Cis-diamminedichloroplatinumで誘発される悪性神経膠腫のアポトーシス

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 瀧波, 賢治
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8411

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第6号　1022－1032（1992）

Cis-diamminedichloroplatinum で誘発される悪性神経膠腫のアポトーシス

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）
瀧　波　賢　治

（平成4年12月28日受付）

アポトーシス (apoptosis) は発生過程や生体内の腸管粘膜上皮における生理的細胞死の形態として1972年，Kerr らにより初めて命名された概念である．アポトーシスは，病的細胞死である壊死に比べ，より生理的であると言われているので，この観点から悪性腫瘍の治療でアポトーシスを検討することは臨床上有用と考えられた．本論文においては，ヒト悪性神経膠腫細胞株である U251MG と U373MG を対象として，抗癌剤刺激に cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) を使用し，光顕的，電顕的検索ならびに DNA の電気泳動を行い，細胞死形態と DNA の損傷を観察するとともに，アポトーシス誘発の可能性について考察した．CDDP の濃度は 0.5μg/ml, 5μg/ml, および 50μg/ml で反応させ，0，24，48，72および96時間後の培養細胞を観察した．その結果，CDDP を 5μg/ml および 50μg/ml で4時間反応させた直後には細胞質突起である微絨毛の減少と粗面小胞体の膨化を認めた．一部の細胞には粗面小胞体からリボゾームが脱落するものもみられた．48時間後には，縮小した円形ないし楕円形を呈した細胞が出現した．72時間後には核および細胞自体も円形を呈し，染色質は核膜周辺に三日月状ないしは半月状に濃縮し，細胞質内は小型や膨化した小胞体とリボゾームで満たされている細胞が認められた．核および細胞自体が大小の隆起を形成し，断片化を生じ，アポトーシス小体に分かれる直前のものも認められた．以上の過程でアポトーシス小体に至るまで，細胞膜は十分保たれていた．DNA の電気泳動では，電顕的にアポトーシスを認めた72時間後から DNA の断片化が始まり96時間後にはさらに断片化は進行した．以上より，ヒト悪性神経膠腫細胞株で CDDP を作用させることによりアポトーシスを誘発することが可能であった．このことは悪性神経膠腫において生理的な細胞死のプログラムは保持されていることを示すものと考えられた．

Key words　apoptosis, glioma cell line, cisplatin, DNA fragmentation

悪性神経膠腫は，外科的治療のみでは完全治癒が期待できない悪性腫瘍である．この腫瘍に対しては手術に加えて放射線治療，化学療法，免疫学的療法を含む集学的治療が行われている[1]が，その長期的治療成績は極めて悪いのが現状である．中でも最も悪性度の高い多形性神経膠芽腫の平均生存期間については，ほぼ8.7～20.9ヶ月であり，治療5年生存率は10％以下である[2)~5)]．今日用いられる化学療法剤の一つ cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) は DNA に対して架橋結合を作ることにより DNA の合成障害を引き起こし肉腫細胞株や白血病細胞株に対して抗腫瘍効果を示すが[6)~9)]，現在までに頭蓋内腫瘍では胚細胞腫[10]や再発性の悪性神経膠腫に有効とする報告[11]がある．最近，CDDP は白血病の細胞株に対してアポトーシスを引き起こすことが1990年に Sorenson ら[12)~14)]により報告され注目されている．

アポトーシス (apoptosis) は発生過程や生体内の腸管粘膜上皮における生理的細胞死として1972年，Kerr ら[15]により命名されたものである．アポトーシスは，オタマジャクシの尾部[16]や昆虫の変態[17]，口蓋形成や指間細胞などの胚発生過程に認めるもの[18)19)]や，成熟個体において肝臓[20]や小腸粘膜上皮[21]などにおいてみられるような一定の細胞数を保つために細胞増殖に対しておこる細胞死などである．近年はリンパ系細胞などがコルチコイド[22]や放射線[23]に反応して細胞死をおこす機構はアポトーシスによると言われ，癌細胞の化学療法や放射線治療などとの関連で注目されている．本研究においてはヒト悪性神経膠腫細胞株を用いて，CDDP によるアポトーシス誘発の可能性について光顕的，電顕的検索，ならびに DNA 電気泳動的に検討した．

材料および方法

Ⅰ．材料および抗癌剤

ヒト悪性神経膠腫由来細胞株である U251MG と U373MG を用いた．培養液は Roswell Park Momorial Institute Media1640 (RPMI 1640)（日水製薬，東京）10.2g を蒸留水 873ml に溶解し高圧滅菌した溶液にグルタミン（日水製薬）0.3g，ペニシリン（明治製薬，東京）100,000U，ストレプトマイシン（明治製薬）100mg と，56℃で30分非動化した牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, New York, U. S. A.) 100ml，7％メイロン溶液（大塚製薬，東京）27ml を加え全量 1000ml として作成した．細胞は上記培養液で37℃，CO_2 濃度5％の環境下で培養した．抗癌剤には白金錯化合物の CDDP であるシスプラチン（ブリストルマイヤーズスクイブ，東京）を使用した．

Abbreviations : CDDP, cis-diamminedichloroplatinum : EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid

Ⅱ．CDDP 投与の抗腫瘍効果判定

1．CDDP 作用濃度の設定

コロニー形成法を行い LD_{90} を求めた．U251MG と U373MG の LD_{90} はそれぞれ0.793μg/ml と0.691μg/ml であった．U251MG と U373MG を72時間培養し，CDDP を 0.5μg/ml, 5μg/ml, および 50μg/ml の濃度で4時間作用させ，培養液を取り除き Dulbecco 燐酸緩衝液（日本製薬）で洗った後に新たな培養液と交換した．

2．培養細胞数の変化

48穴ディシュに細胞を 2×10^3 個培養し，CDDP を4時間作用させた直後，24時間後，48時間後，72時間後，96時間後および120時間後の生細胞と死細胞をトリファンブルー染色で区別し，生細胞数を測定した．

Ⅲ．光顕的および電顕的観察

細胞を 60mm ディシュに 5×10^4 個培養し，培養72時間後に CDDP を 0，0.5μg/ml, 5μg/ml および 50μg/ml の濃度で4時間作用させた．その直後，24時間後，48時間後および72時間後の培養細胞をそれぞれラバーを用いてディシュから剝離し，剝離細胞を含んだ培養液を1500回転で5分間遠心した．培養液を除去した後，ペレット状になった培養細胞を2.5％グルタールアルデヒドを加えて2時間固定した後，1％四酸化オスミウムでさらに2時間固定した．型通り脱水した後，酸化プロピレンで置換し，エポン812に包埋した．ガラスナイフで 1μm の薄切片を作成しトルイジンブルー染色を施したのち光顕的に観察した．また，ウルトラトーム NOVA (LKB, Bromma, Sweden) にて超薄切片を作成し，酢酸ウラニームと鉛の2重染色を施して，電子顕微鏡 H-600 型（日立，東京）で観察した．

Ⅳ．DNA 電気泳動

細胞を 100mm ディシュに 2×10^3 個培養し，培養72時間後に CDDP を 0，0.5μg/ml, 5μg/ml および 50μg/ml の濃度で4時間作用させた．その直後，24時間後，48時間後，72時間後および96時間後の培養細胞をディシュから剝離し，剝離細胞を含んだ培養液を1500回転5分間遠心した．培養液を除去した後，燐酸緩衝溶液で洗浄し，1×10^6 個の細胞に 10mM Tris. Cl, 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 20μg/ml RNAase (Sigma, St. Louis, U. S. A.), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) の組成の溶液を 0.4μl を加えて37℃の恒温槽においた．1時間後にプロティナーゼK（ニッポンジーン，東京）を 100μg/ml 加えて，50℃の恒温槽に一晩おいた．TE buffer (10mM Tris. Cl, 1mM EDTA) で飽和したフェノール，クロロホルム，イソミタールアルコールを25：24：1の割合で調合したものを 0.4μl 加えて，ゆっくりと攪拌した．攪拌後3000回転5分間遠心し，水層のみを取り出し，等量のクロロホルムを加え，再びゆっくり攪拌した．攪拌後3000回転5分間遠心し，同様に水層のみを取り出した．取り出した水層に2倍量の－20℃の100％エタノールと0.25倍量の 10M 酢酸アンモニウムを加えて攪拌後－20℃で冷却した．一晩冷却後，15000回転20分で遠心し DNA を回収した．70％エタノールで DNA を洗い，TE buffer 100μl を加えた．

DNA 量を吸光度計 UV-160V（島津製作所，東京）にて測定し，DNA10μg を2％アガロースゲル（ニッポンジーン）に 70V の定電圧で泳動した．0.5μg/ml の濃度でエチジウムブロ

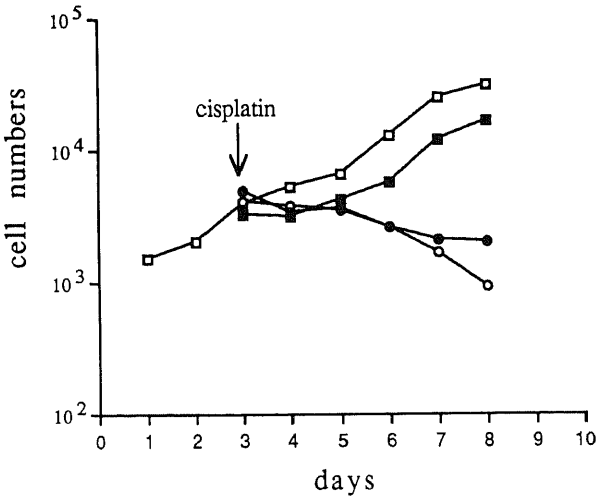

Fig. 1. The effects of cisplatin on U373MG cells. □, control, ■, cisplatin 0.5 μg/ml, ●, cisplatin 5 μg/ml, ○, cisplatin 50 μg/ml. U373MG is cultured for three days and than incubated with 0.5 μg/ml, 5 μg/ml, 50 μg/ml of cisplatin for 4hr (arrow).

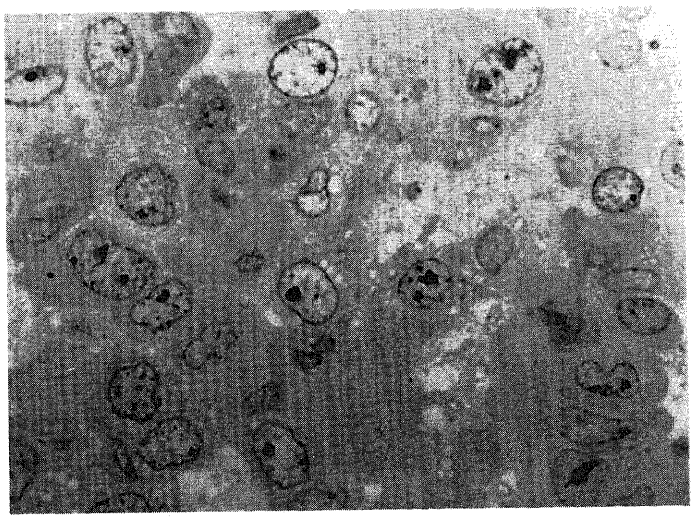

Fig. 2. Light microscopic appearance of control U251MG cells. Toluidine blue stain, ×400.

マイド（ニッポンジーン）を加えた TAE buffer (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA) でゲルを30分間染色した．紫外線照射器 TC-312A (SPECTROLINE, New York, U. S. A.) 上でゲルをポラロイドカメラを用いて撮影じた．

成　　績

Ⅰ．CDDP の抗腫瘍効果

CDDP の投与量が0.5μg/ml では U251MG と U373MG のいずれにおいても CDDP 作用24時間までは細胞数の増加は認められなかった．しかし，48時間以後は対照群と同様な対数増殖を示した．5μg/ml と 50μg/ml の投与では，培養細胞は CDDP 作用直後より増殖を停止し，72時間後から生細胞数の減少を認めた（図1）．

Ⅱ．光顕的および電顕的所見

1．光顕的所見

CDDP を作用させなかった対照群では，U251MG と U373MG のいずれも楕円形の細胞で核は真正染色質が多く，核小体が少数認められた（図2）．細胞密度は高く細胞間隙がはっ

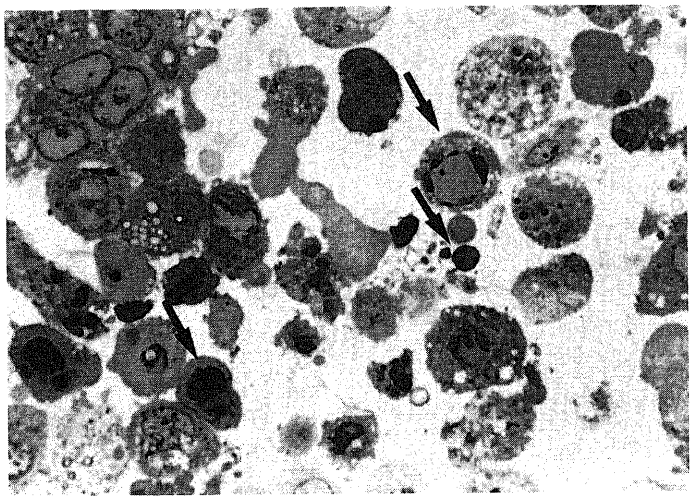

Fig. 3. Light microscopic appearance of U251MG cells at 72 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Most of the cells are in early stages of apoptosis and show sharply delineated masses of condensed chromatin abutting on their nuclear envelopes (arrows). Toluidine blue stain, ×400.

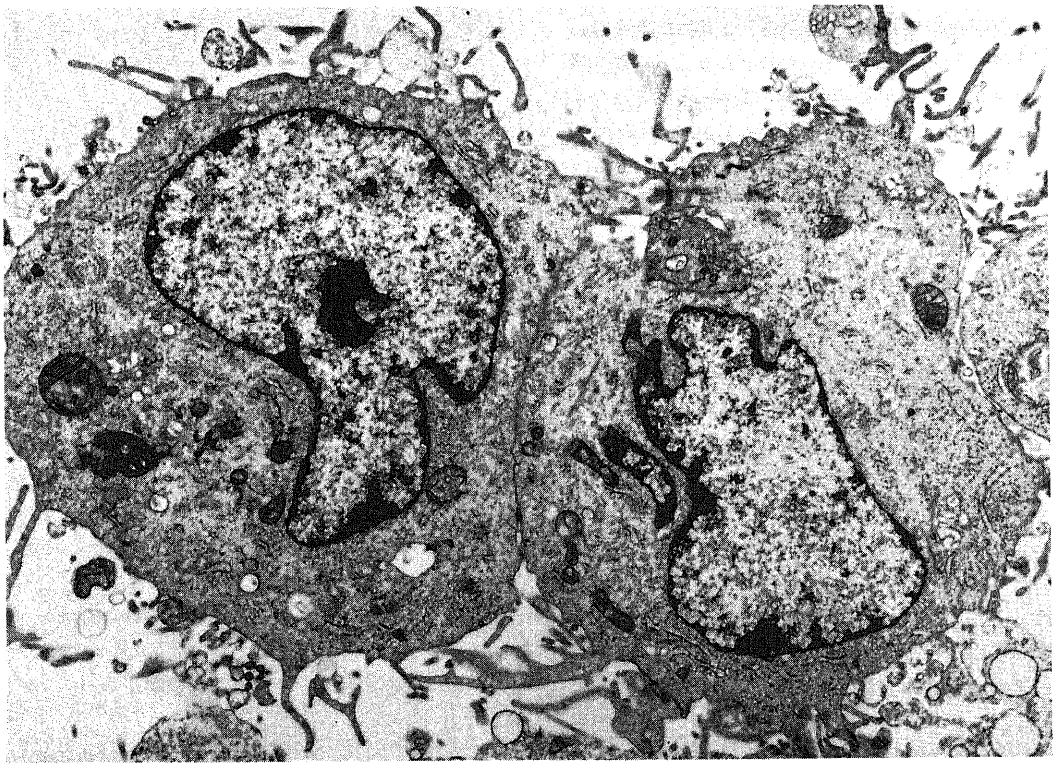

Fig. 4. Electron microscopic appearance of control U251MG cells. ×4,500.

きりとは同定し得ないものが多かった．CDDP を0.5μg/ml 投与したものは対照群に比べていずれの時期においても明らかな形態的変化はみられなかった．CDDP を 5μg/ml および 50μg/ml 投与した群では48時間後より細胞の大きさが縮小し，円形を呈し，一部の細胞の核では染色質が濃縮する所見が認められた．72時間後にはさらに縮小し小型の円形を呈し，染色質は核辺縁に濃縮する細胞を認めた（図3）．

2．電顕所見

i）対照群

CDDP を作用させなかった対照群では，U251MG と U373MG のいずれの細胞とも細胞は楕円形呈し，細胞質突起は発達しており，多くの微絨毛を有していた．核は不整形で真正染色質に富み，一部には散在性に異質染色質を認めた．細胞内器官は豊富であり，多くの粗面小胞体やミトコンドリアが観察された（図4）．

ii）CDDP 投与群

CDDP を0.5μg/ml で投与した培養細胞では，U251MG と U373MG いずれも投与直後に軽度の微絨毛の減少を認めたが，この変化は可逆性であり，24時間後には投与前の状態に戻った．CDDP を 5μg/ml および 50μg/ml 投与した群では，U251MG と U373MG の培養細胞は CDDP を 4 時間作用させた直後より，その大きさは軽度縮小し，微絨毛の減少と粗面小胞体の腫脹を認めた．一部の細胞においては，腫脹した小胞体からリボゾームが脱落するものもみられた（図5）．24時間後には培養細胞の小胞体の腫脹は著明となり，核膜間隙の開大するものも認められた（図6）．また，粗面小胞体の層状構造も認めら

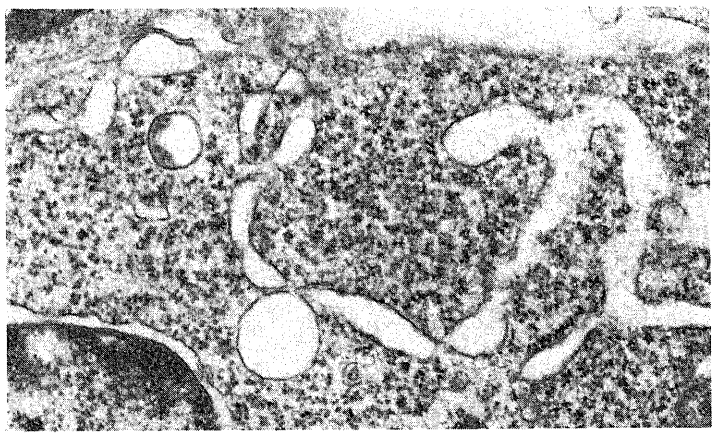

Fig. 5. Electron microscopic appearance of U251MG cells after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. The ribosome is detached from the enlarged rough endoplasmic reticulum. ×30,000.

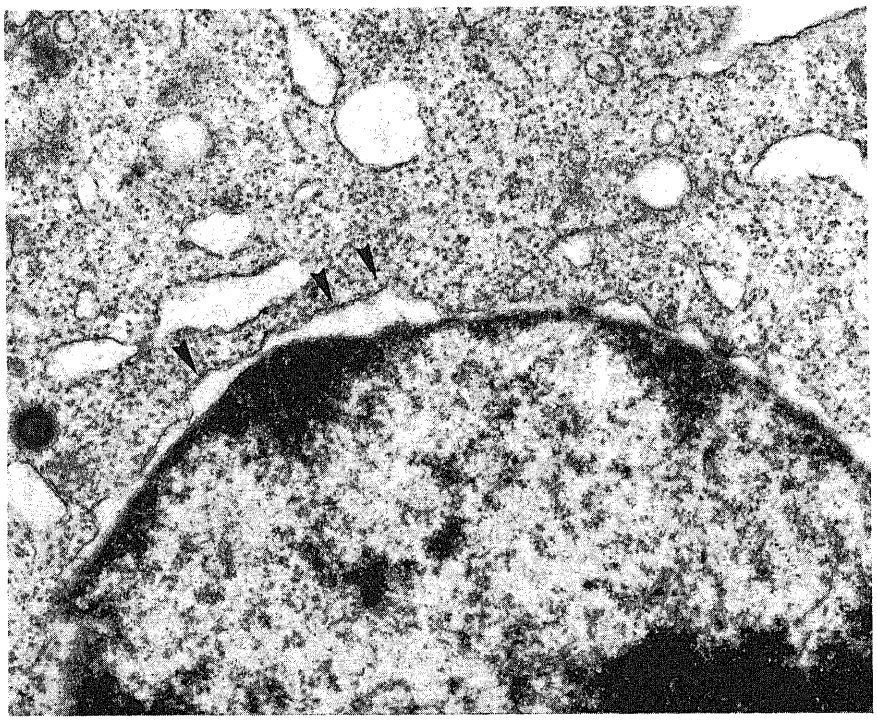

Fig. 6. Electron microscopic appearance of U251MG cells at 24 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. The rough endoplasmic reticulum and intermembrane spaces of nuclear membrane (arrow heads) are enlarged. ×30,000.

れた．48時間後には，大部分の培養細胞の微絨毛は消失し，凝集した円形ないしは楕円形の細胞となった（図7）．細胞内には脂肪沈着や空腔も認められた．72時間後には，細胞とその核は小型円形となり，核小体は消失し，濃縮した染色質は核膜周辺に三日月状ないしは半月状に集合し（図8，9），典型的なアポトーシスを呈した細胞が出現した．アポトーシスの像を呈した培養細胞の細胞質内は小型の小胞体とリボゾームで満たされ，少数の腫脹したミトコンドリアや脂肪沈着および空胞形成もみられた．また，細胞膜や核膜に小胞体によると思われる層状構造が認められた（図10）．一部の細胞では，核および細胞自身が大小の隆起を形成し，細胞と核の断片化をおこす所見（図11）や断片化の結果としてのアポトーシス小体も認めた（図12）．以上の過程で細胞膜構造はアポトーシス小体に至るまで十分保たれていた．アポトーシスの発生はCDDPを5μg/mlで投与したものより50μg/mlで投与したものの方が多い傾向を示した．

iii）電気泳動

U251MGとU373MGのいずれも，CDDPの投与が0.5μg/mlではDNAの断片化はみられなかった．5μg/mlおよび50μg/mlで投与した場合は，DNAは72時間後より断片化を認め，96時間後には断片化はさらに著明となった（図13）．

考　　察

細胞死の形態は二型に分類される．一つは壊死[24]と呼ばれる古典的細胞死で，受動的，偶発的に生じるものであり，もう一

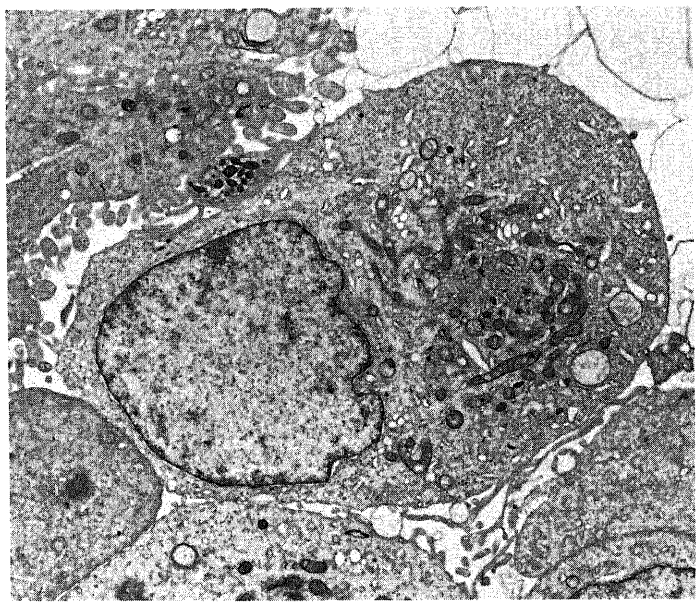

Fig. 7. Electron microscopic appearance of U251MG cells at 48 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. The cell is plump and the number of microvilli has decreased. ×4,500.

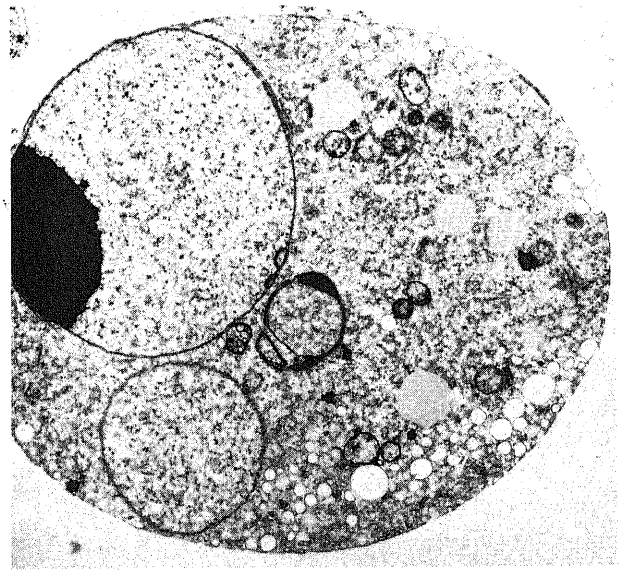

Fig. 8. Electron microscopic appearance of U251MG cells at 72 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Chromatin is compacted and segregated into sharply delineated masses that lie against the nuclear envelope and cytoplasm condenses. ×4,500.

つがアポトーシスである[1)25)]．アポトーシスは壊死と異なり，生理的に予めプログラムされ，必然的に起こる死である．つまり，アポトーシスは細胞が老化したり，不要となったり，傷ついたりすると，内在する自壊機構が働いて細胞死が生じ，積極的に生体がそうした細胞を除去しようとする時に見られる能動的細胞死である[1)25)26)]．したがって病的状態のみならず生理的状態でも生ずる．アポトーシスの出現する部位としては，オタマジャクシからカエルに発生する際の尾部の消失にみられるような形態変化の著しい胚発生過程[2)4)5)27)28)]や成熟個体が細胞数を一定に保つための不断の細胞増殖と均衡して生じる細胞死（リンパ胚中心，胸腺皮質，肝[6)]，副腎皮質[29)]，子宮内膜，前立腺，小腸粘膜上皮[7)]など），ホルモンによる器官の萎縮（副腎皮質刺激ホルモン離脱後の副腎皮質[29)]，グルココルチコイド投与後の胸腺[8)]など）などの生理的な細胞死が起こる部位である．生理的なもの以外でアポトーシスを誘導する外的な刺激としては低線量X線，紫外線および電離放射線の照射，制癌剤の投与および穏和な温熱療法等がある[8)26)30)]．

また，全ての悪性腫瘍においても壊死以外に，自然発生するアポトーシスの像が観察される[31)32)]．つまり，腫瘍細胞は生理的な細胞死であるアポトーシスを発生する機序を全く失っているわけではなく，あらかじめ遺伝的に運命づけられた細胞死機構を保持している．一方，腫瘍の増殖は細胞分裂により増える過

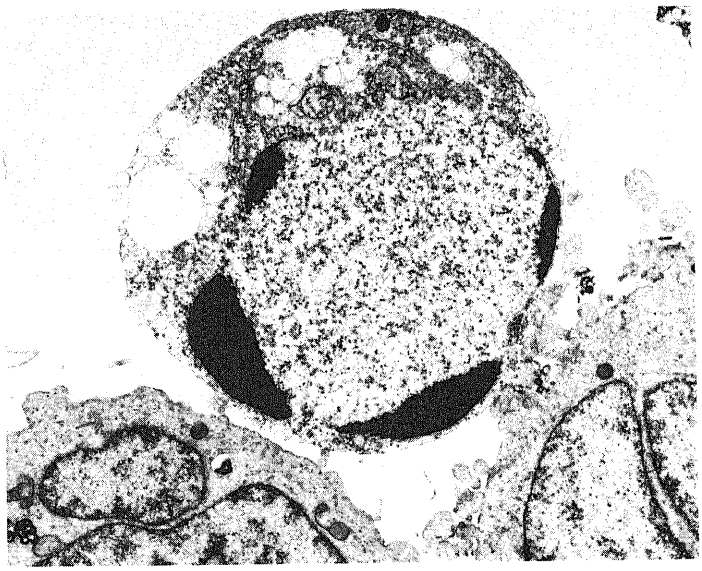

Fig. 9. Electron microscopic appearance of early apoptotic changes of U251MG cells. The nuclear outline is mildly convoluted. There are many vacuoles in the cytoplasm. ×4,500.

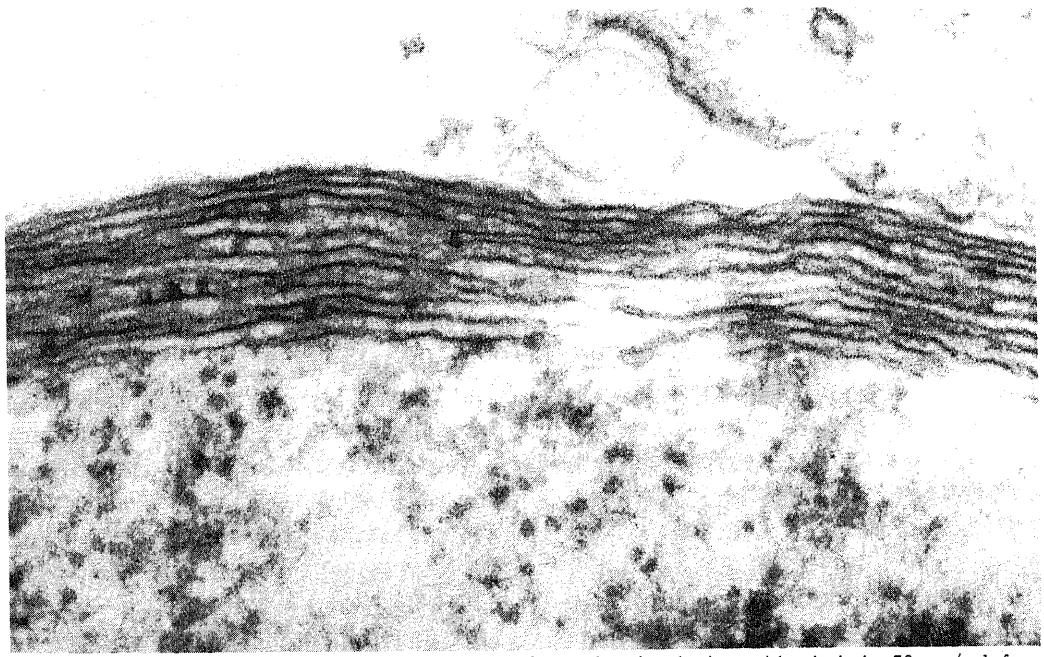

Fig. 10. Electron microscopic appearance of U251MG cells at 72 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. The membrane was in a laminar structure. ×100,000.

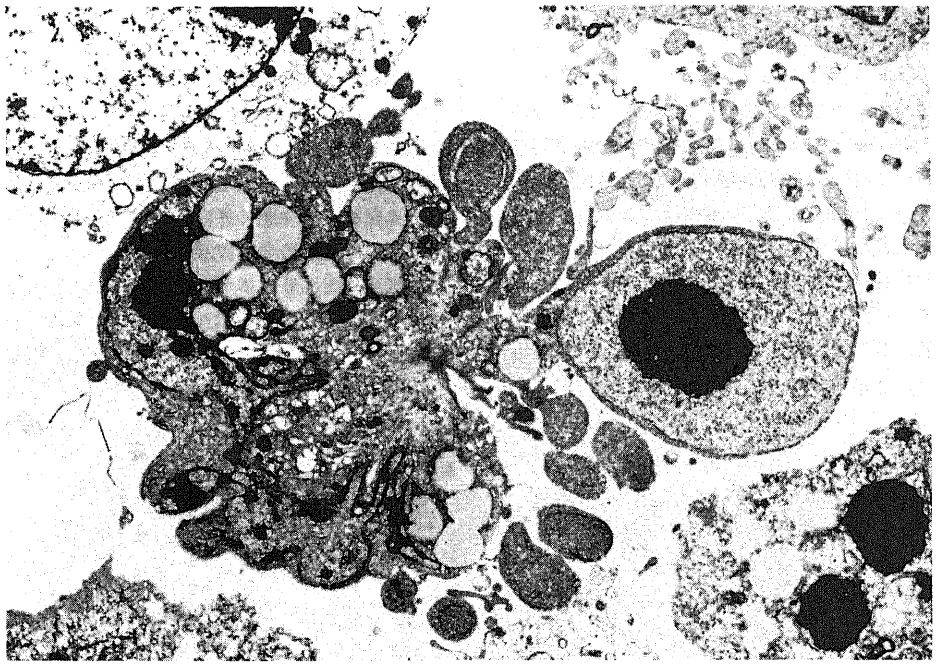

Fig. 11. Electron microscopic appearance of apoptotic changes in U251MG cells. Note the discrete nuclear fragments with characteristic segregation of compacted chromatin, the crowding of organelles, and the marked convolutions of the cellular surface. ×4,500.

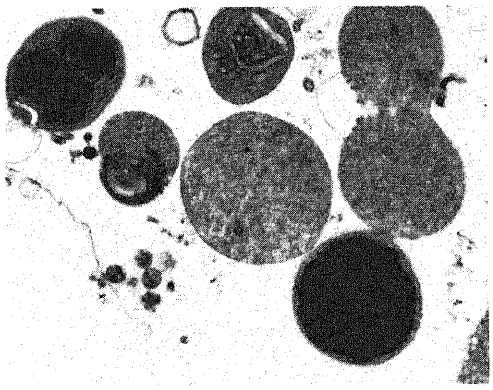

Fig. 12. Electron microscopic appearance of apoptotic bodies in U373MG cells. Apoptotic bodies contain rough endoplasmic reticulum and ribosome and nuclear fragments. ×10,000.

程と細胞死による腫瘍細胞の消滅の過程（細胞喪失）のバランスによって決まる[33]．腫瘍の増殖速度には負の因子として自己調節機構による腫瘍細胞の喪失（アポトーシス）が大きく寄与している[31]．今回，初めて頭蓋内悪性腫瘍である悪性神経膠腫でも培養細胞においてアポトーシスを誘導し得ることを確認した．このことは，極めて予後不良である悪性神経膠腫細胞においても生理的な細胞死のプログラムが保持されていることを示すものであり，今後の腫瘍治療において重要な意味を持つと考えられた．

細胞が外的刺激により障害された場合に起こる形態学的変化として，1）粗面小胞体の腫脹とリボゾームの遊離，2）ミエリン像の形成，3）核クロマチンの凝集，4）細胞質内空胞形成，5）脂肪沈着，6）ミトコンドリアの腫脹と小粒子形成，7）ライソゾームによる自己貪食，8）細胞の全体的な腫脹がある[34)~36)]．本実験においては，シスプラチン作用4時間後より粗面小胞体の腫脹とリボゾームの遊離を認め，粗面小胞体が層状構造を呈した細胞を認めた．核膜外層と小胞体の膜は連続しているため[37)38)]，核膜の層間の腫脹は粗面小胞体の腫脹と同じ変化と考えられる．また，CDDP 投与後48時間後より細胞内空胞が出現していたが，これは粗面小胞体の腫脹が大きくなったものと考えられた．

壊死の形態学的特徴としては，先ず可逆的な変化として核のクロマチンの核膜周囲への辺縁不整な凝集，小胞体の腫脹，軽度のリボゾームの消失を認める．次に，不可逆的変化として1）ミトコンドリアなどの細胞器官の著しい膨化，2）ミトコンドリアマトリックス内の綿状の電子密度の高い部分の出現，3）細胞内器官膜および細胞膜の破壊と細胞の崩壊，4）リボゾームおよびライソゾームの融解，5）核膜の破壊とクロマチンの消失である[24)33)39)~44)]．これに対してアポトーシスの形態学的特徴は，初期像としては，1）細胞質の凝集，2）核小体の消失，3）クロマチンの核膜周囲への辺縁滑らかな濃縮，4）細胞および核の大小の隆起形成がある[1)25)26)45)]．その後，瘤状隆起の膜被包性球状小体化と球状小体の分離と細胞外への遊離を認める[1)25)26)45)]．アポトーシスの特徴として，細胞膜はこの時期まで保たれたままである．後期像として，培養では球状小体の膜が破壊され二次的壊死となり，生体では隣接する細胞による球状小体の貪食，消化像が観察される[1)25)26)45)]．本実験では CDDP 作用後72時間後に観察された像は上記のアポトーシスの像と一致する．アポトーシスの経過時間は極めて短く，アポトーシスの初期像からアポトーシス小体形成までわずかに数分間である[46)~48)]．培養下ではアポトーシス小体が二次的な壊死に陥るまでに要する時間は1～2時間と報告されている[48)]．また生体内では貪食されたアポトーシス小体が処理されるために要する時

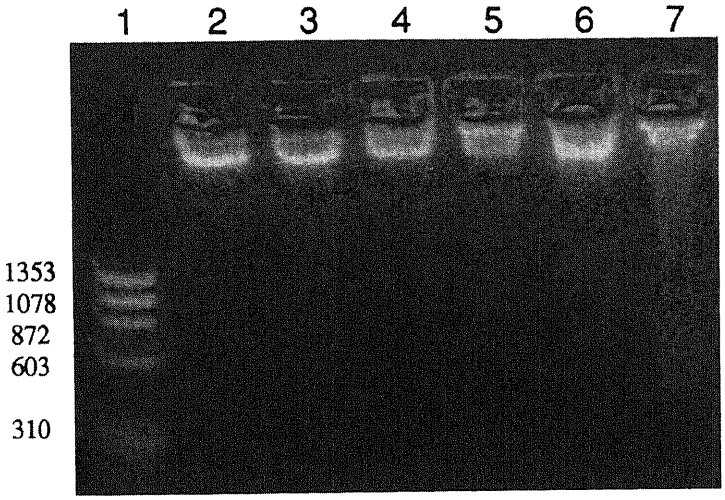

Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cultured U373MG cells. Lane 1: DNA fragment size marked (base pairs), Marker 4. Lane 2: DNA extracted from control cells. Lane 3: DNA extracted from cells just after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Lane 4: DNA extracted from cells at 24 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Lane 5: DNA extracted from cells at 48 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Lane 6: DNA extracted from cells at 72 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr. Lane 7: DNA extracted from cells at 96 hr after incubation with cisplatin 50 μg/ml for 4 hr.

間も2～3時間と短いため[49]，一連のアポトーシスの像を捕らえることは実際上は難しいとされる．本研究で一連のアポトーシスの像を観察し得た理由としては，個々の細胞においてアポトーシスが異なる時間に起きていたこと，および単相培養細胞においてはアポトーシス小体は基質より離れて，培養液中に浮かび上がってくるので培養液中の細胞も含めて観察できたことなどが挙げられる．

アポトーシスの初期像として粗面小胞体の腫脹や細胞内空胞の出現が報告されている[50]．また Walker らはアポシートスの初期像として粗面小胞体の同心円的配列形成が生じ，粗面小胞体の分離した部位の間で細胞の断片化が起こると報告している[51]．本実験においても初期に粗面小胞体の腫脹や細胞内空腔や求心性の層状構造を呈した粗面小胞体が観察されたことはアポトーシスの初期変化と考えられる．しかし，アポトーシスは個々の細胞において出現するため，細胞障害による変化とそれに引き続いて起こったアポトーシスとの境界は不明であり，どこまでが可逆的変化であるかについて判断することは困難である．

細胞がアポトーシスを起こしている場合，細胞膜構造はアポトーシス小体を形成するまで保たれているとされる．本実験においても細胞膜構造は保たれていたが，細胞が断片化を生じる際，細胞膜下に何層かの層状構造が認められた．細胞内の全て膜の合成には小胞体が大きく関与しているので，細胞膜下に何層かの層状構造が認められたことは，断片化を生じる際の膜合成に粗面小胞体および細胞内空砲形成が深く関与していることを示すものと考えられた．

壊死の発生機序に関しては，始めに，ミトコンドリアが障害されることにより ATP 産生能の低下が生じ，それにより細胞膜でのカリウムイオンの流失とナトリウムイオンの流入が起こり，膜透過性が亢進し，最終的に細胞は腫脹し細胞膜および細胞内器官の膜破壊が起こるといわれている[52]．これに対して，アポトーシスにおいては，Ca^{2} および Mg^{2+} 依存性エンドヌクレアーゼが活性化され，DNA に 180-200bp の整数倍のオリゴヌクレオソーム単位の断片化が生ずるとされている[53)~56]．細胞は刺激後2～3時間から2～3日して DNA 断片化を生じ，しかも DNA 断片化はシクロヘキシミドやアクチノマイシンDで阻止される．以上二つのことから，DNA 断片化には新たな蛋白質や RNA の合成が必要であると考えられている[55,57]，但し，新たに合成される蛋白質がどのようなものかについては明らかにされていない．また，DNA 断片化に新たな蛋白合成を必要としない場合や蛋白質合成阻害剤自身がアポトーシスを誘導する場合などの特殊な場合が存在する[58)~60]．本実験においても，CDDP により DNA の断片化が認められた．すなわち，CDDP の刺激により細胞内においてなんらかのシグナルを介してエンドヌクレアーゼが活性化されたのではないかと考えられる．本実験において CDDP を4時間作用させた後は正常の培養条件に戻しているにもかかわらず，72時間後よりアポトーシスが誘導されているため，アポトーシスを起こすような刺激が一度加わると，その刺激が持続的に加わっていなくてもアポトーシスは誘導され得ることを示していると考えられる．つまり，CDDP 刺激後72時間で細胞内で何らかの経路が働き，最終的にエンドヌクレアーゼが活性化され，DNA の断片化が起こりアポトーシスを生じると考えられる．今後，作用後72時間の間に細胞内で起こっていることを多方面から検察することがアポトーシスの機序解明につながるものと考えられる．

CDDP は中心の白金の原子に，2つの塩素と2つのアンモニアがシス位に配置した水溶性の化合物である．CDDP は生体内では塩素が活性化されて2つの反応基を作る．2つの反応基は DNA－本鎖上の隣接するグアニン残基同志，もしくは隣接するグアニン残基とアデニン残基との間で鎖内架橋を形成する．そのため細胞に DNA 合成障害が生じる[6)~8]．CDDP の細胞毒性はこの DNA 合成障害によるとされていた．しかし，1988年に Sorenson らは白血病の細胞株で DNA の合成障害がシスプラチンによる細胞毒性の決定的な因子となるのではなく，細胞が

G_2 期に停止することが CDDP による細胞毒性に関係しているのであると報告した[61]．さらに，1990年には Sorenson らは白血病の細胞株で CDDP による細胞死の初期変化として DNA の断片化が起こり，かつ形態学的にも CDDP により誘導される細胞死がアポトーシスであると報告した[12]．そして，現在までに抗癌剤でアポトーシスを誘導するものとしては，この他にメソトレキセート，エトポシド，5-fluorouracil (5-FU) 等が報告されている[12]．今回の実験において，悪性神経膠腫培養細胞においても CDDP によりアポトーシスを誘導し得たことは，悪性神経膠腫培養細胞においても生理的な細胞死であるアポトーシスのプログラムが残存していることを示すものと考えられる．今後，この細胞自身の持つアポトーシスのプログラグをうまく利用することにより治療抵抗性である悪性神経膠腫に対して新しい有効な治療法を開発できる可能性があると考えられる．

結　　論

ヒト神経膠腫培養細胞において CDDP を使用し，光顕的，電顕的検索ならびに DNA 電気泳動を行い，細胞死形態と DNA の損傷を観察するとともに，アポトーシスの誘発について考察し，以下の結論を得た．

1．CDDP を 0.5μg/ml で投与した培養細胞では，直後に軽度の微絨毛の減少を認めたが，この変化は可逆性であり，24時間後には投与前の状態に戻った．また，CDDP を 0.5μg/ml で投与した培養細胞では DNA 損傷は認められなかった．

2．CDDP を 5μg/ml および 50μg/ml で投与した細胞は 4 時間作用直後より，微小絨毛の減少，粗面小胞体の腫脹とリボゾームの遊離を認めた．24時間後には核においては核膜間隙の開大が認められ，48時間後には，縮小した円形ないし楕円形を呈した細胞が出現した．

3．CDDP を 5μg/ml および 50μg/ml で投与した細胞では72時間後には細胞も核も円形を呈し，染色質は核膜周辺に三日月状ないしは半月状に濃縮し，細胞質内は小型や膨化した小胞体とリボゾームで満たされたものが観察された．一部の細胞では，核および細胞自体の大小の隆起形成も認められた．また，アポトーシス小体も認められた．DNA の電気泳動では72時間後よりアポトーシスに一致して DNA の断片化が認められた．

4．CDDP を投与した細胞では72時間後より細胞死を生じ，その細胞死形態はアポトーシスであった．このことは悪性神経膠腫におて生理的な細胞死のプログラムが保持されていることを示唆する．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜わりました脳神経外科学教室山下純宏教授に深甚の謝意を捧げます．また直接御指導を賜りました同教室立花修助手に深謝致します．多大な御協力を頂きました脳神経外科学教室の諸先生に深謝致します．本研究の遂行に当り，ご協力頂きました電子顕微鏡技術員横田輝一氏，ならびに当教室今村明子技官に感謝の意を表します．

尚，本論文の要旨は第 1 回日本脳腫瘍カンファレンス (1992，日光) において発表した．

文　　献

1） **生塩之敬**：グリオーマの化学療法．Neurosurgeons, **7**, 9-18 (1988).

2） **Kornblith, P. L. & Walker, M.**: Chemotherapy for malignant gliomas. J. Neurosurg., **68**, 1-17 (1988).

3） **Anderson, J., Christensen, L. & Kongsholm H.**: Phase Ⅱ trial of prednimustine in glioblastoma multiforme. Cancer Treat. Rep., **68**, 795-797 (1984).

4） **Mortimer J. E., Crowley J., Eyre H., Weiden P., Eltringham J., Stuckey W. J.**: A phase Ⅱ randomized study comparing sequential and combined intraarterial cisplatin and radiation therapy in primary brain tumors. Cancer, **69**, 1220-1223 (1992).

5） **脳腫瘍全国統計委員会**：脳腫瘍全国集計調査報告．6, 90-97 (1987).

6） **Rosenberg, B. & Van Camp, L.**: The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. Cancer Res., **30**, 1799-1802 (1970).

7） **Roberts, J. J. & Thomson, A. J.**: The mechanism of action of antitumor platinum compounds. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **22**, 71-133 (1979).

8） **Loehrer, P. J. & Einhorn, L. H.**: Cisplatin. Ann. Intern. Med., **100**, 704-713 (1984).

9） **Eastman, A.**: The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. Pharmacol. Ther., **34**, 155-166 (1987).

10) **Kobayasi, T., Yoshida, J., Ishiyama, J., Noda, S., Kito, A. & Kida, Y.**: Combination chemotherapy with cisplatin and etoposide for malignant intracranial germ-cell tumors. J. Neurosurg., **70**, 676-681 (1989).

11) **Feun, L. G., Wallace, S., Stewart, D. J., Chuang, V. P., Yung, W. A., Leavens, M. E., Burgess, M. A., Savaraj, N., Benjamin, R. S., Young, S. E., Tang, R. A., Handel, S., Mavligit, G. & Fields, W. S.**: Intracarotid infusion of cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of recurrent malignant brain tumors. Cancer, **54**, 749-799 (1984).

12) **Sorenson, C. M., Barry, M. B. & Eastman, A.**: Analysis of Events Associated With Cell Cycle Arrest at G_2 Phase and Cell Death Induced by Cisplatin. J. Natl. Cancer Inst., **82**, 749-755 (1990).

13) **Eastman, A.**: Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. Cancer Cells, **2**, 275-280 (1990).

14) **Barry, M. A., Behnke, C. A. & Eastman, A.**: Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem. Pharmacol., **40**, 2353-2362 (1990).

15) **Keer, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.**: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, **26**, 239-257 (1972).

16) **Kerr, J. F. R., Harmon B. & Searle, J.**: An electron-microscope study of cell death in the anuran tadpole tail during spotaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres. J. Cell Sci., **14**, 571-585 (1974).

17) **Lockshin, R. A.**: Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein.

J. Insect Physiol., **15**, 1505-1516 (1969).

18) **Hammar, S. P. & Mottet, N. K.**: Tetrazolium salt and electronmicroscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. J. Cell Sci., **8**, 229-251 (1971).

19) **Farbman, A. I.**: Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. Dev. Biol., **18**, 93-116 (1968).

20) **Kerr, J. F. R.**: Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. J. Pathol., **105**, 13-20 (1971).

21) **Potten, C. S.**: Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and γ irradiation. Nature, **269**, 518-521 (1977).

22) **Wyllie, A. H. & Morris, R. G.**: Hormone-induced cell death: Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. Am. J. Pathol., **109**, 78-87 (1982).

23) **Sellins, K. S. & Cohen, J. J.**: Gene induction by r-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. J. Immunol., **139**, 3199-3206 (1987).

24) **Mclean, A. E. M., Mclean, E. & Judah, J. D.**: Cellular Necrosis in the Liver Induced and Modified by Drugs. Int. Rev. Exp. Pathol., **4**, 127-157 (1965).

25) **Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R.**: Cell Death: The Significance of Apoptosis. Int. Rev. Cytol., **68**, 251-306 (1980).

26) **Waring, P., Kos, F. J. & Mullbacher, A.**: Apoptosis or programmed cell death. Med. Res. Rev., **11**, 219-236 (1991).

27) **Harmon, B. L. Bell & Williams, L.**: An ultrastructural study on the "meconium corpuscles" in rat foetal intestinal epithelium with particular reference to apoptosis. Anat. Embryol., **169**, 119-124 (1984).

28) **Penfold P. L. & Provis, J. M.**: Cell death in the development of the human retina: Phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. Graefe's Arch. Clin. Exp. Opthalmol., **224**, 549-553 (1986).

29) **Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Macaskill, I. A. M. & Currie, A. R.**: Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. J. Pathol., **111**, 85-94 (1973).

30) **Takano, Y. S., Harmon, B. V. & Kerr, J. F. R.**: Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. J. Pathol., **163**, 329-336 (1991).

31) **Kerr, J. F. R. & Searle, J.**: A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. J. Pathol., **107**, 41-44 (1972).

32) **Moore, J. V.**: Death of cells and necrosis of tumours. *In* C. S. Pottern (ed.), Perspectives on Mammalian Cell Death, 1st ed. p295-325. Oxford University Press, New York, 1987.

33) **Martin, C. Raff**: Social controls on cell survival and cell death. Nature, **356**, 397-399 (1992).

34) **Buckley I. K.**: A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. Lab. Invest., **26**, 201-209 (1972).

35) **森　亘，桶田理喜**：ロビンス基礎病理学，第4版，19-21頁，平川書店，東京，1987.

36) **Liepims, A.**: Morphological, physiological and biochemical parameters associated wiyh cell injury: a review. Immunopharmacol. Immunotoxicol., **11**, 539-558 (1989).

37) **Depierre, J. W. & Dallner, G.**: Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. Biochim. Biophys. Acta, **415**, 411-472, (1975).

38) **Fawcent, D.**: The Cell, 2nd ed. p303-352, Sunders, Philadelphia, 1981.

39) **Trump, B. F., Valigorsky, J. M., Dees, J. H., Mergner, W. J., Kim, K. M., Jones, R. T., Pendergrass, R. E., Garbus, J. & Cowley, R. A.**: Cellular change in human disease: A new method of pathological analysis. Human Pathol., **4**, 89-109 (1973).

40) **Kloner, R. A., Ganote, C. E., Whalen, D. A. & Jennings, R. B.**: Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. Am. J. Pathol., **74**, 399-414 (1974).

41) **Ganote, C. E., Seabra-Gromes, R., Nayler, W. G. & Jennings, R. B.**: Irreversible myocardial injury in anoxic perfused rat hearts. Am. J. Pathol., **80**, 419-438 (1975).

42) **Jennings, R. B., Ganote, C. E. & Reimer, K. A.**: Ischemic tissue injury. Am. J. Pathol., **81**, 179-195 (1975).

43) **Laiho, K. U. & Trump, B. F.**: Studies on the Pathogenesis of cell injury: effects of inhibitors of metabolism and membrane function on the mitochondria of ehrlich ascites tumor cells. Lab. Invest., **32**, 163-182 (1975).

44) **Trump, B. F., Berezesky, I. K. & Osornio-Vargas, A. R.**: Cell death and the disease process. The role of calcium. *In* I. D. Bowen & R. A. Lockshin (eds.). Cell Death in Biology and Pathology, 1st ed., p209-242, Chapman and Hall, London, 1981.

45) **Kerr, J. F. R. & Harmon, B.V.**: Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective *In* L. D. Tomei & F. O. Cope (eds.), Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, 1st ed., p5-30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1991.

46) **Russel, S. W., Rosenau, W. & Lee, J. C.**: Cytolysis induced by human lymphotoxin. Cinemicrographic and electron microscopic observations. Am. J. Pathol., **69**, 103-112 (1972).

47) **Matter, A.**: Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. Immunology, **36**, 179-190 (1979).

48) **Sanderson, C. J.**: The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., **192**, 241-255 (1976).

49) **Bursh, W., Paffe, S., Putz, B., Barthel, G. & Schulte-Hermann, R.**: Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. Carcinogenesis, **11**, 847-853 (1990).

50) Kohler, H. R., Dhein, J., Alberti, G. & Krammer, P. H. : Ultrastructural analysis of apoptosis induced by the monoclonal antibody anti-apo-l on a lymphoblastoid B cell line. Ultrastruct. Pathol., 14, 513-518 (1990).

51) Walker, N. I. & Gobe G.: Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. J. Pathol., 153, 333-344 (1987).

52) Trump, B. F. & Mergner, W. J.: Cell injury. *In* B. W. Zweifach, L. Grant & R. T. McCluskey (eds.), The Inflammatory Process, 2nd ed., p115-258, Academic Press, New York, 1974.

53) Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature, 284, 555-556 (1980).

54) Cohen, J. J. & Duke, R. C.: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. J. Immunol., 132, 38-42 (1984).

55) McConkey, D. J., Hartzell, P., Nicotera, P. & Orrenius, S.: Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. FASEB J., 3, 1843-1849 (1989).

56) Arends, M. J., Morris, R. G. & Wyllie, A. H.: Apoptosis: the role of the endonuclease. Am. J. Pathol., 136, 593-608 (1990).

57) Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L. & Dunlop, D.: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J. Pathol., 142, 67-77 (1984).

58) Duke, R. C., Chervenak, R. & Cohen, J. J.: Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytokysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 6361-6365 (1983).

59) Waring, P.: DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. J. Biol. Chem., 265, 14476-14480 (1990).

60) Searle, J., Lawson, T. A., Abbott, P. J., Harmon, B. & Kerr, J. F. R.: An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in population of proliferating normal and neoplastic cells. J. Pathol., 116, 129-138 (1975).

61) Sorenson, C. M. & Eastman, A.: Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. Cancer Res., 48, 6703-6707 (1988).

Apoptosis of Human Glioma Cell Line Induced by Cisplatin

Kenji Takinami, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **101**, 1022—1032 (1992)

Key words apoptosis, glioma cell line, cisplatin, DNA fragmentation

Abstract

Human malignant gliomas are among the most malignant tumors and are resistant to all available therapies. Cisplatin has been shown to be an effective antineoplastic agent in the treatment of a variety of tumors and has recently started to be used for treatment of glioma. Cell death can occur via either of two morphologically and biochemically distinct modes: necrosis or apoptosis. Apoptosis is physiological cell death so it is important to investigate the apoptosis in glioma at this point. Glioma cell lines, U251MG and U373MG, were cultured for three days and then incubated with 0.5 μg/ml, 5 μg/ml, 50 μg/ml of cisplatin for 4 hr. The morphological changes and DNA degradation patterns were investigated at 0, 24, 48, 72 hr after incubation with cisplatin. There were no changes after incubation with 0.5 μg/ml of cisplatin. Ultrastructural analysis of the glioma cell lines just after incubation with 5 and 50 μg/ml of cisplatin showed decrease of microvilli, dilatation of rough endoplasmic reticulum and withdrawal of ribosome from rough endoplasmic reticulum.Ultrastructural analysis of the glioma cell lines 72 hr after incubation with 5 and 50 μg/ml of cisplatin revealed morphologic alterations of the glioma cell lines that were typical of the various steps of apoptotic death. At 72 hr after incubation with 5 and 50 μg/ml of cisplatin compaction of the nuclear chromatin into sharply circumscribed, uniformly dense masses that abutted on the nuclear envelope and condensation of the cytoplasm were recognized. Nuclear fragmentation and marked convolution of the cellular surface were also detected. DNA degradation was noted at 48 hr after incubation with 5 and 50 μg/ml of cisplatin. It is concluded that the morphological features and the DNA degradation pattern caused by cisplatin in the glioma cell lines are consistent with apoptosis. This is the first observation of apoptosis in human glioma cells, suggesting new possible approaches to the treatment of malignant gliomas.