原 著

上皮性卵巣腫瘍における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の免疫組織化学的検討

広島大学医学部産科婦人科学教室¹⁾, 県立広島病院産婦人科²⁾

山中伸一郎¹⁾ 永井 宣隆¹⁾ 村上 隆浩¹⁾ 松田 博²⁾
大濱 紘三¹⁾

当科で手術を行った上皮性卵巣腫瘍 116 例を対象とし, そのホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いて, 増殖細胞マーカーとしての有用性が示唆されている proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現をモノクローナル抗体 PC 10 (Novocastra 社) により免疫組織化学的に検索した。

卵巣腫瘍における平均 PCNA 標識率は, 悪性群 33.0%, 境界悪性群 12.5%, 良性群 3.4% で各群間に有意差が認められ, 病理組織学的に良性—境界悪性, 境界悪性—悪性の区別が難しい場合の診断の一助になり得ると考えられた。

また悪性群における化学療法前後の平均標識率は 35.0% および 26.1% でこの間に有意差 ($p < 0.05$) を認め, 化学療法の効果を細胞増殖能の低下として組織学的に判定することが可能と思われた。

PCNA 標識率と核分裂数との間には相関係数 0.57 ($p < 0.001$) の有意な相関が認められ, PCNA 標識率が核分裂数と同様に腫瘍の組織学的悪性度の指標として有用であることが示唆された。

Key words : Epithelial ovarian tumors—Immunohistochemistry—Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)—Mitotic activity

I. 緒 言

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は,

Immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in epithelial ovarian tumors

Shinichiro YAMANAKA¹⁾, M.D., Nobutaka NAGAI¹⁾, M.D., Takahiro MURAKAMI¹⁾, M.D., Hiroshi MATSUDA²⁾, M.D., Koso OHAMA¹⁾, M.D.

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Hiroshima University

²⁾Hiroshima Prefectural Hospital

論文別刷請求先: 〒734 広島市南区霞 1 の 2 の 3 広島大学医学部産科婦人科学教室 山中伸一郎

平成 4 年 7 月 15 日受付

平成 4 年 10 月 30 日受理

DNA polymerase δ の補助蛋白質として DNA 合成に関与し, 細胞の増殖サイクルの G1 後期から S 期にかけて細胞核内に出現することから, 増殖細胞マーカーとしての有用性が示唆されている。今回われわれは, 当科で手術を行った上皮性卵巣腫瘍 116 例について PCNA の発現を免疫組織化学的に検索するとともに核分裂数との関係も検討したのでその成績を報告する。

II. 対象および方法

1. 対象

1981 年から 1991 年までの 11 年間に広島大学産婦人科で手術を行った上皮性卵巣腫瘍 116 例 (表 1) を

表 1 対象症例

	例数	漿液性	粘液性	類内膜	明細胞
悪性群	79	38	15	19	7
化学療法前	61	25	14	17	5
化学療法後	18	13	1	2	2
境界悪性群	17	4	12	0	1
良性群	20	10	10	0	0
計	116	52	37	19	8

対象として、10%ホルマリンで24～48時間固定されたパラフィン包埋組織切片を用いた。

2. 方法

PCNAの検出は、ABC法により免疫組織化学的に行った。すなわち上記ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片をキシレンにより脱パラフィンした後、0.3% H_2O_2 加メタノール液にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。次に5%正常ウマ血清で非特異的染色を阻止した後、1次抗体としてマウス抗PCNAモノクローナル抗体(クローンPC10, Novocastra社)を用い、100倍希釈で4℃24時間反応させた。次に2次抗体としてビオチン標識抗マウスIgG抗体を加え30分間反応させた後、avidin-biotin peroxidase complexと30分間反応させた。最後に H_2O_2 -diaminobenzidine (DAB)で発色させ、メチルグリーンのcounter stainingを施した。また陰性コントロールとして、上記の1次抗体のかわりに正常マウス血清を用いてABC法を行い、発色しないことを確認した。次に上記染色標本を400倍で鏡検し、腫瘍細胞約1000個中に占めるPCNA陽性細胞数をカウントして症例ごとの陽性百分率(標識率)を算出した。PCNA陽性細胞判定基準を写真1に示した。

なお固定時間によるPCNAの染色性の変化をみる目的で、漿液性腺癌組織を3分割し10%ホルマリンで4時間、24時間、48時間固定してPCNA免疫染色を行い、染色性の相違を検討した。

また一部の悪性例については、100%エタノールで3時間固定したタッチスメアについても同様に染色・カウントし、組織標本と比較した。

さらにPCNA免疫染色標本の連続切片にH-E染色を行い、腫瘍領域中核分裂像の最も多い部分で400倍連続10視野あたりの核分裂数(/10 HPF)を算出し、PCNA標識率との相関を検討した。この際明らかなmetaphaseを示す核分裂像だけを数え、また核崩壊像と核濃縮像を除外した。

写真1 PCNA陽性細胞判定基準。細胞核が濃染(矢印1)～淡染(矢印2)している細胞を陽性とし、まったく染色されていない細胞(矢印3)のみを陰性と判定した。陽性細胞では核が顆粒状～びまん性に染色されている(PCNA免疫染色, ×1000)

写真2 粘液性腺癌。間質部・壊死部(*)を除いては、腫瘍細胞の核が明らかな局在傾向なくほぼ均一に染色されている(PCNA免疫染色, ×100)

III. 成 績

組織標本上でのPCNA陽性細胞の分布をみると、壊死部分ではまったく染色されず、また間質部でもほとんど染色されなかった以外は一定の局在傾向は認められず、特に悪性群では腫瘍部分全体がびまん性に染色されるものが多かった(写真2)。

10%ホルマリンで4時間、24時間および48時間固定した漿液性腺癌組織のPCNA免疫染色像を写真3に示した。固定時間の差による明らかなPCNA染色性の変化は認められなかった。

上皮性卵巣腫瘍におけるPCNA標識率を表2に示した。平均標識率は、悪性群33.0%、境界悪性群

写真3 漿液性腺癌。10%ホルマリンで4時間(a), 24時間(b), 48時間(c)固定した標本のPCNA免疫染色像では, 固定時間の差による明らかな染色性の変化は認められない(PCNA免疫染色, $\times 100$)

表2 上皮性卵巣腫瘍におけるPCNA標識率

	例数	mean $\pm$ SD(%)	
悪性群	79	33.0 $\pm$ 16.2	
化学療法前	61	35.0 $\pm$ 16.6	*1
化学療法後	18	26.1 $\pm$ 12.8	
境界悪性群	17	12.5 $\pm$ 7.5	*1
良性群	20	3.4 $\pm$ 4.6	

*1: $p < 0.001$, *2: $p < 0.05$

図1 上皮性卵巣腫瘍におけるPCNA標識率と核分裂数との相関関係 (●: 悪性例, ○: 境界悪性例, △: 良性例)

12.5%, 良性群3.4%でいずれの間にも有意差 ($p < 0.001$) を認めた。また悪性群を化学療法前と化学療法後に分けると, 平均標識率はそれぞれ35.0%, 26.1%で有意差 ($p < 0.05$) が認められ, 化学療法により細胞増殖能が低下することが示された。なお化学療法後の検体はいずれも1985年以降のもので, 化学療法のregimenはCAP (CPM, ADM, CDDP) であった。

またPCNA標識率と核分裂数との間には, 図1のごとく相関係数0.57 ($p < 0.001$) の有意な相関がみられた。

表3 上皮性卵巣腫瘍悪性群の化学療法前症例における組織型別PCNA標識率

	例数	mean $\pm$ SD(%)	
漿液性腺癌	25	26.6 $\pm$ 14.4	*2
粘液性腺癌	14	43.9 $\pm$ 14.7	
類内膜腺癌	17	35.9 $\pm$ 16.3	
明細胞腺癌	5	48.7 $\pm$ 6.9	

*1: $p < 0.001$, *2: $p < 0.01$

表4 上皮性卵巣腫瘍悪性群の化学療法前症例における進行期別PCNA標識率

	例数	mean $\pm$ SD(%)	
I期	20	34.9 $\pm$ 13.8	
II期	8	33.5 $\pm$ 9.7	
III期	27	33.2 $\pm$ 18.6	
IV期	6	45.2 $\pm$ 18.8	NS

NS: not significant

表5 上皮性卵巣腫瘍悪性群の化学療法前症例における分化度別PCNA標識率

	例数	mean $\pm$ SD(%)	
G1 (高分化)	35	34.9 $\pm$ 17.0	
G2 (中分化)	20	33.7 $\pm$ 17.0	
G3 (低分化)	6	36.0 $\pm$ 13.6	NS

NS: not significant

次に上皮性卵巣腫瘍悪性群の化学療法前症例 (61例) について組織型, 臨床進行期および組織分化度とPCNA標識率との関係を検討した。組織型別の検討では, 漿液性腺癌でのPCNA標識率が他の3型より低く, 細胞増殖能が他に比べて低い傾向がみられた (表3)。臨床進行期別では, 各進行期間に有意差はみられなかったものの, I～III期に比べIV期で高い傾向にあった (表4)。組織分化度別では, 分化度の違いによる標識率の有意な差は認められなかった (表5)。

また固定後経過した時間によるPCNA染色性の変化を検討するため, 化学療法前症例61例を1981～1985年の5年間の26例と1986～1991年の6年間の35例の2群に分け, おおのこのPCNA染色性を検討し, またPCNA標識率のmean $\pm$ SDを算出した。その結果2群間のPCNA染色性に差はみられず, またPCNA標識率のmean $\pm$ SDは1981～1985年の26例が36.1 $\pm$ 17.3%, 1986～1991年の35例が33.4 $\pm$ 15.4%で2群間に有意な差は認められなかった。

写真4に漿液性腺癌例 (PCNA標識率26.2%) の

写真 4 漿液性腺癌。タッチスメア (左) においても、組織標本 (右) とほぼ同様に染色されている (PCNA 免疫染色, $\times 100$)

組織およびタッチスメアの PCNA 免疫染色像を示した。タッチスメアにおいても組織標本とほぼ同様に染色され、タッチスメアの PCNA 免疫染色によっても細胞増殖能の検索が可能と考えられた。

IV. 考 察

PCNA は、一部の全身性エリテマトーデス患者血清中の抗核抗体が増殖細胞の核と特異的に反応することから見出された蛋白質で⁴⁾、細胞周期が速く回転する細胞ではその核内に多量に検出されることから cyclin とも呼ばれている¹⁾。また、PCNA は細胞周期の G1 後期から S 期 (DNA 合成期) にかけて細胞核内に出現し⁵⁾、DNA polymerase δ の補助蛋白質として DNA 合成に重要な役割を果たしていることが判明している²⁾。

増殖細胞抗原に対する免疫組織化学染色用の抗体として現在市販されている主なものに、Ki 67 抗体や抗 BrdU 抗体、抗 PCNA 抗体などがある。Ki 67 抗体は凍結切片での染色は可能であるが、ホルマリン固定パラフィン包埋切片は使用できない。また抗 BrdU 抗体は、パラフィン包埋切片の染色はできるが、前処置として細胞内に BrdU を取り込ませておくことが必要である。一方、抗 PCNA 抗体はホルマリン固定パラフィン包埋切片で染色できるため retrospective な検索が可能であり、また抗 BrdU 抗体のような前処置も必要なく、簡便で有用な増殖細胞マーカーである。

PCNA の細胞内での染色性については、抗 PCNA

抗体により細胞の核が染色され、核内では顆粒状のものからびまん性のものまで、また濃いものから淡いものまで認められたが、今回はこれらをいずれも陽性と判定した (写真 1 参照)。PCNA 陽性細胞の腫瘍組織における分布については壊死部分ではまったく染色されず、また間質部でもほとんど染色されなかった以外は一定の局在傾向は認められず、特に悪性群では腫瘍部分全体がびまん性に染色されるものが多かった (写真 2 参照)。これにより悪性群では壊死部分や間質部を除く腫瘍部分の細胞増殖能がほぼ均一に亢進しているものが多いと考えられた。

PCNA と他の増殖細胞検索法との相関性を示す報告としては、Ki 67 標識率と PCNA 標識率との間に $r=0.76$ ($p<0.05$) の相関を認めたとするもの⁷⁾、PCNA 標識率とフローサイトメトリーによる増殖細胞分画がほぼ一致することを示したもの³⁾、固形悪性腫瘍において PCNA 標識率が組織学的悪性度や核分裂数に相関することを示したもの⁶⁾などがある。

今回のわれわれの検討でも、PCNA 標識率と核分裂数との間には相関係数 0.57 ($p<0.001$) の良好な相関がみられ、PCNA が核分裂数と同様に腫瘍細胞の増殖能の指標として有用であることが示唆された。

これまでに、卵巣腫瘍における PCNA 発現を検索した報告は少ない。澤田ら⁷⁾は、卵巣腫瘍のうち PCNA 標識率が 31% 以上であったのは、良性群 0/5 (0%)、境界悪性群 0/6 (0%)、悪性群 11/17 (65%) であり、腫瘍の癌化とともに PCNA 標識率が上昇するところから、PCNA は腫瘍の悪性度の指標として用いることを報告している。われわれの検討でも、上皮性卵巣腫瘍における平均 PCNA 標識率は良性群 3.4%、境界悪性群 12.5%、悪性群 33.0% で、いずれの間にも有意な差が認められ、病理組織学的に良性一境界悪性、境界悪性一悪性の区別が難しい場合の診断の一助になり得ると考えられた。

また悪性群において、化学療法前に比べて化学療法後で PCNA 標識率が有意に低値であったことより、細胞増殖能の低下を指標とする化学療法効果の推定がある程度可能と考えられた。

今後は PCNA 陽性細胞の判定基準および PCNA 標識率と長期予後との関連性などについてさらに検討していきたい。

本論文の要旨は、第 33 回日本臨床細胞学会総会 (1992 年 6 月、福岡) で発表した。

Summary

We used an immunohistochemical technique to determine whether monoclonal antibody (PC 10) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) could be useful as a marker of proliferating cells with formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of 116 epithelial ovarian tumors. The mean labeling rate for PCNA was 33.0% in the malignant group (79 cases), 12.5% in the borderline-malignant group (17 cases) and 3.4% in the benign group (20 cases), showing significant differences among all groups. The mean labeling rate for PCNA in the malignant group was significantly higher, 35.0%, in the prechemotherapy group (61 cases) than in the postchemotherapy group (18 cases : 26.1%). These results suggest that the decrease in proliferating activity in the malignant cases with PCNA staining may be attributable to chemotherapy. Furthermore, there was a positive correlation ($r=0.57$) between the labeling rate for PCNA and mitotic activity. These results suggest that PCNA is a useful marker for distinguishing malignant tumors and assessing mitotic activity.

文 献

- 1) Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., et al. : Identification

of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportion are sensitive to changes in the rate of cell proliferation, *Exp. Cell Res.*, 136 : 311~319, 1981.

- 2) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., et al. : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta, *Nature*, 326 : 515~517, 1987.
- 3) Garcia, R.L., Coltrera, M.D., Gown, A.M. : Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues, *Am. J. Pathol.*, 4 : 733~739, 1989.
- 4) Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M. : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells, *J. Immunol.*, 121 : 2228~2234, 1978.
- 5) 守内哲也 : PCNA/DNA ポリメラーゼ の補助蛋白質とその遺伝子, *蛋白質核酸酵素*, 33 : 1179~1185, 1988.
- 6) Robbins, B.A., de la Vega, D., Ogata, K., et al. : immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 111 : 841~845, 1987.
- 7) 澤田益臣, 上田外幸, 井上正樹・他 : 婦人科腫瘍並びに関連病変における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の免疫組織学的検討, *日産婦誌*, 44 : 181~187, 1992.