

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

癌の臨床 (1993.07) 39巻8号:895～900.

胃悪性リンパ腫におけるPCNAとAgNORとの比較検討

横田欽一、奥山修兒、結城正光、斉藤裕輔、並木正義、山田政孝



原著

胃悪性リンパ腫における PCNA と AgNOR との比較検討

横田 欽一^{*1} 奥山 修 兒^{*1} 結城 正 光^{*1}
 斉藤 裕 輔^{*1} 並木 正 義^{*1} 山田 政 孝^{*2}

Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) in Malignant Lymphomas of the Stomach : Yokota, K. ^{*1}, Okuyama, S. ^{*1}, Yuki, M. ^{*1}, Saito, Y. ^{*1}, Namiki, M. ^{*1} & Yamada, M. ^{*2} (^{*1}3rd Dept. of Internal Med., Asahikawa Medical College, ^{*2}Dept. of Internal Med., Shibetsu City Hospital)

The development of antibodies against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and of a staining procedure for argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) enabled us to carry out a retrospective study on tumor cell proliferation using routinely processed tissue sections. To clarify the relationship between proliferating activity of tumors and the grade of malignancy, we compared the expression of PCNA and AgNOR with the clinicopathological data in 18 cases of gastric lymphomas. The expression of both PCNA and AgNOR increased with histological grade (MALT lymphoma < mixed type < large cell type), depth of tumor invasion (submucosa < proper muscle < serosa), and showed higher in recurrent cases. PCNA positive rate correlated well to mean AgNOR number ($r=0.77$). Detection of PCNA and/or AgNOR is useful to infer the grade of malignancy in gastric lymphomas.

Key words : Malignant lymphoma, MALT lymphoma, PCNA, AgNOR, Stomach
Jpn. J. Cancer Clin., 39(8) : 895~900, 1993.

1. 材料と方法

はじめに

腫瘍の増殖能は、良性・悪性の区別、悪性度あるいは予後を規定する重要な因子である¹⁾。従来用いられてきた増殖分画の検索法は、手技が繁雑であったり凍結標本を必要としたため、広範な臨床応用には至らなかった。最近になって、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体²⁾や argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) 染色³⁾により、ホルマリン固定パラフィン切片でも増殖分画の検索が可能となった。そこで、当科で診断し切除された胃悪性リンパ腫の切除材料を用いて、両者の発現を比較し、あわせて臨床病理学的因子との関連性を検討した。

1) 対象

対象は1978年10月から1991年12月までに当科および当科関連施設で診断し、胃切除の行われた胃悪性リンパ腫18例である。リンパ腫の組織分類は、本告ら⁴⁾の胃リンパ腫の分類に基づいて見直した。その結果、mucosa associated lymphoid tissue lymphoma (MALT リンパ腫)⁵⁾ 5例、びまん性混合型リンパ腫(混合型) 8例、びまん性大細胞型リンパ腫(大細胞型) 5例、類 Burkitt 型リンパ腫1例である。深達度はsm 9例、pm 6例およびss~se 3例で、所属リンパ節転移は7例にみられた。予後は1993年1月の時点において、生存13例、他病死1例、再発生存中1例および再発死亡3例である。なお、対照として高度の慢性炎症を示した早期胃癌切除胃の非癌部粘膜4例分を用いた。

*1 旭川医科大学第三内科学教室

*2 士別市立病院内科

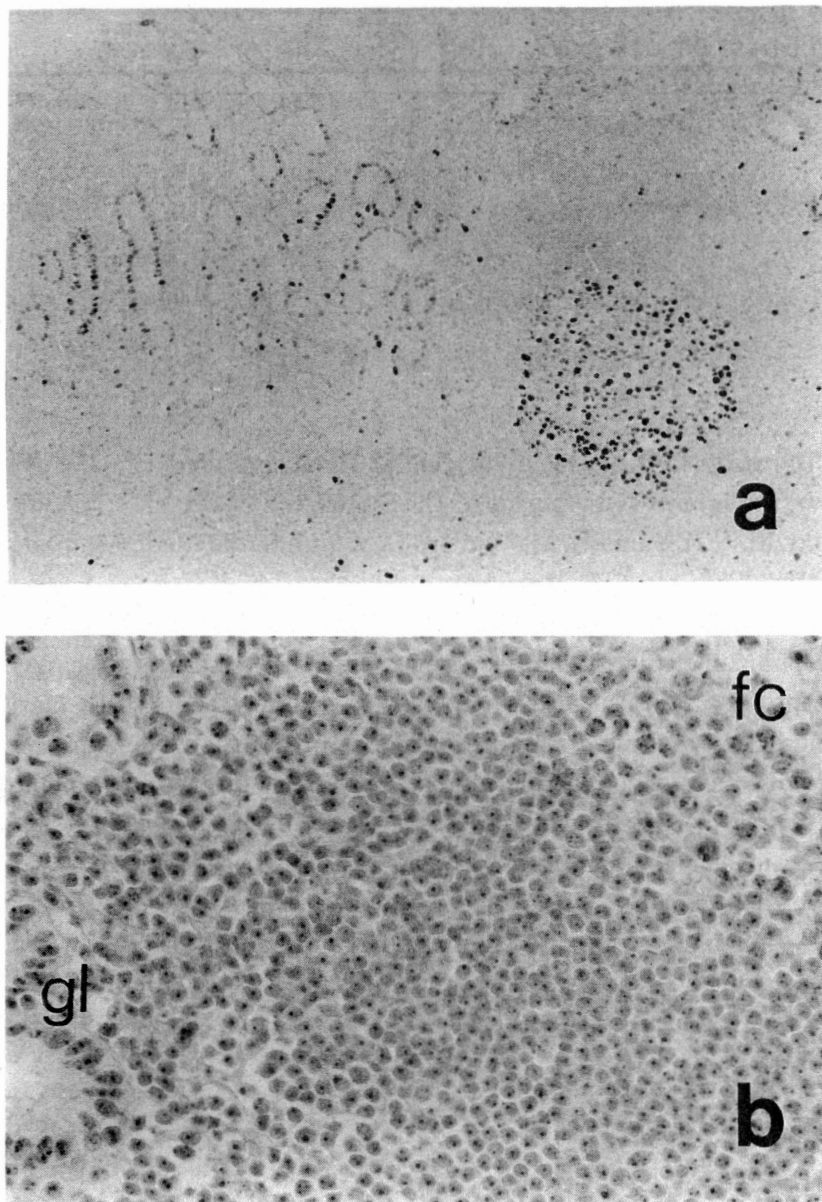


図1 慢性胃炎における発現。a: PCNA, b: AgNOR

2) 染色方法

ホルマリン固定(固定時間1~5日間)パラフィン包埋材料を用い、腫瘍を含む代表的なブロックから連続切片を作製した。脱パラフィン後PCNAは以下のようにABC法で染色した。0.6% H_2O_2 /エタノール(内因性ペルオキシダーゼ阻)20分, 抗ラットPCNA抗体(PC10, DAKO)1:30 120分, ビオチン化抗マウスIgG1:100 60分, ABC complex 60分, DAB発色3分, 1% methylgreen(核染)10分。洗浄液PBS, 1次および2次抗体には0.02% Tween 20を加えた。切片上の胃粘膜増殖帯を陽性コントロールとした。AgNORはCrockerら³⁾の方法にしたがい

one-step法で染色した。脱パラフィン切片に対して、使用直前に調整した染色液(2% グラチン, 1% 蟻酸1容量と50% 硝酸銀2容量を混和)をかけ、室温で35~40分染色し、グリセロールゲラチンで包埋した。各ステップ間は蒸留水で洗浄した。

3) カウント法

PCNAは200倍でカラー写真を撮影し、キャビネ版の写真上で核500個当りの陽性核数をパーセントで算出した。染色のパターンや強さにかかわらず、わずかでも染色されていれば陽性としてカウントした。同様に、AgNOR数についても400倍で撮影したカラー写真上で核100個についてカウントし、核1個当りの平均AgNOR数を算出し

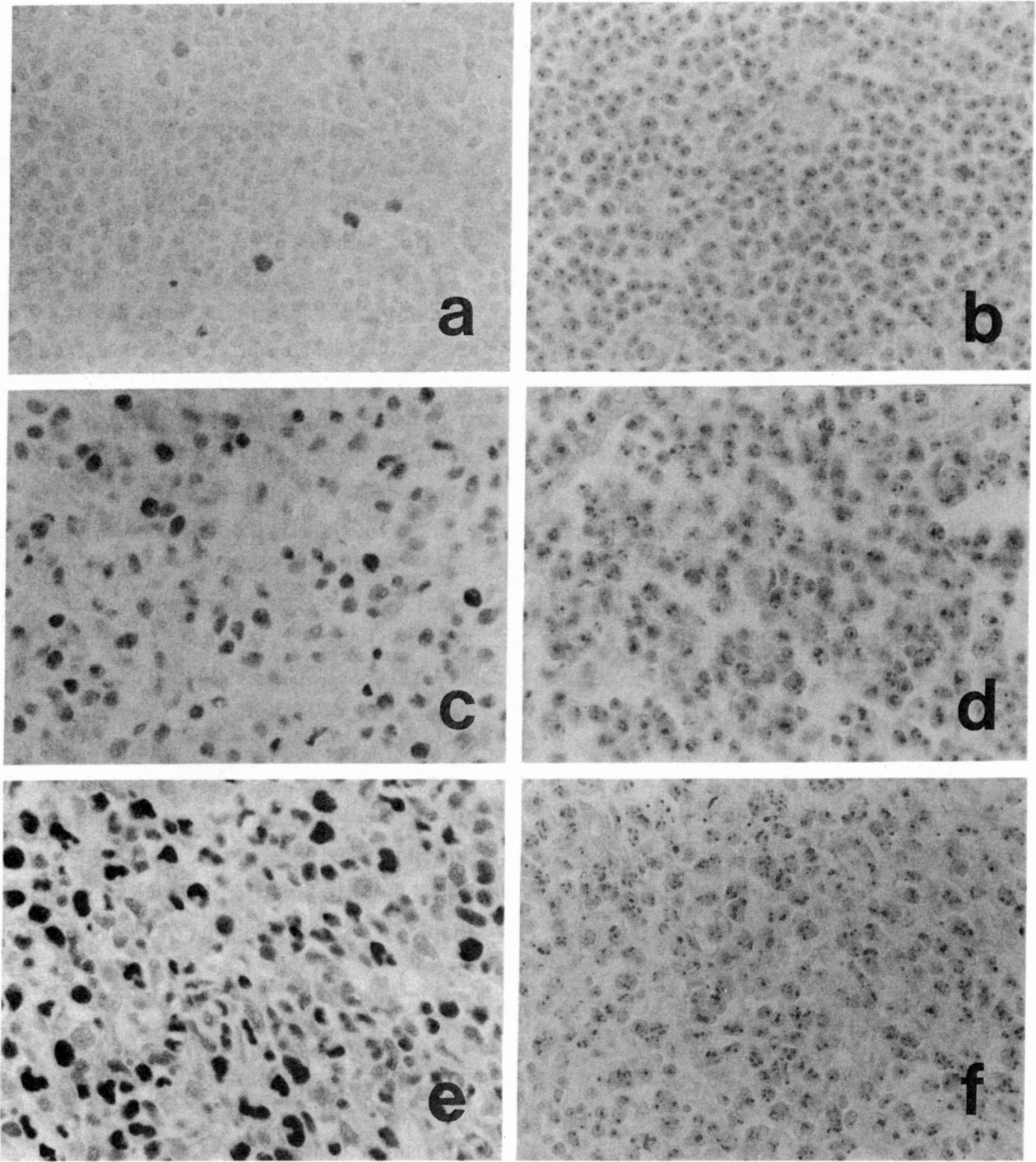


図2 胃悪性リンパ腫における発現。

a, c, e: PCNA, b, d, f: AgNOR. a, b: MALTリンパ腫, c, d: 混合型, e, f: 大細胞型.

た。反応性と考えられる濾胞中心細胞は測定から除外した。

平均値の差の検定は、Mann-Whitney U test (2群間) および Kruskal-Wallis test (3群間) で行い、各群の値は Mean±SD で表示した。

2. 結果

1) 慢性胃炎における PCNA と AgNOR の染色所見

胃粘膜において PCNA 陽性細胞は胃腺管の増殖帯やリンパ濾胞の胚中心にみられ、濾胞周囲や

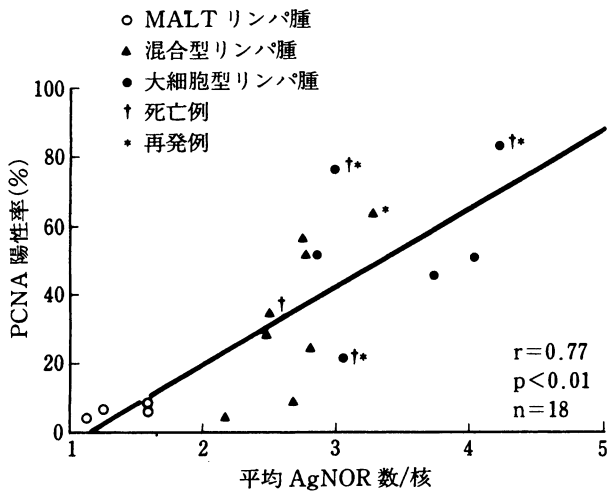


図3 PCNA 陽性率と AgNOR 数の相関

粘膜固有層にびまん性に浸潤するリンパ球にはきわめて少ない(図1a)。一方核内 AgNOR のドット数は、胃腺管の増殖帯細胞(g1)やリンパ濾胞の胚中心細胞(fc)では多く、濾胞周囲にびまん性に浸潤するリンパ球では1個のものが多かった(図1b)。

2) 胃悪性リンパ腫における PCNA と AgNOR の染色所見

MALT リンパ腫、混合型および大細胞型における PCNA と AgNOR の代表的な染色所見を図2に示す。MALT リンパ腫では、濾胞間に増生する腫瘍細胞には PCNA 陽性細胞はきわめて少な

く、AgNOR もほぼ1個である(図2a, 2b)。反応性濾胞中心や blastic transformation^{4,5)} をおこした部分では、両者の増加がみられた。混合型(図2c, 2d)、大細胞型(図2e, 2f)では PCNA 陽性細胞と AgNOR 数の増加がみられた。図3は各症例の PCNA 陽性率と平均 AgNOR 数とを比較したグラフである。両者は相関係数 $r = 0.77 (p < 0.01)$ とよく相関した。

組織型別にみると、MALT リンパ腫、混合型および大細胞型(類 Burkitt 型の1例を含む)の順に、AgNOR 数は 1.39 ± 0.23 , 2.68 ± 0.32 および 3.47 ± 0.59 , PCNA 陽性率は $7 \pm 2\%$, $34 \pm 22\%$ および $55 \pm 22\%$ と、それぞれ有意に (AgNOR: $p < 0.005$, PCNA: $p < 0.05$) 増加した。

3) 臨床病理学的因子との比較

図4に深達度別、リンパ節転移の有無別および再発の有無別の PCNA 陽性率と AgNOR 数を示す。深達度別では sm, pm, ss~と深くなるほど、AgNOR 数が 2.25 ± 0.67 , 2.72 ± 0.84 および 3.74 ± 0.66 , PCNA 陽性率が $17 \pm 16\%$, $43 \pm 20\%$ および $70 \pm 17\%$ と増加した(ともに $p < 0.05$)。リンパ節転移の有無別では、AgNOR 数が 2.33 ± 0.85 および 3.17 ± 0.68 , PCNA 陽性率が $27 \pm 22\%$ および $47 \pm 27\%$ と、それぞれ転移陽性例で高い傾向があったが推計学的には差はなかった。非再発例と再発例を比較してみると、AgNOR 数が 2.45 ± 0.85 および 3.38 ± 0.57 , PCNA 陽性率が

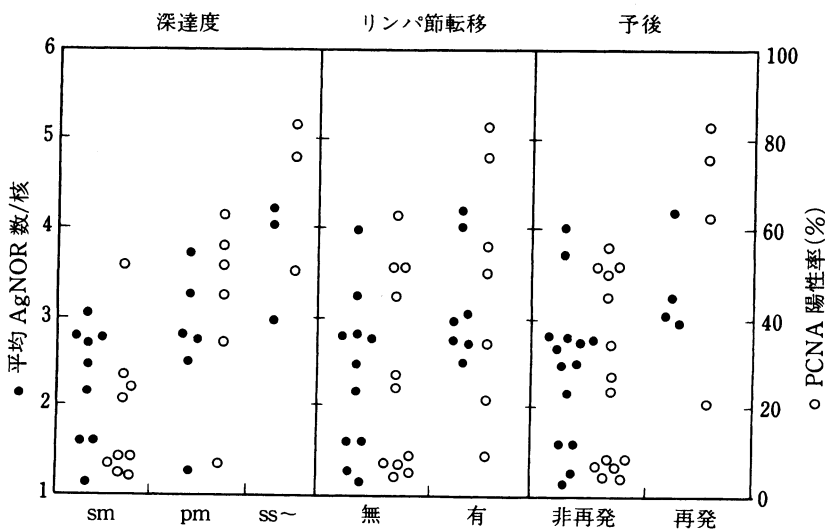


図4 臨床病理学的因子と AgNOR 数および PCNA 陽性率

27±21%および61±28%と、それぞれ再発例で高値を示した(ともに $p < 0.05$)。

3. 考 察

1) 胃リンパ腫の組織分類について

胃リンパ腫の組織分類は本邦ではLSG分類に基づいてなされてきた。しかしIsaacsonら⁵⁾により提唱されたMALTリンパ腫の概念が受け入れられつつあり、これを含めた分類が本告ら⁴⁾により提案されている。MALTリンパ腫は、従来形態学的にpseudolymphomaまたはreactive lymphoreticular hyperplasia (RLH)と診断されていた胃病変の多くに相当する。これらの病変にみられる濾胞間のリンパ球は、免疫組織学的にも⁵⁾、免疫グロブリン遺伝子再構成の検索でもmonoclonalityが証明され⁶⁾、悪性リンパ腫であることが明らかとなっている。われわれも免疫組織学的検討を行った結果、4例はMALTリンパ腫と考えられた⁷⁾ので、本告らにしたがって分類し直した。当院での切除時の病理診断にはびまん性中細胞型との記載が多くみられたが、見直しの結果、しばしば大型の細胞を混在していたため、混合型に変更した。彼らの分類にはびまん性中細胞型の項目が存在せず、それらの多くはMALTリンパ腫に組み込まれるものと思われるが、今回の検討ではRLHとの鑑別が困難な典型例のみをMALTリンパ腫とした。

2) PCNAについて

PCNAは図1aに示したように生理的な増殖細胞の分布に一致して発現しており、ホルマリン固定された臨床材料でも増殖細胞を検出していることが確認された。本検討では全例で胃粘膜増殖帯にPCNA陽性細胞が認められたが、固定時間が3～5日の材料では染色性の減弱やむらが見られ、まったく染色されない部分もあった。したがってPCNAによって増殖分画を正確に比較したい場合は、固定時間を2日以内に統一すべきであろう²⁾。実際、固定時間を10時間以内に統一すると、PCNA陽性率は別の増殖マーカーであるKi-67と $r = 0.90$ ($n = 24$, 節性リンパ腫)とよく相関することが報告されている⁸⁾。一方、通常ホルマリン固定材料では、PCNA陽性率はflow cytometryによるS+G2+M分画と $r^2 = 0.$

612 (r の値は0.78になる、 $n = 14$, 消化管リンパ腫)とやや低い値が報告されている⁹⁾。固定時間の一定でない臨床材料を用いる場合は、増殖分画の大まかな把握あるいは増殖細胞の分布を知る¹⁰⁾という目的で使用すべきであろう。

固定時間が長い場合、内因性ペルオキシダーゼ阻止の際100%メタノールを使用しない^{8,10)}ことにより、PCNAの染色性はかなり救われることが観察された。これは免疫組織学的に検出される2種類のPCNA、すなわち顆粒状に染まりS期に特異的な成分とびまん性に染まり非S期にもみられる成分のうち、後者の成分がメタノールで消失する¹¹⁾ことと関連するものと思われる。

3) AgNORについて

AgNORも図1bに示したように、生理的に増殖性のある細胞においてその数が増加しており、増殖能を反映することがわかる。われわれは、濾胞中心を除く炎症性リンパ球のAgNORがほぼ1個であることを利用して、生検材料に高度のリンパ球浸潤がみられるとき、AgNOR染色によって胃悪性リンパ腫の診断率が有意に向上することを確認し報告した⁷⁾。すなわち悪性リンパ腫では、MALTリンパ腫を除いてAgNOR数の増加が認められる(図2参照)。AgNOR数が増殖能を反映することは、PCNA陽性率と $r = 0.77$ と相関したことから明らかである(図3参照)。

4) 増殖性からみた胃リンパ腫の悪性度分類について

組織分類の変化によりMALTリンパ腫を加えた悪性度分類も必要となろう。MALTリンパ腫はきわめて増殖性が低く(図2a, b, 図3参照)、low-gradeとすべきである。Non-Hodgkinリンパ腫のworking formulation分類では、びまん性混合型もびまん性大細胞型もintermediate-gradeに分類されている。しかしこれには異論があり、Kruegerら¹²⁾ Houmandら¹³⁾は、びまん性混合型をintermediate-gradeに、びまん性大細胞型をhigh-gradeに、そしてBurkitt型をsuper-high-gradeに分類している。今回の検討では、MALTリンパ腫、混合型および大細胞型の順に増殖性が有意に高くなり、再発死亡例は大細胞型のみにもみられたことから(図3参照)、混合型をintermediate-grade、大細胞型をhigh-gradeと

したほうがよいと考える。なお、PCNA陽性率とAgNOR数はともに再発例で高値を示したが(図4参照)、生物学的悪性度との関連性を知るためには、症例数の増加と観察期間の延長が必要と考える。

まとめ

胃悪性リンパ腫18例の切除材料を用いて、PCNAとAgNORの発現を比較した結果、

- 1) PCNA陽性率とAgNOR数は、 $r=0.77$ とよく相関した。
- 2) 両者の発現は、MALTリンパ腫、混合型および大細胞型の順に有意に増加した。
- 3) 両者の発現は、腫瘍の深達度に相関して増加し、再発例で高値を示した。

本稿の要旨は、第78回日本消化器病学会総会(1992年4月東京)において発表した。

文献

- 1) Quinn, C. M. & Wright, N. A. : The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours. *J. Pathol.*, **160** : 93-102, 1990.
- 2) Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., et al. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections. *J. Pathol.*, **162** : 285-294, 1990.
- 3) Crocker, J. & Nar, P. : Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.*, **151** : 111-118, 1987.
- 4) 本告 匡, 小島 勝, 長谷川かをり・他 : 胃悪性リンパ腫の病理組織分類. 胃悪性リンパ腫-病理・診断・治療-, 10-19, 丸善, 東京, 1991.
- 5) Isaacson, P. G. & Spencer, J. : Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. *Histopathology*, **11** : 445-462, 1987.
- 6) Spencer, J., Diss, T. C. & Isaacson, P. G. : Primary B cell gastric lymphoma. A genotypic analysis. *Am. J. Pathol.*, **135** : 557-564, 1989.
- 7) 横田欽一, 奥山修兒, 結城正光・他 : 胃悪性リンパ腫の生検診断-AgNOR染色の有用性と限界について-. 日消誌, **90**(3) : 637-646, 1993.
- 8) Kamel, O. W., LeBrun, D. P., Davis, R. E., et al. : Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/ cyclin 19A2. *Am. J. Pathol.*, **138** : 1471-1477, 1991.
- 9) Woods, A. L., Hall, P. A., Shepherd, N. A., et al. : The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology*, **19** : 21-27, 1991.
- 10) 田中一成, 村田賀子, 柳井秀雄・他 : 大腸各種病変における proliferating cell nuclear antigen (PCNA/ cyclin)陽性細胞の組織学的検討. 日消誌, **89** : 493-497, 1992.
- 11) Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H. : Existence of two population of cyclin/ proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J. Cell. Biol.*, **105** : 1549-1554, 1987.
- 12) Krueger, G. R. F., Rojo Medina, J., Klein, H., et al. : A new working formulation of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer*, **52** : 833-840, 1983.
- 13) Houmand, A., Abrahamsen, B. & Pedersen, N. T. : Relevance of Ki-67 expression in the classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Histopathology*, **20** : 13-20, 1992.

(受付:1993.2.5.)