

学 位 論 文 題 名

潰瘍性大腸炎に伴なう dysplasia の形態学のおよび
免疫組織学的定量分析に関する研究

－癌発生との関連について－

I. 組織構築と形態学的定量分析

II. 免疫組織学的定量分析

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

潰瘍性大腸炎にみられる粘膜病変である dysplasia の生物学的性質を、画像解析による組織形態計測および免疫組織染色の定量分析を行なって解析し、dysplasia と癌発生との関係について、大腸癌、腺腫と対比させて検討した。

II. 材料と研究方法

sm 以上に浸潤した癌の合併 3 例を含む潰瘍性大腸炎切除例 6 例の全割標本（1,163切片）を作製した。HE 染色を行ない、異型上皮を Morson の分類に従って、severe dysplasia（以下 SD129病巣）、moderate dysplasia（以下 MOD386病巣）、mild dysplasia（587病巣）に分類して組織再構築を行なった。

組織形態計測として、細胞レベルにおける異型度を表わす係数である核腺管係数 Index of Nucleus-Gland（ING）を、画像解析装置を用いて直接 HE 染色標本から測定した。

ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色を ABC 法で行なった。一次抗体には ras 癌遺伝子産物 p21のモノクローナル IgM 抗体 rp35（マウス）（北大医学部癌研分子遺伝部門作製）を80倍に希釈して使用し、4℃で24時間反応させた。二次抗体には、biotin 標識抗マウス IgG 抗体（ヤギ）（Bio-Genex 社、BSA-PO kit）を使用し、室温で1時間反応させた。

secretory component の免疫組織染色を行なったが、ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色と同じ染色法を用いた。一次抗体には secretory component に対するポリクローナル抗体であ

る抗人 secretory component (ウサギ) (DAKO 社製 codeNo.187, Lot No.096 B) を50倍に希釈して使用し、4℃で24時間反応させた。二次抗体として biotin 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) (Bio-Genex 社, BSA-PO kit) を室温で1時間反応させた。

高速画像解析システム XL500 (OLYMPUS-Avio) を使用して、染色密度係数 Index of Staining Density (ISD) = 一定面積に含まれる全腺管の面積に対する腺管内染色部分の面積の比率、および染色腺管係数 Index of Staining Gland (ISG) = 一定面積に含まれる全腺管の面積に対する染色腺管面積の比率を測定して定量分析を行なった。

ING の測定および ras 癌遺伝子産物 p21, secretory component の免疫組織染色は、潰瘍性大腸炎症例で sm 以上に浸潤した癌の粘膜内進展部、SD および MOD と分類した病変およびそれに隣接した部分に対して行ない、潰瘍性大腸炎を合併していない sm 以上に浸潤した大腸癌の粘膜内進展部、腺腫、正常大腸粘膜を対照とした。

原則として ING の測定には、一標本当り100倍率で5視野測定。ISD の測定には一標本当り200倍率で5視野測定し、ISG では100倍率で3視野測定した。ras 癌遺伝子産物 p21 は ISD と ISG を測定し、secretory component は ISG を測定した。

潰瘍性大腸炎症例および対照例に対して、測定した係数の平均値の有意差検定のため、3群以上の平均値の差の検討では、一元配置分散分析を行った。また2群間の平均値の差の検討では F 検定を行ない、分散が5%以下の危険率で測定数が30以上の場合は正規分布検定を、30未満の場合は t 分布検定を行なった。分散が5%以上の危険率の場合は、Cochran-Cok の近似法により t を分布検定を行なった。

Ⅲ. 結 果

1. 異型度係数を用いた解析

潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部の SD, MOD は、対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく腺腫より有意に ING 値が高かった。また、SD は潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤して癌部と同じく、MOD, 腺腫より有意に高値であった。更に MOD の60病巣中44病巣 (73.3%) が腺腫より高値であった。また、そのうち13病巣 (21.7%) は対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌の ING の95%信頼区間の範囲の値であり、31病巣 (51.6%) はいわゆる良性悪性境界領域にあった。

2. ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色の定量分析

1) ISD の比較

潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部, SD, MOD は, 対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく, 腺腫より有意に高値であった。

2) ISG の比較

潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部, SD, MOD は, 対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく, 腺腫より有意に高値であった。

3. secretory component の免疫組織染色の定量分析

MOD と腺腫は, 潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部, SD, 対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌より有意に高値であった。

IV. 考 察

潰瘍性大腸炎症例には癌が高率に合併するが, 通常の大腸癌の肉眼型と相違して, 診断が困難で手遅れになることが多く, 癌の早期発見の指標として dysplasia の重要性が指摘されている。しかし, その組織診断に混乱がみられており, 客観的な指標によって組織診断基準を作ることがのぞまれている。

本研究では, Morson の分類にもとづいて, SD および MOD と分類した異型上皮を組織形態計測および免疫組織染色の定量分析を行ない, 客観的診断基準によって再検討し, 潰瘍性大腸炎における dysplasia の生物学的特徴を明らかにしようとしたものである。

細胞異型度を表す核腺管係数 (ING) を指標として組織形態計測を行なった結果では, 潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部, SD のみならず MOD も対照例の腺腫より明らかに異型度が高度であった。また, SD は潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部や対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同様, MOD, 腺腫より有意に高値を示した。すなわち, 潰瘍性大腸炎に合併した SD は高度の異型を示しており, 形態計測上, 粘膜内に限局した癌, すなわち carcinoma in situ と考えることができる。また, MOD の異型度は癌と良性である腺腫との中間の位置にあり, いわゆる良性悪性境界領域病変と考えられるが, 全症例のうち21.7%が癌と同じ異型度を示しており, MOD を示す症例には癌が高率に含まれている可能性がある。

ras 癌遺伝子産物 p21の定量分析として ISD や ISG を計測したが, いずれも潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌分, SD, MOD は, 対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく腺腫より有意に高値を示した。ING の測定結果と照らしあわせて SD は粘膜内癌の生物学的性質

をもつと考えられた。さらに、MOD の中には高い頻度で粘膜内癌が含まれていると考えられる。

secretory component の ISG の計測では、MOD は対照例の腺腫と同じく、潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部、SD より有意に染色率が高かった。MOD の secretory component の合成能は SD より高く、機能分化を反映していると思われた。

V. 結 論

1. SD は、対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく高度の細胞異型を示し、ras 癌遺伝子産物 p21 も増幅していた。したがって粘膜内に限局した癌、すなわち carcinoma in situ であると考えられた。
2. MOD の細胞異型は、癌と腺腫との中間であり、また SD より分化傾向を示していた。したがって良性悪性境界病変と考えられたが、全症例のうち 21.7% が癌と同じ細胞異型を示しており、ras 癌遺伝子産物 p21 も対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく増幅していたことから、悪性のものが含まれていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 細 川 真澄男

潰瘍性大腸炎症例には癌が高率に合併するが、通常の大腸癌の肉眼型と異なるため診断が困難で、進行癌になることが多い。そのため癌の早期発見の指標として dysplasia の重要性が指摘されているが、その組織診断に混乱がみられており、客観的な指標による組織診断の基準を作ることが期待されている。

申請者は Morson の分類にもとづいて、dysplasia を severe および moderate に分類し、客観的診断基準として組織形態計測および免疫組織染色による定量分析を用いて、異型上皮を通常の大腸癌、腺種と対比検討し、潰瘍性大腸炎における dysplasia の生物学的特徴の解明を試みた。

材料として、粘膜下 sm 以上に浸潤した癌の合併 3 例を含む潰瘍性大腸炎切除例 6 例の全割標

本（1163切片）を作製した。HE 染色を行い、異型上皮を Morson の分類に従って、severe dysplasia（以下 SD）129病巣、moderate dysplasia（以下 MOD）386病巣、mild dysplasia 587 病巣に分類して組織再構築を行った。

組織形態計測として、細胞レベルにおける異型度を表わす係数である核腺管係数 Index of Nucleus-Gland (ING) を、画像解析装置を用いて直接 HE 染色標本から測定した。

さらに ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色を ABC 法で行った。一次抗体には、北大癌研分子遺伝部門作製の ras 癌遺伝子産物 p21のモノクローナル IgM 抗体 rp35（マウス）を80倍に希釈して使用し、4℃で24時間反応させた。二次抗体には、biotin 標識抗マウス Ig 抗体（ヤギ）（Bio-Genex 社、BSA-PO kit）を使用し、室温で1時間反応させた。

secretory component の免疫組織染色を行なったが、ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色と同じ染色法を用いた。一次抗体には、secretory component に対するポリクローナル抗体である抗人 secretory component（ウサギ）（code No.187, Lot No.096B DAKO 社製）を50倍に希釈して使用し、4℃で24時間反応させた。二次抗体として biotin 標識抗ウサギ Ig 抗体（ヤギ）（Bio-Genex 社、BSA-PO kit）を室温で1時間反応させた。

高速画像解析システム XL500（OLYMPUS-Avio）を使用して、染色密度係数 Index of Staining Density (ISD)＝一定面積に含まれる全腺管の面積に対する腺管内染色部分の面積の比率、および染色腺管係数 Index of Staining Gland (ISG)＝一定面積に含まれる全腺管の面積に対する染色腺管面積の比率を測定して、定量分析を行った。

異型度係数を用いた解析の結果では、潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部、SD、MOD は、対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく腺腫より有意に ING 値が高かった。また、SD は潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部と同じく、MOD、腺腫より有意に高値であった（ $p < 0.01$ ）。さらに MOD GO 病巣のうち44病巣（73.3%）が腺腫より高値であった。そのうち13病巣（21.7%）は対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌の ING の95%信頼区間の範囲の値であり、31病巣（51.8%）はいわゆる良性悪性境界領域に属した。

ras 癌遺伝子産物 p21の免疫組織染色の定量分析の結果では、ISD と ISG の比較で潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部、SD、MOD は、対照例の Ssm 以上に浸潤した大腸癌と同じく、腺腫より有意に高値であった。（ $p < 0.01$ ）。

secretory component の免疫組織染色の定量分析では ISG の比較では腺腫と同様に潰瘍性大腸炎症例の sm 以上に浸潤した癌部、SD、対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌より有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）。

以上より、SD は対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく高度の細胞異型を示し、ras 癌遺伝子産物 p21 も増加しており、粘膜内に限局した癌すなわち carcinoma in situ であると考えられた。MOD の細胞異型は癌と腺腫との中間であり、また SD より分化傾向を示しており、いわゆる良性悪性境界領域病変と考えられた。しかし癌と同じ細胞異型度を示しているものもみられ、ras 癌遺伝子産物 P21 も対照例の sm 以上に浸潤した大腸癌と同じく増加しており、悪性であるものが含まれていると考えられた。

審査にあたって、葛巻教授より dysplasia に対して ras, p21 を使用した報告例について、細川教授より潰瘍性大腸炎に伴う癌の発生頻度について、阿部教授より組織構築の特徴、核異型に対する形態学的定量分析の応用について、長嶋教授より癌診断について ING と ras, p21 の有効性と構造異型に対する方法等について質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

潰瘍性大腸炎症例の dysplasia に対して、組織形態計測と免疫組織染色の定量分析を組合せて検討した報告はなく、本研究は今後の dysplasia の総合的評価の可能性を示唆した点で意義があり、学位授与に値するものとする。