

胃粘膜増殖能の検討

—特に ^3H -thymidine Autoradiography と proliferating cell nuclear antigen に関連して—

東京医科大学内科学第四講座

水口 泰宏 河合 隆 三輪 一彦 堀部 俊哉
角谷 宏 新戸 禎哲 関 知之 山田 孝史
鶴井 光治 池田 肇 川口 実 斉藤 利彦

【要旨】 今回我々はラットを用い、胃粘膜の増殖能について、PCNA 染色と ^3H -thymidine Autoradiography (^3H -TdR ARG) を比較検討した。ウイスター系ラットを用い、正常群と胃粘膜増殖亢進群の2群を設定した。正常群は無処置のラット、胃粘膜増殖亢進群は OMEPRAZOLE 100 mg/kg を4週間連日投与したラットである。両群とも ^3H -thymidine を投与したのち屠殺し、胃底腺のパラフィン切片を作成した。各々連続切片を作成し、一方を ARG に、他方を PCNA 染色に供した。各群とも腺窩当りの ARG 標識細胞数、PCNA 染色陽性細胞数を計測した。さらに、胃底腺を腺上部、腺頸部、腺下部に分けてそれぞれの陽性細胞の分布も検討した。PCNA 染色は ARG に比べ、正常群及び増殖亢進群でいずれも陽性細胞が多かった。また、PCNA 染色は、ARG と同様に、正常群より増殖亢進群で陽性細胞が多く、さらに陽性細胞の分布においても同様の変化をとらえていた。よって、PCNA 染色は、胃粘膜増殖亢進状態の把握に有用であると考えられた。

緒 言

胃粘膜増殖能の研究は、 ^3H -thymidine Autoradiography (ARG) により、急激に進歩を遂げた。正常胃粘膜においては細胞増殖は腺頸部の増殖細胞帯において行われており、その細胞が腺上部あるいは、腺下部に移動するとともに分化し、胃固有の細胞となる。一方、潰瘍辺縁の胃粘膜において、この増殖細胞帯の拡大が起こり、細胞増殖が亢進し、組織欠損した部分が修復されていくことが明らかとなっている。さらに、ARG においては、Pulse ラベル、Cumulative ラベル法を併用することにより、胃粘膜固有の細胞の寿命など、たとえば被蓋上皮細胞は5~7日、壁細胞は150~250日、も明らかとなってきた¹⁾。

しかしながら、 ^3H は同位元素であり人体への応用の制限、あるいは使用できる設備での試行のみ可能など問題がある。近年、増殖能の検討として、細胞

増殖関連物質の免疫組織学的な検討が可能となってきた。特に proliferating cell nuclear antigen (PCNA) はルーチン標本が使用可能で注目されている。そこで今回我々は、ラットを用い、正常群と胃粘膜増殖亢進群の2群を設定し、ARG と PCNA の陽性細胞を計測し比較検討した。さらに、PCNA 陽性細胞の基準についても検討を加えた。

方 法

8週齢のウイスター系ラットを用いて、正常群と胃粘膜増殖亢進群の2群を設定した。正常群は無処置のラット (N=5) 胃粘膜増殖群は OMEPLAZOLE 100 mg/kg を4週間連日投与したラット (N=5) とした。両群とも ^3H -thymidine (5.0 Ci/mmol, Amersahm, U.K.) を体重 1 g 当たり 185 kBq (1 μCi) 腹腔内に投与し、90分後にネプタール過麻酔下に屠殺し、胃底腺を摘出し Bouin 液にて3時間固定後パラフィンブロックに包埋し、4 μm の連続切片を作

1995年1月26日受付, 1995年4月10日受理

キーワード: トリチウム サイミジン オートラジオグラフィ, 増殖細胞核抗原, 胃粘膜増殖能。

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学第四講座 水口泰宏)

製した。

1. ARG

両群とも薄切連続切片を脱パラフィン後, Kodak NTB 2 ARG 用乳剤中に dipping したのち, 4°C, 5 週間暗所に保存後 FD111 処方で見出し後染色に Hematoxylin and Eosin 染色を行った。

光学顕微鏡下に胃底腺領域の腺窩当たりの陽性細胞数を計測した。尚, 核上に銀粒子 20 個以上認められるものを陽性細胞とした。

2. PCNA 染色

両群とも薄切連続切片を脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い, 正常ウサギ血清で非特異反応をブロッキングした後, 一次抗体としてモノクローナル抗 PCNA 抗体 (1:20 希釈, Dako 社) を 1 時間作用させ, 2 次, 3 次抗体と反応させた後, DAB で発色させた。

光学顕微鏡下に胃底腺領域の腺窩当たりの陽性細胞数を計測した。PCNA 染色陽性細胞の基準を 1) 核のみが均一に染色されているものを陽性細胞とする (P1 計測) と 2) 核も細胞質もともに染色されているもの (P2 計測) の 2 種類とし, それぞれにおいて計測した。

陽性細胞の計測には, 一切片において 3 ケ所以上

行いその平均を計測値とした。

(統計学的処置)

統計学的処置は Student's test により行い, P ≤ 0.05 を有意とした。

結 果

検討 1: 正常群と胃粘膜増殖亢進群の陽性細胞の比較と PCNA の陽性細胞の基準の検討

図 1 に胃底腺 ARG を示す。左が正常群, 右が胃粘膜増殖亢進群である。正常群に比べ増殖亢進群では, 銀粒子の集積により黒色を呈する陽性細胞数が増加している。一方, 図 2 に PCNA 染色像を示しており, 左が正常群, 右が胃粘膜増殖亢進群である。陽性細胞は, ARG と同様に増殖亢進群で増加していた。

腺窩当たりの陽性細胞数は, 図 3 に示すように, ARG では, 正常群の $2.60 \pm 0.30 (M \pm SD)$ に比べ, 増殖亢進群の 4.70 ± 1.22 と, 有意差をもって増加していた。一方 PCNA では, P1 計測で, 正常群 5.93 ± 1.22 , 増殖亢進群 10.11 ± 1.66 , P2 計測で正常群 14.54 ± 1.32 , 増殖亢進群 19.10 ± 3.31 とともに増加していた。しかし, 増加率 (増殖亢進群の陽性細胞数 - 正常群の陽性細胞数 / 正常群の陽性細胞数) は

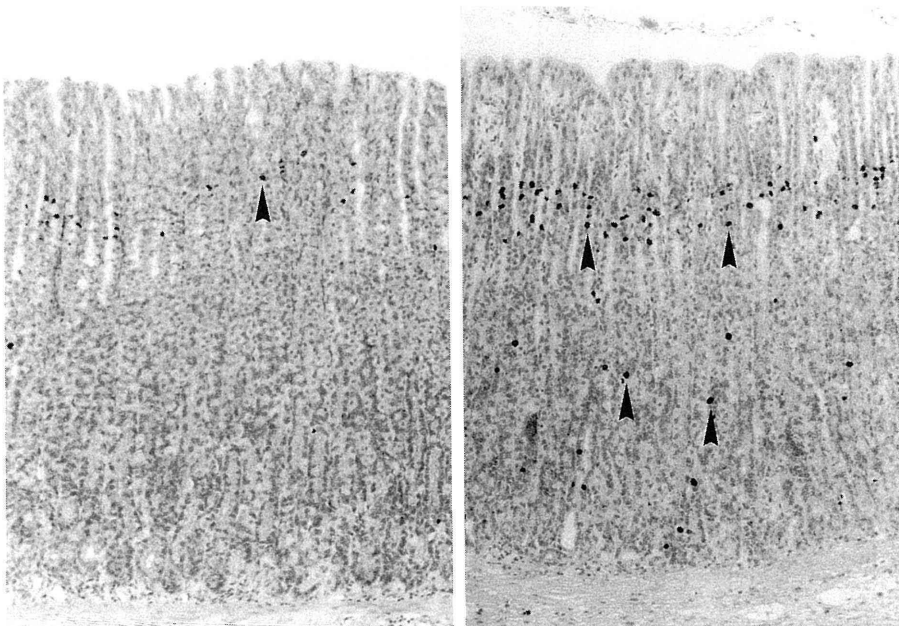


図 1 胃底腺の ³H-thymidine Autoradiography
左が正常群, 右が胃粘膜増殖亢進群である。陽性細胞 (矢印) が, 正常群に比べ胃粘膜増殖亢進群で増加している。

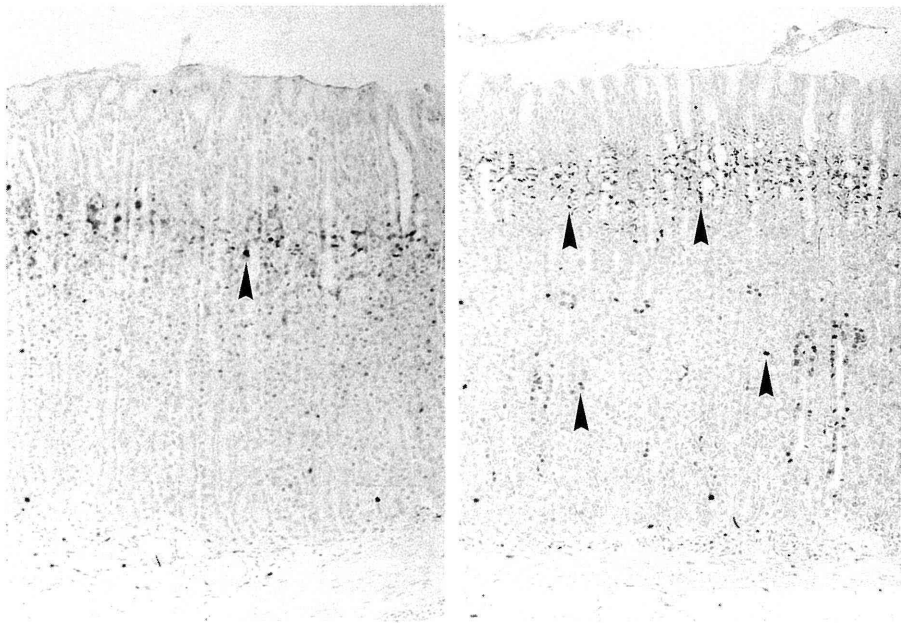


図 2 胃底腺の proliferating cell nuclear antigen 染色像
 左が正常群，右が胃粘膜増殖亢進群である。陽性細胞（矢印）が，正常群に比べ胃粘膜増殖亢進群で増加している。

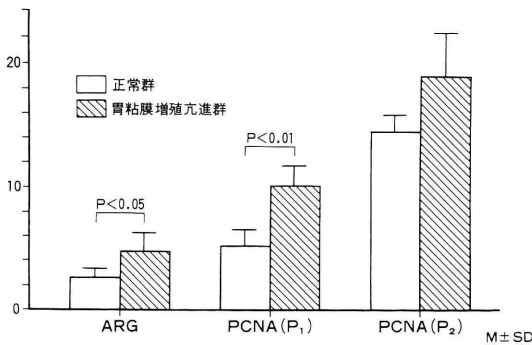


図 3 ³H-thymidine Autoradiography (ARG) と proliferating cell nuclear antigen (PCNA) P1 および P2 計測における腺窩当たりの陽性細胞の比較

ARG で，80.8%，P1 で 70.5% と類似していたが，P2 では，31.4% と低値であった。以上より，PCNA 陽性細胞の基準は，核だけが均一に染色されているものを陽性細胞とするのが良いと思われた。検討 2 については PCNA (P1) 計測のみで ARG と比較した。

検討 2: 胃底腺における ARG および PCNA 陽性細胞の分布

図 4 は，正常群の胃底腺粘膜像を示す。左が ARG

像，右が PCNA 像である。陽性細胞数は，PCNA が多く，その分布は腺頸部，腺下部に ARG に比べ PCNA の陽性細胞が多く見られた。

図 5 に計測値およびその分布の割合を示しているが，陽性細胞は，ARG 2.68 に比べ PCNA は 5.17 と有意に多かった。正常群における陽性細胞の腺上部，頸部，下部における分布の割合は，ARG で腺上部 11.03%，腺頸部 75.89%，腺下部 13.08%，PCNA P1 計測ではそれぞれ 5.31%，77.60%，17.09% であった。ARG に比べ，P1 計測で腺頸部，腺下部に占める割合が多かった。

図 6 は胃粘膜増殖亢進群の胃底腺の連続切片像である。左が ARG 像，右が PCNA 像である。ARG に比べ PCNA で正常群と同様に陽性細胞を多数認めた。腺上部，頸部，下部と分けると，ARG に比べ，PCNA で腺下部に陽性細胞が多く認められた。

図 7 に計測値を示す，陽性細胞数は，ARG 4.70，PCNA 10.11 と有意に多かった。陽性細胞数に分布は，ARG で腺上部 1.95%，腺頸部 75.33%，腺下部 22.72%，P1 ではそれぞれ 1.55%，70.23%，28.22% であった。正常群と同様に，ARG に比べ，PCNA で腺下部に陽性細胞の占める割合が多かった。

さらに，正常群と増殖亢進群の陽性細胞の分布を

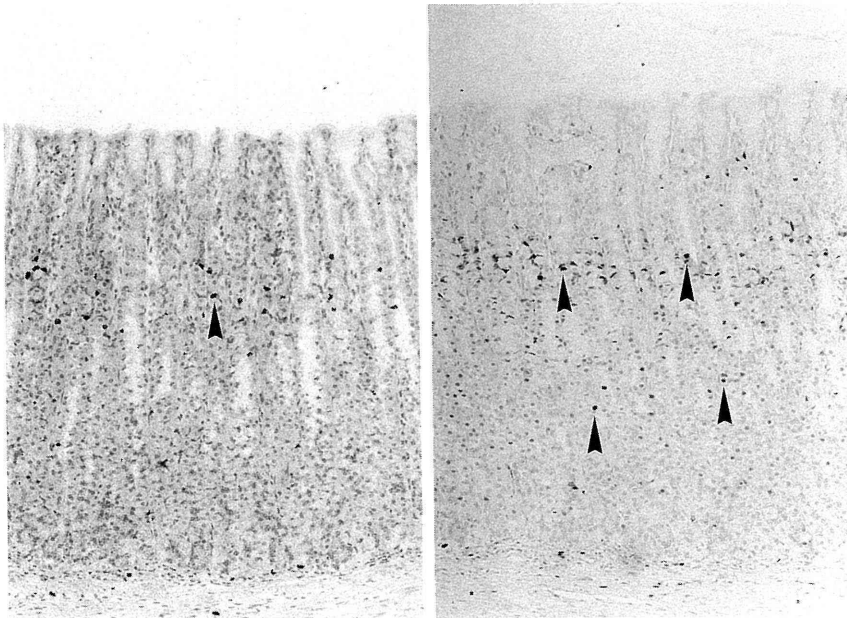


図 4 正常群における ^3H -thymidine Autoradiography (ARG) および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色像
 左が ARG, 右が PCNA 染色像である。
 陽性細胞の PCNA が多く, その分布は腺頸部, 腺下部の PCNA の陽性細胞が多くみられる (矢印)。

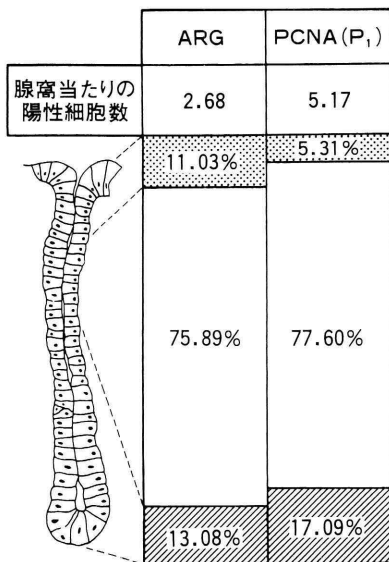


図 5 正常群における陽性細胞数とその分布
 ARG: ^3H -thymidine Autoradiography
 PCNA: proliferating cell nuclear antigen

比較すると, 増殖亢進群で ARG 陽性細胞の分布は, 腺上部で正常群の 11.03% に比べ増殖亢進群では 1.95% と減少し, 腺下部で正常群の 13.08% に比べ増殖亢進群では 22.72% と増加していた. PCNA P₁ 計測でも, 腺上部で正常群の 5.31% に比べ増殖亢進群では 1.55% と減少し, 腺下部で正常群の 17.09% に比べ増加亢進群では 28.22% と増加しており ARG と同様の傾向をとらえていた。

考 察

近年細胞増殖能を検討する方法として ARG や Bromodeoxyuridine (BrdU) で標識し S 期細胞を同定する方法を加え, モノクローナル抗体を用いて検出する方法として PCNA, Ki-67, DNA ポリメラーゼ δ などが開発されてきた²⁾³⁾⁴⁾. その中で PCNA はパラフィン切片で染色可能であり注目されている. PCNA は, 1978 年 Miyachi²⁾ によって全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematoses, SLE) 患者の自己抗体に反応する増殖核抗原として見いだされ, 機能的には DNA ポリメラーゼ δ の補助因子⁵⁾ であることが知られている. これまでの報

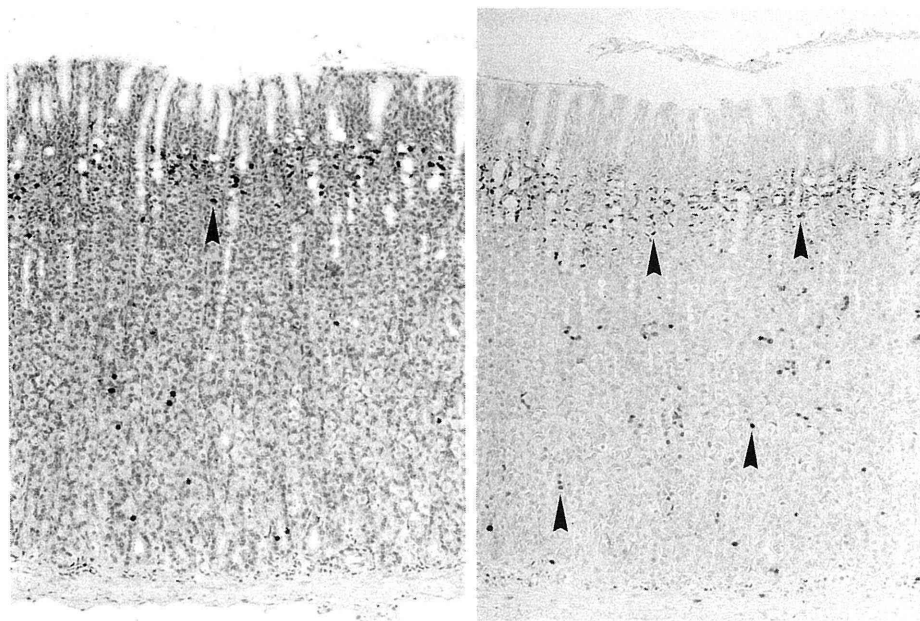


図6 胃粘膜増殖亢進群における³H-thymidine Autoradiography (ARG) および proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色像
 左が ARG, 右が PCNA 染色像である。
 ARG に比べ PCNA で正常群と同様陽性細胞が多数みられる。
 胃底腺を腺上部, 頸部, 下部に分けると, ARG に比べ PCNA で腺下部に陽性細胞が多数認められる (矢印)。

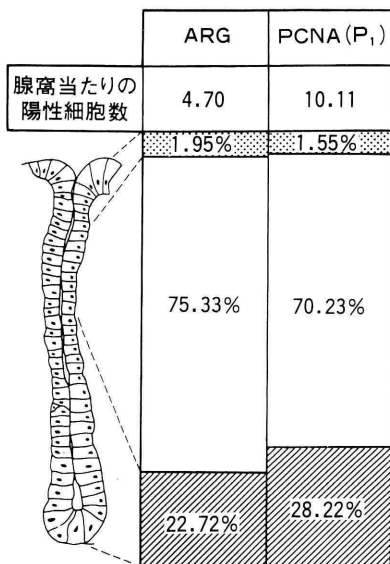


図7 胃粘膜増殖亢進群における陽性細胞数とその分布
 ARG: ³H-thymidine Autoradiography
 PCNA: proliferating cell nuclear antigen

告では, PCNA/cyclin は細胞増殖サイクルの G1 後期から S 期早期にかけて核内に蓄積されるとされている⁵⁾⁶⁾。しかし, その陽性率は報告により差がみられ, 染色性は安定していないとされている。また, ARG と PCNA を詳細に比較検討したものは見当たらない。そこで今回我々は胃底腺粘膜における PCNA と ARG の陽性細胞数を比較した。陽性細胞数の比較では正常状態, 増殖亢進状態いずれも PCNA の方が陽性細胞数が多かった。G2 期や M 期にも低値ながら PCNA が存在するという報告や⁶⁾, さらに Bravo ら⁷⁾ は G0 期の細胞内にも少量ながら存在するとされており, これは, PCNA 染色では細胞増殖サイクルの G1 後期から S 期早期の細胞のみならず, より広い範囲の細胞を陽性細胞としているためと思われた。

一方, さらに諸家の報告⁸⁾⁹⁾ では, 28.9% や 44.0% と PCNA の陽性率に差が認められる。これは, PCNA の染色性が ARG や BrdU に比較し染色性に濃淡の差がみられる特徴があり, 陽性細胞の基準が決まっていないためと考えられる。今回の検討で

は先に述べた如く、P1とP2に分類し計測したところ、それぞれの陽性率は、P1、P2ともARGと同様に正常群に比べ、胃粘膜増殖亢進群で、陽性細胞数は増加していた。しかし、その増加率でP1とARGは、類似していたが、P2は、低値を示していた。このPCNA染色性の問題として、標本の固定条件による影響を受けることが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。鈴木ら¹²⁾は固定法により染色性の違いを検討し、最良な固定法はパラホルムアルデヒド短時間固定であり、緩衝ホルマリン短時間固定およびメタノール固定も良好であると報告している。また、中野ら⁹⁾は、エタノール固定と緩衝ホルマリン固定において、PCNA発現率とBrdU標識率を比較したところ、エタノール固定についてのみ有意な相関関係が認められたと報告している。今回我々の使用したBouin固定における染色では、細胞質が染まったP2計測はいわゆるFalse positiveをひろってしまった可能性があり、Bouin固定ではP1計測がよいと思われた。近年、染色性の評価方法として、画像解析装置を用いる方法もあり、PCNAの弱陽性細胞をどのように評価すべきか、今後さらに基礎的検討が必要と思われた。

ラットの通常胃底腺粘膜の増殖細胞は腺頸部に多く認められ、腺上部、下部にはわずかに認められるのみである。陽性細胞数をPCNAとARGで比較する事に加えて、陽性細胞の胃底腺における分布についても検討を加えた報告はない。今回の胃粘膜増殖亢進群にOMEPLAZOLE(OPZ)を用いたが、これは、以前我々が報告したごとく、OPZを長期大量投与する事により、増殖細胞が腺頸部においてのみ増加するのではなく、腺頸部から腺底部まで広い範囲で増加する¹³⁾。このような、増殖細胞の単なる増加ではなく、分布の変化をPCNAでもとらえられるかを目的とした。ARGの検討では、正常群で 2.60 ± 0.30 に比べ胃粘膜増殖亢進群で 4.70 ± 1.22 と腺窩当たりの標識細胞数が増加しており、さらに標識細胞数が腺頸部において増加しているばかりでなく、腺頸部から腺底部まで広い範囲に見られた。同様に、腺窩当たりのPCNA P1計測陽性細胞数も正常群の 5.93 ± 1.22 に比べ増殖亢進群で、 10.11 ± 1.66 と増加し、陽性細胞の分布も腺頸部から底部に広く分布していた。先の述べたように、陽性細胞の分布胃底腺を腺上部、頸部、下部に分けて検討すると、ARG標識細胞数の分布は正常群に比べ胃粘膜増殖亢進群

で、腺上部で減少し、腺下部で増加していた。PCNA P1計測でも同様の傾向をとらえることができた。

結 語

1. Bouin固定におけるPCNA染色は、核のみ均一に染色されているものを陽性細胞とすべきであると考えられた。
2. PCNA染色は、陽性細胞の増加率及び分布の割合において、ARGと同様の変化をとらえていた。

文 献

- 1) 服部隆則, 細川洋平, 横山慶一, 他: 消化管粘膜の細胞動態と形態保持. 臨床科学 27: 1005~1013, 1991
- 2) Miyachi, K., Fritzier, M.J. & Tan, E.M.: Autoantibodies to nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol 121: 2228~2234, 1978
- 3) Geerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., et al.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer, 31: 13~20, 1983
- 4) Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., et al.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase δ auxiliary protein. Nature, 326: 517~520, 1987
- 5) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. & Macdonald-Bravo, H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . Nature, 326: 515~517, 1987
- 6) Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolebeare, F., et al.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp. Cell Res. 166: 209~219, 1986
- 7) Bravo R, Macdonald-Bravo H.: Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend upon DNA replication. EMBO J 4: 655~661, 1985
- 8) 高 長, 中西功夫: 増殖細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色による胃癌細胞増殖能の検討. 金沢大学十全医学会雑誌 100: 974~980, 1991
- 9) 中野 浩, 生田目公夫, 仲吉昭夫, 他: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) による胃癌増殖活性の評価—その基礎的検討と臨床応用について—. 日外会誌 6: 580~592, 1992
- 10) P.A. Hall., D.A. Levison., A.L. Woods., et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J. Pathol. 162: 285~294, 1990
- 11) Moriuchi, T.: Proliferating cell nuclear antigen

- (PCNA). A nuclear protein engaged in eukaryotic DNA replication for one billion years. *Med. Sci. Res.* **18**: 911~915, 1990
- 12) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一, 他: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の基礎的検討. *臨床検査* **36**: 81~84, 1992
- 13) 河合 隆: Proton pump inhibitor (Omeprazole) の胃粘膜に及ぼす影響について—胃粘膜 ontogeny に関連して—. *東医誌* **46**: 247~257, 1988

Evaluation of Gastric Mucosal Growth Potential

Yasuhiro MIZUGUCHI, Takashi KAWAI, Kazuhiko MIWA,
Toshiya HORIBE, Hiroshi KAKUTANI, Teitetsu NIIDO,
Tomoyuki SEKI, Takashi YAMADA, Kouji TURUI,
Hajimu IKEDA, Minoru KAWAGUCHI and Toshihiko SAITO

The Fourth Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan

PCNA staining, a new method of evaluating mucosal growth potential, presents various problems that still need to be solved, such as positive reactions shown by cells in the G_0 phase in the cell cycle. In the present study, we compared this technique with ^3H -thymidine autoradiography (^3H -TdR ARG) in rats. Wistar rats were divided into two groups: normal (untreated) animals ($n=5$) and those with enhanced gastric mucosal growth (treated with 100 mg/kg/day of omeprazole for 4 weeks; $n=5$). Animals from both groups were sacrificed after administration of ^3H -thymidine, and serial paraffin sections of fundus glands were prepared. One series of sections was subjected to ARG and the other to PCNA staining. In both groups, the numbers of ARG-labeled cells per glandular fossa and PCNA-stained cells were counted. PCNA-stained cells were counted as positive using two different criteria: (1) only cells with nuclei stained evenly and strongly stained (P1 measurement); and (2) all cells with stained nuclei and plasma regardless of the intensity of staining (P2 measurement). The number of ARG-labeled cells was 2.60 ± 0.30 in the normal group and 4.70 ± 1.22 in the enhanced gastric mucosal group. The number of PCNA-stained cells obtained through P1 measurement was 5.93 ± 1.22 in the normal group and 10.11 ± 1.66 in the enhanced gastric mucosal growth group, and the number of PCNA-stained cells obtained through P2 measurement was 14.54 ± 1.32 in the normal group and 19.10 ± 3.31 in the enhanced gastric mucosal growth group.

In PCNA staining, only cells in which nuclei are evenly and strongly stained should be counted as positive cells. Increases (%) in the number of positive cells by PCNA staining were similar to those determined by ARG. It seems the PCNA staining technique, as well as ARG, makes it possible to determine the degree of enhancement of mucosal growth, but improvements are necessary in order to eliminate differences in values obtained according to the measurement method used.

<Key words> ^3H -thymidine Autoradiography, Proliferating cell nuclear antigen, Gastric Mucosal Growth Potential.
