

In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた尿路性器腫瘍の細胞動態学的研究

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

島袋 智之, 山本 光孝, 三井 博

山本 憲男, 酒徳治三郎

小倉記念病院泌尿器科 (部長: 佐長俊昭)

原 田 宏 行, 佐 長 俊 昭

CELL KINETIC STUDY OF UROGENITAL TUMORS UTILIZING IN VITRO BRDU-LABELLING METHOD AND ANTI-BRDU MONOCLONAL ANTIBODY

Tomoyuki SHIMABUKURO, Mitsutaka YAMAMOTO, Hiroshi MITSUI,
Norio YAMAMOTO and Jisaburo SAKATOKU

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

Hiroyuki HARADA and Toshiaki SACHO

From the Department of Urology, Kokura Memorial Hospital

With the aim to apply a rapid analytic method of cell kinetics using in vitro BrdU labelling and anti-BrdU monoclonal antibody to the clinical fields, we investigated the cell kinetics of 20 urogenital malignant tumors.

The DNA synthesizing cells which take up BrdU in its nuclei can be detected so clearly, since the labelling index (LI) is easily identified. The correlations between LI and age and with histological grade and stage of 14 transitional cell cancers of urinary tract were investigated. There was no correlation between LI and age. The LI of high grade groups (G_2 & G_3) were significantly higher than that of the low grade group (G_1) (p less than 0.05). Also between LI of pT1 group and pT3 group, there was a statistical significance (p less than 0.05) and generally LI tended to increase according to stage progression.

Therefore, the cytokinetic data obtained from the before mentioned method can be utilized as a useful marker for measuring malignant potentials of each tumor.

(Acta Urol. Jpn. 35: 1285-1290, 1989)

Key words: In vitro BrdU labeling, Monoclonal antibody, Immunohistochemistry, Cell kinetics

緒 言

最近では尿路性器悪性腫瘍の取り扱い規約も整備され、個々の症例が病理組織学的にも正確に分類記載されるようになってきた。しかしながら、個々の癌組織の生物学的悪性度を推測するには組織学的異型度の情報しか与えられていない。この情報は形態学的指標に対する有用性は有しているが、客観性に乏しいという欠点がある。病理学的には同じ組織型、同じ異型度に分類されながら、臨床経過は大きく異なっていたということも珍しくはない。

それゆえ個々の癌組織の生物学的悪性度をより正確に、より客観的に推測しえる新たな方法が囑望されていたが、そのひとつになりえるものとして、すでに報告した bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体を用いた癌組織の細胞動態解析法がある¹⁾。

本稿では、この細胞動態解析法を用いて、生検あるいは手術的に切除された尿路性器腫瘍の細胞動態解析を試み、えられたデータを従来の組織学的分化度や深達度と比較検討し、その臨床的有用性についての考察を加えたので報告する。

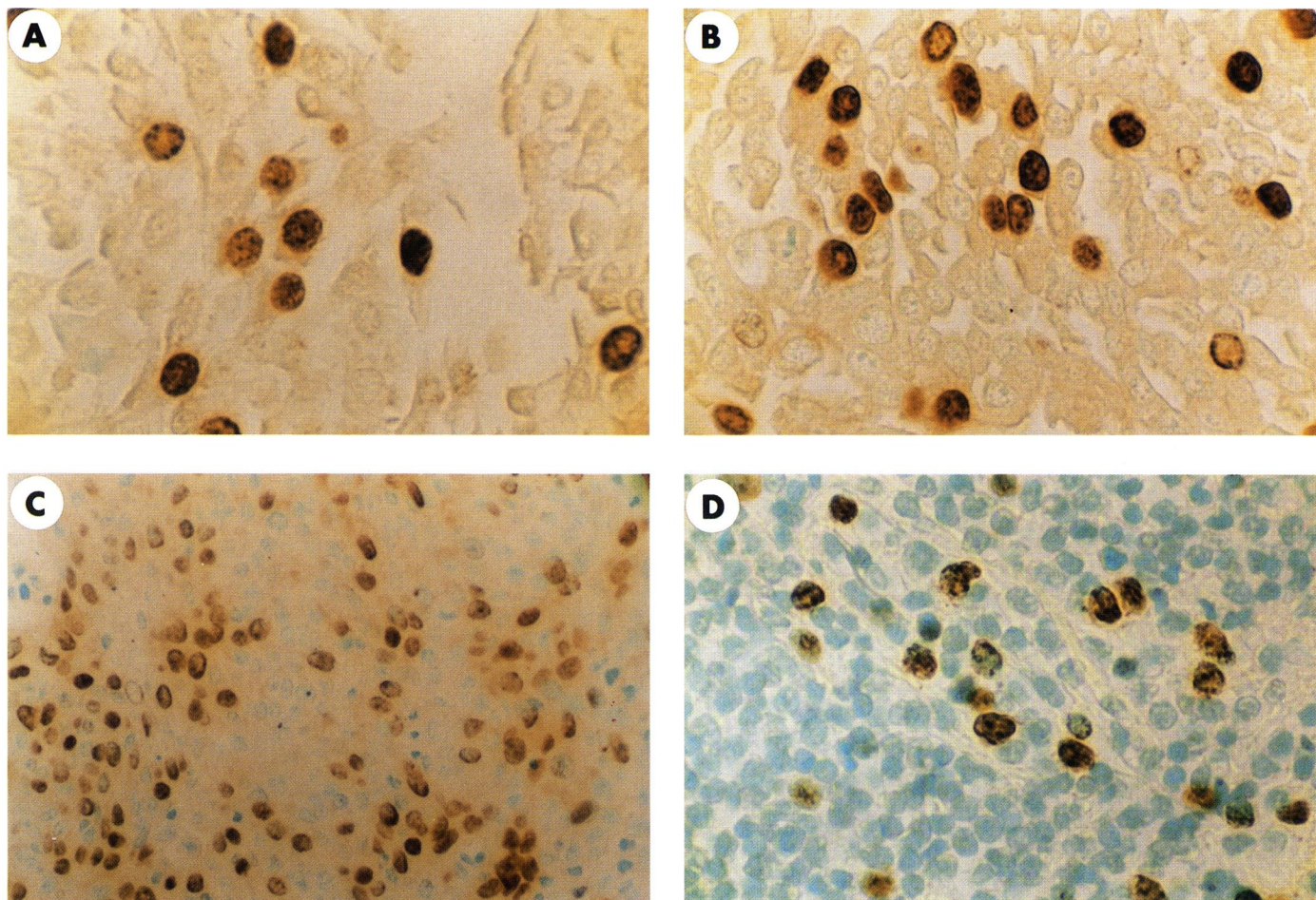


Fig. 1. Photomicrographs of urogenital malignant tumors stained immunohistochemically. (A) Bladder cancer, TCC, G1 ($\times 400$). (B) Pelvic tumor, TCC, G3 ($\times 400$). (C) Urethral tumor, SCC ($\times 200$). (D) Malignant lymphoma, diffuse large cell type ($\times 400$).

対 象 と 方 法

検体は内視鏡下の生検あるいは手術的に摘出された泌尿器科領域における悪性腫瘍組織を用いた。患者は1~81歳の男性13例, 50~89歳の女性7例の計20例である。組織片は可能な限り壊死に陥っていない新鮮な部より採取するように注意した。in vitro BrdU 標識法の詳細は以前報告¹⁾したが, 簡単に述べると, メスの刃を用いて組織片を1 mm 角に細切し, この数片を20 μ M BrdU 含有 MEN 培養液2 ml の入った vial 中で3 気圧下に37°C, 1 時間培養した。PBS にて洗浄したあと70%冷エタノールで固定し, 通常のパラフィン切片を作成した。DNA 合成期細胞に取り込まれた BrdU を検出するためには, 抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法 (avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method) を行った。すなわち, パラフィン包埋切片を5 μ m の厚さに薄切し, 脱パラフィンを行ったあと, 4N 塩酸で室温30 分間の DNA 変性処理を行った。0.1 M

Na₂B₄O₇ 溶液にて塩酸を中和し, ついで非特異的反応を阻止するため5%正常馬血清で処理した。一次抗体は, 100 倍希釈の抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton-Deckinson Co.) を用い, 湿室内で室温1 時間反応させた。二次抗体は, 200倍希釈のビオチン化抗マウス抗体 (Vector Lab.) を用い, 同様に室温で30分間反応させた。ついで調整済みの ABC complex (Vector Lab.) で30分間反応させ, 最後に3,3'-DAB・H₂O₂ 液を用いて発色させた。

細胞動態解析のためには, 組織の中心部まで明瞭に染色された切片を選び, 400倍光学顕微鏡下に, 異なる4, 5カ所で2,000個以上の癌細胞を観察した。標識率 (LI) は全観察細胞に対する標識細胞の割合として算出した。growth fraction (GF) と cell loss rate (L) は Sasaki らの報告した式²⁾により算出した。

結 果

I. 免疫組織化学的染色像 (Fig. 1)

Table 1. Results of cell kinetic analysis of urogenital malignant tumors. LI; labelling index, GF; growth fraction, L; cell loss rate.

Pathological type		Case No.	Age/Sex	LI(%)	GF(%)	L(%)
Bladder tumor	TCC, G1	1	57/M	1.7	6	1
	TCC, G1	2	74/F	3.1	10	3
	TCC, G1	3	55/M	5.3	18	7
	TCC, G1	4	72/M	10.1	34	15
	TCC, G2	5	72/F	8.3	28	12
	TCC, G2	6	89/F	8.9	30	13
	TCC, G2	7	71/M	10.2	34	15
	TCC, G2	8	65/M	12.0	40	18
	TCC, G2)3	9	72/M	14.6	49	22
	TCC, G3	10	78/M	10.5	35	16
Ureteral tumor	TCC, G1	11	62/M	3.1	10	3
	TCC, G3	12	63/M	9.6	32	14
	SCC	13	69/M	14.0	47	21
Pelvic tumor	TCC, G1	14	78/F	8.7	29	12
	TCC, G3	15	71/F	16.3	54	25
Urethral tumor	SCC	16	59/F	34.3	100*	56
Urachal tumor	Adeno.	17	50/F	22.1	74	35
Malignant Lymphoma	Large cell	18	11/M	5.5	18	7
	B cell	19	81/M	9.4	31	14
Neuroblastoma	Undiffer.	20	1/M	6.2	21	8

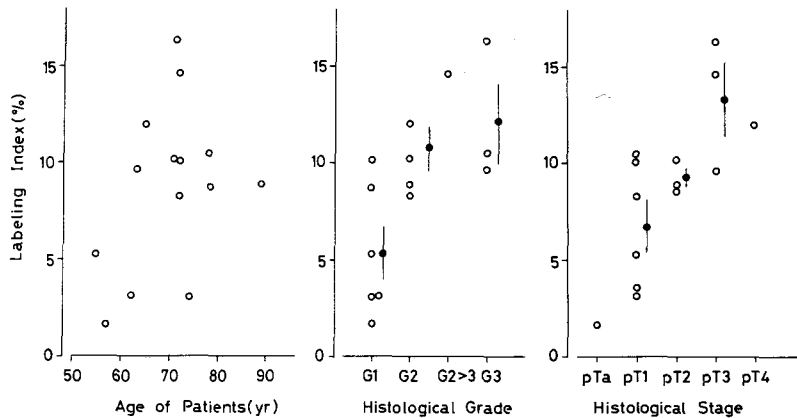


Fig. 2. Labelling index (LI) versus age, grade and stage in patients with transitional cell cancer of the urinary tract. Bar shows standard error.

代表的症例の組織像を Fig. 1 に示した。全症例において、BrdU を取り込んだ DNA 合成期細胞は褐色に染色された核を有した細胞として、容易に同定できた。

II. 細胞動態解析結果 (Table 1)

全症例の細胞動態解析結果を Table 1 に示した。膀胱腫瘍 10 例は全例移行上皮癌であり、grade 別では G1 4 例、G2 5 例、G3 1 例であった。深達度分類では pTa 1 例、pT₁ 5 例、pT₂ 2 例、pT₃ 1 例、pT₄ 1 例であった。いずれの症例でも標識細胞は一定の傾向なく、び慢性に分布していた。腎盂尿管腫瘍では移行上皮癌 4 例、扁平上皮癌 1 例であった。移行上皮癌は G1, G3 がそれぞれ 2 例ずつであり、深達度別では pT₁ が 1 例、pT₂ が 1 例、pT₃ が 2 例であった。扁平上皮癌の 1 例は LI が 14.0%、GF が 47% と高く、旺盛な増殖能を有していることがうかがわれた。いずれの組織型でも標識細胞の分布には一定の傾向なく、び慢性に分布していた。陰嚢内に発生した悪性リンパ腫は、large cell type と B cell type の 2 例であった。LI はそれぞれ 5.5%、9.4% であり、中等度の増殖能を有していることが推測された。尿道腫瘍の 1 例は扁平上皮癌であり、LI は 34.3% と極めて高く、GF も計算上は 100% を超え、高い増殖能を有していることが推測された。本症例は臨床経過もきわめて速く、予後も悪かった。その他、尿膜管腫瘍と神経芽細胞腫をそれぞれ 1 例ずつ認めた。特に尿膜管腫瘍は LI が、22.1%、GF が 74% と高い増殖能を有しており、本症例の予後もきわめて不良であった。

III. 尿路移行上皮癌の LI と患者年齢、組織学的分化度、深達度との関係 (Fig. 2)

尿路移行上皮癌 14 例の LI と年齢、分化度、深達

度との関係を Fig. 2 に示した。すなわち、LI と年齢の間には一定の関係を認めなかった。G1 の LI は $5.3 \pm 1.4\%$ (mean $\pm$ S.E., 以下同様)、G2 (G2>3 を含む) の LI は $10.8 \pm 1.1\%$ 、G3 の LI は $12.1 \pm 2.1\%$ であった。LI と分化度との関係をみてみると、G2 と G3 の間には統計学的に有意の差はなかったが、G1 と G2、G1 と G3 の間には有意の差を認めた ($P < 0.05$)。pT₁ の LI は $6.7 \pm 1.4\%$ 、pT₂ の LI は $9.3 \pm 0.5\%$ 、pT₃ の LI は $13.3 \pm 1.9\%$ であった。これらの LI と深達度との関係をみてみると、pT₁ と pT₂、pT₂ と pT₃ の間には統計学的に有意の差はなかったが、pT₁ と pT₃ の間には有意の差を認めた ($P < 0.05$)。pTa と pT₄ は症例数が少ないため、今回は検討しなかった。

考 察

日常の診療で尿路性器腫瘍を取り扱う場合、個々の腫瘍の生物学的悪性度を推測することは極めて重要なことである。この目的で種々のマーカーが提唱されているが、必ずしも充分とはいえない³⁻⁵⁾。それゆえ、個々の腫瘍の malignant potential をより正確に、より客観的に推測させる新たなマーカーの導入が望まれていた。

悪性腫瘍を特徴付けているのはその異常な増殖力にある。それゆえ、腫瘍細胞の細胞動態を解析し、その増殖力を知ることは、適切な治療法を選択する上でも欠かせない。この意味からも、簡便かつ迅速に個々の悪性腫瘍の細胞動態を測定する方法の確立が望まれる。最近開発された抗 BrdU 抗体を用いた細胞動態解析法はこの要求を充たす可能性を有している。この方法は放射性物質を用いる必要がないため安全で、正

しく行なえば in vitro では信頼性のある解析結果がえられる¹⁾。

尿路移行上皮癌は泌尿器科医が日常の診療の中で最も出会う頻度が高い悪性腫瘍であるが、その発生・進展などの生物学的自然史についての研究は不十分であり⁶⁾、とくに細胞動態学的面からのアプローチは最近やっと緒についたばかりである。

尿路移行上皮癌の病態を、細胞動態の面から検討した今回の検討結果から、標識率 (LI) と年齢の間には一定の関係がなかった。また LI と分化度の間をみても、G2 と G3 の間では差は認められなかったが、G1 と G2 および G3 の high grade 間では LI に明かに有意の差が認められた。このことは形態学的分化度と増殖能一取りも直さず悪性度一の間には、ある一定の関係が成り立つことを示している。形態学的にみた分化度がやや客観性に欠けることを考えれば、LI よりみた増殖能の評価法の利点は大きい。さらにこの 2 つの側面から悪性度を評価すれば、より正確さも増すものと思われる。LI と深達度との間をみても、pT₁ と pT₃ の LI の間には統計学的に有意の差があり、全体としては深達度が進むにつれ LI は大きくなる傾向にあった。このことは進行癌ほど大きな増殖能を有していることを示している。従来、pT₂ までは表在性癌に分類されていたが、pT₁ においても 10% 台の高い LI を有するものがあり、このような症例は早晩浸潤性癌へ移行するのかも知れない。したがって、表在性癌と分類されていても増殖能によっては浸潤性癌として取り扱う必要があるかも知れない。この意味からも、悪性度を測るマーカーとして、LI の導入の必要性が示唆された。

尿路移行上皮癌には種々の発育様式が報告されている⁷⁾。この問題を考えるときには、LI と cell loss rate (L) との関係が重要である。一般に、癌細胞は細胞同志の結合が弱く、剝離し易いと言われている。増殖が周囲の非癌部粘膜上皮より旺盛でかつ細胞損失 (L) が少ない場合には乳頭腫状を呈するであろうし、周囲上皮より増殖能が小さい場合には内反性乳頭腫状を呈するであろう。この意味から潰瘍形成型は腫瘍塊が一度に失われた結果とも考えられる。たとえ LI が同一であっても、表在型と浸潤型では癌の成長速度が大きく異なることは充分考えられる。というのも表在型では膀胱内腔への癌細胞損失が浸潤型に比べ相対的に大きいからである。膀胱癌がどちらの発育様式をとるかは、個々の癌の生物学的性状および宿主の状態に影響されるのであろうが、もし初診時に個々の癌の有

する潜在能力を判定・推測可能なマーカーがあればその臨床的有用性は図り知れない。この意味からも、抗 BrdU 抗体を用いた細胞動態解析データやすでに報告したフローサイトメトリーによる DNA ploidy の検索⁸⁾などは、期待の持てる方法と思われる。

他の泌尿器系腫瘍については、症例数が少ないため確定的なことはいえないが、予後が悪い腫瘍の一種と考えられている尿道癌や尿膜管癌では、明かに高い増殖能を有していた (Case No. 16, 17) ことは示唆に富む所見と思われた。

In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU 抗体を用い、免疫組織化学的方法にて得られる細胞動態解析データは、立ち後れている泌尿器系腫瘍の生物学的自然史を明らかにする目的のみならず、個々の癌の有する生物学的悪性度を判定しより有効な治療手段を選択するための情報としても期待される。

結 語

In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU 抗体による細胞動態解析法を用いて、泌尿器系腫瘍 20 例の細胞動態を解析し、以下の結果をえた。

1) 全症例において、BrdU を取り込んだ DNA 合成期の細胞は明瞭に染色されており、標識率 (LI) の算定は容易であった。

2) 尿路移行上皮癌 14 例において、LI と年齢、組織学的分化度、深達度との関係をみたところ、年齢とは一定の関係を認めなかったが、G1 の low grade 群と G2 および G3 の high grade 群間には有意の差を認めた ($P < 0.05$)。また、pT₁ と pT₃ 群間の LI にも有意の差を認め ($P < 0.05$)、全体としては深達度が増すにつれ LI も大きくなる傾向にあった。

本法を用いてえられた細胞動態に関するデータは、個々の泌尿器系腫瘍の生物学的悪性度を推測するマーカーのひとつとして利用可能なことが示唆され、今後の発展が期待できた。

本論文の要旨は第 5 回 FCM-Cell Biology 研究会 (1987 年, 大阪) において発表した。検体の整理に協力してくれた、研究室の渡辺文江嬢に感謝します。

文 献

- 1) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, 清水功基, 山本憲男, 酒徳治三郎, 村上知之: In vitro BrdU 標識法と抗 BrdU 抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討. Oncologia 1: 印刷中
- 2) Sasaki K: Measurement of tritiated thymidine labeling index by incubation in vitro of surgically removed cervical cancer. Gann

68: 307-313, 1977

- 3) Lessing JA: Bladder cancer: early diagnosis and evaluation of biologic potential. A review of newer methods. J Urol 120: 1-5, 1978
- 4) Wijkstrom H, Gustafson H and Tribukait B: Deoxyribonucleic acid analysis in the evaluation of transitional cell carcinoma before cystectomy. J Urol 132: 894-898, 1984
- 5) Neal DE, Marsh C and Bennet MK: Epidermal growth-factor receptors in human bladder cancer. Comparison of invasive and superficial tumors. Lancet 1 (8425): 366-368, 1985
- 6) 小磯謙吉: 膀胱癌一発生, 浸潤, 転移の基礎と臨床. 日泌尿会誌 78: 2243-2253, 1987
- 7) 新島靖夫, 辻 一郎, 鈴木騏一, 松本恵一, 横川正之, 津川龍三, 小幡浩二, 宮川美栄子, 古武敏彦, 宇山健, 緒方二郎, 大井好忠, 小磯謙吉, 牛島 宥, 伊藤信行, 遠城寺宗知, 下里幸雄・日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 病理学的事項. 膀胱癌取り扱い規約(第一版)., pp. 65-66, 金原出版株式会社, 東京, 1980
- 8) 山本光孝, 島袋智之, 三井 博, 山本憲男, 酒徳治三郎: ホルマリン固定パラフィン・ブロックを用いた FCM による DNA 解析の為の検体処理法の基礎的検討. 関西フローサイトメトリー研究会機関誌 6: 11-16, 1987

(1988年11月4日受付)