

膀胱腫瘍における ABH 同種抗原の研究

愛知医科大学泌尿器科学教室（主任：瀬川昭夫教授）

深津 英捷・野々村仁志・宮川 嘉眞・和気 正史
 羽田野幸夫・平岩 親輔・村松 直・高村 淑恵
 山田 芳彰・西川 英二・佐藤 孝充・本多 靖明
 瀬 川 昭 夫

THE STUDY OF ABH ISOANTIGEN OF BLADDER TUMOR

Hidetoshi FUKATSU, Hitoshi NONOMURA, Yoshimasa MIYAGAWA,

Masafumi WAKI, Yukio HATANO, Shinsuke HIRAIWA,

Tadashi MURAMATSU, Toshie TAKAMURA, Yoshiaki YAMADA,

Eiji NISHIKAWA, Takayoshi SATO, Nobuaki HONDA and Akio SEGAWA

*From the Department of Urology, Aichi Medical University**(Director: Prof. A. Segawa)*

ABH isoantigens in 82 cases with bladder tumor of various grades and stages were investigated by the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method. Correlation of ABC expression for isoantigens with pathological findings on the grading and staging system of the bladder tumors were as follow: Of 60 cases of low grade tumors, 34 (56.7%) were positive and of 22 cases of high grade tumors, 21 (95.5%) were negative. Of 63 cases of low stage tumors, 35 (55.6%) were positive and all 19 cases of high stage tumors, (100%) were negative. The isoantigens in the tissue of the bladder tumors tended to disappear as the histologic anaplasia of the tumor progressed. There was a high correlation between the histological grade, stage and ABC expression ($p < 0.01$). In a follow-up study of 38 patients with low grade, low stage, initial transitional cell carcinoma, 9 of the 24 patients positive for ABC expression (37.5%) showed recurrence during the 1 to 6 year follow-up period, whereas 10 of the 14 patients negative for ABC expression 10 (71.4%) did. There was a high correlation between the recurrence rate and ABC expression ($p < 0.05$).

Therefore, the analysis in the bladder tumors may be valuable for prediction of malignant potential, especially for the low grade, low stage tumors.

Key words: Bladder tumor, ABH isoantigen, ABC technique, Immunohistochemistry

緒 言

血液型物質 ABH 同種抗原（以下型物質）はヒトの多くの上皮細胞および内皮細胞の細胞膜に存在し、細胞の癌化に伴い減弱ないし消失することがよく知られている。型物質は正常尿路上皮にも分布することから、泌尿器科領域においても尿路上皮腫瘍を中心に研究が行なわれ、その消退の程度と腫瘍の malignant potential との相関が注目されている。

今回、著者も avidin biotin-peroxidase complex 法（以下 ABC 法）^{1)~5)} を用い、膀胱上皮腫瘍における型物質の消退の程度と病理組織学的異型度、病理組

織学的深達度、再発および浸潤傾向などとの関係について検討し、若干の知見を得たので文献的考察を加えて報告する。

対象および方法

対象は1980年4月より1985年3月までの5年間に愛知医科大学付属病院泌尿器科を受診し、手術的摘出標本にて病理組織学的に膀胱移行上皮癌と診断された61例で、その血液型はA型29例（22症例）、B型19例（13症例）、AB型5例（5症例）、O型29例（21症例）の計82例である。

なお、病理組織学的異型度と病理組織学的深達度

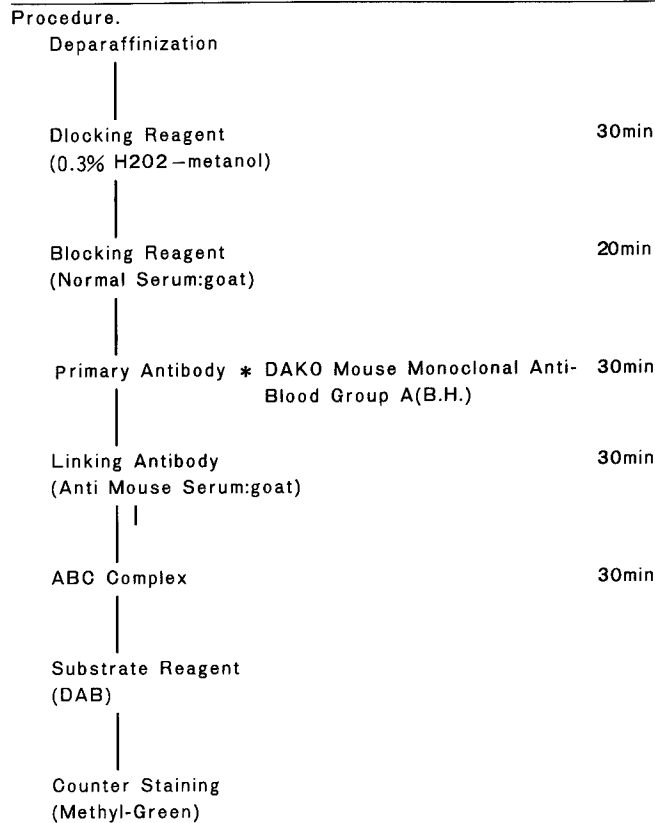


Fig. 1.

は、日本泌尿器科学会膀胱癌取扱規約⁶⁾に従って分類した。また、grade I および grade II を low grade, grade III を high grade とし、pT₁ を low stage, pT₂ 以上を high stage とした。試料は10%ホルマリン液固定後パラフィン包埋し、保存してあるブロックから新たに各3枚のプレパラートを作成し使用した。

染色の方法としては、第1次抗体には DAKO mouse monoclonal anti-blood group A, B, H を使用した。手順は次の通りである。

- (1) アルコール・キシロール系列で脱パラフィンする。
- (2) 0.3% H₂O₂ メタノール溶液で30分間作用させる。
- (3) 磷酸緩衝液で5分間、3回洗浄する。
- (4) 10% 正常馬血清にて室温で20分間作用させる。
- (5) 第1次抗体：緩衝液で希釈した1次血清(A, B, AB型:100倍希釈, O型:80倍希釈)を室温にて30分間作用させ、その後4°Cで1晩置く。
- (6) 磷酸緩衝液で5分間、3回洗浄する。

(7) 第2次抗体：biotin 化 anti-mouse IgG+IgM を30分間作用させる。

(8) 磷酸緩衝液で5分間、3回洗浄する。

(9) avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories 社製)を室温にて30分間作用させる。

(10) 磷酸緩衝液で5分間、3回洗浄する。

(11) トリス緩衝液(pH 7.6)を使って diaminobenzidine 反応を行なう。

(12) 核染(methyl green 染色)

(13) 封入

反応の control として通常の免疫組織反応の際に用いられる種々の control 実験を行ない反応の特異性を確認した。さらに、標本内の赤血球、血管内皮細胞は ABC 法陽性なので positive control とし、線維結合組織、筋肉組織は陰性なので negative control とした。

判定基準は A, B, AB 型では腫瘍細胞の染色性により100~80% (卅), 80~50% (卅), 50~20% (+), 20%以下 (-)に分類した。またO型はその染色性から多少判定基準をゆるめ100~70% (卅), 70~40%

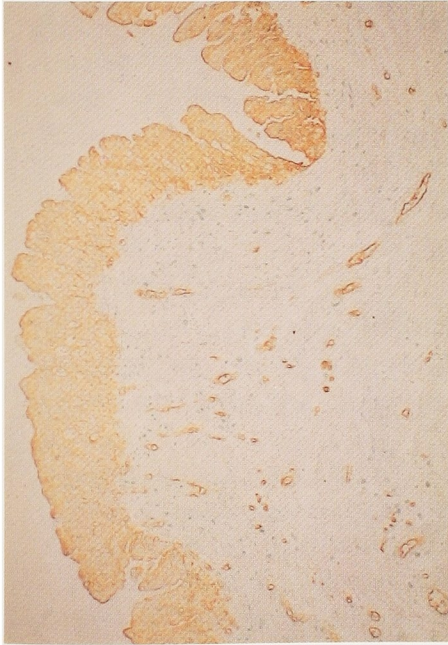


Fig. 2. Normal bladder. Urothelium are stained homogeneously and intensely by dark-brown DAB-H₂O₂ reaction product. Positive reactions are also observed on vascular endothelium.

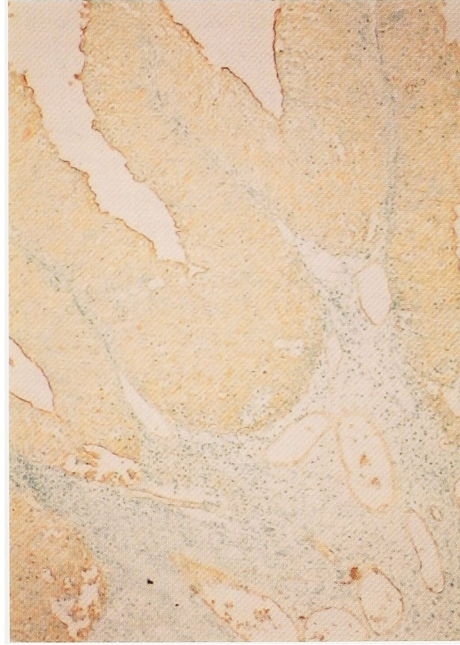


Fig. 3. G1 bladder tumor. Tumor cells are stained homogeneously and as intensely as normal urothelium.

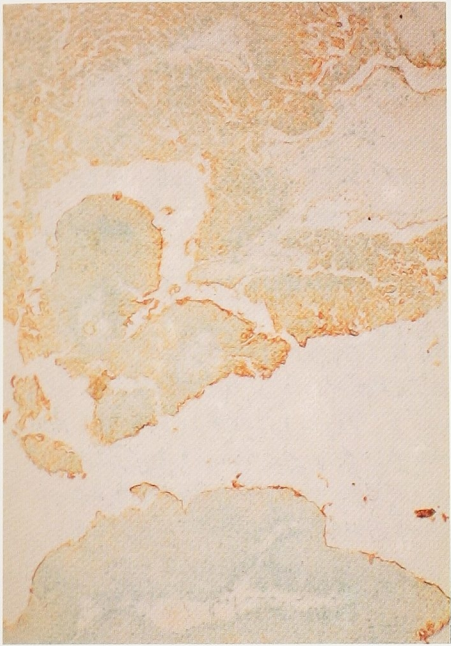


Fig. 4. G1 bladder tumor. Tumor cells are stained non-homogeneously. Some areas are not stained at all.

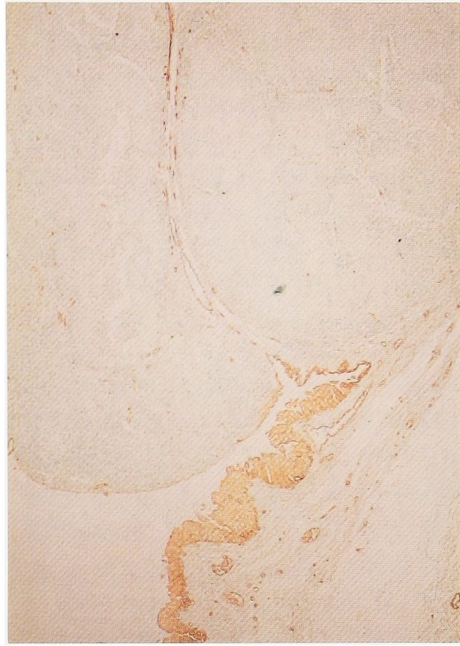


Fig. 5. G3 bladder tumor. Tumor cells are not stained at all, but vascular endothelium and normal bladder epithelium are stained.

(++), 40~10% (+), 10%以下 (-) に分類した。
なお (++)~(+) を陽性, (-) を陰性とした。

結 果

1. ABC 法の染まり方

膀胱正常移行上皮では全層に濃く染っている (Fig. 2) のに対して腫瘍ではいくつかの染まり方が認められた。すなわち、腫瘍細胞が正常移行上皮と同様に全層濃く染まる場合 (Fig. 3), 全層染まっているが多少染色性の低下している場合、まだら状に染まっている場合 (Fig. 4), 全く染っていない場合 (Fig. 5) などである。

2. ABC 反応と血液型

ABC 法反応と血液型との関係を low grade, low stage 42症例を対象に調べてみた。ABC 法反応陽性はA型17症例中11症例 (64.7%), B型7症例中2症例 (28.6%), AB型5症例中3症例 (60%), O型13症例中7症例 (53.8%) であり, ABC 法反応と血液

型との間には特別な相関はみられなかった (Table 1)。

3. ABC 法反応と病理組織学的異型度

ABC 反応の陽性率は grade I は32例中22例 (68.8%), grade II 28例中12例 (42.9%), grade III 22例中1例 (4.5%) と grade が高くなるほど低下する傾向がみとめられた (Table 2)。また, low grade では60例中34例 (56.7%) が陽性, 26例 (43.3%) が陰性であり, 一方 high grade では22例中1例 (4.5%) が陽性, 21例 (95.5%) が陰性となり, ABC 法反応と grade との間に統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

4. ABC 法反応と病理組織学的深達度

ABC 法反応陽性率は pT₁ では63例中35例 (55.6%) であったが, pT₂ 以上は19例中0例 (0%) であった (Table 3)。すなわち, low stage では63例中35例 (55.6%) が陽性, 28例 (44.4%) が陰性であったが, 一方 high stage では19例すべてが陰性を示し,

Table 1. Correlation of ABC with blood group in low grade, low stage.

ABC	Blood Group				Total
	A (%)	B (%)	AB (%)	O (%)	
+++	6	1	2	2	11
++	4	1	1	3	9
+	1			2	3
-	6		2	6	19
Total	17	7	5	13	42

Table 2. Correlation of ABC with grade.

ABC	Grade			Total
	I (%)	II (%)	III (%)	
+++	14	4	1	19
++	3	5	0	8
+	5	3	0	8
-	10	16	21	47
Total	32	28	22	82

ABC 法反応と stage の間に統計学的有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

5. ABC 法反応と再発および浸潤傾向

初回膀胱保存手術を行ない, 充分経過観察のできた low grade・low stage 38症例を対象に検討した。なお, 経過観察期間は1年から6年である。その再発率は陽性24症例中9症例 (37.5%), 陰性14症例中10症例 (71.4%) であり, ABC 法反応と再発との間に統計

Table 3. Correlation of ABC with stage.

ABC	Stage				Total
	P T ₁ (%)	P T ₂ (%)	P T ₃ (%)	P T ₄ (%)	
+++	19				19
++	8				8
+	8				8
-	28	9	5	5	47
Total	63	9	5	5	82

Table 4. Correlation of ABC with recurrence in low grade, low stage.

ABC	Recurrence		Total
	+	-	
Positive	9 (37.5)	15 (62.5)	24
Negative	10 (71.4)	4 (28.6)	14
Total	19	19	38

計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた (Table 4). 浸潤傾向については, 陽性で再発のみられた 9 症例中 1 症例 (11.1%), 陰性で再発のみられた 10 症例中 3 症例 (30%) が浸潤癌に進展し, 陰性症例に浸潤傾向が高い結果が得られたが, 統計学的有意差は認められなかった.

考 察

近年, 組織細胞膜上の糖脂質や糖蛋白などの糖分子が, 細胞の悪性化により変化することが明らかにされてきた. 型物質は赤血球のみならず多くの組織細胞膜上にも存在し⁷⁾, 細胞膜複合糖質より成っているの, 型物質を検索することは細胞の悪性変化の程度を知るうえで重要な意味をもつことになる.

すでに, 子宮⁸⁾, 肺⁹⁾, 胃腸^{11,12)}や喉頭¹³⁾などの癌細胞における型物質の動態が検索され, 癌細胞の悪性化進展との関連性についての報告がなされている. 泌尿器科領域においても前立腺腫瘍^{5,14)}や尿路上皮腫瘍について検討が加えられており, 特に膀胱腫瘍について多くの研究が行なわれている.

組織内の型物質の検出法には 1968 年 Kovaik¹⁵⁾らが開発した specific redcell adherence test (以下 SRCA 法) が最も良く知られているが, 他に蛍光抗体法¹⁶⁾, peroxidase-antiperoxidase 法 (以下 PAP 法)¹⁷⁾, immunoperoxidase 法¹⁸⁾ などがある.

今回, 著者が利用した ABC 法は Hsu ら¹⁾により最近開発された方法で, 1 次抗体の次に biotin で標識した 2 次抗体をつけ, その次に avidin-biotin-peroxidase complex をつけるものであり, 操作が非常に簡単である. また, avidin は鳥類の卵白などに存在する蛋白質であり, biotin はビタミン H で, この両者の強力な親和性を利用した染色法であることから, 非常に高い感度が期待される免疫組織化学法といえる. 佐々木³⁾は ABC 法は SRCA 法や PAP 法に比べて, 感度が非常に高く background も低く特異的である. 操作が 3 step なので簡便である. 判定が比較的容易であるなどの利点をあげている. 河原ら⁴⁾も ABC 法は SRCA 法で染色性の低いといわれている O 型についても, 他の血液型と同様に判定するこ

とができたと述べている. 著者も同様な結果を得たことから, 型物質の検出法として ABC 法は現時点では最良の方法であると考えられる.

膀胱腫瘍における grade と型物質の消退との間には著明な相関を認める報告が多い. Davidson ら¹⁹⁾は膀胱腫瘍の SRCA 法陽性率は grade I~II で 55%, grade III~IV で 12%, grade III~IV の転移巣では 4% であったことから両者に相関のあることを強調している. また, Emmott ら²⁰⁾も膀胱移行上皮癌の陽性率は grade I では 70%, grade II で 37.5%, grade III では 0% であり, high grade になるほど陽性率は低下していると述べている. 公文ら¹⁶⁾ (grade I: 44%, II: 8.3%, III: 0%), 井口ら²¹⁾ (grade I: 76.7%, II: 68%, III: 44%), 滝川と香川²²⁾ (grade I: 76.7%, II: 65.2%, III: 58.8%), 阿部²³⁾ (grade I: 75%, II: 54%, III: 29%) も同様な成績を報告している. また, 佐々木³⁾ ABC 法にて検討し, O 型を除いた A, B, AB 型では low grade 60 例中陽性 37 例 (62%), 陰性 23 例 (38%) であり, high grade 27 例中陽性例 3 例 (11%), 陰性 24 例 (89%) であり, ABC 法反応と grade との間には有意の相関が認められたと述べている. さらに, 河原ら⁴⁾も ABC 法の陽性率は high grade になるほど低下すると報告している. 自験例においても, ABC 法陽性率は grade I は 68.8%, grade II は 42.9%, grade III では 4.5% と high grade になるにしたがって陽性率は低下する傾向がみられた. また, low grade では 56.7% が陽性であるのに対して high grade ではわずか 4.5% が陽性であり, ABC 法反応と grade との間には危険率 1% 以下で有意の相関が認められた. しかし, grade I の腫瘍の 31.3% に ABC 法陰性がみられた. これらのことについて, 公文ら¹⁶⁾も grade I の 36.2% が SRCA 法陰性であったことから, 型物質の消失の程度は, 細胞の機能的脱分化の表現型であり, 細胞の悪性変化に伴い機能的脱分化は形態的脱分化と同時に起こるものではなく, どちらかが先行する場合があります. 膀胱腫瘍のかなりのものでは機能的脱分化が形態的脱分化に先行することを示唆していると述べている. また, 井口ら²¹⁾も papilloma の約 3 分の 1 が SRCA 法陰性を呈し, 逆に grade III の 30% 以上が陽性を示したことから, 型物質の動向は組織学的悪性度と同意でないことを示すものであり, 免疫学的見地からみた腫瘍の malignant potential を表現しているものと考えられると述べている.

また, stage と型物質の消退との間にも相関がみら

れ, Richie ら²⁴⁾は膀胱表在性癌の SRCA 陽性率は 28%であるのに対して浸潤癌では 3%であったとし, 井口ら²¹⁾はそれぞれ 71%と 41%, 滝川と香川²²⁾は 71.2%と 40.9%, 阿部は 72%と 44%と報告し, 浸潤癌では陽性率が低下していることを指摘している. また, 河原⁴⁾も ABC 法の陽性率は high stage では low stage に比べてかなり低下していると述べている. 自験例においても ABC 陽性率は pT₁ では 55.6%であるのに対して pT₂ 以上では 0%であり, ABC 法反応と stage との間には危険率 1%以下で有意の相関が認められた.

さらに, 再発あるいは浸潤傾向との関係について, Decenzo ら²³⁾は 5 年以上経過観察のできた stage A の膀胱腫瘍 (grade I~II) 22 例について調べた結果, SRCA 法陽性 13 例は総て浸潤癌には進展しなかったが, 陰性 9 例中 8 例が 11 年間以内に浸潤癌に進展したとし, Richie ら²⁴⁾も 5 年間経過観察のできた膀胱表在性癌 (grade I~III) 16 例において, 陽性 9 例はすべて浸潤癌に進展しなかったのに対して陰性 7 例中 5 例が浸潤癌に進展したと報告している. 公文ら¹⁶⁾は 1 年以上経過観察のできた grade I・stage O-A の膀胱移行上皮癌 25 例について検討した結果, 陽性 15 例中 4 例に再発がみられたが, 陰性では 10 例中 8 例に再発を認め, そのうち 1 例が浸潤癌に進展したと述べている. また, 滝川と香川²²⁾は 7~90 カ月経過観察のできた pT₁ 以下の膀胱腫瘍 48 例では, 陽性 36 例中 7 例に再発を見たのに対して陰性 12 例中 8 例に再発が認められ, 両群間に統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められたと報告している. また, 佐々木³⁾は ABC 法による検討の結果, 3 年以上経過観察のできた O 型以外の low grade 54 例において, 陽性で再発をみたものは 33 例中 11 例, 陰性では 21 例中 13 例であり, ABC 反応と腫瘍の再発の間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められたと述べている. 自験例においても low grade・low stage 38 症例での検討の結果, ABC 法陽性 24 症例中再発をみたものは 9 症例 (37.5%)であったが, 陰性 14 症例では 10 例 (71.4%)に認められ, ABC 反応と再発との間に危険率 5%以下で有意の相関が認められた. また, 陽性で再発がみられた 9 症例中 1 症例 (11.1%), 陰性で再発がみられた 10 症例中 3 例 (30.0%)が浸潤癌に進展した. 以上より, 膀胱腫瘍における型物質の検索は, low grade・low stage 腫瘍の予後を知るうえで有用な手段でもと考えられる.

結 語

膀胱腫瘍 82 例において ABC 法を使用し型物質の検出を行ない, 病理組織学的異型度, 病理組織学的深達度, 再発ならびに浸潤傾向との関係を検討した.

1) ABC 法は操作が簡便で非常に感度が高く, background も低く特異的である.

2) Low grade 60 例中 34 例 (56.7%) が陽性, high grade 22 例中 21 例 (95.5%) が陰性であり, ABC 法反応と grade との間に統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められた.

3) Low stage 63 例中 35 例 (55.6%) が陽性, high stage 19 例すべてが陰性であり, ABC 法反応と stage の間には統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められた.

4) Low grade・low stage 38 症例のうち再発のみられたものは, 陽性 24 症例中 9 症例 (37.5%), 陰性 14 症例中 10 例 (71.4%)であり, ABC 法反応と再発との間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた.

5) 膀胱腫瘍における型物質の検索は, 腫瘍の malignant potential を知るうえで有用な手段であると考えられた.

稿を終えるにあたり, 御指導頂いた愛知医科大学附属病院中央検査部小枝吉紀, 水野義己, 杉浦 清ならびに第 1 病理学教室助教原一夫諸先生等に深甚なる謝意を要します.

なお, 本論文の要旨は第 74 回日本泌尿器科学会総会にて当教室の和氣正史が発表した.

文 献

- 1) Hsu SM, Raine L and Fanger H The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 177~580, 1983
- 2) 狩野義典・広橋説雄・佐藤雄一・熊野時子・千島伸一・下里 幸雄 Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) 法を用いた免疫及びレクチン組織化学—血液型物質検出への応用—. *病理と臨床* 1: 637~640, 1983
- 3) 佐々木 絹子 Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を用いた表在性尿路腫瘍及び膀胱の Carcinoma in situ の ABH 同種抗原の検索. *日泌尿会誌* 74: 1326~1338, 1983
- 4) 河原弘之: 膀胱腫瘍における ABO (H) isoantigen の検索. *西日泌尿* 48: 91~96, 1986
- 5) 新村武明: 前立腺における ABH 血液型物質に関する組織学的研究. *日泌尿会誌* 76: 806~813, 1985

- 6) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編：泌尿器科・病理，膀胱癌取り扱い規約．金原出版，東京，1980
- 7) Holborrow EJ, Browin PC, Glynn LE, Hawes MD, Gresham GA, O'Brien TH and Coombs RR: The distribution of the blood group, An antigen in human tissue. *Br J Exp Path* 41: 430~437, 1960
- 8) Davidsohn I, Kovarik S and Ni LY: Isoantigens A, B and H in benign and malignant lesions of the cervix. *Arch Pathol* 81: 306~314, 1969
- 9) Davidsohn I and Ni LY: Loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the lung. *Amer J Pathol* 57: 307~334, 1969
- 10) Davidsohn I, Ni LY and Stejskal R: Tissue isoantigens A, B and H in carcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 31: 1244~1250, 1971
- 11) Cowan WK: Blood group antigens on human gastrointestinal carcinoma cells. *Br J Cancer* 16: 535~540, 1962
- 12) Davidsohn I, Kovarik S and Lee EL: A, B and O substances in gastrointestinal carcinoma. *Arch Pathol* 81: 381~390, 1966
- 13) Lin F, Liu PI and McGregor DH: Isoantigens A, B and H in morphologically normal mucosa and in carcinoma of the larynx. *Amer J Clin Pathol* 68: 372~376, 1973
- 14) Gupta RK, Schuster R and Christian. WD: Loss of isoantigens A, B and H in prostate. *Amer J Pathol* 70: 439~448, 1973
- 15) Kovarik S, Davidsohn I and Stejskal R: ABO antigen in cancer detection with the mixed cell agglutination *Arch Pathol* 86: 12~21, 1968
- 16) 公文裕己・朝日俊彦・森岡政明・松村陽右・大森弘之・膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABH isoantigen *日泌尿会誌* 71: 767~774, 1980
- 17) Coon JS and Weintein RS: Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic urothelium. Comparison with the erythrocyte adherence method. *AJC* P 76: 163~171, 1981
- 18) Sadougni N, Mlsna L, Guinan P and Rubenstein A: Prognostic value of cell surface antigens using immunoperoxidase method in bladder carcinoma. *Urology* 20: 143~146, 1982
- 19) Davidsohn I, Stejskal R and Lill P: The loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the urinary bladder. *Lab Invest* 28: 382, 1973
- 20) Emmott RC, Javadpour N, Bergman SM and Soares T: Correlation of the cell surface antigens with stage and grade in cancer of the bladder. *J Urol* 121: 37~39, 1979
- 21) 井口正典・松浦 健・秋山隆弘・八竹 直・栗田孝：膀胱腫瘍における ABO (H)-antigen. *日泌尿会誌* 73: 1444~1451, 1982
- 22) 滝川 浩・香川 征：膀胱腫瘍における Specific red cell adherence (SRCA) test. *西日泌尿* 45: 292~295, 1983
- 23) 阿部良悦：組織血液型同種抗原の研究，第1報 担癌膀胱非腫瘍部膀胱上皮における同種抗原の検索. *日泌尿会誌* 76: 1049~1058, 1985
- 24) Richie JP, Blute RD and Waisman J: Immunologic indicators of prognosis in bladder cancer. The importance of cell surface antigens. *J Urol* 123: 22~24, 1980
- 25) Decenzo JM, Howard P and Irish E: Antigenic deletion and prognosis of patients with stage A transitional cell bladder carcinoma. *J Urol* 114: 874~878, 1975

(1986年12月24日迅速掲載受付)