

学位論文

Doctoral Thesis

原発性体腔液性リンパ腫発症マウスモデルにおける γ 線治療の効果

(The study on γ -irradiation therapy in a primary effusion lymphoma mouse model)

白石 善興

Yoshioki Shiraishi

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御専攻予防開発学

指導教員

岡田 誠治教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻予防開発学

2010年3月

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名 : 原発性体腔液性リンパ腫発症マウスモデルにおける γ 線治療の効果
(The study on γ -irradiation therapy in a primary effusion lymphoma mouse model)

著 者 名 : 白石 善興
Yoshioki Shiraishi

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻予防開発学 岡田誠治教授

審査委員名 : 放射線診断学担当教授 山下 康行
免疫学担当教授 西村 泰治
病態制御学担当教授 松下 修三
放射線治療医学担当教授 大屋 夏生

2010年3月

目 次

要旨	1
発表論文（関連論文およびその他の論文）	3
謝辞	4
略語一覧	5
第1章 研究の背景と目的	
研究の背景	6
研究の目的	7
第2章 HIV (human immunodeficiency virus)	
2-1 HIVの現状について	
2-1-1 HIVの感染傾向	8
2-1-2 HIVの起源	9
2-1-3 HIVウイルス	10
2-1-4 HIVの症状の変化	11
2-2 HIVの病原診断	12
2-3 HIVにおける治療	15
2-4 Primary Effusion Lymphoma (PEL)	
2-4-1 HHV-8の発見	18
2-4-2 PELの疾患概念の確立	19
第3章 悪性腫瘍（がん）治療	
3-1 悪性腫瘍（がん）治療について	
3-1-1 悪性腫瘍とは	20
3-1-2 細胞のがん化メカニズム	21
3-1-3 がんの治療方法	22
3-2 放射線治療	
3-2-1 放射線治療の役割	26
3-2-2 放射線によるアポトーシスのメカニズム	28
3-2-3 臓器・組織の放射線感受性	30
3-2-4 放射線による細胞死	32
3-2-5 放射線治療による副作用	33
3-3 悪性リンパ腫	
3-3-1 悪性リンパ腫とは	34

3-3-2	悪性リンパ腫の種類	34
3-3-3	悪性リンパ腫の治療	35
3-3-4	非ホジキンリンパ腫の治療プロトコールの一例	37
3-4	がん研究のための動物モデル	39
第4章 in vitroにおける放射線感受性		
4-1	実験に用いた細胞	40
4-2	実験方法	41
4-3	in vitroでの結果	
4-3-1	PELにおける放射線の効果	43
4-3-2	γ 線によるPELのアポトーシス誘導	45
第5章 in vivoにおける放射線の効果		
5-1	異種移植と放射線治療のマウスモデル	
5-1-1	実験に用いたマウスと細胞	48
5-1-2	実験方法	49
5-2	PELを移植した高度免疫不全マウスにおける放射線の効果	
5-2-1	皮下移植モデル	51
5-2-2	腹腔内移植モデル	53
5-3	考察	55
第6章 総括および今後の展望		
6-1	まとめ	57
6-2	今後の課題	58
	参考文献	60

要 旨

日本におけるHIV-1感染者は年々増加の一途を辿っているが、薬物療法の進歩によりHIV-1感染者の予後は劇的に改善している。この予後の改善によって最近では悪性腫瘍、特に悪性リンパ腫の合併が長期予後を脅かす因子として問題になっている。Primary Effusion Lymphoma (PEL)は、HIV感染者に比較的特異的にみられる悪性リンパ腫で、そのほとんどが化学療法に耐性で予後が極めて悪いことが知られている。そこで本研究では、化学療法に耐性であるPELに対する放射線療法の有効性について、*in vitro*培養系と高度免疫不全マウスを用いてその効果を検討した。

【方法】

- 1) PEL細胞株 (BCBL-1, BC-1, BC-3) の放射線感受性について調べた。¹³⁷Cs線源を用いて、放射線照射後、MTT法とトリパンブルー染色による細胞数の計数により解析した。また、その他の血液系悪性腫瘍株Raji (バーキットリンパ腫), Jurkat (T細胞性リンパ腫), K562 (赤白血病) とも比較した。さらに、これらの細胞が放射線により、アポトーシスに陥っているか否かをDNA ladder、PI染色、及びAnnexin Vと7-AADの二重染色により確認した。
- 2) 高度免疫不全マウスの皮下及び腹腔内にPEL細胞株を移植してPELを発症したモデルマウスを作成した。これらのマウスに全身放射線照射 (4 Gy×2回) 後、骨髄移植を行うことで、治療モデルを作成し、無治療群と比較実験を行った。

【結果】

- 1) PELの細胞株では、最も放射線に対して抵抗性を持つBCBL-1で、照射3日後のIC₅₀は4 Gy程度で、他の血液系悪性腫瘍株では、IC₅₀が4 Gyから10 Gy程度とPELより耐性であり、PEL細胞株の放射線感受性はほかの血液系悪性腫瘍株に比して有意に高かった。さらに、DNA ladder, PI染色およびAnnexin Vと7-AADの二重染色により、PEL細胞株が放射線によりアポトーシスに陥っていることを確認した。

2) BCBL-1を皮下投与した腫瘍形成モデルにおいて、非治療群では皮下腫瘍の経時的な増大が認められ、移植6週後にはすべて死亡したが、放射線治療群では、移植6週後においても腫瘍の増大は認められなかった。また、BC-3及びBCBL-1を腹腔内投与した腹水形成モデルにおいて、非治療群では顕著に腹水の貯留が認められたが、放射線治療群では移植6週後においても腹水の貯留は認められなかった。

【考察】

本研究によりPEL細胞株の放射線感受性は他の血液系悪性腫瘍株に比べて有意に高いことが証明された。PELは悪性度が高く化学療法耐性であることから、放射線療法が非常に有用な治療手段であることが示唆された。

【結論】

骨髄移植を伴う放射線治療を行うことでPEL患者の予後が大幅に改善される可能性があることが示唆された。

発表論文リスト

関連論文

1. Yoshioki Shiraishi, Kumiko Gotoh, Tomomi Towata, Tatsuya Shimasaki, Shinya Suzu, Akihiro Kojima and Seiji Okada,.
Therapeutic effects of γ -irradiation in a primary effusion lymphoma mouse model. *Exp Therap Med* 1(1):79-84, 2010

その他の論文リスト

1. 白石善興, 島崎達也, 古嶋昭博 「RI測定器の使用法とデータ解析法」
RIの逆襲 アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験 (岡田 誠治 監修),
pp.152-159. 秀潤社(東京), 2007年
2. 島崎達也, 白石善興, 古嶋昭博, 岡田誠治 「ラジオアイソトープの安全管理と使用の実際」, 細胞工学 秀潤社(東京) Vol.26 NO8, pp.952-967, 2007.
3. 古嶋昭博, 白石善興, 島崎達也, 岡田誠治 「生命科学研究に必要なラジオアイソトープ取り扱いの基礎知識」, 細胞工学 秀潤社(東京) Vol.26 NO7, pp.828-834, 2007.

謝辞

本研究を行うに際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野、岡田誠治教授に深く感謝致します。

また、本研究の基になる投稿論文作成にあたり、御助言、御指導いただきました熊本大学生命資源研究・支援センターRI実験分野の古嶋昭博准教授、島崎達也助教、熊本大学生命資源研究・支援センターアイソトープ総合施設の後藤久美子氏、熊本大学エイズ学研究センターの鈴木伸也准教授、砥綿知美氏に深く感謝致します。

実験をサポートしていただいた熊本大学エイズ学研究センターの鈴木郁子氏、徳永京子氏、現在は退職された遠藤優佳氏に深く感謝致します。

研究を行うに際し、御支援いただきました熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野のスタッフの皆様、熊本大学生命資源研究・支援センターアイソトープ総合施設のスタッフの皆様に深く感謝致します。

最後に、これまで温かく見守ってくれた家族に感謝し、ここに、改めて心から感謝の念を表したいと思います。

略語一覧

PEL : Primary Effusion Lymphoma (原発性体腔液性リンパ腫)

IC₅₀: 50% inhibitory concentration (50%阻害濃度)

HAART : Highly Active Antiretroviral Therapy
(高活性抗レトロウイルス療法)

SIV : Simian Immunodeficiency Virus (サル免疫不全ウイルス)

KSHV : Kaposi's sarcoma associated herpesvirus
(カポジ肉腫関連ヒトヘルペスウイルス)

HHV-8 : Human herpesvirus (ヒトヘルペスウイルス-8)

EBV : Epstein-Barr virus (エプスタイン - バーウイルス)

HVS : Herpesvirus saimiri (リスザルヘルペスウイルス)

QOL: Quality of Life (生活の質)

CHOP療法 : 多剤化学併用療法

NHL: Non-Hodgkin Lymphoma (非ホジキンリンパ腫)

LET: Linear Energy Transfer (線エネルギー付与)

MTT : Tetrazolium dye methylthiotetrazole

7-AAD: 7-Amino-Actinomycin D (7-アミノ-アクチノマイシン D)

第1章 研究の背景と目的

背景

世界的なHIVの感染傾向として、国連エイズ計画（UNAIDS）と世界保健機関（WHO）の発表によると、エイズ感染者数が日本を除く先進国では横ばいかもしくは減少しているのに対して、途上国では急激に増加しており、ボツワナとジンバブエでは2007年現在で感染者が推定で成人人口の約25%に達していて、世界のエイズ感染者は3,300万人にも及んでいる。また、先進国の中では日本だけが依然増加傾向にある。しかし、HIVを取り巻く環境は劇的に変化し、HAART（Highly Active Antiretroviral Therapy）の導入以後、HIV患者の予後は大きく改善した(1)。

これにより、HIV患者の死亡率及び死亡要因もHAARTの導入前後では大きく変化し、HIV患者の死亡率は大幅に改善した。それに伴い、死亡要因にも大きな変化が見られ、HAART導入後は、死亡要因として最も多かった日和見感染により死亡する患者が減少し、延命治療が可能になったことで、今まで、陰に隠れていた肝炎や悪性腫瘍が併発する患者の割合が増加し、新たな問題として認識されるようになった。このため、HAART治療の途中で肝炎や悪性腫瘍が併発し、並行して治療を行う必要があるケースが増加した。こうしたケースはこれからも増加することが予測され、併発する肝炎や悪性腫瘍に対して、並行して行える治療法の確立が患者の予後を大きく左右する因子の一つとなっている。

とりわけ、HIV関連の悪性腫瘍の中でも、悪性リンパ腫の合併症が問題視されている。今回、治療法の確立を目指すPEL（Primary Effusion Lymphoma）はHIV患者に比較的特異的に現れる悪性リンパ腫である。このPELは化学療法に耐性で、未だ有効な治療法が確立されていない。このため、動物モデルを使用して放射線療法による治療モデルの確立を目指した。

研究目的

PELは近年、免疫不全患者の間で非ホジキンリンパ腫として認知されている特殊なリンパ腫で、主にHIV陽性患者のような高度免疫不全患者にみられる。それは、病理学的にはHHV-8 関連の腫瘍である(2,3)。また、体腔（胸腔、腹腔、心嚢）に固形腫瘍を形成することなく、浸潤性のリンパ腫として存在する。さらに、AIDS関連のリンパ腫の中でも、PELは積極的に治療を行った場合でも、余命は一般的に2~6カ月程度と極めて予後が不良であると報告されている(4)。その予後についてはHARRT療法の開始後でも不良である(3)。

現状として、PELは極めて化学療法に耐性であることが知られており、ほとんどのPEL患者でCHOP療法のような多剤化学療法を行っても効果がみられず、PELに対する主となる治療法は未だ確立されていないため、有効な治療法の確立が期待されている。

このため、PELの放射線療法による治療モデルを確立することを試みた。放射線療法はがんの治療によく使用される手段の一つであり、全身照射も含め血液系腫瘍、特に悪性リンパ腫に対する有効な治療方法として重要な役割を担っている(5,6)。

リンパ腫の治療には進行具合、大きさ、年齢、一般状態を含む様々な要因が関係する。なぜなら、患者に対して全身照射できる線量には限度があり、がんのある部位や位置によっても照射できる線量には違いがある。

がん治療の中で行われる放射線治療の役割は通常、bulky masses や局所の腫瘍に対して照射され、痛みの緩和や抗がん剤等の化学療法をより効果的に行うため使用されるか、腫瘍の悪性度が低く、ステージがIAの初期患者の治療に用いられるのが一般的であるが、PELのように化学療法に耐性である悪性リンパ腫では放射線療法の効果が患者の予後を左右する鍵となる。

そこで、in vitro培養系でPEL細胞株の放射線感受性を調べ、放射線の影響により起こるアポトーシスの確認を行った。

また、in vivoではPELを発症したマウスモデルを作製し、骨髄移植を伴う放射線治療を施した治療群と無治療群に分け、放射線治療の効果を確かめる実験を行うことで、PELに対する放射線治療の可能性を検討した。

第2章 HIV (human immunodeficiency virus)

2-1 HIVの現状について

2-1-1 HIVの感染傾向

世界的なHIVの感染傾向として、国連エイズ計画（UNAIDS）と世界保健機関（WHO）の発表によると、世界のエイズ感染者は3,300万人にも及んでいる(1)。後天性免疫不全症候群（acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, エイズ）はヒト免疫不全ウイルス（HIV）を感染原因とする疾患で、死亡率の高さ、予防・治療の難しさから、人類が直面する深刻な問題の一つとなっている。また、先進国の中では日本だけが、依然増加傾向にあり、厚生労働省エイズ動向委員会の発表によると、平成20年度に報告された日本の新たなHIV感染者数は過去最高でHIV感染者が1,126名、AIDS患者431名で合計1,557名であった(7)。

エイズは1981年に米国において、男性同性愛者の間でカリニ肺炎やカポジ肉腫など、通常まれな日和見感染や日和見腫瘍をもたらす極めて致死性の高い疾患としてはじめて報告された。その後1983年に、病原体としてレトロウイルスに属するHIV が分離・同定された。HIVはCD4とよばれる細胞膜蛋白質を受容体として細胞に感染する性質をもち、細胞性免疫のCD4陽性のヘルパーT細胞やマクロファージに感染し、細胞を破壊する。そのため、細胞性免疫の著しい機能低下が起こり、全身性の免疫不全状態が引き起こされる。このため、様々な日和見感染症や悪性腫瘍、中枢神経障害など多彩で重篤な全身症状が起こることで知られている。また、適切な治療が行われなかった場合、予後は2～3年である。しかし、1995年以降は治療薬の劇的な進歩により、ウイルス量をコントロールするHAART療法が確立されたため、先進国におけるHIV患者の死亡率や日和見感染の発生率は低下し、HIV患者の予後は大きく改善した。

エイズの流行は70年代半ばに中央アフリカ地域に始まったと推定されている。その後、80年代に入ってカリブ海、欧米、ラテンアメリカ諸国でパンデミックが起こり、次いで80年代末～90年始めに南・東南アジア諸国、さらに90年代半ばに入ると東欧、中国などの諸地域において急激なHIV流行が起っている。

AIDSによる死亡者は、2007年末時点において全世界で、すでに2,500万人以上と推定されている。国連エイズ計画による推計では、サハラ以南のアフリカ地域（感染者2,200万人）と最も多く、次に南・東南アジア（420万人）で感染者が多く、両地域での感染者が世界全体の約8割を占めている(1)。

また、アフリカのいくつかの国々では、エイズの流行によって平均余命が60歳から40歳にまで減少し、AIDSの問題は一つの疾病としてではなく、一つの国の存否を左右するほどの深刻な問題である(8)。

我が国においても、ここ数年の傾向として10～20歳代の若年層の感染者の増加傾向が指摘されている。また、近い将来、我が国において若年層を中心にHIV感染が急増する可能性も指摘されている。その一方で保健所における抗体検査の依頼件数はむしろ減少しており、我が国のHIV感染に対する意識の低さは危機的状況であるといえる。現在のところ、我が国は諸外国と比較して感染者数自体は少ないが、HIV感染の無症候期で検査を受けていない数を考慮すると、実際の感染者は報告件数よりも、もっと深刻であることが予想され、若年者層に対するAIDSの流行阻止に向けたさらなる対策が必要である。

2-1-2 HIVの起源

HIVの起源は、霊長類を自然宿主とするサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus, SIV) のヒトへの伝播によるものである。HIV-2についてはスーティーマンガベイを自然宿主とするSIVに由来する(8)。

この両ウイルスにはvpx 遺伝子という特異的な遺伝子を共有し、系統樹上密接な関係があるとされる。さらに、最近HIV-1がチンパンジーに由来するとされる有力な証拠が提出されている。エイズは1960年～70年代より中央アフリカ地域の密林で風土病的に存在したと考えられ、当時「スリム病」と呼ばれ、著しい「るいそう（極度の痩せ／栄養不良状態）」によって特徴づけられる疾患群の中に、現在でいうエイズも含まれていたと推測されている。その後、交通機関・道路網の発達、経済活動の急速な発展に伴い、人間の行動範囲が急拡大したことと、売春・不特定多数の性的パートナーとの性的接触といった様々な社会的・経済的要因などにより、AIDS感染は急速に世界に広まったものと考えられる。とりわけ1980年以降には、多数の性的パートナーとの性行動を行う欧米の同性愛者間に急速に拡がり、エイズが認識されるきっかけとなった。これに前後して、欧米で、同じ注射器を用いての薬物の回し打ちする薬物乱用者の集団によっても爆発的に流行が拡大したといわれている。1988年に入ると、これまでエイズ流行の兆候のなかったアジア地域、特にタイ・インドでの売春・不特定多数のパートナーとの性的接触によって爆発的な流行が発生した。

2-1-3 HIVウイルス

HIVウイルスはHIV-1とHIV-2が存在し、HIV-1は現在の世界流行（pandemic）の主体となっているウイルスで、全世界に分布している。これに対して、HIV-2は主に西アフリカ地域に限局していて、フランス、ポルトガル、スペインなどに西アフリカ地域と関連をもつ国で報告されているのと、西アフリカ以外の地域では、インドのボンベイ・ゴアにHIV-2感染の侵淫地域が確認されている。

こうした現状からもHIV-2はHIV-1に比べ、感染性や病原性が低く、このことがHIV-2流行を限局的なものにしている理由だと考えられる。世界流行の病因となっているHIV-1は、遺伝学的系統関係からグループM（Major）、O（Outlier）およびN（non-M/non-O）の3群に大別される。また、このうちのグループMは最も主要な系統で、サブタイプA - D, F - H, J, K の9サブタイプに分類される。さらに、こうしたサブタイプ間の組換えウイルスの種類の多さがHIV感染の世界的なパンデミックを引き起こした原因であり、治療の難しさの一因と考えられる(8)。

2-1-4 HIVの症状の変化

HIV感染の自然経過は急性初期感染期、無症候期～中期、エイズ発症期の3期に分けられ、次のような症状が見受けられる。

- 1) 急性初期感染期：HIV感染成立の2～3週間後には、発熱、咽頭痛、筋肉痛、皮疹、リンパ節腫脹、頭痛などのインフルエンザあるいは伝染性単核症様の症状が出現する。症状は全く無自覚の程度から、無菌性髄膜炎に至るほどの強いものまで、その程度は様々である。初期症状は数日から10週間程度続き、多くの場合、自然に軽快する。
- 2) 無症候期～中期：感染後6～8週で血中に抗体が産生されると、ピークに達していたウイルス量は6～8カ月後にある一定のレベルまで減少し、定常状態となり、その後数年～10年間ほどの無症候期に入る。無症候期を過ぎエイズ発症前駆期（中期）になると、発熱、倦怠感、リンパ節腫脹などが出現し、帯状疱疹などを発症しやすくなる。
- 3) エイズ発症期：抗HIV療法が行われないとHIV感染がさらに進行し、HIVの増殖を抑制できなくなり、CD4陽性T細胞の破壊が進む。CD4リンパ球数が $200/\text{mm}^3$ 以下になるとカリニ肺炎などの日和見感染症を発症しやすくなり、さらにCD4リンパ球数が $50/\text{mm}^3$ を切るとサイトメガロウイルス感染症、非定型抗酸菌症、中枢神経系の悪性リンパ腫などを発症する頻度が高くなり、食欲低下、下痢、低栄養状態、衰弱などが著明となる。エイズを発症して未治療の場合の予後は2～3年である。

HIV感染の無症候期には、血中のウイルス量は安定しているように見えるが、他のレトロウイルス感染症における潜伏期のような静的な状態ではなく、HIVは体内で1日当たり10億個から100億個の速さで産生され、それに見合うだけのCD4陽性T細胞が産生され、感染し破壊されるといった過程が感染者の体内で日々繰り返されるためウイルスが潜伏している様に見える。また、HIV感染の主要な病巣部はリンパ節であり、リンパ節の中では感染の早期からウイルスの増殖とリンパ濾胞の破壊が進んでいる。このようなウイルスと免疫系との攻防の後、免疫系が破綻をきたし、その後にエイズが発症するものと考えられている。ウイルス学的には無症候期に定常状態になった時のウイルス量をウイルス学的セットポイントといい、この値がその後の予後に重要な関係があり、セットポイント時のウイルス量が多い程エイズを発症しやすいことが明らかにされている。

2-2 HIVの病原診断

HIV感染症の診断は、臨床知見（指標疾患）による臨床診断に加え、4つの検査が実施される。

- (1) HIV 抗体の検出 ELISA法や粒子凝集法（particle agglutination,PA 法）
- (2) ウイルス抗原の検出（HIV gag 蛋白質p24 アッセイ）
- (3) HIV ゲノムDNA/RNA 検出（PCR法、血漿あるいは血清中のウイルス量の定量のためのamplicore monitor法、NASBA法、b-DNA法など）
- (4) ウイルス分離

HIV感染症の診断は一般にHIV抗体検査による。HIV抗体スクリーニング検査法（酵素抗体法（ELISA）、粒子凝集法（PA）など）の結果が陽性で、かつ抗体確認検査（Western Blot法、蛍光抗体法（IFA））あるいは、HIV抗原検査、ウイルス分離及び核酸診断法（PCR等）等の病原体に関する検査で陽性である場合、HIV感染と診断される。

ただし、周産期に母親がHIVに感染していたと考えられる生後18カ月未満の場合は、HIVの抗体スクリーニング法が陽性であり、また、HIV抗原検査、ウイルス分離及び核酸診断法（PCR等）等の病原体に関する検査陽性、あるいは血清免疫グロブリンの高値に加え、リンパ球数の減少、CD4陽性Tリンパ球数の減少、CD4陽性Tリンパ球数/CD8陽性Tリンパ球数比の減少という免疫学的検査所見のいずれかを有する場合にHIV感染症と診断される。これは、母体由来のIgG抗体が胎盤を通過できるため、この移行抗体が完全に消失するまでの生後15カ月程度までは、抗体検査からは感染の有無を判断できないとされている。

また、AIDS の診断は上記で陽性と判断され、次に示す指標疾患（Indicator Disease）の一つ以上が明らかに認められる場合、AIDSと診断される。

指標疾患 (Indicator Disease)

A . 真菌症

1. カンジダ症 (食道、気管、気管支、肺)
2. クリプトコッカス症 (肺以外)
3. コクシジオイデス症
 - 1) 全身に播種したもの
 - 2) 肺、頸部、肺門リンパ節以外の部位に起こったもの
4. ヒストプラズマ症
 - 1) 全身に播種したもの
 - 2) 肺、頸部、肺門リンパ節以外の部位に起こったもの
5. カリニ肺炎

B . 原虫症

6. トキソプラズマ脳症 (生後1か月以後)
7. クリプトスポリジウム症 (1か月以上続く下痢を伴ったもの)
8. イソスポラ症 (1か月以上続く下痢を伴ったもの)

C . 細菌感染症

9. 化膿性細菌感染症 (13 歳未満で、ヘモフィルス、連鎖球菌等の化膿性細菌により以下のいずれかが2年以内に、二つ以上多発あるいは繰り返して起こったもの)
 - 1) 敗血症
 - 2) 肺炎
 - 3) 髄膜炎
 - 4) 骨関節炎
 - 5) 中耳・皮膚粘膜以外の部位や深在臓器の膿瘍
10. サルモネラ菌血症 (再発を繰り返すもので、チフス菌によるものを除く)
11. 肺結核又は肺外結核
12. 非定型抗酸菌症
 - 1) 全身に播種したもの
 - 2) 肺、皮膚、頸部、肺門リンパ節以外の部位に起こったもの

D. ウイルス感染症

13. サイトメガロウイルス感染症
(生後1か月以後で、肝、脾、リンパ節以外)
14. 単純ヘルペスウイルス感染症
 - 1) 1か月以上持続する粘膜、皮膚の潰瘍を呈するもの
 - 2) 生後1か月以後で気管支炎、肺炎、食道炎を併発するもの
15. 進行性多巣性白質脳症

E . 腫瘍

- 16 . カポジ肉腫
- 17 . 原発性脳リンパ腫
- 18 . 非ホジキンリンパ腫

LSG 分類により

- 1) 大細胞型
免疫芽球型
- 2) Burkitt 型

- 19. 浸潤性子宮頸癌

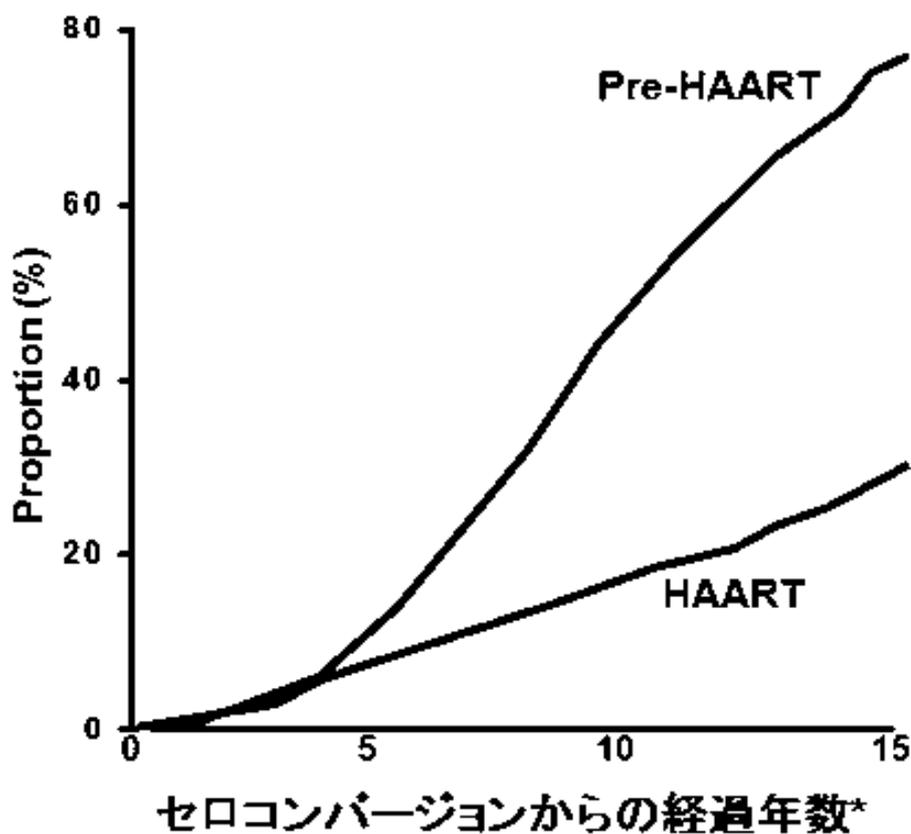
F . その他

- 20 . 反復性肺炎
- 21 . リンパ性間質性肺炎/肺リンパ過形成 : LIP/PLH complex (13歳未満)
- 22 . HIV 脳症 (痴呆又は亜急性脳炎)
- 23 . HIV 消耗性症候群 (全身衰弱又はスリム病)

※C11 活動性結核のうち肺結核及びE19 浸潤性子宮頸癌については、HIV による免疫不全を示唆する症状または所見がみられる場合に限る

2-3 HIVにおける治療

エイズ治療はこれまでの10数年の間に急速な進歩を遂げAZT (azidothymidine) を代表とする逆転写酵素阻害剤 (reverse transcriptase inhibitor, RTI) に加え、優れたプロテアーゼ阻害剤 (protease inhibitor, PI) が開発され、逆転写酵素阻害剤 2種とプロテアーゼ阻害剤、または非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 1種とを組み合わせる多剤 (3剤) 併用療法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) が奏効している。この治療法の導入により、先進国における日和見感染症の頻度や、エイズによる死亡者数は激減している (図1) (9)。



Smit C, et al. AIDS, 2006; 20: 741-749

図 1 HAART前後の死亡率の変化

標準的な治療開始の基準は、これまで血漿中ウイルス量5,000~20,000 コピー/ml 以上、CD4陽性リンパ球500 /mm³ 以下が目安となっていたが、副作用の問題や、さらに有効性の高い薬剤の開発が進んでいることから、現在はCD4陽性リンパ球200 /mm³ (350 /mm³) 以下と、治療開始するタイミングをなるべく遅らせる方向にある。こうした治療でウイルス量をある程度コントロールすることが可能になったことで、治療にとってエイズに伴う種々の合併症の治療がその後の患者の予後を大きく左右する。HAART導入前には日和見感染により死亡する患者が多かったが、HAART導入後には、日和見感染による死亡率は大きく改善した。

また、日和見感染の治療が可能になり、欧米で大流行し、エイズの主要な死因であったカリニ肺炎に対する特効薬であるペントミジン吸入による患者の延命効果等が見込めるようになった。現在のエイズ治療ではこうした日和見感染やエイズ由来の悪性腫瘍にいかに対応できるかが非常に重要で、日和見感染や日和見腫瘍の対策が、患者の予後を決めると言っても過言ではない。

先進国においては、日和見感染による死者はHAART確立後、激減したが、エイズ由来の悪性腫瘍、中でも悪性リンパ腫の発生率は未だに高いのが現状である。次にHIV患者が併発する悪性腫瘍の発生率を示す(図2)(10)。

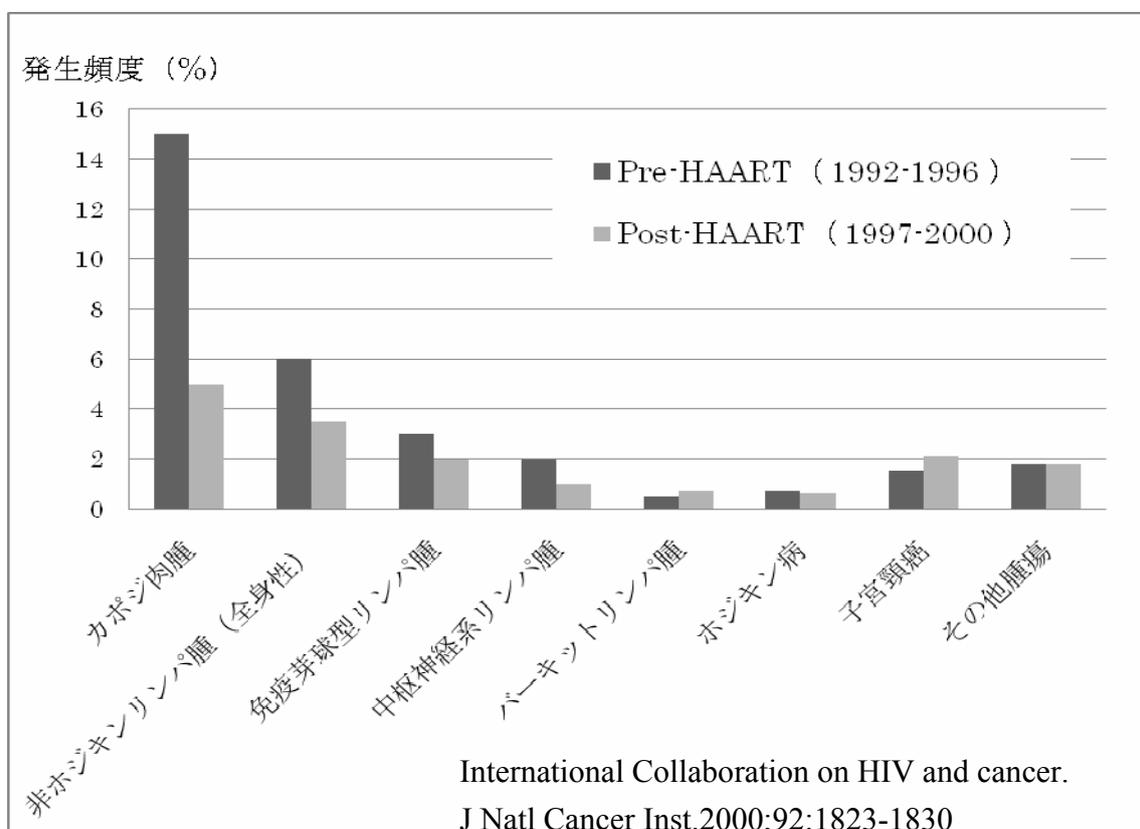


図 2 HIV患者に併発する悪性腫瘍の発生率

この図が示すように、様々なリンパ腫が併発していることが分かる。リンパ腫以外で、高い発症率を示している腫瘍にカポジ肉腫があるが、カポジ肉腫はHAART導入後その割合が大きく減少した。

また、別の報告によると1990-1995年のHAART導入前を1.0とすると、HAART導入後の1996-2002年までの間に発生した件数の比が、カポジ肉腫では0.22 (0.20 to 0.24) , NHL (Non-Hodgkin Lymphoma ; 非ホジキンリンパ腫) では0.40 (0.36 to 0.44) と変化し、1996-2002年の発生件数でもカポジ肉腫が149,702 人/年とNHLが151,000 人/年となり、NHLがカポジ肉腫の発生件数を上回るといった報告もされている(11)。

さらに、カポジ肉腫は有効な治療薬としてドキシソルビシンのリボソーム製剤が開発され、高い奏効率が認められる治療法が確立されている。

その一方で、悪性リンパ腫の治療は難しく、HIV患者の併発する悪性リンパ腫は特に悪性度が高く、治療は困難であることが知られている。また、HIV患者の悪性リンパ腫の発症率は通常の人と比較すると、150~250倍程度のリスクがあるとされ、近年AIDS治療において問題視されている(8)。

特に、Primary Effusion Lymphoma (PEL) はその形状も独特で、その多くが極めて化学療法に耐性であるため、患者の予後はおよそ平均3カ月であり、化学療法による経過は不良である(4)。

このため新たな治療法の確立が急務であることから、PELの放射線感受性を調査し、マウスモデルを使ってPELの治療効果を検討することにより、放射線療法の有用性を確認することにした。

2-4 Primary Effusion Lymphoma (PEL)

2-4-1 HHV-8 の発見

PELはウイルス性の腫瘍であることで知られ、PELの発病にはHHV-8感染により発症するとされている。このHHV-8は当初、カポジ肉腫から発見されたことから、カポジ肉腫関連ヒトヘルペスウイルス (KSHV) と名付けられた。しかし、その後8番目に見つかったヒトヘルペスウイルスであることからHHV-8と呼ばれるようになり、現在ではこの2つの名称がともに使用されている。

カポジ肉腫はハンガリーの皮膚科医Moritz K.Kaposiにより、皮膚に生じる多発性の色素斑性肉腫として報告され、10年後にGiraldoらによりカポジ肉腫の培養組織からヘルペスウイルス様粒子を同定した。その後、米国の同性愛者の中からもこのウイルスが検出され、カポジ肉腫の他にもカリニ肺炎やサイトメガロウイルス感染症などと合併しているケースが多く、免疫不全症を発症していることは明らかでエイズの合併症の一つとして認知されるようになった。しかし、カポジ肉腫は男性の同性愛者のみに発症し、血液製剤でHIVに感染したエイズ患者には見られなかったことと、カポジ肉腫は悪性腫瘍であるにもかかわらず、免疫能が回復すると自然治癒することが報告された。このような疫学的特徴から、腫瘍というよりもウイルスのような病原体が原因ではないかと考えられるようになった。また、いくつかのグループがこの未知の病原体の検出を試み、1994年にコロンビア大学のChangらが、カポジ肉腫の病変部からヘルペスウイルス様DNA断片を発見したと発表した。さらに、この断片をクローニングしたものは今まで発見されたどのウイルスとも一致せず、 γ -1ヘルペスウイルス亜科 (lymphocryptovirus属) のEpstein-Barr Virus (EBV)と γ -2ヘルペスウイルス亜科 (rhadinovirus属) のHerpesvirus saimiri(HVS)に相同性があるだけで新種のウイルスであった。これらのEBVとHVSは共にヒトやサルに悪性リンパ腫を引き起こす癌ウイルスとして知られ、これらのウイルスに類似していることからこの新しく発見されたウイルスも癌ウイルスである可能性が示唆された(12,13)。また、このウイルスはカポジ肉腫ではエイズに合併する症例の他にエイズとは無関係な地中海やアフリカの症例からもほぼ100%の検出率で検出され、カポジ肉腫との関連が決定的となった。また、このウイルスはカポジ肉腫以外からもいくつかの疾患でこのウイルスの断片が発見された。その疾患の一つがPELと呼ばれる特殊なリンパ腫で、このウイルスがカポジ肉腫より、さらに高コピー数で感染していることが報告された。その後、このリンパ腫から感染細胞株が樹立され、ウイルスの粒子が同定され、1996年に140 Kbpにおよぶ遺伝子配列が明らかにされ、現在ではカポジ肉腫やPELなどの疾患に170 KbpのHHV-8が関係していることが明らかとなっている(12,13)。

2-4-2 PELの疾患概念の確立

Primary Effusion Lymphoma (PEL:原発性体液性リンパ腫)は1996年に提唱された概念である。原発部位は胸腔や腹腔および心嚢腔内の貯留液のなかにリンパ球様浮遊液として増殖し、腫瘍塊を形成しないB細胞性のリンパ腫である(13)。

以前から、AIDS患者に体液性リンパ腫がまれにみられることは報告されていたが、症例数が少なかったことと、今までにない疾患概念だったこともあったため、概念として確立するまでには至らなかった。

PEL患者はほとんどが同性愛の男性AIDS患者で、AIDS患者以外では高齢者で発症する例が報告されていて、免疫不全患者を宿主とするHHV-8感染による日和見腫瘍と考えられる。また、AIDS関連のPELではCD4が $200/\text{mm}^3$ を下回った辺りから発症することが多く、発症部位としては胸腔が最も多く、ついで腹腔、心嚢となっている。症状としては胸水、腹水、心嚢水の貯留がみられる。さらに、免疫不全状態に合併しているため、多彩な症例が見受けられ、他の感染症との区別がつかないこともあるとされている。

第3章 悪性腫瘍（がん）治療

第2章ではPELをエイズの見地から説明したが、第3章では、がんの見地から説明する。

3-1 悪性腫瘍（がん）治療について

3-1-1 悪性腫瘍とは

がんと呼ばれているものには、造血器でできるもの、上皮細胞でできる癌または癌腫（cancer, carcinoma）と非上皮性細胞にできる肉腫（sarcoma）に大きく分類することができる。また、ごく稀に1つの腫瘍の中に両者が混在する癌肉腫というものが発生することがある。

これらのがんの発生頻度については、上皮細胞にできる癌（cancer, carcinoma）が圧倒的に多く発生している。また、用語として、ひらがなの「がん」は悪性腫瘍全体を示すときに用いられ、上皮性腫瘍に限定するときは、漢字の「癌」という表現が用いられることが多く、造血器にできるがんを除くとほとんどはかたまりを作って増殖していくため、総称して固形腫瘍と呼ばれている。

表 1 主ながんの分類

造血器でできるがん	白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫等
上皮細胞でできるがん（癌、癌腫）	肺がん、乳がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、卵巣がん、頭頸部のがん（喉頭がん、咽頭がん、舌がん等
非上皮性細胞にできるがん（肉腫）	骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、線維肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫等

次に、がんの特徴には次の3つが挙げられ、これらの特徴を持つものを悪性腫瘍（がん）と呼んでいる。

- 1) 自律性増殖：がん細胞はヒトの正常な新陳代謝に関係なく、自律的に増殖を続け、止まることがないこと。
- 2) 浸潤と転移：周囲にしみ出るように広がる（浸潤）や体のあちらこちらに転移し、次から次へと新しいがん組織を形成すること。
- 3) 悪液質：がん組織は、正常組織が摂取しようとする栄養を奪い取ること。

3-1-2 細胞のがん化メカニズム

我々、生物は細胞により形成されている。がんの正体とは、我々の体内にある正常細胞の中にあるDNAが何らかの要因で、傷つくことにより発生する。

このDNAの損傷は一度に誘発されるわけではなく、長い時間をかけて徐々に誘発され、だんだんと進行していくことが知られている。

また、細胞のがん化に関連した細胞内で働く遺伝子には次のようなものがある。

代表的なものには、がん遺伝子として知られ、傷ついた細胞内で細胞増殖を促進する作用がある遺伝子に「*myc*遺伝子」や「*ras*遺伝子」と呼ばれるものがある。

作用として、細胞内に「*myc*遺伝子」の数が増えると、産生される蛋白質の濃度が高くなることでがん細胞が際限なく増殖を繰り返えしたり、「*ras*遺伝子」と呼ばれる一群のがん遺伝子はDNAの特定の場所に傷がつくと働きが過剰な状態になり、細胞増殖を促進させたりする働きのある遺伝子が存在する。

一方で、がんの増殖を抑制する遺伝子もある。こうした働きを持つ遺伝子をがん抑制遺伝子と呼び、働きとしてはがん細胞のアポトーシスの誘導や増殖抑制を促す働きがある。代表的なものにはp53遺伝子（アポトーシスの誘導）、Rb遺伝子（細胞増殖の抑制）等が知られている。

この他のがん化メカニズムとして、遺伝子に起こる突然変異などがあり、たばこや紫外線など様々な外的要因により誘発される。もともとDNAは4つの塩基配列の組み合わせで決まるが、一部が欠損するなどして配列にずれが生じた場合、全く違ったDNA情報になってしまい、結果としてがんが誘発されることがある(14)。

がん化した細胞からは正常細胞からは産生されることのない異常な蛋白質を産生するため、現在では、この異常な蛋白質を標的とした治療法などの研究が行われている。こうした治療法は、正常細胞に影響を及ぼさずにがん細胞のみを攻撃することができるため、理想的な治療法となりえる。また、がんの診断方法にも利用され、異常たんぱく質など特徴的な産生物質の体液中濃度や血液中濃度を測定することにより診断を行うことができる。このような物質を腫瘍マーカーと呼んでいる。

3-1-3 がんの治療方法

がんの主な治療法には、化学療法と外科療法、放射線療法の3つがあり、これらから選択されるか、または、これらを組み合わせて治療を行うのが一般的である。化学療法としては抗がん剤、ホルモン剤、免疫賦活剤等を用いて行うものから、症状を和らげるために用いられる薬剤、鎮痛剤等まで含まれ、全身に広がる腫瘍に対して治療が可能な唯一の全身療法である。それに対して外科療法は原発巣が局所にとどまる場合、がんを含めて正常細胞の一部を切り取ることにより治療を行う方法である。また、放射線療法も同様に原発巣が局所にとどまる場合、完全寛解がみられたり、病巣部を縮小させたりする効果がある。それ以外にも症状緩和の目的でも用いられ、骨転移などによる疼痛が強い場合などにも使用される。現在では、この他にも研究段階のものまで含めると免疫療法や造血幹細胞移植、温熱療法など、効果が期待される治療法も存在する。

(1-1) 化学療法

化学療法では抗がん剤、ホルモン剤、免疫賦活剤等を使う療法のことであり、20世紀の初頭にドイツのエールリッヒ博士がはじめて使用した言葉である。この療法では、投与された化学物質（抗がん剤）が作用し、がん細胞の分裂を抑え、がん細胞を破壊する治療法で、投与後血液中に入り、全身をめぐる体内のがん細胞を攻撃・破壊する。また、全身にあるがん細胞を見つけ出し攻撃する力を持っているため、全身的な効果が期待できるのが特徴である。

がんは全身病と呼ばれ、早期にはある部位に限定している局所の病巣が、次第に全身に広がり、転移がみられるようになる。主ながんの治療法のうち、外科療法と放射線療法は局所的ながんの治療には強力な効果を発揮するが、全身に散らばったがん細胞のすべてを手術で取り出すことやがん細胞をすべて殺すほどの放射線量を全身に照射することは正常細胞へのダメージが大きいため通常は使用されない。このため、全身病を治すという観点からすると、化学療法ががん治療の中心的な役割を果たすことになる。

しかし、がんに対する薬は現在約100種類近くあり、使用方法も経口薬もあれば、注射薬も存在する。また、その投与期間や作用機序もさまざまである。

薬には、一般に「効果」と「薬物有害反応（副作用）」が存在し、通常、使用する一般的な薬は、効果のほうがずっと強くて、薬物有害反応がほとんどないか、または軽度である。

しかし、抗がん剤の場合は、効果と薬物有害反応が同じくらい、または効果

よりも薬物有害反応の方が大きい場合もあるため、一般の薬と違って非常に使いにくい側面がある。抗がん剤の一般的な副作用には、悪心、嘔吐、脱毛、白血球減少、血小板減少、肝機能障害、腎機能障害等の症状が現れる。薬によって薬物有害反応の種類や程度は異なり、個人差もあるため、個人の薬物有害反応を予測することは極めて困難でいくつかを組み合わせ併用するためにはまだまだ研究が必要であるが、化学療法が発達によって、手術不能の進行がんでも治療が可能になった例も数多くある。

(1-2) 抗がん剤等の効果

薬は一般に、投与量を増やすと効果が見られ、投与量を増やすことにより、今度は薬物有害反応が見られるようになる。一般的な薬ではこの効果と薬物有害反応が出現する投与量に幅があるため、通常量より多く投与しても、薬物有害反応は見られない。しかし、抗がん剤では、効果の出る量と薬物有害反応が出る量が同じか、場合によっては、これが逆転している場合もある。つまり、投与量が少ないところで、すでに薬物有害反応が出て、さらに投与することにより効果が見られる場合がある。このため、抗がん剤の効果を得るためには、薬物有害反応を避けられないことが多くある。

(2-1) 外科療法

がんの原発巣と転移巣を含め病巣部とその周辺をひと塊として切り取る治療法で、一般的には手術療法といわれる。血液を除くほとんどのがんに対して行われ、主病巣や所属のリンパ節等の切除を行う。がんが原発部位だけにとどまっていて、転移等が確認されない場合にはもっとも有効な手段の一つである。また、がんを部分的に切除する手術によって症状が改善され、放射線療法や化学療法の効果が促進されることもある。

外科療法はがんの治癒的療法として昔から行われ、現在では様々な術式（手術の技術や方式）が麻酔学とともに確立された。その反面、外科手術を施すことでがん細胞が急速に増殖、転移する例もある。また、切除によって生体機能が損なわれ、術後障害により QOL（Quality of Life）の面でマイナスになることがある。さらに、手術には体力も必要となるため、高齢者や長い治療生活で体力が低下してしまった場合、手術を受けることが難しく、こうしたケースでは化学療法を中心に治療が行われることになる。

(2-2) 外科療法の種類

がん治療における手術療法には、大きく分けて2つの考え方がある。一つはがん細胞より広い範囲を切除することにより、完治を目指す手術方法である拡大手術という考え方である。

もう一つは、切除する範囲を最小限に限定して放射線療法や化学療法の力を借りることで体への負担を最小限にする縮小手術と呼ばれる考え方がある。この縮小手術の考え方は放射線療法や化学療法の治療精度が上がったことからこのような考え方がされるようになった。

(3-1) 放射線療法

放射線は手術や抗がん剤とともにがん治療にとって重要な役割を果たしている。通常、放射線治療はがんとその周辺部を対象に行われる局所療法として使用される。放射線治療のメリットは手術のように臓器の摘出や切除をすることがないため、臓器を温存することが可能で、手術に比べてQOLの観点から非常に優れた治療法といえる。また、放射線ががん治療に使用されるようになって100年が経過し、その間に放射線治療は放射線治療機器自体の進歩とともにコンピューターの急激な進歩により、がん組織に対してより多くの放射線を照射し、正常な部位にはできるだけ最小限の放射線量で済むように設計ができ、がんを完治させる可能性が格段に上がったといえる。放射線療法は抗がん剤や手術に比べると、副作用が小さく、近年では、X線や γ 線のような電磁波による治療だけでなく、電子・陽子・中性子などといった粒子線が治療に用いられている。

(3-2) 放射線治療が及ぼす細胞への効果

放射線治療の特徴は細胞のDNAに作用し、細胞増殖能を失活させ、細胞にアポトーシスを誘発する作用がある。これは正常細胞にも起こるが、正常細胞には傷付いたDNAを修復する機構が備わっていて、修復できない場合アポトーシスが誘発される。

3-2 放射線治療

3-2-1 放射線治療の役割

以前は放射線治療の対象となるがんは手術ができないほど進行した症例がほとんどであったため、気休めの治療、一時しのぎの治療といったイメージがあった。しかし、実際には放射線治療の果たす役割は非常に重要であり、根治を目指す治療から症状を緩和させる目的で使用される治療まで幅広い役割を担っている。次に、放射線治療の目的および役割について示す。

放射線治療の目的と役割

1) 放射線単独、または抗がん剤などと併用して用いられる治療

臓器の形態や機能を温存することができる治療方法として、次のような腫瘍で治療が行われている。

頭頸部がん、網膜芽細胞腫、悪性リンパ腫、子宮頸がん、肺がん
食道がん、前立腺がん、皮膚がんなど

2) 術前・術後治療

術前照射する理由としては、がん細胞をできるだけ小さくし、手術をしやすくするために事前に照射を行ったり、手術中に散らばるおそれがあるがん細胞を殺すために行われたりする。

術後照射する理由として、手術後切除しきれなかったがん細胞を殺し、再発の可能性を下げるために行われている。

乳がん（温存療法、乳房切除術後）、頭頸部がん、軟骨部腫瘍、
食道がん、肺がんなど

3) 手術後の再発に対する治療

手術後、手術した部位から再発した食道がん、肺がん、頭頸部がん、乳がんなどでは、遠隔転移がない場合、放射線治療単独、または抗がん剤との併用によって治療が行われる。

4) 全身照射

骨髄移植を行う直前に、宿主の骨髄を枯渇させ、白血病などが再発しないようにし、移植された骨髄をうまく生着させるために行う。

5) 術中照射

手術中にがん組織に放射線を照射する方法で、直接確認して確実にがん組織へ照射する。また、がん周辺部の放射線に弱い組織を避けて治療ができる。このため、膵がんや大腸がんなどで行われている。

6) がんによって引き起こされる症状の緩和治療

骨転移の痛みやがん組織による器官、神経等の圧迫による痛みや苦痛、脳転移による神経症状を和らげるために放射線が使用される。

3-2-2 放射線によるアポトーシスのメカニズム

放射線の影響による細胞死には、放射線が細胞のDNAを切断することによって起こる直接作用と生体内にある水分子の電離・励起により生じたフリーラジカルを介して間接的にDNA損傷を与えることにより起こる間接作用がある。

直接作用はその名の通り、放射線自体がDNAを切断することにより、アポトーシスが誘発される。正常細胞の場合は2本鎖のDNAが切断された場合などDNAが修復できない場合、アポトーシスが誘発される。がん細胞ではDNAの修復能がないため、DNAが損傷を受けることにより、アポトーシスが誘発される。

間接作用では放射線照射により次のようにフリーラジカルが生成され、これらの働きによって細胞のDNAに損傷を与える。

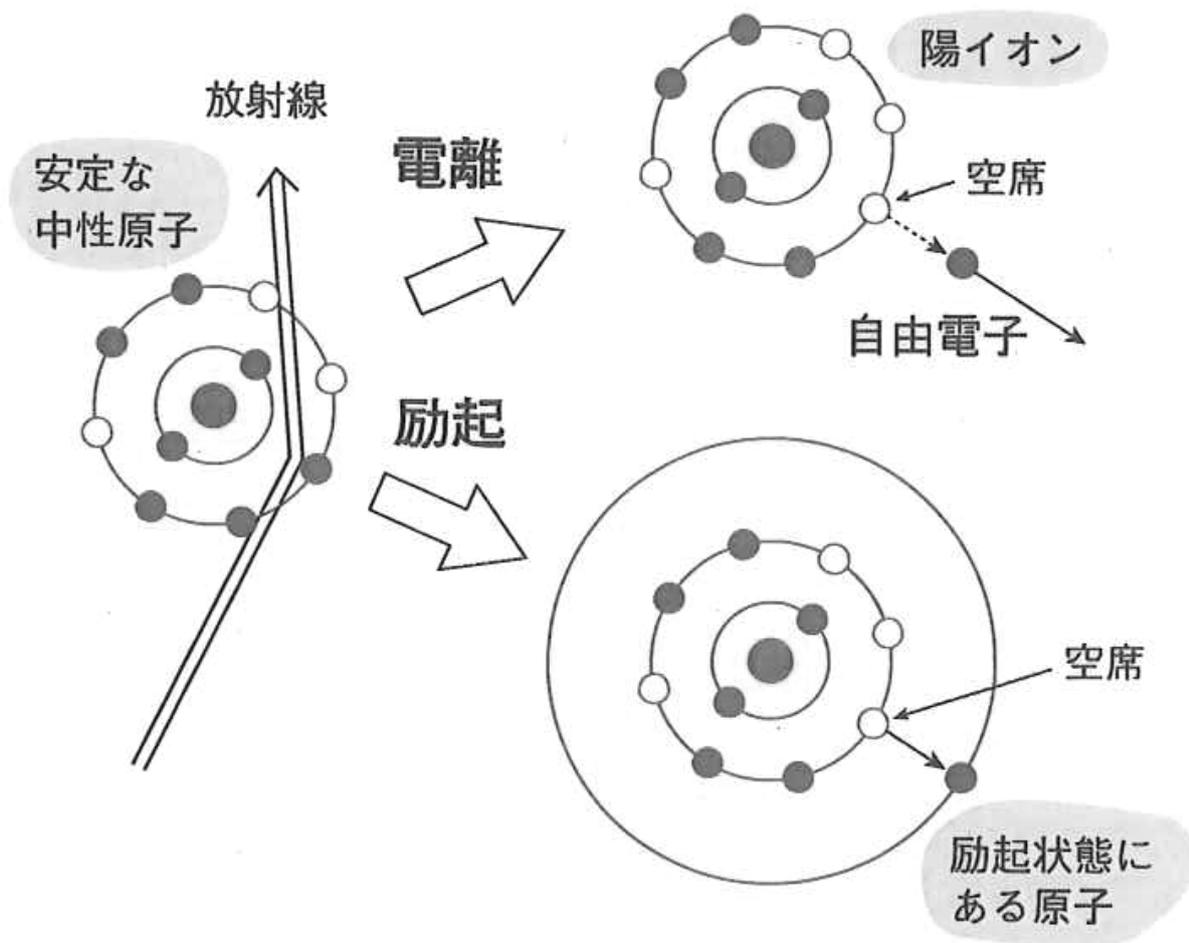


図 3 放射線による電離と励起

高エネルギー研究機構のホームページより引用

電離

放射線によりエネルギーを受けて電子が自由電子として放出される現象である。生体内の水分子が電離されると、水イオンラジカルと電子を生じる。

この時、生成される水イオンラジカルは非常に不安定であるため、OHラジカルとHラジカルに分解される。また、他の水分子と反応することにより、 H_3O^+ とOHラジカルに変化する。さらに、 H_3O^+ は電子とさらに反応することで、Hラジカルを生成する(15)。

励起

放射線により励起された水分子は、HラジカルとOHラジカルを生成する。



このような過程を経て、生成されたラジカルが拡散しDNAへ損傷を与える。また、過酸化水素がスーパーオキシド (O_2^-) と反応してOHラジカルを生成する(15)。

こうして生成されたラジカルが放射線による間接作用である。

ただし、生成されたラジカル同士の距離が近い場合は、再結合が起こるためラジカル生成密度が高い高LETでは間接作用の寄与は小さく、ラジカルの生成密度が低い低LET放射線である γ 線やX線ではこの間接作用が支配的である。

3-2-3 臓器・組織の放射線感受性

放射線が与える臓器や組織に対する影響はベルゴーニとトリポンドーにより提唱された法則があり、放射線感受性の高い組織の特徴として次の3つからなるといわれている。

1. 細胞分裂の頻度が高いもの
2. 将来行う細胞分裂の数が多いもの
3. 形態や機能が未分化なもの

がある。成人における細胞分裂の頻度が高いものとしては細胞再生系に属する、骨髄、小腸、皮膚、水晶体、精巣がこれに該当する。特に造血系の細胞には芽球細胞といった未分化な細胞も存在するため、放射線感受性が特に高いことで知られている。

表 2 組織別の放射線感受性の違い

感受性の程度	組 織
最も高い	リンパ組織（胸腺、脾臓）・骨髄・生殖腺
高い	小腸・皮膚・毛細血管・水晶体
中程度	肝臓・唾液腺
低い	甲状腺・筋肉・結合組織
最も低い	脳・骨・神経細胞

この表 2 が示すように、造血器官であるリンパ組織や骨髄は非常に放射線感受性が高く、0.25 Gy 以上の全身被ばくをした場合、放射線の影響は末梢血中のリンパ球数に減少がみられる。骨髄は造血機能を持つ赤色骨髄と脂肪変性して造血機能を失った白色骨髄に分類できる。小児期にはほとんどが赤色骨髄であるのが、年齢とともに白色骨髄の割合が多くなる。赤色骨髄は 0.5 Gy 程度の被ばくをすると造血機能の低下が起り、血球の供給が止まるため末梢血中の血球数の減少がみられる。

末梢血中の血球は次の表 3 の通りに分類される。

表 3 末梢血中の血球分類

赤血球		
白血球	リンパ球	
	顆粒球	好酸球
		好中球
		好塩基球
		単球
血小板		

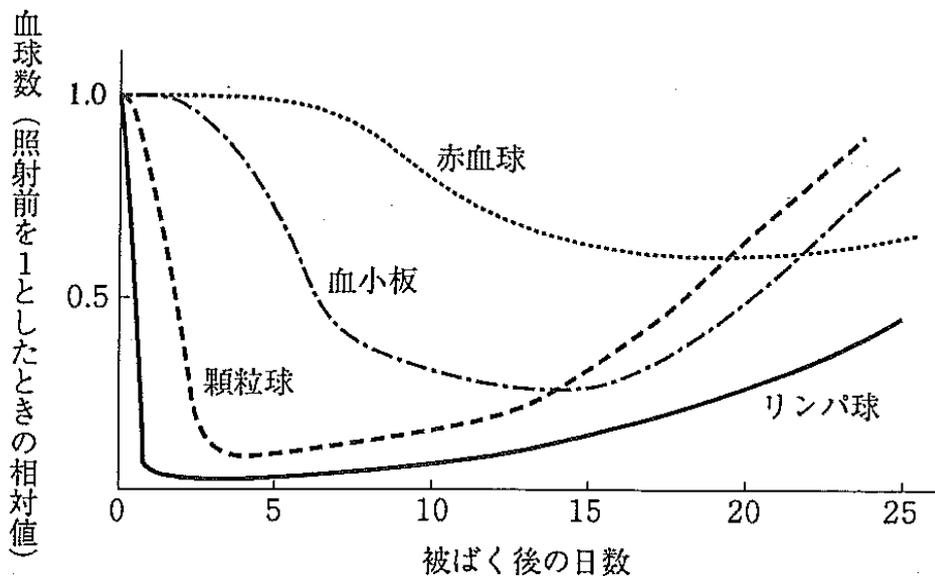


図 4 数 Gy 全身被ばく後における末梢血中の血球数変化モデル
飯田博美 放射線概論より引用

リンパ球はリンパ芽球→幼若リンパ球→リンパ球と分化し、分化しても放射線感受性は低下することなく、末梢血中の成熟リンパ球でも放射線感受性が高いのが特徴であり、リンパ球の回復は他の血球と比較して遅い。顆粒については骨髄芽球の放射線感受性が最も高く、分化に伴い、感受性が低下していく。白血球は免疫応答、貧食作用などの機能を持つため、白血球の減少により免疫機能の低下がみられる。血小板は顆粒球よりさらに遅れて減少が認められ、回復も遅くれる。赤血球は寿命が 120 日と長いいため影響が現れにくく、他の血球に比べて影響が少ない(図 4)(15)。

3-2-4 放射線による細胞死

細胞にある程度の放射線が照射されると細胞分裂に遅延や細胞死が起こる。細胞死には細胞周期の観点から分裂死と間期死に分類される。また、細胞死の形態からネクローシスとアポトーシスに分けられる。

分裂死とは増殖死とも呼ばれ、細胞分裂が盛んに行われている細胞に起こり、照射を受けた後に数回の分裂を経て細胞死に至る場合で、細胞分裂が停止したのちも、DNA やタンパク質の合成が続くため巨細胞が形成されたり、隣接する細胞同士で核の融合がみられることがある。分裂死を起こす細胞には骨髄や腸の細胞などがある。

間期死には間期に放射線を受けた細胞が、分裂を起こすことなく細胞死に至る場合のことで、もはや細胞分裂を行わない神経細胞や筋細胞などの分化した細胞に間期死はみられる。また、細胞分裂をしている細胞でも分裂死が起こる線量より、さらに高い線量を受けた場合に間期死がおこる。この現象は低感受性間期死と呼ばれている。

一方、リンパ球や卵母細胞などでは低線量の照射で間期死がおこり、これを高感受性間期死と呼んでいる。

また、ネクローシスは病理的で受動的な細胞死であり、アポトーシスの生理的で能動的な死と対照的な細胞死の形態である。さらに、アポトーシスは損傷を受けた細胞が自らを排除するために起こる。

ちなみに、放射線照射によるリンパ球にみられる細胞死の形態は高感受性間期死であり、アポトーシスを起こすことが知られている。

アポトーシスが起きると、細胞内のミトコンドリアのエネルギー産生(ATP)機能、あるいは、その分解酵素の活性が阻害されて失活する。このことによつてミトコンドリアのATP合成が阻害され、エネルギーが産生できなくなって細胞死が起こるとされている。

3-2-5 放射線治療による副作用

1) 放射線治療の副作用

放射線による副作用には、急性障害と晩発障害がある。急性障害は放射線治療中または終了直後から起こり、全身的な副作用として疲れやすい・食欲がなくなるといった症状があらわれることがあり、症状には個人差がみられる。また、放射線照射によって骨髄は影響を受けやすいため、血液細胞を造る能力が低下して、白血球や血小板、赤血球等の減少がおこる。皮膚に発赤、色素沈着、乾燥などが起こることがある。

2) 照射部位に起こる急性障害

頭部では、頭痛、耳痛、めまい、脱毛、吐き気などの症状が見られる。口腔・頸部では、口腔、咽頭部に粘膜炎や食道が治療部位に入る場合、食道炎がおこり、飲み込みにくさ・痛み、声がかれるなどの症状がみられる。腹部の場合は胃や腸が照射されることにより、吐き気、嘔吐、腹痛、下痢といった症状が出ることもある。膀胱では膀胱炎症状である頻尿、排尿困難がみられることがある。

3) 晩発障害

治療による重篤な副作用はごく少数の人にみられ、晩発障害は照射された放射線量と照射部位によって発生頻度が推定できる。そのため、治療にはこれらのリスクを考え治療計画が立てられる。起こる可能性のある代表的な症状としては、次のようなものがある。頭部では脳や脳神経の障害により、難聴、顔面神経の麻痺、脳障害、脳下垂体の機能低下などがある。眼に照射された場合、白内障や網膜症がおこることがある。口腔・頸部の場合は唾液腺や甲状腺機能の低下などが考えられる。腹部では直腸・結腸の内腔が狭くなる症状や潰瘍ができることがある。また、リンパや血液の流れが悪くなり、下肢のむくみがみられることもあるとされている。

3-3 悪性リンパ腫

3-3-1 悪性リンパ腫とは

悪性リンパ腫は白血球の中のリンパ球ががん化したものである。本来、リンパ球は病原体や異物の体内への侵入を防ぐための免疫細胞で、侵入してきた病原体や異物を排除するための抗体をリンパ節で作らせ、リンパ球の通り道となるリンパ管を通して全身へと抗体を運んでいる。

悪性リンパ腫の多くはリンパ節から発生するが、リンパ節は人体に500箇所以上存在するため、あらゆる臓器から発生する可能性があり、リンパ節が腫れたり、臓器に腫瘤を形成したりすることが多い。

悪性リンパ腫の発症率は近年増加傾向にあり、EBVなどのウイルス感染やヘリコバクター・ピロリなどの細菌感染により発症するものもみられる。

また、悪性リンパ腫には、良性と呼ばれる腫瘍はなく、すべてが悪性腫瘍である。しかし、その悪性度にはかなりの違いがみられ、進行が遅く放置していてもすぐに影響ないものから、直ちに治療を行わなければ命にかかわるものまでがある。さらに、この腫瘍の特徴として、他の固形腫瘍のように手術で切り取るということはほとんどなく、全身疾患であるため、化学療法を中心に、放射線治療を併用するのが一般的な治療方法である。

3-3-2 悪性リンパ腫の種類

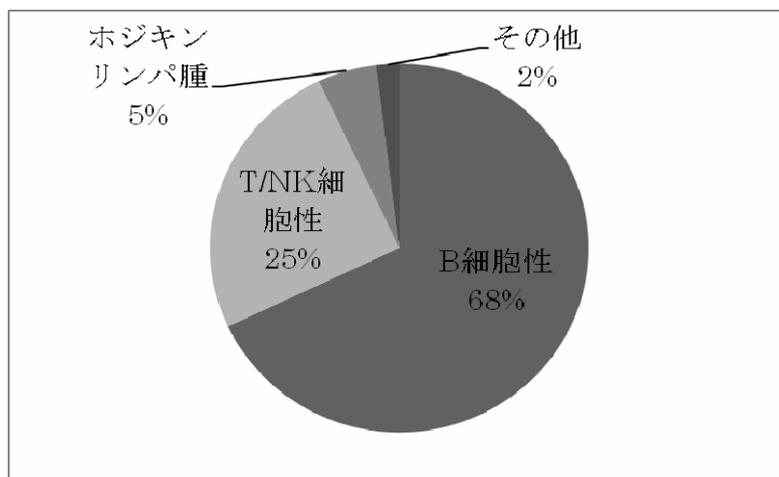


図 5 悪性リンパ腫の発生頻度（がん情報センターより引用）(16)

悪性リンパ腫は大きく二つに分類すると非ホジキンリンパ腫とホジキンリンパ腫に分けることができる。また、本邦ではホジキンリンパ腫は1割以下で、ほとんどが非ホジキンリンパ腫に分類される。その非ホジキンリンパ腫の中でもB細胞性の悪性リンパ腫が最も多い(図5)(16)。

3-3-3 悪性リンパ腫の治療

非ホジキンリンパ腫の場合、悪性リンパ腫の治療方針は、そのリンパ腫の悪性度(表4)によって治療計画が立てられてきた。

表4 悪性リンパ腫の種類と悪性度

悪性度	B細胞性	T/NK細胞性
低悪性度	小細胞性 MALT 濾胞性(グレード1,2,3a)	菌状息肉腫
中悪性度	形質細胞腫/骨髄腫 マンテル細胞 濾胞性(グレード3b) びまん性大細胞型	末梢T細胞性 血管免疫芽球型 NK/T細胞性鼻型 未分化大細胞型
高悪性度	リンパ芽球型 バーキット	リンパ芽球型 成人T細胞性

現在では、治療方針の決定には、B細胞性なのかT細胞性なのかも重要なファクタとなっている。B細胞性の場合、その悪性リンパ腫の細胞表面にCD20が発現しているかどうか調べられ、発現が確認される場合、リツキサンの効果が期待できるため、3種類の抗がん剤と1種類のホルモン剤を用いた化学療法CHOP療法(エンドキサン[一般名:シクロホスファミド]、アドリアシン、オンコビン[一般名:ビンクリスチン]、プレドニン[一般名:プレドニゾロン])と並行して、リツキサンが用いられている。

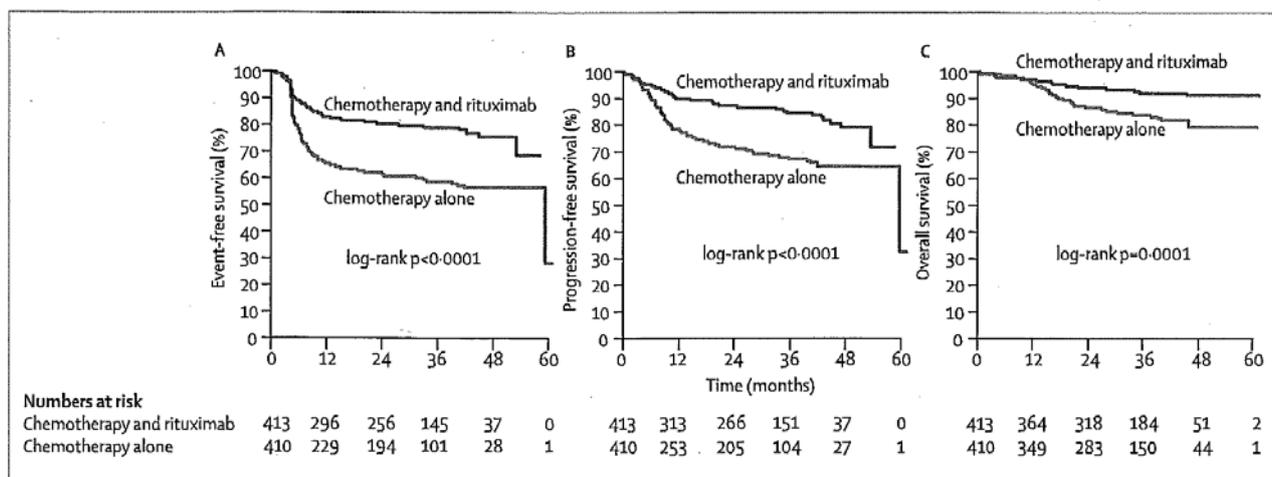


図6 CHOP療法による悪性リンパ腫の効果

Michael P, et al: Lancet Oncol 7:379-391, 2006

CD20が発現している悪性リンパ腫ではCHOP治療だけで治療を行った場合とリツキサンを併用したR-CHOP療法では図 6 のように顕著な効果の差がみられるため、R-CHOP療法が選ばれるようになってきた。(17,18)。

また、治療方針は病期（ステージ）によっても異なる。病期は4期に分けられ、次のように分類される。

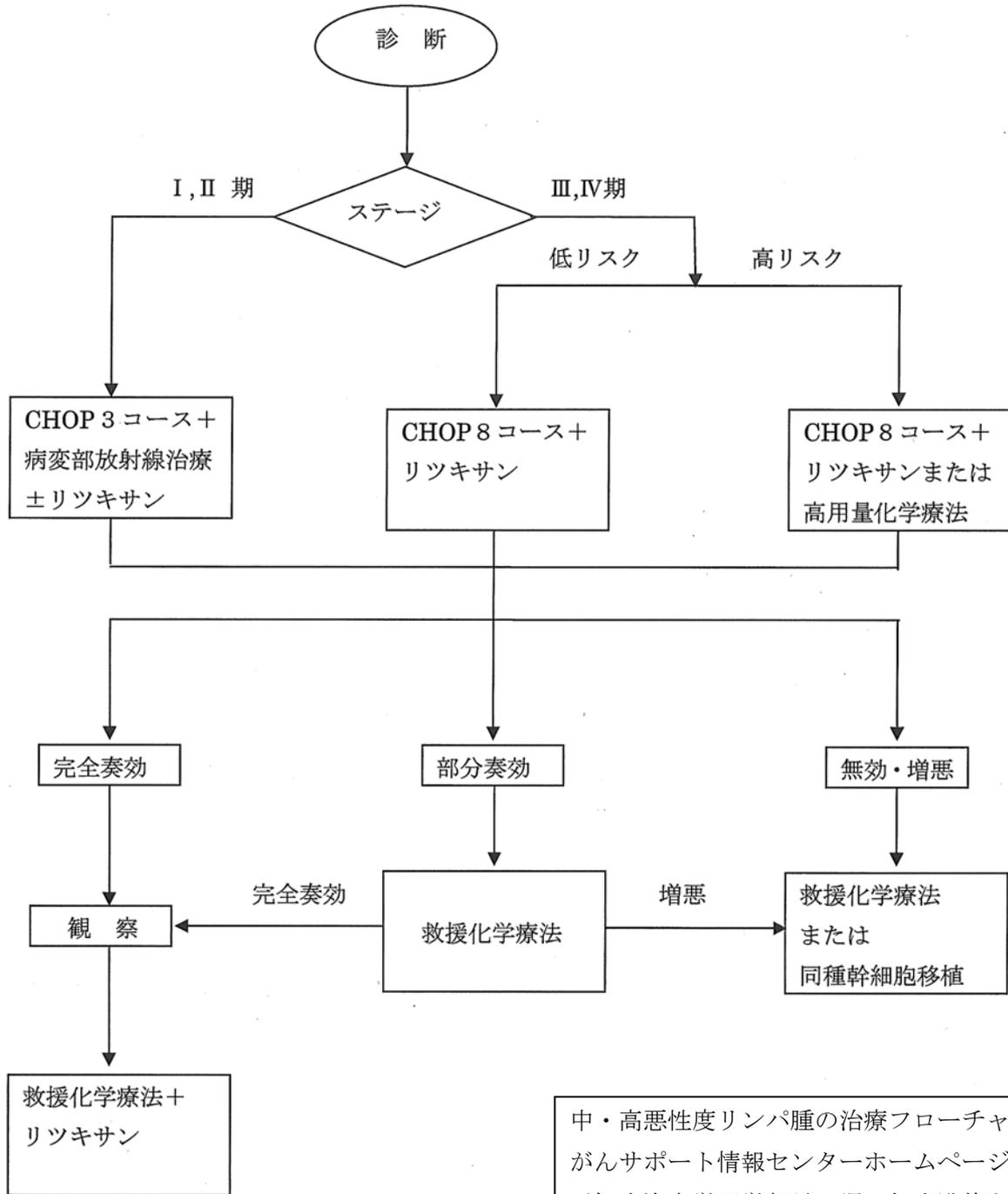
表 5 悪性リンパ腫のステージ

I期	一つのリンパ節領域、またはリンパ組織（扁桃腺、脾臓、胸腺など）に病変がとどまる場合。リンパ節以外の限局的なリンパ腫病変である場合。
II期	横隔膜を境界として、その上または下いずれか一方に限局した2つ以上のリンパ節領域、リンパ組織の病変。
III期	横隔膜をはさんで両側におよぶリンパ節領域またはリンパ組織における病変。
IV期	リンパ節以外の臓器へ広範な浸潤がみられる場合、たとえば、骨髄、肝臓などの臓器に病変がある場合。

悪性リンパ腫から採取された細胞の悪性度、病期で主な方針が決まり、B細胞性でCD20 を発現している場合、リツキサンが併用されている。そのプロトコールの一例を3-3-4の図7、図8に示す。

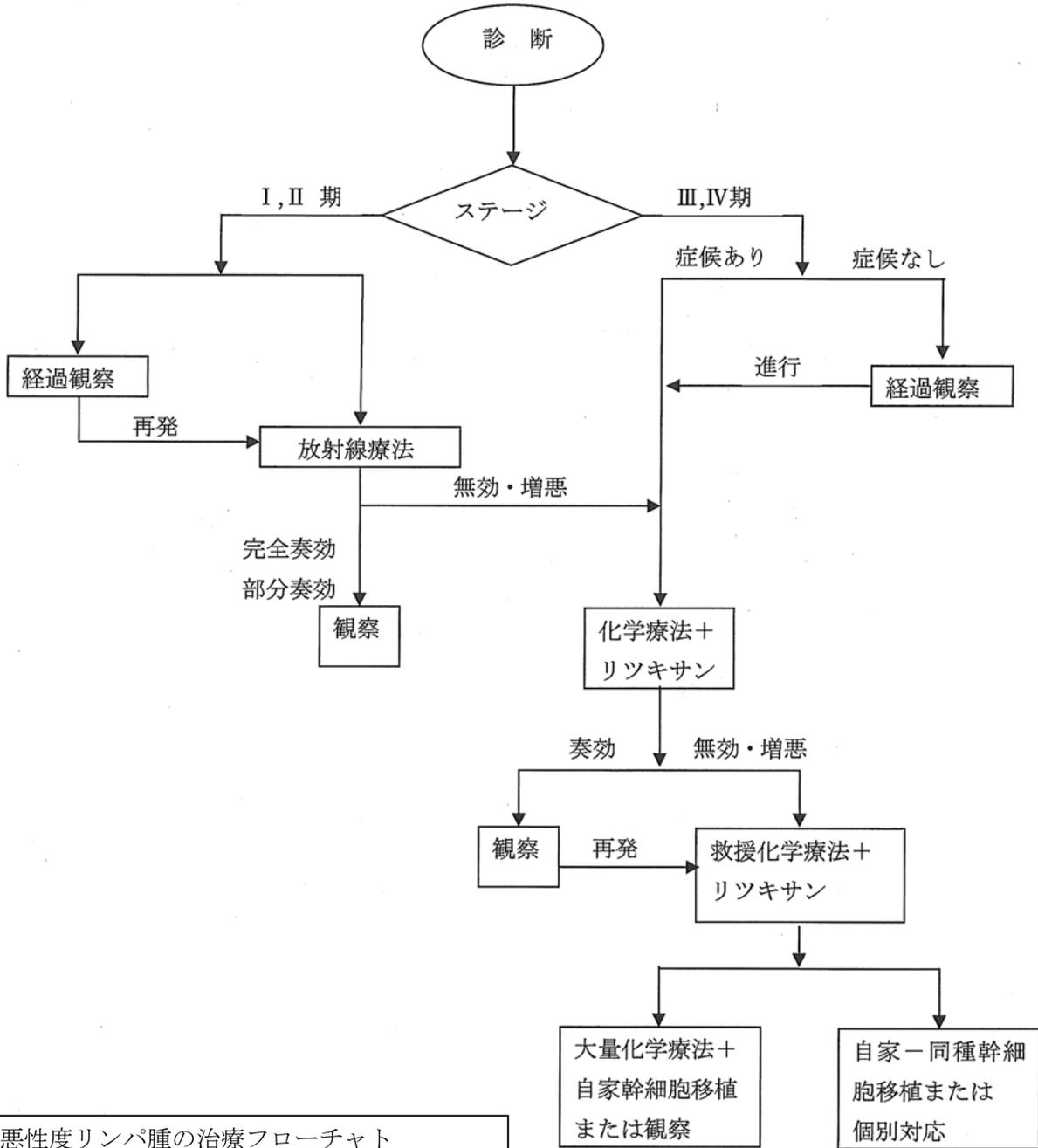
また、ホジキンリンパ腫は日本人には発症割合が低く、治療法として、以前は放射線療法などが使われていたが、現在では化学療法のABVD療法（アドリアシン[一般名：ドキソルビシン]、ブレオマイシン、エクザール[一般名：ビンブラスチン]、ダカルバシン）の4種類の抗がん剤を用いるのが一般的で補助的に放射線療法が用いられている。

3-3-4 非ホジキンリンパ腫の治療プロトコールの一例



中・高悪性度リンパ腫の治療フローチャット
がんサポート情報センターホームページより
前 東海大学医学部長 堀田知光監修を改変

図 7 リンパ腫の悪性度が高い場合の治療法



低悪性度リンパ腫の治療フローチャート
 がんサポート情報センターホームページより
 前 東海大学医学部長 堀田知光監修を改変

図 8 リンパ腫の悪性度が低い場合の治療法

3-4 がん研究のための動物モデル

医学の基礎研究にとって動物実験は欠かすことのできない実験資材で、がん研究のみならず、様々な病態を解明するための重要な手段である。この動物モデルでは試験管の中で行う実験とは違い、その病変が発生する臓器や細胞の微小環境によって結果は大きく異なる。このため、実験動物を使った手法では、試験管内では実現できない臨床症状を反映できるため、非常に意義のあるデータを得ることができる。

例えば、がん研究を行う場合、がん細胞と宿主とのオートクライン、パラクライン機構による複雑な相互作用により影響を受けるため、試験管内のがん細胞の挙動を遺伝子や分子レベルで解析しても臨床に反映することはできない。

特に個体レベルでがん細胞が周辺組織に浸潤および遠隔転移する一連の過程を念頭において実験を行う必要があるが、従来はがんの浸潤・転移の臨床を反映する動物モデルはある特定のがん腫に限られるものであった。このため、近年ではヒトがん細胞を免疫不全マウスに移植することで、より臨床を反映した形で実験を行うことが可能になった。

第4章 in vitroにおける放射線感受性

第4章では、in vitroにおけるPEL細胞株の放射線感受性を調べるため、下記のPEL細胞株とPEL以外の血液系腫瘍細胞を対照細胞として用いた。PELは原発性体腔液性リンパ腫といい、化学療法には極めて耐性である。それに加えて、PELは胸水や腹水を伴って体腔に広がりながら、増殖する性質がある。

このため、治療の対象となる部位が広範囲に及び、全身照射できる放射線量は部分照射に比べ、治療のために照射できる放射線量は厳しく制限される。

そこで、マウスを使った放射線療法の前臨床試験を行う前に、in vitroにおけるPELの放射線感受性実験を行った結果について示す。

4-1 実験に用いた細胞

実験には次のPEL細胞株3種類とPEL以外の血液系腫瘍細胞3種類を用いた。

PEL細胞株

BCBL-1

BC-1

BC-3

PEL以外の血液系腫瘍

Raji (バーキットリンパ腫)

Jurkat (T細胞性腫瘍)

K562 (赤白血病)

BCBL-1(19)は、NIHより入手したものを使用した。BC-1(20)とBC-3(21)は、American Type Culture Collection より購入したものを使用した。その他の細胞はRIKEN CELL BANK から入手したものを使用した。

これらの細胞の培養には、RPMI1640 (medium) に非動化したFCS (Fetal Calf Serum) を加え、10%FCS培地を作製し、抗生物質であるペニシリン (最終濃度: 100 U/ml)、ストレプトマイシン (最終濃度: 100 µg/ml) を添加したものを使用した。細胞培養を行うインキュベータ内の設定は37°C、CO₂ 濃度 5%である。

4-2 実験方法

1) Tetrazolium dye methylthiotetrazole (MTT) 解析

MTT法では、96ウェルのプレートを使用した。手順として、初めに細胞数を 2×10^5 /mlに調整し、それぞれの細胞ごとに照射を行わない 0 Gyのコントロールと3,5,7,10 Gyを照射したものを準備した。それらの細胞をプレートのウェルに100 μ l (2×10^4 個) ずつ、3箇所に入れ、測定値は、その3箇所の平均値 \pm SD で評価した。測定は照射後24時間ごとに、3日間解析を行った。

解析方法は、測定時にMTT (最終濃度: 0.5 mg/ml) をそれぞれのウェルに10 μ l ずつ加えた後、4 時間インキュベータ内で保管し、0.01 NのHClを加えたイソプロピルアルコールを100 μ lずつ入れ、結晶を溶解させ、ELISAプレートリーダーを用い、吸光度 595 nmで測定を行った。

ただし、MTTの結果は放射線を照射していない0 Gyの試料をコントロールとし、その値を1.0 とする比で示した。

2) 細胞計数法

PELとその他の血液系腫瘍に対する放射線の細胞増殖抑制効果について調べた。手順として、MTT法と同様に照射を行わない 0 Gyのコントロールと3,5,7,10 Gyを照射したものを準備し、照射後インキュベータ内で細胞培養を行い、24時間ごとにトリパンブルーで染色し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

3) DNA ladder 解析

細胞死のパターンには特徴があり、DNA ladder解析法はすでに確立されているためそのプロトコールに従った(22)。手順として、 1×10^6 個の細胞を10 mMのEDTAと0.5 %のTriton Xを含む10 mM Tris-HClバッファ100 μ lに溶解した。

その後、毎分15,000回転で5分間遠心した後、サンプルの上澄みをRNase A (Sigma) とProtein K (和光純薬) を用いて処理した。

その後5 MのNaCl 20 μ lとイソプロパノール120 μ lをサンプルに加えて、6時間-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

その後、さらに毎分15,000回転で15分間遠心し、そのペレットを20 μ lのTEバッファに溶かして解読するサンプルを作成した。

その作製した試料のDNA ladder パターンを評価するため、1.5%アガロースのジェル上に置き、電気泳動を行った。

4) DNA 断片のフローサイトメトリー解析

PEL細胞を低張性溶解しているバッファ（0.1%クエン酸ナトリウム、0.1% Triton X, 0.1% RNaseと50 µg/mlヨウ化プロピディウム）内で4℃、4時間染色した(23)。PELのそれぞれの細胞のDNA 内容物をLSR II flow cytometer（BD Bioscience）で解析した。データはFlowJo software（Tree Star）を用いて解析した。

5) Annexin Vと7-AAD 解析

アポトーシスはAnnexin V 【 PE apoptosis Detection Kit I（BD Bioscience）】を用いて定量化した。手順として、放射線照射後の細胞を回収し、洗浄した後、Annexin Vで15分間染色し、さらに7-AADで染色を行い、LSR II flow cytometerで解析した。

6) 統計解析

すべての解析は3回ずつ行い、平均値 ± 標準偏差で表現する。実験のグループ間に見られる違いはStudent's *t* test を用いて統計的な有意差の確認を行った。有意差の有無は、*P* 値が $P < 0.05$ のとき有意であると判断した。

4-3 in vitroでの結果

4-3-1 PELにおける放射線の効果

PELの放射線感受性実験では、3つのPEL細胞（BCBL-1,BC-1,BC-3）とPEL以外の血液系腫瘍細胞（Raji,Jurkat,K562）に3, 5, 7, 10 Gyの放射線を照射した後、3日間培養して、MTT法によって解析を行った結果を図9に示した。図10では放射線照射によって細胞の増殖に与える影響を細胞計数法を用いて示している。

図9の結果、PELはその他の血液系腫瘍に比較して放射線感受性が有意に高いことが分かった。

次に古典的な細胞計数法で放射線照射の影響を確認した。手順は、MTT法と同様に3, 5, 7, 10 Gyを照射した細胞を準備した。それらを24時間おきにトリパンプルーで染色し、細胞数を計数した。結果は図10に示すように、PELでは照射された線量と経過時間により顕著な細胞数の減少が見られ、PEL以外の血液系腫瘍と比較して生存する細胞数が明らかに少ないことが分かった。

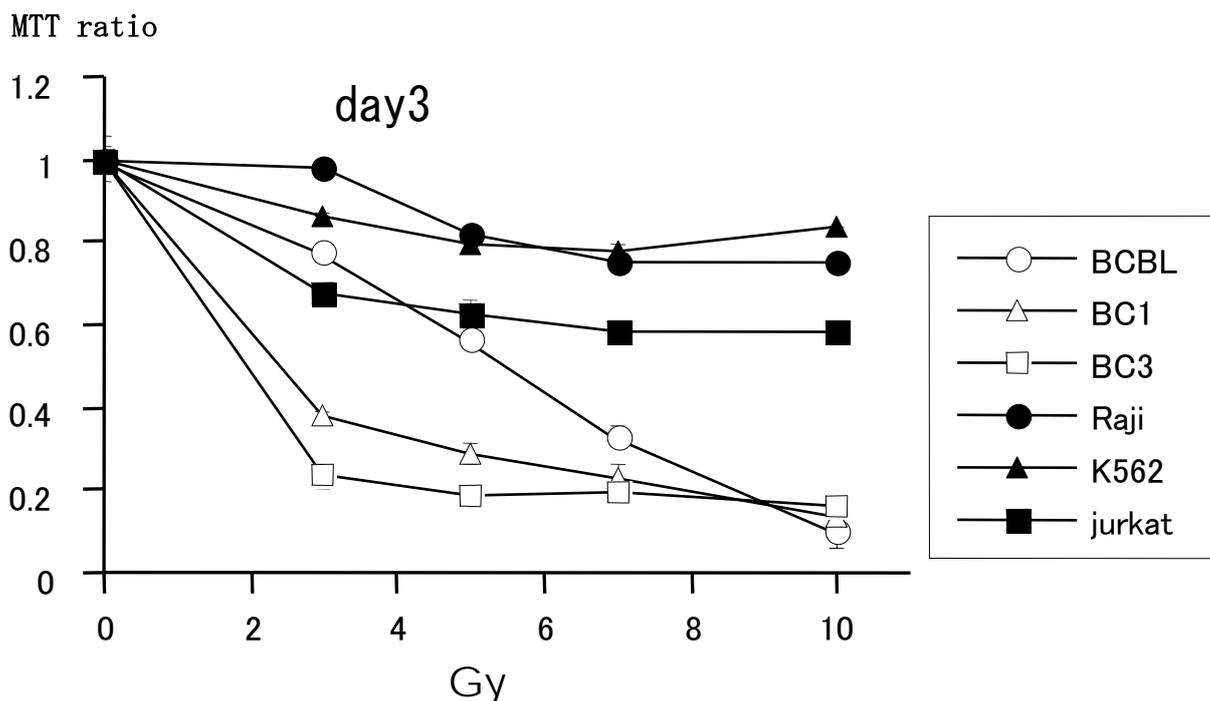


図 9 放射線による細胞増殖抑制（MTT法）

PEL細胞株（BCBL-1,BC-1,BC-3）とPEL以外の血液系悪性腫瘍(Raji, Jurkat ,K562)に3,5,7,10 Gyの放射線照射を行ったものを72時間培養し、MTT法により、細胞増殖能を解析した結果である。

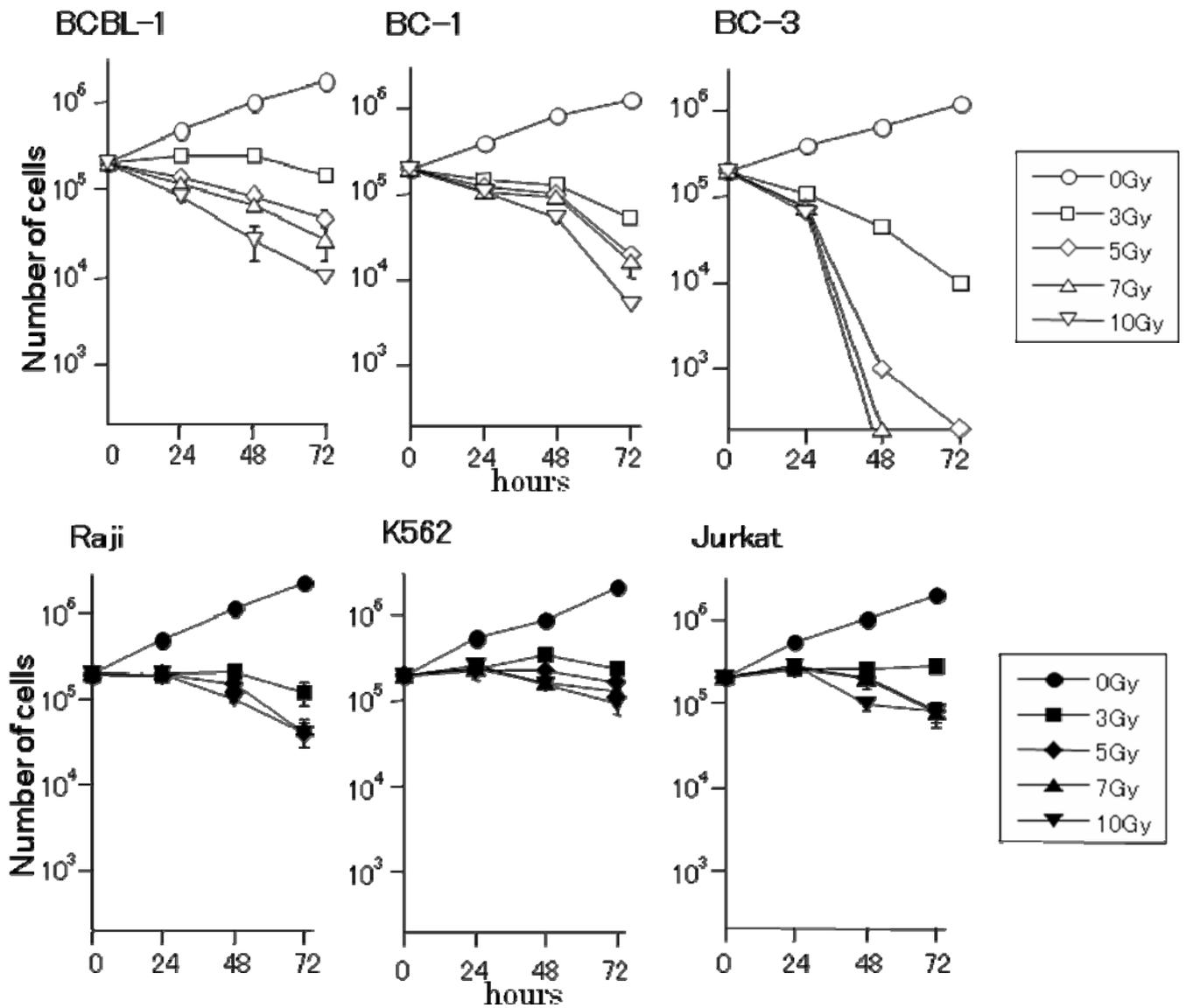


図10. 放射線による細胞増殖抑制（細胞計数法）

PEL細胞株（BCBL-1,BC-1,BC-3）とPEL以外の血液系悪性腫瘍(Raji, Jurkat, K562)に3,5,7,10 Gyの放射線照射を行い、3日間培養しながら24時間ごとに血球計算盤を用いて細胞数の測定を行った結果である。

4-3-2 γ 線によるPELのアポトーシス誘導

放射線による細胞増殖抑制が起こり、PELにアポトーシスが引き起こされているかどうかについて検討を行った。DNAのladder 解析には、放射線照射後48時間のものを使用した。図11では放射線照射によるアポトーシスの特徴であるDNAがヌクレオソーム単位に切断されることから、DNAが階段状に検出される(22)。

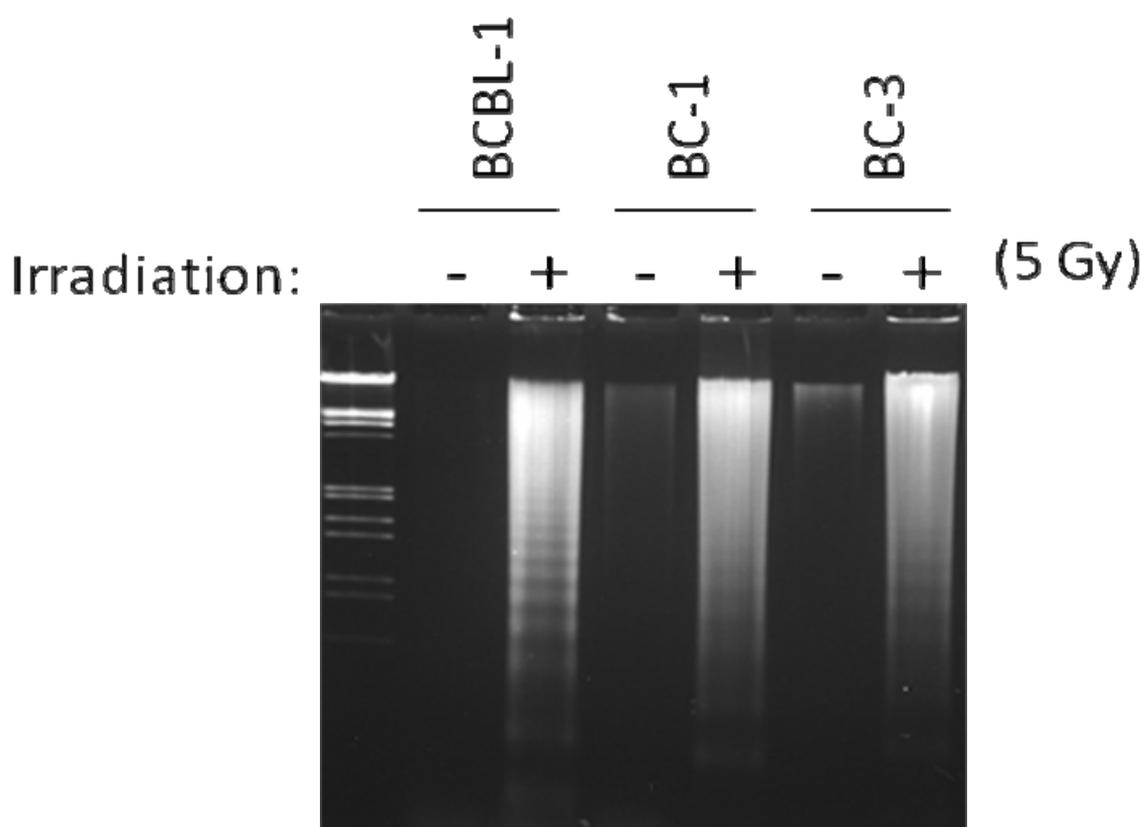


図11 放射線照射によるPELのアポトーシス解析（電気泳動による解析）

1.5%アガロースゲル電気泳動によりDNAを転回放射線によりアポトーシスが誘発され、DNAの断片がはしご状に検出されている。解析は放射線照射48時間後のものを使用した。放射線を照射していないものと5 Gy照射したものをそれぞれ示している。

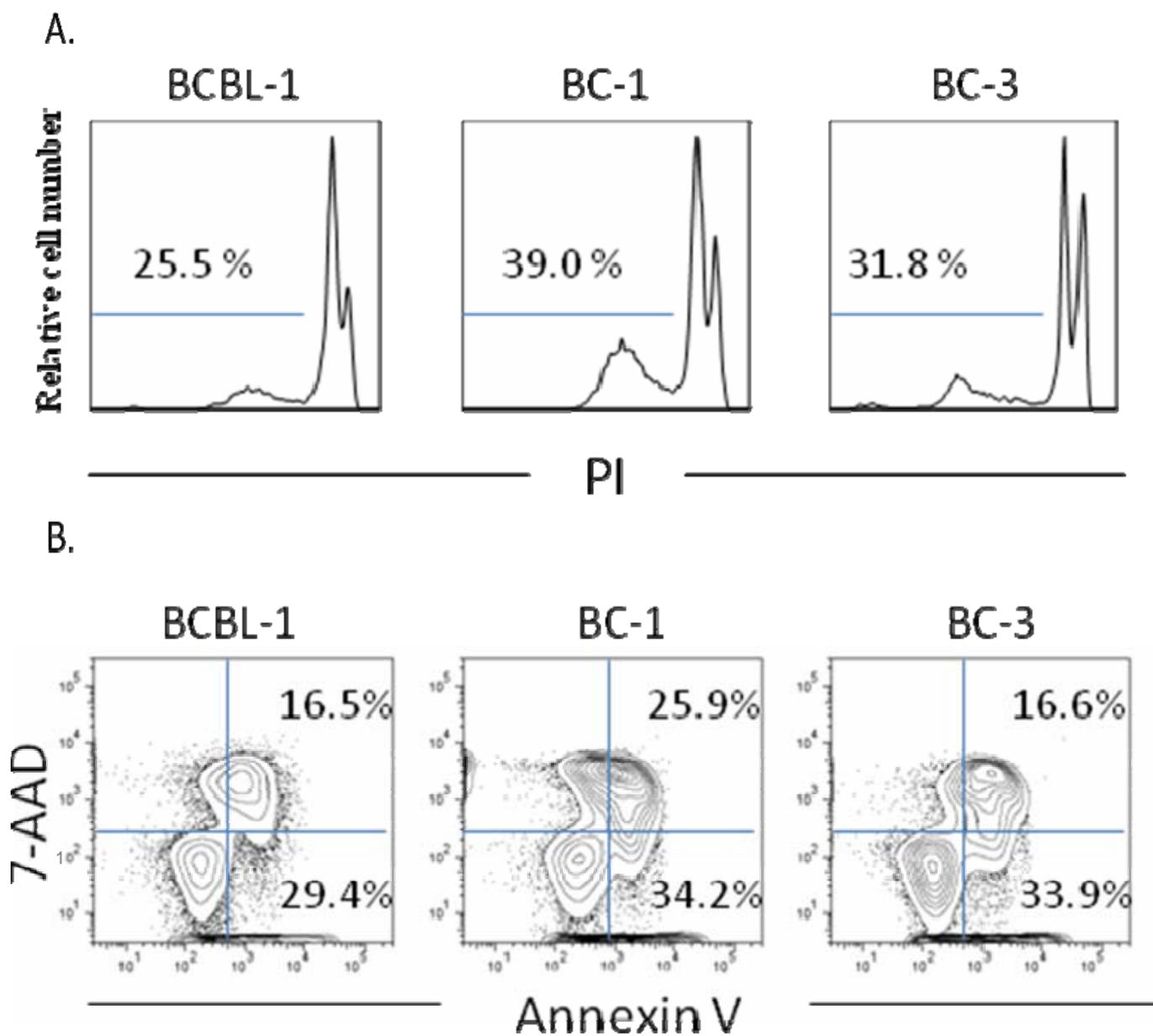


図 12 放射線照射によるPELのアポトーシス解析

(フローサイトメトリーによる解析)

- (A) PI染色をしてDNA断片のフローサイトメトリー解析の結果を示す。
- (B) 照射後72時間培養したものをAnnexin V と7-AADによる二重染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。

図12Aでは、3つのPEL細胞株にG1,G2ブロックが起こり、細胞の増殖を抑制が
おこなっていることを確認した(24)。

次に、PEL細胞株に誘発されるアポトーシスのさらなる確証を得るため、図
12BではAnnexin Vと7-AADの二重染色による解析を行った。

Annexin Vは、細胞膜の内側にあるホスファチジル基セリンに結合するため、
早期アポトーシスを示し、7-AADは膜透過性を示すため、後期のアポトーシス
とネクローシスの確認のため用いられる。

照射後3日目の時点でも早期アポトーシスを示すAnnexin Vがポジティブで
7-AADがネガティブを示す割合が非常に高いことが分かり、放射線によるアポ
トーシスの誘発は化学療法と比較すると、細胞増殖の抑制効果が遅く現れるこ
とが分かった。これは放射線やフリーラジカルによりDNAが傷つくと細胞を修
復するため、チェックポイントと呼ばれる細胞周期で停止した後、修復できず
にアポトーシスを引き起こすためだと考えられる。

これらの結果、すべてで放射線照射によってPEL細胞株にアポトーシスが誘発
され、放射線がPELの増殖能を阻害し、治療に放射線が有用であることが確認で
きた。

第5章 in vivoにおける放射線の効果

第5章では、in vitroの実験から、PELの放射線感受性が高いことが確認され、PELの治療に放射線療法が有効であることが示唆された。このため、高度免疫不全マウス（Balb/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウス）にPELを移植し、放射線治療を行った治療群と無治療群を作製し、放射線療法の前臨床実験を行った。

5-1 異種移植と放射線治療のマウスモデル

5-1-1 実験に用いたマウスと細胞

マウス

Balb/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウス

細胞

BCBL-1 （皮下モデルと腹腔モデルに使用）

BC-3 （腹腔モデルに使用）

5-1-2 実験方法

実験に用いたマウスは次の手順で掛け合わせたものを使用している。

Balb/c Rag-2 deficient (Rag-2^{-/-}) mice と Balb/c Jak3-deficient (Jak3^{-/-}) miceは、Rag-2(25)またはJak3(26)をBalb/cと10世代掛け合わせるにより確立した。さらに、Balb/c Rag-2/Jak3 double deficient (Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}) mice はBalb/c Rag-2^{-/-} mice と Balb/c Jak3^{-/-} miceを交配させることで確立した。

また、動物の管理は、大学内のガイドラインにより、動物実験棟で飼育、管理が行われ、すべての実験手順についても熊本大学動物実験委員会の許可を得て行われている。

1) 皮下移植モデルの実験手順

皮下移植モデルでは、週齢8~10週のBalb/c Rag-2/Jack-3 二重欠損マウス (Balb/c Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-} mice) の左右の皮下に 5×10^6 個のBCBL-1 細胞を 200 μ lの PBSとともに移植した。

次に、PEL細胞を移植して7日後に放射線治療を施す治療群に対して4 Gyを2日に分けて分割照射し、骨髄移植を行った治療群と無治療群に分類した。その後、経過観察を行い、治療効果を示す指標として、週ごとに腫瘍の大きさ、体重およびKaplan-Meier法を用いて評価した。

腫瘍の大きさは最大径と最小径をノギスで毎週測定し、下記の評価式を使用した。腫瘍径の評価式はすでに発表されている式(27,28)を用いて行った。

腫瘍の大きさを評価する公式:

$$\text{腫瘍の大きさ (mm}^3\text{)} = \text{最大径(mm)} \times \text{最小径}^2 \text{(mm}^2\text{)} \times 0.4$$

2) 腹腔内移植モデルの実験手順

腹腔内移植モデルでは、Balb/c Rag-2/Jack-3 二重欠損マウスに 5×10^6 個の BC-3細胞を200 μ lのPBSとともに腹腔内移植したマウスと 5×10^6 個の BCBL-1細胞を200 μ lのPBSとともに腹腔内移植したマウスを作製した。

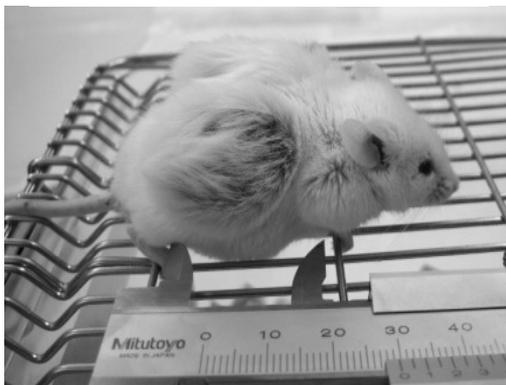
その後、皮下移植モデルのマウスと同様にして、PEL細胞を移植して7日後に4 Gyを2日に分けて分割照射し、骨髄移植を行った治療群と無治療群に分類し、経過観察を行った。

この実験では、PELを移植して6週間後のマウスの体重変化、および腹水の貯留量により評価した。

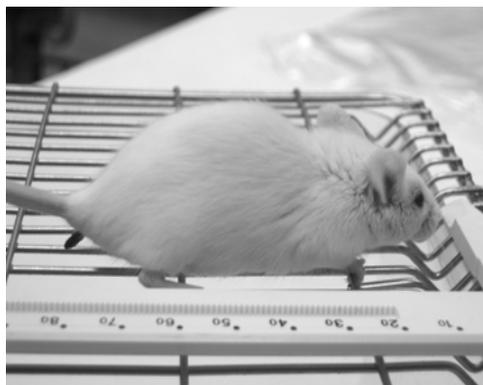
5-2 PELを移植した高度免疫不全マウスにおける放射線の効果

5-2-1 皮下移植モデル

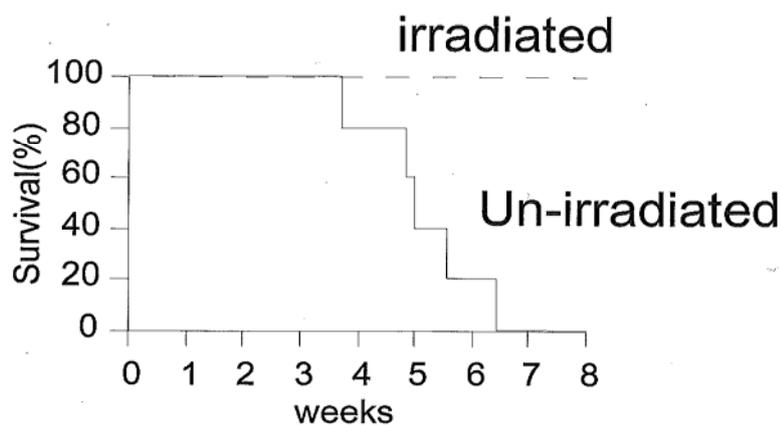
A. Non-irradiated mice



Irradiated mice



B.



C.

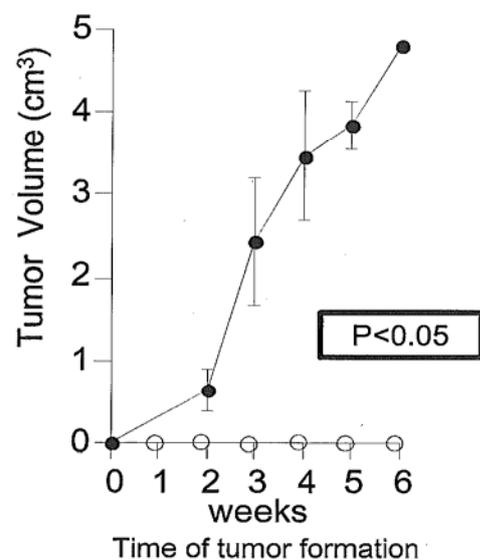


図 13 PELの皮下移植マウスモデルにおける放射線の効果

- (A) BCBL-1を皮下移植した後、骨髄移植を伴う放射線治療を行ったマウスと無治療のマウス（BCBL-1を移植して4週間後）
- (B) 放射線治療の抗腫瘍効果（Kaplan-Meier 法）
- (C) 放射線治療群と無治療群における腫瘍の大きさ
腫瘍の大きさの平均±SD で示した。(P<0.05).

皮下移植モデルにおける実験結果

放射線を照射しなかった無治療群のマウスでは皮下に移植した腫瘍が大きく成長した。特に、2週目以降は日を迫うごとに腫瘍が急激に成長し、図13Aに見られるように無治療群のマウスの背中に大きな固形の腫瘍を形成した。

また、所見として、無治療群のマウスには、立毛や体重減少、カヘキシー（悪液質）のような死期が近いと思われる臨床的な症状が見られ、移植後3～6週ですべて死亡した。

一方、放射線照射を行った治療群では移植後3カ月以上経過しても腫瘍の発現も見られず、臨床的な症状等も全く見られなかった。

5-2-2 腹腔内移植モデル

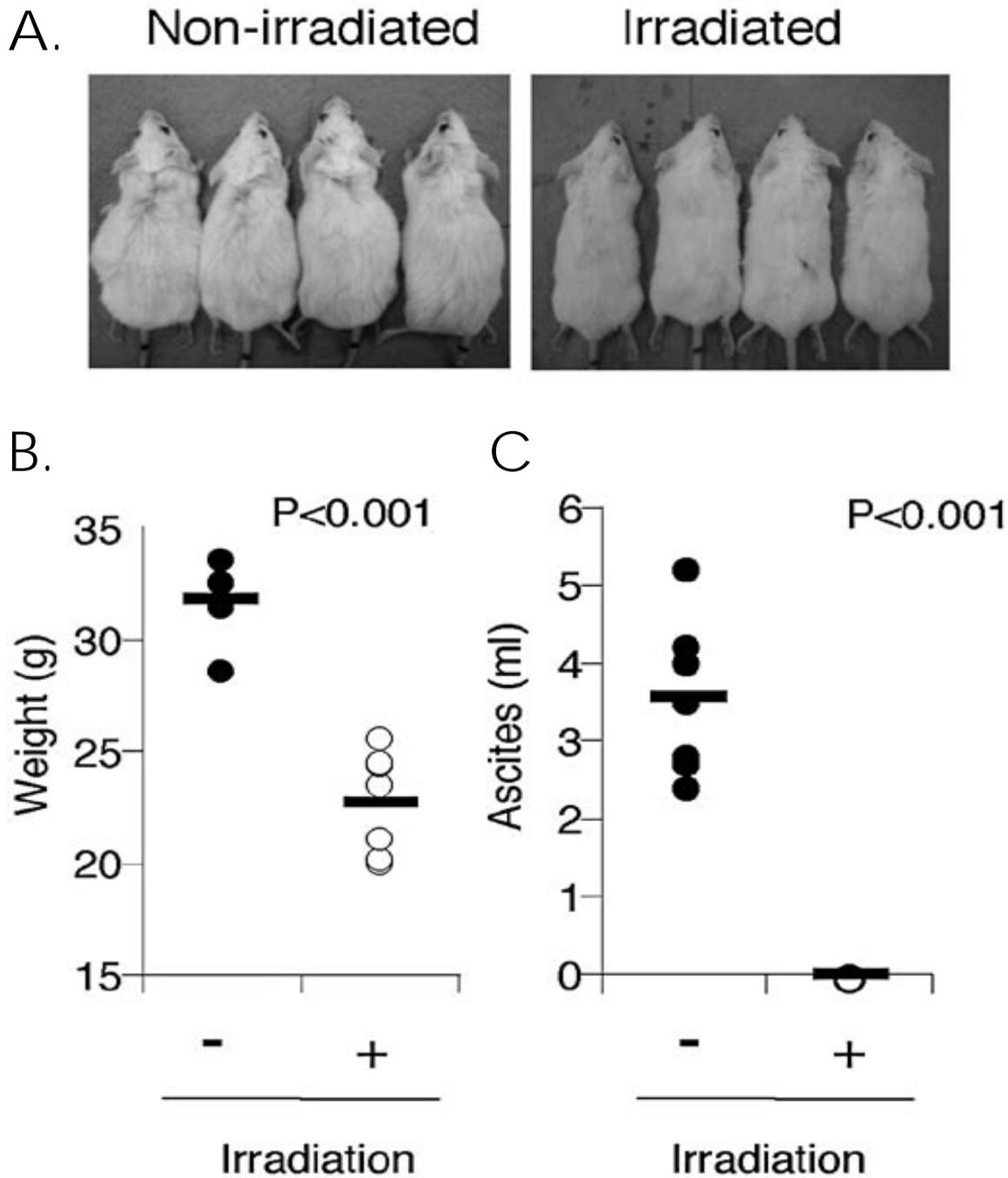


図 14 PELを腹腔内に移植したマウスにおける全身照射の効果

- (A) BC-3を移植した無治療群マウスと放射線治療群マウス
 - (B) BC-3を移植した無治療群と放射線治療群における体重
 - (C) BC-3を移植した無治療群と放射線治療群における腹水の量
- (BC-3を移植して6週間後)

腹腔内移植モデルにおける実験結果

PELの浸潤性腫瘍モデルとしてBalb/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウスの腹腔にBC-3とBCBL-1を 5×10^6 個投与した2タイプのモデルマウスを作製した。

1) BC-3を腹腔内に移植した無治療群のマウス

BC-3移植6週間後の無治療マウス体重は、 31.7 ± 1.6 g, (n=7)と腹水の増加による体重増加がみられ、移植前は20 g前後であったことを考えると約1.5倍に体重が増加している。

また、開腹したマウスから採取された腹水の量は 3.5 ± 1.0 ml, (n=7)であった(図14)。所見としては、皮下に腫瘍ができたマウスとは違い、体重が減少することはなく、すべてのマウスでお腹が大きく膨らみ顕著な体重増加を示した。

2) BCBL-1を腹腔内に移植した無治療群のマウス

BCBL-1移植6週間後の無治療マウス体重は、 29.0 ± 0.9 g, (n=8)とBC-3を移植したマウス程ではなかったが、外見からも腹部に大きな膨らみがみられ、明らかな腹水の貯留が確認できた。

開腹して採取された腹水の量は 1.1 ± 0.4 ml, (n=8)であった。このモデルでも移植時から考えると1.5倍弱の体重増加がみられ、すべてのマウスでBC-3を移植したマウスと同様に顕著な体重増加がみられた。

3) PEL移植後放射線治療を行ったマウス

治療を行ったマウスでは、PELを移植して6週間後の体重が 22.8 ± 2.3 g, (n=7)と健康なマウスの体重増加と変わらず、異常な体重増加は全くみられなかった。

また、臨床的な症状等も全くみられず、開腹しても、腹水の貯留は認められなかった。

これらのデータから、 γ 線照射がPELのin vivoにおける細胞の発育と侵入を阻害していることは明らかで、放射線の全身照射を行い、骨髄を移植することで患者の予後が改善させる可能性があることが示唆された。

5-3 考察

この研究では、PELにおけるin vitroとin vivoでの γ 線照射の直接的な効果について実験を行った。その結果、PELは他の血液系腫瘍細胞に比べ放射線感受性が高いことが明らかとなった。また、骨髄移植を用いた全身照射を行うことでPELを移植したRag-2/Jak3二重欠損マウスを腫瘍形成や浸潤性腫瘍の形成を阻止し、救出することができた。この結果から、我々は γ 線照射が化学療法に耐性であるPELに対する治療法として非常に有用であると考えている。

PELはHHV-8感染を原因とする稀な高悪性度のB細胞性悪性リンパ腫で、その大部分がHIV陽性の患者に見られる。PELに対するCHOP療法のような多剤化学療法の予後は一般的に悪く、HAART療法の最中でも不良であることが知られ、主となる治療法が未だ確立されていない。こうした中で、腹腔などの病変部に十分な薬剤の効果を広げるために、CHOP療法などに使用される薬剤をより高濃度で投与することが検討されている(29)。しかし、浸潤性の腫瘍をとまなう患者には、高濃度の免疫抑制剤の投与は、予後に対するリスクを増加させるという報告もある(30)。それに加え、高濃度の免疫抑制剤を用いた治療法を行った結果、成功しなかったという報告まであり(31)、化学療法での治療は決して良好とはいえない。

また、HHV-8はvFLIPと呼ばれるFLIP蛋白質の同族体を細胞内に含んでいる。このvFLIPにはNF- κ Bを活性化する働きがある(32)。また、このNF- κ Bは様々な刺激によって誘発されるアポトーシスに対して保護する働きがあることで知られている(32-34)。さらに、NF- κ Bの下流遺伝子としBcl-xL,A1,cIAP1,cIAP2, XIAPとIEX-1のような抗アポトーシス遺伝子を発現させることでも知られている(35)。

ゆえに、NF- κ Bの阻害が、PELのアポトーシスを誘発することを示している(36,37)。加えてvFLIPを仲介してNF- κ Bを活性化することはPELの生存に重要な役割を果たしていて、PELの化学療法耐性の原因となっている可能性がある。このようにNF- κ BはPELの分子治療に対するターゲットとして知られ、NF- κ B阻害剤として働く可能性がある候補がいくつかある(37-39)。これらの候補の一つにプロテオソーム阻害剤ボルテゾミブがある。ボルテゾミブはin vitroではPELのアポトーシスを誘導し、NF- κ B活性を阻害したと示されている(40,41)。しかし、ボルテゾミブは治療ではPELの進行をコントロールすることに失敗している(43)。このように臨床前段階で抗腫瘍効果を示したとしても、通常投与された患者に直接的に作用するわけではない。このため、動物を用いたモデルを使用した前

臨床段階においても、PELの治療におけるNF- κ B阻害剤の実際の有用性を検討する必要がある(43)と考えられる。

もともと、悪性リンパ腫は放射線感受性が高いという特徴があり、放射線治療は悪性リンパ腫の治療法として非常に重要な手段の一つである(43)。しかし放射線療法が使用できるのは局所的なもので、そのほとんどが化学療法にも感受性があるものが多いため、悪性リンパ腫の治療には化学療法が中心的な役割を果たしている。

こうした現状の中、最近、PELに関連した化学療法耐性のHIV患者で放射線療法が鎮静の役割を果たし、12カ月以上もの間生存したという報告されている(44)。この報告が示すように、我々の発見もまたPELの放射線感受性の高さを指示している（図9,10）。それに加えて治療効果とin vitroでの腫瘍細胞の放射線感受性に相互関係が確認され、PELの化学療法耐性の患者に対する治療の手段として有用であると考えられる(45)。

In vivo実験では、無治療でPELを皮下移植したマウスでは大きな腫瘍が形成され、腹腔内にPELを移植したマウスでは体重が増加し、腹腔内に浸潤性腫瘍を形成した（図13,14）。

一方、照射を行った治療群では、明らかに12週間浸潤性腫瘍も固形腫瘍も形成せず、PEL移植マウスに放射線治療を施すことで救出できた。ヒト悪性リンパ腫の動物モデルはガン幹細胞の性質に関する研究に応用され、悪性新生物に対する治療戦略の効果に対する評価にも用いられている(46,47)。特に、高度免疫不全マウスの導入により血液系腫瘍に似たマウスモデルの作成が可能(39,48)となったことにより、ヒトPEL細胞株を異種移植したRag-2/Jak3二重欠損マウスを使用し、血液系悪性腫瘍における γ 線照射による治療効果を検証できたと考えている。

第6章 総括および今後の展望

6-1 まとめ

PELは化学療法を用いた治療を施しても予後が3カ月程度と極めて難治性の悪性リンパ腫であるため、治療法の確立が必要とされている。

この研究の成果として、化学療法耐性のPEL患者の治療にいかに関放射線治療が有効であるかということを示すことができ、化学療法耐性のPEL患者の治療方法として骨髄移植を行うことで、救命できる可能性を示唆することができた。

このため、PEL患者に対して放射線療法がもっと積極的に取り入れられるべきであると考えます。

6-2 今後の課題

今後の課題として、このPELの治療法にモノクローナル抗体を用いた抗体療法の確立を目指している。抗体療法の最大のメリットは腫瘍に放射性物質が結合したモノクローナル抗体が抗原抗体反応によって直接接合するため、腫瘍細胞をピンポイントで攻撃することができ、より少ない放射線で確実にがん細胞を死滅させることができるためである(49)。また、こうした治療法は他のがんにも応用することが可能であり、理想的な治療法であると考えられる。

モノクローナル抗体を用いた治療法の経緯

1975年にハイブリドーマ法によるマウス型モノクローナル抗体作成法がNatureに発表された後、多くの抗原に対するマウス型モノクローナル抗体が次々に作製された。こうした抗体を用いた治療法は非常に特異性が高く、標的細胞を選択的に効果が期待されることから、モノクローナル抗体を用いた研究は現在も盛んに研究されている。

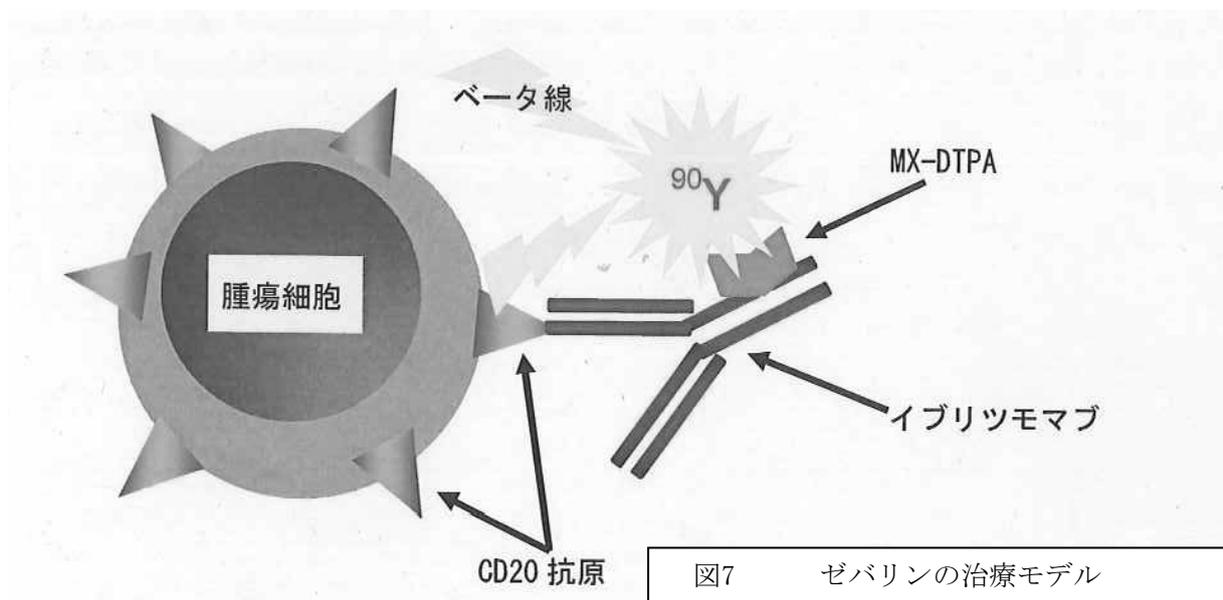


図7 ゼバリンの治療モデル
全薬工業株式会社：リツキサン注10mg/mlに関する資料より引用

現在、認可されているのが抗CD20抗体を⁹⁰Yや¹³¹Iをキレート剤で結合させたものが使用されていて、高い奏効率を誇っている。

ただ、CD20がB細胞リンパ腫の治療にベストであるかはまだ疑問がある。なぜなら、CD20は正常なB細胞にも発現している蛋白質でもあるため、副作用も懸念される。特にPELを発症するような高度免疫不全患者への使用にはかなりのリスクを伴うと考えられる。

また、PELの中にはCD20が落ちていて、ほとんど発現していないため、十分な効果が期待できないものもあり、まだまだ研究の余地がある分野である。このため、このモデルマウスを使用して新規の抗体などを用いることにより、より良い治療法の確立を目指したいと考えている。

参考文献

1. 世界エイズ計画 : Report on the global AIDS epidemic 世界のエイズの流行に関する報告, 2008
2. Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, et al: Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. Blood 88:645-56, 1996
3. Chen YB, Rahemtullah A, Hochberg E: Primary effusion lymphoma. Oncologist 12:569-76, 2007
4. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, et al: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. N Engl J Med 332:1186-91, 1995
5. Lee CK: Evolving role of radiation therapy for hematologic malignancies. Hematol Oncol Clin North Am 20:471-503, 2006
6. Gustavsson A, Osterman B, Cavallin-Stahl E: A systematic overview of radiation therapy effects in non-Hodgkin's lymphoma. Acta Oncol 42:605-19, 2003
7. 厚生労働省 エイズ動向委員会 : 平成20年エイズ動向委員会報告書
http://api-net.jfap.or.jp/mhw/survey/mhw_survey.htm.
8. 国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター
<http://acc-elearning.org/AIDS/HowTo.html>
9. Smit C, Geskus R, Walker S et al.: Effective therapy has altered the spectrum of cause-specific mortality following HIV seroconversion. AIDS.2006 Mar 21;20(5):741-9.

10. International Collaboration on HIV and Cancer : Highly Active Antiretroviral Therapy and Incidence of Cancer in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adults. J Natl Cancer Inst. 2000;92:1823-1830
11. Robert D. T, Costas S. B, Harvey I. P, et al: Local Surgical, Ablative, and Radiation Treatment of Metastases. CA CANCER J CLIN 2009;59:145-170
12. 片野晴隆 : HHV-8とリンパ増殖性疾患.炎症と免疫 vol.8 no.1:68-75,2000
13. 片野晴隆, 森茂郎 : HHV-8と悪性腫瘍ーカポジ肉腫, PEL を中心として.病理と臨床 vol.16 no.7:817-824,1998
14. 国立がんセンター がん対策情報センター
<http://ganjoho.ncc.go.jp/public/index.html>
15. 飯田博美 : 放射線概論 ー第1種放射線試験受験用テキストー
通商産業研究社 第5版6刷, 2004
16. がんサポート情報センター
<http://www.gsic.jp/>
17. Michael P, Lorenz T, Anders O, et al: CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma : a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. Lancet Oncol 7:379-391, 2006
18. Bertrand C, Eric L, Josette B, et al: CHOPCHEMOTHERAPY PLUS RITUXIMAB COMPARED WITH CHOP ALONE IN ELDERLY PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE-B-CELL LYMPHOMA. N Engl J Med, Vol.346, no.4:235-242, 2002
19. Renne R, Zhong W, Herndier B, et al: Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. Nat Med 2:342-6, 1996

20. Cesarman E, Moore PS, Rao PH, et al: In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* 86:2708-14, 1995
21. Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, et al: Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* 88:2648-54, 1996
22. Sellins KS, Cohen JJ: Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 139:3199-206, 1987
23. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-9, 1991
24. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51, 1995
25. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al: RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-67, 1992
26. Park SY, Saijo K, Takahashi T, et al: Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3:771-82, 1995
27. Attia MA, Weiss DW: Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res* 26:1787-800, 1966

28. Harada H, Suzu S, Ito T, et al: Selective expansion and engraftment of human CD16+ NK cells in NOD/SCID mice. *Eur J Immunol* 35:3599-609, 2005
29. Boulanger E, Daniel MT, Agbalika F, et al: Combined chemotherapy including high-dose methotrexate in KSHV/HHV8-associated primary effusion lymphoma. *Am J Hematol* 73:143-8, 2003
30. Pauley JL, Panetta JC, Schmidt J, et al: Late-onset delayed excretion of methotrexate. *Cancer Chemother Pharmacol* 54:146-52, 2004
31. Waddington TW, Aboulaflia DM: Failure to eradicate AIDS-associated primary effusion lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem cell reinfusion: case report and literature review. *AIDS Patient Care STDS* 18:67-73, 2004
32. Liu L, Eby MT, Rathore N, et al: The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277:13745-51, 2002
33. Chaudhary PM, Jasmin A, Eby MT, et al: Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene* 18:5738-46, 1999
34. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM: The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. *Blood* 101:1956-61, 2003
35. Mayo MW, Baldwin AS: The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 1470:M55-62, 2000

36. Keller SA, Schattner EJ, Cesarman E: Inhibition of NF-kappaB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 96:2537-42, 2000
37. Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, et al: Transient inhibition of NF-kappaB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Sci* 100:737-46, 2009
38. Keller SA, Hernandez-Hopkins D, Vider J, et al: NF-kappaB is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood* 107:3295-302, 2006
39. Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, et al: Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. *Int J Cancer* 125:1464-72, 2009
40. McConkey D, Nawrocki ST, Andtbacka R: Velcade displays promising activity in primary effusion lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* 4:491-2, 2005
41. An J, Sun Y, Fisher M, et al: Antitumor effects of bortezomib (PS-341) on primary effusion lymphomas. *Leukemia* 18:1699-704, 2004
42. Boulanger E, Meignin V, Oksenhendler E: Bortezomib (PS-341) in patients with human herpesvirus 8-associated primary effusion lymphoma. *Br J Haematol* 141:559-61, 2008
43. Gospodarowicz M: Radiotherapy in non-Hodgkin lymphomas. *Ann Oncol* 19 Suppl 4:iv47-50, 2008
44. Cassoni A, Ali U, Cave J, et al: Remission after radiotherapy for a patient with chemotherapy-refractory HIV-associated primary effusion lymphoma. *J Clin Oncol* 26:5297-9, 2008

45. Dubray B, Breton C, Delic J, et al: In vitro radiation-induced apoptosis and early response to low-dose radiotherapy in non-Hodgkin's lymphomas. *Radiother Oncol* 46:185-91, 1998
46. Bankert RB, Hess SD, Egilmez NK: SCID mouse models to study human cancer pathogenesis and approaches to therapy: potential, limitations, and future directions. *Front Biosci* 7:c44-62, 2002
47. Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD: Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 22:386-93, 2001
48. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL: Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7:118-30, 2007
49. 全薬工業株式会社：リツキサン注10mg/mlに関する資料
<http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku>