

ヒト肺癌における Glutathione S-transferase π form の発現に 関する免疫組織化学的研究

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

榮本 弘行

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES ON EXPRESSION OF THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE π FORM IN HUMAN LUNG CARCINOMAS

HIROYUKI EIMOTO

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received September 27, 1989

Summary: Expression of glutathione S-transferase π form (GST- π) and μ form (GST- μ) in human lung squamous metaplasia, carcinomas, and non-cancerous fetal and adult tissues was immunohistochemically investigated, and the usefulness of GST- π expression as a lung cancer marker was evaluated by cytology. The following results were obtained.

1. In fetal lungs, both bronchial and alveolar epithelial cells were positively stained with GST- π . In adult lungs, bronchial epithelial cells were positively stained with GST- π , but alveolar epithelial cells were negatively stained. The staining attitude of GST- μ in fetal and adult lungs was varied.
2. Squamous metaplasias were stained 100% with GST- π but not with GST- μ .
3. Squamous carcinomas were stained 100% with GST- π without relation to cancer cell differentiation. In adenocarcinoma, poorly differentiated cancer cells were negatively stained and the majority of moderately and well differentiated cancer cells were positively stained. The staining attitudes of GST- μ in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas were varied.
4. Small cell carcinomas were negatively stained 100% with GST- π and the staining attitude of GST- μ in those carcinomas was varied.
5. The expression of GST- π in cytology as well as histology revealed that this enzyme is a useful marker for the differential diagnosis of small and non-small cell carcinomas of human lung carcinomas.

Index Terms

immunohistochemistry, immunocytochemistry, human lung cancer, glutathione S-transferase π form, glutathione S-transferase μ form

1. はじめに

近年、わが国における肺癌は増加の傾向を示している

が、早期発見の困難さから、発見されても外科的切除可能な症例が少なく、かつ切除された症例の5年生存率は30~45%で予後不良とされている。わが国における1988

年の死亡原因は癌によるものが第1位で、全癌の死亡率を臓器別にみると、肺癌による死亡率は胃癌に次いで第2位となっている¹⁾。肺癌の発生要因としては喫煙をはじめとする環境中に存在する化学物質の関与²⁾が最も重要視され、この癌の予防に対する基礎的研究と共に、ヒト肺癌の早期発見に関する研究も重要課題となっている。

肺癌の免疫組織化学的手法による腫瘍マーカーに関する研究は、1981年頃より活発に行われケラチン、carcino-embryonic antigen (CEA) および epidermal membrane antigen (EMA)、肺特異性抗原ならびにニューロン関連抗原などについて行われている³⁾。しかしながら上述のマーカーはいずれも有用性ととも欠点をも有し、特に細胞診を含めた組織型の鑑別には問題を残している。

Glutathione S-transferase (GST) は、1961年 Boothら⁴⁾により発見されて以来、種々の解毒に関連した多機能酵素群として広く研究がなされている⁵⁾。その機能を大別すると、酵素蛋白質としての機能と有機陰イオンの結合蛋白質としての機能である⁶⁻⁸⁾。GSTは生物一般に広く存在し、免疫学的共通性、酵素学的性質、アミノ酸配列の相同性から alpha, mu, pi と3つのクラスに分類され⁹⁾、ヒトにおいては Mannervikら¹⁰⁾によりヒト胎盤から分離されたヒト胎盤型 GST (GST- π) は pi クラスに属し、mu クラスには GST- μ が知られている。

著者ら¹¹⁾はラットの胎盤より精製した GST placental form (GST-P) を用いて、ラット肺発癌過程におけるこの酵素の発現について検索し、GST-Pは扁平上皮化生と扁平上皮癌に特異的に発現されることを見いだした。

本研究はこの知見と GST-P がアミノ酸配列の解析から GST- π と約86%の相同性を有するとする報告¹²⁾か

らヒト肺癌への応用を試みた結果、GST- π は臨床病理学的に小細胞癌と非小細胞癌の鑑別に有用である知見を得たので報告する。

II. 材料と方法

1. 非肺癌肺組織に対する検索症例の内訳

非肺癌症例で肺における GST- π および GST- μ の検索を行った症例の詳細を Table 1 に示した。これらの10症例は1985年から1989年の間に奈良県立医科大学にて施行された剖検より得られたものである。性別は9例が男性、1例が女性であった。年齢は29歳から83歳で平均65歳であった。また、胎児肺においても同様に GST- π および GST- μ の検索を行った。症例は総数6例ですべて1987年から1989年の間、奈良県立医科大学にて施行された剖検より得られたもので、性別は6例全例とも男性であった。胎齢は18週から31週までであった。

2. 細胞診に対する検索症例の内訳

細胞診材料に対する GST- π の検索を行った症例の詳細を Table 2 に示した。これらの32症例は1988年から1989年の間に奈良県立医科大学にて得られたもので、うち23例は気管支鏡下擦過物より得た塗抹細胞診材料で、他の9例は外科的切除された新鮮材料より作製した捺印細胞診材料であった。それぞれ同時に得られた組織材料により腫瘍の組織型の診断を行い、確実に癌細胞が認められた症例のみを用いた。細胞診の内訳は扁平上皮癌は18例、腺癌は9例、小細胞癌は3例、大細胞癌は2例であった。性別では男性が多く、平均年齢は大細胞癌が74歳で、他の組織型では60歳代であった。

3. 組織材料を用いた肺癌および扁平上皮化生の検索症例の内訳

GST- π および GST- μ の肺癌および扁平上皮化生の組織に対する検索を行った症例の詳細を Table 3 に示

Table 1. Details of non-lung cancer cases examined by GST- π and GST- μ staining intensity

Case number	Sex	Age	Autopsy diagnosis
1	Male	83	Cerebral infarction
2	Male	29	Acute promyelocytic leukemia
3	Male	80	Carcinoma of the gallbladder
4	Male	35	Chronic myelocytic leukemia
5	Male	64	Chronic pulmonary emphysema
6	Male	74	Myocardial infarction
7	Male	78	Carcinoma of the common bile duct
8	Male	67	Myocardial infarction
9	Male	76	Cerebral infarction
10	Female	62	Diabetes mellitus

した。これらの症例は1984年から1989年の間に奈良県立医科大学において剖検、生検または手術により得られた120例であった。肺癌の組織分類は臨床・病理肺癌取り扱い規約¹³⁾に従って行い、組織型別では扁平上皮癌は63例、腺癌は27例、小細胞癌は20例、大細胞癌は4例であった。また、扁平上皮化生は11例で、扁平上皮癌と併存するもの5例、併存しないもの6例であった。

4. 免疫細胞および組織化学的検索

組織材料は10%中性ホルマリン固定・パラフィン包埋されたものから、3-5 μ mの厚さの連続薄切片を作製し、hematoxylin-eosin染色(H.E.染色)および免疫組織化学染色を施行した。H.E.染色により前記のごとく組織診断を行い、免疫染色はavidin-biotin-peroxidase complex method(ABC法)¹⁴⁾を用いた。ABC染色の第一次抗体としては弘前大学第二生化学教室佐藤清美教授から御提供頂いたウサギ抗ヒトGST- π 抗体およびGST- μ 抗体を用いた。これらの抗体はGST- π はヒト胎盤をもとに、GST- μ は成熟肝をもとにそれぞれS-hexylglutathione affinity chromatographyによりGSTの粗精製を行った後に、chromatofocusingにより等電点の差による分離精製を行い、これら精製GST- π および

GST- μ に Freund's complete adjuvant を混じた emulsion を各々の抗原としてウサギに接種して得られた血清より作製した polyclonal antibody である¹⁵⁾。これら一次抗体の特異性をチェックするために対照として同希釈度の非免疫正常血清を用いた。ABC法に用いた試薬であるビオチン化アフィニティ精製免疫グロブリン(第二次抗体)、アビジンビオチンペルオキシダーゼコンプレックス(ABC complex)はVECTOR社のVECTAS-TAIN ABCキットのものを使用した。各薄切片は、1000倍希釈した第一次抗体と室温にて二時間反応を行い、その後、二次抗体と反応続いてABC complexと反応させた。発色は0.1%四塩酸ジアミノベンジン(ナカライ・テスク社製)と0.2N トリス塩酸緩衝液(pH7.6)を等量混合し、この混合液に対し終濃度0.01%となるよう過酸化水素水(三徳化学工業社製)を加えたものを発色液とし、この混合液中にて茶褐色に発色せしめた。対比核染色としてhematoxylin染色を行った。

細胞診材料は採取後すみやかに95%エタノール固定を行い、第一次抗体との反応を行い、その後の操作は前記の免疫組織化学染色と同様の方法を用いた。対比核染色も同様にhematoxylin染色を行った。

Table 2. Details of lung cancer cases examined by GST- π staining intensity using cytological materials

Histological type	Total no. of cases	Sex		Age distribution (mean)	Materials	
		Female	Male		Cytological smear by bronchoscopy	Touch smear from surgical specimen
Squamous cell carcinoma	18	2	16	48~79(65)	11	7
Adenocarcinoma	9	3	6	47~83(69)	7	2
Small cell carcinoma	3	1	2	61~76(68)	3	0
Large cell carcinoma	2	1	1	70~77(74)	2	0

Table 3. Details of lung squamous metaplasia and cancer cases examined by GST- π and GST- μ staining intensity

Histological type	Total no. of cases	Sex		Age distribution (mean)	Materials		
		Female	Male		Autopsy	Biopsy	Surgical operation
Squamous cell carcinoma	63	10	53	41~83(66)	10	42	11
Adenocarcinoma	27	10	17	18~84(63)	4	21	2
Small cell carcinoma	20	6	14	49~80(66)	1	19	0
Large cell carcinoma	4	1	3	64~74(69)	1	1	2
Squamous metaplasia	11	1	10	42~79(64)	1	10	0

細胞診材料と組織材料における GST- π と GST- μ の発現に対する判定基準は以下の如く行った。細胞診材料に対しては腫瘍細胞が染色されるものを陽性(+), 染色されないものを陰性(-)とした。組織材料に対しては病変部が染色されないものを陰性(-), 病変部が部分的に染色されるものを陽性(+), 病変部の大部分または全体が染色されるものを強陽性(++)とした。なお、陽性率については陽性および強陽性と判定されたものを陽性例とした。

III. 結 果

1. 非肺癌症例における GST- π および GST- μ の分布

胎児肺の気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞における GST- π および GST- μ の染色結果を Table 4 に、その代表例を Fig. 1 に示した。GST- π は、6 例全例とも気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞ともに陽性を示したが、GST- μ では陰性を示すものもみられた。

成人肺の上皮細胞における GST- π および GST- μ の染色結果を Table 5 に、その代表例を Fig. 2 と Fig. 3 に示した。GST- π は杯細胞で全例陰性であったが、GST-

μ では陽性例もみられた。線毛上皮細胞における GST- π は Fig. 2 に示したように、全例陽性であったのに対し、GST- μ では 10 例中 9 例までが陰性であった。クララ細胞および I 型細胞は GST- π , GST- μ ともに全例陰性を示した。II 型細胞は GST- π で 10 例中 3 例が陽性を示し、GST- μ で 10 例中 1 例のみ陽性を示した。

2. 細胞診材料における GST- π の陽性率

細胞診材料をもとに肺癌細胞における GST- π 染色の陽性率を Table 6 に示した。扁平上皮癌は Fig. 4 の如く細胞質および核が染色され 18 例全例陽性 (100%) を示した。腺癌は Fig. 5 の代表例に示した如く細胞質および核が染色され、9 例中 8 例 (89%) が陽性を示した。小細胞癌は Fig. 6 に示した如く 3 例は全例とも陰性 (0%) であった。大細胞癌 2 例は 2 例とも陽性 (100%) を示した。

3. 組織材料を用いた GST- π および GST- μ の発現

肺扁平上皮化生および各組織型肺癌の GST- π および GST- μ の染色態度と陽性率を Table 7 に示した。扁平上皮化生における GST- π の発現は陰性が 0 例 (0%), 陽性が 8 例 (73%), 強陽性が 3 例 (27%) であり、GST- μ のそれは陰性が 6 例 (55%), 陽性が 3 例 (27%), 強陽性が 2 例 (18%) であった。各陽性率は GST- π が 100%,

Table 4. GST- π and GST- μ staining intensity in the epithelial cells of fetal lung

Case number	Pregnant period (weeks)	GST- π staining intensity ¹⁾		GST- μ staining intensity ¹⁾	
		Bronchial cell	Alveolar cell	Bronchial cell	Alveolar cell
1	18	+	+	+	+
2	22	+	+	+	+
3	23	+	+	-	+
4	24	+	+	+	-
5	27	+	+	-	-
6	31	+	+	+	+

1) - ; negative
+ ; positive

Table 5. GST- π and GST- μ staining in the epithelial cells of adult lung

Epithelium	Total no. of cases	GST- π staining intensity ¹⁾			GST- μ staining intensity ¹⁾		
		-	+	++	-	+	++
Goblet cell	10	10	0	0	8	2	0
Ciliated cell	10	0	6	4	9	1	0
Clara cell	10	10	0	0	10	0	0
Type I cell	10	10	0	0	10	0	0
Type II cell	10	7	3	0	9	1	0

1) - ; negative
+ ; positive
++ ; strongly positive

GST- μ が 45% で GST- π は GST- μ にくらべ陽性率が高かった。

扁平上皮癌では GST- π は陰性が 0 例 (0%), 陽性が 29 例 (46%), 強陽性が 34 例 (54%), GST- μ は陰性が 26 例 (41%) 陽性が 29 例 (46%) 強陽性が 8 例 (13%) であった。各陽性率は GST- π が 100% と全例陽性であったのに対し GST- μ では 59% であった。扁平上皮癌における GST- π の発現は Fig. 7 に示す如くで、GST- μ のそれは、陰性例では Fig. 8 の如くであった。腺癌では GST- π は陰性が 11 例 (41%), 陽性が 4 例 (15%), 強

陽性が 12 例 (44%), GST- μ は陰性が 12 例 (44%), 陽性が 11 例 (41%), 強陽性が 4 例 (15%) であった。各陽性率は GST- π が 59%, GST- μ が 56% であった。腺癌における GST- π の発現は陽性例では Fig. 9 に示す如くで、陰性例では Fig. 10 に示す如くであった。小細胞癌では GST- π は 20 例の全例が陰性であった。GST- μ は陰性が 14 例 (70%), 陽性が 5 例 (25%), 強陽性が 1 例 (5%) であった。各陽性率は GST- π が 0% であったのに対し、GST- μ が 30% であった。小細胞癌における GST- π の発現は陰性で Fig. 11 に示す如くであった。大細胞

Table 6. GST- π staining positivity of lung cancer cases using cytological materials

Histological type	Total no. of cases	No. of positive cases	Incidence (%)
Squamous cell carcinoma	18	18	100
Adenocarcinoma	9	8	89
Small cell carcinoma	3	0	0
Large cell carcinoma	2	2	100

Table 7. GST- π and GST- μ staining intensity of lung squamous metaplasia and cancer cases

Histological type	Total no. of cases	GST- π staining intensity ¹⁾ (incidence %)			GST- π positivity (%)	GST- μ staining intensity ¹⁾ (incidence %)			GST- μ positivity (%)
		-	+	++		-	+	++	
Squamous metaplasia	11	0 (0)	8 (73)	3 (27)	100	6 (55)	3 (27)	2 (18)	50
Squamous cell carcinoma	63	0 (0)	29 (46)	34 (54)	100	26 (41)	29 (46)	8 (13)	59
Adenocarcinoma	27	11 (41)	4 (15)	12 (44)	59	12 (44)	11 (41)	4 (15)	56
Small cell carcinoma	20	20 (100)	0 (0)	0 (0)	0	14 (70)	5 (25)	1 (5)	30
Large cell carcinoma	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	75	2 (50)	2 (50)	0 (0)	50

- 1) - ; whole part of the lesion was not stained
 + ; lesion was partially stained
 ++ ; whole or large part of the lesion was stained

Table 8. Staining intensity related to cancer cell differentiation

Histological type	Total no. of cases	No. of GST- π positive cases (Incidence %)			No. of GST- μ positive cases (Incidence %)		
		Poorly differentiated	Moderately differentiated	Well differentiated	Poorly differentiated	Moderately differentiated	Well differentiated
Squamous cell ¹⁾ carcinoma	63	15/15 (100)	39/39 (100)	9/9 (100)	9/15 (60)	24/39 (62)	7/9 (78)
Adenocarcinoma ¹⁾	27	0/6 (0)	8/12 (67)	7/9 (78)	2/6 (33)	9/12 (75)	4/9 (44)

- 1) Based on the criteria described in General Rule for Clinical and Pathological Record of Lung Cancer

癌では GST- π は陰性が 1 例(25%), 陽性が 2 例(50%), 強陽性が 1 例 (25%), GST- μ は陰性と陽性がともに 2 例 (50%), 強陽性が 0 例 (0%) であった. 各陽性率は GST- π が 75%, GST- μ が 50% であった.

4. 扁平上皮癌と腺癌の分化度と陽性率

扁平上皮癌および腺癌細胞の分化度と GST- π と GST- μ 各々の染色の陽性率を Table 8 に示した. GST- π では扁平上皮癌は低分化型 15 例中 15 例, 中分化型 39 例中 39 例, 高分化型 9 例中 9 例と分化度とは無関係に 100% の陽性率であった. 腺癌は低分化型 6 例全例陰性で陽性率は 0%, 中分化型では 12 例中 8 例陽性で 67%, 高分化型では 9 例中 7 例陽性で 78% と分化度により陽性率に差がみられた. GST- μ では扁平上皮癌は低分化型 15 例中 9 例陽性で 60%, 中分化型 39 例中 24 例陽性で 62%, 高分化型 9 例中 7 例陽性で 78% の陽性率を示し, 腺癌は低分化型 6 例中 2 例陽性で 33%, 中分化型 12 例中 9 例陽性で 75%, 高分化型 9 例中 4 例陽性で 44% の陽性率を示し, 両組織型ともに分化度による差はみられなかった.

IV. 考 察

GST の一般的な機能としては酵素蛋白質としての機能と有機陰イオンの結合蛋白質としての機能の 2 つに大別される⁵⁻⁸⁾. 酵素としてはグルタチオン抱合反応を触媒する GST 活性のほか, グルタチオンペルオキシダーゼ活性とケトステロイドのイソメラーゼ活性が知られている. グルタチオン抱合反応は種々の薬物の解毒機構として重要なメルカプツール酸生成の初発反応である^{5,6)}. 結合蛋白質としては, これまでに副腎皮質ステロイド, 甲状腺ホルモン, ビリルビン, ヘム, 胆汁酸, BSP, インドシアニングリーン(ICG), 発癌剤, ロイコトリエン C₄ など種々の物質を結合し^{6,16,17)}, それらの細胞内輸送, 運搬, 排泄に関与する¹⁸⁾ と考えられている. GST- π の生体内分布は赤血球¹⁹⁾, 胎盤¹⁰⁾, 腎, 肺などに多く存在していることが報告されている⁸⁾. また, GST- π の機能についてはいまだ統一された見解はないが, alkylating agent に対する耐性腫瘍細胞にこの酵素が増加し, 薬剤耐性との関連が示唆されている²⁰⁾. GST- μ はヒト肝に約 50% 検出されるが, この酵素の存在については個人差のあることが知られている^{21,22)}. また, GST- μ は benzo[*a*]pyrene-4, 5-oxide や styrene 7,8-oxide を抱合する^{23,24)} とされている.

GST と発癌については, ラット胎盤型より単離された GST-P を用いて研究されている. 化学発癌物質の解毒機構は大きく二つにわけられており, 一つは cyto-

chrome P-450 に代表される代謝・活性化に働く酵素群による phase I であり, もう一つは GST-P や γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) に代表される抱合・運搬・排泄に働く酵素群による phase II である. 投与された化学発癌物質に対して細胞が防御するために投与される以前とは異なった酵素の変動がおきると考えられ, 癌および前癌病変での GST-P の発現は細胞が投与された化学物質に対する解毒機構において, phase II に属する酵素群の活性の上昇と phase I の低下を招来した結果の一面を示すものであるといわれている²⁵⁾.

GST- π の腫瘍における発現については種々の悪性腫瘍で報告がなされている. Kodate ら²⁶⁾ は免疫組織化学的にヒト大腸癌および腺腫における GST- π の発現を報告した. Tsutsumi ら²⁷⁾ は胃癌においてこの酵素が oncofetal に発現することを見いだした. 膵癌については, Obara ら²⁸⁾ がハムスターを用いた化学発癌実験で出現する膵管癌, 膵管過形成にて GST-P の発現することを, 水元ら²⁹⁾ がヒト膵管癌にて GST- π の発現することを報告した. 肺については, Di Ilio ら³⁰⁾ は外科的切除材料で 33 例のヒト肺腫瘍組織と 38 例の非腫瘍組織を用い, それぞれから抽出した蛋白質成分での GST の酵素活性を測定し, 腫瘍部に有意な上昇を認めている. しかし, これらの腫瘍の組織型に対する個々の解析はなされていない. 著者ら¹¹⁾ はラットにおける肺化学発癌実験において, GST-P が扁平上皮化生および扁平上皮癌に特異的に出現することを報告した. 本研究において, 非肺癌症例および胎児肺における GST- π の発現を解析したが, 線毛上皮細胞では GST- π の発現は持続し, 肺上皮細胞ではその発現は低下もしくは消失することが判明した. また, 肺に存在する GST のうち最も多い分子種は GST- π とされているが, その局在は線毛上皮細胞であると考えられた. GST- μ では細胞の種類や胎児肺と成人肺による一定の傾向や明らかな差はみられなかった. 肺癌組織での解析では非小細胞癌, 特に扁平上皮癌で 100% の陽性率と高い発現がみられ, ラットにおける肺発癌実験の結果¹¹⁾ を支持するものであった. 従来から扁平上皮癌は異型を伴う化生扁平上皮あるいは異形成上皮から発生すると考えられており, この考えは剖検材料を対象とした研究^{31,32)}, 細胞診による追跡調査³³⁻³⁵⁾ や DNA 量の測定, 動物を用いた実験的研究^{35,36)} などで支持されている. 一方, 異型上皮を経ない de novo 発癌の可能性も考えられており³⁷⁾ 現在も不明である. 扁平上皮化生および扁平上皮癌はともに 100% 陽性であったが, これは両細胞の表現形質の一致を示すものであり, 病変の連続性進展を表しているか否かは不明で, 今後詳細な研究が

必要であろう。腺癌では GST- π の発現は分化度に依存していた。小細胞癌は一般的に抗癌剤に対する薬剤感受性が高いことが知られている。GST- π が小細胞癌において全例陰性を示したことは、癌細胞自身が薬剤に対して感受性をもつことの一面を反映したものか、組織発生の異なることに依存した知見かについては今後の研究の興味深い課題である。非小細胞癌において、GST- π は高い陽性率を示したが、胎児肺より継続して腺毛上皮細胞に GST- π の発現がみられることより、胃癌のように oncofetal な発現²⁷⁾ とは結論できない。

元来、GST- π は細胞質に存在し、種々の陰イオン物質の解毒および輸送蛋白質と考えられてきた。免疫組織化学的にこの酵素を染色すると、陽性細胞ではしばしば細胞質とともに核も染色される。本間ら³⁸⁾ はヒト末梢リンパ球にグリココルチコイドを加えたところ、経時的に細胞質内の GST- π が核内へ移行することをみだし、非ヒストン蛋白質の一部として核に存在することを示した。しかしながら、癌細胞の核に GST- π の存在を生化学的に示した報告はなく、免疫組織化学的に核が GST- π により染色されるのは、その操作過程における GST- π の細胞質から核内への漏出によるものかも知れない。

Kano ら¹²⁾ は GST- π の cDNA のクローニングを行い、最近では分子レベルでの研究もされつつある。Nakagawa ら³⁹⁾ は肺癌培養細胞を用い、GST- π の mRNA レベルでの発現を解析している。その結果、非小細胞癌細胞株にくらべ小細胞癌細胞株では GST- π の gene expression が低いことを報告し、本研究と類似した知見を得ている。現在までに報告されている肺癌腫瘍マーカーについて考察すると、ケラチンはほとんどの上皮性肺癌腫瘍で陽性となり、扁平上皮癌で高率に陽性を示す CEA および EMA は小細胞癌でも低率ながら陽性を示し、小細胞癌と非小細胞癌の鑑別はできない。小細胞癌と非小細胞癌の鑑別には肺特異的なモノクローナル抗体のパネルが報告⁴⁰⁾ されているが、細胞診への応用は現在までは見られない。GST- π は小細胞癌と非小細胞癌との間で発現に差があり、これらの鑑別が可能であった。この新しい知見は日常の臨床病理学的業務に貢献し得るもので、低分化型扁平上皮癌と中間細胞型小細胞癌の鑑別においても、有用な診断技術と考えられる。

V. 結 語

抗 GST- π 抗体および抗 GST- μ 抗体を用いて肺癌および扁平上皮化生、胎児肺、非肺癌の成人肺における GST- π の発現を免疫細胞および組織化学的に検索し以下の結果を得た。

1. GST- π は胎児肺では気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞ともに陽性を示し、成人非肺癌症例では気管支線毛上皮細胞は陽性で肺胞上皮細胞は陰性を示した。GST- μ は GST- π にくらべ個体差があり均一な結果はみられなかった。

2. 扁平上皮化生症例では GST- π は GST- μ にくらべ高い陽性率を示した。

3. 扁平上皮癌症例では GST- π はその分化度によらず全例陽性を示したが、GST- μ は分化度とは無関係に陰性例がみられた。

4. 腺癌では GST- π は低分化型で全例陰性であったが、分化度が高いものでは陽性例もみられた。GST- μ は各分化度で陽性例も陰性例もみられ均一な結果は得られなかった。

5. 小細胞癌では GST- π は全例陰性を示したが、GST- μ は陽性を示す例もみられた。

6. 細胞診材料を用いた GST- π の検索では組織材料を用いた検索とほぼ同様の結果が得られ、特に扁平上皮癌では全例陽性、小細胞癌では全例陰性であった。

以上の結果より、GST- π は細胞および組織学的に非小細胞癌と小細胞癌の鑑別に有用なマーカーとなり得るといふ新しい知見を得た。

本研究には厚生省がん研究 (60 指) 日本における肺癌増加の阻止に関する総合的研究 (昭和 60 年から昭和 62 年) および対がん 10 ヶ年総合戦略プロジェクトによる補助金を受けたものであることを付記する。

本論文の要旨は 1988 年 3 月 23 日から 24 日米国ハワイにて US-Japan Cooperative Cancer Research Program の後援により開催された会議 (Theme: Glutathione S-Transferases and Carcinogenesis), ならびに第 47 回日本癌学会総会, 第 77, 78 回日本病理学会総会, 第 29 回日本肺癌学会総会, 第 109 回奈良医学会にて発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った奈良県立医科大学腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに第 2 内科学教室成田亘啓教授に厚く御礼申し上げます。また、御校閲を賜った第 1 病理学教室青笹克之教授に厚く御礼申し上げます。さらに終始御指導、御協力を頂いた腫瘍病理学教室丸山博司講師、傳田阿由美講師、堤 雅弘助手、弘前大学第 2 生化学教室佐藤清美教授、奈良県立医科大学第 3 外科学教室飯岡壮吾講師、腫瘍放射線科学教室今井照彦助手に深謝致します。

文 献

- 1) 福田正明, 西條長宏: 肺癌・診断と治療 3: p499-504, 1989.
- 2) 黒川利雄: 腫瘍学II. 同文書院, 東京, p697-734, 1988.
- 3) 齊藤 脩, 水口國雄: 免疫病理診断法. 医書院サウンドアース, 東京, p221-229, 1987.
- 4) Booth, J., Boyland, E. and Sims, P.: An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* **79**: 516-524, 1961.
- 5) Chasseaud, L.F.: The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.* **29**: 175-274, 1979.
- 6) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139, 1974.
- 7) Jakoby, W.B. and Habig, W.H.: *in* Enzymatic basis of detoxication (Jakoby, W.B., ed.). Vol. II, Academic Press, New York, p63-94, 1980.
- 8) Mannervik, B.: The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* **57**: 357-417, 1985.
- 9) 土田成紀, 佐藤清美: グルタチオンS-トランスフェラーゼアイソザイム. 蛋白質・核酸・酵素 **33**: 1564-1573, 1988.
- 10) Guthenberg, C. and Mannervik, B.: Glutathione S-transferase (transferase π) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase ρ) from erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**: 1304-1310, 1979.
- 11) Yamamoto, K., Yokose, Y., Nakajima, A., Eimoto, H., Shiraiwa, K., Tamura, K., Tsutsumi, M. and Konishi, Y.: Comparative histochemical investigation of the glutathione S-transferase placental form and γ -glutamyltranspeptidase during N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine-induced lung carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **9**: 399-404, 1988.
- 12) Kano, T., Sakai, M. and Muramatsu, M.: Structure and expression of a human class π glutathione S-transferase messenger RNA. *Cancer Res.* **47**: 5626-5630, 1987.
- 13) 日本肺癌学会編: 臨床・病理肺癌取扱い規約 (改訂第3版)・金原出版株式会社, 東京, 1987.
- 14) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody PAP procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580, 1981.
- 15) Soma, Y., Satoh, K. and Sato K.: Purification and subunit-structural and immunohistochemical characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. *Biochem. Biophys. Acta* **869**: 247-258, 1986.
- 16) Maruyama, H. and Listowsky, I.: Preferential binding of steroids by anionic forms rat glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **259**: 12449-12455, 1984.
- 17) Sun, F.F., Chau, L.-Y., Spur, B., Corey, E.J. and Lewis, R.A.: Identification of a high affinity leukotriene C₄-binding protein in rat liver cytosol as glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **261**: 8540-8546, 1986.
- 18) Senjo, M., Ishibashi, T. and Imai, Y.: Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b₅ from mitochondria. *J. Biol. Chem.* **260**: 9191-9196, 1985.
- 19) Marcus, C.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B.: Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **188**: 287-293, 1978.
- 20) Sato, K.: Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **52**: 205-255, 1989.
- 21) Board, P.G.: Biochemical genetics of glutathione-S-transferases in man. *Am. J. Hum. Genet.* **33**: 36-43, 1981.
- 22) Warholm, M., Guthenberg, C. and Mannervik, B.: Molecular and catalytic properties of glutathione transferase μ from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides. *Biochemistry* **22**: 3610-3617, 1983.
- 23) Warholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B. and von Bahr, C.: Purification of a new glutath-

- ione S-transferase (transferase μ) from human liver having high activity with benzo(*a*)pyrene-4, 5-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**: 512-519, 1981.
- 24) **Seidegård, J., De Pierre, J.W. and Pero, R.W.:** Hereditary interindividual differences in the glutathione transferase activity towards *trans*-stilbene oxide in resting human mononuclear leukocytes are due to a particular isozyme(s). *Carcinogenesis* **6**: 1211-1216, 1985.
- 25) **Farber, E.:** Cellular biochemistry of the step-wise development of cancer with chemicals: G. H.A Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* **44**: 5463-5474, 1984.
- 26) **Kodate, C., Fukushi, A., Narita, T., Kudo, H., Soma, Y. and Sato, K.:** Human placental form of glutathione S-transferase (GST- π) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **77**: 226-229, 1986.
- 27) **Tsutsumi, M., Sugisaki, T., Makino, T., Miyagi, N., Nakatani, K., Shiratori, T., Takahashi, S. and Konishi, Y.:** Oncofetal expression of glutathione S-transferase placental form in human stomach carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**: 631-633, 1987.
- 28) **Obara, T., Makino, T., Ura, H., Yokose, Y., Kinugasa, T., Moore, M.A., Sato, K. and Konishi, Y.:** Comparative histochemical investigation of the glutathione S-transferase placental form and γ -glutamyltranspeptidase during N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Carcinogenesis* **7**: 801-805, 1986.
- 29) 水元一博, 牧野剛緒, 浦 等, 堤 雅弘, 小西陽一, 諸星利男: glutathione S-transferase π form (GST- π)を用いたヒト肺癌の免疫組織化学的検索-CEA 免疫組織染色との比較. *臓臓* **2**: 20-26, 1987.
- 30) **Di Ilio, C., Bel Boccio, G., Aceto, A., Casaccia, R., Mucilli, F. and Federici, G.:** Elevation of glutathione transferase activity in human lung tumor. *Carcinogenesis* **9**: 335-340, 1988.
- 31) **Auerbach, O., Stout, A.P., Hammond, E.C. and Garfinkel, L.:** Changes in bronchial epithelium in relation to lung cancer. *New Engl. J. Med.* **265**: 253-267, 1961.
- 32) 江川博弥: 職業性 Mustard Gas 障害者における気管・気管支上皮粘膜の前癌性病変及び初期癌に関する病理組織学的研究. *弘大医誌*. **30**: 741-786, 1982.
- 33) **Saccomanno, G., Archer, V.E., Auerbach, O., Saunders, R.P. and Brennan, L.M.:** Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* **33**: 256-270, 1974.
- 34) **Nasielle, M., Kato, H., Auer, G., Zetterberg, A., Roger, V. and Karlen, L.:** Cytomorphological grading and Feulgen DNA-analysis of metaplastic and neoplastic bronchial cells. *Cancer* **41**: 1511-1521, 1978.
- 35) **Konaka, C., Auer, G., Nasielle, M., Kato, H., Hayashi, N., Ono, J., Hayata, Y. and Caspersen, T.O.:** Pathogenesis of squamous bronchial carcinoma in 20-methylcholanthrene-treated beagle dogs. *Analyt. Quant. Cytol.* **4**: 61-71, 1982.
- 36) **Kobayashi, H., Okita, M., Yarita, T., Hanzawa, S., Okamoto, T. and Katsuki, H.:** A method for experimental induction of bronchogenic carcinoma in subcutaneously implanted bronchial autograft in dogs. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **75**: 434-442, 1978.
- 37) 下里幸雄: 肺癌: その組織発生, 分化, 予後因子について. *日病会誌*. **72**: 29-57, 1983.
- 38) 本間久登・新津洋司郎・漆崎一郎: グルタチオン S-トランスフェラーゼとステロイドホルモン. *蛋白質・核酸・酵素* **33**: 1574-1581, 1988.
- 39) **Nakagawa, K., Yokota, J., Wada, M., Sasaki, Y., Fujiwara, Y., Sakai, M., Muramatsu, M., Terasaki, T., Tsunokawa, Y., Terada, M. and Saijo, N.:** Levels of glutathione S transferase π mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**: 301-304, 1988.
- 40) **Mulshine, J.L., Cuttitta, F., Bibro, M., Fedorko, J., Fargion, S., Little, C., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D.:** Monoclonal antibodies that distinguish non-small cell from small cell lung cancer. *J. Immunol.* **131**: 497-502, 1983.

Explanation of figures

- Fig. 1. Fetal lung at the week of the 22th, demonstrating positive GST- π staining in alveolar cells as well as bronchial ciliated cells. (GST- π staining, x100)
- Fig. 2. Bronchial ciliated cells of non-cancerous adult lung, demonstrating positive GST- π staining. (GST- π staining, x200)
- Fig. 3. Alveolar epithelial cells of the same case as shown in Fig. 2, demonstrating negative GST- π staining. (GST- π staining, x200)
- Fig. 4. Cytological specimen of squamous cell carcinoma, demonstrating positive GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x400)
- Fig. 5. Cytological specimen of adenocarcinoma, demonstrating strongly positive GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x400)
- Fig. 6. Cytological specimen of small cell carcinoma, demonstrating negative GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x600)
- Fig. 7. Moderately differentiated squamous cell carcinoma, demonstrating strongly positive GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x75)
- Fig. 8. Moderately differentiated squamous cell carcinoma, demonstrating negative GST- μ staining in cancer cells. (GST- μ staining, x66)
- Fig. 9. Moderately differentiated adenocarcinoma, demonstrating positive GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x100)
- Fig. 10. Moderately differentiated adenocarcinoma, demonstrating negative GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x75)
- Fig. 11. Small cell carcinoma, demonstrating negative GST- π staining in cancer cells. (GST- π staining, x75)



