

P-23-B

抗Ki-67抗体および抗PCNA抗体の免疫組織化学における加熱処理抗原性賦活化メカニズムについて

柿本 恒知^{1,2)}、竹腰 進¹⁾、美谷島 克宏^{1,2)}、
長村 義之¹⁾
東海大学 医学部 基盤診療学系 病理診断学¹⁾
日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 安全性研究所²⁾

【はじめに】加熱処理による抗原性賦活化(AR)は、免疫組織化学(IHC)でよく用いられる方法である。ARのメカニズムは、ホルマリン固定による抗原性のmasking、すなわち抗原蛋白の架橋により形成された立体構造障害が加熱により変性/分解されるためと考えられているが、その詳細は明らかではない。先に我々はDot-blot法を用いた解析がIHCの結果を反映し、ARの定量的解析に有効であることを示した。この方法を用いた解析により、加熱処理が分子構造自体のもつmaskingを除去し、ARが起こる可能性を示した。今回、Ki-67およびproliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体を用いて同様の解析を行ったところ、抗体により異なる結果が得られた。【方法】1) Dot-blot法: ラット子宮ホモジネートを遠心分離(13000g, 30分)し、その上清を段階希釈し、Dot blotter (Bio-Rad社)を用いてニトロセルロース膜(NCM)上に吸着させた。このNCMをホルマリン固定し(30分)、加熱処理(microwave照射, 98°C, 15分)を行い、Ki-67抗体MM1 (Novocastra社)およびMIB-5、PCNA抗体PC10 (ともにDAKO社)を用いて抗原を検出し、その検出感度を固定の有無、加熱処理の有無間で比較した。2) IHC: ラット子宮凍結切片を未固定のまま、あるいは30分~1週間ホルマリン固定した。同様に加熱処理を行い、各抗原を検出し(SAB法)、その程度を比較した。【結果】1) Dot-blot法: NCMを加熱すると、固定/未固定に関わらず、いずれの抗体でも検出感度が顕著に(約100倍)増強した。2) IHC: a) MM1: 固定/未固定ともに非加熱では陰性であったが加熱処理で強い陽性像が認められた。b) MIB-5: 未固定では加熱/非加熱ともに陰性であったが、加熱処理を施すと、未固定では陰性(または弱陽性)、固定では強陽性となった。c) PC10: 未固定では、弱い陽性像が認められたが固定すると陰性となった。加熱処理を行うと、未固定では陰性、固定で強陽性となり、非加熱の結果と逆転した。【考察】今回の結果では、MM1のみが新仮説に沿う結果であった。他の抗体では、未固定でDot-blot法とIHCの結果が一致しなかったが、ホルマリン固定すると両者の結果は一致した。このことからMIB-5およびPC10では、さらに複合的なARのメカニズムが存在すると考えられる。

P-24-B

子宮内膜・増殖症および腺癌における遺伝子不安定性: プロゲステロン療法との関連

安田 政実、梶原 博、竹腰 進、長村 義之
東海大学 医学部 基盤診療学系 病理診断学

【はじめに】子宮温存を目的に黄体ホルモン(MPA)療法を施行した増殖症・内膜癌13例を対象に、microsatellite(MS)領域に起こる遺伝子変化を解析した。すなわち、ホルモン療法によって惹起される組織変化とloss of heterozygosity(LOH)の出現・変動パターンとの関連について解析したので報告する。【材料・方法】MPA療法が施行された増殖症:6例、内膜癌:7例のパラフィン切片より、Laser capture microdissection(LMS200)により病変部を採取した。各症例において、治療前および治療中の状態から得られた病理診断検体を用いた。以下の5種類のMS marker: D8S1132, D8S131, D8S133, D8S258, D8S1992のPCR産物を、正常内膜を対照としてLOHの有無を判定した(50%以下のlossを有意とした)。【結果】増殖症の治療前では17%に、治療後では24%にLOHが検出され、有意な変化は認められなかった。また、内膜癌の治療前ではLOHの頻度が7%であったのに対して、治療後のそれは35%で明らかに増加していた。marker別では、D8S1132, D8S133, D8S258で比較的高い陽性率を示した。【まとめ】増殖症・内膜癌において、MPA療法によって生じる組織変化にはLOHがとりわけ内膜癌で惹起されやすいと考えられる。すなわち、「癌から前癌状態への逆行性変化」には仮想遺伝子の消失が起こるものと推察される。