

氏名	しぶ や けい こ 澁谷景子
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2258号
学位授与の日付	平成12年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Detection of Hypoxic Cells in Murine Tumors Using the Comet Assay: Comparison with a Conventional Radiobiological Assay (コメットアッセイ法を用いた、マウスの固形腫瘍における低酸素細胞の検出: 従来の放射線生物学的アッセイ法との比較検討)
論文調査委員	(主査) 教授 小野 公二 教授 池 永満生 教授 平岡 眞寛

論 文 内 容 の 要 旨

[目的] 癌の放射線治療において抵抗性の強い低酸素細胞(酸素分圧5~2.5mmHg以下の細胞)の存在は、治療効果ならびに治療後の再発率に影響を与える重要な因子のひとつである。この問題を克服するべく、低酸素細胞に選択毒性を有する薬剤や、重粒子線治療の開発など、従来より多くの努力がなされてきた。

固形腫瘍における低酸素細胞の占める割合(低酸素細胞分画)は個々の腫瘍により異なることから、その値を予め知るとは、治療の感受性を予測し、最適な治療法を選択するための重要な因子と考えられ、様々な測定法が試みられてきたが、临床上、利用可能な方法は未だ確立されていない。

コメットアッセイ法は個々の細胞のDNA損傷を相対的な差として測定する方法である。すでに、放射線照射により常酸素細胞が低酸素細胞に比べ約3倍のDNA損傷を来すことを利用し、低酸素細胞の検出が可能であると提唱されている。しかし、その測定値の信頼性は未だ完全には実証されていない。本研究は、コメットアッセイを行うための独自の画像解析システムを用いた低酸素細胞分画測定法の精度確認、および低酸素細胞の発生メカニズムの異なる実験腫瘍におけるコメットアッセイによる低酸素細胞分画測定法の信頼性を検証することを目的とする。

[方法] 1. 培養肺瘍細胞(SCCVII腫瘍細胞)を用い、コメットアッセイにおける2つのパラメータ(tail momentとtail length)について線量依存曲線を求めた。また、有酸素下と低酸素下での線量依存曲線を求めた。

2. SCCVII腫瘍細胞を用い、人為的に低酸素細胞と有酸素細胞を混合し、既知の割合と、コメットアッセイ法により求めた割合を比較した。

3. SCCVII腫瘍を大腿部に移植したC3HマウスとEMT-6腫瘍を移植したBalb/cマウスに12Gy照射し、個々の腫瘍について標準的な低酸素細胞分画測定法であるコロニー形成法とコメットアッセイ法を同時に用いて低酸素細胞分画を求め両者を比較検討した。

[結果] 1. 各パラメーターは照射線量とともに増大し、12Gyで有酸素細胞のtail momentは低酸素細胞の4.3倍の値を示した。その差は線量とともに増大する傾向にあった。

2. *in vitro*にて、低酸素細胞と常酸素細胞の混合比をコメットアッセイより算出した値は既知の混合比と一致した。

3. *in vivo*にて、コロニー形成法とコメットアッセイ法から求めた値はSCCVII腫瘍で $r=0.85$ 、EMT-6腫瘍で $r=0.75$ と、有意に相関した。

[考察] コメットアッセイは極く少数の細胞で施行可能であり、また簡便かつ迅速に結果が得られるため、臨床応用できればその利点は大きい。低酸素細胞分画の測定を目的とし、開発・更新したコメットアッセイ用システムについて、*in vitro*における実験系にて、その精度を確認することができた。尚、SCCVII腫瘍は急性型低酸素細胞を多く含み、EMT-6腫瘍は慢性型低酸素細胞を多く含むことが知られている。これらの異なるタイプの低酸素状態を示す腫瘍について、従来の放射線生物学的手法(コロニー形成法)とコメットアッセイ法で低酸素細胞分画を同時に測定した結果、両者は有意に相関し、コ

メットアッセイは生物学的低酸素状態をよく反映していた。これはコメットアッセイの信頼性を支持する有力な根拠と考えられた。

[結論] コメットアッセイは、ヒト腫瘍の低酸素細胞分画測定に有用な方法になり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、放射線照射後のDNA障害を指標とするコメットアッセイ法を用い、腫瘍内低酸素細胞を検出し、臨床で使用可能な低酸素細胞分画測定法として、その信頼性を検証した。

コメットアッセイを行うための独自の画像解析システムを用い低酸素細胞分画を測定し、*in vitro*にて、その精度を確認した。次に、*in vivo*にて、異なる低酸素状態をとることが知られている2腫瘍について、コメットアッセイ法と、従来の標準的な測定法であるコロニー形成法を同時に用い、その低酸素細胞分画の値を比較検討した。その結果、急性の低酸素細胞を多く含む腫瘍においても、慢性の低酸素状態を示す腫瘍においても、細胞の生死をエンドポイントとするコロニー形成法と、コメットアッセイ法の間で、その低酸素細胞分画の値に有意な相関関係が認められた。以上より、コメットアッセイ法は放射線抵抗性低酸素細胞の割合を検出する方法として、臨床応用できる可能性が高いと考えられた。

以上の研究は、臨床で使用できるヒト腫瘍内低酸素細胞分画測定法の開発に貢献し、より有効な治療法を選択するための腫瘍放射線感受性予測方法の確立に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年2月18日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。