

骨肉腫およびその類似疾患の増殖能と
癌関連遺伝子の病理組織学的研究

福 島 純 一

①

論文題目 「骨肉腫およびその類似疾患の増殖能と癌関連遺伝子の
病理組織学的研究」

指導教官名： 町並 陸生 教授

平成3年4月
東京大学大学院医学系研究科
第3種博士課程(医学)
第三基礎医学専攻

氏名： 福島 純一

【はじめに】

骨肉腫は腫瘍細胞が直接、骨あるいは頬骨を形成する悪性腫瘍であると定義される¹⁾。骨肉腫は比較的稀な腫瘍であるが、骨原発の悪性腫瘍中では最も頻度の高い腫瘍である。日本整形外科学会の全国骨腫瘍患者登録一覧表（平成三年度）によると我が国では1991年は年間140例の報告があった。1964年～1988年の同登録の集計によると、原発性悪性骨腫瘍の登録例数6702例中、骨肉腫は2924例で、全体の43.6%をしめ、最多である²⁾。一般に好発年齢は10歳台で、30歳以下の症例が85%以上をしめる。男女比は男性がやや多く1.25:1である。好発部位は大腿骨遠位、脛骨近位、上腕骨近位、肋骨近位の骨幹端である^{3,4)}。骨肉腫は早期に診断されることが少なく、診断時には病期が進行していることが多い。骨肉腫の治療は生検にて診断確定後、術前に化学療法を行い切断術ないし広範腫瘍切除術を行う。さらに、術後も化学療法を継続する。1972年～1991年の累積生存率によると骨肉腫の5年生存率は40.9%である⁵⁾。近年の化学療法の進歩に伴い予後は改善されてきているものの、肺等に遠隔転移をおこす致死的なことが多い。

近年、悪性腫瘍の発生、進展には種々の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の関与が想定され、多くの癌及び肉腫について病理組織学的あるいは分子生物学的にそれらの関与が証明されつつある⁶⁾。一般に悪性腫瘍の発生、進展は複数の癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の異常の累積に起因すると考えられている。大腸癌発生に関する遺伝子異常は最も研究が進んでおり、多段階的に遺伝子の異常がおこり、正常粘膜上皮が腺腫を経て腺癌に到るとするモデルが想定されている^{7,8)}。その他にも多くの悪性腫瘍において遺伝子の異常が検索されている。特に家族性に悪性腫瘍が多発する症候群では腫瘍発生の異常を解析するよいモデルになりうるので研究が盛んにされている。骨肉腫に関してはp53遺伝子の異常に起因するLi-Fraumeni症候群があり、骨肉腫や乳癌等種々の悪性腫瘍が家族集積性に発生する^{9,10)}。手術等により切除された腫瘍を検索する方法として、従来の病理組織学的検索に加えて、その腫瘍の背景因子である遺伝子異常を検索することが各々の症例について今後ますます重要になると考えられる。

骨肉腫の発生に関しては*de novo*の発生とPaget病、梗塞、線維性骨異形成、放射線照射後等に生じる二次性的のものが知られている。我が国では二次性に発生する骨肉腫は少ない。現在まで骨肉腫の発生、進展に関与する遺伝子としてはRB(retinoblastoma)

遺伝子^{11) 12) 13) 14)}とp53遺伝子^{15) 16) 17)}が知られているが、ごく最近になってmdm-2 (murine double minute-2)遺伝子¹⁸⁾、c-met遺伝子¹⁹⁾等が骨肉腫の発生に関与しているとの報告がされている。

骨肉腫においてp53遺伝子、p53蛋白についての検索は既に多くの報告がある。骨肉腫においてp53遺伝子の異常をDNAレベルで検討した報告によるとその異常は特定のエクソンやコドンに集中しているのではなく、むしろ遺伝子の異常は様々な部位にみられるという結果が得られている¹⁶⁾。

一般に悪性腫瘍においてはp53遺伝子の異常やp53蛋白の発現と腫瘍の悪性度ないし予後と関連があるといわれている。果たして骨肉腫についても同様の関係があるかを知る目的でp53蛋白を検討項目にした。骨肉腫でのp53蛋白の検討は既に報告があるので本研究はその追試的な意味合いもあるが、本研究ではいままでの報告とは異なったモノクローナル抗体を用いた。

bcl-2遺伝子は細胞死の抑制する機能を有すると言われている。また、*in vitro*でbcl-2遺伝子を過剰発現させるとその細胞は各種の抗癌剤に抵抗性を示すことがわかっている²⁰⁾。骨肉腫とbcl-2遺伝子、蛋白に関する報告は現在のところなく、骨肉腫とbcl-2遺伝子の関わりがあるか、化学療法との関係があるかを知る目的でbcl-2蛋白を検討項目にした。

c-erbB-2遺伝子は受容体型チロシンキナーゼであるc-erbB-2蛋白をコードする遺伝子で主として乳癌など上皮性の悪性腫瘍でよく検討され、予後との関連もあるとされている。間葉系の腫瘍の一部でもc-erbB-2蛋白が発現しており、骨肉腫組織ではmRNAレベルでの発現が確認されている²¹⁾。骨肉腫では蛋白レベルでの報告はなく、免疫組織化学による蛋白の局在、蛋白の発現の有無と予後の関連があるかを知る目的でc-erbB-2蛋白を検討項目にした。

PTHRPは本来高カルシウム血症の原因物質として単離された蛋白である。しかし、微量ながら広範囲の正常組織にも分布していることがわかっており²²⁾、局所組織で何らかの機能を持つことが推察されている。骨組織では胎児期の骨芽細胞がPTHRPを有しており、更にPTHRPは胎児の骨形成に必須であることがPTHRP遺伝子を欠落させたマウスより判明している²³⁾。そこで、骨芽細胞由来と考えられる骨肉腫においてPTHRPの産生があるか、またPTHRPを産生する骨肉腫はどのような特徴があるかを知る目的でPTHRPを検討項目にした。

RB遺伝子は骨肉腫についてはDNAレベルで比較的良好に検討されており、骨肉腫の腫瘍発生に関与していると考えられている。RB遺伝子は癌抑制遺伝子であり、その遺伝子産物の正常な機能が欠落することが腫瘍発生に関与すると考えられている。しかしながら、免疫組織化学的に腫瘍組織あるいは非腫瘍組織においてRB遺伝子産物の有無を検出することの意味づけがまだ確立されていない。さらに、ホルマリン固定パラフィン包埋組織で安定してRB遺伝子産物を検出する抗体を入手できなかったため検索項目から除外した。

c-fos遺伝子は核内転写調節因子で、遺伝子の発現の調節をつかさどる機能を有している。骨肉腫との関連ではヒト骨肉腫組織でc-fos遺伝子産物の発現を検討した報告²⁴⁾やc-fos遺伝子を過剰発現させたマウスに骨肉腫が発生するという報告²⁵⁾等があり、c-fos遺伝子は骨肉腫の腫瘍発生に関与している可能性があると考えられる。c-fos遺伝子産物の発現と骨肉腫の組織型あるいは悪性度等と関連があるかを示すことは意義があると考えられたが、ホルマリン固定パラフィン包埋組織で安定してc-fos遺伝子産物を検出する抗体を入手できなかったため検索項目から除外した。

近年、骨肉腫における化学療法的重要性は増加してきている。現時点では悪性腫瘍の治療で病変部を取り去る切除術が一番確実な方法であることに異論はないが、骨肉腫においては術前術後の化学療法が治療のポイントになるといっても過言ではない。特に骨肉腫の好発部位は四肢近位であるため機能の温存を目的として切除範囲を最小限に留める手術が望まれる。また、肺等の諸臓器への遠隔転移を生じると致死的になる可能性があり、極力転移の予防に努める必要がある。そこで腫瘍を縮小させるため、遠隔転移を予防するため、あるいは転移巣の治療のために術前術後に強力な化学療法が必要となる。

術前の化学療法の薬剤の投与方法には静脈内投与の他、患部の局所の動脈内へ注入する方法がある。薬剤の選択も多様で2~3種類の薬剤を選択し、投与を繰り返すとより効果的である。東京大学付属病院では症例や治療を行った年度により薬剤の選択や投与方法が多少異なるが、近年はシスプラチンを局所の動脈内に注入し局所灌流療法の後、高濃度のメソトレキセートの投与（超高濃度メソトレキセート療法）、アドリアシンの投与を行うことが多い。他の薬剤としてオンコビン、マイトマイシン、テラルビシン等の薬剤が用いられている。根治術後も約1年間に亘ってシスプラチン、メソトレキセート、アドリアシンを中心とした化学療法を継続する。

一方悪性腫瘍において化学療法により薬剤耐性を生じてくることが知られており、耐

性を生じる機構の一つにP-糖蛋白 (P-glycoprotein) と呼ばれる膜蛋白質によるものがある²⁶⁾。MDR-1 (Multidrug resistance) 遺伝子の遺伝子産物であるP-糖蛋白は正常組織にも存在しており、副腎皮質、腎尿管、肝内胆管等の上皮細胞に強い発現がみられる²⁷⁾。P-糖蛋白は血液腫瘍の他、固形腫瘍でも検索されており²⁸⁾、薬剤耐性の一つの機序と考えられている。骨肉腫においてはMDR-1遺伝子あるいはP-糖蛋白についての報告はまだ少数で、MDR-1遺伝子をmRNAレベルで検索した報告によると、高い発現があった骨肉腫例は予後不良の傾向があるとしている²⁹⁾。一般に軟骨への分化を示す部分が多い軟骨芽細胞型骨肉腫においては化学療法の効果が得にくいことが知られている^{30) 31)}。骨肉腫においてP-糖蛋白の発現の有無と化学療法の効果、転移の有無あるいは予後との関連を知る目的でP-糖蛋白を検討項目に加えた。

骨肉腫に対してはまず生検において診断を確定し、術前の化学療法を行い、切断術ないしは広範切除術を行うのが一般的である。術後も化学療法を継続する³²⁾。肺等の諸臓器に遠隔転移をきたした場合は可能ならば転移局所に対して切除がなされる。生検検体は未治療の状態であり、腫瘍発生の比較的初期の段階の腫瘍の性質を反映していると考えられる。また、手術材料は治療により修飾を受けているが、腫瘍の全体像を捉えるのには好都合である。さらに、転移、再発巣は腫瘍のいわばprogressionの時期に相当し、しかも、治療に抵抗性の腫瘍細胞で構成されると考えられる。

また、骨原発の悪性腫瘍の代表である骨肉腫と対比する意味で骨原発の良性腫瘍である類骨腫と骨巨細胞腫を取り上げ、腫瘍の組織発生、進展の背景にある遺伝子異常を知る目的で骨肉腫と同様に検索した。類骨腫、骨巨細胞腫ともに発生頻度は骨肉腫よりやや少なく、全国骨腫瘍患者登録一覧表 (平成三年度) によると年間それぞれ32例、98例の報告があるにすぎない。

一般に腫瘍を病理組織学的に検索する場合の指標の一つとして分化度がある。分化度は腫瘍細胞がどの程度発生母地の組織の形質を保持しているかを反映する指標である。高分化であれば、発生母地の組織の形質をよく保持しているし、低分化であれば、発生母地の組織の形質の保持が悪くなることを意味している。一方、骨組織の形成に関与する細胞には骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞等があり、これらの各細胞間、あるいはこれらの細胞と骨基質との間において種々のサイトカインを介して骨形成、骨吸収等の骨代謝に関する相互作用のあることが知られている^{33) 34)}。本研究では腫瘍の分化度の観点から骨組織のサイトカインの一つと考えられるparathyroid hormone related protein

(PTHR) に着目してその役割を骨肉腫、類骨骨腫、骨巨細胞腫において検討した。

腫瘍の悪性を推定する一つの手法として腫瘍細胞の核DNA量を測定し、腫瘍細胞が細胞周期のどの部分にあるかの分布を調べ、ヒストグラムを作成して、DNAプロイディパターンを検討する方法がある。この手法にはフローサイトメトリーとイメージサイトメトリーとの二種類の異なった方法があり、それぞれに利点がある。現在まで多数の腫瘍において検索がなされており、腫瘍の悪性度または予後との関連を調べた報告が多い^{36) 37)}。骨肉腫においてはフローサイトメトリーによる報告が幾つかなされているが、イメージサイトメトリーによる報告はまだない^{38) 39)}。そこで、骨肉腫において腫瘍細胞核のDNAプロイディパターンと組織亜型、悪性度、予後との関係を知る目的で、骨肉腫例の中で腫瘍細胞核のDNAが比較的良く保存されている一部の生検組織と肺転移組織に対してイメージサイトメーター(CAS 200 Cell Analysis System : CAS 200)⁴⁰⁾を用いてDNAプロイディパターンを検討した。

また、腫瘍細胞の増殖能を評価する意味で細胞周期の内、G₂期以外の周期にある細胞と反応するKi-67抗原を検出し、腫瘍細胞における陽性細胞の割合(陽性率)を算出し、陽性率と組織学的悪性度及びDNAプロイディパターンとを比較検討した。

臨床の見地からは悪性腫瘍に罹患した患者がどのような経過をたどるかは最も重要な事項の一つである。腫瘍切除術や化学療法により、治療しえたのか、あるいは、種々の治療にもかかわらず腫瘍の再発や遠隔転移をきたし致命的な経過をたどったのかは重要な問題である。特に骨肉腫の場合には好発年齢が10歳代であるという点で、なお一層予後が重要である。骨肉腫の予後は近年の画像診断、手術手技、化学療法の進歩に伴い改善されてきたものの、5年生存率で40.9%と依然として低く、良好な予後とはいえない⁹⁾。現段階では骨肉腫において予後を規定する因子として明確に確立された因子はまだない⁴¹⁾。そこで、検索したすべての骨肉腫について診断確定日すなわち初回生検日からの生存週数を算出し、本研究で検討した各項目別に分けて生存率を比較検討し、骨肉腫に関して予後を規定する因子がどのようなものであるかを検討した。

【材料と方法】

1. 対象

東京大学医学部付属病院で1981年～1989年の期間に外科的に切除された骨肉腫37例を対象とした。当院にて殆どの症例は生検後、腫瘍切除術が施行されているが、一部の症例は他院にて初回生検が施行されている。生検材料、手術切除材料に加えて、転移・再発巣に対して切除術が施行された症例については転移・再発巣の切除検体も検索対象とした。また、当病院にて切除された類骨骨腫5例、骨巨細胞腫5例の腫瘍切除検体についても検索した。検体は10%ホルマリン固定後、パラフィンに包埋した。脱灰の必要な組織は原則として塩酸と蟻酸を含有するPlank & Rychlo液⁴²⁾を使用した。一部はEDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 液を使用した。

子宮内胎児死亡の剖検例2例(17週齢と19週齢)から左大腿骨を採取し、長軸に半割後10%ホルマリンにて24時間固定し、必要に応じてEDTAにて脱灰し、パラフィンに包埋した。

2. 臨床的事項と病理学的検索

骨肉腫については、発生年齢、性別、腫瘍の部位、腫瘍の大きさ、骨外への浸潤の有無、組織亜型、組織学的悪性度について検討した。組織亜型はDahlinらの分類に基づき分類した⁴³⁾。組織学的悪性度はBrodersの分類に基づき、Grade1～Grade4に分類した^{44) 45)}。類骨骨腫、骨巨細胞腫については年齢、性別、腫瘍の部位について検討した。組織学的検索にはパラフィン包埋材料を厚さ4 μmに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した標本を用いた。

3. 免疫組織化学的検索

p53蛋白、bcl-2蛋白、c-erbB-2蛋白、P-糖蛋白およびPTHRの検討

A. 抗体

a. 抗p53蛋白マウスモノクローナル抗体(クローン: DO-7, IgG2b, kappa) (DAKO S/A, Denmark) を使用した。Vojtesekらのホルマリン固定パラフィン包埋組織でのp53蛋白に対するモノクローナル抗体(DO-7)を用いた検討によると、乳癌、胃癌、大腸癌等60種類の癌細胞の核に強く陽性所見が得られたのに対し皮膚、脳、腎、肺、胃、乳腺等の正常組織では発現がなかったとしている⁴⁶⁾。

希釈倍率は100倍で使用した。陽性コントロールはヒト大腸癌組織を用いた

(図10)。

- b. 抗ヒトbcl-2蛋白マウスモノクローナル抗体(クローン: 124, IgG1, kappa)(DAKO S/A, Denmark) を使用した。bcl-2蛋白はt(14; 18)の転座を有する濾胞型の悪性リンパ腫の腫瘍細胞に発現することが知られているが、転座の有無に関係なくbcl-2蛋白は腫瘍組織や正常組織に発現していることが知られている。抗bcl-2蛋白に対するモノクローナル抗体(クローン124)の正常組織での検討では扁桃、リンパ節、脾臓で傍皮質領域やマントル領域の細胞の核膜ないし細胞質に陽性で、胚中心の細胞には陰性であるとしている。また、胸腺では皮質の細胞は陰性、髄質の細胞は陽性であるとしている⁴⁷⁾。

希釈倍率は80倍で使用した。陽性コントロールはヒト濾胞型悪性リンパ腫組織を用いた(図13)。

- c. 抗c-erbB-2蛋白マウスモノクローナル抗体(クローン: CB11, IgG1)(Novocastra Laboratories Ltd., United Kingdom) を使用した。Corbettらはc-erbB-2蛋白をモノクローナル抗体(CB11)を用いてホルマリン固定パラフィン包埋切片にて免疫組織化学的に検討しており、乳癌の20%の症例の癌細胞の細胞膜に陽性となり、非癌部の乳腺小葉上皮、導管上皮は陰性であるという結果を得ている⁴⁸⁾。

希釈倍率は40倍で使用した。陽性コントロールはヒト乳癌組織を用いた(図15)。

- d. 抗p-Glycoproteinマウスモノクローナル抗体(クローン: JSB-1, IgG1)(Novocastra Laboratories Ltd., United Kingdom) を使用した。Valkらの報告によるとP-糖蛋白は正常組織に幅広く分布しており、抗P-糖蛋白モノクローナル抗体(クローン: JSB-1)による検討ではたとえば胃、腸上皮、気管支上皮、乳腺上皮、膀胱上皮、腎尿管上皮、肝毛細胆管上皮と小葉胆管上皮、副腎皮質細胞、脳の毛細血管内皮等に存在していることがわかっている⁴⁹⁾。

希釈倍率は20倍で使用した。陽性コントロールはヒト副腎組織を用いた(図17)。

- e. 抗ヒトPTH RPマウスモノクローナル抗体(クローン: 034, IgG) を使用した。リコンビナントのPTH RP(1-34)をマウスに免疫して製したマウスモノクローナル抗体を用いた。本抗体は虎の門病院病理学科の松下央博士から供与された。PTH RPは成人T細胞性白血病や肺癌等の高カルシウム血症を伴う腫瘍組織だけでなく種々の正常組織にも微量ながら分布していることが免疫組織化学的に示されている²²⁾。本研究で用いた抗体とは別の抗体による報告ではPTH RPは脾臓ランゲルハンス氏

島細胞、精巢のライデッヒ細胞、皮膚表皮の重層扁平上皮や授乳期乳腺の腺房上皮に比較的強い発現がみられるとされている。

希釈倍率は65倍で使用した。陽性コントロールはヒト膵臓組織を用いた(図19)。

B.切片の作製

10%ホルマリン固定パラフィン包埋材料から厚さ4 μm の切片を作製し、必要に応じて2%のアミノプロピル・トリエトキシ・シランを含有するアセトン溶液にて処理をしたシランコーティングスライドガラスを用いた。陽性コントロールに使用した組織は手術、又は生検で切除された検体を10%ホルマリン固定後パラフィンに包埋し、組織切片を作製した。

C.免疫組織化学染色

HISTOFINE免疫組織化学染色システム(ストレプトアビジン-ビオチン:SAB法)(株式会社ニチレイ)を用いた。組織切片をキシレンにて脱パラフィン後アルコールにて水和させた。p53蛋白とbcl-2蛋白の検出には前処置として1000mlのクエン酸緩衝液(10mM:pH 6.0)に脱パラフィンした組織切片を浸漬し、H2500 Microwave Processor (Energy Beam Sciences, Inc.)にて90℃、10分間のマイクロウェーブ照射を施し、抗原の賦活化を行った^{50) 51)}。PThRPの検出には前処置として0.1%のトリプシンと室温で10分間反応させた。内因性ペルオキシダーゼのブロックは3%過酸化水素・メタノール混合液中で15分間処理をした。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて5分間3回洗浄後正常ウサギ血清と37℃にて15分間反応させ非特異反応をブロック後、一次抗体と4℃にて24時間反応させた。陰性コントロールは一次抗体の代わりに正常マウス血清と4℃にて24時間反応させた。PBSにて5分間3回洗浄後二次抗体と37℃にて15分間反応させた。さらに、PBSにて5分間3回洗浄後、標識試薬と37℃にて15分間反応させた。PBSにて5分間3回洗浄後、ジアミノベンチジン(DAB)を用いて発色した。DAB発色後カラチのヘマトキシリンにて核染を施した。ヘモジデリンが多量に沈着している症例についてはDABの発色とヘモジデリンを区別するために適宜、バルミン・ブルー法により鉄染色を加えた。アルコールで脱水、キシレンで透徹し、封入した。

D.画像解析装置(CAS200)による陽性率(陽性細胞/腫瘍細胞数)の計測

CAS200(Cell Analysis System, Inc.)のCell measurement program (version 3.0)を用いた。計測に用いた免疫染色の標本はDABにて褐色に発色させ、ヘマトキシリンにて核染を施した。最初に陰性コントロール標本をヘマトキシリンの色調を認識する波長

610nmのフィルターにて50細胞以上計測し、陽性と陰性ととの閾値を決めた。次にDABの褐色の色調を認識する波長500nmのフィルターにて免疫染色を施した標本の腫瘍細胞を200個以上計測し、測定した腫瘍細胞に対してDABで褐色に発色している陽性細胞の比を求めた。測定はp53蛋白免疫染色の陽性例について行った。

4. イメージサイトメトリーとKi-67抗原 (Mib-1) 免疫染色

A. 切片の作製

10%ホルマリン固定パラフィン包埋材料から厚さ4 μm の切片を作製した。

B. フォイルゲン染色

CAS (Cell Analysis System, Inc.) DNA染色キットを用いた。組織切片は脱パラフィン、脱アルコールの後、脱イオン水で洗浄し、5NのHCl中にて室温で60分、加水分解させた。0.1N HCl 100ml中にDNA染色試薬 (CAS DNA Stain Reagent) を入れ、スターラで60分攪拌し十分に溶解させ作製したDNA染色液中で、スターラを攪拌しながら室温で60分、染色した。0.05N HCl 300ml中にDNA洗浄試薬 (CAS DNA Rinse Reagent) を入れ、攪拌溶解後100mlずつに分けて、組織切片をそれぞれ30秒、5分、10分間洗浄した。さらに組織切片を脱イオン水で3回洗浄した後、1%塩酸アルコールに5分間浸漬した。アルコールで脱水、キシレンで透徹し、封入した。

C. イメージサイトメトリーとKi-67抗原 (Mib-1) 免疫染色

CAS 200 イメージサイトメーター (CAS DNA 定量プログラム Version 3.0) (Cell Analysis System, Inc.)を用いた。あらかじめDNA量の分かっているラット肝細胞の培養細胞と計測する切片とを同時にフォイルゲン染色を施した。最初にコントロールとなる培養細胞のDNA量を20個以上測定し、測定の基準とした。フォイルゲン染色を施した骨肉腫組織切片を用いて顕微鏡直視下に腫瘍細胞を確認しながら、最低150個の腫瘍細胞のDNA量を計測し、DNAヒストグラムを作成した。

また、Ki-67抗原の検出にはマウスモノクローナル抗体 (Mib-1) (Immunotech S.A.)を用いて、他の遺伝子産物の検出に用いた方法と同様に免疫組織化学的検索を行った。さらに、p53陽性細胞の陽性率の解析と同様に画像解析装置を用いてKi-67抗原陽性細胞の比率を算出した。

5. 生存期間の算出と転移、再発の有無

骨肉腫例について生存期間を算出した。生存期間は初回生検月日からの生存週数を算

出した。生存例については最終の生存確認日までの期間を生存期間とした。骨肉腫例について全期間にわたって転移、再発の有無について検索した。病理学的に転移、再発が確認されていない場合でも、各症例の診療記録を参照し、画像等により転移、再発が明確な場合には転移、再発があると分類した。

6. Kaplan-Meier 生存曲線

腫瘍の大きさ、組織学的悪性度、p53蛋白の発現の有無、bcl-2蛋白の発現の有無、c-erbB-2蛋白の発現の有無、P-糖蛋白の発現の有無、PTHrPの発現の有無、DNAプロイディパターンの各パラメーターについて各々Kaplan-Meier法⁵²⁾に基づき累積生存率を算出し、生存曲線を作成した。腫瘍の大きさについては腫瘍最大断面における腫瘍の長径が11cmを越える群と11cm以下の群の2群に分けた。組織学的悪性度についてはBrodersの分類のGrade 1とGrade 2を低悪性度群、Grade 3とGrade 4を高悪性度群とした。p53蛋白、bcl-2蛋白、c-erbB-2蛋白、P-糖蛋白、PTHrPについては陽性群と陰性群の2群に分けた。DNAプロイディパターンについてはaneuploid群とaneuploidでない群の2群に分けた。

各パラメーターの2群間の生存率の有意差はLogrank法⁵³⁾に基づき検討した。

7. 統計学的処理

有意差の検定には必要に応じてフィッシャーの直接確率計算法、Welch's T-test、Student's T testを用いた。生存曲線はKaplan-Meier法⁵²⁾を用い、有意差の検定にはLogrank法⁵³⁾を用いた。

【結果】

A. 臨床的事項と病理学的検索

1. 骨肉腫

a. 年齢、性別：発生年齢は6歳から43歳の範囲に及んでおり、平均年齢は18.1±7.7歳（平均±標準偏差）であった。10歳から19歳の範囲に27例（73.0%）が集中していた。男性は25例、女性は12例で、男女比は2.1：1であった（表1、図1）。

b. 発生部位：発生部位は大腿骨遠位部が13例（35.1%）と最多で、以下脛骨近位部、7例（18.9%）、上腕骨近位部、7例（18.9%）、大腿骨近位部、4例（10.8%）の順

であった。肋骨、腸骨、恥骨、腓骨近位部に各々1例ずつであった（表1、図1）。

c. 腫瘍切除時における腫瘍の大きさと骨外への浸潤の有無：対象とした骨肉腫37例の内、恥骨発生1例は腫瘍切除術を施行しておらず、腫瘍の大きさ、骨外への浸潤の有無については検索対象から除外した。腫瘍の大きさの評価は最大断面における腫瘍の長径を測定した。長径は5.5cmから21.5cmの範囲に及び、平均値は10.9cm±4.0、中央値は11cmであった。腫瘍切除時に骨外への浸潤があった例は23例、腫瘍が骨内に留まっていた例が13例であった（表2、図2、図3）。

d. 病理組織学的事項：骨肉腫の亜分類は骨芽細胞型（Osteoblastic）、24例（64.9%）、線維芽細胞型（Fibroblastic）、8例（21.6%）、軟骨芽細胞型（Chondroblastic）、2例（5.4%）であった。血管拡張型（Telangiectatic）、骨内分化型（Intraosseous Well-Differentiated）、傍骨性骨肉腫（Parosteal Osteosarcoma）が各々1例ずつであった。Brodersの分類に基づきGradeを決めた。Grade 1は1例（2.7%）、Grade 2は4例（10.8%）、Grade 3は21例（56.8%）、Grade 4は11例（29.7%）であった（表1、図4～9）。

e. 転移、再発の有無：全経過を通じ転移、再発を生じた例は20例あった。その内、8例は転移、再発巣の切除術が施行されている。局所再発があったのは1例で再切除術と肺転移巣の切除術とが施行されている。転移巣の切除術が施行された8例はすべて肺転移の切除術が施行されており、その内2例は肺転移に加えて皮膚、指に転移し、各々切除術が施行されている。残りの12例は臨床的に画像等により転移が確認されている。17例は全経過に亘り転移、再発をきたしていない（表2）。

f. 生存期間：生存期間は23週から649週（12年7ヶ月）に及んでおり、平均生存期間は250±202週であった。生存例は19例、死亡例は18例で、生存例についての生存期間の平均週数は417±141週、死亡例については74±38週であった（表2）。

2. 類骨骨腫

a. 年齢、性別：発生年齢は19歳から28歳の範囲に及んでおり、平均年齢は24.0±3.4歳であった。男3例、女2例であった（表3）。

b. 発生部位：椎体骨が4例、手指末節骨1例であった（表3）。

3. 骨巨細胞腫

a. 年齢、性別：発生年齢は19歳から45歳の範囲に及んでおり、平均年齢は30.6±10.0歳であった。男3例、女2例であった（表4）。

b. 発生部位：脛骨骨端部が4例、橈骨骨端部1例であった（表4）。

B. 免疫組織化学的検索

1. 骨肉腫について

1) p53蛋白について

骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変でp53蛋白の発現がみられたのは9例（24.3%）であった。p53蛋白は腫瘍細胞の核に限局して発現していた。検体の種類別においては、生検例37例中6例陽性（16.2%）、手術材料34例中6例陽性（17.6%）、転移巣8例中3例陽性（37.5%）であった。生検例で陽性の6例中、陽性細胞数が50%以上の例は1例、10-50%の例は3例、10%以下の例は2例であった。手術例で陽性例6例中、陽性細胞数が50%以上の例は1例、10-50%の例は3例、10%以下の例は2例であった。転移巣で陽性例3例中、10-50%の例は1例、10%以下の例は2例であった。生検時は陰性で手術材料で陽性の症例が3例あった。逆に生検時のみ陽性で手術材料では陰性の症例が2例あったが、その内の1例は肺転移巣で陽性になっている。また、転移巣で陽性の3例はいずれも生検時に陽性であった（表5、図11a, b、図12a, b）。

また、p53蛋白の発現していた骨肉腫を亜型別にみると陽性9例の内8例は骨芽細胞型であり、1例は傍骨性骨肉腫であった。各亜型ごとの陽性率は骨芽細胞型で24例中8例（33.3%）であったが、線維芽細胞型、8例と軟骨芽細胞型、2例はすべて陰性であった（表10）。

さらに、Gradeごとの陽性率はGrade1は1例でp53蛋白の発現はなく、Grade2は4例中2例陽性で50%、Grade3は21例中5例に陽性で23.8%、そしてGrade4は11例中2例に陽性で18.2%であった（表10）。

p53蛋白の組織内分布は以下の通りであり、本研究で用いた抗体と同じ抗体によるp53蛋白の組織分布の報告と相違はなかった。

p53蛋白は大腸癌、乳癌組織の癌細胞の核に陽性であったのに対し、大腸癌の非癌部の腺管上皮、間質に浸潤するリンパ球、形質細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞には陰性、乳腺では乳腺小葉の腺房上皮、導管上皮には陰性であった。骨肉腫組織においても骨肉腫細胞以外の骨芽細胞、破骨様多核巨細胞にp53蛋白の発現はみられなかった。

2) bcl-2蛋白について

骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変でbcl-2蛋白の発現が

みられたのは6例(16.2%)であった。bcl-2蛋白は腫瘍細胞の核膜及び細胞質に発現がみられた。検体の種類別においては、bcl-2蛋白は生検37例中1例(2.7%)に陽性であった。手術材料では34例中3例(8.8%)に陽性であった。転移巣では8例中4例(50.0%)に陽性であった。生検時の陽性率に比較して転移巣での陽性率が高率であった。生検例で陽性の1例は陽性細胞数が10%以下であった。手術例で陽性例3例はいずれも陽性細胞数が10-50%であった。転移巣で陽性例4例中、陽性細胞数が10-50%の例は1例、10%以下の例は3例であった。転移巣での陽性例4例の内、1例は生検時も陽性であったが、他の3例はいずれも生検時は陰性で、手術材料、転移巣共に陽性であった症例が1例、転移巣のみ陽性であった症例が2例であった(表6、図14a, b)。

また、bcl-2蛋白の発現していた骨肉腫を亜型別にみると陽性例6例の内骨芽細胞型が5例を占めており、1例は線維芽細胞型であった。各亜型ごとの陽性率は骨芽細胞型で24例中5例(20.8%)、線維芽細胞型で8例中1例(12.5%)陽性で、軟骨芽細胞型2例では陽性例はなかった(表11)。

さらに、Grade別の陽性率はGrade1、2ではbcl-2蛋白の発現はみられなかった。Grade3は21例中4例に陽性(19.0%)、Grade4は11例中2例に陽性(18.2%)であった(表11)。

bcl-2蛋白の組織内分布は以下の通りであり、本研究で用いた抗体と同じ抗体によるbcl-2蛋白の組織分布の報告と相違はなかった。

bcl-2蛋白は濾胞型の悪性リンパ腫の腫瘍細胞の核膜ないし細胞質に陽性であった。また、bcl-2蛋白は扁桃とリンパ節の傍皮質領域やマントル領域の細胞質に陽性で、胚中心の細胞には陰性であった。骨肉腫組織内においては破骨様多核巨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞にbcl-2蛋白の発現はなかった。

3) c-erbB-2蛋白について

骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変でc-erbB-2蛋白の発現がみられたのは11例(29.7%)であった。検体の種類別ではc-erbB-2蛋白は生検36例中7例(19.4%)に陽性であった。手術材料では34例中6例(17.6%)に陽性であった。転移巣では8例中1例(12.5%)に陽性であった(表7)。生検例で陽性の7例はいずれも陽性細胞数10%以下であった。手術例で陽性例6例中、陽性細胞数が10-50%の例は1例、10%以下の例は5例であった。転移巣で陽性例1例は陽性細胞数が10%以下であった(表7)。c-erbB-2蛋白は腫瘍細胞の細胞質に発現していた。c-erbB-2蛋白の骨肉腫細

胞における免疫組織化学的活性はいずれも弱く、しかも少数の腫瘍細胞に限られていた(図16 a, b)。また、腫瘍組織に出現する反応性と考えられている破骨細胞様多核巨細胞の細胞質の辺縁部にc-erbB-2蛋白の比較的強い免疫組織化学的活性がみられた。

また、c-erbB-2蛋白の発現していた骨肉腫を亜型別にみると陽性例11例の内、骨芽細胞型が9例を占めており、1例は線維芽細胞型、1例は傍骨性骨肉腫であった。各亜型ごとの陽性率は骨芽細胞型で24例中9例(37.5%)、線維芽細胞型で8例中1例(12.5%)、傍骨性骨肉腫1例中1例(100%)で、軟骨芽細胞型2例では陽性例はなかった(表12)。

さらに、Grade別の陽性率はGrade1ではc-erbB-2蛋白の発現はみられなかった。Grade2は4例中2例(50%)、Grade3は21例中4例に陽性(19.0%)、Grade4は11例中5例に陽性(45.5%)であった(表12)。

c-erbB-2蛋白の組織内分布は以下の通りであり、本研究で用いた抗体と同じ抗体によるc-erbB-2蛋白の組織分布の報告と相違はなかった。

c-erbB-2蛋白は乳癌細胞の細胞膜に局在する場合と細胞質に局在する場合がみられた。Paget病においてc-erbB-2蛋白は癌細胞の細胞膜に局在していた。非癌部の乳腺小葉の腺房上皮、導管上皮にc-erbB-2蛋白は発現していなかった。また、骨肉腫組織内においては、c-erbB-2蛋白は破骨細胞様多核巨細胞の細胞質に陽性、骨芽細胞、血管内皮細胞には陰性であった。

4) P-糖蛋白について

骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変でP-糖蛋白の発現がみられたのは29例(78.3%)であった。陽性例29例の内、16例(55.1%)に転移があり、13例(44.8%)には経過中転移はなかった。P-糖蛋白は腫瘍細胞の細胞膜あるいは細胞質に免疫組織化学的活性がみられた(図18 a, b)。検体の種類別においては、生検例36例中20例陽性(55.6%)、手術材料34例中19例陽性(55.9%)、転移巣8例中1例陽性(12.5%)であった。生検例で陽性の20例中、陽性細胞数が50%以上の例は5例、10-50%の例は4例、10%以下の例は11例であった。手術例で陽性例19例中、陽性細胞数が50%以上の例は6例、10-50%の例は3例、10%以下の例は10例であった。転移巣で陽性例1例は陽性細胞数が10%以下であった(表8)。化学療法の前後でP-糖蛋白の検索ができた33例の内、化学療法前に陽性であった例が19例、陰性であった例が14例であった。化学療法前に陽性の19例の内、化学療法後に11例は陽性、8例は陰性になった。化学療法前に陰性の14例の内、化学療法後には8例は陽性化し、6例は陰性のままであ

た(表8)。

P-糖蛋白の発現していた骨肉腫を亜型別にみると24例の骨芽細胞型のうち20例、9例の線維芽細胞型のうち5例、軟骨芽細胞型が2例、各1例の血管拡張型及び傍骨性骨肉腫のうち各々1例に陽性であった。P-糖蛋白の骨肉腫における局在は主に軟骨への分化を示す部位に高頻度に発現しており、軟骨芽細胞型では2例中2例(100%)に陽性であった(表13、図18 a, b)。

さらに、組織学的悪性度ごとの陽性率はGrade1は1例で陽性(100%)、Grade2は4例中3例陽性(75%)、Grade3は21例中15例に陽性(71.4%)、そしてGrade4は11例中10例に陽性(90.9%)であった(表13)。

P-糖蛋白の組織内分布は以下の通りであり、本研究で用いた抗体と同じ抗体によるP-糖蛋白の組織分布の報告と相違はなかった。

P-糖蛋白は消化管上皮、腎遠位尿管上皮、副腎皮質細胞の細胞膜に発現がみられた。消化管平滑筋細胞、リンパ球、形質細胞、腎系球体の上皮細胞とメサンギウム細胞、副腎髄質細胞は陰性であった。また、骨肉腫組織においては骨芽細胞、破骨細胞様多核巨細胞、血管内皮細胞にP-糖蛋白は発現していなかった。

5) PTHRPについて

骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変においてPTHRPの発現がみられたのは21例(56.8%)であった。PTHRPは腫瘍細胞の細胞質に発現がみられた。また、PTHRPの発現していた骨肉腫を亜型別にみると生検37例中16例(43.2%)に陽性、手術材料では34例中11例(32.4%)に陽性、転移巣では8例中5例(62.5%)に陽性であった(表9、図20 a, b)。生検例で陽性の16例中、陽性細胞数が50%以上の例は5例、10-50%の例は7例、10%以下の例は4例であった。手術例で陽性例11例中、陽性細胞数が50%以上の例は3例、10-50%の例は4例、10%以下の例は4例であった。転移巣で陽性例5例中、50%以上の例は2例、10%以下の例は3例であった(表9)。

また、PTHRPの発現していた骨肉腫の亜型ごとの陽性率は骨芽細胞型で24例中13例(54.2%)、線維芽細胞型で8例中5例(62.5%)、軟骨芽細胞型で2例中2例(100%)、傍骨性骨肉腫で1例中1例(100%)であった(表14)。

さらに、Gradeごとの陽性率はGrade1は1例中1例(100%)、Grade2は4例中3例陽性(75%)、Grade3は21例中13例に陽性(61.9%)、Grade4は11例中4例に陽性(18.2%)であった(表14)。

本研究で使用したモノクローナル抗体 (034) の検討によるとPTHRPは膵臓ではランゲルハンス氏島の細胞の細胞質に陽性で、外分泌部腺房上皮、導管上皮には陰性であった。精巣においてはライデッヒ細胞の細胞質に陽性であったのに対し、精子形成過程の細胞やセルトリ細胞には陰性であった。皮膚では表皮の重層扁平上皮の細胞質に陽性であった。また、授乳期の乳腺では乳腺小葉の腺房上皮の細胞質に強い発現がみられた。本研究で得られた結果はPTHRPの一般的な組織分布と相違がなかった。

6) 骨肉腫p53蛋白陽性例の画像解析装置による陽性率の計測

骨肉腫p53蛋白陽性9症例15検体の内、6症例12検体が測定可能であった。3検体はヘマトキシリンの染色性が悪く、陽性と陰性の閾値が設定できず、陽性率の算出ができなかった。p53蛋白の陽性率は4.4%から94.8%に及び、陽性率0-10%の検体が3例、10-50%の検体が7例、50%以上の検体が2例であった。同一症例において、p53蛋白の陽性率は一定ではなく、原発巣や転移巣で相違がみられた。また、転移巣において原発巣に比較して陽性率が上昇する傾向はなかった (表10)。

2. 類骨骨腫と骨巨細胞腫について

類骨骨腫5例についてはp53蛋白、bcl-2蛋白、c-erbB-2蛋白の発現はいずれも陰性であった。PTHRPは5例の内4例 (80%) が陽性であった (表15)。PTHRPは腫瘍細胞の細胞質に発現がみられた (図21 a,b)。一方、骨巨細胞腫についてはp53蛋白、bcl-2蛋白、PTHRPは5例すべて陰性であった。骨巨細胞腫5例中2例 (40%) はc-erbB-2蛋白が陽性であった (表16)。陽性例では骨巨細胞腫の多核の巨細胞のほとんどすべての細胞の細胞質と一部の単核の間質細胞の細胞質に陽性であった (図22 a,b)。

3. ヒト胎児正常骨組織

17週齢と19週齢のヒト胎児の大腿骨においてPTHRPの免疫組織化学的活性は骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞にあった (図23 b)。c-erbB-2蛋白の免疫組織化学的活性は骨芽細胞、破骨細胞にみられた (図23 c)。bcl-2蛋白についてはヒト胎児の大腿骨において免疫組織化学的活性を有する細胞はなかった (図23 d)。

C. CAS 200によるイメージサイトメトリーとKi-67 (Mib-1) 免疫染色の結果

骨肉腫37例中イメージサイトメトリーにて検索しえた症例は12例12検体であった。その内、原発部位の生検材料が8例で、転移巣切除検体が4例であった。他の検体はフォイルゲン染色で染色性が悪く検索不能であった。おそらく固定や脱灰の影響を受け、

DNAが良く保存されていないためと考えられる。

DNAプロイディの判定は得られたヒストグラムが一つのピークを有しかつDNA Index (DI) が0.9以上1.1以下でtetraploidの細胞が15%以下の場合にはdiploidと判定した。Tetraploidの細胞が15%以上でDIが1.8以上2.2以下の場合にはtetraploidと判定した。DIが1.1以上で2つの異なるピークを有する場合はaneuploidと判定した⁵⁴⁾。

検索しえた骨肉腫12例の内8例(66.7%)はdiploidであり、3例(25%)はaneuploidであり、1例(8.3%)がtetraploidであった(表17、図24~26)。DNAヒストグラムの測定の精度を示す変動係数(CV値: Coefficient of Variation)は骨肉腫12例において平均は 8.33 ± 0.57 であった。

亜型別に整理すると骨肉腫12例の内、骨芽細胞型が9例、線維芽細胞型が3例であった。骨芽細胞型9例の内、5例がdiploid、3例がaneuploid、1例がtetraploidであった。aneuploidとなった症例は3例ともすべて骨芽細胞型でしかもGrade4であった。一方線維芽細胞型3例はすべてdiploidであった(表17)。

一方、イメージサイトメトリーにて検索した症例12例中9例について免疫組織化学的にKi-67抗原が検出できた。2例は陽性細胞が全く認められず検索対象から除外した。また、1例については検索が行えなかった。Ki-67抗原陽性率は6.1%から32.8%に及び平均 $13.8 \pm 8.5\%$ であった。Ki-67抗原陽性率と組織学的悪性度、DNAプロイディパターンとの間に特徴的な傾向はみられなかった(表17)。

D. 免疫組織化学的検索結果と骨肉腫の組織学的亜型、組織学的悪性度及び原発巣と転移巣、との相関についての統計学的検討

1) p53蛋白について

a) 亜型との比較

骨肉腫の亜型別のp53蛋白の発現の比較では陽性例9例の内、8例が骨芽細胞型で骨芽細胞型24例中8例(33.3%)を占めていた。線維芽細胞型と軟骨芽細胞型には陽性例はみられなかった。亜型別のp53蛋白免疫組織化学の結果は下記の表の如くである。

	Osteoblastic	Fibroblastic	Chondroblastic	Parosteal
(陽性率)	(33.3%)	(0%)	(0%)	(100%)
p53蛋白陽性例	8	0	0	1
p53蛋白陰性例	16	9	2	0

次に傍骨性骨肉腫と血管拡張型を除く骨肉腫35例において、骨芽細胞型と骨芽細胞型以外すなわち線維芽細胞型と軟骨芽細胞型の総数とでp53蛋白の発現に有意差があるか否かを検討した。その結果は下記の表の通りである。

	Osteoblastic	Fibroblastic+Chondroblastic
p53蛋白陽性例	8	0
p53蛋白陰性例	16	11

フィッシャーの直接確率計算法によると骨芽細胞型と骨芽細胞型以外の骨肉腫とにおいてp53蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.0312となり、 $P<0.05$ において有意差があるといえる。

b) 組織学的悪性度との比較

次に低悪性度の骨肉腫 (Grade1、Grade 2) と高悪性度の骨肉腫 (Grade 3、Grade4) とにわけてp53蛋白の発現の有無に統計学的に有意差があるか否かを検討した。組織学的悪性度とp53蛋白の発現との関係は次表の如くである。

	Grade1+Grade2	Grade3+Grade4
(陽性率)	(50%)	(21.9%)
p53蛋白陽性例	2	7
p53蛋白陰性例	2	25

フィッシャーの直接確率計算法によると低悪性度と高悪性度とにおいてp53蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.2552となり、 $P<0.05$ において有意差があるとはいえない。

c) 原発巣と転移巣の比較

さらに、原発巣の生検検体と転移巣の検体におけるp53蛋白の発現の陽性率に差があるか否かを検討した。原発巣の生検検体と転移巣検体別のp53蛋白染色結果は次表の如くである。

	原発巣の生検検体	転移巣検体
(陽性率)	(16.2%)	(37.5%)
p53蛋白陽性例	6	3
p53蛋白陰性例	31	5

フィッシャーの直接確率計算法によると生検検体、転移巣検体とにおいてp53蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.9611となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

d) まとめ

以上より通常型骨肉腫においては骨芽細胞型骨肉腫にp53蛋白が発現する傾向があり、統計学的に有意差があった。組織学的悪性度及び原発巣(生検)と転移巣との比較では統計学的な差はみられなかったが、p53蛋白は組織学的悪性度の低い症例で、また原発巣よりも転移巣でより陽性率が高い傾向があった。

2) bcl-2蛋白について

a) 亜型との比較

骨肉腫を亜型別のbcl-2蛋白の発現の比較では陽性例6例の内、5例が骨芽細胞型で骨芽細胞型24例中5例(20.8%)を占めていた。線維芽細胞型は1例陽性で陽性率は11.1%である。軟骨芽細胞型、血管拡張型、傍骨性骨肉腫には陽性例はみられなかった。亜型別に分けた結果は次表の如くである。

	Osteoblastic	Fibroblastic	Chondroblastic
(陽性率)	(20.8%)	(11.1%)	(0%)
bcl-2蛋白陽性例	5	1	0
bcl-2蛋白陰性例	19	8	2

次に通常型骨肉腫35例において、骨芽細胞型と骨芽細胞型以外すなわち線維芽細胞型

と軟骨芽細胞型とでbcl-2蛋白の発現に有意差があるか否かを検討した。

	Osteoblastic	Fibroblastic+Chondroblastic
bcl-2蛋白陽性例	5	1
bcl-2蛋白陰性例	19	10

フィッシャーの直接確率計算法によると骨芽細胞型と骨芽細胞型以外の骨肉腫においてbcl-2蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.0890となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

b) 組織学的悪性度との比較

次に低悪性度の骨肉腫 (Grade 1、Grade 2) と高悪性度の骨肉腫 (Grade 3、Grade 4) とにわけてbcl-2蛋白の発現の有無に統計的に有意差があるか否かを検討した。組織学的悪性度とbcl-2蛋白の発現との関係は次表の如くである。

	Grade1+Grade2	Grade3+Grade4
(陽性率)	(0%)	(28.1%)
bcl-2蛋白陽性例	0	6
bcl-2蛋白陰性例	4	26

フィッシャーの直接確率計算法によると低悪性度と高悪性度とにおいてbcl-2蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.4652となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

c) 原発巣と転移巣の比較

さらに、原発巣生検検体と転移巣の検体におけるbcl-2蛋白の発現の陽性率に差があるか否かを検討した。原発巣の生検検体と転移巣検体のbcl-2蛋白染色結果は次表の如くである。

	原発巣生検検体	転移巣検体
(陽性率)	(2.7%)	(50.0%)
bcl-2蛋白陽性例	1	4
bcl-2蛋白陰性例	36	4

フィッシャーの直接確率計算法によると原発巣の生検検体と、転移巣検体において bcl-2 蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は 0.0022 となり、 $P < 0.05$ において有意差があるといえる。

d) まとめ

以上より原発巣（生検）と転移巣との検体別の比較では、転移巣において bcl-2 蛋白が発現する傾向があり、両者の間に統計学的に有意差があった。また組織学的悪性度の高い骨肉腫で bcl-2 蛋白が発現する傾向があったが、統計学的有意差はなかった。

3) c-erbB-2 蛋白について

a) 亜型との比較

骨肉腫の亜型別の c-erbB-2 蛋白の発現の比較では陽性例 11 例の内 9 例が骨芽細胞型で骨芽細胞型 24 例中 9 例（37.5%）を占めていた。線維芽細胞型と傍骨性骨肉腫に各 1 例ずつ陽性例がみられた。軟骨芽細胞型には陽性例はみられなかった。亜型別にみた c-erbB-2 蛋白免疫組織化学的陽性細胞は下記の如くである。

	Osteoblastic	Fibroblastic	Chondroblastic	Parosteal
(陽性率)	(37.5%)	(11.1%)	(0%)	(100%)
c-erbB-2 蛋白陽性例	9	1	0	1
c-erbB-2 蛋白陰性例	15	8	2	0

通常型骨肉腫 35 例において、骨芽細胞型と骨芽細胞型以外すなわち線維芽細胞型と軟骨芽細胞型とで c-erbB-2 蛋白の発現に有意差があるか否かを検討した。その結果は下記の表の通りである。

	Osteoblastic	Fibroblastic+Chondroblastic
c-erbB-2 蛋白陽性例	9	1
c-erbB-2 蛋白陰性例	15	10

フィッシャーの直接確率計算法によると骨芽細胞型と骨芽細胞型以外の骨肉腫において c-erbB-2 蛋白の免疫組織化学的活性の有無に有意差がないという仮説を支持する確

率は0.0890となり、 $P<0.05$ において有意差があるとはいえない。

b) 組織学的悪性度との比較

次に組織学的悪性度とc-erbB-2蛋白の発現との関係のみた。低悪性度の骨肉腫 (Grade 1、Grade 2) と高悪性度の骨肉腫 (Grade 3、Grade 4) とにわけてc-erbB-2蛋白の発現の有無に統計学的に有意差があるか否か検討した。その結果は次表の如くである。

	Grade1+Grade2 (50%)	Grade3+Grade4 (28.1%)
(陽性率)		
c-erbB-2蛋白陽性例	2	9
c-erbB-2蛋白陰性例	2	23

フィッシャーの直接確率計算法によると低悪性度と高悪性度とにおいてc-erbB-2蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.3557となり、 $P<0.05$ において有意差があるとはいえない。

c) 原発巣と転移巣の比較

さらに、原発巣生検検体と転移巣の検体におけるc-erbB-2蛋白発現の陽性率に差があるか否かを検討した。生検検体と転移巣検体別のc-erbB-2蛋白染色結果は次表の如くである。

	生検検体 (18.9%)	転移巣検体 (12.5%)
(陽性率)		
c-erbB-2蛋白陽性例	7	1
c-erbB-2蛋白陰性例	30	7

フィッシャーの直接確率計算法によると原発巣生検検体と転移巣検体とにおいてc-erbB-2蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.5612となり、 $P<0.05$ において有意差があるとはいえない。

d) まとめ

骨芽細胞型骨肉腫及び、低悪性度の骨肉腫にc-erbB-2蛋白が発現する傾向があったが、

統計学的有意差はなかった。

4) P-糖蛋白について

a) 亜型との比較

骨肉腫の亜型別のP-糖蛋白の発現の比較では、陽性例27例についての比較は下記の通りである。

	Osteoblastic	Fibroblastic	Chondroblastic	Parosteal	Telangiectatic
(陽性率)	(83.3%)	(44.4%)	(100%)	(100%)	(100%)
MDR-1陽性	20	4	2	1	1
MDR-1陰性	4	5	0	0	0

b) 組織学的悪性度との比較

次に低悪性度の骨肉腫 (Grade1、Grade 2) と高悪性度の骨肉腫 (Grade 3、Grade4) とにわけてP-糖蛋白の発現の有無に統計学的に有意差があるか否か検討した。Grade別とP-糖蛋白の発現との関係は次表の如くである。

	Grade1+Grade2	Grade3+Grade4
(陽性率)	(80%)	(78.1%)
P-糖蛋白陽性	4	25
P-糖蛋白陰性	1	7

フィッシャーの直接確率計算法によると低悪性度と高悪性度とにおいてP-糖蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.7083となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

c) 原発巣と転移巣の比較

さらに、原発巣と転移巣の検体においてP-糖蛋白の発現の陽性率に差があるか否かを検討した。原発巣 (生検検体か手術検体のどちらかで発現があった症例) と転移巣のP-糖蛋白染色結果は次表の如くである。

	原発巣	転移巣
(陽性率)	(73.0%)	(12.5%)
P-糖蛋白陽性	28	1
P-糖蛋白陰性	9	7

フィッシャーの直接確率計算法によると原発巣と転移巣においてP-糖蛋白の発現の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.0016となり、 $P<0.01$ において有意差がある。

d) P-糖蛋白の発現と転移の有無との比較

P-糖蛋白陽性例が転移を生じやすい傾向があるかどうかを検討した結果は次表の如くである。

	転移あり	転移なし
P-糖蛋白陽性	16	13
P-糖蛋白陰性	4	4

フィッシャーの直接確率計算法によるとP-糖蛋白の発現の有無と転移の生じやすさに有意差がないという仮説を支持する確率は0.5530となり、有意差はない。

e) まとめ

以上より骨肉腫においては軟骨への分化を示す部位にP-糖蛋白が発現する傾向があり、軟骨芽細胞型骨肉腫ではすべての症例が陽性であった。化学療法前後の比較では化学療法後にP-糖蛋白が高頻度に発現する傾向はなかった。組織学的悪性度別の比較ではP-糖蛋白と悪性度との関連はなかった。原発巣（生検と手術）と転移巣との比較では、転移巣にP-糖蛋白の発現した症例は1例しかなく、原発巣に統計学的に有意にP-糖蛋白が発現していた。

5) PTHRPについて

a) 亜型との比較

PTHRPの免疫組織化学的活性と亜型との関係は次表の如くである。

	Osteoblastic	Fibroblastic	Chondroblastic	Parosteal
(陽性率)	(54.2%)	(62.5%)	(100%)	(100%)
PTHRP陽性例	13	5	2	1
PTHRP陰性例	11	3	0	0

亜型と陽性率との間に一定の傾向は認められなかった。次にOsteoblasticな骨肉腫とOsteoblastic以外の骨肉腫を比較し統計学的に有意差があるか否かを検討した。

	Osteoblastic	Fibroblastic+Chondroblastic
PTHRP陽性例	13	8
PTHRP陰性例	11	3

フィッシャーの直接確率計算法によると骨芽細胞型と骨芽細胞型以外の骨肉腫とにおいてPTHRPの免疫組織化学的活性の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.322となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

b) 組織学的悪性度との比較

低悪性度の骨肉腫 (Grade 1、Grade 2) と高悪性度の骨肉腫 (Grade 3、Grade 4) とにわけてPTHRPの免疫組織化学的活性の有無に統計学的に有意差があるか否かを検討した。その結果は次表の如くである。

	Grade1+Grade2	Grade3+Grade4
(陽性率)	(80%)	(53.1%)
PTHRP陽性例	4	17
PTHRP陰性例	1	15

フィッシャーの直接確率計算法によると低悪性度と高悪性度においてPTHRPの免疫組織化学的活性の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.2664となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

c) 原発巣と転移巣の比較

生検と転移巣においてPTHRPの免疫組織化学的活性の有無に統計学的に有意差がある

が否か検討した。原発巣と転移巣におけるPTHRPの免疫組織化学的活性の有無は次表の如くである。

	原発巣生検検体	転移巣検体
(陽性率)	(43.2%)	(62.5%)
PTHRP陽性例	16	5
PTHRP陽性例	21	3

フィッシャーの直接確率計算法によると原発巣生検検体と転移巣検体においてPTHRPの免疫組織化学的活性の有無に有意差がないという仮説を支持する確率は0.2744となり、 $P < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

d) まとめ

組織学的悪性度の低い骨肉腫に、また原発巣よりも転移巣において陽性率が高い傾向がみられたが、いずれも統計学的有意差はなかった。亜型別においても特別な傾向はなかった。

E. イメージサイトメトリーと骨肉腫の組織学的亜型、組織学的悪性度及び原発巣と転移巣との相関についての統計学的検討

骨肉腫の亜型別にわけて比較すると骨芽細胞型9例と線維芽細胞型3例のDIの平均値はそれぞれ 1.25 ± 0.35 、 0.98 ± 0.05 となりWelch's T-testによる検定では有意差がないとする仮説を棄却する確率は0.0513となり、 $p < 0.05$ において有意差があるとはいえない。また、組織学的悪性度別にわけたDIの平均値はGrade3、4例とGrade4、8例ではそれぞれ、 0.98 ± 0.04 、 1.28 ± 0.36 であった。Welch's T-testによる検定では有意差がないとする仮説を棄却する確率は0.0591となり、 $p < 0.05$ において有意差があるとはいえない。

さらに原発巣と転移巣とに分けて結果を整理すると原発巣生検検体の8例の内6例はdiploidで、残りの各1例がtetraploidとaneuploidであった。転移巣切除検体4例の内2例はdiploidで残り2例はaneuploidであった。

原発巣生検検体8例と転移巣切除検体4例とのDIの平均値はそれぞれ 1.09 ± 0.20 、 1.36 ± 0.46 となった。両者に有意差があるか否かをStudent's T-testで統計学的に処理をした。有意差がないとする仮説を棄却する確率は0.182となり、 $p < 0.05$ において有意差が

あるとはいえない。

F. Kaplan-Meier 生存曲線

Kaplan-Meier 生存曲線は各図の如くである (図27~34)。bcl-2蛋白については陽性群と陰性群において生存率に統計学的に有意差 ($p<0.05$) があり、bcl-2蛋白陽性群は陰性群に比較して生存率が低かった (図30)。他のパラメーターには統計学的有意差はみられなかった。腫瘍径が11cmを越える群は11cm以下の群に比較してわずかに生存率が低い傾向を示した (図27)。高悪性度群は低悪性度群に比較して生存率は低い傾向を示した (図28)。p53蛋白陽性群は陰性群に比較して生存率が高い傾向を示した (図29)。c-erbB-2蛋白及びP-糖蛋白の陽性、陰性の各群について生存率にはほとんど差がなかった (図31、図32)。PTHrP陽性群は陰性群に比較して生存率が高い傾向を示した (図33)。Aneuploid群はaneuploidでない群に比較して生存率が低い傾向を示した (図34)。

【考察】

1. p53遺伝子およびp53蛋白について

骨肉腫においてp53蛋白の発現はすでにいくつかの報告がなされている。上田ら¹⁷⁾によると18例の骨肉腫を2つの抗体で検討し、マウスモノクローナル抗体(クローン: PAb240) (Oncogene) では12例が陽性で陽性率は60%、またマウスモノクローナル抗体(クローン: PAb 1801) (Novocastra) では7例が陽性で陽性率は37.5%であったと報告している。一方、和田山ら⁵⁰⁾によると原発巣と肺転移巣を含む骨肉腫67例を検討し、19例にp53蛋白の発現があり、陽性率は28.4%であったとしている。抗体はマウスモノクローナル抗体(クローン: PAb421) (Oncogene) を使用している。原発巣と転移巣における陽性率はそれぞれ29.6%、19.0%であった。また、同一症例で原発巣と転移巣の両者を検討した症例は9例あり、その内1例は原発巣・転移巣ともにp53蛋白が発現しており、8例は原発巣・転移巣ともにp53蛋白の発現はなかったとしている。さらに、西川ら⁵⁰⁾ はポリクローナル抗体p53-CM1 (Novocastra) にて35例の骨肉腫を検討し、10例が陽性(28.6%)であったと報告している。

本研究では37例中9例(24.3%)にp53蛋白の発現の所見があり、検体種類別での陽性

率は原発巣生検例で16.2% (37例中6例陽性)、手術材料で17.6% (34例中6例陽性)、転移巣切除検体で37.5% (8例中3例陽性)であった。

全症例に対するp53蛋白の発現の陽性率は24.3%で他の報告より若干低かった。本研究で使用したマウスモノクローナル抗体(クローン: DO-7)はヒトp53蛋白のN末端の35-45アミノ酸部位を認識し、野生型p53蛋白と変異型p53蛋白との両方を認識する。現在まで報告されている抗体とは認識部位が異なっており、抗体の検出感度も各抗体により多少異なる可能性がある。そのため、各報告により陽性率が多少異なっていると考えられる。本研究における検体種類別の陽性率は転移巣では生検、手術時の検体に比較して高値であった。和田山ら⁵³⁾の結果では原発巣と転移巣における陽性率は原発巣の方がより高く本研究の結果とは異なっている。

次に同一症例において原発巣生検検体と転移巣切除検体とでp53蛋白の発現の有無を比較をすると、原発巣と転移巣とではp53蛋白の免疫組織化学的活性は一致していることがわかった。同一症例において原発巣と転移巣とを検索した8例の内、3例は原発巣、転移巣ともに陽性であり、残りの5例は原発巣、転移巣ともに陰性であった。即ち、p53蛋白が発現している症例は原発巣、転移巣とも共通して陽性であり、p53蛋白が発現していない症例は原発巣、転移巣とも共通して陰性であった。この結果は和田山ら⁵³⁾の結果と一致した。

しかし、同一症例において原発巣の生検検体と手術切除検体とでp53蛋白の発現の有無を比較をすると、3例において生検時にp53蛋白発現がなく、手術時にはじめてp53蛋白発現がみられた。骨肉腫は生検後、化学療法を施行するので、生検から手術までの期間は症例によっても多少異なるが、平均すると2ヶ月前後である。この期間に腫瘍細胞におけるp53蛋白の免疫組織化学的活性が変化した症例が3例あったということである。その理由として以下のようなことが考えられる。①生検から手術までの期間に自然経過で点突然変異のような遺伝子異常がおこった。②化学療法に抵抗性の腫瘍細胞のみが生き残り、それらの細胞がp53蛋白を発現してきた。③検体採取の問題で生検においては限られた組織しか採取されず、かならずしも腫瘍の全体像を代表しているとはいえない。元々生検時にすでにp53蛋白の発現があったのだが、p53蛋白が発現している腫瘍細胞は生検時に採取されていなかった、等の可能性が挙げられる。

骨肉腫の亜型別の比較ではp53蛋白の発現していた陽性例9例の内、8例が骨芽細胞型で骨芽細胞型24例中8例(33.3%)を占めていた。線維芽細胞型と軟骨芽細胞型には陽

性別はみられなかった。和田山ら⁵⁵⁾の報告によると骨芽細胞型41例中10例(24.4%)、軟骨芽細胞型15例中3例(20.0%)にp53蛋白が陽性であり、線維芽細胞型は1例で陰性であったとしている。すべての骨芽細胞型におけるp53蛋白が発現する頻度は本研究で得たデータの方がやや高かった。線維芽細胞型と軟骨芽細胞型については各々8例、2例と症例数が少なく比較は難しいが、和田山ら⁵⁵⁾の結果と本研究の結果とでは線維芽細胞型骨肉腫ではp53蛋白の発現がなかった点で一致していた。さらに、通常型骨肉腫において骨芽細胞型と骨芽細胞型以外の骨肉腫とに分けてp53蛋白の発現に統計学的有意差があるか否かを検討したところ、 $p < 0.05$ において有意差があることが明らかになった。すなわち、骨芽細胞型の骨肉腫は線維芽細胞型や軟骨芽細胞型の骨肉腫に比較して、p53遺伝子の異常が関与する傾向があるということである。近年、遺伝子工学の進歩により、様々な遺伝子を欠失させたマウスが作製され、遺伝子の機能が検索されているが、p53遺伝子についても例外でなくp53遺伝子を欠失させたマウスがつくられ検索されている。そのマウスには胸腺リンパ腫、骨肉腫等様々な腫瘍が自然発生することが知られている。Donehowerら⁵⁷⁾と相沢ら⁵⁸⁾のp53遺伝子を欠失させたマウスに生じた骨肉腫は両者とも共通して比較的よく分化した骨芽細胞型の骨肉腫であったことは、本研究で得られた結果、すなわち、p53遺伝子の異常が関与する骨肉腫は骨芽細胞型が多いということによく対応していると考えられる。

組織学的悪性度の比較においてはいわゆる高悪性度(Grade 3,4)と低悪性度(Grade 1,2)に分けてp53の発現に有意差があるか否かを検討したところ、 $p < 0.05$ において有意差がないことがわかった。しかし、低悪性度の症例が5例と高悪性度に比して少ないため有意差がでにくい母集団であった。但し、Grade 1の症例1例ではp53蛋白は陰性であった。

骨肉腫に関してはp53蛋白が発現している場合とp53蛋白の発現がない場合があり、p53蛋白が発現する骨肉腫では原発巣と転移巣とにおいてp53蛋白の発現は一致していた。このことから骨肉腫に関してp53遺伝子の異常は転移を促進する要因にはなっていないとは考えにくい。一般に骨肉腫が発見されるのはかなり腫瘍が大きくなってからであり、発見時に既に骨外への浸潤がある場合もある。骨肉腫はいわゆる早期癌の段階で検索されることが稀であるのでp53遺伝子の異常がどの段階で生じるかは不明だが、比較的腫瘍発生の初期の段階でp53遺伝子の異常が生じることが示唆される。一般にp53遺伝子はいわゆる腫瘍のprogressionに関与するとする報告が多数ある^{59) 60)}。それらの一

つに濾胞性の悪性リンパ腫において、腫瘍発生の後期段階にp53遺伝子の異常が生じるとする報告がある⁶¹⁾。事実、筆者が経験した濾胞性悪性リンパ腫の剖検例で、末期に多数の臓器に浸潤して悪性度が強い増殖態度を示した症例があり、初期のリンパ節生検と剖検時のリンパ節においてp53蛋白の検索をしたところ、生検時は陰性で、剖検時にp53蛋白が発現していた。このようにp53遺伝子に異常が生じると分化度が低くなったり、転移が促進されたり、臓器への浸潤が顕著になったりして、より悪性度の強い腫瘍になると考えられている。しかし、骨肉腫に関しては本研究の結果からp53蛋白の発現の有無と臨床病理学的事項や腫瘍の悪性度との間には密接な関係に乏しいことが明らかになった。骨肉腫の発生及び進展においては、p53遺伝子の異常の果たす役割は他の腫瘍で従来いわれてきた役割とは異なる可能性があることが示唆された。

2. bcl-2遺伝子およびbcl-2蛋白について

bcl-2 (B-cell lymphoma leukemia 2) は多くのヒト濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma) にみられるt (14:18) (q32;q21) 転座の転座点の近傍に位置する遺伝子として発見された⁶²⁾。遺伝子の発現は比較的広い組織特異性を示し、リンパ系 (胸腺、リンパ節) と神経系 (中枢および末梢神経) 組織での発現が顕著である⁶³⁾。

Hockenberyら⁶⁴⁾ はbcl-2蛋白は成体においてはprogrammed cell death (PCD) のみられる組織に限局していると報告している。また、LeBrunら⁶⁵⁾ はヒト胎児においてbcl-2蛋白をマウスモノクローナル抗体 (クローン: 100) にて免疫組織化学的に検索しており、胎生期には種々の臓器にbcl-2蛋白が発現しており、bcl-2遺伝子は形態形成に関与しているのではないかとしている。胎児の筋骨格系に関しては骨細胞と軟骨膜にbcl-2蛋白が発現していることがわかっている⁶⁵⁾。本研究で検索した範囲ではヒト胎児では骨芽細胞、及び破骨細胞にはbcl-2蛋白の免疫組織化学的活性はみられなかった。

bcl-2遺伝子はt (14:18) (q32;q21) 転座を有する悪性リンパ腫⁶⁷⁾ 以外にも転座のない腫瘍でも関与していることが知られている⁴⁷⁾。癌においてもbcl-2遺伝子が関与するとする報告があり、例を挙げると前立腺癌⁶⁸⁾、鼻咽頭癌⁶⁹⁾、肺癌⁷⁰⁾ 等である。また、Swansonら⁷¹⁾ はbcl-2蛋白が神経系組織で発現があることより神経組織起源と考えられているPNET (peripheral primitive neuroectodermal tumor) においてbcl-2蛋白を本研究で用いた抗体と同じマウスモノクローナル抗体 (クローン: 124) で免疫組織化学的に検索し、PNET24例の内、17例が陽性例であり、陽性例では陰性例に比較して予後が悪いとしている。

Pezzellaら⁷⁰⁾によると、122例の肺癌例でマウスモノクローナル抗体(クローン: 100)を用いて免疫組織化学的にbcl-2蛋白を検索した結果、25%の扁平上皮癌、12%の腺癌で発現があるとしている。臨床病理学的検索によるとbcl-2蛋白陽性例は陰性例に比較して予後がよいという結果を得ている。Pezzellaらは、このことはbcl-2蛋白を発現する腫瘍は増殖力が比較的弱いからではないかと考察している。

bcl-2遺伝子はアポトーシスまたはPCDを回避する遺伝子であるといわれている⁷²⁾。bcl-2遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスには初期にはBリンパ球の細胞寿命延長による過形成がおこり、時間経過とともに悪性リンパ腫が生じてきたことから⁷⁴⁾、bcl-2遺伝子は従来の高遺伝子とは異なったタイプの”癌遺伝子”である可能性が想定されている。悪性リンパ腫以外の血液系悪性腫瘍においてもbcl-2遺伝子が関与することがわかっており、骨髄性白血病においてbcl-2蛋白が高発現する場合は化学療法が効きにくく、予後が悪いという報告がある⁷⁵⁾。Doleら⁷⁶⁾は神経芽腫の培養細胞にbcl-2遺伝子を導入すると化学療法剤の投与に対して生じるDNAの崩壊が妨げられるという*in vitro*での実験結果を報告している。これはbcl-2蛋白が化学療法剤に対してその効果を妨げることを意味しており、bcl-2蛋白が発現している腫瘍は化学療法が効きにくい可能性がある。

骨肉腫の腫瘍発生に関してbcl-2遺伝子が関与しているという報告は現在までなく、本研究においては一つは”癌遺伝子”の点から、もう一つは化学療法に対する耐性の点から骨肉腫におけるbcl-2蛋白の発現があるか否かについて検索した。骨肉腫37例中6例(16.2%)にbcl-2蛋白の発現があり、少ないながらも骨肉腫の腫瘍発生にbcl-2遺伝子が関与していることが示唆された。骨肉腫生検時の検体では37例中1例(2.7%)のみに陽性であったが化学療法後の転移巣の切除検体では8例中5例(37.5%)に陽性となり、 $p < 0.05$ において統計学的に有意差があった。この事実からbcl-2蛋白は一部の骨肉腫の腫瘍発生に関与しており、しかも、腫瘍発生の後の方の段階すなわちprogressionに相当する段階で関与していることが示唆される。また、bcl-2蛋白が化学療法後に高頻度で発現していることから、bcl-2蛋白が化学療法によって誘導される可能性と骨肉腫細胞の中でbcl-2蛋白を有している化学療法に抵抗性の腫瘍細胞のクローンが生き延びた可能性とが考えられる。以上の様にbcl-2遺伝子は悪性リンパ腫や上皮性悪性腫瘍だけでなく、骨肉腫においても腫瘍の発生と進展に関与しており、化学療法と関係があることが示唆された。

3. c-erbB-2遺伝子及びc-erbB-2蛋白について

c-erbB-2遺伝子はEGF (epidermal growth factor) 受容体遺伝子に類似し、ヒトの顎下腺の腺癌で増幅している遺伝子として見いだされた⁷⁷⁾。c-erbB-2蛋白はEGF受容体と類似した構造をもつ受容体型チロシンキナーゼで、細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域の3つのドメインからなる。リガンドについては幾つかの報告があるものの、まだ確定されていない^{78) 80)}。c-erbB-2蛋白はリガンドと結合し細胞内情報伝達を介して細胞の増殖機構に関与していると考えられており、現在盛んに研究されているが現段階においてはその機能はいまだ不明である。しかし、乳癌⁸¹⁾ 胃癌⁸²⁾ 等においてc-erbB-2 遺伝子の増幅、発現、c-erbB-2蛋白の発現が報告されている。特に乳癌においてはc-erbB-2 遺伝子の増幅、発現、c-erbB-2蛋白の発現、血清中のc-erbB-2蛋白の濃度と予後との関係も調べられており、c-erbB-2蛋白が発現している症例は予後が悪いことが報告されている^{83) 84)}。一方、非上皮性の腫瘍においてはc-erbB-2遺伝子、c-erbB-2蛋白に関する報告は少ない。Dudaら²¹⁾の報告によると肉腫の37%にc-erbB-2遺伝子の増幅があり、骨肉腫に関しては4例の骨肉腫の内1例にはc-erbB-2遺伝子のmRNAに増幅がみられている。

本研究では37例の骨肉腫において11例(29.7%)にc-erbB-2蛋白の発現がみられた。しかし、骨肉腫細胞における免疫組織化学的活性は少数の腫瘍細胞に限局しており、しかも弱かった。腫瘍細胞におけるc-erbB-2蛋白の局在は主に細胞質内であった。コントロールに用いた乳癌組織ではc-erbB-2蛋白が細胞膜に局在する場合と細胞膜にはっきりとした局在を示さず細胞質にびまん性に陽性となる場合があった。本来c-erbB-2蛋白は細胞膜に局在するはずだが、骨肉腫腫瘍細胞におけるc-erbB-2蛋白の局在が細胞質内であった理由として、本研究で用いたマウスモノクローナル抗体(クローン:CB11)はc-erbB-2蛋白の細胞内領域を認識する抗体であるため、c-erbB-2蛋白の細胞内領域の一部が細胞質内に遊離し、その部分が認識された可能性が考えられる。

一方骨肉腫組織内で腫瘍細胞と混在する破骨細胞様多核巨細胞には腫瘍細胞が陰性の症例でもc-erbB-2蛋白の発現がみられた。その局在は細胞膜と細胞質の辺縁部にみられた。

以上得られた結果から骨肉腫におけるc-erbB-2蛋白の関与をまとめると以下のことが可能性として考えられる。骨肉腫細胞の一部はc-erbB-2蛋白を有しており、腫瘍細胞がみずからc-erbB-2蛋白のリガンド様物質を放出し、autocrine、paracrineのループで自

己の増殖に関与する。また、腫瘍細胞の放出するリガンド様物質はparacrine的に周囲の破骨細胞様多核巨細胞の有するc-erbB-2蛋白に作用し、破骨細胞の分化や機能の活性化に関与する。破骨細胞が活性化されれば、骨吸収が生じ、腫瘍細胞が浸潤、増殖しやすい環境が形成される。このように、c-erbB-2蛋白は骨肉腫の増殖、浸潤に関与している可能性が考えられる。

しかし、本研究において得られた結果からはc-erbB-2蛋白を有する骨肉腫と有さない骨肉腫との間に組織型、組織学的悪性度などとの関連に統計学的に有意差はなく、c-erbB-2蛋白を有する骨肉腫を特徴を明らかにすることはできなかった。

今後c-erbB-2蛋白のリガンドが同定され、その局在がわかれば、骨肉腫におけるc-erbB-2蛋白の働きが一層明確になると考えられる。

4. P-糖蛋白について

化学療法前後でP-糖蛋白の発現がどのように変化するかをユースイング肉腫において検索した報告によると化学療法後にP-糖蛋白が高頻度に発現していた⁸⁰⁾。本研究では化学療法前後を比較するとP-糖蛋白の発現が化学療法後に増加する傾向はなかった。また、強力な化学療法後に生じた転移巣について検索したところ8例中1例にのみP-糖蛋白が陽性であった。原発巣と転移巣においての比較では原発巣に有意にP-糖蛋白が高頻度に発現していた。つまり骨肉腫ではP-糖蛋白を発現している症例は既に化学療法前に発現しており、P-糖蛋白が化学療法に伴って誘導されてくる傾向はないことが明らかになった。

手術切除材料では化学療法後であることもあり、腫瘍が壊死あるいは壊死後の線維化を伴っていることが普通である。本研究で検索した骨肉腫の内、手術切除材料で生きている腫瘍細胞が全くみだせなかった症例は2例あった。この2例は共に生検時にP-糖蛋白が陰性であり、化学療法が著効をしめた原因としてP-糖蛋白を介する薬剤耐性の機序が働かなかった可能性が考えられる。

本研究で骨肉腫におけるP-糖蛋白の局在は軟骨への分化を示す部位に高頻度で発現することがわかった。このことは幅広く骨・軟部腫瘍でP-糖蛋白の発現をみた報告でも確認されている⁸⁰⁾。一方軟骨芽細胞型の骨肉腫は化学療法が効きにくい傾向があることが知られている。その機序は明確になってはいないものの、生来軟骨組織には血管がないため、軟骨への分化を示す部位では薬剤の浸透性が悪く効果が得にくいと推察されている。今回の検索でP-糖蛋白の局在が軟骨への分化を示す部位であったことは軟骨芽細胞

胞型の骨肉腫に化学療法が効きにくいことの一つの裏付けになっていると考えられた。

当院での骨肉腫に対する化学療法は主にアドリアマイシン、シスプラチン、メソトレキセート等を組み合わせて行っている。P-糖蛋白は主にアドリアマイシンに対して作用し、細胞外へ排出するポンプの機構を介して薬剤抵抗性を示すものと考えられている。P-糖蛋白の発現の有無が骨肉腫においてかならずしも予後と関連がなかったのは、アドリアマイシン以外の薬剤の関与があるためと推察される。骨肉腫においては、特にシスプラチンが化学療法に必須の薬剤であり、今後はシスプラチンに対する耐性機構、たとえばメタロチオネインやグルタチオン等の関与の検索が必要であると思われる。

5. PTHRPについて

古くから悪性腫瘍に随伴する高カルシウム血症が知られていたが、高カルシウム血症の起因物質としてPTHRPが1987年に3つのグループによってほぼ同時に報告された^{87) 88)}。PTHRPは扁平上皮癌、乳癌、成人T細胞白血病等広範囲の悪性腫瘍で産生される。また、PTHRPは正常組織でも微量ながら広範囲の組織に分布していることがわかって^{22) 30)}。PTHRPは141アミノ酸からなるポリペプチドで、N末側のPTHRP(1-34)はPTHと相同性が高く、PTHと共通の受容体に結合し、骨吸収を促進する作用を示す。また、C末側のPTHRP(107-111)は骨吸収抑制作用を有することがわかっている⁹¹⁾。PTHRPは骨形成、骨吸収を規定するサイトカインとしての機能を有しているといえる。

骨組織におけるPTHRPの機能を調べるために正常マウスとPTHRP遺伝子欠損マウスを用いて検索した報告によると、正常マウスではPTHRP mRNAとPTH/PTHRP受容体mRNAは胎生期、成獣期ともに骨芽細胞、軟骨細胞に発現していた²³⁾。さらに、PTHRP遺伝子欠損マウスでは軟骨細胞、骨芽細胞の分化、増殖が悪く骨組織発生の段階で異常が生じた⁹²⁾。このことから、PTHRPは胎生期、成獣期ともに軟骨細胞、骨芽細胞の分化、増殖に関与する因子であることが示唆された。ヒト胎児の骨組織に関してはPTHRPが免疫組織化学的に骨芽細胞と破骨細胞の両者と肥大軟骨層の軟骨細胞層に検出されたことから、ヒトにおいてもPTHRPは骨芽細胞、破骨細胞等骨形成、骨吸収に関与する細胞の分化、増殖を担っている可能性があると考えられる。

広範囲の正常組織と腫瘍組織におけるPTHRPの免疫組織化学的、イムノブロットイングによる検索をした報告によると骨肉腫に関しては骨肉腫2例中2例にPTHRPが陽性であった²²⁾。この報告以外には骨肉腫について詳細にPTHRPの検索がなされた報告は少ない。

本研究では骨肉腫37例中、生検、手術材料、転移再発巣の少なくとも1病変においてPTHRPの免疫組織化学的活性があった症例は21例(56.8%)であった。これは少なくとも骨肉腫の50%以上の例において腫瘍細胞がPTHRPを産生していることを示唆するものと考えられる。

もともとPTHRPは高カルシウム血症との関連において単離された蛋白であるが、高カルシウム血症の如何にかかわらず、乳癌、肺の扁平上皮癌等で産生されたり、また内分泌臓器を含む広い範囲の正常組織に分布していることが分かっている^{92) 93)}。乳癌においては骨転移との関係で検索されており、骨転移巣においては他の部位に比較してPTHRPの発現が有意に高いとする報告がある^{92) 93)}。

しかし、骨肉腫の場合はPTHRPの免疫組織化学的活性の有無と骨肉腫の亜型、組織学的悪性度や、経時的变化(生検検体と転移検体との比較)との間においては統計学的な差異は認められず、PTHRPが骨肉腫においてどのような機能を持つかについて明確な結論は得られなかった。可能性としては以下のことが考えられる。①胎児骨組織では骨芽細胞にPTHRPの活性があることより、骨芽細胞はPTHRPを産生し、autocrineあるいはparacrine的に骨芽細胞が有するPTH/PTHRP受容体を介して骨芽細胞の分化、増殖を担っている可能性がある。骨肉腫は骨芽細胞系統の細胞が腫瘍化したものと考えられるので、骨芽細胞が本来持っているPTHRP産生能を保持した骨肉腫とその機能を失活した骨肉腫が生じる。つまり、分化度の比較的高い骨肉腫ではPTHRPの活性を残しており、より分化度の低い骨肉腫ではPTHRP産生はみられなくなる。②さらに、PTHRPは他のサイトカインと同様に受容体を介してその作用を発揮すると考えられており、骨肉腫の腫瘍細胞がPTHRPの受容体を有し、autocrineとして機能し、腫瘍の増殖に関与する可能性がある。

近年、PTHRPは血中、尿中において定量ができるようになり、高カルシウム血症を伴う悪性腫瘍の場合には腫瘍マーカーとしての意味をもつようになってきた⁹⁴⁾。骨肉腫の場合は従来腫瘍マーカーとしてはアルカリフォスファターゼが用いられてきたが、将来はPTHRPを腫瘍マーカーとして位置づけることが可能ではないだろうか。

6. イメージサイトメトリーとKi-67抗原について

DNAプロイディを検討する手法としてフローサイトメトリーと画像解析装置を用いるイメージサイトメトリーがある。フローサイトメトリーでは新鮮材料だけでなく、パラフィンブロックから細胞浮遊液を作製して、DNAプロイディを検索する方法も一般的に

なっている^{95) 96)}。フローサイトメトリーとイメージサイトメトリーとにおいて比較対照した報告によると両者の結果は87%の症例で一致したが、13%の症例ではDNA Indexが不一致であったとしている⁹⁷⁾。フローサイトメトリーとイメージサイトメトリーではそれぞれ異なった利点があるが、本研究において骨肉腫のDNAプロイディの検討にイメージサイトメトリーを用いた理由としては以下のことが挙げられる。①イメージサイトメトリーは比較的少数の検体で測定が可能である。フローサイトメトリーでパラフィンブロックから細胞浮遊液を作製するには厚さ50 μ mの切片が3~5枚程度必要なのに対して、イメージサイトメトリーでは通常4~6 μ mの切片1枚で充分である。②イメージサイトメトリーは組織の形態を保持したまま測定ができる。骨肉腫の腫瘍組織は腫瘍細胞のほか既存の血管内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞様多核巨細胞に加えて豊富な間質、たとえば腫瘍性の類骨、骨梁等の間質組織を含有するのが特徴である。イメージサイトメトリーでは腫瘍細胞のみを限定して、測定することが可能であるのでより精度の高い結果が期待できる。③肉腫組織では癌組織と違って細胞間の結合性がゆるく核間距離が離れており、核が相互に重なりあうことが少ないためイメージサイトメトリーの測定に適している。

しかし、本来立体であるはずの核を断面で測定するため、誤差が生じやすく、測定の精度を示す指標になるCV値はフローサイトメトリーに比較して悪い。また、DNAの保存状態が悪く、フォイルゲン染色で染色されない切片では測定ができない等の欠点もある。

本研究で測定が可能であった症例は37例中12例と全体の32.4%に過ぎなかった。また、CV値は 8.33 ± 0.57 であった。

検索した12例の内8例(66.7%)がdiploidであった。一方aneuploidは3例(25%)にすぎなかった。検索しえた症例数が少なく、この結果が骨肉腫の全体像を示しているかどうかは疑問だが、悪性腫瘍である骨肉腫においてdiploidが66.7%を占めたのは今までフローサイトメトリーでなされた報告とは異なっている。たとえば、Bauerら³⁰⁾によると102例の骨肉腫中97例(95.1%)がnondiploidでdiploidは5例(4.9%)のみという報告がされている。

本研究では骨肉腫の組織像の代表として化学療法前の生検組織を検索対象とした。しかし、骨肉腫においては腫瘍組織中においてもその部分部分で組織像が異なっていることが多々あり、生検組織がかならずしも腫瘍の代表的な組織像を示しているとはいえず

い。さらに、同一腫瘍内でも、部分によってDNAプロイディパターンが違うことも報告されており^{90) 99)}、本研究の結果が骨肉腫の全体像のDNAプロイディパターンを代表しているかどうか疑問があるのは否定できない。しかし、統計学的有意差はなかったものの組織学的悪性度別に分けて骨肉腫のDIを比較した場合、Grade3とGrade4ではGrade4の方がDIの平均値が高値であったことと、原発巣と転移巣の比較において、転移巣の方がDI値が高値であったことは今後の症例の蓄積如何では重要な意味をもつ可能性があると考えられる。

腫瘍細胞が細胞周期のどの周期にあるのか、つまり細胞回転途上にあるかあるいはG₀期 (resting phase) にあるか検索する一つの手法として免疫組織化学的にKi-67抗原を検出する方法がある。Ki-67抗原はG₀期以外のG₁期、S期、G₂期、M期の細胞に検出されるため、Ki-67抗原陽性率の高い腫瘍はより増殖力が強く、悪性度が高いと考えられている。本研究で用いた抗体 (Mib-1) はホルマリン固定パラフィン包埋切片でKi-67抗原を検出できる抗体であるのでレトロスペクティブな検索が可能である。本研究で検索しえた症例は9例でKi-67抗原陽性率は各6.1%から32.8%の範囲であった。陽性率と組織学的悪性度、DNAプロイディパターンとの間に特徴的な傾向はなかった。検索した11例中2例はKi-67抗原陽性細胞が全く検出されず、おそらくホルマリン固定、脱灰の影響を受けKi-67抗原の抗原性が失活したものと考えられる。このようにKi-67抗原は切片の条件の違いにより多少影響を受けるので、今後の検索には同一条件下の検索が望まれる。

7. 骨肉腫の予後について

骨肉腫の予後を規定する因子として確立されたものはまだない⁴¹⁾。経験的には肺等の諸臓器に遠隔転移を生じると生存率は急激に低下することがわかっている。今回のKaplan-Meier法による生存率の検討によるとbcl-2蛋白を発現している骨肉腫は発現していない骨肉腫に比較して有意に生存率が低いことが明らかになった。bcl-2遺伝子は血液系の悪性腫瘍において化学療法の抵抗性と関連づけてとらえられている⁷⁵⁾。骨肉腫においても化学療法前よりも化学療法後にbcl-2蛋白が発現する頻度が高く、化学療法に伴ってbcl-2蛋白が発現してくることが推測される。bcl-2蛋白を発現した症例の生存率が低かった事実はbcl-2蛋白を発現した症例が化学療法に抵抗性であり、腫瘍の増殖を押さえ切れず予後不良の経過をたどったと考えることができる。一方、p53蛋白については統計学的に有意差はなかったものの陽性群は陰性群に比較して生存率が高値の

傾向を示した。つまりp53蛋白を発現する骨肉腫は予後がよいことを意味する。この結果は従来の報告とは異なっている。組織学的亜型との比較でも明らかになった様にp53蛋白を発現する骨肉腫は腫瘍性の類骨形成の明瞭な骨芽細胞型が多い傾向があった。骨肉腫についてはp53蛋白の発現の意味づけは従来、他の固形腫瘍等で考えられてきたものとは異なっており、p53蛋白の発現の有無は腫瘍の悪性度や、予後との関連としてではなく、むしろ分化度すなわち腫瘍細胞の類骨形成と密接な関連をもつと考えられる。また、PTHRPについては統計学的に有意差はなかったものの陽性群は陰性群に比較して生存率が高い傾向を示した。この事実はPTHRP陽性の骨肉腫が骨芽細胞の本来の形質を保持している比較的分化度が高い骨肉腫であることに対応していると考えられる。組織学的悪性度並びにDNAプロイディと予後との関係については、推測されたように高悪性度群及び、aneuploid群の方が生存率が低値であった。しかし統計学的有意差はなかったが、これは母集団の症例数が少なかったことも関与していると考えられる。DNAプロイディについては今後の症例の蓄積が重要で、予後を規定する因子になる可能性があると考えられる。腫瘍の大きさ、c-erbB-2蛋白の発現の有無については生存率の相違はほとんどみられなかった。以上のことから骨肉腫の予後を規定する因子としてはbcl-2蛋白の発現の有無とDNAプロイディパターンが重要と考えられ、今後の症例の蓄積が必要と思われる。

8. 類骨骨腫と骨巨細胞腫について

骨肉腫と対比させる意味で良性骨腫瘍の中で、骨芽細胞系の類骨骨腫と破骨細胞系の腫瘍と考えられている骨巨細胞腫について検索した。一般に良性腫瘍の発生においては癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子が関与することは稀である。類骨骨腫においては、p53蛋白、bcl-2蛋白、c-erbB-2蛋白とも5例全例で発現がみられなかった。類骨骨腫では骨肉腫と異なり、このような遺伝子異常は腫瘍発生に関与していないことが示されたと考えられる。また、PTHRPについては5例中4例(80%)とかなり高率に陽性であった。正常の骨芽細胞においてもPTHRPは免疫組織化学的活性があることから、PTHRPは骨芽細胞系の腫瘍の分化の指標になり得ると考えられる。

一方、骨巨細胞腫についてはp53蛋白、bcl-2蛋白、PTHRPは5例全例でその免疫組織化学的活性はみられなかったが、c-erbB-2蛋白については5例中2例(40%)に発現がみられた。骨巨細胞腫ではp53遺伝子とbcl-2遺伝子は腫瘍発生に無関係であることが示されたが、c-erbB-2遺伝子については何らかの関与があることが示唆されたと考えら

れる。骨巨細胞腫の組織発生について現在まで明確な結論は得られておらず、骨巨細胞腫の多核巨細胞がc-erbB-2蛋白を有していた事実は、骨巨細胞腫で出現する多核巨細胞が破骨細胞系の形質をもっていることを示唆しており、この事実は骨巨細胞腫の組織発において重要な意味をもつと考えられる。

9. 免疫組織化学の信頼性について

免疫組織化学は組織内の抗原の分布や局在を抗原-抗体反応を利用して検出する手法で、現在ではその技術が開発された当時に比較するとはるかに安定した結果を得ることができるようになった。そのため現在では免疫組織化学は日常の病理組織診断学においても幅広く応用されている。その理由は①遺伝子工学の進歩により特異度の高いモノクローナル抗体の作製が可能になった。②抗原-抗体反応を増幅するシステムが改良され（アビジン-ビオチン法(ABC法)、ストレプトアビジン-ビオチン法(SAB法)等）、より鋭敏度の高い検出が可能になった。③マイクロウエーブ等を用いた抗原の賦活化を行うことにより、鋭敏度の高い検出が可能になった、等の理由による。

免疫組織化学的検索で得られた結果を評価するとき重要なことは、用いた抗体が正しく目的とする抗原を認識しているかどうかを確認することである。具体的には本来あるべき抗原をもつ組織（陽性コントロール）と検索しようとする組織とを同一過程で染色し、本来ある抗原に反応し、抗原のない部位に反応しないことを確認する。また、免疫組織化学の過程で非特異的な反応を生じていないことを確認するため、抗体の代わりに一次抗体を作製した動物種の血清と反応させた陰性コントロール標本も同時に染色する必要がある。以上の様な過程を終らうえではじめて免疫組織化学の結果を正しく評価できる。

本研究で用いた抗体の抗原認識の組織分布はあらかじめ報告されている結果と相違はなかった。また、陰性コントロール標本においても非特異反応はみられず、本研究で用いた免疫組織化学的検索はより信頼度が高いと考えられた。

【まとめ】

骨肉腫37症例81検体、類骨腫5例5検体、骨巨細胞腫5例5検体を対象として癌関連遺伝子の遺伝子産物であるp53蛋白、bcl-2蛋白、c-erbB-2蛋白及びP-糖蛋白と骨代謝

に関与するサイトカインと考えられるPTHrPを免疫組織化学的に検索した。骨肉腫についてはイメージサイトメトリーによるDNAプロイディバターンの検索を加え、得られた結果と臨床及び病理学的事項とを比較対照し、以下の結論を得た。

(1)通常型骨肉腫の中でp53蛋白は骨芽細胞型の骨肉腫に発現する頻度が有意に高かった。この事実より骨肉腫においてはp53蛋白は腫瘍性類骨の形成能と関連性があると考えられた。また、p53蛋白を発現している骨肉腫はp53蛋白の発現のない骨肉腫より累積生存率が高かったことから、骨肉腫においてはp53蛋白の発現は悪性度や、予後と逆の相関を示すと考えられた。骨肉腫の同一症例においてはp53蛋白の発現は原発巣と転移巣で不変であった。従って一般にp53蛋白の異常は腫瘍発生の比較的後期に生じると考えられているが、骨肉腫においてはp53蛋白の異常は比較的初期に生じているのではないかと考えられる。

(2)bcl-2蛋白は少数例の骨肉腫において発現があり、しかもbcl-2蛋白は原発巣よりも転移巣に発現する頻度が有意に高かった。また、bcl-2蛋白を発現している骨肉腫はbcl-2蛋白の発現のない骨肉腫より累積生存率が有意に低かった。この事実はbcl-2蛋白が化学療法と関連があり、bcl-2蛋白が発現する腫瘍は化学療法に抵抗性をもつようになり、予後が悪くなると考えられた。bcl-2蛋白の発現の有無は骨肉腫の悪性度、予後の指標になりうると考えられた。

(3)c-erbB-2蛋白は少数例の骨肉腫細胞と腫瘍組織内に出現するほとんどすべての破骨細胞様の多核巨細胞に発現があった。c-erbB-2蛋白は骨肉腫の腫瘍発生あるいは増殖に関連がある可能性が考えられた。また、骨肉腫組織内に腫瘍細胞と混在する破骨細胞様の多核巨細胞がc-erbB-2蛋白を発現していることから、c-erbB-2蛋白を介した細胞間の相互作用があり、それが腫瘍の増殖、浸潤に関与している可能性が考えられた。一方骨巨細胞腫においては多数の多核巨細胞と一部間質細胞にc-erbB-2蛋白が発現していた。このことから骨巨細胞腫においてもc-erbB-2蛋白を介した細胞間の相互作用があり、それが腫瘍の発生、増殖に関与している可能性が考えられた。

(4)P-糖蛋白は骨肉腫において軟骨への分化を示す部位に高頻度に発現していた。軟骨芽細胞型の骨肉腫が化学療法の効果を得にくいことと関連があると考えられた。P-糖蛋白の発現は化学療法に伴って発現が増加する傾向はなく、予後との相関もみられなかった。骨肉腫においてはP-糖蛋白だけでなく他の薬剤耐性の機序が関与している可能性があるとと思われる。

(5)PTHRPは約半数の骨肉腫と多くの類骨腫に発現していた。PTHRPは胎児期の骨形成に重要な役割をもっていると考えられており、胎児期の骨芽細胞及び破骨細胞に発現がみられることから、骨肉腫においてはPTHRP発現の有無は骨芽細胞の形質の保持、つまり分化の指標としてとらえることができると考えられた。この考えはPTHRPを発現する骨肉腫はPTHRPを発現しない骨肉腫に比較して累積生存率が高い傾向があったことから支持される。

(6)イメージサイトメトリーによるDNAプロイディパターンの検討では12例の骨肉腫の67%がdiploidを示し、aneuploidを示した骨肉腫は25%にすぎなかった。Aneuploidを示した骨肉腫はaneuploidでない骨肉腫に比較して累積生存率が低い傾向を有したが統計学的有意差はなかった。今後症例を蓄積しaneuploidと骨肉腫の予後との関係を更に検討する必要があると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり貴重なご指導を賜りました東京大学医学部病理学教室、町並陸生教授に深謝します。貴重なご指導を頂いた東京大学医学部病院病理部、松谷章司助教授、東京大学医学部病理学教室、堀内啓先生、石田剛先生、岡輝明先生ならびに虎の門病院病理学科、松下央先生に深謝いたします。臨床的な事項についてご教示頂いた東京大学医学部整形外科学教室、飯島卓夫先生に深謝いたします。貴重な症例を提供して頂いた東京大学医学部分院、村上俊一助教授、日立製作所日立総合病院臨床検査科、高橋敦先生、東京警察病院中央検査科第二部、鈴木恒道先生、関東労災病院検査科病理、江口正信先生に深謝いたします。さらに、標本作製にご指導、ご協力頂いた東京大学医学部病理学教室、福島のみ子技師、安藤恭子技師、増村祥子技師に感謝いたします。

【文献】

- 1) WHO : Histological typing of bone tumours, second edition, Schajowicz, F, Springer-Verlag, 1993.
- 2) 整形外科・病理 悪性骨腫瘍取り扱い規約 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会編、金原出版、1990年7月(第2版)
- 3) Atlas of tumor pathology, Tumors of the bones and joints, Third series, Fascicle 8, AFIP (Armed forces institute of pathology), 1993.
- 4) 町並陸生、牛込新一郎：取り扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断アトラス 骨、文光堂、1992.
- 5) 全国骨腫瘍患者登録一覧表(1991年)日本整形外科学会骨腫瘍委員会(国立がんセンター発行)
- 6) Hansen, MF : Molecular genetic considerations in osteosarcoma, Clin Orthop, 270, September, 237-246, 1991.
- 7) Fearon, E. R. , Vogelstein, B. : A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 759-767, 1990.
- 8) Powell, SM, Zilz, N, Beazer, BY, Bryan, TM, Hamilton, SR, Thibodeau, SN, Vogelstein, B and Kinzler, KW : APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis, Nature, 359, 235-237, 1992.
- 9) Li, FP and Fraumeni, JJ : Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?, Ann Intern Med, 71, 747-752, 1969.
- 10) Li, FP and Fraumeni, JJ : Prospective study of a family cancer syndrome, JAMA, 247, 2692-2694, 1982.
- 11) Friend, SH, Horowitz, JM, Gerber, MR, Wang, XF, Bogenmann, E, Li, FP and Weinberg, RA : Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1988 Apr ;85 (7) : 2234], Proc Natl Acad Sci U S A, 84, 9059-9063, 1987.
- 12) Toguchida, J, Ishizaki, K, Sasaki, MS, Ikenaga, M, Sugimoto, M, Kotoura, Y and Yamamuro, T : Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development

- of osteosarcoma, *Cancer Res*, 48, 3939-3943, 1988.
- 13) Weichselbaum, RR, Beckett, M and Diamond, A : Some retinoblastomas, osteosarcomas, and soft tissue sarcomas may share a common etiology, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2106-2109, 1988.
 - 14) Araki, N, Uchida, A, Kimura, T, Yoshikawa, H, Aoki, Y, Ueda, T, Takai, S, Miki, T and Ono, K : Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors, *Clin Orthop*, 270, September, 271-277, 1991.
 - 15) Mulligan, LM, Matlashewski, GJ, Scrabble, HJ and Cavenee, WK : Mechanisms of p53 loss in human sarcomas, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5863-5867, 1990.
 - 16) Toguchida, J, Yamaguchi, T, Ritchie, B, Beauchamp, RL, Dayton, SH, Herrera, GE, Yamamuro, T, Kotoura, Y, Sasaki, MS, Little, JB, Weichselbaum, RR, Ishizaki, K and Yandell, DW : Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas, *Cancer Res*, 52, 6194-6199, 1992.
 - 17) Ueda, Y, Dockhorn, DB, Blasius, S, Mellin, W, Wuisman, P, Bocker, W and Roessner, A : Analysis of mutant P53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone, *J Cancer Res Clin Oncol*, 119, 172-178, 1993.
 - 18) Ladanyi, M, Cha, C, Lewis, R, Jhanwar, SC, Huvos, AG and Healey, JH : MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma, *Cancer Res*, 53, 16-18, 1993.
 - 19) Rong, S, Jeffers, M, Resau, JH, Tsarfaty, I, Oskarsson, M and Vande, WG : Met expression and sarcoma tumorigenicity, *Cancer Res*, 53, 5355-5360, 1993.
 - 20) Miyashita, T and Reed, JC : Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line, *Blood*, 81, 151-157, 1993.
 - 21) Duda, RB, Cundiff, D, August, CZ, Wagman, LD and Bauer, KD : Growth factor receptor and related oncogene determination in mesenchymal tumors, *Cancer*, 71, 3526-30, 1993.

- 22) Kramer, S, Reynolds, FJ, Castillo, M, Valenzuela, DM, Thorikay, M and Sorvillo, JM : Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues, *Endocrinology*, 128, 1927-37, 1991.
- 23) 網塚憲生、小澤英浩、Warshawsky, H、Goltzman, D : PTHRPの骨組織に対する作用、*日本骨代謝学会雑誌*、12、106、1994.
- 24) Wu, JX, Carpenter, PM, Gresens, C, Keh, R, Niman H, Morris JWS and Mercola, D : The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcoma. *Oncogene*, 5, 989-1000, 1990.
- 25) Grigoriadis, AE, Schellander, K, Wang, ZQ and Wagner EF : Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J of Cell Biology*, 122, 685-701, 1993.
- 26) Riordan, JR, Deuchars, K, Kartner, N, Alon, N, Trent, J and Ling, V : Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines, *Nature*, 316, 817-819, 1985.
- 27) Pavelic, ZP, Reising, J, Pavelic, L, Kelley, DJ, Stambrook, PJ and Gluckman, JL : Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119, 753-757, 1993.
- 28) Axiotis, CA, Monteagudo, C, Merino, MJ, LaPorte, N and Neumann, RD : Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma, *Am J Pathol*, 138, 799-806, 1991.
- 29) Wunder, JS, Bell, RS, Wold, L and Andrulis, IL : Expression of the multidrug resistance gene in osteosarcoma: a pilot study, *J Orthop Res*, 11, 396-403, 1993.
- 30) 菊池文史、石田剛、町並陸生 : 骨肉腫に於ける術前術後の影響に関する考察、*日本整形外科学会誌*、63、S710、1989.
- 31) 竹山信成、今村哲夫 : 骨肉腫の予後、*日本整形外科学会誌*、64、S696、1990.
- 32) 藤浪周一、中瀬古健、萩原義郎 : 骨肉腫の化学療法—近年の動向—、*癌と化学療法* 20 (13) : 1908-1914、1993.
- 33) 米田俊之 : 骨代謝とサイトカイン、*臨床免疫* : 25、538-546、1993.

- 34) Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S : Growth factors to stimulate bone formation : J Bone Min Res, 8, 565-572, 1993.
- 35) Hedley, DW : Flow cytometry using paraffin-embedded tissue : five years on, Cytometry, 10, 229-241, 1989.
- 36) Braly, PS and Klevecz, RR : Flow cytometric evaluation of ovarian cancer, Cancer, 71 (4 suppl) : 1621-1628, 1993.
- 37) Doki, Y, Shiozaki, H, Tahara, H, Kobayashi, K, Miyata, M, Oka, H, Iihara, K and Mori, T : Prognostic value of DNA ploidy in squamous cell carcinoma of esophagus. Analyzed with improved flow cytometric measurement, Cancer, 72, 1813-1818, 1993.
- 38) Helio, H, Karaharju, E and Nordling, S : Flow cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumours, Cytometry, 6, 165-171, 1985.
- 39) Bauer, HC : Current status of DNA cytometry in osteosarcoma, Cancer Treat Res, 62, 151-161, 1993.
- 40) Bacus JW and Grace LJ : Optical microscope system for standardized cell measurements and analysis. Applied Optics. 26, 3280-3293, 1987.
- 41) Davis, AM, Bell, RS and Goodwin, PJ : Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review, J Clin Oncol, 12, 423-431, 1994.
- 42) Plank, J and Rychlo, A. : Eine Schnellentkalkungsmethode. Zbl. allg. Path. Anat. 89 : 252-254, 1952.
- 43) Dahlin, DC and Unni, KK, : Bone tumors. Fourth edition, Springfield, 1986.
- 44) Broders A. : Squamous-cell epithelioma of the lip: A study of five hundred and thirty-seven cases. JAMA 74 : 656-664, 1920.
- 45) Unni, KK : Bone tumors, Churchill Livingstone, 1988.
- 46) Vojtesek, B, Bartek, J, Midgley, CA and Lane, DP : An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. J of Immunological Methods, 151, 237-244, 1992.
- 47) Pezzella, F, Tse, AGD, Cordell, JL, Pulford, KAF, Gatter, KC and Mason, DY : Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14 :18 chromosomal translocation, Am J of Pathol, 137, 225-232, 1990.

- 48) Corbett, IP, Henry, JA, Angus, B : NCL-CB11, A new monoclonal antibody recognising the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin embedded tissue. *J of Pathol*, 161, 15-25, 1990.
- 49) Scheper RJ, Bulte JWM, Brakkee JGP, Quak JJ, van der Schoot, E, Balm, AJM, Meuer, CJLM, Broxterman, HJ, Kuiper, CM, Lankelma, J, and Pinedo, HM : Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multi-drug-resistance. *Int J Cancer*, 42, 389-394, 1988.
- 50) Shi, SR, Key, ME and Kalra, KL : Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections, *J Histochem Cytochem*, 39, 741-748, 1991.
- 51) 川井健司、梅村しのぶ、堤寛 : 加熱処理による抗原賦活化、細胞、26、152-157、1994.
- 52) Kaplan, EL and Meier, P : Non-parametric estimation from incomplete observations, *J. Am. Stat. Assoc.*, 53, 457-541, 1958.
- 53) Peto, R, Pike, MC, Armitage, P, Breslow, NE, Cox, DR, Howard, SV, Mantel, N, McPherson, K, Peto, J and Smith, PG : Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples, *Br J Cancer*, 35, 1-39, 1977.
- 54) Sapi, Z, Hendricks, JB, Pharis, PG and Wilkinson, EJ : Tissue section image analysis of breast neoplasms. Evidence of false aneuploidy, *Am J Clin Pathol*, 99, 714-720, 1993.
- 55) Wadayama, B, Toguchida, J, Yamaguchi, T, Sasaki, MS and Yamamuro, T : p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas, *Br J Cancer*, 68, 1134-1139, 1993.
- 56) 西川哲夫、山本哲司、水野耕作、藤盛孝博、前田盛、鶴飼和浩 : 骨肉腫における癌抑制遺伝子p53蛋白発現についての検討、日本整形外科学会誌、68、400-406、1994.

- 57) Donehower, LA, Harvey, M, Slagle, BL, McArthur, MJ, Montgomery, CJ, Butel, JS and Bradley, A : Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, *Nature*, 356, 215-221, 1992.
- 58) 中鶴陽子、小田秀明、ミリヤナ ザルコヴィッチ、相沢慎一、石川隆俊 : p53遺伝子欠損マウスにおける自然発生腫瘍、*日本病理学会会誌*、83、p307、1994.
- 59) Dobashi, Y, Sakamoto, A, Sugimura, H, Mernyei, M, Mori, M, Oyama, T and Machinami, R : Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma, *Am J Surg Pathol*, 17, 375-381, 1993.
- 60) Lassam, NJ, From, L and Kahn, HJ : Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma, *Cancer Res*, 53, 2235-2238, 1993.
- 61) Sander, CA, Yano, T, Clark, HM, Harris, C, Longo, DL, Jaffe, ES and Raffeld, M : p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas, *Blood*, 82, 1994-2004, 1993.
- 62) Tsujimoto, Y, Finger, LR, Yunis, J, Nowell, PC and Croce, CM : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science*, 226, 1097-1099, 1984.
- 63) Merry, DE, Veis, DJ, Hickey, WF and Korsmeyer, SJ : bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS, *Development*, 120, 301-311, 1994.
- 64) Hockenbery, DM, Zutter, M, Hickey, W, Nahm, M and Korsmeyer, SJ : BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6961-6965, 1991.
- 65) LeBrun, DP, Warnke, RA and Cleary, ML : Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis, *Am J Pathol*, 142, 743-753, 1993.
- 66) Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML : Molecular analysis of the t(14 : 18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med*, 317, 1185-1189, 1987.
- 67) Aisenberg AC, Wikes BM, Jacobson JO : The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood*, 71, 969-972, 1988.
- 68) McDonnell, TJ, Troncoso, P, Brisbay, SM, Logothetis, C, Chung, LW, Hsieh,

- JT, Tu, SM and Campbell, ML : Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer, *Cancer Res*, 52, 6940-6944, 1992.
- 69) Lu, QL, Elia, G, Lucas, S and Thomas, JA : Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma, *Int J Cancer*, 53, 29-35, 1993.
- 70) Pezzella, F, Turley, H, Kuzu, I, Tungekar, MF, Dunnill, MS, Pierce, CB, Harris, A, Gatter, KC and Mason, DY : bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma, *N Engl J Med*, 329, 690-694, 1993.
- 71) Swanson, PE, Humphrey PA, Dehner, LP, : Immunoreactivity for bcl-2 protein in peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Immunohistochemistry*, 1, 182-183, 1993.
- 72) Hockenbery, D, Nunez, G, Milliman, C, Schreiber, RD and Korsmeyer, SJ : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature*, 348, 334-336, 1990.
- 73) Nunez, G, London, L, Hockenbery, D, Alexander, M, McKearn, JP and Korsmeyer, SJ : Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines, *J Immunol*, 144, 3602-3610, 1990.
- 74) McDonnell, TJ and Korsmeyer, SJ : Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18), *Nature*, 349, 254-256, 1991.
- 75) Campos, L, Rouault, JP, Sabido, O, Oriol, P, Roubi, N, Vasselon, C, Archimbaud, E, Magaud, JP and Guyotat, D : High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy, *Blood*, 81, 3091-3096, 1993.
- 76) Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP : Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res*. 54, 3253-3259, 1994.
- 77) Semba, K, Kamata, N, Toyoshima, K and Yamamoto, T : A v-erbB-related

- protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 6497-6501, 1985.
- 78) Peles, E, Bacus, SS, Koski, RA, Lu, HS, Wen, D, Ogden, SG, Levy, RB and Yarden, Y : Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells, *Cell*, 69, 205-216, 1992.
- 79) Holmes, WE, Sliwkowski, MX, Akita, RW, Henzel, WJ, Lee, J, Park, JW, Yansura, D, Abadi, N, Raab, H, Lewis, GD and et al : Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2, *Science*, 256, 1205-1210, 1992.
- 80) Matsuda, S, Kadowaki, Y, Ichino, M, Akiyama, T, Toyoshima, K and Yamamoto, T : 17 beta-estradiol mimics ligand activity of the c-erbB2 protooncogene product, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10803-10807, 1993.
- 81) King, CR, Kraus, MH and Aaronson, SA : Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma, *Science*, 229, 974-976, 1985.
- 82) Yokota, J, Yamamoto, T, Toyoshima, K, Terada, M, Sugimura, T, Battifora, H and Cline, MJ : Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo, *Lancet*, 1, 765-767, 1986.
- 83) Slamon, DJ, Clark, GM, Wong, SG, Levin, WJ, Ullrich, A and McGuire, WL : Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, 235, 177-182, 1987.
- 84) Tsuda, H, Hirohashi, S, Shimosato, Y, Hirota, T, Tsugane, S, Yamamoto, H, Miyajima, N, Toyoshima, K, Yamamoto, T, Yokota, J and et al : Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1, *Cancer Res*, 49, 3104-3108, 1989.
- 85) Hijazi, YM, Axiotis, CA, Navarro, S, Steinberg, SM, Horowitz, ME and Tsokos, M : Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy , *Am J Clin Pathol*, 102, 61-67, 1994.

- 86) Stein, U, Wunderlich, V, Haensch, W and Schmidt, PP : Expression of the *mdr1* gene in bone and soft tissue sarcomas of adult patients, *Eur J Cancer*, 29A, 1979-1981, 1993.
- 87) Burtis, WJ, Wu, T, Bunch, C, Wysolmerski, JJ, Insogna, KL, Weir, EC, Broadus, AE and Stewart, AF : Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy, *J Biol Chem*, 262, 7151-7156, 1987.
- 88) Moseley, JM, Kubota, M, Diefenbach, JH, Wettenhall, RE, Kemp, BE, Suva, LJ, Rodda, CP, Ebeling, PR, Hudson, PJ, Zajac, JD and et, al : Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5048-5052, 1987.
- 89) Suva, LJ, Winslow, GA, Wettenhall, RE, Hammonds, RG, Moseley, JM, Diefenbach, JH, Rodda, CP, Kemp, BE, Rodriguez, H, Chen, EY and et, al : A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression, *Science*, 237, 893-896, 1987.
- 90) Asa, SL, Henderson, J, Goltzman, D and Drucker, DJ : Parathyroid hormone-like peptide in normal and neoplastic human endocrine tissues, *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 1112-1118, 1990.
- 91) Fenton, AJ, Kemp, BE, Hammonds, RJ, Mitchelhill, K, Moseley, JM, Martin, TJ and Nicholson, GC : A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111], *Endocrinology*, 129, 3424-3426, 1991.
- 92) Powell, GJ, Southby, J, Danks, JA, Stillwell, RG, Hayman, JA, Henderson, MA, Bennett, RC and Martin, TJ : Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites, *Cancer Res*, 51, 3059-3061, 1991.
- 93) Vargas, SJ, Gillespie, MT, Powell, GJ, Southby, J, Danks, JA, Moseley, JM and Martin, TJ : Localization of parathyroid hormone-related protein mRNA expression in breast cancer and metastatic lesions by *in situ* hybridization, *J*

Bone Miner Res, 7, 971-979, 1992.

- 94) 中野洋一郎、森直樹、江藤澄哉：血中、尿中PTHrPレベルの測定。Clinical calcium、3、186-194、1994.
- 95) Schutte, B, Reynders, MM, Bosman, FT and Blijham, GH : Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue, Cytometry, 6, 26-30, 1985.
- 96) 福島純一、佐々木学：フローサイトメトリーとパラフィン切片、検査と技術、22、456、1994.
- 97) Bauer, TW, Tubbs, RR, Edinger, MG, Suit, PF, Gephardt, GN and Levin, HS : A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry, Am J Clin Pathol, 93, 322-326, 1990.
- 98) Kucuk, O, Demirel, T, Gilman, SA, Taw, I, Mangold, M, Singh, S and Westerman, MP : Intratumor heterogeneity of DNA ploidy and correlations with clinical stage and histologic grade in prostate cancer, J Surg Oncol, 54, 171-174, 1993.
- 99) Coons, SW and Johnson, PC : Regional heterogeneity in the DNA content of human gliomas, Cancer, 72, 3052-3060, 1993.

表1. 骨肉腫の年齢、性別、部位、組織型、組織学的悪性度

症例番号	年齢	性別	部位	亜分類	組織学的悪性度
1	13	F	Tibia	Osteoblastic	3
2	13	F	Tibia	Fibroblastic	3
3	26	M	Pubic Bone	Fibroblastic	3
4	12	F	Humerus	Osteoblastic	2
5	14	M	Tibia	Osteoblastic	3
6	15	M	Femur	Osteoblastic	3
7	17	F	Femur	Fibroblastic	2
8	17	M	Humerus	Osteoblastic	4
9	17	M	Rib	Osteoblastic	4
10	17	F	Humerus	Osteoblastic	3
11	21	F	Femur	Chondroblastic	3
12	11	M	Femur	Osteoblastic	4
13	15	M	Femur	Osteoblastic	4
14	17	M	Femur	Fibroblastic	4
15	14	F	Tibia	Fibroblastic	1
16	19	F	Femur	Telangiectatic	4
17	22	M	Femur	Osteoblastic	3
18	15	M	Fibula	Osteoblastic	3
19	7	M	Femur	Osteoblastic	3
20	18	M	Humerus	Osteoblastic	4
21	15	M	Iliac Bone	Chondroblastic	3
22	16	M	Femur	Osteoblastic	4
23	18	M	Humerus	Osteoblastic	3
24	32	M	Femur	Osteoblastic	4
25	14	M	Tibia	Osteoblastic	3
26	12	F	Femur	Fibroblastic	3
27	17	M	Femur	Fibroblastic	3
28	12	F	Tibia	Fibroblastic	3
29	14	M	Femur	Osteoblastic	4
30	43	M	Femur	Osteoblastic	3
31	13	F	Tibia	Osteoblastic	3
32	18	M	Femur	Osteoblastic	4
33	19	M	Femur	Osteoblastic	3
34	15	F	Humerus	Fibroblastic	3
35	42	M	Femur	Osteoblastic	2
36	31	M	Humerus	Osteoblastic	3
37	16	M	Femur	Parosteal	2

表2. 骨肉腫の腫瘍の性状、転移・再発の有無と生存期間

症例番号	腫瘍の大きさ(cm)	骨外浸潤	転移・再発の有無	生存期間(週)
1	11.5x5.0	-	-	649
2	8.0x3.2	+	-	633
3	10.0x7.5	+	+	148
4	10.0x9.0	+	+	93
5	18.0x1.5	+	+	75
6	12.5x2.5	-	+	82
7	7.5x4.5	+	-	573
8	17.9x9.5	+	-	562
9	15.0x5.0	+	+	98
10	9.0x4.0	-	+	105
11	7.5x7.0	+	-	439
12	8.0x6.0	+	+	47
13	6.0x2.5	-	-	548
14	10.5x5.5	+	+	146
15	8.0x4.0	+	-	520
16	8.0x6.0	+	+	46
17	11.0x5.0	+	-	388
18	13.5x7.0	-	+	105
19	6.5x3.0	-	-	468
20	16.5x7.0	+	+	64
21	/	/	+	25
22	8.0x3.5	-	+	59
23	14.0x7.8	+	+	31
24	8.0x5.0	-	+	80
25	21.5x7.0	-	+	30
26	12.0x6.0	-	-	288
27	9.0x2.5	-	+	304
28	8.0x3.5	-	-	255
29	5.5x4.0	+	-	261
30	7.5x5.5	+	-	245
31	10.5x5.2	+	+	69
32	16.0x9.0	+	-	240
33	9.0x8.0	+	+	23
34	16.5x3.2	+	-	542
35	16.0x8.0	+	-	341
36	10.0x6.0	+	+	362
37	7.0x7.0	-	-	297

表 3. 類骨骨腫、年齢、性別、発生部位

病理番号	年齢	性別	部位
872617	24	F	Vertebra
873052	19	F	Cervical Spine
876730	26	M	Right Finger
881098	28	M	Vertebra
890344	23	M	Vertebra

表 4. 骨巨細胞腫、年齢、性別、発生部位

病理番号	年齢	性別	部位
860695	31	F	Tibia
861052	19	M	Radius
873514	45	F	Tibia
896970	34	M	Tibia
905771	24	M	Tibia

表5. 骨肉腫、p53蛋白免疫染色結果

症例番号	生検検体 (原発巣)	手術検体 (原発巣)	転移巣
1	-	-	/
2	-	-	/
3	-	-	/
4	-	-	/
5	-	-	/
6	-	ND	/
7	-	ND	/
8	-	-	/
9	-	-	-
10	-	+	-
11	-	-	/
12	-	-	/
13	-	+	/
14	-	-	/
15	-	-	/
16	-	-	/
17	+	-	/
18	-	-	/
19	-	-	/
20	-	-	-
21	-	/	/
22	-	-	/
23	-	-	/
24	++	-	++
25	-	-	-
26	-	-	/
27	-	-	-
28	-	-	/
29	-	-	/
30	+++	++	/
31	++	-	+
32	-	-	/
33	-	-	/
34	-	-	/
35	++	++	/
36	+	+++	+
37	-	++	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++:

陽性細胞数50%以上、ND: not done、/: 検体なし)

表 6. Bcl-2蛋白免疫染色結果

症例番号	生検検体 (原発巣)	手術検体 (原発巣)	転移巣
1	-	-	/
2	-	-	/
3	-	-	/
4	-	-	/
5	-	-	/
6	-	ND	/
7	-	ND	/
8	-	-	/
9	+	-	+
10	-	++	-
11	-	-	/
12	-	-	/
13	-	-	/
14	-	-	/
15	-	-	/
16	-	-	/
17	-	-	/
18	-	-	/
19	-	-	/
20	-	-	-
21	-	/	/
22	-	-	/
23	-	-	/
24	-	++	++
25	-	-	+
26	-	++	/
27	-	-	-
28	-	-	/
29	-	-	/
30	-	-	/
31	-	-	+
32	-	-	/
33	-	-	/
34	-	-	/
35	-	-	/
36	-	-	-
37	-	-	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++: 陽性細胞数50%以上、ND: not done、/: 検体なし)

表7. c-erbB-2蛋白免疫染色結果

症例番号	生検検体 (原発巣)	手術検体 (原発巣)	転移巣
1	+	-	/
2	-	-	/
3	-	-	/
4	-	-	/
5	-	-	/
6	-	ND	/
7	-	ND	/
8	-	-	/
9	+	-	-
10	-	-	-
11	-	-	/
12	-	-	/
13	-	-	/
14	+	+	/
15	-	-	/
16	-	-	/
17	-	-	/
18	-	-	/
19	-	-	/
20	-	+	-
21	-	/	/
22	-	+	/
23	-	-	/
24	-	++	-
25	-	-	-
26	-	-	/
27	-	-	-
28	-	-	/
29	-	-	/
30	+	-	/
31	+	-	-
32	-	-	/
33	-	-	/
34	-	-	/
35	+	-	/
36	+	+	+
37	-	+	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++:
陽性細胞数50%以上、ND: not done、/: 検体なし)

表 8. P-糖蛋白 (多剤耐性遺伝子産物) 結果

症例番号	原発巣生検検体	原発巣手術検体	転移・再発巣
1	+	++	/
2	-	-	/
3	-	+	/
4	-	-	/
5	++	+	/
6	-	ND	/
7	-	ND	/
8	+	-	/
9	+	-	-
10	-	-	-
11	++	-	/
12	+	-	/
13	+++	-	/
14	-	-	/
15	-	+	/
16	-	+	/
17	+++	+++	/
18	++	+	/
19	-	-	/
20	-	+++	-
21	+++	/	/
22	+	+++	/
23	+	+	/
24	+	-	-
25	+	+++	-
26	+	-	/
27	-	+	-
28	+	++	/
29	+	+	/
30	-	++	/
31	-	+	-
32	-	+++	/
33	+++	+++	/
34	-	-	/
35	+++	-	/
36	ND	-	+
37	++	+	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、

+++ : 陽性細胞数50%以上、ND : not done、/ : 検体なし)

表9. PTHRP免疫染色結果

症例番号	生検検体 (原発巣)	手術検体 (原発巣)	転移巣
1	+	++	/
2	+++	+++	/
3	-	-	/
4	+++	++	/
5	-	-	/
6	-	ND	/
7	+++	ND	/
8	+	-	/
9	-	-	-
10	++	-	+
11	++	-	/
12	-	-	/
13	-	-	/
14	-	-	/
15	++	-	/
16	-	-	/
17	-	-	/
18	++	-	/
19	-	-	/
20	-	-	-
21	+++	/	/
22	-	-	/
23	++	+	/
24	+++	-	+
25	+	+	+++
26	-	-	/
27	-	++	-
28	-	-	/
29	++	-	/
30	-	-	/
31	-	-	+
32	-	+++	/
33	-	-	/
34	-	+	/
35	++	+	/
36	+	+++	+++
37	-	++	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++:
陽性細胞数50%以上、ND: not done、/: 検体なし)

表10. 骨肉腫、p53蛋白陽性例のまとめ

症例番号	組織学的亜型	組織学的悪性度	生検検体 (原発) 手術検体 (原発) 転移巣		
			(陽性細胞率; 画像解析により算出)		
10	Osteoblastic	3	-	+	-
				(ND)	
13	Osteoblastic	4	-	+	/
				(ND)	
17	Osteoblastic	3	+	-	/
			(ND)		
24	Osteoblastic	4	++	-	++
			(28.3%)		(11.3%)
30	Osteoblastic	3	+++	++	/
			(67.8%)	(39.6%)	
31	Osteoblastic	3	++	-	+
			(36.6%)		(8.3%)
35	Osteoblastic	2	++	++	/
			(38.6%)	(11.3%)	
36	Osteoblastic	3	+	+++	+
			(4.4%)	(94.8%)	(5.7%)
37	Parosteal	2	-	++	/
				(16.7%)	

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++ : 陽性細胞数50%以上、
 ND: not done、/ : 検体なし)

表 1 1. 骨肉腫、bcl-2蛋白陽性例のまとめ

症例番号	組織学的亜型	組織学的悪性度	生検検体(原発巣)	手術検体(原発巣)	転移巣
9	Osteoblastic	4	+	-	+
10	Osteoblastic	3	-	++	-
24	Osteoblastic	4	-	++	++
25	Osteoblastic	3	-	-	+
26	Fibroblastic	3	-	++	/
31	Osteoblastic	3	-	-	+

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++ : 陽性細胞数50%以上、/: 検体なし)

表 1 2. 骨肉腫、c-erbB-2蛋白陽性例のまとめ

症例番号	組織学的亜型	組織学的悪性度	生検検体(原発巣)	手術検体(原発巣)	転移巣
1	Osteoblastic	3	+	-	/
9	Osteoblastic	4	+	-	-
14	Fibroblastic	4	+	+	/
20	Osteoblastic	4	-	+	-
22	Osteoblastic	4	-	+	/
24	Osteoblastic	4	-	++	-
30	Osteoblastic	3	+	-	/
31	Osteoblastic	3	+	-	-
35	Osteoblastic	2	+	-	/
36	Osteoblastic	3	+	+	+
37	Periosteal	2	-	+	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++ : 陽性細胞数50%以上、/: 検体なし)

表 13. P-糖蛋白 (多剤耐性遺伝子産物) 陽性例のまとめ

症例番号	組織学的型	組織学的悪性度	生検検体(原発巣)	手術検体(原発巣)	転移巣
1	Osteoblastic	3	+	++	/
3	Fibroblastic	2	-	+	/
5	Osteoblastic	3	++	+	/
8	Osteoblastic	4	+	-	/
9	Osteoblastic	4	+	-	-
11	Chondroblastic	3	++	-	/
12	Osteoblastic	4	+	-	/
13	Osteoblastic	4	+++	-	/
15	Fibroblastic	1	-	+	/
16	Telangiectatic	4	-	+	/
17	Osteoblastic	3	+++	+++	/
18	Osteoblastic	3	++	+	/
20	Osteoblastic	4	-	+++	-
21	Chondroblastic	3	+++	/	/
22	Osteoblastic	4	+	+++	/
23	Osteoblastic	3	+	+	/
24	Osteoblastic	4	+	-	-
25	Osteoblastic	3	+	+++	-
26	Fibroblastic	3	+	-	/
27	Fibroblastic	3	-	+	-
28	Fibroblastic	3	+	++	/
29	Osteoblastic	4	+	+	/
30	Osteoblastic	3	-	++	/
31	Osteoblastic	3	-	+	-
32	Osteoblastic	4	-	+++	/
33	Osteoblastic	3	+++	+++	/
35	Osteoblastic	2	+++	-	/
36	Osteoblastic	3	ND	-	+
37	Parosteal	2	++	-	/

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、
+++ : 陽性細胞数50%以上、ND : not done、/ : 検体なし)

表 1 4 . 骨肉腫、PTH RP陽性例のまとめ

症例番号	組織学的亜型	組織学的悪性度	生検検体(原発巣)	手術検体(原発巣)	転移巣
1	Osteoblastic	3	+	++	/
2	Fibroblastic	3	+++	+++	/
4	Osteoblastic	3	+++	++	/
7	Fibroblastic	2	+++	ND	/
8	Osteoblastic	4	+	-	/
10	Osteoblastic	3	++	-	+
11	Chondroblastic	3	++	-	/
15	Fibroblastic	1	++	-	/
18	Osteoblastic	3	++	-	/
21	Chondroblastic	3	+++	/	/
23	Osteoblastic	3	++	+	/
24	Osteoblastic	4	+++	-	+
25	Osteoblastic	3	+	+	+++
27	Fibroblastic	3	-	++	-
29	Osteoblastic	4	++	-	/
31	Osteoblastic	3	-	-	+
32	Osteoblastic	4	-	+++	/
34	Fibroblastic	3	-	+	/
35	Osteoblastic	2	++	+	/
36	Osteoblastic	3	+	+++	+++
37	Parosteal	2	-	++	/

(-:陽性細胞数0%、+:陽性細胞数0-10%、++:陽性細胞数10-50%、+++ :陽性細胞数50%以上、ND: not done、/: 検体なし)

表 1 5. 類骨骨腫、免疫染色結果

症例番号	p53蛋白	bcl-2蛋白	c-erbB-2蛋白	PTHRP
872617	-	-	-	+++
873052	-	-	-	+++
876730	-	-	-	-
881098	-	-	-	+++
890344	-	-	-	+++

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++ : 陽性細胞数50%以上)

表 1 6. 骨巨細胞腫、免疫染色結果

症例番号	p53蛋白	bcl-2蛋白	c-erbB-2蛋白	PTHRP
860695	-	-	-	-
861052	-	-	+++	-
873514	-	-	-	-
896970	-	-	+++	-
905771	-	-	-	-

(-: 陽性細胞数0%、+: 陽性細胞数0-10%、++: 陽性細胞数10-50%、+++ : 陽性細胞数50%以上)

表 17. 骨肉腫、イメージサイトメトリーとKi-67免疫染色の結果

症例番号	検体種類	組織亜型	組織学的 悪性度	細胞数	CV値	DNA INDEX	Ploidy pattern	Ki-67陽性率	p53免疫染色
8	原発	Osteoblastic	G4	158	7.68	0.98	Diploid	22.4%	-
13	原発	Osteoblastic	G4	151	7.91	1.29	Aneuploid	-	-
14	原発	Fibroblastic	G4	168	9.10	0.95	Diploid	10.5%	-
20	転移	Osteoblastic	G4	154	8.38	1.86	Aneuploid	11.5%	-
22	原発	Osteoblastic	G4	154	9.35	1.52	Tetraploid	12.9%	-
24	転移	Osteoblastic	G4	155	8.29	1.65	Aneuploid	7.3%	+
26	原発	Fibroblastic	G3	161	8.24	1.04	Diploid	6.1%	-
27	転移	Fibroblastic	G3	152	8.18	0.96	Diploid	9.0%	-
29	原発	Osteoblastic	G4	152	7.67	1.03	Diploid	-	-
31	転移	Osteoblastic	G3	154	8.86	0.97	Diploid	32.8%	+
32	原発	Osteoblastic	G4	154	8.68	0.93	Diploid	12.0%	-
36	原発	Osteoblastic	G3	152	7.66	0.98	Diploid	ND	+

(+: 陽性、-: 陽性細胞なし、ND: not done)

表18-1. 骨肉腫結果のまとめ

症例番号	組織型	組織学的悪性度	免疫染色結果 (生検/手術/転移)					化学療法
			p53蛋白	bcl-2蛋白	c-erbB-2蛋白	P-糖蛋白	PTHRP	
1	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	+/-/N	+/+/+N	+/+/+N	MTX, ADR局所灌流
2	Fibroblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+++ /+++ /N	MTX大量療法、(ADR+MMC)局所灌流
3	Fibroblastic	2	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/+ /N	-/-/N	MTX, (ADR+MMC)局所灌流
4	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+++ /+++ /N	MTX, (ADR+MMC)局所灌流
5	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	++ /+ /N	-/-/N	MTX大量療法, ADR
6	Osteoblastic	3	-/N /N	-/N /N	-/N /N	-/N /N	-/N /N	MTX, (ADR+MMC+CDP)局所灌流
7	Fibroblastic	2	-/N /N	-/N /N	-/N /N	-/N /N	+++ /N /N	MTX, (ADR+MMC)局所灌流, CDP動注
8	Osteoblastic	4	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+/-/N	+/-/N	CDP
9	Osteoblastic	4	-/-/-	+/-/+	+/-/-	+/-/-	-/-/-	CDP
10	Osteoblastic	3	-/+/-	-+++/-	-/-/-	-/-/-	++/-/+	MTX, CDP
11	Chondroblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	++/-/N	++/-/N	CDP動注, CDP
12	Osteoblastic	4	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+/-/N	-/-/N	(VCR+MTX)x2, (ADR+MMC)局所灌流CDP
13	Osteoblastic	4	-/+ /N	-/-/N	-/-/N	+++ /- /N	-/-/N	CDP動注, MTX大量療法, (ADR+MMC)局所灌流
14	Fibroblastic	4	-/-/N	-/-/N	+ /+ /N	-/-/N	-/-/N	MTX大量療法, CDP, ADR
15	Fibroblastic	1	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/+ /N	++/-/N	MTX, (ADR+MMC)局所灌流, CDP, ADR
16	Telangiectatic	4	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/+ /N	-/-/N	MTX大量療法, CDP, VCR
17	Osteoblastic	3	+/-/N	-/-/N	-/-/N	+++ /+++ /N	-/-/N	CDP, CDP局所灌流, MTX
18	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	++ /+ /N	++/-/N	CDP動注, CDP, CDP局所灌流
19	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/-/N	CDP動注, CDP局所灌流
20	Osteoblastic	4	-/-/-	-/-/-	+/-/-	- /+++ /-	- /- /-	CDP動注, MTX, VCR

(-: 陽性細胞数0%, +: 陽性細胞数0-10%, ++: 陽性細胞数10-50%, +++: 陽性細胞数50%以上、N: not done)

(MTX=Methotrexate, ADR=Adriacin, MMC=Mitomycin, CDP=Cisplatin, VCR=Oncobin、薬剤名のみは静注)

表 18-2. 骨肉腫の結果のまとめ

症例番号	組織型	組織学的悪性度	免疫染色結果 (生検/手術/転移)					化学療法
			p53蛋白	bcl-2蛋白	c-erbB-2蛋白	P-糖蛋白	PTHRP	
2 1	Chondroblastic	3	-/N/N	-/N/N	-/N/N	+++/N/N	+++/N/N	CDP, MTX, ADR
2 2	Osteoblastic	4	-/-/N	-/-/N	-/+/N	+++/+/N	-/-/N	CDP動注, (CDP+MMC)局所灌流
2 3	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/+/N	+/-/N	+++/+/-	CDP動注, MTX
2 4	Osteoblastic	4	++/-/++	-/+/+	-/+/-	+/-/-	+++/-/+	CDP動注, CDP局所灌流, MTX
2 5	Osteoblastic	3	-/-	-/-	-/-	+/+/-	+/+/+	CDP, MTX, CDP局所灌流
2 6	Fibroblastic	3	-/-/N	-/+/N	-/-/N	+/-/N	-/-/N	CDP, MTX, ADR
2 7	Fibroblastic	3	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+/-	MTX, CDP動注, ADR動注
2 8	Fibroblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+/+/-	-/-/N	MTX, CDP動注, ADR動注
2 9	Osteoblastic	4	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+/-/N	++/-/N	CDP動注, テラルピシン動注, MTX
3 0	Osteoblastic	3	+++/-/+	-/-/N	+/-/N	-/+/-	-/-/N	CDP動注, テラルピシン動注, MTX
3 1	Osteoblastic	3	++/-/+	-/-/+	+/-/-	-/+	-/+	CDP, MTX
3 2	Osteoblastic	4	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/+/-	-/+/-	MTX, CDP動注, ADR動注
3 3	Osteoblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	+++/-/+	-/-/N	MTX, (ADR+MMC)局所灌流
3 4	Fibroblastic	3	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/-/N	-/+/N	CDP, MTX, ADR
3 5	Osteoblastic	2	++/+/-	-/-/N	+/-/N	+++/-/	++/+/-	CDP動注
3 6	Osteoblastic	3	+/+/-	-/-	+/+	N/-/+	+/+/-	CDP, MTX
3 7	Parosteal	2	-/+/-	-/-/N	-/+/	++/+/-	-/+/-	ADR動注, CDP動注

(-: 陽性細胞数0%, +: 陽性細胞数0-10%, ++: 陽性細胞数10-50%, +++: 陽性細胞数50%以上, N: not done)

(MTX=Methotrexate, ADR=Adriacin, MMC=Mitomycin, CDP=Cisplatin, VCR=Oncovin, 薬剤名のみは静注)

図1. 骨肉腫症例の性別、年齢分布、発生部位

Male 25

Female 12

Total 37

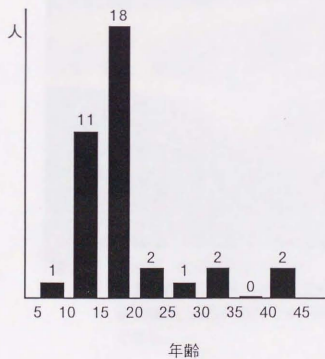
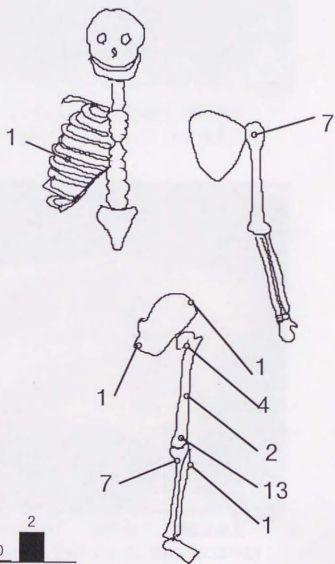




図2. 骨肉腫、肉眼写真像（症例13）、大腿骨遠位、骨皮質は保たれており、腫瘍は髓腔内にとどまっている。腫瘍の大きさは6.0x2.5 cmである。



図3. 骨肉腫、肉眼写真像（症例31）、脛骨近位、腫瘍は骨皮質を破壊して、軟部組織へ浸潤している。腫瘍内には地図状に壊死、出血が混在する。腫瘍の大きさは10.5x5.2 cmである。

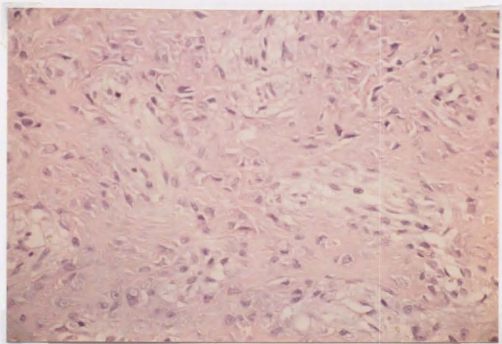


図 4. 骨肉腫、Grade 1、Fibroblastic、HE染色 (x80)
腫瘍細胞間には細いレース状の類骨の形成がある。腫瘍細胞の異型性はごく軽度である。

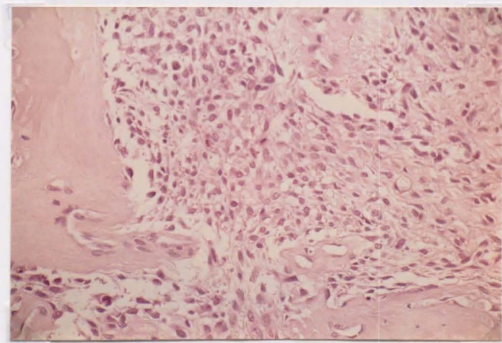


図 5. 骨肉腫、Grade 2、Fibroblastic、HE染色 (x80)
腫瘍細胞の細胞密度がやや高い。腫瘍細胞の異型性は軽度である。

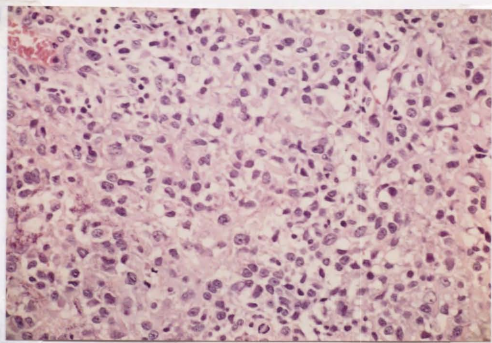


図 6. 骨肉腫、Grade 3、Osteoblastic、HE染色 (x80)
腫瘍細胞間にはレース状の類骨の形成があり、少数の石灰化を伴う。細胞密度が高く、核分裂像が少数散見される。

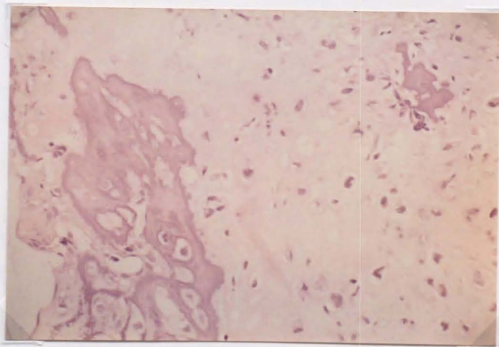


図 7. 骨肉腫、Grade 3、Chondroblastic、HE染色 (x80)
腫瘍細胞は軟骨への分化を示している。石灰化を伴う。

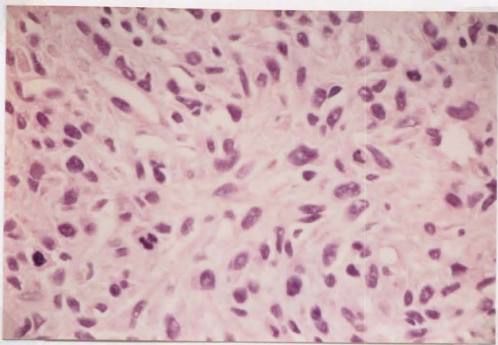


図 8. 骨肉腫、Grade 4、Fibroblastic、HE染色 (x160)
短紡錘形の腫瘍細胞が細胞密度、高く増殖している。腫瘍細胞の核の異型性が強く、異型核分裂像が散見される。

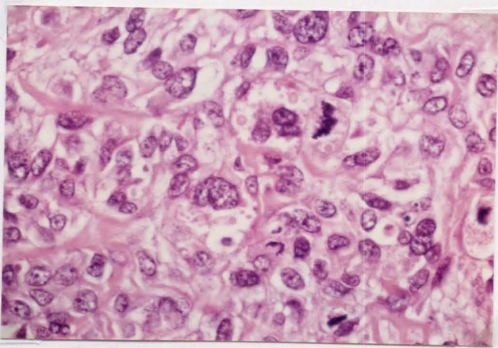


図 9. 骨肉腫、Grade4、Osteoblastic、HE染色 (x160)
腫瘍細胞の核異型性が強く、異型核分裂像がみられる。

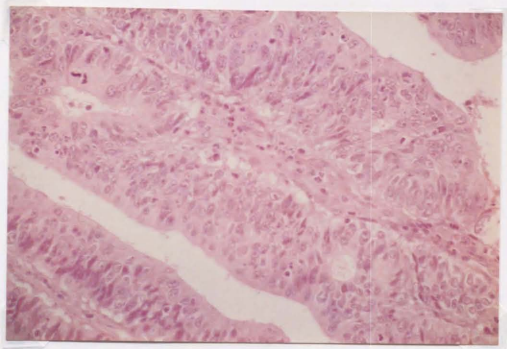


図10a. 大腸癌、HE染色、(x80)
乳頭状に増殖する高分化型腺癌。

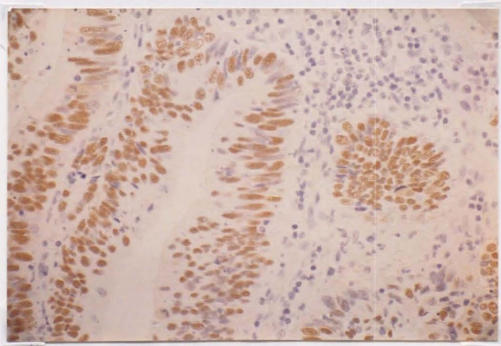


図10b. 大腸癌、抗p53蛋白免疫染色、(x100)
ほとんどの腫瘍細胞の核に陽性である。(抗p53蛋白免疫
染色陽性コントロール)

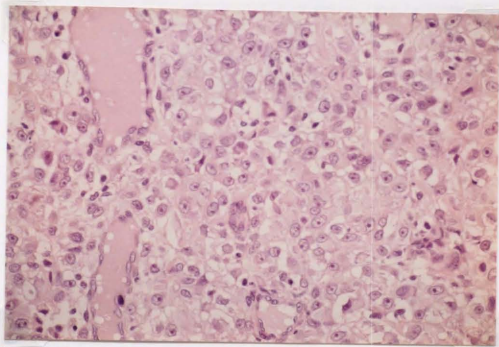


図 1 1 a. 骨肉腫、HE染色 (x80)
Grade 3、Osteoblastic

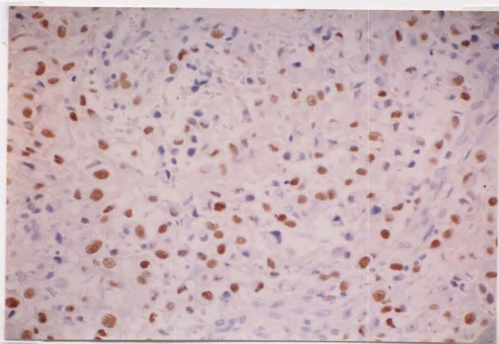


図 1 1 b. 骨肉腫、抗p53蛋白免疫染色、(x80)
多くの腫瘍細胞の核にp53蛋白が陽性。血管内皮細胞は陰性。画像解析による陽性率(陽性細胞数/腫瘍細胞の比)は67.8%である。

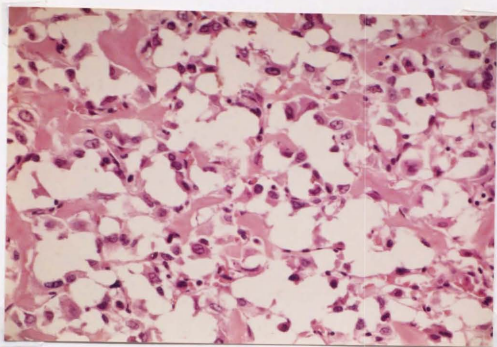


図 1 2 a. 骨肉腫、HE染色 (x80)
Grade 3、Osteoblastic

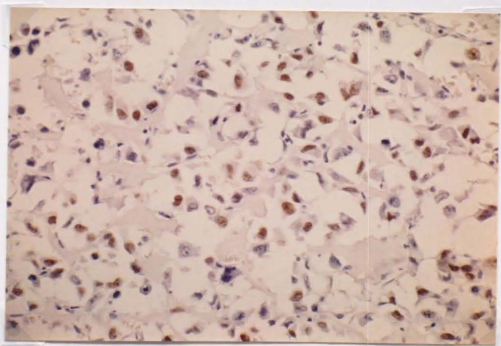


図 1 2 b. 骨肉腫、抗p53蛋白免疫染色、(x80)
p53蛋白陽性細胞がまばらにみられる。画像解析による陽性率は39.6%である。

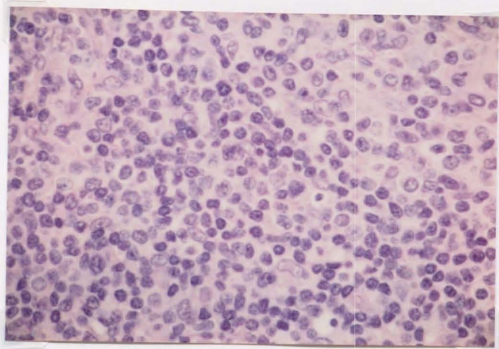


図13a. 濾胞型悪性リンパ腫、HE染色、(x160)
写真右上方は胚中心である。

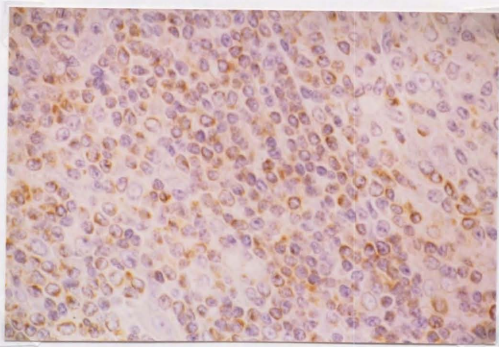


図13b. 濾胞型悪性リンパ腫、抗bcl-2蛋白免疫染色、(x160)
多数の腫瘍細胞の核膜および細胞質にbcl-2蛋白陽性。
(抗bcl-2蛋白免疫染色陽性コントロール)

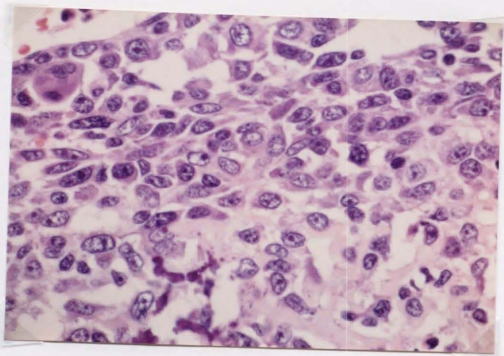


図1 4 a. 骨肉腫、HE染色 (x160)

Grade 3、Osteoblastic、類骨の形成があり、小さな石灰化巣を伴っている。

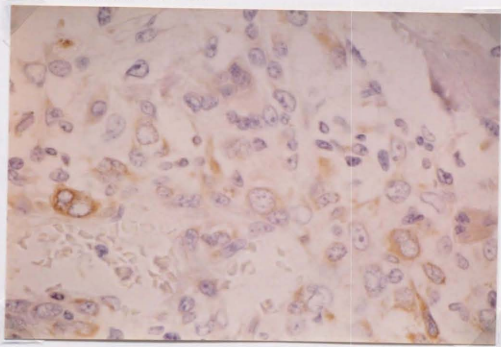


図1 4 b. 骨肉腫、抗bcl-2蛋白免疫染色、(x160)

一部の腫瘍細胞の細胞質に陽性。

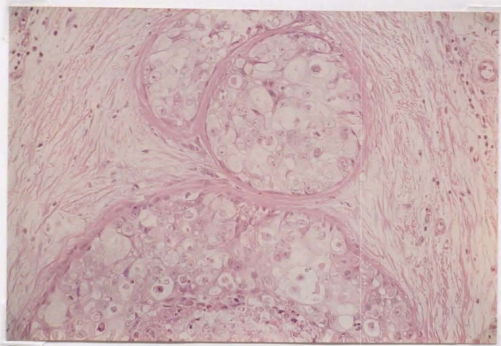


図15a. 乳癌、HE染色、(x50)
浸潤性乳管癌(乳頭腺管癌)の乳管内癌巣。

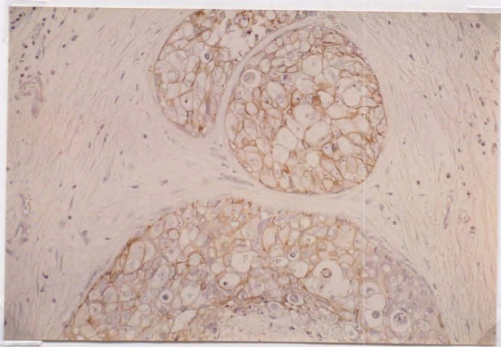


図15b. 乳癌、抗c-erbB-2蛋白免疫染色、(x50)
腫瘍細胞の細胞膜に局限してc-erbB-2蛋白が陽性。
(抗c-erbB-2蛋白免疫染色、陽性コントロール)

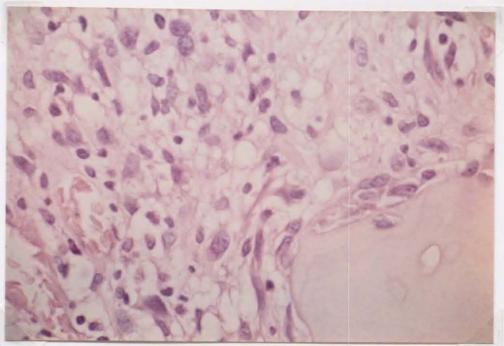


図1 6 a. 骨肉腫、HE染色 (x160)
Grade 3、Osteoblastic

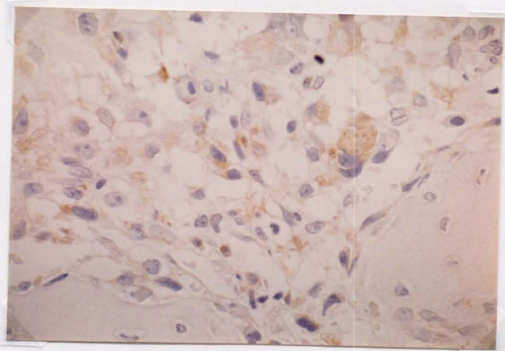


図1 6 b. 骨肉腫、抗c-erbB-2蛋白免疫染色、(x160)
一部の腫瘍細胞の細胞質にc-erbB-2蛋白陽性。

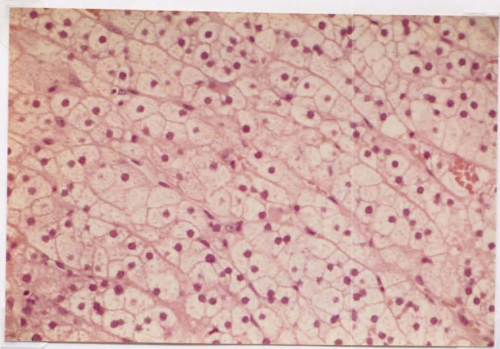


図17a. 正常副腎皮質 HE染色 (x80)

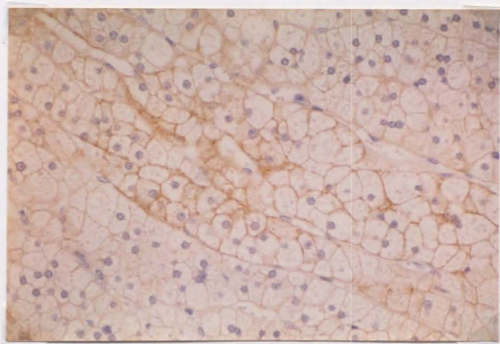


図17b. 副腎皮質 P-糖蛋白免疫染色 (x80)
P-糖蛋白は副腎皮質細胞の細胞膜に局在している。

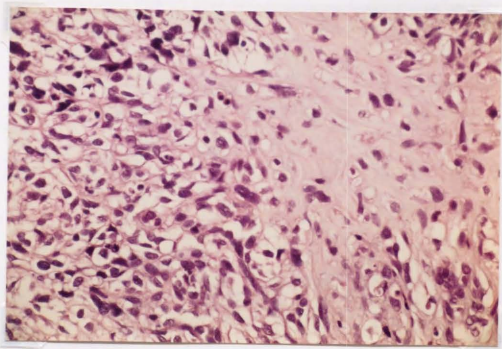


図18a. 骨肉腫、Grade 4、Osteoblastic、HE染色 (x80)
腫瘍組織内には島状に軟骨への分化を示すところが散在する。

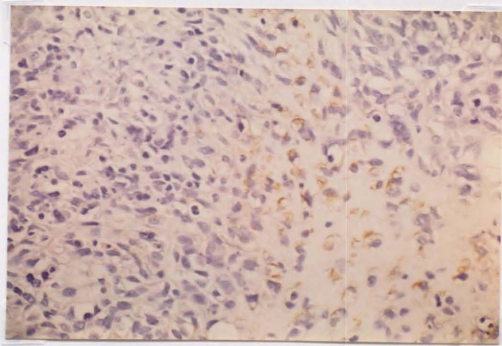


図18b. 骨肉腫、P-糖蛋白免疫染色 (x80)
軟骨への分化を示す腫瘍細胞の細胞膜に一致してP-糖蛋白陽性。その他の腫瘍細胞にはP-糖蛋白の発現はない。

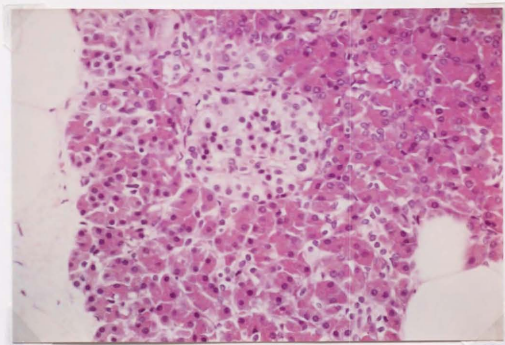


図 1 9 a. 膵臓ランゲルハンス島、HE染色、(x80)

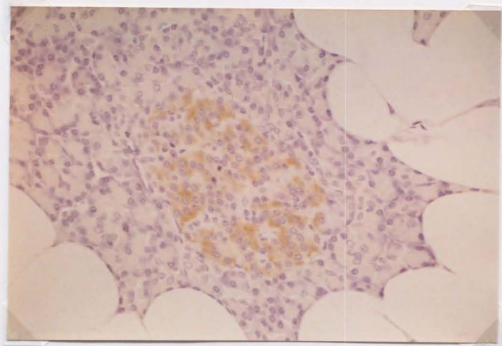


図 1 9 b. 膵臓ランゲルハンス島、抗PTHrP免疫染色、(x80)
ランゲルハンス島の細胞の細胞質にPTHrP陽性。
(抗PTHrP免疫染色、陽性コントロール)

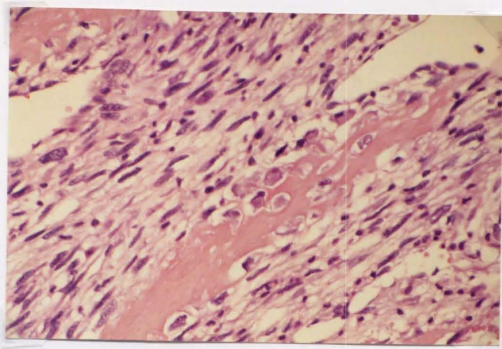


図 2 0 a. 骨肉腫、HE染色 (x80)
Osteoblastic、Grade 3、腫瘍性類骨の形成がみられる。

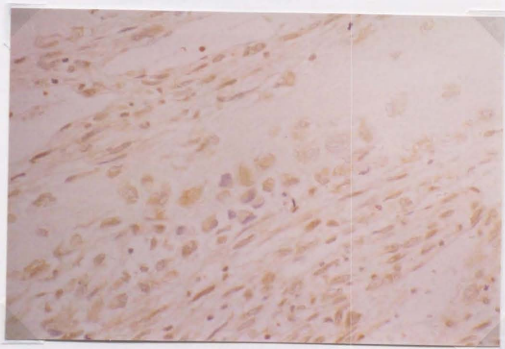


図 2 0 b. 骨肉腫、抗PTHrP免疫染色、(x80)
腫瘍細胞の細胞質にPTHrP陽性。

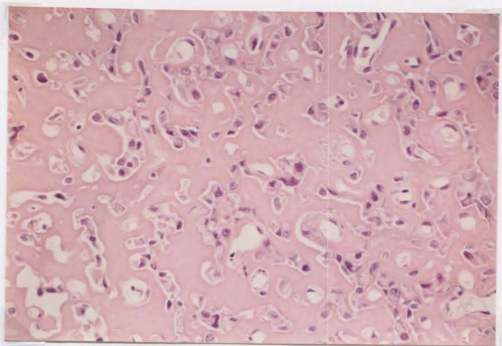


図 2 1 a. 類骨骨腫、HE染色、(x80)
腫瘍細胞間には豊富な不規則な類骨の形成がみられる。腫瘍細胞には異型性はみられない。

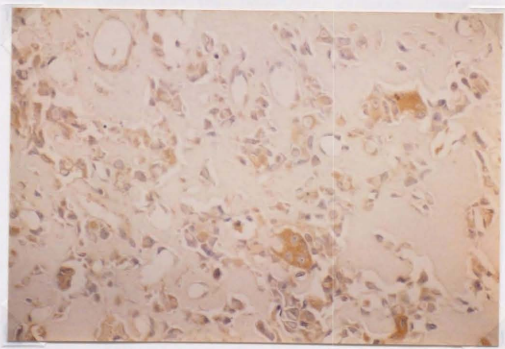


図 2 1 b. 類骨骨腫、抗PTHrP免疫染色、(x80)
大部分の腫瘍細胞と破骨細胞様多核巨細胞の細胞質に PTHrP が陽性。

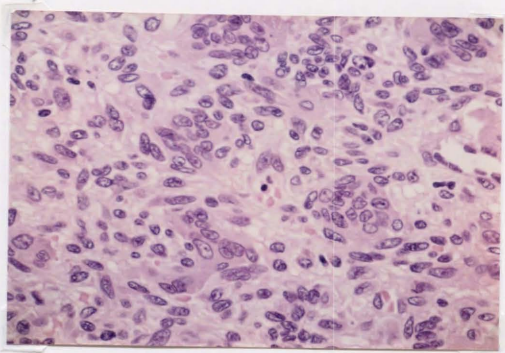


図 2 2 a. 骨巨細胞腫、HE染色、(x160)
紡錘形の単核細胞と多核細胞とが混在して増殖している。

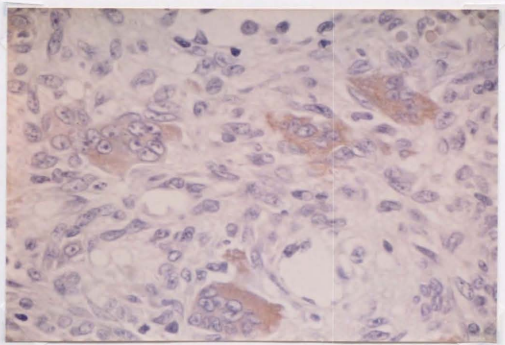


図 2 2 b. 骨巨細胞腫、抗c-erbB-2蛋白免疫染色、(x160)
多核巨細胞と少数の単核細胞の細胞質にc-erbB-2蛋白が
陽性。

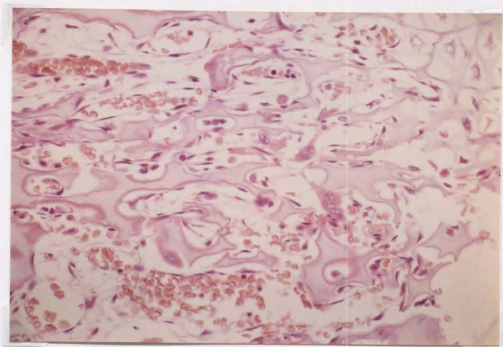


図 2 3 a. 17週ヒト胎児大腿骨、HE染色、(x80)

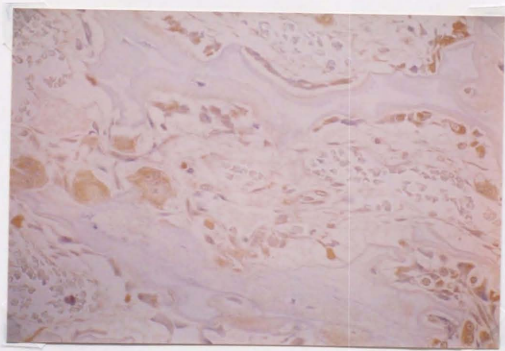


図 2 3 b. 17週ヒト胎児大腿骨、PTHRP染色、(x80)
骨芽細胞、破骨細胞ともに陽性。

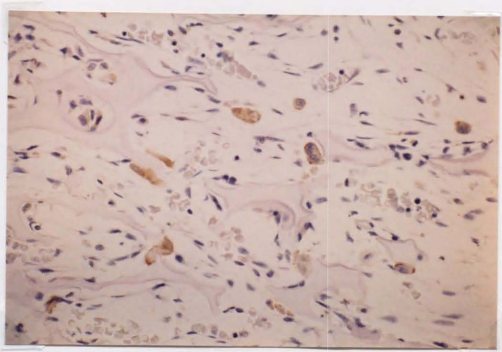


図 2 3 c. 17週ヒト胎児大腿骨、c-erbB-2蛋白免疫染色、(x80)
一部の骨芽細胞と破骨細胞に陽性。

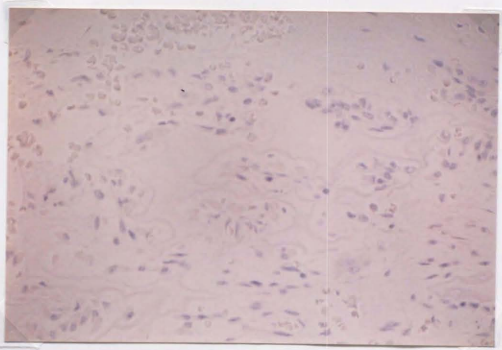


図 2 3 d. 17週ヒト胎児大腿骨、bcl-2蛋白免疫染色、(x80)
骨芽細胞、破骨細胞とも陰性。

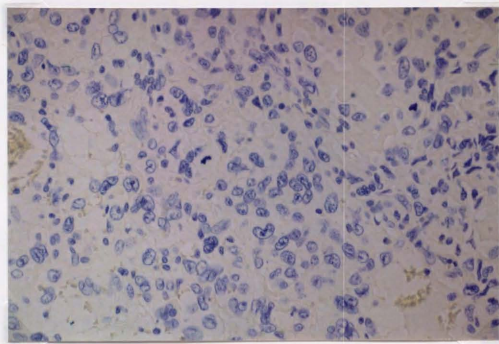


図 2 4 a. 骨肉腫、(症例20)、Feulgen染色、(x80)

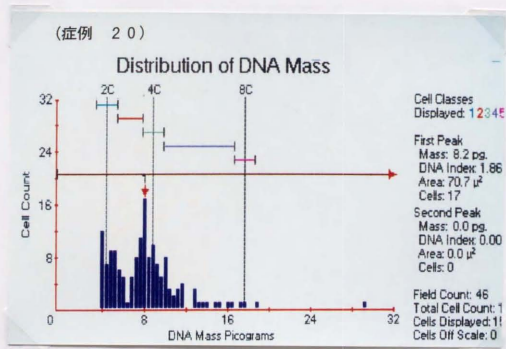


図 2 4 b. 骨肉腫、(症例20)、ヒストグラム、DI=1.86

多数のピークがみられ、aneuploid patternを示している。

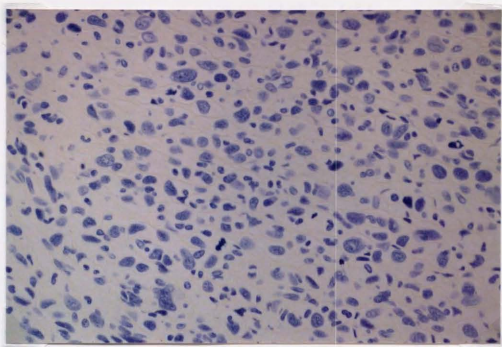


図 2 5 a. 骨肉腫、(症例24)、Feulgen染色、(x80)

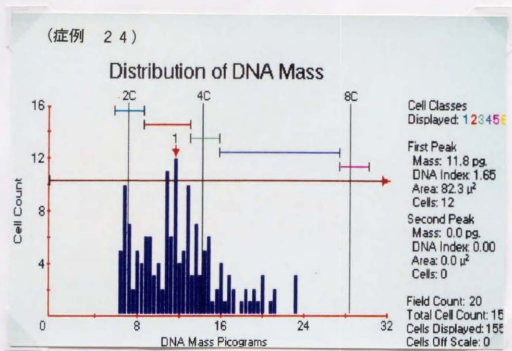


図 2 5 b. 骨肉腫、(症例24)、ヒストグラム、DI=1.65
 多数のピークがみられ、aneuploid patternを示している。

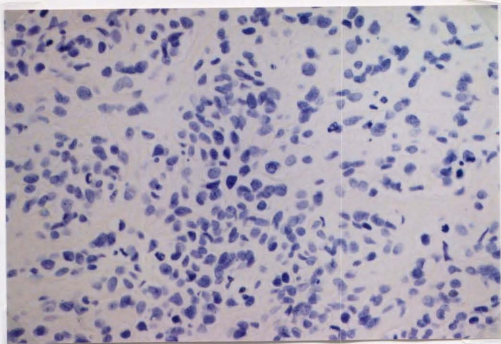


図 2 6 a. 骨肉腫、(症例36)、Feulgen染色、(x80)

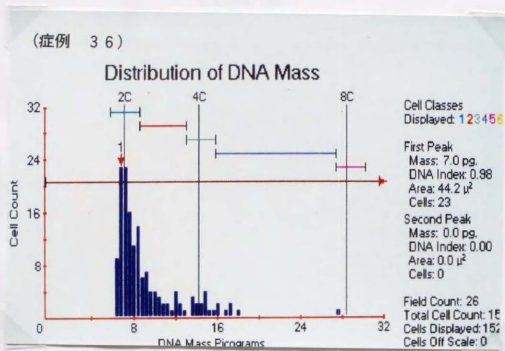


図 2 6 b. 骨肉腫、(症例36)、ヒストグラム、DI=0.98
2倍体の部位に一つのピークがみられ、diploid patternを示している。

図 2 7 . Kaplan-Meier 生存曲線 (腫瘍の大きさ)

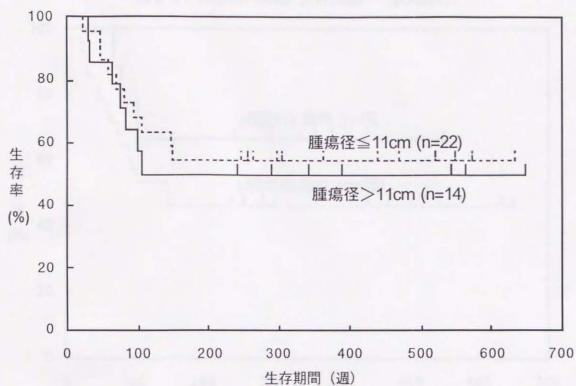


図 2 8 . Kaplan-Meier 生存曲線 (組織学的悪性度)

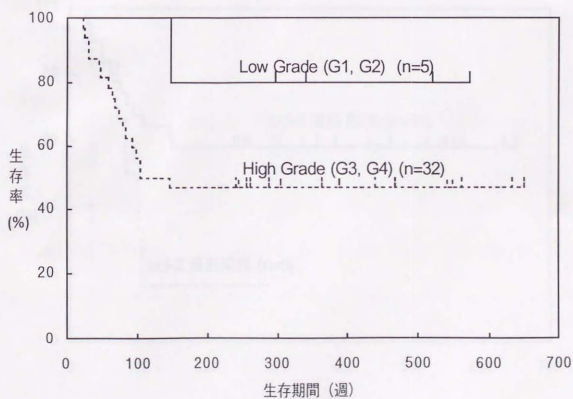


圖 2 9 . Kaplan-Meier 生存曲線 (p53蛋白)

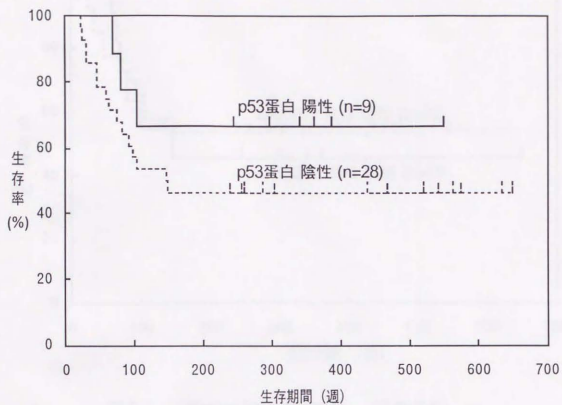


圖 3 0 . Kaplan-Meier 生存曲線 (bcl-2蛋白)

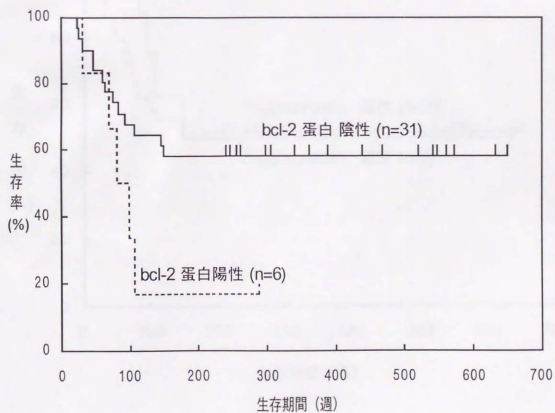


圖 3 1 . Kaplan-Meier 生存曲線 (c-erbB-2 蛋白)

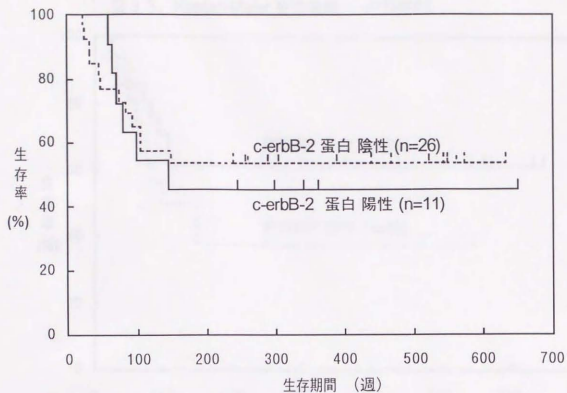


圖 3 2 . Kaplan-Meier 生存曲線 (P-糖蛋白)

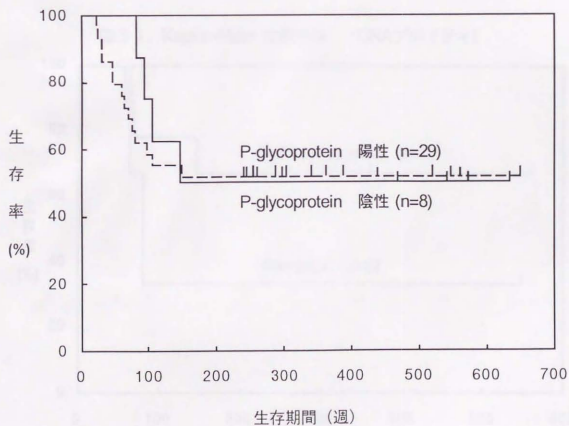


図 3 3 . Kaplan-Meier 生存曲線 (PTHRP)

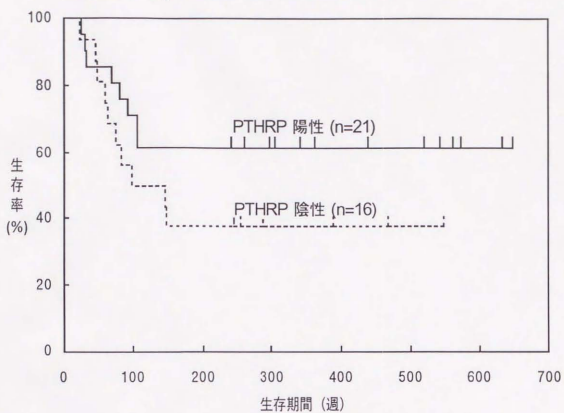


図 3 4 . Kaplan-Meier 生存曲線 (DNAプロイディ)

