原 著

卵巣癌化学療法中の DNA 合成細胞の変動と 腫瘍マーカーとの相関

——抗 BrdU モノクローナル抗体による酵素抗体二重染色法——

岩手医科大学産婦人科¹⁾, 同 臨床病理²⁾

松田 壮正¹⁾ 井筒 俊彦¹⁾ 西谷 徹¹⁾

浅沼美貴子²⁾ 笹生 俊一²⁾ 高山 和夫²⁾

アミラーゼ産生卵巣癌（漿液性嚢胞腺癌）IV期症例に Bromodeoxyuridine (BrdU) の *in vivo* 標識を行い、化学療法前後の摘出組織および捺印細胞標本について、抗 BrdU モノクローナル抗体を使用した酵素抗体法により S 期細胞の同定を行った。その結果、組織における標識率は治療前 11.6%、治療後 1% 以下となり、化学療法に伴って S 期細胞の著明な減少を認めた。これに伴って、血中アミラーゼ値は化学療法中に正常値となったが、治療後も残存組織中にアミラーゼ陽性細胞が検出され、再燃時でもアミラーゼがマーカーとなることが示唆された。BrdU 陽性細胞とアミラーゼ陽性細胞の分布を連続切片により検討したところ、両者が同時に陽性を示した細胞は確認できず、BrdU とアミラーゼはそれぞれ独立したパラメーターとして使用できると思われた。組織標本および捺印細胞標本に酵素抗体二重染色法を行ったが BrdU は核内に、アミラーゼは胞体内に、よいコントラストを示して染め分けられ組織と細胞の染色所見はよく一致した。核の活動性の目安としての BrdU 染色と胞体の形質発現としての腫瘍マーカーを同一標本で分染できる二重染色は、多数の均質な標本を得難い細胞診の場合にも有用な検査法であることが明らかになった。

Key words : Ovarian cancer——Immunocytochemistry——Bromodeoxyuridine——Tumor marker

I. はじめに

卵巣癌は、その発生部位の解剖学的特殊性から早期発見が困難であり、治療においてもシスプラチンを主とする化学療法の進歩で治療効果の改善ははかられてはいるが、現在もなお予後不良である。卵巣癌は、その多彩な組織発生を反映して、多くの腫瘍マーカーが開発され、

有効な補助診断法となっているが、現在すべての問題が解決したとはいえない。われわれは、すでに卵巣癌における異所性アミラーゼ産生を報告し、アミラーゼが卵巣癌の腫瘍マーカーとして有用なことを明らかにしてきた^{3,4,7)}。アミラーゼ産生は、腫瘍細胞の胞体における形質発現の一つとして位置づけられるが、核機能と同時に検索できれば、腫瘍の細胞生物学的見地からも把握でき、多くの情報を入手することができる。近年、DNA

Detection of S-phase cells and tumor marker in ovarian carcinoma during chemotherapy—Immunohistochemical double staining with anti-BrdU monoclonal antibody—

Morimasa MATSUTA, M.D., Toshihiko IZUTSU, M.D., Iwao NISHIYA, M.D.,

Department of Obstetrics and Gynecology, Iwate Medical University, School of Medicine

Mikiko ASANUMA, C.T., I.A.C., Shunichi SASOU, M.D.

and Kazuo TAKAYAMA, M.D.

Division of Pathology, Central Clinical Laboratory, Iwate Medical University, School of Medicine

論文別刷請求先 ☎020 盛岡市内丸19の1 岩手医科大学産婦人科教室 松田壮正

昭和62年11月19日受付

昭和63年4月15日受理

のアナログである Bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体が開発され、DNA 合成細胞の同定が容易になり⁵⁾、脳腫瘍では標識率が予後と関連したという報告もある¹⁾。われわれは、アミラーゼ産生進行卵巣癌症例で、化学療法前後の腫瘍組織にたいして、核の機能として DNA 合成途上 (S 期) の同定、細胞質の形質発現としてアミラーゼ産生を確認し、化学療法の効果や、治療に伴う腫瘍の機能の変化を顕微鏡下に確認し、臨床像との対比を試みた。さらに、細胞診では組織と異なり同一状態の多数の標本を得ることが困難なため酵素抗体二重染色法を行って、細胞診における多重染色の実用化をも合わせて検討した。

II. 症例および方法

1. 症 例

患 者：E.K. 38 歳，ホステス。

主 訴：腹部膨満感。

家族歴・既往歴：特記事項なし。

月経・妊娠歴：初経 14 歳，5 妊 2 産。

現病歴：1986 年 11 月頃より腹部膨満感が出現し 1987 年 1 月某内科受診。腹水貯溜のため、腹水細胞診によって悪性細胞が確認されたため婦人科疾患として岩手医大産婦人科へ紹介された。

入院時所見および検査所見：身長 153 cm，体重 42 kg，栄養状態不良。下腹部は膨満し，腹水貯溜を認める。子宮は両側付属器と一塊となり鶏卵大の可動性不良の腫瘍を形成している。ウィルヒョウリンパ節を触知し，胸部 X-P では右下肺野に coin lesion を認める。超音波および CT 検査では，子宮の前方から左側にかけて充実性，一部多房性で長径 10 cm 短径 4 cm の腫瘍と多量の腹水を認め，左卵巣癌が疑われた。臨床検査では白血球増多 ($13,700/\mu\text{l}$) 低蛋白血症 (5.8 g/dl)，LDH (479 IU/l) およびアミラーゼ (898 IU/l) の上昇が認められた。腫瘍マーカーでは，CA 125 が 940 U/ml ，TPA 281 U/l と高値を示したが，CEA，CA 19-9， α -フェトプロテイン，SCC はいずれも正常値を示した。以上の結果から卵巣癌Ⅳ期 (FIGO) と診断したが全身衰弱が著しく，胸水貯溜も認めたため，1987 年 1 月 29 日試験開腹を行った。その結果，腫瘍は小骨盤腔を占居し，全摘出は困難であったため，試験切除とドレナージ制癌剤注入のための腹腔内シリコンチューブを設置した。術後 Performance Status の改善がみられたため，14 日目に腹腔内へ Mitomycin 20 mg を投与した。その後 CAP 療法を 4 クール終了した時点で，ウィルヒョウリンパ節を触知できなくなり，

CT 上でも腫瘍の著明な縮小を認めたため 1987 年 7 月 23 日再度開腹手術を行い，両側付属器摘出，子宮摘出，大網切除を行った。癌性腹膜炎の状態であったため腹腔内にカーボプラチン計 900 mg 投与，さらに CAP 療法を追加中である。以上の経過を表 1 に示した。

2. 方 法

アミラーゼアイソザイムは電気泳動法を用いて分析した。腫瘍摘出 1 時間前に BrdU 500 mg を静脈内に投与し *in vivo* 標識を行った。捺印スメアを作製した後，摘出組織は 10% ホルマリン溶液にて固定後，通常の方法でパラフィン包埋し，パラフィン切片はヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E) を施した。またその連続切片は，免疫組織化学的検索に用いられた。捺印スメアは 95% アルコールにて固定後，Papanicolaou 染色または，免疫細胞化学的染色が施された。

細胞および組織中のアミラーゼ，BrdU の検出には酵素抗体法間接法⁶⁾を用いた。捺印細胞標本または脱パラフィン切片を 0.3% H_2O_2 メタノール溶液中で 20 分間インキュベートし，内因性ペルオキシダーゼをブロックした後，0.01 M phosphate buffered saline (PBS)，pH 7.4 で洗浄し，抗ヒト唾液腺由来 α -アミラーゼ抗体³⁾ ($\times 1,000$) で 15 分間インキュベートした後 PBS 洗浄，ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG Fab' ($\times 100$ ，MBL) で 15 分間インキュベートした後，3,3'-diamino-benzidine (DAB) にて発色反応を行った。BrdU 染色には同様に内因性ペルオキシダーゼをブロックした後，4 N HCl で 30 分間インキュベートし DNA の denaturation を行い 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，pH 9.85 で中和し，PBS 洗浄後抗 BrdU モノクローナル抗体 ($\times 250$ ，Beckton-Dickinson) で 15 分間続いてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG Fab' ($\times 100$ ，MBL) で 15 分間インキュベートした後 DAB で発色を行った。標識率算定にあたってはヘマトキシリンによる核染色を追加した。酵素抗体法二重染色には，アミラーゼ染色を施した後，BrdU 染色を行った⁸⁾が，BrdU 染色時には Cobalt DAB²⁾を用いて発色を行った。以上の反応はすべて室温で行った。試験開腹時に得た摘出材料の一部は 2% グルタルアルデヒドで前固定し，1% オスミウム酸後固定後，エポン 812 に包埋し，超薄切片は酢酸鉛および酢酸ウランにて二重染色し，H-700 H 型電子顕微鏡で観察した。また，腫瘍の一部はホモゲナイズした後，アミラーゼ活性測定およびアイソザイム分析が施された。

図1 臨床経過, 血清アミラーゼ値およびアイソザイムの変化: 化学療法によって血清アミラーゼ値は正常化し, S型アイソザイムも減少した。

図2 腹水, 腫瘍ホモジネートおよび血清アミラーゼアイソザイムパターン (電気泳動法): 腫瘍中にはアミラーゼ活性があり S 型アイソザイムを示した。血清アミラーゼアイソザイムパターンは腹水のそれを反映していた。

III. 結 果

高値を示した血中アミラーゼ値は, Mitomycin 腹腔内投与およびそれに続く CAP 療法により, 正常値に復帰し, 以後正常値の範囲で推移した。血中アミラーゼアイソザイム分析では $S_1 \sim S_4$ の minor component が泳動されたが (図 1, 2), 経時的にアミラーゼアイソザイムを追跡すると, 唾液腺型 (S 型) 優位であった型から S_1, S_2, S_3 の減少, S_4 の消失という形式をとって血中アミラーゼ値は正常値となった (図 1)。試験開腹時の摘出組織ホモジネートのアイソザイム分析では S_1, S_2, S_3 が泳動されたが, 再手術時の摘出標本ホモジネートでのアミラーゼ

写真1 H-E 染色

- A. 試験開腹時切除標本 ($\times 100$). 漿液性嚢胞腺癌の像
B. 化学療法後摘出標本 ($\times 250$). 著明な結合組織増生の中に腫瘍細胞が散在

写真 2 試験開腹時標本の電顕写真

よく発達した微絨毛と小器官が観察される ($\times 7,500$).
挿入写真: チモーゲン類似顆粒 ($\times 60,000$)

写真 3 試験開腹時標本の捺印細胞標本.
重積性著明な腺癌細胞と砂粒体.
(Papanicolaou 染色, $\times 500$)

活性は測定感度以下であった。また、治療開始前に採取した腹水では $S_1 \sim S_5$ の minor component が泳動された (図 2)。

組織学的には、腫瘍細胞は立方状で、嚢胞状の部分では壁から腔内に向かって乳頭状に増殖し、充実性部でも同様の腫瘍細胞が増殖し、一部に砂粒体がみられる漿液性嚢胞腺癌であった (写真 1 A)。治療後の組織学的検査では肉芽様の結合組織の中に立方状の腫瘍細胞が小胞巣を作っていた (写真 1 B)。

電顕的には microvilli がよく発達し、小器官も同様に発達し、胞体の一部には直径 $0.4 \sim 1 \mu$ の電子密度の高いチモーゲン類似の分泌顆粒が観察された (写真 2)。

捺印細胞所見 (試験切除標本): 細胞集団は重積性著明で乳頭状を示し、細胞は大型で大小不同が著しい。核は偏在し、クロマチンは粗顆粒状で核小体も大型で明瞭

写真 4 連続切片による酵素抗体法 (×100)

A, B: 試験開腹時標本

C, D: 化学療法後標本

A, C: BrdU 染色, 化学療法に伴う BrdU 陽性細胞の著しい減少. B, D: アミラーゼ染色: 同じく陽性細胞の著しい減少. A, B では BrdU 染色陽性細胞群とアミラーゼ陽性細胞群の局在は相補的である

であり, 砂粒体も認められた (写真 3).

BrdU 染色: BrdU 陽性核の同定は組織でも細胞診でも容易であった. 試験開腹時の組織では多くの核が陽性となり標識率は 11.6% であったが, 再開腹時のそれは 1% 以下にとどまった (写真 4 A, 4 C).

アミラーゼ染色: 一部の腫瘍細胞では, その胞体内に顆粒状の陽性像が観察された. 試験開腹時の組織標本ではこれら陽性細胞が多数存在し, 集簇して観察されたが, 再開腹時の標本では少数の陽性細胞が疎に分布して

いるのみであった (写真 4 B, 4 D). 細胞診では試験開腹時の捺印標本にアミラーゼ陽性細胞を観察したが, 再開腹時標本では腫瘍細胞数が少なく, 陽性細胞は観察されなかった.

アミラーゼおよび BrdU 二重染色: 組織でも捺印標本でも BrdU 陽性細胞は, 核が青紫色を呈し, アミラーゼは胞体内に茶褐色に染色され, よいコントラストを示した (写真 5 A, B). BrdU 陽性細胞でアミラーゼ含有細胞は観察されなかった.

A

B

写真 5 酵素抗体法二重染色（試験開腹時標本）

BrdU は青黒色，アミラーゼは褐色に染色されている。

A：パラフィン切片（×250） B：擦印細胞標本（×500）

IV. 考 案

BrdU 染色は、これまでアルコール固定標本によって行われてきたが、通常のホルマリン固定パラフィン切片でも十分可能である⁸⁾ことが確かめられ、細胞診と通常の組織標本との比較も可能になった。今回、われわれは高アミラーゼ血症を示す卵巣癌IV期症例について、血中アミラーゼを腫瘍マーカーとして、化学療法前後で経時的に測定分析するとともに、同様に化学療法前後での腫瘍組織中の DNA 合成細胞を抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて染色し、化学療法に伴う S 期細胞同定の意義を検討した。

血中アミラーゼアイソザイム分画では S 型の増量があり、腫瘍組織中にも S 型アイソザイムが検出されたことから高アミラーゼ血症は腫瘍が産生分泌した S 型アイソザイム増量によることが明らかになった。免疫組織ないし細胞化学的に腫瘍細胞中にアミラーゼが検出でき、また電顕的にチモゲン類似顆粒が観察され、従来の報告^{3,4,7)}と一致している。血中アミラーゼの動きとそのアイソザイムを比較すると、血中アミラーゼ値が正常値に近づくにつれ S₁, S₂, S₃ を産生する腫瘍細胞が減少し、これが血中アミラーゼアイソザイムパターンに反映されたと考えられ、腹水の消失とともに S₄ が血中より消失したものと思われた。しかし血中アミラーゼ活性が正常化した時期でも、CT などの画像診断では腫瘍塊が残存していたので、血中アミラーゼはマーカーとしてはさほど鋭敏ではない、と思われた。しかし、血中アミラーゼ値が正常化した時期においてもアイソザイム分析では S₁, S₂, S₃ の minor component が泳動されており、再開

腹時組織にもアミラーゼ含有細胞が残存していたことから、再発ないし再燃した時に再度アミラーゼ活性測定およびアイソザイム分析がマーカーとして有用となることを示唆している。

腫瘍マーカーの条件の一つとして体液中へ出現することがあげられるが、S 期細胞すなわち DNA 合成期にある細胞を確認することはとりもなおさずその腫瘍細胞が cell cycle 中を回転し活発に活動していることを意味し、これこそ腫瘍活動性のマーカーになりうると考えられる。そこで、化学療法前後で得た腫瘍組織中の S 期細胞同定を酵素抗体法で行い、標識率を計算したところ、治療前で 11.6%、治療後で 1% 以下であった。卵巣癌における *in vivo* の標識率の詳細なデータは見あたらないので、この値の評価は今後の検討を待つことになるが、標識率という客観的測定値が加わればより多くの情報による効果判定が可能と考えられる。卵巣癌においては、second look operation の必要性が指摘されており、初回開腹時および再開腹時摘出材料における標識率の算定と比較は、その時点までの治療効果の評価はもちろんのこと、それ以後の治療法の選択にあたり重要な情報を得ることができると考えられる。特に、アミラーゼと BrdU が同時に陽性となる細胞は検出されず、DNA 合成よりみた核の機能とアミラーゼ産生部位である胞体の形質発現とは異なった細胞周期の表現であり、“マーカー”としては相補的であり、治療効果の評価にあたって、より多くのパラメーターを集積できることとなる。このような観点から、核の機能表現としての BrdU 検出と、胞体における形質発現としての腫瘍マーカーの同時検出は有用であり、特に、均質な標本を多数得ることが困難な細胞診への応用では、二重染色という技術が有用な手技にな

ることを明らかにした。

本研究の一部は科学研究費 No. 62771264 によった。

Summary

A patient of ovarian cancer with hyperamylasemia was treated by chemotherapy and surgical specimens were obtained after the labelling *in vivo* with bromodeoxyuridine (BrdU).

Amylase was detected in the cytoplasm and BrdU was localized in the nuclei of neoplastic cells by immunoperoxidase method (IPX), and amylase positive cells showed no positive image of BrdU.

Labelling index, determined by IPX with anti-BrdU monoclonal antibody, revealed 11.6% and less than 1% before and after chemotherapy, respectively.

Since amylase was considered to express the characteristics of cytoplasm and BrdU showed the function of nuclei, it was seemed amylase and BrdU would be regard as independent parameters in the ovarian cancer. Immunohistochemical double staining, adopted on stamp smear, clarified the relation between the localization of amylase and that of BrdU at a time. Immunohistochemical double staining was regarded as a useful technique on histological and cytological reseaches.

文 献

- 1) Hoshino, T., et al. : Cell kinetic studies of *in situ* human brain tumors with bromodeoxyuridine, *Cytometry*, 6 : 627~632, 1985.
- 2) Hsu, S.M., et al. : Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, 30 : 1079~1082, 1982.
- 3) 松田壮正・他 : アミラーゼ産生卵巣癌の臨床病理学的研究, *日癌治誌*, 20 : 935~942, 1985.
- 4) 松田壮正・他 : アミラーゼと CA 125 を産生するエストロゲンレセプター陽性卵巣癌の1例—酵素抗体法2重染色による検討—, *日臨細胞誌*, 27 : 71~76, 1988.
- 5) Morstijn, G., et al. : Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody, *J. Clin. Invest.*, 72 : 1844~1850, 1983.
- 6) Nakane, P.K., et al. : Enzyme-labeled antibodies : Preparation and application for the localization of antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, 14 : 929~931, 1966.
- 7) 布川茂樹・他 : アミラーゼ産生を示した卵巣類内膜癌の1例, *日臨細胞誌*, 25 : 547~551, 1986.
- 8) Schutte, B., et al. : Studies with antibromodeoxyuridine antibodies : II. Stimulataneus immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by *in vivo* labeling of mouse intestinal mucosa, *J. Histochem. Cytochem.*, 35 : 371~374, 1987.