日消外会誌　28（4）：813～818，1995年

大腸癌における proliferating cell nuclear antigen および argyrophilic nucleolar organizer regions 染色法を用いた細胞増殖能の検討

昭和大学医学部外科

丸森　健司　河村　正敏　高村　光一　小松　信男
保田　尚邦　津嶋　秀史　佐藤　徹　横川　京児
角田　明良　渋沢　三喜　新井　一成　草野　満夫

大腸進行癌52例に対し proliferating cell nuclear antigen（PCNA）染色を施行し，標本採取部分および標本固定時間による発現率の変化を検討するとともに，argyrophilic nucleolar organizer regions（AgNORs）染色を施行し，PCNA，AgNORs 染色両者を用い細胞増殖能を検討した．標本採取部位では正常部→癌中心部→癌先進部の順に PCNA 発現率は高くなり，標本固定時間では固定時間が短いほど高くなった（$p<0.01$）．PCNA，AgNORs 染色両者による臨床病理学的検討では，組織型，壁深達度，脈管侵襲，リンパ節転移，ステージ分類において有意差を示した（$p<0.05$）．また，非治癒切除例や治癒切除後の短期再発例では PCNA，AgNORs とも高値を示し，AGNORs のみ短期再発例で有意差を認めた（$p<0.05$）．以上より，PCNA は標本の固定時間による発現率の変化に留意する必要があるが，細胞増殖能を的確に反映し，AgNORs とともに大腸癌の進行度，悪性度の指標になりうると思われた．

Key words: proliferating cell nuclear antigen, argyrophilic nucleolar organizer regions, colorectal cancer

はじめに

Proliferating cell nuclear antigen（以下，PCNA と略記）は DNA polymerase δ を補助する非ヒストン核タンパク質で，G_0～S 期にかけて核内に出現することが知られている．この PCNA に対するモノクロナール抗体を用いた免疫組織学的な染色による PCNA 発現は DNA 合成，細胞分裂と密接な関係にあり，癌における細胞増殖能を反映すると言われている．最近では，PCNA 発現により胃癌[1]，肝臓癌[2]などの悪性腫瘍の細胞動態や悪性度の検討さらに予後規定因子など，臨床的な応用が試みられている．今回われわれは大腸癌摘出標本を用いて PCNA 染色を行い，標本採取部位および標本固定時間による発現率の変化を検討した．また，PCNA 染色と同様に癌における細胞増殖能を反映するとされている argyrophilic nucleolar regions（以下，AgNORs と略記する）染色を施行し，PCNA，AgNORs 染色両者による大腸癌の細胞増殖能を観察し，悪性度および予後との関連について検討した．

＜1995年1月11日受理＞別刷請求先：丸森　健司
〒142　品川区旗の台1－5－8　昭和大学医学部外科

対象および方法

1）対象

1992年1月から同年12月まで当院で切除された大腸進行癌52例を対象とした．平均年齢は65.4歳，男女比は1：0.86，占居部位は盲腸3例，上行結腸2例，横行結腸6例，下行結腸2例，S 状結腸21例，直腸18例，手術は治癒切除43例，非治癒切除9例であった．

2）PCNA 染色法および計測法

摘出標本より正常部，癌先進部，癌中心部の3か所より検体を採取し，マスクドホルマリンを固定液として4時間固定後パラフィンに包埋，3 μ 厚で薄切にした．キシロール，エタノールで脱パラフィンした後，酵素抗体 Avidin-biotin-peroxidase complex 法にて染色した．すなわち Oncogene Science 社製 PCNA（Ab-1）の100倍希釈したものを1次抗体とし，4℃一晩反応させた後，ヒストファイン Streptavidin-Biotin-PO（M）キットを使用し，2次抗体を室温で15分間反応させた後，ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビシ

ンに15分間，0.006%H_2O_2加DAB発色基質で数分間反応させ発色した．さらにメチルグリーンを用いて核染色を施行した．また癌先進部の検体を用いて，固定時間を4時間にしたもののほかに，12時間，24時間，48時間とした標本をそれぞれ作製，同様の方法で染色し，固定時間の相違による発現率の変化を検討した．測定はバックグランドより強く染まる核を陽性として1症例あたり細胞1,000個中のPCNA陽性細胞数を計測し，発現率とした．

3）AgNORs染色法および計測法

癌先進部4時間固定の標本を同様の操作で脱パラフィンした後，Crockerら[3]の銀染色法に準じ，太田ら[4]と同様の方法で染色した．測定法はHE染色切片であらかじめ測定部位を確認後，1,000倍油浸レンズを用いて癌細胞核内に認めるAgNORsのdotを数え，1症例につき細胞100個中のdot数を算出した．また核内のAgNORsの形態は太田ら[4]の分類に従って計測した．

以上の要領でPCNAおよびAgNORs染色した癌先進部4時間固定の標本を用いて，臨床病理学的事項との比較および治癒切除例と非治癒切除例との比較を検討した．また治癒切除例43例はいずれも術後1～2年を経ているが，今回，短期に再発した症例についても，あわせて比較検討した．なお，各群の有意差検定はWilcoxon-T検定を用い，両側5%の危険率で有意差ありと判定し，臨床病理学的事項の記載は大腸癌取扱い規約[5]に従った．

成　績

1）採取部位によるPCNA発現率の変化

正常部では腺管基底部増殖帯で発現率が高く，また正常部や癌中心部より，癌先進部のほうが発現率は有意に高かった（$p<0.01$）（**Fig. 1, 2**）．

2）固定時間によるPCNA発現率の変化

固定時間による発現率の変化では，4時間，12時間，24時間，48時間の標本のPCNA発現率の平均値はそれぞれ57.3%，48%，45.3%，38.4%となり，固定時間が長くなるにつれ発現率が低下し，それぞれ有意差を認めた（**Fig. 3, 4**）．

3）PCNAとAgNORsとの関連

PCNAとAgNORsは相関係数(r)＝0.622と互いに有意な相関関係にあった（$p<0.01$）（**Fig. 5**）．

4）臨床病理学的事項との比較（**Table 1**）

a）組織型

PCNA, AgNORsとも高分化型腺癌で有意に低値を示した（$p<0.01$）．

Fig. 1　PCNA in each gland

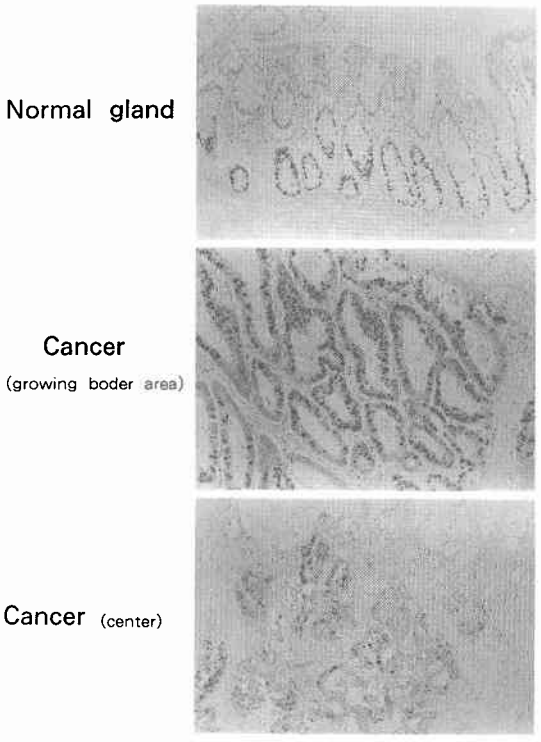
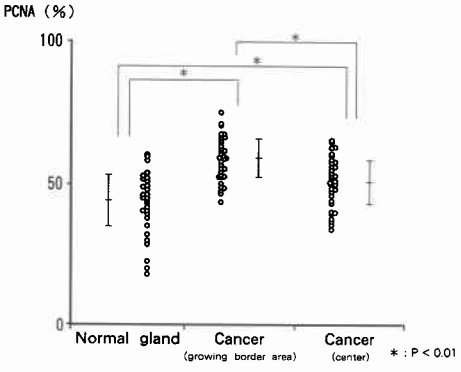


Fig. 2　PCNA in normal gland and cancer



b）壁深達度

PCNA, AgNORsともpmで有意に低値を示し（PCNA：$p<0.05$，AgNORs：$p<0.01$），ss. a_1，s. a_2の間には差は認めなかった．

c）リンパ管侵襲

PCNA, AgNORsともly_0，ly_1で有意に低値を示し（$p<0.05$），ly_2，ly_3となるにつれ高値を示す傾向に

Fig. 3 PCNA in each fixation time

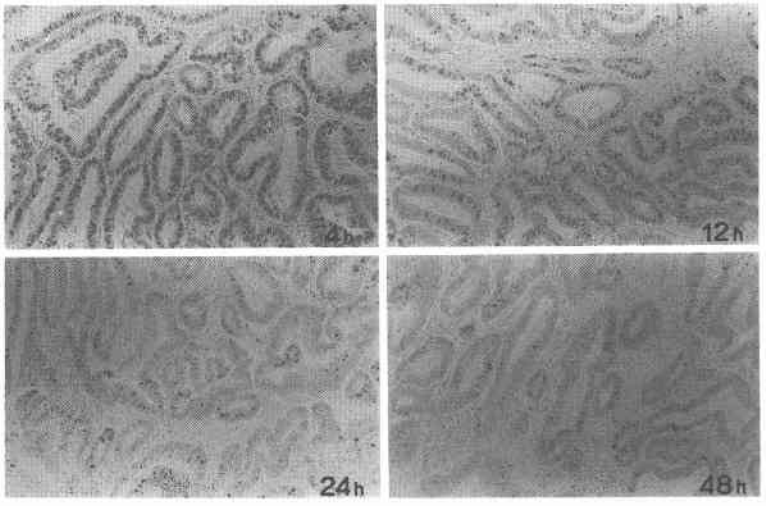


Fig. 4 PCNA in each fixation time

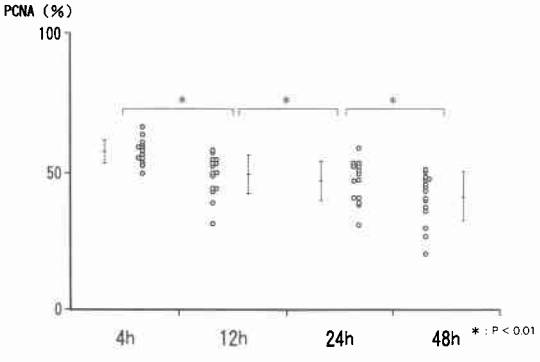
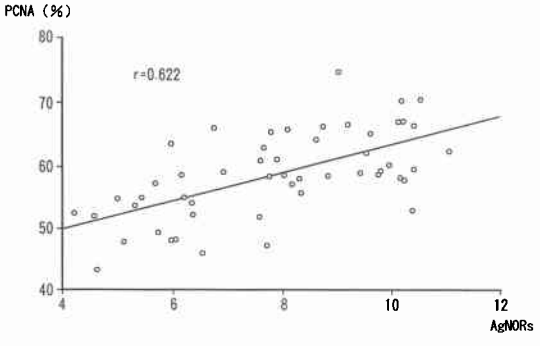


Fig. 5 Correlation between PCNA and AgNORs



あった．

d) 静脈侵襲

PCNA，AgNORs とも v_0で有意に低値を示し（$p<0.05$），v_1～v_3の間には差を認めなかった．

e) リンパ節転移

PCNA，AgNORs とも n_0で有意に低値を示し（$p<0.05$，n_3に対しては AgNORs のみ有意差あり），n_1～n_3の間には差を認めなかった．

f) stage 分類

PCNA, AgNORs とも進行した症例で高値を示す傾向にあり，stage I で有意に低値を示し（$p<0.01$），AgNORs のみ stage II でも有意に低値を示した（$p<0.01$）．

5) 治癒切除例と非治癒切除例との比較

PCNA, AgNORs とも非治癒切除例で高値を示す傾向にあるが有意差は認めなかった（**Fig. 6**）．

6) 短期再発例の検討

PCNA, AgNORs とも再発例で高値を示す傾向にあり，AgNORs のみ有意差を認めた（$p<0.05$）（**Fig. 7**）．

考　察

一般に腫瘍の悪性度判定には，細胞や構造の異型度といった病理組織学的および形態学的診断基準にゆだねる一方，細胞増殖能および細胞動態の解析といった細胞レベルでの客観的判断を加えることが必要である．細胞増殖能の解析には，①分裂期の細胞を直接観察する方法，②DNA 合成期にある細胞標識物を取り込ませて検出する方法，③DNA 合成期に必要な内在性の酵素や補助タンパクをターゲットにした免疫組織学的方法の3つのアプローチ法がある[6]．具体的な方法として ^{3}H-thimidine，5-bromodeoxyuridine

Table 1　Clinicopathological characteristics between PCNA and AgNORs

		n	PCNA(%)	AgNORs
Histological type	well	22	55.8±7.48	6.62±1.6
	mod	23	60.5±6.26	8.5±1.62
	muc	6	62.5±2.48	9.72±1.11
	por	1	57.9	10.22
Depth. of invasion	pm	10	50.3±4.07	5.49±0.84
	ss, a_1	8	59.6±5.61	7.62±2.12
	s, a_2	34	61±5.93	8.64±1.48
Lymphatic invasion	ly_0	7	5.16±6.65	6.21±1.3
	ly_1	21	56.9±6.13	6.93±1.64
	ly_2	21	61.9±5.21	9.03±1.4
	ly_3	3	65.8±5.28	10.3±0.31
Vascular invasion	v_0	18	53.8±5.68	6.23±1.39
	v_1	11	61.3±7.02	8.3±1.4
	v_2	21	60.8±5.8	8.87±1.64
	v_3	2	65.9±0.92	10±0.57
Lymph node metastasis	n_0	28	55.4±6.33	6.55±1.33
	n_1	10	62.5±6.4	8.71±1.48
	n_2	9	62.6±5.69	9.92±0.46
	n_3	2	60.5±2.69	9.94±1.58
	n_4	3	64±3.33	9.98±0.4
Histological stage	I	8	49.2±3.8	5.39±0.89
	II	15	58±5.65	6.88±1.21
	III	12	61.3±6.56	8.55±1.39
	IV	7	62.5±6.06	9.85±0.51
	V	10	61.5±4.48	9.91±1.67

*：$p<0.01$
**：$p<0.05$
***：$p<0.01$ (only AgNORs)

Fig. 6　Histological curability

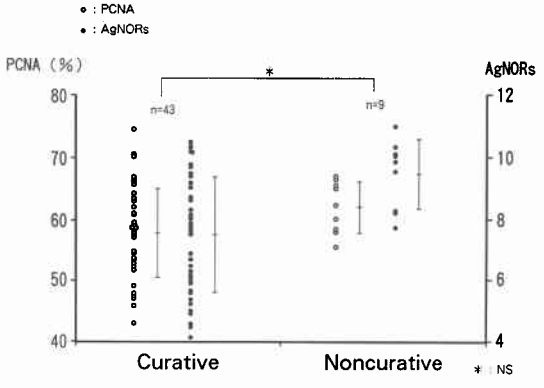
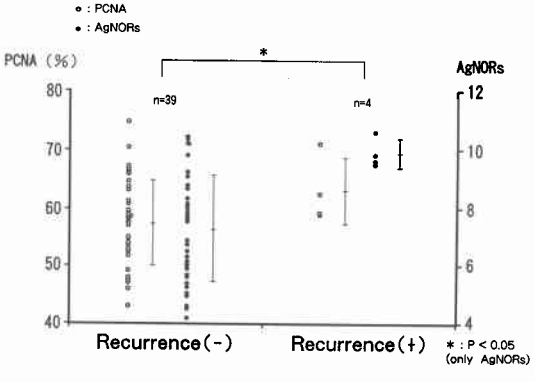


Fig. 7　Recurrence after curative operation



(BrdU)，ki-67，DNA polymerase δ などがあり，各種悪性腫瘍の細胞増殖能の判定に用いられてきた．しかし，これらの方法は，新鮮標本や凍結標本を使用したり，特殊な装置での解析という操作の繁雑さの問題や，体内被曝など人体への毒性の問題といった欠点があり，一般の臨床応用は困難であった．これに対し

PCNAはAgNORsとともには通常の病理学的診断に用いるパラフィン包埋切片で解析することが可能で，臨床応用という点では優れた方法といえる．

PCNAはMiyachiら[7]によって1978年にSLE患者の血清中の核内抗原としてはじめて報告された後，増殖細胞に関与する細胞成分であることがわかり，さらにDNA polymerase δの補助タンパクであることが明らかになった[8]．免疫組織学的染色法によるPCNAの発現はDNA→RNA→タンパク質という細胞の基本的活動に深く関与しており，細胞増殖の盛んな組織中で染色細胞が多くみられるとされている．西村ら[9]は大腸生検組織にPCNA染色し，正常腺管では腺管基底部の増殖帯に一致してPCNA発現率が高く，腺腫→腺癌と異型度が強くなるにつれPCNA発現率が上昇したとし，われわれの検討でも正常腺管基底部の増殖帯で発現率が高く，また，壊死成分の多い癌中心部よりも増殖の著しい癌先進部でPCNA発現率は有意に高値であった．しかし，胃癌や大腸癌の摘出標本においてはPCNA染色についての文献は少なく，その理由のひとつとして，標本固定における条件の問題が考えられる．松野ら[10]はPCNAの染色性に影響を与える因子として，組織の固定条件，つまり固定液と固定条件が重要であるとし，固定液ではマスクドホルマリンやエタノールは染色良好であったが，10%ホルマリンでは染色性が低く，固定時間でも時間の経過とともにその染色性が失われる傾向にあったと報告している．また，中野ら[11]はPCNA染色の適切な条件としてエタノール24時間固定がよいとしている．著者らは固定液を選ぶにあたり，通常のH.E. 染色による病理学的診断への影響が少ないものとして，マスクドホルマリンを選択したが，染色性は良好であった．固定時間においても今回，4時間，12時間，24時間，48時間の4段階にわけ固定時間による染色性の変化を検討したが，それぞれ発現率に有意な差を認めている．このようにPCNAは標本固定から計測に至るまでさまざまな影響因子を考慮したうえで条件を一定にする必要があるといえる．

PCNAの問題点のひとつとして計測における客観性があげられる．PCNAの場合，どの程度の染色強度で陽性とするかの基準の問題がある．田中ら[12]は同一切片上における非特異的染色強度を基準にしたとしており，われわれも間質における線維などのバックグランドの染色強度より強い染色を示したものを陽性とし，さらにメチルグリーンで核染色し，不染の核を見落とさないように工夫した．しかし，いずれにしても染色の強さの程度の評価や計測者による誤差などに検討の余地があるといえる．

一方，AgNORs染色はHowelら[13]によって確立された銀染色法で，これによって染色された核内銀染色顆粒はr-RNAの転写に関与する非ヒストンタンパクといわれている．この核内顆粒数の増加は細胞増殖を反映するとされ，乳腺[14]やリンパ節[2]，大腸[4]などの各臓器において良悪性の鑑別や癌の悪性度の検討に用いられている．著者[15]は胃癌摘出標本40例に対し，AgNORs染色を施行したところ，組織型，深達度，INF，組織間質量で有意差を認め，さらに5-bromodeoxyuridine (BrdU) とも有意な相関関係にあり，AgNORsが癌の進行度や悪性度の指標として有用であることを，すでに報告している．

今回の大腸癌の検討では組織型，壁深達度，脈管侵襲，リンパ節転移，組織学的進行度といった臨床病理学的な各因子においてPCNA，AgNORs染色とともに有意差を認めており，互いに有意な相関関係にあったことから，PCNA，AgNORsとも癌の進行度，悪性度の指標として有用といえる．さらに今回は治癒切除例と非治癒切除例との比較や治癒切除後の短期再発例のような臨床的背景についても検討したが，非治癒切除例や短期再発例でPCNA，AgNORsとも高値を示す傾向にあるも有意差を認めるには至らなかった．これは対象となる症例数が少ないためと思われるが，今後症例を増やして検討する必要があると思われた．

以上よりPCNAは細胞増殖能を的確に反映しており，AgNORsとともに大腸癌の進行度，悪性度の優れた指標となり，かつ操作も簡便であることから容易に臨床応用できる方法といえる．しかし，客観性の問題や長期的予後の指標となりうるかなど，今後さらに症例数を増やし検討する必要があると思われた．

稿を終えるに当たり，ご校閲を賜りました旭川医科大学第2外科水戸廸郎教授に深謝いたします．

本論文の要旨は第42回日本消化器外科学会総会（1993年7月，大阪）および第48回日本大腸肛門病学会総会（JDDW，1993年9月，神戸）にて発表した．

文　献

1) Jain S, Filipe MI, Hall PA et al: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric cancer. J Clin Pathol **44**: 655—659, 1991
2) Crocker J, Paramjit N: Nucleolar organizer regions in lymphomas. J Pathol **151**: 111—118, 1987

3) Matsuno Y, Hirohashi S, Furuya S et al: Heterogeneity of proliferating activity in nodule-in-nodule lesion of small hepato cellular carcinoma. Jpn J Cancer Res 81：1137—1140, 1990
4) 太田秀一，川瀬紀夫，風間和男ほか：大腸腫瘍における核小体形成(AgNORs)の検討．癌の臨 37：953—958，1991
5) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約．第4版．金原出版，東京，1985
6) 土橋康成，光藤章二，時田和彦ほか：消化器生検診断と増殖マーカー解析．消内視鏡 4：1767—1775，1992
7) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 121：2228—2234, 1978
8) Bravo R, Blundell PA: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. Nature 326：515—517, 1987
9) 西村和彦，細川洋平，藤本荘太郎ほか：PCNA免疫組織化学によるヒト大腸腫瘍の進展に伴なう細胞増殖と増殖の場の変化の検討．日消病会誌 90：647—654，1993
10) 松野吉宏，向井 清：増殖細胞核抗原(PCNA)．病理と臨 9：879—883，1991
11) 中野 浩，生田目公夫，熊田 馨ほか：Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)発現率による胃癌増殖活性の評価—その基礎的検討と臨床応用について—．日外会誌 94：580—592，1993
12) 田中一成：抗PCNA抗体による増殖細胞核の染色—パラフィン切片への応用—．病理と臨 9：791—798，1991
13) Howell WM, Black DA: Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. Experientia 36：1014—1015, 1980
14) Smith R, Crocker J: Evaluasion of nucleolar organizer resion-associated proteins in breast malignancy. Histopathology 18：5-14, 1986
15) 丸森健司：AgNORs染色法による胃癌細胞動態の研究—BrdU L.I.値と比較して—．昭和医会誌 53：156—162，1993

A Study Using Proliferating Cell Nuclear Antigen and Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions on Cases of Colorectal Cancer

Takeshi Marumori, Masatoshi Kawamura, Kouichi Takamura, Nobuo Komatsu, Naokuni Yasuda, Hidefumi Tsushima, Tohru Sato, Takashi Yokokawa, Akira Tsunoda, Miki Shibusawa, Kazushige Arai and Mitsuo Kusano
Department of Surgery, Showa University, School of Medicine

Immunohistochemical staining of PCNA was performed on paraffinembedded sections of 52 colorectal cancers, and the fixation time of the specimens and clinicopathological variables were compared. Staining of AgNORs was also evaluated in the same specimens. When the fixation time of the specimens by masked formalin was set at 4, 12, 24 and 48 hours in the advanced part of cancer, the labeling index of PCNA decreased with time and 4 hours of fixation was significantly higher. When sites in normal mucosa and advanced and central parts of cancer were examined, the labeling index of PCNA was the highest in advanced part of cancer. With regard to clinicopathological factors, significant differences between PCNA and AgNORs were noted. It was concluded that PCNA seems to reflect the cell proliferating activity in cancer as well as AgNORs.

Reprint requests: Takeshi Marumori Department of Surgery, Showa University, School of Medicine
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142 JAPAN