日消外会誌　36（1）：1～10，2003年

原　著

胆管癌の上皮内進展部における細胞増殖能，細胞活性および p53 遺伝子産物の解析

岩手医科大学中央臨床検査部臨床病理部門[1)]，岩手医科大学医学部第 1 外科講座[2)]
舩渡　治[1)2)]　菅井　有[1)]　上杉　憲幸[1)]　中村　眞一[1)]
吉田　徹[1)2)]　新田　浩幸[2)]　川村　英伸[2)]　須藤　隆之[2)]
佐々木亮孝[2)]　斎藤　和好[2)]

はじめに：胆管癌では高頻度に上皮内進展を伴うことが知られているが，その生物学的特徴は明らかにされていない．我々は，上皮内進展部（intraepithelial spread portion : IESP）と浸潤部（invasive portion : IP）の差異を明らかにする目的で MIB-1 positive rate（MIB-1 PR），AgNOR dot 数（AgNOR 数）および p53 positive rate（p53 PR）について解析した．**方法**：対象は胆管癌切除例 20 例で，MIB-1 PR，AgNOR 数をそれぞれ算出した．p53 PR は 4 段階に分類し評価した（PR＜5% : －; 5≦PR＜25 : ＋; 25≦PR＜50 : 2＋; PR≧50 : 3＋）．**結果**：MIB-1 PR は IESP : 21.5%, IP : 20.2% で両群間に有意差はみられなかった．AgNOR 数は IESP : 2.2, IP : 3.3 で浸潤部で有意に高かった（p＝0.0012）．p53 陽性例は IESP : 8/20 例（40%），IP : 13/20 例（65%）であった．p53 陽性の癌の多くは上皮内進展部でも過剰発現していた．**考察**：上皮内進展部の増殖能は浸潤部のそれと差がないことが明らかになった．細胞活性は上皮内進展部では低いことが推測された．p53 過剰発現は両者で関与していることが示唆された．

緒　言

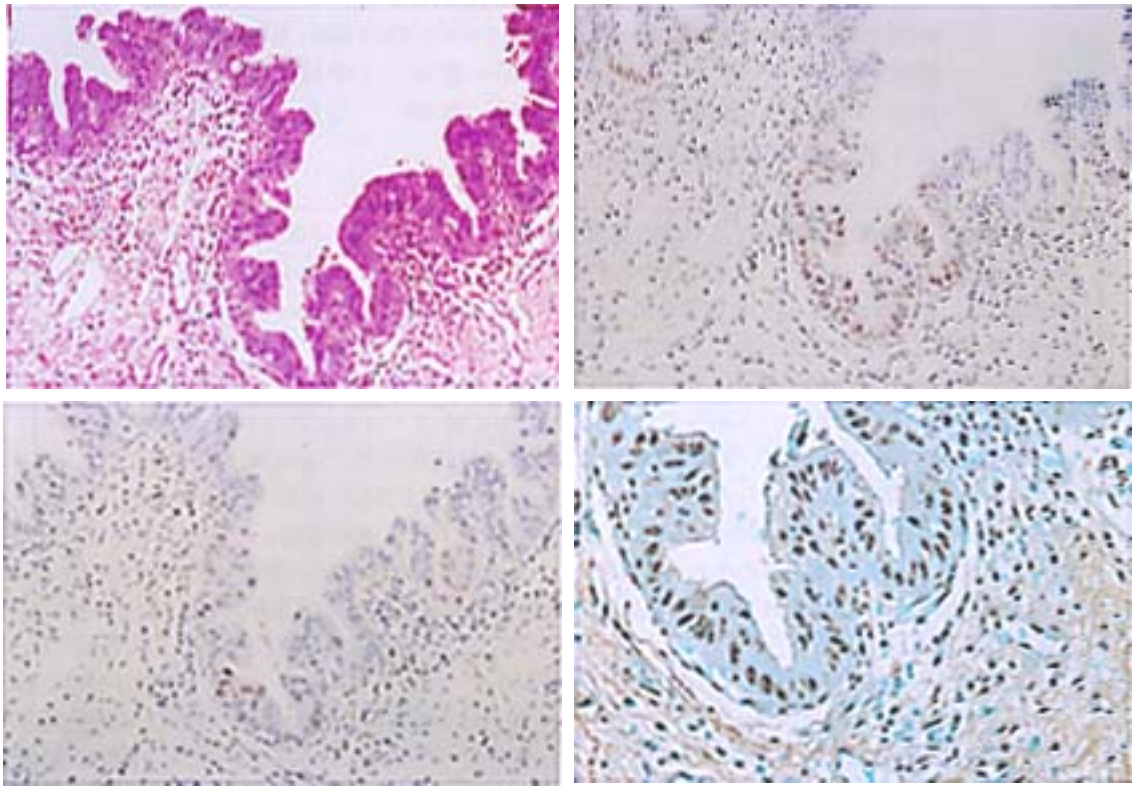
胆管癌は一般に浸潤部を中心とする主癌部とその周囲の上皮内進展部から構成されている場合が多い[1)～3)]．上皮内進展部は主癌部の周囲にみられるが，胆管癌の場合はそれが長軸方向に進展しているのが特徴である[4)～6)]．浸潤部については多くの検討がされているが，上皮内進展部については，その臨床的および生物学的意義についてはほとんど明らかにされていない．病理学的に上皮内進展部と浸潤部の細胞異型度は明らかに異なり，前者のそれは，しばしば severe dysplasia との鑑別が困難である場合もある．臨床的に両者を同じ悪性度をもった癌として扱ってよいか疑問であり，胆管切離断端部となる可能性の高い上皮内進展部の生物学的特徴を理解することは重要である．そこで，我々は胆管癌における浸潤部（invasive portion：以下，IP）と上皮内進展部（intraepithelial spread portion：以下，IESP）との生物学的差異を明らかにする目的で細胞増殖能（MIB-1 陽性細胞率），細胞活性（AgNOR 数）および p53 蛋白過剰発現について解析した．

＜2002 年 9 月 25 日受理＞別刷請求先：舩渡　治
〒020-8505　盛岡市内丸 19―1　岩手医科大学医学部
中央臨床検査部臨床病理部門

対象および方法

1．対象：1992 年 1 月から 1996 年 2 月までに岩手医科大学第 1 外科で手術を施行した胆管癌切除例中，主病巣の周囲に明らかに粘膜内癌を伴う 20 例を対象とした．平均年齢は 66.7 歳（52～79 歳）で，男性 17 例，女性 3 例であった．腫瘍の占居部位，組織型，深達度，進行度は胆道癌取扱い規約[7)]に従った．占居部位は上部胆管 5 例，中部胆管 12 例，下部胆管 3 例で，組織型は乳頭腺癌 4 例，高分化型管状腺癌 3 例，中分化型 10 例，低分化型 3 例であった．深達度は fm 1 例，ss 13 例，se 4 例，si 2 例で，進行度は stage I 1 例，stage II 10

Fig. 1　a : Intraepithelial spread portion of the bile duct carcinoma（H.E. ×200）. b : Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against p53. Nuclear staining was observed in cancer cells（×200）. c : Immunostaining for MIB-1. MIB-1 immunostaining was confined almost entirely to the nucleus（×200）. d : Argyrophilic nucleolar organizer region（AgNOR）staining. AgNORs were visualized as black dots within the nuclei（×400）.



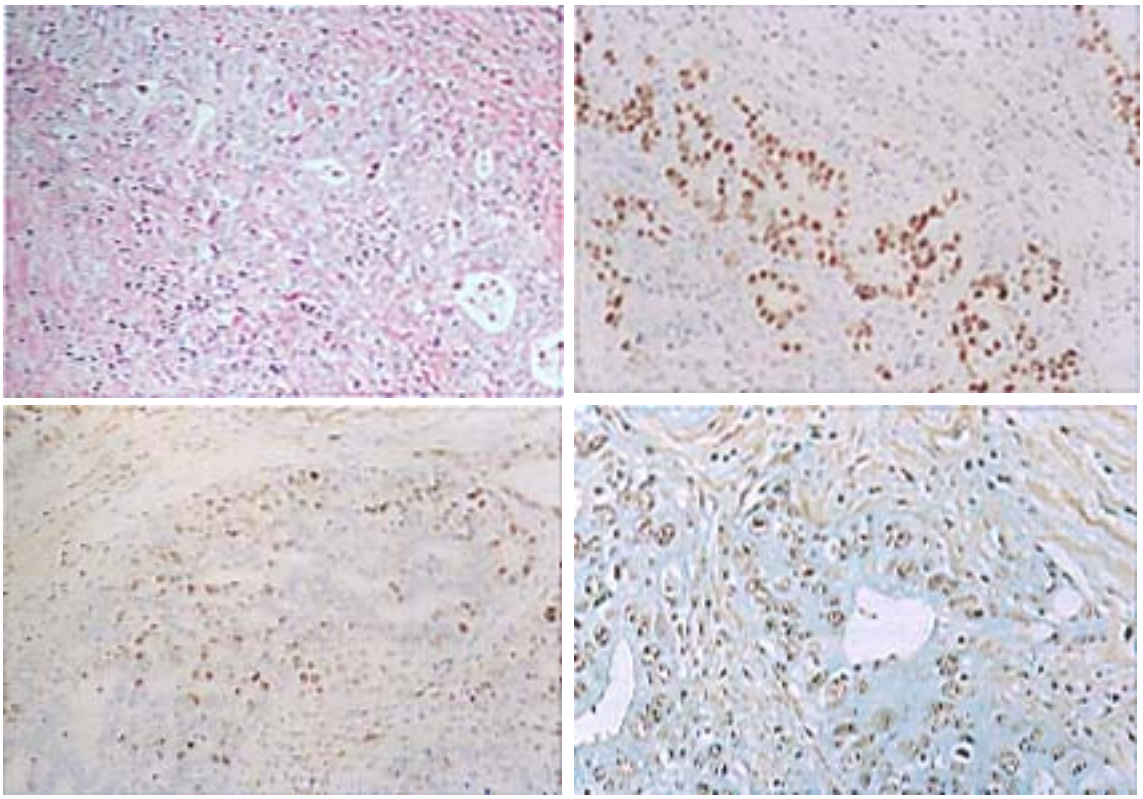
a	b
c	d

例，stage III 4 例，stage IV 5 例であった．

2．方法：切除後直ちに標本を 20% 緩衝ホルマリンで固定後，胆管長軸に並行に 3〜5mm 間隔で，胆管部分を全割して標本を作製した．パラフィン包埋後，4 枚の切片を作製し，それぞれ hematoxylin-eosin 染色（HE 染色），免疫組織化学染色（p53, Ki-67），AgNOR 染色を行った．HE 染色において病理組織学的解析を行い，明らかに上皮内進展を伴う症例を 20 例選択した．主病変占居部位の肝側に異型上皮細胞が連続的に粘膜内を 5mm 以上拡っている症例を上皮内進展として評価を行った（**Fig. 1a**）．

3．染色方法：(1) 抗 p53 および Ki-67 抗体による免疫組織化学：パラフィン包埋切片は脱パラ後，3%H_2O_2 メタノールにて内因性ペルオキシダーゼブロックを行った．マイクロウエーブを 5 分×4 回照射後（出力 500W，H2500 microwave processor，BIO RAD，U.S.A.）酵素抗体 avidin-biotin complex（ABC）法を施行した．すなわち，2% 正常ヤギ血清（ニチレイ，東京）で処理し，1 次抗体はそれぞれ，抗 p53 抗体（100 倍希釈，Do-7 Novocastra，Newcastle，UK）と抗 Ki-67 抗体（200 倍希釈，MIB-1，Imunotech S.A.，Marseille，France）を用い，一晩 4℃ で反応させた．2 次抗体

Fig. 2 a : Invasive portion of main tumor（H.E. ×200）. b : Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against p53. Nuclear staining was observed in cancer cells（×200）. c : Immunostaining for MIB-1. MIB-1 immunostaining was congfined almost entirely to the nucleus（×200）. d : Argyrophilic nuclealar organizer region（AgNOR）staining. AgNORs were visualized as black dots within the nuclei（×400）.



a | b
c | d

としてビオチン標識ヤギ抗マウスIgG＋ウサギIgG抗体（ニチレイ）を30分室温で反応させ，3次抗体にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ニチレイ）を用いた．発色にはdiaminobenzidineを用い，Carraziのヘマトキシリンで核染色を行った.（2）Argyrophilic nucleolar organizer region（以下，AgNOR）染色はPlotonら[8)9)]の1-step法に従って行った．100cc蒸留水に2gのゼラチン（DIFCO，Detroit）と，1mlの蟻酸（和光純薬工業，大阪）を溶解したものをA液，50%硝酸銀水溶液（関東化学，東京）をB液とし，A液とB液をそれぞれ1：2の割合で混合したものを用いた．室温，暗室で15〜20分間反応させ，蒸留水で水洗し，5%チオ硫酸ナトリウムで処理した．核染色はライトグリーンで行った．

4．評価方法：（1）p53 score：腫瘍細胞全体の陽性率を4段階に分類した．すなわち，陽性率が5%未満を－，5〜25%未満を1＋，25〜50%未満を2＋，50%以上を3＋とした．陽性症例の判定は1＋以上をp53陽性と判定した.（2）MIB-1陽性細胞率：顕微鏡100倍下で500〜1,000個の腫瘍細胞を浸潤部と上皮内進展部で無作為に5〜10視野を選び，陽性細胞率を算出した．胆管の正常部分の上皮を陽性コントロールとした.（3）AgNOR

Table 1　Histological findings, p53 score, MIB-1 labeling indices, AgNOR numbers and prognosis

No.	Age/Sex	Locasion	Histology	stage	Operation	Depth	n	ly	v	pn	hm	dm	em	IESP			IP			Prognosis		Recurrrence
														p53	MIB-1	AgNOR	p53	MIB-1	AgNOR			
1	64M	Bscrl	tub2	Ⅱ	HPD	ss	—	2	1	3	2	0	0	3+	40.8	2.80	2+	53.1	2.69	4y 3m	alive	No
2	52F	Bi	tub3	Ⅳa	PPPD	si	—	1	1	1	0	0	0	—	29.3	2.07	—	11.7	2.63	7y	alive	liver
3	68M	Bsr	tub2	Ⅱ	HPD	ss	—	1	1	1	0	0	0	3+	24.2	2.19	3+	23.4	4.30	3y 8m	dead	local
4	70M	Bmsi	tub2	Ⅳa	PD	si	—	1	0	1	0	0	0	—	9.7	1.75	3+	23.6	2.59	5y 2m	alive	No
5	79M	Bsmrli	tub3	Ⅳb	PPPD	se	1+	2	1	3	0	0	1	—	7.7	3.12	1+	14.7	2.98	5m	dead	liver, local
6	66M	Bm	tub2	Ⅱ	PPPD	ss	—	1	0	0	0	0	0	—	5.6	2.50	—	18.0	2.73	6y	dead	liver
7	67M	Bi	tub1	Ⅱ	PPPD	ss	—	1	1	0	0	0	0	—	25.4	1.79	—	4.4	3.06	3y	dead	other disease
8	68M	Bm	pap	Ⅱ	PD	ss	—	1	1	2	0	0	0	3+	5.0	2.02	2+	7.9	3.35	unknown		unknown
9	61M	Bm	tub1	Ⅱ	PPPD	ss	—	2	1	1	0	0	0	—	25.3	2.27	—	37.9	3.40	1y 9m	dead	P.C.
10	68M	Bm	tub2	Ⅲ	PPPD	se	1+	2	2	3	0	0	1	2+	28.2	3.80	2+	56.4	3.03	1y 3m	dead	liver
11	74F	Bmsi	tub3	Ⅲ	PPPD	ss	2+	2	1	3	0	0	0	1+	4.9	1.49	1+	20.9	1.84	2y 8m	dead	other disease
12	63M	Bm	tub1	Ⅲ	PD	se	2+	2	1	3	0	0	1	2+	34.2	2.05	3+	9.4	3.93	unknown		unknown
13	79M	Bsm	pap	Ⅰ	PPPD	fm	—	1	0	0	0	0	0	—	11.2	2.29	—	15.8	3.58	1y 10m	dead	other disease
14	58M	Bm	tub2	Ⅱ	PPPD	ss	1+	1	0	0	0	0	0	2+	20.0	2.93	3+	17.0	3.10	4y 2m	dead	liver
15	59M	Bmsi	tub2	Ⅱ	PPPD	ss	—	1	0	2	0	0	0	2+	13.9	3.96	3+	18.7	3.44	7y 5m	alive	No
16	74M	Bim	tub2	Ⅱ	PPPD	ss	—	2	0	2	0	0	0	—	22.9	2.14	3+	4.0	3.29	2y 11m	dead	PC, No 16 L.N.
17	55M	Bsmi	pap	Ⅱ	PPPD	ss	—	2	0	1	0	0	0	—	3.1	2.64	1+	10.1	3.34	3m	dead	liver, P.C.
18	69F	Bmsc	tub2	Ⅳa	PPPD	ss	1+	1	0	0	0	1	1	—	53.5	1.83	—	13.6	4.20	1m	dead	operative death
19	67M	Bmi	tub2	Ⅲ	PD	se	—	2	0	2	0	0	1	—	8.4	2.80	2+	29.8	3.71	2y 5m	dead	liver
20	73M	Bmi	pap	Ⅳa	PD	ss	3+	2	0	3	0	0	1	—	61.4	1.59	—	13.2	4.40	2y 5m	dead	other disease

HPD : Hepatopancreatoduodenectomy，PPPD : Pylorus preserving pancreatoduodenectomy，PD : Pancreatoduodenectomy，P.C. : Peritonitis carcinomatosa，L.N. Lymph nodes

数（AgNOR dot 数）：浸潤部と上皮内進展部でそれぞれ無作為に5〜10視野を選択し算出した．顕微鏡400倍下で腫瘍細胞100個の核内に認められたdot数をそれぞれ算出し，その平均値を1核あたりのAgNOR数とした．

5．統計学的処理：統計学的解析はMann-Whitney U testを用い，IESPとIPにおけるMIB-1 PR，AgNOR数の比較のみにWilcoxon検定を用いた．$p<0.05$の場合に統計学的に有意差ありと判定した．

結　果

（1）臨床病理学的因子，p53免疫染色，MIB-1，AgNORの結果と予後，再発形式

対象症例20例中，上皮内進展によりhm2と診断された症例が1例（No. 1）あったが，術後4年3か月現在，画像検査上再発を認めていない．その他19例はhm0であった．局所再発は予後不明2例を除いた18例中2例（No. 3, 5）に認められた（**Table 1**）．

（2）p53スコア

p53は腫瘍細胞の核にのみ観察され，細胞質にはみられなかった．陽性分布は腫瘍部でびまん性，あるいは局所性に認められた（**Fig. 1b，2b**）．p53陽性症例は，IESPが8/20例（40%），IPが13/20例（65.0%）であった．IESPとIPにおけるp53スコアを各症例間で比較するとIESP＞IPが2/20例（2例ともIESP : 3＋，IP : 2＋），IESP＜IPが8/20例（IESP : 2＋，IP : 3＋が3例，IESP：－，IP : 3＋が2例，IESP：－，IP : 1＋が2例，IESP：－，IP : 2＋が1例）で浸潤部で高い症例が多かった（**Fig. 3**）．

（3）MIB-1 positive rate（以下，MIB-1 PR）

MIB-1陽性細胞は全例核内に染色された（**Fig. 1c，2c**）．MIB-1 PRの中央値はIESPが21.5%，IPが20.2%で両群間に差異はなかったが，各症例間で比較するとIESPにおいてIPよりもMIB-1 PRが高値の症例が12/20例（60.0%）を占めていた（**Fig. 4,5**）．

（4）AgNOR数

AgNORのdotは核内に種々の大きさの褐色顆粒として明瞭に観察された（**Fig. 1d，2d**）．AgNOR数の中央値はIESPが2.23, IPが3.32で，浸潤部で有意に高かった（$p=0.0012$）．各症例間で比較するとIPにおいてIESPよりも陽性細胞数が高値の症例が16/20例（80.0%）で，浸潤部で高い症例が多かった（**Fig. 6,7**）．

（5）臨床病理学的因子およびp53免疫染色とMIB-1, AgNORとの関係

臨床病理学的因子（腫瘍占居部位，組織型，リンパ節転移の有無，stage）およびp53免疫染色とMIB-1, AgNORとの間には有意な関係は認めなかった（**Table 2**）．

（6）MIB-1 PRとAgNOR数との関係

IESP，IPにおけるMIB-1 PRとAgNOR数は有意な相関を示さなかった．

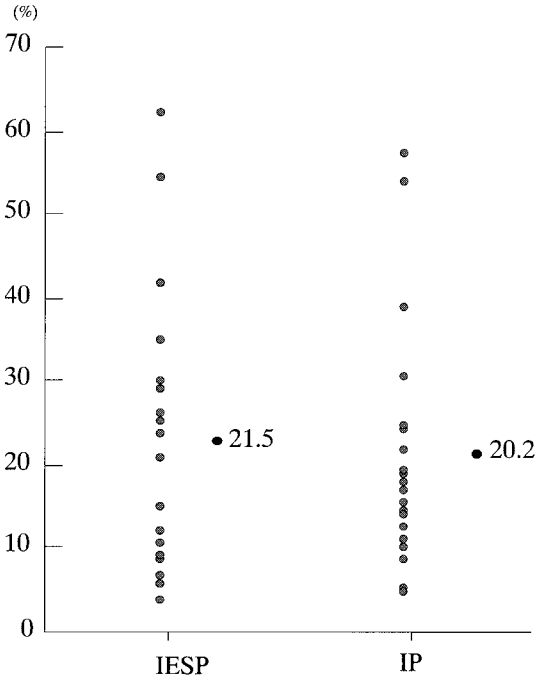
考　察

胆管癌における胆管長軸方向への進展様式を知ることは，手術の切離線を決定する上で重要であるが，術前や術中に胆管癌の浸潤範囲を決めることは困難である．現状では，術中の迅速病理診断に頼らざるを得ない状況であるが，胆管癌の上皮内進展部と炎症性異型上皮の鑑別，胆管粘膜の脱落など，迅速病理診断すらも困難な場合が多い．また，肝門部胆管癌や上部胆管癌の手術症例では胆管断端に癌が遺残し，非治癒切除となる場合がある．これらの胆管断端遺残癌に対して，術中・術後に放射線療法などの集学的治療を併用する際にも，胆管切離断端部となる可能性の高い上皮内進展部の生物学的特徴を理解することは重要である．また，局所再発の場合それが剝離面（em）の癌遺残のためか，胆管断端（hm）癌遺残のためか，あるいは周囲リンパ節転移からの浸潤によるものかは術後の画像所見のみでは正確には分からない．田中ら[10]は，胆管癌術後の5年生存率はhm（＋）とhm（－）の両者で差がなく，hm単独では予後規定因子にはならないと報告している．我々の検討でも，術死1例と予後不明2例を除く17例中，再発を認めたのが10例で，明らかに局所再発であったものは2例しか認めなかった．1例（No. 1）は主病巣から広範に拡がる上皮内進展のため，hm2と診断されたにも関わらず，術後4年3か月再発を認めていない．これらを考慮すると，

Fig. 3　Comparison of p53 score between intraepithelial spread portion and invasive portion. p53 score ; 0 : p53 positive rate（PR）＜5%. 1＋ : 0≦PR＜25%. 2＋：25≦PR＜50%. 3＋：PR≧50%.

		IESP				
		0	1+	2+	3+	Total
IP	0	7 35%	0	0	0	7 35%
	1+	2 10%	1 5%	0	0	3 15%
	2+	1 5%	0	1 5%	2 10%	4 20%
	3+	2 10%	0	3 15%	1 5%	6 30%
	Total	12 60%	1 5%	4 20%	3 15%	

Fig. 4　Mean numbers of MIB-1 labeling indices between intraepithelial spread portion and invasive portion. IESP : Intraeoithelial spread portion. IP : Invasive portion.



断端遺残癌は slow growing の性質を有し，浸潤部のそれとは明らかに生物学的性質が異なるように思われる．胆管癌主病巣の浸潤部とそこから胆管長軸方向に拡がり，しばしば肝側胆管断端にまで及ぶ上皮内癌は同様の性質を持つのか否かについて検討した．

p53 蛋白過剰発現は，IESP が 8/20 例（40%），IP が 13/20 例（65%）で浸潤部と上皮内進展部の両者に高頻度にみられた．このことから，p53 蛋白の過剰発現は癌の比較的早期の段階に関与していることが推測された．しかしながら，各症例間で比較すると浸潤部で高くなる傾向もある（IESP＞IP が 2 例，IESP＜IP が 8 例）．p53 遺伝子は上皮内癌では増殖抑制機構に関与し，癌の悪性度が増すにつれて，その遺伝子異常が蓄積し，転移，浸潤能にも関わってくるものと考えられる．事実，野生型 p53 遺伝子の生理機能として，細胞周期制御[11]，アポトーシス誘導[12]，血管新生阻害[13]などが知られている．また，p53 免疫染色は胆管断端の癌遺残の有無の組織診断の一助として，臨床応用

Fig. 5　Comparison of MIB-1 positive rate between intraepithelial spread portion and invasive portion. IESP＞IP : 12/20（60%），IESP＜IP : 8/20（40%）.

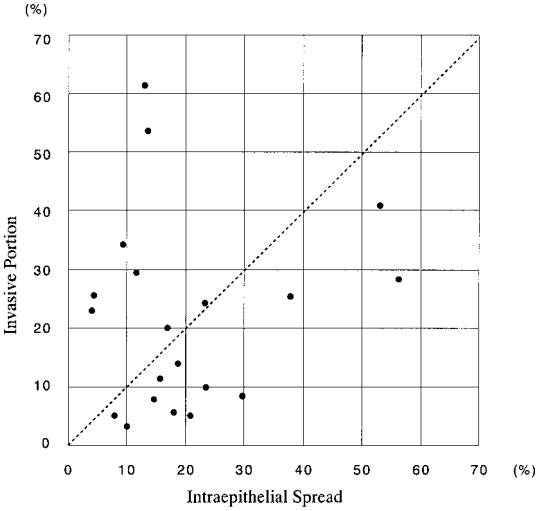


Fig. 6 Mean numbers of AgNOR per nucleus in intraepithelial spread portion and invasive portion. IESP : Intraeoithelial spread portion. IP : Invasive portion.

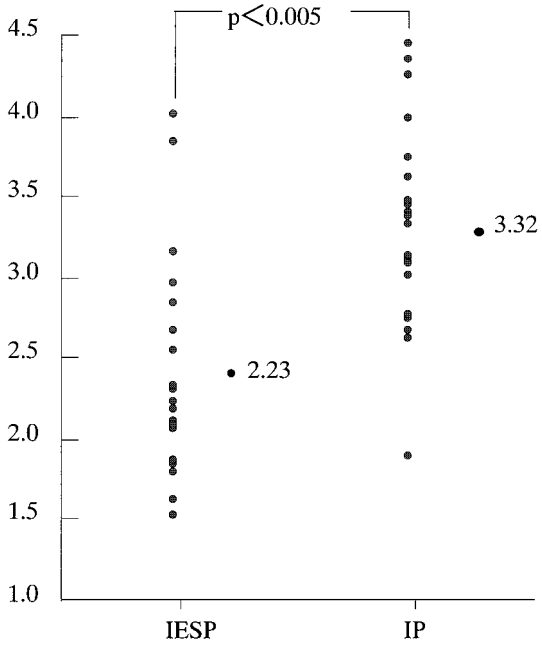
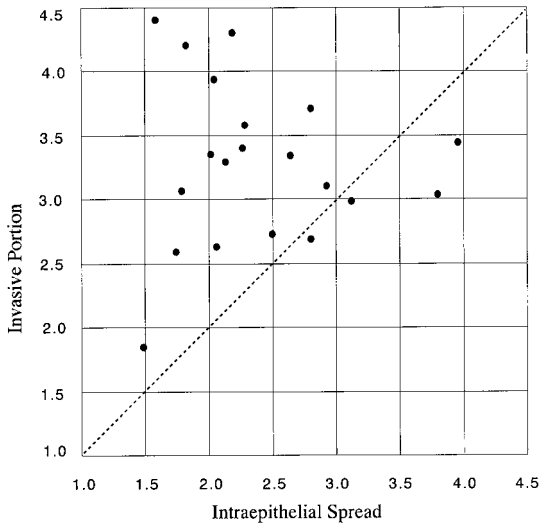


Fig. 7 Comparison of AgNOR numbers per nucleus between intraepithelial spread portion and invasive portion. IESP>IP : 4/20(20%), IESP<IP : 16/20(80%).



に有用と考えられる．

過去に，さまざまな悪性腫瘍でKi-67染色やAgNOR染色を用いた細胞増殖能や悪性度の評価が試みられた[14)~19)]．Ki-67抗原は細胞周期のG1後期，S，G2，M期に存在し細胞の増殖能を示す指標の一つとされている[20)]．一方，AgNORは細胞の蛋白合成動態に深く関与しているRNA polimerase Iなどの動態を捉え，転写活性を反映している[18)]．つまり，MIB-1染色は細胞増殖能そのものを反映し，AgNOR染色は細胞増殖能を含めた細胞活性を反映している可能性が高い．今回の我々の結果では，AgNOR数の中央値は浸潤部で有意に高かった(p=0.0012)．各症例間で比較しても，IESPよりICで高い症例が16/20例（80.0%）を占めた．これは，細胞活性は明らかに浸潤部の方が高いことを示している．一方，MIB-1 PRの中央値はIESPが21.5, ICが20.2で両群間に差はなかった．各症例間で比較するとIESでICよりMIB-1 PRが高値を示す症例が12/20例（60.0%）であった．胆管癌の細胞増殖能はIESとICでは差がないことが明らかになった．Ohashiら[21)]の食道癌の上皮内進展部と浸潤癌のMIB-1 PR（mean±SD）を比較した検討では，前者は18.4±5.05, 後者は31.2±6.67であった．Lee[14)]の報告でも胆嚢癌のMIB-1 PR(mean)は上皮内癌では34.8（SD=11.6%），浸潤癌では68.7（SD=10.2%）とMIB-1PRは上皮内癌において浸潤癌よりも有意に低値を示している．胆管癌では癌化のかなり早期の段階で増殖能が亢進することが推測される．つまり，胆管癌では上皮内癌になった時点で急激にGrowth fraction (GF)が亢進しピークに達し，その後浸潤癌になってもGFはプラトーの状態にあるということが考えられる．また，胆管癌の浸潤部における細胞増殖能は他の消化管悪性腫瘍よりも一般に低いことも推測される．

Okabeら[17)]はnon-Hodgikin ś lymmphomaにおいて，AgNOR数とKi-67陽性細胞率が相関したと報告している．一方，Soomroら[18)]は肺癌においてKi-67とAgNOR数は相関しなかったとしている．我々の検討でも，MIB-1 PRとAgNOR数の結果は相関しなかった．前述したようにKi-67は単

Table 2 Correlation of clinicopathologic findings and MIB-1 positive rate, number of AgNOR

factor	MIB-1 PR（%）			AgNOR dot number		
	IESP	IP	p value	IESP	IP	p value
Median	21.5	20.2	NS	2.2	3.3	p = 0.0012
Tumor site						
Bs (n = 5)	11.2	15.8	NS	2.6	3.3	NS
Bm (n = 12)	17.0	18.4		2.2	3.4	
Bi (n = 3)	25.4	4.4		2.1	3.1	
Histology						
pap (n = 4)	8.1	11.7	NS	2.2	3.5	NS
tub1 (n = 3)	25.4	9.4		2.1	3.4	
tub2 (n = 10)	21.5	21.1		2.7	3.2	
tub3 (n = 3)	7.7	14.7		2.1	2.8	
L.N. metastasis						
n(−)(n = 13)	13.9	18.0	NS	2.3	3.3	NS
n(+)(n = 7)	28.2	14.9		2.1	3.1	
stage						
Ⅰ (n = 1)	11.2	15.8	NS	2.3	3.6	NS
Ⅱ (n = 9)	13.1	18.0		2.5	3.3	
Ⅲ (n = 5)	25.3	17.0		2.1	3.4	
Ⅳ (n = 5)	28.2	14.7		2.1	3.0	
p53						
Positive (n = 8 ; 13)	18.7	18.7	NS	2.5	3.3	NS
Negative (n = 12 ; 7)	17.1	13.6		2.2	3.4	

Bs : Superior bile duct ; Bm : Middle bile duct ; Bi : Inferior bile duct ; pap : Papillary adenocarcinoma ; tub1 : Well differentiated adenocarcinoma
tub2 : Moderately differentiated tubular adenocarcinoma ; tub3 : Poorly differentiated tubular adenocarcinoma ; L.N. : Lymph node ; IESP : Intraepitherial spread portion ; IP : Invasive portion ; NS : Not significant

に細胞増殖の割合を表すのに対して，AgNOR は細胞の蛋白合成に関与し，細胞分化を含む細胞の activity 全体を反映している．また，過去の報告でも腫瘍の分化度が低いほどに，あるいは細胞異型が高度になるほどに AgNOR 数が増加するという解析が数多くなされている[14)19)22)～25)]．我々の検討でも AgNOR は IESP よりも IC で有意に高くなっていた．これらのことから AgNOR は腫瘍の悪性度を評価するには有用なマーカーであると考えられる．

今日まで多くの癌で，その細胞増殖能，細胞活性，p53 免疫染色の検討がなされてきた．しかし，我々の検討のように胆管癌の浸潤部と上皮内進展部をすべて同じ症例間で比較検討した報告はない．MIB-1 染色や AgNOR 染色は標本固定の条件などさまざまな影響を受け，症例間でのばらつきがかなりあることはよく知られており，条件の同じ症例間で比較検討することにこそ意義があると考える．今回の結果から，上皮内進展部の細胞増殖能は浸潤部のそれと差がないかむしろ高いことが明らかになった．また，細胞活性は上皮内進展部では低いことが推測された．これは癌細胞の増殖の場による差からくるものと思われる．浸潤している癌細胞は，増殖をゆるめ機能分化するものと推測される．

近年さまざまな癌でその発生・進展の機序が解明されつつあるが，胆管癌のそれに関しては不明の部分が多い．上皮内進展部を早期癌の状態と仮定してよいかどうかは議論されるべき点ではあるが，今後 microdissection などの手法を用いて，胆

管の炎症性異型上皮，上皮内進展部，浸潤部の遺伝子異常をそれぞれ明らかにし，胆管癌の癌化・進展のメカニズムを解明していく必要がある．

文　献

1）中沢三郎，内藤靖夫，市川正章ほか：粘膜面における胆管癌の広がりについて．日消病会誌　**75**：1370―1376, 1978
2）山口幸二：胆管癌の肉眼型と進展様式．消内視鏡 **4**：353―358, 1992
3）嶋田　紘，新本修一，中川原儀三ほか：胆管癌の進展様式―特に胆管壁の水平浸潤について．日外会誌　**86**：179―186, 1985
4）前場隆志，田中　聡，脇　正志：胆管癌9例の壁外浸潤に関する病理学組織学的検討．日消外会誌 **22**：1899―1902, 1989
5）瀧本　篤：胆管癌の進展様式と生物学的悪性度．胆道　**10**：289―295, 1996
6）Hayashi S, Miyazaki M, Kondo Y et al：Invasive growth patterns of hepatic hilar ductal carcinoma. Cancer **73**：2922―2929, 1994
7）日本胆道外科研究会編：外科．病理胆道癌取扱い規約．第4版．金原出版，東京，1997
8）Ploton D, Bobichon H, Adent JJ：Ultrastructural localization of NOR in nucleoli of human breast cancer tissue using a one steop Ag-NOR staining method. Biol Cell **43**：229―232, 1982
9）Ploton D, Menager M, Jeannesson P et al：Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem J **18**：5―14, 1986
10）田中信孝，登政　和，古屋隆俊ほか：肝側切除断端陽性中下部胆管癌の予後と術式に関する検討．日消外会誌　**28**：1698―1702, 1995
11）Mercer WE, Shields MT, Amin M et al：Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. Proc Natl Acad Sci USA **87**：6166―6170, 1990
12）Polyak K, Xia Y, Zweier JL et al：A model for p53-induced appotosis. Nature **389**：300―305, 1997
13）Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA et al：Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science **265**：1582―1584, 1994
14）Lee SC：Differences in cell proliferation and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen immunoreactivity in situ and invasive carcinomas of the extrahepatic biliary tract. Cancer **78**：1881―1887, 1996
15）Weidner N, Moore II DH, Vartanian R：Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in brast carcinomas using the novel “paraffin”-reactive MIB1 antibody. Hum Pathol **25**：337―342, 1994
16）Shibuya M, Ito S, Miwa T et al：Proliferative potential of brain tumors. Cancer **71**：199―206, 1993
17）Okabe Y, Nakamura S, Okamura H et al：The relation of argyrophilic proteins of nucleolar organaizer regions（AgNORs）to the proportions of Ki-67 or DNA polyimerase α-reacting cells in non-Hodgikin’s lymphomas. Anticancer Res **11**：2031―2036, 1991
18）Soomro IN, Whimster WF：Growth fraction in lung tumors determined by Ki67 immunostaining and comparison with AgNOR scores. J Pathol **162**：217―222, 1990
19）Ruschoff J, Bittinger A, Neumann K et al：Prognostic significance of nucleolar organizing regions（NORs）in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. Pathol Res Pract **186**：85―91, 1990
20）Gerdes J, Schlueter LLC, Duchrow M et al：Immunobiochemical and molecular biologic characterization of he cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol **138**：867―873, 1991
21）Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y et al：Proliferative activity and p53 protein accumulation correlate with early invasive trend, and apoptosis correlates with differentiation grade in oesophageal squamous cell carcinomas. Virchows Arch **430**：107―115, 1997
22）Quinn CM, Wright NA：The clinical assessment of proliferation and growth in humann tumors：Evalution of methods and applications as prognostic variables. J Pathol **160**：93―102, 1990
23）太田秀一，川瀬紀夫，塩川　章ほか：大腸腫瘍における核小体形成の検討．癌の臨　**37**：953―958, 1991
24）Ofner D, Totsch M, Sandbichler P et al：Silver stained nucleolar organizer regions（Ag-NORs）as a predictor of prognosis in colonic cancer. J Pathol **162**：43―49, 1990
25）菅井　有：大腸上皮性病変における Ag-NOR の生物学的意義．日消病会誌　**88**：2749―2756, 1991

Analysis of Proliferative Activity and p53 Gene Product in the Intraepithelial Spread of Advanced Bile Duct Carcinoma

Osamu Hunato[1)2)], Tamotsu Sugai[1)], Noriyuki Uesugi[1)], Shin-ichi Nakamura[1)],
Toru Yoshida[1)2)], Hiroyuki Nitta[2)], Hidenobu Kawamura[2)], Takayuki Sudo[2)],
Ryoko Sasaki[2)] and Kazuyoshi Saito[2)]
Division of Pathology[1)], Central Clinical Laboratory[2)], Department of Surgery,
School of Medicine, Iwate Medical University

Introduction：Bile duct carcinoma is known to spread intraepithelially with high frequency, but biological features remain to be clarified. To differentiate clearly among biological features of the intraepithelial spread portion (IESP) and the invasive portion (IP), we studied the number of argyophilic nucleolar organizer region proteins（AgNOR), Ki-67 positive rate（Ki-67 PR), and p53 overexpression（p53 score). **Methods**：We stained 20 bile duct carcinoma specimens with antihuman p53 protein monoclonal antibody, antihuman Ki-67 protein monoclonal antibody by streptavidin-biotin immunoperoxidase, and AgNOR by Ploton's 1-step method. **Results**：Ki-67 PR was 21.5% in IESP and 20. 2% in IP. AgNOR in IP was significantly larger than in IESP (IESP : 2.2, IP : 3.3, p＝0. 0012) . Nuclear p53 immunopositivity was observed in 8 of 20 patients (40.0%) in IESP and 13 of 20（65.0%）in IP. Cases of p53 positive stain in IP were also observed mostly in IESP. **Conclusion**：No difference in proliferative activity was seen between IESP and IP. This suggests that the cell kinetics of IESP are lower than in IP and that p53 overexpression plays a part in the early of carcinogenesis.

Key words : intraepithelial spread of bile duct carcinoma, invasive portion of bile duct carcinoma, cell activity, proliferative activity, p53 gene product

〔Jpn J Gastroenterol Surg 36 : 1—10, 2003〕

Reprint requests : Osamu Funato　Division of Pathology, Central Clinical Laboratory, School of Medicine, Iwate Medical University
19-1 Uchimaru, Morioka, 020-0023 JAPAN