短 報

抗 PCNA モノクローナル抗体による増殖細胞の検出

——細胞診材料への応用——

山梨医科大学附属病院検査部

中澤久美子 石井 喜雄 弓納持 勉 早川 直美
長田美智子 貴家 基 久米 章司

I. 目 的

腫瘍における細胞増殖能の検出は、当該患者の予後の推定や治療の選択に重要な情報を与える。

従来、細胞増殖能の検出は BrdU (Bromodeoxyuridine) で行われてきたが、この方法は BrdU をあらかじめ取り込ませる前処理が必要であり、細胞診に利用するには制約があった。

そこで今回、細胞増殖能を免疫染色で容易に同定できる PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) のモノクローナル抗体²⁾を用いて細胞診応用への基礎的検討、特に固定液についての検討を行った。

II. 方 法

腫瘍のないリンパ節の捺印標本を用い、LSAB 法(DAKO)にて免疫染色を行った。一次抗体は Ig G₁ 抗 PCNA モノクローナル抗体(日科機)で、室温 10 分間反応させた。検討した固定法および固定時間は、表 1 のように①~⑤の各湿潤固定法と⑥である。また、酵

素処理(トリプシン)、界面活性剤処理(Triton X)、固定液の温度(-20°C、室温)の比較検討も行った。

III. 結 果

表 1 のようにメタノールとアセトン・メタノールの各固定において、PCNA の優れた染色性が得られた。特にメタノールでは、核の構造がよく保たれており、最も良好な結果が得られた(写真 1)。固定時間は 10 分でも染色されたが、1 日の方がより優れていた。酵素あるいは界面活性剤処理では、どの固定液においても染色性が不変または減弱した。固定温度は室温が -20°C より適していた。エタノール固定は、メタノール固定等にかなり劣るも若干の染色性が得られ、さらにメタノールで再固定すると染色性が向上した。また、過去の Papanicolaou 染色標本でもカバーガラス剝離後メタノールで再固定すると PCNA の染色が可能であった(写真 2)。乾燥固定では、後にどの固定液で再固定しても染色されず、また酵素処理も効果がなかった。

IV. 考 察

PCNA は初め SLE の患者血清中に増殖細胞の核と反応する自己抗体が発見され、この抗体を認識する抗原(増殖細胞核抗原)が PCNA と命名されたものである¹⁾。PCNA は DNA polymerase- δ の補助蛋白であることが判明し、細胞分裂に密接に関与している。したがって、PCNA に対するモノクローナル抗体は、細胞増殖能を免疫染色で容易に同定できるため、最近注目されており、特に筆者ら³⁾はホルマリン固定・パラフ

Demonstration of proliferating cell using anti-PCNA monoclonal antibody—practical application for cytological material—

Kumiko NAKAZAWA, C.T., I.A.C., Yoshio ISHII, C.T., I.A.C., Tsutomu YUMINAMUCHI, C.T., I.A.C., Naomi HAYAKAWA, C.T., I.A.C., Michiko OSADA, M.T., Motoi SASUGA, M.D., Shoji KUME, M.D.

Clinical Laboratory, Yamanashi Medical University

論文別刷請求先 ☎ 409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110 山梨医科大学附属病院検査部 中澤久美子

平成 3 年 6 月 12 日受付

平成 3 年 8 月 30 日受理

表 1 PCNA の固定液と固定時間による染色性の検討

固 定 液	10 分	30 分	1 時間	3 時間	1 日
① 95% エタノール	—	—	—	—	+/-
② メタノール	+	+	+	+	+
③ アセトン	—	—	—	—	—
④ アセトン・メタノール (1:1)	+	+	+	+	+
⑤ アセトン・エタノール (1:1)	—	—	—	—	+/-
⑥ 乾燥	—	—	—	—	—

写真 1 リンパ節捺印標本における PCNA の陽性像
(メタノール固定・1 日, ×1000)

写真 2 リンパ節捺印標本
Papanicolaou 染色 (a) 脱色後, メタノールで 1 日再固定した PCNA の免疫染色 (b) (陽性細胞: 矢印, ×1000)

イン包埋切片での応用を可能にした. 今回の検討から, 細胞診材料においても適当な固定条件下で PCNA の検出が可能であった. すなわち, メタノール固定が最も PCNA の抗原の保持に優れ, Papanicolaou 染色で使われる 95% エタノール固定では染色性がメタノール固定に劣るが, メタノールで再固定すると染色性の改善が認められた. このことより, 過去の Papanicolaou 染色標本でも PCNA の染色が可能となり, retrospective な検討が期待できる. なお, Papanicolaou 染色はメタノール固定でも十分染色が可能であり, PCNA の染色予定のときはあらかじめメタノールで固定するのが望ましい.

V. ま と め

抗 PCNA モノクローナル抗体を細胞診材料に応用するとメタノール固定で最も良好な染色性が得られ

た.

稿を終えるにあたり御指導, 御教示頂いた山梨医科大学病理学教室, 川生 明先生, 須田耕一先生, 加藤良平先生, 鈴木幸一先生に深謝致します. 本論文の要旨は第 32 回日本臨床細胞学会総会 (千葉, 1991) で発表した.

文 献

- 1) Miyachi, K. et al. : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells, J. Immunol., 121 : 2228~2234, 1978.
- 2) Ogata, K. et al. : Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication, Exp. Cell Res., 168 : 475~486, 1987.
- 3) 鈴木幸一・他 : 抗 PCNA モノクローナル抗体による増殖細胞の同定, 医学のあゆみ, 157 : 655~656, 1991.