AgNOR 染色と顕微蛍光核 DNA 定量を用いた 甲状腺腫瘍増殖能の検討

山 本 祐 三 伊 藤 尚 坂 哲 郎
牧 本 一 男 高 橋 宏 明

論文要旨

甲状腺腫瘍の組織型別増殖能を検討する目的で、過去の手術摘出症例について Howell らの方法に準じ AgNOR 染色を行ない、平均 AgNOR 数の比較を行なうとともに、一部の症例に DNA 顕微蛍光測光法を併用し、双方の結果を比較した。平均 AgNOR 数は異型腺腫、濾胞癌、乳頭癌とも正常甲状腺に比べて、有意に高値を示した。乳頭癌を Ducommun の分類に従って高、中、低の3つの文化度で分類すると、平均 AgNOR 数は分化度が低下するに従って、段階的に増加を示した。異型腺腫の2症例では、測定された領域の分化度が低下するに従い、AgNOR 数と S+G2M 期細胞比率は共に増加し、双方がよく関連した成績を示した。以上より、AgNOR 染色は甲状腺腫瘍の増殖能を評価する上で、有用な方法であると考えられた。

Key words: 甲状腺腫瘍 (thyroid tumor), AgNOR 染色 (AgNOR staining), 顕微蛍光測光法 (cytofluorometry), 増殖能 (proliferative potential)

はじめに

甲状腺腫瘍は一般的に非内分泌組織の悪性腫瘍と比較して緩慢な成長を示す症例が多いが、組織型の相違により、またしばしば同一組織型の腫瘍でも生物学的態度が異なり、その予測が困難なことがある。また病理学的にも腺腫様甲状腺腫と濾胞腺腫、濾胞腺腫と濾胞癌などしばしば鑑別が困難な場合が少なくない。従来、腫瘍の増殖速度あるいは増殖能を評価する方法には DNA 顕微蛍光測光法やフローサイトメトリーによる核 DNA 定量が用いられてきた。近年、DNA の一部である Nucleolar organizer regions (NORs) を鍍銀染色により検出する AgNOR 染色法が Howell ら¹⁾や Ploton ら²⁾によって考案され、その NOR 数が細胞の増殖、分裂能ひいては生物学的悪性度と関連することを示す数多くの研究報告が出されている³⁻⁷⁾。また、AgNOR 数と他の増殖関連因子との関連で、Crocker ら⁸⁾はフローサイトメトリーを用いた検討で、S-phase と NOR 数は強く相関すると述べ、Murray ら⁹⁾は Ki-67 と NORs との2重染色で Ki-67陽性の核で NOR 数が陰性の核に比べて増加していることを報告している。著者らはこれまでラット実験的舌癌を作製し、AgNOR 染色法と DNA 顕微蛍光測光法の双方をもちいて腫瘍増殖能を

検討した結果、AgNOR 数と多倍体化は密接な関係があることを明らかにした⁹⁾。

今回、著者らは甲状腺腫瘍の増殖能を調べる目的で、AgNOR 染色を行ない、一部の症例については、DNA 顕微蛍光測光法も併用し、双方の結果を比較検討した。

材 料

大阪医科大学耳鼻咽喉科で過去に手術摘出した異型腺腫4例、濾胞癌4例、乳頭癌15例である。正常対照として特別な病変をもたない甲状腺5例を用いた。乳頭癌は Ducommun の組織分類¹⁰⁾に従って、高分化型5例、中分化型7例、低分化型3例に分類した。

方 法

1) AgNOR 染色

摘出腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより3 μ m 切片を作製し、脱パラ後、Howell¹⁾の方法に準じ、切片上に2%ゼラチン1%硝酸銀溶液を1対2で混合させた溶液を滴下し、暗室で30分間反応させた。次に、十分水洗し、脱水、透徹後封入した。AgNOR 数の測定は、光顕1000倍率で目的とする組織型を構成する腫瘍細胞の核100個につき、1核当りのドット数をカウントし平均値を求めた。Integrating eye

大阪医科大学耳鼻咽喉科学教室

Yuzo YAMAMOTO, Takashi ITOH, Tetsuro SAKA, Kazuo MAKIMOTO and Hiroaki TAKAHASHI: Assessment of proliferative activity in thyroid tumors by AgNOR staining and cytofluorometry
Department of Otolaryngology, Osaka Medical College

表 1 病理組織型別平均 AgNOR 数

病理組織型	症例数	平均 AgNOR 数 (Mean±S.D.)
Normal thyroid	5	1.48±0.11
Atypical adenoma	4	3.71±1.36
Follicular carcinoma	4	2.77±0.24
Papillary carcinoma	15	2.32±0.53

表 2 乳頭癌の組織学的分化度別平均 AgNOR 数

分 化 度	症例数	平均 AgNOR 数 (Mean±S.D.)
Well differentiated	5	2.05±0.41
Moderately differentiated	7	2.30±0.46
Poorly differentiated	3	2.80±0.55

表 3 異型腺腫の部位別 DNA 量と AgNOR 数

症例	測定領域	stemline	S+G ₂ M(%)	AgNOR 数
1	腺腫部分	diploid	4.5	2.73±0.75
	異型部分	diploid	10.4	4.38±1.39
2	腺腫部分	diploid	3.3	2.50±0.82
	軽度異型部分	diploid	16.2	3.87±1.07
	高度異型部分	diploid	23.2	5.00±1.06

piece を用い、核内のドットは $1\mu\text{m}$ 以上の大きさのものを数え、それ以下のものは非特異的である可能性が高いため算入しなかった。

2) DNA 顕微蛍光測光法

摘出腫瘍の10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより $3\mu\text{m}$ と $50\mu\text{m}$ の連続切片を作製し、両者を脱パラフィンした。 $3\mu\text{m}$ 切片は H. E. 染色を施し光顕用とした。検鏡のうえ、腫瘍部分のみをマークし、これに対応する領域を $50\mu\text{m}$ 切片上から厳密に分離した。このようにして得られた細胞塊をコラゲナーゼ処理およびホモジナイザーにて単細胞塗抹標本を作製し、DAPI 染色を施した後、落射型顕微蛍光測光システム（オリンパス AH2-QRFL）にて各標本300個以上の腫瘍細胞につき核 DNA 量を定量した。各標本中30個以上のリンパ球の平均 DNA 量を $2C$ とした。

結 果

AgNOR 染色によって、NORs は全ての細胞の核内で境界の明瞭な黒色のドットとして観察された。個々のドットは大きさに多少のばらつきがあったが、大きさに関係なくそれぞれ 1 個として数えた。

1) 組織型別平均 AgNOR 数の比較

表 1 に結果を示す。正常甲状腺は最も低値で、異型腺腫（図 1）、濾胞癌（図 2）、乳頭癌（図 3）との間にそ

図 1 異型腺腫の AgNOR 染色。核内には 1 から 8 個の AgNORs のドットが認められる。1000倍

図 2 濾胞癌の AgNOR 染色。核内には 2 から 5 個の AgNORs のドットが認められる。1000倍

図 3 高分化型乳頭癌の AgNOR 染色。核内には 1 から 3 個の AgNORs のドットが認められる。1000倍

れぞれ有意差が認められた。3 疾患の間には有意差は認められなかった。

2) 甲状腺乳頭癌の組織学的分化度と平均 AgNOR 数の比較

表 2 に結果を示す。Ducommun の組織分類¹⁰⁾で、分化度が低くなるに従って平均 AgNOR 数の増加が認

められた。

3) 異型腺腫における DNA 顕微蛍光測光法と AgNOR 染色法による成績の比較

異型腺腫の2症例について、同一の組織切片上で組織学的に異なった領域を上記2方法で増殖能を評価した。その結果を表3に示す。症例1, 2とも異型度が増すに従って、S+G2M 期細胞比率も AgNOR 数も共に高値を示し、両者は良く対応した成績を示した。

考 察

甲状腺腫瘍の増殖能を評価する方法として、DNA 顕微蛍光測光法やフローサイトメトリーを用いた核 DNA 定量が行なわれてきた。これらの方法ではプロイディ・ボタンと、増殖活性の指標として S+G2M 期細胞比率または S 期細胞比率の2つのパラメータを用い、腫瘍の組織型や分化度別に比較が行なわれてきた。甲状腺腫瘍の良性・悪性の鑑別について、腺腫、濾胞癌および乳頭癌ともその大部分がディプロイド・ボタンで、しかも大多数の高分化型乳頭癌と濾胞癌は濾胞腺腫と類似した低い S+G2M 期細胞比率を示すため、細胞増殖動態の面からは良性、悪性の鑑別が困難であるとする報告¹¹⁻¹⁵⁾が多いのに対し、一部の研究者は、DNA 測定は腫瘍の良性、悪性の鑑別に有用であると述べている^{16,17)}。

著者らは、腫瘍増殖能の評価法として、核内の NORs (nucleolar organizer regions) を検出する AgNOR 染色法を用い、各種の甲状腺腫瘍の増殖能を検討した。平均 AgNOR 数の比較では、異型腺腫、濾胞癌、乳頭癌は正常甲状腺に対して有意に高値を示したが、これら3疾患の間には有意差は認められず、過去の核 DNA 定量の成績¹⁵⁾と同様、AgNOR 数からは甲状腺腫瘍の良性・悪性の鑑別や腫瘍の組織型別増殖能の鑑別は不可能であった。

しかし、今回の研究結果で、異型腺腫の平均 AgNOR 数が最も高値を示したことは非常に興味深い。Fukunaga ら¹⁸⁾はフローサイトメトリーを用い、甲状腺の濾胞性腫瘍について S 期細胞比率を算出し、異型腺腫と濾胞癌に有意な差は認められないが、その平均値は異型腺腫が最も高値であることを示し、著者らの平均 AgNOR 数とよく対応した成績であった。この理由は、WHO の診断基準¹⁹⁾によると、濾胞腺腫と濾胞癌の鑑別は、脈管侵襲や貫通性の被膜侵襲の有無を基準にしているため、現実には、異型腺腫と非浸潤型濾胞癌すなわち被膜内癌との鑑別は不可能であり、今回の4症例に細胞増殖能の点からは癌と考えても矛盾しない症例が含まれている可能性があるためと解釈される。村田ら¹⁵⁾は異型腺腫のなかには異数倍体増殖系を示す症例が存在することを報告し、さらに異数倍体系腫瘍や明らかな S 期細胞

の増加および高い S-G 2 index の値を示す症例はたとえ浸潤・転移が認められなくても、細胞増殖動態からは悪性を強く示唆するものと考えられると述べている。Greenebaum ら¹⁷⁾はフローサイトメトリーを用いて、34例の甲状腺疾患を検討し、8例の腺腫中、3例は異数倍体を示し、その全ては組織学的に非浸潤性濾胞癌で、Hazard ら²⁰⁾の提唱した異型腺腫に相当すると述べ、異数倍体の出現は癌の診断基準となるかも知れないと考察している。さらに、Arps ら¹³⁾は DNA cytophotometry を用い、被膜内濾胞癌や被膜内乳頭癌は、広範な浸潤癌と類似した DNA ヒストグラムを示し、両者の鑑別は不可能であると述べている。今回の AgNOR 染色法でも異型腺腫が高い平均 AgNOR 数を示したことは、前述した過去の DNA 顕微蛍光測光法やフローサイトメトリーの成績と同様、細胞増殖能の面からは被膜内癌の存在を積極的に支持しているものと考えられる。一般的に異型腺腫は予後良好であるとの報告が多いが^{13,18,20)}、今回、対象とした異型腺腫症例についても、今後、臨床経過を慎重に観察する必要があると考えられる。

著者らは最も症例数が多かった乳頭癌に対し、Ducommun の組織分類¹⁰⁾を用いて高分化、中分化、低分化の3段階に分類し、分化度別に平均 AgNOR 数を求めた結果、分化度が低分化になるに従って、高値を示す傾向が認められた。この結果は乳頭癌の核 DNA 定量で、分化度が低くなるに従い S-G2 index が増加したとする過去の報告¹⁵⁾と同じ傾向を示した。

また、異型腺腫の2症例について、同一の組織切片上で組織学的に異型度の異なった領域を DNA 顕微蛍光測光法と AgNOR 染色法の2つの方法で増殖能を評価した。その結果、症例1, 2とも、異型度が増すに従って、S+G2M 期細胞比率も AgNOR 数もともに高値を示し、両者は良く対応した成績を示した。

以上の成績は、甲状腺腫瘍において、AgNOR 数が細胞の増殖能や組織学的分化度を反映することを示すものである。従って、AgNOR 染色法は細胞増殖能の評価に優れた方法であるのみならず、手技的に簡便で、特に、組織構築を壊さないため同一組織切片上の異なった領域の増殖動態を評価する場合に有用な方法であると考えられる。しかし、一方、NOR 数や NOR の大きさはホルモンの影響を受けやすく²¹⁾、甲状腺のような内分泌組織では、AgNOR 染色法の価値は低いという報告²²⁾もあり、今後、さらに詳細な検討が必要である。

SUMMARY

The present study was undertaken to investigate the proliferative potential of 5 normal thyroid tissues, 4 atypical adenomas, 4 follicular carcinomas and 15 papillary carcinomas.

A silver colloid technique to identify nucleolar organizer region associated protein (AgNORs) has been applied to paraffin sections of each sample. A morphometric analysis of highly magnified photographic images of AgNORs in light microscopic preparations was performed. The mean AgNOR number was significantly lower in normal thyroid than in atypical adenoma, follicular carcinoma and papillary carcinoma, but the differences were not significant among the latter three neoplasms.

Papillary carcinomas were divided into three differentiative groups according to Ducommun's histological classification: well, moderately and poorly differentiated. The mean AgNOR number showed a stepwise increase with a lowering of the histological differentiation.

In two atypical adenomas, both AgNOR staining method and cytofluorometry were used to study the proliferative activity of some histological areas with varying differentiation in the same tissue section.

Both AgNOR number and S+G2M fraction showed an increase as the grade of differentiation in the areas examined became lower. Moreover, AgNOR number was associated well with S+G2M fraction in each specimen. Accordingly, it appeared that the AgNOR staining technique is of value in estimating the proliferative activity of thyroid tumors.

文 献

- 1) Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36, 1014-1015, 1980.
- 2) Ploton D, Menager M, et al.: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18 : 5-14, 1986.
- 3) Crocker J, Paramjit N: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 151 : 111-118, 1987.
- 4) Hall PA, Crocker J, et al.: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12, 373-381, 1988.
- 5) Crocker J: Nucleolar organizer regions. In: ed. Underwood JCE, *Current Topics in Pathology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 91-149, 1990.
- 6) De Rosa G, Staibano S, et al.: Nucleolar organizer regions in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma of the skin. *Cancer* 69 : 123-126, 1992.

- 7) Boquist LLV: Nucleolar organizer regions in uterine sarcomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 420 : 353-358, 1992.
- 8) Murray PG, Boldy DAR, et al.: Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin sections. *J Pathol* 159 : 169-172, 1989.
- 9) 伊藤 尚, 山本祐三, 他: ラット実験的舌癌における Ag-NOR と顕微蛍光 DNA 定量の比較検討. *日耳鼻* 95 : 1514, 1992.
- 10) Ducommun J, Hedinger E: Papillary thyroid carcinomas: morphology and prognosis. *Virchows Archiv A* 396 : 19-39, 1982.
- 11) Auer GU, Backdahl M, et al.: Ploidy levels in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Analyt Quant Cytol* 7 : 97-105, 1985.
- 12) Bondeson I, Azavedo E, et al.: Nuclear DNA content and behavior of oxyphil thyroid tumors. *Cancer* 58 : 672-675, 1985.
- 13) Arps H, Sablotny B, et al.: DNA cytophotometry in malignant thyroid tumors-use of different evaluation schemes for prognostic statements-. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 413 : 319-323, 1988.
- 14) Hrafnkelsson J, Stal O, et al.: Cellular DNA pattern, S-phase frequency and survival in papillary thyroid cancer. *Acta Oncologica* 27 : 329-333, 1988.
- 15) 村田晋一, 浦田洋二, 他: DNA 顕微蛍光測光法による甲状腺腫瘍の細胞増殖解析-組織型および分化度との比較検討-. *病理と臨床* 7 : 1009-1015, 1989.
- 16) Bengtsson A, Malmäus J, et al.: Measurement of nuclear DNA content in thyroid diagnosis. *World J Surg* 8 : 481-486, 1984.
- 17) Greenebaum E, Koss LG, et al.: The diagnostic value of flow cytometric DNA measurements in follicular tumors of the thyroid gland. *Cancer* 56 : 2011-2018, 1985.
- 18) Fukunaga M, Shinozaki N, et al.: Atypical adenoma of the thyroid, A clinicopathologic and flow cytometric DNA study in comparison with other follicular neoplasms. *Acta Pathol Jpn* 42 : 632-638, 1992.
- 19) Hedinger C, Williams ED, et al.: Histological Typing of Thyroid Tumours. In *International Histological Classification of Tumours*, 2nd. ed. WHO, Springer-Verlag, Berlin, 1988 : 11.
- 20) Hazard JB, Kenyon R: Atypical adenoma of the thyroid. *AMA Arch Pathol* 58 : 554-563, 1954.
- 21) De Capoa A, Baldini A, et al.: Hormone-regulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NORs. *Cell Biol Int Rep* 9 : 791-796, 1985.
- 22) Nairn ER, Crocker J, et al.: Limited value of AgNOR enumeration in the assessment of thyroid neoplasm. *J Clin Pathol* 41 : 1136, 1988.