短 報

細胞標本における増殖細胞抗原測定のための基礎的検討

総合病院土浦協同病院中央検査科¹⁾, 同 病理科²⁾, 同 呼吸器外科³⁾池田 聡¹⁾ 木村 博¹⁾ 深沢 徳行¹⁾ 鈴木 恵子²⁾ 船越 尚哉³⁾

I. はじめに

腫瘍の悪性度を推定する意味でその腫瘍の増殖能を測定することは大変意義が深い。しかし、細胞診材料を用いて増殖能を測定するためにはいまだ検討が十分とはいえない。今回われわれは捺印細胞標本を用いて増殖能を測定するうえで必要な抗体と固定法の選択について検討を行い、さらに組織標本との相関についても比較検討を行ったので報告する。

II. 方法および対象

1. 抗体と固定法の選択

10例の胃および大腸の腺癌捺印標本を用いて抗体と固定法の検討を行った。抗体はPCNA (PC-10, DAKO社, 50倍希釈)とKi-67 (MIB-1, IM-MUNOTECH社, 70倍希釈)を用いた。固定法については合計で9通りの条件について検討した。なお、固定時間はすべての条件で1日間に統一して行った(表1)。結果については特に測定のしやすさに注目して評価し、陽性陰性がよく判別でき、非特異な反応のないものを良好とした。

2. PCNA・Ki-67の陽性率の比較

PCNA・Ki-67の陽性率の比較を16例の大腸腫瘍(進行癌10例, m癌3例, 腺腫3例)のメタノール固定捺印細胞標本を用いて行った。陽性率の測定につい

ては、核内にDABの発色が確認できるものをすべて陽性とし、発色強度や染色態度については考慮しなかった。

3. Ki-67の細胞標本と組織標本における陽性率の相関

組織標本についても2.と同じ対象を用いて同様に陽性率を測定した。組織材料はホルマリン固定パラフィンブロックの3 μ m厚切片を用い、前処理としてpH 6.0のクエン酸buffer中で、市販の出力500Wの電子レンジを用いて3分×5回の抗原賦活処理を行った。なお、一次抗体の反応時間は1時間とし、染色にはLSABキット(DAKO社)を用いた。細胞標本については途中でブロッキングキット(VECTOR社)を併用し内因性のビオチンを除去した。陽性率の測定には1例あたり4~6視野を選定し対物40倍で写真撮影を行い、そのプリント上の細胞について細胞標本で500個以上、組織標本で1000個以上の細胞を測定対象とした。

表1 抗体と固定法の選択。最も良好なものを◎, 比較的良好を○, わかりづらいものを△とした。

	固定法 (前処理を含む)	評価
PCNA	① 95% エタノール	○
	② メタノール	◎
	③ 0.1% Triton X-100 添加 PBS 4°C, 30 分間処理の後メタノール	○
	④ Triton X-100 1% 添加メタノール	○
	⑤ 4% PFA 水溶液, 4°C 10 分間処理の後メタノール	△
	⑥ アセトン, 4°C 10 分間処理の後メタノール	△
Ki-67	⑦ 95% エタノール	◎
	⑧ メタノール	◎
	⑨ アセトン, 4°C	○
	10 分間処理の後メタノール	

Fundamental study for cell proliferation potential with cytosmear

Satoshi IKEDA¹⁾, C.T., I.A.C., Hiroshi KIMURA¹⁾, C.T., I.A.C., Noriyuki FUKAZAWA¹⁾, C.T., I.A.C., Keiko SUZUKI²⁾, M.D., Naoya FUNAKOSHI³⁾, M.D.

¹⁾Department of Clinical Laboratory, ²⁾Department of Pathology, ³⁾Department of Thoracic Surgery, Tsuchiura Kyodo General Hospital

論文別刷請求先 ☎ 300 茨城県土浦市真鍋新町11の7 総合病院土浦協同病院中央検査科 池田 聡

平成6年4月7日受付

平成6年7月1日受理

写真 1 a:メタノール固定 PCNA 染色像, 核と同時に胞体にも発色がみられ, 陽性陰性の鑑別がしづらい ($\times 40$). b:メタノール固定 Ki-67 染色像, 非特異な反応がほとんどなく核内に限局して発色し, 陽性陰性の鑑別は容易である ($\times 40$)

III. 結 果

1. 結果は表 1 に示す通りとなった. PCNA においてはメタノールが最も良好であったが同時に背景や胞体にも共染しやすく, 症例によっては算定が困難であった. Triton X-100 を用いた場合, 共染はなくなるが同時に核の萎縮が著明に起きるため測定困難となった. PFA, アセトンの使用も染色性を弱め, 測定困難となった.

一方, Ki-67 では PCNA と比較して非特異な反応はほとんどなく, 核内に限局した発色が得られ全般的にクリアな染色結果が得られた. 固定液はエタノール, メタノールが良好であった.

最も良好な結果が得られたメタノール固定における PCNA および Ki-67 の染色像を写真 1 に示す.

2. PCNA と Ki-67 の陽性率を比較すると, その平均値は PCNA で $70.4 \pm 13.8\%$, Ki-67 で $49.5 \pm 14.6\%$ となり PCNA は有意に高値となった (t 検定 $p < 0.001$). さらに PCNA と Ki-67 の陽性率の相関も $r = 0.55$ ($p < 0.05$) となりあまり良好ではなかった (図 1 a).

3. Ki-67 の陽性率は細胞標本, 組織標本のどちらを用いてもその平均値, 変動係数に t 検定で有意差を認めなかった (細胞 $49.5 \pm 14.6\%$, 組織 $48.8 \pm 11.5\%$). また, 両者の相関係数は $r = 0.87$ ($p < 0.01$) とおおむね良好であった (図 1 b).

図 1 a: PCNA と Ki-67 の陽性率の比較, 相関係数 $r = 0.55$ ($p < 0.05$) となった
b: Ki-67 の細胞標本と組織標本における陽性率の相関, 相関係数 $r = 0.87$ ($p < 0.01$), 回帰式 $y = 0.69X + 14.74$ となった

IV. 考 察

細胞増殖能の検索を行うことは腫瘍の悪性度などを推定する意味で重要である. PCNA はすでに多数の報告がなされ, 増殖細胞抗原としての有用性は確立されつつある¹⁾. しかし一方ではその半減期の長さが指摘されており²⁾, 今回の検討でも PCNA は Ki-67 と比較して高い陽性率が観察された.

ところで, 細胞診材料を免疫組織化学的に用いる場合, 標本が作製しやすい, 脱パラフィンなどの操作が不要, 抗原の保持が良好であるなどの利点があり, 今回良い結果が得られた Ki-67 (MIB-1) についてはエタノール, メタノールなどの通常用いられる固定液で良好な標本が得られ, またパラフィン切片を用いた場合に必要な抗原賦活処理も不要である.

これらのことより細胞診材料を用いて増殖能の検索を行う場合, Ki-67 (MIB-1) を用いることにより測定が容易で安定した結果が期待できることがわかった.

文 献

- 1) 中澤久美子・他: 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—, 日臨細胞誌, 30: 1210~1211, 1991.
- 2) 辻 竜彦・他: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点, 日口外誌, 38: 1055~1058, 1992.