

学 位 論 文 題 名

Correlation between nucleolar organizer regions
visualized by silver staining and the growth
rate in lung adenocarcinoma

（肺腺癌における核小体形成部位と増殖速度の関係）

学位論文内容の要旨

I 研究目的

核小体の形態学的異常は、悪性細胞の特徴の一つである。核小体は、蛋白合成の場であるリボソームを合成する細胞内小器官で、その内部にはリボソーム遺伝子を内包する大きな DNA グループが存在している。この DNA ループが核小体形成部位と呼ばれているが、最近、この核小体形成部位が転写される時に結合する蛋白に対し特異的に銀染色を施し、この部位を銀染色陽性顆粒（以下 AgNOR）として光学顕微鏡下に観察できるようになった。この AgNOR は癌細胞において増加することが認められており、増殖能との関連が示唆されている。肺腺癌の場合、胸部レ線学的に腫瘍倍加時間を測定できるため、著者はこの腫瘍倍加時間と AgNOR との間の関連を解析し、AgNOR が増殖能の新しい指標となり得るかを検討した。

II 対象と方法

北海道大学医学部附属病院第一内科に入院し、原発性肺腺癌の診断にて手術治療をおこなった 58 例を対象とした。58 例の内訳は、分化度では高分化腺癌が 18 例、中分化腺癌が 30 例、低分化腺癌が 10 例であった。臨床病期では I 期が 21 例、II 期が 8 例、III 期が 29 例であった。

核内 AgNOR の測定は以下のようにおこなった。10%ホルマリンで 48 時間固定し、パラフィンで包埋した組織より 4 μ m の切片を作製した。先ず最初にヘマトキシリン・エオジン染色にて病理組織学的に検討した後、同部位の組織標本の切片を使用した。

対象切片はキシレン（各 10 分間、2 回）で脱パラフィン後、100%、100%、90%、70%（各 5 分間）で加水処理し、蒸留水（各 3 分間、3 回）にて洗浄した。その後、50%硝酸銀溶液と 2% ゲラチン含有 1% 蟻酸溶液を使用直前に 2 対 1 の比率で混和した染色液の中に暗所にて 40 分間静

置し、銀染色陽性顆粒を染色した。各症例につき、核内に認めるこの銀染色陽性顆粒の個数を油浸レンズで1000倍にて測定し、腫瘍細胞100個の平均値をもってその症例の AgNOR 数とした。

胸部レ線学的腫瘍倍加時間の測定は、少なくとも3カ月以上離れている最も期間の長く観察できた二点の胸部単純写真を用い、それぞれの腫瘍径を測定し下記の式より計算した。

倍加時間＝観測期間×log 2 ÷ log (最終計測時体積／初回計測時体積)

体 積＝ $4/3 \times \pi \{(\text{長径} + \text{短径}) / 4\}^3$

Ⅲ 結 果

正常気管支上皮細胞の AgNOR の個数は1個から2個であり、その平均およびSDは 1.2 ± 0.1 であった。肺腺癌症例の AgNOR 数は1.8から6.3であり、その平均およびSDは 4.0 ± 0.8 で正常気管支上皮より明らかに増加していた ($p < 0.01$)。分化度では高分化腺癌で 3.8 ± 0.7 ，中分化腺癌で 4.2 ± 0.9 ，低分化腺癌で 3.8 ± 0.4 と、分化度による違いは認めなかった。臨床病期では、Ⅰ期で 3.8 ± 0.6 ，Ⅱ期で 4.2 ± 1.2 ，Ⅲ期で 4.2 ± 0.8 と、病期による違いも認めなかった。

胸部レ線学的腫瘍倍加時間を測定でき得た症例は13例であった。腫瘍倍加時間は、特に長かった760日の症例を除くと80日から420日であり、これらの値は従来の報告と大きな違いはなかった。

この13例につき腫瘍倍加時間と AgNOR 数との相関関係を解析したところ、相関係数 $r = -0.911$ にてほぼ直線的に回帰を認め、腫瘍倍加時間と AgNOR 数との間に有意な逆相関関係を認めた。

AgNOR 数が全症例の平均値より多い群と少ない群の二群に分け予後を検討したところ、少ない群で予後良好の傾向 ($P = 0.052$) を認めたが、統計学的に有意差を認めなかった。

Ⅳ 考案ならびに結語

肺腺癌はいまだ予後不良の疾患である。予後を推し量る指標としては、患者の全身状態、臨床病期、腫瘍の分化度などがあるが、増殖能もまた腫瘍側の悪性度を表わすものの一つであろう。腫瘍自体のもつ悪性度をより客観的に評価できるなら、予後の推定に役立つばかりでなく、新たな治療法の確立にも有益である。肺腫瘍では臨床的には増殖能の指標として胸部レ線学的腫瘍倍加時間があるが、実際に測定できる症例は少ない。

一方、核小体は、蛋白合成の場であるリボソームを合成する細胞内小器官であるため、細胞の増殖能と密接に関連しているとされていた。そこではリボソーム遺伝子がループ状に存在し、必要に応じてリボソーム RNA が転写されているが、この DNA ループが核小体形成部位(NOR)と呼ばれている。NOR が転写されるためにはこの部位に RNA ポリメラーゼ I などの NOR 関連

蛋白が結合することが必要である。本研究の銀染色で染色されてくるのはこの NOR 関連蛋白であるから、転写活性をもつ NOR を銀染色陽性顆粒として観察している。癌細胞は増殖能が高いため細胞の蛋白合成が亢進していてより多くのリボソームを必要とする。そのため、NOR の転写活性は亢進し、その結果 AgNOR 数は増加する。著者の予備検討では、正常気管支上皮細胞の AgNOR 数は 1 ないし 2 個であるのに対し、肺腺癌では明らかに増加していた。さらに、著者は胸部レ線学的腫瘍倍加時間と AgNOR 数との間には、高い寄与率 ($r^2=0.811$) をもって逆相関関係を認め、AgNOR 数を腫瘍倍加時間の代わりに増殖能を示す指標として用い得ることを示した。

これまでに増殖能の指標として病理学的には、 ^3H サイミジンやプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込み率、Ki-67 や PCNA による免疫組織学的検討などがなされている。しかし、これらの多くは新鮮標本や特別な前処置を施さなければならず、臨床的には利用が限られていた。一方、AgNOR 数による検討は従来のホルマリン固定法による病理組織標本を用いて比較的簡便に染色することができるため、臨床材料一般に利用可能である。それ故に、著者が AgNOR 数を増殖能の指標として用い得ることを示したことにより、AgNOR 数は肺腺癌のもつ悪性度の客観的指標の一つとして今後臨床的に広く利用できるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

目的：本論文は、人肺腺癌における核小体形成部位と腫瘍の増殖速度の関連を解析し、核小体形成部位の発現個数が増殖能の指標となり得るかを検討したものである。核小体形成部位は one - step silver 染色法にて特異的に染色される銀染色陽性顆粒 (AgNOR) として観察し、その個数を測定した。また、腫瘍の増殖速度として胸部レ線学的腫瘍倍加時間を計測し、AgNOR 数との相関関係を解析した。

結果：肺腺癌では AgNOR 数が正常気管支上皮より有意に増加していた。しかし、分化度や臨床病期による違いは認めなかった。腫瘍倍加時間と AgNOR 数との関係は、相関係数 $r = -0.911$ にてほぼ直線的に回帰を認める有意な逆相関関係を認めた。AgNOR 数と予

後との関係は AgNOR 数が平均値より少ない群が多い群より予後良好の傾向を認めた。

結論：AgNOR 数と胸部レ線学的腫瘍倍加時間との間には、高い寄与率をもって逆相関関係を認めたため、AgNOR 数を腫瘍倍加時間の代わりに増殖能を示す指標として用い得ることを示した。口頭発表にあたり、阿部（和）教授より AgNOR 数と従来の核小体との関係や核異型との関連について、長嶋教授より AgNOR 数の測定方法や浸潤転移能との関連について、細川教授より抗癌剤への感受性との関連について質問があり、申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、長嶋教授、阿部（和）教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

これまでに AgNOR 数と胸部レ線学的腫瘍倍加時間との関係は明らかにされておらず、AgNOR 数が増殖能の指標となることを示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。