

氏 名 ^{たか}高 ^き木 ^{たけ}雄 ^{ひさ}久
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2166 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 11 月 24 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 分 子 医 学 系 専 攻
 学位論文題目 The influence of DNA ploidy of a human tumor cell line on the frequencies
 of micronuclei or chromosome aberrations after irradiation
 (人腫瘍における放射線照射後の微小核出現頻度や染色体異常数に対する DNA
 ploidy の影響についての研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 武 田 俊 一 教 授 丹 羽 太 貫 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、治療前に効果を予測することは、一回線量、線質、治療期間等の調節により、治癒率を向上させると考えられている。しかし、種々の治療効果予測法が研究されているが、十分な成果は得られていない。放射線照射後の DNA の二重鎖切断と染色体切片異常との間には密接な関係があり、染色体切片異常数計測は、生存主予測法として有用である。染色体異常測定法として微小核形成試験及び未成熟染色体凝集法 (Premature Chromosome Condensation) と蛍光 in situ hybridization 法の併用法 (以下 PCC-FISH 法) を用いて、細胞の放射線感受性予測法を開発してきた。多くの報告で、染色体切片異常数や微小核出現頻度は、放射線照射後の生存率に比例するとされている。しかし、人腫瘍細胞では多様な DNA 量が報告されており、非 2 倍体腫瘍細胞でこの関係が成立するか疑問が生じる。本研究では、人由来線維肉腫細胞より分離した、同放射線感受性だが異なる DNA 量を有する 2 つのクローンを用いて、放射線照射後の染色体切片異常数や微小核出現頻度と生存率の関係を検討した。

方法) 人由来線維肉腫腫瘍 HT 1080 から二つの細胞株 (heteroploid 及び pseudodiploid) を分離。各クローンをプラトー期で放射線照射し、照射直後及び 24 時間培養した後、コロニー法により生存率を、Cytochalasin B を用いた微小核形成試験で微小核出現頻度を求めた。また M 期 HeLa 細胞とセンダイウイルスを用い細胞融合させ PCC を誘導し、細胞を伸展固定後、第 4 染色体に特異的な DNA プローブにて in situ hybridization し、第 4 染色体異常数を求め、微小核出現頻度と生存率の関係を検討した。

結果) コロニー法で求めた照射直後の生存率は両クローン間に違いを認めず、24 時間後では両クローンとも生存率はわずかに上昇した。微小核出現頻度は両クローンとも照射線量に従って増加し照射直後、24 時間後とも ploidy の多いクローンのほうが微小核出現頻度は多かった。DNA index で標準化した両クローンの微小核出現頻度は等しくなった。PCC-FISH 法では、照射直後で照射線量と第 4 染色体異常数との間に相関関係を認め、第 4 染色体異常数は ploidy の多いクローンの方が多かった。照射後 24 時間後でも、第 4 染色体異常数は照射線量が同じであれば ploidy の多いクローンのほうが多く認められ、染色体 ploidy で標準化すると同一の照射線量で差を認めなかった。

(考察) 文献的には DNA 量により微小核出現頻度には差がないとの報告があり本研究結果とは異なる。細胞が照射された時の細胞周期が一つの原因と考えられ、他報告では対数増殖期に、本研究では主に G1 期に照射されている。人腫瘍では、細胞分裂を行う細胞の比率は高くなく、腫瘍によりその比率は様々である。一方 PCC-FISH 法では、G1 期の染色体異常の検出が可能で、培養を必要とせず腫瘍の微小環境を含めた評価が可能である。2 倍体の繊維芽細胞や人腫瘍での検討では第 4 染色体切片異常数で放射線感受性予測は可能との報告があり、本研究結果は、非 2 倍体腫瘍においても本法の有用性を示唆する。

結論) HT 1080 腫瘍においては, ploidy の違いによる放射線感受性の差を認めなかったが DNA 量或いは ploidy は, 微小核出現頻度や染色体切片異常数に影響した。放射線感受性予測のため染色体障害の検出を利用した方法を適応する際, DNA 量や染色体 ploidy を考慮する必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では, より正確な細胞の放射線感受性予測方法の確立を目的として, 微小核形成試験および未成熟染色体凝集法と蛍光 in situ hybridization 法 (以下 PCC-FISH 法) を併用した放射線感受性予測法において, 微小核出現頻度と染色体切片異常数に与える DNA 量や染色体 ploidy の影響の検討を行った。

ヒト由来の腫瘍細胞 (HT 1080 細胞) より分離した ploidy の異なる 2 つのクローンを使用し, 放射線照射後の細胞生存率, 微小核形成試験での微小核出現頻度および PCC-FISH 法での第 4 染色体異常数を, 照射直後と 24 時間培養後に測定し以下の結果を得た。1. 2 つのクローンは同じ放射線感受性を示した。2. 両クローンで微小核出現頻度, 第 4 染色体異常数は放射線線量に依存して増加した。3. ploidy の多いクローンで, 微小核出現頻度, 第 4 染色体異常数が多く認められたが, DNA index や染色体 ploidy で標準化すると両者には差を認めなかった。したがって ploidy が放射線照射後の微小核出現頻度や染色体異常数に影響することが明らかとなり, 細胞の放射線感受性予測法として染色体障害を指標とする場合, DNA 量や染色体 ploidy を考慮する必要があると考えられた。

以上の研究は, 染色体障害の検出による放射線感受性予測法における腫瘍細胞の DNA 量や染色体 ploidy の影響の解明に貢献し, 放射線感受性予測法の確立に寄与するところが大きい。

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 11 年 10 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。