氏名(本籍) カ 丸 裕 哉

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 2008 号

学位授与年月日 平成15年3月24日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻

学 位 論 文 題 目 成犬正常肝を用いたラジオ波焼灼後アポトーシス 誘導の証明と急性期病理組織変化の経時的検討

(主 査)

論文審查委員 教授 高 橋 昭 喜 教授 笹 野 公 伸

教授 林 富

# 論 文 内 容 要 旨

### 研究背景, 目的

ラジオ波焼灼療法(Radio-frequency ablation therapy:RFA)は、肝悪性腫瘍に対する有力な局所温熱治療法として、近年急速に普及してきている。しかし、焼灼範囲の急性期病理組織変化は十分理解されておらず、焼灼範囲の組織学的評価方法は確立されていない。

一方,温熱療法の際には細胞死にアポトーシスが関与することが知られており、RFA後の治療辺縁部にもアポトーシス様の形態変化が見られるとの報告は散見されるが、RFA後のアポトーシス誘導を生化学的に示した報告はない。

本研究の目的は RFA 後の焼灼部辺縁にアポトーシスが誘導されていることを形態学的及び生化学的に証明し、更には hematoxylin and eosin (H-E) 染色像と、別の染色法により示されるアポトーシス領域、虚血領域を経時的に対比することで、H-E 染色像における RFA の治療効果範囲判定法を確立することである。

#### 研究方法

9頭の雌ビーグル成犬に対し、開腹下に出力30Wで6分間のRFAを合計30回実施した。成犬を2時間後、24時間後、3日後、7日後に屠殺して肝臓を摘出し、標本を作製した。5頭では、屠殺直前に1回のRFAを追加し、RFA直後の標本とした。得られた標本数はRFA直後、2時間後、24時間後、3日後、7日後のそれぞれで5,6,6,6,7標本であったアポトーシスの形態学的証明のため、通常のH-E染色像による形態観察に加えて、アポトーシスに特徴的な形態変化である核の縮小化、核クロマチン濃縮について定量評価した。同じくアポトーシスに特徴的とされる細胞萎縮は単位面積当たりの細胞数(細胞密度)増加をもって萎縮の進行と判断することとした。これらH-E染色像による評価に加え、terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick end lebeling(TUNEL)法による免疫染色で DNA 断片化を観察した。更に RFA 後の血管障害により2次的に生じる虚血の影響を評価するため、Hypoxia inducible factor (HIF)-α染色を追加した。生化学的検討としては、アポトーシスに特徴的とされる DNA の規則的な切断を反映した DNA ladder formation を証明するため組織 DNA を電気泳動するとともに、アポトーシスの過程で括性化される Cysteine-directed asparagine protease (Caspase)-3 活性の測定を施行した。

### 研 究 結 果

H-E 染色上,REA 後の焼灼部は層構造を呈し,この層構造は直後から 3 日目までの間に 3 層から 5 層に変化していた。焼灼部辺縁では細胞萎縮,核の縮小化と核クロマチン濃縮などの形態変化が経時的に進行し,24 時間以後の標本では周囲正常部と明瞭に区別されるようになった。定量評価では RFA 直後と 2 時間後、 2 時間後と 24 時間後の肝細胞密度増加,核縮小化が統計学的に有意であった(p<0.01, Mann-Whithey U-test: 細胞密度,Student's t-test: 核サイズ)。核濃度は直後と比較して 24 時間後に統計学的有意な上昇を示した(p<0.01, Student's t-test)。

TUNEL 染色では RFA 直後には陽性細胞が認められず、 2 時間後の標本では、中心部に相当する H-E 染色上の第 1 層、第 2 層の一部で陽性を示した。 24 時間以後の標本で辺縁部に相当する第 3 層、第 4 層まで TUNEL 陽性域が拡大した。辺縁部の TUNEL 陽性率は経時的に上昇し (p < 0.01 analysis of variance: ANOVA)、 7 日目には全ての細胞が陽性を示した。

HIF- $\alpha$  染色では,RFA 直後から H-E 染色上の形態変化の見られる領域に一致して陽性を示していた。特に辺縁部第 3 層,第 4 層では陽性率が極めて高く,持続的な強い虚血状態にあることが判明した。

生化学的検討では、辺縁部組織の DNA 電気泳動で 24 時間後に初めて明瞭な DNA ladder formation が検出された。Caspase-3 活性は RFA 直後、2 時間後では低値を示し、24 時間後、3 日後で著明な上昇を示していた。

#### 結 論

RFA 後の焼灼部辺縁は、形態学的にも生化学的にもアポトーシスの条件を満たしていた。辺縁部に於けるアポトーシス誘導と経時的形態変化観察の結果を総合的に判断すると病理学的な治療効果範囲判定は、24 時間以後に行うのが確実な手法と考えられた。その際の判定には、煩雑な生化学的手法を用いなくても H-E 染色のみで粉判定可能である。但し、TUNEL 染色を併用すれば一層精度の高い治療効果範囲判定が可能である。

## 審査結果の要旨

本研究は、肝悪性腫瘍に対する低侵襲治療として近年急速に普及してきているラジオ波焼灼療 法後の急性期病理組織変化を詳細に検討し、その細胞死の一部にアポトーシスが関与しているこ とを形態学、生化学両面から証明したものである。

今までラジオ波焼灼後の急性期,慢性期病理組織像を検討した報告はあるが,急性期を直後,2 時間後,24 時間後,3 日後,7 日後と詳細に分類し検討した報告はない。急性期を詳細に検討することで,今まで幾つかの報告で論じられてきた病理組織像の相違が,一連の経時変化であることが確認された。更に,H-E 染色による形態変化領域と TUNEL 染色や HIF- α 染色の陽性域の対比から,24 時間以後の H-E 染色で形態変化の見られる領域内は将来的に全て細胞死に陥る事が示された。これらの結果は臨床に於ける組織学的効果判定の基準となると共に,効果判定に於ける H-E 染色の重要性を明らかにしたものと言える。

種々の温熱療法に於いてアポトーシスが誘導されることは広く知られているが、ラジオ波焼灼による生体組織へのアポトーシス誘導については今まで報告がなかった。本検討では、ラジオ波焼灼後の焼灼部辺縁にアポトーシスが誘導されることを形態評価および、DNA 電気泳動、Caspase-3 活性測定から証明している。このことは、今までラジオ波焼灼後の細胞死判定に用いられてきたミトコンドリアや細胞代謝産物を染色する方法のみでは十分に認識されない細胞死領域が急性期に存在している可能性を示唆している。今後、病理組織学的効果判定は、この点を考慮した時期あるいは方法で行われるべきであると言える。

以上より、本研究で示された知見は、実際の臨床に於ける組織学的評価にも十分寄与するものであり、今後画像との対比を行っていく上でも基準となる重要な知見である。これを明らかにしたことは十分学位に値すると思われる。