

Fig. 8 Photographs before (A) and after gross total resection of the tumor (B)

White and black arrows indicate the central sulcus and the precentral sulcus, respectively.

① and ② (indicate) hand-digit motor area, ③ hand-arm motor area, ④ upper arm motor area, ⑤ leg motor area, ⑥ leg-knee motor area, identified by direct cortical stimulation.

収縮が得られることを確認した。さらに摘出腔後壁から外側壁で皮質下刺激を行うと、下肢の筋収縮が得られ、皮質脊髄路が摘出腔後壁から外側壁に連続して露出していることが確認された。止血操作、閉頭を行った。

術後経過：術直後軽度の右下肢の麻痺を認めたもののすぐに独歩可能となった。術後のMRIにて腫瘍が全摘され、周囲の正常脳組織にはまったく障害がないことが確認された (Fig. 1)。

組織は ganglioglioma であり、術後11日目の2001年2月26日神経学的脱落症状なく自宅退院となった。現在高校1年生として通常の生活を送っている。

考 察

運動野は、解剖学的特徴から area 4 と 6 で、機能的特徴から一次運動野、補足運動野、外側前運動野に分けられている。Brodmann の大脳領野をみると area 4 は決して中心前回すべてではなく、中心溝側に偏在している。Geyer ら¹⁾ はサルの大脳解剖より、Brodmann の area 4 にあたるベツ錐体細胞を有する一次運動野は、中心溝の直前に存在していると報告している。

一方、area 6 にあたる補足運動野 (supplementary motor area (SMA) proper; pre SMA) と外側前運動野はより前方に広く広がっており、area 6 により外的もしくは内的刺激に対して自発運動を準備し、それを area 4 が実際に行うと報告している¹⁾。

実際に人間の脳でこのような概念は完全には確立して

はおらず、また今回のような顔面運動野より内側上方の前中心回自体に存在する神経膠腫摘出に關しての報告がみられないため、中心溝側の一次運動野を温存すれば永続的な麻痺症状をきたさないかどうかに関しては、今後検討すべき課題が多く残されている。

機能マッピングの結果から神経膠腫内に機能領域が認められることが報告されている⁶⁾。gliomatosis cerebri のように機能領域を含んで広範囲に腫瘍が存在しても、まったく神経学的脱落症状が認められない症例をみることから、神経膠腫の浸潤領域に脳機能が残存することは明らかである。

一方、解剖学的機能領域近傍の神経膠腫で神経学的脱落症状がなく、T1強調画像とT2強調画像の異常信号域が一致し、腫瘍が膨張性に拡大したことが予想される症例では、腫瘍内には機能は存在せず、周辺に偏位した機能領域を温存すれば機能障害なく腫瘍摘出が可能なのではないか。MRI が導入される前から脳実質を切除してきた諸先輩方から伝えられる、「神経膠腫では、術前症状がある症例は摘出によってその症状は悪化し、一見機能領域に存在するかのようにみえても症状がない症例は摘出することは可能である」という言葉は、上記のような理由によるのではないかと考えられる。

以上より、手指の領域よりも内側上方の中心前回に存在しても、前方から発生し中心溝を後方に圧排するように膨張性に増大した神経膠腫であれば、永続的な麻痺症状のない摘出の可能性が示唆される。

本稿の一部は、第21回日本脳神経外科コンgres (山形, 2001) プレナリーセッションにて発表した。

文 献

- 1) Geyer S, Matelli M, Luppino G, Zilles K: Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. *Anat Embryol (Berl)* 202: 443-474, 2000.
- 2) Inoue T, Shimizu H, Yoshimoto T: Imaging the pyramidal tract in patients with brain tumors. *Clin Neurol Neurosurg* 101: 4-10, 1999.
- 3) 隈部俊宏, 中里信和, 佐藤清貴, 日向野修一, 高橋昭喜, 園田順彦, 川岸 潤, 吉本高志: 運動野神経膠腫摘出における awake craniotomy と direct cortical stimulation による術中 functional brain mapping. *脳外* 25: 823-828, 1997.
- 4) 隈部俊宏, 中里信和, 鈴木匡子, 永松謙一, 岩崎真樹, 井上 敬, 吉本高志: 運動領野周辺神経膠腫に対する手術-術前解剖学および機能的マッピングの融合とニューロナビゲーションシステムおよび術中マッピング併用による運動機能温存手術. *脳外誌* 10: 56-64, 2001.
- 5) LeRoux PD, Berger MS, Haglund MM, Pilcher WH, Ojemann GA: Resection of intrinsic tumors from nondominant face motor cortex using stimulation mapping: Report of two cases. *Surg Neurol* 36: 44-48, 1991.
- 6) Skirboll SS, Ojemann GA, Berger MS, Lettich E, Winn HR: Functional cortex and subcortical white matter located within gliomas. *Neurosurgery* 38: 678-685, 1996.
- 7) Yousry TA, Schmid UD, Alkadhi H, Schmidt D, Peraud A, Buettner A, Winkler P: Localization of the motor hand area to a knob on the precentral gyrus. *Brain* 120: 141-157, 1997.

要 旨

中心前回に存在する神経膠腫の手術

隈部 俊宏 中里 信和 岩崎 真樹 永松 謙一
清水 宏明 吉本 高志

中心前回に存在する境界明瞭な神経節膠腫が原因となって痙攣発作にて発症した15歳女性に対して、術前機能マッピングを行った結果、腫瘍は下肢運動野を後方へ圧排偏位し、下降する錐体路を後方から外側に圧排して存在することが予想された。術中機能マッピングを行い、ニューロナビゲーションシステムを併用して腫瘍摘出を行った。中心前回の前半分を直接電気刺激しても下肢の運動誘発を認めず、この領域を除去して腫瘍全摘出を行うことが可能であった。

手指の領域よりも内側上方の中心前回に存在しても、前方から発生し中心溝を後方に圧排するように膨張性に増大した神経膠腫であれば、永続的な麻痺症状のない摘出の可能性が示唆される。

脳外誌 11: 271-277, 2002

Influence of p53 Mutations on Prognosis of Patients with Glioblastoma

Shoji Shiraishi, M.D.¹

Kenji Tada, M.D.¹

Hideo Nakamura, M.D., Ph.D.¹

Keishi Makino, M.D., Ph.D.¹

Masato Kochi, M.D., Ph.D.¹

Hideyuki Saya, M.D., Ph.D.²

Jun-ichi Kuratsu, M.D., Ph.D.³

Yukitaka Ushio, M.D., Ph.D.¹

¹ Department of Neurosurgery, Kumamoto University Medical School, Kumamoto, Japan.

² Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University Medical School, Kumamoto, Japan.

³ Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima, Japan.

Presented at the 14th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Asheville, North Carolina, May 27–30, 2001.

Supported by a grant-in-aid from the Ministry of Education, Sports, Science, and Culture of Japan.

The authors thank Dr. Mitsuhiro Tada, Division of Cell Biology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine for providing the expression plasmid vector pss16 and the reporter yeast strain yIG397.

Address for reprints: Shoji Shiraishi, M.D., Department of Neurosurgery, Kumamoto University Medical School, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan; Fax: +81-96-371-8064; E-mail: sshira@fc.kumamoto-u.ac.jp

Received October 17, 2001; revision received January 30, 2002; accepted February 15, 2002.

BACKGROUND. The influence of *p53* mutations on the biology of astrocytic tumors is controversial. *p53* is thought to be inactivated in the early stage of gliomagenesis; however, what role its inactivation plays in the malignancy of gliomas remains unknown. To understand the significance of *p53* inactivation, the authors identified the locus of *p53* gene mutation in glioma samples at different stages of progression and studied the correlation between the mutation and clinical behavior.

METHODS. Samples from newly diagnosed gliomas, including pure and mixed astrocytomas, were analyzed for *p53* mutations using a yeast functional assay. To determine the locus of the gene mutations, DNA sequencing was performed.

RESULTS. The incidence of *p53* mutations was higher in anaplastic astrocytomas (AA, 48%) than glioblastomas (GBM, 31%). There was no significant difference in the average ages of GBM patients with and without *p53* mutations (54.9 years \pm 2.3 and 53.2 years \pm 4.6, respectively). In GBM patients, the mutation did not affect progression free survival or overall survival. Astrocytomas and GBM differed in the distribution of *p53* mutation loci.

CONCLUSIONS. The *p53* gene mutation does not markedly affect the survival of GBM patients. The difference in the location of *p53* mutations between AA and GBM suggests that in gliomas, the *p53* mutation may contribute not only to tumorigenesis (as an early event) but also to progression to malignancy (as a late event). *Cancer* 2002;95:249–57. © 2002 American Cancer Society.

DOI 10.1002/cncr.10677

KEYWORDS: *p53*, astrocytoma, glioblastoma, yeast functional assay, prognosis, tumorigenesis.

Astrocytic tumors are the most common adult neoplasms of the central nervous system. They have been classified into four clinico-pathologic groups: pilocytic- (PA), diffuse- (DA), and anaplastic astrocytoma (AA), and glioblastoma multiforme (GBM).¹ However, PA is thought to be clinically and genetically distinct from the other astrocytic tumors.^{2,3} In addition, GBMs have been divided into two subgroups based on clinical and biologic features. Primary GBMs arise de novo, while secondary GBMs are the result of progression from lower grade astrocytomas. These tumors can now be characterized by their molecular genetic backgrounds. Some have suggested that primary and secondary GBMs are distinct disease entities that evolve via different genetic pathways.^{4,5} Primary GBMs are characterized by amplification/overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR),^{6,7} homozygous deletion of *p16*,^{8,9} amplification/overexpression of murine double minute 2 (MDM2),^{10,11} and the entire loss of chromosome 10.¹²

Secondary GBMs are characterized by functional loss of TP53 mainly caused by the gene mutations^{13,14} and partial or complete loss of chromosome 10q.¹² As the *p53* gene mutation has been shown to occur in the early stage of progression to secondary GBM,^{14,15-19} it can presumably be present in astrocytic tumors of different stages. Whether the mutation affects sensitivity to therapy and prognosis remains controversial.²⁰⁻²⁷ To clarify whether *p53* mutations affect the clinical biology of these tumors, we explored the *p53* status of 123 surgical specimens using a well-established yeast functional assay. Mutations of the *p53* gene were identified by DNA sequencing.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Tissue Specimens

The samples analyzed in the current study were obtained from the Department of Neurosurgery at Kumamoto University Hospital, Kumamoto, Japan, and its affiliated hospitals. They were from newly diagnosed, consecutive patients treated between 1995 and 2000. There were 73 males and 50 females ranging in age from 0 to 78 years (mean, 45 years). The patients and/or their legal guardians gave written informed consent for use of their specimens. Tumor specimens were obtained by surgical resection (including biopsy), quickly frozen, and kept at -80°C until use. Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were subjected to histopathologic examination. Each specimen was classified according to established World Health Organization criteria.¹ The presence or absence of high cellularity, nuclear atypia, mitoses, microvascular proliferation, and necrosis were recorded. The presence of necrosis and/or microvascular proliferation was used as major criteria to distinguish between GBMs and AAs. There were 9 PAs, 15 DAs, 23 AAs, 55 supratentorial GBMs, 4 brain stem GBMs, 2 giant cell glioblastomas, 1 oligoastrocytoma, and 14 anaplastic oligoastrocytomas. All patients underwent surgical resection (including biopsy) with or without postoperative radiotherapy and/or nitrosourea-based chemotherapy. Most GBM patients younger than 70 years received both radio- and chemotherapy; older patients usually underwent only radiotherapy. To determine the extent of surgical resection we performed postoperative magnetic resonance imaging (MRI) study. Total resection was recorded when there were no residual lesions, subtotal resection when less than 10% of the preoperative mass remained, and partial resection when more than 10%

of the mass remained. For analysis, subtotal and partial resections were combined into the subtotal resection group. All patients were reevaluated after receiving initial adjuvant therapy; at periodical followup visit, MRI was performed. Clinical details including the Karnofsky performance status (KPS) at the time of diagnosis, the extent of surgery, date of recurrence (or regrowth) on MRI, and date of death were recorded.

mRNA Extraction and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

The mRNA was extracted from the frozen tissue samples using the Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) and random hexamer-primed single-strand cDNA was synthesized using the SUPERScript Preamplification System (Life Technologies, Rockville, MD) according to the manufacturer's instructions. To amplify the *p53* cDNA, polymerase chain reaction (PCR) was performed in 25 μL of reaction mixture containing 2.5 μL of 10 X Pfu buffer (Stratagene, La Jolla, CA), 1.25 units of Pfu polymerase (Stratagene), 100 ng of each primer (50 μM of dNTPs, and 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide) using a Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) for 5 minutes at 94°C , for 35 cycles of 40 seconds at 94°C , 70 seconds at 65°C , 90 seconds at 78°C ; then for 6 minutes at 78°C . The *p53* specific primers for a 1 kb fragment encompassing codons 53-364 (exons 4-10) were P3 (5'-ATT TGA TGC TGT CCC CGG ACG ATA TTG AAsC-3', where s represents a phosphorothioate linkage) and P4 (5'-ACC CTT TTT GGA CTT CAG GTC GCT GGA GTsG-3').²⁸

Yeast Functional Assay

To investigate the *p53* gene status in various glioma subtypes, we performed a yeast functional assay as previously described.²⁸ Briefly, the *p53* PCR product and linearized *p53*-expression vector pSS16 were co-transfected into the reporter yeast strain yIG397 using the lithium acetate procedure. The transformed yeast cells were plated, incubated at 30°C for two days to generate colonies, and stored at 4°C overnight to develop color. At least 200 colonies were examined for each plate. When more than 15% of the colonies were red, we judged the sample positive for *p53* functional loss and proceeded to sequencing analysis.

DNA Sequencing

To examine possible effects of *p53* mutations in gliomas, we performed DNA sequencing on samples

judged positive for the mutation. Eight red colonies from each positive plate were randomly picked and *p53* fragments were amplified by direct PCR with P3 and P4 primers, using rTth polymerase (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR products were separated on an 0.8% agarose, then the DNA bands were excised and purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were performed with P3 and P4 primers using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems). The sequencing instrument was an ABI377 automated sequencer (PE Applied Biosystems).

Statistical Analysis

Few patients with GBM, the most malignant glioma subtype, are treated successfully. To clarify whether *p53* gene mutations contribute to the malignancy of GBM, we analyzed the association between *p53* status and clinical parameters in adult patients with cerebral GBM. Progression free survival (PFS) and overall survival (OS) were calculated from the day of surgery to the day of recurrence or death. We used the student *t* test to evaluate the relationship between *p53* status and age and the chi-square test to determine the relationship between *p53* status and gender. The effect of different parameters, i.e., age (54 vs 55), gender, preoperative KPS (60 vs 70), extent of surgical resection (total vs subtotal/biopsy), and *p53* mutation status (intact vs mutated), on the Kaplan-Meier survival curve of PFS or OS was analyzed using the log rank (Mantel-Cox) test. The independent effect of each parameter on PFS and OS was analyzed using the multivariate Cox proportional hazards regression model. Also, to clarify the overall effect of *p53* status on clinical behavior regardless of tumor grade, we performed the same survival analyses on the entire patient population, including DA, AA, and GBM. All calculations were performed using Statview statistical software (Version 5.0; Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). *P* values lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

p53 Mutations and Statistical Analyses in GBM Patients

Clinical data and the results of mutation analysis are summarized in Table 1. *P53* mutations were present in 48% of AAs and 31% of supratentorial GBMs; they were less frequent, or absent, in the other subtypes. The ages of GBM patients with and without *p53* mutations were 53.2 ± 4.6 and 54.9 ± 2.3 years, respectively; there was no significant difference in

age or gender between these two groups. The median survival of GBM patients carrying the mutation was 69.7 ± 16.2 weeks; it was 71.2 ± 3.4 weeks for GBM patients with normal *p53*, and the difference was not statistically significant. *p53* mutations had no influence on PFS or OS not only in GBM (Fig. 1) but also in overall astrocytic tumors, including low grade and anaplastic astrocytomas (Fig. 2); OS was longer in younger patients (≤ 54) and those with a higher KPS ($70 \leq$; $P = 0.003$ and $P = 0.017$, respectively; Tables 2 and 3).

Sequencing Analysis

Of an overall 34 mutations, 28 (82%) were missense mutations; of these, 14 (50%) were located on hot spots. There was only one nonsense mutation (Patient 94, Table 1). Of the 28 missense mutations, 24 (86%) were transition mutations. There was no significance in these mutational characteristics in AA and GBM (Table 4). Of the 34 mutations, 4 (12%) were base deletions; one was a base insertion mutation. With respect to mutation location, 8 of 11 (73%) *p53* mutations in AA and 4 of 17 (24%) in GBM were located on exon 8 (Tables 1 and 4); the difference between AA and GBM was significant at $P = 0.01$.

DISCUSSION

The tumor suppressor *p53* gene mutation is a genetic alteration often seen in astrocytic tumors, especially malignant gliomas, including AA and GBM. This mutation has been documented by single-strand conformational polymorphism study,^{21,22,26,29} immunohistochemistry,^{13,15,18,30} and yeast functional assays.^{28,31}

The aim of the current study was to categorize gliomas genetically to promote the development of evidence based cancer therapies. If such genetics based treatment becomes available, a patient's *p53* status must be known. The yeast functional assay we employed can detect only loss-of-function mutations. However, it is simple and its results are reproducible,^{31,32} and we found it to be as sensitive as other assays for the detection of mutations in the *p53* gene. We consider the yeast functional assay best suited for our current studies.

The influence of *p53* mutations in gliomas has already been discussed.¹ Tumor cells carrying *p53* mutations are resistant to apoptosis induced by DNA damage, while an overexpression of wild-type *p53* enhances the radiosensitivity of glioma cells.³³⁻³⁵ However, the effect of *p53* mutations on the efficacy of radio- and chemosensitivity in patients with gliomas, especially GBMs, remains controversial. Some have reported that the *p53* status of GBM patients did not affect their survival^{22,29} or

TABLE 1
Genetic Status and Clinical Features of Patients with Glioma

No.	Age in years	Gender	WHO Class	WHO Grade	<i>p53</i> Mutation					KPS	Resect
					Mutation	Exon	Codon	Base change	AA change		
1	2	M	PA	1	N						
2	9	F	PA	1	N						
3	20	M	PA	1	N						
4	8	M	PA	1	N						
5	6	M	PA	1	N						
6	9	F	PA	1	N						
7	6	M	PA	1	N						
8	6	M	PA	1	N						
9	36	M	PA	1	N						
10	43	F	DA	2	N					90	total
11	48	M	DA	2	N					100	subtotal
12	62	M	DA	2	N					100	subtotal
13	4	M	DA	2	N					90	total
14	43	F	DA	2	N					100	subtotal
15	50	M	DA	2	N					80	subtotal
16	78	M	DA	2	N					80	biopsy
17	70	M	DA	2	N					90	biopsy
18	35	M	DA	2	N					80	subtotal
19	23	M	DA	2	N					80	biopsy
20	0	F	DA	2	N					90	total
21	41	F	DA	2	N					NR	subtotal
22	60	F	DA	2	P	6	220	tat to tgt	Y to C	160	total
23	62	M	DA	2	P	8	273	cgt to tgt	R to C	100	subtotal
24	39	M	DA	2	P	8	273	cgt to tgt	R to C	100	total
25	38	F	AA	3	N					100	NR
26	62	M	AA	3	N					70	biopsy
27	26	M	AA	3	N					70	subtotal
28	43	M	AA	3	N					NR	NR
29	43	M	AA	3	N					100	biopsy
30	72	M	AA	3	N					100	subtotal
31	50	F	AA	3	N					70	subtotal
32	68	F	AA	3	N					90	total
33	20	M	AA	3	N					70	subtotal
34	35	M	AA	3	N					100	subtotal
35	43	F	AA	3	N					100	total
36	26	M	AA	3	N					90	biopsy
37	54	F	AA	3	P	6	213	cga to caa	R to E	70	subtotal
38	41	M	AA	3	P	7	248	cgg to cag	R to Q	100	total
39	43	F	AA	3	P	7	261	agt to agg	S to R+ ins.	100	subtotal
40	40	M	AA	3	P	8	264	cta del.	L del.	100	subtotal
41	18	F	AA	3	P	8	273	cgt to cat	R to H	70	total
42	31	M	AA	3	P	8	273	cgt to tgt	R to C	100	subtotal
43	42	F	AA	3	P	8	273	cgt to tgt	R to C	90	biopsy
44	29	M	AA	3	P	8	273	cgt to cat	R to H	100	subtotal
45	56	F	AA	3	P	8	273	cgt to tgt	R to C	100	total
46	37	F	AA	3	P	8	280	aga to gga	R to G	20	subtotal
47	48	M	AA	3	P	8	280	aga to aaa	R to K	100	subtotal
48	54	M	GBM	4	N					70	total
49	69	F	GBM	4	N					80	subtotal
50	56	M	GBM	4	N					90	total
51	53	F	GBM	4	N					70	subtotal
52	54	F	GBM	4	N					50	subtotal
53	71	F	GBM	4	N					70	subtotal
54	75	F	GBM	4	N					60	total
55	66	F	GBM	4	N					100	subtotal
56	51	F	GBM	4	N					50	subtotal
57	63	F	GBM	4	N					100	subtotal
58	45	M	GBM	4	N					100	total
59	74	F	GBM	4	N					60	total
60	54	M	GBM	4	N					70	subtotal
61	29	F	GBM	4	N					70	biopsy
62	25	M	GBM	4	N					60	subtotal
63	59	M	GBM	4	N					90	biopsy

(continued)

TABLE 1
(continued)

No.	Age in years	Gender	WHO Class	WHO Grade	p53 Mutation					KPS	Resect	
					Mutation	Exon	Codon	Base change	AA change			
64	54	M	GBM	4	N					70	subtotal	
65	51	F	GBM	4	N					90	subtotal	
66	64	M	GBM	4	N					90	subtotal	
67	38	F	GBM	4	N					10	subtotal	
68	61	F	GBM	4	N					90	biopsy	
69	47	M	GBM	4	N					90	total	
70	53	M	GBM	4	N					60	subtotal	
71	53	M	GBM	4	N					90	biopsy	
72	45	M	GBM	4	N					70	total	
73	72	M	GBM	4	N					100	subtotal	
74	52	F	GBM	4	N					70	subtotal	
75	40	M	GBM	4	N					80	total	
76	68	M	GBM	4	N					60	subtotal	
77	73	F	GBM	4	N					50	total	
78	71	F	GBM	4	N					100	subtotal	
79	48	M	GBM	4	N					100	total	
80	64	F	GBM	4	N					70	total	
81	65	M	GBM	4	N					90	subtotal	
82	21	M	GBM	4	N					100	biopsy	
83	61	M	GBM	4	N					70	total	
84	20	F	GBM	4	N					60	total	
85	89	M	GBM	4	N					80	subtotal	
86	17	F	GBM	4	P		4	90 to 105	del.	100	subtotal	
87	60	M	GBM	4	P		5	131	aac to del.	N to del.	70	subtotal
88	33	M	GBM	4	P		5	158	cgc to ctc	R to L	70	subtotal
89	71	M	GBM	4	P		5	175	cgc to cac	R to H	60	subtotal
90	71	M	GBM	4	P		5	179	cat to tat	H to Y	NR	subtotal
91	23	M	GBM	4	P		5	179	cat to ctt	H to L	50	biopsy
92	54	M	GBM	4	P		6	190	cct to ctt	P to L	60	total
93	23	F	GBM	4	P		6	195	atc to acc	I to T	100	subtotal
94	45	M	GBM	4	P		6	196	cga to tga	R to stop	100	total
95	47	M	GBM	4	P		7	245	ggc to agc	G to S	60	subtotal
96	77	F	GBM	4	P		7	246	atg to gtg	M to V	70	subtotal
97	74	M	GBM	4	P		7	248	cgg to tgg	R to W	80	subtotal
98	67	F	GBM	4	P		7	251	atc to ttc	I to F	90	total
99	56	F	GBM	4	P		8	267	cgg to tgg	R to W	80	subtotal
100	64	M	GBM	4	P		8	273	cgt to ggt	R to G	70	total
101	55	M	GBM	4	P		8	273	cgt to tgt	R to C	60	biopsy
102	89	F	GBM	4	P		8	282	cgg to tgg	R to W	80	subtotal
103	71	M	GBM, BS	4	N							
104	53	M	GBM, BS	4	N							
105	4	F	GBM, BS	4	N							
106	3	M	GBM, BS	4	P		8	277	tgt to ttt	C to F		
107	22	F	GGB	4	N							
108	32	F	GGB	4	P		5	148	cgg to cag	R to Q		
109	47	M	AOA	3	N							
110	42	F	AOA	3	N							
111	49	F	AOA	3	N							
112	51	F	AOA	3	N							
113	39	M	AOA	3	N							
114		M	AOA	3	N							
115	52	M	AOA	3	N							
116	43	M	AOA	3	N							
117	44	F	AOA	3	N							
118	37	M	AOA	4	N							
119	66	M	AOA	4	N							
120	65	F	AOA	4	N							
121	58	M	AOA	4	N							
122	45	F	AOA	3	P		5	131	aac del.	N del.		
123	1	M	OA	2	N							

WHO: World Health Organization; AA change: amino acid change; KPS: Karnofsky performance status; Resect: extent of resection; M: male; F: female; PA: pilocytic astrocytoma; DA: diffuse astrocytoma; AA: anaplastic astrocytoma; GBM: glioblastoma multiforme; BS: brain stem; AOA: anaplastic oligoastrocytoma; OA: oligoastrocytoma; GGB: giant cell glioblastoma; N: negative; P: positive; del: deletion; ins: insertion; stop: stop codon; NR: not recorded.

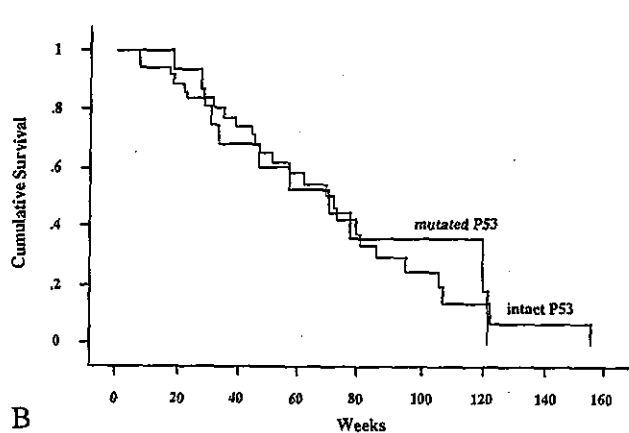
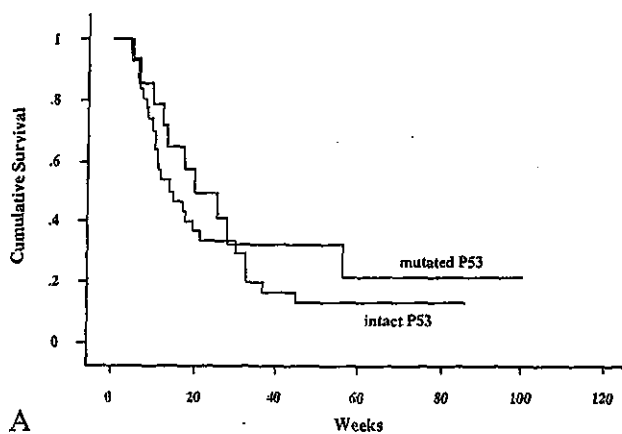


FIGURE 1. Kaplan-Meier A) progression free and B) overall survival curves in glioblastoma patients with mutated (black line, $n = 17$) or intact (gray line, $n = 38$) $p53$ ($P > 0.05$ in both A and B).

sensitivity to radiotherapy.²¹ Others have shown that the presence of $p53$ gene mutations in GBM was associated with longer survival^{23,26} and a better radiation response.²³

The current data show that the time to tumor progression after surgery in patients receiving radiochemotherapy was not affected by the presence of $p53$ mutation. Therefore, the $p53$ gene mutation alone does not account for the radiochemoresistance of GBM. In fact, there is some evidence that $p21$ overexpression due to wild-type $p53$ overexpression results in radioresistance^{36,37} and chemoresistance³⁸ in glioma, and that drug-resistance gene expressions render glioma cells chemoresistant.³⁹

Diverse gene alterations are involved in glioblastoma progression. The $MDM2$ oncogene, whose product degrades and inactivates $p53$ protein,^{40,41} is amplified and overexpressed in approximately 10% of GBMs, particularly primary GBMs with intact

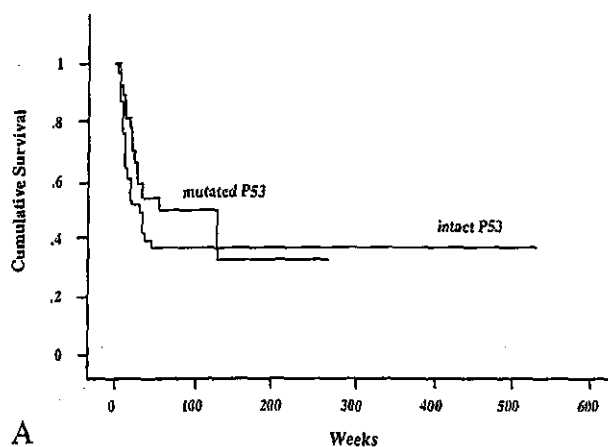


FIGURE 2. Kaplan-Meier A) progression free and B) overall survival curves in patients with diffuse astrocytoma ($n = 15$), anaplastic astrocytoma ($n = 23$), and glioblastoma ($n = 55$) with mutated ($n = 31$) or intact ($n = 62$) $p53$ ($P > 0.05$ in both A and B).

$p53$.¹⁰ Amplification of $MDM2$ leads to inhibition of the tumor-suppressive effects of $p53$. In gliomas, transcription of a short alternative splice variant of $MDM2$ is frequently observed.^{42,43} It has been reported⁴⁴ that the variant lacks the ability to bind $p53$ protein for its degradation. This may be one explanation for the observation that in 30% of primary GBMs there is accumulation of wild-type $p53$ protein. The $p53$ mutation occurs early in the progression from low grade diffuse astrocytoma to glioblastoma.¹ We posit that in secondary GBMs that manifest the mutation, the mutation may be carried over from earlier stages in tumor progression. We found that in 73% of AAs and 24% of GBMs, the $p53$ mutation was localized to exon 8. This suggests that AAs containing the $p53$ mutation on exon 8 have a lower tendency for malignant progression. If this were not the case, GBMs could be expected to have

TABLE 2
Univariate Analysis for Prognosis Factors in GBM

Characteristic	No. of cases	PFS		OS		
		Median ± SE (weeks)	P values	Median ± SE (weeks)	P values	
Age	54 ≥	27	14.4 ± 3.6	0.869	80.3 ± 7.7	0.018
	55 ≤	28	18.0 ± 2.6		46.3 ± 20.6	
Gender	Male	31	17.5 ± 4.7	0.863	61.4 ± 25.0	0.390
	Female	24	17.1 ± 6.1		71.3 ± 3.0	
KPS	60 ≥	15	9.9 ± 1.8	0.050	50.4 ± 10.1	0.055
	70 ≤	39	20.3 ± 2.5		78.3 ± 11.9	
	Not recorded	1				
Extent of resection						
p53 status	Subtotal/biopsy	37	14.1 ± 1.0	0.030	68.6 ± 12.4	0.639
	Total	18	44.9 ± 34.0		71.3 ± 5.0	
	Intact	38	14.4 ± 4.1	0.364	71.2 ± 3.4	0.925
	Mutated	17	20.3 ± 6.6		69.7 ± 16.2	

GBM: glioblastoma multiforme; PFS: progression free survival; OS: overall survival; SE: standard error; KPS: Karnofsky performance score. P values lower than 0.05 were considered significant.

TABLE 3
Multivariate Analysis for Prognosis Factors in GBM

Factor	PFS			OS		
	Hazard ratio	95% Confidence interval	P values	Hazard ratio	95% Confidence interval	P values
Age (54 ≥)	0.992	0.492-1.998	0.982	0.310	0.143-0.675	0.003
Gender (female)	0.726	0.338-1.559	0.412	0.652	0.305-1.397	0.271
KPS (70 ≤)	0.609	0.274-1.350	0.222	0.295	0.126-0.694	0.005
Extent of resection (total)	0.379	0.137-1.050	0.062	1.203	0.543-2.665	0.648
p53 status (mutated)	0.634	0.293-1.370	0.246	0.744	0.316-1.753	0.499

GBM: glioblastoma multiforme; PFS: progression free survival; OS: overall survival; KPS: Karnofsky performance score. P values lower than 0.05 were considered significant.

TABLE 4
Profile of Overall Mutations in Glioma

WHO class	Missense (%)	Hot spot (%)	Transition (%)	Exon 8 (%)
AA	9/11 (82)	6/9 (67)	9/9 (100)	8/11 (73)
GBM	14/17 (82)	6/14 (43)	11/14 (79)	4/17 (24)
others	5/6 (83)	2/5 (40)	4/5 (80)	3/6 (50)
total	28/34 (82)	14/28 (50)	24/28 (86)	15/34 (44)

WHO: World Health Organization; AA: anaplastic astrocytoma; GBM: glioblastoma multiforme.

acquired new p53 mutations on exons other than exon 8 as a later event in progression to GBM. On the other hand, if the propensity for malignant progression is indeed lower in AAs with the mutation on exon 8, one could expect a lower incidence of p53 mutations in GBMs. In fact, this was not the case in the current study, where no less than 31% of GBMs manifested the p53 mutation. In addition, the fact

that the rate of exon 8 mutation in DA was lower than in AA is inconsistent with the first hypothesis. We concluded that some of mutations in GBM were acquired de novo.

We also found that mixed gliomas rarely contained p53 mutations (Table 1). This suggests that in these tumors, the pathway for tumorigenesis or progression is different from that in pure astro-

cytomas. To classify gliomas genetically and to elucidate factors involved in their tumorigenesis and progression to malignancy, large scale studies must be performed that also address the status of other genes, such as *MDM2*, *p16*, *p14*, *EGFR*, and *PTEN*.

Mechanisms upstream and downstream from the *p53* tumor suppressive pathway are being revealed.^{40,41,45-48} TP53 transactivates many target genes that are involved in various biologic functions. Each gene has its own *p53*-binding sequence in its promoter and is under the control of *p53* in a promoter specific manner. As we screened for the functional loss of *p53* by RGC, one of the binding sequences, we were unable to detect all possible mutations⁴⁹ and may have overlooked some mutations resulting in the loss of important unknown promoter activities. Studies are underway to determine whether such mechanisms are impaired in gliomas.

Although we found that in AA the *p53* mutation tended to be located on exon 8, this tendency may lack significance. The current finding may reflect promoter-selective transactivation. In breast carcinoma, *p53* mutations on exon 4 were associated with a particularly poor prognosis, while mutations on exons 6 and 7 and on hot spot regions were not, suggesting that different *p53* domains may affect patient survival differently.⁵⁰ Further investigations may yield information on whether this is also the case in patients with glioma.

REFERENCES

- Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.
- Ishii N, Sawamura Y, Tada M, et al. Absence of *p53* gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a *p53* functional assay. *Int J Cancer*. 1998;76:797-800.
- Cheng Y, Pang JC, Ng HK, et al. Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. *Histopathology*. 2000;37:437-444.
- Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*. 1994;81:427-436.
- Ohgaki H, Schauble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumors. *Virchows Arch*. 1995;427:113-118.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and *p53* mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*. 1996;6:217-223.
- Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW. Preferential inactivation of the *p53* tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol*. 2000;10:249-259.
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al. Deletion of *p16* and *p15* in brain tumors. *Cancer Res*. 1994;54:6353-6358.
- Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997;94:303-309.
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the *MDM2* gene in a subset of human malignant gliomas without *p53* mutations. *Cancer Res*. 1993;53:2736-2739.
- Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of *MDM2* in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:180-185.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest*. 2000;80:65-72.
- Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. *p53* mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res*. 1992;52:674-679.
- Ishii N, Tada M, Hamou MF, et al. Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. *Oncogene*. 1999;18:5870-5878.
- Newcomb EW, Madonia WJ, Pishrody S, Lang SS, Koslow M, Miller DC. A correlative study of *p53* protein alteration and *p53* gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol*. 1993;3:229-235.
- Reifenberger J, Ring GU, Gies U, et al. Analysis of *p53* mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55:822-831.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of *p53* mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997;3:523-530.
- Louis DN, von Deimling A, Chung RY, et al. Comparative study of *p53* gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52:31-38.
- Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, et al. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol*. 1999;97:525-532.
- Haas-Kogan DA, Yount G, Haas M, et al. *p53*-dependent G1 arrest and *p53*-independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;36:95-103.
- Baxendine-Jones J, Campbell I, Ellison D. *p53* status has no prognostic significance in glioblastomas treated with radiotherapy. *Clin Neuropathol*. 1997;16:332-336.
- Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, et al. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of *p16*, *p53*, *EGFR*, *MDM2* or *Bcl-2* genes. *Brain Pathol*. 1998;8:655-667.
- Tada M, Matsumoto R, Iggo RD, et al. Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastoma harboring *p53* mutation. *Cancer Res*. 1998;58:1793-1797.
- Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D, Hulsebos TJ. Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. *Int J Cancer*. 1998;79:159-165.

25. Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treat Rev.* 2000;26:67-73.
26. Schiebe M, Ohneseit P, Hoffmann W, Meyermann R, Rodemann HP, Bamberg M. Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors. *J Neurooncol.* 2000;49:197-203.
27. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001;61:1122-1128.
28. Tada M, Iggo RD, Ishii N, et al. Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay. *Int J Cancer.* 1996;67:447-450.
29. Kraus JA, Glesmann N, Beck M, et al. Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2000;48:89-94.
30. Anker L, Ohgaki H, Ludeke BI, Herrmann HD, Kleihues P, Westphal M. p53 protein accumulation and gene mutations in human glioma cell lines. *Int J Cancer.* 1993;55:982-987.
31. Tada M, Iggo RD, Waridel F, et al. Reappraisal of p53 mutations in human malignant astrocytic neoplasms by p53 functional assay: comparison with conventional structural analyses. *Mol Carcinog.* 1997;18:171-176.
32. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:3963-3967.
33. Gomez-Manzano C, Fueyo J, Kyritsis AP, et al. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res.* 1996;56:694-699.
34. Lang FF, Yung WK, Raju U, Libunao F, Terry NH, Tofilon PJ. Enhancement of radiosensitivity of wild-type p53 human glioma cells by adenovirus-mediated delivery of the p53 gene. *J Neurosurg.* 1998;89:125-132.
35. Broaddus WC, Liu Y, Steele LL, et al. Enhanced radiosensitivity of malignant glioma cells after adenoviral p53 transduction. *J Neurosurg.* 1999;91:997-1004.
36. Jung JM, Bruner JM, Ruan S, et al. Increased levels of p21 WAF1/CIP1 in human brain tumors. *Oncogene.* 1995;11:2021-2028.
37. Kraus A, Gross MW, Knuechel R, Munkel K, Neff F, Schlegel J. Aberrant p21 regulation in radioresistant primary glioblastoma multiforme cells bearing wild-type p53. *J Neurosurg.* 2000;93:863-872.
38. Ruan S, Okcu MF, Ren JP, et al. Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Cancer Res.* 1998;58:1538-1543.
39. Nutt CL, Noble M, Chambers AF, Cairncross JG. Differential expression of drug resistance genes and chemosensitivity in glial cell lineages correlate with differential response of oligodendrogliomas and astrocytomas to chemotherapy. *Cancer Res.* 2000;60:4812-4818.
40. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19 Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998;92:713-723.
41. Honda R, Yasuda H. Association of p19 ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* 1999;18:22-27.
42. Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang C, Sawamura Y, Abe H. Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res.* 1998;58:609-613.
43. Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J. Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int J Cancer.* 1999;80:930-934.
44. Perry ME, Mendrysa SM, Saucedo LJ, Tannous P, Holubar M. p76 MDM2 inhibits the ability of p90 MDM2 to destabilize p53. *J Biol Chem.* 2000;275:5733-5738.
45. Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell.* 2000;101:753-762.
46. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, et al. P53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 2000;102:849-862.
47. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288:1053-1058.
48. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature.* 2000;404:42-49.
49. Di Como CJ, Prives C. Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene.* 1998;16:2527-2539.
50. Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:443-451.

再発悪性神経膠腫に対する高気圧酸素療法併用化学療法

Chemotherapy combined with hyperbaric oxygenation for recurrent malignant gliomas

聖マリアンナ医科大学脳神経外科

田中 克之、榊原 陽太郎、古屋 優、酒井 晃治、
内田 一好、池田 律子、小野寺 英孝、関野 宏明

【はじめに】

悪性神経膠腫における初期導入治療として当院では nimustine hydrochloride (ACNU)/etoposide (VP16) 併用療法を行い、良好な治療成績を報告してきた。その中で、経過観察中に画像上再発を 65.2% に認め、そのうち 60.0% が 6 ヶ月以内に再発し、再発例全例が 2 年以内であった¹⁾。再発悪性神経膠腫に対しては、cisplatin (CDDP)/VP16 併用療法を行っていたが、期待されたほどの治療効果は得られなかった。近年、悪性脳腫瘍において高気圧酸素療法が有効であるとの興味ある報告がなされた⁶⁾。そこで当院でも、再発悪性神経膠腫に対し、高気圧酸素療法 (hyperbaric oxygenation: HBO) 下に化学療法を行い、非常に興味深い成績が得られているので、症例を提示し、若干の文献的考察を含め報告致す。

【対象と方法】

2000 年 12 月から 2002 年 3 月までに、病理組織学的に悪性神経膠腫の診断がなされ、治療経過中に画像上残存腫瘍の増大や新たな再発が疑われた症例を対象とした。治療実施基準は、年齢 15 歳以上 70 歳以下とし、化学療法における治療施行基準を満たすことを条件とした。1) 治療開始後、効果判定可能な 2 ヶ月以上の生存が期待できる全身状態であること、2) 治療前 Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance scale が Grade 0~3 であること、3) 肝機能として GOT・GPT は正常の 2 倍以下、4) 腎機能として、血清クレアチニン 1.5mg/dl 以下、BUN 25mg/dl 以下、5) 白血球数 2000/ μ l 以上、血小板数 50000/ μ l 以上であること。さらに抗癌薬による全身痙攣のコントロールが十分でなく、痙攣発作の生じる可能性が強く示唆される場合、患者およびその家族の理解が十分に得られていない場合は除外した。

期間中に、本治療が実施された症例は 6 例であるが、うち 1 例は、まだ経過観察期間が 1 ヶ月であるため、今回の検討はそれ以外の 5 例 (男性 2 例、女性 3 例) に行なった (Table 1)。発症年齢は 31 歳~70 歳

(平均年齢 48 歳) で、腫瘍の発生部位は、大脳半球部 4 例、基底核部 2 例である。治療の観察期間は 8 ヶ月~17 ヶ月であった。

治療方法は、合志らの報告^{6,8)}に基づき、第 1 日目に carboplatin (CBDCA) を体表面積あたり 300~400mg を 1 時間で静脈内投与したのち、HBO 療法を行った。第 2 日目には、HBO 療法のみを行った。高気圧酸素療法装置は一人用 (米國セクリスト社製装置 Model 2500B) を使い、2.0 絶対気圧下で 1 時間の 100% 酸素吸入を行った。加圧・減圧は 15 分間かけて行った。治療は 6 週間~8 週間毎に実施した。

全例において、治療前に頭部造影 MRI による画像評価と臨床症状さらに血液生化学検査を実施し、常に前述の治療基準を満たしているかを確認した。CBDCA 投与量は骨髄抑制の程度により算出した。治療効果判定は、脳腫瘍治療効果判定基準に基づき評価した。なお、本治療は当院生命倫理委員会の承諾を得た後、患者および家族への十分な説明を行い、同意を得た後実施した。

【結果】

画像上の評価では腫瘍縮小が明らかな症例は 4 例、1 例も増大所見は見られず、奏効率は 80% であった。5 例中 1 例 (case 5) は本学会での報告後、治療開始後 9 ヶ月の経過にて死亡した。また 1 例は再発後 15 ヶ月が経過し徐々に全身状態は悪化しているものの、画像上腫瘍縮小を認め再増大傾向にない。残る 3 例は画像上も腫瘍縮小傾向にあり、2 例は通常の社会生活を営み、1 例は一部介助の生活である。

症例 1 (Case 2) (Fig. 1)

症例は 30 歳女性。頭痛・複視にて発症した。平成 11 年 12 月上旬より、頭痛・複視を自覚し、近医眼科を受診した。頭部 CT にて、松果体部に造影される腫瘍と閉塞性水頭症を認めたため、治療目的に緊急入院した。同年 12 月開頭腫瘍摘出術を行い、病理組織学的に anaplastic astrocytoma と診断された。術後水頭症に対し脳室-腹腔シャント術を行った。術後、通常の放射線

化学療法を行い、記憶力障害は残存するもKPS70%、ADLは家庭内であれば自立しており退院とした。以後、定期的維持化学療法を実施するも、同年5月末画像上腫瘍の増大を認め、化学療法を変更した。その後、さらに腫瘍再増大、ADL・記憶力低下も著明となりステロイドの投与を開始した。その後、本治療の説明、同意を得た上、HBO下化学療法を実施した。入院時および再発時、治療経過中の頭部造影MRIを示す(Fig.1)。明らかに腫瘍縮小を認め、現在治療開始後17ヶ月が経過している。

症例2 (Case 3)

症例は、64歳女性。平成12年12月上旬、左不全片麻痺にて発症した。他院にて脳腫瘍を指摘され、当院へ加療目的に転院した。同年12月開頭腫瘍部分摘出術を施行し、病理組織診断はanaplastic astrocytomaであった。術後放射線化学療法を行うも、著しい顆粒球減少を来したため、回復を待つて退院した。1ヶ月後KPSの著しい低下を来し、緊急入院したが、画像上腫瘍増大と著明な周囲脳組織の浮腫を認めた。同様に本治療の説明・同意を得た上、HBO下化学療法を実施した。入院時および再発時、治療経過中の頭部造影MRIを示す(Fig.2)。明らかに腫瘍縮小と脳浮腫の改善を認めていた。本例のMRS所見を示す。腫瘍部はlactateのピークを認めるもNAA、クレアチニン、コリンのピークは認めず、腫瘍周辺部のピークは対側と類似していたが、NAAが若干低くなっていた(Fig.3)。

【考察】

悪性神経膠腫の一般的治療法は、手術による可能な限りの摘出及び術後の放射線化学療法である。しかしながら、いざ再発するとその治療手立ては有効なものではなく、CDDP/VP16併用療法も再発例においてはその統計学的有意差を示すことはできなかった。

1997年に合志らは、悪性神経膠腫に対して高気圧酸素療法を併用した放射線療法を行い、副作用を軽減し良好な治療成績を報告した⁹⁾。すでに悪性腫瘍における低酸素細胞の存在が放射線治療の抵抗性を示すことは周知の事実であり、悪性脳腫瘍においても、40~60%が低酸素状態の細胞であることから、強い放射線増感作用をもつ高気圧酸素療法は腫瘍縮小効果を期待できる治療であると考えられ、以前にも悪性神経膠腫におけるHBO併用療法の臨床応用の報告がなされた¹³⁾。しかし、これらの報告では腫瘍縮小効果が得られたものの、高圧治療装置内へ放射線照射を同時に行う併用法であり、装置内での全身性痙攣発作や周囲脳組織の放射線壊死の増大が多く、患者への侵襲度が高いことや副作用の増強から、その後治療法として普及されなかった。そこで合志らは、基礎実験の報告^{5,13)}などから、正常脳組織では高気圧酸素治療終了後では比

較的早期に治療前値まで酸素分圧が低下するのに対して、腫瘍組織内では逆に比較的高く酸素分圧が維持されていると考え、高気圧酸素治療終了後から放射線照射までの時間に着目し、高気圧酸素療法終了後早期に放射線照射を行うことで、副作用を軽減し強い放射線増感作用を得ることが可能とした。

化学療法においても、アルキル化剤のnitrosourea系のACNUと白金製剤のCDDPでのHBO療法下での増強効果が報告されている⁹⁾。合志らによると、化学療法とHBO併用においても、薬剤投与とHBO併用の時間が問題であると述べている^{6,7)}。そのためACNUを用いた場合は、ACNU投与後のpharmacokineticsの検討⁹⁾から、腫瘍組織内への移行性にも較差が生じていること、HBOにおける酸素分圧較差から、HBO終了直後にACNUの静脈内投与を行っていた。またACNUに薬剤耐性が生じた場合には、CDDPを用いるようにしていたが、その効果が乏しかったことと、HBO下ではCDDPよりもCBDCAの方がより強い抗腫瘍効果が得られるとの報告¹²⁾から、最近ではCBDCAを用い、良好な腫瘍縮小効果を得ていると述べている⁷⁾。

当院では、初回治療にACNU/VP16療法を用いていることから、再発例ではすでにACNUの薬剤耐性を獲得しているものと考えられたため、CBDCAを用いてHBO併用療法を行った。症例数は少ないが、全例において画像上腫瘍縮小を認めるか経過中の腫瘍増大を認めないなどの抗腫瘍効果を得ることができた。また治療開始後8ヶ月~最長17ヶ月も生存期間を得ていることは興味深い。さらに今回の検討では著しい副作用もなかった。

しかし一方で、60歳以上の2例では抗腫瘍効果があったものの、他の3例に比べ、活動性が低下していた。この理由として、初期治療における放射線治療が影響しているのではないかと考えた。放射線障害に対してはHBOが有効との報告²⁾もあるが、頭部MRIで変化がない場合でも機能低下がある脳組織ではoxy-hemoglobin濃度の低下が遅延しているので放射線治療の影響が出やすいと注意を促す報告¹⁰⁾もあり、高齢者で放射線治療後の脳組織における抗癌剤の影響が危惧された。

いずれも経過観察途中であり、その評価は慎重でなければならぬと考えるが、短期間の入院で治療が可能であり、骨髄抑制などの副作用軽減でき、高齢者や化学療法の副作用で治療制限を受けていても治療が可能であり、さらに今日まで治療に苦慮した再発例において抗腫瘍効果が得られたことは、tumor dormantの観点から見ても、十分に考慮してよい治療ではないかと思われた。

Table 1

Summary of the patients with recurrent malignant glioma after combination therapy with hyperbaric oxygenation

Case No. Age(y)/Sex	Tumor Grade	Tumor location	Response	Clinical outcome
1) 33 / M	AA	right frontal	PR	Alive (17)
2) 32 / F	AA	pineal	PR	Alive (17)
3) 65 / F	AA	putamen	PR	Alive (13)
4) 40 / M	AA	right temporal	PR	Alive (7)
5) 70 / F	GM	right frontal	NC	Death (7, pneumonia)

AA = anaplastic astrocytoma ; GM = glioblastoma ; PR = partial response ; NC = no change
Numbers in parenthesis refer to time (months) after combination therapy with hyperbaric oxygenation

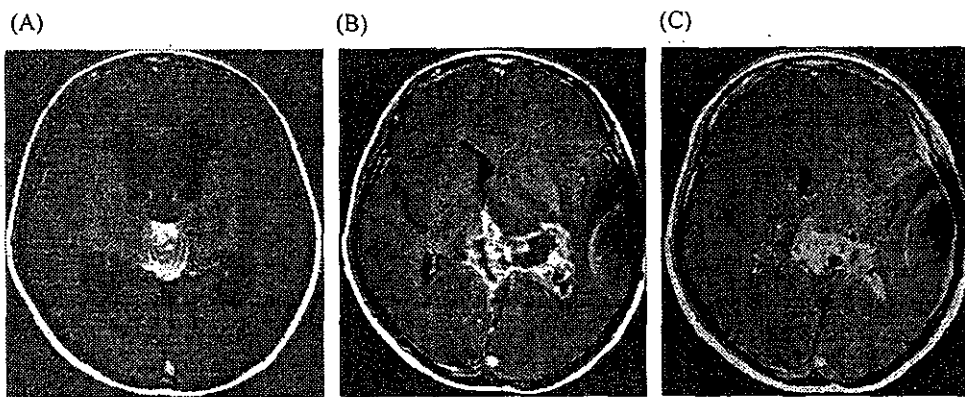


Fig.1 Case 2

Gd-DTPA enhanced MRI scans of pineal glioma before treatment (A), at recurrence (B) and after HBO therapy (C).

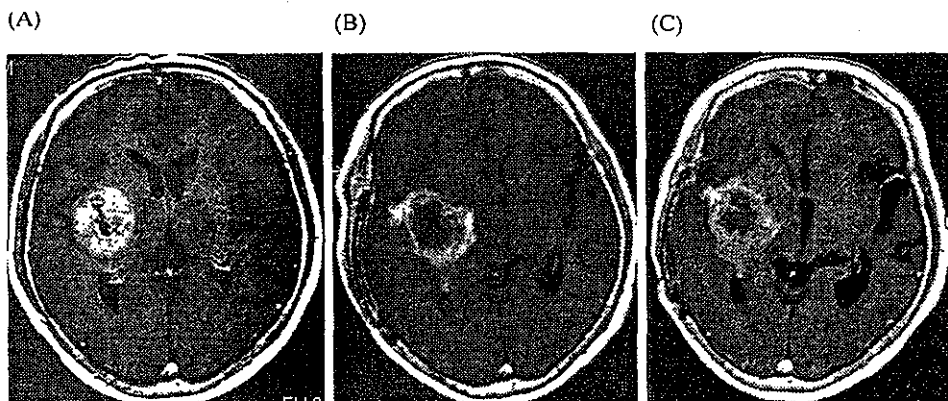


Fig.2 case 3

Gd-DTPA enhanced MRI scans of right putaminal glioma before treatment (A), at recurrence (B) and after HBO therapy (C).

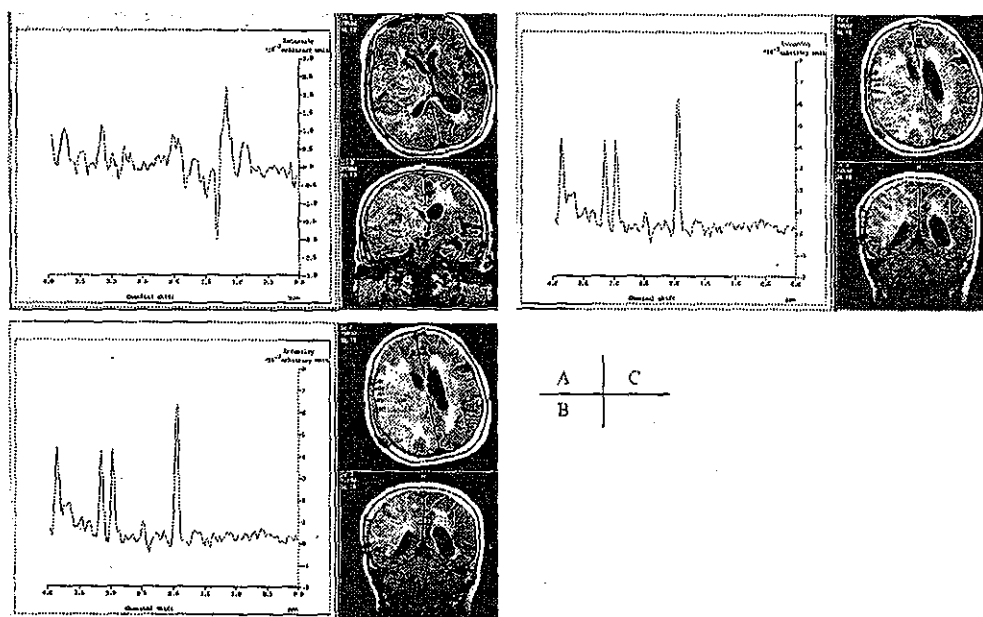


Fig. 3 case 3

A 65-year-old woman with an anaplastic astrocytoma. Proton MR spectrum of the tumor (A), the perifocal lesion (B) and opposite lesion (C).

【文献】

- 1) Chang CH : Hyperbaric oxygen and radiation therapy in the management of glioblastoma. Natl Cancer Inst Monogr 46 : 163-169, 1977
- 2) Chuba PJ, Aronin P, Bhambhani K : Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced injury in children. Cancer 80 : 2005-2012, 1997
- 3) Dowling S, Fischer JJ, Rockwell S : Fluosol and hyperbaric oxygen as an adjunct to radiation therapy in the treatment of malignant gliomas : a pilot study. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 20 : 903-905, 1992
- 4) 平川 亘, 門田紘輝, 朝倉哲彦, 平野宏文, 八代一孝, 横山俊一, 有川和宏 : 高気圧酸素併用による抗癌剤の効果増強に関する実験的研究. 日高圧医誌 28 : 127-133, 1993
- 5) Jamieson D, van den Brenk HAS : Measurement of oxygen tensions in cerebral tissues of rats exposed to high pressure of oxygen. J Appl Physiol 18 : 869-876, 1963
- 6) 合志清隆 : 悪性脳腫瘍の治療と高気圧療法. 脳神経外科 28(9) : 763-771, 2000
- 7) 合志清隆, 今田 肇, 野元 諭, 木下良正, 安部治彦, 加藤貴彦, 津留英智, 溝口義人, 戸崎 剛 : 癌治療と高気圧酸素 - 悪性脳腫瘍の放射線治療を中心として - 日高圧医誌 33 : 81-90, 1999
- 8) 合志清隆, 植村正三郎 : 悪性神経膠腫の高気圧酸素放射線併用療法. 脳外科速報 7 : 479-483, 1997
- 9) 森 照明, 峯浦一喜, 片倉隆一 : 水溶性 nitrosourea 系制癌剤 ACNU の脳腫瘍患者における pharmacokinetics に関する一考察. 脳神経 31 : 601-606, 1979
- 10) 中川 実, 安原隆雄, 寺井義徳, 吉野公博, 藤本俊一郎, 灰田宗孝, 山下優一, 市川祝善 : 酸素吸入による脳内ヘモグロビン濃度の変化を Optical Topography を用いて測定した神経膠芽腫の 1 例. 脳外科速報 10(3) : 195-199, 2000
- 11) 田中克之, 関野宏明 : 悪性神経膠腫に対する ACNU/VP16 併用療法の治療成績 - 第 2 報 補助化学療法としての臨床的意義について - Jpn J Neurosurg 8(9) : 591-596, 1999
- 12) Tonetti M, Giovine M, Gasparini A, Benatti U, De Flora A : Enhanced formation of reactive species from cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum (II) (carboplatin) in the presence of oxygen free radicals. Biochem Pharmacol 46 : 1377-1383, 1993
- 13) Well CH, Goodpasture JE, Horrigan DJ : Tissue gas measurements during hyperbaric oxygen exposure. In : Smith G(ed) Proc 6th Int Cong on Hyperbaric Medicine. Aberdeen University Press, Aberdeen, 118-124, 1977

再発悪性神経膠腫に対する 高気圧酸素療法併用化学療法の治療効果 ～ 1 剖検例の検討 ～

Efficacy of chemotherapy with hyperbaric oxygenation for recurrent malignant gliomas.
～ Case study ～

聖マリアンナ医科大学 脳神経外科

田中 克之、酒井 晃治、平本 準、
森嶋 啓之、松澤 源志、小野寺 英孝、関野 宏明

【はじめに】

再発悪性神経膠腫に対する高気圧酸素療法 (hyperbaric oxygenation: HBO) 併用下に化学療法を行ない、興味深い治療成績を得ていることはすでに報告してきた⁵⁾。その中で、良好な抗腫瘍効果があるものの活動性が低下していた症例があり、高齢者における放射線療法後の脳組織における HBO 併用化学療法の影響が危惧されていた。

今回、HBO 併用化学療法を行ない、抗腫瘍効果があるも活動性が低下し、全経過 21 ヶ月で腫瘍死した退形成性悪性神経膠腫の剖検例を経験したので、文献的考察を加え報告する。

【症例呈示】

患者: 64 歳、女性。

経過: 2000 年 12 月中旬より、左不全片麻痺を自覚した。近医受診し、頭部 CT にて腫瘍性病変を指摘され、当院へ紹介精査入院となった。同年 12 月 27 日開頭腫瘍部分摘出術施行した。病理組織学的診断は anaplastic astrocytoma であった。術後、当院プロトコールに基づき放射線療法を拡大局所に 60Gy 照射し、化学療法として nimustine hydrochloride (ACNU)/etoposide (VP16) 併用化学療法 (ACNU 80mg/m²; Day1, VP16 80mg/m²; Day2,3) を行うも、経過中著しい顆粒球減少を来したため、治療中止し回復を待って退院した。同年 4 月 KPS の著しい低下を来し緊急入院、画像上著しい脳浮腫を伴う腫瘍の再増大を認めた。全身状態を考え、HBO 併用化学療法の説明、同意を得た上で治療を行った。治療方法は報告に基づき、第 1 日目に carboplatin (CBDCA) を体表面積あたり 300~400mg を 1

時間で静脈内投与したのち HBO 療法を行ない、第 2 日目には、HBO 療法のみ実施した。治療は状態に合わせ 6 週間~8 週間ごとに行った。初回入院時、再発時、および治療経過中の画像を示す (Fig.1)。明らかな腫瘍縮小と周囲の脳浮腫の改善を認めた。MRS 所見では腫瘍中心部では lactate の peak を認めるも、NAA, creatinine (Cr), choline (cho) の peak は見られず、腫瘍周辺部の peak pattern は対側に類似していたが、NAA が若干低くなっていた。

その後も治療を継続し HBO 併用化学療法を繰り返して実施していたが、徐々に全身状態も悪化した。経過 18 ヶ月目および 21 ヶ月目の画像を示す (Fig.2)。不整な造影増強効果が腫瘍周囲に進展して認められるようになり、最終的には著明な mass effect を認め、腫瘍死した。家族の同意を得て解剖された。

病理解剖所見: 肉眼的所見では、通常の悪性神経膠腫の剖検所見と同様に表面上 gyrus が拡大し、側頭葉ヘルニアを認め、脳幹部が偏位していた。冠状断でも同様に多彩な所見を示しており、新旧の出血巣や腫瘍の necrosis ないし lipid change を示す特徴的な creamy yellowish な部分が右基底核を中心に認められ、腫瘍は脳梁を介して対側大脳半球にも浸潤発育していた (Fig.3)。

組織学的には、腫瘍中心部では陳旧性の出血巣とともに脂肪変性を伴った壊死所見が著明であった。腫瘍周辺部では、hyalinizing vascular change を示す血管が見られ、ほとんどの細胞で細胞質は著明なエオジン好性を示し、核の染色性が低下、広範な細胞変性が見られた。さらに対側に浸潤するような部分では、明らかな pseudopalisading を示す腫瘍組織も見

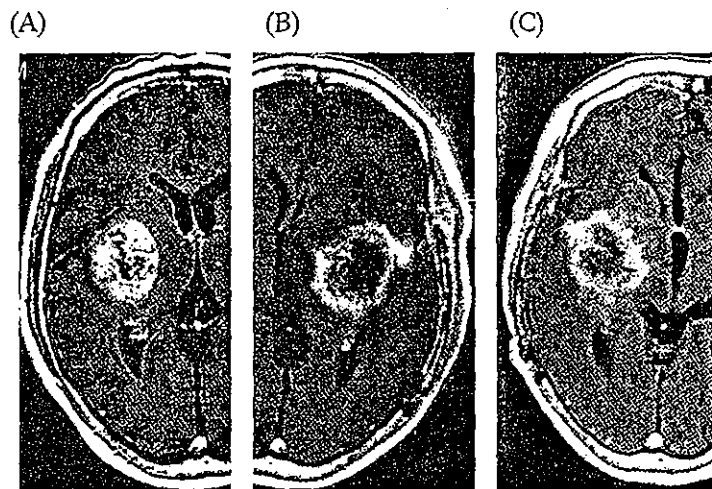


Fig.1

MR images on the first admission in December 2000 (A), on the second admission demonstrating regrowth of the tumor (B) and under treatment with hyperbaric oxygenation (HBO) (C).

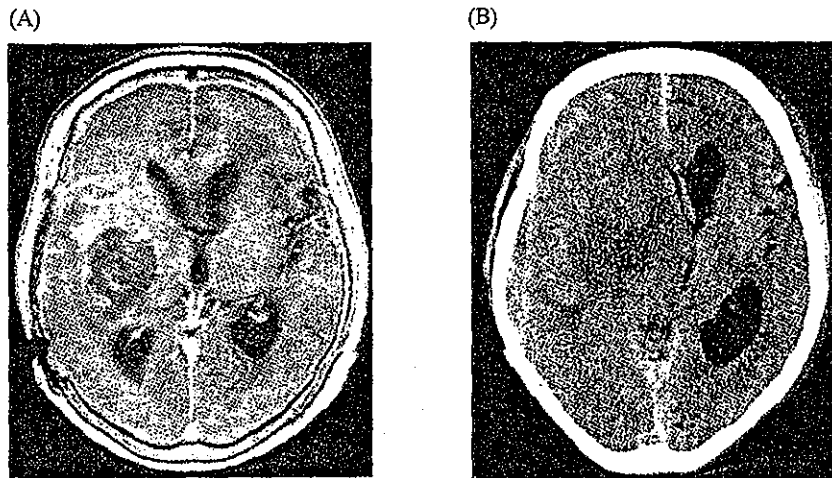


Fig.2

Gd enhanced MR image at 18 months (A) and plain CT scan at 21 months (B)

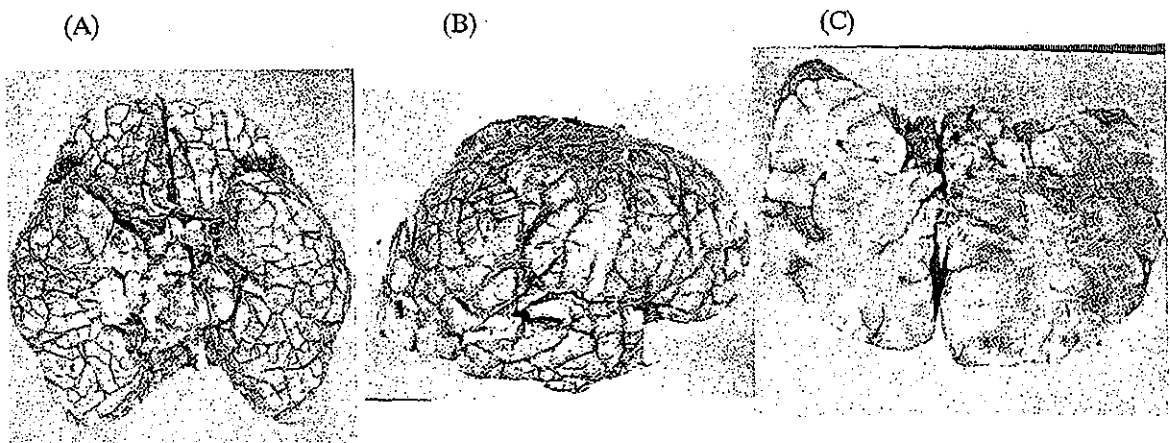


Fig.3

Macroscopic features (A, B).

Large anaplastic astrocytoma in the right basal ganglia extending into the corpus callosum and the contralateral white matter (C).

られた。しかし、多くは変性した細胞に一部取り残される形に腫瘍組織を認めていた(Fig.4)。周辺部においては、MIB-1染色所見では、高いindexを示した。しかし、中心壊死部分や多くの組織においては、MIB-1 indexは低く、染色性は低下していた(Fig.5)。

【考察】

当科では2000年12月より、当院生命倫理委員会の承認のもとに、再発悪性神経膠腫例にHBO併用化学療法を実施し、良好な治療効果を得ている⁵⁾。本治療は、短期間の入院で治療が可能で、骨髄抑制などの副作用も軽減できることから、高齢者でも容易に治療ができること、さらに今日まで治療に苦慮した再発例において抗腫瘍効果が得られたことで、非常に有用な治療法ではないかとの印象がある。本例においても経過中に著明なmass effectの改善を来し、有意なMSTの延長が見られたことから、有意な治療法と判断している。

しかしながら、HBO併用下での化学療法の有効性を直接説明した報告は見られない。実験的報告での抗腫瘍効果の増強は散見される^{2,7)}。一方でHBOのみでも抗腫瘍効果が得られるとの報告もある^{3,4)}。これは生体内における活性酸素の存在や腫瘍組織内でのフリーラジカルスカベンジャー(super oxide dismutase(SOD))の減少を理由として述べているが、当科での経験ではHBO単独での抗腫瘍効果は乏しいとの印象がある。

しかし、抗癌剤によっては明らかに抗腫瘍効果が増強されている。このことから、HBO療法下におけるACNUやcisplatin(CDDP)の抗腫瘍性の増強効果においては、フリーラジカルが関与した抗癌剤の作用増強と、抗癌剤の代謝経路への影響が推察されている⁷⁾。さらにいくつかの臨床使用の報告⁶⁾から、合志らはCBDCAを用いることで、良好な腫瘍縮小効果を得たとしている¹⁾。

当院では、初回治療にACNU/VP16療法を用いているため、再発例ではすでにACNUの薬剤耐性を獲得しているものと考えられ、CBDCAを用いてHBO併用療法を行ってきた。本例においても、画像上経過中の腫瘍増大を認めず、一定の抗腫瘍効果を得ることができた。また全経過21ヶ月も生存期間を得られたことは興味深い。さらに本例では治療における著しい副作用もなかった。そのため、今回の剖検所見から、これまでの再発神経膠腫とは組織学的に何らかの異なった所見が得られるのではないかと考え、これがHBO併用化学療法の有用性の直接的な証明につながることを期待した。

悪性神経膠腫における剖検例においては、その腫瘍の拡がりや画像所見を比較検討することが、治療

効果判定の上からも非常に大切とされる。その際に注意しなければいけないことは、1)最終の画像検査から死亡までの時間、2)可能な限り全脳組織を病理学的に検索すること、3)画像所見と対応して比較検討することであり、これらのことに留意しながら検討した。

最終頭部CT所見では、患側の脳半球は壊死を伴う腫瘍病変とその周囲の著しい脳浮腫を認め、病理学的肉眼所見でも同様の所見であった。また経過中のMRS所見と比較するために、腫瘍中心部、腫瘍周辺部、さらに対側部を分割して組織学的に比較検討した。しかしながら組織学的には、これまでの再発悪性神経膠腫の剖検所見と大きく異なる特徴的所見は見られなかった。一方で、腫瘍中心部の明らかな壊死組織の周囲に、エオジン好性の広範な細胞変性を示す組織を認め、その中に腫瘍性病変が取り残されるようにわずかに見られる部分が存在しており、この所見は、vascular changeなどによる虚血性変化に伴う壊死などは考えにくいと判断した。たしかに通常の化学療法や放射線療法の影響よりも広範囲に組織の変性が著明であり、またその部分では放射線治療後の血管変性の所見は乏しく、HBOが化学療法を修飾して広範囲に抗腫瘍効果を示したことも疑わせたが、直接的な証明もできず推察に過ぎない。またMIB-1染色の評価についても、組織の固定法の問題も残されるために、判断は慎重でなければならないと考えた。

以上のように今回の剖検所見からは、HBO併用化学療法の抗腫瘍効果の増強に関する直接的な証明を得ることは困難であった。しかし、高齢者においても有意な生存期間延長を得られたことから、その臨床における有用性はあると判断しており、今後さらに症例を重ねて検討していく必要があると考えた。

【まとめ】

- 1) 再発悪性神経膠腫に対する高気圧酸素療法(HBO)併用化学療法を行った1剖検例を経験した。
- 2) 腫瘍中心部および周辺部は、著しい細胞の壊死・変性を認め、対側遠隔部にも腫瘍の浸潤が見られた。
- 3) 病理学的所見から、HBO併用による化学療法の抗腫瘍効果を直接証明する所見は得られなかったが、臨床経過からはその有用性が強く示唆され、今後症例を重ねて、検討していく必要があると考えた。

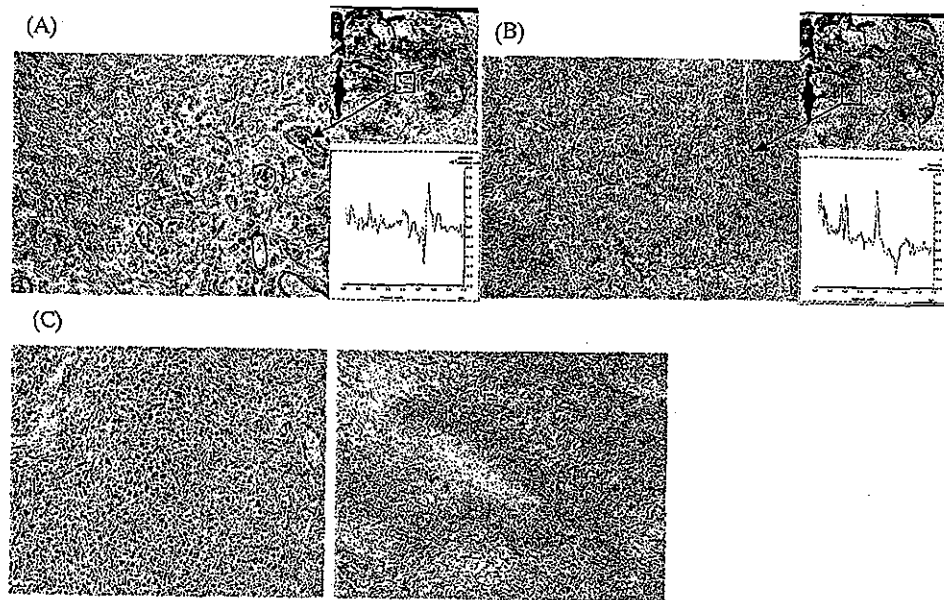


Fig.4
Microscopic features and proton MR spectrum of the center for the tumor (A), the perifocal lesion (B), and the contralateral white matter (C).

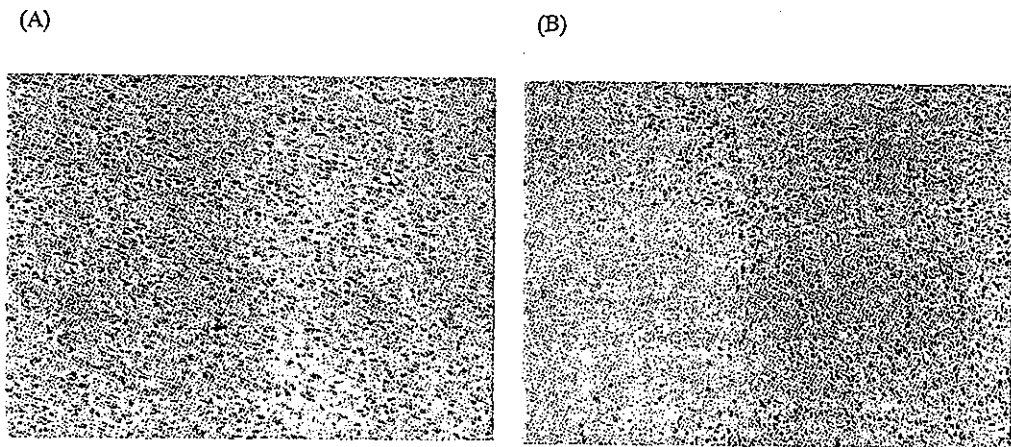


Fig.5
Immunohistochemical features of the center for the tumor (A) and the perifocal lesion (B).

【文献】

- 1) 合志清隆、今田 肇、野元 諭、木下良正、安部治彦、加藤貴彦、津留英智、溝口義人、戸崎剛：癌治療と高気圧酸素－悪性脳腫瘍の放射線治療を中心として－
日高圧医誌 33：81-90, 1999年。
- 2) 櫻田尚樹、木下良正、合志清隆：悪性腫瘍に対する高気圧酸素の応用(2)－動物モデルでの実験的研究－。日高圧医誌 31：45, 1996年。
- 3) 杉山弘行、池田彰宏、久保俊朗：高圧酸素と制癌作用。日高圧医誌 19(1)：141-143, 1984年。
- 4) Takenaka S., Arimura T., Higashi M., Nagayama T., Ito E. : Experimental study of bleomycin therapy in combination with hyperbaric oxygenation.
J Jan. Soc. Cancer, 19 : 864-875, 1980
- 5) 田中克之、榊原陽太郎、古屋 優、酒井晃治、内田一好、池田律子、小野寺英孝、関野宏明：再発悪性神経膠腫に対する高気圧酸素療法併用化学療法。
Neuro-Oncology 12(1)：43-46, 2002年。
- 6) Tonetti M, Giovine M, Gasparini A, Benatti U, De Flora A : Enhanced formation of reactive species from *cis*-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II)(carboplatin)in the presence of oxygen free radicals.
Biochem Pharmacol 46 : 1377-1383, 1993
- 7) 平川 亘、門田紘輝、朝倉哲彦、平野宏文、八代一孝、横山俊一、有川和宏：高気圧酸素併用による抗癌剤の効果増強に関する実験的研究。
日高圧医誌 28：127-133, 1993年。