

ISSN 1341-1993

Neuro-Oncology

ニューロ・オンコロジー

1998, vol 8, No 2

ニューロ・オンコロジーの会

Neuro-Oncology

ニューロ・オンコロジー

1998. vol 8. No 2

主題

“グリオーマ治療耐性とその対策”

“悪性グリオーマ grade III の治療方針”

【 目次 】

はじめに	世話人 自治医科大学 篠田宗次, 増沢紀男	1
I. 総説		
アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した遺伝子導入法とその遺伝子治療への応用	自治医科大学 小澤敬也	2
II. グリオーマ治療耐性とその対策		
放射線照射によるglioma細胞のMHCクラスIの発現への影響	横浜市立大学 佐藤秀光ほか	8
細胞内グルタチオン濃度操作による培養glioma細胞における抗腫瘍効果増強に関する試み(第2報)	都立荏原病院 飯田昌孝ほか	12
Etoposide, mAMSA 耐性細胞におけるATP binding cassette superfamily (MDR-1, MRP, C-MOAT) mRNAの発現様式	香川医科大学 松本義人ほか	17
神経膠腫におけるMDR-1遺伝子の発現とMIBI SPET	宮崎医科大学 横上聖貴ほか	22
グリオーマにおける薬剤耐性関連遺伝子発現の検討	自治医科大学 五味 玲ほか	25
グリオーマの治療耐性の分子生物学的解析に基づいたIndividual Adjuvant Therapy (IAT) - 第3報 -	鳥取大学 田中 聡ほか	29
III. 悪性グリオーマ gradeIII の治療方針		
基底核部悪性神経膠腫の臨床病理像	東京女子医科大学 田鹿安彦ほか	35
悪性神経膠腫に対するACNU, VP-16の治療効果の検討	国立がんセンター中央病院 田中 実ほか	39
成人大脳半球 anaplastic astrocytoma の治療経験	日本大学 宮上光祐ほか	44
Anaplastic astrocytoma (G III)の予後・治療に関する検討	香川医科大学 國塩勝三ほか	52
当院におけるanaplastic astrocytomaの治療成績 - 統計学的検討による考察 -	聖マリアンナ医科大学 田中克之ほか	56
Anaplastic Astrocytomaの当科における治療成績	東邦大学 黒木貴夫ほか	61
当院におけるMalignant Astrocytomaの治療方針を振り返って	昭和大学 岡村康之ほか	66

はじめに

第16回ニューロ・オンコロジーの会は例年にしては暖かい師走の第2土曜日に行われました。この会は第1回目より一貫して脳腫瘍の臨床的治療を中心に、それに関連する分野について討議がなされています。会の主旨も、気取らないざっくばらんな質疑応答が行われ本音が聞ける会であり、多いに役立つ内容が討論されています。今回も皆様に役立つべくふたつのテーマと一つの特別講演を用意しました。すなわち主題テーマとして(1) gliomaの治療耐性とその対策についてと(2) 悪性 glioma grade IIIの治療についてです。

glioma治療は手術が主であることはもちろんですが、補助療法としては放射線と化学療法およびその併用が主流です。それらの補助療法において、当初効果があった症例がある時点より全く反応せず、腫瘍増大する症例を経験していると思われます。これらの機序のひとつに耐性問題があると思われ、演題募集いたしました。薬剤耐性問題は腫瘍を治療する際のすべてではなく、これが解決すれば治癒と言うわけではまったくありません。しかし放射線との組み合わせや薬剤選択において考慮すべき事ではないかと考え、今回のテーマに挙げてみました。

もう一つのテーマは、悪性グリオーマの中のgrade IIIにスポットを当ててみました。Glioblastomaについてはそのほとんどが2年生存が難しいのが現状であり、またこの会でもよく検討されているところであります。しかしAnaplastic astrocytoma(grade III)については年齢やADLの条件を加味すると、治療方法により長期生存した症例をお持ちかと思われます。grade IIIとIVの違い、発生部位や時間的経過で悪性化するなど、対象症例の選定から考えなくてはならない問題もあります。しかし悪性gliomaのうちgrade IIIだけを対象とした場合、各施設での治療成績やその特異点があれば提示していただきたいと思ひます。またその方針や治療方法を示していただき、長期生存した症例より逆に治療について注目すべき点があるのではと考えテーマとしました。簡単に結論を出せるものではありませんが、統計条件をきちんとし、対象疾患や治療方法の評価をしていただければと思ひます。

さて特別講演ですが、自治医科大学の血液学及び分子生物学教授であります小澤敬也先生にお願いしました。新進気鋭の若手教授で遺伝子治療研究部の部長でもあり、血液疾患の遺伝子治療では注目されている先生であります。前回のこの会でも脳腫瘍の遺伝子治療について総説講演がありましたが、今回は遺伝子治療のなかでも新しいベクターでありますアデノ随伴ウイルスを中心に話していただくことにしました。今後、脳腫瘍の遺伝子治療が盛んになる可能性と、その問題点・展望などについて示していただけたと思ひます。

今回のプログラムはやや絞ったテーマにしてしまいましたが、大変興味ある演題が数多く集まり、またデスクッションも比較的十分に時間がとれたのではないと思ひます。明日からの実際の臨床治療に役立つだけでなく、近未来の治療の可能性について思いめぐらすことができれば幸いです。

終わりにこの会の運営にご協力いただきました諸先生や日本化薬株式会社の皆様方に大変多くのご苦勞をいただき、誠にありがとうございます。また編集の勞をいただきます東京女子医科大学附属脳神経センター助教授、久保長生先生に深く感謝いたします。

平成11年1月

第16回世話人

自治医科大学 脳神経外科
篠田宗次、増沢紀男

アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した 遺伝子導入法とその遺伝子治療への応用

Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer and its application to gene therapy

自治医科大学医学部 血液学講座 輸血部 分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部

小澤敬也

【はじめに】

様々な疾患の本態が遺伝子レベルで明らかにされるようになり、一方で遺伝子工学技術が進んでくると、遺伝子操作により疾患を根本的に治そうという遺伝子治療の発想が生まれてきた。この遺伝子治療が現実性を帯びたものとして議論されるようになったのは、1980年代はじめにレトロウイルスベクターが開発されてからである。遺伝子治療の第一候補とされたのがADA（アデノシンデアミナーゼ）欠損症で、世界初の本格的な遺伝子治療が1990年にADA欠損症を対象として米国NIHで開始された。その後、遺伝子治療臨床研究は米国を中心に予想を超える勢いで進められ、遺伝子の投与を受けた患者数は1998年には3,000人を突破したといわれている。対象疾患の過半数は癌であり、次いでHIV感染症となっている。未来医療のイメージを持った遺伝子治療の臨床への展開はこのように大きなブームを巻き起こしたわけであるが、残念ながら、現状では期待された成果が必ずしも上がってきているわけではない。症例数は益々増加していてもその実態はむしろ再び停滞気味であり、技術的ブレイクスルーが待たれている状況である。

本稿では、遺伝子治療の実用化を進める上で最も鍵となる遺伝子導入法の中で、最近注目されているAAVベクターに焦点を当て、その特徴と臨床応用の可能性（特にパーキンソン病の遺伝子治療）について簡単に紹介する。

【AAVのウイルス学的特徴】

AAVは小型のパルポウイルスの仲間に関し、宿主域が広く種々の細胞に感染する。またごくありふれたウイルスで、成人の約85%がAAVに対する抗体を有している。ウイルスゲノムは大きさが4680塩基の線状一本鎖DNAで、プラス鎖あるいはマイナス鎖がほぼ半々を占める。ゲノムの両末端には

145塩基のITR (inverted terminal repeat) と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在する。このITRの部分が複製の開始点となり、プライマーの役割を果たす。また、ウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体DNAへの組み込みにもこのITRが必要である。ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、すなわち複製や転写を司る調節タンパク質のRepをコードしている。p5プロモーターからはRep78とRep68のmRNAが転写され、p19プロモーターからはRep52とRep40のmRNAが転写される。ゲノムの右半分は構造蛋白質であるVP1、VP2、VP3の三つのカプシド蛋白質をコードしている。これらのmRNAはp40プロモーターより転写される。

AAVの生活環は潜伏感染と溶解感染に分けられる。前者はヘルパーウイルスが存在しない場合で、宿主細胞の19番染色体長腕の特定の領域（19q13.3-qterにあるAAVS1という領域）へ組み込まれるのが特徴的である。この組み込みは非相同組換えによるものであり、Repが関与しているものと考えられている。実験的にはRep78/Rep68がAAVS1の中の特定の領域に結合することが示されている。興味深いことに、この中にはAAV-ITRのRep結合領域と共通する塩基配列（GAGC繰返し配列）が含まれている。野生型AAVが標的細胞に感染した際には、RepがAAVのITRとAAVS1の両者に結合し、Repが介在することによりAAVゲノムの19番染色体への部位特異的組み込みが起こるものと想定される。なお、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスが同時に感染したり、あるいはAAVが潜伏感染している細胞にさらに感染すると、AAVの複製が起こる（溶解感染）。

アデノウイルスのヘルパー作用に関しては、E1AがAAVのp5、p19プロモーターをトランスに活性化し、E1BはAAVmRNAの安定化、核から細胞質

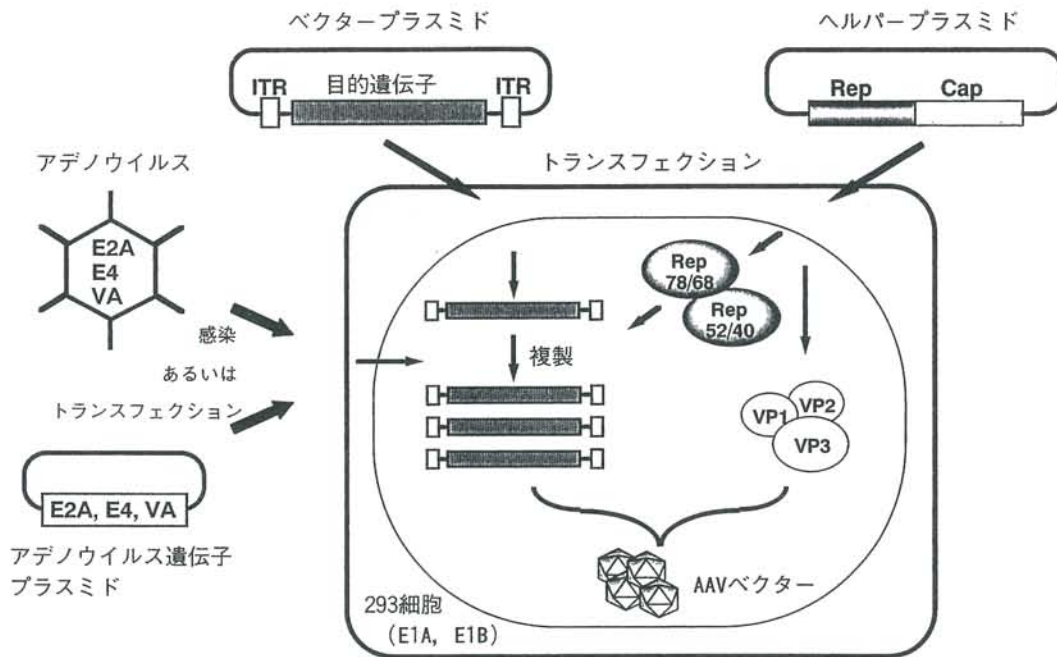


図1. AAVベクター作製法

AAVベクターを作製するには、ゲノム両端のITRの間に目的遺伝子を挿入したベクタープラスミドと、ウイルス蛋白質を補うためのヘルパープラスミドを293細胞にトランスフェクションする。次に、ヘルパーウイルスのアデノウイルスを感染させると、AAVベクターが産生されるようになる(従来法)。最近、アデノウイルスそのものの代わりに、ヘルパー機能を担う遺伝子を発現するプラスミドを他のプラスミドと一緒にトランスフェクションするアデノウイルスフリーシステムが開発され、比較的効率よくベクターを作製できるようになった。

へのmRNAの移行などを促進する。E2A産物とVA RNAはp40からのmRNAの翻訳を促進する。AAVのゲノムは一本鎖DNAであるため、ウイルス遺伝子が発現するためには二本鎖DNAになる必要がある。このステップをアデノウイルスのE1BとE4orf6産物の複合体が促進する。

【AAVベクターの作製法】

AAVを利用した遺伝子導入用ベクターの開発が進められているが、その基本的な作製法を図1に示す。まず、野生型AAVの両端のITRを残し、その間に目的の遺伝子を挿入したプラスミドを作製する(ベクタープラスミド)。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は別のヘルパープラスミドより供給する。この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにして、遺伝子組換えによる野生型ウイルスの出現をできる限り防止している。さて、両方のプラスミドを293細胞(アデノウイルスのE1A, E1Bでトランスフォームしたヒト胎児腎組織由来細胞)にトランスフェクションにより導入し、さらにヘルパーウイルスとしてアデノウイルスを感染させると、組換えAAV(AAVベクター)が産生されるようになる。このAAVベクターは核内に存在するため、細胞を

凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスは加熱(56℃)により失活させる。AAVベクターを精製するには、塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法を行うのが一般的である。

さて、AAVの増殖に必要とされるアデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子領域は既に大筋が判明しているため(E1A, E1B, E2A, VA, E4orf6)、293細胞で発現しているE1A, E1Bを除いたその他をプラスミドDNAとして供給するAAVベクター作製法(アデノウイルスフリーシステム)が開発された²⁾。この方法ではアデノウイルス不活化のための熱処理を必要とせず、従来法に比べて力価の高いベクター液が得られること、免疫原性の強いアデノウイルス由来の蛋白質の混入がないことなどの利点がある。

但し、臨床グレードのベクターを大量作製するシステムが確立されていないことが、AAVベクターの臨床応用が遅れている最大の原因となっている。

【AAVベクターの特徴】

AAVベクターは宿主域が広く、遺伝子導入効率も比較的良好で、野生型AAVが非病原性ウイルスであることから安全性が高いと考えられている。この点がAAVベクターの最大のメリットといえる

(遺伝子治療が一般的な疾患を対象とするようになった場合には、やはり安全性がポイントになる)。さらに、非分裂細胞への遺伝子導入も可能であることも大きな特徴である。一方、弱点としては、小型ウイルスに由来するベクターであるため、挿入できる遺伝子のサイズに限界がある。また、ゲノムが一本鎖DNAであるため、遺伝子発現が起こるには二本鎖になる必要があり、その効率が必ずしも良くないことから、一般に膨大な数のベクターを用いる必要がある。尚、標的細胞を抗癌剤や線照射で処理することにより遺伝子発現効率の改善がみられるが、これはセカンド鎖のDNA合成が促進されるためと考えられている。その他、AAVの大きな特徴である19番染色体への部位特異的組込みという性質が現行のAAVベクターでは失われている。この点については、ベクタープラスミドからRepをコードする遺伝子を取り除いてあるのが原因とされている。細胞内に導入された遺伝子はRep非存在下では大部分エピソームの状態で存在し、染色体DNAに組み込まれる効率は低いものと考えられている。したがって、分裂細胞の場合は導入遺伝子の大半が次第に失われていき、遺伝子発現レベルが早期に低下していく。また、一部は染色体DNAに組み込まれるが、その部位はランダムである。そこで、AAVベクターの標的細胞としては、神経細胞³⁾・筋細胞⁵⁾・肝細胞⁶⁾、気道上皮細胞などの非分

裂細胞が適していると考えられる。このような細胞では遺伝子発現の持続期間も比較的長期に及ぶ。その他、血管内皮⁷⁾などでも発現が確認されているが、投与法の工夫が必要と思われる。

【AAVベクターの遺伝子治療への応用】

臨床研究としては、嚢胞性線維症に対する第一相臨床試験が既にスタートしている。CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子を挿入したAAVベクターを気道に投与するというものである⁸⁾。動物実験段階のものとしては、様々な臓器・疾患を対象として研究が進められている。エリスロポエチン発現ユニットを組み込んだAAVベクターのマウスへの筋注例では、1回の投与で40週間以上にわたって血中エリスロポエチンの高値が持続し、それに伴ってヘマトクリット値が80%以上に達したと報告されている⁹⁾。また、血友病B (第IX因子活性の低下) に対しては、第IX因子遺伝子を含んだAAVベクターの筋注を行う動物実験で有効性が確認されており⁹⁾、臨床応用の準備が進められている。このような筋注投与法は、生理活性蛋白質の補充療法への応用面できわめて有望な方法と思われる。神経細胞を標的とした遺伝子治療実験としては、パーキンソン病が具体的な対象疾患として考えられている(下記)。その他、脳腫瘍モデル動物に自殺遺伝子のヘルペスウイルス・チミジン

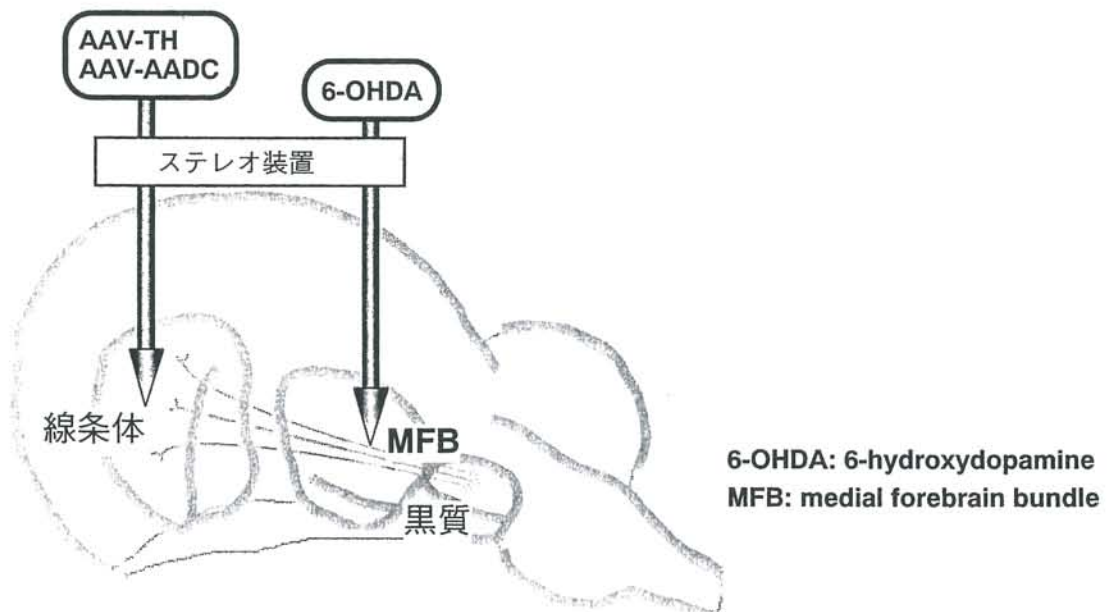


図2. パーキンソン病モデルラット(片側ドーパミン系破壊ラット)の作製と遺伝子治療の方法。
 片側のMFBに神経毒の6-OHDAをステレオ装置を用いて注入し、黒質線条体ドーパミン系ニューロンを破壊する。このパーキンソン病モデルラットの線条体に治療用遺伝子(TH遺伝子及びAADC遺伝子)を含むAAVベクターをステレオ装置を用いて注入すると、線条体でドーパミンが合成され、治療効果が認められる。

キナーゼ (HSV-TK) 遺伝子をAAVベクターで導入する実験でも良好な結果が報告されている¹⁰⁾。

【パーキンソン病の遺伝子治療への応用】

パーキンソン病は黒質線条体ドーパミン系ニューロンの選択的変性により線条体におけるドーパミン含量の低下を生ずる原因不明の神経変性疾患である。内科的治療としては、血液脳関門を通過するL-ドーパの内服療法が主に行われているが、L-ドーパは脳内でドーパミンに変換されて治療効果を発揮する。しかし、このような薬剤の全身投与による治療法よりは、線条体局所でドーパミンを産生させる治療法の方がより合理的かつ理想的であると考えられる。そのため一つのアプローチとして、ドーパミン産生能を有するヒト胎児中脳組織などを線条体へ移植する治療法が試みられ、その有効性も報告されている。しかし、胎児組織は入手の点で倫理的問題が存在し、また多数の患者にこのような治療を実施することは困難である。そこで、将来的により大きな可能性を持った治療戦略として、遺伝子治療法の応用が最近注目されている。治療用遺伝子としては、L-ドーパ療法のような対症療法的アプローチ

としてドーパミン合成酵素遺伝子の利用が検討されているが、さらに、疾患そのものの進行を食い止める対策として、神経細胞保護作用を持つ神経栄養因子の遺伝子を用いる方法が脚光を浴びている。

1) ドーパミン合成酵素遺伝子を用いた遺伝子治療

ドーパミン合成の律速酵素はチロシン水酸化酵素 (TH: tyrosine hydroxylase) であり、チロシンからL-ドーパへの合成を触媒する¹¹⁾。さらに、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase) がL-ドーパをドーパミンに変換する。従来のパーキンソン病遺伝子治療の基礎研究では、ほとんどの例でTH遺伝子が単独で用いられてきた。この場合には、ドーパミンへの変換に関しては内因性のAADCの働きを期待しているわけであるが、パーキンソン病患者の線条体AADC活性はかなり低いことが報告されている。したがって、TH遺伝子に加えてAADC遺伝子を併用した方がドーパミンへの変換効率が上昇し、治療効果も一層高まるものと予想される。そこで我々の研究グループでは、TH遺伝子とAADC遺伝子の併用法に関する検討を行った¹²⁾。遺伝子導入法としてはAAVベクターを用い、二つのベクター (AAV-THとAAV-AADC) を作製し、混合して用いた。これは重複感染可能なAAVの性質を利用したもので、複数のベクターを用いるシステムを採用することにより、今後さらに多くの遺伝子を組み合わせて治療に用いることも可能であると考えられる。

疾患モデル動物としては、一側のMFB (medial forebrain bundle) に神経毒の6-OHDA (hydroxydopamine) を注入し、黒質線条体ドーパミン系ニューロンを片側だけ破壊したパーキンソン病モデルラットを作製した (図2)。このラットでは、片側の線条体でドーパミン含量が低下し、パーキンソン病類似の病態が出現する。遺伝子治療実験では、このパーキンソン病モデルラットの線条体に定位脳手術によりAAVベクターを注入し (AAV-TH、AV-AADCの単独あるいは併用)、異常運動に対する治療効果を検討した (図3)。その結果、TH遺伝子単独でも効果が認められたが、AADC遺伝子の併用で治療効果が増強した (図4)。

2) 神経栄養因子遺伝子を用いた遺伝子治療

線条体でドーパミンを産生させる遺伝子治療法は、ドーパミンニューロンの選択的変性を阻止するものではなく、疾患自体の進行を食い止めることは

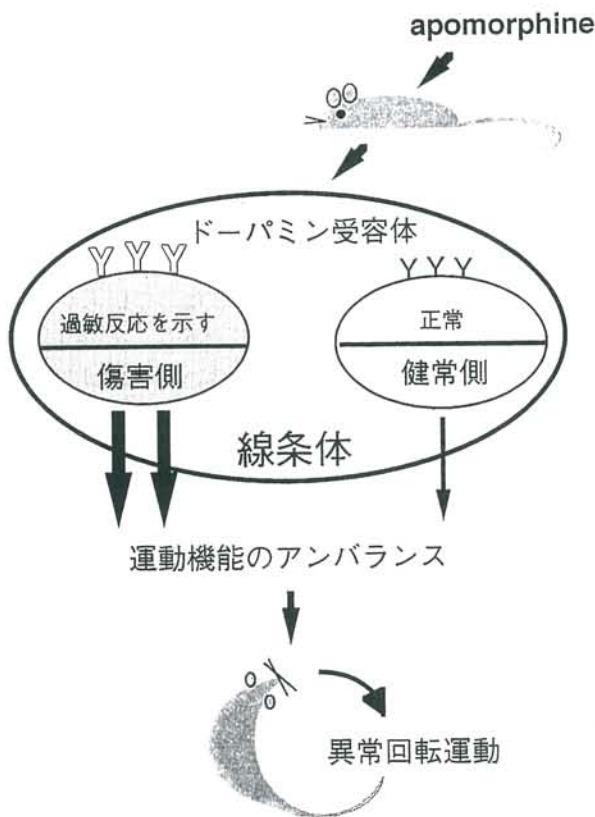


図3. 行動異常の改善を目安とした遺伝子治療の効果判定法。

パーキンソン病モデルラットにアポモルフィンを腹腔内投与した時の異常回転運動を計測する。その結果から、線条体におけるドーパミン含量を評価することが出来る。

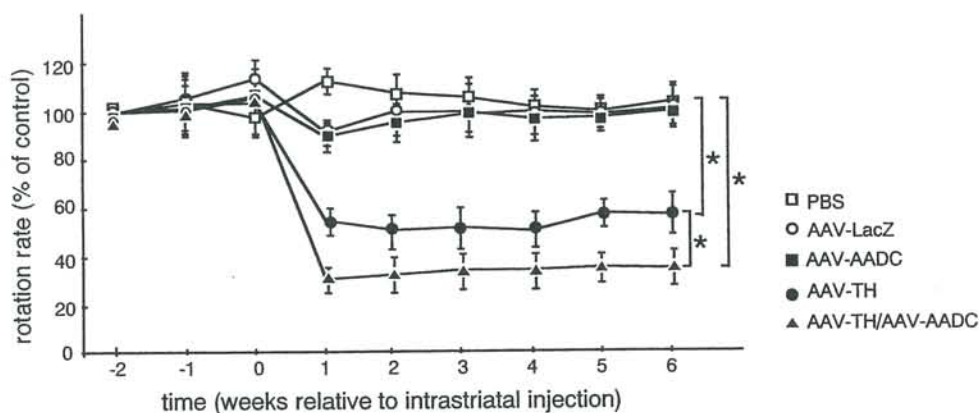


図4. パーキンソン病モデルラットにおける遺伝子治療の効果。
アポモルフィン投与により惹起される異常回転運動を計測すること
により治療効果を判定した (* : $p < 0.01$) .

出来ない。最近では、神経細胞の保護作用のある神経栄養因子〔GDNF(glial cell line-derived neurotrophic factor)や BDNF(brain-derived neurotrophic factor)など〕が注目されており、遺伝子組換え型GDNFの脳内注入実験なども行われ、サルなどの動物モデルでその効果が確認されている。そこで、このような神経栄養因子（特に、ドーパミンニューロンに対する作用の強いGDNF）の遺伝子をパーキンソン病の遺伝子治療に応用する動きが活発になってきている。in vitroの系で初代培養ラット中脳細胞にGDNF遺伝子をAAVベクターで導入すると、ドーパミンニューロンの生存が明らかに改善され、その神経突起の成長が促進されることを我々は観察している¹³⁾。さらに、アデノウイルスベクター^{14、15)}やAAVベクター¹⁶⁾を用いてGDNF遺伝子を導入する動物モデル実験も既に行われており、その有効性が報告されている。このようなアプローチは、パーキンソン病の病態の進行を遅延させる効果を持つものと考えられ、今後の研究の展開が期待される。

【AVのコンポーネントを利用した染色体部位特異的遺伝子組み込み法の開発】

野生型AAVは感染細胞のAAVS1領域特異的にそのゲノムを組み込むが、rep遺伝子を欠くAAVベクターはその特性を失っており、導入した遺伝子は標的細胞の染色体DNAにランダムに組み込まれる。AAVS1領域特異的組み込みにはRep蛋白質(Rep78/68)とITR配列が重要な働きをしていることが判明しており、ITR配列を連結した外来性遺伝子は、Rep蛋白質をトランスに一過性に発現させることにより特異的にAAVS1領域に組み込ませることが可能であ

ると推定される。この考えに基づき、TVI (targeted vector integration) 法と呼ばれるAAVS1領域特異的遺伝子組み込み法が開発されつつある¹⁷⁾。この方法は、宿主染色体の特定の場所に外来性遺伝子を組み込ませるため、安全性の面でより優れていること、細胞の中に入れるステップを工夫することにより組み込むことができるDNAのサイズの制限がなくなることなどが利点として挙げられる。また、組み込み効率自体が向上することから、このような方法は分裂細胞を標的とする場合に適している。

【おわりに】

AAVを遺伝子治療に利用するための研究が世界的に広がりつつあるが、作製法が確立していないことなど実用化を進める上で克服すべき問題点がまだ多く残されている。現行システムを利用した臨床応用は、当面は筋注法を中心に進められると思われる。この方法での対象疾患の筆頭は血友病Bである。これまでのレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の臨床研究では明瞭な効果が得られてきていないだけに、AAVベクターを用いた方法が臨床試験でも有効性を発揮することを期待したい。また、パーキンソン病などの神経疾患の遺伝子治療においても、AAVベクターが最も適していると考えられる。一方、AAVの組み込み機構を利用した外来性遺伝子の第19番染色体部位特異的組み込み法は、ユニークな方法として注目される。部位特異的に遺伝子の組み込みを図る技術は安全性の点で意義が大きく、近未来テクノロジーとして大きな可能性を秘めている。

【文献】

- 1) Matsushita, T., et al.: *Gene Ther.* 5: 938-945, 1998
- 2) Xiao, X., et al.: *J. Virol.* 72: 2224-2232, 1998
- 3) Kaplitt, M. G., et al.: *Nat. Genet.* 8: 148-154, 1994
- 4) Du, B., et al.: *Gene Ther.* 3: 254-261, 1996
- 5) Kessler, P. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
93 : 14082-14087, 1996
- 6) Koeberl, D. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
94 : 1426-1431, 1997
- 7) Maeda, Y., et al.: *Cardiovascular Res.* 35: 514-521,
1997
- 8) Flotte, T., et al.: *Hum. Gene Ther.* 7: 1145-1159,
1996
- 9) Herzog, R. W., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
94: 5804-5809, 1997
- 10) Okada, H., et al.: *Gene Ther.* 3: 957-964, 1996
- 11) Nagatsu, T.: *Neurosci. Res.* 12: 315-345, 1991
- 12) Fan, D., et al.: *Hum. Gene Ther.* 9: 2527-2535,
1998
- 13) Fan, D., et al.: *Neurosci. Lett.* 248: 61-64, 1998
- 14) Choi-Lundberg, D.L., et al.: *Science* 275: 838-841,
1997
- 15) Bilanz-Bleuel, A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 94: 8818-8823, 1997
- 16) Mandel, R.J., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:
14083-14088, 1997
- 17) Surosky, R. T., et al.: *J. Virol.* 71: 7951-7959,
1997

放射線照射によるglioma細胞の MHC クラス Iの発現への影響

横浜市立大学医学部 脳神経外科¹⁾、同寄生虫学教室²⁾

佐藤秀光^{1), 2)}、菅野 洋¹⁾、村田英俊¹⁾、山本勇夫¹⁾、藤巻春香²⁾、南 陸彦²⁾

放射線照射によるglioma細胞のMHCクラスIの発現量とCTL活性を検討した。203G細胞に放射線5Gyを照射し、MHCクラスIの発現を調べた。3日目より発現が増強し12日目に最大となった。また5Gy、10Gy、15Gyを照射したところ、15Gyで最大となった。203G特異的CTLに対する感受性は照射群では非照射群に比べ強かった。放射線療法後免疫療法を試みる時期を決める上で参考になるとと思われる。

Key Words : glioma, MHC class I expression, irradiation, CTL activity

【はじめに】

腫瘍細胞を傷害する細胞には、NKcell、NKT cell、 γ δ Tcell、CD8+細胞障害性T細胞(以下CTL)などが知られているが、これらの中でCTLが腫瘍の排除において主要な役割を果たしている。腫瘍細胞に対するCTLの誘導は腫瘍細胞上にMHC クラスI分子が高発現していることが重要である。これまで放射線照射によって、悪性黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌¹⁻³⁾の細胞表面にMHC クラス Iの発現が増強することが知られているが、gliomaに関しては報告されていない。また、発現が増強された腫瘍細胞に対するCTL活性を調べた報告例はない。今回我々は、203G細胞に放射線を照射することによって、MHC クラス Iの発現が増強し、そしてCTLに対する放射線感受性も増強することを明らかにした。

【材料と方法】

放射線：セシウム137ガンマセル(ベックマン製)を使用した。

FACScan：細胞はmouse gliomaである203Gを使用した。フラスコ内で90~100%confluentにした細胞に5Gy、10Gy、15Gyの放射線を照射した。3日、7日、12日、20日後に細胞を 4×10^6 個ずつ回収した。各々の細胞 2×10^6 個ずつに対し、1次抗体(mouse Anti H-2b antibody(28.8.6S))またはコントロール抗体(mouse IgG)を反応させ、2次抗体はPE labelled Anti mouse Ig antibodyを使用し、FACScanで発現を調べた。検定はKolmogorov-Smirnov検定を行い、 $p < 0.001$ を有意差とした。

CTL assay：50Gy照射した203G 1.7×10^7 個をC57BL/6に腹腔内注射して免疫し、14日後に脾細胞を回収した。10%FCS,5%ConA supplementを加えたRPMI1ml中に、脾細胞 6.5×10^6 個、非照射の203Gまたは5Gy照射し7日目の203GをマイトマイシンCで処理したものを加え、5日間培養した。回収したリンパ球に、標的細胞として⁵¹Cr処理された非照射の203Gまたは5Gy照射し12日目の203Gにそれぞれ10:1, 20:1, 40:1になるように加え200 μ lとし、4時間37°Cでincubationした後、上清100 μ l中の⁵¹Crを測定した。0.2%TritonX加RPMI下で、または、10%FCS加RPMI下でそれぞれの203Gを培養し同様に測定した結果をmaximal release, spontaneous releaseとし、次式% specific lysis = (experimental release-spontaneous release) / (maximal release-spontaneous release) $\times 100$ で算出した。

【結果】

5Gy照射の細胞において3日目の細胞より発現増強が認められ、12日目に発現が最大となり、20日目でも差が認められた。(Fig.1A~D)

線量による比較では、5、10、15Gyの照射群のなかでは、15Gyが最も強い発現がみられた。(Fig. 2A~C)

CTL活性は、リンパ球を5Gy照射した細胞と共培養したものが、5Gy照射した細胞を最も強く傷害し、非照射細胞と共培養したものは非照射細胞を強く傷害した。また5Gy照射した細胞と共培養したものは非照射細胞を比較的強く傷害したが、非照射細胞

Fig.1 Flowcytometric analysis of MHC class I on 203G glioma cells on day3,7,12 and 20 after 5Gy irradiation. A. Day3 B.Day 7 C.Day 12 D.Day20

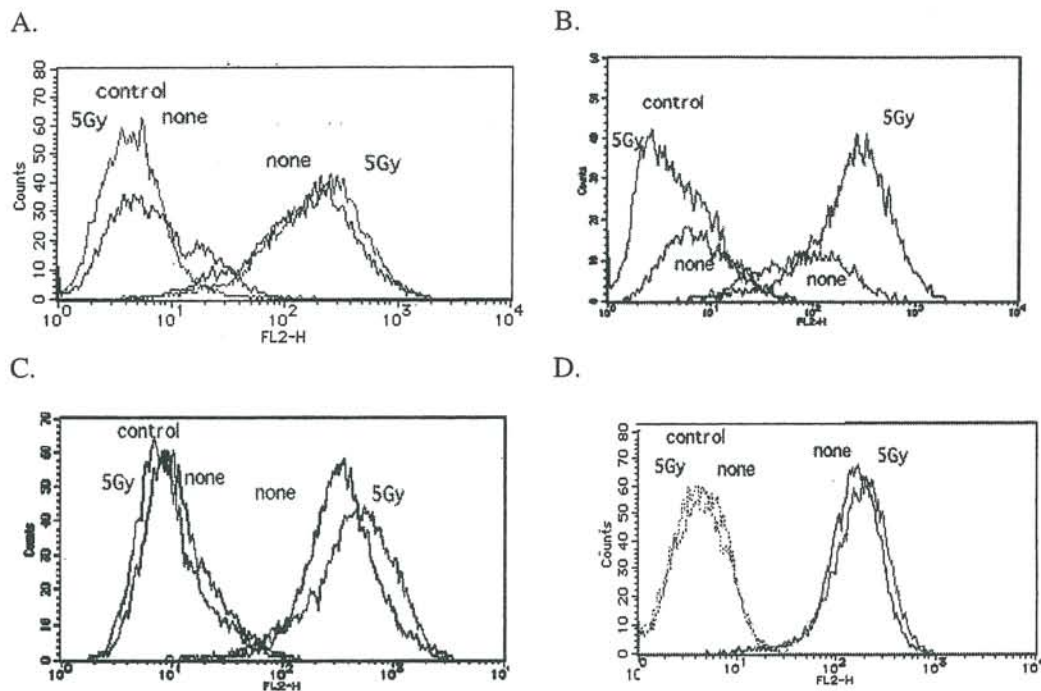
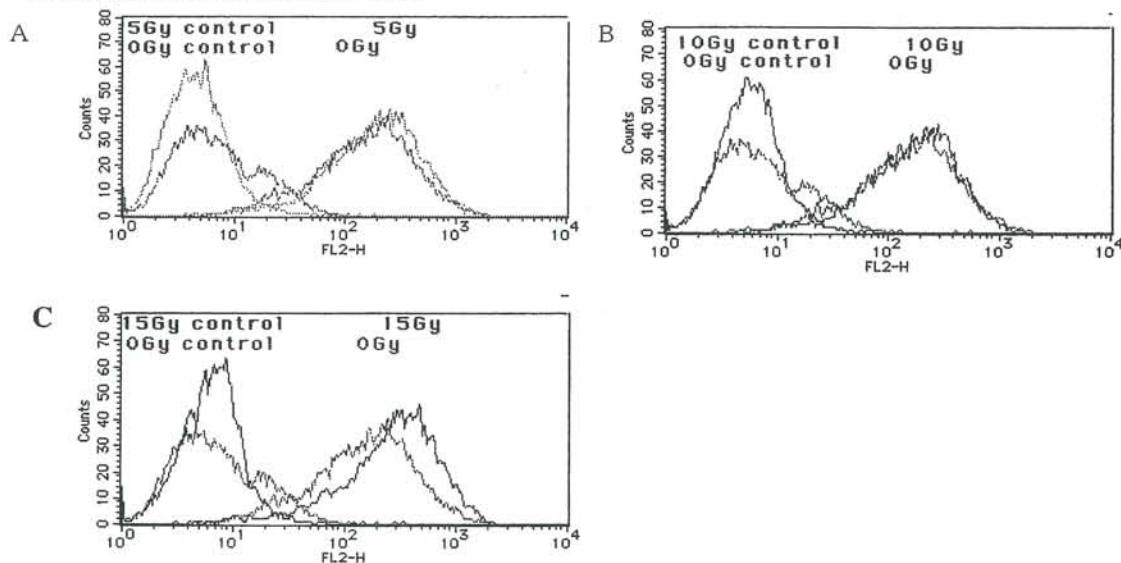


Fig.2 Flowcytometric analysis of MHC class I on glioma cells on day 3 after 5,10or15Gy irradiation.A.5Gy,B.10Gy,C.15Gy.



胞と共培養したものは5Gy照射した細胞に対し弱い傷害性しかもたなかった(data not shown)。

【考察】

腫瘍細胞を傷害する細胞は、NKcell、NKT cell、 $\gamma\delta$ Tcell、CTLなどが知られている。これら

の中でCTLが腫瘍の排除において主要な役割を果たしている。腫瘍細胞に対するCTLの誘導は腫瘍細胞上にMHCクラスI分子が高発現していることが重要である。これまで放射線照射によって、悪性黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌の細胞表面にMHCクラスIの発現が増強することが知られている¹⁻³⁾。(Fig1, 2)

発現の増強量は照射量に依存すると言われている³⁾。我々の結果でも5Gy照射よりも15Gy照射の方が、MHCクラスIの発現は増強したが(Fig2)、照射量と発現量に有意な相関はみられなかった。今回の実験では細胞に放射線を照射すると細胞表面分子と非特異的なコントロール抗体との反応性も上昇してしまうことがあるため、そのような場合には、特異的な分子の発現が増強しているとは判定しがたい。そこで、細胞に放射線を照射すると非特異的なコントロール抗体との反応性がむしろ低下した結果を採用した。

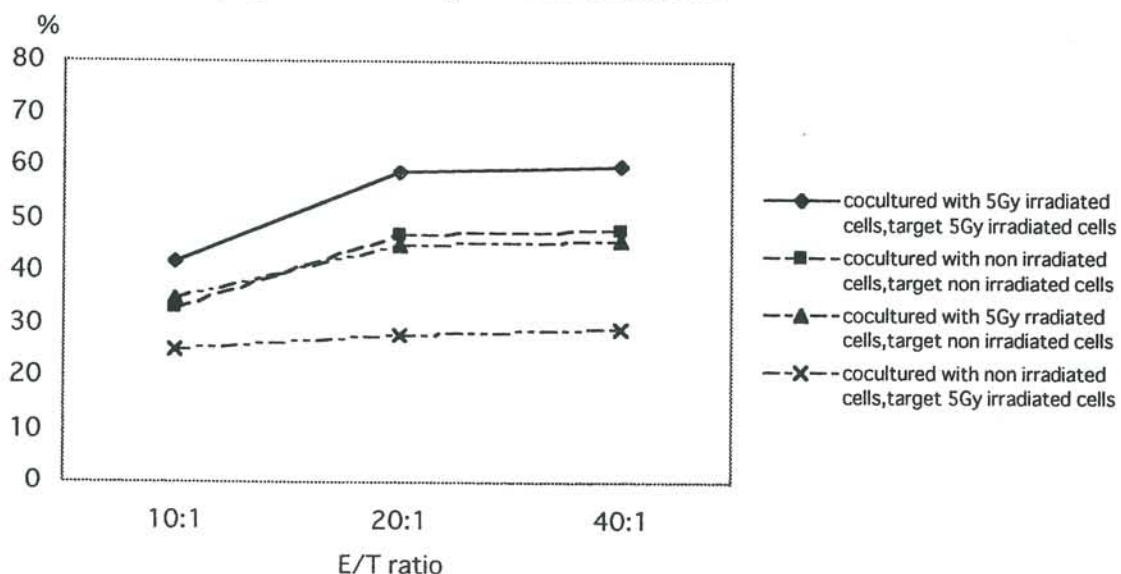
5Gy照射の細胞において3日目の細胞より発現増強が認められ、12日目に発現が最大となり、20日目でも差が認められた(Fig.1)。放射線照射により細胞表面で発現が増強した分子はその後も長期にわたり、強い発現が認められることが知られている³⁾。我々の条件下では、MHCクラスIの発現のピークは7から12日であった。CTLを誘導する際に、照射後7日目の203G細胞を用いて5日間培養し、12日目の細胞を標的細胞とした。203Gで免疫されたマウスの脾臓から回収されたリンパ球は203Gに特異的に細胞傷害性をもち、B16F10に対してはもたないことを確認した(data not shown)。また、抗MHCクラスI抗体を腫瘍細胞にあらかじめ反応させることによりCTL活性はblockされた(data not shown)。CTL活性は、リンパ球を5Gy照射した細胞と共培養したものが、5Gy照射した細胞を最も強く傷害し、非照射細胞と共培養したものは非照射細胞を強く傷害した。また5Gy照射した細胞と共培養したものは非照射細胞を比較的強く傷害したが、非照射細胞と共培養したものは5Gy照射した細胞に対し弱い傷害

性しかもたなかった(Fig.3)。これは、5Gy照射群と非照射群を認識しうるCTLが異なり、免疫して得られたリンパ球は様々な種類のCTLが存在しているが、共培養した細胞に応じたCTLがそれぞれ得られたためと考えられる。この現象がin vivoでもみられるとすると照射前に存在していたCTLは、5Gy照射後の腫瘍細胞を傷害しにくい、新たに出現したCTLは、より強い傷害性をもつ可能性が示唆される。その機序として、照射前に発現がみられない、或いは、発現がわずかであった抗原が照射によって強く発現し、新たに誘導されたCTLがそれを認識していることが考えられる。

CTLが働くためにはMHCだけでなく、B7.1, B7.2, ICAM, LFAなどのcostimulatorや接着分子の働きが重要である。これらの分子も放射線照射により発現の増強がみられる^{2~5)}。このほかMHCクラスII²⁾、carcinoembryonic antigen(CEA)⁴⁾、CA125²⁾、Her2-neu²⁾に関しても同様の報告があり、UV照射でもCD1a、HLA-DR、B7-1、B7-2の発現増強を認めた報告もある⁶⁾。但し、照射前からともと細胞表面に発現している分子は放射線照射により発現が増強する可能性があるが、最初から発現がみられていない分子が照射によって新たに発現する例はないといわれている²⁾。我々が使用した203Gは、B7.2, ICAM, LFAを発現していなかったが、B7.1は発現しており、放射線照射の影響については詳細な検討が必要と考えられる。

放射線照射による細胞表面分子の発現増強の機序はよくわかっていない。ICAMでは、照射により、mRNAレベルでの増強が確認されている⁵⁾。MHCについては今後の研究が期待される。

Fig. 3 CTL activity against non or 5Gy irradiated glioma cells



今回はマウスの腫瘍を調べたに過ぎないが、今後ヒトの腫瘍を放射線照射した後のMHCの変化を調べれば、免疫療法を行う際、その時期を決定する上で非常に参考になると思われる。

【結語】

203G細胞に放射線を照射することによって、MHCクラスIの発現が増強し、それらの細胞に対するCTL活性も増強したことがわかったので報告した。

【文献】

- 1) Abdel-Wahab Z., Dar MM., Hester D., et al:
Cell Immunol.:171,2,246-254,1996
- 2) Santin A.D., Hiserodt J.C., Fruehauf J., et al :
Gynecol.Oncol.:60,3,468-474.1996
- 3) Santin A.D., Hermonat P.L., Hiserodt J.C., et al :
Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.:39,3,737-742,1997
- 4) Hareyama M., Imai K., Ban T., et al:Nippon Igaku
Houshasen Gakkai Zasshi:48,12,1572-1574,1988
- 5) Hareyama M., Imai K., Oouchi A., et al :
Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.:40,3,691-696,1998
- 6) Laihia J.K., Jansen C.T. : Eur.J.Immunol. 27,4,
984-989,1997

細胞内グルタチオン濃度操作による培養glioma細胞における抗腫瘍効果増強に関する試み（第2報）

都立荏原病院 脳神経外科、昭和大学 脳神経外科*

飯田昌孝、土居 浩、岩間淳一、朝本俊司、
楚良繁雄、日野 健、杉山弘行、松本 清*

Effect of intracellular glutathione concentration on hydrogen peroxide and cisplatin-induced cytotoxicity in glioma cell lines(The second report)

Masataka Iida, Hiroshi Doi, Jun-ichi Iwama, Shunji Asamoto,
Shigeo Sora, Ken Hino, Hiroyuki Sugiyama, Kiyoshi Matsumoto*

Department of Neurosurgery, Tokyo Metropolitan Ebara Hospital,
* Department of Neurosurgery, School of Medicine, Showa University

Abstract

The relation between the intracellular glutathione (GSH) concentration and hydrogen peroxide, cisplatin-induced cytotoxicity was investigated. Intracellular GSH concentration in human glioblastoma (T98G, U87MG) and glioma (KG1C) cell lines was one or two orders of magnitude higher than that of hydrogen peroxide and cisplatin-sensitive human leukemic cell line (HL-60, ML-1), which showed higher sensitivity to hydrogen peroxide and cisplatin. Both hydrogen peroxide and cisplatin induced internucleosomal DNA cleavage in human leukemic cell lines, but not in glioblastoma and glioma cell lines. However, both hydrogen peroxide and cisplatin produced apoptotic cells, characterized by cell shrinkage, nuclear fragmentation and chromatin condensation in glioblastoma and glioma cell lines. Pretreatment of these cell lines with L-buthionine-[S,R]-sulfoximine, which significantly reduced the intracellular GSH concentration, increased their sensitivity against hydrogen peroxide and cisplatin, whereas pretreatment with N-acetyl-L-cysteine, which did not significantly change the intracellular GSH concentration, only marginally protected the cells from the cytotoxic effect of hydrogen peroxide and cisplatin. The results suggest that drug sensitivity of tumor cells can be modified by glutathione-modulating compounds.

【はじめに】

抗ガン剤や放射線の抗腫瘍作用にはフリーラジカルの有する強い細胞傷害活性が利用されており、その耐性にはラジカルや過酸化物の消去効果およびDNA修復作用を有するグルタチオン(glutathione, 以下GSH)が関与するといわれています。

今回、我々は活性酸素種である過酸化水素

(hydrogen peroxide, 以下 H_2O_2)と、同様にフリーラジカルの発生やDNAの架橋形成により抗腫瘍効果を発揮するプラチナ製剤(シスプラチン)の glioma 細胞株における細胞傷害活性が、いわゆる apoptosis の形態をとるかをまず検証し、次に細胞内GSHレベルを人為的に増減させた条件で、その細胞傷害活性と細胞内GSH量との関係を検索したので報告する。

【方法】

1. 細胞株

human glioblastoma cell line(T98G, U87MG), human glioma cell line(KG1C), human leukemic cell line (HL-60, ML-1)を 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 mg/ml 含 RPMI 1640 培地、37°C、5% CO₂ 開放系、静置培養条件下にてインキュベーションした。

2. 細胞死の形態

Chamber Slide 上で発育させた培養細胞に、H₂O₂またはシスプラチンを添加して24時間のインキュベーション後に位相差式顕微鏡にて観察した。

さらに、4% paraformaldehyde で固定し May-Grunwald-Giemsa 染色を行い形態的变化を観察した。

処置細胞に対して1.8%アガロースゲル電気泳動によるDNA fragmentation assay 施行し、apoptosis の生化学的指標であるDNAのladder pattern の有無を判定をした。

3. 細胞傷害活性

各培養細胞を 96 well plate (n=3)に散布し、L-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO)を0~10mM、N-acetyl-L-cysteine (NAC)を0~30mMの終濃度で添加、24時間インキュベーションした。

さらに、H₂O₂を0~3mM、シスプラチンを0~1000mMの終濃度でそれぞれBSO、NACと組み合わ

せて培養液中に添加した後、24 時間インキュベーションを行い50% cytotoxic concentration (CC50) を 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法による 590 nm 吸光度より算出した。

4. 細胞内GSH定量

細胞中のGSHを、近藤の方法にしたがい、5%トリクロロ酢酸 (TCA) により抽出し、エーテル洗浄後、DTNB-glutathione reductase recycling method により定量し、TCA抽出残渣中のDNA量 (DAPI 法)で割り、細胞10⁶個あたりの量に換算した。

【結果】

1. 細胞死の形態

位相差顕微鏡像において、H₂O₂およびシスプラチンの両者で、すべての処置後細胞株において apoptosis に特徴的とされる細胞容積の縮小および apoptotic body 産生が認められ、また、May-Grunwald-Giemsa 染色では細胞容積の縮小とともにクロマチンの凝集も観察された(Fig.1)。

しかし、処置後のシャーレ上の付着性細胞と、死細胞に富むと考えられる培養液中の浮遊細胞を、それぞれ別個に採取しDNA fragmentation assayを施行したところ、付着および浮遊細胞のいずれにおいても apoptosis の生化学的指標とされるDNA ladderは認められなかった(Fig.2)。

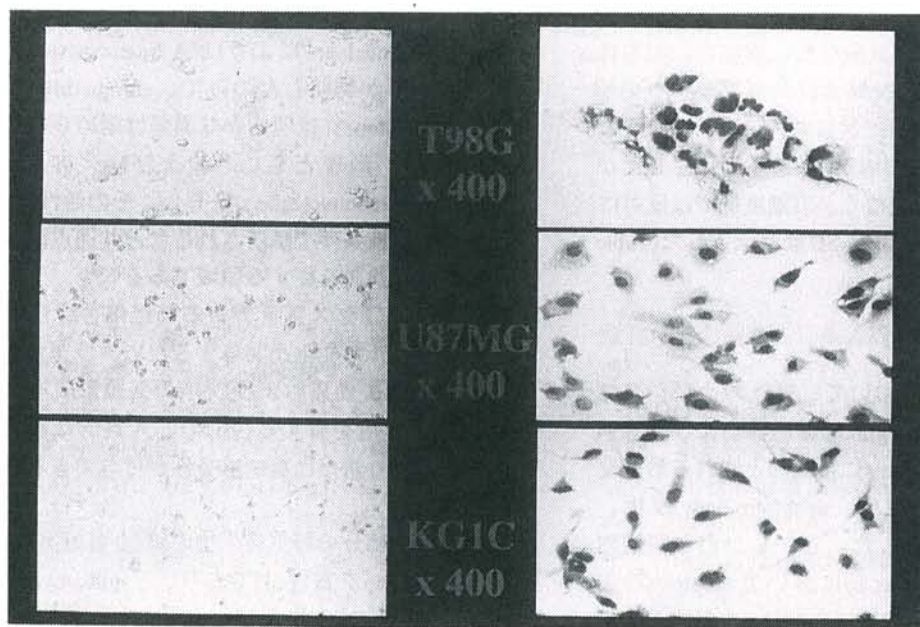


Figure 1 : Morphological changes induced by cisplatin. Cisplatin induced morphological changes such as production of apoptotic body, cell shrinkage, nuclear fragmentation and chromatin condensation in T98G(upper column), U87MG (middle column), KG1C (lower column), righth side(phase-contrast microscope), left side(May-Grunwald-Giemsa stain).

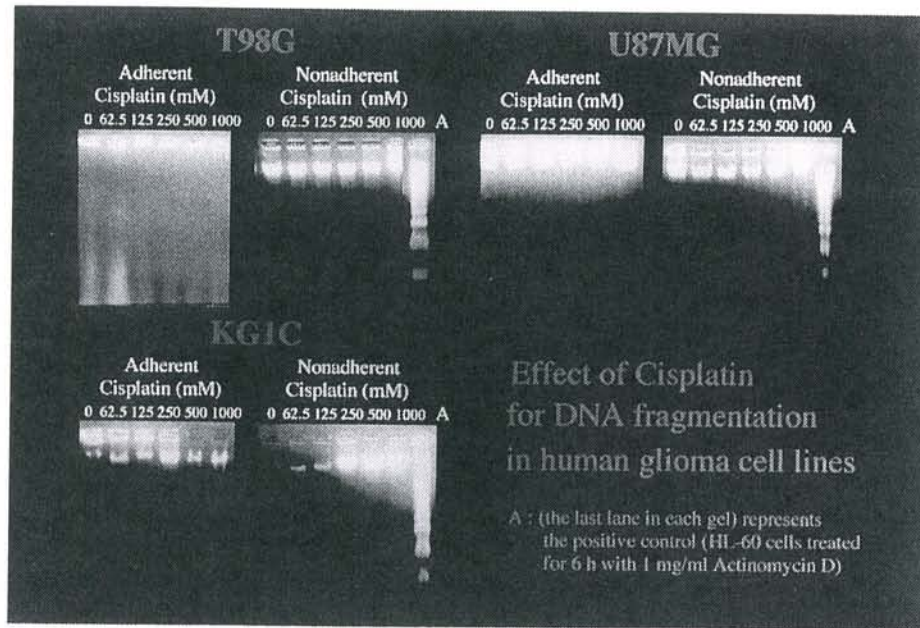


Figure 2 : Effect of cisplatin for DNA fragmentation in glioma cell lines. Cisplatin did not induce internucleosomal DNA fragmentation (so-called DNA ladder), a biochemical hallmark of apoptosis, in glioblastoma and glioma cell lines, but induced morphological changes such as production of apoptotic body, cell shrinkage, nuclear fragmentation and chromatin condensation(Fig. 1).

2. 細胞傷害活性と細胞内GSHレベルの相互関係

未処理control細胞の10⁶個あたりの細胞内GSH量はT98G(482 μg)、U87MG(47 μg)、KG1C(22 μg)であり、Table には示さないがH₂O₂およびシスプラチンに対して感受性の高いHL-60(1.4 μg)、ML-1(2.9 μg)に対し8~344倍の高値を示した。

BSO(0.1~10 mM)は濃度依存性に細胞内GSHをほぼ完全に枯渇させ、H₂O₂およびシスプラチンの感受性を亢進させた。これに対して、比較的低濃度のNAC(1~3 mM)は、細胞内GSHを若干増加させたがその保護作用は明らかでなく、高濃度側では反対にその細胞毒性により細胞内GSH量は低下した(Table 1,2)。

【考察】

位相差式顕微鏡像において、H₂O₂およびシスプラチンの両者が3種類のglioma細胞株および白血病細胞株のすべてにapoptosisに特徴的とされる形態変化である細胞容積の縮小、apoptotic body 産生、chromatinの凝集を誘導した。しかし、白血病細胞株がDNA fragmentation assayにおいてapoptosisの生化学的指標であるDNAのladder patternを呈するのに対して、glioma細胞株はnecrosisにおいて観察されやすいsmear patternすら呈すことなく、多量体のDNA fragmentationが誘導されており、白血病細胞株と

glioma細胞株間においてchromatin構造、endogenous endonuclease(s)に対する耐性等に異差が生じていると考えられた。

両細胞株間においてmicrococcal nucleaseおよびdeoxyribonuclease Iに起因するDNA fragmentationとhistone構造を比較検討したが、白血病細胞株がmicrococcal nucleaseによりDNA fragmentationを誘導しやすい事が判明したのみで、chromatinの構成要素であるhistoneには明らかな異差は認められなかった。また、両者ともCa²⁺およびMg²⁺非依存性endogenous endonuclease(s)を有し、その活性はpH3-5程度の強酸性条件で賦活されるなど共通点は多く、今後、研究検討を要する領域である^{1),2)}。

H₂O₂およびシスプラチンの細胞傷害活性にはフリーラジカルの発生が関与するため、ラジカルや過酸化物の消去効果およびDNAの架橋形成を阻害しDNA修復作用を有するGSHの、人為的な細胞内濃度操作により新たに薬剤感受性が付与できると考えられる。

GSHは大部分の好気性生物の細胞内に存在する主要な非タンパク質性SHであり、γ-glutamyl cysteine synthetase(γ-GCS)およびglutathione synthetaseの2酵素の作用によりグルタミン酸、システイン、グリシンより合成される。本実験に使用したBSOはGSH生成の律速酵素であるγ-GCSを抑制することで細

Table 1 Effect of pretreatment with BSO or NAC on the intracellular glutathione level (per 10⁶ cells) and cytotoxicity of H₂O₂.

Compounds	T98G		U87MG		KG1C		
	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	
BSO	0 (mM)	482.1	>3000	47.4	1344	22.2	>3000
	0.001	314.3	>3000	24.3	1271	11.1	>3000
	0.01	71.1	2134	3.7	1822	0.1	1110
	0.1	6.7	1571	3.1	172	0	126
	1	0	2383	2.7	207	0	149
	10	0	246	1.6	54	0	62
NAC	0 (mM)	482.1	>3000	47.4	1344	22.2	>3000
	0.3	396.5	>3000	32.3	>3000	22.8	>3000
	1	500.9	>3000	34.8	>3000	16.1	>3000
	3	302.7	>3000	44.6	>3000	16.9	>3000
	10	143.6	>3000	31.4	>3000	15.2	>3000
	30	0	Dead	2.9	Dead	0.3	Dead

Table 2 Effect of pretreatment with BSO or NAC on the intracellular glutathione level (per 10⁶ cells) and cytotoxicity of Cisplatin.

Compounds	T98G		U87MG		KG1C		
	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	GSH (μg)	CC ₅₀ (mM)	
BSO	0 (mM)	482.1	>1000	47.4	>1000	22.2	>1000
	0.001	314.3	>1000	24.3	>1000	11.1	>1000
	0.01	71.1	950	3.7	>1000	0.1	>1000
	0.1	6.7	75	3.1	12	0	185
	1	0	55	2.7	5	0	45
	10	0	12	1.6	3	0	20
NAC	0 (mM)	482.1	>1000	47.4	>1000	22.2	>1000
	0.3	396.5	>1000	32.3	>1000	22.8	>1000
	1	500.9	>1000	34.8	>1000	16.1	>1000
	3	302.7	>1000	44.6	>1000	16.9	>1000
	10	143.6	>1000	31.4	>1000	15.2	>1000
	30	0	Dead	2.9	Dead	0.3	Dead

胞内GSHレベルを低下させる。また、NACはGSHの構成要素であるシステインを供給することで細胞内GSHレベルを上昇させるとされている。

未処理control細胞の10⁶個あたりの細胞内GSH量はT98G(482 μg)、U87MG(47 μg)、KG1C(22 μg)であり、Tableには示さないが、H₂O₂およびシスプラチンに対して感受性の高いHL-60(1.4 μg)、ML-1(2.9 μg)に対し8~344倍の高値を示した。高いGlioma細胞内GSHレベルは、フリーラジカルを初めとして、アルキル化剤、白金製剤耐性に深く関与していると考えられ、また、前述した細胞死の形態的

変化にも影響している可能性は否定できないと考える³⁾。

BSOは濃度依存性に細胞内GSHをほぼ完全に枯渇させ、薬剤感受性を飛躍的に亢進させた。これに対して、比較的低濃度のNACは、細胞内GSHレベルを若干増加させたが、高濃度側ではpH低下に起因すると考えられる細胞毒性が優位に働いたためか、逆に細胞内GSHレベルを低下させた。以上の結果から、本実験によりglioma細胞の細胞内GSHレベルを人為的に操作することでプラチナ製剤の抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆された。

欧米においては婦人科および血液内科領域の悪性腫瘍を中心に、すでにBSOの臨床投与の報告^{4),5)}があり、抗腫瘍効果の増強が認められ、副作用も軽度の骨髄抑制が出現した程度であることから、今後、脳神経外科領域にもその使用が拡大される可能性がある。

【結語】

- 1) H₂O₂およびシスプラチンは、3種類のglioma細胞株(T98G, U87MG, KG1C)にapoptosisに特徴的とされる形態変化を誘導したが、apoptosisの生化学的指標であるDNA ladderを伴わなかった。
- 2) Control glioma細胞株の細胞内GSH量は、H₂O₂およびシスプラチンに高感受性を示す白血病細胞株の8-334倍高値を示した。
- 3) BSOは濃度依存的に細胞内GSHを枯渇させ、H₂O₂およびシスプラチンの細胞傷害活性を増強させたが、NACの保護作用は不規則だった。
- 4) 以上から、人為的にglioma細胞の細胞内GSH濃度を減少させることで、シスプラチンの抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆され、今後 in vivo における検討を要すると考えた。

本研究は平成8年度科学研究費の補助を受けた。
シスプラチンは日本化薬から供給された。

【文献】

- 1) Fujiki Yanagisawa-Shiota, Hiroshi Sakagami, Nobuyuki Kuribayashi, Masataka Iida, Tadashi Sakagami and Minoru Takeda.: Endonuclease activity and induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines. *Anticancer Res* 15 : 259-266, 1995.
- 2) Nobuyuki Kuribayashi, Hiroshi Sakagami, Masataka Iida and Minoru Takeda.: Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leukemic cell lines. *Anticancer Res* 16 : 1225-1230, 1996.
- 3) Masataka Iida, Shigeki Sunaga, Nobuo Hirota, Nobuyuki Kuribayashi, Hiroshi Sakagami, Minoru Takeda and Kiyoshi Matsumoto. : Effect of glutathione-modulating compounds on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human glioblastoma and glioma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 123 : 619-622, 1997.
- 4) Siemann, D.W. and Beyers, K.L.: In vivo therapeutic potential of combination thiol depletion and alkylating chemotherapy. *Br. J. Cancer* 68 : 1071-1079, 1993.
- 5) O'Dwyer, P.J., Hamilton, T.C., and Young, R.C. et al.: Deletion of glutathione in normal and malignant human cells in vivo by buthionine sulfoximine : clinical and biochemical results. *J. National Cancer Institute*, 84 : 264-267, 1992.

Etoposide, mAMSA 耐性細胞におけるATP binding cassette superfamily (MDR-1, MRP, C-MOAT)mRNAの発現様式

Expression of ATP binding cassette superfamily (MDR-1, MRP, C-MOAT) mRNA in etoposide and m-AMSA resistant cell lines

香川医科大学 脳神経外科

松本義人、森崎訓明、国塩勝三、本間 温、長尾省吾

【要旨】

癌化学療法を行う上での多剤耐性の原因遺伝子としてエネルギー依存性排出ポンプであるmultidrug resistance-1(MDR-1)、multidrug resistance-associated protein(MRP)が注目されているが、最近、類似のhuman canalicular multispecific organ anion transporter(C-MOAT)が単離された。今回、DNAトポイソメラーゼII阻害剤であるetoposideとm-AMSAを用い66種類の耐性株を樹立し、それらのMDR-1、MRP、C-MOATをmRNA量で測定した。MDR-1はすべての細胞株で、陰性であった。MRPは48.5%(32/66)の細胞株でC-MOATは39.4%(26/66)の細胞株で陽性であった。次に機能の未知なC-MOATを解析するためにMRP陰性、C-MOAT陽性であるZR-m8、ZR-m9、T47D-m19細胞でetoposideの細胞内蓄積量の測定を行った。それぞれの親株と比較して78.6±8.1%、64.5±8.4%、56.3±7.8%までetoposideの細胞内蓄積量が減少していた。以上よりDNAトポイソメラーゼII阻害剤耐性においてエネルギー依存性排出ポンプであるMRP、C-MOATが高率に発現し、耐性を獲得していることが確認された。

【はじめに】

抗癌剤に対する耐性は癌化学療法を行う上で大きな障害となっている。多くの薬剤に同時に耐性となる多剤耐性の原因遺伝子としてmultidrug resistance-1(MDR-1)遺伝子、multidrug resistance-associated protein(MRP)遺伝子が単離解析されたが⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾、最近、類似のhuman canalicular multispecific organ anion transporter(C-MOAT)遺伝子が単離された⁽⁴⁾。これらは薬剤耐性におけるエネルギー依存性排出ポンプである。今回、DNAトポイソメラーゼII(トポII)阻害剤であるetoposideとm-AMSAを用い、66種類の耐性株を樹立し、それらのMDR-1、MRP、C-MOATをmRNA量で測定したので報告する。

【対象・方法】

1 細胞と培地

ヒト由来の癌細胞であるZR-75B、MDA-MB-231、T47D、MCF-7を50unit/ml Penicillin G、50

unit/ml Streptomycin、10%牛胎仔血清を添加したIMEM培養液中にて継代培養した。

2 etoposide・mAMSA耐性株の樹立

それぞれの細胞をtable 1に示す低濃度etoposideあるいはmAMSAの存在下、3か月間培養した。そして、それぞれをクローニングし、低濃度耐性株とした[ZR-75B(13株)、MDA-MB231(11株)、T47D(12株)、MCF7(14株)]。さらにその一部にはtable 1の高濃度etoposideあるいはm-AMSAの存在下で2か月間培養を続け高濃度耐性株を樹立した。

3 ノーザンブロッティング

total RNAの抽出はグアニジン超遠心法を用いて行った。total RNA 10μgを1%ゲル上で電気泳動し、ナイロンフィルターにトランスファーした。プローブ用のMRPとC-MOATのcDNAはtable 2に示したプライマーを用いRT-PCRにて作成し、MDR-1のcDNAはFojo博士(National Cancer Institute of NIH)より供与されたものを使用した。プローブの³²Pラベルはランダムプライミング法を用いた(Amersham、rediprime Kit)。³²Pラベルしたプローブは同一のナイ

Table 1 Drug Concentrations for Selection of Resistant Cells

	1st selection with etoposide*	2nd selection with etoposide*	1st selection with mAMSA*	2nd selection with mAMSA*
ZR-75B	300	900	30	90
MDA-231MB	500 or 1000	1500 or 3000	100	250
T47D	300	900	50	150
MCF-7	500	1500	50	150

* ng/ml

Table 2 Primer sequences

Gene	5' primer	3' primer
MRP	251AATGTCACGTGGAATACCAGC271	965AACAGGCACGACTTGTTC947
C-MOAT	2986TGAAGTCTCCATCTACCTG3005	3867CCAGCCAGTTCAGGGTTTGT3748

ロンフィルターにハイブリダイゼーションさせ、目的のmRNAを同定検出した。それぞれのmRNAの定量はデントメトリーにて数値化した。

4 ³H-etoposide細胞内蓄積量の測定

細胞 3.5×10^5 個を6-well dishに播き翌日、 $2.6 \mu\text{M}$ の³H-etoposideを加え37°Cでインキュベートした(5分、15分、45分)。その後、氷冷PBSにて3回洗浄し、2mlの0.05%SDSを加えた。それを8mlのシンチゾール液に混合し放射活性を測定した。

【結果】

Fig.1にノーザンプロテイングの結果を示す。デントメトリーによる定量は、MRP、C-MOATともに最も強く陽性にてたZR-VP13(900)の値を100(%)ととし、その他の細胞の結果を%表示した(table 3)。

MRPは28.9%(19/66)の細胞で強陽性(31%以上)、19.7%(13/66)の細胞で弱陽性(11~30%)であった。とくにZR-75B、MDA-MB231で陽性細胞株が多かった。親株はすべて陰性であった。

C-MOATは18.2%(12/66)の細胞で強陽性(31%以上)、21.2%(14/66)で弱陽性(11~30)であった。ZR-75Bで陽性細胞株が多く、発現の傾向がMRPと酷似していた。プローブがMRPのC-MOATとホモロジーをもつ部分へハイブリダイゼーションしていることが考えられたためRNase protection assayを行った。完全にハイブリダイゼーションしていなければ陽性にならないRNase protection assayにおいても

ノーザンプロテイングと同様の結果が得られC-MOATプローブのMRPへのハイブリダイゼーションは否定された(図略)。

[³H]-etoposideの細胞内蓄積量測定は、機能の未知なC-MOATを解析するためMRP陰性、C-MOAT陽性であるZR-m8、ZR-m9、T47D-m19細胞で行った。親株と比較して3耐性細胞株においてそれぞれ73±8.1%、64.5±8.4%、53.6±7.8%まで³H-etoposideの細胞内蓄積量は減少していた。(Fig.2)

【考察】

MDR-1、MRP、C-MOAT遺伝子は、それぞれ1986年、1992年、1996年に報告されたATP binding cassetteトランスポーター・スーパーファミリーに属する遺伝子である。前2者は抗癌剤耐性におけるエネルギー依存性排出ポンプであることが証明され、その重要性は認識されている¹⁾²⁾³⁾。C-MOATについてはシスプラチン耐性に関与することが指摘されているが未だ不明な点が多い⁵⁾。我々の樹立した66種類の耐性株においてMDR-1はすべての細胞株で陰性、MRPは弱陽性も含めると48.5%の細胞株で陽性であった。特にetoposide耐性細胞においてMRPが64.7%(22/34)で陽性であり、etoposide耐性においてMRPの重要性が再認識された。m-AMSA耐性へのMRPの関与は我々の検索した限りでは報告はない。しかし、今回の検討では、m-AMSA耐性細胞の31.3%(10/32)がMRP陽性であり、MRPのm-AMSA耐性への関与が示唆された。

Table 3 Quantitative Analysis of MRP and C-MOAT Expression

cell lines	MRP ¹⁾	C-MOAT ²⁾	cell lines	MRP ¹⁾	C-MOAT ²⁾
ZR-75B	3.3	6.8	MDA-MB-231	8.4	2.1
ZR-VP2(300)	24.6	48.6	MDA-VP4(500)	41.6	3.1
ZR-VP3(300)	42.6	90.6	MDA-VP7(500)	52.6	3.1
ZR-VP11(300)	17.4	59.6	MDA-VP11(500)	7.4	2.6
ZR-VP13(300)	18.7	58.4	MDA-VP12(500)	44.3	10.5
ZR-VP16(300)	74.3	96.7	MDA-VP13(500)	5.6	7.1
ZR-VP20(300)	97.0	98.6	MDA-VP7(1000)	24.6	11.6
ZR-m1(30)	8.4	21.6	MDA-m4(100)	49.8	5.1
ZR-m3(30)	7.6	4.6	MDA-m5(100)	66.6	3.1
ZR-m4(30)	8.1	30.6	MDA-m6(100)	50.0	2.6
ZR-m6(30)	8.4	5.3	MDA-m14(100)	55.7	9.6
ZR-m7(30)	9.6	29.6	MDA-m15(100)	42.6	10.3
ZR-m8(30)	7.9	33.1	MDA-VP7(3000)	62.2	7.3
ZR-m9(30)	8.8	52.6	MDA-VP13(1500)	6.8	1.6
ZR-VP11(900)	34.6	57.6	MDA-m4(250)	43.6	2.3
ZR-VP13(900)	100	100	MDA-m14(250)	57.2	7.6
ZR-m1(90)	3.1	27.3	MCF-7	5.1	1.6
ZR-m4(90)	2.3	5.6	MCF-VP3(500)	6.3	2.0
T47D	7.6	5.7	MCF-VP6(500)	24.1	1.3
T47D-VP1(300)	7.5	6.3	MCF-VP7(500)	11.3	3.1
T47D-VP4(300)	8.7	26.6	MCF-VP8(500)	12.6	2.2
T47D-VP5(300)	21.3	5.6	MCF-VP10(500)	13.6	2.1
T47D-VP7(300)	6.6	18.9	MCF-VP13(500)	7.3	2.6
T47D-VP10(300)	6.4	17.8	MCF-VP15(500)	6.1	3.3
T47D-VP15(300)	5.1	10.3	MCF-VP17(500)	6.8	2.7
T47D-m2(50)	4.6	17.6	MCF-m1(50)	7.1	2.3
T47D-m6(50)	8.1	7.8	MCF-m2(50)	5.3	3.9
T47D-m7(50)	8.5	18.6	MCF-m4(50)	6.7	3.6
T47D-m9(50)	9.6	6.7	MCF-m6(50)	7.3	3.1
T47D-m15(50)	8.2	23.6	MCF-m10(50)	7.5	2.1
T47D-m19(50)	7.6	47.6	MCF-m11(50)	9.8	12.3
T47D-VP7(900)	10.6	3.3	MCF-VP6(1500)	43.1	1.1
T47D-VP10(900)	33.6	2.1	MCF-VP17(1500)	63.5	1.3
T47D-m6(150)	17.6	6.7	MCF-m1(150)	9.6	1.6
T47D-m7(150)	16.3	3.6	MCF-m2(150)	10.3	2.1

1) The value is defined as the ratio of the number of sublines to the number of ZR-VP13(900) which has the most expression of MRP of all resistant cell lines.

2) The value is defined as the ratio of the number of sublines to the number of ZR-VP13(900) which has the most expression of C-MOAT of all resistant cell lines.

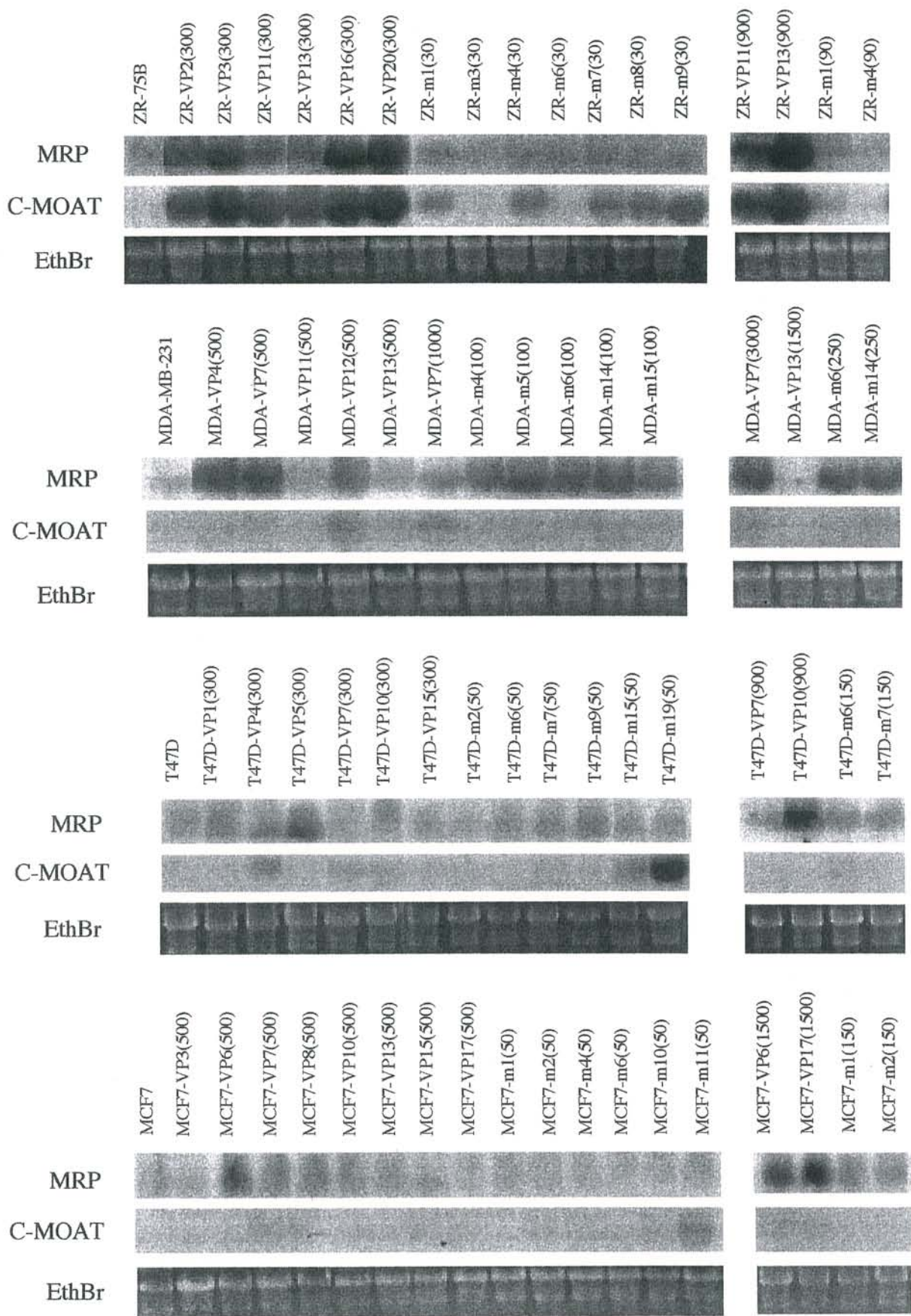


Fig. 1 Northern blot analysis of MRP and C-MOAT expression in etoposide (VP) and m-AMSA(m) resistant cell lines. Lower panel: Ethidium bromide stained RNA prior to transfer.

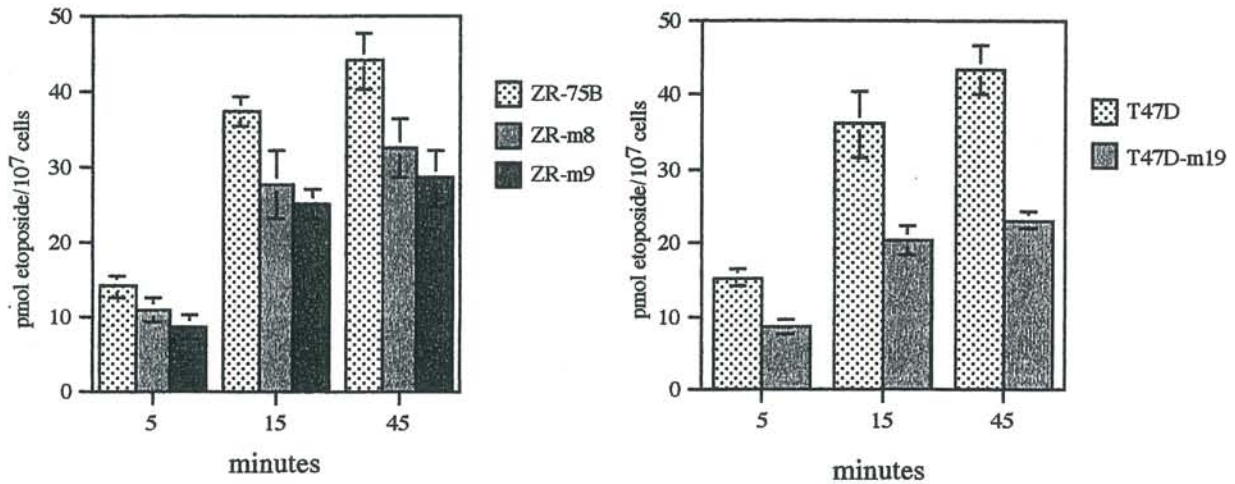


Fig. 2 Etoposide accumulation over a 45 minute period in parental cells and the drug resistant sublines.

C-MOATは耐性株の39.4%(26/66)で陽性であった。薬剤別では etoposide 耐性細胞の 41.2%(14/34)、m-AMSA耐性細胞の37.5%(12/32)で陽性で両者に大きな違いは認められなかった。MRPが陰性でC-MOATのみ発現している細胞での etoposideの蓄積量が減少しておりC-MOATの etoposide、m-AMSA耐性への関与が示唆された。

etoposide、m-AMSAを含むトポII阻害剤の耐性機構には、MRPによる薬剤の細胞内蓄積の減少以外にトポII量の減少や変異などが指摘されてきたが⁶⁾⁷⁾⁸⁾。今回、新たにC-MOATが etoposide、mAMSAの耐性に関与していることが明らかにされた。今後、多剤耐性を考える上でC-MOATの関与も考慮しなければならない。

【文献】

- 1) Fojo, T., Ueda, K., Slamon, D.G. et al: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc.Natl.Acad.Sci. 84:265-269, 1987
- 2) Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H. et al: Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 258 : 1650-1654, 1992.
- 3) Lorico, A., Rappa, G., Srimatkkandada, S. et al: Increased rate of adenosine triphosphate-dependent etoposide(VP-16) efflux in a murine leukemia cell line overexpression the multidrug resistance-associated protein(MRP) gene. Cance Res. 55: 4352-4360, 1995.
- 4) Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J.R. et al: Congenital Jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. Science. 271:1126-1128, 1996.

- 5) Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K. et al: A human canalicular multispecific organic anion transporter (C-MOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. Cancer Res. 56:4124-4129, 1996.
- 6) Bugg, B. Y., Danks, M.K., Beck, W.K. et al: Expression of mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM human leukemic cells selected for resistance to teniposide. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7654-7658, 1991.
- 7) Hinds, M., Deisseroth, K., Mayes, J. et al: Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an amsacrine-resistant form of topoisomerase II. Cancer Res. 51: 4729-4731, 1991.
- 8) Lee, M.S., Wang, J.C., Beran, M.: Two independent amsacrine-resistant human myeloid leukemia cell lines share an identical point mutation in the 170KDa form of human topoisomerase II. J.Mol.Biol.223: 837-843, 1992.

神経膠腫におけるMDR-1遺伝子の発現とMIBI SPET

Expression of MDR-1 gene and MIBI SPET on glioma patients.

宮崎医科大学脳神経外科、都城市郡医師会病院脳神経外科*

横上聖貴、河野寛一*、森山拓造、上原久生、脇坂信一郎、有川章治*

【はじめに】

神経膠腫に対する化学療法では腫瘍の持つ薬剤耐性が治療上重要な要因となる。薬剤耐性因子の中で多剤耐性因子としてP-glycoprotein (Pgp)がある。Pgpは多剤耐性遺伝子MDR-1の発現蛋白で、腫瘍細胞や血管内皮の膜上に発現し、薬剤の排出に関与している³⁾。このPgpの発現を画像診断出来るかどうかその可能性について以下の2種類の核種を用いて検討した。

Technetium-99m sestamibi (MIBI)はいくつかの腫瘍で代謝活性のある細胞に受動的に取り込まれ、Pgpの関与で排出されることが報告されている⁸⁾。また

Thallium (TI)はMIBIと異なり、energy-dependent active transportにより細胞内外を移動する⁴⁾。そこでこの両者のトレーサーのinitial distribution, uptake, retentionを比較検討し、神経膠腫のPgpの発現を術前に画像診断できるかどうか検討した。

【対象と方法】

1996年から1997年間に宮崎医科大学で手術治療を受けた19症例(男15、女4人、30-82才、平均55.1才)を対象とした。組織学的にはglioblastoma (GB)が11例、anaplastic astrocytoma (AAs)が4例、low grade astrocytoma (LGAs)が2例、転移性腫瘍2例で

Table 1 Clinical, SPET, molecular biological and immunohistochemical data of 19 patients

No	Age/sex	diagnosis	TI SPET			MIBI SPET			RT-PCR	Northern blotting	Immuno-histochemistry
			E-UP	D-UI	RI	E-UP	D-UI	RI			
- Pre-therapeutic -											
1	42 / F	GB	2.50	2.43	0.97	4.62	3.43	0.74	+	ND	+
2	48 / F	GB	2.75	3.59	1.30	6.83	4.94	0.72	+	ND	+
3	46 / M	GB	4.17	5.20	1.25	10.25	6.67	0.65	+	ND	+
4	69 / M	GB	1.69	2.96	1.76	2.46	2.24	0.98	+	ND	+
5	56 / M	GB	4.00	3.00	0.75	13.00	12.00	0.92	+	ND	+
6	43 / M	GB	5.61	5.21	1.07	5.71	5.35	0.94	+	ND	+
7	55 / M	GB	2.43	4.17	1.72	3.33	7.50	2.25	+	ND	+
8	61 / M	GB	5.00	2.63	0.53	5.94	4.78	0.80	+	ND	+
9	72 / M	GB	5.81	5.41	1.07	5.62	5.55	0.98	+	ND	+
10	69 / M	GB	2.50	2.08	0.83	2.50	2.63	1.05	+	ND	+
11	82 / F	AA	2.29	2.05	0.90	5.06	5.00	0.99	+	ND	++
12	32 / M	AA	2.89	2.17	0.75	3.50	5.25	1.50	+	ND	++
13	39 / F	LGAS	1.05	1.13	1.08	1.03	0.98	0.95	+	ND	++
14	51 / F	LGAS	0.98	1.15	1.17	8.60	0.98	0.88	+	ND	++
15	77 / M	Meta	3.50	2.67	0.76	8.60	4.00	0.47	+	ND	+++
16	55 / M	Meta	2.39	2.46	1.03	6.44	3.00	0.47	+	ND	+++
- follow-up -											
3	46 / M	GB	2.90	3.30	1.10	2.80	3.50	1.30			
17	65 / M	GB	1.15	1.03	0.90	1.03	0.99	0.96			
18	32 / M	AA	0.98	1.02	1.04	1.12	1.03	0.92			
19	55 / M	AA-GB	5.14	4.25	0.83	3.74	5.80	1.55			

E-UP; early uptake index, D-UI; delayed uptake index
RI; retention index, GB; glioblastoma, AA; anaplastic
Astrocytoma, LGAS; low grade astrocytoma.
Meta; metastatic brain tumor, ND; not detected

あった。術前に single-photon emission tomography (SPET)やMRIは16例に行い、4例は経過観察中に行った。

SPETはまず最初に111 MBqのタリウム201(²⁰¹Tl)投与後20分の像を早期像(early image)、3時間後の像を後期像(delayed image)とした。次に間を3日間あけてMIBIを用いた検査を同様な手順で行った。RIは600 MBqの^{99m}Tc-MIBIを投与し、TI同様20分、3時間の像を撮影した。パラメーターとしてuptake index on the early image (early UI)、uptake index on the delayed image (delayed UI)、及び排出の程度を示すためにretention index (RI)を算出して用いた。

病理学的及び分子生物学的検討

病理標本及びRT-PCR, Northern blotting用の標本は手術時に採取し、ホルマリン固定及び液体窒素で即時に冷却し保存した。

MDR-1のプライマーの設計はMDR-1 codon 70-776をカバーする領域で作成した¹⁾。コントロールとしてG3PDH (codon 70-369)を用いた。RT-PCR、Northern blottingは既定の方法で行った。組織標本はH.E染色に加え、免疫染色も行った。Pgpの免疫染色はLAB-SA法を用いた。抗体はZymedから購入した。

【結果】

TI, MIBIともにGd-MRIの陽性の部位に取り込まれ、enhanceされない部位には取り込まれなかった。

MIBIは悪性の神経膠腫にはよく取り込まれ、retentionも高かった。MIBIのwashoutは転移性腫瘍の方が高かった。治療後にMIBI検査した4症例中、1例に高いuptakeがみられ、この症例は腫瘍の増大が続き再手術を要した(Table 1)。

組織悪性度との検討ではuptakeはTI, MIBIともに良性と悪性の神経膠腫では差が著明で、悪性神経膠腫の方がuptakeが高かった。MIBIではearly uptakeが、TIではdelayed uptakeが悪性度に比例する傾向にあった。Retention index(RI)は転移性腫瘍に低く、特にMIBIでは有意に低くみられた(Table 2)。

RT-PCRでは全症例でMDR-1 geneの発現を認められた。Northern blottingによるMDR-1のm-RNAの定量はできなかった。免疫染色ではLGAsや周囲の正常脳の血管内皮細胞に染色性が得られた。GBの腫瘍細胞は染色されなかった。一方転移性腫瘍では腫瘍細胞自体にPgpの染色性が見られた。

【考察】

投与されたRIのトレーサーは脳血流などの種々の条件で分布するが、TI, MIBIは何れも同様に分布し、Gd-MRIで陽性の部位(脳血管閉門の破綻していると推測される部位)に良く取り込まれる^{6,11)}。TI, MIBI何れも腫瘍細胞の浸潤などの分布を推測するという意味ではGd-MRI以上の所見を示すものではない。しかし、神経膠細胞はPgpを発現していない点から、MIBIのクリアランスを測定することで、

Table 2 Uptake and retention index on SPET

	Early UI	Delayed UI	RI
MIBI SPET			
Glioma			
GB	5.71 ± 3.47	5.31 ± 3.15	1.01 ± 0.60
AA	4.10 ± 0.84	5.35 ± 0.41	1.34 ± 0.31
LGAS	1.08 ± 0.06	0.98 ± 0.00	0.92 ± 0.05
metastatic tumor	7.52 ± 1.52	3.50 ± 0.71	0.47 ± 0.01
TI SPET			
Glioma			
GB	2.87 ± 1.14	2.99 ± 1.07	1.12 ± 0.40
AA	3.44 ± 1.50	2.82 ± 1.24	0.82 ± 0.07
LGAS	1.02 ± 0.04	1.14 ± 0.01	1.13 ± 0.06
metastatic tumor	2.94 ± 0.79	2.56 ± 0.15	0.89 ± 0.19

GB; glioblastoma, AA; anaplastic astrocytoma, LGAS; low-grade astrocytoma
UI; uptake index, RI; retention index

腫瘍の再発か放射線壊死などの反応かという判別に有用である。

TI及びMIBIのuptakeとretentionは異なる。TIは所謂"active transport"で取り込まれるのに対し^{8,12)}、MIBIのuptakeはcytosolに結合して行われ¹⁰⁾、MIBIの脂溶性、細胞内ミトコンドリアなども輸送に関与する。そしてその排出にPgpが関与するとされる⁹⁾。Pgpはいくつかの腫瘍で過剰発現していることが報告されており、抗腫瘍剤に対する多剤耐性を生じ、腫瘍の化学療法上問題となる^{2,5)}。MIBIの集積遅延やクリアランスの向上はPgpを過剰発現している腫瘍の存在を示唆する。

神経膠腫症例でのRI所見と病理学的所見は良く相関した。Pgpの発現は悪性神経膠腫では減少し、一方MIBIは悪性度に比例して集積する所見が得られた。RT-PCRでは全例に陽性であったが、northern blottingではMDR-1定量が出来なかった。神経膠腫でMDR-1の発現率はこれまでの報告では3% - 33%と幅が見られる⁷⁾。RT-PCRは感度が高いために正常の血管内皮に発現したMDR-1をも示していると推測される。免疫染色の陽性細胞の分布はRIの所見に良く一致した。

この免疫染色所見およびMIBI SPETの所見からPgpの発現を推測することが出来、化学療法の種類や投与方法を検討する上で重要な情報を得られると思われる。

【文献】

- 1) Abe Y, Nakamura M, Ota E, et al. Expression of multidrug resistance gene (MDR-1) in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res.* 85: 536-541, 1994.
- 2) Bates SE, Shieh CY, Tsokos M. Expression of mdr-1 / P-glycoprotein in human neuroblastoma. *Am J Pathol* 139: 305-315, 1991.
- 3) Cordon CC, O'Brien JP, Casals D, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc natl Acad Sci USA* 86: 695-698, 1989.
- 4) Jinnouchi S, Hoshi H, Ohnishi T, et al. Thallium-201 SPET for predicting histological types of meningiomas. *J Nucl Med* 34: 2091-2094, 1993.
- 5) Kacinski BM, Yee LD, Carter D, et al. Human breast carcinoma cell levels of MDR-1 (P-glycoprotein) transcripts correlate in vivo inversely and reciprocally with tumours progesterone receptor content. *Cancer Commun* 1: 1-6, 1989.
- 6) Levin VA, Freeman DM, Landahl HD. Permeability characteristics of brain adjacent to tumours in rats. *Arch Neurol* 32:785-791, 1975.
- 7) Matsumoto T, Tani E, Kaba K et al. Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. *J Neurosurg* 72: 460-466, 1991.
- 8) O'Tuama LA, Treves ST, Larar JN, et al. Thallium-201 versus technetium-99m-MIBI SPET in evaluation of childhood brain tumours: a within-subject comparison. *J Nucl Med.* 34:1045-1051, 1993.
- 9) Scopinaro F, Schillaci O, Scarpini M, et al. Technetium-99m sestamibi: an indicator of breast cancer invasiveness. *Eur J Nucl Med* 21: 984-987, 1994.
- 10) Shih WJ, Kadzielawa K, Lee C, et al. Tc-99m sestamibi uptake by cerebellar metastasis from bronchogenic carcinoma. *Clin Nucl Med* 18: 887-890, 1993.
- 11) Stewart DJ. A critique of the role of the blood-brain barrier in the chemotherapy of human brain tumours. *J Neurooncol* 20:121-139, 1994
- 12) Ueda T, Kaji Y, Wakisaka S et al. Time sequential single photon emission computed tomography studies in brain tumor using thallium-201. *Eur J Nucl Med* 20: 138-145, 1993

グリオーマにおける薬剤耐性関連遺伝子発現の検討

Expression of the drug resistant related genes in glioma cells.

自治医科大学 脳神経外科

五味 玲、永井 睦、上野真二、橋本雅章、篠田宗次、増沢紀男

グリオーマの化学療法の効果を制限する因子として薬剤耐性は重要であり、治療方針を決定する際にその腫瘍の使用薬剤への耐性の有無がわかることは大きな意味がある。

今回我々が化学療法剤として使用しているACNUとvincristine、cisplatinについて、その耐性に関与しているとされる薬剤耐性関連遺伝子の発現をグリオーマ細胞株及び脳腫瘍手術標本において検討した。これまでのNorthern blotting法に加えRT-PCR法との比較も検討し、臨床応用の可能性をさらに考察した。

【材料と方法】

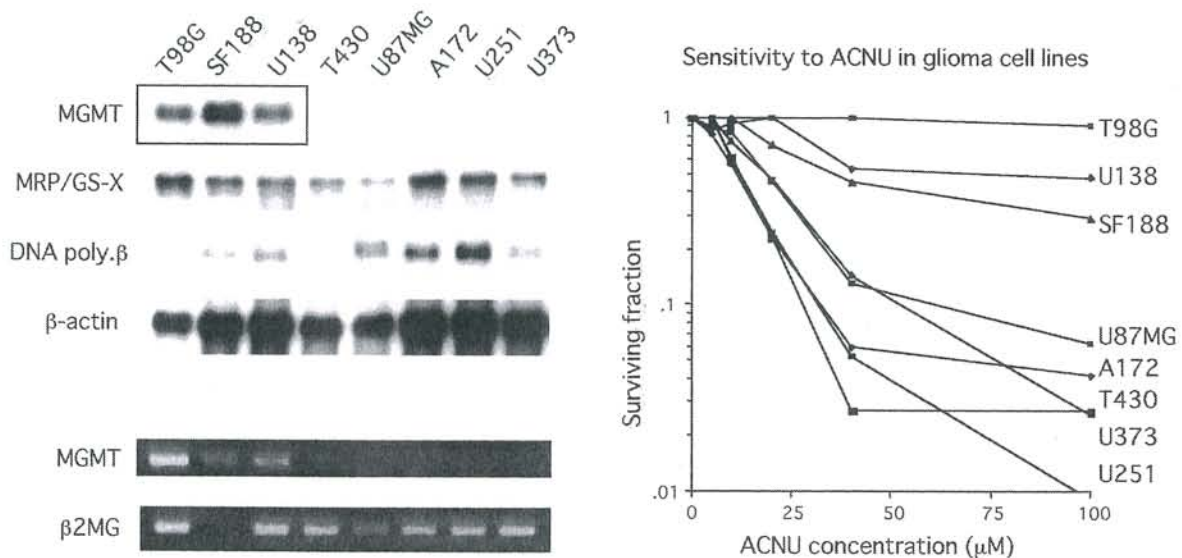
材料はグリオーマ細胞株8株と手術時得られたグリオーマ凍結標本17例である。

発現を検討した遺伝子はACNU耐性に関与するとされるMGMT遺伝子(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase)、vincristine等の耐性に関与すると

されるMDR1 (multidrug resistance 1) 遺伝子、cisplatinの耐性に関与するとされるMRP1(multidrug resistance associated protein 1)/GS-X遺伝子、DNA polymerase β 遺伝子、MT2A(metallothionein-2A)遺伝子である。我々の細胞株での実験でMRP1/GS-XとDNA polymerase β についてはACNU耐性にも関与することが考えられている。

方法は細胞株についてはNorthern blot法とPCR法により、腫瘍サンプルではNorthern blot法のみにて発現量を検討した。Northern blot法は各細胞株及び標本からAGPC法を用いtotal RNAを調整し20mgずつ1%アガロースゲル中で電気泳動し、nylon membraneにblotした後、³²Pで標識したMGMT、MDR1、DNA poly. β 、MRP/GS-X、MT2Aのプロブを用いhybridizationを行い、autoradiographyを施行した。internal controlとして β -actinを用いた。さらに発現量と臨床的な化学療法の効果との間に関連があるかどうか検討した。細胞株については

Fig. 1 細胞株における各種遺伝子発現とACNU耐性の比較



RT-PCR法も用いMGMT、MDR、MRPについて発現を検討した。primer設定は鳥取大学 田中先生より情報をいただいた。SuperscriptIIを用い1mgのRNAよりRTを行い、PCRは94°C30sec、55°C30sec、72°C1minを40サイクルで行った。internal controlとしてβ₂-microglobulinを用いた。

【結果及び考察】

Fig. 1に細胞株におけるACNU耐性と各種関連遺伝子発現をしめす。Surviving curveからはT98G、U138、SF188が他の5株に比べ明らかに耐性度が高い事がわかる。遺伝子発現と比較すると、MGMTはこの3株で明らかに高発現している(囲みの部分)。MGMT発現量がACNU耐性と非常によく相関することを示すと言える。また、RT-PCRでもこの3株のみでバンドを認めておりNorthern blottingの結果と一致した。バンドの濃さが発現量と相関しているわけではないため定量性に疑問はあるものの、ACNU耐性の検索に有用であると考えられる。一方、グリオーマ株にACNUを負荷して耐性を獲得させた細胞では発現の増加が見られていたMRP1/GS-XやDNA polymerase βは自然耐性の検索という点では必ずしも耐性度との相関は認められなかった。臨床例では、同一症例で化学療法を繰り返しているうちに徐々に発現量が増加してきて、獲得耐性に寄与するという種のものなのかもしれない。

Fig. 2はCDDPについて示す。Surviving curveからはT430、SF188、U373が他の5株に比べ明らかに耐性度が低い事がわかる。遺伝子発現では単一のものを示唆するものはないが、囲みで示すようにMT2A、MRP1/GS-Xのどちらも高発現していない場合が、この3株に相当する。CDDP耐性は多因子性ということは知られているが、今回の結果でもACNUと異なり、耐性に関連するとされる遺伝子が「高発現していれば耐性」という単純なものではない事がうかがえた。なお、RT-PCRはMRP1/GS-XについてはほぼNorthern blottingの結果と一致したようだが、MDR1は今回使用した株での発現がほとんどなく評価できなかった。

以上の細胞株での結果から、もっとも有用なのがACNU耐性の診断に対するMGMT発現量の検索であり、MT2AやMRP1/GS-Xの発現量の検討がこれを補助し、また他剤の耐性について示唆を与えると考えられた。

表1は腫瘍標本での結果の一覧を示す。たくさんの因子が関与しているため、またそれにしては症例数が少なく一定の傾向がわかりづらい。そこで、astrocytomaのgrade3、4について手術的にsubtotal以上切除され、radiationも行い化学療法も少なくとも1回以上のPVAを行った、症例3、4、5、9、12の5例を見てみよう。この中で唯一これらの治療が全く奏功せず全経過4ヶ月で死亡した症例3は、MGMT発

Fig. 2 細胞株における各種遺伝子発現とCDDP耐性の比較

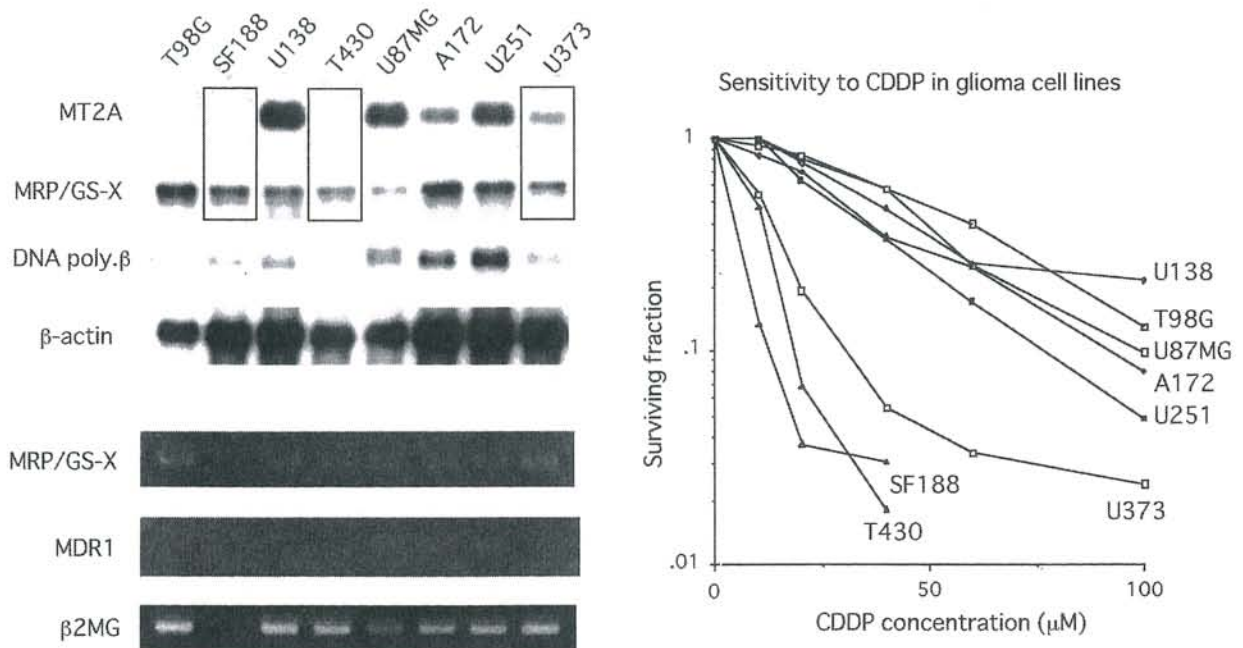


表1 腫瘍サンプルにおける各種遺伝子発現と治療効果の比較

No.	age	sex	diagnosis	Gr	ope.	rad. (Gy)	chemo.	TTP (Mo)	prog.	follow (Mo)	MGMT	MDR	MRP1	MT-2A	DNApoly β
1	29	M	astrocytoma	2	partial	55	-	-	alive	40	-	++	-	+/-	+
2	36	F	astrocytoma	2	biopsy	55	-	-	alive	13	+	-	-	+	+
3	1	M	astrocytoma	3	subtotal	40	PVA	3	dead	4	++	-	-	-	+
4	33	F	astrocytoma	3	subtotal	60	PVA	-	alive	46	-	++	+	-	+
5	34	M	astrocytoma R	3	subtotal	60	PVA	10	dead	11	-	-	-	+	+
6	39	M	astrocytoma R	3	partial	-	-	-	dead	1	-	-	-	++	+
7	73	F	astrocytoma	3	partial	60	-	?	alive	19	-	-	-	++	-
8	14	F	glioblastoma	4	subtotal	-	-	?	alive	5	-	++	-	+/-	+
9	50	F	glioblastoma	4	subtotal	60	PVA	23	dead	46	-	++	-	+	+
10	55	F	glioblastoma	4	partial	60	PVA	8	dead	16	-	-	-	-	++
11	64	M	glioblastoma	4	partial	-	-	-	dead	1	+	-	-	++	+
12	66	F	glioblastoma	4	subtotal	60	PVA	25	dead	31	-	+	-	-	-
13	15	M	ependynoma	2	subtotal	55	-	40	dead	43	+	-	-	-	+
14	35	F	ependynoma R	2	subtotal	40	VA	13	dead	28	++	+	+	-	+
15	36	F	ependynoma R	2	partial	-	MTX	-	dead	15	++	+	+	-	+
16	52	F	ependynoma	2	total	55	-	-	alive	48	++	+	+	-	+
17	65	M	ependynoma	2	partial	60	-	-	alive	70	++	-	+	-	+

PVA: CDDP+Vinblastine+ACNU VA: Vincristine+ACNU MTX: methotrexate

R: recurrent cases TTP: time to tumor progression

現を著明に認めていた。一方他の4例はMGMT発現を認めず、TTPは最短で10ヶ月という症例5はあるものの他は23ヶ月、25ヶ月と長く症例4では初期治療後4年を経過し再発を認めていない。MGMT以外の遺伝子発現でこれほど顕著に差を示すものはなく、細胞株の結果同様臨床面においても治療有用性の指標としてMGMT発現の検索はもっとも有用であると考えた。

一方、症例13-17はependymomaの症例である。興味深いことはいずれもMGMTを高発現しMT2Aの発現が見られないことである。astrocytomaとの腫瘍形成過程での差や組織的な差、薬剤感受性の差などを反映していることが予想される。この結果が示していることは、ependymomaの治療としてACNUなどのnitrosoureaはあまり有効ではないのではないか、むしろCDDPやCBDCAなどの白金製剤の方が有用ではないか、という点である。これについては今後sampleをふやし検討したい。

手技的には今回のNorthern blottingとRT-PCRとの比較では、発現の有無に関する結果ではほぼ一致した結果を得ており、腫瘍サンプルの薬剤抵抗性を見る場合、特にMGMTではRT-PCRは十分有用であると判断される。今回使用した腫瘍標本は、すでにNorthern blottingをするために摘出した(もしくは生検した)標本のすべてをすでに利用してしまっているものもある。そのため腫瘍標本でのNorthernとRT-PCRとの比較はしていないが、細胞株の結果から信頼性はあると考える。脳腫瘍標本の場合、微量サンプルであることも多いことを考えると、今後われわれもRT-PCRを用いる機会が増えるであろう。できれば、腫瘍標本でNorthernとRT-PCRとの比較も検討したい。

【結語】

- 1 グリオーマの化学療法効果を予測するのに、薬剤耐性関連遺伝子発現の検索は有用であると考えられた。特にMGMT発現量の検討は腫瘍のACNUにたいする抵抗性を知る上で非常に有用であると考えた。
- 2 方法としてはNorthern blottingは定量性に優れるが、多量のサンプルと時間がかかる。それに対しRT-PCRは微量のサンプルで短時間にできるものの、定量性に劣り、結果が不安定である点など、いずれも一長一短がある。
- 3 今回の結果からはependymomaについては全例MGMTが高発現しており、ependymomaに化学療法を選択する場合、ACNUよりCDDP、CBDCAなどを中心とした化学療法が良いのかもしれない。

【文献】

- 1) Nagane, M. et al. Jpn. J. Clin. Oncol. 22, 143-149, 1992.
- 2) Gomi, A. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 558-563, 1996.
- 3) Gomi, A. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239, 51-56, 1997.
- 4) Gomi, A. et al. Cancer Res. 57, 5292-5299, 1997

グリオーマの治療耐性の分子生物学的解析に基づいた Individual Adjuvant Therapy (IAT) - 第3報 -

Individual adjuvant therapy for gliomas based on the molecular
biological analysis of the drug resistance

鳥取大学医学部脳神経外科

田中 聡、谷浦晴二郎、Md Ruhul Amin, 松本 聡、渡辺高志

【はじめに】

グリオーマの薬剤耐性および薬剤感受性関連遺伝子の Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)の結果に基づいた個別化補助療法 individual adjuvant therapy (IAT)に関しては、前号および前々号の本誌上で発表した^{1,2)}。本稿では、現在までのRT-PCRとこれに基づく preliminary IATの結果をまとめるとともに、われわれの今後のIATの基本方針に関しても言及したい。

【材料および方法】

RT-PCR

手術時に摘出した72例の凍結神経上皮性腫瘍組織 (low grade glioma 14例、grade III glioma 27例、glioblastoma 21例、medulloblastoma などの embryogenic neuroepithelial tumor 10例) および陽性コントロールとして培養ヒトグリオーマ細胞 U87MGに ACNU, VCR, CDDP および IFN- β を escalating doseで加えて樹立した薬剤耐性株 U87AR, U87VR, U87CR および U87IRより Isogen を用いた guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform single-step extraction methodにより total RNA を抽出した。約 2 μ g の RNA より random primer, RAV-2 reverse transcriptaseを用いてcDNAを合成した。

PCR反応は、96°C-1分、35サイクルの96°C-30秒、55°C-30秒 (annealing)、72°C-1分30秒、最終72°C-7分で行った。ethidium bromide入り3% agarose gelにて各PCR産物10 μ lの電気泳動を行い、トランスイルミネーターにて可視bandが認められたものを陽性とした。PCRのprimerは以下のものを用いている。O⁶-methylguanine DNA methyltransferase(MGMT), 5'-CTCCTGGGCAAGGGGACG TCT, および 5'-GATGAGGATGGGGACAGGATT;

multidrug-resistance gene 1 (MDR1), 5'-TTTTTCATGCT ATAATGCGAC, および 5'-TCCAAGAACAGGACTGAT GG; multidrug-resistance associated protein (MRP), 5'-AGGAGAGATCATCATCGATGG, および 5'-GCCT TCTGCACATTCATGG; glutathion-S transpherase- π (GST- π), 5'-CATGCTGCTGGCAGATCAG, および 5'-CATTTCATCATGTCCACCAGG; human β 2-microglobulin (β 2-MG), 5'-TTCTGGCCTGGAGG GCATCC and 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG; interferon receptor (IFNR), 5'-GTGGGCTTTGGATG GTTTAAGCTT および 5'-GCGGAGAAGGTAATTC TTT; Interleukin 1 β converting enzyme(ICE), 5'-GCA AGACTCTCAAGGAGTAC および 5'-CCTTCTCTATG TGGGCTTTC; Interferon regulatory factor-1 および 2(IRF-1/2), 5'-CAACTTCATCCCGGGGCTCA および 5'-ATATCCGGCACGGATTTTCAT。IRF-1/2はIRF-1 およびIRF-2に共通なprimerであり、IRF-2のみを制限酵素EcoT22Iで切断することにより両者を電気泳動上別のbandに分け、NIH imageを用いてIRF-1とIRF-2の比を求めている³⁾。

Preliminary IAT

1997年5月より1998年10月までの連続22症例の神経上皮性腫瘍に対して、手術により摘出した腫瘍検体に対して前述のRT-PCRの結果に基づいた25回のIATを行った。IATの方法は、後述する retrospective なRT-PCRと薬剤の効果の検討により、MGMT陰性の症例はACNUを、MGMT陽性例では carboplatin (CBDCA)を化学療法の基本薬剤として、その他のPCRの結果を考慮して併用薬剤を決定した。また、その他の要素としての年齢、Karnofsky's performance scale (KPS)、手術摘出率、組織学的悪性度なども補助療法に用いる薬剤の数などを決める参考にした。

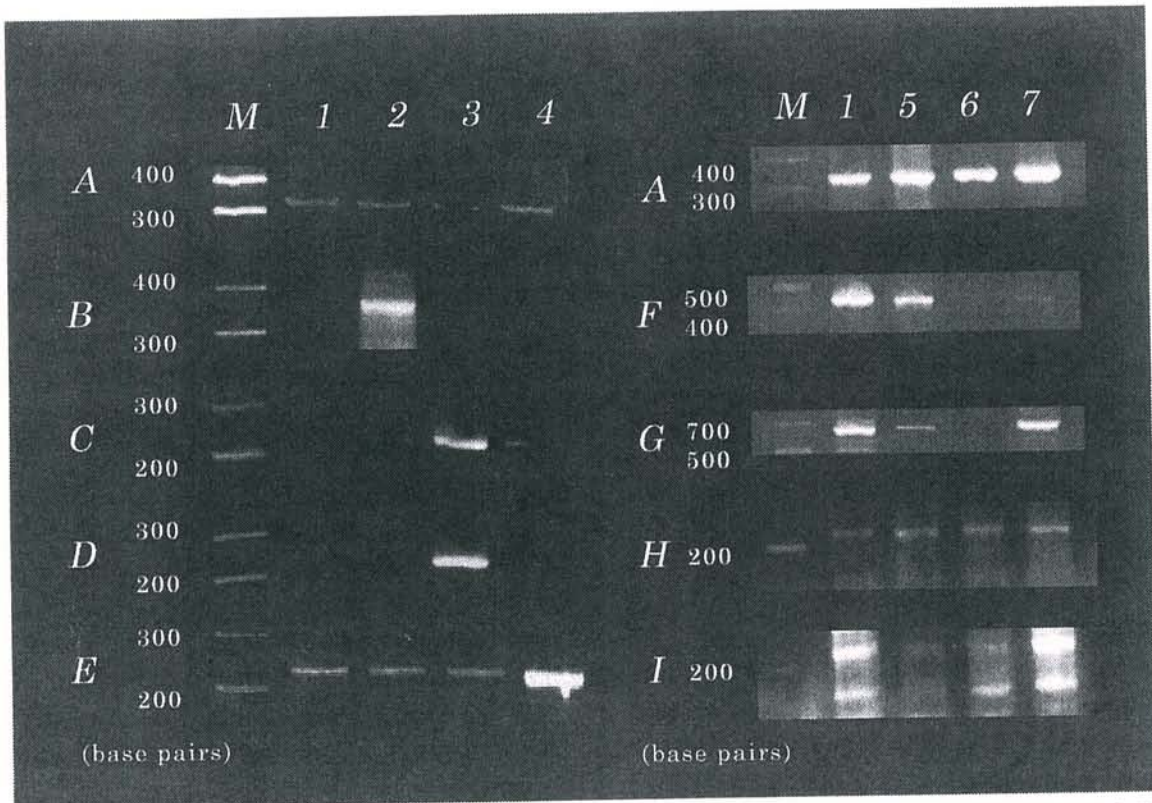


Fig.1 3% agarose-gel electrophoresis of the RT-PCR product amplified from total RNA of U87MG(1), U87AR(2), U87VR(3), and U87CR(4), U87MG-I(5), which was U87MG treated with 100ng/ml of IFN- β for 4 days, U87IR(6), U87IR-N(7), which was U87IR cells treated without IFN- β for 4 days, with the specific primer β 2MG(A,340bp) as an internal control, MGMT(B, 354bp), MDR1(C, 226bp), MRP(D, 235bp) and GST- π (E, 223bp), IFNR(F, 455bp), ICE(G, 674bp), IRF-1 and IRF-2(H, 212bp), IRF-1/-2(I, 212bp and 153bp) stained with 0.005% ethidium bromide. M, PCR Molecular Weight Markers (USB, Cleveland, USA)

【結果】

神経上皮性腫瘍における薬剤耐性および感受性関連遺伝子の発現

U87MGヒトグリオーマ株とこれより樹立した各薬剤耐性株のRT-PCRの結果をFig.1に示す。各薬剤耐性株はMTT assayにて、各々親株に対して約10倍程度の該薬剤に対する抵抗性が示された (data not shown)。RT-PCRではそれぞれ該当する薬剤耐性遺伝子およびIFN感受性関連遺伝子の発現が認められた。全72症例のRT-PCRによる組織型別のmRNA発現率をTable 1に示す。これらの結果において、必ずしも組織学的悪性度の高い症例に薬剤耐性遺伝子の発現が多いという傾向はなかった。IFN感受性関連遺伝子に関しても組織型による有意差は認められなかった。また、初発例47症例と再発例25症例の間にも、すべてのmRNAに関して有意差は認められなかった。尚、抗MGMT、抗IFNR、抗P糖蛋白および抗GST- π モノクローナル抗体を用いた免疫染色を各15症例に関して行ったが、われわれのRT-PCRに比べて特異性は低い結果であった (data not shown)。

また、各mRNAの発現と該薬剤の感受性の関係をTable 2に示した。ここで言う薬剤が有効と認められた症例は、単剤によりPR以上の腫瘍の縮小が認められたもの、または併用療法であっても明らかにその薬剤による効果と考えられるもの、およびIFN- β においては、維持療法において脳腫瘍全国集計調査報告の同一組織型の平均生存期間を上回ったものを含んでいる。その結果、MGMT陽性例でACNUが有効であった症例はなく、MGMT陽性群と陰性群間にACNU有効率の有意差を認めた ($p < 0.025$, chi-square test)。また、ICEおよびIRF-1/2比に関しても同様にIFN- β 有効率の有意差が認められた。その他の薬剤耐性遺伝子に関しては、RT-PCRの結果と薬効の一致率、すなわちRT-PCRの感度は70%以上の高値を示しているが、症例数が少なく、有効群と無効群の有意差は認められなかった。

Preliminary IAT

以上の結果に基づき、主にRT-PCRによるMGMTの発現の有無による preliminary IAT を行った症例の一覧をTable 3に示す。1998年末で補助療法開

Table 1
mRNA expression of human glioma tissues by RT-PCR

Histology	MGMT			IFNR			MDR1			ICE			IRF-1/2			MRP			GST- π				
	Positive	Rate		Positive	Rate		Positive	Rate		Positive	Rate		Positive	Rate		Positive	Rate		Positive	Rate			
Total cases	26/72	36.1%		62/72	86.1%		35/72	48.6%		20/61	32.8%		44/61	72.1%		50/61	82.0%		50/61	82.0%		50/61	82.0%
Low grade glioma	4/14	28.6%		13/14	92.9%		6/14	42.9%		5/11	45.5%		5/11	45.5%		9/11	81.8%		9/11	81.8%		9/11	81.8%
Grade 4 glioma	10/27	37.0%		20/27	74.1%		16/27	59.3%		7/23	30.4%		17/23	73.9%		21/23	91.3%		21/23	91.3%		21/23	91.3%
Glioblastoma multiforme	9/21	42.9%		20/21	95.2%		9/21	42.9%		5/18	27.8%		14/18	77.8%		13/18	72.2%		14/18	77.8%		14/18	77.8%
Medulloblastoma/PNET	3/10	30.0%		9/10	90.0%		4/10	40.0%		3/9	33.3%		8/9	88.9%		7/9	77.8%		7/9	77.8%		6/9	66.7%
Primary	17/47	36.2%		42/47	89.4%		23/47	48.9%		14/39	35.9%		27/39	69.2%		31/39	79.5%		31/39	79.5%		31/39	79.5%
Recurrent	9/25	36.0%		20/25	80.0%		12/25	48.0%		6/22	27.3%		17/22	77.3%		19/22	86.4%		19/22	86.4%		19/22	86.4%

Table 2
Drug-resistance gene mRNA expression and drug sensitivities

Gene-	Drug	mRNA Expression	Effective		Resistant		Effective Rate	Sensitivity/ Chi-square test
			No.	Rate	No.	Rate		
MGMT-		+	0	0%	8	8	0%	71.4%
	ACNU	-	7	53.8%	6	6	25.0%	p<0.025
GST- π -		+	2	25.0%	6	6	100%	80.0%
	CDDP/CBDCA	-	2	100%	0	0	0%	NS
MDR1-		+	0	0%	4	4	0%	71.4%
	VCR/VP-16	-	1	33.3%	2	2	33.3%	NS
MRP-		+	0	0%	6	6	0%	77.8%
	VCR/VP-16	-	1	33.3%	2	2	33.3%	NS
IFNR-		+	8	50.0%	8	8	50.0%	59.1%
	IFN- β	-	1	16.7%	5	5	16.7%	NS
ICE-		+	7	77.8%	2	2	77.8%	70.0%
	IFN- β	-	7	33.3%	14	14	33.3%	p<0.05
IRF-		+	12	54.5%	10	10	54.5%	63.3%
	IFN- β	-	1	12.5%	7	7	12.5%	NS
IRF-1/2 -		\geq	9	100.0%	0	0	100.0%	86.7%
	IFN- β	$<$	4	19.0%	17	17	19.0%	p<0.001

Table 3
Summary of the patients treated by preliminary individual adjuvant therapy *

Pt. No.	P/R	Age	Sex	Diag	Location	Ope (%)	Previous Therapy	KPS (%)	RT-PCR				Therapy	Effect	TTP (M)	SP (M)
									MGMT	IFNR	ICE	IRF-1/2				
1	P	44	M	AA	Lt parietal(P)	95	S	90	-	0.48	+	+	IAR	NC	11	
1	P	45	M	AA	Lt parietal	75	SIAR	70	-	0.61	+	-	AV/I/C	NC	8<	20<
2	P	51	M	AA	Rt frontal(F)	95	S	90	+	2.26	-	-	AVR	PR	17	19<
3	R	72	M	GM	Lt F-P	75	SAR	60	+	0.41	+	+	I	PD	2	
3	R	72	M	GM	Lt F-P	75	SIAR	60	+	0.41	+	+	CE	PR	5	20
4	P	61	M	AA	Bil. frontal	75	S	40	+	0	+	-	IAR	NE	2	3
5	R	61	F	GM	Rt temporal	95	SAR	80	-	1.41	-	-	IA	CR	15<	35<
6	P	14	F	A	brain stem	50	S	40	-	0	+	+	IA7	NC	12	15<
7	P	70	M	AA	Lat. Ventricle	100	S	50	+	1.74	+	+	CI	NE	14<	14<
8	P	22	M	PB	pineal	50	S	80	-	2.00	+	+	AVR	PR	13<	13<
9	R	14	M	A	tectum	95	SRE	60	+	2.62	-	+	I	PR	12<	119<
10	P	77	M	GM	Corpus callosum	75	S	30	-	0	-	-	IA	PD	2	5
11	R	48	M	AA	Rt F-P	75	SR	70	-	0.83	+	+	IA	PR	5	
11	R	49	M	AA	Rt F-P	50	SIAR	20	-	0.10	+	+	A	NC	6	120<
12	P	55	F	GM	Rt frontal	100	S	70	+	0.59	+	+	ICR	NE	11<	11<
13	R	44	F	AO	Rt frontal	100	S	90	-	0.88	-	-	IAR	NE	9<	93<
14	R	44	M	GM	Lt temporal	75	S	80	-	0.48	-	-	AVR/I/C	PD	9<	12<
15	P	67	F	GM	Corpus callosum	0	S	30	-	1.00	-	-	IAR	PR	2	3
16	P	73	F	AA	Lt temporal	50	S	60	-	0	+	+	A	NC	7<	7<
17	P	29	F	A	Rt frontal	100	S	50	+	0	+	+	CI	NE	7<	7<
18	P	59	M	GM	Lt frontal	75	S	70	-	0	-	-	IAR	PR	6<	6<
19	P	24	F	GM	Rt frontal	75	S	60	+	5.04	-	-	ICR	PR	6<	6<
20	R	23	F	M	Cervical spine	100/0	SPER	40	-	14.5	+	+	IARM	PR	4<	54<
21	P	70	M	GM	Lt temporal	75	S	70	-	5.29	-	+	IAR	PR	4<	4<
22	P	60	M	GM	Lt frontal	75	S	30	-	0	+	+	IAR	PD	2	3<

*P/R, primary or recurrent; Ope, operative resection rate; KPS, Karnofsky's performance scale; MGMT, O6-methylguanine DNA methyltransferase; MDR1, multi-drug resistance gene 1; MRP, multi-drug resistant associated protein; GST- π , glutathion S-transferase; TTP, time to tumor progression; SP, survival period; AA, anaplastic astrocytoma; GM, glioblastoma multiforme; A, astrocytoma; PB, pineoblastoma; AO, anaplastic oligodendroglioma; S, surgery; I, IFN- β ; A, ACNU; R, radiation; E, etoposide; C, carboplatin; M, methotrexate; NC, no change; PR, partial response; PD, progressive disease; NE, not evaluable; CR, complete response.

始後2ヶ月以上を経過した25回中、寛解率は72.0% (18回)であり、これらのうち、補助療法前に評価可能病変を有していた20回中、PR以上の腫瘍の縮小が認められたものは11回(有効率55.0%)であった。

【考察】

グリオーマに対する補助療法は、各施設毎にさまざまな治療プロトコルにより行われていると考えられる⁹⁾。これらの治療法を直接比較することは困難であるが、まとまった症例数の randomized studyまたは連続症例で50%を超える有効率を示す報告はほとんど見られない。グリオーマの治療を困難にさせる特徴としては、1] 脳内での浸潤性の増殖、2] 血液脳関門の存在と脳の免疫学的特殊性、3] 組織学的および生物学的多様性、などが挙げられる⁹⁾。脳神経外科手術の進歩による摘出率の向上や drug deliveryの改善のための研究の進歩にも関わらず、治療成績の向上が乏しいのは、3]のグリオーマのheterogeneityに起因するものが大きいように思われる。グリオーマはその組織学的、生物学的および分子生物学的多様性により、薬剤に対する感受性も様々である⁷⁾。

腫瘍の感受性試験に基づいた治療の試みは、グリオーマに関しても報告されている⁸⁾。しかし、これらはいずれもin vitroの細胞培養結果を臨床にあてはめようとするものであり、多大な労力と費用を必要とする割に、十分な成績が得られていない。われわれは、薬剤耐性遺伝子およびIFN-β感受性関連遺伝

子mRNAの発現に着目し、簡便なRT-PCRによる治療の個別化をはかる試みを行っている。その裏付けとして培養薬剤耐性細胞のみならず、retrospectiveに凍結臨床検体のmRNA発現と薬剤感受性を検討したところ、MGMT-ACNUとICE, IRF-1/2-IFN-βに関しては有意な関係が認められた。IFN-βに関しては、化学療法剤に比べて副作用が軽微であり、とくに維持療法における有用性をわれわれは示しており、直接の抗腫瘍作用以外にも宿主の免疫系を介する作用も期待できるため、RT-PCRによる薬剤の決定からは、現在は除外している⁹⁾。MGMT以外の薬剤耐性遺伝子に関しては該当薬剤の使用経験が乏しいことが有意差の認められない一因であり、さらに症例を重ねる必要があると考えられる。

われわれのRT-PCRは約6時間程度でmRNAの検出が可能であり、手術検体の極めて迅速な遺伝子診断が可能である。薬剤耐性遺伝子等の発現の検出に関する報告は、Northern blottingやPCR産物のSouthern blottingによるものがほとんどであるが、われわれは少なくともAgarose gelのEthidium bromide 染色にて可視bandが検出されたものを陽性と判定している¹⁰⁾。実際、PCR産物の電気泳動にてbandが検出されないものに関しても、さらにblottingを行うことにより定量可能なものも少なからず存在すると考えられる。少なくとも薬剤耐性遺伝子に関しては、電気泳動でのbandの検出は、ある程度遺伝子増幅のあるものを半定量的に陽性と判定していると考えられる。もちろんPCRのprimerの選択や反応条件等により、それらの結果は変動すると考えられるが、少な

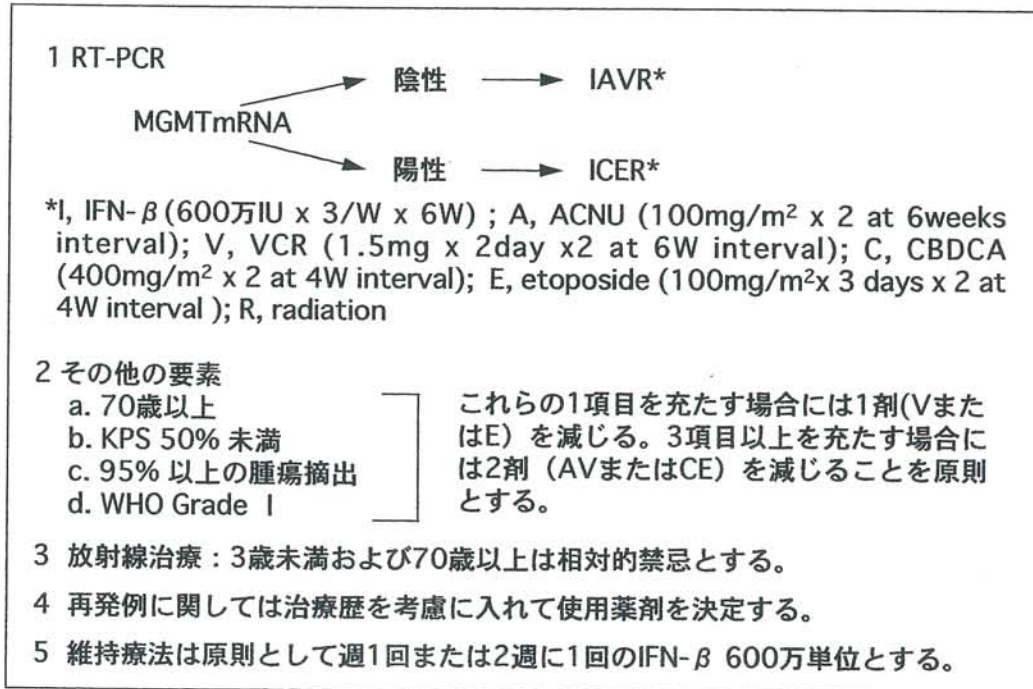


Fig.2 Proposed new protocol of the Individual adjuvant therapy.

くともMGMTに関しては、陽性率およびACNUによる治療効果との一致からみて、スクリーニング法として適切であると考えられる。その他の耐性遺伝子に関しては、さらにprimer, 反応条件を含めて検討を重ねる必要があると考えられた。さらに、薬剤耐性および薬剤感受性関連遺伝子についても変異や転写の異常についても、今後検討を加える必要があると思われる。

Fig.2に、以上の結果を踏まえた今後のわれわれのIATの治療方針を示す。従来行ってきたpreliminary IATは、1例ずつRT-PCRの結果のみならず症例を多方面から検討して治療を選択してきたが、実は概ねこの基準に一致するものであった。化学療法剤は作用も副作用もほぼ容量依存的であり、症例により至適投与量を増減するよりは、他剤を選択すべきであると考えられる。

【文献】

- 1) 田中 聡、谷浦晴二郎、紙谷秀規、渡辺高志、堀 智勝、長島 正：再発悪性グリオーマに対する補助療法薬剤の選択。Neuro-Oncology 7(2): 37-42, 1997
- 2) 田中 聡、谷浦晴二郎、黒崎雅道、Md Ruhul Amin、紙谷秀規、渡辺高志、堀 智勝：グリオーマに対するRT-PCRを用いたIndividual Adjuvant Therapy。Neuro-Oncology 8(1): 53-58, 1998
- 3) Hochhaus A、Yan XH、Willer A、Hehlmann R、Gordon MY、Goldman JM、Melo JV: Expression of interferon regulatory factor (IRF) genes and response to interferon- α in chronic myeloid leukaemia. Leukemia 11: 933-939, 1997
- 4) 高倉公朋、野村和弘編：相対生存率。脳腫瘍全国集計調査報告 Vol.9 脳腫瘍全国統計委員会1996, pp.67-75
- 5) Yoshida J, Kajita Y, Wakabayashi T, Sugita K: Long-term follow up results of 175 patients with malignant glioma: importance of radical tumor resection and postoperative adjuvant therapy with interferon, ACNU and radiation. Acta Neurochir (Wien) 127: 55-59, 1994
- 6) Weingart J, Brem H: Biology and therapy of glial tumors. Curr Opin Neurol Neurosurg 5: 808-812, 1992
- 7) James CD, Olson JJ: Molecular genetics and molecular biology advances in brain tumors. Curr Opin Oncol 8: 188-195, 1996
- 8) Rosenblum ML, Gerosa MA, Wilson CB, Barger GR, Pertuiset BF, de Tribolet N, Dougherty DV : Stem cell studies of human malignant brain tumors. Part 1: Development of the stem cell assay and its potential. J Neurosurg 58:170-176, 1983
- 9) Tanaka S, Taniura S, Matsumoto S, Kamitani H, Oka H, Fujii K, Nagashima T, Watanabe T, Hori T: Long-term human interferon- β maintenance therapy for malignant gliomas. Int J Immunother (in press).
- 10) Nagane M, Shibui S, Oyama H, Asai A, Kuchino Y, Nomura K: Investigation of chemoresistance-related genes mRNA expression for selecting anticancer agents in successful adjuvant chemotherapy for a case of recurrent glioblastoma. Surg Neurol 44: 462-468, 1995

基底核部悪性神経膠腫の臨床病理像

Clinicopathological study of malignant thalamic gliomas

東京女子医科大学 脳神経センター 脳神経外科

田鹿安彦、久保長生、堀 智勝

【はじめに】

基底核部に生じる神経膠腫は比較的少なく2%を占めるのみである。このうち若年者には良性星細胞腫が多くみられ予後も比較的良好のものも多いことが知られている¹⁾。一方成人にみられる場合は悪性神経膠腫のことが多くみられるとの報告もある²⁾。脳深部の基底核ことに視床に生じる腫瘍の場合は手術による摘出は困難な場合が多く、診断についても苦慮する事も多い。そのため組織診断は定位的生検術によることが多い。今回急激な経過をとり治療に難渋した3例の視床部神経膠腫を経験したので、その臨床経過、病理像について検討した。

【症例】

症例1：29歳女性、平成10年6月頃より頭痛があったが旅行に出かけ、旅行先で頭痛嘔吐が増悪し近医

に入院した。頭部CTにて脳腫瘍を指摘され帰京後7月4日当科受診、軽度の右不全麻痺を認め、入院した。頭部CTでは左視床に3×5cm大の軽度高吸収域で造影剤にて増強される腫瘍を認めた。第3脳室は対側に圧迫されていたが脳室拡大はなかった。MRIにてT1で低信号、T2で高信号の腫瘍が視床にみられた。CT誘導下定位的生検術を行い組織を確認した。生検組織では正常組織に浸潤している腫瘍がみられた。腫瘍組織では細胞密度が高く、核クロマチンに富む異型性の強い核を持つ細胞が多くみられた。腫瘍内には小血管が多く血管増生もみられた。GFAPは陽性、MIB-1陽性率も58%と高くglioblastomaと診断した。術後放射線照射を55.2 Gy、ACNU 100mg、VCR 1mg点滴静注行い、腫瘍は軽度縮小し麻痺も改善した。8月下旬に照射治療後、半月後に再び頭痛が強くなり嚥下障害が出現した。

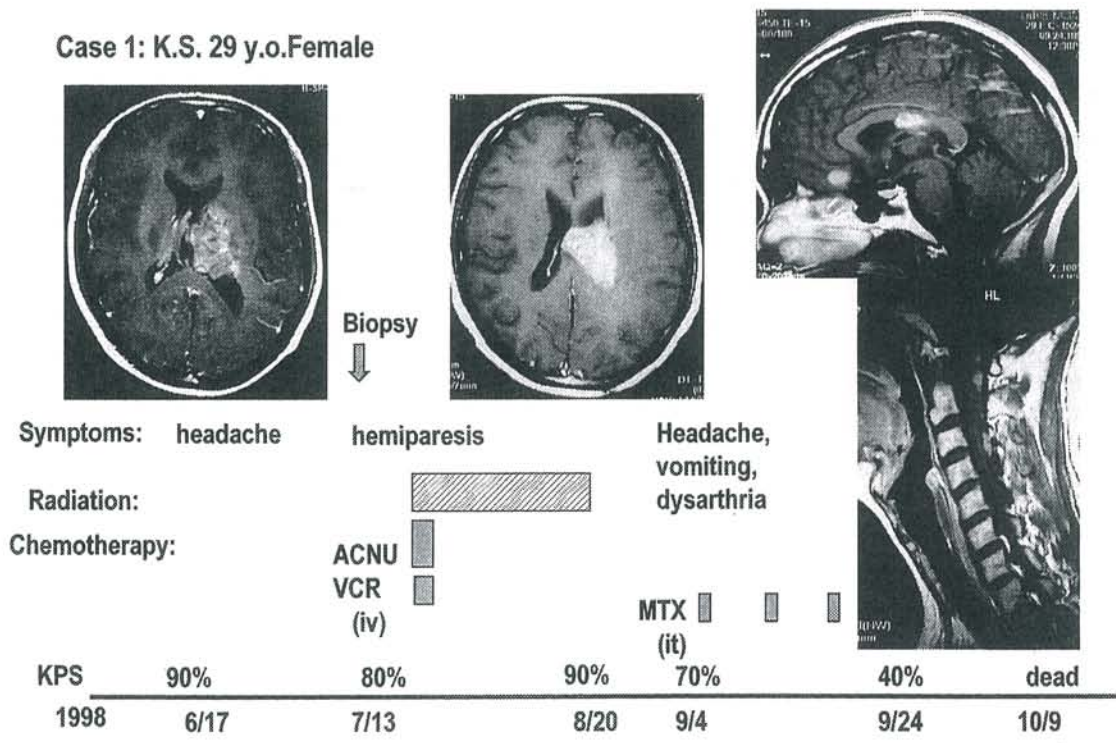


Fig 1. Clinical course of case 1.

MRIを行ったところ前頭葉底部、頸髄への腫瘍の播種がみられた。MTXの髄注を行ったが全経過4ヶ月で10月9日死亡した(Fig.1)。

症例2：48歳男性、平成10年4月頃より記憶力の低下があり近医で受診、頭部CTにて脳腫瘍を指摘され5月1日当科来院した。軽度の記憶力障害、右不全麻痺を認めた。頭部CTでは左視床部から後角にかけて3 cm大のやや高吸収域の腫瘍がみられた。入院後CTにて腫瘍の増大を認め、さらにMRIにて小脳から脳幹部、左視床、島回にT1で低信号、T2で高信号を呈する多発性の病変がみられたため、変性疾患、悪性リンパ腫なども疑われた。髄液検査ならびに細胞診では正常であった。Tl SPECTでは視床部に集積がみられた。プレドニン60mg/day投与を始め漸減したが、変化はみられないため6月10日CT誘導下定位的生検術を行った。生検組織では出血が多い組織であったが、部分的には異型性の強い細胞が集ったところがみられ、GFAP陽性、vimentin陽性であった。MIB-1陽性率も24%と高値であったのでanaplastic astrocytomaと診断された。術後局所に放射線照射55.2 GyとACNU 100mgとVCR1mgの静脈内投与がなされた。照射中水頭症のためV-P shuntを行った。放射線照射後のCTでは視床部の腫瘍は軽度縮小していたが、8月頃より意識はapallicとなり、その後嚥下障害と呼吸不全をおこし10月24日全経過6ヶ月で死亡した (Fig.2)。

症例3：8歳女児、平成9年9月頃手の振戦がみられ、12月に全身痙攣発作があり近医にて投薬を受けた。その後もけいれん発作が続いたため平成10年2月当院小児科入院し検査を受けた。この際のMRIではT2で両側視床は腫脹し軽度高信号となっていた。腫瘍が疑われたが家族の希望で経過観察となった。1ヶ月後のMRIでは両側視床部特に左側はT2で高信号を呈し、T1Gdで左視床には軽度造影される部分もみられた。小児科通院していたが5月15日痙攣発作、意識障害にて緊急入院、頭部CTにて右視床部の広範な出血、脳室内出血がみられ当科に転科した。意識は昏睡状態、瞳孔は縮瞳、四肢麻痺がみられた。脳室ドレナージをおこない、意識全身状態の改善を待ち、6月10日開頭術にて生検を行った。組織は非常に細胞密度が高く核クロマチンに富む腫瘍細胞からなり、異型性が強くみられた。小血管は多くみられたが血管増生はみられなかった。GFAP陽性、vimentin陽性、MIB-1陽性率も30%と高値であった。Anaplastic astrocytomaと診断し放射線照射化学療法を始めたが、再出血をおこし中断した。インターフェロンベータ100万単位週3回静脈内投与を続け、7月31日より全脳照射45 Gyを行った。また水頭症のためV-P shuntとその入れ換えをおこなった。意識は傾眠傾向のまま、MRIでは視床部に腫瘍の残存がみられ12月3日全経過15ヶ月で死亡した (Fig.3)。

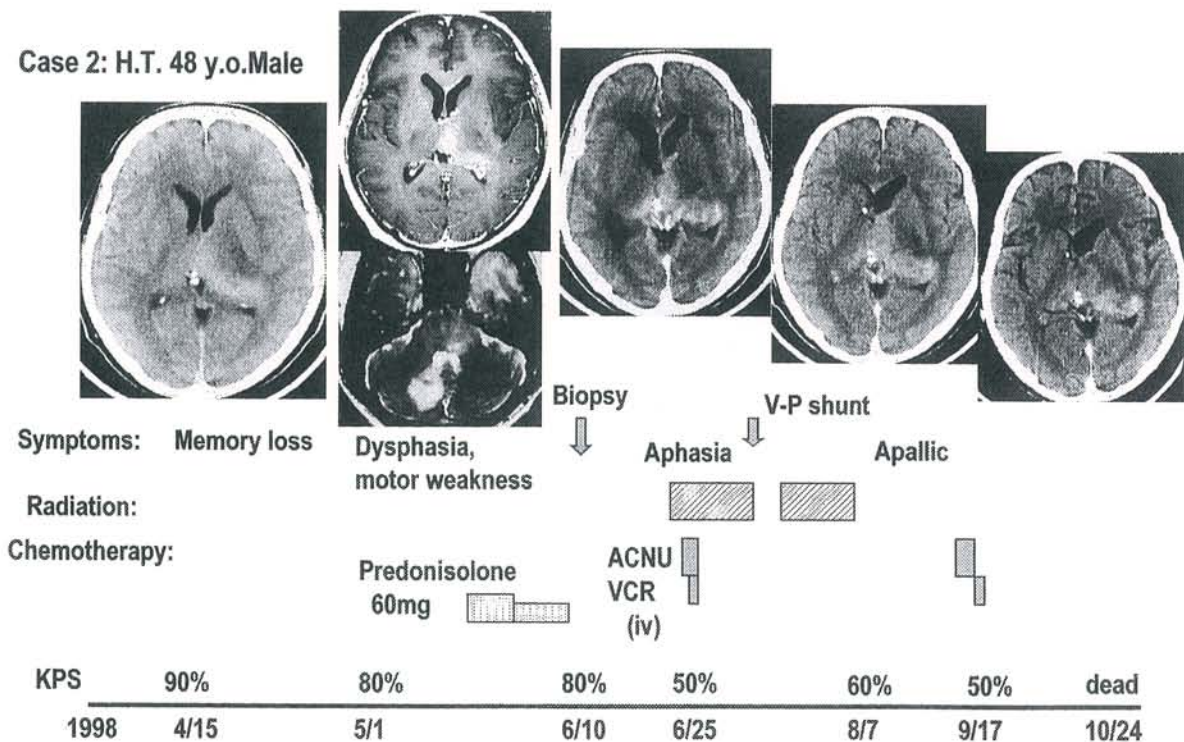


Fig 2. Clinical course of case 2.

【考察】

基底核特に視床部の神経膠腫は全脳腫瘍の1-5%と比較的少ないと報告されている。以前Kelly³⁾が72例のthalamic astrocytomasのうち40例の手術放射線療法を行った例を検討し報告している。手術例は6歳から78歳で平均年齢48歳であった。Grade 3の7例は生検術で平均生存週は52週、grade 4では生検術27例の平均生存週は19週、摘出術を受けた7例では62週であった。Kellyの方法は定位的な摘出術であるが積極的な手術を勧めている。Krouwer と Prados²⁾がまとめた57例では生検術は37例で摘出術は6例であった。組織学的にはastrocytoma 14例、anaplastic astrocytoma 25例、 glioblastoma 2例で不明16例であった平均年齢は22歳で平均生存期間は73週であった。多変量解析を行った結果では予後に関与する因子は摘出範囲であったと述べているが、anaplastic astrocytoma については全摘出を目指すべきであるかはまだ結論がでていないとしている。本邦ではNishioら⁴⁾が20例のthalamic gliomaで年齢別の検討をおこなっている。15歳以下ではlow grade astrocytoma 2例、 anaplastic astrocytoma 2例、 glioblastoma 1例で2例は死亡していた。16歳から25歳ではlow grade astrocytoma 3例、 anaplastic astrocytoma 2例、 glioblastoma 1例で4例は死亡していた。26歳以上ではlow grade astrocytoma 4例、 anaplastic astrocytoma 3例、 glioblastoma 2例で9例は

死亡していた。年齢が高くなるほど悪性のものが多くなり予後も不良であった。我々の3例のうち2例は成人例でいずれも悪性であった。小児の1例も当初はlow-grade astrocytoma も考え経過観察としていたが結果的には悪性のanaplastic astrocytoma であった。やはり早期の診断、治療が必要であったと考えさせられる。

今回3例の視床部悪性神経膠腫を検討したが、いずれも数ヶ月で症状の悪化をきたしており進行が極めて早かった。画像診断されたときにすでに浸潤性の大きな腫瘍となっており、治療に困難が伴う傾向であった。摘出術はやはり脳深部のため困難が考えられ、生検術にとどめられた。診断については生検術によることでも、CT誘導下で摘出部位を決められれば診断に十分な組織を得られると思われた。このような脳深部の腫瘍で治療に抵抗性のものの治療には、今後も更なる検討が必要である。

【文献】

- 1) Franzini A, Leocata F, Cajola L, Servello D, Allegranza A, Broggi G: Low-grade tumors in basal ganglia and thalamus: Natural history and biological reappraisal. Neurosurgery 35:817-821, 1994.
- 2) Krouwer HGJ, Prados MD: Infiltrative astrocytomas of the thalamus. J Neurosurg 82:548-557, 1995.
- 3) Kelly PJ: Stereotactic biopsy and resection of

Case 3: M.M. 8 y.o.Female

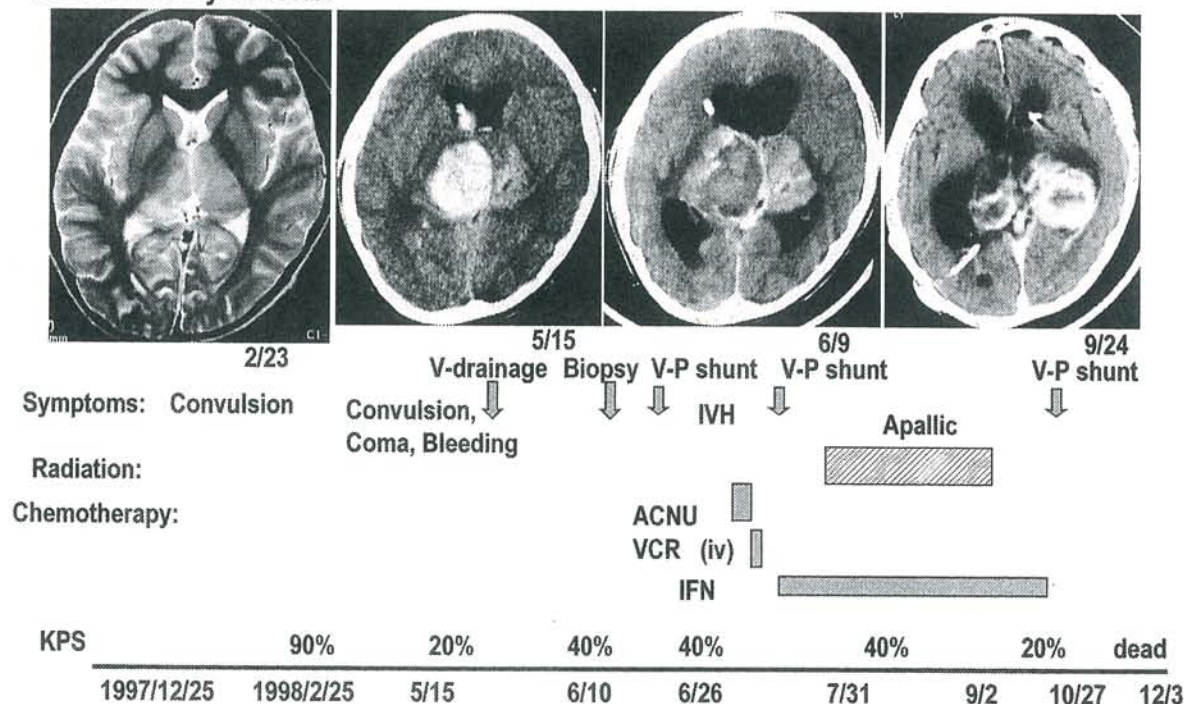


Fig 3. Clinical course of case 3.

thalamic astrocytomas. *Neurosurgery* 25:185-195, 1989.

- 4) Nishio S, Morioka T, Suzuki S, Takeshita I, Fukui M: Thalamic gliomas: a clinicopathologic analysis of 20 cases with reference to patient age. *Acta Neurochir (Wien)* 139:336-342, 1997.

悪性神経膠腫に対するACNU,VP-16の治療効果の検討

Effects of ACNU and VP-16 on malignant glioma

国立がんセンター中央病院 脳神経外科

田中 実、渋井壮一郎、野村和弘

【はじめに】

原発性悪性神経膠腫の治療では可及的な腫瘍摘出に止まらず、放射線治療に適正な化学療法を追加することにより一層治療効果を向上できる可能性がある。当施設では、悪性神経膠腫に対し、可及的腫瘍の摘出を試みた後、放射線開始時よりACNU及びVP-16を用いた化学療法を行ってきた。その治療効果を当施設で経験した他の治療法と比較して検討した。これまで知られている予後因子としては、若年者、Karnofsky performance status良好などがあるが、成人例に限って、その他の予後因子についても検索した。

【対象、方法】

対象は1980年から現在までに経験した悪性神経膠腫108例の内、年齢が20-65歳の成人例で、少なくとも50Gy以上の放射線照射と化学療法の初期治療を完遂し得た61例とした。治療効果は、ACNU/VP-16群34例と「その他の群」27例に分け、各種化学放射線療法後の腫瘍サイズの縮小度及び生存期間中央値の延長で判定した。当施設のACNU/VP-16群のStudy design、およびその他の群の内訳をFig.1及びTable 1に示す。生存曲線はKaplan-Meier法を用いlogrank testで評価した。また、組織学的分類、手術摘出度、有効率などの各因子の予後との関連性をCox proportional hazard modelを用いて検討した。

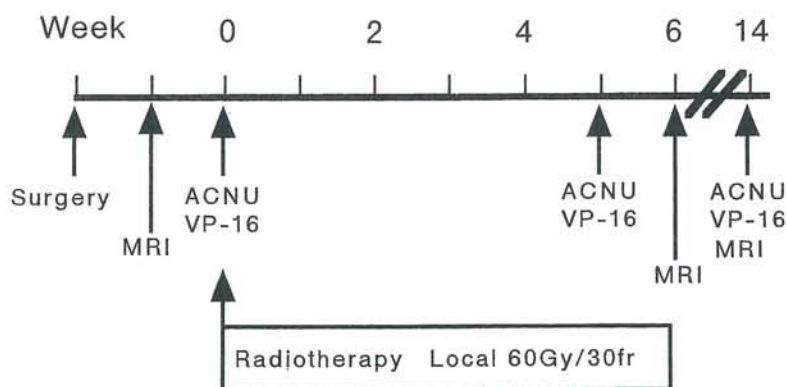


Fig. 1 Study design
Treatment schedule of chemoradiotherapy using ACNU and VP-16

Table 1. Therapeutic protocols

RT+ACNU+VP-16	34 cases
Others	27 cases
RT+ACNU+VCR	13 cases
RT+ACNU	5 cases
RT+ACNU+IFN	3 cases
RT+other agents	6 cases

【結果】

悪性神経膠腫の組織学的分類としては、Anaplastic astrocytomaが28例、Glioblastomaが33例で、年齢は、21歳～65歳（平均43.0歳）、男性

38例、女性23例である (Table 2)。悪性神経膠腫61例のACNU/VP-16群と「その他の群」のKaplan-Meier法による生存曲線をFig. 2に示した。ACNU/VP-16群の生存期間中央値は23.8カ月、「その他の

Table 2. Patients characteristics

	Anaplastic astrocytoma	Glioblastoma
Number of patients	28	33
Males /Females	18/10	20/13
Median age (range)	40 (24 - 65)	45 (21 - 63)
Patients over 40 yrs	14 (50%)	22 (66.7%)
Patients under 40 yrs	14 (50%)	11 (33.3%)
Surgery performed		
biopsy	5 (17.9%)	8 (24.2%)
50% removal	6 (21.4%)	4 (12.1%)
75% removal	5 (17.9%)	11 (33.3%)
>95% removal	12 (42.9%)	10 (30.3%)

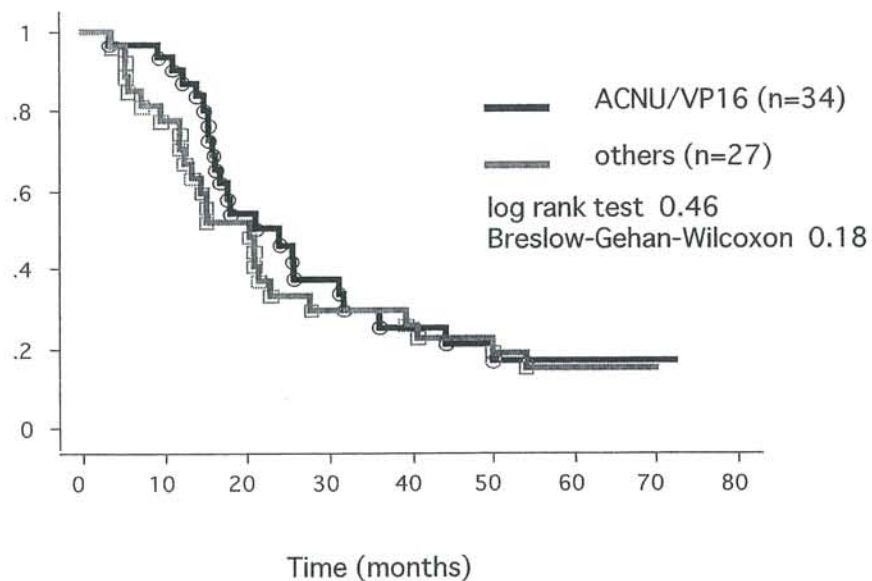


Fig. 2 Survival curves of each treatment group

Table 3. Tumor reduction rate by treatment group

Treatment Group	Response				Total Cases	Response Rate (%)	CR Rate (%)	χ^2 test RR(CR)
	CR	PR	PD	NC				
ACNU/VP16	7	10	8	9	34	50.0	20.6	0.89 (0.56)
Others	4	10	8	5	27	51.9	14.8	

群」は20.0カ月であり両者の間に統計学的有意差は認められなかった。Anaplastic astrocytomaに限っても、ACNU/VP-16群の生存期間中央値は31.7カ月、「その他の群」は22.8カ月と有意差は認められなかった。

悪性神経膠腫全体の complete response と partial response を合わせた有効率(response rate)についても、Table 3に示すように、両群とも約50%であった。また、Complete response rate (CR率)では、ACNU/VP-16群の方が20.6%とやや高い傾向にあったが、これも有意差はなかった。両群で疾患別の有効率を検討した。Anaplastic astrocytomaにおいては、ACNU/VP-16群で16例中9例(有効率56.3%)、「そ

他の群」では12例中7例(有効率28.3%)であり、Glioblastomaにおいては、ACNU/VP-16群で18例中8例(有効率44.4%)、「その他の群」では15例中7例(有効率46.7%)であった。Anaplastic astrocytomaの方がGlioblastomaに比べ若干有効率が高い傾向があるものの、有意差はなかった。しかし、腫瘍摘出度別に検討すると、 χ^2 乗検定の結果、両群とも95%以上の亜全摘のできた症例は、部分摘出に終わった例より有意に有効率が高かった(p=0.019)。

診断およびCRの有無で分類したKaplan-Meier法による生存曲線 (Fig. 3, Table 4)では、GlioblastomaのCR例の生存期間中央値は50カ月に達し、Anaplastic

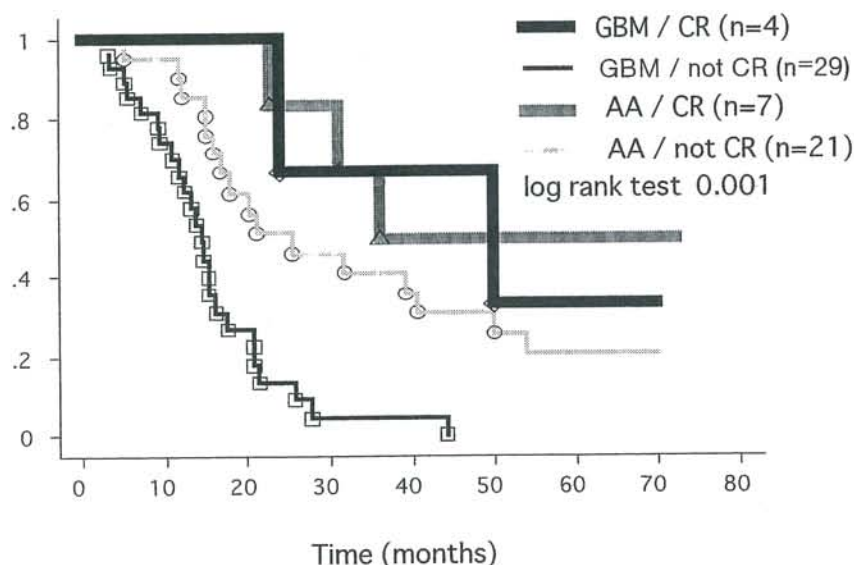


Fig. 3 Survival curves by quartiles of histology/CR rate
CR = complete response

Table 4. Median survival time for complete or partial responders

		MST (months)		
		Anaplastic astrocytoma	Glioblastoma	malignant glioma
NCCH	PR	31.7	14.5	20.2 §
	CR	NA	50.0	50.0
USCF 2)	PR	29.2	16.8	?
	CR	49.2	NA	?

NCCH = Natinal Cancer Center Hospital, USCF = the University of California, San Francisco, MST = median survival time, NA = not achieved, § = logrank test 0.0076

astrocytomaのCR例はまだ生存中央値に達していない。尚、CRに至らなかったAnaplastic astrocytomaの生存期間中央値は25.4カ月、Glioblastomaは14.5カ月であった。

次に、悪性神経膠腫における予後因子を検討した。単変量解析では、病理診断、腫瘍摘出度、放射線照射量、化学療法薬剤数、有効率、CR率で有意差があり、これらのうち、多変量解析で予後決定因子と成り得たのは、診断、摘出度、CR率であった。尚、有効率は独立した予後因子とは言えなかった (Table 5)。

ACNU,VP-16投与による主な副作用は骨髄抑制であり、約20%の患者で投与後2週間前後で白血球が2000/mm³以下に低下したが多くは経過観察のみで特に治療を必要とする症例はなかった。しかし、108例中1例にVP-16によると思われる二次性の白血病を経験した。Anaplastic astrocytomaの44歳女性で術後ACNU/VP-16による化学放射線療法によりCRに至ったが、当初より化学療法後の白血球の回復が遅

れがちであり75% doseで維持療法を行っていた。VP-16の総投与量は2180mg/m²と比較的少なかつたにも拘わらず、術後2年目後半に急性骨髄性白血病 (FAB分類: M5) を発症し、全経過36.2カ月で二次性白血病のため死亡した。

【考察】

今回は、特に予後因子として重大と考えられる年齢を考慮して20歳から65歳の成人例に限った。その結果、有効率、生存期間中央値の延長という尺度では、ACNU/VP-16群と「その他の群」に有意な差はなかった。その原因としては、「その他の群」に用いた薬剤にACNUが多く含まれていたことによるものと思われる。VP-16とACNUとの間に相乗効果があまらなかったという結果とも言える。

一方、当施設のACNU/VP-16群と他施設での治療成績をTable 6に示した¹⁾。これによるとACNU/VP-16群は有効率、CR率が比較的高いにも拘わらず、生存期間中央値はさほど延長していないことがわか

Table 5. Multivariate and univariate association with survival in 61 patients with malignant glioma

Variable (Ref. variable)	P log rank	
	Multivariate	Univariate
Age (20<age<40)	NI	0.0607
Sex (male)	NI	0.4859
Histology (AA)	0.0027	0.0013
Surgery (≥95% removal)	0.0203	0.0115
Radiation dose (≥58Gy)	0.1363	0.0462
Chemotherapy (≥2agents)	0.1345	0.0140
ACNU/VP16 (ACNU/VP16)	NI	0.4615
Response rate (Response)	NS	0.0430
CR rate (CR)	0.0209	0.0031

NI = not included, NS = not significant

Table 6. The effect of therapies

Treatment Protocols	MST (months)			Response Rate (%)	CR Rate (%)
	AA	GBM	MG		
RT+ACNU+VP16	31.4	15.3	23.8	50.0	20.6
IAR (unpublished)	53.1	22.4	26.8	38.8	10.5
RT+ACNU 1)	46.0	12.0	17.0	47.5	5.0

MST = median survival time

る。UCSFの1977年から1984年までの悪性神経膠腫362例の検討では、統一したtreatment protocolはないが、全体として有効率 26.7%でCR率 5.8%であったと報告されている²⁾。そのPR 76例とCR 21例の生存期間中央値には有意差があり、Anaplastic astrocytomaのCR例 (10例) の生存期間中央値は52カ月、GlioblastomaのCR例 (11例) はまだ生存中央値に達しておらず、11例中4例が43カ月を経過しなお生存中であるという (Table 4)。これは、当施設とほぼ同様の結果である。

このように画像上CRとなった症例はPRに終わった例より有意に生存中央値が延長している。当施設のCR例は11例で、そのうち7例がAnaplastic astrocytomaであった。ただし、術後より残存腫瘍のないまま経過した症例は、化学療法の効果とは別に扱われCR例には含まれない。臨床的特徴としては、比較的若く、performance statusも良く、摘出度の高い症例に多い傾向がみられた。

亜全摘により、有効率が有意に高くなることを考えると、可及的な腫瘍の摘出をした上で、有効率、できればCR率の高い治療法を組み合わせることで治療成績が向上するのではないかと期待される。しかし、他施設との比較では有効率、CR率が低くてもあまり予後に差がないことも事実である (Table 6)。これはそれぞれの母集団にバラツキがあったためではないかとも考えられる。また、CR例の予後は極めて良好であることを考えるとCR率を高くする治療法の確立が重要であるが、有効率の向上が得られれば、その延長線上にCR率の向上が約束されるのかはまだこれからの検討課題である。その一方で、今回我々が経験したような二次性白血病の危険性も考慮しなければならない。

VP-16による二次性白血病の特徴は、薬剤投与から1年から1年半と短期間にMyelodysplastic syndromeなど前白血病状態を取ることなく発症し、短期に大量投与した例や積算量が4000mg/m²を越えた例に発症率が高いこと、11q23を含む染色体異常 (11q23領域における転座関連遺伝子は、mixed-lineage leukemia (MLL) 遺伝子という。) が多く報告されていること、日本やイタリアなどに報告が多くアングロサクソン系には報告例がないなど人種により発症率に著しい違いがみられることなどが挙げられる³⁻⁵⁾。今回我々が経験した症例は、積算量が比較的少なかったにも拘わらず発症していることから、今後VP-16を用いるprotocolを使用する場合には、その総投与量と投与間隔に一層の配慮が必要であると共に、個々の症例の化学療法後の経過を注意深く観察していくことが重要であると思われる。

【文献】

- 1) Takakura K, Abe H, Tanaka R, Kitamura K, Miwa T, Takeuchi K, et al.: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J Neurosurg* 64:53-7, 1986
- 2) Murovic J, Turowski K, Eilson CB, Hosino T, Levin V: Computerized tomography in the prognosis of malignant cerebral gliomas. *J Neurosurg* 65:799-806, 1986
- 3) Kudo K, Yoshida H, Kiyoi H, Numata S, Horibe K, Naoe T: Etoposide-related acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 12:1171-5, 1998
- 4) Haupt R, Fears TR, Heise A, Gardner H, Loiacono G, De Terlizzi M, Tucker MA: Risk of secondary leukemia after treatment with etoposide (VP-16) for Langerhans' cell histiocytosis in Italian and Austrian-German populations. *Int J Cancer* 71:9-13, 1997
- 5) Iida H, Taji H, Iida M, Suzuki R, Sugihara T, Minami S, Kodera Y, et al.: Secondary leukemia after etoposide treatment involved MLL gene rearrangement. *Jpn J Clin Hematol* 35:569-75, 1994 (in Japanese)

成人大脳半球 anaplastic astrocytoma の治療経験

Treatment for the adult patients with anaplastic astrocytoma in their cerebral hemisphere

日本大学 脳神経外科

宮上光祐、片山容一、中村三郎

【はじめに】

astrocytic tumorの中ではanaplastic astrocytomaは比較的頻度が少なく、glioblastomaの約半数で、全脳腫瘍の5.4%といわれる³⁾。頻度が少ないこともありanaplastic astrocytoma単独例のまとまった治療成績、予後に関する報告は少なく、多くはglioblastomaを含めmalignant gliomaとして報告されている。近年、各種画像解析、手術機器、microsurgeryの進歩などにより脳腫瘍の治療成績は向上しているが、anaplastic astrocytomaを含めmalignant gliomaの治療成績は依然として満足すべきものではない。

従来、われわれはmalignant gliomaに対する治療としてできるだけ手術により腫瘍を摘出後、主として放射線照射にACNU,インターフェロン β (INF- β)の併用療法を行った^{1,2)}。1976年以降にわれわれの施設で経験した成人大脳半球のanaplastic astrocytomaに対する治療成績、予後についてretrospectiveに検討したので報告する。

【対象ならびに方法】

1976年1月から1995年12月までの20年間に経験した成人大脳半球anaplastic astrocytomaの中で、術後1ヶ月以上生存し、2年以上follow upできた29例を対象とした。組織型は29例のうち真のanaplastic astrocytomaは26例であった。他の3例はanaplastic oligo-astrocytomaであった。これらのうちの2例はlow grade astrocytomaからanaplastic astrocytomaへの悪性転化例であり、1例はoligodendrogliomaからanaplastic oligo-astrocytomaへの悪性転化例であった。29例の背景は、年齢は平均45.9(24-73)歳、40歳未満9例、40-60歳16例、60歳以上4例であった。男女比は男性18例、女性11例であった。腫瘍局在は、前頭葉が19例(66%)で最も多かった。その他

頭頂葉4例、側頭葉3例、後頭葉2例、基底核部1例であった。

anaplastic astrocytomaに対する治療は、手術、放射線療法、化学療法の併用を基本とした。しかし、それぞれの時期における治療方針の相違、日本大学関連病院で初回治療後の紹介例が含まれていたため、治療法が異なる例もあった。すなわち、初期治療として1)手術単独のみ、2)手術と放射線療法、3)手術と放射線療法、化学療法の併用の3群に分類してretrospectiveに検討した。

手術は術後に新たな神経障害の増悪を起こさない程度にできるだけ広範囲の腫瘍切除を目標とし、初期治療として全例に腫瘍摘出術を施行した。腫瘍摘出術はgross total removalが7例、subtotal removalが11例で、両者をあわせて18例(67%)と大部分を占めた。partial removalは11例であった。再発再増大後7例に再手術を行なった。再手術の適応は、基本的には1)初回手術から再発再増大までの期間が短期間でない(6ヶ月以上)こと。2)腫瘍摘出術によって新たな神経脱落症状を起こさないことなどを条件とした。

放射線照射は初期治療として21例に手術後に併用した。21例の照射量は50-60Gyが15例、60-70Gyが4例であったが、2例は患者の状態不良などにより40Gyで中止となった。初期治療で照射が行われなかった症例で、再発後に照射治療が行われた例が4例であった。照射を併用した群と非併用群の両群の患者背景において明らかな差はみられなかった。

(Table 1)

化学療法は、手術後に放射線照射開始時期にあわせてACNU 100mg-150mg/body(70-80mg/m²)を静注、または動注で投与した。20%mannitolを併用動注を7例に行った。初期治療として手術後、照射を行わずACNUを投与した例が5例であった。ACNUの投与回数は2-6回施行した。

Table 1. Characteristics of 29 patients with anaplastic astrocytoma before treatment

characteristics No.	Total 29	Radiotherapy(+) 21	Radiotherapy(-) 8
Age			
mean(range)	45.9(24-73)	44.7(24-73)	48.9(34-62)
< 40	9 (31%)	7	2
40 - 60	16 (55%)	11	5
60 <	4 (14%)	3	1
Sex			
Male	18 (62%)	14	4
Female	11 (38%)	7	4
Tumor location			
Frontal	19 (66%)	14	5
Parietal	4 (14%)	4	0
Temporal	3 (10%)	1	2
Occipital	2 (7%)	1	1
Deep	1 (3%)	1	0
Extent of removal			
Partial	11 (38%)	9	2
Subtotal	11 (38%)	6	5
Total	7 (24%)	6	1
Chemotherapy			
ACNU only	11 (38%)	8	3
ACNU, INF	6 (21%)	6	0

インターフェロンは、初期治療として1986年以降の症例で6例に手術後に照射、ACNUに併用して投与した。ACNUは1日300万単位、週5日点滴静注で、4週以上を1クールとした。維持療法はACNUは2-3ヶ月に1回、インターフェロン300万/1/2週を2年間投与を基本とした。

anaplastic astrocytomaの治療成績、治療予後についてはKaplan Meier 生存曲線を用いて検討した。初期治療として1)手術単独（またはACNU併用）療法群、2)手術、照射併用群、3)手術、照射、化学療法群の3群について比較した。治療予後への関与が考慮される因子として年齢、腫瘍摘出率、照射の併用の有無、化学療法の併用の有無について統計的に有

意差検定を行なった。統計解析はstatview4.5を用い、LogrankおよびWilcoxon検定を行なった。

【結果】

anaplastic astrocytomaの治療結果

初期治療の方法から3群に分類して検討した。

1) 手術単独、または手術、ACNU併用群（非照射群）(Table 2)

Table 2に示すごとく8例含まれ、このうちの3例は手術、ACNU併用群であった。年齢は平均49(34-62)歳、組織型は8例中2例はanaplastic oligoastrocytomaで、6例がanaplastic astrocytomaであった。8例の腫瘍摘出率は全摘出2例、亜全摘出

Table 2. Group 1 cases with treatment of surgery only or surgery with ACNU chemotherapy on initial treatment

No.	age/sex	patho.	tumor removal	chemo.	therapy after recurrence	survival
1	62/M	AA	partial	-	ACNU	D, 27m
2	34/F	AA	total	-	ACNU, INF	A, 141m
3	52/M	OA	subtotal	-	rad., ACNU,INF	A, 41m
4	42/M	AA	partial	-	rad., ACNU,VCR	D, 40m
5	53/M	OA	subtotal	-	rad., ACNU,INF	A, 84m
6	55/F	AA	subtotal	ACNU		D, 72m
7	36/F	AA	total	ACNU		A, 163m
8	58/F	AA	subtotal	ACNU	rad., ACNU,INF	D, 74m

AA: Anaplastic astrocytoma OA: Anaplastic oligoastrocytoma
D: Dead A: Alive rad.: radiation

Table 3. Group 2 cases with combined treatments of surgery and radiation on initial treatment

No.	age/sex	patho.	tumor removal	radiation	chemo.	therapy after recurrence	survival
9	48/M	AA	partial	60Gy	-		D, 45m
10	27/M	AA	partial	60Gy	-		A, 54m
11	24/M	AA	subtotal	61Gy	-		A, 146m
12	45/M	AA	subtotal	60Gy	-		A, 46m
13	40/F	AA	total	60Gy	-	partial, ACNU, INF	D, 92m
14	42/M	LGA-AA	partial	60Gy	-	ACNU	D, 44m
15	34/M	O-OA	subtotal	65Gy	-	ACNU, INF	A, 134m

Table 4. Group 3 cases with combined treatments of surgery, radiation and chemotherapy

No.	age/sex	patho.	tumor removal	radiation	chemo.	therapy after recurrence	survival
16	55/F	AA	total	54Gy	ACNU		A, 84m
17	46/M	AA	total	40Gy	ACNU		A, 40m
18	24/F	AA	partial	52Gy	ACNU	ACNU	A, 64m
19	73/F	AA	subtotal	70Gy	ACNU		D, 15m
20	37/F	AA	partial	60Gy	ACNU		D, 15m
21	56/F	AA	total	50Gy	ACNU		A, 41m
22	64/M	AA	partial	40Gy	ACNU	ACNU	D, 17m
23	56/M	AA	subtotal	70Gy	ACNU	ACNU	D, 26m
24	35/M	AA	partial	60Gy	ACNU, INF	op., CDDP, VP16	D, 33m
25	41/M	AA	subtotal	60Gy	ACNU, INF	op., ACNU, VCR	D, 32m
26	62/M	AA	partial	50Gy	ACNU, INF		D, 2m
27	54/F	AA	total	60Gy	ACNU, INF	ACNU, INF	D, 23m
28	26/M	AA	partial	50Gy	ACNU, INF		A, 33m
29	50/M	AA	partial	60Gy	ACNU, INF	ACNU, INF	D, 14m

4例、部分摘出2例で、8例中6例（75%）が全摘出または亜全摘出の広範囲の腫瘍摘出されている。初期治療後に再発再増大した症例の4例に50-60Gyの照射を行ない、ACNU, INF- β を3例に併用、1例はACNU, vincristineを照射に併用した。再発例の他の2例は照射を行わず、ACNU単独、またはACNU, INF- β の治療を行なった。

この群の初回手術からの生存期間(月数)をTable 2に示したが、4例は生存期間27-74ヶ月で死亡、他の4例は41-163ヶ月で生存中である。平均生存期間は80ヶ月で、全例24ヶ月（2年）以上生存し、5年以上生存例が8例中5例に認め予後良好であった。

2) 手術、照射併用群 (Table 3)

Table 3に示すごとく7例認めた。7例の平均年齢は37(24-48)歳。組織型は7例中1例はanaplastic astrocytomaで、6例がanaplastic astrocytomaであった。7例の腫瘍摘出率は全摘出1例、亜全摘出3例、部分摘出3例であった。7例全例に照射が行なわれており、照射量は60-65Gyであった。初回治療として化学療法を行っていないが、再発後の治療として

手術（部分摘出）、ACNU, INF- β の併用を1例、手術を行わずACNU, INF- β の併用を1例、ACNUを1例に行なった。

7例の治療予後は、3例は44-92ヶ月で死亡。4例は46-146ヶ月でいずれも生存している。7例の平均生存は80ヶ月で予後良好であった。

3) 手術、照射、化学療法併用群 (Table 4)

Table 4に示すごとく14例含まれた。14例中8例は手術、照射、ACNUの併用を行ない、他の6例は手術、照射、ACNU, INF- β の併用治療を行なった。14例の平均年齢は48.5(24-73)歳であった。組織型はすべてanaplastic astrocytomaであった。14例の腫瘍摘出率は、全摘出4例、亜全摘出3例、部分摘出7例で、全摘出または亜全摘出は14例中7例(50%)であった。照射は2例を除き50Gy以上の照射が行なわれた。再発後の治療はTable 4に示す如くACNUを主体とした化学療法を主としたが、2例は腫瘍摘出術も行なった。再発後の治療としてシスプラチン、VP16とACNU, ビンクリスチンの各併用を各1例に行なった。14例の平均生存は31ヶ月であり、2年生存

は8例(57%)、5年生存は2例であった。2年未満死亡例をみると、症例19は73歳の高齢で、照射量が70 Gyと多かった。症例20,22,26,29は部分摘出であった。症例26の術後2ヶ月で死亡した例は骨髄抑制などによる合併症で死亡した。

4) Kaplan-Meier 生存分析 (Fig.1,2,3)

われわれの経験したanaplastic astrocytoma29例のKaplan-Meier生存曲線をFig.1に示した。平均生存期間は57.4ヶ月で、2年生存23例(79%),5年生存は5年以上追跡調査できた23例中10例(43%)であった。120ヶ月(10年)以上の生存は4例あった。

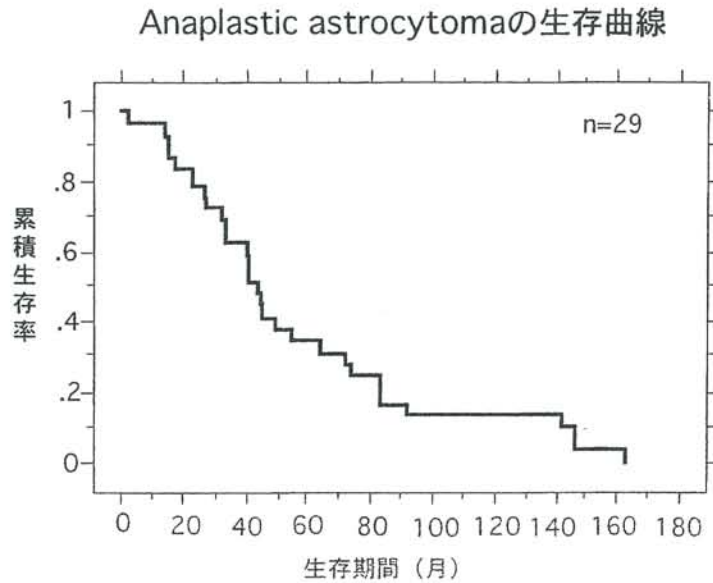


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curve in 29 cases of anaplastic astrocytomas

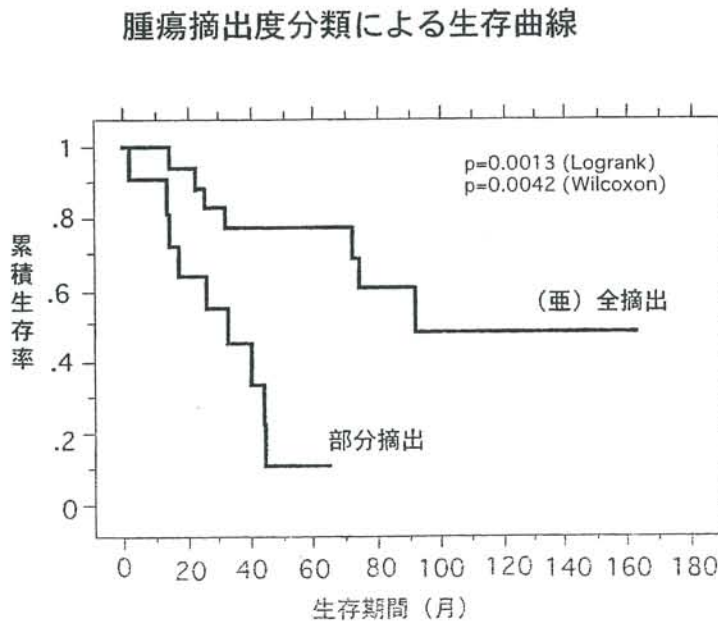


Fig. 2. Note significant difference on survival time between total or subtotal removal and partial removal of tumor

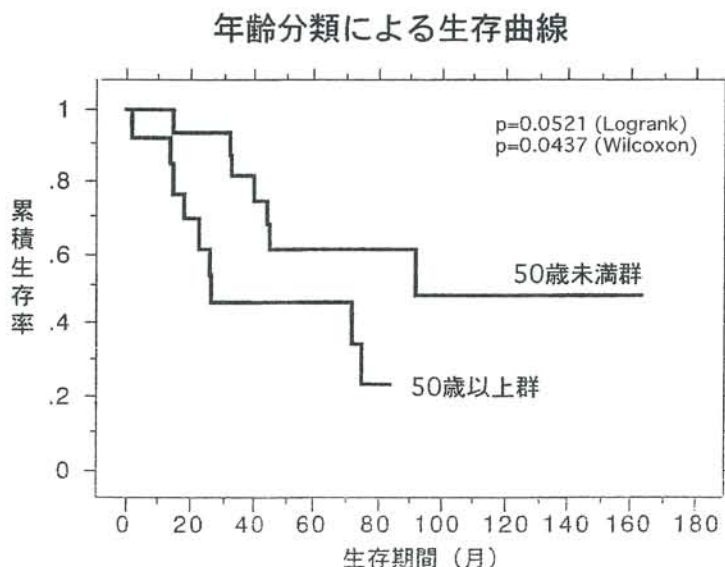


Fig. 3.

Note significant difference on survival time between the patients younger than 50 years and those older than 50 years

予後に影響すると思われる因子として腫瘍摘出度について検討した。Fig.2に示すごとく腫瘍摘出度、すなわち腫瘍全摘または亜全摘群は部分摘出群に比較し予後良好であった。両群間に明らかな有意差を示した(Logrank:p=0.0013, Wilcoxon:p=0.0042)。しかし、放射線療法の併用の有無、化学療法の併用の有無による比較では有意差は得られませんでした。

年齢差による検討では、60歳以上の高齢者は4例ありましたがいずれも30ヶ月以内で死亡し、予後不良であった。さらに、50歳を境として50歳以上群と

50歳未満群の2群間で差を検討した。Fig.3に示すごとく、50歳未満群で予後良好の傾向であった(Logrank:p=0.0521, Wilcoxon:p=0.0437)。とくに50歳以上の例では、50歳未満例に比較し5年以上生存例が少なかった。

5) 症例

症例1、Anaplastic astrocytoma, 41歳、男性(Table 4の症例25) (Fig. 4,5,6)

Todd's palsyを伴う痙攣発作で発症した左前頭葉腫瘍である。関連病院で腫瘍部分摘出、ACNU100mg

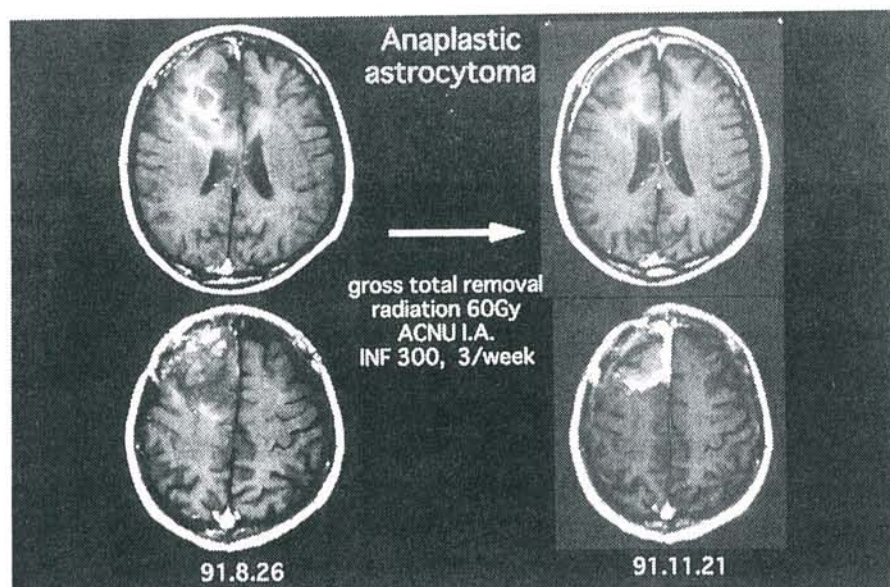


Fig. 4. Case 1 patient with anaplastic astrocytoma before and after initial treatment

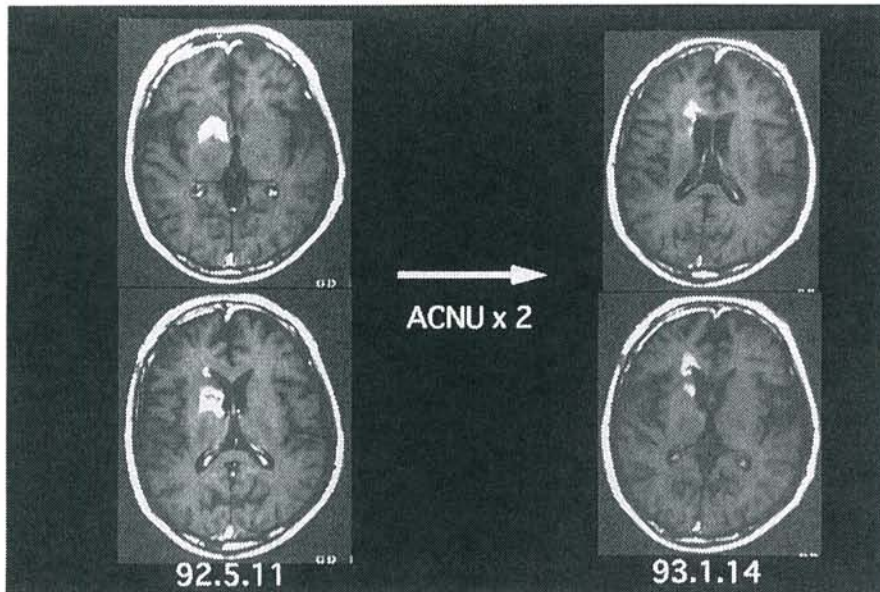


Fig. 5. Case 1 patient with recurrent anaplastic astrocytoma before and after treatment by chemotherapy with ACNU

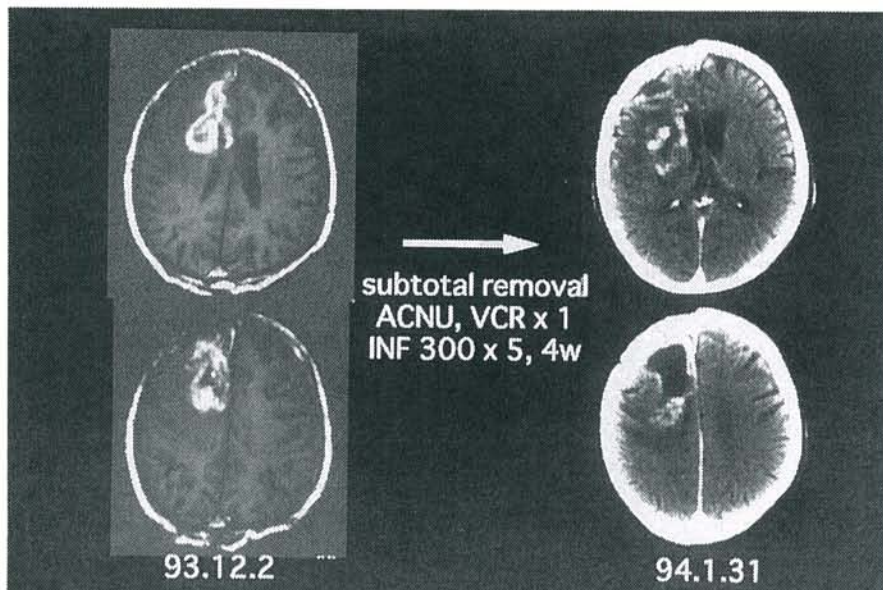


Fig. 6. Case 1 patient on recurrence again before and after treatment by surgery, chemotherapy and Interferon- β

単独動注、インターフェロン300万の36日連日投与を行なった後に当院に紹介入院となった。当院での初期治療はFig.4の造影MRIに示すごとく1991,9,9に再手術(gross total removal)施行し、術後に放射線照射60Gy, ACNU 100mg 単独動注、インターフェロン300万、週3回、4週おこない、Fig. 4の右の造影MRIはその治療後である。当院での初回手術後約8ヶ月後(1992,5,11)、Fig. 5左に示す如く左大脳基底核部に再発像を認めた。これに対しACNU 100mg動

注、2回行った。腫瘍はFig.5右に示す如く縮小し、PRがえられた。しかしその後、1993,12,2にはFig.6左のごとく再び明らかな腫瘍増大がみられた。これに対し再手術(subtotal removal)、ACNU125mg/body静注、ビンクリスチン1.5mg、インターフェロン300万単位、連日1ヶ月投与を行い、腫瘍縮小が一時えられましたが、まもなく再増大し、全経過32ヶ月で死亡しております。

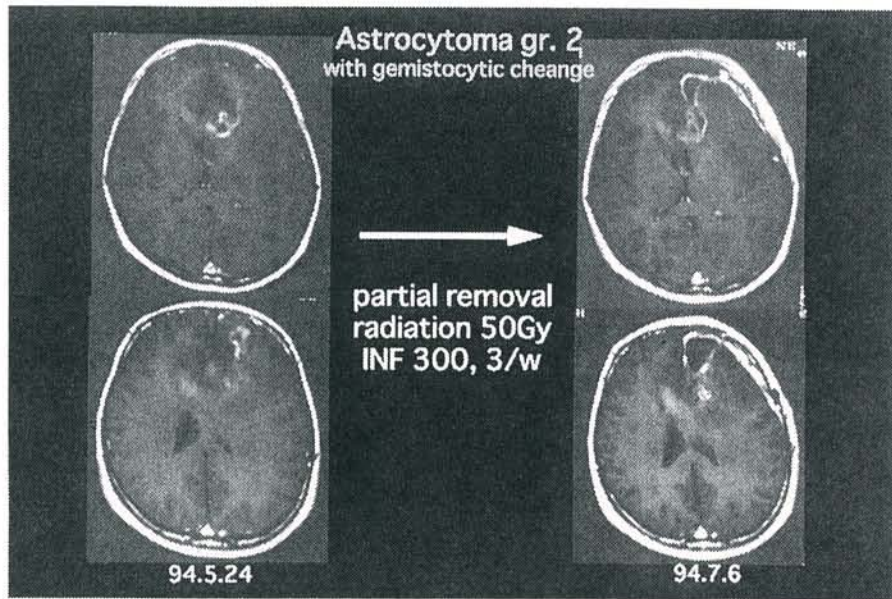


Fig. 7. Case 2 patient with anaplastic astrocytoma transformed from astrocytoma grade 2 before and after surgery, radiation and Interferon- β

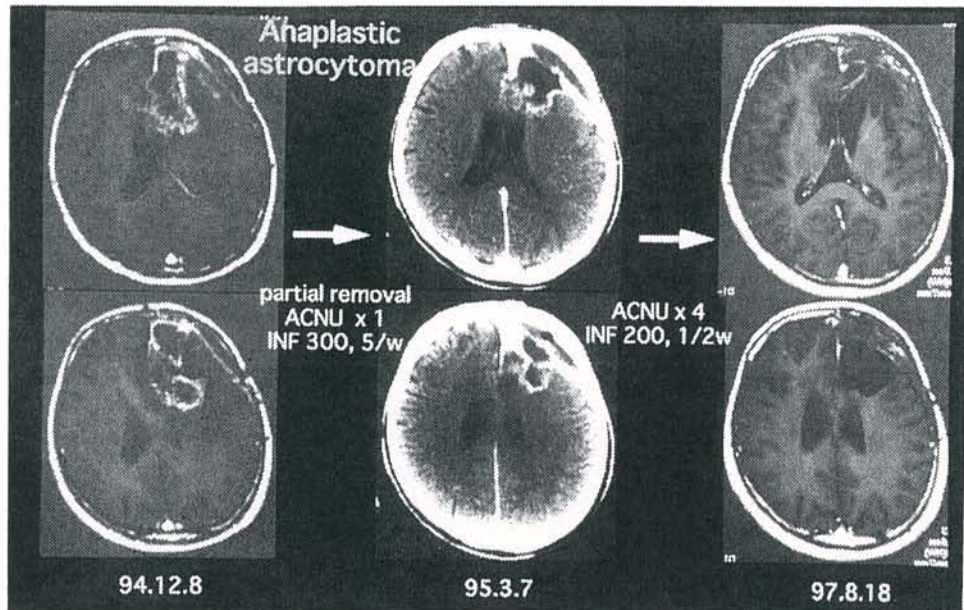


Fig. 8. Case 2 patient was treated by surgery, ACNU and Interferon- β after recurrence and recurrent tumor was disappeared. He was alive for 33 months after initial surgery with complete remission.

症例2、Astrocytoma grade 2 \rightarrow Anaplastic astrocytoma, 26歳、男性(Table4の症例28) (Fig.7,8)

痙攣発作で発症した右前頭葉腫瘍である。初回治療はFig.7に示すごとく、1994,6,6に手術(partial removal)施行し、術後に60Gyの照射、インターフェロン300万単位、3/週、4週間投与を行った。初回手術時の病理診断はastrocytoma grade 2 with

gemistocytic differentiationであった。初回手術後6ヶ月後にはFig.8左に示すごとく腫瘍再増大がみられたため、再手術(partial removal、90%切除)とACNU120mg/body、静注、インターフェロン300万、週5回、4週投与した。病理検索の結果anaplastic astrocytomaに悪性転化していた。退院後も維持療法としてACNUを2-3ヶ月に1回、インターフェロン

300万単位を2週に1回の割合で投与しつづけたところ腫瘍像は消失した(Fig.8右)。初回手術後2年9ヶ月を経過しているが再発はなく、通常の仕事に勤務しております。

【考察】

anaplastic astrocytomaの治療成績は、glioblastomaより明らかにすぐれている点で諸家の報告は一致しており、各2年生存率はanaplastic astrocytomaで50%以上、glioblastomaは30%以下といわれる。anaplastic astrocytomaの平均生存期間は報告者により幅があるが、最近の放射線治療、化学療法などの併用治療の結果では、anaplastic astrocytomaの平均生存期間は36ヶ月から50ヶ月の報告が多い。

悪性グリオーマの予後を左右する因子として年齢、組織型、治療前のKarnofsky performance status、腫瘍摘出率、放射線治療、化学療法などの併用の有無などがあげられている。すでにわれわれも悪性グリオーマの予後因子について検討し、諸因子の中で年齢と腫瘍摘出率が生存率に影響した事を報告した²⁾。年齢は60歳以上は60歳未満例に比較し予後不良であり、腫瘍摘出率では全摘出または亜全摘出のできた例では、部分摘出例に比較し予後良好であった。

悪性グリオーマに対する治療として放射線治療と化学療法の併用療法の有効性に関して、Walkerら³⁾は悪性グリオーマの術後にBCNUを併用した放射線療法が放射線治療単独よりも有意に治療成績を向上したと報告した。Takakuraら⁴⁾、Yamashitaら⁵⁾も悪性グリオーマの術後の放射線単独療法よりも、放射線治療とACNUの併用療法が予後良好で、CT上の腫瘍縮小率が約3倍に改善したと報告した。

今回のわれわれのanaplastic astrocytoma29例の検討では、全体の平均生存期間は57.4ヶ月で、2年生存率が79%、5年生存率は43%で比較的予後良好であった。この理由として対象症例として前頭葉腫瘍が全体の66%と多かったことから、腫瘍全摘出または、亜全摘出のできたものが60%以上で、比較的多くの症例で広範囲切除が可能であったことが考えられる。治療予後に関する因子の検討では、年齢、腫瘍摘出率、放射線療法、化学療法などについて検討したが、有意差検定で差がでたのは腫瘍摘出率と年齢であり、これまでの報告に一致した。年齢は60歳以上は明らかに不良であったが、50歳を境にしても50歳以上の方が予後不良の傾向であった。放射線療法や化学療法などの併用の有無から3群に分類して検討したわれわれの結果では、手術単独（または手術、ACNU併用）群と手術、照射併用群の方が、むしろ手術、照射、化学療法併用群より予後良好で

あったのは、前2者では後者に比較し腫瘍全摘出、または亜全摘出例が多かったことによる可能性がある。すなわち、治療関与因子として積極的な広範囲腫瘍摘出が放射線治療や化学療法より、より重要な因子となっていることが更めて明らかになった。しかし、今後、治療予後調査において患者背景、stagingの決定などにより、一定条件下での多施設間の比較が必要であろう。

【まとめ】

1. anaplastic astrocytoma 29例を対象として治療法から3群に分類して治療成績、予後因子などについてretrospectiveに検討した。29例の平均生存期間は57.4ヶ月で、2年生存率が79%、5年生存率は43%であった。
2. 治療法は1)手術単独（または手術、ACNU併用）群、8例、2)手術、照射併用群、7例、3)手術、照射、化学療法併用群、14例の3群である。1)群と2)群の各平均生存期間は80ヶ月で、3)群の31ヶ月に比較し予後良好であったが、これは1、2群に腫瘍全摘出または亜全摘出例がより多かったことによると思われる。
3. 治療予後因子の検討では、腫瘍摘出率と年齢で有意差を認めた。腫瘍全摘出、または亜全摘出例は、部分摘出例に比較し予後良好であった。60歳以上では全例予後不良であり、50歳を境にしても50歳未満例に比較し50歳以上では不良であった。

【文献】

- 1) 宮上光祐, 坪川孝志: 成人大脳半球悪性Gliomaに対するACNU, 放射線治療法—ACNUの投与方法からみた治療成績—, 癌と化学療法 17: 1447-1453, 1990.
- 2) 宮上光祐, 吉野篤緒, 渋谷 肇, 中村三郎: 悪性グリオーマに対する放射線照射, ACNU, インターフェロンβ併用療法の治療経験, Neuro-Oncology 6:30-33, 1996.
- 3) 脳腫瘍全国集計調査報告, 第8巻, 1993
- 4) Takakura K, Abe H, Tanaka R et al: Effects of ACNU and radiotherapy on glioma. J Neurosurg 54:53-57, 1986
- 5) Walker DW, Alexander EJr, Hunt WE et al: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. J Neurosurg 49:333-343, 1978
- 6) Yamashita J, Handa H, Tokuriki Y et al: Intraarterial ACNU therapy for malignant brain tumors; Experimental studies and preliminary clinical results. J Neurosurg 59:424-430, 1983

Anaplastic astrocytoma (G III)の予後・治療に関する検討

香川医科大学 脳神経外科

國塩勝三、森崎訓明、松本義人、本間 温、長尾省吾

Analysis of treatment and prognosis of anaplastic astrocytoma(G III)

Department of Neurological Surgery, Kagawa Medical University, Kagawa

Katsuzo KUNISHIO, Kuniaki MORISAKI, Yoshihito MATSUMOTO,
Yutaka HONMA, Seigo NAGAO

Abstract

We analyzed the prognosis of the patients with anaplastic astrocytoma, clinically. Intraoperative radiotherapy (IORT) was performed in 11 of 23 patients with anaplastic astrocytomas. Twenty or 25 Gy of irradiation was delivered in a single fraction intraoperatively, followed by external beam radiotherapy. There was no significant differences survival rate between the patients with IORT and those without IORT, although some cases with radionecrosis after IORT revealed good prognosis.

p27 is a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor that regulates the decision to enter S phase or withdraw from the cell cycle. We analyzed a series of 17 cases with anaplastic astrocytoma, and evaluated whether deregulated p27 expression correlates with proliferative potential (MIB-1 labeling index (LI)) and survival rate. p27 immunoreactivity was clearly observed as diffuse nuclear staining without cytoplasmic staining. Though the patients with low p27 expression tended to be associated with poor prognosis, there was no significant differences. No apparent correlation could be found between clinical data and prognosis. These findings suggested that p27 expression may have an influence on proliferating potential or prognosis in anaplastic astrocytoma.

Key words: intraoperative radiotherapy, anaplastic astrocytoma, p27, MIB-1

【はじめに】

これまで我々は、悪性神経膠腫に対する補助療法として、術中照射療法(IORT)および動注化学療法を行い、それらの効果、合併症、予後との関連性などについて報告してきた^{4,6)}。今回、悪性神経膠腫のなかでもanaplastic astrocytoma (WHO Grade III)に限定し、治療および予後に関する臨床検討をおこなった。さらに、cyclin dependent kinase (CDK)阻害蛋白質のP27⁹⁾の発現に関しても検討を加えたので報告する。

【対象および方法】

1. 対象・治療方針

1984年から1997年までに香川医科大学脳神経外科にて治療したanaplastic astrocytoma 24例を対象とした。年齢は5歳~76歳(平均52.3歳)、男性17例、女性7例である。そのうち1989年以後の11症例では、IORT(20~25Gy)に外照射療法(40~60Gy)を施行している。1989年までの13症例では外照射のみを行っている。これまでの当科における悪性神経膠腫の治療方針としては、可及的に腫瘍摘出後IORTを行い術後に外照射およびACNU、CBDCAを用いた動注化学療法を施行することである。

2. 解析方法

年齢、発生部位、手術摘出度、およびIORTの有無などの各因子と予後との関連性をKaplan Meier法の生存曲線を用いて統計学的に解析した。さらに

連絡先: 〒761-0793

香川県木田郡三木町池戸1750-1

香川医科大学 脳神経外科 國塩勝三

Phone:087-891-2207 Fax:087-891-2208

Cox's Proportional hazard modelを用いた多変量解析にて予後に影響を及ぼす因子を検討した。

3. 免疫組織学的検索

組織標本の保存が良好であった17例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗p27蛋白モノクローナル抗体およびMIB-1モノクローナル抗体¹⁾による免疫組織化学的検索を行った。

7μm切片を作製し、ABC法による酵素抗体法を行った。すなわち、脱パラフィン後、H₂O₂加メタノールにより内因性ペルオキシダーゼの除去を行い、0.01Mクエン酸緩衝液(PH6.0)による浸漬によりマイクロウェーブ照射(700W, 15分間)にて抗原を賦活した。一次抗体として抗p27蛋白モノクローナル抗体(Novocastra社)(1:50)およびMIB-1モノクローナル抗体(MBL社)(1:50)にて4℃で一晩反応させた。ビオチン化抗マウスImmunoglobulin(1:500)で室温、30分反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(1:500)、室温、30分反応させた。さらにdiaminobenzidine液にて発色させた後、メチルグリーンで核染色を行った。p27およびMIB-1陽性率は、約1000個の腫瘍細胞のうち陽性細胞の割合で標示した。

【結果】

1. 臨床検討

年齢では、60歳以上と未満でKaplan Meier法による生存曲線を用いて検討したが、60歳以上の高齢者ほど予後不良となる傾向はあるものの有意差はなかった。発生部位では大脳半球に発生したもの、大脳基底核や脳幹などの脳深部に発生したものとで比較したが有意差はみられなかった。手術摘出度に関しては、亜全摘出群、部分摘出群、生検群の3者間では、やや亜全摘出群が他群よりも若干予後が良い傾向にあるものの有意差はみられなかった(Fig.1)。IORTの効果については、IORTの有無では予後に差はなかった(Fig.2)。また、ほとんど全例において動注化学療法を中心とした何らかの化学療法を行っており、化学療法による予後については有意差検定はできなかった。

IORTの合併症として、照射後急性脳浮腫を呈し外減圧術を要したものが1例みられた。2例では放射線壊死をきたし壊死部摘出術を施行し、比較的予後は良好である(Table 1)。年齢、発生部位、手術、IORTおよび化学療法の5因子にてCox proportional hazard modelを用いた多変量解析による予後の検索

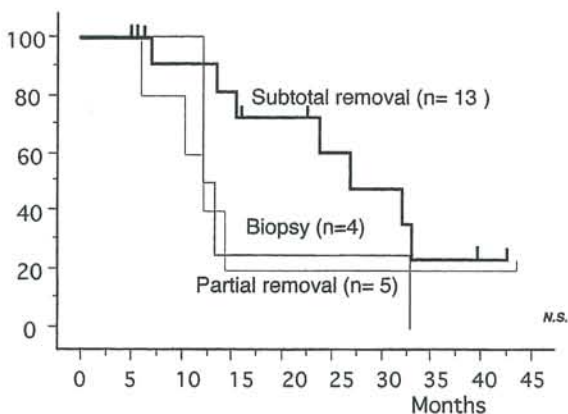


Figure 1. Kaplan-Meier survival curves of 13 patients who were resected subtotally, 5 patients with partial removal, and 4 patients with biopsy. The difference of the survival curve among the extent of surgery is not significant.

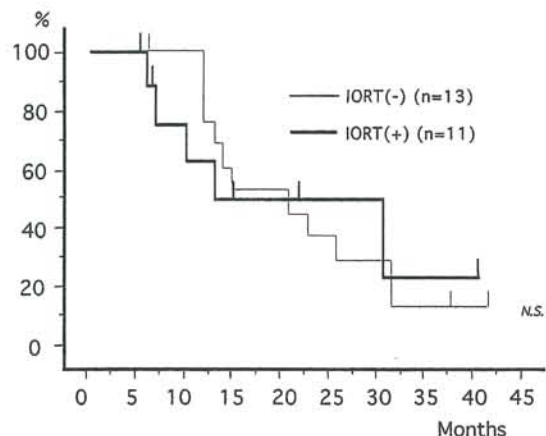


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves of 11 cases with IORT and 13 without IORT. There is no significant difference in survival rate between the two groups.

Table 1. Summary of the patients with complication after IORT.

Case	Age /Sex	Dose of IORT(Gy)	Complication	Treatment	Prognosis
1	42/M	25	Brain edema	Ext.decomp.	Dead (29mos)
2	37/M	25	Radionecrosis	Necrotomy	Alive (36mos)
3	40/M	20	Radionecrosis	Necrotomy	Alive (64mos)

IORT=intraoperative radiotherapy; Ext.decomp.=external decompression; Int.decomp.=internal decompression

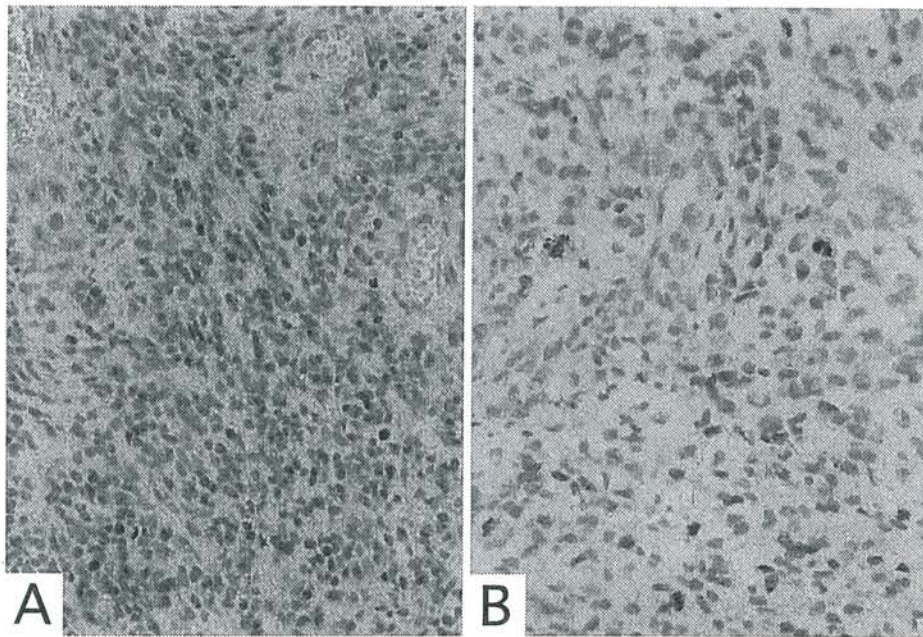


Figure 3.
Microphotograph of a tumor specimens showing many tumor cells with p27 positive nuclei (A). Several tumor cells are positive for MIB-1 staining (B).
(Hematoxylin and eosin staining, original magnification, $\times 400$)

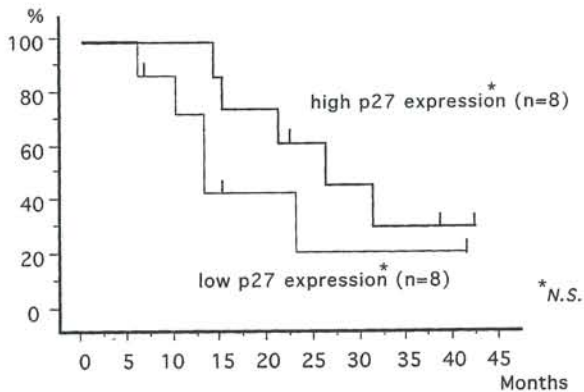


Figure 4.
Kaplan-Meier survival curves shows that patients with high p27 expression tended to be longer than patients with low p27 expression, however, there is no significant difference in survival rate between them.

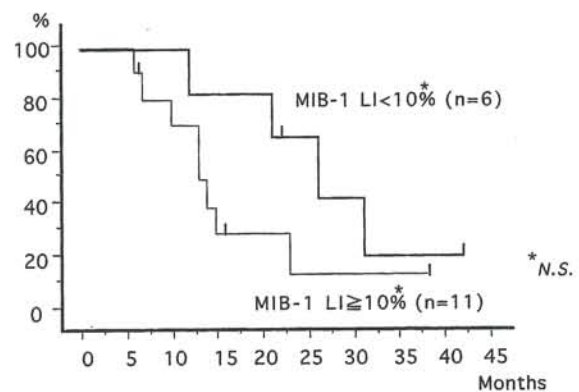


Figure 5.
Kaplan-Meier survival curves shows that patients with low MIB-1 labeling index tended to be longer than patients with high MIB-1 labeling index, however, there is no significant difference in survival rate between them.

では、有意差をもって予後に関連する因子はみられなかった。

2. 免疫組織学的検討

p27陽性反応は主に腫瘍細胞の核に認められ、その陽性率は9.9%~87.1%で平均41.2%であった (Fig.3A)。また、MIB-1陽性率は0.1%~41.2%で平均15.2%であった (Fig.3B)。両者の陽性率は逆相関の傾向がみられたが、有意差はなかった。Kaplan Meier法による予後との関連性についての検

討では、p27陽性率50%未満群が有意差はないものの50%以上の群より予後不良となる傾向がみられた (Fig.4)。さらにMIB-1陽性率10%以上の症例が未満よりも予後不良となる傾向がみられた (Fig.5)。

【考案】

悪性神経膠腫の補助療法としてのIORTの効果に関してはこれまで報告してきた^{4,6)}が、組織分類を anaplastic astrocytoma のみに限定して検討した報告

は少ない。今回の検討結果では、IORTの有無を含め、年齢、手術摘出度など各々の因子で予後との関連性で統計学的に有意差はみられなかった。しかしながら、IORT後放射線壊死を生じnecrotomyを行った後比較的予後の良好な症例もみられるのも事実である。

p27はcyclin D1およびcyclin E/cdk2複合体と結合するcyclin dependent kinase (CDK)活性阻害蛋白質である⁹⁾。また、p27ノックアウトマウスでは巨体で種々の臓器が大きくなること、下垂体腫瘍ができやすいなどより細胞の増殖および腫瘍化などに関連した働きを有すると考えられている^{3,11)}。一般に癌におけるp27蛋白発現についての報告は、乳癌、肺癌、大腸癌、悪性リンパ種などで散見される^{2,8,9,10,11,13,14)}が、脳腫瘍とくに神経膠腫において検討した報告は文献上Pivaら¹²⁾の報告のみである。我々も神経膠腫においてp27蛋白発現と腫瘍増殖能、さらにMIB-1陽性率との関連性を検討し、Pivaら¹²⁾と同様の結果がえられたことを報告した⁷⁾。すなわち、神経膠腫においてp27蛋白発現は病理組織学的悪性度および腫瘍増殖能であるMIB-1陽性率と関連すると考えられる^{7,12)}。他の悪性腫瘍においても、多くは悪性度に比例して、p27の発現が減少してくること、さらに陽性率の低いものほど予後が不良になることがいわれている^{2,8,9,10,11,13,14)}。今回の結果でも有意差はみられていないが、p27陽性率の低いものが高いものより予後が不良となる傾向がみられ、MIB-1陽性率と逆相関の傾向がある。以上より、今後症例を蓄積して検討を加える必要があるものの、免疫組織学的手法によるp27発現の検討はMIB-1陽性率と同様、患者の予後把握さらには治療方針の決定に有用なマーカーとなると推察された。

【文献】

- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle C, Gerdes J : Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-363, 1992
- Esposito VA, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A : Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57: 3381-3385, 1997
- Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM : A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85: 733-744, 1996
- Fujiwara T, Honma Y, Ogawa T, Irie K, Kuyama H, Nagao S, Takashima H, Hosokawa A, Ohkawa M, Tanabe M, Intraoperative radiotherapy for gliomas. *J Neuro-Oncol* 23: 81-86, 1995
- Hengst L, Reed SI : Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271: 1861-1864, 1996
- 國塩勝三、森崎訓明、河井信行、小川智也、入江恵子、本間温、長尾省吾 : 悪性神経膠腫に対する術中照射療法に関する検討. *Neuro-Oncology* 8;21-27, 1998
- Kunishio K, Morisaki M, Matsumoto Y, Honma Y, Nagao S : Relationship of the expression of the cell-cycle inhibitor p27 with MIB-1 labeling index and prognosis in human gliomas. (投稿中)
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Florentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M : Increased proteasome-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3: 231-234, 1997
- Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Mateo MS, Sanchez-Verde L, Villuendas R, Troncone G, Piris MA : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27KIP1 in Lymphoid Tissue. p27KIP1 Expression Is Inversely Proportional to the Proliferative Index. *Am J Pathol* 151:151-160, 1997
- Mori M, Mimori M, Shiraishi T, Tanaka S, Ueno H, Sugimachi K, Akiyoshi T : p27 expression and gastric carcinoma. *Nature Med* 3: 593, 1997
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K : Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85: 707-720, 1996
- Piva R, Cavalla P, Bortolotto S, Cordera S, Richiardi P, Schiffer D : p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas. *Neurosci Lett* 234: 127-130, 1997
- Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M : The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57: 1259-1263, 1997
- Tshilias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM : Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a noble prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 58: 542-548, 1998

当院における anaplastic astrocytoma の治療成績

— 統計学的検討による考察 —

Evaluation of anaplastic astrocytoma in our hospital.
A Statistical Study using Cox's Proportional Hazard Model.

聖マリアンナ医科大学脳神経外科

田中克之、山口由太郎、鈴木理恵、平本 準、関野宏明

【はじめに】

malignant gliomaの予後影響因子として、組織診断つまり anaplastic astrocytoma(以後AA)と glioblastoma(以後GB)との予後の相違が指摘されているが、多くの報告は、単変量解析により生存率を比較するか、多変量解析により予後影響因子として統計学的に有意か否かを検討しており、予後を推察するには至っていない。

本年の脳腫瘍カンファレンスにおいて、東北大学より60歳以上の神経膠腫に対する治療について、malignant gliomaの治療成績が年齢により異なるのではとの報告があった。Burgerらも、malignant gliomaにおいて、年齢により大きく予後が異なっていたことを報告している。当院でのACNU/VP16療法の治療成績検討の多変量解析でも、組織診断よりも年齢、入院時KPSが予後に影響していたことから、改めてこれらの予後影響因子を考慮した統計学的検討からanaplastic astrocytomaの治療成績を報告したい。

【対象】

対象は、当院にて診断され、その後追跡調査が行われた malignant glioma症例74例である。年齢は8歳～80歳までの平均54.7歳で、男性42例女性32例、観察期間は82.4ヶ月、平均観察期間は18.8ヶ月であった。AA症例は38例であり、年齢は24歳～80歳(平均年齢±標準偏差 53.0±15.9)で、男性20例、女性18例であった。GB症例は36例であり、年齢は8歳～76歳(平均年齢±標準偏差 56.4±16.6)で、男性22例、女性14例であった。AA群で、入院時KPSは80.0±20.7%であり、手術摘出率は58.4±36.4%であった。一方、GB群では、入院時KPSは66.9±20.5%であり、手術摘出率は67.9±32.8%であった(Table 1)。

【治療方法】

当院では、すべての malignant gliomaに対し、できる限りの摘出術を行い、拡大局所の放射線療法と、化学療法を施行している。1994年以前は

Table 1 Summary of the patients with malignant gliomas

	total (cases)	AA (cases)	GB (cases)
No. of patients	74	38	36
age (years)			
mean±S.D.	54.7±16.2	53.0±15.9	56.4±16.6
range	8~80	24~80	8~76
sex			
male	42	20	22
female	32	18	14
KPS			
mean±S.D.	73.6±21.5	80.0±20.7	66.9±20.5
extent of resection			
mean±S.D.	63.0±34.8	58.4±36.4	67.9±32.8

IFN/ACNU療法を、1994年以降はACNU/VP16療法を施行した。

IFN/ACNU療法群は、Day1~7までIFN-β 300万単位を点滴静脈内投与し、ACNUはDay2に2mg/kgを点滴静注した。Day3より放射線療法を行い、休薬期間は5週間とした。

ACNU/VP16療法群は、Day1にACNU 80mg/m²を静脈内投与、Day2およびDay3にVP16 80mg/m²を静脈内投与した。やはりDay3より放射線療法を併用、休薬期間は原則的に5週間とした。

【統計学的解析方法】

1) AA群およびGB群における累積生存率曲線は、Kaplan-Meier法を用い、一般化Wilcoxon検定にて検定した。予後影響因子として年齢（発症時年齢が60歳以上とそれ未満）、入院時KPS（70%以上とそれ未満）、手術摘出率（摘出率75%以上とそれ未満）において、予め単変量解析を施行し、各因子の予後への影響を評価した。

2) 続いて、最も予後に影響する年齢で2群（発症時年齢が60歳以上とそれ未満）に分け、組織診断別

単変量層別解析を施行し、残る予後影響因子の同時有意差検定（尤度比検定、Wald検定）を行った後、比例ハザード性を検定した。

3) AA群およびGB群において、選択された共変量を基に、多変量解析としてCoxの比例ハザードモデルによる回帰分析を行い、さらに、推定累積生存曲線を求めた。

予後影響因子には、名義尺度と順序尺度があるため、ともに二値変数として便宜的に間隔尺度として扱った。

なお、検討には、StatView version5.0J (SAS Institute Inc.USA)を用いた。

【結果】

1) 組織診断別単変量解析

組織診断別単変量解析ではAA群とGB群とで、生存率に有意差が認められた(一般化Wilcoxon test : p =0.068)。しかし、多変量解析では、年齢、入院時KPS、摘出率よりも有意な因子とはならなかった (Table 2)。

Table 2 Results of multivariate analysis using Cox's proportional hazard model in the patients with malignant gliomas

covariants	coefficient	SE	p value	HR	95% CI
age ≥ 60	1.026	0.356	0.0039	2.791	(1.390 , 5.604)
KPS ≥ 70%	- 0.680	0.319	0.0332	0.507	(0.271 , 0.947)
pathological diagnosis					
glioblastoma	0.229	0.336	0.4954	1.257	(0.651 , 2.429)
ACNU/VP16	- 0.721	0.350	0.0392	0.486	(0.245 , 0.965)

SE:standard error, HR:hazard ratio, 95%

CI:95% confidence interval

Table 3 Results of multivariate analysis using Cox's proportional hazard model in the patients over 60 years with anaplastic astrocytoma

covariants	coefficient	SE	p value	HR	95% CI
extent of resection ≥ 75%	- 0.191	0.937	0.8383	0.826	(0.132 , 5.183)
KPS ≥ 70%	- 0.924	0.964	0.3381	0.397	(0.060 , 2.629)
ACNU/VP16	0.134	0.664	0.8402	1.143	(0.311 , 4.198)

SE:standard error, HR:hazard ratio, 95% CI:95% confidence interval

Fig.1 Kaplan-Meier cumulative survival plots for the pathological diagnosis in consideration of the age of onset in the patients with malignant gliomas : Univariate analysis

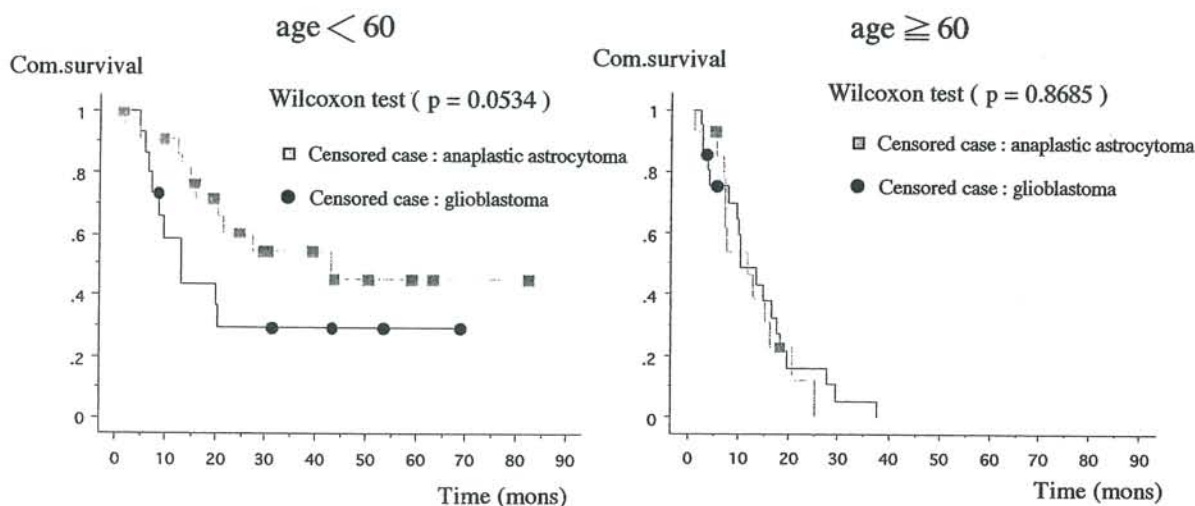
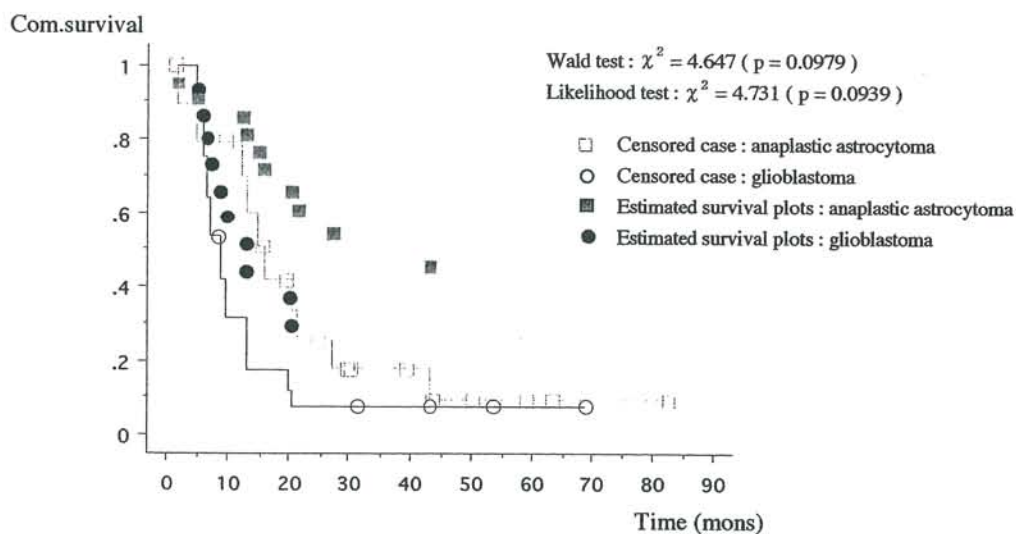


Fig.2 Baseline cumulative survival plots (○, □) and estimated cumulative survival plots (●, ■) using Cox's proportional hazard model in patients under 60 years with malignant gliomas : Multivariate study



2) 年齢群ごとによる組織診断別単変量解析

60歳以上と以下の群において組織診断別単変量解析を行った結果、median survival timeは、60歳以上では、AA群が11.8ヶ月、GB群が10.5ヶ月と有意差はなく、60歳以下では、AA群が43.1ヶ月、GB群が12.8ヶ月と明らかに異なった(p=0.053) (Fig.1)。

3) 年齢群ごとによる多変量解析

組織診断別に共変量として、入院時KPS、化学療法、さらに手術摘出率を用い、多変量解析を行った。

まず、AA群での60歳以上群においては、入院時KPS、化学療法、摘出率は尤度比検定からも回帰モデルに有意に寄与しておらず、予後影響因子ではないことが判明した(Table 3)。一方、60歳以下群においては、入院時KPS、化学療法、摘出率の各回帰係数は、それぞれ-1.960、-2.086、0.307であり、対数ハザード比(95% 上限、下限)は、0.141(0.029、0.686)、0.124(0.026、0.592)、1.360(0.311、5.941)であった。この結果、手術摘出率、入院時KPSが予後

Table 4 Results of multivariate analysis using Cox's proportional hazard model in the patients under 60 years with anaplastic astrocytoma

covariants	coefficient	SE	p value	HR	95% CI
extent of resection ≥ 75%	- 1.960	0.808	0.0152	0.141	(0.029, 0.686)
KPS ≥ 70%	- 2.086	0.797	0.0088	0.124	(0.026, 0.592)
ACNU/VP16	0.307	0.752	0.6831	1.360	(0.311, 5.941)

SE:standard error, HR:hazard ratio, 95% CI:95% confidence interval

に影響を及ぼすことが明らかとなり、残差プロットでも確認された(Table 4)。

次にGB群において、同様に多変量解析を行ったが、予後影響因子として年齢以上に影響を及ぼす因子を認めなかった。

以上から推定累積生存率曲線を求めた。年齢60歳以下のAA群において、入院時KPSが70%以上、摘出率が75%以上であればかなりの予後が望めることがわかった(Fig.2)。

【考察】

多変量解析においては、多重共線性の影響を考慮して、予後を評価することが重要で、これらを考慮した今回の検討で、60歳以上と以下とで、AAとGBの予後が異なることは興味深い。

Burgerら²⁾は、National Brain Tumor Study Groupの解析から、年齢と発症から手術までの期間が、AA群とGB群とで統計学的に有意差があったことから、病理組織学的診断においては、各施設で異なる可能性があり、また一部はGBに至る過程をAAと診断している可能性があり、AAと診断された中には本来のAAと一部GBが含まれると報告している。GBにおいては、その臨床経過からsecondaryとde novo GBとにpathwayが分けられ、発症年齢も異なる傾向が報告されており³⁾、臨床経過の長いsecondary GBにおいては、その可能性は一層高いものと想像できる。一方、臨床上短期間の経過をとるde novo GBの発生過程においては、摘出された組織がAAと診断されるため、AAの生存率が本来のAAの生存率より短くなる可能性がある。Daumas-Duportら³⁾がより客観的な診断基準を報告したが、経過の短いde novo GBでは、基本所見の組み合わせで的確に診断できるのか疑問が残る。また分子生物学的検討でも、de novo GBにおいてAAと似たgenetic changeを

報告⁴⁾しているものがあることも興味深く、本来のAAと一部GBが含まれる可能性をより疑わせる。今回の臨床データの検討からも、60歳以上のAA群とGB群とに生存率の有意差が無いことは、60歳以上のAA群の中には、de novo GBのpathwayの途中を含んでしまう可能性が強く示唆され、少なくとも臨床においては、60歳以上の高齢者では2群を同様に扱うべきと考えられた。

一方で60歳以下においては、的確な組織診断と治療方針が予後を左右する可能性が示された。malignant gliomaの予後影響因子として、年齢、組織診断以外に、入院時KPS⁵⁾や手術摘出率⁴⁾も重要とされている。入院時KPSや手術摘出率よりも組織悪性度が予後に影響するとする多変量解析の報告⁶⁾もあるが、これは多重共線性の影響があり疑問が残る。手術摘出率に関しては、AAでは統計学的有意差がなく、GBにて手術有効とするもの⁷⁾もあるが、今回の検討では、明らかに60歳以下のAAにおいて、摘出率は生存率に影響していた。さらに、各予後影響因子を考慮した推定累積生存率において、有意に生存率が向上していることは、今後60歳以下のAA症例に対する積極的な治療が重要であることを示していると思われた。

【結語】

- 1) 予後影響因子を考慮した統計学的検討からanaplastic astrocytoma(AA)の治療成績を検討した。
- 2) 組織診断別単変量解析の結果、60歳以下のmedian survival timeは、AA群とGB群では明らかに有意差があり(AA群：43.1ヶ月、GB群：12.8ヶ月(p=0.053))、60歳以上では2群に差はなかった。
- 3) 60歳以下のAAにおいては、入院時KPSと手術摘出率が予後に影響しており、積極的治療により生存率の向上が期待できると思われた。

【文献】

- 1) Burger PC, Green SB: Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59 : 1617-1625, 1987.
- 2) Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA: Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56 : 1106-1111, 1985.
- 3) Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P: Grading of astrocytomas : a simple and reproducible method. *Cancer* 62 : 2152-2165, 1988.
- 4) Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ : Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg* 78 : 767-775, 1993.
- 5) Gehan EA, Walker MD : Prognostic factors for patients with brain tumors. in Bailar JC, Weisberger EK (eds): *Modern Concepts in Brain Tumor Therapy: Laboratory and Clinical Investigations*. National Cancer Institute Monograph, 1977, vol. 46, pp. 189-195.
- 6) James CD, He J, Carlbom E, Nordenskjold M, Cavenee WK, Collins P : Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon α and interferon β -1 gene deletions in human glial tumors. *Cancer Res* 51 : 1684-1688, 1991.
- 7) 隈部俊宏, 嘉山孝正, 吉本高志, 溝井和夫: Malignant astrocytoma初期治療後のcomplete response症例の検討. *脳外* 22 : 545-551, 1994.
- 8) Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW : Pathway leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81 : 427-436, 1994.
- 9) Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Leone M, Soffietti R: Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. *Cancer* 61: 1386-1393, 1988.

Anaplastic Astrocytomaの当科における治療成績

Follow-up study of primary anaplastic astrocytoma

東邦大学 第一脳神経外科

黒木貴夫、大塚隆嗣、周郷延雄、長尾建樹、清木義勝、柴田家門

東邦大学佐倉病院 脳神経外科

勝目幹郎

【はじめに】

Astrocytoma Grade IIIの5年生存率は1996年度脳腫瘍全国集計調査報告では、22.2% (Malignant astrocytoma)¹⁾であり、手術手技、化学療法、放射線療法および定位的放射線外科治療が進歩してきたことを考え合わせても、その治療成績の大幅な改善は認めていない。

我々は、過去10年間に、初回の手術および組織生検で病理組織学的にAstrocytoma Grade IIIと診断された9例についての治療経験をもとに、予後に影響を及ぼす諸因子について検討したので報告する。

【対象および方法】

対象は1989年から1998年までに手術された9例である(Table 1)。性別は男性6例、女性3例で、年齢は14歳～80歳(平均45歳)であった。発生部位は脳深部のもの3例、脳表のもの6例で、部分摘出術および亜全摘出術が3例、組織生検が6例に行なわれた。放

射線治療は全例に行なわれ、拡大局所放射線療法7例、拡大局所放射線療法と定位的放射線外科治療との組み合わせが1例、定位的放射線外科治療のみが1例であった。化学療法は7例に行なわれ、動脈内投与が4例、静脈内投与が3例であった。

寛解期間 (Disease-Free survival time) はKarnofsky performance status (KPS) 60以上を示し、すなわち、時々の援助により、独自で生活できることを意味している。我々は、予後を判定する上で、この寛解期間が非常に重要だと考えている。この寛解期間は、8ヶ月から43ヶ月(平均22ヶ月)とかなりのばらつきを認めた。また、生存期間は11ヶ月から82ヶ月(平均33ヶ月)であった。

予後に影響を及ぼすと考えられた年齢、腫瘍の局在部位および画像診断所見、手術方法、放射線治療方法および化学療法の種類と、寛解期間と生存期間をとともに延長させる要因について検討した。

Table 1 Summary of 9 Cases with Grade III Astrocytoma
D-F survival time = Disease-Free survival time, RS = Radiosurgery

Case No.	Age	Sex	Location	Sign/Symptoms	Operation	Radiation	Chemotherapy	D-F survival time (M)	Outcome (Survival time)
1	55	M	lt-frontoparietal	rt hemihyesthesia	partial	60 Gy	I.A. MCNU 50mg x 6 CBDCA 450mg x 6	43	death (60)
2	35	M	corpus callosum	headache	biopsy	40 Gy RS 25 Gy 30 Gy	I.A. MCNU 50mg x 6 CBDCA 450mg x 6	36	death (37)
3	61	M	rt-temporal	headache	biopsy	60 Gy	I.V. MCNU 50mg x 8 CBDCA 450mg x 8	07	death (11)
4	63	M	lt-frontal	disorientation	subtotal	60 Gy	I.A. MCNU 50mg x 5 CBDCA 450mg x 5	24	alive (82)
5	35	F	lt-thalamus	rt hemiparesis	biopsy	60 Gy	(-)	09	death (12)
6	32	M	rt-occipital	lt hemianopsia	biopsy	50 Gy	I.A. MCNU 50mg x 2 CBDCA 450mg x 2	12	death (17)
7	33	F	rt-frontoparietal	convulsion	partial	60 Gy	I.V. MCNU 50mg x2/w x 7 CBDCA 450mg x5/w x 7	36	alive (36)
8	80	F	rt-frontal	convulsion	biopsy	RS 30 Gy	(-)	08	death (14)
9	14	M	rt-thalamus	lt hemiparesis	biopsy	50 Gy	I.V. ACNU 150mg x 2 VCR 2mg x 2 Interferon 3MU x 50	22	death (24)

【結果】

35歳以下の若年群と60歳以上の中高年群を比較すると、寛解期間に有意差を認めないが、生存期間では中高年群が有意に延長を認めた(Table 2)。腫瘍の局在部位では、表在性腫瘍で生存期間の延長を認めた。画像診断所見では充実性腫瘍より表在性腫瘍で、寛解期間および生存期間ともに延長を認めた。手術方法では組織生検より部分あるいは亜全摘出で、寛解期間と生存期間の両方の延長を認めた(Table 3)。放射線治療についてその照射量を検討すると、50Gy以下よりも60Gy以上のほうが有意に寛解期間と生存期間の延長を認めた(Table 4)。化学療法については、未治療群よりも経静脈的投与化学療法、経静脈的投与化学療法よりも経動脈的投与化学療法のほうが寛解期間と生存期間ともに延長を認めた。

次に、今回の9症例のうち代表例4例を呈示する。

症例1 (Fig. 1)は55歳の男性である。右半身の知覚障害で発症し、MRI上、左前頭頭頂部に腫瘍を認めた。腫瘍の部分摘出術後、60Gyの局所拡大照射を行ない、経動脈的にMCNU（ラニムスチン）50mgとCBDCA（カルボプラチン）450mgを4ヶ月おきに6回繰り返して施行した。発症後43ヶ月の経過は良好であったが、その後再発を認め、60ヶ月で死亡した。

症例4 (Fig.2)は63歳の男性である。見当識障害で発症し、MRI上、左前頭部に嚢胞性の腫瘍を認めた。腫瘍の亜全摘出術後、60Gyの局所拡大照射を行ない、経動脈的に、MCNU（ラニムスチン）50mgとCBDCA（カルボプラチン）450mgを4ヶ月お

Table 2 Relationship between the survival time and prognostic factors

Factors	D-F survival time	Survival time
Age		
≤ 35 (5)	23.0 (M)	25.2 (M)
≥ 60 (4)	20.5	41.8
Location		
superficial (6)	21.7	36.7
deep (3)	22.3	24.3
CT findings		
solid (6)	20.5	23.3
cystic (3)	24.7	51.0

Table 3 Relationship between the survival time and operation

Factors	D-F survival time	Survival time
Operation		
biopsy	15.7 (M)	18.5 (M)
partial or subtotal	34.3	59.3

Table 4 Relationship between the survival time and adjuvant therapy

Factors	D-F survival time	Survival time
Radiation		
≤ 50 Gy (3)	14.0 (M)	18.3 (M)
≥ 60 Gy (6)	25.8	39.7
Chemotherapy		
Negative (2)	8.5	13.0
Intra-venous (3)	21.8	23.7
Intra-arterial (4)	28.8	49.0

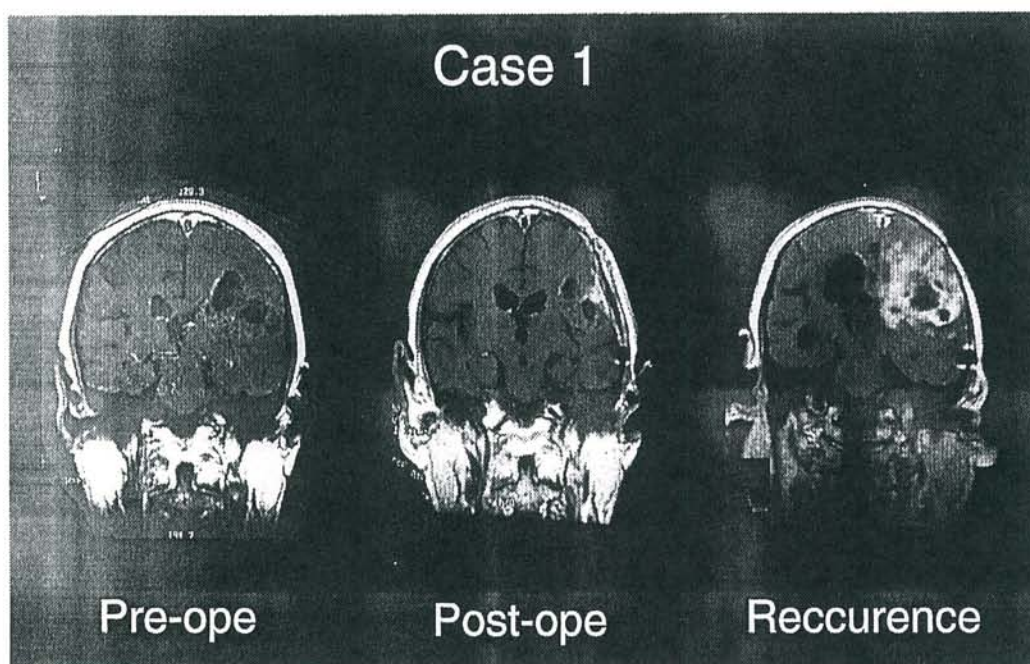


Fig. 1

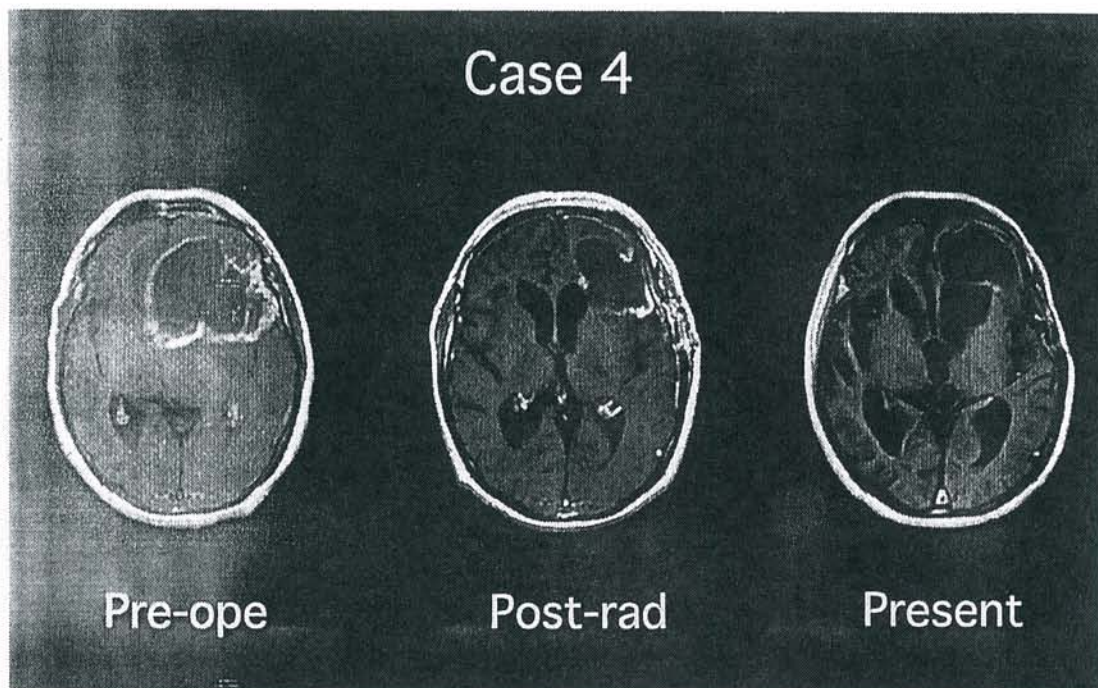


Fig 2.

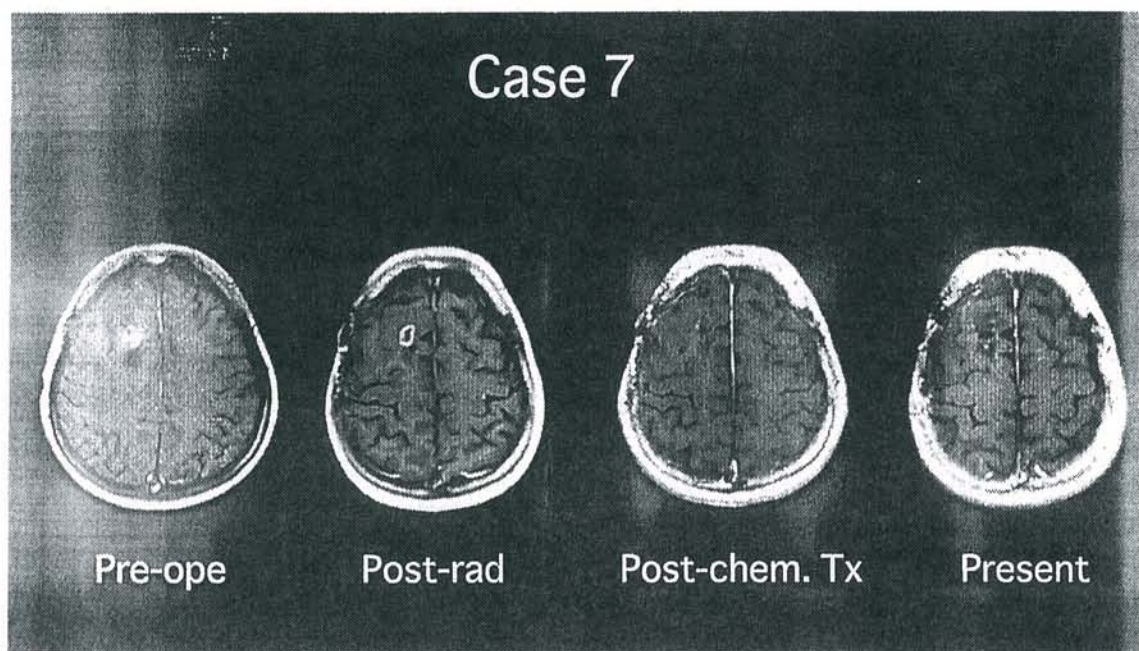


Fig 3.

きに5回繰り返して施行した。経過は良好であったが、24ヶ月後より、意志の疎通は可能であるが、ほぼ全面介助を要する状態となり、発症後82ヶ月の現在も生存はしているものの、寝たきりの状態である。

症例7 (Fig.3)は33歳の女性である。痙攣発作で発症し、MRI上、右前頭頭頂部に腫瘍を認めた。腫瘍の亜全摘出術後、60Gyの拡大局所照射を行ない、経静脈的にMCNU (ランムスチン) 50mg、週2回と

CBDCA (カルボプラチン) 450mg、週5回の投与をそれぞれ7クール行なった。その後の経過は良好で、発症後36ヶ月の現在も、元気に外来通院している。

症例8 (Fig.4)は80歳の女性である。痙攣発作で発症し、CT上、右前頭部に造影効果を認めない低吸収域を認めた。組織生検後、年齢および全身状態を考慮し、直径5cmで30Gyの定位的放射線外科治療を施行した。しかし、腫瘍は急速に増大し、発症後14ヶ月で死亡した。

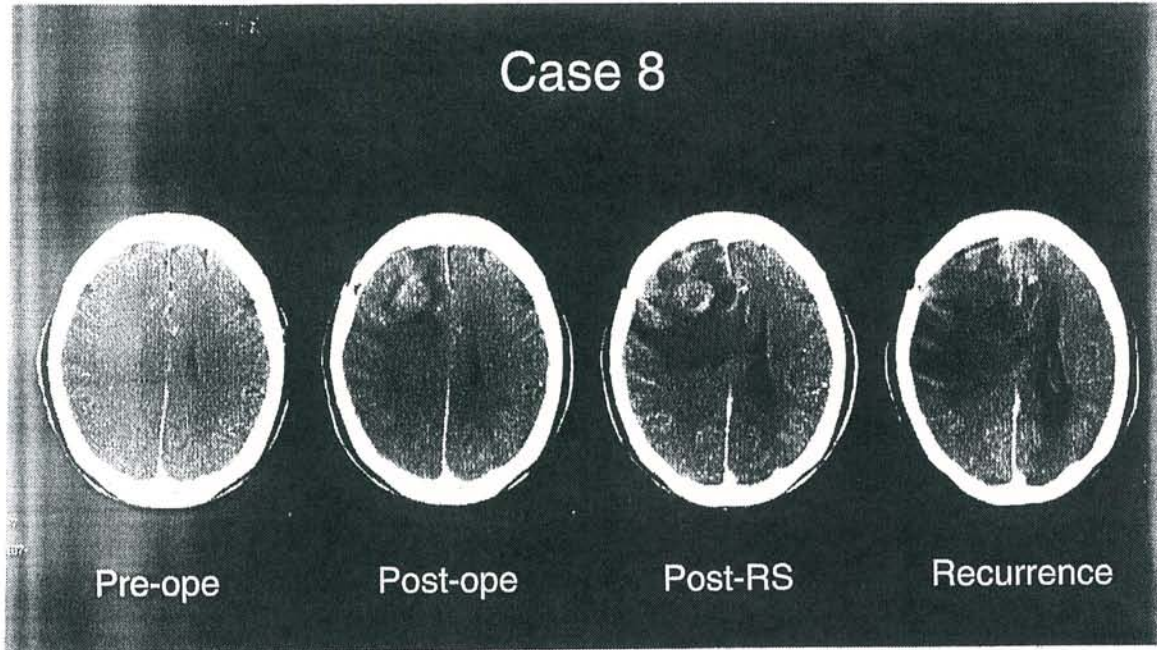


Fig 4.

【考察】

Astrocytoma Grade IIIの臨床像および治療は、おおくの場合、Astrocytoma Grade IVすなわち神経膠芽腫とともに統計され、Astrocytoma Grade III単独で報告されることは少ない。我々の症例も過去10年間で9症例と症例数が少なく単独で臨床像および治療成績を比較検討するのは統計学的にかなりの無理があるようである。これらの点を踏まえて、これら9症例の結果と予後を左右する因子について、再発までの期間および生存期間との関係を考察した。

再発までの期間および生存期間ともに延長する予後良好因子について検討すると、我々の症例では、年齢は予後良好因子とならなかった。一般的に、若年者ほど予後が良好であるのは、周知の事実であるが、隈部ら²⁾は若年者ほど生命予後が良好であったと報告し、その理由として、若年者ほど積極な摘出術が行なわれた結果であると結論づけている。われわれの9症例では、若年者5症例のうち3症例が脳深部に腫瘍が存在し、積極的な手術が行なえなかった結果、年齢が予後良好因子となりえなかったと推測された。

腫瘍発生部位は予後良好因子とはなりえなかったが、画像診断上の嚢胞性腫瘍は実質性腫瘍と比較すると、予後良好因子であった。これは、嚢胞性腫瘍3例すべてが前頭葉に存在し、症例4(Fig.2)のように、積極的な手術が行なわれた結果と思われた(Table 2)。

次に、外科治療について検討すると、積極的な外科治療、すなわち、可能な限りの腫瘍摘出術が予後

良好因子であった(Table 3)。Ammiratiら³⁾は、31例の大脳半球悪性神経膠腫に対し、19例の全摘出術と12例の亜全摘出術を施行し、KPS80以上の期間を比較検討した結果、亜全摘例の12.5週と比べ、全摘例では18.5週と長期間であったと報告している。このように、積極的外科治療は、患者の単なる生存期間の延長だけではなく、Quality of lifeをも改善させると考えられた。

さらに、手術後の放射線療法について検討すると、60Gy以上のhigh doseの拡大局所放射線療法および拡大局所放射線療法と定位的放射線外科治療の組み合わせは、予後良好因子であった。60Gy以上のhigh doseの放射線療法については、異論の多いところではあるが、我々の症例2は再発時、長期間の腫瘍コントロール後の再発例であり、患者の強い希望もあり、追加の定位的放射線外科治療を追加した。結局、再発は免れなかったものの、悪性神経膠腫に対する拡大局所放射線療法と定位的放射線外科治療の組み合わせは、今後の新たな治療法の可能性を示唆するものだと我々は考えている(Table 4)。Lunfordら⁴⁾は、定位的放射線外科治療が、腫瘍の増大を阻止し、また、患者のmorbidityを減じる非侵襲的な外科的治療法と述べ、25例のanaplastic astrocytomaのついて、その有効性を報告している。

次に、化学療法について検討すると、我々の9症例では、動脈内投与による化学療法が、予後良好因子であった(Table 4)。現在までに多くの化学療法が文献的に報告されているが、最近、Mastronardiら⁵⁾は、Tamoxifenの経口大量療法(160-200mg/day)

Table 5 Good prognostic factors

-
1. CT findings : cystic tumor
 2. Operation : resect as much as possible
 3. Radiation therapy : ≥ 60 Gy
 4. Chemotherapy : Intra-arterial injection
-

とCBDCA (450-600mg/sq) の併用化学療法の有効性を示唆している。また、Hildebrandら⁶⁾は、Dibromodulcitol(1400mg/sq)と Procarbazine(150mg)の経口投与とBCNU (150mg/sq)の経静脈投与の併用化学療法を行い、再発anaplastic astrocytoma 11例中6例にその有効性を認めたと報告している。Dropchoら⁷⁾は40例の再発性悪性神経膠腫に対し、Cisplatin(75mg/sq)の動注化学療法を行ない、4例(10%)に寛解を、また9例(22%)に腫瘍の静止化を認め、その動注化学療法治療の可能性を示唆している。しかし、我々の症例7(Fig.3)のように、静脈内投与による化学療法により、腫瘍が静止化、コントロールされている症例も存在している。最近の我々の化学療法の原則は動脈内投与であるが、未だ投与方法に関しては決定的ではない。このように、悪性Gliomaに対する化学療法の薬剤選択および、投与方法は未だ決定的なものではなく、試行錯誤の状態であるのが現状のようである。

これらの結果をまとめると、我々の9症例では、嚢胞性腫瘍、可能な限りの腫瘍摘出、60Gy以上のhigh doseの放射線療法および、動脈内投与による化学療法が予後良好因子であった(Table 5)。

Table 6は我々の悪性Glioma治療のProtocolである。原則は、可能な限り摘出し、術後、拡大局所放射線療法を行なっている。最近では、照射後の脳萎縮を考慮し、高齢者には照射量を減らしている。その後、患者の全身状態に合わせて、化学療法を施行しているが、原則として、動脈内投与を優先している。そして、再発を認めた場合には、定位的放射線外科治療を追加している。

最後に、我々の症例でも、症例8(Fig.4)のように、組織生検ではGrade IIIと診断されたものの、臨床的には神経膠芽腫と思われる症例も含まれており、sampling errorとも考えられ、まずは、確実なGrade IIIの診断が重要だと思われた。⁸⁾さらに、我々の9症例では、年齢や発生部位、発症時の腫瘍の大きさ、および症状の程度により、治療方針が大きく左右されており、まずは一つのProtocolをもとにした一貫した初期治療および後療法における症例の蓄積が重要だと考えられた。

Table 6 Protocol for Grade III Astrocytoma

-
1. Resection as much as possible
 2. Conventional radiation therapy
40-60 Gy
 3. Chemotherapy
MCNU 50mg (50mg/sq m)
CBDCA 450mg (400mg/sq m)
I.A. every 4-5 months
I.V. every 5/weak
 4. If progress
Radiosurgery 20-30 Gy
-

【結語】

初回の手術および組織生検で病理組織学的にAstrocytoma Grade IIIと診断された9例についての治療経験をもとに、予後に影響を及ぼす諸因子について検討した。

一つのProtocolをもとにした一貫した初期治療および後療法における症例の蓄積が重要だと考えられた。

【文献】

- 1) The Committee of Brain Tumor Registry of Japan: Special Report of Brain Tumor Registry of Japan (1969-1990). *Neurol Med Chir* 39: 59-108, 1999
- 2) 隈部俊宏, 嘉山孝正, ほか: Malignant Astrocytoma 初期治療後Complete Response症例の検討. *脳神経外科* 22: 545-551, 1994
- 3) Ammirati M, Vick N, et al: Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery* 21: 201-206, 1987
- 4) Lunsford LD, Pollock BE, et al: Therapeutic Neuro-radiology, Present and Future -Stereotactic Radiosurgery for Brain Tumors- : 臨床神経化学—神経放射線学的診断・治療の進歩 p252-262, 1995 玉木紀彦編、メディカ出版
- 5) Mastronardi L, Puzzilli F, et al: Tamoxifen and carboplatine combination treatment of high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 38: 59-68, 1998
- 6) Hildebrand J, De Witte O, et al; Response of recurrent glioblastoma and anaplastic astrocytoma to dibromodulcitol, BCNU and procarbazine -A phase-II study. *Journal of Neuro-Oncology* 37: 155-160, 1998
- 7) Dropcho EJ, Rosenfeld SS, et al: Phase II study of intracarotid or selective intracerebral infusion of cisplatin for treatment of recurrent anaplastic gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 36: 191-198, 1998
- 8) 大塚隆嗣, 清水義勝, ほか: 大脳半球発生 Low grade gliomaの治療成績と治療における問題点. *Neuro-Oncology* 7: 45-48, 1997

当院におけるMalignant Astrocytomaの 治療方針を振り返って

昭和大学脳神経外科

岡村康之、泉山 仁、阿部琢己、池田尚人
佐々木健、嶋津基彦、神保洋之、松本 清

【目的】

浸潤性格を有するastrocytic tumorでは、手術摘出が常に絶対的非治療切除に終わり、発見時に機能保持を前提とする全摘出が困難なほど増大している事が多い。発育先端域である深部腫瘍が術後に残存することも多く、腫瘍が残存すれば再発は不可避であり、悪性転化を含めて治療はさらに困難なものとなっていく。当院では、anaplastic astrocytomaとglioblastomaの治療方針は、基本的に異なることはない。今回は、その治療方針を振り返り、反省点及び今後の展望について報告する。

した。重点項目に、年齢、男女差、発生部位、術式、摘出率、術後プロトコル(Fig.1)の実行、放射線量、放射線療法の有無、化学(F-IFN)療法¹⁾の有無、生存期間、直接死(腫瘍死、腫瘍死以外)をあげ、予後との関連性を検討した。また、anaplastic astrocytomaとglioblastomaとも比較した。当院において、基本的な治療方針は、anaplastic astrocytomaとglioblastomaとも異なることなく、出来るだけ神経症状を悪化させないよう腫瘍及び浸潤周囲脳を含めた切除のあとに、放射線療法にF-IFNを加えた後療法を施行してきた。

【対象及び方法】

対象は、1988年1月より1998年10月までの約10年間に当院にて初回手術治療を施行し、確実に追跡調査可能であったanaplastic astrocytoma 11例を対象と

【結果】

anaplastic astrocytomaは、男女比では、男性に多く、平均年齢は、47.5歳であった(Fig.2)。これは、全国統計²⁾と比較すると平均年齢が低い、傾向と

昭和大学病院脳神経外科におけるgliomaに対する後療法
原則として、virgin caseに施行する。

1) **operation**
原則として、神経学的症状を悪化させない程度にできるかぎりremoval、不可能な場合はbiopsyでも術中にINF-β(600万単位)+テシールを病変部位に貼布する。
副室が開放した場合、テシールにてパック後施行。

2) 術後2週間より(抜糸後、皮膚の状態を見ながら) **同調化学放射線療法**を開始する。

	(放射線量)
1st day ヘルジピン60mg p.o.(VCR投与1hr前)VCR 0.02mg/kg+ソリタTs 200ml	2.0 Gy
2nd day ヘルジピン60mg p.o.(VCR投与1hr前)VCR 0.02mg/kg+ソリタTs 200ml 20%マンニトール100ml 助眼内投与 ACNU 1mg/kg 助眼内投与(生食20mlにて溶解)	2.0 Gy
3rd day 20%マンニトール100ml 助眼内投与 ACNU 1mg/kg 助眼内投与(生食20mlにて溶解)	3.0 Gy
4th day	3.0 Gy
5th day 以降	2.0 Gy

4weeksを1クールとし、原則的に2クール施行。

放射線療法
照射線源：Total **60 Gy** iliac
照射野：局所
照射範囲：CTでの腫瘍周囲低吸収域、およびMRI-T2画像での高信号域を完全に含む
照射量および期間：2 Gy/dose 10 Gy/week, 60 Gy/6 weeks

3) **INF-β**の投与 1week=1クールとして、6クール施行する
1.術中投与：前述
2.術後投与：術後、2週間目より5 day/week, 600万単位/dayで静脈内投与する。

Fig. 1

してはほぼ同様であった。発生部位では、anaplastic astrocytomaは、特に、右大脳半球に多く、frontal lobeに多く認められた。一方、glioblastomaは、左大脳半球に多く、temporal lobeにやや多く認められた(Fig.3)。手術と生存期間では、anaplastic astrocytomaの場合、totalかsubtotal removalがほとんどで、生存期間は、28.0ヶ月であった。一方、glioblastomaは、partial removalが多く、生存期間は、12.2ヶ月であった(Fig.4)。Kaplan-Meire法による生存曲線では、anaplastic astrocytomaの方がglioblastomaに比べて有意に生存期間が長いことが分かる(Fig.5)。さらに、anaplastic astrocytomaにおけるF-IFNの有無による生存曲線では、両群に生存率の有意差は認められなかった(Fig.6)。死亡原因は、Disseminationが6例と多く、Time to tumor progressionは、平均17ヶ月であった。

2症例を呈示する。

<症例1>

40歳の男性。Rt. frontal lobeのanaplastic astrocytomaで、Rt. frontal lobectomyを施行し、total

性別・発症年齢		
	Anaplastic astrocytoma	Glioblastoma
	11	28
male	8	14
female	3	14
mean age	47.5	56.0

Fig. 2

発生部位		
	Anaplastic astrocytoma	Glioblastoma
	11	28
Rt.	8	11
Lt.	3	16
frontal	7	7
temporal	2	12
parietal	1	6
occipital	0	2
basal ganglia	1	0
cerebellum	0	0
brain stem	0	1

Fig. 3

手術・生存期間		
	Anaplastic astrocytoma	Glioblastoma
	11	28
Operation		
Total	5	3
Subtotal	4	8
Partial	2	15
Biopsy	0	2
Survival time (M)	28.0	12.2

Fig. 4

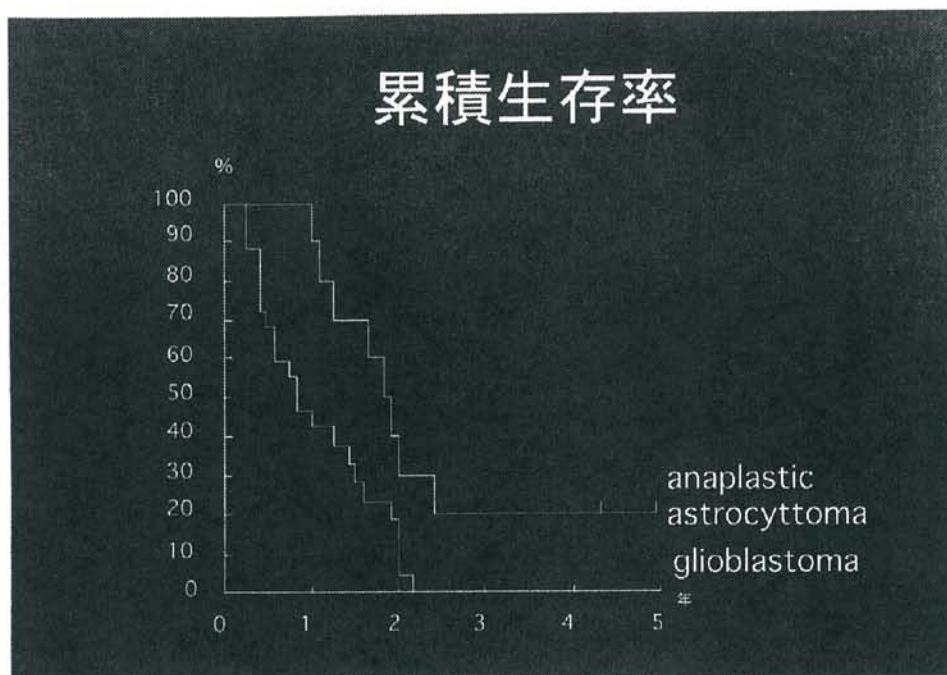


Fig. 5

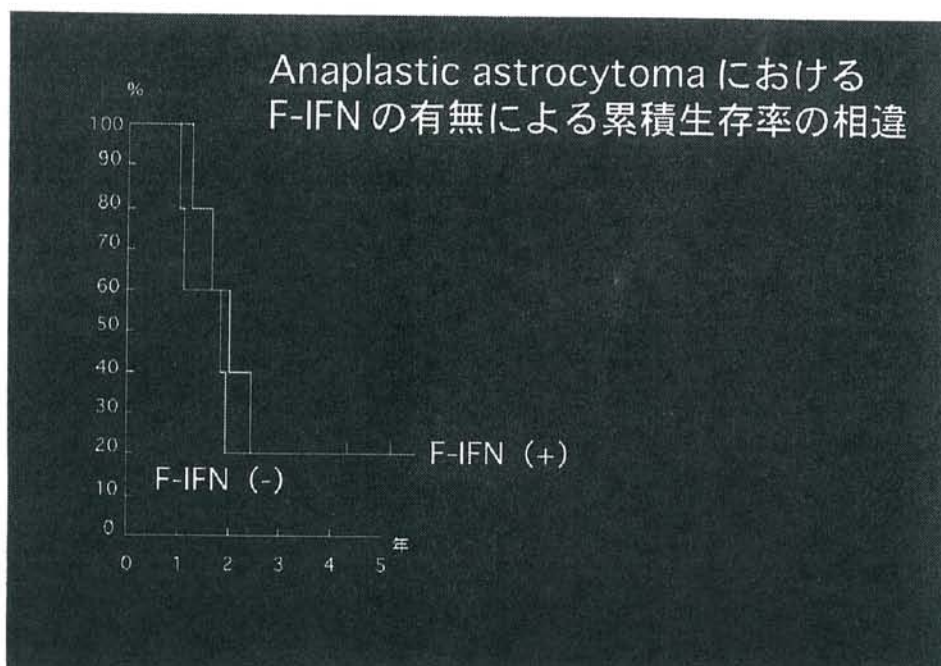


Fig. 6

removalであった(Fig.7)。その後、プロトコールに従い化学療法、放射線療法を施行したが、術後7ヶ月後には腫瘍の再発を認め(Fig.8)、再手術・化学療法を施行した。さらに8ヶ月後に局所再発を認め、静脈注射にて行ってきたACNUによる化学療法を動注に切り替えて行ったところ(Fig.9)、2ヶ月後のMRIでは、明らかに腫瘍の縮小が認められたが、初

回手術の20ヶ月後に dissemination を起こし死亡した。

<症例2>

56歳の女性。Rt. frontal lobe の anaplastic astrocytoma で、Rt. frontal lobectomy を施行し、subtotal removal であった。術後は、プロトコールに従い化学療法・放射線療法を行った(Fig.10)。退院

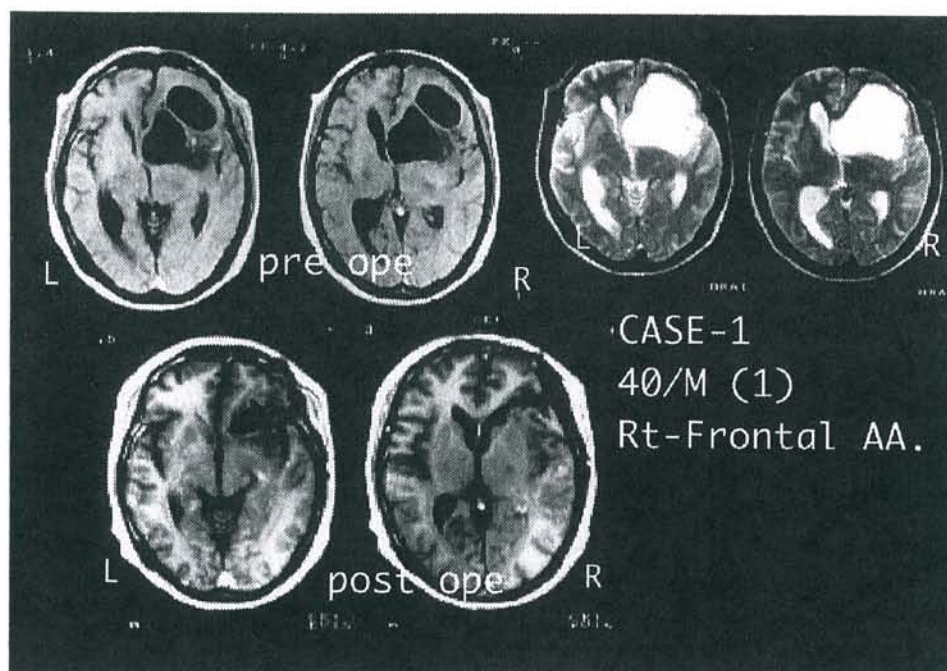


Fig. 7

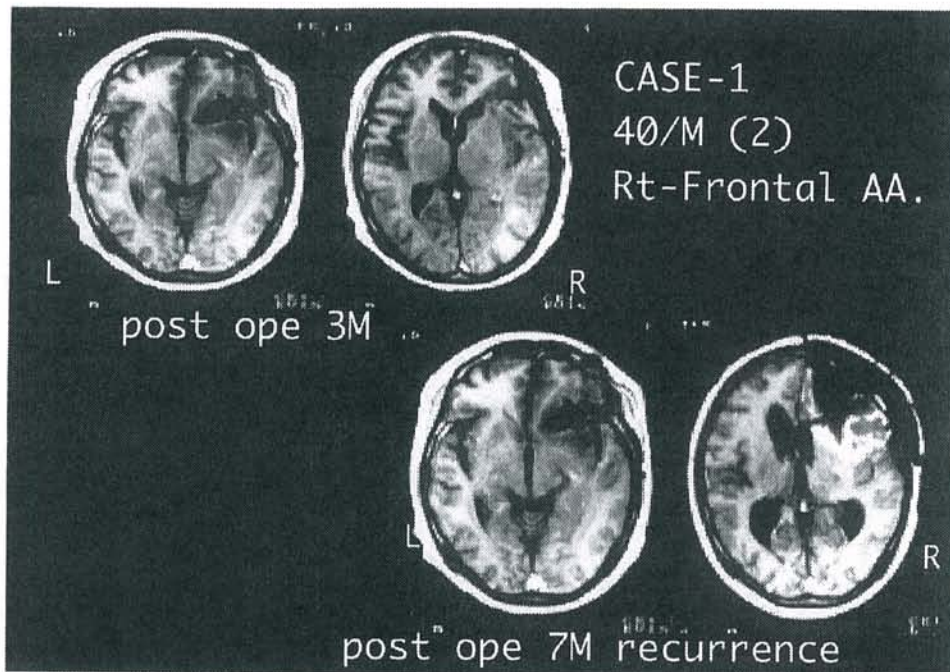


Fig. 8

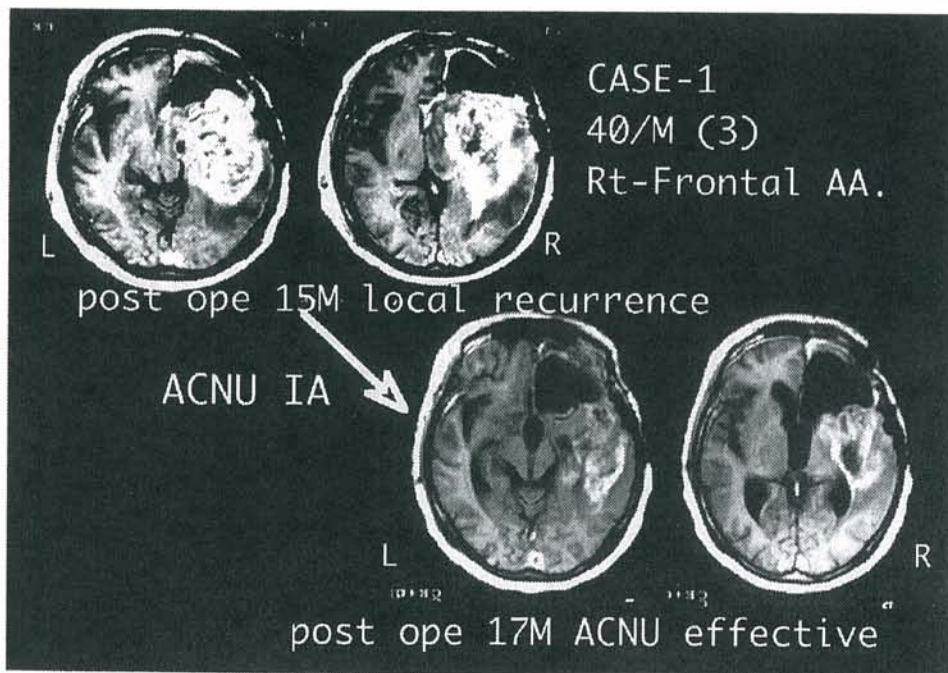


Fig. 9

後、外来での維持療法は施行しなかったが、32ヶ月後で腫瘍の再発を認め、再手術を施行せず、化学療法と30Gyの追加放射線療法を施行した(Fig.11)。また、その後15ヶ月後にも再度、腫瘍の増大を認め、さらに化学療法と30Gyの追加放射線療法を施行した。現在、外来通院中である。

【考察】

当院におけるanaplastic Astrocytoma 11症例の治療経験を振り返り、その反省点及び今後の展望を考察する。

(1) Anaplastic astrocytomaはGBMより予後はよく、再発までの期間は長い。これは、確実な維持療法と長期follow upが、重要であることが示唆される。

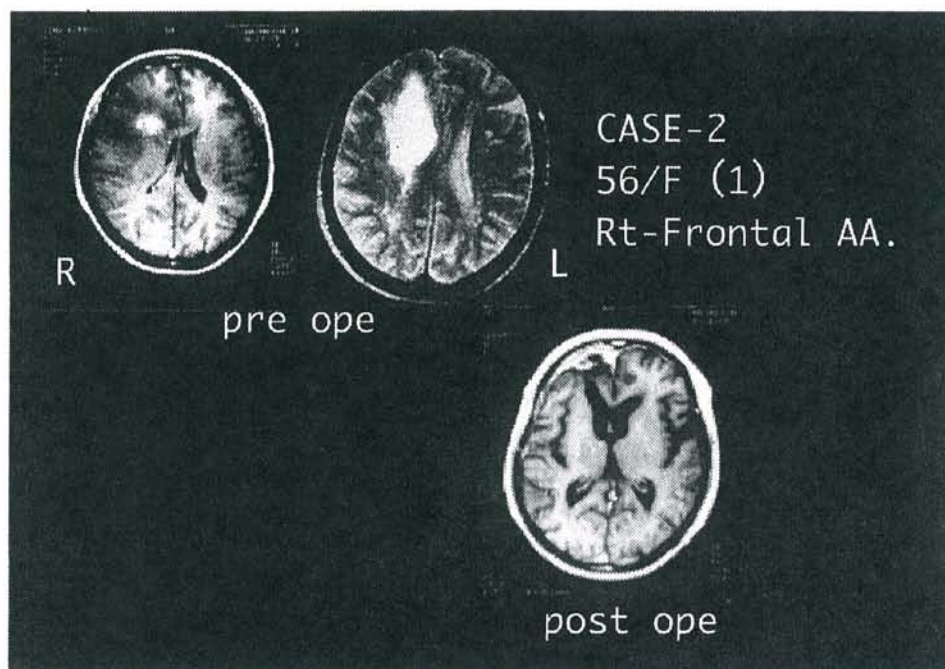


Fig. 10

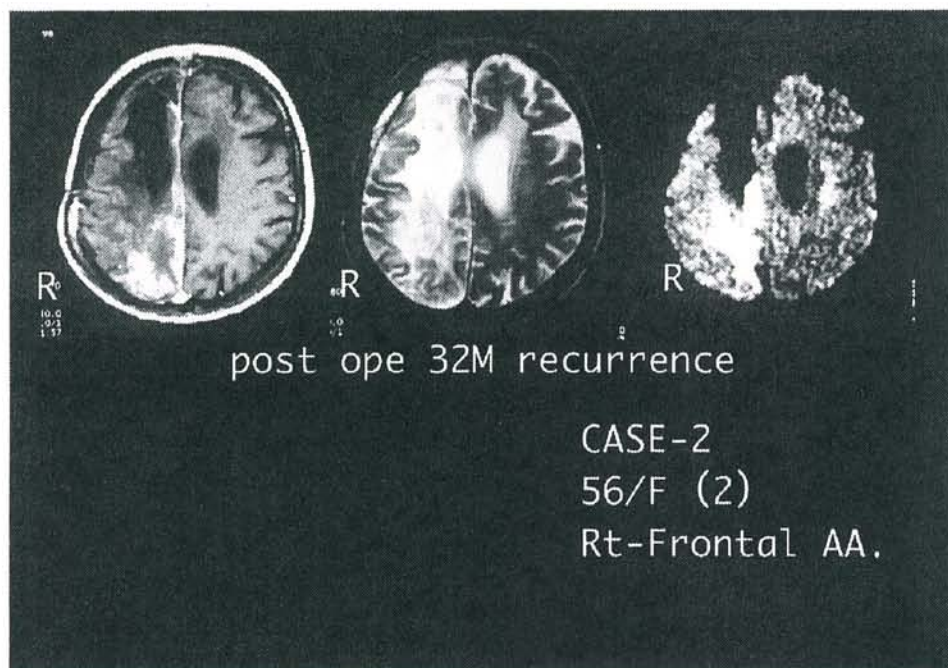


Fig. 11

(2) 再発時の治療法としては、さらに放射線を追加したり、抗瘍剤を変更したりすることが多いのも特徴である。

(3) 死亡原因としてのDisseminationの予防策としては、プロトコールの完全な実践、頻回な手術をさけるべきである。

【結語】

Anaplastic astrocytomaは、Glioblastomaより生存曲線は長い、確実な長期follow upと再発に応じた治療法の実践が必要である。

【文献】

- 1) 松本 清、泉山 仁、他：悪性グリオーマに対するフィブリン塊を用いたインターフェロン局所療法の臨床的検討. 外科治療 74 : 250-251、1996
- 2) 高倉公朋編：脳腫瘍全国集計調査報告書 Vol.9 : 1990
- 3) 泉山 仁、他：当院におけるLow Grade Astrocytomaの治療成績. Neuro-Oncology7(2) : 49-50、1997

第16回 ニューロ・オンコロジーの会

第16回世話人：自治医科大学 脳神経外科

篠田 宗次 増沢 紀男

TEL 0285-58-7373(直通)

FAX 0285-44-5147(直通)

テーマ演題 「グリオーマ治療耐性とその対策」

「悪性グリオーマ gradeⅢ の治療方針」

1. 日時：平成10年12月12日（土）14:00～17:10

2. 場所：日本化薬（株）東京支社会議室

住所 東京都豊島区高田2-17-22 目白中野ビル5階

TEL 03-5955-1800（代表）

3. プログラム（発表 6分、討論 4分）

1. グリオーマ治療耐性とその対策（14:00～15:00）

座長 自治医科大学 五味 玲

1) 放射線療法と免疫療法併用の時期的検討

—マウスグリオーマ細胞の MHC の発現に関して—

横浜市立大学 脳神経外科¹ 寄生虫学² 佐藤秀光^{1,2}、村田英俊¹、菅野 洋¹
鈴木範行¹、林 明宗¹、山本勇夫¹
藤巻春香²、南 陸彦²

2) 細胞内グルタチオン濃度操作による培養グリオーマ細胞における
抗腫瘍効果増強に関する試み（第二報）

都立荏原病院 脳神経外科 飯田昌孝、土居 浩、岩間淳一、朝本俊司、楚良繁雄
日野 健、杉山弘行、松本 清

3) VP-16耐性における多剤耐性遺伝子(MDR-1, MRP, C-MOAT, topo II 遺伝子
変異)の発現頻度について

香川医科大学 脳神経外科 松本義人、森崎訓明、國塩勝三、本間 温、長尾省吾

4) 神経膠腫に於る MDR-1 gene 発現と MIBI 画像所見

宮崎医科大学 脳神経外科 横上聖貴、森山拓造、上原久生、脇坂信一郎
都城市郡医師会病院 脳神経外科 河野寛一

5) グリオーマにおける薬剤耐性関連遺伝子発現の検討

自治医科大学 脳神経外科 五味 玲、永井 睦、上野眞二、橋本雅章
篠田宗次、増沢紀男

6) グリオーマの治療耐性の分子生物学的解析に基づいた Individual Adjuvant
Therapy (IAT)

鳥取大学医学部 脳神経外科 田中 聡、谷浦晴二郎、Md Ruhul Amin、
松本 聡、渡辺高志

II. 特別講演 (15:00~15:45)

座長 自治医科大学 増沢紀男

「アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した遺伝子導入法とその遺伝子治療への応用」

自治医科大学 血液学講座・遺伝子治療研究部 教授 小澤敬也 先生

【休憩】(15分) ー軽食をご用意しておりますー

III. 「悪性グリオーマ gradeⅢ の治療方針」 (16:00~17:10)

座長 自治医科大学 橋本雅章

1) 基底核部悪性神経膠腫の臨床病理像

東京女子医科大学脳神経センター 脳神経外科 田鹿安彦、久保長生、堀 智勝

2) 悪性神経膠腫に対する ACNU, VP-16 の治療効果の検討

国立がんセンター中央病院 脳神経外科 田中 実、渋井壮一郎、野村和弘

3) 成人大脳半球 anaplastic astrocytoma の治療経験

日本大学 脳神経外科 宮上光祐、片山容一、中村三郎

4) Anaplastic astrocytoma(GⅢ) の治療・予後に関する検討

香川医科大学 脳神経外科 國塩勝三、森崎訓明、松本義人、本間 温、長尾省吾

5) 当院における anaplastic astrocytoma の治療成績

聖マリアンナ医科大学 脳神経外科 田中克之、平本 準、鈴木理恵
山口由太郎、関野宏明

6) Anaplastic astrocytoma の当科における治療成績

東邦大学 脳神経外科 黒木貴夫、大塚隆嗣、周郷延雄、清木義勝、柴田家門

7) 当院における Malignant Astrocytoma の治療方針を振り返って

昭和大学医学部 脳神経外科 岡村康之、泉山 仁、阿部琢巳、池田尚人
佐々木健、神保洋之、嶋津基彦、松本 清

1) 会費として、受付で1,000円頂きます。

2) 御参加の先生方は、日本脳神経外科専門医クレジット(3点)が取得できます。

ニューロ・オンコロジーの会（第1回～第17回）

第1回	開催日	H3. 4. 13 (土)
	世話人	東京大学医学部脳外科・松谷雅生
	テーマ演題	再発髄芽腫の治療
	講演	再発髄芽腫の治療（熊本大脳神経外科・生塩之敬）
	特別講演	最近の癌遺伝子と癌抑制遺伝子研究の展開（国立がんセンター研究所・口野嘉幸）
第2回	開催日	H3. 12. 14 (土)
	世話人	東京女子医大脳神経センター脳神経外科・久保長生
	テーマ演題	再発神経膠腫の診断と治療
	教育講演	再発神経膠腫の診断－脳放射線壊死との鑑別に於いて－（筑波大脳神経外科・吉井与志彦）
	特別講演	癌化学療法の進歩－基礎から臨床（国立がんセンター・西條長宏）
第3回	開催日	H4. 4. 11 (土)
	世話人	順天堂大脳神経外科・佐藤潔
	テーマ演題	悪性脳腫瘍に対する免疫・生物療法の現状および展望
	教育講演	悪性グリオーマに対する β -Interferon療法（獨協医大脳神経外科・永井政勝）
	特別講演	悪性グリオーマに対するTNF療法の現況（名古屋大脳神経外科・吉田純）
第4回	開催日	H4. 12. 12 (土)
	世話人	日本大脳神経外科・宮上光祐
	テーマ演題	再発髄膜腫の診断と治療
	特別講演	悪性髄膜腫瘍（九州大脳神経外科・福井仁士）
第5回	開催日	H5. 4. 10 (土)
	世話人	国立がんセンター脳神経外科・野村和弘
	テーマ演題	転移性脳腫瘍の診断と治療
	特別講演	人がんの発生と進展にかかわる癌抑制遺伝子（国立がんセンター生物学部長・横田純）
第6回	開催日	H5. 12. 11 (土)
	世話人	群馬大学脳神経外科・田村勝
	テーマ演題	CNS Lymphomaの診断と治療
	教育講演	悪性リンパ腫の化学療法（東京女子医大血液内科・押味和夫）
第7回	開催日	H6. 4. 9 (土)
	世話人	帝京大学医学部附属市原病院脳神経外科・長島 正
	テーマ演題	悪性グリオーマの治療
	教育講演	癌遺伝子治療の現況と今後の展望－悪性グリオーマ治療を中心に－ （国立がんセンター研究所生物物理部・口野嘉幸）
第8回	開催日	H6. 12. 10 (土)
	世話人	日本医科大学脳神経外科・高橋弘
	テーマ演題	悪性脳腫瘍におけるBRMを含めた維持療法
	教育講演	フローサイトメトリーを用いた脳腫瘍のcell kineticsと免疫（関西医科大学脳神経外科・河本圭司）
第9回	開催日	H7. 4. 15 (土)
	世話人	順天堂大学脳神経外科・新田泰三
	テーマ演題	悪性グリオーマの手術に関する問題点
	教育講演	癌免疫の進歩（順天堂大学脳神経外科・奥村康）
	特別講演	マッピング下の functional area の手術（鳥取大学医学部免疫学・堀 智勝）

第10回	開催日	H7.12.9(土)
	世話人	筑波大学脳神経外科・吉井與志彦
	テーマ演題	悪性グリオーマの治療評価診断と治療法の選択
	一般演題	悪性グリオーマ全般について
	教育講演	TI-201SPECTによる腫瘍診断-脳腫瘍への応用を含めて-(金沢大学医学部核医学科・利波紀久)
教育講演	DNA修復と神経系(放射線医学総合研究所・佐藤弘毅)	
第11回	開催日	H8.4.6(土)
	世話人	神奈川県立がんセンター脳神経外科・久間祥多
	テーマ演題	悪性グリオーマに対する化学療法-各施設のプロトコルについて-
	一般演題	悪性グリオーマに対するその他の非手術的治療
	教育講演	統計的検定の結果をどう解釈するか(愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・橋 敏明)
教育講演	感受性試験を基にした脳腫瘍の化学療法(金沢大学がん研究所化学療法部・田中基裕)	
第12回	開催日	H8.12.7(土)
	世話人	昭和大学脳神経外科・松本 清
	テーマ演題	高齢者(70歳以上)の髄膜腫に対する治療
	一般演題	高齢者の脳腫瘍治療における現況
	教育講演	良性脊髄腫外腫瘍の治療の問題点について・・・特に頭蓋内髄膜腫・神経鞘腫との比較について・・・ (東京都立神経病院脳神経外科・高橋 宏)
教育講演	脳腫瘍におけるアポトーシスの意義(佐賀医科大学脳神経外科・田淵和雄)	
第13回	開催日	H9.4.12(土)
	世話人	慶應義塾大学脳神経外科・大谷光弘
	テーマ演題	Low grade gliomaに対するadjuvant therapyの適応とtimingについて
	一般演題	Low grade gliomaの興味ある症例
	特別講演	T細胞に認識されるヒトメラノーマ抗原の単離同定と免疫遺伝子治療への臨床応用 (Surgery Branch, National Cancer Institute, NIH・河上 裕)
第14回	開催日	H9.12.13(土)
	世話人	東京医科大学脳神経外科・秋元治朗
	テーマ演題	神経細胞系腫瘍の臨床
	テーマ演題	再発悪性グリオーマに対する治療選択
	特別講演	癌化学療法分子標的-耐性とアポトーシス-(東京大学分子細胞生物学研究所 鶴尾 隆)
第15回	開催日	H10.4.11(土)
	世話人	東邦大学脳神経外科・柴田家門
	テーマ演題	脳室内腫瘍の治療選択
	テーマ演題	脳腫瘍(原発・再発)に対する新しい治療の試み
	特別講演	変異型ウィルスを応用した脳腫瘍の遺伝子治療(慶應義塾大学生理学教室・矢崎貴仁)
第16回	開催日	H10.12.12(土)
	世話人	自治医科大学脳神経外科・篠田宗次 増沢紀男
	テーマ演題	グリオーマ治療耐性とその対策
	テーマ演題	悪性グリオーマ gradeⅢ の治療方針
	特別講演	アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した遺伝子導入法とその遺伝子治療への応用 (自治医科大学 血液学講座・遺伝子治療研究部・小澤敬也)

次回開催予定

第17回	開催日	H11.4.10(土)
	世話人	東京大学脳神経外科・藤巻高光
	テーマ演題	転移性脳腫瘍とどう闘うか
	テーマ演題	ependymomaの臨床像・その他
	特別講演	悪性脳腫瘍髄腔内播種に対する髄腔内化学療法(熊本大学脳神経外科・河内正人)

編集後記

皆様のご協力でNeuro-Oncology Vol 8, No 2ができました。

第16回ニューロ・オンコロジーの会は、自治医科大学 脳神経外科 増沢紀男教授、篠田宗治先生のお世話で多数の先生方のご出席をいただき無事終了いたしました。

今回は「悪性グリオーマgrade IIIの治療方針」「グリオーマ治療耐性とその対策」をテーマに多数の演題が討論されました。教育講演は「アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した遺伝子導入法とその遺伝子治療への応用」で自治医科大学血液学講座・遺伝子治療研究部の小澤敬也教授にご講演をしていただきました。グリオーマの治療は薬剤耐性という問題が立ちはだかっています。さらにGrade IIIといえどもその治療はGlioblastomaと同様に困難な事です。今回の会でさらにいろいろの問題点が出てきたように思います。

このNeuro-Oncologyの会も毎回多数の先生方のご出席とすばらしい発表で内容が充実して参りました。1991年に第1回のNeuro-Oncologyの会が開催され、Neuro-Oncologyが発刊されすでにVol 8となりました。臨床の場でお忙しいのに、皆様のご協力のおかげです。脳腫瘍の臨床を中心に討論が出来る場としてのNeuro-Oncologyの会は極めて意義のあるものと思います。

この会により各施設での脳腫瘍に対する治療体制が理解できてきました。さらにお互いに協力できる体制が出来ることを期待いたします。

第17回は東京大学 医学部 脳神経外科 藤巻高光先生のお世話で転移性脳腫瘍、上衣腫に関して問題点を討論したいと思います。

まだまだこの雑誌を充実したものにしたいと思いますので本会や本誌に関するご意見をお聞かせください。

Neuro-Oncology Vol 8. No 2. 1998

1998年12月 発行

編集・発行/ ニューロ・オンコロジーの会
(編集:久保 長生)

事務局 〒162-8666

東京都新宿区河田町8-1

東京女子医科大学 脳神経外科学教室内

Tel: 03-3353-8111, Fax:03-5269-7438

E-mail: okubo@nij.twmu.ac.jp (Osami KUBO)