

氏名(本籍) 山口 剛(滋賀県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第489号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 Disruption of erythrocytes distinguishes fixed cells/tissues from viable cells/tissues following microwave coagulation therapy

(赤血球の崩壊によりマイクロ波凝固療法後の細胞及び組織の生物活性が評価できる)

審査委員 主査 教授 大久保 岩男

副査 教授 村田 喜代史

副査 教授 永田 啓

## 論文内容要旨

※整理番号	493	(ふりがな) 氏名	やまぐち つよし 山口 剛
学位論文題目	Disruption of erythrocytes distinguishes fixed cells/tissues from viable cells/tissues following microwave coagulation therapy (赤血球の崩壊によりマイクロ波凝固療法後の細胞及び組織の生物活性が評価できる)		
<b>研究の目的</b> マイクロ波凝固療法 (microwave coagulation therapy:以下 MCT) は、近年、肝腫瘍に対する有効かつ低侵襲な治療法として広く行われている。MCT 後の組織は明瞭に 2つの層、すなわち、①電極に接した、酸性フォスファターゼ (acid phosphatase: 以下 AcP) 陰性である inner zone と②その周りの AcP 活性の減弱した outer zone に分かれる。inner zone では、マイクロ波を十分に照射されているにもかかわらず、顕微鏡下で細胞は核を有し組織の構造が非常によく保たれている。この inner zone では、マイクロ波により凝固壊死 (以下 coagulative necrosis) とは異なった、特異的な細胞死である microwave fixation (以下 fixation) を生じていると報告されている。fixation した組織は、少なくとも 1ヶ月は組織の形態を保つが、AcP 活性は認めず、そのメカニズムがまだよくわかっていない。また臨床において、MCT 後の組織を、生検、或いは摘出した場合、その組織が fixation しているのか、再発しているのかということの判別は Hematoxylin-Eosin (以下 HE) 染色では非常に困難であるとされてきた。酵素組織化学染色を用いれば fixation か再発かの診断ができるが、手技に時間がかかり、凍結標本を用いねばならず、ホルマリン固定した標本を用いることができない。fixation のメカニズム、および、マイクロ波により fixation した組織とマイクロ波の非照射領域とを簡便に判別する方法を、HE 染色や、酵素組織化学染色、電子顕微鏡を用いて検討した。			
<b>方法</b> 動物実験：体重約 300g の雄性 Wistar ラットを 14 匹、セボフルランによる全身麻酔下にて開腹し、肝臓に電極を刺入し、20 ワット 20 秒でマイクロ波を照射した。照射直後、2 日後、7 日後、14 日後、16 日後、1 カ月後、3 カ月後に上記と同様の全身麻酔下にて失血により犠死させ、肝臓を摘出し、HE 染色、AcP の酵素組織化学染色を用いて組織学的検討を行った。また、別の Wistar ラット 6 匹をマイクロ波照射直後、および、16 日後に全身麻酔下にて灌流固定し、犠死させ、肝臓を摘出し、電子顕微鏡を用いて組織学的検討を行った。			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。  
 2. ※印の欄には記入しないこと。

臨床検体： 2000年から2003年の間に、8名の患者が、MCT施行後肝腫瘍がMCTのみで制御できなくなったため肝切除を受けた。摘出された肝組織に対しHE染色、AcPの酵素組織化学染色、電子顕微鏡を用いて組織学的検討を行った。

#### 結果

ラットでも臨床検体でも、inner zoneでは、光顕下で組織の構造が保たれ、fixationしていた。しかし、電顕下では細胞内小器官は認められず、細胞膜と核膜は傷害されていた。光顕下でinner zoneでは、非照射の領域と比べ、細胞の大きさがやや小さくなり、好酸性が増していた。光顕下でも電顕下でも赤血球の崩壊が認められた。

#### 考察

今回の我々の結果では、inner zoneの細胞は、細胞膜が傷害されており、細胞の大きさが非照射の細胞より小さくなる。これらより、マイクロ波は細胞膜を傷害して、その内容を放出させると考えられる。つまりinner zoneにおけるfixationの主な原因は細胞膜の障害と考えられる。inner zoneにおいていわゆるcoagulative necrosisが起こらない理由は、inner zoneの細胞のライソゾームの失活、白血球の遊走の欠失の2つが考えられる。necrosisの形態は、酵素による消化と蛋白の変性の2つの作用の結果からなる。fixationでは反応があまりにも急速なので、酵素による消化が生じない。その結果fixationした細胞の形態が保たれるのである。fixationは光顕下でその形態が長期に保持されているという点でcoagulative necrosisとは確かに異なっているが、膜の傷害はcoagulative necrosisに特徴的であり、fixationでみられた細胞質の好酸性は蛋白の変性を示す。ゆえにfixationはcoagulative necrosisの一つの型で酵素による消化が生じないものと考えられる。

我々の目的は、HE染色のみでマイクロ波で焼灼した組織を評価することであった。我々のこの研究は、赤血球の崩壊がマイクロ波によりfixationした組織と非照射の組織を区別するための最も重要な現象であることを示している。焼灼した組織の評価において、赤血球の崩壊が実用的な現象であるという報告は今までにない。

#### 結論

特異的な細胞死であるであるfixationの原因は、マイクロ波による細胞膜の破壊であると推察される。fixationではライソゾームによってもたらされる酵素による消化が欠如するため、組織の構造が比較的長く保たれており、MCTの分野ではfixationと通常のcoagulative necrosisは区別すべきであるが、今回の結果からfixationは酵素による消化が生じない、coagulative necrosisの一亜型と考えられる。赤血球の崩壊の有無が、MCTによりfixationした組織とMCTされていない組織を判別する重要な手がかりとなる。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	493	氏名	山口 剛
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>マイクロ波凝固療法 (MCT) は、近年肝腫瘍に対する有効かつ低侵襲な治療法として普及している。MCT 後の組織には、光顕下で組織構造が保たれた特異的な細胞死である microwave fixation (fixation) した組織が存在し、その評価は従来 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色では非常に困難とされてきた。Fixation のメカニズムを解明し、MCT 後の組織を HE 染色で評価可能か否かを調べるため、マイクロ波照射後のラットの肝組織や、臨床症例の MCT 後の肝組織に対し、HE 染色や、酵素組織化学である acid phosphatase(AcP)染色、電子顕微鏡を用いて検討した。</p> <p>その結果、ラットでも臨床検体でも光顕下で fixation していた組織において AcP 活性を認めず、電顕下では細胞小器官は認められず、細胞膜と核膜は傷害されていた。光顕下でも電顕下でも fixation していた組織に赤血球の崩壊が認められた。</p> <p>以上より、特異的な細胞死である fixation の原因は、マイクロ波による細胞膜の破壊であると推察された。fixation は酵素による消化が生じない、coagulative necrosis の一亜型と考えられた。赤血球の崩壊の有無が、MCT により fixation した組織と MCT されていない組織を判別する重要な手がかりとなると考えられた。</p> <p>本研究は、赤血球の崩壊の有無が MCT により fixation した組織と MCT されていない組織を判別する重要な手がかりとなることを初めて提唱し、fixation のメカニズムを解明したものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 17 年 2 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 17 年 2 月 14 日)			