

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
市岡 従道	主査 教授 黒 岩 敏 彦 副査 教授 檜 林 勇 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 森 浩 志
主論文題名 Enhanced detection of malignant glioma xenograft by fluorescein-human serum albumin conjugate (悪性神経膠腫移植モデルでのフルオレセイン・アルブミン結合物による腫瘍蛍光標識の検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>悪性神経膠腫は浸潤性腫瘍であるため、手術に際して、肉眼的所見で浸潤域を的確に判断することは困難である。我々は、術中に蛍光色素 fluorescein- sodium (FLS-Na) を経静脈投与して神経膠腫を蛍光標識する方法を用い、一定の成果を得てきた。しかし、FLS-Na は腫瘍部の破綻した血液脳関門を介して腫瘍組織内に拡散することにより腫瘍の蛍光を得るため、腫瘍周囲に存在する脳浮腫が淡い蛍光を示すことも度々経験され、より腫瘍特異的な蛍光標識法が望まれる。</p> <p>一方、腫瘍は宿主より栄養され、特に窒素化合物は腫瘍内へ高率に取り込まれることが知られている。Albumin に蛍光色素を結合することで、蛍光色素の腫瘍への集積率を改善できると期待される。これまで、albumin に蛍光色素である aminofluorescein を結合し、腫瘍選択的な蛍光を得られたとする報告があるが、albumin の結合の有無による腫瘍部の蛍光強度の違いや蛍光持続時間を詳細に検討した報告はない。</p> <p>本研究では、albumin に FLS-Na を結合したものを作製し、腫瘍移植マウスで、腫瘍部および非腫瘍部における蛍光強度の計測を行い、これらの経時的変化について、FLS-Na との比較・検討を行った。</p> <p>《方法》</p> <p>1) 腫瘍モデル 腫瘍モデルは、5 週齢雄、体重 25g の SCID マウス背部皮下に、悪性神経膠腫細胞株 U251MG の浮遊液を接種し、3 週間で腫瘍径が 1.6-2cm に発育したものをを用いた。</p> <p>2) Fluorescein-human serum albumin conjugate (FLS-HSA) の作製 FLS-Na と HSA との結合には、Stehle らが methotrexate と albumin を結合した方法を一部改変して用いた。FLS-Na を dimethylsulfoxide に溶解し 14.6mg/ml の溶液を作製し、更に、この溶液 1ml に対し、dicyclohexylcarbodiimide 14mg と N-hydroxysuccinimide 50mg を溶解し、室温で 12 時間放置した。これと、pH 7.4, 0.13M sodium phosphate buffer 1ml に HSA 50mg を溶解したものを緩徐に混和し、30 分間攪拌した。Vacuum bottle top filter、ゲルクロマトグラフィーを通して、不純物を除去した後、遠心濾過することで濃縮した。UV 法を用いて albumin 濃度を測定し、最終的に albumin 濃度を 10%、fluorescein 濃度を 0.2mg/ml に調整した。FLS-Na と比較し、FLS-HSA の蛍光特性の偏位は 2nm 程度に留まった。</p> <p>3) 担腫瘍マウスへの薬剤投与 FLS-Na を乳酸加リンゲルに溶解し、FLS-HSA と同濃度の 0.2mg/ml とした。FLS-Na、FLS-HSA</p>	

とも、0.3ml をマウス尾静脈から投与した。

4) 蛍光写真の撮影

FLS-Naあるいは FLS-HSA を投与した担癌マウスを、15, 30, 60, 180, 360, 720 分後に 3 匹ずつ屠殺し、腫瘍表面を露出するために背面の皮膚を剥ぎ、蛍光手術顕微鏡下にデジタルカメラで撮影した。蛍光強度のコントロールとして、血糖値測定用チップに FLS-Na を滴下したものを腫瘍の傍らに設置した。

5) 画像解析

撮影した写真は Photoshop4.0J の histogram にて、腫瘍部、腫瘍辺縁部、コントロールの輝度を測定した。数値は各部位につき 3 箇所計測し、これの平均値を用いた。コントロールの輝度で calibration した腫瘍部、辺縁部の輝度を蛍光の絶対値として採用した。腫瘍部と辺縁部のコントラストは t/p (tumor/peripheral) ratio で表した。

《結果》

1) FLS-Na

投与 15 分後では、腫瘍部・辺縁部ともに蛍光が強く、コントラストが悪いため、腫瘍を同定するには不適當と思われた。60 分以降では、腫瘍部・辺縁部とも蛍光が消失し、肉眼的に捕らえることができなくなった(180 分でも同様であったため、360 分以降の実験は行わなかった)。T/p ratio は、各時点とも 1.6 前後に一定しており、これらに統計学的有意差は認められなかった。

2) FLS-HSA

投与 15, 30 分後では、辺縁部の蛍光が強く、コントラストが悪いため、腫瘍を同定するには不適當と思われた。時間の経過とともに、辺縁部の蛍光強度が弱くなり、60, 180, 360 分後では、肉眼的に腫瘍特異的な蛍光が得られた。FLS 投与群での t/p ratio の最大値(30 分後)より、FLS-HSA 投与 60,180,360 分後の t/p ratio は ANOVA (Analysis of Variance between groups) にて統計学的に有意差(p<0.01)を持って高値を示した。720 分後では腫瘍部・辺縁部とも蛍光は消失し、蛍光顕微鏡下に腫瘍／非腫瘍部を判別することはできなかった。

《考察》

悪性神経膠腫の浸潤域を術中に評価するために、FLS-Na を静脈内投与し、蛍光標識する方法が従来より行われているが、腫瘍組織に高率に取り込まれる albumin と蛍光色素を結合することで、より腫瘍特異的な蛍光を獲得することが期待される。本研究は、FLS-Na に albumin を結合したものを作製し、脳腫瘍皮下移植マウスに投与して、実際の腫瘍部・非腫瘍部の蛍光強度を測定することで、FLS-Na との比較を行ったものである。

蛍光強度は、励起光の条件、温度、pH その他の条件によって変化し、励起光の照射により蛍光が消退していくなど、厳密な定量化は困難である。今回、擬似的な定量化を行った上で、合理性・客観性を持たせるため、別個体間の比較は、主に腫瘍部／辺縁部の蛍光コントラスト = t/p ratio で評価した。

結果として、FLS-Na での t/p ratio は、15 分後から 180 分後まで変化を示さず、肉眼的な蛍光像は 30 分までは強いものの 60 分以降には全く認められなかった。それに対し、FLS-HSA では蛍光の持続が長く、特に FLS-Na が消退する 60 分後以降で、t/p ratio が上昇し、腫瘍特異的な蛍光染色が得られ 360 分後まで持続した。また FLS-HSA では、30 分後より 60 分後の方が腫瘍部の蛍光強度が上昇していた。これは、FLS に結合した albumin を腫瘍組織が trap する機序が働き、循環回数が増えるほど、腫瘍組織に FLS-HSA が集積しているものと推察される。Albumin に FLS を結合することで、腫瘍の蛍光標識は腫瘍選択性・持続性において、より効率的になる結果となった。

今回の実験では、time-course を取り FLS-Na との比較をシンプルに行う目的で腫瘍皮下移植モデルを採用し、FLS-HSA の FLS-Na に対する優位性が示された。しかし、皮下移植モデルであるために、血液脳関門や腫瘍周囲の脳浮腫、浸潤性に拡がる腫瘍細胞などが再現されていないという問題がある。実際の手術での有効性を明確にするには、腫瘍頭蓋内移植モデル等による検討が更に必要であると考える。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第676号	氏名	市岡 従道
論文審査担当者		主査 教授 黒岩 敏彦 副査 教授 檜 林 勇 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 谷川 允彦 副査 教授 森 浩志	
主論文題名			
Enhanced detection of malignant glioma xenograft by fluorescein-human serum albumin conjugate (悪性神経膠腫移植モデルでのフルオレセイン・アルブミン結合物による腫瘍蛍光標識の検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>浸潤性に進展する悪性神経膠腫の術中同定法として、Fluorescein-sodium(以下 FLS-Na)の術中投与および、蛍光手術顕微鏡システムが用いられているが、FLS-Naをalbuminに結合することで、腫瘍に albumin が取り込まれる性質を利用し、より腫瘍選択的な蛍光が得られる可能性がある。申請者は、FLS-Na と albumin の結合物 (fluorescein-human serum albumin conjugate 以下 FLS-HSA) を作製し、腫瘍移植モデルでの腫瘍部の蛍光強度および腫瘍/辺縁部のコントラスト(t/p ratio)を測定し、FLS-Na との差異を経時的に比較検討した。これにより以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 色素投与後の蛍光の持続時間は、FLS-Na では 30 分であるが、FLS-HSA では 360 分と長い。 2) FLS-HSA での腫瘍部の蛍光強度は 30 分後に一旦低下するが、60 分後に再び上昇する。 3) t/p ratio は FLS-Na では、15 分から 180 分まで 1.6 前後ではほぼ一定であるが、FLS-HSA では 60 分から 360 分に 2.4 前後のピークを認め、ピーク時の t/p ratio は FLS-HSA の方が有意に高い。 <p>FLS-Na は既に臨床において多くの症例の蓄積があるが、投与後の蛍光持続時間、蛍光強度の経時的な検討はなされていなかった。本研究は FLS-Na、FLS-HSA の蛍光強度、t/p ratio を経時的に計測することで、各々の腫瘍染色の至適時間帯を明らかにするとともに、FLS-Na に対する FLS-HSA の腫瘍特異性の高さを示し得た。また、これは実際の手術に準じた蛍光顕微鏡システムを用いて得た蛍光強度とコントラストのデータであり、臨床的に有用性が高いと考えられる。これらの結果は、今後の術中腫瘍蛍光標識法の改良に貢献するところが大きいと考えられた。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Journal of Neuro-Oncology 67: 47-52, 2004</p>			