

## VI 免疫染色による大腸絨毛状腫瘍中の増殖細胞の検討

### 1 目的

絨毛状腫瘍の病理組織学的検討および組織形態計測による検討から、絨毛状構造は一つの構造異型であり、悪性とすべき組織所見の一つであると見做された。絨毛状構造が悪性であることの一つの構造異型であるとする、粘膜内におけるその増殖様式は腺癌のそれと類似しているのではないかと考えられる。そこで、抗 DNA polymerase  $\alpha$  抗体を用いた免疫染色により絨毛状腫瘍中の分裂能を有する核を染色し、細胞増殖能の面から絨毛状腫瘍と良性腺管腺腫、腺癌との比較検討を行った。

### 2 材料と方法

材料は筑波大学附属病院および日立総合病院にてポリペクトミーおよび外科切除された良性腺管腺腫 15 例、粘膜内癌 6 例、絨毛状腫瘍 4 例、およびそれらの外科切除材料から採取した正常大腸粘膜 7 例である。これら各病巣の組織片を新鮮なうちに採取し、4% paraformaldehyde (PFA) 中にて 4°C で 18~20 時間固定した。PFA の浸透がよいように、組織片の大きさは最大径 1 cm 以内、厚さ 2 mm 以内とした。固定後、10%、15%、20% sucrose 加 phosphate buffered saline 中で、それぞれ 4°C で 6~8 時間ずつ洗い、OTC compound に包埋、液体窒素にて凍結した。包埋時、病巣の表層がでるように注意した。約 6  $\mu$  の凍結切片を作成し、室温にて十分乾燥した。

0.3%  $H_2O_2$  にて室温で 20 分および正常ヤギ血清にて室温で 20 分のブロッキングを行った後、マウス抗 DNA polymerase  $\alpha$  モノクローナル抗体 (医学生物学研究所, 名古屋) を用い、PAP 法にて免疫染色を行った。一次抗体は室温にて一晚反応させた。発色は 3,3'-DAB $\cdot$ 4HCl にて行い、対比染色はヘマトキシリンにて行った。

### 3 結果

正常粘膜，良性腺管腺腫，腺癌，絨毛状腫瘍の各病巣につき陽性率（核 1,000～10,000 個に対する陽性細胞の割合）を算出した。また，粘膜内での陽性細胞の分布が表層側で優位なものを surface，腺底側（粘膜筋板側）で優位なものを bottom，全層に均等に分布するものを diffuse として，各病巣の陽性細胞の分布を比較検討した<sup>6)</sup>。

病変別にみた陽性率の平均値は正常粘膜，良性腺管腺腫，絨毛状腫瘍，粘膜内癌の順に大きくなっていった。腫瘍性病変の陽性率は正常粘膜に比べて高く，良性腺管腺腫の陽性率  $38.8 \pm 7.65$  と正常粘膜のそれ  $23.0 \pm 4.35$  との間には t 検定（両側）上 1% の危険率で有意差が認められた。粘膜内癌では陽性率が高いようにみえたがばらつきが大きく，他の病変の陽性率との間には統計的有意差はみられなかった。また，絨毛状腫瘍の陽性率と良性腺管腺腫，腺癌の陽性率との間にも統計的な有意差はみられなかった（表 2 5）。

病変ごとに陽性細胞の分布をみると，正常粘膜では腺底部側約 2/3 に陽性細胞が分布し，腺底部で最も多く，表層粘膜にはみられなかった。粘膜内癌では病巣全層に陽性細胞が分布していることが多かった。それに対し，良性腺管腺腫では様々な分布を示したが，表層優位な型が比較的多かった。絨毛状腫瘍では全層に陽性細胞がみられたものの腺底側に陽性細胞が目立っていたため，分布型は bottom とした。絨毛先端部の陽性率は低かった（表 2 6，図 4 5～4 8）。

表 2 5 陽性率

組織	陽性率 (%)
正常粘膜	23.0 ± 4.35* (17.2 ~ 29.9) (n= 7)
良性腺腫	38.8 ± 7.65* (22.5 ~ 51.5) (n=15)
粘膜内癌	45.8 ± 11.3 (30.0 ~ 61.7) (n= 6)
絨毛状腫瘍	40.6 ± 2.88 (37.6 ~ 45.3) (n= 4)

\* p<0.01 有意差あり

表 2 6 陽性細胞の分布

組織	陽性細胞の分布		
	surface	bottom	diffuse
正常粘膜	0	7	0
良性腺腫	7	4	3
粘膜内癌	0	1	5
絨毛状腫瘍	0	4	0

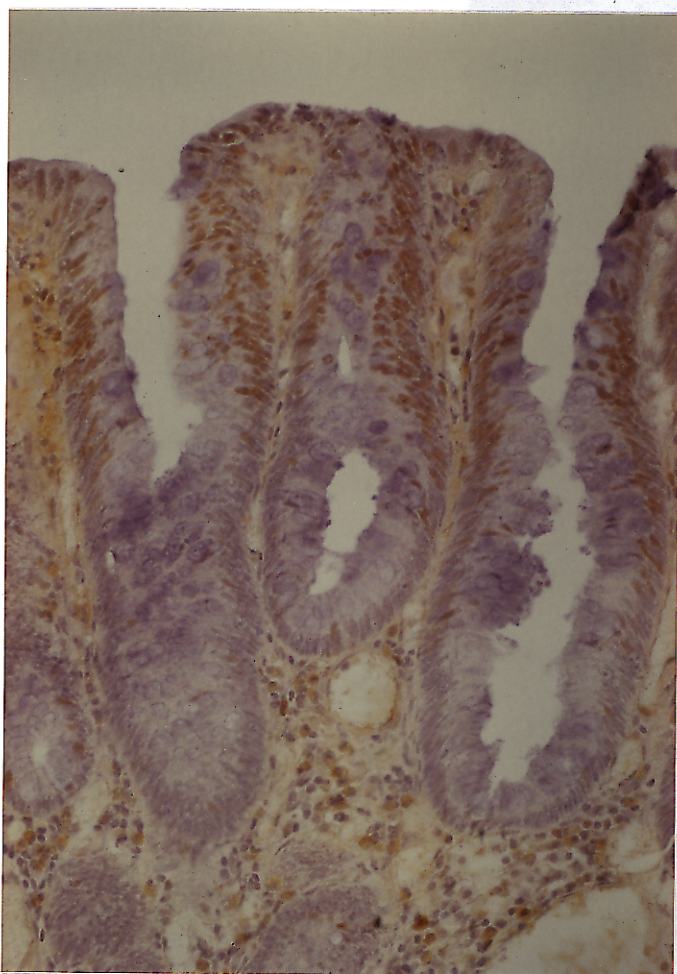
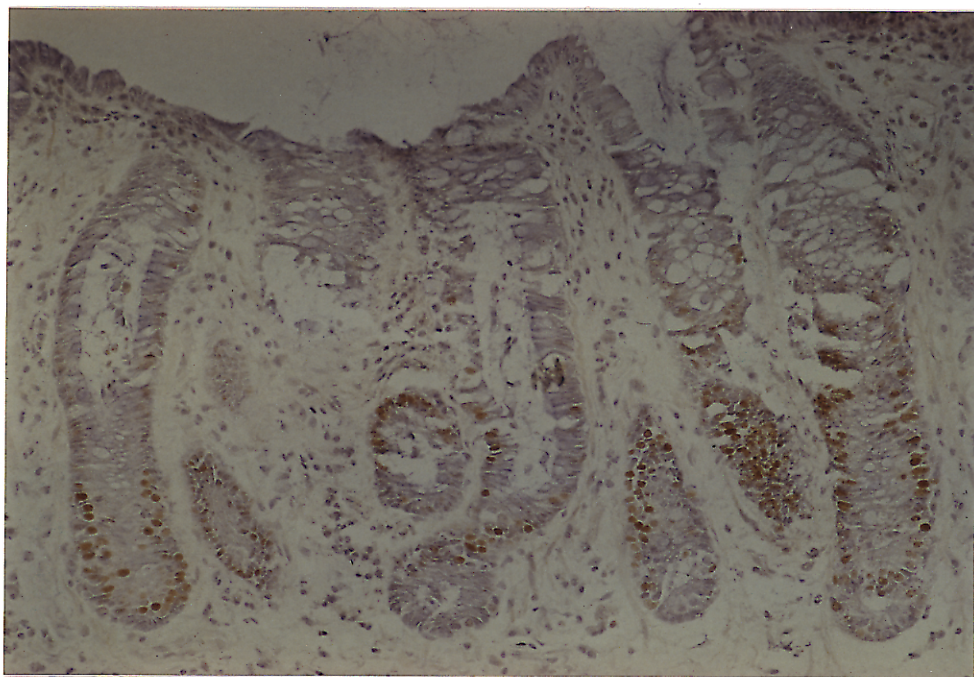


図 4 5 正常粘膜. 腺  
 底部側の 2 / 3 に陽  
 性細胞が分布してい  
 る. 表層には陽性細  
 胞はみられない.  
 (↑)

図 4 6 良性腺管腺腫.  
 腫瘍腺管表層側に陽  
 性細胞が分布する  
 (surface). (日立  
 総合病院 HGH892032)  
 (←)

図 4 7 粘膜内癌. 腫瘍腺管全体に陽性細胞がみられる (diffuse). (筑波大学病院 S-15470) (→)

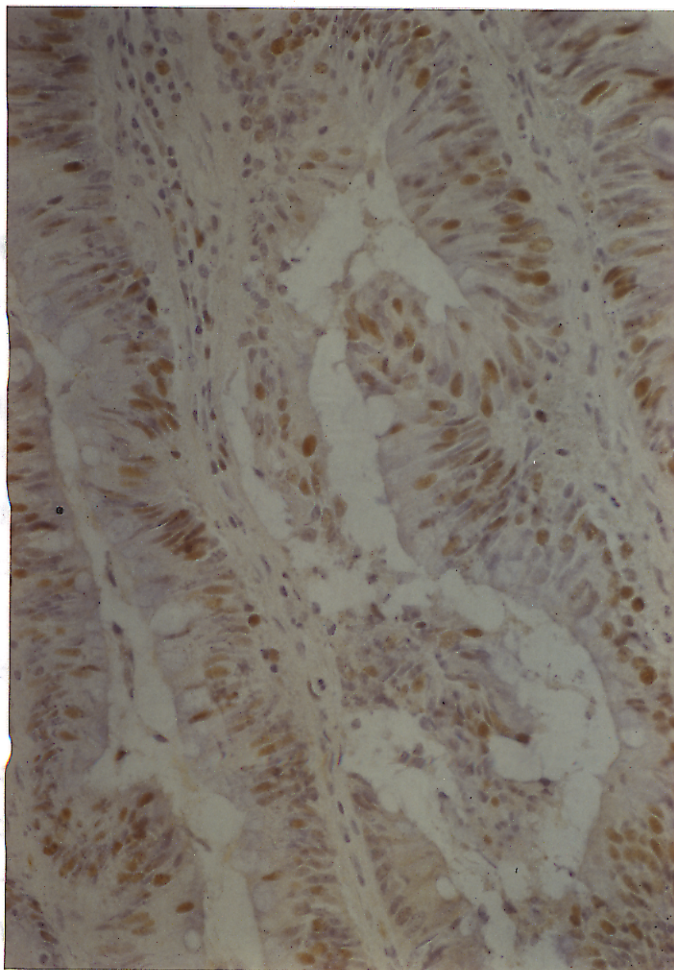
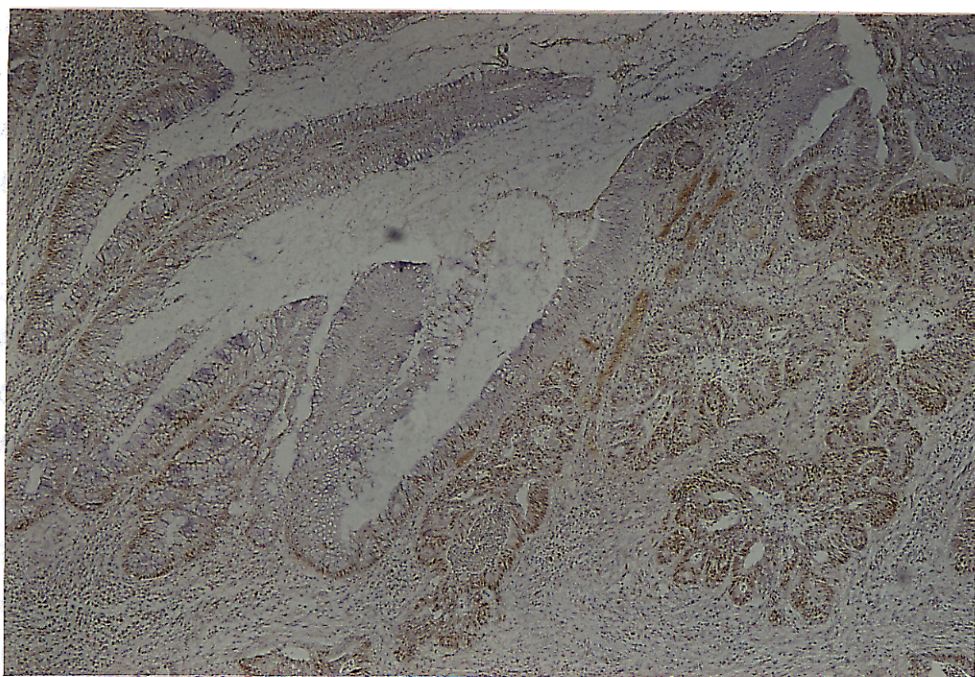


図 4 8 絨毛状腫瘍. 陽性細胞は腫瘍腺管全体に分布するが, 腺底部側に多く絨毛先端部はむしろ少ない. (筑波大学病院 S-16249) (↓)



## 4 考按

### 1) 大腸上皮性腫瘍組織中の増殖細胞の認識

腫瘍の細胞動態を知るための一番簡便な方法は、腫瘍組織上で分裂増殖期にある細胞を認識し、その量と分布を調べることである。そのために従来、 $^3\text{H}$ -TdR あるいは BrdU を腫瘍組織に取り込ませることによる分裂増殖期細胞の標識が行われてきた<sup>3, 29, 58, 68)</sup>。しかし、最近、DNA 複製のための主要酵素である DNA polymerase  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体が作製され、免疫組織化学染色によって、組織切片上で分裂増殖能をもった細胞を容易に認識できるようになった<sup>49, 58, 54)</sup>。DNA polymerase  $\alpha$  は鋳型 DNA の配列に沿って、4 種のデオキシヌクレオチドを重合させる酵素であり、細胞周期内にある全増殖細胞の核内に存在する。

抗 DNA polymerase  $\alpha$  抗体を用いた免疫染色では、細胞周期の G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、S、M の各期の細胞が陽性となる<sup>54)</sup>。したがって、その陽性率は、主として S 期の細胞に取り込まれる  $^3\text{H}$ -TdR あるいは BrdU を用いた場合の標識率に比べて高くなる。しかし、抗 DNA polymerase  $\alpha$  抗体で染色される正常粘膜中の増殖細胞が腺底部を中心に多く、表層にみられなかったことは、 $^3\text{H}$ -TdR あるいは BrdU を用いて標識した場合と同一の分布様式を示しているということである<sup>3, 29, 58, 68)</sup>。したがって、抗 DNA polymerase  $\alpha$  抗体を用いた免疫染色法は、基本的には  $^3\text{H}$ -TdR、BrdU を用いた場合と同様の細胞動態を観察できると考えられる。

### 2) 絨毛状腫瘍と腺管腺腫、腺癌における増殖細胞の頻度と分布の比較

正常粘膜と腫瘍性病変との間にはその陽性率に差がみられたが、良性腺管腺腫および粘膜内癌ではともに陽性率のばらつきが大きく、それらの間には差はみられなかった。Risioら<sup>68)</sup>は腫瘍の異型度が強いほど BrdU による標識率が高いとしているが、その標識率をみるとやはりばらつきが大きい。これは、腫瘍が発生してからある大きさに増殖するまでの様々な大きさの時期で、常に増殖速度が同じとは限らないことがひとつの理由と考えられる。

各病変群での陽性細胞の分布をみると、良性腺管腺腫では病巣の表層に陽

性細胞の多い症例が比較的目立ったのに対し、粘膜内癌では病巣の全層に均等に分布していた。腺腫において増殖帯が表層で見られることはこれまでも報告されている<sup>3,29)</sup>。そのことに対して服部<sup>25)</sup>は、大腸粘膜上皮の細胞動態を考慮するならば、腺管の中下部で腺腫が生じ、その後細胞増殖帯が上皮の流れによって表層に移動するのであろうと述べている。もし、良性腺管腺腫における細胞増殖帯が腺管深部から表層へと移動するものであるならば、良性腺管腺腫で陽性細胞の分布がばらついている結果も理解できる。つまり、細胞増殖帯が全層であるものは、それが深部から表層へ移動する時期の所見であると見做すことができるからである。このように良性腺管腺腫では正常粘膜の細胞動態と似たような、腺底部から腺管表層への腫瘍上皮の流れが存在すると考えられる。それに対し、癌では腫瘍腺管全体に増殖細胞がみられることから、良性腺管腺腫のような腫瘍上皮の流れはみられず、規則性なく増殖していると考えられる。

絨毛状腫瘍では病巣の全層に陽性細胞がみられたが、腺底部側に多い傾向がみられた。ただし、良性腺管腺腫のように腫瘍表層に陽性細胞の多い症例はみられなかった。したがって、絨毛状腫瘍では、良性腺腫で考えられるような、増殖細胞の腺底部から腫瘍表層への移動という細胞動態をしていない可能性がある。

一方、絨毛状腫瘍には、組織学的に絨毛上皮が間質に内翻して腺管を形成している像が絨毛の上部までみられることが少なくない(図5)。このような腺管を新生するためには、そこに増殖能のある細胞が存在しなければならない。このことから、絨毛全層に増殖能のある細胞が存在しているものと考えられる。また、病理組織学的検討の章でみたように、絨毛状腫瘍中にみられる明らかな癌巣は腫瘍粘膜内の表層、底部どちらにもみられ、やはり増殖能のある細胞が絨毛全層に存在することを示唆している。Wiebecke<sup>35)</sup>も絨毛状腫瘍の mitotic index は腺底部はもとより腫瘍表層でも高いとしている。

そのようなことと今回の結果とからは、絨毛状腫瘍の増殖細胞の分布は良性腺管腺腫よりも腺癌のそれに類似している可能性が示唆される。ただし、今回の検討では症例数が少ないため、多くの症例の検討によりその仮説を検証する必要がある。

## 5 小括

抗 DNA polymerase  $\alpha$  抗体を用いて絨毛状腫瘍中の分裂増殖能力のある細胞を染色し、陽性細胞の頻度と分布を良性腺管腺腫、腺癌のそれと比較した。絨毛状腫瘍ではその分布は良性腺管腺腫よりも腺癌のそれに類似していることが示唆された。しかし、この仮説を検証するためにはさらに多くの症例での検討が必要である。