

大腸癌術後の implantation による器械吻合部における局所再発と povidone-iodine 液によるその予防に関する実験的研究

昭和大学医学部第2外科学教室 (主任: 草野満夫教授)

張 仁 俊

大腸癌術後吻合部再発の原因としての implantation の可能性を明らかにし、さらにその予防法として povidone-iodine (PVP-I) 溶液による腸管洗浄の有用性を検討した。ラットの盲腸管腔内にラット大腸癌細胞株 RCN-9 の細胞浮遊液を注入した後に linear stapler を用いて盲腸の先端を切除した。3週間後、組織学的に高率に癌腫の形成を認めた (8/11, 73%)。また PVP-I 溶液の implantation への影響をみるため、*in vitro* で RCN-9 の細胞浮遊液を 0.0005% から 5% までの PVP-I 溶液に 5 分間接触させた後、trypan blue 染色および MTT assay にて癌細胞の viability を評価した。その結果、0.16% 以上の PVP-I 溶液には有効な殺細胞効果が認められた。また、*in vivo* では stapler 操作前に 5% および 2.5% PVP-I 溶液で腸管洗浄すると癌腫の形成が有意に抑制された (おのおの 18%, 20%)。以上より、実験的に suture-line implantation の可能性が示唆され、その予防として PVP-I 溶液を用いた化学的腸管洗浄が有効であると考えられた。

Key words: suture-line implantation, RCN-9, povidone-iodine, stapling device, colorectal cancer

はじめに

大腸癌術後の局所再発は予後を決定する大きな問題点であるが、その一因として英国では古くから implantation metastasis が指摘されている¹⁾²⁾。また、括約筋温存手術における自動吻合器の普及に伴って、直腸癌術後吻合部再発の頻度が増大したとの報告もあり³⁾⁴⁾、切除断端、脈管侵襲などの再発危険因子とともに implantation の関与を考慮する必要がある。一方、implantation の予防法として、欧米ではさまざまな抗腫瘍細胞剤を用いた術中の腸管洗浄が推奨されているが^{5)~7)}、本邦ではいまだ生理食塩水による機械的洗浄が主流のようである^{8)~12)}。

本研究は linear stapler を用いて implantation の可能性を明らかにし、さらに、抗腫瘍細胞剤の 1 つとして認識されている povidone-iodine (以下、PVP-I) 液による腸管の化学的洗浄が implantation の予防に有効かどうか *in vitro*, *in vivo* の両面より検討することを目的とした。

実験材料と方法

すべての実験を通して Fisher 344 ラットに発生した

大腸癌由来の細胞株である RCN-9 (RIKEN Cell Bank より購入) を使用した。培養液には 10% 牛胎仔血清 (FBS) 添加 RPMI1640 を使用し、37°C、湿度 100%、5% CO₂ の条件下で静置培養した。

1. 実験 1: 自動吻合器による implantation の発生
実験動物には 10~12 週齢、雄性の Fisher 344 ラット (株日本生物材料センターより購入) を使用し、自動吻合器には linear stapler として MULTIFIRE ENDO TA 30 TITANIUM (Auto Suture Company, USA) を用いた。

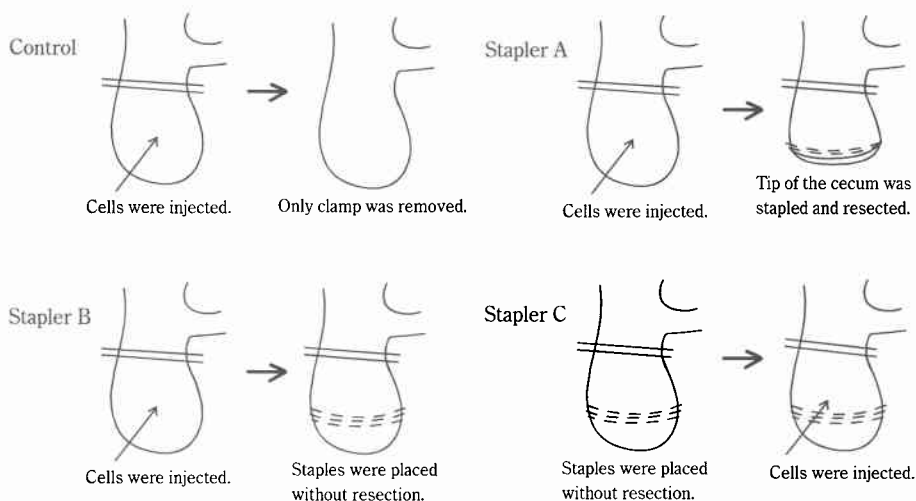
24 時間絶食後のラットを Diethylether 吸入麻酔下、下腹部正中切開で開腹した後、盲腸の先端を長さ 2.5 cm、最大幅 1.5 cm にわたってブルドック鉗子によりクランプし、以下の群に分けて手術を行った (Fig. 1)。

① Control 群: RCN-9 細胞浮遊液 (1×10⁶/200 μl) 注入後にクランプを解除し閉腹した (stapler は使用せず、腸管も切除しない)。

② Stapler A 群: RCN-9 細胞浮遊液 (1×10⁶/200 μl) を注入し linear stapler を操作して盲腸先端を切除、クランプを解除後に閉腹した。

③ Stapler B 群: RCN-9 細胞浮遊液 (1×10⁶/200 μl) を注入し linear stapler を使用するが腸管は切除せず、クランプを解除後に閉腹した。

Fig. 1 Scheme of the method (experiment 1)



④ Stapler C群: Linear stapler をかけた後に RCN-9細胞浮遊液($1 \times 10^6/200\mu\text{l}$)を注入し腸管を切除せずに、クランプを解除後に閉腹した。

細胞浮遊液の腸管管腔内への注入には27G針を用い、注入操作に際しては癌細胞の腹腔内散布の防止に努めた。自動吻合器の操作では、腸管にstapleのかかる長さ約2cmとし、均等になるように留意した。また、細胞浮遊液注入からクランプ解除までの操作は各群とも1分間で行った。

すべてのラットを3週間後に屠殺した。Stapleを慎重に除去した後、できる限りstaple除去部の近傍でstaple lineの長軸方向に切り出し、hematoxyline-eosine染色にて癌腫形成の有無を組織学的に調べた。

2. 実験2: PVP-I液のimplantationへの影響

1) *In vitro* study

PVP-I液がRCN-9細胞のviabilityに与える影響を検索するべく以下の実験を行った。

PVP-I液として1ml中にPVP-I 100mg(有効ヨウ素として10mg)を含有するイソジン液(明治製菓株式会社)を使用し、希釈には生理食塩水を用いた。RCN-9細胞浮遊液を同量のPVP-I溶液に5分間接触させた。PVP-I溶液は終濃度5%, 1.6%, 0.5%, 0.16%, 0.05%, 0.016%, 0.05%, 0.0016%, 0.0005%となるように希釈し、コントロールとして生理食塩水を用いた。PVP-I混和細胞浮遊液を1,000rpm, 5分間遠沈し上澄を除去した後、細胞数を調整して検体として使用した。

① Trypan-blue exclusion test

各検体1ml(1×10^6 cells)に0.4%trypan blue液1mlを加え、5分後にBürker-Türk計算盤を用いて全細胞数、染色された細胞数を計測した。実験はすべて3検体ずつ行った。非染色細胞数を全細胞数で除してviabilityを求め、各検体のviabilityをControlのviabilityに対する割合で表した%viabilityも併せて算出した。細胞数、viability、%viabilityは3検体の平均値と標準偏差で表した。

② MTT assay

96ウエルマイクロプレート(Nunc, Denmark)に検体を各PVP-I濃度別に $100\mu\text{l}$ (5×10^4 cells)ずつ分注し、5%CO₂, 37°C, 湿度100%の条件で培養した。24時間および48時間後、各ウエルに0.4M MTT (3-(4,5-dimethyl-2,5-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide)液(SIGMA, USA) $10\mu\text{l}$ と0.1Mコハク酸ナトリウム $10\mu\text{l}$ を加えて3時間酵素反応させた後にDimethyl sulfoxide; DMSO液(SIGMA, USA)を $200\mu\text{l}$ 加えMTT-formazanを抽出し、マイクロプレート吸光度測定装置(MTP-120 MICROPLATE READER, CORONA ELECTRIC)により各ウエル検体の550nmにおける吸光度を測定、以下の与式によってinhibition indexを算出し、効果を判定した。すべて3検体ずつ行った。

$$\text{Inhibition index} = \frac{C-P}{C-B} \times 100 (\%)$$

(C: controlの吸光度, P: PVP-Iに接触させた検体の吸光度, B: back groundの吸光度)

2) *In vivo* study

Fig. 2a Implanted adenocarcinoma in mucosal layer of the cecum in Stapler A group. (H.E ×20)



Fig. 2b-1 Implanted adenocarcinoma in sub-mucosal layer of the cecum in stapler A group. (H.E ×20)

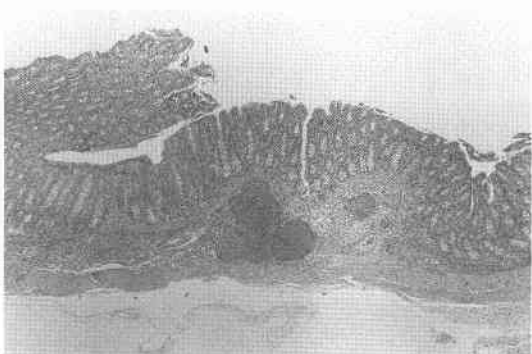
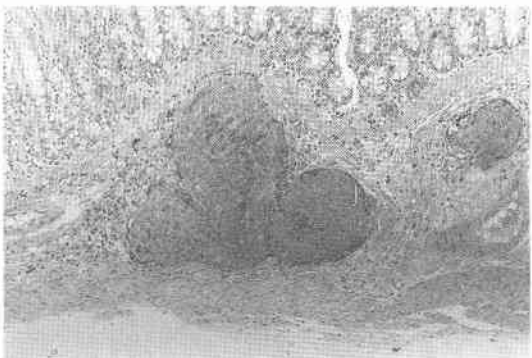


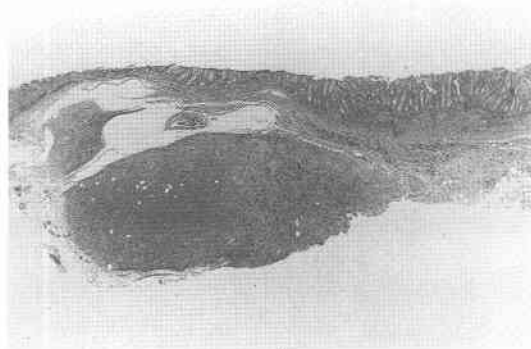
Fig. 2b-2 Magnification of Fig. 2b-1. (H.E ×100)



PVP-I液のimplantationに与える影響をみるために実験1と同様にFisher 344ラット, RCN-9を用いて以下の3群に分けて手術を行った。PVP-I液は細胞浮遊液を盲腸内へ注入した直後に同じく27G針を用いて注入した。

① PVP-I A群：実験1と同様の手技でラット盲腸先端をブルドック鉗子でクランプする。RCN-9細胞浮

Fig. 2c Implanted massive adenocarcinoma on serosa of the cecum in Staple A group. (H.E ×20)



遊液 ($1 \times 10^6/100\mu\text{l}$) と10%PVP-I液100 μl を27G針を用いて別々に注入し5分間, 腸管外より用手的に攪拌, 洗浄した後, linear staplerを操作し盲腸先端を切除, クランプを解除して閉腹した (PVP-I溶液の最終濃度は5%)。

② PVP-I B群：5%PVP-I液を用い同様の操作を行う (PVP-I溶液の最終濃度は2.5%)。

③ PVP-I C群：2.5%PVP-I液を用い同様の操作を行う (PVP-I溶液の最終濃度は1.25%)。

実験1と同様にすべてのラットを3週間後に屠殺し, 癌腫形成の有無を組織学的に調べた。

3. 統計学的処理

*In vivo*の2群間の癌腫発生率の検定はFisherの直接法を, *in vitro*の3つの測定値の平均値の差の検定にはt検定を行った。いずれも危険率5%未満のとき有意差があるものと判定した。

結 果

1. 実験1：自動吻合器によるimplantationの発生遊離癌細胞を注入するのみであるControl群では13匹すべてに癌腫の発生を認めなかったが, Stapler A群では11匹中8匹 (73%)に癌腫の発生を認め, その主座は粘膜層2匹 (Fig. 2a), 粘膜下層2匹 (Fig. 2b-1, 2), 漿膜下層3匹, 漿膜1匹 (Fig. 2c)であった。同様にStapler B群では14匹中5匹 (36%)に癌腫が発生し, その主座は粘膜下層1匹, 漿膜4匹, Stapler C群では10匹中4匹 (40%)に癌腫が発生し, その主座は粘膜下層1匹, 漿膜下層2匹, 漿膜1匹であった。Control群とStapler A群, Stapler B群およびStapler C群の癌腫の発生率の間に統計学的有意差を認めた。腸管切除を伴うStapler A群では腸管を切除しな

Table 1 Location and incidence of tumors in Experiment 1. Rats in Stapler A, Stapler B and Stapler C group showed high incidence significantly compared with that of Control group.

Group	Tumor(+)						Tumor(-)	Incidence
	m	sm	mp	ss	s	subtotal		
Control (n=13)	0	0	0	0	0	0	13	0%
Stapler A (n=11)	2	2	0	3	1	8	3	73%
Stapler B (n=14)	0	1	0	0	4	5	9	36%
Stapler C (n=10)	0	1	0	2	1	4	6	40%

Control vs. Stapler A; $p < 0.01$ Control vs. Stapler B; $p = 0.04$ Control vs. Stapler C; $p = 0.02$ Stapler A vs. Stapler B; $p = 0.11$ (N.S.) Stapler A vs. Stapler C; $p = 0.20$ (N.S.)

Table 2 Total cell counts, dyed cell counts and viabilities of RCN-9 cells after contact with diluted PVP-I solutions evaluated by trypan blue exclusion test.

PVP-I conc. (%)	total cell count ($\times 10^4$)	dyed cell count ($\times 10^4$)	viability (%)	%viability (%)
control	70.0 \pm 8.0	5.0 \pm 2.0	93.0 \pm 2.1	***
0.0005	68.7 \pm 14.2	11.3 \pm 5.5	84.0 \pm 6.3	90.3 \pm 6.3
0.0016	66.0 \pm 17.5	13.5 \pm 2.6	78.7 \pm 9.9	84.6 \pm 9.9
0.005	73.7 \pm 14.4	16.7 \pm 2.3	77.2 \pm 1.5	83.0 \pm 1.5
0.016	72.0 \pm 8.5	13.7 \pm 1.5	80.9 \pm 2.5	87.0 \pm 2.5
0.05	70.0 \pm 25.2	29.3 \pm 2.5	55.5 \pm 11.0	59.7 \pm 11.0
0.16	92.7 \pm 14.2	85.3 \pm 10.1	7.6 \pm 3.2	8.2 \pm 3.2
0.5	88.3 \pm 9.5	73.6 \pm 7.5	16.5 \pm 4.6	17.7 \pm 4.6
1.6	73.0 \pm 23.4	64.7 \pm 18.5	10.8 \pm 2.9	11.6 \pm 2.9
5	75.3 \pm 24.8	67.0 \pm 23.6	11.4 \pm 5.9	12.3 \pm 5.9

Mean \pm SD

い Stapler B 群, Stapler C 群よりも癌腫の発生率が高かったが統計学的有意差はみられなかった (Table 1).

2. 実験 2 : PVP-I 液の implantation への影響

1) *In vitro* study

① Trypan blue exclusion test

PVP-I 濃度別に全細胞数, 非染色細胞数, viability, %viability を 3 検体の平均値および標準偏差で示す (Table 2). 0.16%以上の PVP-I 溶液に接触させたものと比較すると統計学的に有意に viability が低かった (Fig. 3).

② MTT assay

24時間および48時間培養後に得られた吸光度および inhibition index を 3 検体の平均値および標準偏差で表した (Table 3). 0.16%, 0.5%, 1.6%, 5% PVP-I 溶液の inhibition index は 0.05% PVP-I 溶液の inhibition index よりも有意に高かった (Fig. 4).

2) *In vivo* study

Fig. 3 %viability of RCN-9 cells after contact with various concentrations of PVP-I solutions evaluated by trypan blue exclusion test. Cells contacted with PVP-I solution in excess of 0.16% showed low %viability significantly.

*0.16 to 5% vs. 0.05%; $p < 0.01$

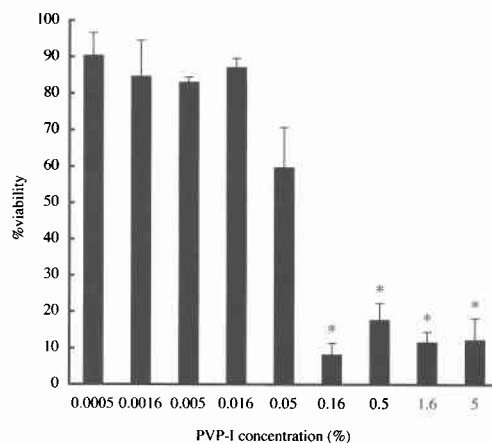


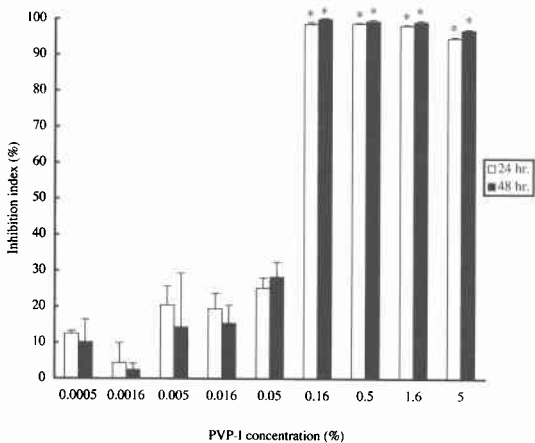
Table 3 Optical density (OD) and inhibition index (I.I) in MTT assay of RCN-9 cells incubated for 24 or 48 hours after contact with diluted PVP-I solutions.

PVP-I conc. (%)	24 hours		48 hours	
	OD	I.I	OD	I.I
(back ground)	0.118±0.001	***	0.105±0.006	***
(control)	0.581±0.028	***	0.643±0.004	***
0.0005	0.523±0.004	12.5±0.8	0.588±0.034	10.2±6.3
0.0016	0.561±0.026	4.4±5.6	0.630±0.010	2.4±1.8
0.005	0.486±0.024	20.5±5.2	0.566±0.080	14.4±14.9
0.016	0.491±0.020	19.5±4.3	0.560±0.027	15.5±5.0
0.05	0.464±0.013	25.3±2.8	0.491±0.022	28.3±4.2
0.16	0.125±0.003	98.6±0.5	0.105±0.002	99.9±0.3
0.5	0.124±0.001	98.7±0.2	0.109±0.003	99.3±0.5
1.6	0.127±0.001	98.1±0.2	0.110±0.002	99.1±0.4
5	0.143±0.002	94.7±0.3	0.122±0.002	96.8±0.4

Mean ± SD

Fig. 4 Inhibition index as a result of MTT assay of RCN-9 cells contacted with various concentration of PVP-I solutions. PVP-I solution in excess of 0.16% showed high inhibition index significantly.

*24hr. 0.16 to 5% vs. 0.05%; p<0.01, *48hr. 0.16 to 5% vs. 0.05%; p<0.01



PVP-I A 群では11匹中 2 匹 (18%) に癌腫の発生を認め、その主座はいずれも漿膜下層であった。PVP-I B 群では10匹中 2 匹 (20%) に癌腫の発生を認め、その主座は粘膜下層 1 匹、漿膜下層 1 匹であった。PVP-I C 群では10匹中 6 匹 (60%) と半数以上に癌腫の発生を認め、その主座は粘膜層 2 匹、固有筋層 1 匹、漿膜 3 匹であった。同様の stapling 操作および腸管切除を施行した実験 1 の Stapler A 群の癌腫発生率と PVP-I

A 群および PVP-I B 群の癌腫発生率の間に統計学的有意差を認めた (Table 4)。

考 察

大腸癌術後局所再発は、肝転移とならんで外科医にとって克服を急務とする課題の 1 つであり、その予防が第一義であることは論を待たない。局所再発の原因の 1 つとして欧米では古くから suture-line implantation の概念が確立しており¹²⁾、諸家がいろいろな方法で癌腫近傍の腸管内遊離癌細胞の存在を証明している^{13)~16)}。本邦でも近年、腸管内遊離癌細胞が注目されており、局所再発との関係およびその予防法に関する臨床的検討がなされている^{8)~11)}。角田ら¹⁷⁾は大腸癌新鮮切除標本の腸管洗浄液中に存在する遊離癌細胞の viability の高さに注目し、implantation による局所再発の可能性を述べている。また、linear stapler によって閉鎖された circular stapler 挿入部の局所再発の報告例¹⁸⁾は癌腫とは離れた部位での局所再発という点で implantation の可能性を強く示唆するものである。一方で、直腸癌に対する circular stapler を用いた低位前方切除術後の高い吻合部再発率を報告する論文が散見される³⁾⁴⁾。その原因として癌腫と肛門側切除断端までの距離が短縮し、切除断端、脈管侵襲などの再発危険因子が増大することが考えられるが、他の成因として Hurst ら³⁾は、直腸癌34例に対する前方切除後11例に局所再発を認めたことから、直腸洗浄を施行しなかったことによる implantation の可能性を述べている。Umpleby ら¹³⁾、角田ら¹⁷⁾が指摘したように、癌腫に近い部位に遊離癌細胞が多いということを考慮する

Table 4 Location and incidence of tumors in Experiment 2-2). The incidence of tumor was significantly reduced in PVP-I A group (5%PVP-I finally) and PVP-I B group (2.5%PVP-I finally) compared with Stapler A group that was regarded as control.

Group	Tumor(+)						Tumor(-)	Incidence
	m	sm	mp	ss	s	subtotal		
Stapler A (n=11)	2	2	0	3	1	8	3	73%
PVP-I A (n=11)	0	0	0	2	0	2	9	18%
PVP-I B (n=10)	0	1	0	1	0	2	8	20%
PVP-I C (n=10)	2	0	1	0	3	6	4	60%

Stapler A vs. PVP-I A ; p=0.03 Stapler A vs. PVP-I B ; p=0.03 Stapler A vs. PVP-I C ; p=0.66 (N.S.)

と、吻合部が癌腫に近ければ implantation が発生しやすくなるのは当然である。Gertsch ら¹⁴⁾は低位前方切除術の際に経肛門的に使用された circular stapler の本体と anvil およびドーナツ状の切除断端を洗浄し 10例中 9 例に遊離癌細胞の存在を証明している。本研究では、これらの遊離癌細胞の存在下で suture-line implantation が発生することが実験的に明らかになった。

実験 1 において Stapler A 群では、腸管内に遊離癌細胞が存在する状態で linear stapler を用いて腸管を切除することにより高率に切除断端に癌腫の形成を認めた。またその主座は粘膜から漿膜まで腸管壁のあらゆる層に発生している。このことより、implantation の発生機序として癌細胞が staple により挟まれ、粘膜に固定され生着するもの、癌細胞が staple に押し込まれて、または staple の刺入部を通して腸管壁に入り込み生着するもの、腸管の切除により腸管内の癌細胞が切除断端に生着するものなどが考えられる。Stapler B 群は腸管を切除しなかった場合、Stapler C 群は stapling 後に癌細胞が staple 部に接触した場合を想定して設けた群である。両者とも癌腫の発生を認めており、腸管切除を伴わなくても、あるいは遊離細胞が存在しない腸管に stapling しても操作後に一定数の癌細胞が接触すれば implantation が発生しうるとを示唆している。遊離癌細胞を腸管内に注入するのみで stapler は使用せず、腸管も切除しない Control 群では癌腫が形成されなかったことより stapling や切除操作が implantation に深く関与しているといえる。これは Morgan¹⁹⁾の述べる腸管内遊離癌細胞が正常粘膜には生着せず raw surface に生着するという説を裏付けるものである。参考までに、教室では縫合糸による im-

plantation についても検討しており、実験 1 と同様にラット盲腸をクランプし RCN-9細胞浮遊液を注入した後、縫合糸で結節縫合を施した結果、3 週間後に 18 匹中 15 匹 (83%) に組織学的に腫瘍の形成を認めている。ただ、前述したように大腸癌術後の吻合部再発のうち、特に低位前方切除後の吻合部再発の頻度が比較的高く、問題となっている。低位前方切除における吻合のほとんどが stapler を用いて施行されているのが現状であるので、今回の研究では stapler による implantation の可能性とその機序について検証、言及した。

Implantation による局所再発の予防法として術中の腸管洗浄があげられ、本邦では生理食塩水を用いた機械的洗浄の報告がみられる^{8)~12)}。一方、欧米ではさまざまな薬剤を用いた化学的洗浄が推奨されている^{5)~7)}。本研究で化学的洗浄液として用いた PVP-I 液はハロゲン系の消毒薬で、ヨードホルムの 1 つであり²⁰⁾、細菌に対してはアミノ酸に作用してその効果を発揮するとされている²¹⁾。著者の調べた限りでは、PVP-I 液の癌細胞に対する作用機序に言及した報告はみられなかったが、Docherty ら²²⁾、Umpleby ら²³⁾が行った外科医に対するアンケート調査においては PVP-I 液が術中腸管洗浄液として広く用いられており、抗腫瘍細胞剤としても認識されていることがうかがえる。

実験 2 の *in vitro* study では trypan blue exclusion test と MTT assay により PVP-I 溶液の殺細胞効果を評価した。Trypan blue exclusion test は正常な細胞膜を有している細胞は trypan blue 液に染色されないことを利用して染色細胞数と非染色細胞数を計測することにより viability を求めるものであり、Um-

plebyら²³⁾も本法によりPVP-I溶液の癌細胞に対する効果を判定している。しかし、本法は染色性に幅があり、時間経過とともに染色性が変化するため誤差を生じやすく、また、計算盤を用いて肉眼的に計測するため客観性に欠ける点は否めない。これに対してMTT assayは以下に述べるようにcell viabilityのより客観的な指標たりうるため、本研究では両者を併せて行った。MTT assayは細胞内酵素に着目した*in vitro*試験法で、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide)を水素受容体(tetrazolium塩)としてTCA回路内の酵素で細胞内のATP産生に関与しているコハク酸脱水素酵素の酵素活性を腫瘍細胞の増殖能の指標とするものである²⁴⁾。Mosmann²⁵⁾によりcytotoxic assayとして1983年に紹介されたが、マイクロプレートを用いることにより、迅速にかつ大量に検体を処理することが可能であるため、制癌剤感受性試験法として広く普及している。通常、癌細胞と薬剤をマイクロプレート内で48~72時間持続接触させて効果を判定するのが一般的であるが、本研究では術中の腸管内での接触を前提にしているためマイクロプレートで培養する前に5分間接触させることとした。それでも0.16%以上のPVP-I溶液と接触したものでは24および48時間後に100%に近いinhibition indexが得られており、癌細胞の増殖能はほとんど消失しているものと解釈できる。*In vivo* studyでは腸管内の遊離癌細胞に対するPVP-I溶液の効果を検討したが、臨床的にはlinear staplerを使用する際には必ず腸管切離が伴うので、Stapler A群の手技を基本術式とした。その結果、5%、2.5%PVP-I溶液で腸管内を洗浄することでimplantationの発生率が有意に低下した。

殺細胞効果が発現するPVP-I溶液の濃度が*in vitro*では0.16%、*in vivo*では2.5%と両者の間に10倍以上の開きがある。これにはPVP-I水溶液の複雑な性質が関係している。PVP-Iは1-vinyl-2-pyrrolidoneの重合体とヨウ素の複合体であり²⁶⁾、その殺菌力は遊離ヨウ素 I_2 に負うところが大きい²⁷⁾。遊離ヨウ素は希釈することによりPVPのmatrixより逸脱し²⁸⁾、その濃度は100倍希釈で最大($10^{-4}M/l$)となる²⁷⁾。ゆえに、0.1%溶液が最大の殺細胞効果を持つと考えられるが、実際には、遊離ヨウ素は有機物の存在下で不活化を受け^{20,21)}、希釈度が大きいとすぐに消費されてしまう。そのため、有機物が細胞培養液のみである*in vitro*の環境では希釈度の高い溶液でも有効であるのに対し、細

胞培養液、血液、腸液、便などの有機物の多い腸管内では遊離ヨウ素のcapacityの大きい高濃度のPVP-I溶液を必要とすることが理解できる。Zamoraら²⁹⁾はPVP-I溶液に種々の有機物を加えて細菌に接触させて殺菌効果を調べているが有機物のない状態では0.01%の濃度で有効であったのに対し、血液を混入させたときの有効濃度は5%であったと報告している。細菌と癌細胞が同様に考えられるとは一概にはいえないが、有効な殺細胞効果を得るためには高濃度のPVP-I溶液を使用することが望ましいと考えられる。しかし、PVP-I溶液はヨウ素製剤であるため局所的な副作用、中毒、特に甲状腺への影響も考慮しなくてはならない。本研究では組織学的にはラット盲腸粘膜に障害はみられなかったが、Zamora³⁰⁾が5%、10%PVP-I液の局所障害を指摘している。一方、Banichら³¹⁾は367例の大腸癌手術例、感染予防目的で腸管内を500mlから1,000mlの10%PVP-I溶液で洗浄した際に全身的な中毒は認めなかったと報告している。いずれにせよ、腸管内投与は薬剤本来の目的、用法とは異なるため十分な注意が必要であり、臨床応用するには、洗浄法、洗浄範囲、使用濃度などの検討が必要となる。

以上、自動吻合器によるsuture-line implantationの可能性と、その予防対策としてのPVP-I溶液による術中腸管洗浄の有効性について述べた。本邦では、腸管内の遊離癌細胞を除去するための手段として1,000mlから2,000mlの生理食塩水による機械的洗浄が多く施設で行われているが、⁸⁾⁻¹²⁾、神藤ら¹²⁾は低位前方切除の際に2,000mlの生理食塩水で洗浄を施行した後吻合予定部粘膜の擦過細胞診で70%の症例に癌細胞の遺残を認めたとしており、腸管のひだの間に潜む遊離癌細胞までは洗い出せない可能性を示唆し、機械的洗浄の限界を指摘している。一方、殺細胞効果を持つPVP-I溶液による洗浄は機械的洗浄と化学的洗浄の相乗効果が期待され、機械的洗浄のみよりも短時間で済み、本実験の結果を踏まえるとsuture-line implantationの予防にはいっそう有効な操作であると考えられ、今後臨床研究によりこの有用性が明確になることが期待される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った草野満夫教授、また直接御指導、ご教示を頂いた濫澤三喜助教授、ならびに角田明良講師、角田ゆう子博士に深謝いたします。さらにpovidone-iodineについて深い知見をくださった昭和大学薬学部薬品分析化学教室の田村善蔵教授、前田昌子教授、

また、MULTIFIRE ENDO TA 30 TITANIUM を供与してくださったオートスーチャージャパン株式会社、ならびに昭和大学外科学教室研究室の皆様深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ryall C: The technique of cancer operations, with reference to the danger of cancer infection. *Br Med J* 2: 1005—1008, 1908
- 2) Gordon-Watson C: Origin and spread of cancer of the rectum in relation to surgical treatment. *Lancet* 1: 239—245, 1938
- 3) Hurst PA, Prout WG, Kelly JM et al: Local recurrence after low anterior resection using the staple gun. *Br J Surg* 69: 275—276, 1982
- 4) Anderberg B, Enblad P, Sjudahl R et al: Recurrent rectal carcinoma after anterior resection and rectal stapling. *71: 98—100, 1984*
- 5) Keynes WM: Implantation from the bowel lumen in cancer of the large intestine. *Ann Surg* 153: 357—364, 1961
- 6) 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
- 7) Long RTL, Edwards RH: Implantation metastasis as a cause of local recurrence of colorectal carcinoma. *Am J Surg* 157: 194—201, 1989
- 8) 福田一郎, 亀山雅男, 今岡真義ほか: 直腸癌括約筋温存術後の局所再発防止対策残存直腸洗浄の意義。癌と化療 18: 1965—1967, 1991
- 9) 國友一史, 寺嶋吉保, 堀内雅文ほか: 直腸癌局所再発予防のための二重構造 Sump Tube を用いた吻合前直腸内洗浄。日本大腸肛門病会誌 46: 96—99, 1993
- 10) 前田耕太郎, 橋本光政, 片井 均ほか: 前方切除術時の直腸内洗浄法の有効性に関する検討。日消外会誌 27: 1974—1978, 1994
- 11) 平井勝也, 河原秀次郎, 足利 建ほか: 直腸癌に対する低位前方切除術における術中直腸内洗浄の意義について。日臨床医会誌 56: 2296—2300, 1995
- 12) 神藤英二, 望月英隆, 長谷和生ほか: 直腸癌前方切除術における術中肛門側直腸内洗浄の効果と問題点。日本大腸肛門病会誌 49: 399—404, 1996
- 13) Umpleby HC, Fermor B, Symes MO et al: Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 71: 659—663, 1984
- 14) Gertsch P, Bear HU, Kraft R et al: Malignant cells are collected on circular staples. *Dis Colon Rectum* 35: 238—240, 1992
- 15) Farmor B, Umpleby HC, Lever JV et al: Proliferative and metastatic potential of exfoliated colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 76: 347—349, 1986
- 16) Skipper D, Cooper AJ, Marston JE et al: Exfoliated cells and in vitro growth in colorectal cancer. *Br J Surg* 74: 1049—1052, 1987
- 17) 角田明良, 渋沢三喜, 神山剛一ほか: 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。日消外会誌 29: 1022—1027, 1996
- 18) Davidson JT, Clay LD III, Umanoff M et al: Cancer recurrent at stapled colon incision. *N J Med* 87: 297—298, 1990
- 19) Morgan CN: Cancer of rectum, lecture delivered at Royal College of Surgeons of England. *Ann R Coll Surg Engl* 9: 13—24, 1951
- 20) 尾家重治: ヨードホール。小林寛伊編。消毒・滅菌ガイド。感染制御のために。中外医学社, 東京, 1995, p135—142
- 21) Hsu YC, Nomura S, Kruse CW: Some bactericidal and virucidal properties of iodine not affecting infectious RNA and DNA. *Am J Epidemiol* 82: 317—328, 1966
- 22) Docherty JG, McGregor JR, Purdie CA et al: Efficacy of tumoricidal agents in vitro and in vivo. *Br J Surg* 82: 1050—1052, 1995
- 23) Umpleby HC, Williamson RCN: The efficacy of agents employed to prevent anastomotic recurrence in colorectal carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl* 66: 192—194, 1984
- 24) 峠 哲哉, 平林直樹, 高木 弘: 抗癌剤感受性試験の現況とその問題点。日臨外医会誌 53: 751—757, 1992
- 25) Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55—63, 1983
- 26) 厚生省: 第十二改正, 日本薬局方。廣川書店, 東京, 1991, p704—705
- 27) Gottardi W: The influence of the chemical behaviour of iodine on the germicidal action of disinfectant solutions containing iodine. *J Hosp Infect* 6: 1—11, 1985
- 28) Rackur H: New aspects of mechanism of action of povidone-iodine. *J Hosp Infect* 6: 13—23, 1985
- 29) Zamora JL, Price MF, Chuang P et al: Inhibition of povidone-iodine's bactericidal activity by common organic substance: An experimental study. *Surgery* 98: 25—29, 1985
- 30) Zamora JL: Povidone-iodine and wound

infection. Surgery 93 : 121—122, 1984
31) Banich FE, Mendak SJ Jr : Intraoperative
colonic irrigation with povidone-iodine; an

effective method of wound sepsis prevention.
Dis Colon Rectum 32 : 219—222, 1989

Suture-line Implantation in Colorectal Cancer Surgery and Efficacy of Povidone-iodine Solution —An Experimental Study—

Hirotooshi Cho

Department of Surgery, Showa University, School of Medicine

(Director: Mitsuo Kusano)

Suture-line implantation of exfoliated tumor cells may account for local recurrence of colorectal cancer, and it has been recommended that the bowel lumen be lavaged during the operation. The aim of this study was to demonstrate experimentally suture-line implantation and the efficacy of povidone-iodine solution for its prevention. In an *in vivo* study, free cancer cells of the RCN-9 line were injected into the cecal lumen of Fisher 344 rats, with or without introducing povidone-iodine solution into lavage for five minutes consecutively. Then a linear stapler was placed to resect the upper pole of the cecum. The rats were killed on the 21st postoperative day and examined for the presence of cecal tumors histologically. The group without lavage revealed 73% (8/11) tumor formation. Intra-operative bowel lavage using 5% and 2.5% povidone-iodine solution significantly reduced the incidence of tumor growth (18 and 20%). In an *in vitro* study, the viability RCN-9 cells was determined by the trypan blue dye exclusion test and MTT assay after contact with povidone-iodine solutions (final concentration 0.0005 to 5%) and normal saline for five minutes. Povidone-iodine solution in excess of 0.16% showed a cytotoxic effect on cancer cells in each technique. We conclude that suture-line implantation may occur in the stapling technique and povidone-iodine solution is useful for prophylaxis against implantation in colorectal cancer surgery.

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