精巣腫瘍における globotriaosylceramide (Gb₃) の 免疫組織化学的検討

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 折笠精一教授)

大山	力	折笠	精一	川村	貞文
佐藤	信	鈴木	謙一	斎藤	誠一
福士	泰夫	吉川	和行	星	宣次

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF GLOBOTRIAOSYL CERAMIDE (Gb₃) IN TESTICULAR TUMORS

Chikara Ohyama, Seiichi Orikasa, Sedafumi Kawamura, Makoto Satoh, Ken-ichi Suzuki,
Seiichi Saito, Yasuo Fukushi, Kazuyuki Yoshikawa and Senji Hoshi

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

(Director: Prof. S. Orikasa)

Testicular tumor tissues and various normal tissues were examined by immunohistochemical techniques for expression of globotriaosylceramide (Gb₃) using anti-Gb₃ monoclonal antibody (1A4). In formalin fixed paraffin-embedded specimens (31 cases), Gb₃ was positive for every kind of elements of testicular germ cell tumors, especially its incidence of positive staining were 100% in seminomas (16/16) and embryonal carcinomas (6/6). On the other hand, four cases of testicular malignant lymphoma were all negative for Gb₃, and some normal testicle, liver, kidney, pancreas, spleen, ileum and rectum showed very weak reactivity with 1A4. In frozen materials (10 cases), similar incidence of positive staining with that of paraffin-embedded specimens were observed in drying only manner, 4% paraformaldehyde fixation following drying and 10 min. of acetone fixation following drying. Incidence of very strong staining in testicular germ cell tumors were as follows, 7/10 in 4% paraformaldehyde fixation, 6/10 in drying only, 4/10 in 10 min. of acetone fixation and 7/22 in paraffin-embedded specimens. Fixation with 30 min. of acetone fixation and 10 min. of 90% ethanol and treatment with 10 min. of chloroform:methanol (2:1, v/v) extremely decreased the reactivity with 1A4, suggesting that Gb₃ exists mainly as glycolipid.

Gb₃ may thus be a useful histological marker for testicular germ cell tumor, and the tissue should be treated with the process of freezing followed by 4% paraformaldehyde fixation, drying only or 10 min. of acetone fixation, and formalin fixed paraffin-embedded specimens were also available enough.

Key words: Gb₃, testicular tumor, immunohistochemistry

要旨: anti-Gb₃ monoclonal antibody である1A4を用いて, 精巣腫瘍及び各種正常組織における免疫組織化学的検討を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋切片31例では, Gb₃は精巣胚細胞腫瘍のすべてのelementに陽性例が認められ, 特にセミノーマ(16例), 胎児性癌(6例)では全例陽性であった。これに対し, 精巣悪性リンパ腫の4例はすべて陰性であり, 又, 正常組織においては, 精巣組織, 肝, 腎, 脾, 回腸, 直腸に極めて弱い染色性を認めたにすぎなかった。

精巣胚細胞腫瘍組織10例の凍結切片においては, 風乾のみによる固定, アセトン10分, 4%パラホルムアルデヒド固定が各々, ホルマリン固定パラフィン包埋切片と同様の陽性率を呈した。しかし, 染色性の強さを比較すると, 4%パラホルムアルデヒド固定, 風乾のみ, アセトン10分, ホルマリン固定パラフィン包埋切片の順に高く, 抗原性の保持には, 4%パラホルムアルデヒドによる固定がもっとも優れていることがうかがわれた。さらに, アセトン30分, 90%エタノール10分固定, クロロホルム:メタ

ノール（2：1，v/v）10分固定では染色性は著しく低下したことより，Gb₃は主として糖脂質の形で存在するものと考えられた。

Gb₃は精巣胚細胞腫瘍にほとんど例外なく大量に蓄積されており，その抗原性は通常のパラフィン包埋切片のみならず，凍結切片を用いた迅速な固定操作においても十分に保存されることから，精巣胚細胞腫瘍の新たな組織学的マーカーとして有望であると考えられた。

キーワード：Gb₃，精巣腫瘍，免疫組織化学

緒 言

精巣胚細胞腫瘍のマーカーとしては，絨毛癌に対する human chorionic gonadotropin（HCG）や卵黄嚢腫瘍の α -fetoprotein（AFP）が広く用いられている¹⁾。しかし，精巣胚細胞腫瘍のなかで最も発生頻度の高いセミノーマに関しては lactate dehydrogenase（LDH）や placental alkaline phosphatase（PLAP）が時おり用いられているが²⁾³⁾，組織学的にも血清マーカーとしてもその有用度は限られ，新たなマーカーの開発が待たれている。

我々は細胞膜の重要な構成成分であり，近年，癌関連抗原として注目を集めている糖脂質^{4)~6)}に着目し，泌尿生殖器系悪性腫瘍における糖脂質発現パターンに関する検討を重ねてきた^{7)~10)}。その中で，精巣胚腫瘍では，globotriaosyl ceramide（Gb₃）が正常精巣組織に比し著明に蓄積していることを明らかにし¹¹⁾，さらに，セミノーマと肉眼的，組織学的所見が類似する精巣悪性リンパ腫では，セミノーマで特徴的な Gb₃の増加を欠くことを明らかにしてきた¹²⁾。そこで今回は Gb₃を精巣胚細胞腫瘍の組織学的マーカーとして確立するべく，anti-Gb₃ monoclonal antibody（1A4）を用いて，固定法の検討を含めた免疫組織化学的検索を行った。

対象と方法

1. ホルマリン固定パラフィン包埋切片

1985年から1990年の間に，当科にて手術的に摘出された精巣胚腫瘍の原発巣31例（病理組織型は，セミノーマ（S）：16例，胎児性癌（E）：6例，奇形腫（T）：4例，絨毛癌（C）：1例，卵黄嚢腫瘍（Y）：1例，S+E+T：2例，S+E+Y：1例と，精巣悪性リンパ腫4例（diffuse，large，noncleaved cell 3例，diffuse，large，polymorphous 1例）を用いた。正常組織として，前立腺癌に対する除睾術によって得られた正常精巣組織18例，剖検例より得られた肝：2例，腎：2例，脾：3例，膵：3例，肺：2例，唾液腺：1例，甲状腺：3例，副腎：2例，膀胱：2例，前立腺：2例，回腸：1例，直腸：1例を用いた。

2. 凍結切片

精巣胚細胞腫瘍組織10例（E：5例，S：5例），正常精巣組織15例，正常肝，腎，脾，肺，脳，心筋各1例を OCT compound を用いて液体窒素で凍結し，-80℃で保存した。クライオスットにて5μmの薄切切片を作製し，30分風乾させた後，以下の各処理法を行った。

A：風乾に引き続き免疫組織染色を行った。

B：アセトン（4℃）で10分間固定した後免疫組織染色。

C：アセトン（4℃）で30分間固定した後免疫組織染色。

Table 1 ホルマリン固定パラフィン包埋切片の染色結果

腫瘍組織	(++)	(+)	(-)	陽性/総数
S	4	12	0	16/16
E	3	3	0	6/6
C	1	0	0	1/1
T	1	2	1	3/4
Y	1	0	0	1/1
S+E+T	0	1	1	1/2
E+S+Y	1	0	0	1/1
ML	0	0	4	0/4
正常組織				
精巣	0	2	16	2/18
肝	0	2	0	2/2
脾	0	1	2	1/3
膵	0	3	0	3/3
肺	0	0	2	0/2
唾液腺	0	0	1	0/1
甲状腺	0	0	3	0/3
副腎	0	0	2	0/2
膀胱	0	0	2	0/2
前立腺	0	0	2	0/2
回腸	0	1	0	1/1
直腸	0	1	0	1/1

(++)：強陽性 (+)：陽性 (-)：陰性
S：seminoma E：embryonal carcinoma C：choriocarcinoma T：teratoma Y：yolksac tumor ML：malignant lymphoma

Fig. 1 a: セミノーマ (ホルマリン固定パラフィン包埋切片, $\times 100$) 1A4陽性 membraneous pattern. b: 胎児性癌 (ホルマリン固定パラフィン包埋切片, $\times 40$) 1A4陽性, membraneous pattern.

D: 90%エタノール(4℃)で10分間固定した後免疫組織染色。

E: クロロホルム: メタノール = 2: 1 (v/v) 溶液に10分間浸した後免疫組織染色。

F: 4%パラホルムアルデヒド(PFA)で10分間固定した後免疫組織染色。

3. 免疫組織染色

すでに述べた avidin-biotin complex method (ABC法)¹³⁾で免疫組織染色を行った。以下にその概要を述べる。ホルマリン固定パラフィン包埋切片は、脱パラフィン後、0.5%スキミルックにてブロッキング、0.3% H_2O_2 メタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロックした。一次抗体は抗 Gb₃ MAb (1A4) (マウス IgM) を室温で一晩反応させ、二次抗体は Vectastain ABC kit (VECTOR) のビオチン化抗マウス IgM を1時間反応させた。次いで、同 kit の ABC 試薬を1時間反応させ、0.025% diaminobenzidine で発色させた。1A4は The Biomembrane Institute, Seattle, WA, U.S.A. の Prof. Hakomori よりハイブリドーマ¹⁴⁾を譲りうけ、その培養上澄を用いた。

凍結切片は、内因性ペルオキシダーゼを0.3% H_2O_2 リン酸緩衝液でブロックした他は、パラフィン包埋切

片と同様の操作を施した。

免疫組織染色の染色性を強陽性(++)、陽性(+)、陰性(-)の3段階に分類した。

結 果

1. ホルマリン固定パラフィン包埋切片の染色結果を Table 1 に示した。精巣胚細胞腫瘍組織の陽性率は S: 16/16 (陽性例/総数), E: 6/6, C: 1/1, T: 3/4, Y: 1/1, S+E+T: 1/2, E+S+Y: 1/1であったが精巣悪性リンパ腫は4例すべて陰性であった。精巣胚細胞腫瘍組織の染色パターンは、membraneous patternが多かったが(Fig. 1), 細胞質も強く染色される例も認められた(Fig. 2)。奇形腫においては、腺腔構造をとる細胞が陽性を呈したが、軟骨組織は陰性であった(Fig. 3)。今回の検討では、精巣胚細胞腫瘍の組織型による陽性率の差は認めなかった。

正常精巣組織の陽性率は2/18であったが、陽性例では、peritubular myoid 細胞は陰性で、精祖細胞や精母細胞が弱く染色され、強陽性例はなかった。セルトリー細胞の染色性は判断不能であった。他の正常組織では、肝、腎、脾、膵、回腸、直腸に陽性例を認めたが、染色性は弱く強陽性例はなかった。腎においては、糸球体は陰性で尿細管系が弱く染色され、膵では、腺房細

Fig. 2 a: セミノーマ, b: 胎児性癌, c: 絨毛癌, d: 卵黄囊腫瘍 (ホルマリン固定パラフィン包埋切片, $\times 200$) いずれも1A4陽性で細胞質も染色されており強陽性と判断した。

胞が陽性を呈したが、ランゲルハンス島細胞は陰性であった。回腸や直腸では、腺組織が弱く染色された。Fig. 4 に正常精巣と腎の染色標本を示した。

2. 凍結切片の処理法 (固定法) により染色性は大きく変化した (Fig. 5)。処理法 A. (風乾のみ), 処理法

B (アセトン固定10分), 処理法 F (4% PFA 10分固定) がホルマリン固定パラフィン包埋切片とほぼ同様の陽性率であったが、精巣胚細胞腫瘍組織の強陽性例の割合は処理法 A が6/10, 処理法 F が7/10でパラフィン包埋切片の7/22 (セミノーマ16例+胎児性癌6例) より

Fig. 3 奇形腫（ホルマリン固定パラフィン包埋切片）a：気管上皮様の腺管構造をなす部分が染色されているが（ $\times 400$ ），b：軟骨の部分は陰性である（ $\times 200$ ）。

Fig. 4 a：正常精巢（ホルマリン固定パラフィン包埋切片， $\times 100$ ）1A4陰性，b：正常精巢（ホルマリン固定パラフィン包埋切片 $\times 100$ ）1A4陽性，精細管辺縁の幼若な精細胞が弱く染色されている（ $\times 200$ ），c：腎（ホルマリン固定パラフィン包埋切片）糸球体は陰性で，近位一遠位尿細管が弱く染色されている（ $\times 200$ ）。

Fig. 5 凍結切片の処理法による染色性の変化

Fig. 6 セミノーマの凍結切片での染色性の変化. a: 4%PFA 固定や, b: 風乾のみでは強陽性を呈するが, c: 90%エタノール固定では陰性化する (×200).

多く, 処理法 B (アセトン固定10分) では4/10とやや低下した. 処理法 C (アセトン固定30分) や処理法 E (クロロホルム: メタノール= 2: 1 溶液10分) では処理法 A, B, F で強陽性や陽性を呈した精巣胚細胞腫瘍組織の半数が陰性化し, 処理法 D (90%エタノール10分) では, 全例が陰性化した. 正常組織では, 処理法 A, B, F で精巣, 肝, 腎に陽性例を認めたが, 処理法 C では肝1例のみが陽性を呈し, 処理法 D や E ではすべての正常組織が陰性となった. Fig. 6 に凍結切片 (セミノーマ, 胎児性癌) の処理法による染色性の変化

を示した.

考 察

globotriaosylceramide (Gb₃) は ceramide に糖が 3 分子結合したもので, Gal α1-4 Gal β1-4Glc β1-ceramide という簡単な構造の糖脂質であり¹¹⁾, ヒト組織中では赤血球, 肝, 腎などに分布している¹⁵⁾. しかし, ヒトテラトカルシノーマの cell line である2102Ep に発現している糖脂質の中で Gb₃ が最も大量であること¹⁶⁾, Burkitt lymphoma や¹⁴⁾平滑筋肉腫に大量に蓄積していること¹⁷⁾などより, Gb₃ は, ある程度特異性を

持った腫瘍関連抗原と見なすことができる。

我々はすでに、精巣胚細胞腫瘍組織と正常精巣組織から糖脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィ (TLC) で糖脂質発原パターンを比較した。その結果、精巣胚細胞腫瘍組織では、ceramide trihexoside が著明に増加しており、この ceramide trihexoside を酵素分解、TLC 免疫染色、radioimmunoassay で構造決定し、Gb₃であることを明らかにしている。この変化は、組織型を問わずセミノーマ、胎児性癌、奇形腫に共通した変化であり、Gb₃精巣胚細胞腫瘍（とりわけ、有用なマーカーの存在しないセミノーマにおいて）の新たな腫瘍マーカーとして有望であると結論した¹¹⁾。さらに、セミノーマ（特に anaplastic seminoma）と組織学的鑑別が困難な精巣悪性リンパ腫においては Gb₃ がほとんど発現しておらず、糖脂質発現パターンの比較によって両者の鑑別が客観的かつ clear cut に可能なことを報告してきた¹²⁾。

そこで今回は、Gb₃を精巣胚細胞腫瘍の組織学的マーカーとして応用すべく、anti-Gb₃ MoAb (1A4) による免疫組織化学的検討を行った。

免疫組織化学では、まず固定法が問題となる。Gb₃は中性糖脂質の globoseries に属する糖脂質であるから、一般にはパラホルムアルデヒドによる固定が最適とされている。しかし、Gb₃を精巣腫瘍の組織学的マーカーとして広く応用するには、最も一般的に行われているホルマリン固定パラフィン包埋切片での染色性を検討する必要がある。また、迅速な診断を行うためには、凍結切片、及び吸引細胞診の検体における抗原性を効率良く保存する固定法を検討する必要がある。

今回の検討により、TLC で得られた Gb₃発現様式、すなわち、精巣胚細胞腫瘍組織に大量に認められ、正常組織や精巣悪性リンパ腫にはほとんど認められないという結果は、そのまま組織上でも確認できることが判明した。さらに、組織処理法に関しては、凍結切片では 4 % PFA 固定、風乾のみ、アセトン 10 分固定の順に適しており、ホルマリン固定パラフィン包埋切片も十分利用できることが確認された。

また、今回の処理法の中で、抗原性の保持が十分でなかったエタノール、長時間アセトン固定、及び、クロロホルム-メタノール処理の結果より、Gb₃は精巣胚細胞腫瘍、正常組織の双方において主に糖脂質として存在しているものと考えられ、1A4 による染色性の違いは単純に Gb₃の量的な差を反映しているものと考えられた。

Gb₃は、もともと P 式血液型の P^k抗原として同定されたもので¹³⁾、ヒト組織では、赤血球をはじめ肝腎など種々の臓器に分布している。他の泌尿器系正常組織としては、腎⁹⁾、前立腺¹⁰⁾、膀胱¹⁹⁾の Gb₃の量は、TLC 上の ceramide trihexoside 分画から判断して、正常精巣とほぼ同等であった。しかし、精巣胚細胞腫瘍組織には、正常精巣組織の 50~100 倍の Gb₃が存在し¹¹⁾、この量的な差がそのまま染色性に反映されたともいえる。

正常精巣組織は、ほとんどが A14 陰性であったが、パラフィン包埋切片で 2 例が陽性であった。これは、正常精巣組織の Gb₃の量が免疫組織化学的な検出限界に近く、固定や染色過程の影響を受けやすいためと考えられる。しかし、この正常精巣は前立腺癌症例由来であり、年齢やホルモン療法の影響を考慮すると、厳密な意味では精巣腫瘍の発生源地としてのコントロールにはならない。今後、若年者や胎児の精巣での検討が必要である。

今回の検討により、TLC で認められる Gb₃の大きな変化を、組織上の腫瘍マーカーとして利用し得ることが確認され、Gb₃の腫瘍マーカーとしての使用がさらに現実的かつ容易となった。今後、精巣腫瘍症例における Gb₃の血中濃度を測定することにより、血中マーカーとしての可能性を検討する予定である。

文 献

- 1) Javadpour, N.: Serum and cellular markers in testicular cancer. in *Principles and Management of Testicular Cancer*, p. 155-166, G. Thieme Inc., New York, 1986.
- 2) Ford, T.F., Butcher, D.N., Samuelli, C.T., Masters, J.R.W., Constance Parkinson, M. and Oliver, R.T.D.: Serum and tissue tumour markers in seminomas. *Br. J. Urol.*, 57, 750-754, 1985.
- 3) Lange, P.H., Millan, J.L., Stigbrand, T., Vessella, R.L., Ruoslahti, E. and Fishman, W.H.: Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for seminoma. *Cancer Res.*, 42, 3244-3247, 1982.
- 4) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733-764, 1981.
- 5) Hakomori, S.: Glycolipids of tumor-cell membrane. *Adv. Cancer Res.*, 18, 265-315, 1973.
- 6) Hakomori, S. and Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers—A guest editorial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71, 231-251, 1983.

- 7) Fukushi, Y., Kannagi, R., Hakomori, S., Shepard, T., Kulander, G. and Singer, I.W.: Location and distribution of difucoganglioside (VI³ NeuAc V³III³ Fuc₂ nLc₆) in normal and tumor tissue defined by its monoclonal antibody FH6. *Cancer Res.*, **45**, 3711—3717, 1985.
- 8) Fukushi, Y., Orikasa, S., Shepard, T. and Hakomori, S.: Changes of Le^x and dimeric Le^x haptens and their sialylated antigens during development of human kidney and tumors. *J. Urol.*, **135**, 1048—1059, 1986.
- 9) Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C., Satoh, M. and Fukushi, Y.: Changes in glycolipids in human renal-cell carcinoma and their clinical significance. *Int. J. Cancer* **49**, 329—334, 1991.
- 10) Satoh, M., Fukushi, Y., Kawamura, S., Ohyama, C., Saito, S., Orikasa, S., Nudelman, E. and Hakomori, S.: Glycolipid expression in prostatic tissue and analysis of the antigen recognized by antiprostatic monoclonal antibody APG1. *Urol. Int.*, **48**, 20—24, 1992.
- 11) Ohyama, C., Fukushi, Y., Satoh, M., Saitoh, S., Orikasa, S., Nudelman, E., Straud, M. and Hakomori, S.: Changes in glycolipid expression in human testicular tumor. *Int. J. Cancer*, **45**, 1040—1044, 1990.
- 12) Ohyama, C., Orikasa, S., Satoh, M., Saito, S., Ohtani, H. and Fukushi, Y.: Globotriaosylceramide glycolipid in seminoma: Its clinicopathological importance in differentiation from testicular malignant lymphoma. *J. Urol.*, **148**, 72—75, 1992.
- 13) 大山 力, 中角尚誉, 佐藤 信, 吉川和行, 星 宣次, 折笠精一, 林 隆則, 光野 聡, 村上房夫, 黒須清一, 千葉隆一, 箱崎半道: Bromodeoxyuridine in vivo labeling による膀胱腫瘍のS期細胞の検討. *日泌尿会誌*, **81**, 524—531, 1990.
- 14) Nudelman, E., Kannagi, R., Hakomori, S., Parsons, M., Lipinski, M., Wiels, J., Fellous, M. and Tursz, T.: A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science*, **220**, 509—511, 1983.
- 15) 生化学データブック I, 日本生化学会編, p. 839, 東京化学同人, 東京, 1979.
- 16) Kannagi, R., Lavery, S.B., Ishigami, F., Hakomori, S., Shevinsky, L.H., Knowles, B.B. and Solter, D.: New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, Stage-specific embryonic antigen 3. *J. Biol. Chem.*, **258**, 8934—8942, 1983.
- 17) Li, S.-C., Kundu, S.K., Degasperri, R. and Li, Y.-T.: Accumulation of globotriaosylceramide in a case of leiomyosarcoma. *Biochem. J.*, **240**, 925—927, 1986.
- 18) 内貴正治: P 式血液型における最近の進歩. *生化学*, **51**, 1240—1248, 1949.
- 19) 川村貞文, 福士泰夫, 佐藤 信, 斉藤誠一, 吉川和子, 星 宣次, 折笠精一: ヒト膀胱癌における糖脂質発現パターンの変化. 第49回日本癌学会総会記事, p. 366, 1990.

(1993年3月1日受理)