

液体窒素処理自家腫瘍骨の移植に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9480

液体窒素処理自家腫瘍骨の移植に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科整形外科科学教室 (主任: 富田勝郎教授)

山 本 憲 男

本研究では、同種骨と同等あるいはそれ以上の成績を期待できる新しい自家骨の処理法として、液体窒素を用いた冷却処理について検討を行った。材料はヒト骨肉腫細胞由来のOST細胞と新鮮な牛中足骨を用いた。牛中足骨内に温度センサーを設置し、 -196°C の液体窒素中、 20°C の室温中、 30°C の加温生理食塩水中の温度変化を測定し、一定の温度変化が得られる条件を検討した。ブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) を用いた免疫染色を行い、液体窒素処理後の腫瘍細胞の増殖能について免疫組織学的に検討を行った。液体窒素処理を行った腫瘍細胞塊をヌードマウスの皮下に移植し、経時的推定腫瘍体積の測定および組織学的検討を行った。また四肢荷重部に用いるための検討として、液体窒素処理による処理骨の力学的強度変化について液体窒素未処理骨およびオートクレーブ処理骨との圧縮強度を比較検討した。またその際の骨の破断面について、走査型電子顕微鏡による観察を行いその特徴について検討した。液体窒素中20分、室温中15分、加温生理食塩水中15分の計50分で、一定の温度変化の下で液体窒素処理を行うことができた。BrdU染色では、液体窒素未処理群では陽性を示したが、液体窒素処理を行った腫瘍細胞は陰性であった。推定腫瘍体積は、液体窒素未処理群で経時的に増加していたが、液体窒素処理群では経時的に減少した。組織像は、液体窒素未処理群で腫瘍細胞の組織浸潤が認められたが、液体窒素処理群では、腫瘍細胞の残存は認められず、移植腫瘍組織塊の壊死および瘢痕形成像が認められた。圧縮強度は、液体窒素未処理群で平均 $2.40 \pm 0.06\text{kN}$ 、液体窒素処理群で平均 $2.31 \pm 0.09\text{kN}$ 、オートクレーブ処理群で平均 $1.51 \pm 0.25\text{kN}$ と、オートクレーブ処理群でのみ液体窒素未処理群と比べ有意に初期強度の低下 ($p < 0.05$) が認められたが、液体窒素処理群では圧縮強度は温存されていた。走査型電子顕微鏡による観察では、液体窒素処理骨の破断面は緻密で平滑であったが、オートクレーブ処理骨の破断面は不整で、破断面の凹凸が目立っていた。以上の結果から、液体窒素処理により腫瘍細胞は死滅することが明らかとなった。また液体窒素処理後も骨強度は力学的に温存されており、液体窒素処理自家腫瘍骨の移植は、骨腫瘍切除後の再建術として有効な方法となると考える。

Key words liquid nitrogen, autograft, malignant bone and soft tissue tumor, reconstruction

整形外科領域における近年の集学的治療の進歩により、四肢発生の悪性骨軟部腫瘍に対して、生活の質的向上を目指した患肢温存術が積極的に行われている^{1)~4)}。患肢の再建に当たっては、腫瘍用人工関節、冷凍同種骨、自家骨、創外固定器を用いた新生自家骨による再建など、さまざまな方法が用いられている。このうち腫瘍用人工関節は、人工材料自体の耐久性に問題があり、人工関節のゆるみのため再置換術を余儀なくされることがある⁵⁾。また、関節機能に大きな役割を果たす筋や靭帯が人工物に生着することを期待できないため⁶⁾、その付着部の処理は大きな問題となる。同種骨は骨銀行の整備された欧米では広く用いられているが⁷⁾⁸⁾、日本では宗教的生死感のため入手するのが困難な状況であり、一般化されていないのが現状である⁹⁾。また、B型肝炎 (hepatitis B)、C型肝炎 (hepatitis C)、後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome) などの感染が問題となることがある¹⁰⁾。新生自家骨による再建は恒久的であり、耐久性、感染の問題も解決しており非常に有効な方法である¹¹⁾。しかし関節面の再建ができないのが難点である。そのため日本では、患者自身の罹患骨を再建術に利用する

ことが注目されており、罹患骨を処理する方法には、放射線処理¹²⁾¹³⁾、オートクレーブ処理^{14)~17)}、パストール処理¹⁸⁾¹⁹⁾などの方法が試みられてきた。しかし、これらの方法では、その手技や温度管理が煩雑であったり、特殊な器具が必要であるといった問題点があった。特に、広く用いられてきたオートクレーブ処理では骨伝導能は温存されるものの²⁰⁾、加熱による骨形成因子 (bone morphogenetic protein) 失活による骨誘導能の消失がおこるため²¹⁾骨癒合には不利である。そこで、従来の主な処理方法は骨を加温して処理することを目指していたが、患者自身の罹患骨を処理する新しい方法として、逆に骨を冷却処理することで再建に用いることができないかと考え検討を行った。

材料および方法

I. 実験材料

1. 骨検体

ヒトの大腿骨遠位部と比較的形態に近い、雌の成牛 (ホルスタイン種、3~4才) の新鮮な中足骨を用いた。中足骨は社団法人石川県金沢食肉公社より、屠殺直後の新鮮なものを無償で供

平成12年5月25日受付, 平成12年6月22日受理

Abbreviations : DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, BrdU, bromodeoxyuridine

与して戴いた。

2. 培養細胞株及びその条件

当科にて樹立・継代培養されているヒト骨肉腫由来のOST (Osteosarcoma Takase) 細胞を用いた²²⁾。細胞株は加熱失活処理した10%仔牛胎児血清 (fetal bovine serum) (大日本製薬, 大阪) 100単位 (unit, U) / ml ペニシリン (萬有製薬, 東京), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製薬, 東京) を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (日水製薬, 東京) を用いて37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 水蒸気飽和の条件下で単層培養を行った。また, 細胞浮遊液の調製にはトリプシン0.25%溶液 (Life Technologies, Inc., Rockville, USA) を用いた。

3. 実験動物

生後10週の雄性のヌードマウス (BALB/C nu/nu) を実験動物として用いた。室温は22 \pm 3 $^{\circ}$ C, 湿度は55 \pm 5%に保ち, 発癌物質のない特殊条件 (specific pathogen free) の下に各ケージに5匹ずつ分けて飼育した。飼料としては滅菌した Charles River Formula-1 固形飼料 (日本チャールズリバー, 神奈川) を自由摂取させ, 飲料水として塩素添加の水道水を与えた。

II. 実験方法

1. 牛中足骨内部の温度変化

牛中足骨内部の温度変化を測定した。新鮮な牛中足骨をマイクロ・カッティング・マシン BS3000-N (Exakt, Hamburg, Germany) を用いて遠位端から170mmの長さに切断した。直径2mmのキルシュナーワイヤー (日本マティス, 東京) を用いて, 切断端から90mmの骨髓内と150mmの軟骨下骨内にまで骨孔を作成した。この骨孔内にデジタル温度計 SK-2000MC (佐藤計量器製作所, 東京) のセンサー先端を設置した。切断端から液体窒素 (liquid nitrogen) が流入しないようにながら-196 $^{\circ}$ Cの液体窒素中, 20 $^{\circ}$ Cの室温中, 30 $^{\circ}$ Cの加温生理食塩水中の温度変化について各10検体を用いて測定した。またその時に, 中足骨に骨折が起こらないような冷却・加温条件を検討した (図1)。

2. 液体窒素処理後の骨肉腫細胞の免疫組織学的観察

単層培養後にトリプシンで調製した骨肉腫細胞 (OST細胞) をヌードマウスの皮下に5 \times 10⁶個 (0.2ccの培養液を含む) 接種し腫瘍塊を形成させた。これを0.3gの大きさに細切し牛中足骨の骨内に挿入した後に, 実験1で決定した条件下で処理を行った。次にこの腫瘍塊をさらに細断片化した標本を作成後, 液体窒素未処理群, 液体窒素1回処理群, 液体窒素2回処理群についてプロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) 染色キット (ZYMED laboratories Inc, San Francisco, USA) を用いて各群同条件下に免疫組織学的検討を行った (図2)。まず標本を0.1%プロモデオキシウリジン/細胞培養液 (DMEM) 中に標識のため1時間浸透させ, 10%フォルムアルデヒド溶液にて固定した後, 標本を上昇エタノール系列にて脱水した。パラフィン包埋しマイクロトームにて1mm間隔で2 μ mの切片を作製し, 切片をポリエリジンコートスライドガラスに貼りつけ, キシレンにて脱パラフィンを行った。標本はHE染色と抗BrdU抗体を用いた免疫組織染色を行った。免疫組織染色はマニュアルに従い, 蛋白消化と内因性ペルオキシダーゼ反応を阻害し, さらに非特異的反応を抑制した。次に一次抗体であるマウス抗BrdU抗体を室温にて一晚反応させた後, ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ (streptavidin-peroxidase) 反応を10分間室温にて行った。発色はジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine) 溶液にて3~5分間反応させた。陽性対照は, キットに添付されているマウス小腸を用いて, 陽性所見を示すことを確認した。また陰性対照としては, 一次抗体の反応過程を除いて反応を行い, 陽性所見は認めなかった。

3. ヌードマウスを用いた液体窒素処理後の骨肉腫細胞の再発についての肉眼的及び組織学的観察

実験2と同様の手順で, 骨肉腫細胞 (OST細胞) をヌードマウスの皮下に接種し腫瘍塊を形成した。これを0.3gの大きさに細切し牛中足骨の骨内に挿入し, 実験1で決定した条件下で処理を行った。その後, この処理した腫瘍塊を他のヌードマウスの皮下に移植した。ヌードマウスは塩酸ケタミン (三共, 東京) を12.5mg腹腔内投与して麻酔を行い, イソジン液 (明治製薬, 東

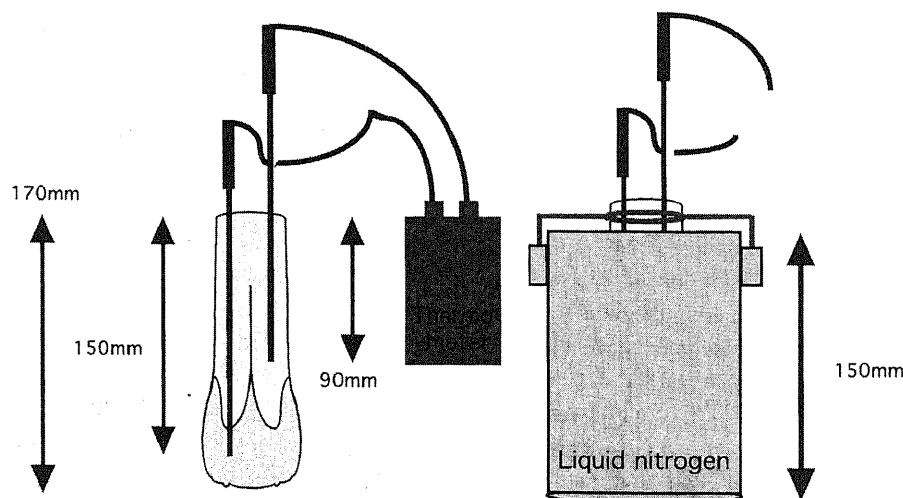


Fig. 1. Measurement of temperature changes inside the bone. The tip of one thermometer was inserted into the bone marrow and that of the other one into the subchondral bone of the metatarsus. Temperature changes were measured under three incubation conditions: in liquid nitrogen at -196 degrees, at a room temperature of 20 degrees, and in physiological saline at 30 degrees.

京)にて局所の消毒を行った後、尖刃刀(フェザー安全剃刀,大阪)を用いて背部皮膚を10mmにわたって小切開し、腫瘍塊を移植した。移植後は4-0針付きナイロン糸(ケイセイ医科工業,東京)を用いて皮膚の縫合を行った(図3)。

経時的に移植腫瘍塊の推定腫瘍体積について、液体窒素未処理群、液体窒素1回処理群、液体窒素2回処理群について各20匹を用いて検討を行った。推定腫瘍体積は、下記の式にて求めた。

$$V(\text{推定腫瘍体積}) = 1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 (\text{mm}^3)$$

またHE染色を用いて各群を組織学的に検討した。

4. 力学的検討(横方向への圧縮強度測定)

液体窒素処理骨の強度を測定、比較検討するため、液体窒素未処理群、液体窒素1回処理群、120℃、15分のオートクレーブ処理群について各10検体を用いて測定を行った。検体は、

各処理を施した中足骨を骨幹部で切断面が平滑になるようマイクロ・カッティング・マシンBS3000-Nを用いて骨軸に垂直に50mmの長さに切断した。次に両圧縮面に5mmの厚さのシリコンラバー(ワコム電創製,埼玉)をあて、万能試験機DSS-5000(島津製作所製,京都)を用いて骨軸に対する横方向の圧縮破壊荷重を測定した。試験は室温中で行い、クロスヘッドの移動スピードは2mm/分とした(図4)。

5. 破断面の走査型電子顕微鏡による検討

強度測定後の標本の破断面について、液体窒素1回処理群、120℃、15分のオートクレーブ処理群について走査型電子顕微鏡DS-130C(明石ビームテクノロジー製,東京)を用いて観察し、検討を行った。検体には強度測定後の標本を用い、マイクロ・カッティング・マシンBS3000-Nを用いて、破断面を含むように20mm大の大きさに切り出した標本を作成した。この標本の

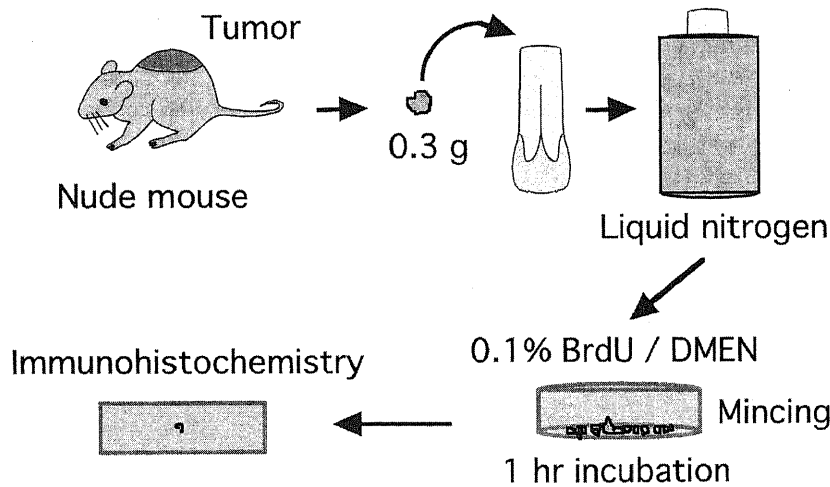


Fig. 2. Evaluation of tumor cell viability (*in vitro* study). The tumor mass which had proliferated on the back of a nude mouse was resected. It was then subjected to liquid nitrogen treatment, incubated in a 0.1% BrdU/culture solution for 1 hr, and stained immunologically to evaluate cell viability. The tumor mass from the control group without the liquid nitrogen treatment was processed similarly in the culture solution and was incubated in a 0.1% BrdU/culture solution for 1 hr.

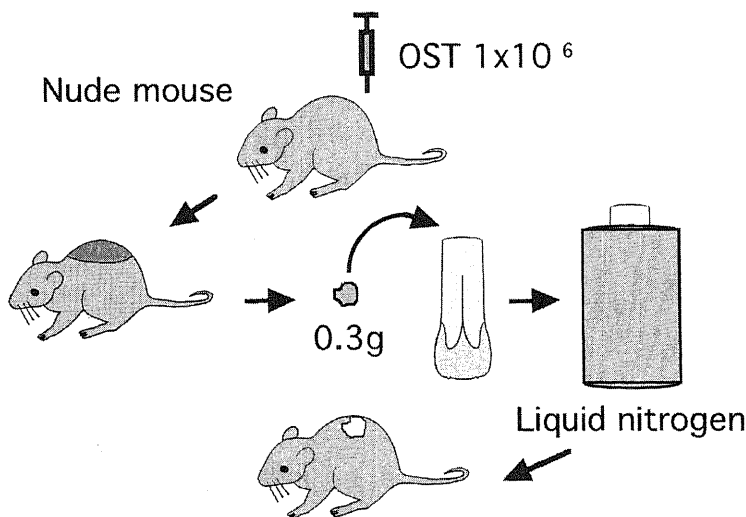


Fig. 3. Examination of actual tumor proliferation potential (*in vivo* study). A 0.3g piece cut from the tumor, which had proliferated on the back of the nude mouse, was transplanted to the back of another nude mouse after treatment with the liquid nitrogen method. Changes in tumor volume and histological findings in the control and liquid nitrogen groups were examined and compared.

破断面を上にして試料台に載せ、真空蒸着装置イオンコータ IB-3型 (エイコーエンジニアリング製, 水戸) を用い真空中で金を蒸着させて観察した。

Ⅲ. 統計学的検討

測定結果は平均値±標準偏差 (x̄±SD) で表記した。各群間の有意差検定には分散分析の後にSchefféの多変比較法を用い、統計学的有意差は、危険率5%未満 (p<0.05) をもって有意差ありと判定した。

成 績

I. 牛中足骨内部の温度変化

20℃の室温中に保管してあった検体は、-196℃の液体窒素中では骨髓内・軟骨下骨部とも急速に温度の低下が認められ、処理後20分で骨髓内・軟骨下骨部とも-180℃程度となり、その後の温度変化は緩徐となった (図5A)。冷却後の加温では、液体窒素処理後-180℃となった検体は、20℃の室温中では15分で骨髓内・軟骨下骨部とも-100℃程度まで温度が上昇していた (図5B)。-100℃からの加温生理食塩水中での温度変化は、加温後15分程度で温度変化が緩徐となり、その時点で骨髓内・軟骨下骨部とも約0℃まで加温されていた (図5C)。以上の結果を踏まえて、本実験での処理過程は、20℃の常温から-196℃

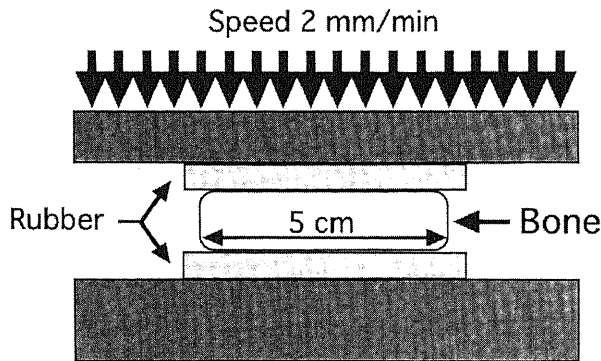


Fig. 4. Examination of compression strength. Using a compression tester like the one shown in the figure, the compression strengths of intact bone, autoclaved bone, and liquid nitrogen treated bone were measured.

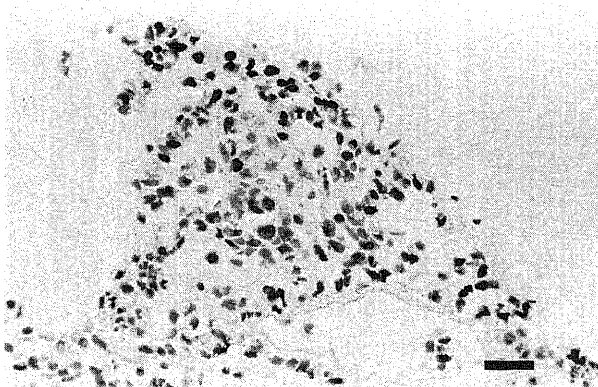


Fig. 6. Immunohistochemical staining of BrdU of the control group treated as described below Fig 2, and showing positive appearance. Scale bar: 25μm.

の液体窒素処理20分、20℃の室温中処理15分、30℃の温水 (加温生理食塩水) 中処理15分の計50分を1コースとした。

Ⅱ. 液体窒素処理後の骨肉腫細胞の免疫組織学的観察

BrdUを用いた免疫染色において、液体窒素未処理群では陽性像を示したが、液体窒素1回処理群、液体窒素2回処理群ではともに陽性細胞は観察されなかった (図6)。

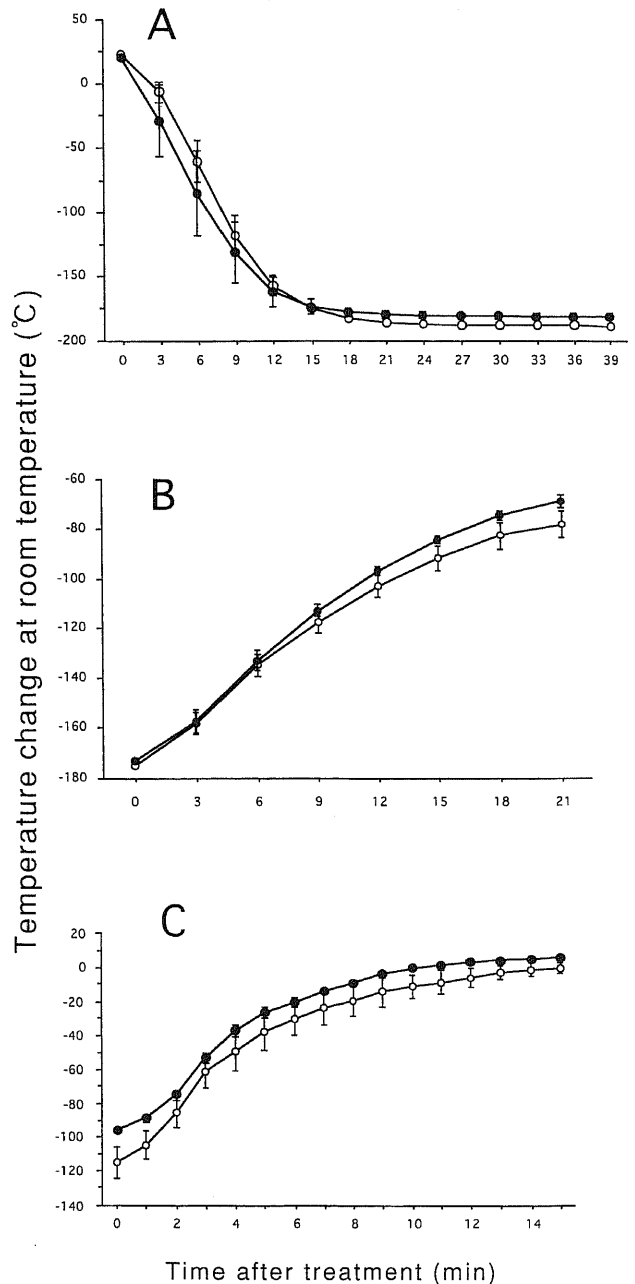


Fig. 5. Temperature changes in the metatarsus. (A) Temperature changes during liquid nitrogen processing. The temperature became nearly stable in about 20 min. (B) Temperature changes of the liquid nitrogen-treated bone after incubation at a room temperature of 20 degrees. It took about 15 min to reach a temperature of -100 degrees. (C) Temperature changes of the bone treated as in (B), and after its incubation in physiological saline at 30 degrees. The temperature became nearly stable in about 15 min. Temperature in the medullary cavity (●) and subchondral bone (○) are shown.

Ⅲ. ノードマウスを用いた骨肉腫細胞の再発についての肉眼的及び組織学的観察

液体窒素未処理群では、経時的に推定腫瘍体積は増大した(図7)。HE染色による組織学的観察では、腫瘍細胞の増生と組織間浸潤が認められた(図8A, 8B)。一方、液体窒素1回処理群、液体窒素2回処理群ではともに経時的に推定腫瘍体積は減少し

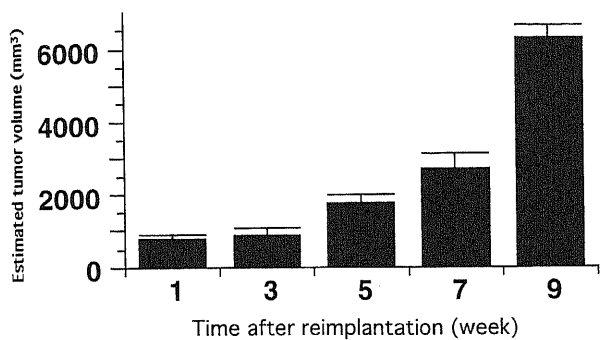


Fig. 7. Estimated tumor volume of the control group treated as described below Fig 2.

た(図9)。組織像でも腫瘍細胞の残存は認められず、HE染色による組織学的観察では、移植塊の周囲には線維組織が形成され、壊死組織像と炎症細胞の浸潤が認められた(図10)。

Ⅳ. 液体窒素処理骨の力学的検討

骨軸に対する横方向の圧縮破壊荷重は、液体窒素未処理群で $23.5 \pm 0.6\text{kN}$ 、液体窒素一回処理群で $22.6 \pm 0.9\text{kN}$ 、オートク

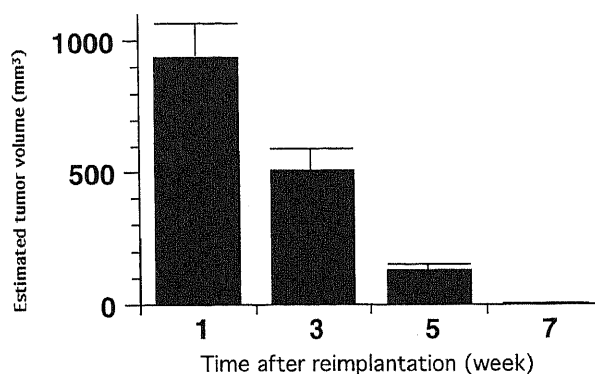


Fig. 9. Estimated tumor volume of the liquid nitrogen method (1 cycle) group.

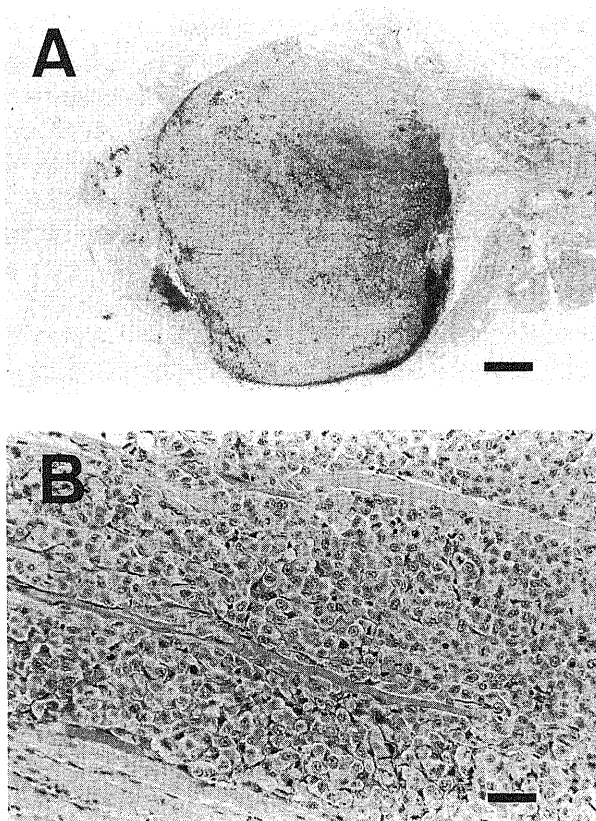


Fig. 8. (A) Low magnification image of the histology of the control group treated as described below Fig 2. (B) High magnification image, histologically demonstrating that tumor cells have permeated the spaces between muscle fibers. Scale bar: $500\mu\text{m}$ (A); $50\mu\text{m}$ (B).

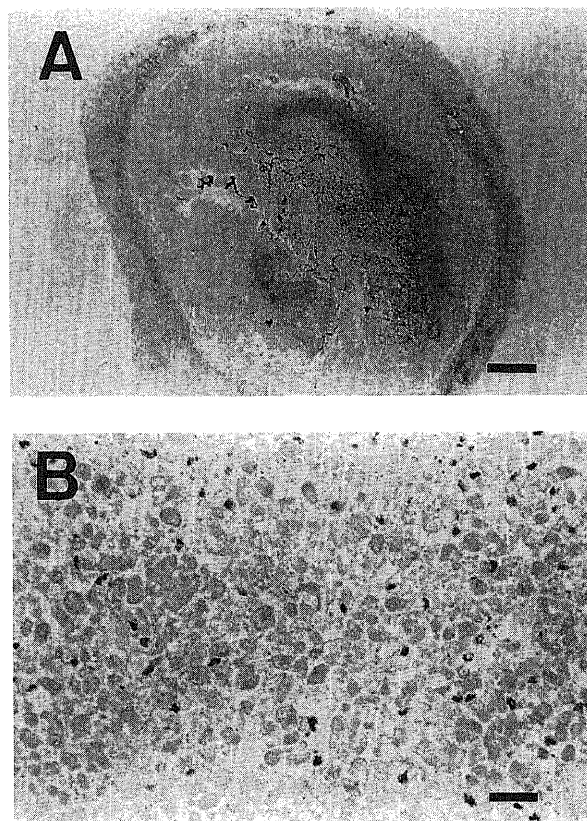


Fig.10. (A) Low magnification image of the histology of the liquid nitrogen method group. (B) High magnification image showing histological evidence of fibrous tissue around the transplanted mass. Necrosis and infiltration of inflammatory cells are also observed. Scale bar: $250\mu\text{m}$ (A); $25\mu\text{m}$ (B).

レーブ処理群で $14.8 \pm 2.5 \text{ kN}$ であった。オートクレーブ群でのき裂発生荷重は、液体窒素未処理群と比べ有意に低下 ($p < 0.05$) していたが、液体窒素一回処理群では、液体窒素未処理群と比べて有意差はなく、圧縮強度は変化しないことがわかった (図11)。

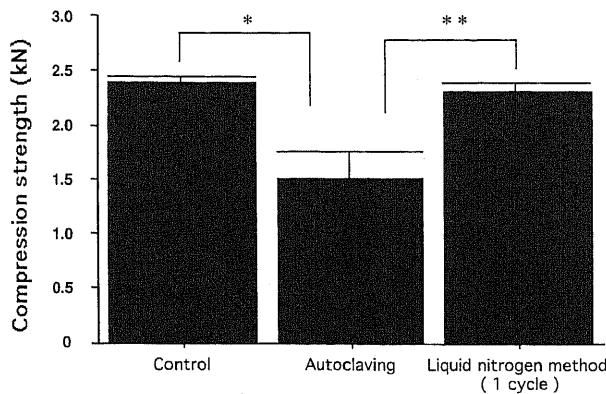


Fig.11. Compression strength. Values are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$. ** $p < 0.05$.

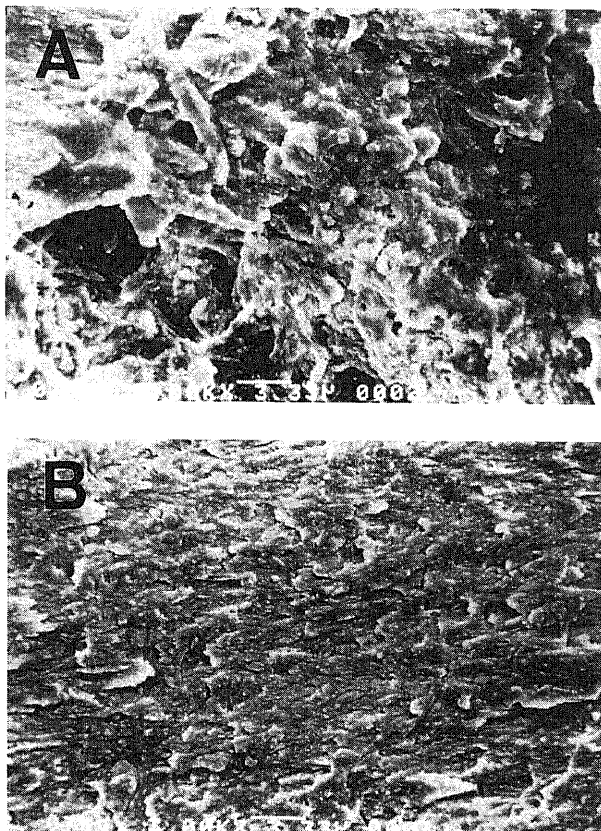


Fig.12. Scanning electron micrographs of fracture surface. (A) Autoclaved bone. (B) Liquid nitrogen treated bone. While the fracture surface of the autoclaved bone was irregular and uneven, that of the liquid nitrogen treated bone was smooth and fine-grained. Scale bar: $3.33 \mu\text{m}$.

V. 破断面の走査型電子顕微鏡による観察

オートクレーブ処理骨の破断面は不整で、凹凸が目立っていた (図12A)。一方、液体窒素処理骨の破断面は緻密で平滑であった (図12B)。

考 察

液体窒素の外科的応用は、1962年にCooper²³⁾によって脳腫瘍の治療に用いられるようになったのが最初である。それ以後、直腸癌²⁴⁾、皮膚癌²⁵⁾、腎癌²⁶⁾、肝癌²⁷⁾などの各種悪性腫瘍の局所療法に用いられている。整形外科領域では、1966年にGageら²⁸⁾により、骨への液体窒素効果の基礎的実験が行われ、1969年にMarcoveら²⁹⁾により骨腫瘍に対する臨床応用が報告されて以来、主に良性骨・軟部腫瘍に対する局所補助療法の一つとして用いられてきた^{30)~33)}。その使用法は、良性腫瘍ないしは準悪性の骨巨細胞腫などに対して、手術部局所に液体窒素をスプレー処理するものであり、局所再発の割合については、他の方法と同等以上の成績が得られており、術後の創部感染に関しても問題ないことが報告されている³¹⁾³³⁾。しかし高悪性度の肉腫においては、液体窒素処理はこれまで応用されたことがなく、また整形外科領域では、腫瘍を一端切り出して、体外で液体窒素処理をするといった方法も行われていなかった。一方歯科口腔外科領域においては、癌に侵された自家骨を液体窒素処理して再建に用いる方法が用いられ、様々な症例が報告されている^{34)~39)}。

Dongら³⁹⁾は、下顎骨における良性・悪性骨腫瘍に対して液体窒素を利用した再建法を行い、良好な成績を報告し、その中で利点として、自家骨であり抗原性がないこと、骨欠損部と移植骨の形状が完全に一致しているため良好な美容上の結果が得られること、凍結過程で腫瘍細胞を破壊し再発率を減少させることができること、他の部位からの骨移植が不要であるため手術が簡略化できることなどを挙げている。

これらのことより我々は、整形外科領域においても、肉腫に侵された自家骨をいったん切り出し、液体窒素処理した後に還納して四肢の再建に利用することは可能ではないかと考えた。そこで今回基礎的実験を行い、その臨床応用への可能性を検討した。

液体窒素は、無色・無臭の液体で、断熱膨張を利用して工業的に作られ、値段的にも安価で、入手も比較的容易である。沸点は約 -196°C と極低温であり、従来から行われているオートクレーブやバスター処理のような他の処理法と比べて、処理中の温度管理に神経を使う必要がないという大きな利点がある。用いる器具も断熱容器さえあればよく、容易に処理を行うことができる利点もある。

液体窒素のもたらす凍結による細胞障害の機序は複雑であるが、凍結過程での細胞内外の氷晶形成や脱水が細胞に致命的に働くと考えられている。Kimuraら⁴⁰⁾の報告では、凍結法には緩慢凍結と急速凍結があり、 $0.1^\circ\text{C}/\text{分}$ 程度の緩慢凍結では細胞周囲の媒体から凍結が始まり、細胞外の浸透圧上昇に伴い細胞内脱水が生じ、細胞内液は濃縮され氷晶形成が起こりにくくなる。したがって、細胞機能は障害を受けにくい。さらに低温になると細胞内脱水が進行し、細胞容積の減少、収縮変形が起こり、細胞障害をきたすようになる。一方急速凍結では、細胞内脱水が進行する前に周囲の温度変化のため細胞は原型を保ったまま凍結され、氷晶がある程度以上に成長すると、機械的に

細胞を障害するようになると述べている。

また、Uedaira⁴¹⁾やNeel⁴²⁾は、腫瘍細胞は正常の細胞よりも低温による障害を受けやすいと報告している。Helpap⁴³⁾が述べているように、最も効果的な凍結障害の与え方は、急速な凍結と緩徐な融解であり、このことから液体窒素は有効な冷却材であると言える。またHayashiら⁴⁴⁾は、凍結防止剤なくして生きた細胞の凍結保存は不可能と述べており、凍結保存の際には、Mazurら⁴⁵⁾が報告しているようにプログラムフリーザーによる厳密な温度コントロールを行ったり、Polgeら⁴⁶⁾が報告したように、細胞内の水分子と結合することで、細胞凍結の際の細胞内氷結による細胞破壊を抑制するグリセロールを用いる方法や、Lovelockら⁴⁷⁾が報告したように、グリセロール同様に凍結防止作用のあるジメチルスルフォキシド(dimethylsulfoxide)を用いる方法が行われている。逆説的に言えば、これらの手段を講じなければ、細胞は障害を受けて死滅する。

液体窒素処理後の骨再置換能について、Marcianiら⁴⁸⁾は犬の下顎骨を用いた実験で、生理食塩水で処理した骨と比べ、骨の再置換に有意差はなかったと報告している。また、酵素の残存についても、液体窒素処理後も酵素が温存されることが報告されている。

骨内の温度変化についてBöhmら⁴⁹⁾は、子牛の大腿骨における加温実験で、骨髓内と軟骨下骨内では温度変化に差が生じると報告しており、本実験では温度計の先端を骨髓内と軟骨下骨内に設置して、温度変化を観察した。また、今回の実験では処理条件をなるべく厳しくするため、切断端から液体窒素が入らないようにして、温度変化を測定した。実際の臨床応用の際には、切断端から液体窒素が髓内に流入することになるため、より急激に髓内の凍結が進み、腫瘍細胞へより大きな障害を与えることができると推測されるが、今回のプロトコールは、周囲からの冷却のみで温度変化が確実に一定に落ち着くまでの時間を処理時間と設定した。温度変化は液体窒素中、液体窒素処理後室温中、処理後30℃の生理食塩水中のそれぞれについて測定を行った。これは、当初は液体窒素処理直後に温水処理を行う予定であったが、予備実験で、液体窒素処理後の温水処理を行う場合には、-100℃程度まで温度が回復していないと骨折が生じることが判明したため、室温での加温処理の過程も行うこととしたためである。以上より、本実験の液体窒素処理は、一定の温度変化が得られるように、-196℃の液体窒素中20分、20℃の室温中15分、30℃の生理食塩水中15分の計50分を1コースとした。ここでまず、液体窒素処理後の腫瘍細胞の増殖能(cell viability)を調べるため、BrdU染色を行った。BrdUはチミン類似物質であり、細胞周期が回転している場合に、S期の細胞の核内に取り込まれる。これを応用して腫瘍増殖能を検討した。その結果、培養液にて処理を行った対照群では腫瘍細胞の核が染色され陽性を示したが、同時に染色を行った液体窒素1回処理群・2回処理群では核の染色は認められず陰性であった。このことから、液体窒素処理した腫瘍細胞は、細胞周期が回転しておらず、死滅しているか、もしくは細胞周期が著しく遅くなっているものと考えられた。

そこで、実際の腫瘍増殖能を調べるため、ヌードマウスを用いた増殖実験を行った。対照群では経時的に腫瘍塊の増大を認めた一方で、液体窒素1回処理群・2回処理群では経時的な腫瘍塊の縮小を認めた。組織学的な検討では、腫瘍細胞は死滅しており、移植塊の周囲には線維組織の形成が認められ、

壊死組織像と炎症細胞の浸潤を認めた。これらのことより、本実験の液体窒素処理により、腫瘍細胞に増殖能力はなく、腫瘍は壊死に陥っているものと結論した。また、液体窒素1回処理群・2回処理群とも同等の成績であり、両者とも腫瘍の再発は認めないため、液体窒素処理は、-196℃の液体窒素中20分、20℃の室温中15分、30℃の生理食塩水中15分の計50分の1コースで十分であると結論した。

また本検討では、液体窒素処理骨を四肢のいわゆる荷重部の再建に用いることを目的としており、液体窒素処理骨の力学的強度についても検討を行った。その結果、圧縮試験機を用いた圧縮試験では、オートクレーブ処理骨の力学的強度は無処理骨に比べ有意に低下していた。一方液体窒素処理骨では、無処理骨に比べても圧縮強度の低下はなく、力学的強度は十分に保たれていた。破断面を走査電子顕微鏡で観察すると、オートクレーブ処理骨では、破断面は不整で、凹凸が多く小孔が多く認められていた。これは熱変性により、骨内の有機成分が消失したためであると推察され、この小孔が連続することによって骨内で微小骨折が無数に起こり、この結果として骨強度が低下するものと推察した。一方で、液体窒素処理骨の破断面は平滑で緻密であり、これは、液体窒素処理骨は骨内の有機成分が温存されており、骨内も密に保たれていたことが、強度が温存されていた一因であると推察された。

臨床応用への可能性についてであるが、関節面の再建においては、オートクレーブ処理骨では、熱処理をするため軟骨基質が失われ、関節面を人工関節を使って再建しなければならないが、完全な関節面の適合性を得ることはできない。また、同種骨においても、いかに近い形態のものを選ぼうとも完全な関節面の適合性を得ることはできない。その一方で、液体窒素処理では軟骨細胞自体は死滅するが、軟骨基質は温存されるため完全な適合性を得ることができる。

また周囲の靭帯組織との関係については、周囲の軟部組織との癒合・置換について北岡⁵⁰⁾は、冷凍保存同種骨を用いた関節再建の実験で、冷凍保存されていた靭帯を移植骨側の靭帯に再縫合した場合、その移植骨側の靭帯および靭帯付着部はきわめて正常に類似した形態学的、機能的構造に再生されることを明らかにした。具体的には、移植後24週で、正常の90%まで強度が回復されると報告している。このように、他者から移植された組織でも修復・置換が行われることより、液体窒素処理においても、同等以上の良好な軟部組織の修復・置換が行われると推察される。このことから、関節面の再建についても、本法は利点が大いだと推察される。

処理時間についてであるが、今回の検討では腫瘍細胞の処理条件は液体窒素が骨切断面から進入しないようにして処理を行った。しかし、実際の臨床では、摘出した腫瘍骨を、軟部組織を剥離した後に、そのまま直接液体窒素内に入れることになる。そのため、切断端からも液体窒素が骨髄内に直接進入することになるので、今回の検討よりも早く骨の温度を低下させることができると推察される。そのため今回の検討からは、液体窒素処理には、-196℃の液体窒素中20分、20℃の室温中15分、30℃の生理食塩水中15分の計50分が必要であるとしたが、この処理時間をより短縮することは可能であると考えている。また他にも、抗癌剤処理の併用、蒸留水による処理の併用などにより、より安全に、より短時間で処理を行うことが可能であると推察される。

液体窒素処理後の初期強度に関しては、液体窒素処理後も圧縮強度は温存されており、十分に局所再建に用いることが可能であると推察される。しかし経時的な耐久性については、冷凍同種骨、各種処理自家骨で問題となることがある。液体窒素処理骨における経時的な強度の変化については未知数であり、今後検討を行う必要があると考えている。しかし、人工関節においても経過とともに再手術が必要となることが多く、現時点では関節面を含んだ恒久的な再建は、腫瘍用人工関節、冷凍同種骨、各種処理自家骨を用いた方法すべてにおいて不可能である。このことから考えても、液体窒素処理骨による再建が、恒久的な方法となるかは不明であるが、完全な関節面の適合性が得られること、既存骨との癒合が有利である可能性が大きいことを考えると、他の方法以上の利点があると推察される。

結 論

患者自身の罹患骨を処理し、悪性骨・軟部腫瘍切除後の再建に用いるための基礎的検討として、牛中足骨、ヒト骨肉腫細胞由来のOST細胞、ヌードマウスを用いて、以下の知見を得た。

1. -196℃の液体窒素中20分、20℃の室温中15分、30℃の加温生理食塩水中15分の計50分の処理により、一定の温度変化の下で液体窒素処理を行うことができた。また、その際骨折は起きなかった。

2. BrdUを用いた免疫染色では、液体窒素未処理群では陽性を示したが、1.の条件下で液体窒素処理を行った腫瘍細胞は陰性であり、液体窒素処理により腫瘍細胞の細胞周期は著しく遅延しているか、腫瘍細胞は死滅していることが示唆された。

3. ヌードマウスを用いた生体内での検討では、液体窒素未処理群で推定腫瘍体積は経時的に増加したが、一方、液体窒素処理群では経時的に推定腫瘍体積は減少した。組織学的には、液体窒素未処理群で腫瘍細胞は組織浸潤を起こしていたが、液体窒素処理群では、細胞の残存は認められず移植腫瘍組織塊の壊死および癬痕形成像が認められた。以上より、液体窒素処理後の腫瘍細胞に増殖能はなく、液体窒素処理により腫瘍細胞は死滅することが明らかにされた。

4. 圧縮強度は、オートクレーブ処理群でのみ液体窒素未処理群と比べ有意に低下 ($p < 0.05$) していたが、液体窒素処理群では力学的強度は温存されていた。

5. 走査型電子顕微鏡による破断面の観察では、液体窒素処理骨の破断面は緻密で平滑であったが、オートクレーブ処理骨の破断面は不整で、破断面の凹凸が目立っていた。これは、液体窒素処理骨では蛋白・有機物が温存されている一方で、オートクレーブ処理骨では、これらが加温処理による熱変性で消失してしまっていることが示唆された。またこれが、オートクレーブ処理骨で力学的強度が低下している一方で、液体窒素処理骨では強度が温存されている理由の一つであることが推察された。

以上より、患者自身の罹患骨を再処理して、悪性骨・軟部腫瘍の再建に用いる新しい方法として、液体窒素処理は有効な方法となることが明らかにされた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学医学部整形外科講座富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。本研究に関し終始直接の御指導を戴きました同講座土屋弘行助教授に心から感謝致します。本実験の遂行に際し、多大な御助言と御協力を戴きました石川県工

業試験場舟木克之博士、舟田義則博士、無償で牛の中足骨を提供して戴いた社団法人石川県金沢食肉公社和田 等氏、終始御協力を戴いた整形外科腫瘍班の諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は、第18回日本骨・関節・軟部組織移植研究会(1999年、東京)、第73回日本整形外科学会学術集会(2000年、神戸)、The 3rd Meeting of The Asia Pacific Musculoskeletal Society(2000年、Hong Kong)において発表した。

文 献

- 1) Enneking WF, Spaner SS, Goodman, MA. A system of staging musculoskeletal neoplasms. *Clin Orthop* 204: 9-24, 1986
- 2) 富田勝郎, 土屋弘行, 横山明男, 立石昭夫, 高田典彦, 八木知徳, 石井清一, 山脇慎也, 柿崎 寛, 千木良正機, 檜垣昇三, 川野寿, 大幸俊三, 井上幸雄, 福島 博, 館崎慎一郎, 新城 清, 武内章二, 内田淳正, 林 英紀, 遠藤寿男, 葉山 泉, 井上 治. 骨肉腫患肢温存の動向. *臨整外* 22: 1147-1153, 1987
- 3) Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Morinaga T, Kitano S, Yamamoto N. Caffeine-assisted chemotherapy and minimized tumor excision for nonmetastatic osteosarcoma. *Anticancer Res* 18: 657-666, 1998
- 4) Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada N, Yamamoto N. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy. *Clin Orthop* 358: 27-35, 1999
- 5) Kavanagh BF, Fitzgerald RH. Multiple revisions for failed total hip arthroplasty not associated with infection. *J Bone Joint Surg Am* 60: 1144-1149, 1987
- 6) 小沢直人. 多孔体合成ハイドロキシアパタイトとラット臍組織との結合. *日整会誌* 65: 1091-1098, 1991
- 7) Makley JT. The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. *Clin Orthop* 187: 58-75, 1985
- 8) Mnamneh W, Malinin TI, Markley JT, Dick HM. Massive osteoarticular allografts in the reconstruction of extremities following resection of tumors not requiring chemotherapy and radiation. *Clin Orthop* 197: 76-87, 1985
- 9) 矢部啓夫, 中西忠行, 根本哲夫, 他: 骨腫瘍における同種保存骨移植の治療成績. *整形外科* 43: 1701-1707, 1992
- 10) Tomford WW. Transmission of Disease through Transplantation of Musculoskeletal Allografts. *J Bone Joint Surg Am* 77: 1742-1754, 1995
- 11) Tsuchiya H, Tomita K, Minematsu K, Mori Y, Asada N, Kitano S. Limb salvage using distraction osteogenesis. A classification of the technique. *J Bone Joint Surg Br* 79: 403-411, 1997
- 12) Yamamuro T, Kotoura Y. Intraoperative radiation therapy for osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 62: 177-183, 1993
- 13) 平野 徹, 吉田伍一, 岩崎勝郎, 林 靖之, 南 和徳. 術中照射を利用した骨関節再建法. *整災外* 39: 623-630, 1996
- 14) Thompson VP, Steggall CT. Chondrosarcoma of the proximal portion of the femur treated by resection and bone replacement. A six-year result. *J Bone Joint Surg Am* 38: 357-367, 1956
- 15) Wagner M, Pesch HJ. Autoclaved bone grafts in prosthesis replacement of the hip. *Orthopade* 18: 463-467, 1989
- 16) Lauritzen C, Alberius P, Santanelli F, Vallfors B, Lilja J, Stephensen H. Repositioning of craniofacial tumorous bone after

autoclaving. *J Reconstr Surg* 25: 161-165, 1991

- 17) 下崎英二, 富田勝郎, 北岡克彦, 松本忠美, 土屋弘行, 伊藤貴夫, 糸川秀人. オートクレーブボン. 骨・関節・靭帯 5: 634-642, 1992
- 18) 真鍋 淳. パスツール処理自家骨移植に関する実験的研究. 日整会誌 67: 255-266, 1993
- 19) 杉浦英志, 佐藤啓二. 70℃処理骨の基礎. *MB Orthop.* 8: 45-50, 1995
- 20) Wangerin K, Ewers R, Kestel M. Interaction of bone resorption and bone synthesis using an autoclaved bone graft. *Prog Clin Biol Res* 187: 343-351, 1985
- 21) Urist MR, Dawson E. Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop* 154: 97-113, 1981
- 22) 山崎安朗. ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察. 十全医会誌 71: 1-13, 1975
- 23) Cooper IS. Cryogenic surgery of the basal ganglion. *JAMA* 181: 600-604, 1962
- 24) Theiss R, Schmidt KH, Buess G, Junginger T. Cryosurgery in inoperable rectal cancer. *Zentralbl Chir* 110: 142-146, 1985
- 25) Buchner SA. Cryosurgery in malignant tumors of the skin. *Ther Umsch* 50: 848-851, 1993
- 26) Uchida M, Imaide Y, Sugimoto K, Uehara H, Watanabe H. Percutaneous cryosurgery for renal tumors. *Br J Urol* 75: 132-136, 1995
- 27) Shafir M, Shaprio R, Sung M, Warner R, Sicular A, Klipfel A. Cryoablation of unresectable malignant liver tumors. *Am J Surg* 171: 27-31, 1996
- 28) Gage AA, Greene JCW, Neiders ME, Emmings FG. Freezing bone without excision. *JAMA* 197: 770-774, 1966
- 29) Marcove RC, Miller TR. Treatment of primary and metastatic bone tumors by cryosurgery. *JAMA* 207: 1890-1894, 1969
- 30) Biesecker JL, Marcove RC, Huvos AG, Mike V. Aneurysmal bone cysts. A clinicopathologic study of 66 cases. *Cancer* 26: 615-625, 1970
- 31) Malawer MM, Dunham W. Cryosurgery and acrylic cementation as surgical adjuncts in the treatment of aggressive (benign) bone tumors. Analysis of 25 patients below the age of 21. *Clin Orthop* 262: 42-57, 1991
- 32) Marcove RC, Sheth DS, Takemoto S, Healey JH. The treatment of aneurysmal bone cyst. *Clin Orthop* 311: 157-163, 1995
- 33) Malawer MM, Bickels J, Meller I, Buch RG, Henshaw RM, Kollender Y. Cryosurgery in the treatment of giant cell tumor. A long-term followup study. *Clin Orthop* 359: 176-188, 1999
- 34) Plezia RA, Smith DB, weaver AW. Frozen Autogenous Mandible as an Immediate Replacement Graft. *J Oral Surg* 36: 481, 1978
- 35) Leipzig B, Cummings CW. Immediate mandibular reconstruction. Human experience with autogenous frozen mandibular grafts. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89: 879-881, 1981
- 36) Dougherty TP, Rafetto LK, Edwards RC, Caudill RJ, McInnes G. Reimplantation of Freeze-Treated Bone in Immediate Reconstruction of the Mandible. *Am J Surg* 144: 463-465, 1982
- 37) Bradley PF. A Two-stage Procedure for Reimplantation of Autogenous freeze-treated Mandibular Bone. *J Oral Maxillofac Surg* 278-284, 1982
- 38) Iida T, Ogawa F. Survey of oral lesions treated with cryosurgery during the past 20 years. *Low Temp Med* 16: 59-61, 1990
- 39) Yao-Dong jun, Guo-Zhang Zhi, She-Wang ping, Zubing Li. The use of immediate frozen autogenous mandible, for benign tumour mandibular reconstruction. *Br J Oral Maxillofac Surg* 34: 58-61, 1996
- 40) Kimura T, Kojima Y, Nakagawara G. Current status of cryopreservation of pancreatic islets. *Low Temp Med* 22: 1-6, 1996
- 41) Uedaira hisashi. Dynamic states of water in biological systems under low temperature. *Low Temp Med* 3: 87-89, 1977
- 42) Neel HB. Cryosurgery for the treatment of cancer. *Laryngoscope* 90: 231-248, 1980
- 43) Helpap B. Cryosurgery techniques, Morphology and immunology. An overview. *Low Temp Med* 8: 7-12, 1982
- 44) Hayashi H, Ohe N, Kasai S, Mito M, Sakao N, Urao T, Kuraoka Y. Development of the ultra-rapid cell freezing method by using helium gas. *Low Temp Med* 14: 81-86, 1988
- 45) Mazur P, Miller RH. Survival of fetal rat pancreas frozen to -78 and -196°C. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 4105, 1976
- 46) Polge C, Smith AU, Parks AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666, 1949
- 47) Lovelock JE, Bishop MWE. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulfoxide. *Nature* 183: 1394-1395, 1959
- 48) Marciani RD, Giansanti JS, Massaey GB. Reimplantation of freeze-treated and saline-treated mandibular bone. *J Oral Surg* 34: 314-319, 1976
- 49) Böhm P, Stihler J. Intraosseous temperature during autoclaving. *J Bone Joint Surg* 77-B: 649-653, 1995
- 50) 北岡克彦. 冷凍保存同種骨移植における靭帯および靭帯付着部の再生に関する実験的研究. 十全医会誌 103: 96-107, 1994

Evaluation of Reimplantation of Tumor-Bearing Frozen Autografts Treated with Liquid Nitrogen Norio Yamamoto, Department of Orthopaedic surgery, School of medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 109, 193 — 202 (2000)

Key words liquid nitrogen, autograft, malignant bone and soft tissue tumor, reconstruction.

Abstract

Although autoclaved or pasteurized autografts could be used for reconstruction in malignant bone and soft tissue tumors, these methods have many problems. To overcome such problems, we devised a new method for treatment of autografts utilizing the hypothermic effect of liquid nitrogen. The purpose of this study is to evaluate this new processing method and to elucidate the capability for practical use. We measured temperature changes inside the bone incubated under three conditions; in liquid nitrogen at -196 degrees, in the air at a room temperature of 20 degrees, and in physiological saline at 30 degrees. We established a liquid nitrogen for the treatment of bone, in which bone specimen was cooled in liquid nitrogen for 20 min, followed by incubation in room air for 15 min, and then in physiological saline for 15 min. To examine the viability of the tumor cells, treated under the liquid nitrogen method, BrdU immunostaining was carried out. The nuclei were not stained, suggesting either that the tumor cells died out or that cell cycle was blocked after the liquid nitrogen treatment. In vivo tumor proliferation potential was also examined in nude mice. We evaluated tumor volume and histological findings in the control and liquid nitrogen method groups. In the control group, the tumor volume increased over time, and histologically tumor cells permeate spaces between muscle fibers. On the other hand, the volume decreased over time in the liquid nitrogen method group. Histologically fibrous tissue was observed around the transplanted mass, and necrosis and infiltration of inflammatory cells were observed. From these results, we assumed that the tumor cells died out in the liquid nitrogen method. The compression strengths were measured for intact bone, autoclaved bone, and liquid nitrogen treated bone. There was no significant difference in the compression strength between intact bone and liquid nitrogen treated bone. However, the strength of the autoclaved bone was reduced to about two-third of that of the intact bone. We observed the fracture surface of the autoclaved bone and liquid nitrogen treated bone after the compression test with a scanning electron microscope. The fracture surface of the autoclaved bone was irregular and uneven. On the other hand, the fracture surface of the liquid nitrogen treated bone was smooth and fine-grained. This might reflect the difference of compression strength. From these results, we conclude that the liquid nitrogen method could be one of the most effective method for the reconstruction in malignant bone and soft tissue tumors.