<短 報>

肝細胞癌における Ag-NORs 数と BrdU 標識率の比較検討

青木 一教 岡田 周市
吉森 正喜* 坂元 亨宇

野瀬 晴彦 岡崎 伸生
廣橋 説雄**

核小体形成部位 (nucleolar organizer region, NOR) は ribosomal RNA gene を含む DNA の loop であり, 核小体形成や蛋白合成に深く関与している¹⁾. 同部の関連蛋白はコロイド銀染色により核内に黒点として観察することができ (Ag-NORs)²⁾, その解析は核小体の活動性を検討する上で良い指標とされている³⁾. また最近では種々の腫瘍において Ag-NORs 数が細胞増殖能と密接に関連することが報告されている^{2,3)}が, その詳細はいまだ明らかでない. 今回は肝細胞癌において Ag-NORs 数が細胞増殖能を反映しているか否かを明らかにするため, Ag-NORs 数と DNA 合成期細胞の比率を示す Bromodeoxyuridine (BrdU) 標識率 (BrdU-LI) を比較検討した.

対象と方法: 当院にて切除された肝細胞癌17例 (男性13例, 女性4例, 平均年齢63歳) を対象に, 同一試料を用いて, 癌部および非癌部の Ag-NORs 数と BrdU-LI を測定し, 両者の関連について比較検討した.

1) Ag-NORs 数: Ag-NORs 染色は, BrdU-LI の測定に用いた切片と連続する4 μ m のエタノール固定パラフィン切片を用いて, Crocker らの方法⁴⁾に準じて行った. 油浸鏡検下で, BrdU-LI 算出部位の核200個について Ag-NORs 数を計測し, 核1個あたりの平均 Ag-NORs 数を算出した (Fig. 1A).

2) BrdU-LI: 眼科用ハサミで約1mm 角とした新鮮試料を0.1%BrdU (Sigma 社製) 加 MEM 培地に入れ, 95%O₂, 5%CO₂の混合ガスにて3気圧に加圧し, 37°C で60分間振盪培養した. その後, 組織片を70%冷エタノールで固定し, 通常の過程により4 μ m のパラフィン切片を作成した. 脱パラ後, DNA の denaturation のため4N 塩酸で10分間処理し, 抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson 社製) を用いた Avidin-Biotin-Peroxydase Complex 法 (ABC 法) により免疫染色した⁵⁾. BrdU-LI (%) は細胞1,000個を数え, BrdU の取り込みにより核

Fig. 1A Ag-NORs staining on paraffin section in hepatocellular carcinoma. ($\times 1,000$)

Fig. 1B BrdU immunostaining in hepatocellular carcinoma. ($\times 400$)

が褐色に着色している細胞数から算出した (Fig. 1B).

成績: 1) 核1個あたりの Ag-NORs 数

癌部では 2.89 ± 0.83 (平均 $\pm$ 標準偏差, 以下同様) であり, 非癌部の 1.42 ± 0.14 に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$)

2) BrdU-LI: 癌部では $2.28 \pm 1.03\%$ であり, 非癌部の $0.12 \pm 0.12\%$ に比べ有意に高率であった ($p < 0.01$).

3) Ag-NORs 数と BrdU-LI との比較検討

核1個あたりの Ag-NORs 数と BrdU-LI との間には有意な正の相関がみられた ($r = 0.82$, $p < 0.01$) (Fig. 2).

考察: Ag-NORs は核小体の活動性を反映してお

* 国立がんセンター中央病院内科

** 同研究所 病理部

<受付日1992年8月12日>

Fig. 2 Correlation between mean number of Ag-NORs and BrdU labeling index in hepatocellular carcinoma (n=17; $r=0.82$; $p<0.01$).

り、病変の良悪性診断に役立つだけでなく、細胞増殖能の指標としても期待されている。細胞増殖能は癌の発育や生物学的悪性度と関連しているため、増殖能を定量的に評価することは、症例の予後の推定やより適切な治療方針の決定に重要である。これまでに Ag-NORs と細胞増殖能の関連については、培養細胞ではその量的増加が細胞倍增時間や [^3H] thymidine の取り込みと正に相関することが示されている^{6,7)}。また、臨床病理学的には乳癌や胃癌などで、Ag-NORs 数が細胞増殖能の指標である Ki-67 陽性細胞数と正に相関することが報告されている^{2,3)}。しかし、Ag-NORs の数

的增加は ribosomal DNA の転写活性の程度、染色体数の増加、細胞周期等の種々の要因に影響されると考えられており¹⁾、Ag-NORs 数が細胞増殖能を反映しているかは必ずしも明らかでない。今回の肝細胞癌における検討では、Ag-NORs 数と DNA 合成期細胞の比率を示す BrdU 標識率の間に有意な正の相関が認められ、Ag-NORs 数が肝細胞癌の細胞増殖能の指標として有用であることが示された。Ag-NORs 染色は、方法は簡便であり、さらに通常のホルマリン固定パラフィン切片を用いて行うことのできるため、retrospective な検討も可能である。従って、Ag-NORs 染色による細胞増殖能の定量的評価は、今後、肝細胞癌症例の予後の推定や治療方針の決定など、肝細胞癌の臨床に有益な情報を提供するものと考えている。

索引用語：肝細胞癌、Ag-NORs 数、BrdU 標識率

文献：1) Crocker J: Pathology of the nucleus 91-149, 1990 2) Raymond WA, Leong AS: Hum Pathol 20: 741-746, 1989 3) Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, et al: Cancer Res 51: 3503-3506, 1991 4) Crocker J, Nar P: J Pathol 151: 111-118, 1987 5) 島袋智之, 山本光孝, 三井 博, 他: Oncologia 21: 93-100, 1988 6) Trerè D, Pession A, Derenzini M: Exp Cell Res 184: 131-137, 1989 7) Derenzini M, Pession A, Trerè D: Lab Invest 63: 137-140, 1990

The relationship between number of argyrophilic nucleolar organizer regions and uptake of bromodeoxyuridine in hepatocellular carcinoma

Kazunori AOKI, Shuichi OKADA, Haruhiko NOSE, Nobuo OKAZAKI Masayoshi YOSHIMORI*,
Michiie SAKAMOTO and Setsuo HIROHASHI**

* Department of Internal Medicine, National Cancer Center Hospital (Tokyo)

** Pathology Division, National Cancer Center Research Institute (Tokyo)