

氏名・(本籍) 江川 雅章(岡山県)  
 学位の種類 博士(医学)  
 学位記番号 博士(論)第262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12年3月27日  
 学位論文題目 Kinetic analysis of malignant fibrous histiocytoma cells treated with anticancer agents in vivo  
 (悪性線維性組織球腫の抗癌剤投与下における in vivo での細胞動態の分析)

審査委員 主査 教授 山路 昭  
 副査 教授 岡部 英俊  
 副査 教授 福田 眞輔

## 論文内容の要旨

### 【目的】

臨床的に軟部肉腫に対する化学療法剤の投与については議論のあるところで、その感受性についても、腫瘍と薬剤の種類により様々である。ヌードマウス可移植ヒト軟部悪性線維性組織球腫(以下MFH)1株につき、各種化学療法剤投与後の腫瘍細胞増殖動態を免疫組織化学的手法により分析するとともに、増殖と対比してアポトーシスについても検討する。さらに、これらの結果が実用的な化学療法剤感受性テストとして有用であるかどうかについても考察する。

### 【方法】

滋賀医大整形外科教室にてヌードマウス皮下継代中の軟部MFHを対象をした。120腫瘍をヌードマウス皮下移植後、約2週目、腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>になった時点で、薬剤の初回投与を行った。以後4日ごとに計3回、総投与量LD50を腹腔内投与した。用いた薬剤はCisplatin(CDDP)、Adriamycin(ADM)、Vincristine(VCR)の3種類である。コントロールには同容量の生理食塩水を投与した。初回投与後、1、5、9、17、33日に各薬剤投与群6腫瘍となるようにIUdR、BrdUを2時間間隔で腹腔内投与し、1時間後ヌードマウスを屠殺し腫瘍を摘出した。70%エタノール固定、パラフィン包埋、薄切の後、免疫組織化学的二重染色を施行し、これによりBrdU陽性細胞、IUdR陽性細胞、両陽性細胞について標識細胞数を求めこれによりS期所要時間(Ts)を求めた。さらに、LI(BrdU labeling index)、PCNA labeling index、Tsよりcell cycle所要時間(Tc)を求めた。アポトーシスについてはTUNEL法にて染色し、その陽性細胞の割合を算出した。

さらに、実際の腫瘍体積変化を知るため1週間に2回ヌードマウス皮下継代中の腫瘍の長径と短径を計測し、腫瘍体積=1/2×長径×(短径)<sup>2</sup>の計算式により換算した。腫瘍体積の経時的変化を片対数グラフにプロットし、腫瘍体積倍化時間(Tv)を計測した。より効果のある化学療法剤は、この逆数(1/Tv)が小さくなることが知られており、これと免疫組織化学的手法により得られたパラメーターとを対比、解析した。

### 【結果】

TvはVCR群が-5.8日で、ADM群が12.7日、CDDP群が9.1日、コントロール群が5.2日でVCR群が最も抗腫瘍効果を示した。

LIと1/TVとの関係では、5、9日に各群間で有意差があり、KLI(Ki-67 labeling index)では、9、17日目で有意差があり、PCNA-LIでは、5、9、17日目に有意差があったが、どのパラメーターも1日目では有意差がなかった。Tsは、VCR群の1日目でとくに延長されており、その他の薬剤群でも1日目で延長されていた。1/TVとTsは1、33日目に相関関係があった。

Tcは、VCR群の1日目でとくに延長されており、その他の薬剤群でも1日目で延長されていた。さらに各群間においてTcは実験期間中、すべての期間で有意差が認められた。また、1/TVと1

日目の Tc との間に強い相関関係が認められた。

$Tc = 73.956 - 221.884 / Tv$ ;  $R^2 = 0.713$ ,  $p < 0.0001$  (Pearson's analysis)

アポトーシスは、各薬剤群で誘導されることが判明した。しかしコントロール群ではわずかに認められたのみであった。また  $1/Tv$  との相関関係は早期には認められなかった。

#### 【考 察】

我々は既に同様の実験系にて得られた potential doubling time が組織型によらず、定量的に悪性度を反映している可能性を報告した。軟部肉腫における化学療法の効果の有無については、議論のあるところであり、従来 *in vivo* の効果判定に最も信頼がおけた Battle Columbus Lab. の方法も、その判定に時間を要するため実用性が低かった。当研究により、VCR が本研究に使用した MFH の株において最も抗腫瘍効果があり、さらに Tc を最も延長させることが判明した。つまり、一般的により効果的な薬剤ほど早期より Tc を延長させることが推測された。このことより、化学療法の効果は殺細胞効果とともに、生細胞であっても細胞動態上 cell cycle が延長化することにより得られることが判明した。さらに 1 日目の Tc を算出することにより早期に化学療法剤の効果判定ができると考えられた。

*in vivo* の研究においても、化学療法剤によりアポトーシスが誘導された。

#### 【結 論】

軟部肉腫に対する化学療法剤の効果は、薬剤の殺細胞効果とともに cell cycle の延長、アポトーシスの誘導により得られることが判明した。また、本方法は実用的な化学療法剤感受性テストとなり得ることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヌードマウスに移植したヒト軟部悪性線維性組織球腫 1 株をもちい、各種化学療法剤投与後の腫瘍細胞増殖動態を免疫組織化学的手法により分析するとともに、増殖と対比してアポトーシスについても検討したものである。

その結果、効果的な薬剤ほど早期より cell cycle 所要時間を延長させた。*in vivo* の研究において、化学療法剤によりアポトーシスが誘導された。

本研究により軟部肉腫に対する化学療法剤の効果は、薬剤の殺細胞効果とともに cell cycle 所要時間の延長、アポトーシスの誘導により得られることを明らかにした。また、本方法は実用的な化学療法剤感受性テストとなり得ることが示唆され、今後臨床応用が期待される。よって博士 (医学) の学位に値するものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年2月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。