対象と方法

対象は1992年より1994年に教室で切除された大腸癌34例で、うち19例は腸液細胞診に供し、15例は癌細胞

の viability の検査に用いた。

1. 腸液細胞診

大腸癌19例(結腸癌11例、直腸癌8例)の男女比は10:9、平均年齢は67(53~82)歳であった。検索大腸癌19例の病理学的背景は、癌占居部位ではC1例、A1例、T2例、S7例、Rs3例、Ra3例、Rb2例、Dukes分類ではDukes A6例、Dukes B6例、Dukes C7例であった。肉眼型は1型4例、2型12例、5型3例で、組織型は高分化腺癌(well)11例、中分化腺癌(mod)6例、低分化腺癌(por)1例、未分化腺癌(undif.)1例、腫瘍径の中間値は4cm(2.5~8cm)であった。これらの新鮮切除標本の腸管を長軸に切開し、癌腫の辺縁から5cmごとに口側は最長15cm、肛門側は最長10cmまで腸液を、スライドガラスの端を用いて腸粘液を含めて採取した。そして95%エタノールで固定後、Papanicolaou染色を行い細胞診専門医による検鏡を行った。また癌腫からの擦過細胞診も同時に行った。なお術前処置は原則としてポリエチレングリコール1.5~2lの経口投与を行った。

2. 検出癌細胞の viability

1) 病理学的背景および切除標本内容の洗浄法

大腸癌15例(結腸癌12例、直腸癌3例)の男女比は2:1、平均年齢は68(57~82)歳であった。病理学

<1996年1月10日受理>別刷請求先:角田 明良
〒142 品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部外科

的背景として、癌占居部位では A 5 例, T 2 例, S 5 例, Ra 1 例, Rb 2 例, Dukes 分類では Dukes A 2 例, Dukes B 8 例, Dukes C 5 例であった。肉眼型は 1 型 1 例, 2 型 10 例, 3 型 4 例で, 組織型は well 6 例, mod 7 例, por 2 例, 腫瘍径の中間値は 5.5cm (2~8cm) であった。これらの新鮮切除標本で癌腫に近接した前後をクランプし, 組織培養液 (TCM 199, GIBCO) 40 ml で浣腸器を用いて切除断端より洗浄した後, 癌腫の口側および肛門側腸管内容液を採取した。

洗腸の具体的方法は, 50ml 用浣腸器を用いて洗浄する腸管の長さに応じて適量の培養液を注入した後, 拇指と示指で漿膜側から愛護的に 2~3 回はさみもみして培養液と腸液を均一化させた後, 回収した。通常は 20ml ずつ 2 回にわけて採取した。

2) 癌細胞の分離

洗浄液を stainless steel mesh ($\phi 100\mu\text{m}$) に通して便残渣を除去した後, 170g で 5 分間遠沈した。TCM-199・20ml を用いて洗浄・遠沈を 2 回くり返した後に 1 ml の cell suspension とし, Nycodenz® (Nycomed, Oslo) linear density gradient colum に重層した⁷⁾。この colum の作製方法は, Nycodenz® と TCM-199 の容量比が 3 : 0, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 の 4 種の medium を用意した後, これらを順次 3 ml ずつ colum に重層し, colum を室温下, 45度の傾きで 45 分間静置して, linear density gradient を作製した。Cell suspension を重層した colum を 1,500g で 45 分間遠沈した後に形成された数層の細胞層のうち, 癌細胞を優位に含む最上層をピペットで採取した。これをさらに TCM-199 で洗浄・遠心 (170g, 5 分間) し, 最終的に 200~300 μl の検体とした。

3) 細胞診

検体の一部を Shandon cytocentrifuge で 1,000 rpm, 5 分間遠沈して, スメアーとし Giemza 染色下で細胞診専門医による検鏡を行った。

4) Viability study

① Trypan blue 染色法: 検体 100 μl に 0.3% trypan blue 100 μl を加え, 5 分後に細胞計算板上で大型の癌細胞数を計算し, その染色性より生細胞の割合 (% Viability = (非染色性癌細胞数/癌細胞総数) × 100) を求めた。

② 蛍光色素法: Fluorescein diacetate (FDA : Sigma Chemical Co) 25mg を 5ml のアセトンに溶解した後, TCM-199 を用いて 25 μM FDA 溶液を作製した。検体 100 μl に 200 μl の FDA 溶液を加えて 25°C 30 分

間 incubate した後, TCM-199 で洗浄, 遠沈 (3,000 rpm, 3 分間) して 10 μl の TCM-199 に溶解した。その後 UV illumination 下で蛍光を発する大型の細胞を観察した。

なお使用する臨床病理学的用語は, 大腸癌取扱い規約 (第 5 版)⁸⁾ に従った。

結 果

1. 切除標本における腸液の細胞診

細胞診で認められた遊離癌細胞の陽性率は, 口側腸管では癌腫の辺縁から 5cm 以内で 100% (19/19), 5~10cm で 67% (10/15), 10~15cm で 75% (3/4) であり, 肛門側腸管では 5cm 以内で 100% (18/18), 5~10cm で 75% (6/8) であった (Table 1)。また, 切除腸管の断端を含めた 5cm 未満の部位における遊離癌細胞の陽性率は, 口側断端で 74% (14/19), 肛門側断端で 89% (17/19) であった。遊離癌細胞の密度は, 遊離癌細胞がスライドガラスの全視野で認められるものを \equiv , 癌細胞がスライドガラス全視野の 1/4 以下に認められるものを $+$, その中間を $\#$, 癌細胞の認められないものを $-$ と評価した。癌腫より 5cm 以内では, 口側および肛門側でおのおの \equiv は 5%, 6%, $\#$ は 63%, 72%, $+$ が 32%, 22% に認められた。5~10cm では \equiv はなく, 口側および肛門側ではおのおの $\#$ が 27%, 12%, $+$ が 40%, 63%, $-$ が 33%, 25% であった。同様に, 口側の 10~15cm では \equiv がなく, $\#$ が 25%, $+$ が

Table 1 Positive smears in relation to distance from tumor

	distal ←		Tumor	→ proximal		
	10-5	5-0		0-5	5-10	10-15(cm)
Numbers of smears	8	18		19	15	4
Positive smears	No.	6	18	19	10	3
	%	75	100	100	67	75

Fig. 1 Frequency of tumor cells in relation to distance from tumor.

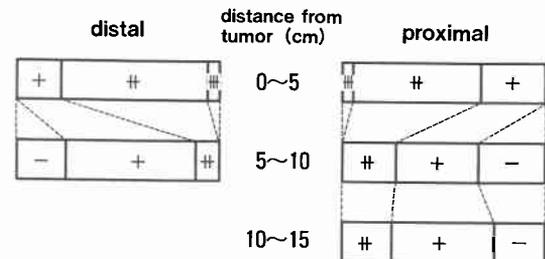


Fig. 2 Photomicrograph (HE, $\times 400$) of a representative smear.



50%, -が25%であった。口側および肛門側腸管いずれにおいても、癌からの距離が5cm以内の方が5cm以上より遊離癌細胞の密度は高かった (Fig. 1)。一方、遊離癌細胞の密度は、Dukes 分類, 肉眼型, 組織型, 腫瘍径などの病理学的背景に影響を受けなかった。遊離癌細胞の代表的な顕微鏡写真を示す (Fig. 2)。

2. 癌細胞の viability

1) Trypan blue exclusion

口側腸管から得られた検体では, 大腸癌15例中13例 (87%) で viable な遊離癌細胞が認められた。Non-viable な癌細胞を含めた癌細胞総数は $0.13 \sim 25.9 \times 10^5$ 個で, 13例の中間値は 0.66×10^5 個であった。Viability

は58~100%で, 中間値は79%であった。癌細胞が分離できなかった2例は, 占居部位 A で主に回腸より採取した検体であった (Table 2)。

肛門側腸管から得られた検体では, 大腸癌15例中12例 (80%) で viable な遊離癌細胞が認められた。癌細胞総数は $0.08 \sim 37.9 \times 10^5$ 個で, 12例の中間値は 0.27×10^5 個であった。Viability は60~100%で, 中間値は83%であった。癌細胞が分離できなかった3例の占居部位は, Rb, Ra, S でいずれも肛門側断端までの長さが短く, 洗浄液の採取が困難だった症例であった (Table 3)。

Trypan blue 染色法における代表的な viable な遊離癌細胞の顕微鏡像を示した (Fig. 3)。

2) 蛍光色素法

口側腸管の検体5例と肛門側腸管の検体3例を対象に行った。全例に蛍光顕微鏡下で蛍光を発する大型の癌細胞が認められた (Table 1, 2, Fig. 4)。

3) 細胞診

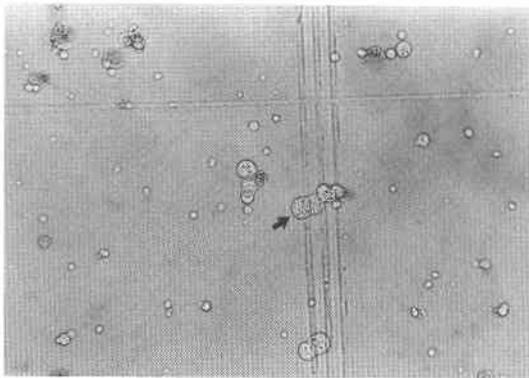
細胞診で検鏡される細胞には, 癌細胞の他に好中球, 組織球, リンパ球, 正常上皮細胞が認められた。Shandon cytocentrifuge を用いた検体では細胞破壊のつよいものが多く, そのためおのおの細胞数の比率は明らかでないが, 細胞破壊のないもので評価すると, 癌細胞の比率は30%前後の症例が多かった。口側腸管と肛門側腸管の洗浄液の両方で癌細胞が認められたのが15例中10例であった。口側腸管あるいは肛門側腸管の

Table 2 Proximal colon irrigation (13 patients): number of tumor cells and percentage of viable tumor cells recovered

Site	Dukes'	Degree of differentiation	Tumor diameter (cm)	Distance (cm)	Trypan blue exclusion		Fluorescence
					Total no. tumor cells $\times 10^5$	Percent viability of tumor cells recovered	
T	A	Well	2.0	40	0.13	68	
S	C	Moderate	5.5	19	0.24	100	
S	B	Moderate	5.7	20	0.33	70	
S	C	Well	3.5	13	0.37	64	
A	B	Moderate	7.0	13	0.42	98	
S	A	Well	3.8	11	0.61	71	
Ra	C	Poor	5.5	24	0.66	98	+
A	B	Moderate	5.0	15	0.68	92	+
S	B	Well	4.5	15	3.2	58	
T	B	Poor	7.0	6	4.25	79	
Rb	B	Moderate	5.0	24	7.17	64	+
Rb	C	Moderate	7.0	17	18.30	81	+
A	C	Moderate	8.0	11	25.90	80	+
Range				6-40	0.13-25.9 $\times 10^5$	58-100%	
Median				15	0.66 $\times 10^5$	79	

Table 3 Distal colon irrigation (12 patients) : number of tumor cells and percentage of viable tumor cells recovered

Site	Dukes ^a	Degree of differentiation	Tumor diameter (cm)	Distance (cm)	Trypan blue exclusion		Fluorescence
					Total no. tumor cells $\times 10^6$	Percent viability of tumor cells recovered	
S	C	Moderate	5.5	5.5	0.08	100	
A	B	Moderate	7.0	13	0.09	95	
Rb	C	Moderate	7.0	4	0.12	67	
A	B	Well	5.0	16	0.20	88	+
S	A	Well	3.8	2	0.20	80	
T	B	Poor	7.0	6	0.22	93	
T	A	Well	2.0	5	0.31	66	
S	B	Moderate	5.7	4	0.34	60	
A	B	Well	6.0	16	0.39	100	+
S	B	Well	4.5	4	1.30	67	
A	B	Moderate	5.0	26	1.31	85	+
A	C	Moderate	8.0	25	37.90	79	
Range				2-26	0.08-37.9 $\times 10^6$	60-100%	
Median				5.3	0.27 $\times 10^6$	83	

Fig. 3 Trypan blue exclusion ($\times 400$). Arrow shows viable tumor cells which excluded the dye.**Fig. 4** Fluorescence showed by tumor cells ($\times 400$). Viable tumor cells were seen to fluoresce under UV illumination.

みに癌細胞が認められたものがおのおの3例、2例であった。

考 察

大腸癌切除標本を用いて implantation metastasis に関する検討を行った。

本研究では腸管内遊離癌細胞の存在とその高率な viability を証明することができた。前者に関しては、McGrew ら⁹⁾が大腸癌切除標本の断端部粘膜に高率に遊離癌細胞が存在するのを示し、切除標本における癌細胞陽性率は癌腫からスミア採取部までの距離が長くなるほど低率であると報告している。本研究では、遊離癌細胞の存在とともにその密度が明らかになり、癌腫の近位側腸管で密度は大であった。また、癌の口

側腸管内に遊離癌細胞が認められたことは、腸管運動と矛盾している結果であった。McGrew ら⁹⁾は開腹直後に癌腫の口側および肛門側腸管をテープで縛ったところ、おのおのテープの口側および肛門側腸管内には癌細胞がみられなかったことより、癌細胞の腸管内遊離は術中の腸管操作によるものと推察している。

細胞の viability をみる方法として trypan blue 染色が繁用されている¹⁰⁾。正常な細胞膜を有する細胞は trypan blue に染色されないが、生細胞でない場合には青く染色される。死ぬ過程にある細胞が正常な細胞膜を有していると染色されないため、trypan blue 染色が必ずしも viability の絶対的な証明にはなり難いが、

Tennant ら¹⁰⁾は trypan blue 染色による viability の評価と細胞の増殖は相関関係があると報告している。蛍光色素法も viability をみる方法として用いられている。本研究で用いた fluorescein diacetate は生細胞の細胞膜で加水分解されると蛍光顕微鏡で紫外線下に細胞内の蛍光を観察することができる¹¹⁾。遊離癌細胞の viability が高率であるのは、Umpleby ら⁵⁾によって報告されており、切除標本の断端より3cm 以内の腸管内遊離癌細胞が検索対象となっている。本研究では、断端より癌腫辺縁までの遊離癌細胞を対象としているが、本研究における viability は口側 (79%) および肛門側 (80%) 腸管の検体ともに、Umpleby らの報告⁵⁾ (% viability : 口側92.5%, 肛門側79.3%) と大差なく、癌細胞の viability は癌腫からの距離による影響が少ないと思われる。このことから術中操作により遊離癌細胞が腸管内容とともに容易に移動することが示唆される。癌細胞の viability を証明する最善の方法は、腫瘍形成能をみることと思われる。Fermor ら¹²⁾はヒト大腸癌遊離癌細胞を免疫抑制マウスに尾静脈内投与したところ、17匹中6匹にヒト大腸癌細胞由来の腫瘍形成をみたしており、implantation metastasis の可能性を支持している。

Implantation metastasis の可能性を臨床的に支持するものとして、吻合前に薬剤で腸管洗浄すると吻合部再発率が低下したという報告¹³⁾¹⁴⁾がある。また大腸癌患者の痔核切除¹⁵⁾や裂肛、痔瘻¹⁶⁾などに癌が発育するという臨床的経験もこれを裏付けている。Morgan¹⁷⁾は腸管内遊離癌細胞が正常粘膜には生着しないが、raw surface に生着することを指摘している。腸管内腔に露出した癌組織は便流の影響もあって、常時脱落し、癌腫周囲に存在すると思われるが、壁内転移の原因になりにくいのはこのためと思われる。Implantation metastasis を強く示唆する再発形式として結腸癌吻合部再発があげられる¹⁸⁾。これは、直腸癌局所再発の成因には、切除断端 (AW), 外科的剝離面 (ew), リンパ管侵襲 (ly), 静脈侵襲 (v), implantation などがあげられるが¹⁹⁾、結腸癌では切離断端距離は十分にとれ、骨盤内で隣接臓器の多い直腸癌とは異なり、外科的剝離面までの距離も十分にとれるため、吻合部再発の成因が脈管侵襲 (ly, v) と implantation に限られるためである。

Implantation metastasis の予防として、術中操作で癌細胞が腸管内播種しないように癌腫の口側と肛門側をテープで縛ることが勧められている²⁰⁾。また、mer-

curic perchloride¹³⁾, sodium hypochloride¹⁴⁾などのほかに formalin²¹⁾などの薬剤で腸管切離断端を洗浄することも行われている。以上のような術中操作は簡便にできることであり、implantation metastasis を予防することにより予後の改善が期待できると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導御教示賜りました第2病理学教室・太田秀一教授および第1生化学教室・竹田 稔教授、坂上 宏講師に深謝いたします。

文 献

- 1) Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L et al: Local recurrence following 'curative' surgery for large bowel cancer: II. The rectum and rectosigmoid. *Br J Surg* 71: 17-20, 1984
- 2) Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L et al: Local recurrence following 'curative' surgery for large bowel cancer: I. The overall picture. *Br J Surg* 71: 12-16, 1984
- 3) Gordon-Watson C: Origin and spread of cancer of the rectum in relation to surgical treatment. *Lancet* 1: 239-245, 1938
- 4) Rosenberg IL: The aetiology of colonic suture line recurrence. *Ann R Coll Surg Engl* 61: 251-257, 1979
- 5) Umpleby HC, Fermor B, Symes MO et al: Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 71: 659-663, 1984
- 6) 高橋 孝, 梶谷 鏝: 術後再発例, 再手術例からみた直腸癌根治術式の選択. *日消外会誌* 11: 232-240, 1978
- 7) Shortman K, Haskill JS, Szenberg A et al: Density distribution of lymphocyte populations. *Nature* 216: 1227-1229, 1967
- 8) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第5版. 金原出版, 東京, 1994
- 9) McGrew EA, Laws JF, Cole WH: Free malignant cells in relation to recurrence of carcinoma of the colon. *JAMA* 154: 1251-1254, 1954
- 10) Tennant JR: Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 2: 685-694, 1964
- 11) Rotman B, Papermaster BW: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 134-141, 1966
- 12) Fermor B, Umpleby HC, Lever JV et al: Proliferative and metastatic potential of exfoliated colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 76: 347-349, 1986
- 13) Keynes WM: Implantation from the bowel

- lumen in cancer of the large intestine. *Ann Surg* 153 : 357-364, 1961
- 14) Southwick HW, Harridge WM, Cole WE: Recurrence at the suture line following resection for carcinoma of the colon. Incidence following preventive measures. *Am J Surg* 103 : 86-89, 1962
 - 15) Beahrs OH, Phillips JW, Dockerty MB: Implantation of tumor cells as a factor in recurrence of carcinoma of the rectosigmoid. *Cancer* 8 : 831-838, 1955
 - 16) Killingback M, Wilson E, Hughes ESR: Anal metastasis from carcinoma of the rectum and colon. *Aust N Z J Surg* 34 : 178-187, 1965
 - 17) Morgan CN: Cancer of rectum, lecture delivered at Royal College of Surgeons of England. *Ann R Coll Surg Engl* 9 : 13-24, 1951
 - 18) 角田明良, 河村正敏, 中尾健太郎ほか: 結腸癌治癒切除後吻合部再発例の検討. *日本大腸肛門病会誌* 46 : 215-218, 1993
 - 19) 五十嵐達紀: 直腸癌局所再発(骨盤内再発および会陰部再発)の成立機序に関する臨床病理学的研究. *日本大腸肛門病会誌* 39 : 361-372, 1986
 - 20) Cole WH: Recurrence in carcinoma of the colon and proximal rectum following resection for carcinoma. *Arch Surg* 65 : 264-270, 1952
 - 21) Long RTL, Edwards RH: Implantation metastasis as a cause of local recurrence of colorectal carcinoma. *Am J Surg* 157 : 194-201, 1989

Viability of Free Malignant Cells in Specimens Removed because of Colorectal Carcinoma

Akira Tsunoda, Miki Shibusawa, Gouichi Kamiyama, Manabu Takada,
Noboru Yokoyama and Mitsuo Kusano
Department of Surgery, School of Medicine, Showa University

Papanicolau smear preparations of mucus from the lining surface of 19 colon specimens removed because of carcinoma were examined. At a distance of 5 cm or more from the tumor, 67-75% of the smears were positive, while 100% contained malignant cells if the smears were taken less than 5 cm from the tumor. Then the viability of tumor cells shed into the intestinal lumen was determined in the patients with colorectal carcinoma. Fifteen operative specimens were irrigated. The resulting cell specimens were centrifuged on a Nycodenz linear density gradient column so that tumor cells were concentrated in a band at the top. In 13 of the 15 proximal lumen specimens a median of 0.66×10^5 tumor cells were recovered, with a median percentage viability of 79. In 5 specimens examined, the neoplastic cells showed fluorescence. In 12 of the 15 distal lumen specimens a median of 0.27×10^5 tumor cells were recovered with a median percentage viability of 83, and fluorescence was observed in 3 specimens examined. Thus viable exfoliated tumor cells were demonstrated. Their presence in large numbers at the site of an intestinal anastomosis supports their potential role in the etiology of suture line recurrence.

Reprint requests: Akira Tsunoda Department of Surgery, School of Medicine, Showa University
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142 JAPAN