Peroxidase-antiperoxidase 法による膀胱癌組織に おける血液型抗原の検索

福島労災病院泌尿器科 藤 岡 知 昭
(部長: 千葉隆一)

DETECTION OF BLOOD-GROUP ANTIGENS IN URINARY BLADDER CANCER TISSUE BY PEROXIDASE-ANTIPEROXIDASE METHOD

Tomoaki Fujioka

Department of Urology, Fukushima Rosai Hospital
(Director: Prof. Ryuichi Chiba)

Recognition of the innate aggressiveness of a bladder cancer early in the course of the disease would greatly facilitate management, and potentially identify those tumors which are likely to recur and invade.

Recently, several investigators have reported on the significance of the detection of blood-group ABO(H) antigens on the surface of bladder tumor of the Specific Red Cell Adherence (SRCA) test. This test, in many cases, proved to be a valuable tool for predicting the behaviour of non-invasive tumors.

However, the SRCA test has limitation. First, the procedure does not reliably detect the O(H) antigen. Furthermore, it is very difficult to locate the antigen in tissue by the SRCA test because the absorbed red blood cells covered morphological details of the specimen.

In this study, the Peroxidase-antiperoxidase (PAP) method was employed to detect the antigens in 23 cases of human bladder cancer. The PAP method is more sensitive and easier to perform than the SRCA technique, and displays the PAP reaction and histopathology of the tissue on the same slide. And the PAP staining could show the exact location of the antigen in reference to well preserved tissue structures.

The PAP method was estimated to be more suitable than the SRCA test for detection of ABO(H) antigens in human bladder tumors.

要旨: 膀胱癌症例においてその進行過程を予測することは治療法を選択する上で重要である。近年 Specific Red Cell Adherence (SRCA) 試験による ABO (H) 抗原の有無と膀胱癌の予後との関係が注目を浴びている。しかし SRCA 試験は感度の上で O 抗原の検索に問題があり、また組織に吸着した赤血球が組織構造を被覆するために同一標本における病理組織所見の検討が困難などである。今回著者らは PAP 法により 23 例の膀胱癌組織の血液型抗原を検索した。PAP 法は SRCA 試験と比較し、より鋭敏な反応であり、またその施行は容易である。さらに同一組織薄切標本上で PAP 反応と病理学的検討を同時に可能とせしめる。しかも PAP 法によれば微細な段階での抗原の存在を知りうる。本法は ABO 抗原の検査としてよりふさわしいものと考えらる。

緒 言

膀胱表在癌の治療において、その症例が浸潤癌に進行する可能性を予測することは、その治療法を選択において重要である。近年膀胱癌組織内の血液型抗原の存在はその予後を予測する因子として注目を浴びている。しかしながら、通常この抗原の検査に用いられる Specific Red Cell Adherence (SRCA) 試験は数々の

問題を有している¹⁾。つまり、SRCA 試験においては、O (H) 抗原の検索は難しいとされ、さらには組織に吸着した赤血球が微細構造を被覆するために抗原の存在を組織及び細胞段階で知り得ないなどである^{2)~4)}。

今回著者らは SRCA 試験の欠点を補うべく、免疫組織化学である Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法を採用し膀胱癌症例の ABO (H) 抗原を検索したが、

この方法と従来の SRCA 試験とを比較検討することにより若干の知見を得たので報告する。

検索対象

対象はカリフォルニア大学ロスアンゼルス校医学部泌尿器科にて、膀胱癌の診断のもとに治療を受けた23症例である。このうち12例は最低4年間浸潤癌に進行することのなかった表在癌であり、残りの11例は根治的膀胱全摘除施行症例である。おのおのの症例より1～4種の平均3 μ mのパラフィン包埋薄切標本を作製し、脱パラフィン後 Tris 緩衝生食により洗浄した。

(PAP 法)

PAP 法は Stersberg の方法に準じた⁵⁾(第1図)。組織内因性ペルオキシターゼの破壊と組織中 IgG の Fc-receptor による非特異反応を阻止する目的で3%過酸化水素で5分間、さらに5%卵アルブミンで20分間処理した⁶⁾。

血液型 A 及び B の検体において、第一抗体(1:5希釈抗 A 又は B 人血清)*で1時間、第二抗体(1:20希釈ヤギ抗人免疫グロブリン)**で30分間、さらに最後にチンパンジー PAP(1:10希釈)で30分間、それぞれ順次湿潤容器内にて感作させる。血液型 O の検体においては、まず Ulex europaeus agglutinin I***の0.05M Tris 緩衝液(0.03ng Lectin/ml)にて12時間以上感作させる。さらにウサギ抗 Ulex 抗体(1:10希釈)にて1時間、豚抗ウサギ免疫グロブリン(1:10希釈)及びウサギ PAP(1:50希釈)***でそれぞれ30分間、標本

第1図 Principle of PAP technique

* Dades Division

** Biotics

*** Vectors Lab.

を被い放置した。名抗体処理の間では未反応な余分な抗体を取り除くために Tris 緩衝生食により充分洗浄をくり返した。最後に発色反応液中にて3分間染色、さらにヘマトキシリンにて再度核染色を行なった。発色反応液は10mg 3-amino-9-ethyl carbazole の6ml dimethyl sulfoxide 溶解液、0.4ml の3%過酸化水素及び0.02M Na-acetate 緩衝液(pH 5.0～5.2)より構成されている。標本はグリセロールゲラチンにて封入した。

おのおのの検査には試薬対照、組織対照及び組織内対照が含まれている。第一段階において、まず抗血液型血清の代わりに血液型 AB の人血清を、また Ulex の代わりに Tris 緩衝生食を使用した。またおのおのの抗体、PAP の非特異反応が存在しないことも確認した。陽性組織対照としてアルコール固定した各型赤血球****、正常膀胱移行上皮組織及び正常前立腺組織を用いた。標本内の血管内皮及び赤血球を陽性組織内対照とし、筋組織、線結合組織を陰性対照とした(第2図)。

抗血液型抗体及び Ulex はそれぞれ各型赤血球****による抗体吸収試験を行ない、その特異反応性が確認された。赤血球は Tris 緩衝生食で洗浄後、抗血液型血清(1:1希釈)及び Ulex (0.1mg Lectin/ml)と混合、37℃で2時間放置、その後その浮遊液より遠心分離により抗体と反応した赤血球を取り除いた。この過程においてある程度の溶血は不可避であり、その結果吸収後血清及び Ulex はペルオキシターゼを含有することになる。よつてこのペルオキシターゼを破壊するために抗血液型血清及び Ulex で感作後再び検体を3%過酸化水素にて処理をした。

(SRCA 試験)

SRCA 試験は Kovarik の方法に準じた⁷⁾。4 μ m のパラフィン薄切標本を脱パラフィン後まずヘマトキシリンにて核染色した。A 及び B 型血清にて15分間、Ulex で60分間、湿潤容器内にて標本を感作した。未反応抗体及び Ulex を15分間 Tris 緩衝生食にて洗浄除去後、それぞれ同型の赤血球で検体を被った。A 及び B 型例では15分間、O 型例では30分間放置後、Tris 緩衝生食で満たしたペトリ皿にて反転させ、未吸着な赤血球を底部に静かに沈下させた。さらに2%グルタルアルデヒドで固定し、最後にエオジンにて再染色した。

**** Dako Corp.

***** Biological Corp. of America

第1表 PAP reaction of red blood cells and bladder tissues with antiblood-group serum and Ulex.

specimen (antigen)	primary serum or Ulex.			
	Anti-A	Anti-B	Ulex	AB serum* or TBS**
A-red cells	+	-	-	-
A-tissue	+	-	-	-
B-red cells	-	+	-	-
B-tissue	-	+	-	-
O-red cells	-	-	+	-
O-tissue	-	-	+	-

*Negative control in A and B cases. 1:5 dilution
**Negative control in O cases. 0.05 M Tris buffered saline, pH 7.4.

第3表 PAP and SRCA reaction of the superficial bladder tumor alood-goup antigens

Blood group	Specimen	PAP reaction	SRCA reaction
O	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	-
	5	+	-
	6	+	-
A	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+
	10	+	-
B	11	+	+
	12	+	-

第2表 PAP reaction of absorbed antiblood-group serum and Ulex

specimen (antigen)	Anti-A* serum absorbed with		
	A-red cells	B-red cells	O-red cells
A-red cells	-	+	+
A-tissue	-	+	+
	Anti-B serum* absorbed with		
	A-red cells	B-red cells	O-red cells
B-red cells	+	-	+
B-tissue	+	-	+
	Ulex** absorbed with		
	A-red cells	B-red cells	O-red cells
O-red cell	+	+	-
O-tissue	+	+	-

* 1:1 dilution. ** 0.1 mg lectin/ml

対照として検体と異型血清及び赤血球をそれぞれ反応させた。組織対照及び組織内対照はPAP法と同様である。

(検査結果の判定)

PAP反応及びSRCA試験は陽性及び陰性とのみ判定し定量的評価は見合わせた。PAP法において検体組織の10%以上が反応を示した場合陽性とし、SRCA試験においてはWeinsteinの2+以上を陽性とした⁸⁾。

結 果

第1表に示すごとく、抗血液型抗原とUlexはそれぞれの設定された濃度で特異性を示し、またおの

第4表 Detection of blood-group antigens with the PAP method in 11cystectomy cases

Blood -group	Case No.	Path. diagnosis	PAP reaction of tissue *			
			Normal	Atypia	CIS ¹	TCC ²
O	1	pTis, G 2, N 0, M 0		+	+	
	2	pT1, G 1, N 0, M 0		-	-	+
	3	pT1, G 1, N 0, M 0		+		+
	4	pT3, G 3, N 0, M 0	+	-	-	-
	5	pT3, G 3, N 0, M 0	+	+	-	-
	6	pT3, G 3, N 0, M 0	-	-	-	-
A	7	pTis, G 2, N 0, M 0	+	+	+	
	8	pT1, G 3, N 0, M 0	-	-	-	
	9	pT2, G 1, N 0, M 0	+	+		+
	10	pT2, G 3, N 0, M 0	-	-	-	-
B	11	pTis, G 2, N 0, M 0		-	-	
Total			4/7	5/10	2/8	3/8

* Histopathological evaluation of various areas of cystectomy specimen
1 CIS : Carcinoma in situ, 2 TCC : Transitional cell carcinoma

第2図 Severe atypia of bladder (Blood-group O) Positive PAP reaction. ($\times 600$)
Endothelial cells of vessels constitute built-in positive control.

第3図 Transitional cell carcinoma, pT2, G3, NO, MO. The endothelium of many small vessels contained showed positive PAP reaction in spite of negative PAP staining of the cancer tissue.

おのの間には相互反応を示さない。さらに抗体及び Ulex の特異反応は各型赤血球による吸収試験により確認した(第2表)。

第3表は12例の表在膀胱癌症例における SRCA 試験と PAP 反応を比較した。これら表在癌は最低4年間浸潤癌に進行しなかつた症例であり、陽性組織対照となりうるものとする。PAP 反応は表在癌全例において陽性(抗原の存在)を示したのに対し、SRCA 試

験では5例において陰性(抗原の不在)を示した。しかも O 型6症例において SRCA 試験では3例で陽性を示したにすぎなかつた。

PAP 法による染色標本においては、抗原の存在の有無と同時に病理組織所見の検討を同時に同一標本で行うことが可能である。第4表は11例の膀胱全摘症例における PAP 反応と病理所見との関係である。限られた症例ではあるが ABO (H) 抗原の存在は原発腫瘍の

進展度よりも病理組織学的分化度と相関するよう思われ、また随伴性上皮内癌及び浸潤癌には血液抗原が存在しない点が興味深く今後の検討を要する。

考 案

膀胱癌組織において、その血液型抗原の検索に SRCA 試験は有効な手段であることは疑う余地がない。しかしその検査施行においては種々の問題を有している。偽陽性 (false positive) を防ぐためには未反応な余分の赤血球を洗浄により取り除かなければならない。一方、不注意で過剰な洗浄は組織に吸着した赤血球をも排除し、偽陰性 (false negative) を示すことになる。特に反応の弱い O 型症例の検索においては繊細な注意が必要である。一方、PAP 法はその複雑な施行過程にもかかわらず、手技的に容易でしかも再現性にすぐれているものと考ええる。

血液型 O 型症例において、SRCA 試験による O (H) 抗原の検索は疑問が多い。Askari らは O 型膀胱癌症例の 91% は検査しうる O 抗原が存在しないと報告している⁴⁾。Coon と Weinstein は SRCA 試験は、剖検により得た血液型 O の正常尿管移行上皮組織の 1/3 において O 抗原の存在を示さないとし、現在広く行なわれている SRCA 試験は膀胱癌組織における O 抗原の検査にふさわしくないと述べている⁹⁾。今回著者らの成績で O 抗原の検索において PAP 法は SRCA 試験と比較して、より鋭敏に反応することを確認した (第 3 表)。

最も重要な PAP 法の長所は SRCA 試験や蛍光抗体法では明確にすることができない微細な抗原の存在を検査する点にある。さらに同一標本において PAP 反応は通常の病理組織的検索を妨害しないという点である。今回の症例において ABO (H) 抗原が細胞表面または細胞表面と細胞質内の両方に存在する 2 種に分類することが可能である。一方 SRCA 試験では吸着した赤血球が標本組織を被覆するので病理組織及び細胞段階での構築は検討できない (第 4 表)。

ある種の膀胱癌組織は多数の小血管を含有している。このような症例においては癌組織陰性にもかかわらず陽性組織内対照であるが血管内皮が著明な PAP 陽性を示す場合がある (第 3 図)。一方 SRCA 試験では吸着した赤血球が組織構造を被うので抗原の正確な位置を知り得ない。よってこのような症例においては SRCA 試験偽陽性を示す可能性がある。一方 PAP 法

においては同様の現症に起因する偽陽性は非常に少ないものとする。

ま と め

PAP 法は血液型 A 及び B 型のみならず、O 型症例においてもその血液抗原を検査しうる感度とともに施行手技は容易である。PAP 法は膀胱癌症例の検査法として推奨できるものと考えられる。

本論文の要旨は第 407 回日本泌尿器科学会東京地方会で発表した。稿を終えるにあたり、御指導を賜った恩師 J.B. deKernion 教授に心より感謝致します。

References

- 1) Cummings, K.B.: Carcinoma of the bladder: Predictor. *Cancer*, **45**, 1849—1855, 1981.
- 2) Denk, H., Tappeiner, G., Davidovits, A., Eckertorfer, R. and Holzner, J.H.: Carcinom-bryonic antigen and blood group substances in carcinomas of the stomach and colon. *J.N.C.I.*, **53**, 933—942, 1974.
- 3) Emmott, R.C., Javadpour, N., Bergman, S.M. and Soares, T.: Correlation of the cell surface antigens with the stage and grade of the bladder. *J. Urol.*, **121**, 37—39, 1979.
- 4) Askari, A., Colmenares, E., Saberi, A. and Jarman, W.D.: Red cell surface antigen and its relationship to survival of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, **125**, 182—184, 1981.
- 5) Sternberger, L.A.: The unlabeled antibody peroxidase peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In *Immunocytochemistry*. p. 107—167, Willey Medical Publication, New York, 1979.
- 6) Zeher, D.R.: Use of hydrogen peroxide-egg albumin to eliminate non-specific staining in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 415—416, 1978.
- 7) Kovarik, S., Davidson, I. and Stejskal, R.: ABO antigens in cancer. *Arch. Path.*, **86**, 12—21, 1966.
- 8) Wwinstein, R.S., Alroy, J., Farrow, G.M., Miller A.W. III. and Davidoshn, I.: Blood group isoantigen deletion in carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer*, **43**, 661—668, 1978.
- 9) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Variability in the expression of the O(H) antigen in human transitional epithel. *J. Urol.*, **125**, 301—306, 1981.

(1982年3月26日受付)