



The influence of surgical procedure and the effect of chemotherapy on nodal and distant metastases of human malignant melanomas that have been grafted into nude mice

小國, 晶子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4799

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004799>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	小國 晶子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4799 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The influence of surgical procedure and the effect of chemotherapy on nodal and distant metastases of human malignant melanomas that have been grafted into nude mice （ヒト悪性黒色腫のマウス移植モデルにおけるリンパ節転移と遠隔転移に外科処置が与える影響及び化学療法の効果について）

審 査 委 員

主 査	教 授	田原 真也
	教 授	丹生 健一
	教 授	横崎 宏

学位論文の内容要旨

The influence of surgical procedure and the effect of chemotherapy on nodal and distant metastases of human malignant melanomas that have been grafted into nude mice

ヒト悪性黒色腫のマウス移植モデルにおけるリンパ節転移と
遠隔転移に外科処置が与える影響及び化学療法の効果について

神戸大学大学院医学系研究科外科系講座
口腔外科学分野
(指導教員：古森 孝英教授)

小 國 晶 子

目 的

日本人では白人と比較して口腔粘膜の悪性黒色腫の発生率が高いとされているが、その治療法はいまだ確立していない。今回、口腔悪性黒色腫の転移予防に対する治療法を確立することを目的に、動物における悪性腫瘍転移モデルを作成し、腫瘍に対する外科処置が転移形成に与える影響、および化学療法の転移抑制効果について検討した。

研究方法

1) 移植材料の調整

移植材料としてヒト悪性黒色腫細胞株 (G-361、JCR Bank) を用いた。EMEM (Earle's salt, NaHCO₃, L-glutamine) (SIGMA, USA) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 、10,000 units/ml Penicillin と 10 mg/ml Streptomycin (Penicillin-streptomycin)を加えたものを用いて、37℃、5%CO₂ 濃度下に培養した。実験動物として5週齢雌ヌードマウス BALBnu/CrlCrj (Charles River 社)を用い、動物実験は、神戸大学大学院医学研究科附属動物実験施設規則に基づいて行った。培養した G-361 細胞 4.0×10³ 個をヌードマウスの側背部皮下に移植し、直径が 10 mm 程度になったところで腫瘍を摘出、1 mm³ 片に切り、以下の実験に用いた。

2) G-361 腫瘍移植によるリンパ節・肺転移の頻度および腫瘍穿刺が転移率に与える影響

G-361 腫瘍を 200 匹のヌードマウスに移植した。半数を穿刺群とし移植 2 週後以降屠殺まで週 2 回腫瘍を 18 ゲージ針で穿刺した。移植 2、3、4、5、6 週後にマウスを安楽死させ、腋窩リンパ節と肺を摘出した。摘出組織から SepaGene (三光純薬)を用いて DNA を抽出し、すでに報告した方法でヒト由来の β -globin を nested PCR 法で増幅し、陽性のものを転移ありと判定した。

さらに G-361 腫瘍を別の 10 匹に移植、同様に 2 週後より穿刺を行い、6 週後に腋窩リンパ節と肺を摘出、HE 標本を作成し、病理組織学的に転移の有無を確認した。

3) G-361 皮下移植腫瘍に対する抗癌剤の効果

10 匹のマウスに G-361 腫瘍を移植し、直径 10 mm 程度になった時点で 5 匹に Dimethyl triazeno imidazole carboxamide (DTIC) 50 mg/kg を腹腔内投与、残りの 5 匹に cisplatin (CDDP) 8 mg/kg を腹腔内投与し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。

4) 抗癌剤投与による腫瘍摘出後の転移抑制効果

G-361 腫瘍を移植 6 週後にエーテル麻酔下で皮下腫瘍を全摘出した。これらのマウスを以下の 5 群に分けた。①対照群：皮下腫瘍摘出後処置なし、②DTIC 術前投与群：皮下腫瘍摘出 3 日前に DTIC 50 mg/kg を腹腔内投与、③CDDP 術前投与群：皮下腫瘍摘出 3 日前に CDDP 8 mg/kg を腹腔内投与、④DTIC 同時投与群：皮下腫瘍摘出直後に DTIC 50 mg/kg を腹腔内投与、⑤CDDP 同時投与群：皮下腫瘍摘出直後に CDDP 8 mg/kg を腹腔内投与。各群 30 匹 (計 150 匹) のマウスを用いた。皮下腫瘍摘出 2 週後に動物を安楽死させ腋窩リンパ節と肺を摘出し、PCR 法により転移の有無を検索した。統計学的分析は χ^2 乗検定で行った。

結 果

1) G-361 腫瘍移植によるリンパ節・肺転移の頻度および腫瘍穿刺が転移率に与える影響

β-globin の PCR 分析の結果、非穿刺群では G-361 腫瘍移植 2、3、4 週後では腋窩リンパ節および肺とも転移は検出されず、5 週後でリンパ節転移はなかったが肺転移が 1/10 (10%) に検出された。6 週後では 4/10 (40%) にリンパ節転移、5/10 (50%) に肺転移が検出された。一方、穿刺群では移植 3、4、5、6 週後の転移率は、リンパ節でそれぞれ 1/10 (10%)、4/10 (40%)、4/10 (40%)、6/10 (60%)、肺でそれぞれ 0/10 (0%)、4/10 (40%)、3/10 (30%)、8/10 (80%)となっており、穿刺することにより早期から高頻度に転移が形成されることが明らかとなった。また、病理組織学的には 6 週後で肺とリンパ節への転移がそれぞれ 2/10 (20%)で確認できた。

2) G-361 皮下移植腫瘍に対する抗癌剤の効果

DTIC、CDDP とも投与翌日より皮下腫瘍は若干の縮小傾向を示したが、4～5 日後には再増殖を認めた。DTIC と CDDP の縮小率には差は認められなかった。

3) 抗癌剤投与による腫瘍摘出後の転移抑制効果

移植 6 週後に皮下腫瘍を全摘出し、その 2 週後にリンパ節、肺と摘出したところ、対照群では 15/30 (50%) でリンパ節転移、16/30 (53.3%) で肺転移が検出された。抗癌剤を投与した動物の転移率は、DTIC 術前投与群でリンパ節転移 10/29 (34.5%)、肺転移 9/29 (31.0%)、CDDP 術前投与群でリンパ節転移 8/28 (28.6 %)、肺転移 9/28 (32.1%)と、対照群と比較してやや低下していたが有意差は認められなかった。これに対し、DTIC 同時投与群ではリンパ節転移 2/30 (6.7%)、肺転移 3/30 (10.0%)、CDDP 同時投与群ではリンパ節転移 2/30 (6.7%)、肺転移 3/30 (10.0%)となっており、同時投与群では両薬剤とも対照群と比較して有意に転移の抑制効果が認められた。

考 察

口腔悪性黒色腫の予後は皮膚悪性黒色腫と比べて不良であるとする報告が多く、近年の文献をみても 5 年生存率は 6.6～45%程度と報告されている。死因の多くは原発巣再発ではなく遠隔転移であり、口腔悪性黒色腫患者の予後向上のためには転移の制御が重要な問題である。一方で、当科ではこれまで、術前の生検なしに手術を行い術日より DTIC + nimustine hydrochloride (ACNU) + vincristine (VCR) + OK432 による免疫化学療法を行うとする治療を施行し、良好な予後が得られることを報告してきた。

皮膚悪性黒色腫では部分生検は転移を促進する可能性から推奨されず、Dermascopy を用いて肉眼的に診断したり、症例によっては全摘生検を行ったりするのが通例である。これに対し口腔悪性黒色腫では部分生検の適否について述べた報告はほとんどなく、むしろ早期診断のために生検を推奨する報告も散見される。最近われわれは、口腔悪性黒色腫で治療前に生検や抜歯など何らかの外科処置が行われた症例の予後は著しく不良で、ほとんどが遠隔転移のため死亡していることを報告した。今回の研究でも、皮下移植腫瘍に繰り返し穿刺を行った場合、早期かつ高率にリンパ節転移や肺転移をきたすことが示され、臨床の場においても口腔悪性黒色腫が疑われる場合には安易に部分生検を行うことは控えたほうがよいものと考えられた。

皮膚悪性黒色腫は進展度に応じた治療方法が確立しているが、口腔悪性黒色腫は施設によりさまざまな治療が行われているのが現状である。悪性黒色腫の予後不良因子として最も重要なものは遠隔転移であるが、転移性の黒色腫に対して有効な治療法は少ない。今回の研究で G-361 腫瘍をマウス皮下に移植し 6 週後に摘出すると、約 50%の動物でその後リンパ節転移や肺転移が出現したことから、6 週後には微小転移が存在していたと推測される。この微小転移に対して臨床的に転移性黒色腫に使用される DTIC と CDDP の投与を行い、転移抑制効果を調べた。両薬剤とも G-361 皮下腫瘍が 10mm の大きさまで増大した時点で投与しても、その効果は限定的なものであった。その結果 DTIC、CDDP ともに皮下腫瘍摘出 3 日前に投与した場合、若干の転移抑制効果はあるものの対照群との有意差はなく、皮下腫瘍摘出と同時に投与した場合、有意にリンパ節転移、肺転移を抑制しうることが明らかとなった。動物実験の結果ではあるが、手術当日からの免疫化学療法により後発転移が抑制できる可能性が示唆され、今後さらに検討が必要と思われた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2062 号	氏 名	小國 晶子
論 文 題 目 Title of Dissertation	The influence of surgical procedure and the effect of chemotherapy on nodal and distant metastases of human malignant melanomas that have been grafted into nude mice ヒト悪性黒色腫のマウス移植モデルにおけるリンパ節転移と遠隔転移に外科処置が与える影響及び化学療法の効果について		
審 査 委 員 Examiner	主 査 田原真也 Chief Examiner 副 査 丹生 謙一 Vice-examiner 副 査 横 崎 宏 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

本研究者は、口腔悪性黒色腫の転移予防に対する治療法を確立することを目的に、動物における悪性腫瘍転移モデルを作成し、腫瘍に対する外科処置が転移形成に与える影響、および化学療法の転移抑制効果について検討した。

移植材料としてはヒト悪性黒色腫細胞株 G-361 を用いた。培養した細胞をヌードマウスの側背部皮下に移植し、直径が 10 mm 程度になったところで腫瘍を摘出、1 mm³ 片に切り、以下の実験に用いた。

1) G-361 腫瘍移植によるリンパ節・肺転移の頻度および腫瘍穿刺が転移率に与える影響

G-361 腫瘍をヌードマウスに移植し、その半数を穿刺群として移植 2 週後以降屠殺まで週 2 回腫瘍を 18 ゲージ針で穿刺した。移植 2、3、4、5、6 週後にマウスを屠殺し、腋窩リンパ節と肺を摘出した。その後 DNA を抽出、ヒト由来 β -globin を PCR 法で増幅し、陽性のものを転移ありと判定した。その結果、非穿刺群では G-361 腫瘍移植 2、3、4 週後では腋窩リンパ節および肺とも転移は検出されず、5 週後でリンパ節転移はなかったが肺転移が 10% で検出された。6 週後では 40% にリンパ節転移、50% に肺転移が検出された。一方、穿刺群では移植 3、4、5、6 週後の転移率は、リンパ節でそれぞれ 10%、40%、40%、60%、肺でそれぞれ 0%、40%、30%、80% となっており、穿刺により早期から高頻度に転移が形成されることが示唆された。

2) 抗癌剤投与による腫瘍摘出後の転移抑制効果

G-361 腫瘍を移植 6 週後に全摘出し、これらのマウスを以下の 5 群に分けた。①対照群：皮下腫瘍摘出後処置なし、②DTIC 術前投与群：皮下腫瘍摘出 3 日前に DTIC 腹腔内投与、③CDDP 術前投与群：皮下腫瘍摘出 3 日前に CDDP 腹腔内投与、④DTIC 同時投与群：皮下腫瘍摘出直後に DTIC 腹腔内投与、⑤CDDP 同時投与群：皮下腫瘍摘出直後に CDDP 腹腔内投与。

皮下腫瘍摘出 2 週後に動物を安楽死させ腋窩リンパ節と肺を摘出し、PCR 法により転移の有無を検索したところ、対照群では 50% でリンパ節転移、53.3% で肺転移が検出された。抗癌剤 (DTIC、CDDP) を術前に投与した動物の転移率は、対照群と比較してやや低下していたが有意差は認められなかった。これに対し、同時投与群では両薬剤とも対照群と比較して有意に転移の抑制効果が認められた。

皮膚悪性黒色腫では部分生検は転移を促進する可能性から推奨されず、Dermascopy を用いて肉眼的に診断したり、症例によっては全摘生検を行ったりするのが通例である。これに対し口腔悪性黒色腫では部分生検の適否について述べた報告はほとんどなく、むしろ早期診断のために生検を推奨する報告も散見される。今回の研究では、皮下移植腫瘍に繰り返し穿刺を行った場合、早期かつ高率にリンパ節転移や肺転移をきたすことが示され、臨床の場合においても口腔悪性黒色腫が疑われる場合には安易に部分生検を行うことは控えたほうがよいものと考えられる。

皮膚悪性黒色腫は進展度に応じた治療方法が確立しているが、口腔悪性黒色腫は施

設によりさまざまな治療が行われているのが現状である。今回の研究で G-361 腫瘍をマウス皮下に移植し 6 週後に摘出すると、約 50% の動物でその後リンパ節転移や肺転移が出現したことから、6 週後には微小転移が存在していたと推測される。この微小転移に対して DTIC と CDDP の投与を行い、転移抑制効果を調べた。その結果 DTIC、CDDP とともに皮下腫瘍摘出 3 日前に投与した場合、若干の転移抑制効果はあるものの対照群との有意差はなく、皮下腫瘍摘出と同時に投与した場合、有意にリンパ節転移、肺転移を抑制しうることが明らかとなった。動物実験の結果ではあるが、手術当日からの免疫化学療法により後発転移が抑制できる可能性が示唆され、今後さらに検討が必要と思われた。

本研究はヒト悪性黒色腫のマウス移植モデルにおいて、外科処置がこの転移に与える影響及び化学療法の効果について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった悪性黒色腫の転移と外科処置の相関関係および化学療法の転移抑制効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。