原 著

抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた頸癌放射線
感受性の免疫細胞化学的研究佐賀医科大学産科婦人科学教室¹⁾, 同 中央検査室²⁾, 同 病理³⁾福田 耕一¹⁾ 岩坂 剛¹⁾ 蜂須賀 徹¹⁾ 林 嘉信¹⁾
杉森 甫¹⁾ 次富 久之²⁾ 武藤 文博³⁾

主に子宮頸癌の放射線治療施行例に対し Bromodeoxyuridine (BrdU) を投与し, 抗 BrdU モノクローナル抗体を用い DNA 合成期細胞 (S 期細胞) を免疫組織化学的に検出し BrdU 標識率 (L.I) を求め照射効果との関連性を検討した. 今回の pilot study では BrdU を直接腫瘍部に局注し, 局注部位より細胞および組織標本を採取し, 酵素抗体法により S 期細胞を検出した. 研究対象となったのは子宮頸癌 15 例, 子宮体癌 1 例, そして腺癌 1 例の計 17 例であり, いずれも初回照射例である. 結果は照射前の細胞組織標本で多数の S 期細胞を観察したが照射効果の出現に伴い S 期細胞の減少がみられた. また放射線抵抗性を示した頸癌の 1 例では照射中多数の S 期細胞を認めた. すなわち照射前に比し照射中 BrdU の L.I の減少は腫瘍の proliferative potential の低下を反映しており, 照射効果との相関が十分示唆された. 以上 BrdU の細胞組織化学的研究は頸癌放射線感受性の判定の一助となると考えられ, 特に細胞診レベルで S 期細胞を検出し得たことは簡便であり, 将来臨床面での有用性が期待される.

Key words: Cervical cancer—BrdU—Immunocytochemical study—Radiosensitivity

I. 緒 言

Thymidine analogue である Bromodeoxyuridine (BrdU) が DNA 合成期細胞 (S 期細胞) の同定に有用なことはよく知られており, すでに一部の領域で S 期細胞

の免疫組織化学的検出が報告されている^{2,6,9)}. ただし細胞診レベルでの S 期細胞の検出はまだ広く行われていない. 今回われわれは放射線増感剤のひとつである BrdU を主に頸癌放射線治療施行症例に直接投与し, 抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて S 期細胞を細胞組織化学的に検索することにより, 個々の腫瘍の proliferative activity を明らかにすることを試みた. このことは照射前, あるいは照射中の頸癌腫瘍細胞の生物学的特徴を把握すると同時に, 放射線感受性 (radiosensitivity) の問題とも関係してくるものと考えられたのでここに報告する.

II. 材料および方法

1. 材 料

1986 年 9 月より 1987 年 10 月の間に佐賀医科大学産婦人科教室において放射線治療を施行した頸癌 15 例 (Ib 期 3 例, IIb 期 6 例, IIIb 期 6 例, 組織型はいずれも大

An immunocytochemical study for radiosensitivity in cervical carcinoma using anti-BrdU monoclonal antibody

Koichi FUKUDA, M.D., M.I.A.C., Tsuyoshi IWASAKA, M.D., Tooru HACHISUGA, M.D., Yoshinobu HAYASHI, M.D., Hajime SUGIMORI, M.D., F.I.A.C.

Department of Obstetrics and Gynecology, Saga Medical School

Hisayuki Tsugitomi, C.T., I.A.C.

Laboratory Medicine, Saga Medical School

Fumihiro MUTOH, C.T., I.A.C.

Department of Pathology, Saga Medical School

論文別刷請求先 〓840-01 佐賀市鍋島町鍋島三本杉 佐賀医

科大学産婦人科 福田耕一

昭和 62 年 12 月 5 日受付

昭和 63 年 8 月 26 日受理

Table 1

Immunoperoxidase Staining for BrdU	
Histological specimens	Cytological specimens
↓	↓
Fixation in 70% ethanol	Fixation in 70% ethanol
↓	↓
Paraffin section	
↓	
Inactivation for endogenous peroxidase incubate in 0.3% H ₂ O ₂ added methanol solution	
↓	
Rinse in PBS 5 min×3	
↓	
Denaturation of DNA in 4N HCl 30 min	
↓	
Neutralization with buffer borate 3 min×2 (0.2M H ₃ BO ₃ : 0.01M Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O=1 : 9, pH 9.1)	
↓	
Rinse in PBS 5 min×3	
↓	
Anti-BrdU monoclonal antibody (Becton Dickinson) 30 min	
↓	
Rinse in PBS 5 min×3	
↓	
HRP labeled anti-mouse IgG F(ab') ₂ (Amersham) 30 min	
↓	
Rinse in PBS 5 min×3	
↓	
DAB-H ₂ O ₂ reaction	
↓	
Counter stain with methyl green or hematoxylin	

細胞非角化型扁平上皮癌), 腺癌 1 例 (Ⅱ期, 扁平上皮癌) として子宮体癌 1 例 (Ⅳb 期, 高分化型腺癌) の計 17 例の初回照射例より細胞および組織標本を採取した。

2. 方法

BrdU の投与方法としては 1 例を除きすべての症例に対し照射前 1 回投与し, その後適当な線量 (後述) がかった時点で BrdU を再投与した。BrdU の投与の実際は BrdU 500 mg を生理食塩水 10 ml に溶解し, 頸部腫瘍部に数カ所にわたって局注, 約 30 分後に局注部位より細胞および組織標本を採取し 70% エタノール液にて固定の後, 酵素抗体法 (間接法) により BrdU 染色を行った。組織標本はパラフィン包埋薄切, 脱パラの後, 細胞標本とともに 0.3% H₂O₂ 加メタノール液にて内因性ペルオキシダーゼを阻止し, 4N HCl にて DNA 変性処理を加え, ホウ酸・ホウ砂緩衝液にて中和の後, PBS でよく洗滌し, 1 次抗体に抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson 社), 2 次抗体に HRP labeled anti-mouse IgG F(ab')₂ (Amersham 社) を 1% BSA 加 PBS にてそれぞれ 25 倍希釈して用いた。H₂O₂-DAB 反応にて発色させ counter stain は methyl green または hematoxylin を用いた (Table 1)。

なお組織標本においては連続切片の 1 枚に H-E 染色

を施し通常の病理学的診断を行い, また細胞標本においては 1 枚を 95% エタノール液にて固定し, Papani-colau 染色による細胞診を行った。

III. 研究成績

BrdU 陽性細胞を S 期細胞とした。照射前, 比較的広範囲に BrdU 陽性を呈した腫瘍組織は照射による核や細胞質の変性に伴い BrdU 陽性細胞の減少が観察された。また細胞および組織標本において 400 倍拡大視野で BrdU 陽性細胞の全腫瘍細胞に対する割合を適当な部位で 5-6 視野数え Labeling Index (L.I) を算出した。以下, 子宮頸癌における研究成績について述べる。

子宮頸癌症例は Ib 期 3 例, IIb 期 6 例, IIIb 期 6 例の計 15 例で, 年齢は 56 歳から 80 歳, 平均 68 歳であった。IIIb 期の 1 例を除き, すべての症例に対し照射前 BrdU が投与された。

照射前の組織標本では 14 例中 2 例において癌組織が採取されず正常頸部扁平上皮のみであった。評価可能であった 12 例について, BrdU L.I は 6.4~21.6% で平均 12.1% (BrdU 標識細胞数/総細胞数=4,030/33,223) であった。細胞標本では 14 例中 3 例には癌細胞が採取

Table 2

BrdU Labeling Index (LI, %) in radiosensitive cases with cervical carcinoma				
	Prior to irradiation		During the course of irradiation	
Histological specimens	12.1 (6.4-21.6)	N=12	4.3 (0.6-9.5)	N=6
Cytological specimens	11.7 (2.1-22.5)	N=9	4.8 (0.9-5.8)	N=4

N=No. of patients

Fig. 1 Immunoperoxidase stain for BrdU in smear of the case with Stage IIIb cervical carcinoma undertaken whole pelvic irradiation in a dose of 30 Gy showed many labeled tumor nuclei, LI 60.9%. (counterstain with methyl green, $\times 400$)

されず, また 2 例は BrdU 陰性であった. BrdU 陽性で評価可能であった 9 例について, その BrdU L.I は 2.1~22.5% で平均 11.7% (BrdU 標識細胞数/総細胞数 = 447/3,820) であった. なお細胞および組織標本において L.I と臨床期には相関がみられなかった.

照射中すべての症例に対し BrdU の投与が行われ, 細胞および組織標本の採取が行われた. Ib 期, IIb 期に対しては RALS 1,200~1,800 cGy (A 点線量), Linac (central split) 2,000 cGy 前後で, また IIIb 期の症例に対しては Linac (whole pelvis) 2,000~3,000 cGy で BrdU を投与した.

組織標本で radiosensitive な症例 (照射終了時の組織標本で癌細胞がみられないもの) 14 例中 8 例は壊死組織のみであり, 残り 6 例が BrdU 陽性の変性した癌細胞を認め評価可能であった. BrdU L.I は 0.6~9.5% で平均 4.3% (BrdU 標識細胞数/総細胞数 = 425/9,962) であった. 細胞標本では 14 例中 10 例は壊死組織や repair cell であり癌細胞を認めず, 4 例のみが BrdU 陽性の変性した癌細胞を認め評価可能であった. その時の BrdU L.I は 0.9~5.8% で平均 4.8% (BrdU 標識細胞数/総細胞

Fig. 2 Many viable cancer cells were observed in the tissue section of the same case as Fig. 1. (H-E stain, $\times 200$)

Fig. 3 BrdU stain of the case with Stage IIIb cervical carcinoma prior to irradiation showed many BrdU-positive cells, LI 11.8%. (tissue section, counterstain with hematoxylin, $\times 200$)

数 = 117/2,419) であった (Table 2).

唯一 radioresistant (照射終了直後の組織検査で viable cancer cell が認められるもの) であった IIIb 期の 1 症例は, 照射前 BrdU を投与していないため治療開始前の BrdU L.I は不明だが, 照射中 (whole pelvis 3,000 cGy) の細胞標本において 60% 以上の高い L.I を示した (Fig. 1). 組織標本 (H-E 染色) でも多数の viable cancer cell を観察できたが, BrdU 染色を行った組織標本では, 変性した少数の癌細胞のみで L.I の算出は不可能であった (Fig. 2).

radiosensitive であった IIIb 期の 1 症例の照射前 BrdU 染色の細胞および組織標本において多数の BrdU 陽性細胞を観察したが (Fig. 3, 4), whole pelvis 1,000 cGy 程度の照射では, 照射効果は不十分であり, BrdU 陽性細胞が照射前より増加し L.I も高値となった (Fig. 5, 6). whole pelvis 2,000 cGy の時点になると照射効果も出現し L.I も照射前より減少してきている (Fig. 7,

Fig. 4 Cytological specimen of the same tumor as Fig. 3, BrdU stain was diffuse and punctate, LI 10.9%. (counterstain with methyl green, $\times 400$)

Fig. 5 BrdU stain of the case undertaken whole pelvic irradiation in a dose of 10 Gy, LI 19.6%. (tissue section, counterstain with hematoxylin, $\times 200$)

8). whole pelvis 3,000 cGy の時点では変性した癌細胞がわずかにみられるだけで、組織標本における L.I の算出は不可能であった (Fig. 9, 10). なおこの症例においては照射前, 照射中 1,000 cGy, 2,000 cGy, 3,000 cGy の計 4 回, 一週毎に BrdU を投与した.

また個々の症例における細胞および組織標本の L.I は必ずしも parallel ではなかった. 両者の L.I が parallel であったのは照射前, 照射中を通じて約半数であった.

IV. 考 察

子宮頸癌の放射線感受性 (radiosensitivity) は照射前すでに腫瘍自体に内在するものと考えられている¹⁰⁾が従来より照射効果 (radiation effect) として細胞組織学的に判定されてきている^{5,17,18)}. 放射線感受性の組織学的判定には大星・下里の分類が一般に用いられているが, 頸癌放射線感受性の問題に関しては今までに多数の優れた研究報告がある.

Fig. 6 Cytological specimen of the same tumor as Fig. 5, LI 23.4%. (counterstain with hematoxylin, $\times 400$)

Fig. 7 BrdU stain of the case undertaken whole pelvic irradiation in a dose of 20 Gy, LI 19.5%. (tissue section, counterstain with hematoxylin, $\times 200$)

Fig. 8 Cytological specimen of the same tumor as Fig. 7, LI 5.1%. (counterstain with hematoxylin, $\times 400$)

今回われわれは頭頸部領域を中心に用いられてきた放射線増感剤のひとつである Bromodeoxyuridine (BrdU) を直接頸癌放射線治療例に投与し, 近年 Gratzner ら⁴⁾により開発された抗 BrdU モノクローナル抗体を用い, 免疫細胞組織化学的に S 期細胞を検出し, 個々の腫瘍に

Fig. 9 BrdU stain of the case undertaken whole pelvic irradiation in a dose of 30 Gy. A few degenerated cancer cells were observed. (tissue section, counterstain with hematoxylin, $\times 200$)

Fig. 10 Cytological specimen of the same tumor as Fig. 9, LI 1.7%. (counterstain with hematoxylin, $\times 400$)

におけるS期細胞の比率をL.I.として表し、それぞれの biological behavior を明らかにし照射効果との相関を検討した。すなわち、以前より腫瘍の有する生物学的特性を免疫組織化学的に分析し放射線感受性との相関を検討報告してきたが²⁾、今回は核DNAのcell cycleの中で細胞化学的あるいは組織化学的にS期細胞を検出することで、腫瘍の有する proliferative activity ならびに照射効果を検討した。

頸癌放射線治療において核DNA量の変化を経時的に追跡し cell cycle における増殖相の各期(G₁期, S期, G₂期, M期)と放射線感受性の問題を研究した報告がいくつかみられるが^{1, 7, 10, 12, 13, 15~17, 19)}、今回のわれわれの研究は cell cycle におけるS期だけを瞬間的に捉えたものに近いと考えられる。

BrdUの臨床応用は頭頸部領域において脳腫瘍の増殖能を抗BrdUモノクローナル抗体を用い免疫細胞化学的に研究した報告がいくつかあるが^{3, 6, 9)}、婦人科領域にお

いてはBrdUの放射線増感剤としての役割が明確でないこともあって¹⁴⁾臨床面への応用は行われておらず、*in vitro*における免疫組織化学的S期細胞の検出が最近行われてきている。

頸癌放射線治療におけるS期細胞の同定に関しては以前より³H-thymidineによる研究報告がある。すなわち岩田⁷⁾は1,000 cGy以上の照射で³H-thymidineのL.I.が低下してくるとしているが、野口¹⁰⁾はtest doseでL.I.の低下はみるものの照射効果との関係ははっきりしないとしている。また移植実験腫瘍において松沢⁹⁾は3,000 cGy照射後残存した腫瘍細胞は³H-thymidineで標識されないとしている。われわれの抗BrdUモノクローナル抗体を用いた成績では、照射効果不十分なものでは3,000 cGy照射後でも多数のBrdU陽性細胞が検出された。また照射効果が出現するにつれBrdUのL.I.は細胞組織標本において低下してきたが、1,000 cGy照射程度では照射効果不十分で、逆にL.I.が照射前より上昇していることがあった。これは照射前投与したBrdUが壊死剝離に陥らなかった腫瘍細胞中に残存しており、新たに投与したBrdUとともに検出されてきたものと考えられた。

L.I.と照射効果との関係は前述したとおりだが、BrdU陰性の腫瘍細胞が必ずしもnon-viableとは限らず、L.I.の減少はproliferative potentialの低下によるものと考えられ、照射効果ありと判定してもよいと考えられる。またDNA合成は行いが分裂しえないまま細胞死に陥ってゆく巨核細胞で、BrdU陽性を呈してくるものもあったが、これは細胞学的には、死細胞とみなすべきであろう^{16, 18)}。一方、IIIb期の1例のように照射中のL.I.が60%という高値を示したものはradioresistantであったが、その腫瘍増殖能が強いと考えられた。

照射効果の組織学的評価については、以前よりtest doseとして1,000 cGy照射後に生検を行い評価する方法があるが^{5, 10, 17, 18)}、少なくとも3,000 cGy照射しないと評価は困難であるという報告もある¹⁴⁾。今回のBrdUによる細胞組織化学的照射効果の判定については、照射前、それに2,000~3,000 cGy照射時点で生検を施行するのが適当と考えられた。線量がそれ以下では照射効果の出現が不十分なことが考えられ、またそれ以上の線量では、照射による組織の硬化でBrdUの局注投与が困難となりBrdU染色を行うには不適当と考えられた。

BrdU投与による照射効果の判定には、腫瘍の発育型としてexophytic typeの方がendophytic typeと比較し、BrdU投与ならびに細胞および組織標本の採取がより確実に行えた。また技術的問題のひとつとしてcou-

nter stain は methyl green の方が核の褐色が浮かび上がり弱拡大でも見落としにくい L.I の算出が困難である。核内構造の観察も含め L.I の算出には hematoxylin の方がよいと考えられる。ただし弱拡大では BrdU 陽性細胞を見落としやすいことに留意すべきである。

以上 BrdU の用い方として、照射前投与と照射中投与の二通りが考えられたわけだが、前者においては予後を含めた腫瘍の悪性度と biological behavior の評価が可能なが示唆され、後者においては適当線量がかかった時点で放射線感受性評価の一助となり得ることが示唆された。

最後に BrdU の副作用については、使用量も少なく局注投与を行っており、他の報告同様問題はなかった。また BrdU の放射線増感剤の役割については今後の問題であらう。

V. 結 語

頸癌放射線感受性判定の一助として、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた細胞組織化学的方法が有用であることについて述べてきた。細胞標本と組織標本において L.I が parallel でないものもあり、多少の問題点は残しているが、S 期細胞の検出が細胞診レベルで容易に可能であったことが今回注目された。BrdU の L.I と腫瘍の biological malignancy との相関については数年の follow が必要であらう。また放射線治療を含め、他の化学療法等の治療効果判定にも BrdU に限らず、免疫組織化学的技法の応用が今後大いに期待される。

Summary

Bromodeoxyuridine (BrdU) is a thymidine analogue that is also incorporated into nuclear DNA. Since Gratzner (1982) first developed a monoclonal antibody for identification of BrdU-containing nuclei, its use in immunohistochemical studies on the cellular proliferative activity of neoplastic tissue has been reported to be valuable in various tumors, especially brain tumors. DNA-synthesizing cells (S-phase cells) in seventeen patients (15 with cervical carcinoma, 1 with vaginal carcinoma, 1 with endometrial carcinoma) who had undergone radiotherapy were detected by the immunoperoxidase technique using anti-BrdU monoclonal antibody to evaluate their radiosensitivity. All patients received a local injection of BrdU into the cervix before radiotherapy or during the course of irradiation. Biopsied tissue specimens and smears were taken from the injected site in the cervix and

indirect immunoperoxidase staining was used to visualize BrdU-containing nuclei in the tissue samples. In cases showing a good response to irradiation, the BrdU labeling index (LI) decreased during the course of irradiation and only one case of poor response to irradiation showed a high LI during the course of radiotherapy. Immunocytochemical detection of S-phase cells may thus be useful for evaluating the radiosensitivity of cervical carcinoma.

文 献

- 1) 海老原順一：放射線による子宮頸癌の核 DNA の変化，慈恵医誌，86：462，1971.
- 2) 福田耕一，杉森 甫，藤本郁野・他：子宮頸癌の放射線感受性への免疫組織化学的アプローチ，日癌治誌，23：19，1988.
- 3) 福井仁士：脳腫瘍の増殖能，福岡医誌，77：651，1986.
- 4) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication, Science, 218：474，1982.
- 5) Gusberg, S.B., Herman, G.G.: Radiosensitivity and virulence factors in cervical cancer, Am J Obstet Gynecol, 100：627，1968.
- 6) Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J.A., et al.: Proliferative potential of human meningiomas of the brain, Cancer, 58：1466，1986.
- 7) 岩田正晴：放射線による子宮頸癌の治癒過程に関する基礎的研究，日産婦誌，28：892，1976.
- 8) 松沢大樹：癌研究と放射線療法・癌・放射線療法. 1, 篠原出版社，東京，1978.
- 9) Nagashima, T., DeArmond, S.J., Murovic, J., et al.: Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues, Acta Neuropathol, 67：155，1985.
- 10) 野口 浩：子宮頸癌放射線感受性に関する研究，とくに試験照射法による臨床応用について，日産婦誌，28：910，1976.
- 11) 奥田博之，林 裕治，吉田京介・他：子宮頸癌における放射線照射効果判定法と PSK による効果増強作用について，婦人科悪性腫瘍化学療法研究会誌，3：66，1987.
- 12) Pallavicini, M.G., Lalande, M.E., Miller, R.G., et al.: Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G2+M phases after irradiation of a solid tumor in vivo. Cancer Research, 39：1891，1979.
- 13) 佐々木寛：放射線照射による子宮頸癌細胞の G2-M 期同調化現象の研究，特に核 DNA 量の解析とその臨床的意義について，日癌治誌，16：1456，1981.

- 14) 関場 香, 奥田博之, 林 裕治・他: 子宮頸癌放射線治療における照射効果の増強について, 産婦人科の実際, 35 : 55, 1986.
 - 15) Sinclair, W.K. and Morton, R.A. : Variations in X-ray response during the division cycle of partially synchronized chinese hamster cells in culture, *Nature*, 199 : 1158, 1963.
 - 16) 杉下 匡: 子宮頸癌の放射線治療と細胞診, 臨婦産, 32 : 596, 1978.
 - 17) 塚原嘉治, 塩沢久要, 塚本隆是・他: 子宮頸癌放射線感受性の組織学的判定方法の再検討, 試験照射後根治手術により剔出した 100 余例の手術材料を中心として, 日産婦誌, 27 : 1213, 1975.
 - 18) 渡辺 亘, 工藤隆一: 子宮頸癌の組織型と放射線感受性に関する形態学的研究, 特に扁平上皮癌の組織型について, 日産婦誌, 35 : 1791, 1983.
 - 19) Yau, T.M., Kim, S.C., Nygaard, O.F., et al. : Correlation of cell cycle parameters with radiation sensitivity in a series of murine L5178Y cells, *Int J Radiat Biol*, 37 : 429, 1980.
-