

研究速報

Bromodeoxyuridine in vitro 連続標識法に
よる potential doubling time の評価
—頭頸部扁平上皮癌における検討—

- 1) 弘前大学医学部放射線医学教室
- 2) 青森県立中央病院臨床検査部
- 3) 東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門

真里谷 靖¹⁾ 青木 昌彦¹⁾ 樽沢 信子¹⁾
竹川 鉦一¹⁾ 貝森 光大²⁾ 阿部 由直³⁾

(平成5年3月5日受付)

(平成5年5月24日最終原稿受付)

Determination of Potential Doubling Time Using In Vitro
Continuous Labeling Method with Bromodeoxyuridine
: Estimation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Yasushi Mariya¹⁾, Masahiko Aoki¹⁾, Nobuko Tarusawa¹⁾,
Shoichi Takekawa¹⁾, Mitsuomi Kaimori²⁾ and Yoshinao Abe³⁾

- 1) Department of Radiology, Hirosaki University, School of Medicine
- 2) Department of Clinical Laboratory, Aomori Prefectural Central Hospital
- 3) Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Cancer, Tohoku University

Research Code No. : 407

Key words : Head and neck carcinoma, Potential doubling time,
Bromodeoxyuridine, In vitro labeling, Repopulation

Using in vitro continuous labeling with bromodeoxyuridine and immunohistochemical staining, potential doubling time (Tpot) was calculated in 24 patients with head and neck carcinoma treated with radiotherapy. There was no evident correlation between Tpot and tumor response in the cases treated with external irradiation. However, in one case of T₂N₀ mesopharyngeal carcinoma with short Tpot, tumor was microscopically residual even though it showed good radioresponsiveness during radiotherapeutic course. Meanwhile, all patients treated with brachytherapy showed complete response in spite of various Tpot. Tpot seems significant in the selection of fractionation to control head and neck carcinoma with external radiotherapy.

はじめに

放射線治療期間中にも腫瘍細胞の repopulation がみられることは知られており、その際の

増殖速度の指標として、治療前の腫瘍の potential doubling time (Tpot) が重要であるとされている¹⁾。我々は、bromodeoxyuridine (BUdR)

を用いた in vitro 連続標識法²⁾を新鮮生検標本に応用し、Tpot を評価することを可能にしたので報告する。

対象および方法

対象は、頭頸部扁平上皮癌初回治療例 24 例である。このうちテレコバルトによる外照射施行例は 17 例で、9 例に根治照射を行った。分割は 1 回 2 Gy 週 5 回照射を用いた。また、²²⁶Radium による組織内照射を舌癌 T₂N₀7 症例に対して行った。

標本は、治療前に生検により原発巣から採取、リン酸緩衝液で洗浄後、直径 1~2 mm 程度の組織片に細切し、carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) にて約 4 気圧に加圧した BUdR (200 μM, Sigma 社製) 添加 thymidine 不含培地 (RPMI 1640, 10% 仔牛血清加) 中において、37°C でインキュベートした。BUdR 標識時間は 30 分、1~1.5 時間、3 時間とし、標識終了後ただちに 10% ホルマリンで固定し、抗 BUdR モノクローナル抗体を用い、免疫組織染色により BUdR 標識細胞を描出した (Fig. 1(A))。

標本上の腫瘍細胞は少なくとも 1,000 個以上カウントし、腫瘍細胞中の BUdR 標識細胞の割合を labeling index (LI) とした。LI の経時的増加から最小二乗法を用いて回帰直線を求め、これより標識時間 0 の LI (LI₀)、DNA 合成期時間 (Ts) を算出し (Fig. 1(B))²⁾、さらに、次式³⁾より Tpot を計算した。

$$T_{pot} = \lambda \cdot T_s / LI_0 \quad (\lambda = 1.0)$$

結 果

全 24 例における LI₀、Ts の平均は 15.1 ± 5.7% (mean ± s.d.)、18.9 ± 13.2 時間であった。これより得られる Tpot は平均 5.9 ± 5.4 日、中央値は 4.5 日であった。また、標識時間と LI の相関係数 (r) は、最大 0.998、最小 0.615、平均 0.882 ± 0.126 であった。

テレコバルトによる根治照射例 9 例における Tpot と局所一次効果との関連を検討すると (Table 1)、PR 群の Tpot は 4.3 ± 1.5 日、CR

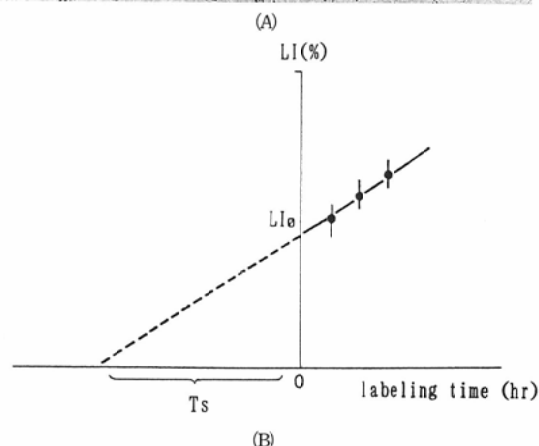
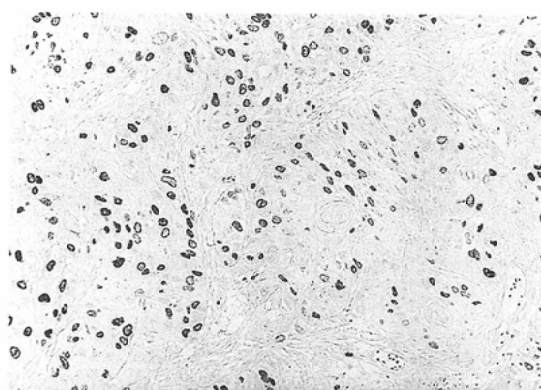


Fig. 1(A) Tumor cells labeled with bromodeoxyuridine (incubation time: 0.5 hour).

(B) Method to calculate Ts (duration period of DNA synthesis) and LI₀ (labeling index at 0 hour incubation)

群では 3.7 ± 1.4 日と、両群に明らかな差異を認めなかった。しかし PR 群の中には、照射前半で腫瘍が著明に縮小したにもかかわらず、照射終了後の原発部生検で組織学的に腫瘍残存が認められた中咽頭癌 T₂N₀症例もあった (case 1)。同例の Tpot は 2.1 日と短く、照射期間は 68 日とやや延長していた。

一方、組織内照射を施行した舌癌 7 例では、Tpot は最小 2.2 日、最大 30.0 日、平均 8.6 ± 9.1 日と症例間でばらつきがみられた。しかしいずれも原発巣の局所一次効果は CR であった。

考 察

照射期間中の腫瘍の repopulation の影響を抑

Table 1 Growth kinetic parameters and tumor response in the cases radically treated with telecobalt.

case	primary site	TNM	RT/Tov (Gy/day)	r	LI ₀ (%)	Ts (hr)	Tpot (day)	tumor response
1.	mesopharynx	T ₂ N ₀ M ₀	70/68	0.985	24.0	12.1	2.1	PR
2.	maxilla	T ₄ N ₂ M ₀	46/66	0.850	6.2	7.0	4.7	PR
3.	oral space	T ₃ N ₀ M ₀	70/71	0.615	15.8	15.2	4.1	PR
4.	larynx	T ₂ N ₀ M ₀	70/65	0.954	8.7	13.1	6.3	PR
5.	mesopharynx	T ₃ N ₀ M ₀	70/86	0.912	22.4	13.2	2.5	CR
6.	"	T ₄ N ₂ M ₀	70/86	0.840	26.7	12.5	2.0	CR
7.	"	T ₄ N ₂ M ₀	70/86	0.998	10.9	15.7	6.0	CR
8.	hypopharynx	T ₄ N ₂ M ₀	70/63	0.804	27.6	26.5	4.0	CR
9.	oral space	T ₃ N ₀ M ₀	70/57	0.993	15.9	15.9	4.2	CR

cf) RT/Tov: radiotherapy / overall treatment time, r: coefficient of correlation between labeling index and incubation time, LI₀: labeling index at 0 hour incubation, Ts: duration period of DNA synthesis, Tpot: potential doubling time

止できる照射法としては, accelerated fractionation が最も適するとされるが¹⁾, 正常組織の障害を考えると, 必ずしも全ての症例に用いるべきではない。従って, 同法が必要となる症例を選択するための適応基準を設定すべきであり, Tpot は理論的にその基準となり得るパラメータである¹⁾。

Tpot に関し最近注目される研究として, EORTC の trial がある¹⁾。しかし, 彼らの方法は BUdR の人体内投与を必要とし, 倫理的問題も含めて我国での導入は困難である。これに対して in vitro 標識²⁾を基本とする我々の手法は, 同じく生検標本を用いるものの標識薬剤の人体内投与が不要であり, 技術的にも比較的簡便であることから, 我国においてはより実用的な方法のひとつと考えられる。

照射効果との関連をみると, 外照射例において Tpot の長短と局所一次効果に特に相関はなかった。しかし, 実際には局所制御との関連が重要であるため, 今後多数の症例でより長期の観察を行うべきであり, 特に repopulation の影響を受ける可能性が高い short Tpot 症例の局所制御に関する検討が重要と思われた¹⁾。一方, 組織内照射施行例では, Tpot にかかわらず全例 CR を得た。組織内照射では, 少なくとも局所一次効果に関しては外照射ほど増殖動態の影響を受けないと考えられた。

本法の問題点としては, in vitro でのデータは in vivo のそれと異なるものではないかという疑問と, 細胞をカウントする際に腫瘍内の heterogeneity の影響を無視できないことが挙げられる。しかし, 前者については両者の標識率に大きな差異はないとする多くの報告があり^{3), 4)}, 特に問題にはならないと思われる。また後者については, 標識時間を 3 通り以上とすること, 標本中の平均的な部分を複数箇所カウントすること, heterogeneity が目立つ例ではカウント数を数倍に増やすことなどで対処が可能と考えられる。

最後に, 御指導, 御協力を戴いた岩手医科大学第一病理学教室佐々木功典教授, 青森県立中央病院臨床検査科沢田茂博氏に深謝致します。

文 献

- 1) Begg AC, Hofland I, Glabekke MV, et al: Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients: results from the EORTC cooperative trial 22851. *Seminars in Radiation Oncology* 2: 22-25, 1992
- 2) 佐々木功典, 荻野哲朗, 奥田信一郎, 他: 人固形癌の in vitro ³H-thymidine 標識法, 病理と臨床, 2: 571-573, 1984
- 3) Steel GG: Growth kinetics of tumours. 72-81, 1977, Oxford University Press, Oxford
- 4) Meyer JS and Bauer WC: In vitro determination of tritiated thymidine labeling index (LI). *Cancer* 36: 1374-1380, 1975