

前立腺癌におけるエストロゲンレセプターの免疫組織学的検索

—ホルモン療法及び細胞増殖能との関連—

奈良県立医科大学第2病理学教室

中岡伸悟

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ESTROGEN RECEPTOR IN HUMAN PROSTATIC CARCINOMA —MODIFICATION BY HORMONE THERAPY AND ITS ASSOCIATION WITH CELL KINETICS—

SHINGO NAKAOKA

The Second Department of Pathology, Nara Medical University

Received July 24, 1992

Summary: Immunohistochemical detection of estrogen receptor (ER) in paraffin sections of human benign prostatic hypertrophy (BPH) and prostatic carcinoma (PC) is examined. H 222 monoclonal antibody (ER-ICA kit) against ER was used in 30 cases of BPH and 50 cases of PC. All BPH cases were positive for ER, whereas only 48% of malignant cases (24/50) reacted with H 222 antibody. Positive rates for well-, moderately-, and poorly-differentiated adenocarcinomas were 86%, 64%, and 11%, respectively, indicating correlation between the histological degree of differentiation and positive reaction for ER. Moreover, 15 cases of PC after estrogen treatment were also examined and the histological effect on hormone therapy was investigated. Effects of estrogen treatment were poor when cases were negative staining for ER before therapy. It is suggested that ER immunohistochemistry has a new prognostic value in PC in terms of the response to hormone therapy. In addition, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and argyrophilic staining of the nucleolar organizer region (AgNOR) were examined to determine whether ER status related to cell kinetics. PCNA index and AgNOR score in poorly-differentiated PC were higher than those in more differentiated PC. ER status in PC seems to be correlated to the cell proliferative index.

Index Terms

prostatic carcinoma, benign prostatic hypertrophy, estrogen receptor, hormone therapy, PCNA, AgNOR

緒 言

近年、我国においても前立腺癌は増加傾向にある。その発生機序として加齢¹⁾、遺伝的要因²⁾³⁾および環境的要因⁴⁾などが指摘されているが、未だ確定的なものはない。しかし、前立腺癌は乳癌などのホルモン依存性腫瘍と同

じく、性ホルモンレセプターが関与しているという際だった特徴をもっている。この観点から、前立腺癌の発癌機構の解明にはホルモン依存性機構の解明が必要不可欠であり、アンドロゲンを中心に多くの研究結果が報告されてきている。この中には腫瘍の生物学的動態や予後判定として、アンドロゲンレセプター(AR)の存在が重要

であるとする報告も見られる⁵⁾。一方1941年、Hugginsらが抗男性ホルモン療法を開発⁶⁾して以来、臨床的治療分野でエストロゲンを主としたホルモン療法は主導的な役割を果たしている。ところが、近年、ホルモン療法に反応しない癌や反応しても再燃を示すホルモン非依存性癌の存在が問題になり、そのような癌に対して化学療法も盛んに行われてきている⁷⁾。以上の事実は、前立腺癌のホルモン療法におけるエストロゲンレセプター(ER)の関与を示唆するものであるが、これらについての報告は未だ少ない。そこで著者は前立腺癌について、性ホルモン依存性としてのERが発癌機構及び腫瘍増殖に対しいかなる位置づけになるかを研究するため、パラフィン包埋の前立腺組織を用いて前立腺肥大症及び癌におけるERの発現頻度、ERとホルモン療法との関連並びにERと細胞増殖能との相関について免疫組織学的に検討をした。

材料及び方法

研究対象としての前立腺組織は、1990年1月より1991年12月迄に奈良県立医大、県立奈良病院、県立三室病院、日生病院泌尿器科においてTransurethral resection (TUR)、前立腺全摘術及び前立腺針生検によって得た。これらの標本はすべて10%ホルマリン固定液で処理後、パラフィン包埋をした後、3~4 μm に薄切した。このパラフィン切片を材料として用い、免疫染色を施行する前にHE染色標本で日本泌尿器科学会、日本病理学会前立腺癌取扱規約⁸⁾に従った組織学的分類(高分化型(Well)、中分化型(Mod)、低分化型(Por))を行った。得られた標本は前立腺肥大症30例と前立腺癌50例(Well 7例、Mod 25例、Por 18例)で、そのうち15例の前立腺癌(Mod 10例、Por 5例)においてはホルモン療法前後の組織を得た。年齢は55歳から89歳で平均年齢70.1歳であった。また前立腺全摘術によって5例の大切片標本が得られた。これらのパラフィン標本に対し、以下の免疫染色及び検索を行った。

I. パラフィン包埋の前立腺組織におけるERの発現

1. ERの検出条件

ERの検出条件は当教室ですでに甲状腺について行っている⁹⁾が、前立腺に対し以下の条件につき再検討した。

1) 前処置の設定

前処置として用いた酵素は、Protease: 0.1%, 3%, 5%, 及び10% (Sigma: P-0384), DNAase I: 2% (Sigma: D-5025), Trypsin: 0.1% (Type I, Sigma: T-8003)の3種類で、各濃度37°C, 10分間で反応させ、比較検討した。

2) 一次抗体の反応条件の検討

一次抗体はH 222抗体(ER-ICA Kit: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Abbot Laboratories)を用い、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で反応時間(60分, 90分, 120分, overnight)及び反応温度(4°C, 37°C)を変えて比較検討した。

ERの検出方法はパラフィン切片を脱パラフィン後、Tris-HCl buffer (pH 7.6)で洗浄し、1% H_2O_2 含有メタノールで内因性 peroxidase の除去を行い、その後10% Protease で前処置を37°C, 10分間行った。正常家兔血清で非特異的の反応を除去し、一次抗体を37°C, 2時間で反応させた。二次抗体(ビオチン化抗ラットIgG抗体)、ABC complex (ABC Kit: Vector Laboratories)は37°C, 40分間で各々反応させた。最後に、diaminobenzidine (DAB)で発色させ、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を施した。なお各染色毎にER陽性の乳癌組織を陽性コントロールとして用い、陰性コントロールとして一次抗体の代わりにControl antibody (ER-ICA Kit)を反応させた。ERの判定は核質が褐色に染色された腺上皮細胞とし、腺上皮細胞(腫瘍細胞)100個中、陽性細胞が5%以下を陰性(-)、5~15%を弱陽性(+), 15~25%を中等度陽性(++)及び25%以上を強陽性(+++)とした。

2. ERの検索項目

1) 前立腺癌の組織分化度とERの発現及び年齢別分布

上記のER検出方法で、前立腺癌の組織分化度とERの発現及び年齢別分布に関し検討をした。

2) 前立腺全摘出標本を用いた組織分化度とERの分布

前立腺全摘術で得たパラフィン包埋の大切片(横断面)標本5例を用い、組織分化度によるER発現の差異と分布を比較検討した。

3) ホルモン療法に対する効果とERの発現

ホルモン療法前後で針生検及びTURで得られたパラフィン包埋の前立腺組織15例に対し、HE染色で治療前の組織分化度及び治療後の組織学的効果を判定するとともに、治療前後の組織におけるERの比較検討を行った。通常、ホルモン療法の効果指標としては日本泌尿器科学会、日本病理学会編前立腺癌取扱規約⁹⁾による組織学的効果度がよく用いられている。ところが実際判定対象となる組織は針生検によって得られる小切片であり、時にEf₁とEf₂を明確に判定することが困難なことがある。そのため今回は有効例に関し、Ef₁、Ef₂と分けずEf(+)とし、無効例Ef₀をEf(-)と表記し2群に分けた。ホルモン療法は14例がdiethylstilbestrol diphosphate

(Honvan[®])で500 mg/dayの静脈内投与を30日間、1例がchlormadinone acetate(Prostal[®])で100 mg/dayを12週間経口投与した。

II. パラフィン包埋の前立腺組織標本における細胞増殖因子(PCNA, AgNOR)とERとの関連

ERの発現と細胞増殖能との関連を検討するため、PCNA及びAgNORを用い、ERを検出したパラフィン包埋前立腺組織に対し組織学的検討を加えた。

1. PCNA検出の条件設定と評価方法

抗PCNA抗体として、PC10(IgG2a, mouse monoclonal antibody, DAKO社)を用いた。この抗体から低濃度で安定した結果を得るため、抗体濃度及び反応時間を検討した。濃度は、100倍、300倍、600倍及び800倍に希釈した。反応時間は30分、60分及び90分を設定し、反応温度は37℃及び室温で行った。これらの組合せの中で最も安定した染色が得られる条件を検索した。PCNAの検出はパラフィン切片を脱パラフィン後、蒸留水で洗浄し、0.3% H₂O₂を含むメタノールで内因性Peroxidaseを除去した。0.05 MTris-HCl buffer(PH 7.6)で洗浄した後、正常馬血清で非特異的反応を除去し、一次抗体を至適条件下で反応させた。二次抗体は37℃、30分で、ABC complexは37℃、45分でそれぞれ反応させた。発色はERにおける免疫組織染色と同様DABを用い、核染色はヘマトキシリンで行った。PCNAを用いた細胞増殖能の評価方法として、100個の腺上皮細胞(または腫瘍細胞)のうち核質が褐色に染色された陽性細胞の数をLabeling index(L.I.)とし、組織分化度及びERの発現と比較検討した。

2. AgNORの検出と評価方法

AgNOR染色は2%のゲラチンと1%のギ酸を溶解したA液と50%の硝酸銀水溶液のB液を1:2に混合した染色液を用いて施行した。染色は暗室で行い、室温で30分間反応させた。蒸留水にて洗浄後、脱水、透徹、

封入した。油浸レンズを用い顕微鏡下で核内のAgNOR数を1症例中100個の細胞について算出した。また核内のAgNOR 1 dot当たりの面積(AgNOR area)はオリンパス画像解析装置(日本アビオニクス社・SPICCA-II)を用いて計測した。AgNOR scoreは、各切片の1個の核内AgNORの平均dot数と1 dot当たりの平均面積の積で示した。

結 果

I. パラフィン包埋の前立腺組織におけるERの発現

1. ERの検出条件

1) 前処置の設定

前処置としてよく使用される酵素Protease, DNAase及びTrypsinのうちProteaseのみが陽性で、濃度は10%が強陽性を示した(Table 1)。

2) 一次抗体の反応条件

最適な前処置で処理した後、H 222抗体の反応条件を検索したところ、37℃、120分が強陽性を示し、次に37℃、90分が弱陽性を示したが、他はすべて陰性であった(Table 2)。

2. ERの検索結果

1-1)、2)から得られた最適な検出条件で前立腺肥大症30例と前立腺癌50例のERの検出を行った。

1) ER発現と組織学的分化度

Table 2. Comparison of immunohistochemical staining for ER according to different temperature and incubation time

Temperature (°C)	Time(min)	Staining intensity
37	60	—
	90	+
	120	##
4	overnight	—

Table 1. Comparison of immunohistochemical staining for ER according to different pretreatment

Pretreatment	Temperature(°C)	Time(min)	Staining intensity
protease	0.1%	37	—
	3%	37	+
	5%	37	##
	10%	37	###
DNAase	2%	37	—
Trypsin	0.1%	37	—
No pretreatment	37	10	—

Protease : type XXV, DNAase : type I, Trypsin : type I

ERの発現を大きく陽性群(+~+++)と陰性群(-)に分け、組織学的分化度別にER陽性率を比較すると、前立腺肥大症30例では全例陽性(100%)、前立腺癌では高分化型7例中6例(86%)、中分化型25例中16例(64%)、及び低分化型18例中2例(11%)であった(Table 3, Photo 1, 2, 3, 4). すなわち組織分化度が低くなるに従いER陽性率も有意に低下する結果を示した。また陽性群を陽性細胞の出現頻度、すなわちimmunoreactivityで分類したが一定の傾向は示さなかった。前立腺肥大症及び前立腺癌の各組織型とER陽性出現数の年齢別分布をTable 4に示した。各年齢間で組織型及びER陽性出現数に関し、一定の傾向は認められなかった。

2) 前立腺全摘出標本を用いた組織分化度とERの分布

大切片5例のHE染色による組織学的診断は①前立腺肥大症のみ、②前立腺肥大症+高分化型腺癌、③前立腺肥大症+高分化型腺癌+中分化型腺癌、④前立腺肥大症+中分化型腺癌、及び⑤前立腺肥大症+高分化型腺癌+中分化型腺癌+低分化型腺癌であった。各mapping(Fig.)に示すように同一切片内でも腫瘍の組織学的分化度の差によってER陽性細胞の出現頻度が異なり、前項の結果と同様分化度が低い部分にER陽性細胞が少ないという結果を得た。また④のmappingに示すように同じ中分化型腺癌でもER陽性細胞群と陰性細胞群が混在するという結果も得た。しかし、前立腺全摘出を受ける手術適応の多くは、組織分化の高いものに限られてくるためER陰性を示すものは少なかった。

3) ホルモン療法に対する効果とERの発現

ホルモン療法前の組織診断では前立腺癌15症例のうち中分化型が10例、低分化型が5例であった。中分化型の中で、ER陽性例5例のうち4例(80%)はホルモン療

法が有効であった。しかしER陰性例は5例ともホルモン療法に無効であった。低分化型でも1例のER陽性例はホルモン療法に有効であったが、陰性4例はいずれも無効であった(Table 5)。また、これらのER陽性例についてのimmunoreactivityに関しては、中・低分化型腺癌とも(++)~(+++)と中等度ないし、強陽性を示した。以上より、中・低分化型であってもER陽性が中等度以上

Table 4. Age distribution of benign prostatic hypertrophy (BPH) and prostatic carcinoma (PC) with ER

Age	BPH	PC			ER	
		Wel	Mod	Por	(+)	(-)
50~59Y	1	3	1	0	4(3)	1
60~69Y	14	0	9	9	19(5)	13
70~79Y	14	3	11	6	25(11)	9
80~89Y	1	1	4	3	6(5)	3
No. of total cases	30	7	25	18	54(24)	26

Wel : Well-differentiated, Mod : Moderately-differentiated

Por : Poorly-differentiated adenocarcinoma

() : The number of PC

Table 5. Relationship between ER expression and the effect of treatment with estrogen in prostatic carcinomas

Histological type	ER	No. of cases	Ef(+)	Ef(-)
Mod	+	5	4	1
	-	5	0	5
Por	+	1	1	0
	-	4	0	4

Ef(+)=E₁ and E₂

Ef(-)=E₀

Table 3. Immunohistochemical staining for ER according to histological types of prostatic lesions

Histological type	No. of cases	Incidence (%)	Immunoreactivity			
			-	+	##	#
BPH	30	30(100)	0	10	14	6
Wel	7	6(86) ^{a)}	1	1	3	2
PC	25	16(64) ^{b)}	9	2	4	10
Por	18	2(11) ^{c)}	16	0	1	1

(-) Negative (0-5% positive cells/100 cells)

(+) Weakly positive (5-15% positive cells/100 cells)

(##) Moderately positive (15-25% positive cells/100 cells)

(#) Strongly positive (More than 25% positive cells/100 cells)

a) Significantly different from BPH group (p<0.01)

b) Significantly different from Wel group (p<0.01)

c) Significantly different from Mod group (p<0.01)

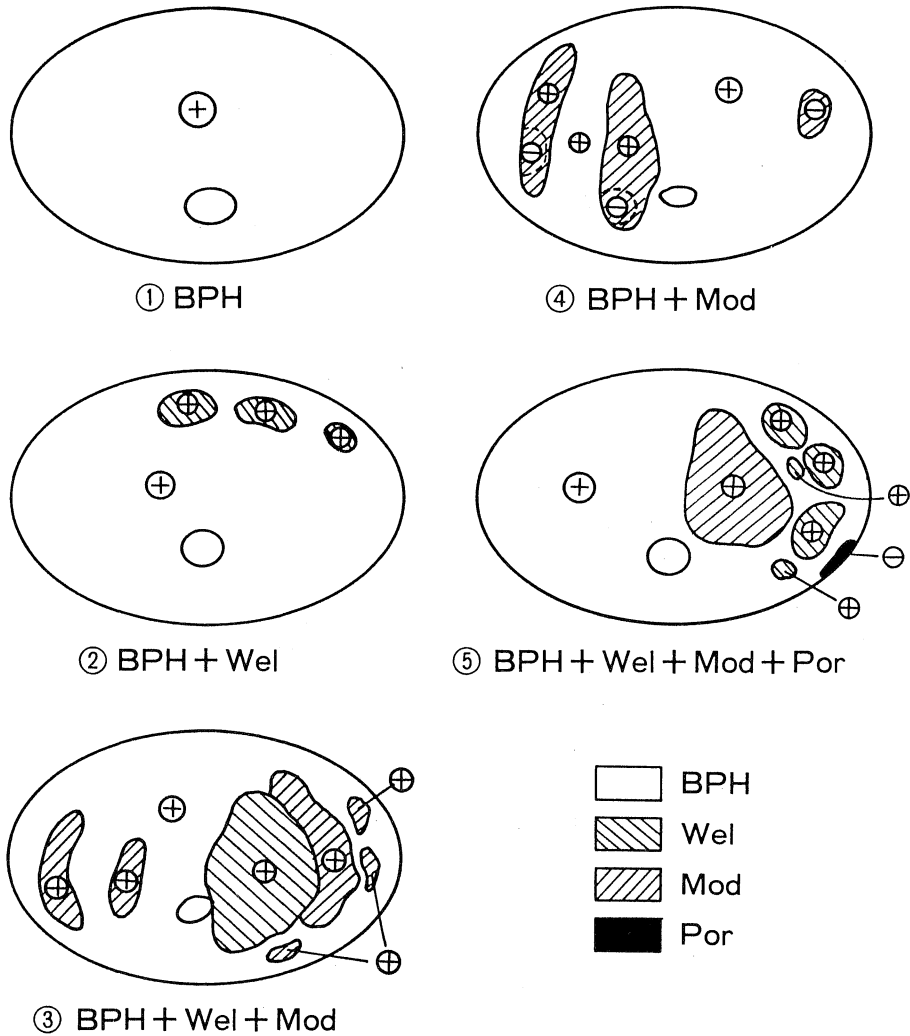


Fig. Schematic localization of immunohistochemical staining for ER and histological types of prostatic lesions.

である症例においてホルモン療法が有効であることを示唆する結果を得た。

II. パラフィン包埋の前立腺組織標本における細胞増殖因子(PCNA, AgNOR)とERとの関連

1. PCNA 検出の条件設定

PCNA 検出の最適条件は、一次抗体(PC 10)の100倍希釈で室温60分、300倍希釈で室温90分、600倍希釈で37℃90分で最も安定した染色が得られた(Table 6)。今回は一次抗体を最も低濃度である600倍を用い、37℃90分の反応条件でPCNAを検出した。

2. 細胞増殖因子(PCNA, AgNOR)と組織分化度及びER発現との関連

Table 6. Combination of appropriate conditions for the PCNA staining

Dilution of PC10	Temperature (°C)	Time (min)
1 : 100	room	60
1 : 300	room	90
1 : 600	37	90

組織分化度別にPCNAのLI及びAgNORのdot数を測定した結果、PCNAでは前立腺肥大症と高分化型の前立腺癌で有意差はみられなかったが、中分化型、低分化型と分化度が低下するにつれLIが有意に高くなる傾向を認めた(Photo 5, 6)。AgNORのdot数も前立腺

Table 7. Cell kinetic information on benign and malignant prostatic lesions

		No. of cases	PCNA		AgNOR	
			L. I.	dot/cell	area(μm^2)	score
BPH		30	1.14 \pm 0.33	2.57 \pm 0.30	1.12 \pm 0.45	2.88 \pm 0.72
	Wel	7	1.12 \pm 0.54	3.02 \pm 0.19*	1.26 \pm 0.23	3.28 \pm 0.36*
PC	Mod	25	4.17 \pm 1.68*	3.66 \pm 0.57*	1.45 \pm 0.44	5.34 \pm 1.21*
	Por	18	6.55 \pm 1.89*	4.10 \pm 0.78*	2.19 \pm 0.40*	8.95 \pm 1.42*

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen L. I. : Labeling index

AgNOR : Argyrophilic staining of the nucleolar organizer region

*Significantly different from BPH group ($p < 0.01$)

Table 8. Relationship between ER immunohistochemistry and cell kinetics for PCNA and AgNOR on prostatic carcinomas

	No. of cases	PCNA		AgNOR	
		L. I.	dot/cell	area(μm^2)	score
ER(+)	24	1.45 \pm 0.72	3.53 \pm 0.46	1.31 \pm 0.41	4.64 \pm 1.46
ER(-)	26	6.65 \pm 2.96*	4.08 \pm 0.82*	2.05 \pm 0.45*	8.42 \pm 2.33*

*Significantly different from ER(+) group ($p < 0.01$)

肥大症 2.57 ± 0.30 , 前立腺癌では高分化型 3.02 ± 0.19 , 中分化型 3.66 ± 0.57 , 低分化型 4.10 ± 0.78 と低分化になるとともに高くなった。さらに AgNOR area, AgNOR score と組織分化度とを比較検討した結果, AgNOR area, AgNOR score とともに分化度の低い方が高い数値を示した。また, その傾向は AgNOR score が dot 数や area に比べ相関関係が最も著しいという結果が得られた (Table 7, Photo 7, 8)。一方, ER の発現と細胞増殖因子との関連を検索したところ, PCNA, AgNOR(dot 数, area 及び score) いずれにおいても ER 陰性群の方が陽性群より有意に ($p < 0.01$) 高い数値を示し, 細胞増殖能との相関を示した (Table 8)。

考 察

前立腺における ER の存在は RBA (Radioligand binding assays) 法⁹⁾や, EIA (Enzyme immunoassay) 法¹⁰⁾¹¹⁾などですでに指摘されており, また凍結切片を用いた前立腺内の ER の局在性をみた報告もされている。しかしながら ER-EIA を用いた測定では, 前立腺癌の方が前立腺肥大症より細胞質分画の ER が高かったとするもの¹²⁾や, ER-ICA test で, 前立腺癌には ER が陰性であったとするもの¹³⁾, あるいは両者に差は認められなかったとするもの¹⁴⁾など, 一定の見解は得られていない。またその分布においても, ER が腺周囲の線維芽細胞や平滑筋細胞及び過形成を示す基底細胞に多く存在し, 腺上皮細胞には認められなかったとする報告¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾が多い。

今回, 著者は, Greene ら¹⁷⁾が作製した, H 222 抗 ER モ

ノクローナル抗体を用いることによって, 腺細胞及び腫瘍細胞の核を染色することができた。この抗体はヒト乳癌培養株である MCF-7 の細胞質分画から抽出されたモノクローナル抗体であり, その特異性は高いとされている^{18)~20)}。一般には凍結標本を用いる場合が多いが, 最近, 条件設定により, パラフィン標本にても染色が可能になってきた⁹⁾。今回の検索でも, 前処置や一次抗体の反応温度及び反応時間を設定することで, 十分な ER の検出が測定でき, 癌細胞個々の heterogeneity を観察し得た。また ER 陽性の判定については, 従来染色細胞が 1 個でもあれば陽性としたり²¹⁾, 5~10% の細胞陽性率を cut off 値とした報告²¹⁾²²⁾があるが, 一定の判定基準は定まっていない。今回の検索では, 代表的な 3 視野における各腺上皮細胞および, 腫瘍細胞 100 個の中から, 5 個以上あるもの (5%) を陽性 (cut off 値) としたが, これは陰性コントロール群がすべて, この値以下の陽性率であったことを基準とした。

前立腺における ER と組織分化度との関連については, 前立腺肥大症で全例 ER 陽性であったが, 前立腺癌では ER 陽性率が低下し, しかも分化度が低くなるにつれ低下するという結果を得た。現在のところ ER と前立腺癌の組織分化度との相関を検討した報告はないが, AR に関しては, 中等度以上の分化型癌に AR 陽性例が多く, ホルモン療法の効果もこの群に高いとする報告⁹⁾がある。そこでさらに, ER 発現とホルモン療法との関連について検索した。

前立腺癌におけるホルモン療法は, 1941 年 Huggins

ら⁹⁾が提唱した除糞術とエストロゲン製剤の投与が中心となってきた。エストロゲン剤の作用は、間脳一下垂体系に作用しゴナドトロピン分泌抑制を介してアンドロゲンを減少させる間接的な作用と、前立腺内におけるテストステロンの代謝過程で、5 α -reductase 活性を阻害し、デハイドロテストステロンの生成を抑制するという直接的な作用で効果を発揮すると言われている。しかし、エストロゲン製剤の効果が期待できる前立腺癌は、組織学的に分化度の高いもので、低分化型では効果があっても持続時間が短いことが多い。また、ホルモン療法を続けている間に再燃する場合もあり、その場合の組織像は治療前に比べ低分化型になっていることが多く、さらに前立腺組織中のデハイドロテストステロンやARも減少していると言われている⁷⁾。これらの機序については前立腺組織のホルモン依存性の喪失やホルモン依存性の変化、及び不十分な治療などが言われてきた。島崎ら²⁹⁾は、元来前立腺癌にはホルモン感受性細胞と抵抗性細胞が混在し、ホルモン療法によってホルモン感受性細胞は消失・縮小するが、逆にホルモン抵抗性細胞は残存し増殖するとの仮説を立てている。一方、松本²⁴⁾はアンドロゲン依存性腫瘍から樹立した細胞株を用い、それらがFGF (Fibroblast Growth Factor) 様因子を分泌していることを見出した。この事から島崎らの説をさらに一歩進め、このFGF 様成長因子が自らの細胞増殖あるいはホルモン非依存性の細胞を増殖させるため、ホルモン療法に対し抵抗性を示すようになるという新しい仮説を立てた。その他免疫力などの宿主環境状態の影響も唱えられており、抗男性ホルモン剤の投与が免疫力の低下を引き起こしそのためホルモン依存性を失うとする報告²⁵⁾もある。今回の実験では、①ER 陽性細胞が、前立腺肥大症やより分化度の高い癌に多いこと②一つの前立腺癌標本あるいは同一分化度の癌組織内にもER 陽性細胞群と陰性細胞群が混在し、低分化な組織の部分にER 陽性細胞が乏しいこと③ER 陽性細胞が多い症例にホルモン療法がよく反応していること④ER 陽性細胞群は陰性群に対し増殖能が低いことなどが認められた。以上より島崎らが提唱する前立腺癌内のホルモン感受性細胞と抵抗性細胞の混在が、ホルモン抵抗性や再燃性の原因になっていることが強く示唆された。そして、そのホルモン感受性細胞としてのER 陽性細胞が、ホルモン療法効果の直接の指標になり得ると考えられた。従来このホルモン療法の効果指標としては、①組織中のデハイドロテストステロンの測定；治療前にデハイドロテストステロンの量が多い症例は、ホルモン療法によく反応する。②ARの測定；可溶性核分画のARの多い症例ほど長期間ホルモン療法

に反応する、などの報告²⁶⁾²⁷⁾がある。また、血清プロラクチンの高値は前立腺癌の予後が悪いという報告²⁸⁾もみられる。しかし、いずれも組織が大量に必要であったり、簡便性に欠けていたりする場合が多く、簡単で確実なホルモン療法効果の予知指標が求められてきた。その点において、今回著者が行ったERの測定は、パラフィン切片を利用できること、症例数は少ないがホルモン療法の反応を鋭敏に表していることからホルモン療法の新しい効果指標として有用であり、今後さらに症例を追加し経過を追っていくことで臨床的に応用する価値があるものと考えられた。

このように、ERとホルモン療法の関連性は強く示唆されたが、前立腺癌が高齢者に多いという点から加齢との関連はさけて通れない問題である。Zumoffら²⁹⁾が13種の血清ホルモン濃度を前立腺癌患者と正常者と比較したところ、テストステロン、デハイドロテストステロン、コルチゾール、及びエストロゲンの4種については、65歳未満の前立腺癌患者と正常者の間に有意差を見出したが、65歳以上では有意差は認めなかったとしている。すなわち前立腺癌も乳癌と同様、若年者と老年者で病因論的に異なると考えられている。しかしながら、今回の検討では、前立腺癌の組織分化度及びERの存在の有無につき年齢別による相違は有意に認められなかった。

更に、ERが組織分化度と相関を示すことから、細胞増殖能との関連を検討した。細胞増殖能の評価としてパラフィン切片を用いたものでは、PCNA³⁰⁾やAgNOR³¹⁾が最近よく利用されている。しかも定量的な指数として、PCNAではL.I.、AgNORでは1個の細胞の核内にあるdot数が通常使用されている。しかしAgNORにおいて、従来のdot数による評価だけでは増殖能は反映されるが、腺腫と癌のような前癌性病変と癌との鑑別には役立たないという報告があり、dot数とdot面積の平均値の積(AgNOR score)がその鑑別に有効であるとする意見³²⁾がある。今回、これらの細胞増殖能の評価を前立腺において再検討するため、PCNA及びAgNORを増殖能の指標として組織分化度との相関を検索した。その結果、ほぼ分化度が低くなるにつれ増殖能が高い値を示した。しかし、PCNAにおけるL.I.は、他の腫瘍において報告されている値と比べ全体的に小さい値を示した。この事は従来から、前立腺腫瘍はdoubling timeが長いとの報告³³⁾に一致するものであると考えられる。次にAgNORの面積及びAgNOR scoreについて検討した。いずれも組織分化度との関連を示したが、特にAgNOR scoreがdot数及び面積より鮮明に分化度ごとの差異を示した。この事から、前立腺においてもAgNOR scoreが有用で

あると考えられた。AgNOR の面積に関しては、悪性度が高くなるにつれて小さくなるとされており³⁴⁾³⁵⁾、今回の実験結果と相違するが、AgNOR の発現には細胞増殖、転写活性及び遺伝子増幅などの種々の因子の関与が想定されており³⁶⁾、そのことからすれば一定の見解を得るにはさらに症例を重ね検討する余地があると考えられた。

以上より、PCNA 及び AgNOR が前立腺においてもその増殖能の評価として用いられることが確認されたところで、ER の発現による増殖能の差異を検索したが、有意に ER 陰性群の方が増殖能が高いという結果を得た。この結果から、ER の発現の有無がホルモン療法に対する反応の予測のみならず細胞増殖能の程度をも推測されることが示唆された。また同時に ER 陰性細胞群は、ホルモン抵抗性細胞群であるだけでなく、何らかの原因(増殖因子の関与あるいは制御因子の欠如)によって強い細胞増殖能を保持している細胞群であると考えられた。

以上、前立腺肥大症及び前立腺癌における ER の発現及びその意義に関し、組織分化度、ホルモン療法及び細胞増殖能の面から免疫組織学的に検討した。

結 語

前立腺癌における ER の発現が、発癌機構及び腫瘍増殖に対しいかなる影響を示すのかについて検討するため、前立腺組織のパラフィンブロックを用い免疫組織学的に検索し、さらに細胞増殖能との関連を解析した。その結果、以下の結論を得た。

1. ER の出現頻度は前立腺肥大症に比べ、前立腺癌で低く、特に分化度が低下するにつれ、ER の頻度も減少傾向を示した。

2. ホルモン療法に対する反応は、ER 陽性群が陰性群に比べ良好で、ER 発現の検索はホルモン治療効果を示す指標として有益であると考えられた。

3. 前立腺全摘術から得られた大切片標本における ER の検索より、同一標本、同一分化度の癌であっても ER 陽性群と陰性群が混在するものを認めた。この事は、癌細胞の heterogeneity を示すと同時に、ホルモン非依存性癌の発生原因の一つである可能性が示唆された。

4. 前立腺肥大症及び前立腺癌の組織分化度と細胞増殖能(PCNA, AgNOR)は相関関係を示し、細胞増殖能の評価としては特に AgNOR score が有用であった。

5. ER 陰性群は ER 陽性群に比べ有意に細胞増殖能が強く、ホルモン療法に抵抗を示すだけでなく、何らかの増殖因子の関与または制御因子の欠如が関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始、御指導、御校閲を賜りました日浅義雄教授に深甚なる謝意を捧げると共に、論文の御校閲、御助言を賜りました泌尿器科学教室岡島英五郎教授ならびに腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝致します。更に直接、御指導いただきました小西 登講師に感謝するとともに、研究を御援助下さった泌尿器科学教室三馬省二講師、第2病理学教室北堀吉映助手をはじめ、教室諸兄に感謝の意を表します。

本論文の一部は第81回日本病理学会総会、第51回日本癌学会総会および第83回アメリカ癌学会にて発表した。

文 献

- 1) Shain, S. A., McCullough, B. Nitchiuk, M. and Boesel, R. W.: Prostate carcinogenesis in the AXC rat. *Oncology* 34: 114-122, 1977.
- 2) Cannon, L., Bishop, D. T., Skolnick, M., Hunt, S., Lyon, J. L. and Smart, C. R.: Genetic epidemiology of prostate cancer in the Utah Mormon genealogy. *Cancer Surv.* 1: 47-69, 1982.
- 3) Meikle, A. W., Smith, J. A. and West, D. W.: Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex-steroid levels. *The Prostate* 6: 121-128, 1985.
- 4) 大野良之, 青木国雄, 黒石哲生, 富永祐民: 日本人の尿路性器癌の疫学. *臨泌.* 38: 555-569, 1984.
- 5) 島崎 淳, 布施秀樹, 座間秀一: 前立腺癌. *癌の臨床* 31: 1195-1201, 1985.
- 6) Huggins, C. and Hodges, C. V.: Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1: 293-297, 1941.
- 7) 平尾佳彦, 窪田一男, 吉江 貫, 田畑尚一, 三馬省二, 大園誠一郎, 岡島英五郎, 佐々木憲二, 吉川元祥, 妻谷憲一, 平田直也, 青山秀雄: 前立腺癌に対する化学療法. *泌尿紀要* 37: 817-824, 1991.
- 8) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 泌尿器科・病理前立腺癌取扱い規約(第1版). 金原出版, 東京, 1985.
- 9) Hiasa, Y., Nishioka, H., Kitahori, Y., Yane, K., Nakaoka, S., Ohshima, M., Konishi, N., Nishii, K., Kitamura, M. and Sugimura, M.: Immuno-

- histochemical detection of estrogen receptors in paraffin sections of human thyroid tissues. *Oncology* **48** : 421-424, 1991.
- 10) **Tilley, W. D., Keightley, D. D. and Marshall, V. R.** : Oestrogen and Progesterone receptors in benign prostatic hyperplasia in humans. *J. Steroid Biochem.* **13** : 395-399, 1980.
 - 11) **Ekman, P., Barrack, E. R., Greene, G. L., Jensen, E. V. and Walsh, P. C.** : Estrogen receptors in human prostate : Evidence for multiple binding sites. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57** : 166-176, 1983.
 - 12) **Harper, M. E., Sibley, P. E. C., Francis, A. B., Nicholsson, R. I. and Griffiths, K.** : Immunocytochemical assay for estrogen receptors applied to human prostatic tumors. *Cancer Res. (Suppl.)* **46** : 4288_s-4290_s, 1986.
 - 13) **Mobbs, B. G., Johnson, I. E. and Liu, Y.** : Quantitation of cytosolic and nuclear estrogen and progesterone receptor in benign, untreated, and treated malignant human prostatic tissue by radioligand binding and enzyme-immunoassays. *The Prostate* **16** : 235-244, 1990.
 - 14) **Wernert, N., Gerdes, J., Loy, V., Seitz, G., Scherr, O. and Dhom, G.** : Investigations of the estrogen (ER-ICA-test) and the progesterone receptor in the prostate and prostatic carcinoma on immunohistochemical basis. *Virchows Archiv A Pathol. Anat. Histopathol.* **412** : 387-391, 1988.
 - 15) **Emtage, L. A., Dunn, P. J. S. and Rowse, A. D.** : Androgen and oestrogen receptor status in benign and neoplastic prostate disease. *Brit. J. Urol.* **63** : 627-633, 1989.
 - 16) **Wernert, N. and Seitz, G.** : Prostatic cancer Immunohistochemistry of steroid hormone receptors. *Curr. Top. Pathol.* **83** : 475-494, 1991.
 - 17) **King, W. J. and Greene, G. L.** : Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* **307** : 745-747, 1984.
 - 18) **King, W. J., DeSombre, E. R., Jensen, E. V. and Greene, G. L.** : Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors. *Cancer Res.* **45** : 293-304, 1985.
 - 19) **McCarty, K. S. Jr., Miller, L. S., Cox, E.B., Konrath, J. and McCarty, K. S. Sr.** : Estrogen receptor analyses, correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109** : 716-721, 1985.
 - 20) **Jonat, W., Maass, H. and Stegner, H. E.** : Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples. *Cancer Res. (Suppl.)* **46** : 4296_s-4298_s, 1986.
 - 21) **中尾 誠, 野口真三郎, 小山博記, 佐藤文三** : 免疫組織化学的手法による乳癌エストロゲンレセプターの局在の検討-形態学的レセプターの検索は乳癌の臨床に何をもちたらし得るか. *乳癌の臨床* **1(2)** : 292-302, 1986.
 - 22) **戸井雅和, 浜田雄蔵, 世戸芳博, 久松和史, 末広真一, 峠 哲哉, 新本 稔, 服部孝雄** : 乳がんの Estrogen Receptor Assay におけるモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法と Dextran Coated Charcoal (DCC)法の比較. *癌と化学療法* **13(10)** : 3056-3062, 1986.
 - 23) **島崎 淳, 布施秀樹, 秋元 晋, 角谷秀典, 赤倉功一郎, 市川智彦** : ホルモン依存性の基礎的・臨床的検討. *癌と化学療法* **15(4)**, PART-II : 909-916, 1988.
 - 24) **松本圭史** : 性ホルモン癌の増殖. *ホルモンと臨床* **37** : 1073-1077, 1989.
 - 25) **Kalland, T. and Haukaas, S.** : Effect of treatment with diethylstilbestrol-polyestradiol phosphate or estramustine phosphate (estrecyt) on natural killer cell activity in patients with prostatic cancer. *Invest. Urol.* **18** : 437-439, 1981.
 - 26) **Geller, J., De La Vega, D. J., Albert, J. D. and Nachtshiem, D. A.** : Tissue dihydrotestosterone levels and clinical response to hormonal therapy in patients with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58** : 36-40, 1984.
 - 27) **Geller, J., Albert, J. D., Nachtshiem, D. A. and Loza, D.** : Comparison of prostatic cancer tissue dihydrotestosterone levels at the time of relapse following orchiectomy or estrogen therapy. *J. Urol.* **132** : 693-696, 1984.
 - 28) **Mee, A. D., Khan, O. and Mashiter, K.** : High serum prolactin associated with poor prognosis in carcinoma of the prostate. *Brit. J. Urol.* **56** : 698-701, 1984.

- 29) **Zumoff, B., Levin, J., Strain, G. W., Rosenfeld, R. S., O'Connor, J., Freed, S. Z., Kream, J., Whitmore, W. S., Fukushima, D. K. and Hellman, L.** : Abnormal levels of plasma hormones in men with prostate cancer : Evidence toward a "two-disease" theory. *The Prostate* **3** : 579-588, 1982.
- 30) **松野吉宏, 向井 清** : 増殖細胞核抗原(PCNA). *病理と臨床* **9** : 879-883, 1991.
- 31) **笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文子, 佐藤郁郎** : AgNORs-病理組織診断への応用. *病理と臨床* **9** : 890-893, 1991.
- 32) **菅井 有** : 大腸上皮性増殖性病変における Ag-NOR の生物学的意義. *日消誌*. **88**(11) : 2749-2756, 1991.
- 33) **Whitmore, W. F. Jr.** : Prostate cancer, natural history and staging. *in Urologic Cancer*. eds. Garnick, M. B. and Richie, J. P. Plenum Med. Book Co., N. Y. and London, 1983.
- 34) **Ruschoff, J., Plate, K., Bittinger, A. and Thomas, C.** : Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Path. Res. Pract.* **185** : 878-885, 1989.
- 35) **Yang, P., Huang, G. S. and Zhu, X. S.** : Role of nucleolar organizer regions in differentiating malignant from benign tumors of the colon. *J. Clin. Pathol.* **43** : 235-238, 1990.
- 36) **Matsumura, K., Sasaki, K., Tsuji, T., Murakami, T., Takahashi, M. and Shinozaki, F.** : Changes of AgNORs in HeLa cells during serum starvation. *Br. J. Cancer* **62** : 385-387, 1990.

Explanation of photos

- Photo. 1. Positive reaction with ER-ICA in well-differentiated PC (arrowhead). (ABC method, counterstained with hematoxylin, $\times 200$)
- Photo. 2. Higher magnification of Photo 2. ($\times 1000$)
- Photo. 3. Positive reaction with ER-ICA in poorly differentiated PC (arrowhead). (ABC method, counterstained with hematoxylin, $\times 200$)
- Photo. 4. Negative reaction with ER-ICA in poorly-differentiated PC. (ABC method, counterstained with hematoxylin, $\times 400$)
- Photo. 5. Immunohistochemical staining for PCNA in well-differentiated PC. (ABC method, counterstained with hematoxylin, $\times 200$)
- Photo. 6. Immunohistochemical staining for PCNA in poorly-differentiated PC with PCNA. (ABC method, counterstained with hematoxylin, $\times 200$)
- Photo. 7. A histological section of well-differentiated PC. ($\times 400$) : Many nuclei possess only a few AgNORs.
- Photo. 8. A histological section of poorly-differentiated PC. ($\times 400$) : Most cells contain numerous AgNORs which are irregularly large.

