膀胱腫瘍細胞の免疫組織化学的研究

CEA, Ferritin, β_2 -MG, Keratin, および Glycogen での検討

昭和大学藤が丘病院泌尿器科 (主任: 甲斐祥生教授)

小 野 寺 恭 忠

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES ON BLADDER TUMOURS

Evaluation by CEA, Ferritin, β_2 -MG, Keratin and Glycogen

Yasutada Onodera

Department of Urology, Fujigaoka Hospital, Showa University of Medicine

(Director: Prof. Y. Kai)

The focus of my study was the immunohistological expressions of bladder tumour cells when stained by several antigens, those being; Carcinoembryonic antigen (CEA), Ferritin, Beta 2 Microglobulin (β_2 -MG), Keratin and Glycogen. There were 59 cases of bladder cancer studied using the Peroxidase-antiperoxidase technique (PAP) of staining. Specimens were formalin-fixed, paraffin embedded, and then sectioned.

Some correlation was found between histological grade, stage and CEA incidence but was not found in the Ferritin or β_2 -MG. Keratin and Glycogen were detected in all cases. These staining patterns were mosaic according to higher grade and stage. It is believed this demonstrates that immunohistochemical expressions of staining with CEA, Keratin, and Glycogen may be a sensitive indicator of histological grade, stage.

Key words: bladder tumour, immunohistochemical evaluation

要旨: 膀胱移行上皮癌59症例について異型度, 深達度別に腫瘍細胞組織内の各種腫瘍マーカー (CEA, Ferritin, β_2 -MG), および Keratin, Glycogen について, パラフィン包埋薄切を用いて Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) 法により免疫組織化学的に検討した。

膀胱腫瘍組織内の陽性率, 分布および局在は CEA では Grade, Stage が進むにつれて陽性率は高率となり, Ferritin と β_2 -MG では一定の傾向を示さず, Keratin と Glycogen では陽性率は100%であり, Grade, Stage が進むにつれて, 腫瘍組織内の分布は mosaic 状となった。

CEA, Keratin, Glycogen は, 組織学的 Grade, Stage の指標として有用と思われる。

キーワード: 膀胱腫瘍, 免疫組織学的検討

結 言

膀胱腫瘍においては深達度と組織学的異型度が重要な予後因子とされ, 治療の方針も主としてこの因子により決定されている。また組織学的異型度は, 深達度との間に密接な関係があり, 生物学的悪性度を表す指標の一つとされてきたが, いまだ明確な関係の解明はなされておらず, その有用性については必ずしも十分ではないと思われる。

そこで著者は膀胱腫瘍において, 異型度, 深達度を中心に腫瘍細胞組織内の各種腫瘍マーカー (CEA, Fer-

ritin, β_2 -MG), および Keratin, Glycogen について免疫組織化学的に検討した。

対象および方法

I. 対象

1983年6月から1987年5月までの4年間に昭和大学藤が丘病院泌尿器科において膀胱移行上皮癌と診断された症例59例を対象とした。性別は男性42例, 女性17例であり, 年齢は35歳から83歳, 平均65.4歳であった。

Grading (G) と Staging (T) を日本泌尿器学会膀胱癌取り扱い規約¹⁾に従って分類した結果, Grade で

は、G1が17例、G2が28例、G3が14例、StageではT1が24例、T2が23例、T3が8例、T4が4例である。また初発例は51例（G1・14例 G2・26例、G3・11例）、再発例は8例（G1・3例、G2・2例、G3・3例）であり、乳頭状は51例（G1・17例、G2・28例、G3・6例）、非乳頭状8例（G3・8例）であった。

II. 方法

材料はTUR-Bt時のcold biopsyおよびopen surgeryで摘出された組織より採取した。組織標本は10%パラフィン包埋薄切を用い、まずHE染色にて腫瘍組織を確認したのち、Stenbergerら²⁾の方法に準じてDaKo PAP Kit (Dako Corporation)を用い、Peroxidase Antiperoxidase法(PAP法)にて行った。その操作手順は3 μ で薄切後、脱パラフィンし0.3% H_2O_2 添加メタノール中に30分間作用させ、0.1%Protease PBS溶液に5分間3回浸漬し、さらに非特異反応のブロックを行うために5%正常ブタ血清を作用させた。次に一次抗体(ウサギ血清)を室温で30分間反応させた後、PBS溶液に5分間3回浸漬、さらにHRP標識抗ウサギIgブタ血清を室温で30分間作用させ、PBS

溶液に5分間3回浸漬し、3,3'-diaminobenzidineにて呈色させヘマトキシリンで核染色し、脱水、透徹封入した(Table 1)。

なお、GlycogenはPAS染色を用いた。

III. 検討方法

1) 腫瘍細胞内の陽性率：陽性率の分類は、1. 陰性(-)・染色細胞なし、2. 弱陽性(+)・染色細胞が10%以下、3. 強陽性(2+)・染色細胞が10%以上の3段階に分け、染色細胞がみられるもの全てを陽性と算定した。なお切片は同一腫瘍の連続切片を使用し、その陽性率とGrade, Stage, 初発・再発例、乳頭状・非乳頭状との関係を検討した。

2) 染色陽性細胞の分布および局在：分布状態はmosaic, diffuse, focalの3種類に大別した。局在は腫瘍細胞の細胞膜表面に染色されるもの、細胞質が染色されるものに区別した。なお有意差検定は χ^2 -testを用いた。

結 果

各種マーカーの陽性率をTable 2に一括して示した。以下各抗原について腫瘍のGrade, Stage, 初発・再発例、乳頭状・非乳頭状例に分けて陽性率および腫瘍組織内の分布ならびに局在を検討した。

1) CEA

陽性率は、GradeではG1が6/17例(35.3%)G2が16/28例(57.1%)、G3が9/14例(64.3%)であり、Gradeが進むにつれて陽性率も高くなった。またStageでは、T-1が11/24例(45.8%)、T-2が13/23例(56.5%)、T-3が4/8例(50.0%)、T-4が3/4例(75.0%)であり、T-3を除きStageが進むにつれて陽性率も高率になった。しかし、いずれも統計学的有意差は認めなかった。さらに初発例の陽性例はG1・4例(28.6%)、G2・14

Table 1 Immunoperoxidase Method

deparaffiation
↓
normal swine serum
↓
primary rabbit anti-Keratin, Ferritin, β_2 -MG serum
↓
peroxidase-conjugated swine anti-rabbit serum, IG fraction diluted 1 : 20
↓
counterstaining with hematoxylin

Table 2 Relation between Stainig and Grade or Stage of the Tumors

	No. of cases	CEA	Ferritin	β_2 -MG	Keratin	Glycogen
Grade						
I	17	6 (35.3%)	10 (66.7%)	17 (100.0%)	17	17
II	28	16 (57.1%)	15 (53.6%)	22 (78.6%)	28	28
III	14	9 (64.3%)	11 (78.6%)	12 (85.7%)	14	14
Stage						
T-1	24	11 (45.8%)	11 (45.8%)	21 (87.5%)	24	24
T-2	23	13 (56.5%)	16 (69.6%)	21 (91.3%)	23	23
T-3	8	4 (50.0%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)	8	8
T-4	4	3 (75.0%)	4 (100.0%)	4 (100.0%)	4	4
total	59	31 (52.5%)	36 (61.0%)	51 (86.4%)	59 (100.0%)	59 (100.0%)

Fig. 1 Immunohistochemical localization of CEA. Grade 2. Transitional cell carcinoma (TCC); Weak and diffuse staining in the cytoplasm.

Fig. 2 Immunohistochemical localization of Ferritin. Grade 2. TCC; Diffuse staining in the cytoplasm.

Fig. 3 Immunohistochemical localization of Beta 2 microglobulin. Grade 2. TCC; Strong and diffuse staining in the membrane and cytoplasm.

Fig. 4 Immunohistochemical localization of Keratin. Left: Grade 1. TCC; Diffuse staining in the membrane and cytoplasm.

Right: Grade 3. TCC; Mosaic staining in the cytoplasm.

Fig. 5 Localization of Glycogen on PAS staining.

Left: Grade 1. TCC; Diffuse and strong staining in the membrane.

Right: Grade 3. TCC; Mosaic staining in the membrane and cytoplasm.

例 (53.8%), G3・7 例 (63.6%), 再発例の陽性例は G1・2 例 (66.7%), G2・2 例 (100%), G3・2 例 (66.7%) であり, 乳頭状症例の陽性例は 27 例 (52.9%), 非乳頭状症例で 4 例 (50.0%) であるが, 統計学的有意差は認められなかった. なお, 腫瘍組織内の分布および局在には, 一定の傾向をみなかった (Fig. 1).

2) Ferritin

陽性率は, Grade では G1 が 10 例 (66.7%), G2 が 15 例 (53.6%), G3 が 11 例 (78.6%) となり, Stage 別での検討でも同様に一定の傾向を示さず, 初発・再発例

および乳頭状・非乳頭状症例での検討でも同様に一定の傾向を認めなかった。また腫瘍組織内の分布および細胞内の局在も、一定していなかった (Fig. 2)。

3) β_2 -MG

陽性率は、Grade では G1が17例(100%)、G2が22例(78.6%)、G3が12例(85.7%)となり、Stage 別での検討でも同様に、一定の傾向を認めず、腫瘍組織内の分布、細胞内の局在も、一定していなかった。また初発・再発例、乳頭状・非乳頭状例でも有意差を認めなかった (Fig. 3)。

4) Keratin

陽性率は、100%であり、腫瘍組織内の分布は、G1では、全層に染色されるか、または、表層に強陽性の部分があり、Gradeが進むにつれて強陽性の部分は、mosaic 状を呈した。初発・再発例の検討では特に差を認められず、乳頭状・非乳頭状での検討では非乳頭状症例は強陽性部が mosaic 状を示した。なお、局在は、腫瘍細胞膜表面に強く染色されるものと、腫瘍細胞質内に diffuse に染色されるものとがあり、一定の傾向を認めなかった (Fig. 4)。

5) Glycogen

陽性率は、100%であり、Keratinと同様に、Grade、Stageが進むにつれて、腫瘍組織内の分布は、mosaic 状を呈した。初発・再発例の検討では差を認めず、乳頭状・非乳頭状での検討では非乳頭状症例は強陽性部が mosaic 状を示した (Fig. 5)。

考 察

近年免疫組織化学の発達はめざましく、泌尿器科領域においても数多く報告されている。しかし、ABH 抗原以外での膀胱腫瘍組織内の陽性率、分布、局在および臨床的有用性についての検討では、いまだに統一した見解は出されていない。

膀胱腫瘍組織内の陽性率、分布および局在に関して、諸家の報告と比較してみると、

1) CEA: 腫瘍内陽性率は、著者の検討では52.5% (31/56)であり、藤岡ら27% (10/37)³⁾、Nakatsu ら28% (15/54)⁴⁾の報告より高く、Jaukzke ら57% (86/150)⁵⁾の報告より低い結果であった。

組織学的異型度、深達度との関係については、Wiley, E.L.⁶⁾、Jakse, G. ら⁷⁾が病理組織学的異型度や深達度とは全く相関しないと報告し、また藤岡ら³⁾は深達度とは相関するが異型度とは相関しないと述べている。一方、Wahren, B.⁸⁾、Jautzke, G.⁹⁾、鹿子木基二ら⁹⁾は、いずれとも相関がみられると報告しており、

見解はまちまちである。今回の著者の検討では、Grade、Stage の進行につれて陽性率も高くなる傾向を認めるが、統計学的有意差をみなかった。

2) Ferritin: 竹本ら¹⁰⁾は乳癌での検討で良性疾患に比して組織内陽性率が高いが、進行度、異型度との相関は示さないと報告している。しかし、膀胱腫瘍での報告はみられない。著者の検討では、陽性率は61.0% (36/59)であり、深達度や異型度の分析、組織内の分布や局在の検討のいずれにおいても一定の傾向を示さなかった。

3) β_2 -MG: Gray, R. ら¹¹⁾によれば、膀胱正常上皮および良性疾患ではすべてに存在しており、dysplasia から癌までの進行では、進行するにしたがってその陽性率は低くなり、移行上皮癌のモニターとして有用であるとされる。しかし著者の検討では、陽性率86.4% (51/59)で、進行度、異型度と相関を認めず、また分布、局在とも一定していなかった。

4) Keratin: 上皮細胞の骨格蛋白の主たるものであり、W.B.J. Nathrath ら¹²⁾によれば、正常移行上皮、papilloma, CIS, 移行上皮癌の low grade にみられ、とくに squamous metaplasia, carcinoma では著名に反応するが、移行上皮癌の high grade では反応が弱いとされる。また Patricia D.W. ら¹³⁾は、tonofilament のみならず空胞膜や fine filament にも存在すると報告している。今回の検討では陽性率は100% (59/59)であり、Gradeが進むにつれて、強陽性の染色部分が mosaic 状を呈した。

5) Glycogen 顆粒: 膀胱粘膜上皮にも腫瘍細胞にも分布することは周知の事実であるが、細胞そのものによって合成されるか、または肝、筋肉などにより供給されるかは明確ではない。著者の研究でも陽性率は100% (59/59)であり、Keratinと同様に進行度、異型度が進むにつれて、分布は mosaic 状となった。

以上、膀胱腫瘍の Grade、Stage の進行にともない、CEA では陽性率の上昇、Keratin および Glycogen では腫瘍組織内の分布に特徴的な変化を認めることから、膀胱腫瘍の予後の推測や治療方針の決定への補助診断として有用性の高いことが示唆された。

結 語

1) 膀胱移行上皮癌59症例について、CEA, Ferritin, β_2 -MG, Keratin, Glycogen の免疫組織学的観察を行い、これらの陽性率、腫瘍組織内の分布及び局在について検討した。

2) CEA の陽性率は、high grade, high stage ほど

陽性率が高いが、腫瘍組織内分布、局在には、一定の傾向は認められなかった。

3) Ferritin, β_2 -MG では、grade, stage 共に相関が認めず、分布・局在でも一定の傾向がみられなかった。

4) Keratin, Glycogen の陽性率は、100%であり、grade が進むにつれて、強陽性部分の分布は、mosaic 状を呈した。

稿を終えるに臨み、御校閲を賜りました甲斐祥生教授、ならびに御指導頂きました池内隆夫助教授に厚く感謝の意を表します。また、御助言を頂きました研究室鈴木孝氏に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第74回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 泌尿器科, 病理膀胱癌取り扱い規約, 第1版, 金原出版, 東京, 1980.
- 2) Stenberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J. and Meyer, H.G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horse radish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315—333, 1970.
- 3) Fujioka, T., Ohhori, T., Lovekovich, L. and deKernion, J.B.: Investigation of blood group antigens and carcinoembryonic antigen in urinary bladder carcinoma. *Urol. Int.*, 41, 397—402, 1986.
- 4) Nakatsu, H., Kobayashi, I., Onishi, Y., Igawa, M., Ito, H., Tahara, E. and Nihira, H.: ABO(H) blood group antigens in carcinoembryonic antigens as indicators of malignant potential in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 131, 252—257, 1984.
- 5) Jautzke, G. and Altenaehr, E.: Immunohisto-

chemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) and its correlation with grading and staging on tissue sections of urinary bladder carcinoma. *Cancer*, 50, 2052—2056, 1982.

- 6) Wiley, E.L., Mendelson, G., Droller, J. and Eggleston, J.C.: Immunoperoxidase detection of carcinoembryonic antigen and blood group substances in papillary transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 128, 276—280, 1982.
- 7) Jakse, G., Rauschmeier, P., Rosmantith, F. and Hofsdter, F.: Determination of carcinoembryonic antigen in tissue, serum and urine in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol. Int.*, 38, 121—125, 1983.
- 8) Wahren, B.: Cellular content of carcinoembryonic antigen in urothelial carcinoma. *Cancer*, 42, 1533—1539, 1978.
- 9) 鹿子木基二: 尿路系における腫瘍組織, 血清および尿中の carcinoembryonic antigen (CEA) について—免疫組織化学および Radioimmunoassay による検討—. *日泌尿会誌*, 75, 1558—1571, 1984.
- 10) 竹本洋一: 乳ガン組織内 estrogen の免疫組織学的研究, CEA, Ferritin との比較並びに予後との関係. *医学のあゆみ*, 92, 2069—2080, 1983.
- 11) Walton, G.R., McCue, P.A. and Graham, S.D. Jr.: Beta-2-microglobulins as a differentiation marker in bladder cancer. *J. Urol.*, 136, 1197—1200, 1986.
- 12) Nathrath, W.B.J., Arnhold, H. and Wilson, P.D.: Keratin, luminal epithelial antigen and carcinoembryonic antigen in human urinary bladder carcinomas. *Path. Res. Pract.*, 175, 299—307, 1982.
- 13) Wilson, P.D., Nathrath, W.B.J. and Trejdosiewicz, L.K.: Immunoelectron microscopic localisation of Keratin and luminal epithelial antigens in normal and neoplastic urothelium. *Path. Res. Pract.*, 175, 289—298, 1982.

(1990年8月18日受理, 特別掲載)