

学 位 論 文 題 名

メチルセルロース法による in vitro 神経芽種コロニーの形成

学位論文内容の要旨

I 研 究 目 的

神経芽腫の治療成績は改善してはいるが歩みは遅く、進行例に関してはマスキングにより頻度は減少しつつあるが、その治療には難渋しているのが現状である。その理由として骨髄への転移が多く、その診断も腫瘍細胞が少ないうちは困難なことがあげられる。そこで著者はメチルセルロース法による in vitro コロニー法で神経芽腫の骨髄転移の有無、早期診断への可能性、コロニー形成と臨床経過との相関等につき検討した。

II 研 究 方 法

1. 対象：進行性神経芽腫患児10例（Ⅲ期4名，Ⅳ期6名）で、計28回採取された骨髄液を用いた。また対照として鑑別診断等のため採取をされたが、血液学的に異常を認めなかった8例の骨髄液を用いた。

2. メチルセルロース液の作製：メチルセルロース粉末 9.6 g を滅菌し、加温蒸留水 195.2 ml に溶かし冷却後、Iscove modified Dulbecco medium (IMDM) を 195.2 ml 加え攪拌し、2.4 %メチルセルロース液とした。

3. conditioned medium (PHA添加ヒト末梢血培養上清 (PHA-LCM)) の作成: ヒトリンパ球を、20% FCS と 1% PHA を含む IMDM 細胞浮遊液を作成し、炭酸ガス培養器にて 5 日間培養後濾過液を PHA-LCM とした。

4. メチルセルロース法による細胞培養: 単核球を IMDM に浮遊させ、FCS 20%、2-メルカプトエタノール 5×10^{-5} M、PHA-LCM 20% およびメチルセルロース濃度 0.96% とし、 $0.5 \sim 5 \times 10^5$ 個ずつペトリ皿に分注した。倒立顕微鏡にて single cell であることを確認後、炭酸ガス濃度 5%、37°C、湿度 100% の条件下で培養を開始した。

5. コロニーの観察および同定: 倒立顕微鏡にて観察し、14日目には 50 個以上の細胞集団をコロニーとして算定した。コロニーを吸引塗抹し、May-Grünwalds-Giemsa 法 (MG 染色) 等にて細胞形態を観察、同定した。

Ⅱ 結 果

1. 正常ヒト骨髓におけるコロニー形成

4～5 日目頃より好中球、マクロファージ、好中球とマクロファージの混在したものおよび好酸球の 4 型のコロニーが認められた。これらは倒立顕微鏡で同定可能で、その総和を CFU-C として算定した。

2. 神経芽腫患児骨髓におけるコロニー形成

神経芽腫患者よりは神経芽腫コロニーが形成された。3～4 日目に出現し、12～16 日目に最大となり 30～40 日目頃には退縮した。小型で淡褐色の細胞密度に富む円形の均一な細胞より構造され時に神経突起を有し、前述の各血液幹細胞コロニーと鑑別し得た。このコロニーの細胞の MG 染色所見はもとの細胞と同様であった。また播種細胞数と得られたコロニー数の間には直線関係が得られた。組織学的陰性例では神経芽腫コロニーは培養されず CFU-C が正常対照と同様に見られたのに対し、陽性例では 1×10^5 個あたり神経芽腫コロニーが 0.6～816 個、CFU-C が 0～116 個それぞれ混在して見られた。

3. CFU-C および神経芽腫コロニーの経時的動態パターン

本法は造血幹細胞と神経芽腫コロニーの混在することが特徴であり、これらの経時的観察と臨床経過との相関にて 3 群に分けた。1) 第 1 群: Ⅲ期神経芽腫で治癒した症例 (3 症例)。当初より骨髓の CFU-C は正常で神経芽腫コロニーも見られず、治療により CFU-C は増加し神経芽

腫コロニーは全く見られない。2) 第2群: IV期神経芽腫で治癒した症例(2症例)。当初は骨髄のCFU-Cは正常～やや低下、神経芽腫コロニーも見られる。治療により速やかにCFU-Cは正常化し、神経芽腫コロニーは見られなくなる。なお1症例では本法により神経芽腫の早期診断と骨髄転移の確定診断をし得た。3) 第3群: III, IV期神経芽腫で死亡した症例(5症例)。当初より骨髄のCFU-Cは低下し、IV期の場合は神経芽腫コロニーも見られる。治療を開始してもCFU-Cは回復せず、骨髄浸潤の状況により神経芽腫コロニーが出現あるいは増加する。1例は生存中であるがこの群に帰属すると考えられる。本例でも神経芽腫コロニーの形成で骨髄転移が確認された。

IV 考 按

神経芽腫コロニーは、①コロニーを吸引後塗抹し染色すると培養前の細胞と同様の形態を呈した、②播種細胞数とコロニー数の間の直線的関係よりコロニーは単一の神経芽腫起源であることが推定された、③他の細胞では見られない特徴的な神経突起を有する、の3点より神経芽腫由来と考えられた。組織学的所見との相関は極めて良好であり、感度において優れていると考えられた。また骨髄転移の診断は腫瘍細胞が少ないうちは困難であるが、培養早期に典型的な神経芽腫コロニーが出現することにより鑑別診断に有用である。著者はメチルセルロース法を用いて神経芽腫コロニー形成に初めて成功した。メチルセルロースは寒天に比べ取扱いが容易であり、細胞を取り出せるという大きな利点を有するため、細胞の同定等の応用が可能である。

著者の培養系の最大の特徴は colony-stimulator である PHA-LCM を使用しているため腫瘍性幹細胞と造血幹細胞との同時定量が可能な点である。従来系で stimulator を塗加した培養系の報告はなく、この種の培養系を用いたのは著者らが最初である。この系で CFU-C と神経芽腫コロニーの経時的動態パターンを3群に分類して臨床経過との相関性を検討した。経過中全くコロニーの形成を見ない例、あるいは治療後速やかに神経芽腫コロニーが消失し代りに CFU-C が見られてくるものは予後が期待し得るが、神経芽腫コロニーが増加傾向の見られ CFU-C が減少する例は予後が悪いと考えられる。以上よりこの in vitro 神経芽腫コロニー法が将来的に神経芽腫の骨髄転移の有無、早期診断、さらに予後の推定などに臨床応用できる可能性がある。

V 結 語

(1) 小児の骨髓を用いPHA-LCMを添加したメチルセルロース法によるin vitroコロニー形成能を検討した。(2) 正常骨髓では正常造血幹細胞コロニー(CFU-C)が得られた。(3) 神経芽腫例ではCFU-Cに混じて神経芽腫コロニーが見られ容易に鑑別し得た。(4) 神経芽腫コロニーの形成は骨髓転移の有無と良く相関し、従来の組織学的検索法より感度および特異性の面で優れていると考えられた。(5) CFU-Cと神経芽腫細胞のコロニーの割合の変化は患児の予後との相関が見られ、治療開始後神経芽腫コロニーの減少とCFU-Cの増加を見る例は予後良好であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 宮 崎 保

神経芽腫は現在、マスキリングにより進行例の頻度は減少しつつあり、且つ又その治療成績も年毎に徐々に改善しつつあるが、進行例の治療にはいまま難渋しているのが実状である。その理由として骨髄への転移が多く、その診断も腫瘍細胞が少ないうちは困難なことがあげられる。筆者は今回メチルセルロース法による *in vitro* コロニー法で神経芽腫の骨髄転移の有無、早期診断への可能性、コロニー形成と臨床経過との相関性等を明らかにする目的で本研究を行った。方法としては単核球を IMDM メジウムに浮遊させ、FCS 20%、2-メルカプトエタノール 5×10^{-5} M、PHA-LCM 20% およびメチルセルロース濃度 0.96% とし、 $0.5 \sim 5 \times 10^{-5}$ 個ずつペトリ皿に分注し、倒立顕微鏡にて single cell であることを確認後、炭酸ガス濃度 5%、37℃、湿度 100% の条件下で培養を行った。コロニーは倒立顕微鏡で観察し、14 日目に 50 個以上の細胞集団をコロニーとして算定した。コロニーを吸引塗抹し、May-Grunwalds-Giemsa 法 (MG 染色) 等にて細胞形態を観察、同定している。

神経芽腫コロニーは、組織学的所見との相関は極めて良好であり、感度においても優れていた。この方法を用いて筆者は (1) 正常骨髄では正常造血幹細胞コロニー (CFU-C) が見られること、(2) 神経芽腫例では CFU-C に混じて神経芽腫コロニーが見られ容易に鑑別し得ること、(3) 神経芽腫コロニーの形成は骨髄転移の有無と良く相関し、従来の組織学的検索法より感度および特異性の面で優れていること、(4) GFU-C と神経芽腫細胞のコロニーの割合の変化は患児の予後とよく相関し、治療開始後神経芽腫コロニーの減少と CFU-C の増加を見る例は治療の予後が良好であることなどの結果を得た。以上の研究に使用された筆者の培養系の特徴はメチルセルロースを用いて神経芽腫コロニー形成に成功している点と colony-stimulator である PHA-LCM を使用することにより腫瘍細胞と造血幹細胞との同時定量が可能であった点である。従来の系で stimulator を添加した培養系の報告はなく、筆者はこの培養系を用いることにより初めて CFU-C と神経芽腫コロニー経時的動態パターンをいくつかの群に分類して臨床経過との相関性を検討することが出来たと考えることが出来る。経過中全く神経芽腫コロニーの形成を見ない例、あるいは治療後速やかに神経芽腫コロニーが消失し代わりに CFU-C

が見られてくるものは予後が期待し得るが、神経芽腫コロニーが増加傾向の見られ CFU-C が減少する例は予後が悪いと考えられる結果であった。以上よりこの in vitro 神経芽腫コロニー法を他の種の転移診断法と組み合わせて検討することにより神経芽腫の骨髄転移の有無転移の有無及び早期診断の精度を上げ得るものと考えられ、学位論文として評価に足るものと判断した。

なお、副査の葛巻、宮崎両教授から神経芽細胞種コロニーの判定基準、PHA-LCM 以外の stimulator との比較、骨髄の転移部を効率的にキャッチするための工夫、細胞培養にメチルセルロースを用いた理由などにつき専門の立場から質問があり、さらに、古舘、西両教授からも骨髄への転移を早期にキャッチする上での有力な示唆を頂戴し、それらを交えて討議が行なわれたが、大部分の質問に対し概ね妥当と考えられる答えがなされたものと判断した。