

氏名・(本籍)	中島正之(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第235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10年6月30日
学位論文題目	Estimation of volume doubling time and cell loss in an experimental rat glioma model <i>in vivo</i> (実験ラット神経膠腫モデルにおける腫瘍倍加時間とcell lossに関する検討)
審査委員	主査 教授 服部隆則 副査 教授 森田陸司 副査 教授 犬伏俊郎

論文内容の要旨

【目的】

神経膠腫の発生、増殖進展機構には、なお不明の点が多い。近年腫瘍の増大に関連して、腫瘍細胞自身が有するprogramed cell death (apoptosis) の機構が注目されている。腫瘍が増大過程において単に増殖するだけでなく、細胞喪失もおこしていることは知られていたが、その多くがapoptosisであることや、化学療法、放射線治療で腫瘍細胞がapoptosisを引き起こすことも明らかになってきた。

しかし、無治療の状態でapoptosisが腫瘍の増殖機構とどのような関連をもつのか、また、どのような機序でおこるのかは未だ十分解明されていまい。そこで、実験脳腫瘍モデルを用いて経時的に腫瘍の増大を画像で捉え腫瘍の増殖能および腫瘍倍加時間とapoptosisとの関係、cell loss factor (CLF) におけるapoptosisの関わりを検討した。

【方法】

妊娠17日目のウイスターラットに80mg/kgのethylnitrosourea (ENU) を投与し、得られた仔ラットを用いた。生後24週目から経時的にMRIを撮影し、腫瘍の増大速度から腫瘍倍加時間を近似的に求めた。15匹のラットでは、bromodeoxyuridine (BrdU)、iododeoxyuridine (IodU) を3時間間隔で投与後、脳を取り出しアルコール固定、BrdU-labeling index (LI)、IodU-LI、BrdU-LI & IodU-LIを求め、理論的腫瘍倍加時間 (Tp) を計算し、腫瘍体積倍加時間 (Vd) と比較しCLFを算出した。

他の8個の腫瘍ではBrdUのみを副腔内投与し、1時間後に10%ホルマリンで灌流固定、後固定を行った。パラフィン連続切片でBrdU-LI、apoptosis index (AI)、mitosis index (MI) を求めた。apoptosisの同定にはApop Tag kit (Oncor) を用いた。

【結果】

1. Vd, Tp, CLF

BrdU-LI は0.72~8.08% (3.48 ± 2.11)、Vdは3.3~29.2日 (11.03 ± 7.74)、Tpは2.3~13.3日 (6.81 ± 3.33) であった。BrdU-LI、Vd、Tpは個々の腫瘍で広くばらつきが認められたが、S期時間はほぼ一定で約7時間であった。BrdU-LIとVd、BrdU-LIとTpは有意な相関関係が見られ、 $Vd = 17.6 \times (\text{BrdU-LI})^{-0.63}$ ($R=0.76$, $P<0.001$, $n=13$)、 $Tp = 22.6 \times (\text{BrdU-LI})^{-1.02}$ ($R=0.92$, $P<0.0001$, $n=12$) であった。またTpおよびVdから推測されるCLFは $CLF = 1 - 1.28 \times (\text{BrdU-LI})^{-0.39}$ であった。今回のモデルにおけるCLFは従来*in vitro*で推測されていたCLFに比較して低い値であった。

2. apoptosis

すべての腫瘍でapoptosisが同定できた。AIは0.04~0.78%とばらつきがみられたが、BrdU-LI、MIと有意な相関関係がみられ、 $AI = 0.229 + 0.253 \text{Ln}(\text{BrdU-LI})$ ($n=8$, $R=0.971$, $P<0.0001$)、 $AI = 1.051 + 0.285 \text{Ln}MI$ ($n=8$, $R=0.937$, $P<0.001$) であった。

【考 察】

腫瘍の成長解析は形態的な病理組織所見のみからは判断が困難な臨床経過の予測、治療の指針に重要な役割を果たす。腫瘍の増大にはその増殖能のみでなくapoptosisの関与が指摘されてきた。

近年、deoxynucleotidyltransferase(Tdt)-mediated biotinylated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL)法を用いることにより、比較的簡便にapoptosisにおちいった細胞の評価が可能となった。増殖能とapoptosisとの関係については議論がまだまだ多く、まだin vivoでの検討はなされていなかった。今回の研究によりラット神経膠腫モデルにおいてapoptosisは増殖能が高い腫瘍ほど多くみられることが示され、増殖能との密接な関係が示唆された。

【まとめ】

in vivoモデルで神経膠腫の増殖能とapoptosisとの関係について検討した。apoptosisはすべての腫瘍で認められ、腫瘍の増殖能との密接な関係が示唆された。この結果は脳腫瘍の治療によってどのように増殖能、apoptosisが影響を受けるかを検討する上で重要なデータと考える。

論文審査の結果の要旨

脳腫瘍の治療効果判定、予後の推測を行う際、腫瘍の生物学的特性を知ることは極めて重要である。本研究はラット実験モデルを用いて、神経膠腫の特性と細胞動態を解析したものである。

胎生期にethylnitrosoureaを投与することにより誘発される神経膠腫は、生後24週頃より観察され、その成長過程で、腫瘍倍加時間 (Vd) をMRIで、理論的倍加時間 (Tp) をbromodeoxyuridine (BrdU) とiododeoxyuridine (IodU) の時間差二重標識により算定した、その結果、Vdは3.3~29.2日、Tpは2.3~13.3日であり、共にBrdU標識率の高低と相関を示した。一方、VdとTpから算定されるcell loss factor (CLF) は0.3から0.7までのものが多かった。TUNEL法でapoptosisを同定すると、apoptosis index (AI) は0.04~0.78%で、腫瘍によりばらつきがみられたが、CLFやAIもBrdU標識率と相関していた。この結果は神経膠腫のような悪性腫瘍においてもapoptosis機構が保持されていることを示し、特筆できる所見であった。

本研究は、神経膠腫の成長と細胞動態を明らかにしたもので、臨床研究に有益な情報を与えるもので、博士(医学)の学位論文に値すると認められる。