

氏名 (本籍)	安田 聡 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1267 号
学位授与日付	平成 13 年 1 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	家兎VX2舌癌に対するレンチナンと各種抗癌剤併用の抗腫瘍効果について 1) シスプラチンとの併用, TUNEL法による抗腫瘍効果の検討 2) ネダプラチンとの併用, TUNEL法による抗腫瘍効果の検討
審査委員	(主査) 教授 立松 憲 親 (副査) 教授 出口 隆 教授 片桐 義博

論文内容の要旨

VX2癌はKiddとRousにより発見された可移植腫瘍で、口腔癌で最も頻度の高い扁平上皮癌に組織型が類似している。また移植が容易で移植率がきわめて高いという利点がある。これまで家兎VX2舌癌モデルを用いて、BRM (biological response modifier) 製剤や各種抗癌剤の投与及び併用投与を行い、形態学的、組織学的腫瘍壊死率、各種免疫染色などによって効果判定を行い、その抗腫瘍効果の増強について報告してきた。その概要としては各種抗癌剤の投与において、さらに併用投与により腫瘍のネクロシスが増強されるというものであったが、アポトーシスに対する検討はなされていない。今回、BRM製剤や各種抗癌剤のアポトーシス誘導能を検討する目的で、BRM製剤としてレンチナン (以下LNTと略す)、抗癌剤としてシスプラチン (以下CDDPと略す) およびネダプラチン (以下CDGPと略す) を使用し、その効果判定方法としてTUNEL法を用いて検討を行った。

研究方法

実験動物は2.0kgの雄の白色家兎を1群5羽、計40羽使用し、BRM製剤としてLNT、抗癌剤としてはCDDP、CDGPを使用した。外山の方法に準じてVX2癌細胞浮遊液 (体積比50%) を作製した。ペントバルビタールナトリウム麻酔下に、家兎の左舌縁表面から約5mmの深さに0.1ml (12×10⁶個/ml) 無菌的に移植した。移植後14日目に以下の8群に分けて処置を行った。抗癌剤の投与経路としては、LNTは静脈内投与 (以下i.v.と略す)、CDDPは腫瘍内投与 (以下i.t.と略す)、CDGPに関しては、i.v.およびi.t.とした。なお生食水1ml (i.v.) 投与群をControl群とした。

実験群: (各群5羽) a. Control群 b. LNT2mg (i.v.) 投与群 c. CDDP0.02mg (i.t.) 投与群
d. CDDP0.02mg (i.t.) +LNT2mg (i.v.) 投与群 e. CDGP0.02mg (i.t.) 投与群
f. CDGP0.02mg (i.v.) 投与群 g. CDGP0.02mg (i.t.) +LNT2mg (i.v.) 投与群
h. CDGP0.02mg (i.v.) +LNT2mg (i.v.) 投与群

併用投与群は当教室の大久保らのデータに基づき、CDGP投与後、24時間おいてLNTを投与した。移植後28日目に屠殺し、通法により4μmの連続切片とした。TUNEL法はTACS™ 2TdT-Blue Label In Situ Apoptosis Detection Kitを用い染色した。得られた標本は光学顕微鏡にて観察、200倍の一視野におけるTUNEL陽性細胞数と陰性細胞数を計測し、その比を検討した。有意差検定にはStudent's *t*-testを用い、危険率 (p<0.05) にて有意差ありと判定した。

研究結果

TUNEL陽性細胞の核はTACS™ Blue Labelにより青緑色に染色された。腫瘍の中央部ではネクロシスによる組織の欠損が観察され、TUNEL陽性細胞は腫瘍の辺縁部に認められた。これは腫瘍の増殖により、中心部で

は栄養血管の閉塞がみられるためではないかと考えられる。a. Control群においては一視野中に観察されるTUNEL陽性細胞の数は数個であった。それに対してb. LNT群ではTUNEL陽性細胞は著明に多く認められた($p < 0.05$)。それはc. CDDP0.02mg (i.t.) 投与群, e. CDGP (i.t.) 投与群, f. CDGP (i.v.) 投与群においてもほぼ同等に観察されたが、これらの各群の間には有意差は認められなかった。またd. CDDP0.02mg (i.t.) + LNT2mg (i.v.) 投与群, g. CDGP (i.t.) + LNT投与群およびh. CDGP (i.v.) + LNT投与群においてはさらにその傾向が強く認められた ($p < 0.05 - 0.005$)。

CDGPとCDDPの間には有意差が認められなかった。両者は脱離基の異なる抗腫瘍性白金錯体であるが、作用機序はDNAのヌクレオシドと反応しDNAの複製を阻害する点ではほぼ同様である。投与経路による差についてはCDGP単独投与群, CDGP+LNT併用投与群共に, i.t.投与群が若干i.v.投与群よりもアポトーシス誘導が多い傾向がみられたが、両者の間に有意差は認められなかった。その原因としてはi.t.投与群の方がi.v.投与群よりも腫瘍内におけるCDGPが高濃度になるためと思われるが、有意差が認められなかったのは、必ずしもCDGPの濃度依存性にアポトーシスの誘導が増強されるわけではなく、誘導には各種の要素が関わっており、直接CDGPが接触した部位はネクローシスが惹起されたことが示唆された。

結 論

家兎VX2舌癌に対しLNT, CDDP, CDGPを投与し, TUNEL法にて染色を行い, 以下の結果を得た。

1. LNT投与群, CDDP投与群, CDGP投与群共にアポトーシス誘導がControl群に対して有意に増強した。
2. 併用投与群ではさらにアポトーシスの誘導が促進された。
3. CDGPの腫瘍内投与群および静脈内投与群では, 投与経路によるアポトーシス誘導には有意差はみられなかった。
4. CDGPとCDDPの間にはアポトーシス誘導に有意差が認められなかった。
5. アポトーシス抑制因子の解明が必要で, それが固形癌への化学療法の奏効性を高める要素となることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 安田 聡は, VX2舌癌をモデルとして, LNT, CDDP, CDGPのアポトーシス誘導能をTUNEL法にて検討した。その結果, これらの抗癌剤が同等のアポトーシス誘導能を持ち, さらに併用投与によりアポトーシスの誘導を促進することを明らかにした。本研究の成果は, 癌患者の化学療法ならびに口腔外科学の発展に, 少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

家兎VX2舌癌に対するレンチナンと各種抗癌剤併用の抗腫瘍効果について

- 1) シスプラチンとの併用, TUNEL法による抗腫瘍効果の検討
1999年 岐阜大医紀 47: 209~214
- 2) ネグプラチンとの併用, TUNEL法による抗腫瘍効果の検討
2000年 岐阜大医紀 48: 255~260