



Title	ヒト髄芽腫培養細胞株の樹立とその生物学的特性の研究
Author(s)	田村, 和義
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37193">https://hdl.handle.net/11094/37193</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	た　　むら　　かず　　よし
学位の種類	医　　学　　博　　士
学位記番号	第　　9 7 0 2　　号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科　外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	ヒト髄芽腫培養細胞株の樹立とその生物学的特性の研究
論文審査委員	(主査) 教　授　早川　　徹 (副査) 教　授　濱岡　利之　　教　授　岡山　博人

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目　　的)

髄芽腫 (medulloblastoma) は、小児に好発し、髄腔内に播種しやすい悪性脳腫瘍である。この腫瘍は、神経細胞とグリア細胞に分化する以前の前駆細胞 (髄芽細胞) より発生すると考えられており、その培養細胞株を樹立することは、神経分化を研究する上でも貴重な材料になると思われる。そこで、髄芽腫手術材料より培養細胞株樹立を試み、その生物学的特性を検索することを目的とした。

### (方法ならびに成績)

#### (1) 細胞株の樹立

2 歳女兒の小脳虫部に発生した髄芽腫摘出腫瘍片ならびに 9 歳女兒の小脳虫部髄芽腫摘出術 2 年後に発生した右前頭葉転移巣より得た腫瘍切除片を材料とした。すなわち術中切除腫瘍組織を約 1 ml に細切した後、その細切片を 25 cm<sup>2</sup> フラスコ内で静置培養した。初回培養液には、非働化した患者血清 2, 胎仔牛血清 (FCS) 1, RPMI 1640 を 1 の割合で用いたが、その後は、RPMI 1640 に 10% FCS, グルタミン, 非必須アミノ酸, ピルビン酸ナトリウムを添加した培養液を用い、患者血清の割合を漸減した。腫瘍片から単層に同心円状に増殖してきた細胞塊が、直径 1 cm を越えてから、他のフラスコへ継代し、以後順次継代培養を繰り返した。こうして樹立した 2 例の細胞株を、それぞれ ONS-76 および 81 と命名した。

#### (2) 髄芽腫細胞の免疫組織化学的特性

ONS-76 ならびに 81 と両細胞株における神経細胞およびグリア細胞関連マーカー蛋白の存在を、免疫ペルオキシダーゼ法にて検索した。すなわち 2-3 日培養後 4% パラホルムアルデヒドで 4℃

夜固定した培養細胞を用い、グリア細胞線維性酸性蛋白 (GFAP), S-100蛋白, ニューロン特異的エノラーゼ (NSE) ならびにニューロフィラメント蛋白 (NFP) (68, 145, 200kd) について免疫組織細胞化学的検討を行った。一次抗体として前3者は、各々抗ウサギ血清を、NFPについてはモノクローナル抗体を用いた。また二次抗体として、一次抗体にウサギ血清を用いた標本には, horse-radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を用い、一次抗体にモノクローナル抗体を用いた標本には、HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用いた。最後に、diaminobenzidine (DAB) 呈色反応を行い発色させた。ONS-76ならびに81細胞株は、共にGFAP, S-100蛋白は陰性であったが、神経細胞に多く存在するNSEおよびNFP (145,200kd) は陽性であった。

### (3) 髄芽腫細胞の主要組織適合抗原複合体の同定

10% FCS 添加 RPMI 1640 培地に浮遊させた両髄芽腫培養細胞を、10cm 径プラスチックシャーレに播き、recombinant human interferon  $\gamma$  (rHuIFN $\gamma$ ) を、2, 20, 200  $\mu$ /ml になるように培地に添加し、48時間培養した。トリプシン-EDTA 液を用いて細胞を回収した後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗HLA-DRモノクローナル抗体を氷上で30分間作用させた。主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス I の検索には、1次抗体に抗HLA-ABCモノクローナル抗体を、2次抗体にはFITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用い、FACSscan で蛍光光度を測定した。ONS-76ならびに81細胞は、共に通常培養条件でHLA-ABC (クラス I) 抗原を発現していたが、rHuIFN $\gamma$  の作用によりその抗原は増強された。一方両細胞とも通常培養条件では、HLA-DR (クラス II) 抗原を発現していなかったが rHuIFN $\gamma$  を培養液に添加すると rHuIFN $\gamma$  添加量依存性にクラス II 抗原が検出された。

### (4) 髄芽腫播種モデルの作製

ヌードマウス (BALA/c nu/nu) 大槽内に、 $1 \times 10^7$  個のONS-76細胞を経皮的に注入し、髄腔内播種モデルを作製した。すべてのマウスは65日以内に頭蓋内播種腫瘍のため腫瘍死し、その median survival time (MST) は56日であった。

(総括)

- (1) 手術摘出材料より2種類の髄芽腫培養細胞株を樹立した。
- (2) 樹立した培養細胞は、神経成分を有するにもかかわらず、今までグリア系細胞にしか誘導しえなかったMHCクラスII抗原を表現しえた。
- (3) ヌードマウスにおける髄芽腫の髄腔内播種モデルの作製に成功した。この疾患の主死亡原因が髄腔内播種であることを考えると、有用な実験モデルになると思われる。
- (4) 本研究結果は、髄芽腫の発生起源を解明するうえで貴重な資料を提供するものであり、また本腫瘍患者の予後不良原因となっている髄腔内播種の病態の解明、治療法の開発に役立つものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、悪性脳腫瘍である髄芽腫の培養細胞株を樹立し、その生物学的特性を明らかにすると共に、本疾患の髄腔内播種病態モデルを開発したものである。まず、髄芽腫2症例の手術標本より2種類の髄芽腫培養細胞株の樹立に成功し、その免疫細胞化学的検索より、同培養細胞が神経細胞成分を有すると共に、グリア細胞の性格を併せ持つ可能性を示した。この知見は髄芽腫が神経細胞とグリア細胞に分化する以前の前駆細胞より発生していることを示唆するものである。また本培養細胞をヌードマウス大槽内に移植することにより、本疾患患者の主死亡原因をなす髄腔内播種病態の動物実験モデルの作成に成功した。本研究は、髄芽腫の腫瘍発生に関して新しい知見を加えると共に、中枢神経系の細胞分化、髄芽腫臨床病態の解明、治療法の開発にも有用な情報を提供するものであり、学位に値するものと思われる。