膀胱腫瘍細胞の免疫組織学化学的研究

膀胱内注入療法の臨床効果での比較検討

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

Immunohistochemical Evaluation on Intravesical Therapy for Bladder Tumours

Yasutada Onodera

Department of Urology, Fujigaoka Hospital, Showa University of Medicine

(Director: Prof. Y. Kai)

The focus of my study was the immunohistochemical studies of tumour cells induced by ADM intravesical instillation therapy when stained by several antigens, those being; Carcinoembryonic antigen (CEA), Ferritin, Beta 2 Microglobulin (β_2 -MG), Keratin and Glycogen before and after the therapy. Then I discussed as to their value in indicating therapeutic efficacy. There were 18 cases of bladder cancer studied using the Peroxidase-antiperoxidase technique (PAP) of staining.

Data indicated a 44.4% response rate following therapy with intravesical ADM. Immunohistochemical evaluation showed improvement as indicated by not staining with CEA. Also observed was no change and slightly diffuse staining with Keratin; and a decrease in all layers of Glycogen expression. However this could not be observed with the Ferritin or β_2 -MG. It is believed this demonstrates that immunohistochemical expressions of staining with CEA, Keratin, and Glycogen may be a sensitive indicator of a therapeutic response to intravesical ADM.

Key words: bladder tumour, immunohistochemical evaluation, intravesical therapy

要旨: 表在性膀胱癌18症例の ADM 膀胱内注入療法前後での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) 法により免疫組織学的変化と治療効果の関係について検討した. ADM 膀胱内注入療法の臨床効果は, 有効率44.4%で, 注入療法前後の腫瘍組織内の変化は, CEA では注入前後ともに陰性例に有効例が多く, Ferritin, β_2 -MG では臨床効果による差は認めない. Keratin では, 注入前後で変化を認めないもののうち全層に弱陽性に染色されたものに, 特に有効例を多くみた. Glycogen では, 注入後に減少したうち, 全層部で減少した例に有効例が多い傾向をみた. CEA, Keratin, Glycogen は膀胱内注入療法の効果判定の指標として有用と思われる.

キーワード: 膀胱腫瘍, 免疫組織学化学的検討, 膀胱内注入療法

緒 言

膀胱内注入療法は表在性膀胱腫瘍の治療法の一つとして検討され, その臨床効果も認められているが, 臨床的有効性に対する変化を従来のヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E 染色) による組織学的検査で確認できることは比較的少なく, 治療効果の指標となりうる新しい組織学的検索法の開発が待たれているのが現状と思われる.

そこで著者は膀胱腫瘍において, 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, 膀胱内注入療法前後での免疫組織学的変化について検討を加えたので報告する.

対象および方法

I. 対象

1983年6月から1985年5月までの2年間に昭和大学

藤ガ丘病院泌尿器科において表在性膀胱移行上皮癌 (Ta, T1) と診断され, ADM の膀胱内注入療法で治療を行った18症例を対象とした。性別は, 男性16例, 女性2例であり, Grading は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 1は11例, Grade 2は6例, Grade 3は1例であった。

II. 方法

ADM 30mg~40mg を生食水30ml に溶解し, 10~20日間連日膀胱内注入し, 材料は治療前に, cold punch biopsy にて採取, 治療後は, TUR-Bt 時に採取した。

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) を用いて, Peroxidase-Antiperoxidase 法 (PAP 法) にて行った。なお, その操作手順は, 前報で詳しく述べた。

また Glycogen は PAS 染色法を用い, さらに一部の腫瘍組織に電顕による観察を行った。操作手順は, 前固定は2.5%グルタルアルデヒド (カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4) で1時間固定, 後固定は1%オスミウム酸 (カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4) で1時間固定した後, 系列アルコールにて脱水, 酸化プロピレンで置換後 EPON812 にて包埋した。酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色を施し, さらにアルカリビスマス染色を行った。検鏡は日立電子顕微鏡 H600 を用いて観察し, Glycogen 顆粒分布を検討した。

III. 判定および検討方法

1) 染色陽性細胞の分布および局在: 分布状態は染色部位により細胞表面 (CS), 表層 (S), 中層 (M), 基底層 (B), 全層 (W) に分け, 染色状態により染色無し (-), 10%以下の染色 (±), 巣状に染色 (+), ビマン性に染色 (2+) 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と, 細胞質が染色されるものに区別した。

2) 臨床効果判定と検討方法: 注入療法の効果判定および注入前後での腫瘍効果判定は, ADM 注入療法終了後の内視鏡検査により,

- 1: 著効: 腫瘍が消失したもの,
- 2: 有効: 腫瘍が50%以上の縮小したもの,
- 3: 無効: 腫瘍が50%未満の縮小, または全く変化のみられないもの,
- 4: 進行: 腫瘍の50%以上の増大をみたものの4段階に分類し判定した。

検討方法は同一腫瘍において, 注入前後での染色状

Table 1 Response of Intravesical Chemotherapy

No. of cases	CR	PR	response rate	NR
Grade				
I 11	0	5	45.5%	6
II 6	0	3	50.0%	3
III 1	0	0	0.0%	1
total 18	0	8	44.4%	10

CR ; complete response, PR ; partial response

NR ; none response

態, 分布, 局在を比較検討し, さらに腫瘍組織内変化と臨床効果との関係を比較検討した。

結 果

膀胱内注入療法の臨床効果は, 著効0, 有効8例, 無効10例であり, 有効率は Grade 1が, 45.5%, Grade 2が50%, Grade 3が0%で, 全体で44.4%であった (Table 1)。

注入療法前後の各種抗原の染色状態の変化を, Table 2 に一括して示した。以下各抗原について免疫組織化学的变化と臨床効果との関係を検討した。

1) CEA

7例は注入前後ともに染色が陽性のもの, 3例は染色が注入前陰性で後陽性化, 8例は染色が前後ともに陰性であった。臨床効果との関係は前後ともに染色陰性例に有効例が多い。

2) Ferritin

5例は染色が注入前後ともに陽性, 3例は染色が注入前陽性で後陰性, 1例は染色が注入前陰性で後陽性で, 9例は注入前後共に染色陰性であった。臨床効果による差は認めなかった。

3) β_2 -MG

14例は染色が注入前後ともに陽性で, そのうち6例は注入後に染色が強くなり, 2例は注入後に染色が弱くなり, 6例は不変であった。また2例は注入後陰性, 1例は前後とも陰性であった。臨床効果による差は認めなかった。

4) Keratin

7例は注入前に基底層が強陽性, 表層, 中層が弱陽性に染色され, 注入後に全体に陽性を示した。11例は注入前後で変化を認めなかった。臨床効果との関係は注入前後で変化を認めないものに有効例が多く, そのうち全層に弱陽性に染色されたものにとくに有効例を多くみた。

Table 2 Staining in the pre-and post-therapy of each patient

pt.	CEA	Ferritin	β_2 -MG	Keratin	Glycogen
1	(-)→(±)	(-)→(-)	(±)→ (+)	B (2+)→W (2+)	M (2+)→W (±)
2	(±)→(+)	(-)→(-)	(±)→ (2+)	W (2+)→W (2+)	W (2+)→M (2+)
3	(+)→(±)	(±)→(+)	(2+)→ (2+)	B (2+)→W (2+)	W (2+)→M (2+)
④	(-)→(-)	(-)→(-)	cs (2+)→cs (+)	B (2+)→B (2+)	W ((±)→W (±)
5	(+)→(±)	(-)→(-)	cs (2+)→cs (2+)	B (2+)→W (2+)	S (+)→W (±)
⑥	(-)→(-)	(±)→(+)	cs (±)→cs (±)	W (2+)→W (2+)	W (+)→W (±)
7	(-)→(-)	(+)→(+)	cs (+)→cs (±)	B (2+)→B (2+)	W (2+)→W (+)
⑧	(±)→(+)	(+)→(+)	cs (2+)→cs (2+)	B (2+)→W (2+)	W (2+)→W (±)
⑨	(-)→(-)	(-)→(+)	cs (+)→cs (2+)	W (2+)→W (2+)	M (2+)→W (±)
10	(-)→(±)	(+)→(-)	(-)→ (-)	B (2+)→W (2+)	W (+)→W (+)
⑪	(-)→(-)	(-)→(-)	cs (+)→cs (+)	B (2+)→B (2+)	W (2+)→M (+)
⑫	(-)→(-)	(-)→(-)	(±)→ (+)	W (2+)→W (2+)	W (2+)→W (±)
13	(-)→(-)	(-)→(-)	(+)→ (-)	B (2+)→W (+)	S (2+)→W (+)
⑭	(-)→(-)	(-)→(-)	cs (+)→cs (+)	W (2+)→W (+)	W (+)→W (±)
15	(2+)→(2+)	(+)→(-)	cs (±)→cs (+)	B (2+)→W (+)	W (+)→W (+)
16	(2+)→(2+)	(+)→(+)	cs (+)→cs (+)	B (2+)→W (2+)	M (2+)→M (2+)
⑰	(+)→(±)	(+)→(+)	(±)→ (+)	W (2+)→W (2+)	M (2+)→W (±)
18	(-)→(±)	(-)→(-)	(±)→ (-)	W (+)→W (2+)	W (2+)→W (±)

○ : response case, cs : cell surface, S : surface layer, M : middle lay. B : basic lay.
W : whole lay. (-) : no stainig. (±) : rare positivity. (+) : focal pos. (2+) : diffuse pos.

Fig. 1 Localization of Glycogen on PAS staining before and after treatment with intravesical ADM.

Left : Grade 2. TCC, before treatment ; Diffuse and strong staining in the membrane and cytoplasm.
Right : Grade 2. TCC, after treatment ; Markedly decreased straining in the all layers.

5) Glycogen

14例で注入後に減少し、そのうち7例は特に表層部が、7例は全層で減少していた。また、4例で注入前後の変化を認めなかった。臨床効果との関係は注入後に減少したうちで全層部減少例に有効例が多い傾向を

Fig. 2 TEM showing the transitional epithelium before and after treatment with intravesical ADM.

Left : Before treatment ; Diffuse distribution of Glycogen granule, diffuse distribution of euchromatin in nucleus.
Right : After treatment ; Markedly decreased distribution of Glycogen granule, many vesicle in the cytoplasm, clearly mitochondria, heterochromatin on the edge of nucleus.

みた (Fig. 1).

電顕像での検計において、Glycogen顆粒は注入前には多く認めるが、注入後では著明に減少していた。

またその他の所見として細胞質の中に大きな空胞変性を認め、ミトコンドリアは淡明化し変性している。なお、核は注入前には真性クロマチンが核内全体に分布し、注入後には異質クロマチンが核辺縁に付着している所見が見られた (Fig. 2)。

考 察

膀胱内注入療法における腫瘍組織への影響を病理組織学的に検索した研究は少なく、さらに免疫組織学的に検討した報告はきわめて少ない。

抗癌剤膀胱内注入療法による腫瘍細胞の組織学的変化に関しては、光学顕微鏡的観察において腫瘍表面の細胞剝離、出血および壊死を認める。また、電顕を用いた研究でも糸球体の膨化変形、cristaeの崩壊ついで細胞質の膨化、融解がみられ、これらの変化は抗癌剤本来の制癌作用であるDNA合成阻害作用というよりは、化学毒性による非特異的な変化である^{3)~5)}といわれている。

一方、S.L. Strobel ら⁶⁾はMMCを使用した膀胱内注入療法前後の比較において、光学顕微鏡学的検査ではほとんど変化がみられなかったが、免疫組織学的検査によるABH抗原では変化がみられ、注入後消失例に有効例が多く、治療効果の指標となると述べている。

今回著者の検討でも、ADM膀胱内注入療法後は浮腫、上皮の脱落、剝離、好中球の浸潤が見られたが、その程度と治療効果は一致しなかった。そこで、免疫組織化学的に注入前後でCEA, Ferritin, β_2 -MG, Keratin, Glycogen顆粒の変化と臨床効果との関係を検討した。

CEAでは、注入前後ともに陰性例に有効例が多いが、Ferritin, β_2 -MGでは、臨床効果と免疫組織化学的变化に相関を認めなかった。またKeratinでは、注入前後で差を認めないものに有効例が多く、うち全層に弱陽性のものに、とくに有効例が多くみられた。Glycogen顆粒は、注入後に減少し、特に全層減少例に有効例が多い傾向を認めた。藤岡⁷⁾は、膀胱内注入療法によるGlycogen顆粒の減少は有効例において著明であり、この事実がADMに特有のものかどうかは別としても、注入療法の治療効果の判定に有用であると報告し、著者の結果と一致した見解を述べている。

以上、ADMの膀胱内注入療法による腫瘍組織内への影響を免疫組織学的に観察すると、CEA, KeratinおよびGlycogen顆粒においては、有効例に各々ある一定の免疫組織学的特徴や変化が認められることにより、これらが注入療法での治療効果判定の指標として

有用であることが示唆された。

結 語

1) 表在性膀胱腫瘍18症例のADM膀胱内注入療法前後での免疫組織化学的变化についてCEA, Ferritin, β_2 -MG, Keratin, Glycogenを用いて観察し、治療効果との関係について検討した。

2) 対象としたADM膀胱内注入療法18症例の臨床効果は、著効なし、有効8例、無効10例であり、有効率は44.4%であった。

3) CEAでは、注入前後ともに陰性例に有効例を多く認めた。

4) Ferritin, β_2 -MGでは、共に一定の傾向を認めなかった。

5) Keratinでは、全層に弱陽性に染色されたものに有効例が多かった。

6) Glycogenでは、注入後染色性が減少したものに、有効例が多くみられた。

以上より、CEA, KeratinおよびGlycogenは、注入療法における治療効果の判定の指標となり得るものと思われる。

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定の鈴木孝氏に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第74回日本泌尿器科学会総会において口演発表した。

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-antihorse radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315-333, 1970.
- 3) Murphy, W.M., Soloway, M.S. and Lin, C.J.: Morphological effects of thio-TERA on mouse uroepithelium. *Acta Cytolol.*, 21, 701-704, 1977.
- 4) Murphy, W.M., Soloway, M.S. and Crabtree, W. N.: The morphological effects of mitomycin C in Mammalian urinary bladder. *Cancer*, 47, 2567-2574, 1981.
- 5) 藤岡知昭, 石井延久, 千葉隆一: Adriamycin膀胱

注入療法の病理学的検討. 泌尿紀要, 29, 869—873, 1983.

- 6) Strobel, S.L., Tuttele, S.E., Wise, H.A. and Sharma, H.M.: Mitomycin-C induced improvement in superficial bladder tumors: A morphologic and immunohistochemical evalua-

tion. Urol. Res., 13, 51—54, 1985.

- 7) 藤岡良影: 膀胱腫瘍に対する抗腫瘍剤膀胱内注入療法の影響に関する電子顕微鏡的研究. 日医大誌, 49, 61—77, 1982.

(1990年 8 月18日受理, 特別掲載)