Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を用いた 表在性尿路腫瘍及び膀胱の Carcinoma in situ の ABH 同種抗原の検索

北海道大学医学部泌尿器科 佐々木 絹子

THE STUDY OF ABH ISOANTIGEN OF SUPERFICIAL UROTHELIAL TUMOR AND CARCINOMA IN SITU OF THE BLADDER BY THE AVIDIN-BIOTIN PEROXIDASE COMPLEX (ABC) METHOD

Kinuko Sasaki

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine
(Director: Prof. Tomohiko Koyanagi)

ABH isoantigen of 154 superficial urothelial tumor including 11 carcinoma in situ of the bladder was investigated by the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method, and the results were compared with those obtained by the specific red cell adherence test (SRCA).

Antigenicity as detected by ABC method seemed to be correlated to tumor grade and recurrence rate, while that by SRCA method did not. 62 percent of the low grade papillary bladder tumor of blood group other than O was positive by ABC method, while only 25 percent was positive by SRCA method. As for the recurrence rate of low grade tumor, 11 of 33 cases (33%) with positive ABH showed recurrence during the minimum 3 years' followup period, while 13 of 21 cases (62%) without ABH isoantigens did so in blood group other than O. In carcinoma in situ of the bladder, it was found that ABH antigen was deleted in 82 percent of the patients using ABC method. Even among the patients who were initially positive by both methods, antigenicity tended to be deleted as clinical course progressed.

The advantages of ABC method are: 1) it is more sensitive and more specific than SRCA and peroxidase anti peroxidase (PAP) method, 2) in blood group O, the sensitivity was increased, 3) the technique is simple, and 4) many slides can be processed at one time. In view of the fact, however that the urothelial tissues processed in alcohol show variable reduction of their reactivity, it was suggested that the current method needs to be reappraised for accurate interpretation of tissue ABH reactivity.

要旨: 膀胱腫瘍119例, 腎盂尿管腫瘍34例, 膀胱の Carcinoma in situ 11例の計154例について血液型物質の有無を Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 法を用いて検索し, SRCA 法と比較した。

ABC 法でみると, 抗原の陽性率と grade 及び再発率の間には有意の相関がみられたが, SRCA 法では相関がみられなかった。O 型以外の low grade 膀胱腫瘍では ABC 法の陽性率は62%であつたが, SRCA 法ではわずか25%であつた。low grade の膀胱腫瘍の再発率をみると, ABC 法陽性は33例中11例(33%)再発しているのに比べ, 陰性では21例中13例(62%)が再発していた。膀胱の Carcinoma in situ では11例中9例(82%)が ABC 法陰性であり, 最初 ABC 法でも SRCA 法でも陽性であつたものが, 経過と共に陰性になつていく例がある事が分かつた。

ABC 法の利点として, ① SRCA 法に比べても, PAP 法に比べても感度が非常に高く, back ground も低く特異的である。② 故に O 型についても感度が増した。③ 3 step なので操作が簡単。④ 一度にかなり大量の染色が可能。⑤ 判定が比較的容易 などの利点があるが, パラフィン切片はその過程で特に腫瘍では型物質がアルコールに溶け出してしまうという報告があるので今後, 方法論的な検討を要すると思われる。

緒 言

癌化に伴う細胞膜の生化学的構造的変化、特に細胞膜の糖脂質及び糖蛋白の変化が重要な意味をもつことが最近明らかにされてきている。血液型物質 ABH 同種抗原は、これら細胞膜複合糖質より成っているが、人の多くの上皮細胞及び内皮細胞に分布し¹⁾、癌化に伴い減弱ないし消失する事より、尿路上皮腫瘍においても、その有無が腫瘍の予後を決める上で重要な関係がある事が以前より示唆されている。組織内の血液型物質の検討は、光学顕微鏡レベルでは、1968年 Kovarik 等²⁾が開発した特異的赤血球付着法 Specific red cell adherence test (SRCA 法) が良く知られているが、その他にも蛍光抗体法³⁾や Peroxidase anti peroxidase (PAP) 法⁴⁾があり、又、電子顕微鏡レベルではバクテリオファージ T₄をマーカーとする免疫学的標識法⁴⁾等により行われてきている。しかし SRCA 法は手技が煩雑な上に判定に迷う事も多く、更に H 型物質に関しては、はつきりしない点も多いという欠点があった。今回、私達は Avidin-Biotin-Peroxidase Complex 法⁵⁾ (以下 ABC 法と略す) を用いる事により、血液型物質の組織化学的検出を容易にかつ、より特異的なものとする事が出来たので本法と従来の SRCA 法とを比較検討した。対象は当教室の過去13年間の膀胱腫瘍119例と腎盂尿管腫瘍34例、それに最近の膀胱の Carcinoma in situ 11例で、これ等について同種抗原の検出を試み悪性化に伴う同種抗原の消失の程度と組織学的異型度との相関、又、再発率、予後との関係について検討し併せて血液型物質の検出法に関する最近の文献的考察を加えた。又、少数ながら正常の腎実質の血液型物質についても観察した。

対象及び方法

【対象】当教室の昭和44年以降の grade 0—1, pT₁ 以下の膀胱腫瘍と、53年以降の入手可能なすべての膀胱腫瘍 (計119例)、昭和44年以降の腎盂尿管腫瘍 (計34例)、それと最近5年間の膀胱の Carcinoma in situ 11例 (以下 CIS と略す、primary 9, secondary 2) を対象とした。腫瘍は病理組織学的にすべて初発の移行上皮癌を選んだ。grading と staging は、日本泌尿器科学会膀胱癌取扱規約に従って分類し、grade 0—I, 78例、grade II—III, 41例であつた。以上いずれも約4μの10%ホルマリン固定のパラフィン切片で行つた。

【方法】抗 A, 抗 B, 抗 AB 血清はともに血液型判定用標準血清を用いた。抗 H は europeus agglutinin I

(vector 社) を用いた。

I) ABC 法⁶⁾ (表1) (図1) Avidin は鳥類の卵白等に存在する蛋白質の一種であり、Biotin はビタミン H であるがこの両者の結合力は非常に強く抗原抗体反応の1000倍以上であるといわれる。Avidin と Biotin の結合は、1個の Avidin に4個の Biotin が結合し、非常にはずれずらい。この Avidin-Biotin 複合体が解離するのは0.45% H₂O₂の中での酸化、120℃15分の加熱あるいは6—8M のグアニジン pH1.5というような条件であり非常に結合が強く安定である。このような性質から高感度、高特異性が期待出来る免疫組織化学法といえる。手順は次の通りである。

- ① 組織片を脱パラする。
- ② 0.3% H₂O₂ methanol 溶液で30分(内因性ペルオキシダーゼの block)
- ③ 磷酸緩衝液で5分間、2回洗浄
- ④ 10%正常豚血清を10分間作用させる。
- ⑤ 第1次抗体：各々の血液型に合った抗血清を40倍希釈して2時間室温、その後4℃で一晩置く。O 型に関してはビオチン化 ulex europeus I を同様に作用させる。
- ⑥ 磷酸緩衝液で5分間、3回洗浄

表1 染色方法

(A, B, AB型)	(O型)
抗 A, 抗 B, 抗 AB ヒト血清	Biotin 化 ulex I
↓	↓
Biotin 化抗 ヒト IgM + IgG	(H 型特異レクチン)
↓	↓
Avidin-Biotin-Peroxidase Complex	
↓	
DAB 反応	

図1 正常尿路上皮、ABC 法陽性、陽性部は茶色で1目で分かる。約×180

⑦ 第2次抗体：A, B, AB型はビオチン化 anti-human IgG+IgM を30分間作用させる。

⑧ 磷酸緩衝液で5分間, 3回洗浄

⑨ Avidin-Biotin-Peroxidase Complex を30分間, 室温で作用させる。

⑩ 磷酸緩衝液で5分間, 3回洗浄

⑪ トリス緩衝液 (pH7.6) を使つて Diaminobenzidin 反応を行う→陽性は Dark Brown に発色する。

⑫ 核染 (hematoxylin 染色)

⑬ 封入

反応の control として通常の免疫組織反応の際に用いられる種々の control 実験を行い, 反応の特異性を確認した。更に標本内の赤血球, 血管内皮細胞は ABC 法陽性なので built in positive control とし, 結合織, 筋肉組織は ABC 法陰性なので built in negative control に用いた。判定基準は, ABC 法では腫瘍の25%以上が dark brown に発色している場合を陽性, それ以下の場合を陰性としたが, O型では判定基準を少しゆるめ, 腫瘍の10%程度の発色でも陽性とした。

II) SRCA 法²⁾⁸⁾ (図2) 赤血球は各血液型の健康人より, その都度採取し, pH7.4 トリス緩衝液にて3回以上, 上清が透明になるまで洗浄し, 1%赤血球浮遊液を作成した。さらに非特異反応を防ぐために, 補体を非活性化した AB 血清を全体の浮遊液の5%程度入れた。手順は次の通りである。

① 組織片を脱パラ, 水洗した後, hematoxylin で染色。

② 水洗後, トリス緩衝液に入れる。

③ トリス緩衝液をふき取り, 湿潤室に並べ, それぞれの血液型に合った抗血清又は抗 H を充分にのせる (抗 A, 抗 B は30分, 抗 H は3時間)

④ トリス緩衝液にて15分間ずつ3回洗浄

⑤ 標本の上に各血液型に合った前述の1%indicator 赤血球をのせて湿室中に15分放置

⑥ 別に, トリス緩衝液を入れたシャーレに棒状片2本を置き, 試料を反転させて10分間置く, これによって, 切片面に附着しない赤血球は切片を離れてシャーレの底に沈降する。

⑦ 10分後, トリス緩衝液を静かに吸引し, 2% glutaraldehyde を含む Millonig 緩衝液で室温30分固

図3 a low grade tumor SRCA 法。正常上皮には少々赤血球が附着しているが腫瘍部は不明瞭。約×90

b aの拡大。ABC法。正常上皮は陽性反応。約×180

c bの拡大。ABC法。腫瘍への移行部分で, ABC反応が陽性から陰性になつていくところがよく分かる。又腫瘍部にも散在性に陽性部分がある。約×360

図2 正常尿路上皮 SRCA 法陽性。約×90

定.

- ⑧ 蒸留水で3回軽く水洗
 - ⑨ Eosin 染色
 - ⑩ 封人
- 判定はABC法に準じた

結 果

図1はABC法の、図2はSRCA法のそれぞれ正常上皮における反応であり、全層が陽性反応を示している。

(I) SRCA との比較

SRCA法で陰性と思われる症例でも、ABC法で行うと陽性に、即ち茶色に発色する傾向が強かった。図3aの如く、SRCA法では赤血球の附着が不明瞭で判定がつかねる症例もABC法でみると正常部は茶色

に発色して抗原性を示し腫瘍の部分は発色していない(図3b)。しかしさらにこれを拡大すると(図3c)腫瘍部の細胞も散在性に染まったものがあつて抗原の消退はall or noneではない事が分かる。今回行つたSRCA法の陽性率は非常に低く(表2a, 表3)膀胱腫瘍では、A, B, AB型のlow gradeの54例中14例(25%), high gradeでは25例中2例(8%)であり、O型ではさらに低かつた。

又、low gradeの再発率をみても、SRCA陽性の再発率5/13(39%), SRCA陰性の再発率19/35(54%)でやはり有意の相関はみられなかつた。一方、腎盂尿管腫瘍は膀胱腫瘍よりは陽性率が高く、A, B, AB型ではlow gradeの9例中4例(44%) high gradeの12例中1例(8%)が陽性であり、以上の結果からは

表 2

a) 膀胱腫瘍とABC法, SRCA法の関係
A, B, AB型

	ABC法(+)	ABC法(-)	SRCA法(+)	SRCA法(-)
grade 0-1	37/60 (62%)	23/60 (38%)	14/56 (25%)	42/56 (75%)
grade 2-3	3/27 (11%)	24/27 (89%)	2/25 (8%)	23/25 (92%)

O型

	ABC法(+)	ABC法(-)
grade 0-1	3/22 (14%)	19/22 (86%)
grade 2-3	1/16 (6%)	15/16 (94%)

b) low grade膀胱腫瘍の再発とABC法,
SRCA法の関係
ABC法

	ABC法(+)	ABC法(-)
再発(+)	11/33 (33%)	13/21 (62%)

SRCA法		
	SRCA法(+)	SRCA法(-)
再発(+)	5/13 (39%)	19/35 (54%)

表 3 腎盂・尿管腫瘍とABC法, SRCA法の関係

A, B, AB型

	ABC法(+)	ABC法(-)	SRCA法(+)	SRCA法(-)
grade 0-1	8/ 9 (89%)	1/ 9 (11%)	4/ 9 (44%)	5/ 9 (56%)
grade 2-3	2/12 (17%)	10/12 (83%)	1/12 (8%)	11/12 (92%)

O型

	ABC法(+)	ABC法(-)
grade 0-1	2/ 3 (67%)	1/ 3 (33%)
grade 2-3	0/10 (0%)	10/10 (100%)

SRCA 法の陽性率と grading の間には相関はみられなかった。膀胱の Carcinoma in situ 例では、最初 SRCA 法陽性であったものは11例中2例(18%)であったが、終局的にはすべて陰性となった。

(II) ABC 法での染まり方の pattern

正常上皮ではほぼ全層に染まっているのに対し、腫瘍では尿路上皮の被蓋細胞のみ染まっているもの(図4)や、基底膜部分が主に染まっているもの(図5)など様々であり、一般的には、まだら状に染まるものが多かった(図6)。low grade のものはよく染まり、high grade のものは染まらない傾向にある事は確かであるが、中には high grade で染まるもの(図7)や、low grade でも染まらないもの(図8)もあった。又、SRCA 法ではほとんど陰性であった O 型の腫瘍も図9、図10の如くに染色されるものも出て来た。異型性のない O 型の上皮では図11の様に良く染色され特に扁平化している部分にも強い染色がみられた。

(III) ABC 法による膀胱腫瘍(表2 a, 表2 b)

膀胱腫瘍は A 型55人, B 型22人, AB 型10人, O 型

38人であり、これは血液型の分布(A:O:B:AB=4:3:2:1)とほぼ一致するが A 型が若干多い様である。まず A, B, AB 型でみると、low grade の60例中 ABC 法陽性は37例(62%)、ABC 法陰性は23例(38%)であり、high grade の27例中、ABC 法陽性は3例(11%)陰性は24例(89%)であり、ABC の反応と grade との間には有意の相関($p<0.01$)が認められた。O 型

図6 low grade tumor ABC 法陽性。約×90

図4 low grade tumor ABC 法陽性。被蓋細胞のみ染まっている。約×90

図7 high grade tumor であるにもかかわらず ABC 法陽性の部分がある。約×90

図5 low grade tumor ABC 法陽性。基底膜部分だけ染まっている。約×90

図8 low grade tumor ではあるが ABC 法陰性。ただし↑部分は血管内皮でこは陽性である。約×360

図9 O型 low grade tumor ABC法陽性部分. 約×360

図10 O型 low grade tumor ABC法陽性部分. 約×360

図11 O型の異型性のない上皮, 扁平化している部分(↑印)もABC法陽性. 約×90

では, low grade 22例中 ABC 陽性は 3 例 (14%), 陰性は 19 例 (86%) であり, 判定基準をかなり甘くしたにも拘わらず, 他の型に比し, 陽性率と陰性率が逆転していた。O 型の high grade 16 例では陽性が 1 例 (6%), 陰性 15 例 (94%) であり, O 型だけでみると

ABC の反応と grade との間には有意の相関は認められなかった。

low grade の膀胱腫瘍患者について, A, B, AB 型の 3 年以上経過観察出来た 54 例で, ABC の反応と腫瘍再発との関連を検討した (表 2 b)。ABC 法陽性で再発をみたものは 33 例中 11 例 (33%) で, 一方 ABC 法陰性で再発をみたものは 21 例中 13 例 (62%) みられ, ABC の反応と腫瘍の再発の間には有意の相関 ($p < 0.05$) が認められた。O 型では 3 年以上経過観察出来たのは 14 例でありこのうち ABC 法陽性は 3 例であるが再発をみたものはなく (0%) ABC 法陰性 11 例中再発をみたものは 5 例 (45.5%) であったが症例数が少なく ABC の反応と腫瘍の再発の間には有意の差はなかった。

(IV) ABC 法による腎盂尿管腫瘍 (表 3)

当教室の 1969 年から 1980 年までの腎盂尿管腫瘍 34 例 (A 型 10 例, B 型 8 例, O 型 13 例, AB 型 3 例) について調べた。A, B, AB 型では low grade 9 例中 ABC 法陽性は 8 例 (89%) ABC 法陰性は 1 例 (11%), high grade の 12 例中, ABC 法陽性は 2 例 (17%), ABC 法陰性は 10 例 (83%) であり, ABC の反応と grade との間には有意の相関 ($p < 0.01$) があつた。O 型 13 例のうち low grade の 3 例では ABC 法陽性 2 例 (67%) 陰性 1 例 (33%), high grade の 10 例ではすべて ABC 法陰性であつた。O 型では症例数が少く, ABC 反応と grade との間に相関はみられなかった。

(V) 膀胱の Carcinoma in situ (表 4)

1976 年以降の膀胱の Carcinoma in situ 11 例 (primary 9 例, Secondary 2 例) について, 抗原性の推移を経時的に観察した。SRCA 法で陰性と思われる症例でも ABC 法で染色すると陽性にみえる, 即ち抗原性がまだあると思われるものが多かった。症例(1)の病理組織はほとんど Brunn's nest から成っていたが核の異型性はかなり高く CIS を疑われた。図 12 の如く, SRCA 法は陰性であるが ABC 法は陽性であつた。病変は局所的であり経尿道的に切除されたが 5 年後に再発した。この時も同様に SRCA 法陰性, ABC 法陽性であつた。症例(2)と(4)は SRCA 法 ABC 法いずれも陰性であつた。症例(3)は最初の CIS 診断時 SRCA 法も ABC 法も陽性であつた。膀胱全剝を勧めるも拒否され, 結局 2 年後から全尿路に及ぶ浸潤癌となつていつた症例であるが, その経過中, SRCA 法疑陽性, ABC 法陽性の時期が一時あるも, 明らかな浸潤癌となつた時点ではすでに SRCA 法も ABC 法も陰性となつている。症

図12a CIS 症例(1). SRCA 法陰性. 約×90
b 同一症例. ABC 法陽性. 約×90

図13a US 症例(6). SRCA 法陰性. 約×90
b 同一症例. ABC 法陽性. 約×90

表4 CIS 症例と SRCA 法, ABC 法

I. Primary CIS			
	標準本採取法	SRCA 法	ABC 法
(1) M.T.	① TUR	(－)	(＋)
	② TUR	(－)	(＋)
(2) R.N.	① 生 検	(－)	(－)
	② 全 剔	(－)	(－)
(3) S.S.	① 生 検	(＋)	(＋)
	② 生 検	(±)	(＋)
	③ 全 剔	(－)	(－)
(4) K.K.	① 生 検	(－)	(－)
	② 全 剔	(－)	(－)
(5) M.K.	① 生 検	(－)	(＋)
	② 全 剔	(－)	(＋)
(6) K.T.	① 生 検	(±)	(＋)
	② 生 検	(＋)	(＋)
	③ 生 検	(－)	(＋)
	④ 全 剔	(－)	(－)
(7) T.K.	① 生 検	*	(－)
	② 全 剔		(－)
(8) T.N.	① 生 検	*	(－)
(9) T.I.	① 生 検	*	(－)
	② 全 剔		(－)
II. Secondary CIS			
(10) M.K.	① 最初の乳頭状腫瘍	(－)	(－)
	② CIS	(－)	(－)
(11) S.N.	① 最初の乳頭状腫瘍	(＋)	(＋)
	② CIS	(－)	(－)

例(5)は生検時も全剔時も SRCA 法陰性, ABC 法陽性であつた。症例(6)は膀胱刺激症状が4年続いた後生検し CIS の診断がついた。この時は SRCA 法疑陽性, ABC 法陽性であつた。3年後再び生検しやはり CIS の診断であつたが, SRCA 法, ABC 法ともに陽性。さらに5ヵ月後の生検でやはり CIS であり, この時は SRCA 法陰性となるも ABC 法は陽性であつた(図13)。その後直ちに膀胱全剔を施行したが病変は前立腺内にもありこの部分は SRCA 法 ABC 法ともに陰性であつた(図14)。症例(7)(8)(9)は SRCA 法を行っていないが ABC 法陰性であつた(図15)。症例(10)は無症候性の血尿があつてから5年後に当科を初診した所, 数個

図14 CIS 症例(6). 前立腺内が移行上皮癌でおきかえられており ABC 法陰性. ↑印は, 前立腺内腔の上皮で陽性の control 約×180

図15 CIS 症例(7). O 型 ABC 法陰性. 約×180

の乳頭状腫瘍あり, 経尿道的に切除したが, その5年後, 又, 乳頭状腫瘍が1個出現し再度経尿道的に切除. いずれも low grade であった. その後より頻繁に尿細胞診で class V が出現し数回生検したがいずれも minimum から moderate の atypia のみで CIS とはいえ切れなかった. この間全くの無症状であり頻繁に行われた膀胱鏡検査でも所見がなかった. 最近になり, 初診から11年目に移行上皮癌に加えて CIS 病変ありという診断がついた. これまでの組織は SRCA 法ではすべて陰性であった. ABC 法では乳頭状腫瘍と CIS の組織では陰性であったが atypia の組織では判定がつけ難かった. この症例は細胞診と膀胱鏡検査により嚴重に経過観察中である. 症例(11)は無症候性血尿より5ヵ月後に当科を初診した所, 膀胱腫瘍と右腎盂腫瘍疑にて, 経尿道的膀胱腫瘍切除と右腎尿管全別を行っている. その後4回再発し, 経尿道的に切除しているがそれまではいずれも SRCA 法, ABC 法ともに陽性であった. 5回目の切除の際, 三角部と後部尿道の

図16a 腎糸球体は ABC 法陽性. 約×180

b 集合管は ABC 法陽性であるが尿細管は ABC 法陰性. 約×90

浮腫状の部分を生検したところこれが CIS であり, この時は SRCA 法も ABC 法も陰性であった. 以上 CIS における ABH 同種抗原の推移を経過と共にみていくと, 最初の頃は陽性であったものも時が経つにつれ陰性になっていく例があり, 私達の例では結局11例中9例(82%)が ABC 法で陰性となっている.

(V) 腎糸球体の血管内皮では当然の事ながら ABC 法陽性であるが近位尿細管, 遠位尿細管では ABC 法陰性であった. 集合管は陽性であり乳頭部に近づくにつれ染色が濃くなっていく傾向がみられた(図16).

考 按

1) ABC 法⁶⁾⁷⁾について

ABC 法は Su-Ming Hsu 等により最近開発された方法である. これは1次抗体の次に biotin で標識した2次抗体をつけ, その次に avidin-biotin-peroxidase complex を付けるもので, 非常に染色力が強くたとえば甲状腺組織で試みると, 一次抗体を希釈して比較した場合, PAP 法と IBRAB 法(indirect bridged avidin-biotin)では1次抗体が1600倍希釈で反応疑陽性だった時, ABC 法では6400倍希釈でも陽性であったと彼等は報告している. このように PAP 法よりもよ

り高感度であり、又、PAP 法では① 抗 A 人血清、② Rabbit 抗人 IgG、③ 抗 Rabbit IgG、④ Rabbit PAP と 4 step であるのに対し、ABC 法は① 抗 A 人血清、② Rabbit 抗人 IgG、③ avidin-biotin-peroxidase complex と 3 step で良いという簡便さがあり、その上 back ground も比較的少なく一度にかなり大量の染色が出来、判定も比較的容易である。

2) 抗原の分布について

O 型の血液型特異物質を H 物質と称し、この H 物質に glycosyltransferase の働きでガラクトースがつけば B 型、N-アセチルガラクトサミンが付けば A 型物質となる。赤血球にだけあると考えられていた型物質は 1920 年代に精子及び精液にもある事がみつけれられて以来、他の組織にも広範にみとめられる事が判明した。血液型物質の同定は凝集阻止反応によつて行われ、ついで蛍光抗体法が広く用いられるようになった。Coombs 等⁹⁾は 1956 年混合凝集法 (mixed agglutination technique) を開発し、Holborrow 等¹⁾は 1960 年、人の組織の A 抗原について蛍光抗体法と混合凝集法を用いて調べ尿管にも膀胱にも尿道にも、又、幼児と胎児の腎の糸球体と集合管にも抗原が存在しているが、曲尿管には存在していなかったと述べている。さらに彼は組織及び細胞を前もつて ethanol 処理した時に、凍結切片を使つた蛍光抗体法の場合は 90%30 分の処理でも 45%90 分の処理でも血管内皮の染色を消失させてしまうが、膀胱、子宮、消化管等の上皮の染色はそのままであり、腎では糸球体は浸されるが集合管は浸されない。ただし細胞を使つた混合凝集反応の場合は腎盂膀胱からとれた細胞を前もつて 70% アルコールで 40 分処理した後でも陽性反応であつたと報告している。Kovarík 等²⁾は 1968 年、Tönder 等¹⁰⁾の行つた方法の変法を使つて、Coombs の混合凝集法を組織レベルに応用した SRCA 法を開発した。これ以後組織標本での ABH 同種抗原の検索が盛んとなつた。彼等はパラフィン切片で行つた蛍光抗体法ではムチンと粘液を含んでいる細胞だけ陽性で、他の血管内皮細胞、扁平上皮等すべて陰性であつたものが、SRCA 法で行つてみるとすべて陽性であつたとし、今迄「Alcohol soluble」の型物質はパラフィン過程で溶け出すと仮定されていたが、SRCA 法はパラフィン切片の「water soluble」と「Alcohol soluble」抗原の両方を明確に反映するとした。そして、この方法は非常に sensitivity が高く特異的でありパラフィン処理をして長期間おいたものでもその効果を妨げないとした。

3) 尿路上皮腫瘍の stage, grade, 予後と ABH 同種抗原の關係

① 膀胱腫瘍について

Davidsohn 等¹¹⁾は 124 例の膀胱腫瘍について SRCA 法を使つて調べ、grade I-II の 51 例中 6 例 (12%) に陽性、22 例 (43%) に斑状陽性、grade III-IV の 73 例中 64 例 (88%) に陰性、grade III-IV の転移巣では 49 例中 47 例 (96%) 陰性であつた事より grade が低い程型物質が陽性に出るとして両者に相關のある事を強調し、その後多くの研究者によつて試みられた。中には Lange 等¹⁴⁾や D'elia 等²¹⁾のように grade と陽性率との間に、はつきりした相關がなかつたと言っているものもいるが、大多数は grade と SRCA との相關を確認し、さらに SRCA 法は臨床的な予後を知る上での malignant potential として意義が大きい事を示唆している。Decenzo 等¹²⁾は stage A の 5 年以上経過観察した膀胱腫瘍 22 例について調べ、最初 SRCA 陰性なのは再発してもやはり陰性であり、SRCA 陰性 9 例中 8 例は 11 年以内に浸潤癌になつたが陽性 13 例は浸潤癌にならなかつたとし Bergman 等¹³⁾は low grade, low stage 5 年以上経過観察の 14 例について、同じ陽性でも (+) のものは再発したが (++) 以上では再発しなかつたとして同じ陽性判定でも両者の間に相違があるとし、Lange 等¹⁴⁾は、stage 0, A の 5 年以上経過観察の 37 例について grade と SRCA の陽性率は厳密には相關していないが特に low stage では予後を知る上で良い指標となり、又一度でも SRCA 陽性になつたものは浸潤癌になる危険性は低く、逆に陰性ならば浸潤癌になる危険性が高いと述べている。Young 等¹⁵⁾も 23 人についてやはり浸潤性との相關の高い事を挙げ、Emmott 等¹⁶⁾は 76 人について調べ ABH 同種抗原と組織学的脱分化の間及び stage A 腫瘍の再発浸潤傾向との間に相關があると結論した。本邦でも加藤¹⁷⁾に続き、当教室の兼田¹⁸⁾が 1979 年尿路性器の正常及び腫瘍組織における ABH 同種抗原について検討し、膀胱腫瘍の ABH 抗原は grade に相關して徐々に消失していく事、抗原陽性のものと陰性のものでは再発率に有意の差がある事を確認している。Richie 等¹⁹⁾は全剔標本についても調べ、浸潤癌と SRCA 陰性率の間には高い相關があると言っている。さらに Newman 等²⁰⁾は 322 例という多数の膀胱腫瘍について検討し再発を superficial recurrence と invasive recurrence に分け、SRCA 陽性の人は再発はしても invasive recurrence となる率は低いと述べ、最近でも D'elia 等²¹⁾は

stage 0 の乳頭状膀胱腫瘍40例で SRCA 陽性の25人中21人(84%)は平均13.3年の経過でもずっと stage 0にとどまっているが、SRCA 陰性の15人中11人(73%)は平均4.3年で stage B 以上に進行したとして、SRCA 法が invasive potential の良い指標になると言っている。しかし当教室では low grade, low stage の3年以上平均7年経過観察の膀胱腫瘍82例中浸潤癌になつたのは4例で全体の5%程度であり、そのうち SRCA 法は全例陰性で ABC 法は陽性1例、あとの3例は陰性であつた。即ち、SRCA 法でみると浸潤癌になつたのは陽性17例のうち0、陰性61例のうち4例であり、ABC 法でみると陽性40例のうち1例、陰性42例のうち3例で、浸潤性との間には SRCA 法、ABC 法ともに有意の相関はみられなかつた。

以上これまで多くの研究者がこの SRCA 法を試みその malignant potential としての有効性を説いてきたが、その陽性率は、たとえば low grade でみると25%から72%とかなりの幅がある。今回の私達の場合、low grade の SRCA 陽性率は56例中14例(25%)と非常に低く、なおかつ陽性率と grade、再発率との間に相関はみられなかつたが、同一標本で行つた ABC 法では low grade の陽性率は60例中32例(62%)となり、陽性率と grade、再発率との間には有意の相関があつた。最近 Catalonia²²⁾は、これら研究者(Decenzo 等¹²⁾, Lange 等¹⁴⁾, Bergman 等¹³⁾, Emmott 等¹⁶⁾, Alroy 等²³⁾, Weinstein 等²⁴⁾, Young 等¹⁵⁾, Richie 等¹⁹⁾, Johnson and Lamm²⁴⁾, Newman 等²⁶⁾)による SRCA 法の結果をすべて総合して表をつくり(表5)その中で最近、多くの泌尿器科医は浸潤の有無よりも grade によって全別を適応を決めている傾向にあるが、表の如く

表5 Catalonia (Urology 18, 113, 1981.)より引用

high grade でも SRCA 陽性であるならば浸潤癌になる確率は1%であるからその場合はむしろ保存的に治療を行つた方がよいのではないかと提唱している。尚 O 型についてはいつも false negative が問題となり今回の場合も同様であつた。特に SRCA 法では low grade 22例中はずきりとした陽性のものはなく、疑陽性が2-3例あるのみであり、もちろん high grade ではすべて陰性であつたが ABC 法でみると low grade 22例中3例(14%)に、high grade 16例中1例(6%)に陽性であつた。Coon 等²⁵⁾は剖検時の正常膀胱を検索し、O 型以外の40人中 SRCA 陰性は1人だけなのに対し、O 型29人中1/3以上が陰性であつたとし、このように O 型で false negative が多いのでは抗 H の検索は不適當ではないかと述べている。O 型でも問題なかつたという論文²⁶⁾もあるが、石山等²⁸⁾²⁹⁾はパラフィン切片ではなくフオルマリン固定した凍結切片を用いて検索し、パラフィン切片では SRCA による H 物質の検出は困難としている。

㊥ 膀胱の Carcinoma in situ について

Weinstein 等²⁹⁾は9例の全別を行つた膀胱上皮内癌について SRCA 法で ABH 抗原を検索し、atypia の部分も CIS の部分も同様の反応を示し、9例中8例が陰性で1例のみ陽性であつたとし、同一症例の正常部分では4例が陽性、4例が陰性を示した事より、正常の様に見えても陰性の部分には low grade の CIS があるのではないかと推測した。しかし彼等の言っている正常組織の SRCA 陰性の例はすべて O 型例である事からむしろ false negative と考えた方がよい様に思える。Emmott 等¹⁰⁾も CIS 症例を SRCA 法で検索し、8例中陽性は1例のみとしている。彼等は膀胱の良性病変についても調べ、cystitis cystica 8例、cystitis grandularis 8例はすべて陽性であつたのに対し、squamous metaplasia は4例すべて陰性であつたと述べている。私達は今回11例の CIS について調べたが最初陽性であつたものが経過と共に陰性になつていく例があり、最終的には SRCA 法では9例全部が陰性であり、ABC 法では11例中9例(82%)が陰性であつた。

㊦ 腎盂尿管腫瘍について

Hall 等³¹⁾は腎盂尿管腫瘍で、術後3年以上経過観察している29例について、病理組織と SRCA の関係を検討し、SRCA 陽性13例中浸潤癌になつていたもの4例、SRCA 陰性16例中浸潤癌になつていたものは14例であつたとし、抗原の有無と malignant potential の間に強い相関があるので、剝離細胞で SRCA を調べる

事により術前に, segmental ureterectomy にするか extensive nephroureterectomy にするか決めるのに有効であると述べている。今回私達は A, B, AB 型 21 例, O 型 13 例の計 34 例の腎盂尿管腫瘍について調べた。A, B, AB 型についてみると, SRCA 法では low grade 9 例中 4 例 (44%), high grade 12 例中 1 例 (8%) が陽性であり SRCA の反応と grade には相関がなかったが, ABC 法では low grade 9 例中 8 例 (89%), high grade 12 例中 2 例 (19%) が陽性で, ABC の反応と grade には相関があつた。O 型については両法とも相関がなかった。この 34 例中, 経過観察可能だった 25 例について検討した。A, B, AB 型 14 例のうち low grade は 8 例で, このうち 7 例が ABC 陽性であり, それぞれ術後 3 年と術後 5 年で, 80 歳以上の 2 例が死亡しているが他の 5 人は 4 年から 13 年の経過観察で皆健在である。low grade の ABC 陰性は 1 例で癌死している。high grade 6 例中, ABC 陽性は 2 例であつたが, うち 1 例が癌死, ABC 陰性の 4 例では 1 例が癌死で 1 例は現在肺転移がある。O 型の low grade 2 例は ABC 陽性 1 例, 陰性 1 例で, いずれも術後 10 年経つが健在であり, high grade 9 例は全部 ABC 陰性で癌死は 4 例であつた。以上 high grade の予後が悪いのは当然の事ながら, low grade の ABC 陽性例は統計学的には有意の差はなかったが予後の良い印象がある。

4) 抗原検索の方法論の問題点について

Limas 等³²⁾は正常な膀胱粘膜と膀胱移行上皮癌について各々新鮮凍結切片とパラフィン過程を通した切片について血液型物質の存在を比較検討し, パラフィン過程を経たものは新鮮凍結切片に比しその反応性が低下している事, SRCA 陰性の浸潤癌で, 血液型物質の前駆物質である Thomsen-Friedenreich antigen が自然に unmasking されている例もあつた事, A, B, AB 型の腫瘍の患者では, A, B 抗原陰性にも拘わらず, H 抗原に対する反応性が増加していた事を述べ, H 抗原に対する反応性が増加するのは, 腫瘍においては precursor substance → substance H → Aor B substance の生合成過程が障害されるので O 型の患者であれば抗 H 抗原に対しては陰性となり, A, B 型の患者では抗 Aor 抗 B 抗原に対しては陰性であるが抗 H 抗原に対しては正常より強く陽性になるためとしている。又, 彼女等はさらに最近の論文³³⁾で, 方法論について述べまず正常の尿路上皮 25 例 (O 型 13 例を含む) について調べた所, 新鮮凍結切片ではすべて陽性 (100%) であつたが, パラフィン過程を通つた切片では 25 人中

3 人が陰性となり陽性率は 88% であつた。一方膀胱移行上皮癌 57 人中, 新鮮凍結切片では 39 人 (69%) に陽性であつたが, パラフィン過程後は 13 人 (23%) に陽性と, 実に 69% → 23% へと減少していた。又, 凍結切片と比較して 10% フォルマリン処理だけのものでは正常上皮も腫瘍も凍結切片と変わりはなく, 50% アルコール処理したものでは正常のものは変化ないが腫瘍のうちの 26% に反応の減弱がみられた。さらに 80% アルコールで処理したものは, 正常でも 24% が陰性に, 腫瘍では 70% が陰性になり, これはパラフィン過程を通つた組織で行つた成績と大体同じ結果であつた。次にいつも問題になっている O 型と, O 型以外のものに分けて腫瘍と正常上皮について, それぞれ凍結切片とパラフィン切片で SRCA の陽性率を比較してみると, O 型の正常上皮では凍結切片 100% 陽性, パラフィン切片 89% 陽性, O 型の腫瘍では凍結切片 79% 陽性, パラフィン切片は, わずか 24% 陽性とかなり陽性率が低下してきている。又, A, B, AB 型での正常上皮では, 凍結切片 100% 陽性は言うまでもなく, 正常でのパラフィン切片は 89% 陽性, A, B, AB 型の腫瘍は凍結切片では 61% 陽性, パラフィン切片では 40% 陽性となつており, 一番陽性率が低いのは O 型の腫瘍のパラフィン切片であり, 次に低いのが A, B, AB 型の腫瘍のパラフィン切片ということになる。これらの事より彼女は腫瘍における ABH 抗原はアルコールに可溶性でしかも正常組織よりアルコールに感受性が高いものであろうと推測し, 現在まで SRCA が陰性である事は抗原が無い事であると考えられてきたが, この中には実は malignant biological potential とは関係のないもの, つまりパラフィンの過程でアルコールに溶けてしまつた部分があるに違いない。つまり正常上皮の凍結切片からは常に血液型物質が検出されるが腫瘍の凍結切片では 2/3 程度の検出率であり, 腫瘍のパラフィン切片では 30% 程度の陽性率で逆に言えば 70% の陰性率である。このうち 30% は, 凍結切片でもパラフィン切片でも陰性になるもので, あとの 40% はパラフィン過程のうちに消失してしまつたものであろうとして方法論の重要性を強調している。

最近 Coon 等³⁴⁾は血液型物質の前駆物質である Thomsen-Friedenreich antigen について検討し, 特に ABH 抗原陰性の腫瘍において, 予後の指標として有効であるとしており, 方法論と併せて今後この方面での検索も必要と思われる。

結 語

(1) 膀胱腫瘍、腎盂尿管腫瘍、膀胱の Carcinoma in situ の血液型物質の有無を Avidin-Biotin 法を用いて検索し、SRCA と比較した。Avidin-Biotin 法の利点として

① SRCA 法に比べても、PAP 法に比べても感度が非常に高い。たとえば膀胱の low grade の A, B, AB 型腫瘍でみると、SRCA 法では25%陽性であるのに対し、ABC 法では62%陽性と、約2.5倍の陽性率となっている。又、PAP 法に比べても back ground が低く、特異的であつた。

② O 型についても、SRCA 法ではほとんど陰性が疑陽性であつたものが陽性の例も出て来た。

③ 新鮮血を使う必要がなく、又、3 step なので操作が簡単である

④ 一度にかなり大量の染色が出来る。

⑤ 判定が比較的容易 等の点が挙げられる

(2) 今回行つた膀胱腫瘍の SRCA 法では A, B, AB 型 low grade 56例中14例陽性 (25%), high grade 25例中2例陽性 (8%) で、grade と陽性率の間に相関はなかつた。又、low grade の再発率は SRCA 陽性では13例中5例 (39%) SRCA 陰性では35例中19例 (54%) であり、再発率と SRCA の反応とは相関がなかつた。

膀胱腫瘍の ABC 法では A, B, AB 型 low grade 60例中37例陽性 (62%), high grade 27例中3例陽性 (11%) で、grade と陽性率の間には相関がみられた。又 low grade の再発率は ABC 陽性では33例中11例 (33%), ABC 陰性では21例中13例 (62%) であり、再発率と ABC の反応の間には相関がみられた。しかし腫瘍の浸潤性と ABC の反応の間には相関は認められなかつた。

(3) 腎盂腫瘍の SRCA 法では A, B, AB 型 low grade 9例中4例陽性 (44%) high grade 12例中1例陽性 (8%) で grade と陽性率の間に相関はなかつた。

ABC 法では A, B, AB 型 low grade 9例中8例陽性 (89%) high grade 12例中2例陽性 (17%) と grade と陽性率の間には相関がみられた。

(4) O 型の場合は、いずれの場合も grade と反応の間に相関がみられなかつた。

(5) CIS は11例中9例 (82%) が ABC 法で陰性であつた。最初陽性であつたものも経過と共に陰性になっていく例がある事が分かつた。

(6) ただし、パラフィン過程で特に腫瘍では型物質がアルコールに溶けてしまうという報告があるので今

後方法論を検討する必要があるだろう。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜つた小柳教授と、ABC 法について御指導頂いた国立がんセンター研究所病理の広橋先生、猪野先生に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は第47回泌尿科東部連合総会と第263回北海道地方会において発表した。

文 献

- 1) Holbrow, E.J., Browin, P.C., Glynn, L.E., Hawes, M.D., Gresham, G.A., O'Brien, T.F. and Coombs, R.R.: The distribution of the blood group: An antigen in human tissue. Brit. J. Exp. Path., 41, 430—437, 1960.
- 2) Kovarik, S., Davidsohn, I. and Stejskal, R.: ABO antigen in cancer detection with the mixed cell agglutination reaction. Arch. Pathol., 86, 12—21, 1968.
- 3) 公文裕巳, 朝日俊彦, 森岡政明, 松村陽右, 大森弘之: 膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABH isoantigen. 日泌尿会誌, 71, 767—774, 1980.
- 4) Kumon, H.: T₄-bacteriophage as a surface marker for scanning electron microscopy. Biomedical Res., 2, Suppl., 41—48, 1981.
- 5) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic urothelium: Comparison with the erythrocyte adherence method. A.J.C.P., 76, 163—171, 1981.
- 6) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29, 577—580, 1981.
- 7) 狩野義典, 広橋説雄, 他: Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) 法を用いた免疫及びレクチン組織化学—血液型物質検出への応用—. 病理と臨床, 1, 637—640, 1983.
- 8) 武田勝博, 黒田 直: 新生児死体諸臓器組織混合凝集反応. 福島医学雑誌, 31, 1—2, 1981.
- 9) Coombs, R.R.A., Bedford, D. and Rouillard, C. M.: A and B blood-group antigens on human epidermal cells: Demonstrated by mixed agglutination. Lancet, I, 461, 1956.
- 10) Tönder, O., Milgrom, F. and Witebisky, E.: Mixed agglutination with tissue sections. J. Exp. Med., 119, 265—273, 1964.
- 11) Davidsohn, I., Stejskal, R. and Lill, P.: The loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the urinary bladder. Lab. Invest., 28, 382, 1973.
- 12) Decenzo, J.M., Howard, P. and Irish, E.:

- Antigenic deletion and prognosis of patients with stage A transitional cell bladder carcinoma. *J. Urol.*, 114, 874, 1975.
- 13) Bergman, S. and Javadpour, N.: The cell surface antigen A, B or O(H) as an indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma: Preliminary report. *J. Urol.*, 119, 49, 1978.
 - 14) Lange, P.H., Limas, C. and Fraley, E.E.: Tissue blood-group antigens and prognosis in low stage transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 119, 152—155, 1978.
 - 15) Young, A.K., Hammond, E. and Middleton, A.W. Jr.: The prognostic value of cell surface antigens in low stage, non-invasive, transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 122, 462, 1979.
 - 16) Emmott, R.C., Javadpour, N., Bergman, S.M., et al.: Correlation of the cell surface antigens with stage and grade in cancer of the bladder. *J. Urol.*, 121, 37, 1979.
 - 17) 加藤哲郎: 特異的赤血球吸着法 (SRCA) による尿路移行上皮の ABH (O) 同種抗原の観察. *日泌尿会誌*, 68, 71—81, 1977.
 - 18) 兼田達夫: 尿路性器の正常および腫瘍組織における ABH 同種抗原の検討. *日泌尿会誌*, 70, 1401—1413, 1979.
 - 19) Richie, J.P., Blute, R.D. and Waisman, J.: Immunologic indicators of prognosis in bladder cancer: The importance of cell surface antigens. *J. Urol.*, 123, 22, 1980.
 - 20) Newman, A.J. Jr., Carlton, C.E. Jr. and Johnson, S.: Cell surface A, B or O(H) blood group antigens as an indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma. *J. Urol.*, 124, 27, 1980.
 - 21) D'elia, F.L., Cooper, H.S., Mulholland, S.G.: ABH isoantigens in stage 0 papillary transitional cell carcinoma of the bladder correlation with biological behaviour. *J. Urol.*, 127, 665, 1982.
 - 22) Catalona, W.J.: Practical utility of specific red cell adherence test in bladder cancer. *Urology*, 18, 113, 1981.
 - 23) Alroy, J., et al.: Isoantigens A, B and H in urinary bladder carcinomas following radiotherapy. *Cancer*, 41, 1739, 1978.
 - 24) Johnson, J.D. and Lamm, D.L.: Prediction of bladder tumor invasion with the mixed cell agglutination test. *J. Urol.*, 123, 25, 1980.
 - 25) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Variability in the expression of the O(H) antigen in human transitional epithelium. *J. Urol.*, 125, 301, 1981.
 - 26) 井口正典, 松浦 健, 秋川降弘, 八竹 直, 栗田 孝: 膀胱腫瘍における ABO(H) antigen. *日泌尿会誌*, 73, 1444—1451, 1982.
 - 27) 石山昱夫, 小室絵里佳, 高橋雅典: 混合凝集反応を用いた組織抗原 (ABO) の検出法について. *帝京医学雑誌*, 1(2), 191—200, 1978.
 - 28) 石山昱夫, 小室絵里佳, 小川公平, 藤田 潤: ヒト癌組織の ABH 血液型活性について. *帝京医学雑誌*, 2(2), 169—176, 1979.
 - 29) Weinstein, R.S., Alroy, J.D.V.M., Farrom, G.M., et al.: Blood group isoantigen deletion in carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer*, 43, 661—668, 1979.
 - 30) Emmott, R.C., Droller, M.J., Javadpour, N.: Studies of A, B, or O(H) surface antigen specificity carcinoma in situ and non-malignant lesion of the bladder. *J. Urol.*, 125, 32, 1981.
 - 31) Hall, L., Faddoul, A., Saberi, A. and Edson, M.: The use of the red cell surface antigen to predict the malignant potential of transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis. *J. Urol.*, 127, 23, 1982.
 - 32) Limas, C. and Lange, P.: Altered reactivity for ABH antigens in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Cancer*, 46, 1366—1373, 1980.
 - 33) Limas, C. and Lange, P.: ABH antigen detectability in normal and neoplastic urothelium (influence of methodologic factors). *Cancer*, 49, 2476—2484, 1982.
 - 34) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *A.J.C.P.*, 77, 692—699, 1982.

(1983年1月21日受付, 特別掲載)