

論文の内容の要旨

免疫組織化学および In situ hybridization 法の 病理組織学への応用に関する研究

林 幸子

近年、免疫学や遺伝子工学が急速に進歩し、病理組織診断にもそれらの技法が取り入れられるようになった。著者は病理標本を通し、これらの方法を日常応用可能な方法として開発し、患者病態の解明のために役立てるべく研究を行ってきた。以下、著者の取り組んできた種々の手法と得られた知見につき3章に分けて述べる。

第一章 正常肺および女性生殖器におけるアミラーゼの証明 — 組織化学、免疫組織化学および免疫電子顕微鏡による検出 —

肺癌や卵巣癌の中にアミラーゼを産生する症例が知られており、癌細胞の”異所産生”であると考えられていた。一方、肺や女性生殖器にもアミラーゼが存在するという生化学的所見が報告されたが、アミラーゼ産生細胞の同定はなされていなかった。そこで、正常肺と女性生殖器について免疫組織化学、酵素組織化学および免疫電子顕微鏡法の3法を用い、アミラーゼの局在を検索した。PLP 固定凍結標本に対する免疫染色と組織化学は、アミラーゼの局在、染色強度とも同様の結果を示した (Table 1)。肺では上皮細胞と気管支腺漿液細胞に陽性像が認められた。卵管では上皮細胞および上皮細胞内に存在する ciliary vesicle に、子宮体部と頸部では上皮細胞と腺細胞に陽性所見が得られた。免疫電子顕微鏡法では、アミラーゼ陽性細胞の蛋白産生にかかわる小器官に陽性反応が認められた。これらの所見は肺癌や卵巣癌が産生するアミラーゼは異所産生ではなく eutopic であることを支持するものであった。また肺の炎症性疾患において生じる肺組織中のアミラーゼ上昇も局所のアミラーゼ産生亢進に基

づくと考えられる。

この研究は肺および子宮の組織にはじめてアミラーゼの局在を示したものであり、さらにその産生は炎症や腫瘍における高アミラーゼ血症の病態を理解する基礎的な知見であると考えられる。

第二章 増殖細胞抗原の同定

第1部 ホルマリン固定パラフィン標本での bromodeoxyuridine 染色の検討

第2部 核内増殖細胞抗原と bromodeoxyuridine との比較検討および、Ki-67 染色の肺腫瘍への応用

腫瘍細胞の増殖能の分析は、腫瘍の悪性度、患者の予後の判定などに有用であるといわれている。古くはラジオアイソトープを標識した thymidine を細胞に取り込ませる方法を用いていたが、近年、増殖細胞抗原に対するモノクローナル抗体が種々開発され、病理標本に応用されるようになった。第1部では thymidine のアナログである bromodeoxyuridine (BrdU) に対する抗体を用いたホルマリン固定パラフィン標本での染色法の確立を行った。従来 BrdU はホルマリン固定標本での染色は困難であるとされていたが、pronase、pepsin、trypsin 等の酵素で前処理することによりアルコール固定標本と同様の染色結果を得る事に成功した。

第2部では、BrdU に変わりうる増殖細胞抗原の選択をはかった。すなわち、あらかじめ増殖細胞に異種物質を取り込ませる必要のない細胞内在性の核内増殖細胞抗原である Ki-67、DNA polymerase α 、PCNA に対する抗体による免疫染色の検討を行った。その上で、それぞれの positive ratio (PR) と BrdU labeling index (LI) の比較を行った。その結果、BrdU LI と他の抗原の PR は、いずれも良好な相関関係を示し、特に、BrdU LI と Ki-67 PR の相関係数は $r=0.98$ 、回帰直線は $y=1.26x+2.5$ ($y=Ki-67 PR$ 、 $x=BrdU LI$) と最も良好であった (Fig. 1)。そこで、Ki-67 を肺腫瘍に免疫染色し、その有用性を検討した。肺腫瘍では組織型により Ki-67 PR が異なり、腺癌での平均値は 15%、扁平上皮癌では 30% と両者の Ki-67 PR に有意差が認められた。腺癌と扁平上皮癌について、それぞれの平均 Ki-67 PR より低いグループと高いグループに分け、生存曲線の検討を行った。その結果、Ki-67 PR の低いグループの方が有意に生存率が良好であった。

第3章 Pneumocystis carinii の In situ hybridization 法による検出

Pneumocystis carinii (Pc) は免疫能低下患者に多く認められる病原体で、病理組織診断において、特異的染色法の確立が期待されていた。ribosomal RNA (rRNA) は病原体に多量に存在し、種特異性が高いことが知られているが、これを *in situ hybridization* に応用した報告はいまだなかった。そこで、rRNA を標的とし、ビオチン標識した合成 oligonucleotide を用いてホルマリン固定パラフィン切片上での *in situ hybridization* による Pc の同定を試みた。その結果、Pc が陽性であることが既に判明していた肺 (解剖例、12例) はすべて陽性、陰性であることが判明していた肺 (解剖例、20例) はすべて陰性という結果を得た (Table 2)。その他の病原体であるウイルス (サイトメガロ、ヘルペス)、マイコバクテリウム (*M. tuberculosis*、*M. kansasii*)、原虫 (赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム、トキソプラズマ)、真菌 (カンジダ、ムコール、クリプトコッカス、アスペルギルス) にはすべて陰性であった。Pc に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行ったところ *in situ hybridization* 法の結果と一致した。

本法による Pc の同定は長期間固定した解剖例のホルマリン固定標本においても充分検出可能であった。また、Pc の塩基配列と類似した rRNA をもつ真菌や赤痢アメーバにも反応しないこと、モノクローナル抗体による免疫染色と同様の結果を示したことなど、特異性の高い方法であった。rRNA を検出する方法は、他の病原体にも応用可能な方法であると考えられ、広く普及することが期待される。

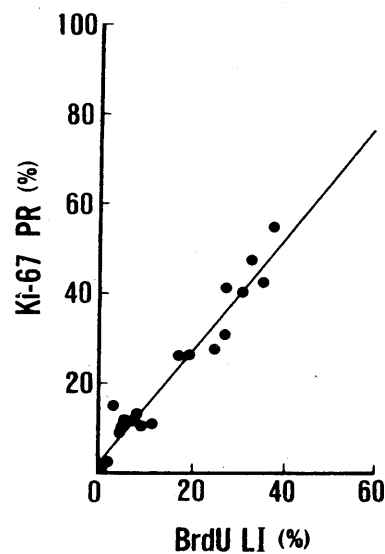


Fig.1 Correlation between BrdU LI and Ki-67 PR
 Regression line: $y=1.26x + 2.5$
 Correlation coefficient: $r=0.97$

Table 1. Reactivity for amylase observed using histochemical and immunohistochemical procedures

Organ	Histological site	Staining procedure		
		Histochemistry	Immunohistochemistry	
			PLP / cryostat ^a	formalin / paraffin ^b
Lung				
Bronchus	Ciliated epithelial cells	+	+	-
	Serous glandular cells	+ ~ ++	+ ~ ++	- ~ +
Alveoli	Alveolar cells	-	-	-
Fallopian tube				
	Surface epithelial cells	±	+	-
	Ciliary vesicles	++	++	++
Uterus				
Endometrium	Surface epithelial cells	±	+	-
	Glandular cells	±	± ~ +	-
Cervix	Surface epithelial cells	± ~ +	+	-
	Glandular cells	++	++	- ~ ±
Ovary		-	-	-

The intensity of the staining was graded as follows: ++, strong; +, moderate; ±, weak; -, none.

^a Cryostat sections of periodate/lysine/paraformaldehyde-fixed tissue section.

^b Formalin-fixed, paraffin-embedded sections.

Table 2. Reactivity of *in situ* hybridization and monoclonal antibody with lung tissues.

Method	Pc ^a positive lung			Pc ^a negative lung		
	Reactivity		Total	Reactivity		Total
	+	-		+	-	
ISH ^b	12	0	12	0	20	20
IHC ^c	12	0	12	0	20	20

^a Presence of Pc was decided on the formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections stained with hematoxylin and eosin or Grocott's methenamine silver nitrate staining.

^b *In situ* hybridization of ribosomal RNA.

^c Immunohistochemistry with a monoclonal antibody.