

# ラット再生肝組織における Proliferating Cell Nuclear Antigen と Bromodeoxyuridine の染色性についての比較研究 — 固定条件の影響について —

崎山順子 森 秀治 一村光子 唐下博子 岡本 基 遠藤 浩

## 要 約

種々の条件下 (10%緩衝ホルマリン・6時間, 1%パラホルムアルデヒド・6時間, 100%メタノール・4時間, 70%エタノール・6時間, 100%アセトン・2時間, カルノア液・4時間) で固定したラット再生肝組織に免疫組織染色を施し, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の核内染色パターンについての検討を行った。その結果, 100%メタノール及び70%エタノールで固定した場合には, 明瞭な顆粒状の染色像が得られた。10%緩衝ホルマリン及び1%パラホルムアルデヒドの場合には, 明瞭な顆粒状並びに弱いびまん性の染色像が得られた。S期に対する代表的なマーカーとして知られる Bromodeoxyuridine (BrdU) の染色像との比較のもと, 再生肝組織中の PCNA 陽性細胞の数と BrdU 陽性細胞の数を再生ピーク時の術後1日目にて検討したところ, 100%メタノール及び70%エタノールで固定した際の陽性細胞数が, 最も BrdU の所見と一致した。しかし, 10%緩衝ホルマリン, 1%パラホルムアルデヒド, 100%アセトン, カルノア液で固定した場合には, BrdU の所見と著しい解離が見られた。これらの知見は, PCNA を指標に細胞増殖を評価する上で, 100%メタノール, 70%エタノールでの固定が有用であることを示唆する。

---

キーワード: PCNA, BrdU, 免疫組織染色, 再生肝

---

## はじめに

細胞動態に関するマーカーは, 各種腫瘍の生物学的悪性度の予測及び治療効果・予後判定の重要な指標となり得る。従来から細胞増殖能の評価に使われてきた<sup>3</sup>H-Thymidine を用いる方法<sup>1)</sup>はアイソトープ使用などの問題点があるため最近では Thymidine の analogue で, 細胞周期の S 期の細胞の新しく合成される DNA にのみ取り込まれる Bromodeoxyuridine (BrdU)<sup>2)</sup>が頻繁に使用されるようになってきた<sup>3-6)</sup>。しかし, BrdU は元々体内に存在しないので何らかの方法<sup>7)</sup>で標識しないといけないと言う問題点がある。そこで, DNA polymerase $\delta$ の補助タンパク質である Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)<sup>8-11)</sup>に対す

るモノクローナル抗体が開発されてからは, これが日常的なパラフィン切片に应用可能なため急速に普及してきている<sup>12,13)</sup>。しかし, PCNA の染色性が固定条件にどのような影響を受けるかについての基礎的な検討は未だ十分とは言えない。そこで, 今回われわれは BrdU を対照として, 固定条件が PCNA の染色性にどのような影響を与えるかについて検討を行ったので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材料

対象として体重120g前後のSD系雄性ラットを用いた。最初に75%肝切除を行い再生肝を作製した。実験群として無処理, 術後6時間, 1日,

2日, 4日目を各3匹ずつとした。BrdUは体重1gあたり50 $\mu$ gを肝摘出60分前に腹腔内に注入することで標識した。今回検討した固定条件は, 10%緩衝ホルマリン(10% BF)・6時間, 1%パラホルムアルデヒド(1% PFA)・6時間, 100%メタノール・4時間, 70%エタノール・6時間, 100%アセトン・2時間, カルノア液(メタノール/酢酸3:1)・4時間で固定温度はすべて4 $^{\circ}$ Cとした。使用した切片は日常の方法でパラフィン包埋し3 $\mu$ の連続切片を作製し用いた。

## 2. 免疫染色

使用したモノクローナル抗体は抗PCNA抗体(DAKO社, PC10)と抗BrdU抗体(Becton Dickinson社, B44)である。

各々の実験群ラットにおいて3 $\mu$ の連続切片を5枚用意し, 1枚は形態観察用のHE染色, 残り4枚を各々の免疫染色用及び陰性対照用に用いた。免疫染色は脱パラ後, 内因性ペルオキシダーゼ阻害として3%過酸化水素加メタノールにて室温, 30分処理後PBSにて洗浄。このあと, BrdU染色用については抗体が2本鎖のDNAとは反応しないので, あらかじめ2N-塩酸にて室温, 60分反応させ1本鎖に変性させ中和後PBSにて洗浄。次に10%正常ヤギ血清を室温, 30分反応後, 一次抗体として抗PCNA抗体は500倍, 抗BrdU抗体は50

倍にそれぞれPBSにて希釈し4 $^{\circ}$ C, 一晚反応後PBSにて洗浄。次に, VECTA-STAIN ABCキットを用いABC法を行った。最後にDAB-cobalt法で発色させ, メチル緑で後染色を施した。また, 陰性対照として, 上記の一次抗体の代わりに正常マウス血清を用いて, ABC法を行い発色しないことを確かめた。

## 3. 観察

組織標本上を片寄りなく細胞1,000個を観察し陰性対照を対照とし陽性細胞数を求めた。また, 同時にPCNA, BrdUの核内染色パターンについて油浸にて詳細に観察した。

## 結 果

PCNAの核内染色パターンは, Fig. 1に示すようにアルコール系の固定液(100%メタノール, 70%エタノール)では, 陰性との区別の明瞭な顆粒状の染色性が見られた。Fig. 2に示すようにホルムアルデヒド系固定液(10% BF, 1% PFA)では, 明瞭な顆粒状と弱いびまん性の染色性が見られた。Fig. 3に示すようにアセトン固定では, 弱いびまん性の染色性のみが見られ, カルノア液についてはほとんど染色されなかった。また, BrdUの核内染色パターンは, Fig. 4に示すように有機溶媒系固定液(100%メタノール, 70%エタノール

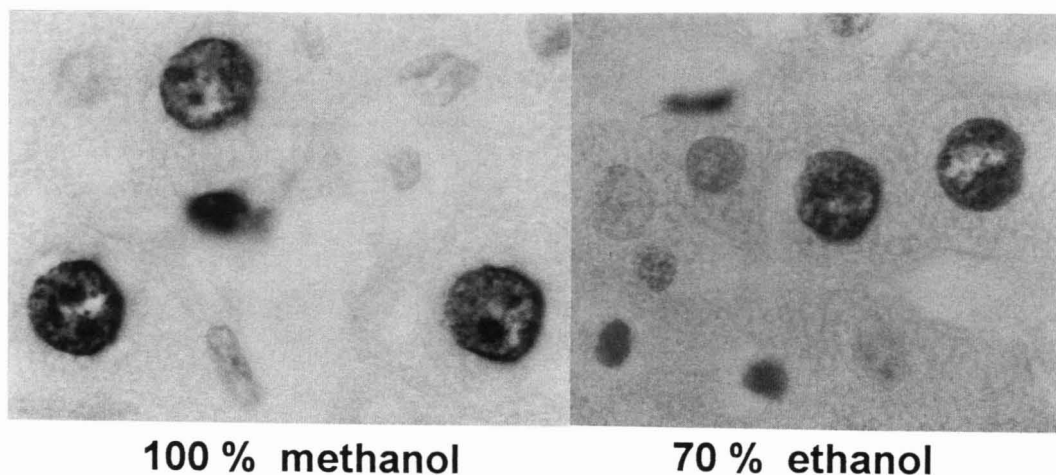


Fig. 1 Nuclear PCNA staining pattern in rat regenerating liver specimen fixed with 100% methanol or 70% ethanol.

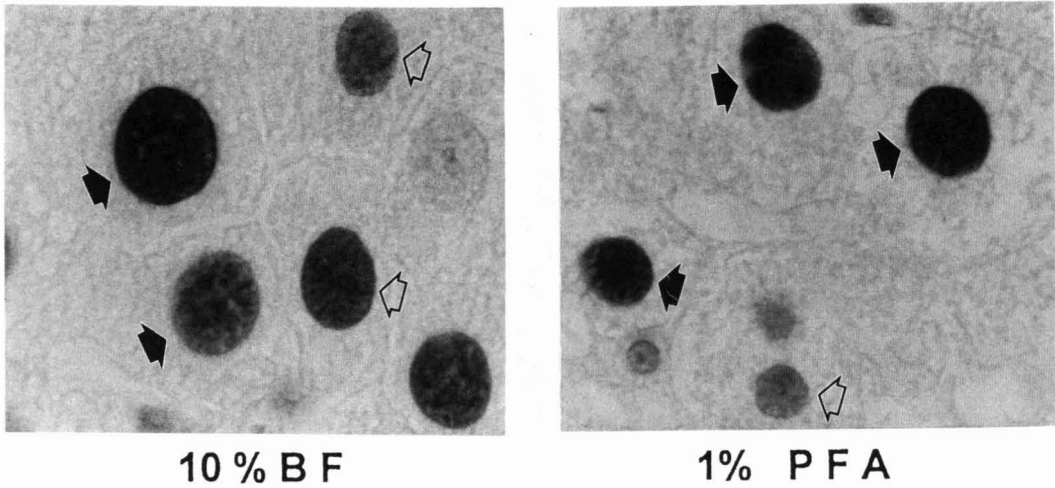


Fig. 2 Nuclear PCNA staining pattern in rat regenerating liver specimen fixed with 10% BF or 1% PFA. They showed both granular pattern (solid arrow) and diffuse pattern (open arrow).

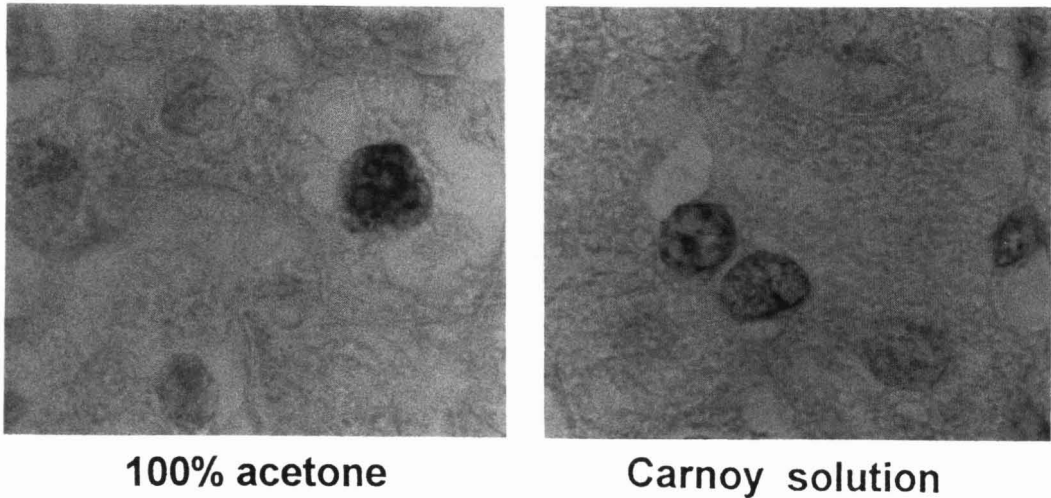


Fig. 3 Nuclear PCNA staining pattern in rat regenerating liver specimen fixed with 100% acetone or Carnoy solution.

ル、100%アセトン)及びカルノア液において陰性との区別の明瞭な顆粒状の染色性が見られた。

Fig. 5に示すようにホルムアルデヒド系固定液では弱いびまん性の染色性が見られた。再生肝組織における各々の固定条件でのPCNA, BrdU陽性細胞数を再生のピークと思われる術後24時間後の標本と比較してみると Fig. 6に示すように、アルコール系固定液のPCNAの所見が最もよく

BrdUの所見と一致した。ホルムアルデヒド系、アセトン及びカルノア液では、BrdUの所見と著しい解離が見られた。

#### 考 察

Dierendonck ら<sup>14)</sup>は、ヒト癌培養細胞株を用いて各種固定条件を検討した結果、19A2(IgM抗体)を用いたPCNAの染色性は、100%メタノール固

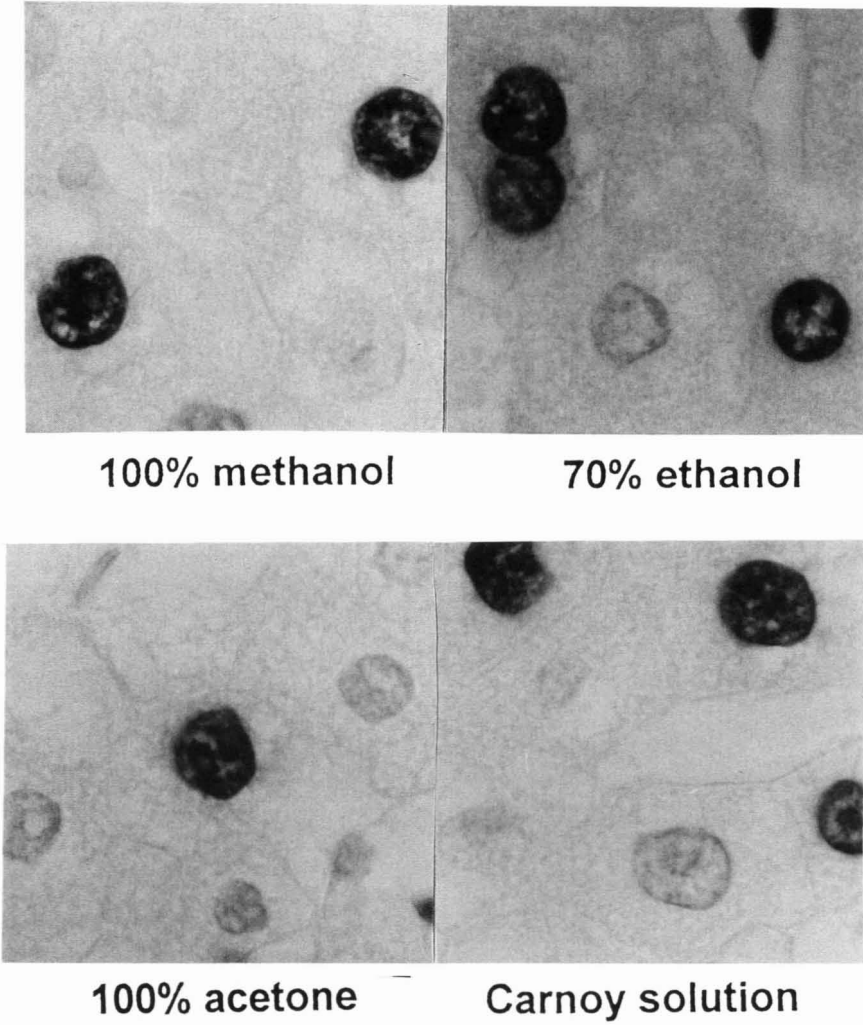


Fig. 4 Nuclear BrdU staining pattern in rat regenerating liver specimen fixed with 100% methanol, 70% ethanol, 100% acetone or Carnoy solution.

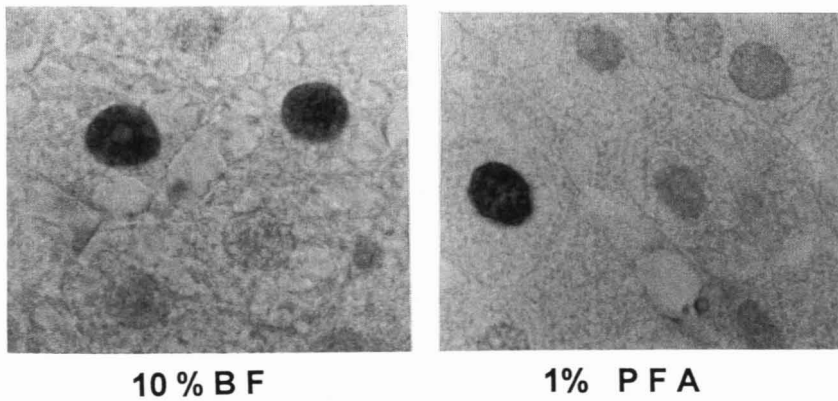


Fig. 5 Nuclear BrdU staining pattern in rat regenerating liver specimen fixed with 10% BF or 1% PFA.

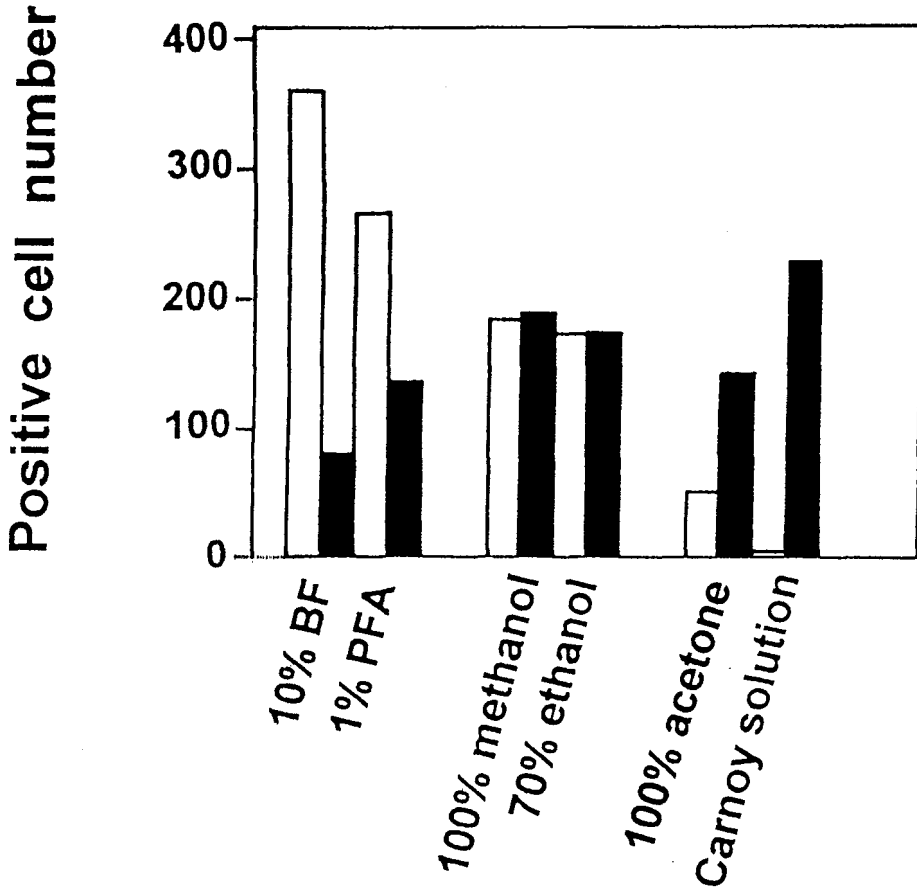


Fig. 6 Comparison of PCNA and BrdU-positive cells in rat regenerating liver specimen. Number of PCNA-(*opened*) and BrdU-(*closed*) positive cells were counted in specimen fixed with 10% BF, 1% PFA, 100% methanol, 70% ethanol, 100% acetone or Carnoy solution.

定が優れており、さらに1% PFA 固定後、100%メタノールで再固定したのが、最も良好な結果であったとしている。一方、ホルムアルデヒド系(10%ホルムアルデヒド、2% PFA)単独固定、70%エタノール及びカルノア液では染色されなかったと報告している。Sasano ら<sup>15)</sup>は食道扁平上皮癌の細胞標本では PC10にて4% PFA で30分から1時間固定し、さらにメタノールで5分間固定したのが最もよい染色性が得られたとしている。鈴木ら<sup>16)</sup>は、培養細胞株及び組織切片にて4% PFA、1日固定が最も良好で、10% BF で短期間(2日以内)固定も良好であったとしている。また、95%エタノールと70%メタノールについては長時間固定でも検出可能であったと報告している。松野

ら<sup>17)</sup>は、組織切片において有機溶媒による固定では、エタノール固定が良好で、アセトン固定では、抗原がほとんど細胞質内へ拡散したと報告している。今回のわれわれの検討ではホルムアルデヒド系の固定液である10% BF と1% PFA において良好な染色結果を得た。また、2日以上固定では染色性の明かな低下が見られた(結果は示していない)。有機溶媒のなかでは、100%メタノールと70%エタノールにおいて良好な染色結果を得たが、アセトン、カルノア液ではほとんど染色されなかったが、松野らが報告しているような細胞質内への拡散はあまり認められなかった。BrdUの固定条件については、多田ら<sup>18)</sup>は、ホルマリン固定においても70%エタノール固定とほぼ同じ Labe-

ling Index を得たが、70%エタノール固定において最も明瞭な染色性が得られたと報告している。われわれの検討でも、有機溶媒の固定液においては明瞭な染色性を得たが、ホルムアルデヒド系の固定液では弱い染色性しか得られなかった。これは、ホルムアルデヒド系の固定液では、DNA とヒストンとが cross link するため、抗 BrdU 抗体と DNA 鎖中の BrdU との結合が低下するためと考えられる。PCNA はその他の増殖細胞マーカーに比べて高い陽性率を示すことが多く報告されている<sup>14,15)</sup>。しかし、今回の検討では、ホルムアルデヒド系の固定では PCNA が BrdU に比して高い陽性率を示したが、アルコール系の固定では BrdU と一致した。故に、PCNA の固定にアルコール系の固定液を用いることが、PCNA を増殖細胞マーカーとして評価する上において有用であると考えられる。

## 文 献

- 1) Fabrikant J.I., Cherry J.: The kinetics of cellular proliferation in normal and malignant tissues. V. Analysis of labeling indices and potential tissue doubling time in human tumor cell populations. *J Surg. Oncol.* 1: 23-47, 1969.
- 2) Gratzner HG.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-476, 1982.
- 3) Terao K., Shimizu A., Harada M., Kuni Y., Ito Y., Tamai S., Iimori K., Sugimasa Y., Takemiya S., Okamoto T., Motohashi H., Sairenji M., Inoue T., Kanisawa M.: Difference in the vitro uptake of bromodeoxyuridine between liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. *Cancer* 64: 104-109, 1989.
- 4) Meyer J.S., Nauert J., Koehm S., Hughes J. Cell kinetics of human tumors by in vitro bromodeoxyuridine labeling. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 1449-1454, 1989.
- 5) 伊藤義彦, 多羅尾和郎, 久邇之房, 清水昭男, 原田昌興, 玉井拙夫, 藤本泰則, 杉政征夫, 武宮省治, 岡本堯: 原発性肝癌細胞の異型度分類による DNA 合成の差異について—BrdU の取り込み率よりの検討—. *肝臓* 30: 538-544, 1989.
- 6) 多羅尾和郎, 清水昭男, 原田昌興, 玉井拙夫, 伊藤義彦, 久邇之房, 杉政征夫, 武宮省治, 岡本堯: 肝生検組織の肝細胞の DNA 合成よりみた肝硬変から肝癌への super-high-risk group の設定について—BrdU の Labeling index による検討—. *肝臓* 30: 866-871, 1989.
- 7) Sasaki K., Ogino T., Takahashi M.: In vitro BrdUrd labeling of solid tumors and immunological determination of labeling index. *J. Histotech.* 10: 47-49, 1987.
- 8) Prelich G., Tan C.K., Kostura M., Mathews M.B., So A.G., Downey K.M., Stillman B.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- $\delta$  auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987.
- 9) Bravo R., Frank R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H.: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326: 515-517, 1987.
- 10) 守内哲也: PCNA/DNA ポリメラーゼ  $\delta$  補助蛋白質とその遺伝子. *蛋白質 核酸 酵素* 33: 1179-1185, 1988.
- 11) Garcia R.L., Coitrera M.D., Gown M.: Analysis of proliferative grade using antiPCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am. J. Pathol.* 134: 733-739, 1989.
- 12) Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., Kellock D.B., Watkins J.A., Barnes D.M., Gillet C.E., Camplejohn R., Waseem N.H., Lane D.P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin section: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162: 285-294, 1990.
- 13) 山中伸一郎, 永井宣隆, 村上隆浩, 松田 博, 大濱絃三: 上皮性卵巣腫瘍における Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織化学的検討. *J. Jpn. Clin. Cytol.* 32: 21-25, 1993.
- 14) van Dierendonck J.H., Wijsman J.H., Keijzer R., van de Velde C.J.H., Cornelisse C.J.: Cell-cycle-related staining patterns of antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 138: 1165-1172, 1991.
- 15) Sasano H., Miyazaki S., Nishihira T., Sawai T., Nagura H.: The proliferative cell fraction in cytology specimens. A study of human esophageal carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 98: 161-166, 1992.
- 16) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一, 岩沢篤郎, 中野 浩, 磯山 恵一, 今井 満, 中川信廣, 近藤峰子, 光谷俊幸: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の基礎的検討. *臨床検査* 36: 81-84, 1992.
- 17) 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原 (PCNA). *病理と臨床* 7: 879-883, 1991.
- 18) 多田利彦, 児玉哲郎, 渡辺 昌, 佐藤雄一, 下里幸雄: BrdU (Bromodeoxyuridine) モノクローナル抗体を用いた細胞動態解析法の基礎的検討とその臨床応用. *医*

Comparative studies of proliferating cell nuclear antigen  
and bromodeoxyuridine staining pattern  
in rat regenerating liver cells

Junko SAKIYAMA, Shuji MORI, Mituko ICHIMURA, Hiroko TOHGE,  
Motoi OKAMOTO, Hiroshi ENDO

**Abstract**

Immunohistochemical staining pattern of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was examined in rat regenerating liver specimens fixed under the various conditions (10% buffered formalin for 6 hr, 1% paraformaldehyde for 6 hr, 100% methanol for 4 hr, 70% ethanol for 6 hr, 100% acetone for 2 hr and Carnoy solution for 4 hr). Most distinct granular staining pattern of PCNA was observed in fixation with 100% methanol or 70% ethanol. Specimens fixed with 10% buffered formalin or 1% paraformaldehyde showed both distinct granular and slight diffuse pattern of PCNA staining. Specimens fixed with 100% acetone showed only slight diffuse staining. Specimens fixed with Carnoy solution showed little staining. Number of PCNA positive cells in the specimens fixed with 100% methanol or 70% ethanol on 24 hours after hepatectomy coincided closely with those of BrdU positive cells, which is known to be a representative marker of cell proliferation. In contrast, dissociative result was obtained in specimens fixed with 10% buffered formalin, 1% paraformaldehyde, 100% acetone or Carnoy solution when numbers of PCNA positive cells were compared with those of BrdU. These findings suggest that tissue specimens fixed with 100% methanol or 70% ethanol is useful for evaluating the extent of cell proliferation.

---

**Key words :** PCNA, BrdU, immunohistochemical staining, regenerating liver

---

School of Health Sciences Okayama University