

称号及び氏名 博士（獣医学） 川部 美史

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 **Canine oral malignant melanoma:evaluation of radiotherapy and profiling of plasma metabolites using gas chromatography mass spectrometry**

(犬の口腔内悪性メラノーマ：放射線治療の評価とガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリーによる血漿中代謝物プロファイル解析)

論文審査委員
主査 小森 雅之
副査 久保 喜平
副査 長谷川 貴史
副査 竹中 重雄

論文要旨

はじめに

口腔内悪性メラノーマは犬で最もよく認められる口腔内悪性腫瘍であり、その予後は非常に悪いことが知られている。無治療での中央生存期間は **2.2** か月と報告されている。放射線治療の有効性が報告されているものの中央生存期間は約 **7** か月であり、外科手術の約 **9** か月と比べると短いため、治療の第一選択は顎骨切除による拡大手術とされている。しかし放射線治療についてはまだ情報が少なく、ステージ毎の予後比較もされていない。

最近の医学研究において、細胞の活動によって生じる特異的な分子を網羅的に解析するメタボロミクスをバイオマーカー探索や疾患診断に応用する試みが活発化し、腫瘍症例において予後判定に有用である可能性が示されている。

そこで本研究では、犬の口腔内悪性メラノーマの症例を **WHO** 分類ガイドラインに基づいてステージ分類し、放射線治療が生存期間に与える影響について評価した。また、メタボロミクスを用いて口腔内悪性メラノーマ症例における血中代謝物の変化を調査するとともに、予後予測の可能性についても検討した。

第1章 放射線治療が生存期間に与える影響

1) 放射線治療実施症例における、ステージ毎の予後

犬の口腔内悪性メラノーマに対して放射線治療を行った症例群において、拡大手術と比較した予後を検証した。

2006年7月から2012年12月に岐阜大学動物病院に初診で来院し、病理にて口腔内悪性メラノーマと診断された犬の中で、治療に放射線を用いその予後が確認できた111例についてステージ毎に回顧的調査を実施した。拡大手術との比較のため、拡大手術を併用した症例は除外した。治療にはオルソボルテージX線、メガボルテージX線、および電子線のいずれかを使用した。それぞれ総線量が35-50Gyとなるよう、照射回数を4-8回、1回線量を6-10Gyでプランニングし、原則1週間の照射間隔で治療を行った。

111症例の体重の中央値は9.8 kg (2.5 - 52 kg)、年齢の中央値は12.2歳 (3 - 17歳)であった。雑種、M.ダックス、L.レトリバーが全体の半数近くを占めたが、それ以外の多くの犬種でも発生が認められた。放射線治療以外に、外科切除による腫瘍の減容積(45例)、化学療法(66例)、COX-2阻害薬(29例)等の治療を併用した。腫瘍の発生部位は、上顎が40例、下顎が38例、口唇、頬粘膜がそれぞれ11例、硬口蓋、軟口蓋がそれぞれ4例、舌が3例であった。発生部位による有意な差は認められなかった。

TMN分類を基にしたWHOのステージ分類では、ステージIが19例、ステージIIが24例、ステージIIIが37例、ステージIVが31例であった。ステージ毎の中央生存期間は、ステージI(758日)で最も生存期間が長く、ステージII(278日)、III(163日)、IV(80日)の順に短くなる傾向が示された。過去の拡大手術の報告と比較して、放射線治療においても同等かそれ以上の生存期間が得られた。

カルテ上に記載のあった放射線障害をVeterinary radiation therapy oncology groupが報告した障害スコアに基づいて、軽度なものからスコア1(50例)、スコア2(36例)、スコア3(9例)に分類した。放射線の直接的な影響以外にも、腫瘍が大きいものや浸潤が重度なものでは腫瘍の縮小に伴い、口腔鼻腔瘻や骨折等の重篤な障害が認められた。

これらの結果より、放射線治療が口腔内悪性メラノーマに対して有用であることが示された。ステージ毎の生存期間は有意に異なっており、放射線治療における予後予測にはTNM分類に基づいたステージ分類が有効であると考えられた。腫瘍の部位や大きさによっては重篤な障害が発生する可能性があるため、治療前の十分な検査と飼い主への説明が重要である。

2) 使用したX線の電圧の差が生存期間に与える影響

メガボルテージX線は高エネルギーX線での三次元原体照射である。多方向から照射が可能のため周囲組織への副作用を軽減できる利点がある反面、使用できる施設に限られる、コストが高い等の問題がある。これに対しオルソボルテージX線は常用電圧で1門もしくは対向2門照射を行っており、メガに比べてコストは低いものの、組織への透過性が低いことによる皮膚や骨への障害が問題になることがある。上記の症例群から電子線を使用した4例を除外し、オルソボルテージX線(68例)あるいはメガボルテージX線(39例)を使用した107例について、生存期間

の違いを検討した。

オルソ使用症例とメガ使用症例の中央生存期間はそれぞれ **121.5** 日と **233** 日で、有意な差が認められた。放射線別に中央生存期間を示すと、ステージⅠ、ステージⅡとステージⅣではメガとオルソの間に有意な差は認められなかったが、ステージⅢにおいてはメガを使用した症例の中央生存期間は **209.5** 日で、オルソの **98.5** 日と比較して有意に長いという結果が得られた。

以上より、ステージⅢ症例ではメガボルテジ **X** 線の使用が有用と考えられた。腫瘍の小さいステージⅠやステージⅡではオルソボルテジでも十分な線量を与えられる可能性があるが、ステージⅢでは腫瘍が大きいため均一な線量分布を得ることができない。加えて周囲への放射線障害のため、総線量を上げることも困難である。これに比べてメガは線量分布を調節できる利点があることから大きな腫瘍に対しても十分な線量を与えることが可能であり、このことが生存期間の差につながったと考えられる。また、ステージⅣ症例では生存期間が原発巣ではなく転移病巣に左右されるため、局所治療である放射線治療では差が出なかったと考えられる。

第2章 血中代謝物の変化と放射線治療が及ぼす影響

1) 健常犬と悪性メラノーマ罹患犬の血中代謝物の比較

これまでの複数の研究において、正常症例と腫瘍罹患症例の間に血中代謝産物の変化が生じている可能性が示されている。本研究では腫瘍を悪性メラノーマに限定し、正常症例と悪性メラノーマ症例における血中代謝物プロファイルの差異について検証するとともに、放射線治療後の血中代謝物プロファイルの変化から腫瘍マーカーとしての可能性を検討することを目的とした。

2009 年 **4** 月から **2012** 年 **11** 月に岐阜大学動物病院に来院し、口腔内悪性メラノーマの治療に放射線を用い、血液検査を実施した **32** 例を疾患群とした。対象として健常犬 **9** 例をコントロール群とした。採取したヘパリン血漿から脂溶性化合物を除去したのち、トリメチルシリル誘導体化したものを分析試料とした。ガスクロマトグラフィー質量分析装置、以下 **GC-MS** により、各種代謝物を測定した。疾患群とコントロール群において同定した代謝物の相対的含有量を比較し、多変量解析を実施した。

GC-MS で検出したイオンを **NIST** ライブラリーで検索し、代謝物の同定を行ったところ、**60** 以上の代謝物を検出することができた。いくつかの代謝物で症例群とコントロール群で検出率に差があった。検出された代謝物のうち、すべての血漿に共通して認められた **46** の代謝物のみで **OPLS-DA** スコアプロットを実施した結果、コントロール群と症例群は異なるものとして認識された。すなわちこのことはそれぞれの群間で血漿代謝物プロファイルに差があることを示している。

46 の代謝物のうち、**12** の代謝物に有意差が認められた。変化の認められた代謝物のうち、アミノ酸は減少、脂肪酸は増加する傾向が示された。疾患群における脂肪酸の増加は、代謝亢進状態であることを示していると考えられる。アミノ酸の変化は腫瘍の侵襲性や生存率に関与することが報告されている。また、リンパ腫で変化の認められたものとは異なるアミノ酸に変化が認められたことから、腫瘍の特定に役立つ可能性が示唆された。

2) 放射線治療前後での代謝プロファイルの変化

悪性メラノーマの診断バイオマーカーとしての有用性を検討するため、放射線治療前後の代謝プロファイル変化を検討した。

症例群 **32** 例の治療後の血漿を用いて前述の **OPLS-DA** モデルによる判定を実施した。正常群との比較において、治療後症例群の **1** 例のみが正常群として評価された。この **1** 例は初診時のステージが **I** であり、放射線治療後に完全寛解が得られ、再発や進行病変を認めることなく長期生存が得られた症例であった。しかし同様にステージ **I** で完全寛解し、長期生存した症例がもう **1** 例あったが、こちらは症例群として評価された。前者は治療後の採血を治療の半年後に行っており、後者は治療直後に行っていた。この **2** 例の違いは代謝プロファイルが正常に戻るまでの期間を反映している可能性がある。

総括

第一章では放射線治療が犬の口腔内悪性メラノーマ症例に対して有用な治療法であることを明らかにした。中央生存期間は臨床ステージが高いものほど短く、使用した放射線の比較からステージ **III** 症例におけるメガボルテージ **X** 線の優位性を明らかにした。第二章では **GC-MS** による血中代謝物プロファイル検出が犬の口腔内悪性メラノーマ症例を診断するツールとして有用であることを明らかにした。その知見は犬の口腔内悪性メラノーマの早期発見や治療後の予後予測に有用なバイオマーカーになり得る可能性がある。

審査結果の要旨

口腔内悪性メラノーマは犬で最もよく認められる口腔内悪性腫瘍であり、その予後は非常に悪く、無治療での中央生存期間は **2.2** か月と報告されている。本疾患に対する放射線治療の有効性が報告されているものの中央生存期間は約 **7** か月であり、外科手術の約 **9** か月と比べると短いため、治療の第一選択は顎骨切除による拡大手術とされている。しかし、本疾患に対する放射線治療についてはまだ情報が少なく、ステージ毎の予後比較もされていない。

一方、最近の医学研究において、細胞の活動によって生じる特異的な分子を網羅的に解析するメタボロミクスをバイオマーカー探索や疾患診断に応用する試みが活発化し、腫瘍症例において予後判定に有用である可能性が示されている。そこで本研究では、犬の口腔内悪性メラノーマの症例を **WHO** 分類ガイドラインに基づいてステージ分類し、放射線治療が生存期間に与える影響について評価した。また、メタボロミクスを用いて口腔内悪性メラノーマ症例における血中代謝物の変化を調べるとともに、予後予測の可能性についても検討した。

第 **1** 章では、放射線治療が生存期間に与える影響を評価するために、犬の口腔内悪性メラノーマに対して放射線治療を行った症例群において、拡大手術と比較したステージ毎の予後を検証した。2006 年から 2012 年に岐阜大学動物病院に初診で来院し、病理組織学的検査に

て口腔内悪性メラノーマと診断された犬の中で、治療に放射線を用いその予後が確認できた111例についてステージ毎に回顧的調査を実施した。111症例の体重の中央値は9.8 kg (2.5 - 52 kg)、年齢の中央値は12.2歳 (3 - 17歳)であった。腫瘍の発生部位は、上顎が40例、下顎が38例、口唇と頬粘膜がそれぞれ11例、硬口蓋と軟口蓋がそれぞれ4例、舌が3例であったが、発生部位による有意な差は認められなかった。TNM分類を基にしたWHOのステージ分類では、ステージⅠが19例、ステージⅡが24例、ステージⅢが37例、ステージⅣが31例であった。ステージ毎の中央生存期間は、ステージⅠ(758日)で最も生存期間が長く、ステージⅡ(278日)、Ⅲ(163日)、Ⅳ(80日)の順に短くなる傾向が示された。過去の拡大手術の報告と比較して、放射線治療においても同等かそれ以上の生存期間が得られた。以上の結果より、放射線治療が口腔内悪性メラノーマに対して有用であることが示されたが、ステージ毎の生存期間は有意に異なっており、放射線治療における予後予測にはTNM分類に基づいたステージ分類が有効であると考えられた。

次に、使用したX線の電圧の差が生存期間に与える影響を評価するために、上記の症例群から電子線を使用した4例を除外し、オルソボルテージX線(オルソ、68例)あるいはメガボルテージX線(メガ、39例)を使用した107例について検討した。オルソおよびメガ使用症例の中央生存期間はそれぞれ121.5日と233日で、有意な差が認められた。また、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅳではメガとオルソ間で中央生存期間に有意な差は認められなかったが、ステージⅢではメガの中央生存期間は209.5日で、オルソの98.5日に比べて有意に長く、ステージⅢ症例ではメガボルテージX線の使用が有用と考えられた。

第2章では、腫瘍を悪性メラノーマに限定し、正常症例と悪性メラノーマ症例における血中代謝物プロファイルの差異について検証するとともに、放射線治療後の血中代謝物プロファイルの変化から腫瘍マーカーとしての可能性を検討した。2009年から2012年に岐阜大学動物病院に来院し、口腔内悪性メラノーマの治療に放射線を用い、血液検査を実施した32例を疾患群とした。対象として健常犬9例をコントロール群とした。採取したヘパリン血漿から脂溶性化合物を除去したのち、トリメチルシリル誘導体化したものを分析試料とし、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)により、各種代謝物を測定した。疾患群とコントロール群において同定した代謝物の相対的含有量を比較し、多変量解析(OPLS-DA法)を実施したところ、すべての血漿に共通して検出された46の代謝物のうち、12の代謝物に有意差が認められた。変化の認められた代謝物のうち、アミノ酸は減少、脂肪酸は増加する傾向が示された。

次に、悪性メラノーマの診断バイオマーカーとしての有用性を検討するため、放射線治療前後の代謝プロファイル変化を検討した。症例群32例の治療後の血漿を用いて前述のOPLS-DA法による判定を実施したところ、正常群との比較において、治療後症例群の1例(治療半年後に採血)のみが正常群として評価された。この1例は初診時のステージがⅠであり、放射線治療後に完全寛解が得られ、再発や進行病変を認めることなく長期生存が得られた症例であった。また、悪性メラノーマの放射線治療後では正常群や治療前と比べて、その代謝物プロファイルに変化が生じていることが明らかとなった。

以上のように、本研究は、放射線治療が犬の口腔内悪性メラノーマ症例に対して有用な治療法であることを明らかにした。また、中央生存期間は臨床ステージが高いものほど短く、使用した放射線の比較からステージⅢ症例におけるメガボルテージX線の優位性を明らかにした。さらに、GC-MSによる血中代謝物プロファイル解析が犬の口腔内悪性メラノーマの早

期発見や治療後の予後予測に有用なバイオマーカーになり得る可能性を示した。これらの成果は、獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。