

モノクローナル抗体 Ki-67 を使用した 前立腺吸引組織スミアにおける増殖細胞に関する研究

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 三宅弘治教授)

佐井 紹徳, 高士 宗久, 三宅 弘治

愛知県がんセンター臨床病理検査部 (主任 : 有吉 寛部長)

越 川 卓

STUDY OF GROWTH FRACTION ON FINE NEEDLE ASPIRATED PROSTATIC TISSUE SMEAR USING MONOCLONAL ANTIBODY Ki-67

Shotoku Sai, Munchisa Takashi and Koji Miyake

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

Takashi Koshikawa

From the Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital

Immunohistochemical staining using monoclonal antibody Ki-67 was performed in 30 patients with benign prostatic hypertrophy (BPH), one with prostatic tuberculosis (TB), 22 with prostatic adenocarcinoma, one with prostatic transitional cell carcinoma and one with prostatic invasion from a bladder cancer. Specimens were aspirated from the prostate transrectally and a cytological smear were made. This antibody is specific for a proliferation-associated nuclear antigen. Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase stained immunopositive nuclei red making positive or negative specimens easy to recognize. In BPH and TB smears, no immunopositive cell was reactive with Ki-67. In prostatic malignancy were found many immunopositive cells ranging from 2.5 to 10.2% (mean 5.9%) in prostatic adenocarcinoma (n=22), and from 11.9 to 24.3% (mean 18.1%) in prostatic transitional cell carcinoma. Transitional cell carcinoma may have a much greater growth fraction than adenocarcinoma in prostatic tissue. Poorly differentiated adenocarcinoma showed a higher growth fraction (from 4.2 to 10.2%, mean 6.9%) than well differentiated (from 3.1 to 8.9%, mean 5.8%) and moderately differentiated adenocarcinoma (from 2.5 to 10.1%, mean 5.6%), but this difference was not significant. There was no correlation with age, clinical stage, bone metastasis or Böcking's cytological grade.

In conclusion, immunohistochemical staining using Ki-67 on aspirated prostatic smear visualizes the growth fraction of prostatic disease well and is useful to diagnose prostate cancer.

(Acta Urol. Jpn. 37: 881-886, 1991)

Key words: Prostate cancer, Fine needle aspiration cytology, Ki-67

緒 言

悪性腫瘍を治療する上で、個々の腫瘍の病理組織学的所見に加えて、その増殖能という生物学的特性を理解することが重要と考えられる。1983年に Gerdes らが作製した Ki-67 は、増殖能を検出するモノクローナル抗体として近年注目されている。これは Hodgkin 病由来の cell line L 428 中の特異的抗原を認

識し、増殖期細胞 (proliferating cells) の核抗原と反応するが、いわゆる休止期細胞 (resting cells) とは反応しないとされている¹⁾。また Ki-67 が認識する核抗原は、early G1, S, G2 およびM期の細胞核にのみ存在し、G0 期には存在しないことが明らかにされている²⁾。

前立腺癌は泌尿器科領域で頻度の高い悪性腫瘍でありながら、早期発見が比較的困難で、進行癌として発

見されることが多い疾患である。その診断には前立腺触診と針生検が最も有効な手段であるが、前立腺針生検はスクリーニング検査として外来レベルで行うには、侵襲・合併症の点で不都合であると考えられる。一方、経直腸的前立腺吸引細胞診法は前立腺針生検よりも細い針を使用し、細胞を吸引液とともに採取する方法であり、侵襲が少なくスクリーニングに適した方法である。しかし、核が小型で配列が比較的整っている前立腺癌の細胞診所見や精嚢細胞を同時に吸引したケースのそれでは診断が困難となることも少なくない。著者らは、Ki-67が増殖細胞に反応するという特性に着目し、前立腺吸引細胞診材料について、Ki-67を使用した免疫組織化学染色を行い、前立腺癌増殖期細胞の同定と labeling index の算定による前立腺疾患増殖能の判定、前立腺癌診断に対する有用性について検討した。

材 料

1987年11月より1990年5月までに当科を受診した患者のうち、前立腺肥大症30例、肉芽腫性前立腺炎(結核)1例、前立腺癌22例、前立腺部移行上皮癌1例および膀胱移行上皮癌の前立腺浸潤1例より採取した検体を材料とした。吸引細胞診法は各症例に対し1回行い、全視野における総細胞数が1,000に満たないものは原則として除外した。なお前立腺癌は全例未治療症例である。

方 法

1. Ki-67 染色

経直腸的前立腺吸引細胞診法により、前立腺から吸引液を採取し、スライドガラス上に塗布し、冷風乾燥固定後、抗原性保持の目的でアセトン固定を10分間行なった。免疫組織化学染色は、APAAP法(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase法: DAKO APAAP KIT sistem 40を使用)で行い、一次抗体はKi-67(DAKO-PC: Dako社)を1%BSAにて10倍希釈して使用し、その反応時間は30分間とした。二次抗体は抗マウスウサギ血清で30分間反応させ、APAAP reagentは30分間反応させた。各抗体反応は室温にて湿室中で行い、また各操作間では0.05 M Tris 緩衝液(pH 7.6)にて十分に洗浄を行った。発色はalkaline phosphatase substrateで20分間行なった。マイヤー-ヘマトキシリンにて核染色後、グリセリンゼラチンで封入し鏡検した。Ki-67陽性細胞は核のみが赤色に染色され、その染色態度は様々であったが、陽性と陰性の判定は容易であった。

2. Ki-67 labeling index

陽性細胞が均一に存在する細胞集塊を原則として10カ所以上選び、総細胞数として1,000以上カウントし、その中に占める陽性細胞の百分率をKi-67 labeling index (%) (以下Ki-67 indexと略す)として算定した。なお誤差を少なくするために検体を2枚用意し異なった時期に染色し、両者の平均値をKi-67 indexとした。前立腺癌においては別に針生検による組織検査を行い、組織像および腫瘍分化度³⁾を確認し組織別、分化度別にKi-67 labeling indexを比較した。また、年齢別、臨床病期別、骨転移の有無別およびBöckingの細胞学的異型度⁴⁾に、Ki-67 indexの検討を行った。

結 果

1. 各疾患における染色所見

a. 前立腺良性疾患

前立腺肥大症の30例で、Ki-67に反応する細胞はみられなかった(Fig. 1A)。また、肉芽腫性前立腺炎(結核)の1例については、類上皮細胞の混在により細胞異型を伴う細胞診像を認めたが、Ki-67陽性細胞はみられなかった。

b. 前立腺癌

一部の癌細胞に核が赤く染色されるKi-67陽性細胞をみた(Fig. 1B~D)。各症例において、細胞形態、細胞配列に差異を認めたが、陽性細胞の形態は同様であり、核内に顆粒状に色素に認めた、腺癌については分化度別に比較したが、染色態度にいずれも差を認めなかった。移行上皮癌では細胞配列において腺癌と差異を認めるが、Ki-67陽性細胞の染色態度は同様であった。

2. Ki-67 labeling index

Tableに各疾患におけるKi-67 indexを示す。

a. 前立腺良性疾患

前立腺肥大症、前立腺結核の両者においてKi-67 indexは0%であった。

b. 前立腺悪性疾患

前立腺癌でのKi-67 indexは、2.5~10.2% (平均5.9%)であり、移行上皮癌の2例では、それぞれ11.9%、24.3%といずれも高値を示した。

3. 前立腺癌症例における他因子の検討

a. 年齢 (Fig. 2A)

50歳代から80歳代の各年齢層において比較した。Ki-67 indexは各年齢層においてほぼ同等の値を示している。

b. 分化度(腺癌) (Fig. 2B)

高分化型腺癌では3.1~8.9% (平均5.8%)、中分化

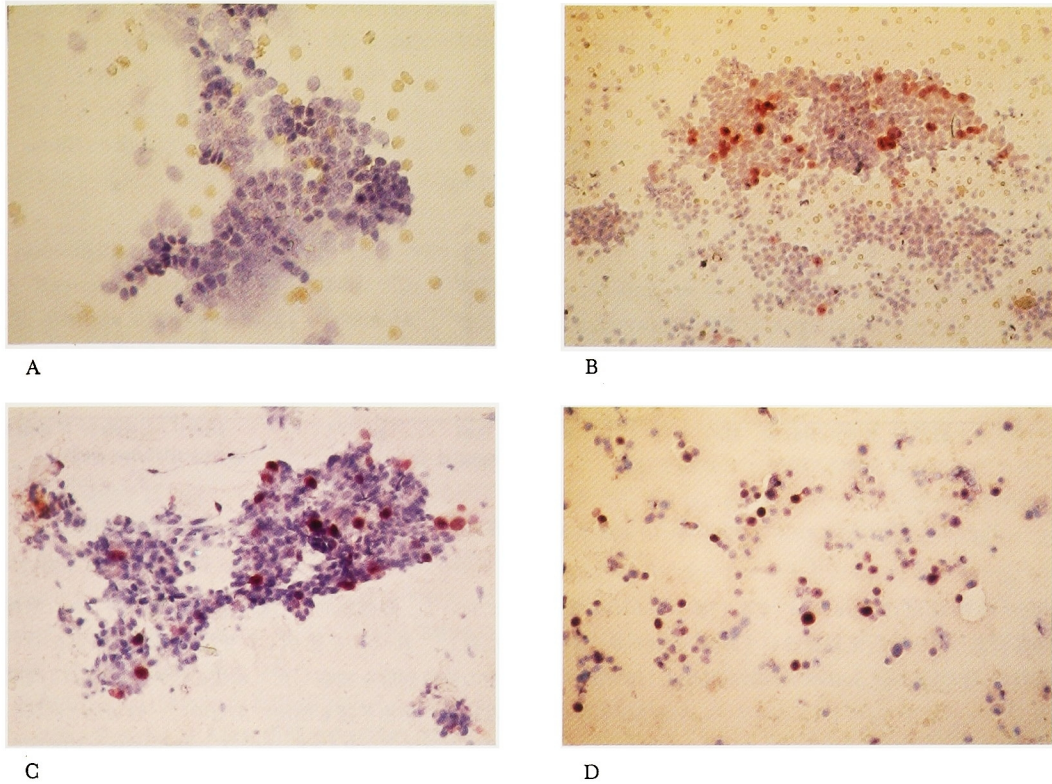


Fig. 1. No immunopositive nuclei are seen in benign prostatic hypertrophy (A, $\times 200$). Many immunopositive nuclei are seen in both well differentiated adenocarcinoma (B, $\times 100$) and poorly differentiated adenocarcinoma (C, $\times 100$). Large immunopositive nuclei are seen in transitional cell carcinoma (D, $\times 100$).

Table. Ki-67 labeling index in each prostatic disease

		Ki-67 labeling index (%)
prostate cancer		2.5-10.2 (mean 5.9)*
wel (n = 5)		3.1- 8.9 (mean 5.8)
mod (n = 13)		2.5-10.1 (mean 5.6)
por (n = 4)		4.2-10.2 (mean 6.9)
TCC (n = 2)		11.9-24.3 (mean 18.1)
BPH	(n = 30)	0
TB	(n = 1)	0

*except prostatic TCC

型腺癌では2.5~10.1% (平均5.6%), 低分化型腺癌で4.2~10.2% (平均6.9%)であった。高分化型および中分化型腺癌での平均値は、ほぼ同等であり、低分化型腺癌において平均6.9%と若干高値を示している。しかし統計学的には有意差は認められなかった。

c. 臨床病期と骨転移

Stage B が4例, Cが4例, Dが12例であった。3

群間の Ki-67 index に明らかな相違を認めなかった。また、骨転移のない群の平均値が6.7%, 骨転移のある群が5.1%であり、統計学的に有意差を認めなかった。

d. Böcking の細胞学的異型度 (Fig. 2C)

腺癌においては grade 3 がみられないため、grade 1 と grade 2 で比較したが、Ki-67 labeling

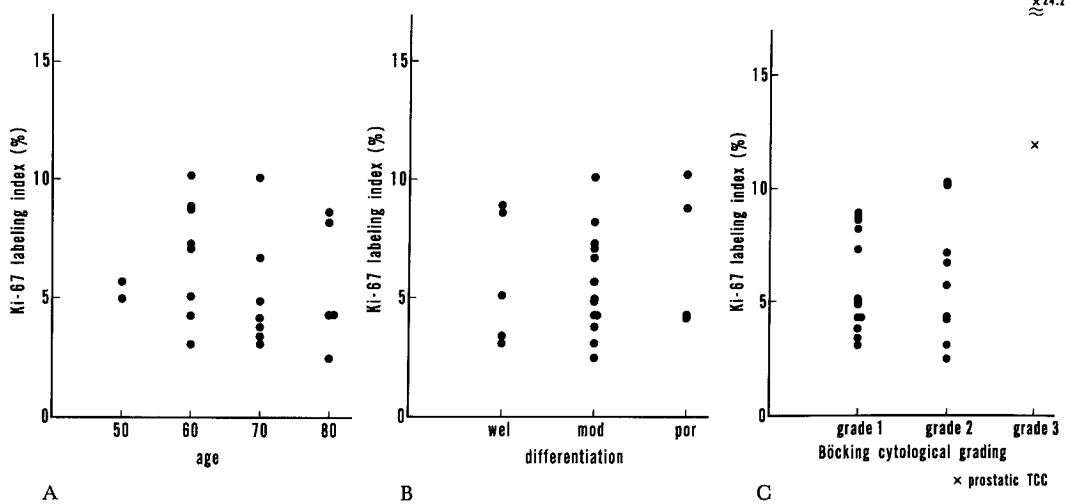


Fig. 2. There is no correlation to age (A), differentiation (B) or Böcking's cytological grade (C).

index の平均値は grade 1 で 5.1%, grade 2 で 6.0%であった。移行上皮癌はいずれも grade 3 と判断され、その Ki-67 index の平均値は 18.1%であった。

考 察

前立腺癌はその解剖学的あるいは生物学的特性のために症状が現われにくく、早期癌のうちに発見できないことが少なくない。一般に早期発見のためには直腸内触診、腫瘍マーカーの測定、超音波断層撮影法などが行われ、異常所見を認めたものに前立腺針生検が行われる。著者らも前記の手順にて前立腺癌の診断を行っていたが、針生検は合併症が比較的多くみられ、外来レベルで多数の患者に行うには不都合であると考え、最近では経直腸の前立腺吸引細胞診法を主に行っている。本法の利点として侵襲が少なく短時間に行えることや検査後の合併症が少ないことがあげられる。逆に欠点としては、癌細胞が吸引されても細胞異型性が低いために確実な癌診断が行えない症例があること、精囊細胞の同時吸引などによる contamination のために疑陽性がみられることなどがあげられる。

1983年に Gerdes らが報告したモノクローナル抗体 Ki-67 は、増殖細胞に反応し、休止期細胞には反応しないという特性を有している。すなわち、正常組織では、精細胞や子宮腔粘膜などの増殖活性の高い一部の細胞にのみ反応がみられ、他の細胞には反応しない。また悪性腫瘍においては、early G1, S, G2 および M 期に相当する細胞によく反応し、休止期細胞には反応しない^{1,2)}。そこで今回著者らは、前立腺疾患

において、経直腸の吸引細胞診法により得られた検体に対し、Ki-67 を使用した免疫組織化学染色を行い、その染色形態を観察した。本法の所用時間は約 3 時間と短く、染色手技も簡便であるので一般染色と同時に進められる。APAAP 法により発色させた増殖細胞は赤色を呈するので、陽性と陰性の判定は容易である。Ki-67 に反応する抗原が何であるかはいまだ明らかでないが、これは核内に存在し、強拡大で観察すると顆粒状の色素沈着として認められる。前立腺癌では、Ki-67 index は、2.5~10.2% (平均 5.9%) であり、前立腺良性疾患では 0% であった。今回の検討により前立腺癌と前立腺良性疾患との間に明らかに増殖活性の差異がみられた。したがって Ki-67 index の算定を行うことにより、前立腺癌をより確実に診断できる可能性が示唆された。前立腺肥大症においても 0.5~6.0%³⁾、0.2~0.4%⁴⁾ の Ki-67 index が得られるとの報告もあるが、このようなケースでは Ki-67 index が比較的低値を示すタイプの前立腺癌との鑑別が困難となるかもしれない。しかしこのようなケースは少数であると考えられ、多くの症例でみれば、経直腸の前立腺吸引細胞診材料に本染色法を行うことで、より診断能が向上するものと考えられた。今回研究対象とした症例のうち、前立腺癌は全例一般染色で陽性と判断され、免疫組織化学染色でも全例に陽性細胞を認めた。良性疾患では結核の 1 例と前立腺肥大症の 2 例において疑陽性と判断され、これらの症例では Ki-67 陽性細胞は認められず、癌除外診断の一助となった。

一方、抗プロモデオキシウリジン抗体を使用した免

疫組織化学染色では, S期細胞が選択的に同定でき⁷⁻¹⁰⁾, その labeling index は1.02~6.29% (平均2.9%) と報告されているが¹¹⁾, この方法はプロモデキソウリジン標識をあらかじめ行わなければならない, ヒトに用いる場合は安全性の面で問題が残されており, また外来レベルでの検査としては必ずしも適当ではない。

凍結組織切片を用いた前立腺癌の Ki-67 index では, Raymond らは, 6~53% (平均16.3%) と報告し⁵⁾, Gallee らは, 0.4~9.1% (平均2.9%) と報告している⁶⁾。著者らの吸引細胞診材料を用いた方法では, 2.5~10.2% (平均5.9%) であった。Raymond らの報告で Ki-67 index がかなり高値となっているが, Gallee らは, これはカウントした細胞数が少ないことや染色手技に違いがあるためだろうと述べてい。また根本ら¹¹⁾, Meyer¹²⁾, の報告したS期細胞の labeling index も平均2.9%, 0.9%と比較的低値であることからみても, 著者らの Ki-67 index と Gallee らのそれを合わせた0.4~10.2%が前立腺癌の Ki-67 index の範囲と考えられる。

細胞増殖能に影響をおよぼす可能性のある因子として, 年齢・腫瘍分化度・臨床病期・骨転移の有無および Böcking の細胞学的異型度別に, Ki-67 index を検討した。年齢別では, 各年齢層で Ki-67 index に差異はみられなかった。腺癌においては, 分化度別に増殖能を検討したが, 平均値で低分化型腺癌においてやや高値を示した。しかしこれは症例数が少ないので統計学的に有意差はみられなかった。また, 膀胱移行上皮癌の前立腺浸潤症例および前立腺部移行上皮癌症例より得られた Ki-67 index は, それぞれ11.8%, 24.3%といずれも高値を示しており, 組織像により Ki-67 index に差異があると考えられた。

Raymond らは⁵⁾, 凍結組織切片による Ki-67 score と Gleason score¹³⁾ がよく相関したと報告しているが, 著者らは吸引細胞診材料を使用した関係で, 細胞診用の grade である Böcking の細胞学的異型度を指標とした。Böcking の細胞学的異型度との対比では, 腺癌では grade 3 の細胞診所見がなかったのが今回の検討では判定不能であるが, 移行上皮癌はいずれも grade 3 であり, Ki-67 index も高値を示した。しかしこれが組織型差によるものか, 異型度の違いによるものかは判断できない。このように Ki-67 index の大小と他因子との検討を行ってみたが, はっきり相関関係がみられる因子はなかった。前立腺癌ではホルモン療法後の再燃が問題となるが, 治療後の Ki-67 index の変化や再燃癌での値について現在検

討中である。

大腸疾患では, 山口ら¹⁴⁾が大腸腺腫に比し大腸癌が高い増殖能を有し, 高分化型腺癌に比べて, 中分化型および低分化型腺癌で Ki-67 陽性率が有意に高かったと報告している。吉野内¹⁵⁾は子宮内膜癌において報告しているが, 分化度による Ki-67 index の差異を認めていない。柴田ら¹⁶⁻¹⁸⁾の転移性脳腫瘍についての検討で, Ki-67 index は乳癌が最も高く56.7%, 前立腺癌が最も低く2.2%であったのは興味深く, これは個々の組織型により増殖活性が異なることを示唆するものである。以上のような他領域での検討は, おもに凍結組織切片で行われているが, 吉野内¹⁵⁾, 柴田ら¹⁶⁻¹⁸⁾の報告では, 擦過標本による検討も行われており, 凍結組織切片と同様に良好に染色されたと述べられている。特に婦人科領域では, 子宮内膜癌に対する子宮スミアにおいて Ki-67 陽性細胞が高頻度に認められ, スクリーニング検査としての有用性が述べられている。以上のように Ki-67 を使用した labeling index の算定は, 各領域でその有用性が報告されており, 今後泌尿器科領域でも汎用されていく方法と考えられる。

結 語

モノクローナル抗体 Ki-67 を使用した免疫組織化学染色を, 経直腸の前立腺吸引細胞診法により作成した吸引スミアに対して行い, 以下の結果を得た。

- 1) 前立腺癌の増殖能は前立腺良性疾患に比して明らかに高かった。
- 2) 低分化型腺癌は, 高および中分化型腺癌に比して Ki-67 labeling index が若干高値を示した。
- 3) 移行上皮癌は腺癌に比して Ki-67 labeling index が高値を示した。
- 4) 経直腸の前立腺吸引細胞診法に本染色法を応用することは前立腺癌早期診断の一助となる。

本論文の要旨は第39回日本泌尿器科学会中部総会にて報告した。

文 献

- 1) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al.: Production of mouse monoclonal antibody with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20, 1983
- 2) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*

- 133: 1710-1715, 1984
- 3) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 泌尿器科・病理. 前立腺癌取扱い規約. 第1版, 66~70, 金原出版, 東京, 1985
 - 4) Leistschneider W and Nagel R: Grading of prostatic carcinoma. In: Atlas of Prostatic Cytology. Edited by Leistschneider W and Nagel R Translated by Mills R and Winter D. 81-106, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985
 - 5) Raymond WA, Leong A S-Y, Bolt JW, et al. Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki-67 immunostaining. J Pathol 156: 161-167, 1988
 - 6) Gallee MPW, Jong EV, Kate FJWT, et al.. Monoclonal antibody Ki-67 defined growth fraction in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. J Urol 142: 1342-1345, 1989
 - 7) Gatzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-475, 1987
 - 8) 高橋 学, 佐々木功典, 村上知之. Bromodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. 最新医学 40: 80-84, 1985
 - 9) Sasaki K, Ogino T and Takahashi M: Immunological determination of labeling index on human tumor tissue sections using monoclonal anti-BrdUrd antibody. Stain Technol 61: 155-161, 1986
 - 10) Sasaki K, Ogino T and Takahashi M: In vitro BrdUrd labeling index. J Histotechnol 10: 47-49, 1987
 - 11) Nemoto R, Uchida K, Shimazui T, et al.: Immunocytochemical demonstration of S phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human prostate adenocarcinoma. J Urol 141: 337-340, 1989
 - 12) Meyer J, Sufrin G and Martin SA: Proliferative activity of benign human prostate, prostatic adenocarcinoma and seminal vesicle evaluated by thymidine labeling. J Urol 128: 1353-1356, 1982
 - 13) Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 50: 125-128, 1966
 - 14) 山口明夫, 石田哲也, 西村元一, ほか: モノクローナル抗体 Ki-67 を用いた大腸癌の細胞動態の検討. (研究速報) 日外会誌 88: 1045, 1987
 - 15) 吉野内光夫: 抗 BrdU 抗体と Ki-67 を用いた子宮癌の増殖能の検討. 日癌治 24: 2513-2521, 1989
 - 16) 柴田太一郎, Burger PC and Kleihues P: 髄膜腫, 神経鞘腫の成長解析について. 脳神経外科 16: 939-944, 1988
 - 17) 柴田太一郎, Burger PC and Kleihues P: モノクローナル抗体 Ki-67 による成人神経系腫瘍 100 例における増殖細胞の同定. Neurol Med Chir 27: 1147-1151, 1987
 - 18) 柴田太一郎: 組織学的悪性度の補完情報としての Ki-67 PAP 染色. 臨床病理 36: 221-224, 1988
(Received on February 7, 1991)
(Accepted on April 26, 1991)
(迅速掲載)