Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)による 悪性リンパ腫の検索

安見 和彦¹⁾, 田丸 淳一¹⁾, 浅井 隆善²⁾
三方 淳男¹⁾

1) 千葉大学医学部第一病理学教室

2) 千葉大学医学部付属病院輸血部

(平成3年12月9日受付)
(平成4年3月4日受理)

Immunohistological study of malignant lymphomas using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Kazuhiko Yasumi¹⁾, Jun-ichi Tamaru¹⁾, Takayosi Asai²⁾, Atsuo Mikata¹⁾

1) First Department of pathology, Chiba University School of Medicine

2) Division of Blood Transfusion, Chiba University Hospital

Proliferative activity of neoplastic and non-neoplastic cells in 123 lymphoma cases [non-Hodgkin's lymphoma (NHL) 70 cases, Hodgkin's disease (HD) 53 cases], as well as 18 control reactive lymphadenopathies, was estimated by employing immunohistochemical procedures [avidin-biotin complex (ABC) method] with a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is synthesized during the late G1 and S phases. Immunostaining of PCNA was achieved using sections of formalin fixed and paraffin embedded lymphoma tissue stored in the pathology files of our departments and of some affiliated institutions. PCNA positive rates (positive cells/total cells) were determined, and relationship between these rates and pathological parameters were investigated. There was a positive correlation between the PCNA positive rates and a Working Formulation in NHL ($P < 0.05$). In HD, Reed-Sternberg (RS) cells were highly positive (44%). No relationship was found, however, between the PCNA positive rates and a Rye classification. This finding may be explained either by speculating the cell cycle of RS cells deranged in a manner that G1-S phases are prolonged or, alternatively, that proliferated RS cells destroyed by host reaction. These results indicate that PCNA immunostain is a useful method to analyse malignant lymphomas in formaldehyde fixed, paraffin embedded materials.

Key words : PCNA (proliferating cell nuclear antigen), non-Hodgkin lymphoma, Hodgkin disease

は じ め に

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は増殖細胞の G1後期から S 期において最も増加する分子量36KD の核蛋白で DNA ポリメラーゼ δ の補助因子サイクリンとして知られている細胞増殖に関連した蛋白である。

1978年に、Miyachi らが SLE 患者のうち3%に増殖細胞核のみと反応する自己抗体を発見し、その抗原を PCNA と命名した¹⁾。またその後、これとは別にポリメラーゼ δ の研究グループからもその補助蛋白として報告されている²⁾。PCNA は他の細胞増殖抗原と異なりその抗原性が、通常のホルマリン固定、パラフィン包埋によってもある程度保存されることが知られている³⁾⁴⁾。この特性により、いままで行われてきた BrdU 取り込み⁵⁾や、Ki-67反応性抗原を測定する方法⁶⁾と違い、過去のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を利用して免疫組織化学的に増殖細胞の比率を測定できる⁷⁾⁸⁾。従って比較的頻度の低い疾患の検索には非常に有用である⁹⁾。

今回、PCNA 抗体を使用し過去の症例にさかのぼって非ホジキンリンパ腫、ホジキン病症例を中心に免疫染色法により腫瘍細胞の増殖性の検索を行った。

材 料 と 方 法

1. 材 料

非ホジキンリンパ腫と非腫瘍性病変例は千葉大学付属病院で、ホジキン病症例は千葉大学付属病院とその関連病院、慶応大学病理学教室とその関連病院において生検診断用に採取され、通常の方法で処理されたパラフィン包埋標本を使用した。症例の病理診断は表に示した(表1)。

症例数は141例、内訳は“正常”または反応性病変18例(“正常”3例、リンパ濾胞過形成9例、T領域過形成5例、混合性過形成1例)非ホジキンリンパ腫70例(B細胞性51例、T細胞性19例)、ホジキン病53例である。

2. 組織型の決定

非ホジキンリンパ腫においては、Working Formulation (WF) 分類¹⁰⁾¹¹⁾の major category で組織型を分類し、免疫染色(後出)によってT細胞性とB細胞性に分けて検討した。またB細胞性リンパ腫のうち背景に非腫瘍性T細胞の浸潤が特に強いものがみられたので、これらの症例をT infiltration

表1 検索対象例

非ホジキンリンパ腫	70
T細胞性	19例
B細胞性	51例
ホジキン病	53
LP	10例
MC	27例
NS	12例
LD	4例
反応性病変	18
T領域過形成	5例
濾胞過形成	9例
混合性病変	1例
その他	3例

rich B細胞性リンパ腫として別に分類した。なお、これらの症例はWF分類ではびまん性大細胞型に分類された(表5)。

ホジキン病の組織型はRyeの分類¹²⁾¹³⁾に従った。

3. 免疫染色

PCNAの抗原性はホルマリンの固定時間に左右されるといわれている。そこで“正常”リンパ節を使用し、10%ホルマリン使用時の固定時間の染色性に与える影響について検討した。

材料は外科手術で得られたリンパ節で切除後直ちに半割し、ホルマリンで固定を行った。固定時間は3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、7日間で固定終了後通常の方法でパラフィンブロックを作成した。その後PCNA免疫染色を行い、各標本のリンパ濾胞芽中心における陽性率を計測した。

免疫染色は通常のstreptavidin biotin (ABC)法で(DAKO社製Avidin-Biotin System)を行った。抗体には(DAKO-PCNA PC 10¹⁴)を用い発色は3-, 3'diaminobenzidine, (DAB)で行い二重染色時には、まず第1抗体をDABで茶褐色に呈色させた後、第2抗体はアルカリファスターゼABC法を行い、ファストブルーで青く呈色させた。

腫瘍細胞のT/Bのマーカーを決定するために、UCHL-1, MT-1の等量混合液、或いはL26, MB-1の等量混合液で染色の後、抗PCNA抗体で二重染色を行い、核染色は省略した。使用した抗体の各々の希釈倍率は表に示した(表3)。

表2 使用した抗体と希釈倍率

抗体	発売元	クローン	特異性	希釈倍率
PCNA	DAKO	PC10	増殖細胞核	100倍
MT-1	Bio-science		T細胞, 一部B細胞	50倍
UCHL-1	DAKO	UCHL-1	T細胞 CD45RO	500倍
MB-1	Bio-science		B細胞, 一部T細胞	50倍
L26	DAKO	L26	B細胞 CD20	750倍

表3 PCNA 陽性率の固定時間による変化

経過時間	3	6	12	24	48	7日
陽性率%	50.4	57.3	50.0	50.0	53.1	0.0

表4 反応性病変の PCNA 陽性率

	症例数	T細胞	濾胞外B細胞	濾胞B細胞
濾胞過形成	9	2.8(± 2.4)	1.5(± 1.2)	37.2(±14.4)
T領域過形成	5	3.5(± 3.3)	0.6(± 0.5)	28.3(±16.8)
混合性過形成	1	0.7	10.9	26.6
" 正常"	3	0.1(±0.2)	0.1(± 0.1)	21.2(± 5.6)

平均値% (±標準偏差)

4. 陽性率の算出

陽性率の算出は顕微鏡下に行った。非ホジキンリンパ腫では二重染色により T 細胞性と B 細胞性に分け、それぞれ代表的な腫瘍部位 4 ヶ所で、各100個以上の細胞中（総数400～600個）の陽性細胞数を計測し算出した。腫瘍細胞か浸潤細胞かの判定は、細胞異型、異型細胞密度とその T/B 染色性により、また PCNA 陽性は染色性の強弱にかかわらず、核のみが染色されたものを陽性と判定した。また濾胞性病変の場合は濾胞内と濾胞外に分けて計測した。

ホジキン細胞、リードステルンベルグ (RS) 細胞等の陽性率は、1症例につき50個以上の RS 細胞を選び、その中で核が明らかに陽性である細胞の個数を計測し算出した。この際、細胞質が陽性の細胞は除外した。

背景のリンパ球は二重染色により T 細胞性と B 細胞性に分け、それぞれ RS 細胞の出現している病

変部と思われる部位で非ホジキンリンパ腫と同様に計測した。

検討の対象とした141例以外に、PCNA や PanT, PanB 抗体のいずれかがまったく陽性にならなかった症例31例（ホジキン病8例, T 細胞性非ホジキンリンパ腫7例, B 細胞性非ホジキンリンパ腫11例, 非腫瘍性病変5例）は除外した。

結果は二標本 t 検定を行い評価した。

結 果

1. 免疫組織化学的検討

固定時間3時間から48時間のあいだでは PCNA 陽性率は50.0%から57.4%を示し大きな差はみられなかった。しかし7日間の固定ではリンパ濾胞に PCNA 陽性細胞はみられず、その染色性は著しく低下しており判定は不能であった（表3）。

当教室で通常に処理されるリンパ節生検材料の固

図1a 反応性病変 濾胞過形成 (PCNA+Pan-B)

芽中心の大型細胞の多くは核が抗 PCNA 抗体陽性(青色)，細胞膜は PanB 抗体陽性(褐色)である(矢印)。暗殻，濾胞内にも核が青染する PCNA 陽性リンパ球が散在する。

図1b 反応性病変 T領域過形成 (PCNA+Pan-T)

T領域のTリンパ球(細胞膜がPanTで褐色)は，少数ながら核が青染(PCNA陽性)するものがある。

定時間は大部分一昼夜(12~24時間)であり，ほとんどの症例ではその染色性に影響はないと思われる。総計172例中31例(約18.2%)で PCNA, PanT, PanB 免疫染色が判定不能であった原因の大部分は固定過剰によると推測された。

2. 反応性病変の PCNA 陽性率

反応性病変における T 細胞, B 細胞, 濾胞芽中心の B 細胞の, 抗 PCNA 抗体陽性率の平均値はそれぞれ, 2.4%, 3.1%, 31.7%であった(表4)。

“正常”例, 濾胞性過形成例(図1a), T 領域過形

図2a High grade に分類されるバーキットリンパ腫 (H-E 染色)

図2b 同症例腫瘍性 B 細胞 (PCNA+PanB)

多数の PanB 陽性細胞の核は PCNA 陽性 (青染) である。

成例 (図1b) の間には T 細胞, B 細胞, 濾胞の B 細胞ともに PCNA 陽性率に有意差はなかった。

3. 非ホジキンリンパ腫の PCNA 陽性率

低悪性度群に分類されるのは濾胞性リンパ腫 (8例), びまん性小リンパ球型リンパ腫 (3例), 中悪性度群に分類されるのはびまん性小切れ込み細胞型 (8例), 混合細胞型 (8例), 大細胞型 (9例), 高悪性度群に分類されるのは小型非切れ込み細胞型

(5例) (図2), 免疫芽球型 (11例), リンパ芽球型 (4例) (図3) であった。

B 細胞性リンパ腫における PCNA 陽性率は表に示すごとく, びまん性小リンパ球の $2.4 \pm 1.6\%$ からびまん性大細胞型 T infiltration rich B 細胞型 (図4) の $38.5 \pm 10.5\%$ に分布した (表5)。腫瘍細胞の PCNA 陽性率は混在する非腫瘍性細胞の陽性率より有意に高かった ($P < 0.01$)。濾胞性リンパ腫

図3a T infiltration rich B細胞リンパ腫 (H-E 染色)
中型, 小型の浸潤 T リンパ球が多い。

図3b 同症例浸潤 T 細胞 (PCNA + UCHL-1)
大型異型の腫瘍細胞は PanB 陽性 (褐色) で, 核は PCNA 陽性 (青染) である。

図3c 同症例腫瘍性 B 細胞 (PCNA + Pan-B)
浸潤 T 細胞では核の青染 (PCNA 陽性) はごく少数である。

を除く低悪性度群 (平均2.4%) と中悪性度群 (平均23.9%) の PCNA 陽性率を比較すると中悪性度群が有意に高いことがわかった ($P < 0.05$)。また高悪性度群 (平均31.6%) も中悪性度群より有意に高か

った ($P < 0.05$)。

また, 背景に非腫瘍性の T 細胞の浸潤の高度な症例 (T infiltration rich B細胞性リンパ腫) の腫瘍細胞の PCNA 陽性率は, 平均35.8%と通常のびま

図4a High grade に分類されるリンパ芽球型症例 (H-E 染色)

図4b 同症例腫瘍性 T 細胞 (PCNA+Pan-T)
PCNA 陽性細胞 (核が青染) が多い。

ん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の PCNA 陽性率 23.0%より有意に高かった ($P<0.05$)。しかし、背景の T 細胞の陽性率には両者の間に有意差はみられなかった (表 6)。

濾胞性リンパ腫の腫瘍細胞と反応性病変の濾胞芽中心細胞には PCNA 陽性率の有意差がみられず、またびまん性小細胞性 B リンパ腫でも、反応性リンパ節における濾胞外の B リンパ球の陽性率 1.6%に

比べ有意差はなく、低悪性度群リンパ腫での陽性率は非腫瘍性病変の PCNA 陽性率と有意差はみられなかった。

T 細胞性リンパ腫についても同様に検索した (表 7)。T 細胞性リンパ腫においても腫瘍細胞の PCNA 陽性率は非腫瘍性のそれより有意に高かった ($P<0.01$)。今回検索した症例中には T 細胞性リンパ腫においても高悪性度群の陽性率が中悪性度群

表5 B細胞性非ホジキンリンパ腫のPCNA陽性率(WF分類)

	症例数	腫瘍細胞	非腫瘍T細胞	非腫瘍B細胞
軽度悪性群				
濾胞性	8	30.4(± 9.8)	2.8(± 2.2)	3.2(± 2.2)
びまん性 小リンパ球型	3	2.4(± 1.6)	0(± 0)	
中等度悪性群				
びまん性 小切れ込み				
細胞型	6	7.6(± 1.4)	1.8(± 0.9)	
混合型	5	24.9(± 8.5)	3.0(± 1.2)	
大細胞型	7	23.0(± 6.8)	1.7(± 0.9)	
(Tcell rich B)	9	35.8(±10.5)	2.3(± 0.9)	
高度悪性群				
小型非切れ込み細胞型				
(パークット)	5	29.4(± 4.7)	1.9(± 2.7)	
免疫芽球型	8	33.0(± 6.1)	0.2(± 0.2)	
平均値%(±標準偏差)				

のそれより有意に高かった ($P<0.01$) (表8)。

また特殊型としてレンネルト型リンパ腫 (8.6%) IBL 様 T 細胞性リンパ腫 (平均11.8%), Ki-1陽性リンパ腫(平均7.5%)があったが、これら症例は WF 分類では分類不能であり悪性度分類には加えなかった。

4. ホジキン病の PCNA 陽性率

ホジキン細胞, RS 細胞(図5)の PCNA 陽性率は、組織型別に LP 型60.7%, MC 型52.7%, NS 型48.7%, LD 型53.5%であった(表9)。全例の PCNA 陽性率は平均53.1%と高値をとり、この値は非ホジキンリンパ腫のいずれの組織型の腫瘍細胞の陽性率より有意に高かった ($P<0.01$)。

ホジキン病の Rye 分類は予後と相関がみられるといわれているが¹³⁾、組織型間でホジキン細胞の PCNA 陽性率に有意差はみられなかった。

また、ホジキン病の背景 T 細胞の PCNA 陽性率 (平均10.9%) は、非ホジキン B リンパ腫や反応性病変の非腫瘍性 T 細胞の陽性率 (平均1.7%及び2.4%) より有意に高かった ($P<0.01$)。さらに LP 型、MC 型で背景 T 細胞の PCNA 陽性率が B 細胞の陽性率より有意に高い値をとった ($P<0.05$)。

考 察

腫瘍細胞の増殖能を悪性度の指標とする事は広く行われている。H-E 標本で核分裂像を計測することは簡便な方法である^{15)~17)}。しかしこの方法は再現性が低いなど多くの問題が指摘されている^{18)~20)}。また BrdU や、Ki-67反応性抗原を利用する方法は客観性は増すが、それぞれ生材料や凍結切片を必要とし検索の範囲は限られる。これらの方法に比べて PCNA の免疫染色法は、ホルマリン固定パラフィン切片での検索が可能であることに大きな特色がある。しかし PCNA の抗原性はホルマリンによる固定時間に大きく左右されるといわれている⁹⁾。今回の検索の結果、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた PCNA 免疫染色は、固定時間が48時間程度であれば、固定による抗原性の消失はほとんど見られず、細胞の増殖性 (G1後期~S 期細胞率) をよく反映していると思われた。従って通常の方法によって作成された生検用の標本を使つての PCNA の検索は非常に有用であると考えられる。

上記の結果に基づき過去の症例を用いてホジキン病、非ホジキンリンパ腫において PCNA 陽性率と組織学的悪性度に相関があるかを検討した結果、非ホジキンリンパ腫では、濾胞性リンパ腫を除くと

表6 PCNA positive rates of Non Hodgkin's B cell Lymphoma

F:濾胞性 DS:びまん性小リンパ球型 DSC:びまん性小切れ込み細胞型
 DM:混合型 DL:大細胞型 TrB:Tcell rich B細胞型
 SNC:小型非切れ込み細胞型(バーキット) IBL:免疫芽球型

表7 T細胞性非ホジキンリンパ腫のPCNA陽性率(WF分類)

	症例数	腫瘍細胞%	非腫瘍B細胞
軽度悪性群			
中等度悪性群			
びまん性 小切れ込み			
細胞型*	2	5.9(± 2.5)	0.6(± 0.8)
混合型	3	5.3(± 3.9)	0(± 0)
大細胞型	2	5.7(± 2.7)	0.2(± 0.2)
高度悪性群			
免疫芽球型多型細胞型	3	32.1(± 4.8)	0.3(± 0.3)
リンパ芽球型	4	21.5(± 7.8)	0.4(± 0.5)
特殊型			
Lennert 型リンパ腫	1	8.6	5.6
IBL 様 T リンパ腫	2	12.8(± 6.4)	8.4(± 7.9)
Ki-1 陽性リンパ腫	2	8.0(± 3.1)	1.2(± 1.2)

* LSG の中細胞型

平均値% (±標準偏差)

表8 PCNA positive rates of Non Hodgkin's T cell Lymphoma

DSC：びまん性小切れ込み細胞型 DM：混合型 DL：大細胞型

IBL：免疫芽球型多型細胞型 LBL：リンパ芽球型

表9 ホジキン病のPCNA陽性率

	症例数	ホジキン細胞	背景T細胞	背景B細胞
LP	10	58.0(±39.2)	9.4(± 4.6)	0.9(± 0.7)
MC	27	43.1(±26.1)	11.9(± 4.9)	2.5(± 4.8)
LD	4	32.1(±33.6)	ND	ND
NS	12	48.7(±23.6)	10.9(± 5.2)	0.5(± 0.8)

平均値% (±標準偏差)

WF分類による組織学的悪性度とPCNA陽性率は良く相関することが判明した。今回調査した範囲では、悪性リンパ腫の多数例でPCNAの陽性率と病理組織学的所見の関連を検討した報告はまだ発表されていない。HallらがPCNAを用いた腫瘍細胞増殖能の研究で、悪性リンパ腫でもKi-67陽性率とPCNA陽性率が良く相関することを示しているのみである²¹⁾。

Ki-67を使用し、悪性リンパ腫における腫瘍細胞の陽性率をWF分類の組織型ごとに比較検討したWeissらの論文²²⁾では、各組織型における腫瘍細胞のKi-67の陽性率が、小細胞型の11%から小細胞非切れ込み型の86%と、今回の検索した陽性率より高

値であった。しかし、各悪性度間の陽性率の傾向は今回の検索とはほぼ同様であった。全般的に我々のPCNA陽性率が低い傾向であるが、これは、Ki-67が細胞周期に入っている全ての細胞で陽性になるのに対し、PCNAはG1後期からS期の細胞で表出されるためと思われる。

また、悪性リンパ腫を使用しPCNAとKi-67の陽性率の相関を検討した論文としてはKamelらの報告²³⁾があり、PCNAとKi-67の陽性率には強い相関が見られるとしており、PCNAの陽性率は、低悪性度群では26%、中悪性度群では54%と、今回の検索よりかなり高値をとっている。我々の陽性率との相違はおそらく使用クローン(Kamelらは19A2)や二

図5a ホジキン病症例 (PCNA)

RS 細胞の核が陽性である。核染色は行っていない。

図5b 同症例 (PCNA + Pan-T)

背景の T リンパ球 (膜が PanT で褐色) には, PCNA 陽性細胞が多い。

図5c 同症例 (PCNA + Pan-B)

背景の B リンパ球での PCNA 陽性細胞は少ない。

次抗体の相違, 陽性率算定法の相違によるものと思われる。

リンパ濾胞芽中心では正常もしくは非腫瘍性病変においても陽性率は高値 (平均31.7%) をとり, 濾胞性リンパ腫における PCNA 陽性率と有意差は見られなかった。小細胞性びまん性リンパ腫において

も非腫瘍性病変の濾胞外 B 細胞の陽性率との間に有意差はみられなかった。すなわち, 低悪性度群リンパ腫においては, 腫瘍化と細胞分裂能の亢進は必ずしも平行しないことがわかった。

ホジキン病においては Rye 分類による組織型と RS 細胞の PCNA 陽性率に相関はなかった。しか

し、ホジキン病のRS細胞のPCNA陽性率(平均54.4%)は、非ホジキンリンパ腫のいずれの組織型よりも高い値を示した。Ki-67を使用したRS細胞の陽性率は、Gerdesらの研究²⁴⁾では78%から83%であった。我々の陽性率との差は、前述のごとく細胞周期においてKi-67とPCNAが陽性となる期間の違いによると思われる。また、ホジキン病におけるPCNA免疫染色では、RS細胞の細胞質が特異的に陽性となるという報告もみられるが、その理由は明らかにされていない²⁵⁾。今回の検索では固定、染色の条件によってホジキン病のみならず、Ki-1リンパ腫、大細胞型リンパ腫でも腫瘍細胞の細胞質が陽性に染色される場合がみられ、細胞質の陽性がRS細胞の特異性とは考えられなかった。

染色体分析によりRS細胞の多くに染色体異常があるといわれており腫瘍性の性格が明らかになったとはいえず^{26)~28)}、ホジキン病が腫瘍なのか炎症なのかはいまだに断定的な証拠は得られていない²⁹⁾。今回の検索によりRS細胞のPCNA陽性率が非ホジキンリンパ腫の陽性率より高値をとったことはその高い増殖能を示すものであり、これは腫瘍説を支持する結果といえなくもない。しかし、常識的にもRS細胞の増殖能がパーキットリンパ腫や大細胞型リンパ腫の増殖能を上回るとは考えにくい。³H-Thymidineの取り込み実験では3~4%³⁰⁾或いは20.7%³¹⁾のRS細胞が標識されたと報告されている。以上の報告などを勘案すると、RS細胞では、G1後期でcell cycleが止まり、S期への導入が正常に行われていない可能性が考えられる。最近では癌抑制遺伝子として知られるp53(正常型)の誘導によってPCNA発現が特異的に抑制されることが判明しており³²⁾、RS細胞において変異型p53が発現しているとすればPCNA陽性率の高値を説明できるかも知れない。

ホジキン病において、背景のT細胞のPCNA陽性率が、反応性病変やBリンパ腫におけるそれよりも有意に高い点も注目に値する。今回の研究では、ホジキン病の背景で増殖しているT細胞の機能については検索できなかったが、おそらく宿主反応の一つの表現と思われる。

また、非ホジキンリンパ腫のうち、背景に非腫瘍性T細胞の浸潤の強いT infiltration rich B細胞性リンパ腫もホジキン病のRS細胞と同様にPCNA陽性率が高値をとっている。ホジキン病の背景のT細胞は通常 helper/inducer 形質を有するも

のが多いといわれているが²⁹⁾、これらの非腫瘍性T細胞が宿主の抗腫瘍免疫能を反映しているとすれば、浸潤細胞の多さは宿主の免疫能の高さの反映といえる。非ホジキンB細胞リンパ腫において浸潤T細胞数が多いほど予後がよいとの報告もみられる³³⁾³⁴⁾。また、インターロイキン2で活性化した浸潤T細胞を生体に注入する養子免疫療法も考案され注目されている³⁵⁾³⁶⁾。これらの事実より、T infiltration rich B細胞性リンパ腫は、増殖能の高い腫瘍に対する旺盛な宿主反応の表現と解釈することが出来る。反対に浸潤T細胞のサイトカインによって腫瘍細胞の増殖が促進される可能性もある。腫瘍細胞がT細胞を誘導するような物質を産生しているのではないかということも含め、今後さらに詳細な検討が必要であると思われる。

以上、本研究では、PCNAの免疫染色による陽性率の算定は、非ホジキンリンパ腫の悪性度をよく反映することが明らかとなった。ホジキン病に関してもRS細胞のPCNA陽性率が予想以上に高いことが判明したが、この点に関しては、RS細胞の増殖が宿主の抗腫瘍反応によって制御されているのか、或いはRS細胞におけるサイクリン代謝異常(cell cycleの異常)を反映しているものと思われた。

ま と め

1. ホルマリン固定パラフィン切片を用いたPCNA免疫染色は、固定時間が48時間程度であれば、細胞の増殖性(G1後期~S期細胞数)をよく反映していると思われた。
2. 非ホジキンリンパ腫では濾胞性リンパ腫を除くとWF分類の組織学的悪性度とPCNA陽性率は良く相関する。従ってPCNA免疫染色は、予後の判定に有用と思われた。
3. ホジキン病のRS細胞のPCNA陽性率は、非ホジキンリンパ腫のいずれの組織型よりも高い値を示した。
4. ホジキン病のRye分類による組織型とRS細胞のPCNA陽性率に相関はなかった。
5. ホジキン病の背景T細胞のPCNA陽性率はB細胞性リンパ腫や反応性病変の浸潤T細胞の陽性率より有意に高い値をとった。
6. 以上の結果より、PCNA免疫染色は悪性リンパ腫の予後や病態の解析に有用であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導ご校閲を賜りました三方淳男教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究に際しご指導くださった田丸淳一助

手、輸血部浅井隆善講師、伊藤道博技師に心より感謝致します。

最後に、いろいろな面でご援助をいただいた千葉大学第一病理学教室の皆様深く感謝致します。

文

- 1) Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 121 : 2228-2234, 1978
- 2) Lee MYWT, Tan CK, Downy KM et al : Further studies of calf thymus DNA polymerase delta purified to homogeneity by a new procedure. Biochemistry 23 : 1906-1913, 1984
- 3) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K et al : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111 : 841-845, 1978
- 4) Garcia RL, Coltrera MD and Gown AM : Analysis of proliferative grade using antiPCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Am J Pathol 4 : 733-739, 1989
- 5) Grater HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science 218 : 474-475, 1982
- 6) Gerdes J, Schwab U, Lemke H and Stein H : Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31 : 13-20, 1983
- 7) 向井清 : 細胞増殖抗原, 病理と臨床 8 (臨時増刊) : 178-185, 1990
- 8) 田中一成 : 抗 PCNA 抗体による増殖細胞の染色-パラフィン切片への応用-, 病理と臨床 9 : 791-798, 1991
- 9) 松野吉宏, 向井清 : 増殖細胞核抗原(PCNA), 病理と臨床 9 : 879-883, 1991
- 10) The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project : National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas; summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer 49 : 1429, 1982
- 11) 難波紘二 : 非ホジキンリンパ腫の国際分類, 新分類

献

- による悪性リンパ腫アトラス(小島, 花岡, 飯島, 須知ら編), 文光堂, 東京, pp.41-50, 1981
- 12) Lukes RJ, Craver IF, Hall TC et al : Report of the nomenclature committee, Cancer Res 26 : 1311, 1966
- 13) 三方淳男 : ホジキン病, 新分類による悪性リンパ腫アトラス(小島, 花岡, 飯島, 須知ら編), 文光堂, 東京, PP.79-84, 1981
- 14) Waseen NH and Lane DP : Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA): structural conservation and the detection of a nucleolar form. J Cell Sci 96 : 121-129, 1990
- 15) Lee TK, Myers MRT, Marshall RB et al : The significance of mitotic rate: A retrospective study of 127 thyroid carcinomas. Hum Pathol 16 : 1024-1046, 1985
- 16) 三方淳男, 渡辺昌, 津金昌一郎 : T および B リンパ腫の病理; 予後因子と治療対策: B リンパ腫の予後と関連する形態表現. 日網会誌 27 : 319-328, 1988
- 17) 向井清 : 組織学的悪性度診断. 病理と臨床 9 : 844-847, 1991
- 18) Silverberg SG : Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus. Hum Pathol 7 : 451-454, 1976
- 19) Baak JPA : Mitosis counting in tumors. Hum Pathol 21 : 683-685, 1991
- 20) 下田忠和, 二階堂孝ほか : 平滑筋肉腫における核分裂数と予後の検討. 病理と臨床 9 : 848-854, 1991
- 21) Hall PA, Levinson DA, et al : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 162 : 285-294 1990
- 22) Weiss LM, Strickler JG et al : Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. Human Pathol 18 : 1155-1159,

- 1987
- 23) Kamel OW, LeBrun DP, et al: Growth Fraction Estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A2. *Am J Pathol* 138 : 1471-1477, 1990
 - 24) Gerdes J, Van Baarlen JS et al: Tumor cell growth fraction in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 128 : 390-393, 1987
 - 25) Denis RB, and Allen MG : Aberrant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 15 : 764-768, 1991
 - 26) Mark J : Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasms; An assessment of recent observations by banding techniques. *Adv Cancer Res* 24 : 165-222, 1977
 - 27) Rowley JD : Chromosome studies in malignant lymphomas. Malignant lymphoma, UICC Technical Report Service, vol.37 : pp.71-96, UICC, Geneva, 1978
 - 28) Reeves BR : Cytogenetics of malignant lymphomas; studies utilizing a Giemsa banding technique. *Human Genetics* 20 : 231-250, 1973
 - 29) 渡辺昌, 影山圭三 : Hodgkin 病, 現代病理学大系(飯島, 石川ら編) 中山書店 東京 pp90-117, 1987
 - 30) Peckham MJ : Quantitative cytology and cytochemistry of Hodgkin's tissue labelled in vivo with tritiated thymidine. *Br J Cancer* 28 : 332-339, 1973
 - 31) Kaplan HS and Gartner S : "Stenberg-Reed" giant cells of Hodgkin's disease: cultivation in vitro, heterotransplantation, and characterization as neoplastic macrophages. *Int J Cancer* 19 : 511-525
 - 32) Mercer WE, Shields MT et al : Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 6166-6170, 1990
 - 33) Mikata A, Suzuki H and Okawa H : Immunohistochemical studies on B cell lymphomas with special reference to T cell infiltration and its significance as a prognostic factor. *Acta Pathol Jpn* 38 : 47-58, 1988
 - 34) Jacob MC, Piccinni MP et al : T lymphocytes from invaded lymph nodes in patients with B-cell derived non-Hodgkin's lymphoma : Reactivity toward the malignant clone. *Blood* 75 : 1154-1162, 1990
 - 35) Ito K, Platsoucas CD, Balch CM : Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. *J Exp Med* 168 : 1419-1441, 1988
 - 36) Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R : A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 23 : 1318-1321, 1986