

PSK 併用による子宮頸癌放射線照射効果増強作用について —特に落射型蛍光顕微測光法による核 DNA 変化の解析—

岡山大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 関場 香教授)

林 裕 治

Enhancing Effect of Irradiation on Carcinoma of the Uterine Cervix by Administering Protein-bound Polysaccharide Kureha (PSK) —Quantitative Nuclear DNA Analysis following Irradiation—

Yuji HAYASHI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School, Okayama
(Director: Prof. Kaoru Sekiba)*

概要 子宮頸癌放射線療法例34例を対象として、PSK 併用の有無による照射効果の違いを、1) 落射型蛍光顕微測光法を用いた核 DNA 量の測定による cell kinetics の経時的変化および、2) 大星・下里分類による病理組織像を主体としこれに colposcope 像を加味して判定した臨床的照射効果の変化の両面から検討した。対象34例を PSK 非投与13例 (非投与群)、PSK 投与21例 (投与群; 3g群: 12例, 6g群: 9例) の2群に分け、30Gy 照射時の臨床的照射効果を判定した。その結果、良好例は、非投与群10/13 (77%)、投与群19/21 (90%) であった。さらに、これら良好例29例につき検討し、以下の結果を得た。

① 20Gy 照射時点で大星・下里分類 Iib 以上を示した症例は、非投与群2/10 (20%)、投与群10/19 (52.6%) であり、投与群で早期に良好な照射効果もたらされ、しかも、この効果は PSK dose dependent であった。

② 投与群では、一般に放射線少量分割照射によく認められる巨核細胞の出現が少なく、腫瘍の融解壊死の傾向が早期にもたらされた。

③ cell kinetics の面からは、投与群では非投与群に比し、Over 4C Cell (hypertetraploid cell) population の増加が14Gy 以後鈍り、20Gy の時点では有意に低率であった。さらに、この Over 4C Cell の出現率を投与群間で比較すると6g 群の方がより低率であった。

これらのことより、放射線に PSK を併用することにより、腫瘍の radiosensitivity が高まり、比較的少ない線量の段階から癌細胞は lethal な damage を受ける結果、Endomitosis による巨核細胞つまり Over 4C Cell の形成が減少した可能性が示唆された。しかも、この変化は PSK dose dependent であると考えられた。

Synopsis The combined effect of PSK and radiation therapy has been studied in 34 patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix by noting the tumor cell kinetics change following irradiation. The DNA content of Pararosanillin-Feulgen stained tumor cells was measured by cytofluorometry to elucidate tumor cell kinetics. Twenty-one cases (PSK group) were administrated 3g. or 6g. of PSK daily until at least 30Gy. Thirteen cases (control group) were treated with external cobalt-60 irradiation without PSK. In radiosensitive cases (n=29; PSK group: 19, control group: 10), the PSK group had a smaller Over 4C Cell population in the DNA histogram after 14Gy than the control group, and the population at 20 Gy in the PSK group was significantly smaller ($p < 0.05$). At 20Gy, the PSK group showed better histopathological response than the control group according to the Ooboshi-Shimosato classification, and the PSK group showed a smaller giant cell formation and more colliquative necrosis. These findings indicated that Over 4C cell (giant cell) formation due to endomitosis was decreased because of the increase in lethal damage to tumor cells following PSK administration with irradiation. In radioresistant cases (n=5) also, there seemed to be an advantage.

Key words: PSK • DNA-cytofluorometry • Irradiation • Endomitosis • Giant cell

緒言

サルノコシカケ科に属する担子菌カワラタケの一系統より抽出された蛋白多糖体であるPSKの子宮頸癌における放射線照射効果の増強作用については、1974年の笠松の報告以来 sensitization と immunopotentialion の両方あると言われているが^{3)~5)}、その作用機序についてはいまだ不明の点が多い。一方、腫瘍細胞動態 (cell kinetics) は放射線照射効果により変化することが放射線生物学の研究によつて明らかとなつている¹⁸⁾²⁰⁾。そこで、今回、著者は子宮頸癌放射線療法例を対象として、落射型蛍光顕微測光法を用いて核DNA量を測定し、PSK併用の有無により子宮頸癌の cell kinetics がいかに変化するかを解析し、PSKの照射効果増強の作用機序を解明しようと試みた。

対象および方法

子宮頸部扁平上皮癌34例を対象とし、これらをPSK非投与群すなわち放射線単独群13例、PSK 3g~6g/day投与群21例 (3g群:12例, 6g群:9例)の2群に分け、比較検討した。2群間において、年齢、stage および組織型には特に差を認めなかつた (表1)。

1. 治療スケジュール

PSK併用群は、放射線照射開始と同時に1日3gないし6gを連日内服投与とし少なくとも30Gy照射時までには継続した。外照射は telecobalt 全骨盤照射で1日2Gy、週5回の分割で計50~60Gy照射した。なお、30Gyまでは center block を使用せず、¹³⁷Cs60mCiを用いた小線源腔内照射は telecobalt 30Gy照射以後に行つた。

2. 標本作製および染色法

表1 対象症例 (1982~1985)

	平均年齢	stage			組織型		
		II	III	IV	Gr I	Gr II	Gr III
PSK 非投与群 (n=13)	66.4	6	6	1	—	11	2
PSK 投与群 (n=21)	64.7	12	8	1	—	18	3

Gr I : large cell keratinizing type

Gr II : large cell non-keratinizing type

Gr III : small cell non-keratinizing type

材料採取は、治療前、6Gy、14Gy、20Gy、30Gy および治療終了時の各時点で colposcopy 下に行い捺印細胞標本および組織標本を作製した。次に、図1のごとく、前者は、100%メタノールにて固定し1N塩酸で60℃、5分間加水分解した。ついで、0.1N塩酸、7℃で加水分解を停止した後、Pararosanillin-Feulgen reaction にて7℃、10分間のDNA染色を行つた。核DNAと結合したPararosanillinの特異蛍光の安定化と細胞質内の非特異的蛍光の除去のため post irradiation の処理を行つた²⁾。

3. 蛍光顕微測光法

癌細胞核DNA測定はOlympusの落射型蛍光顕微鏡MMSP-RFを使用した。また、標本中には癌細胞以外にかなりの間質細胞や遊走細胞 (leucocytes, lymphocytes, plasma cells, histiocytes) が混じっているため、細胞同定法として林の方法を用いた⁶⁾。すなわち、Blue励起 ($\lambda=405\text{nm}$)を用いて癌細胞であることを確認したのちに、Green励起光 ($\lambda=546\text{nm}$)に切り換えて核DNA

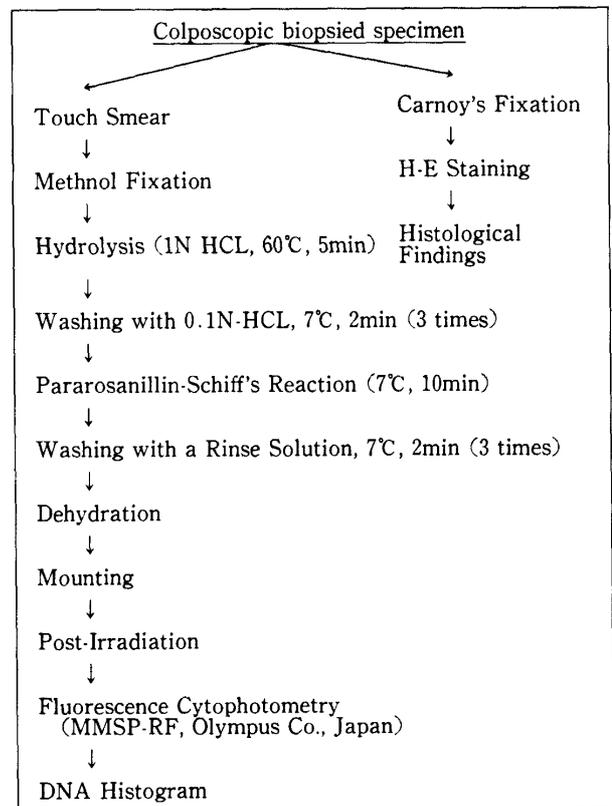


図1 標本作製および染色法

量を測定した。

4. DNA 値による細胞動態の解析 (図2)

1) 各時点で好中球30個, 癌細胞200個の DNA 値を測定し, 各々の値の対数をとつて histogram (\log_{10} transformation histogram) を作成した¹⁵⁾。

2) 各症例ごとに好中球に対する stem cell modal value を求め¹⁴⁾, これに相当する DNA 値を2C値とし, その2倍を4C値とし, 2C値あるいは4C値の $\pm 25\%$ の範囲内の細胞をそれぞれ2C Cell, 4C Cell とした¹⁷⁾。また, 4C Cell のDNA 値を超えるものは Over 4C Cell (hypertetraploid cell) とした。そして, 2C Cell, 4C Cell, Over 4C Cell それぞれの占める割合, つまり, cell population を算出し, 放射線照射に伴う cell kinetics を検討した。

5. cell kinetics と臨床的照射効果の比較

核DNA測定から得た cell kinetics の結果と各照射時点において大星・下里分類による組織学的評価に腔拡大鏡写真による腫瘍面積の測定を行い腫瘍全体の縮小効果を加味して判定した臨床的照射効果⁵⁾とを2群間で比較した。

成 績

対象34例の30Gy照射時点における臨床的照射

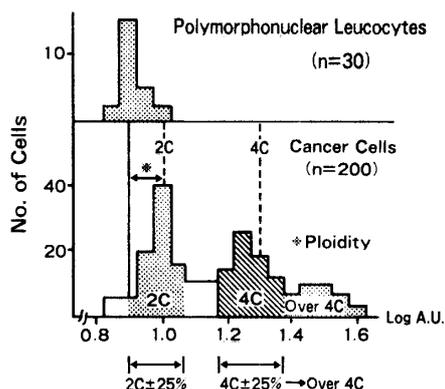


図2 2C, 4C, and Over 4C Cell in DNA histogram

効果の判定を表2に示す。ここで, 組織学的に照射効果良好と判定したものは原則として大星・下里分類 IIb 以上を示したものである。表のように, 良好例の占める割合は, 非投与群10/13 (77%) に対し, 投与群19/21 (90%) であつた。

1. 照射効果良好例についての検討

① 組織学的照射効果の推移 (表3)

表3に示すように, 2群ともに照射量の増加に伴い照射効果があがっている。しかし, PSK 投与群では, 早期により良好な照射効果をもたらされており, しかも, この効果は PSK dose dependent であつた。

また, 組織学的特徴として, 投与群では, 放射線少量分割照射の際によく見られる巨核細胞の出現が少なく, 腫瘍の融解壊死の傾向が早期に現れた。

② 各 cell population の変化 (図3, 図4)

2群間において, 治療前の各 cell population には差がなかつた (図3)。

2C Cell は, PSK 投与の有無にかかわらず線量の増加とともに減少した。4C Cell は, 2群ともに6Gyの時点で増加し, その後, やや減少あるいは横ばいの状態を示したが, 投与群の方がやや高い割合で推移した。

Over 4C Cell は, 2群ともに線量の増加に伴い次第に増加傾向が認められた。しかし, 投与群では14Gyからの増加が鈍り, 特に20Gyの時点では有意に低率であつた ($p < 0.05$)。また, これを投

表2 30Gy照射時の臨床的照射効果

		良好例		不良例	
PSK 非投与群 (n=13)		10		3	
PSK 投与群 (n=21)	3g 群 (n=12)	19	10	2	2
	6g 群 (n=9)		9		—

表3 各照射時点における大星・下里分類 II b 以上の占める割合

(): % (照射効果良好例)

		6Gy		14Gy		20Gy	
PSK 非投与群 (n=10)		0/10 (0)		0/10 (0)		2/10 (20)	
PSK 投与群 (n=19)	3g 群 (n=10)	1/19 (5.3)	0/10 (0)	6/19 (31.6)	2/10 (20)	10/19 (52.6)	4/10 (40)
	6g 群 (n=9)		1/9 (11)		4/9 (44)		6/9 (67)

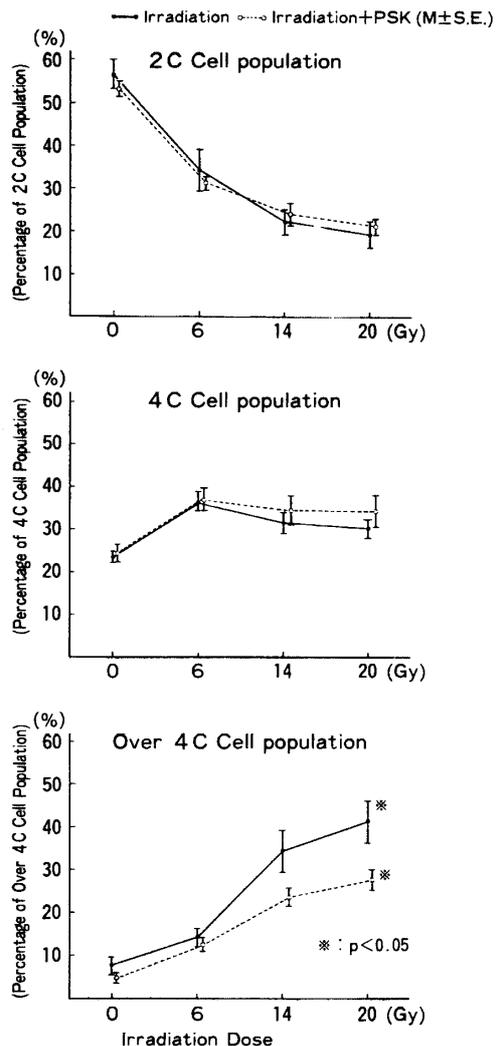


図3 照射による細胞集団の変化

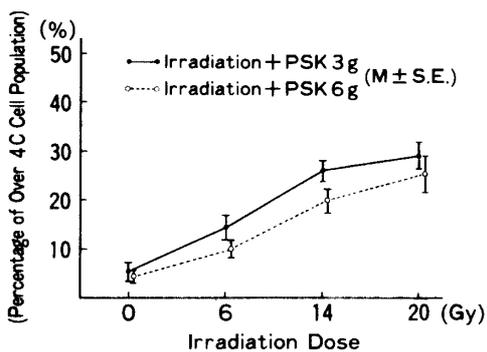


図4 PSK投与量による照射によるOver 4C細胞集団の変化

与群間で比較すると6g群の方がより低率の傾向を示した(図4)。

ここで、実際の症例の組織像とDNA histogramを呈示する(写真1, 2および図5)。前述したよ

うに、PSK投与例では20Gy照射時における巨核細胞の出現が少なく融解壊死形成が強く、より良好な照射効果を示している。一方、histogram上では照射に伴うOver 4C Cellの増加が少ない。

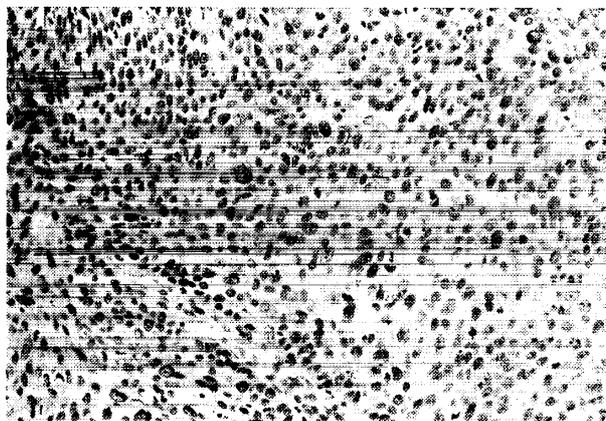


写真1a 照射前症例、大細胞非角化型(x110)

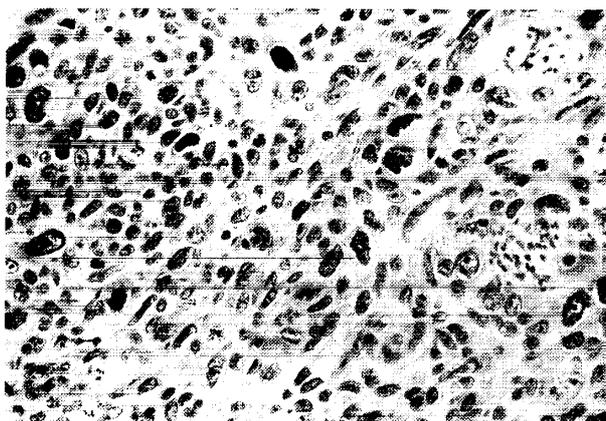


写真1b 20Gy照射症例、顕著な巨大細胞形成(x110)

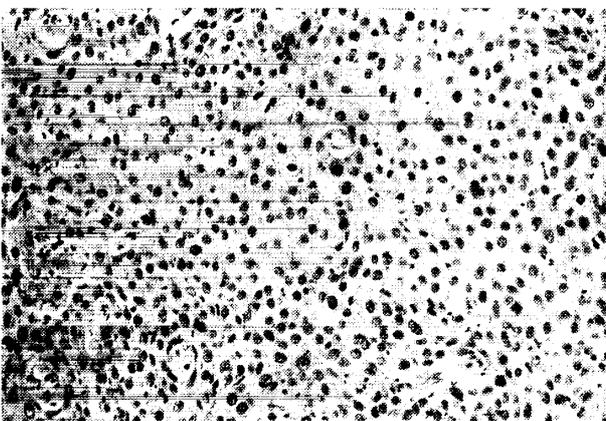


写真2a 照射+PSK 6g症例前治療、大細胞非角化型(x110)

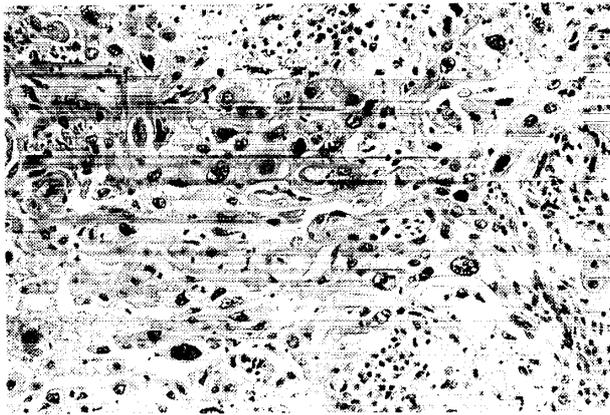


写真 2b Irradiation + PSK 6g case at 20Gy, Note marked colliquative necrosis (×110)

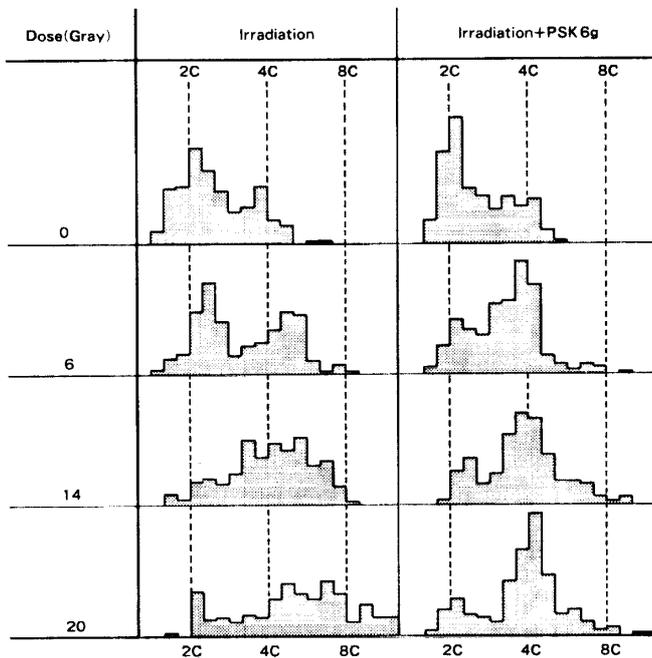


図5 Changes of DNA histograms following irradiation

2. 照射効果不良例について (図6)

照射効果不良例は5例と少ないため十分な検討はできなかつたが、PSK投与の有無による違いを cell kinetics の面から検討し、以下の結果を得た。すなわち、投与群では4C Cellの増加が6Gy以後20Gyまで持続する傾向を示し、Over 4C Cellの出現が照射全経過を通じて低率であつた。一方、2C Cellは、2群ともに30Gy照射時にも高率に残存していた。また、組織学的には全例30Gy照射時点でも放射線変化のほとんど見られない腫瘍細胞が多く残存していた。

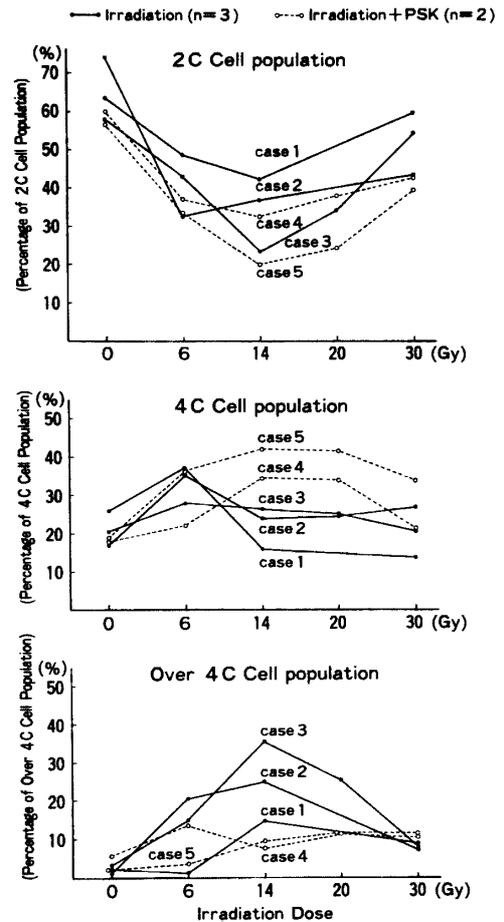


図6 Changes of cell population following irradiation (radioresistant cases)

考 察

PSKの放射線照射効果の増強作用に関しては、マウス移植腫瘍における実験結果より線量-生存率曲線のD₀値を減少させることが証明されており¹³⁾、さらに子宮頸癌放射線療法例においても今までいくつかの併用効果が報告されている。岩井ら³⁾は、原発巣およびリンパ節を病理組織学的に検討し、PSKの放射線増強効果には免疫反応が関与している可能性を示唆している。また、教室の数田⁵⁾は、免疫学的検討からPSKの併用効果が認められる症例ではリンパ球機能が放射線療法後も保持ないし増強されていると述べている。これに対し、笠松ら⁴⁾はPSK併用により照射効果が増強されていることを病理組織学的検討より明らかにし、この増強効果は放射線抵抗性を示す角化傾向に乏しい類上皮癌に対し特異的であり、その意味ではPSKの作用はimmunopotentialとい

うよりは、むしろ広義の放射線増感作用が予想されると述べている。

このように PSK 併用による放射線照射効果の増強作用に関して、組織学的あるいは免疫学的に検討した報告はいくつか挙げられるが放射線照射に伴う cell kinetics の変化の面から検討した臨床例での報告は未だ見られない。そこで、今回著者は落射型顕微測光法を用いた核 DNA 測定による cell kinetics の変化を解析し、PSK の放射線照射効果増強作用を追求した。ところで、近年、核 DNA 量の解析法として Flowcytometry が繁用されている⁸⁾。しかし、Flowcytometry では本研究のように臨床例の固形腫瘍から得られた材料を用いる場合、癌細胞のみを取り出し、しかも、多くの被検細胞を得ることは困難であることが多い。この点、本研究で用いた顕微分光測光法は、被検細胞の同定が確実であれば検体細胞数が比較的少なくても測定できる利点を有している。近年、藤田²⁾は顕微測光法の一つとして、落射型測光法を開発し、従来の透過型測光法に比べ、精度を著しく改善した。また、実際の標本上での癌細胞の同定という問題に関しては、今回、用いた教室の林の方法⁶⁾により信頼性が向上できたと考えている。

ところで、現在、被照射組織の効果判定法として、大星・下里分類が一般的に用いられている。今回著者もこの分類を基準として用いた。しかし、この分類は本来、根治あるいはそれに近い線量を照射した場合の効果判定であるため、14Gy や 20 Gy といった少線量での判定には無理な場合がある。また、本検討のように小さな組織切片で判定する場合にはその採取部位がはたして全体像をどこまで反映しているかが大きな問題となる。そこで、著者は colposcopy 下に最も照射効果不良と思われる部位を狙って組織を採取するとともに病巣全体の縮小率を加味して、臨床的照射効果の判定を行った。教室の奥田ら⁹⁾はこの判定法を用いて検討した結果、30Gy 照射時の評価は 5 年生存率をよく反映しており、十分に臨床応用に適すると述べている。また、教室の数田⁵⁾は同様の方法により、30Gy 照射時点において PSK 投与群で明ら

かな照射効果の増強が認められたと報告している。本検討でも 30Gy 照射時点での良好例の割合が、非投与群 77% に比し、投与群では 90% と高く、また、早期により良好な照射効果をもたらされた。しかもこの効果は PSK dose dependent であつた。

そこで、このような PSK の効果について cell kinetics の変化から検討を行った。DNA histogram から求めた 2C Cell, 4C Cell は cell cycle 上では、各々 G0-G1 期細胞, G2-M 期細胞に相当すると考えられるが治療前におけるこれらの cell population は 2 群間に差を認めなかつた。照射効果良好例では、照射に伴い、2C Cell は 2 群とも減少していった。これは、growth fraction の 2C Cell 即ち G1 細胞が cell cycle を回りながら照射 damage をうけて減少したことに基づくのはもちろんであるが、さらに固形腫瘍では比較的 2C Cell の多くを占めるといわれている non-growth fraction⁷⁾すなわち G0 細胞の cyclic 化 (recruitment) による減少もその大きな要因と考えられる。そして、2 群ともに 6Gy の時点で 4C Cell の増加が認められたが、これは既に G2 block による細胞の分裂遅延が起こっており、G2-M 期へ細胞が蓄積した結果と考えられる¹⁰⁾。cell cycle 上、放射線感受性の最も高い時期は G2-M 期であり¹⁸⁾、4C Cell の増加は感受性の面からは好都合である。投与群においては、この 4C Cell がその後もやや高い割合で持続しており、放射線により癌細胞死がより進行しやすくなる可能性が示唆される。さらに、線量が増えて 14Gy の時点になると、2 群とも Over 4C Cell の増加が認められてくるが、投与群では非投与群に比し、14Gy 以降 Over 4C Cell の割合が少なく、20Gy の時点では有意に低率であつた。ところで、この Over 4C Cell の出現は、少量分割照射における細胞死の過程に特徴的ないわゆる Endomitosis に基づく巨核細胞形成により生ずると考えられるが¹¹⁾⁶⁾¹⁹⁾、この時点において、組織学的にも巨核細胞が増加してくる。しかし、投与群では非投与群に比し、巨核細胞の出現が少なく腫瘍の融解壊死の傾向が早期に見られた。園田¹¹⁾も、比較的少線量照射後の腫瘍の組織

学的変化において、PSK 併用照射例では対照群に比し腫瘍細胞の液状壊死が早期に見られたと報告している。また、一般に、一回照射の量を多量にすると細胞は短期間に致死障害を受け細胞分裂を経ず死に至るといわれており、その組織所見としては核破碎や細胞質融解が見られるといわれている¹²⁾。これらのことを考え合わせると、PSK を少量分割照射に併用することにより、より大量の放射線照射と同様の組織学的効果が比較的早期より出現しているものと考えられる。

では、PSK 併用により cell cycle 上、一体どの時期において radiosensitivity が高まっているのであろうか。本研究の成績では、上記のごとく cell kinetics 上、14Gy 以降の Over 4C Cell population の推移において、2 群間で最も大きな差が認められた。この Over 4C Cell の出現は、前述した Endomitosis による巨核細胞形成によるものと考えられるので、投与群において Over 4C Cell が非投与群に比し少ないのは、この Endomitosis を起こす細胞が少ないためであろうと考えられる。即ち、PSK 併用により癌細胞は S~G2 期に至る間に sublethal ではあるが control に比しより強い damage を受けて、G2-M 期に集積してくる。その結果、最も放射線感受性の高い G2-M 期の照射 damage が lethal な効果となつて、多くの癌細胞が Endomitosis へ移行しないまま細胞死する。このような結果が 14Gy 以降の Over 4C Cell の減少として現れ、しかも、その効果は PSK dose dependent である可能性が示唆された。

照射効果不良例の検討では、PSK 併用の有無にかかわらず、2C Cell は全例 30Gy の時点でも高率に残存していた。また、この時点の組織像でも PSK 併用による相違は認められず、放射線変化に乏しい腫瘍細胞が多く残存していた。しかし、4C Cell, Over 4C Cell の変化において照射効果良好例と同様な傾向が PSK 投与群において見られたことから、不良例においても PSK の照射効果増強作用が発現している可能性が考えられ、今後、症例を増やしてこの点に関し追求していきたい。しかし、放射線抵抗性腫瘍に関しては、放射線生物学的に諸種の因子が複雑に絡み合った状態で存

在しており、cell kinetics の面からだけで論じるにはまだまだ問題があり、多面的なアプローチが必要であると考えている。

稿を終わるに臨み、御指導と御校閲を賜りました関場香教授に深謝し、また直接御指導いただいた奥田博之講師、石井良夫講師に厚くお礼申し上げます。また、標本作製等でお世話になつた岡崎靖子技師をはじめ、研究室諸兄に感謝します。本研究の要旨は第37、38回日本産科婦人科学会学術講演会ならびに第22回日本癌治療学会総会において発表した。

文 献

1. 海老原順一：放射線による子宮頸癌の核 DNA の変化。慈医誌，86：462，1971。
2. 藤田哲也：顕微測光法。組織細胞化学の最新技術。（濱島義博，藤田哲也 編），日本組織細胞化学学会，京都，1977。
3. 岩井正二，塚原嘉治：子宮頸癌の放射線療法と PS-K。癌の臨床，22：730，1976。
4. 笠松達弘，近江和夫，野沢志朗，中西 敬，松本よ志，恒松隆一郎，種村健二郎，山田拓郎，瀬戸輝一：子宮頸癌放射線療法における PS-K の併用効果。医学のあゆみ，91：515，1974。
5. 数田 稔：子宮頸癌放射線療法における PS-K の併用効果。日産婦誌，37：1908，1985。
6. 林 健興：放射線治療に伴う子宮頸癌の cell kinetics—特に落射型顕微測光法による核 DNA 変化の解析—。日産婦誌，36：2138，1984。
7. 御供泰治，太田和雄：固形癌の細胞回転と化学療法。癌と化療，5：709，1978。
8. 太田和雄，野村和弘：フローサイトメトリー—手技と実際—。蟹書房，東京，1984。
9. 奥田博之，林 裕治，吉田京介，浅野浩一，数田稔，関場 香：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。Oncology & Chemotherapy，3：66，1987。
10. 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 DNA 量の解析とその臨床的意義について。日癌治誌，16：1456，1981。
11. 園田隆彦：子宮頸癌における PS-K 併用の試み。癌と化療，2：1067，1975。
12. 杉下 匡：子宮頸癌の放射線治療と細胞診。臨婦産，32：596，1978。
13. 浦野宗保，小池幸子，安藤興一，碓井貞仁，小林靖彦：PS-K と放射線照射との併用に関する基礎的研究。癌の臨床，22：1095，1976。
14. Fu, Y.S., Reagan, J.W. and Richart, R.M.: Definition of precursors. Gynecologic. Oncology, 12：220，1981。
15. Okagaki, T. and Izuo, M.: Correlation of

- modal DNA values obtained by microphotometry and tests for their shifts. *J. Natl. Cancer Inst.*, 60 : 1251, 1978.
16. *Richards, B.M. and Atkin, N.B.* : DNA content of human tumors: Change in uterine tumors during radiotherapy and their response to treatment. *Brit. J. Cancer*, 13 : 789, 1959.
17. *Sprenger, E., Ulrich, H. and Schondorf, H.* : The diagnostic value of cell-nuclear DNA determination in aspiration cytology of benign and malignant lesions of the breast. *Analytical and Quantitative Cytology*, 1 : 29, 1979.
18. *Terasima, T. and Tolmach, L.J.* : Changes in X-ray sensitivity of Hela cells during the division cycle. *Nature*, 190 : 1210, 1961.
19. *Tolmach, L.J. and Marcus, P.I.* : Development of X-ray induced giant Hela cells. *Exp. Cell Res.*, 20 : 350, 1960.
20. *Yau, T.M., Kim, S.C., Nygaard, O.F. and Gregg, E.C.* : Correlation of cell cycle parameters with radiation sensitivity in series of murine L5178Y cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 37 : 429, 1980.

(No. 6277 昭62・11・10受付)