

氏名・(本籍) 森本 茂 (滋賀県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 博士(論)第217号
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位授与年月日 平成9年9月26日
 学位論文題目 Kinetic Analysis of Tumor Cells in Bone and Soft Tissue Sarcomas
 (骨軟部肉腫の細胞動態解析)

審査委員 主査 教授 服部 隆 則
 副査 教授 馬場 忠 雄
 副査 教授 福田 眞 輔

論文内容の要旨

【目的】

最近になりBromodeoxyurine (BrdU) を特異的に認識するモノクローナル抗体 (Br-3) と BrdU と Iododeoxyuridine (IUdR) をともに認識するIU-4が開発され、両者を用い二重染色することで簡便に腫瘍のS期時間や理論的な倍加時間を計測できるようになった。

我々は本方法を用いた骨軟部悪性腫瘍の細胞動態解析を行い、臨床面と比較し骨軟部腫瘍の悪性度判定での本方法の有用性を検討した。

【方法】

手術中に採取し、ヌードマウス皮下継代中の骨肉腫3例、悪性線維性組織球腫3例、脂肪肉腫2例、滑膜肉腫、骨原発悪性リンパ腫、悪性神経鞘腫、脱分化型軟骨肉腫それぞれ1例、計12例を対象とした。IUdR及びBrdUを2時間間隔でヌードマウスに投与後、屠殺、腫瘍を摘出しパラフィン包埋切片を作成した。Br-3を用いBrdU標識細胞をABC法にて褐色に発色させた。酢酸処理後IU-4を反応させIUdR標識細胞をAPAAP法にて青色に発色させた。単位時間tあたりにS期を出た細胞の割合dSは青色にのみ染まった細胞を重染色細胞と褐色にのみ染まった細胞との和で割った値となり ($dS = \text{blue} / \text{brown} + \text{double}$)、S期時間 (T_s) はtをdSで割った値となる ($T_s = t / dS$)。腫瘍を構成する細胞が全て置き換わるのに必要な時間Turnover time (T_{over}) T_s をBrdU標識細胞率 (BrdU-LI) で割ることで求められる ($T_{\text{over}} = 100 \times T_s / \text{BrdU-LI}$)。細胞損失がないと仮定した場合の腫瘍の倍加時間Potential doubling time (T_p) は係数kとTurnover timeとの積で計算される ($T_p = k \times T_{\text{over}}, k = 0.7 - 0.8$)。さらに継代中の腫瘍の長径と短径を実測し腫瘍体積を換算、経時的变化を片対数グラフ上に表わしTumor volume doubling time (T_v) を計測した。以上の方法で求めた理論的な増殖能力の指標 (BrdU-LI、 T_p) と、臨床的予後や T_v との関係を統計処理し検定した。

【結果】

BrdU-LIは5~37%、 T_s は13~34時間、 T_p は54~375時間であった。 T_p は死亡した悪性線維性組織球腫と骨肉腫が短く、予後良好であった粘液型脂肪肉腫と悪性神経鞘腫が特に長かった。組織型を考慮せず、生存例6例と死亡例6例でBrdU-LIと T_p を比較してみたところ、BrdU-LIは生存例で6~26% (平均15%)、死亡例で12~37% (平均24%) と死亡例が高い値を示した。 T_p は生存例が69~375 (平均151) 時間で、死亡例が54~92 (平均72) 時間であり、生存例は死亡例より長い傾向にあった。しかしBrdU-LI、 T_p ともに統計上の有意差は認めなかった。 T_v は8~37日であった。悪性線維性組織球腫の2例が短く、脂肪肉腫の1例と悪性神経鞘腫が37日と遅かった。BrdU-LIと T_p 及びBrdU-LIと T_v の関係は負の軽い相関性を示したが、 T_p と T_v の関係は強い正の相関性を示した (Pearson相関係数 $R = 0.925$, $P < 0.0001$; Spearmanランク相関係数 $\rho = 0.751$, $P = 0.0127$)。

【考 察】

IUdR及びBrdU二重染色法は他の解析方法と比べ骨軟部腫瘍の特徴である組織のheterogeneityを考慮でき、また細胞周期の動的な面まで考慮できる利点がある。すでに脳腫瘍や急性白血病、大腸癌や乳癌の癌腫などにおいて人体に直接IUdRとBrdUを投与するin situな方法で計測されたTs、TcまたはTpが報告されている。骨軟部悪性腫瘍における報告は我々が知る限りまだないが、ヌードマウス移植株での研究である我々の数値と他組織の悪性腫瘍のin situな研究の数値と比較するとよく似た値であった。本研究でTpは臨床病理学上悪性度が高く予後が悪いと考えられる腫瘍ほど短い値を示した。また症例数が少なく有意差はでなかったが生存例と死亡例の平均のTpは死亡例が短かった。さらにTpは腫瘍径を実測して得られたTvとも強い相関関係を示した。これらよりTpは骨軟部悪性腫瘍において異なった組織診断においても有用な臨床上の予後因子になりうると考える。またTpを測定するだけで腫瘍が成長するのを待たずにその増殖時間を推測できる。これを従来最も信頼性があるとされながらヌードマウスに移植した腫瘍の体積の変化を指標としていたために、時間がかかりすぎ実用的でなかった抗癌剤感受性テスト (Battelle Columbus法) に応用すれば、Tpを測定することで早期に抗癌剤の効果が判定できる可能性があり、今後臨床応用が期待される。

【結 論】

IUdR及びBrdU二重染色法により計測されたPotential doubling timeは骨軟部悪性腫瘍において有用な予後因子となりうる。また抗癌剤感受性テストなど今後の臨床応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、骨と軟部組織の悪性腫瘍の特性を、細胞動態の観点から解析したものである。著者は、切除された骨肉腫 (3例)、悪性線維性組織球腫 (MFH) (3例)、脂肪肉腫 (2例)、滑膜肉腫 (1例)、骨原発悪性リンパ腫 (1例)、悪性神経鞘腫 (1例) と脱分化型軟骨肉腫 (1例) をヌードマウスに移植し、腫瘍の成長速度と細胞増殖動態について調べている。細胞動態は、bromodeoxyuridine (BrdU) とiododeoxyuridine (IUdR) で二重標識し、標識率、DNA合成時間 (Ts) と世代時間 (理論的体積倍加時間 (Tp)) を算定し、実測体積倍加時間 (Tv) と比較することで、各骨軟部腫瘍の特徴を調べている。

その結果、悪性骨軟部腫瘍では、BrdU標識率は5~37%、Tsは13~34時間、Tpは54~375時間であった。Tpについては、症例数の関係から腫瘍間に有意差は認めなかったが、死亡例で生存例よりも短い傾向が見られた。また、Tpは病理組織学的に悪性度が高いMFHや骨肉腫が、比較的悪性度の低い粘液型脂肪肉腫や悪性神経鞘腫より短い値を示した。TpはTvと正の相関を示し、Tpが予後因子となりうる可能性が示唆された。

本研究は、今まで報告のなかった骨軟部肉腫の増殖動態を初めて明らかにし、ヌードマウス移植系を用いた研究が抗癌剤感受性テストなどの応用に道を拓くもので、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認められる。