甲状腺疾患におけるc-myc蛋白発現と細胞増殖・機能の関連性

―免疫組織化学的検索を中心に―

1994

筑波大学大学院博士課程
医学研究科
中村 謙司

筑　波　大　学

博士（医学）学位論文

甲状腺疾患におけるc-myc蛋白発現と細胞増殖・機能の関連性
－免疫組織化学的検索を中心に－

1994

筑波大学大学院博士課程医学研究科

中村 靖司

寄贈
中村靖司氏
平成 年 月 日
95016109

目次

第１章　序説　・・1
１．本研究の背景
１）　c-myc 遺伝子と c-myc 蛋白　・・1
２）　甲状腺疾患における c-myc の研究　・・2
３）　甲状腺疾患における濾胞上皮の増殖と機能　・・3
２．本研究の目的　・・5
３．本研究の概要　・・6

第２章　甲状腺疾患における c-myc 蛋白発現　・・7
１．内分泌器官としての甲状腺の病理形態学的特色　・・7
２．甲状腺非腫瘍性疾患における c-myc 蛋白の免疫組織化学的検索　・・9
１）　目的　・・9
２）　対象と方法　・・9
３）　結果　・・11
４）　考察　・・12
３．甲状腺腫瘍性疾患における c-myc 蛋白の免疫組織化学的検索　・・14
１）　目的　・・14
２）　対象と方法　・・14
３）　結果　・・15
４）　考察　・・16
４．甲状腺疾患における c-myc 蛋白の western 法による解析　・・17
１）　目的　・・17
２）　対象と方法　・・17
３）　結果　・・18
４）　考察　・・18
５．小括　・・20

第３章　甲状腺疾患における c-myc 蛋白と細胞増殖　・・21
１．甲状腺疾患における増殖細胞核抗原 Ki-67 抗原の発現　・・21
２．甲状腺非腫瘍性疾患における c-myc 蛋白と Ki-67 抗原発現の関連性　・・23
１）　目的　・・23
２）　対象と方法　・・23
３）　結果　・・24
４）　考察　・・25

3．甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白とKi-67抗原発現の関連性 ・・26
1） 目的 ・・26
2） 対象と方法 ・・26
3） 結果 ・・27
4） 考察 ・・27
4．小括 ・・29

第4章 甲状腺疾患におけるc-myc蛋白と濾胞上皮細胞の機能 ・・30
1．甲状腺疾患におけるチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼ生成 ・・30
2．甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白とチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼの関連性 ・・32
1） 目的 ・・32
2） 対象と方法 ・・32
3） 結果 ・・33
4） 考察 ・・35
3．甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白とチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼの関連性 ・・37
1） 目的 ・・37
2） 対象と方法 ・・37
3） 結果 ・・38
4） 考察 ・・40
4．小括 ・・42

第5章 総括 ・・43

謝辞 ・・45

関連した学会発表 ・・46

引用文献 ・・47

第１章　序説

１．本研究の背景

１）　c-myc 遺伝子と c-myc 蛋白

c-myc 遺伝子はトリ急性骨髄球症（avian acute myelocytomatosis）を引き起こす avian retrovirus MC29 から分離された v-myc 遺伝子の homologue として1970年代後半に発見され，ヒトでは第8番染色体（8q24）に位置している[1),2)]．その後の研究によりヒト c-myc 遺伝子は3つのエクソンからからなり，第1エクソンはプロモーターおよびリーダー配列のみで，第2エクソン5' 端から蛋白をコードする配列が始まり第3エクソンまで続いている[3)-5)]こと（図１），さらに c-myc 遺伝子プロモーター領域に転写因子 E2F が結合する配列が存在すること[6),7)]が明らかになっている．

c-myc 蛋白は439アミノ酸基よりなり分子量は49 kDと予想されているが，変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動では56～68 kDの位置に検出される[8),9)]．通常 c-myc 蛋白は95％以上が DNA 結合蛋白として細胞核内に存在し[10)-12)]，半減期は20～30分と非常に不安定である[13)]．c-myc 蛋白の構造的特徴は中央部に非特異的 DNA 結合部位を有し[14)]，またそのC末端に多くの転写因子でみられる helix-loop-helix（HLH）[15)]およびロイシンジッパー（leucine zipper）[16)]構造を有することが挙げられる[17),18)]．後者ロイシンジッパーにより，max 等の蛋白と２量体を形成する[19)]．転写活性制御部位はN末端1～143アミノ酸残基に[20)]，核ターゲティングシグナルは320～328アミノ酸基[21)]に位置している（図１）．

c-myc 蛋白は，基本的にG_0期を除いて発現しており[22)-24)]，増殖刺激が加わると c-fos についで発現し，DNA の複製ならびに転写に関与しているとされている．増殖を続けている細胞では c-myc の発現は一定であり[25)]，逆に細胞分化に従って c-myc の発現は抑制され

る[26),27)]．近年，c-mycが自己増殖配列に結合する複製開始蛋白と推定する報告[28)]やエンハンサー結合蛋白とする説[29)]が出されている．また，c-myc蛋白がheat shock遺伝子[30)]等の転写促進ないしは抑制を実際に行っていること[31),32)]が明らかになっている．加えて，Rb（retinoblastoma）蛋白と結合することによりc-myc蛋白の不活化が起きている可能性も報告されている[33),34)]．

c-myc遺伝子は当初プロトオンコジーンとして考えられていたこともありヒト癌腫において数多くの検討がなされている．一般的に，プロトオンコジーンがオンコジーンとして作用を示すためにはいくつかの機構が考えられており，DNAの量的変化（遺伝子増幅），mRNAの発現量の増加（遺伝子発現），点突然変異，遺伝子産物である蛋白の代謝異常等が挙げられるが，c-myc遺伝子の場合は，遺伝子増幅に伴うものが多いとされている．c-mycが発癌に関与している例としてBurkittリンパ腫におけるc-myc遺伝子の免疫グロブリンH鎖遺伝子近傍への転座（t(8; 14)）が挙げられる[35)-37)]．これは転座によって免疫グロブリン遺伝子のエンハンサー領域にc-myc遺伝子が接することになり，c-myc遺伝子の転写が亢進するため[38)]と考えられている．

ヒト癌腫におけるc-myc蛋白に関する検討はいくつかみられ，進行胃癌[39)]，膀胱癌[40)]等において組織学的・生物学的悪性度ならびに予後との関連がみられている．また，非腫瘍性病変に対する検討は少ないが，消化管上皮[41)]，胎盤[42)]において検討されており，増殖能との相関が報告されている．

2）　甲状腺疾患におけるc-mycの研究

甲状腺悪性腫瘍におけるc-myc遺伝子の検討はいくつか行われており，多くがmRNAの量的増加すなわち遺伝子発現が乳頭癌，濾胞癌において検出されている．また，未分化癌においてもc-myc mRNAの量的増加すなわち遺伝子発現が検出されている[43)-45)]．一

方，c-myc DNA の量的増加（遺伝子増幅）や構造変化の有無については乳頭癌について有りとする報告[46),47)]もみられるが，否定的な報告もなされている[44)].

良性腫瘍における c-myc 遺伝子の解析もいくつか行われており，濾胞腺腫で c-myc mRNA の発現が検出されている[43)].

非腫瘍性病変では c-myc 遺伝子の発現は検出されておらず[48)]，また，c-myc 遺伝子の増幅，構造変化も検出されていない.

培養健常部甲状腺濾胞上皮細胞を用いた *in vitro* の実験系ではTSH の刺激により c-myc 遺伝子発現が誘導されることが報告されている[43)].

甲状腺疾患における c-myc 蛋白発現については，免疫組織化学的手法を用いた検討が少数行われており，c-myc 蛋白の陽性像が，乳頭癌症例で顕著であることが報告されている[49),50)].

3） 甲状腺疾患における濾胞上皮の増殖と機能

甲状腺は高度に分化した内分泌臓器で，外表面に結合組織性の被膜を有し，内部は結合組織により多くの境界不明瞭な小葉に分割されている．実質は濾胞（follicle）とそれを取り囲む毛細血管網を有する結合組織からなっている．濾胞の大きさは大小様々（直径0.02-0.9mm）で，類球形ないしは楕円形，不正多角形を示し，単層立方ないしは円柱上皮からなる濾胞上皮（follicular epithelium）とそれに囲まれた濾胞腔（follicular lumen）からなり，濾胞腔内にはコロイドを貯めている．コロイドは濾胞上皮細胞からの分泌物で，その主成分は糖蛋白質であるチログロブリン（thyroglobulin; Tg）である．また，濾胞上皮基底部や，濾胞間にはＣ細胞（C cell, 傍濾胞細胞; parafollicular cell）が分布している．C細胞は APUD（amine precursor uptake and decarboxylation）系細胞に属し神経堤由来とされており，発生学的にも濾胞上皮とは異なる．その機能としてはカルシトニン（calcitonin）を分泌し、カルシウム代謝を制御している.

甲状腺濾胞上皮細胞は機能的にはヨウ素化合物である甲状腺ホルモン〔（チロキシン, thyroxine; T_4）およびトリヨードチロニン, triiodothyronine; T_3）〕を合成・分泌しており，これら甲状腺ホルモンは，主として末梢組織での新陳代謝に関与している．甲状腺ホルモンの合成・分泌は下垂体前葉ホルモンである甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone; TSH）の制御を受けている．

濾胞上皮細胞は機能に応じて形態が変化し，一般的には機能亢進状態では上皮細胞丈は高く濾胞腔は小型であるが，機能低下状態では上皮細胞丈は低く濾胞腔は大型化する．加えて，機能状態によって濾胞構造も変化し，機能亢進状態では濾胞の乳頭状の増生像がみられる．濾胞内容のエオジン染色濃度も機能状態により変化する．

生化学的には T_4, T_3 のみならず甲状腺ホルモン合成に関わる Tg や甲状腺ペルオキシダーゼ（human thyroid peroxidase, hTPO）の量ならびに活性を測定し機能状態を測定することが可能であり，各種症例で検討されている．

甲状腺疾患における濾胞上皮の増殖能の検討は少数であるが，BrdU（bromo-deoxyuridine）labelling index を指標とした Yoshida らによる検討で健常部甲状腺組織で0.2%，腺腫様甲状腺腫で0.7%，濾胞腺腫で0.6%，悪性腫瘍の濾胞癌で1.2%，乳頭癌で1.5%と報告[51]されており，他の組織型と比較して低率である．その一方で生命予後も不良な未分化癌は高い増殖細胞率を示すことが報告されている[52]．

増殖に関与する因子としては，甲状腺濾胞上皮短期培養系ならびにラット FRTL-5 細胞を用いた *in vitro* 実験系で T_4, ハイドロコルチゾン（hydrocortisone）等が増殖促進に，TSH 等が増殖抑制に働くことが明らかになっている[53]．Insulin-like growth factor（IGF-I），epidermal growth factor（EGF），hepatocyte growth factor（HGF）等の増殖・分化因子についても報告が散見される[54),55]．

2．本研究の目的

これまで述べてきたように，c-myc 蛋白は細胞核に局在し，遺伝子の転写・複製活性を調節することにより細胞増殖に関与すると考えられており，多くの悪性腫瘍でその発現の亢進が指摘されてきた．しかしながら，1993年 Craig ら[56]により，培養細胞を用いた実験ではあるが，細胞分化に伴って c-myc 蛋白が細胞質に偏位して発現することが報告された．

これまで，我々は甲状腺外科材料の検索の際に，種々の甲状腺疾患組織に c-myc 蛋白の陽性像がしばしばみられることを経験してきた．この陽性像は腫瘍性疾患はもとより非腫瘍性疾患の濾胞上皮にもみられ，また，核ばかりでなく細胞質にもみられることから，甲状腺疾患組織における c-myc 蛋白の発現は細胞増殖だけでは一概に説明できないと考えられる．そこで，本研究は甲状腺疾患組織で発現している c-myc 蛋白が細胞増殖制御以外の機能，具体的には甲状腺濾胞上皮細胞における機能状態と関係を有しているか否かを明らかにすることを最終的な目的とした．

3．本研究の概要

本研究では，まず甲状腺疾患手術材料を用い，甲状腺疾患を非腫瘍性疾患と腫瘍性疾患に二分し病理組織学的な検討を加えるとともに，甲状腺組織における c-myc 蛋白の発現を免疫組織化学的手法ならびに western 法を用いて検討した（第 2 章）．

続いて，増殖細胞の指標として Ki-67 抗原の発現を同一症例の同一部位にて検討し，甲状腺組織における c-myc 蛋白の発現と細胞増殖の関係を検討した（第 3 章）．

最後に，機能状態の指標としてチログロブリン及び甲状腺ペルオキシダーゼの発現を検討することにより，甲状腺組織における c-myc 蛋白の発現と機能状態の関係を検討した（第 4 章）．

図 1　c-myc 遺伝子と c-myc 蛋白の構造

第２章　甲状腺疾患におけるc-myc蛋白発現

１．内分泌器官としての甲状腺の病理形態学的特色

甲状腺は内分泌器官の中でも機能の状態が比較的鋭敏に組織像に反映される．この傾向は特に非腫瘍性疾患において顕著で，一般的には機能亢進状態では上皮細胞丈は高く濾胞腔は小型であるが，機能低下状態では上皮細胞丈は低く濾胞腔は大型化する．加えて，機能状態によって濾胞構造も変化し（図２），たとえば機能亢進状態では濾胞の乳頭状の増生像がみられる．同様に，濾胞内容のエオジン染色濃度も機能状態により変化する．しかしながら，同一の組織切片上においてさえ，みられるすべての濾胞上皮細胞が全く同じ形態を示すことは殆どあり得ない．病変のみられない甲状腺組織においてもそうであるが，特に腺腫様甲状腺腫では濾胞間の形態像の差が著しい．例えば，腺腫様甲状腺腫の組織像ではコロイドが充満する大型濾胞からコロイドを欠く小型濾胞構造まで多彩な濾胞がみられ，大部分の濾胞上皮は萎縮を示し，濾胞上皮細胞は扁平化しているが（図３-a），時に結節内で小濾胞の密な増生（図３-b）や乳頭状増殖（Sanderson's polster）がみられる．即ち，甲状腺において，各々の濾胞上皮細胞は形態的にも機能状態の点からもheterogenous であると考えられる．また，腫瘍性疾患では，癌胞巣の中心部と周囲組織浸潤部位ないしは転移巣では，遺伝子・蛋白の変化があることも知られている[57),58)]．

これまでの分子生物学ならびに内分泌学的研究は，主に遺伝子ないしは蛋白を抽出し解析することが行われてきた．この際，培養細胞株を樹立するかもしくは組織をホモジェネートする方法で行われ，一疾患をhomogenous なものとしてとらえてきた．ところが，遺伝子-蛋白-細胞というsequence において得られた知見を組織に応用する際に乖離がみられており，そのため，近年，*in situ* hybridization[59),60)]や合成ペプチドを抗原とした抗体を用いる免疫組織化学[61)]が見直されている．

これまでc-myc蛋白を用いた検討に関しては前章で述べた通りであるが，c-myc蛋白の

組織内での発現・分布に関する検索ならびに甲状腺疾患組織を用いたc-myc蛋白に関する検討は数少ない.

2．甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の免疫組織化学的検索

1）　目的

甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の発現を，疾患別および各疾患における濾胞上皮の病変像を異にする部位（病変部位）別に，免疫組織化学的手法にて検索し，甲状腺非腫瘍性疾患における甲状腺濾胞上皮の病理組織学的変化とc-myc蛋白の発現の関係を明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

<u>対象</u>

筑波大学附属病院にて1981年より1993年の13年間に行われた外科的切除甲状腺材料約600例を病理組織学的に検討し，その中から固定条件の良いものでかつ典型的な組織像を呈する症例を選び出した．

対象疾患は甲状腺濾胞上皮が病変の主たるもののみとし，腺腫様甲状腺腫（adenomatous goiterとadenomatous nodule：以下AG）21例と中毒性び慢性過形成（toxic diffuse hyperplasia：以下TDH，臨床的にはBasedow病とほぼ同義）20例を対象とした．

AG症例については，過形成病巣（hyperplastic foci：hypと略す）及び萎縮病巣（atrophic foci：atrと略す）に分けて検索した．TDH症例については，過形成病巣（hyperplastic foci）及び退縮病巣（involuted foci：invと略す）に，更に過形成巣については乳頭状増生を示す部位（hyperplastic foci with pseudopapillary growth：hyp ppと略す）ならびに小濾胞の密な増生を示す部位(hyperplastic foci with small follicular growth：hyp sと略す）に分けて検討した．

慢性甲状腺炎（橋本病）は通常外科的治療の対象とはならず，外科的切除例においても炎症細胞浸潤による影響があり，c-myc の発現と増殖・機能との関係をみるのに不適当と考えられるので対象より除外した．

Hashitoxicosis 症例は，基本的には橋本病類似の病因で，組織像は中毒性び慢性過形成像を呈するものの，リンパ球浸潤や炎症性の変化に伴う濾胞上皮の特殊な変性像がみられ，二次性変化の可能性もあるため，本論文では対象から除外した．

対照コントロールとして，甲状腺腫瘍性疾患症例の腫瘍部より離れた非腫瘍部位から，リンパ球浸潤等の病理組織学的な変化のない40部位を選んで用いた（non-tumorous control：非病変部位，以下 NTC と略す）．

対象症例とした組織型別症例数を表 1 に，病変部位数の内訳を表 2 に示す．

方法

手術摘出甲状腺を10 %中性緩衝ホルマリン（3.7 %W/V）で約24-48時間浸漬固定後，病変部および非病変部を切り出し，通常パラフィン標本とした後，ヘマトキシリン-エオジン（hematoxylin-eosin：H-E）染色を施し，病理組織学的検討を行った．

同時に上記ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて LSAB 法[62][63]（labelled streptavidin-biotin 法）（ヒストファイン；ニチレイ，東京）により，抗 c-myc 蛋白抗体を用いて免疫組織化学的染色を施した．発色は 3,3'-diaminobenzidine・4HCl（DAB）（同仁化学研究所，熊本）を用い，核染色としてメチルグリーンによる染色を行った．LSAB 法手技を表 3 に示す．

使用した抗体の詳細を表 4 に示す．

免疫組織化学的染色後，各病変部位について約500個の細胞について陽性率を細胞核及び細胞質に分けて算定した．

また，統計学的有意差の検定は ANOVA（analysis of variance）post hoc test の Scheffé's F test ならびに Mann-Whitney's U test で行った．

3） 結果

健常甲状腺濾胞上皮（非病変部位）でのc-myc蛋白の発現様式と発現率：

非病変部（NTC）の部位を対象に健常甲状腺濾胞上皮のc-myc蛋白発現様式と発現率を検討した.

NTCでのH-E像ならびにc-myc蛋白免疫染色像を図4・5に示す.

NTCではc-myc陽性細胞は，細胞核では約10%程度，散在性に，また、細胞質では約40%の濾胞上皮細胞に陽性像が認められた. 尚、使用した抗c-myc蛋白抗体，OP-10(9E10)，NCL-cMYC（9E11）ともに同様の染色像がみられた.

非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白発現様式と発現率：

腺腫様甲状腺腫（AG）と中毒性び慢性過形成（TDH）症例を対象に濾胞上皮のc-myc蛋白発現様式と発現率を検索した.

〔非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白発現様式〕

代表的な非腫瘍性疾患におけるH-E像とc-myc蛋白免疫染色像を図6・7に示す.

AGおよびTDH症例ともにc-myc蛋白抗体陽性像が細胞核，細胞質ともに認められた. また、AGおよびTDH症例の過形成病巣においてc-myc蛋白の陽性像が高率でみられた.

〔非腫瘍性疾患における細胞核c-myc蛋白陽性細胞率と細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係〕

非腫瘍性疾患における細胞核c-myc蛋白陽性細胞率と細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係をみると，両者の間に明らかな相関はなく，c-myc蛋白の陽性像は細胞核または細胞質に偏りがみられた.（図8） このことはAGならびにTDH症例に分けて検討しても同様の結果であった.（図9・10） 特にTDH症例では細胞核・細胞質ともに陽性細胞の少ない病変群（A群）と細胞核の陽性細胞率は変化に富むが殆どの濾胞上皮細胞が細胞質にc-myc蛋白の陽性像を示す病変群（B群）とに分けられた. そこで各病変部位別でのc-myc蛋白陽性率を，細胞核とならびに細胞質に分けて検討した.

非腫瘍性疾患における細胞核・細胞質別のc-myc蛋白陽性細胞率：

非腫瘍性疾患を対象にc-myc蛋白の陽性細胞率を細胞核・細胞質に分けて計測した.

〔非腫瘍性疾患における細胞核c-myc蛋白陽性細胞率〕

非腫瘍性疾患における組織型別の細胞核c-myc蛋白陽性細胞率を図11に示す. また, 病変部位別の細胞核c-myc蛋白陽性細胞率を図12に示す.

組織型別にみると, 細胞核c-myc蛋白陽性細胞率は, TDH症例が非病変部位（NTC）に対して高率であった（$p<0.05$）. 病変部別の検討では, 同じAG症例の中でも過形成病巣と萎縮性病巣とでは前者過形成病巣の陽性細胞率が高く（$p<0.0001$）, また, TDH症例では過形成病巣がNTCおよび退縮病巣に対して顕著な高値を示した（$p<0.0001$）.

〔非腫瘍性疾患における細胞質c-myc蛋白陽性細胞率〕

非腫瘍性疾患における組織型別の細胞質c-myc蛋白陽性細胞率を図13に示す. また, 病変部位別の細胞質c-myc蛋白陽性細胞率を図14に示す.

細胞質c-myc蛋白陽性細胞率は, TDH症例が非病変部位（NTC）に対して高率であった（$p<0.05$）. 病変部別の検討では細胞核での結果と同様にAG症例ならびにTDH症例ともに過形成病巣の陽性細胞率が, NTCないしは萎縮病巣ないしは退縮病巣の陽性細胞率に対して有意に高率であった（$p<0.0001$）.

4） 考察

甲状腺非腫瘍性疾患についてc-myc蛋白の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討した.

健常甲状腺濾胞上皮（非病変部位）でも低頻度ながらc-myc蛋白の発現がみられ, これまでの報告[49), 50)]と一致した.

c-myc蛋白の細胞核陽性率は細胞質陽性率と相関せず, また, 細胞質にc-myc蛋白陽性像を呈し細胞核にはc-myc蛋白陽性像がみられない症例もあることより, 細胞核ならびに細胞質におけるc-myc蛋白発現は独立事象であり, c-myc蛋白は細胞核ないしは細胞質では

異なった機能を有している可能性が考えられる.

加えて，病理組織学的に腺腫様甲状腺腫および中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣すなわち hyperfunctional と考えられる部位に c-myc 蛋白が高率に発現していることが認められ，且つ萎縮病巣ないしは退縮病巣と比較して顕著に高率であった．このことは同部位において c-myc 蛋白が過形成ないしは濾胞上皮の機能に関連している可能性を示唆する.

3．甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の免疫組織化学的検索

1）　目的

前項と同様に，甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の発現を，組織型別および病変部位別に，免疫組織化学的手法にて，組織型別ないしは病変部位別のc-mycの発現率の違いを検索し，各種甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白発現の程度ならびにc-myc蛋白の組織内分布様式を明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

<u>対象</u>

前項と同様に筑波大学附属病院にて1981年より1993年の13年間に行われた外科的切除甲状腺材料および剖検材料約600例を病理組織学的に検討し，その中から，固定条件の良いものでかつ典型的な組織像を呈する症例について，甲状腺癌取扱い規約[65]（表5）に準じて組織型分類を行い選び出した．対象とした症例は濾胞腺腫（follicular adenoma：以下FAd）17例，乳頭癌（papillary carcinoma：以下PC）19例，濾胞癌(follicular carcinoma：以下FC）5例ならびに未分化癌（undifferentiated carcinoma：以下UC）5例である．

更に，各腫瘍性疾患を腫瘍中央部（center lesion of tumor：cntrと略す）と腫瘍辺縁部（peripheral lesion of tumor：periと略す）または腫瘍被包外浸潤部位（extra-capsular infiltrative lesion：infと略す，乳頭癌症例のみ）に分けて検索した．尚，濾胞癌おいては，明らかに被膜浸潤ないしは脈管侵襲の認められるもののみ対象とした．

対照コントロールとして甲状腺腫瘍性疾患症例の腫瘍部より離れた非腫瘍部位（NTC）40部位を用いた．

対象症例の組織型別症例数を表6に，計測した病変部位数の内訳を表7に示す．

方法

前項と同様に通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本を作成し，病理組織学的ならびに抗 c-myc 蛋白抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った.

3）　結果

腫瘍性疾患各組織型における c-myc 蛋白発現様式：

腫瘍性疾患を組織型別に分類し，各々の腫瘍細胞における c-myc 蛋白発現様式を検討した.

代表的な腫瘍性疾患での H-E 像ならびに c-myc 蛋白免疫染色像を図15に示す.

腫瘍性疾患を全体を通じて，細胞核ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性像がみられた．特に細胞質に対する染色像は腫瘍全般に明瞭であり，更に，NCL-cMYC抗体（9E11クローンより作成）染色においては，腫瘍細胞の細胞核周囲にいわゆる Goldi 野陽性像といわれているパターンに類似した，粗大顆粒状の陽性像を呈する傾向があった.

腫瘍性疾患における細胞核・細胞質別の c-myc 蛋白陽性細胞率：

腫瘍性疾患を組織型ならびに部位別に分類し，各々の腫瘍細胞における c-myc 蛋白の陽性細胞率を細胞核・細胞質に分けて計測した.

〔腫瘍性疾患における細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率〕

腫瘍性疾患組織型別ならびに病変部位別の細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率を示す．（図16・17）

細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率は，未分化癌（UC）症例が対照とした非病変部位（NTC）に対して有意に高率であった（$p=0.003$）．濾胞腺腫（FAd），乳頭癌（PC），濾胞癌（FC）は NTC よりやや高い値を示したが有意差はみられなかった．また，病変部位別では腫瘍辺縁部が腫瘍中心部に対して高い値を示す傾向がみられたが有意差はなかった.

〔腫瘍性疾患における細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率〕

腫瘍性疾患組織型別ならびに病変部位別の細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率を示す．（図18・19）

細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率は，各組織型ともに対照とした非病変部位（NTC）に対して有意に高率であり（$p<0.01$），病変部位別では，腫瘍中心部と腫瘍辺縁部間に有意差はみられなかった．

4）　考察

甲状腺腫瘍性疾患について c-myc 蛋白の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討した．

細胞核と細胞質での c-myc 蛋白陽性細胞率は異なった傾向がみられた．即ち，細胞核における c-myc 蛋白の発現は，未分化癌症例が著明に高率を示したのに対し，細胞質における c-myc 蛋白の発現はすべての腫瘍性疾患で高率で組織型間には差がみられなかった．

未分化癌症例が高率に細胞核に c-myc 蛋白を発現していたことは，生命予後不良な，他の臓器の癌腫と同様に c-myc 蛋白の発現が癌細胞の増殖能に関係していることが推察される．　しかしながら，腫瘍性疾患における細胞質 c-myc 蛋白の発現は細胞核の場合と同様の考えでは説明できず，他の要因との関係を考えざるを得ない．加えて，腫瘍性疾患において，C末端の９アミノ酸基差のあるOP-10（9E10クローン）ならびにNCL-cMYC（9E11クローン）間で，かなり異なった染色性を呈したことは特筆すべき点で，腫瘍性疾患において c-myc 蛋白の蛋白生合成の過程における差異やprocessing 異常ないしは alternative な蛋白の存在が示唆される．

4．甲状腺疾患におけるc-myc蛋白のwestern法による解析

1）　目的

第2章　2.および3.における検討で，甲状腺の非腫瘍性・腫瘍性疾患共に，c-myc蛋白が細胞核のみでなく細胞質にも免疫組織化学的に陽性像を示し，また，細胞核と細胞質におけるc-myc蛋白陽性像には相関関係がみられないことを明らかにした．そこで，甲状腺疾患での，細胞核と細胞質におけるc-myc蛋白陽性像の分布様式の乖離が，固定・染色操作に伴うものでないことの確認と，細胞核と細胞質に発現していると考えられるc-myc蛋白に質的差異が存在するか否かを明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

対象

筑波大学附属病院にて1993年より1994年の2年間に行われた外科的切除甲状腺のうち，非腫瘍性疾患として中毒性び慢性過形成5例，腫瘍性疾患として乳頭癌6例，濾胞癌2例を対象とした．そのうち乳頭癌2例と濾胞癌1例は前項で検索した症例に含まれる．

方法

外科的に切除された未固定甲状腺より病変部を切り出し，0.5％ Triton X-100（Serva Finebiochemica, Germany）および蛋白分解酵素阻害剤としてleupeptin（和光純薬工業，大阪），pepstatin A（同），aprotinin（同）を添加した10 mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.4)中でポリトロン型ホモジェナイザーを用いて破砕，細胞膜を可溶化した後，遠心し，細胞核分画と細胞質分画を回収した．各分画を試料調整液（2％ sodium dodecyl sulfate （SDS）（和光純薬工業, 大阪）および5％ 2-mercaptoethanol（同）添加 62.5 mM Tris塩酸緩衝

液(pH 6.8)）と混和し泳動用試料とした．各泳動用試料はLaemmliら[66]の方法に従ってSDS-polyacrylamideゲル電気泳動を行った．電気泳動終了後，Towbin[67]らの方法によりnitrocellulose膜（NC膜）（BA 85, Schleicher & Schuell, Germany）に転写した．転写後，NC膜は5％スキムミルク（Difco Laboratories Inc., USA）にてブロッキングを行い，ECL western blotting detection kit（Amersham Life Sci., UK）を用いて目的とする蛋白を検出した．抗体としては前項で述べたOP-10抗体を用いた。

3）　結果

Western blottingの結果を図20に示す．

細胞核分画におけるc-myc蛋白の発現は中毒性び慢性過形成症例1例，乳頭癌症例3例，濾胞癌症例1例の計4例に約67 kDの位置に認められた．このうち，乳頭癌症例1例と濾胞癌症例1例は前項で検索した症例であった．

細胞質分画に約67 kD c-myc蛋白の発現が全症例にみられた．

また，細胞質分画に発現しているc-myc蛋白において約64 kDの位置に変位バンドが乳頭癌5例，濾胞癌1例の計6例に認められた．このうち，乳頭癌症例2例と濾胞癌症例1例は前項で検索した症例であった．

4）　考察

通常はc-mycは細胞核に局在[10)-12)]しているものとされているが，本章での解析では核分画にc-myc蛋白が検出されなかった症例もみられた．即ち，細胞核におけるc-myc蛋白の発現が殆どみられない場合がある．これは前項における検討結果で中毒性び慢性過形成症例ならびに乳頭癌症例において，細胞核c-myc蛋白陽性細胞率が低値であった症例が存在していたことと一致する．

細胞質分画では，明らかなc-myc蛋白発現を認め，且つc-myc蛋白の細胞質への偏在傾向がみられる．解析した症例数こそ少ないが，第2章　2.および3.の免疫組織化学的検索の結果と一致する．c-myc蛋白が細胞質に強く発現がみられることについては，通常，c-myc蛋白の半減期が短い[13]ことを考えると，発現蛋白量が圧倒的に多いか，代謝され難くなっている可能性が最も考えられる．

加えて，細胞質発現c-myc蛋白に分子量的に異なるものがみられたが，このような報告はこれまでにはなく，新たな成果であり，ヒト組織において，発現c-myc蛋白にalternative splicingが生じているか，もしくはprocessingの異常が生じていることが推察される．また，最近の研究にて，対象が培養細胞ではあるが，分化の発現と関連してc-myc蛋白の性状[68),69)]ないしは分布様式の変化[56)]がみられるとの報告がある．甲状腺の細胞についての報告はみられないが，変化したc-myc蛋白が細胞増殖以外の機能を担っている可能性も考えられる．

5．小括

この章では甲状腺疾患組織を用い，非腫瘍性疾患と腫瘍性疾患に大別すると共に，各々の疾患を病理組織学的に分類し，また，各組織型において病変部位別に細分して，c-myc蛋白の発現を免疫組織化学手法とwestern法にて検討した．

その結果，以下のことが明らかとなった．

1）細胞核c-myc蛋白は未分化癌症例において高率に発現していた．

2）細胞質c-myc蛋白は非腫瘍性疾患では腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において高率に発現していた．また，腫瘍性疾患においては，組織型によらず全般に高率に発現していた．

3）細胞核c-myc蛋白と細胞質c-myc蛋白発現の間には相関関係はなくほぼ独立事象であると考えられた．

4）細胞質におけるc-myc蛋白発現をwestern法にて確認した．また，分子量の異なるc-myc蛋白の発現を新たに認めた．

以上のことより，c-myc蛋白の発現と細胞増殖との関係は未分化癌症例のみにおいてみられ，他の疾患における発現，特に細胞質に発現しているc-myc蛋白は増殖以外の機能と関係している可能性が考えられた．

組織型		平均年齢（歳）	男女比（男：女）
非病変部位（NTC）	40部位	(48.0)	(29：11)
腺腫様甲状腺腫（AG）	21例	45.4	4：17
中毒性び慢性過形成（TDH）	20例	27.3	7：13

表１　非腫瘍性疾患症例内訳

組織型	
非病変部位（NTC）	40部位
腺腫様甲状腺腫（AG）	21例
過形成病巣（hyp）	26部位＊
萎縮病巣（atr）	26部位＊
中毒性び慢性過形成（TDH）	20例
過形成病巣乳頭状増生部（hyp pp）	10部位
過形成病巣小濾胞状増生部（hyp s）	15部位
退縮病巣（inv）	18部位

＊多発性腫瘤の重複を含む

表２　非腫瘍性疾患計測病変内訳

1）脱パラフィン

2）0.6 % H_2O_2（v/v）添加メタノール（20分間）
［内因性peroxidase活性の不活化］

3）0.01 M リン酸緩衝生理的食塩水（PBS）（pH 7.6）洗浄（5分間×3回）

4）10 %（v/v）ウサギ正常血清*1（10分間　室温）
［非特異的吸着反応のブロッキング］

5）1次抗体（検索対象抗原に対する抗体）（30-60分間*2　室温）

6）0.01 M PBS（pH 7.6）洗浄（5分間×3回）

7）2次抗体（ビオチン標識抗マウスIgG+IgA+IgMウサギ抗体*3）（10分間　室温）

8）0.01 M PBS（pH 7.6）洗浄（5分間×3回）

9）ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（5分間　室温）

10）0.01 M PBS（pH 7.6）洗浄（5分間×3回）

11）発色基質（0.0001 %H_2O_2（v/v）添加0.5 mM DAB-PBS溶液にて発色

12）発色停止（水道水）

13）核染

14）脱水・透徹・封入

15）検鏡

*1　モノクロナール抗体の場合
（ポリクロナール抗体の場合は10 %（v/v）ヤギ正常血清）
*2　反応時間は抗体による
*3　モノクロナール抗体の場合
（ポリクロナール抗体の場合はビオチン標識抗ウサギヤギ抗体）

表3　labelled streptavidin-biotin 法手順

	由来クローン	抗体種別	抗原	
OP-10	9E10 clone[64]	MoAb	c-myc蛋白408-439アミノ酸基	Oncogene Science Inc., USA
NCL-cMYC	9E11 clone[64]	MoAb	c-myc蛋白408-420アミノ酸基	Novocastra Laboratories Ltd., UK

MoAb: monoclonal antibody

表 4　使用した抗 c-myc 蛋白抗体

図２　甲状腺濾胞の変化

図３　腺腫様甲状腺腫の組織像〔a: 萎縮巣　b: 過形成巣〕
同一組織内でも種々の病理形態学的変化がみられる
（H-E 染色像: 180倍）

図４　非病変部位のH-E染色像（180倍）
非病変部位では，濾胞上皮は扁平で吸収空胞もみられない．

図５　非病変部位のc-myc蛋白免疫染色像（180倍）
少数の濾胞上皮細胞の細胞質に陽性像がみられる

図６　非腫瘍性疾患のH-E 染色像（中毒性び慢性過形成症例：240倍）
立方状の濾胞上皮細胞が偽乳頭状に増生する過形成巣と，
扁平濾胞上皮細胞よりなる退縮巣が混在する．

図７　非腫瘍性疾患のc-myc蛋白免疫染色像
（中毒性び慢性過形成症例：240倍）
過形成巣において細胞核ならびに細胞質に強い陽性像が見られる．
退縮巣には陽性像は見られない．

図８　非腫瘍性疾患における細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図9　腺腫様甲状腺腫症例における細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図10　中毒性び慢性過形成症例における
細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

mean+SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

NTC: non-tumorous control n=40
AG: adenomatous goiter n=21
TDH: toxic diffuse goiter n=20

図11　非腫瘍性疾患における組織型別細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U test

atr;	atrophic foci	n=26
hyp;	hyperplastic foci	n=26
inv;	involuted foci	n=18
hyp pp;	hyperplastic foci with pseudopapillary growth	n=10
hyp s;	hyperplastic foci with small follicular growth	n=15

図12　非腫瘍性疾患各病変部における
細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

NTC: non-tumorous control n=40
AG: adenomatous goiter n=21
TDH: toxic diffuse goiter n=20

図13　非腫瘍性疾患における組織型別細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U test

atr;	atrophic foci	n=26
hyp;	hyperplastic foci	n=26
inv;	involuted foci	n=18
hyp pp;	hyperplastic foci with pseudopapillary growth	n=10
hyp s;	hyperplastic foci with small follicular growth	n=15

図14　非腫瘍性疾患各病変部における
細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率

□ 良性腫瘍	Benign tumours
1．濾胞腺腫	Follicular adenoma
特殊型（Variant）	
1） 好酸性細胞型腺腫	Follicular adenoma, oxyphilic cell type
2） 明細胞型腺腫	Follicular adenoma, clear cell type
3） 硝子化索状腺腫	Hyalinizing trabecular adenoma
4） 異型腺腫	Atypical adenoma
2．その他の良性腫瘍	Other benign tumours
□ 悪性腫瘍	Malignant tumours
1．乳頭癌	Papillary carcinoma
特殊型（Variant）	
1） 被包型乳頭癌	Papillary carcinoma, encapsulated type
2） 濾胞型乳頭癌	Papillary carcinoma, follicular type
3） び慢性硬化型乳頭癌	Papillary carcinoma, diffuse sclerosing type
4） 好酸性細胞型乳頭癌	Papillary carcinoma, oxyphilic cell type
2．濾胞癌	Follicular carcinoma
1） 微小浸潤（被包）型濾胞癌	Follicular carcinoma, minimally invasive (encapsulated)
2） 広汎浸潤型濾胞癌	Follicular carcinoma, widely invasive
特殊型（Variant）	
1） 好酸性細胞型濾胞癌	Follicular carcinoma, oxyphilic cell type
2） 明細胞型濾胞癌	Follicular carcinoma, clear cell type
3．未分化癌	Undifferentiated (anaplastic) carcinoma
4．髄様癌（C細胞癌）	Medullary carcinoma
5．悪性リンパ腫	Malignant lymphomas
6．その他の悪性腫瘍	Other malignant tumours
7．続発性（転移性）腫瘍	Secondary (metastatic) tumours
□ その他の腫瘍	Miscellaneous tumours
□ 分類不能腫瘍	Unclassified tumours
□ 腫瘍様病変	Tumour-like lesions

表5　甲状腺腫瘍の組織学的分類[65)]

組織型		平均年齢（歳）	男女比（男：女）
非病変部位（NTC）	40部位	(48.0)	(29：11)
濾胞腺腫（FAd）	17例	50.9	2：15
乳頭癌（PC）	19例	49.1	4：15
濾胞癌（FC）	5例	54.6	2：3
未分化癌（UC）	5例	64.4	1：4

表６　腫瘍性疾患症例内訳

組織型	
非病変部位（NTC）	40部位
濾胞腺腫（FAd）	17例
腫瘍中心部（cntr）	17部位
腫瘍周辺部（peri）	7部位
乳頭癌（PC）	19例
腫瘍中心部（cntr）	20部位＊
被包外浸潤部（inf）	20部位＊
濾胞癌（FC）	5例
腫瘍中心部（cntr）	5部位
腫瘍周辺部（peri）	3部位
未分化癌（UC）	5例
腫瘍中心部（cntr）	6部位＊

＊多発性腫瘤の重複を含む

表７　腫瘍性疾患計測病変内訳

図15　腫瘍性疾患の c-myc 蛋白免疫染色像

a) 乳頭癌症例 H-E 染色像（180倍）：特徴的な核を有する乳頭癌細胞が乳頭状ないしは濾胞状に増生している.
b) 乳頭癌症例 c-myc 蛋白免疫染色像（180倍）：殆どの乳頭癌細胞の細胞質に顆粒状の陽性像が見られる.
c) 未分化癌症例 H-E 染色像（120倍）：核異型の目立つ細胞が, 特定の構造を呈することなく増生している.
d) 未分化癌症例 c-myc 蛋白免疫染色像（120倍）：大多数の未分化癌細胞が核に陽性像を示している.

mean+SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

NTC:	non-tumorous control	n=40
FAd:	follicular adenoma	n=17
PC:	papillary carcinoma	n=19
FC:	follicular carcinoma	n=5
UC:	undifferentiated carcinoma	n=5

図16　腫瘍性疾患における組織型別細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U test

cntr; central lesion of tumor
peri ; peripheral lesion of tumor
inf; extra-capsular infiltrative lesion

FAd cntr: n=17
peri: n=7
PC cntr: n=20
inf: n=20
FC cntr: n=5
peri: n=3
UC n=6

図17　腫瘍性疾患各病変部における細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

NTC:	non-tumorous control	n=40
FAd:	follicular adenoma	n=17
PC:	papillary carcinoma	n=19
FC:	follicular carcinoma	n=5
UC:	undifferentiated carcinoma	n=5

図18　腫瘍性疾患における組織型別細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率

mean+SD

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U test

cntr; central lesion of tumor
peri ; peripheral lesion of tumor
inf; extra-capsular infiltrative lesion

FAd cntr: n=17
peri: n=7
PC cntr: n=20
inf: n=20
FC cntr: n=5
peri: n=3
UC n=6

図19　腫瘍性疾患各病変部における
細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率

図20　細胞核・細胞質分画における c-myc 蛋白の western 法による解析

第3章　甲状腺疾患における c-myc 蛋白と細胞増殖

1．甲状腺疾患における増殖細胞核抗原 Ki-67 抗原の発現

序論で述べた如く，c-myc 蛋白は一般的には細胞の増殖に深く関係しているものとされている[21]．甲状腺疾患のうち未分化癌の c-myc 蛋白の発現は，細胞増殖との関係が考えられるが，前章の検討において，他の甲状腺疾患においても c-myc 蛋白の発現がみられることが明らかになった．そこで，実際に c-myc 蛋白の発現と細胞増殖の関連があるか否かを確認する必要がある．本章では，甲状腺疾患を非腫瘍性ならびに腫瘍性疾患に分けて，細胞核ならびに細胞質での c-myc 蛋白の発現を細胞増殖の面から検討した．

細胞の増殖能ならびに増殖期細胞を知る方法として，1960年には放射性物質である ^{3}H-thymidine を脳腫瘍患者に投与し S 期（DNA 合成期）細胞に取り込ませ，autoradiography にて S 期細胞の同定が行われるようになった[70]．この方法は放射性物質を用いるため人体への適用は制限され，実際には培養細胞や実験動物に限られていた．

1982年に thymidine の相同体である bromodeoxyuridine（BrdU）に対するモノクロナール抗体が開発され[71]，複製中の DNA を BrdU で標識することにより生体内での S 期細胞を免疫組織化学的に同定することが可能となった．一時 BrdU を用いた S 期細胞同定法は臨床応用された[72),73]が，BrdU が突然変異源であるため[74]，現在では人体への適応は制限されている．

1980年代には DNA polymerase α [75]や，Ki-67 抗原[76),77]に対するモノクロナール抗体が開発された．これらの抗体は増殖周期（G_1（gap 1）期，S（DNA 合成）期，G_2（gap 2）期，M（分裂）期）中の細胞核内に発現する抗原を認識するため，S 期の細胞のみでなく，細胞の growth fraction を同定することが可能となり，また前処置としての薬物投与を必要としないため広く応用された．しかしながら，これらの抗体は，凍結切片においてのみ使用可能であり，既存の病理標本の大多数を占めるパラフィン包埋標本には適用することが

不可能であった.

1987年にはcyclinとも呼ばれる非ヒストン核蛋白質であり，DNA polymerase δの補助因子である増殖細胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen: PCNA）に対する抗体がホルマリン固定パラフィン包埋標本に応用され[78]，組織学的悪性度や生命予後との検討が数多くなされた．しかしながら，固定法により認識する細胞周期が異なること[79),80]，場合によってはG0期細胞にも染色像がみられることや[81]，PCNAの発現がBrdUによるS期細胞やKi-67陽性細胞と明らかな乖離を示す場合のあることが報告されている[82].

Ki-67はGerdesらにより最初に報告され，Hodgkin病の腫瘍細胞培養株の核抗原を抗体として作成されたモノクロナール抗体である[76]．この抗体は増殖周期にはいっているすべての細胞の核と反応するとされており，late G_1, S, G_2, M期の細胞のすべてが陽性となるが，G0期（休止期）の細胞とは反応しないとされている[82]．また，BrdU labelling indexともよく相関するとの報告[83]がみられている．加えて，これまでKi-67抗体を用いた免疫組織化学は凍結切片でのみ可能であったが，Shiらにより開発されたマイクロウエーブ加熱処理法[84]によりパラフィン包埋標本においても可能となった．Ki-67が反応する抗原の詳細は未だ不明であるが，これまでの形態学的な分裂像の観察より客観的かつ鋭敏であり，またBrdUの様な煩雑な操作が不要であるため，近年，細胞増殖のマーカーとして悪性リンパ腫[85]や乳癌[86]をはじめとする多くの腫瘍で検討され，有用性が確認された.

甲状腺疾患で，Ki-67抗原を増殖細胞指標に用いた検討は非常に少ないが，それらの報告では，非腫瘍性疾患で概ね1％，腫瘍性疾患で0～5％と報告されている．これまでの甲状腺疾患におけるKi-67抗原の発現ならびにBrdU labelling indexの報告の要約を表8に示す.

2．甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白とKi-67抗原発現の関連性

1）　目的

第２章　2.の検索の結果，甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の発現がみられ，特に腺腫様甲状腺腫および中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において，細胞質c-myc蛋白の発現が著明であった．本項では，特に腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣について，抗増殖細胞核抗原Ki-67を指標として，濾胞上皮細胞の増殖の程度を免疫組織学的手法にて検討し，一般的に知られているc-myc蛋白と細胞増殖の関係が成立しているか否かを明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

<u>対象</u>

前章と同一の症例の病変部位を検索対象とした．病変部位の分類は前章と同様に行った．

対照コントロールとして，腫瘍性疾患の腫瘍部より離れた非腫瘍部位（NTC）40部位を用いた．

対象症例の内訳は，第２章　表１ならびに表２に示した通りである．

<u>方法</u>

前章で用いた標本の連続切片を通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本より作成し，silane（3-aminopropyltriethoxysilane; APES）でコーティングしたスライドグラスにのせ，免疫組織化学用標本とした．標本は脱パラフィン後，10 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）中に浸漬し750W，５分間，５回マイクロウェーブを照射した．マイクロウェーブ処理後，前章同様にLSAB法により免疫組織化学的染色を施し，検索・検定した．

使用したKi-67を表9に示す.

次に, 各疾患におけるKi-67陽性細胞率と前章で検索した細胞核および細胞質c-myc蛋白陽性細胞率との相関関係についてSpearmanの順位相関検定を行い検討した.

3） 結果

健常甲状腺濾胞上皮（非病変部位）でのKi-67抗原発現率： 非病変部（NTC）の部位を対象に健常甲状腺濾胞上皮のKi-67陽性細胞率を計測した.

NTCでは, Ki-67陽性像は顆粒状で, 濾胞上皮細胞核に限局して認められたが, その陽性細胞率は低く0.6±2.1%であった.

非腫瘍性疾患におけるKi-67抗原発現率：

腺腫様甲状腺腫（AG）と中毒性び慢性過形成（TDH）症例を対象に, 濾胞上皮のKi-67陽性細胞率を計測した.

非腫瘍性疾患におけるKi-67免疫染色像を図21に示す.

〔非腫瘍性疾患における組織型別Ki-67陽性細胞率〕（図22）

非腫瘍性疾患における組織型別のKi-67陽性細胞率は, TDHで非病変部位（NTC）と比較して高値を示したが, 有意差はみられなかった.

〔非腫瘍性疾患における病変部別Ki-67陽性細胞率〕（図23）

非腫瘍性疾患における病変部別のKi-67陽性細胞率は, AGならびにTDHともに過形成病巣の陽性細胞率が, 萎縮病巣ないしは退縮病巣に対してKi-67抗体陽性細胞率に対して有意に高率であった（$p<0.01$）.

非腫瘍性疾患におけるKi-67陽性細胞率と細胞核・細胞質別のc-myc蛋白陽性細胞率の関係：

非腫瘍性疾患を対象に, Ki-67陽性細胞率と細胞核ならびに細胞質にわけてc-myc蛋白

陽性細胞率の関係を検討した．（図24・25）

非腫瘍性疾患におけるKi-67陽性細胞率とc-myc蛋白陽性細胞率との間には細胞核および細胞質ともに相関関係はみられなかった．AGならびにTDH症例に分けて検討しても同様であり，相関関係はみられなかった．

4） 考察

甲状腺非腫瘍性疾患について増殖細胞核抗原Ki-67抗原の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討し，同時に非腫瘍性疾患におけるKi-67抗原発現，つまり増殖細胞指標とc-myc蛋白発現の関係を検討した．

非腫瘍性疾患におけるKi-67抗原発現率はNTC 0.6%，AG 1.3%，TDH 0.5%であり，概ねこれまでの報告[87), 88), 90), 91)]と一致し，きわめて低率であった．

各組織型における増殖細胞指標としてのKi-67発現は非病変部位で0.6%，腺腫様甲状腺腫で1.3%でBrdUを用いたYoshidaらの報告[51)]よりは高値を示した．これは，甲状腺疾患における増殖指標の検討は数少ないが，S期のみを標識するBrdUに対してKi-67は増殖期にある細胞の殆どを検出できるため，つまり，growth fractionを認識しているためと考えられた．

腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性甲状腺腫症例において，Ki-67陽性細胞率が，各々の過形成病巣が萎縮病巣ないしは退縮病巣に対して有意に高率であった．

また，非腫瘍性病変においてKi-67陽性細胞率と細胞核および細胞質c-myc陽性細胞率の間には相関はなかった．腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において，細胞核および細胞質c-myc蛋白陽性細胞が多数みられることを考えると，細胞核および細胞質に発現しているc-myc蛋白の大部分は増殖に関与していないものと考えられる．

3．甲状腺腫瘍性疾患における c-myc 蛋白と Ki-67 抗原発現の関連性

1） 目的

前章で示したように，甲状腺腫瘍性疾患における c-myc 蛋白の発現が，細胞核では未分化癌症例で増加し，細胞質では腫瘍性疾患全般に発現が増加していた．本項では，組織型別および病変部位別に，抗増殖細胞核抗原 Ki-67 を用いた免疫組織化学的手法にて増殖細胞率を検索し，各々の甲状腺腫瘍性疾患においても，一般的に知られている c-myc 蛋白と細胞増殖の関係が成立しているか否かを明らかにすることを目的とした．

2） 対象と方法

<u>対象</u>

前章と同一の症例の病変部位を検索対象とした．病変部位の分類は前章と同様に行った．

対照コントロールとして，腫瘍性疾患の腫瘍部より離れた非腫瘍部位（NTC）40部位を用いた．

対象症例の内訳は第２章　表６ならびに表７に示した通りである．

<u>方法</u>

前章に用いた標本の連続切片を通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本より作成した．

標本は前項と同様にマイクロウェーブ処理し，Ki-67 を用いて，免疫組織化学的染色を施し，検索した．

また，Ki-67 陽性細胞率と前章で検索した細胞核および細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の相関関係について Spearman の順位相関検定を行い検討した．

3） 結果

腫瘍性疾患におけるKi-67抗原発現率：

腫瘍性疾患を組織型別ならびに病変部位別に分類し，濾胞上皮のKi-67抗原発現率を検討した.

腫瘍性疾患におけるKi-67免疫染色像を図21に示す.

〔腫瘍性疾患における組織型別Ki-67抗原発現率〕（図26）

腫瘍性疾患における組織型別Ki-67陽性細胞率は，未分化癌（UC）症例と濾胞癌（FC）症例において，非病変部位（NTC）と比較して有意に高率であった（$p<0.0001$）．また，UC症例は乳頭癌（PC）症例と，FC症例は濾胞腺腫（FAd）症例と比較して有意に高率であった（$p<0.0001$）．

〔腫瘍性疾患における病変部別Ki-67抗原発現率〕（図27）

UC症例を除く腫瘍性病変において，各々の腫瘍辺縁部が腫瘍中心部に対して高値を示したが有意ではなかった.

腫瘍性疾患におけるKi-67陽性細胞率と細胞核・細胞質別のc-myc蛋白陽性細胞率の関係：（図28・29）

腫瘍性疾患を対象に，Ki-67陽性細胞率とc-myc蛋白陽性細胞率の関係細胞核ならびに細胞質別に検討した.

腫瘍性疾患において，Ki-67陽性細胞率と細胞核および細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の相関関係は，唯一未分化癌においてのみみられた（$r^2=0.706$）．（図30）

4） 考察

甲状腺腫瘍性疾患について増殖細胞核抗原Ki-67抗原の発現を免疫組織化学的手法を用

いて検討し，腫瘍性疾患における Ki-67 抗原発現，つまり増殖細胞指標と c-myc 蛋白発現の関係を検討した．

腫瘍性疾患における Ki-67 抗原発現は，FAd 症例で 1.8%，PC 症例で 2.7%，FC 症例で 9.1%と概ねこれまでの報告[87)-90)]と一致したが，Yoshida らの BrdU を用いた報告[51)]よりは高値を示した．甲状腺疾患における増殖指標の検討は数少ないが，非腫瘍性疾患と同様，S 期のみを標識する BrdU に対して，Ki-67 は増殖期の細胞の大部分を検出できるためであろうと考えられた．

各組織型における Ki-67 発現は濾胞癌と未分化癌症例において顕著に高率であった．

また，未分化癌症例の Ki-67 陽性細胞率が，未分化癌の先行病変として頻度の高い乳頭癌症例に対して有意に高率である点に関しては，未分化転化において著しい自律増殖能を獲得したものと考えられ，これまでいわれてきたように高い増殖能＝予後不良という関係が成立するものと考えられる．また，濾胞癌症例の Ki-67 陽性細胞率が濾胞腺腫に対して高率を示した点については，甲状腺濾胞腺腫ならびに濾胞癌において adenoma-carcinoma sequence が成立するならば，腫瘍の progression において増殖能の増大が獲得されることを示唆している．

病変部位別では腫瘍性疾患の各組織型において，腫瘍辺縁部が腫瘍中心部に比べて Ki-67 陽性細胞率の増加傾向を示した．これは，有意差こそなかったが，腫瘍周辺部において細胞の増殖能が高いという腫瘍における一般的傾向に一致する．

Ki-67 陽性細胞率と細胞核ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率との相関関係は未分化癌においてのみ強い相関関係が見られた．未分化癌の症例数は少ないが，Ki-67 抗原発現と細胞核 c-myc 蛋白発現との有意な相関が見られ，一般的に生命予後不良とされている癌腫において，細胞核発現 c-myc 蛋白は増殖能に高い関連性を有していることを示している．

c-myc 蛋白の発現を細胞増殖指標からみると，細胞核発現 c-myc 蛋白は細胞増殖に関わるものと細胞増殖とは関係ないものがあることが示唆され，細胞質発現 c-myc 蛋白は細胞増殖には関係がないことが考えられた．

4．小括

この章では甲状腺疾患組織を用い，非腫瘍性疾患および腫瘍性疾患について各組織型ならびに病変部に細分し，増殖細胞指標としての Ki-67 抗原発現率を用いて免疫組織化学的に検討するとともに，c-myc 蛋白の発現率との関係を検討した．

その結果，以下のことが明らかとなった．

1） Ki-67 抗原は未分化癌症例および濾胞癌症例において高率に発現していた．

2） 未分化癌症例において，細胞核 c-myc 蛋白発現と Ki-67 抗原発現の間に相関関係がみられた．

3） 細胞質 c-myc 蛋白発現と増殖細胞指標である Ki-67 抗原発現の間には相関関係はみられなかった．

以上より，細胞核発現 c-myc 蛋白の一部は細胞増殖に関与しているものと考えられる．また，細胞質に発現している c-myc 蛋白は細胞増殖とは関係ないことが明らかとなった．

組織型	Ki-67陽性細胞率（%）	BrdU labelling index（%）
健常甲状腺組織	0 [88]	0.2 [51]
腺腫様甲状腺腫	1 [87]	＜1 [87], 0.7 [51]
中毒性び慢性過形成	0.1-4.1 [91]	—
（非腫瘍性疾患）	0 [90]	—
濾胞腺腫	4.63 [87], 0 [89]	2.24 [87], 0.6 [51]
（良性腫瘍）	0-3.1 [88]	—
乳頭癌	1 [87], 0 [90]	＜1 [87], 1.5 [51]
濾胞癌	0 [90]	1.2 [51]
未分化癌	—	—
（悪性腫瘍）	0.2-3.9 [88]	—

表８　各種甲状腺疾患における増殖細胞率

	由来クローン	抗体種別	抗原	
MIB-1	MIB-1[91]	MoAb	1002 bp Ki-67 cDNA由来の組み換え蛋白	Immunotech S. A., France

MoAb: monoclonal antibody

表 9　使用した Ki-67 抗体

図21　甲状腺疾患組織における Ki-67 免疫染色像

非腫瘍性疾患

a) 腺腫様甲状腺腫症例（180倍）：極少数の細胞核陽性像が見られる（▲）

腫瘍性疾患

b) 乳頭癌症例（180倍）：少数散在性に陽性像が見られる（▲）

c) 未分化癌症例（120倍）：散在性に陽性像が見られる

組織型	症例数	Ki-67抗体陽性細胞率（%） (mean ± SD)
非病変部位（NTC）	40部位	0.6±2.1
腺腫様甲状腺腫（AG）	21例	1.3±3.9
中毒性び慢性過形成（TDH）	20例	0.5±0.8

mean+SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

図22　非腫瘍性疾患における組織型別 Ki-67 陽性細胞率

mean+SD
Statistical analysis was performed by Mann-Whitney 's U test

atr;	atrophic foci	n=26
hyp;	hyperplastic foci	n=26
inv;	involuted foci	n=18
hyp pp;	hyperplastic foci with pseudopapillary growth	n=10
hyp s;	hyperplastic foci with small follicular growth	n=15

図23　非腫瘍性疾患各病変部における Ki-67 陽性細胞率

図24　非腫瘍性疾患における Ki-67 陽性細胞率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率との関係

図25　非腫瘍性疾患における Ki-67 陽性細胞率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率との関係

組織型	症例数	Ki-67抗体陽性細胞率（%） (mean ± SD)
非病変部位（NTC）	40部位	0.6±2.1
濾胞腺腫（FAd）	17例	1.8±2.6
乳頭癌（PC）	19例	2.7±4.0
濾胞癌（FC）	5例	9.1±9.7
未分化癌（UC）	5例	13.8±10.4

mean＋SD
Statistical analysis was performed by Scheffé's F test

図26　腫瘍性疾患における組織型別 Ki-67 陽性細胞率

mean+SD
Statistical analysis was performed by Mann-Whitney's U test

cntr; central lesion of tumor
peri ; peripheral lesion of tumor
inf; extra-capsular infiltrative lesion

FAd cntr: n=17
peri: n=7
PC cntr: n=20
inf: n=20
FC cntr: n=5
peri: n=3
UC n=6

図27　腫瘍性疾患各病変部における Ki-67 陽性細胞率

図28　腫瘍性疾患における Ki-67 陽性細胞率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率との関係

図29　腫瘍性疾患における Ki-67 陽性細胞率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率との関係

図30　未分化癌症例における Ki-67 陽性細胞率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

第４章　甲状腺疾患におけるc-myc蛋白と濾胞上皮細胞の機能

１．甲状腺疾患におけるチログロブリンと甲状腺ペルオキシダーゼ生成

c-myc蛋白の発現が細胞核だけでなく細胞質にもみられること，そしてc-myc蛋白の発現が細胞増殖との関係だけでは説明できないことが前章までに得られた．特に腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例における過形成病巣においては，増殖細胞指標であるKi-67抗原の発現とは無関係な，細胞質のc-myc蛋白発現がみられた．そこでこの現象が，濾胞上皮の甲状腺ホルモン合成に関与する何らかの機能に関連しているのではないかという仮説を元に，本章では組織レベルにおいて検出可能なチログロブリンと甲状腺ペルオキシダーゼの生成状態とc-myc蛋白の発現の関係を検索することとした．

チログロブリン（thyroglobulin，以下Tg）は分子量660 kDの巨大な糖蛋白であり，甲状腺濾胞上皮で生成され，濾胞腔に分泌・貯蔵される．濾胞腔に含まれる蛋白の濃度は20～30%にものぼりその大部分がTgである．Tgの大部分は沈降係数19の19S-Tgで，２つのサブユニットで構成されている．甲状腺に取り込まれたヨウ素はTg分子内のチロシン残基に結合しモノヨードチロシン（monoiodotyrosine, MIT），ジヨードチロシン（diiodotyrosine, DIT），トリヨードチロシン（triiodotyrosine, T_3），チロキシン（thyroxine, T_4）等の有機ヨードとしてペプチド鎖内に存在する．Tgは甲状腺ホルモン（T_4, T_3）合成の場として機能すると同時にMIT，DITの形でヨウ素を貯蔵する機能も有している．

甲状腺疾患組織のTgに関する検討はきわめて少なく，Rollandらが病態Tgを酵素的に*in vitro*でヨウ素化し形成されるMIT，DIT，T_3，T_4組成を調べ正常組織と差がないとする報告[93]している．また，甲状腺腫瘍では一般的に悪性になるほどTg含量が減少し，同時に著明にヨウ素含量が低下[94]するとされている．また，Tg中のシアル酸含量が悪性度に応じて減少する[93]ことや，Tg分子自体の多型が出現することが報告されている[95]．

病理学的には，人体内でTgを産生しているのは濾胞上皮由来の細胞のみである．市販のポリクロナール抗体を用いた光顕的免疫組織化学にて正常甲状腺，慢性甲状腺炎（橋本病），び慢性甲状腺腫，濾胞腺腫，多くの甲状腺悪性腫瘍で陽性像が認められる．甲状腺癌においては，乳頭癌細胞の70%[96), 97)]，濾胞癌細胞の20%にTgが証明されている[98)]が，未分化癌はTg陰性であるという報告[99), 100)]が多い．

甲状腺ペルオキシダーゼ（(human) thyroid peroxidase，以下hTPO）は甲状腺ホルモン合成のkey enzymeとして知られている．hTPOは甲状腺濾胞上皮細胞内の膜成分（疎面小胞体，核膜，small apical vesicle）に強固に結合して存在している．その分子量は約110 kD[101)]で，甲状腺に取り込まれたヨウ素イオンのH_2O_2による酸化，Tgのチロシン残基のヨウ素化，ヨードチロシン残基のカップリングによるT_4, T_3残基の生成という甲状腺ホルモン合成に必要な段階すべてを触媒している．近年の研究で，橋本病やBasedow病症例における抗ミクロソーム抗体は，甲状腺ミクロソームに含まれるhTPOに対する抗体であることが明らかとなっている[102)-105)]．また，臨床的なhTPOに関する知見として，橋本病やBasedow病で出現する抗hTPO抗体以外にも，甲状腺腫瘍でペルオキシダーゼ活性が上昇する[106)]こと，また，悪性腫瘍例でhTPOの活性が低下しているとの報告もみられる[107)]．

抗hTPO抗体の病理学的な応用は近年いくつか試みられており，hTPO染色像は腫瘍の分化度に反比例することが報告[108), 109)]されている．hTPOのいずれの部位を認識する抗体を作成するかによって染色像が異なるとの報告もある[110)]．しかしながらTgと同様にhTPOと非腫瘍性病変を含めた種々の甲状腺疾患の関係や濾胞上皮細胞の増殖能との関連に関する報告はない。

2．甲状腺非腫瘍性疾患におけるc-myc 蛋白とチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼ合成の関連性

1）　目的

前章までに，甲状腺の非腫瘍性疾患においてc-myc蛋白の発現がみられ，特に腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において，細胞質 c-myc 蛋白の発現が著明であったが，細胞質における c-myc 蛋白の発現は増殖細胞指標である Ki-67 抗原発現率とは相関しないことを見いだした．一般に病理組織学的には過形成病巣は hyperfunction な部位と解釈されている．これらの点を踏まえ，甲状腺濾胞上皮の機能状態，特に甲状腺ホルモン合成系に深く関与するチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの生成の程度を，疾患別ならびに病変部位別に分けて免疫組織化学的手法にて検索し，c-myc蛋白の発現が甲状腺濾胞上皮細胞の機能状態と関係があるか否かを明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

<u>対象</u>

前章と同一の症例の病変部位を検索対象とした．病変部位の分類は前章と同様に行った．

対照コントロールとして，腫瘍性疾患の腫瘍部より離れた非腫瘍部位（NTC）40部位を用いた．

対象症例の内訳は，第2章　表1ならびに表2に示した通りである．

尚、各症例の術前甲状腺機能検査を表10に示す．

方法

第2章と同一症例の連続切片を通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本より作成し，抗チログロブリン抗体ならびに抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った．尚，核染色としてヘマトキシリンによる染色を行った．

使用した抗チログロブリン抗体（抗Tg抗体）を表11に示す．

抗ヒト甲状腺ペルオキシダーゼ抗体（抗hTPO抗体）は，ウサギを用いて作成した．作成手順を図31に示す．抗体力価は受動的赤血球凝集反応（ミクロソームテスト）で確認し，最終的には受動的赤血球凝集反応において25,600倍値を示した．また，精製抗原を用いてOuchterlony法を行い特異性を確認した．

免疫組織化学的染色後，濾胞上皮の細胞質に染色像のみられるものを陽性細胞とした．陽性細胞比率は，各病変部位毎に1視野（200倍）における陽性細胞の比率を5段階に分けて評価した．抗Tg抗体ならびに抗hTPO抗体における陽性細胞比率の評価は，陽性細胞が全くみられないものを陰性（－），視野内の全濾胞上皮細胞のうち陽性細胞が1/4に満たないものを（±），同様に半数に満たないものを（＋），3/4に満たないものを（＋＋），3/4を越えるものを（＋＋＋）とした．

また，抗Tg抗体陽性細胞比率ならびに抗hTPO抗体陽性細胞比率と第2章　2.で検討した細胞核および細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の相関関係についてSpearmanの順位相関検定を行い検討した．

3）　結果

健常甲状腺濾胞上皮（非病変部位）でのチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの発現様式と発現比率：

非病変部（NTC）部位を対象に健常甲状腺濾胞上皮のチログロブリン（Tg）と甲状腺ペルオキシダーゼ（hTPO）の発現様式と発現比率を観察した．

NTCでのTg陽性像は濾胞上皮細胞に淡くみられた．NTCでは，Tg陽性細胞は約40%

であった.

NTCにおけるhTPO陽性像もTgと同様で, hTPO陽性細胞は約30%であった.

非腫瘍性疾患におけるチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの発現様式と陽性細胞比率：

腺腫様甲状腺腫（AG）と中毒性び慢性過形成（TDH）症例を対象に濾胞上皮のTgならびにhTPO発現様式と陽性細胞比率を検索した.

〔非腫瘍性疾患におけるTg発現様式〕

抗Tg抗体陽性像は濾胞上皮細胞質, コロイド, 吸収空胞に認められた.（図32） 時に, 陽性像が細胞質で細顆粒状にみられるものや, 濾胞腔面（apical surface）に強くみられる症例もみられた.

〔非腫瘍性疾患におけるTg陽性細胞比率〕

非腫瘍性疾患におけるTg陽性細胞比率を図33に示す.

AGおよびTDH症例において, NTCに比してTg陽性細胞が多くみられる傾向を示していたが有意差はみられなかった.

病変部位別のTg陽性細胞比率を図34に示す.

病変部別の検討では, AG症例において過形成病巣が萎縮性病巣に対してTg陽性を示す細胞が多く（$p<0.0001$）, 同様にTDH症例でも過形成病巣が退縮巣に比して, Tg陽性を示す細胞が増加しており, 小濾胞様増生を示す過形成病巣で有意にTg陽性細胞が増加していた（$p<0.0001$）.

〔非腫瘍性疾患におけるhTPO発現様式〕

抗hTPO抗体陽性像も抗Tg抗体の場合と同様の分布を示したが, 抗Tg抗体に比して, 濾胞腔面が強く染色される傾向があった.（図32）

〔非腫瘍性疾患におけるhTPO陽性細胞比率〕

非腫瘍性疾患におけるhTPO陽性細胞比率を図35に示す.

AGならびにTDH症例ではhTPO陰性細胞の比率が減少し, 高低幅広いhTPO陽性細

胞率の分布がみられ，TDH 症例においては，NTCに比して有意に陽性細胞の増加を認めた（p=0.01）．

病変部位別の hTPO 陽性細胞比率を図36に示す．

病変部別の検討では，AG 症例において過形成病巣が萎縮性病巣に対して Tg 陽性を示す細胞が多かったが有意差はなかった．TDH 症例でも同様に過形成病巣が退縮巣に比して，Tg 陽性を示す細胞が増加していたが有意差はみられなかった．

非腫瘍性疾患におけるチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞核・細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係：

非腫瘍性疾患を対象に Tg ならびに hTPO 陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係を検討した．

〔非腫瘍性疾患における Tg 陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係〕

非腫瘍性疾患における Tg 陽性細胞比率と細胞核（図37）ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係（図38）を示す．

非腫瘍性疾患における Tg 陽性細胞比率と c-myc 蛋白陽性細胞率の間に，細胞核ならびに細胞質ともに正の比例関係が認められた（$p<0.0001$）．この傾向は疾患別に分けてみても同様であった．また，Tg 陽性細胞の比率が極めて高い部位（+++）において，細胞核 c-myc 蛋白陽性率がやや減少する傾向がみられた．

〔非腫瘍性疾患における hTPO 陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係〕

非腫瘍性疾患における hTPO 陽性細胞比率と細胞核（図39）ならびに細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係（図40）を示す．

非腫瘍性疾患における hTPO 陽性細胞比率と c-myc 蛋白陽性細胞率の間に，細胞核ならびに細胞質ともに正の相関関係が認められた（$p<0.0001$）．この傾向は疾患別に分けてみても同様であった．

非腫瘍性疾患における臨床甲状腺機能とc-myc蛋白発現ならびに免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能状態との相関：

非腫瘍性疾患における臨床甲状腺機能とc-myc蛋白発現との相関を検討した．しかしながら，細胞核・細胞質発現c-myc蛋白ともに臨床甲状腺機能とは相関はみられなかった．同様に免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能との相関を検討したが，有意な関係はみられなかった．また，TSHレセプター抗体との関係においても，c-myc蛋白発現ならびに免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能状態との相関はみられなかった．

4） 考察

甲状腺非腫瘍性疾患において，濾胞上皮の機能状態をみるために，チログロブリン（Tg）と甲状腺ペルオキシダーゼ（hTPO）の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討し，同時にTgおよびhTPOの発現とc-myc蛋白発現の関係を検討した．

非腫瘍性病変におけるTgおよびhTPOの発現は過形成病巣に高くみられた．このことは，病理組織学的にいわゆる過形成としてとらえられていた部位においてチログロブリン生成能が高まっていることを意味し，過形成像は機能亢進状態を反映しているとするこれまでの考えを支持する．

腺腫様甲状腺腫（AG）ならびに中毒性び慢性過形成（TDH）症例の過形成病巣は，特に細胞質c-mycが高率に発現されていた部位であり，また，TgおよびhTPOの発現が細胞核ならびに細胞質c-myc蛋白の発現と良い相関を示したことから，甲状腺組織においてはc-myc蛋白，特に細胞質発現c-myc蛋白がTgないしはhTPOの発現，即ち，甲状腺ホルモン合成系の一部に関係している可能性が考えられる．

尚，臨床甲状腺機能とc-myc蛋白発現ならびに免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能状態との相関がみられなかった点に関しては，第2章　1．で述べた通り，同一組織内でも病変の異なる部位がモザイク状に分布しているため，総和としてとらえる臨床甲状腺機能と個々の細胞としてとらえる組織学的手法の結果との間に乖離が生じたものと考える．

3．甲状腺腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白とチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼ生成の関連性

1）　目的

前章までに，甲状腺の腫瘍性疾患についてc-myc蛋白の発現を検討した結果，細胞核発現c-myc蛋白は増殖細胞率の高い未分化癌症例に高率に発現していることが明らかになった．また，細胞質発現c-myc蛋白は乳頭癌をはじめとする腫瘍性疾患で高率で発現しており，その発現は増殖細胞率に相関しないことが明らかとなった．この点を踏まえ，甲状腺濾胞上皮の機能状態，特に甲状腺ホルモン合成系に深く関与するチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの生成の程度を，組織型別ならびに病変部位別に分けて免疫組織学的手法にて検索し，腫瘍性病変においてもc-myc蛋白の発現が甲状腺濾胞上皮細胞の機能状態と関係があるか否かを明らかにすることを目的とした．

2）　対象と方法

<u>対象</u>

前章と同一の症例の病変部位を検索対象とした．病変部位の分類は前章と同様に行った．

対照コントロールとして，腫瘍性疾患の腫瘍部より離れた非腫瘍部位（NTC）40部位を用いた．

対象症例の内訳は第2章　表6ならびに表7に示した通りである．

尚、各症例の術前甲状腺機能検査を表10に示す．

<u>方法</u>

第2章と同一症例の連続切片を通常ホルマリン固定パラフィン包埋標本より作成し，抗

チログロブリン抗体ならびに抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った.

また, 抗 Tg 抗体陽性細胞比率ならびに抗 hTPO 抗体陽性細胞比率と第 2 章　3.で検討した細胞核および細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の相関関係について Spearman の順位相関検定を行い検討した.

3）　結果

腫瘍性疾患におけるチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの発現様式と発現比率：

腫瘍性疾患を組織型別ならびに病変部位別に分類し, 濾胞上皮の Tg ならびに hTPO 発現様式と発現比率を検索した.

〔腫瘍性疾患における Tg 発現様式〕

腫瘍性疾患症例における典型的な抗 Tg 抗体免疫染色像を図41に示す.

未分化癌（UC）症例を除く腫瘍性疾患で抗 Tg 抗体陽性像がみられ, 主として細胞質がび慢性に染色された. また, 乳頭癌（PC）の一部に, 濾胞腔面が濃染するものがみられた. 症例によっては, 細胞質内に抗 Tg 抗体陽性像が粗大顆粒状にみられた.

〔腫瘍性疾患における Tg 陽性細胞比率〕

腫瘍性疾患における組織型別の抗 Tg 抗体陽性細胞比率を図42に示す.

組織型別の検討では, UC 症例を除く腫瘍性疾患においては Tg 陽性細胞が多くを占めており, 非病変部位に比して有意に高率であった（$p<0.05$）. また, PC 症例では特にその傾向が強かった（$p<0.0001$）. これに反して, UC 症例は Tg 陰性のものが多数で, 一部に Tg 陽性細胞がみられるものの低率であった.

腫瘍性疾患の病変部位別の抗 Tg 抗体陽性細胞比率を図43に示す.

病変部別の検討では濾胞腺腫（FAd）ならびにおよび PC 症例において, 腫瘍中心部に対して腫瘍辺縁部で Tg 陽性細胞が増加傾向を示したが, 有意差はみられなかった. また,

濾胞癌（FC）症例では腫瘍辺縁部で腫瘍中心部に比してTg陽性細胞の比率の減少がみられたが，これもまた有意差はみられなかった．

〔腫瘍性疾患におけるhTPO発現様式〕

腫瘍性疾患症例における典型的な抗hTPO抗体免疫染色像を図41に示す．

各腫瘍性疾患において細胞質にび慢性に陽性像がみられた．また，濾胞腔面が強く染色されるものが多かった．

〔腫瘍性疾患におけるhTPO陽性細胞比率〕

腫瘍性疾患における組織型別の抗hTPO抗体陽性細胞比率を図44に示す．

組織型別の検討では，各々の腫瘍性疾患においてはhTPO陽性細胞の増加をみとめ，非病変部位に比して有意に高率であった（$p<0.0001$）．

腫瘍性疾患の病変部位別の抗hTPO抗体陽性細胞比率を図45に示す．

病変部位別の検討では，各々の腫瘍辺縁部が，腫瘍中心部に比して，hTPO陽性細胞の減少傾向がみられたが，有意差はなかった．

腫瘍性疾患におけるチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞核・細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係：

腫瘍性疾患を対象にTgならびにhTPO陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係を検討した．

〔腫瘍性疾患におけるTg陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係〕（図46・47）

腫瘍性疾患においてTg陽性細胞比率と細胞核c-myc蛋白陽性像の間には相関関係はみられなかった．Tg陽性細胞比率と細胞質c-myc蛋白陽性率の間には相関関係がみられたが（$p=0.0007$），細胞質c-myc蛋白陽性率は概ね高値であり，Tg陽性細胞比率の増加に伴う細胞質c-myc蛋白陽性細胞の増加は緩徐であった．

〔腫瘍性疾患におけるhTPO陽性細胞比率と細胞核ならびに細胞質c-myc蛋白陽性細胞率の関係〕（図48・49）

腫瘍性疾患においてhTPO陽性細胞比率と細胞核c-myc蛋白陽性像の間には相関関係

はみられなかった．hTPO 陽性細胞比率と細胞質 c-myc 蛋白陽性率の間には相関関係がみられたが（p＜0.0001），細胞質 c-myc 蛋白陽性率は概ね高値であり，hTPO 陽性細胞比率の増加に伴う細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞の増加は殆どみられなかった．

腫瘍性疾患における臨床甲状腺機能と c-myc 蛋白発現ならびに免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能状態および増殖細胞率との相関：

腫瘍性疾患における臨床甲状腺機能と c-myc 蛋白発現との相関を検討した．しかしながら，細胞核・細胞質発現 c-myc 蛋白ともに臨床甲状腺機能とは相関はみられなかった．同様に免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能との相関を検討したところ，術前 Tg 値と hTPO 陽性細胞比率との間に正の相関関係がみられた（p=0.037 Spearman rank correlationにて検定）．この傾向は乳頭癌症例において顕著であった（p=0.0077）．また，TSH レセプター抗体との関係においては，c-myc 蛋白発現ならびに免疫組織化学的濾胞上皮細胞機能状態との相関はみられなかった．加えて，増殖細胞率との相関もみられなかった．

4）　考察

甲状腺腫瘍性疾患において，濾胞上皮の機能状態をみるために，チログロブリン（Tg）と甲状腺ペルオキシダーゼ（hTPO）の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討し，同時に Tg および hTPO の発現と c-myc 蛋白発現の関係を検討した．

未分化癌（UC）症例を除く，腫瘍性疾患において Tg および hTPO 陽性像が強くみられた．これは，甲状腺の腫瘍性病変は分化度が高いものが多く，発生母地の性格を良好に保っているためと考えられる．このことは，術前 Tg 値と hTPO 陽性細胞率が正の相関関係を示したことに矛盾しない．また，Tg に関しては，甲状腺腫瘍性病変では血清 Tg 値が上昇する[112]が，この場合の Tg は低ヨウ素低シアル酸[113]で，生合成されても通常の濾胞腔への輸送および蓄積が起こらず早急に血液中に放出されてしまう short-loop[114),115]が生じているため，恒常性維持のために Tg 生成能が上昇したと考えられている．また，腫瘍性疾患において生成される Tg は低ヨウ素 Tg で，正常組織の Tg と比べヨウ素化を受け難

くホルモン形成能が低いとする報告[107]もあり，甲状腺ホルモン合成のため代償的にTg生成が増加している可能性もある．しかしながら，hTPOに関する同様の研究はなく，腫瘍性疾患におけるhTPO生成の増加がいかなる機構で生じているかは不明である．

また，未分化癌症例においてはTgの発現を欠くものが多く，未分化転化との関係が考えられる．同様のことが濾胞癌症例における腫瘍辺縁部にみられたことは，腫瘍の発育・進展にともなって，いわゆる脱分化が生じている可能性を示唆する．このことは，第3章で増殖細胞核Ki-67抗原発現率が，腫瘍中心部に比して腫瘍辺縁部において増加していたこともあり，癌腫の増殖と分化では，増殖に伴って分化は抑制されるとの考え[116), 117)]に一致する．

しかし，hTPO陽性細胞率とc-myc蛋白陽性細胞率との関係は明瞭でなかった．

腫瘍性疾患においては，細胞質に発現しているc-myc蛋白のTgないしはhTPOを介する甲状腺ホルモン合成系との関連性は，非腫瘍性疾患に比べて明瞭でなかった．このことは腫瘍性疾患におけるc-myc蛋白の発現は，非腫瘍性病変と異なって細胞増殖に関係している可能性が考えられる．

4. 小括

本章では甲状腺疾患組織を用い，非腫瘍性疾患および腫瘍性疾患について各組織型ならびに病変部に細分し，甲状腺ホルモン合成に深く関与しているチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼの発現を免疫組織化学的に検索し，甲状腺疾患組織において濾胞上皮の機能を評価するとともに，細胞核ならびに細胞質発現c-myc蛋白との関係を検討した．

その結果，以下のことが明らかとなった．

1） 非腫瘍性疾患の腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において，c-myc蛋白の発現に比例して，チログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼの生成が有意に増加していた．

2） しかし腫瘍性疾患ではc-myc蛋白発現とチログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼの生成の関連は明瞭でなかった．

以上により，甲状腺濾胞上皮のc-myc蛋白の発現増加は，濾胞上皮の甲状腺ホルモン合成機能と関係していると考えられる．特にこの関係は非腫瘍性疾患において明らかであった．

PDx	Pt	Age	Sex	pre fT4	pre T3	pre TSH	TRAb	Tg	TGHA	MCHA
AG	IS	71	F	0.74	108	2.04		217.0	0	0
AG	MY	66	F	0.81	87	4.50		93.7	0	400
AG	MM	45	F	0.84	129	1.15		ne	ne	ne
AG	SK	39	F	0.87	129	1.90		113.0	0	0
AG	YY	38	M	0.88	124	13.90		10.0		10
AG	NH	51	F	0.99	111	1.58		ne	ne	ne
AG	OA	37	M	1.01	113	1.57		39.2	0	0
AG	KK	43	F	1.04	94	1.60		40.2	0	0
AG	YH	50	F	1.06	107	0.40		ne	0	0
AG	AM	16	F	1.22	104	0.80		34.0	0	0
AG	SY	31	F	1.23	92	0.70		254.0	0	0
AG	SM	49	F	1.31	107	0.80		64.7	0	100
AG	OC	33	F	1.43	104	0.52		ne	0	0
AG	TT	55	F	1.43	146	0.81		1300.0	0	0
AG	NK	22	F	1.44	96	0.80		79.4	0	0
AG	TH	72	F	1.48	100	0.38		ne	ne	ne
AG	HH	47	F	1.49	110	0.86		ne	0	0
AG	SY	58	F	2.07	150	0.03		31.3	0	100
AG	YY	57	F	2.35	126	1.22		30.0	0	1600
AG	KR	38	M	ne	92	1.00		125.0	0	0
AG	QU	45	F	ne	ne	ne		ne	ne	ne
TDH	GN	26	F	0.21	58	0.99	+	38.4	400	1600
TDH	FK	42	M	0.36	104	2.48		ne	ne	ne
TDH	KS	31	F	0.43	174	0.03	+	74.7	0	0
TDH	HY	56	M	0.54	152	1.40		ne	ne	ne
TDH	NK	18	F	0.72	78	0.03	+	ne	0	0
TDH	KH	21	M	0.80	77	0.03		110.0	0	1600
TDH	SY	29	M	0.89	148	0.10		88.6	0	1600
TDH	SM	21	F	1.01	100	0.19		70.6	400	25600
TDH	MM	21	F	1.08	79	0.60	+	23.5	0	0
TDH	YK	24	M	1.22	256	0.03		ne	ne	ne
TDH	SA	17	F	1.37	123	2.24		ne	ne	ne
TDH	KK	18	M	1.46	105	0.70		38.0	ne	ne
TDH	OY	16	F	1.48	82	0.61		ne	ne	ne
TDH	HS	35	F	1.48	80	0.40		28.5	0	400
TDH	AH	58	F	1.53	278	0.28	+	ne	0	25600
TDH	AK	29	F	1.82	266	0.14	+	28.4	100	1600
TDH	OK	20	F	2.01	168	0.20		15.4	ne	ne
TDH	FN	49	F	2.07	122	0.10	+	ne	0	1600
TDH	SK	20	F	2.30	112	0.22	+	ne	0	400
TDH	YC	19	F	3.12	244	0.03	+	46.1	0	25600

PDx	Pt	Age	Sex	pre fT4	pre T3	pre TSH	TRAb	Tg	TGHA	MCHA
FAd	YF	37	F	0.79	103	1.95		30.6	0	0
FAd	KT	72	F	0.90	183	0.09		294.0	0	0
FAd	US	44	F	0.96	103	2.56		2140.0	ne	ne
FAd	YH	78	F	0.98	117	0.60		67.9	ne	ne
FAd	IM	47	M	1.19	93	1.04		38.7	ne	ne
FAd	TH	62	F	1.20	79	1.50		2980.0	0	0
FAd	TK	69	F	1.20	106	2.70		1010.0	0	0
FAd	KA	39	M	1.20	112	2.20		40.0	0	0
FAd	HF	53	F	1.20	102	1.80		138.0	0	0
FAd	NY	35	F	1.30	98	0.20	+	117.0	0	1600
FAd	YS	27	F	1.33	107	1.24		ne	ne	ne
FAd	IK	51	F	1.36	94	1.98		155.0	0	0
FAd	IE	33	F	1.43	98	1.10		ne	ne	ne
FAd	KT	52	F	1.58	83	2.04		125.0	0	0
FAd	FC	53	F	1.70	106	1.60		ne	100	400
FAd	MK	72	F	1.75	125	1.16		134.0	0	0
FAd	NY	19	F	ne	121	1.30		61.5	0	400
PC	KK	50	F	0.85	83	4.90		ne	ne	ne
PC	AE	45	F	0.94	117	2.03		ne	ne	ne
PC	AK	40	F	1.09	129	0.19		10.0	0	0
PC	YT	59	F	1.12	88	1.37		ne	ne	ne
PC	TE	38	F	1.18	99	3.96		26.4	25600	1600
PC	KS	57	F	1.22	126	2.64		41.7	0	1600
PC	NT	32	M	1.24	100	1.93		35.6	0	0
PC	NM	18	F	1.24	109	0.30		298.0	0	0
PC	SK	49	F	1.29	126	1.91		49.8	0	0
PC	TM	68	M	1.29	113	0.50		43.6	ne	ne
PC	KY	83	F	1.32	99	0.79		575.5	25600	25600
PC	TT	55	F	1.43	146	0.81		1300.0	0	0
PC	AN	43	F	1.49	99	1.46		58.2	0	0
PC	TN	36	F	1.52	119	0.75		138.0	0	0
PC	NS	56	F	1.63	104	0.30		30.1	0	0
PC	SG	32	M	1.71	116	4.05		ne	0	0
PC	SA	46	F	ne	ne	ne		ne	ne	ne
PC	EH	39	F	ne	ne	ne		21.9	0	0
FC	SK	38	F	0.20	44	108.54		160.0	ne	ne
FC	IT	64	F	0.78	97	1.40		ne	0	0
FC	HH	42	F	0.93	94	0.50		1640.0	0	0
FC	YS	68	M	1.04	134	1.47		ne	0	0
FC	NA	61	M	1.90	152	0.90		ne	0	0
UC	IA	76	F	1.20	66	0.50		ne	ne	ne
UC	TM	68	M	1.29	113	0.50		43.6	ne	ne
UC	MY	65	F	1.70	101	2.40		ne	ne	ne
UC	TM	36	F	ne	139	ne		ne	ne	ne
UC	KT	77	F	ne	ne	ne		ne	ne	ne

PDx: 病理組織学的分類
TRAb: TSH レセプター抗体
TGHA: サイロイドテスト　MCHA: ミクロゾームテスト

正常値：
fT4: 0.80-2.10 ng / dl
T3: 70-160 ng / dl
TSH: 0.3-4.0 μU / ml
Tg: ≦30 ng / ml

ne: not examined
TGHA 及び MCHA の0は100倍未満

表10　対象症例の術前臨床甲状腺機能

	由来クローン	抗体種別	抗原	
NCL-THY	1D4 [111)]	MoAb	精製ヒトthyroglobulin	Novocastra Laboratories Ltd., UK

MoAb: monoclonal antibody

表11　使用した抗チログロブリン抗体

使用したウサギならびに試薬

ウサギ（日本白色, ♂, 2.5 Kg, 東京実験ファーム）

hTPO: ヒト甲状腺ミクロゾーム（peroxidase）（TMA01, Canadian Bioclinical Ltd., Canada）

CFA: complete Freund's adjuvant（Difco Laboratories Inc., USA）

Protein Aカラム（Ampure PA, Amersham Life Sci., UK）

図31　抗ヒト甲状腺ペルオキシダーゼ抗体作成手順

図32　非腫瘍性疾患のチログロブリンならびに
甲状腺ペルオキシダーゼ免疫染色像

a) 中毒性び慢性過形成症例の Tg 免疫染色像（240倍）：
過形成巣濾胞上皮細胞に陽性像がみられる
b) 中毒性び慢性過形成症例の hTPO 免疫染色像（240倍）：
過形成巣濾胞上皮細胞に陽性像がみられる

図33　非腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率

図34　非腫瘍性疾患各病変部におけるチログロブリン陽性細胞比率

NTC: non-tumorous control n=40
AG: adenomatous goiter n=21
TDH: toxic diffuse goiter n=20

図35　非腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率

図36　非腫瘍性疾患各病変別における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率

mean+SD
−: none, ±: 0< <25%, +: 25≦ <50%,
++: 50≦ <75%, +++: 75%≦
p<0.0001
Statistical analysis was performed by
Spearman rank correlation

図37　非腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

mean+SD
−: none, ±: 0< <25%, +: 25≦ <50%,
++: 50≦ <75%, +++: 75%≦
p<0.0001
Statistical analysis was performed by
Spearman rank correlation

図38　非腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図39　非腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図40　非腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図41　腫瘍性疾患のチログロブリンならびに
甲状腺ペルオキシダーゼ免疫染色像

a) 乳頭癌症例のTg免疫染色像（180倍）：
殆どの乳頭癌細胞の細胞質に陽性像がみられる.
b) 乳頭癌症例のhTPO免疫染色像（180倍）：
殆どの乳頭癌細胞の細胞質に陽性像がみられ，特に濾胞腔側に強く陽性像が観察される.
c) 未分化癌症例のTg免疫染色像（120倍）：
未分化癌細胞はTg陰性である.

NTC: non-tumorous control n=40
FAd: follicular adenoma n=17
PC: papillary carcinoma n=19
FC: follicular carcinoma n=5
UC: undifferentiated carcinoma n=5

図42　腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率

図43　腫瘍性疾患各病変別のチログロブリン陽性細胞比率

NTC: non-tumorous control n=40
FAd: follicular adenoma n=17
PC: papillary carcinoma n=19
FC: follicular carcinoma n=5
UC: undifferentiated carcinoma n=5

図44　腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率

図45　腫瘍性疾患病変部別の甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率

mean+SD
−: none, ±: 0< <25%, +: 25≦ <50%,
++: 50≦ <75%, +++: 75%≦
Statistical analysis was performed by
Spearman rank correlation

図46　腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

mean+SD
−: none, ±: 0< <25%, +: 25≦ <50%,
++: 50≦ <75%, +++: 75%≦
p<0.001
Statistical analysis was performed by
Spearman rank correlation

図47　腫瘍性疾患におけるチログロブリン陽性細胞比率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図48　腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞核 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

図49　腫瘍性疾患における甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞比率と細胞質 c-myc 蛋白陽性細胞率の関係

第5章　総括

c-myc蛋白は細胞核に局在し，遺伝子の転写・複製活性を調節することにより細胞増殖に関与すると考えられており，多くの悪性腫瘍でその発現の亢進が指摘されてきた．しかしながら，1993年 Craig らは，培養細胞を用いた実験ではあるが，細胞分化に伴ってc-myc蛋白が細胞質に偏位して発現することを報告している[56]．我々も甲状腺外科材料の検索の際に，種々の甲状腺疾患組織にc-myc蛋白の陽性像がしばしばみられることを経験してきた．この陽性像は腫瘍性疾患はもとより非腫瘍性疾患の濾胞上皮にもみられており，
また，核ばかりでなく細胞質にもみられ，甲状腺疾患組織におけるc-myc蛋白の発現は細胞増殖だけでは一概に説明できないところが本研究の動機になった．

本研究では，甲状腺疾患組織で発現しているc-myc蛋白が細胞増殖制御以外の機能，具体的には甲状腺濾胞上皮細胞における機能状態と関係を有しているか否かを明らかにすることを最終の目的とした．

始めに，甲状腺疾患はその組織像が，増殖・機能の状態により多様な変化を呈するため，病理組織形態学的に検索し，甲状腺疾患を非腫瘍性疾患と腫瘍性疾患に二分し，それを更に病変の種類により細分してc-myc蛋白の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討した．細胞核c-myc蛋白陽性像は未分化癌症例において高率に認められた．

また，細胞質c-myc蛋白は腫瘍性疾患すべての症例にみられるとともに，非腫瘍性疾患である腺腫様甲状腺腫や中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣に高率に認められた．

加えて，western 法にてc-myc蛋白の発現を乳頭癌症例および中毒性び慢性過形成症例の細胞核・細胞質両分画において認めるとともに，細胞質分画に分子量の異なるc-myc蛋白を検出した．

次に，従来からいわれているc-myc蛋白の発現と細胞増殖の関係が甲状腺疾患でも成立しているか否かを検討した．増殖細胞核抗原Ki-67抗原の発現を増殖の指標として検索したところ，細胞核c-myc蛋白陽性率の高い未分化癌症例において，Ki-67陽性細胞率との相関が見られた．しかし，細胞質に発現しているc-myc蛋白と細胞増殖との関係は認められ

なかった.

続いて，甲状腺疾患において c-myc 蛋白発現が甲状腺ホルモン合成を中心とする甲状腺機能に関与しているかどうかを検討した．甲状腺濾胞上皮の機能の指標としてチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼの発現を免疫組織化学的に検討した．その結果，チログロブリンは未分化癌を除く腫瘍性疾患において高い発現がみられたが，増殖の著しい未分化癌症例は殆どが陰性であった.

c-myc 蛋白発現とチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼ発現の関係をみると，細胞質 c-myc 陽性細胞率がチログロブリンならびに甲状腺ペルオキシダーゼ陽性細胞率と相関し，特に非腫瘍性疾患の腺腫様甲状腺腫ならびに中毒性び慢性過形成症例の過形成病巣において強い相関がみられた.

以上の結果より，甲状腺疾患では，c-myc 蛋白の細胞核での発現は他の癌腫でいわれているように，細胞増殖と関係があることが未分化癌において証明できた．他の組織型で明瞭な関連性はみられなかったのは，他臓器癌と異なって，甲状腺癌は未分化癌を除いて著しく増殖能が低いためと考えられる.

本研究の目的である，増殖以外の要因と c-myc 蛋白との関係について，甲状腺ホルモン合成系との関連性が，非腫瘍性疾患における検討により明らかになった．これは特に，細胞質に発現している c-myc 蛋白において甲状腺ホルモン合成系との関連が明瞭であり，western 法にて細胞質分画に分子量の異なる c-myc 蛋白が発現しているという本研究の新知見とあわせて考えると，細胞質に発現する c-myc 蛋白の機能について，今後の研究の課題を提供し得たと考える.

謝辞

本研究にあたり，終始御指導いただきました基礎医学系 病理学 小形 岳三郎教授に心より深く感謝致します．また，あらゆる面で御指導くださいました基礎医学系 病理学 菅間 博講師，堀口 尚先生ならびに矢澤 卓也助手に深く感謝いたします．

技術面そのほかで御指導御協力いただきました筑波大学付属病院 検査部 病理検査部門 鈴木 悦主任臨床検査技師，筑波大学 研究協力課 森 敏幸技官を始め筑波大学付属病院 検査部 病理検査部門の皆様方に感謝いたします．

最後に論文審査にあたり，御校正ならびに御助言いただきました基礎医学系 免疫学 中内 啓光教授ならびに基礎医学系 神経発生学 岡戸 信男教授，基礎医学系 腫瘍生化学 三輪 正直教授，臨床医学系 代謝内分泌内科学 山下 亀次郎教授，臨床医学系 代謝内分泌外科学 相吉 悠治助教授に深く感謝いたします．

関連した学会発表

本研究の内容は以下の学会で発表した.

1)　第24回甲状腺外科検討会　平成3年9月（仙台）

「甲状腺における c-myc 遺伝子産物の検討」

中村 靖司, 菅間 博, 志和 美重子, 堀口 尚, 藤井 敬二, 小形 岳三郎

2)　第81回日本病理学会総会　平成4年5月（仙台）

「甲状腺組織における c-myc 蛋白発現の検討」

中村 靖司, 菅間 博, 堀口 尚, 藤井 敬二, 小形 岳三郎

3)　第53回日本癌学会総会　平成6年10月（名古屋）

「甲状腺組織における c-myc 蛋白発現の検討」

中村 靖司, 菅間 博, 矢澤 卓也, 山本 達生, 堀口 尚, 小形 岳三郎

引用文献

1) Bishop JM, Sheiness D. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nuclestide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 1979; 31: 514-521

2) Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Berg H, Graf T, Stehelin D. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 1979; 281: 425-455

3) Colby WW, Chen EY, Smith DH, Levinson AD. Identification and nucleotide sequence of a human locus homologaus to the v-myc oncogene of avian myerocytomatosis virus MC29. *Nature* 1983; 301: 722-725

4) Watt R, Stanson LW, Marcu KB, Gallo RC, Croce CM, Rovera G. Nucleotide sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene. *Nature* 1983; 303: 725-728

5) Battey J, Moulding C, Taub R, Murphy W, Stewart T, Potter H, Lenoir G, Leder P. The human c-myc oncogene: structural consequences of translation into the IgH locus in Burkitt lymphorma. *Cell* 1983; 34: 779-787

6) Moberg KH, Tyndall WA, Pyrc J, Hall DJ. Analysis of the c-myc P2 promotor. *J Cell Physiol* 1991; 148: 75-84

7) Mudryj M, Hiebert SW, Nevins JR. A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J* 1990; 9: 2179-2184

8) Persson H, Leder P. Nuclear localization and DNA binding properties of a proteiin expressed by human c-myc oncogene. *Science* 1984; 225: 718-721

9) Hann SR, Abrams HD, Rohrschneider LR, Eisenman RN. Proteins encoded by v-myc oncogenes : Identification and localization in acute leukemia virus transformant and bursal lymphoma cell lines. *Cell* 1983; 34: 789-798

10) Rabbitts PH, Watson JV, Lamond A, Foster A, Stinson MA, Evan G, Fischer W, Atherson E, Sheppard R, Rabbitts TH. Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *EMBO J* 1985; 4: 2009-2015

11) Eisenman RN, Tachibana CY, Abrams HD, Hann SR. V-myc-and c-myc-ebcorded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 114-126

12) Persson H, Gray HE, Godeau F, Braunhut S, Bellve AR. Multiple growth-associated nuclear proteins immunoprecipiated by antisera against human c-myc peptide antigens. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 942-949

13) Bader JP, Hausman FA, Ray DA. Intranuclear degradation of transformation-inducing protein-encord by avain MC29 virus. *J Biol Chem* 1986; 261: 8303-8308

14) Donner P, Bunte L, Greiser-Wilke I, Molling K. Decreased DNA-binding ability of purified transfomation-specific protien from deletion mutants of the acute avian leukemia virus MC29. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2861-2865

15) Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin N, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterogenous helix-loop-helix proteins generated complexes that binding specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989; 58: 537-544

16) Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; 240: 1759-1764

17) Gillespie DA, Eisenman RN. Detection of Myc-associated protein by chemical cross-linking. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 865-868

18) Dang CV, McGuireM, Buckmire M, Lee WMF. Involvement of the 'leucine zipper' region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein. *Nature* 1989; 337: 664-666

19) Blackwood EM, Luscher B, Kretzner L, Eisenman RN. The Myc:Max protein complex and cell growth regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1991; 56: 109-117

20) Kato GJ, Barrett J, VillaGarcia M, Dang CV. An amino-terminal c-myc domain requierd for neoplastic transformation activates transcription. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5914-5920

21) Dang CV, Lee WMF. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4048-4054

22) Dotto GP, Gilman MZ, Marugama M, Weinberg RA. c-myc and c-fos expression in differentiationg mouse primary keratinocyte. *EMBO J* 1986; 5: 2853-2857

23) Nath P, Getzenberg R, Beebe D, Pallansh L, Zelenka P. c-myc mRNA is elevated as differentiating lens cells withdraw from the cell cycle. *Exp Cell Res* 1987; 169: 215-222

24) Lasson LG, Gray HE, Totterman T, Pettersson U, Nilsson K. Drastically increased expression of myc and fos protooncogenes during in vitro differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 223-227

25) Hann SR, Yhompson CB, Eisenman RN. c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cells cycle in human and avian cells. *Nature* 1985; 314: 366-369

26) Endo T, Nadal-Ginard B. Transcriptional and posttranscriptional control of c-myc during myogenesis: its mRNA remains inducible in differentiated cell and dose not suppress the differentiated phenotype. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 1412-1421

27) Sejersen T, Sumegi J, Ringertz NR. Dencity-dependent arrest of DNA replication is accompanied by decreased levels of c-myc mRNA in myogenic but not in differention-defective myoblasts. *J Cell Physiol* 1985; 125: 465-470

28) Iguchi-Ariga SMM, Itani T, Kiji Y, Ariga H. Possible function of the c-myc product: promotion of cellular DNA replication. *EMBO J* 1987; 6: 2365-2371

29) Sudo K, Ogata M, Sato Y, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. Cloned origin of DNA replication in c-myc gene can function and transmitted in transgenic mice in an episomal state. *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 5425-5432

30) Pelham HRB. Speculations on the fuctions of the major heat chock and glucose-regulated protein. *Cell* 1986; 46: 959-961

31) Kingston RE, Baldwin ASJr, Sharp PA. Regulation of heat schock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature* 1984; 312: 280-282

32) Kaddurah-Daouk P, Greene JM, Baldwin ASJr, Kingston RE. Activation and repression of mammalian gene expression by the c-myc protein. *Genes Dev* 1987; 1: 347-357

33) Hateboer G, Timmers HT, Rustgi AK, Billaud M, Van't Veer LJ, Bernards R. Proc Natl Acad Sci USA TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-myc and adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8489-93

34) Goodrich DW, Lee WH. Abrogation by c-myc of G1 phase arrest induced by RB protein but not by p53. *Nature* 1992; 360: 177-179

35) Manolov G, Manolova Y. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphoma. *Nature* 1972; 237: 33-34

36) Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosome abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56

37) Bernheim A, Berger R, and Lenoir G. Cytogenetics studies on african Burkitt's lymphoma cell lines: t(8; 14) t(2; 8) and t(8; 22) translocations. *Cancer Cytogenet* 1981; 3: 307-315

38) Hayday AC, Gillies SD, Saito H, Wood C, Wiman K, Haywards WS, Tonegawa S. Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy chain locus. *Nature* 1984; 307: 334-340

39) Ninomiya I, Yonemura Y, Matsumoto H, Sugiyama K, Kamata T, Miwa K, Miyazaki I, Shiku H. Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. *Oncology* 1991; 48: 149-153

40) Kotake T, Saiki S, Kinouchi T, Shiku H, Nakayama E. Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 1198-1201

41) Sundaresan V, Forgacs IC, Wight DGD, Wilson B, Evan GI, Watson JV. Abnormal distribution of c-myc oncogene product in familial adenomatous polyposis. *J Clin Pathol* 1987; 40: 1274-1281

42) Diebold J, Arnholdt H, Lai MD, Löhors U. c-myc expression in early human placenta-a critical evaluation of its localization. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991; 61: 65-73

43) Yamashita S, Ong J, Fagin JA, Melmed S. Expression of the myc cellular proto-oncogene in human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 1170-1173

44) Terrier P, Sheng Z, Schlumberger M, Tubiana M, Calliou B, Travagli JP, Fragu P, Paramentier C, Riou G. Structure and expression of c-myc and c-fos protooncogenes in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1988; 57: 43-47

45) Anasland R, Lillehaug JR, Jøsendal O. Varhaug JE, Kleppe K. Expression of oncogenes in thyroid tumors: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *Br J Cancer* 1988; 57: 358-363

46) Knyazev PG, Fedorov SN, Serova OM, Pluzhnikova GF, Novikov LB, Kalinovsky VP, Seitz JF. Molecular-genetic analysis of myc and c-Ha-ras proto-oncogene alternations in human carcinoma. *Hamatol Bluttransfus* 1987; 31: 469-473

47) Del Senno L, Gambari R, Degli Uberti E, Barbieri R, Bernardi F, Buzzoni D, Marchetti G, Pansini G, Perrotta C, Conconi F. c-myc alternations in human thyroid carcinomas. *Cancer Detect Prev* 1987; 10: 159-166

48) Burman KD, Djuh YY, LaRocca RV, Nunes ME, D'Avis JC, Nicholson DE, Wartofsky L. c-myc expression in the thyroid I: normal, adenomatous, and cancerous thyroid tissue. *Horm Metab Res* 1987; 17: 63-65

49) Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, Yanaihara N. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology* 1991; 18: 11-18

50) Roncalli M, Springall DR, Varndell IM, Gaitonde VV, Hamid Q, Ibrahim NBN, Grimelius L, Wilander E, Polak JM, Coggi G. Oncoprotein immunoreactivity in human endocrine tumors. *J Pathol* 1991; 163: 117-127

51) Yoshida A, Kamma H, Asaga T, Masuzawa C, Kawahara S, Mimura T, Ito K. Proliferative activity in thyroid tumors. *Cancer* 1992; 69: 2548-2552

52) Kusunoki T, Nakano T, Funasaka K, Murata K, Nishida S, Tomura T, Hashimoto S, Ohta F. Proliferating nuclear antigen (PCNA) of human diseased thyroid cells. *J Otolaryngol Jpn* 1993; 96: 651-658

53) Ambesi-Impiombato FS, Parks LA, Coon HG. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 3455-3459

54) Mauchamp J, Charrier B, Takasu N, Margotat A, Chambard M, Dumas D. Modulation by thyrotropin, prostaglandin E2 and Catecholamines of sensivity to acute stimulation in cultured thyroid cells. In: Doumont J eds. Hormons and Cell Reguration vol 3. Ireland: E

55) Dremier S Taton M, Coulonval K, Nakamura T, Matsumoto K, Dumont JE. Mitogenic, dedifferentiating, and scattering effects of hepatocyte growth factor on dog thyroid cells. *Endocrinology* 1994; 135: 135-140

56) Craig RW, Buchan HL, Civin CI, Kastan MB. Altered cytoplasmic/nuclear distribution of the c-myc protein in differentiating ML-1 human myeloid leukemia cells. *Cell Growth and Differentiation* 1993; 4: 349-357

57) 張ヶ谷健一. 癌細胞の浸潤・転移と接着因子. *病理と臨床* 1994; 12: 768-770

58) 河野隆志, 横田淳. 癌の悪性化, 転移に関わる癌抑制遺伝子. *実験医学* 1992; 10: 231-235

59) Gall JG, Paudue M. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378-383

60) John HA, Birnstiel ML, Johes LW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 223: 582-587

61) 大海忍, 辻村邦夫, 稲垣昌樹編. 抗ペプチド抗体実験プロトコール. ペプチド合成からタンパク質機能解析まで. 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 秀潤社, 東京

62) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580

63) Shi ZR, Itzkowitz SH, Kim YS. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 317-322

64) Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 3610-3616

65) 甲状腺癌取扱い規約. 第4版. 甲状腺外科検討会編 金原出版, 東京 1991

66) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

67) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacryl amide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354

68) King MW. Developmentally regulated alternative splicing in the Xenopus laevis c-Myc gene creates an intron-1 containig c-Myc RNA present only in post-midblastula embryos. *Nucl Acids Res* 1991; 19: 5777-5783

69) Principaud E, Spohr G. Xenopus laevis c-myc I and II genes: molecular structure and developmental expression. *Nucl Acids Res* 1991; 19: 3081-3088

70) Johoson HA, Haymaker WE, Rubini JR, Fliedner TM, Bond VP, Cronkite EP, Hughes WL. A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the in vivo uptake of tritiated thymidine. *Cancer* 1960; 13: 636-642

71) Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: 474-475

72) Shibuya M, Hoshino T, Ito S, Wacker MR, Prados MD, Davis RL, Wilson CB. Meningiomas: Clinical implications of a high proliferative potential determined by bromodeoxyuridine labelling. *Neurosurgery* 1992; 30: 494-498

73) Hoshino T, Ito S, Asai A, Shibuya M, Prados MD, Dodson BA, Davis RL. Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int J Cancer* 1992; 50: 1-5

74) Goz B. The effect of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Phamacol Rev* 1978; 29: 249-272

75) Masaki S, Shiku H, Kaneda T, Koiwai O, Yoshida S. Production and charactorization of monoclonal antibody against 10S DNA polymerase α form calf thymus. *Nucl Acid Res* 1982; 10: 4703-4713

76) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20

77) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715

78) Robbins BA, De La Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RN. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-845

79) Moriuchi T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). A nuclear protein engaged in eukaryotic DNA replication for one billion years. *MedSci Res* 1990; 18: 911-915

80) Galand P, Degraef C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for making S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet* 1989; 22: 383-392

81) 堤寛, 守内哲也. 増殖細胞のマーカー: 免疫組織化学的見地から. *病理と臨床* 1988; 6: 1229-1236

82) Gerdes J, Li L, Schilneter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic chalacterization of the cell proliferetion associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873

83) Dieredonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, Velde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related

staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labelling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-1172

84) Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748

85) Freedman AS, Nadler LM. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 1991; 5: 871-889

86) Bilous AM, McKay M, Milliken J. A comparison between Ki-67 antibody reactivity and other pathological variables in breast carcinoma. *Pathology* 1991; 23: 282-285

87) Trere D, Farabegoli F, Cancerllieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. *J Pathol* 1991; 165: 53-59

88) Wallin G, Backdahl M, Christensson B, Grimerius L, Auer G. Nuclear protein content and Ki-67 immunoreactivity in non-neoplastic and neoplastic thyroid cells. *Anal Quant Cytol Histol* 1992; 14: 296-303

89) Henry MJ, Stanley MW, Swesson B, Connolly JE, Bates H. Cytologic assessment of tumor cell kinetics: applications of monoclonal antibody Ki-67 to fine-needle aspiration smears. *Diagn Cytopathol* 1991; 7: 591-596

90) Rigaud C, Bogomoletz WV. Apparent lack of usefullness of monoclonal antidody Ki-67 in thyroid tumour pathology. Relation of histological typing and classification. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 198-200

91) Derwahl M, Huber G, Studer H. Slow growth but intense hypertrophy of thyrocytes in long-standing Grave's goitres. *Acta Endocrinol Copenh* 1989; 121: 389-94

92) Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encording for Ki-67 epitope. *Laboratory Investigation* 1993; 68: 629-636

93) Rolland M, Montfort MF, Valenta L, Lissitzky S. Iodoamino acid composition of the thyroglobulin of normal and diseased thyroid glands. Comparison with in vitro iodinated thyroglobulin. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 95-108

94) Tarutani O, Ui N. Properties of thyroglobulins from normal thyroid and thyroid tumor on a concanavalin A-sepharose column. *J Biochem (Tokyo)*1985; 98: 851-857

95) Malthiery Y, Marriq C, Berge-Lafranc JL, Franc JL, Henry M, Lejeune PJ, Ruf J, Lissitzky S. Thyroglobulin structure and function: recent advances. *Biochemie* 1989; 71: 195-210

96) Micco C, Ruf J, Carayon P, Chrestian MA, Henry JF, Toga M. Immunohistochemical

study of thyroglobulin in thyroid carcinomas with monoclonal antibodies. *Cancer* 1987; 59: 471-476

97) Albores-Saaverdra JA, Nauji M, Civantos F, Morales AR. Thyroglobulin in carcinoma of the thyroid. An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1983; 14: 62-66

98) Boecker W, Dralle H, Husselmann H, Bay V, Brasson M. Immunohistochemical analysis of thyroglobulin synthesis in thyroid carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1980; 385: 187-200

99) Kawaoi A, Okano T, Nemoto N, Shiina Y, Shikata T. Simulataeous detection of thyroglobulin (Tg), thyroxine (T4), and triiodothyronine (T3) in nontoxic thyroid tumors by immunoperoxidase method. *Am J Pathol* 1982; 108: 39-49

100) Permanetter W, Nathrath WB, Lohrs U. Immunohistochemical analysis of thyroglobulin and keratin in benign and malignant thyroid tumors. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1982; 398: 221-228

101) Yokoyama N, Taurog A. Porcine thyroid peroxidase: relationship between the negative enzyme and an active, highly purified tryptic fragment. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 838-844

102) Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985; 190: 147-152

103) Kohno Y, Hiyama Y, Shimojo N, Niimi H, Nakajima H, Hosoya T. Autoantibodies to thyroid peroxidase in patients with chronic thyroiditis: effect of autoantibody binding on enzyme activities. *Clin Exp Immunol* 1986; 65: 534-541

104) Kotani T, Umeki K, Matsunaga S, Kato E, Ohtaki S. Detection of autoantibodies to thyroid peroxidase in autoimmune thyroid diseases by micro-ELISA and immunoblotting. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 928-933

105) Portmann L, Hamada N, Heinrich G, DeGroot LJ. Anti-thyroid peroxidase antibody in patents with autoimmune thyroid disease: possible identify with anti-microsomal antibody. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 61: 1001-1003

106) 樽谷修, 阿部展祐輝, 石田常博, 泉雄勝, 高橋礼子, 佐藤公幸, 河野陽一, 桧山義雄, 吉村弘一, 細谷東一郎. *日本内分泌学会雑誌* 1988; 64: 390-401

107) 細谷東一郎. 甲状腺ホルモンと関連蛋白質. 基礎と臨床. 朝倉書店, 東京 1991

108) Micco CD, Ruf JR, Chrestian MA, Gros N, Henry JH, Carayon P. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic and neoplastic human thyroid tissues. *Cancer* 1991; 67: 3036-3041

109) Yamashita H, Noguchi S, Maurakami N, Adachi M, Maruta J. Immunohistochemical differentiation of benign thyroid follicular cell tumor from malignant ones: Usefulness of anti-peroxidase and JT-95 antibodies. *Acta Pathol Jpn* 1993; 43: 670-673

110) Ruf J, Toubert ME, Czarncka B, Gorde JMD, Ferrand M, Carayon P. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. *Endocrinology* 1989; 125: 1211-1218

111) Male DK, Champion BR, Pryce G, Matthew SH Shepherd P. Antigenic determinants of human thyroglobulin differentiated using antigen fragments. *Immunology* 1985; 54: 419-427

112) 阿部展祐輝, 石川常博, 佐野浩司, 泉雄勝, 樽谷修. 甲状腺腫瘍患者の血中チログロブリン値. *日本内分泌学会誌* 1986; 62: 9-17

113) Schneider AB, Ikekubo K, Kuma K. Iodine content of serum thyroglobulin in normal individuals and patient with thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1251-1256

114) Monaco F, Dominici R, Thyroglobulin, The parathyroid hormon, Eggo MC, Burrow GN eds. Ravem Press, NY, USA 1985; p115-126

115) Monaco F, Napolitano G, Lio S, Roche J. Existe-t-il une double voie de secretion de la thyroglobuline: un "circuit court" faiblement glycosylo-iode et un "circuit long" fortement glycosylo-iode?. *C R Seances Soc Biol* 1989; 183: 108-116

116) 岡田節人. 細胞分化のいくつかの系. 現代生物学体系11b 発生・分化B 江上信夫, 岡田節人, 安増郁夫編 中山書店, 東京 1980; 99-103

117) 穂積本男. 細胞分化と増殖. *病理と臨床* 1991; 9: 34

筑波大学附属図書館
1 00950 16109 4

[redacted]

業務用

本学関係