

の初期段階を示唆する病態である可能性があり、EPO 硝子体内投与により、EPOR の down regulation が起こったこと、IV 型コラーゲンのみに陽性の線状の構造の増加を認めなかったことから、EPO が糖尿病網膜症の発症を抑制する可能性がある。

〔結論〕

EPO 硝子体内投与は、糖尿病網膜症における網膜毛細血管の一時的退縮を抑制し、結果として単純網膜症の発症を抑制する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

本研究は、ラットのストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルを用いて、糖尿病網膜症発症初期における網膜血管病変と、それに対するエリスロポエチン (EPO) 硝子体注射の影響を検討したものである。

5 週齢の正常 SD 系雄ラットにストレプトゾトシン (60mg/kg 体重) を腹腔投与した。炎症所見をはじめとする網膜血管自体の形態的・機能的な異常所見は認められなかったものの、糖尿病発症極初期の 1 週目より視神経乳頭部周囲を除く網膜血管網に、内皮細胞と周皮細胞を欠如し、基底膜成分 (IV 型コラーゲン) のみで構成される線状構造が出現した。この構造およびその周囲に細胞増殖を認めないことから、血管退縮による基底膜遺残であることが示唆された。ところが、これに EPO (50ng/眼) を硝子体注射するとこの退縮変化が抑制され、ほぼ正常の網膜の血管構築が保たれることが明らかとなった。

本研究は糖尿病発症初期における網膜血管の退縮性変化を発見し、これに対する EPO 硝子体投与の抑制効果を明らかにした点で、今後の治療面への応用も期待できることから、学術的価値が高い研究であると評価できる。

58

氏名	シノ 塩	ヤマ 山	タカ 高	ヒロ 広
学位の種類	博士 (医学)			
学位授与の番号	甲第 533 号			
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 16 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻, 博士課程修了者)			
学位論文題目	<b>Intraoperative flow cytometry analysis of glioma tissue for rapid determination of the tumor presence and its histopathological grade</b> (神経膠腫の術中迅速解析のためのフローサイトメトリーによる腫瘍悪性度判定の検討)			
主論文公表誌	Journal of Neuro-Oncology 投稿中			
論文審査委員	(主査) 教授 村垣 善浩			
	(副査) 教授 岡田 芳和, 小田 秀明			

## 論文内容の要旨

〔目的〕

手術中に腫瘍組織の悪性度・浸潤度を迅速に診断することは非常に重要であり、術前診断の情報と併せて摘出組織を診断した情報は、その後の手術方針決定のために必要な情報である。神経膠腫摘出術においては、浸潤性に広がる腫瘍の性質上、組織の凍結切片による診断により腫瘍摘出範囲が見極められているが、凍結切片であるために不完全な標本となることも少なくない。そこで本研究では、術中迅速診断と同等の時間で摘出組織の迅速解析を行うために、多数の細胞の同時定量解析が可能なフローサイトメトリーによる脳腫瘍組織迅速解析手法を確立することを目的とした。

## 〔対象および方法〕

本学脳神経外科にて脳腫瘍摘出術を受けた患者の摘出検体を測定した。2008年10月31日～2010年8月27日の感染症が陰性と確認できた連続100症例のうち、悪性神経膠腫と確認できた81症例328組織について解析した。

組織を染色液中でピペッティングすることで細胞を単離・染色した後に、フローサイトメーターによりDNA量を解析した。組織解析に要する時間は10分程度であった。測定したDNAヒストグラムより、DNA diploidyのG0/G1期のピーク以上のDNA量を持つ細胞の割合を算出し、malignancy index (MI)と定義した。DNA量の多い細胞にはDNA aneuploidyやS期、G2/M期の細胞等が含まれる。解析したMIと同一部位から摘出した標本の病理組織学的悪性度(WHO grade)を比較し、フローサイトメーターによる迅速悪性度解析に関して評価した。

## 〔結果〕

正常組織(4.6±2.6%)と腫瘍組織(25.3±22.0%)のMIには有意差があり、ROC解析の結果、感度87.9%、特異度87.9%で判別可能であった。また、腫瘍摘出腔組織(正常:4.6±2.6%)と腫瘍組織悪性度(grade II:13.3±11.0%, grade III:35.0±21.8%, grade IV:46.6±23.1%)ごとのMIにはすべての群間において有意差が認められた。

## 〔考察〕

本手法では、フローサイトメトリーによりDNA aneuploidyを含めたMIというパラメータによって、客観的に神経膠腫組織の迅速判定ができた。解析に要する時間も凍結切片による迅速診断よりも早い10分であり、十分臨床で利用可能であると考えられる。今後、同じグレードの症例であっても、MIやDNAヒストグラムパターンによる分類で、再発率や予後の予測が可能かどうか調査を進めていく。また、本手法を他の臓器腫瘍においても適応可能か検討していく。

## 〔結論〕

本研究では、フローサイトメトリーによる術中の迅速組織測定手法を確立した。さらに、DNA contentの新たな指標であるMIによって、神経膠腫において組織学的悪性度の判定が可能であることを示し、術中の腫瘍摘出範囲の意思決定に寄与する指標を提示することができた。

## 論文審査の要旨

本研究は、多数細胞の同時定量解析が可能なフローサイトメトリーによる脳腫瘍組織の術中迅速解析手法を確立することを目的とした。方法は81症例328組織を対象に、10分程度で解析可能な簡便法を開発し、新たに定義したmalignancy index (MI: G0/G1期ピーク以上細胞数/全細胞数)を算出した。同時に同部位の病理組織診断と悪性度(WHO grade)を比較し、本法の脳腫瘍悪性度解析に関する評価を行った。結果、正常組織(4.6%)と腫瘍組織(25.3%)のMIに有意差があり、ROC解析で感度87.9%と特異度87.9%であった。WHO各grade間に関してMIでは有意差を認めたが、一般のDNA indexでは有意差を認めなかった。本研究はフローサイトメトリーによる術中の迅速組織測定手法を確立し、新たな解析方法であるMIの神経膠腫における有用性を示した。今後他の外科領域に応用が期待される。