

氏名 (本籍)	松 尾 篤 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博 士 (医学)
学位授与番号	乙第 1 2 8 6 号
学位授与日付	平成 13 年 10 月 16 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	A simple method for classification of cell death by use of thin layer collagen gel for the detection of apoptosis and/or necrosis after cancer chemotherapy
審 査 委 員	(主査) 教授 佐 治 重 豊 (副査) 教授 高 橋 優 三 教授 藤 原 久 義

論 文 内 容 の 要 旨

癌薬物療法における細胞死はnecrosisで代表されるが、近年apoptosisの概念が分子生物学的に解明され、p53, TNF family, Fas, Fas ligand, caspace familyへの経路がほぼ判明し、DNAの断片化現象とマクロファージによる断片化DNAの貪食処理が確認・報告されている。しかし、apoptosisの定義に関してはDNAの断片化にあるのか、caspaseの発現によるのかは議論のあるところであるが、前者に対してはhematoxylineosin (HE) 染色による核の形態学的変化、TUNELやHoechstを用いた免疫組織染色、電子顕微鏡(電顕)による形態学的判定、等が用いられている。この中で、電顕による判定が最も信頼性が高いが、その手技の煩雑さ、迅速性、経済面で問題も多く、apoptosisをより簡便で適格に判定できる方法の開発が望まれている。今回、申請者らはchamber slide上にコラーゲンゲルを用いて癌細胞を1,2層になるように薄く散布後、5-FUとCDDPを添加接触培養し、経時的にサンプルを採取後、同一標本でHoechst 33258染色(Ho)、HE染色及び電顕像を作成し、比較検討できる技術を確認した。そして、電顕像を細胞死の優位判定基準とした場合のHoとHE染色所見を同一細胞で比較検討し、HoとHE染色による免疫組織染色での形態学的細胞死分類を試み、電顕法と遜色のない判定が可能であることを確認した。

研究対象と研究方法

胃癌細胞株MKN45(wild type p53)をRPMI-1640で 1×10^6 個/mlに調整後、新田ゼラチン社製のPrimasterで作製したコラーゲンゲルに封入した。次いで、その $1 \mu\text{l}$ を用いMKN45細胞が1,2層になるようにchamber slide上に薄く塗り、10% FCS添加RPMI-1640培地を接触させ24時間培養し細胞分裂期を調整した。その後、5-FU ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)とCDDP ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$)を添加した培養液で3,6,12,24,48時間接触させapoptosisを誘導後PBSで洗浄し、2.5%グルタルアルデヒドで固定後PBS洗浄し、以下の検討を行った。①Ho染色後、360nm波長で蛍光観察し写真撮影した。②Ho染色後同一標本を用いてヘマトキシリン・エオジンで後染色し写真撮影した。③HE標本をPBS洗浄後、オスミウム固定、アルコール、プロピレンオキシド脱水、エポン包埋し60度恒温槽で3日間重合した。得られた標本から80-100nm切片を作製し酢酸ウラニール染色後、透過型電子顕微鏡にて観察し写真撮影した。判定は電顕写真上の細胞をHo、HE染色写真から同定し、細胞死の程度により形態学的分類を試みた。

研究結果

1. 生細胞：電顕にて判定された生細胞はHoで青く、HEでも核はbasophilicに、細胞質はeosinophilicに染色され、正常形態を示した。
2. apoptosis細胞：① early stage apoptosisは電顕にて細胞全体が萎縮し、核の形態は歪で核膜周囲にクロマチンが凝集、細胞質は全体的に暗いがミトコンドリア等の細胞内小器官は正常形態を呈していた。Hoでは核は全体的に薄く淡く染まり全体像が不明瞭なのに対し、HEでは電顕像で核周辺のクロマチン濃染像に相関してヘマトキシリンによる濃染像がみられたが、細胞質はエオジンで淡く染まるのみであった。

- ② late stage apoptosisは電顕にて円形のクロマチン凝集を伴うアポトーシス小体を認め、Hoでは電顕像のクロマチン凝集に一致して強い青色を、HEでは強いヘマトキシリンによる染色像を示した。
- ③ early stage necrosisは電顕にて核は生細胞と遜色ないが、細胞質は細胞膜が維持されているものの腫脹したミトコンドリアと多数の空胞で占められ、Hoでは染色されず、HEでは生細胞の形態を呈していた。
- ④ late stage necrosisは電顕にて細胞膜と核膜は破壊され、クロマチン、細胞内小器官はそれぞれ流出し、Hoにては染色されず、HEにても核は染色されず細胞質がエオジンで淡く染まるのみであった。
- ⑤ apo-necrosisは電顕にてapoptosisの特徴である円形のクロマチン凝集像を認める一方、細胞質はnecrosisの特徴であるミトコンドリアの腫脹と小器官の流出が見られ、apoptosisとnecrosis両方の特徴を併せ持つ形態であった。この細胞はHoでは淡く染まり、HEでは電顕像のクロマチン凝集に一致してヘマトキシリンによる濃染像がみられたが細胞質はエオジンで淡く染まるのみであった。
- ⑥ 分類不能型は電顕にて細胞質は巨大な空胞で占められ、細胞内小器官は核膜の周囲へ圧排されており分類不能であった。この細胞はHoでは染色されず、HEでは核はbasophilicであるが、細胞質は電顕像の巨大空胞に一致してエオジンで染色されなかった。

考察と結語

細胞死の判定は癌薬物療法において重要で、特に癌細胞のnecrosisは炎症反応を誘起し悪液質を誘導するが、apoptosisの場合はマクロファージに貪食処理されるため生体反応が少なく、かつ樹状細胞の抗原認識と成熟に関与する可能性が高く、免疫療法の面からも注目されている。従来、apoptosisはTUNEL染色などで検索され、apoptotic indexとして評価されてきたが、その判定には若干の曖昧さが存在した。今回の検討結果、Ho単独でも生細胞あるいはクロマチンが凝集したapoptosisのlate stageの判定が可能であったが、HE染色との併用で電顕と遜色のない細胞死分類、即ち生細胞、apoptosisのearly stageとlate stage、necrosisのearly stageとlate stage、apo-necrosis及び分類不能の7段階に判定可能であった。申請者らが開発した方法は簡便で、操作中に遠心、拡散などの物理的負荷を受けないため結果が正確で、同一標本での併用染色が可能で、コラーゲンゲルで細胞が覆われているためin vivoの環境に近い、等の多くの利点を含んでいる。今後抗癌療法の効果判定法として、細胞死の形態学的判定が可能となり、この分野に大きく貢献できると期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者 松尾 篤は、wild type p53発現胃癌細胞株MKN-45を用い、CDDP・5-FU添加によるapoptosisを誘導後、電子顕微鏡検査、Hochest33258染色及びHE染色を同一標本で検索できるコラーゲンゲル法を開発した。その結果、電顕操作を省略しても生細胞、apoptosisのearly stageとlate stage、necrosisのearly stageとlate stage、apo-necrosis及び分類不能の7段階に判定可能であることを明らかにした。これらの研究結果は抗癌療法における新しい治療戦略の評価法として、その応用範囲は極めて広く、癌治療の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

A simple method for classification of cell death by use of thin layer collagen gel for the detection of apoptosis and/or necrosis after cancer chemotherapy

Jpn J Cancer Research 2001 ; 92 : 813-819

図は同 cover figure に採用された