

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 佐野 知江  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 661 号  
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 アポトーシスの病理組織学的検索における M30 cytoDEATH 免疫染色の有用性について  
—TUNEL 法との比較検討—

論文審査委員 主査 教授 味岡 洋一  
副査 教授 寺井 崇二  
副査 教授 佐藤 祐一

### 博士論文の要旨

【背景と目的】アポトーシスの病理組織学的検索には、caspase 系酵素の活性化により生じた断片化 DNA を認識する TUNEL 法が汎用されてきた。しかし TUNEL 法には細胞壊死も認識することや、アポトーシス指数 (apoptotic index: A. I.) を算定する際、どの大きさの断片核までを TUNEL 陽性とするかについての基準が無いことから、A. I. には客観性が乏しい、等の問題点があった。M30 cytoDEATH 免疫染色はアポトーシスの際に caspase 3 で切断される細胞骨格蛋白 CK18 のエピトープを特異的に認識する方法であり、アポトーシスの早期段階の細胞質に陽性となり、壊死細胞には染色されないことから、A. I. の客観的算定に有用な方法と期待されている。本研究では、M30 cytoDEATH 免疫染色と TUNEL 法の比較を行うことで、M30 cytoDEATH 免疫染色がアポトーシスの病理組織学的検索に有用かどうかについて検討した。

【方法】内視鏡的切除ホルマリン固定大腸腺腫 27 病変を対象とした。パラフィンブロックからの 3 $\mu$ m 切片で HE 染色、M30 cytoDEATH 免疫染色、TUNEL 法を施行した。M30 cytoDEATH 免疫染色では、細胞質全体がびまん性もしくは顆粒状に染色されるものを陽性、TUNEL 法では、茶色に発色された顆粒状もしくは点状陽性物すべてを TUNEL 陽性 (A11 TUNEL 陽性) とし、それらの中で形態学的にアポトーシス小体 (apoptotic body: AB) と判定できるものを AB TUNEL 陽性、とした。HE 染色標本でアポトーシス小体が認められる領域を選択し、M30 cytoDEATH 免疫染色と TUNEL 法染色で同一視野領域を対物 40 倍で観察し、それぞれの陽性細胞頻度をアポトーシス指数 (apoptotic index: 以下 A. I.) として算定した。

【結果】TUNEL 法の A11 TUNEL 陽性では、小点状陽性物が複数集簇して存在するものの明らかなアポトーシス小体を形成しないもの、小型点状陽性物が腺管基底側にびまん性に出現するものなどがみられた。M30 cytoDEATH 免疫染色では、陽性判定に苦慮するものは少なかった。24 例の腺腫から 54 領域を抽出し、各領域の A. I. を算定した。A11 TUNEL 陽性の A. I. (A11 TUNEL A. I.) は  $9.49 \pm 0.87\%$ 、AB TUNEL 陽性の A. I. (AB TUNEL A. I.) は  $3.73 \pm 0.29\%$ 、M30 cytoDEATH 免疫染色の A. I. (M30 A. I.) は  $2.53 \pm 0.35\%$  で、それぞれの間には有意差があった ( $P < 0.001$ )。M30 A. I. は、A11 TUNEL A. I.、AB TUNEL A. I. のいずれとも有意に相関していた ( $P < 0.001$ )。

【考察】本研究では、M30 cytoDEATH 免疫染色がアポトーシスを正確に反映しているかどうかを確認す

るため、TUNEL 法で染色された全ての顆粒状・点状物をアポトーシスとみなした場合と、組織像を加味してアポトーシス小体を形成した顆粒状・点状染色物のみをアポトーシスとみなした場合とで A. I. の比較を行った。M30 A. I. は All TUNEL A. I.、AB TUNEL A. I. とも有意に相関しており ( $P < 0.001$ )、M30 cytoDEATH 免疫染色はアポトーシス細胞の頻度を反映しているものと考えられた。M30 cytoDEATH 免疫染色により同定されるアポトーシスは、その早期の段階のみを捉えているため A. I. は低い値で表現される。そのため、質的に異なる病変の AI を比較検討する際には、実際のアポトーシスの違いが十分に反映されなくなる可能性も否定できない。今後、良性腫瘍・悪性腫瘍・非腫瘍性病変などを包括した検討の追加が必要である。しかし、TUNEL 法に比べ判定の容易さや客観性の観点から、M30 cytoDEATH 免疫染色はアポトーシスの病理組織学的検索法として有用なものとして期待される。

#### 審査結果の要旨

アポトーシスの病理組織学的検索には TUNEL 法が汎用されてきたが、同法では細胞壊死も認識することや、アポトーシス指数 (apoptotic index: A. I.) を算定する際の客観性などに問題がある。本研究では、M30 cytoDEATH 免疫染色が、アポトーシスの病理組織学的検索に有用かどうかを明らかにすることを目的とした。大腸腺腫 27 病変を対象とし、パラフィンブロック切片に HE 染色、M30 cytoDEATH 免疫染色、TUNEL 法を施行した。TUNEL 法では、小点状陽性物の集簇、アポトーシス小体、小型点状陽性物が腺管基底側にびまん性に出現、など様々な陽性所見がみられた。他方 M30 cytoDEATH 免疫染色では、陽性判定に苦慮するものは少なかった。A. I. の比較では、全ての TUNEL 陽性物の A. I. が  $49 \pm 0.87\%$ 、アポトーシス小体を形成した TUNEL 陽性物の A. I. が  $3.73 \pm 0.29\%$ 、M30 cytoDEATH 免疫染色の A. I. (M30 A. I.) が  $2.53 \pm 0.35\%$  で、それぞれの間には有意差があった ( $P < 0.001$ ) が、M30 A. I. は、2つの TUNEL A. I. いずれとも有意に相関していた ( $P < 0.001$ )。これらのことから、M30 cytoDEATH 免疫染色はアポトーシスを認識しており、TUNEL 法に比べ判定の容易さや客観性の観点から、アポトーシスの病理組織学的検索法として、より有用なものと考えられる。

以上のことから、本研究は、M30 cytoDEATH 免疫染色が汎用されている TUNEL 法に比べ、アポトーシスの病理組織学的検索に、より有用である可能性を示したことに、学位論文としての価値を認める。