

## ヒト肺癌の増殖能と血管容積に関する 免疫組織化学的研究

矢満田 健

信州大学医学部第2外科学教室

(主任: 飯田 太教授)

### Immunohistochemical Studies of Proliferative Activity and Vascular Volume of Human Lung Cancer

Takeshi YAMANDA

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Futoshi IIDA)

The aims of this study were to clarify proliferative activity of lung cancer cells and the significance of small vessels in tumor tissue. Immunostaining of proliferating cell nuclear antigen/cyclin (PCNA) was used for determining the proliferative activity of cancer cells and platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) for blood microvessels.

Fifty-two lung cancers, 34 adenocarcinomas and 18 squamous cell carcinomas, surgically removed between 1991 and 1992, were used in the study. Small pieces of carcinoma tissue were fixed in methacarn solution, embedded in paraffin, sectioned and stained with PCNA and PECAM-1 monoclonal antibody.

The PCNA immunohistochemistry demonstrated higher positive rates in squamous cell carcinoma than adenocarcinoma and in less differentiated squamous cell and adenocarcinoma. It was, however, revealed that PCNA positive rates were not related to tumor size, lymph node status or appearance of distant metastasis. On the other hand, the vascular volume, represented by the ratio of the area of microvessels to that of carcinoma tissues, was remarkably lower in less differentiated cases. There was a statistically significant inverse relationship between the vascular volume and the PCNA positive rate.

PCNA immunohistochemistry thus revealed higher proliferative activity in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma and in less differentiated than in more differentiated carcinoma. Less differentiated carcinomas were characterized by poorer angiogenesis. *Shinshu Med J* 42: 547-560, 1994

(Received for publication May 31, 1994)

---

**Key words:** PCNA/cyclin, PECAM-1, proliferative activity, vascular volume, human lung cancer  
PCNA/cyclin, PECAM-1 増殖性, 血管容積, ヒト肺癌

---

#### I 緒 言

ヒトの癌組織において、癌細胞の増殖能は癌の悪性度を反映し、個々の症例の予後を推測する上の参考に

なる<sup>1)2)</sup>。一方、癌細胞の増殖、腫瘍の増大には腫瘍間質の関与も重要視されており、特に血管形成 (angiogenesis) は癌への栄養素の供給のみならず、癌の血行転移の立場からも関心が持たれている<sup>3)-7)</sup>。

癌細胞の増殖能を評価するために、以前は<sup>8)H-チミジン</sup>を用いたラジオオートグラフィーや Bromodeox-

別刷請求先: 矢満田 健

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第2外科

uridine (BrdU) を用いた免疫組織化学的染色が用いられてきたが<sup>9-11)</sup>, これらはDNA合成期(以下S期)においてDNA中に取り込まれる物質を外から投与することによって細胞増殖を評価しようとするもので、臨床材料を対象とする場合には制約が多い。最近ではパラフィン包埋切片で染色が可能という利点からProliferating cell nuclear antigen/cyclin (PCNA)<sup>12)</sup>に対する抗体が用いられつつある。PCNAはDNA polymerase $\delta$ の補助蛋白で細胞周期の第1間期(以下G1期)後期からS期にかけての細胞の核内に出現する抗原で、最近これに対するモノクローナル抗体により検出可能となり<sup>13)-20)</sup>, 甲状腺癌<sup>2)</sup>, 乳癌<sup>21)</sup>, 大腸癌<sup>22)</sup>, 中枢神経系腫瘍<sup>23)</sup>などでPCNA染色による増殖能の研究結果が報告されつつある。

腫瘍組織の血管構築を調べるために、種々の抗原をマーカーとして血管を特異的に免疫染色することが行われている。血管内皮細胞のマーカーとしてはFactor VIII関連抗原<sup>24)</sup>が、周囲の結合組織のマーカーとしてはラミニン<sup>25)</sup>等が用いられている。Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)<sup>26)</sup>は血小板の表面に発見された膜糖蛋白であり、血管内皮にも発現することが判明している。近年、この糖蛋白に対するモノクローナル抗体が精製され<sup>27)</sup>, 従来の血管マーカーより免疫染色において優れていることが明らかになった<sup>27)-30)</sup>。

癌細胞の増殖、腫瘍組織の細小血管の構築についてはそれぞれ知見が集まりつつあるが、両者の関係は解明されていない。著者は肺癌のうち臨床外科的治療の対象となる腺癌と扁平上皮癌を対象として、肺癌細胞の増殖能をPCNAに対する免疫組織化学染色を用いて、肺癌組織中の細小血管の形態および血管面積比をPECAM-1に対する免疫組織化学染色を用いて検討した。

## II 材料と方法

### A 組織材料および患者の臨床的背景

1991年から1992年にかけて原発性肺癌として信州大学医学部付属病院第2外科にて外科的に切除された肺癌組織を使用した。癌の組織型別内訳は腺癌34例(高分化型23例, 中分化型11例), 扁平上皮癌18例(高分化型4例, 中分化型9例, 低分化型5例)であった(表1)。癌の組織学的診断は今回の研究結果を知らされていない病理医によって肺癌取扱い規約<sup>31)</sup>に従い行われた。また、切除肺で腫瘍径を計測し、組織学的

表1 対象

原発性肺癌症例		52 例
腺 癌	34 例	
高分化型		23
中分化型		11
扁平上皮癌	18 例	
高分化型		4
中分化型		9
低分化型		5

リンパ節転移の有無も記録した。腫瘍径は最小13mm, 最大120mmであった。

患者の年齢は40歳から83歳, 平均63.9歳で、性別は男性27名, 女性25名であった。

### B 組織固定法

手術により摘出した肺癌組織の周辺部分から5×5×5 mmの組織片を採取し、メタカーン溶液(メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)<sup>32)</sup>にて24時間固定した後、エタノール系列で脱水して、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋組織より、ミクロトーム(ヤマト, 東京)で4  $\mu$ mの薄切片を作製し、スライドガラスに貼付した。病理学的診断のため全症例について、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

### C 免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色はHsuら<sup>33)</sup>に従い、Avidin-Biotin-complex (ABC) 法を行った。

#### 1 PCNA 染色

脱パラフィン切片を用いて、2%正常ヤギ血清(Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA)で30分、ついで抗ヒトPCNA IgM抗体(クローン19A 2, 日科機, 東京)を一次抗体として2時間湿潤箱中、室温で反応させ、ビオチン化抗マウスIgM抗体(Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA)に1時間、さらにアヴィジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ(ABC)複合体溶液(Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA)の中で一時間反応させた。一次抗体、二次抗体はそれぞれ、150mM塩化ナトリウムを含んだpH7.4の20mMリン酸緩衝液で300倍, 200倍に希釈して用いた。次に50mMトリス塩酸緩衝液で緩衝した0.05%3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩(和光純薬, 大阪)と0.01%過酸化水素を含むDAB反応液中で15分間反応、発色させた。1%メチルグリーン溶液中で核染色を行い、イソプロピルアルコールおよびキシロールにて封入した。

## 2 PECAM-1染色

脱パラフィン切片を用いて、2%正常ウマ血清 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) で30分、ついで抗PECAM-1モノクローナルIgG抗体 (クローンJC70, DAKO PATTS, Denmark) を一次抗体として2時間湿潤箱中、室温で反応させ、ビオチン化抗マウスIgG抗体 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) に1時間、さらに、PCNA染色と同様にABC溶液の中で1時間反応させた。一次抗体と二次抗体はそれぞれ150mM塩化ナトリウムを含

んだpH7.4の200mMリン酸緩衝液で10倍、200倍に希釈して用いた。DAB反応液中で15分間反応、発色させた。最後に、1%メチルグリーン溶液中で核染色を行い、封入した。

## 3 対照実験

抗体を使用しないで染色するか、一次抗体の抗ヒトPCNA IgM抗体および抗ヒトPECAM-1 IgG抗体の代わりに正常マウス血清 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) を用いて上記とまったく同様の方法で染色した。

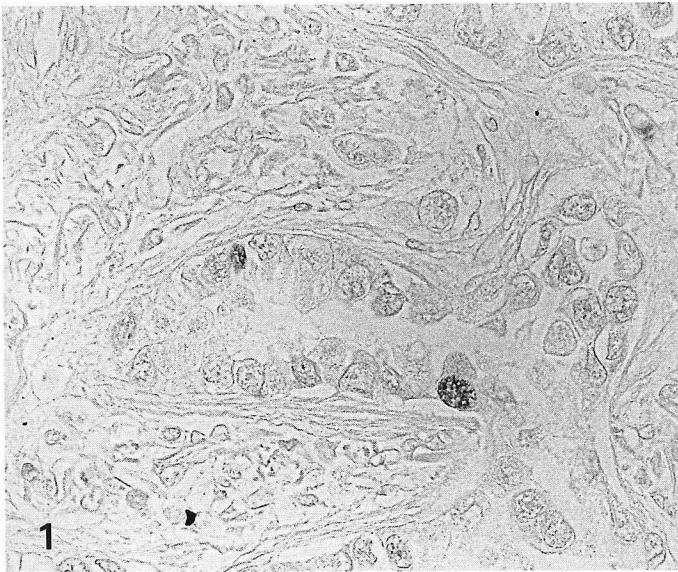


図1 高分化型腺癌のPCNA染色顕微鏡写真

陽性細胞は規則性なく分布している。倍率750倍

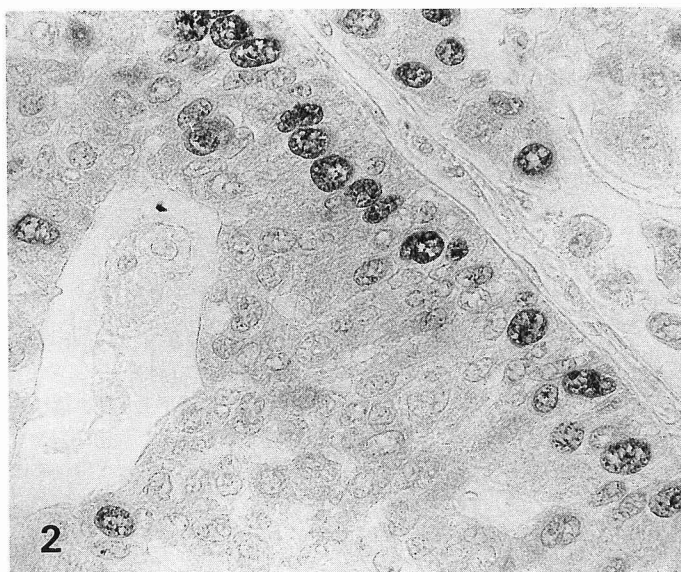


図2 中分化型腺癌のPCNA染色顕微鏡写真

癌細胞核内に陽性反応産物が観察される。陽性産物の核内出現は種々の程度に認められる。陽性細胞は癌細胞巢の周辺部分に多く認められる。倍率750倍

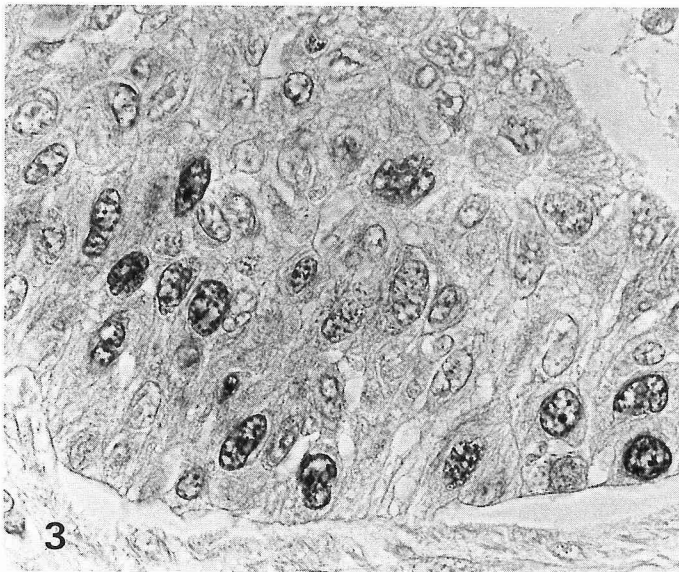


図3 中分化型扁平上皮癌のPCNA染色光顕写真

癌細胞の中心部にも陽性核が認められる。倍率750倍

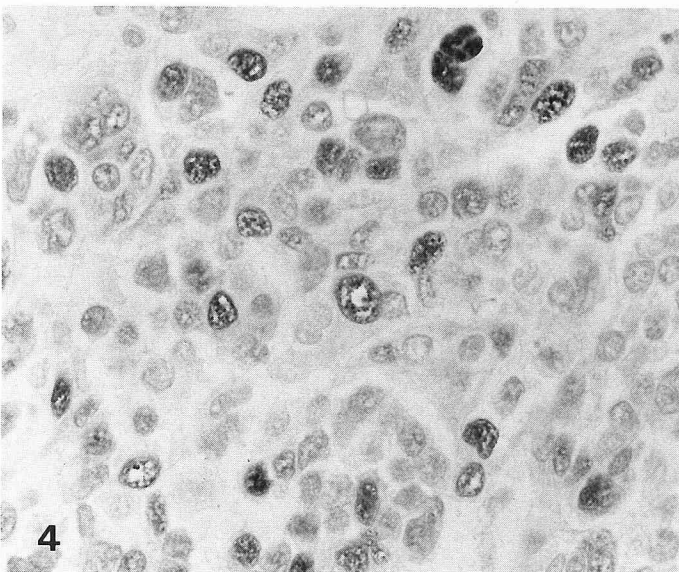


図4 低分化型扁平上皮癌のPCNA染色光顕写真

陽性核は癌組織全体に不規則に分布している。倍率750倍

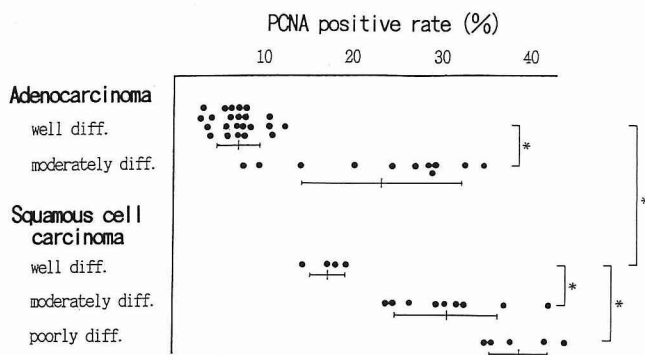


図5 組織型、組織学的分化度とPCNA陽性率の関係

腺癌に比べ扁平上皮癌の陽性率が高値であり、また両組織型ともに分化度が低いものほど陽性率は高値である。平均値±標準偏差、\*； $P < 0.01$

## D 観察法

## 1 PCNA 陽性率

染色後の切片を光学顕微鏡 Vanox AHB-LB (オリンパス光学, 東京) で観察し, それぞれの症例について比較的よい染色性が得られた部位を無作為に132倍で10枚写真撮影し, 最終的に390倍に拡大した写真を作製した。写真1枚につき100から200個の細胞を観察でき, 1症例について1,000から2,000個の細胞を算定した。

染色反応の判定は, 核内における茶褐色の反応物質の出現により判定した。S期ならびにG1後期の細胞におけるPCNA抗原の発現は濃度, 分布とも様々な核染色パターンを示すとされている<sup>34)-36)</sup>, 細胞質と比較して核が明瞭に染色された細胞をPCNA陽性細胞とした。陽性率の判定は3人(著者, 白田, 清水)で別々に行いそれぞれの値の平均値で示した。

## 2 血管面積比の計測

JC70で染色後の切片を光学顕微鏡 Vanox AHB-LB (オリンパス光学, 東京) で観察し, それぞれの症例について66倍で10枚写真撮影し, 最終的に190倍に拡大した写真を作製した。染色陽性の内皮細胞で取り囲まれた血管腔を手動的にマジックインクで塗りつぶした後, 画像解析装置 (Macintosh, Quadra 900, USA) を使用して腫瘍組織中にしめる血管面積の割合を計測し, 腫瘍組織に対する血管面積比を求めた。

## E 統計学的検討

PCNA陽性率および血管面積比は, それぞれ平均値±標準偏差で表現し, Student t-test を用いて危険率1%および5%で有意差検定を行い, 5%未満をもって有意差ありと判定した。PCNA陽性率と血管面積比との相関係数はPearsonの検定を用いて危険率1%および5%で有意差検定を行い, 危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

## III 結 果

## A PCNA 染色および陽性率

PCNA反応産物は細胞核内に種々の程度に観察され, 反応陽性細胞は切片全体にはほぼ均一に分布していた。腺癌は高分化型では癌細胞の充実性胞巣は形成せず, PCNA陽性細胞は規則性なく分布していた(図1)。中分化型では陽性細胞の分布に一定の傾向がみられないものが多かった(11例中8例)が, 図2のごとく癌胞巣の周辺部に陽性細胞が分布している症例もあった(11例中3例)。一方, 扁平上皮癌におけるPCNA陽性細胞の分布は, 高分化型, 中分化型(図3), 低分化型(図4)のいずれにおいてもPCNA陽性細胞の分布に一定の傾向はなく癌組織全体に分布していた。

PCNA陽性率を腺癌と扁平上皮癌の間で比較すると, それぞれ $12.3 \pm 9.2\%$ ,  $30.5 \pm 9.0\%$ で扁平上皮癌

表2 PCNA陽性率と腫瘍径, リンパ節および術後遠隔転移との関係

			症例数	PCNA 陽性率 (%)	
腺 癌					
腫瘍径	≤30mm	19	12.9± 9.8	] NS	
	>30mm	15	11.5± 9.0		
リンパ節転移	(+)	13	12.0± 9.2	] NS	
	(-)	21	12.7± 9.9		
術後遠隔転移	(+)	11	15.8±11.9	] NS	
	(-)	23	10.6± 7.5		
扁平上皮癌					
腫瘍径	≤30	10	30.1±10.7	] NS	
	>30	8	31.0± 7.8		
リンパ節転移	(+)	6	27.3± 8.9	] NS	
	(-)	12	36.7± 6.7		
術後遠隔転移	(+)	5	31.2± 6.7	] NS	
	(-)	13	30.1± 9.9		

NS; not significant

腫瘍径およびリンパ節転移は病理学的検索結果で示した。

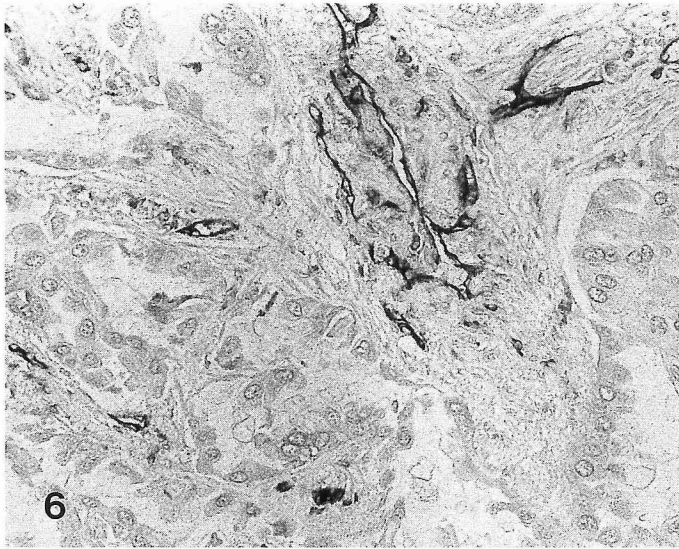


図6 高分化型腺癌のPECAM-1染色  
光顕写真

反応産物は血管内皮に発現している。癌巣周辺の肥厚した間質内に血管増生を認める。倍率225倍

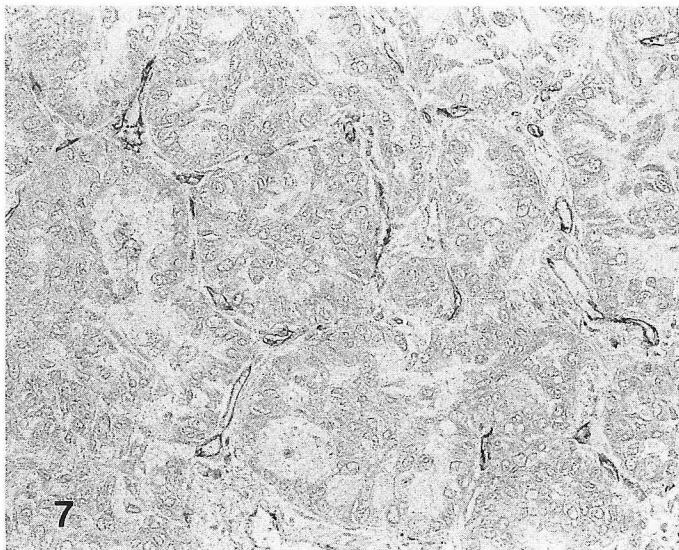


図7 中分化型腺癌のPECAM-1染色  
光顕写真

癌巣周囲のわずかな間質内に血管増生を認める。倍率225倍

は有意に ( $P < 0.01$ ) 高値であった。PCNA 陽性率を腺癌、扁平上皮癌の分化度別に比較すると図5のごとく、腺癌における陽性率は高分化型  $7.1 \pm 2.5\%$ 、中分化型  $23.2 \pm 9.0\%$  で中分化型腺癌は有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示した。一方、扁平上皮癌では高分化型、中分化型、低分化型それぞれ  $17.3 \pm 2.0\%$ 、 $30.6 \pm 5.8\%$ 、 $38.9 \pm 3.4\%$  で、中分化型および低分化型は高分化型より有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示した。

腺癌、扁平上皮癌それぞれについて PCNA 陽性率と腫瘍径およびリンパ節転移との関係を検討した。その成績は表2のごとく、腫瘍径については最大腫瘍径

が  $\leq 30\text{mm}$  群と  $> 30\text{mm}$  群間で、またリンパ節転移については転移陰性群と転移陽性群間で有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。また、術後17か月から43か月までの遠隔転移の有無と PCNA 陽性率との関係についても検討したが、両者の間に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

#### B PECAM-1染色および血管面積比

PECAM-1反応産物は血管内皮細胞に観察された。JC70で染色される血管は正常肺組織においては肺胞壁内に細い毛細血管として観察されたが、肺癌組織においては血管の断面積も様々でかなり太い血管も認め



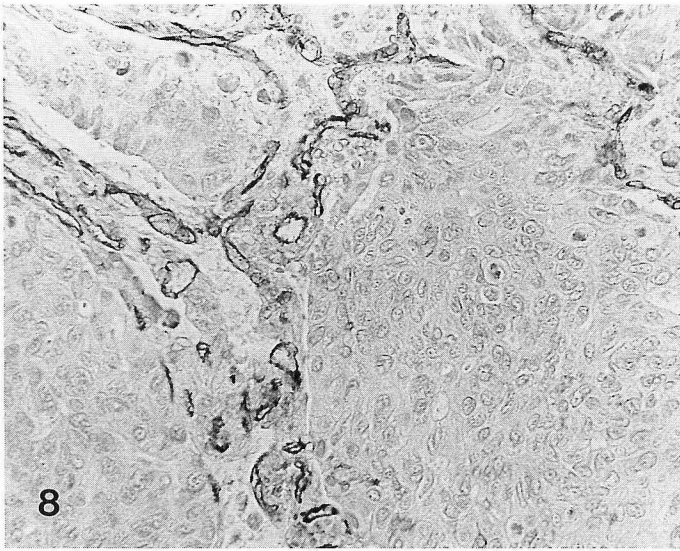


図8 高分化型扁平上皮癌のPECAM-1染色光顕写真  
癌胞巣の周囲の間質内に多数の血管増生を認める。倍率225倍

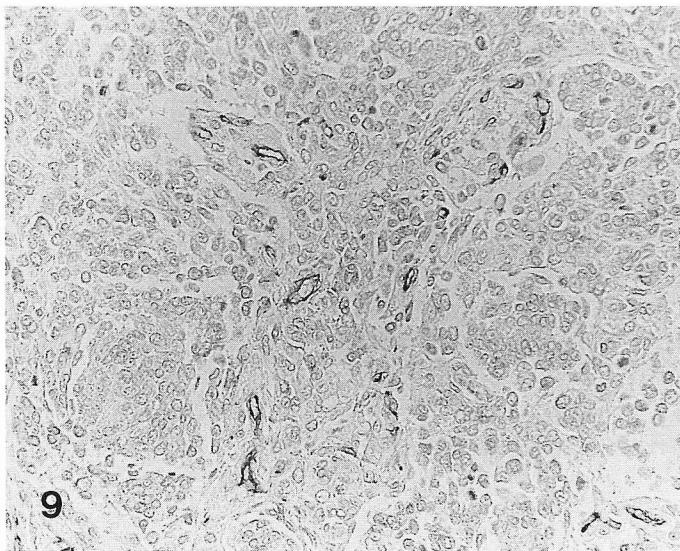


図9 低分化型扁平上皮癌のPECAM-1染色光顕写真  
血管は癌組織の中に不規則に分布し、細く未熟な形態である。倍率225倍

られた。また、血管形態も不規則であり分枝も多く認められる傾向にあった。組織型および組織学的分化度により血管形態にも差が認められた。高分化型腺癌では癌胞巣周辺の線維化により肥厚した間質に血管増生を認めた(図6)。それに対して中分化型腺癌では癌胞巣を取り巻く、わずかな間質の中に血管増生を認め、血管断面積は高分化型に比べ小さいものが多かった(図7)。高分化型扁平上皮癌では癌胞巣周囲に多数の血管断面が観察され、その太さも大小不揃いであった(図8)。低分化型扁平上皮癌では明らかな癌胞巣は形成しないため血管は癌組織内に不規則に分布し、

その形態は細く未熟で断面積は明らかに小さかった(図9)。

腫瘍組織中における血管面積の比率を組織型および分化度別に検討した。腺癌では $1.70 \pm 0.63\%$ 、扁平上皮癌では $1.58 \pm 0.80\%$ で、両群間に有意差は認められなかった( $P > 0.05$ )。血管面積比と病理学的所見との関係を検討すると、表3のごとく腺癌においては、高分化型 $1.94 \pm 0.60\%$ 、中分化型 $1.19 \pm 0.37\%$ で、両群間に有意差( $P < 0.01$ )が認められた。しかし腫瘍径およびリンパ節転移と血管面積比の間には有意差は認められなかった( $P > 0.05$ )。また遠隔転移の有無

表3 腺癌における血管面積比と病理・臨床所見との関係

病理・臨床所見		血管面積比 (%)	
組織学的分化度	高分化型 (n=23)	1.94±0.60	**
	中分化型 (n=11)	1.19±0.37	
腫瘍径	≤30mm (n=19)	1.68±0.46	NS
	>30mm (n=15)	1.72±0.83	
リンパ節転移	(+) (n=13)	1.82±0.81	NS
	(-) (n=21)	1.63±0.51	
遠隔転移	(+) (n=11)	1.96±0.79	NS
	(-) (n=23)	1.58±0.53	

血管面積比は mean±SD で示した。

\*\* ; P<0.01, NS ; not significant

腫瘍径およびリンパ節転移は病理学的検索結果で示した。

表4 扁平上皮癌における血管面積比と病理・臨床所見との関係

病理・臨床所見		血管面積比 (%)	
組織学的分化度	高分化型 (n=4)	2.69±0.79	* **
	中分化型 (n=9)	1.46±0.47	
	低分化型 (n=5)	0.91±0.10	
腫瘍径	≤30mm (n=10)	1.92±0.88	*
	>30mm (n=8)	1.16±0.46	
リンパ節転移	(+) (n=6)	1.21±0.39	NS
	(-) (n=12)	1.77±0.90	
遠隔転移	(+) (n=5)	1.11±0.49	NS
	(-) (n=13)	1.76±0.83	

血管面積比は mean±SD で示した。

\* ; P<0.05, \*\* ; P<0.01, NS ; not significant

腫瘍径およびリンパ節転移は病理学的検索結果で示した。

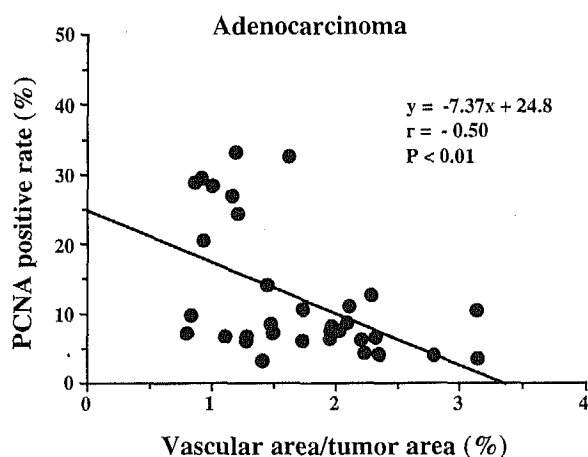


図10 腺癌における PCNA 陽性率と血管面積比の関係

両者の間に有意の負の相関が認められる。



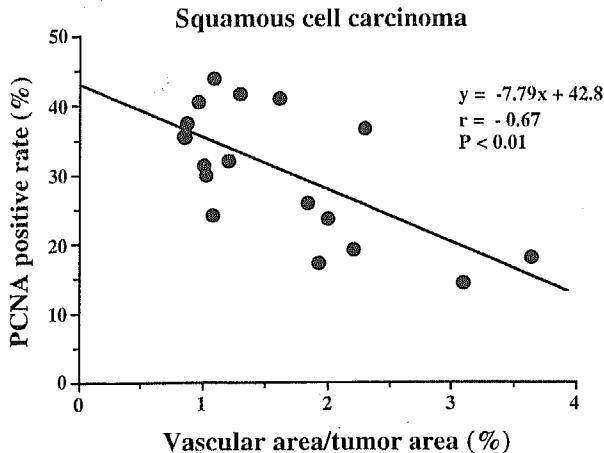


図11 扁平上皮癌における PCNA 陽性率と血管面積比の関係  
両者の間に有意の負の相関が認められる。

との間にも有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。扁平上皮癌では表4のごとく高分化型  $2.69 \pm 0.79\%$ 、中分化型  $1.46 \pm 0.47\%$ 、低分化型  $0.91 \pm 0.10\%$  で組織学的分化度の低いものほど血管面積比は低値を示した ( $P < 0.05$ )。腫瘍径との関係では  $\leq 30\text{mm}$  群は  $1.92 \pm 0.88\%$ 、 $> 30\text{mm}$  群は  $1.16 \pm 0.46\%$  で両群間に有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。血管面積比とリンパ節あるいは遠隔転移との間には有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

#### C 染色の対照実験

一次抗体を使用しなかった対照実験および一次抗体の代わりに正常マウス血清を使用した対照実験では腺癌、扁平上皮癌いずれにおいても反応は陰性であった。

#### D PCNA 陽性率と血管面積比の関係

PCNA 陽性率と血管面積比との関係を組織型別に回帰直線を求め検討した。腺癌では図10に、扁平上皮癌は図11に示した。腺癌では  $r = -0.50$ 、 $P < 0.01$ 、扁平上皮癌では  $r = -0.67$ 、 $P < 0.01$  で両群ともに PCNA 陽性率と血管面積比の間には有意の負の相関が認められた。

### IV 考 察

PCNA は細胞周期の G1 後期および S 期の細胞の核内に出現する DNA polymerase  $\delta$  の補助蛋白で<sup>12)~20)</sup>、近年 PCNA モノクローナル抗体を用いて、甲状腺腫瘍細胞<sup>2)</sup>、白血病細胞<sup>37)38)</sup>、その他種々の腫瘍細胞<sup>39)40)</sup>の増殖能が検討されつつある。本法は *in vitro* での細胞増殖能の評価が可能であるため、従来の  $^3\text{H}$ -チミジンや BrdU による S 期細胞の標識法に代わり、臨床材料を対象とした研究に有利な手段と考え

られている<sup>17)41)42)</sup>。PCNA に対する抗体としてはクローン 19A2 とクローン PC10 が組織化学的検索に利用されているが、今回の検討は 19A2 抗体を使用した。免疫組織化学において組織固定法は特に重要であるが、PCNA の抗原性は非アルデヒドであるメタカーン固定にてよく保存されると言われ<sup>32)39)43)</sup>、また 30 時間以上のホルマリン固定では 19A2 の反応性は著明に減弱するという報告があるので<sup>44)</sup>、著者はメタカーン固定を用い、固定時間および組織の大きさについても検討した上で最適の条件を設定した。

肺癌組織における PCNA 陽性細胞の分布は癌の組織型および組織学的分化度により多少異なっていた。高分化型腺癌においては陽性細胞の分布に一定の傾向は認められなかったが、中分化型腺癌では癌胞巢の周辺部に陽性細胞が多い症例もみられた (11 例中 3 例)。中分化型腺癌の中にこのような症例がみられることの意義は不明である。これに対し扁平上皮癌では分化度とは関係なく陽性細胞の分布に一定の傾向はみられなかった。教室の小出<sup>45)</sup>は著者と同じ染色法を用いて、食道の高分化型および中分化型扁平上皮癌では癌胞巢の周辺部分に陽性細胞が多いと述べている。肺癌では食道癌と異なり、明らかな角化真珠の形成はみられず、同じく高分化型あるいは中分化型扁平上皮癌といっても肺癌と食道癌ではかなり異なった分化度を意味するものと考えられる。

PCNA 陽性率による肺癌組織の増殖能を腺癌と扁平上皮癌の間で比較すると腺癌に比べ扁平上皮癌が高く、分化度別に検討した成績では腺癌、扁平上皮癌ともに組織学的分化度が低いものほど PCNA 陽性率が高いことが明らかとなり、腫瘍の増大は扁平上皮癌や

低分化癌がより速いことが推測された。病理組織学的には一般に組織学的分化度は腫瘍の悪性度を反映すると考えられているが<sup>40)</sup>、このことは今回の検討によりある程度裏付けられた。また、PCNA 陽性率はより客観的に癌の悪性度を評価する方法と考えることができる。しかし、癌の進行度を示す腫瘍径、リンパ節転移、術後遠隔転移等と PCNA 陽性率との間には有意な相関は認められず、本法は癌の悪性度を評価する方法としては適しているが、進行度を評価する方法としては不適切であると考えられた。肺癌細胞の増殖能と予後との関係について、Ten Velde ら<sup>41)</sup>は DNA フローサイトメトリーによる検討で S 期細胞の割合が高い症例は有意に予後が不良であったと報告しているが、PCNA 陽性率と予後との関連についての報告は未だなく今後の検討課題と思われる。肺癌組織の増殖能を Teodori ら<sup>42)</sup>は BrdU 標識率で検討し、BrdU の標識率と組織型、組織学的分化度、TNM 病期との間に相関は認められなかったとしている。一方、吉田<sup>43)</sup>は BrdU 標識率を用いた検討で組織型、分化度との間に著者と同様の傾向を認めて報告している。また、原<sup>44)</sup>は Ki-67 による免疫組織化学的染色により、腺癌よりも扁平上皮癌が陽性率が高いという著者と同様の結果を報告している。Fontanini ら<sup>50)</sup>はホルマリン固定標本で、PC10 抗体を使用して、非小細胞肺癌の増殖能を検討し、腫瘍径の大きな組織、より進行した肺癌に PCNA 陽性率が高値であったと報告している。折橋<sup>51)</sup>は扁平上皮癌についてホルマリン固定標本で PC10 抗体を用いて検討し、分化度と陽性率との間に有意差を認めなかったと報告している。今回の検討では基礎実験により固定条件を設定したメタカーン固定標本に 19A2 抗体を使用し得られた成績であるが、固定条件および抗体の相違が諸家の報告不一致の原因ではないかと考えられる。

PECAM-1<sup>20)</sup>は血小板の表面に発現する膜糖蛋白であるが、この糖蛋白が血管内皮細胞にも発現し、細胞接着に関与するものと考えられている。Parums ら<sup>27)</sup>により PECAM-1 に対するモノクローナル抗体 JC70 が使用可能となり、これまで血管内皮のマーカーとされてきた Facter VIII 関連抗原やラミニンなどより優れた血管内皮の免疫組織化学的マーカーと考えられている<sup>27)-30)</sup>。

腫瘍組織内における細小血管の分布はその腫瘍の形態構築や増大速度などに深く関係していると思われる。腫瘍組織の細小血管は腺癌のうちでも高分化型では癌

胞巣周辺の線維化により肥厚した間質内に、中分化型では癌胞巣を取り巻くわずかな間質内に分布していた。一方、扁平上皮癌の高分化型および中分化型では癌胞巣と間質がほぼ明瞭に分離されており、細小血管は癌胞巣周囲の間質内に分布していたのに対し、低分化型では腫瘍組織内に不規則に分布し、その形態も分化度が低いほど細く未熟であった。以上の細小血管の分布から、肺癌の組織型および分化度による癌胞巣と間質の関係がより明らかにされた。

血管面積比の形態計測の結果、腺癌、扁平上皮癌ともに、分化度が低いものほど、血管面積比が小さいという結果が得られた。面積比はステレオロジーによる解析において体積比の指標とも言われているので<sup>52)</sup>、分化度が低いものほど体積比、すなわち血管容積が小さいと考えられた。Hori ら<sup>53)</sup>はラットに培養肝癌細胞ならびに肺癌細胞を使用した実験で、腫瘍の増大に伴い腫瘍内には血管が少ない部分が出現することを証明し、正常組織と比較し腫瘍組織への血液供給は相対的に少ないと報告している。また Adachi ら<sup>54)</sup>は早期胃癌組織の血管構造をシリコンゴム化合物の血管内注入により解析した結果、血管分布は分化型癌では正常ないし多いのに対し、未分化型癌では明らかに少ないという結果を報告している。今回の結果およびこれらの報告は、腫瘍内血管の形状および容積の分析が肺癌の悪性度の評価の一助になる可能性を示唆していると考えられた。腫瘍組織内の血管の数の検討で Weidner ら<sup>9)</sup>、Horak ら<sup>6)</sup>は乳癌組織において単位面積あたりの血管数の多いものはリンパ節あるいは遠隔転移の出現頻度が高く、予後も不良であると報告しているが、今回の検討では、肺癌のリンパ節あるいは遠隔転移出現と腫瘍組織内血管容積との関連は認められなかった。

血管面積比と PCNA 陽性率の関係を検討したところ負の相関が認められた。PCNA 陽性率は癌の分化度と相関するので、分化度が低く、増殖能の高い腫瘍ほど血管容積が小さいという事実が明らかにされた。つまり、肺癌においては腺癌、扁平上皮癌ともに癌組織の分化度が低いほど、あるいは癌細胞の増殖能が高いほど血管新生能力は低いと考えられた。血管新生に関与する因子 (angiogenic factor) として acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic FGF (bFGF), angiogenin, transforming growth factor  $\alpha$  および  $\beta$  (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) などが発見され、腫瘍組織においては腫瘍細胞がこれらの因子を放出し、血管

新生をもたらしていると考えられている<sup>55)</sup>。また最近、腫瘍細胞の核に存在する bFGF は腫瘍細胞の自発的増殖にも関与していると報告されている<sup>56)</sup>。これらの因子の機能発現様式の詳細に関しては未だ十分明らかにされていないが、腫瘍細胞の増殖能と腫瘍組織内における血管増生との間には何らかの関連があることを示唆している。血管新生因子は量的な因子以外に血管の質的な性格を規定しているとも考えられているが<sup>55)</sup>、腫瘍組織中の血管の透過性は正常組織と比較して高いという報告<sup>57)58)</sup>もあり、血管の量的な分析に加えて質的な検討も今後の重要な研究課題である。

## V 結 語

ヒト肺癌組織において、免疫組織化学的手法を用いて、肺癌細胞の増殖能および腫瘍組織内の細小血管の形態観察および血管容積を研究し、以下のことが明らかとなった。

- 1) 肺癌における PCNA 陽性細胞は中分化型腺癌の中には癌巣の周辺部に分布する症例もみられたが、多くの症例では高分化型腺癌および扁平上皮癌と同様、一定の傾向はみられなかった。
- 2) PCNA 陽性率からみた癌細胞の増殖能は腺癌に比べ扁平上皮癌が高かった。また両組織型ともに組

織学的分化度の低いものほど、癌細胞の増殖能が高かった。

- 3) 腫瘍組織中の血管形態および分布は組織学的分化度により異なった。血管面積は、腺癌、扁平上皮癌ともに分化度が低くなるほど低値であった。
- 4) 癌細胞増殖能と腫瘍内血管面積との間には負の相関が認められた。
- 5) PCNA 陽性率により肺癌細胞の悪性度の一側面を明らかにすることができ、腫瘍組織中の細小血管の形態および血管面積の検討により腫瘍と血管新生との関係について新知見を得た。

本論文の要旨は、第50回日本癌学会総会（1991年9月、東京）、第51回日本癌学会総会（1992年9月、大阪）、第44回胸部外科学会総会（1992年10月、新潟）、第93回日本外科学会総会（1993年4月、仙台）において発表した。

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に御助言、御指導を賜った解剖学第1教室永田哲士教授、および PCNA 陽性率の判定に御協力頂いた解剖学第1教室臼田信光助教授および外科学第2教室清水忠博医師に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ten Velde GPM, Schutte B, Vermeylen A, Volovics A, Reijnders MMJ, Blijham GH: Flowcytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin embedded tissue of non-small lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 455-460, 1988
- 2) Shimizu T, Usuda N, Yamanda T, Sugeno A, Iida F: Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer* 71: 2807-2812, 1993
- 3) Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM: Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. *Cancer Res* 34: 997-1004, 1974
- 4) Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 133: 419-423, 1988
- 5) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 6) Horak ER, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340: 1120-1124, 1992
- 7) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlated with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143: 401-409, 1993
- 8) Galand P, Maignet P, Argullo M, Chretien J, Douvils N: In vitro autoradiographic studies of cell

- proliferation in the gastrointestinal tract of man. *J Nucl Med* 9: 37-39, 1968
- 9) Bleiberg H, Galand P: In vitro autoradiographic determination of cell kinetic parameters in adenocarcinomas and adjacent healthy mucosa of the human colon and rectum. *Cancer Res* 36: 325-328, 1976
  - 10) Meyer JS, Hixon B: Advanced stage and early relapse of breast carcinoma associated with high thymidine labeling indices. *Cancer Res* 39: 4042-4047, 1979
  - 11) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475, 1982
  - 12) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234, 1978
  - 13) Bravo R, Fey SJ, Bellantin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE: Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp Cell Res* 136: 311-316, 1981
  - 14) Celis JE, Bravo R: Synthesis of the nuclear protein cyclin in growing, senescent and morphologically transformed human skin fibroblast. *FEBS Lett* 165: 21-25, 1984
  - 15) Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166: 209-219, 1986
  - 16) Celis JE, Madsen P, Nielsen S, Celis A: Nuclear patterns of cyclin (PCNA) antigen distribution subdivide S-phase in cultured cells-some applications of PCNA antibodies. *Leuk Res* 10: 237-249, 1986
  - 17) Ogata K, Kurki P, Celis JE: Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated DNA replication. *Exp Cell Res* 168: 475-486, 1987
  - 18) Prelich G, Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B: The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 326: 471-475, 1987
  - 19) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Bravo HM: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein DNA polymerase-delta. *Nature* 326: 515-517, 1987
  - 20) Celis JE, Madsen P, Celis A, Nielsen HV, Gesser B: Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway (s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 220: 1-7, 1987
  - 21) Battersby S, Anderson TJ: Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *Hum Pathol* 21: 781, 1990
  - 22) 田中松平, 大村健二, 石田文生, 渡辺洋宇: 大腸腫瘍における K-ras 変異および PCNA 標識率を用いた細胞動態に関する検討. *日外会誌* 94: 1249-1255, 1993
  - 23) Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Palma PD, Barbareschi M: Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Arch [A]* 419: 417-423, 1991
  - 24) Mukai K, Rosai J, Burgdorf WHC: Localization of FVIII-Rag in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method: *Am J Surg Pathol* 4: 273-276, 1980
  - 25) Barsky SH, Baken A, Siegal GP: Use of antibasement membrane antibodies to distinguish blood vessel capillaries from lymphatic capillaries. *Am J Clin Pathol* 7: 667-677, 1984
  - 26) Albela SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114: 1059-1068, 1991
  - 27) Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY: JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43: 752-757, 1990
  - 28) Burgdorf WHC, Mukai K, Rosai J: Immunohistochemical identification of factor VIII related antigen in

- vascular endothelial cells of cutaneous lesions alleged vascular nature. *Am J Clin Pathol* 75 : 167-171, 1981
- 29) Ordenez NG, Batsakis JG : Comparison of *Ulex europaeus* lectin and Factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using the immunoperoxidase method. *Arch Pathol Lab Med* 108 : 129-132, 1984
  - 30) Stephenson TJ, Mills PM : Monoclonal antibodies to blood group isoantigens : an alternative marker to factor VIII-related antigen for benign and malignant vascular endothelial cells. *J Pathol* 147 : 139-148, 1985
  - 31) 日本肺癌学会編：肺癌取扱い規約第3版．金原出版，東京，1987
  - 32) Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM : Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. *Histochemistry* 21 : 97-116, 1970
  - 33) Hsu SM, Raine L, Fanger H : A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying peptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75 : 734-738, 1981
  - 34) Celis JE, Celis A : Individual nuclei in polykaryons can control cyclin distribution and DNA synthesis. *EMBO J* 4 : 1187-1192, 1985
  - 35) Celis JE, Celis A : Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : subdivision of S phase. *Cell Biol* 82 : 3262-3266, 1985
  - 36) Bravo R : Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 163 : 287-293, 1986
  - 37) Keim D, Hailat N, Hodge D, Hanash SM : Proliferating cell nuclear antigen expression in childhood acute leukemia. *Blood* 76 : 985-990, 1990
  - 38) Takasaki Y, Robinson WA, Tan EM : Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Immunol* 73 : 655-661, 1984
  - 39) Garcia RL, Cortrera MD, Gown AM : Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* 134 : 733-739, 1989
  - 40) Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 111 : 841-845, 1987
  - 41) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM : A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154 : 1899-1909, 1981
  - 42) Waseem NM, Lane DP : Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Cell Sci* 96 : 121-129, 1990
  - 43) Coltrera MD, Gown AM : PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem Cytochem* 39 : 23-30, 1991
  - 44) Arnold BG, Onsi WK, David PL, Roger AW : Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using two anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 141 : 1453-1458, 1992
  - 45) 小出直彦：食道癌の細胞増殖と細胞死に関する組織化学的研究．*信州医誌* 42 : 379-388, 1994
  - 46) Chung CK, Zaino R, Stryker JA, Neill M, Munth WE : Carcinoma of the lung : Evaluation of histological grade and factors influencing prognosis. *Ann Thorac Surg* 33 : 599-604, 1982
  - 47) Teodori L, Trinca ML, Goehde W, Hemmer J, Salvati F, Storniello G, Francesco M : Cytokinetic investigation of lung tumors using the anti-bromodeoxyuridine (BrdU) monoclonal antibody method : comparison with DNA flow cytometric data. *Int J Cancer* 45 : 995-1001, 1990
  - 48) 吉田勝明：抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた肺腺癌細胞増殖動態の解析．*東医大誌* 46 : 104-116, 1988
  - 49) 原 享子：Ki-67を用いた肺癌の増殖能の検討．*肺癌* 33 : 177-186, 1993

- 50) Fontanini G, Pingitore R, Bigini D, Viganti S, Pepe S, Ruggiero A, Maccharini P: Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labeling and DNA flow cytometry data. *Am J Pathol* 141: 1285-1290, 1992
- 51) 折橋典大: 肺扁平上皮癌に対する抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色の臨床的検討—手術標本および経気管支生検標本での染色パターン—. *肺癌* 33: 897-904, 1993
- 52) 永田哲士: 顕微鏡的形態計測の原理と手技. *細胞* 8: 283-303, 1976
- 53) Hori K, Suzuki M, Tanda S, Saito S: Characterization of heterogeneous distribution of tumor blood flow in the rat. *Jpn J Cancer Res* 82: 109-111, 1991
- 54) Adachi Y, Mori M, Enjoji M, Sugimachi K: Microvascular architecture of early gastric carcinoma. *Cancer* 72: 32-36, 1993
- 55) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 56) Nishikawa K, Yoshitake Y, Minemura M: Localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in a metastatic cell line (AT-3) established from the Dunning prostatic carcinoma of rat: application of a specific monoclonal antibody. *Adv Exp Med Biol* 324: 131-139, 1992
- 57) Heuser LS, Miller FN: Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer* 57: 461-464, 1986
- 58) Nugent LJ, Jain RK: Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 44: 238-244, 1984

(6. 5. 31 受稿)