

学 位 論 文 題 名

肝細胞癌におけるマイクロウェーブ照射抗原
賦活法によるp53免疫組織化学染色の有用性
—生物学的悪性度およびアポトーシスとの関連—

学位論文内容の要旨

教室では、肝細胞癌（以後、HCC）の生物学的悪性度評価において、腫瘍核DNA量（DNA ploidy pattern）を指標として検討してきたが、筆者らはproliferating cell nuclear antigen(PCNA)の免疫染色から求めた標識率（以後、PCNA LI）もHCCの増殖能、悪性度と関連し、その悪性度指標となりうることを認めた。さらに、筆者らは新鮮凍結標本を対象とするp53の免疫染色を施行し、p53の免疫染色上の発現がHCCの生物学的悪性度の指標になりうることを報告した。しかし、その方法では対象を新鮮凍結標本としたために、組織構築上の詳細な検討や retrospective studyなどが困難であった。

そこで筆者はこの問題点を解消するために、ホルマリン固定標本を対象としうる、マイクロウェーブ照射を用いた抗原賦活法（以後、MW-AR法）によるp53免疫染色方法を施行し、この有用性について検討した。さらに、p53がアポトーシスに関与している可能性を検索するために、アポトーシス関連抗Lewis^Y(Le^Y)抗体であるBM-1/JIMR0による免疫染色を同時に施行し、検討した。

対象および方法

1. 対象

1992年1月から1993年3月までに当科で初回切除したHCC症例中、適切な新鮮凍結標本を採取しえた48症例を対象とした。年齢は34歳より71歳、平均58.8±7.9歳、性別は男性36例、女性12例であった。

2. 免疫染色方法と判定方法

1) ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫染色：通常のp53免疫染色(LSAB法、DAKO社製キット)とMW-AR法によるp53免疫染色を施行した。すなわち、4μmのパラフィン包埋切片を脱パラフィンし、過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼを阻止した。さらに、正常ヤギ血清により非特異的反応を阻止し、ついで一次抗体として抗p53モノクローナル抗体(D0-7、DAKO社、×50)を4℃、一晚反応させた。その後、キットのビオチン標識二次抗体を反応させ、最後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビ

ジン溶液を反応させた。発色はDABで行い、核染色にはMayerのヘマトキシリンを用いた。また、MW-AR法におけるマイクロウェーブ照射は、過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの阻止後に、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中で家庭用電子レンジを用いて、500W、5分間、3回施行した。照射後、検体を蒸留水で十分に洗浄し、前述の免疫染色法を続行した。染色性の判定は、検鏡により肝癌細胞の核が染色されているものを染色陽性細胞とした。

症例としての免疫染色性の判定は、この染色陽性細胞の標識率により行い、以下の如く分類した。

- ①染色陰性 (-):陽性細胞を全く認めないもの _____ p53免疫染色陰性例
- ②染色弱陽性(±):陽性細胞が10%未満のもの _____
- ③染色陽性 (+):陽性細胞が10%以上かつ80%未満のもの _____ p53免疫染色陽性例
- ④染色強陽性(++) :陽性細胞が80%以上のもの _____

2) 新鮮凍結標本の免疫染色: 7 μ mの薄切切片を作製し、冷アセトン固定後、通常の免疫染色を施行した。この場合の判定は、筆者らのこれまでの報告に従い、検鏡の強拡大像で少なくとも3視野以上に肝癌細胞の核の染色像を認めたものを、p53免疫染色陽性例とした。

3) BM-1/JIMROによる免疫染色: ホルマリン固定パラフィン包埋組織の連続切片を対象として、BM-1/JIMRO(日本抗体研究所、 $\times 50$)を1次抗体とする通常の免疫染色を施行した。細胞質の染色像を認めたものを染色陽性細胞と判定した。

検討項目

- 1. MW-AR法による免疫染色結果と通常の免疫染色法の結果を比較検討した。
- 2. MW-AR法による免疫染色結果と 同じ症例の新鮮凍結標本に対する免疫染色結果の相関を検討した。
- 3. MW-AR法によるp53免疫染色の染色性と臨床病理学的諸因子の相関を検定し、本法がHCCの生物学的悪性度の指標になりうるかを検討した。
- 4. アポトーシスの存在が疑われるp53の少数、散在性の染色例、すなわちMW-AR法の染色弱陽性(±)26例において、パラフィン包埋連続切片におけるBM-1/JIMROによる免疫染色陽性細胞とp53染色陽性細胞との関係について検討した。

統計学的検討は χ^2 -testで行い、有意差検定は危険率5%以下を有意差ありとした。

結 果

- 1. 通常のp53免疫染色ではすべて染色陰性(-)であったが、MW-AR法を用いた免疫染色では極めて良好な染色像を得た。その結果、p53免疫染色陽性例を12例(25.0%)に認めた。特に、この内8例はp53免疫染色強陽性例であった。
- 2. 新鮮凍結標本に対するp53免疫染色陽性例は10例であった。この結果とMW-AR法による免疫染色結果に有意の相関を認めた。

3. MW-AR法のp53免疫染色陽性例はすべて腫瘍径が2cm以上の進行例であった。p53免疫染色陽性例の率は多結節癒合型や分化度のより低いものが有意に高値であり、また被膜浸潤陽性群、門脈腫瘍栓陽性群および肝内転移陽性群で高値であった。さらに、p53免疫染色強陽性例の率は、HCV抗体陽性群、組織学的分化度のより低いもの、門脈腫瘍栓陽性群およびPCNA LI40%以上群で有意に高値であった。また、DNA ploidy patternのaneuploidのものは、p53免疫染色陽性例 および強陽性例の率がともに高値であった。

4. BM-1/JIMRO染色陽性細胞と p53染色陽性細胞との関係が同一細胞と思われたものは10例、また近傍の細胞と判定されたものは12例であり、両者に全く関連性を認めなかったものはわずか4例のみであった。

考 察

HCCにおけるp53の免疫組織化学的発現が、生物学的悪性度の指標となるとした論文は少ない。そこで筆者は、マイクロウェーブ照射による抗原賦活法(MW-AR法)を用いた免疫染色を試みた。筆者の方法は、10mMクエン酸緩衝液中で家庭用電子レンジを用いて照射したが、この方法により初めてホルマリン固定標本のp53免疫染色が良好となった。また、本法の結果は同一症例の新鮮凍結標本に対する通常の免疫染色結果と有意に相関した。一方、本法によるp53免疫染色陽性例 および強陽性例の率が高かったHCCの臨床病理学的因子は、一般にHCCの臨床的進行例に多く認められる因子であった。これより、本法によるp53の免疫組織化学的発現の有無はHCCの生物学的悪性度判定上、有用な指標になると思われた。

近年、アポトーシスは腫瘍細胞の増殖活性においてマイナス的に作用する点で、重要な意義をもつことが判明してきた。しかし、著者が検索しえた範囲内では、HCC切除組織におけるp53とアポトーシスとの関連を免疫組織化学的に検討した論文はなかった。そこで、アポトーシスの存在が疑われる症例に対してBM-1/JIMROによる免疫染色を施行し、この染色陽性細胞とp53染色陽性細胞の関係を検討した。その結果、これらが同一、あるいは近傍の関係であったものを84.6%に認めた。これより、少数、散在性に染色されたp53は自身を含めた周辺の細胞にアポトーシスを誘導している可能性のあることが免疫組織化学的に示唆された。

結 語

1. ホルマリン固定標本に対するp53免疫染色は、MW-AR法により初めて染色良好となった。また、このMW-AR法による免疫染色結果は同一症例の新鮮凍結標本に対する通常の免疫染色結果と有意に相関した。

2. 本法によるp53免疫染色陽性例および強陽性例の率が高かったHCCの臨床病理学的因子は、HCCの臨床的進行例に多く認められる因子であった。

3. 本法により少数、散在性に染色された p53はアポトーシスの誘導に関与している可能性のあることが免疫組織化学的に示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 葛 卷 暹

学位論文題名

肝細胞癌におけるマイクロウェーブ照射抗原 賦活法によるp53免疫組織化学染色の有用性 —生物学的悪性度およびアポトーシスとの関連—

肝細胞癌(以後HCC)の新鮮凍結標本を対象とするp53の免疫染色では、組織構築上の詳細な検討やretrospective studyなどが困難であった。本研究では、この問題点を解消するために、ホルマリン固定標本を対象としうる、マイクロウェーブ照射を用いた抗原賦活法(以後、MW-AR法)によるp53免疫染色方法を施行し、この有用性について検討した。さらに、p53がアポトーシスに関与している可能性を検索するために、アポトーシス関連抗Lewis^Y(Le^Y)抗体であるBM-1/JIMR0による免疫染色を同時に施行し、検討した。

研究方法

対象は1992年1月から1993年3月までに当科で初回切除したHCC症例中、適切な新鮮凍結標本を採取しえた48症例とした。

免疫染色方法として、1)ホルマリン固定標本の免疫染色は通常のp53免疫染色(LSAB法)とMW-AR法によるp53免疫染色を施行した。一次抗体は、抗p53モノクローナル抗体(DO-7、DAKO社、×50)を用いた。また、MW-AR法におけるマイクロウェーブ照射は、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中で家庭用電子レンジを用いて、500W、5分間、3回施行した。染色性の判定は、検鏡により肝癌細胞の核が染色されているものを染色陽性細胞とした。症例としての免疫染色性の判定はこの染色陽性細胞の標識率により行い、以下の如く分類した。

- | | |
|-------------------------------|----------------|
| ①染色陰性（－）：陽性細胞を全く認めないもの | p53免疫染色
陰性例 |
| ②染色弱陽性（±）：陽性細胞が10%未満のもの | |
| ③染色陽性（＋）：陽性細胞が10%以上かつ80%未満のもの | p53免疫染色
陽性例 |
| ④染色強陽性（＋＋）：陽性細胞が80%以上のもの | |

2) 新鮮凍結標本の免疫染色は、7 μ mの薄切切片の冷アセトン固定後、通常の免疫染色を施行した。この判定は、検鏡の強拡大像で少なくとも3視野以上に肝癌細胞の核の染色像を認めたものをp53免疫染色陽性例とした。

3) BM-1/JIMROによる免疫染色は1)と同じホルマリン固定パラフィン包埋組織の連続切片を対象として、BM-1/JIMRO（日本抗体研究所、 $\times 50$ ）を1次抗体とする通常の免疫染色を施行した。細胞質の染色像を認めたものを染色陽性細胞と判定した。

検討項目

1. MW-AR法による免疫染色結果と通常の免疫染色法の結果の比較。
2. MW-AR法による免疫染色結果と同じ症例の新鮮凍結標本に対する免疫染色結果の相関。
3. MW-AR法によるp53免疫染色の染色性と臨床病理学的諸因子の相関の検定およびHCCの生物学的悪性度の指標としての本法の有用性。
4. アポトーシスの存在が疑われるMW-AR法の染色弱陽性（±）例における、パラフィン包埋連続切片のBM-1/JIMROによる免疫染色陽性細胞とp53染色陽性細胞との関係。

研究結果

1. 通常のp53免疫染色ではすべて染色陰性（－）であったが、MW-AR法を用いた免疫染色では極めて良好な染色像を得た。その結果、p53免疫染色陽性例を12例（25%）に認めた。特に、この内8例はp53免疫染色強陽性例であった。
2. 新鮮凍結標本に対するp53免疫染色結果とMW-AR法による免疫染色

結果に有意の相関を認めた。

3. MW-AR法のp53免疫染色陽性例はすべて腫瘍径が2cm以上の進行例であった。また、p53免疫染色陽性例の率およびp53免疫染色強陽性例の率が有意に高かった因子は組織学的分化度のより低いもの、被膜浸潤陽性、門脈腫瘍栓陽性およびPCNA LI40%以上などのHCCの臨床的進行例に多く認められるものであった。

4. BM-1/JIMRO染色陽性細胞とp53染色陽性細胞との関係が同一細胞と思われたものは26例中10例、また近傍の細胞と判定されたものは12例と高率であった。

以上より、ホルマリン固定標本に対するp53免疫染色は、MW-AR法により初めて染色良好となり、このMW-AR法によるp53の免疫染色性はHCCの生物学的悪性度の指標になりうる点および本法により少数、散在性に染色されたp53はアポトーシスの誘導に関与している可能性のあることが免疫組織化学的に示唆された。

審査にあたって、葛巻教授より免疫染色されるp53の性状およびBM-1/JIMROの認識するアポトーシスのタイプについて、西教授よりヒトHCCにおけるp53のDNAにおける変異および頻度について、細川教授よりMW-AR法による抗原賦活作用の機序とその特異性について、浅香教授よりMW-AR法による蛋白変性の可能性について、などの質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究では、HCCのホルマリン固定標本に対するp53免疫染色において、MW-AR法を10mMクエン酸緩衝液中で家庭用電子レンジを用いて行い良好な染色性を得た点およびp53がアポトーシスに関与する可能性のあることを免疫組織化学的に示唆した点で意義があり、学位の授与に値するものと考ええる。