

経皮的吸引針生検組織を用いた肝細胞癌の悪性度判定に関する検討

仙石 宣彦

肝細胞癌 (HCC) における組織学的分化度と生物学的悪性度の比較・検討と、さらに内科的治療例に対する予後判定の指標を得る目的で、種々の組織学的マーカー染色を経皮的吸引針生検組織を用いて検討した。マーカー検索は、Ki-67, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) および p53 の免疫染色と、AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer regions) 染色を行った。材料は肝細胞癌 60 症例 68 腫瘍から経皮的吸引針生検によって得られた HCC 組織の 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋組織標本を用いた。免疫染色ではそれぞれの Labeling Index (LI) を求め、AgNORs では、Type 1 (核小体そのものを表す)、Type 2 (Type 1 内の辺縁部に small black dot が集まったもの)、Type 3 (核小体に cluster 状に集簇した dot)、と Type 4 (核小体外に孤立性に散在する dot) に分類し、Type 2~4 の細胞 100 個あたりの count 数を計測して検討した。疾病対照としては肝硬変 (LC, 25 例)、慢性持続性肝炎 (CPH, 11 例) を用いた。

HCC の Edmondson グレード (以下 Ed) I~III の各グループ間での上記各マーカーの染色結果は、Ki-67, p53, AgNORs Type 3 および 4 では Ed の上昇すなわち HCC 細胞の分化度の低下にしたがってそれぞれの平均計測値が増大したので、HCC における脱分化と増殖能の増大ないし遺伝子変異との関連性が示唆された。PCNA は CPH で有意に低値であったが、LC と HCC の各組織型間の相関はみられなかった。AgNORs Type 2 は LC でもっとも高値で、HCC では Ed I~III にしたがって漸減したので、今回の検索材料においては、それは細胞の脱分化に逆相関することが示唆された。

肝動脈塞栓療法+経皮的エタノール局注療法を受けた HCC 症例のうち、単発性で境界明瞭な、3 cm 径以下の Ed I 病変について、治療後 1 年以内の再発の有 (n=13)、無 (n=15) により 2 群に分け、各種マーカーの染色性を比較すると、Ki-67, p53, AgNORs Type 3 および 4 の平均計測値が統計的には有意差はなかったが、再発群でそれぞれ高値であった。また、これらのマーカーで非常に高い計測値を示すものはほとんど再発群に属していた。これらマーカー染色性による両群判別の意義を検討すると、p53 染色性が両群を分けるのに有意な要素であった。

(平成 6 年 10 月 20 日採用)

A Study of Prediction of the Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Using Aspiration Needle Biopsy Tissues

Nobuhiko Sengoku

川崎医科大学附属川崎病院 病理部
〒700 岡山市中山下2-1-80

Department of Pathology, Kawasaki Hospital, Kawasaki
Medical School : 2-1-80 Nakasange, Okayama, 700 Japan

This study was made to examine the correlations between grades of histological differentiation and grades of biological malignancy in hepatocellular carcinoma (HCC) and to obtain a possible prognostic indication in HCC patients who are to receive transcatheter arterial embolization and/or percutaneous ethanol injection therapy. To do this, I used aspiration needle biopsy specimens from HCC with several histological markers.

The markers examined included immunostains of Ki-67, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and p53 as well as stains of AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer regions). The materials were obtained from 68 tumors in 60 cases of HCC and the specimens were 10% formalin-fixed and paraffin-embedded. The labeling index (LI) was calculated for the immunostain and the following categorization was made for the evaluation of AgNORs stains; Type 1 (suggesting nucleoli), type 2 (showing small black dots within nucleoli along the margin), type 3 (showing clustered black dots within nucleoli) and type 4 (showing scattered black dots on the outside of nucleoli). Specimens similarly obtained from liver cirrhosis (LC, 25 cases) and chronic persistent hepatitis (CPH, 11 cases) were used for disease controls.

The mean values in the LI of Ki-67 and p53 as well as in the count of AgNORs types 3 and 4 increased, respectively, as Edmondson (Ed)-grades of HCC increased from I to III, suggesting a correlation between cellular dedifferentiation and proliferating potentials as well as a gene mutation in HCC. The LI of PCNA was significantly low in CPH, but revealed no significant correlation between LC and each Ed-grade of HCC. The mean count of AgNORs type 2 was the highest in LC and decreased as Ed-grades increased, suggesting its reverse correlation with cellular dedifferentiation in the present series of investigations.

The stainability of each marker examined was compared between two groups of recurrent (n=13) and non-recurrent (n=15) cases of HCC, which were confirmed by one year follow-up after combined transcatheter arterial embolization and percutaneous ethanol injection therapy. For this comparison, 28 cases with solitary defined tumors smaller than 3 cm in diameter and comprised histologically of Ed-grade I were selected from the 60 cases of HCC.

The mean values of Ki-67, p53, AgNORs type 3 and 4 appeared, respectively, to be higher in the recurrent group of HCC than in the non-recurrent group, though statistically insignificant. It was found that most cases with very high values of these markers were of the recurrent group. A multivariate study for division of the two groups of HCC was made of the marker stainability examined, and it indicated a significant value in p53. (Accepted on October 20, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(4): 253-

266, 1994

Key Words ① Hepatocellular carcinoma ② Histological markers
③ Biopsy specimens

は じ め に

悪性腫瘍の予後に影響を及ぼす要因としては、腫瘍の悪性度、発生部位、年齢、基礎疾患を有するか否かなど様々な要素が絡んでいるが、もっとも大きな意味を持つのは腫瘍自体の生物学的悪性度であり、それを表現する因子として腫瘍細胞の増殖能あるいは増殖速度が重視されている¹⁾。病理学的な腫瘍診断学においては、基本的に細胞異型性あるいは構造異型性の程度を形態学的に判断して、それぞれの腫瘍の“分化度”を判定し、より低分化な腫瘍ほど悪性度も高いと一般的に考えられている。しかしそのような組織形態学的分類と臨床的予後の相関は必ずしも明らかではなく、また、類似した組織学的分化度を呈するものでもその生物学的悪性度は症例によってかなりの違いが存在することは経験的に知られている。近年種々の細胞増殖能マーカーの登場により、様々な悪性腫瘍においてそれらのマーカーによる検討がなされ、予後との関連についても論じられている。それらマーカーと予後との関連については多くの場合手術例についての研究であるが、今回筆者は、肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; 以下 HCC と略) の経皮的吸引針生検組織を用いて、組織学的分化度と生物学的悪性度との関係を検討し、さらに内科的治療例における予後判定の可能性を求めるため、種々の組織学的マーカーの染色結果と治療後再発性との関係についてレトロスペクティブに検討した。

材料および方法

1. 材 料

対象は川崎病院内科および川崎医大内科における HCC 60 症例で、材料はその 68 病変から経皮的吸引針肝生検によって得られた HCC 組織の 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋組織切片を用いた。これら HCC の Edmondson グレード分類別の内訳は、グレード I が 48 例、II が

20 例、III が 9 例であった。1 切片中に異なるグレードが混在する場合は、それらは別々の組織型とみなした。疾病対照としては肝硬変 (以下 LC と略, 25 例)、慢性持続性肝炎 (以下 CPH と略, 11 例) を用い、それぞれについて同様の方法によって標本作製されたものを用いた。

2. 方 法

1) 免疫染色

PCNA (Novocastra Laboratory, PC-10), Ki-67 (Immunotech S. A., MIB-1), p53 (Oncogene Science, Ab-6), のそれぞれモノクローナル抗体を用いて、上記材料を対象に Labeled Streptavidin-biotin 法によって免疫染色を行った。呈色には DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) を用いた。なお、各抗体の染色操作に先立って、脱パラフィン切片に対しクエン酸バッファーとともにマイクロウェーブ照射による前処理を行ったが、Ki-67, p53 では 100°C 3 分間×5 回、PCNA の場合には 5 分間×2 回、それぞれ照射した。

2) AgNORs 染色

Crocker の方法²⁾にしたがった。すなわち、上記材料を脱パラフィン、蒸留水にて水洗後、1%ゼラチン・1%蟻酸液と 50%硝酸銀液を 1:2 の割合に混合したものを染色液とし、暗室にて 30 分反応させた。反応後は脱イオン水で水洗した後、型どりの脱水、透徹、および封入を行った。

3) 計 測 法

免疫染色の標本に関しては、それぞれの標本で 200 倍視野のカラー写真を撮り、その写真上でもっとも多数の細胞が集まっている部分を中心に一定範囲を設定し、その内における、陽性核細胞のパーセンテージをそれぞれの Labeling Index (以下 LI と略) とした。特に PCNA では淡く染まる核と濃く染まる核が混在してしまわれたが、強陽性に染色されるものは S 期、淡いものはそれ以外といわれるので³⁾、S 期とみなされるもののみを選んで LI を計算した。

AgNORs では油浸レンズを用いた 1000 倍視野で細胞 100 個あたりの AgNOR 数を後述の分類

にしたがって count した。

4) 検索マーカーの概要

I. PCNA⁴⁾

PCNA (proliferating cell nuclear antigen, 増殖細胞核抗原) は cyclin とも呼ばれる非ヒストン核蛋白質 (分子量 36kD) で、増殖サイクルの主として G 1 後期から S 期にかけて細胞核内に蓄積し、DNA ポリメラーゼ δ の補助因子として機能することが知られている。

II. Ki-67

Ki-67 は Gerdes ら⁵⁾ により最初に報告された、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り、cell cycle 中のすべての細胞の核と反応するとされている⁶⁾。以前は凍結切片でしか使えなかったが、最近ホルマリン固定パラフィン包埋切片に適用可能な抗体が市販された。

III. AgNORs

NORs (nucleolar organizer regions) とは核小体関連の ribosomal DNA のループを形成してる構造の名称であり、この DNA は RNA polymerase I により ribosomal RNA に転写される。この NORs は DNA \rightarrow RNA \rightarrow 蛋白質という細胞の基本的な活動を深く関与しており、その数などが細胞の代謝や増殖などと深く関連していることが以前より推察されてきた。NORs の遺伝子は 13, 14, 15, 21, 22 の染色体上に存在する

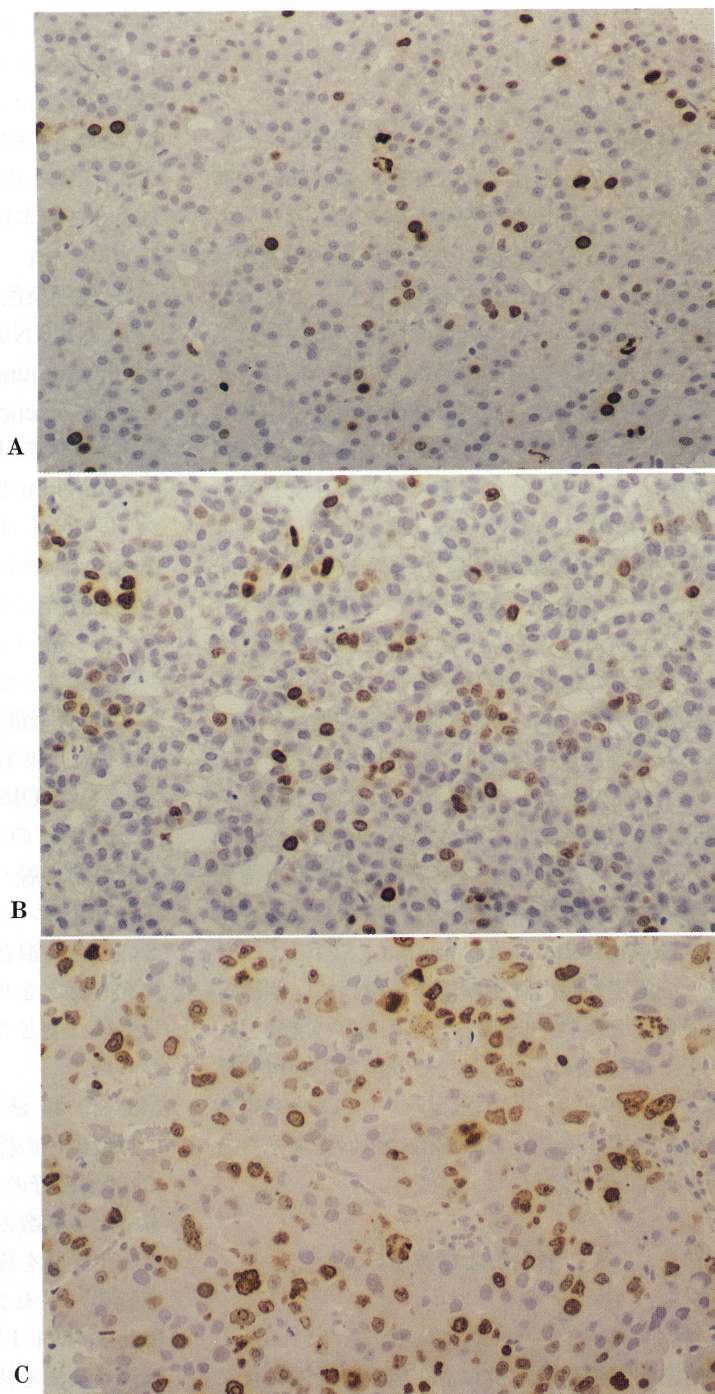


Fig. 1. Immunostains for Ki-67 on HCC of Edmondson grade I (A), II (B) and III (C). Distinct positive brown stains are evident in nuclei. The labeling index increased corresponding to the grade of Edmondson. LSAB \times 200

が、1986年 Ploton ら⁷⁾ によって簡単な一種の鍍染色法により通常の病理組織標本上で NORs 関連蛋白を観察できることが明らかとなり、AgNORs 法として近年腫瘍動態の研究に用いられるようになってきた。

IV. p53⁸⁾

p53 遺伝子は、1979年に DNA 腫瘍ウィルス SV40 でトランスフォームした細胞内でウィルス蛋白と結合する細胞内蛋白をコードする遺伝子として同定されたもので、癌抑制遺伝子と癌遺伝子の両面性を持っている。培養細胞のトランスフォーメーションを引き起こすことから当初は癌遺伝子としての役割が考えられたが、人のいくつかの腫瘍で 17p 上のゲノムの欠失が明らかにされ、癌抑制遺伝子としての可能性が考えられるようになった。さらに、トランスフォーム能を持つ p53 遺伝子は変異型で癌の増悪因子としても働き、正常 p53 遺伝子は逆に細胞増殖を抑制する機能を有することが報告された。

結 果

I. 各種マーカーの染色結果

1) Ki-67 (Fig. 1)

Ki-67 の陽性細胞は **Figure 1** に示すように、核に一致して非常に明瞭な染色性が認められた。個々の陽性細胞間には染色強度のばらつきが比較的少なく、また、陽性、陰

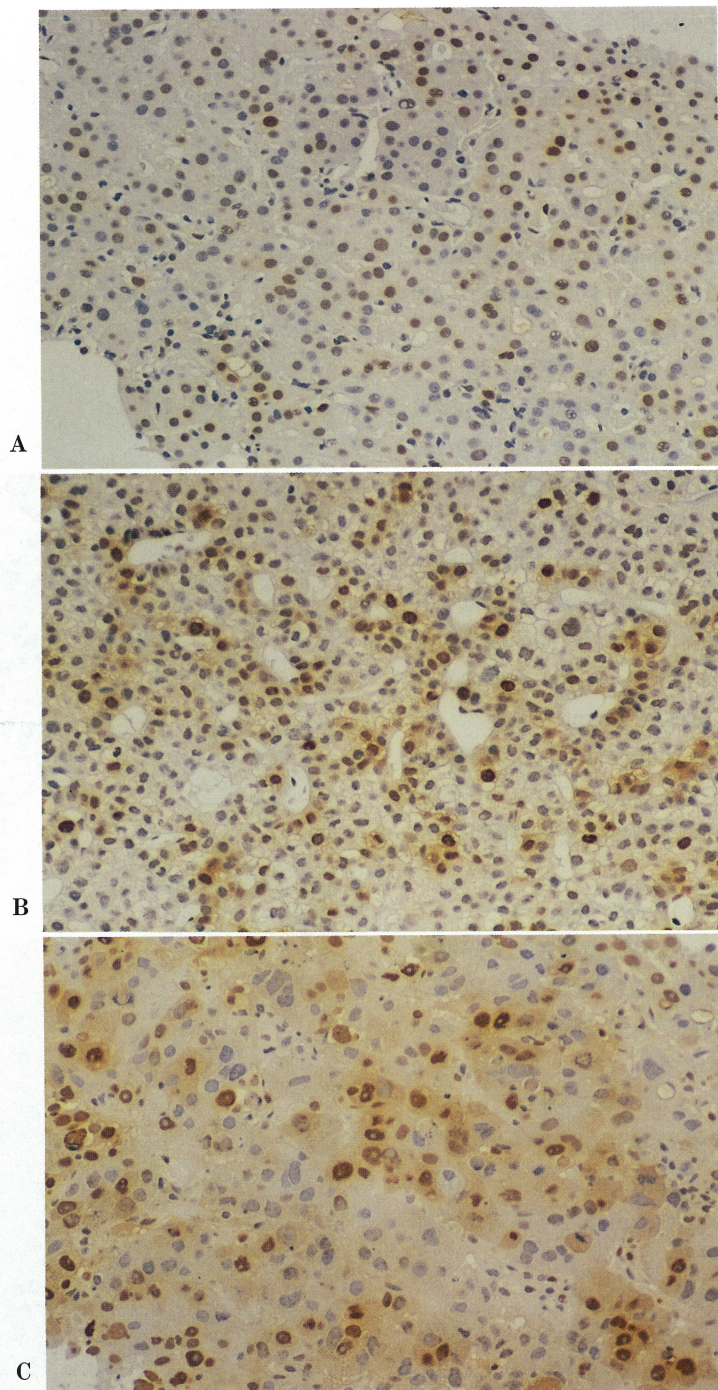


Fig. 2. Immunostains for PCNA on HCC of Edmondson grade I (A), II (B) and III (C). Positive brown stains in nuclei very considerably. The strongly stained cells may represent S-phase cells. LSAB×200

性の区別が容易であった。しかし **Figure 1A, B, C** に示すように Edmondson グレード I では核はほぼ一様に染まるが、グレード II, III と分化度が低下するにつれて陽性核内に black dot が出現するなど、染色の不均一性が目立つようになった。

2) PCNA (Fig. 2)

PCNA 免疫染色でも核に一致した陽性像を示したが、Ki-67 に比べ染色強度のばらつきが多かった。このなかで、強陽性のものは S 期の細胞を表し、淡く染まるものはそれ以外、すなわち G1 後期のものとされ、一般に S 期のものを選んで count される³⁾。しかし実際にはそれらの判別は必ずしも容易ではないので定量的評価にはやや問題があった。

3) p53 (Fig. 3)

p53 の免疫染色でも陽性像は核に認められたが、PCNA 染色と同様に陽性像のばらつきが多かった。Edmondson グレード I の症例では LI が低値を示すものが多いが、グレード II, III になると over expression を示すものが増加した。

4) AgNORs

AgNORs 法によって陽性となるものは核内に黒色の dot または area として存在する。今回筆者は N. Kawase らの分類にほぼ準じて⁹⁾、AgNORs 陽性核内物質を **Figure 4** に示したような 4 種類のパター

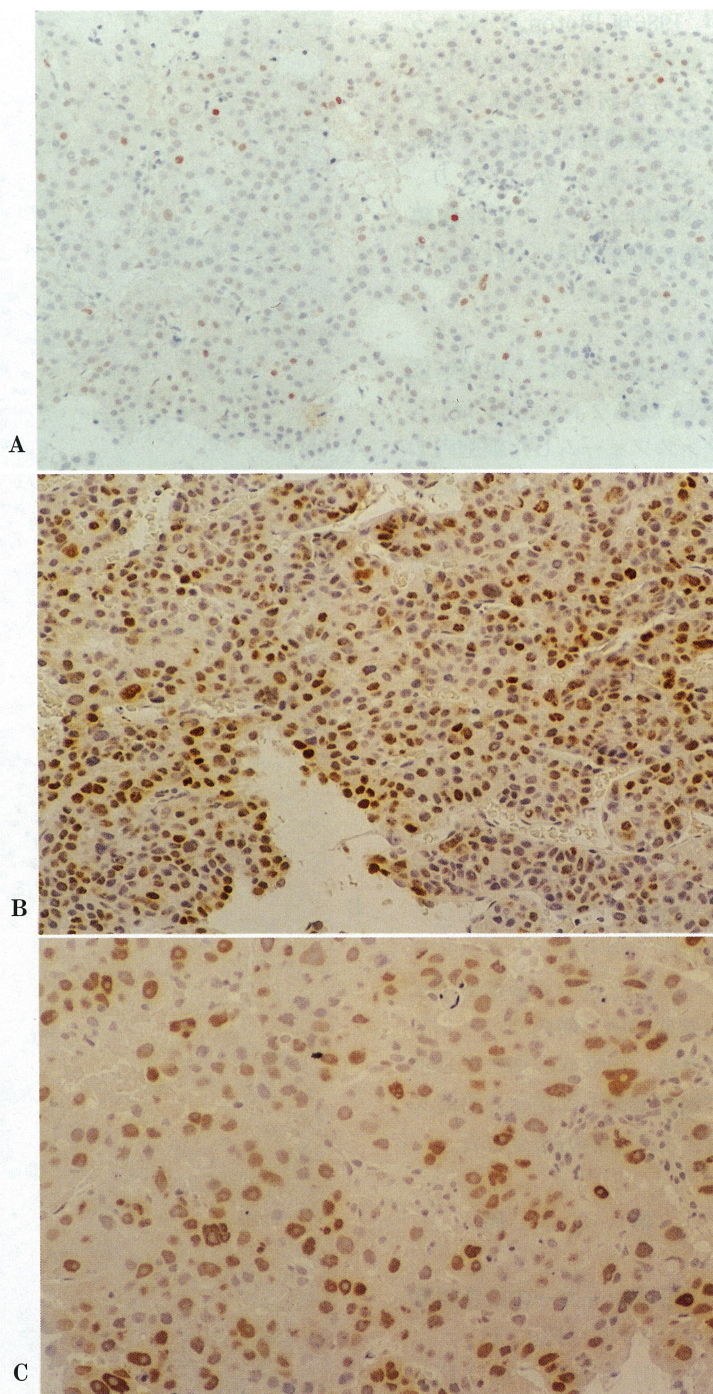


Fig. 3. Immunostains for p53 on HCC of Edmondson grade I (A), II (B) and III (C). Positive brown stains are seen in nuclei. The labeling index was very low in many cases of Edmondson grade I while it was often overexpressed in cases of Edmondson grade II (B) and III (C). LSAB×200

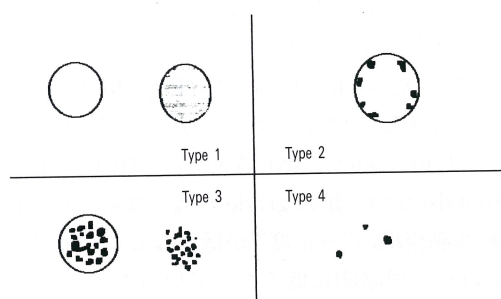


Fig. 4. Morphometric categorization of AgNORs. Type 1: Ring-shaped or uniform black-brown area suggesting nucleoli. Type 2: Small black dots distributing within nucleoli along the margins. Type 3: Clustering small black dots within definite and indefinite nucleoli. Type 4: Isolated small black dots scattering on the outside of nucleoli. The 2 to 4 are believed to represent true NORs.

ンに分け、それぞれ AgNORs Type 1, 2, 3, 4 として検討を試みた。Type 1 はリング状に、または一様に黒く染色されるパターンである。Type 2 は核小体内部の周辺部に黒色の dot が偏在したもの。Type 3 は核小体内で cluster 状に集簇した黒色の小 dot で、これには核小体そのものの構造が不明瞭なものがある。Type 4 は核小体外に孤立性に散在する黒色 dot である。Figure 5A~D にそれぞれの染色パターンを示すが、このうち Type 1 (5A) は核小体そのものを表すと思われ、Type 2 (5B), Type 3 (5C) および Type 4 (5D) に含まれる dot がいわゆる真性の AgNORs とされている¹⁰⁾。組織像、臨床像との関係の検討においては、今回はこの Type 2, 3, 4 を用いて行った。NORs の count 法は N. Kawase ら⁹⁾の方法にしたがった。すなわち Type 4 では分離した dot を一つずつ count したが、Type 2 と 3 では dot の集合体作为一个の構造物として count し、各標本ごとにそ

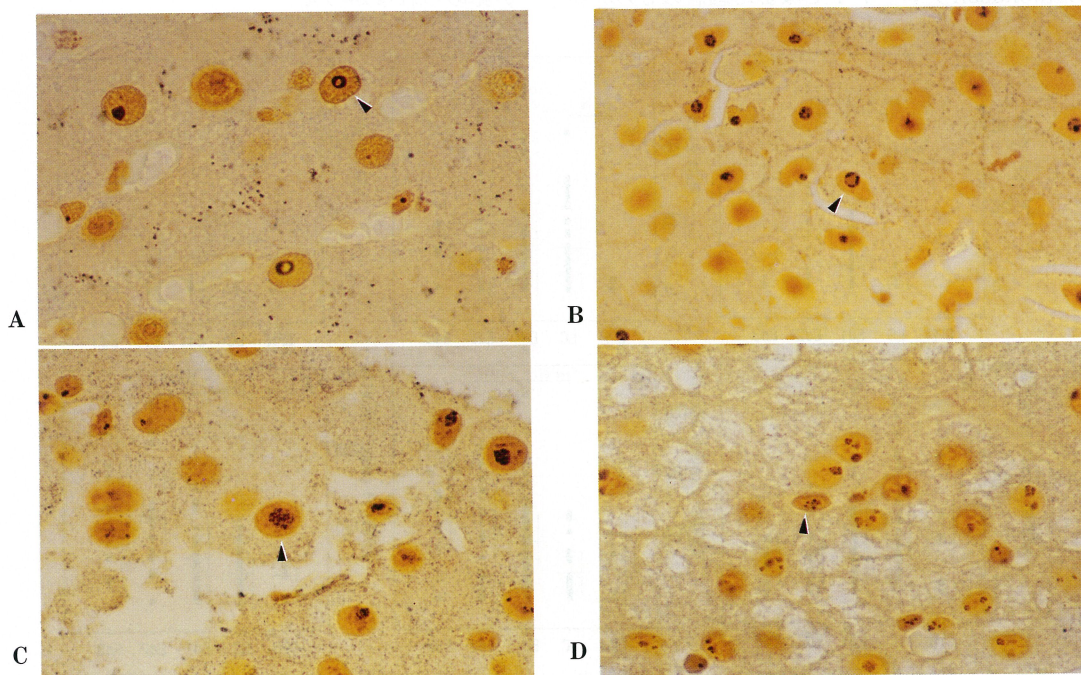


Fig. 5. AgNORs stains on HCC of Edmondson grade I. Silver-binding method $\times 1000$

A: Type 1 showing ring-shaped AgNORs. B: Type 2 showing small black dots distributing within nucleoli along the margins. C: Type 3 showing clustering small black dots within nucleoli. D: Type 4 showing isolated small black dots on the outside of nucleoli.

れらを count 数の総和を出した。

II. 各マーカーの染色結果と Edmondson グレード分類の相関 (Fig. 6)

1) Ki-67 (Fig. 6A)

Ki-67 の平均 Labeling Index (以下 mLI と略) は CPH, LC, HCC Edmondson グレード I～III の順序で段階的に増加していた。そして LC と CPH 間をのぞく各相互間で有意差を認めた。

2) PCNA (Fig. 6B)

PCNA は CPH において有意に mLI の低値を示した。しかし LC と HCC の Edmondson グレード I～III では、Ki-67 でみられたような組織型との明らかな対応関係はみられなかった。

3) p53 (Fig. 6C)

p53 は LI は CPH では全例で 0 を示し、LC でもほとんどの症例で陰性であった。HCC の段階になると陽性を示す例が出現するようになり、Edmondson グレード I ではまだ低値のものが多

いが、II, III と進むにつれて LI の高い例が明らかに増加していった。

4) AgNORs Type 2 (Fig. 6D)

これは LC においてもっとも高い平均 count 数 (以下 m-count と略) を示し、HCC では Edmondson の分類の grade が高くなるほど、すなわち癌組織の“分化度”が低くなるにつれて m-count は段階的に低くなっていった。

5) AgNORs Type 3 (Fig. 6E)

CPH と LC ではほとんど差を認めなかったが、LC と HCC Edmondson グレード I の間で有意な count 数の増加がみられた。HCC 中では分化度が低くなるにつれて m-count の増加が認められ、Edmondson グレード II および III 間で有意差が存在していた。

6) AgNORs Type 4 (Fig. 6F)

基本的に Type 3 と同様な傾向を示すが HCC の中では Edmondson グレード I と II の間で有意差が存在し、グレード II と III の間ではそれぞれが認められなかった。

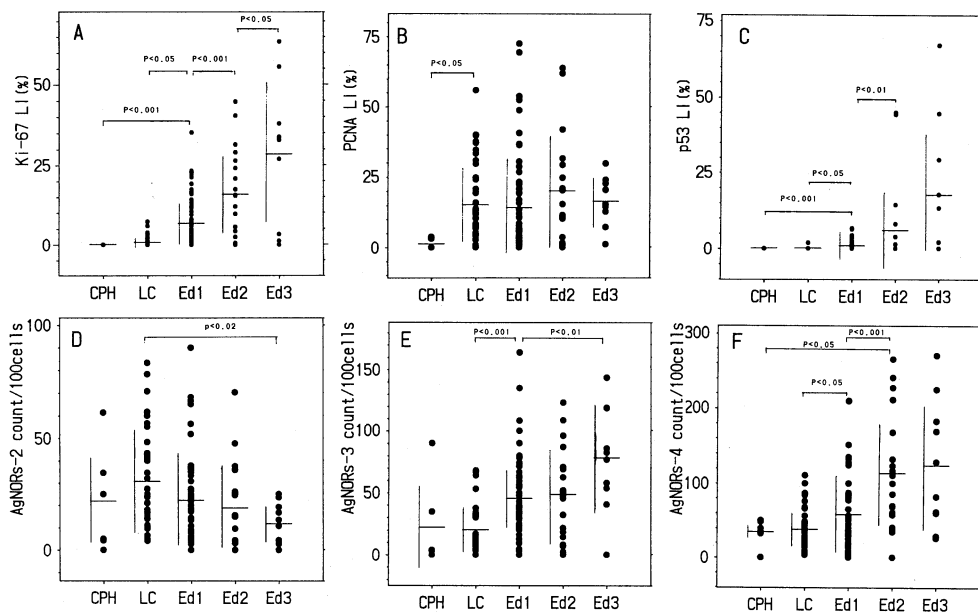


Fig. 6. Correlation between the staining results of each marker examined and the grade of Edmondson grading (Ed). The values of Ki-67, p53 and AgNORs types 3 and 4 show a parallel increase to dedifferentiation of HCC cells as revealed by Ed. AgNORs type 2, however, shows a reverse relation to HCC. The PCNA LI is significantly low in chronic persistent hepatitis (CPH), but does not show any correlation between liver cirrhosis (LC) and HCC Ed I to III.

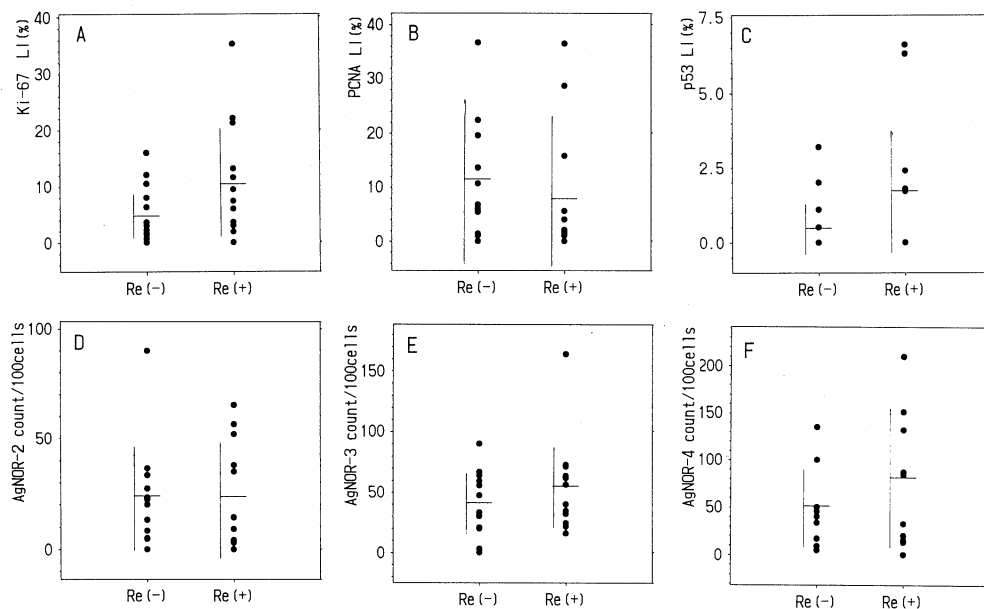


Fig. 7. Comparison of the values of each marker examined between two HCC groups with and without recurrence. The values of Ki-67, p53, AgNORs types 3 and 4 showed a tendency to be higher in the recurrent group than in the non-recurrent one. However, PCNA showed a slightly higher LI in the non-recurrent group than in the recurrent one. The mean counts of AgNORs type 2 were almost equal in the two groups. A significant correlation, however, was not evident between the two groups.

Table 1 に各マーカー相互の Spearman の順位相関係数を示す。Ki-67 と AgNORs Type 3, 4 および p53 間に、また p53 と AgNORs Type 4 の間に、および AgNORs Type 3 と Type 4 の間にそれぞれ有意の相関関係が認められ、AgNORs Type 2 と Type 3 ないし Type 4 の間に有意の逆相関関係が認められた。

Table 1. Correlation between each marker examined
Upper value : Spearman's rank correlation coefficient () : P-value.

	PCNA	p53	AgNORs-2	AgNORs-3	AgNORs-4
Ki-67	0.05 (0.3785)	0.365 (0.0001)	-0.003 (0.9772)	0.34 (0.0018)	0.41 (0.0018)
PCNA		-0.173 (0.118)	0.115 (0.3183)	0.007 (0.9551)	-0.083 (0.4739)
p53			0.121 (0.2828)	0.131 (0.2423)	0.284 (0.0101)
AgNORs-2				-0.400 (0.0002)	-0.255 (0.0198)
AgNORs-3					0.365 (0.0007)

Table 2. Clinical résumé for two groups of HCC patients with and without recurrence after TAE+PEIT

	再発(-)n=15	再発(+)n=13
M : F	12 : 3	9 : 4
基礎病変	LC : 13 CAH : 2	LC : 13
腫瘍径(mm)	18.2±8.1	22.8±5.0
HCV (+)	10	10
HBsAg (+)	2	2

TAE : transcatheter arterial embolization, PEIT : percutaneous ethanol injection therapy

III. HCC の悪性度判定の指標としての各種マーカーの検討

上記各マーカーが HCC において悪性度をどの程度反映するかということについて検討した。一般に腫瘍の悪性度

Table 3. Arbitrary subsets of the value from each marker examined, and numbers of HCC cases with and without recurrence in each subset

	Ki-67 LI			PCNA LI			p53 LI		(%)
	0-10	10-20	20-	0-10	10-20	20-	0-5	5-	
再発 (-)	12	3	0	8	3	4	15	0	
再発 (+)	9	1	3	10	1	2	11	2	

	AgNORs-2			AgNORs-3			AgNORs-3			count/100cells
	0-20	20-40	40-	0-50	50-100	100-	0-50	50-100	100-	
再発 (-)	7	7	1	10	5	0	11	3	1	
再発 (+)	7	4	2	6	6	1	6	3	4	

に関する研究の場合、死亡するまでの期間が用いられることが多い。HCCの場合、肝硬変症や慢性肝炎などを基礎疾患として有することが多く、したがってHCC患者の死亡原因には非癌性の肝機能低下が係わることが少なくなく、生存期間だけでは悪性度の判定が必ずしも正確とはいえない。筆者は腫瘍そのものの生物学的悪性度を判断する基準を城ら¹¹⁾の方法に準じて、次のように設定した。すなわち検討症例として、単発性の境界明瞭なHCC、径が3 cm以下、組織学的分化度がEdmondsonグレードIであり、肝動脈塞栓療法(TAE)+経皮的エタノール局注療法(PEIT)による治療により画像的・生検組織学的に消失したものを選んだ。そしてそれらを治療後1年以内の局所再発の有無によって悪性度の高い群と悪性度の低い群に分類し、両グループにおける各種マーカーの染色結果を比較した。

まず、両群に属する検討症例の臨床概要をTable 2に示す。再発群では腫瘍径の平均が非再発群に比べてやや大きかったが、その有意差はみられなかった。次に各マーカーの計測値の比較を2群間で試みた(Fig. 7)。なお、統計処理にはMan-Whitney検定を用いた。

Ki-67, p53, AgNOR Type 3および4は、mLIないしはm-countが再発群において非再発群よりそれぞれ高値を示した。しかし統計学的な有意差はいずれも認められなかった。AgNOR Type 2ではm-countは両群でほとんど同様であった。PCNAのmLIは逆に非再発群の方がやや高値であった。また各マーカーの計数値

Table 4. Significance in the distinction between two groups of HCC with and without recurrence in each marker examined as revealed by a multivariate study of each marker.

	P value
Ki-67	0.5228
PCNA	0.0927
p53	0.0141
AgNORs-2	0.7132
AgNORs-3	0.7722
AgNORs-4	0.5226

discriminant analysis

を段階的に分けて、それぞれに属する症例の内訳を再発群、非再発群で比較してみると(Table 3), Ki-67, p53, AgNORs Type 3および4では強陽性ないし高count数を示すものは大部分が再発群に属していた。

次に多変量解析によって上記2群間の判別分析を行うと(Table 4), 各種マーカーのうちp53のLIが2群間の判別に有意な要素であることが示された。

考 察

1. Ki-67は以前より凍結切片に対して免疫組織学的研究がなされ、その染色性は種々の悪性腫瘍において、組織学的分化度あるいは組織型との関連性^{12), 13)}や予後との関連性¹⁴⁾を示すことが知られている。同マーカーはHCCに関してはあまり注目されていなかったが、その分化度との関連が報告されている¹⁵⁾。最近になって発

売されたホルマリン固定、パラフィン包埋切片に適用可能な Ki-67モノクローナル抗体を用いた研究報告はまだ少ないが、今回の結果にみられるように少なくとも HCC の吸引針生検組織では、凍結切片を用いた場合と同様に、非特異的と思われる反応の少ない良好な染色性が得られた。また組織学的分化度との関連性も示された。

2. PCNA は以前よりパラフィン切片に適用可能であったことから、増殖能のマーカーとして多くの免疫組織学的な研究に用いられてきた。

HCC に関しては Kitamoto ら¹⁶⁾、Adachi ら¹⁷⁾によって組織学的分化度や予後との相関性を指摘されている。一方、Irene ら¹⁸⁾は PCNA LI と予後の関係は認めるが分化度との相関は認めなかったとしている。Irene らはさらに非癌性の肝組織については、非特異性変化、慢性肝炎、肝硬変の順に PCNA LI が低下したとしている。Nakamura ら¹⁹⁾は逆に PCNA LI は CPH, CAH と進むにつれて上昇し、肝の構造改築とも関連しているとしている。

このように PCNA の結果については報告者による違いがみられるが、今回筆者の行った検討では LC, HCC Edmondson グレード I～III の間で有意差はみられず、CPH は有意に PCNA 発現率の低下を示した。この結果からみると、PCNA で表現される増殖能力は LC 以上ではあまり差がなく、したがって HCC では腫瘍細胞の増殖能力を知るためのマーカーとしては不適と考えられた。また PCNA 免疫染色の問題点としては、個々の陽性細胞間で染色強度にはばらつきがかなりあることである。前述のように、一般的には染色の濃いものが S 期、薄いものがそれ以外、すなわち G1後期の細胞に相当するといわれるが、実際にはそれらを区別することは必ずしも簡単ではない。さらに in vitro の実験ではあるが、増殖速度の遅い細胞では BrdU で同定される S 期細胞と、PCNA で認識される細胞に解離があることが指摘されている²⁰⁾。

3. AgNORs も前述のように、近年細胞増殖能のマーカーとして研究にしばしば用いられている。種々の良悪性病変において、NORs の数

の増加が組織学的分化度の低下と関連したという報告^{9), 21), 22)}があり、また悪性腫瘍の予後判定^{9), 21), 22)}や良悪性の鑑別に有用であったとする報告^{23), 24)}がみられる。また乳癌や、non-Hodgkin's lymphoma などでは Ki-67免疫染色との正の相関性が指摘され^{23), 25)}さらに flow cytometry を利用した DNA histogram との関係では、AgNORs 数と S 期が強く相関したという報告²⁶⁾がある。HCC に関しては Shiro ら²⁷⁾は臨床的ステージの進行に伴う AgNORs の増加を指摘しており、また PEIT 治療後の再発に対する予後予測にも有用であったとしている¹¹⁾。AgNORs が細胞の増殖能や代謝機能の亢進を反映していることは間違いないところであるが、AgNORs を count する方法には現在統一された方法がなく、各施設、研究者によって様々な方法で行われている。核小体内・外の small black dot をすべて数えるべきとする意見もあるが¹⁰⁾、Shiro ら^{11), 27)}、Kawase ら⁹⁾、Howat ら²⁸⁾は、核小体内に集簇する AgNORs を 1 つの構造物とみなし、核小体外のものと区別して別々に count する方法を採用している。

今回筆者は上記の後者に準じた count 法を用いたが、核小体の辺縁部に集まるものを Type 2 として独立させたところに特徴がある。今回の結果では Type 3, 4 では HCC の組織学的異型性の増加に伴って count 数の増加を示し、これまでの HCC をはじめとする様々な腫瘍についての AgNORs の成績と矛盾しないものであった。しかし Type 2 として count した AgNORs は m-count が LC でもっとも高値を示し、HCC では異型性が増すにつれてむしろ漸減した。さらに AgNORs Type 2 は Type 3 および 4 とそれぞれ逆相関を示した。この意義は不明であるが、仮説としては、増殖能の亢進に伴って AgNORs として現れる NORs 関連蛋白は初期には核小体の辺縁部に集まる傾向があり、増殖能の増大に伴って数的増加とともに Type 3 のように集簇するものと考えている。なお、Type 3 と 4 は正の相関を示した。以上の結果により、AgNORs の検討には dot の数のみならず、その分

布状態も考慮する必要性が示唆された。

4. p53 遺伝子は前述のように正常型のものと変異形のものがあり、癌化に先だって変異型が出現する場合と、癌化が起こったあとに増悪因子の1つとして変異を生ずる場合があるといわれる²⁹⁾。p53の変異型が結腸腺腫の癌化に際し認められるが、結腸癌の部位、組織型、分化度、デューク・ステージ、DNA ploidy については相関がないと報告されている³⁰⁾。伊藤ら³¹⁾はHCCにおいてp53の免疫組織学的検討を行いその発現と臨床病期、分化度、およびPCNAで表される増殖能との間に関連性を見出している。筆者の検討でもHCCの組織分化度との明らかな相関を見出した。増殖能マーカーとの関係ではPCNAとは相関しなかったが、Ki-67およびAgNORs Type 4との有意の正の相関が存在した。

5. 次にHCC患者の予後の指標としてのこれらマーカーの意義について述べる。過去においてHCCをはじめ様々な悪性腫瘍について各種増殖能マーカーと予後の関連性が検討されている。それらマーカーの有用性が指摘される場合が多いが、これは前述のように多くは手術例について行われている。肝癌の治療は現在では外科的切除のほか、最近ではTAE、PEITなどの内科的治療法が行われるようになっていく。どのような治療法が選択されるかは、症例自体の条件のほか、施設によっても異なっている。しかし肝の予備能上の問題から切除できない場合や、微小HCCの早期発見の進歩から、今後は内科的治療法が選択される例が増加するものと推定される。

そこで今回これら各種のマーカーが、内科的治療に先立って施行されるHCCの経皮的吸引針生検組織に適用して、予後の指標となりうるかどうかを検討した。前述のように悪性腫瘍の予後を最も左右するものは腫瘍自体の生物学的悪性度である。さらに、悪性度が高いほど早期に再発すると考えられるので、一定の条件すなわち単発性で境界明瞭な、径3 cm以下のHCCで、TAE+PEITにより治療され、画像上およ

び生検組織学上HCC病巣が消失した症例を選択し、これらを治療後1年以内の局所再発の有無によって2群に分類し、両群間で検索マーカー値を比較検討した。

その結果、Ki-67、AgNORs Type 3および4、p53において、それぞれの計測数値の平均値が有意差はないものの、再発群において非再発群よりも高値を示し、さらに一定以上の強陽性あるいは高count数を示すものはほとんど再発例であった。また多変量解析により検索マーカーのうちではp53が再発群と非再発群の判別に有意性を示すことが明らかになったので、これらのマーカーが経皮的吸引針生検組織によるHCC予後予測に有用であることが示唆された。

HCCは比較的早期より組織型の多彩性を示すことが知られている。神代ら³²⁾によると結節性病変の径が1 cm以下では約80%は単一の高分化型の組織型のみよりなるが、1~2 cm程度になるとすでに40%の症例には高分化型および中分化型組織型の様々な程度の混在がみられるという。今回の検討には症例数の関係から径3 cm以下でEdmondsonグレードIを示したものを選択したが、ほとんどは1 cm以上であった。針生検で得られるのはHCC病巣組織のごく一部のみであり、腫瘍の情質を完全に代表しているかどうか不明といわざるを得ない。しかしそれにも拘わらず、一定の傾向を持つ結果が得られたことから、針生検組織によるHCCの予後予測の可能性が示唆されたものと思われる。

径1 cm以下のHCCに対する針生検の正診率は66%程度³³⁾といわれている。今後、超音波機器の改良などによる診断能の向上と生検法の改良によって、HCC病変が1 cm以下の超早期の段階で発見され、正確に生検される例が増えるものと期待される。今後さらにそのようなHCC症例の蓄積を待っていて、より正確な予後判定のためのマーカーの検討を重ねたいと考えている。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学付属川崎病院病理 伊藤慈秀教授に深甚なる謝意を表しますとともに、病理標本を提供していただいた、平野 寛 前川崎医大消化器内科教授に深謝いたします。

また本研究にご協力いただいた川崎病院病理部の各位に感謝いたします。

本論分の要旨は6年11月、第62回日本消化器病学会中国四国支部例会にて発表した。

文 献

- 1) 相沢 幹, 菊池浩吉: 新病理学総論. 東京, 南山堂. 1987, pp 498—503
- 2) Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J Pathol* 151: 111—118, 1987
- 3) 佐々木功典, 村上知之, 小野貞英, 菅井 有: 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の比較. *病理と臨床* 9: 894—601, 1991
- 4) 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原 (PCNA). *病理と臨床* 9: 879—883, 1991
- 5) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13—20, 1983
- 6) 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* 133: 1710—1711, 1984
- 7) Ploton D, Menager M, Jeannesson P: Improvement in the staining and in the visualization of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18: 5—14, 1986
- 8) 関谷千尋, 藤本佳也: 肝癌と癌抑制遺伝子. *最新医学* 33: 1473—1481, 1992
- 9) Kawase N, Shiokawa A, Ota H, Saitoh T, Yoshida H, Kazama K: Nucleolar organizer regions and PCNA expressin is prostatic cancers. *Pathology International* 44: 213—222, 1994
- 10) Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ: How should we count AgNORs proposals for a standardized approach. *J Pathol* 158: 185—188, 1989
- 11) 城 友宏, 関 寿人, 内藤雄二, 井上恭一, 岡村明治: 肝細胞癌の予後予測における Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNORs) の有用性. *肝臓* 33: 399—404, 1992
- 12) Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY: New approach to assessisg lung tumors in man. *J Clin Pathol* 39: 590—593, 1986
- 13) Walker RA, Camplejohn RS: Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinoma. *Br J Cancer* 57: 281—283, 1988
- 14) Ueda T, Aozaka K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matumoto K: Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 63: 1607—1611, 1988
- 15) Grigioni WF, D'errico A, Bacci F, Gaudio M, Mazziotti A, Gozzetti G, Mancini AM: Primary liver neoplasms: evaluation of proliferative index using MoAb Ki-67. *J Pathol* 158: 23—29, 1989
- 16) Kitamoto M, Nakanishi T, Kira S, Kawaguchi M, Nakashio R, Suemori S, Kajiyama G, Asahara T, Dohi K: The assessment of proliferating cell nucleolar antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis. *Cancer* 72: 1859—1865, 1993
- 17) Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyosi M: Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer* 72: 2902—2909, 1993
- 18) Irene OL, Edward CS, Sheung T, Annie S, Chan Y, Mike KP: Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 73: 2268—2274, 1994
- 19) Nakamura T, Hayama M, Sakai T, Hothi M, Tanaka E: Proliferating activity of hepatocytes in chronic viral hepatitis as revealed by immunohistichemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Hum Pathol* 24: 750—753, 1993

- 20) Coltrare MD, Gown A : PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem cytochem* 39 : 23—30, 1991
- 21) Suzuki T, Takano Y, Kida Y, Okudaira M : Silver-binding argyrophilic organizer regions (AgNORs) in gall-bladder cancer : correlation with malignant grading and prognosis. *Acta Pathologica Japonica* 43 : 36—43, 1993
- 22) Vuhahula EAM, Nikai H, Miyauchi M, Takata T, Ito H : Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) count in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Pathology International* 44 : 368—373, 1994
- 23) Raymond WA, Leong ASY : Nucleolar organizer regions relate to growth fraction in human breast carcinoma. *Hum Pathol* 20 : 741—746, 1989
- 24) Ruschoff J, Prasser C, Cortez T, Hohne HM, Hohenberger W, Hofdtadter F : Diagnostic value of AgNORs staining in follicular cell neoplasms of the thyroid. *Am J Surgical Pathol* 17 : 1281—1288, 1993
- 25) Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld, AG : A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathol* 12 : 373—381, 1988
- 26) Giri DD, Sottingham JF, Lawry J, Dundas SAC, Underwood JCE : Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions : correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J Pathol* 157 : 307—313, 1989
- 27) Shiro T, Seki T, Naitoh Y, Inoue K, Okamura A : A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71 : 44—49, 1993
- 28) Howat AJ, Giri DD, Cotton DWK, Slater DN : Nucleolar organizer regions in spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer* 63 : 474—478, 1989
- 29) 高橋 玲, 山本千城, 奥山隆三 : p53とアポトーシス. *実験医学* 17 : 2403—2407, 1993
- 30) Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC : p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138 : 807—813, 1991
- 31) 伊藤隆之, 城 知宏, 関 寿人, 中川泰一, 若林正之, 塩崎安子, 井上恭一, 岡村明治 : 肝細胞癌における癌抑制遺伝子 ; p53 蛋白の臨床病理学的検討—特に増殖能との関係について—. *肝臓* 34 : 989—994, 1993
- 32) 神代正道, 中島 収 : 細小肝癌と前癌病変の病理. *臨床消化器内科* 7 : 477—484, 1992
- 33) 江原正明, 村岡秀樹, 加藤 敬, 福田浩之, 長門義宣, 吉川正治, 杉浦信之, 大藤正雄 : 肝細胞癌の画像診断. *最新医学* 47 : 1504—1510, 1992