



Clinical relevance of in vitro chemoresistance in childhood acute non-lymphoblastic leukemia

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, さゆり メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1198

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 345号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	山 田 さゆり		
論文題目	Clinical relevance of <i>in vitro</i> chemoresistance in childhood acute non-lymphoblastic leukemia (小児急性非リンパ性白血病における <i>in vitro</i> 薬剤感受性の臨床的意義)		

博士(医学) 山田 さゆり

論文題目

Clinical relevance of *in vitro* chemoresistance in childhood acute non-lymphoblastic leukemia

(小児急性非リンパ性白血病における*in vitro* 薬剤感受性の臨床的意義)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

近年の抗癌剤などによる治療方法の改善に伴い、小児急性非リンパ性白血病(acute non-lymphoblastic leukemia: ANLL)の予後は年々向上している。小児急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)では、抗癌剤感受性試験であるMTT(methyl-thiazol-tetrazolium)アッセイにおいて判明した薬剤耐性が臨床的予後と密接に関連があるという多くの報告があるが、小児ANLLにおいては少数例を対象にした報告が散見されるのみであり、未だ明確な結果は得られていない。

本研究においては、小児ANLLについて抗癌剤薬剤感受性試験を施行し、その細胞の薬剤耐性が寛解導入の可否を予測しうる可能性および、その生物学的特性が薬剤耐性に影響を及ぼすかについて検討した。

〔材料及び方法〕

- 1) 1988年1月～2000年2月に診断された、0～16歳の初発ANLLの140名を対象とした。対象患者もしくはその両親からインフォームドコンセントを得たうえで、白血病細胞を70%以上含む骨髓血もしくは末梢血を採取し、単核球を分離した。
- 2) 抗癌剤感受性試験はMTTアッセイによった。96穴マイクロプレートを用い、ウェルあたり 2×10^5 個の白血病細胞と、5段階希釈(1倍、 5^{-1} 倍、 5^{-2} 倍、 5^{-3} 倍、 5^{-4} 倍)した14剤の抗癌剤(daunorubicin, aclarubicin, etoposide, L-asparaginase, pirarubicin, mitoxantrone, melphalan, 4-hydroperoxy-cyclophosphamide, cytarabine, bleomycin, vincristine, vinblastine, prednisolone, dexamethasone)とを10%FCS-RPMI 1640の培養液100 μ l中で、4日間、37℃、5%CO₂下で培養した。コントロールには抗癌剤無添加ウェルを用いた。*in vitro*における抗癌剤の最高濃度は、臨床使用量での最高血中濃度とした。
- 3) 4日培養後、マイクロプレートの各ウェルに濃度5mg/mlのMTT色素(Sigma社製)を10 μ l分注し、37℃で更に4時間培養した。
- 4) 4時間後、コントロールウェルで細胞質内に十分な量の青色のformazanの形成を位相差顕微鏡で確認し、各ウェルに0.04N塩酸を含むisopropyl alcohol 100 μ lを加え攪拌しformazanを溶解させ、波長540nmで吸光度を測定した。
- 5) 各薬剤の70%lethal dose(LD70)をdose-response curveより片対数表を用いて求めた。LD70値の測定感度は片対数表で求めうる有効数値内とした。グルココルチコイドに関しては次式の如くleukemic cell survival(LCS)を求めた。

$$LCS(\%) = 100 \times (OD \text{ drug exposed well} / \text{Mean OD drug free wells}).$$

〔結果〕

- 1) 対象患者の内訳は、FAB(M0/1/2)81例、(M3)7例、(M4/5)36例、(M6/7)16例であった。完全寛解到達例114例、寛解導入不応例18例、部分寛解例8例であった。

- 2) 寛解導入不応例／完全寛解到達例の平均LD70値(μ g/ml)(mean $\pm$ SD)は、etoposideでは各々、 $14.6 \pm 6.8/9.5 \pm 7.8$ ($p=0.011$)、同様にcytarabineでは $16.7 \pm 18.0/9.0 \pm 15.2$ ($p=0.047$)、melphalanでは $66 \pm 27/33 \pm 27$ ($p=0.0003$)であった。これら3剤では、寛解導入不応例は完全寛解到達例に比べて、いずれも有意に耐性であった。他の11剤では統計学的有意差は認めなかった。
- 3) FAB subtypeと薬剤耐性との検討では、FAB M4/5群がM0/1/2群に比してL-asparaginase($p=0.023$)に有意に感受性を示したが、prednisolone($p<0.0001$)、dexamethasone($p=0.0001$)においては耐性であった。FAB M3群はM4/5群に比べて、prednisolone($p=0.049$)で有意に感受性であったが、4-hydroperoxy-cyclophosphamide($p=0.038$)、cytarabine($p=0.014$)、L-asparaginase($p=0.003$)では耐性であった。

〔考察〕

小児ANLLでの寛解到達例と不応例においては薬剤感受性に差異が認められた。この結果から、特に臨床的主要薬剤であるcytarabine, etoposideに対して *in vitro* で耐性が認められた場合、寛解到達不応の要因の一つになりうることも考えられた。FAB subtypeによって薬剤感受性が異なっていたことから、細胞生物学的な相違が薬剤感受性に影響を及ぼす可能性が考えられた。薬剤感受性試験の結果によって、治療早期からリスク群の層別化が可能となり、最適な薬剤を選択することで予後の改善につながる可能性がある。

〔結論〕

小児ANLLにおいて、薬剤感受性が臨床反応や細胞生物学的特徴と強い関連があることが示された。MTTアッセイを使用した *in vitro* 抗癌剤感受性試験は小児ANLLにおいても治療に対する反応を予測する一因子となりうる可能性があること、治療法の改善に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年の抗癌剤などによる治療方法の改善に伴い、小児急性非リンパ性白血病(acute non-lymphoblastic leukemia: ANLL)の予後は年々向上している。小児急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)では、抗癌剤感受性試験であるMTT(methyl-thiazol-tetrazolium)アッセイにおいて判明した薬剤耐性が臨床的予後と密接に関連があるという多くの報告があるが、小児ANLLにおいては少数例を対象にした報告が散見されるのみである。そこで申請者は、小児ANLLについて抗癌剤薬剤感受性試験を施行し、その細胞の薬剤耐性が寛解導入の可否を予測しうる可能性、およびその生物学的特性が薬剤耐性に影響を及ぼすかについて検討した。

- 1) 1988年1月～2000年2月に診断された、0～16歳の初発ANLLの140名を対象とした。白血病細胞を70%以上含む骨髓血もしくは末梢血を採取し、単核球を分離した。
- 2) 抗癌剤感受性試験はMTTアッセイによった。96穴マイクロプレートに14剤の抗癌剤(daunorubicin, aclarubicin, etoposide, L-asparaginase, pirarubicin, mitoxantrone, melphalan, 4-hydroperoxy-cyclophosphamide, cytarabine, bleomycin, vincristine, vinblastine, prednisolone, dexamethasone)と白血病細胞を入れて、4日間培養した。コントロールには抗癌剤無添加ウェルを用いた。*in vitro*における抗癌剤の最高濃度は、臨床使用量での最高血中濃度とした。
- 3) 4日培養後、マイクロプレートの各ウェルにMTT色素を添加し、更に4時間培養した。その後、各ウェ

ル内のformazanの吸光度を測定した。

- 4) 各薬剤の70%lethal dose(LD70)をdose-response curveより求めた。グルココルチコイドに関しては次式の如くleukemic cell survival(LCS)を求めた。 $LCS(\%) = 100 \times (OD \text{ drug exposed well} / \text{Mean } OD \text{ drug free wells})$ 。

以上の研究から以下の結果を得た。

- 1) 対象患者の内訳は、FAB(M0/1/2)81例、(M3)7例、(M4/5)36例、(M6/7)16例であった。完全寛解到達例114例、寛解導入不応例18例、部分寛解例8例であった。
- 2) etoposide、cytarabine、melphalanでは寛解導入不応例は完全寛解到達例に比べて、いずれも有意に耐性であった。他の11剤では統計学的有意差は認めなかった。
- 3) FAB subtypeと薬剤耐性との検討では、FAB M4/5群がM0/1/2群に比してL-asparaginaseに有意に感受性を示したが、prednisolone、dexamethasoneにおいては耐性であった。FAB M3群はM4/5群に比べて、prednisoloneで有意に感受性であったが、4-hydroperoxy-cyclophosphamide、cytarabine、L-asparaginaseでは耐性であった。

申請者は、小児ANLLでの寛解到達例と不応例において薬剤感受性に差異があることを示し、in vitro抗癌剤感受性試験は小児ANLLにおいても治療効果を予測する一因子となりうる可能性を示した。また、FAB subtypeによって薬剤感受性が異なっていたことから、細胞生物学的な相違が薬剤感受性に影響を及ぼす可能性も示した。

審査委員会は申請者が小児ANLLにおいて、薬剤感受性が臨床反応や細胞生物学的特徴と強い関連があることを示したことを高く評価した。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) Drug free wellの細胞生存率について
- 2) MTT assayにおける薬剤併用効果の評価について
- 3) 薬剤添加後の培養期間を4日間とした理由について
- 4) 抗癌剤自身のMTT assayへの影響について
- 5) 血中濃度の設定根拠について
- 6) 分離時におけるblast細胞の割合について
- 7) サンプルのViabilityについて
- 8) formazanの溶解性について
- 9) 骨髄移植症例の取り扱いについて
- 10) MTT assay法の再現性について
- 11) MTT assay法から得られた結果から臨床への予測について
- 12) 正常細胞における抗癌剤の影響について

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 梅 村 和 夫

副査 大 橋 京 一 副査 大 西 一 功