

氏名(本籍)	石川 勝行(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第410号
学位授与年月日	平成19年1月29日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 野村 靖夫 (副査) 浅利 昌男 有嶋 和義 代田 欣二

論文内容の要旨

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り、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℃ 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℃、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ヵ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 のアクセサリタンパク質で、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。

論文審査の結果の要旨

動物の腫瘍の治療に際して、予後を予測することは非常に重要である。病理組織学的診断は、獣医臨床における予後判定の重要な要素となっているが、形態学的所見が決定的な判断の根拠となりにくい腫瘍もあり、より一層客観的な根拠となり得る指標が求められるようになった。腫瘍は、自律性進行性の異常増殖で、著者は細胞動態を解析することが獣医臨床における腫瘍の予後判定の客観化につながると考えた。論文は二つの部分から成っている。

①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

thymidine 誘導体である 5-bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナル抗体を用いる BrdU 免疫染色法は、DNA 合成期 (S 期) の細胞を正確に検索でき、アイソトープを必要とする細胞動態解析法に代わるものとして、ヒトの腫瘍症例にも応用されていたが、イヌおよびネコの腫瘍例に適用した報告は乏しかった。著者は、イヌおよびネコへの応用を意図して BrdU の投与方法と投与量、組織固定法および DNA 変性処理を検討した。ヒトでは BrdU を高用量で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、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たが、イヌおよびネコの静脈内に 3.0mg/kg ~ 83.3mg/kg の範囲で単回投与した限りでは、特別な副作用は発現せず良好な染色結果が得られた。BrdU 法の固定に関しては、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。加熱固定すると 10% 緩衝ホルマリンでも BrdU の抗原性を保存することが可能であった。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℃ 1 分間の処理が抗原賦活に効果的であった。DNA 変性処理は、4 規定塩酸による 37℃、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たところ、ヒトの腫瘍におけると同様に病理組織学的所見と 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客観的に証明された。BrdU 標識率のばらつきが小さな腫瘍は、良性腫瘍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、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であった。個々の腫瘍における標識率のバラツキは、同一腫瘍内でも細胞異型あるいは分化度の違いを反映する可能性があり、

局所的な標識率の高さとその部位での浸潤性や遠隔転移との関連性を今後さらに検討する必要があると考察した。

臨床応用に際しては、BrdU標識率が腫瘍の増殖能を忠実に表現しているか、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の問題となるため、検索対象としたすべての腫瘍例を病理診断から14か月後まで追跡調査した。この間に悪性腫瘍と診断された21例中13例(61.9%)が腫瘍の転移・再発によって斃死したが、いずれも高い標識率を示していた。一方、良性腫瘍とされた症例はBrdU標識率も低く、15例中4例(26.7%)が腫瘍以外の原因で斃死したのみで、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になると結論した。

②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——

BrdU免疫染色法は、鋭敏で正確なDNA合成期(S期)の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、催奇形性や変異原性の問題を無視できない。細胞内在性抗原であるKi-67およびPCNAに対するモノクローナル抗体による免疫染色法では、このような問題点は無いが、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、その相関性を論じた研究は少ない。信頼性を確立するため、先に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適用、組織固定法や抗原賦活法の最適化を検討し、これらを比較した。

イヌおよびネコの腫瘍における抗Ki-67ならびに抗PCNAモノクローナル抗体を用いた検索法では、抗原賦活処理が不可欠であるが、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液に浸漬し、マイクロウェーブ法で加熱して抗原賦活処理を行う方法が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としては、70%エタノール固定が最も良好な染色結果を示し、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った。

Ki-67抗体が反応する抗原の性状は未詳であるが、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されている。BrdU標識率とKi-67標識率は、相関係数 $r=0.96$ 、回帰直線は、 $Y(\text{Ki-67標識率})=1.3X(\text{BrdU標識率})+5.31$ で、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 のアクセサリタンパク質で、増殖能の高い組織で高濃度に検出されるが、BrdU標識率とPCNA標識率における相関係数は $r=0.73$ 、回帰直線は、 $Y(\text{PCNA標識率})=1.2X(\text{BrdU標識率})+15.42$ で、この方法もイヌおよびネコの腫瘍例の細胞動態解析に有用な手法であった。また、BrdU標識率と核分裂指数との間でも相関が認められた(相関係数 $r=0.70$)。

以上のごとく著者は、獣医臨床に従事する立場から増殖細胞標識法の手技など基礎的検討を行った上で、イヌおよびネコに自然発生した腫瘍例にBrdU免疫染色法を適用して、本法が十分応用可能で、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、自身が診療したイヌおよびネコに自然発生した腫瘍例を主体に追跡調査を行って予後判定に有用であることを証明した。また、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法で検索した腫瘍例に適用し、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した。

これらの成績は、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批判に耐える根拠を付与し、獣医臨床と基礎獣医学の連携・発展に寄与するもので、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しい業績と評価する。