

氏名・(本籍)	石 澤 命 仁 (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 第121号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成4年3月23日
学位論文題目	骨軟部悪性腫瘍における各種腫瘍マーカーの発現と細胞動態との関係 —BrdUを用いた二重染色法による検討—

審 査 委 員	主査 教授	服 部 隆 則
	副査 教授	越 智 幸 男
	副査 教授	福 田 眞 輔

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔目 的〕

骨軟部腫瘍の病理学的診断には各種腫瘍マーカーの免疫組織化学的検索が頻繁に行われている。しかし診断的価値を有する腫瘍マーカーといえども個々の症例では腫瘍細胞の中にそれらを発現しない細胞を含み、免疫組織化学的に不均一な細胞群からなることが多く、ことに悪性のものでこの傾向が顕著である。さらに骨軟部腫瘍において、特徴的な免疫組織化学的マーカーを発現している細胞とそうでない細胞との間の増殖力の差異については、十分な検討がなされていなかった。そこで我々は、(1)脂肪肉腫と軟骨肉腫(脱分化型)におけるS-100の発現、(2)悪性線維性組織球腫(MFH)における $\alpha$ -1-antichymotrypsin (ACT)、prolyl hydroxylase (PH)、およびfibronectinの発現を検索し、それらのマーカーを有する細胞の増殖能力との関係を検索した。

### 〔実験材料〕

当科で手術時採取した5例の骨軟部肉腫を用いた。脂肪肉腫(myxoid)、MFH<sub>1</sub>(myxoid + storiform、軟部原発)、MFH<sub>2</sub>(storiform pleomorphic、骨原発)の3例はヌードマウス皮下継代中の材料を用い、脱分化型軟骨肉腫は手術時採取した新鮮材料、MFH<sub>3</sub>(storiform pleomorphic、軟部原発)については、ACT、fibronectinには手術時採取新鮮材料を、PHにはヌードマウス初代移植腫瘍を用いた。

## 〔方 法〕

### (1) 腫瘍細胞の bromodeoxyuridine (BrdU) 標識および標本作製

ヌードマウス移植腫瘍には in vivo BrdU 標識を行った。即ち担腫瘍ヌードマウス腹腔内に BrdU を投与し 1 時間後屠殺、直ちに腫瘍を摘出した。10% 冷中性ホルマリンにて 24 時間固定後パラフィン包埋し、切片を作製した。MFH の症例に関しては腫瘍の一部を直ちに OCT compound 中にて凍結包埋し、クリオスタットにて薄切しアセトン固定した。手術時採取新鮮材料については in vitro BrdU 標識を施行した。即ち、手術時摘出した腫瘍片を培養液中にて細切浮遊の後、BrdU を添加し 3 気圧に加圧、37℃ の恒温振盪槽中で 1 時間インキュベートし in vivo の材料と同様の方法で固定・包埋の後薄切した。

### (2) 免疫組織化学二重染色法

作製した組織切片に BrdU と各マーカーの二重染色を施行した。パラフィン切片については、2N 塩酸にて処理し、抗 BrdU モノクローナル抗体を反応させた後、間接法にて DAB を用いて発色させた。続いて、第二の一次抗体として抗 S-100 抗体、抗 ACT 抗体、抗 fibronectin 抗体—以上ポリクローナルの何れか一つを反応させ、アビジン・ビオチン・アルカリフォスファターゼ法にて、Fast Red で発色させた。凍結切片については抗 PH モノクローナル抗体を反応させ間接法を用いて Fast Red にて発色させた。次に 2N 塩酸処理の後、抗 BrdU 抗体を反応、ABC 法を用いて DAB で発色させた。以上の操作により BrdU を褐色、各種マーカーを赤色に染色し、同一組織切片上で BrdU 陽性細胞あるいは BrdU 陰性細胞における各マーカーの発現を光顕下に観察した。

## 〔結 果〕

### (1) 脂肪肉腫・脱分化型軟骨肉腫における S-100 蛋白の発現と増殖能

#### a. 脂肪肉腫

S-100 強陽性の細胞には BrdU の取り込みが少なく、S-100 染色性が低いもののほど BrdU で強く標識される細胞の割合が多く、かつ染色性も強かった。

#### b. 脱分化型軟骨肉腫

脱分化部では BrdU 陽性細胞が多数観察されたが、S-100 は陰性であった。軟骨様の分化が明瞭な部位では S-100 は腫瘍細胞の核および細胞質に濃染していたが BrdU の取り込みは殆ど認められなかった。

### (2) MFH における ACT、PH、fibronectin の発現と増殖能

#### a. ACT ( $\alpha$ -1-antichymotrypsin)

3 系の MFH 中、MFH<sub>3</sub> の手術時採取新鮮材料のみが ACT 陽性を示した。ACT 強陽性の細胞には BrdU 陰性となる傾向を認めた。

#### b. PH (prolyl hydroxylase)

3 例の MFH 中、MFH<sub>2</sub>、MFH<sub>3</sub> は PH 強陽性を示し、ともに PH は殆どすべての腫瘍細胞細

胞質に局在し BrdU 強陽性の細胞にも PH の発現を認めた。MFH<sub>1</sub> では一部の腫瘍細胞の細胞質に PH 発現を認めたが前二者に比し染色性は低かった。BrdU 陽性細胞の一部にも PH の発現を認めた。

### c. fibronectin

3 例とも fibronectin は細胞間に陽性であった。MFH<sub>2</sub>、MFH<sub>3</sub> では細胞質にも fibronectin の局在する細胞を認めた。fibronectin の分布様式と BrdU の取り込みとの間には、特に一定の傾向は認められなかった。

### 〔考察・結論〕

BrdU は thymidine の analogue であり S 期細胞の核内に取り込まれる。抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた BrdU と腫瘍マーカーとの二重染色法により同一組織切片上で S 期腫瘍細胞とマーカーの分布を観察できる。結果(1)より脂肪肉腫・脱分化型軟骨肉腫では脂肪ないし軟骨細胞の分化形質である S-100 の発現が増強した細胞では増殖能が低下していることが示唆された。結果(2)より MFH における ACT 陽性細胞即ち組織球様の細胞は増殖の主要部分ではなく増殖の主役となる細胞はプロコラーゲン合成に関与する PH の発現、即ち線維芽細胞様の性格を持つことが判明し、MFH の組織起源は、線維芽細胞・未分化間葉系細胞であることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、骨軟部腫瘍の特性を、bromodeoxyuridine (BrdU) で細胞増殖の観点から、また各種腫瘍マーカーの発現について免疫組織化学的に検討したものである。著者は、滋賀医科大学附属病院で切除された脂肪肉腫、脱分化型軟骨肉腫と悪性線維性組織球腫 (MFH) の一部を手術直後に BrdU で in vitro で標識し、また、腫瘍をヌードマウスの皮下に移植し継代されている腫瘍を BrdU で標識することで、腫瘍細胞の増殖能を調べている。一方、手術時とヌードマウス移植腫瘍のパラフィン切片で、脂肪肉腫と脱分化型軟骨肉腫について S-100 蛋白の発現を、MFH については  $\alpha$ -antichymotrypsin (ACT)、fibronectin および prolyl hydroxylase (PH) などの発現を酵素抗体法で調べている。その結果、

(1) BrdU の標識率 (S 期細胞の割合) は、脂肪肉腫で約 13.7%、軟骨肉腫で約 11.7%、MFH で約 14.2% であった。脱分化型軟骨肉腫では標識細胞の分布に heterogeneity があり、軟骨形成がみられる部位では標識細胞は僅かであった。

(2) S-100 蛋白の染色では、脂肪肉腫と脱分化型軟骨肉腫のいずれにおいても BrdU の取り込みの少ない細胞により強い発現がみられ、S-100 蛋白が細胞の分化発現に関連していることが示唆された。

(3) MFH では ACT (組織球様細胞のマーカー) と PH (線維芽細胞のマーカー) の発現がみ

られたが、ACT 陽性細胞は BrdU が陰性、PH 陽性細胞は BrdU 陽性の傾向があった。このことより MFH の増殖の主体をなすものは線維芽細胞様細胞であることが明らかとなった。

本研究はこれまで殆ど検索がなされていなかった整形外科領域の悪性腫瘍の免疫組織化学的マーカーの発現と増殖能との関連を明らかにしたものであり、その臨床病理学的意義は大きく、博士（医学）の学位論文に値すると認められる。