原 著

多発性骨髄腫における Ag-NORs 染色の臨床的意義

静岡赤十字病院臨床検査部¹⁾, 金沢大学医学部第3内科²⁾大畑 雅彦¹⁾ 中村 忍²⁾ 岡部 洋子²⁾

本研究では多発性骨髄腫 multiple myeloma : MM の骨髄標本における Ag-NORs 染色を試みた。MM の Ag-NORs 染色で得られたドットは、数・大きさ・染色パターンに多様性があった。われわれは、ドットの染色パターンにより独自の scoring system を考案し、臨床の場で応用されている病期分類、形態分類と対比して検討を行った。この scoring system は、病期分類に比し形態分類とよく相関していた。また、total score ≥ 300 群は生存期間が有意に短く予後不良であった。total score < 200 群は、ゆっくりした経過をとり化学療法なしに観察できる症例と思われた。経過を観察し得た症例では、病勢を反映して Ag-NORs の染色パターンが変化した。Ag-NORs は、MM の予後因子として、また治療選択の上からも重要な指標として臨床的意義は大きく、本 scoring system は実用的なものであると考えられた。

Key words : Multiple myeloma—Ag-NORs—Scoring system—Prognosis—Proliferation

I. はじめに

Nucleolar organizer regions (NORs) は、核小体形成に関与する DNA のループで、ribosomal RNA の前駆体の生成に関与している¹⁾。NORs は、ヒトでは第 13, 14, 15, 21 および 22 染色体に局在し²⁾、これに関連する蛋白は強い銀親和性を有することから、コロイド銀液により細胞核内にドット (dot) 状に染め出すことができ³⁾、argyrophilic proteins of the

nucleolar organizer regions (Ag-NORs) と称されている。

Ag-NORs の数および形状は、種々の悪性腫瘍において悪性度に応じて変化するので、腫瘍細胞の増殖能を表わす指標の一つとして注目され、臨床にも利用されつつある^{1,4,5)}。本研究では、多発性骨髄腫 (multiple myeloma, MM) における Ag-NORs 染色の臨床的意義を検討する目的で、MM 患者の骨髄標本を用いて Ag-NORs 染色を行い、著者らの考案した scoring system⁶⁾ に従い観察したので報告する。

II. 対象および方法

1) 対象

1985~1991 年までに、静岡赤十字病院内科で診断、治療した MM 29 例を対象とした。MM の診断には、加納ら⁷⁾の診断基準を用いた。年齢分布は、45~86 歳 (平均 64.3 歳) であった。MM の異常免疫グロブリン (M 蛋白) のタイプは、IgG 型 18 例、IgA 型 6 例、Bence-Jones protein (BJP) 型 4 例、IgD 型 1 例で

Clinical significance of Ag-NORs-staining in multiple myeloma

Masahiko OHATA¹⁾, M.T. Shinobu NAKAMURA²⁾, M.D., M.I.A.C. Youko OKABE²⁾, M.D.

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

²⁾Third Department of Internal Medicine, Kanazawa University School of Medicine

論文印刷請求先 ☎ 420 静岡県静岡市追手町 8 の 2 静岡赤十字病院臨床検査部 大畑雅彦

平成 5 年 7 月 8 日受付

平成 5 年 10 月 29 日受理

あった。正常対照として、悪性リンパ腫 (clinical stage I) 10 例, 特発性血小板減少性紫斑病 5 例の計 15 例の骨髓塗抹標本の形質細胞を用いた。年齢分布は, 40~73 歳 (平均 56.3 歳) であった。MM の病期分類は, Durie および Salmon⁸⁾ の基準を, また形態分類は, Greipp ら⁹⁾ の基準を用いた。

2) 方法

Ag-NORs 染色は, Crocker ら¹⁾ の方法に準じて以下の 2 通りの方法で行った。① 未固定標本を用いる場合には, 4°C の buffered acetone formalin (BAF) で 30 秒固定した後⁵⁾, 流水水洗を行い, Ag-NORs 染色を施行した。② ギムザ染色標本では, 99% エタノールにて一昼夜脱色した後水洗し, Ag-NORs 染色を施した。骨髓標本は各例ごとに 2 枚用意し, そのうち 1 枚は Ag-NORs 染色後, 対染色としてギムザ染色を 10~20 秒間行い, 染色性の比較を行った。注意深く焦点を合わせながら油浸系強拡大 (1000 倍) で検鏡し, 正常対照では 50 個の形質細胞

について, MM では 200 個の骨髓腫細胞について, それぞれ Ag-NORs ドットをカウントし, scoring system⁶⁾ を用いてそのパターンを % で表示した。Ag-NORs 染色態度は, 図 1 のように大きく 3 つのパターンに分類できた。すなわち, ① 核内に一様に散在しドット状に染色されるもの。これを核内のドット数により I 型 a~d に分類した。② 核小体内にドット状に染色されるもの。これらを核小体内のドット数により II 型 a~c に分類した。③ 3 μ m 以上の大型ドットまたは 3 μ m 以上の不整形ドットを核内に有するものを III 型と表現した。また, それぞれの type の score に出現頻度 (%) を乗じて得た値 (score $\times$ %) を合計し, total score とした。ドットのサイズは, OLYMPUS ミクロメーターを用いてそれぞれの症例について 50~100 個の形質細胞あるいは骨髓腫細胞にみられる最も大きなドットの直径を測定し, その平均値を求めた。統計学的検討では, 病期分類および形態分類の各群間の比較には ANOVA の検定を用い, 生存率の検定には Kaplan-Meier 法を用いた。

Type	No. of Ag-NORs	Score	Staining pattern
I a)	1~2	1
b)	3~5	2
c)	6~9	3
d)	≥ 10	4
II a)	1~5 in nucleolus	3
b)	6~9 in nucleolus	4
c)	≥ 10 in nucleolus	5
III	large ($\geq 3\mu$ m) dot or irregular	5

図 1 Scoring System of Ag-NORs in Myeloma

写真 1 BAF+Ag-NORs stain ($\times 100$)

表 1 Stainability of Ag-NORs and cells in different fixatives

固定条件	細胞の染色性	Ag-NORs の染色性	
		I 型	II・III 型
BAF	1 年以内放置	良好	良好
	1 年以上放置	不良 (薄い)	不良 (判別困難)
		黒褐色のドットが認められない	
メタノール (ギムザ標本脱色)	褐色調が強い	良好	良好

表2 Ag-NORs total scores and proportion of Ag-NORs type II and III according to fixatives

固定条件	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
BAF (1年以内)	288.0 (50.0%)	371.0 (90.0%)	407.5 (97.0%)	197.5 (34.0%)	286.5 (69.5%)
メタノール (ギムザ標本脱色)	299.5 (51.5%)	409.0 (94.5%)	385.0 (92.0%)	205.0 (39.5%)	269.0 (63.0%)

(上段 total score, 下段 II・III%)

写真2 postdecolorization Ag-NORs stain (×100)

写真3 May-Giemsa stain (×100)

写真4 postdecolorization Ag-NORs stain. Giemsa stain (-) (×100)

写真5 postdecolorization Ag-NORs stain. Giemsa stain (+), (↑) Myeloma cell (×100)

III. 成績

1) Ag-NORsの染色性

Ag-NORs染色は、室温にて1年以上未固定で保存してあった骨髓標本では、ほとんど黒褐色ドット状に

染まらず観察が困難であった(表1)。したがって未固定標本は、標本保存期間が1年以内のものを対象とした。1年以上経過している骨髓標本については、ギムザ染色を99%エタノールにて脱色した後、Ag-NORs染色を施した。BAF固定では、黒褐色ドットがきわめて明瞭であった。メタノール固定(ギムザ標

本)でも Ag-NORs の染色性は良好であったが, 細胞全体の褐色調が強く, 特にII型のドットの判別がやや困難な症例もあった。しかし, total score, および II・III% に両者間に差を認めなかった (表 1, 2, 写真 1, 2)。Ag-NORs 染色後, ギムザ液にて対染色を施すと, 形質細胞と骨髓腫細胞の細胞質は弱く好塩基性に染まり, 骨髓中に存在するほかの細胞との鑑別が容易となった (写真 3~5)。

2) 病期分類と Ag-NORs

MM における Ag-NORs の total score, II・III型の占める割合 (II・III%), II型の中のcおよびIII型の占める割合 (II c・III%) および平均ドット直径は, 病期の進行とともに大きくなる傾向がみられたが, 各病期間で有意な差は認められなかった (図 2)。

3) 形態分類と Ag-NORs

total score の $\bar{X} \pm SD$ は, 正常形質細胞 149.8 ± 23.7 , mature myeloma 161.3 ± 18.8 , intermediate myeloma 212.0 ± 55.8 , immature myeloma 318.8 ± 77.8 , plasmablastic myeloma 402.0 ± 61.6 と分化型から未分化型になるにつれて漸次上昇した。形態分類上 total score ($P < 0.005$), II・III% ($P < 0.005$), およびドット直径 ($P < 0.05$) で各群間にそれぞれ有意な差を認めた (図 3)。

4) 病期および形態分類と Ag-NORs 各分画パターン

各病期および各形態の scoring パターンを正常対象と比較すると, mature type の MM は正常とよく類似したパターンを示した。しかし, 形態分類で分化型から未分化型になるに従い, 核内ドットの増加とともに II・III型の比率も増加していく傾向がみられた。病期の進行に従っても同様の傾向が認められたが, その程度は形態分類の方がより顕著であった (図 4)。

5) 骨髓中の骨髓腫細胞の占める割合 (%) および血清中M蛋白量と Ag-NORs

表 3 に示すように骨髓中の骨髓腫細胞の%およびその実数と Ag-NORs の total score, II・III%, II c・III% および平均ドット直径との間には, 有意な相関は認められなかった。また, M蛋白量に関しては量の多い症例で, total score, II・III% が高値である傾向がみられたが, 有意な相関は認められなかった。

6) Ag-NORs と生存率

図 5 に示すように total score < 300 の群では, ≥ 300 の群と比較して有意 ($P < 0.01$) に生存期間の延長が認められた。同様に, II・III% $< 50\%$ の群で $\geq 50\%$ の群と比較して有意に生存期間の延長が認められた。ドット直径では, $\geq 3 \mu m$ の群と $< 3 \mu m$ の群

図 2 Ag-NORs score distribution in each stage of MM

図3 Ag-NORs score distribution in different morphological type of MM

図4 Ag-NORs scoring patterns according to stages and morphological types of MM

で比較したが、生存期間に有意な差は認められなかった。しかし、ドット直径 $\geq 3\mu\text{m}$ 群では、2年以内に死亡する例が多い傾向がみられた(表3)。

7) 症例呈示(図6)

56歳, 女性。平成2年, IgG κ type のMMと診断された。初診時のAg-NORsは, 図6Aのパターンで, II・III% 70%, total score 450であった(写真

6)。VAD療法(vincristine, doxorubicin, dexamethasone)を2回, さらにcyclophosphamide (CY) 50 mg/日およびprednisolone (PSL) 10 mg/日を投与され, M蛋白は消失した。平成2年4月27日施行の骨髄標本(図6c)のAg-NORs染色では, III型が消失し, II・III% およびII c・III%の減少がみられた。しかし, 平成3年2月7日, IgG 5797 mg/

図5 Survival curves according to Ag-NORs total score (Kaplan-Meier)

dI と急増し、再入院となった。

再入院時の骨髄では骨髄腫細胞が著増し、Ag-NORs 染色 (図6D) ではⅢ型が53%と大部分を占めていた (写真7)。入院後VAD療法を施行したが平成3年3月2日咯血し、左主気管支閉塞を起こし、さらに敗血症を併発して、3月11日敗血症ショックにて死亡した。

IV. 考 案

MMの診断は、骨髄穿刺ならびに生検標本の細胞組織学的所見、骨所見、血清中のM蛋白によりなされ、比較的容易である。しかし、治療に対する反応性ならびに予後は、個々の症例で大きな差異があり適切

表3 The relationship of proportion of myeloma cells in bone marrows and amount of M-protein to Ag-NORs

Case	age	(sex)	diagnosis	lg		Stage	BM			Ag-NORs			
				type	amount (mg/dl)		morphological type**	NCC ($\times 10^4/\mu l$)	Plasma cell (%)	Total Score	II・III (%)	IIc・III (%)	Dot diameter (μm)
1	74	(F)	MM	(G・ κ)	3000	I A	A	22.9	21.0	149	9	5	2.42
2	51	(F)	MM	(G・ κ)	3880	I A	A	19.6	8.4	183	27	0	1.48
3	63	(M)	MM	(G・ κ)	3650	I A	C	11.3	12.2	217	45	2	2.65
4	70	(F)	MM	(G・ κ)	3260	I A	C	2.6	21.2	259	50	7	2.12
⑤	69	(M)	MM	(G・ κ)	3454	I A	C	6.4	10.2	426	90	70	3.59
6	62	(M)	MM	(G・ λ)	3382	I A	D	15.0	22.0	340	72	35	2.79
⑦	73	(F)	MM	(G・ κ)	2890	I A	D	47.4	12.6	310	78	9	2.79
8	60	(M)	MM	(G・ λ)	3450	I B	B	40.6	31.6	168	13	0	1.67
9	45	(M)	MM	(A・ κ)	4190	IIA	A	66.0	30.2	152	40	0	2.07
⑩	65	(F)	MM	(G・ κ)	3910	IIA	B	5.1	51.8	279	38	2	2.48
*11	57	(F)	MM	(A・ κ)	3830	IIA	B	13.2	13.2	164	8	3	1.90
12	79	(M)	MM	(A・ κ)	4100	IIA	C	9.3	26.8	261	44	1	1.89
13	72	(F)	MM	(A・ λ)	4127	IIA	C	7.3	8.0	340	93	3	2.47
⑭	66	(M)	MM	(BJP・ κ)		IIA	C	2.6	9.0	342	74	24	2.36
⑮	80	(F)	MM	(G・ κ)	3470	IIA	C	7.5	40.0	482	100	87	4.27
⑯	86	(M)	MM	(G・ κ)	4880	IIB	C	8.0	11.2	242	45	0	2.40
⑰	56	(F)	MM	(G・ κ)	3100	IIB	D	22.0	20.2	450	70	52	3.97
18	78	(F)	MM	(G・ κ)	3630	IIIA	B	13.4	44.4	237	6	0	1.87
19	67	(M)	MM	(A・ κ)	5367	IIIA	C	5.7	59.4	337	95	2	—
20	57	(F)	MM	(A・ κ)	4210	IIIA	C	6.1	46.6	254	33	1	2.35
21	54	(F)	MM	(G・ κ)	9320	IIIA	C	35.5	42.6	353	95	3	2.67
⑳	59	(M)	MM	(G・ λ)	10535	IIIA	C	8.8	72.0	321	67	9	2.89
㉑	51	(F)	MM	(BJP・ λ)		IIIA	D	3.0	35.6	422	98	29	—
㉒	55	(F)	MM	(G・ κ)	11200	IIIA	D	12.4	33.3	456	94	63	—
25	54	(M)	MM	(BJP・ λ)		IIIB	C	11.5	53.8	197	4	0	2.32
㉔	62	(M)	MM	(D・ λ)	34889 μm	IIIB	C	—	29.2	389	85	20	3.02
㉕	57	(F)	MM	(BJP・ κ)		IIIB	C	15.3	21.2	372	67	59	2.59
㉖	72	(M)	MM	(G・ λ)	11800	IIIB	C	10.7	59.8	309	61	5	1.95
㉗	70	(M)	MM	(G・ κ)	6410	IIIB	D	40.2	94.2	434	91	69	3.36

○ decease within 2 years

* cases of very slow progression observed since 1979

** A : Mature

C : Immature

B : Intermediate

D : Plasmablastic

図6 Clinical course and sequential change in Ag-NORs in a case with IgG-K MM

写真6 Case 17(A). Giemsa stain (+) ($\times 100$)

写真7 Case 17(D). Giemsa stain (+) ($\times 100$)

な治療法の選択が難しい。そのために、診断時に治療に対する反応性、延いては予後を予測する方法の開発が望まれている。

Durie および Salmon⁸⁾ は、MM の病期を骨髄腫細胞の量に対応した所見、すなわちM蛋白量、Hb 量、Ca 量、骨病変および腎機能を指標とした病期分類を

提唱し、治療反応性や予後とよく相関することを報告している。また、Greipp ら⁹⁾ は骨髄塗抹標本の骨髄腫細胞を形態学的に4型に分類し、その中の plasmablastic myeloma は生存期間が10ヵ月とほかの型に比べて有意に短いこと、腎不全の合併と骨髄腫細胞のトリチウムチミジンの labeling index (LI) の上昇

とが相関することを報告している。ほかにも、いくつかの予後因子が報告されているが¹⁰⁾、まだ十分に信頼性のあるものとはいえない。われわれは細胞の増殖に関与する蛋白のひとつで、すでに造血器腫瘍、特にリンパ腫¹¹⁾および白血病⁹⁾で検討が進められている Ag-NORs およびその染色が MM にも臨床応用できないかと考え検討した。

MM における Ag-NORs の染色性をみると、ドット数、形状ともに症例によりさまざまであった。そこでわれわれは、ドットの染色パターンとその数の組み合わせにより分類する scoring system⁶⁾を考案し、数値化することを試みた。さらに得られた成績を、Durie および Salmon⁸⁾の病期分類ならびに Greipp ら⁹⁾の形態分類と対比し検討した。その結果、Ag-NORs は、形態分類と有意に相関することが明らかとなった。Ag-NORs は、一般に細胞の活動性を表す指標とされており、そのドットの数や分布は、細胞の増殖と機能の状態に応じて変化する¹²⁾。Hall ら¹¹⁾は、non-Hodgkin's lymphoma において Ki-67 陽性細胞とドット数との間に強い相関関係があったと報告をしている。また、Giri ら⁴⁾は、乳癌で Ag-NORs のドットが 3 個以上の群では、DNA aneuploidy の比率が有意に高いと述べている。さらに Nairn ら¹³⁾は甲状腺疾患における Ag-NORs を観察し、機能亢進症においてもドット数の増加を認めている。また、われわれも、本 scoring system が細胞の増殖マーカーである Ki-67 および PCNA の陽性細胞比率と有意な相関関係を示すことを報告している⁶⁾。このように Ag-NORs は、細胞の増殖能を含めた一般的な活動性を反映する指標となりうるものと考えられる。今回の MM における検討でも、形態学的悪性度とよく相関し、客観的な指標として十分に臨床上利用できるものと考えられた。また、病期との関係においても、病期の進行とともに total score および II・III 型の比率が増加する傾向が認められた。

MM の寛解導入には、アルキル化剤単独使用と多剤併用とがある。特に最近、病期の進行した例では、初回治療に VAD 療法を用いて強力に治療することにより良好な成績が得られるようになってきている^{14,15)}。しかし、強力な化学療法は骨髄抑制などに伴う chemotherapy death の危険性を有しており、治療法の選択には慎重を期す必要がある。今回の生存率の検討から、Ag-NORs の total score ≥ 300 、II・III% ≥ 50 、また IIc・III% の高い症例は予後不良と推

測されるので、初回より積極的に多剤併用療法を行うべきと考えられる。一方、total score < 200 の症例は無治療で経過を観察することも考慮してよいと思われる。今回観察した中で症例 11 は、昭和 54 年発症の、きわめて進行の遅い IgA κ type の MM で、Ag-NORs の total score も 164 と低値であった。本例では、発症時にごく短期間化学療法を行ったが、これ以外は無治療で経過を観察し、現在も生存中である。このように Ag-NORs 染色の scoring system は治療法を決定するうえで十分に役立つものと考えられる。また、経過を観察する際には、Ag-NORs の染色パターンの推移を知ることが重要である。症例を呈示した T・M 例 (症例 17) は、再発時 IgG の急増とともに III% の著明な上昇を認め、臨床所見ともよく一致していた。

V. 結 語

Ag-NORs は、簡便であり、本 scoring system を用いて定量化することにより予後の推定など、臨床上きわめて有用な情報が得られ、MM の日常検査として十分導入が可能であると考えられる。さらに、MM における細胞増殖動態を観察する上でも役立つものと思われる。

本論文の一部は、北國がん基金 (第 6 回、平成 4 年度) の援助を受けた。記して感謝の意を表する。

Summary

In order to clarify the clinical significance of argyrophilic proteins of nucleolar organizer region (Ag-NORs)-staining in multiple myeloma (MM), bone marrow smears obtained from 29 MM patients were stained by the Ag-NORs-staining procedure, and the smear of each patient was classified according to the newly designed Ag-NORs-scoring system for MM. The Ag-NORs scores reflected well progression of the clinical stage of MM. Furthermore, the scores closely correlated with the morphological classification of MM according to Greipp et al. There was also a significant relation between the Ag-NORs scores and prognosis; the survival times of patients having Ag-NORs scores of 300 or more were significantly shorter than those whose scores were less than 300. The Ag-NORs-staining and our scoring system are very helpful for understanding the proliferation

potential of MM and are useful for choosing appropriate treatments.

文 献

- 1) Crocker, J., Nar, P. : Nucleolar organizer regions in lymphoma, *J. Pathol.*, 151 : 111~118, 1987.
- 2) Ferguson-Smith, M.A., Handmaker, S.D. : Observations on the satellited human chromosomes, *Lancet*, 1 : 638~640, 1961.
- 3) Ploton, D., et al. : Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level, *Histochemical J.* 18 : 5~14, 1986.
- 4) Giri, D.D., et al. : Silver-binding nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in benign and malignant breast lesions : correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry, *J. Pathol.*, 157 : 307~313, 1989.
- 5) 中村 忍・他 : Nucleolar organizer region (NOR) 銀染色の血液塗抹乾燥標本への応用, *日血会誌*, 53 : 559~566, 1990.
- 6) 大畑雅彦・他 : 多発性骨髄腫における Ag-NORs 染色の有用性 (新しい Ag-NORs scoring system と細胞増殖マーカーとの関係について), *医学のあゆみ*, 161 : 883~884, 1992.
- 7) 加納 正 : 骨髄腫と特発性単クローン性免疫グロブリン血症の境界領域をどのように考えるか, *臨床免疫*, 6 : 352~358, 1983.
- 8) Durie, B.G.M., Salmon, S.E. : A clinical staging system for multiple myeloma, Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival, *Cancer*, 36 : 842~854, 1975.
- 9) Greipp, P.R., et al. : Multiple myeloma : Significance of plasmablastic subtype in morphological classification, *Blood*, 65 : 305~310, 1985.
- 10) 小阪昌明・他 : 骨髄腫・マクログロブリン血症, *現代医療*, 21 : 2353~2364, 1989.
- 11) Hall, P.A., et al. : A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma, *Histopathology*, 12 : 373~381, 1988.
- 12) 高橋正宜・他 : 癌細胞分化誘導と核小体オルガナイザー域 (NORs) の変動, *医学のあゆみ*, 123 : 800~802, 1982.
- 13) Nairn, E., et al. : Limited value of AgNOR enumeration in assessment of thyroid neoplasma, *J. Clin. Pathol.*, 41 : 1136, 1988.
- 14) Samson, D., et al. : Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma, *Lancet*, 2 : 882~885, 1989.
- 15) 藤井康彦・他 : 多発性骨髄腫に対する VAD 療法の治療効果—特に初回治療例に対する有用性について—, *臨床血液*, 32 : 280~282, 1991.