

# リンパ節転移陰性乳癌組織における thymidine phosphorylase 発現症例の検討

本原 昭子<sup>1)\*</sup> 麻 沼 和 彦<sup>2)</sup> 藤 森 実<sup>1)</sup> 土 屋 眞 一<sup>3)</sup>  
 浜 善 久<sup>1)</sup> 丸 山 正 幸<sup>1)</sup> 草 間 律<sup>1)</sup> 天 野 純<sup>1)</sup>

- 1) 信州大学医学部第2外科学教室  
 2) 信州大学医学部第1解剖学教室  
 3) 長野県がん検診センター病理

## Clinicopathological Significance of Thymidine Phosphorylase Expressed in Node-Negative Breast Cancer Tumors

Akiko MOTOHARA<sup>1)</sup>, Kazuhiko ASANUMA<sup>2)</sup>, Minoru FUJIMORI<sup>1)</sup>, Shin-ichi TSUCHIYA<sup>3)</sup>  
 Yoshihisa HAMA<sup>1)</sup>, Masayuki MARUYAMA<sup>1)</sup>, Ritsu KUSAMA<sup>1)</sup> and Jun AMANO<sup>1)</sup>

- 1) *Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine*  
 2) *Department of Anatomy and Organ Technology, Shinshu University School of Medicine*  
 3) *Division of Clinical Pathology, Nagano Cancer Detection Center*

The expression of thymidine phosphorylase (dThd Pase) in node-negative human invasive ductal carcinoma tissues was investigated by the immunocytochemical method using anti-thymidine phosphorylase monoclonal antibody. Subjects were 5 recurrent and 30 non-recurrent patients who underwent surgery at the Department of Surgery at Shinshu University Hospital between 1993 and 1996. The median follow-up period was 62.5 months. Positive dThd Pase staining was observed in the five recurrent and four non-recurrent cases. Tumor recurrence was significantly more developed in patients with dThd Pase positive staining than in those with negative staining ( $p < 0.01$ ). Among the nine dThd Pase positive cases, four patients who were administered doxifluridine (5'-DFUR) or medroxyprogesterone (MPA) did not manifest recurrence. Among the recurrent patients, two were cured by oral administration of 5'-DFUR or MPA. It is suggested that the expression of thymidine phosphorylase in human breast cancer tissues may be a risk factor for tumor recurrence. The prognosis of node-negative and dThd Pase positive breast cancer patients might be improved by hormonal therapy or oral administration of 5'-DFUR. *Shinshu Med J* 49 : 79-83, 2001

(Received for publication November 17, 2000 ; accepted in revised form December 15, 2000)

**Key words:** thymidine phosphorylase, node-negative, breast cancer, medroxyprogesterone, doxifluridine

チミジンホスホリラーゼ, リンパ節陰性, 乳癌, メドロキシプロゲステロン, ドキシフルリジン

### I 諸 言

病理組織学的にリンパ節転移を認めない乳癌 (n0乳癌) 患者の予後は極めて良好で, 5年生存率は90%以上と考えられている。そのためn0乳癌患者に対する術後化学療法やホルモン療法には様々な意見がある。

n0乳癌患者における危険因子が同定され, 術後化学療法およびホルモン療法を行うべき症例を選択できれば, 臨床上非常に有意義である。再発危険因子として, 乳癌細胞のestrogen receptor (ER)の有無, 脈管侵襲, 組織学的Grade<sup>1)</sup>, 年齢, 腫瘍径などが有意義であるとされており, また最近, 腫瘍細胞のerb-b2の増幅, vascular endothelial growth factor (VEGF) や thymidine phosphorylase (dThd Pase) の過剰発現

\* 別刷請求先: 本原 昭子 〒390-8621  
 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第2外科

と患者予後について検討が進んでいる<sup>2)</sup>。dThd Pase はチミジンをチミンと2-デオキシリボース-1-リン酸に変換する酵素であるが、5FU やそのプロドラッグであるドキシフルリジン (5'-DFUR) やテガフルルの活性化にも関係している。また dThd Pase は血管新生活性を有しており、多くの固形癌で dThd Pase の発現の亢進が報告されている。

今回われわれは、n0乳癌における dThd Pase 活性と患者の予後について検討を行った。

## II 対 象

信州大学第2外科学教室において、1993年から1996年の4年間に根治手術が行われた浸潤性乳管癌 n0症例のうち、再発例5例および、同時期に根治手術を施行した非再発症例より抽出した30例を対象にした。平均経過観察期間の中央値は62.5カ月 (17~91カ月) であった。全例女性で、5FU または、その誘導体を術後補助療法として服用した。病理組織学的に high risk と判断された症例 (リンパ管侵襲または血管侵襲が高度、または腫瘍径が大きい) については、cyclophosphamide (CPA), epirubicin hydrochloride (EPI), 5FU を用いた CEF 療法も行われた。ホルモン療法は、ER 陽性閉経後症例に対しては、tamoxifene (TAM) の経口投与が行われた。medroxyprogesterone (MPA) 投与は、数人の high risk 患者に対して行われた。

## III 方 法

### A 病理組織学的検討

手術によって得られた乳癌組織を、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋した。L-lysine コートしたスライドガラスを用い、薄切切片を作成し HE 染色を行った。

### B 免疫組織学的検討

Avidin-biotin complex (ABC) 法により dThd Pase の免疫染色を行った。キシレンとアルコールで脱パラフィンを行い、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、内因性ペルオキシダーゼを0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むメタノールに30分浸し失活させた。PBS で洗浄した後、1%の馬血清を用いブロッキングした。500倍に希釈した mouse anti-dThd Pase IgG monoclonal antibody (Clone; MOPC 21, Nippon Roche Research Center, Kamakura) を一次抗体とし、4°C で一晚反応させた。またコントロールとして正常マウ

ス IgG (east. acrs BIOLOGICALS 社製 Mouse IgG1, Myeloma Protein, Clone No: MoPC 21) を一次抗体の代わりに用いた。PBS で洗浄した後、二次抗体は200倍に希釈した horse biotinylated anti-mouse antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い室温で30分反応させた。PBS で洗浄した後、avidin biotinylated peroxidase complex (Vector Laboratories) に30分反応させ、PBS で洗浄した後、0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) と1% methylgreen solution. で発色、核染色を行い、脱水、封入した。

### C エストロゲンレセプター (ER) の測定

組織内 ER の測定を EIA 法にて行った (株式会社ビー・エム・エル, 東京)。14fmol/mg Protein 以上を陽性とした。

### D 統計処理

dThd Pase の発現と患者予後は、StatView computer program (Abacus Concepts, Inc, CA, USA) を用い Fisher の直接確率計算法で行った。

## IV 結 果

dThd Pase 陽性症例は、再発症例5例、非再発症例4例であり、dThd Pase の発現と再発の有無とに危険率1%未満で有意差を認めた (表1)。同一症例で二つ以上の組織型が全体の1/3以上を占める場合には1/3以上を占める組織型について別々に染色を行ったが、染色結果は同一であった。

組織型別の dThd Pase 染色結果を表2に示す。組織型と dThd Pase 発現に特徴は認められなかった。陰性例を図1Aに、陽性例を図1Bに示す。

dThd Pase 陽性症例9例中非再発例4例は全例術後補助療法として5'-DFUR または TAM 以外の内分泌療法が行われた。その内訳は MPA 3例、toremifene citrate 1例であった。

再発症例は術後化学療法として、全例5FU を服用していた。再発後5'-DFUR または MPA を投与された2例は治癒した (表3)。

ER は35例中15例が陽性であった。dThd Pase 陽性症例9例中 ER 陽性は再発例1例、非再発例1例の計2例であった。

CEF 療法は35例中7例に行われた。dThd Pase 陽性症例には4例に行われており、そのうち2例が再発した。再発後5FU 服用と CEF 療法のみが行われた2例は死亡した (表3)。

表1 Thymidine phosphorylase の発現と再発

	thymidine phosphorylase	
	陽性	陰性
再発例	5	0
非再発例	4	26

\*  
\*p<0.01

表2 Thymidine phosphorylase の発現と組織型

	dThd Pase	
	陽性	陰性
乳頭腺管癌	3	6
充実腺管癌	3	8
硬癌	4	10
浸潤性小葉癌	1	5
その他	2	6

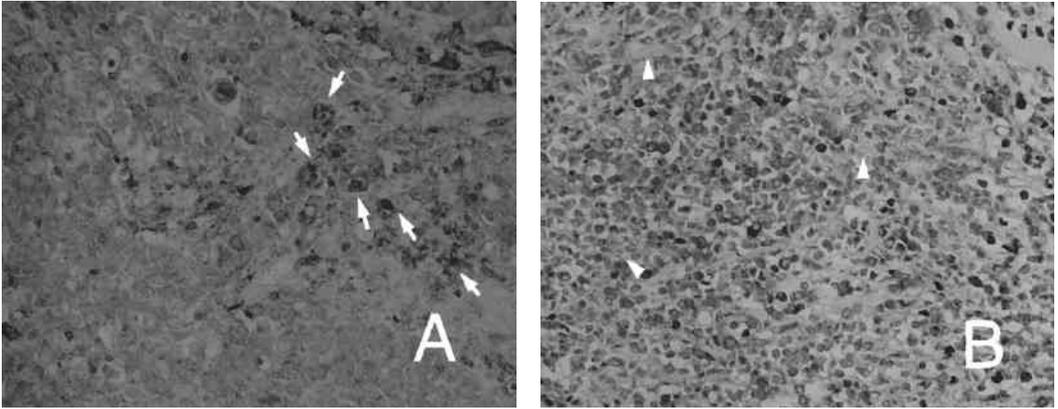


図1 Thymidine phosphorylase 染色

- A Thymidine phosphorylase 染色陰性症例。ほとんどの癌細胞は染色陰性である。わずかに陽性細胞を認める (矢印)。
- B Thymidine phosphorylase 染色陽性症例。染色強陽性および陽性細胞がほとんどを占めるが、陰性細胞が散見される (矢頭)。

表3 Thymidine phosphorylase 陽性症例の検討

症例	年齢	dThd Pase 発現	腫瘍径 (mm)	組織学的診断		ER	転移部位	治療		予後	経過観察 期間(月)
				ly	v			再発前	再発後		
1	59	陽性	40	2	1	-	骨	5-FU, CEF	5-FU, CEF	死亡	17
2	63	陽性	43	1	1	-	局所, 骨	5-FU, CEF	5-FU, CEF	死亡	72
3	24	陽性	45	0	0	-	肺	5-FU	5'-DFUR, CEF	治癒	80
4	75	強陽性	14	1	0	-	リンパ節	5-FU	MPA, CEF	治癒	87
5	78	強陽性	14	1	1	+	局所	5-FU, TAM	5'-DFUR, TAM irradiation	治療中	45
6	58	強陽性	105	2	1	-	なし	MPA, CEF		非再発	48
7	40	強陽性	75	1	0	-	なし	5-FU, MPA		非再発	75
8	47	強陽性	60	2	2	-	なし	5'-DFUR, MPA CEF		非再発	70
9	68	強陽性	70	1	0	+	なし	5'-DFUR toremifene citrate		非再発	43

ly : 0, リンパ管浸潤なし; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度

v : 0, 血管浸潤なし; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 高度

ER: estrogen receptor

CEF: CEF therapy

TAM: tamoxifene

MPA: medroxyprogesterone

5'-DFUR: doxifluridine

## V 考 察

dThd Pase と患者予後については、未治療 n0 乳癌症例における組織内 dThd Pase 濃度は単独では独立した予後因子ではない<sup>3)</sup>とされている。しかし一方、乳癌組織における dThd Pase の発現は重要な予後因子である腋窩リンパ節転移と相関するとの報告もあり<sup>4)</sup>、一定の見解は得られていない。dThd Pase は乳癌細胞のみならず、組織に浸潤した単球や正常乳腺組織にも発現が見られることがあり、組織内 dThd Pase 濃度は必ずしも乳癌細胞の dThd Pase の発現量を表してはいない。今回の n0 乳癌再発症例において免疫組織学的に dThd Pase が陽性であったことから、dThd Pase の乳癌細胞での発現は予後不良因子である可能性が推察された。

n0 乳癌に対する術後化学療法の有効性に関しては定まった見解はない。当教室では n0 乳癌においても、手術切除標本の病理組織学的検査で脈管侵襲が高度の症例に対して CEF 療法を行っている。CEF 療法で用いられる薬剤と dThd Pase の発現に関しては、エンドキサンが dThd Pase の活性を上げるとの報告<sup>5)</sup>や、5'-DFUR とエンドキサンの併用が有効との報告<sup>6)</sup>がある。しかし、dThd Pase の発現と CEF 治療効果に関連性はないとされ<sup>7)</sup>、われわれの検討でも、CEF 療法が行われた 7 例中 dThd Pase 陽性の 2 例に再発が見られた。また、CEF 療法後再発した 1 症例に対し、5'-DFUR 服用と CEF 療法を行い転移巣の消失が得られた。このことより、5'-DFUR 服用と CEF 療法の併用の dThd Pase 陽性症例に対する有効性についてはその可能性が考えられたが、CEF 単独療法は dThd Pase 陽性 n0 乳癌の予後を改善するとは考えられなかった。

5'-DFUR は組織内 dThd Pase により 5FU に変換されるため、5'-DFUR 投与により dThd Pase の活性が高い乳癌組織内の 5FU 濃度が高くなり、抗腫瘍効果が増し再発率が低下するとの報告がある<sup>7)</sup>。再発症例 5 例全例においては、5FU が投与されており、5'-DFUR は服用されていなかったこと、肺転移症例 1 例は 5'-DFUR 服用および CEF 療法により転移巣の著明な縮小効果をみたことから、5'-DFUR が dThd Pase の高発現乳癌の予後を改善する可能性が推察さ

れた。

一方、dThd Pase が強発現していた 9 例中 4 例の非再発症例の特徴として、術後ホルモン療法があげられる。1 例は Goserelin acetate の皮下注を受けており、もう 3 例は MPA の服用が行われていた。一方、再発例 5 例にこのホルモン療法が行われていなかった。Goserelin acetate は閉経前乳癌で有効性が認められている。MPA は進行再発乳癌における有効性が示されており、また一方、CEF との併用療法および 5'-DFUR との併用療法において、それぞれ単独より優れた成績が報告されている<sup>8)</sup>。MPA は血栓症、うっ血性心不全、肥満などの副作用が強いため、術後補助療法としては一般的に用いられていない。しかし、dThd Pase 陽性 n0 乳癌の予後が Goserelin acetate または MPA によるホルモン療法で改善する可能性が示唆され、これらのホルモン療法が症例によっては考慮されるべきであると考えられた。ただし、本検討では 5'-DFUR が dThd Pase の高発現乳癌の予後を改善する可能性が推察されており、n0 乳癌の予後改善に、5'-DFUR のみで充分なのか、あるいはホルモン療法を併用すべきなのか、今後の検討が必要と思われる。

dThd Pase 陰性 n0 乳癌では再発が認められていない。経過観察期間は充分長くはないので今後の経過観察が必要ではあるが、dThd Pase 陰性 n0 乳癌の術後化学およびホルモン療法に関しては、これまでの当科の方針通り、ER 陽性例では TAM および 5FU 系の薬剤、ER 陰性例では、5FU 系の薬剤のみの服用で良好な予後が得られる可能性が高いと推察された。しかし、これらの術後療法なしでも良好な結果が得られる可能性は否定できないため、今後検討を行ってきたい。

以上、n0 乳癌組織における dThd Pase の発現は危険因子の一つである可能性および、ホルモン療法が予後の改善に寄与する可能性が示唆された。n0 乳癌における再発率の低下を目指し、今後症例を重ね検討を続けて行きたい。

## VI おわりに

本実験で使用した mouse anti-dThd Pase IgG monoclonal antibody は Nippon Roche Research Center の御厚意により提供していただきました。

## 文 献

- 1) Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade

in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19 : 403-410, 1991

- 2) 戸井雅和, 黒井克昌 : 腫瘍血管と血管新生因子. *細胞* 31 : 3124-3127, 1999
- 3) 戸井雅和, 上野貴之 : 腫瘍血管新生の関連因子. *Mol Med* 35 : 1232-1241, 1998
- 4) Kudiak R, Miszczak-Zadorska E, Jesionek-Kupnicka D, Greger J : The activity of thymidine phosphorylase correlates with tumor size and lymph nodes status in breast carcinoma. *Z Naturforsch* 54 : 1096-1102, 1999
- 5) Iwata H, Mizutani M, Iwase T, Murai H, Miura S : A case of metastatic breast cancer achieving complete response by combination therapy with 5'-Deoxy-5-fluorouridine and cyclophosphamide. *Breast Cancer* 7 : 83-86, 2000
- 6) Sawada N, Ishikawa T, Fukase Y, Nishida M, Yoshikubo T, Ishitsuka H : Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 4 : 1013-1019, 1998
- 7) Yamamoto Y, Toi M, Tominaga T : Prediction of the effect of 5'-deoxy-5-fluorouridine by the status of angiogenic enzyme thymidine phosphorylase expression in recurrent breast cancer patients. *Oncol Rep* 3 : 863-865, 1996
- 8) 富永 健 : Medroxyprogesterone acetate (MPA). *医療ジャーナル* 34 : 1743-1748, 1998

(H 12. 11. 17 受稿 ; H 12. 12. 15 受理)

---