

イヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能に関する
免疫組織化学的解析

2007. 02

石川 勝行

イヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能に関する

免疫組織化学的解析

2007.02

石川勝行

目 次

緒 論	1
第 1 章 イヌおよびネコにおける抗 Bromodeoxyuridine(BrdU) モノクローナル抗体標識法 の基礎的研究と腫瘍症例における細胞増殖能の解析	4
1-1 はじめに	4
1-2 材料および方法	4
1-3 結果	7
1-4 考察	12
図・表	16
第 2 章 抗 Ki-67 および抗 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) モノクローナル抗体標識法 によるイヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能の解析 — BrdU 免疫染色法と比較して —	33
2-1 はじめに	33
2-2 材料および方法	34
2-3 結果	37
2-4 考察	44
図・表	47
第 3 章 総合考察	63
第 4 章 結 論	67
論文要旨	69
Summary	73
謝 辞	78
引用文献	79

緒 論

腫瘍をもつ動物の予後は、様々な因子が複雑に関係して規定される。主なものとしては、個体の背景、臨床での病期、腫瘍の病理組織学的所見、そして治療法の選択とそれに対する反応性などが挙げられる。小動物の高齢化に伴って、動物臨床の場では、腫瘍を診断・治療する機会が年々増加してきており、その予後を判断することは腫瘍診療の中で最も重要な事項と考えられるが、より確実な予後診断の根拠を得ることは非常に困難である場合が多い。特に病理組織学的診断は、腫瘍の性状を直接観察した結果であり、臨床における予後診断上重要な要素となっている。これまで腫瘍の特徴を決定づける病理組織学的所見としては、細胞異型性、組織成分の構成、浸潤・増殖の様相や転移像などの組織学的特徴が挙げられてきたが、今後はさらに客観的な根拠となり得る指標が必要とされている。特に、腫瘍を特徴づける性質の一つは、細胞の進行性異常増殖であることから、その発育の早さや増殖の特性を表す組織内および細胞内物質を、免疫学的染色により解析する組織化学的アプローチ法（細胞動態解析法）は、これまで行われてきた臨床での病期診断や病理組織学的所見と併せて非常に重要な意義を持ち、臨床における腫瘍の予後診断を決定づける因子の一つとして大きく貢献するものと考えられる。つまり、動物の腫瘍を免疫組織化学的手法によって解析することにより、その腫瘍の成長の速さと浸潤・増殖性の特徴を客観的に推測することが可能であり、動物の腫瘍に対する予後診断において、新たに重要な因子を付与することができると思われる。

細胞動態解析の研究は、1950年代に³H-thymidineの合成が可能になり、さらにオートラジオグラフィが普及したことにより（16）成長解析学（cell kinetics）として急速に発展し、種々の腫瘍の成長解析法が試みられてきた。しかし、これらの手法はアイソトープを必要とするため、施設と時間的な面から臨床に適用するには著しい制約を受けていた。近年、thymidine誘導体である5-bromodeoxyuridine（BrdU）に対するモノクローナル抗体がGratznerら（8）によって開発され、免疫組織化学への応用が可能になって以来、BrdU免疫染色法はDNA合成期（S期）の細胞検出を簡便かつ迅速に行うことができるダイナミックな方法として注目を集め、ヒトでは脳腫瘍の増殖能解析など、ほぼ確立され応用されてきた歴史がある（14）。しかし、BrdUは外来性の抗原であり、免疫染色適用にあたっては生体に予め投与する必要がある。現在では、BrdU法以外にKi-67やProliferating cell nuclear antigen（PCNA）などの、細胞増殖サイクルに連動して発現される内在性抗原（増殖細胞核抗原）に対するモノクローナル抗体が開発されており（25）、BrdUのように投与処置の必要が無いことや副作用が無いことなどから、簡便で迅速な細胞動態解析法として新展開をみせている（6, 24, 25, 54）。しかし、これらの中でもBrdU法はS期細胞のみを検出することから、現在でも細胞動態解析法としては最も鋭敏な解析法とすることができる。

病理組織学的検査所見を予後診断に活用する場合の問題点として、良性・悪性境界病変の存在がある。客観的な腫瘍増殖能の評価としては、核分裂像の多寡を計測して推測する手法が用いられてきたが、これには計測方法の統一化がなされていないこと、病理医の見方に個人差があること、標本作製時のアーティファクトの問題もあり厳密なものとは言い難い。これに対して BrdU 法やその他の増殖細胞関連抗原に対する免疫染色法は、発色した標識細胞の局在と標識率を端的に計測することが可能であることから、良性・悪性境界病変の幅を狭めるための迅速で客観的な判断因子となり得る可能性がある。

これまで、イヌおよびネコの腫瘍に対して BrdU 免疫染色を行った研究は少なく、BrdU 免疫染色法によりこれらの腫瘍の細胞増殖能の解析を行うことは、今後、動物腫瘍に対して免疫組織化学を行う上での基礎となる研究となる。つまり、BrdU 法は、S 期にある細胞が BrdU を thymidine として DNA に取り込むことを利用しているため、生体内における腫瘍の活発な成長態度をより忠実に表現しているものと考えられる。その他の増殖細胞抗原の局在および標識率を BrdU のそれと比較検討することは、その増殖細胞抗原の鋭敏さを比較することでもあるので、腫瘍の成長態度をみる上で重要である。さらに、これらの細胞動態解析を行った研究において、動物臨床の立場からその解析結果を検証することができれば、予後診断に応用できる解析方法および結果としてその意義は大きなものとなる。

著者はこの研究の第 1 章で、Labeled Streptavidin-Biotinylated Peroxydase (LSAB) 法による BrdU 免疫染色法を適用し、標識法の手技的な基礎的検討を行った。さらにこれを基に、イヌおよびネコに自然発生した腫瘍症例（イヌ 30 例、ネコ 6 例、13 種類の腫瘍）に BrdU 免疫染色法を適用して、その標識細胞の局在と標識率を病理組織学的所見と対比させて検索した。これによりイヌおよびネコにおいても BrdU 免疫染色法の応用が可能であることを見出し、さらに、BrdU 免疫染色法はヒトで応用されている場合と同様に、腫瘍の成長を解析する方法としてイヌおよびネコの腫瘍にも有用であることを見出した。今回全ての症例で、病理診断時より 14 ヶ月後までの追跡調査を行って、BrdU 標識率と病理組織学的悪性度ならびに実際の症例の予後との関連性を比較して、BrdU 免疫染色法による標識率が動物臨床腫瘍学における予後診断に有用であることを見出した。

また第 2 章では、増殖細胞核抗原の一つである Ki-67 および PCNA のモノクローナル抗体を用いた免疫染色を、BrdU 免疫染色を施したイヌおよびネコの腫瘍から 23 例（イヌ 18 例、ネコ 5 例、9 種類の腫瘍）を抽出して適用し、組織固定法や抗原賦活法の最適化を再検討した。さらに、BrdU、Ki-67 および PCNA の各免疫染色による標識細胞の局在と標識率、ならびに核分裂数を比較検討することによって、Ki-67、PCNA および核分裂数と DNA 合成期（S 期）の細胞（BrdU 標識細胞）との相関性を明らかにすることができた。

本研究で BrdU 免疫染色法における標識率と、Ki-67 および PCNA 標識率との関係式

がそれぞれ得られたことにより、今後、これらの増殖細胞核抗原を標識する手法をイヌおよびネコの腫瘍に適用する場合、BrdU免疫染色法を用いることなくS期細胞の標識率を推測することが可能となった。特にKi-67免疫染色法は、BrdU免疫染色法に匹敵する非常に優れた腫瘍増殖能の解析法であることが証明された。

第1章 イヌおよびネコにおける抗 Bromodeoxyuridine(BrdU) モノクローナル抗体標識法の基礎的研究と腫瘍症例における細胞増殖能の解析

1-1 はじめに

増殖相にある細胞はG₁, S, G₂, M期という細胞周期を繰り返すことにより分裂・増殖を行っている。しかし、生体中ではそのほとんどが増殖能は有するものの、細胞周期外に位置する休止期(G₀期)にとどまる細胞で占められている。生体における腫瘍細胞は、様々な増殖制御機構が破綻し、絶えず増殖相にある細胞として定義することができる。このため、休止期の細胞には認められず、増殖相の細胞に特徴づけられる物質を細胞増殖マーカー(増殖細胞関連抗原)として用いることにより、生体中の腫瘍細胞を検出するばかりでなく、その増殖能を推定すること(細胞動態解析)が可能となってくる(49)。近年 thymidine の類似体である bromodeoxyuridine(BrdU) に対するモノクローナル抗体が開発されたことをはじめに、細胞動態解析法は飛躍的に発展し、現在では様々な増殖細胞関連抗原に対するモノクローナル抗体が開発され、多くの分野で応用されている。

thymidine の誘導体である 5-bromodeoxyuridine (BrdU) は、thymidine 同様 DNA 合成中の細胞核に取り込まれることが知られている(7)。1982年、BrdU に対するモノクローナル抗体が開発され(8)、BrdU で標識された生体のS期細胞が免疫組織化学的に検出可能となった。その後、BrdU を用いた腫瘍の成長解析は、ヒトおよび実験動物での研究に広く応用されてきたが、動物臨床における症例に応用した報告は少ない。

イヌおよびネコに自然発生した腫瘍の増殖動態を解析するために抗 BrdU 免疫染色法の適用を試みた。BrdU を術前に投与し、腫瘍摘出後パラフィン切片上で BrdU を取り込んだS期細胞を抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた免疫染色により検出した。これまでイヌおよびネコの臨床例において BrdU を用いた免疫学的染色法(BrdU 免疫染色)を応用した報告は少なく、その基礎的検討として BrdU の投与量および投与方法、組織の固定法、免疫染色法を検討し、さらに同法を種々の腫瘍の臨床例に適用して細胞動態解析を試みた。

1-2 材料および方法

(1) 材 料

a. BrdU 投与法の検討

5-Bromo-2'-Deoxyuridine(Sigma-Aldrich Co; St Luis, Mo, USA) を、3.0 ~ 83.3 mg / kg (body weight) の投与量で動物の静脈内に投与した。投与約1時間後に、BrdU 免疫染色の基礎的検討時においては実験動物の小腸組織を、臨床例では対象とする腫瘍組織を外科的に摘出し、10%緩衝ホルマリン液または70%エタノール液で固定し、常法に従ってパラ

フィン包埋，パラフィン切片を作成した。

BrdU の投与濃度は 1.5% とし，体重 1kg 当たり 0.2ml 以上を投与した。BrdU 溶液は投与前に 0.22 μ m の滅菌フィルター (Millex-GX, Millipore Co. Bedford, MA, USA) にて滅菌したものを使用した。BrdU 溶液の組成としては Table 1-2 のとおりである。また，臨床例については全頭で，飼い主に対して研究目的と BrdU 投与に関するインフォームド・コンセントを行って，投与の承諾を得た。

b, 組織固定法の検討

BrdU 免疫染色法における固定法を検討するために，実験動物の成イヌおよび成ネコの小腸を使用した。小腸摘出 1 時間前に BrdU を投与した。摘出した小腸を約 5mm の厚さでスライスし，組織片の体積の 10 倍以上の 10% 緩衝ホルマリン液または 70% エタノール液にて室温で振盪しながら 6, 12 および 24 時間，また 1, 2 および 3 週間，さらに 1, 2, および 3 ヶ月間固定した。一部の材料は固定時間による染色性を検討するために，10% 緩衝ホルマリン液では，液中でバーナーを用いて沸点に達しない温度 (約 60 $^{\circ}$ C) で加熱処理しながらの熱固定で 2 時間，室温下の 6, 12 および 24 時間固定の 4 方法で，70% エタノール液では，室温で 12 および 24 時間固定の 2 方法を行って，染色結果を比較した。なお，使用した実験動物は，岐阜大学応用生物学部の実験動物ガイドラインに沿って取り扱った。

c, 供試した腫瘍材料

検索材料としての腫瘍は，岐阜大学附属動物病院外科，または一般動物病院の臨床例であり，イヌおよびネコの腫瘍の外科的摘出材料を用いて BrdU 免疫染色法による検索を行った。症例はイヌ 30 例，ネコ 6 例。年齢は 5 ~ 14 歳齢であった。腫瘍の種類は乳腺腫瘍 13 例，うち乳腺腺腫 3 例 (イヌのみ)，乳腺腺癌 10 例 (イヌ 7 例，ネコ 3 例，いずれも乳腺の単純腺癌を供試した)，乳腺以外の上皮系腫瘍 15 例，うち扁平上皮癌 4 例 (イヌ 3 例，ネコ 1 例)，基底細胞腫 1 例 (ネコ)，基底細胞癌 1 例 (ネコ)，皮脂腺腺腫 5 例 (イヌのみ)，皮脂腺上皮腫 2 例 (イヌのみ)，マイボーム腺腺腫 1 例 (イヌ)，マイボーム腺上皮腫 1 例 (イヌ)，また，非上皮系腫瘍 8 例，うち脂肪腫 2 例 (イヌのみ)，脂肪肉腫 1 例 (イヌ)，皮膚肥満細胞腫 grade III 2 例 (イヌのみ)，悪性組織球症 2 例 (イヌのみ)，骨肉腫 1 例 (イヌ) であった。供試した材料の詳細は Table 1-1 に示した。

(2) 病理組織学的検索

摘出標本を固定後，常法に従い作成したパラフィン切片を，ヘマトキシリン・エオジン (H&E) にて染色。その HE 標本を光学顕微鏡により観察し，腫瘍の組織学的悪性度を検索した。病理組織学的診断は Meuten (22) の分類に準じた。

組織標本作製にあたっては、免疫染色用として H&E 標本に連続した未染色のパラフィン切片（厚さ 4 μ m）を数枚作成しておき、これを使用した。BrdU 免疫染色は、通常の免疫染色法に比べて操作過程が多く、その操作の過程で組織がスライドガラスより剥離する可能性が高いため、予めスライドガラスに Aminopropyltriethoxysilane（Sigma-Aldrich Co.）処理を施した。

（3）BrdU 免疫染色

a, BrdU 免疫染色の手順

BrdU 免疫染色の手順は Yanai ら（52）の方法に従った。抗 BrdU モノクローナル抗体を用いて、Labeled Streptavidin-Biotinylated Peroxydase（LSAB）法にて染色し、腫瘍中の S 期細胞を検索した（24）。発色剤としては 3,3-diaminobenzidine4HCl(DAB；和光純薬学工業㈱，大阪)を用い、対比核染色としてヘマトキシリン染色を施した (Figure 1-1)。

その詳細は、標本を脱パラフィン操作の後リン酸緩衝液（PBS）にて洗浄し、37 $^{\circ}$ C，4 規定塩酸（5N HCl）にて 30 分作用させて、固定した材料の DNA を変性させた。その後硼酸・硼砂緩衝液（PH 7.6）を 4 $^{\circ}$ Cにて 15 分間作用させて、DNA 変性処理時の塩酸を中和させた。10%ホルマリン固定標本に関しては、PBS 中において 0.05% Protease（Nagarase, Sigma-Aldrich Co.）にて 1, 3 および 5 分間の 3 法によるプロテアーゼ処理を行って比較検討した。その後 0.3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化させ、5%ヤギ血清 (Chemicon Temecula, CA, USA) にて非特異的抗体の結合を阻止した後、抗 BrdU モノクローナル抗体（一次抗体；IU-4, \times 10,000, Cosmo Bio Co. Ltd.,Tokyo,Japan）を 4 $^{\circ}$ Cにて一晩作用させた。その後 PBS にて 3 回 1 時間の洗浄を行い、ビオチン化抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体（二次抗体；DAKO, Glostrup, Denmark）を室温にて 30 分間作用させた。この後 PBS にて 3 回 30 分間の洗浄を行って、西洋ワサビ ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO cytomation)を室温にて 30 分間作用させた。そして再び、PBS にて 3 回 30 分間の洗浄を行い、ジアミノベンチジン（DAB）にて標識細胞を可視化させ、最後に対比核染色としてヘマトキシリン染色を施した (Figure 1-1)。

b, BrdU 標識率の算定

様々な固定法における BrdU 免疫染色陽性細胞の鮮鋭度をその視認性の強さにより次の 3 段階にて評価した。+；強陽性，+/-；弱陽性，-；陰性。

BrdU 陽性細胞の標識率（Labeling Index;LI）の算定にあたっては、顕微鏡下にて DAB により茶褐色に染色された標識細胞の局在とその出現割合を求めた。各々の標識率は、最も染色性の良好な部位にて 1000 個以上の細胞を観察（high power [\times 400] field にて 10 視野以上）して、BrdU 免疫染色陽性細胞の全腫瘍細胞に対する割合を計測し、これを BrdU 標識率とした。

1-3 結 果

(1) BrdU 免疫染色法の基礎的検討

a, BrdU 投与経路および投与用量

BrdU 投与経路については、静脈内投与でいずれも良好な染色性を示した。

BrdU 投与用量については、静脈内投与で全例共に副作用等はなく、3.0mg/kg (body weight) 以上の用量で S 期細胞の検索が可能とされる良好な免疫染色性が得られた。

b, 組織固定法および DNA 変性処理

細胞核における BrdU 免疫染色性は、70%エタノール固定法で 1 週間以内に処理した場合に良好な染色性を示した (Table 1-3, Figure 1-6-A)。

しかし、10%緩衝ホルマリン固定法においても、バーナーによる約 60℃の加熱処理を行うことにより良好な染色性が得られた (Figure 1-6-B)。この固定法では、DNA 変性処理の後に行うプロテアーゼ処理を省略しても良好な核の染色性が保たれており、その結果、組織に与えるダメージが極めて少なかった。

また、10%緩衝ホルマリン液固定 (固定時間 6 時間以上) のパラフィン切片に対して行った、硼酸・硼砂緩衝液による中和の後の 0.05% protease 処理では、37℃、1 分間の処理が最も効果的であった (Figure 1-6-C,D,E,F)。

(2) BrdU 免疫染色標識細胞の検索

a, 腫瘍の組織学的特徴および BrdU 標識細胞の検出

乳腺腫瘍、上皮系腫瘍、非上皮系腫瘍に分けて述べる。

i 乳腺腫瘍

乳腺腫瘍はイヌで乳腺腺腫 3 例、乳腺腺癌 7 例、ネコで乳腺腺癌 3 例を検索した。

乳腺腺腫 Mammary (gland) adenoma

[イヌ] 組織所見：乳腺上皮由来の良性腫瘍であり、小型の管状構造を形成しつつ、乳管内に結節性または乳頭状に増殖し、検索した 3 例とも周囲組織への浸潤はみられなかった。上皮の異型性は低く分裂像も乏しかった (Figure 1-7-A)。BrdU 免疫染色：1 視野中の BrdU 免疫染色陽性細胞の検出頻度は低く、腫瘍巣にほぼ均一に点在し、腫瘍の急激な成長を示唆する BrdU 免疫染色陽性細胞 (S 期細胞) の局所的な集中も認められなかった (Figure 1-7-B)。3 例の平均 BrdU 標識率は 5.6%であった。

乳腺線癌 Mammary carcinoma

[イヌ] 組織所見：乳腺上皮由来の悪性腫瘍であり、腫瘍細胞は大小の不規則な管状構

造を形成しつつ周囲の結合組織に浸潤増殖し、組織構築の乱れや腫瘍細胞のリンパ管内への浸潤が認められた。腫瘍細胞は明瞭な核仁をもち異型性が高く、核分裂像も豊富であった。間質における炎症性細胞浸潤、腫瘍内の壊死巣も観察された (Figure 1-7-C)。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は高異型性を示す腫瘍巣にほぼ一致して高率に検出され、陽性細胞の局所的な集中がしばしば認められた (Figure 1-7-D)。7 例の平均 BrdU 標識率は 14.5%であった。

[ネコ] 組織所見：3 例ともに周囲組織への浸潤性が高く容易にリンパ管転移を示した。明瞭な核仁と不規則な核膜を持つ高悪性の浸潤癌であった (Figure 1-7-E)。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は高異型性の局所に一致して極めて高率に検出され、陽性細胞の局所的な集中が随所でみられた (Figure 1-7-F)。3 例の平均 BrdU 標識率は 25.0%であった。

ii 上皮系腫瘍 (乳腺腫瘍を除く)

乳腺腫瘍を除く上皮系組織由来の腫瘍としては、イヌで扁平上皮癌 3 例、皮脂腺腺腫 5 例、マイボーム腺腺腫 1 例、マイボーム腺上皮腫 1 例および皮脂腺上皮腫 2 例、ネコで扁平上皮癌 1 例、基底細胞腫 1 例および基底細胞癌 1 例を検索した。

扁平上皮癌 Squamous carcinoma

[イヌ] 組織所見：各症例ともに周囲組織への浸潤性増殖を示した。癌細胞は大小不同を示し高異型性で分裂像も豊富であった。腫瘍の内部では壊死が高度で、間質には多数の炎症性細胞浸潤が認められた (Figure 1-8-A)。3 例の中では角化傾向の強い 2 症例と無角化の 1 症例であった。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部に高頻度に検出された (Figure 1-8-B)。3 例の平均 BrdU 標識率は 23.7%であった。

[ネコ] 組織所見：ほぼイヌと同様の組織所見であるが、ネコの方がより周囲への浸潤性が高く、皮膚を容易に破壊する傾向がみられた。腫瘍細胞の核仁は明瞭で不規則に配列し、高悪性の所見を示した。角化傾向は認めなかった (Figure 1-8-C)。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部に極めて高密度で偏在して認められた (Figure 1-8-D)。BrdU 標識率は 43.4%であった。

基底細胞腫および基底細胞癌 Basal cell tumor and Basal cell carcinoma

[ネコ] 組織所見：基底細胞腫では、表皮の基底細胞に似た卵円形核を有する腫瘍細胞が、大小の胞巣を形成しつつ結節状に増殖していた。腫瘍細胞は結合織によって被囊化されており、腫瘍細胞は比較的大きさが均一で、異型性は低い分裂像は散見された。本症例ではメラニン色素の沈着が認められた (Figure 1-9-A)。一方、基底細胞癌での所見は、基底細胞に似た腫瘍細胞が不規則な島状結節を形成しつつ周囲組織に浸潤性に増殖してい

た。腫瘍細胞は大小不同を呈し、卵円形の核と明瞭な核仁を持つ腫瘍細胞は異型性が高く、多数の分裂像が観察された。間質は細胞密度が高く、線維芽細胞や著明な膠原線維の増生が認められた (Figure 1-9-C)。BrdU 免疫染色：基底細胞腫では、BrdU 免疫染色陽性細胞は腫瘍巣に散在性に認められ (Figure 1-9-B)、BrdU 標識率は 4.3%であった。基底細胞癌では陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部に高密度で偏在して認められ (Figure 1-9-D)、BrdU 標識率は 22.2%であった。

皮脂腺腺腫 Sebaceous gland adenoma

[イヌ] 組織所見：皮膚皮脂腺由来の良性腫瘍で、腫瘍は薄い結合織に被嚢化され多小葉性に結節性増殖を示した。成熟皮脂腺によく分化した部位と小葉辺縁部の好塩基性細胞の増殖が認められた。腫瘍細胞の分裂像は乏しく核は比較的均一で核の異型性は低い。間質では炎症性細胞浸潤が認められた (Figure 1-10-A)。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は小葉辺縁部の好塩基性細胞にのみ散在性に認められた (Figure 1-10-B)。5 例の平均 BrdU 標識率は 5.4%であった。

皮脂腺上皮腫 Sebaceous gland epithelioma

[イヌ] 組織所見：表皮基底層から連続して真皮内に大小の胞巣を結節状に形成。大部分が好塩基性細胞にて構成され、胞巣の中心部では皮脂腺細胞への分化が認められた。腫瘍細胞は軽度の異型性を示し、分裂像が散見された (Figure 1-10-C)。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞は好塩基性細胞にのみ散在性に認められた (Figure 1-10-D)。2 例の平均 BrdU 標識率は 9.3%であった。

マイボーム腺腺腫およびマイボーム腺上皮腫

Miebomian gland adenoma and Meibomian gland epithelioma

[イヌ] 組織所見：マイボーム腺腺腫は眼瞼のマイボーム腺細胞由来の良性腫瘍であり、その所見は皮脂腺腺腫と共通する (Figure 1-11-A)。マイボーム腺上皮腫はやや未熟で軽度異型性のみられる腺細胞と好塩基性細胞が不規則な島状胞巣を形成し、周囲には炎症細胞が浸潤していた (Figure 1-11-B)。BrdU 免疫染色：マイボーム腺腺腫では、BrdU 免疫染色陽性細胞は小葉辺縁部の好塩基性細胞にのみ散在性に認められ (Figure 1-11-C)、BrdU 標識細胞は 3.7%であった。マイボーム腺上皮腫では BrdU 免疫染色陽性細胞は島状胞巣内で、マイボーム腺腫に比較して高率に認められ (Figure 1-11-D)、BrdU 標識率は 17.0%であった。

iii, 非上皮系腫瘍

非上皮由来の腫瘍として、イヌでは脂肪腫 2 例、脂肪肉腫 1 例、皮膚肥満細胞腫 (Grade III) 2 例、悪性組織球症 2 例、骨肉腫 1 例を検索した。

脂肪腫および脂肪肉腫 Lipoma and Liposarcoma

[イヌ] 組織所見：脂肪腫では、皮下結合組織に成熟した脂肪細胞からなる限界明瞭な結節性増殖が認められた。核の大小不同、異型性に乏しく核分裂像は認められなかった (Figure 1-12-A)。一方、脂肪肉腫では、脂肪滴を有し脂肪細胞への分化を示す部位と、卵円形～紡錘形の核を有する充実性肉腫様の部位からなり、周囲組織へのびまん性浸潤を示した。腫瘍細胞は多形型 (pleomorphic type) であり不規則な配列を示し、核仁明瞭で高度の異型性を示していた。分裂像も豊富であった (Figure 1-12-C)。BrdU 免疫染色：脂肪腫では BrdU 免疫染色陽性細胞はほとんど観察されず、数カ所の視野でごく少数のみ観察された (Figure 1-12-B)。2 例の平均 BrdU 標識率は 0.8% であった。脂肪肉腫では陽性細胞は多くの視野にわたって高率に認められた (Figure 1-12-D)。BrdU 標識率は 27.5% であった。

肥満細胞腫 グレード III Mastcell tumor (grade III)

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は著しい大小不同を呈し、薄い結合織により所々区画されながら索状に配列し、真皮から皮下の深部組織にかけてびまん性増殖を示した。腫瘍細胞は細胞質内に好酸性顆粒を容れ、成熟した肥満細胞に似るものから、光学的には顆粒を認めにくい未分化なものまで様々であった。組織学的グレードは、grade III (Patnaik 分類) とした。顆粒はトルイジンブルー染色に異染性を示した。腫瘍細胞は異型性に富み、2 核～多核の腫瘍細胞も少なくなかった。分裂像も豊富であり、出血、浮腫、局所的壊死巣、また炎症性細胞の浸潤も認められた (Figure 1-13-A)。2 症例ともに他の臓器への転移巣が認められた。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞はいずれの視野でも比較的高率に認められ (Figure 1-13-B)、2 例の平均 BrdU 標識率は 13.5% であった。

悪性組織球症 Malignant histiocytosis

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は大小不同が著しく、真皮～皮下組織での浸潤性増殖を示した。大型の核や多核を有する腫瘍細胞もあり、異型性が高く分裂像も豊富であった (Figure 1-13-C)。また、本来組織球やマクロファージ、顆粒球が有するリゾチームについて免疫染色を施したところ腫瘍細胞は陽性反応を示し、マクロファージ系細胞であることが証明された。また、1 症例では、腹腔内への広範な転移が認められた。BrdU 免疫染色：BrdU 免疫染色陽性細胞はいずれの視野においても高率に認められ (Figure 1-13-D)、2 例の平均 BrdU 標識率は 18.2% であった。

骨肉腫 Osteosarcoma

[イヌ]組織所見：骨膜を由来とした悪性腫瘍であるが、線維芽細胞によく似た紡錘形の骨芽細胞が周囲組織に向かって浸潤増殖する像が認められた。腫瘍細胞は大小不同で異型性が高く、分裂像も豊富であった。島状の類骨の形成や、その周囲に多数の破骨細胞も認められた (Figure 1-13-E)。本症例は骨盤腔全体にわたる播種状の転移が認められた。BrdU免疫染色：BrdU免疫染色陽性細胞はいずれの視野でも高率に認められ (Figure 1-13-F)、BrdU標識率は24.6%であった。

b, 標識率

低いBrdU標識率(平均値±標準偏差値)を示した腫瘍は、乳腺腺腫3.0～7.1(5.6)%, 基底細胞腫4.3%, 皮脂腺腺腫2.7～7.3(5.4)%, 皮脂腺上皮腫8.5～10.0(9.3)%, マイボーム腺腺腫3.7%, 脂肪腫0.4～1.2(0.8)%, であり、いずれも良性の組織像を示した。一方、高いBrdU標識率を示した腫瘍は、乳腺癌9.2～30.5(17.7)%, 扁平上皮癌18.8～43.4(28.7)%, 基底細胞癌22.2%, マイボーム腺上皮腫17.0%, 脂肪肉腫27.5%, 皮膚肥満細胞腫(grade III)13.0～13.9(13.5)%, 悪性組織球症14.5～21.7(18.2)%, 骨肉腫24.6%であり、マイボーム腺上皮腫以外の腫瘍はいずれも組織学的に悪性を示した (Table 1-4,1-5)。

良性・悪性腫瘍のBrdU標識率の平均値をFigure1-2に棒グラフで表す。その平均値は良性腫瘍で5.9%, 悪性腫瘍で20.4%, と悪性腫瘍は良性腫瘍の約3.5倍の数値を示し、悪性腫瘍の増殖サイクルの速さが示唆された (Table 1-5)。また同じ乳腺腺癌でも標識率の平均値はイヌ14.5%, ネコ25.0%を示し、ネコの標識率はイヌの約1.7倍であった (Table 1-6, Fig 1-3)。扁平上皮癌においても標識率(平均値)はイヌ23.7%, ネコ43.4%を示し、ネコの標識率はイヌの約1.8倍であった (Table 1-6, Figure 1-4)。一般に臨床的にもネコの乳腺腺癌、扁平上皮癌はイヌのそれに比べて増殖速度が速く、悪性の性格を有するものが多いのが特徴であり、今回の高い標識傾向と一致した。

c, 生存曲線

病理診断時より12ヵ月後の追跡調査では、良性腫瘍では15症例中4例(26.7%)が死亡していたのに対し(腫瘍以外の死因も含む)、悪性腫瘍では21症例中13例(61.9%)が死亡していた。36例の腫瘍を組織学的悪性度に分けて生存曲線を作成すると、悪性腫瘍と良性腫瘍の間で明瞭な生存率の差が認められた (Figure 1-5)。

1-4 考 察

BrdU 免疫染色法の基礎的研究として、その投与方法と投与量、組織固定法および DNA 変性処理の検討を行った。生体への薬剤投与経路としては、静脈内投与、腹腔内投与あるいは経口投与が一般的である。今回、投与の确实性と血中内 BrdU 消失時間の早さ（約 10～20 分）（34）などを考慮して、静脈内投与方法を選択してイヌおよびネコに適用したところ、特別な副作用も発現することなく良好な染色結果が得られた。BrdU 投与量に関しては、実験動物において佐々木ら（34）は 5mg/kg 以上、Moran ら（23）は 100mg/kg、鈴木ら（47）は 150mg/kg、またヒトでは脳腫瘍患者で星野は（14）100～200mg/kg、Nagashima ら（28）は 150～200mg/kg を設定している。今回のイヌおよびネコの検索では、3.0mg/kg～83.3mg/kg の範囲で投与したが、いずれも良好な染色結果であった。

BrdU は、取り込まれた細胞が放射線に対する感受性が高まることから、放射線増感剤として悪性脳腫瘍や頭頸部癌の治療に用いられてきた（14）。また、BrdU は、一度細胞に取り込まれると永久的に細胞内に残存すること、催奇形性や発癌性に関して長期のデータがないこと等から、投与量は可能な限り少量化すべきである。今回、イヌおよびネコにおける BrdU 投与量としては、ヒトで使用される量と比較して、3mg/kg 以上というごく少量の投与量で実施することが可能であることがわかった。BrdU 高用量での長時間投与あるいは反復投与を行った場合の副作用として、骨髄抑制、白血球減少症、被毛粗剛、脱毛などの症状が報告されているが（7）、今回の投与は単回投与での短時間標識法であることから、このような副作用はいずれの症例も全く認められなかった。

BrdU 免疫染色法における固定法と固定時間に関しては、1 週間以内の 70%エタノール固定による材料において良好な免疫染色結果を得た。2 週間以上の長期にわたるエタノール固定では、BrdU に対する染色性は著しく低下し、S 期細胞の検出には不適當であった。ホルマリン固定を行うと DNA と histone が cross link し、そのため BrdU と DNA 鎖中の BrdU の結合が低下することになり、その免疫染色性が低下するとされている（34）。しかし、今回、材料採取後速やかに 10%緩衝ホルマリン液内でバーナーによる加熱を行いながら固定を行った標本では、免疫染色性は良好であり、DNA 変性処理後に行う protease 処理の省略をも可能であった。つまり、組織を加熱固定することにより BrdU の抗原性を保存することが可能であり、染色性の低下を防ぐことが示唆された。6 時間以上のホルマリン固定を行った材料では、DNA 変性処理に加えて、さらに protease 処理が必要となる（11, 46）。イヌおよびネコの材料においても、0.05% protease 37℃ 1 分間の処理が染色性の回復に最も効果的であった。この場合、組織標本はやや損傷を受けたが、6 時間以上固定したホルマリン材料でも利用が可能となった。細胞核 DNA の大部分は二重鎖の状態にあるが、市販の抗 BrdU モノクローナル抗体は単鎖 DNA 上にある BrdU と

のみ反応するので、BrdU 免疫染色においては DNA の変性という操作が必要になってくる。DNA 変性処理には酸、アルカリ、熱等があるが、今回は 4 規定塩酸にて 37°C、30 分間処理による方法を選択したところ、操作も簡便で得られる結果も一定していた。

BrdU は thymidine の誘導体であり、DNA 合成を行っている細胞は、BrdU を thymidine 同様その細胞核に取り込む。したがって、その局在部位は DNA そのものであると考えられる (7)。今回実施した細胞増殖解析の方法は、BrdU 単回投与による瞬間標識法 (flash labeling method) に相当する (3)。この方法の利点は、組織固定前に BrdU を短時間標識した組織標本上で、S 期細胞 (DNA 合成中の細胞) を容易に検出することが可能であり、短時間のうちにその局在と全腫瘍細胞中に占める標識細胞の割合 (BrdU 標識率) を測定することができる点にある。BrdU 標識率のみからただちに腫瘍の成長速度を推測することはできないが、DNA 合成中の細胞が多いほど細胞分裂も盛んであり、成長速度が早いことは容易に想像される (12)。この方法は早くからヒトの脳腫瘍で臨床的に応用されており、星野ら (14) は髄芽腫で 9.5%、膠芽腫で 6.7%、星状膠細胞腫・髄膜腫で 1% 以下、悪性星状膠細胞腫で 2% の BrdU 標識率を報告している。また、Sasaki ら (36) は乳癌で 7.3% (1.6 ~ 16.0%) の標識率を報告している。一方、藤田 (3)、服部 (10) は ³H-thymidine を用いた S 期細胞の検索を行い、乳癌での標識率は 12 ~ 25.6%、扁平上皮癌で 11 ~ 36%、基底細胞癌で 5 ~ 20%、骨肉腫で 28% と報告している。正常組織において Messier ら (21) は、³H-thymidine 単回投与のマウスおよびラットにおける標識率は表皮では 1.9 ~ 2.2%、真皮結合組織では 0.2 ~ 0.8%、ヒトにおいて藤田ら (3) は、正常表皮の標識率は 3.5 ~ 7.0% であったと報告している。これらのヒトの悪性腫瘍における標識率の結果は、今回のイヌおよびネコの悪性腫瘍とほぼ同じ標識率であった。また、上記のヒトと実験動物の正常組織における標識率は今回のイヌおよびネコの良性腫瘍の標識率と同等であった。

今回、イヌおよびネコの腫瘍例への BrdU 免疫染色法の適用において、組織学的悪性度と BrdU 標識率の高さが概ね一致した。つまり、組織学的に悪性所見を示した腫瘍例は一般に標識率が高く、その平均値は良性所見を示す腫瘍例の約 3.5 倍であり、悪性腫瘍における成長速度の速さが BrdU 標識率により客観的に示された。しかし、マイボーム腺上皮腫は組織学的に悪性所見は強くはなかったものの、BrdU 標識率はその他の良性腫瘍に比べて明らかに高値を示した。これは、マイボーム腺上皮腫は組織学的に悪性度は低いが局所浸潤傾向のある腫瘍であることは既知のことであり、BrdU 標識率が潜在的悪性度を表現する可能性があり興味あるところである。今後も症例を増やして検討する必要がある。また、個々の腫瘍ごとにみると標識率にはバラツキがあり、たとえば乳腺腺癌例での標識率の範囲は 9.2 ~ 30.5%、扁平上皮癌例では 18.8 ~ 43.4% と、約 2.3 ~ 3.3 倍の幅であった。これは、Shimosato ら (43) が肺癌の各組織型における BrdU の標識率を検討して、小細胞癌では 17.9 ~ 19.8% と一様に高いが、腺癌では非常に広範囲にわたる標識率 (0.1

～19.2%)を示し、同一組織内の局所の細胞異型度あるいは分化度とよく相関しているという報告と一致した結果であると考えられる。標識率が高いレベルで大きなばらつきがある腫瘍は乳腺腺癌と扁平上皮癌であり、いずれも上皮系腫瘍である。次にばらつきが大きい腫瘍は、乳腺腺腫、皮脂腺腺腫、脂肪腫の良性腫瘍であるがその標識率のレベルは低い。また、皮膚肥満細胞腫や悪性組織球症の非上皮系悪性腫瘍のBrdU標識率は高いレベルではあるが大きなばらつきではなかった。つまり、BrdU標識率のばらつきが小さな腫瘍は、良性腫瘍かあるいは組織の構成および分化度が比較的均一な非上皮系腫瘍であり、BrdU標識率のばらつきが大きな腫瘍は、組織の構成および分化傾向が多様な上皮系腫瘍と言うことができる。局所的な標識率の高さはその部位での浸潤性や遠隔転移性と関連性がないか、今後さらに検討していく必要がある。また、BrdU免疫染色陽性細胞の局在を探索することで、同一の腫瘍組織内でも局所的に一樣な増殖態度を示さない細胞群の存在が明らかとなった場合、これを応用することによってさらに微細な局所での成長解析が可能となることを示唆するものである。

BrdU免疫染色法の臨床への応用に際して問題となるのは、BrdUによって求められた標識率が腫瘍の増殖能を忠実に表現し得るものかと言うことと、生存率を含めて予後の推測あるいは治療の選択に役立つ指標となり得るかである。一般にヒトでは標識率の高い腫瘍ほど予後不良で、生存率が低くなることが知られている(14)。今回、病理診断時より14ヵ月後までの追跡調査では、高いBrdU標識率であった21症例中13例(61.9%)が腫瘍の転移、再発によって死亡し、いずれも高い標識率を示していた。これに対して、比較的低いBrdU標識率であった症例は、15例中4例(26.7%)の死亡(Figure 1-5)で、その死因はいずれも腫瘍によるものではなかった。この生存率の差は、腫瘍の良性・悪性という病理診断の差と言うより、BrdU標識率の差であることが証明される結果であった。このことから小動物の腫瘍においても、BrdU標識率が予後診断の一助となる可能性が十分あると考えられるが、今回は症例数が少ないため今後はさらに症例を重ねる必要がある。

現在、イヌおよびネコの悪性腫瘍の治療法には、外科的治療、化学療法、放射線療法が挙げられ、一般的には外科的治療と化学療法が行われている。今回検索の対象となった腫瘍の中で、外科的治療が困難な腫瘍としてはネコの乳腺腺癌、イヌの脂肪肉腫、イヌのgrade III皮膚肥満細胞腫が挙げられる。これらの腫瘍の組織像は細胞異型度、構造異型度のいずれをとっても今回の検索で高悪性所見を呈していたが、この中で、ある種の化学療法剤(ロムスチン;アルキル化剤)に比較的良く反応する腫瘍はイヌの肥満細胞腫であることが知られている。ネコの乳腺腺癌やイヌの脂肪肉腫は抗癌剤に対する感受性はほとんど認められず、外科治療による完全切除が望めない場合は予後不良となる。grade III皮膚肥満細胞腫は組織学的に悪性度が高いにもかかわらず、BrdU標識率は他の悪性腫瘍に比べ明らかに低かった。星野(14)は星状膠細胞腫について、予後不良だった星状膠細胞腫の中には病理組織学的には他の星状膠細胞腫と何ら区別はつかなかったが、高いBrdU

標識率を示す増殖能の高い星状膠細胞腫の存在があり、これらは悪性星状膠細胞腫と同じ予後経過をたどったと報告している。このこととは逆に、イヌの grade III 皮膚肥満細胞腫は組織学的に高悪性を示しているが、BrdU 標識率は低く、化学療法に比較的良く反応する。つまり、BrdU 標識率により化学療法に対する感受性をある程度予測できる可能性があると思われるが、今回この点についても症例数が少ないため、可能性有りとするも今後の課題としたい。

今後は、免疫組織化学をイヌおよびネコの腫瘍に応用する場合、個々の腫瘍型における標識率、組織学的悪性度と生物学的態度、治療への反応性と生存期間をそれぞれ比較検討し、その関連性をより多くの症例について検索する必要があると思われる。

☒ 表

Table 1-1 検索材料・BrdU 投与量と病理組織学的所見

症例 No	動物種	性別	年齢	投与 BrdU 量 (mg/kg)	臓器	組織診断名	経過
1	イヌ	♀	8	16.6	乳腺	乳腺腺腫	
2	イヌ	♀	8	33.3	"	"	
3	イヌ	♀	10	25.0	"	"	局所再発
4	イヌ	♀	6	15.0	"	乳腺腺癌	
5	イヌ	♀	10	15.0	"	"	4カ月後死亡
6	イヌ	♀	10	12.0	"	"	
7	イヌ	♀	12	16.7	"	"	
8	イヌ	♀	13	15.0	"	"	
9	イヌ	♀	17	22.7	"	"	9カ月後死亡
10	イヌ	♀	A	3.3	"	"	
11	ネコ	♀	12	16.7	"	"	3カ月後死亡
12	ネコ	♀	16	55.0	"	"	6カ月後再発.11カ月後死亡
13	ネコ	♀	A	15.0	"	"	死亡
14	イヌ	♀	9	13.2	前肢	扁平上皮癌	肺転移
15	イヌ	♀	12	33.3	皮膚	"	2カ月後死亡
16	イヌ	♂	A	15.0	"	"	
17	ネコ	♀	13	30.0	鼻鏡	"	
18	ネコ	♀	16	55.0	皮膚	基底細胞腫	11カ月後死亡
19	ネコ	♀	11	15.0	口腔	基底細胞癌	3カ月後死亡
20	イヌ	♀	8	16.7	皮膚	皮脂腺腺腫	
21	イヌ	♀	8	15.0	"	"	
22	イヌ	♂	11	15.0	"	"	10カ月後死亡
23	イヌ	♀	12	33.3	"	"	2カ月後死亡
24	イヌ	♂	A	33.3	眼瞼	"	10カ月後死亡
25	イヌ	♂	8	33.3	皮膚	皮脂腺上皮腫	
26	イヌ	♀	8	15.0	"	"	
27	イヌ	♀	8	15.0	眼瞼	マイボーム腺腺腫	
28	イヌ	♀	17	22.7	"	マイボーム腺上皮腫	9カ月後死亡
29	イヌ	♀	10	17.8	皮下	脂肪腫	局所再発
30	イヌ	♂	11	3.0	筋間	"	
31	イヌ	♂	11	6.3	陰部皮下	脂肪肉腫	1年前摘出術,2カ月後再発 4カ月後死亡
32	イヌ	♂	9	7.1	口腔	皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	転移,死亡
33	イヌ	♂	14	15.0	陰部	"	転移,1カ月内死亡
34	イヌ	♂	7	9.3	前肢端	悪性組織球症	
35	イヌ	♀	A	83.3	腹腔内	"	転移,死亡
36	イヌ	♂	5	15.0	骨盤腔	骨肉腫	腹腔内播種,死亡

A : adult

No9 と No28, No12 と No18, No15 と No23 は同一症例

Table 1-2 投与 BrdU 溶液

BrdU	15mg
DMSO (溶媒)	0.024ml
生理食塩液	0.976ml
濃度	15mg /ml

Table 1-3 固定法による BrdU 免疫染色性の違い

固定時間	10%緩衝ホルマリン		70%エタノール
	プロテアーゼ処理有り	プロテアーゼ処理無し	
2 時間 60°C	+	+	ND
6 時間 RT	+	+/-	+
12 時間 RT	+	+/-	+
24 時間 RT	+	+/-	+
1 週間 RT	+	+/-	+
2 週間 RT	+	-	+
3 週間 RT	+	-	+/-
1 カ月 RT	+	-	-
2 カ月 RT	+	-	-
3 カ月 RT	+	-	-

+; 強陽性 +/-; 陽性 -; 陰性 RT; 室温 ND; 実施せず

Table 1-4 BrdU 標識率

症例 No	動物種	性別	年齢	組織診断名	BrdU 標識率 %	経過
1	イヌ	♀	8	乳腺腺腫	7.1	
2	イヌ	♀	8	//	6.8	
3	イヌ	♀	10	//	3.0	局所再発
4	イヌ	♀	6	乳腺腺癌	21.0	
5	イヌ	♀	10	//	11.3	4カ月後死亡
6	イヌ	♀	10	//	16.4	
7	イヌ	♀	12	//	9.2	
8	イヌ	♀	13	//	12.6	
9	イヌ	♀	17	//	12.8	9カ月後死亡
10	イヌ	♀	A	//	18.4	
11	ネコ	♀	12	//	23.8	3カ月後死亡
12	ネコ	♀	16	//	20.6	6カ月後再発,11カ月後死亡
13	ネコ	♀	A	//	30.5	死亡
14	イヌ	♀	9	扁平上皮癌	25.4	肺転移
15	イヌ	♀	12	//	27.0	2カ月後死亡
16	イヌ	♂	A	//	18.8	
17	ネコ	♀	13	//	43.4	
18	ネコ	♀	16	基底細胞腫	4.3	11カ月後死亡
19	ネコ	♀	11	基底細胞癌	22.2	3カ月後死亡
20	イヌ	♀	8	皮脂腺腺腫	3.9	
21	イヌ	♀	8	//	6.1	
22	イヌ	♂	11	//	7.0	10カ月後死亡
23	イヌ	♀	12	//	7.3	2カ月後死亡
24	イヌ	♂	A	//	2.7	10カ月後死亡
25	イヌ	♂	8	皮脂腺上皮腫	10.0	
26	イヌ	♀	8	//	8.5	
27	イヌ	♀	8	マイボム腺腫	3.7	
28	イヌ	♀	17	マイボム腺上皮腫	17.0	9カ月後死亡
29	イヌ	♀	10	脂肪腫	1.2	局所再発
30	イヌ	♂	11	//	0.4	
31	イヌ	♂	11	脂肪肉腫	27.5	1年前摘出術,2カ月後再発 4カ月後死亡
32	イヌ	♂	9	皮膚肥満細胞腫 (grade ₁)	13.9	転移,死亡
33	イヌ	♂	14	//	13.0	転移,1カ月内死亡
34	イヌ	♂	7	悪性組織球症	21.7	
35	イヌ	♀	A	//	14.6	転移,死亡
36	イヌ	♂	5	骨肉腫	24.6	腹腔内播種,死亡

A : adult

No9 と No28, No12 と No18, No15 と No23 は同一症例

Table 1-5 各腫瘍における BrdU 標識率

腫瘍のタイプ	症例数	BrdU 標識率% (平均値 ± 標準偏差値)
1. 乳腺腺腫	3	3.0 — 7.1 (5.6 ± 2.3)
2. 乳腺腺癌	10	9.2 — 30.5 (17.7 ± 6.6)
3. 扁平上皮癌	4	18.8 — 43.4 (23.7 ± 10.5)
4. 基底細胞腫	1	4.3
5. 基底細胞癌	1	22.2
6. 皮脂腺腺腫	5	2.7 — 7.3 (5.4 ± 2.0)
7. 皮脂腺上皮腫	2	8.5 — 10.0 (9.3 ± 1.1)
8. マイボーム腺腺腫	1	3.7
9. マイボーム腺上皮腫	1	17.0
10. 脂肪腫	2	0.4 — 1.2 (0.8 ± 0.6)
11. 脂肪肉腫	1	27.5
12. 皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	2	13.0 — 13.9 (13.5 ± 0.6)
13. 悪性組織球症	2	14.6 — 21.7 (18.2 ± 5.0)
14. 骨肉腫	1	24.6
良性腫瘍	15	0.4 — 10.0 (5.9 ± 4.1)
悪性腫瘍	21	9.2 — 43.4 (20.4 ± 8.0)
計	36	0.4 — 43.4 (14.4 ± 9.8)

Table 1-6 各腫瘍における動物種による標識率の違い

腫瘍のタイプ	症例数		BrdU 標識率% (平均 ± 標準偏差値)	
	イヌ	ネコ	イヌ	ネコ
1. 乳腺腺腫	3	-	3.0 - 7.1 (5.6±2.3)	-
2. 乳腺腺癌	7	3	9.2 - 21.0 (14.5±4.2)	20.6 - 30.5 (25.0±5.1)
3. 扁平上皮癌	3	1	18.8 - 27.0 (23.7±4.4)	43.4
4. 基底細胞腫	-	1	-	4.3
5. 基底細胞癌	-	1	-	22.2
6. 皮脂腺腺腫	5	-	2.7 - 7.3 (5.4±2.0)	-
7. 皮脂腺上皮腫	2	-	8.5 - 10.0 (9.3±1.1)	-
8. マイボーム腺腫	1	-	3.7	-
9. マイボーム腺上皮腫	1	-	17.0	-
10. 脂肪腫	2	-	0.4 - 1.2 (0.8±0.6)	-
11. 脂肪肉腫	1	-	27.5	-
12. 皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	2	-	13.0 - 13.9 (13.5±0.6)	-
13. 悪性組織球症	2	-	14.6 - 21.7 (18.2±5.0)	-
14. 骨肉腫	1	-	24.6	-
良性腫瘍	14	1	0.4 - 10.0 (6.1±4.2)	4.3
悪性腫瘍	16	5	9.2 - 27.5 (18.0±5.9)	20.6 - 43.4 (28.1±9.3)
計	30	6	0.4 - 27.5 (12.4±7.9)	4.3 - 43.4 (24.1±12.8)

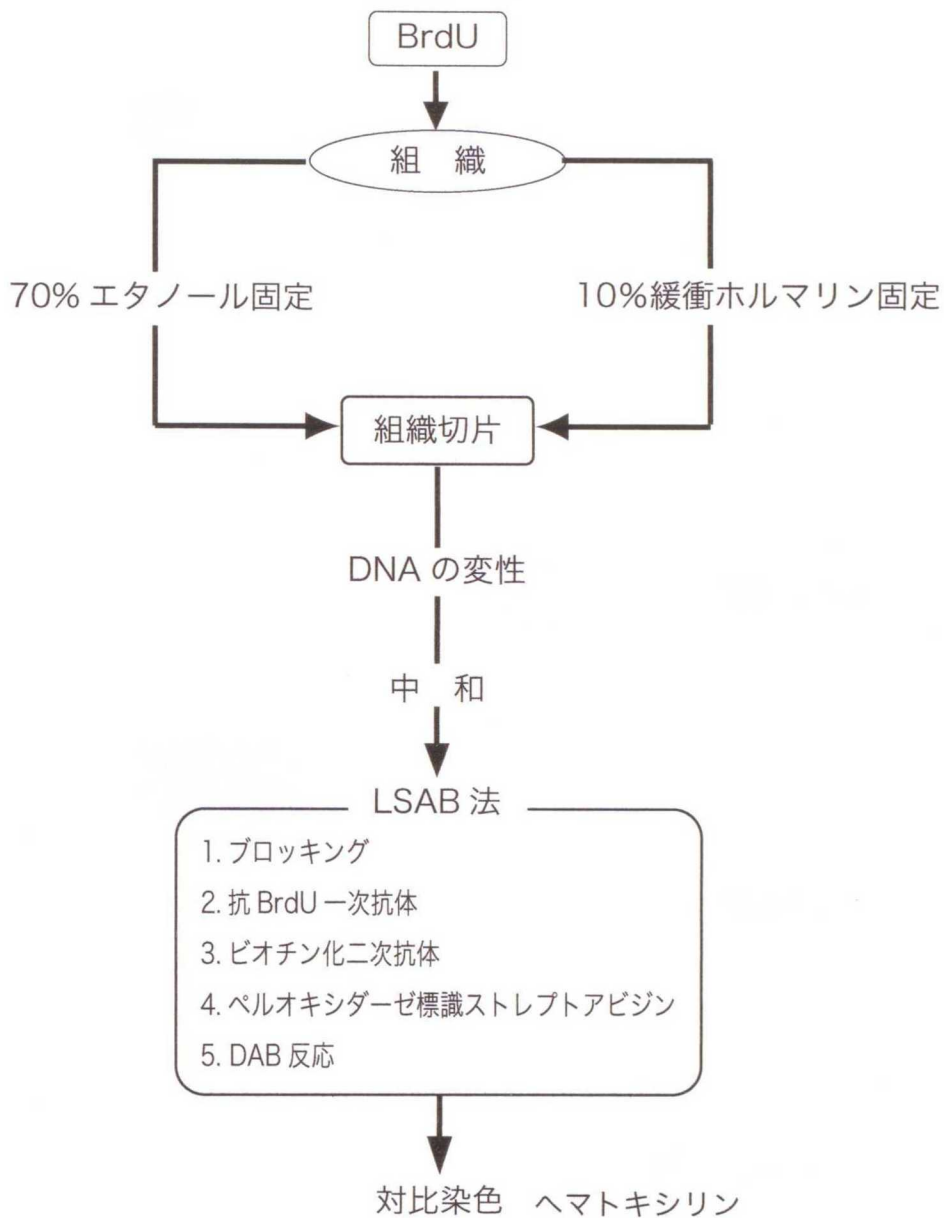


Figure 1-1 BrdU 免疫染色手順

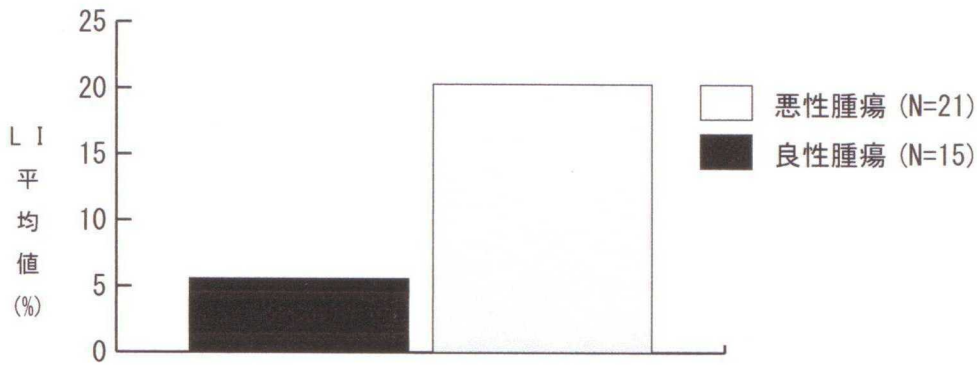


Figure 1-2 良性，悪性腫瘍における BrdU 標識率 (LI)

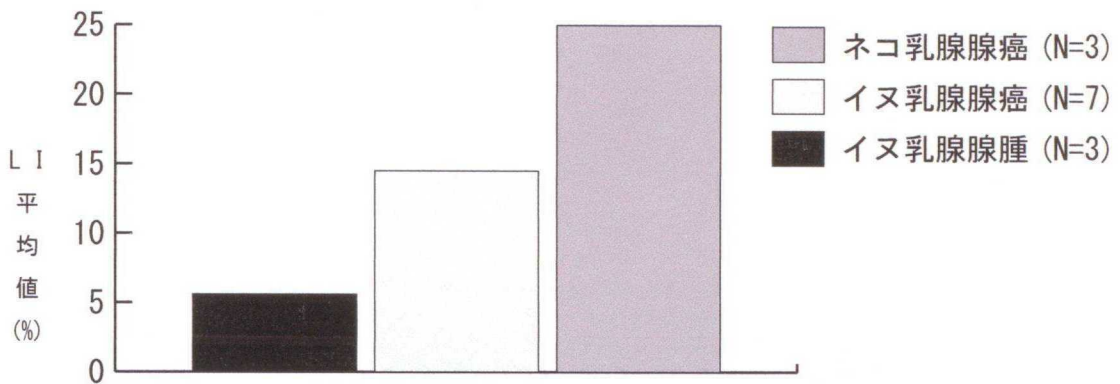


Figure 1-3 イヌ，ネコの乳腺腫瘍における BrdU 標識率 (LI)

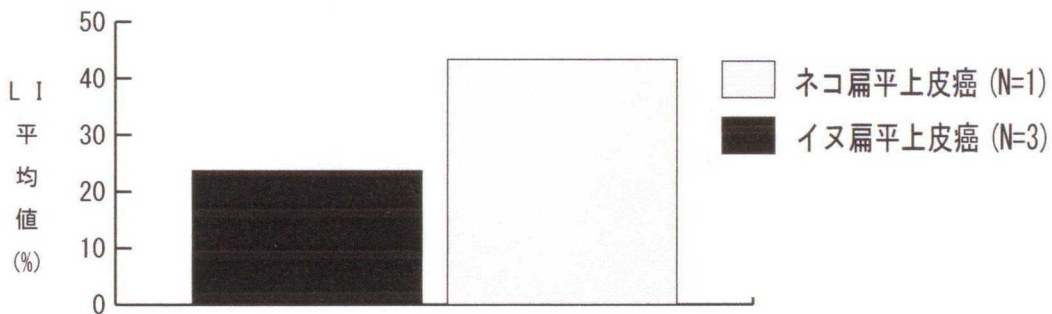
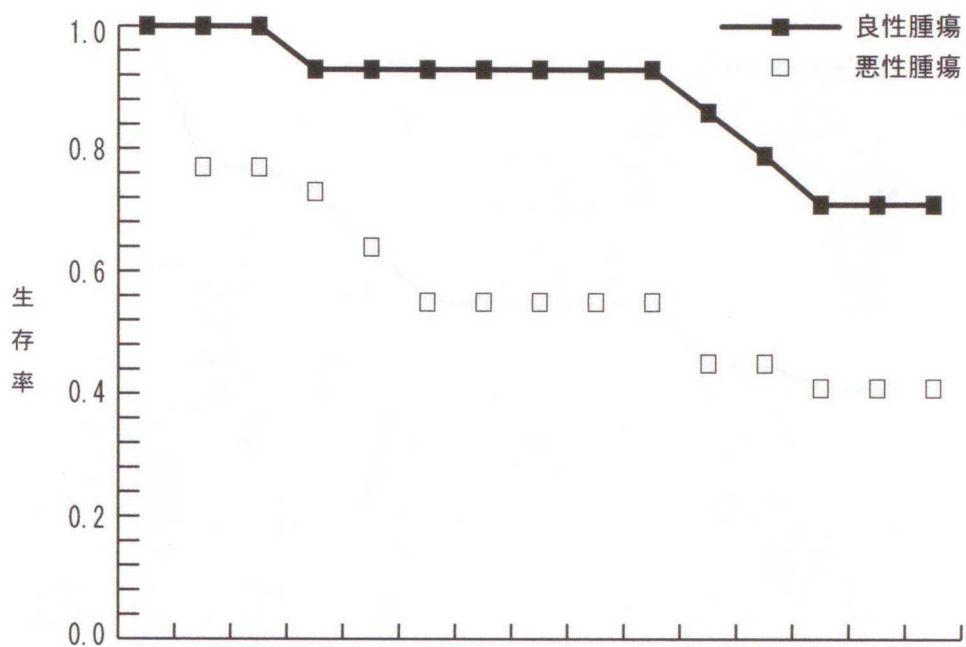


Figure 1-4 イヌ，ネコの扁平上皮癌における BrdU 標識率 (LI)



Months	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
良性腫瘍 (n=15)	1	1	1	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.86	0.79	0.71	0.71	0.71
悪性腫瘍 (n=21)	1	0.77	0.77	0.73	0.64	0.55	0.55	0.55	0.55	0.45	0.45	0.41	0.41	0.41	0.41

Figure 1-5 良性腫瘍例と悪性腫瘍例の生存曲線

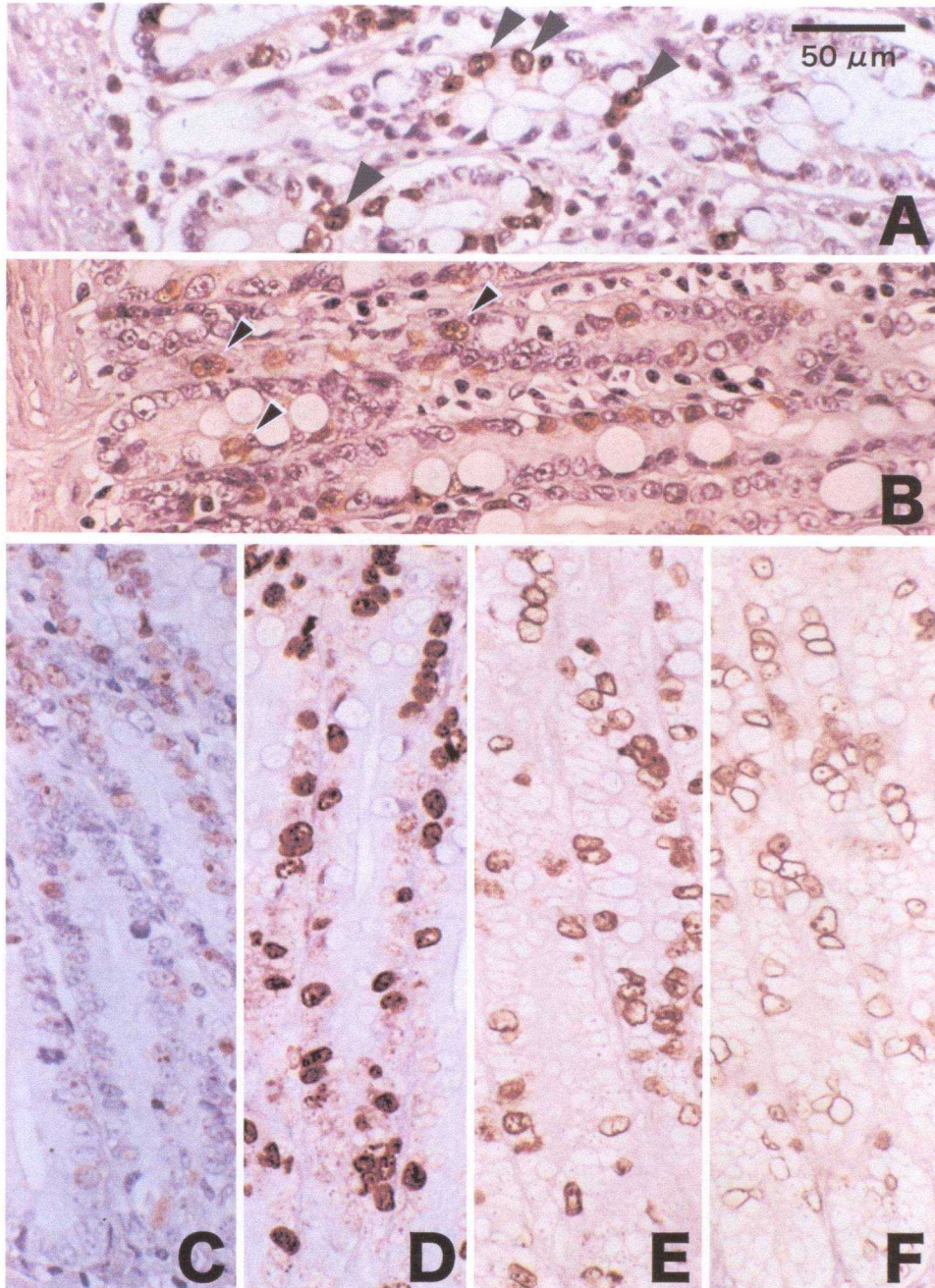


Figure 1-6 固定法および DNA 変性処理法の違いによる BrdU 免疫染色性

A : ネコの小腸, 70%エタノールにて12時間固定. **B** : イヌの小腸, 10%緩衝ホルマリンにて60°C 2時間固定, 加熱処理. 矢頭は陽性を示した細胞の核を示す. 組織構造が良好に保たれている. **C** : ネコの小腸, 10%緩衝ホルマリンにて60°C 2時間固定, プロテアーゼ未処理. 弱陽性細胞が散在して認められる. **D** : Cと同じ材料, 37°C 1分間のプロテアーゼ処理. 陽性反応を示した細胞はより強調されて確認され, 組織構造の状態も良好. **E** : Cと同じ材料, 37°C 3分間のプロテアーゼ処理. 染色性の強さはヘマトキシリン対比染色と共に減弱している. **F** : Cと同じ材料, 37°C 5分間のプロテアーゼ処理, 組織構造へのダメージが大きい.

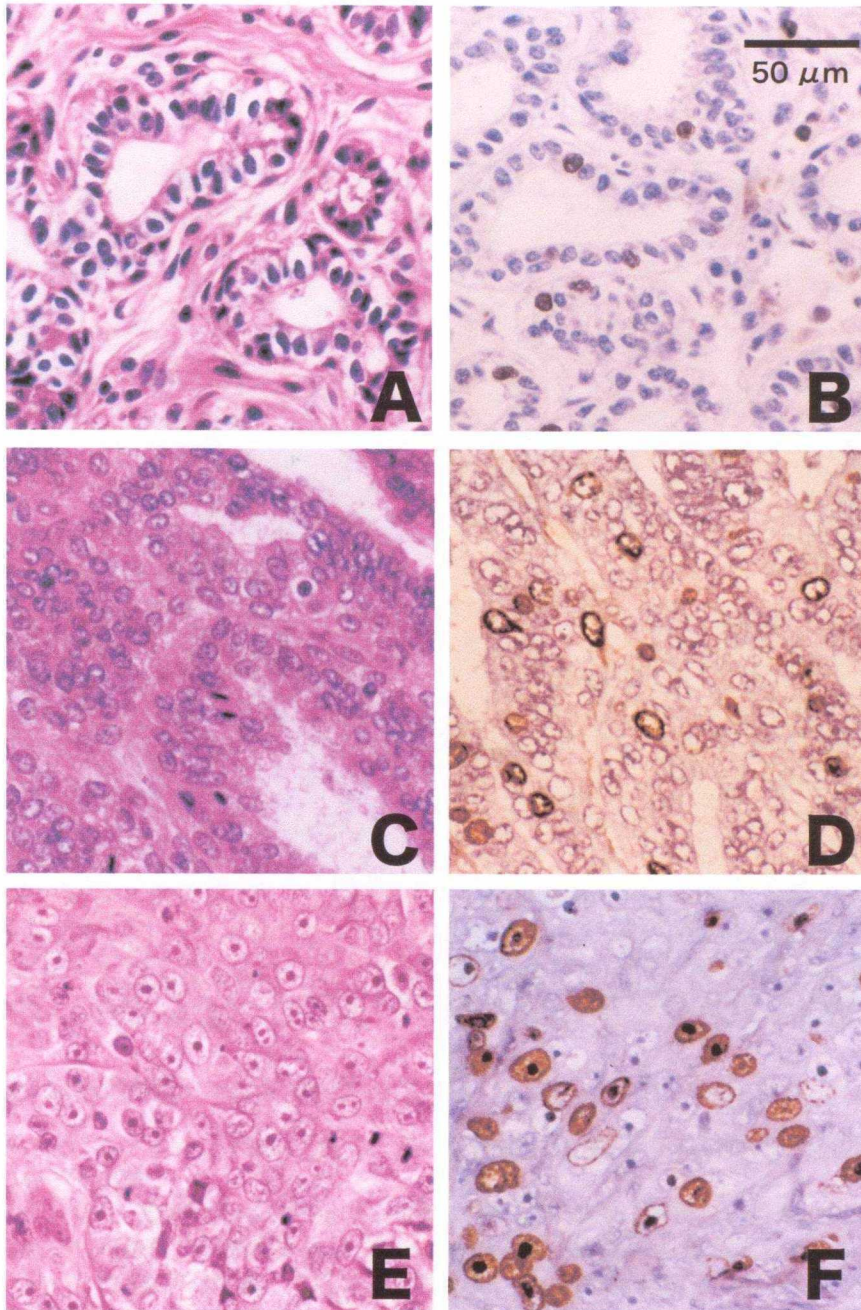


Figure 1-7 乳腺腫瘍における BrdU 免疫染色

A, C, E: ヘマトキシリン・エオジン染色. **B, D, F:** BrdU 免疫染色. **A, B:** イヌの乳腺腺腫.
C, D: イヌの乳腺腺癌. **E, F:** ネコの乳腺腺癌

A: イヌの乳腺腺腫, 腫瘍細胞は乳管を形成し, BrdU 陽性細胞は乳管上皮細胞に散在して認められる (**B**). 平均 BrdU LI: 5.6%. **C:** イヌの乳腺腺癌, 腫瘍細胞は管状構造を形成しつつ周囲の結合組織に浸潤, 腫瘍細胞の異型性は高く核分裂像も豊富に認められる. BrdU 陽性細胞は高異型性を示す腫瘍巣に一致して高率に認められる (**D**). 平均 BrdU LI: 14.5%. **E:** ネコの乳腺腺癌, 極めて高悪性度の組織像を示す. BrdU 陽性細胞は高異型性の部位に一致して検出, 局所的な集中が随所で認められた (**F**). 平均 BrdU LI: 25.0%.

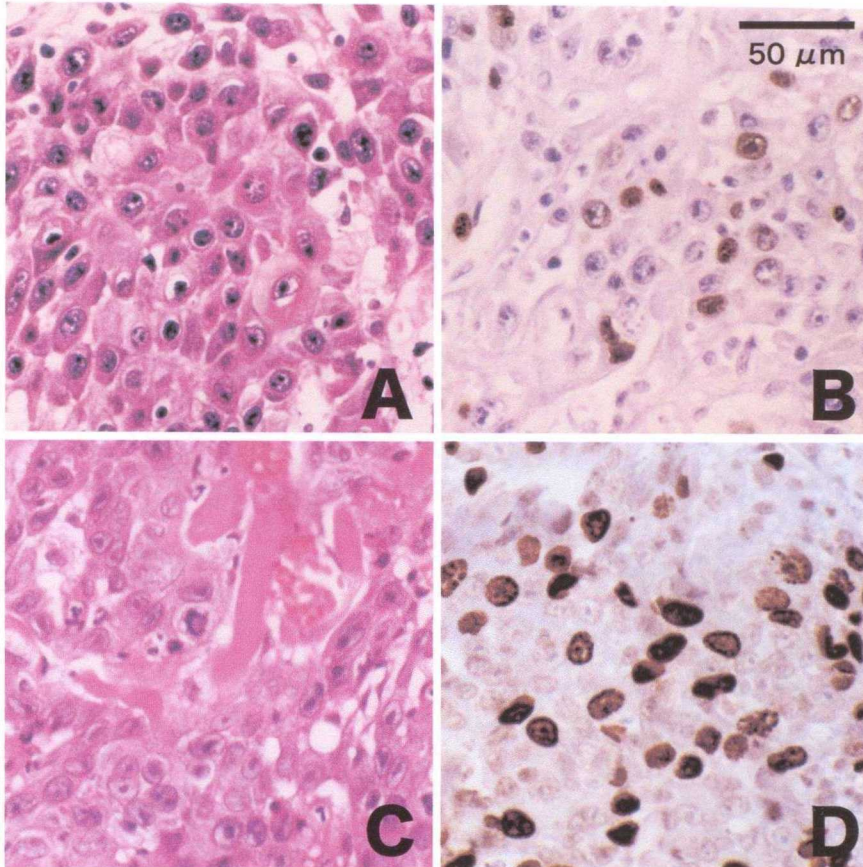


Figure 1-8 扁平上皮癌における BrdU 免疫染色

A, C : ヘマトキシリン・エオジン染色. **B, D** : BrdU 免疫染色. **A, B** : イヌの扁平上皮癌.
C, D : ネコの扁平上皮癌

A : イヌの扁平上皮癌. 腫瘍細胞は円形巣状に増殖を示し高異型性, 分裂像も頻繁に認められる. BrdU 陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部に高頻度に検出される. 角化傾向が認められる部位もある. (**B**). 平均 BrdU LI : 23.7%. **C** : ネコの扁平上皮癌. 高悪性の所見を示し, 角化傾向は認められない. BrdU 陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部で高密度に偏在して認められる (**D**). 平均 BrdU LI : 43.4% .

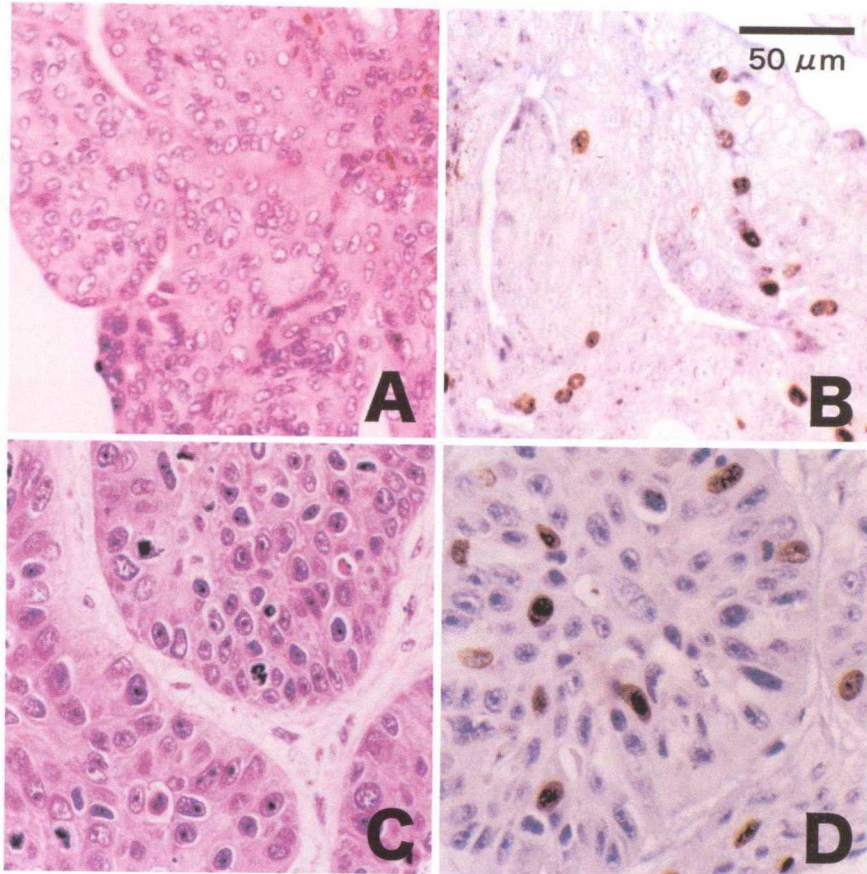


Figure 1-9 基底細胞腫および基底細胞癌における BrdU 免疫染色

A, C : ヘマトキシリンエオジン染色. **B, D** : BrdU 免疫染色. **A, B** : ネコの基底細胞腫.
C, D : ネコの基底細胞癌

A : ネコの基底細胞腫. 腫瘍細胞は大小の胞巣を形成しつつ結節状に増殖, 異型性は低い分裂像は散見される. BrdU 陽性細胞は腫瘍巣に散在して認められる (**B**). BrdU LI : 4.3%. **C** : ネコの基底細胞癌. 腫瘍細胞は不規則な島状結節を形成しつつ周囲組織に浸潤増大. BrdU 陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部で高密度に偏在して認められる (**D**). BrdU LI : 22.2%.

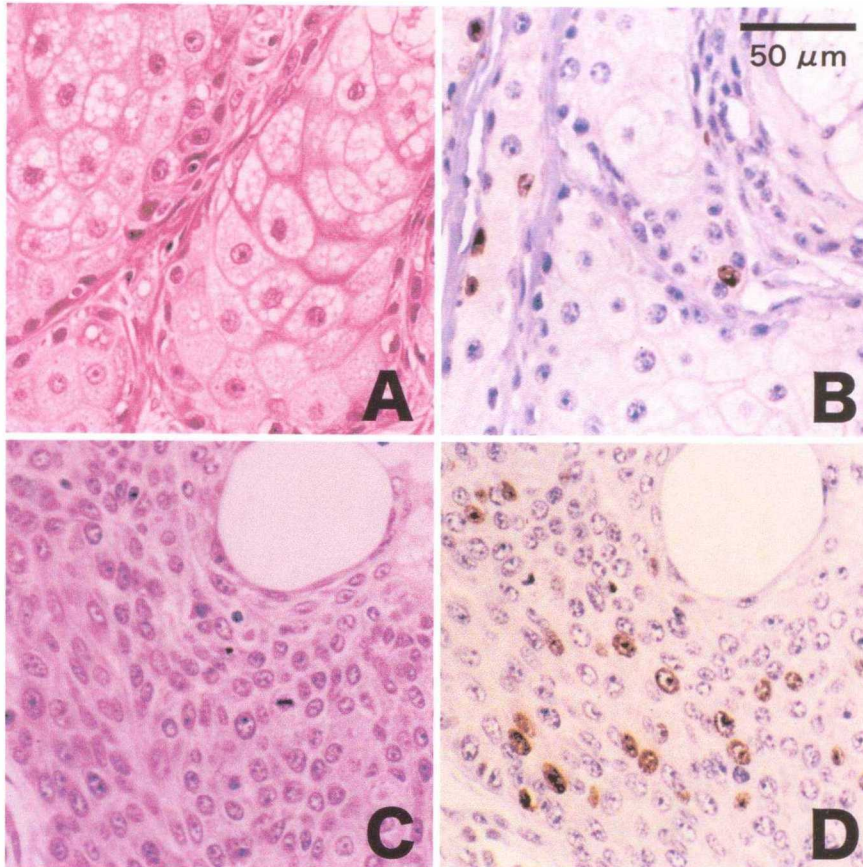


Figure 1-10 皮脂腺腺腫および皮脂腺上皮腫における BrdU 免疫染色

A, C : ヘマトキシリン・エオジン染色, **B, D** : BrdU 免疫染色, **A, B** : イヌの皮脂腺腺腫,
C, D : イヌの皮脂腺上皮腫

A : イヌの皮脂腺腺腫, 腫瘍は薄い結合織に被囊化され多小葉性に結節性増殖を示す, 腫瘍細胞の異型性は低く分裂像も乏しい, BrdU 陽性細胞は小葉辺縁部の好塩基性細胞にのみ散在性に認められる (**B**), 平均 BrdU LI : 5.4%, **C** : イヌの皮脂腺上皮腫, 表皮基底層から連続して真皮内に大小の胞巣を結節状に形成, 腫瘍細胞は軽度の異型性を示し分裂像が散見される, BrdU 陽性細胞は好塩基性細胞にのみ散在性に認められた (**D**), 平均 BrdU LI : 9.3%.

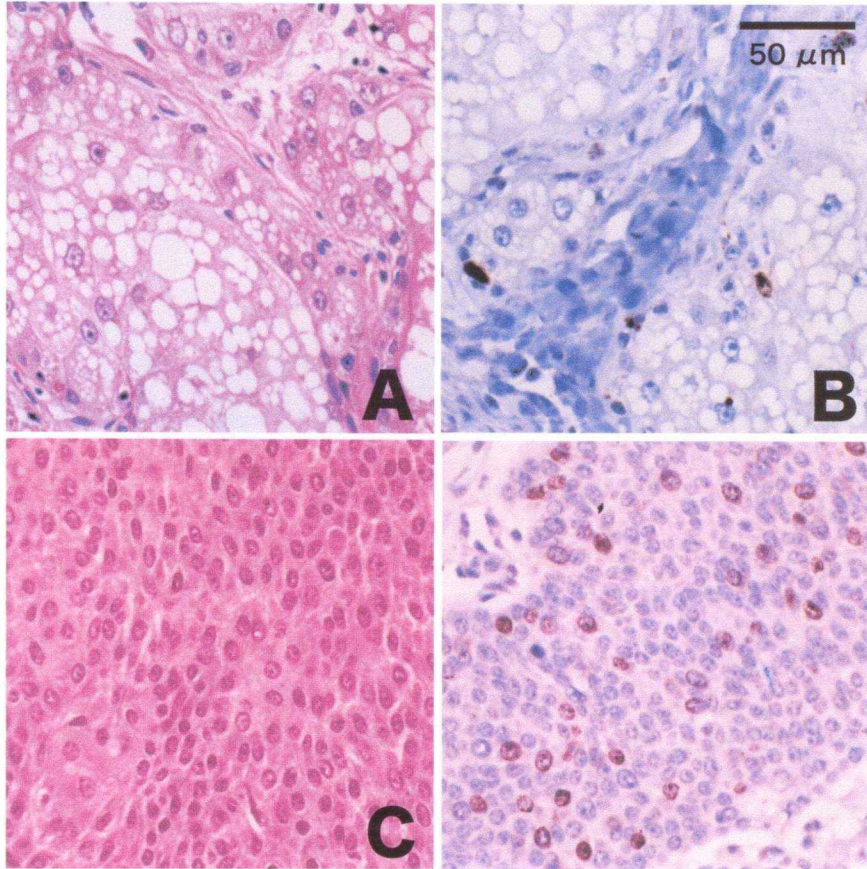


Figure 1-11 マイボーム腺腺腫とマイボーム腺上皮腫における BrdU 免疫染色

A, C : ヘマトキシリン・エオジン染色, **B, D** : BrdU 免疫染色, **A, B** : イヌのマイボーム腺腺腫,
C, D : イヌのマイボーム腺上皮腫

A : イヌのマイボーム腺腺腫, 腫瘍は比較的分化を示し小葉性に結節性増殖を示す, 腫瘍細胞の異型性は低く分裂像も乏しい, BrdU 陽性細胞は小葉辺縁部の好塩基性細胞に一致して散在性に認められる (**B**), BrdU LI : 3.7%, **C** : イヌのマイボーム腺上皮腫, 未熟な皮脂腺細胞と好塩基性細胞が不規則な島状胞巣を形成し増殖, 腫瘍細胞は軽度異型性を示し, 分裂像は散見される, BrdU 陽性細胞は比較的高率に認められる (**D**), BrdU LI : 17.0% .

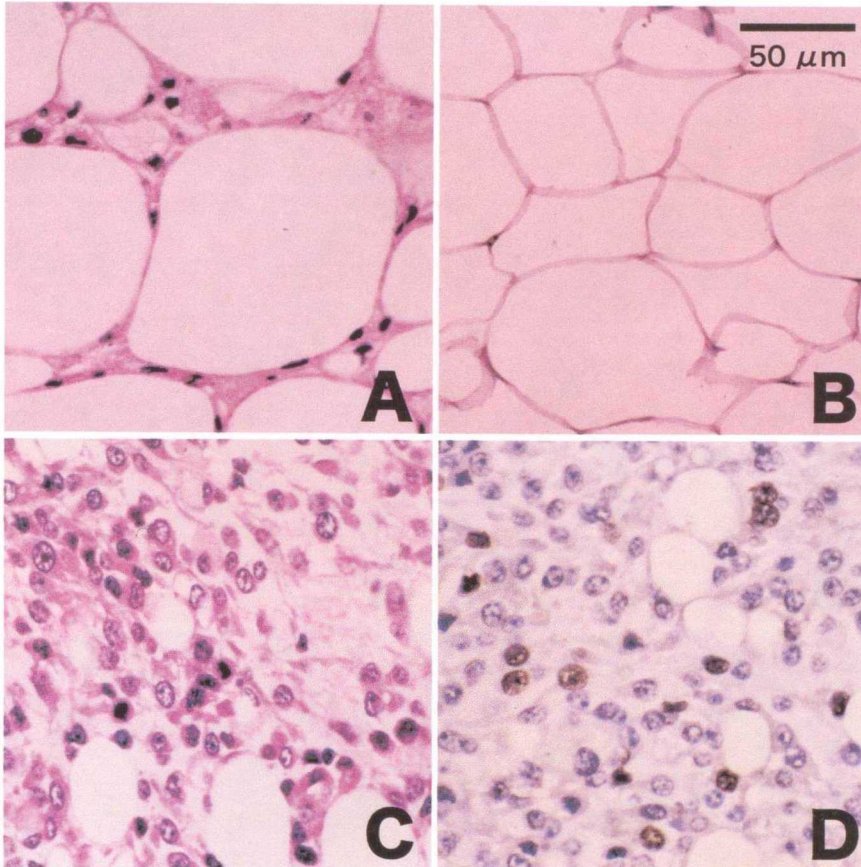


Figure 1-12 脂肪腫および脂肪肉腫における BrdU 免疫染色

A, C : ヘマトキシリン・エオジン染色, **B, D** : BrdU 免疫染色, **A, B** : イヌの脂肪腫,

C, D : イヌの脂肪肉腫

A : イヌの脂肪腫, 成熟した脂肪細胞からなる, 腫瘍細胞の異型性は低く分裂像は認められない, BrdU 陽性細胞はほとんど確認できない (**B**), 平均 BrdU LI : 0.8%, **C** : イヌの脂肪肉腫, 脂肪滴を有する脂肪細胞への分化を示す部位と, 卵円形~紡錘形の核を有する肉腫様部位からなり, 周囲組織へのびまん性浸潤を示す, 腫瘍細胞は高度の異型性を示し分裂像は豊富, BrdU 陽性細胞は多くの視野で高率にみられる (**D**), 平均 BrdU LI : 27.5%.

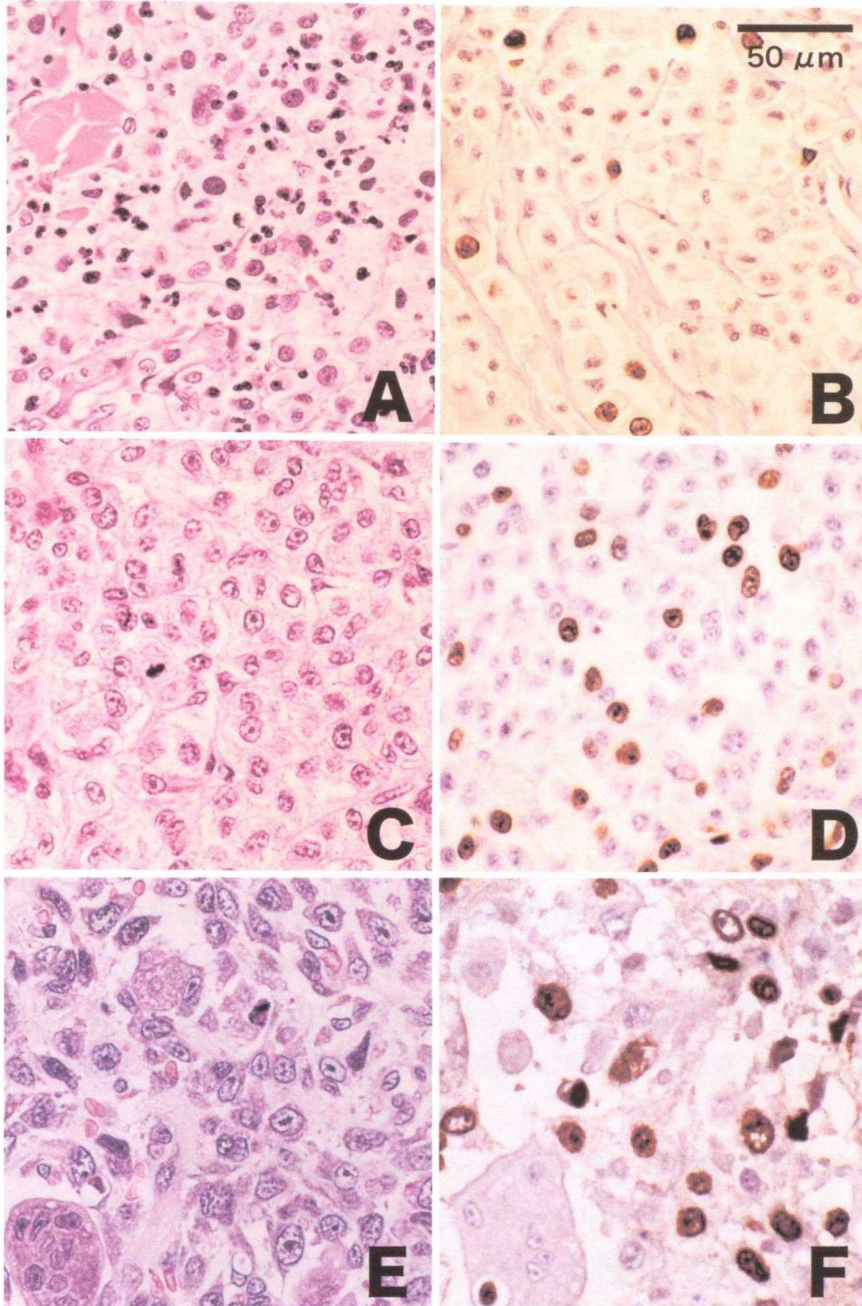


Figure 1-13 皮膚肥満細胞腫 (Grade III), 悪性組織球症および骨肉腫における BrdU 免疫染色

A, C, E: ヘマトキシリンエオジン染色. **B, D, F:** BrdU 免疫染色. **A, B:** イヌの皮膚肥満細胞腫. **C, D:** イヌの悪性組織球症. **E, F:** イヌの骨肉腫.

A: イヌの皮膚肥満細胞腫. 腫瘍細胞は所々結合織により区画されながら, 真皮から皮下の深部組織にかけてびまん性浸潤増殖を示す. 腫瘍細胞の異型性に富み多核の細胞も認め, 分裂像も豊富. BrdU 陽性細胞はどの視野でも高率にみられる (**B**). 平均 BrdU LI: 13.5%.

C: イヌの悪性組織球症. 腫瘍組織は真皮~皮下組織で浸潤性増殖を示した. 腫瘍細胞は異型性が高く分裂像豊富. BrdU 陽性細胞は多くの視野で高率にみられる (**D**). 平均 BrdU LI: 18.2%.

E: イヌの骨肉腫. 紡錘形の骨芽細胞由来の腫瘍細胞が周囲組織に向かって浸潤性増殖を示す. 腫瘍細胞は大小不同, 異型性高く分裂像も豊富. BrdU 陽性細胞はどの視野でも高率に認められる. BrdU LI: 24.6%.

第2章 抗Ki-67 および抗Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)モノクローナル抗体標識法によるイヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能の解析

— BrdU 免疫染色法と比較して —

2-1 はじめに

細胞増殖の過程を明らかにする研究には多くの方法が論じられている。Thymidine 誘導体である 5-bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体が開発されたことによって、S 期の細胞を正確に検索できる簡便で迅速な細胞動態解析法として急速に発展してきた。これらの方法は、S 期細胞の DNA の局在を標識する Gold standard な方法(8)として認められ、臨床人医学でも多くの情報が蓄積され体系的に確立された方法となっている。現在では、増殖細胞核抗原である Ki-67 や Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) などの抗体が開発されたことにより、細胞動態解析法はさらに簡便な方法となり飛躍的に進歩している(6, 25)。また、これらの抗原の局在と標識率により細胞増殖能を解析する方法を、動物の腫瘍に適用した報告も集められてきている(1, 2, 6)。Ki-67 は分子量 300-kDa の核内あるいは核小体内蛋白質で、免疫染色法では増殖細胞の細胞周期中 G₁ 前期, S, G₂, M 期の全ての細胞が陽性となる(5)。PCNA は DNA Polymerase δ の補助因子としての機能していることが知られている増殖細胞核抗原であり、免疫染色法では G₁ 後期から S 期にかけての細胞が陽性になる (Figure 2-1) (4, 27)。Ki-67 や PCNA などの内在性抗原の免疫染色結果と、BrdU に代表される外来性の抗原を利用した免疫染色法の結果とを比較することは、Ki-67 や PCNA 免疫染色法の信頼性を確立するためにも、さらに詳細な細胞増殖相の解析を行うためにも必要である。

イヌおよびネコの腫瘍に適用した BrdU 免疫染色法は、細胞の増殖能を定量的に測定し、腫瘍の成長解析を行う上で有用であることを第 1 章で述べた。しかし、BrdU 法では腫瘍摘出術前に BrdU を投与する必要がある、手技的に煩雑であることと催奇形性や変異原性などの毒性の問題が未だ解決されておらず、安心して臨床に応用することができないのが現状である。そこで第 2 章では、BrdU 免疫染色法の結果を基準として、抗 Ki-67 および抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた免疫染色法を同一の材料に適用して標識率を求め、腫瘍の成長解析法としての有用性の再確認と BrdU 免疫染色結果との関連性を検討した。さらに核分裂指数についても同様に比較し、それぞれの相互関連を求めて腫瘍の増殖能測定法としての有用性を検討した。

2-2 材料および方法

(1) 材料

a, BrdU 投与方法

BrdU 投与経路, 投与用量については, 第 2 章で述べたとおりである.

b, Ki-67 免疫染色および PCNA 免疫染色における組織固定法の検討

Ki-67 免疫染色法および PCNA 免疫染色法における固定法を検討するために, 第 1 章で用いた実験動物の成イヌおよび成ネコの小腸を使用した. 小腸摘出 1 時間前に BrdU を投与した. 摘出した小腸を約 5mm の厚さでスライスし, 組織片の体積の 10 倍以上の 10% 緩衝ホルマリン液または 70% エタノール液にて室温で振盪しながら 24 時間固定した.

c, 供試した腫瘍材料

検索材料として第 1 章にて BrdU を投与したイヌおよびネコの腫瘍 36 例の中から, 悪性腫瘍を中心に 23 例を抽出して, 各種の細胞増殖マーカーを用いた免疫染色を施した. いずれも臨床例の外科的摘出例であり, イヌ 18 例, ネコ 5 例であった. その内訳は, 乳腺腺腫 2 例 (イヌのみ), 乳腺腺癌 9 例 (イヌ 6 例, ネコ 3 例), 扁平上皮癌 4 例 (イヌ 3 例, ネコ 1 例), 基底細胞癌 1 例 (ネコ), マイボーム腺上皮腫 1 例 (イヌ), 脂肪肉腫 1 例 (イヌ), 皮膚肥満細胞腫 (grade III) 2 例 (イヌのみ), 悪性組織球症 2 例 (イヌのみ), 骨肉腫 1 例 (イヌ) であった (Table 2-1).

これらの症例は腫瘍摘出まで化学療法剤などの特殊な薬剤の使用歴はなかった.

(2) 病理組織学的検索

摘出標本を固定後, 常法に従い作成したパラフィン切片を, ヘマトキシリン・エオジン (H&E) にて染色. その H&E 標本を光学顕微鏡により観察し, 腫瘍の組織学的悪性度を検索した. 病理組織学的診断は第 1 章と同じく Meuten (22) の分類に準じた.

組織標本作製にあたっては, 免疫染色用として H&E 標本に連続した未染色のパラフィン切片 (厚さ 4 μ m) を数枚作成しておき, これを使用した.

(3) 免疫染色

a, 各細胞増殖マーカーの免疫染色法の概要

脱パラフィンした切片を, 抗 BrdU モノクローナル抗体 (50 倍希釈, Dako cytomation A/S, Glostrup, Denmark), 抗 Ki-67 抗体 (MIB-1, マウスモノクローナル抗体; DAKO

cytomation), または抗 PCNA 抗体 (PC10, マウスモノクローナル抗体; DAKO cytomation) を用いて, Labeled Streptavidin-Biotinylated Peroxydase (LSAB) キット (DAKO cytomation) により免疫染色を行って, 陽性細胞を検索した. 対比核染色はヘマトキシリン染色にて行った (Figure 2-2).

b, BrdU 免疫染色

第 1 章で述べたとおりに行った.

c, Ki-67 免疫染色法と抗原賦活法

渋谷ら (41) の報告を基に次のような手順で行った. つまり切片を脱パラフィン後, 抗原賦活法としては無処置のものと, 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH6.8) に浸し, 家庭用電子レンジにてマイクロウェーブ持続照射 (発振周波数: 2450MHz, 出力: 600W) による加熱 (5 分間×5~7 回), またはオートクレーブにて 120°C 15 分の加熱処理による抗原賦活を行ったものを用意した. 電子レンジ照射間隔は 30 秒とし, この休止中に蒸留水を適宜追加し, 切片が乾燥しないようにした. 加熱後は室温下で 30 分程度放置して冷却させた後, LSAB 法による Ki-67 免疫染色を行った.

LSAB 法は, 標本をゆっくりリン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄した後, 無水メタノールにて作成した 0.3% 過酸化水素を室温で 30 分間作用させて内因性ペルオキシダーゼを阻害した. その後 5% ヤギ血清 (Chemicon) を 1 時間作用させた後, 抗 Ki-67 モノクローナル抗体 (× 50) を 4°C にて一晩作用させた. その後 PBS にて 3 回 1 時間の洗浄を行い, ビオチン化抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体 (二次抗体; DAKO, Glostrup, Denmark) を室温にて 30 分間作用させた. この後 PBS にて 3 回 30 分間の洗浄を行って, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO cytomation) を室温にて 30 分間作用させた. そして再び, PBS にて 3 回 30 分間の洗浄を行い, ジアミノベンチジン (DAB) にて標識細胞を可視化させ, 最後に対比核染色としてヘマトキシリン染色を施した.

d, PCNA 免疫染色

Ki-67 免疫染色と同様の方法で行った. 抗原賦活処理として 0.05M クエン酸緩衝液 (pH6.8) または 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0) に浸し, 家庭用電子レンジによるマイクロウェーブ持続照射あるいはオートクレーブによる処置を行った. 加熱後は室温下で 30 分程度放置して冷却させた後, LSAB 法による PCNA 免疫染色を行った.

LSAB 法は, 標本をゆっくり PBS にて洗浄した後, 無水メタノールにて作成した 0.3% 過酸化水素を室温で 30 分間作用させて内因性ペルオキシダーゼを阻害した. その後 5% ヤギ血清 (Chemicon) を 1 時間作用させた後, 抗 PCNA モノクローナル抗体 (× 100) を 4°C にて一晩作用させた. その後は Ki-67 免疫染色における手順と同じように行った.

e, 標識率の算定（核分裂指数の算定を含む）

BrdU, Ki-67 および PCNA の免疫染色後における陽性細胞の標識率（Labeling Index ; LI）の算定にあたっては、顕微鏡下において、DAB により茶褐色に染色された陽性細胞の局在と標識率を求めた。各々の標識率は、最も染色性の良好な部位にて 1000 個以上の細胞を観察（high power [$\times 400$] field にて 10 視野以上）して、BrdU, Ki-67, PCNA 免疫染色陽性細胞の全腫瘍細胞に対する割合をそれぞれ計測し、これを標識率とした。

核分裂指数（mitotic index:MI）は H & E 染色標本を用いて、標識率算定と同様の方法で、核分裂像を示す細胞の割合を算定した。さらにそれぞれの標識率相互の相関関係をみるため、BrdU 標識率と Ki-67 標識率, BrdU 標識率と PCNA 標識率, BrdU 標識率と MI の関係を、回帰直線と Spearman の相関係数により解析した。また、それぞれの免疫染色法における陽性細胞の局在と標識率を、組織学的悪性度と対比させて比較・検討した。

2-3 結 果

(1) Ki-67 免疫染色における抗原賦活法

10%緩衝ホルマリン固定，70%エタノール固定のいずれの固定法においても，加熱による抗原賦活化処理を行わなかった切片では陽性反応が得られなかった．クエン酸緩衝液による処理と，電子レンジによるマイクロウェーブ持続照射を行った抗原賦活法が最も効果的な賦活化処理法であり，染色性が優れていた．(Figure 2-7-B)．オートクレーブ処理による方法も陽性細胞の観察には支障なかった．10%緩衝ホルマリン固定の標本では70%エタノール固定標本に比べやや染色性が低下したが，組織構造の保存状態は良好であり，ヘマトキシリンによる核染色の状態も良好であった (Figure 2-7-D)．

抗 Ki-67 モノクローナル抗体による免疫染色で陽性反応を示した細胞は，同じ部位での非陽性細胞と明確に区別することができた．陽性所見は核内にびまん性，あるいは数個の核小体状の顆粒状反応物として認められた (Figure 2-8-A,B,C)．

(2) PCNA 免疫染色における抗原賦活法

抗 PCNA モノクローナル抗体による免疫染色においても Ki-67 抗原賦活法と同様，リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液中での短期間マイクロウェーブ処理が抗原賦活法として有効であった (Figure 2-8-D)．陽性所見は核内にびまん性に認められ，一部の細胞では細胞質内にも陽性反応物を認めた (Figure 2-9-H)．

(3) 組織学的検索

a. BrdU, Ki-67 および PCNA 免疫染色による組織学的検索

第1章において BrdU 免疫染色を施した腫瘍のうち，悪性腫瘍を中心にした23例に対して Ki-67 免疫染色，PCNA 免疫染色を同時に行ってそれぞれの組織における陽性細胞の局在と標識率を検索した．その内容を乳腺腫瘍，上皮系腫瘍（乳腺腫瘍を除く），非上皮系腫瘍に分けて述べる．

i 乳腺腫瘍

イヌで乳腺腺腫2例，乳腺腺癌6例，ネコで乳腺腺癌3例を検索した．

乳腺腺腫 mammary gland adenoma

[イヌ] 組織所見：2症例とも周囲組織への浸潤はみられなかった．腫瘍上皮細胞の異型性は低く分裂像も乏しかった (figure 2-9-A)．

BrdU 免疫染色：1視野中の陽性細胞検出率は低く，腫瘍巢の乳腺上皮細胞にほぼ均一に点在していた．腫瘍の急速な成長を示唆する S 期陽性細胞の局所的な集中は認められず，2例の

平均 BrdU 標識率は 7.0%であった (figure 2-9-B).

Ki-67 免疫染色：乳腺上皮細胞における陽性細胞の割合は低いが、BrdU 標識率の約 1.7 倍の標識率を示した。2 例の平均 Ki-67 標識率は 11.7%であった (figure 2-9-C).

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 3.9 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった (figure 2-9-D)。2 例の平均 PCNA 標識率は 27.5%であった。

乳腺腺癌 mammary gland carcinoma

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は異型性が高く、核分裂像も豊富で、周囲の結合組織に浸潤増殖し、組織構築の乱れを伴ってリンパ管内への浸潤も認められた。(figure 2-9-E).

BrdU 免疫染色：陽性細胞は高異型性を示す乳腺上皮細胞にほぼ一致して高率に検出されたが、局所的な集中も認められた。6 例の平均 BrdU 標識率は 14.9%であった (figure 2-9-F).

Ki-67 免疫染色：乳腺上皮細胞における陽性細胞の割合は、BrdU 標識率の約 1.7 倍を示し、その組織内局在は BrdU 陽性細胞の局在と同様であった。6 例の平均 Ki-67 標識率は 25.5%であった (figure 2-9-G).

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 2.1 倍を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。陽性反応は核内にとどまらず、細胞質内にも認められた。6 例の PCNA 標識率は 31.3%であった (figure 2-9-H).

[ネコ] 組織所見：腫瘍細胞は核の大小不同で明瞭で粗大な核仁を特徴として、きわめて異型度が高く、リンパ管浸潤像は明確で悪性度の高い浸潤性乳腺癌であった (figure 2-9-I).

BrdU 免疫染色：陽性細胞は基底膜に近い細胞、あるいは高異型性の乳腺上皮細胞にほぼ一致してきわめて高率に検出され、陽性細胞の局所的な集中が随所で見られた。3 例の平均 BrdU 標識率は 25.0%であった (figure 2-9-J).

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.5 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。3 例の平均 Ki-67 標識率は 37.3%であった (figure 2-9-K).

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.7 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。3 例の平均 PCNA 標識率は 43.6%であった (figure 2-9-L).

ii 上皮系腫瘍 (乳腺腫瘍を除く)

乳腺腫瘍を除く上皮性組織由来の腫瘍としては、イヌで扁平上皮癌 3 例、マイボーム腺上皮腫 1 例、ネコで扁平上皮癌 1 例、基底細胞癌 1 例を検索した。

扁平上皮癌 squamous cell carcinoma

[イヌ] 組織所見：癌細胞は周囲組織に浸潤傾向を示し、腫瘍細胞は粗大な核仁をもち、

多数の分裂像を認めた (Figure 2-10-A)。3例中2例に角化を認めたが、1例は非角化性扁平上皮癌であった。

BrdU 免疫染色：陽性細胞は基底膜に近い辺縁部に高頻度検出された。3例の平均 BrdU 標識率は 23.7%であった (Figure 2-10-B)。

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.4 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。3例の平均 Ki-67 標識率は 34.0%であった (Figure 2-10-C)。

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 2.3 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。1領域の腫瘍細胞の全てが陽性反応を示す部位も認められた。3例の平均 PCNA 標識率は 53.9%であった (Figure 2-10-D)。

[ネコ]組織所見：イヌとほぼ同様の組織像を示したが、角の大小不同やと不整な核膜など異型度が高く、不規則な配列で周囲組織への浸潤傾向が強かった。角化傾向は全く認められなかった (Figure 2-10-E)。

BrdU 免疫染色：陽性細胞は腫瘍巢の辺縁部にきわめて高頻度で検出された。BrdU 標識率は 43.4%であった (Figure 2-10-F)。

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.4 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。Ki-67 標識率は 62.4%であった (Figure 2-10-G)。

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.5 倍の値を示した。陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であったが、1領域の腫瘍細胞の全てが陽性反応を示す部位も認められた。PCNA 標識率は 66.5%であった (Figure 2-10-H)。

基底細胞癌 basal cell carcinoma

[ネコ]組織所見：腫瘍細胞は明瞭な核仁と不整な核膜など異型性高く、多数の分裂像が観察され、周囲組織への浸潤増殖を示した (Figure 2-11-A)。

BrdU 免疫染色：陽性細胞は腫瘍巢の辺縁部に高密度で偏在して認められた。BrdU 標識率は 22.2%であった (Figure 2-11-B)。

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.7 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。Ki-67 標識率は 37.4%であった (Figure 2-11-C)。

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.8 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。PCNA 標識率は 39.1%であった (Figure 2-11-D)。

マイボーム腺上皮腫 meibomian gland epithelioma

[イヌ]組織検査：腫瘍細胞はほぼ均一な大きさであるがやや異型性を示し、分裂像も散見される。(Figure 2-11-E)。

BrdU 免疫染色：陽性細胞はやや異型性のある腫瘍細胞の部位に一致して認められた。BrdU 標識率は 17.0%であった (Figure 2-11-F)。

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.7 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．Ki-67 標識率は 28.5%であった (Figure 2-11-G)．

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.8 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．PCNA 標識率は 49.4%であった (Figure 2-11-H) ．

iii 非上皮系腫瘍

非上皮系組織由来の腫瘍として，イヌで脂肪肉腫 1 例，皮膚肥満細胞腫 (grade III) 2 例，悪性組織球症 2 例，骨肉腫 1 例を検索した．

脂肪肉腫 liposarcoma

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は不規則な核膜と大小不同，複数の核仁を有し (Pleomorphic Type)，高異型性で分裂像も豊富，周囲組織へのび慢性浸潤を認めた (Figure 2-12-A)．

BrdU 免疫染色：陽性細胞は多くの視野にわたって高率に認められた．BrdU 標識率は 27.5%であった (Figure 2-12-B)．

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.7 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．Ki-67 標識率は 46.6%であった (Figure 2-12-C)．

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.6 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．PCNA 標識率は 43.1%であった (Figure 2-12-D)．

皮膚肥満細胞腫 グレード III Mastcell tumour. grade III

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は異型性に富み，2 核～多核の腫瘍細胞も少なくなかった．分裂像も豊富で組織学的グレードは grade III (Patnaik 分類) と診断した．2 症例とも他の部位への転移巣が認められた (Figure 2-12-E)．

BrdU 免疫染色：陽性細胞は多くの視野にわたって高率に認められた．2 例の平均 BrdU 標識率は 13.5%であった (Figure 2-12-F)．

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.6 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．2 例の平均 Ki-67 標識率は 22.1%であった (Figure 2-12-G)．

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 2.4 倍の値を示し，陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった．2 例の平均 PCNA 標識率は 32.7%であった (Figure 2-12-H)．

悪性組織球症 Malignant histiocytosis

[イヌ] 組織所見：大型の核や多核を有する腫瘍細胞は異型性が高く，分裂像は豊富であった．1 症例は腹腔内への広範囲な転移を示した (Figure 2-13-A)．

BrdU 免疫所見：陽性細胞は多くの視野にわたって高率に認められた．2 例の平均 BrdU 標識率は 18.2%であった (Figure 2-13-B) ．

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.6 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。2 例の平均 Ki-67 標識率は 28.3%であった (Figure 2-13-C)。

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.5 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。PCNA 標識率は 27.1%であった (Figure 2-13-D)。

骨肉腫 Osteosarcoma

[イヌ] 組織所見：腫瘍細胞は大小不同で高異型性を示し、分裂像も豊富であった。島状の類骨の形成や、その周囲に多数の破骨細胞も認められた。本症例は骨盤腔内全域にわたる播種状の転移が認められた (Figure 2-13-E)。

BrdU 免疫染色：陽性細胞は多くの視野にわたって高率に認められた。BrdU 標識率は 24.6%であった (Figure 2-13-F)。

Ki-67 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.5 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。Ki-67 標識率は 36.2%であった (Figure 2-13-G)。

PCNA 免疫染色：BrdU 標識率の約 1.7 倍の値を示し、陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様であった。PCNA 標識率は 43.0%であった (Figure 2-13-H)。

b. Ki-67 および PCNA 免疫染色における標識細胞の局在の概要

Ki-67 および PCNA 免疫染色における標識細胞の局在は、BrdU 免疫染色の標識細胞にほぼ一致して認められた。これらは悪性度の高い細胞の局在とほぼ一致していた。上皮系腫瘍では、陽性細胞は基底膜に近い細胞、あるいは組織学的にも高異型性の細胞に一致して標識される傾向がみられた。また、犬の乳腺腺癌の一例では、PCNA 免疫染色の陽性反応物が核内のみならず細胞質にも認められた。

c. 標識率および核分裂指数

腫瘍 23 例についての BrdU, Ki-67 および PCNA 免疫染色の LI ならびに MI の値を示した (Table 2-2)。

BrdU LI, Ki-67 LI, PCNA LI ならびに MI は、腫瘍により大きな差が見られた。BrdU の LI は 6.8 ~ 43.4%, Ki-67 の LI は 9.0 ~ 62.4%, PCNA の LI は 20.6 ~ 67.1% であり、MI は 0.14 ~ 2.38% と、腫瘍により幅がみられたが、MI ではその幅がきわめて小さかった (Table 2-3)。各々の LI の平均値は PCNA (39.0%) > Ki-67 (30.5%) > BrdU (19.4%) の順で高かった。

組織学的悪性度と各々の LI の関連については、悪性例の各 LI は、BrdU で 9.2 ~ 43.4 (平均 20.8) %, Ki-67 では 16.2 ~ 62.4 (平均 32.5) %, PCNA においては 16.4 ~ 67.1 (平均 39.6) % であり、MI は 0.18 ~ 2.38 (平均 0.9) % であった。一方、組織学的に良性例では、BrdU で 6.8 ~ 17.0 (平均 10.3) %, Ki-67 では 9.0 ~ 28.5 (平均 17.3) %, PCNA

PCNAにおいては20.6～49.4(平均34.8)%であり,MIは0.14～0.49(平均0.35)%であり,いずれも悪性腫瘍より低い数値を示した (Table 2-3, Figure 2-3).

また,各免疫染色の標識率における悪性腫瘍標識率/良性腫瘍標識率比(悪性腫瘍での平均標識率/良性腫瘍での平均標識率)はBrdUで2.02, Ki-67では1.88, PCNAで1.14であり,MIにおいては2.57であった. MIは悪性・良性腫瘍間の差が一番大きく,免疫染色における悪性腫瘍と良性腫瘍の間での標識率の差はBrdUが最も大きく, BrdU > Ki-67 > PCNAの順であった.

各免疫染色ともに極めて高い標識率を示した腫瘍は,ネコの乳腺腺癌1例,ネコの扁平上皮癌1例であり,次いで高い標識率を示した腫瘍は,イヌの乳腺腺癌1例,ネコの乳腺腺癌2例,イヌの扁平上皮癌2例,ネコの基底細胞癌1例,イヌの脂肪肉腫1例,イヌの悪性組織球腫症1例,イヌの骨肉腫1例であった. また,悪性腫瘍の標識率は,良性腫瘍(乳腺腺腫)における標識率に比べて高い結果が得られた.

(4) 各種の細胞増殖マーカーにおける相互関係

同一腫瘍における各マーカーの標識率はPCNA > Ki-67 > BrdU ≫ MIの順に高値を示した. また, BrdU 標識率を基準にしたところ各マーカーそれぞれに密接な相関が認められた.

a, BrdU, Ki-67 における標識率の比較

Ki-67 標識率と BrdU 標識率との相互関係図 (Figure 2-4) より, その回帰直線は以下のようなになる.

$$Y \text{ (Ki-67 標識率)} = 1.3 X \text{ (BrdU 標識率)} + 5.31 \quad (r = 0.96)$$

相関係数の r の値は 1 に非常に近く, この 2 つの標識率の間には密接な相関が認められる.

Ki-67 は, 全細胞周期中の細胞を表し, 腫瘍の成長率に相当する. また, BrdU 標識率は腫瘍の S 期細胞数から求めることが可能であり, 逆に BrdU 標識率から S 期細胞数を求めることも可能である. このため, 下記の式により 0.64 は S 期時間/細胞周期時間にあたることになる (Table .2-4).

$$\begin{aligned} \frac{\text{BrdU 標識率}}{\text{Ki-67 標識率}} &= \frac{\text{S 期時間/全腫瘍細胞}}{\text{Cycling cell/全腫瘍細胞}} \\ &= \frac{\text{S 期時間}}{\text{Cycling cell}} \\ &= 0.64 \end{aligned}$$

b, BrdU と PCNA および核分裂数における陽性率の比較

PCNA 標識率と BrdU 標識率, ならびに MI と BrdU 標識率との回帰直線は相互関係 (Figure 2-5, Figure 2-6) により, 以下のようになった.

$$Y (\text{PCNA 標識率}) = 1.21 X (\text{BrdU 標識率}) + 15.44 \quad (r = 0.73)$$

$$Y (\text{MI}) = 0.05 X (\text{BrdU 標識率}) - 0.12 \quad (r = 0.70)$$

Ki-67 標識率 / BrdU 標識率との相関関係に比較するとその値は低いが, PCNA, MI ともに弱いながら BrdU 標識率との相関が認められた.

2-4 考 察

本章では、第1章で述べた BrdU 免疫染色法を基準として、他の細胞増殖マーカーである Ki-67, PCNA, さらに細胞分裂数 (MI) について比較検討し、腫瘍の成長解析の指数としての有用性を検討した。各種の増殖細胞関連抗原を検出する免疫染色法では、各々の至適染色条件を設定することが、染色法の信頼性を高める上で非常に重要である。それぞれの細胞増殖マーカーの免疫染色に対し、それぞれ適した組織固定法や前処理法が報告されている (37, 40, 44)。しかし、実際には各施設で独自の方法が考案され実施されており、未だ統一されていないのが現状である。そこで今回、Ki-67 および PCNA 免疫染色法における手技を再検討して、BrdU 免疫染色法と比較検討することとした。

イヌおよびネコの組織における抗 Ki-67 モノクローナル抗体ならびに抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた増殖期細胞の検索では、抗原賦活化処理が不可欠であった。抗原賦活化の方法としては、マイクロウェーブ加熱処理と重金属溶液による処理法があげられる (44)。今回は渋谷ら (41) の方法に従い、単純加熱法、オートクレーブ法、マイクロウェーブによる加熱法を検討したところ、マイクロウェーブ法が最も染色性良好であった。さらに、抗原賦活処理をリン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液中で行えば良好な結果をもたらすことから、抗原賦活法において緩衝液の選択は加熱方法とともに重要な染色条件であると考えられた。Ki-67 および PCNA 免疫染色における組織の固定法に関しては、70%エタノール固定が最も良好な染色結果を示したが、10%緩衝ホルマリンで加熱固定した材料であれば染色性は良好であり、通常の方法に対しても適用可能であると考えられた。

また、抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた免疫染色においても、Ki-67 抗原賦活法と同様に、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液中で短時間マイクロウェーブ処理が極めて有効であることが確認された。イヌの乳腺癌における PCNA 免疫染色で、陽性反応は核内にとどまらず細胞質内にも認められた。その原因は不明であるが、固定時に核内から細胞質内に流出した可能性や、細胞自身による分解過程の PCNA を検出した等が考えられ、注意を要すると思われる。

以上、Ki-67, PCNA 免疫染色法の方法論的基礎研究について述べたが、今後はいずれの免疫染色法もあらゆる施設で実施可能であり、手技も特別な方法を必要とせず比較的簡便であることから、今後も小動物臨床における腫瘍の組織化学的検索の手段として応用可能であることは言うまでもない。

BrdU 免疫染色法は S 期細胞を選択的に標識し、信頼性の高い腫瘍の成長解析法であるが、材料摘出の前にあらかじめ BrdU を生体に投与する必要性があり、臨床的な応用には倫理上制限されていることは第1章で述べた。このため、この様な前処置の必要が無く簡便な免疫組織化学的マーカーが求められるようになり、その代表的なものとして今回応用した Ki-67 および PCNA があげられる (26)。しかし今回、各種免疫染色による標識率

の中で、良性と悪性腫瘍の標識率の差が最も大きい染色法は BrdU であったことから、BrdU 免疫染色法は他の方法より鋭敏な悪性度判断の指標となることが示唆された。

Ki-67 は Gerdes ら (5) により最初に報告され、ホジキン病の腫瘍細胞の培養株の核分画を抗原として作成されたモノクローナル抗体である。この抗体は Cell cycle に入るすべての細胞の核と反応するとされており、lateG1, S, G2, M期のすべての細胞が陽性となるが、G0期の細胞とは反応しないとされている。このため、Ki-67 標識率は growth fraction を直接反映すると考えられている。Ki-67 抗体が反応する抗原の性状は未だ不明な点があるが、分裂象の観察より客観的かつ鋭敏とされており、さらに BrdU の場合のような煩雑な操作が不要であることから、細胞増殖解析の良いマーカーとして様々な腫瘍で検討され、予後因子としても有用であるとされている (2, 5)。また、人医学の分野で Ki-67 の標識率と BrdU による標識率は一定の比率で相関するので、両者の関係を示す計算式は容易に作れるとの報告がある (36)。したがって、Ki-67 抗体による染色を行えば、S期細胞の比率も容易に換算できることになる。本研究における、BrdU 標識率と Ki-67 標識率の相関係数は 1.3 ($r = 0.96$) であった。ヒト腫瘍におけるこの係数は、in vivo 悪性腫瘍で 1.59 ($r = 0.89$) (44)、肺癌 1.26 ($r = 0.97$) (12)、膀胱腫瘍 1.37 ($r = 0.95$) (50)、in vitro では脳腫瘍 1.26 ($r = 0.97$) (24) と報告されており、今回のイヌおよびネコの係数ときわめて近く、BrdU 標識率と Ki-67 標識率との密接な相関関係が認められた。

PCNA は cyclin ともよばれる分子量 36,000 の核蛋白で、細胞周期の主として、G1後期からS期にかけて細胞核内に蓄積し、DNA polymerase δ の補助因子として機能し、細胞の増殖とこれに付随する DNA 合成に密接に関係することが知られている (25)。近年、ホルマリン固定パラフィン切片でも使用可能な抗 PCNA 抗体が市販されるようになったことなどから、免疫組織化学的な細胞増殖マーカーとして急速に注目を浴びてきている。また、核分裂指数 (MI) に関して、その増加が認められる場合は、腫瘍の増殖能が高いと同時に組織学的悪性度が高いとされており、核分裂数の計測を行うことは日常の組織診断において重要である。

今回、Ki-67 同様 PCNA 標識率および核分裂数 MI) についても、BrdU 標識率との相関関係を検討した。PCNA 標識率/BrdU 標識率は 1.21 ($r = 0.73$)、MI では、MI/BrdU 標識率は 0.05 ($r = 0.72$) であり、その相関係数は Ki-67 標識率/BrdU 標識率の場合より低い値であった。ヒトにおける PCNA 標識率/BrdU 標識率では、肺癌で 1.71 ($r = 0.79$) (12)、MI 標識率/BrdU 標識率では、脳腫瘍で 0.098 ($r = 0.52$) (24) との報告がある。Ki-67 標識率/BrdU 標識率と比較してその相関係数は低いとされているが、これは本研究における結果と一致していた。PCNA に関しては、細胞周期によって抗原量が異なり、様々な染色態度を示す陽性細胞が認められる。また、固定法により認識する細胞周期が異なること、陰性・陽性細胞の区別が困難なこと、長期保存したエタノール固定材料では、偽陽性化や細胞質の陽性反応が発生することが多いなどの欠点があり (37)、PCNA 陽性細胞の定量的評価を行う際に問題となる。しかし、このような欠点を理解した上での腫瘍の悪性度を検討する場合、その簡便さにおいてはきわめ

て有用なマーカーであると考えられる。MIに関しては、固定までの時間や固定時間、切片の厚さ、観察者による metaphase の認識の違い、核崩壊や核濃縮像との鑑別が煩雑であるなどの問題がある。このため、今回行った BrdU, Ki-67 および PCNA 免疫染色のように、明確に標識細胞を色分けして区別される免疫組織化学的手法は、判定が容易であり、組織レベルでの詳細な分析には、MI の測定に比べきわめて有利である (48) と考えられる。

本研究ではイヌおよびネコの腫瘍組織において、BrdU, Ki-67, PCNA 標識率ならびに MI についてその局在を探索し、組織学的悪性度と標識率との関係、さらにそれぞれの標識率における相関関係を検討した。BrdU 標識率, Ki-67 標識率, PCNA 標識率ともに組織学的悪性度とよく相関し、特に Ki-67 標識率は BrdU 標識率と高い相関関係にあることが認められた。今回得られた Ki-67 標識率と BrdU 標識率の回帰直線である Y (Ki-67 標識率) = $1.3 X$ (BrdU 標識率) + 5.31 ($r = 0.96$) より、腫瘍の成長率は BrdU 標識率から求めることができ、また、逆に Ki-67 標識率からも求めることができることになる。つまり、いずれかの細胞増殖マーカーによる検索から他方の標識率も推定することが可能となり、イヌおよびネコの腫瘍成長解析に新たな手法が加わったことになる。

以上より、特に BrdU, Ki-67 および PCNA 標識法は腫瘍の成長率を迅速に表示でき、特に Ki-67 標識法は、BrdU 標識法との組み合わせによりイヌおよびネコの腫瘍における増殖能を的確かつ簡便に検出する方法として有用であると思われた。

BrdU, Ki-67 および PCNA 免疫染色の動物臨床への応用と展望については第 3 章(総合考察)で述べる。

☒ 表

Table 2-1 検索材料・BrdU 投与量・病理診断名

症例 No	動物種	性別	年齢	投与 BrdU 量 (mg/kg)	臓器	組織診断名	経過
1	イヌ	♀	8	16.6	乳腺	乳腺腺腫	
2	イヌ	♀	8	33.3	//	//	
3	イヌ	♀	6	15.0	//	乳腺腺癌	
4	イヌ	♀	10	15.0	//	//	4ヵ月後死亡
5	イヌ	♀	10	12.0	//	//	
6	イヌ	♀	12	16.7	//	//	
7	イヌ	♀	17	22.7	//	//	9ヵ月後死亡
8	イヌ	♀	A	3.3	//	//	
9	ネコ	♀	12	16.7	//	//	3ヵ月後死亡
10	ネコ	♀	16	55.0	//	//	半年後再発, 11ヵ月後死亡
11	ネコ	♀	A	15.0	//	//	死亡
12	イヌ	♀	9	13.2	前肢	扁平上皮癌	肺転移
13	イヌ	♀	12	33.3	皮膚	//	2ヵ月後死亡
14	イヌ	♂	A	15.0	//	//	
15	ネコ	♀	13	30.0	鼻鏡	//	
16	ネコ	♀	11	15.0	口腔	基底細胞癌	3ヵ月後死亡
17	イヌ	♀	17	22.7	眼瞼	マボム腺上皮腫	9ヵ月後死亡
18	イヌ	♂	11	6.3	陰部皮下	脂肪肉腫	1年前に摘出術 2ヵ月後再発, 4ヵ月後死亡
19	イヌ	♂	9	7.1	口腔	皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	転移, 死亡
20	イヌ	♂	14	15.0	陰部	//	転移, 1ヵ月内死亡
21	イヌ	♂	7	9.3	前肢端	悪性組織球症	
22	イヌ	♀	A	83.3	腹腔内	//	転移, 死亡
23	イヌ	♂	5	15.0	骨盤腔	骨肉腫	腹腔内播種, 死亡

A : adult

症例 7 と症例 17 は同一症例

Table 2-2 各マーカーの標識率と MI (mitotic index; 核分裂指数)

症例 No	動物種	組織診断名	標識率 (%)			MI	経過
			BrdU	Ki-67	PCNA		
1	イヌ	乳腺腺腫	7.1	14.3	34.4	0.49	
2	イヌ	//	6.8	9.0	20.6	0.14	
3	イヌ	乳腺腺癌	21.0	33.4	36.4	0.18	
4	イヌ	//	11.3	16.2	23.2	0.39	4ヵ月後死亡
5	イヌ	//	16.4	24.3	33.8	0.61	
6	イヌ	//	9.2	28.2	24.0	0.71	
7	イヌ	//	12.8	22.4	25.4	0.48	9ヵ月後死亡
8	イヌ	//	18.4	28.4	44.7	0.50	
9	ネコ	//	23.8	37.1	34.2	0.51	3ヵ月後死亡
10	ネコ	//	20.6	32.9	32.3	2.38	半年後再発, 11ヵ月後死亡
11	ネコ	//	30.5	41.8	64.4	1.78	死亡
12	イヌ	扁平上皮癌	25.4	35.7	48.7	1.42	肺転移
13	イヌ	//	27.0	38.7	45.9	1.30	2ヵ月後死亡
14	イヌ	//	18.8	27.6	67.1	0.98	
15	ネコ	//	43.4	62.4	66.5	2.11	
16	ネコ	基底細胞癌	22.2	37.4	39.1	0.99	3ヵ月後死亡
17	イヌ	マヒン腺上皮腫	17.0	28.5	49.4	0.42	9ヵ月後死亡
18	イヌ	脂肪肉腫	27.5	46.6	43.1	0.80	1年前に摘出術 2ヵ月後再発, 4ヵ月後死亡
19	イヌ	皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	13.9	21.4	34.3	0.38	転移, 死亡
20	イヌ	//	13.0	22.7	31.1	0.40	転移, 1ヵ月内死亡
21	イヌ	悪性組織球症	21.7	31.2	37.8	0.70	
22	イヌ	//	14.6	25.3	16.4	0.35	転移, 死亡
23	イヌ	骨肉腫	24.6	36.2	43.0	1.06	腹腔内播種, 死亡

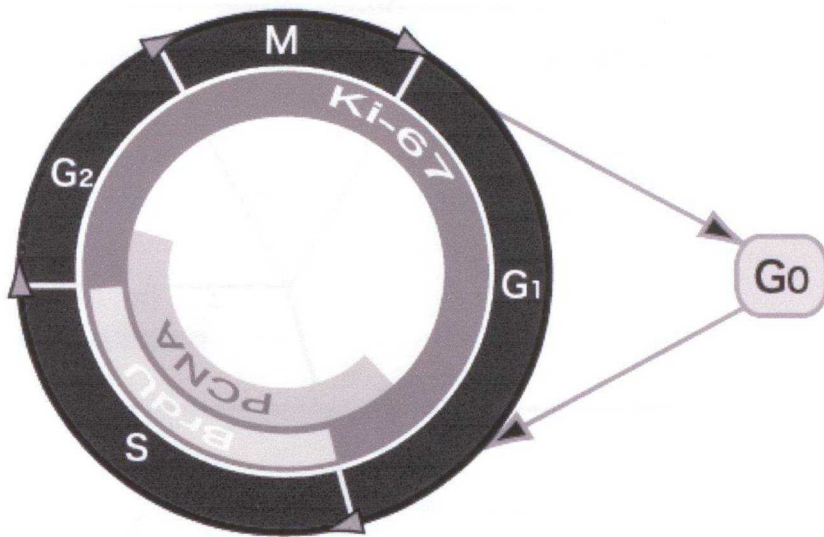
症例 7 と症例 17 は同一症例

Table 2-3 腫瘍別のBrdU, Ki-67, PCNA 標識率とMI(mitotic index; 核分裂指数)

診断名	症例数	標識率 % (平均値 ± 標準偏差値)			
		BrdU	Ki-67	PCNA	MI
乳腺腺腫	2	6.8-7.1(7.0±0.2)	9.0-14.3(11.7±3.7)	20.6-43.4(27.5±9.8)	0.14-0.49(0.32±0.25)
乳腺腺癌	9	9.3-30.5(18.2±6.7)	16.2-41.8(29.4±7.9)	23.2-64.4(35.4±12.8)	0.39-2.38(0.84±0.74)
扁平上皮癌	4	18.9-43.4(28.7±10.5)	27.6-62.4(41.1±15.0)	45.9-67.1(57.1±11.3)	0.98-2.11(1.45±0.48)
基底細胞癌	1	22.2	37.4	39.1	0.99
マイボーム腺上皮腫	1	17.0	28.5	49.4	0.42
脂肪肉腫	1	27.5	46.6	43.1	0.80
皮膚肥満細胞腫 (gradeⅢ)	2	13.0-13.9(13.5±0.6)	21.4-22.7(22.1±0.9)	31.1-34.3(32.7±2.3)	0.38-0.40(0.39±0.01)
悪性組織球症	2	14.5-21.7(18.2±5.0)	25.3-31.2(28.3±4.2)	16.4-37.8(27.1±15.1)	0.35-0.70(0.53±0.25)
骨肉腫	1	24.6	36.2	43.0	1.06
良性腫瘍	3	6.8-17.0(10.3±5.8)	9.0-28.5(17.3±10.1)	20.6-49.4(34.8±14.4)	0.14-0.42(0.35±0.19)
悪性腫瘍	20	9.2-43.4(20.8±7.9)	16.2-62.4(32.5±10.4)	16.4-67.1(39.6±14.0)	0.35-2.38(0.90±0.61)
計	23	6.8-43.4(19.4±8.4)	9.0-62.4(30.5±11.4)	20.6-67.1(39.0±13.9)	0.14-2.38(0.83±0.60)

Table 2-4 BrdU 標識率に対する Ki-67, PCNA 標識率
MI (mitotic index; 核分裂指数) の比率

診断名	症例数	BrdU/Ki-67	BrdU/PCNA	BrdU/MI
乳腺腺腫	2	0.60	0.25	21.88
乳腺腺癌	9	0.62	0.51	19.78
扁平上皮癌	4	0.70	0.50	19.78
基底細胞癌	1	0.59	0.57	22.42
マイボーム腺上皮腫	1	0.60	0.34	40.48
脂肪肉腫	1	0.59	0.64	34.38
肥満細胞腫 (gradeⅢ)	2	0.61	0.41	34.62
悪性組織球症	2	0.64	0.67	34.34
骨肉腫	1	0.68	0.57	23.21
良性腫瘍	3	0.60	0.30	29.43
悪性腫瘍	20	0.64	0.53	23.11
計	23	0.64	0.50	23.41



G1 : 分裂後期 S : DNA 合成期 G2 : 分裂前期
M : 分裂期 G0 : 休止期

■ BrdU の検出時期 ■ Ki-67 の検出時期
■ PCNA の検出時期

Figure 2-1 Cell Cycle と各マーカーが検出される時期

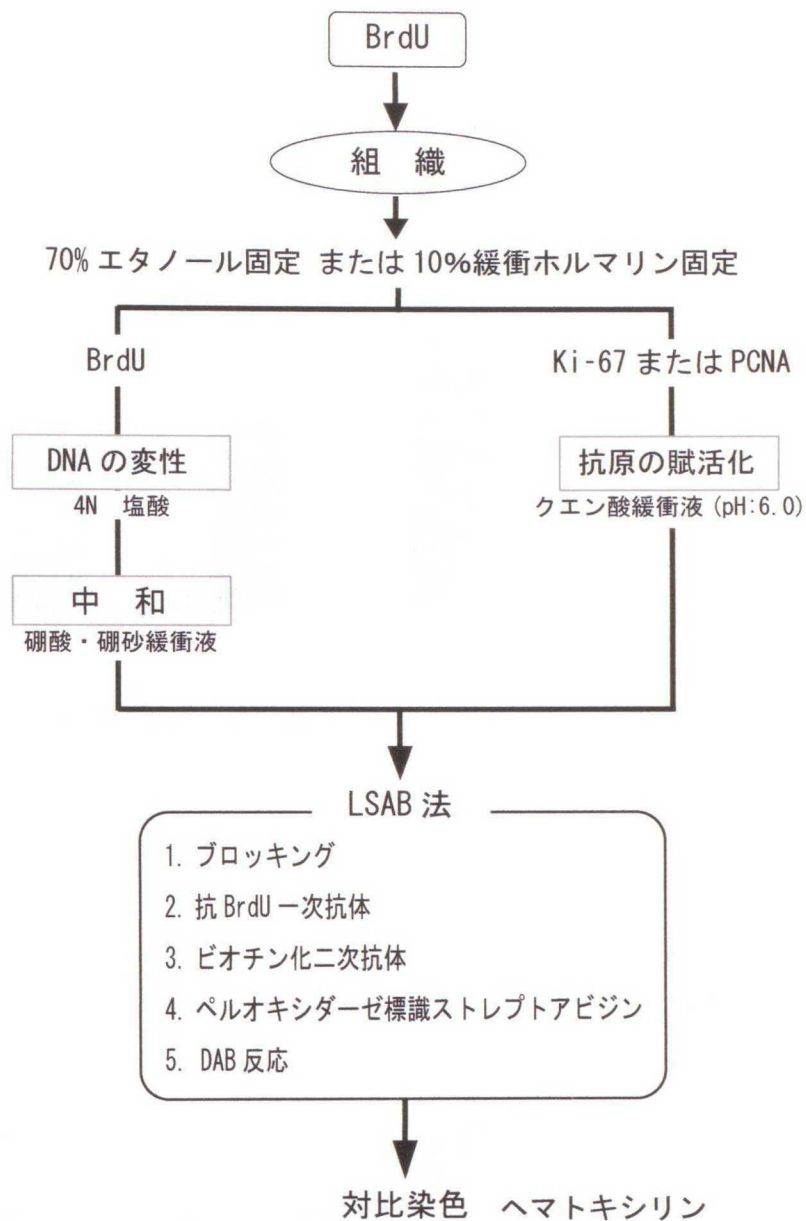


Figure 2-2 BrdU, Ki-67 および PCNA 免疫染色手順

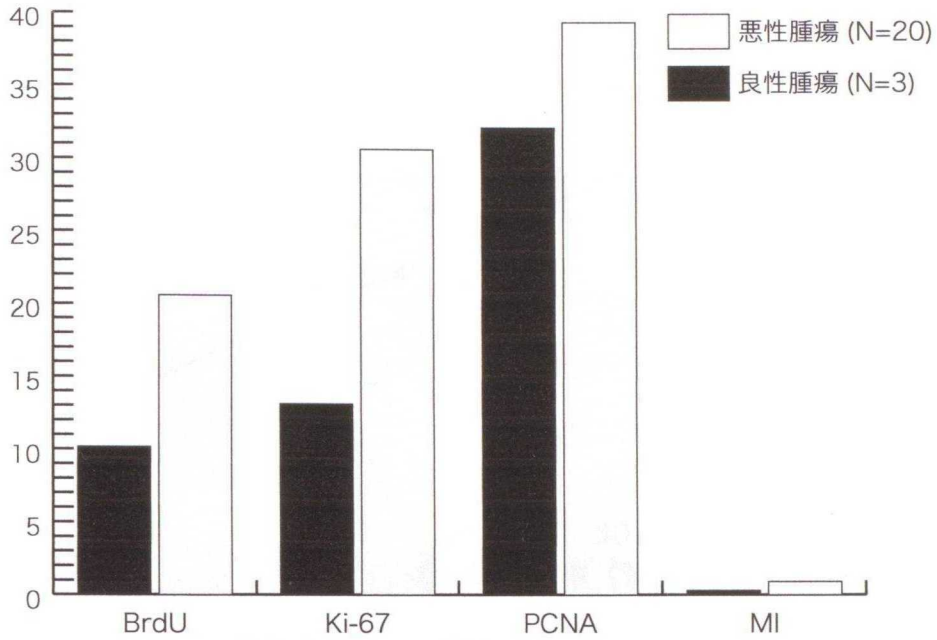


Figure 2-3 良性、悪性腫瘍における各マーカーの標識率と分裂指数 (MI)

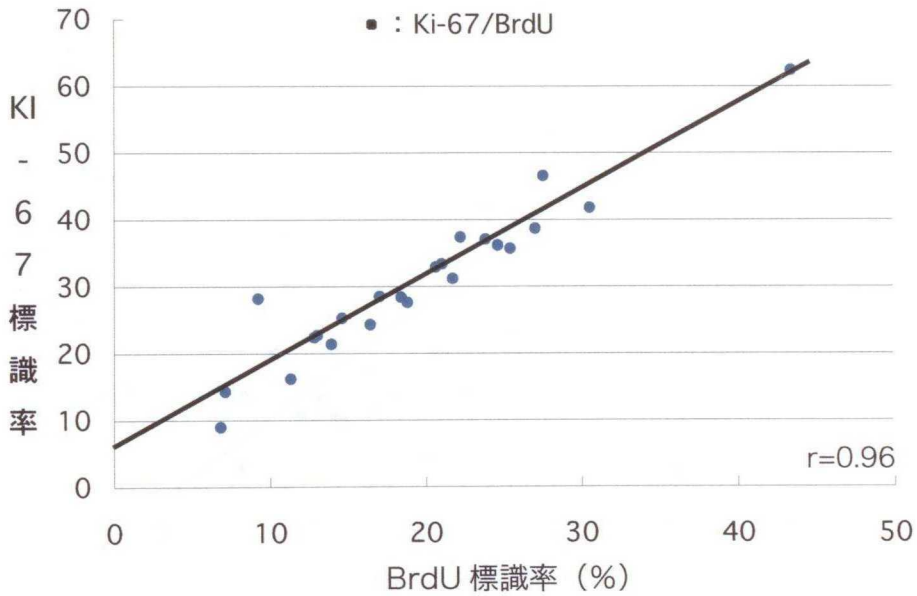


Figure 2-4 Ki-67 と BrdU 標識率の関係

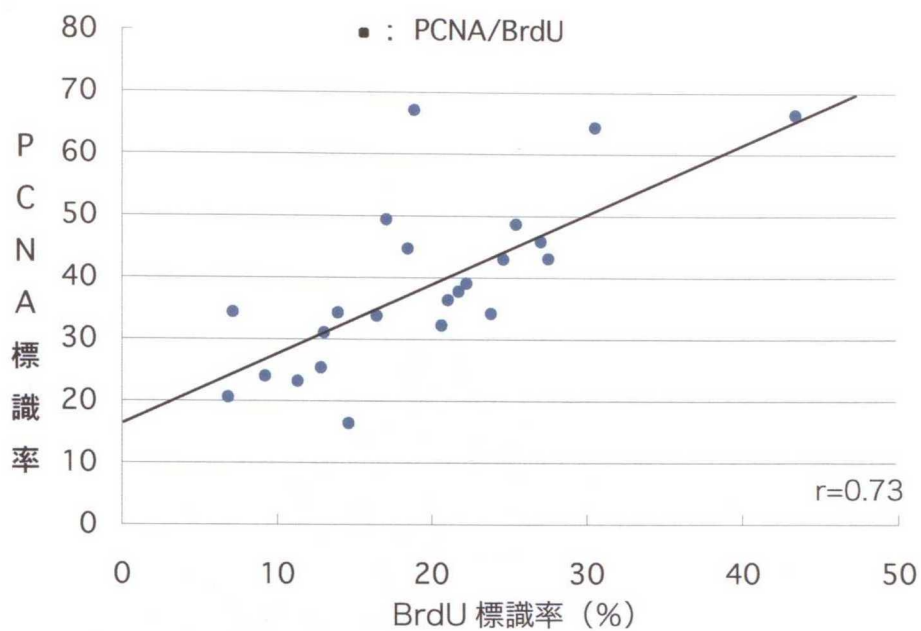


Figure 2-5 PCNA と BrdU 標識率との関係

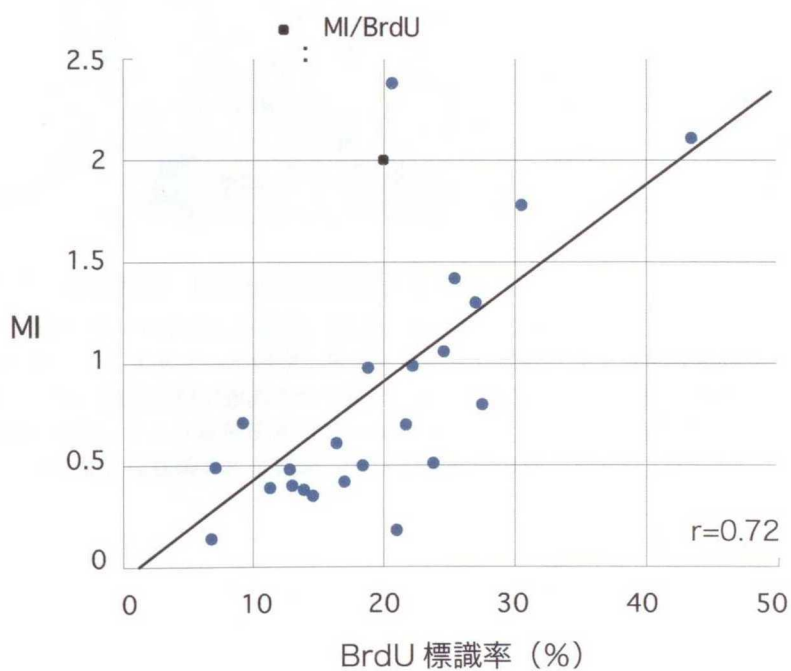


Figure 2-6 核分裂指数 (MI) と BrdU 標識率との関係

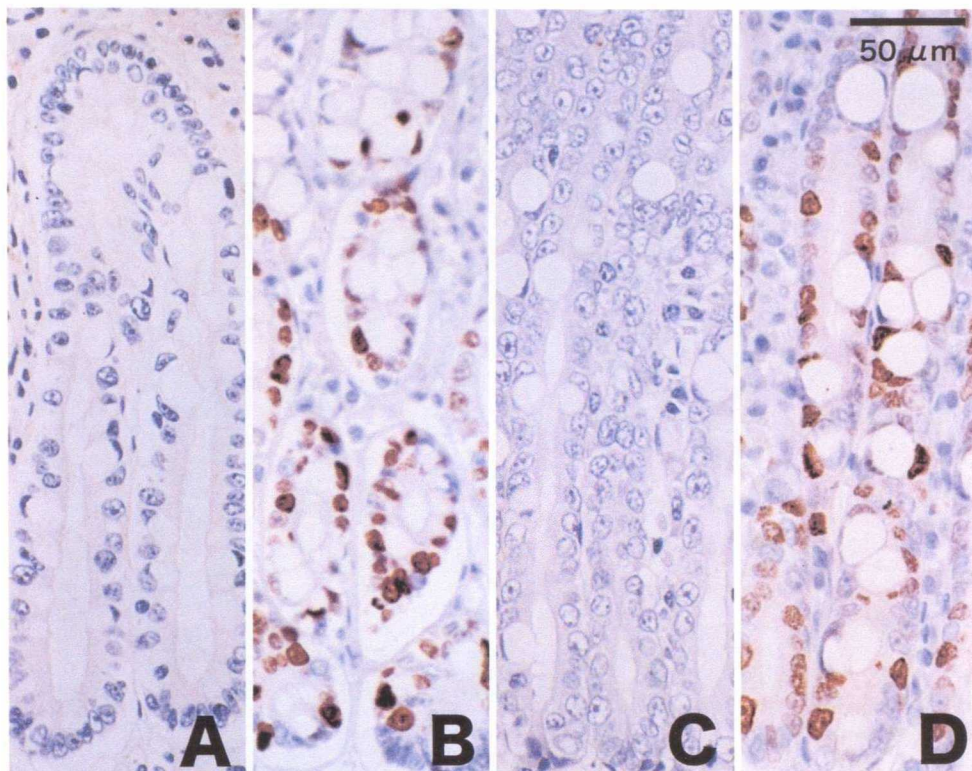


Figure 2-7 各固定法, 抗原賦活法における Ki-67 免疫染色性

A, C: ヘマトキシリン・エオジン染色. **B, D**: Ki-67 免疫染色.

A: ネコの小腸, 70%エタノール固定. **B**: Aと同様の材料, クエン酸緩衝液中でのマイクロウェーブ持続照射処理. Ki-67 陽性細胞が強調されて認められる. **C**: ネコの小腸, 10%緩衝ホルマリンにて固定.

D: Cと同様の材料. クエン酸緩衝液中でのマイクロウェーブ持続照射処理. Bに比べてやや染色性は落ちるが ki-67 陽性細胞は強調されて確認され, 組織構造の状態も良好.

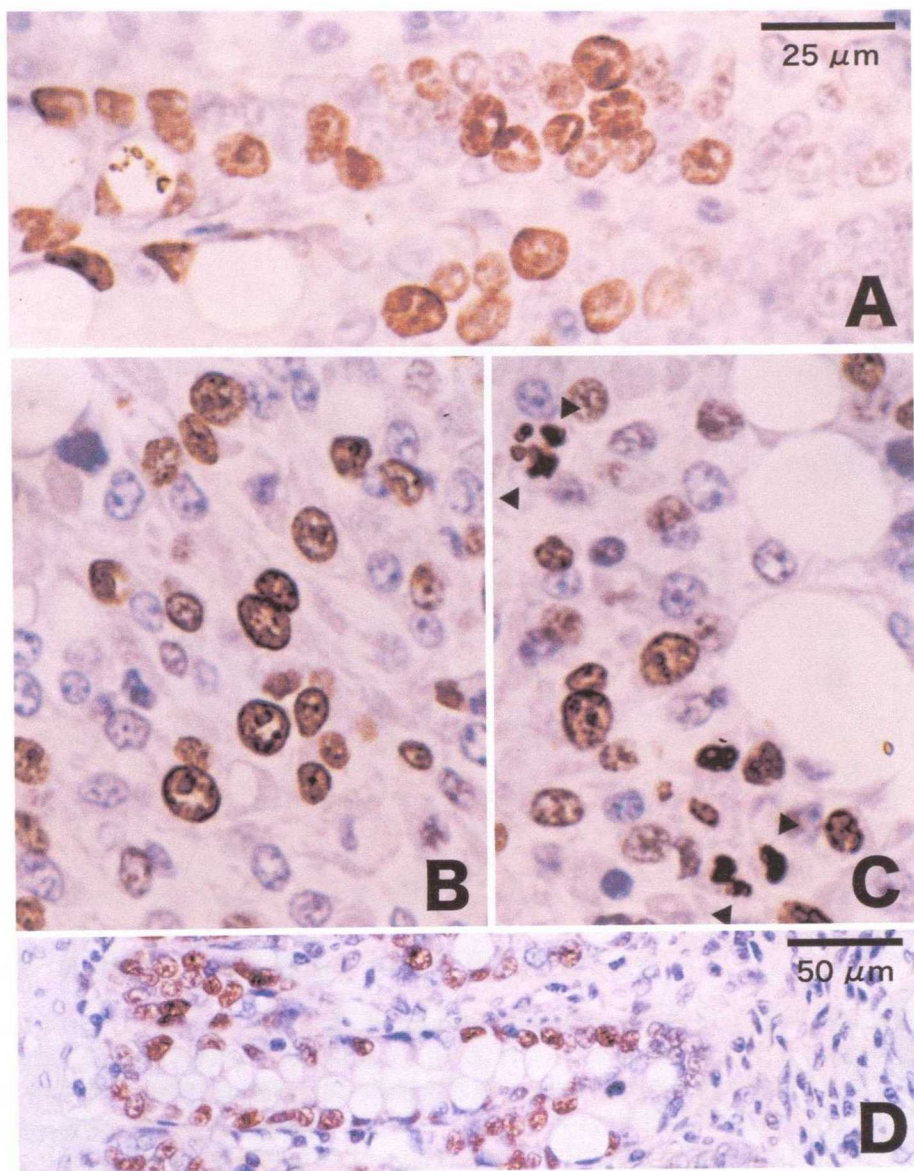


Figure 2-8 Ki-67 標識細胞と PCNA 免疫染色の染色性

A, B, C: Ki-67 免疫染色. Ki-67 陽性細胞は非陽性細胞と明確に区別できる. 陽性反応は核内でびまん性, あるいは数個の核小体様の顆粒状反応物 (矢頭) として認められる.

D: PCNA 免疫染色. Ki-67 免疫染色時の抗原賦活法と同様に, マイクロウェーブ処理による抗原賦活法で PCNA 陽性細胞は強調され認められる.

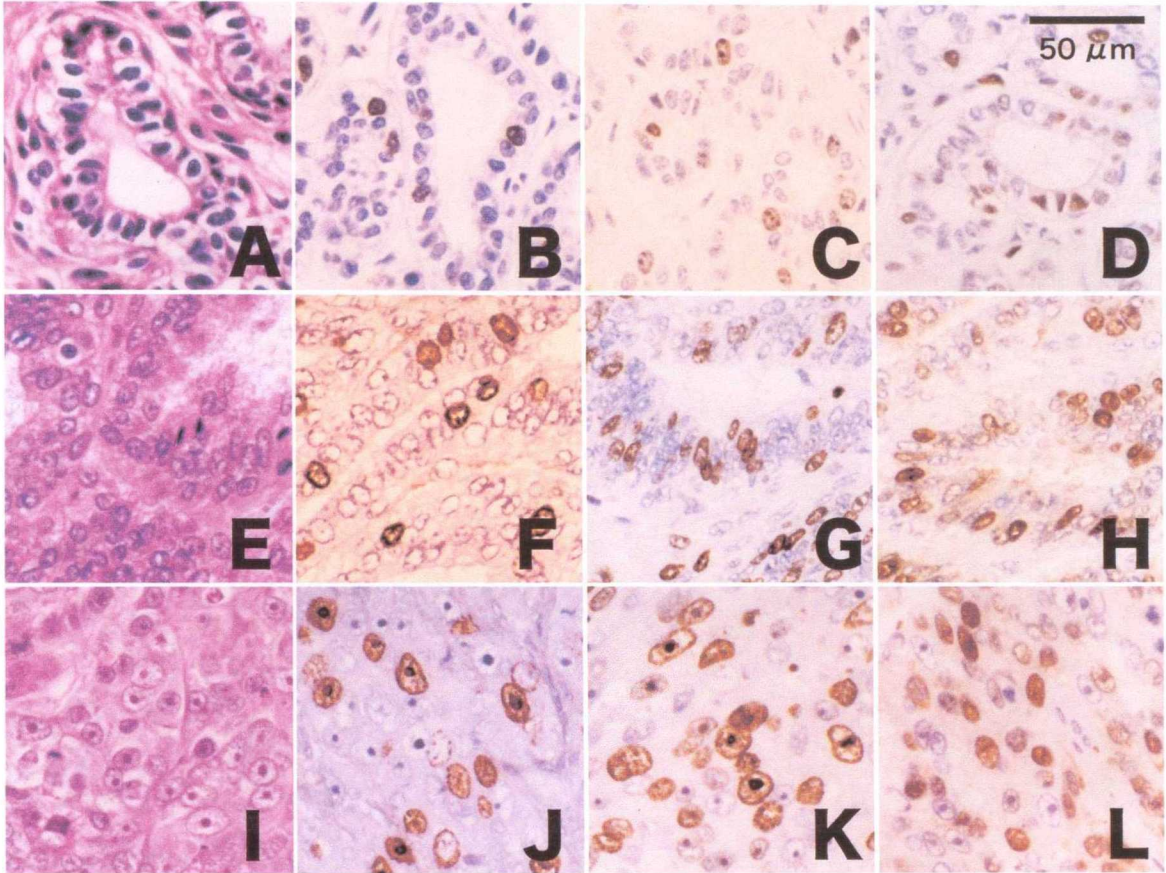


Figure 2-9 乳腺腫瘍におけるBrdU, Ki-67, PCNA免疫染色

A, E, I: ヘマトキシリンエオジン染色. **B, F, J:** BrdU免疫染色. **C, G, K:** Ki-67免疫染色. **D, H, L:** PCNA免疫染色. **A, B, C, D:** イヌの乳腺腫. **E, F, G, H:** イヌの乳癌. **I, J, K, L:** ネコの乳癌.

A: イヌの乳腺腺腫. 腫瘍細胞は周囲組織への浸潤は無く上皮の異型性は低く分裂像も乏しい, **B:** BrdU陽性細胞の検出頻度は低く乳腺上皮細胞にほぼ均一に点在. 平均 BrdU LI: 7.0%. **C:** Ki-67陽性細胞の局在はBrdUの場合と同様. 平均 Ki-67 LI: 11.7%. **D:** PCNA陽性細胞の局在はBrdUの場合と同様. 平均 PCNA LI: 27.5%. **E:** イヌの乳腺腺癌. 腫瘍細胞のリンパ管内浸潤が認められ, 異型性は高く核分裂増も豊富. **F:** BrdU陽性細胞は高異型性の乳腺上皮細胞に一致して高率に認められる. 平均 BrdU LI: 14.9%. **G:** Ki-67陽性細胞の局在はBrdUの場合とほぼ同様. 平均 Ki-67 LI: 25.5%. **H:** PCNA陽性細胞の局在はBrdUの場合とほぼ同様で, 陽性反応は核だけではなく細胞質内にも認められる. 平均 PCNA LI: 31.3%. **I:** ネコの乳腺腺癌. 極めて高悪性度の所見. **J:** BrdU陽性細胞は基底膜に近い細胞, 高異型性の乳腺上皮細胞に一致して極めて高率に検出. 平均 BrdU LI: 25.0%. **K:** Ki-67陽性細胞はBrdUの場合と同様でBrdU標識率の1.5倍. 平均 Ki-67 LI: 37.3%. **L:** PCNA陽性細胞の局在はBrdUの場合と同様. 平均 PCNA LI: 43.6%.

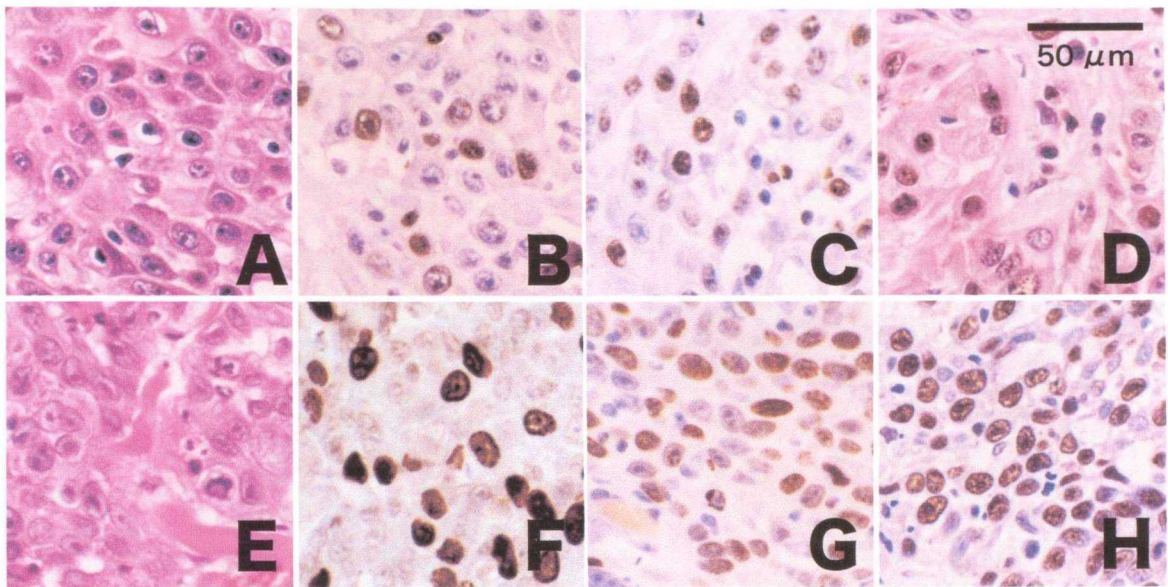


Figure 2-10 扁平上皮癌における BrdU, Ki-67, PCNA 免疫染色

A, E:ヘマトキシリンエオジン染色. **B, F:**BrdU 免疫染色. **C, G:**Ki-67 免疫染色. **D, H:**PCNA 免疫染色.
A, B, C, D: イヌの扁平上皮癌. **E, F, G, H:** ネコの扁平上皮癌. **A:** イヌの扁平上皮癌. 腫瘍細胞は周囲組織への浸潤が高く、異型性が高く分裂像も豊富. **B:** BrdU 陽性細胞は基底膜に近い腫瘍巢の辺縁部に高度検出. 平均 BrdU LI: 23.7%. **C:** Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様. 平均 Ki-67 LI: 34.0%. **D:** PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様. 平均 PCNA LI: 53.9%. **E:** ネコの扁平上皮癌. イヌより高悪性度を示し癌真珠の形成は認めない. **F:** BrdU 陽性細胞は腫瘍巢の辺縁部に極めて高頻度で検出. 平均 BrdU LI: 43.4%. **G:** Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様. 平均 Ki-67 LI: 62.4%. **H:** PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様で. 平均 PCNA LI: 66.5%.

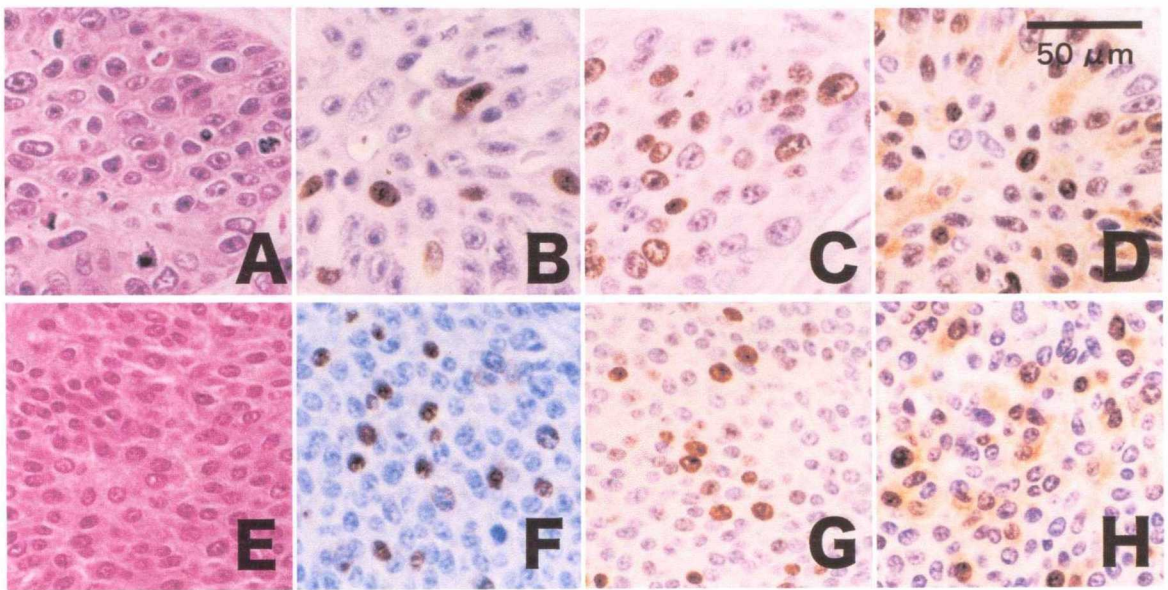


Figure 2-11 基底細胞癌，マイボーム腺上皮腫における BrdU，Ki-67，PCNA 免疫染色

A, E : ヘマトキシリンエオジン染色, **B, F** : BrdU 免疫染色, **C, G** : Ki-67 免疫染色, **D, H** : PCNA 免疫染色. **A, B, C, D** : イヌの基底細胞癌. **E, F, G, H** : イヌのマイボーム腺上皮腫. **A** : イヌの基底細胞癌, 腫瘍細胞は周囲組織への浸潤性強く, 細胞異型性が高く分裂像も豊富, **B** : BrdU 陽性細胞は腫瘍巣の辺縁部に高度検出, 平均 BrdU LI : 22.2%. **C** : Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様, 平均 Ki-67 LI : 37.4%. **D** : PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様, 平均 PCNA LI : 39.1%. **E** : イヌのマイボーム腺上皮腫, 周囲組織に浸潤性増殖, 腫瘍細胞は高悪性度を示し分裂像は極めて豊富, **F** : BrdU 陽性細胞は高悪性性の腫瘍細胞の部位に一致して高率に認められる, 平均 BrdU LI : 17.0%. **G** : Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様, 平均 Ki-67 LI : 28.5%. **H** : PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様で, 平均 PCNA LI : 49.4%.

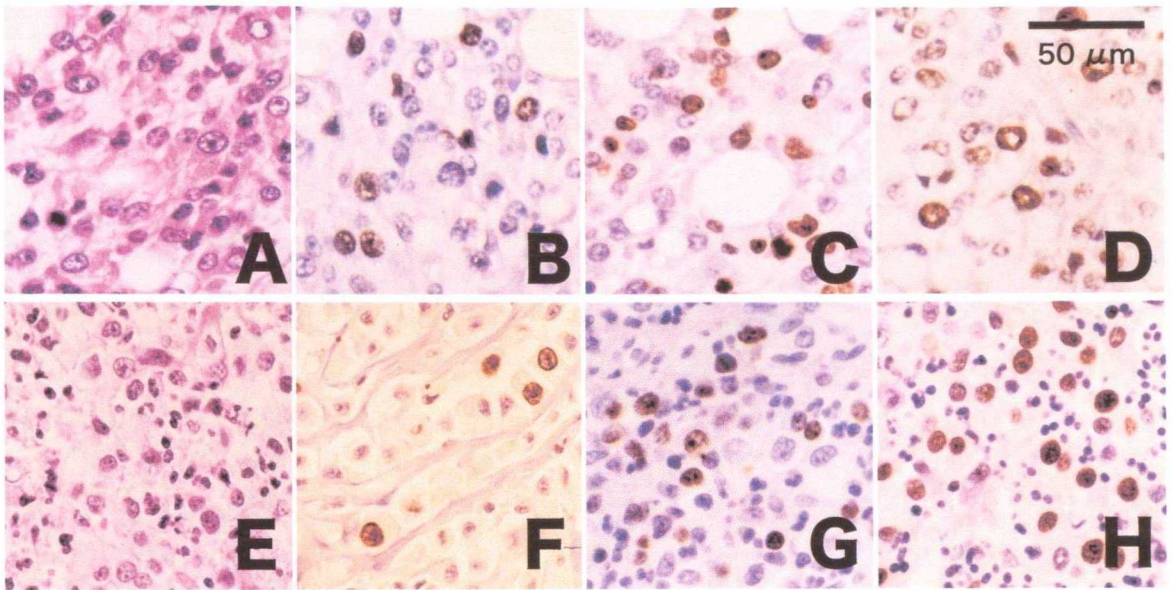


Figure 2-12 脂肪肉腫, 皮膚肥満細胞腫 (grade III) における BrdU, Ki-67, PCNA 免疫染色

A, E : ヘマトキシリンエオジン染色. **B, F** : BrdU 免疫染色. **C, G** : Ki-67 免疫染色. **D, H** : PCNA 免疫染色. **A, B, C, D** : イヌの脂肪肉腫. **E, F, G, H** : イヌの皮膚肥満細胞腫 (grade III). **A** : イヌの脂肪肉腫. 腫瘍細胞は周囲組織へびまん性浸潤を示す, 細胞異型性が高く分裂像も豊富. **B** : BrdU 陽性細胞は多くの視野で高率に検出. 平均 BrdU LI : 27.5%. **C** : Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様. 平均 Ki-67 LI : 46.6%. **D** : PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様. 平均 PCNA LI : 43.1%. **E** : イヌの皮膚肥満細胞腫 (grade III). 腫瘍細胞は異型性に富み 2~3 核の細胞も散見. 分裂像も豊富. **F** : BrdU 陽性細胞は多くの視野で高率に認められる. 平均 BrdU LI : 13.5%. **G** : Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様. 平均 Ki-67 LI : 22.1%. **H** : PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様で, 平均 PCNA LI : 32.7%.

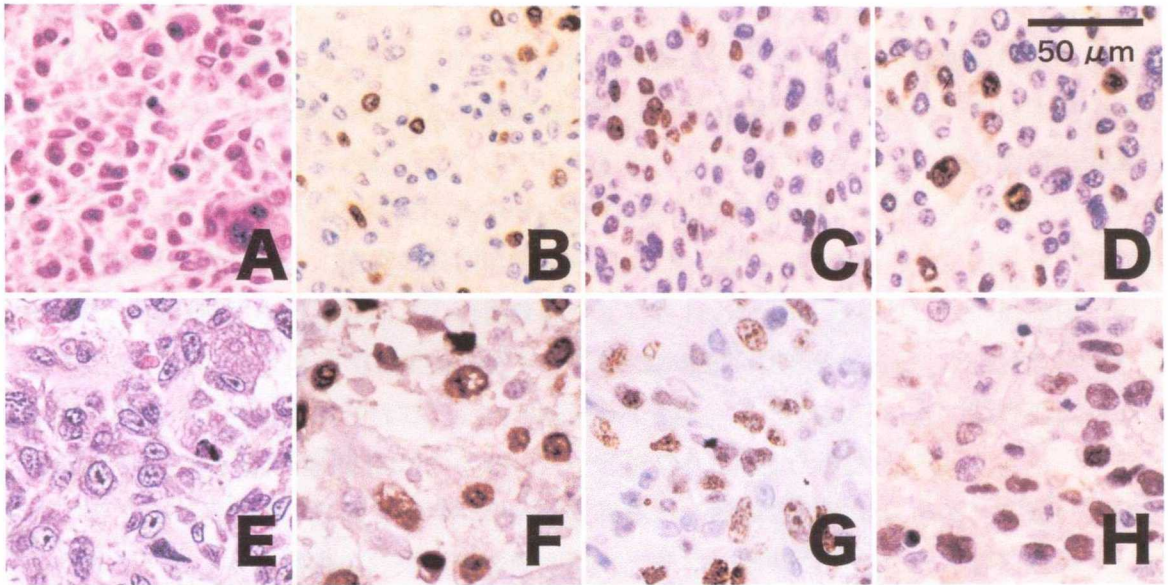


Figure 2-13 悪性組織球症，骨肉腫における BrdU，Ki-67，PCNA 免疫染色

A, E：ヘマトキシリンエオジン染色，**B, F**：BrdU 免疫染色，**C, G**：Ki-67 免疫染色，**D, H**：PCNA 免疫染色。**A, B, C, D**：イヌの悪性組織球症，**E, F, G, H**：イヌの骨肉腫。**A**：イヌの悪性組織球症，大型の核や多核を有する腫瘍細胞は，異型性が高く分裂像豊富，**B**：BrdU 陽性細胞は多くの視野にわたって高率に検出，平均 BrdU LI：18.2%，**C**：Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様，平均 Ki-67 LI：28.3%，**D**：PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合と同様，平均 PCNA LI：27.1%，**E**：イヌの骨肉腫，腫瘍細胞は大小不同で異型性に富み，分裂像も豊富，**F**：BrdU 陽性細胞は多くの視野で高率に認められる，平均 BrdU LI：24.6%，**G**：Ki-67 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様，平均 Ki-67 LI：36.2%，**H**：PCNA 陽性細胞の局在は BrdU の場合とほぼ同様で，平均 PCNA LI：43.0%。

第3章 総合考察

動物臨床において、腫瘍の予後診断をする際は病理組織学的診断を非常に重要視している。実際には、腫瘍症例を診察して、身体検査と臨床検査を行った後、生検材料あるいは手術により切除した腫瘍組織の病理組織学的検査を行うが、この結果をふまえて、その後の治療を含めた総合的な判断を迅速に行うことが症例の予後を大きく左右することになる。しかし、このような過程で、現在行われている病理組織診断が、動物臨床の現場において満足のいく予後判定の一助としての所見を提供できているか否か、疑問が残ることもある。

その第一の問題点として、これまでの病理組織検査では、腫瘍の性質を特徴付ける進行性異常増殖という観点からみた、腫瘍成長の速さを表現した所見については未だ十分ではないという事が挙げられる。これまでこれらのことについては、主に核分裂像の多寡によって論じられてきたが、検査の統一性の問題等から厳密なものとは言い難く不十分であったように思われる。細胞の異型度や腫瘍の浸潤・増殖の様相からみた組織学的悪性度の評価、遠隔転移の可能性などの所見はよく観察されるところであり、大いに臨床での予後判定の材料となり得る所見であるが、その腫瘍の成長の速度を評価した表現は少なく、臨床の場では十分に活用されていないのが現状である。これは、これまで腫瘍の成長速度を推測する客観的な判断要素が少なかったからに他ならないと思われる。

第二の問題点は、良性・悪性境界病変とみられる腫瘍の診断時にある。実際の臨床の場でもこのような腫瘍の病理組織診断所見は、非常に曖昧なものにならざるを得ず、逆に臨床を混乱させる検査所見の一つにもなっている。イヌの肥満細胞腫を例にとってみると、肥満細胞腫での組織学的悪性度分類に関しては、現在では通常 Patnaik の分類 (31) (grade I ~ III) が用いられているが、イヌの皮膚肥満細胞腫 60 例を 10 名の病理医が診断したところ、全員の病理診断医が一致したグレードを示したのは僅か 16 例であったとの報告がある (29)。また、病理診断医が下す Patnaik 分類でのグレードは Grade II (良性・悪性の中間位グレード) が圧倒的に多いことなど、組織の見方に病理診断医独自の主観が入り、動物臨床の場では混乱をみている。これに対し、肥満細胞腫の細胞増殖能と分化度を評価するために、Silver-staining Nucleolar Organiziner (AgNOR:好銀性核小体形成領域) を鍍銀染色により可視化してその局在と標識率を求め、これが症例の生存期間や再発の有無と関連しているという報告 (18) に端を発し、現在では、肥満細胞腫の予後を推測する因子として、Ki-67 や PCNA などの免疫染色が試みられている (33)。

このように腫瘍に対する病理組織学的診断時に、腫瘍の成長のスピードを推し量る客観的な要素と、良性・悪性の判断を客観的に捉えることができる因子を得ることは、今後動物臨床の立場からも強く要求されることであり、急務であると考えられる。そこで著者は腫瘍の成長速度を計測できる手法として、また、良性・悪性の判断を客観的に行うための因

子を得る手法として、免疫組織化学的アプローチ法、特に BrdU 免疫染色法に着目した。BrdU 免疫染色法などの細胞動態の測定は、癌研究や細胞生物学領域といった基礎的研究分野において重要な研究課題となっているばかりではなく、ヒトでは癌の放射線治療や化学療法を効果的に行うために、さらには予後判定といった臨床腫瘍学の分野においてもその必要性が増している(34, 35, 36)。これらの臨床応用は動物臨床の場では皆無に等しく、専ら研究目的の応用に限られている。しかし今後は、動物臨床腫瘍学においても、腫瘍の予後診断を決定づける因子の一つを探る非常に重要な分野となるであろう。

BrdU 免疫染色法は、BrdU が thymidine 誘導体として DNA 合成期の細胞核 (DNA) に取り込まれるため、S 期の細胞検出を簡便かつ迅速に行うことができる方法である (14) が、in vivo での実施の際には事前に BrdU を生体内に投与するという煩雑な面がある。しかし、BrdU が thymidine 類似物質として DNA 合成期にのみ細胞に取り入れられることで、鋭敏に増殖期の細胞を標識できる面では、他の方法より優れている (23, 27)。著者は、これまで BrdU 免疫染色法が動物医療の分野で適用されたことが少ないことから、イヌおよびネコにおける腫瘍にこれを適用することは、今後、Ki-67 や PCNA などの増殖細胞核抗原に対する免疫組織化学を行う上での基礎となると考える。このため、BrdU 免疫染色法をイヌおよびネコの腫瘍に適用するために、その手技的な検討を行って、ヒトでの場合と同じように実施することが可能であることが分かった。BrdU 投与量は 3mg/kg 以上という極少量の投与で検索が可能であったこと、固定法は 1 週間以内の 70%エタノール固定法や、10%緩衝ホルマリン固定法でも熱固定するか、室温固定であれば簡単なプロテアーゼ処理で染色性良好であること、DNA 変性処理は 4 規定塩酸にて 37℃、30 分の処理で良いことなど、臨床とその周囲の場で十分応用可能な手技である。

BrdU は DNA 合成期細胞の DNA そのものに取り込まれ、細胞の死滅まで体内の留まることから、いくつかの毒性を発揮する可能性があると言われている (14)。このためヒトでは十分な安全性、あるいは安全性のための対処法が確立されるまで投与は控えられている。ある薬剤において、副作用を考慮した投与の是非は、その個体に及ぼす利益と害の大きさを勘案して決定すべきである。今回イヌおよびネコに投与した BrdU 用量の体重当たりの換算を行うと、ヒトでの用量の約 30~50 分の 1 であり非常に少用量であること、実際に使用した動物では、副作用や催奇形性などの毒性を現した症例は全くなかったこと、イヌ・ネコのライフサイクルは 14~15 年であり、暴露される期間がヒトより短いことなどから、問題発生の可能性はヒトより非常に低いと考えられる。しかし、今後は動物臨床においても安全性が確立されるまで投与は控えられるべきであろう。多田ら (48)、佐々木ら (34) は BrdU 免疫染色法を、摘出した腫瘍組織、つまり in vitro において適用している。BrdU 溶液中で短時間組織培養を行う方法や、圧力をかけた容器にて組織と BrdU 溶液を接触させる方法である。これらの方法は、腫瘍摘出前の BrdU 投与処置や BrdU の催奇形性、変異原性、発癌性などの未知の問題から解放されることになる。また、BrdU

免疫染色に限らず、Ki-67 や PCNA 免疫染色法も、Fine -needle aspiration(吸引生検) 材料など、臨床の現場で簡単に採取することができる材料にも応用できる可能性がある。様々な組織材料に対して免疫組織化学を行おうとする試みは、現在では動物臨床の場でも十分応用が可能であると考えられ、今後の発展が期待される場所であり、今後の課題としたい。

BrdU 免疫染色法をイヌおよびネコの腫瘍症例に適用した場合、その標識率が動物の予後を反映した結果となるか否かは、臨床での最大の関心事である。今回、BrdU 免疫染色法を適用した症例について、追跡調査により生存曲線を導いた。BrdU 標識率の高い悪性腫瘍は、標識率の低い良性腫瘍に比べて明らかに生存率が低い結果であった。これは後述するように BrdU 標識率と Ki-67 および PCNA 標識率とが高い相関関係を示すことから、BrdU のみならず Ki-67 や PCNA などの増殖細胞関連抗原についても同じ結果が推察される。今後、様々な腫瘍のタイプごとに増殖細胞関連抗原の標識のデータが蓄積されることによって、腫瘍の予後を診断する上での新たな客観的根拠が得られるものと思われる。本研究はその一端を担ったものと思われる。

BrdU 免疫染色法における標識細胞の局在と標識率を、Ki-67 や PCNA などの新しい免疫染色法のそれと比較することは、それぞれの関係を明らかにするためにも必要であり、これらの免疫染色法の信頼性向上のためにも重要である。そこで今回、それぞれの増殖細胞抗原の標識率相互の関係式から、S 期の細胞の出現率を導き出すことが可能になると考え、BrdU、Ki-67、PCNA それぞれの免疫染色における標識細胞の局在と標識率、さらに核分裂指数との関係を検討した。BrdU 標識率、Ki-67 標識率、PCNA 標識率ならびに核分裂数ともに組織学的悪性度とよく相関し、特に Ki-67 標識率は BrdU 標識率と高い相関関係にあることが認められた。これにより BrdU 標識率と Ki-67 標識率の回帰直線式は $Y(\text{Ki-67 標識率}) = 1.3 \times (\text{BrdU 標識率}) + 5.31$ ($r = 0.96$) となり、Ki-67 標識率から BrdU 標識率、つまり S 期の細胞の出現率が容易に求められるようになった。また、これら各増殖細胞抗原の標識率相互の関係式が導き出されたことによって、それぞれの免疫組織化学的手法の信頼性向上にもつながったものと考えられる。

以上のように、これまで動物臨床における病理組織学的検査では言及し得なかった腫瘍の成長の速さについて、または、良性・悪性境界病変を診断する際の客観的判断因子について研究する際、免疫組織化学的手法は非常に有用である。特に BrdU 免疫染色法の確立は、Ki-67 や PCNA などの増殖細胞核抗原にて腫瘍細胞の増殖能を検索する際の基礎となり、欠くことのできない手法であった。腫瘍の予後診断は、決してこれらの標識率のみで判断できるものではないが、今後は腫瘍の組織タイプごとに各種増殖細胞抗原の平均標識率を見出す研究等が進められれば、良性・悪性境界病変の診断時に、あるいは腫瘍の成長速度を推測する際に重要な情報をもたらすと思われる。

アイソトープ棟でしか取り扱うことができなかった ^3H -thymidine による細胞動態解

析法が，thymidine 誘導体であり DNA 合成期に直接取り込まれる BrdU のモノクローナル抗体を利用した免疫染色へと簡易化され，さらに Ki-67 や PCNA 免疫染色法のように特殊な処置を必要としない免疫染色法へと発展したと言える．そしてこれらの各手法は腫瘍の予後診断を行う上で有意義であり，今後もさらに応用できるものと確信している．

第4章 結 論

これまで、ヒトと実験動物の研究以外では報告が少なかった BrdU 免疫染色法をイヌおよびネコに適用し、BrdU 投与から免疫染色までの手技的検討を試みた。次に、これらの手法を元に、臨床におけるイヌおよびネコの腫瘍症例 36 例に適用し、腫瘍組織における BrdU 免疫染色陽性細胞の局在と標識率を検索し解析することにより、以下の 1～4 の知見を得た。

また、上記 36 例中の中から悪性腫瘍を中心とした 23 例について、BrdU に替わる増殖細胞関連抗原である、Ki-67 および PCNA のモノクローナル抗体を使った免疫染色を行って、同一材料を用いた BrdU 免疫染色における陽性細胞の局在と標識率とを比較し、さらに各増殖マーカー間の標識率の相関についても検討した。これにより腫瘍の成長解析法として以下の 5～7 の知見を得た。

1, BrdU の投与方法

BrdU の静脈内投与量は 3.0mg/kg 以上の単回投与で、投与より 1 時間後に動物より採材することで、組織における BrdU 標識細胞は他の細胞と明確に区別ができ、良好な染色性が得られた。

2, 固定法の検討

組織の固定法については、70%エタノール固定、1 週間以内の固定で良好な染色性が得られた。10%緩衝ホルマリン固定法では、材料採取後速やかにホルマリン液中で加熱処理して熱固定を行うと、その免疫染色性は極めて良好で、DNA 変性後のプロテアーゼ処理の省略が可能となった。さらに、ホルマリン液中に長時間（6 時間以上）浸漬した材料でもプロテアーゼ処理（0.05% Protease, 37℃ / 1 分以内）を施すことで陽性細胞の検索が可能であった。

3, BrdU 免疫染色による S 期細胞の検出と標識率

腫瘍の種類により BrdU 陽性細胞の出現部位が異なっていた。上皮系組織由来の良性腫瘍では、陽性細胞は基底層に相当する未分化な細胞に主に認められるのが特徴であった。一方、非上皮系組織に由来する悪性の腫瘍では、陽性細胞は異型性の高い部分に一致して高率に認められた。同一腫瘍組織内での陽性細胞の偏在は、その部位での浸潤・増殖力の強さを表現している可能性がある。

BrdU 標識率において、良性の腫瘍は低い標識率を示し、悪性の腫瘍は高い標識率を示す傾向があり、悪性腫瘍では良性腫瘍の約 4 倍の標識率を示した。S 期細胞の検出頻度で示される腫瘍細胞の増殖能は、その組織学的ならびに生物学的悪性度とほぼ相関して高まることが示された。

BrdU 標識率が高値で、組織学的にも悪性腫瘍と診断された症例の 59%は、摘出後

14 ヶ月までに腫瘍の再発や転移により死亡していた。これに対して、標識率が低値で組織学的に良性腫瘍と診断された症例の死亡率は 33%であったことから、BrdU 標識率は動物の予後経過とも相関すると考えられ、予後の判定に有用な指標となり得ることが示唆された。

4, イヌおよびネコの腫瘍においてもヒトと同様に、BrdU 免疫染色法を適用することによって、増殖期の指標となる S 期細胞の局在と標識率を検索することが可能で、同法は腫瘍の生物学的特徴の解析に有用であると思われた。

5, Ki-67 および PCNA 免疫染色法の検討

Ki-67 免疫染色では、70%エタノール固定によるパラフィン切片で良好な免疫染色性が得られたが、10%緩衝ホルマリン固定では、リン酸緩衝液中で加熱固定することで十分な染色結果が得られた。

抗原賦活処理としてパラフィン切片をクエン酸緩衝液中でマイクロウェーブ加熱処理することで良好な免疫染色性が得られた。

PCNA 免疫染色では組織固定法として 10%緩衝ホルマリンまたは 70%エタノール固定のパラフィン切片共に良好な免疫染色性が得られたが、70%エタノールに長時間浸漬した材料では陽性・陰性の識別が不明瞭な反応が認められた。抗原賦活処理法として Ki-67 免疫染色法の場合と同様に行って良好な結果を得た。

6, Ki-67 および PCNA, 核分裂数によるイヌおよびネコの腫瘍の成長解析

—BrdU 標識率との比較—

同一腫瘍組織における Ki-67 陽性細胞, PCNA 陽性細胞の分布は, BrdU 陽性細胞の分布とほぼ一致した。Ki-67 および PCNA 標識率は, BrdU 標識率と同様に, 良性腫瘍では低く, 悪性腫瘍では高い傾向があった。標識率は $\text{BrdU} < \text{Ki-67} < \text{PCNA}$ の順に高い値を示した。Ki-67 標識率と BrdU 標識率の間には極めて強い相関関係が認められ ($\text{Ki-67 標識率} = 1.3 \times (\text{BrdU 標識率}) + 5.31$)、PCNA 標識率あるいは核分裂指数においても BrdU 標識率との間に相関が認められた。

7, 抗 Ki-67 (MIB-1) モノクローナル抗体を用いた免疫染色では, 増殖細胞を組織切片上で容易に検出でき, その標識率は組織学的悪性度および BrdU 標識率と高い相関を示した。これにより, Ki-67 免疫染色法がイヌおよびネコにおける腫瘍の増殖能を解析する, より信頼性の高い方法としてその有用性が確認された。

【論文要旨】

イヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能に関する免疫組織化学的解析

石川 勝行

腫瘍をもつ動物の予後には、様々な因子が複雑に関係しているが、予後を予測することは腫瘍罹患動物の診療の中で非常に重要な事項である。病理組織学的診断は、腫瘍の性状を形態学的に観察した結果であり、臨床における予後判定の重要な要素となっている。しかし、形態学的所見が決定的な判断の根拠となりにくい腫瘍があり、さらに客観的な根拠となり得る指標が求められるようになってきた。腫瘍の特質の一つは、細胞の進行性異常増殖で、その発育の早さや増殖の特性を表す組織内および細胞内物質を、免疫学的染色により解析する組織化学的アプローチ法（細胞動態解析法）は、臨床における腫瘍の予後判定の客観化に大きく貢献すると考えられる。

thymidine 誘導体である 5-bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体が開発されたことによって、BrdU 免疫染色法は、これまでアイソトープを必要としてきた細胞動態解析法に代わり、DNA 合成期（S 期）の細胞を正確に検索できる方法として急速に普及した。この方法は、ヒトの腫瘍症例にも応用され、多くの情報が蓄積されて体系的に確立された方法となっているが、イヌおよびネコの腫瘍症例に適用した報告は少ない。

BrdU 免疫染色法は非常に鋭敏で正確な S 期細胞の検出方法であるが、予め生体に BrdU を投与する必要があるが、催奇形性や変異原性の問題を解決できていない。細胞内在性抗原である Ki-67 および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対するモノクローナル抗体による免疫染色法は、BrdU 法におけるような問題点は無く、安全で簡便な細胞動態解析法として広く応用されている。ただし、イヌおよびネコの腫瘍について、BrdU に代表される外来性の抗原を利用した Gold Standard な免疫染色法の結果と、Ki-67 や PCNA などの内在性抗原の免疫染色結果とを比較してその相関性を論じた研究は少ない。小動物の腫瘍の Ki-67 や PCNA 免疫染色法の信頼性を確立し、さらに詳細な細胞増殖相の解析を行うためにはこれらを比較検討する必要がある。

著者は、イヌおよびネコに Labeled Streptavidin-Biotinylated Peroxydase (LSAB) 法による BrdU 免疫染色法を適用し、増殖細胞標識法の手技など基礎的検討を行った。これを基に、イヌおよびネコに自然発生した腫瘍症例（イヌ 30 例、ネコ 6 例、13 種類の腫瘍）に BrdU 免疫染色法を適用して、その標識細胞の局在と標識率を病理組織学的所見と対比した。これによりイヌおよびネコにおいても BrdU 免疫染色法が十分応用が可能で、ヒトで応用されている場合と同様にイヌおよびネコの腫瘍の成長解析法としても有用であることを明らかにした。その後、全ての症例で追跡調査を行って、BrdU 標識率および病理組織学的悪性度と実際の症例の予後との関連性を比較して、BrdU 免疫染色法がイヌおよびネコの腫瘍における予後判定に有用であることを証明した。さらに Ki-67 および PCNA のモノクローナル抗体を用いた免疫染色を、BrdU 免疫染色を実施した腫瘍（イヌ 18 例、ネコ 5 例、9 種類の腫瘍）に適用し、組織固定法や抗原賦活法の最適化を検討した。BrdU、Ki-67 および PCNA の各免疫染色による標識細胞の局在と標識率、ならびに核分裂指数を比較検討することによって、Ki-67、PCNA および核分裂指数と S 期の細胞（BrdU

標識細胞)との相関性を明らかにすることができた。

イヌおよびネコにおける抗 Bromodeoxyuridine(BrdU) モノクローナル抗体標識法の基礎的研究と腫瘍症例における細胞増殖能の解析

イヌおよびネコにおける BrdU 免疫染色法の基礎的研究として、その投与方法と投与量、組織固定法および DNA 変性処理の検討を行った。BrdU 溶液をイヌおよびネコの静脈内に 3.0mg/kg ~ 83.3mg/kg の範囲で投与したが、特別な副作用も発現せず良好な染色結果が得られた。ヒトでは BrdU 高用量での長時間投与あるいは反復投与 (500 ~ 1000mg/day, 5 ~ 6 週間投与) を行った場合の副作用として、骨髄抑制、白血球減少症、被毛粗剛、脱毛などが報告されているが、著者の選択した単回投与による短時間標識法では、いずれの症例においてもこのような副作用は全く認められなかった。

BrdU 免疫染色法のための固定法と固定時間に関しては、1 週間以内の 70% エタノール固定で良好な免疫染色結果を得た。10% 緩衝ホルマリン固定においても、液内で組織を加熱固定することにより、BrdU の抗原性を保存することが可能であり、加熱固定が重要な要素となることが示唆された。6 時間以上のホルマリン固定を行った材料では、0.05% protease 37°C 1 分間の処理が抗原賦活に最も効果的であった。また、DNA 変性処理としては、4 規定塩酸による 37°C、30 分間処理が、操作も簡便で得られる結果も安定していた。

イヌおよびネコの腫瘍例への BrdU 免疫染色法の適用においても、ヒトの腫瘍と同様に組織学的所見と BrdU 標識率が概ね一致した。組織学的に悪性所見を示した腫瘍例は一般に BrdU 標識率が高く、その平均値は良性所見を示す腫瘍例の約 3.5 倍で、悪性腫瘍における成長速度の速さが BrdU 標識率により客観的に証明された。しかし、個々の腫瘍ごとにみると標識率にはバラツキがあり、これは同一組織内で、局所的な細胞異型度あるいは分化度の違いを反映していると考えられた。BrdU 標識率のばらつきが小さな腫瘍は、良性腫瘍かあるいは組織の構成および分化度が比較的均一な非上皮系腫瘍であり、BrdU 標識率のばらつきが大きな腫瘍は、組織の構成および分化傾向が多様な上皮系腫瘍とすることができる。局所的な標識率の高さはその部位での浸潤性や遠隔転移と関連性がないか、今後さらに検討する必要がある。

BrdU 免疫染色法の臨床への応用に際して問題となるのは、BrdU によって求められた標識率が腫瘍の増殖能を忠実に表現しているかということと、予後の推測あるいは治療の選択に役立つ指標となり得るかどうかである。病理診断時より 14 ヶ月後までの追跡調査では、悪性腫瘍と診断された 21 症例中 13 例 (61.9%) が腫瘍の転移・再発によって斃死し、いずれも高い標識率を示していた。これに対して、病理診断で良性腫瘍とされた症例は BrdU 標識率も低く、15 症例中 4 例 (26.7%) が腫瘍以外の原因で斃死したのみであった。このことから小動物の腫瘍においても、BrdU 標識率は予後判定の重要な要素となる

と考えられるが、今後さらに症例を重ね追跡期間を延長して、より多くの症例について、個々の腫瘍型における標識率と生物学的態度、治療反応性、組織学的異型度を比較検討し、総合的な予後との関連性を検討する必要がある。

抗 Ki-67 および抗 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) モノクローナル抗体標識法によるイヌおよびネコの腫瘍の細胞増殖能の解析

——BrdU 免疫染色法と比較して——

各種の増殖細胞関連抗原を検出する免疫染色法では、各々の至適染色条件を設定することが、染色法の信頼性を高める上で非常に重要である。Ki-67 および PCNA 免疫染色法における手技を再検討した上で、BrdU 免疫染色法の検索結果と比較検討した。

イヌおよびネコの腫瘍における抗 Ki-67 モノクローナル抗体ならびに抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた増殖期細胞の検索では、抗原賦活化処理が不可欠であった。いくつかの抗原賦活法の中ではマイクロウェーブ法が染色性良好であり、抗原賦活処理をリン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液中で行えば良好な結果をもたらした。Ki-67 および PCNA 免疫染色における組織の固定法に関しては、70%エタノール固定が最も良好な染色結果を示したが、10%緩衝ホルマリンでも加熱固定した材料であれば染色性は良好であり、日常の材料についても適用可能であると考えられた。

Ki-67 抗体が反応する抗原の性状は未だ不明であるが、BrdU 法の場合のような煩雑な操作が不要であることから、細胞増殖解析の良いマーカーとして様々な腫瘍で検討されている。ヒトの腫瘍における Ki-67 の標識率と BrdU による標識率は一定の比率で相関するとの報告がある。本研究における BrdU 標識率と Ki-67 標識率との関係では、相関係数 $r=0.96$ で極めて強い相関が認められた。また、BrdU 標識率と Ki-67 標識率の回帰直線は、 Y (Ki-67 標識率) $=1.3X$ (BrdU 標識率) $+5.31$ となった。つまり、Ki-67 免疫染色法を用いることで、S 期の細胞数を推測することが可能となり、Ki-67 免疫染色法はイヌおよびネコの腫瘍例の細胞動態解析にも非常に有用な手法であった。PCNA は DNA ポリメラーゼ δ のアクセサリ蛋白で、増殖能の高い組織で高濃度に検出されるとされている。BrdU 標識率と PCNA 標識率における相関係数は $r=0.73$ で相関が認められた。また、BrdU 標識率と PCNA 標識率の回帰直線は、 Y (PCNA 標識率) $=1.2X$ (BrdU 標識率) $+15.42$ となった。BrdU 標識率と核分裂指数 (MI) との間でも、相関係数 $r=0.70$ であり相関が認められた。

以上のように、BrdU 免疫染色法をイヌおよびネコの腫瘍にて適用して、組織学的悪性度ならびに症例の生存率と良く相関すること、Ki-67 や PCNA 免疫染色における標識細胞の局在と標識率は、BrdU 免疫染色のそれと非常に良く相関することを明らかにし、イヌおよびネコの腫瘍における細胞増殖能の解析と予後判定に重要な根拠を付与した。

[SUMMARY]

Immunohistochemical analysis of
cell kinetics of tumors in dog and cat

Katsuyuki ISHIKAWA

The prognosis of the tumor-bearing animal will depend on the complicated influences of various factors. To treat an animal suffering from neoplastic diseases, it is very important to predict the prognosis of the patient. Histopathological diagnosis depends on the morphological features of the tumor and will give very important information to predict the prognosis. But, there are considerable numbers of tumors which require not only morphologic findings but also more information on the biological behavior and/or the responsibility to therapeutic agents to get an accurate basis for the clinical judgment. Increasing cancer patients and the progress in its therapy, veterinary clinicians have to look for the more reliable information other than some arbitrary pathological diagnosis based on routine morphology. One of the most important characteristics of the neoplastic diseases is so-called autonomous growth. Cell kinetic analysis employing immunohistochemical methods will give an objective basis to consider the prognosis of each cancer patient in veterinary oncology.

A monoclonal antibody to 5-bromodeoxyuridine (BrdU) which is a thymidine derivative has been developed, and BrdU immunostaining technique is believed to have equal reliability comparing with cell kinetic analysis of methods using isotopes. BrdU immunostaining technique has become a useful widely-used tool for the cell kinetic analysis instead of the isotope methods. BrdU immunostaining technique can precisely detect the cells in S-phase (DNA synthetic period). BrdU immunostaining technique has been applied to characterize the tumor cases in human medicine, and a lot of data has been collected to make a systematic knowledge to judge the prognosis. But, there are a limited number of reports applying this method to analyze the tumor cases in the dog and cat. For BrdU immunostaining technique, it needs pretreatment to give it for living body, while it can provide a very accurate data on cells in DNA synthetic period. BrdU immunostaining is a good technique to analyze DNA synthesis, but there remains an important question whether this chemical will be free from teratogenicity or mutagenicity for the living individuals and this question has not been answered yet.

Following BrdU method, anti-Ki-67 or anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) have been developed and utilized in the progression of immunohistochemistry. These antigens are normal substances in the living cells, so they do not cause the troubles on teratogenicity or mutagenicity in the patients, although their detecting phases in the cell cycle are not the same as in previous methods. There are only a few papers on canine and/or feline neoplastic diseases describing the results of Ki-67 immunostaining and/or PCNA immunostaining compared with those of the Gold Standard methods such as BrdU immunostaining or methods using radioisotopes. In order to compare and confirm the reliability of Ki-67 and/or PCNA immunostaining for cell kinetics in these species, further investigations were necessary to reveal the

relationships among them.

The author carried out several investigations to clarify these problems: At first, application of BrdU immunostaining technique visualized by the Labeled Streptavidin-Biotinylated Peroxidase (LSAB) to the normal tissues of dogs and cats was tested. Then, this method was applied to spontaneous neoplasms in these animals. Thirty canine and 6 feline cases bearing 13 different spontaneous tumors were given BrdU and evaluated for determining the localization of marked cells and labeling index by BrdU immunostaining technique to compare with histopathological findings. BrdU immunostaining labeled the canine and feline cells in proliferating phase as well as similar states of human cells and showed efficacy to analyze the cell kinetics among them.

The author also carried out the follow-up study of all cases to compare the results of cell kinetic analysis, histopathological diagnosis and prognosis and concluded this BrdU immunostaining had an efficacy to predict the prognosis of his own clinical cases. The author's study using his own clinical cases spent a lot of time. During the study over 10 years, newly developed immunostaining methods using PCNA and Ki-67 became more popular without basic researches on canine and feline tumors. Therefore, these immunostaining methods were applied to the same cases composed of 18 dogs and 5 cats suffering from 9 neoplasms that had been evaluated by BrdU immunostaining and checked appropriate fixative, fixation time, and antigen retrieval. Comparing the localization of labeled cells, labeling index and mitotic index revealed relationships among the cells of S-phase (BrdU labeled cells), cells labeled with Ki-67 and PCNA.

Basic study on anti-Bromodeoxyuridine (BrdU) monoclonal antibody labeling method in normal tissues and the analysis of the tumor cell growth in dogs and cats.

The route of administration and dose, fixation and how to denature the DNA were examined to obtain the basic data for BrdU immunostaining technique. BrdU solution was given ranging 3.0 to 83.3 mg/kg by single intravenous injection, but no special side effects were observed and obtained good staining results, while human patients showed side effects as bone marrow suppression, leukopenia, rough hair or alopecia following at high dose and repeated administration (500 to 1000mg/day for 5 to 6 weeks).

On fixatives and fixation time, immunostaining result was good under 70% ethanol fixation within 1 week. It was possible to reserve the antigenicity of BrdU in 10% neutral buffered formalin solution, if the tissues were heated in the fixative solution. If

one wants to use formalin solution, heating will be a very important factor. For antigen retrieval for the material fixed over 6 hours in formalin, it was most effective to treat with 0.05% protease at 37°C for 1 minute. And for DNA denaturation, it was easy and stable to treat with 4 regulation hydrochloric acid at 37 degree centigrade for 30 minutes. BrdU labeling index and histopathological findings were in good accordance in the most of tumor cases in dogs and cats as well as in humans. Generally the BrdU labeling index of the tumor with malignant histopathology was high and the average of labeling index of malignancy was 3.5 times of those of benign tumors. Rapid growth was proved objectively by BrdU labeling index. But, BrdU labeling index was varying in individual tumor, probably reflecting the presence of foci with different cellular atypia or levels of differentiation. Narrow range of fluctuation in BrdU labeling were seen in parimarily benign and/or nonepithelial tumors with rather equal differentiation. Wide or highly fluctuating BrdU labeling were seen in epithelial tumors composed of numerous components or with multiple levels of differentiation. Further investigation will be necessary to reveal whether local high BrdU labeling index would reflect local invasivion or distant metastasis.

For veterinary clinicians, it might be most important whether the labeling index of BrdU immunostaining would properly reflect the true growth rate, suggesting the prognosis and choosing therapeutic methods. The author planned and traced the clinical course of canine and feline patients suffered from neoplastic diseases after the confirmation of histopathological diagnosis. During the follow-up study, 13 cases out of 21 malignant neoplasms (61.9%) died of recurrence and /or metastasis of the tumor within 14 months and each case showed high labeling index. On the contrary, benign neoplasms diagnosed histopathologically showed low labeling index and 4 cases out of 15 (26.7 %) died of other than neoplastic diseases in the same period. These facts suggested BrdU labeling index would be a very important prognostic factor for the neoplastic diseases among dogs and cats. Further investigation of number of accumulated cases and prolonged duration of following-up would provide prognostic informations on each type of tumor, biological behavior, responsibility to therapy relating to histopathology.

Proliferation analysis of tumors in dogs and cats employing anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibody immunostaining. In comparison with the --- BrdU immunity staining technique, ---

It is essential for keeping the reliability to search and establish the suitable staining conditions for the methods detecting the proliferation rate using antibodies relating the cell growth. The author checked and studied the best way for immunostaining

using anti-PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies and compared the results of these staining with BrdU labeling. Antigen retrieval was necessary for these two antibodies to detect the proliferating cell nuclei. Among several antigen retrieval methods, microwave heating in the phosphate buffer or citrate buffer yielded good results. For anti-PCNA and Ki-67 immunostaining, 70 % ethanol fixation gave the best staining results. It was also possible to obtain similar results using 10 % neutral buffered formalin fixation accelerated by heating. Although the nature of epitope for anti-Ki67 antibody was still obscure, it needs no complicated procedures as in BrdU method. So, anti-PCNA and Ki-67 antibodies are believed to be a good tool to analyze proliferating cells. There is a report on the correlation of the labeling index of Ki-67 and BrdU in the human tumors. The author obtained very good correlation between the labeling index of the Ki-67 and BrdU labeling index in this research and the coefficient of correlation $r=0.96$. The regression line of the labeling index of the Ki-67 and BrdU became Y (Ki-67 labeling index) $=1.3X$ (BrdU labeling index) $+5.31$. Therefore, it was possible to count the cells of the DNA synthetic period by using Ki-67 immunostaining technique, and Ki-67 immunostaining seemed to be very useful for the cell kinetic analysis of the tumor of dogs and cats.

PCNA is thought to be accessory protein of the DNA polymerase δ and detected in the high concentration in the tissues having high growth activity. Correlation was recognized as the coefficient of correlation in the BrdU labeling index and the PCNA labeling index with $r=0.73$. And, the regression line of the BrdU labeling index and the PCNA labeling index became Y (PCNA labeling index) $=1.2X$ (BrdU labeling index) $+15.42$. BrdU labeling index and mitotic index was a coefficient of correlation $r=0.70$, and correlation was recognized.

Conclusively, BrdU immunostaining technique was applicable for canine and feline neoplasms. BrdU labeling index had a good correlation to the grading of histopathological malignancy, and survival rates. Ki-67 and PCNA immunostaining labeled proliferating cells in a good correlation to BrdU method. These facts provided an important basis to analyze the proliferating activity and predict the prognosis for neoplastic diseases in dogs and cats.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を戴きました岐阜大学応用生物科学部獣医病理学研究室 柵木利昭教授、柳井徳磨助教授、酒井洋樹先生に深く感謝致します。また、本論文に対しまして、懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学獣医学部病理学研究室 野村靖夫教授、同大学獣医学部解剖学第二研究室 有嶋和義教授、同大学生物科学総合研究所 代田欣二教授に厚くお礼申し上げます。さらに、本研究の実施にあたり多大なるご協力を戴きました岐阜大学応用生物科学部獣医病理学研究室 細井理代および吉田和典の両氏に心より感謝致します。

本論文の一部は *Journal of Toxicologic Pathology*(2006,vol.19, Evaluation of cell proliferation in canine tumors by the bromodeoxyuridine labeling method, immunostaining of Ki-67 antigen and proliferating cell nuclear antigen. pp123-127 および,2005. vol.18. Immunohistochemical Demonstration of S-phase Cell in Canine and Feline Spontaneous Tumor by Anti-bromodeoxyuridine Monoclonal Antibody. pp135-400) に掲載された。

主査	麻布大学	獣医学部	病理学研究室	野村 靖夫 教授
副査	麻布大学	獣医学部	解剖学第二研究室	有嶋 和義 教授
	麻布大学	生物科学総合研究所		代田 欣二 教授

引用文献

- 1 Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*. 2000; 257: 231-7.
- 2 Endl E, Hollmann C, Gerdes J. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol*. 2001; 63: 399-418.
- 3 藤田哲也. 腫瘍の増殖と成長. In: *現代病理学大系 9A 腫瘍 I*, 飯田宗一, 石川栄世, 影山圭三, editors ed. 東京, 中山書店, 1985; pp 70-111.
- 4 Galand P, Degraef C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cell in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet*. 1989; 22: 383-392.
- 5 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133: 1710-5.
- 6 Goodson WH 3rd, Moore DH 2nd, Ljung BM, Chew K, Mayall B, Smith HS, Waldman FM. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 59: 113-23.
- 7 Goz B. The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol Rev*. 1977; 29: 249-72.
- 8 Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982; 218: 474-5.
- 9 長谷川篤彦. 腫瘍の新治療展開. *獣医畜産新報* 1993; 46: 645-6.
- 10 服部隆則. 腫瘍細胞の生体内動態. In: *現代病理学大系 9A 腫瘍 I*, 飯田宗一, 石川栄世, 影山圭三. editors ed. 東京, 中山書店, 1985; pp 289-304.
- 11 Hayashi Y, Hattori Y, Moriwaki A, Asaki H, Hori Y. Effects of prolonged weak anodal direct current on electrocorticogram in awake rabbit. *Acta Med Okayama*. 1988; 42: 293-6.
- 12 Hayashi Y, Fukayama M, Koike M, Kaseda S, Ikeda T, Yokoyama T. Cell-cycle analysis detecting endogenous nuclear antigens: comparison with BrdU-in vivo labeling and an application to lung tumors. *Acta Pathol Jpn*. 1993; 43: 313-9.
- 13 Hoshino T and Sano K. Radiosensitization of malignant brain tumors with bromodeoxyuridine (thymidine analogue). *Acta Radiologica Therapy Physios Biology*. 1969; 8: 15-21.
- 14 星野孝夫. BrdU(bromodeoxyuridine) 脳腫瘍への応用. *病理と臨床*. 1991; 9: 862-7.
- 15 伊藤 仁, 長村義之. 細胞診における免疫組織化学. *病理と臨床*. 1993; 11: 314-9.
- 16 Johnson HA, Haymaker WE, Rubini JR, Friedner TM, Bond VP, Cronkite EP, Hughes W. A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the in vivo uptake of tritiated thymidine. *Cancer*. 1960; 13: 636-42.

- 17 Kitchell BE. In: *Kirk's Current veterinary therapy XII*. Kirk RW, ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company. 1995; pp 1098-1103
- 18 Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1996; 209: 1418-20.
- 19 Madewell BR. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med*. 2001; 15: 334-40.
- 20 松野吉宏, 向井清. 増殖細胞核抗原 (PCNA). *病理と臨床*. 1991; 9: 879-883.
- 21 Messier B, Leblond CP. Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am J Anat*. 1960; 106: 247-85.
- 22 Meuten DJ. *Tumors in domestic animals*. Iowa State Press. Ames, Iowa. 2002
- 23 Moran R, Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. *J Histochem Cytochem*. 1985; 33: 821-7.
- 24 Morimura T, Kitz K, Budka H. In situ analysis of cell kinetics in human brain tumors. A comparative immunocytochemical study of S phase cells by a new in vitro bromodeoxyuridine-labeling technique, and of proliferating pool cells by monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1989; 77: 276-82.
- 25 向井 清. 第 2 章 腫瘍マーカーとして有用な分子, 期待される分子, 増殖細胞抗原. *病理と臨床*. 1988; 8: 178-185.
- 26 向井 清. 組織学的悪性度診断. *病理と臨床*. 1991; 9: 844-847.
- 27 Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, and Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem*. 2003; 51: 1681-1688.
- 28 Nagashima T, DeArmond SJ, Murovic J, Hoshino T. Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1985; 67: 155-9.
- 29 Northrup NC, Howerth EW, Harmon BG, Brown CA, Carmicheal KP, Garcia AP, Latimer KS, Munday JS, Rakich PM, Richey LJ, Stedman NL, Gieger TL. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 17: 561-4.
- 30 Ohta G, Sakai H, Kachi S, Hirata A, Yonemaru K, Kitajima A, Yanai T, and Masegi T. Assessment of proliferative potentials of canine osteosarcomas and chondrosarcomas by MIB-1 immunohistochemistry and bromodeoxyuridine incorporation. *J Comp Pathol*. 2004; 131: 18-27.
- 31 Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. 1984; 21: 469-74.

- 32 Raza A, Ucar K, Bhayana R, Kempinski M, and Preisler HD. Utility and sensitivity of anti BrdU antibodies in assessing S-phase cells compared to autoradiography. *Cell Biochem Funct.* 1985; 3: 149-153.
- 33 Sakai H, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol.* 2002; 127: 233-8.
- 34 佐々木巧典, 萩野哲郎, 高橋 学. BrdUrd を応用した核酸の免疫組織化学. *病理と臨床.* 1988; 6: 344-350.
- 35 佐々木巧典. フローサイトメトリーによる DNA ヒストグラムと免疫染色による増殖細胞抗原陽性率との比較—その臨床的意義. *病理と臨床.* 1991; 9: 894-901.
- 36 Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Takahashi M. Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer.* 1988; 62: 989-93.
- 37 佐藤雄一. 免疫組織化学における固定法の問題点. *病理と臨床.* 1993; 11: 274-282,
- 38 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22.
- 39 Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol.* 1991; 165: 173-8.
- 40 芹沢照彦. EPOS(Enhanced Polymer One-Step Staining) 法の術中迅速診断法への応用. 細胞増殖関連核抗原 (PCNA および KI-67 抗原) の局在観察に対する至適染色条件. *病理と臨床.* 1994; 12: 745-748.
- 41 渋谷 誠, 宇都宮洋才, 長村義之: MIB-1 抗体を用いた増殖期細胞の免疫組織化学的同定法 - パラフィン切片における抗原賦活法の検討 -. *病理と臨床.* 1993; 11: 373-377.
- 42 下田忠和, 二階堂孝, 池上雅博, 牛込晋一郎, 服部隆則. 平滑筋肉腫における核分裂数と予後の検討—特に核分裂像計測上の問題. *病理と臨床.* 1991; 9: 848-854.
- 43 Shimosato Y, Asamura H, Yoshida K, Noguchi M, Nakajima T, Mukai K. Factors possibly affecting the degree of malignancy in adenocarcinoma of the lung. DNA content and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index. *Chest.* 1989; 96: 375-385.
- 44 Shi SR, Key ME, Kalra K. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991; 39: 741-8.
- 45 Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.* 1992; 69: 367-74.
- 46 Sugihara H, Hattori T, Fukuda M. Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissues. *Histochemistry.* 1986; 85: 193-5.
- 47 鈴木敏恵, 坂本 忍, 工藤秀機, 澤木敬子. ラット骨髄増殖過程における BrdU を用いた免疫組織化学的検討. *医学と生物学.* 1991; 123: 239-241.

- 48 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌, 佐藤雄一, 下里幸雄. BrdU(bromodeoxyuridine)モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的研究とその臨床応用. *医学のあゆみ*. 1984; 135: 445-9
- 49 玉井克之. DNA複製装置と増殖関連抗原. *病理と臨床*. 1991; 9: 855-861.
- 50 Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUrd and Ki-67 immunostaining. *J Urol*. 1991; 145: 846-9.
- 51 Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci*. 1990; 96: 121-9.
- 52 Yanai T, Matsumoto C, Takashima H, Yoshida K, Sakai H, Isowa K, Iwasaki T, Sato Y, Masegi T. Immunohistochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in cattle tissues. *J Comp Pathol*. 1996; 114: 265-72.
- 53 Yoshida K, Yanai T, Iwasaki T, Sakai H, Ohta J, Kati S, Ishikawa K, Lackner AA, Masegi T. Proliferative potential of canine oral epulides and malignant neoplasms assessed by bromodeoxyuridine labeling. *Vet Pathol*. 1999; 36: 35-41.
- 54 Zacchetti A, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS*. 2003; 111: 430-8.